



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102459346 B

(45)授权公告日 2016.10.26

(21)申请号 201080026552.X	(51)Int.Cl.
(22)申请日 2010.04.27	C07K 16/46(2006.01)
(65)同一申请的已公布的文献号	C07K 16/28(2006.01)
申请公布号 CN 102459346 A	C07K 16/22(2006.01)
(43)申请公布日 2012.05.16	C07K 16/18(2006.01)
(30)优先权数据	C12N 15/13(2006.01)
61/173,129 2009.04.27 US	C12N 1/21(2006.01)
61/177,412 2009.05.12 US	C12N 1/19(2006.01)
(85)PCT国际申请进入国家阶段日	C12N 5/10(2006.01)
2011.12.15	C12P 21/02(2006.01)
(86)PCT国际申请的申请数据	C12P 21/08(2006.01)
PCT/US2010/032625 2010.04.27	A61K 39/395(2006.01)
(87)PCT国际申请的公布数据	A61P 35/00(2006.01)
W02010/129304 EN 2010.11.11	(56)对比文件
(73)专利权人 昂考梅德药品有限公司	CN 1176659 A,1998.03.18,全文.
地址 美国加利福尼亚州	CN 1511850 A,2004.07.17,全文.
(72)发明人 奥斯丁·L·格尼	CN 1558916 A,2004.12.29,全文.
阿龙·肯·萨拓	WO 2007147901 A1,2007.12.27,
(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限	审查员 蔡苗
公司 11127	
代理人 丁香兰 庞东成	

(54)发明名称

制造异源多聚体分子的方法

(57)摘要

本发明提供制造诸如双特异性抗体等异源多聚体分子的方法以及包含所述分子的组合物。该方法包括在两条多肽的界面处相接触的氨基酸中引入突变,从而修改离子对间的静电相互作用。

权利要求书2页 说明书31页
序列表7页 附图15页

1. 一种双特异性抗体,包含:

(a)包含IgG2免疫球蛋白CH3结构域的第一多肽,其中,所述CH3结构域在与IgG2的249位和288位对应的位置上含有氨基酸取代,其中与IgG2的249位和288位对应的位置上的所述氨基酸取代替换为谷氨酸;和

(b). 包含IgG2免疫球蛋白CH3结构域的第二多肽,其中,所述CH3结构域在与IgG2的236位和278位对应的位置上含有氨基酸取代,其中与IgG2的236位和278位对应的位置上的所述氨基酸取代替换为赖氨酸;

其中与同源二聚体的装配相比,所述第一多肽和第二多肽优先相互装配成异源二聚体;并且

其中所述双特异性抗体包含氨基酸序列同一的第一免疫球蛋白轻链多肽和第二免疫球蛋白轻链多肽。

2. 一种双特异性抗体,所述双特异性抗体包含:

(a)包含SEQ ID NO:5的CH3结构域的第一多肽;和

(b)包含SEQ ID NO:9的CH3结构域的第二多肽;

其中与同源二聚体的装配相比,所述第一多肽和第二多肽优先相互装配成异源二聚体;并且

其中所述双特异性抗体包含氨基酸序列同一的第一免疫球蛋白轻链多肽和第二免疫球蛋白轻链多肽。

3. 如权利要求1或2所述的双特异性抗体,其中,所述双特异性抗体特异性地结合选自由下述抗原组成的组的抗原: DLL4、VEGF、VEGFR2、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、JAG1、JAG2、EGFR、ERBB2、ERBB3、c-Met、IGF-1R、PDGFR、Patched、Hedgehog家族多肽、WNT家族多肽、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、LRP5、LRP6、CD20、IL-6、TNF α 、IL-23、IL-17、CD80、CD86、CD3、CEA、Muc16、PSMA、PSCA、CD44、c-Kit、DDR1、DDR2、RSP01、RSP02、RSP03、RSP04、BMP家族多肽、BMPR1a、BMPR1b及其组合。

4. 如权利要求3所述的双特异性抗体,其中,一条多肽特异性地结合DLL4。

5. 如权利要求3所述的双特异性抗体,其中,一条多肽特异性地结合VEGF。

6. 如权利要求3所述的双特异性抗体,其中,一条多肽特异性地结合DLL4,并且一条多肽特异性地结合VEGF。

7. 如权利要求1或2所述的双特异性抗体,所述抗体为单克隆抗体。

8. 如权利要求1或2所述的双特异性抗体,所述抗体为人源化抗体。

9. 如权利要求1或2所述的双特异性抗体,所述抗体为人抗体。

10. 如权利要求6所述的双特异性抗体,所述抗体为单克隆抗体。

11. 如权利要求6所述的双特异性抗体,所述抗体为人源化抗体。

12. 如权利要求6所述的双特异性抗体,所述抗体为人抗体。

13. 如权利要求1或2所述的双特异性抗体,所述抗体还包含细胞毒素或放射性同位素。

14. 如权利要求6所述的双特异性抗体,所述抗体还包含细胞毒素或放射性同位素。

15. 一种分离的多核苷酸,所述多核苷酸编码权利要求1~12中任一项所述的双特异性抗体。

16. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求15所述的多核苷酸。

17. 一种宿主细胞,所述宿主细胞产生权利要求1~12中任一项所述的双特异性抗体。
18. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1~14中任一项所述的双特异性抗体和药物可接受的载剂。
19. 权利要求1~14中任一项所述的双特异性抗体在制备用于治疗癌症的药物中的应用。
20. 如权利要求19所述的应用,所述治疗包括所述双特异性抗体和第二治疗剂的施用。
21. 如权利要求20所述的应用,所述第二治疗剂是化疗剂。
22. 一种制备双特异性抗体的方法,所述双特异性抗体含有包含免疫球蛋白CH3结构域的多肽和第二包含免疫球蛋白CH3结构域的多肽,所述方法包括取代第一多肽的CH3结构域内的至少一个氨基酸和取代第二多肽的CH3结构域内的至少一个氨基酸,所述取代促进异源二聚化,并且
其中所述双特异性抗体为:人IgG2,其中第一免疫球蛋白多肽中与IgG2的249和288位对应位置上的氨基酸替换为谷氨酸,并且其中第二免疫球蛋白多肽中与IgG2的236和278位对应位置上的氨基酸替换为赖氨酸;
并且
其中所述双特异性抗体包含氨基酸序列同一的第一免疫球蛋白轻链多肽和第二免疫球蛋白轻链多肽。

制造异源多聚体分子的方法

技术领域

[0001] 本发明提供制造诸如双特异性抗体等异源多聚体分子的方法,和包含所述分子的组合物。所述方法包括在两条多肽间的界面处相接触的氨基酸中引入取代。上述取代包括使组成异源多聚体分子的多肽之间的静电相互作用和/或疏水/亲水相互作用发生改变的氨基酸变化。在上述取代所产生的多聚体分子中,同源多聚体分子是不利的,而优选形成异源多聚体分子。

背景技术

[0002] 单克隆抗体的特点在于其特异性地结合特定抗原的能力,该能力使其能够在体内结合其靶标但不结合非抗原部位。一旦与靶标结合,治疗性单克隆抗体就能够递送毒性有效载量,充当受体的激动剂或拮抗剂,或充当配体的中和剂。还可以对单克隆抗体进行修饰,从而使其在各物种中具有更好的免疫耐受性。一种此类修饰是人源化,其需要将结构区域中的氨基酸置换为存在于人体中的氨基酸。随后可对人源化抗体进行进一步修饰。一种此类修饰是使人源化抗体带有额外的细胞毒性机制,其可以是放射性同位素、细菌毒素、炎性细胞因子、化疗剂或前药。

[0003] 越来越多的有功效的癌症治疗剂得到了批准,其或者是嵌合抗体(利妥昔单抗(Rituximab))或人源化IgG1(赫赛汀(Herceptin)和Campath-1H),或者是带有化疗剂的缀合物(Mylotarg)或带有放射性同位素的缀合物(Zevalin和Bexxar)。尽管存在这些进展,用于癌症治疗的单克隆抗体的功效仍然有限,因此进一步的改进还有巨大的潜力。一类有望对癌症治疗具有更强效力的抗体衍生物是双特异性抗体。

[0004] 在其结合臂中具有双重特异性的抗体通常在自然界中不存在,因此这种抗体是通过重组DNA或细胞融合技术来开发的。经设计,多数双特异性抗体可募集有效抵抗病原靶细胞的具有细胞毒性的免疫系统效应细胞。在超过15年的深入研究后,已开发出多种不同类型的双特异性抗体,但仅有少数进入了临床试验阶段。

[0005] 在最早的双特异性抗体当中,有经设计用来使针对癌靶细胞的T细胞重新定向的构建体。当细胞毒性T淋巴细胞(CTL)附着在肿瘤细胞上并同时被与T细胞受体(TCR)-CD3复合体相互作用的双特异性抗体的一个臂触发时,靶细胞会被杀死。CTL据认为是免疫系统的最强力的杀伤细胞,其因缺乏Fc γ 受体而不能被单克隆抗体使用。

[0006] 另一类双特异性抗体是同时结合肿瘤细胞和激活性Fc γ 受体(例如,单核细胞上的CD64/Fc γ RI)的那些双特异性抗体。该类型的双特异性抗体与Fc γ 受体的结合能够引发效应细胞的活化,并且不受到同时结合正常IgG的竞争。

[0007] 一种产生双特异性抗体的方法称为“knobs-into-holes(球入洞)”方案(参见例如WO 2006/028936)。在此技术中,使构成人IgG中CH3结构域的界面的选定氨基酸突变,从而减少了Ig重链的错配。在CH3结构域内两条重链的直接相互作用的位置上,将具有小侧链的氨基酸(hole(洞))引入一条重链的序列中,并将具有大侧链的氨基酸(knob(球))引入另一条的序列中。结果是,据已描述,knob和hole之间的蛋白相互作用导致了经转染的哺乳动物

宿主细胞形成了多达90%的正确的双特异性人IgG。

[0008] 本发明通过用疏水性更高的氨基酸残基置换参与亲水相互作用的氨基酸残基和/或通过用另一氨基酸置换参与电荷相互作用的氨基酸来使在两条多肽间的界面处相互作用的选定氨基酸突变,从而提供了优选形成异源多聚体分子的方法。

发明内容

[0009] 本发明提供制备包含两条多肽的异源多聚体多肽的方法,所述两条多肽都含有人免疫球蛋白CH3结构域,所述方法包括将所述两条多肽中的一条的CH3结构域内的至少一个氨基酸取代为另一氨基酸,从而促进异源多聚体的形成,所述至少一个氨基酸位于与选自自由人IgG2的236位、245位、249位、278位、286位和288位组成的组的位置对应的位置。在一个实施方式中,本发明提供制备包含两条多肽的异源多聚体多肽的方法,所述两条多肽都含有人免疫球蛋白CH3结构域,所述方法包括将所述两条多肽中的每一条的CH3结构域中的至少一个带电荷氨基酸残基取代为带相反电荷的氨基酸。在另一个实施方式中,取代后的氨基酸对在异源多聚体多肽中形成离子对。

[0010] 在另一个实施方式中,本发明提供制备包含两条多肽的异源多聚体多肽的方法,所述两条多肽都含有人免疫球蛋白CH3结构域,所述方法包括将所述两条多肽中的一条的CH3结构域中的至少一个亲水氨基酸残基取代为另一氨基酸。在一个实施方式中,将该亲水氨基酸残基取代为疏水残基。在某些实施方式中,取代造成了对具有羟基侧链的氨基酸的置换,所述具有羟基侧链的氨基酸被不具有羟基侧链的氨基酸取代。在另一实施方式中,该方法还包括:将一条多肽的CH3结构域中的至少一个亲水氨基酸残基取代为另一氨基酸所述两条多肽的界面处所述两条多肽中的一条取代为另一氨基酸。在又一实施方式中,取代后的氨基酸在所述两条多肽的界面处与另一氨基酸相互作用。据预测可在界面处相互作用的代表性氨基酸包括表1中列出的那些氨基酸,或者是位于与表1中列出的那些氨基酸对应的位置上的氨基酸。

[0011] 在一个实施方式中,两条多肽的人免疫球蛋白CH3结构域选自由IgG、IgA和IgD的CH3结构域组成的组。在另一实施方式中,免疫球蛋白CH3结构域是IgG2CH3结构域。

[0012] 在一个实施方式中,含有CH3结构域的第一条多肽包含与第一免疫球蛋白轻链多肽特异性地结合的第一免疫球蛋白重链多肽,含有CH3结构域的第二条多肽包含与第二免疫球蛋白轻链多肽特异性地结合的第二免疫球蛋白重链多肽。在另一实施方式中,第一免疫球蛋白轻链多肽和第二免疫球蛋白轻链多肽在氨基酸序列上是同一的。

[0013] 在一个实施方式中,所述方法包括取代一个CH3结构域中的位于与人IgG2的249位和288位对应的位置上的氨基酸。在另一实施方式中,用谷氨酸置换位于249位和288位的氨基酸。在另一实施方式中,用天冬氨酸置换位于249位和288位上的氨基酸。在一个实施方式中,所述方法包括取代一个CH3结构域中的位于与人IgG2的249位、286位和288位对应的位置上的氨基酸。在另一实施方式中,用谷氨酸置换位于249位和288位上的氨基酸,且用苯丙氨酸置换位于286位上的氨基酸。在一个实施方式中,所述方法还包括取代第二个CH3结构域中的位于与人IgG2的236位和278位对应的位置上的氨基酸。在另一实施方式中,用赖氨酸置换位于236位上的氨基酸,且用赖氨酸置换位于278位上的氨基酸。

[0014] 在一个实施方式中,所述方法包括取代一个CH3结构域中的位于与人IgG2的236位

和278位对应的位置上的氨基酸。在另一实施方式中,用赖氨酸置换位于236位上的氨基酸,且用赖氨酸置换位于278位上的氨基酸。

[0015] 在一个实施方式中,所述方法包括制备一价的异源多聚体多肽。在另一个实施方式中,所述方法包括制备包含可检测的标签或表位的一价异源多聚体多肽。

[0016] 在一个实施方式中,所述方法包括制备二价的异源多聚体多肽。在另一个实施方式中,第一条多肽通过其免疫球蛋白抗原结合域结合靶分子,而第二条多肽是免疫粘附素。在一个实施方式中,相对于同源二聚体的装配,第一条和第二条多肽优选相互装配成异源二聚体。在另一个实施方式中,第一条和第二条多肽装配形成双特异性抗体。

[0017] 在一个实施方式中,所述方法包括制备异源多聚体分子,其中,含有CH3结构域的第一条多肽包含与第一免疫球蛋白轻链多肽特异性地结合的第一免疫球蛋白重链多肽,含有CH3结构域的第二条多肽包含与第二免疫球蛋白轻链多肽特异性地结合的第二免疫球蛋白重链多肽。在另一实施方式中,第一免疫球蛋白轻链多肽和第二免疫球蛋白轻链多肽在氨基酸序列上是同一的。在又一实施方式中,免疫球蛋白轻链多肽与免疫球蛋白重链多肽连接。

[0018] 在一个实施方式中,所述方法包括制备特异性地结合两种不同抗原的双特异性抗体。在另一个实施方式中,双特异性抗体结合同一抗原上的两个不同的表位。

[0019] 在一个实施方式中,所述方法包括制备特异性地结合抗原的异源多聚体多肽,所述抗原选自DLL4、VEGF、VEGFR2、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Notch(全)、JAG1、JAG2、DLL(全)、JAG(全)、EGFR、ERBB2、ERBB3、ERBB(全)、c-Met、IGF-1R、PDGFR、Patched、Hedgehog家族多肽、Hedgehog(全)、WNT家族多肽、WNT(全)、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、FZD(全)、LRP5、LRP6、CD20、IL-6、TNF α 、IL-23、IL-17、CD80、CD86、CD3、CEA、Muc16、PSMA、PSCA、CD44、c-Kit、DDR1、DDR2、RSP01、RSP02、RSP03、RSP04、RSP0(全)、BMP家族多肽、BMP(全)、BMPR1a、BMPR1b及其组合组成的组。

[0020] 在一个实施方式中,所述方法包括制备包含VEGF结合序列的异源多聚体多肽,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的轻链序列。在另一个实施方式中,异源多聚体多肽包含VEGF结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:13的轻链序列。在又一个实施方式中,异源多聚体多肽包含VEGF结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:15的轻链序列。在再又一个实施方式中,异源多聚体多肽包含DLL4结合序列,所述DLL4结合序列包含SEQ ID NO:19。

[0021] 在一个实施方式中,所述方法包括制备异源多聚体多肽,所述异源多聚体多肽是结合DLL4和VEGF的双特异性抗体。在一个实施方式中,异源多聚体多肽包含序列同一的轻链多肽。在另一实施方式中,轻链多肽与重链多肽连连接。在又一个实施方式中,所述双特异性抗体包含VEGF结合序列和DLL4结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的轻链序列;所述DLL4结合序列包含SEQ ID NO:19。在又一个实施方式中,所述异源多聚体多肽包含VEGF结合序列和DLL4结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:13的轻链序列;所述DLL4结合序列包含SEQ ID NO:19。在再一个实施方式中,所述异源多聚体多肽包含VEGF结合序列和DLL4结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:15的轻链序列;所

述DLL4结合序列包含SEQ ID NO:19。

[0022] 本发明还提供特异性地结合VEGF的抗体,其中,所述抗体包含:(a)包含GYTFTNYWMH(SEQ ID NO:20)的重链CDR1、包含SINPSNGGTSYNEKFKR(SEQ ID NO:21)的重链CDR2、和包含HYYDNSYAMDY(SEQ ID NO:22)的重链CDR3;和/或(b)包含QASQDISNYVN(SEQ ID NO:23)的轻链CDR1、包含DASNLQT(SEQ ID NO:24)的轻链CDR2、和包含QQYDDLPP(SEQ ID NO:25)的轻链CDR3。本发明还提供特异性地结合VEGF的抗体,其中,所述抗体包含:(a)包含GYTFTNYWMH(SEQ ID NO:20)的重链CDR1、包含SINPSNGGTSYNEKFKR(SEQ ID NO:21)的重链CDR2、和包含HYYDNSYAMDY(SEQ ID NO:22)的重链CDR3;和/或(b)包含RASQGINHLAW(SEQ ID NO:26)的轻链CDR1、包含AASNLHS(SEQ ID NO:27)的轻链CDR2、和包含QQYDNLPL(SEQ ID NO:28)的轻链CDR3。

[0023] 在一个实施方式中,所述抗体是人VEGF的拮抗剂。在另一个实施方式中,所述抗VEGF抗体是抗体片段。在一个实施方式中,所述抗体是单克隆抗体或人源化抗体。

[0024] 在一个实施方式中,所述抗VEGF抗体抑制肿瘤生长。

[0025] 在一个实施方式中,所述抗VEGF抗体以约100nM以下的 K_D 结合人VEGF。

[0026] 本发明还提供用本文所述的方法制得的异源多聚体多肽。在一个实施方式中,异源多聚体多肽具有用本文所述的方法制得的异源多聚体多肽的特性。

[0027] 在一个实施方式中,异源多聚体多肽是一价的。

[0028] 在另一个实施方式中,异源多聚体多肽是二价的。在又一个实施方式中,异源多聚体多肽是双特异性抗体。

[0029] 本发明还提供包含免疫球蛋白CH3结构域的多肽,其中,所述CH3结构域在与人IgG2的249位和288位对应的位置上具有谷氨酸。

[0030] 本发明还提供包含免疫球蛋白CH3结构域的多肽,其中,所述CH3结构域在与人IgG2的249位和288位对应的位置上具有谷氨酸,且在与人IgG2的286位对应的位置上具有苯丙氨酸。

[0031] 本发明还提供包含免疫球蛋白CH3结构域的多肽,其中,所述CH3结构域在与人IgG2的236位和278位对应的位置上具有赖氨酸。

[0032] 在一个实施方式中,多肽免疫球蛋白CH3结构域是IgG CH3结构域。

[0033] 在一个实施方式中,异源多聚体多肽同时包含下述(i)和(ii):(i)包含免疫球蛋白CH3结构域的多肽,其中,所述CH3结构域在与人IgG2的249位和288位对应的位置上具有谷氨酸;或包含免疫球蛋白CH3结构域的多肽,其中,所述CH3结构域在与人IgG2的249位和288位对应的位置上具有谷氨酸且在与人IgG2的286位对应的位置上具有苯丙氨酸;(ii)包含免疫球蛋白CH3结构域的多肽,其中,所述CH3结构域在与人IgG2的236位和278位对应的位置上具有赖氨酸。

[0034] 在一个实施方式中,含有CH3结构域的第一条和/或第二条多肽还包含免疫球蛋白CH2结构域。

[0035] 在一个实施方式中,所述多肽包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0036] 在一个实施方式中,所述多肽包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0037] 在一个实施方式中,所述多肽包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0038] 在一个实施方式中,异源多聚体多肽包含:选自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7组成的组的第一氨基酸序列;和选自由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9组成的组的第二氨基酸序列。

[0039] 本发明还提供包含选自SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:9的多肽的异源多聚体多肽。在一个实施方式中,异源多聚体多肽是异源二聚体。在另一个实施方式中,异源多聚体多肽是双特异性抗体。在又一个实施方式中,异源多聚体多肽是一价抗体。

[0040] 在一个实施方式中,异源多聚体多肽特异性地结合选自由下述抗原组成的组的抗原:DLL4、VEGF、VEGFR2、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Notch(全)、JAG1、JAG2、DLL(全)、JAG(全)、EGFR、ERBB2、ERBB3、ERBB(全)、c-Met、IGF-1R、PDGFR、Patched、Hedgehog家族多肽、Hedgehog(全)、WNT家族多肽、WNT(全)、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、FZD(全)、LRP5、LRP6、CD20、IL-6、TNF α 、IL-23、IL-17、CD80、CD86、CD3、CEA、Muc16、PSMA、PSCA、CD44、c-Kit、DDR1、DDR2、RSP01、RSP02、RSP03、RSP04、RSP0(全)、BMP家族多肽、BMP(全)、BMPR1a、BMPR1b及其组合。

