



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102471378 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 02

(21) 申请号 201080032565. 8

C07K 16/46 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 06. 25

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

61/220, 687 2009. 06. 26 US

US 6165745 A, 2000. 12. 26, 权利要求 1, 第 5 — 6 栏.

(85) PCT 国际申请进入国家阶段日

2012. 01. 19

US 6165745 A, 2000. 12. 26, 权利要求 1, 第 5 — 6 栏.

(86) PCT 国际申请的申请数据

PCT/US2010/040028 2010. 06. 25

Jendeberg 等. Engineering of Fc1 and Fc3 from human immunoglobulin G to analyse subclass specificity for staphylococcal protein A. 《Journal of Immunological Methods》. 1997, 第 201 卷 25 — 34 页.

(87) PCT 国际申请的公布数据

W02010/151792 EN 2010. 12. 29

审查员 赵九永

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 S · 戴维斯 E · 史密斯

D · 迈克多纳德 K · L · 奥森

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理
事务所 (普通合伙) 11400

代理人 郭玥 葛强

(51) Int. Cl.

C07K 16/06 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 25 页
序列表 3 页 附图 10 页

(54) 发明名称

容易地分离的具有天然免疫球蛋白形式的双
特异性抗体

(57) 摘要

本发明提供了给予分离容易性的双特异性抗
体形式, 其包含有在 CH3 结构域中经差别修饰的
免疫球蛋白重链可变结构域, 其中所述差别修饰
就 CH3 修饰而言是非免疫原性的或基本上非免疫
原性的, 并且所述修饰中的至少一个导致所述双
特异性抗体对于亲和试剂例如 A 蛋白的差别亲和
力, 并且所述双特异性抗体能够基于其对于 A 蛋
白的亲和力而从破裂的细胞中、从培养基中或从
抗体混合物中分离。

1. 关于 A 蛋白的结合是异源二聚的双特异性抗原结合蛋白,其包含:
 - a. 第一多肽,其从 N-末端至 C-末端包含:选择性地结合第一表位的第一表位结合区、包含第一 CH3 区的免疫球蛋白恒定区,该第一 CH3 区为选自 IgG1、IgG2 和 IgG4 的人 IgG 的 CH3 区,其中所述第一 CH3 区结合 A 蛋白;和
 - b. 第二多肽,其从 N-末端至 C-末端包含:选择性地结合第二表位的第二表位结合区、包含第二 CH3 区的免疫球蛋白恒定区,该第二 CH3 区为选自 IgG1、IgG2 和 IgG4 的人 IgG 的第二 CH3 区,其中所述第二 CH3 区包含减少或消除该第二 CH3 区与 A 蛋白的结合的修饰。
2. 权利要求 1 的双特异性蛋白,其中所述第一多肽和所述第二多肽为人 IgG 重链。
3. 权利要求 1 的双特异性蛋白,其还包含免疫球蛋白轻链。
4. 权利要求 3 的双特异性蛋白,其中所述免疫球蛋白轻链为人免疫球蛋白轻链。
5. 权利要求 1 的双特异性蛋白,其中所述第一多肽和所述第二多肽中每一个为人 IgG1 重链。
6. 权利要求 1 的双特异性蛋白,其中所述修饰选自 IMGT 外显子编号系统中的 (a)95R, 和 (b) 95R 和 96F,或者 EU 编号系统中的 (a') 435R,和 (b') 435R 和 436F。
7. 权利要求 6 的双特异性蛋白,其还包含 1 至 5 个选自下列的修饰:IMGT 外显子编号系统中的 16E、18M、44S、52N、57M 和 82I,或者 EU 编号系统中的 356E、358M、384S、392N、397M 和 422I。
8. 权利要求 6 的双特异性蛋白,其中所述双特异性抗体的 CH3 区在人中是非免疫原性的或基本上非免疫原性的。
9. 权利要求 7 的双特异性蛋白,其中所述双特异性抗体的 CH3 区在人中是非免疫原性的或基本上非免疫原性的。
10. 制备关于 A 蛋白的结合是异源二聚的双特异性抗体的方法,其包括:
 - a. 获得核酸序列,其编码包含识别第一表位的第一可变结构域的第一免疫球蛋白重链,其中所述第一免疫球蛋白重链包含人 IgG 的第一 CH3 区,所述人 IgG 选自 IgG1、IgG2 和 IgG4,并且其中所述第一 CH3 区结合 A 蛋白;
 - b. 获得第二核酸序列,其编码包含识别第二表位的第二可变结构域的第二免疫球蛋白重链,其中所述第二免疫球蛋白重链包含人 IgG 的第二 CH3 区,所述人 IgG 选自 IgG1、IgG2 和 IgG4,并且其中所述第二 CH3 区包含减少或根除所述第二 CH3 区与 A 蛋白的结合的修饰;
 - c. 获得第三核酸序列,其编码与所述第一和第二免疫球蛋白重链配对的免疫球蛋白轻链;
 - d. 将所述第一、第二和第三核酸序列引入到哺乳动物细胞中;
 - e. 让所述细胞表达双特异性抗体;和
 - f. 基于该双特异性抗体结合 A 蛋白的能力来分离所述双特异性抗体。
11. 权利要求 10 的方法,其中所述修饰选自 IMGT 外显子编号系统中的 (a)95R,和 (b) 95R 和 96F,或者 EU 编号系统中的 (a') 435R,和 (b') 435R 和 436F。
12. 权利要求 11 的方法,其还包括 1 至 5 个选自下列的修饰:IMGT 外显子编号系统中的 16E、18M、44S、52N、57M 和 82I,或者 EU 编号系统中的 356E、358M、384S、392N、397M 和 422I。
13. 权利要求 11 的方法,其中所述双特异性抗体的 CH3 区在人中是非免疫原性的或基本上非免疫原性的。

14. 权利要求 12 的方法,其中所述双特异性抗体的 CH3 区在人中是非免疫原性的或基本上非免疫原性的。

15. 权利要求 10 的方法,其中在包含 A 蛋白的固体支持物上分离所述双特异性抗体。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述固体支持物包括 A 蛋白亲和柱,并且使用 pH 梯度来分离所述双特异性抗体。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述 pH 梯度为包含一个或多个位于 pH3 和 pH5 之间的 pH 阶梯的阶梯式梯度。

18. 分离关于 A 蛋白的结合是异源二聚的双特异性抗体的方法,其包括:

从破裂的细胞或抗体混合物中分离包含具有经差别修饰的 IgG1、IgG2 或 IgG4CH3 结构域的重链恒定区的双特异性抗体,其中所述经差别修饰的 IgG1、IgG2 或 IgG4CH3 结构域包含第一 CH3 区和第二 CH3 区,所述第一 CH3 区结合 A 蛋白而所述第二 CH3 区包含减少或根除所述第二 CH3 区与 A 蛋白的结合的修饰,其中所述经差别修饰的 CH3 结构域在人中是非免疫原性的或基本上非免疫原性的,并且其中所述双特异性抗体基于其对于 A 蛋白的亲合力而从破裂的细胞或混合物中分离。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述重链恒定区的一个单体为人 IgG1,并且所述重链恒定区的另一个单体为经修饰的人 IgG1,该经修饰的人 IgG1 在所述第二 CH3 区包含选自下列的修饰:IMGT 外显子编号系统中的 (a) H95R,和 (b) H95R 和 Y96F,或者 EU 编号系统中的 (a') H435R,和 (b') H435R 和 Y436F。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述经修饰的人 IgG1 在所述第二 CH3 区还包含选自下列的修饰:IMGT 外显子编号系统中的 D16E、L18M、N44S、K52N、V57M 和 V82I,或者 EU 编号系统中的 D356E、L358M、N384S、K392N、V397M 和 V422I。

容易地分离的具有天然免疫球蛋白形式的双特异性抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及具有重链异源二聚体（即相差至少一个氨基酸的两个免疫球蛋白重链）的抗原结合蛋白或抗体，其允许基于免疫球蛋白重链和经修饰或经突变的免疫球蛋白重链对于亲和试剂的差别亲和力来进行该抗原结合蛋白质的分离。本发明还涉及抗原结合蛋白（包括双特异性抗体），其具有有着不同的关于 A 蛋白的亲力的 IgG CH2 和 CH3 区，这允许通过所述 IgG 区对于 A 蛋白的差别结合来进行快速分离。

[0002] 背景

[0003] 抗体是多功能分子，其携带有独特的对于靶抗原的结合特异性以及通过不依赖于抗原的机制与免疫系统相互作用的能力。许多目前所使用的用于癌症的生物学治疗剂是针对通常在所靶向的癌细胞上过表达的抗原的单克隆抗体。当此类抗体结合肿瘤细胞时，它们可以触发依赖抗体的细胞毒性（ADCC）或依赖补体的细胞毒性（CDC）。不幸地，癌性细胞经常发展出抑制这些正常免疫应答的机制。

[0004] 近年来，已经进行了努力以开发出具有超过一种抗原结合特异性的抗体样治疗剂，例如双特异性抗体。在癌症疗法的情况下，多特异性形式可以允许这样的可能性，即使用例如，一种特异性来将该分子靶向肿瘤细胞抗原，和另一种特异性来触发通常对于免疫系统不可用的应答。双特异性抗体也可以用作双组分异源二聚受体系统的替代配体，所述双组分异源二聚受体系统通常在当其天然配体与该两个组分结合并将该两个组分带到一起时而被其天然配体激活。

[0005] 在本领域中已开发了许多形式以处理由具有多种结合特异性的分子所提供的治疗机会。理想地，此类分子应当是表现良好的蛋白质，其易于生产和纯化，并且具有有利的体内特性，例如，适合于所希望的目的的药物动力学，最小的免疫原性，和如果希望，常规抗体的效应子功能。

[0006] 产生双特异性抗体的最直接的方式（在单个细胞中表达两种不同的抗体）引起多个种类，因为各自的重链形成同源二聚体和异源二聚体，但是只有异源二聚体是所希望的。此外，轻链和重链可能不适当地配对。下面描述了试图以不同的方式解决这些问题的形式的几个实例。

[0007] 用于双特异性 T 细胞募召剂（Bispecific T cell Engager, BiTE）分子的一种形式（参见例如，Wolf, E. 等人，(2005) Drug Discovery Today 10 :1237-1244）基于单链可变区片段（scFv）模块。scFv 由通过柔性连接体相融合的抗体的轻链和重链可变区构成，这样的轻链和重链可变区通常可以合适地折叠从而这些区域可以结合关联抗原。BiTE 将两个具有不同特异性的 scFv 串联连接在单链上（参见图 1A）。这种构造排除了具有两个拷贝的相同重链可变区的分子的产生。此外，设计连接体构造以确保各自轻链和重链的正确配对。

[0008] BiTE 形式具有几个缺点。首先，scFv 分子在其聚集倾向方面是众人皆知的。并且，尽管据说 scFv 连接体的免疫原性低，但不能排除产生针对 BiTE 的抗体的可能性。BiTE 形式中 Fc 部分的不存在也使得其血清半寿期非常短，并且这不得不要频繁重复施用或通过泵的连续输注这样的复杂化。最后，Fc 的不存在也意味着由 Fc 介导的效应子功能

的缺失,所述由 Fc 介导的效应子功能在某些情况下可能是有益的。

[0009] 第二种形式(图 1B)为小鼠和大鼠单克隆抗体的杂合体,并且依赖于常规的 A 蛋白亲和层析的改进(参见例如, Lindhofer, H. 等人, (1995) J. Immunol. 155 :219-225)。在该形式中,在同一细胞中(例如,要么作为两个杂交瘤的四源杂交瘤(quadroma)融合物,要么在经改造的 CHO 细胞中)一起产生小鼠 IgG2a 和大鼠 IgG2b 抗体。由于每个抗体的轻链优先地与其关联种类的重链相联合,因此仅可以装配出三种不同的抗体种类:两种亲本抗体,以及通过其 Fc 部分相联合的各包含一个重链/轻链对的两个抗体的异源二聚体。所希望的异源二聚体可以容易地从该混合物中纯化出来,因为其与 A 蛋白的结合特性不同于亲本抗体的结合特性:大鼠 IgG2b 不与 A 蛋白结合,而小鼠 IgG2a 结合。因此,该小鼠-大鼠异源二聚体与 A 蛋白结合,但在比小鼠 IgG2a 同源二聚体高的 pH 处洗脱出来,并且这使得可能选择性地纯化该双特异性异源二聚体。与使用 BiTE 形式一样,这种杂合体形式具有两个单价抗原结合位点。

[0010] 所述小鼠/大鼠杂合体的缺点在于:由于它是非人的,因而它可能在患者中引起免疫应答,这可能具有有害的副作用(例如,“HAMA”或“HARA”反应),和/或中和该治疗剂。

[0011] 被称为“杵-臼(knobs-into-holes)”的第三种形式(图 1C)已经在现有技术中进行了讨论,其被认为潜在地可用于产生双特异性抗体(US 专利号 7,183,076)。在该策略中,将两个抗体的 Fc 部分进行改造以给予一个抗体以凸出的“杵”,和给予另一个抗体以互补的“臼”。当在同一细胞中生产时,据称重链优先地通过经改造的“杵”与经改造的“臼”的联合而形成异源二聚体而不是同源二聚体。正确的轻链-重链配对的问题通过选择具有不同特异性但是采用相同轻链的抗体而得到解决。

[0012] 这种形式的缺点在于,“杵-臼”策略可以导致大量不希望的同源二聚体的产生,因而不得不需要进一步的纯化步骤。这种困难通过下述事实而加重:污染性种类在许多其特性方面与所希望的种类几乎相同。所述经改造的形式还可能是潜在地免疫原性的,因为产生“杵”和“臼”的突变引入了外源序列。

[0013] 仍然存在有对于使上面所提及的某些或所有缺点最小化的双特异性抗体形式的需要,特别是对于治疗应用。

[0014] 附图简述

[0015] 图 1 图解说明了三种双特异性抗体形式:(A) 双特异性 T 细胞募召剂(BiTE);(B) 小鼠-大鼠杂合体;和(C) 具有共同轻链的杵-臼。

[0016] 图 2 图解说明了 Fc Δ Adp 修饰:(A) 人 IgG1(SEQ ID NO:1) 和 IgG3(SEQ ID NO:3) 的 Fc 区的比对,显示了加框的 Fc Δ Adp 修饰;(B) Fc Δ Adp 双特异性抗体的示意性表示。

[0017] 图 3 图解说明了 IgG1、IgG2 和 IgG4(有和没有 Δ Adp 二肽修饰)以及 IgG3 的人 CH3 结构域的比对(采用 IMGT 外显子编号和 EU 编号)。

[0018] 图 4 显示了关于双特异性抗体的分离的 A 蛋白柱描记图,显示了使用阶梯式梯度的洗脱谱。

[0019] 图 5 显示了来自层析分离的经洗脱的柱级分(在图 4 中所显示的)的 IL4-Ra 和 IL-6Ra BIACORE™ 结合谱。用固定化的抗-Fc 抗体来捕获级分中的抗体,然后就与所捕获的抗体的结合来对可溶性 IL-4Ra 或 IL-6Ra 进行检定。

[0020] 图 6 显示了 Fc Δ Adp 双特异性抗体 (IL-6R Δ /IL-4R)、Fc Δ Adp 同源二聚体 (IL-6R Δ /IL-6R Δ)、具有野生型 CH3 序列的 IgG1 抗体 (IL-4R/IL-4R) 和对照单特异性抗体的药物动力学谱。

[0021] 图 7 图解说明了在 Raji 细胞杀伤测定法中 CD20xCD3 Δ Adp 双特异性抗体的效力。

[0022] 图 8 图解说明了使用 CD20xCD3 Δ Adp 双特异性抗体的旁观细胞 (293) 杀伤测定法。

[0023] 图 9 显示了使用不同 mFc 异源二聚体的表达试验的结果。图版 A :异源二聚 mIgG2a/mIgG2aPTTTK 与同源二聚 mIgG2a 和同源二聚 IgG2aPTTTK 的 pH 分离的 Western 印迹 ;图版 B :异源二聚 mIgG2a/mIgG2aTTTK 与同源二聚 mIgG2a 和同源二聚 IgG2aTTTK 的 pH 分离的 Western 印迹 ;IP =输入 ;FT =流过 (flow through) ;W2 =第二次洗涤 (1x PBS pH 7.2) ;E1 =第一次洗脱 (20mM 柠檬酸钠,1M NaCl pH 5.5) ;E2 =第二次洗脱 (20mM 柠檬酸钠,1M NaCl ;57% pH 5.5+43% pH 2.6) ;E3 =第三次洗脱 (20mM 柠檬酸钠,1M NaCl pH 2.6)。

[0024] 图 10 图解说明了相对于混合的同种型 (例如,mIgG2a 和 mIgG1) 的异源二聚体的形成而言突变型 IgG2a 的异源二聚体的优先形成,其中使用 4 : 1 的 IFNAR1 构建体 :IFNAR2 构建体比例。

[0025] 泳道 1 :IFNAR1-IgG2a :IFNAR2-IgG1 ;

[0026] 泳道 2 :INFAR1-IgG2a :IFNAR2-IgG2aTTT ;

[0027] 泳道 3 :IFNAR1-IgG2a :IFNAR2-IgG2aTTTK ;

