



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104704000 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 10

(21) 申请号 201380048863. X

(22) 申请日 2013. 09. 18

(30) 优先权数据

61/703, 170 2012. 09. 19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 03. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/060480 2013. 09. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/047222 EN 2014. 03. 27

(71) 申请人 艾伯维生物医疗股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 F·A·哈丁 O·J·拉左

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 林彦

(51) Int. Cl.

C07K 16/24(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

权利要求书6页 说明书25页

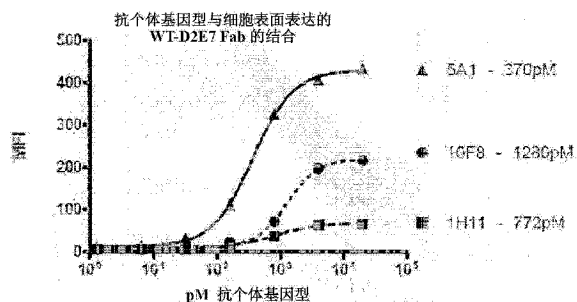
序列表6页 附图24页

(54) 发明名称

识别具有降低免疫原性的抗体的方法

(57) 摘要

本发明描述识别与参考抗体相比具有降低免疫原性的所述参考抗体的变体的方法。本发明进一步描述与参考抗 TNF- α 参考抗体相比具有降低免疫原性的所述参考抗 TNF- α 抗体的变体。



1. 一种识别具有降低免疫原性的参考抗体变体的方法,其包含以下步骤:

(a) 使宿主细胞库与特异性结合到参考抗体的抗个体基因型抗体接触,所述参考抗体是结合到靶分子的单克隆抗体,所述宿主细胞库包含各自在细胞表面上表达与所述参考抗体相差单一氨基酸点突变的抗体变体的哺乳动物宿主细胞;

(b) 识别所述宿主细胞库中表达抗体变体的细胞群体,所述抗体变体展示相对于所述参考抗体降低的与所述抗个体基因型抗体的结合;和

(c) 识别在所述群体中富集的抗体变体,

由此识别具有降低免疫原性的参考抗体变体。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中步骤 (b) 包含对所述宿主细胞库进行流式细胞计数法并从所述宿主细胞库分选所述群体。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述流式细胞计数法是荧光活化细胞分选 FACS。

4. 根据权利要求 1 到 3 中任一权利要求所述的方法,其进一步包含 (d) 测定所述抗体变体是否保留其结合到所述靶分子的能力。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中步骤 (d) 包含通过流式细胞计数法、磁性珠粒分选、BIAcore、FACS、ELISA、AlphaLisa 和 KinExA 分析所述抗体变体与所述靶分子的结合水平。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中步骤 (d) 包含在包含以下步骤的方法中通过流式细胞计数法分析所述抗体变体与所述靶分子的结合水平:(i) 使所述宿主细胞库或所述群体的细胞与荧光标记靶分子接触;(ii) 对所述细胞进行流式细胞计数法;(iii) 依照结合的荧光标记靶分子的量将所述细胞分选为子群;和 (iv) 测定所述抗体变体在表达抗体变体的细胞子群中是否富集,所述抗体变体与所述靶分子的结合实质上等于或优于所述参考抗体,由此测定所述抗体变体是否保留结合到所述靶分子的能力。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中步骤 (d) (i) 到 (d) (iii) 是在步骤 (b) 之前、同时或之后实施。

8. 根据权利要求 6 到 7 中任一权利要求所述的方法,其中步骤 (d) (iv) 是在步骤 (c) 之前、同时或之后实施。

9. 根据权利要求 1 到 8 中任一权利要求所述的方法,其进一步包含 (e) 测定与所述参考抗体的表达水平相比所述变体的表达水平。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中步骤 (e) 包含通过流式细胞计数法、磁性珠粒分选、BIAcore、FACS、ELISA、AlphaLisa 和 KinExA 分析所述抗体变体的表达水平。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中步骤 (e) 包含在包含以下步骤的方法中通过流式细胞计数法分析所述抗体变体的表达水平:(i) 使所述宿主细胞库或所述群体的细胞与荧光标记抗体接触,所述荧光标记抗体结合到在所述抗体变体与所述参考抗体之间保守的表位;(ii) 对所述细胞进行流式细胞计数法;(iii) 依照结合荧光标记抗体的量将所述细胞分选为子群;和 (iv) 测定所述抗体变体在细胞子群中是否富集,所述细胞与所述荧光标记抗体的结合程度实质上等于或优于表达所述参考抗体的细胞,由此测定所述抗体变体的表达水平是否实质上等于或优于所述参考抗体。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述表位位于所述抗体变体和所述参考抗体的恒定区中。

13. 根据权利要求 11 到 12 中任一权利要求所述的方法,其中步骤 (e) (i) 到 (e) (iii) 是在步骤 (b) 之前、同时或之后实施。

14. 根据权利要求 11 到 12 中任一权利要求所述的方法,其中步骤 (e) (iv) 是在步骤 (c) 之前、同时或之后实施。

15. 根据权利要求 1 到 14 中任一权利要求所述的方法,其中所述抗个体基因型抗体经荧光标记。

16. 根据权利要求 1 到 15 中任一权利要求所述的方法,其中步骤 (c) 包含对从所述群体获得的核酸进行大规模平行测序。

17. 根据权利要求 6 到 8 中任一权利要求所述的方法,其中步骤 (d) (iv) 包含对从所述细胞子群获得的核酸进行大规模平行测序,所述细胞表达的抗体变体与所述靶分子的结合实质上等于或优于所述参考抗体。

18. 根据权利要求 11 到 14 中任一权利要求所述的方法,其中步骤 (e) (iv) 包含对从所述细胞子群获得的核酸进行大规模平行测序,所述细胞与所述荧光标记抗体的结合水平实质上等于或优于表达所述参考抗体的细胞。

19. 根据权利要求 1 到 16 中任一权利要求所述的方法,其中所述宿主细胞库具有少于 10,000 个独特成员。

20. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述宿主细胞库具有约 50 到约 10,000 个独特成员。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述宿主细胞库具有约 1,000 到约 1,300 个独特成员。

22. 根据权利要求 1 到 21 中任一权利要求所述的方法,其中所述宿主细胞是 293c18 细胞。

23. 根据权利要求 1 到 22 中任一权利要求所述的方法,其中所述抗体变体是从包含艾伯斯坦-巴尔病毒复制起点和核抗原的载体表达,且其中抗体可变结构域是作为所述细胞表面上的全长 IgG-跨膜锚融合蛋白的一部分来展示。

24. 根据权利要求 1 到 23 中任一权利要求所述的方法,其中所述参考抗体包含两个抗体可变结构域且其中所述抗体变体包含抗体可变结构域,其中的至少一者相对于所述参考抗体中的所述可变结构域具有单点突变。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述单一氨基酸取代位于所述两个抗体可变结构域的互补决定区 CDR 中。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述两个抗体可变结构域的所述 CDR 中的约 50 到约 60 个氨基酸位置经各天然氨基酸取代。

27. 根据权利要求 1 到 26 中任一权利要求所述的方法,其中使用 NNK 诱变构筑所述宿主细胞库。

28. 一种参考抗 TNF- α 抗体或抗体的参考抗 TNF- α 结合片段的变体,所述参考抗体或结合片段包含 6 个互补决定区“CDR”,其氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:5(CDR-H1)、SEQ ID NO:6(CDR-H2)、SEQ ID NO:7(CDR-H3)、SEQ ID NO:8(CDR-L1)、SEQ ID NO:9(CDR-L2) 和 SEQ ID NO:10(CDR-H3),其中所述变体包含至少一个选自以下的取代:CDR-L1 中的 G5F、CDR-L1 中的 G5I、CDR-L1 中的 G5V、CDR-L1 中的 G5W、CDR-L1 中的 G5Y、CDR-L1 中的 R7I、CDR-L1 中

的 R7T、CDR-L1 中的 R7V、CDR-L1 中的 N8A、CDR-L1 中的 N8D、CDR-L1 中的 N8E、CDR-L1 中的 N8G、CDR-L1 中的 N8L、CDR-L1 中的 N8M、CDR-L1 中的 N8Q、CDR-L1 中的 N8R、CDR-L1 中的 N8T、CDR-L2 中的 A1I、CDR-L2 中的 A1T、CDR-L2 中的 A1V、CDR-L2 中的 T4D、CDR-L3 中的 R2G、CDR-L3 中的 N4F、CDR-L3 中的 N4M、CDR-L3 中的 N4W、CDR-L3 中的 N4Y、CDR-L3 中的 R5L、CDR-L3 中的 R5N、CDR-L3 中的 R5W、CDR-L3 中的 R5Y、CDR-L3 中的 T9Y、CDR-H1 中的 D1S、CDR-H1 中的 Y2A、CDR-H1 中的 Y2C、CDR-H1 中的 Y2K、CDR-H1 中的 Y2M、CDR-H1 中的 Y2R、CDR-H1 中的 Y2S、CDR-H1 中的 Y2V、CDR-H1 中的 H5C、CDR-H1 中的 H5D、CDR-H1 中的 H5E、CDR-H1 中的 H5S、CDR-H1 中的 H5T、CDR-H2 中的 T3A、CDR-H2 中的 T3G、CDR-H2 中的 T3N、CDR-H2 中的 W4A、CDR-H2 中的 W4F、CDR-H2 中的 W4H、CDR-H2 中的 W4L、CDR-H2 中的 W4M、CDR-H2 中的 W4V、CDR-H2 中的 N5G、CDR-H2 中的 S6D、CDR-H2 中的 S6L、CDR-H2 中的 I9K、CDR-H2 中的 D10L、CDR-H2 中的 Y11A、CDR-H2 中的 Y11C、CDR-H2 中的 Y11E、CDR-H2 中的 Y11F、CDR-H2 中的 Y11G、CDR-H2 中的 Y11H、CDR-H2 中的 Y11I、CDR-H2 中的 Y11K、CDR-H2 中的 Y11L、CDR-H2 中的 Y11M、CDR-H2 中的 Y11N、CDR-H2 中的 Y11Q、CDR-H2 中的 Y11R、CDR-H2 中的 Y11S、CDR-H2 中的 Y11V、CDR-H2 中的 Y11W、CDR-H2 中的 A12Y、CDR-H2 中的 D13N、CDR-H2 中的 V15D、CDR-H2 中的 V15L、CDR-H2 中的 V15M、CDR-H2 中的 V15Q、CDR-H2 中的 V15T、CDR-H2 中的 E16F、CDR-H2 中的 E16H、CDR-H2 中的 E16K、CDR-H2 中的 E16R、CDR-H2 中的 E16T、CDR-H2 中的 E16W、CDR-H2 中的 G17A、CDR-H2 中的 G17C、CDR-H2 中的 G17E、CDR-H2 中的 G17H、CDR-H2 中的 G17I、CDR-H2 中的 G17K、CDR-H2 中的 G17L、CDR-H2 中的 G17M、CDR-H2 中的 G17N、CDR-H2 中的 G17P、CDR-H2 中的 G17Q、CDR-H2 中的 G17R、CDR-H2 中的 G17S、CDR-H2 中的 G17T、CDR-H2 中的 G17Y、CDR-H3 中的 V1G、CDR-H3 中的 V1R、CDR-H3 中的 V1W、CDR-H3 中的 L4T、CDR-H3 中的 L4V、CDR-H3 中的 T6V、CDR-H3 中的 S9K、CDR-H3 中的 S9W、CDR-H3 中的 S9Y 和 CDR-H3 中的 D11V，

其中与所述参考抗体或结合片段的 CDR 序列相比，所述 6 个 CDR 总共具有至多 8 个氨基酸取代。

29. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段，其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代：CDR-L1 中的 G5F、CDR-L1 中的 G5I、CDR-L1 中的 G5Y、CDR-L1 中的 R7I、CDR-L1 中的 R7T、CDR-L1 中的 R7V、CDR-L1 中的 N8A、CDR-L1 中的 N8D、CDR-L1 中的 N8E、CDR-L1 中的 N8G、CDR-L1 中的 N8L、CDR-L1 中的 N8M、CDR-L1 中的 N8Q、CDR-L1 中的 N8R、CDR-L1 中的 N8T、CDR-L2 中的 A1V、CDR-L3 中的 R2G、CDR-L3 中的 N4F、CDR-L3 中的 N4M、CDR-L3 中的 N4W、CDR-L3 中的 R5L、CDR-L3 中的 R5N、CDR-L3 中的 R5W 和 CDR-L3 中的 R5Y。

30. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段，其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代：CDR-L3 中的 R2G、CDR-L3 中的 R5L、CDR-L3 中的 R5N 和 CDR-L3 中的 R5Y。

31. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段，其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代：CDR-L1 中的 G5F、CDR-L1 中的 G5I、CDR-L1 中的 G5Y、CDR-L1 中的 R7I、CDR-L3 中的 N4M 和 CDR-L3 中的 R5W。

32. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段，其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代：CDR-L1 中的 N8D 和 CDR-L1 中的 N8E。

33. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段,其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代:CDR-L1 中的 R7T、CDR-L1 中的 R7V、CDR-L1 中的 N8A、CDR-L1 中的 N8G、CDR-L1 中的 N8L、CDR-L1 中的 N8M、CDR-L1 中的 N8Q、CDR-L1 中的 N8R、CDR-L1 中的 N8T、CDR-L2 中的 A1V、CDR-L3 中的 N4F 和 CDR-L3 中的 N4W。

34. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段,其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代:CDR-L1 中的 G5F、CDR-L1 中的 G5I、CDR-L1 中的 G5V、CDR-L1 中的 G5W、CDR-L1 中的 G5Y、CDR-L1 中的 R7I、CDR-L1 中的 R7T、CDR-L1 中的 R7V、CDR-L1 中的 N8A、CDR-L1 中的 N8G、CDR-L1 中的 N8L、CDR-L1 中的 N8M、CDR-L1 中的 N8Q、CDR-L1 中的 N8R、CDR-L1 中的 N8T、CDR-L2 中的 A1I、CDR-L2 中的 A1T、CDR-L2 中的 A1V、CDR-L2 中的 T4D、CDR-L3 中的 N4F、CDR-L3 中的 N4M、CDR-L3 中的 N4W 和 CDR-L3 中的 R5W。

35. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段,其中所述 CDR 包括 CDR-L1 中的 G5V 取代。

36. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段,其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代:CDR-L1 中的 G5W、CDR-L2 中的 A1I、CDR-L2 中的 A1T 和 CDR-L2 中的 T4D。

37. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段,其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代:CDR-L1 中的 G5W、CDR-L1 中的 R7T、CDR-L1 中的 R7V、CDR-L1 中的 N8A、CDR-L1 中的 N8D、CDR-L1 中的 N8E、CDR-L1 中的 N8L、CDR-L1 中的 N8M、CDR-L1 中的 N8Q、CDR-L1 中的 N8R、CDR-L2 中的 A1I、CDR-L2 中的 A1T、CDR-L2 中的 A1V、CDR-L2 中的 T4D、CDR-L3 中的 N4F、CDR-L3 中的 N4W、CDR-L3 中的 N4Y 和 CDR-L3 中的 T9Y。

38. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段,其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代:CDR-L3 中的 N4Y 和 CDR-L3 中的 T9Y。

39. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段,其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代:CDR-H1 中的 D1S、CDR-H1 中的 Y2A、CDR-H1 中的 Y2C、CDR-H1 中的 Y2K、CDR-H1 中的 Y2M、CDR-H1 中的 Y2R、CDR-H1 中的 Y2S、CDR-H1 中的 Y2V、CDR-H1 中的 H5C、CDR-H1 中的 H5D、CDR-H1 中的 H5E、CDR-H1 中的 H5S、CDR-H1 中的 H5T、CDR-H2 中的 T3A、CDR-H2 中的 T3G、CDR-H2 中的 T3N、CDR-H2 中的 W4A、CDR-H2 中的 W4F、CDR-H2 中的 W4H、CDR-H2 中的 W4L、CDR-H2 中的 W4M、CDR-H2 中的 W4V、CDR-H2 中的 D10L、CDR-H3 中的 V1G、CDR-H3 中的 V1R、CDR-H3 中的 V1W、CDR-H3 中的 L4T、CDR-H3 中的 L4V、CDR-H3 中的 T6V、CDR-H3 中的 S9K 和 CDR-H3 中的 D11V。

40. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段,其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代:CDR-H2 中的 N5G、CDR-H2 中的 S6D、CDR-H2 中的 S6L、CDR-H2 中的 I9K、CDR-H2 中的 Y11A、CDR-H2 中的 Y11C、CDR-H2 中的 Y11E、CDR-H2 中的 Y11F、CDR-H2 中的 Y11G、CDR-H2 中的 Y11H、CDR-H2 中的 Y11I、CDR-H2 中的 Y11K、CDR-H2 中的 Y11L、CDR-H2 中的 Y11M、CDR-H2 中的 Y11N、CDR-H2 中的 Y11Q、CDR-H2 中的 Y11R、CDR-H2 中的 Y11S、CDR-H2 中的 Y11V、CDR-H2 中的 Y11W、CDR-H2 中的 A12Y、CDR-H2 中的 V15D、CDR-H2 中的 V15L、CDR-H2 中的 V15M、CDR-H2 中的 V15Q、CDR-H2 中的 V15T、CDR-H2 中的 E16F、CDR-H2 中的 E16H、CDR-H2 中的 E16K、CDR-H2 中的 E16R、CDR-H2 中的 E16T、CDR-H2 中的 E16W、CDR-H2 中的 G17A、CDR-H2 中的 G17C、CDR-H2 中的 G17E、CDR-H2 中的 G17H、CDR-H2 中的

G17I、CDR-H2 中的 G17K、CDR-H2 中的 G17L、CDR-H2 中的 G17M、CDR-H2 中的 G17N、CDR-H2 中的 G17P、CDR-H2 中的 G17Q、CDR-H2 中的 G17R、CDR-H2 中的 G17S、CDR-H2 中的 G17T、CDR-H2 中的 G17Y、CDR-H3 中的 S9W 和 CDR-H3 中的 S9Y。

41. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段,其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代:CDR-H2 中的 N5G、CDR-H2 中的 S6D、CDR-H2 中的 S6L、CDR-H2 中的 Y11M、CDR-H2 中的 Y11Q、CDR-H2 中的 A12Y、CDR-H2 中的 E16H、CDR-H2 中的 G17H、CDR-H3 中的 S9W 和 CDR-H3 中的 S9Y。

42. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段,其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代:CDR-H2 中的 I9K、CDR-H2 中的 Y11A、CDR-H2 中的 Y11C、CDR-H2 中的 Y11E、CDR-H2 中的 Y11F、CDR-H2 中的 Y11G、CDR-H2 中的 Y11H、CDR-H2 中的 Y11I、CDR-H2 中的 Y11K、CDR-H2 中的 Y11L、CDR-H2 中的 Y11N、CDR-H2 中的 Y11R、CDR-H2 中的 Y11S、CDR-H2 中的 Y11V、CDR-H2 中的 Y11W、CDR-H2 中的 V15D、CDR-H2 中的 V15L、CDR-H2 中的 V15M、CDR-H2 中的 V15Q、CDR-H2 中的 V15T、CDR-H2 中的 E16F、CDR-H2 中的 E16K、CDR-H2 中的 E16R、CDR-H2 中的 E16T、CDR-H2 中的 E16W、CDR-H2 中的 G17A、CDR-H2 中的 G17C、CDR-H2 中的 G17E、CDR-H2 中的 G17I、CDR-H2 中的 G17K、CDR-H2 中的 G17L、CDR-H2 中的 G17M、CDR-H2 中的 G17N、CDR-H2 中的 G17P、CDR-H2 中的 G17Q、CDR-H2 中的 G17R、CDR-H2 中的 G17S、CDR-H2 中的 G17T 和 CDR-H2 中的 G17Y。

43. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段,其中所述 CDR 包括至少一个选自以下的取代:CDR-H2 中的 I9K、CDR-H2 中的 Y11A、CDR-H2 中的 Y11C、CDR-H2 中的 Y11E、CDR-H2 中的 Y11F、CDR-H2 中的 Y11G、CDR-H2 中的 Y11H、CDR-H2 中的 Y11I、CDR-H2 中的 Y11K、CDR-H2 中的 Y11L、CDR-H2 中的 Y11N、CDR-H2 中的 Y11R、CDR-H2 中的 Y11S、CDR-H2 中的 Y11V、CDR-H2 中的 Y11W、CDR-H2 中的 D13N、CDR-H2 中的 V15D、CDR-H2 中的 V15L、CDR-H2 中的 V15M、CDR-H2 中的 V15Q、CDR-H2 中的 V15T、CDR-H2 中的 E16F、CDR-H2 中的 E16K、CDR-H2 中的 E16R、CDR-H2 中的 E16T、CDR-H2 中的 E16W、CDR-H2 中的 G17A、CDR-H2 中的 G17C、CDR-H2 中的 G17E、CDR-H2 中的 G17I、CDR-H2 中的 G17K、CDR-H2 中的 G17L、CDR-H2 中的 G17M、CDR-H2 中的 G17N、CDR-H2 中的 G17P、CDR-H2 中的 G17Q、CDR-H2 中的 G17R、CDR-H2 中的 G17S、CDR-H2 中的 G17T 和 CDR-H2 中的 G17Y。

44. 根据权利要求 28 所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段,其中所述 CDR 包括 CDR-H2 中的 D13N 取代。

45. 根据权利要求 28 到 44 中任一权利要求所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段,其中所述参考抗 TNF- α 抗体或参考抗 TNF- α 结合片段包含氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:2 的可变重链片段和氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:4 的可变轻链片段。

46. 一种核酸分子,其编码根据权利要求 28 到 45 中任一权利要求所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段。

47. 一种宿主细胞,其包含编码根据权利要求 28 到 45 中任一权利要求所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段的核酸分子。

48. 一种医药组合物,其包含根据权利要求 28 到 45 中任一权利要求所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段和医药上可接受的载剂。

49. 一种治疗患有免疫病症的人类患者的方法,其包含向所述人类患者投与治疗有效

量的根据权利要求 28 到 45 中任一权利要求所述的抗 TNF- α 抗体或抗 TNF- α 结合片段。

50. 根据权利要求 49 所述的方法, 其中所述免疫病症选自类风湿性关节炎、青少年型特发性关节炎、银屑病关节炎、关节粘连性脊椎炎、克罗恩氏病、斑块状银屑病和轴心型脊椎关节炎。

识别具有降低免疫原性的抗体的方法

[0001] 相关申请案交叉参考

[0002] 本申请案根据 35U. S. C. § 119(e) 主张优先权主张对 2012 年 9 月 19 日提出申请的临时申请案系列第 61/703, 170 号的优先权, 其内容的全文以引用方式并入本文中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请案含有已以 ASCII 格式通过 EFS-Web 提交且由此全文以引用方式并入本文中的序列表。在 2013 年 9 月 17 日创建的所述 ASCII 副本名为 381493-721 WO(118133)_SL.txt 且大小为 6,980 字节。

背景技术

[0005] B 细胞表位是由免疫系统的抗体鉴别的分子位点。治疗蛋白中 B 细胞表位的识别可用于设计在投与患者时不会引发免疫反应的变体。

[0006] B 细胞表位可通过通常利用丙氨酸（丙氨酸扫描）使蛋白质的氨基酸个别突变并测定各突变对抗体结合的效应来识别（翁达（Onda）等人，2011，国家科学院院刊（Proc. Natl. Acad. Sci.）108(14):5742-7）。诱变后破坏蛋白质 - 抗体结合指示突变残基是由抗体鉴别的 B 细胞表位的一部分。已发现，B 细胞表位中的单一突变甚至可消除与一组针对蛋白质的抗体的结合，并且可通过在 B 细胞表位中引入突变来降低蛋白质的免疫原性（永田（Nagata）和派斯坦（Pastan），2009，高级药物递送综述（Advanced Drug Delivery Reviews）61:977-985）。然而，此方法还耗时且劳动密集。此外，丙氨酸扫描不一定会识别可最大降低免疫原性的突变。

