



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107849136 B

(45) 授权公告日 2022. 04. 01

| | |
|---|---|
| (21) 申请号 201680040714.2 | (51) Int.Cl. |
| (22) 申请日 2016.07.21 | C07K 16/28 (2006.01) |
| (65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 107849136 A | (56) 对比文件 |
| (43) 申请公布日 2018.03.27 | W0 2005111082 A1,2005.11.24 |
| (30) 优先权数据 | W0 2014020140 A1,2014.12.24 |
| 15306192.4 2015.07.22 EP | W0 2011073943 A1,2011.06.23 |
| (85) PCT国际申请进入国家阶段日 | H R Hoogenboom等.Cloning and |
| 2018.01.10 | expression of a chimeric antibody |
| (86) PCT国际申请的申请数据 | directed against transferrin receptor. |
| PCT/EP2016/067465 2016.07.21 | 《The Journal of Immunology》.1990,全文. |
| (87) PCT国际申请的公布数据 | Moura I C等.Identification of the |
| W02017/013230 EN 2017.01.26 | transferrin receptor as a novel |
| (73) 专利权人 伊纳泰里斯公司 | immunoglobulin(Ig)A1 receptor and its |
| 地址 法国埃夫里 | enhanced expression on mesangial cells in |
| (72) 发明人 P·劳奈 C·贝兰格 H·苏谢 | IgA nephropathy..《The Journal of |
| (74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所 | Expeimental Medicine》.2001,第194卷(第4 |
| 11256 | 期),417-425. |
| 代理人 孟凡宏 谢燕军 | 审查员 马驰 |
| | 权利要求书2页 说明书29页 |
| | 序列表20页 附图3页 |

(54) 发明名称
抗TfR抗体及其在治疗增殖性和炎症疾病中的用途

(57) 摘要
本发明涉及特异性结合人转铁蛋白受体的人源化抗体及其在治疗癌症和炎症疾病中的用途。

1. 一种分离的抗TfR抗体或具有抗TfR抗体的抗原结合部分的蛋白, 包含以下任一:

(a) 包含SEQ ID NO:1的HCDR1、SEQ ID NO:2的HCDR2、SEQ ID NO:3的HCDR3的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:4的LCDR1、SEQ ID NO:5的LCDR2和SEQ ID NO:6的LCDR3的可变轻链多肽;

(b) 包含SEQ ID NO:1的HCDR1、SEQ ID NO:2的HCDR2、SEQ ID NO:3的HCDR3的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:4的LCDR1、SEQ ID NO:8的LCDR2和SEQ ID NO:6的LCDR3的可变轻链多肽;

(c) SEQ ID NO:11的VH的可变重链多肽和SEQ ID NO:13的VL的可变轻链多肽;

(d) SEQ ID NO:11的VH的可变重链多肽和SEQ ID NO:14的VL的可变轻链多肽;

(e) SEQ ID NO:12的VH的可变重链多肽和SEQ ID NO:13的VL的可变轻链多肽;

(f) SEQ ID NO:12的VH的可变重链多肽和SEQ ID NO:14的VL的可变轻链多肽;

其中所述抗TfR抗体或蛋白特异性结合SEQ ID NO:16的转铁蛋白受体 (TfR)。

2. 如权利要求1所述的分离的抗TfR抗体或蛋白, 其中所述抗体或蛋白以10nM或更小的 K_D 结合转铁蛋白受体。

3. 如权利要求2所述的分离的抗TfR抗体或蛋白, 其中所述抗体或蛋白以1nM或更小的 K_D 结合转铁蛋白受体。

4. 如权利要求1-3任一项所述的分离的抗TfR抗体或蛋白, 其中所述抗体或蛋白诱导的HL-60细胞系的细胞凋亡水平等于或优于具有SEQ ID NO:9的VH和SEQ ID NO:10的VL的相应参考嵌合抗体的诱导水平。

5. 如权利要求1-3任一项所述的分离的抗TfR抗体或蛋白, 其包含人IgG4同种型恒定区、或突变体或化学改性的恒定区, 其中与具有野生型IgG1同种型恒定区的相应抗体相比, 所述突变体或化学改性的恒定区没有赋予所述抗体ADCC活性或赋予所述抗体降低的ADCC活性。

6. 如权利要求1-3任一项所述的分离的抗TfR抗体或蛋白, 其包含人IgG1同种型恒定区、或突变体或化学改性的恒定区, 其中与具有野生型IgG1同种型恒定区的相应抗体相比, 所述突变体或化学改性的恒定区赋予所述抗体增加的ADCC活性。

7. 如权利要求1-3任一项所述的分离的抗TfR抗体或蛋白, 其是SEQ ID NO:18的重链和SEQ ID NO:17的轻链的mAb1。

8. 如权利要求1-7任一项所述的分离的抗TfR抗体或蛋白在制备 (i) 药物或 (ii) 诊断性试剂盒中的用途。

9. 如权利要求1-7任一项所述的分离的抗TfR抗体或蛋白在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

10. 根据权利要求9所述的用途, 其中所述肿瘤是血液系统肿瘤。

11. 根据权利要求10所述的用途, 其中所述血液系统肿瘤是淋巴瘤或白血病。

12. 如权利要求1-7任一项所述的分离的抗TfR抗体或蛋白在制备用于治疗实体瘤、移植抗宿主病或炎性疾病的药物中的用途。

13. 一种药物组合物, 包含与一种或多种药学可接受的赋形剂、稀释剂或载体组合的如权利要求1-12任一项所述的抗TfR抗体或蛋白。

14. 如权利要求13所述的药物组合物, 还包含其他活性成分。

15. 一种冻干物制剂、预充注射器或小瓶, 包含如权利要求1-7任一项所述的抗TfR抗体或蛋白。

16. 用于在宿主细胞中重组生产如权利要求1-7任一项所述的抗TfR抗体的克隆或表达载体, 包含至少一种编码所述抗TfR抗体的核酸。

17. 如权利要求16所述的克隆或表达载体, 包含至少一种编码如权利要求7所定义的mAb1的核酸。

18. 宿主细胞, 包含如权利要求16或17所述的克隆或表达载体。

19. 一种用于生产如权利要求1-7任一项所述的抗TfR抗体或蛋白的方法, 包括: (i) 培养如权利要求18所述的宿主细胞以通过所述宿主细胞表达所述抗体或蛋白; 和(ii) 回收所述抗体或蛋白。

20. 如权利要求19所述的用于生产抗TfR抗体或蛋白的方法, 在培养步骤(i) 和回收步骤(ii) 之间包括纯化所述抗体或蛋白的步骤。

21. 如权利要求1-3任一项所述的抗TfR抗体, 其与治疗性部分偶联。

22. 如权利要求21所述的抗TfR抗体, 其中所述治疗性部分是细胞毒素、药物或放射性毒素。

抗TfR抗体及其在治疗增殖性和炎性疾病中的用途

技术领域

[0001] 下文公开的是特异性结合TfR转铁蛋白受体的抗体。这种抗体尤其可用于治疗增殖性和炎性疾病，例如淋巴瘤或白血病。更具体地，本公开涉及与相应的亲本鼠源抗体A24相比具有等效或改进性质的具体的人源化抗TfR抗体，或其与人IgG1恒定区的嵌合版本。

背景技术

[0002] 转铁蛋白受体(CD71)(下文称为“TfR”)是二硫键连接的同型二聚体跨膜糖蛋白，由两个各自约90kDa的760个氨基酸的单体组成。TfR在调控铁吸收和细胞生长中起关键作用(Gill等,N Engl J Med.,332,1744-1748,1995-Hermine等,N Engl J Med.,332,1749-1751,1995)。当二铁转铁蛋白结合其细胞表面受体时，其经由网格蛋白包被的小窝被内化至其中解离铁-转铁蛋白络合物的酸性囊泡。释放后，受体和去铁-转铁蛋白循环回到细胞表面。

[0003] TfR在不断更新的组织(例如骨髓中血细胞的前体、肝脏中肝细胞、表皮中角化细胞和肠上皮隐窝中肠上皮细胞)的细胞质膜上组成型表达。

[0004] 若干研究表明，TfR在恶性组织中的表达比其在健康的相应物中更丰富(Gatter等,J Clin Pathol.,36,539-545,1983-Faulk等,Lancet.,2,390-392,1980-Shindelman等,Int J Cancer,27,329-334,1981)。若干作者报道了基于利用与药物偶联的抗TfR抗体或转铁蛋白本身来杀死恶性细胞的这种想法的治疗方法。

[0005] 还提出了使用抗TfR抗体阻断转铁蛋白和TfR之间的相互作用，从而阻止铁吸收，导致铁剥夺和细胞生长的负调控。然而，尽管许多出版物描述了抗TfR抗体的制备，几乎没有报道具有抗增殖活性的抗TfR单克隆抗体(mAb)。

[0006] Trowbridge和Lopez(Proc.Natl Acad Sci USA,79,1175-1179,1982)报道了称为42/6且类型为IgA(k)的单克隆抗体的性质，所述抗体阻断转铁蛋白与其受体的结合并能够通过阻断细胞周期的S期细胞来体外抑制人T白血病细胞系的生长。42/6抗体和产生其的杂交瘤(ATCC HB-8094)公开于美国专利4,434,156中。

[0007] Lesley等(Mol Cell Biol.5,1814-21,1985)研究了属于IgG或IgM类的抗鼠源转铁蛋白受体单克隆抗体对转铁蛋白的结合和对鼠淋巴瘤细胞体外生长的影响。他们观察到IgM抑制细胞生长但IgG不，尽管它们能够诱导TfR的下调和降解。然而，通过抗免疫球蛋白抗体交联的IgG能够抑制细胞生长。在随后的工作中，相同的团队(Lesley等,Exp Cell Res.,182,215-33,1989)研究了IgG和IgM单克隆抗TfR抗体及其单价和二价片段对鼠淋巴瘤细胞生长和TfR表达的影响。他们报道，这些影响取决于通过抗体的转铁蛋白受体的交联度，其是抗体效价的结果。单价抗体片段没有明显的影响；二价抗体片段诱导细胞表面受体表达的下调而不损害其内化和再循环且不损害细胞生长；多价IgM诱导抗体-络合的受体积聚在细胞表面上，阻断其内化并导致细胞生长的强烈抑制。

[0008] 上文引用的现有技术似乎表明，抗TfR抗体的抗增殖性质在各种抗体之间完全不同，且它们不能基于其阻断或不阻断转铁蛋白结合其受体的能力来预测。

[0009] 在之前的出版物(Moura等,J Exp Med,194,417-425,2001)中,发明人报道了结合人TfR的命名为A24的小鼠单克隆IgG(IgG2kappa)。

[0010] WO2005/111082公开了A24抗体,一种能够阻断T细胞增殖的鼠源抗体,其似乎比之前描述的mAb 42/6更有效地抑制T细胞增殖。A24以竞争性方式阻止Tf结合TfR。A24也降低TfR表达并损害TfR再循环。A24也能够阻断来自急性和慢性形式的两种ATL的恶性T细胞的离体增殖(Moura等,Blood,103,5,1838-45,1March 2004,Callens等,2010;J.Exp.Med., Vol 207No 4,pp731-750)。该抗体已被描述为能够阻止体外和体内的套细胞淋巴瘤发展(Lepelletier等Cancer Res 2007;67:1145-1154;Callens等2008,Leukemia,22,42-48)。

[0011] 对于向人施用,目前强制人源化鼠源抗体以避免免疫原性反应。然而,当进行A24抗体的第一人源化过程时,发明人发现所有人源化变体的结合丧失和细胞凋亡性质。因此,发明人不得不在若干人源化步骤中设计A24的特定变体,其结合保留的A24亲本抗体的功能性质和预测的降低的对人的免疫原性。

[0012] 发明简述

[0013] 因此,本公开涉及一种分离的抗TfR抗体或具有抗TfR抗体的抗原结合部分的蛋白,包含以下任一:

[0014] (a) 包含SEQ ID NO:1的HCDR1、SEQ ID NO:2的HCDR2、SEQ ID NO:3的HCDR3的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:4的LCDR1、SEQ ID NO:5的LCDR2和SEQ ID NO:6的LCDR3的可变轻链多肽;

[0015] (b) 包含SEQ ID NO:1的HCDR1、SEQ ID NO:2的HCDR2、SEQ ID NO:3的HCDR3的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:4的LCDR1、SEQ ID NO:8的LCDR2和SEQ ID NO:6的LCDR3的可变轻链多肽;

[0016] (c) 包含SEQ ID NO:11的VH的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:13的VL的可变轻链多肽;

[0017] (d) 包含SEQ ID NO:11的VH的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:14的VL的可变轻链多肽;

[0018] (e) 包含SEQ ID NO:11的VH的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:15的VL的可变轻链多肽;

[0019] (f) 包含SEQ ID NO:12的VH的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:13的VL的可变轻链多肽;

[0020] (g) 包含SEQ ID NO:12的VH的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:14的VL的可变轻链多肽;

[0021] (h) 包含SEQ ID NO:12的VH的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:15的VL的可变轻链多肽;

[0022] 其中所述抗TfR抗体或蛋白特异性结合SEQ ID NO:16的转铁蛋白受体。

[0023] 在具体的实施方式中,所述抗体或蛋白以10nM或更小的 K_D ,优选1nM或更小的 K_D 结合转铁蛋白受体。

[0024] 在另一个具体的实施方式中,所述抗体或蛋白诱导的HL-60细胞系的细胞凋亡水平等于或优于用具有SEQ ID NO:9的VH和SEQ ID NO:10的VL的亲本鼠源可变区的相应嵌合抗体测量的诱导水平。

[0025] 优选地,根据本公开的这种抗TfR抗体是人源化抗TfR抗体。

[0026] 在另一个可以与之前的实施方式结合的具体的实施方式中,所述抗TfR抗体包含人IgG4同种型恒定区、或突变体或化学改性的恒定区,其中与具有野生型IgG1同种型恒定区的相应抗体相比,所述突变体或化学改性的恒定区没有赋予所述抗体ADCC活性或赋予所述抗体降低的ADCC活性。或者,所述抗TfR抗体或蛋白可以包含人IgG1同种型恒定区、或突变体或化学改性的恒定区,其中与具有野生型IgG1同种型恒定区的相应抗体相比,所述突变体或化学改性的恒定区赋予所述抗体增加的ADCC活性。

[0027] 根据本发明的抗体的实例包括人源化抗TfR抗体mAb1-mAb16,如下文尤其是表1所描述。

[0028] 本文还公开了如上所定义的分选的抗TfR抗体或蛋白用作药物,或用于诊断,例如用于治疗肿瘤。所述肿瘤优选是血液系统肿瘤,例如淋巴瘤或白血病。

[0029] 或者,所述分离的抗TfR抗体或蛋白也可以用于治疗HTLV-1相关疾病,以降低与HTLV-1感染有关的炎性疾病,包括HAM/TSP、多肌炎和关节炎中的病毒载量。

