



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102946906 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 15

(21) 申请号 201180031150. 3

C07K 16/28(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 04. 22

C07K 16/30(2006. 01)

C07K 16/46(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/327, 302 2010. 04. 23 US

(56) 对比文件

CN 101052653 A, 2007. 10. 10, 说明书第
33-34、44 页, 实施例 1-5, 图 1.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 12. 24

CN 101537180 A, 2009. 09. 23, 全文.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/033610 2011. 04. 22

CN 1176659 A, 1998. 03. 18, 全文.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/133886 EN 2011. 10. 27

审查员 朱宁

(73) 专利权人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 J·舍尔 C·斯皮斯 D·G·延苏拉

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 张莉 黄革生

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

C07K 16/24(2006. 01)

权利要求书3页 说明书75页 附图44页

(54) 发明名称

生产异源多聚体蛋白质

(57) 摘要

本申请描述用于高效生产能够特异性结合多个靶标的抗体和其它多聚体蛋白质复合物(在本文中统称为异源多聚体蛋白质)的方法。所述靶标可以是例如单个分子上的不同表位或位于不同分子上。该方法将异源多聚体蛋白质的高效高基因表达水平、正确组装和易于纯化组合在一起。本发明还提供使用这些异源多聚体蛋白质的方法, 和包含这些抗体的组合物、套盒和制品。

1. 制备异源多聚体蛋白质的方法,所述异源多聚体蛋白质包含具有第一异源二聚化区域的第一含铰链的多肽、和具有第二异源二聚化区域的第二含铰链的多肽,其中第二异源二聚化区域与第一异源二聚化区域相互作用,且其中第一和第二含铰链的多肽在铰链区之间通过至少一个链间二硫键连接,所述方法包括步骤:

(a) 培养包含编码第一含铰链的多肽的第一核酸的第一宿主细胞,其中在表达该含铰链的多肽的条件下进行该培养;

(b) 培养包含编码第二含铰链的多肽的核酸的第二宿主细胞,其中在表达该含铰链的多肽的条件下进行该培养;和

(c) 破坏第一和第二宿主细胞的细胞膜,以从所述宿主细胞中释放第一和第二含铰链的多肽,形成异源多聚体蛋白质,其中第一和第二宿主细胞已在单个悬浮液中组合在一起;

其中异源多聚体蛋白质是双特异性抗体或多特异性抗体,且第一和第二含铰链的每一多肽是抗体重链,且与抗体轻链配对以形成第一对和第二对,并且其中第一对和第二对的轻链包含不同的可变区序列。

2. 根据权利要求1的方法,还包括步骤:回收异源多聚体蛋白质。

3. 根据权利要求1的方法,其中第一异源二聚化区域和第二异源二聚化区域在界面相遇,第二异源二聚化区域的界面部分包含突起(knob),所述突起可置入第一异源二聚化区域的界面部分中的腔洞(hole)中。

4. 根据权利要求1的方法,其中第二异源二聚化区域是包含突起(knob)的Fc区或第一异源二聚化区域是包含腔洞(hole)的Fc区,或同时两者。

5. 根据权利要求1的方法,其中第一Fc区和第二Fc区在界面相遇,其中第二Fc区的界面包含突起(knob),所述突起可置入第一Fc区的界面中的腔洞(hole)中,其中该腔洞或突起或两者是之前已经被引入到第一和第二Fc区的界面中的。