[0007] 因此，需要容许识别并消除 B 细胞表位的简单的非劳动密集但全面的方法。

发明内容

[0008] 本发明提供允许对要阐明的参考抗体中所关注区域内的每一氨基酸的免疫原性贡献的系统。本发明提供，参考抗体的任何、一些或所有位置处的氨基酸残基可突变成其它 19 个氨基酸中的一些或全部且评估所述突变对抗体免疫原性的效应。还可评估突变对抗体的表达水平和 / 或与靶分子的结合的效应，从而容许识别其中消除或减少免疫原性区但其保留有利性质（例如，适宜表达水平、与靶分子的结合）的抗体变体。因此，本发明提供降低抗体免疫原性的方法。所述方法是基于筛选并识别与抗个体基因型抗体的结合降低的抗体变体。与抗个体基因型抗体的结合的降低与降低的活体内免疫原性相关（例如，参见永田和派斯坦，2009，高级药物递送综述 61:977-985）。

[0009] 本发明的方法通常包含以下步骤：(a) 使宿主细胞库与特异性结合到参考抗体的抗个体基因型抗体接触，所述参考抗体是结合到靶分子的单克隆抗体，所述宿主细胞库包含各自在细胞表面上表达与参考抗体相差单一氨基酸点突变的抗体变体的哺乳动物宿主细胞；(b) 识别所述宿主细胞库中表达抗体变体的细胞群体，所述抗体变体展示相对于参考抗体降低的与抗个体基因型抗体的结合；和 (c) 识别在所述群体中富集的抗体变体，由此识别具有降低免疫原性的参考抗体变体。在某些方面中，所述方法需要对宿主细胞库进

行流式细胞计数法和使用（例如）荧光活化细胞分选（FACS）从宿主细胞库分选所述群体。

[0010] 在某些方面中，所述方法进一步包含以下步骤：测定具有降低免疫原性的抗体变体是否以实质上等于或优于参考抗体的水平结合到靶分子和 / 或以实质上等于或优于参考抗体表达水平的水平表达。在具体实施例中，结合和表达是通过流式细胞计数法、磁性珠粒分选、BIAcore、FACS、ELISA、AlphaLisa 或 KinExA 测定，并且是在识别具有降低免疫原性的抗体变体之前、同时或之后测定。

[0011] 本文所述方法已适用于抗 TNF- α 抗体 D2E7（还称作阿达木单抗（Adalimumab））。识别与 1 个、2 个或 3 个不同抗个体基因型抗体的结合降低的 D2E7 变体。本发明提供具有与 D2E7 的 CDR 序列相关的 CDR 序列的抗 TNF- α 抗体，但其具有至少一个降低与抗 Id 抗体的结合的取代。所述变体在本文中有时称作“降低免疫原性”变体。

[0012] 本发明的抗 TNF- α 抗体包含 6 个氨基酸序列对应于以下序列的 CDR：SEQ ID NO:5 (CDR-H1)、SEQ ID NO:6 (CDR-H2)、SEQ ID NO:7 (CDR-H3)、SEQ ID NO:8 (CDR-L1)、SEQ ID NO:9 (CDR-L2) 和 SEQ ID NO:10 (CDR-H3)，并且具有至少一个选自以下的取代：CDR-L1 中的 G5F、CDR-L1 中的 G5I、CDR-L1 中的 G5V、CDR-L1 中的 G5W、CDR-L1 中的 G5Y、CDR-L1 中的 R7I、CDR-L1 中的 R7T、CDR-L1 中的 R7V、CDR-L1 中的 N8A、CDR-L1 中的 N8D、CDR-L1 中的 N8E、CDR-L1 中的 N8G、CDR-L1 中的 N8L、CDR-L1 中的 N8M、CDR-L1 中的 N8Q、CDR-L1 中的 N8R、CDR-L1 中的 N8T、CDR-L2 中的 A1I、CDR-L2 中的 A1T、CDR-L2 中的 A1V、CDR-L2 中的 T4D、CDR-L3 中的 R2G、CDR-L3 中的 N4F、CDR-L3 中的 N4M、CDR-L3 中的 N4W、CDR-L3 中的 N4Y、CDR-L3 中的 R5L、CDR-L3 中的 R5N、CDR-L3 中的 R5W、CDR-L3 中的 R5Y、CDR-L3 中的 T9Y、CDR-H1 中的 D1S、CDR-H1 中的 Y2A、CDR-H1 中的 Y2C、CDR-H1 中的 Y2K、CDR-H1 中的 Y2M、CDR-H1 中的 Y2R、CDR-H1 中的 Y2S、CDR-H1 中的 Y2V、CDR-H1 中的 H5C、CDR-H1 中的 H5D、CDR-H1 中的 H5E、CDR-H1 中的 H5S、CDR-H1 中的 H5T、CDR-H2 中的 T3A、CDR-H2 中的 T3G、CDR-H2 中的 T3N、CDR-H2 中的 W4A、CDR-H2 中的 W4F、CDR-H2 中的 W4H、CDR-H2 中的 W4L、CDR-H2 中的 W4M、CDR-H2 中的 W4V、CDR-H2 中的 N5G、CDR-H2 中的 S6D、CDR-H2 中的 S6L、CDR-H2 中的 I9K、CDR-H2 中的 D10L、CDR-H2 中的 Y11A、CDR-H2 中的 Y11C、CDR-H2 中的 Y11E、CDR-H2 中的 Y11F、CDR-H2 中的 Y11G、CDR-H2 中的 Y11H、CDR-H2 中的 Y11I、CDR-H2 中的 Y11K、CDR-H2 中的 Y11L、CDR-H2 中的 Y11M、CDR-H2 中的 Y11N、CDR-H2 中的 Y11Q、CDR-H2 中的 Y11R、CDR-H2 中的 Y11S、CDR-H2 中的 Y11V、CDR-H2 中的 Y11W、CDR-H2 中的 A12Y、CDR-H2 中的 D13N、CDR-H2 中的 V15D、CDR-H2 中的 V15L、CDR-H2 中的 V15M、CDR-H2 中的 V15Q、CDR-H2 中的 V15T、CDR-H2 中的 E16F、CDR-H2 中的 E16H、CDR-H2 中的 E16K、CDR-H2 中的 E16R、CDR-H2 中的 E16T、CDR-H2 中的 E16W、CDR-H2 中的 G17A、CDR-H2 中的 G17C、CDR-H2 中的 G17E、CDR-H2 中的 G17H、CDR-H2 中的 G17I、CDR-H2 中的 G17K、CDR-H2 中的 G17L、CDR-H2 中的 G17M、CDR-H2 中的 G17N、CDR-H2 中的 G17P、CDR-H2 中的 G17Q、CDR-H2 中的 G17R、CDR-H2 中的 G17S、CDR-H2 中的 G17T、CDR-H2 中的 G17Y、CDR-H3 中的 V1G、CDR-H3 中的 V1R、CDR-H3 中的 V1W、CDR-H3 中的 L4T、CDR-H3 中的 L4V、CDR-H3 中的 T6V、CDR-H3 中的 S9K、CDR-H3 中的 S9W、CDR-H3 中的 S9Y 和 CDR-H3 中的 D11V。与阿达木单抗的 CDR 序列相比，6 个 CDR 总共可具有至多 8 个、至多 7 个、至多 6 个、至多 5 个或至多 4 个氨基酸取代。在某些方面中，与阿达木单抗的 CDR 相比，各 CDR 可具有至多 4 个、至多 3 个或至多 2 个取代。在具体实施例中，本发明的抗 TNF- α 抗体具有氨基酸取代的一或多个组合，其中重链

取代（如果存在）包含以下中的至少一者：(a)CDR-H1 中的 Y2K；(b)CDR-H1 中的 Y2M；(c)CDR-H1 中的 Y2K 和 CDR-H3 中的 T6V；(d)CDR-H1 中的 Y2K、CDR-H3 中的 V1G 和 CDR-H3 中的 T6V；(e)CDR-H3 中的 V1W；和 (f)CDR-H3 中的 V1G 和 CDR-H3 中的 T6V，并且其中轻链取代（如果存在）包含以下中的至少一者：(a)CDR-L1 中的 G5S 和 CDR-L1 中的 A11S；(b)CDR-L1 中的 R7I；(c)CDR-L1 中的 G5S、CDR-L1 中的 R7T 和 CDR-L1 中的 A11S；和 (d)CDR-L1 中的 G5S、CDR-L1 中的 R7I 和 CDR-L1 中的 A11S。在具体实施例中，本发明抗体包含选自图 22 中所述氨基酸取代的氨基酸取代的组合。

[0013] 本发明的抗 TNF- α 抗体优选与阿达木单抗抗个体基因型抗体 5A1、10F8、7A11、1H11、6A11 和 10B7 中的一者、二者、三者、四者、五者或所有六者的结合降低。

[0014] 本发明进一步涉及编码本发明的抗 TNF- α 抗体的核酸分子和包含其的宿主细胞。

[0015] 本发明进一步涉及包含本发明的抗 TNF- α 抗体的医药组合物和通过投与抗 TNF- α 抗体或含有其的医药组合物治疗患有免疫病症的人类患者的方法。在某些方面中，所治疗免疫病症是类风湿性关节炎 (RA)（包括成人的中度到严重 RA）、青少年型特发性关节炎 (JIA)（包括 4 岁和更大年龄患者的中度到严重多关节 JIA）、银屑病关节炎 (PsA)（包括成人的 PsA）、关节粘连性脊椎炎 (AS)（包括成人的 AS）、克罗恩氏病 (Crohn's disease) (CD)（包括成人的中等或严重 CD）、慢性斑块状银屑病 (Ps)（包括成人的中度到严重慢性斑块状银屑病）或轴心型脊椎关节炎 (axSpA)（包括无结构损害的 X 射线证据的成人患者的严重 axSpA）。

附图说明

[0016] 图 1A-1C：图 1A 提供合成 D2E7（阿达木单抗，HUMIRA）可变重链 (V_H) 和可变轻链 (V_L) 片段的翻译氨基酸序列。图 1B 提供 D2E7 V_H 和 V_L 片段的 CDR 氨基酸序列。图 1C 提供 D2E7 V_H 和 D2E7 V_L 片段的核苷酸序列（分别为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3）。

[0017] 图 2：提供 D2E7- V_L 中引起与 TNF- α 的中性结合和与抗 Id 5A1(a)、10F8(b) 或 7A11(c) 的降低结合的有益突变列表。给出在个别 CDR 和在卡巴特 (Kabat) 编号两种情况下的氨基酸位置。图 2 按出现顺序分别揭示 SEQ ID NO.:8-10。

[0018] 图 3A-3B：图 3A 提供 D2E7- V_H CDR-H1 和 CDR-H2 中将引起与 TNF- α 的中性结合和与抗 Id 1H11(d)、6A11(e) 或 10B7(f) 的降低结合的有益突变列表。图 3B 提供 D2E7- V_H CDR-H3 中引起与 TNF- α 的中性结合和与抗 Id 1H11(d)、6A11(e) 或 10B7(f) 的降低结合的有益突变列表。给出在个别 CDR 和在卡巴特编号两种情况下的氨基酸位置。图 3A 按出现顺序分别揭示 SEQ ID NO.:5-6。图 3B 揭示 SEQ ID NO:7。

[0019] 图 4 提供载体 pYA206 和 pCW600 中的 D2E7 的结构。

[0020] 图 5 提供人类 TNF- α 对细胞表面表达的 WT D2E7Fab 的滴定曲线。

[0021] 图 6 提供结合到细胞表面表达的 WT-D2E7Fab 的抗个体基因型（抗 Id）的滴定曲线。

[0022] 图 7A-7B：图 7A 提供经 TNF- α 染色的野生型 D2E7 的 FACS 分选概况。图 7B 提供经 TNF- α 染色的 V_H 点突变库的 FACS 分选概况。

[0023] 图 8A-8B 提供经 1H11 染色的野生型 D2E7 和 V_H 点突变库的 FACS 分选概况。

[0024] 图 9 提供沉默密码子突变 D2E7 富集比（以位置计）。给出在个别 CDR 情况下的氨基酸位置。

[0025] 图 10 提供 D2E7 子库的板图。给出在个别 CDR 和在卡巴特编号两种情况下的氨基酸位置。图 10 按出现顺序从顶部到底部，从左到右分别揭示 SEQ ID NO.:8-10 和 5-7。

[0026] 图 11 提供 D2E7 突变体子库和野生型对照的 FACS 概况。

[0027] 图 12 提供 D2E7 突变体子库和野生型对照的 FACS 概况。

[0028] 图 13A-13D 提供 D2E7 重链可变区的空间填充模型。图 A、B 和 C 分别以灰色显示轻链 CDR 1、2 和 3。图 D 以灰色显示抗 Id 抗 Id 1H11 的表位。如下文所绘示 V_H 序列 (SEQ ID NO:2) 显示加下划线的 CDR 和以粗体双下划线文本表示的对于与抗 Id 1H11 的结合重要的位置。三个 CDR 中的各者都向所述表位贡献一或多个氨基酸。

[0029] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD **DY** AM **H** WVRQAPGKGLEWVS**AIT** **W** NSGHIDYADS
VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK **V** SY **L** STASSLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:2)

[0030] 图 14A-14D 提供 D2E7 轻链可变区的空间填充模型。图 A、B 和 C 分别以灰色显示轻链 CDR 1、2 和 3。图 D 以灰色显示抗 Id 5A1 和 10F8 的表位。如下文所绘示 V_L 序列 (SEQ ID NO:4) 显示加下划线的 CDR 和以粗体双下划线文本表示的对于与抗 Id 5A1 和 10F8 的结合重要的位置。三个 CDR 中的各者都向所述表位贡献一或多个氨基酸。

[0031] DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGI **RNY** LAWYQQKPGKAPKLLIY **A** ASTLQS GVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRY **N** RAPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:4)

[0032] 图 15 提供 D2E7- V_H CDR1-2 突变体的单点 FACS 分析。

[0033] 图 16 提供 D2E7 代表性位置分析。

[0034] 图 17 提供平均 1H11 富集比（以位置计）。

[0035] 图 18 提供平均 5A1 富集比（以位置计）。

[0036] 图 19 提供平均 10F8 富集比（以位置计）。

[0037] 图 20A-20B 显示抗 TNF- α 抗体突变对与四个市售供体的血清试样中的抗阿达木单抗抗体的结合的影响。氨基酸位置是以卡巴特编号给出。VL-SS 是指 CDR-L1 中具有取代 G28S 和 A34S (卡巴特编号) 的 VL, 其对应于 CDR-L1 中的 G5S+A11S 组合。

[0038] 图 21A-21B 显示与抗阿达木单抗抗体的结合的降低最大的抗 TNF- α 变体抗体。VL-SS 是指 CDR-L1 中具有取代 G28S 和 A34S (卡巴特编号) 的 VL, 其对应于 CDR-L1 中的 G5S+A11S 组合。

[0039] 图 22 显示具有多个氨基酸取代的变体的结合数据。VL-SS 是指 CDR-L1 中具有取代 G28S 和 A34S (卡巴特编号) 的 VL, 其对应于 CDR-L1 中的 G5S+A11S 组合。

具体实施方式

[0040] 识别具有降低免疫原性的抗体的方法

[0041] 本发明进一步提供允许对要阐明的所关注抗体（参考抗体）内所关注区域中的每一氨基酸的免疫原性贡献的系统。所述方法需要对参考抗体在一或多个区（例如，CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、FR-L1、FR-L2、FR-L3、FR-H1、FR-H2、FR-H3 和 FR-H4 中的一或多者）进行全面诱变和评估突变对与抗个体基因型抗体（“抗 Id”）的结合

的效应。本文所述方法可识别上述具有降低免疫原性的抗 TNF- α 抗体变体。

[0042] 库设计和构筑:设计抗体库,其在参考抗体的所需区或结构域中的每一可能位置处含有每一可能单一氨基酸取代,用于识别突变对与抗 Id 抗体的结合的效应(良好、差或中性)。随后使用(例如)“随机化 NNK 密码子”构筑抗体变体库以产生单一氨基酸变体,其中“N”是指任何碱基(例如,A、C、G 或 T)且“K”是指 G 或 T。NNK 随机化方案可编码覆盖所有 20 种天然氨基酸的 32 个不同密码子。抗体的各位置处的氨基酸残基可突变为与相同位置处的野生型氨基酸不同的 19 种氨基酸中的任一者,从而在抗体中产生单一氨基酸点突变。最终结果是抗体变体库,其涵盖有一个残基在库中成员之间各有不同的多种抗体的群组。基于靶向突变的氨基酸数目,库的总体复杂性可介于约 50-10,000 个成员之间(例如,50、100、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500 或 10,000 个成员),介于约 1000-5000 个成员之间,或为约 1000 个成员。与库的大小和复杂性无关,本文所述方法容许同时筛选库的所有成员并同时对其进行测序。

[0043] 作为非限制性实例,为识别与参考抗体相比具有降低免疫原性的特定抗体变体,互补决定区(CDR)中的氨基酸残基是潜在突变靶。B 细胞表位的消除或减少可产生具有降低免疫原性的抗体。通常,可考虑并识别约 50 到 60 个 CDR 氨基酸位置用于突变。可设计并构筑合成 DNA 片段组,其编码野生型亲代 V_H 或 V_L 和所有可能的单一氨基酸抗体变体。可使用上述随机化 NNK 密码子产生单一氨基酸抗体变体。因此,CDR 内各位置处的氨基酸残基可突变,从而沿所选 CDR 区产生单一氨基酸点突变。最终结果是抗体变体库,其是有一个残基在库中成员之间各有不同的多种抗体的群组。在此实例中,库具有约 1000-1300 个成员,其中所选区中的 50 到 60 或 65 个 CDR 氨基酸位置中的各者经 19 种天然氨基酸中的一者取代,在任何给定位置处总共 20 种不同氨基酸(即, $50 \times 20 = 1000$; $60 \times 20 = 1200$; 或 $65 \times 20 = 1300$)。

[0044] 抗体变体的表达:在库构筑后,第二步骤是表达抗体变体库用于通过细胞表面展示来分选。可使用基于展示的方法(例如噬菌体展示、酵母展示、细菌展示和核糖体展示)表达变体库,并且优选地在哺乳动物细胞中表达以确保所表达变体进行适当折叠和翻译后修饰。

[0045] 对于哺乳动物表达来说,用于在细胞表面上系留并展示四聚体免疫球蛋白分子的跨膜结构域可为能够经由酶、化学或光解裂解移除的任何跨膜结构域。在一些实施例中,跨膜结构域侧接由裂解酶鉴别并裂解的裂解位点。举例来说,裂解酶可为脂肪酶、酯酶、磷酸酶、糖苷酶或羧肽酶。在一些实施例中,跨膜结构域包含具有核酸酶(例如核糖核酸酶(RNase)或脱氧核糖核酸酶(DNase))鉴别并裂解的序列的寡核苷酸或寡核苷酸类似物。在一些实施例中,跨膜结构域包含蛋白酶鉴别并裂解的肽或肽类似物。

[0046] 在一些实施例中,可使用 mRNA 剪接产生具有或无跨膜结构域的免疫球蛋白(例如,参见美国专利第 7,947,495 号,其全部内容都以引用方式并入本文中)。

[0047] 在其它实施例中,跨膜结构域侧接由重组酶鉴别的重组酶鉴别位点。重组酶鉴别位点的实例包括(但不限于)lox 位点、att 位点、dif 位点和 frt 位点。关于重组酶的综合参见(例如)索尔(Sauer),1994,生物技术新见(Curr. Opin. Biotech.) 5:521-527; 兰迪(Landy),1993,生物技术新见 3:699-707; 萨多夫斯基(Sadowski),1993,FASEB

7:760-767 ;和美国专利公开案第 20040115814 号。

[0048] 用于本文所述组合物和方法中的跨膜结构域可源自 I 型、II 型和 III 型膜蛋白 (例如, 参见切斯纳特 (Chesnut) 等人, 1996, 免疫学方法杂志 (J. Imm. Methods), 193:17-27; 瓦尔贝里 (Wahlberg) 等人, 1997, 细胞生物学杂志 (J. Cell Biol.), 137:555-562; 廖 (Liao), 2001, 生物技术与生物工程 (Biotech. and Bioeng.), 73:313-323 ;和美国专利第 5, 264, 357 号和第 6, 686, 168 号)。本文所述跨膜结构域可用于产生包含全长抗体 (例如, IgG) 或其片段的免疫球蛋白-跨膜结构域融合蛋白, 其系留到表达融合蛋白的细胞表面并在其上展示。

[0049] 特别可用于本文所述组合物和方法中的跨膜结构域包括 (但不限于) 血小板源生长因子受体 (PDGF-R) 跨膜结构域 (例如, 参见切斯纳特等人, 1996, 免疫学方法杂志, 193:17-27)、B7-1 跨膜结构域 (例如, 参见周 (Chou) 等人, 1999, 生物技术与生物工程, 65(2):160-169) 和无唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR) 跨膜结构域 (例如, 参见廖, 2001, 生物技术与生物工程., 73:313-323)。在一些实施例中, 细胞表面系留结构域是指 GPI 信号序列, 其引导免疫球蛋白经由糖基化磷脂酰肌醇 (GPI) 连接体锚定到细胞表面 (例如, 参见麦道夫 (Medof) 等人, 1987, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 84:2007-2011 ;和美国专利第 5, 109, 133 号和第 5, 264, 357 号)。在某些情形中, GPI 信号序列来自人类促衰变因子 (DAF)。在其它实施例中, 细胞表面跨膜结构域锚来自免疫球蛋白。

[0050] 哺乳动物展示载体可用于展示完整抗体, 但还可展示抗体片段, 例如 Fc、Fab'、F(ab)'₂ 和单链 Fv。重链和轻链二者都可借助使用内部核糖体进入位点 (IRES) 元件编码为单一转录物, 所述元件将编码可变和恒定轻链的多核苷酸序列接合到编码可变和恒定重链的多核苷酸。

[0051] 在实施例中, 哺乳动物展示载体包含融合到重链恒定区 C 末端的可移除 GPI 锚, 以有利于分离具有所需结合特性和生物活性的抗体。GPI 锚在存在时使得免疫球蛋白分子能够在哺乳动物宿主细胞表面上展示。通过用适当限制性内切核酸酶消化移除 GPI 锚使得膜结合免疫球蛋白分子可转化为可溶性免疫球蛋白分子。

[0052] 适宜哺乳动物宿主细胞的实例包括 (但不限于) HeLa 细胞 (HeLa S3 细胞, ATCC CCL2.2)、Jurkat 细胞、Raji 细胞、Daudi 细胞、人类胚肾细胞 (293-HEK ;ATCC 293c18, ATCC CRL 1573)、非洲绿猴肾细胞 (CV-1 ;Vero ;ATCC CRL 1587)、SV40 转型的猴肾细胞 (COS-1 ; ATCC CRL 1650)、犬类肾细胞 (MDCK ;ATCC CCL 34)、幼仓鼠肾细胞 (BHK-21, BHK-570 ; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314)、中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-K1 ;ATCC CCL61 ;CHO DG44 (蔡辛 (Chasin) 等人, 1986, 体细胞与分子遗传学 (Som Cell Molec Genet), 12, 555)) 和其它啮齿类动物细胞系 (例如 NS0、SP2/O、GH1 (ATCC CCL82)、H-4-II-E (ATCC CRL 1548) 和 NIH-3T3 (ATCC CRL 1658))。

[0053] 在一个实施例中, 可使用美国专利第 7, 947, 495 号 (其全部内容都以引用方式并入本文中) 中所述的方法和载体。哺乳动物细胞表面展示系统包括自复制载体和哺乳动物细胞。自复制哺乳动物载体通常包含 : (1) 自复制复制起点 ; (2) 至少一个真核启动子 ; (3) 固定或可移除跨膜结构域 ; (4) 轻链恒定区 ; (5) 重链恒定区 ; (6) 用于插入轻链和重链可变区的限制位点 ; (7) 内部核糖体进入位点 (IRES) ; 和 (8) 至少一个可选标记。另外, 载体可包含原核复制起点、转录终止子、多腺苷酸化信号和 / 或前导序列, 以及在真核宿主细胞

中表达所需的其它序列。转型后,在容许表达抗体的条件下培育宿主细胞。可从所述细胞容易地回收所得质粒(例如,参见希尔特(Hirt),1967,分子生物学杂志,26,365-369)。

[0054] 除上述技术外,酵母表面展示库可用于变体抗体库的细胞表面展示。酵母表面展示技术(由博德(Boder)和维特鲁普(Wittrup),2000,酶学方法(Methods in Enzymology)328:430-444综述,其全部内容以引用方式并入本文中)容许在酵母壁上以用于细胞分选方法分析中的标记分子可及以与其相互作用的形式表达抗体库。在一个实施例中,变体表达为与在酵母细胞壁表面上展示的酵母AGA2蛋白的全部或一部分的融合蛋白,用于根据下文所述方法进行分选。例如,参见博德等人,1997,自然生物技术15:553-557和费尔德豪斯(Feldhaus)等人,2003,自然生物技术21:163-170。