[0030] 本公开进一步涉及包含与一种或多种药学可接受的赋形剂、稀释剂或载体组合的上述抗TfR抗体或蛋白的药物组合物。药物组合物可以另外包括其他活性成分。

[0031] 在具体的实施方式中,所述组合物是冻干物制剂,或预充注射器或预充小瓶,其包含治疗可接受量的如上定义的抗TfR抗体或蛋白。

[0032] 本公开还涉及编码如上定义的抗体或蛋白的至少重链和/或轻链可变区的分离的核酸;包含一个或多个这种核酸的克隆或表达载体;或用于在宿主细胞中重组生产如上定义的抗TfR抗体的克隆或表达载体。

[0033] 在具体的实施方式中,克隆或表达载体包含至少一种编码如以下实施例中定义的mAb1-mAb16的任一种的重链和轻链多肽的以下核酸。

[0034] 本公开还涉及包含如上定义的一种或多种克隆或表达载体的宿主细胞。

[0035] 本公开进一步涉及用于生产如上定义的抗TfR抗体或蛋白的方法,包括:(i)培养本公开的宿主细胞以通过宿主细胞表达所述抗体或蛋白;任选(ii)纯化所述抗体或蛋白;和(iii)回收所述抗体或蛋白。

附图说明

[0036] 图1是显示根据HL-60细胞凋亡诱导测定所测量,与具有亲本A24可变区的嵌合INA01抗体相比,INA01的最初6个人源化变体(INA01变体1-6)缺乏细胞凋亡诱导的图。

[0037] 图2是显示根据HL-60细胞凋亡诱导测定所测量,第二轮人源化变体(INA01变体7-11)的细胞凋亡效果改进,但仍低于具有亲本A24可变区的嵌合INA01抗体的图。

[0038] 图3是显示根据HL-60细胞凋亡诱导测定所测量,第三轮人源化变体(INA01变体12-17)的细胞凋亡的有效诱导,优于具有亲本A24可变区的嵌合INA01抗体的图。

[0039] 图4是mAb1-mAb16的产量:示出了基于2个生产批次的各次产生的抗体mAb1-mAb16的量(mg)。

[0040] 图5显示具有亲本A24VL的根据本公开的VL序列的比对(图5A)和具有亲本A24VH的根据本公开的VH序列的比对(图5B)。

[0041] 发明详述

[0042] 定义

[0043] 为了使本公开更容易被理解,首先定义了某些术语。其他的定义如贯穿发明详述所示。

[0044] 术语“免疫反应”是指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和由上述细胞或肝脏产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用,其导致对侵入病原体的人体、感染病原体的细胞或组织、癌细胞,或自身免疫或病理性炎症情况下的正常人细胞或组织的选择性损害、破坏或消除。

[0045] “信号转导途径”或“信号转导活性”是指通常由蛋白-蛋白相互作用(例如生长因子与受体的结合)引起的生化因果关系,导致信号从细胞的一部分传送到细胞的另一部分。通常,传送涉及在一系列引起信号转导的反应中一种或多种蛋白质上的一个或多个酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基的特异性磷酸化。倒数第二个过程典型地包括核事件,其导致基因表达改变。

[0046] 除非另有描述,术语CD71或转铁蛋白受体或TfR是指如SEQ ID NO:16定义的人TfR。

[0047] 本文引用的术语“抗体”包括完整抗体和其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。

[0048] 天然存在的“抗体”是包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。各重链由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。各轻链由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可以进一步再分成称为互补决定区(CDR)的高变区,穿插有称为框架区(FR)的更保守的区域。各VH和VL由三个CDR和四个FR组成,其从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如效应子细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。

[0049] 本文使用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗原部分”)是指保留特异性结合抗原(例如一部分TfR)的能力的全长抗体或抗体的一个或多个片段。已经表明,抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段进行。术语抗体的“抗原结合部分”内涵盖的结合片段的实例包括Fab片段;由V_L、V_H、C_L和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)₂片段;包含通过绞链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;由V_H和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体的单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段;由在绞链区具有改性的IgG重链(例如IgG4)的单臂组成的Unibody,结构域抗体片段(Ward等,1989Nature341:544-546);或由V_H结构域组成的纳米抗体片段;和分离的互补决定区(CDR),或包含这种抗原结合部分的任何融合蛋白。

[0050] 此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由独立的基因编码,它们可以利用重组方法通过合成接头连接,使得它们成为其中VL和VH区域配对形成单价分子的单链蛋白(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等.,1988Science 242:423-426;和Huston等.,1988Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883)。这种单链抗体也意欲涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体片段使用本领域技术人员已知的常规方法获得,并以和完整抗体相同的方法筛选片段的有效性。

[0051] 如本文所使用的“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体

的抗体(例如,特异性结合TfR的分离的抗体基本上不含特异性结合TfR以外的其他抗原的抗体)。然而,特异性结合TfR的分离的抗体可以与其他抗原例如来自其他物种的TfR分子具有交叉反应。此外,分离的抗体可以基本上不含其他的细胞材料和/或化学品。

[0052] 本文使用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物对于具体的表位显示单一的结合特异性和亲合性。

[0053] 如本文所使用,“同种型”是指由重链恒定区基因提供的抗体类别(例如,IgM、IgE、IgG如IgG1或IgG4)。

[0054] 短语“识别抗原的抗体”和“抗原特异性的抗体”在本文中可与术语“特异性结合抗原的抗体”互换使用。

[0055] 如本文所使用,“特异性结合抗原”,例如“特异性结合TfR”的抗体或蛋白是指以100nM或更小、10nM或更小、1nM或更小的 K_D 结合所述抗原(例如SEQ ID NO:16的人TfR)的抗体或蛋白。

[0056] 如本文所使用的术语“ K_D ”意欲是指由 K_d 与 K_a 之比(即 K_d/K_a)获得的解离常数,并以摩尔浓度(M)表示。抗体的 K_D 值可通过本领域公认的方法测定。一种用于测定抗体的 K_D 的方法是通过利用表面等离子共振,或利用生物传感器系统例如 **Biacore**[®] 系统。用 **Biacore**[®] 系统测量抗TfR抗体 K_D 的方法描述于以下实施例中。

[0057] 如本文所使用的术语“ K_{assoc} ”或“ K_a ”意欲是指具体的抗体-抗原相互作用的结合速率,而如本文所使用的术语“ K_{dis} ”或“ K_d ”意欲是指具体的抗体-抗原相互作用的解离速率。

[0058] 如本文所使用,术语“亲合性”是指在单一抗原位点的抗体和抗原之间相互作用的强度。在各抗原位点内,抗体“臂”的可变区通过弱的非共价力与抗原的众多位点相互作用;相互作用越多,亲合性越强。

[0059] 如本文所使用,术语“亲合力”是指抗体-抗原络合物的总体稳定性或强度的信息测量。它由三种主要因素控制:抗体表位亲合性;抗原和抗体两者的效价;和相互作用部分的结构排列。最终这些因素定义抗体的特异性,即特定抗体结合精确的抗原表位的可能性。在具体的实施方式中,本公开所述抗TfR抗体是二价抗体。

[0060] 如本文所使用,术语“HL-60细胞系”是指由Collins等(PNAS 1978,75:2458-1462)衍生以及在Gallagher等(Blood,1979,54:713-733)中描述的早幼粒细胞,例如可在 **ATCC**[®] 保藏中心以保藏号CCL-240TM获得。

[0061] 如本文所使用,抗体A24是指W02005/111082中公开的抗体。

[0062] 如本文所使用,术语“ADCC”或“抗体依赖性细胞毒性”活性是指细胞耗尽活性。ADCC活性可以通过可商购的ADCC测定测量,例如,Promega以Ref#G7015销售的ADCC报道基因生物测定,以及如实施例中所述简要描述。

[0063] 如本文所使用,术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有的脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、母牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0064] 如本文所使用,术语“优化的”是指已经改变核苷酸序列以使用在生产细胞或生物,通常是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人细胞中优选的密码子编码氨基酸序列。将优化的核苷酸序列工程化以完全保留或尽可能保留由起始核苷酸序列初始编码的氨

核酸序列。由优化的核苷酸序列编码的氨基酸序列也被称为是优化的。

[0065] 如本文所使用,两条序列之间的百分比同一性是序列共有的相同位置数的函数(即%同一性=相同位置数/总位置数 \times 100),考虑需要被引入以用于两条序列的最佳比对的空位数和各空位的长度。序列的比较和两条序列之间百分比同一性的确定可以利用如下所述的数学算法完成。

[0066] 两条氨基酸序列之间的百分比同一性可以利用整合入ALIGN程序(2.0版)的E.Meyers和W.Miller(Comput.Appl.Biosci.,4:11-17,1988)的算法,利用PAM120权重残基表,空位长度罚分为12和空位罚分4来测定。或者,两条氨基酸序列之间的百分比同一性可以利用整合入GCG软件包的GAP程序(可在<http://www.gcg.com>获得)的Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.48:444-453,1970)算法测定,利用Blossom 62矩阵或PAM 250矩阵,和空位权重为16、14、12、10、8、6或4和长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0067] 两条氨基酸序列之间的百分比同一性还可以利用例如算法诸如用于核酸序列的BLASTN程序来测定,默认字长(W)为11,期望值(E)为10,M=5,n=4,并比较两条链。

[0068] 重组抗体

[0069] 本公开抗体包括人源化重组抗体mAb1-mAb16,其是分离的且结构上的特征在于可变重链和轻链的氨基酸序列和人恒定同种型,如下表1所示:

[0070] 表1:mAb1-mAb16的可变重链和轻链的氨基酸序列

| 抗体 | VH 氨基酸序列 | VL 氨基酸序列 | 同种型恒定区 |
|-------|--------------------|--------------------|------------|
| mAb1 | SEQ ID NO:11 (VH4) | SEQ ID NO:13(VL4) | IgG4 |
| mAb2 | SEQ ID NO:11 (VH4) | SEQ ID NO:14 (VL5) | IgG4 |
| mAb3 | SEQ ID NO:12 (VH5) | SEQ ID NO:13 (VL4) | IgG4 |
| mAb4 | SEQ ID NO:12 (VH5) | SEQ ID NO:15 (VL6) | IgG4 |
| mAb5 | SEQ ID NO:11 (VH4) | SEQ ID NO:13(VL4) | IgG1 |
| mAb6 | SEQ ID NO:11 (VH4) | SEQ ID NO:14 (VL5) | IgG1 |
| mAb7 | SEQ ID NO:12 (VH5) | SEQ ID NO:13 (VL4) | IgG1 |
| mAb8 | SEQ ID NO:12 (VH5) | SEQ ID NO:15 (VL6) | IgG1 |
| mAb9 | SEQ ID NO:11 (VH4) | SEQ ID NO:13(VL4) | IgG1 (AA) |
| mAb10 | SEQ ID NO:11 (VH4) | SEQ ID NO:14 (VL5) | IgG1 (AA) |
| mAb11 | SEQ ID NO:12 (VH5) | SEQ ID NO:13 (VL4) | IgG1 (AA) |
| mAb12 | SEQ ID NO:12 (VH5) | SEQ ID NO:15 (VL6) | IgG1 (AA) |
| mAb13 | SEQ ID NO:11 (VH4) | SEQ ID NO:13(VL4) | IgG1 N297A |
| mAb14 | SEQ ID NO:11 (VH4) | SEQ ID NO:14 (VL5) | IgG1 N297A |
| mAb15 | SEQ ID NO:12 (VH5) | SEQ ID NO:13 (VL4) | IgG1 N297A |
| mAb16 | SEQ ID NO:12 (VH5) | SEQ ID NO:15 (VL6) | IgG1 N297A |

[0072] 用于制备mAb1-mAb16的IgG4、IgG1及其突变体形式IgG1AA和IgG1N297A的同种型恒定区的相应氨基酸和核苷酸编码序列是本领域众所周知的。

[0073] mAb1的全长轻链和重链和相应编码序列显示于下表2。

[0074] 表2:全长重链和轻链DNA编码序列

| 抗体 | 氨基酸序列 | DNA 编码序列 |
|------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| mAb1 | 重链: SEQ ID NO:18 轻链: SEQ ID NO:17 | 重链: SEQ ID NO:20 轻链: SEQ ID NO:19 |

[0076] 根据本公开的一些抗体的VH CDR1(也称为HCDR1)、VH CDR2(也称为HCDR2)、VH CDR3(也称为HCDR1)、VL CDR1(也称为LCDR1)、VL CDR2(也称为LCDR2)、VL CDR3(也称为HCDR3)的氨基酸序列的实例显示于表3。

[0077] 表3中,本公开的一些抗体的CDR区使用Chothia系统(Chothia C,Lesk AM.1987,J Mol Biol 196,901-917)描述。

[0078] 便于阅读,CDR区下文中分别称为HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、CDR3。

[0079] 表3:根据Chothia定义的mAb1-mAb16和参考A24抗体的CDR区

| 初始抗体 | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| A24 | SEQ ID NO:1 | SEQ ID NO:2 | SEQ ID NO:3 | SEQ ID NO:4 | SEQ ID NO:7 | SEQ ID NO:6 |
| mAb1 mAb5 mAb9 mAb13 | SEQ ID NO:1 | SEQ ID NO:2 | SEQ ID NO:3 | SEQ ID NO:4 | SEQ ID NO:5 | SEQ ID NO:6 |
| mAb2 mAb6 mAb10 mAb14 | SEQ ID NO:1 | SEQ ID NO:2 | SEQ ID NO:3 | SEQ ID NO:4 | SEQ ID NO:8 | SEQ ID NO:6 |
| mAb3 mAb7 mAb11 mAb15 | SEQ ID NO:1 | SEQ ID NO:2 | SEQ ID NO:3 | SEQ ID NO:4 | SEQ ID NO:5 | SEQ ID NO:6 |
| mAb4 mAb8 mAb12 mAb16 | SEQ ID NO:1 | SEQ ID NO:2 | SEQ ID NO:3 | SEQ ID NO:4 | SEQ ID NO:7 | SEQ ID NO:6 |

[0081] 在一个实施方式中,分离的重组抗体具有:包含SEQ ID NO:1的HCDR1;SEQ ID NO:2的HCDR2;SEQ ID NO:3的HCDR3的重链可变区和包含SEQ ID NO:4的LCDR1;SEQ ID NO:5或8的LCDR2;和SEQ ID NO:6的LCDR3的轻链可变区,其中所述抗体特异性结合SEQ ID NO:16

的转铁蛋白受体。

[0082] 在具体的实施方式中,根据本公开的分离的重组抗体包含以下任一:

[0083] (a) 包含SEQ ID NO:1的HCDR1、SEQ ID NO:2的HCDR2、SEQ ID NO:3的HCDR3的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:4的LCDR1、SEQ ID NO:5的LCDR2和SEQ ID NO:6的LCDR3的可变轻链多肽;

[0084] (b) 包含SEQ ID NO:1的HCDR1、SEQ ID NO:2的HCDR2、SEQ ID NO:3的HCDR3的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:4的LCDR1、SEQ ID NO:8的LCDR2和SEQ ID NO:6的LCDR3的可变轻链多肽;

[0085] (c) 包含SEQ ID NO:11的VH的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:13的VL的可变轻链多肽;

