



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105274170 A

(43) 申请公布日 2016.01.27

(21) 申请号 201510813445.6

(22) 申请日 2010.11.05

(30) 优先权数据

61/258,565 2009.11.05 US

(62) 分案原申请数据

201080060730.0 2010.11.05

(71) 申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 M·马里基 D·E·莱利

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

(51) Int. Cl.

C12P 21/00(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

权利要求书1页 说明书82页

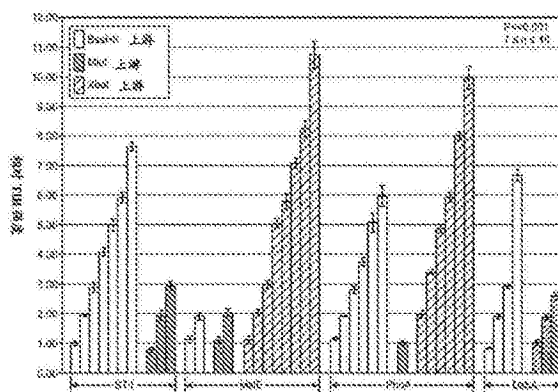
序列表28页 附图6页

(54) 发明名称

分泌异源多肽的方法和组合物

(57) 摘要

本申请涉及分泌异源多肽的方法和组合物。本发明一般涉及分子生物学和蛋白质技术领域。更具体地,本发明涉及用于从细菌分泌异源多肽的信号序列。本发明还涉及重组多肽及其应用。



1. 制备抗体的方法,所述方法包括培养包含多核苷酸的宿主细胞,所述多核苷酸包括:(1) 与编码抗体重链的多核苷酸有效连接的第一翻译起始区(TIR),其中该TIR包含共翻译原核分泌信号序列;和(2) 与编码抗体轻链的多核苷酸有效连接的第二TIR,其中该第二TIR包含共翻译或翻译后原核分泌信号序列,由此抗体在宿主细胞中表达后,重链和轻链折叠和组装形成具生物学活性的抗体。

2. 权利要求1的方法,其中第一TIR包含STII或DsbA变体信号序列。

3. 权利要求1或2的方法,其中第二翻译起始区包含STII、DsbA、MalE或PhoA变体信号序列。

4. 权利要求1-3之任一的方法,其中宿主细胞还包含(3) 与编码Fc多肽的多核苷酸有效连接的第三翻译起始区。

5. 权利要求4的方法,其中第三翻译起始区包含STII、PhoI或DsbA变体信号序列。

6. 包含变体翻译起始区(TIR)的多核苷酸,其中变体TIR包含PhoA、MalE、DsbA或STII分泌信号区的核酸变体。

7. 权利要求6的多核苷酸,与编码异源多肽的多核苷酸有效连接,由此异源多肽在宿主细胞中表达时,异源多肽折叠和组装形成具有生物学活性的异源多肽。

8. 权利要求7的多核苷酸,其中异源多肽选自抗体重链和抗体轻链。

9. 通过权利要求1-5之任一的方法获得的抗体。

10. 包含权利要求9的抗体的药物组合物。

分泌异源多肽的方法和组合物

[0001] 本申请是申请日为2010年11月5日、中国申请号为201080060730.0、发明名称为“分泌异源多肽的方法和组合物”的发明申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求申请日为2009年11月5日的美国专利申请号61/258,565的优先权，并将其内容以引用的方式并入本文。

发明领域

[0004] 本发明一般涉及分子生物学和蛋白质技术领域。更具体地，本发明涉及用于从细菌中分泌异源多肽的信号序列。本发明也涉及通过原核生物生产的重组多肽及其应用。

[0005] 发明背景

[0006] 将异源多肽分泌到大肠杆菌和其它原核生物的周质间隙或分泌到它们的培养基中受多种因素影响。一般，对用于分泌目的多肽的载体进行改造，以将编码分泌信号序列的DNA置于编码目的多肽的DNA的5'端。

[0007] 近年来，使用异源多肽（例如抗体）作为各种失调和疾病的诊断和治疗药剂的前景越来越好。许多研究和临床应用需要大量的功能性多肽，因此需要用于多肽生产的扩大的、但是经济的系统。特别有用的是，使用各种表达宿主，从例如大肠杆菌 (*E. coli*) 或枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 等原核生物到酵母、植物、昆虫细胞和哺乳动物细胞，通过重组体生产抗体。Kipriyanov 和 Little(1999) *Mol. Biotech.* 12:173-201。

[0008] 与其它多肽生产体系相比，细菌，特别是大肠杆菌，具有许多独特的优点。所用的原材料（即细菌细胞）便宜且易于生长，因此降低了产品的成本。原核宿主比例如哺乳动物细胞生长更快，这使得可以对遗传操作进行更快的分析。较短的增代时间和易于扩大规模也使细菌发酵成为用于蛋白质大量生产的更具有吸引力的手段。包括大肠杆菌在内的许多细菌物种的基因组结构和生物学活性已经得到充分研究，且可获得广范的合适载体，这使得表达期望的抗体更加方便。与真核生物相比，该生产过程涉及较少的步骤，这些步骤包括重组基因的操作、将多个拷贝稳定转化到宿主中、表达的诱导和产物的表征。Pluckthun 和 Pack(1997) *Immunotech* 3:83-105。

[0009] 各种方法已被用来在细菌中产生重组多肽。可以通过胞质中表达的包涵体的再折叠，或通过表达后分泌到细菌周质中，来从细菌获得重组蛋白。在分泌和再折叠之间的选择一般基于几种因素。分泌通常是用于生产抗体的更快和更普遍使用的策略。Kipriyanov 和 Little(1999)，同上。

[0010] 在原核系统中表达抗体可以在不同规模上进行。摇瓶培养（在2-5升范围内）一般产生小于5mg/升的产物。Carter 等 (1992) *Bio/Technology* 10:12-16 发展了高细胞密度发酵系统，其中获得了高水平表达（多达2g/升）的抗体片段。Carter 等获得的 Fab' 的该克/升滴度在很大程度上可以归因于，比简单的摇瓶更为精确地控制的发酵罐环境导致了较高的细胞密度。该系统包含设计来共表达轻链和重链片段的双顺反子操纵子。该双顺反子操纵子处于单个的大肠杆菌磷酸饥饿诱导型 *phoA* 启动子的控制之下。每个抗体链之前

具有大肠杆菌热稳定肠毒素 II(stII) 信号序列,以指导分泌到周质空间中。

[0011] 对于在大肠杆菌中生产抗体的综述,见 Pluckthun 和 Pack(1997) Immunotech 3:83-105 ;Pluckthun 等 (1996), 于 ANTIBODY ENGINEERING:A PRACTICAL APPROACH, 第 203-252 页 (Oxford 出版社) 中 ;Pluckthun(1994), 于 HANDBOOK OF EXP PHARMCOL 卷 3:THE PHARMCOL OF MONOCLONAL ANTIBODIES, 第 269-315 页 (M. Rosenberg 和 G. P. Moore 编辑 ; Springer-Verlag, Berlin) 中。

[0012] 许多生物学测定 (例如 X 射线晶体学) 和临床应用 (例如蛋白质疗法) 需要大量的蛋白质。因此,需要用于产生正确组装的、可溶的和功能性异源多肽 (例如抗体) 的高产而简单的系统。

[0013] 本文引用的所有参考文献,包括专利申请和出版,均以引用的方式就其全部内容并入到本文中。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明提供了用于增加异源蛋白生产的新的手段,所述手段包括使用新的翻译起始区 (TIR) 变体,包括包含共翻译分泌信号肽 (以共翻译方式指导转移的信号肽) 的 TIR 变体和 / 或包含翻译后分泌信号肽 (以翻译后方式指导转移的信号肽) 的 TIR 变体。此外,本文公开了使用载体增加抗体生产,所述载体包含与包含共翻译或翻译后分泌信号肽的 TIR 有效连接的抗体轻链,和与包含共翻译分泌信号肽的 TIR 有效连接的抗体重链,用于峰值表达。本文也提供了新的 TIR 变体。

[0016] 在一个方面,本发明提供了变体翻译起始区。在一些实施方案中,变体包括变体翻译起始区 (在一些实施方案中,原核翻译后分泌信号序列或原核共翻译分泌信号序列)。在一些实施方案中,变体包括分泌信号序列 (例如 PhoA、MalE、DsbA 或 STII) 的核酸变体。在一些实施方案中,变体还包含 MlaI、BssHII、或 XbaI 限制性位点。在一些实施方案中,变体包括包含表 3 中所示序列的翻译起始区变体。

[0017] 在一个方面,本发明提供了变体分泌信号序列。在一些实施方案中,分泌信号序列是原核翻译后分泌信号序列或原核共翻译分泌信号序列。在一些实施方案中,分泌信号序列是真核翻译后分泌信号序列或真核共翻译分泌信号序列。在一些实施方案中,变体是 PhoA、MalE、DsbA 或 STII 分泌信号序列的核酸变体。在一些实施方案中,变体包含表 3 中所示的分泌信号序列。本发明的变体分泌信号序列适用于例如本文公开的任何方法中。

[0018] 在另一个方面,本发明提供了包含本发明的翻译起始区的多核苷酸。在一些实施方案中,翻译起始区包含表 3 中所示的序列 (例如,SEQ ID NOs 1-42 之一)。在一些实施方案中,翻译起始区包含 SEQ ID NOs. 1-14、16-24、26-39、41-42 之一。该多核苷酸适用于例如本文公开的任何方法中。

[0019] 在另一个方面,本发明提供了包含本发明的分泌信号序列的多核苷酸。在一些实施方案中,分泌信号序列包含表 3 中所示的序列 (例如,SEQ ID NOs 1-42 之一)。在一些实施方案中,翻译起始区包含 SEQ ID NOs. 1-14、16-24、26-39、41-42 之一。该多核苷酸适用于例如本文公开的任何方法中。

[0020] 在另一个方面,本发明提供了包含本发明的翻译起始区的多核苷酸,所述翻译起始区与编码异源多肽的多核苷酸有效连接,借以在宿主细胞 (例如,原核宿主细胞,例如,大肠杆菌宿主细胞) 中表达异源多肽时,异源多肽折叠和组装形成具生物学活性的异源多

肽。本文还公开了异源多肽的实例。在一些实施方案中,异源多肽是抗体重链。在一些实施方案中,异源多肽是抗体轻链。在一些实施方案中,异源多肽是Fc多肽。在一些实施方案中,异源多肽是多聚体多肽。在一些实施方案中,异源多肽是异源多聚体。在一些实施方案中,翻译起始区是本文中公开的任何翻译起始区,例如包含表3中所示序列的翻译起始区。在一些实施方案中,翻译起始区包含SEQ ID NOs 1-42之一的序列。在一些实施方案中,翻译起始区包含SEQ ID NOs 1-14、36-39、41-42之一的序列。在一些实施方案中,翻译起始区包含变体STII、DsbI、PhoA或MalE信号序列。

[0021] 在另一个方面,本发明提供了多核苷酸,其包括:(1)与编码第一异源多肽的多核苷酸有效连接的第一翻译起始区(TIR),其中TIR包含共翻译原核分泌信号序列;和(2)与编码第二异源多肽的多核苷酸有效连接的第二TIR,其中第二TIR包含共翻译或翻译后原核分泌信号序列,借以在宿主细胞中表达抗体时,第一和第二异源多肽折叠和组装形成具生物学活性的多肽复合物。

[0022] 在另一个方面,本发明提供了编码抗体的多核苷酸,所述多核苷酸包括:(1)与编码抗体重链的多核苷酸有效连接的本发明的第一翻译起始区;和(2)与编码抗体轻链的多核苷酸有效连接的第二翻译起始区,借以在宿主细胞(例如,原核宿主细胞,例如,大肠杆菌宿主细胞)中表达抗体时,重链和轻链折叠和组装形成具生物学活性的抗体。

[0023] 在一些实施方案中,第一翻译起始区包含共翻译原核分泌信号序列(例如,通过信号识别肽指导翻译的信号序列)。在一些实施方案中,第一翻译起始区包含STII或DsbA信号序列。在一些实施方案中,第一翻译起始区包含DsbA信号序列。在一些实施方案中,第一翻译起始区包含PhoA或MalE信号序列。在一些实施方案中,第一翻译起始区包含SEQ ID NOs:1-10和36-42之一的序列。在一些实施方案中,第一翻译起始区包含SEQ ID NOs:1-10、36-29、41和42之一的序列。在一些实施方案中,第一翻译起始区包含SEQ ID NOs:1-42之一的序列。在一些实施方案中,第一翻译起始区包含SEQ ID Nos. 1-14、16-24、26-39、41-42之一的序列。

[0024] 在一些实施方案中,第二翻译起始区包含:(i)共翻译原核分泌信号序列或翻译后原核分泌信号序列(例如,通过sec途径指导翻译的信号序列)。在一些实施方案中,第二翻译起始区包含STII、DsbA、MalE或PhoA信号序列。在一些实施方案中,第二翻译起始区包含PhoA或MalE信号序列。在一些实施方案中,第二翻译起始区包含SEQ ID NOs1-42之一的序列。在一些实施方案中,第二翻译起始区包含SEQ ID NOs1-14、16-24、26-39、41-42之一的序列。

[0025] 在一些实施方案中,编码抗体的多核苷酸还包括(3)与编码Fc多肽的多核苷酸有效连接的第三翻译起始区。在一些实施方案中,第三翻译起始区包含STII、PhoA或DsbA信号序列。在一些实施方案中,第三翻译起始区包含DsbA信号序列。在一些实施方案中,第三翻译起始区包含PhoA信号序列。

[0026] 在另一个方面,本发明提供了多核苷酸,其包括:(1)与编码抗体重链的多核苷酸有效连接的第一翻译起始区(TIR),其中TIR包含共翻译原核分泌信号序列;和(2)与编码抗体轻链的多核苷酸有效连接的第二TIR,其中第二TIR包含共翻译或翻译后原核分泌信号序列,借以在宿主细胞中表达抗体时,重链和轻链折叠和组装形成具生物学活性的抗体。

[0027] 在另一个方面,本发明提供了编码抗体片段(例如单价抗体片段)的多核苷酸,所

述多核苷酸包括：(1) 与编码抗体重链的多核苷酸有效连接的本发明的第一翻译起始区；(2) 与编码抗体轻链的多核苷酸有效连接的第二翻译起始区；和 (3) 与编码 Fc 多肽的多核苷酸有效连接的第三翻译起始区，借以在宿主细胞（例如，原核宿主细胞）中表达抗体时，重链、轻链和 Fc 多肽折叠和组装形成具生物学活性的抗体（例如单臂抗体）。在一些实施方案中，第三翻译起始区包含共翻译原核分泌信号序列或翻译后原核分泌信号序列。在一些实施方案中，第三翻译起始区包含 STII、PhoA、MalE 或 DsbA 信号序列。在一些实施方案中，第三翻译起始区包含 DsbA 信号序列。在一些实施方案中，第三翻译起始区包含 PhoA 信号序列。在一些实施方案中，第三翻译起始区包含 SEQ ID Nos 1-42 之一的序列。在一些实施方案中，第三翻译起始区包含 SEQ ID Nos. 1-14、16-24、26-39、41-42 之一的序列。

[0028] 在另一个方面，本发明提供了编码抗体的多核苷酸，所述多核苷酸包括：(1) 与编码抗体重链的多核苷酸有效连接的第一翻译起始区，其中第一翻译起始区包含 STII 或 DsbA 信号序列；和 (2) 与编码抗体轻链有效连接的第二翻译起始区，其中第二翻译起始区包含 STII、DsbA、MalE 或 PhoA 信号序列，借以在宿主细胞（例如，原核宿主细胞）中表达抗体时，重链和轻链折叠和组装形成具生物学活性的抗体。在一些实施方案中，第一翻译起始区包含 DsbA 信号序列，第二翻译起始区包含 MalE 或 PhoA 信号序列。在一些实施方案中，编码抗体的多核苷酸还包括 (3) 与编码 Fc 多肽的多核苷酸有效连接的第三翻译起始区。在一些实施方案中，第三翻译起始区包含 STII、PhoA 或 DsbA 信号序列。在一些实施方案中，第三翻译起始区包含 PhoA 信号序列。在一些实施方案中，第三翻译起始区包含 DsbA 信号序列。

[0029] 在一些实施方案中，所述变体翻译起始区的翻译强度低于野生型翻译起始区的翻译强度。在一些实施方案中，所述变体翻译起始区的翻译强度高于野生型翻译起始区的翻译强度。在一些实施方案中，与野生型氨基酸序列相比，翻译起始变体的氨基酸序列没有改变。在一些实施方案中，与野生型氨基酸序列相比，翻译起始变体的氨基酸序列是改变的。在一些实施方案中，翻译起始区包括原核分泌信号序列。在一些实施方案中，第一和第二翻译起始区（以及在一些实施方案中，第三翻译起始区）提供近似相等的翻译强度。在一些实施方案中，相对翻译强度是约 1 或 2。在一些实施方案中，相对翻译强度是约 1。在一些实施方案中，相对翻译强度是约 2。在一些实施方案中，相对翻译强度是 1 和 / 或 2。在一些实施方案中，相对翻译强度是约 3 或约 4。在一些实施方案中，相对翻译强度选自 1 或大于 1、2、3、4、5 或更高（例如 6 或 7 或更高）。

[0030] 在一些实施方案中，本发明的多核苷酸还包括与异源多肽有效连接的启动子。在一些实施方案中，启动子是原核启动子，其选自 *phoA*、*tac*、*lpp*、*lac-lpp*、*lac*、*ara*、*trp* 和 T7 启动子。在一些实施方案中，启动子是 *phoA* 启动子。在一些涉及抗体重链和轻链表达的实施方案中，多核苷酸还包括：(a) 第一启动子，其中第一启动子与轻链有效连接；和 (b) 第二启动子，其中第二启动子与重链有效连接。在一些实施方案中，第一和第二启动子都是 *phoA* 启动子。在一些涉及抗体重链、轻链和 Fc 多肽表达的实施方案中，多核苷酸还包括 (c) 第三启动子，其中第三启动子与 Fc 多肽有效连接。在一些实施方案中，第三启动子是 Fc 多肽。

[0031] 当表达包含一个以上多肽的多肽（例如，包含重链和轻链的抗体）时，用于表达多肽的多核苷酸可以是多顺反子多核苷酸（即，包含和表达在单个启动子调节控制下的多个

顺反子的单个多核苷酸)。多顺反子载体的常见例子是包含和表达在一个启动子控制下的两个不同多肽的“双顺反子”载体。当双顺反子或多顺反子载体表达时,多个编码区(例如,基因)首先转录为单个转录单元,然后分开进行翻译。顺反子指遗传元件,其基本上等同于包含编码多肽链的核酸序列和邻近的控制区(包括,例如 TIR)的翻译单元。在其它实施方案中,多核苷酸可以包括分顺反子,所述分顺反子指包含至少两个分开的启动子-顺反子对的单个多核苷酸,其中每个顺反子在其自身的启动子的控制下。当分顺反子表达载体表达时,不同基因的转录和翻译过程都是分开和独立的。在另一个实施方案中,多核苷酸可以包括多顺反子部分和分顺反子(separate cistron)部分。

[0032] 在另一个方面,本发明提供了包含本发明的多核苷酸的载体。在一些实施方案中,载体是表达载体。

[0033] 在另外的方面,本发明提供了包含一个或多个本发明的多核苷酸以及载体(carrier)的组合物。在一个实施方案中,载体是在药学上可接受的。

[0034] 在一个方面,本发明提供了包含本发明的多核苷酸或载体的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞包含编码抗体(在一些实施方案中,双特异性或单臂载体)的本发明多核苷酸。宿主细胞可以包含一个或多个共同编码抗体的多核苷酸。载体可以是任何类型的,例如,重组载体,例如表达载体。可以使用各种宿主细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是原核细胞,例如大肠杆菌。在一些实施方案中,大肠杆菌是内源蛋白酶活性缺陷型菌株。在一些实施方案中,大肠杆菌的基因型缺乏 degP 和 prc 基因并包含突变的 spr 基因。

[0035] 在一些实施方案中,宿主细胞还包含编码原核伴侣蛋白,例如 Dsb 蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD、FkpA 和 / 或 DsbG)的多核苷酸。在一些实施方案中,伴侣蛋白在宿主细胞中过量表达。在一些实施方案中,伴侣蛋白是 Dsb A 和 / 或 DsbC。

[0036] 在一个方面,宿主细胞包含一个或多个共同编码单臂抗体的多核苷酸。在一个实施方案中,单个多核苷酸编码:(a)单臂抗体的轻链和重链组分,以及(b)Fc 多肽。在一个实施方案中,单个多核苷酸编码单臂抗体的轻链和 Fc 多肽组分,而分开的多核苷酸编码重链多肽。在一个实施方案中,单个多核苷酸编码单臂抗体的重链和 Fc 多肽组分,而分开的多核苷酸编码单臂抗体的轻链组分。在一个实施方案中,由分开的多核苷酸分别编码单臂抗体的轻链组分、单臂抗体的重链组分和 Fc 多肽。

[0037] 本文描述了异源多肽。在一些实施方案中,异源多肽是抗体。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在其它实施方案中,抗体是多克隆抗体。在一些实施方案中,抗体选自嵌合抗体、亲和力成熟的抗体、人源化抗体和人抗体。在某些实施方案中,抗体是双特异性抗体。在某些实施方案中,抗体是抗体片段。在一些实施方案中,抗体是单价抗体。在一些实施方案中,抗体是 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂ 或 scFv。在一些实施方案中,抗体是包含 Fc 区的单臂抗体(即,重链可变区和轻链可变区形成单个抗原结合臂),其中 Fc 区包含第一和第二 Fc 多肽,其中第一和第二 Fc 多肽以复合物形式存在,形成,与包含所述抗原结合臂的 Fab 分子相比,增加所述抗体片段稳定性的 Fc 区。

[0038] 在一些实施方案中,抗体结合(在一些实施方案中,特异性结合)c-met。在一些实施方案中,抗 c-met 抗体包括:

[0039] (a) 第一多肽,其包含具有如下序列的重链可变区:

[0040] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNSDTRFNPNFKDRFT

ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO :43),

[0041] CH1 序列和第一 Fc 多肽 ;

[0042] (b) 第二多肽,其包含具有如下序列的轻链可变区 :

[0043] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTR

[0044] ESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKR

[0045] (SEQ ID NO :44),和 CL1 序列 ;以及

[0046] (c) 包含第二 Fc 多肽的第三多肽,其中重链可变区和轻链可变区以复合物的形式存在,形成单个抗原结合臂,其中第一和第二 Fc 多肽以复合物的形式存在,并形成,与包含所述抗原结合臂的 Fab 分子相比,增加所述抗体片段稳定性的 Fc 区。在一些实施方案中,第一多肽包含图 7 中描述的 Fc 序列 (SEQ ID NO :68),第二多肽包含图 8 中描述的 Fc 序列 (SEQ ID NO :47)。在一些实施方案中,第一多肽包含图 8 中描述的 Fc 序列 (SEQ ID NO :47),第二多肽包含图 7 中描述的 Fc 序列 (SEQ ID NO :68)。

[0047] 在一些实施方案中,抗 c-met 抗体包括 : (a) 包含重链可变区的第一多肽,所述多肽包含序列 :

[0048] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVG MIDPSNSDTRFNPNFKDRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO :45) ;

[0049] (b) 包含轻链可变区的第二多肽,所述多肽包含序列

[0050] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (S
EQ ID NO :46) ;以及包含 Fc 多肽的第三多肽,所述多肽包含序列 :

[0051] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLW
CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL
SPGK (SEQ ID NO :47),

[0052] 其中重链可变区和轻链可变区以复合物的形式存在,形成单个抗原结合臂,其中第一和第二 Fc 多肽以复合物的形式存在,并形成,与包含所述抗原结合臂的 Fab 分子相比,增加所述抗体片段稳定性的 Fc 区。

[0053] 在一个实施方案中,抗 c-met 抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含图 7 中描述的 CDR1-HC、CDR2-HC 和 CDR3-HC 序列 (SEQ ID NO :52-53 和 66) 之一或多个。在一些实施方案中,抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含图 7 中描述的 CDR1-LC、CDR2-LC 和 CDR3-LC 序列 (SEQ ID NOs:49-51) 之一或多个。在一些实施方案中,重链可变区包含图 7 中描述的 FR1-HC、FR2-HC、FR3-HC 和 FR4-HC 序列 (SEQ ID NOs:62-65)。在一些实施方案中,轻链可变区包含图 7 中描述的 FR1-LC、FR2-LC、FR3-LC 和 FR4-LC 序列 (SEQ ID NO:57-60)。

[0054] 在一些实施方案中,抗体包括至少一个促进抗体片段中 Fc 序列的异源二聚化而将同源二聚化降到最低的特性。这样的特性提高通过如本文中描述的本发明方法可获得的免疫球蛋白群体的产量和 / 或纯度和 / 或同质性。在一个实施方案中,第一 Fc 多肽和第二 Fc 多肽在界面相遇 / 相互作用。在一些其中第一和第二 Fc 多肽在界面相遇的实施方案中,第二 Fc 多肽 (序列) 的界面包含突起 (也称为“结” (knob)), 其可位于第一 Fc 多肽 (序列) 的界面的腔 (也称为“洞”) 中。在一个实施方案中,抗体包含 Fc 突变,构成如 W02005/063816 中描述的“结”和“洞”。例如,洞突变可以是 Fc 多肽中的 T366A、L368A 和 / 或 Y407V 之一或多个,结突变可以是 T366W。

[0055] 本发明还提供了使用本发明的变体 TIR 和信号序列的方法。应理解的是,本文中公开的任何变体 TIR、信号序列和多核苷酸都适用于例如本文中公开的本发明的方法中。在另外的方面,本发明提供了制备本发明的异源多肽的方法。例如,本发明提供了制备异源多肽 (例如抗体,其如在本文中所定义的包括全长抗体及其片段) 的方法,所述方法包括培养包含本发明的多核苷酸 (例如,包含翻译起始区的多核苷酸) 的宿主细胞,以表达多核苷酸,借以在宿主细胞 (例如,原核宿主细胞) 中表达所述多核苷酸,将异源多肽折叠形成具生物学活性的异源多肽。在涉及表达抗体的实施方案中,当所述多核苷酸在宿主细胞中表达时,轻链和重链折叠和组装形成具生物学活性的抗体。在一些实施方案中,方法还包括从宿主细胞培养物中回收异源多肽 (例如,抗体)。在一些实施方案中,从宿主细胞培养基中回收异源多肽。在一些实施方案中,方法还包括将所回收的异源多肽 (例如,抗体) 与药学上可接受的载体、赋形剂或载体组合,以制备包含异源多肽 (例如,抗体) 的药学制剂。

[0056] 在一个方面,本发明提供了从细胞中分泌目的异源多肽的方法,所述方法包括培养包含本发明的多核苷酸的宿主细胞,以表达多核苷酸和分泌异源多肽。

[0057] 在一个方面,本发明提供了从细胞中转运 (translocate) 目的异源多肽的方法,所述方法包括培养包含本发明的多核苷酸的宿主细胞,以表达多核苷酸和转移异源多肽。

[0058] 在另一个方面,本发明提供了优化细胞中目的异源多肽分泌的方法,包括比较在一组翻译起始区的多核苷酸变体控制下的多肽的表达水平,其中该组变体代表一系列翻译强度,以及确定用于产生成熟多肽的最优翻译强度。在一些实施方案中,最优翻译强度低于野生型翻译起始区的翻译强度。在一些实施方案中,最优翻译强度高于野生型翻译起始区的翻译强度。在一些实施方案中,变体包含分泌信号序列的多核苷酸变体。在一些实施方案中,变体分泌信号序列是 sec 途径信号序列和 / 或 SRP 途径信号序列。在一些实施方案中,变体分泌信号序列是 PhoA、MalE、DsbA 或 STII 变体信号序列。在一些实施方案中,变体是表 3 中所示的一个或多个变体。在一些实施方案中,变体包含 SEQ ID Nos 1-14、36-39、41-42 之一的序列。

[0059] 在一个方面,本发明提供了通过如本文中描述的本发明的方法获得的异源多肽。在一些实施方案中,异源多肽是抗体。

[0060] 在一个方面,本发明提供了使用本发明的方法产生的异源多肽的用途,用于制备治疗和 / 或预防疾病的药物,所述疾病例如癌症、肿瘤、细胞增生性疾病、和 / 或免疫 (例如自身免疫) 疾病等。异源多肽可以是本文中描述的任何形式,包括抗体、抗体片段、多肽 (例如,寡肽), 或它们的组合。

[0061] 在一个方面,本发明提供了本发明的多核苷酸在制备用于治疗 and / 或预防疾病的

药物中的应用,所述疾病例如癌症、肿瘤、细胞增生性疾病和 / 或免疫 (例如自身免疫) 疾病等。

[0062] 在一个方面,本发明提供了本发明的表达载体在制备用于治疗 and / 或预防疾病的药物中的应用,所述疾病例如癌症、肿瘤、细胞增生性疾病和 / 或免疫 (例如自身免疫) 疾病等。

[0063] 在一个方面,本发明提供了本发明的宿主细胞在制备用于治疗 and / 或预防疾病的药物中的应用,所述疾病例如癌症、肿瘤、细胞增生性疾病和 / 或免疫 (例如自身免疫) 疾病等。

[0064] 在一个方面,本发明提供了本发明的制品在制备用于治疗 and / 或预防疾病的药物中的应用,所述疾病例如癌症、肿瘤、细胞增生性疾病、免疫 (例如自身免疫) 疾病和 / 或血管发生相关疾病 (伤口愈合) 等。

[0065] 在一个方面,本发明提供了本发明的试剂盒在制备用于治疗 and / 或预防疾病的药物中的应用,所述疾病例如癌症、肿瘤、细胞增生性疾病和 / 或免疫 (例如自身免疫) 疾病等。

附图说明

[0066] 图 1 :所示信号肽穿过细菌内膜的转移。麦芽糖结合周质蛋白 (MalE) 和碱性磷酸酶 (PhoA) 信号肽借助分子马达 (molecular motor) SecA,以翻译后的方式指导从细胞质向周质的转移。热稳定肠毒素 II (StII) 和巯基 - 二硫键互换蛋白 (DsbA) 信号肽借助信号识别颗粒 (SRP),以共翻译的方式指导转移。

[0067] 图 2 :信号肽变体的相对转移起始区强度。携带载体的 27C7 细胞的基础的碱性磷酸酶活性,所述载体具有在 STII、MalE、PhoA 或 DsbA 信号肽和大肠杆菌碱性磷酸酶 (BAP) 基因的成熟结构域之间的融合。每个条代表与发色底物 PNPP 一起孵育的单个培养物,酶活性测定为培养物在 410nm 处的吸收值减去携带空载体 (pBR322) 的培养物的吸收值。相对于携带质粒 pPho41 的 27C7 细胞的基础活性,将活性标准化。白色条代表在相对于起始密码子的第一碱基对而言的 -9 位上具有 BssHII 限制性位点的信号肽变体。灰色或条纹条分别代表在 -9 位上具有 MluI 或 XbaI 位点。所有的活性是 7 至 10 个重复实验的平均值。误差线报告为 95% 置信限的平均值不确定性。相邻条之间相对 TIR 强度的差异均是统计上显著的 ($P < 0.001$)。这些条代表克隆 SH1. 2、SH2. 41、SH3. 38、SH4. 60、SH5. 34、SH6. 52、SH8. 36、SL1. 2、SL2. 74、SL3. 72、MH1. 92、MH2. 100、ML1. 97、ML2. 123、MX1. wt、MX2. 15、MX3. 12、MX5. 37、MX6. 4、MX7. 25、MX8. 13、MX11. 34、PH1. 70、PH2. 64、PH3. wt、PH4. 67、PH5. 71、PH6. 77、PL1. 104、PX2. 41、PX3. wt、PX5. 53、PX6. 15、PX8. 24、PX10. 23、DH1. 48、DH2. wt、DH3. 79、DH7. 72、DL1. wt、DL2. 3、DL3. 37 (按顺序从左至右)。

[0068] 图 3A 和 3B :利用重链信号肽操作,监测不同种类的抗体的组装。将 64B4 细胞在 25mL 的 C. R. A. P. 磷酸限制性培养基中培养 24 小时,制备可溶性级分以及总蛋白沉淀,通过光密度 (OD) 进行标准化,用于 SDS-PAGE 分析。(A) 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离来自携带质粒 pBR-SS-5D5-1. 1 (SS1. 1)、pBR-MS-5D5-1. 1 (MS1. 1)、pBR-DS-5D5-1. 1 (DS1. 1) 或 pBR-PS-5D5-1. 1 (PS1. 1) 的细胞的样品 (以 kDa 表示的质量标示在左侧),转移到硝酸纤维素上,以 α -Fc 特异性抗体作为探针检测包含重链的抗体物的存在。可溶性样品 (顶部印

迹)包括经推定的条带,对应于(从顶部到底部):全长抗体、重链-重链-轻链(HHL)、重链-轻链(HL)或游离重链(重链单体)。以 0.2M DTT 还原经标准化的总蛋白样品(底部印迹),以破坏二硫键结构,每条泳道都迁移为表观质量约 49kDa 的单个条带。(B)将来自(A)的样品在分开的 SDS-PAGE 凝胶上进行电泳(以 kDa 表示的质量标示在右侧),转移到硝酸纤维素上,以 α - κ Lc 特异性抗体作为探针检测包含轻链的复合物。可溶性样品(顶部印迹)包括经推定的条带,对应于(从顶部到底部):全长抗体、HL、轻链-轻链(LL)二聚体或游离轻链(轻链单体)。以 0.2M DTT 还原经标准化的总蛋白样品(底部印迹),每条泳道迁移为表观质量约 25kDa 的单个条带。缩写:S=信号序列 STII, M=信号序列 MaIE, D=信号序列 DsbA, P=信号序列 PhoA。XX#. # (例如 DS1.1) 指在实验中使用的重链信号序列、轻链信号序列、重链 TIR、轻链 TIR。

[0069] 图 4:利用轻链信号肽操作,监测不同种类抗体的组装。将 64B4 细胞在 25mL 的 C. R. A. P. 磷酸限制性培养基中培养 24 小时,制备可溶性级分以及总蛋白沉淀,通过光密度(OD)进行标准化,用于 SDS-PAGE 分析。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离来自携带质粒 pBR-DS-5D5-1.1(DS1.1)、pBR-DS-5D5-1.2(DS1.2)、pBR-DM-5D5-1.1(DM1.1)、pBR-DM-5D5-1.2(DM1.2)、pBR-DD-5D5-1.1(DD1.1)、pBR-DD-5D5-1.2(DD1.2)、pBR-DP-5D5-1.1(DP1.1)或 pBR-DP-5D5-1.2 的细胞的样品(以 kDa 表示的质量标示在左侧),转移到硝酸纤维素上,如沿图像的右侧所示,分别以 α -Fc 或 α - κ Lc 特异性抗体作为探针检测包含重链或轻链的抗体的存在。可溶性样品(顶部印迹)包括经推定的条带,对应于(从顶部到底部):全长抗体、重链-重链-轻链(HHL)、重链-轻链(HL)二聚体或游离重链。以 0.2M DTT 还原经标准化的总蛋白样品(中部印迹、底部),以破坏二硫键结构,当以 α -Fc 抗体作为探针进行检测时,每条泳道迁移为表观质量约 49kDa 的单个条带。当以 α - κ Lc 特异性抗体作为探针进行检测时,所有泳道迁移为表观质量约 25kDa 的单条带,或约 27kDa 和约 25kDa 的双条带。缩写:S=信号序列 STII, M=信号序列 MaIE, D=信号序列 DsbA, P=信号序列 PhoA。XX#. # (例如 DS1.1) 指在实验中使用的重链信号序列、轻链信号序列、重链 TIR、轻链 TIR。

[0070] 图 5:从 10-L 的发酵,监测抗体物随着时间的组装。将 64B4 细胞在 10-L 的发酵中培养 3 天至高细胞密度,以规律的时间间隔取样(每条泳道上的取样时间以接种后的小时表示),从中制备可溶性级分以及总蛋白沉淀,通过光密度(OD)进行标准化,用于 SDS-PAGE 分析。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离来自携带质粒 pBR-SS-5D5-1.1 和共表达的带伴侣的质粒 pJJ247(SS1.1+ 伴侣)、pBR-DD-5D5-1.1 和 pJJ247(DD1.1+ 伴侣)、pBR-DS-5D5-1.1 和 pJJ247(DM1.1+ 伴侣)、或 pBR-DP-5D5-1.1 和 pJJ247(DP1.1+ 伴侣)的细胞的样品(以 kDa 表示的质量标示在左侧),转移到硝酸纤维素上,如沿图像的右侧所示,分别以 α -Fc 或 α - κ Lc 特异性抗体作为探针检测包含重链或轻链的抗体物的存在。可溶性样品(顶部印迹)包括经推定的条带,对应于(从顶部到底部):全长抗体、重链-重链-轻链(HHL)、重链-轻链(HL)二聚体、轻链-轻链(LL)二聚体或游离轻链。以 0.2M DTT 还原经标准化的总蛋白样品(中部印迹、底部),以破坏二硫键结构,当以 α -Fc 抗体作为探针进行检测时,每条泳道迁移为表观质量约 49kDa 的单个条带。当以 α - κ Lc 特异性抗体作为探针进行检测时,所有泳道迁移为表观质量约 25kDa 的单条带。缩写:S=信号序列 STII, M=信号序列 MaIE, D=信号序列 DsbA, P=信号序列 PhoA。XX#. # (例如 DS1.1) 指在实验中使用的重