[0055] 还可使用抗体变体的噬菌体展示。抗体链可表达为与噬菌体外表面的噬菌体外壳蛋白的融合蛋白。其后,可筛选展示包装用于展示与靶结合的抗体。在一个实施例中,抗体变体以单价方式从丝状噬菌体颗粒展示为与包装于各颗粒内并在噬菌体外部表达的M13的基因III产物的融合体。抗体噬菌体展示方法已为所属领域技术人员已知且描述于(例如)以下文献中:霍根博姆(Hoogenboom),“抗体噬菌体展示技术和其应用的概述(Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications)”,分子生物学方法:抗体噬菌体展示:方法和方案(Methods in Molecular Biology:Antibody Phage Display:Methods and Protocols)(2002)178:1-37(奥布莱恩(O'Brien)和艾特肯(Aitken)编辑,人类出版社(Human Press),托托瓦,纽泽西州)。

[0056] 在另一实施例中,使用核糖体展示技术(参见黑恩斯(Hanes)等人,2000,酶学方法328:403-430;普吕克通(Pluckthun)等人,2000,高级蛋白质化学(Adv. Prot. Chem.)55:367-403;利普希(Lipovsek)和普吕克通,2004,免疫学方法杂志290:51-67)表达变体抗体。核糖体展示技术纳入活体外翻译和基因型(例如RNA)与所编码表型(例如变体抗体)之间的共价或非共价连接,以选择与抗Id抗体的结合降低的变体抗体。所述库是通过合成不同序列的合成DNA池来制得,其随后经转录以产生mRNA池。活体外翻译用于产生所展示的所编码多肽或蛋白质,并且使用固定结合配偶体选择所需结合相互作用。编码结合实体的mRNA可用于制造cDNA,其随后可经扩增且可重复所述过程以富集编码具有所需特性的变体抗体的基因群体。可通过克隆个别编码序列和DNA测序识别所选蛋白质。

[0057] 还可使用细菌展示系统表达变体抗体。例如,参见斯科拉(Skerra)等人,1988,科学240:1038-1041;贝特尔(Better)等人,1988,科学240:1041-1043;哈维(Harvey)等人,2004,美国国家科学院院刊101(25):9193-9198;和马佐尔(Mazor)等人,2007,自然生物技术25(5):563-565。

[0058] 库分选:可使用基于亲和性的富集分析来分选展示所表达抗体变体的宿主细胞。变体抗体可基于其(1)与抗Id的结合的损失,(2)任选地与靶抗原的结合的保留和(3)任选地表达水平进行分选。抗Id是针对其它抗体的可变区的抗体。出于此原因,抗Id的抗原结合位点可类似于抗Id所鉴别抗体结合的靶分子。制造抗Id的方法已为业内所知,并且通常需要使用所关注抗体(例如,参考抗体)作为免疫原以通过传统方式(例如那些下文针对参考抗体所述者)产生抗体。抗Id抗体可为具有人类或动物来源的单克隆抗体。

[0059] 适用于分选抗体变体的分析的实例包括(但不限于)荧光活化细胞分选(FACS)、磁性珠粒分选、特瑞利斯生物科学(Trellis Bioscience)公司(南旧金山,加利福尼亚

州)的 CellSpot™抗体筛选技术和 / 或基因泰克 (Genetix) 有限公司 (汉普郡,英国)的 ClonePix FL 哺乳动物细胞克隆筛选设备。

[0060] 对于 FACS 分选,将细胞与荧光标记抗体 (例如,检测变体非诱变部分中的共同表位的抗 Id 或抗体)或靶抗原以接近参考抗体亲和性的解离常数 (K_D) 的浓度一起培育,以最显著地区别参考抗体与具有类似亲和性的变体。以此方式将经染色细胞分选为一或多个子群,使得具有所关注性质的变体在相关子群中的频率增加或减小。

[0061] 可使用上述方法中的任一者执行抗 Id 结合的分选。通常,将表达抗体变体的细胞与抗 Id 一起培育并依照所结合抗 Id 的量进行分选。可从表达参考抗体的细胞获得基线结合值,并且可通过将展示与抗 Id 的结合降低的细胞分选为具有高于或低于基线值的结合抗 Id 的子群来识别所述细胞。

[0062] 任选地,还基于表达水平分选抗体变体的细胞表达。例如,在 FACS 期间结合到表达抗体变体的细胞的荧光抗体或抗原的总量与所展示变体抗体的结合亲和性和总量二者有关。所展示变体抗体的量在克隆间可变。因此,在某些情况下,可使用 FACS 使用针对免疫球蛋白的荧光标记抗体 (例如抗 IgG 抗体) (除分选抗 Id 结合外) 分选表达所关注变体抗体 (例如,经由跨膜结构域锚系留到细胞表面的全长 IgG) 的细胞。用于检测不同性质的不同抗体 (例如用于检测表达水平的抗 Id 和抗 IgG 抗体) 通常经具有不同激发和 / 或发射谱的荧光团标记,由此提供双色检测系统。

[0063] 还可针对靶结合分选细胞。通常,将需要选择保留与靶结合的抗体变体,例如与参考抗体相比与靶分子的结合大致相等或更强的变体。可通过 FACS 将经抗 Id 和靶分子共染色的库分选为两个子群:靶结合高于某一阈值的第一群体,和针对靶结合以及降低的抗个体基因型结合双重分选的第二群体。用于检测不同性质的不同分子 (例如抗 Id 和靶分子) 通常经具有不同激发和 / 或发射谱的荧光团标记,由此提供双色检测系统。

[0064] 在其它实施例中,可针对抗 Id 结合、表达水平和靶结合分选细胞。在这些实施例中,可使用利用三种可区分标记的三色检测系统。

[0065] 在使用双重或三重染色以针对抗 Id 结合和表达水平和 / 或靶结合同时分选时,通常用具有不同激发和 / 或发射谱的荧光团标记经标记靶和经标记抗体,由此提供双色或三色检测系统。还可连续分选为不同群体。举例来说,可基于靶结合和表达水平将分选为与抗 Id 的结合降低的子群的细胞分选为其它子群,基于靶结合和表达水平的分选是同时或依序进行。在其它实施例中,使用下述独立验证方法对在针对抗个体基因型抗体结合 (和表达其的宿主细胞) 分选期间识别的变体针对靶结合加以表征。

[0066] 分选群体的分析:在分选为子群后,可通过对编码变体的质粒进行测序来测定各抗体变体在各子群中的频率。本发明的优选 DNA 测序方法是“大规模平行测序”或“大规模平行焦磷酸测序” (例如,参见美国专利第 6,787,308 号、第 6,833,246 号、第 6,897,023 号、第 6,956,114 号、第 7,057,026 号、第 7,115,400、第 7,211,390 号和第 7,232,656 号)。此方法容许快速且廉价地对 DNA 进行测序且加速对具有所需活性或特性的特定抗体变体的识别。

[0067] 在测序后,可执行序列的统计分析以识别所需变体。所述分析可包括对原始 DNA 序列的计算机分析。原始 DNA 序列可翻译成蛋白质序列,与参考抗体比对并比较以识别突变。可针对类别的类型 (例如降低免疫原性,和增加、降低或中性表达,或对靶分子的亲和

性)将在各位置观察到的各氨基酸的频率制表并与参考抗体比较。具有所需活性的变体(例如那些降低免疫原性、保留表达和/或保留与靶分子的结合者)将富集于所选群体中,而具有不需要活性的变体将在所选群体中去除。

[0068] 可计算各变体的富集比(ER),其提供与其它变体和/或参考抗体相比,变体在群体中富集或缺乏程度的量度。在基于(a)表达水平高于某一阈值和(b)与抗个体基因型的低结合分选细胞(“分选”群体)的实施例,在给定位置处发现突变的次数是针对对所述位置测序的次数规范化且表示为每1000个序列的频率。随后用分选群体中的突变频率除以在所表达群体中的频率,获得富集比(ER),其指示与所表达群体相比,突变在分选群体中是否富集或缺乏,以及其富集或缺乏的程度。分选群体中富集的突变将会降低与抗个体基因型的结合,而缺乏的突变将会增加与抗个体基因型的结合。类似地,可计算根据对靶的增加、降低或类似(中性)亲和性分选的各变体的富集比。

[0069] 在仅针对与抗个体基因型的降低结合分选细胞(例如其中不同时针对表达水平分选细胞)的实施例,富集比可通过用经结合抗个体基因型低于从表达参考抗体的细胞测定的基线值的子群中的突变频率除以经结合抗个体基因型等于或高于基线值的子群中的突变频率来测定。

[0070] 个别变体的验证:可使用多种技术分析个别表达的变体多肽的结合特性以确认其在库背景中的特征。这些技术包括BIAcore、FACS、ELISA、AlphaLisa和KinExA。BIAcore分析使用表面等离子体共振(SPR)(一种容许检测未标记相互作用物的光学现象)测定结合且其可用于测定个别抗体变体的结合亲和性(例如,美国专利申请案第2008/0274114号;和车(Che)等人,2009,制药与生物医学分析杂志(J. Pharm. and Biomed. Analysis)50(2):183-188)。可使用AlphaLISA测定个别变体与靶分子的结合亲和性(例如,参见乌尔曼(Ullman)等人,1996,临床化学(Clinical Chemistry),42(9):1518-1526;和秀治(Hideharu)等人,2007,癌症科学(Cancer Science)98(8):1275-1280)。KinExA(动力学排除分析)测量受体、配体(L)和LR复合物的混合物中的未复合受体(R)分子的浓度。通过将溶液相混合物暴露于固相固定的L极短时间来测量未复合R的浓度。溶液相混合物与固相固定L之间的“接触时间”保持足够短以使LR复合物不显著解离。在以动力学方式排除LR复合物显著解离的可能性时,仅未复合(“游离”)R可结合到固相。结合到固相的游离R的量(通过次要标记的荧光发射测量)与溶液相试样中的游离R的浓度成正比。还可使用KinExA测定个别变体与靶分子的结合亲和性(例如,参见美国专利申请案第2008/0274114号;和达林(Darling)等人,2004,分析与药物研发技术(ASSAY and Drug Development Technologies)2:647-657)。

[0071] 变体抗TNF- α 抗体

[0072] 上述方法已适于抗TNF- α 抗体D2E7(还称作阿达木单抗),以识别与D2E7相比对抗个体基因型抗体的亲和性降低的变体。展示对抗个体基因型抗体的亲和性降低的变体称作“降低免疫原性”变体。

[0073] 在某些方面中,本发明提供与D2E7相比免疫原性降低的抗TNF- α 抗体。与D2E7的CDR相比,本发明的抗TNF- α 抗体通常在CDR中具有一或多个氨基酸取代,其中与D2E7相比,所述至少一或多个取代降低抗体免疫原性。在某些实施例中,由于消除或减少一或多个B细胞表位而降低免疫原性。

[0074] D2E7 的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别表示为 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4, 并且分别由 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 编码。重链和轻链可变区的氨基酸序列还绘示于图 1A 中。D2E7 的 CDR 的氨基酸序列和其相应识别符呈现于图 1B 中。如美国专利第 6,090,382 号中公开的 D2E7 的重链和轻链可变区的核苷酸序列显示于图 1C 中。编码 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的任何其它核苷酸序列可代替所公开序列用于本发明的组合物和方法中。

[0075] 在某些方面中,本发明的具有降低免疫原性的抗 TNF- α 抗体相对于 D2E7 具有相当或改良的与 TNF- α 的结合。可通过(例如)章节 6.1 中所述的验证方法测试亲和性。

[0076] 产生具有消除或减少的 B 细胞表位且具有与 D2E7 相比较低的免疫原性的抗 TNF- α 抗体的实例性取代列示于图 2 和 3(即图 3A-3B)中。适宜取代包括 CDR-L1 中的 G5F、CDR-L1 中的 G5I、CDR-L1 中的 G5V、CDR-L1 中的 G5W、CDR-L1 中的 G5Y、CDR-L1 中的 R7I、CDR-L1 中的 R7T、CDR-L1 中的 R7V、CDR-L1 中的 N8A、CDR-L1 中的 N8D、CDR-L1 中的 N8E、CDR-L1 中的 N8L、CDR-L1 中的 N8M、CDR-L1 中的 N8Q、CDR-L1 中的 N8R、CDR-L2 中的 A1I、CDR-L2 中的 A1T、CDR-L2 中的 A1V、CDR-L2 中的 T4D、CDR-L3 中的 R2G、CDR-L3 中的 N4F、CDR-L3 中的 N4M、CDR-L3 中的 N4W、CDR-L3 中的 N4Y、CDR-L3 中的 R5L、CDR-L3 中的 R5N、CDR-L3 中的 R5W、CDR-L3 中的 R5Y、CDR-H1 中的 D1S、CDR-H1 中的 Y2A、CDR-H1 中的 Y2C、CDR-H1 中的 Y2K、CDR-H1 中的 Y2M、CDR-H1 中的 Y2R、CDR-H1 中的 Y2S、CDR-H1 中的 Y2V、CDR-H1 中的 H5C、CDR-H1 中的 H5D、CDR-H1 中的 H5E、CDR-H1 中的 H5S、CDR-H1 中的 H5T、CDR-H2 中的 T3A、CDR-H2 中的 T3G、CDR-H2 中的 W4A、CDR-H2 中的 W4F、CDR-H2 中的 W4H、CDR-H2 中的 W4L、CDR-H2 中的 W4M、CDR-H2 中的 W4V、CDR-H2 中的 N5G、CDR-H2 中的 S6D、CDR-H2 中的 S6L、CDR-H2 中的 I9K、CDR-H2 中的 D10L、CDR-H2 中的 Y11A、CDR-H2 中的 Y11C、CDR-H2 中的 Y11E、CDR-H2 中的 Y11F、CDR-H2 中的 Y11G、CDR-H2 中的 Y11H、CDR-H2 中的 Y11I、CDR-H2 中的 Y11K、CDR-H2 中的 Y11L、CDR-H2 中的 Y11M、CDR-H2 中的 Y11N、CDR-H2 中的 Y11Q、CDR-H2 中的 Y11R、CDR-H2 中的 Y11S、CDR-H2 中的 Y11V、CDR-H2 中的 Y11W、CDR-H2 中的 A12Y、CDR-H2 中的 D13N、CDR-H2 中的 V15D、CDR-H2 中的 V15L、CDR-H2 中的 V15M、CDR-H2 中的 V15Q、CDR-H2 中的 V15T、CDR-H2 中的 E16F、CDR-H2 中的 E16H、CDR-H2 中的 E16K、CDR-H2 中的 E16T、CDR-H2 中的 E16W、CDR-H2 中的 G17A、CDR-H2 中的 G17C、CDR-H2 中的 G17E、CDR-H2 中的 G17H、CDR-H2 中的 G17I、CDR-H2 中的 G17K、CDR-H2 中的 G17L、CDR-H2 中的 G17M、CDR-H2 中的 G17P、CDR-H2 中的 G17Q、CDR-H2 中的 G17R、CDR-H2 中的 G17S、CDR-H2 中的 G17T、CDR-H2 中的 G17Y、CDR-H3 中的 V1G、CDR-H3 中的 V1R、CDR-H3 中的 V1W、CDR-H3 中的 L4T、CDR-H3 中的 L4V、CDR-H3 中的 T6V、CDR-H3 中的 S9K、CDR-H3 中的 S9W、CDR-H3 中的 S9Y 和 CDR-H3 中的 D11V。

[0077] 本发明的抗 TNF- α 抗体可单独或组合地包含图 2 和 3 中所列示取代中的任一者以及任选地一或多个额外取代。产生具有消除或减少的 T 细胞表位且与 D2E7 相比具有较低免疫原性的抗体的实例性 CDR-L1 取代列示于美国公开案第 2010/0266613A1 号和 PCT 国际公开案第 2010/121140 号的表 11 中,所述案件各自的全部内容都以引用方式并入。CDR-L1 中的适宜取代和取代组合包括 R7Q ;A11S ;R7Q+A11S ;N8T ;N8T+A11S ;I6T ;A11G ;I6T+A11G ;Q4G ;Q4G+A11S ;Q4G+A11G ;Q4H ;Q4H+A11S ;Q4R ;Q4R+A11S ;G5S ;G5S+A11S ;N8S+A11S ;I6T+A11S ;和 N8T+A11G。

[0078] 产生与 D2E7 相比对 TNF- α 的亲和性增加的抗体的实例性取代列示于美国公开案

第 2010/0266613A1 号和 PCT 国际公开案第 2010/121140 号的表 12 和 25 中。适宜取代包括 CDR-L2 中的 S3K、CDR-L2 中的 S3R、CDR-L2 中的 S3N、CDR-L2 中的 T4H、CDR-L2 中的 T4Q、CDR-L2 中的 T4V、CDR-L2 中的 T4F、CDR-L2 中的 T4W、CDR-L2 中的 T4Y；CDR-L2 中的 L5R、CDR-L2 中的 L5K、CDR-L2 中的 Q6K、CDR-L2 中的 Q6R、CDR-H1 中的 D1G、CDR-H1 中的 Y2H、CDR-H1 中的 A3G 和 CDR-H2 中的 T3N。

[0079] 本发明抗体可包含美国公开案第 2010/0266613A1 号和 PCT 国际公开案第 2010/121140 号的表 11-25 中所述的一或多个取代。

[0080] 本发明的抗 TNF- α 抗体可为抗体的单克隆、遗传改造和以其它方式经修饰的形式,包括(但不限于)嵌合抗体、人类化抗体、异源偶联物抗体(例如,双特异性抗体、双价抗体、三价抗体和四价抗体);和抗体的抗原结合片段,包括(例如)Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG 和 scFv 片段。此外,除非另外指明,否则术语“单克隆抗体”(mAb)打算包括能够特异性结合到蛋白质的完整分子以及抗体片段(例如,Fab、Fab'、F(ab')₂和 Fv 片段)二者。

[0081] Fab 和 F(ab')₂片段缺少完整抗体的 Fc 段,其比完整抗体更快地从动物或植物的循环中清除,并且可具有更少非特异性组织结合(瓦尔(Wahl)等人,1983,核医学杂志(J. Nucl. Med.)24:316)。Fab 片段含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(C_H1)。Fab' 片段与 Fab 片段的不同之处在于重链 C_H1 结构域的羧基末端增加了数个残基,包括一或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。F(ab')₂片段是通过裂解 F(ab')₂胃蛋白酶消化产物的铰链半胱氨酸处的二硫键来产生。“Fv”片段是含有完整靶鉴别和结合位点的最小抗体片段。此区是由一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域以紧密非共价缔合组成(V_H-V_L二聚物)。“单链 Fv”或“scFv”抗体片段在单一多肽链中包含抗体的 V_H和 V_L结构域,并且也在本发明的范围内。本发明涵盖的其它抗体包括“单一结构域抗体”,其是由对靶分子展现足够亲和性的单一 V_H或 V_L结构域组成。在具体实施例中,单一结构域抗体是骆驼科抗体(例如,参见里希曼(Riechmann),1999,免疫学方法杂志(Journal of Immunological Methods)231:25-38)。

[0082] 本发明的抗 TNF- α 抗体优选是单克隆抗体。本文所用术语“单克隆抗体”并不限于经由杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指源自单一克隆(包括任何真核、原核或噬菌体克隆)的抗体而并非是指产生其的方法。可结合本发明使用的单克隆抗体可使用业内已知的多种技术(包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合)制备。本发明抗体包括嵌合、灵长类化、人类化或人类抗体。

[0083] 本发明的抗 TNF- α 抗体可为双特异性抗体。双特异性抗体是对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体,通常为人类或人类化抗体。在本发明中,结合特异性中的一者可针对任何两种抗原,例如细胞表面蛋白质、受体、受体亚单位、组织特异性抗原、病毒源蛋白质、病毒编码的包膜蛋白、细菌源蛋白质或细菌表面蛋白质等。

[0084] 本发明的抗 TNF- α 抗体包括衍生抗体。举例来说,但并无限制,衍生抗体通常通过以下方式来修饰:糖基化、乙酰基化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团衍生、蛋白水解裂解、连接到细胞配体或其它蛋白质。多种化学修饰中的任一者可通过已知技术来实施,包括(但不限于)特定化学裂解、乙酰基化、甲酰基化、衣霉素(tunicamycin)的代谢合成等。另外,衍生物可使用(例如)ambrx 技术含有一或多个非天然氨基酸(例如,参见沃尔夫森(Wolfson),2006,化学生物学杂志(Chem.

Biol.) 13(10):1011-2)。

[0085] 在本发明的又一实施例中,抗 TNF- α 抗体可为序列相对于相应野生型序列已经修饰以改变至少一个恒定区调介的生物效应子功能的抗体。举例来说,在一些实施例中,本发明的参考抗体和 / 或抗体变体可经修饰以相对于未经修饰的抗体降低至少一个恒定区调介的生物效应子功能,例如降低与 Fc 受体 (Fc γ R) 的结合。可通过使抗体的免疫球蛋白恒定区区段在 Fc γ R 相互作用所需的特定区域突变来降低 Fc γ R 结合 (例如,参见坎菲尔德 (Canfield) 和莫里森 (Morrison), 1991, 实验医学杂志 (J. Exp. Med.) 173:1483-1491 ; 和伦德 (Lund) 等人, 1991, 免疫学杂志 147:2657-2662)。降低抗体的 Fc γ R 结合能力还可降低其它依赖于 Fc γ R 相互作用的效应子功能,例如调理作用、吞噬作用和抗原依赖性细胞毒性 (“ADCC”)。

[0086] 在本发明的其它实施例中,参考抗体和 / 或抗体变体可经修饰以相对于未经修饰的抗体获得或改良至少一个恒定区调介的生物效应子功能,以 (例如) 增强 Fc γ R 相互作用 (例如,参见 US 2006/0134709)。举例来说,本发明的参考抗体和 / 或抗体变体可具有以大于相应野生型恒定区的亲和性结合 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 / 或 Fc γ RIIIA 的恒定区。

[0087] 因此,本发明的抗 TNF- α 抗体可改变生物活性,其引起增加或降低调理作用、吞噬作用或 ADCC。所述改变为业内已知。举例来说,抗体中降低 ADCC 活性的修饰描述于美国专利第 5,834,597 号中。实例性 ADCC 降低的变体对应于“突变体 3”(显示于美国专利第 5,834,597 号的图 4 中),其中缺失残基 236 且残基 234、235 和 237 (使用 EU 编号) 经丙氨酸取代。

[0088] 在一些实施例中,本发明的抗 TNF- α 抗体具有低水平的岩藻糖或缺少岩藻糖。缺少岩藻糖的抗体与增强的 ADCC 活性相关,尤其在低抗体剂量时。参见希尔兹 (Shields) 等人, 2002, 生物化学杂志 277:26733-26740 ; 新川 (Shinkawa) 等人, 2003, 生物化学杂志 278:3466-73。制备无岩藻糖抗体的方法包括在大鼠骨髓瘤 YB2/0 细胞中生长 (ATCC CRL 1662)。YB2/0 细胞表达低水平的 FUT8mRNA,其编码 α -1,6-岩藻糖基转移酶,即多肽岩藻糖基化所需的酶。

[0089] 在又一方面中,抗 TNF- α 抗体可为已通过 (例如) 使免疫球蛋白恒定区区段中参与 FcRn 相互作用的特定区域突变来修饰,以增加或降低其与胎儿 Fc 受体 (FcRn) 的结合亲和性的抗体 (例如,参见 WO 2005/123780)。在特定实施例中, IgG 类的参考抗体和 / 或抗体变体经突变,使得重链恒定区中氨基酸残基 250、314 和 428 中的至少一者单独或以其任何组合 (例如在位置 250 和 428,或在位置 250 和 314,或在位置 314 和 428,或在位置 250、314 和 428) 经取代,且位置 250 和 428 为特定组合。对于位置 250,取代氨基酸残基可为除苏氨酸外的任何氨基酸残基,包括 (但不限于) 丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。对于位置 314,取代氨基酸残基可为除亮氨酸外的任何氨基酸残基,包括 (但不限于) 丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。对于位置 428,取代氨基酸残基可为除甲硫氨酸外的任何氨基酸残基,包括 (但不限于) 丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。