[0086] (d) 包含SEQ ID NO:11的VH的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:14的VL的可变轻链多肽;

[0087] (e) 包含SEQ ID NO:11的VH的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:15的VL的可变轻链多肽;

[0088] (f) 包含SEQ ID NO:12的VH的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:13的VL的可变轻链多肽;

[0089] (g) 包含SEQ ID NO:12的VH的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:14的VL的可变轻链多肽;

[0090] (h) 包含SEQ ID NO:12的VH的可变重链多肽和包含SEQ ID NO:15的VL的可变轻链多肽;

[0091] 其中所述抗TfR抗体特异性结合SEQ ID NO:16的转铁蛋白受体。

[0092] 在具体的实施方式中,如上所定义的所述重组抗TfR抗体具有以下一个或多个性质:

[0093] (i) 它们以10nM或更小的 K_D ,优选1nM或更小的 K_D 结合转铁蛋白受体,所述 K_D 通过例如以下实施例所描述的SPR测量;

[0094] (ii) 它以0.1 μ g/ml或更低,优选0.05 μ g/ml或更低的EC50结合转铁蛋白受体,所述EC50如以下实施例所描述的ELISA测定中测量;

[0095] (iii) 它诱导的HL-60细胞系的细胞凋亡水平等于或优于用具有SEQ ID NO:9的VH和SEQ ID NO:10的VL的亲本鼠源可变区的相应参考嵌合抗体测量的诱导水平,例如利用HL-60细胞凋亡诱导测定所测量。通常,可以测定10 μ g/ml的本公开的重组抗体与相同量的包含SEQ ID NO:9的VH和SEQ ID NO:10的VL的A24的亲本鼠源可变区的参考嵌合抗体相比对HL-60细胞系细胞凋亡的诱导。如果用测试抗体测量的阳性细胞的百分比没有显著低于用参考抗体测量的阳性细胞的百分比,则测试抗体在HL-60细胞凋亡诱导测定中诱导的细胞凋亡等于参考抗体。

[0096] 如本文所使用,“相应的”参考嵌合抗体是指对于特定性质,例如细胞凋亡诱导,同种型恒定区与待测试抗体的同种型恒定区100%相同的参考抗体。

[0097] 在可以与之前的实施方式结合的某些实施方式中,本文提供的抗体是如上定义抗体的抗体片段。

[0098] 抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、Unibody和scFv片段、双

体、单域或纳米抗体和其他片段。

[0099] 术语“双体”是指具有两个抗原结合位点的小的抗体片段,该片段包含在同一多肽链(VH-VL)中与轻链可变域(VL)连接的重链可变域(VH)。通过使用太短以至于不允许同一链上的两个结构域配对的接头,所述结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。

[0100] 单域抗体是包含抗体的全部或一部分重链可变域或全部或一部分轻链可变域的抗体片段。在某些实施方式中,单域抗体是人单域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见例如,美国专利号6,248,516B1)。

[0101] 抗体片段可通过各种技术制备,包括但不限于蛋白水解消化完整抗体以及本文描述的通过重组宿主细胞生产。

[0102] 在某些实施方式中,本公开的抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以减少对人的免疫原性,同时具有亲本非人抗体的至少相同的亲合性(或更优的亲合性)。在优选的实施方式中,本公开的抗体是亲本抗体A24的人源化抗体。

[0103] 通常,人源化抗体包含一个或多个可变域,其中CDR(或其部分)源自于非人抗体例如鼠源A24抗体,FR(或其部分)源自于人抗体序列。人源化抗体任选还将包含至少一部分人恒定区。在一些实施方式中,将人源化抗体中一些FR残基用来自非人抗体(例如,衍生CDR残基的A24抗体)的相应残基替换,例如,以恢复或改进抗体特异性或亲合性。在一些具体的实施方式中,还替换人源化抗体中一些CDR残基,例如,以恢复或改进抗体特异性或亲合性。

[0104] 人源化抗体和制备它们的方法例如综述于Almagro和Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008), 并进一步描述于例如Riechmann等., Nature 332:323-329 (1988); Queen等., Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); 美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409; Kashmiri等, Methods 36:25-34 (2005) (描述特异性决定区(SDR)移植); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (描述“再铺平”); Dall’Acqua等., Methods 36:43-60 (2005) (描述“FR洗牌”); 和Osborn等, Methods 36:61-68 (2005) 以及Klimka等, Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (描述FR洗牌的“引导的选择”方法)。

[0105] 优选地,根据本公开的重组抗体是人源化沉默抗体,优选人源化沉默IgG1或IgG4抗体。

[0106] 如本文所使用,术语“沉默”抗体是指在ADCC活性测定中测量的显示没有ADCC活性或低的ADCC活性的抗体。

[0107] 在一个实施方式中,“没有ADCC活性或低的ADCC活性”是指沉默抗体显示的ADCC活性至少低于10%,例如低于50%的在具有野生型人IgG1同种型的相应抗体中观察到的ADCC活性。

[0108] 沉默的效应子功能可以通过突变抗体的Fc恒定部分获得并已经描述于Art: Strohl 2009 (AA&N297A); Baudino 2008, D265A (Baudino等., J. Immunol. 181 (2008): 6664-69, Strohl, CO Biotechnology 20 (2009): 685-91)。沉默的IgG1抗体的实例包含所谓的AA突变体,其在IgG1Fc氨基酸序列中包含L234A和L235A突变。另一个沉默的IgG1抗体包含N297A突变,其形成无糖基化或非糖基化抗体。

[0109] 具有突变体氨基酸序列的抗体可以通过突变(例如定点突变或PCR介导的突变)编

码核酸分子,然后利用本文描述的功能性测定测试编码的改变的抗体的保留功能(即上述功能)。

[0110] 具有保守修饰的抗体

[0111] 在某些实施方式中,本公开抗体(或包含其抗原结合部分的结合蛋白)具有包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区和包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区,其中一个或多个这些CDR序列具有基于本文描述的mAb1-mAb16抗体的规定氨基酸序列或其保守修饰,和其中所述抗体或蛋白保留本公开抗TfR抗体的期望的功能性质。

[0112] 抗TfR抗体的期望的功能性质包括但不限于:

[0113] (i) 以10nM或更小的 K_D ,优选1nM或更小的 K_D 结合转铁蛋白受体,所述 K_D 例如利用Biacore®通过SPR测定测量;

[0114] (ii) 它以0.1 μ g/ml或更低,优选0.05 μ g/ml或更低的EC50结合转铁蛋白受体,所述EC50在如以下实施例所描述的ELISA测定中测量;

[0115] (iii) 它诱导的HL-60细胞系的细胞凋亡水平等于或优于用具有SEQ ID NO:9的VH和SEQ ID NO:10的VL的亲本鼠源可变区的相应参考嵌合抗体测量的诱导水平,例如利用HL-60细胞凋亡诱导测定所测量。通常,可以测定10 μ g/ml的本公开的重组抗体与相同量的包含SEQ ID NO:9的VH和SEQ ID NO:10的VL的A24的亲本鼠源可变区的参考嵌合抗体相比对HL-60细胞系细胞凋亡的诱导。如果用测试抗体测量的阳性细胞的百分比没有显著低于用参考抗体测量的阳性细胞的百分比,则测试抗体在HL-60细胞凋亡诱导测定中诱导的细胞凋亡等于参考抗体。

[0116] 如本文所使用,术语“保守的序列修饰”意欲是指其中氨基酸残基用具有类似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸替换。具有类似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,本公开抗体的CDR区内的一个或多个氨基酸残基可以用来自相同侧链家族的其他氨基酸残基替换,并且可以使用本文描述的功能性测定来测试改变的抗体的保留功能。

[0117] 可以通过本领域已知的标准技术将修饰引入抗体,例如定点突变和PCR介导的突变。

[0118] 框架或Fc工程化

[0119] 本公开的工程化抗体包括其中已经对VH和/或VL内的框架残基进行修饰,例如以改进抗体的性质的那些。通常进行这种框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个框架残基“突变回”相应种系序列。更具体地,已经经过体细胞突变的抗体可以包含不同于该抗体来源的种系序列的框架残基。这种残基可通过将抗体框架序列与该抗体来源的种系序列进行比较来鉴定。为使框架区序列回到它们的种系构造,可以通过例如定点突变或PCR介导的突变将体细胞突变“突变回”种系序列。这种“突变回”的抗体也意欲被本发明涵盖。

[0120] 另一种框架修饰涉及突变框架区内或甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残

基,以去除T细胞表位,从而降低抗体可能的免疫原性。

[0121] 尤其是,Antitope公司(Cambridge UK)开发了一系列评估和去除免疫原性的专利技术,其基于对治疗抗体和蛋白中T细胞表位位置的鉴定。这些技术总结如下:

[0122] iTope™-一种用于预测结合人MHC II类等位基因的肽的生物信息学技术(Perry等2008Drugs in R&D,9(6):385-396)。

[0123] TCED™-在利用尤其是抗体V区的EpiScreen™T细胞表位地图测定的研究中鉴定的已知T细胞表位的数据库(Bryson等2010Biodrugs 24(1):1-8)。数据库可以通过BLAST检索询问以鉴定共同基序(Altschul等1997Nucleic Acids Res.(1997)25:3389-3402)。

[0124] 除了在框架或CDR区内进行修饰,可以工程化本公开抗体以包括Fc区内的修饰,通常为了改变抗体的一种或多种功能性质,例如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。

[0125] 此外,本公开的抗体可以被化学修饰(例如,可将一个或多个化学部分与抗体连接)或可以被修饰以改变其糖基化,再次改变抗体的一个或多个功能性质。这些实施例的每一个在下文进一步详细描述。

[0126] 如本文所使用,术语“同种型恒定区”或“Fc区”可互换使用以定义免疫球蛋白重链的C末端区域,包括天然的序列Fc区和变体Fc区。人IgG重链Fc区通常定义为包含从IgG抗体的位置C226或从P230到羧基末端的氨基酸残基。Fc区中残基编号是Kabat的EU指数的编号。Fc区的C末端赖氨酸(残基K447)例如可在抗体的生产或纯化期间去除。因此,本公开的抗体组合物可以包含去除所有K447残基的抗体群、K447残基没有去除的抗体群和具有含有或不含K447残基的抗体混合物的抗体群。

[0127] 在一个具体的实施方式中,修饰CH1的绞链区使得改变绞链区中半胱氨酸残基的数量,例如增加或减少。这种方法进一步描述于Bodmer等的美国专利号5,677,425中。改变CH1的绞链区中半胱氨酸残基的数量以例如促进轻链和重链的装配或增加或降低抗体的稳定性。

[0128] 在另一个实施方式中,将抗体的Fc绞链区突变以降低抗体的生物半衰期。更具体地,将一种或多种氨基酸突变引入Fc绞链片段的CH2-CH3结构域界面区,使得抗体相对于天然Fc绞链结构域SpA结合具有削弱的葡萄球菌蛋白A(SpA)结合。这种方法进一步详细描述于Ward等的美国专利号6,165,745中。

[0129] 在另一个实施方式中,修饰抗体以增加其生物半衰期。各种方法都是可能的。例如,可以引入一个或多个以下突变:T252L、T254S、T256F,如Ward等的美国专利号6,277,375所述。或者,为增加生物半衰期,可以改变抗体的CH1或CL区以包含取自IgG的Fc区的CH2结构域的两个环的补救受体结合表位,如Presta等的美国专利号5,869,046和6,121,022所述。

[0130] 仍然在其他实施方式中,通过用不同的氨基酸残基替代至少一个氨基酸残基来改变Fc区,以改变抗体的效应子功能。例如,可以用不同的氨基酸残基替换一个或多个氨基酸,使得抗体对于效应子配体具有改变的亲合性,但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲合性改变的效应子配体例如可以是Fc受体或补体的C1组分。这种方法进一步详细描述于Winter等的美国专利号5,624,821和5,648,260中。

[0131] 在另一个实施方式中,可以用不同的氨基酸残基替换选自氨基酸残基的一个或多

个氨基酸,使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。这种方法进一步详细描述于Idusogie等的美国专利号6,194,551中。

[0132] 在另一个实施方式中,改变一个或多个氨基酸残基从而改变抗体固定补体的能力。该方法进一步描述于Bodmer等的PCT公开文本W0 94/29351中。

[0133] 在又一个实施方式中,通过修饰一个或多个氨基酸来修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或增加抗体对于Fc γ 受体的亲合性。该方法进一步描述于Presta的PCT公开文本W0 00/42072中。此外,已经绘制了人IgG1对于Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII和Fc γ Rn的结合位点,并且已经描述了具有改进结合的变体(参见Shields,R.L.等,2001J.Biol.Chem 276:6591-6604)。

[0134] 在其他实施方式中,通过修饰一个或多个氨基酸来修饰Fc区以降低抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或降低抗体对于Fc γ 受体的亲合性。具有降低的效应子功能,尤其是降低的ADCC的这种抗体包括沉默抗体。

[0135] 在某些实施方式中,使用IgG1同种型的Fc结构域。在一些具体的实施方式中,使用IgG1Fc片段的突变体,例如降低或消除融合多肽介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或结合Fc γ 受体的能力的沉默IgG1Fc。IgG1同种型沉默突变体的一个实例是其中氨基酸位置234和235的亮氨酸被丙氨酸替代的IgG1,如Hezareh等在J.Virol2001Dec;75(24):12161-8中所述。

[0136] 在某些实施方式中,Fc结构域是阻止Fc结构域在位置297处的糖基化的沉默Fc突变体。例如,Fc结构域包含位置297的天冬酰胺的氨基酸替换。这种氨基酸替换的一个实例是用甘氨酸或丙氨酸替换N297。

[0137] 仍然在另一个实施方式中,修改抗体的糖基化。例如,可以制备无糖基化抗体(即抗体缺乏糖基化)。可以改变糖基化以例如增加抗体对抗原的亲合性。这种碳水化合物修饰可以伴随有例如抗体序列内一个或多个糖基化位点的改变。例如,可以进行一个或多个氨基酸替换,其导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点,从而消除该位点的糖基化。这种无糖基化可以增加抗体对抗原的亲合性。这种方法进一步详细描述于Co等的美国专利号5,714,350和6,350,861中。

[0138] 另外或者选择性地,可以制备具有改变的糖基化种类的抗体,例如具有降低含量的岩藻糖残基的低岩藻糖基化(hypofucosylated)抗体或具有增加的二等分GlcNAc结构的抗体。已经证明,这种改变的糖基化模式增加抗体的ADCC能力。这种碳水化合物修饰可以伴随有,例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体。本领域已经描述了具有改变的糖基化机制的细胞,且其能用作其中表达本公开重组抗体,从而生产具有改变的糖基化的抗体的宿主细胞。例如,Hang等的EP 1 176 195描述了FUT8基因(其编码岩藻糖基转移酶)被功能性破坏的细胞系,使得这种细胞系表达的抗体显示出低岩藻糖基化。因此,在一个实施方式中,本发明抗体通过在显示低岩藻糖基化模式的细胞系(例如,编码岩藻糖基转移酶的FUT8基因表达缺陷的哺乳动物细胞系)中的重组表达来制备。Presta等的PCT公开文本W0 03/035835描述了一种变体CHO细胞系Lec13细胞,其将岩藻糖连接到Asn(297)-连接的碳水化合物上的能力降低,还导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(也参见Shields,R.L.等,2002J.Biol.Chem.277:26733-26740)。Umana等的PCT公开文本W0 99/54342描述了工程化以表达糖蛋白修饰的糖基转移酶(例如, β (1,4)-N乙酰氨基葡萄糖转移