[0028] 泳道 4 :IFNAR1-IgG2a :IFNAR2-IgG2aPTTTK ;

[0029] 泳道 5 :IFNAR1-IgG2a :IFNAR2-IgG2aRF。

[0030] 概述

[0031] 本发明至少部分地基于在双特异性抗原结合蛋白中采用两个相差至少一个氨基酸的免疫球蛋白 CH3 重链恒定结构域序列。所述至少一个氨基酸的差异导致经改善的分离该蛋白质的能力,因为该差异导致有差别的所述 CH3 结构域序列结合亲和试剂的能力。

[0032] 在一个方面,提供了抗原结合蛋白,其包含第一和第二多肽,所述第一多肽从 N-末端至 C-末端包含选择性地结合第一抗原的第一抗原结合区,随后为包含第一 CH3 区的恒定区,该第一 CH3 区为选自 IgG1 (SEQ ID NO :1)、IgG2 (SEQ ID NO :3)、IgG4 (SEQ ID NO :5) 及其组合的人 IgG 的 CH3 区 ;并且,所述第二多肽从 N-末端至 C-末端包含选择性地结合第二抗原的第二抗原结合区,随后为包含第二 CH3 区的恒定区,该第二 CH3 区为选自 IgG1、IgG2、IgG4 及其组合的人 IgG 的 CH3 区,其中所述第二 CH3 区包含减少或消除该第二 CH3 结构域与 A 蛋白的结合的修饰。

[0033] 在一个实施方案中,所述第二 CH3 区包含 95R 修饰 (根据 IMGT 外显子编号 ;435R,根据 EU 编号)。在另一个实施方案中,所述第二 CH3 区还包含 96F 修饰 (IMGT ;436F,根据 EU)。在特别的实施方案中,所述第二 CH3 区选自 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :6。

[0034] 在一个实施方案中,所述第二 CH3 区来自经修饰的人 IgG1 (SEQ IDNO :2),并且还包含选自 D16E、L18M、N44S、K52N、V57M 和 V82I (IMGT ;D356E、L358M、N384S、K392N、V397M 和 V422I,根据 EU) 的修饰。

[0035] 在一个实施方案中,所述第二 CH3 区来自经修饰的人 IgG2(SEQ IDNO :4),并且还包含选自 N44S、K52N 和 V82I (IMGT ;N384S、K392N 和 V422I,根据 EU) 的修饰。

[0036] 在一个实施方案中,所述第二 CH3 区来自经修饰的人 IgG4(SEQ IDNO :6),并且还包含选自 Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q 和 V82I (IMGT ;Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q 和 V422I,根据 EU) 的修饰。

[0037] 在一个实施方案中,所述 CH3 结构域是嵌合的结构域,其包含人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 和人 IgG4 之中两个或更多个的序列。

[0038] 在一个实施方案中,所述 CH3 结构域来自人 IgG1、人 IgG2 或人 IgG4,并且所述抗原结合蛋白还包含 CH1 结构域和 CH2 结构域,其中所述 CH1 结构域和所述 CH2 结构域独立地选自人 IgG1 CH1 或 CH2 结构域,人 IgG2 CH1 或 CH2 结构域,或者嵌合的人 / 人 IgG1/IgG2 或嵌合的人 / 人 IgG1/IgG3 或嵌合的人 / 人 IgG2/IgG3 结构域或嵌合的人 / 人 IgG1/IgG4 或嵌合的 IgG3/IgG4 或嵌合的 IgG2/IgG4 结构域。在一个特别的实施方案中,所述嵌合的 IgG1/IgG2、IgG1/IgG3、IgG2/IgG3、IgG1/IgG4、IgG3/IgG4 和 IgG2/IgG4 结构域在人中是非免疫原性的或基本上非免疫原性的。

[0039] 在一个实施方案中,所述抗原结合蛋白还包含免疫球蛋白轻链。在一个实施方案中,所述免疫球蛋白轻链选自人 λ 和人 κ 轻链。

[0040] 在一个实施方案中,所述第一和第二抗原结合区各包含至少一个 CDR,在另一个实施方案中,至少两个 CDR,在另一个实施方案中,各包含三个 CDR。在一个特别的实施方案中,所述 CDR 来自免疫球蛋白重链。在另一个特别的实施方案中,所述重链为人重链。

[0041] 在一个实施方案中,所述第一抗原结合区包含第一免疫球蛋白重链可变结构域,并且所述第二抗原结合区包含第二免疫球蛋白重链可变结构域。

[0042] 在一个实施方案中,所述第一和第二免疫球蛋白重链可变结构域独立地选自小鼠、大鼠、仓鼠、兔、猴、猿和人的结构域。

[0043] 在一个实施方案中,所述第一和第二免疫球蛋白重链可变结构域独立地包含人 CDR、小鼠 CDR、大鼠 CDR、兔 CDR、猴 CDR、猿 CDR 和人源化的 CDR。在一个实施方案中,所述 CDR 是人的,并且是经体细胞突变的。

[0044] 在一个实施方案中,所述第一和第二免疫球蛋白重链可变结构域包含人构架区 (FR)。在一个实施方案中,所述人 FR 是经体细胞突变的人 FR。

[0045] 在一个实施方案中,通过就对于目的抗原的反应性来筛选包含抗体可变区的噬菌体文库而获得所述第一和 / 或第二抗原结合区。在另一个实施方案中,通过用目的抗原免疫接种非人动物例如小鼠、大鼠、兔、猴或猿并且鉴定编码对于目的抗原特异性的可变区的抗体可变区核酸序列来获得所述第一和 / 或第二抗原结合区。在一个特别的实施方案中,所述非人动物包含一个或多个人免疫球蛋白可变区基因。在另一个特别的实施方案中,所述一个或多个人免疫球蛋白可变区基因以染色体外的形式,作为在内源性免疫球蛋白基因座处的替换,或者作为随机整合入该非人动物的基因组中的转基因而存在于所述非人动物中。在一个实施方案中,所述第一和 / 或第二抗原结合区从杂交瘤或四源杂交瘤获得,在另一个实施方案中,从使用细胞分选来筛选经免疫接种的非人动物的免疫细胞而获得。

[0046] 在一个实施方案中,所述抗原结合蛋白为双特异性抗体。在一个实施方案中,所述双特异性抗体是完全人的双特异性抗体并且具有独立地在 μ M、nM 或 pM 范围内的对于每个

表位的亲和力。

[0047] 在一个实施方案中,所述抗原结合蛋白在人中是非免疫原性的或基本上非免疫原性的。在一个特别的实施方案中,所述抗原结合蛋白缺乏非天然的人 T- 细胞表位。在一个实施方案中,所述 CH3 区的修饰在人中是非免疫原性的或基本上非免疫原性的。在一个特别的实施方案中,所述 CH3 区的修饰不导致非天然的人 T- 细胞表位。

[0048] 在一个实施方案中,所述抗原结合蛋白包含重链,其中所述重链在人中是非免疫原性的或基本上非免疫原性的。在一个实施方案中,所述重链具有不包含非天然的 T 细胞表位的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述重链包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列的蛋白水解不能形成在人中具有免疫原性的大约 9 个氨基酸的氨基酸序列。在一个特别的实施方案中,所述人为用所述抗原结合蛋白进行治疗的人。在一个实施方案中,所述重链包含这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列的蛋白水解不能形成在人中具有免疫原性的大约 13 至大约 17 个氨基酸的氨基酸序列。在一个特别的实施方案中,所述人为用所述抗原结合蛋白进行治疗的人。

[0049] 在一个方面,提供了包含如在本文中所描述的 CH2 和 / 或 CH 3 修饰的双特异性结合蛋白,其中所述双特异性结合蛋白包含特异性地识别 B 细胞上的抗原的第一结合部分,和特异性地识别 T 细胞上的抗原的第二结合部分。

[0050] 在一个实施方案中,所述结合蛋白为双特异性抗体。在一个特别的实施方案中,所述双特异性抗体包含人 IgG1 重链和人 IgG1 Δ Adp 重链。在一个实施方案中,所述第一结合部分为特异性地识别 CD20 的人重链可变结构域。在一个实施方案中,所述第二结合部分为特异性地识别 CD3 的人重链可变结构域。在一个实施方案中,所述双特异性抗体在 Raji 杀伤测定法中展示出大约 $2.8-3.2 \times 10^{-12}M$ 或大约 $2.8-3.0 \times 10^{-12}M$ 的 EC50,并且在旁观细胞杀伤测定法中展示出不大于大约 1-10% 或 1-5% 的旁观细胞杀伤,其中所述旁观细胞不包含 CD20 表位。在一个特别的实施方案中,所述旁观细胞为 293 细胞。在另一个特别的实施方案中,在大约 $10^{-8}M$ 至大约 $10^{-14}M$ 的双特异性抗体浓度范围内,测量在该测定法中的旁观细胞杀伤。

[0051] 在一个方面,提供了制备双特异性抗体的方法,其包括:获得核酸序列,其编码包含识别第一表位的第一可变结构域的第一免疫球蛋白重链,其中所述第一免疫球蛋白重链包含 IgG1、IgG2 或 IgG4 同种型恒定结构域,或者它们的嵌合的同种型恒定结构域;获得第二核酸序列,其编码包含识别第二表位的第二可变结构域的第二免疫球蛋白重链,其中所述第二免疫球蛋白重链包含 IgG1、IgG2 或 IgG4 同种型恒定结构域,或者它们的嵌合的同种型恒定结构域,所述 IgG1、IgG2 或 IgG4 同种型恒定结构域或者它们的嵌合的同种型恒定结构域在其 CH3 结构域中包含根除或减少与 A 蛋白的结合的修饰;获得第三核酸序列,其编码与所述第一和第二免疫球蛋白重链相配对的免疫球蛋白轻链;将所述第一、第二和第三核酸序列引入到哺乳动物细胞中;允许所述细胞表达免疫球蛋白;和,使用 A 蛋白来分离所述免疫球蛋白。

[0052] 在一个实施方案中,所述细胞选自 CHO 细胞、COS 细胞、293 细胞、HeLa 细胞和表达病毒核酸序列的视网膜细胞(例如,PERC. 6™ 细胞)。

[0053] 在一个方面,提供了双特异性抗原结合蛋白,其包含结合抗原的第一特异性和激活受体的第二特异性,其中所述双特异性抗原结合蛋白包含第一多肽和第二多肽,所述第

一多肽包含含有 A 蛋白结合决定子的第一 IgG1、IgG2 或 IgG4 CH3 结构域,并且所述第二多肽包含缺乏 A 蛋白结合决定子的第二 IgG1、IgG3 或 IgG4 CH3 结构域。

[0054] 在一个实施方案中,激活受体的所述第二特异性以在 M、mM、 μ M、nM 或 pM 范围内的 K_D 结合所述受体。

[0055] 在一个实施方案中,所述第二特异性结合选自 G 蛋白偶联受体、受体酪氨酸激酶、整合蛋白和 Toll-样受体的受体。

[0056] 在一个实施方案中,所述第二特异性与所述受体接触,并且引起该受体或亚基或蛋白质与其物理地相联合从而进行丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的磷酸化;引起核苷酸的环化(例如, cAMP、cADP 或 cGMP);引起磷脂酰肌醇或其衍生物(例如, IP3 或 PIP3)的产生;引起脂质第二信使(例如,二酰甘油、神经酰胺、溶血磷脂酸、类二十烷酸)的产生;引起去磷酸化(例如,磷酸酶活性);引起脂质的磷酸化从而形成第二信使;引起第二信使的水解;引起蛋白水解;引起氧化还原信号传导;引起蛋白质向细胞器(例如,向细胞核)的转运;引起所述受体(与自身)聚集从而形成同源多聚体,或(与其他受体)聚集从而形成异源多聚体;或者引起跨膜通道的打开或关闭。

[0057] 在一个方面,提供了制备双特异性抗体的方法,其包括:从四源杂交瘤中分离目的双特异性抗体,其中所述目的双特异性抗体包含第一重链、第二重链,所述第一重链为 IgG1、IgG2 或 IgG4 同种型,和所述第二重链为具有这样的恒定结构域的 IgG1、IgG2 或 IgG4 同种型,所述恒定结构域在其 CH3 结构域中包含根除或减少与 A 蛋白的结合的修饰,其中使用 A 蛋白来分离所述目的双特异性抗体。

[0058] 在一个方面,提供了制备双特异性抗体的方法,其包括从破裂的细胞或抗体混合物中分离具有经差别修饰的 IgG1、IgG2 或 IgG4 CH3 结构域的双特异性抗体的步骤,其中所述经差别修饰的 CH3 结构域在人中是非免疫原性的或基本上非免疫原性的,并且其中所述修饰导致具有异源二聚重链的双特异性抗体,所述异源二聚重链的单体具有对于 A 蛋白的差别亲和力,并且使用 A 蛋白从所述破裂的细胞或混合物中分离所述双特异性抗体。

[0059] 在一个实施方案中,使用 A 蛋白亲和支持物来分离所述双特异性抗体,其中所述双特异性抗体在大约 3.9 至大约 4.4,大约 4.0 至大约 4.3,大约 4.1 至大约 4.2 的 pH 处,或者在大约 pH 4.2 处洗脱下来。在一个实施方案中,所述双特异性抗体在大约 4、4.1、4.2、4.3、4.4 或 4.5 的 pH 处洗脱下来。

[0060] 在一个实施方案中,使用 A 蛋白亲和支持物和 pH 梯度或阶梯来分离所述双特异性抗体,其中所述 pH 梯度或阶梯包含离子改性剂。在一个特别的实施方案中,所述离子改性剂以大约 0.5 至大约 1.0M 的浓度存在。在一个特别的实施方案中,所述离子改性剂为盐。在一个实施方案中,所述离子改性剂选自乙酸的铍、锂、钠和钾盐;碳酸氢钠和碳酸氢钾;碳酸锂、碳酸钠、碳酸钾和碳酸铯;氯化锂、氯化钠、氯化钾、氯化铯和氯化镁;氟化钠和氟化钾;硝酸钠、硝酸钾和硝酸钙;磷酸钠和磷酸钾;以及硫酸钙和硫酸镁。在一个特别的实施方案中,所述离子改性剂为碱金属或碱土金属的卤化物盐。在一个特别的实施方案中,所述离子改性剂为氯化钠。

[0061] 在一个方面,结合蛋白包含 Fc,其中所述 Fc 包含如本文所描述的那样进行修饰的第一 CH3 结构域和未修饰的第二 CH3,从而形成异源二聚 Fc,其中该差别修饰导致所述结合蛋白在比缺乏差别修饰的相应结合蛋白高 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.3 或 1.4 个 pH

单位处从 A 蛋白亲和材料上洗脱下来。

[0062] 在一个实施方案中,经差别修饰的结合蛋白在大约 4.2 的 pH 处洗脱下来,而未修饰的结合蛋白在大约 3 的 pH 处洗脱下来。在一个实施方案中,经差别修饰的结合蛋白在大约 4.5 的 pH 处洗脱下来,而未修饰的结合蛋白在大约 3.5 的 pH 处洗脱下来。在一个实施方案中,经差别修饰的结合蛋白在大约 4 的 pH 处洗脱下来,而未修饰的结合蛋白在大约 2.8-3.5、2.8-3.2 或 2.8-3 的 pH 处洗脱下来。在一个实施方案中,经差别修饰的结合蛋白在大约 4.2 的 pH 处洗脱下来,而未修饰的结合蛋白在大约 2.8 的 pH 处洗脱下来。在一个实施方案中,经差别修饰的结合蛋白在大约 4.4 的 pH 处洗脱下来,而未修饰的结合蛋白在大约 3.6 的 pH 处洗脱下来。在这些实施方案中,“未修饰的”是指在所述 CH3 结构域两者上都缺乏在 435(EU 编号)处的修饰,或缺乏在 435 和 436(EU 编号)处的修饰。

[0063] 在本文中所描述的实施方案和方面中的任一个可以彼此结合使用,除非另外指明或从上下文中显而易见。从对于随后的描述所进行的研究中,其他实施方案将会对于本领域技术人员来说变得显而易见。

[0064] 详细描述

[0065] 本发明不限于所描述的特定方法和实验条件,因为这样的方法和条件可以变动。也要理解,本文中所使用的术语仅是为了描述特定实施方案的目的,而并不旨在是限制性的,因为本发明的范围由权利要求书来定义。

[0066] 除非另外定义,本文中所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解的那样相同的含义。尽管在本发明的实践或测试中可以使用与在本文中所描述的那些相似或等价的任何方法和材料,但现在描述特定的方法和材料。所有述及的出版物特此通过提及而合并。

[0067] 在本文中所使用的术语“抗体”包括由四条多肽链(通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链)组成的免疫球蛋白分子。每条重链包含重链可变区(在本文中缩写为 HCVR 或 VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域,CH1、CH2 和 CH3。每条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为 LCVR 或 VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域,CL。VH 和 VL 区可以进一步细分为高变区(称为互补性决定区(CDR)),其点缀有更为保守的区域(称为构架区(FR))。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 组成,所述三个 CDR 和四个 FR 从氨基末端至羧基末端以下述顺序布置:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(重链 CDR 可以缩写为 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;轻链 CDR 可以缩写为 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3)。术语“高亲和力”抗体是指具有至少 10^{-9} M,至少 10^{-10} M,至少 10^{-11} M,或至少 10^{-12} M(如通过表面等离子共振(例如 BIACORE™)或溶液亲和 ELISA 所测量的)的与其靶的结合亲和力的那些抗体。