酸、色氨酸或酪氨酸。所述突变增加抗体与 FcRn 的结合,此防止抗体降解并延长其半衰期。

[0090] 在其它方面中,参考抗体和 / 或抗体变体具有一或多个氨基酸插入其一或多个超变区中,如(例如)以下文献中所述:荣格(Jung)和普鲁克森(Plückthun),1997,蛋白质工程 10:9, 959-966;矢崎(Yazaki)等人,2004,蛋白质工程设计与选择(Protein Eng. Des Sel.) 17(5):481-9. Epub 2004 年 8 月 17 日;和美国专利申请案第 2007/0280931 号。

[0091] 本发明的抗 TNF- α 抗体包括通过(例如)将任何类型的分子共价附接到抗体,使得共价附接不干扰与 TNF- α 的结合来修饰的抗体偶联物。

[0092] 在某些方面中,本发明的抗 TNF- α 抗体可偶联到效应子部分或标记。如本文所用术语“效应子部分”包括(例如)抗肿瘤剂、药物、毒素、生物活性蛋白质(例如酶)、其它抗体或抗体片段、合成或天然聚合物、核酸(例如,DNA 和 RNA)、放射性核素(具体来说放射性碘化物)、放射性同位素、螯合金属、纳米粒子和报告基团(例如荧光化合物或可通过 NMR 或 ESR 光谱检测的化合物)。

[0093] 在一个实例中,抗 TNF- α 抗体可偶联到效应子部分(例如细胞毒性剂、放射性核素或药物部分),以修改给定生物反应。效应子部分可为蛋白质或多肽,例如(但不限于)毒素(例如相思豆毒素、蓖麻毒素 A、假单胞菌(Pseudomonas) 外毒素或白喉(Diphtheria) 毒素)、信号传导分子(例如 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板源生长因子或组织纤溶酶原活化剂)、血栓形成剂或抗血管生成剂(例如,血管抑素(angiotatin)或内皮抑素(endostatin))或生物反应调节剂(例如细胞因子或生长因子(例如,白介素-1(IL-1)、白介素-2(IL-2)、白介素-6(IL-6)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或神经生长因子(NGF)))。

[0094] 在另一实例中,效应子部分可为细胞毒素或细胞毒性剂。细胞毒素和细胞毒性剂的实例包括紫杉醇(taxol)、细胞松弛素 B(cytochalasin B)、短杆菌肽 D(gramicidin D)、溴化乙锭、依米丁(emetine)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替托泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicine)、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羟基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光辉霉素(mithramycin)、放线菌素 D、1-脱氢睾酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、四卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)和嘌呤霉素(puromycin)和其类似物或同系物。

[0095] 效应子部分还包括(但不限于)抗代谢物(例如氨甲蝶呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶氨烯咪胺(decarbazine))、烷基化剂(例如,氮芥(mechlorethamine)、塞替哌(thiotepa) 氯芥苯丁酸(chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)和洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露醇、链脲霉素(streptozotocin)、丝裂霉素 C5 和顺二氯二氨铂(II)(DDP 顺铂)、蒽环抗生素(anthracycline)(例如,柔红霉素(先前称作道诺霉素(daunomycin))和多柔比星)、抗生素(例如,放线菌素 D(dactinomycin)(先前称作放线菌素(actinomycin))、博来霉素(bleomycin)、光辉霉素、氨茴霉素(anthracycline)(AMC)、卡奇霉素(calicheamicin)或多卡米星(duocarmycin))和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。

[0096] 其它效应子部分可包括放射性核素（例如但不限于 ^{111}In 和 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、铋 213 、铜 252 、铱 192 和钨 188 / 铼 188 ）和药物（例如但不限于烷基磷酸胆碱、拓扑异构酶 I 抑制剂、类紫杉醇和苏拉明（suramin））。

[0097] 偶联所述效应子部分与抗体的技术已为业内所熟知（例如，参见赫尔斯特伦（Hellstrom）等人，受控药物递送（Controlled Drug Delivery），第 2 版，第 623-53 页（鲁滨逊（Robinson）等人编辑，1987））；索普（Thorpe）等人，1982，免疫学综述（Immunol. Rev.）62:119-58 和杜伯威克（Dubowchik）等人，1999，药理学和疗法（Pharmacology and Therapeutics）83:67-123）。

[0098] 在某些方面中，抗 TNF- α 抗体偶联到小分子毒素。在某些实例性实施例中，本发明的抗 TNF- α 抗体偶联至多拉斯他汀（dolastatin）或多拉斯他汀肽类似物或衍生物，例如奥里斯他汀（auristatin）（美国专利第 5,635,483 号和第 5,780,588 号）。多拉斯他汀或奥里斯他汀药物部分可经由其 N（氨基）末端或 C（羧基）末端附接到抗体（WO 02/088172）。实例性奥里斯他汀实施例包括 N-末端连接的单甲基奥里斯他汀药物部分 DE 和 DF，如美国专利第 7,498,298 号（其全部内容都以引用方式并入本文中）中所揭示（例如，揭示制备单甲基缬氨酸化合物（例如偶联到连接体的 MMAE 和 MMAF）的连接体和方法）。

[0099] 在其它实例性实施例中，小分子毒素包括（但不限于）卡奇霉素、美坦生（maytansine）（美国专利第 5,208,020 号）、单端孢霉烯（trichothene）和 CC1065。在本发明的一个实施例中，抗体偶联到一或多个美坦生分子（例如，每个抗体分子约 1 到约 10 个美坦生分子）。美坦生可（例如）转化为 May-SS-Me，其可还原为 May-SH3 并与抗体反应（沙里（Chari）等人，1992，癌症研究 52:127-131）以产生类美坦生（maytansinoid）-抗体或类美坦生-Fc 融合偶联物。还可使用的卡奇霉素的结构类似物包括（但不限于） γ_1^1 、 γ_3^1 、N-乙酰基- γ_1^1 、PSAG 和 θ_1^1 （欣曼（Hinman）等人，1993，癌症研究 53:3336-3342；洛德（Lode）等人，1998，癌症研究 58:2925-2928；美国专利第 5,714,586 号；美国专利第 5,712,374 号；美国专利第 5,264,586 号；美国专利第 5,773,001 号）。

[0100] 本发明抗体还可偶联到用于靶向递送的脂质体（例如，参见帕克（Park）等人，1997，药理学进展（Adv. Pharmacol.）40:399-435；马蒂（Marty）和施文德纳（Schwendener），2004，分子医学方法（Methods in Molecular Medicine）109:389-401）。

[0101] 词语“标记”在本文中使用是指可直接或间接偶联到本发明的抗 TNF- α 抗体的可检测化合物或组合物。标记自身可检测（例如，放射性同位素标记或荧光标记），或在酶标记情形中可催化可检测的底物化合物或组合物的化学变化。有用的荧光部分包括（但不限于）荧光素、荧光素异硫氰酸酯、罗丹明（rhodamine）、5-二甲基氨基-1-萘磺酰氯、藻红素和诸如此类。有用的酶标记包括（但不限于）碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶和诸如此类。

[0102] 核酸和表达系统

[0103] 本发明的抗 TNF- α 抗体可通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链基因来制备。为了重组表达抗体，用一或多个携带编码抗体的免疫球蛋白轻链和重链的 DNA 片段的重组表达载体转染宿主细胞，使得在所述宿主细胞中表达所述轻链和重链并任选地分泌到培养宿主细胞的培养基中，可从所述培养基回收抗体。使用标准重组 DNA 方法来获得抗体重链和轻链基因，将这些基因纳入重组表达载体中并将所述载体引入宿主细胞中，

例如那些描述于以下文献中者：分子克隆：实验室手册 (Molecular Cloning ;A Laboratory Manual), 第 2 版 (桑布鲁克 (Sambrook)、弗里奇 (Fritsch) 和马尼亚蒂斯 (Maniatis) (编辑), 冷泉港, 纽约, 1989), 分子生物学现行规范 (Current Protocols in Molecular Biology) (奥苏贝尔, F.M. (Ausubel, F.M.) 等人编辑, 格林出版联合有限公司 (Greene Publishing Associates), 1989) 和美国专利第 4,816,397 号。

[0104] 可在原核或真核宿主细胞中表达本发明抗体。在某些实施例中, 抗体的表达是在真核细胞 (例如, 哺乳动物宿主细胞) 中进行, 以优化经适当折叠的免疫活性抗体的分泌。用于表达本发明重组抗体的实例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞) (包括 DHFR⁻CHO 细胞, 描述于乌尔劳布 (Urlaub) 和蔡辛, 1980, 美国国家科学院院刊 77:4216-4220 中, 其与 DHFR 可选标记一起使用, 例如, 如考夫曼 (Kaufman) 和夏普 (Sharp), 1982, 分子生物学 (Mol. Biol.) 159:601-621 中所述)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞、293 细胞和 SP2/0 细胞。在将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞中时, 通过将宿主细胞培养足以使抗体可在宿主细胞中表达或使抗体可分泌到宿主细胞生长的培养基中的时间来产生抗体。

[0105] 还可使用宿主细胞来产生完整抗体的部分, 例如 Fab 片段或 scFv 分子。还可使用重组 DNA 技术移除不必结合到 TNF- α 的编码轻链和重链中的一者或二者的一些或所有 DNA。本发明抗体还涵盖从所述经截短 DNA 分子表达的分子。

[0106] 对于本发明的抗 TNF- α 抗体的重组表达, 可用本发明的两个表达载体共转染宿主细胞, 第一载体编码源自重链的多肽且第二载体编码源自轻链的多肽。通常, 两个载体各自含有单独可选标记。或者, 可使用编码重链和轻链两种多肽的单一载体。

[0107] 在产生编码 D2E7 或具有与 D2E7 的 CDR 序列相关的 CDR 序列的抗 TNF- α 抗体的一或多个部分的核酸后, 可立即向编码序列中引入其它改变或突变, 以 (例如) 产生编码具有不同 CDR 序列的抗体、与 Fc 受体的亲和性降低的抗体或不同亚类的抗体的核酸。

[0108] 在通过重组表达产生本发明的抗 TNF- α 抗体后, 可立即对其进行回收并通过业内已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法纯化, 例如色谱 (例如, 离子交换色谱、亲和色谱, 尤其在蛋白质 A 或蛋白质 G 选择后用于 TNF- α 的亲和色谱, 和尺寸柱色谱)、离心、差异溶解性, 或用于纯化蛋白质的任何其它标准技术。此外, 本发明的抗 TNF- α 抗体或其片段可与本文所述或以其它方式为业内已知的异源多肽序列融合, 以促进纯化。

[0109] 如果需要, 抗 TNF- α 抗体可在分离后通过 (例如) 高效液相色谱 (例如, 参见费舍尔 (Fisher), 生物化学与分子生物学实验室技术 (Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology) (沃克 (Work) 和伯登 (Burdon) 编辑, 爱思唯尔 (Elsevier), 1980)) 或通过在 SuperdexTM 75 柱上的凝胶过滤色谱 (法玛西亚生物技术 AB (Pharmacia Biotech AB), 乌普萨拉, 瑞典) 进行进一步纯化。

[0110] 治疗用途

[0111] 本发明的 TNF- α 抗体可用于治疗各种免疫和自体免疫病状以及炎症疾病的病症或症状。

[0112] 可用本发明的抗 TNF- α 抗体治疗的 TNF- α 相关病状和疾病包括 (但不限于) 以下：

[0113] ■ 急性和慢性免疫和自体免疫病状, 例如全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、甲状

腺炎、移植物抗宿主病、硬皮病、糖尿病、葛雷夫斯氏病 (Grave's disease) 和诸如此类；

[0114] ■ 感染, 包括 (但不限于) 败血症综合症、恶病质、因急性或慢性细菌感染引起的循环衰竭和休克、急性和慢性寄生虫和 / 或细菌、病毒或真菌传染病, 例如 AIDS (包括后遗症, 例如恶病质、自体免疫病症、AIDS 痴呆综合症和感染)；

[0115] ■ 炎症疾病, 例如慢性炎症病状和血管炎症病状, 包括慢性炎症病状 (例如结节病、慢性炎症肠病、溃疡性结肠炎和克罗恩氏病状) 和血管炎症病状 (例如但不限于, 弥漫性血管内凝血、动脉粥样硬化和川崎氏病状 (Kawasaki's pathology))；

[0116] ■ 神经变性疾病, 包括 (但不限于) 脱髓鞘疾病, 例如多发性硬化症和急性横贯性脊髓炎；锥体外和小脑病症, 例如皮层脊髓系统损伤；基底神经节病症或小脑病症；多动运动障碍, 例如亨廷顿氏舞蹈症 (Huntington's Chorea) 和老年舞蹈症 (senile chorea)、药物诱导的运动障碍, 例如那些由阻断 CNS、多巴胺 (dopamine) 受体的药物诱导者；运动机能减退性运动障碍, 例如帕金森氏病 (Parkinson's disease)；进行性上眼神经核麻痹症、小脑和脊髓小脑病症, 例如小脑的结构损伤；脊髓小脑变性 (脊髓性共济失调、弗里德赖希共济失调症 (Friedreich's ataxia)、小脑皮层变性、多系统变性 (门塞尔 (Mencel)、德热里纳-托马斯 (Dejerine-Thomas)、史-德雷格尔 (Shi-Drager) 和马查多-约瑟 (Machado-Joseph))；和全身性病症 (雷夫苏姆疾病 (Refsum's disease)、无 β 脂蛋白血症、共济失调症、血管扩张症和线粒体多系统病症)；脱髓鞘病症, 例如多发性硬化症、急性横贯性脊髓炎；运动单元病症, 例如神经性肌萎缩 (前角细胞变性, 例如肌萎缩性侧索硬化、幼儿脊髓性肌萎缩和青少年脊髓性肌萎缩)；阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease)；中年唐氏综合症 (Down's Syndrome)；弥漫性路易体疾病 (Diffuse Lewy body disease)；路易体型老年性痴呆、韦尼克-科尔萨科夫综合症 (Wernicke-Korsakoff syndrome)；长期酗酒；克罗伊茨费尔特-雅各布病 (Creutzfeldt-Jakob disease)；亚急性硬化性泛脑炎、哈勒沃登-施帕茨病 (Hallerrorden-Spatz disease) 和拳击员痴呆 (Dementia pugilistica) 或其任何子集；

[0117] ■ 恶性病状, 包括分泌 TNF- α 的肿瘤或涉及 TNF- α 的其它恶性肿瘤, 例如但不限于白血病 (急性、慢性髓细胞性、慢性淋巴细胞性和 / 或骨髓发育不良综合症)；淋巴瘤 (何杰金氏 (Hodgkin's) 和非何杰金氏 (non-Hodgkin's) 淋巴瘤, 例如恶性淋巴瘤 (伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma) 或蕈样真菌病 (Mycosis fungoide)), 和

[0118] ■ 酒精诱导的肝炎。

[0119] 在某些具体实施例中, 本发明抗体用于治疗任何批准使用阿达木单抗的适应症, 例如类风湿性关节炎 (RA) (包括成人的中度到严重 RA)、多关节青少年型特发性关节炎 (JIA) (包括 4 岁和更大年龄患者的中度到严重 JIA)、银屑病关节炎 (PsA) (包括成人的 PsA)、关节粘连性脊椎炎 (AS) (包括成人的 AS)、克罗恩氏病 (CD) (包括成人的中等或严重 CD)、银屑病 (例如慢性斑块状银屑病 (Ps) (包括成人的中度到严重慢性斑块状银屑病) 和轴心型脊椎关节炎 (axSpA) (包括无结构损害的 X 射线证据的成人患者的严重 axSpA)。

[0120] 因此, 本发明提供治疗有需要的患者的任何上述疾病的方法, 所述方法包含: 向患者投与本发明的抗 TNF- α 抗体。任选地, 在例如 1 天、2 天、3 天、5 天、1 周、2 周或 1 个月重复所述投与。重复投与可为相同剂量或不同剂量。投与可重复 1 次、2 次、3 次、4 次、5 次、6 次、7 次、8 次、9 次、10 次或更多次。举例来说, 根据某些剂量方案, 患者接受延长时间

(例如 6 个月、1 年或更长时间) 的抗 TNF- α 疗法。在某些实施例中, 投与患者的抗 TNF- α 抗体的量是治疗有效量。如本文所用, TNF- α 抗体的“治疗有效”量可以单一剂量或在治疗方案的过程期间(例如在 1 周、2 周、3 周、1 个月、3 个月、6 个月、1 年或更长时间的过程期间) 投与。典型剂量将取决于患者和疾病的严重程度, 但通常在 10mg 和 160mg 范围内(例如, 10mg、15mg、20mg、25mg、30mg、35mg、40mg、45mg、50mg、60mg、80mg、100mg、120mg、140mg 或 160mg)。在具体实施例中, 本发明提供包含抗 TNF- α 抗体的医药组合物或治疗本文所揭示的一或多种病症的方法, 剂量范围以上述值中的任一者为端值。治疗方案中, 本发明的抗 TNF- α 抗体将根据患者的年龄、体重和疾病状况而定。治疗方案可继续 2 周到无限期。在具体实施例中, 治疗方案继续 2 周到 6 个月、3 个月到 5 年、6 个月到 1 或 2 年、8 个月到 18 个月或诸如此类。投与本发明的抗 TNF- α 抗体的患者优选是人类。在某些方面中, 人类是儿科患者。在其它方面中, 人类是成人患者。

[0121] 本发明的抗 TNF- α 抗体可与至少另一治疗剂(“第二治疗剂”) 组合投与。抗 TNF- α 抗体与第二治疗剂可并行(同时或依序) 或分开投与。

[0122] 在某些方面中, 第二治疗剂是抗风湿药物、抗炎症药剂、化学治疗剂、放射性治疗剂、免疫抑制剂或细胞毒性药物。

[0123] 抗风湿药物包括(但不限于) 金诺芬(auranofin)、硫唑嘌呤(azathioprine)、氯喹(chloroquine)、D-青霉胺(D-penicillamine)、硫代苹果酸金钠羟基氯喹(gold sodium thiomalate hydroxychloroquine)、硫代苯酸金钠(Myocrisin) 和柳氮磺吡啶(sulfasalazine) 氨甲蝶呤。

[0124] 抗炎症药剂包括(但不限于) 地塞米松(dexamethasone)、颇得斯安(pentasa)、美沙拉嗪(mesalazine)、阿肠克(asacol)、磷酸可待因(codeine phosphate)、贝诺酯(benorylate)、芬布芬(fenbufen)、消痛灵(naprosyn)、双氯芬酸(diclofenac)、依托度酸(etodolac) 以及吲哚美辛(indomethacin)、阿司匹林(aspirin) 和布洛芬(ibuprofen)。

[0125] 化学治疗剂包括(但不限于) 放射性分子、毒素(还称作细胞毒素或细胞毒性剂, 其包括任何对细胞的存活力有害的试剂)、含有化学治疗化合物的试剂和脂质体或其它囊泡。适宜化学治疗剂的实例包括(但不限于) 1-脱氢睾酮、5-氟尿嘧啶、氮烯咪胺、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、放线菌素 D、阿霉素(adriamycin)、阿地白介素(aldesleukin)、烷基化剂、别嘌呤醇钠(allopurinol sodium)、六甲蜜胺(altretamine)、氨磷汀(amifostine)、阿那曲唑(anastrozole)、氮苄霉素(AMC)、抗有丝分裂剂、顺二氯二氨铂(II)(DDP) 顺铂)、二氨基二氯铂、蒽环抗生素、抗生素、抗代谢物类、天冬酰胺酶、活 BCG(膀胱内)、倍氯米松(betamethasone) 磷酸钠和乙酸倍氯米松、比卡鲁胺(bicalutamide)、硫酸博来霉素、白消安、甲酰四氢叶酸钙(calcium leucovorin)、卡奇霉素、卡培他滨(capecitabine)、卡铂(carboplatin)、洛莫司汀(CCNU)、卡莫司汀(BSNU)、氯芥苯丁酸、顺铂、克拉屈滨(Cladribine)、秋水仙碱(Colchicin)、偶联雌激素、环磷酰胺、环硫磷酰胺、阿糖胞苷、阿糖胞苷、松胞菌素 B(cytochalasin B)、环磷酰胺(Cytoxan)、达卡巴嗪(Dacarbazine)、放线菌素 D、放线菌素 D(先前称作放线菌素)、柔红霉素 HCL、柠檬酸柔红霉素、地尼白介素 2(denileukin diftitox)、右雷佐生(Dexrazoxane)、二溴甘露醇、二羟基炭疽菌素二酮、多西他赛(Docetaxel)、甲磺酸多拉司琼(dolasetron mesylate)、多柔比星 HCL、屈大麻酚(dronabinol)、埃希氏大肠杆菌(E. coli)L-天冬酰胺酶、依米丁(emetine)、阿法

依伯汀 (epoetin- α)、欧文氏菌 (Erwinia)L- 天冬酰胺酶、酯化雌激素、雌二醇、雌莫司汀磷酸钠 (estramustine phosphate sodium)、溴化乙锭 (ethidium bromide)、乙炔雌二醇 (ethinyl estradiol)、依替膦酸盐 (etidronate)、依托泊苷嗜橙菌因子、磷酸依托泊苷、非格司亭 (filgrastim)、氟尿苷 (floxuridine)、氟康唑 (fluconazole)、磷酸氟达拉滨 (fludarabine phosphate)、氟尿嘧啶、氟他胺 (flutamide)、醛叶酸 (folinic acid)、吉西他滨 (gemcitabine)HCL、糖皮质激素、乙酸戈舍瑞林 (goserelin acetate)、短杆菌肽 D (gramicidin D)、格拉司琼 (granisetron)HCL、羟基脲 (hydroxyurea)、伊达比星 (idarubicin)HCL、异环磷酰胺 (ifosfamide)、干扰素 α -2b、伊立替康 (irinotecan)HCL、来曲唑 (letrozole)、甲酰四氢叶酸钙 (leucovorin calcium)、乙酸柳菩林 (leuprolide acetate)、左旋咪唑 (levamisole)HCL、利多卡因、洛莫司汀、类美坦生、氮芥 HCL、乙酸甲羟孕酮 (medroxyprogesterone acetate)、乙酸甲地孕酮 (megestrol acetate)、美法仑 HCL、巯基嘌呤、美司钠 (mesna)、氨甲蝶呤、甲基睾固酮、光辉霉素、丝裂霉素 C、米托坦 (mitotane)、米托蒽醌、尼鲁特米 (nilutamide)、乙酸奥曲肽 (octreotide acetate)、昂丹司琼 (ondansetron)HCL、太平洋紫杉醇 (paclitaxel)、帕米膦酸二钠 (pamidronate disodium)、喷司他汀 (pentostatin)、毛果芸香碱 (pilocarpine)HCL、霉菌素 (plimycin)、具有卡莫司汀植入物的聚苯丙生 20 (polifeprosan 20)、卟菲尔钠 (porfimer sodium)、普鲁卡因、丙卡巴肼 (procarbazine)HCL、普萘洛尔、利妥昔单抗 (rituximab)、沙格司亭 (sargramostim)、链脲霉素、他莫昔芬 (tamoxifen)、紫杉醇、替尼泊苷 (teniposide)、替托泊苷、睾内酯 (testolactone)、四卡因、苯丁酸氮芥 (thioepa chlorambucil)、硫鸟嘌呤、塞替派、托泊替康 (topotecan)HCL、柠檬酸托瑞米芬 (toremifene citrate)、D2E7、维甲酸 (tretinoin)、戊柔比星 (valrubicin)、硫酸长春碱、硫酸长春新碱和酒石酸长春瑞滨 (vinorelbine tartrate)。

[0126] 在本发明的其它方面中,第二治疗剂是除本发明的抗 TNF- α 抗体外的 TNF- α 拮抗剂。所述 TNF- α 拮抗剂的实例包括 (但不限于)可溶性 TNF- α 受体;依那西普 (etanercept) (ENBREL; 英姆纳克斯 (Immunex)) 或其片段、衍生物或类似物;英夫利昔单抗 (infliximab) (REMICADE; 森托克 (Centacor)) 或其衍生物、类似物或抗原结合片段;IL-10, 已知其经由干扰素- γ 活化的巨噬细胞阻断 TNF- α 产生 (奥斯瓦尔德 (Oswald) 等人,1992, 美国国家科学院院刊 89:8676-8680)、TNFR-IgG (阿什克纳济 (Ashkenazi) 等人,1991, 美国国家科学院院刊 88:10535-10539);鼠类产物 TBP-1 (雪兰诺 (Serono)/ 耶达 (Yeda));疫苗 CytoTAB (普罗赛瑞克斯 (Protherics));反义分子 104838 (ISIS);肽 RDP-58 (桑斯塔特 (SangStat));沙利度胺 (thalidomide) (赛尔基因 (Celgene));CDC-801 (赛尔基因);DPC-333 (杜邦 (Dupont));VX-745 (福泰 (Vertex));AGIX-4207 (阿赛洛遗传 (AtheroGenics));ITF-2357 (意大利法马克 ((Italfarmaco));NPI-13021-31 (尼罗斯 (Nereus));SCIO-469 (西奥斯 (Scios));TACE 靶向剂 (因缪尼克斯 (Immunix)/AHP);CLX-120500 (卡利克斯 (Calyx));噻唑并普瑞 (Thiazolopyrim) (戴纳瓦克斯 (Dynavax));金诺芬 (兰多拉 (Ridaura)) (史密斯克莱-必康制药 (SmithKline Beecham Pharmaceuticals));奎纳克林 (quinacrine) (二氯水合米帕林 (mepacrine dichlorohydrate));替尼达普 (tenidap) (因纳布莱克斯 (Enablex));黑色素 (Melanin) (大规模生物 (Large Scale Biological));和乌里亚奇 (Uriach) 的抗 p38MAPK 药剂。