链信号序列、轻链信号序列、重链 TIR、轻链 TIR。

[0071] 图 6 :在诱导条件下的成熟 PhoA 的积累。将 27C7 细胞在 25mL 的 C. R. A. P. 磷酸限制性培养基中培养 24 小时,通过光密度 (OD) 标准化可溶性级分,预备用于 SDS-PAGE 分析。将大肠杆菌 phoA 基因的成熟区与所示的 DsbA 或 STII (底部) TIR 变体 (顶部) 融合。通过考马斯亮蓝染色显现凝胶上蛋白质的存在。对应于 PhoA (右边) 的成熟区的推定条带出现在质量为约 47kDa 处 (质量标示在左侧)。

[0072] 图 7 :描述了 MetMAb (0A5D5v2) 的构架区 (FR)、CDR、第一恒定区 (CL 或 CH1) 和 Fc 区 (Fc) 的氨基酸序列。图公开了按出现的顺序分别为 SEQ ID NOS 57-60、49-51 和 61 的轻链序列,和按出现的顺序分别为 SEQ ID NOS 62-65、52-53 和 66-68 所示的重链序列。所描述的 Fc 序列包含如 WO 2005/063816 中描述的“洞”(腔)突变 T366S、L368A 和 Y407V。

[0073] 图 8 :描述了 Fc 多肽 (SEQ ID NO:47) 的序列,所述 Fc 多肽包含如 WO 2005/063816 中描述的“结”(突起)突变 T366W。在一个实施方案中,包含该序列的 Fc 多肽与包含图 7 的 Fc 序列的 Fc 多肽形成复合物,以产生 Fc 区。

[0074] 发明描述

[0075] 常规技术

[0076] 本文中描述或参考引用的技术和程序为本领域技术人员普遍充分理解,并通过使用常规方法而普遍使用,例如描述于如下文献中的广泛使用的方法: Sambrook 等,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual) 第三版 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory 出版社, Cold Spring Harbor, N. Y. ; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 等编辑 (2003)) ; METHODS IN ENZYMOLOGY 系列 (Academic 出版社公司) : PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames 和 G. R. Taylor 编辑 (1995)) ; Harlow 和 Lane 编辑 (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL ; 和 ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney 编辑 (1987))。

[0077] 定义

[0078] 如本文中使用的术语“载体”,旨在指能够运输与其连接的另一个核酸的核酸分子。一类载体是“质粒”,其指环形双链 DNA 环,另外的 DNA 片段可以连接到其中。另一类载体是噬菌体载体。另一类载体是病毒载体,其中另外的 DNA 片段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们所引入到的宿主细胞中自主复制 (例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体 (例如,非附加型哺乳动物载体) 在被引入到宿主细胞中时,可以整合到宿主细胞的基因组中,并由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与它们有效连接的基因的表达。这样的载体在本文中被称为“重组表达载体”(或,简单地,“重组载体”)。一般,在重组 DNA 技术中使用的表达载体通常是以质粒的形式存在。在本说明书中,由于质粒是载体的最常用的形式,“质粒”和“载体”可以互换使用。

[0079] 如本文中使用的,术语“顺反子”旨在指遗传元件,其一般地等同于包含编码多肽链的核苷酸序列和邻近控制区域的翻译单元。“邻近控制区域”包括,例如翻译起始区 (TIR ; 如下文中定义的) 和终止区域。

[0080] “多顺反子”表达载体指包含和表达在单个启动子调节控制下的多个顺反子的单个载体。多顺反子载体的一个常见例子是“双顺反子”载体,其包含和表达在一个启动子控

制下的两个不同多肽。当双顺反子或多顺反子载体表达时,多个基因首先被转录为单个转录单元,然后分开进行翻译。

[0081] 根据本发明的“分顺反子”(separate cistron)表达载体指包含至少两个分开的启动子-顺反子对的单个载体,其中每个顺反子各自在其自己的启动子的控制下。当分顺反子表达载体表达时,不同基因的转录和翻译过程是分开的和独立的。

[0082] 如本文中使用的,“翻译起始区”或TIR或翻译的起始区域或翻译的起始序列指,提供目的基因的有效翻译起始的核酸区域。通常,一个具体顺反子中的TIR包括核糖体结合部位(RBS)和RBS的5'和3'序列。RBS定义为最低程度地包含Shine-Dalgarno区域和起始密码子(AUG)。因此,TIR也可以包括待翻译的核酸序列的至少一部分。优选地,本发明的TIR包括编码信号肽的分泌信号序列,所述分泌信号序列位于顺反子中轻链和重链的编码序列之前。TIR变体包括在TIR区域中改变了该TIR的特性,例如其下文中定义的翻译强度,的序列变体(特别是取代)。优选地,本发明的TIR变体在位于顺反子中轻链或重链编码序列之前的分泌信号序列的前2至约14个、优选约4至12个、更优选约6个密码子中包含序列取代。

[0083] 如本文中使用的,术语“翻译强度”是指,在一个对照系统中对分泌的多肽进行的度量,其中TIR的一个或多个变体被用于指导多肽的分泌,并将结果与在相同培养和测定条件下的野生型TIR或一些其它对照进行比较。不限于任何一个理论,如本文中使用的“翻译强度”可以包括,例如对mRNA稳定性、核糖体与核糖体结合部位结合的效率、和穿膜转移方式的衡量。

[0084] “分泌信号序列”或“信号序列”指编码短信号肽的核酸序列,所述信号肽能够用来指导新合成的目的蛋白质通过细胞膜,通常是原核生物的内膜或内膜和外膜两者。由此,将目的蛋白质,例如免疫球蛋白轻链或重链多肽分泌到原核宿主细胞的周质中或培养基中。由分泌信号序列编码的信号肽可以是宿主细胞内源的,或它们可以是外源的,包括待表达多肽天然的信号肽。分泌信号序列一般存在于待表达多肽的氨基末端,并通常在多肽的生物合成和从细胞质分泌之间被酶促去除。因此,信号肽通常不存在于成熟的蛋白质产物中。

[0085] “有效连接”指两个或多个组分的并置,其中所述组分处于允许它们以其预期方式起作用的关系中。例如,如果启动子以顺式的方式起作用来控制或调节所连接的编码序列的转录,则其与编码序列有效连接。通常但不一定,“有效连接的”DNA序列是连续的,以及当需要连接两个蛋白质编码区或就分泌引导序列来说,是连续的和符合阅读框的。然而,尽管有效连接的启动子一般位于编码序列的上游,其不必与编码序列连续。有效连接的增强子可以位于编码序列的上游、内部或下游、以及在离启动子很远的位置。连接可以通过本领域已知的方法来实现,例如使用PCR方法、通过退火、或通过在合适的限制性位点处进行连接。如果不存在合适的限制性位点,可以按照常规实践使用合成的寡核苷酸接头或衔接物。

[0086] 如本文中使用的,“调控元件”指以顺式方式存在的、为编码异源多肽的多核苷酸转录和翻译成多肽所必需的核苷酸序列。转录调控元件通常包含待表达基因序列5'的启动子、转录起始和终止位点、和多腺苷酸化信号序列。术语“转录起始位点”指构建体中的核酸,其对应于整合到初级转录本(即,mRNA前体)中的第一个核酸;转录起始位点可以与启动子序列重叠。

[0087] “启动子”指控制与其有效连接的基因或序列转录的多核苷酸序列。启动子包括用

于 RNA 聚合酶结合和转录起始的信号。所使用的启动子将在旨在表达所选序列的宿主细胞的细胞类型中起作用。本领域熟知（并在例如 GenBank 等数据库中标识）大量的启动子，包括来自多种不同来源的组成型、诱导型和阻遏型启动子，它们可以作为克隆的多核苷酸或从克隆的多核苷酸（来自例如 ATCC 等保藏机构以及其它商业或私人来源）中获得。利用诱导型启动子，启动子的活性对信号作出反应而增加或降低。

[0088] 如本文中使用的，术语“宿主细胞”（或“重组宿主细胞”）旨在指，已经经过遗传改变、或能够通过引入外源多核苷酸（例如重组质粒或载体）来进行遗传改变的细胞。应理解的是，这样的术语旨在不仅指特定的主题细胞，还指这样的细胞的后代。因为在继代中由于突变或环境影响而可能发生某些改变，事实上，这样的后代可能与亲本不相同，但其仍然包括在如本文中使用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0089] “分离的”多肽（例如，抗体）是已经从其天然环境的组分中被鉴定和分离和 / 或回收的多肽。其天然环境的污染物组分是干扰抗体的诊断或治疗用途的物质，其可以包括酶、激素、以及其它蛋白质性或非蛋白质性的溶质。在优选的实施方案中，多肽将被纯化至：(1) 通过 Lowry 方法测量，大于 95% 重量的多肽，最优选大于 99% 重量；(2) 足以通过使用旋杯式序列分析仪获得至少 15 个残基的 N 末端或内部氨基酸序列的程度；或 (3) 通过在还原或非还原条件下的 SDS-PAGE（十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳）、使用考马斯亮蓝或优选银染、确定的同质性。分离的多肽包括在重组细胞中的原位多肽，这是因为在重组细胞中多肽的天然环境的至少一个组分将不存在。然而，通常通过至少一个纯化步骤来制备分离的多肽。

[0090] “分离的”核酸分子是从污染物核酸分子中鉴定和分离的核酸分子，其中在该核酸分子的天然来源中所述污染物核酸分子通常与该核酸分子相伴。分离的核酸分子可以以非其天然存在的形式、或在非其天然存在的环境中存在。因此，分离的核酸分子不同于其在天然细胞中时的核酸分子。然而，分离的核酸分子可以包括包含在通常表达该核酸（例如，编码核酸的抗体）的细胞中的核酸分子，在该细胞中，例如，核酸分子的染色体位置可以不同于天然细胞中的染色体位置。

[0091] 如在本文中可互换使用的，“多核苷酸”或“核酸”指任何长度的核苷酸的多聚体，其包括 DNA 和 RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基，和 / 或它们的类似物，或任何能够通过 DNA 或 RNA 聚合酶、或通过合成反应整合到多聚体中的底物。多核苷酸可以包含经修饰的核苷酸，例如甲基化的核苷酸及其类似物。如果存在的话，对核苷酸结构的修饰可以在多聚体组装之前或之后进行。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分打断。可以在合成后再对多核苷酸进行修饰，例如与标记物缀合。其它类型的修饰包括，例如，“加帽”（“caps”）；以类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸；核苷酸间的修饰，例如，具有不带电荷的键（例如，甲基磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等）、和具有带电荷的键（例如，硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等），包含悬垂部分，例如蛋白质（例如，核酸酶、毒素、抗体、信号肽、ply-L-赖氨酸等），具有嵌入剂（例如，吡啶、补骨脂素等），包含螯合剂（例如，金属、放射性金属、硼、氧化性金属等），包含烷化剂，具有经修饰的键（例如， α 端基异构核酸等）；以及多核苷酸的未经修饰的形式。此外，通常存在于糖中的任何羟基都可以被例如磷酸酯基团、磷酸基团取代，被标准保护基团保护，或被激活以制备与另外的核苷酸的其它连接，或可以与固体或半固体支持物缀合。5' 和 3' 末端 OH 可以

被磷酸化或以胺或 1 至 20 个碳原子的有机封端基团部分进行替代。其它羟基也可以被衍生为标准保护基团。多核苷酸也可以包含在本领域通常所知的核糖体或脱氧核糖的类似物形式,包括,例如 2'-O-甲基-,2'-O-烯丙基-,2'-氟代-或 2'-叠氮基-核糖,碳环糖类似物, α 端基异构糖,差向异构糖,例如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖,无环类似物和基本核苷类似物,例如甲基核糖苷。可以用备选连接基团替代一个或多个磷酸二酯键。这些备选连接基团包括在但不限于实施方案,其中磷酸被 P(O)S(“硫代酯”)、P(S)S(“二硫代酯”)、(O)NR₂(“酰胺酯”)、P(O)R、P(O)OR'、CO 或 CH₂(“亚甲基缩醛(formacetal)”)替代,其中每个 R 或 R' 独立地是 H 或被取代的或未取代的烷基 (1-20C),所述烷基任选地包括醚(-O-)键、芳基、链烯基、环烷基、环烯基或 araldyl。多核苷酸中不是所有的键都必需是相同的。前述描述适用于本文中提及的所有多核苷酸,包括 RNA 和 DNA。

[0092] 如本文中使用的,“寡核苷酸”一般指短的、通常是单链的、通常是合成的多核苷酸,其通常但不一定在长度上小于约 200 个核苷酸。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”不互相排斥。上文对核苷酸的描述等同地和完全地适用于寡核苷酸。

[0093] 如本文中使用的,“多肽”一般指来自任何细胞来源、具有多于约 10 个氨基酸的肽和蛋白质。“异源”多肽是对所利用的宿主细胞而言外来的多肽,例如由大肠杆菌产生的人蛋白质。尽管异源多肽可以是原核的或真核的,优选其是真核的,更优选是哺乳动物的,最优选人的。优选地,其通过重组产生,或是重组多肽。“异源”多肽是对所利用的宿主细胞而言外来的多肽,例如由大肠杆菌产生的人蛋白质。尽管异源多肽可以是原核的或真核的,优选其是真核的,更优选是哺乳动物的,最优选人的。优选地,其通过重组产生,或是重组多肽。

[0094] 哺乳动物多肽的例子包括这样的分子,例如肾素;生长激素,包括人生长激素;牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;促甲状旁腺激素;脂蛋白;1-抗胰蛋白酶;胰岛素 A 链;胰岛素 B 链;胰岛素原;促血小板生成素;促卵泡激素;降钙素;黄体生成素;胰高血糖素;凝血因子,例如 VIIIc 因子、IX 因子、组织因子和 von Willebrands 因子;抗凝血因子,例如蛋白 C;心房利钠因子;肺表面活性剂;纤溶酶原激活物,例如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)及其变体,例如 RETEASE™和 TNKASE™;铃蟾肽;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子 α 和 β ;抗 ErbB2 结构域的抗体,例如 2C4(WO 01/00245;杂交瘤 ATCC HB-12697),其与 ErbB2 的胞外结构域中的区域(例如, ErbB2 的约第 22 位至约第 584 位残基(含第 22 位和第 584 位残基)的区域中任何一个或多个残基)结合;脑啡肽;血清白蛋白,例如人血清白蛋白;苗勒氏(Muellerian)抑制物;松弛素 A 链;松弛素 B 链;松弛素原;小鼠促性腺激素相关肽;微生物蛋白,例如 β 内酰胺酶;DNA 酶;抑制素;活化素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子的受体;整联蛋白;蛋白 A 或 D;类风湿因子;神经营养因子,例如脑源神经营养因子(BDNF),神经营养素 -3、-4、-5 或 -6(NT-3、NT-4、NT-5 或 NT-6),或神经生长因子,例如 NGF;心肌营养素(心肌肥大因子),例如心肌营养素 -1(CT-1);血小板源生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子,例如 aFGF 和 bFGF;表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF),例如 TGF- α 和 TGF- β ,包括 TGF-1、TGF-2、TGF-3、TGF-4 或 TGF-5;胰岛素样生长因子 -I 和 -II(IGF-I 和 IGF-II);des(I-3)-IGF-I(脑 IGF-I),胰岛素样生长因子结合蛋白;CD 蛋白,例如 CD-3、CD-4、CD-8 和 CD-19;红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态生成蛋白(BMP);干扰素,例如干扰素 - α 、- β 、和 - γ ;

血清白蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)或牛血清白蛋白(BSA);集落刺激因子(CSFs),例如M-CSF、GM-CSF和G-CSF;白细胞介素(ILs),例如IL-1至IL-10;抗HER-2抗体;Apo2配体;超氧化物歧化酶;T细胞受体;表面膜蛋白;促衰变因子;病毒抗原,例如AIDS包膜的一部分;转运蛋白;归巢受体;地址素;调控蛋白;抗体;以及任何以上所列多肽的片段。

[0095] 本文中优选的多肽包括人血清白蛋白(HSA);2C4;组织因子;抗组织因子;抗CD20;抗HER-2;heregulin;抗IgE;抗CD11a;抗CD18;VEGF及其受体和抗体,例如rhuFab V2和AVASTIN™;生长激素及其变体,例如hGH;生长激素受体;生长激素释放蛋白(GHRP);LIV-1(EP 1,263,780);TRAIL;肿瘤坏死因子(TNF)及其抗体;TNF受体和相关抗体;TNF-受体-IgG;TNF受体相关因子(TRAFs)及其抑制剂;因子VIII;因子VIII B结构域;干扰素,例如干扰素- γ ;转化生长因子(TGFs),例如TGF- β ;抗TGF,例如抗TGF- β ;活化素;抑制素;抗活化素;抗抑制素;组织纤溶酶原激活物及其变体,例如t-PA、RETEPLASE™和TNKase;抗Fas抗体;Apo-2配体;Apo-2配体抑制剂;Apo-2受体;Apo-3;凋亡因子;Ced-4;DcR3;死亡受体和激动剂抗体(DR4、DR5);淋巴毒素(LT);催乳素;催乳素受体;SOB蛋白;WISP(wnt诱导的分泌蛋白);神经毒素-3(NT-3);神经生长因子(NGF)和抗NGF;DNA酶;肝炎抗原;单纯疱疹抗原;瘦蛋白;胰岛素样生长因子(IGFs),例如IGF-1和IGF-2及其结合蛋白和受体,例如IGFBP-1至IGFBP-6;胰岛素;成纤维细胞生长因子(FGFs),例如FGF-17;To11蛋白;TIE配体;CD40和抗CD40;免疫粘附素;枯草杆菌蛋白酶;肝细胞生长因子(HGF);促血小板生成素(TPO);白细胞介素,例如IL-2、IL-12、IL-17、IL-22、IL-8、IL-9及其抗体;以及前列腺特异性癌抗原(PSCA)。

[0096] 特别优选的多肽是重组多肽,更优选抗体,其包括单克隆抗体和人源化抗体。这样的抗体可以是全长抗体或抗体片段。更优选地,这些抗体是人或人源化抗体。更优选地,抗体是抗c-met、抗IgE、抗CD18、抗VEGF、抗组织因子、2C4、抗Her-2、抗CD20、抗CD40或抗CD11a抗体。涵盖在多肽的定义中的抗体片段优选包括轻链,更优选 κ 轻链。这样的优选片段包括,例如Fab、Fab'、F(ab')₂或F(ab')₂-亮氨酸拉链(LZ)融合体,以及单臂抗体。

[0097] 蛋白质“表达”指基因中编码的信息向信使RNA(mRNA)和然后向蛋白质的转化。

[0098] “免疫缀合物”(可互换称为“抗体-药物缀合物”或“ADC”)意指和一个或多个细胞毒素剂缀合的抗体,所述细胞毒素剂例如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素(例如,蛋白质毒素,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或其片段),或放射性同位素(即,放射性缀合物)。

[0099] “阻断性”抗体或抗体“拮抗剂”是指,抑制或降低其结合的抗原的生物学活性。在一些实施方案中,阻断性抗体或拮抗剂抗体完全抑制了抗原的生物学活性。

[0100] 如本文中使用的,“激动剂抗体”是模拟目的多肽(例如,HGF)的至少一种功能活性的抗体。

[0101] “结合亲和力”一般指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合伙伴(例如,抗原)之间非共价相互作用的总计的强度。除非另有说明,如在本文中使用的,“结合亲和力”指内在的结合亲和力,其反映结合对(例如,抗体和抗原)成员之间1:1的相互作用。分子X对其伙伴Y的亲和力一般可以通过解离常数(Kd)来表示。理想地,Kd为 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 5×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、 3×10^{-9} 、 5×10^{-9} 或甚至 1×10^{-10} 或更强。可以通过本领域已知的常见方法,包括

本文中描述的方法,来测量亲和力。低亲和力抗体一般结合抗原较慢并趋向容易解离,而高亲和力抗体一般结合抗原较快并趋向更久地保持结合。本领域已知多种测量结合亲和力的方法,其任何一种都可以用于本发明目的。下面描述了特定的举例说明性实施方案。

[0102] 在一个实施方案中,以目的抗体的 Fab 形式及其抗原,通过放射性标记的抗原结合测定试验 (RIA),测量根据本发明的“Kd”或“Kd 值”,如下面试验所描述的:通过在存在滴定系列的未标记抗原时,以最低浓度的 (^{125}I)- 标记的抗原平衡 Fab,然后以抗 Fab 抗体包被的平板捕获结合的抗原,测量 Fab 对抗原的溶液结合亲和力 (Chen 等, (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881)。为了建立用于测定试验的条件,以于 50mM 碳酸钠 (pH 9.6) 中的 5 $\mu\text{g/ml}$ 的捕获抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) 包被微量滴定板 (Dynex) 过夜,随后以于 PBS 中的 2% (w/v) 的牛血清白蛋白,在室温 (约 23°C) 封闭 2 至 5 小时。在非吸附性平板 (Nunc#269620) 上,将 100pM 或 26pM [^{125}I]- 抗原与目的 Fab (例如,与评估抗 VEGF 抗体相符, Fab-12, Presta 等, (1997) Cancer Res. 57:4593-4599 中) 的系列稀释液混合。然后将目的 Fab 孵育过夜;然而,可以使孵育持续更长时间 (例如,65 小时),以保证达到了平衡。此后,将混合物转移到捕获平板上,在室温下孵育 (例如,1 小时)。然后,去掉溶液,以于 PBS 中的 0.1% 吐温 20 洗涤平板 8 次。平板干燥后,每孔加入 150 μl 的闪烁剂 (MicroScint-20; Packard),在 Topcount γ 计数器 (Packard) 上对平板计数 10 分钟。对于每个 Fab,选择给出小于或等于 20% 最大结合的浓度,用于竞争性结合测定。根据另一个实施方案,通过使用表面等离子共振测定,测量 Kd 或 Kd 值,该测定可以使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore 公司, Piscataway, NJ),在 25°C 下,用固定化抗原 CM5 芯片,以约 10 个响应单位 (RU) 进行。简言之,以 N- 乙基 -N'-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS),按照供应商的操作说明,活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片 (CM5, BIAcore 公司)。以 10mM 乙酸钠 (pH 4.8) 将抗原稀释至 5 $\mu\text{g/ml}$ (约 0.2 μM),然后以 5 $\mu\text{l/分钟}$ 的流速注入,以实现偶联蛋白质达到约 10 个响应单位 (RU)。在注入抗原后,注入 1M 乙醇胺来封闭未反应的基团。为了进行动力学测量,将 Fab 的 2 倍系列稀释液 (0.78nM 至 500nM),在含 0.05% 吐温 20 的 PBS (PBST) 中,于 25°C 以约 25 $\mu\text{l/分钟}$ 的流速注入。在一些实施方案中,以下更改用于表面等离子共振测定方法:将抗体固定到 CM5 生物传感器芯片上至达到约 400RU,为了进行动力学测量,将目标蛋白的 2 倍系列稀释液在 PBST 缓冲液中于 25°C 以约 30 $\mu\text{l/分钟}$ 的流速注入。通过同时拟合结合和解离传感图,使用简单一对一 Langmuir 结合模型 (BIAcore 评估软件,第 3.2 版) 计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (Kd) 计算为比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。见例如, Chen, Y. 等, (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881。如果通过表面等离子共振测定的结合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,则使用荧光淬灭技术来测定结合速率,该技术在分光光度计,例如带停流装置的分光光度计 (Aviv Instruments) 或具有搅拌红色杯的 8000- 系列 SLM-Aminco 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中,在存在递增浓度的抗原时,测量于 PBS (pH 7.2) 中的 20nM 抗抗原抗体 (Fab 形式) 在 25°C 的荧光发射强度 (激发 = 295nm; 发射 = 340nm, 16nm 带通) 的增加或降低。

[0103] 根据本发明的“结合速率”或“结合的速率”或“ k_{on} ”也可以用上述同样的表面等离子共振技术进行测定,所述测定使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore 公司, Piscataway, NJ),在 25°C,用固定的抗原 CM5 芯片,以约 10 个响应单位 (RU) 进行。简

言之,以 N- 乙基 -N'-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS),按照供应商的操作说明,活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片 (CM5, BIAcore 公司)。以 10mM 乙酸钠 (pH 4.8) 将抗原稀释至 $5\mu\text{g/ml}$ (约 $0.2\mu\text{M}$),然后以 $5\mu\text{l/分钟}$ 的流速注入,以实现偶联蛋白质达到约 10 个响应单位 (RU)。在注入抗原后,注入 1M 乙醇胺来封闭未反应的基团。为了进行动力学测量,将 Fab 的 2 倍系列稀释液 (0.78nM 至 500nM),在含 0.05% 吐温 20 的 PBS (PBST) 中,于 25°C 以约 $25\mu\text{l/分钟}$ 的流速注入。在一些实施方案中,以下更改用于表面等离子共振测定方法:将抗体固定到 CM5 生物传感器芯片上至达到约 400RU,为了进行动力学测量,将目标蛋白的 2 倍系列稀释液在 PBST 缓冲液中于 25°C 以约 $30\mu\text{l/分钟}$ 的流速注入。通过同时拟合结合和解离传感图,使用简单一对一 Langmuir 结合模型 (BIAcore 评估软件,第 3.2 版) 计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (Kd) 计算为比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。见例如,Chen, Y. 等, (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881。如果通过表面等离子共振测定的结合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,则优选使用荧光淬灭技术来测定结合速率,该技术在分光光度计,例如带停流装置的分光光度计 (Aviv Instruments) 或具有搅拌红色杯的 8000- 系列 SLM-Aminco 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中,在存在递增浓度的抗原时,测量于 PBS (pH 7.2) 中的 20nM 抗抗原抗体 (Fab 形式) 在 25°C 的荧光发射强度 (激发 = 295nm; 发射 = 340nm, 16nm 带通) 的增加或降低。

[0104] “裸露的抗体”是没有与异源分子 (例如细胞毒素部分或放射性标记) 缀合的抗体。

[0105] 具有指定抗体的“生物学特征”的抗体,是拥有该指定抗体的一个或多个生物学特征的抗体,其中所述生物学特征使所述指定抗体与结合同样抗原的其它抗体区分开来。

[0106] 为了筛选与目的抗体所结合的抗原上的表位结合的抗体,可以进行例如《抗体,实验手册》(Antibodies, A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow 和 David Lane 编辑 (1988) 中描述的常规交叉封闭测定。

[0107] 为了增加包含本发明的氨基酸序列的抗体或多肽的半衰期,可以将补救受体结合表位 (salvage receptor binding epitope) 附到抗体 (特别是抗体片段) 上,如例如美国专利 5,739,277 中描述的。例如,可以将编码补救受体结合表位的核酸分子在阅读框内与编码本发明的多肽序列的核酸连接,由此该改造的核酸分子表达的融合蛋白包含补救受体结合表位和本发明的多肽序列。如本文中使用的,“补救受体结合表位”指 IgG 分子 (例如, gG_1 、 IgG_2 、 IgG_3 或 IgG_4) 的 Fc 区中负责增加 IgG 分子的体内血清半衰期的表位 (例如 Ghetie 等, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766 (2000), 表 1)。在其 Fc 区包含取代和具有增加的血清半衰期的抗体也描述于 W000/42072, W0 02/060919; Shields 等, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001); Hinton, *J. Biol. Chem.* 279:6213-6216 (2004) 中。在另一个实施方案中,也可以例如通过连接其它的多肽序列来增加血清半衰期。例如,可以在可用于本发明方法的抗体或其它多肽上连接与 FcRn 受体结合的血清白蛋白或血清白蛋白部分、或连接血清白蛋白结合肽以使血清白蛋白与抗体或多肽结合,例如 W001/45746 中公开的多肽序列。在一个优选的实施方案中,待连接的血清白蛋白肽包含氨基酸序列 DICLPWGLW (SEQ ID NO:48)。在另一个实施方案中,通过这些方法增加了 Fab 的半衰期。关于血清白蛋白结合肽的序列,也见 Dennis 等, *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002)。

[0108] “片段”意指多肽或核酸分子的一部分,其优选包含参照核酸分子或多肽全长的至

少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或更长。片段可以包含 10、20、30、40、50、60、70、80、90、或 100、200、300、400、500、600 或更多个核苷酸, 或 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、190、200 或更多个氨基酸。

[0109] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”可以从最广泛意义上互换使用, 其包括单克隆抗体(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, 只要其表现出期望的生物学活性), 和也可以包括某些抗体片段(如在本文中更详细地描述的)。抗体可以是人的、人源化的和/或亲和力成熟的抗体。

[0110] 术语“可变的”指, 可变区的某些部分在抗体之间在序列上广泛不同, 这些部分在每个特定抗体对其特定抗原的结合和特异性中使用。然而, 可变性在抗体的整个可变区中不是均匀分布的。其集中在轻链和重链可变区中三个称为互补决定区(CDRs)或超变区的片段中。可变区中较为高度保守的部分称为构架(FR)。天然重链和轻链的可变区各包括 4 个 FR 区, 其一般采取 β 折叠构象, 通过 3 个 CDRs 连接, 该 CDRs 形成环连接, 在某些情况下组成 β 折叠结构的一部分。通过 FR 区, 每条链中的 CDRs、以及与来自另一链的 CDRs、紧靠在一起, 导致形成抗体的抗原结合位点(见 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, National Institute of Health, Bethesda, MD(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合, 但表现出各种效应子功能, 例如抗体依赖性细胞毒性中抗体的参与。

[0111] 抗体经木瓜蛋白酶消化, 产生两个相同的抗原结合片段, 称为“Fab”片段, 每个片段具有单个抗原结合位点; 以及剩余的“Fc”片段, 其名称反映了其容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生 $F(ab')_2$ 片段, 所述片段具有两个抗原结合位点, 并仍然具有交联抗原的能力。

[0112] “Fv”是最小抗体片段, 其包含完全的抗原识别和结合位点。在两条链的 Fv 种类中, 该区域由紧密地、非共价结合的一条重链和一条轻链可变区的二聚体组成。在单条链的 Fv 种类中, 一条重链和一条轻链可变区可以通过柔性肽接头共价连接, 以使轻链和重链可以在类似于两条链的 Fv 种类的“二聚体”结构中结合。正是在这种构象中, 每个可变区的 3 个 CDRs 相互作用, 在 VH-VL 二聚体的表面上界定抗原结合位点。6 个 CDRs 共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而, 即使单个可变区(或 Fv 的一半, 其仅包含 3 个对抗原特异的 CDRs)也具有识别和结合抗原的能力, 尽管其亲和力比完整的结合位点低。

[0113] Fab 片段还包含轻链的恒定区和重链的第一恒定区(CH1)。Fab' 片段不同于 Fab 片段, 差异在于其在重链 CH1 区的羧基端添加了几个残基, 包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab' -SH 是本文中对 Fab' 的命名, 其中恒定区的半胱氨酸残基携带游离的巯基基团。 $F(ab')_2$ 抗体片段起初作为一对 Fab' 片段产生, 它们之间具有铰链半胱氨酸。也已知抗体片段的其它化学偶联。

[0114] 基于抗体恒定区的氨基酸序列, 可以将来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”分为两个显著不同的类型, 称为 κ 和 λ 。

[0115] 根据其重链恒定区的氨基酸序列, 可以将免疫球蛋白分为不同的类别。有 5 个主要类别的免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 它们其中几个可以被进一步分为亚类(同种型), 例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 和 IgA₂。对应于不同类别免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。已公知不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构象。“抗体

片段”包含完整抗体的仅一部分,其中该部分优选保留了至少一个,优选大多数或所有,通常与该部分存在于完整抗体中时相关的功能。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段;双抗体(diabody);线性抗体;单链抗体分子;和从抗体片段形成的多特异性抗体。在一个实施方案中,抗体片段包含完整抗体的抗原结合位点,由此保留了结合抗原的能力。在另一个实施方案中,抗体片段,例如包含 Fc 区的抗体片段,保留了至少一个通常与该 Fc 区存在于完整抗体中时相关的生物学功能,例如 FcRn 结合、抗体半衰期调节、ADCC 功能和补体结合。在一个实施方案中,抗体片段是单价抗体,其具有与完整抗体基本相似的体内半衰期。这样的抗体片段可以包含与 Fc 序列连接的一个抗原结合臂,所述 Fc 序列能够赋予该片段体内稳定性。

[0116] 当在本文中使用时,术语“超变区”、“HVR”或“HV”指抗体可变区的区域,其在序列上是超变的和/或形成结构上定义的环。通常,抗体包含 6 个超变区;3 个在 VH(H1、H2、H3) 中,3 个在 VL(L1、L2、L3) 中。有多种超变区划界在使用中,并涵盖在本发明中。Kabat 互补决定区(CDRs)基于序列可变性,是最普遍使用的(Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia 则涉及结构环的位置(Chothia 和 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987))。AbM 超变区是 Kabat CDRs 和 Chothia 结构环之间的折中,其被用于 Oxford Molecular's AbM 抗体建模软件。“接触”超变区以可得复合物晶体结构的分析为基础。来自这些超变区之每个的残基注解如下。

[0117]

环	Kabat	AbM	Chothia	接触
	-----	----	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Kabat 编号)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Chothia 编号)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0118] 超变区可以包含如下“延伸的超变区”:VL 中的 24-36 或 24-34(L1)、46-56 或 50-56(L2) 和 89-97(L3);VH 中的 26-35(H1)、50-65 或 49-65(H2) 和 93-102、94-102 或 95-102(H3)。针对这些定义之每一个,这些可变区残基按照 Kabat 等同上引文进行编号。

[0119] “构架”或“FR”残基是除了如本文中定义的超变区残基以外的可变区残基。

[0120] 非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是包含来自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌合抗体。人源化抗体的大部分是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的超变区

的残基被来自例如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长目动物等非人物种（供体抗体）的具有期望的特异性、亲和力和能力的超变区的残基取代。在某些情况下，人免疫球蛋白的构架区（FR）残基被相应的非人残基取代。此外，人源化抗体可以包含受体抗体或供体抗体中没有的残基。进行这些改变以进一步完善抗体的性能。通常，人源化抗体将包含至少一个，典型地两个，可变区的基本上所有，其中所有或基本上所有超变环对应于非人免疫球蛋白的超变环，所有或基本上所有的 FRs 是人免疫球蛋白序列的 FRs。人源化抗体可选地也将包含免疫球蛋白恒定区（Fc）（典型地人免疫球蛋白恒定区）的至少一部分。更多详细信息见 Jones 等, *Nature* 321:522-525(1986) ; Riechmann 等, *Nature* 332:323-329(1988) ; 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)。也见本文中引用的下列综述文章和参考文献: Vaswani 和 Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma&Immunol.* 1:105-115(1998) ; Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038(1995) ; Hurle 和 Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433(1994)。

[0121] “嵌合”抗体（免疫球蛋白）具有：重链和 / 或轻链的一部分与来自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与来自另一个物种或属于另一个抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，以及这样的抗体的片段，只要它们表现出期望的生物学活性（美国专利号 4,816,567 ; 和 Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855(1984)）。如本文中使用的的人源化抗体是嵌合抗体的子集。

[0122] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 VH 和 VL 区，其中这些区域存在于单个多肽链中。通常，scFv 多肽还包含 VH 和 VL 区之间的多肽接头，所述多肽接头使 scFv 形成用于抗原结合的期望结构。关于 scFv 的综述，见 Pluckthun, 于 *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编辑, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页 (1994) 中。

[0123] “抗原”是预先确定的抗原，抗体可以选择性与其结合。靶抗原可以是多肽、碳水化合物、核酸、脂质、半抗原或其它天然存在或合成的化合物。优选地，靶抗原是多肽。

[0124] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小的抗体片段，该片段包含于相同多肽链中彼此连接的轻链可变区（VL）和重链可变区（VH）（VH-VL）。通过使用太短而不允许相同链上的两个区域发生配对的接头，这些区域被迫与另一条链的互补区配对，产生两个抗原结合位点。双抗体更详细地描述于例如 EP 404,097 ; WO 93/11161 ; 和 Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993) 中。

[0125] “人抗体”是拥有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体，和 / 或使用如本文中公开的用于制备人抗体的任何技术已经制备的抗体。人抗体的该定义特别地不包括包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0126] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个 CDRs 中具有一个或多个改变的抗体，所述改变导致与不拥有这些改变的亲本抗体相比，该抗体对抗原的亲和力提高。优选的亲和力成熟的抗体将对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。亲和力成熟的抗体通过本领域已知的程序产生。Marks 等, *Bio/Technology* 10:779-783(1992) 描述了通过 VH 和 VL 区改组进行的亲和力成熟。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) 描述了 CDR 和 / 或构架残基的随机诱变。

[0127] “Fc 受体”或“FcR”描述与抗体的 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是天然序列的人 FcR。此外,优选的 FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR(γ 受体),其包括受体 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接的形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA(“激活性受体”)和 Fc γ RIIB(“抑制性受体”),它们具有类似的氨基酸序列,主要在其胞质结构域上不同。激活性受体 Fc γ RIIA 在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制性受体 Fc γ RIIB 在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。(见综述:M. in **Daëron**, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234(1997))。FcRs 综述于 Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92(1991);Capel 等, Immunomethods 4:25-34(1994);和 de Haas 等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41(1995) 中。其它 FcRs, 包括那些今后将被鉴定出的 FcRs, 均被本文中的术语“FcR”涵盖。该术语也包括新生儿受体 FcRn, 其负责将母亲的 IgGs 转移到胎儿(Guyer 等, J. Immunol. 117:587(1976) 和 Kim 等, J. Immunol. 24:249(1994)), 并调节免疫球蛋白的体内稳态。WO 00/42072(Presta) 描述了具有与 FcRs 提高的和降低的结合力的抗体变体。通过引用的方式特地将该专利公布的内容并入本文。也见 Shields 等, J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)。