酶II (GnTIII)) 的细胞系,使得在该工程化的细胞系中表达的抗体显示增加的二等分GlcNAc结构,这导致抗体的ADCC活性增加(也参见Umana等1999Nat.Biotech.17:176-180)。

[0139] 本公开预期的本文抗体的另一种修饰是peg化或hes化或相关技术。可以将抗体peg化以例如增加抗体的生物(例如血清)半衰期。为peg化抗体,通常使抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)例如PEG的反应性酯或醛衍生物在其中一个或多个PEG基团与抗体或抗体片段连接的条件下反应。peg化可通过与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷化反应来进行。如本文所使用,术语“聚乙二醇”意欲涵盖已经用于衍生其他蛋白质的任何PEG形式,例如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-顺丁烯二酰亚胺。在某些实施方式中,待peg化的抗体是无糖基化抗体。peg化蛋白质的方法是本领域已知的且可以应用于本公开抗体。例如参见Nishimura等的EP 0 154 316和Ishikawa等的EP 0 401 384。

[0140] 本公开预期的本文抗体的另一种修饰是将本公开抗体的至少抗原结合区域与血清蛋白(例如人血清白蛋白)或其片段偶联或蛋白融合以增加由此产生的分子的半衰期。这种方法例如描述于Ballance等的EP 0 322 094。

[0141] 另一种可能性是将本公开抗体的至少抗原结合区域与能够结合血清蛋白(例如人血清白蛋白)的蛋白融合以增加由此产生的分子的半衰期。这种方法例如描述于Nygren等的EP 0 486 525。

[0142] 在一个具体的实施方式中,根据本公开的抗体的效应子功能或补体激活功能相对于同一同种型的野生型抗体已经降低或消除。在一方面,效应子功能通过选自以下的方法降低或消除:抗体糖基化的减少、将抗体同种型改变为天然具有降低或消除的效应子功能的同种型,和修饰Fc区域。在具体的相关实施方式中,所述具有降低或消除的效应子功能的同种型是IgG4同种型。

[0143] 编码本公开抗体的核酸分子

[0144] 本文还公开了编码本公开的抗TfR抗体或相关蛋白的核酸分子。可变轻链核苷酸序列的实例是编码mAb1-mAb16任意之一的可变轻链氨基酸序列和利用遗传密码(任选考虑基于宿主细胞物种的密码子偏好)的那些,mAb1-mAb16的序列容易从表1和表2获得。

[0145] 本公开还涉及来源于后者序列的核酸分子,所述后者序列已被优化用于在哺乳动物细胞例如CHO细胞系中的蛋白表达。

[0146] 核酸可存在于完整细胞中、细胞裂解液中,或可以是部分纯化或基本上纯化形式的核酸。当通过标准技术从其他细胞组分或其他污染物(例如其他细胞核酸或蛋白)纯化出来时,核酸是“分离的”或“基本上纯化的”,所述标准技术包括碱性/SDS处理、CsCl分带技术、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域中众所周知的其他。参见F.Ausubel,等,ed.1987Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing and Wiley Interscience,New York。本公开的核酸可以是例如DNA或RNA且可以包含或不包含内含子序列。在一个实施方式中,核酸可存在于载体中,例如噬菌体展示载体或重组质粒载体中。

[0147] 本公开核酸可以利用标准的分子生物学技术获得。一旦获得编码例如VH和VL片段的DNA片段,可以通过标准的重组DNA技术进一步操作这些DNA片段,例如将可变区基因转化为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,将编码VL或VH的DNA片段(例如表1中定义的VL和VH)与另一个DNA分子或与编码另一个蛋白的片段(例如抗体恒定区或

柔性接头)可操作连接。本文所使用的术语“可操作连接”意欲是指以功能性方式连接两个DNA片段,例如使得由这两个DNA片段编码的氨基酸序列仍然在框内,或使得蛋白在期望的启动子的控制下表达。

[0148] 可以通过将编码VH的DNA与另一个编码重链恒定区(CH1、CH2和CH3)的分子可操作连接来将编码VH区域的分离的DNA转化为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(例如参见Kabat,E.A.,等,1991Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)且涵盖这些区域的DNA片段可通过标准的PCR扩增获得。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区。在一些实施方式中,重链恒定区选自IgG1同种型,例如人IgG1同种型。在其他的实施方式中,重链恒定区选自IgG4同种型,例如人IgG4同种型。对于Fab片段重链基因,可以将编码VH的DNA与另一个仅编码重链CH1恒定区的DNA分子可操作连接。

[0149] 可以通过将编码VL的DNA与另一个编码轻链恒定区CL的DNA分子可操作连接来将编码VL区域的分离的DNA转化为全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(例如参见Kabat,E.A.,等,1991Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)且涵盖这些区域的DNA片段可通过标准的PCR扩增获得。轻链恒定区可以是kappa或lambda恒定区。

[0150] 为产生scFv基因,将编码VH和VL的DNA片段与另一个编码柔性接头(例如编码氨基酸序列(Gly4-Ser)₃)的片段可操作连接,使得VH和VL序列可以表达为相邻的单链蛋白,其中VL和VH区域通过柔性接头连接(例如参见,Bird等,1988Science 242:423-426;Huston等,1988Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;McCafferty等,1990Nature 348:552-554)。

[0151] 制备生产单克隆抗体的转染瘤

[0152] 可以使用例如本领域众所周知的重组DNA技术和基因转染方法的组合(例如,Morrison,S.(1985)Science 229:1202)在宿主细胞转染瘤中产生本公开抗体。

[0153] 例如,为表达抗体或其抗体片段,可以通过标准的分子生物学或化物化学技术(例如,DNA化学合成、PCR扩增或利用表达目标抗体的杂交瘤的cDNA克隆)获得编码部分或全长轻链和重链的DNA,且可以将DNA插入表达载体中,使得基因与转录和翻译控制序列可操作连接。在这里的上下文中,术语“可操作连接”意欲是指将抗体基因连接入载体,使得载体内的转录和翻译控制序列发挥其调节抗体基因的转录和翻译的预期功能。选择与所使用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达控制序列。可以将抗体轻链基因和抗体重链基因插入单独的载体中,或更通常地,将两个基因插入相同的表达载体中。通过标准方法将抗体基因插入表达载体中(例如,在抗体基因片段和载体上连接互补的限制性位点,或如果不存在限制性位点,则平末端连接)。通过以下本文描述的抗体的轻链和重链可变区可用于产生任何抗体同种型的全长抗体基因:将它们插入已经编码期望同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体,使得VH片断与载体内的CH片断可操作连接,且VL片断与载体内的CL片断可操作连接。另外或选择性地,重组表达载体可以编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可以将抗体链基因克隆入载体,使得信号肽在框内与抗体链基因的氨基末端连接。信号肽可以

是免疫球蛋白信号肽或异种信号肽(即来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽)。

[0154] 除抗体链基因之外,本文公开的重组表达载体携带控制抗体链基因在宿主细胞中表达的调控序列。术语“调控序列”意欲包括启动子、增强子和控制抗体链基因的转录或翻译的其他表达控制元件(例如聚腺苷酸化信号)。这种调控序列例如描述于Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990)。本领域技术人员将理解,表达载体的设计,包括调控序列的选择,可以取决于例如待转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白质表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的调控序列包括在哺乳动物细胞中引导高水平蛋白表达的病毒元件,例如来自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如主要腺病毒晚期启动子(AdMLP))和多瘤的启动子和/或增强子。或者,可使用非病毒调控序列,例如泛素启动子或P球蛋白启动子。仍然进一步,调控元件由不同来源的序列组成,例如SRa启动子系统,其包含来自SV40早期启动子和人T细胞白血病病毒1型的长末端重复序列的序列(Takebe, Y. 等, 1988 Mol. Cell. Biol. 8: 466-472)。

[0155] 除抗体链基因和调控序列之外,本公开的重组表达载体可以携带其他的序列,例如调节宿主细胞中载体的复制的序列(例如复制的来源)和选择标记基因。选择标记基因促进选择已经引入载体的宿主细胞(例如参见均为Axel等的美国专利号4,399,216, 4,634,665和5,179,017)。例如,通常选择标记基因赋予已经引入载体的宿主细胞对药物例如G418、潮霉素或氨甲喋呤的抗性。选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于具有氨甲喋呤选择/扩增的dhfr-宿主细胞)和neo基因(用于G418选择)。

[0156] 对于轻链和重链的表达,通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染入宿主细胞。术语“转染”的各种形式意欲涵盖通常用于将外源DNA引入原核或真核宿主细胞的多种技术,例如电穿孔法、磷酸钙沉淀法、DEAE-葡聚糖转染等。理论上,可以在原核或真核宿主细胞中表达本公开的抗体。讨论了在真核细胞例如哺乳动物宿主细胞、酵母或丝状真菌中抗体的表达,因为这种真核细胞,尤其是哺乳动物细胞比原核细胞更加可能装配并分泌正确折叠且免疫活性的抗体。

[0157] 在一个具体的实施方式中,根据本公开的克隆或表达载体包含与适合的启动子序列可操作连接的mAb1-mAb16任意之一的重链和轻链的编码序列之一。

[0158] 用于表达本公开重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括dhfr-CHO细胞,描述于Urlaub和Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220,与DHFR选择标记一起使用,例如,描述于R. J. Kaufman和P. A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621), CHOK1dhfr+细胞系、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞,例如GS CHO细胞系和GS Xceed™基因表达系统(Lonza)。

[0159] 当将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞时,通过将宿主细胞培养一段时间来制备抗体,所述时间足以在宿主细胞中表达抗体,且任选将抗体分泌入其中生长宿主细胞的培养基中。分泌后,例如可以利用标准的蛋白纯化方法从培养基中回收和纯化抗体(例如参见Abhinav等2007, Journal of Chromatography 848:28-37)。

[0160] 在一个具体的实施方式中,本公开的宿主细胞是用表达载体转染的宿主细胞,所述表达载体具有与适合的启动子序列可操作连接的适于分别表达mAb1-mAb16的编码序列。

[0161] 然后将后者宿主细胞在适合条件下进一步培养,以表达和生产分别选自

mAb1-mAb16的本公开抗体。

[0162] 免疫偶联物

[0163] 另一方面,本公开表征了与治疗性部分例如细胞毒素、药物(例如免疫抑制剂)或放射性毒素偶联的本文公开的抗TfR抗体或其片段。这种偶联物在本文中称为“免疫偶联物”。包括一种或多种细胞毒素的免疫偶联物称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒素试剂包括对细胞有害(例如杀死)的任何试剂。实例包括taxon、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽醌二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、地卡因、利多卡因、心得安,和嘌呤霉素及其类似物或同源物。治疗剂还包括例如抗代谢物(例如氨甲喋呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶氮烯咪胺)、消融剂(例如甲二氯二乙胺、噻替派苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲菌素、丝裂霉素C和顺-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂、蒽环类药物(例如柔红霉素(旧称红必霉素)和阿霉素)、抗生素(例如更生霉素(旧称放线菌素)、博莱霉素、光神霉素和安曲霉素(AMC))和抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春花碱)。

[0164] 可以利用本领域可获得的接头技术将细胞毒素与本公开抗体偶联。用于将细胞毒素与抗体偶联的接头类型的实例包括但不限于胺、硫醚、酯、二硫化物和含肽接头。可以选择例如容易通过溶酶体隔室的低pH切割或容易通过蛋白酶(例如优选在肿瘤组织例如组织蛋白酶(例如组织蛋白酶B、C、D)中表达的蛋白酶)切割的接头。

[0165] 为进一步讨论细胞毒素的类型、接头和将治疗剂偶联至抗体的方法,还参见Panowski S等2014Jan 1;6(1):34-45对抗体药物偶联物的综述。

[0166] 还可以将本公开的抗体与放射性同位素偶联以生成细胞毒性放射性药物,也称为放射性免疫偶联物。可以与抗体偶联用于诊断或治疗的放射性同位素的实例包括但不限于碘¹³¹、镱¹¹¹、钇⁹⁰和镥¹⁷⁷。现有技术中已有制备放射性免疫偶联物的方法。

[0167] 双特异性或多特异性分子

[0168] 另一方面,本文进一步公开了包含本公开的抗TfR抗体的双特异性或多特异性分子。可以将抗体衍生为或连接至另一个功能性分子,例如,另一个肽或蛋白(例如,另一个抗体或受体的配体)以生成结合至少两个不同的结合位点或靶分子的双特异性分子。事实上,可以将抗体衍生为或连接至超过一个的其他功能性分子以生成结合超过两个的不同结合位点和/或靶分子的多特异性分子;这种多特异性分子也意欲被本文使用的术语“双特异性分子”涵盖。为产生双特异性分子,可以将本发明抗体功能性连接(例如通过化学偶合、遗传融合、单价结合或者相反)至一个或多个其他的结合分子,例如另一个抗体、抗体片段、肽或结合模拟物,使得产生双特异性分子。

[0169] 因此,本公开包括包含至少一个对于TfR的第一结合特异性,例如mAb1-mAb16任意之一的一个抗原结合部分和对于第二靶标表位的第二结合特异性的双特异性分子。例如,第二靶标表位是不同于第一靶标表位的另一个TfR表位。

[0170] 此外,对于其中双特异性分子是多特异性的实施方式,分子可以进一步包括除第一和第二靶标表位之外的第三结合特异性。

[0171] 在一个实施方式中,本文公开的双特异性分子包含作为结合特异性的至少一种抗

体或其抗体片段,包括,例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Unibody或单链Fv。抗体也可以是轻链或重链二聚体,或其任何最小片段,例如Ladner等的美国专利号4,946,778所描述的Fv或单链构建体。

[0172] 可用于本文公开的双特异性分子的其他抗体是鼠源、嵌合和人源化的单克隆抗体。

[0173] 本公开的双特异性分子可以使用本领域已知的方法通过偶联成分结合特异性来制备。例如,双特异性分子各结合特异性可以单独产生,然后彼此偶联。当结合特异性是蛋白质或肽时,可以使用多种偶联或交联剂用于共价结合。交联剂的实例包括蛋白A、二亚胺碳、N-琥珀酰亚胺-S-乙酰基-硫代醋酸盐(SATA)、5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻次苯基二马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫)丙酸盐(SPDP)和4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC)(例如参见Karpovsky等1984J.Exp.Med.160:1686;Liu,MA等,1985Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:8648)。其他方法包括描述于Paulus,1985Behring Ins.Mitt.No.78,118-132;Brennan等,1985Science 229:81-83和Glennie等,1987J.Immunol.139:2367-2375的那些。