[0127] 可与抗 TNF- α 抗体组合使用的其它第二治疗剂和与所述第二治疗剂的组合法可用于的特定适应症揭示于 WO 2004/004633 中,其全部内容都以引用方式并入本文中。

[0128] 医药组合物和医药投与

[0129] 本发明的抗 TNF- α 抗体可纳入适于投与患者的医药组合物中。通常,医药组合物包含抗 TNF- α 抗体和医药上可接受的载剂。如本文所用“医药上可接受的载剂”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂和生理上相容的类似试剂。医药上可接受的载剂的实例包括以下中的一或多者以及其组合:水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇和诸如此类。在许多情形中,组合物中优选地包括等渗剂,例如,糖、多元醇(例如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。医药上可接受的载剂可进一步包含少量辅助性物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲液,其可增强抗体或抗体部分的存架寿命或有效性。

[0130] 本发明组合物可呈多种形式。这些形式包括(例如)液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如,可注射和可输注溶液)、分散液或悬浮液和粉剂。优选形式取决于计划投与模式和治疗应用。典型优选组合物呈可注射或可输注溶液形式。优选投与模式是非经肠(例如,静脉内、皮下、腹膜内、肌内)。在优选实施例中,抗 TNF- α 抗体是通过静脉内输注或注射投与。在另一优选实施例中,抗 TNF- α 抗体是通过肌内或皮下注射投与。

[0131] 本发明的抗 TNF- α 抗体可于医药试剂盒中提供。医药试剂盒是包含本发明的抗 TNF- α 抗体(例如,呈冻干形式或呈水溶液形式)和任选地以下中的一或多者的包装:第二治疗剂,例如如上文所述;用于投与抗 TNF- α 抗体的装置,例如笔、针和/或注射器;和用于悬浮抗体(如果抗体呈冻干形式)的医药级水或缓冲液。

[0132] 在某些方面中,抗 TNF- α 抗体的各单位剂量是单独包装,并且试剂盒可含有一或多个单位剂量(例如,2 个单位剂量、3 个单位剂量、4 个单位剂量、5 个单位剂量、8 个单位剂量、10 个单位剂量或更多)。在具体实施例中,一或多个单位剂量各自容纳在注射器或笔中。典型单位剂量包含 10mg 到 160mg 抗 TNF- α 抗体(例如,10mg、15mg、20mg、25mg、30mg、35mg、40mg、45mg、50mg、60mg、80mg、100mg、120mg、140mg 或 160mg)。在具体实施例中,本发明提供包含介于以上述值中的任一者为端值的范围内的抗 TNF- α 抗体的单位剂量。

[0133] 另外,可包括其它添加剂,例如稳定剂、缓冲液(例如封阻缓冲液或溶胞缓冲液)和诸如此类。在具体实施例中,抗体和一或多种添加剂可以干粉形式(通常为冻干粉剂)提供(个别或组合),其包括在溶解后将提供具有适当浓度的溶液的赋形剂。

[0134] 实例

[0135] 实例 1:用于表达和细胞表面展示的载体。

[0136] D2E7(阿达木单抗)的合成可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)结构域是由商业基因合成供应商(DNA 2.0 公司,门洛帕克,加利福尼亚州)构筑。图 1A-1C 显示合成 D2E7 V_H 和 V_L 片段的 DNA 序列、翻译氨基酸序列、侧接限制位点和 CDR。互补决定区(CDR)由粗体下划线文本指示。将合成 D2E7 V_H 和 V_L 克隆到载体 pYA206(艾伯斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)衍生的附加型载体,其用于表达抗体并在哺乳动物细胞表面上展示)中。pYA206 是质粒 pYA104 的具有以下修饰的衍生物(赤松(Akamatsu)等人,免疫学方法杂志,2007 年 10 月 31 日;327(1-2):40-52):1) 人类 C λ 恒定结构域已经人类 C κ 恒定结构域替代,2) 糖基化磷脂酰肌醇连接信号(GPI 锚)已经血小板源生长因子受体(PDGF-R)的跨膜结构域替

代, 3) 独特 NotI 和 XhoI 位点位于 C κ 结构域的上游, 用于克隆与 C κ 同在框架中的 V κ 结构域, 和 4) 独特 NgoMIV 和 SacI 位点位于 IgG $_1$ 的上游, 用于克隆与 IgG $_1$ 恒定区同在框架中的 V μ 结构域。

[0137] pCW600 是质粒 pYA206 的衍生物, 且 CH 基因经 Fab 替代。

[0138] 用 NgoMIV 和 SacI 消化 D2E7V μ 片段, 并且用 NotI 和 XhoI 消化 D2E7V κ 片段。将两个片段克隆到质粒 pYA206 中以产生质粒 pYA206-D2E7。图 4 显示 pYA206-D2E7 的结构。此质粒含有 EBNA-1 基因和艾伯斯坦-巴尔病毒的 oriP, 所述 oriP 容许在哺乳动物细胞中以附加体形式复制。pUC 复制起点和氨苄西林抗性基因容许质粒在埃希氏大肠杆菌中繁殖。针对在 SV40 启动子控制下具有嘌呤霉素抗性基因来选择哺乳动物细胞转型体。CMV 启动子和内部核糖体进入位点 (IRES) 容许表达所展示的抗体重链和轻链。所表达抗体经由融合到 IgG $_1$ 恒定结构域末端的 PDGF-R 跨膜结构域系留到细胞膜。

[0139] 用 NgoMIV 和 SacI 消化 D2E7V μ 片段, 用 NotI 和 XhoI 消化 D2E7V κ 片段, 并且将两个片段克隆到质粒 pCW600 中以产生质粒 pCW600-D2E7。图 4 显示 pCW600-D2E7 的结构。此质粒含有 EBNA-1 基因和艾伯斯坦-巴尔病毒的 oriP, 所述 oriP 容许在哺乳动物细胞中以附加体形式复制。pUC 复制起点和氨苄西林抗性基因容许质粒在埃希氏大肠杆菌中繁殖。针对在 SV40 启动子控制下具有嘌呤霉素抗性基因选择哺乳动物细胞转型体。CMV 启动子和内部核糖体进入位点 (IRES) 容许表达所展示的 Fab 重链和轻链。所表达 Fab 经由融合到 IgG $_1$ 恒定结构域末端的 PDGF-R 跨膜结构域系留到细胞膜。

[0140] 实例 2 : D2E7 的表面展示和 FACS 滴定分析

[0141] 用 pYA206-D2E7 转型表达 EBNA-1 蛋白的 293c18 细胞 (美国典型培养物保藏中心, 马纳萨斯, 弗吉尼亚州)。在补充有 10% 胎牛血清 (FBS) 和 0.25mg/ml G418 的 DMEM 培养基中培养 293c18 细胞。将 0.125 μ g pYA206-D2E7 或 pCW600-D2E7 质粒以 1:200 与 25 μ g 作为载体质粒的 pUC19 加上 60 μ l lipofectamine (英杰 (Invitrogen), 加利福尼亚州) 混合并将其添加到 2×10^7 个 293c18 细胞中。载体质粒过量 200 倍以确保各细胞都由至多含有质粒的单一 D2E7 转型。48 小时后, 通过添加嘌呤霉素选择转型细胞, 并且随后在 FACS 分析之前再培养 18 天。

[0142] 用 Alexa Fluor 647 (英杰, 加利福尼亚州) 标记人类 TNF- α (R&D 系统 (R&D Systems), 明尼阿波利斯, 明尼苏达州)。使 1mg 人类 TNF- α 与 84 μ g Alexa Fluor 647 试剂于室温下反应 30 分钟, 并且随后使用凝胶过滤柱从未反应试剂纯化。将经 pCW600-D2E7 转染的 293c18 细胞用 1/200 稀释的 PE 标记抗人类 IgG (南方生物技术 (Southern Biotech)) 和不同浓度的 Alexa Fluor 647 标记的 TNF- α 在冰上双重染色 1 小时, 用 FACS 缓冲液 (磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 加 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA)) 洗涤并在 FacsCalibur (BD) 上分析。利用浓度介于 20nM 到 0.26nM 范围内的 Alexa Fluor 647 标记的 TNF- α 执行滴定曲线。各曲线的中点 (此处发生半数最大结合) 定义抗体/抗原复合物的 EC $_{50}$ 。野生型 D2E7 的结果显示于图 5 中。在此分析中, 表面展示的 D2E7Fab 以 0.15nM 的 EC $_{50}$ 结合到 TNF- α 。

[0143] 使抗 D2E7 抗体 1H11、5A1 和 10F8 (抗个体基因型, 抗 Id) 与生物素偶联。使 1mg 各抗 Id 与 43 μ g Sulfo-NHS-LC-生物素 (皮尔斯 (Pierce)) 试剂于室温下反应 2 小时。通过在亚米康 (Amicon) 微量离心过滤器中旋转移除过量生物素。将经 pCW600-D2E7 转染的 293c18 细胞用 1/200 稀释的 PE 标记抗人类 IgG (南方生物技术) 和生物素化抗 Id 双重染

色 1 小时,用 FACS 缓冲液(磷酸盐缓冲盐水(PBS)加 0.5%牛血清白蛋白(BSA))洗涤,随后用 1/200 稀释的抗蛋白链菌素-APC 染色。以浓度介于 20nM 到 0.26nM 范围内的抗 Id 执行滴定曲线。各曲线的中点(此处发生半数最大结合)定义抗 Id/D2E7 复合物的 EC_{50} 。各抗个体基因型的结果显示于图 6 中。在此分析中,表面展示的 D2E7Fab 分别以 0.77nM、0.37nM 和 1.28nM 的 EC_{50} 结合到抗 Id 1H11、5A1 和 10F8。

[0144] 实例 3 :D2E7 单一氨基酸突变体库的构筑

[0145] 靶向各 D2E7CDR 氨基酸位置(在图 1A 中加下划线,总共 34 个 V_H 位置和 27 个 V_L 位置)用于 NNK 随机化。使用 NNK 编码方案(其中 N = A、C、G 或 T 且 K = G 或 T),这是因为 1) 编码所有 20 种天然氨基酸仅需要 32 个密码子,2) 32 个密码子中仅包括单一终止密码子(TAG),和 3) 最大简并性(编码单一氨基酸的不同密码子数)是 3,而不是在完全 64 密码子遗传密码中出现的最大 6 倍简并性。

[0146] 由合成基因的商业供应商(DNA 2.0, 门洛帕克,加利福尼亚州)合成 61 个不同 DNA 片段,其各自在不同 CDR 位置具有 NNK 简并性。利用引物 D2E7reampFwd(5'-CTCGAAAA TAATAAGGGAAAATCAG-3') (SEQ ID NO:11) 和 D2E7reampRev(5'-TGGTAGTGTGGGGACTC-3') (SEQ ID NO:12) 对这些片段进行 PCR 扩增。纯化 PCR 产物,随后用 NgoMIV 和 SacI 消化 V_H 片段,并用 NotI 和 XhoI 消化 V_L 片段。在琼脂糖凝胶上运行所有片段,纯化并亚克隆到携带相对野生型可变区片段的质粒 pCW600-D2E7 中。将所得质粒单独转型到埃希氏大肠杆菌 Top 10 细胞(英杰,加利福尼亚州)中以形成 61 个不同 DNA 片段中的各者的转型体的子库。执行所述转型,使得所获得的埃希氏大肠杆菌转型体是各子库中可能密码子的总数的至少 10 倍。汇集 V_H 和 V_L 的所得子库以产生两个最终库-包含 34 个位置和 1088 个不同密码子的 D2E7 V_H 库,以及包含 27 个位置和总计 864 个不同密码子的 D2E7 V_L 库。

[0147] 实例 4 :D2E7 V_H 和 V_L 点突变体 Fab 库针对 TNF- α 结合的 FACS 染色和 4 路分选

[0148] 用 0.5 μ g 库质粒、100 μ g pUC19 载体质粒和 250 μ l lipofectamine 将 D2E7 V_H 和 V_L 库转染到 293c18 细胞中,2 天后用 0.8 μ g/ml 嘌呤霉素选择并再培养 18 天,之后进行 FACS 分选。将细胞用 0.15 纳摩尔浓度的 Alexa Fluor 647-TNF- α 和 1:200PE 标记的抗 IgG(南方生物技术)染色并在 MoFlo FACS 机(大科北美(Dako North America)公司,卡平特里亚,加利福尼亚州)上进行分选。野生型 D2E7 和 V_H 点突变库的 FACS 分选概况显示于图 7A-7B 中。图 A 显示经野生型 D2E7Fab 表达质粒 pCW600 转型的细胞的 FACS 概况;x 轴显示用 PE-抗 IgG 染色且 y 轴显示用 Alexa Fluor 647-TNF- α 染色。由于细胞群体中的抗体是异源表达,故 FACS 概况显示大致沿指向右上象限的对角线排列的个别数据点。

[0149] 基于 FACS 闸将 V_H 点突变库的 TNF- α 染色细胞分选为 4 个子群(图 7A-7B,图 B)。使用野生型抗体在类似 FACS 条件下的特征来设定闸以将细胞分选为较高亲和性(H)群体(R4)、中性或‘中等’亲和性(M)群体(R5)、较低亲和性(L)群体(R6)和 IgG 非表达(Z)群体(R3)。x 轴显示抗 IgG-PE 染色且 y 轴显示用人类-TNF- α -AF647 染色。

[0150] 实例 5 :D2E7 V_H 和 V_L 点突变体 Fab 库针对抗 Id 结合的 FACS 染色和 2 路分选

[0151] 将表达 D2E7 的细胞用 0.15 纳摩尔浓度 Alexa Fluor 647-TNF- α 和 EC_{50} (1H11 为 0.77nM,5A1 为 0.37nM 和 10F8 为 1.28nM)的生物素化抗个体基因型 mAb 共染色,随后于室温下培育 2 小时。随后洗涤细胞并于 4°C 下与抗蛋白链菌素-APC 和抗人类 IgG κ -FITC 一起培育 1 小时。洗涤细胞,随后在 MoFlo FACS 机(大科北美公司,卡平特里亚,加利福尼

亚州)上进行分选。经 1H11 染色的野生型 D2E7 和 V_H 库的 FACS 分选概况显示于图 8A-8B 中。抗 IgG-PE 染色显示于 x 轴上且抗 Id1H11-APC 染色显示于 y 轴上。执行 2 路分选, 从而以“分选”(与抗个体基因型结合较低的细胞)和“表达”(对抗人类 IgG κ FITC 呈阳性的细胞)闸收集最少 200 万个细胞。

[0152] 由于抗体在细胞群体中异源表达, 故 FACS 概况显示大致沿指向右上象限的对角线排列的个别数据点。D2E7WT 和 V_H 点突变库的 FACS 概况分别显示于图 8 的图 A 和 B 中。为收集各库中以所有表达点突变在库中的正确频率含有所述点突变的参考细胞群体, 绘制具有平行于 y 轴的左边缘的闸; 利用这些闸的分选收集所有 IgG 表达超出一定水平的细胞, 不管所展示抗体与抗 Id 的结合程度如何。这些闸和群体命名为“表达闸”和“表达群体”(图 B “R4”)。以大致平行于野生型群体的主对角线并在其正下方绘制的闸的顶部进行其它分选; 这些闸经设计以收集表达对抗个体基因型的结合亲和性降低的抗体的细胞, 不管其 IgG 表达的整体水平如何。这些闸和群体称作“分选闸”和“分选群体”(图 B “R3”)。以“分选”和“表达”闸二者收集约 2,000,000 个细胞。

[0153] 实例 6: “表达”和“分选”群体的大规模平行测序

[0154] 从“表达”和“分选”细胞群体回收质粒并执行 PCR 扩增以制备适于大规模平行测序的短扩增子。使用 PCR 引物, 其紧邻 D2E7 V_H 和 V_L 结构域的 CDR1 和 CDR3 区外退火。引物是: V_H 正向引物 D2E7_ V_H _CDR1_5'-TTAGTTGTGCTGCATCAGGTTT-3' (SEQ ID NO:13); V_H 反向引物 D2E7_ V_H _CDR3_rev 5'-GGTCACCAGTGTTCCCTGAC-3' (SEQ ID NO:14); V_L 正向引物 D2E7_ V_L _CDR1_5'-GTAGGCGACAGGGTCACAAT-3' (SEQ ID NO:15); 和 V_L 反向引物 D2E7_ V_L _CDR3_rev 5'-AGTCCGTTTGATCTCGACCTT-3' (SEQ ID NO:16)。因此, 各扩增子含有完整 CDR 1、CDR2 和 CDR3 区用于对所有点突变进行定位和制表, 但省略框架 1 和 4 的大部分。随后使用基因组测序仪 FLX 如由制造商所指导对 D2E7 V_H 和 V_L 库“分选”和“表达”扩增子进行测序。(454 生命科学 (Life Sciences), 布兰福德, 康涅狄格州)。

[0155] 使用计算机程序检验序列并将在“表达”和“分选”群体中发现各点突变的次数制表。计算机程序首先读数并将各密码子制表。对于具有一个以上密码子的氨基酸, 程序将各氨基酸中不同密码子的出现率加在一起, 以整体概述各子群中所述氨基酸变体的特征。

[0156] 对于评价与 TNF- α 的结合的 D2E7 库的 4 路分选, 给出各密码子变体的富集比 (ER) 评分。ER 表示在 H 群体中发现变体的频率与其整体频率相比高多少或低多少。类似地, 可计算 M、L 和 Z 群体各者中各变体的富集比。预计较高亲和性变体在 H 群体中富集 (ER>1) 且在 L 群体中缺乏 (ER<1)。相反地, 预计较低亲和性突变体在 H 群体中缺乏 (ER<1) 且在 L 群体中富集 (ER>1)。可仅通过查看 H 群体的富集比来识别较高、较低和中性亲和性变体。

[0157] 在评价 D2E7 库与抗个体基因型的结合的 2 路 FACS 分析中, “分选”群体含有与抗个体基因型结合较低的变体。在这种情形中, 分选变体的较高 ER 表示与抗个体基因型的结合降低。

[0158] 实例 7: 具有所需性质的点突变体的识别

[0159] 为分析数据, 针对对位置测序的次数规范化在给定位置发现突变的次数且表示为每 1000 个序列的频率。随后用分选群体中的突变频率除以所表达群体中的频率以给出富集比 (ER), 其指示与所表达群体相比, 突变在分选群体中是否富集或缺乏以及其程度。在分选群体中富集的突变与 TNF- α 的结合将增强, 而缺乏的突变的结合将降低。类似地, 与抗

个体基因型的结合降低的分选细胞将对特定抗个体基因型具有高富集比。

[0160] 实例 8 : 沉默野生型密码子分析

[0161] 在测定库中的变体在分选子群中是否富集或缺乏时,有用地在相同实验条件下比较变体的特征与野生型蛋白质的特征。这可通过跟踪沉默 WT 密码子的特征容易地进行,所述沉默 WT 密码子是编码 WT 蛋白质但含有因 NNK 随机化产生的沉默密码子变化的变体 DNA 序列。举例来说,在野生型密码子是 GGG(甘氨酸)的库位置处,NNK 随机化将产生 GGT 密码子,其仍编码甘氨酸,但在本文所述分选和统计分析方法中可如任何其它变体一般对其加以跟踪。根据起始密码子,可在任一位置出现 0 到 3 个沉默野生型密码子;在实践中这确保在覆盖 50-65 个不同位置的典型 CDR 库中将可获得数十个沉默野生型密码子。可使用这些沉默野生型富集比的平均值确定实验的中点;高于此中点,将发现亲和性改良的变体;低于此中点,将发现亲和性较低的变体;且在所述中点附近将发现中性变体。图 9 显示沉默野生型密码子分析的结果。有益突变(即,那些具有与抗个体基因型 1H11 的降低结合和与 TNF- α 的中性结合者)可具有高于 0.25(平均值+1SD)的 1H11-ER 和介于 1.21 与 1.59 之间(平均值 $\pm$ 1SD)的 TNF- α -ER。

[0162] 实例 9 : 单点 FACS 分析

[0163] 为预测 CDR 中可导致与抗个体基因型的结合降低的位置,用仅有一个位置突变为 32 个可能密码子的子库转染平铺于 96 孔板中的 293c18 细胞(图 10)。培养 2 天后,收获细胞并用与 PE 偶联的抗个体基因型(EG₅₀)和 TNF- α -647(EG₅₀)染色。FACS 分析显示具有与抗个体基因型的结合低的大细胞群体的位置。图 11 显示,V_H中的一些位置(加圆圈)可经突变以降低 1H11 结合,并且无 V_L位置可导致类似效应。类似地,图 12 显示,V_L链中某些位置的突变可降低与抗个体基因型 5A1 和 10F8 的结合。V_H链中的突变不会降低与 5A1 和 10F8 的结合。

[0164] V_H中具有经预测对 1H11 结合重要的变灰位置的 D2E7 的 Pymol 模型显示于图 13A-13D 中。所预测表位显示,尽管所述位置散布在三个 CDR 之间,但其在模型中毗邻并形成不连续构象表位。类似地,图 14A-14D 显示,V_L中对 5A1 和 10F8 结合重要的位置形成构象或不连续表位。

[0165] 为确认与抗个体基因型的结合降低,在细胞表面上表达单一突变体全长 IgG,随后用与 AF647 偶联的抗个体基因型(EG₅₀)和抗 IgG-PE 染色。为确认与靶的中性结合,用 TNF- α -AF647(EG₅₀)和抗 IgG-PE 对细胞表面上的全长 IgG 染色。

[0166] V_H CDR1-2(Y32)从 Y 突变为 K、R、S、T 或 V。图 15 显示突变体的单点 FACS 分析。用抗个体基因型 1H11 进行的 FACS 染色确认所有变体的结合降低。TNF- α 染色显示除 T 外的所有突变体都是中性结合,这与图 16 中此突变体的较低 ER 相关。选择图 16 中所示的 D2E7V_L的有益突变作为与 1H11 具有降低结合(1H11-ER 高于 0.25)且与 TNF- α 具有中性结合(TNF- α -ER 为 1.21-1.60)者。不期望突变呈灰色。

[0167] 图 17 提供平均 1H11 富集比(以位置计)。D2E7V_H中具有高平均 ER 的位置具有更多的可能氨基酸取代,从而使抗体与抗 Id 1H11 的结合降低。

[0168] 图 18 提供平均 5A1 富集比(以位置计)。D2E7V_L中具有高平均 ER 的位置具有更多的可能氨基酸取代,从而使抗体与抗个体基因型 5A1 的结合降低。

[0169] 图 19 提供平均 10F8 富集比(以位置计)。D2E7V_L中具有高平均 ER 的位置具有

更多的可能氨基酸取代,从而使抗体与抗个体基因型 10F8 的结合降低。

[0170] 实例 10 :D2E7 桥接分析

[0171] 研发 D2E7 桥接分析以使 D2E7 与从人类供体获得的抗阿达木单抗抗体 (ADAb) 的结合可视化。于 4℃ 下用 PBMS 中的 0.5 μg/ml 野生型 D2E7 抗体涂布 Immobilon 高结合 ELISA 板过夜。第二天,用含有 0.1% 吐温 (Tween)-20 的 PBS (PBS/ 吐温) 洗涤板。用 PBS 中的 1% 人类 AB 血清 (huAB/PBS) 将板于室温下封阻 1-2 小时。将人类血清试样 (生物再生 (Bioreclamation), 纽约) 在 huAB/PBS 中稀释并添加到 ELISA 板中。最后,添加生物素化野生型 D2E7 抗体到 15ng/ml 的最终浓度。将板在 4℃ 下培育过夜。第二天,在 PBS/ 吐温中洗涤板。根据制造商的推荐在 huAB/PBS 中以 1:1000 稀释抗生蛋白链菌素 -HRPO (MABTECH) 并以 100 μl/ 孔添加到板中。将板于室温下培育 30 分钟,随后用 PBS/ 吐温洗涤一次并用蒸馏水洗涤两次。添加 TMB 单组份 (BioFX 实验室 (BioFX Laboratories)) 并显色 15 分钟。于 650nm 下读板。包括阳性对照 (鼠类抗人类 D2E7 单克隆抗体)。