[0041] 在一个实施方式中,异源多聚体多肽包含VEGF结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的轻链序列。在另一个实施方式中,异源多聚体多肽包含VEGF结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:13的轻链序列。在一个实施方式中,异源多聚体多肽包含SEQ ID NO:10的VH序列和SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30的VL序列。在另一个实施方式中,异源多聚体多肽包含VEGF结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:15的轻链序列。在又一个实施方式中,异源多聚体多肽包含DLL4结合序列,所述DLL4结合序列包含SEQ ID NO:19。

[0042] 在一个实施方式中,异源多聚体多肽是结合DLL4和VEGF的双特异性抗体。在一个实施方式中,VEGF结合序列包含SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18。在一个实施方式中,DLL4结合序列包含SEQ ID NO:19。在另一个实施方式中,所述双特异性抗体包含VEGF结合序列和DLL4结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的轻链序列;所述DLL4结合序列包含SEQ ID NO:19。在又一个实施方式中,所述异源多聚体多肽包含VEGF结合序列和DLL4结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:13的轻链序列;所述DLL4结合序列包含SEQ ID NO:19。在再一个实施方式中,所述异源多聚体多肽包含VEGF结合序列和DLL4结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:15的轻链序列;所述DLL4结合序列包含SEQ ID NO:19。

[0043] 在一个实施方式中,异源多聚体多肽包含氨基酸序列同一的轻链多肽。在另一实施方式中,异源多聚体多肽包含与重链多肽连接的轻链多肽。

[0044] 在一个实施方式中,异源多聚体多肽包含在一个CH3结构域中的位于与人IgG2的249位和288位对应的位置上的取代氨基酸。在一个实施方式中,用谷氨酸置换异源多聚体多肽在249位和288位上的氨基酸。在另一实施方式中,用天冬氨酸置换位于249位和288位上的氨基酸。

[0045] 在一个实施方式中,异源多聚体多肽包含在第二个CH3结构域中的位于与人IgG2的236位和278位对应的位置上的取代氨基酸。在一个实施方式中,用赖氨酸置换异源多聚体多肽在236位上的氨基酸,且用赖氨酸置换该异源多聚体多肽在278位上的氨基酸。在一个实施方式中,异源多聚体多肽包含在一个CH3结构域中的位于与人IgG2的236位和278位对应的位置上的取代氨基酸。

[0046] 在一个实施方式中,含有CH3结构域的第一条和/或第二条多肽还包含单链Fv。

[0047] 本发明还提供分离的多肽,所述分离的多肽包含选自由SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30组成的组的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述分离的多肽是抗体。

[0048] 在一个实施方式中,异源多聚体多肽还包含细胞毒素或放射性同位素。

[0049] 本发明还提供编码本发明的多肽或抗体的多核苷酸。本发明还提供在高度严格条件下与编码本发明的多肽或抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。

[0050] 本发明还提供包含本发明的多核苷酸的宿主细胞。

[0051] 本发明还提供制造异源多聚体多肽的方法,所述方法包括在使所述多肽表达的条件下培养所述宿主细胞。

[0052] 本发明还提供包含本发明的异源多聚体多肽和药物可接受的载剂的药物组合物。

[0053] 本发明还提供治疗病症的方法,所述方法包括向有治疗需要的患者施用本发明的异源多聚体多肽或组合物。在一个实施方式中,所述病症是癌症。在另一个实施方式中,所述方法还包括施用第二治疗化合物。在一个实施方式中,将所述第二治疗化合物用来治疗因向患者施用异源多聚体多肽而引起的副作用。在另一实施方式中,所述第二治疗化合物是抗癌剂。在又一个实施方式中,将异源多聚体多肽和第二治疗化合物同时施用或依次施用。

附图说明

[0054] 图1:抗体CH2和CH3结构域的结构。该结构是存储在PDB中的抗体Fc结构域的结构(文件1FC1)(Deisenhofer.J.(1981)Biochemistry,20,2361-2370),在用Pymol软件程序(DeLano Scientific LLC,California USA)生成的带式视图中显示。显示了二聚体结构中每条链的CH2和CH3结构域。Fc段的二聚体化是通过CH3结构域间的相互作用来介导的。

[0055] 图2:CH3二聚体界面。所显示的是CH3结构域的带式结构视图。左侧是两个CH3结构域的二聚体的图像。右侧是单CH3结构域的图像,并且绘出了可能参与链间相互作用的氨基酸的侧链。

[0056] 图3:选定参与链间相互作用的氨基酸。显示了二聚体化的CH3结构域的三个单独视图,选择这些视图可最佳地观察特定的氨基酸残基。该结构示于用Pymol软件程序(DeLano Scientific LLC,California USA)生成的带式视图中。每个视图都突出显示了据推测参与链间配对的选定氨基酸。通过绘出侧链并通过氨基酸标志和位置,突出显示了单个的氨基酸。编号方案与人IgG2恒定区相对。

[0057] 图4:对人IgG同种型的比对。显示了对人IgG同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的恒定区的比对。CH3结构域由线指示。实心圆标注出了图2和图3中所突出显示的且据推测参与链间相互作用的单个氨基酸。

[0058] 图5:用于评估同源二聚体化和异源二聚体化的测定构造。为了确定Fc变体发生同源二聚体化或与另一Fc变体发生异源二聚体化的相对倾向,发明人制备了“微抗体(mini-body)”表达构建体,该构建体编码连接区和与N端信号序列及FLAG表位连接的IgG2的CH2-CH3结构域(人IgG2恒定区的氨基酸103~326)。该构建体在转染细胞时指导分泌型二聚体Fc结构域(此处称之为“微抗体”)的表达。蛋白质印迹分析揭示出,微抗体的大小远小于通过用编码重链和轻链的表达载体转染细胞而产生的完整抗体的大小。通过用编码完整抗体和微抗体Fc结构域构建体的载体转染细胞,可以评估异源二聚体的形成。异源二聚体的形成将产生包含一条微抗体链和复合有轻链的一条全长重链的中等大小的分子。

[0059] 图6:高效形成异源二聚体Fc结构域的抗体变体。制造了编码含有野生型人IgG2CH2和CH3结构域(Wt)及变体(Var1(亦称作13B),和Var2)的带FLAG标签的微抗体的表达载体质粒、编码含有野生型人IgG2CH2和CH3结构域(Wt)或变体(Var3/13A)的全长重链的表达载体质粒和编码全长轻链(L2)的表达载体质粒。Var1包含CH3结构域内的249位Lys至Glu的氨基酸取代和288位Lys至Glu的氨基酸取代。抗体Var2包含CH3结构域内的249位Lys至Glu的氨基酸取代、268位Tyr至Phe的氨基酸取代和288位Lys至Glu的氨基酸取代。抗体Var3(亦称作13A)包含236位Glu至Lys的氨基酸取代和278位Asp至Lys的氨基酸取代。用上述表达载体的组合瞬时转染HEK293细胞。用抗FLAG抗体进行了非还原性蛋白质印迹分析,从而揭示分泌出的抗体产物的大小。野生型人IgG2容易展示出同源二聚体化,如右图所示,其中,容易检测到表达出的含有野生型人CH2-CH3结构域的带Flag标签的“微抗体”。抗体Var1(13B)发生同源二聚体化的能力大幅度降低。抗体Var2没有或几乎没有显示出同源二聚体化能力。在中图和左图中,微抗体变体与全长重链变体共表达,并且产生了异源二聚体抗体形式。野生型全长重链和野生型微抗体的共表达导致产生了两种同源二聚体(如中图中的抗FLAG蛋白质印迹和在右图抗Fc蛋白质印迹中观察到的质量中等的条带所清楚展示的)。这些数据显示,Var1(13B)和Var3(13A)的共表达使同源二聚体化优先,而Var2和Var3的共表达几乎只产生异源二聚体。

[0060] 图7:双特异性抗体与两个靶标的结合。进行了酶联免疫吸附测定(ELISA)来检查双特异性抗体变体(Var2-Var3)结合抗原的能力。不用抗原(-)或者用抗FLAG抗体(0.05mg/ml,来自SIGMA的克隆M2)或重组人DLL4(0.1mg/ml)(带羧基端8×His标签的氨基酸27~519)包被ELISA板。随后将经包被的板与对照细胞培养基(阴性对照)或与来自转染有编码上述Var2、Var3和轻链L2的表达载体的细胞的条件培养基温育。结果显示,通过共表达Var2和Var3重链和L2轻链而产生的双特异性抗体变体能够结合DLL4(即用来产生Var3的亲本野生型抗体所识别的抗体),还能够因Var重链变体臂所呈现的FLAG表位标签而能够结合抗FLAG抗体。

[0061] 图8:抗VEGF Fab(219R0302)部分阻断VEGF所诱导的HUVEC增殖。在抗VEGF Fab片段219R0302背景下,在第7天对HUVEC细胞进行增殖抑制筛选。用M199+2%FBS作为饥饿培养基,并将体积标准化至测试样品的最低浓度。以多种测试抗体、贝伐单抗(Avastin)和作为对照的重组人VEGF为背景,测试了219R0302Fab。

[0062] 图9:抗VEGF Fab(219R0302)阻断VEGFR2Fc与hVEGF的biacore表面的结合。使用标准NHS/EDC化学手段在CM5芯片上生成VEGF表面。使219R0302Fab或对照非结合性Fab流过该表面,随后立即注射VEGFR2。如所显示的,VEGFR2在对照Fab实验中与VEGF结合良好,而在

219R0302Fab实验中受到阻断。

[0063] 图10:抗VEGF IgG(219R0302和219R0202)以与贝伐单抗(Avastin)相似的程度阻断VEGF所诱导的HUVEC增殖。将21R0302和219R0202IgG重构造为IgG2,并进行表达和纯化,用于确认性体外测试。

[0064] 图11:抗VEGF抗体219R0302和219R0202在PE13乳腺肿瘤异种移植模型中抑制肿瘤生长。用300,000个活的PE13细胞向小鼠右侧肋部进行皮下注射。219R0302诱导了比219R0202更强的肿瘤生长延迟。Avastin显示出了与219R0302无差别的最强力的生长延迟,表明219R0302和Avastin在此模型中具有几乎相等的效力。与219R0302不同,219R0202在统计学上不同于Avastin和219R0302。

[0065] 图12:双特异性抗体构造。B)单基因双特异性抗体(SGBSP)。在此构造中,通过30个氨基酸的连接物(6×GGGS)将每条轻链连接在其相应的重链上。C)一价双特异性抗体(MBSP)。在此构造中,使用了同样的轻链,该同样的轻链可以源自任何一个亲本抗体。在与同样的轻链组合时,两条重链之一或全部必须能够结合其靶标。

[0066] 图13:SGBSP和MBSP是超过90%的异源二聚体,并且可以通过改变Var3/Var1比来消除同源二聚体。A)经蛋白A纯化的SGBSP(9219R0202_21M18)和MBSP(219R0202重链(13A/Var3),21M18重链(13B/Var1),21M18轻链)纯度高于90%,并且包含小部分的Var1同源二聚体(SBSP:21M18SGBSP同源二聚体(13B/Var1);MBSP:带有21M18轻链的21M18重链(13B/Var1))。泳道1:标准品,泳道2:21M18,泳道3:MBSP,泳道4:空白,泳道5:SGBSP。MBSP异源二聚体pI约7.1;MBSP 13A同源二聚体pI约8.3;MBSP 13B同源二聚体pI约6.2;SGBSP异源二聚体pI约7.8;SGBSP 13A同源二聚体pI约8.6;SGBSP 13B同源二聚体pI约6.4。B)可以通过使用至少2:1倍的摩尔过量的219R0202重链(13A/Var3):21M18重链(13B/Var1)来使MBSP 13B/Var1同源二聚体的比例最小化。13A:13B重链比:泳道1,1:8;泳道2,1:6;泳道3,1:4;泳道4,1:2;泳道5,1:1;泳道6,2:1;泳道7,4:1;泳道8,6:1;泳道9,8:1;泳道10,梯形带。

[0067] 图14:SGBSP部分阻断VEGF所诱导的HUVEC增殖。219R0302_21M18和219R0202_21M18SGBSP均部分抑制VEGF所诱导的HUVEC增殖,且后者显示出明显比前者更高的活性。

[0068] 图15:双特异性抗体与经hDLL4转染的细胞良好结合。LZ1,非特异性抗体对照;SGBSP,219R0202_21M18单基因双特异性抗体;MBSP,带有同样的21M18LC的219R0202_21M18一价双特异性抗体;Homo 13A,仅与21M18LC一起表达的219R0202HC(具有13A突变);Homo 13B,仅与21M18LC一起表达的21M18HC(具有13B突变)。将结合曲线拟合至非线性变换,从而产生括号中所示的EC50值(NF表示无拟合)。

[0069] 图16:两种SGBSP和MBSP以特异性的方式同时结合VEGF和DLL4。通过使用双靶向测定,219R0302_21M18和219R0202_21M18两种SGBSP(图A)和MBSP(图B)均显示出同时与VEGF和DLL4的结合。

[0070] 图17:SGBSP在VEGF所诱导的增殖测定中显示出部分抑制。与贝伐单抗(Avastin)和rhVEGF对照相比,SGBSP显示出对VEGF所诱导的增殖的部分抑制。

具体实施方式

[0071] 本发明提供用于产生诸如双特异性抗体等异源多聚体多肽的方法、组合物和试剂盒。本发明使得能够以高产量产生主要是(且在某些实施方式中,几乎完全是)异源多聚体

的分子。本文中提供了关于方法、组合物和试剂盒的详细内容。

[0072] “异源多聚体”、“异源多聚体复合体”、“异源多聚体多肽”或“异源多聚体分子”在本文中可互换使用,指的是至少包含第一条多肽和第二条多肽的分子,其中,所述第二条多肽在氨基酸序列上与所述第一条多肽相差至少一个氨基酸残基。异源多聚体可以包括由所述第一条多肽和第二条多肽形成的“异源二聚体”,或者可以形成更高级的三级结构,在所述三级结构中还存在除所述第一条多肽和第二条多肽以外的多肽。

[0073] 除了上下文另外指明的情况,术语“第一条”多肽和“第二条”多肽及其变形仅是一般性代号,不应将其视作确定本发明的异源多聚体的具体或特定的多肽或组成部分。

[0074] 术语“多肽”、“肽”、“蛋白”和“蛋白片段”在本文中可互换使用,指的是氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于:其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人造化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0075] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及在功能上与天然存在的氨基酸相似的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及后来受到修饰的那些氨基酸,例如,羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指基础化学结构与天然存在的氨基酸相同的化合物,例如,与氢、羧基、氨基和R基结合的 α 碳,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这种类似物可以具有经修饰的R基(例如正亮氨酸)或经修饰的肽骨架,但保留了与天然存在的氨基酸相同的基础化学结构。氨基酸模拟物是指结构与氨基酸的通常化学结构不同、但功能与天然存在的氨基酸相似的化合物。带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸(或天冬氨酸盐)和谷氨酸(或谷氨酸盐)。带正电荷的氨基酸包括精氨酸、组氨酸和赖氨酸。

[0076] 在最广意义上讲,本文所用的术语“抗体”和“免疫球蛋白”可以互换使用,其包括本文所述的单克隆抗体(例如,全长或完整的单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体,只要其表现出所需生物活性即可)和抗体片段。术语“双特异性抗体”意在包括具有两种不同的结合特异性的任何抗体,即,该抗体结合两个不同的表位,这两个表位可以位于同一靶抗原上,或更常见地位于不同的靶抗原上。

[0077] 天然抗体和免疫球蛋白通常是约150,000道尔顿的异源四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,但不同的免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数量有所不同。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条重链在一端具有可变区(V_H),之后是多个恒定区。每条轻链在一端具有可变区(V_L),并在另一端具有恒定区。轻链的恒定区与重链的第一个恒定区对齐,而轻链的可变区与重链的可变区对齐。据信,特定氨基酸残基构成轻链和重链可变区间的界面(Clothia等,J.Mol.Biol.186,651-66,1985);Novotny和Haber,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82,4592-4596(1985))。根据其重链组成,定义了五个人免疫球蛋白类别,即IgG、IgM、IgA、IgE和IgD。将IgG类和IgA类抗体进一步划分为亚类,即IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,以及IgA1和IgA2。IgG、IgA和IgD抗体中的重链具有三个恒定区域,命名为CH1、CH2和CH3,而IgM和IgE抗体的重链具有四个恒定区域,即CH1、CH2、CH3和CH4。因此,重链具有一个可变区和三个或四个恒定区,对免疫球蛋白结构和功能的综述见例如Harlow等编,《Antibodies: A Laboratory Manual》,第14章,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor

(1988)。

[0078] “抗体片段”仅包含完整抗体的一部分,其中该部分优选保留至少一种、优选大部分或全部的存在于完整抗体中时与该部分通常相关的功能。

[0079] 本文所用术语“单克隆抗体”是指从基本同源的抗体群体中获得的抗体,即,除了可能少量存在的可能自然发生的突变外,组成该群体的个体抗体是相同的。单克隆抗体特异性高,且结合单一抗原。此外,与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同的是,每个单克隆抗体对抗原上的单一决定簇。所述抗体“选择性地结合”或“特异性地结合”的意思是,该抗体与表位的反应或联结比与替代性物质(包括不相关蛋白)的反应或联结更频繁、更迅速、保持时间更长、亲和力更强或上述效果的某种组合。“选择性地结合”或“特异性地结合”意思是,例如,抗体与蛋白结合的 K_D 为至少约0.1mM,但更常见为至少约1 μ M。“选择性地结合”或“特异性地结合”有时是指,抗体与蛋白结合的 K_D 有些时候为至少约0.1 μ M或更佳,另外一些时候为至少约0.01 μ M或更佳。由于不同物种中的同源蛋白间存在序列同一性,特异性结合可以包括识别多于一种物种中的肿瘤细胞标志物蛋白的抗体。

[0080] 术语“表位”或“抗原决定簇”在本文中可互换使用,指的是能够被特定抗体识别并特异性地结合的抗原的部分。当抗原是多肽时,表位可以由连续氨基酸构成,也可以由借助蛋白的三级结构折叠而并置的不连续氨基酸构成。由连续氨基酸构成的表位通常在蛋白变性时得以保留,然而通过三级结构折叠形成的表位通常在蛋白变性时丢失。表位通常包含独特空间构象中的至少3个且更常见为至少5个或8~10个氨基酸。

[0081] 本文的抗体具体包括“嵌合”抗体及这种抗体的片段(只要这些片段显示出所需的生物活性即可)，“嵌合”抗体中,重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,而上述链的剩余部分则与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源(美国专利第4,816,567号;和Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci USA 81:6851-6855(1984))。

[0082] 非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是包含最低限度的源自非人免疫球蛋白序列的嵌合抗体。在多数情况下,人源化抗体是来自受体超变区的残基被具有所需特异性、亲和力和结合力的来自诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类等非人物种(供体抗体)的超变区的残基置换了的人免疫球蛋白(受体抗体)。在一些情况下,将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基置换为相应的非人残基。此外,人源化抗体可以包含在受体抗体或供体抗体中都不存在的残基。做这些修饰是为了进一步改善抗体的性能。通常,人源化抗体基本上会包含至少一个且通常两个可变区域中的全部,其中,全部或基本上全部超变环都对应非人免疫球蛋白的超变环,且全部或基本上全部FR都是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体可选地还包含免疫球蛋白(通常为人免疫球蛋白)恒定区(Fc)的至少一部分。更多细节参见Jones等,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。另外参见以下综述文章和其中引用的参考文献:Vaswani和Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions 23:1035-1038(1995);Hurlle和Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994)。

[0083] “人抗体”是具有与人产生的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列的抗体和/或已

通过使用本文公开的制造人抗体的任何技术制成的抗体。人抗体的该定义特定地排除了包含非人的抗原结合残基的人源化抗体。

[0084] “亲和力成熟”抗体是在其一个或多个CDR中具有一个或多个修改的抗体,与不具有这些修改的亲本抗体相比,所述修改使该抗体与抗原的亲和力提高。优选的亲和力成熟抗体对靶抗原的亲和力将是纳摩尔或甚至是皮摩尔级。通过本领域已知的程序来制造亲和力成熟抗体。Marks等, *Bio/Technology* 10:779-783(1992)描述了通过VH和VL区改组来进行亲和力成熟。对CDR和/或框架残基的随机突变在以下文献中有所描述:Barbas等, *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813(1994); Schier等, *Gene* 169:147-155(1995); Yelton等, *J. Immunol.* 155:1994-2004(1995); Jackson等, *J. Immunol.* 154(7):3310-9(1995); 和 Hawkins等, *J. Mol. Biol.* 226:889-896(1992)。

[0085] 本文所用的术语“Fc区”通常是指包含免疫球蛋白重链C端多肽序列的二聚体复合体,其中,C端多肽序列是通过用木瓜蛋白酶消化完整抗体而得到的序列。Fc区可以包括天然或变异的Fc序列。虽然免疫球蛋白重链Fc序列的界限可以有所不同,但通常将人IgG重链Fc序列定义为从约Cys226位基或从约Pro230位的氨基酸残延伸至Fc序列的羧基端。免疫球蛋白的Fc序列通常包含两个恒定的结构域,即CH2结构域和CH3结构域,并可选地包含CH4结构域。本文的“Fc多肽”意为构成Fc区的多肽中的一条。Fc多肽可以从任何适合的免疫球蛋白获得,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型,IgA、IgE、IgD或IgM。在一些实施方式中,Fc多肽包含部分或全部的野生型铰链序列(通常位于其N端)。在一些实施方式中,Fc多肽不含功能性的或野生型的铰链序列。

[0086] 本文所用的“铰链区”、“铰链序列”及其变化形式包涵本领域已知的意义,该意义在例如以下文献中有所说明:Janeway等, *Immuno Biology:the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY)(第4版,1999); Bloom等, *Protein Science* (1997), 6:407-415; Humphreys等, *J. Immunol. Methods* (1997), 209:193-202。

[0087] 本文所用的术语“在严格条件下杂交”意在描述用于杂交和清洗的条件,在该条件下,彼此至少60%同源的核苷酸序列通常会保持彼此杂交。在一些实施方式中,该条件使得彼此间的同源性为至少约70%、至少约80%、至少约85%或90%的序列通常保持彼此杂交。这种严格条件对本领域的技术人员而言是已知的,且可见于 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6中。严格杂交条件的一个非限制性实例是于约45°C在6×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中的杂交,随后是于50°C~65°C用0.2×SSC、0.1% SDS进行的一次或多次清洗。