[0174] 或者,两种结合特异性可以在同一载体中编码并在同一宿主细胞中表达和装配。当双特异性分子是mAb x mAb、mAb x Fab、Fab x F(ab')₂或配体x Fab融合蛋白时,这种方法特别有用。本公开的双特异性分子可以是包含一个单链抗体和结合决定因子的单链分子或包含两个结合决定因子的单链双特异性分子。

[0175] 双特异性分子与其具体靶标的结合可通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(REA)、FACS分析、生物测定(例如生长抑制和细胞凋亡)或蛋白质印迹测定来证实。这些测定中的每一个通常通过使用对目标络合物特异性的标记试剂(例如抗体)来检测目标蛋白-抗体络合物的存在。

[0176] 本公开的抗体也可以用于制备人工T细胞受体(也称为嵌合T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR))。例如,抗体的可变区可用于形成scFv,其经由间隔基连接至TCR(例如CD3zeta)的跨膜结构域和信号转导胞内域,且可在T细胞表面制备。这种CAR可用于继承转移治疗,例如用于治疗增殖性疾病。

[0177] 药物组合物

[0178] 另一方面,本公开提供包含与药学可接受的载体一起配制的本文公开的一种抗体或抗体组合(例如选自mAb1-mAb16的一种抗体)的组合物,例如药物组合物。这种组合物可以包括一种抗体或(例如两种或更多种不同的)抗体的组合,或如上文所述的免疫偶联物或双特异性分子。

[0179] 本文公开的药物组合物也可以在联合治疗中施用,即与其他的试剂组合。例如,联合治疗可以包括本公开的抗TfR抗体,例如选自mAb1-mAb16的一种抗体与至少一种抗病毒、抗炎性或另一种抗增殖试剂组合。可用于联合治疗的治疗剂的实例详细描述于关于本公开抗体的用途的以下小节中。

[0180] 如本文所述,“药学可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有溶剂、分散体介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。载体应该适于静脉内、肌肉、皮下、胃肠外、脊髓或表皮施用(例如通过注射或输注)。在一个实施方式中,载体应该适于皮下途径。取决于施用途径,可以将活性物质,即抗体、免疫偶联物或双特异性分子涂覆在材料中

以保护化合物免受可以使化合物失活的酸和其他天然条件的作用。

[0181] 无菌磷酸盐缓冲盐水是药学可接受的载体的实例。其他适合的载体是本领域众所周知的(例如参见Gennaro(ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995))。制剂可以进一步包括一种或多种赋形剂、防腐剂、增溶剂、缓冲剂、白蛋白以防止小瓶表面上的蛋白损失,等。

[0182] 药物组合物的形式、施用途、剂量和方案天然取决于患者的待治疗的病症、疾病严重程度、年龄、体重和性别等。

[0183] 本公开的药物组合物可以配制成用于局部、经口、胃肠外、鼻内、静脉内、肌内、皮下或眼内施用等。

[0184] 优选地,药物组合物包含介质,其在药学上适用于能够注射的制剂。这些尤其可以是等渗、无菌的盐水溶液(磷酸一钠或磷酸二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等或这些盐的混合物),或干燥尤其是冷冻干燥的组合物,其在取决于情况添加无菌水或生理盐水时允许构成可注射的溶液。

[0185] 可以根据各种参数调节用于施用的剂量,尤其根据所使用的施用方式、相关病理或期望的治疗持续时间。

[0186] 为制备药物组合物,将有效量的抗体溶于或分散于药学可接受的载体或水性介质中。

[0187] 适于注射用途的药物形式包括无菌水溶液或分散体;包括芝麻油、花生油或水性丙二醇的制剂;和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末或冻干物。在所有情况下,形式必须无菌且必须是存在简单的注射性的流体。它在制造和储存条件下必须是稳定的,且必须对抗微生物例如细菌和真菌的污染作用保存。

[0188] 可在水中与表面活性剂例如羟丙基纤维素适当混合来制备作为游离碱或药理学可接受的盐的活性物质的溶液。还可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和在油中制备分散体。在储存和使用的普通条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物生长。

[0189] 可以将本公开抗体配制成中性或盐形式的组合物。药学可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白质的游离氨基形成)且其与无机酸例如诸如盐酸或磷酸或有机酸例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱例如诸如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁和有机碱例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。

[0190] 载体也可以是包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其适合的混合物和植物油的溶剂或分散介质。例如可以通过以下来保持适当的流动性:通过利用包衣例如卵磷脂、在分散体的情况下通过维持所需粒径,和通过利用表面活性剂。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯类、三氯叔丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞等来预防微生物的作用。在很多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可以通过在组合物中使用延迟吸收试剂,例如单硬脂酸铝和凝胶来实现可注射组合物的延长吸收。

[0191] 根据需要,通过将所需含量的活性物质和以上列举的各种其他成分加入适当的溶剂中来制备无菌可注射溶液,然后进行过滤灭菌。通常,通过将各种无菌活性成分加入包含基础分散介质和来自上述列举的那些的所需其他成分的无菌载体中来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其从之前无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何其他的期望成分的粉末的。

[0192] 还预期用于直接注射的更浓或高度浓缩溶液的制备,其中预期使用DMSO作为溶剂以形成极快速的渗透,将高浓度的活性剂递送到小的肿瘤区域。

[0193] 一旦配制,将溶液以与剂量制剂相容的方式和以治疗有效的含量施用。容易地以各种剂型施用制剂,例如上面描述的可注射溶液的类型,但也可以使用药物释放胶囊等。

[0194] 对于水溶液的肠胃外施用,例如,如有必要,溶液应该适当地缓冲,且首先用足够的盐水或葡萄糖使得液体稀释剂等渗。这些特定的水溶液尤其适用于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。关于这点,可以使用的无菌水性介质根据本公开是本领域技术人员已知的。例如,可以将一个剂量溶于1ml等渗NaCl溶液中,并添加至1000ml皮下输注流体或在建议的输注位置注射(例如参见"Remington's Pharmaceutical Sciences"15th Edition,pages 1035-1038and 1570-1580)。取决于待治疗的受试者的状况,剂量必然会发生一些变化。在任何情况下,负责施用的人将决定用于个体受试者的适当剂量。

[0195] 本公开抗体可以配制为治疗混合物,以每剂量包含约0.0001到1.0毫克,或约0.001到0.1毫克,或约0.1到1.0或甚至1.0到约10毫克。还可以施用多次剂量。

[0196] 除配制用于肠胃外施用例如静脉内或肌内注射的化合物之外,其他的药学可接受的形式包括例如用于口服施用的片剂或其他固体;定时释放胶囊;和目前使用的任何其他形式。

[0197] 在某些实施方式中,预期使用脂质体和/或纳米颗粒以将抗体引入宿主细胞。脂质体和/或纳米颗粒的形成和使用是本领域技术人员已知的。

[0198] 纳米胶囊通常可以以稳定的可重复的方式捕获化合物。为避免由胞内聚合物过载引起的副作用,通常使用能够体内降解的聚合物设计这种超细颗粒(尺寸为约0.1 μ m)。预期在本公开使用满足这些要求的生物可降解的聚烷基-氰基丙烯酸酯纳米颗粒,且这种颗粒可以容易地制备。

[0199] 脂质体由分散于水性介质的磷脂形成并自发形成多层同中心的双层囊泡(也称为多层囊泡(MLV))。MLV的直径通常为25nm-4 μ m。MLV的超声波作用导致形成直径为200-500 Å的小单层脂质体(SUV),其在核心中包含水性溶液。脂质体的物理特性取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在。

[0200] 本公开的抗体或蛋白的用途和方法

[0201] 本公开的抗体或蛋白具有体外和体内的诊断和治疗效用。例如,可以向例如体外或体内培养的细胞施用这些分子,或向受试者例如体内施用这些分子,以预防或诊断多种疾病。

[0202] 本公开抗体不但能够抑制细胞增殖,而且能够诱导高度增殖细胞例如T细胞的细胞凋亡。

[0203] 本文预期将本公开的抗TfR抗体或蛋白用作药物,尤其用于治疗、预防和诊断细胞增殖性疾病,例如表达高水平TfR的肿瘤,更具体地,血液系统肿瘤,例如淋巴瘤,和尤其是ATL、MCL、霍奇金病、大B细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、急性白血病(骨髓和淋巴)以及实体瘤,例如肾癌、肺癌(小细胞)等。

[0204] 进一步公开了本公开抗体用于治疗、预防或诊断HTLV-1相关的疾病,尤其是减少与HTLV-1感染相关的炎性疾病包括HAM/TSP、多肌炎和关节炎中的病毒载量。

[0205] 本公开还涉及通过施用包含治疗有效剂量的本发明抗体的组合物来降低或抑制

人血细胞中的转铁蛋白吸收的方法。

[0206] 如上公开使用的抗体或蛋白可作为唯一的活性成分或结合例如佐剂或与其他药物组合一起施用,所述其他药物例如用于治疗或预防上述疾病的抗病毒、抗炎性试剂或细胞毒素、抗增殖、化疗或抗肿瘤试剂。

[0207] 例如,如上公开使用的抗体可以与AZT、IFN- α 、抗CD20mAb、抗CD25mAb、化疗剂一起使用。

[0208] 适合的抗肿瘤剂可以包括但不限于,烷化剂(例如环磷酰胺、氮芥、苯丁酸氮芥、美法仑、硝基脲、替莫唑胺)、蒽环类药物(例如柔红霉素、阿霉素、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌、戊柔比星)、紫杉烷类(例如紫杉醇、多西他赛)、埃博霉素、拓扑异构酶I抑制剂(例如伊立替康或拓扑替康)、拓扑异构酶II抑制剂(例如依托泊苷、替尼泊苷或Tafluposide)、核苷酸类似物和前体类似物(例如阿扎胞苷、硫唑嘌呤、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、巯基嘌呤、氨甲喋呤或硫鸟嘌呤)、肽抗生素(例如卡铂、顺铂和奥沙利铂)、类视黄醇(例如维甲酸、阿利维A酸、贝沙罗汀)、长春花生物碱和衍生物(例如长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨)、靶向治疗例如激酶抑制剂(例如依鲁替尼、艾代拉里斯、厄洛替尼,吉非替尼,伊马替尼、威罗菲尼、维莫德吉)、蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米、卡菲倍米布)、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(例如伏立诺他或罗咪酯肽)。

[0209] 根据上述,本公开在仍然进一步的方面提供:

[0210] 如上所述的方法,包括共施用,例如同时或顺次施用本公开的治疗有效量的抗TfR抗体或蛋白和至少一种第二药物物质,所述第二药物物质是例如如上所述的抗病毒或抗增殖试剂。

[0211] 在一个实施方式中,本公开抗体或蛋白可用于检测TfR水平,或包含TfR的细胞的水平。这可以例如通过以下来实现:在允许形成抗体和TfR之间的络合物的条件下将样品(例如体外样品)和对照样品与抗TfR抗体接触。检测并比较样品和对照中的抗体和TfR之间形成的任何络合物。例如,可以使用本发明组合物进行本领域众所周知的标准检测方法例如ELISA和流式细胞仪测定。

[0212] 因此,一方面,本公开进一步提供用于检测样品中TfR(例如人TfR抗原)的存在的方法,或用于测量TfR的含量的方法,包括在允许抗体或其部分和TfR之间形成络合物的条件下将样品和对照样品与特异性结合TfR的本公开抗体或蛋白或其抗原结合区域接触。然后检测络合物的形成,其中样品较之对照样品之间络合物形成的差异指示样品中TfR的存在。

[0213] 还在本公开范围内的是由本文公开的组合物(例如抗体、蛋白、人源化抗体、偶联抗体和多特异性分子)和使用说明书组成的试剂盒。试剂盒可以进一步包含至少一种其他试剂,或一种或多种其他的抗体或蛋白(例如具有互补活性的抗体,其结合不同于第一抗体的靶标抗原上的表位)。通常,试剂盒包括指示试剂盒的内容物的计划使用的标记。术语标记包括试剂盒上或与试剂盒一起或以其他方式伴随试剂盒提供的任何文书或记录材料。试剂盒可以进一步包含用于诊断患者是否属于将响应如上定义的抗TfR抗体治疗的组的工具。

[0214] 已经充分描述的本发明将通过以下实施例进一步阐明,所述实施例仅是说明性的而不意味着进一步限制。

具体实施方式

[0215] 方法

[0216] 1. 通过ELISA的亲合性测试

[0217] 为了测定抗体的特异性,可使用以下方案应用ELISA测试。将重组人TfR(从R&D Systems获得,目录号2474-TR)直接涂覆在96孔板上过夜并洗涤两次,然后用若干稀释(10)的抗体(鼠源和人源化mAb)(稀释可以从50 μ g/ml到0.001 μ g/ml的浓度开始)孵育并在室温下孵育1小时。洗涤两次后,将二抗山羊-抗人IgG在室温下黑暗中孵育1小时,洗涤两次并用TMB溶液孵育10分钟,然后读取450nm的吸光度。

[0218] 2. 利用表面等离子体共振(Biacore system)的亲合性测定

[0219] 为测定 K_D 值,可以使用如下所述的BiacoreTM技术应用表面等离子体共振技术。

[0220] 将组氨酸-标签的人TfR(从R&D Systems获得,目录号2474-TR)通过共价固定的五-His mAb CM5传感器芯片后结合。将十种不同浓度的抗体(1-500nM)注入抗His/TfR-His表面4分钟,然后解离络合物5分钟。用BIAevaluation软件中执行的非线性二乘算法,使用时间的单指数函数分析结合和解离谱两者。

[0221] 3. ADCC测定

[0222] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性是利用基于抗体的药物杀死靶标癌细胞的期望机制。抗体结合细胞表面上的靶标抗原。当靶标结合抗体的Fc效应子部分也结合效应子细胞(主要是天然杀伤细胞)的细胞表面上Fc γ RIIIa受体时,发生两种细胞类型的多种交联,导致ADCC通道活化。杀死靶细胞是该通道活化的终点且用于经典的ADCC生物测定,其使用供体外周血单核细胞(PBMC)或天然杀伤(NK)细胞亚群作为效应子细胞。ADCC报道基因生物测定完全试剂盒(Promega, G7015)包含进行基于抗CD20的ADCC报道基因生物测定所需的所有组分和试剂。ADCC报道基因生物测定使用ADCC通道活化中较早点处的选择性读出:在效应子细胞中通过NFAT(活化T细胞的核转录因子)通道活化基因转录。此外,ADCC报道基因生物测定使用稳定表达Fc γ RIIIa受体的工程化Jurkat细胞和驱动荧光虫荧光素酶的表达的NFAT反应元件作为效应子细胞。ADCC中抗体生物活性通过由NFAT通道活化产生的荧光素酶来量化;效应子细胞中的荧光素酶活性用荧光读取数来量化。作为与人源化mAb比较的阳性对照,试剂盒提供抗CD20抗体。

[0223] 4. HL-60和PHA活化的T细胞的细胞凋亡诱导测定

[0224] 对于细胞凋亡测定,将细胞在24孔板以每孔100.10³个细胞的浓度以400 μ l孵育。随后,在若干稀释的鼠源或人源化抗体存在下(从200 μ g/ml到3 μ g/ml)孵育细胞3和4天。孵育时间后,将细胞离心并在膜联蛋白V和Tropo 3存在下标记15分钟,然后进行流式细胞术分析。