[0172] 实例 11 :用于验证 D2E7V_H和 V_L点突变体的抑制分析

[0173] 使用实例 10 的桥接分析筛选来自在其知情同意书上列示阿达木单抗而非氨甲蝶呤作为药剂的人类供体的市售血清试样中的抗阿达木单抗 (“ADAb”) 的存在。选择显示 ADAb 的证据的供体用于进一步研究。通过使用下述阳性和阴性对照执行抑制分析来确认 ADAb 的特异性。所选供体的 ADAb 对 D2E7 的 Fab 片段具有特异性。

[0174] 针对 D2E7 桥接分析的抑制筛选识别为与 D2E7 相比对鼠类抗个体基因型抗体的结合降低的变体抗体。变体抗体在桥接分析中的抑制显示,变体仍能够结合患者血清 ADAb。因此,不干扰桥接分析的变体不与 ADAb 交叉反应,且因此代表 D2E7 的抗体结合表位内的突变。

[0175] 将 Immobilon ELISA 板用 0.5 μg/ml 野生型 D2E7 涂布过夜,洗涤并封阻。在单独 96 孔板中,将 D2E7 变体抗体在 huAb/PBS 中稀释到 10 μg/ml。以一式两份测试各变体。使用赫赛汀 (Herceptin) 和 DP10 (与 D2E7 无关的 IgG₁ 抗体) 作为抗阿达木单抗抗体结合的阴性对照。使用野生型 D2E7 抗体作为抑制的阳性对照。还分别使用 DP10 和 D2E7Fab 片段作为阴性和阳性对照。将来自对阿达木单抗展现免疫反应的供体的血清在 huAB/PBS 中稀释到 1:25,并且将 100 μl 添加到含有变体和对照的孔中。供体血清的最终浓度是 1:50。将 100 μl 稀释血清和所添加的变体和对照转移到 D2E7 涂布板。立刻将 100 μl 于 huAB/PBS 中的 30ng/ml 生物素化 D2E7 添加到板中。将板于 4℃ 下培育过夜。第二天,洗涤板,并添加稀释抗生蛋白链菌素 -HRPO。将板用 PBS/ 吐温 -40 洗涤一次,并添加 TMB 单组份 (BioFX 实验室) 并显色 15 分钟。于 650nm 下读板。

[0176] 包括无关抗体 DP10 作为所有测试中的对照且其对 ADAb 与板上的 D2E7 的结合无影响。对 ADAb 与 DP10 结合的抑制%平均为 88+/-12%。利用来自四个商业供体的 ADAb 阳性血清试样执行抑制分析。所有四个供体的结果大部分重叠,V_H CDR3 的变化对 ADAb 结合的影响最大 (图 20A-20B)。以两种方式选择优选变体:图 21A 显示所有抑制百分比比所测试的所有变体的平均值高大于 2 个标准偏差的变体的列表。图 21B 显示所有在四个供体的任一者中具有任何显著活性的变体。所识别的最佳点突变是 T100V,抑制%为 53+/-10%。V95W 次佳,平均值为 47%。除 V_H CDR3 外的最佳变体是具有 2 个变体氨基酸取代的 V_L R30,平均百分比为 23%。

[0177] 基于单一变体的数据产生组合变体。构筑在 VH 和 VL 二者中含有变化的组合, 在一些情形中将所述取代纳入变体 VL 中, 所述变体 VL 在 CDR-L1 中具有取代 G28S 和 A34S (卡巴特编号), 其对应于如 WO 2010/121140 中最初描述的 CDR-L1 中的 G5S+A11S 组合。具有 G5S+A11S 取代的变体 VL 主链在本文中称作 VL-SS。表达变体抗体并纯化且在 ADA_b 抑制分析和 TNF- α 结合亲和性分析中测试。对 2 个以上供体的 ADA_b 结合结果取平均值。使用表面等离子体共振测试 (拜尔科 (Biacore)) 评价结合。结果显示于图 22 中。变体 Y32K/SS-R30T 和 Y32K/SS-R30I 展现降低 ADA 结合与保留抗 TNF α 亲和性的最佳组合。

[0178] 本申请案中引用的所有出版物、专利、专利申请案和其它文件都是出于所有目的全文以引用方式并入本文中, 其并入程度如同出于所有目的将每一个别出版物、专利、专利申请案或其它文件个别指明以引用方式并入一般。

[0179] 尽管已阐释并描述各个具体实施例, 但应了解, 可在不背离本发明的精神和范围的情况下进行各种改变。

[0001]

序列表

<110> 艾伯维生物医疗股份有限公司

<120> 识别具有降低免疫原性的抗体的方法

<130> 381493-721W0 (118133)

<140>

<141>

<150> 61/703, 170

<151> 2012-09-19

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释= “人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 1

gaggtgcage tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ccggcaggte cctgagactc 60

tcctgtgcgg cetctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120

ccagggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttggga atagtgggtca catagactat 180

gcggactctg tggagggccg attcaccate tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240

ctgcaaataga acagtctgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagtctcg 300

taccttagca ccgcgtcttc ccttgactat tggggccaag gtaccctgggt caccgtctcg 360

agt 363

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释= “人工序列的描述：合成多肽”

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

[0002]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释= “人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 3

gacatecaga tgaccagtc tccatcctec ctgtctgcat ctgtagggga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcaagtc gggcaccaga aattacttag cctgggtatca gcaaaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatget gcaccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180

cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctacagcct 240

gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg caccgtatac ttttgccag 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

[0003]

<220>

<221> source

<223> /注释= “人工序列的描述：合成多肽”

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释= “人工序列的描述：合成肽”

<400> 5

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释= “人工序列的描述：合成肽”

[0004]

<400> 6
Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注释= “人工序列的描述：合成肽”

<400> 7
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注释= “人工序列的描述：合成肽”

<400> 8
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注释= “人工序列的描述：合成肽”

<400> 9
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0005]

<220>
<221> source
<223> /注释= “人工序列的描述：合成肽”

<400> 10
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注释= “人工序列的描述：合成引物”

<400> 11
ctcgaaaata ataaaggga aatcag 26

<210> 12
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注释= “人工序列的描述：合成引物”

<400> 12
tggtagtgtg gggactc 17

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注释= “人工序列的描述：合成引物”

<400> 13
ttagttgtgc tgcacaggt tt 22

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source

[0006]

<223> /注释= “人工序列的描述：合成引物”

<400> 14

ggtcaccagt gttecctgac

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释= “人工序列的描述：合成引物”

<400> 15

gtaggcgaca gggteacaat

20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注释= “人工序列的描述：合成引物”

<400> 16

agtccgtttg atctcgacct t

21

D2E7(阿达木单抗, HUMIRA) V_H (SEQ ID NO:2)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGR
FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**VSYLSTASSLDY**WGQGTLVTVSS

D2E7 (阿达木单抗, HUMIRA) V_L (SEQ ID NO:4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIY**AASTLOS**GVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDVATYYC**QRYNRAPYT**FGQGTKVEIK

图 1A

抗体链	互补决定区编号	序列	SEQ ID NO.
重链	1	DYAMH	5
重链	2	AITWNSGHIDYADSVEG	6
重链	3	VSYLSTASSLDY	7
轻链	1	RASOGIRNYLA	8
轻链	2	AASTLOS	9
轻链	3	QRYNRAPYT	10

图 1B

```
GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCGGCAGGTC CCTGAGACTC      60
TCCTGTGCGG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCCTGGGT CCGGCAAGCT      120
CCAGGGAAGG GCCTGGAATG GGTCTCAGCT ATCACTTGGA ATAGTGGTCA CATAGACTAT      180
GCGGACTCTG TGGAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAT      240
CTGCAAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAT ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGTCTCG      300
TACCTTAGCA CCGCGTCCTC CCTTGACTAT TGGGGCCAAG GTACCCTGGT CACCGTCTCG      360
AGT                                                                              363
```

D2E7 可变重链的核苷酸序列

```
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGGGA CAGAGTCACC      60
ATCACTTGTC GGGCAAGTCA GGGCATCAGA AATTACTTAG CCTGGTATCA GCAAAAACCA      120
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCACTT TGCAATCAGG GGTCCCCTCT      180
CGGTTTCAAGT GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTACAGCCT      240
GAAGATGTTG CAACTTATTA CTGTCAAAGG TATAACCGTG CACCGTATAC TTTTGGCCAG      300
GGGACCAAGG TGGAAATCAA A                                                                              321
```

D2E7 可变轻链的核苷酸序列

图 1C

位置	卡巴特	WT 氨基酸	可变轻链中的有益突变
L1-1	24	R	
L1-2	25	A	
L1-3	26	S	
L1-4	27	Q	
L1-5	28	G	$F^{ab}, I^{ab}, V^b, W^{bc}, Y^{ab}$
L1-6	29	I	
L1-7	30	R	I^{ab}, T^{abc}, V^{abc}
L1-8	31	N	$A^{abc}, D^{ac}, E^{ac}, G^{abc}, L^{abc}, M^{abc}, Q^{abc}, R^{abc}, T^{abc}$
L1-9	32	Y	
L1-10	33	L	
L1-11	34	A	
L2-1	50	A	I^{bc}, T^{bc}, V^{abc}
L2-2	51	A	
L2-3	52	S	
L2-4	53	T	D^{bc}
L2-5	54	L	
L2-6	55	Q	
L2-7	56	S	
L3-1	89	Q	
L3-2	90	R	G^a
L3-3	91	Y	
L3-4	92	N	$F^{abc}, M^{ab}, W^{abc}, Y^c$
L3-5	93	R	L^a, N^a, W^{ab}, Y^a
L3-6	94	A	
L3-7	95	P	
L3-8	96	Y	
L3-9	97	T	Y^c

图 2

位置	卡巴特	WT 氨基酸	可变重链中的有益突变
H1-1	31	D	S ^d
H1-2	32	Y	A ^d , C ^d , K ^d , M ^d , R ^d , S ^d , V ^d
H1-3	33	A	
H1-4	34	M	
H1-5	35	H	C ^d , D ^d , E ^d , S ^d , T ^d
H2-1	50	A	
H2-2	51	I	
H2-3	52	T	A ^d , G ^d , N ^d
H2-4	52a	W	A ^d , F ^d , H ^d , L ^d , M ^d , V ^d
H2-5	53	N	G ^e
H2-6	54	S	D ^e , L ^e
H2-7	55	G	
H2-8	56	H	
H2-9	57	I	K ^{ef}
H2-10	58	D	L ^d
H2-11	59	Y	A ^{ef} , C ^{ef} , E ^{ef} , F ^{ef} , G ^{ef} , H ^{ef} , I ^{ef} , K ^{ef} , L ^{ef} , M ^e , N ^{ef} , Q ^e , R ^{ef} , S ^{ef} , V ^{ef} , W ^{ef}
H2-12	60	A	Y ^e
H2-13	61	D	N ^f
H2-14	62	S	
H2-15	63	V	D ^{ef} , L ^{ef} , M ^{ef} , Q ^{ef} , T ^{ef}
H2-16	64	E	F ^{ef} , H ^e , K ^{ef} , R ^{ef} , T ^{ef} , W ^{ef}
H2-17	65	G	A ^{ef} , C ^{ef} , E ^{ef} , H ^e , I ^{ef} , K ^{ef} , L ^{ef} , M ^{ef} , N ^{ef} , P ^{ef} , Q ^{ef} , R ^{ef} , S ^{ef} , T ^{ef} , Y ^{ef}

图 3A

位置	卡巴特	WT 氨基酸	可变重链中的有益突变
H3-1	95	V	G^d, R^d, W^d
H3-2	96	S	
H3-3	97	Y	
H3-4	98	L	T^d, V^d
H3-5	99	S	
H3-6	100	T	V^d
H3-7	100a	A	
H3-8	100b	S	
H3-9	100c	S	K^d, W^e, Y^e
H3-10	100d	L	
H3-11	101	D	V^d
H3-12	102	Y	