[0088] 本文所用的术语“细胞毒素”或“细胞毒剂”是指抑制或阻止细胞功能且/或引起细胞破坏的物质。该术语意在包括:放射性同位素(例如,At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²和Lu的放射性同位素);化疗剂,例如氨甲喋呤、阿霉素(adriamycin)、长春花生物碱(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、道诺菌素(daunorubicin)或其他嵌插剂;酶及其片段,例如核水解酶;抗生素;和毒素,例如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体;以及下文公开的各种抗肿瘤剂或抗癌剂。下文描述了其他细胞毒剂。肿瘤破坏剂(tumoricidal)引起肿瘤细胞的破坏。

[0089] “药物可接受”是指联邦或州政府的管理局已许可或可以许可,或者在美国药典或

其他公认的用于动物(包括人)的药典中列出。

[0090] “药物可接受的载质”是指与本文公开的至少一种抗体一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或载剂。

[0091] 本文所用的术语“受试者”是指任何动物(例如,哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类动物、啮齿类动物等,其将是特定治疗的接受者。通常,述及人受试者时,术语“受试者”和“患者”在本文中可以互换使用。

[0092] 术语“治疗有效量”是指有效“治疗”受试者或哺乳动物的疾病或病症的抗体、多肽、多核苷酸、有机小分子或其他药物的量。对于癌症的情况,治疗有效量的药物可以减少癌细胞数量、减小肿瘤尺寸、抑制或终止癌细胞向周边器官的浸润(包括例如癌向软组织和骨中的扩散)、抑制和终止肿瘤转移、抑制和终止肿瘤生长、在一定程度上减轻一种或多种癌症相关症状、降低发病率和死亡率、提高生命质量或这些效果的组合。只要药剂会阻止生长和/或杀死已存在的癌细胞,就可以称之为抑制细胞生长的和/或细胞毒性的。

[0093] 本文所用的术语“多核苷酸”或“核酸”是指由通过磷酸二酯键连接的多个核苷酸单元(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或相关的结构变体)组成的聚合物,包括但不限于DNA或RNA。该术语涵盖了包括DNA和RNA的任何已知碱基类似物的序列,所述碱基类似物包括但不限于:4-乙酰胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺苷、氮丙啶基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、次黄嘌呤核苷(inosine)、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基次黄嘌呤核苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖基Q核苷(beta-D-mannosylqueosine)、5'-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基巯基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-羟乙酸甲酯、尿嘧啶-5-羟乙酸、氧丁醇核苷(oxybutoxosine)、假尿嘧啶、Q核苷(queosine)、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-羟乙酸甲酯、尿嘧啶-5-羟乙酸、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。

[0094] 本文所用的术语“载体”意在指核酸分子,其能够运输与其连接的另一核酸。一种类型的载体是“质粒”,其是指环状双链DNA环,其中连接有额外的DNA片段。另一类型的载体是噬菌体载体。再一类型的载体是病毒载体,其中,额外的DNA片段可以连接至病毒基因组中。某些载体能够在已导入这些载体的宿主细胞中进行自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体,和游离的哺乳动物载体)。在导入宿主细胞时,其他载体(例如,非游离的哺乳动物载体)可以整合到宿主细胞的基因组中,从而随宿主基因组一起进行复制。此外,某些载体能够引导与其可操作地连接的基因的表达。本文中将此类载体称作“重组表达载体”(或简称“重组载体”)。一般而言,在重组DNA技术中使用的表达载体通常为质粒形式。由于质粒是最常用的载体形式,在本文中,“质粒”和“载体”可以互换使用。

[0095] 本发明的异源多聚体多肽可用于治疗多种病症。“病症”是指会从用本发明的抗体或方法进行治疗中获益的任何病况。其包括慢性的或急性的病症或疾病,包括使哺乳动物对所讨论的病症有患病倾向的那些病理状况。本文中要治疗的病症的非限制性实例包括:细胞增殖症;非白血病和淋巴恶性肿瘤;神经元的、神经胶质的、星形细胞的、丘脑下部

和其他腺的、巨噬细胞的、上皮的、间质的和囊胚腔的病症；和炎性、免疫学及其他血管生成相关病症。术语“细胞增殖症”和“增殖症”是指与一定程度的异常细胞增殖有关的病症。在一个实施方式中，所述细胞增殖症是癌症。本文所用的“肿瘤”是指不论恶性或良性的所有赘生性细胞生长和增殖，以及所有癌前的和癌的和细胞和组织。

[0096] 通常，将特定抗原用作本发明的异源多聚体多肽的靶标。在一个实施方式中，所述抗原是肿瘤抗原。本文所用的“肿瘤抗原”包括与正常细胞相比在肿瘤细胞上差异表达的任何分子。在一些实施方式中，与正常细胞相比，在肿瘤细胞中，该分子以可检测地或显著地更高或更低的水平进行表达。在一些实施方式中，与正常细胞相比，在肿瘤细胞中，该分子显示出可检测地或显著地更高或更低水平的生物活性。在一些实施方式中，已知或认为该分子对肿瘤细胞的致癌特性有贡献。多种肿瘤抗原在本领域中是已知的。还可以根据本领域技术人员所公知的技术和测定来确定分子是否是肿瘤抗原，例如无性系形成测定 (clonogenic assay)、转化测定、体外或体内肿瘤形成测定、凝胶迁移测定、基因敲除分析等。

[0097] 术语“癌症”或“癌的”是指或描述哺乳动物的生理病况，其常见特征为失调的细胞生长/增殖。癌症的实例包括但不限于癌瘤 (carcinoma)、淋巴瘤 (例如，非霍奇金氏淋巴瘤)、母细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更多具体实例包括：鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺部腺癌、肺部鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌 (hepatocellular cancer)、胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤 (hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝脏癌 (hepatic carcinoma) 和多种类型的头部颈部癌。

[0098] 本文所用的“治疗”是指意在改变受治疗个体或细胞的自然进程的临床干预，可以为了预防而进行治疗，或在临床病理学进程中进行治疗。治疗的理想效果包括防止疾病的出现和复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接的病理学后果、防止转移、降低疾病进展速度、改善或舒缓疾病状况和缓解或改进预后。在一些实施方式中，使用本发明的抗体来推迟疾病或病症的发展。

[0099] “有效量”是指在剂量形式和持续时间方面需要的有效实现所需的治疗结果或预防结果的量。本发明的抗体的“治疗有效量”可以根据诸如疾病状况、年龄、性别和个体体重等因素以及该抗体在该个体中引发所需的响应的能力而有所不同。治疗有效量还指治疗有益效果超过了抗体的任何有毒或有害效果的量。

[0100] 在一方面，本发明提供在其免疫球蛋白Fc的CH3结构域内包含取代的异源多聚体多肽，所述取代促进异源二聚体化。这些取代包括对含有CH3结构域的一条多肽中的至少一个氨基酸的置换。在一个实施方式中，被取代的氨基酸是带电荷的氨基酸，或者是疏水/亲水氨基酸。

[0101] 在某些实施方式中，在本发明的第一条或第二条多肽内进行的取代发生在至少一个氨基酸上，所述氨基酸的侧链从第一条多肽的与第二条多肽的界面伸出或者位于该界面处，并因此位于与第二条多肽的同样位于这两条多肽界面处的氨基酸相互作用的位置上。“界面”意指独立的多肽发生相互接触的位置。表1显示了位于两条含有CH3结构域的多肽的界面处的氨基酸的预测实例。在一个实施方式中，改变氨基酸侧链以使第一条和第二条多肽间的静电相互作用发生变化，可使异源多聚体稳定，并因此使异源多聚体的形成比同源

多聚体的形成更占优势。同源多聚体分子将包含带相似电荷的分子,并且将自然地相互排斥。异源多聚体分子包含侧链会相吸引的氨基酸对,因此有利于异源多聚体的形成。

[0102] 在一方面,本发明展示出,对含有CH3结构域的一条多肽的位于236位、245位、249位、278位、286位和288位的一个或多个氨基酸进行取代的结果是,相对于所形成的同源二聚体的量,异源多聚体优先形成。以上列出的氨基酸位置是在从人IgG2重链恒定区的起点(即,CH1序列的N端)开始对氨基酸进行编号时位于IgG2的CH3结构域内的位置。氨基酸位置在四种IgG同种型内以及在IgG、IgA和IgD之间是可变的。因此,特定的氨基酸位置并不意味着限于位于任何一种免疫球蛋白中的特定位置上的氨基酸,而是意味着涵盖所有免疫球蛋白同种型中的位于与在人IgG2CH3结构域中提到的那些位置对应的位置上的氨基酸残基。位于四种IgG同种型内的氨基酸的这种可变性示于表1中,并图示在图2~图4中。

[0103] 选择靶位点显著改变保持多肽的电荷和/或疏水性的效果的取代,从而实现了异源多聚体多肽的优先形成。根据侧链性质上的相似性,可以将氨基酸分组为(见A.L.Lehninger,《Biochemistry》,第2版,第73-75页,Worth Publishers,New York (1975)):

[0104] (1)非极性氨基酸:Ala(A),Val(V),Leu(L),Ile(I),Pro(P),Phe(F),Trp(W),Met(M);

[0105] (2)无电荷的极性氨基酸:Gly(G),Ser(S),Thr(T),Cys(C),Tyr(Y),Asn(N),Gln(Q);

[0106] (3)酸性氨基酸:Asp(D),Glu(E);

[0107] (4)碱性氨基酸:Lys(K),Arg(R),His(H)。

[0108] 另一个选择是,可以根据相同的侧链性质将天然存在的残基划分为以下各组:

[0109] (1)疏水氨基酸:正亮氨酸,Met,Ala,Val,Leu,Ile;

[0110] (2)中性亲水氨基酸:Cys,Ser,Thr,Asn,Gln;

[0111] (3)酸性氨基酸:Asp,Glu;

[0112] (4)碱性氨基酸:His,Lys,Arg;

[0113] (5)残基影响链方向的氨基酸:Gly,Pro;

[0114] (6)芳香族氨基酸:Trp,Tyr,Phe。

[0115] 在本发明的一些实施方式中,用具有酸性侧链的氨基酸置换了具有碱性侧链的氨基酸,或反之。例如,用天冬氨酸或谷氨酸置换碱性氨基酸赖氨酸、精氨酸或组氨酸。

[0116] 在一些实施方式中,用疏水氨基酸取代亲水氨基酸(或至少相对亲水的氨基酸)。此类型取代的实例是用苯丙氨酸置换酪氨酸残基。在某些实施方式中,经过置换,除去了特定氨基酸位置上的aa羟基侧链并提高了该部位的疏水性,上述特定氨基酸位置位于含有CH3结构域的多肽之间的界面上或接近该界面。

[0117] 本文所用的“Var3”和“13A”可互换使用,用来描述包含下述取代的变体:用赖氨酸取代236位上的谷氨酸,并且用赖氨酸取代278位上的天冬氨酸。本文所用的“Var1”和“13B”同样可互换使用,用来描述包含下述取代的变体:用谷氨酸取代249位上的赖氨酸,并且用谷氨酸取代288位上的赖氨酸。

[0118] 在一个实施方式中,对于第一条多肽修改编码位于界面的氨基酸的核酸,以改变氨基酸离子配对的电荷。为了达到这一目的,将编码第一条多肽的界面中的至少一个“原

始”氨基酸残基的核酸置换为编码至少一个侧链电荷与所述原始氨基酸残基相反的氨基酸残基的核酸。应认识到的是,可以有多于一对的原始残基和对应的取代残基。被置换的原始残基的数量上限是第一条多肽和第二条多肽的界面中的残基总数。

[0119] “原始核酸”意思是编码第一条多肽或第二条多肽的可“修改”(即,遗传改造)的核酸。原始核酸或起始核酸可以是天然存在的核酸或者可以包含已经过预先修改的核酸(例如,人源化抗体片段)。“修改”核酸,意思是通过置换至少一个编码兴趣氨基酸残基的密码子来改变原始核酸。以此方式对DNA进行遗传改变的技术已在Mutagenesis:a Practical Approach,MJ.McPherson编,IRL Press,Oxford,UK.(1991)中有所综述,并且包括例如定点突变、盒式突变和聚合酶链式反应(PCR)突变。通过改变原始核酸,相应地修改了原始核酸所编码的原始多肽。

[0120] 在本发明的一个实施方式中,异源多聚体多肽是双特异性抗体。在某些实施方式中,双特异性抗体包含:第一条多肽,即与轻链多肽配对的重链多肽;和第二条多肽,即与另一轻链多肽配对的第二重链多肽。

[0121] 还包括具有多于两个结合价的异源多聚体多肽。例如,使用本文所述的方法还可以制备三特异性抗体(Tutt等,J.Immunol,147:60(1991))。

[0122] 在本发明的一个实施方式中,该方法包括制造异源多聚体分子,例如双特异性抗体,该分子利用能够与存在于双特异性分子中的两个重链可变区配对的单一轻链。为了鉴定此轻链,可以采用多种方案。在一个实施方式中,针对双特异性抗体所能够靶定的每个抗原,鉴定出了一系列单克隆抗体,随后确定了这些抗体所用的轻链中的哪一条能够在与针对第二靶标而鉴定出的任何抗体的重链配对时发挥功能。以此方式,可以鉴定出能够与两条重链一起发挥功能从而能够与两个抗原结合的轻链。在另一个实施方式中,诸如噬菌体展示等展示技术使得能够鉴定出能够与两条以上重链一起发挥功能的轻链。在一个实施方式中,构建了由多样性重链可变区库和单一轻链可变区组成的噬菌体文库。该文库可以进一步用来鉴定结合各种兴趣抗原的抗体。因此,在某些实施方式中,经鉴定的抗体将具有相同的轻链。

[0123] 在本发明的某些实施方式中,异源多聚体多肽包含至少一个单链Fv(scFv)。在某些实施方式中,异源多聚体多肽包含两个scFv。例如,scFv可以与异源多聚体多肽中所包含的含有CH3结构域的一条多肽或全部两条多肽融合。一些方法包括制造下述双特异性分子:其中,使用含有至少一个CH3结构域的重链恒定区中的一个或全部两个来连接单链Fv结构域,从而提供抗原结合。

[0124] 该异源多聚体分子可以包含具有不同特异性的两个抗原结合臂。例如,可以制造包含作为抗原结合臂的第一条多肽(例如经典免疫球蛋白分子)和作为免疫球蛋白融合蛋白的第二条多肽的异源多聚体分子。可用于本发明的免疫球蛋白融合蛋白的实例是免疫粘附素。

[0125] 本文所用的术语“免疫粘附素”是指抗体样分子,其将异源蛋白(“粘附素”,例如受体、配体或酶)的“结合结构域”与免疫球蛋白恒定区的效应组分结合。在结构上,免疫粘附素包含了具有所需结合特异性的粘附素氨基酸序列和免疫球蛋白恒定域序列的融合物,而所述具有所需结合特异性的粘附素氨基酸序列并非抗体的抗原识别和结合部位(抗原联结部位)(即,是“异源的”)。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定域序列可以从任何免疫球蛋白获

得,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型,IgA、IgE、IgD或IgM。

[0126] 可以制造结合任何抗原的本发明的异源多聚体多肽。在一些实施方式中,异源多聚体多肽结合选自由下述物组成的组的一个或多个抗原: DLL4、VEGF、VEGFR2、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Notch(全)、JAG1、JAG2、DLL(全)、JAG(全)、EGFR、ERBB2、ERBB3、ERBB(全)、c-Met、IGF-1R、PDGFR、Patched、Hedgehog家族多肽、Hedgehog(全)、WNT家族多肽、WNT(全)、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、FZD(全)、LRP5、LRP6、CD20、IL-6、TNF α 、IL-23、IL-17、CD80、CD86、CD3、CEA、Muc16、PSMA、PSCA、CD44、c-Kit、DDR1、DDR2、RSP01、RSP02、RSP03、RSP04、RSP0(全)、BMP家族多肽、BMP(全)、BMPR1a、BMPR1b及其组合。本文所用的“全(pan)”意在描述与来自同一家族中的多种抗原结合的异源多聚体多肽。例如,“Notch(全)”意在描述与Notch1、Notch2、Notch3或Notch4的组中的超过一种抗原结合的异源多聚体多肽。

[0127] 在一个实施方式中,异源多聚体多肽特异性地结合DLL4和VEGF。

[0128] 在一个实施方式中,异源多聚体多肽中的一条多肽结合DLL4的特异性与申请日为2007年9月28日的共同待决的美国专利申请第11/905,392号(通过援引将其并入本文)中所描述的21M18抗体的特异性相同。

[0129] 在一个实施方式中,本发明提供结合VEGF的抗体。在一个实施方式中,本发明提供特异性地结合VEGF的抗体(219R0302),其中,所述抗体包含:(a)包含GYTFTNYWMH(SEQ ID NO:20)的重链CDR1,包含SINPSNGGTSYNEKFKR(SEQ ID NO:21)的重链CDR2,和包含HYDNSYAMDY(SEQ ID NO:22)的重链CDR3;和/或(b)包含QASQDISNYVN(SEQ ID NO:23)的轻链CDR1,包含DASNLQT(SEQ ID NO:24)的轻链CDR2,和包含QQYDDLPP(SEQ ID NO:25)的轻链CDR3。在另一个实施方式中,本发明提供特异性地结合VEGF的抗体(219R0202),其中,所述抗体包含:(a)包含GYTFTNYWMH(SEQ ID NO:20)的重链CDR1,包含SINPSNGGTSYNEKFKR(SEQ ID NO:21)的重链CDR2,和包含HYDNSYAMDY(SEQ ID NO:22)的重链CDR3;和/或(b)包含RASQGINHLAW(SEQ ID NO:26)的轻链CDR1,包含AASNLHS(SEQ ID NO:27)的轻链CDR2,和包含QQYDNLPL(SEQ ID NO:28)的轻链CDR3。

[0130] 在一个实施方式中,VEGF和DLL4异源多聚体多肽包括特异性与21M18相同的抗体和219R0302或219R0202。这些异源多聚体多肽在制成后可以具有与重链连接的轻链,或使用相同的轻链。在一个实施方式中,抗体在其Fc区中包含本文所述的13A/13B取代。

[0131] 在一个实施方式中,VEGF结合序列包含SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18。在一个实施方式中,DLL4结合序列包含SEQ ID NO:19。在另一个实施方式中,所述双特异性抗体包含:VEGF结合序列和DLL4结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的轻链序列;所述DLL4结合序列包含SEQ ID NO:19。在又一个实施方式中,所述异源多聚体多肽包含:VEGF结合序列和DLL4结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:13的轻链序列;所述DLL4结合序列包含SEQ ID NO:19。在再一个实施方式中,所述异源多聚体多肽包含:VEGF结合序列和DLL4结合序列,所述VEGF结合序列包含SEQ ID NO:11的重链序列和SEQ ID NO:15的轻链序列;所述DLL4结合序列包含SEQ ID NO:19。

[0132] 在另一个实施方式中,VEGF结合序列包含选自由SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30组成的组的多肽。在一个实施方式中,VEGF多肽是抗体。

[0133] 在一些实施方式中,异源多聚体多肽或抗体是完整抗体,例如单克隆抗体或人源化抗体。在另一个实施方式中,所述抗体是抗体片段,例如Fab或scFv。在一个实施方式中,抗VEGF抗体/多肽抑制肿瘤生长。

[0134] 本发明的异源多聚体多肽可以具有双特异性(二价),并且能够同时结合两种不同的抗原。在一个实施方式中,异源多聚体多肽包含两个抗体联结部位。在另一个实施方式中,异源多聚体多肽是二价的免疫粘附素。不同的抗原可以位于不同的细胞上或同一细胞上。可以例如通过以下方法来在体外显示出抗原的交联:提供已结合有第一抗原的固体表面,添加对第一抗原有特异性的双特异性抗体并添加第二抗原,该结合蛋白对第二抗原也有特异性,随后检测已结合的第二抗原的存在。

[0135] 在某些实施方式中,本发明的异源多聚体多肽可以阻断两个受体与其相应配体间的相互作用。例如,对DLL4和VEGF有特异性的双特异性抗体抑制VEGF所诱导的细胞迁移和Notch受体信号传导。在此情况下,两种受体结合特异性的组合在抑制细胞迁移方面比单独的亲本抗体更具功效。

[0136] 本发明的异源多聚体分子还可以是一价的,意思是其具有一个抗原结合部位。在一个实施方式中,一价异源多聚体多肽具有一个可变区,而第二含有CH3结构域的多肽在被截短后不含可变区。这些第二含有CH3结构域的多肽可以具有可检测的标签。在一个实施方式中,一价异源多聚体多肽包含FLAG表位。FLAG表位是由8个氨基酸残基(DYKDDDDK)组成的合成表位。在另一个实施方式中,一价异源多聚体多肽是免疫粘附素。

[0137] 在一个实施方式中,以称作单基因双特异性(SGBSP)的第一种构造制造了本发明的异源多聚体分子。为了产生SGBSP,使用30个氨基酸的连接物来以遗传手段将轻链绑缚或连接到其重链上(参见Lee等,Mol. Immunol. 36:61-71(1999))。因此,每个SGBSP结合单元可以使用其自身的轻链来形成结合其相应靶标的Fab结合单元。在一个实施方式中,所述单基因还包含Var3/13A和Var1/13B突变。在一个实施方式中,使用抗DLL4和抗VEGF抗体来产生SGBSP。在一个实施方式中,制造21M18和219R0302/219R0202重链来作为SGBSP。在另一个实施方式中,克隆了分别带有13B和13A突变的21M18和219R0302/219R0202重链。

[0138] 在又一个实施方式中,以称作一价双特异性(MBSP)的第二种构造制造了本发明的异源多聚体分子。MBSP使用同样的轻链和包含Var3/13A和Var1/13B突变的两条不同的重链。对于MBSP,两条重链之一或全部必须与同样的轻链组合来结合其靶标。在一些实施方式中,该同样的轻链是一条上述重链的亲本轻链。在一个实施方式中,使用抗DLL4和抗VEGF抗体来产生SGBSP。在一个实施方式中,制造21M18和219R0302/219R0202重链来作为SGBSP。在另一个实施方式中,克隆了分别带有13B和13A突变的21M18和219R0302/219R0202重链。