[0128] 已知测量与 FcRn 结合的方法(见例如, Ghetie 1997, Hinton 2004)。可以例如在表达人 FcRn 的转基因小鼠或转染的人细胞系中,或在以 Fc 变体多肽给药的灵长目动物中,测定体内与人 FcRn 的结合以及人 FcRn 高亲和性结合多肽的血清半衰期。

[0129] 具有改变的 Fc 区氨基酸序列和增加的或降低的 C1q 结合能力的多肽变体描述于美国专利号 6,194,551B1 和 WO 99/51642 中。通过引用的方式特地将这些专利公布的内容并入本文。也见 Idusogie 等, J. Immunol. 164:4178-4184(2000)。

[0130] 如本文中使用的,术语“Fc 区”一般指包含免疫球蛋白重链的 C 末端多肽序列的二聚体复合物,其中该 C 末端多肽序列可通过完整抗体的木瓜蛋白酶消化得到。Fc 区可以包含天然的或变异的 Fc 序列。尽管免疫球蛋白重链的 Fc 序列的边界可以变化,人 IgG 重链 Fc 序列通常定义为从约 Cys226 位,或从约 Pro230 位的氨基酸残基,延伸到 Fc 序列的羧基端的片段。免疫球蛋白的 Fc 序列通常包含两个恒定区,CH2 区和 CH3 区,和可选地包含 CH4 区。本文中“Fc 多肽”意指组成 Fc 区的多肽之一。Fc 多肽可以获自任何合适的免疫球蛋白,例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚类、IgA、IgE、IgD 或 IgM。在一些实施方案中,Fc 多肽包含部分或全部野生型铰链序列(通常在其 N 端)。在一些实施方案中,Fc 多肽不包含功能性或野生型铰链序列。

[0131] 如本文中使用的,“抗体突变体”或“抗体变体”指抗体的氨基酸序列变体,其中该物种依赖性抗体的一个或多个氨基酸残基已经被改变。这样的突变体必定与物种依赖性抗体具有小于 100% 的序列同一性或相似性。在一个实施方案中,抗体突变体具有与物种依赖性抗体的重链或轻链可变区的氨基酸序列有至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、更优地至少 95% 的氨基酸序列同一性或相似性的氨基酸序列。关于该序列的同一性或相似性在本文中定义为,在比对序列和如果需要的话,引入空位以获得最大的百分比序列同一性后,候选序列中与物种依赖性抗体残基同一(即,相同的残基)或相似(即,来自基于共同侧链特性的相同组的氨基酸残基,见下文)的氨基酸残基的百分

比。在可变区以外的抗体序列中 N 末端、C 末端或内部的延伸、删除、或插入都不应被视为影响序列同一性和相似性。

[0132] “病症”或“疾病”是将受益于以本发明的物质 / 分子或方法进行治疗的任何状况。它包括慢性的和急性的病症或疾病,包括那些使哺乳动物易患所述疾病的病理状况。本文中待治疗的病症的非限定性例子包括恶性和良性肿瘤;癌、胚细胞瘤和肉瘤。

[0133] “治疗”指治疗性处理和预防性或防止性措施。需要治疗的对象包括那些已经患有良性的、癌前的或非转移性的肿瘤以及那些需防止癌症发生或复发的对象。

[0134] 术语“治疗有效量”指治疗或预防哺乳动物中疾病或病症的药剂的量。就癌症而言,药剂的治疗有效量可以减少癌细胞的数量;减小原发肿瘤的大小;抑制(即,在一定程度上减慢和优选终止)癌细胞浸润到周围器官中;抑制(即,在一定程度上减慢和优选终止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上缓解与疾病相关的一个或多个症状。就药物达到阻止已存在的癌细胞的生长和/或将其杀死的程度,其可以是抑制细胞的和/或细胞毒性的。对于癌症治疗,可以例如通过评估存活时间、至疾病进展的时间(TTP)、反应率(RR)、反应持续时间和/或生活质量来度量体内功效。

[0135] 本文中的“自身免疫病”是产生于并针对于个体自身组织的非恶性疾病或病症。本文中的自身免疫病特地不包括恶性或癌性疾病或状况,特别不包括 B 细胞淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病和慢性成髓细胞性白血病。自身免疫疾病或病症的例子包括但不限于,炎症反应,例如炎症性皮肤病,包括牛皮癣和皮炎(例如,特应性皮炎);系统性硬皮病和硬化症;和炎性肠病相关的反应(例如克罗恩病和溃疡性结肠炎);呼吸窘迫综合征(包括成人呼吸窘迫综合征;ARDS);皮炎;脑膜炎;脑炎;眼色素层炎;结肠炎;肾小球性肾炎;过敏性疾病,例如湿疹和哮喘和其它涉及 T 细胞浸润以及慢性炎症反应的疾病;动脉粥样硬化;白细胞粘着缺陷;类风湿性关节炎;系统性红斑狼疮(SLE);糖尿病(例如 I 型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病);多发性硬化;雷诺综合征;自身免疫性甲状腺炎;变态反应性脑脊髓炎;修格兰氏症候群;幼年发病型糖尿病;与由细胞因子和 T 淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫反应,典型地见于结核病、肉样瘤病、多肌炎、肉芽肿病和脉管炎;恶性贫血(阿狄森氏病);涉及白细胞渗出的疾病;中枢神经系统(CNS)炎性病症;多器官损伤综合征;溶血性贫血(包括但不限于冷球蛋白血症或 Coombs 阳性贫血);重症肌无力;抗原-抗体复合物介导的疾病;抗肾小球基底膜疾病;抗磷脂综合征;过敏性神经炎;格雷夫斯病;兰伯特-伊顿肌无力综合征;大疱性类天疱疮;天疱疮;自身免疫性多内分泌腺病;莱特尔氏病;僵人综合征;白塞病;巨细胞性动脉炎;免疫复合物性肾炎;IgA 肾病;IgM 多神经病;免疫性血小板减少性紫癜(ITP)或自身免疫性血小板减少症等。

[0136] 术语“癌”和“癌的”指或描述哺乳动物中具有不受控制的细胞生长的典型特征的生理状况。该定义包括良性和恶性癌症。“早期癌症”或“早期肿瘤”意指非侵入或转移的或分类为 0、I 或 II 期的癌症。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴癌、胚细胞瘤(包括成神经管细胞瘤和成视网膜细胞瘤)、肉瘤(包括脂肪肉瘤和滑膜细胞肉瘤)、神经内分泌肿瘤(包括类癌瘤,胃泌素瘤和胰岛细胞癌)、间皮瘤、施旺细胞瘤(包括听神经瘤)、脑膜瘤、腺癌、黑素瘤、和白血病或淋巴系统恶性肿瘤。这样的癌症的更多具体例子包括鳞状细胞癌(例如,鳞状上皮细胞癌);肺癌,包括小细胞肺癌(SCLC),非小细胞肺癌(NSCLC),肺腺癌和

肺鳞状细胞癌；腹膜癌；肝细胞癌；胃部或胃癌，包括胃肠癌；胰腺癌；成胶质细胞瘤；宫颈癌；卵巢癌；肝癌；膀胱癌；肝细胞瘤；乳癌（包括转移性乳癌）；结肠癌；直肠癌；结肠直肠癌；子宫内膜或子宫癌；唾液腺癌；肾或肾脏癌；前列腺癌；外阴癌；甲状腺癌；肝癌；肛门癌；阴茎癌；睾丸癌；食道癌；胆道肿瘤；以及头颈癌和多发性骨髓瘤。

[0137] 术语“癌前的”指典型地先于癌症或发展成癌症的状况或生长。癌前生长具有以异常的细胞周期调控、增殖、或分化为特征的细胞，这可以通过细胞周期调控、细胞增殖或分化的标记物来确定。

[0138] “发育异常”意指组织、器官或细胞的任何异常生长或发育。优选地，发育异常是高级别的或癌前的。

[0139] “转移”指癌从其原发位置扩散到身体中其它位置。癌细胞可以脱离原发肿瘤，渗透入淋巴管和血管中，通过血流进行循环，并在身体其它位置在正常组织中在远处病灶中生长（转移）。转移可以是局部的或远距离的。转移是一个连续的过程，取决于肿瘤细胞自原发肿瘤脱离，通过血流进行移动，停止在远距离位置。在新的位置上，这些细胞建立血供，并可以生长形成威胁生命的团块。

[0140] 肿瘤细胞中的刺激性和抑制性分子途径都调节这种行为，肿瘤细胞和在远距离位置中的宿主细胞之间的相互作用也是有意义的。

[0141] “非转移的”意指癌症是良性的或保留在原发位置，其尚未渗透入淋巴管或血管系统或除了原发位置的组织中。通常，非转移性癌症是处于 0、I 或 II 期，和偶尔处于 III 期的癌症。

[0142] “原发肿瘤”或“原发癌”意指起始的癌，而非位于对象身体中的另一个组织、器官或位置上的转移性损伤。

[0143] “良性肿瘤”或“良性癌”意指仍局限在起源位置并且不具有浸润、侵入或转移到远距离位置能力的肿瘤。

[0144] “肿瘤负荷”意指身体中癌细胞的数量，肿瘤的大小，或癌的数量。肿瘤负荷也被称为肿瘤负担。

[0145] “肿瘤数量”意指肿瘤的数量。

[0146] “受试者”意指哺乳动物，包括但不限于人或非人哺乳动物，例如牛、马、犬、绵羊或猫。优选地，受试者是人。

[0147] 术语“抗癌疗法”指用于治疗癌症的疗法。抗癌治疗剂的例子包括但不限于，例如化疗剂，生长抑制剂，细胞毒素药物，用于放射治疗的药物，抗血管生成药物，凋亡剂，抗微管蛋白药物和治疗癌症的其它药物，抗 CD20 抗体，血小板衍生生长因子抑制剂（例如，Gleevec™(Imatinib Mesylate)），COX-2 抑制剂（例如，塞来昔布 (celecoxib)），干扰素类，细胞因子，与下列靶标 ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR- β 、BlyS、APRIL、BCMA 或 VEGF 受体、TRAIL/Apo2 之一或多个结合的拮抗剂（例如，中和抗体），以及其它生物活性的或有机化学的药物等。本发明也包括它们的组合。

[0148] 如本文中使用的，术语“细胞毒素药物”指抑制或阻止细胞的功能和 / 或导致细胞破坏的物质。该术语旨在包括放射性同位素（例如， I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 和 Re^{186} ），化疗剂，以及毒素，例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或它们的片段。

[0149] “化疗剂”是用于癌症治疗的化合物。化疗剂的例子包括用于治疗癌症的

化合物。化疗剂的例子包括烷化剂,例如三胺硫磷 (thiotepa) 和 **CYTOXAN®** 环磷酰胺 (cyclophosphamide); 烷基磺酸酯类,例如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和 哌泊舒凡 (piposulfan); 氮丙啶类 (aziridines), 例如 benzodopa、卡巴醌 (carboquone)、meturedopa 和 uredopa; 乙烯亚胺类和甲基三聚氰胺类 (methyamelamine), 包括六甲蜜胺 (altretamine)、三乙烯亚胺三嗪 (triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺 (trietylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲基三聚氰胺 (trimethylolomelamine); acetogenins (特别是 bullatacin 和 bullatacinone); 喜树碱 (camptothecin) (包括合成的类似物拓扑替康 (topotecan)); 苔藓抑制素 (bryostatin); callistatin; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物); cryptophycins (特别是 cryptophycin 1 和 cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin (包括合成类似物 KW-2189 和 CB1-TM1); 艾榴塞洛素 (eleutherobin); pancratiostatins; sarcodictyin; spongistatin; 氮芥类, 例如 苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、cholophosphamide、雌氮芥 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、二氯甲基二乙胺 (mechlorethamine)、盐酸甲氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新恩比兴 (novembichin)、胆固醇苯乙酸氮芥 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 亚硝基脲类, 例如卡莫司汀 (carmustine)、吡葡亚硝脲 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和 ranimustine; 抗生素, 例如 烯二炔类抗生素 (例如, 加利车霉素 (calicheamicin), 特别是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II (见例如, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))); 达内霉素 (dynemicin), 包括达内霉素 A; 二膦酸盐, 例如氯膦酸盐 (clodronate); 埃斯培拉霉素 (esperamicin); 以及新制癌菌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关的色素蛋白烯二炔类抗生素发色团); aclacinomysins, 放线菌素 (actinomycin), 安曲霉素 (authramycin), 重氮丝氨酸 (azaserine), 博来霉素 (bleomycins), 放线菌素 C (cactinomycin), carabycin, 洋红霉素 (carminomycin), carzinophilin, chromomycinis, 放线菌素 D (dactinomycin), 道诺霉素 daunorubicin, 地托比星 (detorubicin), 6-重氮基-5-取代-L-正亮氨酸, **ADRIAMYCIN®** 阿霉素 (doxorubicin) (包括吗啉代阿霉素 (morpholino-doxorubicin)、氰基吗啉代阿霉素 (cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯啉并阿霉素 (2-pyrrolino-doxorubicin) 和脱氧阿霉素 deoxydoxorubicin), 表柔比星 (epirubicin), 依索比星 (esorubicin), 伊达比星 (idarubicin), 麻西罗霉素 (marcellomycin), 丝裂霉素 (mitomycins), 例如丝裂霉素 C, 菌酚酸 (mycophenolic acid), 诺加霉素 (nogalamycin), 橄榄霉素 (olivomycins), 培洛霉素 (peplomycin), potfiromycin, 嘌呤霉素 (puromycin), quelamycin, 罗多比星 (rodorubicin), 链黑菌素 (streptonigrin), 链脲霉素 (streptozocin), 杀结核菌素 (tubercidin), 乌苯美司 (ubenimex), 净司他丁 (zinostatin), 佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物, 例如 氨甲蝶呤 (methotrexate) 和 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil) (5-FU); 叶酸类似物, 例如二甲叶酸 (denopterin), 氨甲蝶呤 (methotrexate), 蝶罗呤 (pteropterin),

三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 例如氟达拉滨 (fludarabine), 6- 巯基嘌呤 (6-mercaptopurine), thiamiprine, 硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 例如环胞苷 (ancitabine), 阿扎胞苷 (azacitidine), 6- 阿扎胞苷 (6-azauridine), 卡莫氟 (carmofur), 阿糖胞苷 (cytarabine), 二脱氧尿苷 (dideoxyuridine), 去氧氟尿苷 (doxifluridine), 依诺他滨 (enocitabine), 氟尿苷 (floxuridine); 雄激素类, 例如二甲睾酮 (calusterone), 屈他雄酮丙酸酯 (dromostanolone propionate), 环硫雄醇 (epitiostanol), 美雄烷 (mepitiostane), 睾内脂 (testolactone); 抗肾上腺素, 例如氨鲁米特 (aminoglutethimide), 米托坦 (mitotane), 曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充物, 例如 frolinic acid; 醋葡醛内酯 (aceglatone); 醛磷酰胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid); 乙炔尿嘧啶 (eniluracil); 安吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); edatraxate; defofamine; 地美可辛 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); 依氟鸟氨酸 (elfornithine); 依利醋铵 (elliptinium acetate); 埃博霉素 (epothilone); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓 (gallium nitrate); 羟基脲 (hydroxyurea); 蘑菇多糖 (lentinan); lonidainine; 类美登素化合物 (maytansinoids), 例如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocins); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); mopidanmol; nitraerine; 喷司他丁 (pentostatin); phenamet; 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); podophyllinic acid; 2- 乙基酰肼 (2-ethylhydrazide); 普鲁苄肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 利索新 (rhizoxin); 西佐喃 (sizofiran); 锗螺胺 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2, 2', 2''- 三氯三乙基胺 (2, 2', 2''-trichlorotriethylamine); 单端孢霉烯 (trichothecenes) (特别是 T-2 毒素, verracurin A, 杆孢菌素 (roridin A) 和 anguidine); 尿烷 (urethan); 长春地辛 (vindesine); 氮烯咪胺 (dacarbazine); 甘露醇氮芥 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿拉伯糖苷 (arabinoside) (“Ara-C”); 环磷酰胺 (cyclophosphamide); 噻替派 (thiotepa); 紫杉烷类化合物 (taxoids), 例如 **TAXOL®** 紫杉醇 (paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.), ABRAXANE™ 不含 Cremophor, 白蛋白 - 改造的紫杉醇纳米制剂 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), 和 **TAXOTERE®** 紫杉醇 (doxetaxel) (**Rhône-Poulenc** Rorer, Antony, 法国); chloranbucil; **GEMZAR®** 吉西他滨 (gemcitabine); 6- 硫鸟嘌呤 (6-thioguanine); 巯基嘌呤 (mercaptopurine); 甲胺喋呤 (methotrexate); 铂类似物, 例如顺铂 (cisplatin) 和卡铂 (carboplatin); 长春花碱 (vinblastine); 铂; 依托泊苷 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (vincristine); **NAVELBINE®** 长春瑞滨 (vinorelbine); 二羟基蒽醌 (novantrone); 替尼泊苷 (teniposide); 依达曲沙 (edatrexate); 柔红霉素 (daunomycin); 氨基喋呤 (aminopterin); 希罗达 (xeloda); 伊班膦酸 (ibandronate); 伊立替康 (irinotecan) (Camptosar, CPT-11) (包括伊立替康 (irinotecan) 与 5-FU 和甲酰四氢叶酸 (leucovorin) 的治疗方案); 拓扑异构酶抑

制剂 RFS 2000 ;difluoromethylornithine (DMFO) ;类视色素,例如视黄酸 (retinoic acid) ;卡培他滨 (capecitabine) ;考布他汀 (combretastatin) ;VELCADE 硼替佐米 (bortezomib) ;REVLIMID 来那度胺 (lenalidomide) ;甲酰四氢叶酸 (leucovorin) (LV) ;奥沙利铂 (oxaliplatin),包括奥沙利铂 (oxaliplatin) 治疗方案 (FOLFOX) ;减少细胞增殖的 PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFR(例如埃罗替尼 (erlotinib) (TarcevaTM)) 和 VEGF-A 的抑制剂,以及以上任何的药用可接受的盐、酸或衍生物。

[0150] 该定义也包括抗激素药物,其起调节或抑制激素对肿瘤的作用,例如抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂 (SERMs),包括,例如它莫西芬 (tamoxifen) (包括 **NOLVADEX®** 它莫西芬), 雷洛昔芬 (raloxifene), 屈洛昔芬 (droloxifene), 4-羟基他莫昔芬 (4-hydroxytamoxifen), 曲沃昔芬 (trioxifene), keoxifene, LY117018, 奥那司酮 (onapristone), 和 FARESTON 托瑞米芬 (toremifene) ;抑制芳香酶的芳香酶抑制剂,其调节肾上腺中雌激素的产生,例如 4(5)-咪唑类,氨鲁米特 (aminoglutethimide), **MEGASE®** 甲地孕酮 (megestrol acetate), **AROMASIN®** 依西美坦 (exemestane), formestane, 法偈唑 (fadrozole), **RIVISOR®** 伏氯唑 (vorozole), **FEMARA®** 来曲唑 (letrozole), 和 **ARIMIDEX®** 阿那曲唑 (anastrozole) ;和抗雄激素类,例如氟他胺 (flutamide), 尼鲁米特 (nilutamide), 比卡鲁胺 (bicalutamide), 亮丙瑞林 (leuprolide), 和戈舍瑞林 (goserelin) ;以及 troxacitabine (1,3-二氧戊环胞嘧啶核苷类似物) ;反义寡核苷酸,特别是那些抑制涉及异常细胞增殖的信号途径中基因,例如 PKC- α , Raf 和 H-Ras,表达的反义寡核苷酸;核酶,例如 VEGF 表达抑制剂 (例如, **ANGIOZYME®** 核酶) 和 HER2 表达抑制剂;疫苗,例如基因治疗疫苗,例如, **ALLOVECTIN®** 疫苗, **LEUVECTIN®** 疫苗, 和 **VAXID®** 疫苗; **PROLEUKIN®** rIL-2; **LURTOTECAN®** 拓扑异构酶 1 抑制剂; **ABARELIX®** rmRH; 长春瑞滨 (Vinorelbine) 和 Esperamicins (见美国专利号 4,675,187), 以及以上任何的药用可接受的盐、酸或衍生物。

[0151] 如在本申请中使用的,“前体药物”指药用活性物质的前体或衍生物形式,与亲本药物相比,其对肿瘤细胞的细胞毒性较低,能够被酶催化激活或转化为更活跃的亲本形式。见例如, Wilman, 《癌症化疗中的前体药物》(“Prodrugs in Cancer Chemotherapy”) Biochemical Society Transactions, 14, 第 375-382 页, 615th Meeting Belfast (1986) 和 Stella 等, 《前体药物:靶向给药的化学方法》(“Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,”) Directed Drug Delivery, Borchardt 等编辑, 第 247-267 页, Humana 出版社 (1985)。本发明的前体药物包括但不限于含磷酸盐前体药物,含硫代磷酸盐前体药物,含硫酸盐前体药物,含肽前体药物, D-氨基酸修饰的前体药物,糖基化的前体药物,含 β -内酰胺的前体药物,含任选取代的苯氧乙酰胺的前体药物或含任选取代的苯乙酰胺的前体药物,5-氟胞嘧啶以及可以被转化为更活跃的无细胞毒性药物的其它 5-氟尿苷前体药物。可以被衍生为用于本发明的前体药物的细胞毒性药物的例子包括但不限于上述那些化疗剂。

[0152] “放射治疗”意指使用直接的 γ 射线或 β 射线来诱导对细胞足够的损伤,以限制其正常起作用的能力或完全破坏细胞。应理解的是,本领域已知许多确定治疗剂量和持续

时间的手段。典型的治疗是作为一次施用来给予的,典型的剂量为每天 10 至 200 个单位(Grays)。

[0153] “生物学活性”或“功能性”多肽(例如异源多肽)是能够在结构的、调控的、生物化学的或生物物理的事件中施行一个或多个其天然活性的多肽。

[0154] “生物学活性”或“功能性”抗体是能够在结构的、调控的、生物化学的或生物物理的事件中施行一个或多个其天然活性的抗体。例如,生物学活性抗体可以具有特异地结合抗原的能力,该结合又可以引发或改变例如信号转导或酶活性等细胞或分子事件。生物学活性抗体也可以阻断受体的配体活化或充当激动剂抗体。抗体施行一个或多个其天然活性的能力依赖于几个因素,包括多肽链的正确折叠和组装。如本文中使用的,由本公开的方法产生的生物学活性抗体典型地包括异源四聚体,所述异源四聚体具有两个相同的 L 链和两个相同的 H 链,这些链通过多个二硫键相连接并正确地折叠。

[0155] 本发明的组合物及其使用方法

[0156] 在一个方面,本发明提供了 TIR 变体。因此,对于一个给定的 TIR,可以产生具有各种翻译强度的一系列氨基酸或核酸序列变体,由此提供了一种可以调节该因子用于许多不同多肽最优分泌的方便手段。通过使用在这些变体,例如 PhoA,控制下表达的报告基因,提供了对不同翻译起始区的相对翻译强度进行定量的方法。可以在质粒载体背景下提供变体或突变体 TIRs,由此提供一组质粒,在这些质粒中可以插入目的基因,并可以测量目的基因的表达,以建立用于成熟多肽最大表达的最佳翻译强度范围。

[0157] 可以通过常规技术进行 TIR 的诱变,导致密码子改变,尽管优选核苷酸序列中的沉默改变,但这些密码子改变也可以改变氨基酸序列。TIR 中的改变可以包括,例如与信号序列中的改变组合,Shine-Dalgarno 序列的数量和间距上的改变。用于产生突变体信号序列的一个方法是在编码序列开始处产生“密码子库”,其不改变信号序列的氨基酸序列(即,改变是沉默的)。这可以通过改变每个密码子的第三位核苷酸来实现;此外,一些氨基酸,例如亮氨酸、丝氨酸和精氨酸,具有多个第一和第二位,这给制备库增添了复杂性。该诱变方法详细描述于 Yansura 等(METHODS:A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158(1992))中。基本上,编码信号序列的 DNA 片段和成熟多肽的开端是合成的,由此前 6 至 12 个密码子每个的第三位(和可能地,第一和第二位,如上所述)是改变的。这些密码子下游的另外的核苷酸提供用于互补引物结合的位点,所述互补引物用于产生底端链。以 DNA 聚合酶 I(Klenow)处理顶端编码链和底端链引物,将导致一组包含随机化密码子的双股 DNA 片段。设计引物以包含有用的克隆位点,所述克隆位点可以用于将该 DNA 片段插入合适的载体中,由此允许扩增密码子库。备选方法包括,例如以随机核苷酸替代整个 rbs(Wilson 等,BioTechniques 17:944-952(1994)),以及使用噬菌体展示文库(见例如,Barbas 等,Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:4457-4461(1992);Garrard 等,Gene 128:103-109(1993))。

[0158] 细菌 Sec 移位酶利于原核生物中蛋白质输出。分泌蛋白质可以通过两种不同机制被靶向到 Sec 移位酶,即共翻译和翻译后靶向。在后者中,包含信号序列的分泌蛋白以其合成完成的状态从核糖体中释放出来并被引导到 Sec 移位酶。在各种革兰氏阴性菌中,分泌蛋白通过分泌特异性分子伴侣 SecB 被引导到 Sec 移位酶,所述分泌特异性分子伴侣 SecB 维持这些蛋白质处于能够转运的、非折叠状态。在共翻译靶向中,在分泌蛋白的信号序列从

核糖体中露出时信号识别颗粒 (SRP) 与其结合, 整个 SRP/ 核糖体 / 新生分泌蛋白链的三元复合物被靶向到 Sec 移位酶。

[0159] 例如, 麦芽糖结合周质蛋白 (MalE) 和碱性磷酸酶 (PhoA) 信号肽借助分子马达 SecA, 以翻译后方式指导从细胞质到周质的转运。以翻译后方式指导转运的其它示例性信号肽有 dsbC、lolA、ompA、lamb 和 lpp。热稳定肠毒素 II (stII) 和巯基 - 二硫键互换蛋白 (dsbA) 信号肽借助信号识别颗粒 (SRP), 以共翻译方式指导转运。以共翻译方式指导转运的其它示例性信号肽有 yraI、tort、tolB、sfmC、nikA 和 sfmC。也见 Natale 等对于 Sec- 和 Tat- 介导的跨细菌细胞质膜的蛋白质分泌的综述。(Natale 等 (2008) *Biochimica et Biophysica Acta* 1778:1735-56)。

[0160] 我们开发了针对信号肽的新的变体翻译起始区 (TIR) 信号肽文库 (图 2、表 2), 代表用于在大肠杆菌中跨内膜转运的两类主要的分泌途径: sec (PhoA, MalE) 和 SRP (DsbA, STII)。每个文库包括一组包含不同翻译强度的变体 TIR 的载体, 从而提供了一种可以容易地调节给定目的蛋白翻译水平的手段。

[0161] 一般, 在质粒载体中提供 TIR 变体, 所述质粒载体具有用于目的基因表达的合适元件。例如, 典型的构建体将包含于信号序列 5' 的启动子、用于插入目的基因或报告基因的于信号序列 3' 的限制性酶识别位点、和选择标记, 例如药物抗性标记, 用于选择和 / 或维持转化了所得质粒的细菌。本文对质粒载体另外进行了讨论和例示。在本领域中已知适合于原核生物宿主使用的启动子, 本文对其中一些进行了例示和描述。

[0162] 可以使用能以某种方式进行定量的任何报告基因。由此, 例如, 可以定量碱性磷酸酶的产生, 作为对 phoA 基因产物分泌水平的量度。其它例子包括, 例如 β 内酰胺酶基因。

[0163] 通常, 可以产生一组载体, 对于载体的每个顺反子具有各种 TIR 强度。该有限的组使得可以比较在各种 TIR 强度组合下每条链的表达水平以及全长产物产量。TIR 强度可以通过定量报告基因的表达水平来测定, 如详细描述于 Simmons 等, 美国专利号 5, 840, 523 中。为了本发明目的, 以 (N- 轻链, M- 重链) 表示载体中特定 TIRs 对的翻译强度组合, 其中 N 是轻链的相对 TIR 强度, M 是重链的相对 TIR 强度。例如, (3- 轻链, 7- 重链) 意思是载体对于轻链表达提供约 3 的相对 TIR 强度, 对于重链表达提供约 7 的相对 TIR 强度。基于翻译强度比较, 选择待在本发明表达载体构建体中组合的单个期望 TIRs。这样构建的载体可以用来转化适当的宿主。优选地, 宿主是原核生物宿主。更优选地, 宿主是大肠杆菌。

[0164] 可以例如通过目的多肽的功能性测定试验 (如果可得的话), 放射免疫测定 (RIA)、酶联免疫测定 (ELISA), 或通过 PAGE 和目的多肽正确分子量的可视化, 测量多肽的分泌水平。用于测分泌多肽的水平的方法在本领域公知, 本文对其中一些进行了例示。

[0165] 抗体

[0166] 本发明的抗体优选为单克隆抗体。本文中提供的抗体的 Fab、Fab'、Fab' -SH 和 F(ab')₂ 片段也涵盖在本发明范围内中。这些抗体片段可以通过传统手段产生, 例如酶消化, 或可以通过重组技术产生。这样的抗体片段可以是嵌合的或人源化的。这些片段可以用于下述诊断和治疗目的。

[0167] 因此, 在一些实施方案中, 抗 c-met 抗体是包含 Fc 区的单臂抗体 (即, 重链可变区和轻链可变区形成单个抗原结合臂), 其中 Fc 区包括第一和第二 Fc 多肽, 其中第一和第二 Fc 多肽以复合物形式存在, 形成, 与包含所述抗原结合臂的 Fab 分子相比较, 增加所述抗体

片段稳定性的 Fc 区域。当病理学疾病的治疗需要拮抗功能且抗体的双价性导致不需要的激动剂效应时,单臂抗体的单价特性(即,包含单个抗原结合臂的抗体)将导致和/或保证抗体与靶标分子结合后的拮抗作用。此外,包含 Fc 区的单臂抗体,与具有类似/基本相同的抗原结合特性的 Fab 形式相比较,具有较优的药物动力学属性(例如增加的半衰期和/或降低的体内清除率),由此克服了常规单价 Fab 抗体使用中的主要缺陷。单臂抗体公开于例如 W02005/063816 ;Martens 等, Clin Cancer Res (2006), 12:6144 中。在一些实施方案中,单臂抗体是单价抗体片段,其中该抗体片段包括包含轻链可变区的第一多肽、包含重链可变区和所述第一 Fc 多肽的第二多肽,以及包含所述第二 Fc 多肽的第三多肽,由此重链可变区和轻链可变区形成单个抗原结合臂,并由此第一和第二 Fc 多肽以复合物形式存在,形成 Fc 区域,与包含所述抗原结合臂的 Fab 分子相比较,该 Fc 区域增加所述抗体片段的稳定性。

[0168] 在一些实施方案中,抗体结合(在一些实施方案中,特异性结合)c-met。在一些实施方案中,抗 c-met 抗体包括:(a) 第一多肽,其包含具有如下序列的重链可变区、CH1 序列和第一 Fc 多肽:

[0169] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVG MIDPSNSDTRFNPNFKDRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO :43),

[0170] (b) 第二多肽,其包含具有如下序列的轻链可变区、和 CL1 序列:

[0171] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLA WYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGT KVEIKR (SEQ ID NO :44), 以及

[0172] (c) 包含第二 Fc 多肽的第三多肽,其中重链可变区和轻链可变区以复合物的形式存在,形成单个抗原结合臂,其中第一和第二 Fc 多肽以复合物的形式存在,形成 Fc 区,与包含所述抗原结合臂的 Fab 分子相比,该 Fc 区增加所述抗体片段的稳定性。在一些实施方案中,第一多肽包含图 7 中描述的 Fc 序列 (SEQ ID NO :68),第二多肽包含图 8 中描述的 Fc 序列 (SEQ ID NO :47)。在一些实施方案中,第一多肽包含图 8 中描述的 Fc 序列 (SEQ ID NO :47),第二多肽包含图 7 中描述的 Fc 序列 (SEQ ID NO :68)。

[0173] 在一些实施方案中,抗 c-met 抗体包括:(a) 包含重链可变区的第一多肽,所述多肽包含序列:

[0174] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVG MIDPSNSDTRFNPNFKDRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVS SVLT VLV LHDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO :45);

[0175] (b) 包含轻链可变区的第二多肽,所述多肽包含序列:

[0176] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLA WYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO :46);

[0177] 以及包含 Fc 多肽的第三多肽,所述多肽包含序列:

[0178] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLW
CLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK (SEQ ID NO :47),

[0179] 其中重链可变区和轻链可变区以复合物的形式存在,形成单个抗原结合臂,其中第一和第二 Fc 多肽以复合物的形式存在,形成与包含所述抗原结合臂的 Fab 分子相比增加所述抗体片段稳定性的 Fc 区。

[0180] 在一个方面,抗 c-met 抗体包含:

[0181] (a) 至少 1、2、3、4 或 5 个超变区 (CDR) 序列,所述超变区序列选自:

[0182] (i) 包含序列 A1-A17 的 CDR-L1,其中 A1-A17 为 KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO :49)

[0183] (ii) 包含序列 B1-B7 的 CDR-L2,其中 B1-B7 为 WASTRES (SEQ ID NO :50)

[0184] (iii) 包含序列 C1-C9 的 CDR-L3,其中 C1-C9 为 QQYYAYPWT (SEQ ID NO :51)

[0185] (iv) 包含序列 D1-D10 的 CDR-H1,其中 D1-D10 为 GYTFTSYWLH (SEQ ID NO :52)

[0186] (v) 包含序列 E1-E18 的 CDR-H2,其中 E1-E18 为 GMIDPSNSDTRFNPNFKD (SEQ ID NO :53) 和

[0187] (vi) 包含序列 F1-F11 的 CDR-H3,其中 F1-F11 为 T/SYGSYVSPLDY (SEQ ID NO:54);

[0188] 和 (b) 至少一个变体 CDR,其中该变体 CDR 序列包含 (i)-(vi) 中所描述序列的至少一个残基的修饰。在一些实施方案中,CDR-H3 包含 TYGSYVSPLDY (SEQ ID NO:55)。在一些实施方案中,CDR-H3 包含 SYGSYVSPLDY (SEQ ID NO:56)。在一些实施方案中,包含这些序列 (按如本文中描述的组) 的本发明的抗体是人源化的或人的。

[0189] 在一个实施方案中,抗 c-met 抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含图 7 中描述的 CDR1-HC、CDR2-HC 和 CDR3-HC 序列 (SEQ ID NO:52-53 和 66) 之一或多个。在一些实施方案中,抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含图 7 中描述的 CDR1-LC、CDR2-LC 和 CDR3-LC 序列 (SEQ ID NOs:49-51) 之一或多个。在一些实施方案中,重链可变区包含图 7 中描述的 FR1-HC、FR2-HC、FR3-HC 和 FR4-HC 序列 (SEQ ID NOs:62-65)。在一些实施方案中,轻链可变区包含图 7 中描述的 FR1-LC、FR2-LC、FR3-LC 和 FR4-LC 序列 (SEQ ID NO:57-60)。

[0190] 本发明的抗 c-met 抗体中的变体 HVRs 可以在 HVR 中具有一个或多个残基的修饰。在一个实施方案中,HVR-L2 变体在下列位置的任何组合中包含 1-5 (1、2、3、4 或 5) 个取代: B1 (M 或 L)、B2 (P、T、G 或 S)、B3 (N、G、R 或 T)、B4 (I、N 或 F)、B5 (P、I、L 或 G)、B6 (A、D、T 或 V) 和 B7 (R、I、M 或 G)。在一个实施方案中,HVR-H1 变体在下列位置的任何组合中包含 1-5 (1、2、3、4 或 5) 个取代: D3 (N、P、L、S、A、I)、D5 (I、S 或 Y)、D6 (G、D、T、K、R)、D7 (F、H、R、S、T 或 V) 和 D9 (M 或 V)。在一个实施方案中,HVR-H2 变体在下列位置的任何组合中包含 1-4 (1、2、3 或 4) 个取代: E7 (Y)、E9 (I)、E10 (I)、E14 (T 或 Q)、E15 (D、K、S、T 或 V)、E16 (L)、E17 (E、H、N 或 D) 和 E18 (Y、E 或 H)。在一个实施方案中,HVR-H3 变体在下列位置的任何组合中包含 1-5 (1、2、3、4 或 5) 个取代: F1 (T、S)、F3 (R、S、H、T、A、K)、F4 (G)、F6 (R、F、M、T、E、K、A、L、W)、F7 (L、I、T、R、K、V)、F8 (S、A)、F10 (Y、N) 和 F11 (Q、S、H、F)。每个位置后括号中的字母表示示例性取代 (即,替换) 氨基酸;如本领域技术人员将显而易见的是,可以使用