图 3B

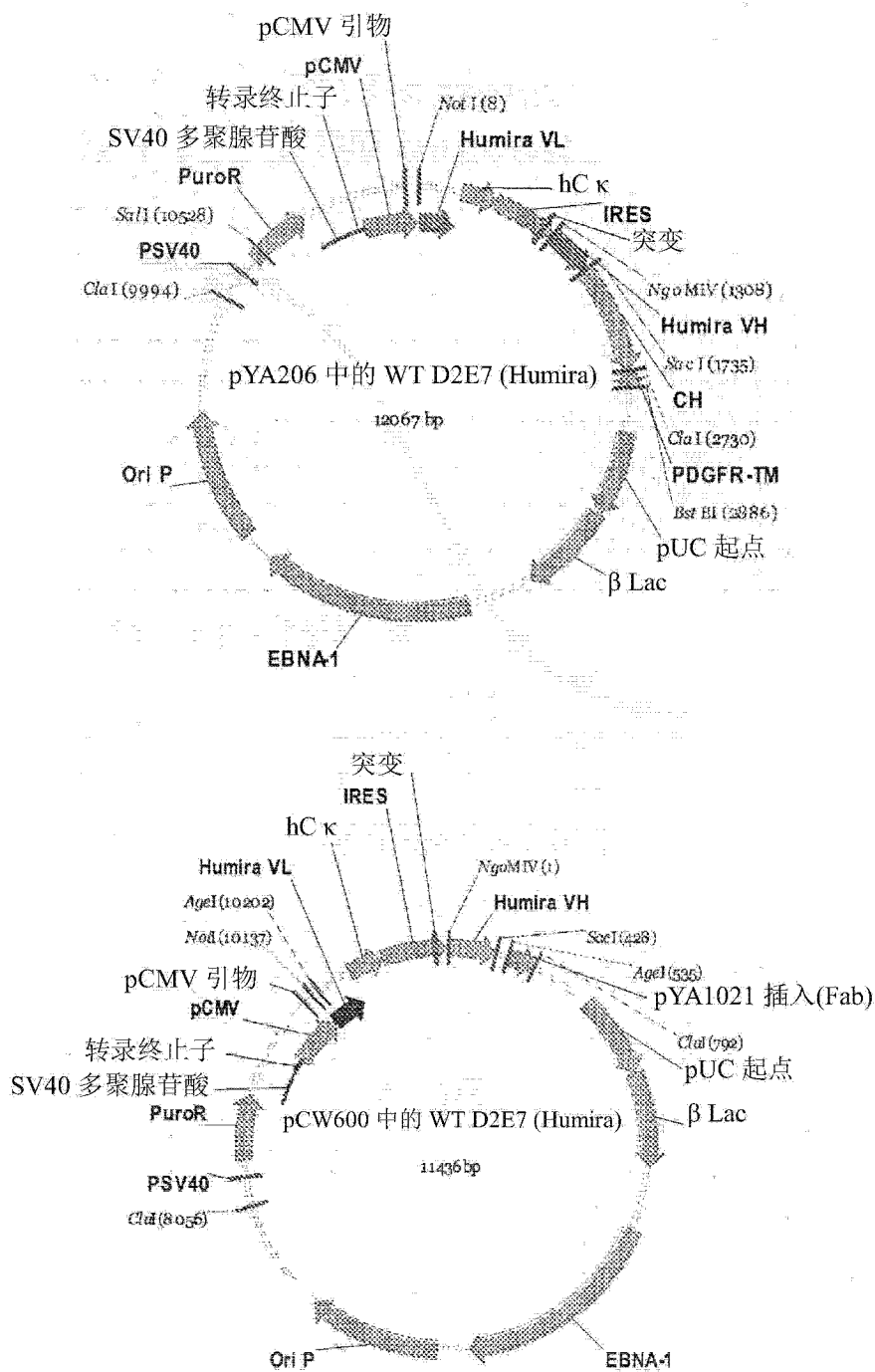


图 4

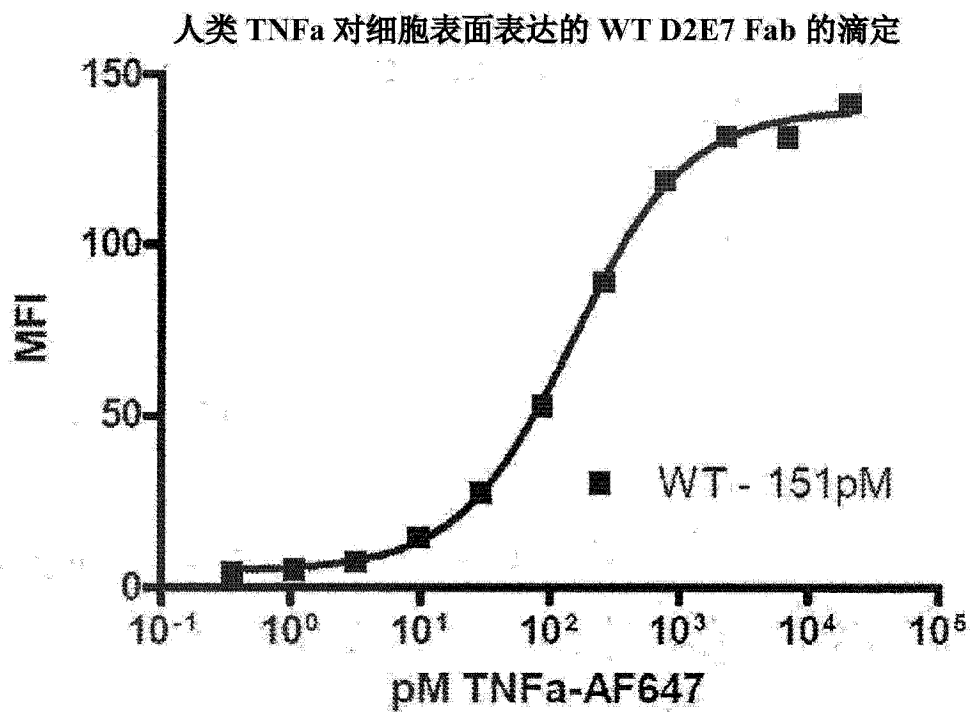


图 5

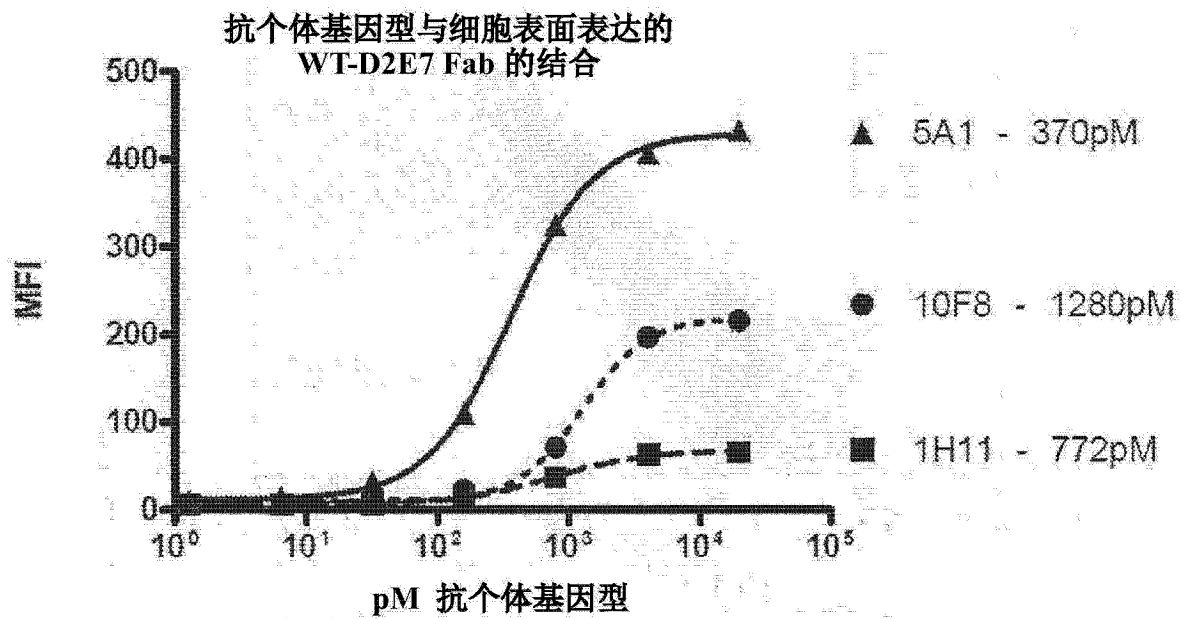


图 6

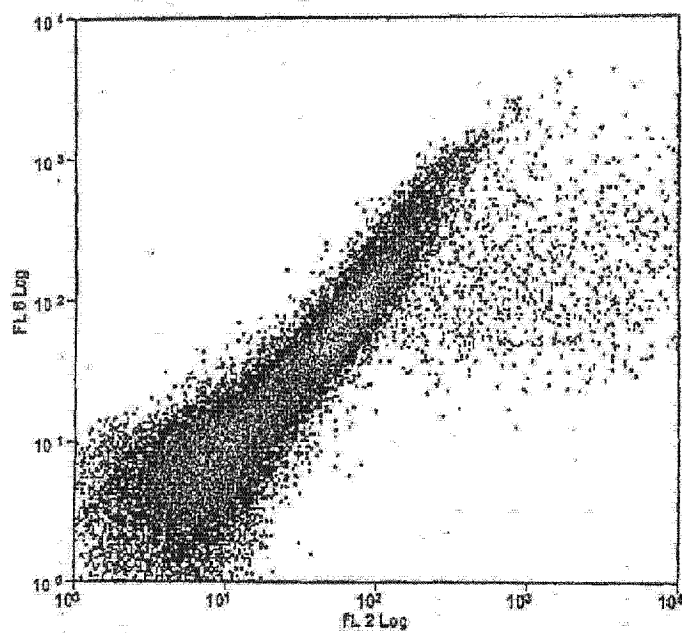


图 7A

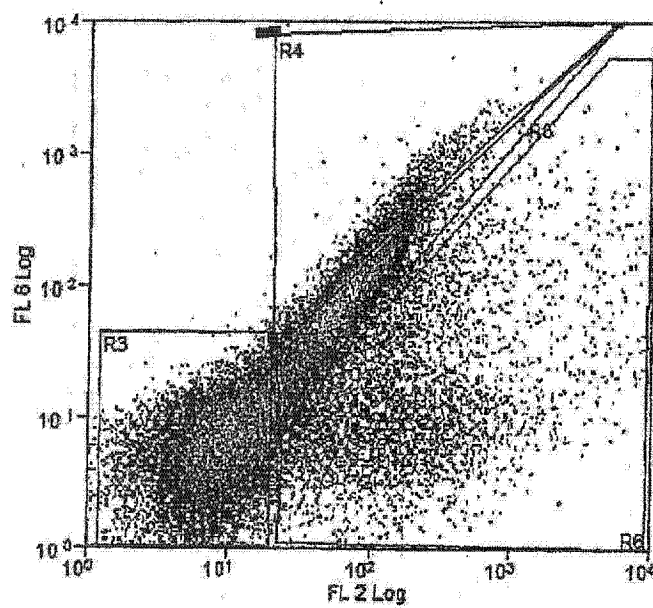


图 7B

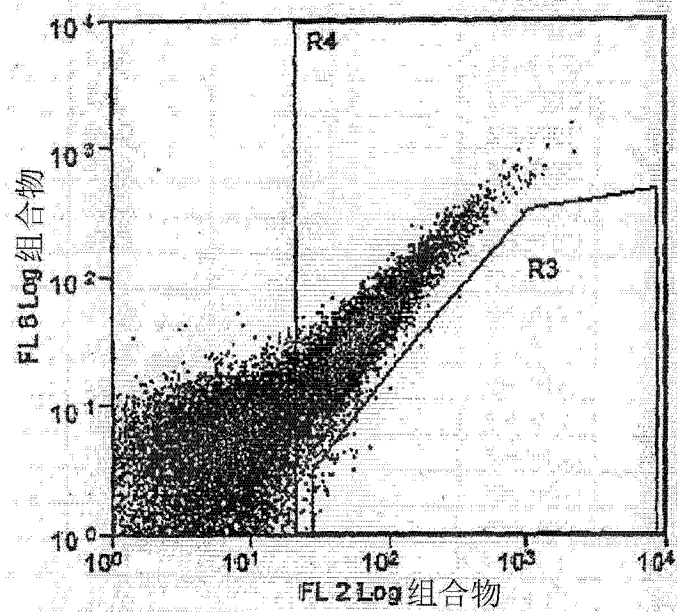


图 8A

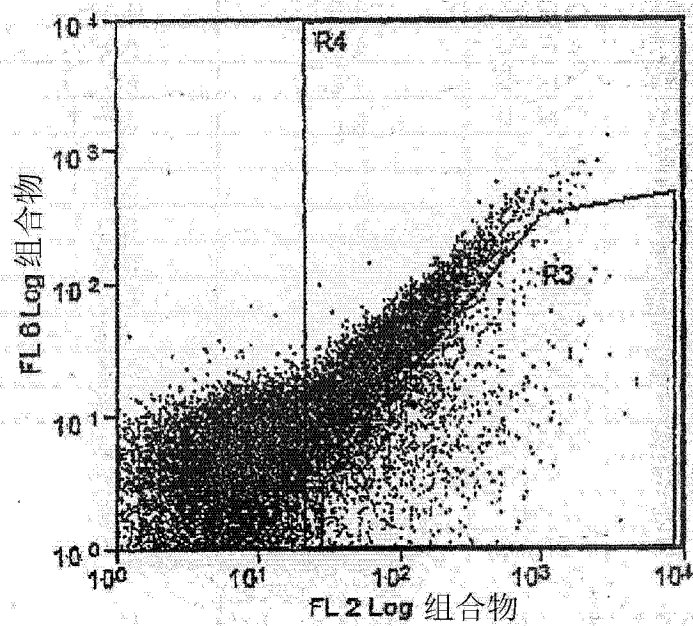


图 8B

WT-AA	WT	AA	突变体	CDR	位置		1H11 富集比	TNF α 富集比
D	GAC	D	GAT	CDR-H1	1		0.29	1.47
A	GCC	A	GCG	CDR-H1	3		0.06	1.64
A	GCC	A	GCT	CDR-H1	3		0.4	1.33
H	CAC	H	CAT	CDR-H1	5		0.14	1.46
A	GCG	A	GCT	CDR-H2	1		0.3	1.08
I	ATC	I	ATT	CDR-H2	2		0.08	1.23
T	ACG	T	ACT	CDR-H2	3		0.44	1.36
N	AAC	N	AAT	CDR-H2	5		0.27	1.63
G	GGC	G	GGG	CDR-H2	7		0.16	1.46
G	GGC	G	GGT	CDR-H2	7		0.07	1.27
H	CAC	H	CAT	CDR-H2	8		0.19	1.38
I	ATA	I	ATT	CDR-H2	9		0.01	1.85
A	GCA	A	GCT	CDR-H2	12		0.02	1.47
A	GCA	A	GCG	CDR-H2	12		0.02	1.11
S	AGC	S	TCT	CDR-H2	14		0.01	1.57
S	AGC	S	TCG	CDR-H2	14		0	1.58
S	AGC	S	AGT	CDR-H2	14		0.07	1.14
V	GTG	V	GTT	CDR-H2	15		0.04	1.52
E	GAA	E	GAG	CDR-H2	16		0.13	1.72
G	GGA	G	GGT	CDR-H2	17		0.02	1.29
G	GGA	G	GGG	CDR-H2	17		0.02	1.44
S	AGC	S	AGT	CDR-H3	2		0.12	1.27
L	CTC	L	CTT	CDR-H3	4		0.07	1.43
L	CTC	L	TTG	CDR-H3	4		0.02	1.43
L	CTC	L	CTG	CDR-H3	4		0.02	1.50
S	TCA	S	TCG	CDR-H3	5		0.2	1.45
S	TCA	S	TCT	CDR-H3	5		0.01	1.40
S	TCA	S	AGT	CDR-H3	5		0.04	1.39
T	ACA	T	ACT	CDR-H3	6		0.08	1.14
A	GCT	A	GCG	CDR-H3	7		0.27	1.22
S	TCC	S	AGT	CDR-H3	8		0	1.53
S	TCC	S	TCG	CDR-H3	8		0.02	1.53
S	TCC	S	TCT	CDR-H3	8		0.46	0.92
S	AGC	S	TCG	CDR-H3	9		0	1.63
S	AGC	S	AGT	CDR-H3	9		0.14	1.19
L	CTA	L	TTG	CDR-H3	10		0	1.34
Y	TAC	Y	TAT	CDR-H3	12		0.34	1.34

	1H11	TNF- α	与 TNF- α 的中性 结合
平均值	0.12	1.40	1.21-1.59
SD	0.13	0.19	

图 9

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	VL CDR1-1 R24	VL CDR1-9 Y32	VL CDR2-6 Q55	VL CDR3-7 P95	VH CDR2-1 A50	VH CDR2-9 I57	VH CDR2-17 G65	VH CDR3-8 S100b
B	VL CDR1-2 A25	VL CDR1-10 L33	VL CDR2-7 S56	VL CDR3-8 Y96	VH CDR2-2 I51	VH CDR2-10 D58	VH CDR3-1 V95	VH CDR3-9 S100c
C	VL CDR1-3 S26	VL CDR1-11 A34	VL CDR3-1 Q89	VL CDR3-9 T97	VH CDR2-3 T52	VH CDR2-11 Y59	VH CDR3-2 S96	VH CDR3-10 L100d
D	VL CDR1-4 Q27	VL CDR2-1 A50	VL CDR3-2 R90	VH CDR1-1 D31	VH CDR2-4 W52a	VH CDR2-12 A60	VH CDR3-3 Y97	VH CDR3-11 D101
E	VL CDR1-5 G28	VL CDR2-2 A51	VL CDR3-3 Y91	VH CDR1-2 Y32	VH CDR2-5 N53	VH CDR2-13 D61	VH CDR3-4 L98	VH CDR3-12 Y102
F	VL CDR1-6 I29	VL CDR2-3 S52	VL CDR3-4 N92	VH CDR1-3 A33	VH CDR2-6 S54	VH CDR2-14 S62	VH CDR3-5 S99	
G	VL CDR1-7 R30	VL CDR2-4 T53	VL CDR3-5 R93	VH CDR1-4 M34	VH CDR2-7 G55	VH CDR2-15 V63	VH CDR3-6 T100	
H	VL CDR1-8 N31	VL CDR2-5 L54	VL CDR3-6 A94	VH CDR1-5 H35	VH CDR2-8 H56	VH CDR2-16 E64	VH CDR3-7 A100a	

图 10

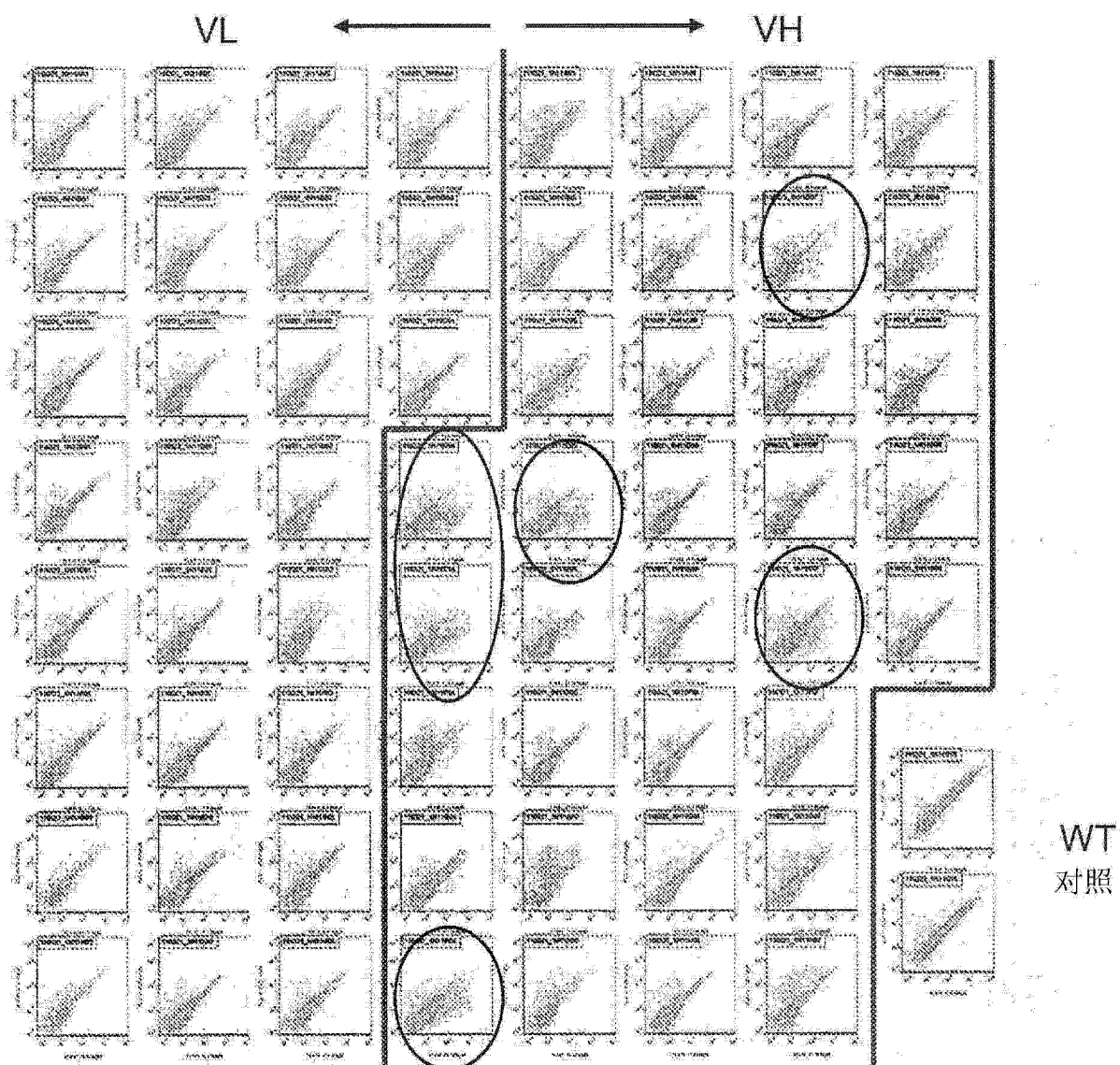


图 11

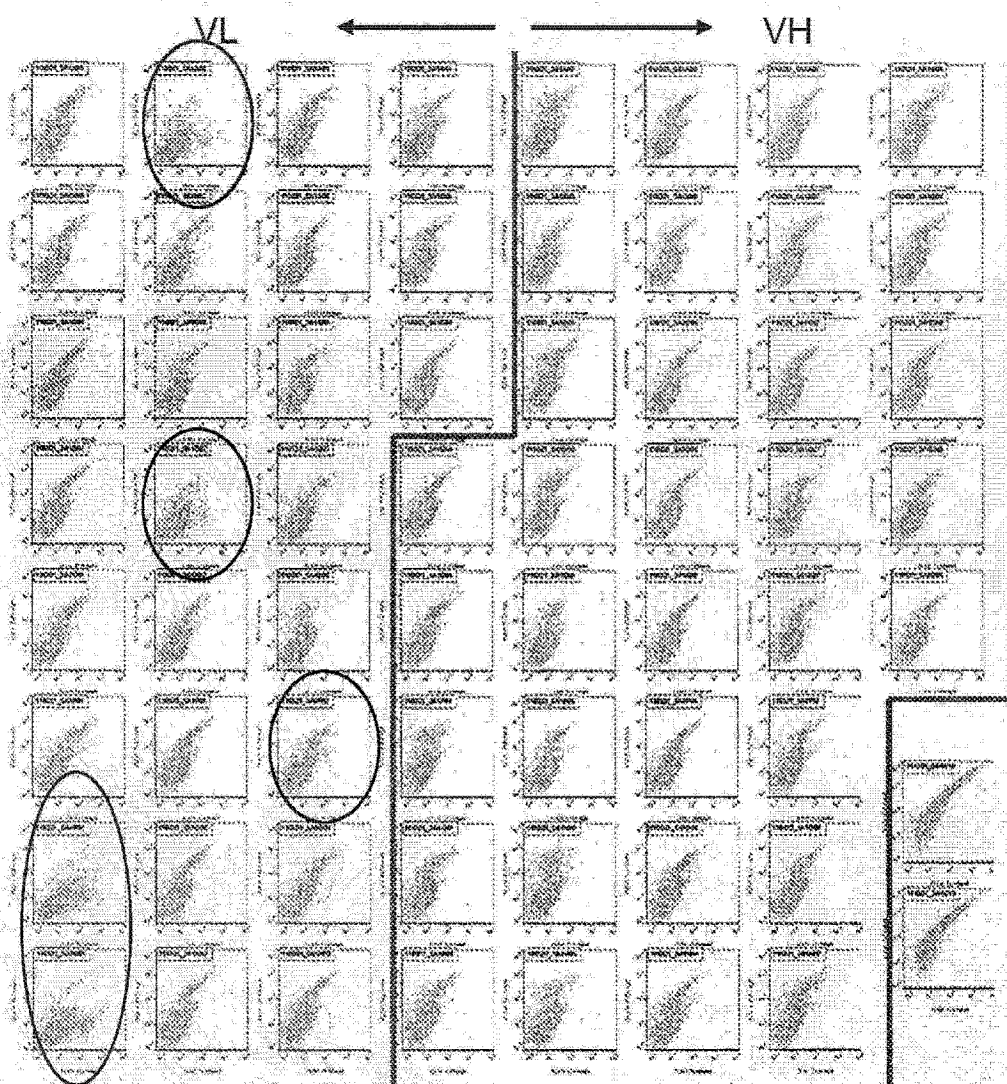


图 12

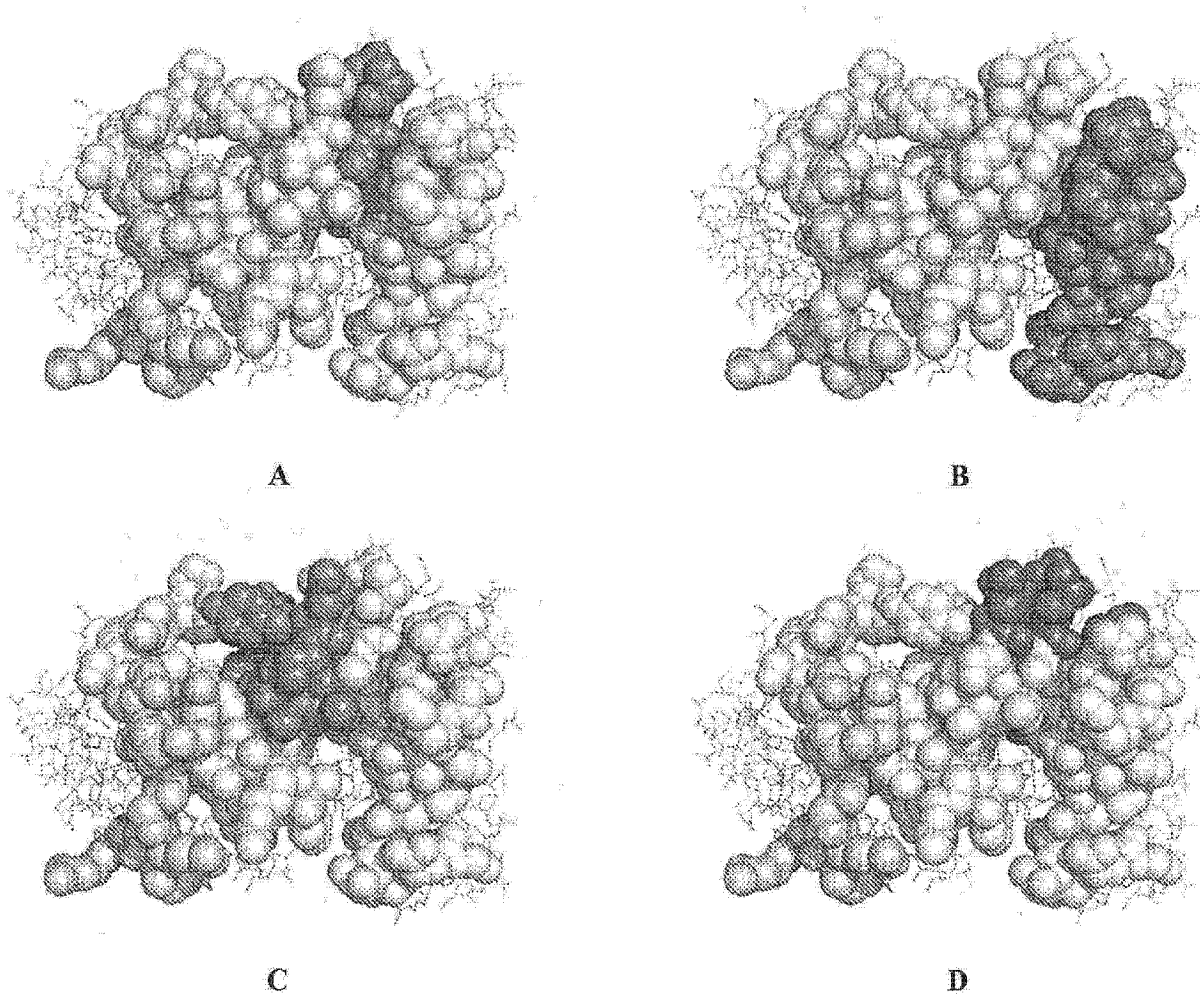


图 13A-D

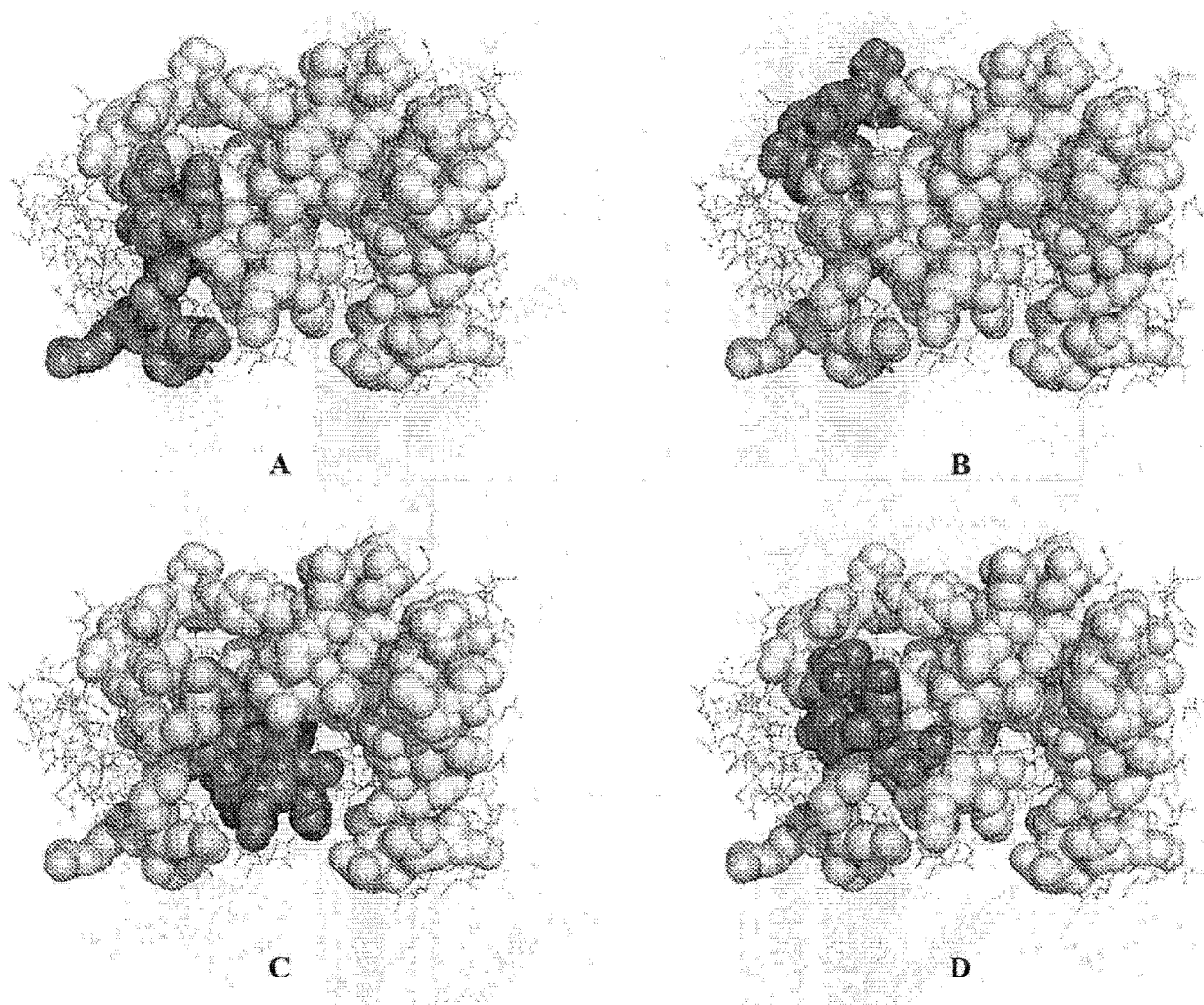


图 14A-D

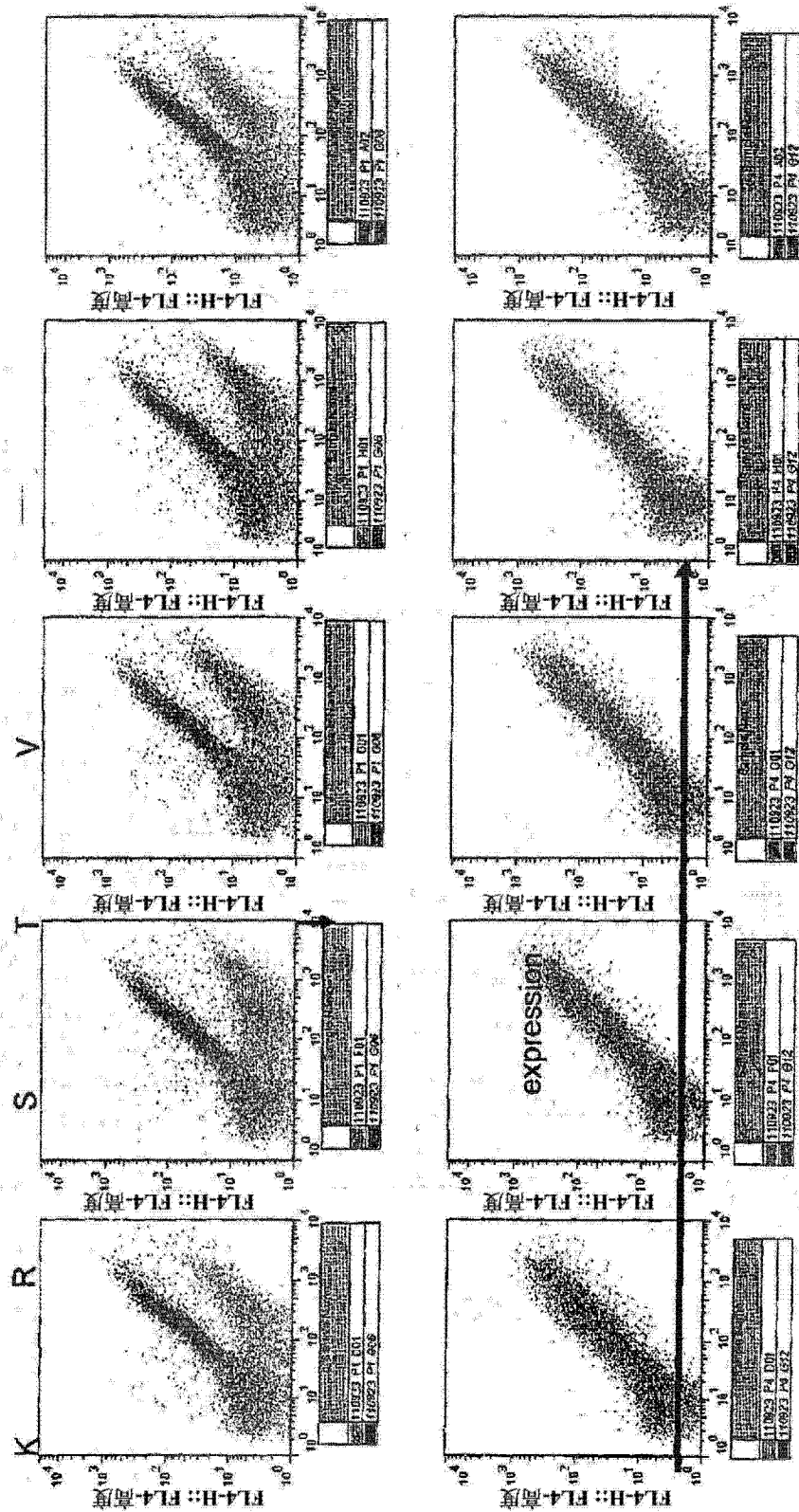


图 15

AA	CDR	位置	1H11 富集比	位置中的平均 1H11 富集比	THF α 富集比
A	CDR-H1	2	5.22	5.69	1.37
A	CDR-H1	2	6.21	5.69	1.32
C	CDR-H1	2	11.17	5.69	1.22
D	CDR-H1	2	0.56	5.69	0.03
E	CDR-H1	2	0.44	5.69	0.00
F	CDR-H1	2	0.03	5.69	1.32
G	CDR-H1	2	6.95	5.69	0.39
G	CDR-H1	2	5.42	5.69	0.25
H	CDR-H1	2	3.58	5.69	1.14
I	CDR-H1	2	6.80	5.69	1.20
K	CDR-H1	2	9.58	5.69	1.47
L	CDR-H1	2	1.44	5.69	0.95
L	CDR-H1	2	1.40	5.69	0.91
L	CDR-H1	2	1.29	5.69	0.64
M	CDR-H1	2	4.37	5.69	1.25
N	CDR-H1	2	8.40	5.69	1.60
P	CDR-H1	2	1.22	5.69	0.38
P	CDR-H1	2	1.03	5.69	0.33
Q	CDR-H1	2	9.41	5.69	1.18
R	CDR-H1	2	8.02	5.69	1.65
R	CDR-H1	2	6.88	5.69	1.46
R	CDR-H1	2	10.28	5.69	1.45
S	CDR-H1	2	7.32	5.69	1.65
S	CDR-H1	2	9.20	5.69	1.44
S	CDR-H1	2	6.28	5.69	1.28
T	CDR-H1	2	9.51	5.69	1.2
T	CDR-H1	2	6.48	5.69	1.14
V	CDR-H1	2	9.34	5.69	1.41
V	CDR-H1	2	6.44	5.69	1.28
W	CDR-H1	2	6.50	5.69	1.19