[0068] 短语“抗原结合蛋白”包括这样的蛋白质,所述蛋白质具有至少一个 CDR 并且能够选择性地识别抗原,即能够以至少在 μ M 范围内的 K_D 结合抗原。治疗性抗原结合蛋白(例如,治疗性抗体)常常要求位于 nM 或 pM 范围内的 K_D 。“抗原结合蛋白”还包括这样的蛋白质,所述蛋白质包含如本文中所描述的第一和第二 CH3 结构域以及第一蛋白或配体识别结构域和第二蛋白或配体识别结构域,其中所述第一蛋白或配体识别结构域和所述第二蛋白或配体识别结构域每个独立地识别相同的蛋白或配体,或一起识别相同的蛋白或配体,或者每个独立地识别不同的蛋白或配体。此类蛋白质的一个实例是免疫粘附素,其包含融合

蛋白（异源或同源）二聚体，其中该二聚体的多肽为包含受体组分或配体组分的融合多肽，其中所述配体组分包含结合受体的氨基酸序列。

[0069] 短语“双特异性抗体”包括能够选择性地结合两个或更多个表位的抗体。双特异性抗体通常包含两条不同的重链，每条重链特异性地结合不同的表位——要么在两个不同的分子（例如，抗原）上，要么在同一个分子（例如，同一个抗原）上。如果双特异性抗体能够选择性地结合两个不同的表位（第一表位和第二表位），那么第一重链对于第一表位的亲和力通常将会比第一重链对于第二表位的亲和力低至少一个或两个或三个或四个数量级，反之亦然。被双特异性抗体所识别的表位可以在相同的或不同的靶上（例如，在相同或不同的蛋白质上）。可以例如通过将识别相同抗原的不同表位的重链相组合来制备双特异性抗体。例如，可以将编码识别相同抗原的不同表位的重链可变序列的核酸序列与编码不同重链恒定区的核酸序列相融合，并且可以在表达免疫球蛋白轻链的细胞中表达这样的序列。典型的双特异性抗体具有两条重链，每条重链具有三个重链 CDR，随后为（N-末端至 C-末端）CH1 结构域、铰链、CH2 结构域和 CH3 结构域；以及免疫球蛋白轻链，其要么不赋予抗原结合特异性但可以与每条重链相联合，要么可以与每条重链相联合并且可以结合一个或多个被重链抗原结合区所结合的表位，要么可以与每条重链相联合并且使得一条或两条所述重链能够与一个或两个表位结合。

[0070] 术语“细胞”包括适合于表达重组核酸序列的任何细胞。这些细胞包括原核生物和真核生物（单细胞或多细胞）的细胞、细菌细胞（例如，大肠杆菌（*E. coli*）、芽孢杆菌属物种（*Bacillus* spp.）、链霉菌属物种（*Streptomyces* spp.）的菌株，等等）、分支杆菌细胞、真菌细胞、酵母细胞（例如，酿酒酵母（*S. cerevisiae*）、粟酒裂殖酵母（*S. pombe*）、巴斯德毕赤酵母（*P. pastoris*）、甲醇毕赤酵母（*P. methanolica*）等）、植物细胞、昆虫细胞（例如，SF-9、SF-21、被杆状病毒感染的昆虫细胞、粉纹夜蛾（*Trichoplusia ni*）等）、非人动物细胞、人细胞、或者细胞融合物例如杂交瘤或四源杂交瘤。在一些实施方案中，所述细胞为人、猴、猿、仓鼠、大鼠或小鼠细胞。在一些实施方案中，所述细胞是真核的并且选自下列细胞：CHO（例如，CHO K1、DXB-11CHO、Veggie-CHO）、COS（例如，COS-7）、视网膜细胞、Vero、CV1、肾细胞（例如，HEK293、293EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK）、HeLa、HepG2、WI38、MRC5、Colo205、HB 8065、HL-60（例如，BHK21）、Jurkat、Daudi、A431（表皮的）、CV-1、U937、3T3、L 细胞、C127 细胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、塞托利细胞、BRL 3A 细胞、HT1080 细胞、骨髓瘤细胞、肿瘤细胞以及源自上面提及的细胞的细胞系。在一些实施方案中，所述细胞包含一个或多个病毒基因，例如表达病毒基因的视网膜细胞（例如，PER. C6TM 细胞）。

[0071] 短语“互补性决定区”或术语“CDR”包括由生物的免疫球蛋白基因的核酸序列所编码的氨基酸序列，其通常（即，在野生型动物中）出现在免疫球蛋白分子（例如，抗体或 T 细胞受体）的轻链或重链的可变区中的两个构架区之间。CDR 可以由例如种系序列或者经重排或未重排的序列编码，和例如由幼稚或成熟的 B 细胞或 T 细胞编码。在某些情况下（例如，对于 CDR3），CDR 可以由不是邻接的（例如，在未重排的核酸序列中）但在 B 细胞核酸序列中是邻接的（例如，由于剪接或连接所述序列（例如，V-D-J 重组从而形成重链 CDR3））两个或更多个序列（例如，种系序列）编码。

[0072] 短语“重链”或“免疫球蛋白重链”包含来自任何生物的免疫球蛋白重链恒定区序列，并且，除非另外说明，包含重链可变结构域。重链可变结构域包含三个重链 CDR 和四个

FR 区,除非另外说明。重链的片段包括 CDR, CDR 和 FR, 以及其组合。典型的重链在可变结构域之后(从 N-末端至 C-末端)具有 CH1 结构域、铰链、CH2 结构域和 CH3 结构域。重链的功能性片段包括这样的片段,所述片段能够特异性地识别抗原(例如,以在 μ M、nM 或 pM 范围内的 K_D 识别抗原),能够从细胞中进行表达和分泌,并且包含至少一个 CDR。

[0073] 短语“包含 Fc 的蛋白质”包括抗体、双特异性抗体、免疫粘附素以及其他至少包含免疫球蛋白 CH2 和 CH3 区的功能性部分的结合蛋白。“功能性部分”是指可以结合 Fc 受体(例如, Fc γ R; 或 FcRn, 即新生 Fc 受体)和 / 或可以参与补体激活的 CH2 或 CH3 区。如果 CH2 和 CH3 区包含致使其不能结合任何 Fc 受体并且也不能激活补体的缺失、置换和 / 或插入或者其他修饰,那么该 CH2 和 CH3 区就不是功能性的。

[0074] 包含 Fc 的蛋白质可以在免疫球蛋白结构域中包含修饰,包括所述修饰影响该结合蛋白的一个或多个效应子功能(例如,影响 Fc γ R 结合, FcRn 结合和因此半寿期,和 / 或 CDC 活性的修饰)的情况。此类修饰包括但不限于下列修饰及其组合(参考免疫球蛋白恒定区的 EU 编号): 238、239、248、249、250、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、297、298、301、303、305、307、308、309、311、312、315、318、320、322、324、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、337、338、339、340、342、344、356、358、359、360、361、362、373、375、376、378、380、382、383、384、386、388、389、398、414、416、419、428、430、433、434、435、437、438 和 439。

[0075] 例如,但非限制性地,所述结合蛋白为包含 Fc 的蛋白质并展示出增加的血清半寿期(相比于没有所描述的修饰的相同的包含 Fc 的蛋白质而言),并且具有在位置 250(例如, E 或 Q); 250 和 428(例如, L 或 F); 252(例如, L/Y/F/W 或 T)、254(例如, S 或 T) 和 256(例如, S/R/Q/E/D 或 T) 处的修饰; 或者在 428 和 / 或 433(例如, L/R/SI/P/Q 或 K) 和 / 或 434(例如, H/F 或 Y) 处的修饰; 或者在 250 和 / 或 428 处的修饰; 或者在 307 或 308(例如, 308F、V308F) 和 434 处的修饰。在另一个实例中,所述修饰可以包括 428L(例如, M428L) 和 434S(例如, N434S) 修饰; 428L、259I(例如, V259I) 和 308F(例如, V308F) 修饰; 433K(例如, H433K) 和 434(例如, 434Y) 修饰; 252、254 和 256(例如, 252Y、254T 和 256E) 修饰; 250Q 和 428L 修饰(例如, T250Q 和 M428L); 307 和 / 或 308 修饰(例如, 308F 或 308P)。

[0076] 短语“离子改性剂”包括这样的部分,其减少蛋白质之间的非特异性(即,非亲和力)离子相互作用的影响,或者破坏蛋白质之间的非特异性(即,非亲和力)离子相互作用。“离子改性剂”包括,例如, I 族和 II 族金属与乙酸根、碳酸氢根、碳酸根、卤素(例如, 负氯离子或负氟离子)、硝酸根、磷酸根或硫酸根的盐,离子组合。“离子改性剂”的非限制性的举例说明性的列表包括乙酸的铍、锂、钠和钾盐; 碳酸氢钠和碳酸氢钾; 碳酸锂、碳酸钠、碳酸钾和碳酸铯; 氯化锂、氯化钠、氯化钾、氯化铯和氯化镁; 氟化钠和氟化钾; 硝酸钠、硝酸钾和硝酸钙; 磷酸钠和磷酸钾; 以及硫酸钙和硫酸镁。“离子改性剂”包含影响离子相互作用的那些部分,其在加入至 pH 梯度或阶梯之后,或者在“离子改性剂”中平衡 A 蛋白支持物和应用 pH 阶梯或梯度之后,导致在同源二聚 IgG 和异源二聚 IgG(例如,野生型人 IgG 和相同的但携带一个或多个本文中所描述的其 CH3 结构域的修饰的 IgG) 的洗脱之间的 pH 单位距离的变宽。“离子改性剂”的合适的浓度可以由采用相同的柱子、pH 阶梯或梯度的其浓度来确定,其中增加“离子改性剂”的浓度直至在给定的 pH 阶梯或 pH 梯度下达到最大 pH 距离。

[0077] 短语“轻链”包含来自任何生物的免疫球蛋白轻链恒定区序列,并且,除非另外说明,包含人 κ 和 λ 轻链。轻链可变 (VL) 结构域通常包含三个轻链 CDR 和四个构架 (FR) 区,除非另外说明。通常,全长轻链从氨基末端至羧基末端包含 VL 结构域 (其包含 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4) 和轻链恒定结构域。在本发明中可使用的轻链包括,例如不选择性地结合被所述抗原结合蛋白选择性地结合的第一或第二抗原的那些。合适的轻链包括可以通过在现有的抗体文库 (湿文库或计算机文库) 中就最经常采用的轻链进行筛选而鉴定出的那些,其中所述轻链基本上不干扰所述抗原结合蛋白的抗原结合结构域的亲和力和 / 或选择性。合适的轻链包括可以结合一个或两个被所述抗原结合蛋白的抗原结合区结合的表位的那些。

[0078] 短语“ μ M 范围”意指 1-999 μ M;短语“nM 范围”意指 1-999nM;短语“pM 范围”意指 1-999pM。

[0079] 短语“经体细胞突变的”包括涉及来自经历了类别转换的 B 细胞的核酸序列,其中在经类别转换的 B 细胞中的免疫球蛋白可变区 (例如,重链可变结构域,或包括重链 CDR 或 FR 序列) 的核酸序列与在类别转换之前的 B 细胞中的该核酸序列是不同的,例如在未经类别转换的 B 细胞与经历了类别转换的 B 细胞之间 CDR 或构架核酸序列的差异。“经体细胞突变的”包括涉及来自经亲和力成熟的 B 细胞的核酸序列,其与在未经亲和力成熟的 B 细胞中的相应序列 (即,在种系细胞的基因组中的序列) 是不同的。短语“经体细胞突变的”还包括涉及来自在将 B 细胞暴露于目的抗原之后的该 B 细胞的核酸序列,其中所述核酸序列不同于在将该 B 细胞暴露于目的抗原之前的相应核酸序列。短语“经体细胞突变的”涉及来自抗体的序列,所述抗体已在动物 (例如具有人免疫球蛋白可变区核酸序列的小鼠) 中作为对于抗原攻击的应答而产生,并且由于在这样的动物中固有地运作的选择过程而引起。

[0080] 短语“可变结构域”包括免疫球蛋白轻链或重链 (其如所希望的那样进行修饰) 的氨基酸序列,其从 N-末端至 C-末端 (除非另外指明) 顺次包含下列氨基酸区域:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。“可变结构域”包括能够折叠成具有双 β 片层结构的规范结构域 (VH 或 VL) 的氨基酸序列,其中所述 β 片层通过在第一 β 片层和第二 β 片层之间的二硫键相连接。

[0081] 具有经修饰的 IgG CH3 区的双特异性抗体

[0082] 发明人已开发了一种新的形式,其将常见的轻链策略与选择性 A 蛋白纯化方案 (其可以用于人抗体组分) 的实施相组合。

[0083] 先前已注意到 (Lindhofer, H. 等人, (1995) J. Immunol. 155 :219-225), 由于人 IgG3 不与 A 蛋白结合,因而潜在地可以将它与任何其他三种人 IgG 亚类一起在与用于小鼠-大鼠杂合体的纯化策略相似的纯化策略中使用。然而,尽管所有四种人 IgG 亚类是高度同源的,但并不知道 IgG1、IgG2 和 IgG4 的 Fc 部分如何容易地与 IgG3 形成异源二聚体;甚至仅优先形成同源二聚体都将可能在某些情况下 (例如,从四源杂交瘤中分离) 对于所希望的异源二聚体的总产量具有负面影响。还可能需额外的修饰以补偿 IgG3 的铰链区与其他亚类的铰链区之间的差异。还优选的是,在某些情况下,不需要存在完全的 IgG3 Fc, 因为对于效应子功能的潜在影响。

[0084] 因此,发明人设计出了采用幸运地简单的 A 蛋白结合决定子的“最小”形式。已报

道 (Jendeberg, L. 等人, (1997) J. Immunological Meth. 201 :25-34), IgG3 不能结合 A 蛋白是由单个氨基酸残基, Arg435 (EU 编号 ;Arg95, 根据 IMGT) (在其他 IgG 亚类中的这一相应位置被组氨酸残基占据) 所决定的。因此, 可能的是, 使用其中 His435 突变为 Arg 的 IgG1 序列, 以代替 IgG3。因此, IgG1 中的单个点突变应当足以产生顺应于新纯化方案的不同的结合亲和力。这种修饰将被称为 IgG1 Δ A, 以表示其不能结合 A 蛋白 (和, 类似地, IgG2 Δ A 和 IgG4 Δ A——或更一般地, Fc Δ A)。

[0085] 然而, 特定的点突变通过所述突变而引入新的肽序列, 其可能潜在地是免疫原性的。在理论上, 点突变可以加载到 MHC II 类分子上并呈递给 T 细胞, 并因此引起免疫应答。为了避免该缺陷, 可以使用二肽突变, H435R/Y436F (EU 编号 ;H95R/Y96F, 根据 IMGT)。所得的序列在所述改变附近与 IgG3 的序列相同 (参见, 图 2A), 并因此预期是免疫学上“不可见的”, 因为将没有非天然的短肽可用于呈递给 T 细胞。已报道, 该双突变体仍然不结合 A 蛋白 (Jendeberg, L. 等人, (1997) J. Immunological Meth. 201 :25-34)。最后, 该双肽突变不包括任何形成 Fc 二聚体界面的残基, 因此不可能干扰异源二聚体的形成。该二肽突变被称为 “IgG1 Δ Adp” (和, 类似地, IgG2 Δ Adp、IgG4 Δ Adp 和 Fc Δ Adp)。IgG1、IgG2 和 IgG4 中该二肽修饰的布置在图 3 中在标示为 IgG1 Δ Adp、IgG2 Δ Adp 和 IgG4 Δ Adp 的序列 (其与野生型人 IgG CH3 结构域序列以及 hIgG3 一起显示) 中指明, 其中显示了 IMGT 外显子编号和 EU 编号。

[0086] 所述 Fc Δ Adp 修饰不包括任何据信形成 Fc 二聚体界面的残基, 因此所述 Fc Δ Adp 修饰不可能干扰异源二聚体的形成。由于所述 Fc Δ Adp 是如此地最小, 因而它也可能掺入到其他经改造的 Fc 形式中。IgG2 Δ Adp 和 IgG4 Δ Adp 在其中希望与它们中的每一个相关的效应子功能 (或其缺乏) 的情况下可以是有利的。

[0087] 总之, 上面所描述的双特异性抗体形式包括使用相同轻链的具有不同特异性的两个抗体, 其中它们中之一的 Fc 区被修饰为 Fc Δ Adp 形式 (参见, 图 2B)。它的构型为天然的人抗体的构型, 并因此应当共享其有利的特性, 包括低的聚集倾向, 体内稳定性, 最小的免疫原性, 与抗体相似的生物分布特性, 良好的药物动力学, 和可选地, 效应子功能。提供了用于分离此类双特异性抗体的方法, 其在实施中是相对快速和简单的。