[0139] 为了表达具有V_L和V_H域的选定组合或随机组合的本发明的异源多聚体分子,将编码这些域的V基因装配到细菌表达载体中。例如,可以使用含有编码细菌分泌信号序列和肽连接物的序列的、并且含有用于插入V_L和V_H基因的易用限制性位点的载体。作为另一选择,可能合乎需要的是,通过例如使用重叠引物的PCR扩增,首先将全部必要的编码序列(例如,分泌序列、V_L、V_H和连接肽)装配到单一序列中,随后将其连接到质粒或其他载体中。当需要提供V_L和V_H域的特定组合时,使用对编码这些域的序列有特异性的PCR引物。当需要产生大量V_L和V_H域的多种组合时,使用引物混合物来扩增多种序列。

[0140] 用于构建和在细菌中表达本发明的异源多聚体多肽的载体是可以获得的,其包含

分泌信号序列和易用的限制性克隆位点。从B细胞杂交瘤的cDNA中分离出编码对特定抗原具有特异性的结合部位的V_L和V_H基因组合。另一选择是,从基因组DNA获得V_L和V_H基因的随机组合,并且筛选与兴趣抗原结合的产物。通常,采用聚合酶链式反应(PCR)来进行克隆,并使用与克隆载体中的限制性位点相容的引物。参见例如Dreher, M.L.等(1991) *J. Immunol. Methods* 139:197-205; Ward, E.S. (1993) *Adv. Pharmacol.* 24:1-20; Chowdhury, P.S.和Pastan, I. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:568-572。

[0141] 在一个实施方式中,本发明提供表达本文所述的多肽或抗体的多核苷酸。在一个实施方式中,本发明提供在严格条件下与编码本发明的多肽或抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。在一个实施方式中,所述多核苷酸包含序列SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16。

[0142] 在一个实施方式中,本发明的双特异性抗体是通过表达下述物而制成的:1)第一条多肽,其包含与第一种特异性对应的重链可变域,所述重链可变域与第二种特异性的轻链可变域连接;和2)第二条多肽,其包含与第一种特异性对应的轻链可变域,所述轻链可变域与第二种特异性的重链可变域连接。

[0143] 对于本发明的某些异源多聚体多肽,合乎需要的可能是在其他宿主细胞中进行表达。例如,包含恒定域的异源多聚体多肽通常在真核细胞中更高效地表达,包括酵母、昆虫、脊椎动物和哺乳动物的细胞。在所表达的产物需要糖基化时,将有必要使用此类细胞。可以将编码第一条和第二条多肽的DNA片段克隆至例如HCMV载体中,该载体经设计用来在哺乳动物细胞中表达人重链的人轻链(参见例如Bendig等,美国专利第5,840,299号;Maeda等(1991) *Hum. Antibod. Hybridomas* 2,124-134)。此类载体包含用于高水平转录轻链和重链构建体的人巨细胞病毒(HCMV)启动子和增强子。在优选实施方式中,轻链表达载体是编码人 κ 轻链的pKN100(由S.Tarran Jones博士惠赠,MRC Collaborative Center, London, England),重链表达载体是编码人 γ -1重链的pG1D105(由S.Tarran Jones博士惠赠)。两种载体都包含在哺乳动物细胞和大肠杆菌中具有功能的HCMV启动子和增强子、复制起点和可选标志物。

[0144] 可选标志物是编码对在选择性培养基中生长的已转化的宿主细胞的生存或生长而言必要的蛋白的基因。常见的可选标志物编码具有下述作用的蛋白:(a)提供对抗生素或其他毒素(例如,氨基青霉素、新霉素、氨基嘌呤或四环素)的抗性,(b)补充营养缺陷,或(c)供应不能从复杂培养基中得到的关键营养成分,例如,编码杆菌D-丙氨酸消旋酶的基因。特别有用的可选标志物提供对氨基嘌呤的抗性。例如,通过在包含氨基嘌呤(Mtx)(DHFR的竞争性拮抗剂)的培养基中培养全部转化体,转染有DHFR选择基因的细胞首先被鉴定。当采用野生型DHFR时,适合的宿主细胞是缺乏DHFR活性的中华仓鼠卵巢(CHO)细胞系,该细胞系的制备和繁殖如Urlaub和Chasin(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77,4216所述。随后使已转染的细胞暴露于升高水平的氨基嘌呤下。这导致多拷贝的DHFR基因的合成,并且伴随有多拷贝的构成表达载体的其他DNA的合成,所述其他DNA例如为编码抗体或抗体片段的DNA。在另一实例中,当使用氨基嘌呤阻断DNA合成时,缺乏胸腺嘧啶激酶(TK)的突变骨髓瘤细胞不能使用外源供应的胸腺嘧啶。可用于转染的载体携带完整TK基因,该基因使得可以在补充有胸腺嘧啶的培养基中生长。

[0145] 当需要在酵母中表达基因构建体时,适合用于酵母的选择基因是存在于酵母质粒

YRp7中的trp1基因。Stinchcomb等,1979Nature,282,39;Kingsman等,1979,Gene 7,141。trp1基因为没有能力在色氨酸中生长的酵母突变株(例如,ATCC No.44076或PEP4-1.Jones(1977)Genetics 85,12.)提供选择标志物。酵母宿主细胞基因组中tip I损伤的存在则通过在无色氨酸情况下生长来检测转化提供了有效环境。类似地,缺乏Leu2的酵母菌株(ATCC 20,622或38,626)通过带有Leu2基因的已知质粒而得到补充。

[0146] 用于转化载体和表达本发明的抗体的优选宿主细胞是细菌细胞、酵母细胞和哺乳动物细胞,例如,COS-7细胞、中华仓鼠卵巢(CHO)细胞和淋巴起源的细胞系(例如淋巴瘤、骨髓瘤或杂交瘤细胞)。用本领域已知的方法在液体培养基中培养已转化的宿主细胞,所述培养基包含可同化的:碳源,例如糖类(如葡萄糖或乳糖);氮源,例如氨基酸、肽、蛋白或其降解产物(如蛋白胍、铵盐等);和无机盐,例如钠、钾、镁和钙的硫酸盐、磷酸盐和/或碳酸盐。该培养基还包含例如生长促进物质,例如微量元素(如铁、锌、锰等)。

[0147] 异源多聚体分子可用于本文所述的诊断和治疗方法中。在某些实施方式中,使用本发明的分子来检测生物样品(例如,患者组织活检物、胸膜流出物或血样)中的肿瘤细胞标志物蛋白的表达。可以对组织活检物进行切片,并且使用例如免疫荧光或免疫组化来检测蛋白。此外,可以分离来自样品的单个细胞,并通过FACS分析来在固定细胞或活细胞上检测蛋白表达。在某些实施方式中,可以在蛋白阵列上使用异源多聚体分子来检测肿瘤细胞标志物的表达,例如肿瘤细胞标志物在肿瘤细胞上、细胞裂解物中或其他蛋白样品中的表达。在某些实施方式中,在体外细胞水平测定、体内动物模型等中,通过使异源多聚体分子与肿瘤细胞接触,用本发明的异源多聚体分子来抑制肿瘤细胞的生长。在某些实施方式中,通过施用治疗有效量的针对一种或多种肿瘤细胞标志物的异源多聚体分子,用异源多聚体分子来治疗患者的癌症。

[0148] 在本发明的一些实施方式中,异源多聚体分子是人源化的双特异性抗体。人源化抗体是在构成每条抗体链内的三个互补决定区(CDR)的抗原决定区或超变区内包含最低限度的来自非人(例如啮齿类动物)抗体的序列的抗体。在施用到人受试者中时,此类抗体治疗性地用于降低抗原性和HAMA(人抗小鼠抗体)响应。在实践中,人源化抗体通常是带有最少的非人序列或基本没有非人序列的人抗体。人抗体是由人产生的抗体或氨基酸序列与人所产生的抗体对应的抗体。

[0149] 可以使用本领域中已知的各种技术来制造人源化抗体。依照Jones等,1986,Nature,321:522-525;Riechmann等,1988,Nature,332:323-327;Verhoeyen等,1988,Science,239:1534-1536.中的方法,通过用具有所需特异性、亲和力和能力(capability)的非人抗体(例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠等抗体)的CDR来取代人抗体的CDR,可以使抗体人源化。通过对可变的人框架区中的额外残基和/或已置换的非人残基中的额外残基进行取代,可以进一步修饰人源化抗体,从而精炼和优化抗体的特异性、亲和力和/或能力。

[0150] 对制造人源化抗体的人重链和/或轻链可变域的选择可能对降低抗原性是重要的。根据“最优满足(best-fit)”法,针对已知的人可变域氨基酸序列的整个文库,对啮齿类抗体的可变域的序列进行筛选。因此,在某些实施方式中,使用与啮齿类抗体的同源性最高且去掉了CDR的人氨基酸序列作为人源化抗体的人框架区(FR)(Sims等,1993,J.Immunol,151:2296;Chothia等,1987,J.Mol.Biol,196:901)。另一方法使用特定FR,所述特定FR源自特定轻链或重链亚类的全部人抗体的共有序列,并且该方法可以用于若干不同的人源化抗

体(Carter等,1992,PNAS,89,4285;Presta等,1993,J.Immunol,151:2623)。在某些实施方式中,使用方法的组合来挑选人可变FR,以用于产生人源化抗体。

[0151] 还应理解的是,被人源化的抗体(例如啮齿类抗体)必须保留对抗原的高亲和力以及其他有利的生物学性质。为了实现这一目标,可以通过对来自待人源化的啮齿类抗体和各种候选人源化序列的亲本序列进行分析来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型对本领域技术人员而言是熟悉且可以获得的。可以使用计算机程序来图解和显示选定的候选抗体序列的很可能的三维构象结构。对这些模型的使用允许对残基在待人源化抗体功能中的可能作用进行分析,即,对影响候选抗体结合其抗原的能力的残基进行分析。以此方式,可以将FR残基从亲本抗体中选出并组合至受体人源化抗体中,从而获得所需的抗体特性。通常,来自亲本抗体(例如,具有所需抗原结合性质的啮齿类抗体)抗原决定区(或超变区)的CDR中的残基保留在人源化抗体中,以用于结合抗原。在某些实施方式中,来自亲本抗体的可变FR内的至少一个额外残基保留在人源化抗体中。在某些实施方式中,可变FR内的多达6个来自亲本抗体的额外残基保留在人源化抗体中。

[0152] 将来自免疫球蛋白的成熟重链和轻链的可变区的氨基酸分别命名为H_x和L_x,其中,x是表示Kabat,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services,1987,1991.的方案中所述的氨基酸位置的编号。Kabat列出了每个亚类的抗体的多个氨基酸序列,并且列出了该亚类中每个残基位置上最常出现的氨基酸,从而产生了共有序列。Kabat使用了为所列序列中的每个氨基酸都分配残基编号的方法,而且该分配残基编号的方法已成为本领域的标准。通过参考保守氨基酸,将所讨论的抗体与Kabat共有序列中的一个进行比对,从而可以将Kabat的方案扩展至未包括在他的纲要中的其他抗体。通过使用Kabat编号系统,容易鉴定出不同抗体中位于同等位置的氨基酸。例如,在人抗体的L50位置的氨基酸占据了与小鼠抗体的氨基酸位置L50对等的位置。此外,通过使用Kabat编号系统,可以将任何两个抗体序列以唯一方式比对,例如,用来确定百分比同一性,从而使一个抗体序列中的每个氨基酸与另一个序列中的具有相同Kabat编号的氨基酸对齐。在一些实施方式中,在进行比对后,如果将受试者抗体区(例如,重链或轻链的整个成熟可变区)与参照抗体的同一区域进行比较,受试者和参照抗体区域间的百分比序列同一性是:受试者和参照抗体区域中的相同氨基酸所占位置的数量除以两个区域中比对的位置总数(不计入空位),再乘以100来转换成百分比。

[0153] 除了人源化抗体外,使用本领域中已知的各种技术可以直接制备全人抗体。可以制造体外免疫的永生化人B淋巴细胞或从产生针对靶抗原的抗体的免疫化个体分离出的永生化人B淋巴细胞(参见例如Cole等,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,第77页(1985);Boemer等,1991,J.Immunol.,147(1):86-95;和美国专利第5,750,373号)。另外,如果噬菌体文库表达人抗体,可以从噬菌体文库中选择人抗体(Vaughan等,1996,Nat.Biotech.,14:309-314;Sheets等,1998,Proc.Natl.Acad.Sci,95:6157-6162;Hoogenboom和Winter,1991,J.Mol.Biol,227:381;Marks等,1991,J.Mol.Biol,222:581)。还可以在含有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制造人抗体,所述小鼠在免疫化时能够在不产生内源免疫球蛋白的情况下产生全部人抗体。在美国专利第5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425和5,661,016号中描述了该方法。

[0154] 本发明还涵盖特异性地识别兴趣抗原的双特异性抗体,所述抗原包括但不限于肿

瘤细胞标志物。双特异性抗体是能够特异性地识别并结合至少两种不同的表位的抗体(参见例如Wu等, Simultaneous Targeting of Multiple Disease Mediators by a Dual-Variable-Domain Immunoglobulin, Nature Biotech., 25(11):1290-97)。所述不同的表位可以在同一分子内(例如,同一肿瘤标志物多肽)或在不同分子上,从而使二者都可以例如特异性地识别并结合肿瘤细胞标志物。双特异性抗体可以是完整抗体或抗体片段。

[0155] 示例性的双特异性抗体可以结合两种不同的表位。双特异性抗体还可以用来将细胞毒剂引导至表达特定抗原的细胞。这些抗体具有抗原结合臂和结合细胞毒剂或放射性核素螯合剂(例如EOTUBE、DPTA、DOTA或TETA)的臂。制造双特异性抗体的技术在本领域中是常见的(Millstein等, 1983, Nature 305:537-539; Brennan等, 1985, Science 229:81; Suresh等, 1986, Methods in Enzymol 121:120; Traunecker等, 1991, EMBO J. 10:3655-3659; Shalaby等, 1992, J. Exp. Med. 175:217-225; Kostelny等, 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Gruber等, 1994, J. Immunol. 152:5368; 和美国专利第5,731,168号)。还包括具有多于两个结合价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体(Tutt等, J. Immunol. 147:60(1991))。

[0156] 在某些实施方式中,提供了异源多聚体多肽的片段,用来例如提高肿瘤穿透。用来产生抗体片段的各种技术是已知的:传统上,通过对完整抗体进行蛋白水解消化来得到这些片段(例如Morimoto等, 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; Brennan等, 1985, Science, 229:81)。在某些实施方式中,通过重组手段来制造抗体片段。Fab、Fv和scFv抗体片段都可以在大肠杆菌或其他宿主细胞中表达并分泌,从而使得可以大量地制造这些片段。还可以从上文讨论的抗体噬菌体文库中分离出此类抗体片段。抗体片段还可以是例如美国专利第5,641,870号中所描述的线形抗体,并且可以是单特异性或双特异性的。对技术人员而言,制造抗体片段的其他技术将是显而易见的。

[0157] 还可以理想的是,特别是对于抗体片段的情况,对异源多聚体分子进行修饰以提高其血清半衰期。这可以通过例如下述方式来实现:通过使适合的区域突变,或通过将表位整合至肽标签中并随后将该标签融合至异源多聚体分子的任一末端或中部(例如通过DNA合成或肽合成),从而将救助受体(salvage receptor)结合表位整合到异源多聚体分子中。

[0158] 为了实现本发明的目的,应认识到的是,经修饰的抗体可以包含使异源多聚体与兴趣多肽联结的任何类型的可变区。在这点上,可变区可以包含或源自经诱导可引发体液应答并产生针对所需肿瘤相关抗原的免疫球蛋白的任何类型的哺乳动物。因此,经修饰的抗体的可变区可以源于例如人、鼠、非人灵长类(例如,食蟹猴、猕猴等)或狼。在一些实施方式中,经修饰的免疫球蛋白的可变区和恒定区都是人的。在其他实施方式中,相容抗体的可变区(通常源自非人来源)可以经改造或经特定剪接而提高该分子的结合性质或降低该分子的免疫原性。就此而言,可以通过包含导入的氨基酸序列来人源化或修改可用于本发明的可变区。

[0159] 通过至少部分置换一个或多个CDR,如有必要,还通过进行部分框架区置换和序列改变,来修改重链和轻链的可变区。虽然可以从与框架区所源自的抗体属于同一类别或甚至同一亚类的抗体得到CDR,但将从不同类别的抗体且优选从来自不同物种的抗体得到CDR。可以不必用来自供体可变区的整个CDR置换全部CDR来将一个可变域的抗原结合能力转移至另一个。相反,可以仅需要转移保持抗原结合部位的活性所必须的那些残基。鉴于在美国专利第5,585,089、5,693,761和5,693,762号中所给出的证明,本领域的技术人员将完

全有能力通过实施常规实验或通过试错试验来获得免疫原性降低的功能性抗体。

[0160] 尽管对可变区进行了修改,但本领域的技术人员将认识到,本发明的经修饰的异源多聚体可以包含抗体或其免疫反应性片段,其中,与免疫原性大致相同的、包含天然或未修改的恒定区的抗体相比,已经对一个或多个恒定区结构域的至少一部分进行了删除或修改,从而提供了所需的生物化学特性,例如提高的肿瘤定位或降低的血清半衰期。在一些实施方式中,经修饰的抗体的恒定区将包含人恒定区。对与本发明相容的对恒定区进行的修饰包括一个或多个结构域中的一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代。即,本文公开的经修饰的异源多聚体可以包含对三个重链恒定域(CH1、CH2或CH3)和/或轻链恒定域(CL)中的一个或多个的修改或修饰。在本发明的一些实施方式中,包括其中个一个或多个结构域部分或完全缺失了的经修饰的恒定区。在一些实施方式中,经修饰的抗体将包含结构域缺失的构建体或变体,其中已除去了整个CH2结构域(Δ CH2构建体)。在一些实施方式中,将用短氨基酸间隔物(例如,10个残基)来置换所除去的恒定区结构域,所述短氨基酸间隔物提供一些通常由缺失的恒定区来赋予的分子柔性。

[0161] 在不限制本发明的范围的情况下,据信包含经本文所述修饰的恒定区的异源多聚体多肽提供了经修改的效应功能,该功能反过来又影响所施用的多肽的生物学特性。例如,恒定区结构域的(通过点突变或其他方法造成的)缺失或失活可以减少循环中的经修饰抗体的Fc受体结合,从而提高肿瘤定位。在其他情况下,与本发明一致的是,恒定区修饰可以是调节补体结合,并因此降低血清半衰期和所缀合的细胞毒素的非特异性联结。可以使用对恒定区的其他修饰来消除二硫键或寡糖部分,所述二硫键或多糖部分因提高的抗原特异性或抗体柔性而使定位增强。类似地,使用技术人员完全知晓的公知生物化学或分子工程技术,可以容易地做出本发明的恒定区修饰。

[0162] 本发明还涉及包含与细胞毒剂缀合的异源多聚体多肽的异源多聚体分子。细胞毒剂包括化疗剂、生长抑制剂、毒素(例如,源于细菌、真菌、植物或动物的具有酶活性的毒素或其片段)、放射性同位素(即放射缀合物)等。可用于产生此类免疫缀合物的化疗剂包括例如氨甲喋呤、阿霉素、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、道诺霉素或其他嵌插剂。可以使用的具有酶活性的毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素(modeccin)A链、 α -帚曲菌素(alpha-sarcin)、油桐蛋白(Aleurites fordii proteins)、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂(Momordica charantia inhibitor)、麻风树毒素(curcin)、巴豆毒素、肥皂草抑制剂(sapaonaria officinalis inhibitor)、白树毒素(gelonin)、分裂毒素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素、依诺霉素和单端孢霉烯族毒素(tricothecenes)。在一些实施方式中,使用多种公知的螯合剂中的任一种或直接加标签,可以使异源多聚体分子与放射性同位素缀合,所述放射性同位素例如 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 和 ^{188}Re 。在其他实施方式中,所公开的组合物可以包含与药剂、前药或淋巴因子(例如干扰素)偶联的异源多聚体分子。异源多聚体分子和细胞毒剂的缀合物是使用多种双官能蛋白偶联剂制成的,所述双官能蛋白偶联剂例如N-琥珀酰亚胺-3-(2-硫代吡啶)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酰酯的双官能衍生物(例如盐酸己二亚胺酸二甲酯)、活性酯(例如二琥珀酰亚胺辛二酸酯)、醛(例如戊二醛)、双叠氮化合物(例如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(例如双(对重氮基苯甲酰

基)乙二胺)、二异氰酸酯(例如2,6-二异氰酸甲苯酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。还可以使用抗体和一种或多种小分子毒素(例如卡奇霉素、美登醇、单端孢霉烯和CC1065)及这些毒素的具有毒素活性的衍生物的缀合物。在一些实施方式中,异源多聚体多肽可以与其他具有免疫学活性的配体(例如抗体或其片段)复合,其中,所得的分子结合赘生性细胞和效应细胞(例如T细胞)。

[0163] 不论获得了如何有用的量,可以将本发明的异源多聚体多肽以多种缀合(即,免疫缀合物)或未缀合的形式中的任何一种形式来使用。另一选择是,可以以未缀合的或“裸”形式来使用本发明的异源多聚体多肽,从而利用受试者的天然防御机制(包括补体依赖型细胞毒作用(CDC)和抗体依赖型细胞毒作用(ADCC))来清除恶性细胞。选用何种缀合或未缀合的异源多聚体多肽将取决于癌症的类型和阶段、对附加治疗(例如,化疗或外部辐射)的使用和患者的状况。应认识到的是,鉴于本文的教导,本领域的技术人员可以容易地作出这种选择。

[0164] 可以通过本领域中已知的任何方法来测定本发明的异源多聚体多肽的免疫特异性结合。可以使用的免疫测定包括但不限于使用诸如BIAcore分析、FACS分析、免疫荧光、免疫细胞化学、蛋白质印迹、放射免疫测定、ELISA、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体结合测定、免疫放射测定、荧光免疫测定和蛋白A免疫测定等技术的竞争和非竞争测定系统。此类测定在本领域中是常规且公知的(参见例如Ausubel等编,1994,Current Protocols in Molecular Biology,卷1, John Wiley&Sons, Inc., New York,通过援引将其完整地并入本文)。

