

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 97149215

A61K39/395

※ 申請日期： 97.12.17

C07K16/18

※IPC 分類：C12N15/13

(2006.01)

(2006.01)

(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

雙價雙特異性抗體

BIVALENT, BISPECIFIC ANTIBODIES

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

代表人：(中文/英文)

1. 菲杜林 克勞士納

KLAUSNER, FRIDOLIN

2. 丹尼斯 史崔柏

STREBEL, DENISE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士貝士勞市格蘭山查街124號

124 GRENZACHERSTRASSE CH-4070 BASEL SWITZERLAND

國 籍：(中文/英文)

瑞士 SWITZERLAND

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 克里斯汀 克蘭
KLEIN, CHRISTIAN
2. 斯克佛 渥夫干
SCHAEFER, WOLFGANG

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY
2. 德國 GERMANY

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2007年12月21日；07024865.3

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於新穎的雙價雙特異性抗體、其製造及用途。

【先前技術】

工程蛋白，諸如能結合兩種或兩種以上抗原之雙特異性或多特異性抗體在此項技術中已知。該等多特異性結合蛋白可使用細胞融合、化學結合或重組DNA技術產生。

最近已開發出多種重組雙特異性抗體形式，例如藉由(例如)IgG抗體形式與單鏈域融合而得之四價雙特異性抗體(參見，例如 Coloma, M.J., 等人，Nature Biotech 15 (1997) 159-163；WO 2001077342；及Morrison, S.L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234)。

另外已開發出抗體核心結構(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)不再保留之其他若干新形式，諸如雙功能抗體、三功能抗體或四功能抗體、微型抗體、若干單鏈形式(scFv、Bis-scFv)，其能結合兩種或兩種以上抗原(Holliger, P. 等人，Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136；Fischer, N., Léger O., Pathobiology 74 (2007) 3-14；Shen, J. 等人，Journal of Immunological Methods 318 (2007) 65-74；Wu, C. 等人，Nature Biotech 25 (2007) 1290-1297)。

所有該等形式均使用連接子以使抗體核心(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)與另一結合蛋白(例如scFv)融合或使(例如)兩個Fab片段或scFv融合(Fischer N., Léger O.,

Pathobiology 74 (2007) 3-14)。儘管顯而易見連接子對雙特異性抗體之工程化有利，但其亦可造成治療配置中之問題。事實上，此等外來肽可能引出針對連接子本身或蛋白質與連接子之間的接合子之免疫反應。此外，此等肽之可撓性質使其更傾向於蛋白質裂解，潛在地導致抗體穩定性差、聚集及免疫原性增加。另外，吾人可能希望藉由維持與天然產生之高度相似性來保留效應功能，諸如補體依賴性細胞毒性(CDC)或抗體依賴性細胞毒性(ADCC)，其係經Fc受體結合介導。

因此，理想地，吾人應旨在開發一般結構與天然產生抗體(如IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)極為相似、與人類序列具最小偏差之雙特異性抗體。

在一種方法中，與天然抗體極為相似之雙特異性抗體係使用四源雜交瘤技術(參見Milstein, C.及A.C. Cuello, Nature, 305 (1983) 537-40)基於兩種表現具有雙特異性抗體之所要特異性之鼠類單株抗體的不同融合瘤細胞株的體細胞融合而產生。由於所得雜交融合瘤(或四源雜交瘤)內兩條不同抗體重鏈及輕鏈之隨機配對，因此產生多達十種不同抗體種類，其中僅一種為所要的功能性雙特異性抗體。由於存在錯配副產物且產量顯著降低，意謂需要複雜的純化程序(參見，例如Morrison, S.L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234)。一般而言，若使用重組表現技術，則錯配副產物之相同問題仍存在。

一種避免錯配副產物問題之方法(其稱為"杵入白(knobs-

into-holes)")旨在藉由將突變引入CH3域中以改變接觸界面來促使兩條不同抗體重鏈配對。在一條鏈上，龐大胺基酸經具有短側鏈之胺基酸置換以產生"白"。相反地，具有大側鏈之胺基酸被引入另一CH3域中以產生"杵"。藉由共同表現此兩條重鏈(及兩條相同輕鏈，其須適於兩條重鏈)，觀測到異源二聚體形成("杵-白")對比同源二聚體形成("白-白"或"杵-杵")之高產量(Ridgway, J.B., Presta LG, Carter P; 及 WO 1996027011)。異源二聚體之百分率可藉由使用噬菌體呈現法重塑兩個CH3域之相互作用表面及引入雙硫橋以穩定該等異源二聚體來進一步增加(Merchant, A.M.等人, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., Ridgway, J.B., Wells, J.A., Carter, P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35)。杵入白技術之新方法描述於(例如)EP 1870459A1中。儘管此形式似乎極具吸引力，但當前尚無描述朝臨床進展之資料。此策略之一重大限制在於兩種親本抗體之輕鏈須相同以防止錯配及形成非活性分子。因此，此技術並不適於自針對第一抗原及第二抗原之兩種抗體起始容易地開發針對兩種抗原之重組雙價雙特異性抗體，此係由於此等抗體之重鏈及/或相同輕鏈須最優化。

Simon T.等人, EMBO Journal, 9 (1990) 1051-1056係關於單特異性抗體之域突變。

【發明內容】

本發明係關於一種雙價雙特異性抗體，其包含：

a)與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈；及

b)與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈，其中恆定域CL及CH1經彼此置換。

本發明之另一實施例為一種製備本發明之雙價雙特異性抗體之方法，

其包含以下步驟：

a)用以下載體使宿主細胞轉化：

- 包含編碼與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈的核酸分子的載體，
- 包含編碼與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈的核酸分子的載體，其中恆定域CL及CH1經彼此置換；

b)在允許該抗體分子合成之條件下培養該宿主細胞；及

c)自該培養物回收該抗體分子。

本發明之另一實施例為一種宿主細胞，其包含：

- 包含編碼與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈的核酸分子的載體，
- 包含編碼與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈的核酸分子的載體，其中恆定域CL及CH1經彼此置換。

本發明之另一實施例為一種包含本發明之抗體之組合物，較佳醫藥組合物或診斷組合物。

本發明之另一實施例為一種包含本發明之抗體及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥組合物。

本發明之另一實施例為一種治療需要治療之患者之方法，其特徵在於將治療有效量之本發明之抗體投與該患

者。

【實施方式】

本發明係關於一種雙價雙特異性抗體，其包含：

- a) 與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈；及
- b) 與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈，其中恆定域CL及CH1經彼此置換。

因此，該雙價雙特異性抗體包含：

- a) 與第一抗原特異性結合之抗體之第一輕鏈及第一重鏈；及
- b) 與第二抗原特異性結合之抗體之第二輕鏈及第二重鏈，其中第二輕鏈及第二重鏈之恆定域CL及CH1經彼此置換。

因此，對於該與第二抗原特異性結合之抗體而言，以下情況適用：

在輕鏈內

恆定輕鏈域CL經該抗體之恆定重鏈域CH1置換；

且在重鏈內

恆定重鏈域CH1經該抗體之恆定輕鏈域CL置換。

如本文所用之術語"抗體"係指完整單株抗體。該等完整抗體由兩對"輕鏈"(LC)與"重鏈"(HC)組成(該等輕鏈(LC)/重鏈對在本文中縮寫為LC/HC)。該等抗體之輕鏈及重鏈為由若干域組成之多肽。在完整抗體中，各重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為HCVR或VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含重鏈恆定域CH1、CH2及CH3(抗體類別IgA、IgD及

IgG)及視情況之重鏈恆定域CH4(抗體類別IgE及IgM)。各輕鏈包含輕鏈可變域VL及輕鏈恆定域CL。一種天然產生完整抗體IgG抗體之結構展示於(例如)圖1中。可變域VH及VL可進一步細分成高變區(稱為互補判定區(CDR))，間隔有較為保守之區(稱為構架區(FR))。各VH及VL包含以下列次序自胺基末端至羧基末端排列的三個CDR及四個FR：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(Janeway C.A., Jr, 等人(2001). Immunobiology. , 第5版, Garland Publishing; 及 Woof J., Burton, D., Nat Rev Immunol 4 (2004) 89-99)。兩對重鏈與輕鏈(HC/LC)能夠與同一抗原特異性結合。因此，該完整抗體為雙價單特異性抗體。該等"抗體"包括(例如)小鼠抗體、人類抗體、嵌合抗體、人類化抗體及基因工程化抗體(變異抗體或突變抗體)，只要保留其特徵性特性即可。尤其較佳者為人類抗體或人類化抗體，尤其如重組人類抗體或重組人類化抗體。

存在由以下希臘字母表示之五種類型之哺乳動物抗體重鏈： α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ (Janeway, C.A., Jr, 等人(2001). Immunobiology. , 第5版, Garland Publishing)。所存在之重鏈類型界定抗體類別：此等鏈分別見於IgA、IgD、IgE、IgG及IgM抗體中(Rhoades RA, Pflanzner RG (2002). Human Physiology, 第4版, Thomson Learning)。不同重鏈在尺寸及組成方面不同； α 及 γ 含有約450個胺基酸，而 μ 及 ϵ 具有約550個胺基酸。

各重鏈具有兩個區，恆定區及可變區。恆定區在相同同

型之所有抗體中皆相同，但在不同同型之抗體中不同。重鏈 γ 、 α 及 δ 具有包含三個恆定域CH1、CH2及CH3(成一直線)之恆定區及用於增加可撓性之鉸鏈區(Woof J., Burton, D., Nat Rev Immunol 4 (2004) 89-99)；重鏈 μ 及 ϵ 具有包含四個恆定域CH1、CH2、CH3及CH4之恆定區(Janeway, C.A., Jr, 等人(2001). Immunobiology. , 第5版, Garland Publishing)。重鏈之可變區在由不同B細胞產生之抗體中不同，但對於由單一B細胞或B細胞純系產生之所有抗體皆相同。各重鏈之可變區的長度為約110個胺基酸且包含單一抗體域。

在哺乳動物中，僅存在兩種類型之輕鏈，其稱為 λ 及 κ 。輕鏈具有兩個連續域：一個恆定域CL及一個可變域VL。輕鏈之近似長度為211至217個胺基酸。輕鏈較佳為 κ 輕鏈，且恆定域CL較佳為 $C\kappa$ 。

如本文所用之術語"單株抗體"或"單株抗體組合物"係指單一胺基酸組成之抗體分子之製劑。

本發明之"抗體"可為任何類別(例如IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，較佳為IgG或IgE)或亞類(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2，較佳為IgG1)，因此，產生本發明之雙價雙特異性抗體的兩種抗體具有相同亞類(例如IgG1、IgG4及類似者，較佳為IgG1)之Fc部分，較佳相同異型(例如高加索人)之Fc部分。

"抗體之Fc部分"為熟習此項技術者所熟知之術語且基於抗體之木瓜蛋白酶裂解來定義。本發明之抗體含有(作為Fc部分)較佳來源於人類源之Fc部分及較佳人類恆定區之

所有其他部分。抗體之Fc部分直接涉及於補體活化、C1q結合、C3活化及Fc受體結合中。儘管抗體對補體系統之影響視某些條件而定，但與C1q結合係由Fc部分中之規定結合位點引起。該等結合位點在現有技術中已知且(例如)由Lukas, T.J.等人, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R.及Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R.等人, Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E.等人, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E.等人, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M.等人, J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A.等人, Immunology 86 (1995) 319-324; 及EP 0 307 434描述。該等結合位點為(例如)L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及P329(根據Kabat之EU索引編號, 見下文)。亞類IgG1、IgG2及IgG3之抗體通常顯示補體活化、C1q結合及C3活化, 而IgG4並不活化補體系統, 不結合C1q且不活化C3。較佳地, Fc部分為人類Fc部分。

術語"嵌合抗體"係指通常藉由重組DNA技術製備之包含來自一種來源或物種之可變區(亦即, 結合區)及至少一部分來源於不同來源或物種之恆定區的抗體。包含鼠類可變區及人類恆定區之嵌合抗體為較佳的。本發明所涵蓋之其他較佳形式之"嵌合抗體"為恆定區與原始抗體之彼恆定區相比已加以修飾或改變以產生本發明之特性、尤其關於C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合之特性。該等嵌合抗體亦

稱作"類別轉換抗體"。嵌合抗體為包含編碼免疫球蛋白可變區之DNA區段及編碼免疫球蛋白恆定區之DNA區段的經表現免疫球蛋白基因之產物。產生嵌合抗體之方法涉及此項技術中所熟知之習知重組DNA技術及基因轉染技術。參見，例如Morrison, S.L.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855；US 5,202,238及US 5,204,244。

術語"人類化抗體"係指構架或"互補判定區"(CDR)已經修飾成包含與親本免疫球蛋白之特異性相比具不同特異性之免疫球蛋白之CDR的抗體。在一較佳實施例中，將鼠類CDR移植至人類抗體之構架區中以製備"人類化抗體"。參見，例如Riechmann, L.等人，Nature 332 (1988) 323-327；及Neuberger, M.S.等人，Nature 314 (1985) 268-270。尤其較佳之CDR對應於表示識別上文對於嵌合抗體所述之抗原之序列的彼等CDR。本發明所涵蓋之其他形式之"人類化抗體"為恆定區與原始抗體之彼恆定區相比已另外加以修飾或改變以產生本發明之特性、尤其關於C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合之特性。

如本文所用之術語"人類抗體"意欲包括具有來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區之抗體。人類抗體在現有技術中已為熟知的(van Dijk, M.A.及van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374)。人類抗體亦可在能夠於免疫後在無內源性免疫球蛋白產生之情況下產生完整譜系或選定譜系範圍之人類抗體的轉殖基因動物(例如小鼠)中產生。人類生殖系免疫球蛋白基因

陣列在該生殖系突變小鼠中之轉移將引起抗原挑釁後產生人類抗體(參見, 例如 Jakobovits, A. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A. 等人, Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M. 等人, Year Immunol. 7 (1993) 33-40)。人類抗體亦可在噬菌體呈現庫中產生(Hoogenboom, H.R.及 Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D. 等人, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597)。Cole 等人及 Boerner 等人之技術亦可用於製備人類單株抗體(Cole 等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 第 77 頁(1985); 及 Boerner, P. 等人, J. Immunol. 147 (1991) 86-95)。如對於本發明之嵌合抗體及人類化抗體已提及, 如本文所用之術語"人類抗體"亦包含在恆定區中(例如)藉由"類別轉換", 亦即 Fc 部分之變化或突變(例如自 IgG1 至 IgG4 及/或 IgG1/IgG4 突變)而加以修飾以產生本發明之特性、尤其關於 C1q 結合及/或 FcR 結合之特性的該等抗體。

如本文所用之術語"重組人類抗體"意欲包括由重組方式製備、表現、產生或分離之所有人類抗體, 諸如, 自諸如 NS0 或 CHO 細胞之宿主細胞或自轉殖有人類免疫球蛋白基因之動物(例如小鼠)分離之抗體或使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體所表現之抗體。該等重組人類抗體具有呈重排形式之可變區及恆定區。本發明之重組人類抗體已經歷活體內體細胞超突變。因此, 重組抗體之 VH 區及 VL 區之胺基酸序列為儘管來源於且涉及人類生殖系 VH 序列及