[0088] 具有经修饰的小鼠 IgG CH 区的双特异性结合蛋白

[0089] 发明人已设计出了用于容易地分离结合蛋白的方法, 所述结合蛋白包含关于在 CH3 结构域中的一个或多个氨基酸而言为异源二聚的免疫球蛋白重链 (或其功能性的包含 CH2 和 CH3 的片段)。仔细选择小鼠 IgG CH 结构域的修饰和应用特定的分离技术赋予了从同源二聚体中和从不包含所述修饰的异源二聚体中容易地分离包含两个经差别修饰的小鼠 CH 区的结合蛋白的能力。

[0090] 在 247 处包含脯氨酸, 在 252、254 和 256 处包含苏氨酸, 和在 258 处包含赖氨酸的小鼠 IgG1 仅微弱地与 A 蛋白结合。然而, 小鼠 IgG2a 和 IgG2b 在那些位置 (IgG2b 位置 256 和 258 除外) 处包含不同的残基, 并且小鼠 IgG2a 和 2b 与 A 蛋白很好地结合。在制备对于重链而言为异源二聚的抗体的方法中差别修饰两个小鼠 IgG 的 CH 区将会赋予这样的抗体以有区别的 A 蛋白结合特征。以这样的方式, 设计出了有区别的 A 蛋白分离方案, 其允许简便地将经修饰的异源二聚体与任何小鼠 IgG 同源二聚体 (无论是 IgG1 (其将会仅十分弱地与 A 蛋白结合, 如果从根本上来说) 的同源二聚体, 还是小鼠 IgG2a 的同源二聚体、小鼠

IgG2b 的同源二聚体或者 IgG2a/IgG2b 的异源二聚体) 相分开。例如, 具有两个不同的重链可变结构域但相同的同种型(例如 IgG2a) 的双特异性抗体可以在采用重链序列的合适的表达系统中进行表达, 其中仅修饰 IgG2a CH 区中的一个以减少或消除 A 蛋白结合决定子。以这样的方式, IgG2a CH 区中仅一个将会展示出实质的对于 A 蛋白的亲合力, 并且将会容易地从经修饰的异源二聚体中分离任何从未修饰的 IgG2a 和经修饰的 IgG2a 的二聚体形成的抗体。

[0091] 在各种实施方案中, 涉及这样的抗体, 其中 Fc 二聚体的单个 CH 区包含经修饰的 CH 区, 而 Fc 二聚体的另一 CH 缺乏它们。修饰小鼠 IgG CH 区以便在选自下列的特定位置(EU 编号) 处包含特定的氨基酸: 252T、254T 和 256T; 252T、254T、256T 和 258K; 247P、252T、254T、256T 和 258K; 435R 和 436F; 252T、254T、256T、435R 和 436F; 252T、254T、256T、258K、435R 和 436F; 24tP、252T、254T、256T、258K、435R 和 436F; 和 435R。在一个特别的实施方案中, 进行特定的成组修饰, 其选自下列: M252T、S254T、S256T; M252T、S254T、S256T、I258K; I247P、M252T、S254T、S256T、I258K; H435R、H436F; M252T、S254T、S256T、H435R、H436F; M252T、S254T、S256T、I258K、H435R、H436F; I247P、M252T、S254T、S256T、I258K、H435R、H436F; 和 H435R。

[0092] 可以将异源二聚的基于小鼠 IgG 的结合蛋白用于各种各样的应用。例如, 它们允许用于分离具有小鼠恒定结构域的双特异性抗体的方法, 其中所述修饰不干扰或基本上不干扰该抗体与一个或多个小鼠 Fc 受体的结合, 从而该抗体可以参与例如 ADCC 或 CDC, 并且也结合两个或更多个在相同或不同靶上的表位。

[0093] 在一个方面, 提供了用于分离包含第一小鼠 IgG CH 区和第二小鼠 IgG CH 的结合蛋白的方法, 其中修饰所述第一 IgG CH 区(但不修饰所述第二 IgG CH 区) 以便减少或消除所述第一小鼠 IgG CH 区而不是所述第二小鼠 IgG CH 区的 A 蛋白结合亲合力, 并且其中所述结合蛋白包含结合第一表位的第一结合部分和结合第二表位的第二结合部分。

[0094] 在一个实施方案中, 所述修饰不改变或基本上不改变所述结合蛋白与 Fc 受体的结合亲合力。在一个实施方案中, 所述结合蛋白包含增加或降低该结合蛋白与 Fc 受体的亲和力的修饰。

[0095] 在一个实施方案中, 相比于缺乏所述修饰的相应的结合蛋白而言, 所述修饰不改变或基本上不改变所述结合蛋白在包含天然小鼠 Fc γ R 受体和 / 或天然小鼠 FcRn 的小鼠中的血清半寿期。

[0096] 在一个实施方案中, 相比于缺乏所述修饰的相应的结合蛋白而言, 所述修饰不改变或基本上不改变所述结合蛋白在包含天然小鼠高和低亲合力 Fc γ R 受体和 / 或 FcRn 受体的替换的小鼠中的血清半寿期。

[0097] 在一个实施方案中, 所述第一表位和所述第二表位是不同的, 并且在不同的细胞上或在不同的蛋白质上。在一个实施方案中, 所述第一表位和所述第二表位是不同的, 并且在相同的细胞上或在相同的蛋白质上。

[0098] 在一个实施方案中, 所述 Fc 受体选自高亲合力 Fc 受体、低亲合力 Fc 受体和 FcRn。在一个特别的实施方案中, 所述 Fc 受体选自下列中的一个或多个: 小鼠 FcRn、小鼠 Fc γ R、小鼠 Fc γ RIIB、小鼠 Fc γ RIII、小鼠 Fc γ RIV 及其组合。在一个特别的实施方案中, 所述 Fc 受体选自下列中的一个或多个: 人 FcRn、人 Fc γ R、人 Fc γ RIIB、人 Fc γ RIIC、人

Fc γ RIIIB、人 Fc γ RIIIA、人 Fc γ RIIA 及其组合。

[0099] 免疫原性

[0100] 本发明的许多实施方案的一个优点是能够采用修饰来制备双特异性抗体,所述双特异性抗体不仅基于与 A 蛋白的差别结合而为可容易分离的,并且还在人中是非免疫原性的或基本上非免疫原性的。该特征使得这样的实施方案特别可用于制备用于人治疗用途的双特异性抗体中,和可用于制备免疫粘附素,其例如是非免疫原性的或基本上非免疫原性的(采用人结合部分,即人受体组分和/或人配体)。该特征与这样的双特异性抗体相关,所述双特异性抗体具有 IgG1、IgG2 和 IgG3 的具有 H95R/Y96F (IMGT 编号) 修饰的 CH3 结构域,和包含进一步修饰(其导致该位置被修饰从而反映不同 IgG 同种型的野生型序列)的那些 CH3 结构域。因此,尽管在自然界中未发现所述修饰与特定的 IgG 同种型相关,但经修饰的序列局部地与不同 IgG 同种型的野生型序列相同,并且并不预期所述修饰是免疫原性的或基本上免疫原性的。还可能的是,即使其序列不与任何天然序列局部相同,修饰也是非免疫原性的;此类修饰将会是同样有用的。如果是非免疫原性的,那么最小的点突变 H95R (IMGT 编号) 因而将会是本发明的合适的实施方案。

[0101] 因此,提供了双特异性抗体,所述双特异性抗体关于其重链恒定结构域而言在人中是非免疫原性的或基本上非免疫原性的,然而携带一个或多个重链恒定结构域的差别修饰,包括导致重链恒定结构域对于亲和试剂(例如,A 蛋白)的差别亲和力的修饰。所述修饰包括本文中公开的那些。在一个特别的实施方案中,关于其 CH3 结构域而言在人中为非免疫原性的或基本上非免疫原性的,然而具有经差别修饰的重链的双特异性抗体为包含有着下列修饰之一(或者,在另一个实施方案中,基本上由下列修饰之一组成)的 CH3 结构域的人 IgG1、IgG2 或 IgG4 :H95R,或者 H95R 和 Y96F (IMGT 编号)。

[0102] 预期所述双特异性抗体关于其中对于人 IgG1、IgG2 和 IgG4 同等型的耐受性尚未在任何大程度上被打破的人而言,是非免疫原性的或基本上非免疫原性的。

[0103] 特别地,预期所述 Fc Δ Adp 修饰是免疫学上“不可见的”,因为 MHC II 类分子的结合沟容纳包含由 T 细胞受体的可变环所识别的主要决定子的 9-聚体,从而缺乏任何天然 9-聚体子序列的肽将看起来不可能引起免疫应答。然而,比 9-聚体更长的肽(通常大约 13-至 17-聚体)被 MHC II 类分子结合,并且可能的是,突出的区段可能潜在地影响结合。因此,消除较长的非天然序列的额外修饰(在 Fc Δ Adp 修饰之外)可以进一步减少免疫原性的潜在性。一个特别的实例为修饰 V422I (EU ;V82I,根据 IMGT 编号),其在 IgG1 Δ Adp 中将最小非天然肽的长度从 14 个残基延伸至 39 个残基,和在类似地定义的 IgG2 Δ Adp 中延伸至 43 个残基。另一个实例为 IgG4 Δ Adp 中的修饰 L445P (EU ;L105P,根据 IMGT 编号),其将该长度从 10 个残基延伸至 14 个残基。

[0104] 药物动力学

[0105] 对于 A 蛋白的结合位点与对于新生 Fc 受体 (FcRN,其被认为负责赋予免疫球蛋白以延长的血清半寿期)的结合位点相重叠。因此,在 A 蛋白结合位点附近的修饰提高了这样的可能性,即在本文中所提出的形式可以具有比 IgG1、2 和 4 更短的血清半寿期,假定人 IgG3 (大约 7 天)具有比其他 IgG 亚类(大约 21 天)更短的血清半寿期。一些影响 His435 的 Fc 突变体已显示不结合 FcRN,并且在小鼠中具有较短的半寿期。然而,药物动力学分析已显示, IgG1 Δ A/IgG1 异源二聚体的血清半寿期并非与 IgG1 同源二聚体的血清半寿期相

当不同（参见，实施例 2）。因此，IgG1 Δ Adp 突变具有去除 A 蛋白结合而同时仍然保留 IgG1 的较长半寿期的优点。

[0106] 因此，在一个实施方案中，提供了包含如在本文中所描述的 CH3 结构域修饰的双特异性抗原结合蛋白，其中所述抗原结合蛋白展示出与缺乏在 CH3 结构域处的修饰的相同的双特异性抗原结合蛋白等价的药物动力学特性曲线。在一个实施方案中，提供了包含 IgG1 Δ A/IgG1 异源二聚 Fc 的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体所具有的血清半寿期为在其他方面相同但包含 IgG3 CH3 结构域或者在其他方面相同但包含至少一个 IgG3 重链的双特异性抗体的大约 1.5 倍、大约 2 倍、大约 2.5 倍或大约 3 倍。在一个实施方案中，提供了包含 IgG1 Δ A/IgG1 异源二聚 Fc 的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体展示出与没有该 IgG1 Δ A 修饰的双特异性抗体（即 IgG1 同源二聚双特异性抗体）大致相同的血清半寿期。

[0107] 免疫球蛋白重链

[0108] 可以使用本领域中已知的任何方法来产生可以用于产生具有所希望的特征（例如，所希望的特异性，所希望的亲和力，所希望的功能性，例如阻断、非阻断、抑制、激活等）的双特异性抗体的免疫球蛋白重链可变区。然后，可以通过将包含可变区的核酸序列克隆到具有本文中所描述的所希望的重链恒定区的构建体中来构建所希望的重链。

[0109] 在一个实施方案中，第一重链包含由源自第一动物（其已用第一抗原进行免疫接种）的成熟 B 细胞基因组的核酸所编码的可变区，并且第一重链特异性地识别第一抗原。在一个特别的实施方案中，第二重链包含由源自第二动物（其已用第二抗原进行免疫接种）的成熟 B 细胞基因组的核酸所编码的可变区，并且第二重链特异性地识别第二抗原。

[0110] 在一个实施方案中，第一动物和 / 或第二动物为包含未重排的人免疫球蛋白重链可变区的经基因改造的动物。在一个实施方案中，第一动物和 / 或第二动物为包含未重排的人免疫球蛋白重链可变区和人免疫球蛋白恒定区的经基因改造的动物。在一个实施方案中，第一动物和 / 或第二动物为包含未重排的人免疫球蛋白重链可变区的经基因改造的小鼠。

[0111] 免疫球蛋白重链可变区序列可以通过本领域中已知的任何其他方法（例如，通过噬菌体展示）来获得，并且可以将由此所获得的序列用于制备核酸构建体以用于连接至编码任何合适的重链（例如，具有如在本文中所描述的经修饰的 CH3 结构域的重链）的核酸，并置于表达构建体中和转移至能够产生重链（例如，在合适的轻链存在下）的细胞。

[0112] 免疫球蛋白轻链

[0113] 包含识别两个不同表位（或两个不同抗原）的两条重链的双特异性抗体更容易被分离，在它们可以与相同的轻链（即具有相同的可变结构域和恒定结构域的轻链）相配对时。在本领域中已知各种方法用于产生轻链，所述轻链可以与具有不同特异性的两条重链相配对，而不干扰或基本上不干扰重链可变结构域与其靶抗原的选择性和 / 或亲和力。

[0114] 在一种方法中，轻链可以通过下述方式来选择：调查所有轻链可变结构域的使用统计学，鉴定出人抗体中最频繁使用的轻链，并且将该轻链与具有不同特异性的两条重链相配对。

[0115] 在另一种方法中，轻链可以通过下述方式来选择：观察噬菌体展示文库（例如，包含人轻链可变区序列的噬菌体展示文库，例如人 ScFv 文库）中的轻链序列，并且从该文库

中选择出最经常使用的轻链可变区。

[0116] 在另一种方法中,轻链可以通过下述方式来选择:使用两条重链的重链可变序列作为探针来对轻链可变序列的噬菌体展示文库进行检定。与两个重链可变序列都相联合的轻链被选择作为用于所述重链的轻链,并且允许相关于两个表位的结合和/或激活。

[0117] 在另一种方法中,轻链可以通过下述方式来选择:将已知的轻链与所希望的重链相组合,并且就结合特异性、亲和力和/或激活能力来对所得到的双特异性抗体进行检定。

[0118] 在任何用于选择轻链的方法中遇到困难(例如,所述轻链干扰所述重链中的一条或两条与其抗原的结合,或者所述轻链不能与所述重链中的一条或两条令人满意地相联合)的情况下,可以将所述轻链与所述重链的关联轻链进行比对,并且在所述轻链中产生修饰以便更接近地匹配对于该两条重链的关联轻链来说共同的序列特征。如果免疫原性的机会需要被最小化,那么所述修饰优选地导致在已知的人轻链序列中存在的序列,从而蛋白水解加工不可能产生 T 细胞表位,基于在领域中已知用于评估免疫原性的可能性的参数和方法(即,计算机测定法以及湿测定法)。

[0119] 抗体和结合蛋白

[0120] 所述组合物和方法在制备人双特异性抗体(即包含人恒定结构域和可变结构域的双特异性抗体)中是特别有用的。在一些实施方案中,人抗体包括具有源自人种系免疫球蛋白序列(在一些实施方案中,源自经体细胞突变的人免疫球蛋白序列(例如,在包含人免疫球蛋白基因序列的动物中产生的))的重链可变结构域和重链恒定结构域的那些抗体。在一些实施方案中,人可变区和/或恒定区可以包含不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基或者由于例如在 CDR(特别是 CDR3)中的重组和/或剪接而编码的氨基酸残基。人抗体并不想要包括其中已经将源自另一哺乳动物物种(例如小鼠)的种系的 CDR 序列嫁接到人构架序列上的抗体。那些抗体被称为人源化的或嵌合的抗体。人抗体包括包含突变(例如,通过随机或位点专一诱变而在体外引入的)的那些抗体,但是所述突变优选地在人种系中是非免疫原性的。

[0121] 所述方法和组合物可以用于制备嵌合抗体,其优选地在人种系中是非免疫原性的,或具有低免疫原性。嵌合抗体是其中重链可变区或构架区或 CDR 或者重链恒定区或结构域之一来自不同物种(例如,人和小鼠,或者人和灵长类)的抗体。在一些实施方案中,嵌合抗体包括具有非人来源(例如,小鼠)的重链可变区和人来源的重链恒定区的抗体。在一些实施方案中,嵌合抗体包括具有人来源的重链可变区和非人(例如,小鼠)来源的重链恒定区的抗体。在各种实施方案中,小鼠来源的区域与具有或没有体细胞高变的小鼠免疫球蛋白种系序列相同或基本上相同。嵌合抗体还包括这样的抗体,所述抗体具有与人免疫球蛋白种系序列相同或基本上相同的轻链恒定区和非人(例如,小鼠)重链或嵌合的人/非人重链。嵌合抗体包括这样的抗体,所述抗体具有与非人(例如,小鼠)免疫球蛋白种系序列相同或基本上相同的轻链恒定结构域和人重链或嵌合的非人/人重链。