[0165] 在一些实施方式中,使用ELISA来确定针对肿瘤细胞标志物的异源多聚体多肽的免疫特异性。ELISA测定包括制备抗原、用抗原包被96孔微滴定板的孔、向孔中添加针对肿瘤细胞标志物的与诸如酶底物(例如,辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)等可检测化合物缀合的抗体、温育一段时间并检测抗原的存在。在一些实施方式中,与肿瘤细胞标志物结合的异源多聚体分子并未与可检测的化合物缀合,而是向孔中添加了识别该针对肿瘤细胞标志物的异源多聚体分子的第二缀合抗体。在一些实施方式中,并未用抗原包被孔,而是用针对肿瘤细胞标志物的抗体包被孔,并且可以在向经包被的孔中添加抗原后,添加与可检测的化合物缀合的第二抗体。本领域的技术人员将知晓可经修改而提高所检测到的信号的参数以及本领域已知的其他ELISA变体(参见例如Ausubel等编,1994,Current Protocols in Molecular Biology,卷1, John Wiley&Sons, Inc., New York, 11.2.1)。

[0166] 可以通过竞争结合测定来确定针对肿瘤细胞抗原的异源多聚体多肽的结合亲和力和异源多聚体-抗原相互作用的解离速率(off-rate)。竞争结合测定的一个实例是放射免疫测定,其包括:在逐渐增加的量的未标记抗原存在时,将带标记的抗原(例如³H或¹²⁵I)或者其片段或变体与所感兴趣的异源多聚体多肽温育,随后检测与带标记的抗原结合的异源多聚体多肽。可以从Scatchard作图分析的数据来确定:针对肿瘤细胞标志物的异源多聚体多肽的亲和力,和结合的解离速率。在一些实施方式中,使用BIAcore动力学分析来确定针对肿瘤细胞标志物的异源多聚体多肽的结合速率和解离速率。BIAcore动力学分析包括分析抗体与芯片间的结合和解离,在所述芯片的表面上固定有肿瘤细胞标志物抗原。

[0167] 在本发明的另一方面,可以以化学手段或生物合成手段将抗体连接到抗肿瘤剂或产生可检测信号的试剂上。与抗体连接的抗肿瘤剂包括破坏或损坏肿瘤的任何试剂,所述

肿瘤已结合有所述抗体,或处在已结合有所述抗体的细胞的环境中。举例而言,抗肿瘤剂是毒剂,例如化疗剂或放射性同位素。适合的化疗剂对本领域的技术人员而言是已知的,并且包括蒽环类(例如,道诺霉素和多柔比星)、氨甲喋呤、长春地辛、新制癌菌素、顺铂、苯丁酸氮芥、胞嘧啶阿拉伯糖苷、5-氟尿嘧啶、美法仑、蓖麻毒素和卡奇霉素。使用常规方法使化疗剂与抗体缀合(参见例如Hermentin和Seiler(1988)Behring Inst.Mitt.82,197-215)。

[0168] 产生可检测信号的试剂可在体内和体外用于诊断目的。产生可检测信号的试剂产生可以用外部手段(通常是测量电磁辐射)来检测的可测量信号。在多数情况下,产生信号的试剂是酶或发色团,或者通过荧光、磷光或化学发光来发射光。发色团包括吸收紫外区或可见光区的光的染料,并且可以是酶促反应的底物或降解产物。

[0169] 本发明还包括连接有靶标部分或报告部分的异源多聚体多肽。靶标部分是结合对中的第一成员。抗肿瘤剂,举例而言,与所述对中的第二成员缀合,并因此被引导至抗体所结合的部位。上述结合对的常见实例是抗生物素蛋白和生物素。在一个实施方式中,将生物素与本发明的异源多聚体多肽缀合,从而为缀合有抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素的抗肿瘤剂或其他部分提供了靶标。另一选择是,将生物素或其他此类部分连接到本发明的异源多聚体多肽上,并将其用作例如诊断系统中的报告者,在所述诊断系统中,产生可检测信号的试剂缀合有抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素。

[0170] 在治疗中,可以向肿瘤患者施用足以防止或减少肿瘤进展(例如,肿瘤的生长、侵袭、转移和/或复发)的量的异源多聚体多肽。将足以实现此目标的量定义为治疗有效剂量。对此应用有效的量将取决于疾病的严重程度和患者自身免疫系统的总体状况。剂量实施计划也会随着疾病状况和患者状态而变化,并且通常为单一推注剂量或持续输注至每日多次施用(例如,每4~6小时),或者根据治疗医师的指示或患者的状况。可以以高达40mg/kg体重或更高的单剂量来施用本发明的抗体。更优选的是,以0.2mg/kg体重~20mg/kg体重的剂量来施用抗体。然而,应注意的是,本发明并不限于任何特定剂量。

[0171] 本发明可以用来治疗任何适合的肿瘤,包括例如乳腺、心脏、肺、小肠、结肠、脾、肾脏、膀胱、头颈、卵巢、前列腺、脑、胰腺、皮肤、骨、骨髓、血、胸腺、子宫、睾丸、宫颈或肝的肿瘤。

[0172] 通过将纯化的本发明的异源多聚体多肽与药物可接受的载质(例如,载剂、赋形剂)结合,制备了用于储存和使用的制剂(Remington, The Science and Practice of Pharmacy第20版, Mack Publishing, 2000)。适合的药物可接受的载质包括但不限于:无毒缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;盐,例如氯化钠;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵(hexamethonium chloride);氯化苄烷铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯(alkyl paraben),例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量多肽(例如,小于约10个氨基酸残基);蛋白,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;糖类,例如单糖、二糖、葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子,例如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白络合物);和非离子表面活性剂,例如吐温(TWEEN)或聚乙二醇(PEG)。

[0173] 可以以用于局部治疗或系统治疗的多种方式来施用本发明的药物组合物。施用可

以是：局部（例如，向粘膜递送，包括向阴道和直肠递送）施用，例如经皮贴、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末；肺部（例如，通过吸入或吹入粉末或气雾剂，包括使用喷雾器；气管内、鼻内、表皮和经皮）施用；口服施用；或胃肠外施用，包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注；或颅内（例如，鞘内或脑室内）施用。

[0174] 治疗性制剂可以为单位剂型。此类制剂包括：片剂、丸剂、胶囊、粉末、颗粒、水或非水性介质中的溶液或悬浮液，或者用于口服施用、胃肠外施用、直肠施用或吸入式施用的栓剂。在诸如片剂等固体组合物中，主要活性成分与药物载体混合。常规的成片成分包括玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶和其他稀释剂（例如水），从而形成包含本发明的化合物或无毒的其药物可接受的盐的均质混合物的固体预制组合物。随后将该固体预制组合物再分成上述类型的单位剂型。该新型组合物的片剂、丸剂等可以经包衣或复混而提供具有长期作用优点的剂型。例如，该片剂或丸剂可以包含经外部组分包被的内部组合物。此外，这两种组分可被肠溶层分隔，该肠溶层用来抵抗瓦解并允许内部组分完整地通过胃或推迟释放。可将多种材料用于此类肠溶层或涂层，所述材料包括多种聚合物酸和聚合物酸与诸如虫胶、鲸蜡醇和乙酸纤维素酯等材料的混合物。

[0175] 药物制剂包含与脂质体复合的本发明的异源多聚体多肽（Epstein等，1985，Proc.Natl.Acad.Sci USA 82:3688；Hwang等，1980，Proc.Natl.Acad.Sci USA 77:4030；和美国专利第4,485,045和4,544,545号）。美国专利第5,013,556号中公开了具有增强的循环时间的脂质体。用含有磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生化的磷脂酰乙醇胺（PEG-PE）的液体组合物，可以通过反相蒸发来产生一些脂质体。使脂质体挤压通过具有确定孔径的滤器，从而产生具有所需直径的脂质体。

[0176] 还可以将异源多聚体多肽封装在微胶囊中。通过例如凝聚技术或通过界面聚合来制备此类微胶囊，例如，分别为，在胶体药物递送系统（例如，脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米粒和纳米胶囊）或在粗乳剂（如Remington, The Science and Practice of Pharmacy第20版，Mack Publishing(2000)中所述）中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚（甲基丙烯酸甲酯）微胶囊。

[0177] 还可以制备持续释放的制剂。持续释放的制剂的适合实例包括含有抗体的固体疏水聚合物半透性基质，该基质为定形物体形式（例如，膜或微胶囊）。持续释放基质的实例包括聚酯、诸如聚（甲基丙烯酸2-羟乙酯）或聚乙烯醇等水凝胶、聚交酯（美国专利第3,773,919号）、L-谷氨酸和7-乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、诸如LUPRON DEPOTTM（由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球体）等可降解的乳酸-乙醇酸共聚物、蔗糖乙酸酯异丁酸酯和聚D-(-)-3-羟基丁酸。

[0178] 在一些实施方式中，治疗涉及到对本发明的异源多聚体多肽和化疗剂或多种不同的化疗剂的混合物的组合施用。用异源多聚体多肽的治疗可以在施用化疗剂之前、同步或之后进行。本发明所考虑的化疗剂包括本领域已知的并且可以商购获得的化学物质或药物，例如多柔比星、5-氟尿嘧啶、胞嘧啶阿拉伯糖苷（“Ara-C”）、环磷酰胺、三胺硫磷（thiotepa）、白消安、细胞毒素、紫杉醇、氨甲喋呤、顺铂、美法仑、长春碱、吉西他滨、依立替康和卡铂。组合施用可以包括：在单一药物制剂中的共施用或使用独立的制剂的共施用，或以任何顺序但通常在使所有活性试剂能够同时发挥其生物学活性的时期内进行的连续施用。可以使用制造商的操作说明所述的或技术熟练的从业者凭经验确定的此类化疗剂的制

备和剂量实施计划。此类化疗剂的制备和剂量实施计划还在Chemotherapy Service Ed., M.C.Perry, Williams&Wilkins, Baltimore, Md.(1992)中有所描述。

[0179] 在其他实施方式中,治疗涉及到对本发明的异源多聚体多肽和放射疗法的组合施用。用异源多聚体多肽的治疗可以在施用放射疗法之前、同步或之后进行。可以使用技术熟练的从业者所确定的此类放射疗法的任何剂量实施计划。

[0180] 在其他实施方式中,治疗涉及到将本发明的异源多聚体多肽和针对肿瘤相关抗原的抗体组合施用,所述抗体包括但不限于与EGF受体(EGFR)(西妥昔单抗/Erbitux[®])结合的抗体、与erbB2受体(HER2)结合的抗体(曲妥单抗/Herceptin[®])和与血管内皮生长因子(VEGF)结合的抗体(贝伐单抗/Avastin[®])。此外,治疗可以包括对一种或多种细胞因子的施用,可以伴随有对癌细胞的手术移除或治疗医师视为必要的任何其他疗法。

[0181] 在其他实施方式中,治疗可以涉及到将本发明的异源多聚体多肽与第二治疗剂组合施用。在一些实施方式中,施用第二治疗剂来治疗因施用异源多聚体多肽而引起的副作用。

[0182] 对于治疗疾病,本发明的异源多聚体多肽的适合剂量取决于待治疗的疾病类型、疾病的严重程度和进程、疾病的响应性、施用异源多聚体多肽是为了治疗性目的还是预防性目的、之前的疗法、患者的临床史等等,所有这些都由治疗医师来判断。对异源多聚体多肽的施用可以是一次,也可以通过一系列治疗进行,所述一系列治疗持续数天至数月或直至实现治愈或疾病状态的减少(例如,肿瘤尺寸的减小)为止。从对患者体内药物积累的测量中可以计算出最佳剂量实施计划,并且该计划会根据单个抗体的相对效力而发生变化。施用医师能够容易地确定最佳剂量、剂量实施方法和重复率。通常,剂量为0.01 μ g/kg体重~100mg/kg体重,并且可以在每日、每周、每月或每年给药一次或多次。治疗医师能够根据药物在体液或组织中的测得的停留时间和浓度来估算剂量实施的重复率。

[0183] 本发明提供包含本文所述的异源多聚体多肽的试剂盒,该试剂盒可用于执行本文所述的方法。在某些实施方式中,试剂盒包含在一个或多个容器中的至少一种纯化的针对肿瘤标志物的异源多聚体多肽。在某些实施方式中,试剂盒包含至少两种异源多聚体多肽。本领域技术人员将容易知道,可以将本发明公开的抗体容易地加入一种本领域公知的成熟试剂盒形式中。

[0184] 还可以参考以下实施例来明确本公开的实施方式,所述实施例详细描述了本公开的异源多聚体多肽的制备和使用本公开的异源多聚体多肽的方法。对本领域技术人员显而易见的是,可以在不脱离本公开的范围的情况下对材料和方法做出多种修改。在任何可能的地方,在所有附图中将使用相同的附图标记来指代相同或相似的部分。除非内容另有明确规定,本文和所附权利要求中所用的单数形式“一个”、“或”和“一种”包含复数的所指代物。因此,例如,述及“抗体”时,其包括多个此类抗体或者一个以上抗体以及本领域技术人员所知的其等价物。此外,除非另有说明,本说明中所用的表示成分的量、反应条件、纯度、多肽和多核苷酸的长度等的所有数字,都被术语“约”修饰。因此,本说明书和权利要求中所述的数值参数是可以根据本发明的所需性质而变化的近似值。

[0185] 可以以任何变化形式和全部变化形式来组合所有本文所述的各种实施方式和选择。

[0186] 实施例

[0187] 实施例1.对抗体二聚体化界面中的候选物相互作用的鉴定

[0188] 为了更好地理解抗体重链CH3结构域之间的二聚体化界面的特性,查看了抗体CH3结构域的晶体结构(由Deisenhofer.J.(1981)Biochemistry,20,2361-2370报导首次的结构)。在此结构中,CH3结构域间的链间相互作用介导二个Fc片段的二聚体化(图1)。CH3结构域相互作用的表面包含疏水残基的中心区,其侧翼是亲水残基或具有带电荷特征的残基。在核心疏水区内存在保守的酪氨酸,其含有用于潜在的亲水相互作用的羟基,因此其不仅作为疏水残基,还使亲水相互作用能够形成。图2显示了对二聚体化的CH3结构域的结构描绘。为了清楚,使一条链的阴影比另一条的更暗。显示了在CH3结构域间的相互作用表面上排列的氨基酸的侧链。图3在三幅独立的结构图中突出显示了参与潜在的链间相互作用的CH3结构域内的选定氨基酸。图3中的氨基酸位置编号与人IgG2恒定区相对。图4显示了对人IgG同种型恒定域的比对。突出显示了参与链间相互作用的且在图2中标注出的特定残基。表1列出了每个人IgG同种型的与潜在地参与链间相互作用的这些残基对应的氨基酸位置,其中的编号命名法与人IgG种系恒定区对应。

[0189] 表1

	氨基酸	人 IgG1 残基号	人 IgG2 残基号	人 IgG3 残基号	人 IgG4 残基号
	Tyr	232	228	279	229
	Leu	234	230	281	231
	Ser	237	233	284	234
	Glu 或 Asp	239	235	286	236
	Glu	240	236	287	237
	Lys	243	239	290	240
	Gln	245	241	292	242
	Ser	247	243	294	244
	Thr	249	245	296	246
[0190]	Leu	251	247	298	248
	Lys	253	249	300	250
	Asn	273	269	320	270
	Lys 或 Asn	275	271	322	272
	Thr	277	273	324	274
	Val 或 Met	280	276	327	277
	Asp	282	278	329	279
	Asp	284	280	331	281
	Ser	286	282	333	283
	Phe	288	284	335	285
	Tyr	290	286	337	287
	Lys 或 Arg	292	288	339	289
[0191]	Thr	294	290	341	291

[0192] 实施例2:对选择性地进行异源二聚体化的Fc变体的鉴定

[0193] 对抗体CH3结构域中若干类型的修饰的能力进行了针对这些修饰自发生成异源二聚体抗体的能力的分析。合乎逻辑的是,通过选择性地减少出现在各CH3链间的亲水相互作用,可以使抗体的同源二聚体化更不利,而且通过同时引入不利于同源二聚体化但允许异

源二聚体化的取代,可以产生相容的Fc变体对,所述变体对选择性地对异源二聚体化,但几乎没有同源二聚体化倾向。

[0194] 因此,产生了一系列的变体对,并且对其选择性地形成异源二聚体抗体的能力进行了评估。将氨基酸取代引入包含连接物和重链CH₂-CH₃区的截短的重链(称其为微抗体),或者引入全长抗体重链重链。使用大小不同的两条重链,能够使异源二聚体物种作为分子量中等的分子可视化,并且提供了评估变体抗体形成异源二聚体的相对倾向的测定。图5以卡通形式描绘了这一测定形式。测试了抗体的若干变体对。将氨基酸取代引入抗体表达载体中,从而使可能参与链间相互作用的选定氨基酸得到变更。随后将编码这些变体抗体序列的表达载体单独转染或与其他伴侣链组合转染至哺乳动物细胞(人HEK 293细胞)中。48小时后,收集来自自己转染的细胞的条件培养基,并进行蛋白质印迹分析,随后用针对人Fc域的抗体进行探测。

[0195] 如图6所示,设计了变体对,所述变体对中每个变体的同源二聚体化倾向很小(如果有),但是在共表达时能够高效地有助于异源二聚体的形成。抗体变体Var2(包含氨基酸取代249K至E、286Y至F和288K至E)与抗体变体Var3(13A)(包含氨基酸取代236E至K和278D至K)的共表达导致了几乎只有异源二聚体形成。修改带电荷氨基酸来操纵引力和斥力,以利于异源二聚体化;同时,通过用非极性的苯丙氨酸氨基酸残基置换中心酪氨酸来消除由所述中心酪氨酸介导的羟基相互作用,从而实现对抗体二聚体化界面“核心”内的氨基酸相互作用的修改,以减少同源二聚体化倾向。上述组合操纵能够有效减少同源二聚体化,同时能够保留异源二聚体化。

[0196] 实施例3:双特异性抗体与两种不同靶标的结合

[0197] 进行了酶联免疫吸附测定(ELISA)来检查双特异性抗体变体(Var2-Var3)结合抗原的能力。不用抗原(-)或者用抗FLAG抗体(0.05mg/ml,来自SIGMA的克隆M2)或重组人δ样配体(DLL4)(0.1mg/ml)(带羧基端8×His标签的氨基酸27~519)包被ELISA板。随后将经包被的板与对照细胞培养基(阴性对照)或与来自转染有所示编码Var2、Var3和轻链L2的表达载体的细胞的条件培养基温育。于室温使结合进行1小时后,清洗平板,并通过使用与HRP缀合的抗人IgG二抗检测已结合的抗体。通过共表达Var2和Var3变体而制得的双特异性抗体变体具有功能性活性(图7)。Var3(13A)重链和配对的轻链能够结合DLL4(即用来开发Var3的亲本同源二聚体抗体所识别的抗原),而Var2重链臂呈现FLAG表位标签并能够在ELISA中与抗FLAG抗体相互作用。因此,该双特异性抗体能够与两种不同的靶标相互作用,其中每条重链参与不同的相互作用。

[0198] 实施例4:抗VEGF抗体的开发

[0199] 用人VEGF免疫小鼠,并分离脾脏。PCR扩增重链,并将其插入人轻链κ基因的噬菌粒文库中。对噬菌粒文库进行救援(rescue),并针对人VEGF对其进行连续三轮的选择。分离出了一组VEGF(+)Fab并在一系列测定中进行测试以发现VEGF拮抗剂(HUVEC增殖测定, Biacore阻断测定)。

[0200] 在HUVEC增殖测定中,一种VEGF(+)Fab(219R0302)部分抑制了VEGF所诱导的HUVEC增殖(图8)。简言之,使冷冻的HUVEC细胞(Lonza CC-2517)在ECGM(Lonza CC-3124)中传代,并进行小量库存(mini-banked)。将细胞从在生长培养基(M199+10%的热失活FBS(Gibco Cat#10082139)+50μg/ml的EGS(BD:354006)+1×肝素+1mM L-Gln)中小量库存的HUVEC直接

解冻。为了进行增殖测定,于4℃用50 μ l 10 μ g/ml的大鼠尾I型胶原溶液(BD:354236,I型胶原制备于0.02N的乙酸中)预包被96孔板过夜。次日,对平板进行充分的吹打以除去I型胶原溶液,并用200 μ l DPBS清洗一次。通过使用内皮细胞亚克隆试剂(Lonza:CC-5034),将HUVEC细胞从瓶上胰蛋白酶消化脱落。从瓶中收集全部细胞,并通过于4℃在1200rpm下离心5分钟来分离细胞。将细胞以10⁵个细胞/ml的密度重悬于饥饿/测定培养基(M199+2%的H.I.FBS+1 \times 肝素+1mM L+5单位/ml肝素-Gln)中。以5000个/孔、50 μ l/孔的方式将细胞播种到测定平板中。随后使细胞在37℃的培养箱中静置3小时。通过逐滴添加DPBS 200 μ l来用DPBS小心清洗细胞一次,随后添加100 μ l饥饿培养基。于37℃温育细胞过夜。次日早晨(测定d=0),将测试抗体(或对照:Avastin和LZ1)与rhVEGF(R&D 293-VE-010)组合制备。在测试不同抗体浓度的滴定时,在测定培养基中制备了与rhVEGF(最终浓度5ng/ μ l)组合的5倍稀释液(从20 μ g/ml最终浓度开始)。于37℃将这些溶液预温育2小时。小心将培养基从测定板中吸去,并将100 μ l Ab:VEGF混合物添加至细胞。在37℃的培养箱中温育3~4天后,向每个孔中添加额外的Ab+rhVEGF混合物(使Ab和rhVEGF的最终浓度保持相同),再温育4天。在第7天,将20 μ l阿尔玛蓝(Alamar blue)试剂(Invitrogen,Cat#DAL1025)添加到200 μ l培养基中,并于37℃温育5~6小时。用荧光微孔板读取仪(Ex=530nm/Em=590nm)对平板进行读数。