本领域已知和 / 或本文中描述的技术,对其它氨基酸作为在本文中描述的背景中的取代氨基酸的合适性进行常规评估。在一个实施方案中,HVR-L1 包含 SEQ ID NO:49 的序列。在一个实施方案中,变体 HVR-H3 中的 F1 是 T。在一个实施方案中,变体 HVR-H3 中的 F1 是 S。在一个实施方案中,变体 HVR-H3 中的 F3 是 R。在一个实施方案中,变体 HVR-H3 中的 F3 是 S。在一个实施方案中,变体 HVR-H3 中的 F7 是 T。在一个实施方案中,本发明的抗体包含变体 HVR-H3,其中 F1 是 T 或 S,F3 是 R 或 S,F7 是 T。

[0191] 在一个实施方案中,本发明的抗 c-met 抗体包含变体 HVR-H3,其中 F1 是 T,F3 是 R,和 F7 是 T。在一个实施方案中,本发明的抗体包含变体 HVR-H3,其中 F1 是 S。在一个实施方案中,本发明的抗体包含变体 HVR-H3,其中 F1 是 T,F3 是 R。在一个实施方案中,本发明的抗体包含变体 HVR-H3,其中 F1 是 S,F3 是 R,和 F7 是 T。在一个实施方案中,本发明的抗体包含变体 HVR-H3,其中 F1 是 T,F3 是 S,F7 是 T 和 F8 是 S。在一个实施方案中,本发明的抗体包含变体 HVR-H3,其中 F1 是 T,F3 是 S,F7 是 T 和 F8 是 A。在一些实施方案中,所述变体 HVR-H3 抗体还包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H 和 HVR-H2,其中按顺序每一个分别包含 SEQ ID NOs:49、50、51、52 和 53 中描述的序列。在一些实施方案中,这些抗体还包含人亚类 III 重链构架共有序列。在这些抗体的一个实施方案中,构架共有序列在第 71、73 和 / 或 78 位包含取代。在这些抗体的一个实施方案中,第 71 位是 A,第 73 位是 T,和 / 或第 78 位是 A。在这些抗体的一个实施方案中,这些抗体还包含人 κ I 轻链构架共有序列。

[0192] 在一个实施方案中,本发明的抗 c-met 抗体包含变体 HVR-L2,其中 B6 是 V。在一些实施方案中,所述变体 HVR-L2 抗体还包含 HVR-L1、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3,其中按顺序每一个分别包含 SEQ ID NOs:49、51、52、53、54 中描述的序列。在一些实施方案中,所述变体 HVR-L2 抗体还包含 HVR-L1、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3,其中按顺序每一个分别包含 SEQ ID NOs:49、51、52、53、55 中描述的序列。在一些实施方案中,所述变体 HVR-L2 抗体还包含 HVR-L1、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3,其中按顺序每一个分别包含 SEQ ID NOs:49、51、52、53、56 中描述的序列。在一些实施方案中,这些抗体还包含人亚类 III 重链构架共有序列。在这些抗体的一个实施方案中,构架共有序列在第 71、73 和 / 或 78 位包含取代。在这些抗体的一个实施方案中,第 71 位是 A,第 73 位是 T,和 / 或第 78 位是 A。在这些抗体的一个实施方案中,这些抗体还包含人 κ I 轻链构架共有序列。

[0193] 在一个实施方案中,本发明的抗 c-met 抗体包含变体 HVR-H2,其中 E14 是 T、E15 是 K、和 E17 是 E。在一个实施方案中,本发明的抗体包含变体 HVR-H2,其中 E17 是 E。在一些实施方案中,所述变体 HVR-H2 抗体还包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1 和 HVR-H3,其中按顺序每一个分别包含 SEQ ID NOs:49、50、51、52、54 中描述的序列。在一些实施方案中,所述变体 HVR-H2 抗体还包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1 和 HVR-H3,其中按顺序每一个分别包含 SEQ ID NOs:49、50、51、52、55 中描述的序列。在一些实施方案中,所述变体 HVR-H2 抗体还包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1 和 HVR-H3,其中按顺序每一个分别包含 SEQ ID NOs:49、50、51、52、55 中描述的序列。在一些实施方案中,这些抗体还包含人亚类 III 重链构架共有序列。在这些抗体的一个实施方案中,构架共有序列在第 71、73 和 / 或 78 位包含取代。在这些抗体的一个实施方案中,第 71 位是 A,第 73 位是 T,和 / 或第 78 位是 A。在这些抗体的一个实施方案中,这些抗体还包含人 κ I 轻链构架共有序列。

[0194] 适合用于本发明方法的其它抗 c-met 抗体在本领域中已知。

[0195] 在一个方面,抗 c-met 抗体包含至少一个促进抗体片段中 Fc 序列的异源二聚体化,而使其同源二聚体化降到最低的特征。这样的特征提高免疫球蛋白群体的产量和 / 或纯度和 / 或同质性。在一个实施方案中,抗体包含 Fc 突变,所述 Fc 突变构成如 WO2005/063816 中描述的“结”和“洞”。例如,洞突变可以是 Fc 多肽中 T366A、L368A 和 / 或 Y407V 之一或多个,结突变可以是 T366W。本文中另外描述了结和洞 Fc 突变。

[0196] 从基本上同质的抗体的群体(即除了可能以较低数量存在的可能天然突变以外,组成群体的各个抗体是相同的)中获得单克隆抗体。因此,修饰语“单克隆的”表示抗体的特征——该抗体不是无关抗体的混合物。

[0197] 可以使用 Kohler 等, Nature, 256:495 (1975) 首次描述的杂交瘤方法,或通过重组 DNA 方法(美国专利号 4,816,567),制备本发明的单克隆抗体。

[0198] 在杂交瘤方法中,对小鼠或其它合适的宿主动物(例如仓鼠)进行免疫,以诱发生成或能够产生抗体的淋巴细胞,该抗体将与用于免疫的蛋白质特异结合。可以通过多次皮下(sc)或腹腔(ip)注射抗原和免疫佐剂来在动物中刺激生成抗抗原的抗体。可以使用本领域公知的方法制备抗原,本文中进一步描述了其中的一些。例如,下文描述了重组产生人和小鼠抗原。在一个实施方案中,与免疫球蛋白重链的 Fc 部分融合的抗原免疫动物。在优选的实施方案中,以抗原-IgG1 融合蛋白免疫动物。通常用抗原与单磷脂酰 A (MPL)/海藻糖 dicrynomycolate (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) 的免疫原缀合物或衍生物对动物进行免疫,将溶液在多个位点进行皮内注射。两周后,对动物进行加强。7 至 14 天后,对动物进行采血,将血清进行抗体滴度测定。对动物进行加强直到滴度达平台。

[0199] 备选地,可以在体外免疫淋巴细胞。然后使用合适的融合剂(例如,聚乙二醇),将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 等 59-103 页 (Academic 出版社, 1986))。

[0200] 将这样制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中铺种和生长,所述培养基优选包含一种或多种抑制未融合的、亲本骨髓瘤细胞生长或生存的物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HGPRT 或 HPRT),用于杂交瘤的培养基一般将包含次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶 (HAT 培养基),这些物质阻止 HGPRT 缺陷细胞的生长。

[0201] 优选的骨髓瘤细胞是那些有效融合、支持所选择的抗体生产细胞稳定高水平产生抗体的、并对培养基例如 HAT 培养基敏感的骨髓瘤细胞。在它们中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系,例如来自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的骨髓瘤细胞系(可从 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA 获得),和 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞(可从美国典型培养物保藏中心 American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA 获得)。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已被描述用于产生人单克隆抗体(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0202] 测定培养杂交瘤细胞的培养基中针对抗原的单克隆抗体的产生。优选地,通过免疫沉淀反应,或通过体外结合测定,例如放射性免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA),测定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0203] 可以例如通过 Munson 等, *Anal. Biochem.*, 107:220(1980) 的 Scatchard 分析, 测定单克隆抗体的结合亲和力。

[0204] 鉴定出产生期望特异性、亲和力和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后, 可以通过有限稀释程序对克隆进行亚克隆和通过标准的方法进行培养 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第 59-103 页 (Academic 出版社, 1986))。用于此目的合适的培养基包括, 例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外, 可以在动物中作为腹水肿瘤, 在体内培养杂交瘤细胞。

[0205] 通过常规的免疫球蛋白纯化程序, 例如蛋白 A 琼脂糖、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱, 从培养基、腹水液或血清中合适地分离由亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0206] 可以通过使用组合文库筛选具有期望活性 (一种或多种) 的合成的抗体克隆, 以制备本发明的抗体。原则上, 通过筛选噬菌体文库来选择合成的抗体克隆, 所述文库包含展示有与噬菌体外壳蛋白融合的各种抗体可变区 (Fv) 片段的噬菌体。通过亲和力色谱, 针对期望的抗原, 淘选这样的噬菌体文库。表达能够与期望抗原结合的 Fv 片段的克隆被吸附到抗原上, 因此与文库中非结合的克隆分开。然后将结合的克隆从抗原上洗脱下来, 可以通过另外的抗原吸附 / 洗脱循环来进一步富集。可以通过设计合适的抗原筛选程序, 选择目的噬菌体克隆, 其后使用来自目的噬菌体克隆的 Fv 序列和描述于 Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 卷 1-3 中的合适的恒定区 (Fc) 序列构建抗体克隆, 以获得本发明的任何抗体。实施例中公开了产生抗体的示例性方法。

[0207] 抗体的抗原结合区由两个约 110 个氨基酸的可变 (V) 区组成, 其中一个可变区来自轻链 (VL), 一个来自重链 (VH), 两者都存在 3 个超变环或互补决定区 (CDRs)。可变区可以在噬菌体上被功能性展示, 或作为单链 Fv (scFv) 片段 (其中 VH 和 VL 通过短的、柔性肽共价连接), 或作为 Fab 片段 (其中 VH 和 VL 每一个与恒定区连接并非共价相互作用, 如 Winter 等, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994) 中描述)。如本文中使用的, 编码 scFv 的噬菌体克隆和编码 Fab 的噬菌体克隆被统一称为“Fv 噬菌体克隆”或“Fv 克隆”。

[0208] 可以通过聚合酶链式反应 (PCR) 分别克隆 VH 和 VL 基因的库, 并在噬菌体文库中随机重组, 然后搜索抗原结合克隆, 如 Winter 等, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994) 中描述。来自免疫来源的文库提供了针对免疫原的高亲和力抗体, 而不需要构建杂交瘤。备选地, 将天然库克隆, 以提供具有针对广泛的非自体 and 自体抗原的人抗体的单一来源, 而不需要任何免疫, 如 Griffiths 等, *EMBO J*, 12:725-734 (1993) 描述。最后, 也可以通过从干细胞克隆未重排的 V 基因片段, 使用包含随机序列的 PCR 引物, 编码高度可变的 CDR3 区和完成体外重排, 从而合成制备天然文库, 如 Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992) 描述。

[0209] 使用丝状噬菌体, 通过与次要外壳蛋白 pIII 融合, 可以展示抗体片段。抗体片段可以作为单链 Fv 片段来展示, 其中 VL 和 VL 区通过柔性多肽间隔子连接在相同的多肽链上, 例如, 如 Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) 所描述; 或可以作为 Fab 片段来展示, 其中一条链与 pIII 融合, 另一条分泌到细菌宿主细胞周质中, 在那里组装为 Fab- 外壳蛋白结构, 其通过置换一些野生型外壳蛋白而展示在噬菌体表面, 例如, 如 Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19:4133-4137 (1991) 中描述。

[0210] 通常,从收获自人或动物的免疫细胞,获得编码抗体基因片段的核酸。如果期望文库偏向于靶向特定抗原的克隆,可以以抗原免疫个体以产生抗体反应,回收脾细胞和 / 或循环 B 细胞和其它外周血淋巴细胞 (PBLs) 用于文库构建。在优选的实施方案中,通过在携带一系列功能性人免疫球蛋白基因 (和缺乏功能性内源抗体产生系统) 的转基因小鼠中产生抗体反应,由此获得偏向于抗原反应性克隆的人抗体基因片段文库,其中在这样的转基因小鼠中抗原免疫将导致产生抗抗原的人抗体的 B 细胞。产人抗体的转基因小鼠的产生描述如下。

[0211] 可以通过使用合适的筛选程序分离表达抗原特异性膜结合抗体的 B 细胞,例如通过以抗原亲和力和色谱分离细胞,或通过将细胞吸附到荧光染料标记的抗原上随后进行流式激活细胞分选 (FACS),额外地富集抗原反应性细胞群体。

[0212] 备选地,可以使用来自未免疫的供体的脾细胞和 / 或 B 细胞或其它 PBLs,更好地代表该可能的抗体库,这也允许使用其中抗原不具有抗原性的任何动物 (人或非人) 物种构建抗体文库。为了构建体外整合抗体基因的文库,可以从个体收获干细胞以提供编码未重排抗体基因片段的核酸。可以从各种动物物种,例如人、小鼠、大鼠、兔、luprine、犬、猫、猪、牛、马、和鸟类物种等中获得目的免疫细胞。

[0213] 从目的细胞中回收编码抗体可变基因片段 (包括 VH 和 VL 片段) 的核酸并进行扩增。在经重排的 VH 和 VL 基因文库的情况下,可以通过从淋巴细胞中分离基因组 DNA 或 mRNA,如 Orlandi 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:3833-3837 (1989) 中描述,随后以与重排的 VH 和 VL 基因的 5' 和 3' 末端匹配的引物进行聚合酶链式反应 (PCR),获得期望的 DNA,由此产生多样 V 基因库用于表达。可以用在编码成熟 V 区的外显子的 5' 端的反向引物和基于 J 片段的正向引物,从 cDNA 和基因组 DNA 中扩增 V 基因,如 Orlandi 等 (1989) 和 Ward 等, *Nature*, 341:544-546 (1989) 中描述。然而,对于从 cDNA 进行的扩增,反向引物也可以基于前导外显子,如 Jones 等, *Biotechnol.*, 9:88-89 (1991) 中描述,正向引物基于恒定区,如 Sastry 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:5728-5732 (1989) 中描述。为了使互补最大化,可以在引物中整合简并性,如 Orlandi 等 (1989) 或 Sastry 等 (1989) 中描述。优选地,通过使用靶向每个 V 基因家族的 PCR 引物,使文库的多样性最大化,以扩增存在于免疫细胞核酸样品中的所有可得的 VH 和 VL 排列,例如,如 Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) 的方法中描述,或如 Orum 等, *Nucleic Acids Res.*, 21:4491-4498 (1993) 的方法中描述。为了将扩增的 DNA 克隆到表达载体中,可以在 PCR 引物中引入稀有的限制性位点作为在一端的尾,如 Orlandi 等 (1989) 中描述,或以加尾的引物进行进一步 PCR 扩增,如 Clackson 等, *Nature*, 352:624-628 (1991) 中描述。

[0214] 合成的重排 V 基因的库可以在体外来源于 V 基因片段。大多数人 VH 基因片段已经被克隆和测序 (报告于 Tomlinson 等, *J. Mol. Biol.*, 227:776-798 (1992) 中), 和作图定位 (报告于 Matsuda 等, *Nature Genet.*, 3:88-94 (1993) 中); 以编码多样序列和长度的 H3 环的 PCR 引物,这些克隆的片段 (包括 H1 和 H2 环的所有主要构象) 可用来产生多样 VH 基因库,如 Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992) 中描述。也可以利用集中于单一长度的长 H3 环中的所有序列多样性,产生 VH 库,如 Barbas 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4457-4461 (1992) 中描述。人 V_{κ} 和 V_{λ} 片段已经被克隆和测序 (报告于 Williams 和 Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23:1456-1461 (1993) 中), 其可用于产生合成的

轻链库。基于一系列 VH 和 VL 折叠以及 L3 和 H3 长度,合成的 V 基因库将编码具有相当多的结构多样性的抗体。在扩增 V 基因编码 DNA 后,可以根据 Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388(1992) 的方法,对种系 V 基因片段进行体外重排。

[0215] 可以通过以几种方式将 VH 和 VL 基因库组合在一起,构建抗体片段库。可以将每个库构建在不同的载体中,在体外对这些载体进行重组,例如,如 Hogrefe 等, Gene, 128:119-126(1993) 中描述,或通过组合感染进行体内重组,例如描述于 Waterhouse 等, Nucl. Acids Res., 21:2265-2266(1993) 中的 loxP 系统。体内重组方法利用 Fab 片段的双链特性来克服由大肠杆菌转化效率带来的文库大小的限制。对天然 VH 和 VL 库分别克隆,一个克隆到噬菌粒中,另一个克隆到噬菌体载体中。然后通过对包含噬菌粒的细菌进行噬菌体感染,组合这两个文库,以使每个细胞包含不同的组合和使文库的大小仅受所存在的细胞的数量(约 10^{12} 个克隆)的限制。两个载体均包含体内重组信号,以使 VH 和 VL 基因重组到单个复制子上并共包装到噬菌体病毒粒中。这些巨型文库提供了大量的具有良好亲和力(约 10^{-8} M 的 K_d^{-1}) 的多样抗体。

[0216] 备选地,可以将库相继克隆到相同的载体中,例如,如 Barbas 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982(1991) 中描述,或通过 PCR 组装到一起,然后进行克隆,例如,如 Clackson 等, Nature, 352:624-628(1991) 中描述。PCR 组装也可以用于将 VH 和 VL DNAs 与编码柔性多肽间隔子的 DNA 连接,以形成单链 Fv(scFv) 库。在另一项技术中,使用“细胞内 PCR 组装”,通过 PCR 组合淋巴细胞中的 VH 和 VL 基因,然后克隆所连接的基因的库,如 Embleton 等, Nucl. Acids Res., 20:3831-3837(1992) 中描述。

[0217] 由天然库(自然或合成的)产生的抗体可以具有中度亲和力(约 10^6 至 10^7 M⁻¹ 的 K_d^{-1}),但也可以通过构建第二文库和从中重新选择来体外模拟亲和力成熟,如 Winter 等(1994), 同上引文中描述。例如,可以在 Hawkins 等, J. Mol. Biol., 226:889-896(1992) 的方法中或在 Gram 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580(1992) 的方法中,通过使用易错聚合酶(报告于 Leung 等, Technique, 1:11-15(1989) 中),体外随机引入突变。此外,可以在选择的各单个 Fv 克隆中随机突变一个或多个 CDRs(例如用跨目的 CDR 的携带随机序列的引物进行 PCR),并筛选较高亲和力的克隆,进行亲和力成熟。WO 96/07754(1996 年 3 月 14 日公布)描述了用于在免疫球蛋白轻链的互补决定区中诱导突变来构建轻链基因文库的方法。另一个有效的方法是,将通过噬菌体展示方法选择的 VH 或 VL 区,与获自未免疫供体的天然存在的 V 区变体的库,进行重新组合,并在几轮链改组中筛选较高亲和力,如 Marks 等, Biotechnol., 10:779-783(1992) 中描述。该技术允许产生具有 10^{-9} M 范围亲和力的抗体和抗体片段。

[0218] 可以使用抗原的期望区域的氨基酸序列,设计编码期望靶抗原的核酸序列。

[0219] 可以通过本领域已知的多种方法,制备编码靶抗原的核酸。这些方法包括但不限于通过 Engels 等, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28:716-734(1989) 中描述的任何方法进行的化学合成,例如三酯、亚磷酸酯、亚磷酸酰胺和 H- 磷酸酯方法。在一个实施方案中,在抗原编码 DNA 的设计中使用了表达宿主细胞偏好的密码子。备选地,可以从基因组或 cDNA 文库中分离编码抗原的 DNA。

[0220] 在构建编码抗原的 DNA 分子后,将 DNA 分子与表达载体(例如质粒)中的表达控制序列有效连接,其中控制序列被载体所转化的宿主细胞识别。通常,质粒载体包含来自与

宿主细胞相容的物种的复制和控制序列。载体通常携带复制位点以及能够在转化的细胞中提供表型选择的蛋白质的编码序列。用于在原核和真核宿主细胞中表达的合适的载体在本领域已知,本文进一步描述了一些。可以使用真核生物,例如酵母,或来自多细胞生物(例如哺乳动物)的细胞。

[0221] 可选地,将编码抗原的 DNA 与分泌引导序列有效连接,所述分泌引导序列导致表达产物被宿主细胞分泌到培养基中。分泌引导序列的例子包括 stII、ecotin、lamB、疱疹 GD、lpp、碱性磷酸酶、转化酶和 α 因子。蛋白 A 的 36 个氨基酸的引导序列 (Abrahmsen 等, EMBO J., 4:3901 (1985)) 也适用于本文。

[0222] 以本发明的上述表达或克隆载体转染和优选转化宿主细胞,在常规营养培养基中进行培养,所述培养基酌情改良用于诱导启动子、选择转化体或扩增编码期望序列的基因。

[0223] 转染指宿主细胞摄取表达载体,而不管任何编码序列实际上是否表达。技术人员已知许多转染的方法,例如 CaPO_4 沉淀和电穿孔。通常,当宿主细胞中存在该载体活动的任何迹象时,转染被认为是成功的。用于转染的方法在本领域公知,本文进一步描述了一些。

[0224] 转化意指将 DNA 导入到生物体中,以使 DNA 作为染色体外元件或通过染色体整合而可以复制。根据所使用的宿主细胞,使用适用于该细胞的标准技术进行转化。用于转化的方法在本领域公知,本文进一步描述了一些。

[0225] 可以如 Sambrook 等,同上引文中的一般描述,培养用来产生抗原的原核宿主细胞。

[0226] 可以在各种培养基中培养用来产生抗原的哺乳动物宿主细胞,所述培养基在本领域公知,本文描述了其中一些。

[0227] 在本公开中提及的宿主细胞涵盖体外培养的细胞以及处于宿主动物中的细胞。

[0228] 可以使用本领域公认的方法进行抗原的纯化,本文描述了其中一些。

[0229] 可以将纯化的抗原附着到合适的基质上,所述基质例如琼脂糖球、丙烯酰胺球、玻璃珠、纤维素、各种丙烯酸共聚体、羟基甲基丙烯酸酯凝胶、聚丙烯酸和聚甲基丙烯酸共聚体、尼龙、中性和离子载体等等,用于噬菌体展示克隆的亲和力和色谱分离。可以通过 Methods in Enzymology, 卷 44 (1976) 中描述的方法,将抗原蛋白质附着到基质上。用于将蛋白质配体附着到多糖基质(例如琼脂糖、葡聚糖或纤维素)上的一个普遍使用的技术涉及:以卤化氰活化载体,随后将肽配体的脂肪族或芳族伯胺与活化的基质偶联。

[0230] 备选地,可以使用抗原包被吸附平板的孔,在附于吸附平板上的宿主细胞上表达、或用于细胞分选,或与生物素缀合用于以链霉亲和素包被珠进行捕获、或用于任何其它本领域已知的用于噬菌体展示文库淘选的方法。

[0231] 在适于至少一部分噬菌体颗粒与吸附剂结合的条件下,将固定的抗原与噬菌体文库样品接触。通常,选择包括 pH、离子强度、温度等条件以模拟生理条件。洗涤结合在固相上的噬菌体,然后以酸洗脱,例如,如 Barbas 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991) 中描述,或以碱洗脱,例如,如 Marks 等, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) 中描述,或通过抗原竞争洗脱,例如,以与 Clackson 等, Nature, 352:624-628 (1991) 的抗原竞争方法类似的程序。在单轮选择中,可以将噬菌体富集 20-1,000 倍。此外,富集的噬菌体可以在细菌培养基上生长和对其再进行选择循环。

[0232] 选择的效率取决于许多因素,包括洗涤期间解离的动力学,以及单个噬菌体上的多个抗体片段是否能够同时与抗原结合。可以通过采用短时间的洗涤、多价噬菌体展示、和固相中抗原的高包被密度,保留具有快解离动力学(和弱结合亲和力)的抗体。高密度不仅可以通过多价相互作用稳定噬菌体,而且利于已解离的噬菌体的再结合。可以通过使用长时间洗涤和单价噬菌体展示(如 Bass 等, *Proteins*, 8:309-314(1990) 和 WO 92/09690 中描述),和抗原的低包被密度(如 Marks 等, *Biotechnol.*, 10:779-783(1992) 中描述),促进具有慢的解离动力学(和良好结合亲和力)的抗体的选择。

[0233] 可以在针对抗原具有不同亲和力,甚至具有微小差异亲和力,的噬菌体抗体之间进行选择。然而,所选择的抗体的随机突变(例如,如在一些上述亲和力成熟技术中进行的)可能导致许多突变体,其大多数与抗原结合,少数具有更高的亲和力。使用有限的抗原,可以将非常高亲和力的噬菌体竞争出来。为了保留所有较高亲和力的突变体,可以将噬菌体与过量的生物素化抗原进行孵育,但其中该生物素化抗原的摩尔浓度低于针对抗原的目标摩尔亲和力常数。然后,可以用链霉亲和素包被的顺磁珠捕获高亲和力结合的噬菌体。这样的“平衡捕获”允许根据抗体的结合亲和力来选择抗体,该方法的灵敏性允许从大大过量的较低亲和力噬菌体中分离出亲和力高至少 2 倍的突变体克隆。也可以操纵用于洗涤结合到固相上的噬菌体的条件,以根据解离动力学来进行区分。

[0234] 可以对抗体克隆进行活性选择。可以通过下列方式选择对应于这样的抗体的 Fv 克隆:(1) 从如上所述的噬菌体文库中分离抗体克隆,任选地通过在合适的细菌宿主中扩大该分离的噬菌体克隆群体,而扩增该群体;(2) 选择抗原和第二蛋白质,其中针对该抗原和第二蛋白质,分别期望获得阻断活性和非阻断活性;(3) 将抗原结合性噬菌体克隆吸附到固定的抗原上;(4) 使用过量的第二蛋白质洗脱任何不需要的克隆,所述克隆识别与第二蛋白质的结合决定簇重叠或相同的抗原决定簇;和(5) 洗脱步骤(4) 后保持吸附的克隆。可选地,可以通过将此处描述的选择程序重复一次或多次来进一步富集具有期望的阻断/非阻断特性的克隆。

[0235] 编码本发明的杂交瘤来源的单克隆抗体或噬菌体展示 Fv 克隆的 DNA,可以使用常规程序容易地分离和测序(例如,通过使用设计以从杂交瘤或噬菌体 DNA 模板中特异扩增目的重链和轻链编码区的寡核苷酸引物)。一旦分离后,可以将 DNA 置于表达载体中,然后将表达载体转染到原本不产生免疫球蛋白的宿主细胞中,例如大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞或骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中合成期望的单克隆抗体。关于编码抗体的 DNA 在细菌中重组表达的综述文章包括 Skerra 等, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256(1993) 和 Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151(1992)。

[0236] 可以将本发明的编码 Fv 克隆的 DNA 与已知的编码重链和/或轻链恒定区的 DNA 序列(例如,可以从 Kabat 等,同上引文中得到的合适的 DNA 序列)组合,以形成编码全长或部分长度重链和/或轻链的克隆。应理解的是,可以将任何同种型的恒定区(包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE) 用于该目的,并且这样的恒定区可以来自任何人或动物物种。可以将来自一种动物(例如人)物种的可变区 DNA 的 Fv 克隆与另一种动物物种的恒定区 DNA 融合,形成“杂种”全长重链和/或轻链的编码序列,这包括在如本文中使用的定义“嵌合的”和“杂种”抗体中。在优选的实施方案中,将来自人可变 DNA 的 Fv 克隆与人恒定区 DNA 融合,形成全人的、全长或部分长度的重链和/或轻链的编码序列。

[0237] 也可以例如,通过以人重链和轻链恒定区的编码序列替代来自杂交瘤克隆的同源鼠序列(例如,如Morrison等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)的方法中),对编码来自本发明杂交瘤的抗体的DNA进行修饰。对于编码杂交瘤或Fv克隆来源的抗体或片段的DNA,还可以通过将该免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列共价连接,进行另外的修饰。通过该方式,可以制备具有本发明的Fv克隆或杂交瘤克隆来源的抗体的结合特异性的“嵌合的”或“杂种”抗体。

[0238] 抗原特异性

[0239] 本发明适用于具有任何合适抗原结合特异性的抗体。优选地,本发明的抗体对抗原特异,所述抗原是生物学重要的多肽。更优选地,本发明的抗体可以用于在动物中治疗或诊断疾病或病症。治疗性抗体的非限定性例子包括抗VEGF、抗c-met、抗IgE、抗CD11、抗CD18、抗CD40、抗组织因子(TF)、抗HER2和抗TrkC抗体。也涉及针对非多肽抗原(例如肿瘤相关糖脂抗原)的抗体。

[0240] 当抗原是多肽时,其可以是跨膜分子(例如,受体,例如受体酪氨酸激酶),或是配体,例如生长因子。示例性抗原包括分子,例如肾素;生长激素,包括人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺素;促甲状腺激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素A链;胰岛素B链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;黄体生成素;胰高血糖素;凝血因子,例如VIII因子、IX因子、组织因子(TF)和von Willebrands因子;抗凝血因子,例如蛋白C;心房利钠因子;肺表面活性剂;纤溶酶原激活物,例如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活物(t-PA);铃蟾肽;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子 α 和 β ;脑啡肽;RANTES(受激活调节正常T细胞表达和分泌的因子);人巨噬细胞炎症蛋白(MIP-1- α);血清白蛋白,例如人血清白蛋白;苗勒氏(Muellerian)抑制物;松弛素A链;松弛素B链;松弛素原;小鼠促性腺激素相关肽;微生物蛋白,例如 β 内酰胺酶;DNA酶;IgE;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA),例如CTLA-4;抑制素;活化素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子的受体;蛋白A或D;类风湿因子;神经营养因子,例如骨源神经营养因子(BDNF),神经营养素-3、-4、-5或-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6),或神经生长因子,例如NGF β ;血小板源生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子,例如aFGF和bFGF;表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF),例如TGF- α 和TGF- β ,包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4或TGF- β 5;胰岛素样生长因子-I和-II(IGF-I和IGF-II);des(I-3)-IGF-I(脑IGF-I),胰岛素样生长因子结合蛋白;CD蛋白,例如CD-3、CD-4、CD-8、CD-19、CD20和CD40;红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态生成蛋白(BMP);干扰素,例如干扰素- α 、- β 、和- γ ;集落刺激因子(CSFs),例如M-CSF、GM-CSF和G-CSF;白细胞介素(ILs),例如IL-1至IL-10;超氧化物歧化酶;T细胞受体;表面膜蛋白;促衰变因子;病毒抗原,例如AIDS包膜的一部分;转运蛋白;归巢受体;地址素;调控蛋白;整联蛋白,例如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM;肿瘤相关抗原,例如HER2、HER3或HER4受体;以及任何以上所列多肽的片段。

[0241] 本发明包括的抗体的示例性抗原包括CD蛋白,例如CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD34和CD46;ErbB受体家族的成员,例如EGF受体、HER2、HER3或HER4受体;细胞粘着分子,例如LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、 α 4/ β 7整联蛋白,和 α v/ β 3整联蛋白,包括其 α 或 β 亚基(例如,抗CD11a、抗CD18或抗CD11b抗体);生长因子,例如VEGF;组织因子(TF);TGF- β α 干扰素(α -IFN);白细胞介素,例如IL-8;IgE;血型抗原Apo2;

死亡受体 ; flk2/flt3 受体 ; 肥胖 (OB) 受体 ; mpl 受体 ; CTLA-4 ; 蛋白 C 等。在一些实施方案中,本发明的抗体结合 (在一些实施方案中,特异性结合) c-met。

[0242] 抗体片段

[0243] 本发明涵盖抗体片段。在某种情况下,使用抗体片段而不是整个抗体是具有优势的。较小的片段大小允许快速清除,和可以导致更好地接近实体瘤。

[0244] 已开发出各种用于产生抗体片段的技术。传统上,这些片段源于完整抗体的蛋白水解消化 (见例如, Morimoto 等, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117(1992) ; 和 Brennan 等, *Science*, 229:81(1985))。然而,这些片段现在可以直接由重组宿主细胞产生。Fab、Fv 和 ScFv 抗体片段都可以在大肠杆菌中表达并从中分泌,由此允许容易地产生大量的这些片段。可以从以上讨论的抗体噬菌体文库中分离抗体片段。可选地,可以从大肠杆菌中直接回收 Fab' -SH 片段并进行化学偶联形成 F(ab')₂ 片段 (Carter 等, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。根据另一种方法,可以直接从重组宿主细胞培养物中分离 F(ab')₂ 片段。包含挽救受体结合表位残基的具有增加的体内半衰期的 Fab 和 F(ab')₂ 片段描述于美国专利号 5,869,046 中。用于产生抗体片段的其它技术对技术人员将是显而易见的。在其它实施方案中,所选择的抗体是单链 Fv 片段 (scFv) (见例如, W0 93/16185 ; 美国专利号 5,571,894 和 5,587,458)。Fv 和 sFv 是具有完整结合位点但缺乏恒定区的抗体种类 ; 因此,它们适合于在体内使用时降低非特异性结合。可以构建 sFv 融合蛋白,产生效应子蛋白在 sFv 的氨基或羧基端的融合。见《抗体工程》(Antibody Engineering), Borrebaeck 编辑, 同上。抗体片段也可以是“线性抗体”,例如,如例如美国专利号 5,641,870 中描述的。这样的线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0245] 因此,在一些实施方案中,抗 c-met 抗体是包含 Fc 区的单臂抗体 (即,重链可变区和轻链可变区形成单个抗原结合臂),其中 Fc 区包含第一和第二 Fc 多肽,其中第一和第二 Fc 多肽以复合物形式存在,形成与包含所述抗原结合臂的 Fab 分子相比较增加所述抗体片段稳定性的 Fc 区。本文中进一步描述了单臂抗体。

[0246] 人源化抗体

[0247] 本发明涵盖人源化抗体。本领域已知用于人源化非人抗体的各种方法。例如,人源化抗体可以具有从非人来源引入到其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其一般取自“输入”可变区。可以基本上按照 Winter 及其同事的方法 (Jones 等 (1986) *Nature* 321:522-525 ; Riechmann 等 (1988) *Nature* 332:323-327 ; Verhoeyen 等 (1988) *Science* 239:1534-1536), 通过用超变区序列替代相应的人抗体序列来进行人源化。因此,这样的“人源化的”抗体是嵌合抗体 (美国专利号 4,816,567), 其中显著不足完整的人可变区已经被来自非人物种的相应序列取代。实践中,人源化抗体一般是人抗体,其中一些超变区残基和可能一些 FR 残基被来自啮齿类动物抗体中类似位点的残基取代。

[0248] 选择人可变区 (轻链和重链) 用于制备人源化抗体,对降低抗原性非常重要。根据所谓的“最佳配合” (best-fit) 方法,将啮齿类动物抗体的可变区的序列,相对于已知的人可变区序列的文库进行筛选。然后将与啮齿类动物最接近的人序列接受为用于人源化抗体的人构架 (Sims 等, (1993) *J. Immunol.* 151:2296 ; Chothia 等, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901)。另一个方法使用特定的构架,所述构架来自特定轻链或重链亚类的所有人

抗体的共有序列。该相同的构架可以用于几种不同的人源化抗体 (Carter 等, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 ;Presta 等, (1993) *J. Immunol.*, 151:2623)。

[0249] 另外重要的是,人源化抗体保留对抗原的高亲和力和其它有利的生物学特性。为了实现该目标,根据一种方法,对亲本序列和各种人源化概念产物,使用该亲本和人源化序列的三维模型进行分析,由此制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是通常可得,并为本领域技术人员所熟悉。可以得到用于描述和展示所选的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。通过检查这些展示,可以分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用,即分析能够影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。通过这种方式,可以选择 FR 残基,将其与受体和输入序列组合,以获得期望的抗体特性,例如对靶标抗原(一种或多种)的增加的亲和力。通常,超变区残基直接和最显著地参与影响抗原结合。

[0250] 人抗体

[0251] 可以通过将选自人源噬菌体展示文库的 Fv 克隆可变区序列与上述已知的人恒定区序列结合,构建本发明的人抗体。可选地,可以通过杂交瘤方法制备本发明的人单克隆抗体。用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂种杂交瘤 (heteromyloma) 细胞系已由例如 Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001(1984) ;Brodeur 等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) ;和 Boerner 等, *J. Immunol.*, 147:86(1991) 描述。

[0252] 现在可以产生这样的转基因动物(例如,小鼠),其经免疫后能够在不产生内源免疫球蛋白的情况下产生完整的人抗体库。例如,已有描述,嵌合和胚系突变体小鼠中抗体重链连接区 (JH) 基因的纯合缺失将导致内源抗体产生被完全抑制。在这样的胚系突变体小鼠中转移人胚系免疫球蛋白基因系列,将导致在抗原攻击后产生人抗体。见例如, Jakobovits 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551(1993) ;Jakobovits 等, *Nature*, 362:255(1993) ;Bruggermann 等, *Year in Immunol.*, 7:33(1993)。

[0253] 也可以使用基因改组,从非人(例如,啮齿类动物)抗体衍生出人抗体,其中人抗体具有与初始非人抗体类似的亲和力和特异性。根据该方法(其也被称为“表位印记”),以人 V 区基因的库取代通过如上所述的噬菌体展示技术获得的非人抗体片段的重链或轻链可变区,创建非人链/人链 scFv 或 Fab 嵌合体的群体。以抗原进行选择,导致分离非人链/人链嵌合 scFv 或 Fab,其中人链恢复了在最初噬菌体展示克隆中对应的非人链移去后被破坏的抗原结合位点,即表位控制(印记)人链伙伴的选择。当重复该过程以取代剩下的非人链后,获得人抗体(见 PCT WO 93/06213, 公布于 1993 年 4 月 1 日)。与传统的通过 CDR 嫁接进行的非人抗体的人源化不同,该技术提供完全的人抗体,其没有非人来源的 FR 或 CDR 残基。