[0122] 在一些实施方案中,所述组合物和方法用于制备经亲和力成熟的抗体。在一些实施方案中,经亲和力成熟的抗体在一个或多个 CDR 中包含一个或多个改变,其导致相比于缺乏所述改变的基本上相同的抗体而言更高的所述抗体对于其靶抗原的亲和力(例如,在 nM 或 pM 范围内的 K_D)。经亲和力成熟的抗体可以通过本领域中已知的任何合适的方法来制备,例如,通过 CDR 和/或构架区的随机或位点定向诱变,随后为亲和筛选、VH 结构域改

组等。

[0123] 在一些实施方案中,所述抗体为中和抗体。中和抗体包括能够中和、抑制或阻止抗原的生物学活性的抗体。中和抗体包括在结合抗原后阻止或降低所述抗原在体内和体外作用于该抗原的天然靶的能力的那些抗体。中和抗体的实例包括针对生物学受体的蛋白质配体的抗体,其阻止所述配体结合所述受体,或者针对生物学受体的抗体,其阻止所述受体结合其配体,其中在不存在所述抗体的情况下的配体结合引起所述受体在细胞内产生变化。确定一种抗体是否为中和抗体通常需要进行功能测定法,其中测量所述抗体对于所述抗原的生物学活性的影响。

[0124] 本发明的方法和组合物在各种关于抗体和其他结合蛋白的应用中也是有用的。本文提供了一些有用应用的简短描述。

[0125] 可以制备包含针对肿瘤抗原和 T- 细胞抗原的结合特异性的双特异性结合蛋白,其靶向细胞上的抗原,例如 CD20,并且还靶向 T- 细胞上的抗原,例如 CD3。以这样的方式,所述双特异性抗体靶向患者中的目的细胞(例如,淋巴瘤患者中的 B 细胞,通过 CD20 结合)以及该患者的 T- 细胞。在各种实施方案中,对所述双特异性抗体进行设计,以便在结合 CD3 后激活 T- 细胞,从而将 T- 细胞激活与特定的、所选择的肿瘤细胞相偶联。

[0126] 也可以制备包含两个结合部分的双特异性蛋白,所述两个结合部分中的每个针对在相同细胞的表面上的结合伙伴(即,每个针对不同的靶)。该设计特别适合于靶向在相同细胞的表面上表达该两种靶的特定细胞或细胞类型。尽管靶可能独个地出现在其他细胞上,但是对这些结合蛋白的结合部分进行选择,从而使得每个结合部分以相对低的亲和力(例如,低 μM , 或高 nM ——例如,超过一百 nM 的 K_D , 例如 500、600、700、800 nM) 结合其靶。以这样的方式,仅在所述两种靶在相同细胞上邻近的情况下,才有利于延长的靶结合。

[0127] 可以制备包含结合相同靶的两个结合部分的双特异性结合蛋白,所述两个结合部分中的每个在相同靶的不同表位处结合。该设计特别适合于使成功地用结合蛋白阻断靶的可能性最大化。多个细胞外环(例如,跨膜通道或细胞表面受体的细胞外环)可以被相同的双特异性结合分子所靶向。

[0128] 可以制备包含两个结合部分的双特异性结合蛋白,所述两个结合部分簇集并激活免疫信号传导的负调节物,从而导致免疫抑制。当所述靶在相同的细胞上时,可以实现顺式阻抑;当所述靶在不同的细胞上时,可以实现反式阻抑。顺式阻抑,例如可以用具有抗 -IgGRIIb 结合部分和抗 -Fe1D1 结合部分的双特异性结合蛋白来实现,从而使得 IgGRIIb 仅在 Fe1D1 存在下才被簇集,以便下调对于 Fe1D1 的免疫应答。反式阻抑,例如可以用具有抗 -BTLA 结合部分和特异性地结合组织特异性目的抗原的结合部分的双特异性结合蛋白来实现,从而使得抑制性 BTLA 分子的簇集仅在所选择的靶组织中发生,这潜在地处理自身免疫疾病。

[0129] 可以制备激活多组分受体的双特异性结合蛋白。在该设计中,针对受体的两个组分的两个结合部分结合该受体,使该受体交联,并激活从该受体的信号传导。这可以例如使用具有结合 IFNAR1 的结合部分和结合 IFNAR2 的结合部分的双特异性结合蛋白来进行,其中结合使该受体交联。这样的双特异性结合蛋白可以提供关于干扰素治疗的备选方案。

[0130] 可以制备转运结合部分跨越半渗透性屏障(例如,血脑屏障)的双特异性结合蛋白。在该设计中,一个结合部分结合可以越过特定的选择性屏障的靶;另一个结合部分靶向

具有治疗活性的分子,其中该具有治疗活性的靶分子通常不能穿过该屏障。这种类型的双特异性结合蛋白对于将治疗剂带至否则治疗剂将不会到达的组织是有用的。一些实例包括靶向 pIGR 受体以转运治疗剂进入肠或肺,或者靶向运铁蛋白受体以转运治疗剂跨越血脑屏障。

[0131] 可以制备转运结合部分进入特定细胞或细胞类型的双特异性结合蛋白。在该设计中,一个结合部分靶向容易地内在化到细胞中的细胞表面蛋白(例如,受体)。另一个结合部分靶向细胞内蛋白质,其中所述细胞内蛋白质的结合导致治疗效应。

[0132] 结合吞噬免疫细胞的表面受体和感染性病原体(例如,酵母或细菌)的表面分子以将所述感染性病原体带至吞噬免疫细胞附近从而促进所述病原体的吞噬的双特异性结合蛋白。此类设计的一个实例可以为靶向 CD64 或 CD89 分子和也靶向病原体的双特异性抗体。

[0133] 具有抗体可变区作为一个结合部分和具有非 Ig 部分作为第二个结合部分的双特异性结合蛋白。所述抗体可变区实现靶向,而所述非 Ig 部分为与 Fc 相连接的效应子或毒素。以这样的方式,配体(例如,效应子或毒素)被递送至由该抗体可变区所结合的靶。

[0134] 具有两个部分的双特异性结合蛋白,所述两个部分中的每个结合至 Ig 区(例如,包含 CH2 和 CH3 区的 Ig 序列),从而使得任何两个蛋白质部分可以在 Fc 的情境下被带至彼此附近。该设计的实例包括诱捕剂(trap),例如,同源二聚或异源二聚的诱捕剂分子。

[0135] 核酸

[0136] 可以通过本领域中已知的任何合适的方法来获得编码单克隆抗体的核酸序列。用于获得单克隆抗体(和其核酸序列)的合适方法的实例包括,例如,通过杂交瘤方法(参见,例如 Kohler 等人,(1975)Nature 256 :495-497)或噬菌体抗体文库(参见,例如,参见 Clackson 等人,(1991)Nature 352 :624-628)。

[0137] 在各种实施方案中,所述免疫球蛋白重链可变结构域源自经基因改造的动物或转基因动物的核酸序列。在一些实施方案中,所述区域源自包含人免疫球蛋白小基因座(minilocus)的动物。在一些实施方案中,所述区域源自包含一个或多个染色体外核酸的小鼠,所述染色体外核酸包含一个或多个编码免疫球蛋白序列的核酸。在各种实施方案中,所述动物可以具有一个或多个未重排的人免疫球蛋白核酸序列。在一些实施方案中,所述动物包含人轻链可变区核酸序列,在一些实施方案中,包含人重链可变序列,在一些实施方案中,包含重链和轻链可变序列,和在一些实施方案中,还包含人恒定区序列。在一个特别的实施方案中,所述核酸序列源自其中内源性小鼠重链可变区基因区段和轻链可变区基因区段已经被人重链可变区基因区段和轻链可变区基因区段替换的小鼠。

[0138] 在一些实施方案中,所述核酸序列源自这样的动物的幼稚 B 细胞或 T 细胞。在其他实施方案中,所述核酸序列源自用目的抗原进行免疫接种的动物的 B 细胞或 T 细胞。

[0139] 在各种实施方案中,所述核酸序列通过用引物(包括例如,成组的简并引物,其包含一个或多个 FR 序列、连接序列或恒定序列)扩增它们而源自细胞。

[0140] 在各种实施方案中,所述免疫球蛋白可变结构域源自用目的抗原进行免疫接种的动物的核酸。例如,用目的抗原对非人的转基因或经基因改造的动物进行免疫接种(通过例如,使动物暴露于该抗原或者携带该抗原或编码该抗原的可表达形式的核酸的细胞),从而允许所述动物经历免疫应答,从所述动物中分离免疫细胞(例如,B 细胞),可选地使所

述细胞永生化,和筛选所述细胞以鉴定与该抗原的反应性和/或鉴定和/或分离核酸序列,所述核酸序列编码当置于抗体的情境下时能够识别该抗原的免疫球蛋白可变区。在一些实施方案中,所述细胞为B细胞。在一些实施方案中,使用经免疫接种的动物的B细胞来制备杂交瘤,并且鉴定表达特异性地识别所述抗原的表位的抗体的B细胞,以及鉴定和/或分离编码识别所述表位的可变区氨基酸序列的核酸序列。

[0141] 在一些实施方案中,所述核酸源自人、非人灵长类(例如,猿类例如黑猩猩)、猴类(例如,食蟹猴或恒河猴)、啮齿类(例如,小鼠、大鼠、仓鼠)、驴、山羊、绵羊等。

[0142] 在一些实施方案中,所述重链包含源自人细胞的序列。例如,在体外暴露于抗原并置于合适的宿主动物(例如,SCID小鼠)的人胎儿细胞。

[0143] 在一些实施方案中,使用载体将所述核酸引入到细胞中。载体包括,例如质粒、粘粒、反转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、植物病毒、YAC、BAC、EBV-衍生的附加体。

[0144] 在一些实施方案中,所述核酸存在于表达载体或表达构建体中。在一些实施方案中,所述表达载体或构建体为包含启动子的载体,所述启动子有效地连接至目的核酸序列,从而使得该目的核酸序列能够在合适的细胞中在合适的条件下进行表达。表达载体或构建体可以包含前导序列、增强子、增强转录或翻译的启动子元件、转录终止序列、剪接序列、增强转录的内含子、IRES元件、标记基因、选择序列、重组酶识别位点、同源臂、病毒序列、操纵基因(例如,原核操纵基因)等。在一些实施方案中,所述表达载体包含允许诱导型表达的元件,例如,有效地连接至真核启动子的原核操纵基因。在一些实施方案中,在添加表达诱导物后,诱导了表达。在其他实施方案中,在去除表达抑制物后,诱导了表达。在一些实施方案中,通过温度变化来诱导表达。

[0145] 在一些实施方案中,一个或多个重链核苷酸序列在同一个载体上。在一些实施方案中,此处的重链核酸序列和轻链核酸序列在同一个载体上。在一些实施方案中,两个重链核酸序列和轻链核酸序列在同一个载体上。

[0146] 在一些实施方案中,所述核酸在包含一个或多个来自病毒的核酸的细胞中表达。在特别的实施方案中,所述病毒选自腺病毒、腺伴随病毒、SV-40、EB病毒、反转录病毒、慢病毒、杆状病毒、冠状病毒、单纯疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒、塞姆利基森林病毒、新培斯病毒和痘苗病毒。

[0147] 宿主细胞为可以被转化以表达目的核酸的细胞。在各种实施方案中,转化包括改变细胞的核酸内容,从而使得它包含外源核酸(例如,在自然界中未在所述细胞中发现的核酸,或者一个或多个额外拷贝的相应于在自然界中在所述细胞中发现的核酸序列的核酸)。可以通过本领域中已知的任何合适的方法来改变细胞的核酸内容,例如,通过将核酸整合到细胞的基因组中或者通过将它以染色体外或基因组外的形式置于细胞中。在一些实施方案中,可以改变细胞的核酸内容从而使得所述细胞瞬时地表达目的核酸,或者可以改变核酸内容从而使得所述细胞稳定地表达目的核酸。在一些实施方案中,当细胞分裂时,细胞的基因内容的改变得到遗传。

[0148] 分离双特异性抗原结合蛋白

[0149] 一旦基于此处的信息而选择了合适的成组修饰,就尝试通过使用本领域中已知的方法来分离双特异性抗原结合蛋白。在每种情况下,仅应用公开的方法并不提供令人满意的分开。

[0150] Lindhofer 等人制备了具有异源二聚重链的双特异性抗体（其中具有一条结合 A 蛋白的重链（小鼠 IgG）和一条不结合 A 蛋白的重链（大鼠 IgG）），并且用从中性至 pH 5.8 的 pH 阶梯式梯度（以洗脱异源二聚体），然后用从 5.8 至 3.5 的 pH 阶梯（以洗脱小鼠 / 小鼠同源二聚体），成功地将大鼠 / 小鼠异源二聚双特异性抗体与小鼠 / 小鼠和大鼠 / 大鼠二聚体的四源杂交瘤混合物相分开。（参见，Lindhofer 等人，(1995) *Preferential species-restricted heavy/light chainpairing in rat/mouse quadromas :Implications for a single-steppurification of bispecific antibodies.* J. Immunol. 155(1) :219-225）。

[0151] 当应用于将 IgG1 同源二聚体与具有两条相同的但 IgG1 CH3 结构域之一包含 H435R/Y436F 二肽修饰的 IgG1 重链的 IgG1 异源二聚体相分开时，Lindhofer 方法不成功。发明人发现，在线性 pH 梯度中，经二肽修饰的 IgG1 在大约 pH 3.9 处洗脱，而 IgG1 同源二聚体在大约 pH 3.7 处洗脱。该 pH 差异被认为不足以达到使用 Lindhofer 方法令人满意地将异源二聚体与同源二聚体相分开。可预测地，该差异不是可重复的。

[0152] 在采用相对较大的离子强度（其由为了保持特定的 pH 阶梯或梯度所需要的缓冲液强度所贡献）的层析运行中观察到层析行为的变化。但通过添加有机改性剂（1- 丙醇）并未达到令人满意的分开。然而，有些令人惊讶地，对于一些层析运行来说，添加 0.5M 至 1.0M 的离子改性剂（例如，NaCl）急剧地和出人意料地改善了同源二聚 IgG1 和异源二聚 IgG1 的分开。离子改性剂的添加拓宽了用于洗脱的 pH 范围（在具有离子改性剂时为 1.2 个 pH 单位，但在没有离子改性剂时为 0.2 个 pH 单位），从而使得 pH 阶梯式梯度可以成功地分开所述两个种类。但是，在其他的运行中，用仅大约 150mM 的 NaCl 浓度达到了令人满意的分开（参见实施例 4）。为了确保可以达到令人满意的分开，在一个实施方案中，双特异性抗原结合蛋白的分离在大约 0.5 至大约 1.0M 的离子改性剂存在下进行。

[0153] 因此，在一个实施方案中，用于分离双特异性抗原结合蛋白（其包含具有包含如在本文中所描述的修饰的一条链的异源二聚 IgG）的方法包括在离子改性剂存在下采用 pH 梯度的步骤。在一个实施方案中，所述离子改性剂以足以使 IgG 同源二聚体和如在本文中所描述的（即，具有 CH3 修饰的）IgG 异源二聚体从 A 蛋白支持物上的洗脱之间的 pH 差异最大化的浓度存在。在一个特别的实施方案中，所述离子改性剂以大约 0.5 至大约 1.0M 的浓度存在。在另一个特别的实施方案中，所述离子改性剂以大约 0.15 至大约 0.5M 的浓度存在。

[0154] 在一个实施方案中，所述离子改性剂为盐。在一个实施方案中，所述离子改性剂为碱金属或碱土金属与卤素的盐。在一个特别的实施方案中，所述盐为碱金属或碱土金属的氯化物盐，例如 NaCl、KCl、LiCl、CaCl₂、MgCl₂。在一个特别的实施方案中，所述盐以大约 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 或 1.0 的体积摩尔浓度存在。

[0155] 在一个实施方案中，所述 pH 梯度从大约 pH 3.9 至大约 pH 4.5；在另一个实施方案中，从大约 pH 4.0 至大约 pH 4.4；和在另一个实施方案中，从大约 pH 4.1 至大约 pH 4.3。在一个特别的实施方案中，所述梯度为线性梯度。

[0156] 在一个实施方案中，所述 pH 梯度为阶梯式梯度。在一个实施方案中，所述方法包括给经平衡的 A 蛋白柱（例如，在 PBS 或另一种合适的缓冲液或液体中进行平衡）应用大约 pH 3.9，大约 pH 4.0，大约 pH 4.1，大约 pH 4.2，大约 pH 4.3，或大约 pH 4.4 的阶梯。在

一个特别的实施方案中,所述阶梯为大约 pH 4.2。

[0157] 在一个实施方案中,包含异源二聚 IgG CH3 结构域的双特异性抗体在一个或多个基本上没有非异源二聚 IgG 的级分中从 A 蛋白支持物上洗脱。在一个特别的实施方案中,洗脱出的双特异性抗体级分包含少于总蛋白质的大约 1 重量%,0.5 重量%,或 0.1 重量%的非异源二聚抗体。

实施例

[0158] 给出下列实施例以便给本领域普通技术人员描述如何制备和使用本发明的方法和组合物,但不意欲限制发明人认为是其发明的范围。已作出了努力以确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确度,但应当说明一些实验误差和偏差。除非另外指明,份是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,和压力处于或接近大气压。