VL序列，但可能不天然存在於活體內人類抗體生殖系譜內之序列。

如本文所用之"可變域"(輕鏈之可變域(VL)、重鏈之可變區(VH))表示直接涉及於抗體與抗原結合中之輕鏈與重鏈對中之每一者。可變人類輕鏈及重鏈之域具有相同的一般結構且各域包含由三個"高變區"(或互補判定區，CDR)連接，序列廣泛保守的四個構架(FR)區。構架區採用 β 摺疊構形且CDR可形成連接 β 摺疊結構之環。各鏈中之CDR由構架區保持呈其三維結構且與來自另一鏈之CDR一起形成抗原結合位點。抗體重鏈及輕鏈CDR3區在本發明之抗體之結合特異性/親和力中起尤其重要之作用且由此提供本發明之另一目的。

術語"高變區"或"抗體之抗原結合部分"當於本文中使用时係指抗體中負責抗原結合之胺基酸殘基。高變區包含來自"互補判定區"或"CDR"之胺基酸殘基。"構架"或"FR"區為不同於如本文所定義之高變區殘基之彼等可變域區。因此，抗體之輕鏈及重鏈自N末端至C末端包含域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。各鏈上之CDR係由該等構架胺基酸分隔。尤其，重鏈之CDR3為對抗原結合起最大作用之區。CDR及FR區係根據Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)之標準定義來確定。

重鏈之"恆定域"及輕鏈之"恆定域"並不直接涉及於抗體

與抗原之結合中，但展現各種效應功能。視其重鏈之恆定區之胺基酸序列而定，抗體或免疫球蛋白分成以下類別：

如本文所用之術語"雙價雙特異性抗體"係指如上文所述之抗體，其中兩對重鏈與輕鏈(HC/LC)中之每一者與不同抗原特異性結合，亦即，第一重鏈及第一輕鏈(起源於針對第一抗原之抗體)一起與第一抗原特異性結合，且第二重鏈及第二輕鏈(起源於針對第二抗原之抗體)一起與第二抗原特異性結合(如圖2所描繪)；該等雙價雙特異性抗體能夠同時與兩種不同抗原特異性結合而不與兩種以上抗原結合，此一方面與僅能與一種抗原結合之單特異性抗體，且另一方面與(例如)可同時與四種抗原分子結合之四價四特異性抗體形成對比。

根據本發明，所要雙價雙特異性抗體與不當副產物相比之比率可藉由僅置換一對重鏈與輕鏈(HC/LC)中之某些域而改良。兩個HC/LC對中之第一對起源於與第一抗原特異性結合之抗體且保持基本上不變，而兩個HC/LC對中之第二對起源於與第二抗原特異性結合之抗體且藉由以下置換而改變：

- 輕鏈：該與第二抗原特異性結合之抗體之恆定輕鏈域CL經恆定重鏈域CH1置換，及
- 重鏈：該與第二抗原特異性結合之抗體之恆定重鏈域CH1經恆定輕鏈域CL置換。

因此，所得雙價雙特異性抗體為人工抗體，其包含：

- a) 與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈；及

b) 與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈，

其中該輕鏈(與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈)含有恆定域CH1而非CL，

其中該重鏈(與第二抗原特異性結合之抗體之重鏈)含有恆定域CL而非CH1。

在本發明之另一態樣中，所要雙價雙特異性抗體與不當副產物相比之該改良比率可由以下兩種替代方法中之一者來進一步改良：

A) 第一替代方法(參見圖3)：

本發明之該雙價雙特異性抗體之CH3域可藉由"杵入白"技術改變，該技術以若干實例詳細描述於(例如)WO 96/027011, Ridgway, J.B.等人，Protein Eng 9 (1996) 617-621；及 Merchant, A.M.等人，Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681中。在此方法中，兩個CH3域之相互作用表面經改變以增加含有此兩個CH3域之兩條重鏈的異源二聚。兩個CH3域(或兩條重鏈之兩個CH3域)中之每一者可為"杵"，而另一者為"白"。雙硫橋之引入穩定異源二聚體(Merchant, A.M.等人，Nature Biotech 16 (1998) 677-681；Atwell, S., Ridgway, J.B., Wells, J.A., Carter, P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35)且增加產量。

因此，在較佳實施例中，第一CH3域及第二CH3域各自在包含抗體CH3域之間的原始界面之界面處會合的雙價雙特異性抗體之CH3域係藉由"杵入白"技術改變，該技術包括藉由將雙硫橋引入CH3域中而進一步穩定(描述於WO

96/027011, Ridgway, J.B.等人, Protein Eng 9 (1996) 617-621; Merchant, A.M.等人, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; 及 Atwell, S., Ridgway, J.B., Wells, J.A., Carter P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35中)以促進雙價雙特異性抗體形成。

因此, 在本發明之一態樣中, 該雙價雙特異性抗體之特徵在於:

一條重鏈之CH3域及另一條重鏈之CH3域各自在包含抗體CH3域之間的原始界面之界面處會合;

其中該界面經改變以促進雙價雙特異性抗體形成, 其中該改變之特徵在於:

a) 一條重鏈之CH3域經改變,

使得在雙價雙特異性抗體內會合另一條重鏈之CH3域之原始界面的一條重鏈之CH3域之原始界面內, 胺基酸殘基經具有較大側鏈體積之胺基酸殘基置換, 進而在一條重鏈之CH3域之界面內產生隆凸, 該隆凸可定位於另一條重鏈之CH3域之界面內的空腔中;

及

b) 另一條重鏈之CH3域經改變,

使得在雙價雙特異性抗體內會合第一CH3域之原始界面的第二CH3域之原始界面內, 胺基酸殘基經具有較小側鏈體積之胺基酸殘基置換, 進而在第二CH3域之界面內產生空腔, 第一CH3域之界面內之隆凸可定位於該空腔內。

較佳地, 該具有較大側鏈體積之胺基酸殘基係選自由精胺酸(R)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)組成之

群。

較佳地，該具有較小側鏈體積之胺基酸殘基係選自由丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)、纈胺酸(V)組成之群。

在本發明之一態樣中，兩個CH3域進一步藉由在各CH3域之相應位置中引入半胱胺酸(C)作為胺基酸來改變以使得兩個CH3域之間可形成雙硫橋。

在本發明之另一較佳實施例中，(例如)EP 1870459A1中所述，藉由使用殘基R409D、K370E(K409D)(對於杵殘基)及D399K、E357K(對於白殘基)來改變兩個CH3域。

或

B) 第二替代方法(參見圖4)：

藉由一個恆定重鏈域CH3經恆定重鏈域CH1置換，且另一個恆定重鏈域CH3經恆定輕鏈域CL置換。置換重鏈域CH3之恆定重鏈域CH1可為任何Ig類別(例如IgA、IgD、IgE、IgG及IgM)或亞類(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)。

置換重鏈域CH3之恆定輕鏈域CL可為 λ 型或 κ 型，較佳為 κ 型。

因此，本發明之一較佳實施例為一種雙價雙特異性抗體，其包含：

- a) 與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈；及
- b) 與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈，其中恆定域CL及CH1經彼此置換；

且其中，視情況

c) 一條重鏈之CH3域及另一條重鏈之CH3域各自在包含抗體CH3域之間的原始界面之界面處會合；

其中該界面經改變以促進該雙價雙特異性抗體形成，其中該改變之特徵在於：

ca) 一條重鏈之CH3域經改變，

使得在雙價雙特異性抗體內會合另一條重鏈CH3域之原始界面的一條重鏈CH3域之原始界面內，一個胺基酸殘基經一個具有較大側鏈體積之胺基酸殘基置換，進而在一條重鏈之CH3域之界面內產生一個隆凸，該隆凸可位於另一條重鏈之CH3域之界面內的一個空腔中；

及

cb) 另一條重鏈之CH3域經改變，

使得在雙價雙特異性抗體內會合第一CH3域之原始界面的第二CH3域之原始界面內，一個胺基酸殘基經一個具有較小側鏈體積之胺基酸殘基置換，進而在第二CH3域之界面內產生一個空腔，第一CH3域之界面內之一個隆凸可位於該空腔內；

或 d)

一個恆定重鏈域CH3經一個恆定重鏈域CH1置換，另一個恆定重鏈域CH3經一個恆定輕鏈域CL置換。

本文所用之術語"抗原"或"抗原分子"可互換使用且係指抗體可特異性結合之所有分子。雙價雙特異性抗體與第一抗原及第二不同抗原特異性結合。本文所用之術語"抗原"

包括例如蛋白質、蛋白質上之不同抗原決定基(如本發明含義內之不同抗原)及多醣。此主要包括細菌、病毒及其他微生物之部分(外鞘(coats)、莢膜(capsules)、細胞壁、鞭毛、纖毛(fimbriae)及毒素)。脂質及核酸僅在與蛋白質及多醣組合時方具抗原性。非微生物外源性(非自身)抗原可包括花粉、卵白、及來自移植組織及器官或在輸入血細胞表面上之蛋白質。較佳地，抗原係選自由細胞激素、細胞表面蛋白、酶及受體細胞激素、細胞表面蛋白、酶及受體組成之群。

腫瘤抗原為由腫瘤細胞表面上之MHC I或MHC II分子呈現之彼等抗原。此等抗原有時可由腫瘤細胞呈現且從不由正常細胞呈現。在此狀況下，其稱為腫瘤特異性抗原(TSA)且通常由腫瘤特異性突變而產生。更常見者為由腫瘤細胞及正常細胞呈現之抗原，且其稱為腫瘤相關抗原(TAA)。識別此等抗原之細胞毒性T淋巴細胞可能會在腫瘤細胞增殖或轉移之前將其殺死。腫瘤抗原亦可以(例如)突變受體之形式處於腫瘤表面上，在此狀況下該等腫瘤抗原將由B細胞識別。

在一較佳實施例中，雙價雙特異性抗體特異性結合之兩種不同抗原(第一抗原及第二抗原)中之至少一者為腫瘤抗原。

在另一較佳實施例中，雙價雙特異性抗體特異性結合之兩種不同抗原(第一抗原及第二抗原)中之兩者均為腫瘤抗原；在此狀況下，第一抗原及第二抗原亦可為同一腫瘤特

異性蛋白上之兩種不同抗原決定基。

在另一較佳實施例中，雙價雙特異性抗體特異性結合之兩種不同抗原(第一抗原及第二抗原)中之一者為腫瘤抗原且另一者為效應細胞抗原，例如T細胞受體、CD3、CD16及類似者。

在另一較佳實施例中，雙價雙特異性抗體特異性結合之兩種不同抗原(第一抗原及第二抗原)中之一者為腫瘤抗原且另一者為抗癌物質，諸如毒素或激酶抑制劑。

如本文所用之"特異性結合"或"與...特異性結合"係指特異性結合抗原之抗體。較佳地，抗體特異性結合此抗原之結合親和力具有 10^{-9} mol/l 或 10^{-9} mol/l 以下(例如 10^{-10} mol/l)之KD值，較佳具有 10^{-10} mol/l 或 10^{-10} mol/l 以下(例如 10^{-12} mol/l)之KD值。結合親和力係以標準結合檢定，諸如表面電漿共振技術(Biacore®)來測定。

術語"抗原決定基"包括能與抗體特異性結合之任何多肽決定子。在某些實施例中，抗原決定基決定子包括分子之化學活性表面基團，諸如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基，且在某些實施例中，可具有特定三維結構特徵及/或特定電荷特徵。抗原決定基為抗原中由抗體結合之區。在某些實施例中，當抗體優先識別蛋白質及/或巨分子之複雜混合物中之其靶抗原時，該抗體被稱為特異性結合抗原。

本發明之另一實施例為一種製備本發明之雙價雙特異性抗體之方法，

其包含：

a) 用以下載體使宿主細胞轉化：

- 包含編碼與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈的核酸分子的載體，

- 包含編碼與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈的核酸分子的載體，其中恆定域CL及CH1經彼此置換；

b) 在允許該抗體分子合成之條件下培養該宿主細胞；及

c) 自該培養物回收該抗體分子。

一般而言，存在編碼該與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈的兩個載體及編碼該與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈的另外兩個載體。兩個載體中之一者編碼各別輕鏈且兩個載體中之另一者編碼各別重鏈。然而，在製備本發明之雙價雙特異性抗體之替代方法中，僅一個編碼與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈的第一載體及僅一個編碼與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈的第二載體可用於使宿主細胞轉化。

本發明涵蓋一種製備抗體之方法，其包含在允許該等抗體分子合成之條件下培養相應宿主細胞及自該培養物回收該等抗體，例如藉由表現以下核酸序列來達成：

- 編碼與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈的第一核酸序列；

- 編碼該與第一抗原特異性結合之抗體之重鏈的第二核酸序列；

- 編碼與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈的第三核酸序

列，其中恆定輕鏈域CL經恆定重鏈域CH1置換；及

- 編碼該與第二抗原特異性結合之抗體之重鏈的第四核酸序列，其中恆定重鏈域CH1經恆定輕鏈域CL置換。

本發明之另一實施例為一種宿主細胞，其包含：

- 包含編碼與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈的核酸分子的載體，
- 包含編碼與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈的核酸分子的載體，其中恆定域CL及CH1經彼此置換。

本發明之另一實施例為一種宿主細胞，其包含：

- a) 包含編碼與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈的核酸分子的載體及包含編碼與第一抗原特異性結合之抗體之重鏈的核酸分子的載體，
- b) 包含編碼與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈的核酸分子的載體及包含編碼與第二抗原特異性結合之抗體之重鏈的核酸分子的載體，其中恆定域CL及CH1經彼此置換。

本發明之另一實施例為一種包含本發明之雙價雙特異性抗體之組合物，較佳醫藥組合物或診斷組合物。

本發明之另一實施例為一種包含本發明之雙價雙特異性抗體及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥組合物。

本發明之另一實施例為一種治療需要治療之患者之方法，其特徵在於將治療有效量之本發明之雙價雙特異性抗體投與該患者。

如本文所用之術語"核酸或核酸分子"意欲包括DNA分子及RNA分子。核酸分子可具有單鏈或雙鏈，但較佳為雙鏈

DNA。

如本文所用之表述"細胞"、"細胞株"及"細胞培養物"可互換使用且所有該等名稱均包括子代。因此，詞"轉化體"及"經轉化細胞"包括初級個體細胞及來源於該細胞之培養物，與轉移之數目無關。亦應瞭解，所有子代由於有意或無意之突變而在DNA含量方面可能不精確一致。包括具有與在原始經轉化細胞中篩選之功能或生物活性相同之功能或生物活性的變異子代。在意欲不同名稱時，將自上下文顯而易見。

如本文所用之術語"轉化"係指載體/核酸轉移至宿主細胞中之過程。若將無強大細胞壁障壁之細胞用作宿主細胞，則轉染係(例如)藉由如Graham及Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546頁及以後內容所述之磷酸鈣沈澱法來進行。然而，亦可使用(諸如)藉由核注射或藉由原生質體融合將DNA引入細胞中之其他方法。若使用原核細胞或含有實質細胞壁構造之細胞，則(例如)一種轉染方法為如Cohen, F. N等人，*PNAS*. 69 (1972) 7110頁及以後內容所述使用氯化鈣進行鈣處理。

使用轉化來重組產生抗體在現有技術中已為熟知的且描述於(例如)Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S.等人，*Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G.等人，*Arzneimittelforschung* 48 (1998) 870-880之評論文章中以及US 6,331,415及US 4,816,567