6. 根据权利要求1的方法,其中第一异源二聚化区域和第二异源二聚化区域包含亮氨酸拉链。

7. 根据权利要求1的方法,其中第一异源二聚化区域和第二异源二聚化区域包含卷曲螺旋。

8. 根据权利要求1的方法,其中每一含铰链的多肽与抗体轻链配对形成靶标结合臂。

9. 根据权利要求1的方法,其中一对含铰链的多肽和抗体轻链是人源化的,或者两对均是人源化的。

10. 根据权利要求1的方法,其中含铰链的多肽和抗体轻链在分开的表达质粒上编码。

11. 根据权利要求1的方法,其中含铰链的多肽和抗体轻链在相同的表达质粒上编码。

12. 根据权利要求1的方法,其中宿主细胞选自原核细胞和真核细胞。

13. 根据权利要求1的方法,其中宿主细胞是原核细胞。

14. 根据权利要求13的方法,其中所述原核细胞是大肠杆菌细胞。

15. 根据权利要求14的方法,其中所述大肠杆菌细胞是1pp缺陷型。

16. 根据权利要求1的方法,其中宿主细胞是哺乳动物细胞或植物细胞。

17. 根据权利要求16的方法,其中所述哺乳动物细胞是CHO细胞。

18. 根据权利要求1的方法,其中步骤(a)和步骤(b)的细胞在分开的细胞培养物中。

19. 根据权利要求 1 的方法, 其中步骤 (a) 和 (b) 的细胞在包含这两种宿主细胞的混合培养物中。

20. 根据权利要求 18 的方法, 其中在破坏细胞膜之前, 将步骤 (a) 和 (b) 的细胞混合、离心和重悬浮于缓冲液中。

21. 根据权利要求 18 的方法, 其中, 将步骤 (a) 和 (b) 的细胞离心、重悬浮于缓冲液中, 然后组合, 之后破坏细胞膜。

22. 根据权利要求 1 的方法, 其中破坏细胞膜选自: 对细胞膜进行通透化和使细胞膜解体。

23. 根据权利要求 1 的方法, 其中破坏细胞膜选自: 细胞裂解、超声、渗透压震扰、通过微流化器、加入 EDTA、低渗缓冲液、使用冻融技术、电穿孔、和通过不锈钢球匀浆器。

24. 根据权利要求 1 的方法, 其中破坏细胞膜是使用洗涤剂实施的。

25. 根据权利要求 1 的方法, 其中破坏细胞膜是使用溶剂实施的。

26. 根据权利要求 1 的方法, 其中破坏细胞膜是使用表面活性剂实施的。

27. 根据权利要求 25 的方法, 其中溶剂是甲苯或二甲基亚砷。

28. 根据权利要求 26 的方法, 其中表面活性剂是 Triton-X 100 或吐温 20。

29. 根据权利要求 2 的方法, 其中回收步骤还包括至少一个纯化步骤。

30. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 还包括步骤:

(a) 在包含蛋白 A 的柱上捕获所述异源多聚体蛋白,

(b) 从所述柱上洗脱所述异源多聚体蛋白, 和

(c) 将所述洗脱的异源多聚体蛋白稀释到包含离液剂或温和洗涤剂的溶液中。

31. 根据权利要求 1 的方法, 其中异源多聚体蛋白质是单臂抗体。

32. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述抗体是人源化的。

33. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述抗体是全长抗体。

34. 根据权利要求 1 的方法, 其中一对抗体重链和轻链对或两对抗体重链和轻链对是人的。

35. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述抗体是人的。

36. 根据权利要求 1 的方法, 其中抗体选自 IgG、IgA 和 IgD。

37. 根据权利要求 36 的方法, 其中抗体是 IgG。

38. 根据权利要求 37 的方法, 其中抗体是 IgG1。

39. 根据权利要求 37 的方法, 其中抗体是 IgG2。

40. 根据权利要求 1 的方法, 其中抗体是治疗性抗体。

41. 根据权利要求 1 的方法, 其中抗体是激动剂抗体。

42. 根据权利要求 1 的方法, 其中抗体是拮抗剂抗体。

43. 根据权利要求 1 的方法, 其中抗体是诊断性抗体。

44. 根据权利要求 1 的方法, 其中抗体是封闭抗体。

45. 根据权利要求 1 的方法, 其中抗体是中和抗体。

46. 根据权利要求 1 的方法, 其中抗体能够与肿瘤抗原结合。

47. 根据权利要求 46 的方法, 其中肿瘤抗原不是细胞表面分子。

48. 根据权利要求 46 的方法, 其中肿瘤抗原不是分化群因子。

49. 根据权利要求 1 的方法,其中抗体能够与分化群因子结合。
50. 根据权利要求 1 的方法,其中抗体能够与细胞存活调节因子结合。
51. 根据权利要求 1 的方法,其中抗体能够与细胞增殖调节因子特异性结合。
52. 根据权利要求 1 的方法,其中抗体能够与和组织发育或分化相关的分子结合。
53. 根据权利要求 1 的方法,其中抗体能够与细胞表面分子结合。
54. 根据权利要求 1 的方法,其中抗体能够与淋巴因子结合。
55. 根据权利要求 1 的方法,其中多肽的至少 45%形成所述双特异性抗体。
56. 根据权利要求 1 的方法,其中所述双特异性抗体能够特异性结合两个靶标分子。
57. 根据权利要求 8 的方法,其中第一臂特异性结合第一靶标分子,第二臂特异性结合第二靶标分子。
58. 根据权利要求 1 的方法,其中多肽的至少 45%存在于复合物中,所述复合物包含第一含铰链的多肽和抗体轻链对以及第二含铰链的多肽和抗体轻链对。
59. 根据权利要求 29 的方法,其中在纯化异源多聚体蛋白的步骤之前,分离的多肽中不超过 10%以单体或同源二聚体存在。
60. 根据权利要求 1 的方法,其中第一和第二重链-轻链对各包含通过二硫键互相连接的重链和轻链。
61. 根据权利要求 1 的方法,其中第一对和第二对之间的 pI 值差异为至少 0.5。
62. 产生异源多聚体蛋白质组合文库的方法,其中所述异源多聚体蛋白质包含具有第一异源二聚化区域的第一含铰链的多肽、和包含具有第二异源二聚化区域的第二含铰链的多肽,其中第二异源二聚化区域与第一异源二聚化区域相互作用,其中第一和第二含铰链的多肽在铰链区之间通过至少一个链间二硫键连接,所述方法包括步骤:
- (a) 培养第一宿主细胞和至少两种另外的宿主细胞,其中
 - i. 所述第一宿主细胞包含第一核酸,所述核酸编码第一含铰链多肽;和
 - ii. 所述另外的宿主细胞包含核酸,所述核酸编码第二含铰链多肽,
 - (b) 破坏第一宿主细胞和至少两种另外的宿主细胞的细胞膜,以使第一含铰链多肽和第二含铰链多肽释放到细胞外环境中,其中该第一宿主细胞和至少两种另外的宿主细胞已经在单个悬浮液中组合在一起;和
 - (c) 回收异源多聚体蛋白质复合物;
- 其中异源多聚体蛋白质是双特异性抗体或多特异性抗体,且第一和第二含铰链的每一多肽是抗体重链,且与抗体轻链配对以形成第一对和第二对,并且其中第一对和第二对的轻链包含不同的可变区序列。
63. 根据权利要求 8 的方法,其中每一个或两个结合臂能够结合一个以上的靶标。

生产异源多聚体蛋白质

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2010 年 4 月 23 日递交的题为“生产异源多聚体蛋白质”的美国临时专利申请序列号 61/327,302 的优先权,通过参考引用的方式将其全部内容并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于生产异源多聚体蛋白质 (heteromultimeric proteins) 的方法。

[0004] 发明背景

[0005] IgG 类单克隆抗体包含两个相同的抗原结合臂和一个恒定区 (Fc)。具有不同特异性的结合臂的抗体通常不天然存在,因此,必须利用化学工程 (例如化学交联等)、重组 DNA 和 / 或细胞融合技术来制备。

[0006] 双特异性抗体能够同时结合两个不同的抗原。该特性可以用于开发不能以常规单克隆抗体进行的治疗策略。已经开发的大量富于想象力的双特异性抗体形式反映了对这些分子的强烈兴趣。见 Berg J, Lotscher E, Steimer KS, 等, “Bispecific antibodies that mediate killing of cells infected with human immunodeficiency virus of any strain,” *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) 88(11):4723-4727 以及 Fischer N 和 Leger O., “Biospecific Antibodies: Molecules That Enable Novel Therapeutic Strategies,” *Pathobiology* (2007) 74:3-14。