[0225] 5. 生产率测定(400ml)

[0226] 对于生产率测试,合成重链的VH基因并克隆入表达载体pXCIGG(Δ K)。之前将轻链亚克隆入pXCKappa载体。在体积为400ml的CHO K1SV GS-KO细胞中瞬时表达16个抗体(摇瓶)。利用蛋白A亲和色谱法纯化产生的抗体。利用预测的消光系数(1.49)测定所有抗体变体的抗体浓度。变体完整性通过在还原和非还原条件下的SDS-PAGE测定。

[0227] 实施例mAb1-mAb16

[0228] 如表1所述的实施例mAb1-mAb16可以利用常规的抗体重组生产和纯化方法制备。

[0229] 例如,已经将编码序列克隆入生产载体以在哺乳动物生产细胞系中重组表达。

[0230] 下表4和5提供用于实施本发明,尤其是用于生产本公开的核酸、表达载体和抗体的详细的氨基酸和核苷酸序列。

[0231] 表4:用于实施本发明的氨基酸和核苷酸序列的简要说明

[0232]

| SEQ ID NO: | 序列描述 |
|------------|---|
| 1 | A24、VH4 和 VH5 的 HCDR1 氨基酸序列 |
| 2 | A24、VH4 和 VH5 的 HCDR2 氨基酸序列 |
| 3 | A24、VH4 和 VH5 的 HCDR3 氨基酸序列 |
| 4 | A24、VL4、VL5 和 VL6 的 LCDR1 氨基酸序列 |
| 5 | VL4 的 LCDR2 氨基酸序列 |
| 6 | A24、VL4、VL5 和 VL6 的 LCDR3 氨基酸序列 |
| 7 | A24 的 LCDR2 氨基酸序列 |
| 8 | VL5 的 LCDR2 氨基酸序列 |
| 9 | A24 的 VH0 氨基酸序列 |
| 10 | A24 的 VL0 氨基酸序列 |
| 11 | VH4 氨基酸序列 |
| 12 | VH5 氨基酸序列 |
| 13 | VL4 氨基酸序列 |
| 14 | VL5 氨基酸序列 |
| 15 | VL6 氨基酸序列 |
| 16 | 人转铁蛋白受体氨基酸序列 |
| 17 | mAb1、mAb3、mAb5、mAb7、mAb9、mAb11、mAb13、mAb15 的全长轻链(含 VL4) |
| 18 | mAb1、mAb2 的全长重链(含 VH4-IgG4 同种型) |
| 19 | 编码 mAb1、mAb3、mAb5、mAb7、mAb9、mAb11、mAb13、mAb15 的全长轻链(含 VL4)的核苷酸序列 SEQ ID NO:19 |
| 20 | 编码 mAb1、mAb2 的全长重链(含 VH4-IgG4 同种型)的核苷酸序列 SEQ ID NO:20 |

[0233] 表5:用于实施本发明的氨基酸和核苷酸序列的简要说明

[0234]

| SEQ ID NO: | 描述以下氨基酸或核苷酸序列: |
|------------|--|
| 1 | GYTFTNQ |
| 2 | NTYTGE |
| 3 | EGWDSMDY |
| 4 | SASSSVNYMH |
| 5 | STSNRAT |
| 6 | QQRSSYPLT |
| 7 | STSNLAS |
| 8 | STSNRAS |
| 9 | QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNQGMNWVKQAPGKGLKWMGW INTYTGEPINADDFKGRFAISLETSAAYLQINNLKNEDMATYFCVREGWD SMDYWGQGTSTVTVSS |
| 10 | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVNYMHWQKPGTSPKLWIYSTSNL ASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLEL KR |
| 11 | QVQLVQSGPELKKPGASVKVSKASGYTFTNQGMNWVKQAPGKGLKWMGW WINTYTGEPINADDFKGRFVISLDTSAAYLQISSLKAEDTAVYFCVREGW |

[0235]

| | |
|----|---|
| | DSMDYWGQGTSVTVSS |
| 12 | MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASGYTFTNQ GMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPIINADDFKGRFVISLETSASTAYLQI SNLKNEDTAVYFCV REGWDSMDYWGQGTSVTVSS |
| 13 | QIVLTQSPATLSVSPGERATLSCS ASSSVNYMH WFQKPGQSPRLLIY STSNR ATG IPARFSGSGSGTSYTLTISLEPEDFAVYYC QQRSSYPL TFGQGTKLEIKR |
| 14 | QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS ASSSVNYMH WFQKPGQSPRLLIY STSNR ASGV PARFSGSGSGTSYTLTISRLEPEDFAVYYC QQRSSYPL TFGQGTKLEIKR |
| 15 | QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS ASSSVNYMH WFQKPGQSPRLLIY STSNL ASGV PARFSGSGSGTSYTLTISRLEPEDAAVYYC QQRSSYPL TFGAGTKLELKR |
| 16 | MMDQARSAFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDNHVMKLAVIDEENADNN TKANVTCPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGCKGVEPKTECERLAGTE SPVREEPGEDFPAARRLYWDDLKRLSEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREAG SQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLV YLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKI TFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFHGAHLGTGDPYTPGFPSF NHTQFPSPRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTS SKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVKGFVEPDHYVVGAQRDAWGPGAAGSGV GTALLKLAQMFSMDMVLKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGVATEWLEGYLSS LHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDS NWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSIGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIER IPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHTDELNDYERYNSQLSFVRDLNQYRAD IKEMGLSLQWLYSARGDFRATSRLLTDFGNAEKTDRLFVMMKKLNDRVMRVE YHFLSPYVSPKESPRHVFVWGSQSHTLPALLENLKLKQNNGAFNETLFRNQ ALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF |
| 17 | MSVPTQVLGLLLLWLTDARCQIVLTQSPATLSVSPGERATLSCSASSSVNYMH WFQKPGQSPRLLIY STSNR ATGIPARFSGSGSGTSYTLTISLEPEDFAVYYC QQRSSYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 18 | MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASGYTFTNQ GMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPIINADDFKGRFVISLDTSASTAYLQI SSLKAEDTAVYFCVREGWDSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTITCTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPAEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG |
| 19 | AAGCTTGCCGCCACCATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTG CTGTGGCTGACCGATGCCAGGTGCCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCC ACCCTGTCTGTGTCTCCCGGCGAGAGAGCTACCCTGTCTGCTCCGCCTCC TCCTCCGTGAACCTACATGCACTGGTTCAGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCC AGACTGCTGATCTACTCCACCTCCAACCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAG ATTTTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCTCTATACCCTGACCATCTCCAGCCT GGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGCGGTCTCTACC CCCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGG CACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTACCCAGGGAGGCCA AGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGA GAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTG TGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACA GGGCGAGTGCTGATGAATTC |

[0236]

20

AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGTCTGGGTGTTCTTCTTCTGTCC
 GTGACCACCGGCGTGCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCCCGA
 GCTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCCGGCT
 ACACCTTTACAAACCAGGGCATGAAGTGGGTCAAGCAGGCCCTGGCAAG
 GGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCCATCAA
 CGCCGACGACTTCAAGGGCAGATTCTGTGATCTCCCTGGACACCTCCGCCTC
 CACCGCCTACCTGCAGATCAGTCTCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTGT
 ACTTCTGCGTGCGGGAAGGCTGGGACTCCATGGACTATTGGGGCCAGGGC
 ACCTCCGTGACCGTGTCTAGCGTTCTACAAAGGGCCCAAGCGTGTTCCTC
 CTGGCCCCCTGCTCCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTG
 CCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCG
 GAGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGC
 GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGG
 CACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
 TGGACAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGCCACCCTGCCCCCCTGCCCA
 GCCCCGAGTTCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCTAAGCCC
 AAGGACACCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGT
 GGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACG
 GCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTTAA
 CAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGC
 TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGTAAAGTCTCCAACAAGGGCCTGCCAAGC
 AGCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCCC
 AGGTCTACACCTGCCACCCAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTG
 TCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAAGCGACATCGCCGTGGA
 GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCA
 GTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGA
 CAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACG
 AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGC
 TGATGAATTC

[0237] 结果

[0238] 设计功能性人源化抗体A24

[0239] 人源化

[0240] 人源化程序如下所列进行：

[0241] 1. 鉴定亲本抗体的结构域和区域。

[0242] 2. 将亲本抗体序列与一组参考序列比对。

[0243] 3. 构建亲本蛋白的3D结构模型。

[0244] 4. 基于收集的数据,进行替换各位置的可能性的初始评估并将位置分类。

[0245] 5. 当需要时构建人源化变体的结构模型,并与亲本模型相比较以结构上分析可能的替换。

[0246] 6. 通过检测亲本和受体序列之间的不同位置进行CDR移植。通常保留起作用的位置,且基于替换对亲合性的可能影响和与受体框架的相容性,仅当这种替换相对有利时才替换所述起作用的位置。

[0247] 7. 设计一组人源化轻链和重链的最终变体组合。

[0248] 序列注解

[0249] 用保守的结构域数据库(CDD) (Marchler-Bauer等.2011) 确定各氨基酸链的结构域内容和各结构域的大约边界。根据几种常用的定义(Kabat和Wu 1991,Chothia和Lesk 1987,更新于Al-Lazikani等.1997,Honegger和Plückthun 2001) 精确测定可变结构域边界和互补决定区(CDR)的边界。使用更新的Chothia CDR定义(Al-Lazikani等.1997) 并使用其

中Chothia 1987编号的位置编号。

[0250] 序列比对

[0251] 利用MAFFT (Kato等.2002) 产生亲本序列与小鼠和人种系序列的多重比对,且根据与亲本序列的序列一致性(SeqID) 将各比对中的输入排序。通过聚类100%的SeqID并排除多余的输入将参考组简化为独特的序列组。

[0252] 关键位置残基的鉴定

[0253] 抗体Fv' 具有大量关键位置,其组成VH/VL链间分界面或负责已经在五个CDR中定义的离散组的典型结构(Chothia和Lesk 1987,Martin和Thornton 1996,Al Laziniki等.1997)。在提出替换之前,应该详细考虑这些位置。基于与人种系的亲本抗体序列对比,鉴定最接近的匹配输入。基于下列的排序标准将最佳人种系鉴定为受体:

[0254] 1. 框架内的序列一致性。

[0255] 2. 相同或相容的链间分界面残基。

[0256] 3. 具有亲本CDR典型构象的支持环。

[0257] 4. 在表达抗体中发现重链和轻链种系的组合。

[0258] 构建3D模型

[0259] 使用Lonza建模平台产生亲本鼠源抗体及其变体的Fv区的结构模型。基于其与靶标的序列一致性以及模板结构的定性晶体测量例如分辨率(以埃(Å) 表示),将用于框架(FR) 和互补决定区(CDR) 以及完全Fv的候选的结构模板片段评分、排列并从内部的抗体数据库选择。

[0260] 为了将CDR在结构上与FR模板对齐,将CDR两侧的五个残基包括于CDR模板中。基于重叠片断和所产生的结构序列比对产生片段的比对。通过MODELLER处理模板片段和比对(Sali等.1993)。

[0261] 该方案产生源自一组比对的模板结构的构象限制。满足限制的结构的集合通过偶联梯度和模拟的退火优化程序产生。基于能量评分从这个集合选择一个或多个模型结构,所述能量评分源自蛋白质结构的评分和构象限制的满足度。检查模型,利用侧链优化算法和最小化的能量优化靶标和模板之间不同的位置的侧链。

[0262] 一套可视化和计算工具用于评估CDR的构象可变性以及结构域和区域的核心和局部包装,表面分析用于选择一个或多个优选的模型。

[0263] 建模结构的比较

[0264] 如之前所述,将亲本和人源化Fv区的结构模型单独建模,以确保构造的变体模型不具有对亲本模型结构的任何固有的偏好。然而,人源化变体与亲本序列的高度序列一致性经常导致为许多模型选择相同的结构模板。

[0265] 为评估不同的替换对亲和性和稳定性的影响,使用很多结构性标准。溶剂可及性、局部原子排列和替换相对于预测的抗原结合分界面或Fv二聚体分界面的位置是关键标准。观察到不利的溶解状态、不好的原子间接触或在关键位置较差地放置不恰当的残基导致潜在替换的拒绝。其他标准,例如静电效应、氢键模式或潜在的氢键模式也用于评估替换的合适性。一些位置比其他更适合接受替换,因为一组关键位置在支持CDR的典型类型、单个结构域核心的包装或结构域间分界面中起作用。

[0266] 潜在替换的评估

[0267] 基于其对结合亲和性和稳定性的潜在影响,评估亲本和受体框架之间不同的或靠近预测表位的所有位置。

[0268] 存在许多有助于这种分类的因素,这来自亲合性和稳定性两者的考虑。对有助于分类的因素是:

[0269] -负责抗原结合的位置;

[0270] -关键位置;

[0271] -VH/VL分界面内的保守残基;

[0272] -决定CDR典型类型的位置;

[0273] -与CDR的距离;

[0274] -参考比对中位置处的保守性或变化;

[0275] -溶剂可及性;

[0276] -局部原子排列;

[0277] -局部次级结构;

[0278] -静电效应;

[0279] -氢键模式;

[0280] -氢键势能;

[0281] -翻译后修饰;

[0282] -N-糖基化;

[0283] -脱酰胺作用。

[0284] 关键位置初始定义为Chothia CDR中的那些,确定为VH/VL分界面的关键位置;有助于确定CDR构象或在参考比对中高度保守的位置。许多位置是保守性的,并将仅接受一小类,或仅一种氨基酸。

[0285] 最佳的受体框架选择

[0286] 产生比较亲本可变结构域和人种系的序列比对。给定总体序列一致性、匹配的分界面位置和类似分类的CDR典型位置的情况下,轻链仍然具有若干同样适合的受体框架;通常一个对于一个区域略更适合,但对于另一个区域较不适合。因此选择两个轻链受体框架VK6-A26和VK3-L6。

[0287] 重链与人种系VH7-7-4.1最佳匹配。VH7种系家族仅包含一个成员,其可以加入VH1家族(Knappik等,2000)。由于很可能发现VH7种系的频次比VH1种系更少,认为优选使用后者作为受体框架。然而,当分析具有潜在的回复突变的位置时,很清楚VH7种系已经包含适当的残基。因此,两个IGHV种系用作受体框架;VH7-7-4.1和VH1-1-03。

[0288] 将J-片断基因与A24亲本序列在FR4和J-片断上相比。JK4和JH4鉴定为分别与轻链和重链最佳匹配,因此被选择为J-片断受体框架。

[0289] 人源化

[0290] 产生了亲本和受体框架之间具有不同残基的所有位置的列表。分析并考虑分离情况和其他可能的替换情况下的所有位置。排列各位置,并提出有关在人源化变体中替换和评估哪个残基的建议。对于轻链,提出三条人源化链;一条使用受体VK3-L6,两条具有受体VK6-A26,其中一条具有额外的从亲本序列保留(回复突变)的起作用的位置。对于重链,提出两条人源化链;一条使用各自选择的受体。VH7-7-4.1移植是更保守的;参见表6。