[0201] 还使用Biacore 2000测试了Fab,以查看其是否阻断了VEGF-VEGFR2相互作用。简言之,使用标准胺类化学手段(NHS/EDC)将VEGF固定在CM5芯片上。使抗VEGF的Fab或对照Fab以25 μ g/ml流过该表面,随后立即使重组VEGFR2以10 μ g/ml流过该表面。在进行进一步的筛选和测序时,还发现了该Fab(219R0202)的另一个轻链变体,据显示该变体具有相似的性质(数据未示出)。将219R0302和219R0202的序列显示为SEQ ID NO:10~SEQ ID NO:16。在Biacore阻断实验中,219R0302Fab完全阻断了VEGFR2与VEGF的结合(图9)。

[0202] 将这两种IgG重构造为IgG2,并进行表达和纯化,用于确认性体外测试。219R0302和219R0202均完全抑制了VEGF所诱导的HUVECS激活,其程度与已许可的抗VEGF试剂贝伐单抗(Avastin)几乎相同(图10)。

[0203] 使用Biacore 2000仪器确定了IgG的亲和力。简言之,使用标准胺类化学手段(NHS/EDC)将重组蛋白固定在CM5芯片上。对于每种Fab和IgG,在该表面上注射不同的浓度(100~1nM),并随时间收集动力学数据。使用同步整体拟合方程来拟合数据,从而产生每种Fab和IgG的亲和力常数(KD)。确定了219R0202/219R0302人和小鼠VEGF的亲和力,并与Avastin比较。与Avastin不同,219R0202和219R0302与人和小鼠VEGF结合(表2)。该数据表示219R0202/219R0302表位与仅结合人VEGF的Avastin的表位不同。

[0204] 表2:219R0302和219R0202与人和小鼠VEGF结合

	IgG	hVEGF (nM)	mVEGF (nM)
[0205]	219R0302	2.1	21
	219R0202	1.5	23
	Avastin	1.3	不结合

[0206] 还在乳腺肿瘤异种移植物模型(UM-PE13)中测试了这两种抗体,其展示出对肿瘤生长的显著抑制(图11)。简言之,在密歇根大学建立了乳腺肿瘤异种移植物细胞系UM-PE13。使用了免疫功能受损的雄性NOD/SCID小鼠来建立UM-PE13肿瘤异种移植物。用300,000个活细胞向小鼠右侧肋部进行皮下注射。一旦肿瘤尺寸达到65~200mm³,将小鼠随机分组。如图11所示,219R0302诱导了比219R0202更强的肿瘤生长延迟。Avastin显示出了无法

与219R0302区分的最强力的生长延迟,表明219R0302和Avastin在此模型中具有几乎相等的效力。与219R0302不同,219R0202在统计学上不同于Avastin和219R0302。

[0207] 实施例5:双特异性抗体构造的开发

[0208] 使用所发现的异源二聚体突变(13A/13B),用两种构造来产生靶向hDLL4(21M18)和VEGF(219R0302,219R0202)的双特异性抗体。

[0209] 在称作单基因双特异性(SGBSP)的第一种构造中,使用了30个氨基酸的连接物(5×GGGGS)来以遗传手段将轻链束缚到其重链上,如Lee等之前所做的(Mol.Immunol.36:61-71(1999))(图12B)。由此,每个结合单元都使用其自身轻链来形成结合其相应靶标的Fab结合单元。当与上述双特异性突变(13A/13B)偶联时,两种不同的单基因集结到一起,从而形成双特异性抗体。

[0210] 在称作一价双特异性(MBSP)的第二种构造中,将同样的轻链与两种不同的重链配合使用,一种重链带有13A突变,另一种带有13B突变(图12C)。对于此方法,在与同样的轻链组合时,两条重链之一或全部必须能够结合其靶标。在一些情况下,该同样的轻链是一条上述重链的亲本轻链。

[0211] 两种抗体构造都是使用21M18(抗人DLL4)和219R0302/219R0202(抗VEGF)作为组成部件来构建的。克隆了分别带有13B和13A Fc突变物的21M18和219R0202/0302重链。一旦经表达和纯化,测试每种双特异性抗体与对照抗体相比的抗DLL4和抗VEGF活性。

[0212] 为了在Biacore中评估双靶向性,如前所述制造了高密度VEGF表面,并且使双特异性物以高浓度流过,从而使该表面饱和(25μg/ml)。在双特异性物与该表面结合后,立即使DLL4-Fc融合蛋白以10μg/ml流过同一表面。如果该双特异性物的两臂都具有功能,则DLL4应当与已结合的双特异性物中未发生结合的抗DLL4臂结合。

[0213] 实施例6:抗DLL4/抗VEGF单基因双特异性(SGBSP)抗体的开发

[0214] 使用219R0302和219R0202之一和21M18来制造SGBSP。两种SGBSP均表达良好,并用蛋白A色谱进行纯化。为了评估同源二聚体物种和异源二聚体物种的相对水平,使用等电点聚焦来测定每种SGBSP。由于同源二聚体物种(13A/13B同源二聚体)的pI与异源二聚体物种的不同,根据凝胶密度计量,凝胶清楚地显示两种SGBSP有超过90%的异源二聚体(图13A)。

[0215] 为了测试抗体的抗VEGF活性,在同一个VEGF诱导增殖测定中测试抗体。如图14所示,219R0302_21M18和219R0202_21M18SGBSP均部分抑制VEGF所诱导的HUVEC增殖,且后者显示出明显比前者更高的活性。由于在双特异性物情况下VEGF结合单元是单体,与Avastin或亲本抗体(219R0302/219R0202)相比,据预测其活性会因亲合力损失而降低。

[0216] 还测定了219R0302_21M18和219R0202_21M18SGBSP对VEGF的亲合力。219R0202_21M18SGBSP的结合亲合力(6.9nM)比219R0202的(1.5nM)弱约5倍,这与亲合力损失一致(表3)。219R0302_21M18SGBSP的结合亲合力(7.6nM)比219R0302的(2.1nM)弱约4倍,这与亲合力损失一致(表3)。

[0217] 表3:SGBSP和MBSP的VEGF Biacore分析

[0218]

IgG	VEGF(nM)
219R0302	2.1
219R0202	1.5

219R0302_21M18SGBSP	7.6
219R0202_21M18SGBSP	6.9
219R0202_21M18MBSP	21

[0219] 在FACS结合测定中,还测试了219R0202_21M18SGBSP对转染有人DLL4的细胞的结合(图15)。当与21M18比较时,因亲合力的损失,DLL4结合活性损失了约5倍。简言之,根据制造商(Roche Inc.)的建议使用Fugene 6转染试剂,来对人293HEK细胞进行转染。用编码全长人DLL4的cDNA表达载体和用来标记瞬时转染的细胞的编码绿色荧光蛋白的第二载体pcDNA-GFP来转染细胞。转染后24~48小时,于37°C将细胞与不同浓度的SGBSP温育1小时。随后用染色培养基(含2%FCS的HBSS)冲洗细胞两次,并将细胞与以1:200稀释在PBS中的荧光二抗(即山羊抗人IgG H/L-藻红蛋白(PE))温育1小时。随后使用FACS标定仪器(FACS Caliber instrument)(BD Bioscience)通过流式细胞术来分析细胞。通过确定呈GFP信号和PE信号阳性的细胞的存在来评估特异性的SGBSP结合。

[0220] 通过使用上述双靶向测定,219R0302_21M18和219R0202_21M18SGBSP都如所预期地显示出与VEGF和DLL4的结合(图16A)。SGBSP还显示出对VEGF所诱导的增殖的部分抑制(图17)。因此,这些测定确认了双特异性突变物确实将每个结合单元以异源二聚体方式集结到了一起,并且每个结合臂都具有功能。

[0221] 实施例7:抗DLL4/抗VEGF一价双特异性(MBSP)抗体的开发

[0222] 在第二个实例中,使用21M18重链、相同的219R0302/219R0202重链和21M18轻链制造了MBSP。MBSP表达良好,并用蛋白A色谱进行纯化。为了评估同源二聚体物种和异源二聚体物种的相对水平,使用等电点聚焦来测定MBSP。由于同源二聚体物种(13A/13B同源二聚体)的pI与异源二聚体物种的不同,根据凝胶密度计量,IEF凝胶分析显示MBSP有超过90%的异源二聚体(图13A)。如图13B所示,可以通过提高21R0202重链(13A):21M18重链(13B)的比率来使剩余的21M18 13B同源二聚体消失。

[0223] 由于在双特异性物情况下VEGF结合单元是单体且失去了其亲本LC,据预测其结合活性会因亲合力损失和轻链对结合的贡献的损失而降低。作为对此观点的确认,MBSP的结合亲和力(21nM)比219R0202的(1.5nM)弱约14倍,这与亲本抗体相比的亲合力损失和轻链结合损失一致(表3)。

[0224] 在FACS结合测定中,还测试了MBSP与转染有人DLL4的细胞的结合(图15)。当与21M18比较时,因亲合力的损失,DLL4结合活性损失了约3倍。

[0225] 通过使用前述双靶向测定,MBSP如所预期地显示出与VEGF和DLL4的结合(图16B)。该测定确认了双特异性突变物确实将每个结合单元以异源二聚体方式集结到了一起,并且每个结合臂都具有功能。

[0001]

序列表

序列 Var1 (13B) (SEQ ID NO:1) (氨基酸取代以粗体显示)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV**E**GFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS**E**LTVDKSRWQQGNVFS **S**VMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

序列 Var1 (13B) –无 CH1 或铰链 (SEQ ID NO:4) (氨基酸取代以粗体显示)

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLV**E**GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS**E**LTVDKSRWQQGNVFS **S**VMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

序列 Var1 (13B) –仅 CH3 (SEQ ID NO:5) (氨基酸取代以粗体显示)

KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV**E**GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD
GSFFLYS**E**LTVDKSRWQQGNVFS **S**VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

序列 Var2 (SEQ ID NO:2)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV**E**GFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFL**F**SELTVDKSRWQQGNVFS **S**VMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

序列 Var2 –无 CH1 或铰链 (SEQ ID NO:6)

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLV**E**GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFL**F**SELTVDKSRWQQGNVFS **S**VMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

[0002]

序列 Var2 –仅 CH3 (SEQ ID NO:7)

KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSD
GSFFLFSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

序列 Var3 (13A) (SEQ ID NO:3) (氨基酸取代以粗体显示)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPCVAGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE**K**MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPML**K**SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

序列 Var3 (13A) –无 CH1 或铰链 (SEQ ID NO:8) (氨基酸取代以粗体显示)

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE**K**MTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPML**K**SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

序列 Var3 (13A) –仅 CH3 (SEQ ID NO:9) (氨基酸取代以粗体显示)

KTKGQPREPQVYTLPPSRE**K**MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPML**K**SD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

219R0302/0202 VH 氨基酸序列(SEQ ID NO:10)

QVQLKQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFITNYMMHWKLRPGQGFIEWIGDINPSNGGTSYNEKF
KRKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTIHYYDINSYAMDYWGQGTSTVTVSSAST

219R0302/0202 HC 氨基酸序列(SEQ ID NO:11)

QVQLKQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFITNYMMHWKLRPGQGFIEWIGDINPSNGGTSYNEKF
KRKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTIHYYDINSYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSV

[0003]

FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPEPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP
 EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC
 KVS NKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTT PMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

219R0302/0202 HC DNA 序列(SEQ ID NO:12)

CAGGTGCAATTGAAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCT
 GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGCACTGGGTGAAGCTGAGGCTGGACA
 AGGCTTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCCAGCAATGGTGGTACTAGCTACAATGAGAAGTTC
 AAGAGAAAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCC
 TGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAATACTACTATGATAATTCTATGCTAT
 GGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCTAGCGTC
 TTCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
 AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCA
 CACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
 TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
 TGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGC
 AGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
 GAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG
 TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTT
 CCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGC
 CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAG
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT
 ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
 GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

219R0302 LC 氨基酸序列(SEQ ID NO:13)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYVNWYQQKPKGKAPKLLIYDASNLTQGVPSRFSG
 RSGTHFTFTISSLQPEDLATYYCQYDDLPTFGRTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

219R0302 LC DNA 序列(SEQ ID NO:14)

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTCCGAGACAGAGTCACCATCA
 CTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATGTAAATTGGTATCAACAAAACAGGGAAAGC
 CCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCATCCAACCTGCAAACAGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGA

[0004]

AGGGGATCTGGGACACATTTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATCTGGCAACAT
 ATTACTGTCAACAATATGATGATCTTCCCTCCCCTTTTGGCAGAGGGACCAAGCTGGAGATCAA
 ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCAGCAGTCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
 ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAG
 TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
 CACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
 GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT
 GT

219R0202 LC 氨基酸序列(SEQ ID NO:15)

DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQGINNHLAWYQQKPGKVPKSLIYAASNLSHSGVPSKFSG
 SSGSHTFTLI ISSLQPEDIATYYCQYDNLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

219R0202 LC DNA 序列(SEQ ID NO:16)

GATATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTCGGAGACAGAGTCACCATCA
 CTTGTTCGGGCGAGTCAGGGCATCAATAATCATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGT
 CCCTAAGTCCCTCATATATGCTGCATCCAATCTCCATAGTGGCGTCCCATCAAAGTTCAGCGGC
 AGTGGATCTGGGACACACTTCACTCTCATCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACAT
 ATTACTGTCAACAGTATGATAATCTCCCCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
 ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCAGCAGTCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
 ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAG
 TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
 CACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
 GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT
 GT

219R0202_SG (Var3/13A)氨基酸序列(SEQ ID NO:17) (连接序列以带下划线的粗体显示)
 (13A 取代以粗体显示)

DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQGINNHLAWYQQKPGKVPKSLIYAASNLSHSGVPSKFSG
 SSGSHTFTLI ISSLQPEDIATYYCQYDNLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC **GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG**QVQLKQSGAEL
 VKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMHWKLRPGQGFIEWIGDINPSNGGTSYNEKFKRKATLTVDKS
 SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTIHYYDNSYAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
 ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTC

[0005]

NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSH
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI
EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE**K**MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
MLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

219R0302_SG (Var3/13A)氨基酸序列(SEQ ID NO:18) (连接序列以带下划线的粗体显示)
(13A 取代以粗体显示)

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCQASQDISNYVNWYQQKPGKAPKLLIYDASN LQTGVPSRFSG
RSGTHFTFTISSLQPEDLATYQCQYDDL PPTFGRG TKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADY EKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG**QVQLKQSGAEL
VKPGASVKLSCKASG YFTFTNYWMHWV KLRPGQGF EWIGDINPSNGGTSYNEKFKRKATLTVDKS
SSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCTIHYYDNSYAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRST
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SNFGTQTYTC
NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSH
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI
EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE**K**MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
MLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

21M18_SG (Var1/13B)氨基酸序列(SEQ ID NO:19) (连接序列以带下划线的粗体显示) (13B
取代以粗体显示)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESV DNYGIFSMKW FQQKPGQPPKLLIYAASNQGS GPVD
RFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ QSKVEPWTFFGGG TKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADY EK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG**QVQLVQSG
AEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQFKGRVTFTT
DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD YDVGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRS
TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SNFGTQTY
TCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDV
SHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP A
PIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVE**E**GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPMLDSDGSFFLYSE**L**TVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

219R0302/0202 重链 CDR1 (SEQ ID NO:20)

GYTFTNYWMH

219R0302/0202 重链 CDR2 (SEQ ID NO:21)

SINPSNGGTSYNEKFKR

219R0302/0202 重链 CDR3 (SEQ ID NO:22)

HYYDNSYAMDY

219R0302 轻链 CDR1 (SEQ ID NO:23)

QASQDISNYVN

219R0302 轻链 CDR2 (SEQ ID NO:24)

DASNLQT

219R0302 轻链 CDR3 (SEQ ID NO:25)

[0006]

QQYDDLPP

219R0202 轻链 CDR1 (SEQ ID NO:26)

RASQGINNHLAW

219R0202 轻链 CDR2 (SEQ ID NO:27)

AASNLHS

219R0202 轻链 CDR3 (SEQ ID NO:28)

QQYDNLPL

219R0302 VL 氨基酸序列(SEQ ID NO:29)

[0007]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYVNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLTGVPSRFSG
RSGGTHFTFTISSLQPEDLATYYCQQYDDLPTFGRGTKLEIKRT

219R0202 VL 氨基酸序列(SEQ ID NO:30)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINNHLAWYQQKPGKVPKSLIYAASNLSHSGVPSKFSG
SGSGTHFTLI ISSLQPEDIATYYCQQYDNLPLTFGGGTKVEIKRT