中。

如本文所用之"表現"係指使核酸轉錄成 mRNA 之過程及/或使經轉錄 mRNA(亦稱為轉錄物)隨後轉譯成肽、多肽或蛋白質中之過程。轉錄物及經編碼多肽統稱作基因產物。若聚核苷酸來源於基因組 DNA, 則真核細胞中之表現可包括 mRNA 之拼接。

"載體"為將所插入之核酸分子轉移至宿主細胞中及/或宿主細胞之間的核酸分子、尤其自我複製型核酸分子。該術語包括主要功能在於將 DNA 或 RNA 插入細胞中(例如染色體整合)之載體、主要功能在於 DNA 或 RNA 複製之複製載體及功能在於 DNA 或 RNA 轉錄及/或轉譯之表現載體。亦包括提供一種以上所述功能之載體。

"表現載體"為當引入適當宿主細胞中時可轉錄及轉譯成多肽之聚核苷酸。"表現系統"通常係指包含可起作用以得到所要表現產物之表現載體的合適宿主細胞。

本發明之雙價雙特異性抗體較佳係由重組方式產生。該等方法在現有技術中廣泛已知且包含在原核細胞及真核細胞中進行蛋白質表現, 隨後分離抗體多肽且通常純化至醫藥學上可接受之純度。對於蛋白質表現而言, 編碼輕鏈及重鏈或其片段之核酸係藉由標準方法插入表現載體中。在如 CHO 細胞、NS0 細胞、SP2/0 細胞、HEK293 細胞、COS 細胞、酵母或大腸桿菌(*E. coli*)細胞之適當原核或真核宿主細胞中進行表現, 且自該等細胞(上清液或溶解後之細胞)回收抗體。雙價雙特異性抗體可存在於完整細胞中、

細胞溶解產物中或以部分純化之形式或大體上純之形式存在。藉由包括鹼/SDS處理、管柱層析及此項技術中所熟知之其他技術的標準技術進行純化以去除其他細胞組份或其他污染物，例如其他細胞核酸或蛋白質。參見Ausubel, F.等人編，Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

在NS0細胞中之表現係由(例如)Barnes, L.M.等人，Cytotechnology 32 (2000) 109-123；及Barnes, L.M.等人，Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270描述。瞬間表現係由(例如)Durocher, Y.等人，Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9描述。可變域之選殖係由Orlandi, R.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837；Carter, P.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289；及Norderhaug, L.等人，J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87描述。較佳瞬間表現系統(HEK 293)係由Schlaeger, E.-J.及Christensen, K., Cytotechnology 30 (1999) 71-83且由Schlaeger, E.-J., J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199描述。

舉例而言，適合於原核生物之控制序列包括啟動子、視情況之操縱序列及核糖體結合位點。已知真核細胞利用啟動子、強化子及聚腺苷酸化信號。

當使核酸與另一核酸序列成功能關係時，其係"以可操作方式連接"。舉例而言，若前序列或分泌性前導子之DNA表現為參與多肽分泌之前蛋白，則其係以可操作方式連接至該多肽之DNA；若啟動子或強化子影響編碼序列轉

錄，則其係以可操作方式連接至該序列；或若核糖體結合位點經定位以有利於轉錄，則其係以可操作方式連接至編碼序列。一般而言，"以可操作方式連接"意謂經連接之DNA序列為相連的，且在分泌性前導子之狀況下為相連的且為同閱讀框的。然而，強化子無須為相連的。連接係藉由在便利的限制性位點處接合而實現。若該等位點不存在，則根據習知規範使用合成寡核苷酸接附子或連接子。

雙價雙特異性抗體適宜藉由習知免疫球蛋白純化程序自培養基分離，該等程序諸如蛋白質A瓊脂糖、羥磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和層析。編碼單株抗體之DNA及RNA易於使用習知程序分離及定序。融合瘤細胞可充當該DNA及RNA之來源。一旦分離，即可將DNA插入表現載體中，接著使該等表現載體轉染至不會以其他方式產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如HEK 293細胞、CHO細胞或骨髓瘤細胞)中，以獲得在宿主細胞中重組單株抗體之合成。

雙價雙特異性抗體之胺基酸序列變異體(或突變體)係藉由將適當核苷酸變化引入抗體DNA中或藉由核苷酸合成來製備。然而，該等修飾可僅在(例如)如上文所述之極有限範圍中進行。舉例而言，修飾不改變上文所提及之抗體特徵(諸如IgG同型及抗原結合)，但可改良重組產生之產量、蛋白質穩定性或有利於純化。

提供以下實例、序列表及圖式以幫助理解本發明，本發明之真實範疇陳述於隨附申請專利範圍中。當然，可在不脫離本發明之精神下對所述程序作出修改。

序列表

- SEQ ID NO: 1 野生型<IGF-1R>抗體重鏈之胺基酸序列
- SEQ ID NO: 2 野生型<IGF-1R>抗體輕鏈之胺基酸序列
- SEQ ID NO: 3 <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體之重鏈
 (HC)之胺基酸序列，其中重鏈域
 CH1經輕鏈域CL置換
- SEQ ID NO: 4 <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體之輕鏈
 (LC)之胺基酸序列，其中輕鏈域CL
 經重鏈域CH1置換
- SEQ ID NO: 5 IGF-1R胞外域His-抗生蛋白鏈菌素結合
 肽-標籤(IGF-1R-His-SBP ECD)之胺基酸
 序列
- SEQ ID NO: 6 野生型ANGPT2 <ANGPT2>抗體重鏈之
 胺基酸序列
- SEQ ID NO: 7 野生型ANGPT2 <ANGPT2>抗體輕鏈之
 胺基酸序列
- SEQ ID NO: 8 用於杵入白技術之具有 T366W 交換之
 CH3域(杵)的胺基酸序列
- SEQ ID NO: 9 用於杵入白技術之具有 T366S、L368A、
 Y407V 交換之 CH3域(白)的胺基酸序列
- SEQ ID NO: 10 IGF-1R胞外域His-抗生蛋白鏈菌素結合
 肽-標籤(IGF-1R-His-SBP ECD)之胺基酸
 序列

實例

關於人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈之核苷酸序列之一般資訊在Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中給出。抗體鏈之胺基酸係根據EU編號來編號及命名(Edelman, G.M.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。

重組DNA技術

如 Sambrook, J. 等人, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所述, 使用標準方法來操縱DNA。根據製造商之說明書使用分子生物試劑。

基因合成

所要基因區段係自藉由化學合成製得之寡核苷酸製備。側接有獨特限制性核酸內切酶裂解位點之600-1800 bp長基因區段係藉由寡核苷酸之黏接及接合(包括PCR擴增)來裝配且隨後經由指定限制性位點(例如KpnI/SacI或AscI/PacI)選殖至基於pPCRScrip(Stratagene)之pGA4選殖載體中。經次選殖之基因片段之DNA序列係藉由DNA定序來確證。基因合成片段係根據Geneart(Regensburg, Germany)之給定規格定製。

DNA序列測定

DNA 序列係藉由 MediGenomix GmbH(Martinsried, Germany)或 Sequiserve GmbH(Vaterstetten, Germany)所進行之雙鏈定序來測定。

DNA及蛋白質序列分析及序列資料管理

使用 GCG(Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin)之套裝軟體 10.2 版及 Infomax 之 Vector NT1 Advance 組套 8.0 版來進行序列生成、定位、分析、註解及說明。

表現載體

對用於瞬間表現(例如在 HEK293 EBNA 或 HEK293-F 中)之表現質體之所述抗體變異體的表現，應用基於具有 CMV-內含子 A 啟動子之 cDNA 組織或基於具有 CMV 啟動子之基因組組織的細胞。

除抗體表現卡匣以外，載體亦含有：

- 允許此質體在大腸桿菌中複製之複製起點，及
- 在大腸桿菌中賦予安比西林(ampicillin)抗性之 β -內醯胺酶基因。

抗體基因之轉錄單元包含以下元件：

- 5'末端之獨特限制性位點，
- 來自人類細胞巨大病毒之即刻早期強化子及啟動子，
- 在 cDNA 組織之狀況下接著為內含子 A 序列，
- 人類抗體基因之 5'末轉譯區，
- 免疫球蛋白重鏈信號序列，
- 具有免疫球蛋白外顯子-內含子組織之 cDNA 組織形式或具有免疫球蛋白外顯子-內含子組織之基因組組織形式的

- 人類抗體鏈(野生型或具有域交換)，
- 具有聚腺苷酸化信號序列之3'末轉譯區，及
- 3'末端之獨特限制性位點。

如下文所述之包含所述抗體鏈之融合基因係藉由PCR及/或基因合成產生且以已知重組方法及技術藉由(例如)使用各別載體中之獨特限制性位點連接相應核酸區段來裝配。經次選殖之核酸序列係藉由DNA定序來驗證。對於瞬間轉染，藉由自經轉化之大腸桿菌培養物(Nucleobond AX, Macherey-Nagel)進行質體製備來製備較大量之質體。

細胞培養技術

如 Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J.及 Yamada, K.M.(編)，John Wiley & Sons, Inc.中所述使用標準細胞培養技術。

雙特異性抗體係藉由如下文所述在附著性生長HEK293-EBNA中或在懸浮生長之HEK29-F細胞中瞬間共同轉染各別表現質體來表現。

在HEK293-EBNA系統中瞬間轉染

雙特異性抗體係藉由在培養於補充有10%超低IgG FCS(胎牛血清，Gibco)、2 mM L-麩胺鹽胺(Gibco)及250 µg/ml遺傳黴素(Gibco)之DMEM(達爾伯克改良伊格爾培養基(Dulbecco's modified Eagle's medium)，Gibco)中之附著性生長HEK293-EBNA細胞(表現艾伯斯坦-巴爾病毒(Epstein-Barr-Virus)核抗原之人類胚腎細胞株293；美國菌

種保存中心(American type culture collection)寄存編號 ATCC CRL-10852號，批號959 218)中瞬間共同轉染各別表現質體(例如編碼重鏈及經修飾重鏈，以及相應輕鏈及經修飾輕鏈)來表現。對於轉染，以4:1(3:1至6:1範圍內)之FuGENE™試劑(μ l)與DNA(μ g)比率使用FuGENE™ 6轉染試劑(Roche Molecular Biochemicals)。分別使用1:1(等莫耳)(1:2至2:1範圍內)之(經修飾及野生型)輕鏈編碼質體與(經修飾及野生型)重鏈編碼質體之莫耳比自各別質體表現蛋白質。第3天用L-麩胺鹽胺(至4 mM)、葡萄糖[Sigma]及NAA [Gibco]餵養細胞。轉染後第5天至第11天藉由離心收集含有雙特異性抗體之細胞培養物上清液且將其儲存於-20℃下。關於人類免疫球蛋白在(例如)HEK293細胞中之重組表現的一般資訊在Meissner, P.等人，Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203中給出。

在HEK293-F系統中瞬間轉染

雙特異性抗體係藉由根據製造商之說明書使用HEK293-F系統(Invitrogen)瞬間轉染各別質體(例如編碼重鏈之質體及編碼經修飾重鏈之質體，以及編碼相應輕鏈之質體及編碼經修飾輕鏈之質體)而產生。簡言之，用四種表現質體及293fectin或fectin(Invitrogen)之混合物轉染在搖瓶中或攪拌式發酵槽中於無血清FreeStyle 293表現培養基(Invitrogen)中懸浮生長之HEK293-F細胞(Invitrogen)。對於2 L搖瓶(Corning)而言，使HEK293-F細胞於600 mL中以 1.0×10^6 個細胞/毫升之密度接種且在120 rpm、8% CO₂下培

育。第二天，用由A)20 mL Opti-MEM(Invitrogen)以及600 μ g以等莫耳比編碼重鏈或經修飾重鏈(分別)及相應輕鏈之總質體DNA(1 μ g/mL)及B)20 mL Opti-MEM+1.2 mL 293 fectin或fectin(2 μ l/mL)構成之約42 mL混合物以約 1.5×10^6 個細胞/毫升之細胞密度轉染細胞。根據葡萄糖消耗，在發酵過程中添加葡萄糖溶液。5-10天後收集含有所分泌抗體之上清液且直接自上清液純化抗體或將上清液冷凍且儲存。

蛋白質測定

經純化抗體及衍生物之蛋白質濃度係藉由測定280 nm下之光學密度(OD)，使用基於Pace等人，Protein Science, 1995, 4, 2411-1423之胺基酸序列所計算之莫耳消光係數來測定。

上清液中抗體濃度之測定

細胞培養物上清液中抗體及衍生物之濃度係藉由蛋白質A瓊脂糖珠粒(Roche)進行免疫沈澱來估測。60 μ L蛋白質A瓊脂糖珠粒在TBS-NP40(50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40)中洗滌三次。隨後，將1-15 mL細胞培養物上清液施加於在TBS-NP40中預平衡之蛋白質A瓊脂糖珠粒。在室溫培育1小時後，珠粒在Ultrafree-MC過濾柱(Amicon)上用0.5 mL TBS-NP40洗滌一次，用0.5 mL 2 $\times$ 磷酸鹽緩衝鹽水(2 $\times$ PBS, Roche)洗滌兩次，且用0.5 mL 100 mM檸檬酸鈉(pH 5.0)簡單洗滌四次。藉由添加35 μ l NuPAGE® LDS樣本緩衝液(Invitrogen)溶離結合之抗體。

一半樣本分別與NuPAGE®樣本還原劑組合或保持未還原，且在70℃加熱10分鐘。隨後，將5-30 µl施加於4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE(Invitrogen)(對於非還原之SDS-PAGE用MOPS緩衝液，對於還原之SDS-PAGE用含有NuPAGE®抗氧化劑電泳緩衝液(running buffer)添加劑(Invitrogen)之MES緩衝液)且用庫馬斯藍(Coomassie Blue)染色。

細胞培養物上清液中抗體及衍生物之濃度係藉由親和HPLC層析定量測量。簡言之，將含有與蛋白質A結合之抗體及衍生物之細胞培養物上清液施加於Agilent HPLC 1100系統上於200 mM KH₂PO₄、100 mM檸檬酸鈉(pH 7.4)中之Applied Biosystems Poros A/20管柱，且用200 mM NaCl、100 mM檸檬酸(pH 2.5)自基質溶離。藉由UV吸光度及峰面積積分定量所溶離之蛋白質。經純化之標準IgG1抗體用作標準物。

或者，細胞培養物上清液中抗體及衍生物之濃度係藉由三明治-IgG-ELISA測量。簡言之，StreptaWell High Bind 抗生蛋白鏈菌素A-96孔微量滴定盤(Roche)用100微升/孔0.1 µg/mL結合生物素之抗人IgG捕捉分子F(ab')₂ <h-Fcγ> BI(Dianova)塗佈在室溫下1小時或者在4℃下隔夜，隨後用200微升/孔PBS、0.05% Tween(PBST, Sigma)洗滌三次。將100微升/孔含有各別抗體之細胞培養物上清液於PBS(Sigma)中之一系列稀釋液添加至各孔中，且在室溫於微量滴定盤震盪器上培育1-2小時。各孔用200微升/孔

PBST洗滌三次，且在室溫於微量滴定盤震盪器上用100 μ l以0.1 μ g/mL之F(ab')₂<hFc γ >POD(Dianova)作為偵測抗體偵測結合之抗體1-2小時。未結合之偵測抗體用200微升/孔PBST洗滌三次除去，且藉由添加100微升ABTS/孔偵測結合之偵測抗體。在Tecan Fluor光譜儀上於405 nm之測量波長(參考波長492 nm)進行吸光度測定。