[0007] 另一类多特异性分子是重组融合蛋白。由免疫调节蛋白的胞外结构域和免疫球蛋白 (Ig) 的恒定区 (Fc) 组成的重组融合蛋白代表了一类不断增长的人类治疗剂。免疫粘附素将蛋白质序列的结合区域 (具有所需特异性) 与抗体的效应结构域组合在一起。免疫粘附素具有两个对其作为治疗剂的潜力而言有意义的重要特性: 靶标特异性和药代动力学稳定性 (体内半衰期和抗体的相当)。免疫粘附素可用作拮抗剂来抑制或阻断有害的相互作用, 或作为激动剂来模拟或增强生理反应。见 Chamow SM, Zhang DZ, Tan XY, 等, “A humanized, bispecific immunoadhesin-antibody that retargets CD3+ effectors to kill HIV-1-infected cells,” *J Hematother* 1995; 4(5):439-446。

[0008] 其它文献中讨论了其它的多特异性分子。例子包括但不限于: Fisher 等, *Pathobiology* (2007) 74:3-14 (对多种双特异性形式的评论); 美国专利号 6,660,843, 2003 年 12 月 9 日授予 Feige 等 (肽体 peptibodies); 美国专利公开号 2002-004587, 2002 年 1 月 10 日公开 (多特异性抗体); 美国专利号 7612181, 2009 年 11 月 3 日授予 Wu 等 (双可变区形式); 美国专利号 6,534,628, Nord K 等, *Prot Eng* (1995) 8:601-608, Nord K 等, *Nat Biotech* (1997) 15:772-777 和 Grönwall 等, *Biotechnol Appl Biochem*. (2008) Jun; 50(Pt 2):97-112 (亲合体 (Affibodies)); Martens 等, *Clin Cancer Res* (2006), 12:6144-6152 和 Jin 等, *Cancer Res* (2008) 68(11):4360-4368 (单臂抗体); Bostrom 等, *Science* (2009) 323:1610-1614 (双功能 Fab, aka 混合价抗体)。其它形式为本领域技术人员所知。

[0009] 对于上述多特异性分子, 制备临床级别的材料仍是一个挑战。如以上所指出的, 存

在许多途径可以生产具有混合结合臂（即互相不同的结合臂）的分子。这些方法每个都具有其自身的缺陷。

[0010] 化学交联是费力的，因为可能还需要将目的物从同二聚体和其它不需要的副产物中纯化出来。此外，化学修饰步骤可以改变蛋白质的完整性，从而导致差的稳定性。因此，该方法常常是低效的并可能导致抗体活性的丢失。

[0011] 细胞融合技术（例如，杂种杂交瘤）表达两种重链和两种轻链，这两条重链和两条轻链随机组装，导致产生 10 种抗体组合。所需要的异源多聚体 抗体仅占这样产生的抗体的一小部分。对所需异源多聚体蛋白质的纯化显著地降低了生产产量和增加制备成本。

[0012] 重组 DNA 技术已被用来产生多种异源多聚体形式，例如单链 Fv、双抗体 (diabodies) 等，它们不包含 Fc 区。这类抗体分子的主要缺陷是缺乏 Fc 区和由此缺乏抗体引发效应子功能（例如，补体激活、Fc 受体结合等）的能力。因此，需要包含功能性 Fc 区的双特异性抗体。

[0013] 重组 DNA 技术也已被用来产生“knob into hole”双特异性抗体。见美国专利申请 20030078385 (Arathoon 等 -Genentech)。该策略的一个局限性是两个亲本抗体的轻链必须相同，以防止由于它们在相同的细胞中表达而错配和形成不需要和 / 或无活性的分子。

[0014] 因此，仍然需要生产异源多聚体蛋白质的可供选择的方法。本文中描述的本发明提供了这样的方法。从本文提供的对本发明的描述，本发明的这些和其它方面以及优势将是显而易见的。

[0015] 发明简述

[0016] 使用目前的技术生产异源多聚体蛋白质（例如，多特异性抗体）具有缺陷，所述缺陷包括产生产品的混合物、降低的产量和效应子功能的降低 / 消失等。因此，需要高效和高水平生产异源多聚体蛋白质。