[0254] 双特异性抗体

[0255] 双特异性抗体是具有对至少两个不同抗原的结合特异性的单克隆、优选人或人源化、抗体。在该情况中,一个结合特异性可以针对抗原,另一个可以针对任何其它抗原。示例性的双特异性抗体可以结合抗原的两个不同的表位。双特异性抗体也可以用于将细胞毒性剂定位至表达抗原的细胞。这些抗体拥有抗原结合臂和结合细胞毒素药物(例如,皂草毒蛋白、抗干扰素 α 、长春花生物碱、蓖麻蛋白 A 链、氨甲蝶呤或放射性同位素半抗原)的臂。双特异性抗体可以作为全长抗体或抗体片段(例如, $F(ab')_2$ 双特异性抗体)来制备。

[0256] 用于制备双特异性抗体的方法在本领域已知。传统上,重组产生双特异性抗体是基于共表达两对免疫球蛋白重链-轻链,其中两个重链具有不同的特异性(Milstein 和 Cuello, *Nature*, 305:537(1983))。因为免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(quadromas)产生潜在的 10 种不同抗体分子的混合物,其中仅一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化(通常通过亲和力和色谱步骤)相当困难,产物产率低。类似的程序公开于 WO 93/08829(1993 年 5 月 13 日公布),和于 Traunecker 等, *EMBO J.*, 10:3655(1991) 中。

[0257] 根据一种不同的更优选的方法,将具有期望结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。优选与包含至少部分铰链、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定区融合。优选于至少一个融合物中存在包含轻链结合所需位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合体和,如果期望的话,免疫球蛋白轻链的 DNA,插入到分开的表达载体中,并共转染到合适的宿主生物中。对于在构建中使用不等比率的 3 种多肽链提供最优产量的实施方案,这使得可以极大灵活性地调整 3 种多肽片段的相互比例。然而,当以相等比率表达至少两种多肽链可以导致高产,或当比率不是特别重要时,可以在一个表达载体中插入两种或所有 3 种多肽链的编码序列。

[0258] 在该方法的优选实施方案中,双特异性抗体由在一个臂中的具有第一结合特异性的杂种免疫球蛋白重链和在另一个臂中的杂种免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。已发现,该不对称结构利于期望的双特异性化合物从不需要的免疫球蛋白链组合中分离,这是因为免疫球蛋白轻链在双特异性分子的仅一半中存在,这提供了一种便利的分离方式。该方法公开于 WO 94/04690 中。产生双特异性抗体的更详细说明,见例如 Suresh 等, *Methods in Enzymology*, 121:210(1986)。

[0259] 根据另一种方法,可以对一对抗体分子之间的界面进行改造,以使从重组细胞培养物中回收的异源二聚体的百分比达到最大。优选的界面包含抗体恒定区的至少一部分 C_H3 结构域。在该方法中,以较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)(结或突起)取代来自第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸侧链。在第二抗体分子的界面上产生与该大的侧链具有相同或相似大小的互补性“腔”(洞),方式是以较小的氨基酸(例如,丙氨酸或苏氨酸)取代大的氨基酸侧链。这提供了用于增加异源二聚体产量、使之超过例如同源二聚体等其它不需要的终产物的机制。本文中进一步描述了结和洞。

[0260] 双特异性抗体包括交联的或“杂缀合”抗体。例如,杂缀合体中的抗体之一可以与亲和素蛋白偶联,另一个与生物素连接。这样的抗体已经例如被建议用来将免疫系统细胞靶向不需要的细胞(美国专利号 4,676,980),和用于治疗 HIV 感染(WO 91/00360、WO 92/00373 和 EP 03089)。可以使用任何方便的交联方法制备杂缀合体抗体。合适的交联剂在本领域公知,其与许多交联技术一同公开于美国专利号 4,676,980 中。

[0261] 用于从抗体片段产生双特异性抗体的技术也已在文献中得到描述。例如,可以使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan 等, *Science*, 229:81(1985) 描述了其中将完整抗体进行蛋白酶水解切割以产生 F(ab')₂ 片段的程序。以二硫醇络合剂亚砷酸钠将这些片段还原,以稳定邻近的二硫醇和防止分子间二硫化物形成。然后,将所产生的 Fab' 片段转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后,通过以巯基乙胺进行还原,将 Fab'-TNB 衍生物之一再转化为 Fab'-巯基化合物,并与等摩尔量的另一 Fab'-TNB 衍生物混合,以形

成双特异性抗体。所产生的双特异性抗体可以用作选择性固定化酶的试剂。

[0262] 最近的进展使从大肠杆菌中直接回收 Fab' -SH 片段变得容易,可以对所述片段进行化学偶联,以形成双特异性抗体。Shalaby 等, J. Exp. Med., 175:217-225(1992) 描述了完全人源化的双特异性抗体 F(ab')₂ 分子的产生。每个 Fab' 片段分别从大肠杆菌中分泌,对其进行直接的体外化学偶联,以形成双特异性抗体。由此形成的双特异性抗体能够与过量表达 HER2 受体的细胞和正常的人 T 细胞结合,以及引发人细胞毒性淋巴细胞对人乳房瘤靶标的溶解活性。

[0263] 用于制备和直接从重组细胞培养物中分离双特异性抗体片段的各种技术也已被描述。例如,已使用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体。Kostelny 等, J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992)。通过基因融合,将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽与两个不同抗体的 Fab' 部分连接。在铰链区还原抗体同源二聚体以形成单体,然后重现氧化以形成抗体异源二聚体。该方法也可以用于产生抗体同源二聚体。由 Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993) 描述的“双抗体”(diabody) 技术提供了可以用于制备双特异性抗体片段的一个备选机制。该片段包含通过接头与轻链可变区 (VL) 连接的重链可变区 (VH), 所述接头太短而不允许在相同链上的这两个区域配对。因此,一个片段的 VH 和 VL 区被迫与另一个片段的互补 VL 和 VH 区配对,由此形成两个抗原结合位点。通过使用单链 Fv (sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的另一个策略也已被报道。见 Gruber 等, J. Immunol., 152:5368(1994)。

[0264] 也可以考虑具有两个以上效价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tutt 等, J. Immunol. 147:60(1991)。

[0265] 多价抗体

[0266] 多价抗体可以比双价抗体更快地被表达抗体所结合的抗原的细胞内化(和/或分解代谢)。本发明的抗体可以是具有 3 个或更多抗原结合位点的多价抗体(其非 IgM 类)(例如,四价抗体),其可以通过重组表达编码抗体的多肽链的核酸来容易地产生。多价抗体可以包含二聚化区和 3 个或多个抗原结合位点。优选的二聚化区包括 Fc 区或铰链区(或由其组成)。在该情况下,抗体将包含 Fc 区和位于 Fc 区氨基末端的 3 个或更多个抗原结合位点。本文中优选的多价抗体包含 3 个至约 8 个,但优选 4 个抗原结合位点(或由其组成)。多价抗体包含至少一个多肽链(优选两个多肽链),其中该(一个或多个)多肽链包含两个或更多个可变区。例如,多肽链(一个或多个)可以包含 VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, 其中 VD1 是第一可变区,VD2 是第二可变区,Fc 是 Fc 区的一个多肽链,X1 和 X2 代表氨基酸或多肽,n 为 0 或 1。例如,多肽链(一个或多个)可以包括:VH-CH1-柔性接头-VH-CH1-Fc 区链;或 VH-CH1-VH-CH1-Fc 区链。本文中多价抗体优选还包含至少两个(优选 4 个)轻链可变区多肽。本文中的多价抗体可以,例如包含约 2 至约 8 个轻链可变区多肽。这里涉及的轻链可变区多肽包含轻链可变区和任选地还包含 CL 区。

[0267] 抗体变体

[0268] 在一些实施方案中,涉及本文中描述的抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能期望改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。通过将适当的核苷酸改变引入到抗体核酸中,或通过肽合成,可以制备抗体的氨基酸序列变体。这样的修饰包括,例如在抗体的氨基酸序列中删除、和/或插入,和/或取代残基。可以进行任何组合的删除、插入和取代,以获

得最终构建体,条件是最终构建体拥有期望的特性。可以在产生序列时在对象抗体氨基酸序列中引入氨基酸改变。

[0269] 用于鉴定抗体中可以作为优选诱变位置的某些残基或区域的一种有用方法,称为“丙氨酸扫描诱变”,如由 Cunningham 和 Wells(1989)Science, 244:1081-1085 所描述。在此,鉴定一个目标残基或一组目标残基(例如,带电荷残基,例如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸),并以中性或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或多聚丙氨酸)进行取代,以影响这些氨基酸与抗原的相互作用。然后通过取代位点或针对取代位点引入另外的或其它变体,精细化显示出对取代具有功能敏感性的那些氨基酸位置。因此,尽管预先确定用于引入氨基酸序列变化的位点,但突变的性质本身不需要预先确定。例如,为了分析给定位点上突变的性能,在目标密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机诱变,对表达的免疫球蛋白筛选期望的活性。

[0270] 氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基末端融合(其长度范围从一个残基到包含一百或更多个残基的多肽),以及序列内部单个或多个氨基酸残基的插入。末端插入的例子包括具有 N 末端甲硫氨酸残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的 N 或 C 末端与酶(例如,对于 ADEPT)或增加抗体的血清半衰期的多肽融合。

[0271] 多肽的糖基化一般是 N-连接的或 O-连接的。N-连接的指将糖部分连接到天冬酰胺残基的侧链上。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中 X 是除了脯氨酸以外的任何氨基酸)是用于糖部分酶促附加到天冬酰胺侧链的识别序列。因此,多肽中这些三肽序列之任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指糖 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一连接到羟基氨基酸上,最通常地是丝氨酸或苏氨酸上,尽管也可以使用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸。

[0272] 通过改变氨基酸序列以使其包含一个或多个上述三肽序列,可以方便地实现对抗体添加糖基化位点(用于 N-连接的糖基化位点)。也可以通过在原抗体的序列中添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基(或以其进行取代),进行改变(对于 O-连接的糖基化位点)。

[0273] 在抗体包含 Fc 区时,可以改变与其连接的糖。例如,美国专利申请号 2003/0157108(Presta, L.) 中描述了具有成熟糖结构并且在抗体的 Fc 区缺乏岩藻糖附着的抗体。也见 US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。WO 2003/011878, Jean-Mairet 等, 和美国专利号 6,602,684, Umana 等中提及了在连接于抗体的 Fc 区的糖中具有平分型 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)的抗体。在连接到抗体的 Fc 区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体报告于 WO 1997/30087, Patel 等中。关于具有改变的连接至 Fc 区的糖的抗体,也见 WO 1998/58964(Raju, S.) 和 WO 1999/22764(Raju, S.)。关于具有修饰的糖基化的抗原结合分子,也见 US 2005/0123546(Umana 等)。

[0274] 本文中优选的糖基化变体包含 Fc 区,其中连接到 Fc 区的糖结构缺乏岩藻糖。这样的变体具有改良的 ADCC 功能。可选地,在 Fc 区中还包含进一步提高 ADCC 的一个或多个氨基酸取代,所述取代例如,在 Fc 区的第 298、333 和/或 334 位(Eu 残基编号)的取代。关于“去岩藻糖的”或“岩藻糖缺乏的”抗体的出版物的例子包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;

WO 2003/084570 ;WO 2005/035586 ;WO 2005/035778 ;WO2005/053742 ;Okazaki 等 , J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004) ;Yamane-Ohnuki 等 , Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)。产生去岩藻糖的抗体的细胞系的例子包括蛋白质岩藻糖基化缺陷型 Lec13 CHO 细胞 (Ripka 等 , Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986) ; 美国专利申请号 US 2003/0157108A1, Presta, L ; 和 WO 2004/056312A1, Adams 等 , 特别是于实施例 11 中), 以及敲除细胞系, 例如 α -1, 6- 岩藻糖基转移酶基因 FUT8 敲除 CHO 细胞 (Yamane-Ohnuki 等 , Biotech. Bioeng. 87:614 (2004))。

[0275] 在一个方面, 本发明提供了这样的抗体片段, 其包括至少一个促进抗体片段中 Fc 序列的异源二聚化而将同源二聚化降到最低的特性。这样的特性提高通过如本文中描述的本发明方法可获得的免疫球蛋白群体的产量和 / 或纯度和 / 或同质性。在一个实施方案中, 第一 Fc 多肽和第二 Fc 多肽在界面相遇 / 相互作用。在一些其中第一和第二 Fc 多肽在界面相遇的实施方案中, 第二 Fc 多肽 (序列) 的界面包含突起 (也称为“结”), 所述突起可置于第一 Fc 多肽 (序列) 的界面中的腔 (也称为“洞”) 中。在一个实施方案中, 第一 Fc 多肽已从模板 / 原始多肽改变为编码腔, 或第二 Fc 多肽已从模板 / 原始多肽改变为编码突起, 或两者都发生。在一个实施方案中, 第一 Fc 多肽已从模板 / 原始多肽改变为编码腔, 且第二 Fc 多肽已从模板 / 原始多肽改变为编码突起。在一个实施方案中, 第二 Fc 多肽的界面包含突起, 所述突起可置于第一 Fc 多肽的界面中的腔中, 其中腔或突起或两者是已经被引入到第一和第二 Fc 多肽的界面中的。在一些其中第一和第二 Fc 多肽在界面相遇的实施方案中, 第一 Fc 多肽 (序列) 的界面包含突起, 所述突起可置于第二 Fc 多肽 (序列) 的界面中的腔中。在一个实施方案中, 第二 Fc 多肽已从模板 / 原始多肽改变为编码腔, 或第一 Fc 多肽已从模板 / 原始多肽改变为编码突起, 或两者都发生。在一个实施方案中, 第二 Fc 多肽已从模板 / 原始多肽改变为编码腔, 且第一 Fc 多肽已从模板 / 原始多肽改变为编码突起。在一个实施方案中, 第一 Fc 多肽的界面包含突起, 所述突起可置于第二 Fc 多肽的界面中的腔中, 其中该腔或突起或两者是已经被引入到第一和第二 Fc 多肽的界面中的。

[0276] 在一个实施方案中, 突起和腔各包含天然存在的氨基酸残基。在一个实施方案中, 通过以比原始残基具有更大侧链体积的输入残基, 取代来自模板 / 原始多肽的界面的原始残基, 产生包含突起的 Fc 多肽。在一个实施方案中, 通过包括如下步骤的方法来产生包含突起的 Fc 多肽, 在所述步骤中, 以比原始残基具有更大侧链体积的输入残基的编码多核苷酸, 取代来自所述多肽的界面的原始残基的编码多核苷酸。在一个实施方案中, 原始残基是苏氨酸。在一个实施方案中, 原始残基是 T366。在一个实施方案中, 输入残基是精氨酸 (R)。在一个实施方案中, 输入残基是苯丙氨酸 (F)。在一个实施方案中, 输入残基是酪氨酸 (Y)。在一个实施方案中, 输入残基是色氨酸 (W)。在一个实施方案中, 输入残基是 R、F、Y 或 W。在一个实施方案中, 通过取代模板 / 原始多肽中两个或更多个残基来产生突起。在一个实施方案中, 包含突起的 Fc 多肽包含以色氨酸取代第 366 位苏氨酸, 氨基酸编号按照 Kabat 等 (第 688-696 页, 于 Sequences of proteins of immunological interest, 第 5 版, 卷 1 (1991 ; NIH, Bethesda, MD) 中) 的 EU 编号方案进行。

[0277] 在一些实施方案中, 通过以比原始残基具有较小侧链体积的输入残基, 取代模板 / 原始多肽的界面中的原始残基, 产生包含腔的 Fc 多肽。例如, 通过包括如下步骤的方法来产生包含腔的 Fc 多肽, 在所述步骤中, 以比原始残基具有较小侧链体积的输入残基的编码

多核苷酸,取代来自所述多肽的界面的原始残基的编码多核苷酸。在一个实施方案中,原始残基是苏氨酸。在一个实施方案中,原始残基是亮氨酸。在一个实施方案中,原始残基是酪氨酸。在一个实施方案中,输入残基不是半胱氨酸 (C)。在一个实施方案中,输入残基是丙氨酸 (A)。在一个实施方案中,输入残基是丝氨酸 (S)。在一个实施方案中,输入残基是苏氨酸 (T)。在一个实施方案中,输入残基是缬氨酸 (V)。可以通过取代模板 / 原始多肽中一个或多个原始残基来产生腔。例如,在一个实施方案中,包含腔的 Fc 多肽包含对两个或多个选自丝氨酸、亮氨酸和酪氨酸的原始氨基酸的取代。在一个实施方案中,包含腔的 Fc 多肽包含两个或多个选自丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和缬氨酸的输入残基。在一些实施方案中,包含腔的 Fc 多肽包含对两个或更多个原始氨基酸的取代,所述原始氨基酸选自苏氨酸、亮氨酸和酪氨酸,且其中以选自丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和缬氨酸的输入残基取代所述原始氨基酸。在一些实施方案中,被取代的原始氨基酸是 T366、L368 和 / 或 Y407。在一个实施方案中,包含腔的 Fc 多肽包含以丝氨酸对第 366 位的苏氨酸进行的取代,氨基酸编号按照 Kabat 等, 同上的 EU 编号方案。在一个实施方案中,包含腔的 Fc 多肽包含以丙氨酸对第 368 位的亮氨酸进行的取代,氨基酸编号按照 Kabat 等, 同上的 EU 编号方案进行。在一个实施方案中,包含腔的 Fc 多肽包含以缬氨酸对第 407 位的酪氨酸进行的取代,氨基酸编号按照 Kabat 等, 同上的 EU 编号方案进行。在一个实施方案中,包含腔的 Fc 多肽包含两个或更多个氨基酸取代,所述取代选自 T366S、L368A 和 Y407V,氨基酸编号按照 Kabat 等, 同上的 EU 编号方案进行。在这些抗体片段的一些实施方案中,包含突起的 Fc 多肽包含以色氨酸对第 366 位的苏氨酸进行的取代,氨基酸编号按照 Kabat 等, 同上的 EU 编号方案进行。

[0278] 在一个实施方案中,抗体包含 Fc 突变,所述 Fc 突变构成如 W02005/063816 中描述的“结”和“洞”。例如,洞突变可以是 Fc 多肽中 T366A、L368A 和 / 或 Y407V 之一或多个,结突变可以是 T366W。

[0279] 另一类变体是氨基酸取代变体。这些变体在抗体分子中有至少一个氨基酸 (至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个或更多个) 残基被不同的残基取代。对于取代诱变最有意义的位点包括超变区,但也可以考虑 FR 改变。保守取代示于表 A 中“优选取代”的标题下。如果这样的取代导致生物学活性改变,则可以引入更实质性的改变 (在表 A 中称为“示例性取代”,或如以下在提交氨基酸类别时进一步描述的),并筛选产物。

[0280] 表 A

[0281]

原始残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile

[0282]

Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0283] 抗体生物学特性上的实质性修饰可以通过选择如下取代来进行,所述取代可以在维持 (a) 取代区域中多肽骨架的结构,例如,作为折叠或螺旋构象,(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性,或 (c) 侧链的体积上具有显著不同的影响。根据共同的侧链特性,将天然存在的残基分为以下几类:

[0284] (1) 疏水的: 正亮氨酸, met, ala, val, leu, ile;

[0285] (2) 中性亲水的: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0286] (3) 酸性的: asp, glu;

[0287] (4) 碱性的: his, lys, arg;

[0288] (5) 影响链取向的残基 :gly, pro ;以及

[0289] (6) 芳香族的 :trp, tyr, phe。

[0290] 非保守性取代将需要这些类别之一的成员与另一类别进行交换。

[0291] 一类取代变体涉及取代亲本抗体 (例如, 人源化或人抗体) 的一个或多个超变区残基。通常, 选择用于进一步开发的所得变体, 相对于产生其的亲本抗体来说, 将具有改良的生物学特性。产生这样的取代变体的一种方便途径涉及 :使用噬菌体展示进行的亲和力成熟。简言之, 将几个超变区位点 (例如, 6-7 个位点) 突变, 以在每个位点上产生所有可能的氨基酸取代。由此产生的抗体, 作为与被包装在每个噬菌体颗粒中的 M13 的基因 III 产物的融合体, 从丝状噬菌体颗粒中被展示。然后, 如本文中公开的, 对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性 (例如, 结合亲和力)。为了鉴定用于修饰的候选超变区位点, 可以进行丙氨酸扫描诱变, 以鉴定对抗原结合具有显著贡献的超变区残基。备选地或此外, 可以有利的是, 分析抗原-抗体复合物的晶体结构, 以鉴定抗体和抗原之间的接触点。这样的接触残基和邻近残基是用于根据本文中详细说明的技术进行取代的候选。一旦产生了这样的变体后, 如本文中描述, 筛选该组变体, 可以选择在一个或多个相关测定试验中具有优良特性的抗体用于进一步开发。

[0292] 可以通过本领域已知的各种方法, 制备编码抗体的氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于, 从天然来源 (在天然存在的氨基酸序列变体情况下) 提取, 或通过对抗体的先前制备的变体或非变体形式进行寡核苷酸介导的 (或定点的) 诱变、PCR 诱变和盒诱变来进行制备。

[0293] 可能期望在本发明的免疫球蛋白多肽的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸修饰, 由此产生 Fc 区变体。Fc 区变体可以包含人 Fc 区序列 (例如, 人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区), 所述 Fc 区序列可以在一个或多个氨基酸位置, 包括铰链半胱氨酸的位置, 上包含氨基酸修饰 (例如, 取代)。

[0294] 依照本说明书和本领域的教导, 可以考虑, 在一些实施方案中, 本发明的方法中使用的抗体可以包含一个或多个与野生型对应抗体相比的改变, 例如在 Fc 区。这些抗体与其野生型对应物相比, 仍然保留了基本上相同的治疗用途所需的特性。例如, 据认为可以在 Fc 区中产生某些改变, 所述改变导致改变的 (即, 提高的或降低的) C1q 结合和 / 或补体依赖性细胞毒性 (CDC), 例如, 如 W099/51642 中描述的。关于 Fc 区变体的其它例子, 也见 Duncan 和 Winter Nature 322:738-40 (1988) ;美国专利号 5, 648, 260 ;美国专利号 5, 624, 821 ;和 W094/29351。W000/42072 (Presta) 和 WO 2004/056312 (Lowman) 描述了具有与 FcRs 提高的或减少的结合的抗体变体。将这些专利公布的内容通过参考引用的方式特地并入本文中。也见 Shields 等, J. Biol. Chem. 9 (2) :6591-6604 (2001)。具有增加的半衰期和与新生儿 Fc 受体 (FcRn) 的改善结合 (所述结合负责将母体 IgGs 转移到胎儿中 (Guyer 等, J. Immunol. 117:587 (1976) 和 Kim 等, J. Immunol. 24:249 (1994)) 的抗体, 描述于 US2005/0014934A1 (Hinton 等) 中。这些抗体包含其中具有一个或多个取代的 Fc 区, 所述取代改善了 Fc 区与 FcRn 的结合。具有改变的 Fc 区氨基酸序列和增加的或降低的 C1q 结合能力的多肽变体描述于美国专利号 6, 194, 551B1、W099/51642 中。将这些专利公布的内容通过参考引用的方式特地并入本文中。也见 Idusogie 等, J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)。

[0295] 抗体衍生物

[0296] 可以对本发明的抗体进行另外的修饰,以包含本领域已知和容易获得的额外非蛋白质性部分。优选地,适合于抗体衍生的部分是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限定性例子包括但不限于聚乙二醇 (PEG)、乙二醇 / 丙二醇的共聚物、羟甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二噁烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯 / 马来酸酐共聚物、聚氨基酸 (均聚物或随机共聚物)、和葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷 / 环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇 (例如,丙三醇)、聚乙烯醇,及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性而可以在制造上具有优势。聚合物可以是任何分子量的,和可以是带分支的或无分支的。连接到抗体的聚合物的数量可以变化,如果连接多于一个的聚合物,它们可以是相同的或不同的分子。通常,可以根据一些因素来确定用于衍生的聚合物的数量和 / 或类型,所述因素包括但不限于:待改良的抗体的特定特性或功能、抗体衍生物是否将被用于在限定条件下的治疗等。

[0297] 筛选具有期望特性的抗体

[0298] 可以通过本领域已知的各种测定 (其中一些在本文中公开),对本发明抗体的物理 / 化学特性和生物学功能进行表征。例如,可以通过一系列测定来进一步表征抗体,所述测定包括但不限于 N 末端测序、氨基酸分析、非变性大小排阻高压液相色谱 (HPLC)、质谱、离子交换色谱和木瓜蛋白酶消化。

[0299] 在本发明的某些实施方案中,对本文中产生的抗体进行生物学活性分析。在一些实施方案中,对本发明的抗体进行其抗原结合活性的测试。在本领域已知和可以在本文中使用的抗原结合测定试验非限定地包括使用下列技术进行的任何直接或竞争性结合测定,所述技术例如 western 印迹、放射性免疫测定、ELISA (酶联免疫吸附测定)、“三明治”免疫测定、免疫沉淀测定、荧光免疫测定和蛋白 A 免疫测定。以下实施例部分提供了举例说明性测定试验。

[0300] 载体、宿主细胞和重组方法

[0301] 为了重组产生异源多肽 (例如,抗体),分离其编码核酸,插入到可复制的载体中用于进一步克隆 (DNA 的扩增) 或用于表达。编码多肽 (例如,抗体) 的 DNA 可以容易地使用常规程序分离和测序 (例如,通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。许多载体是可得到的。载体的选择部分地取决于所使用的宿主细胞。通常,优选的宿主细胞是原核生物来源的。应理解的是,可以将任何同种型的恒定区,包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE 恒定区,用于该目的,而且恒定区可以从任何人或动物物种获得。

[0302] a. 使用原核宿主细胞产生抗体:

[0303] i. 载体构建

[0304] 编码本发明多肽 (例如,抗体) 的多肽组分的多核苷酸序列可以使用标准重组技术获得。可以从产生抗体的细胞,例如杂交瘤细胞中分离期望的多核苷酸并对其进行测序。可选地,可以使用核苷酸合成仪或 PCR 技术合成多核苷酸。一旦获得后,将编码多肽的序列插入到能够在原核宿主中复制和表达异源多核苷酸的重组载体中。许多可得到和在本领域已知的载体可用于本发明目的中。合适的载体的选择将主要取决于待插入到载体中的核酸的大小和待以载体转化的特定的宿主细胞。取决于其功能 (异源多核苷酸的扩增或表达,或两者) 和其与所栖居的特定宿主细胞的相容性,每个载体包含各种组分。载体组分通常包括但不限于:复制起点、选择标记基因、启动子、核糖体结合位点 (RBS)、信号序列、异源

核酸插入物和转录终止序列。

[0305] 通常,与宿主一起使用包含来源于该宿主细胞的相容物种的复制子和控制序列的质粒载体。载体通常携带复制位点、以及能够在转化的细胞中提供表型选择的标记序列。例如,一般使用来源于大肠杆菌物种的质粒 pBR322 转化大肠杆菌。pBR322 包含编码氨苄青霉素 (Amp) 和四环素 (Tet) 抗性的基因,由此提供了用于鉴定转化细胞的容易的手段。pBR322、其衍生物或其它微生物质粒或噬菌体也可以包含或经改变后包含可被微生物用来表达内源蛋白质的启动子。可以用于表达特定抗体的 pBR322 衍生物的例子详细描述于 Carter 等,美国专利号 5,648,237 中。

[0306] 此外,包含与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体也可以作为转化载体与这些宿主一起使用。例如,可以利用噬菌体,例如 λ GEM. TM. -11,产生重组载体,所述重组载体可以用来转化易感宿主细胞,例如大肠杆菌 LE392。

[0307] 本发明的表达载体可以包含两个或更多个启动子-顺反子对,分别编码每个多肽组分。启动子是位于顺反子上游(5')的、调节其表达的非翻译调控序列。原核启动子一般分为两类,可诱导的和组成型。可诱导启动子是这样的启动子,其对培养条件的改变,例如营养物的存在或缺乏或温度的改变,作出反应,启动在其控制下的顺反子的增加转录水平。

[0308] 已公开大量可以被多种潜在的宿主细胞识别的启动子。可以通过以限制性酶消化从来源 DNA 中移出启动子和将所分离的启动子序列插入到本发明的载体中,将所选择的启动子与编码轻链或重链的顺反子 DNA 有效连接。天然启动子序列和许多异源启动子都可用于来指导扩增和/或表达靶基因。在一些实施方案中,使用异源启动子,这是因为与天然靶多肽的启动子相比,异源启动子通常允许更强的转录和所表达靶基因的更高产量。

[0309] 适合原核宿主使用的启动子包括 PhoA 启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统,以及杂种启动子,例如 tac 或 trc 启动子。然而,其它在细菌中起作用的启动子(例如,其它已知的细菌或噬菌体启动子)也是合适的。它们的核苷酸序列已经公布,由此技术人员可以使用连接物或接头提供任何需要的限制性位点,将它们与编码靶轻链和重链的顺反子(Siebenlist 等,(1980)Cell 20:269)有效连接。

[0310] 在本发明的一个方面,重组载体中的每个顺反子都包含分泌信号序列组分,所述分泌信号序列组分指导所表达的多肽跨膜转运。通常,信号序列可以是载体的组分,或其可以是插入到载体中的靶多肽 DNA 的一部分。选择用于本发明目的信号序列应该是可以被宿主细胞识别和加工的(即,被信号肽酶切割)。对于不识别和加工异源多肽的天然信号序列的原核宿主细胞,该信号序列用例如选自本发明的信号肽的原核信号序列取代。此外,载体可以包含选自碱性磷酸酶、青霉素酶、Lpp 或热稳定肠毒素 II(STII)引导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA 和 MBP 的信号序列。

[0311] 在本发明的一个方面,一个或多个多核苷酸(例如,表达载体)共同编码单臂抗体。在一个实施方案中,单个多核苷酸编码:(a)单臂抗体的轻链和重链组分,和(b)Fc 多肽。在一个实施方案中,单个多核苷酸编码单臂抗体的轻链和重链组分,而分开的多核苷酸编码 Fc 多肽。在一个实施方案中,由分开的多核苷酸分别编码单臂抗体的轻链组分、单臂抗体的重链组分和 Fc 多肽。单臂抗体的产生描述于,例如 W02005063816 中。

[0312] 适合用于表达本发明抗体的原核宿主细胞包括古细菌(Archaeobacteria)和真细菌(Eubacteria),例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物。有用的细菌的例子包括埃

希氏杆菌属 (*Escherichia*) (例如, 大肠杆菌)、芽孢杆菌属 (*Bacilli*) (例如, 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*))、肠杆菌属 (*Enterobacteria*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种 (例如, 铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*))、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、根瘤菌属 (*Rhizobia*)、透明颤菌属 (*Vitreoscilla*) 或副球菌属 (*Paracoccus*) 细菌。在一个实施方案中, 使用革兰氏阴性细胞。在一个实施方案中, 使用大肠杆菌细胞作为本发明的宿主。大肠杆菌菌株的例子包括菌株 W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, 卷 2 (Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1987), 第 1190-1219 页; ATCC 保藏号 27, 325) 及其衍生物, 包括具有基因型 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR 的菌株 33D3 (美国专利号 5, 639, 635), 和菌株 63C1 与 64B4。其它菌株及其衍生物, 例如大肠杆菌 294 (ATCC 31, 446)、大肠杆菌 B、大肠杆菌 λ 1776 (ATCC 31, 537) 和大肠杆菌 RV308 (ATCC 31, 608) 也是合适的。这些例子是举例说明性的而不是限定性的。用于构建任何具有规定基因型的上述细菌的衍生物的方法在本领域已知和描述于, 例如 Bass 等, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) 中。通常需要考虑复制子在细菌细胞中的可复制性来选择合适的细菌。例如, 当使用熟知的质粒例如 pBR322、pBR325、pACYC177 或 pKN410 提供复制子时, 大肠杆菌、沙雷氏菌、或沙门氏菌物种可以适合用作宿主。一般, 宿主细胞应该分泌最小量的蛋白水解酶, 并且可能期望于细胞培养物中加入额外的蛋白酶抑制剂。

[0313] ii. 抗体生产

[0314] 以上述表达载体转化宿主细胞, 在常规营养培养基中进行培养, 所述培养基酌情改良以用于诱导启动子、选择转化体、或扩增编码期望序列的基因。

[0315] 转化意指将 DNA 引入到原核宿主中, 以使 DNA 可作为染色体外元件或通过染色体整合进行复制。取决于所使用的宿主细胞, 使用适合于该细胞的标准技术进行转化。使用氯化钙进行的钙处理通常用于具有结实细胞壁屏障的细菌细胞。另一个用于转化的方法使用聚乙二醇 /DMSO。可以使用的另一个技术是电穿孔。

[0316] 将用来生产本发明多肽的原核细胞于本领域已知的和适合所选宿主细胞培养的培养基中生长。合适的培养基的例子包括补加必需营养补充物的 Luria 肉汤 (LB)。在一些实施方案中, 培养基也包含基于表达载体的结构选择的选择试剂, 以选择性允许包含表达载体的原核细胞的生长。例如, 将氨苄青霉素添加到培养基中, 用于表达氨苄青霉素抗性基因的细胞的生长。

[0317] 也可以包括除碳、氮和无机磷酸盐源以外的任何必需补充物, 它们以适当浓度单独地或作为与另一种补充物或培养基 (例如复杂氮源) 的混合物引入。可选地, 培养基可以包含一种或多种还原剂, 所述还原剂选自谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、巯基乙酸盐、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇。

[0318] 在合适的温度下培养原核宿主细胞。对于大肠杆菌生长, 例如, 优选温度范围从约 20°C 至约 39°C, 更优选从约 25°C 至约 37°C, 更优选约 30°C。培养基的 pH 可以从约 5 至约 9 的任何 pH, 其主要取决于宿主生物。对于大肠杆菌, pH 优选从约 6.8 至约 7.4, 更优选约 7.0。

[0319] 如果将可诱导启动子用于本发明的表达载体, 则在适合于启动子激活的条件下

诱导蛋白质表达。在本发明的一个方面,使用 PhoA 启动子控制多肽的转录。因此,将转化的宿主细胞在磷酸盐限制性培养基中培养,以进行诱导。优选地,磷酸盐限制性培养基为 C. R. A. P 培养基(见例如,Simmons 等,J. Immunol. Methods(2002), 263:133-147)或 W02002/061090 中描述的培养基。如本领域中已知的,可以根据所使用的载体构建体,使用多种其它诱导物。

[0320] 在一个实施方案中,本发明的表达多肽被分泌到宿主细胞的周质中并从中回收。蛋白质回收一般涉及破坏微生物,通常通过渗透休克、超声或细胞溶解的手段。一旦将细胞破坏后,可以通过离心或过滤,将细胞碎片或完整细胞除去。可以例如通过树脂亲和层析,进一步纯化蛋白质。可选地,可以将蛋白质输送到培养基中并从中分离。可以将细胞从培养基中移出,对培养物上清进行过滤和浓缩,以用于所产生蛋白质的进一步纯化。可以使用通常所知的方法,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和 Western 印迹测定法,进一步分离和鉴定所表达的多肽。

[0321] 在本发明的一个方面,通过发酵方法,大量生产抗体。各种大规模补料分批发酵程序可用于重组蛋白质的生产。大规模发酵具有至少 1000 升的容量,优选约 1,000 至 100,000 升的容量。这些发酵罐使用搅拌叶轮分配氧和营养物,特别是葡萄糖(优选碳/能量源)。小规模发酵通常指在体积容量不大于约 100 升(可以从约 1 升至约 100 升)的发酵罐中进行的发酵。

[0322] 在发酵过程中,一般在细胞已经于合适条件下生长至期望密度(例如,OD550 为约 180-220,在该时期,细胞处于早期静止期)后,开始诱导蛋白质表达。可以根据所使用的载体构建体,如本领域已知和以上所描述,使用各种诱导物。在诱导前,可以使细胞生长较短时间。通常诱导细胞约 12-50 小时,但可以使用更长或更短的诱导时间。

[0323] 为了提高本发明多肽的产量和质量,可以更改各种发酵条件。例如,为了提高所分泌抗体多肽的正确组装和折叠,可以使用另外的过量表达伴侣蛋白,例如 Dsb 蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD 和 / 或 DsbG)或 FkpA(具有分子伴侣活性的肽基脯氨酰顺式,反式-异构酶),的载体,共转化宿主原核细胞。伴侣蛋白已被证明促进细菌宿主细胞中产生的异源蛋白质的正确折叠和可溶性。Chen 等,(1999)J. Biol. Chem. 274:19601-19605; Georgiou 等,美国专利号 6,083,715;Georgiou 等,美国专利号 6,027,888;Bothmann 和 Pluckthun(2000)J. Biol. Chem. 275:17100-17105;Ramm 和 Pluckthun,(2000)J. Biol. Chem. 275:17106-17113;Arie 等,(2001)Mol. Microbiol. 39:199-210。在一些实施方案中,在细菌宿主细胞中表达 DsbA 和 C。