蛋白質純化

蛋白質係參考標準方案自經過濾之細胞培養物上清液純化。簡言之，將抗體施加於蛋白質 A 瓊脂糖管柱(GE healthcare)且用PBS洗滌。在pH 2.8下達成抗體溶離，隨後立即中和樣本。藉由於PBS中或於20 mM組胺酸、150 mM NaCl(pH 6.0)中進行尺寸排除層析(Superdex 200，GE Healthcare)自單體抗體分離聚集蛋白質。將單體抗體溶離份彙集，必要時使用(例如)MILLIPORE Amicon Ultra(30 MWCO)離心濃縮器濃縮，冷凍且儲存於-20°C或-80°C下。一部分樣本係供後續蛋白質分析及分析表徵(例如藉由SDS-PAGE、尺寸排除層析或質譜分析)之用。

SDS-PAGE

根據製造商之說明書使用NuPAGE®預製凝膠系統(Invitrogen)。詳言之，使用10%或4-12% NuPAGE® Novex® Bis-TRIS預製凝膠(pH 6.4)及NuPAGE® MES(還原凝膠，含有NuPAGE®抗氧化劑電泳緩衝液添加劑)或MOPS(非還原凝膠)電泳緩衝液。

分析型尺寸排除層析

用於測定抗體之聚集及寡聚狀態之尺寸排除層析係藉由HPLC層析來進行。簡言之，將經蛋白質A純化之抗體施加於Agilent HPLC 1100系統上於300 mM NaCl、50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.5)中之Tosoh TSK凝膠G3000SW管柱或施加於Dionex HPLC系統上於2×PBS中之Superdex 200管柱(GE Healthcare)。藉由UV吸光度及峰面積積分來量化所溶離之蛋白質。BioRad凝膠過濾標準物151-1901充當標準物。

質譜分析

交換抗體之總脫糖基化質量係經由電噴霧電離質譜分析(ESI-MS)來測定及確證。簡言之，將100 μg 經純化抗體用於100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7)中之50 mU N-糖苷酶F(PNGaseF, ProZyme)以至多2 mg/ml之蛋白質濃度在37°C下脫糖基化12-24小時且隨後經由在Sephadex G25管柱(GE Healthcare)上進行HPLC來脫鹽。脫糖基化及還原後藉由ESI-MS測定各別重鏈及輕鏈之質量。簡言之，將於115 μl 中之50 μg 抗體與60 μl 1M TCEP及50 μl 8 M胍鹽酸鹽一起培育，隨後脫鹽。在配備有NanoMate源之Q-Star Elite MS系統上經由ESI-MS測定總質量及經還原重鏈及輕鏈之質量。

IGF-1R ECD結合ELISA

在ELISA檢定中以IGF-1R胞外域(ECD)評估所產生抗體之結合特性。為此，將與N末端His-抗生蛋白鏈菌素結合肽標籤(His-SBP)融合之包含天然前導序列及 α 鏈之人類

IGF-1R胞外域之LI-富含半胱胺酸-12域(根據McKern等人, 1997; Ward等人, 2001)的IGF-1R胞外域(殘基1-462)選殖至pcDNA3載體衍生物中且在HEK293F細胞中瞬間表現。IGF-1R-His-SBP ECD之蛋白質序列係以SEQ ID NO:10給出。將StreptaWell High Bind抗生蛋白鏈菌素A-96孔微量滴定盤(Roche)用100微升/孔含有可溶性IGF-1R-ECD-SBP融合蛋白之細胞培養物上清液在4°C下塗佈隔夜且用200微升/孔PBS、0.05% Tween(PBST, Sigma)洗滌三次。隨後, 將100微升/孔各別抗體及作為參考之野生型<IGF-1R>抗體於包括1% BSA(部分V, Roche)之PBS(Sigma)中的連續稀釋液添加至孔中且在室溫下於微量滴定盤震盪器上培育1-2小時。對於連續稀釋液, 將相同量之經純化抗體塗覆於孔上。將孔用200微升/孔PBST洗滌三次且在室溫下於微量滴定盤震盪器上用100微升/孔0.1 µg/mL(1:8000)之F(ab')₂<hFcγ>POD(Dianova)作為偵測抗體偵測經結合之抗體1-2小時。將未結合之偵測抗體用200微升/孔PBST洗滌三次以除去且藉由添加100微升ABTS/孔來偵測經結合之偵測抗體。在Tecan Fluor光譜儀上於405 nm之量測波長(參考波長492 nm)下進行吸光度測定。

IGF-1R ECD Biacore

所產生抗體與IGF-1R ECD之結合亦係藉由使用BIACORE T100儀器(GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden)進行表面電漿共振來研究。簡言之, 對於親和力量測, 經由胺偶合使山羊抗人IgG, JIR 109-005-

098抗體固定於CM5晶片上用於呈現針對經標記之人類IGF-1R ECD-Fc之抗體。在25℃下在HBS緩衝液(HBS-P(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% Tween 20, pH 7.4))中量測結合。添加呈不同濃度之溶液形式之IGF-1R ECD(R&D Systems或經內部純化)。藉由80秒至3分鐘之IGF-1R ECD注射來量測締合；藉由將晶片表面用HBS緩衝液洗滌3-10分鐘來量測解離且使用1:1朗哥謬爾結合模型(Langmuir binding model)估測KD值。由於<IGF-1R>抗體之負載密度及捕捉量較低，因此獲得單價IGF-1R ECD結合。樣本曲線減去陰性對照數據(例如緩衝液曲線)用於校正系統固有基線漂移且用於減小雜訊信號。使用Biacore T100評估軟體1.1.1版來分析感測圖譜且計算親和力數據。圖11展示Biacore檢定之流程。

實例1

可變域CL及CH1經彼此置換之單特異性雙價<IGF-1R>抗體(本文中縮寫為<IGF-1R> CL-CH1交換抗體)的產生、表現、純化及表徵

實例1A

製造單特異性雙價<IGF-1R> CL-CH1交換抗體之表現質體

此實例中所述之單特異性雙價<IGF-1R> CL-CH1交換抗體之重鏈可變域及輕鏈可變域的序列(包括各別前導序列)係來源於WO 2005/005635中所述之人類<IGF-1R>抗體重鏈(SEQ ID NO: 1, 質體4843-pUC-HC-IGF-1R)及輕鏈(SEQ

ID NO: 2, 質體 4842-pUC-LC-IGF-1R), 且重鏈恆定域及輕鏈恆定域係來源於人類抗體(C κ 及IgG1)。

將編碼<IGF-1R>抗體前導序列、重鏈可變域(VH)及人類 κ 輕鏈域(CL)之基因區段接合且與人類 γ 1重鏈恆定域(鉸鏈-CH2-CH3)之Fc域之5'末端融合。編碼由CH1域經CL域交換(CH1-CL交換)產生之各別融合蛋白之DNA係藉由基因合成而產生且於下文表示為<IGF-1R> HC**(SEQ ID NO: 3)。

<IGF-1R>抗體前導序列、輕鏈可變域(VL)及人類 γ 1重鏈恆定域(CH1)之基因區段係接合為獨立鏈。編碼由CL域經CH1域交換(CL-CH1交換)產生之各別融合蛋白之DNA係藉由基因合成而產生且於下文表示為<IGF-1R> LC**(SEQ ID NO: 4)。

圖 5 及 圖 6 展示經修飾<IGF-1R> HC**重鏈及經修飾<IGF-1R> LC**輕鏈之蛋白質序列之示意圖。

在下文中簡要描述各別表現載體：

載體 pUC-HC-IGF-1R**

載體 pUC-HC**-IGF-1R 為(例如)用於在 HEK293(EBNA)細胞中瞬間表現 CL-CH1 交換<IGF-1R>重鏈 HC**(cDNA 組織化表現卡匣；具有 CMV-內含子 A)或用於在 CHO 細胞中穩定表現之表現質體。

除<IGF-1R> HC**表現卡匣以外，此載體亦含有：

- 允許此質體在大腸桿菌中複製之來自載體 pUC18 之複製起點，及

- 在大腸桿菌中賦予安比西林抗性之 β -內醯胺酶基因。

<IGF-1R> HC**基因之轉錄單元包含以下元件：

- 5'末端之AscI限制性位點，
- 來自人類細胞巨大病毒之即刻早期強化子及啟動子，
- 接著為內含子A序列，
- 人類抗體基因之5'未轉譯區，
- 免疫球蛋白輕鏈信號序列，
- 與人類 $\gamma 1$ 重鏈恆定域(鉸鏈-CH₂-CH₃)之Fc域之5'末端融合的編碼人類重鏈可變域(VH)與人類 κ 輕鏈恆定域(CL)之融合體的人類<IGF-1R>成熟HC**鏈，
- 具有聚腺苷酸化信號序列之3'未轉譯區，及
- 3'末端之限制性位點SgrAI。

重鏈**CL-CH₁交換<IGF-1R> HC**表現載體pUC-HC**-IGF-1R之質體圖譜展示於圖7中。<IGF-1R> HC**之胺基酸序列(包括信號序列)係以SEQ ID NO: 3給出。

載體pUC-LC**-IGF-1R

載體pUC-LC**-IGF-1R為(例如)用於在HEK293(EBNA)細胞中瞬間表現CL-CH₁交換<IGF-1R>輕鏈LC**(cDNA組織化表現卡匣；具有CMV-內含子A)或用於在CHO細胞中穩定表現之表現質體。

除<IGF-1R> LC**表現卡匣以外，此載體亦含有：

- 允許此質體在大腸桿菌中複製之來自載體pUC18之複製起點，及
- 在大腸桿菌中賦予安比西林抗性之 β -內醯胺酶基因。

<IGF-1R> LC基因之轉錄單元包含以下元件：**

- 5'末端之限制位點 Sse8387I，
- 來自人類細胞巨大病毒之即刻早期強化子及啟動子，
- 接著為內含子A序列，
- 人類抗體基因之5'未轉譯區，
- 免疫球蛋白重鏈信號序列，
- 編碼人類輕鏈可變域(VL)與人類 $\gamma 1$ 重鏈恆定域(CH1)之融合體的人類<IGF-1R>抗體成熟LC**鏈，
- 具有聚腺苷酸化信號序列之3'未轉譯區，及
- 3'末端之限制位點 SalI及 FseI。

輕鏈**CL-CH1交換<IGF-1R> LC**表現載體pUC-LC**-IGF-1R之質體圖譜展示於圖8中。<IGF-1R> LC**之胺基酸序列(包括信號序列)係以SEQ ID NO: 4給出。

質體pUC-HC**-IGF-1R及pUC-LC**-IGF-1R可用於瞬間或穩定共同轉染至(例如)HEK293、HEK293 EBNA或CHO細胞中(2載體系統)。出於比較原因，自與此實例中所述者類似的質體4842-pUC-LC-IGF-1R(SEQ ID NO: 2)及4843-pUC-HC-IGF-1R(SEQ ID NO: 1)瞬間表現野生型<IGF-1R>抗體。

為使HEK293 EBNA細胞中之瞬間表現達成較高表現量，可將<IGF-1R> HC**表現卡匣經由AscI、SgrAI位點且將<IGF-1R> LC**表現卡匣經由Sse8387I及FseI位點次選殖至4700 pUC-Hyg_OriP表現載體中，該表現載體含有：

- OriP元件，及

- 潮黴素抗性基因作為選擇性標記。

可將重鏈及輕鏈轉錄單元次選殖至兩個獨立4700-pUC-Hyg-OriP載體中以供共同轉染(2載體系統)或可將其選殖至一個共用4700-pUC-Hyg-OriP載體中(1載體系統)以供隨後用所得載體瞬間或穩定轉染。圖9展示基本載體4700-pUC-OriP之質體圖譜。

實例1B

製造單特異性雙價<IGF-1R> CL-CH1交換抗體表現質體

包含野生型<IGF-1R>抗體之經交換Fab序列之<IGF-1R>融合基因(HC**及LC**融合基因)係以已知重組方法及技術藉由連接相應核酸區段來裝配。

編碼IGF-1R HC**及LC**之核酸序列各自藉由化學合成法合成且隨後選殖至Geneart(Regensburg, Germany)之基於pPCRScrip(Stratagene)之pGA4選殖載體中。將編碼IGF-1R HC**之表現卡匣經由PvuII及BmgBI限制性位點接合至各別大腸桿菌質體中，產生最終載體pUC-HC**-IGF-1R；將編碼各別IGF-1R LC**之表現卡匣經由PvuII及Sall限制性位點接合至各別大腸桿菌質體中，產生最終載體pUC-LC**-IGF-1R。藉由DNA定序來驗證經次選殖之核酸序列。對於瞬間及穩定轉染，藉由自經轉化之大腸桿菌培養物(Nucleobond AX, Macherey-Nagel)進行質體製備來製備較大量之質體。

實例1C

瞬間表現單特異性雙價<IGF-1R> CL-CH1交換抗體、純

化及藉由質譜分析確證一致性

重組 <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體係藉由如上文所述在 HEK293-F 懸浮細胞中瞬間共同轉染質體 pUC-HC**-IGF-1R 及 pUC-LC**-IGF-1R 來表現。

經表現且經分泌之單特異性雙價 <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體係自經過濾之細胞培養物上清液如上文所述藉由蛋白質 A 親和層析來純化。簡言之，將來自瞬間轉染之含有 <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體之細胞培養物上清液藉由離心及過濾而淨化且施加於用 PBS 緩衝液 (10 mM Na_2HPO_4 、1 mM KH_2PO_4 、137 mM NaCl 及 2.7 mM KCl, pH 7.4) 平衡之蛋白質 A HiTrap MabSelect Xtra 管柱 (GE Healthcare)。將未結合之蛋白質用 PBS 平衡緩衝液、接著 0.1 M 檸檬酸鈉緩衝液 (pH 5.5) 洗去且用 PBS 洗滌。用 100 mM 檸檬酸鈉 (pH 2.8) 達成抗體溶離，接著用每 2 ml 溶離份 300 μl 2 M Tris (pH 9.0) 立即中和樣本。藉由在 HiLoad 26/60 Superdex 200 製備級管柱 (GE Healthcare) 上於 20 mM 組胺酸、150 mM NaCl (pH 6.0) 中進行尺寸排除層析自單體抗體分離聚集蛋白質且隨後使用 MILLIPORE Amicon Ultra-15 離心濃縮器濃縮單體抗體溶離份。將 <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體冷凍且儲存於 -20°C 或 -80°C 下。如上文所述藉由存在及不存在還原劑之情況下進行 SDS-PAGE 且隨後用庫馬斯亮藍染色來分析 <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體之完整性。藉由分析型尺寸排除層析確證 <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體之單體狀態 (圖 12)。提供經表徵之樣本用於後續蛋白質分析及