[0017] 通过各种手段生产抗体分子被广泛熟知。例如，美国专利 6331415 (Cabilly 等) 描述了重组生产免疫球蛋白的方法，其中重链和轻链从单个载体或从位于单个细胞中的两个分开的载体同时表达。Wibbenmeyer 等 (1999, Biochim Biophys Acta 1430 (2):191-202) 以及 Lee 和 Kwak (2003, J. Biotechnology 101:189-198) 描述了使用在分开的大肠杆菌培养物中表达的质粒，从分开产生的重链和轻链生产单克隆抗体。在例如 Harlow 等, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory 出版社, Cold Spring Harbor, N. Y., (1988) 和 W02006028936 中描述了多种其它关于抗体生产的技术。然而，这些方法的每一种都具有例如产量低、使用化学试剂等缺陷。

[0018] 本发明方法提供：在分开的宿主细胞中表达包含铰链的异源多聚体蛋白质的每一个成分，例如抗体的一个臂，和在不添加还原剂的情况下组装该含铰链的异源多聚体蛋白质，例如多特异性抗体。

[0019] 本发明提供了容易和高效的生产程序 / 方法，其允许经济地生产异源多聚体蛋白质，例如多特异性抗体。

[0020] 本发明提供了生产多特异性免疫球蛋白复合物（例如多特异性抗体）和其它多聚体蛋白质（在本文中统称为异源多聚体蛋白质）的高效和 novel 的方法，所述方法克服了传统方法的局限性。根据本发明的方法，异源多聚体蛋白质，例如双特异性抗体，可以以高度同质的异源多聚体多肽形式提供。此外，本文中提供的方法不依赖于添加还原剂来实现在

异源多聚体蛋白质中至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个链间二硫键的形成。

[0021] 在第一方面,本文中描述的方法允许制备异源多聚体蛋白质,所述异源多聚体蛋白质包含具有第一异源二聚化区域的第一含铰链的多肽、和具有第二异源二聚化区域的第二含铰链的多肽,其中第二异源二聚化区域与第一异源二聚化区域相互作用,且其中第一和第二含铰链的多肽通过至少一个链间二硫键连接,所述方法包括以下步骤:

[0022] (a) 培养包含编码第一含铰链的多肽的第一核酸的第一宿主细胞,其中在表达该含铰链的多肽的条件下进行该培养;

[0023] (b) 培养包含编码第二含铰链的多肽的核酸的第二宿主细胞,其中在表达该含铰链的多肽的条件下进行该培养;

[0024] (c) 破坏细胞膜,以使第一和第二含铰链的多肽释放到胞外环境中,其中第一和第二宿主细胞已在单个悬浮液中组合在一起;和

[0025] (d) 回收异源多聚体蛋白质,

[0026] 其中所述方法不需要添加还原剂。

[0027] 在第二方面,本发明涉及制备异源多聚体蛋白质的方法,所述异源多聚体蛋白质包含具有第一异源二聚化区域的第一含铰链的多肽、和具有第二异源二聚化区域的第二含铰链的多肽,其中第二异源二聚化区域与第一异源二聚化区域相互作用,且其中第一和第二含铰链的多肽通过至少一个链间二硫键连接,所述方法包括以下步骤:

[0028] (a) 提供纯化的具有第一异源二聚化区域的第一含铰链的多肽;

[0029] (b) 提供纯化的具有第二异源二聚化区域的第二含铰链的多肽;

[0030] (c) 将第一和第二含铰链的多肽组合;

[0031] (d) 使第一含铰链的多肽与第二含铰链的多肽重折叠;和

[0032] (e) 回收异源多聚体蛋白质复合物。

[0033] 在第三方面,本文中提供的方法涉及制备异源多聚体蛋白质的方法,所述方法包括:孵育第一对免疫球蛋白重链和轻链多肽和第二对免疫球蛋白重链和轻链多肽,其中孵育条件允许该第一对和第二对多肽多聚化以形成基本同质的抗体群体,其中该条件不包括添加还原剂;其中第一对多肽能够结合第一靶标;其中第二对多肽能够结合第二靶标分子;其中第一重链多肽的 Fc 多肽与第二重链多肽的 Fc 多肽在交界面上相遇,第二 Fc 多肽的界面包含突起,所述突起可置入第一 Fc 多肽界面的腔洞中。