[0291] 表6人源化链

| [0292] | 链 | 名称 | 描述 |
|--------|---|-----|--------------------------------|
| | L | VL1 | 具有受体 VK6-A26 的 A24 人源化轻链 |
| | L | VL2 | 具有进一步回复突变的 A24 人源化轻链受体 VK6-A26 |
| | L | VL3 | 具有受体 VK3-L6 的 A24 人源化轻链 |
| | H | VH1 | 具有受体 VH7-7-4.1 的 A24 人源化重链 |
| | H | VH2 | 具有受体 VH1-1-03 的 A24 人源化重链 |

[0293] 首先产生的6个人源化抗体未能保留A24的功能性质

[0294] 基于之前小节中描述的方法,我们首先设计了A24的3个人源化轻链变体,(下文称为VL1、VL2和VL3)和A24的2个人源化重链变体(下文称为VH1和VH2)。我们将A24相应的VH和VL称为VH0和VL0。

[0295] 我们产生了以下6个人源化抗体,其具有人源化VH和VL和人IgG1同种型的以下组合:

[0296] INA01变体1人源化抗体:VH1/VL1

[0297] INA01变体2人源化抗体:VH2/VL1

[0298] INA01变体3人源化抗体:VH1/VL2

[0299] INA01变体4人源化抗体:VH2/VL2

[0300] INA01变体5人源化抗体:VH1/VL3

[0301] INA01变体6人源化抗体:VH2/VL3

[0302] 我们根据上述测定分析了这6个人源化抗体对HL-60细胞的细胞凋亡的诱导,并将诱导细胞凋亡的这种性质与具有相同人IgG1同种型的参考鼠源抗体A24(VH0/VL0)的嵌合形式进行比较。结果显示于图1。

[0303] 如图1所示,我们意外发现所有测试的人源化抗体丧失了它们的结合性质。考虑到一些变体具有与其亲本鼠源A24抗体同样的所有6个CDR这一事实,这是特别意外的。

[0304] 产生5个新的人源化抗体

[0305] 然后我们设计了新的重链(VH3)并产生以下人源化抗体:

[0306] INA01变体7人源化抗体:VH0/VL1

[0307] INA01变体8人源化抗体:VH3/VL1

[0308] INA01变体9人源化抗体:VH3/VL2

[0309] INA01变体10人源化抗体:VH3/VL3

[0310] INA01变体11人源化抗体:VH3/VL0

[0311] 再一次,我们基于上述的HL-60细胞凋亡诱导试验测试了这些人源化抗体诱导细胞凋亡的能力,并与嵌合INA01(对应于具有亲本鼠源A24可变区和人IgG1同种型的抗体)进行比较。结果显示于图2。

[0312] 如图2所示,人源化抗体再一次至少部分丧失了其诱导细胞凋亡的性质。

[0313] 产生6个新的人源化抗体

[0314] 基于由上述3个新抗体获得的结果,我们再一次设计了3条新的轻链和2条新的重

链。

[0315] 尤其是,我们使用生物信息学分析来预测降低免疫原性同时仍保持亲本抗体A24的有利性质的氨基酸的变化(在框架或在CDR区)。

[0316] 在目前的分析中,用iTope™分析A24衍生序列对人MHC II类的混杂的高亲合性结合剂。认为混杂的高亲合性MHC II类结合肽与T细胞表位的存在有关(Hi11等2003Arthritis Res Ther. (2003) 1:R40-R48),尽管中度和低亲合性结合剂也能引发T细胞反应。因此用iTope™为潜在的T细胞表位的位置提供有用的初始“低分辨率”筛选。此外,通过TCED™ BLAST检索分析序列,以定位之前通过其他蛋白序列的EpiScreen™分析鉴定的任何T细胞表位。

[0317] 如表7所示;在生物信息学分析中,iTope™显示LCDR2中的氨基酸替换L53R和/或S55T可以降低免疫原性。

| 序列 | p1 锚定 | p1 位置 | iTope™ 残基 | MHC II 配体 | 高亲合性 | TCED™ 同源性 |
|------------------|-------|-------|-----------|-----------|------|-----------|
| [0318] IYS01 VL4 | I48 | Fw2 | IYSTSNRAT | 7 | 2 | ..A...L.S |
| IYS01 VL5 | I48 | Fw2 | IYSTSNRAS | 21 | 11 | ..A...L.. |
| IYS01 VL6 | I48 | Fw2 | IYSTSNLAS | 26 | 15 | ..A..... |
| MHC II 口袋位置: | | | 1 4 6 7 9 | | | 1 4 6 7 9 |

[0319] 表7

[0320] 因此我们决定测试3个新的轻链,与A24的LCDR2相比,一个(VL4)在LCDR2包括2个氨基酸替换,一个(VL5)在LCDR2仅包括一个氨基酸替换,和一个(VL)与A24相比具有相同的LCDR2。

[0321] 用IgG1同种型恒定区产生以下6个新的人源化抗体。

[0322] INA01变体12VH4/VL4

[0323] INA01变体13VH5/VL4

[0324] INA01变体14VH4/VL5

[0325] INA01变体15VH5/VL5

[0326] INA01变体16VH4/VL6

[0327] INA01变体17VH5/VL6

[0328] 图5a显示VL4、VL5、VL6与A24抗体的VL的比对。

[0329] 图5b显示VH4和VH5与A24抗体的VH的比对。

[0330] 我们基于上述的HL-60细胞凋亡诱导试验测试了这些人源化抗体诱导细胞凋亡的能力,并与嵌合INA01(对应于具有亲本鼠源A24可变区和人IgG1同种型的抗体)进行比较。结果显示于图3。

[0331] 如图3所示,与嵌合INA01(对应于具有亲本鼠源A24可变区和人IgG1同种型的抗体)相比,所有6个新测试的人源化抗体现在具有类似或甚至更优的性质。

[0332] 特别是LCDR2中具有2个氨基酸替换的抗体变体12和变体13现在意外显示优于亲本嵌合INA01抗体的诱导性质。

[0333] 转化为IgG

[0334] 为表达全长IgG,将四个领先的候选变体12、14、15和17的重链(V_H)和轻链(V_L)的可变结构域片段从Fab表达载体亚克隆入人IgG4、人IgG1野生型、人IgG1L234AL235A和人

IgG1N297A的适当表达载体,所述人IgG1L234AL235A在本文中称为“AA”,形成生产根据本发明的16个抗体(如下表8所述的mAb1-mAb16)的表达载体,:

[0335] 表8:mAb1-mAb16的可变区和IgG Fc区的描述

| [0336] | 实例 | 可变区和 IgG Fc 区 |
|--------|-------|----------------------------------|
| | mAb1 | 具有 IgG4 Fc 区的 VH4/VL4 |
| | mAb2 | 具有 IgG4 Fc 区的 VH4/VL5 |
| | mAb3 | 具有 IgG4 Fc 区的 VH5/VL4 |
| | mAb4 | 具有 IgG4 Fc 区的 VH5/VL6 |
| | mAb5 | 具有 IgG1 Fc 区的 VH4/VL4 |
| | mAb6 | 具有 IgG1 Fc 区的 VH4/VL5 |
| | mAb7 | 具有 IgG1 Fc 区的 VH5/VL4 |
| | mAb8 | 具有 IgG1 Fc 区的 VH5/VL6 |
| | mAb9 | 具有 IgG1 AlaAla 突变体 Fc 区的 VH4/VL4 |
| | mAb10 | 具有 IgG1 AlaAla 突变体 Fc 区的 VH4/VL5 |
| | mAb11 | 具有 IgG1 AlaAla 突变体 Fc 区的 VH5/VL4 |
| | mAb12 | 具有 IgG1 AlaAla 突变体 Fc 区的 VH5/VL6 |
| | mAb13 | 具有 IgG1 N297A 突变体 Fc 区的 VH4/VL4 |
| | mAb14 | 具有 IgG1 N297A 突变体 Fc 区的 VH4/VL5 |
| | mAb15 | 具有 IgG1 N297A 突变体 Fc 区的 VH5/VL4 |
| | mAb16 | 具有 IgG1 N297A 突变体 Fc 区的 VH5/VL6 |

[0337] 人IgG的瞬时表达和纯化

[0338] 用编码IgG mAb1-mAb16的重链和轻链的表达载体DNA转染细胞。

[0339] 结果如图4所示。结果表明,与其他同种型、IgG1和突变体沉默的IgG1相比,用IgG4同种型制备的抗体产量更高。

[0340] 与mAb1相关的分析数据

[0341] 表9:mAb1的分析数据

| [0342] | 选择标准 | mAb1 |
|--------|--------------------------------|----------------------------|
| | 人 TfR 结合亲和力 (SPR, K_D nM) | 0,315 nM |
| [0343] | HL-60 细胞凋亡诱导 | 0.2 to 10 $\mu\text{g/ml}$ |
| | ELISA 测定中的 EC50 | 0.024 $\mu\text{g/ml}$ |

[0344] 值得注意地,本发明抗体的 K_D 亲和性和 EC_{50} 低于10nM,并且甚至低于1nM,且如HL-60细胞凋亡测定测量的具有比A24更好的细胞凋亡诱导,因此特别适于用作药物。

[0345] 此外,它们具有有利的可展性,尤其用于在真核细胞中生产和由于预测的免疫原性降低而向人施用。

[0346] 可以容易地将编码可变区的编码序列转入适合的表达载体和细胞系用于制备沉默的IgG1抗体,其例如包含含有L234A L235A突变的IgG1Fc变体,或包含N297A突变的IgG1Fc变体。

[0347] 或者,也可以将编码可变区的编码序列转入表达载体和细胞系用于制备具有高ADCC活性的抗体,其例如包含IgG1Fc野生型,和/或具有二等分G1cNAc或N297氨基酸位置处低岩藻糖基化聚糖。

序列表

<110> INATHERYS

<120> 抗 TfR 抗体及其在治疗增殖性和炎性疾病中的用途

<130> INA001

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Gln
1 5

[0001]

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Glu Gly Trp Asp Ser Met Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Ser Thr Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

[0002]

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Ser Thr Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 9
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

[0003]

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Ile Asn Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Val Arg Glu Gly Trp Asp Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

[0004]

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 11

<211> 117

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Ile Asn Ala Asp Asp Phe
50 55 60

[0005] Lys Gly Arg Phe Val Ile Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Glu Gly Trp Asp Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 136

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Gln Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Ile Asn Ala
65 70 75 80

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

[0006]

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Val Arg Glu Gly Trp Asp Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

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

[0007]

| |
|---|
| Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg |
| 100 105 |

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

| |
|---|
| Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly |
| 1 5 10 15 |

| |
|---|
| Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met |
| 20 25 30 |

| |
|---|
| His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr |
| 35 40 45 |

Ser Thr Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

[0008]

<400> 15

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 16
<211> 760
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
1 5 10 15

[0009] Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp
20 25 30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Glu Glu Glu Asn Ala
35 40 45

Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Val Thr Lys Pro Lys Arg Cys Ser Gly
50 55 60

Ser Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Val Phe Phe Leu Ile Gly
65 70 75 80

Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr
85 90 95

Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro
100 105 110

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

Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile
 130 135 140

Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln
 145 150 155 160

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

Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val
 180 185 190

[0010] Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg
 195 200 205

Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys
 210 215 220

Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys
 225 230 235 240

Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile
 245 250 255

Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu
 260 265 270

Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe
 275 280 285

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Pro | Ile | Val | Asn | Ala | Glu | Leu | Ser | Phe | Phe | Gly | His | Ala | His | Leu | Gly | |
| | 290 | | | | | | 295 | | | | 300 | | | | | | |
| | Thr | Gly | Asp | Pro | Tyr | Thr | Pro | Gly | Phe | Pro | Ser | Phe | Asn | His | Thr | Gln | |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| | Phe | Pro | Pro | Ser | Arg | Ser | Ser | Gly | Leu | Pro | Asn | Ile | Pro | Val | Gln | Thr | |
| | | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| | Ile | Ser | Arg | Ala | Ala | Ala | Glu | Lys | Leu | Phe | Gly | Asn | Met | Glu | Gly | Asp | |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |
| | Cys | Pro | Ser | Asp | Trp | Lys | Thr | Asp | Ser | Thr | Cys | Arg | Met | Val | Thr | Ser | |
| | | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| [0011] | Glu | Ser | Lys | Asn | Val | Lys | Leu | Thr | Val | Ser | Asn | Val | Leu | Lys | Glu | Ile | |
| | 370 | | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | |
| | Lys | Ile | Leu | Asn | Ile | Phe | Gly | Val | Ile | Lys | Gly | Phe | Val | Glu | Pro | Asp | |
| | 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | |
| | His | Tyr | Val | Val | Val | Gly | Ala | Gln | Arg | Asp | Ala | Trp | Gly | Pro | Gly | Ala | |
| | | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | |
| | Ala | Lys | Ser | Gly | Val | Gly | Thr | Ala | Leu | Leu | Leu | Lys | Leu | Ala | Gln | Met | |
| | | | | | 420 | | | | 425 | | | | | 430 | | | |
| | Phe | Ser | Asp | Met | Val | Leu | Lys | Asp | Gly | Phe | Gln | Pro | Ser | Arg | Ser | Ile | |
| | | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | |
| | Ile | Phe | Ala | Ser | Trp | Ser | Ala | Gly | Asp | Phe | Gly | Ser | Val | Gly | Ala | Thr | |
| | 450 | | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | |

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr
465 470 475 480

Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val
485 490 495

Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn
500 505 510

Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp
515 520 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe
530 535 540

[0012]

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp
545 550 555 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu
565 570 575

Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Glu
580 585 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn
595 600 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp
610 615 620

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln
625 630 635 640

Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu
645 650 655

Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys
660 665 670

Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro
675 680 685

Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser
690 695 700

Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys
705 710 715 720

Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala
725 730 735

[0013]

Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp
740 745 750

Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
755 760

<210> 17

<211> 233

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

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

Asp Ala Arg Cys Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

| 20 | 25 | 30 |
|---|-----|---------|
| Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Val Asn Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg | | |
| 65 | 70 | 75 80 |
| Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser | | |
| 100 | 105 | 110 |
| [0014] | | |
| Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro | | |
| 145 | 150 | 155 160 |
| Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His | | |

195

200

205

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 18
<211> 462
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

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

[0015]

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Gln Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Ile Asn Ala
65 70 75 80

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

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Val Arg Glu Gly Trp Asp Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