功能表征。ESI質譜分析確證完全脫糖基化<IGF-1R> CL-CH1交換抗體之理論分子量。

實例 1D

在 IGF-1R ECD 結合 ELISA 中且藉由 Biacore 分析單特異性雙價<IGF-1R> CL-CH1交換抗體之 IGF-1R 結合特性

單特異性雙價<IGF-1R> CL-CH1交換抗體之結合特性係如上文所述在 ELISA 檢定中以 IGF-1R 胞外域 (ECD) 來評估。為此，將與 N 末端 His- 抗生蛋白鏈菌素結合肽標籤 (His-SBP) 融合之包含天然前導序列及 α 鏈之人類 IGF-1R 胞外域之 LI- 富含半胱胺酸 -12 域 (根據 McKern 等人，1997；Ward 等人，2001) 的 IGF-1R 胞外域 (殘基 1-462) 選殖至 pcDNA3 載體衍生物中且在 HEK293F 細胞中瞬間表現。IGF-1R-His-SBP ECD 之蛋白質序列在上文給出。所獲得之滴定曲線顯示<IGF-1R> CL-CH1交換抗體具功能性且顯示在方法誤差內與野生型<IGF-1R>抗體相當之結合特徵及動力學且由此似乎具完全功能性(圖 13)。

此等發現係由各別經純化抗體之 Biacore 數據確證，該等數據顯示具有 3.7 pM 之 KD 值的單特異性雙價<IGF-1R> CL-CH1交換抗體對於 IGF-1R ECD 具有與具有 3.2 nM 之 KD 值之原始野生型<IGF-1R>抗體相當之親和力及結合動力學：

實例 1G

藉由 FACS 以 IGF-1R 過度表現 I24 細胞分析單特異性雙價<IGF-1R> CL-CH1交換抗體之 IGF-1R 結合特性

為確證<IGF-1R> CL-CH1交換抗體與在I24細胞(表現重組人類IGF-1R之NIH3T3細胞, Roche)表面上過度表現之IGF-1R的結合活性, 藉由FACS進行研究。簡言之, 將每個FACS管 5×10^5 個I24細胞與經純化<IGF-1R> CL-CH1交換抗體及作為參考之野生型<IGF-1R>抗體之稀釋液一起培育且在冰上培育1小時。用4 ml冰冷PBS(Gibco)+2% FCS(Gibco)洗去未結合之抗體。隨後, 將細胞離心(以400 g, 5分鐘)且在避光下於冰上用F(ab')₂ <hFcγ>PE結合物(Dianova)偵測經結合之抗體歷時1小時。用4 ml冰冷PBS+2% FCS洗去未結合之偵測抗體。隨後, 將細胞離心(5分鐘, 400 g), 再懸浮於300-500 μL PBS中且在FACSCalibur或FACS Canto(BD FL2通道, 每次擷取為10,000個細胞)上量化經結合之偵測抗體。實驗期間, 包括各別同型對照以排除任何非特異性結合。<IGF-1R> CL-CH1交換抗體及野生型<IGF-1R>參考抗體與I24細胞上之IGF-1R的結合引起相當的平均螢光強度濃度依賴性偏移。

實例2:

單特異性雙價<ANGPT2>野生型抗體之描述

實例2A

製造單特異性雙價<ANGPT2>野生型抗體之表現質體

此實例中所述之單特異性雙價ANGPT2 <ANGPT2>野生型抗體之重鏈可變域及輕鏈可變域的序列(包括各別前導序列)係來源於WO 2006/045049中所述之人類<ANGPT2>抗體重鏈(SEQ ID NO: 6)及輕鏈(SEQ ID NO: 7), 且重鏈

恆定域及輕鏈恆定域係來源於人類抗體(C κ 及IgG1)。

將野生型<ANGPT2>抗體選殖至與先前實例1A中所述之載體類似的質體SB04-pUC-HC-ANGPT2(SEQ ID NO: 6)及SB06-pUC-LC-ANGPT2(SEQ ID NO: 7)中。

出於比較原因且用於共同表現實驗(參見實例3)，自質體SB04-pUC-HC-ANGPT2及SB06-pUC-LC-ANGPT2瞬間(共同)表現野生型<ANGPT2>抗體。

實例2B

製造單特異性雙價<ANGPT2>野生型抗體表現質體

編碼<ANGPT2> HC及LC之核酸序列各自藉由化學合成法合成且隨後選殖至Geneart(Regensburg, Germany)之基於pPCRScrip(Stratagene)之pGA4選殖載體中。將編碼<ANGPT2> HC之表現卡匣選殖至各別大腸桿菌質體中，產生最終載體SB04-pUC-HC-ANGPT2；將編碼各別<ANGPT2> LC之表現卡匣選殖至各別大腸桿菌質體中，產生最終載體SB06-pUC-LC-ANGPT2。藉由DNA定序來驗證經次選殖之核酸序列。對於瞬間及穩定轉染，藉由自經轉化之大腸桿菌培養物(Nucleobond AX, Macherey-Nagel)進行質體製備來製備較大量之質體。

實例3

在與IGF-1R特異性結合之重鏈及輕鏈中恆定域CL及CH1經彼此置換之雙特異性雙價<ANGPT2-IGF-1R>抗體(本文中縮寫為<ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1交換抗體)的表現

實例3A

<IGF-1R> CL-CH1 交換抗體及 <ANGPT2> 野生型抗體在 HEK293 EBNA 細胞中之瞬間共同表現及純化以得到雙特異性 <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 交換抗體

為產生經由一側之 <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體 Fab 識別 IGF-1R 且經由另一側之 <ANGPT2> 野生型 Fab 區識別 <ANGPT2> 之功能性雙特異性抗體，將兩個編碼 <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體之表現質體 (實例 1A) 與兩個編碼 <ANGPT2> 野生型抗體之表現質體 (實例 2A) 一起共同表現。假設野生型重鏈 HC 與 CL-CH1 交換重鏈 HC** 產生統計上之締合，由此產生雙特異性且雙價 <IGF-1R-ANGPT2> CL-CH1 交換抗體產生。在假設兩種抗體得以同等充分表現且不考慮副產物之情況下，此應產生 1:2:1 比率之三種主要產物：A) <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體，B) 雙特異性 <IGF-1R-ANGPT2> CL-CH1 交換抗體，及 C) <ANGPT2> 野生型抗體。可預期若干種副產物。然而，由於僅 CL-CH1 域交換，因此副產物之頻率與完全 Fab 交換相比應減小。請注意，由於 <ANGPT2> 野生型抗體顯示比 <IGF-1R> 野生型抗體及 <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體高之表現瞬間表現量，因此 <ANGPT2> 野生型抗體質體與 <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體質體之比率向有利於 <ANGPT2> 野生型抗體之表現移動。

為產生主要產物 A) <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體、B) 雙特異性 <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 交換抗體及 C) <ANGPT2> 野生型抗體之混合物，如上文所述在懸浮 HEK293-F 細胞

中瞬間共同轉染四種質體 pUC-HC**-IGF-1R 及 pUC-LC**-IGF-1R 及質體 SB04-pUC-HC-ANGPT2 及 SB06-pUC-LC-ANGPT2。所收集之上清液含有主要產物 A) <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體、B) 雙特異性 <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 交換抗體及 C) <ANGPT2> 野生型抗體之混合物且表示為"雙特異性 CL-CH1 交換混合物"。藉由離心收集含有雙特異性 CL-CH1 交換混合物之細胞培養物上清液且隨後如上文所述進行純化。圖 14

如所述藉由在存在及不存在還原劑之情況下進行 SDS-PAGE 且隨後用庫馬斯亮藍染色來分析抗體混合物之完整性。SDS-PAGE 顯示如預期有 2 種不同重鏈及輕鏈存在於製劑中(還原凝膠)。抗體混合物之單體狀態係藉由分析型尺寸排除層析確證且顯示經純化抗體種類係呈單體狀態。提供經表徵之樣本用於後續蛋白質分析及功能表征。

實例 3B

在細胞 FACS 橋接檢定中針對 I24 IGF-1R 表現細胞偵測功能性雙特異性 <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 交換抗體

為確證在來自實例 3A 中所述之瞬間共同表現的主要產物 A) <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體、B) 雙特異性 <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 交換抗體及 C) <ANGPT2> 野生型抗體之經純化雙特異性 CL-CH1 交換混合物中功能性雙特異性 <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 交換抗體的存在，進行針對 I24 細胞(表現重組人類 IGF-1R 之 NIH3T3 細胞，Roche)之細胞 FACS IGF-1R-ANGPT2 橋接檢定。檢定原理描繪於圖 10

中。存在於經純化抗體混合物中之雙特異性<ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1交換抗體能夠同時與I24細胞中之IGF-1R且與ANGPT2結合；且由此將以兩個相對Fab區橋接其兩種靶抗原。

簡言之，將每個FACS管 5×10^5 個I24細胞與整個經純化抗體混合物一起培育且在冰上培育1小時(滴定160微克/毫升混合物)。將各別經純化抗體野生型<IGF-1R>及<ANGPT2>作為對照施加於I24細胞。用4 ml冰冷PBS(Gibco)+2% FCS(Gibco)洗去未結合之抗體，將細胞離心(以400 g，5分鐘)且在冰上用50 μ l 2 μ g/mL人類ANGPT2(R&D Systems)偵測經結合之雙特異性抗體歷時1小時。隨後，將未結合之ANGPT2用4 ml冰冷PBS(Gibco)+2% FCS(Gibco)洗滌一次或兩次以除去，將細胞離心(以400 g，5分鐘)且在冰上用50 μ l 5 μ g/mL <ANGPT2> mIgG1-生物素抗體(BAM0981, R&D Systems)偵測經結合之ANGPT2歷時45分鐘；或者，將細胞與50 μ l 5 μ g/mL mIgG1-生物素-同型對照(R&D Systems)一起培育。用4 ml冰冷PBS(Gibco)+2% FCS(Gibco)洗去未結合之偵測抗體，將細胞離心(以400 g，5分鐘)且在避光下於冰上用50 μ l 1:400抗生蛋白鏈菌素-PE結合物(Invitrogen/Zymed)偵測經結合之偵測抗體歷時45分鐘。用4 ml冰冷PBS+2% FCS洗去未結合之抗生蛋白鏈菌素-PE結合物。隨後，將細胞離心(5分鐘，400 g)，再懸浮於300-500 μ L PBS中且在FACSCalibur(BD FL2通道，每次擷取為10,000個細胞)上量

化結合性抗生蛋白鏈菌素-PE結合物。實驗期間，包括各別同型對照以排除任何非特異性結合作用。另外，包括經純化單特異性雙價IgG1抗體<IGF-1R>及<ANGPT2>作為對照。

圖 15 中之結果顯示與來自交換抗體(<IGF-1R> CL-CH1 交換抗體)與野生型抗體(<ANGPT2>野生型抗體)共同表現之經純化抗體交換混合物(<ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 交換抗體)一起培育引起螢光顯著偏移，其指示能夠同時與 I24 細胞中之 IGF-1R 且與 ANGPT2 結合之功能性雙特異性 <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 交換抗體存在；且由此以兩個相對 Fab 區橋接其兩種靶抗原。與此相對，各別 <IGF-1R> 及 <Ang-2> 對照抗體在 FACS 橋接檢定中不會引起螢光偏移。

總而言之，此等資料顯示藉由共同表現各別野生型質體及交換質體，可產生功能性雙特異性抗體。正確雙特異性抗體之產量可藉由(例如)使用杵入白技術以及雙硫鍵穩定化(參見實例 4)促使野生型重鏈及經修飾交換重鏈正確異源二聚而增加。

實例 4

具有經修飾 CH3 域(杵入白)之雙價雙特異性 <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 交換抗體的表現

為進一步改良雙特異性 <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 交換抗體之產量，將杵入白技術應用於 <IGF-1R> CL-CH1 交換抗體及野生型 <ANGPT2> 抗體之共同表現以獲得均質且具

功能性之雙特異性抗體製劑。出於此目的，使<IGF-1R> CL-CH1交換抗體之重鏈*HC*中之CH3域經具有T366W交換之SEQ ID NO: 8之CH3域(杵)置換且使野生型<ANGPT2>抗體之重鏈中之CH3域經具有T366S、L368A、Y407V交換之SEQ ID NO: 9之CH3域(白)置換，或反之亦然。另外，可包括雙硫鍵以增加穩定性及產量以及形成離子橋且增加異源二聚產量之額外殘基(EP 1870459A1)。

如實例3中所述進行所得具有經修飾CH3域(杵入白)之雙價雙特異性<ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1交換抗體的瞬間共同表現及純化。

請注意，異源二聚之最優化可(例如)藉由使用不同杵入白技術達成，該等技術諸如將額外雙硫橋引入CH3域中(例如將Y349C引入"杵鏈"中及將D356C引入"白鏈"中)及/或與由EP 1870459A1所述之殘基R409D、K370E(K409D)(對於杵殘基)及D399K、E357K(對於白殘基)的使用組合。

【圖式簡單說明】

圖1具有包含典型次序之可變域及恆定域之兩對重鏈與輕鏈的對一種抗原具特異性之天然產生完整抗體IgG之示意圖。

圖2包含以下各者之雙價雙特異性抗體之示意圖：a)與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈；及b)與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈，其中恆定域CL及CH1經彼此置換。

圖3包含以下各者之雙價雙特異性抗體之示意圖：a)與

第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈；及b)與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈，其中恆定域CL及CH1經彼此置換，且其中兩條重鏈之CH3域係由杵入白技術而改變。

圖4包含以下各者之雙價雙特異性抗體之示意圖：a)與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈；及b)與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈，其中恆定域CL及CH1經彼此置換，且其中兩條重鏈之恆定重鏈域CH3中之一者經恆定重鏈域CH1置換，且另一個恆定重鏈域CH3經恆定輕鏈域CL置換。

圖5 <IGF-1R> CL-CH1交換抗體(具有κ恆定輕鏈域CL)之重鏈**<IGF-1R> HC**之蛋白質序列圖解。

圖6 <IGF-1R> CL-CH1交換抗體之輕鏈**<IGF-1R> LC**之蛋白質序列圖解。

圖7重鏈**<IGF-1R> HC**表現載體pUC-HC**-IGF-1R之質體圖譜。

圖8輕鏈**<IGF-1R> LC**表現載體pUC-LC**-IGF-1R之質體圖譜。

圖9 4700-Hyg-OriP表現載體之質體圖譜。

圖10針對I24 IGF-1R表現細胞進行以偵測功能性雙特異性<ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1交換抗體之存在之細胞FACS IGF-1R-ANGPT2橋接檢定的檢定原理。

圖11 IGF-1R ECD Biacore流程。

圖12在HEK293-F細胞瞬間轉染後自細胞培養物上清液

序列表

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

<120> 雙價雙特異性抗體

<130> 24679 EP

<140> 097149215

<141> 2008-12-17

<150> EP 07024865

<151> 2007-12-21

<160> 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 467

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 野生型<IGF-1R>抗體重鏈之胺基酸序列

<400> 1

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
115 120 125

Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

340	345	350
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
355	360	365
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
370	375	380
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
385	390	395
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
405	410	415
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
420	425	430
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
435	440	445
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
450	455	460
Pro Gly Lys		
465		
<210> 2		
<211> 235		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 野生型<IGF-1R>抗體輕鏈之胺基酸序列		
<400> 2		
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro		
1	5	10
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser		
20	25	30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser		
35	40	45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Lys Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 3
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> <IGF-1R> CL-CH1交換抗體之重鏈** (HC**) 之胺基酸序列，其中重鏈域CH1經輕鏈域CL置換

<400> 3

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
115 120 125

Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser
130 135 140

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
165 170 175

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
180 185 190

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
195 200 205

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
210 215 220

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
225 230 235 240

Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 4

<211> 233

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> <IGF-1R> CL-CH1交換抗體之輕鏈** (LC**) 之胺基酸序列，其中輕鏈域CL經重鏈域CH1置換

<400> 4

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Lys Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys
115 120 125