[0159] 实施例 1:双特异性 IL-4Ra/IL-6Ra 抗原结合蛋白

[0160] 发现两个已知的人 IgG1 同种型抗体(一个针对 IL-4Ra,和一个针对 IL-6Ra)具有仅相差四个氨基酸的轻链。共表达实验揭示了,抗-IL-4Ra 抗体的轻链可以用来自 IL-6Ra 的轻链替换并仍然保持对于 IL-4Ra 的高亲和力结合,由此使得使用抗-IL-4Ra 重链和抗-IL-6Ra 重链以及相同的轻链来产生双特异性抗体是可行的。因此,将 IL-6Ra 抗体的重链修饰为 Fc Δ Adp 形式(即 CH3 二肽修饰 H95R/Y96F,根据 IMGT 外显子编号)。

[0161] 然后,将抗-IL-6Ra 轻链与抗-IL4Ra/Fc 重链和抗-IL6Ra/Fc Δ Adp 重链在 CHO 细胞中共表达,并且使来自这些细胞的条件培养基经历蛋白 A 层析。在用包含同源二聚体和异源二聚体的混合物的细胞上清液加载 A 蛋白柱后,用 pH 阶梯式梯度来进行洗脱,所述 pH 阶梯式梯度通过改变两种缓冲液(A:100mM 柠檬酸钠,150mM NaCl, pH6.0;和 B:100mM 柠檬酸钠,150mM NaCl, pH 3.0;参见,图 4)的组合以便产生分别在 pH 6.0、pH 4.2 和 pH 3.0 处的三个相而产生。在图 4 中,IL-4R 表示抗-IL-4Ra,和 IL-6R Δ 表示抗-IL-6Ra(IgG1 Δ Adp)。就与 IL-6Ra 和 IL-4Ra 蛋白的结合来对所示的柱级分进行检定(参见,图 5)。进行阶梯式洗脱,从而引起在 pH 4.2 处洗脱的一个峰,和在 pH 3.0 处的第二个峰(图 4)。BIACORE™ 分析显示,如所预期的,流过材料可以结合可溶性 IL-6Ra,但不结合 IL-4Ra(图 5)。相应于 pH4.2 峰的级分可以结合大约相等量的 IL-6Ra 和 IL-4Ra,这与异源二聚体相一致。在 pH 3.0 处洗脱的峰仅可以结合 IL-4Ra,而不结合 IL-6Ra,这相应于所预期的抗-IL-4Ra 同源二聚体。这确立了,用简单的 pH 阶梯式梯度,通过使用 A 蛋白层析可以有效地分离异源二聚双特异性抗体。

[0162] 实施例 2:Fc Δ Adp 蛋白的药物代谢动力学

[0163] 为了测试 Fc Δ Adp 修饰是否影响包含异源二聚 Fc/Fc Δ Adp 的分子的药物动力学,给小鼠注射经纯化的上面所描述的抗-IL-4Ra/抗-IL-6Ra 的异源二聚种类,并且在 28 天的时间段内测量血清中人免疫球蛋白的浓度(图 6;表 1)。所述异源二聚体的血清半寿期为大约 10 天,这与野生型的半寿期类似。这确立了, Fc Δ Adp 修饰对于血清半寿期没有可检测的影响。

表 1. 药物动力学 (n = 5)

药物	测试出的半寿期 (天)
	(平均值 ± 标准偏差)
IL-6R Δ /IL-4R	11.2 ± 1.8
IL-6R Δ /IL-6R Δ	10.8 ± 1.9
IL-4R/IL-4R	10.8 ± 1.9
对照	11.2 ± 1.9

[0164]

[0165] 实施例 3 : 双特异性 CD20/CD3 抗原结合蛋白

[0166] 发现, 当与已知的 (激活性) 抗 - 人 CD3 抗体的轻链共表达时, 已知的抗 - 人 CD20 抗体的重链仍然能够结合 CD20。然后, 将抗 - CD3 轻链与抗 - CD20/Fc 重链、抗 - CD3/Fc Δ Adp 重链或者这两条重链共表达。然后, 将所得到的同源二聚体和异源二聚体的混合群体用于生物测定法中以测定杀伤表达 CD20 的靶细胞的能力 (图 7)。简而言之, 将 2×10^7 个人 PBMC 细胞用 6×10^7 个 CD3xCD28 珠 (Invitrogen) 激活 72 小时。然后, 添加三十个单位的 IL-2 (R&D Systems), 并将所述细胞温育额外的 24 小时。然后, 将所述细胞分成 0.5×10^6 / mL 的浓度, 并添加额外的 30U IL-2。然后, 将所述细胞温育额外的 48 小时, 并用于生物测定法中。在进行生物测定法的那天, 将 2×10^6 / mL 的表达 CD20 的靶细胞 (Raji) 用 8uM 钙荧光素 -AM (Invitrogen) 标记 30 分钟。在 200 微升的具有含有所示量的抗体的上清液的总体积中, 将经洗涤的靶细胞以 1 : 10 的靶细胞 : 效应细胞比例添加至经激活的 hPBMC 细胞 (220,000 个总细胞 / 孔)。将细胞温育 2 小时, 并且收集上清液和对荧光进行定量。通过计算特定荧光与最大荧光的比例来测量细胞毒性。CD20 抗体 (单独的) (使用抗 - CD3 轻链) 和抗 - CD3 抗体都不能引起靶细胞的杀伤; 甚至混合该两种试剂也没有效应。但是, 当共表达所有三种组分时, 观察到显著的杀伤, 这表明该效应归因于异源二聚双特异性种类。基于所估计的在经瞬时转染的 CHO 细胞上清液中的双特异性抗体的量, 估计该效应的 EC_{50} 为大约 15pM。

[0167] 实施例 4 : 用经纯化的双特异性 CD20/CD3 抗原结合蛋白的细胞杀伤特异性

[0168] 使如在实施例 3 中所描述的来自转染的 CHO 细胞上清液经历 A 蛋白亲和层析, 其中使用阶梯式梯度用于洗脱。通过改变两种缓冲液 (A : 20mM 柠檬酸钠, 1M NaCl, pH 5.2 ; B : 20mM 柠檬酸钠, 1M NaCl, pH2.7) 的组合以便产生分别在 pH 5.2、pH 4.2 和 pH 2.8 处的三个相来产生所述阶梯式梯度。然后, 将来自在 pH 4.2 处洗脱的峰的蛋白质用于如在实施例 3 中所描述的细胞杀伤测定法。在 3pM 的 EC_{50} 处观察到靶细胞杀伤 (图 8)。进行额外的细胞毒性测定法, 其检查了所观察到的杀伤的靶特异性。在该实验中, 将经标记的表达 CD20 的靶细胞 (Raji) 或没有 CD20 的靶细胞 (293) 与经激活的人 PBMC 一起进行温育。将每个靶细胞类型单独地或者与另一类型的未标记的靶细胞相联合地添加至所述测定法。在所有情况中, 表达 CD20 的靶细胞以 3pM 的 EC_{50} 被特异性地杀伤, 而 CD20 阴性的细胞系不被杀伤。

[0169] 实施例 5 : 经差别修饰的 hIgG2Fc 的 A 蛋白分离

[0170] 首先通过经过 A 蛋白柱 (rProtein A FF, GE) 的“结合 - 和 - 洗涤”方法来富集经差别修饰的异源二聚人 IgG2 Fc/ Δ AdpFc 和未修饰的人同源二聚 IgG2Fc/Fc。为了进一步将 hIgG2 Fc/ Δ AdpFc 与 hIgG2 Fc/Fc 相分开,如下通过使用 SMART™ 系统 (GE) 来进行阶梯式梯度洗脱。溶剂系统由溶剂 A (PBS, 1X)、溶剂 B (20mM 柠檬酸钠和 1M NaCl, pH 5.5) 和溶剂 C (20mM 柠檬酸钠和 1M NaCl, pH 2.5) 组成。所述洗脱以在第一个 20 分钟内用 100% A 进行的等度洗脱开始,随后在 20 分钟处快速转换至 100% B。然后,在下一个 10 分钟中起始至 33.5% C 和 66.5% B 的线性梯度;将 33.5% 的 C 的浓度维持 20 分钟直至第一个峰 (Fc/ Δ AdpFc) 的完全洗脱。随后施行从 33.5% C 至 100% C 的线性梯度 30 分钟。使流速保持 250 微升 / 分钟,并通过 UV 检测器在 280nm 处检测层析谱。hIgG2Fc/ Δ AdpFc 在 pH 4.5 处洗脱,而 hIgG2 在 pH 3.5 处洗脱。

[0171] 实施例 6 :经差别修饰的 hIgG4Fc 的 A 蛋白分离

[0172] 首先通过经过 A 蛋白柱 (rProtein A FF, GE) 的“结合 - 和 - 洗涤”方法来富集经差别修饰的异源二聚人 IgG4 (Fc/ Δ AdpFc) 和未修饰的同源二聚 IgG4 (Fc/Fc)。为了进一步将 hIgG4Fc/ Δ AdpFc 与 hIgG4Fc/Fc 相分开,如下通过使用 SMART™ 系统 (GE) 来进行阶梯式梯度洗脱。溶剂系统由溶剂 A (PBS, 1X)、溶剂 B (20mM 柠檬酸钠和 1M NaCl, pH 5.1) 和溶剂 C (20mM 柠檬酸钠和 1M NaCl, pH 2.8) 组成。所述洗脱以在第一个 20 分钟内用 100% A 进行的等度洗脱开始,随后在 20 分钟处快速转换至 100% B。然后,在下一个 10 分钟中起始至 50% C 和 50% B 的线性梯度;将 50% 的 C 的浓度维持 20 分钟直至第一个峰 (Fc/ Δ AdpFc) 的完全洗脱。随后施行从 50% C 至 100% C 的线性梯度 30 分钟。使流速保持 250 微升 / 分钟,并通过 UV 检测器在 280nm 处检测层析谱。hIgG4Fc/ Δ AdpFc 在大约 pH 4 处洗脱,而同源二聚体在从大约 pH 4 至 pH 2.8 的梯度期间洗脱。

[0173] 实施例 7 :经差别修饰的 hIgG1 CD3xCD20 的 A 蛋白分离

[0174] 如下在 1mL rProtein A FF (GE Biosciences) 柱上分开经差别修饰的异源二聚抗 -hCD3xCD20 IgG1 (Fc/ Δ AdpFc) 和未修饰的同源二聚抗 -hCD20。溶剂系统为缓冲液 A1 (PBS 1X)、缓冲液 A2 (20mM 柠檬酸钠和 1M NaCl pH 5.1)、缓冲液 B (20mM 柠檬酸钠和 1M NaCl pH 2.8)。使混合的样品结合,并且在 PBS 和缓冲液 A2 中进行洗涤。使用阶梯以达到 4.2 的 pH,其洗脱下双特异性 CD3*xCD20 IgG1 (Fc/ Δ AdpFc),然后从 pH 4.2 至 pH 2.8 的线性梯度洗脱下同源二聚抗 -hCD20 IgG1。

[0175] 实施例 8 :经修饰的 CH3 与 Fc 受体的结合亲和力

[0176] 在 Biacore™ 稳态平衡结合测定法中测试了具有 Δ Adp 修饰 (H435R 和 Y436F, EU 编号) 的人 IgG1 同种型双特异性抗体与各种人 Fc 受体的结合亲和力。

[0177] 简而言之,使用具有偶联有胺的抗 - 五 -his mAb (Qiagen) 的羧甲基化右旋糖酐 (CM5) 芯片来捕获人 Fc 受体的各种不同的构建体。使下列具有 his 标签的 Fc 受体胞外结构域结合至不同的经抗 - 五 -his 包被的 CM5 芯片的表面 :Fc γ RI、Fc γ RIIA (R131 多形核白细胞)、Fc γ RIIB 和 Fc γ RIIIB (每个均从 R&D Systems 获得);以及 Rc γ RIIA (H131 多形核白细胞)、Fc γ RIIIA (V176 多形核白细胞) 和 Rc γ RIIIA (F176 多形核白细胞) (每个均在 Regeneron 制备)。对于高亲和力受体 Fc γ RI 胞外结构域,以三个浓度 (25nM、50nM 和 100nM),和对于低亲和力 Fc γ R 受体胞外结构域,在 5 μ M 至 39nM 之间,使抗体经过表面,并测定结合速率常数和解离速率常数 (k_a 和 k_d) 值,并将其用于计算所述抗体的平衡解离常数

(K_D)。使用处于 pH 7.2 的 HBS-T 缓冲液,在室温下进行结合研究。对于对照抗体 (hmAb)、抗 -CD20 和抗 -CD3 Δ dp 修饰以及 CD20xCD3 Δ dp 双特异性抗体测定 K_D 。抗 -CD3 Δ dp 抗体的 K_D 值揭示相比于未修饰的 hIgG1 同种型抗体而言在与任何所测试的 Fc 受体的结合方面没有显著的差异 (表 2)。

[0178]

表 2. hIgG Ab 与 hFcγR 胞外结构域的结合的 K_D (nM)				
hFcR	人 IgG1 同源二聚体		人 IgG1 Δ Adp	
	hmAb	CD20-hFc	CD3-hFc Δ Adp 同源二聚体	双特异性 CD20xCD3 Δ Adp 异源二聚体
FcγR1	5.00	4.27	3.17	3.61
FcγRIIA (R131)	1,460	739	588	328
FcγRIIA (H131)	915	458	451	222
FcγRIIB	3,400	1,850	1,360	794
FcγRIIIA (V176)	810	430	218	248
FcγRIIIA (F176)	2,500	533	407	267
FcγRIIIB	3,700	1,170	906	520

[0179] 实施例 9:在 hFcRn 小鼠中双特异性 hIgG1 Δ Adp 的药物动力学

[0180] 在野生型 (WT) 小鼠和关于用 hFcRn 基因替换小鼠 FcRn 而言纯合的小鼠 (hFcRn 小鼠) 中测定了双特异性抗 -hCD3/hCD20IgG1 Δ Adp 抗体和其抗体相关对照 (抗 -hCD3 IgG 和抗 -hCD3 IgG Δ Adp 同源二聚体) 的药物动力学清除速率。野生型和 hFcRn 小鼠来自具有包含 C57BL6 (75%) 和 129Sv (25%) 的背景的杂交育种品系。每个组包含 4 只 WT 或 hFcRn 小鼠,除了在接受 IgG1 同种型匹配的对照抗体的一组 WT 小鼠的情况下,在该情况下该组包含 3 只小鼠。小鼠接受 1mg/kg 的同种型 - 匹配的 (hIgG1) 对照、抗 -hCD3xCD20 IgG1 Δ Adp 双特异性、抗 -hCD3 IgG1 或抗 -hCD3 IgG1 Δ Adp 同源二聚体。所有测试物品以皮下方式进行施用。在 0 小时、6 小时、1 天、2 天、3 天、4 天、7 天、10 天、14 天、21 天和 30 天时收集抽血。

[0181] 通过夹心 ELISA 来测定人抗体的血清水平。简而言之,将山羊多克隆抗 - 人 IgG (Fc-特异性的) 抗体 (Jackson ImmunoResearch) 以 1 微克 /mL 的浓度在 96- 孔平板中进行包被,并在 4°C 下温育过夜。在用 BSA 封闭所述平板后,将以 6- 剂量系列稀释物形式的血清样品和以 12- 剂量系列稀释物形式的各自抗体的参考标准添加至所述平板,并在室温下温育一个小时。在洗涤以去除未结合的抗体后,使用缀合有辣根过氧化物酶 (HRP) 的相同的山羊多克隆抗 - 人 IgG (Fc-特异性的) 抗体 (Jackson ImmunoResearch) 来检测经捕获的人抗体,并根据制造商的建议通过标准的比色四甲基联苯胺 (TMB) 底物来进行显色。在平板阅读器上记录在 450nm 处的吸光度,并通过使用在样品平板中产生的参考标准曲线来计算血清样品中 hIgG 的浓度。

[0182] 在所测试的 30- 天时间段期间,没有观察到所述四种 IgG1 抗体的血清半寿期的显著差异。特别地,在具有 Δ Adp 修饰的 IgG1 抗体和野生型 IgG1 抗体之间没有观察到显著

的差异。用野生型 (mFcRn) 小鼠或具有人源化的 FcRn (hFcRn) 的小鼠, 在所述抗体中均未观察到差异。如所预期的, hFcRn 小鼠展示出比野生型小鼠稍微更快的清除。结果显示在表 3 中。

[0183]

表 3. 在小鼠中进行皮下注射后的平均 PK 参数评估				
小鼠 基因型	抗体	n	C _{最大} (mcg/mL)	AUC ((hr) (mcg/mL))
mFcRn	CD3xCD20	4	9.0 ± 2.3	114.3 ± 30.6
	CD3	4	11.1 ± 1.7	175.4 ± 56.4
	CD3ΔAdpΔAdp	4	11.7 ± 1.8	155.3 ± 34.02
	对照 hIgG	3	15.1 ± 3.01	162.5 ± 27.02
hFcRn	CD3xCD20	4	12.3 ± 0.98	83.2 ± 18.6
	CD3	4	7.7 ± 2.2	65.2 ± 16.5
	CD3ΔAdpΔAdp	4	9.9 ± 1.34	70.4 ± 15.4
	对照 hIgG	4	16.1 ± 2.7	131.3 ± 20.4