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

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
145 150 155 160

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

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

[0016] Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
225 230 235 240

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

[0017] Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
450 455 460

| | | | |
|--------|--|------|--|
| | <210> | 19 | |
| | <211> | 724 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | 智人 | |
| | <400> | 19 | |
| | aagcttgccg ccaccatgtc cgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct gctgtggctg | 60 | |
| | accgatgcca ggtgccagat cgtgctgacc cagtctcctg ccaccctgtc tgtgtctccc | 120 | |
| | ggcgagagag ctaccctgtc ctgctccgcc tctcctccg tgaactacat gactggttc | 180 | |
| | cagcagaagc ccggccagtc cccagactg ctgatctact ccacctcaa ccgggccacc | 240 | |
| | ggcatccctg ccagattttc cggtcttgge tccggcacct cctataacct gaccatctcc | 300 | |
| | agcctggaac ccgaggactt cgccgtgtac tactgccage agcggctctc ctaccccctg | 360 | |
| | acctttggcc agggcaccaa gctggaatc aagcgtacgg tggccgctcc cagcgtgttc | 420 | |
| [0018] | atcttcccc caagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg | 480 | |
| | aacaacttct accccaggga ggccaagggt cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc | 540 | |
| | ggcaacagcc aggagagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc | 600 | |
| | agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg | 660 | |
| | accaccagg gcctgtccag ccccgtagc aagagcttca acaggggca gtgctgatga | 720 | |
| | attc | 724 | |
| | <210> | 20 | |
| | <211> | 1411 | |
| | <212> | DNA | |
| | <213> | 智人 | |
| | <400> | 20 | |
| | aagcttgccg ccaccatgga atggtcctgg gtgttctgt tcttctgtc cgtgaccacc | 60 | |
| | ggcgtgcaact cccagggtgca gctgggtgag tctggcccc agctgaagaa acctggcgcc | 120 | |

| | | |
|--------|--|------|
| | tccgtgaagg tgtcctgcaa ggcttccggc tacaccttta caaaccaggg catgaactgg | 180 |
| | gtcaagcagg cccctggcaa gggcctgaag tggatgggct ggatcaacac ctacaccggc | 240 |
| | gagcccatca acgccgacga cttcaagggc agattcgtga tctccctgga cacctccgcc | 300 |
| | tccaccgcct acctgcagat cagctctctg aaggccgagg ataccgccgt gtacttctgc | 360 |
| | gtgcgggaag gctgggactc catggactat tggggccagg gcacctccgt gaccgtgtct | 420 |
| | agcgcttcta caaaggggcc aagcgtgttc cccctggccc cctgctccag aagcaccagc | 480 |
| | gagagcacag ccgccctggg ctgcctgggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg | 540 |
| | tcttgaaca gcggagccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc | 600 |
| | agcggcctgt acagcctgag cagcgtgggtg accgtgccc gcagcagcct gggcaccaag | 660 |
| | acctacacct gtaacgtgga ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaggggtggag | 720 |
| | agcaagtacg gcccaccctg cccccctgc ccagccccg agttcctggg cggaccagc | 780 |
| [0019] | gtgttcctgt tccccccaa gccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccagggtg | 840 |
| | acctgtgtgg tgggtggacgt gtcccaggag gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg | 900 |
| | gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagtt taacagcacc | 960 |
| | taccgggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaagagtac | 1020 |
| | aagtgtaaag tctccaacaa gggcctgcc agcagcatcg aaaagaccat cagcaaggcc | 1080 |
| | aagggccagc ctagagagcc ccaggtctac accctgccac ccagccaaga ggagatgacc | 1140 |
| | aagaaccagg tgtccctgac ctgtctgggtg aagggtttct acccaagcga catcgccgtg | 1200 |
| | gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgettgac | 1260 |
| | agcgacggca gcttcttcct gtacagcagg ctgaccgtgg acaagtccag atggcaggag | 1320 |
| | ggcaacgtct ttagctgtct cgtgatgcac gaggcctgc acaaccacta caccagaag | 1380 |
| | agcctgagcc tgtccctggg ctgatgaatt c | 1411 |

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

[0020]

<400> 22

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 23

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

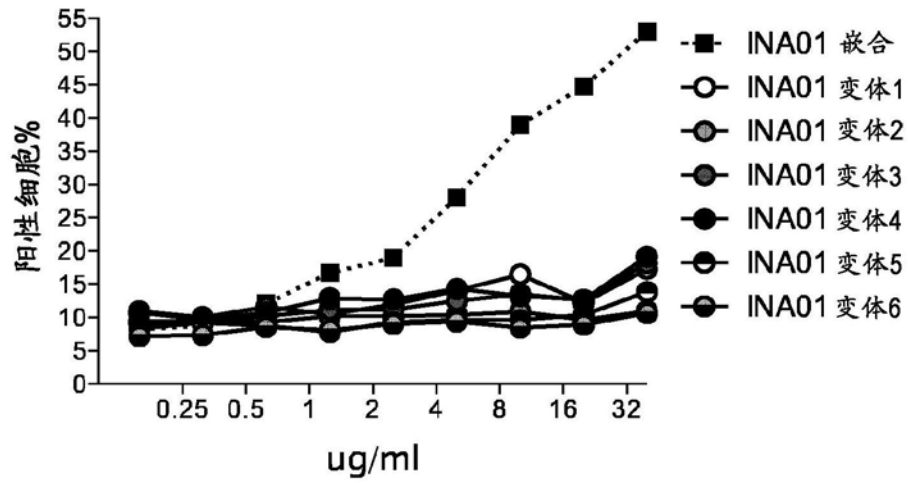


图1

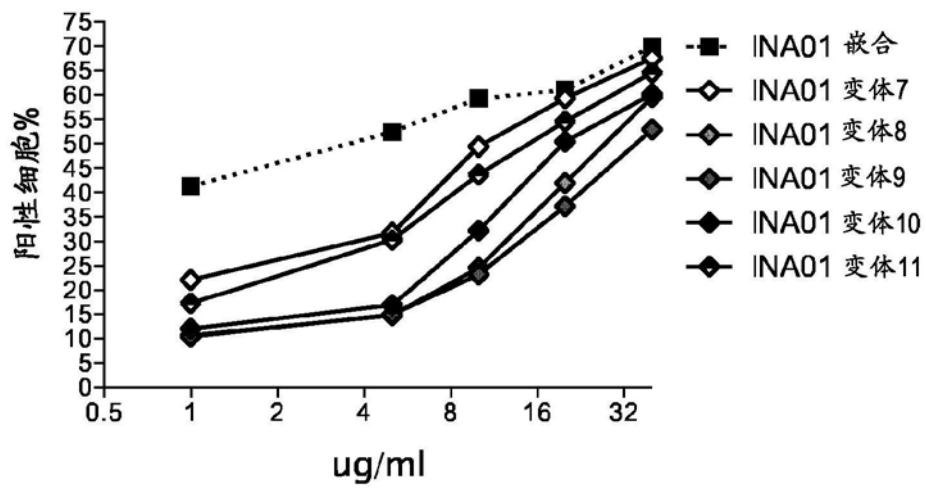


图2

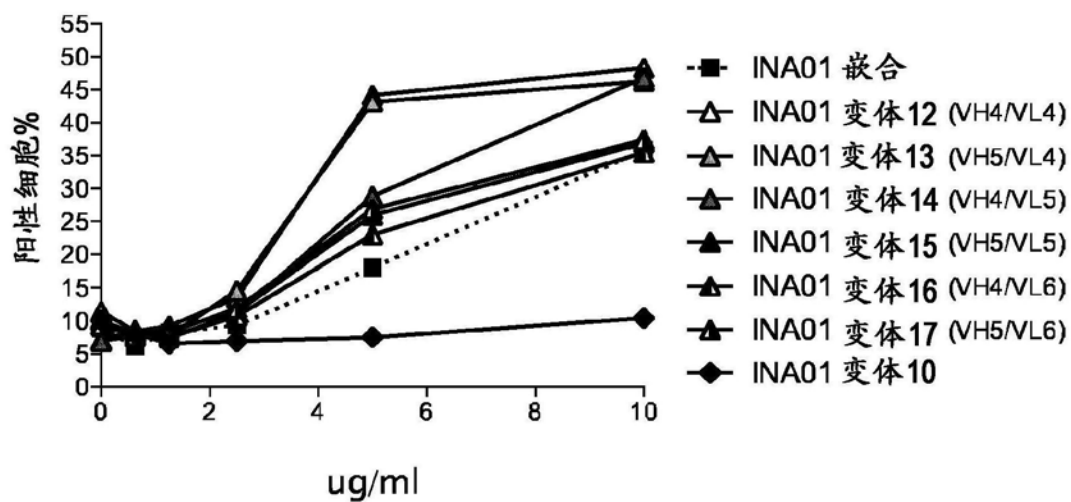


图3

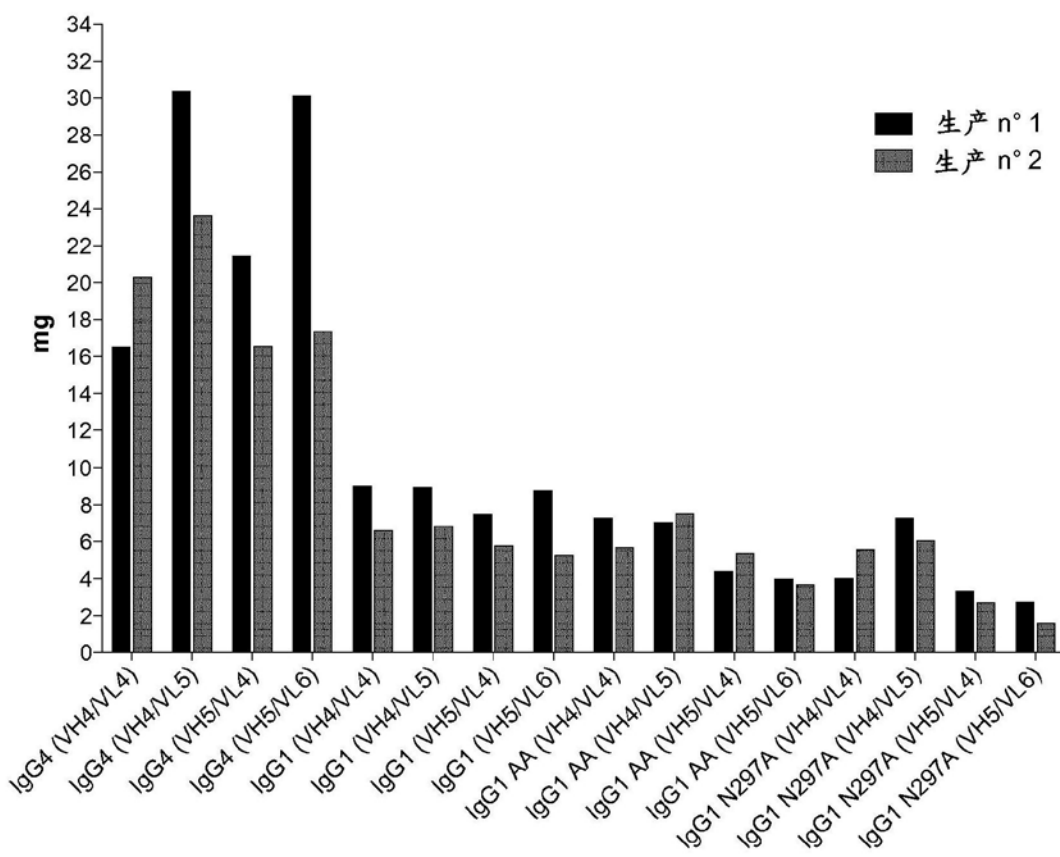


图4

| | | | |
|----------------|-----|---|-----|
| 序列 A24 VL | 1 | LLTISASVI- - - - -MSRGQIVLTQSPA | 32 |
| Seq. INA01 VL6 | 1 | MSVPTQVLGLLLWLTDARCQIVLTQSPATLSLSPGERAT | 40 |
| Seq. INA01 VL5 | 1 | MSVPTQVLGLLLWLTDARCQIVLTQSPATLSLSPGERAT | 40 |
| Seq. INA01 VL4 | 1 | MSVPTQVLGLLLWLTDARCQIVLTQSPATLSVSPGERAT | 40 |
| | | MSVPTQVLGLLLWLTDARCQIVLTQSPATLS . SPGERAT | |
| 序列 A24 VL | 33 | ITCSASSSVNYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPAR | 72 |
| Seq. INA01 VL6 | 41 | LSCSASSSVNYMHWFQKPGQSPRLLIYSTSNLASGVPAR | 80 |
| Seq. INA01 VL5 | 41 | LSCSASSSVNYMHWFQKPGQSPRLLIYSTSNRASGVPAR | 80 |
| Seq. INA01 VL4 | 41 | LSCSASSSVNYMHWFQKPGQSPRLLIYSTSNRATGI PAR | 80 |
| | | LSCSASSSVNYMHWFQKPGQSPRLLIYSTSN ASGVPAR | |
| 序列 A24 VL | 73 | FSGSGSGTSSYSLTISRMEAEADAATYYCQQRSSYPFTFGAG | 112 |
| Seq. INA01 VL6 | 81 | FSGSGSGTSSYTLTISRLEPEDAAVYYCQQRSSYPFTFGAG | 120 |
| Seq. INA01 VL5 | 81 | FSGSGSGTSSYTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGQG | 120 |
| Seq. INA01 VL4 | 81 | FSGSGSGTSSYTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGQG | 120 |
| | | FSGSGSGTSSYTLTISRLEPED AVYYCQQRSSYPFTFG G | |
| 序列 A24 VL | 113 | TKLEELKR | 119 |
| Seq. INA01 VL6 | 121 | TKLEELKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYP | 160 |
| Seq. INA01 VL5 | 121 | TKLEELKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYP | 160 |
| Seq. INA01 VL4 | 121 | TKLEELKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYP | 160 |
| | | TKLE . KRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYP | |

图5a

| | | | |
|----------------|-----|---|-----|
| 序列 A24 VH | 1 | MAAAQSAAQAQIQLVQSGPELKKPGETVKIS | 30 |
| Seq. INA01 VH5 | 1 | MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGPELKKPGASVKVS | 40 |
| Seq. INA01 VH4 | 1 | MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGPELKKPGASVKVS | 40 |
| | | MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGPELKKPGASVKVS | |
| 序列 A24 VH | 31 | CKASGYTFTNQGMNVVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPI NA | 70 |
| Seq. INA01 VH5 | 41 | CKASGYTFTNQGMNVVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPI NA | 80 |
| Seq. INA01 VH4 | 41 | CKASGYTFTNQGMNVVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPI NA | 80 |
| | | CKASGYTFTNQGMNVVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPI NA | |
| 序列 A24 VH | 71 | DDFKGRFAISLETSASTAYLQISNLKNEDMATYFCVREGW | 110 |
| Seq. INA01 VH5 | 81 | DDFKGRFVISLETSASTAYLQISNLKNEDTAVYFCVREGW | 120 |
| Seq. INA01 VH4 | 81 | DDFKGRFVISLDTASTAYLQISSLKAEEDTAVYFCVREGW | 120 |
| | | DDFKGRFVISLETSASTAYLQISNLKNEDTAVYFCVREGW | |
| 序列 A24 VH | 111 | DSMDYWGQGTSTVTVSS | 126 |
| Seq. INA01 VH5 | 121 | DSMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA | 160 |
| Seq. INA01 VH4 | 121 | DSMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA | 160 |
| | | DSMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA | |

图5b