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
130 135 140

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
145 150 155 160

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
165 170 175

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
195 200 205

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
210 215 220

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230

<210> 5
<211> 557
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> IGF-1R胞外域His-抗生蛋白鏈菌素結合肽-標籤 (IGF-1R-His-SBP ECD)
之胺基酸序列

<400> 5

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45

Leu	Glu	Asn	Cys	Thr	Val	Ile	Glu	Gly	Tyr	Leu	His	Ile	Leu	Leu	Ile
50						55					60				
Ser	Lys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Arg	Phe	Pro	Lys	Leu	Thr	Val
65					70					75					80
Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu	Leu	Leu	Phe	Arg	Val	Ala	Gly	Leu	Glu	Ser	Leu
				85					90					95	
Gly	Asp	Leu	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	Val	Ile	Arg	Gly	Trp	Lys	Leu	Phe
			100					105					110		
Tyr	Asn	Tyr	Ala	Leu	Val	Ile	Phe	Glu	Met	Thr	Asn	Leu	Lys	Asp	Ile
			115				120					125			
Gly	Leu	Tyr	Asn	Leu	Arg	Asn	Ile	Thr	Arg	Gly	Ala	Ile	Arg	Ile	Glu
	130					135					140				
Lys	Asn	Ala	Asp	Leu	Cys	Tyr	Leu	Ser	Thr	Val	Asp	Trp	Ser	Leu	Ile
145					150					155					160
Leu	Asp	Ala	Val	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ile	Val	Gly	Asn	Lys	Pro	Pro	Lys
				165					170					175	
Glu	Cys	Gly	Asp	Leu	Cys	Pro	Gly	Thr	Met	Glu	Glu	Lys	Pro	Met	Cys
			180						185				190		
Glu	Lys	Thr	Thr	Ile	Asn	Asn	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Arg	Cys	Trp	Thr	Thr
			195				200					205			
Asn	Arg	Cys	Gln	Lys	Met	Cys	Pro	Ser	Thr	Cys	Gly	Lys	Arg	Ala	Cys
	210					215					220				
Thr	Glu	Asn	Asn	Glu	Cys	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Gly	Ser	Cys	Ser
225					230					235					240
Ala	Pro	Asp	Asn	Asp	Thr	Ala	Cys	Val	Ala	Cys	Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr
				245					250					255	
Ala	Gly	Val	Cys	Val	Pro	Ala	Cys	Pro	Pro	Asn	Thr	Tyr	Arg	Phe	Glu

260	265	270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala		
275	280	285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met		
290	295	300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr		
305	310	315
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys		
325	330	335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly		
340	345	350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn		
355	360	365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val		
370	375	380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser		
385	390	395
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly		
405	410	415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp		
420	425	430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe		
435	440	445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu		
450	455	460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg		
465	470	475
		480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Ala Ala Ala Leu
485 490 495

Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Gly Thr His His His His His His Ser
500 505 510

Gly Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
515 520 525

Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro
530 535 540

Gln Gly Gln Arg Glu Pro Ser Gly Gly Cys Lys Leu Gly
545 550 555

<210> 6
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 野生型血管生成素-2 <ANGPT2>抗体重链之氨基酸序列

<400> 6

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr
115 120 125

Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 7
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 野生型血管生成素-2 <ANGPT2>抗体轻链之氨基酸序列

<400> 7

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 用於杵入白技術之具有T366W交換之CH3域（杵）的胺基酸序列

<400> 8

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 用於杵入白技術之具有T366S、L368A、Y407V交換之CH3域（白）的胺基酸序列

<400> 9

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 10
<211> 557
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> IGF-1R胞外域His-抗生蛋白鏈菌素結合肽-標籤 (IGF-1R-His-SBP ECD)
之胺基酸序列

<400> 10

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
 100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
 115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
 130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
 165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
 180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
 195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
 210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
 225 230 235 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
 245 250 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
 260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
 275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
 290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
 305 310 315 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
355 360 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
420 425 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Ala Ala Ala Leu
485 490 495

Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Gly Thr His His His His His His Ser
500 505 510

Gly Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
515 520 525

Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro



五、中文發明摘要：

本發明係關於新穎的域交換之雙價雙特異性抗體、其製造及用途。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to novel domain exchanged, bivalent, bispecific antibodies, their manufacture and use.