[0324] 为了将所表达的异源蛋白(特别是那些对蛋白水解敏感的异源蛋白)的蛋白水解降到最低,可以将某些蛋白水解酶缺陷型宿主菌株用于本发明。例如,可以对宿主细胞株进行修饰,以使编码已知的细菌蛋白酶的基因产生遗传突变,所述细菌蛋白酶例如蛋白酶 III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶 I、蛋白酶 Mi、蛋白酶 V、蛋白酶 VI 以及它们的组合。可以获得一些大肠杆菌蛋白酶缺陷型菌株,其描述于例如 Joly 等,(1998),同上;Georgiou 等,美国专利号 5,264,365;Georgiou 等,美国专利号 5,508,192;Hara 等,Microbial Drug Resistance, 2:63-72(1996)中。

[0325] 在一个实施方案中,将蛋白水解酶缺陷型和被过量表达一个或多个伴侣蛋白的质粒转化了的大肠杆菌菌株,用作本发明表达系统中的宿主细胞。

[0326] iii. 抗体纯化

[0327] 可以使用本领域已知的标准蛋白质纯化方法。以下程序是合适纯化程序的示例：在免疫亲和或离子交换柱上进行分级分离、乙醇沉淀、反相 HPLC、在硅基上或在阳离子交换树脂（例如 DEAE）上进行层析、色谱聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀，以及使用例如 Sephadex G-75 进行的凝胶过滤。

[0328] 在一个方面，将固定在固相上的蛋白 A 用于本发明抗体产物的免疫亲和纯化。蛋白 A 是来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的 41kD 的细胞壁蛋白，其与抗体的 Fc 区高亲和性结合。Lindmark 等，(1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13。固定蛋白 A 的固相优选是包含玻璃或硅基表面的柱，更优选是受控制的多孔玻璃柱或硅酸柱。在一些应用中，以试剂（例如甘油）包被柱，以阻止污染物的非特异性粘附。

[0329] 作为纯化的第一步，将如上所述的来自细胞培养物的制备物施加到固定了蛋白 A 的固相上，以允许目的抗体与蛋白 A 特异性结合。然后洗涤固相，以除去与固相非特异结合的污染物。最后，通过洗脱，从固相回收目的抗体。

[0330] 免疫缀合物

[0331] 本发明也提供免疫缀合物（可互换地称为“抗体-药物缀合物”或“ADC”），其包括与细胞毒素剂缀合的本文中描述的任何抗体，所述细胞毒素剂例如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素（例如，细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素，或其片段），或放射性同位素（即，放射性缀合物）。

[0332] 当未缀合的药剂的全身给药可能导致不可接受的对正常细胞以及待消灭的肿瘤细胞的毒性水平时，使用抗体-药物缀合物进行细胞毒素剂或细胞抑制剂（即，在癌症治疗中杀死或抑制肿瘤细胞的药物）(Syrigos 和 Epenetos(1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz 和 Springer(1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172; 美国专利号 4,975,278) 的局部给药，将允许药物部分向肿瘤的靶向递送、以及在其中的细胞内积累 (Baldwin 等，(1986) *Lancet* (1986年3月15日): 第603-05页; Thorpe, (1985) “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,” 于 *Monoclonal Antibodies* '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera 等编辑，第475-506页中)。由此寻求具有最低毒性的最大功效。多克隆抗体和单克隆抗体都已被报道用于这些策略 (Rowland 等，(1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。在这些方法中使用的药物包括道诺霉素、阿霉素、氮甲蝶呤和去乙酰长春花碱 (Rowland 等，(1986) 同上)。在抗体-毒素缀合物中使用的毒素包括细菌毒素，例如白喉毒素；植物毒素，例如蓖麻毒素；小分子毒素，例如格尔德霉素 (Mandler 等，(2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler 等，(2000) *Bioorganic&Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler 等，(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)；类美登素 (maytansinoids) (EP 1391213; Liu 等，(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)；和加利车霉素 (calicheamicin) (Lode 等，(1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman 等，(1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)。毒素可以通过机制，包括微管蛋白结合、DNA 结合或拓扑异构酶抑制，实现其细胞毒性和细胞抑制效应。当与大的抗体或蛋白质受体配体缀合时，一些细胞毒性药物倾向失活或活性降低。

[0333] **ZEVALIN®**（替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idec）是

抗体-放射性同位素缀合物,它由通过硫脲接头-螯合剂结合的、靶向在正常和恶性 B 淋巴细胞表面上的 CD20 抗原的鼠 IgG1 κ 单克隆抗体和 ^{111}In 或 ^{90}Y 放射性同位素组成 (Wiseman 等, (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman 等, (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig 等, (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig 等, (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。尽管 ZEVALIN 具有抗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 的活性,但用药导致大多数病人中严重的和长时间的血细胞减少。

[0334] MYLOTARG™ (吉妥单抗 (gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals) 是由与加利车霉素 (calicheamicin) 连接的 hu CD33 抗体组成的抗体药物缀合物,其在 2000 年被批准用于通过注射治疗急性髓性白血病 (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 美国专利号 4,970,198; 5,079,233; 5,585,089; 5,606,040; 5,6937,62; 5,739,116; 5,767,285; 5,773,001)。Cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.) 是由通过二硫化物接头 SPP 与类美登素药物部分 DM1 连接的 huC242 抗体组成的抗体药物缀合物,其进展到临床二期用于治疗表达 CanAg 的癌,例如结肠癌、胰腺癌、胃癌和其它癌。MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.) 是由与类美登素药物部分 DM1 连接的抗前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的单克隆抗体组成的抗体药物缀合物,其正在开发用于前列腺肿瘤的潜在治疗。已经将 auristatin 肽, auristatin E (AE) 和单甲基 auristatin (MMAE), dolastatin 的合成类似物与嵌合单克隆抗体 cBR96 (对癌上的 Lewis Y 特异) 和 cAC10 (对造血系统恶性肿瘤上的 CD30 特异) 缀合 (Doronina 等, (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784), 其处于治疗开发中。

[0335] 本文中描述了用于产生免疫缀合物的化疗剂 (例如,上文中)。可使用的酶促活性毒素及其片段包括白喉 A 链、白喉毒素的非结合性活性片段、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、蒴莲根毒蛋白 II A 链、 α 帚曲霉素、油桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草 (*Saponaire officinalis*) 抑制剂、多花白树毒蛋白 (gelonin)、mitogellin、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin) 和单端孢霉烯类化合物 (tricothecenes)。见例如,于 1993 年 10 月 28 日公布的 WO 93/21232。可得到多种放射性核素用于产生放射性缀合抗体。其例子包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。可以使用多种双官能蛋白偶联试剂,进行抗体和细胞毒素剂的缀合,所述偶联试剂例如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫基)-丙酸酯 (SPDP)、亚氨基四氢噻吩 (iminothiolane (IT))、亚氨酸酯 (imidoesters) 的双官能衍生物 (例如二甲基己二亚氨酸酯 HCl)、活性酯 (例如双琥珀酰亚胺辛二酸酯)、醛 (例如戊二醛)、双叠氮基化合物 (例如双 (对-叠氮苯甲酰基) 己二胺)、双重氮衍生物 (例如双 (对重氮苯甲酰基)-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 1,5-二氟代-2,4-二硝基苯)。例如,可以按 Vitetta 等, Science, 238:1098 (1987) 中的描述,制备蓖麻毒素免疫毒素。碳 14 标记的 1-异硫氰酸基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核素与抗体缀合的代表性螯合剂。见 WO94/11026。

[0336] 本文中也涉及抗体和一个或多个小分子毒素的缀合,所述小分子毒素例如加利车霉素 (calicheamicin)、类美登素 (maytansinoids)、dolastatins、aurostatins、单端孢霉

烯 (trichothecene) 和 CC1065, 以及这些毒素的具有毒素活性的衍生物。

[0337] i. 美登素 (Maytansine) 和类美登素 (maytansinoids)

[0338] 在一些实施方案中, 免疫缀合物包括本发明的抗体 (全长或片段) 与一个或多个类美登素分子的缀合物。

[0339] 类美登素是有丝分裂抑制剂, 其通过抑制微管蛋白的聚合起作用。美登素首先从东非灌木美登木 (*Maytenus serrata*) 中分离出来 (美国专利号 3, 896, 111)。其后, 发现某些微生物也产生类美登素, 例如美登醇 (maytansinol) 和 C-3 美登醇酯 (美国专利号 4, 151, 042)。合成的美登醇及其衍生物和类似物公开于例如美国专利号 4, 137, 230 ; 4, 248, 870 ; 4, 256, 746 ; 4, 260, 608 ; 4, 265, 814 ; 4, 294, 757 ; 4, 307, 016 ; 4, 308, 268 ; 4, 308, 269 ; 4, 309, 428 ; 4, 313, 946 ; 4, 315, 929 ; 4, 317, 821 ; 4, 322, 348 ; 4, 331, 598 ; 4, 361, 650 ; 4, 364, 866 ; 4, 424, 219 ; 4, 450, 254 ; 4, 362, 663 ; 和 4, 371, 533 中。

[0340] 类美登素药物部分是在抗体药物缀合物中具有吸引力的药物部分, 这是因为它们: (i) 通过发酵或化学修饰、发酵产物的衍生化, 相对容易制备, (ii) 易于用适合通过非二硫化物接头与抗体缀合的官能基团进行衍生化, (iii) 在血浆中稳定, 和 (iv) 对多种肿瘤细胞系有效。

[0341] 包含类美登素的免疫缀合物及其制备方法和它们的治疗用途公开于例如美国专利号 5, 208, 020、5, 416, 064 和欧洲专利 EP 0 425 235B1 中, 特此以参考引用的方式将这些公开明确地并入本文。Liu 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996) 描述了包含与靶向人结肠直肠癌的单克隆抗体 C242 连接的称为 DM1 的类美登素的免疫缀合物。该缀合物被发现对培养的结肠癌细胞具有高度细胞毒性, 和在体内肿瘤生长测定中显示出抗肿瘤活性。Chari 等, *Cancer Research* 52:127-131 (1992) 描述了这样的免疫缀合物, 其中类美登素通过二硫化物接头与结合人结肠癌细胞系上的抗原的鼠抗体 A7 缀合, 或与结合 HER-2/neu 癌基因的另一个鼠单克隆抗体 TA. 1 缀合。在体外进行了 TA. 1- 类美登素缀合物对人乳房癌细胞系 SK-BR-3 的细胞毒性测试, 所述细胞系每个细胞表达 3×10^5 HER-2 表面抗原。药物缀合物达到了类似于游离类美登素药物的细胞毒性程度, 该毒性程度可以通过增加每个抗体分子的类美登素分子的数量而得到增加。A7- 类美登素缀合物在小鼠中显示出低的全身细胞毒性。

[0342] 可以通过将抗体与类美登素分子进行化学连接, 制备抗体 - 类美登素缀合物, 不显著降低抗体或类美登素分子的生物学活性。见例如, 美国专利号 5, 208, 020 (特此以参考引用的方式将此公开明确地并入本文)。每个抗体分子缀合平均 3-4 个类美登素分子已经证实在增强靶细胞的细胞毒性上有效而不负面影响抗体的功能或可溶性, 但预期即使一个分子的毒素 / 抗体也可以使细胞毒性增强超过使用裸露抗体。类美登素在本领域公知, 其可通过已知的技术进行合成或从天然来源分离。合适的类美登素公开于例如美国专利号 5, 208, 020 和其他专利以及上述非专利出版物中。优选的类美登素是美登醇和在该类美登醇分子的芳香环中或其它位置上进行过修饰的美登醇类似物, 例如各种美登醇酯。

[0343] 有许多本领域已知的连接基团可以用于制备抗体 - 类美登素缀合物, 包括, 例如那些在美国专利号 5, 208, 020 或欧洲专利 0 425 235B1, Chari 等, *Cancer Research* 52:127-131 (1992) 以及于 2004 年 10 月 8 日申请的美国专利申请号 10/960, 602 中公开的基团, 特此以参考引用的方式将这些公开明确地并入本文。可以按于 2004 年 10 月 8 日申

请的美国专利申请号 10/960,602 中公开的内容,制备包含接头组分 SMCC 的抗体-类美登素缀合物。如上述专利中公开的,连接基团包括二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团、或酯酶不稳定基团,优选二硫化物和硫醚基团。本文中描述和示例了另外的连接基团。

[0344] 可以使用多种双官能蛋白偶联剂,制备抗体和类美登素的缀合物,所述双官能蛋白偶联剂例如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫基)-丙酸酯 (SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯 (SMCC)、亚氨基四氢噻吩 (iminothiolane (IT))、亚氨酸酯 (imidoesters) 的双官能衍生物(例如二甲基己二亚氨酸酯 HCl)、活性酯(例如双琥珀酰亚胺辛二酸酯)、醛(例如戊二醛)、双叠氮基化合物(例如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(例如双(对重氮苯甲酰基)-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 1,5-二氟代-2,4-二硝基苯)。特别优选的偶联剂包括提供二硫键的 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫基)-丙酸酯 (SPDP) (Carlsson 等, *Biochem. J.* 173:723-737 (1978)) 和 N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶硫基)戊酸酯 (SPP)。

[0345] 根据连接的类型,可以将接头连接到类美登素分子的各个位置上。例如,可以使用常规的偶联技术,通过与羟基的反应,可以形成酯连接。该反应可以在具有羟基的 C-3 位置、以羟甲基修饰的 C-14 位置、以羟基修饰的 C-15 位置、和具有羟基的 C-20 位置发生。在优选的实施方案中,该连接在美登醇或美登醇类似物的 C-3 位置形成。

[0346] ii. Auristatins 和 dolastatins

[0347] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含本发明的抗体与 dolastatins 或 dolastatin 肽类似物和衍生物、auristatins(美国专利号 5,635,483 和 5,780,588)的缀合物。已有证据显示 dolastatins 和 auristatins 干扰微管动力学、GTP 水解、和核与细胞的分裂 (Woyke 等 (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584), 其具有抗癌 (美国专利号 5,663,149) 和抗真菌 (Pettit 等, (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965) 活性。dolastatins 或 auristatins 药物部分可以通过该肽药物部分的 N(氨基)末端或 C(羧基)末端,连接到抗体上 (WO 02/088172)。

[0348] 示例性 auristatin 实施方案包括 N 末端连接的单甲基 auristatin 药物部分 DE 和 DF,其公开于“Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands,”(美国系列号 10/983,340,2004 年 11 月 5 日提交)中,特此以参考引用的方式将此公开就其全部明确地并入本文。

[0349] 一般,可以通过在两个或更多个氨基酸和/或肽片段之间形成肽键,来制备基于肽的药物部分。可以例如根据肽化学领域公知的液相合成方法(见 E. **Schröder** 和 K. Lübke, “The Peptides,” 卷 1, 第 76-136 页,1965, Academic 出版社),产生这样的肽键。可以根据美国专利号 5,635,483 和 5,780,588;Pettit 等, (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465;Pettit 等, (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G. R., 等, *Synthesis*, 1996, 719-725; 和 Pettit 等, (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15*:859-863 的方法,制备 auristatin/dolastatin 药物部分。也见 Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784; “Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands,”美国系列号 10/983,340,2004 年 11 月 5 日递交,特此以参考引用的方式就其全部并入本文(公开了例如用于制备与接头缀合的单甲基缬氨酸化合物,例

如 MMAE 和 MMAF 的接头和方法)。

[0350] iii. 加利车霉素 (Calicheamicin)

[0351] 在其它实施方案中,免疫缀合物包含本发明的抗体与一个或多个加利车霉素分子的缀合物。抗生素的加利车霉素家族能够在亚皮摩尔浓度下产生双链 DNA 断裂。加利车霉素家族的缀合物的制备见美国专利号 5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001 和 5,877,296 (均属于 American Cyanamid 公司)。可以使用的加利车霉素的结构类似物包括但不限于 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙酰- γ_1^I 、PSAG 和 θ_1^I (Hinman 等, Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode 等, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) 和上述 American Cyanamid 的美国专利)。抗体可以缀合的另一个抗肿瘤药物是 QFA,它是抗叶酸剂。加利车霉素和 QFA 都具有细胞内作用位点且不容易穿过质膜。因此,细胞通过抗体介导的内化作用吸收这些药剂将大大地增强它们的细胞毒性效应。

[0352] iv. 其它细胞毒素剂

[0353] 其它可以与本发明的抗体缀合的抗肿瘤剂包括 BCNU、streptozotocin、长春新碱 (vincristine) 和 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil)、统称 LL-E33288 复合物的药剂家族 (描述于美国专利号 5,053,394 和 5,770,710 中)、以及 esperamicins (美国专利号 5,877,296)。

[0354] 可使用的酶促活性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 (来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、蒴莲根毒蛋白 II A 链、 α 帚曲霉素、油桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草 (*Saponaire officinalis*) 抑制剂、多花白树毒蛋白 (gelonin)、mitogellin、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin) 和单端孢霉烯类化合物 (tricothecenes)。见例如,1993 年 10 月 28 日公布的 WO 93/21232。

[0355] 本发明还涉及在抗体与具有核酸水解活性的化合物 (例如,核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶,例如脱氧核糖核酸酶;DNA 酶) 之间形成的免疫缀合物。

[0356] 为了选择性破坏肿瘤,抗体可以包含高放射性原子。多种放射性同位素可以用于产生放射性缀合的抗体。例子包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和 Lu 的放射性同位素。当缀合物用于检测时,其可以包含用于闪烁成像研究的放射性原子,例如 Tc^{99m} 或 I^{123} ,或用于核磁共振 (NMR) 成像 (也被称为磁共振成像, MRI) 的自旋标记物,例如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0357] 可以以已知的途径在缀合物中掺入放射性或其它标记物。例如,可以使用合适的氨基酸前体 (其涉及例如以氟-19 替代氢),通过生物合成或通过进行氨基酸化学合成来合成肽。可以通过肽中的半胱氨酸残基来连接标记物例如 Tc^{99m} 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 和 In^{111} 。可以通过赖氨酸残基来连接钆-90。可以使用 IODOGEN 方法 (Frake 等 (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57) 来掺入碘-123。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy” (Chatal, CRC 出版社,1989) 中详细描述了其它方法。

[0358] 可以使用多种双官能蛋白偶联剂,制备抗体和细胞毒素剂的缀合物,所述双官能蛋白偶联剂例如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫基)-丙酸酯 (SPDP)、琥珀酰亚胺

基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亚氨基四氢噻吩(IT)、亚氨酸酯(imidoesters)的双官能衍生物(例如二甲基己二亚氨酸酯HCl)、活性酯(例如双琥珀酰亚胺辛二酸酯)、醛(例如戊二醛)、双叠氮基化合物(例如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(例如双(对重氮苯甲酰基)-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1,5-二氟代-2,4-二硝基苯)。例如,可以按Vitetta等,Science 238:1098(1987)中的描述,制备蓖麻毒素免疫毒素。碳14标记的1-异硫氰酸基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核素与抗体缀合的代表性螯合剂。见W094/11026。接头可以是“可切割的接头”,利于细胞毒素药物在细胞中的释放。例如,可以使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫化物的接头(Chari等,Cancer Research 52:127-131(1992);美国专利号5,208,020)。

[0359] 本发明的化合物明确涉及但不限于以交联剂制备的ADC,所述交联剂为可以从商业获取(例如,从Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., 美国)的BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC、磺基-SMPB、和SVSB(琥珀酰亚胺-(4-乙烯磺)苯甲酸酯)。见2003-2004Applications Handbook and Catalog,第467-498页。

[0360] v. 抗体药物缀合物的制备

[0361] 在本发明的抗体药物缀合物(ADC)中,抗体(Ab)通过接头(L)与一个或多个药物部分(D)缀合,例如每个抗体约1至约20个药物部分。可以使用本领域技术人员已知的有机化学反应、条件和试剂,通过几个途径制备式I的ADC,包括:(1)抗体的亲核基团与二价接头试剂反应,通过共价键形成Ab-L,其后与药物部分D进行反应;和(2)药物部分的亲核基团与二价接头试剂反应,通过共价键形成D-L,其后与抗体的亲核基团反应。本文中描述了另外的用于制备ADC的方法。

[0362] $Ab-(L-D)_p$ I

[0363] 接头可以由一个或多个接头组分组成。代表性接头组分包括6-马来酰亚胺己酰基(“MC”)、马来酰亚胺丙酰基(“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”)、丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”)、对氨基苄氧羰基(“PAB”)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶硫基)-戊酸酯(“SPP”),N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(“SMCC”)和N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰)氨基苯甲酸酯(“SIAB”)。另外的接头组分在本领域已知,本文中描述了一些。也见“Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”,美国系列号10/983,340,2004年11月5日递交,特此以参考引用的方式就其全部内容并入本文。

[0364] 在一些实施方案中,接头可以包含氨基酸残基。示例性氨基酸接头组分包括二肽、三肽、四肽或五肽。示例性二肽包括:缬氨酸-瓜氨酸(vc或val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(af或ala-phe)。示例性三肽包括:甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。氨基酸接头组分包含的氨基酸残基包括那些天然存在的,以及次要氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物,例如瓜氨酸。可以设计氨基酸接头,优化其对特定酶引起的酶促断裂的敏感性,所述酶例如肿瘤相关蛋白酶、catantigen B、C和D,或纤溶酶蛋白酶。

[0365] 抗体上的亲核基团包括但不限于:(i)N末端氨基,(ii)侧链氨基,例如赖氨酸,

(iii) 侧链硫醇基,例如半胱氨酸,和(iv)当抗体被糖基化时,糖的羟基或氨基。氨基、硫醇基和羟基是亲核的,其能够与接头部分和接头试剂上的亲电子基团反应形成共价键,包括:(i) 活性酯,例如 NHS 酯、HOBt 酯、卤甲酸酯、和酰基卤;(ii) 烷基卤和苄基卤,例如卤代乙酰胺类;(iii) 醛、酮、羧基和马来酰亚胺基团。某些抗体具有可还原的链内二硫键,即半胱氨酸桥。通过以还原剂,例如 DTT(二硫苏糖醇)处理,可使抗体具有反应性以与接头试剂进行缀合。理论上,每个半胱氨酸桥将由此形成两个反应性硫醇亲核体。可以通过赖氨酸与 2-亚氨基四氢噻吩(Traut 试剂)的反应,导致胺转化为硫醇,从而将另外的亲核基团引入到抗体中。可以通过引入一个、两个、三个、四个或更多半胱氨酸残基(例如,制备包含一个或多个非天然半胱氨酸氨基酸残基的突变体抗体),将反应性硫醇基团引入到抗体中。

[0366] 也可以通过对抗体进行修饰以引入亲电子部分,产生本发明的抗体药物缀合物,所述亲电子部分能够与接头试剂或药物上的亲核取代基反应。可以例如用高碘酸氧化剂,氧化糖基化抗体的糖,以形成可以与接头试剂或药物部分的氨基反应的醛或酮基。所得到的亚胺 Schiff 碱基团可以形成稳定的连接,或可以被例如硼氢化物试剂还原形成稳定的胺键。在一个实施方案中,糖基化抗体的碳水化合物部分与半乳糖氧化酶或偏过碘酸钠的反应可以在蛋白质中产生羰基(醛和酮)基团,所述羰基基团能够与药物上合适的基团反应(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一个实施方案中,包含 N 末端丝氨酸或苏氨酸残基的蛋白质可以与偏过碘酸钠反应,导致产生醛替代第一个氨基酸(Geoghegan 和 Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146;美国专利号 5,362,852)。这样的醛可以与药物部分或接头亲核体反应。

[0367] 同样,药物部分的亲核基团包括但不限于:能够与接头部分和接头试剂上的亲电子基团反应形成共价键的胺、硫醇、羟基、酰肼、肟、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯、和芳酰肼,所述亲电子基团包括:(i) 活性酯,例如 NHS 酯、HOBt 酯、卤甲酸酯、和酰基卤;(ii) 烷基和苄基卤,例如卤代乙酰胺;(iii) 醛、酮、羧基和马来酰亚胺基团。

[0368] 可选地,可以例如通过重组技术或肽合成,制备包含抗体和细胞毒素剂的融合蛋白。DNA 的长度可以包含编码缀合物的两个部分的相应区域,所述区域可以互相邻近或被编码不破坏缀合物的期望特性的接头肽的区域分隔开。

[0369] 在另一个实施方案中,可以将抗体与“受体”(例如链霉亲和素)缀合用于肿瘤预靶向,其中给个体施用抗体-受体缀合物,随后使用清除剂从血液循环中除去未结合的缀合物,然后施用与细胞毒素剂(例如,放射性核苷酸)缀合的“配体”(例如,抗生物素蛋白)。

[0370] 药物制剂

[0371] 通过将具有期望纯度的异源多肽与可选生理可接受载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版, Osol, A. 编辑(1980))混合,制备异源多肽的治疗性制剂,以水溶液、冻干的或其它干燥制剂的形式,用于贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂是在所使用的剂量和浓度下对接受者非毒性的,其包括缓冲液,例如磷酸盐、柠檬酸盐、组氨酸和其它有机酸;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;氯化己烷双胺;苯扎氯铵;苯索氯铵;苯酚;丁基或苯甲基醇;对羟苯甲酸烷基酯,例如对羟苯甲酸甲基或丙基酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约 10 个残基)多肽;蛋白质,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；单糖，二糖，或其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，例如 EDTA；糖，例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成盐反离子，例如钠；金属络合物（例如，Zn-蛋白质络合物）；和 / 或非离子型表面活性剂，例如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。

[0372] 本文中的制剂也可以包含多于一种为治疗特定适应症所需的活性化合物，优选那些不互相产生不利影响、具有互补活性的化合物。这样的分子适宜以对预期目的有效的量而组合存在。

[0373] 也可以将活性组分截留在微囊中（例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微囊，分别例如羟甲基纤维素或明胶微囊和聚（甲基丙烯酸甲酯）微囊）、在胶态药物递送系统中（例如，脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米粒和纳米囊）、或在粗乳剂中。这样的技术公开于 Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版，Osol, A. 编辑 (1980) 中。

[0374] 用于在体内施用的制剂必须是无菌的。这通过无菌滤膜过滤，容易实现。

[0375] 可以制备缓释制剂。缓释制剂合适的例子包括包含抗体的固相疏水聚合物的半透性基质，其中基质为成形物品的形式，例如薄膜或微囊。缓释基质的例子包括聚酯；水凝胶（例如，聚（2-羟甲基-甲基丙烯酸酯）、或聚乙烯醇；聚乳酸交酯（美国专利号 3,773,919）；L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物；不可降解性乙烯-醋酸乙烯酯；可降解性乳酸-乙醇酸共聚物，例如 LUPRON DEPOT™（可注射微球，由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成）；以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。聚合物例如乙烯-醋酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸可以使分子的释放超过 100 天，而某些水凝胶则在较短时间内释放蛋白质。当包封的抗体长时间在体内保留时，它们可能因为于 37℃ 暴露在潮湿中而变性或聚集，从而导致生物学活性的失去和在免疫原性上可能的改变。可以根据所涉及的机制，设计合理的策略用于稳定。例如，如果发现聚集机制是通过硫-二硫化物间交换而形成分子间 S-S 键，则可以通过修饰巯基残基、从酸性溶液冻干、控制含湿量、使用合适的添加剂、和开发特定聚合物基质组合物，实现稳定。

[0376] 应用

[0377] 本发明的异源多肽可以用于例如纯化、检测和靶向其识别的特定多肽，包括体外和体内诊断和治疗方法。

[0378] 在一个方面。本发明的抗体可以用于在免疫测定中定性和定量测量生物学样品中特定的抗原。用于检测抗原-抗体结合的常规方法包括，例如酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射性免疫测定 (RIA) 或免疫组织化学。许多方法可以为检测目的而使用与抗体结合的标记物。与抗体一起使用的标记是不干扰其与抗体结合的任何可检测的功能性物质。已知了许多标记，包括放射性同位素 ^{32}P 、 ^{32}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I ；荧光团，例如稀土螯合物或荧光素及其衍生物；罗丹明及其衍生物；丹酰；伞形酮；荧光素酶，例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶（美国专利号 4,737,456）；荧光素；2,3-二氢二氮杂萘二酮；辣根过氧化物酶 (HRP)；碱性磷酸酶； β -半乳糖苷酶；葡糖淀粉酶；溶菌酶；糖氧化酶，例如葡萄糖氧化酶，半乳糖氧化酶，和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶；杂环氧化酶，例如尿酸氧化酶和黄嘌呤氧化酶；乳过氧化物酶；生物素/抗生物素蛋白；自旋标记物；噬菌体标记；稳定自由基；成像放射性核素（例如钆）等等。

[0379] 可以利用常规的方法将这些标记与异源多肽共价结合。例如,可以使用偶联剂,例如二醛、碳二亚胺、双马来酰亚胺、双亚氨酸酯、双重氮化联苯胺等,将上述荧光、化学发光和酶标记物附加于抗体。见例如美国专利号 3,940,475(荧光测定法)和美国专利号 3,645,090(酶法);Hunter 等, *Nature* 144:945(1962);David 等, *Biochemistry* 13:1014-1021(1974);Pain 等, *J. Immunol. Methods* 40:219-230(1981);和 Nygren *Histochem. and Cytochem* 30:407-412(1982)。本文中优选的标记物是酶,例如辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。这样的标记(包括酶)与抗体多肽的缀合是免疫技术领域普通技术人员的标准操作程序。见例如, O' Sullivan 等, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," 于 *Methods in Enzymology*, J. J. Langone 和 H. Van Vunakis 编辑, 卷 73(Academic 出版社, New York, N. Y., 1981), 第 147-166 页中。这样的结合方法适用于本发明的异源多肽。

[0380] 作为标记异源多肽的替代方式,可以利用以可检测物质标记的竞争性抗原标准和未标记的异源多肽,通过竞争性免疫测定法,测定生物流体中的抗原。在该测定中,将生物样品、标记的抗原标准和异源多肽组合,测定与未标记异源多肽结合的标记的抗原标准的量。生物样品中的测试抗原的量与和异源多肽结合的标记抗原标准的量成反比。

[0381] 在一个方面,本发明的异源多肽(例如抗体)对体外或体内检测和分析特定表面抗原的表达是特别有用的。如以上所讨论的,通常,无糖基化的抗体不执行效应子功能(即,ADCC 或 CDC 活性)。因此,当该抗体与细胞表面抗原结合时,其不会引发不需要的细胞毒性事件。表面抗原可以特异于特定细胞或组织类型,因此充当该细胞或组织类型的标志物。优选地,表面抗原标志在特定细胞或组织类型的不同分化阶段差异表达。靶向这样的表面抗原的抗体因此可以用于筛选表达该标志的细胞或组织群体。例如,本发明的抗体可用于筛选和分离干细胞,例如胚胎干细胞、造血干细胞和间充质干细胞。本发明的抗体也可用于检测表达肿瘤相关表面抗原(例如, c-met、HER2、HER3 或 HER4 受体)的肿瘤细胞。

[0382] 本发明的抗体或其它异源多肽可用作亲和纯化试剂。在该过程中,使用本领域公知的方法,将多肽固定到固相例如 Sephadex 树脂或滤纸上。将固定的多肽与包含待纯化抗原的样品接触,其后以合适的溶剂洗涤支持物,所述溶剂将除去样品中除了与固定的多肽结合的待纯化抗原以外的基本上所有的物质。最后,以另一种合适的溶剂,例如甘氨酸缓冲液(pH5.0)洗涤支持物,将抗原从多肽上释放出来。

[0383] 在一个方面,本发明提供了使用本发明方法产生的异源多肽的用途,用于制备治疗和/或预防疾病例如癌、肿瘤、细胞增生性疾病、和/或免疫(例如自身免疫)病症等的药物。异源多肽可以是本文中描述的任何形式,包括抗体、抗体片段、多肽(例如,寡肽)、或其组合。在一些实施方案中,抗原是人蛋白质分子,受试者是人受试者。

[0384] 本发明的异源多肽可用来诊断、治疗、抑制或预防与一个或多个抗原分子的异常表达和/或活性相关的疾病、病症或病况,包括但不限于恶性和良性肿瘤;非白血病和淋巴系统恶性肿瘤;神经元、神经胶质、星形胶质细胞、下丘脑和其它腺体、巨噬细胞、上皮、基质和囊胚腔病症;以及炎性、血管生成性的和免疫性病症。

[0385] 在某些实施方案中,给受试者施用包含抗体的免疫缀合物。优选地,免疫缀合物和/或与其结合的抗原被细胞内化。

[0386] 本发明的异源多肽可以在治疗中单独使用或与其它组合物组合使用。例如,异源

多肽可以与抗体、化疗剂（包括化疗剂的混合液）、其它细胞毒素剂、抗血管生成剂、细胞因子和/或生长抑制剂共给药。在异源多肽抑制肿瘤生长时，可能特别期望，将异源多肽与一种或多种也抑制肿瘤生长的其它治疗剂组合。可选地或此外，患者可以接受组合的放射性治疗（例如，外部粒子束照射，或以放射性标记的试剂（例如抗体）进行治疗）。上述这样的组合疗法包括组合给药（其中两种或多种药剂包括在同一或分开的制剂中），以及分开给药，在该情况下，抗体的给药可以在辅助疗法（一种或多种）施用之前和/或之后进行。

[0387] 通过任何合适的途径，包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内，对异源多肽（和可选地，辅助治疗剂）给药，以及，如果需要局部治疗，进行病灶内给药。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。此外，抗体适合通过脉冲输注的方式，特别是以递减剂量的抗体，进行给药。优选通过注射给药，最优选静脉或皮下注射，其部分取决于给药是短暂的还是长期的。

[0388] 本发明的异源多肽组合物可以以符合良好医疗实践的方式进行配方、分配剂量和施用。在该情况中考虑的因素包括所治疗的特定疾病、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状态、疾病的起因、药剂递送的部位、施用方法、施用方案、以及医师所知的其它因素。抗体不必、但可选地，与一种或多种目前被用来预防或治疗所提及疾病的药剂一起配制。这样的其它药剂的有效量取决于制剂中存在的抗体的量、疾病或治疗的类型、以及以上所讨论的其它因素。它们通常按如上文使用的相同的剂量和给药途径，或此前使用的剂量的约1%至99%来使用。

[0389] 为了预防或治疗疾病，抗体的合适剂量（当单独或与其它药剂例如化疗剂组合使用时）将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和进程、抗体是用于预防性还是治疗性目的、以前的治疗、患者的临床史和对抗体的反应、以及主治医生的判断。抗体可以适宜地一次或经一系列治疗来向患者施用。取决于疾病的类型和严重性，无论是例如通过一次或多次分开的给药还是通过连续输注，约1 μ g/kg至15mg/kg（例如0.1mg/kg-10mg/kg）的抗体是用于给患者施用的起始候选剂量。对于历经几天或更长时间的重复给药，取决于状况，可以维持治疗直到产生期望的疾病症状的抑制。抗体的优选剂量将从约0.05mg/kg至约10mg/kg。也可以施用较高的起始负荷剂量，之后可以施用一个或多个较低的剂量。然而，也可以使用其它剂量方案。该疗法的进展容易通过常规技术和测定法进行监测。

[0390] 制品

[0391] 在本发明的另一个实施方案中，提供了包含用于治疗上述疾病的物质的制品。制品包括容器和容器上或与容器相伴的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器等。容器可以由例如玻璃或塑料等各种材料制成。容器容纳对于治疗疾病有效的组合物，并可以具有无菌进入孔（例如容器可以是具有皮下注射针可穿透的瓶塞的静脉溶液袋或小瓶）。组合物中至少一种活性剂是本发明的抗体。标签或包装说明书指示该组合物用于治疗特定的疾病，例如癌症。此外，制品可以包括：(a) 其中包含组合物的第一容器，其中组合物包含抗体；和(b) 其中包含组合物的第二容器，其中组合物包含另外的细胞毒素剂。在本发明的该实施方案中的制品可以另外包括指示该第一和第二抗体组合物可用来治疗癌症的说明书。可选地或此外，制品可以另外包括第二（或第三）容器，所述容器包含药学可接受缓冲液，例如用于注射的抑菌水（BWF1）、磷酸盐缓冲盐水、Ringer溶液和葡萄糖溶

液。其可以另外包括其它从商业和使用者角度上所期望的材料,包括其它缓冲液、稀释液、过滤器、针和注射器。

[0392] 以下实施例旨在仅对本发明的实践进行举例说明,其不是作为限定。本文中所引用的所用专利和科学文献均就其全部通过参考引用的方式明确并入本文。

实施例

[0393] 材料和方法

[0394] 细菌菌株和培养基

[0395] 用于该研究的菌株和质粒列于表 1 中。对于摇瓶培养,将所有菌株在 Lauria-Bertani (LB) 或 C. R. A. P. 磷酸限制性培养基 (1) 中,于所标示的 30 或 37℃ 生长。发酵罐培养基基本上如参考文献 1 中描述。以下列浓度加入抗生素: 50 μ g/mL 羧苄青霉素、50 μ g/mL 卡那霉素、12.5 μ g/mL 氯霉素或 20 μ g/mL 四环素。

[0396] 相对 TIR 文库的构建和评价

[0397] 使用简并引物,PCR 扩增热稳定肠毒素 II (stII)、麦芽糖结合周质蛋白 (malE)、碱性磷酸酶 (phoA)、或巯基-二硫键互换蛋白 (dsbA) 信号肽,将其与 phoA 基因的成熟结构域融合,所述简并引物在亲本基因起始密码子后的前 6 个氨基酸中引入摆动碱基的沉默密码子突变 (2) 以及在所述起始密码子上游 9 个碱基对 (bps) 的 BssHII、MluI 或 XbaI 限制性位点 (见表 2)。也产生了编码每个信号序列的野生型密码子的 DNA。然后将这些插入序列通过常规方法克隆到 pPho41 (3) 质粒的 SpeI/NotI (New England Biolabs) 位点中,并转化到感受态 JM109 细胞 (Promega) 中,复苏 1 小时,在 200mL 添加有羧苄青霉素的 LB 中于 37℃ 传代培养 16 小时,随后进行大量制备 (maxi-prepped) (Qiagen)。