[0184] 实施例 10 : 在低盐缓冲液中的大规模分离

[0185] 根据本发明, 从大规模培养中分离双特异性 CD3xCD20 Δ Adp 抗体。简而言之, 在 11 升的生物反应器中培养表达双特异性抗 -hCD3xCD20 Δ Adp (在 CD3 重链上的修饰) 抗体的 CHO-K1 细胞系。携带该双特异性抗体的细胞生长至大约 8.25×10^6 个细胞 /mL 的密度, 产生大约 250-350mg 抗体 /L。相反地, 对照抗 -hCD3 抗体的产量为大约 100-150mg/L。

[0186] 在用 10mM 磷酸钠, 0.5M NaCl, pH 7.2 平衡的 MabSelect SuRe™ 树脂 (GE) (20cm 床高, 1cm ID) 上分离抗体, 加载经澄清的细胞培养物至 19g/L, 并用 3 个柱体积的 10mM 磷酸钠, 0.5M NaCl, pH7.2 洗涤柱子, 随后用 2 个柱体积的 20mM 磷酸钠, pH 7.2 (无 NaCl) 进行洗涤。用 40mM 乙酸盐, pH 3.0 洗脱抗体。

[0187] 单特异性抗 -CD30 抗体在 pH 3.6 处洗脱, 而双特异性抗 -hCD3xCD20ΔAdp 在 pH 4.4 处洗脱。

[0188] 实施例 11 : 使用温和 pH 的小鼠异源二聚体的选择性 A 蛋白洗脱

[0189] 用关于与野生型或突变型 (TTTK 或 PTTK)mIgG2a Fc 相融合的人 IFNAR1 (hIFNAR1) 和人 IFNAR2 (hIFNAR2) 细胞外结构域的表达构建体瞬时转染 CHO-K1 细胞。通过用相等量的这两种表达质粒转染细胞来使 hIFNAR1-mFc 和 hIFNAR2-mFc 之间的比例保持在 1 : 1。在转染后 4 天收集培养基, 并使其经历 A 蛋白纯化, 其中使用 0.2mL NAb ProteinA Plus™ 旋转柱 (spin column) (Thermo Scientific/Pierce)。简而言之, 用 1x PBS, pH 7.2 平衡柱子。将 1ml CHO-K1 培养基与 A 蛋白树脂在室温下温育 10 分钟。然后, 用 1xPBS, pH7.2 洗涤柱子三次。用包含 1M NaCl 的 20mM 柠檬酸钠缓冲液洗脱结合的蛋白质。使用 0.4mL 具有逐渐降低的 pH 的洗脱缓冲液进行三次洗脱。通过 Western 印迹分析来检测不同级分中的蛋白质。

[0190] 结果显示, 用 pH 梯度洗脱, 可能将野生型和星状突变型 mIgG2a 的异源二聚体与野生型 mIgG2a 的同源二聚体相分开 (参见图 9 的两个凝胶上的级分 E1)。

[0191] 实施例 12 : 相对于同种型异源二聚体而言优先的 mIgG2a 突变体的异源二聚体形

成

[0192] 构建 DNA 质粒用于具有 C- 末端小鼠 Fc (mIgG2a 或 mIgG1) 的人 I 型干扰素受体 (hIFNAR1 和 hIFNAR2) 的细胞外结构域的哺乳动物表达。使用位点定向诱变引入在 mIgG2a 序列中的突变。突变体为 TTT = M252T、S254T、S256T ; TTK = M252T、S254T、S256T、I258K ; PTTK = I247P、M252T、S254T、S256T、I258K ; RF = H435R、H436F。用所述表达构建体瞬时转染 CHO-K1 细胞。通过用为 hIFNAR2-mFc (mIgG1 或突变型 mIgG2a) 4 倍的 hIFNAR1-mFc 表达质粒 (hIFNAR1-mIgG2a) 转染细胞来使 IFNAR1-mFc 与 IFNAR2-mFc 之间的比例保持在 4 : 1。在转染后 4 天收集培养基, 并通过 Western 印迹分析来检测 mFc 蛋白。

[0193] 结果显示, mIgG2a 和 mIgG1 之间的异源二聚体形成远没有野生型 mIgG2a 和 mIgG2a 突变体之间的异源二聚体形成有效 (比较图 10 的泳道 1 与泳道 2 至 5)。使用 4 : 1 的 IFNAR1 构建体 : IFNAR2 构建体比例以保持在实验中野生型 IgG2a 构建体过量。

[0001]

序列表

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> 容易地分离的具有天然免疫球蛋白形式的双特异性抗体

<130> 0890A-W0

<140> To be assigned

<141> Filed herewith

<150> 61/220,687

<151> 2009-06-26

<160> 7

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

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

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
1				5					10					15	
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
		35				40						45			

[0002]

```

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
  50          55          60
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
  65          70          75          80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
          85          90          95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          100          105

```

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 4
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
  1          5          10          15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
          20          25          30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
          35          40          45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
          50          55          60
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
          65          70          75          80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
          85          90          95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          100          105

```

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 5
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
  1          5          10          15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
          20          25          30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
          35          40          45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
          50          55          60
Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
          65          70          75          80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
          85          90          95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
          100          105