十一、圖式：

公告本

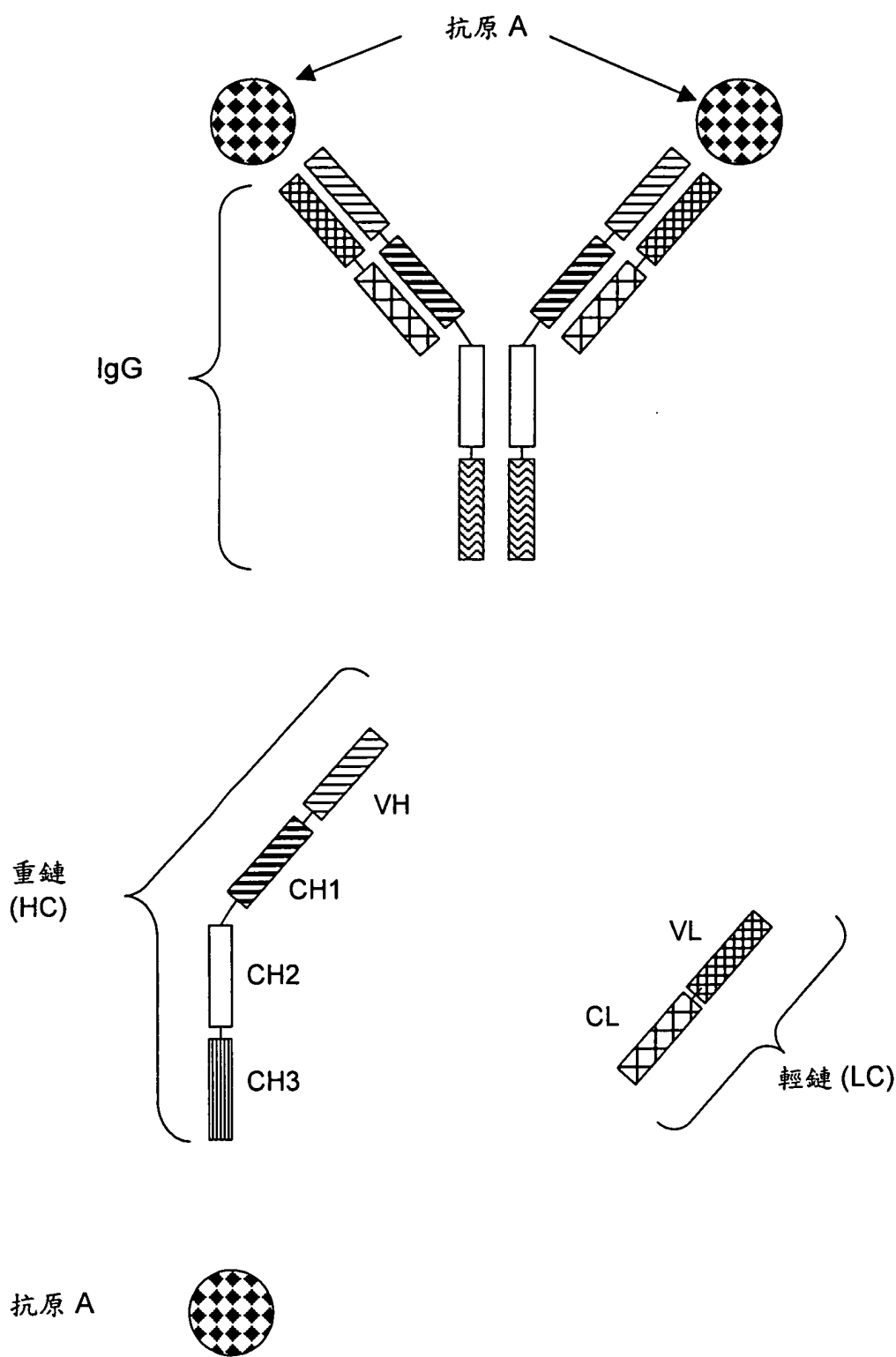


圖 1

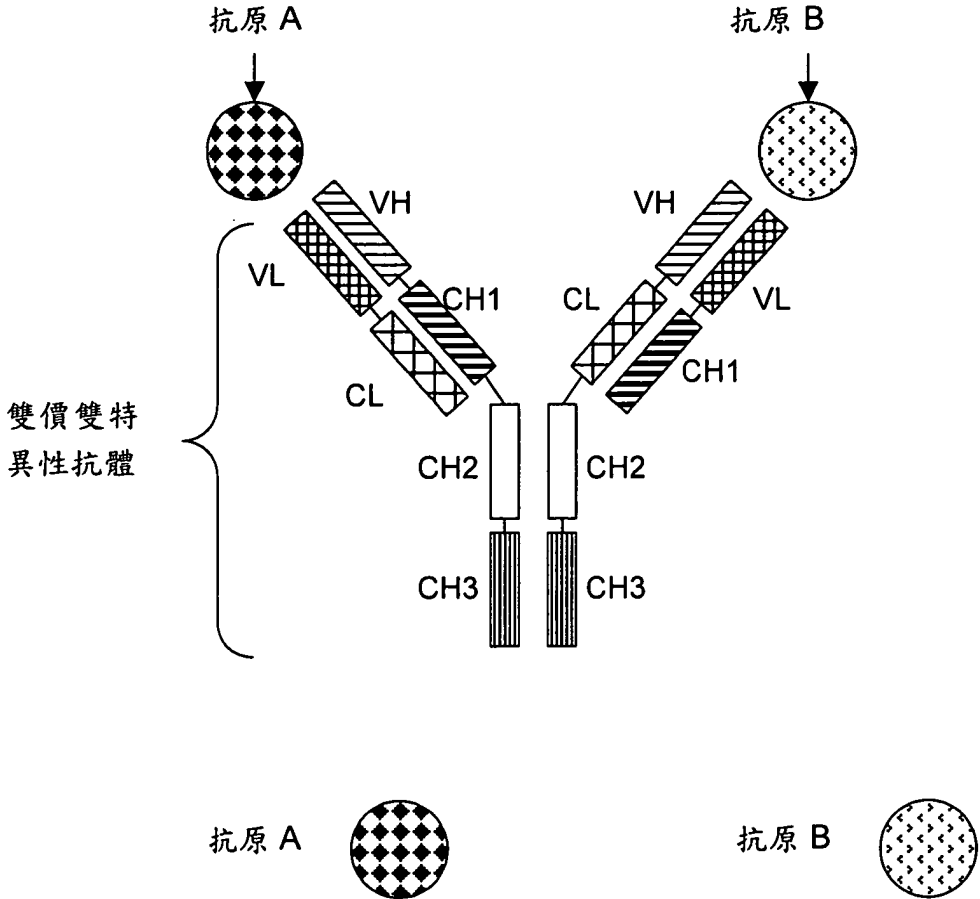


圖 2

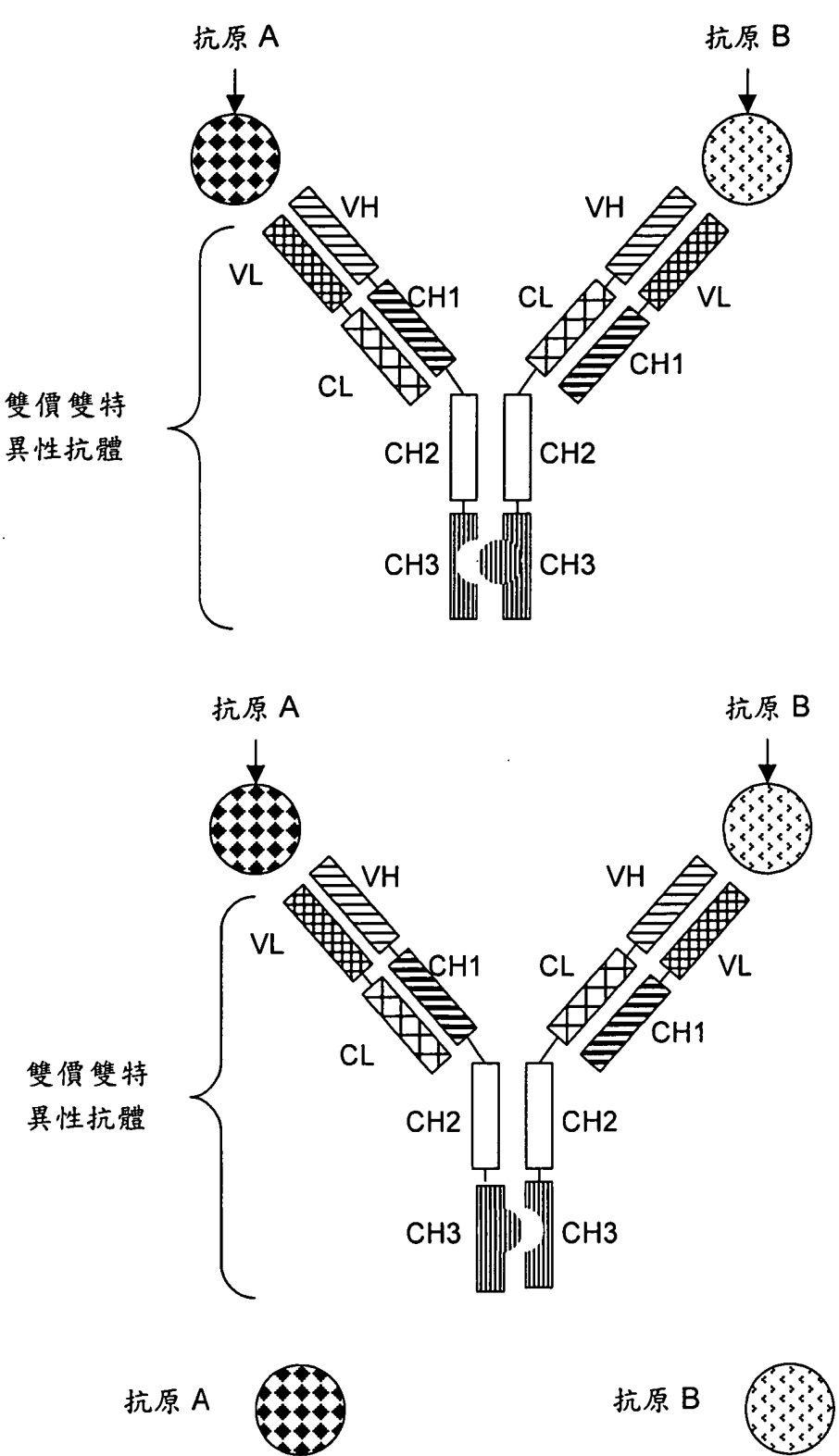


圖 3

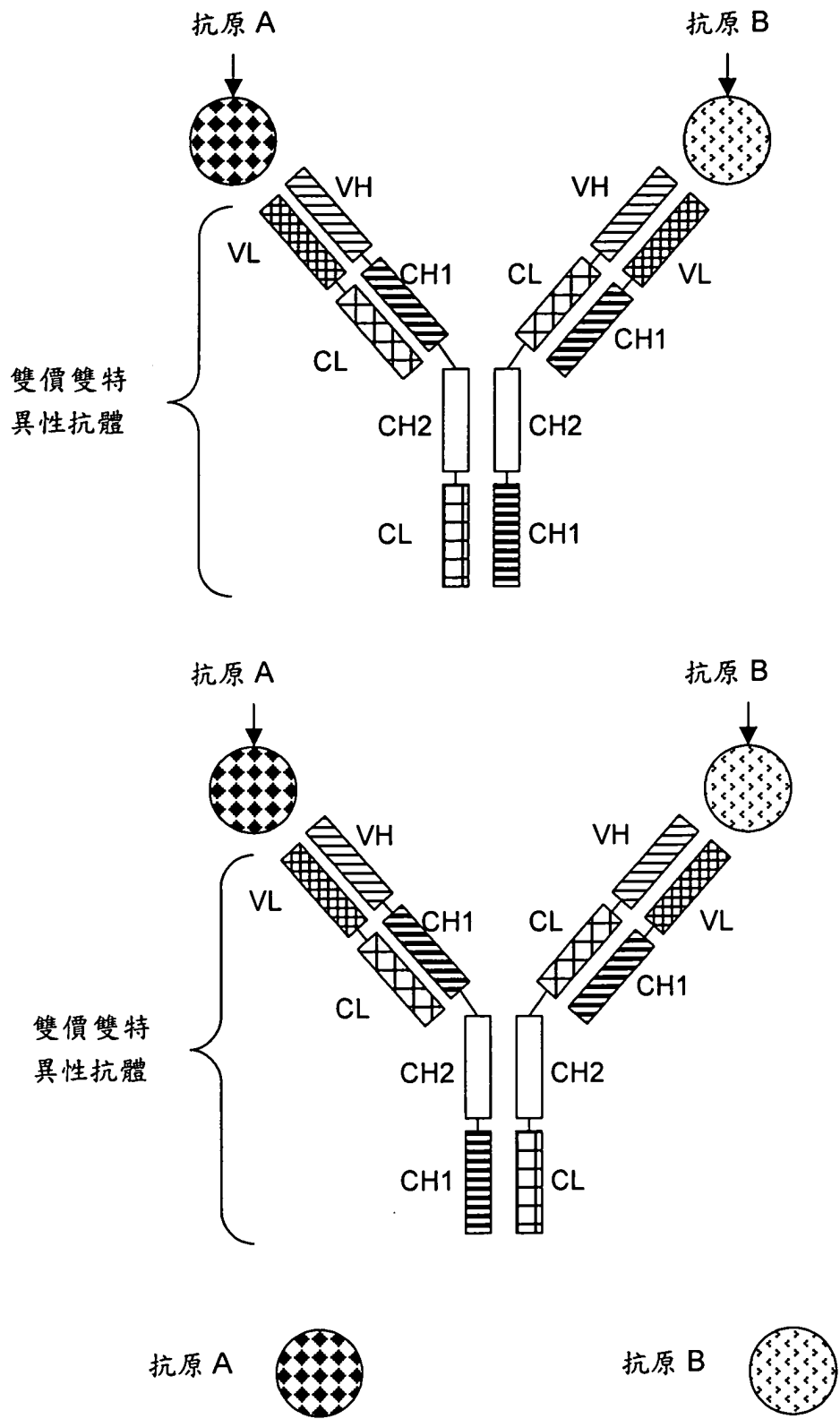


圖 4

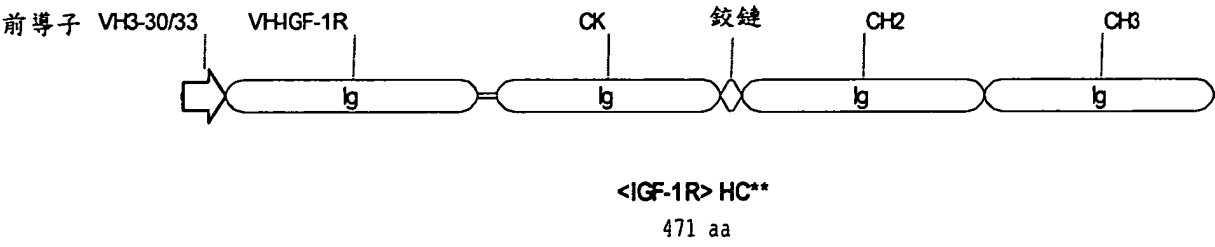


圖 5

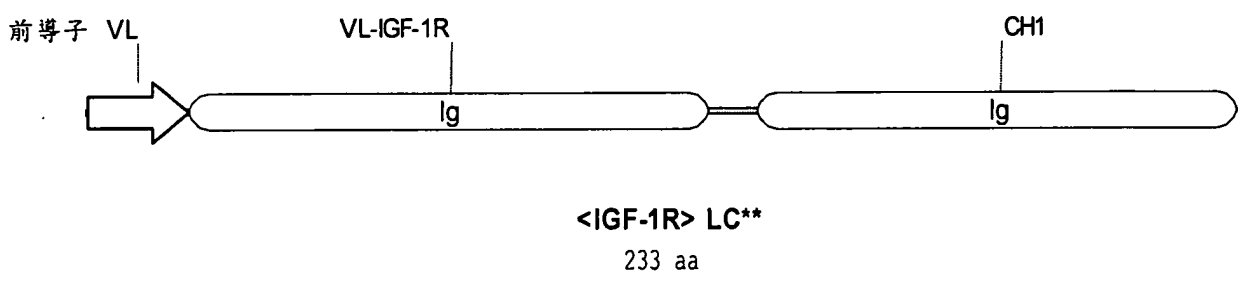


圖 6

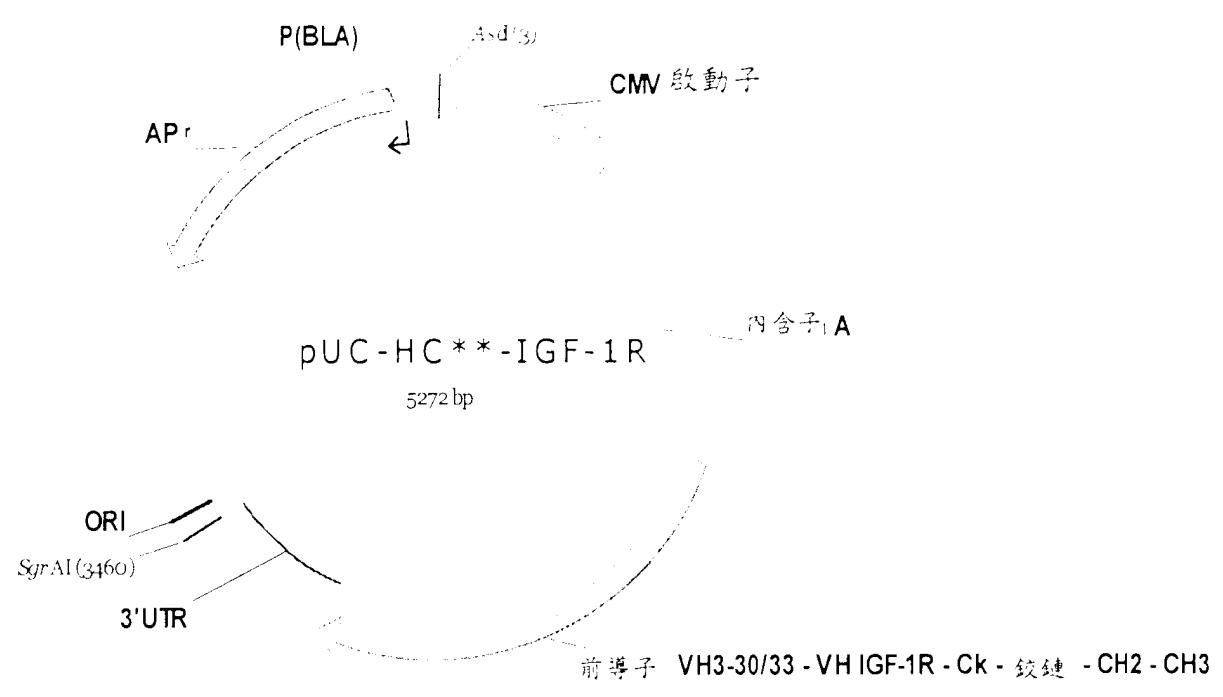


圖 7

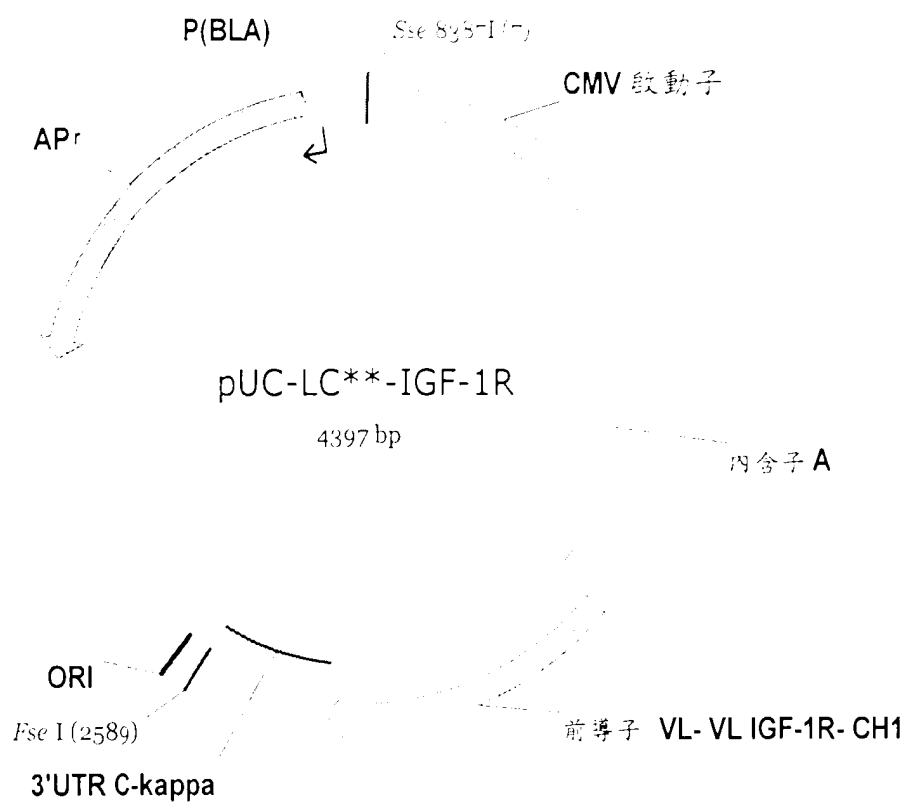


圖 8

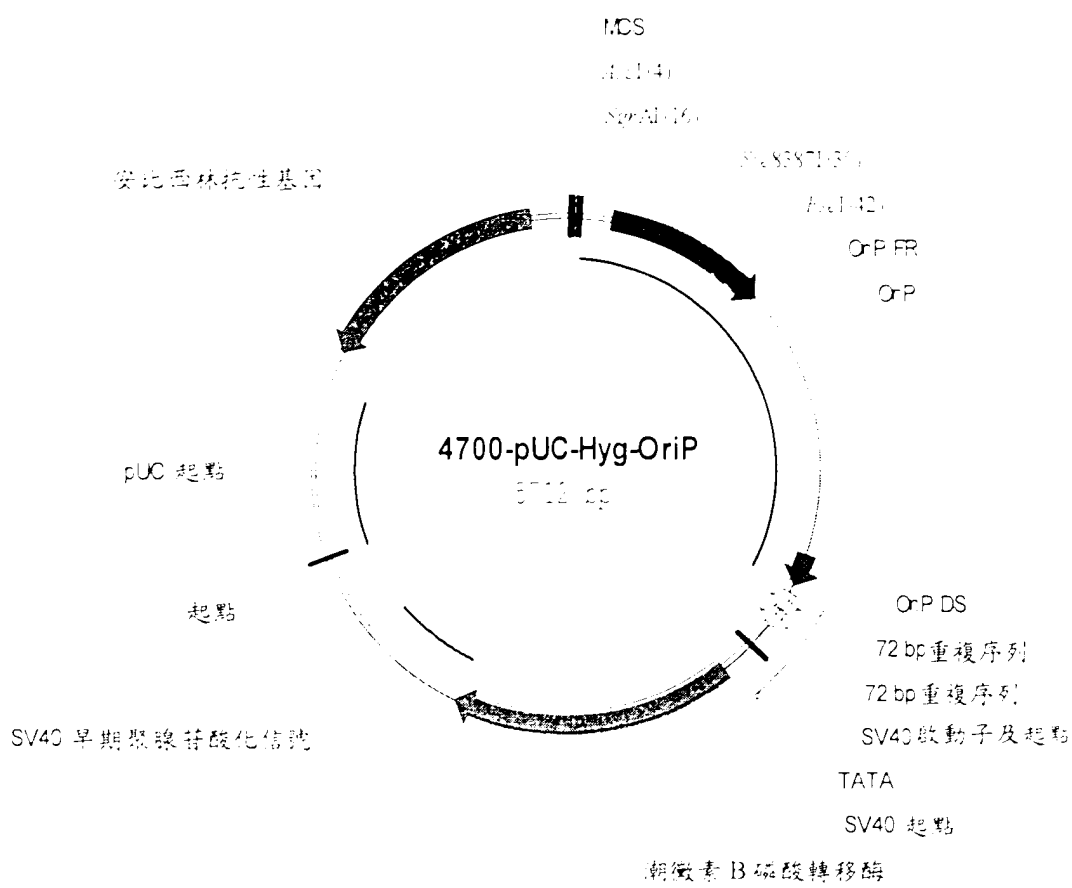


圖 9

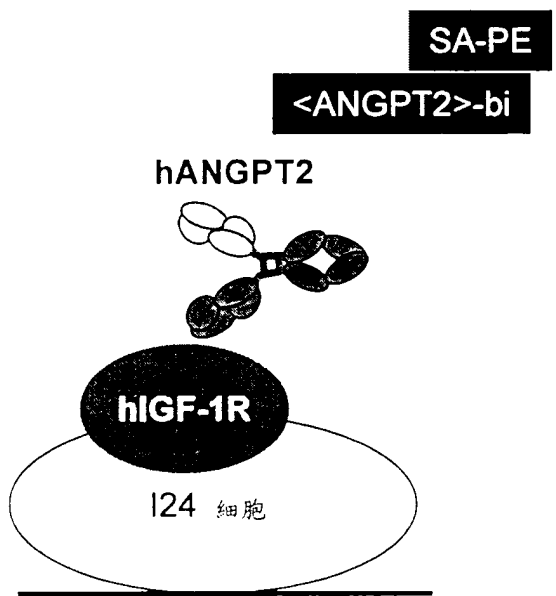


圖 10

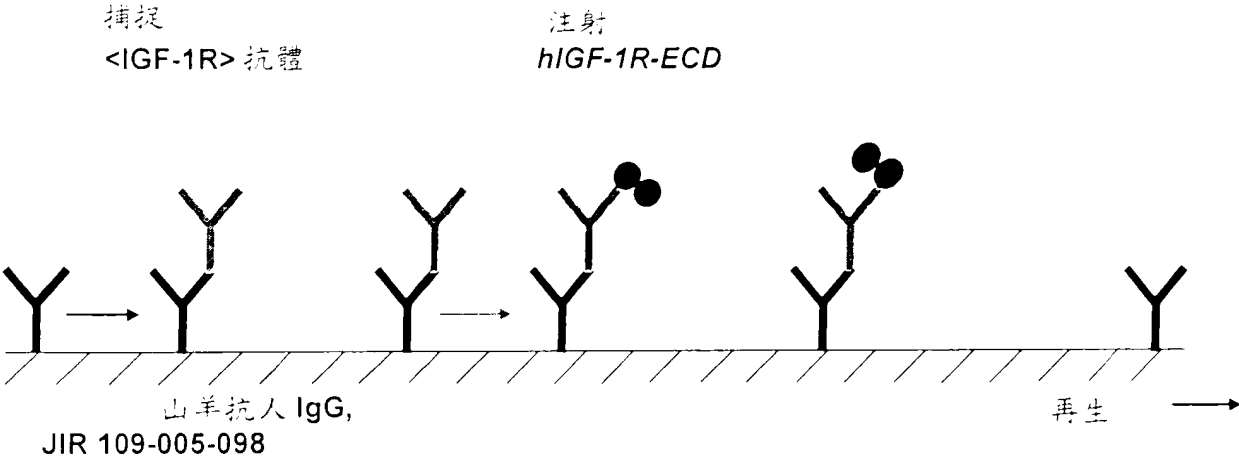


圖 11

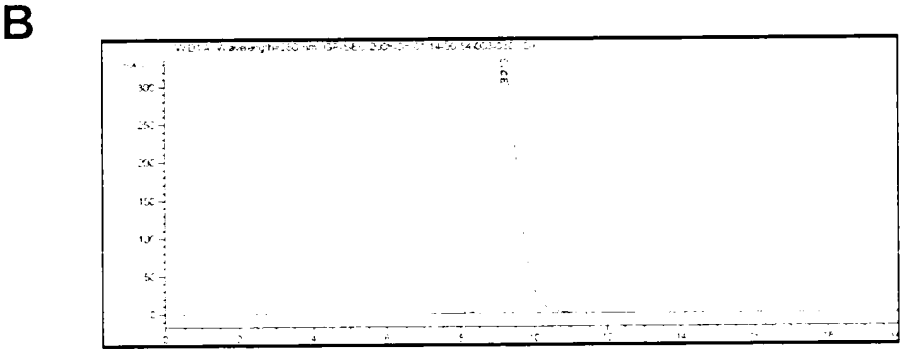
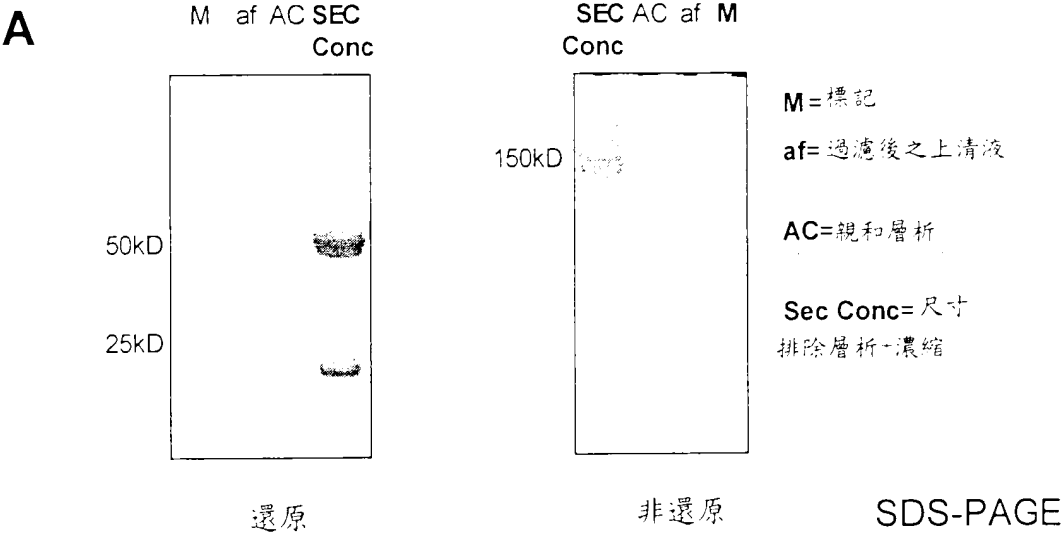


圖 12

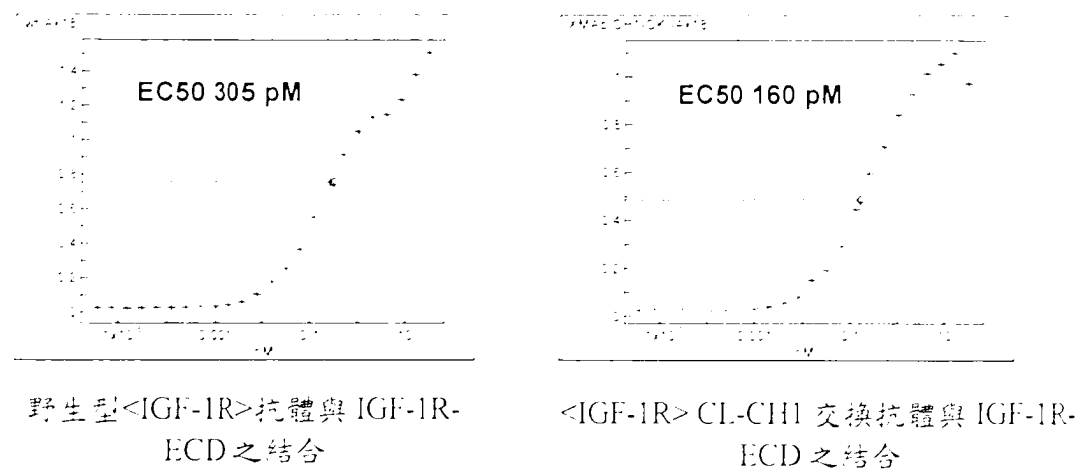


圖 13

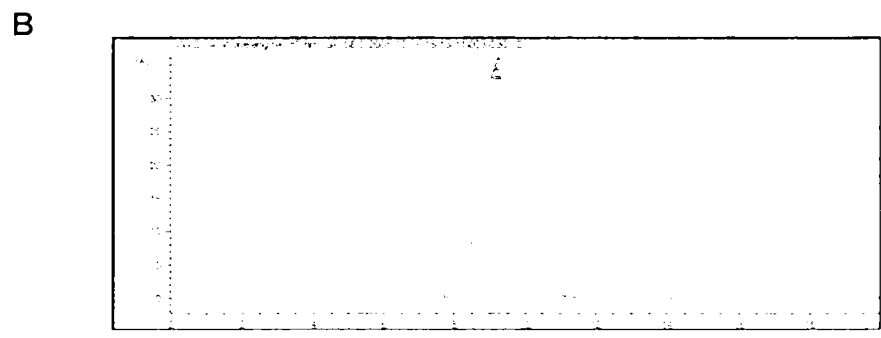
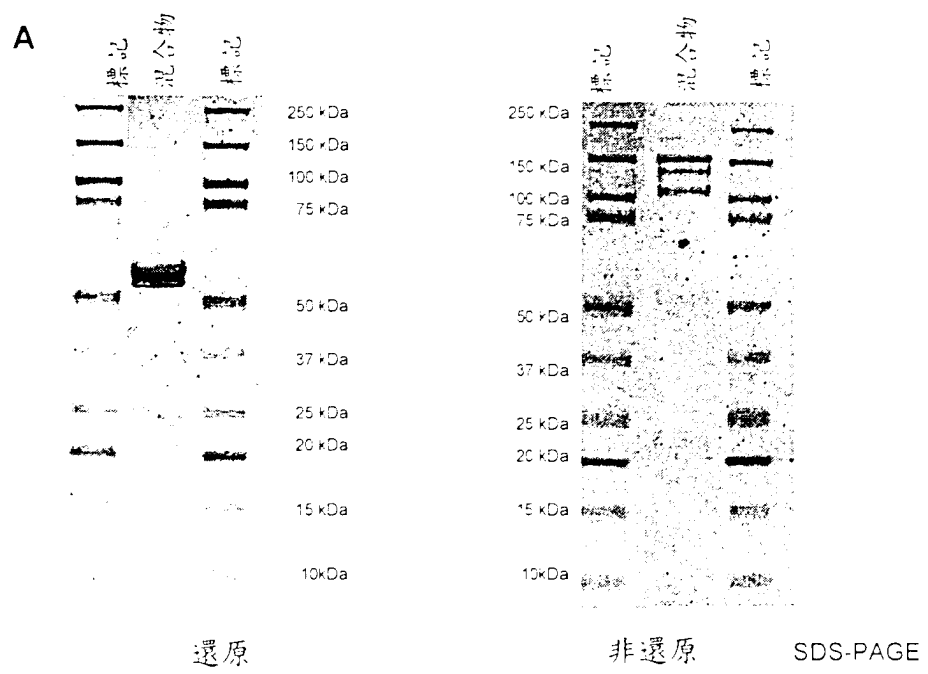


圖 14

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (2) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

分離的具有HC*及LC*之經純化單特異性雙價<IGF-1R> CL-CH1交換抗體(IgG1*)的SDS-PAGE(圖12A)及尺寸排除層析(圖12B)。

圖13在基於ELISA之結合檢定中單特異性<IGF-1R> CL-CH1交換抗體及野生型<IGF-1R>抗體與IGF-1R ECD之結合。

圖14自來自經瞬間轉染HEK293-F細胞之細胞培養物上清液純化之<ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1交換抗體混合物的SDS-PAGE(圖14A)及尺寸排除層析(圖14B)。

圖15針對I24 IGF-1R表現細胞進行以偵測經純化抗體混合物中功能性雙特異性<ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1交換抗體之存在之細胞FACS IGF-1R-ANGPT2橋接檢定中樣本A至E之結果：經純化蛋白質樣本A至E：

A=未經處理之I24

B=I24+2 μ g/mL hANGPT2+hIgG同型

C=I24+2 μ g/mL hANGPT2+自<IGF-1R> CL-CH1交換抗體與包含雙特異性<ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1交換抗體之<ANGPT2>野生型抗體共同表現之混合物

D=I24+2 μ g/mL hANGPT2+<ANGPT2>野生型抗體