[0398] 将来自每个文库的复苏了的细胞的等分样涂于选择性 LB 琼脂平板上,以确定文库大小;所有文库产生对理论文库大小的约 10 至 100x 覆盖。然后将纯化的 DNA 转化到感受态 27C7 细胞中,涂于添加有羧苄青霉素和 100 μ g/mL 的 5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐 (BCIP;Sigma) 的 LB 琼脂平板上,于 37℃ 培养 16 小时。表现出淡蓝色的菌落推定地表示它们含有显示至少低水平的 PhoA 活性的 TIR 变体,而深蓝色菌落指示细胞含有强 TIR 变体 (4),白色菌落暗示细胞携带具有很少或无 PhoA 表达的 TIR 变体;每个文库在给定琼脂平板上的蓝色菌落的百分比从约 2% 至 70%。对来自显示出变化的蓝色调的各单菌落的 DNA 进行小量制备 (miniprep) (Qiagen),通过 SRS 分析 (Genentech, Inc.) 进行测序,再次转化到感受态 27C7 细胞中,如以前的描述 (3),测试它们的基本 PhoA 活性。简言之,将菌落在选择性 LB 中于 30℃ 培养 16 小时,按 1:100 稀释到新鲜培养基中,于 30℃ 再培养 4 小时。然后,基于光密度 (OD_{550}) 对培养物进行标准化,重新悬浮于 strict-AP 培养基中 (3),然后在 -20℃ 储存过夜。然后融解细胞,以甲苯 (Sigma) 处理使其部分通透化 (5),在 37℃ 通气 1 小时。然后将每种培养物各 40 微升加到于 1M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中包含 1mM 4-硝基苯基磷酸二钠六水化物 (PNPP;Promega) 的溶液中,在暗中于室温孵育 1 小时。通过加入 100 μ L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.5) 来停止反应,在 20 分钟内于 410nm 处读取吸收值 (A_{410})。通过先从每个样品的 A_{410} 中减去来自包含空载体 (pBR322) 的培养物的背景吸收值,然后除以来自携带 pPho41 质粒的培养物的校正过的吸收值,计算相对 TIR 强度。所有所报告的 TIR 值均是至少 7 次重复试验的结果。

[0399] 抗体表达载体的构建

[0400] 通过常规方法将信号肽克隆到以前描述的双顺反子系统中 (1)。通过以拼接重叠延伸 (SOE) PCR, 将目的信号肽与目的重链融合来产生重链信号肽变体, 克隆到 BssHII/HpaI (New England Biolabs) 位点。使用 SOE-PCR 类似地制备轻链信号肽变体, 克隆到由各单个 TIR 变体核苷酸序列规定的 MluI/PacI (New England Biolabs) 或 XbaI/PacI (New England Biolabs) 位点 (表 2)。通过 SRS 分析 (Genentech, Inc) 确认所有构建体的序列。

[0401] 小规模诱导和分析

[0402] 在添加有 5mM 磷酸钠 (pH 7.0) 的 5mL 选择性 LB 中, 于 30℃ 培养细胞 16 小时。然后将 500 μ L 细胞等分样接种于 25mL 选择性 C. R. A. P. 磷酸限制性培养基中, 于 30℃ 培养 24 小时。按指示的, 当细胞达到 OD₆₀₀ 约 2.0 时, 以异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1.0mM, 诱导携带质粒 pJJ247 的细胞。取终点全培养液样品在裂解缓冲液 (10mM Tris pH 6.8, 5mM EDTA, 0.2mg/mL 溶菌酶 (Sigma), 5mM 碘乙酸 (Sigma)) 中稀释至 OD₆₀₀ 约 3.0, 在冰上孵育 10 分钟。将样品进行超声处理, 离心除去细胞碎片, 然后使用 SDS-PAGE 分析 (10% Bis-Tris, Invitrogen) 进行分析。将全细胞裂解物样品标准化到相等的光密度, 以 0.2M 二硫苏糖醇 (DTT, Sigma) 进行还原, 使用 SDS-PAGE 分析进行分析。所用泳道加载等体积的样品, 以按 1:200,000 稀释的人抗 Fc (Southern Biotech) 抗体或按 1:200,000 稀释的小鼠抗 κ Lc (Southern Biotech) 抗体为探针, 进行探测。所有抗体均是与 HRP 缀合的, 使用 Western Lightning-ECL (PerkinElmer) 显现免疫印迹, 用膜曝光 Biomax XAR 胶片 (Kodak)。也通过考马斯亮蓝染色, 按标准技术, 分析蛋白质样品。

[0403] 大规模诱导

[0404] 按以前的描述 (1) 进行发酵。简言之, 将来自 5mL 选择性 LB 培养基的冷藏保存细胞的 500 μ L 等分样接种到 500mL 选择性 LB 中, 于 30℃ 培养 16 小时。然后接种到 10-L 发酵罐中 (基本上如参考文献 1 中所述), 使用基于计算机的算法, 根据发酵要求, 饲喂浓缩的葡萄糖溶液, 使细胞生长至高密度。按指示的, 当细胞达到 OD₅₅₀ 约 200, 以异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1.0M, 诱导携带质粒 pJJ247 的细胞。以规律的间隔时间取全培养液和标准化的 OD₅₅₀ 样品, 在 2-3 天后终止所有发酵。使用在线和离线测量的参数, 对培养物适合度进行常规检测。如上所述, 使用 SDS-PAGE 分析, 对样品进行分析。

[0405] 样品的 HPLC 分析

[0406] 通过以前发展的反相 HPLC 分析技术 (Lisa Wong, 私人通讯), 对来自小或大规模诱导试验的样品进行总 (不溶的和可溶的) 重链或轻链浓度的分析。通过双柱、基于蛋白 L 反相的 HPLC 测定法 (Analytical Operations, Genentech, Inc.), 对样品进行包含轻链的抗体种类分析。通过将色谱峰面积与标准曲线进行比较来获得抗体的滴度, 所述标准曲线通过以已知量目的分子掺入空白样品而生成。

[0407] 表 1: 该研究中使用的菌株和质粒

[0408]

菌株或质粒	相关基因型/表型	参考文献 或来源
大肠杆菌菌株		
27C7	$\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) $\Delta phoA \Delta E15$ $\Delta (argF-lac)169$ $ptr3$ $degP41$ kan^R $ompT \Delta (nmpc-fepE)$	(3)
64B4	W3110 $\Delta fhuA$ $\Delta phoA$ $ilvG^+$ Δprc $spr43HI$ $\Delta degP$ $\Delta manA$ $lacI^S$ $\Delta ompT$	实验室储备
JM109	$e14$ (McrA ⁻) $recA1$ $endA1$ $gyrA96$ $thi-1$ $hsdR17$ (r_K ⁻) m_K ⁻) $supE44$ $relA1$ $\Delta (lac-proAB)$ [F ⁺ $traD36$ $proAB$ $lacI^S$ $\Delta M15$]	Promega
质粒		
pPho41	Cb ^r	(3)
pBR322	Cb ^r , Tc ^r	实验室 储备物
ph5D5	人源化 5D5 抗体(可互换称为 5D5.v2 抗体), 克隆于 pBR322 中	实验室 储备物
pJJ247	大肠杆菌 $dsbA$ 和 $dsbC$, 在 tac 启动子控制下, 于 pACYC-衍生载体中, Km ^r	实验室 储备物
pBR-STIIHc1.0-PhoA	大肠杆菌 $BssHIII$ -ssSTII TIRv.1, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-STIIHc2.41- PhoA	大肠杆菌 $BssHIII$ -ssSTII TIRv.2, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-STIIHc3.38- PhoA	大肠杆菌 $BssHIII$ -ssSTII TIRv.3, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-STIIHc4.60-	大肠杆菌 $BssHIII$ -ssSTII TIRv.4, 在 pPho41 中与	本研究

[0409]

PhoA	$\Delta(1-22)$ PhoA 融合	
pBR-STIIHc5.34-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHIII</i> -ssSTII TIRv.5, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-STIIHc6.52-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHIII</i> -ssSTII TIRv.6, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-STIIHc8.36-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHIII</i> -ssSTII TIRv.8, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-STIILc1.0-PhoA	大肠杆菌 <i>MluI</i> -ssSTII TIRv.1, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-STIILc2.74-PhoA	大肠杆菌 <i>MluI</i> -ssSTII TIRv.2, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-STIILc3.72-PhoA	大肠杆菌 <i>MluI</i> -ssSTII TIRv.3, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-DsbAHc1.48-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.1, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-DsbAHc2.WT-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.2, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-DsbAHc3.79-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.3, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-DsbAHc7.72-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.7, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-DsbALc1.WT-PhoA	大肠杆菌 <i>MluI</i> -ssDsbA TIRv.1, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-DsbALc2.3-PhoA	大肠杆菌 <i>MluI</i> -ssDsbA TIRv.2, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-DsbALc3.37-PhoA	大肠杆菌 <i>MluI</i> -ssDsbA TIRv.3, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-PhoAHc1.70-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.1, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-PhoAHc2.64-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.2, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-PhoAHc3.WT-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.3, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-PhoAHc4.67-	大肠杆菌 <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.4, 在 pPho41 中与	本研究

[0410]

PhoA	$\Delta(1-22)$ PhoA 融合	
pBR-PhoAHc5.71-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.5, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-PhoAHc6.77-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.6, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-PhoALc1.104-PhoA	大肠杆菌 <i>MluI</i> -ssPhoA TIRv.1, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-PhoAXb2.41-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.2, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-PhoAXb3.WT-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.3, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-PhoAXb5.53-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.5, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-PhoAXb6.15-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.6, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-PhoAXb7.1-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.7, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-PhoAXb8.24-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.8, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-PhoAXb10.23-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.10, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-MalEHc1.92-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHII</i> -ssMalE TIRv.1, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-MalEHc2.100-PhoA	大肠杆菌 <i>BssHII</i> -ssMalE TIRv.2, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-MalELc1.97-PhoA	大肠杆菌 <i>MluI</i> -ssMalE TIRv.1, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-MalELc2.123-PhoA	大肠杆菌 <i>MluI</i> -ssMalE TIRv.2, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-MalEXb1.WT-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.1, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-MalEXb2.15-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.2, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-MalEXb3.12-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.3, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究

[0411]

PhoA	22)PhoA 融合	
pBR-MalEXb5.37-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.5, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-MalEXb6.4-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.6, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-MalEXb7.25-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.7, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-MalEXb8.13-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.8, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-MalEXb11.34-PhoA	大肠杆菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.11, 在 pPho41 中与 $\Delta(1-22)$ PhoA 融合	本研究
pBR-SS-5D5-1.1	STII TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SS-5D5-1.2	STII TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SS-5D5-2.1	STII TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SS-5D5-2.2	STII TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SM-5D5-1.1	STII TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SM-5D5-1.2	STII TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SM-5D5-2.1	STII TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SM-5D5-2.2	STII TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SD-5D5-1.1	STII TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SD-5D5-1.2	STII TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SD-5D5-2.1	STII TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SD-5D5-2.2	STII TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究

[0412]

	Lc 融合	
pBR-SP-5D5-1.1	STII TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SP-5D5-1.2	STII TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SP-5D5-2.1	STII TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-SP-5D5-2.2	STII TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MS-5D5-1.1	MalE TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MS-5D5-1.2	MalE TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MS-5D5-2.1	MalE TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MS-5D5-2.2	MalE TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MM-5D5-1.1	MalE TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MM-5D5-1.2	MalE TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MM-5D5-2.1	MalE TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MM-5D5-2.2	MalE TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MD-5D5-1.1	MalE TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MD-5D5-1.2	MalE TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MD-5D5-2.1	MalE TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MD-5D5-2.2	MalE TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MP-5D5-1.1	MalE TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.1, 与	本研究

[0413]

	5D5 Lc 融合	
pBR-MP-5D5-1.2	MalE TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MP-5D5-2.1	MalE TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-MP-5D5-2.2	MalE TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DS-5D5-1.1	DsbA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DS-5D5-1.2	DsbA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DS-5D5-2.1	DsbA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DS-5D5-2.2	DsbA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DM-5D5-1.1	DsbA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DM-5D5-1.2	DsbA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DM-5D5-2.1	DsbA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DM-5D5-2.2	DsbA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DD-5D5-1.1	DsbA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DD-5D5-1.2	DsbA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DD-5D5-2.1	DsbA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DD-5D5-2.2	DsbA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DP-5D5-1.1	DsbA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DP-5D5-1.2	DsbA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.2, 与	本研究

[0414]

	5D5 Lc 融合	
pBR-DP-5D5-2.1	DsbA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-DP-5D5-2.2	DsbA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PS-5D5-1.1	PhoA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PS-5D5-1.2	PhoA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PS-5D5-2.1	PhoA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PS-5D5-2.2	PhoA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; STII TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PM-5D5-1.1	PhoA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PM-5D5-1.2	PhoA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PM-5D5-2.1	PhoA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PM-5D5-2.2	PhoA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; MalE TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PD-5D5-1.1	PhoA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PD-5D5-1.2	PhoA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PD-5D5-2.1	PhoA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PD-5D5-2.2	PhoA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; DsbA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PP-5D5-1.1	PhoA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.1, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PP-5D5-1.2	PhoA TIRv.1, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究
pBR-PP-5D5-2.1	PhoA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.1, 与	本研究

[0415]

	5D5 Lc 融合	
pBR-PP-5D5-2.2	PhoA TIRv.2, 与 5D5 Hc 融合; PhoA TIRv.2, 与 5D5 Lc 融合	本研究

[0416] Hc = 重链

[0417] Lc = 轻链

[0418] 5D5 = 抗 c-met 单克隆抗体克隆 5D5.v2。5D5.v2 重链和轻链序列显示于图 7 中, 也描述于例如 W02006/015371 ;Jin 等, Cancer Res(2008)68:4360 中。

[0419] 表 2 :信号序列变体

[0420] 加粗斜体 = 变化的序列 (即, 起始密码子后前 6 个氨基酸)

[0421] 斜体 = BssHII、MluI 或 XbaI 限制性位点

[0422]

亲本基因	克隆 ID	相关基因型/表型	相对 TIR 强度	SEQ ID NO:
<i>stII</i>	SH1.2	<i>GCGCGCATTATGAAGAAAAACATCGCTT</i> <i>TT</i> CTTCTTGCATCTATGTTCGTTTTTICTAT T GCTACAAACGCTTACGCT	0.99 ± 0.07	1
	SH2.41	<i>GCGCGCATTATGAAAAAATATAGCGT</i> <i>T</i> TCTTCTTGCATCTATGTTCGTTTTTICTA TTGCTACAAACGCTTACGCT	1.94 ± 0.05	2
	SH3.38	<i>GCGCGCATTATGAAAAAACATTGCCT</i> <i>TTC</i>	2.9 ± 0.2	3

[0423]

		TTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCTATT GC TACAAACGCTTACGCT		
	SH4.60	GCGCGCATTATG A AAAA A ATATTGCCT TT CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCTAT T GCTACAAACGCTTACGCT	4.1 ± 0.1	4
	SH5.34	GCGCGCATTATG A AGAAAA A ATATTGCAT TC CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCTA TTGCTACAAACGCTTACGCT	5.0 ± 0.2	5
	SH6.52	GCGCGCATTATG A AAAA A AATATTGCAT TT CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	5.9 ± 0.2	6
	SH8.36	GCGCGCATTATG A AAAA A AATATTGCTT TT CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	7.7 ± 0.1	7
	SL1.2	ACGCGTATTATG A AGAAAA A CATCGCTT TT CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	0.75 ± 0.07	8
	SL2.74	ACGCGTATTATG A AAAA A GAATATCGCCT TT CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	1.9 ± 0.2	9
	SL3.72	ACGCGTATTATG A AAAA A AATATTGCTT TT CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	2.9 ± 0.2	10
malE	MH1.92	GCGCGCATTATG A AAAA TTA AGACTGGAG C ACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	1.1 ± 0.1	11
	MH2.100	GCGCGCATTATG A AGATTAA A ACCGGAG	1.9 ± 0.1	12

[0424]

		CCCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC		
	ML1.97	ACGCGTATTATGAAGATCAAGACAGGGG CCCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	1.1 ± 0.1	13
	ML2.123	ACGCGTATTATGAAGATCAAGACAGGGG CCCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	2.0 ± 0.1	14
	MX1.wt	TCTAGAATTATGAAAAATAAAACAGGTG CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	1.1 ± 0.1	15
	MX2.15	TCTAGAATTATGAAAAATAAGACGGGGG CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	2.0 ± 0.1	16
	MX3.12	TCTAGAATTATGAAAAATCAAAACCGGCG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	3.01 ± 0.09	17
	MX3.37	TCTAGAATTATGAAGATCAAGACTGGAG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	5.0 ± 0.2	18
	MX6.4	TCTAGAATTATGAAAAATAAGACGGGAG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	5.8 ± 0.3	19
	MX7.25	TCTAGAATTATGAAGATAAAGACTGGTG	7.1 ± 0.2	20

[0425]

		CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC		
	MX8.13	TCTAGAATTATGAAAATTAAAGACGGGAG CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	8.2 ± 0.3	21
	MX11.34	TCTAGAATTATGAAGATTAAAGACGGGCG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	10.8 ± 0.5	22
<i>phoA</i>	PH1.70	GCGCGCATTATGAAACAATCCACGATTG CCCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC	1.14 ± 0.05	23
	PH2.64	GCGCGCATTATGAAACAGTCGACGATCG CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC	1.93 ± 0.03	24
	PH3.wt	GCGCGCATTATGAAACAAGCACTATTG CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC	2.8 ± 0.1	25
	PH4.67	GCGCGCATTATGAAGCAATCTACTATCG CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC	3.7 ± 0.1	26
	PH5.71	GCGCGCATTATGAAGCAATCAACTATCG CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC	5.1 ± 0.3	27
	PH6.77	GCGCGCATTATGAAACAATCTACTATTG CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC	6.0 ± 0.4	28
	PL1.104	ACGCGTATTATGAAACAGTCTACTATCG CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC	1.00 ± 0.07	29

[0426]

	PX2.41	<i>TCTAGAATTATGAAGCAGAGTACGATTG</i> <i>CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> <i>CCCTGTGACAAAAGCC</i>	2.0 ± 0.1	30
	PX3.wt	<i>TCTAGAATTATGAAACAAGCACTATTG</i> <i>CACCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> <i>CCCTGTGACAAAAGCC</i>	3.39 ± 0.09	31
	PX5.53	<i>TCTAGAATTATGAAGCAATCCACAATAG</i> <i>CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> <i>CCCTGTGACAAAAGCC</i>	4.9 ± 0.1	32
	PX6.15	<i>TCTAGAATTATGAAACAATCCACCATTGC</i> <i>CCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACC</i> <i>CCTGTGACAAAAGCC</i>	5.9 ± 0.2	33
	PX8.24	<i>TCTAGAATTATGAAACAGTCTACTATCGC</i> <i>GCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACC</i> <i>CCTGTGACAAAAGCC</i>	8.0 ± 0.1	34
	PX10.23	<i>TCTAGAATTATGAAACAATCCACAATCG</i> <i>CACCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> <i>CCCTGTGACAAAAGCC</i>	10.0 ± 0.4	35
<i>dsbA</i>	DH1.48	<i>GCGCGCATTATGAAAAAATTGGCTCG</i> <i>CCCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG</i> <i>CGCATCGGCG</i>	0.80 ± 0.03	36
	DH2.wt	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATTGGCTGG</i> <i>CGCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG</i> <i>CGCATCGGCG</i>	1.89 ± 0.09	37
	DH3.79	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATATGGCTGG</i> <i>CTCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG</i> <i>CGCATCGGCG</i>	2.92 ± 0.08	38
	DH7.72	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATATGGTTGG</i> <i>CTCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG</i> <i>CGCATCGGCG</i>	6.7 ± 0.2	39
	DL1.wt	<i>ACGCGTATTATGAAAAAGATTGGCTGG</i> <i>CGCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG</i>	1.0 ± 0.1	40

[0427]

		CGCATCGGCG		
	DL2.3	ACGCGTATTATGAAGAAATTGGTTGG CTCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG CGCATCGGCG	1.87 ± 0.09	41
	DL3.37	ACGCGTATTATGAAGAAAGATTGGTTA GCACTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTA GCGCATCGGCG	2.6 ± 0.1	42

[0428] 说明:克隆的命名约定如下:XY.# = X表示信号序列(S = STII, P = PhoA 等等); Y表示限制性序列(H指 Bssh11 限制性位点, X指 XbaI 位点, L指 MluI 位点), #表示 TIR 强度(例如, 1 = 1 的 TIR, 7.72 = 7.72 的 TIR)。wt = 野生型 TIR 序列。

[0429] 表 3:最终时间点发酵滴度

[0430]

重链信号序列(TIR)/轻链信号序列(TIR)	DsbA/C (+/-)	相对全长 Ab 滴度*
STII (1)/STII (1)	-	1.0
STII (1)/STII (1)	+	4.9
STII (1)/PhoA (1)	-	0.6
STII (1)/PhoA (1)	+	5.6
STII (2)/STII (2)	+	0.8
MalE (1)/STII (1)	-	0.4
MalE (1)/PhoA (1)	-	0.4
MalE (1)/PhoA (1)	+	1.5
DsbA (1)/STII (1)	-	1.4
DsbA (1)/STII (1)	+	3.3
DsbA (1)/STII (2)	+	3.6
DsbA (2)/STII (1)	-	0.9
DsbA (1)/MalE (1)	-	1.7
DsbA (1)/MalE (1)	+	10.1
DsbA (1)/DsbA (1)	-	1.9
DsbA (1)/DsbA (1)	+	12.7

[0431]

DsbA (2)/DsbA (2)	+	10.6
DsbA (1)/PhoA (1)	-	1.9
DsbA (1)/PhoA (1)	+	10.0
DsbA (2)/PhoA (1)	-	1.5
DsbA (2)/PhoA (1)	+	6.7
PhoA (1)/STII (1)	-	0.3

[0432] * 将所有样品相对于 STII (1)/STII (1) 样品的滴度标化, STII (1)/STII (1) 样品包含在无伴侣 DsbA 和 DsbC 存在时表达的全长抗体。

[0433] 结果 / 讨论

[0434] 针对代表大肠杆菌中跨内膜转运的两类主要分泌途径的信号肽 :sec (PhoA, MalE) 和 SRP (DsbA, STII), 我们开发了新型变体翻译起始区 (TIR) 信号肽文库 (图 2、表 2)。每个文库包括一组含不同翻译强度的变体 TIRs 的载体, 这提供了一种可以容易地调节给定目的蛋白的翻译水平的手段。麦芽糖结合周质蛋白 (MalE) 和碱性磷酸酶 (PhoA) 信号肽借助分子马达 SecA, 以翻译后方式指导从细胞质到周质的转运。热稳定肠毒素 II (stII) 和巯基 - 二硫键互换蛋白 (dsbA) 信号肽借助信号识别颗粒 (SRP), 以共翻译方式指导转运 (图 1)。

[0435] 在文库构建中, BssHII、MluI 或 XbaI 限制性位点是亲本基因起始密码子上游插入的 9 个碱基对 (bps)。取决于所存在的限制性位点的类型, 观察到了不同范围的 TIR 强度 (图 2)。通常, 携带 MluI 位点的序列显示出最小范围的 TIR 强度 (约 1-3), 而上游 BssHII 位点给出中等范围 TIR 强度 (约 1-8), XbaI 位点给出最高范围 TIR 强度 (约 1-11)。在非翻译区中存在的这些限制性位点涵盖在 TIR 中 (3)。然而不能排除这样的可能性——对于所检测的任何信号肽 / 限制性位点组合, 可能存在更高的 TIR 变体, 这些结果看起来代表所检测的每个信号肽文库的平均 TIR 强度。

[0436] 构建了一系列质粒来举例说明翻译水平和信号肽对分泌的影响。在每种情况中, 将目的基因插入到 phoA 启动子、trp Shine-Dalgarno 和拥有不同相对 TIR 强度的信号序列的下游。在摇瓶规模上进行转化和 phoA 启动子的诱导后, 通过 SDS-PAGE 分析来自表达异源蛋白 (抗 c-met 抗体克隆 5D5. v2) 的全细胞的裂解物。在这些实验中, 重链或轻链 TIR 是改变的, 而对应的轻链或重链保持不变。

[0437] 图 3A 和 3B 显示了操控重链信号肽的结果。当以 α -Fc 特异性抗体为探针进行探测时, ssDsbA- 重链 TIR 1 变体, 与其它信号肽变体相比, 给出了全长抗体 (FL-Ab)、以及重链 (HL) 二聚体和重链 - 重链 - 轻链 (HHL) 种类的明显增加 (图 3A, 顶部印迹)。对来自这些样品的总重链进行的检测揭示了, 所检测的所有信号肽融合物之间相对类似的水平 (图 3A, 底部印迹)。当以 α - κ Lc 抗体显现轻链时, 获得了类似的结果, 其中 ssDsbA- 重链 TIR 1 变体再次显示出最高水平的 FL-Ab (图 3B, 顶部印迹)。令人惊奇的是, DsbA TIR 1- 重链融合样品缺乏较低质量的种类, 即预测的轻链 - 轻链 (LL) 二聚体和游离轻链, 它们在其它样品中可见。通常, 翻译后信号肽 (MalE, PhoA) 与重链融合时, 比共翻译 (STII, DsbA) 信号肽融合, 看起来有更多表达的总轻链 (图 3B, 底部印迹)。总的来说, 关于与重链融合的信

号肽和全长抗体生产,观察到了以下的等级次序: DsbA>STII>MalE>PhoA。尤其是,与 STII 变体 TIR 相比, DsbA 变体 TIR 导致增加的表达(例如,全长抗体的表达),尽管相对 TIR 强度没有变化(即,两个 TIR 都是强度 1)。

[0438] 图 4 显示了操控轻链信号肽的结果。将轻链信号肽从 STII TIR 1 变体改变为 PhoA TIR 1 或 2 变体,导致 FL-Ab 滴度显著增加(图 4,顶部印迹)。对与轻链融合的信号肽的修饰看起来不影响所表达重链的总量(图 4,中部印迹),但确实显著改变了所存在的轻链的总量,其中已加工的轻链的最高积累出现在具有与轻链融合的 STII 或 DsbA TIR 变体 2 的样品中(图 4,底部印迹)。当与翻译后信号肽融合时,在总的轻链样品中观察到了两条带,指示未加工的轻链。总的来说,关于与轻链融合的信号肽和全长抗体生产,观察到了以下的等级次序: PhoA $\geq$ MalE>STII>DsbA。

[0439] 10-L 发酵中随着时间监测抗体的组装,揭示了与显示于图 3A、3B 和 4 的摇瓶试验类似的结果。从具有与重链融合的 DsbA- 来源 TIR 变体和与轻链融合的 DsbA- 或 PhoA- 来源信号肽的样品中,观察到了最高量的 FL-Ab(图 5,顶部印迹)。这些样品也显示出了,比 STII TIR 1 重链融合,更多的 HHL 和 HL 二聚体种类。此外,在具有与轻链融合的 PhoA TIR 1 信号肽的样品中,容易地见到 LL 二聚体和游离轻链。对减少的总蛋白样品的检测揭示了,在发酵的表达诱导条件下, DsbA 信号肽融合导致比 STII 融合更多的总重链(图 5,中部印迹)。类似地,对于轻链信号肽融合,观察到了 DsbA TIR 1 信号肽融合比 STII TIR 1 较高的轻链积累(图 5,底部印迹)。然而,以 PhoA TIR 1 信号肽融合,见到轻链的最高积累。在取自摇瓶的总轻链样品中见到的两条带在发酵样品中表现为仅一条带,表明在 10-L 发酵中轻链被更有效地加工。

[0440] 我们将不同信号肽与大肠杆菌 phoA 基因的成熟结构域(mPhoA)融合,进一步检测当与 STII- 或 DsbA- 来源的 TIR 变体融合和在摇瓶中于诱导条件下表达时,总轻链或重链表达水平的差异。观察到了对总轻链和重链表达水平的类似影响(图 6)。当蛋白质表达被诱导时,对于 DsbA 信号肽融合, mPhoA 的表达显示出伴随着 TIR 强度的增加而上升,直到 7 的 TIR 强度(在本研究使用的最高 TIR 强度)。对于 STII 信号肽融合,观察到了类似的随着 TIR 强度增加的 mPhoA 表达增加,直到 TIR 强度为 6 或 8,在此处, mPhoA 量看起来比 STII TIR 3 样品中存在的 mPhoA 要低。令人惊奇的是,使用 DsbA 强度 1 的 TIR,比使用 STII 强度 1 的 TIR,产生更多的重链和轻链,并且 STII- 驱动的 PhoA 转运,比 DsbA- 驱动的 PhoA 转运,以较低的总蛋白浓度达到最大量。此外,将 TIR 序列从 STII 改变为 DsbA,增加了 TIR 效应的动力学范围。

[0441] 使用基于蛋白 L 的 HPLC 测定,对来自 10-L 发酵的样品进行了抗体滴度分析(表 3)。HPLC 数据与由 Western 印迹分析揭示的定性滴度水平非常一致(图 3A、3B、4)。当将重链信号序列从 STII- 来源 TIR 变体改变为 Dsb- 来源 TIR 变体时, FL-Ab 滴度增加了约 40-90%。当 DsbA 1 重链融合与和 DsbA、MalE 或 PhoA TIR 1 信号肽融合的轻链配对时,产生了最高滴度。当将轻链与 MalE 或 PhoA TIR 信号肽融合时,产生了最高滴度。

[0442] 相比之下,当将翻译后信号肽与重链融合时, FL-Ab 滴度下降了,其中 PhoA TIR 1 和 MalE TIR 1 信号肽融合显示出滴度分别下降了 70%和 60%。我们得出结论,当将共翻译信号肽(例如, DsbA)用于驱动翻译时,重链表达得到了优化。

[0443] 我们测试了分子伴侣过量表达的效应。伴侣 DsbA 和 DsbC(在本文中有时被称为

DsbA/C) 的过量表达增强了与重链融合的 DsbA 信号肽和与轻链融合的 DsbA、PhoA 或 MalE 信号的益处。当与由和重链或轻链融合的 STII TIR 1 信号驱动的 FL-Ab 表达 (SS1.1+ 伴侣) 相比较时,观察到了在 DsbA TIR 1 重链融合与 MalE、PhoA 或 DsbA TIR 1 轻链融合进行配对时,FL-Ab 滴度增加约 2 至 2.5 倍。

[0444] 我们调查了与抗体的轻链和重链融合的信号肽和最终抗体滴度之间的关系。当将共翻译 (例如,DsbA 或 STII) 信号肽与重链的 N 末端融合时,完整组装的抗体 (FL-Ab) 滴度最高,其中 DsbA- 来源 TIR 变体导致最大的所观察到的 FL-Ab 产量。因此,在诱导条件下,DsbA TIR 变体比 STII TIR 变体可以允许更高的过客蛋白的翻译水平,由此导致加工的过客蛋白的更高的表达水平。相比之下,当将翻译后信号肽 (即,MalE 或 PhoA) 与重链融合时,抗体滴度显著下降。该效应可能是由于蛋白质水解或可能是由于重链跟从的不同折叠途径导致 (6)。对来自表达与重链融合的 PhoA 或 MalE TIR 1 信号肽的样品的总重链水平的检测,揭示了表观质量上的微小迁移,这可能是由于存在未加工的重链 (图 3A,底部印迹)。

[0445] 在 10L 发酵中,翻译后信号肽 MalE- 来源或 PhoA- 来源 TIR 变体与轻链的融合导致了加工的轻链的大量积累和增加的抗体滴度,超过 STII 介导的转运 (图 5,底部印迹)。与由 STII TIR 变体介导的轻链转运相比,当轻链由 DsbA TIR 变体转运时,也观察到了轻链以及 FL-Ab 增加的产量。然而,从 DsbA TIR 1 变体表达的总轻链的量不高于来自 PhoA 或 MalE TIR 1 变体的。令人感兴趣的是,对来自 10-L 发酵的随时间采集的样品的分析显示,在具有与 MalE、DsbA 或 PhoA TIR 变体融合的轻链的发酵操作中,FL-Ab 滴度随时间持续升高,而与 STII TIR 变体的融合不仅达到较低的最大滴度,而且在早得多的时间点达到该滴度水平 (图 5,顶部印迹)。因此,这些数据说明,轻链可以以共翻译或翻译后的方式有效地转运,而重链需要共翻译转运用于峰表达。

[0446] 单臂抗 c-met 抗体的表达

[0447] 我们评价了与单臂抗体的轻链、重链和 Fc 融合的信号肽与最终抗体滴度之间的关系。将具有 1 的 TIRs 的 STII 信号序列用于轻链、重链和 Fc 多肽;将具有 TIR 1 的 PhoA 信号序列 (SEQ ID NO:29) 用于轻链和具有 TIR 1 的 DsbA 信号序列 (SEQ ID NO:40) 用于重链和 Fc 片段;将具有 TIR 1 的 PhoA 信号序列用于轻链和 Fc 片段和将具有 TIR 1 的 DsbA 信号序列用于 HC,构建质粒。使用上述蛋白质 L 反相 HPLC 测定法,测量来自终点样品的相对滴度量。相对于表 4 第一行中情况 (STII 信号序列且 TIR = 1 用于 LC、HC 和 Fc,无 DsbA/C 的共表达) 的滴度,将相对滴度值标准化。

[0448] 结果示于表 4 中。当将共翻译 (例如,DsbA) 信号肽与重链的 N 末端融合、将翻译后 (例如,PhoA) 信号肽与轻链的 N 末端融合、将翻译后 (例如,PhoA) 信号肽与 Fc 区融合、且在 DsbA/C 存在下表达时,单臂抗体的相对滴度最高。总的来说,关于与轻链、重链和 Fc 片段融合的信号肽和单臂抗体在 DsbA/C 存在时的表达,观察到了以下的等级次序:P. D. D>P. D. P. >S. S. S. 在 DsbA/C 缺乏时的表达水平在所有测试样品中类似,其中大多数分泌到周质的抗体聚集在一起。二硫键分子伴侣的共表达增加了折叠的抗体的产生,由此揭示通过 TIR 优化实现了增加的抗体表达。

[0449] 表 4:单价单臂抗 c-met 抗体 (MetMAb) 的表达

[0450]

质粒	LC, HC, Fc	DsbA/C	相对滴度
pxCM11H.v2.H.Fc.1.K.2192	STII TIR 1 用于 Lc, Hc 和 Fc	-	1.0
pxCM11H.v2.H.Fc.1.K.2192	STII TIR 1 用于 Lc, Hc 和 Fc	+	1.7
pPDD.111.MetMAb	PhoA TIR 1 用于 Lc, DsbA TIR 1 用于 Hc 和 Fc	-	1.0
pPDD.111.MetMAb	PhoA TIR 1 用于 Lc, DsbA TIR 1 用于 Hc 和 Fc	+	3.8
pPDP.111.MetMAb	PhoA TIR 1 用于 Lc, DsbA TIR 1 用于 Hc, PhoA TIR 用于 Fc	-	0.7
pPDP.111.MetMAb	PhoA TIR 1 用于 Lc, DsbA TIR 1 用于 Hc, PhoA TIR 用于 Fc	+	2.5

[0451] 缩写 :D = 信号序列 DsbA ;P = 信号序列 PhoA。XXX#. #. # (例如 PDP. 111) 指用于实验中的轻链信号序列、重链信号序列、Fc 信号序列、轻链 TIR、重链 TIR、Fc TIR。

[0452] 总之, 该技术提供了一种新的方式, 该方式可以用于, 例如, 在大肠杆菌中, 通过从一系列新的 TIR 变体中进行选择, 并且进一步地通过将共翻译或翻译后信号序列用于轻链和将共翻译信号序列用于重链, 操作轻链和重链的表达, 由此增加折叠的抗体的产量。使用本文中公开的新型 TIR 变体, 进一步通过将共翻译或翻译后信号序列用于轻链、将共翻译信号序列用于重链、且将共翻译或翻译后信号序列用于 Fc 多肽, 也实现了包含重链、轻链和 Fc 区的单臂抗体的表达提高。总的来说, 该方法的功效看起来广泛适用于广范围的抗体 (例如, 包含结和洞突变的双特异性抗体)、抗体衍生物和基于细菌的重组蛋白生产。

[0453] 部分参考文献列表

[0454] 1. Simmons, L. C., Reilly, D., Klimowski, L., Raju, T. S., Meng, G., Sims, P., Hong, K., Shields, R. L., Damico, L. A., Rancatore, P. 和 Yansura, D. G. (2002) Journal of immunological methods 263(1-2), 133-147

[0455] 2. Stemmer, W. P., Morris, S. K., Kautzer, C. R. 和 Wilson, B. S. (1993) Gene

123(1), 1-7

[0456] 3. Simmons, L. C. 和 Yansura, D. G. (1996) *Nature biotechnology* 14(5), 629-634

[0457] 4. Le Calvez, H., Green, J. M. 和 Baty, D. (1996) *Gene* 170(1), 51-55

[0458] 5. Jackson, R. W. 和 DeMoss, J. A. (1965) *Journal of bacteriology* 90(5), 1420-1425