与 THF α 的 WT 结合: 1.21 - 1.60

与 1H11 的 WT 结合: 0.00 - 0.25

图 16

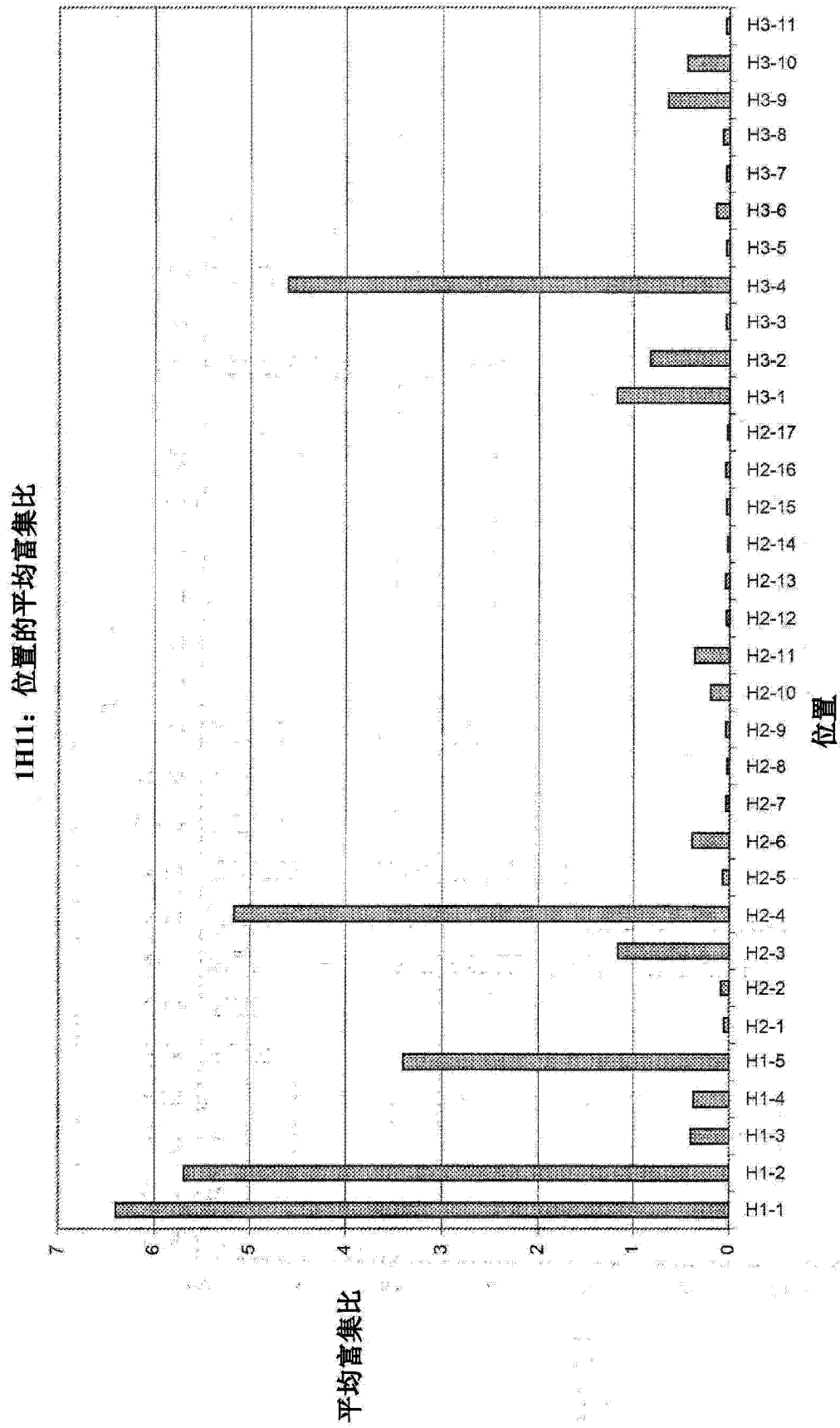


图 17

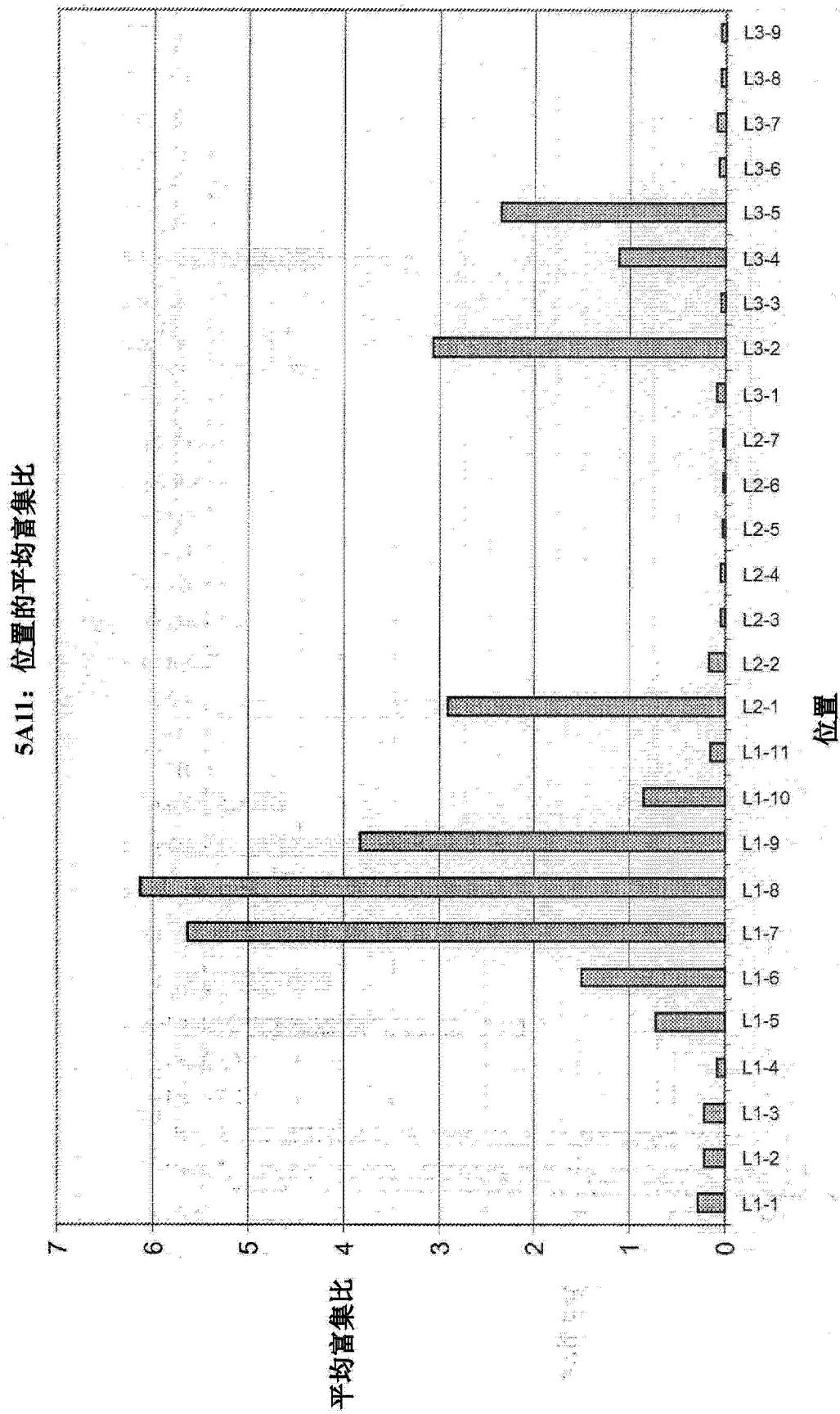


图 18

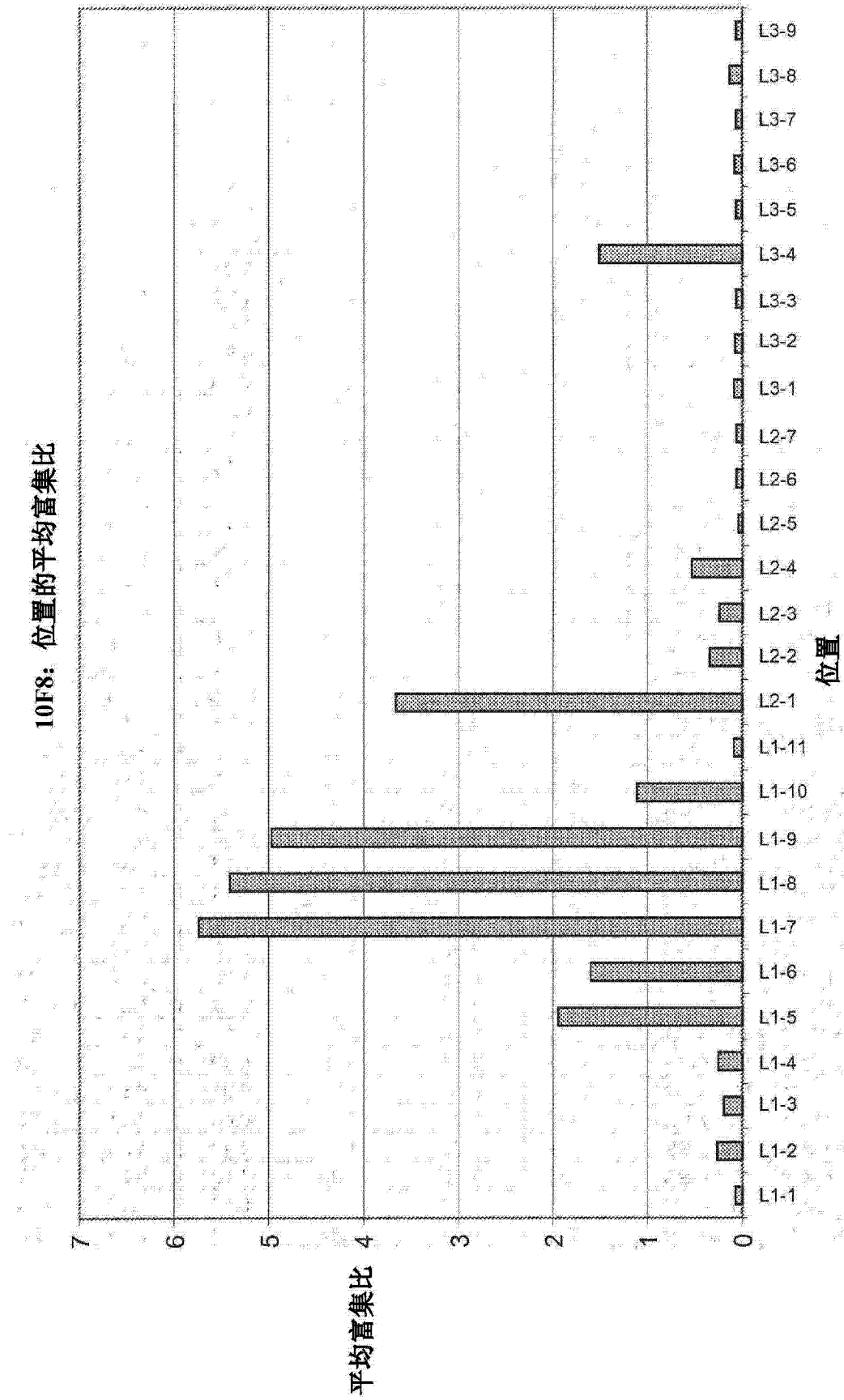


图 19

变体	记号	37440	23709	90814	84111	平均值	SD
WT	WT	1.67	-1.16	0.00	-0.44	0.02	1.20
VL-SS	VL-SS	-2.90	3.79	0.35	-0.33	0.23	2.76
VL R30T	VL4	8.44	26.36	18.92	11.19	16.23	8.08
VH Y59I + VL-SS	VH16-SS	0.13	1.60	-0.66	-0.46	0.15	1.02
VH Y59R + VL-SS	VH20-SS	-1.23	2.82	-1.08	1.24	0.44	1.95
VH V63D + VL-SS	VH24-SS	-0.77	-0.37	-0.69	-0.54	-0.59	0.18
VL G28F	VL1	3.15	15.50	0.69	0.22	4.89	7.19
VL G28V	VL2	-5.29	10.13	-0.71	-0.07	1.01	6.51
VL G28Y	VL3	-1.46	8.33	-0.16	0.00	1.68	4.48
VL N31D	VL5	-0.46	13.13	0.56	1.32	3.64	6.37
VL N31L	VL6	3.77	10.88	1.19	1.68	4.38	4.48
VL N31T	VL7	3.43	8.70	1.04	0.88	3.51	3.65
VL A50T	VL9	1.77	15.45	0.01	-0.19	4.26	7.51
VL T53D	VL10	0.00	3.77	-1.25	-0.50	0.51	2.24
VL N92F	VL11	5.96	24.50	4.50	4.41	9.85	9.80
VL N92Y	VL12	7.62	22.66	6.17	6.19	10.66	8.03
VL R93L	VL13	2.14	17.92	1.19	1.92	5.79	8.09
VL R93N	VL14	1.79	15.93	1.22	1.48	5.10	7.22
VH D31S + VL-SS	VH1-SS	3.20	25.37	2.20	1.63	8.10	11.53
VH Y32A + VL-SS	VH2-SS	8.88	31.91	4.01	2.69	11.87	13.62
VH Y32R + VL-SS	VH3-SS	11.81	52.68	5.85	3.80	18.54	23.02
VH Y32S + VL-SS	VH4-SS	7.34	25.95	4.08	2.21	9.90	10.91
VH H35E + VL-SS	VH6-SS	0.99	20.58	0.07	0.23	5.47	10.08
VH H35T + VL-SS	VH7-SS	14.67	33.27	2.20	10.15	15.07	13.18
VH T52A + VL-SS	VH8-SS	-1.98	18.61	0.64	0.86	4.53	9.48
VH T52G + VL-SS	VH9-SS	2.32	24.96	1.61	1.36	7.56	11.60
VH I57K + VL-SS	VH10-SS	-2.69	8.43	-1.23	-0.42	1.02	5.03
VH Y59A + VL-SS	VH12-SS	-2.32	4.80	-1.31	-1.09	0.02	3.23
VH Y59C + VL-SS	VH13-SS	-4.39	4.37	-1.01	-0.49	-0.38	3.61
VH Y59F + VL-SS	VH14-SS	-1.51	7.70	-0.01	-0.23	1.49	4.19
VH Y59H + VL-SS	VH15-SS	-0.38	6.28	-0.49	-0.04	1.34	3.30
VH Y59L + VL-SS	VH18-SS	-0.74	5.37	-1.39	-0.48	0.69	3.14
VH Y59M + VL-SS	VH19-SS	0.58	2.92	-1.25	-0.53	0.43	1.82
VH Y59S + VL-SS	VH21-SS	-2.89	6.58	-1.41	-1.08	0.30	4.26
VH Y59V + VL-SS	VH22-SS	-1.52	4.05	-1.24	0.20	0.37	2.56
VH Y59W + VL-SS	VH23-SS	-1.16	8.76	1.03	-0.24	2.10	4.53
VH V63L + VL-SS	VH25-SS	-0.41	7.11	-0.45	-0.10	1.54	3.72
VH G65A + VL-SS	VH26-SS	-2.74	6.44	-1.32	-0.31	0.52	4.07
VH G65E + VL-SS	VH27-SS	-2.55	8.87	-0.38	-0.46	1.37	5.10
VH G65L + VL-SS	VH28-SS	-2.94	1.80	-1.25	-1.10	-0.88	1.97
VH G65M + VL-SS	VH29-SS	-2.30	3.73	-0.30	-1.12	0.00	2.62
VH G65Q + VL-SS	VH30-SS	-1.54	5.57	1.01	-0.46	1.14	3.13
VH G65R + VL-SS	VH31-SS	3.27	7.88	-0.47	-0.14	2.63	3.88

图 20A

变体	记号	37440	23709	90814	84111	平均值	SD
VH G65S + VL-SS	VH32-SS	-1.77	5.59	-1.30	-0.46	0.51	3.43
VH V95R + VL-SS	VH33-SS	-1.47	9.95	-0.32	0.35	2.13	5.27
VH V95W + VL-SS	VH34-SS	26.86	59.72	63.70	37.73	47.00	17.63
VH L98T + VL-SS	VH35-SS	22.01	43.07	13.08	8.65	21.70	15.29
VH L98V + VL-SS	VH36-SS	9.75	45.57	6.23	3.32	16.22	19.75
VH T100V + VL-SS	VH37-SS	47.11	61.75	60.87	42.04	52.94	9.89
VH D101V + VL-SS	VH38-SS	0.93	13.57	-0.32	0.55	3.68	6.61
VH Y32K + VL-SS	VH39-SS	13.28	35.32	6.92	4.34	14.97	14.08
VH Y32V + VL-SS	VH40-SS	7.07	19.62	2.17	1.36	7.56	8.43
VH H35C + VL-SS	VH41-SS	2.04	24.36	0.94	0.77	7.03	11.57
VH H35S + VL-SS	VH42-SS	3.09	30.19	4.08	1.16	9.63	13.76
VH V95G + VL-SS	VH43-SS	29.10	53.62	18.01	13.00	28.43	18.09
G28I		5.05	15.84		-0.10	6.93	8.14
G28W		3.54	14.89		-0.05	6.13	7.80
R30I		18.99	44.28		8.46	23.91	18.41
R30V		19.04	40.09		10.16	23.10	15.37
N31E		10.69	29.20		3.37	14.42	13.31
N31G		6.16	19.35		1.03	8.85	9.45
V31R		5.80	13.38		0.78	6.65	6.35
A50V		2.15	15.98		-0.01	6.04	8.68
R93W		6.25	28.88		2.34	12.49	14.33
VH-Y32K		36.31	24.20			30.26	8.56
VH-Y32V		21.20	13.50			17.35	5.44
VH-H35C		12.70	19.40			16.05	4.74
VH-H35S		13.99	22.56			18.28	6.06
VH-V95G		34.70	38.58			36.64	2.75
DP10		99.82	84.18	95.33	71.54	87.72	12.63

图 20B

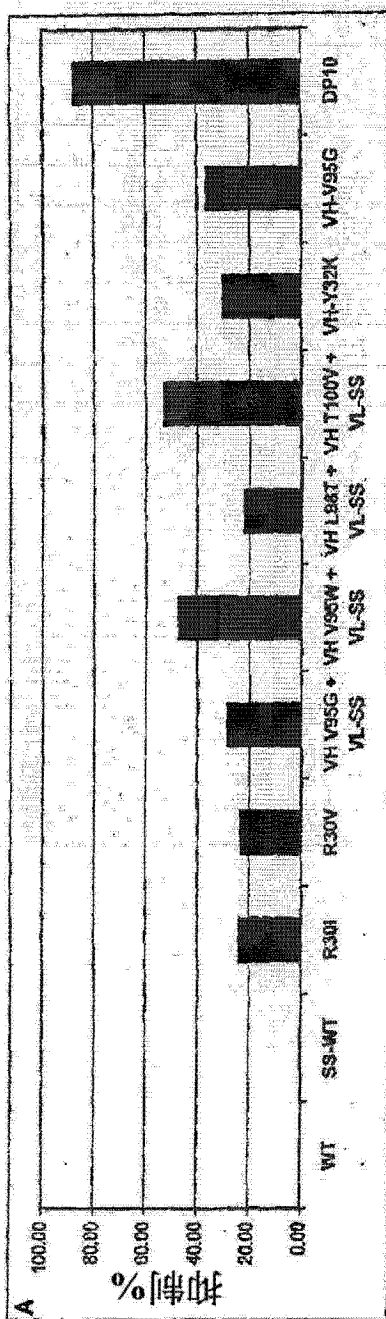


图 21A

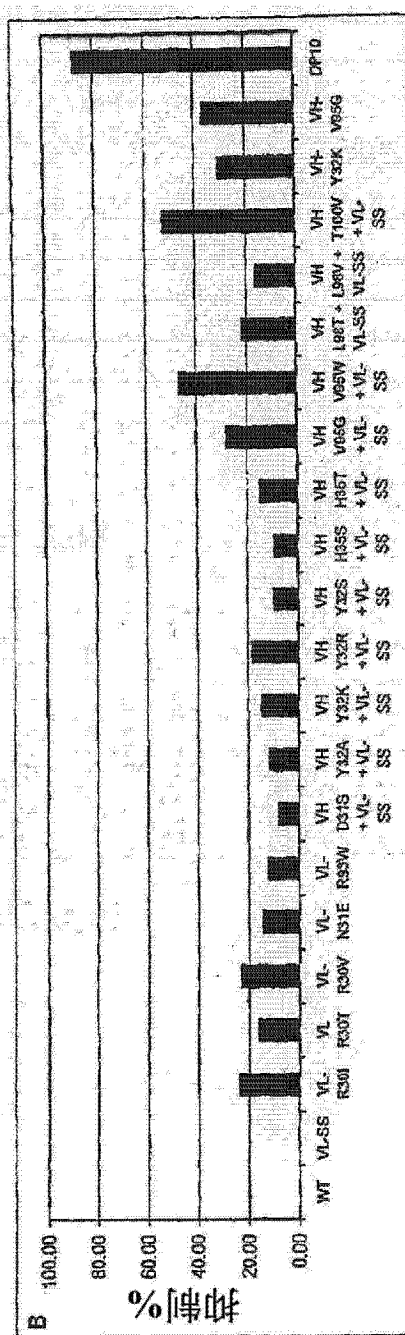


图 21B

VH	VL	ADAb 桥接	亲和性倍数	亲和性 pM
WT	WT	5	100	83 +/- 10
WT	SS	0.4	82	150
Y32K/T100V	SS	28	142	61
Y32K/V95G/T100V	SS	24	122	71
Y32K	SS/R30T	45	55	130
Y32K	SS/R30I	48	50	149
V95G/T100V	SS	15	25	335
Y32M	SS	0	21	411
V95W	R30I	95	23	379
V95W	R30T	97	0	>10,000

图 22