E=I24+2 μ g/mL hANGPT2+<IGF-1R>野生型抗體。

十、申請專利範圍：

公告本

1. 一種雙價雙特異性抗體，其包含：

- a)與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈；及
- b)與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈，其中恆定域CL及CH1互相置換。

2. 如請求項1之抗體，其特徵在於：

一條重鏈之CH3域及另一條重鏈之CH3域各在一個包含該等抗體CH3域之間的原始界面之界面會合(meet)；

其中該界面經改變以促進該雙價雙特異性抗體形成，其中該改變之特徵在於：

- a)一條重鏈之CH3域經改變，

使得在該雙價雙特異性抗體內會合另一條重鏈CH3域之原始界面的一條重鏈CH3域之原始界面內，一個胺基酸殘基經一個具有較大側鏈體積之胺基酸殘基置換，進而在另一條重鏈CH3域之界面內產生一個隆凸，該隆凸可位於另一條重鏈CH3域之界面內之一個空腔中；

及

- b)另一條重鏈之CH3域經改變，

使得在該雙價雙特異性抗體內會合第一CH3域之原始界面的第二CH3域之原始界面內，一個胺基酸殘基經一個具有較小側鏈體積之胺基酸殘基置換，進而在該第二CH3域之界面內產生一個空腔，該第一CH3域之界面內之一個隆凸可位於該空腔內。

3. 如請求項2之抗體，其特徵在於：

該具有較大側鏈體積之胺基酸殘基係選自由精胺酸(R)、
苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)組成之群。

4. 如請求項2或3中任一項之抗體，其特徵在於：

該具有較小側鏈體積之胺基酸殘基係選自由丙胺酸(A)、
絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)、纈胺酸(V)組成之群。

5. 如請求項2或3中任一項之抗體，其特徵在於：

兩個CH3域係藉由在各CH3域之相應位置中引入半胱胺
酸(C)胺基酸而進一步改變。

6. 如請求項1之抗體，其特徵在於：

兩條重鏈之恆定重鏈域CH3之一經一個恆定重鏈域CH1
置換；且另一個恆定重鏈域CH3經一個恆定輕鏈域CL置
換。

7. 一種製備如請求項1之雙價雙特異性抗體之方法，其包
含以下步驟：

a)用以下載體轉化宿主細胞：

- 包含編碼與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈
的核酸分子的載體，
- 包含編碼與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈
的核酸分子的載體，其中恆定域CL及CH1互相置換；

b)該宿主細胞在允許該抗體分子合成之條件下培養；及

c)自該培養物回收該抗體分子。

8. 一種宿主細胞，其包含：

- 包含編碼與第一抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈
的核酸分子的載體，

- 包含編碼與第二抗原特異性結合之抗體之輕鏈及重鏈的核酸分子的載體，其中恆定域CL及CH1互相置換。

9. 一種組合物，其包含如請求項1至6中任一項之雙價雙特異性抗體。
10. 如請求項9之組合物，其係診斷組合物或醫藥組合物。
11. 如請求項9之組合物，其係醫藥組合物，包含如請求項1至6中任一項之雙價雙特異性抗體及至少一種醫藥上可接受之賦形劑。

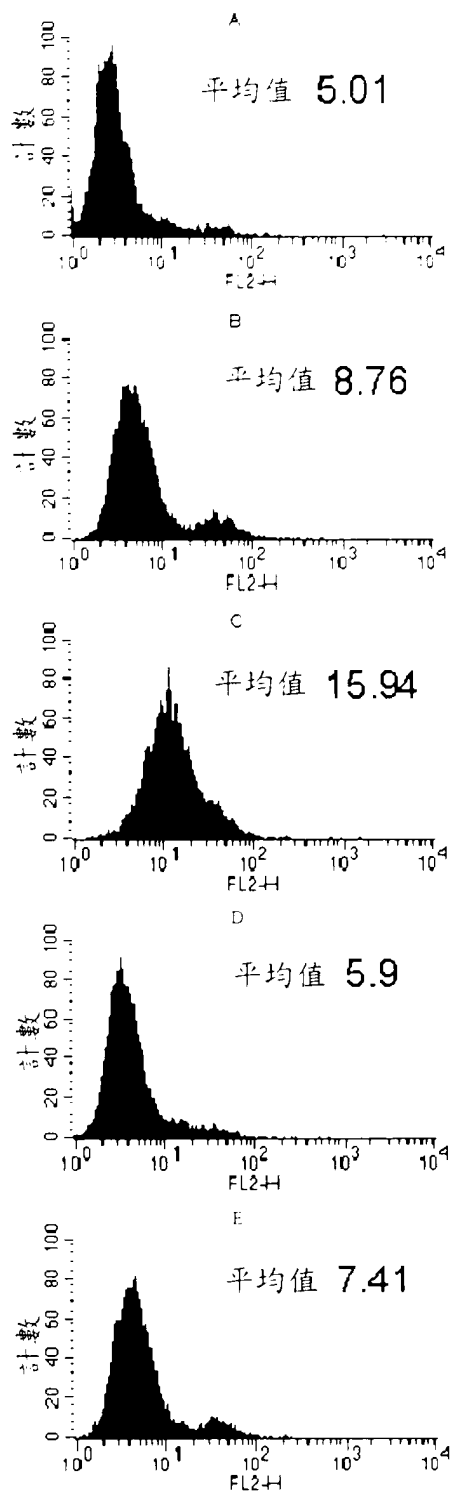


圖 15