```

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 6
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
  1          5          10          15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
          20          25          30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
          35          40          45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
          50          55          60
Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
          65          70          75          80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
          85          90          95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
          100          105

```

[0003]

<210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 7
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 1 5 10 15
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

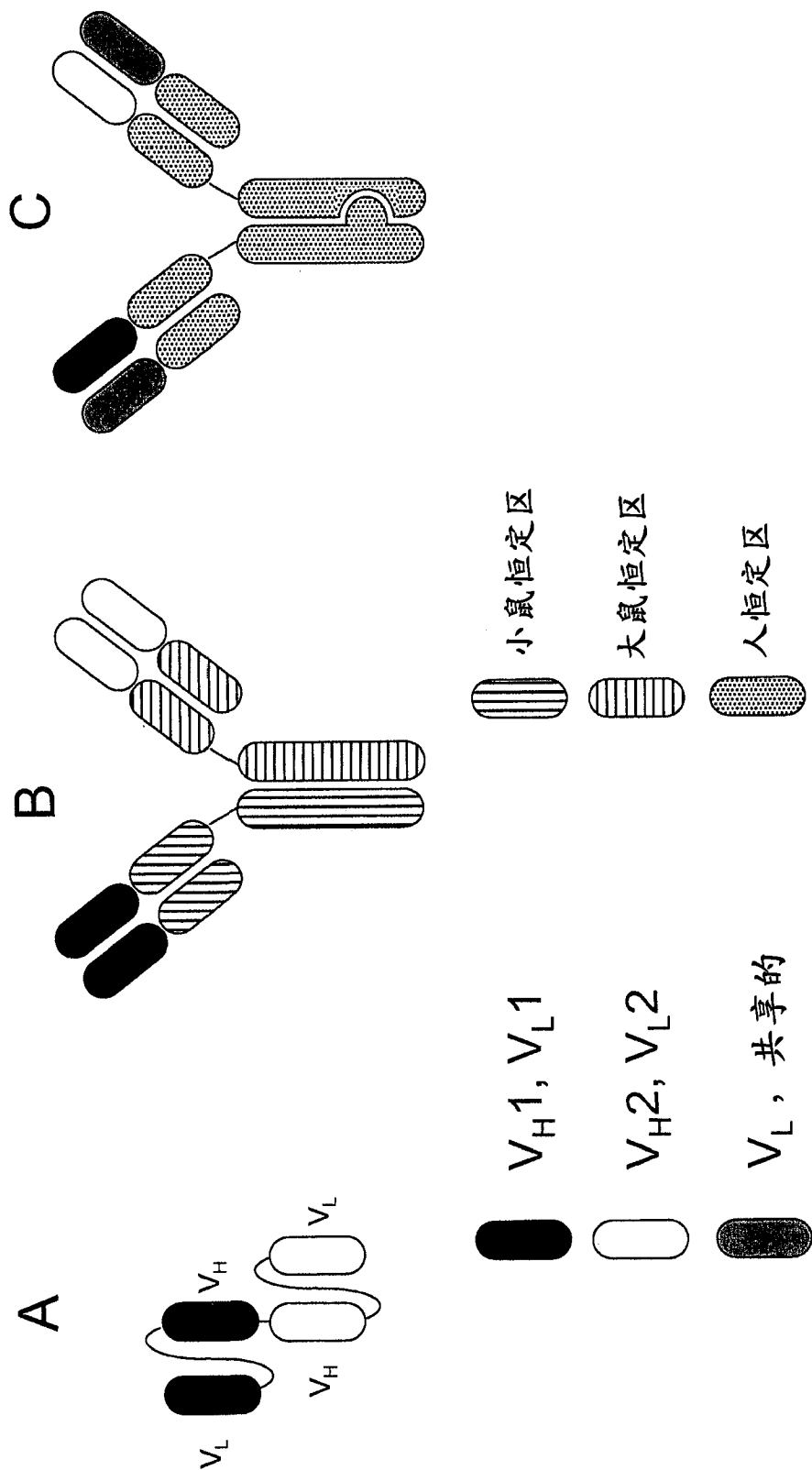


图 1

lgG1 lgG3	252 252	M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P P E V K R N W V V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y	300
	252	M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P P E V Q F K N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T F	300
lgG1 lgG3	301 301	R V V S V L T V L H Q D D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V V Y	349 349
		R V V S V L T V L H Q D D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V V Y	
lgG1 lgG3	350 350	T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G O P E N N Y K T I T P P V D L	398 398
		T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S S G O P E N N Y N T I T P P M T	
lgG1 lgG3	399 399	D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T O K S L S L S P G K	447
		D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N I F S C S V M H E A L H N R F T O K S L S L S P G K	447

图 2

ΔAdp

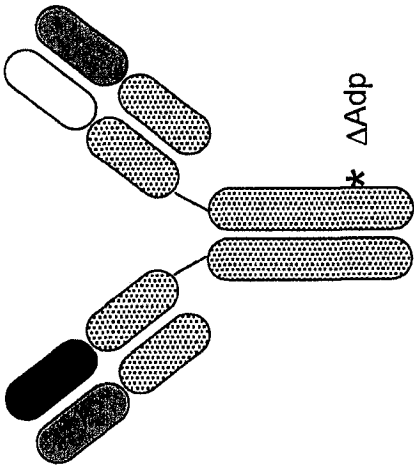


图 2B

IMGT	1	10	20	30	40	50	60
EU	341	350	360	370	380	390	400
higG1	GQPREPQVYT	LPPSRDELTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	YKTTTPPVLD
higG1ΔAdp	GQPREPQVYT	LPPSRDELTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	YKTTTPPVLD
higG2	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	YKTTTPPVLD
higG2ΔAdp	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	YKTTTPPVLD
higG4	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	YKTTTPPVLD
higG4ΔAdp	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	YKTTTPPVLD
higG3	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YNTTTPPVLD	YNTTTPPVLD

IMGT	61	70	80	90	100	107
EU	401	410	420	430	440	447
higG1	DGSFFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:1)
higG1ΔAdp	DGSFFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	ALHNRRFTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:2)
higG2	DGSFFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:3)
higG2ΔAdp	DGSFFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	ALHNRRFTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:4)
higG4	DGSFFFLYSRL	TVDKSRWQEG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSLGK	(SEQ ID NO:5)
higG4ΔAdp	DGSFFFLYSRL	TVDKSRWQEG	NVFSCSVMHE	ALHNRRFTQKS	LSLSLGK	(SEQ ID NO:6)
higG3	DGSFFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	ALHNRRFTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:7)

图 3

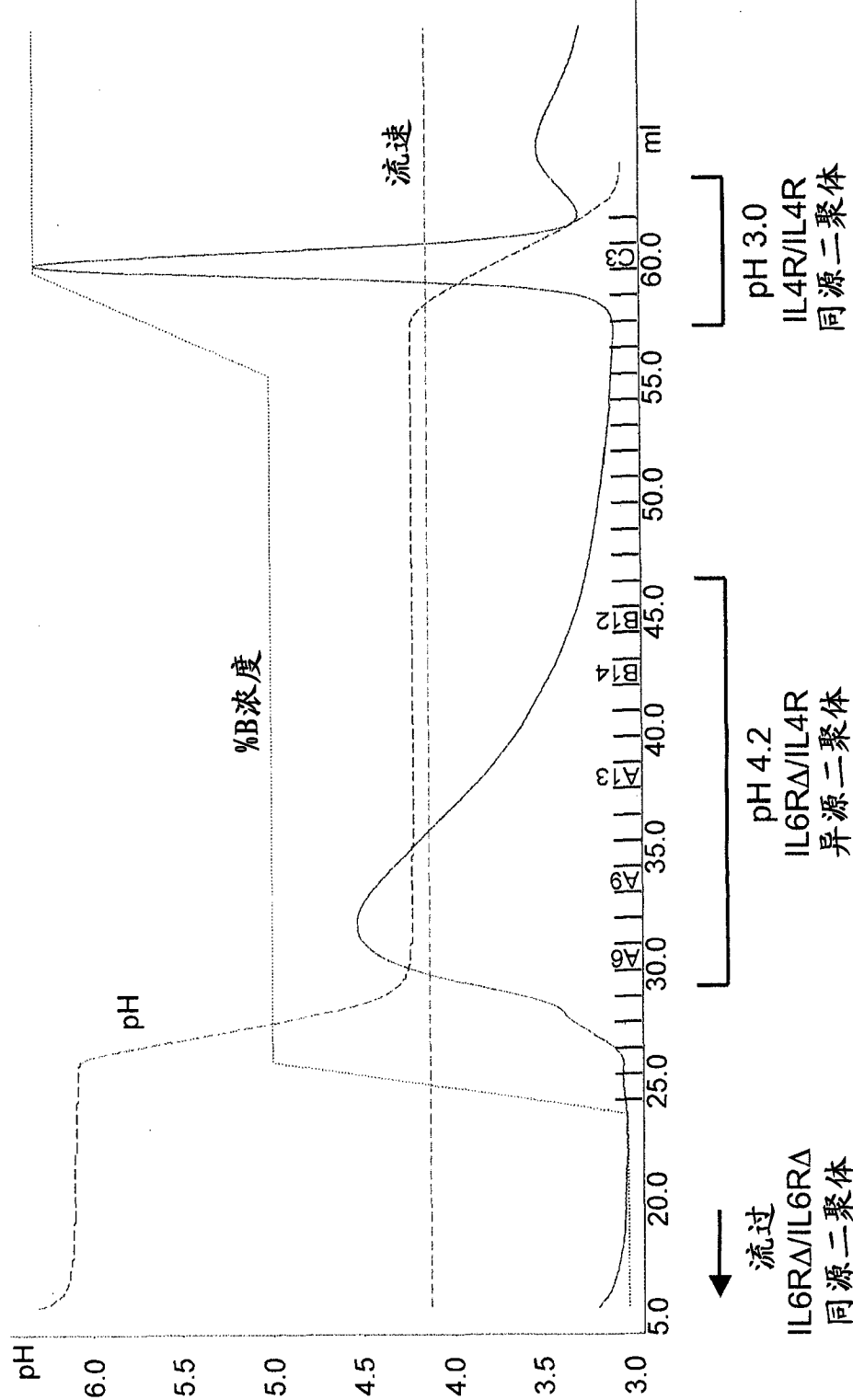


图 4

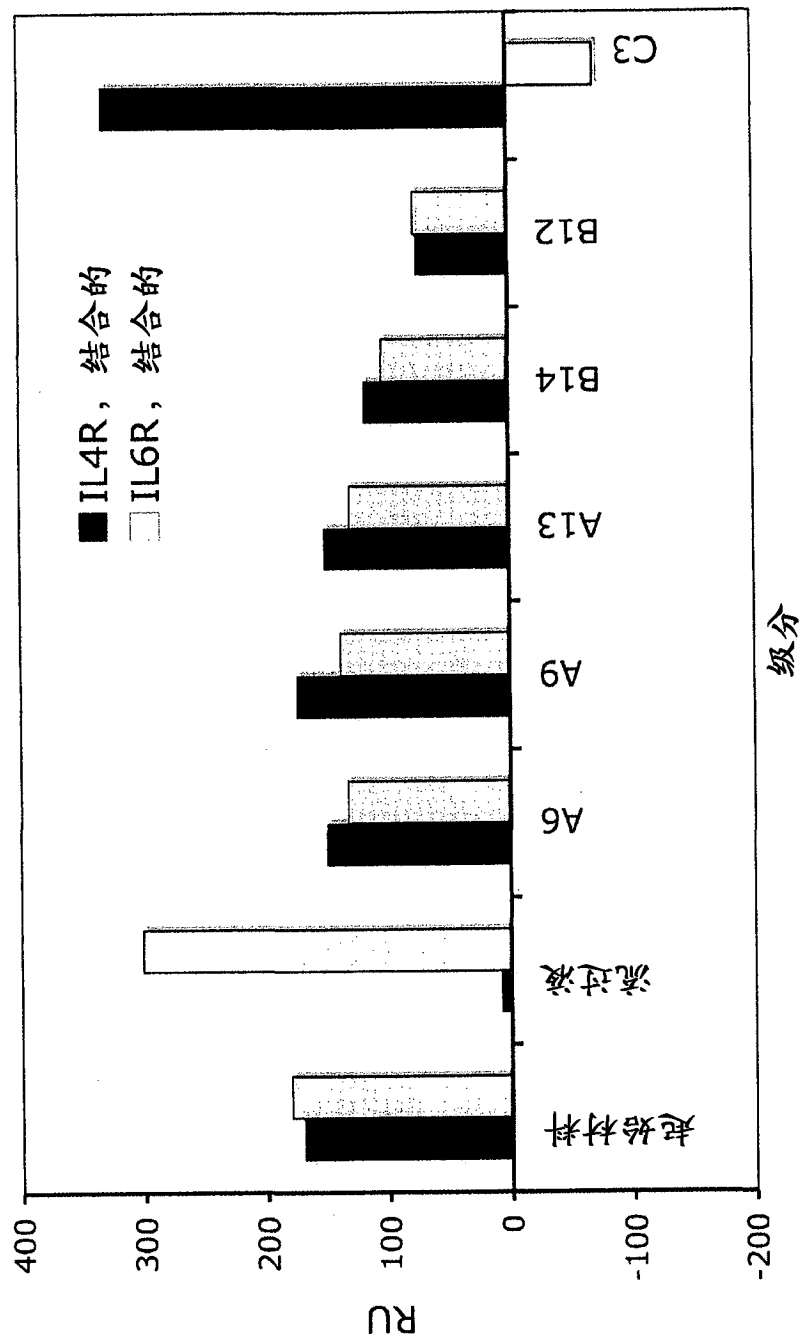


图 5

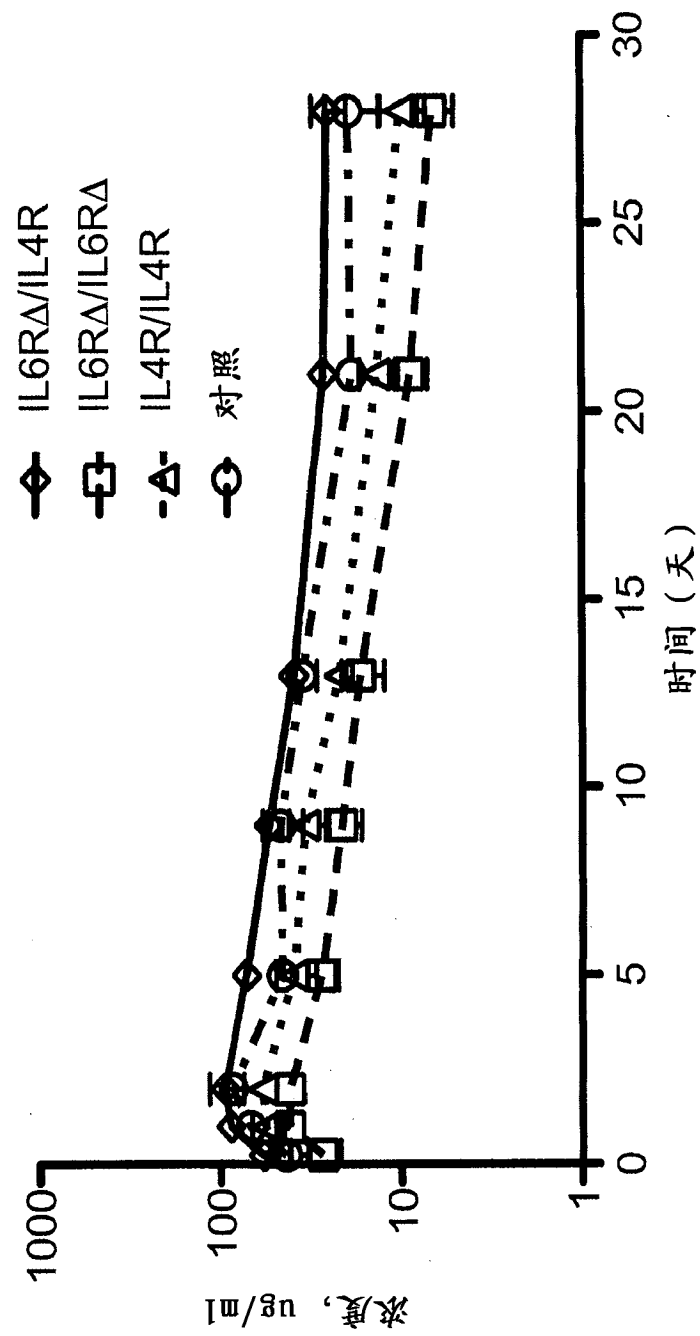


图 6

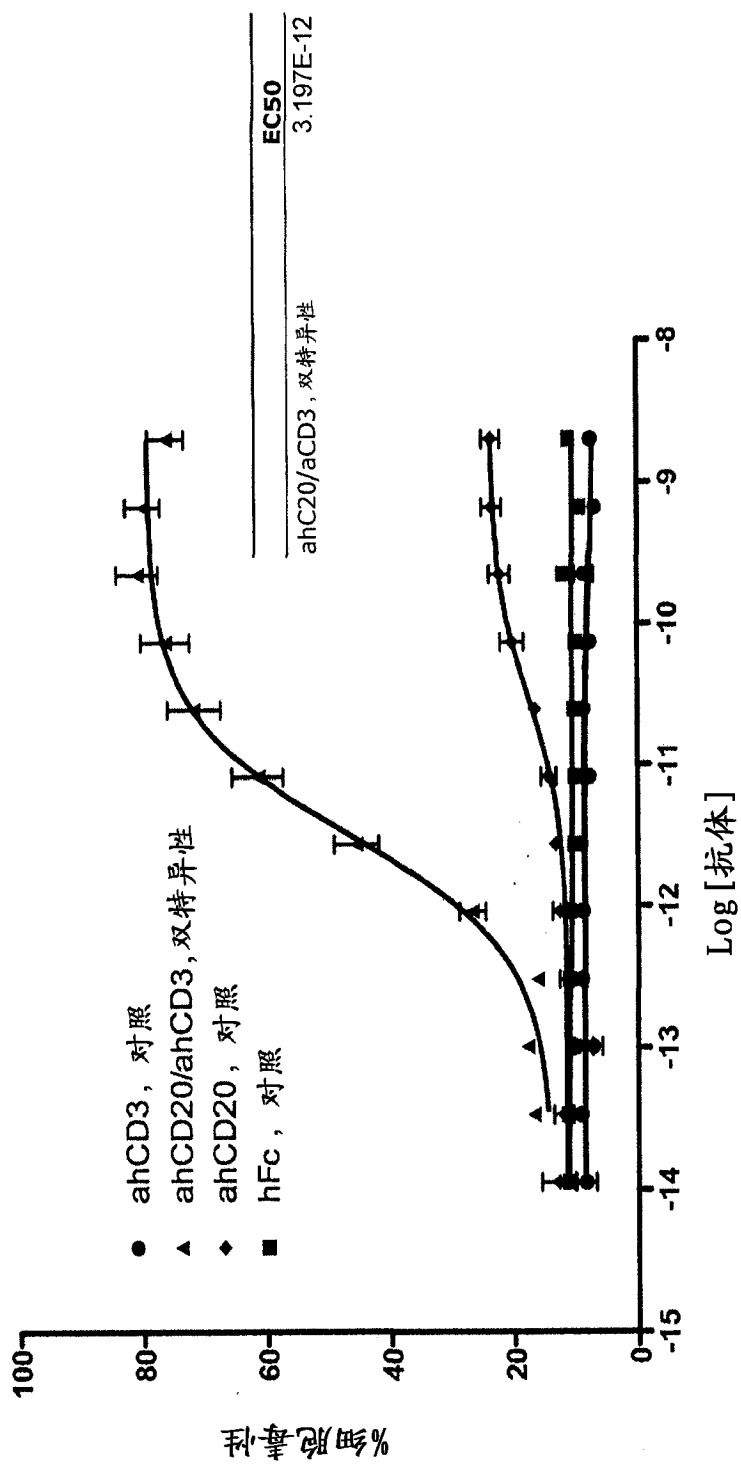


图 7

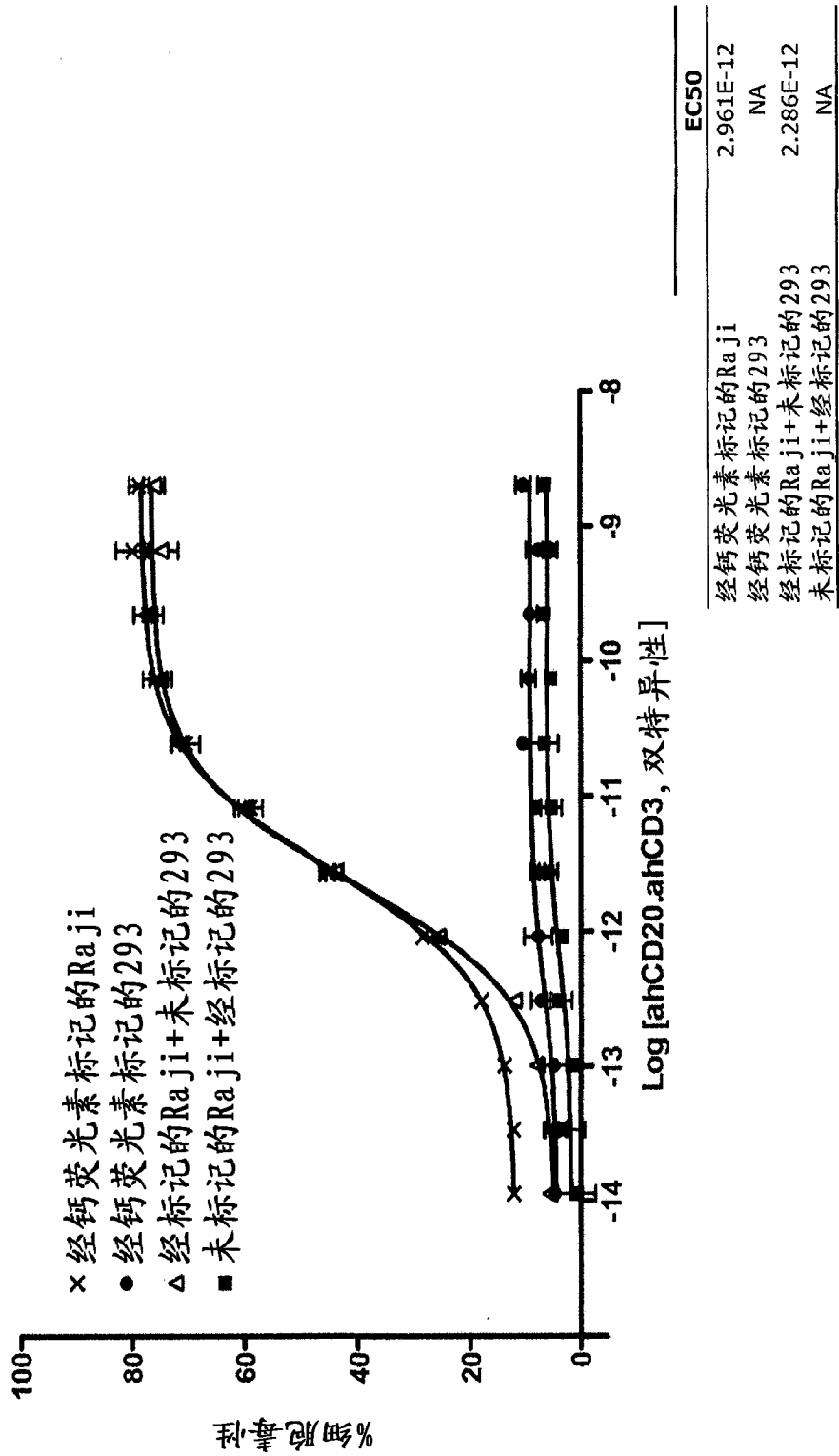


图 8

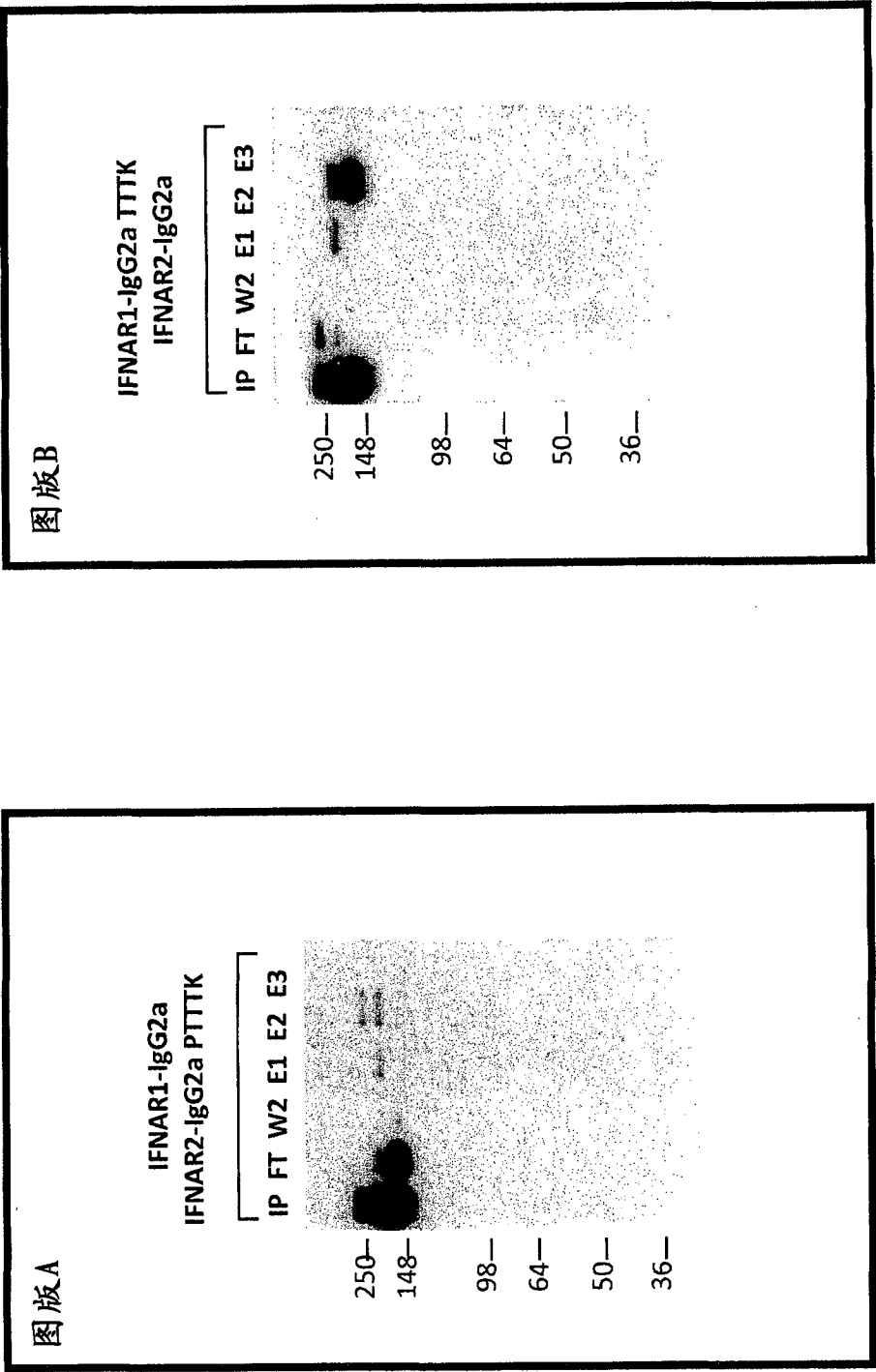


图 9

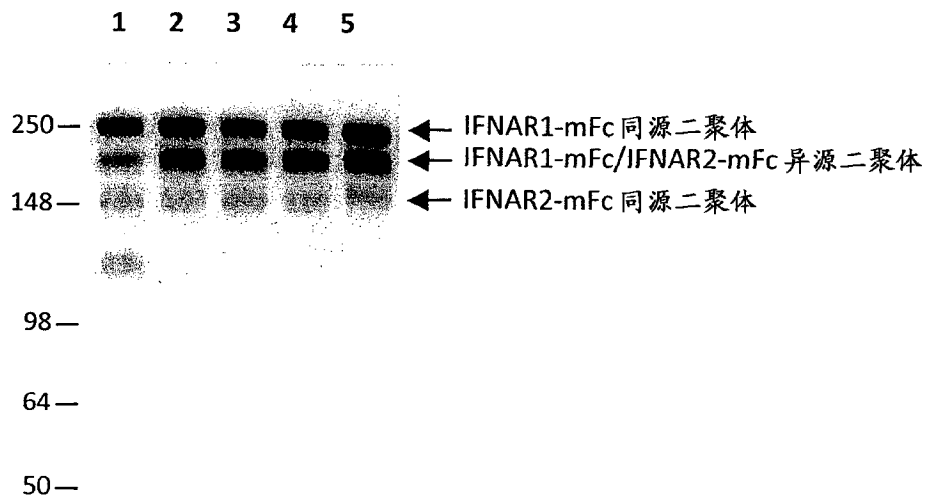


图 10