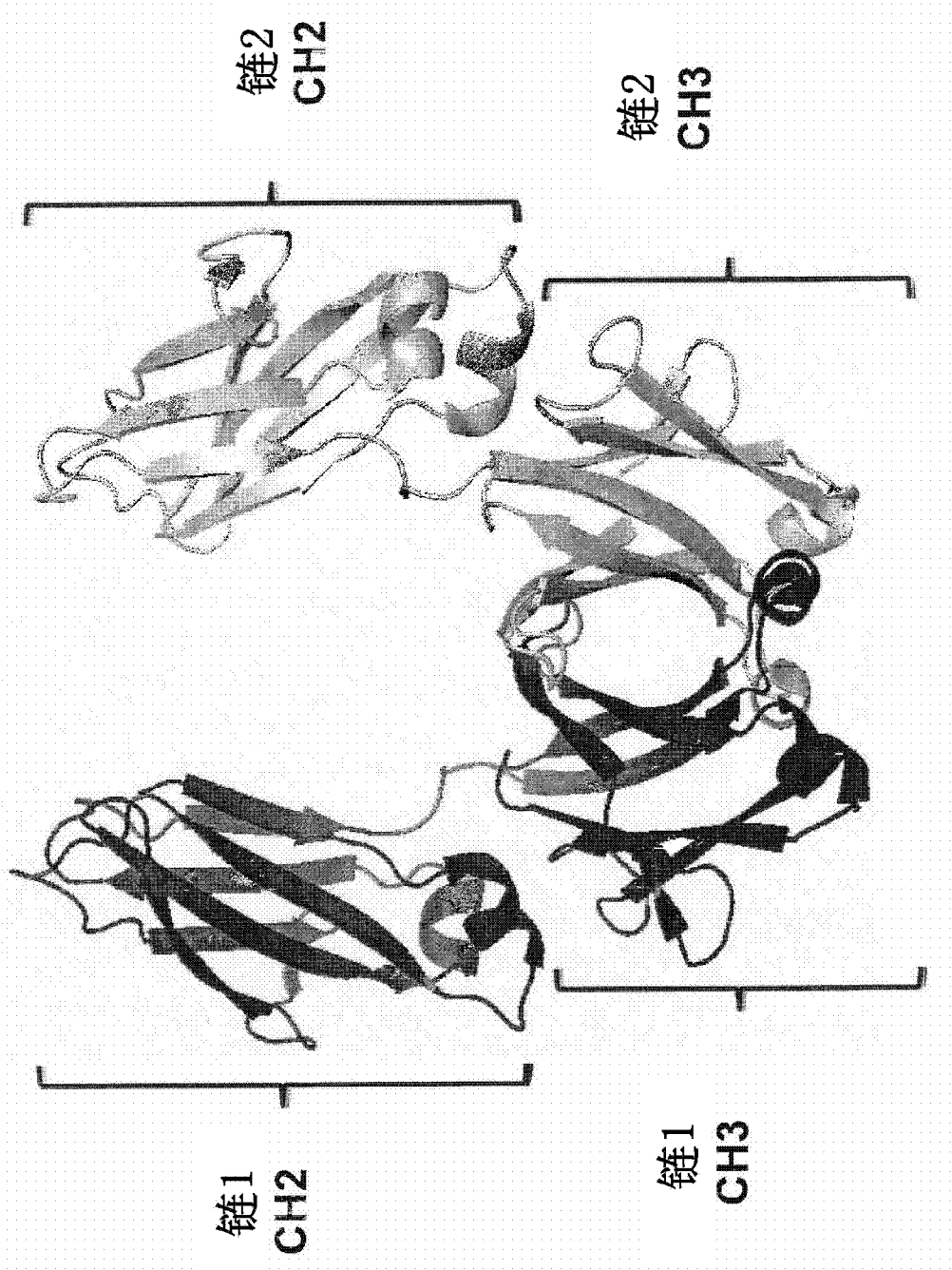


图1

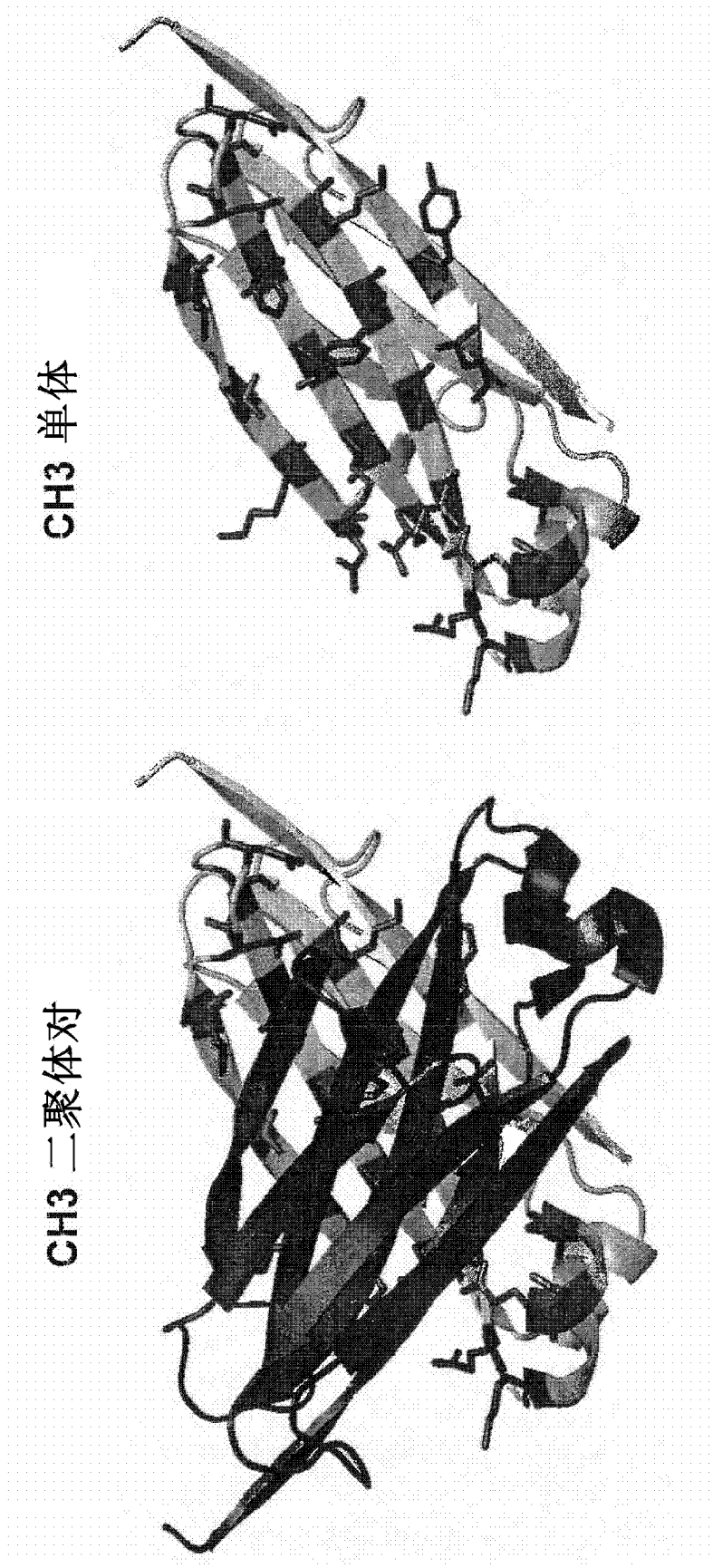


图2

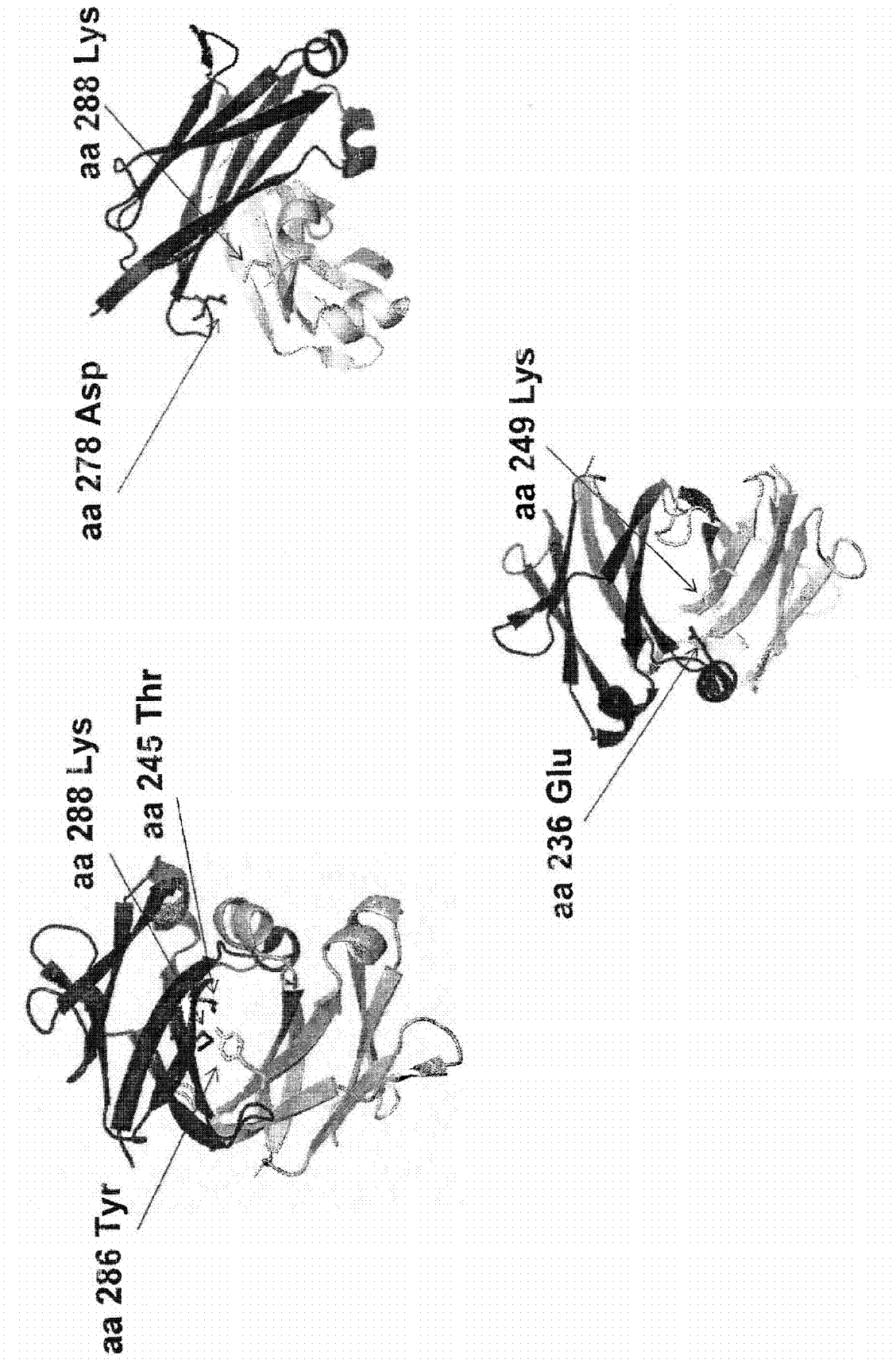


图3

CH1

IGHG1	人	1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
IGHG2	人	1	ASTKGPSVEFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
IGHG3	人	1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
IGHG4	人	1	ASTKGPSVEFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

铰链

IGHG1	人	61	GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHRKPSNTKVKRVE
IGHG2	人	61	GLYSLSSVTVTPSSNEGTQTYTCNVDRKPSNTKVKRVER
IGHG3	人	61	GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVNHRKPSNTKVKRVEKTPLGDTTHTCPRCFPKSC
IGHG4	人	61	GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVDRKPSNTKVKRVEE

CH2

IGHG1	人	100	PKSCDKTHTCPPAPPELLGCPSEVLFPPKPKDT
IGHG2	人	101	KCCVECPCCPAPPEVMSPSVELFPPKPKDT
IGHG3	人	121	DTPPCPRCPKSCDTPPCPRCPPEKSGDTPPPPCPCPAPPELLGCPSEVLFPPKPKDT
IGHG4	人	101	KYGPPCPCPCPAPPELLGCPSEVLFPPKPKDT

IGHG1	人	134	LMI SRTPEVTCVAVDVSHEDPEVQFNWYDGVVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLVTH
IGHG2	人	130	LMI SRTPEVTCVAVDVSHEDPEVQFNWYDGVVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLVTH
IGHG3	人	181	LMI SRTPEVTCVAVDVSHEDPEVQFNWYDGVVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLVTH
IGHG4	人	131	LMI SRTPEVTCVAVDVSHEDPEVQFNWYDGVVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLVTH

CH3

IGHG1	人	194	QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEETKNOVSLTCLVK
IGHG2	人	190	QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVK
IGHG3	人	241	QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVK
IGHG4	人	191	QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVK

IGHG1	人	254	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSCSVMHE
IGHG2	人	250	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSCSVMHE
IGHG3	人	301	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSCSVMHE
IGHG4	人	251	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSCSVMHE

IGHG1	人	314	ALHNHYTKSLSLSLSPGK
IGHG2	人	310	ALHNHYTKSLSLSLSPGK
IGHG3	人	361	ALHNHYTKSLSLSLSPGK

图4

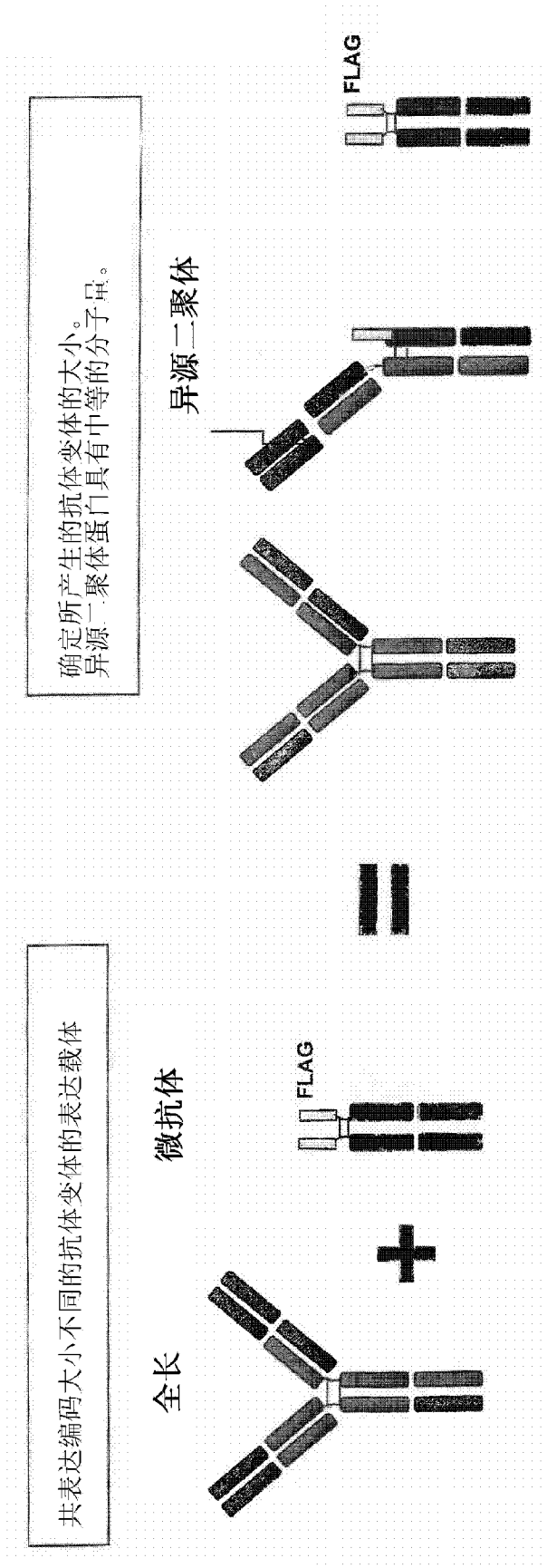


图5

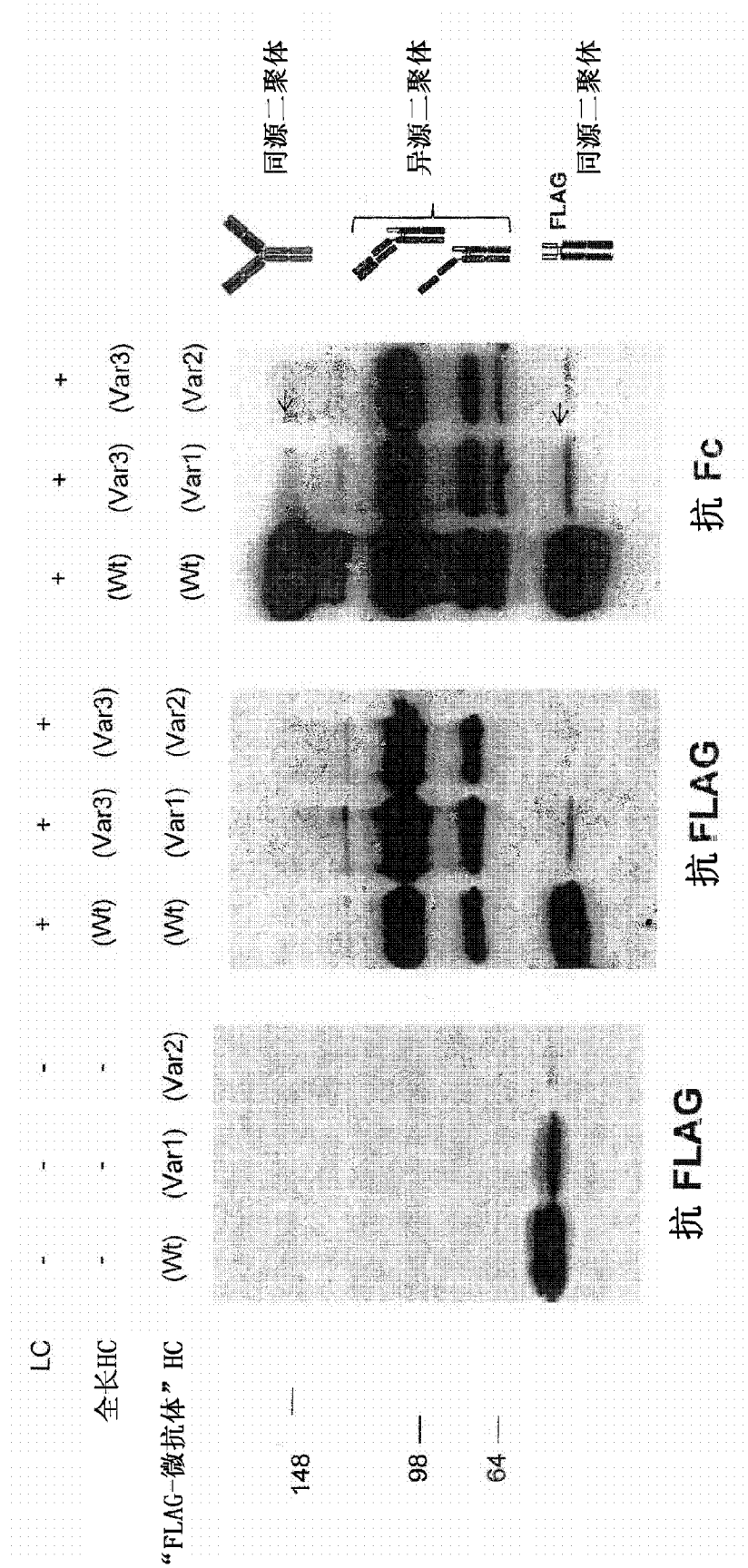


图6

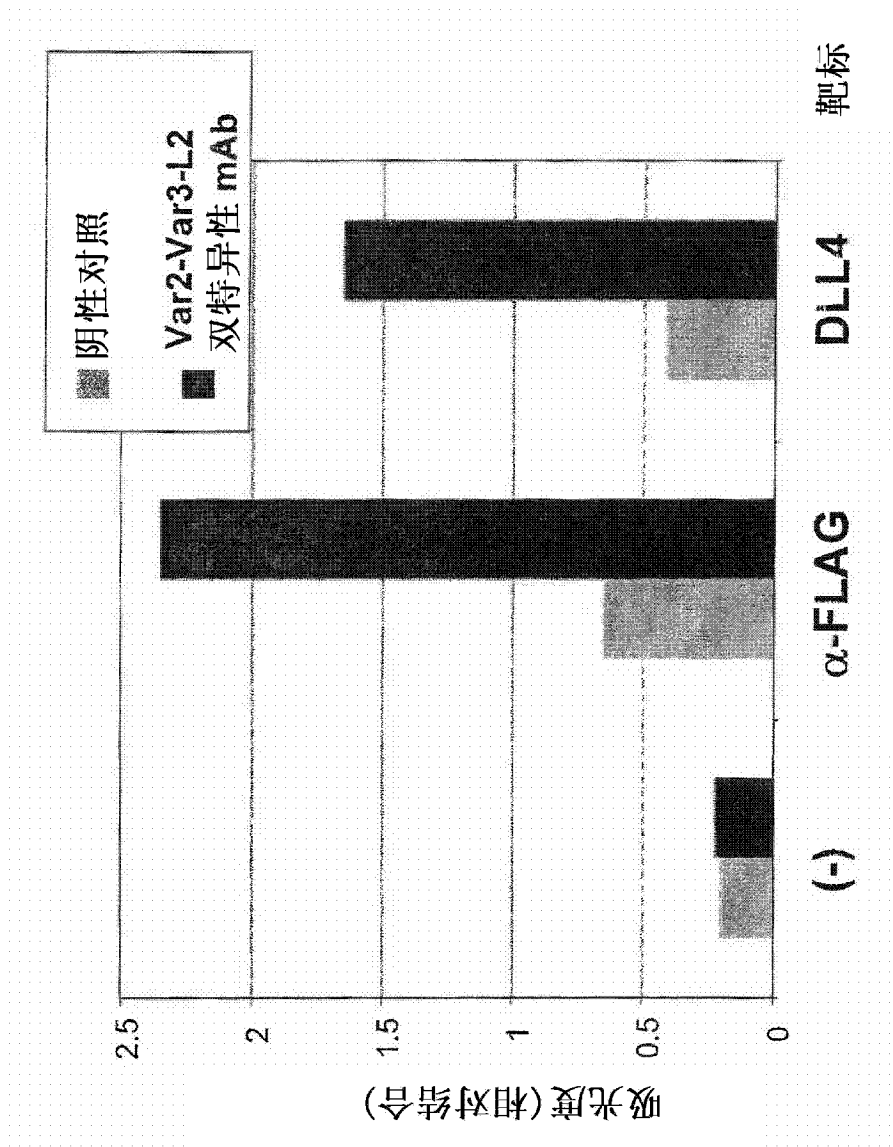


图7

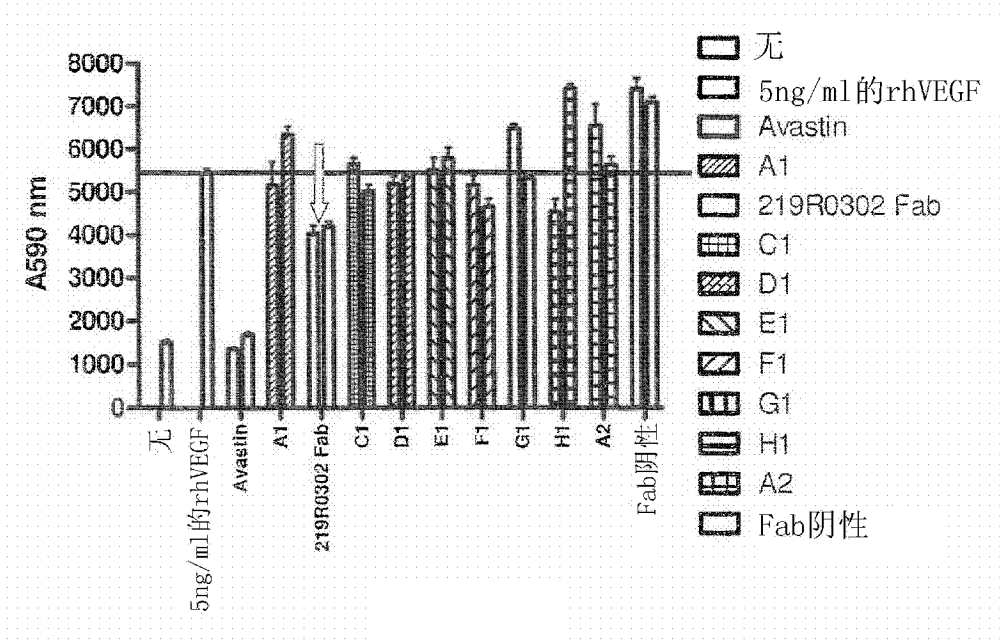


图8

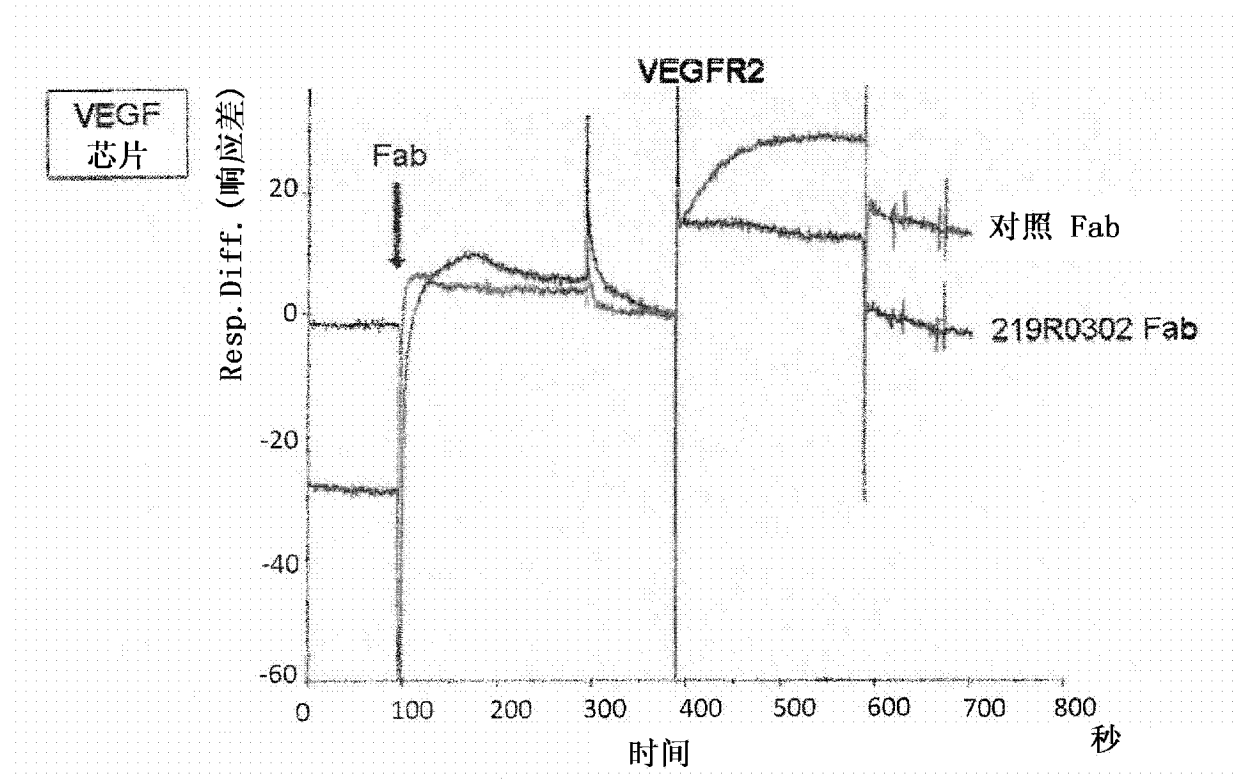


图9

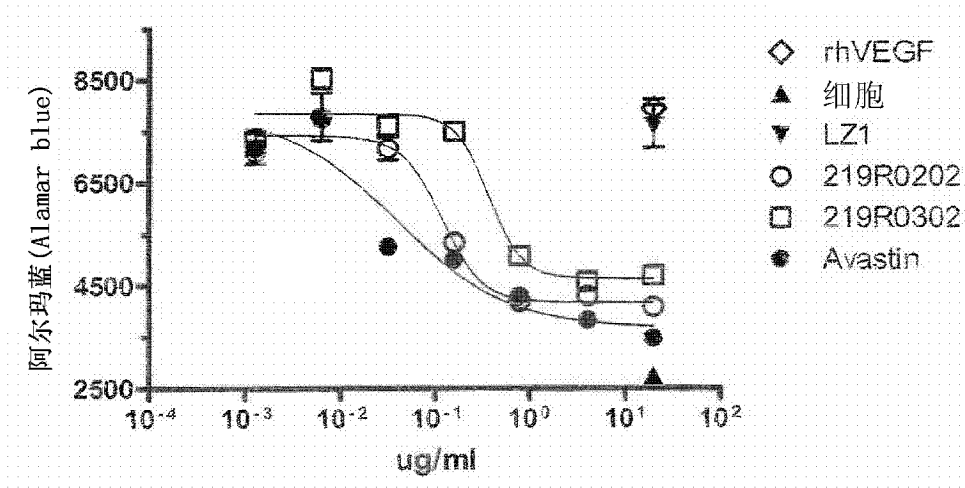


图10

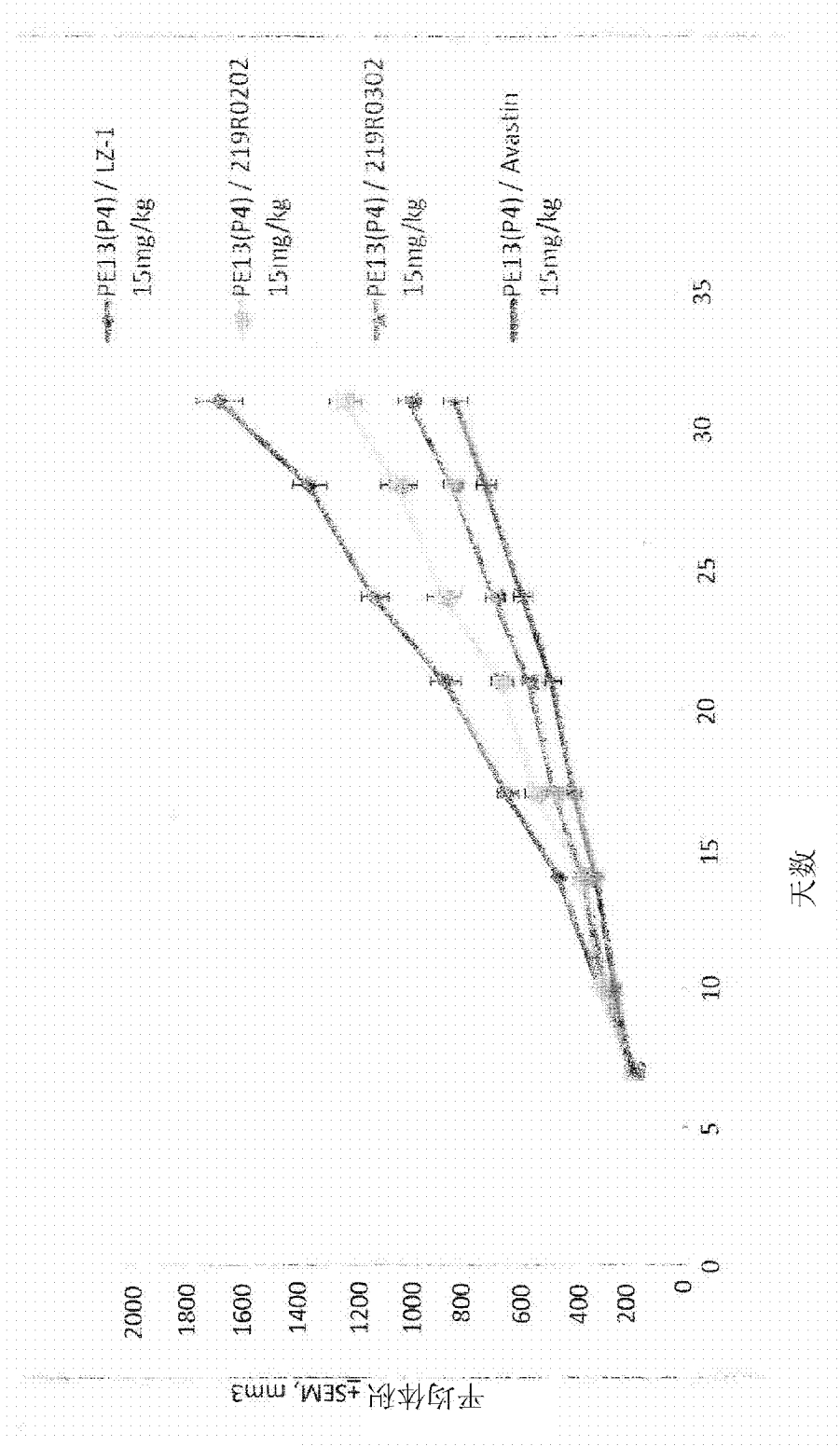


图11

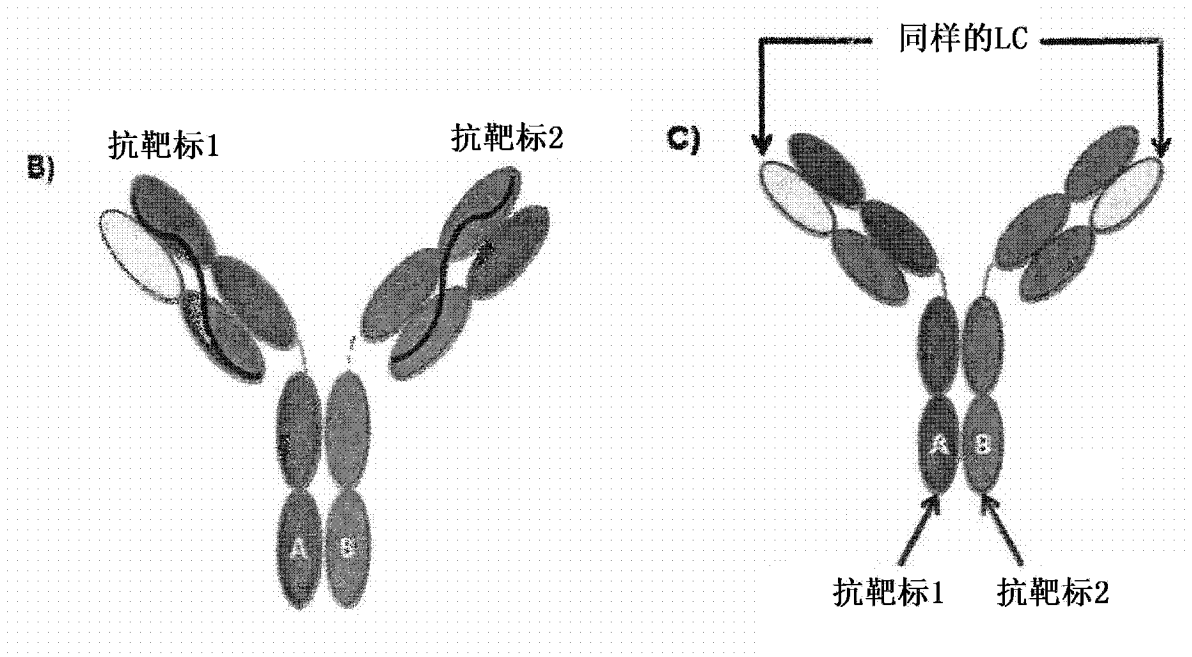


图12

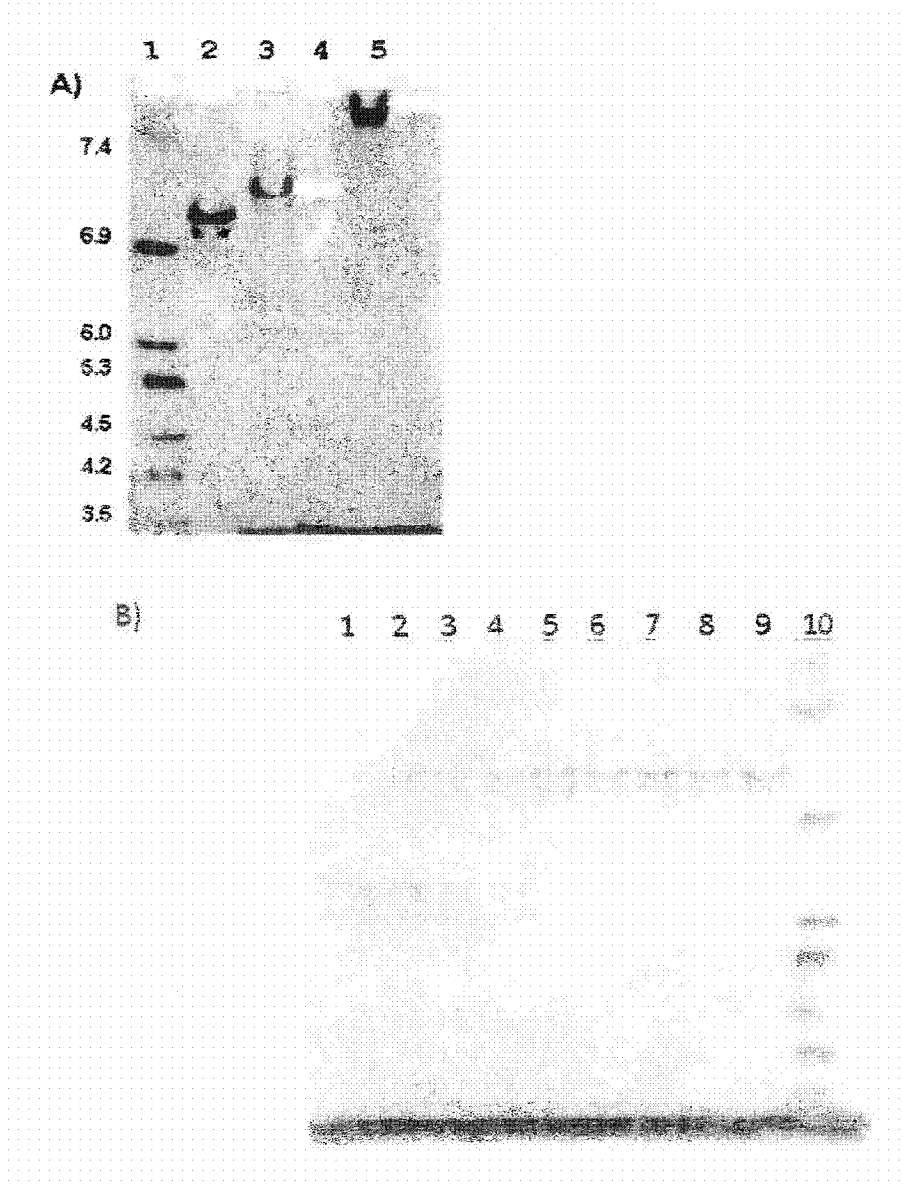


图13

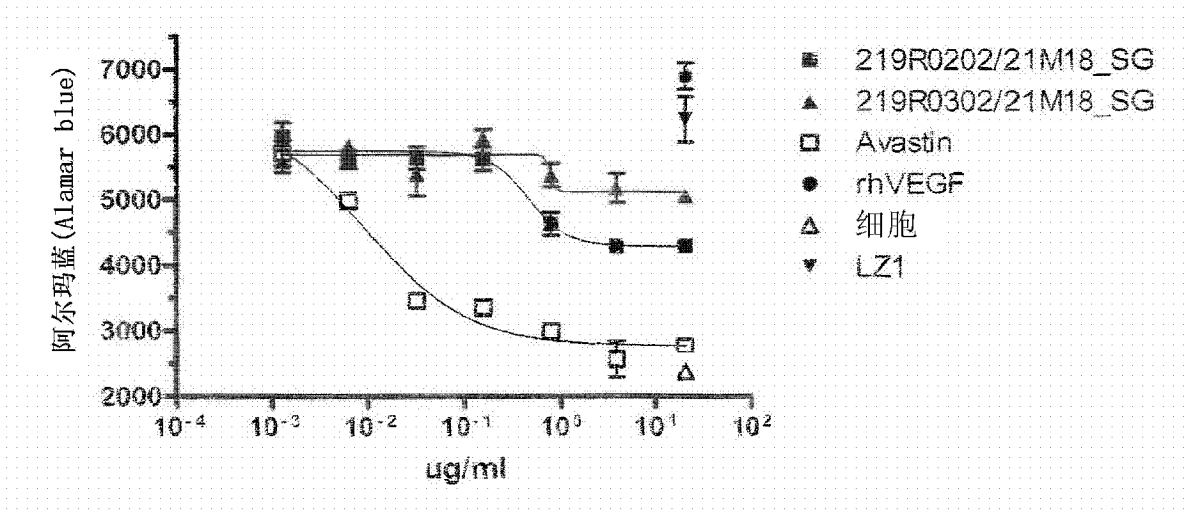


图14

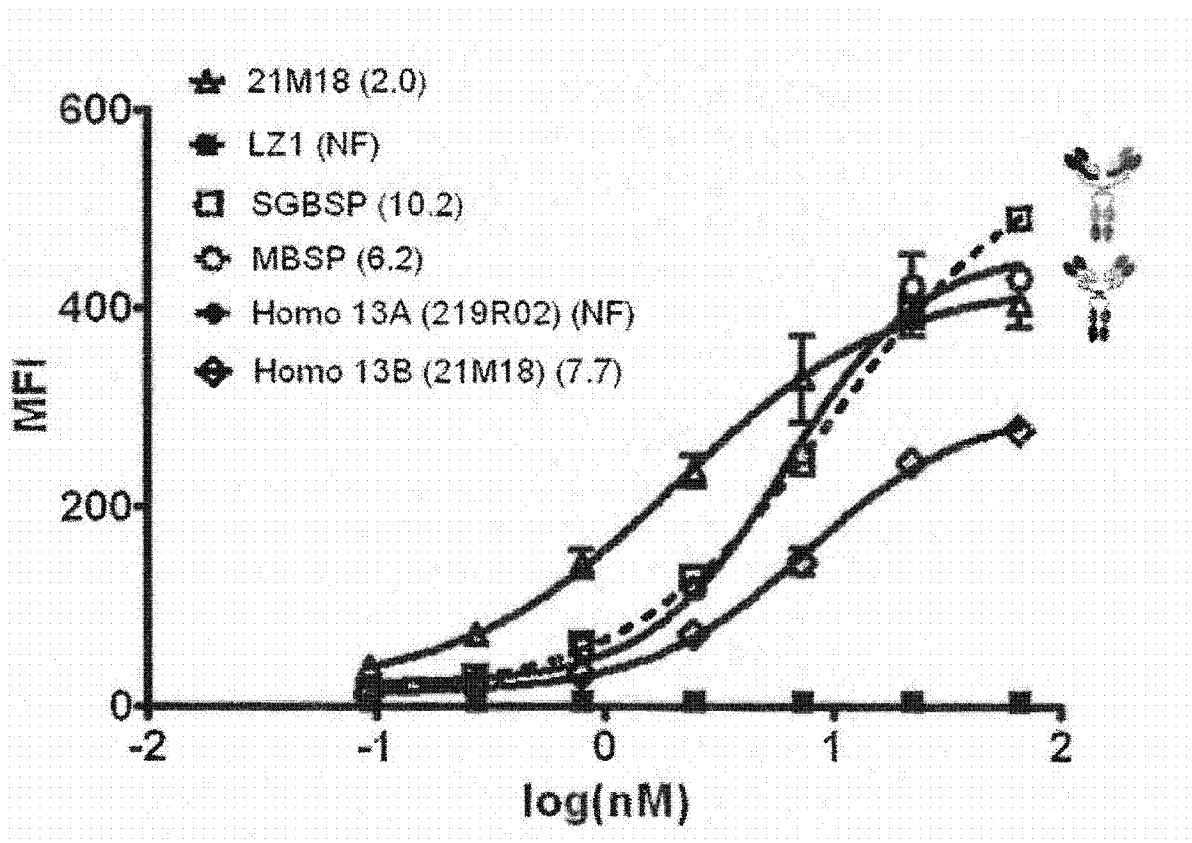


图15

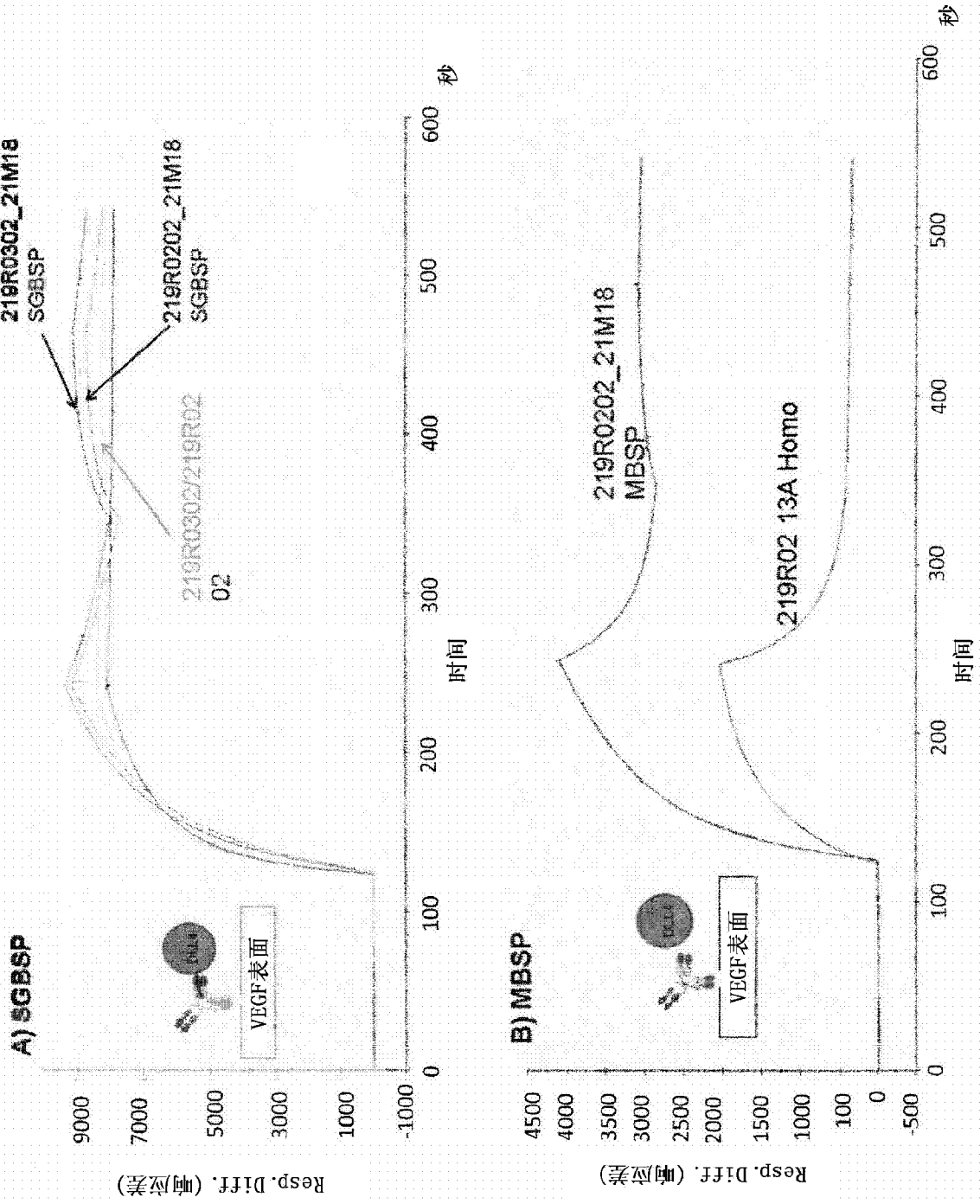


图16

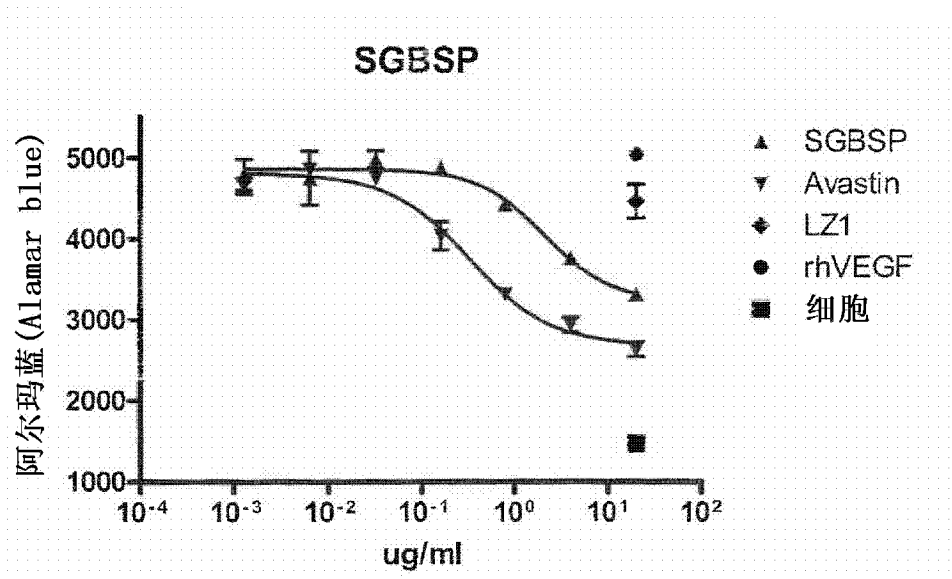


图17