[0459] 6. Kadokura, H. 和 Beckwith, J. (2009) *Cell* 138(6), 1164-1173

[0460] 尽管前面提到了特定的实施方案, 需理解的是, 本发明不由此被限定。本领域技术人员知道, 可以在不偏离本发明总体概念的情况下, 对所公开的实施方案进行各种修改。所有这些修改都旨在落入本发明范围内。

[0461] 本申请涉及下述各项。

[0462] 1. 制备抗体的方法, 所述方法包括培养包含多核苷酸的宿主细胞, 所述多核苷酸包括: (1) 与编码抗体重链的多核苷酸有效连接的第一翻译起始区 (TIR), 其中该 TIR 包含共翻译原核分泌信号序列; 和 (2) 与编码抗体轻链的多核苷酸有效连接的第二 TIR, 其中该第二 TIR 包含共翻译或翻译后原核分泌信号序列, 由此抗体在宿主细胞中表达后, 重链和轻链折叠和组装形成具生物学活性的抗体。

[0463] 2. 项 1 的方法, 其中第一 TIR 包含 STII 或 DsbA 变体信号序列。

[0464] 3. 项 2 的方法, 其中第一翻译起始区包含 DsbA 变体信号序列。

[0465] 4. 项 2 的方法, 其中第一翻译起始区包含 SEQ ID NOs: 1-10、36-39、41 和 42 之一的序列。

[0466] 5. 项 1-4 之任一的方法, 其中第二翻译起始区包含 STII、DsbA、MalE 或 PhoA 变体信号序列。

[0467] 6. 项 5 的方法, 其中第二翻译起始区包含编码 PhoA 或 MalE 变体信号序列的多核苷酸。

[0468] 7. 项 5 的方法, 其中第二翻译起始区包含 SEQ ID NOs. 1-14、16-24、26-39 和 41-42 之一的序列。

[0469] 8. 项 1-7 之任一的方法, 其中宿主细胞还包含 (3) 与编码 Fc 多肽的多核苷酸有效连接的第三翻译起始区。

[0470] 9. 项 8 的方法, 其中第三翻译起始区包含 STII、PhoI 或 DsbA 变体信号序列。

[0471] 10. 项 8 的方法, 其中第三翻译起始区包含 PhoI 或 DsbA 变体信号序列。

[0472] 11. 项 8 的方法, 其中第三翻译起始区包含 SEQ ID NOs: 23、24、26-39、41 和 42 之一的序列。

[0473] 12. 项 1-11 之任一的方法, 其中第一和第二翻译起始区提供大约相等的翻译强度。

[0474] 13. 项 12 的方法, 其中相对翻译强度为大约 1 或 2。

[0475] 14. 项 8-10 之任一的方法, 其中第一、第二和第三翻译起始区提供大约相等的翻译强度。

[0476] 15. 项 14 的方法, 其中相对翻译强度为大约 1 或 2。

[0477] 16. 项 1-15 之任一的方法, 其中在宿主细胞中该多核苷酸还包含启动子。

[0478] 17. 项 16 的方法, 其中启动子是原核启动子, 其选自 *phoA*、*tac*、*lpp*、*lac-lpp*、*lac*、

ara 和 T7 启动子。

[0479] 18. 项 1-17 之任一的方法,其中宿主细胞是原核细胞。

[0480] 19. 项 18 的方法,其中原核细胞是大肠杆菌。

[0481] 20. 项 19 的方法,其中大肠杆菌是内源蛋白酶活性缺陷型菌株。

[0482] 21. 项 19 或 20 的方法,其中大肠杆菌的基因型缺失 degP 和 prc 基因,并携带突变的 spr 基因。

[0483] 22. 项 1-21 之任一的方法,其中宿主细胞还包含编码至少一个原核多肽的多核苷酸,所述原核多肽选自 DsbA、DsbC、DsbG 和 FkpA。

[0484] 23. 项 22 的方法,其中多核苷酸编码 DsbA 和 DsbC。

[0485] 24. 项 1-23 之任一的方法,其中宿主细胞包含共同编码抗体的一个或多个多核苷酸。

[0486] 25. 项 1-24 之任一的方法,其中方法还包括从宿主细胞培养物中回收抗体。

[0487] 26. 项 25 的方法,其中从宿主细胞培养基中回收抗体。

[0488] 27. 项 25 或 26 的方法,其中方法还包括将所回收的抗体与药学可接受的载体、赋形剂或载体组合,以制备包含抗体的药物制剂。

[0489] 28. 项 25 或 26 的方法,其中所形成的免疫球蛋白多肽复合物的至少 50% 为抗体。

[0490] 29. 项 28 的方法,其中所形成的免疫球蛋白多肽复合物的至少 70% 为抗体。

[0491] 30. 项 1-29 之任一的方法,其中抗体是单克隆抗体。

[0492] 31. 项 30 的方法,其中抗体是嵌合抗体、亲和力成熟抗体、双特异性抗体、人源化抗体、抗体片段或人抗体。

[0493] 32. 项 31 的方法,其中抗体片段是单臂抗体。

[0494] 33. 项 32 的方法,其中抗体结合 c-met。

[0495] 34. 项 30 的方法,其中抗体是双特异性抗体。

[0496] 35. 包含变体翻译起始区 (TIR) 的多核苷酸,其中变体 TIR 包含 PhoA、MalE、DsbA 或 STII 分泌信号区的核酸变体。

[0497] 36. 项 35 的多核苷酸,其中变体 TIR 包含 SEQ ID NOs. 1-14、16-24、26-39、41-42 之一的序列。

[0498] 37. 项 35 的多核苷酸,其中所述变体翻译起始区的翻译强度小于野生型翻译起始区的翻译强度。

[0499] 38. 项 35-37 之任一的多核苷酸,与编码异源多肽的多核苷酸有效连接,由此异源多肽在宿主细胞中表达时,异源多肽折叠和组装形成具有生物学活性的异源多肽。

[0500] 39. 项 38 的多核苷酸,其中异源多肽选自抗体重链和抗体轻链。

[0501] 40. 项 39 的多核苷酸,其中异源多肽包括 (a) 抗体重链和 (b) 抗体轻链。

[0502] 41. 项 30 的多核苷酸,其中异源多肽还包括 (c)Fc 多肽。

[0503] 42. 项 35 的多核苷酸,其中异源多肽是抗体,其中多核苷酸包括:(1) 与编码抗体重链的多核苷酸有效连接的第一 TIR,其中该 TIR 包含共翻译原核分泌信号序列;和(2) 与编码抗体轻链的多核苷酸有效连接的第二 TIR,其中第二 TIR 包含共翻译或翻译后原核分泌信号序列,由此抗体在宿主细胞中表达时,重链和轻链折叠和组装形成具生物学活性的抗体。

- [0504] 43. 项 42 的多核苷酸,还包含 (3) 与编码 Fc 多肽的多核苷酸有效连接的第三 TIR。
- [0505] 44. 项 35-43 之任一的多核苷酸,其还包含启动子。
- [0506] 45. 项 44 的多核苷酸,其中启动子是原核启动子,其选自 phoA、tac、lpp、lac-lpp、lac、ara 和 T7 启动子
- [0507] 46. 项 35 的多核苷酸,其中异源多肽是蛋白酶、免疫粘附素、或受体的胞外结构域。
- [0508] 47. 项 42-45 之任一的多核苷酸,其中抗体是单克隆抗体。
- [0509] 48. 项 42-45 之任一的多核苷酸,其中抗体是嵌合抗体、亲和力成熟抗体、双特异性抗体、人源化抗体、抗体片段或人抗体。
- [0510] 49. 项 48 的多核苷酸,其中抗体片段是单臂抗体。
- [0511] 50. 项 49 的多核苷酸,其中抗体结合 c-met。
- [0512] 51. 项 48 的多核苷酸,其中抗体是双特异性抗体。
- [0513] 52. 项 49 或 51 的多核苷酸,其中抗体重链包含突变 T366A、L368A、Y407V 和 / 或 T366W 中的一个或多个。
- [0514] 53. 项 49 的多核苷酸,其中 Fc 多肽包含突变 T366A、L368A、Y407V 和 / 或 T366W 中的一个或多个。
- [0515] 54. 通过项 1-34 之任一的方法获得的抗体。
- [0516] 55. 包含项 54 的抗体的药物组合物。

[0001]

序列表

<110> 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

<120> 分泌异源多肽的方法和组合物

<130> P4386R1 WO

<140>

<141>

<150> 61/258,565

<151> 2009-11-05

<160> 68

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 1

```
gcgcgcatta tgaagaaaaa catcgctttt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60
gctacaaacg cttacgct 78
```

<210> 2

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 2

```
gcgcgcatta tgaagaaaaa tatagcgttt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60
gctacaaacg cttacgct 78
```

<210> 3

[0002]

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 3

gcgcgcatta tgaaaaaaa cattgccttt ctcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct 78

<210> 4

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 4

gcgcgcatta tgaaaaaaa tattgccttt ctcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct 78

<210> 5

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 5

gcgcgcatta tgaagaaaaa tattgcattc ctcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct 78

<210> 6

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

[0003]

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 6

gcgcgcattt tgaataaaaaa tattgcattt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60

gtacaaaacg cttacgct 78

<210> 7

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 7

gcgcgcattt tgaataaaaaa tattgcattt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60

gtacaaaacg cttacgct 78

<210> 8

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 8

acgcgtattt tgaataaaaaa catcgcattt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60

gtacaaaacg cttacgct 78

<210> 9

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 9

acgcgtattt tgaataaaaaa tatcgcattt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60

gtacaaaacg cttacgct 78

[0004]

<210> 10

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 10

acgcgtatta tgaaaaaaa tattgctttt ctctctgcat ctatgttcgt ttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct 78

<210> 11

<211> 87

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 11

gcgcgcatta tgaaaattaa gactggagca cgcctctcg cattatccgc attaacgacg 60

atgatgtttt ccgcctcgcc tctcgcc 87

<210> 12

<211> 87

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 12

gcgcgcatta tgaagattaa aaccggagcc cgcctctcg cattatccgc attaacgacg 60

atgatgtttt ccgcctcgcc tctcgcc 87

<210> 13

<211> 87

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0005]

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 13

```
acgcgtatta tgaagatcaa gacaggcgcg cgcattcctcg cattatccgc attaacgacg      60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc                                           87
```

<210> 14

<211> 87

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 14

```
acgcgtatta tgaagatcaa gacaggggccc cgcattcctcg cattatccgc attaacgacg      60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc                                           87
```

<210> 15

<211> 87

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 15

```
tctagaatta tgaaaataaa aacagggtgca cgcattcctcg cattatccgc attaacgacg      60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc                                           87
```

<210> 16

<211> 87

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 16

```
tetagaatta tgaaaattaa gacggggggcg cgcattcctcg cattatccgc attaacgacg      60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc                                           87
```

[0006]

<210> 17	
<211> 87	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 17	
tctagaatta tgaaaatcaa aaccggcgct cgcattcctcg cattatccgc attaacgacg	60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc	87
<210> 18	
<211> 87	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 18	
tctagaatta tgaagaatcaa gactggagct cgcattcctcg cattatccgc attaacgacg	60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc	87
<210> 19	
<211> 87	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 19	
tctagaatta tgaaaataaa gacgggagct cgcattcctcg cattatccgc attaacgacg	60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc	87
<210> 20	
<211> 87	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0007]

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 20

```
tctagaatta tgaagataaa gactggtagc cgcattctcg cattatccgc attaacgacg      60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc                                           87
```

<210> 21

<211> 87

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 21

```
tctagaatta tgaagataaa gacgggagca cgcattctcg cattatccgc attaacgacg      60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc                                           87
```

<210> 22

<211> 87

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 22

```
tctagaatta tgaagattaa gacggggcct cgcattctcg cattatccgc attaacgacg      60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc                                           87
```

<210> 23

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 23

```
gcgcgcatta tgaacaatc cagcattgcc ctggcactct taccgttact gtttaccct      60
```

[0008]

gtgacaaaag cc	72
<210> 24	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 24	
gcgcgcatta tgaacacagtc gacgatcgca ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72
<210> 25	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 25	
gcgcgcatta tgaacaaaag cactattgca ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72
<210> 26	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 26	
gcgcgcatta tgaagcaatc tactatcgct ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72
<210> 27	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0009]

<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"		
<400> 27		
gcgcgcattt tgaagcaatc aactatcgca ctggcactct taccgttact gtttaccct	60	
gtgacaaaag cc	72	
<210> 28		
<211> 72		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"		
<400> 28		
gcgcgcattt tgaacaatc tactatcgca ctggcactct taccgttact gtttaccct	60	
gtgacaaaag cc	72	
<210> 29		
<211> 72		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"		
<400> 29		
acgcgtattt tgaaacagtc tactatcgct ctggcactct taccgttact gtttaccct	60	
gtgacaaaag cc	72	
<210> 30		
<211> 72		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"		
<400> 30		

[0010]

tctagaatta tgaagcagag tacgattgct ctggcactct taccgttact gtttaccct 60
gtgacaaaag cc 72

<210> 31

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 31

tctagaatta tgaacaaaag cactattgca ctggcactct taccgttact gtttaccct 60
gtgacaaaag cc 72

<210> 32

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 32

tctagaatta tgaagcaatc cacaatagct ctggcactct taccgttact gtttaccct 60
gtgacaaaag cc 72

<210> 33

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 33

tctagaatta tgaacaaatc caccattgcc ctggcactct taccgttact gtttaccct 60
gtgacaaaag cc 72

<210> 34

<211> 72

<212> DNA

[0011]

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 34

tctagaatta tgaaacagtc tactatcgcg ctggcactct taccgttact gtttaccct 60

gtgacaaaag cc 72

<210> 35

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 35

tctagaatta tgaaacaatc cacaatcgca ctggcactct taccgttact gtttaccct 60

gtgacaaaag cc 72

<210> 36

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 36

gagcgcatTA tgaaaaaat ttggctcgcc ctggctgggt tagttttagc gtttagcgca 60

tcggcg 66

<210> 37

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

[0012]

<400> 37	
gcgcgcatta tgaaaaagat ttggctggcg ctggctggtt tagttttagc gtttagcgca	60
tcggcg	66
<210> 38	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 38	
gcgcgcatta tgaaaaagat atggctggct ctggctggtt tagttttagc gtttagcgca	60
tcggcg	66
<210> 39	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 39	
gcgcgcatta tgaaaaagat atggctggct ctggctggtt tagttttagc gtttagcgca	60
tcggcg	66
<210> 40	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 40	
acgcgtatta tgaaaaagat ttggctggcg ctggctggtt tagttttagc gtttagcgca	60
tcggcg	66

[0013]

<210> 41	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 41	
acgcgtatta tgaagaaaaa ttggttggt ctggctggt tagttttagc gtttagcgca	60
tcggcg	66
<210> 42	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 42	
acgcgtatta tgaagaagat ttggttagca ctggctggt tagttttagc gtttagcgca	60
tcggcg	66
<210> 43	
<211> 119	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的多肽"	
<400> 43	
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	

[0014]

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
多肽"

<400> 44

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 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

[0015]

	85	90	95
Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile			
	100	105	110
Lys Arg			
<210> 45			
<211> 449			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的多肽"			
<400> 45			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
	20	25	30
Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe			
	50	55	60
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
	115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			
	130	135	140

[0016]

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
165	170	175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
180	185	190	
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
195	200	205	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
210	215	220	
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
225	230	235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
245	250	255	
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
260	265	270	
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
275	280	285	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
290	295	300	
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
325	330	335	
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
340	345	350	
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser			
355	360	365	
Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
370	375	380	

[0017]

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 46

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
多肽"

<400> 46

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 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

[0018]

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 47

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
多肽"

<400> 47

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

[0019]

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

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的肽"

[0020]

<400> 48

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
肽"

<400> 49

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
肽"

<400> 50

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
肽"

[0021]

<400> 51

Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
肽"

<400> 52

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His

1 5 10

<210> 53

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
肽"

<400> 53

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe

1 5 10 15

Lys Asp

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
肽"

[0022]

<220>

<221> 变体

<222> (1)..(1)

<223> /置换="Ser"

<220>

<221> misc feature

<222> (1)..(1)

<223> /注释="相对于对所述位置在该注释中的残基，序列中给出的残基并不具有优选性"

<400> 54

Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的
肽"

<400> 55

Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的
肽"

<400> 56

Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 57

<211> 23

[0023]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
肽"

<400> 57

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
20

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
肽"

<400> 58

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 59

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
多肽"

<400> 59

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

[0024]

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
肽"

<400> 60
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 61
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
多肽"

<400> 61
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0025]

100

105

<210> 62

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
肽"

<400> 62

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

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20

25

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
肽"

<400> 63

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1

5

10

<210> 64

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
多肽"

<400> 64

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

[0026]

1	5	10	15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
20	25	30	

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
肽"

<400> 65

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
1	5	10

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
肽"

<400> 66

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr		
1	5	10

<210> 67

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
多肽"

<400> 67

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
---	--	--

[0027]

1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
20	25	30	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
35	40	45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
100	105		

<210> 68

<211> 222

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
多肽"

<400> 68

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe			
1	5	10	15
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
20	25	30	
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val			
35	40	45	
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
50	55	60	
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
65	70	75	80

[0028]

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys			
85	90	95	
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
100	105	110	
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro			
115	120	125	
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val			
130	135	140	
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly			
145	150	155	160
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp			
165	170	175	
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp			
180	185	190	
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His			
195	200	205	
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
210	215	220	

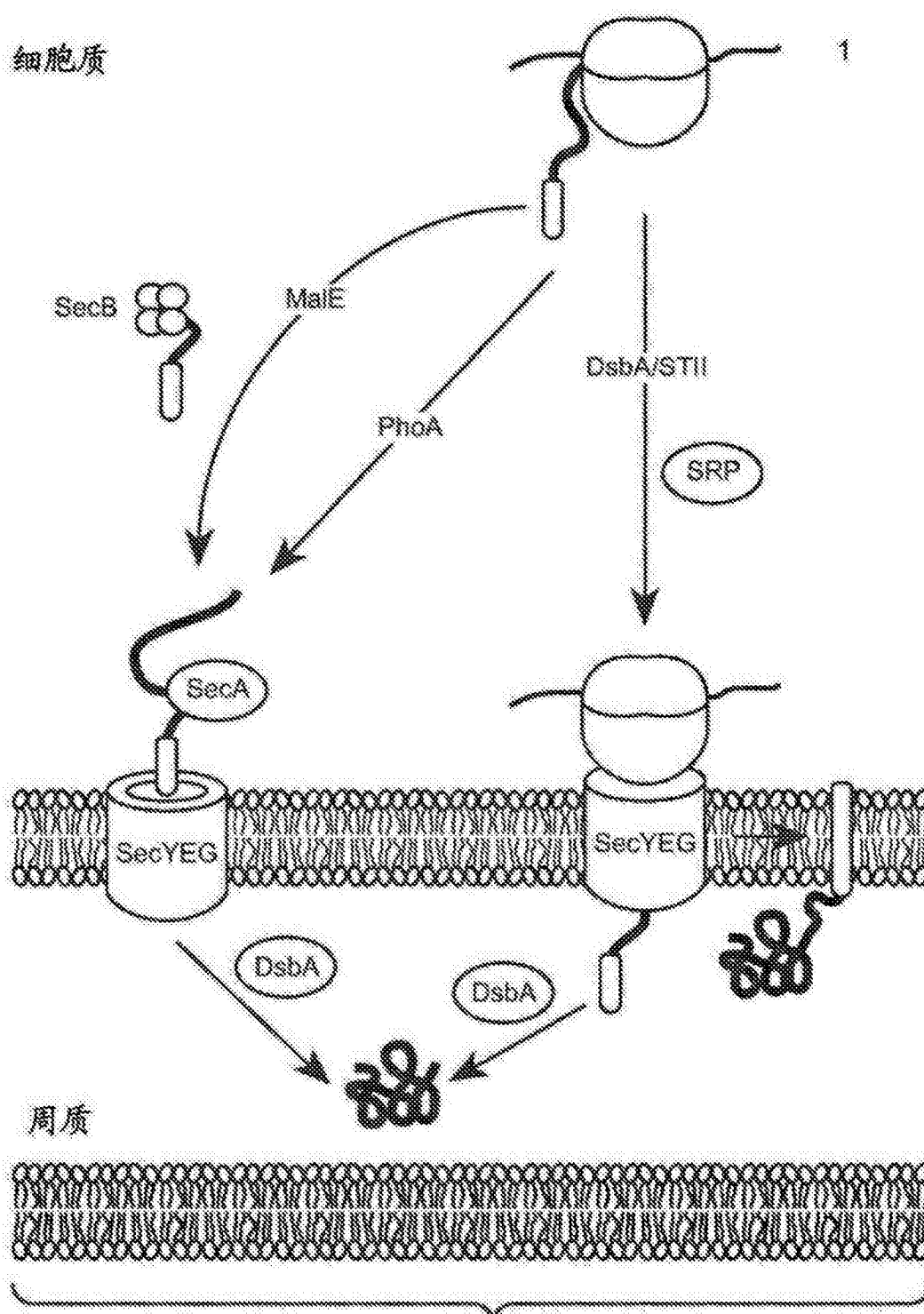


图 1

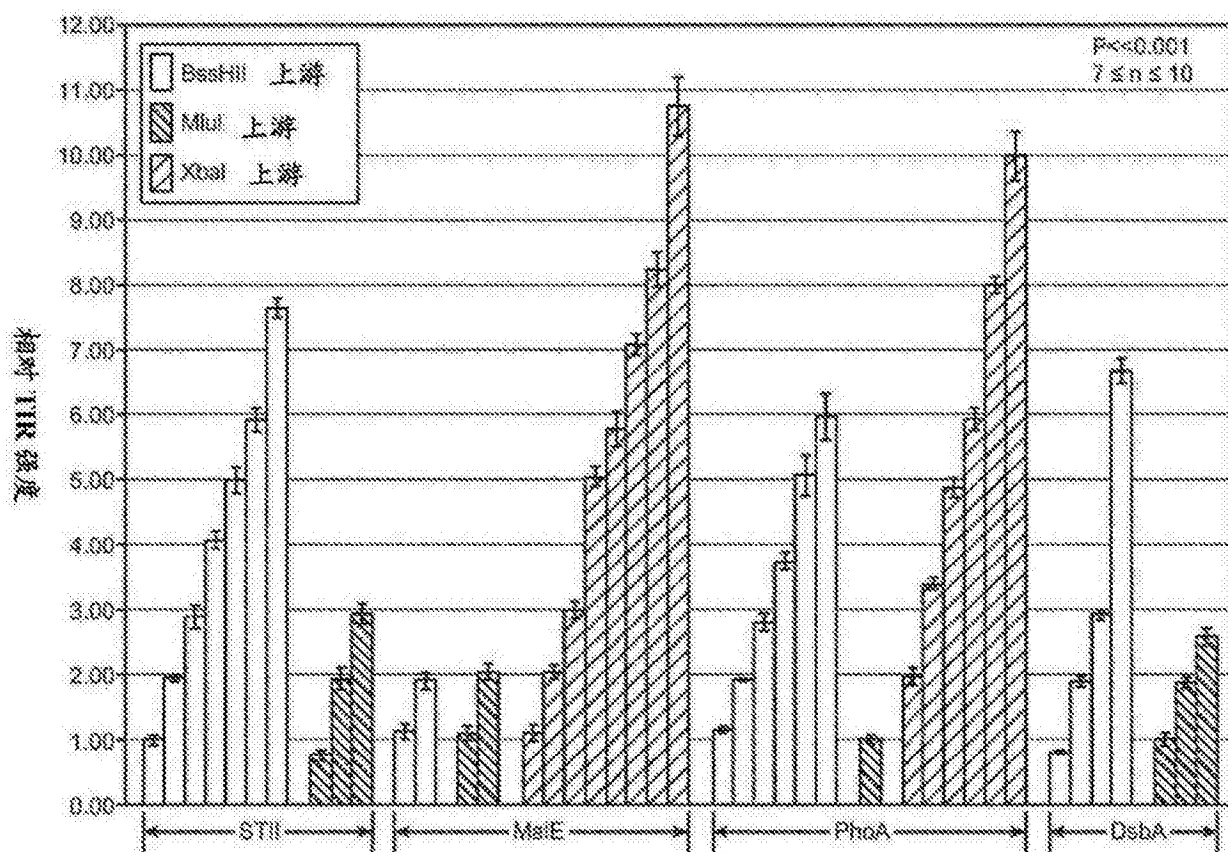


图 2

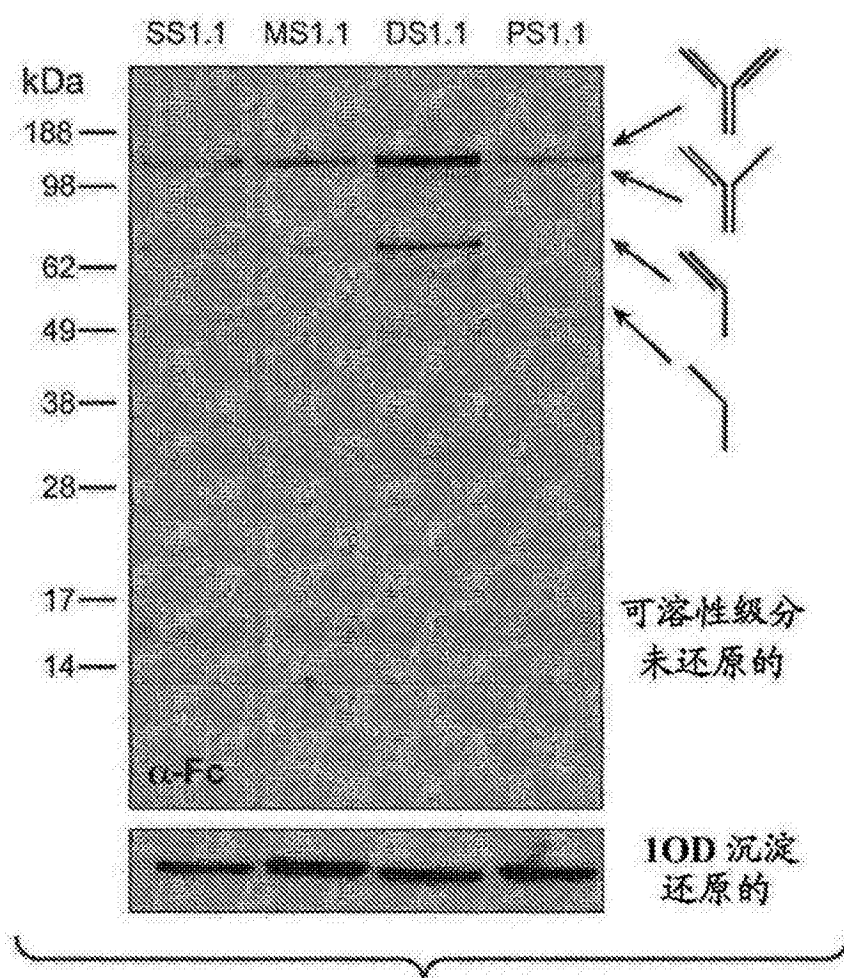


图 3A

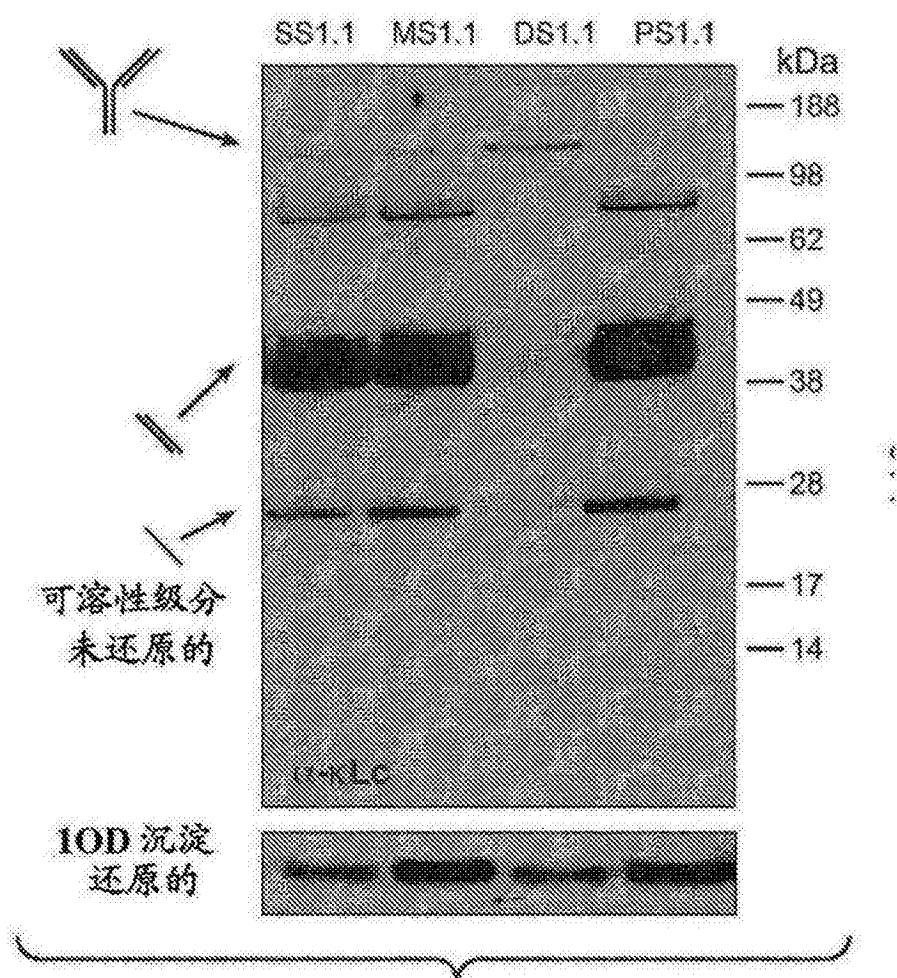


图 3B

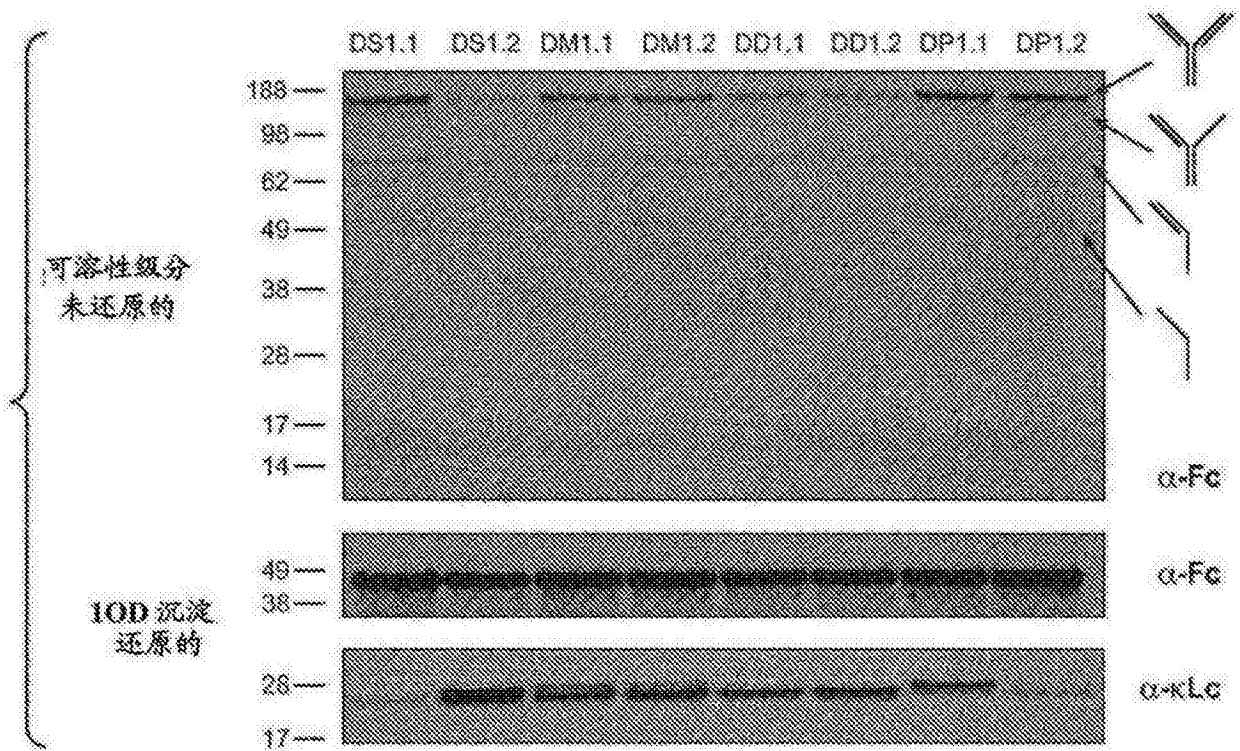


图 4

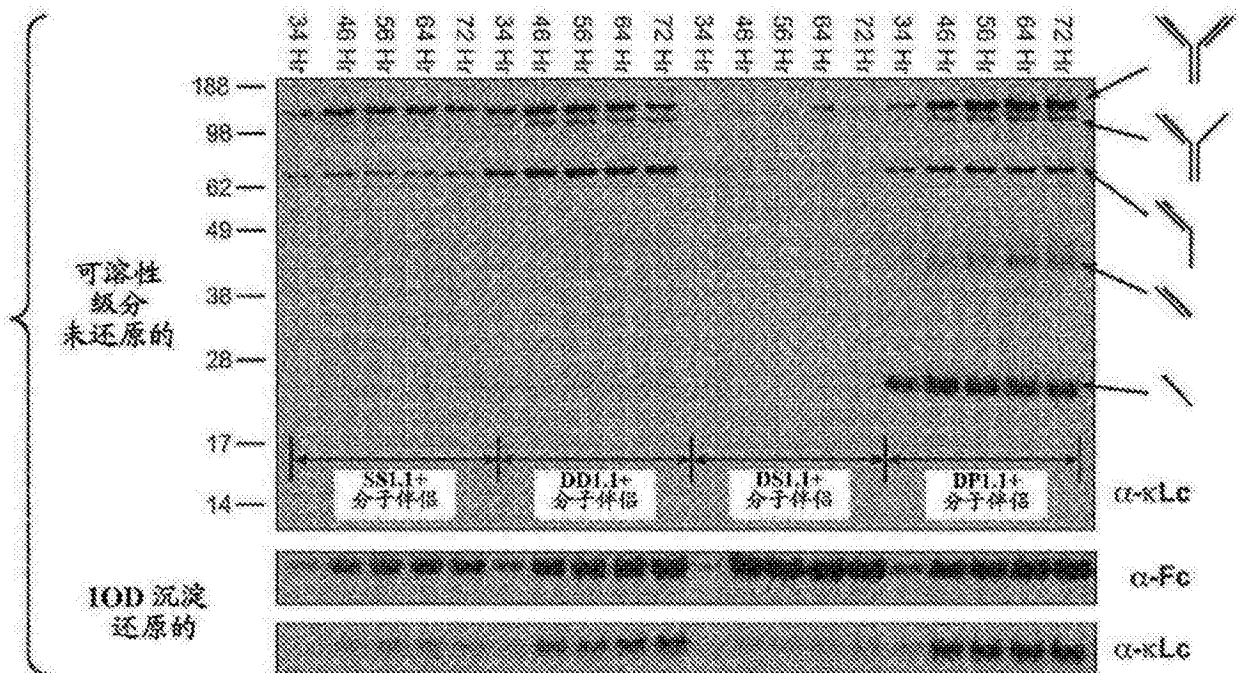


图 5

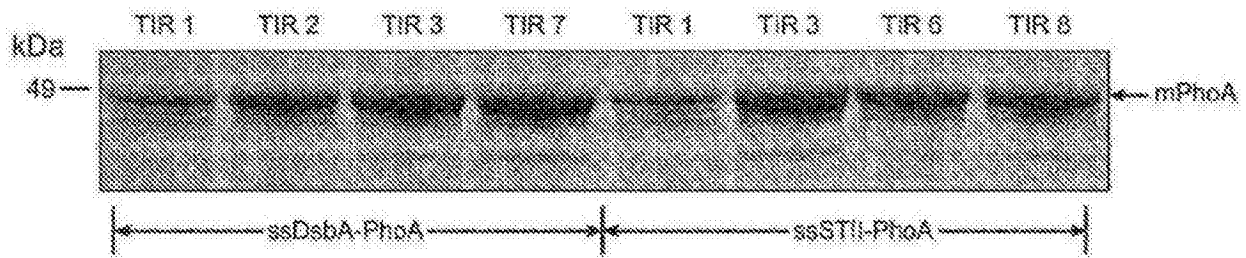


图 6

5D5.v2 轻链

FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC
 FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY
 FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR
 CDR1-LC: KSSQSLLYTSSQKNYLA
 CDR2-LC: WASTRES
 CDR3-LC: QQYYAYPWT
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5D5.v2 重链

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV
 FR3-HC: RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
 FR4-HC: WGQGTLLTVSS
 CDR1-HC: GYTFTSYWLH
 CDR2-HC: GMIDPSNSDTRFNPFKD
 CDR3-HC: ATYRSYVTPLDY
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
 VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 7

DKTHTCPPELPGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 8

Abstract

This invention related to methods and composition for secretion of heterologous polypeptides. The present invention relates generally to the fields of molecular biology and protein technology. More specifically, the invention concerns signal sequences for the secretion of heterologous polypeptide from bacteria. The invention also concerns recombinant polypeptides and uses thereof.