[0034] 在第四方面,本发明提供了产生异源多聚体蛋白质的组合文库的方法,所述异源多聚体蛋白质包含具有第一异源二聚化区域的第一含铰链的多肽、和具有第二异源二聚化区域的第二含铰链的多肽,其中第二异源二聚化区域与第一异源二聚化区域相互作用,且其中第一和第二含铰链的多肽通过至少一个链间二硫键连接,所述方法包括以下步骤:

[0035] (a) 培养第一宿主细胞和至少两种另外的宿主细胞,其中

[0036] a. 所述第一宿主细胞包含第一核酸,所述第一核酸编码包含第一异源二聚化区域的多肽;和

[0037] b. 所述另外的宿主细胞包含核酸,所述核酸编码包含第二异源二聚化区域的多肽,

[0038] (b) 将第一宿主细胞和该至少两种另外的宿主细胞混合;

[0039] (c) 处理细胞,以使包含第一和第二异源二聚化区域的多肽释放到胞外环境中;

和

[0040] (d) 回收异源多聚体蛋白质,

[0041] 其中所述方法不需要添加还原剂。

[0042] 在第五方面,本发明提供了通过本文中描述的方法产生的异源多聚体蛋白质。

[0043] 应理解的是,本发明的方法可以包括对起始和 / 或完成本文所描述的本发明方法所包括的步骤而言显而易见的其它步骤,这些步骤通常是常规步骤。例如,在一个实施方案中,于本发明方法的步骤 (a) 之前加上一个步骤,在该步骤中,将编码第一含铰链的多肽的核酸引入到第一宿主细胞中,和将编码第二含铰链的多肽的核酸引入到第二宿主细胞中。在一个实施方案中,本发明的方法另外还包括纯化异源多聚体蛋白质的步骤,所述异源多聚体蛋白质具有与至少两个不同靶标的结合特异性。在一个实施方案中,在纯化异源多聚体蛋白质步骤之前,不超过约 10%、15% 或 20% 的分离的多肽以单体或重链 - 轻链二聚体的形式存在。

[0044] 在一个实施方案中,第一和 / 或第二含铰链的多肽是抗体重链。在另一个实施方案中,抗体重链与抗体轻链配对形成重链 - 轻链对。在一些实施方案中,重链 - 轻链对是共价连接的。在另一个实施方案中,重链 - 轻链对规定靶标结合臂。在一些实施方案中,靶标结合臂是相同的。在一些实施方案中,靶标结合臂各自识别两个不同的靶标。

[0045] 在一些实施方案中,第一和 / 或第二含铰链的多肽包含 Fc 区。在另一个实施方案中,第一和 / 或第二含铰链的多肽包含至少一个重链恒定区。在另一个实施方案中,第一和 / 或第二含铰链的多肽包含重链可变区。在另一个实施方案中,第一和 / 或第二含铰链的多肽包含受体结合结构域。在另一个实施方案中,第一和 / 或第二含铰链的多肽是基本相同的 (即,异源二聚化区域可以是不同的,而异源二聚化区域以外的区域是相同的)。在一些实施方案中,第一和 / 或第二含铰链的多肽是不同的。

[0046] 在一些实施方案中,异源多聚体蛋白质选自抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、单臂抗体、单特异性单价抗体、多特异性单价抗体、双特异性 maxibody、monobody、免疫粘附素、肽体 (peptibody)、双特异性肽体、单价肽体、亲和体 (affibody) 和受体融合蛋白。

[0047] 在一些实施方案中,所述异源多聚体蛋白质包含铰链区,所述铰链区 具有通常能够形成重链间二硫键的半胱氨酸残基,该半胱氨酸残基为至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、或任何整数个 (多达所有)。在一些实施方案中,铰链区中已经引入了额外的半胱氨酸。

[0048] 本发明的异源多聚体蛋白质也可以是抗体片段,例如 Fc 或 Fc 融合多肽,只要其包含免疫球蛋白的铰链区即可。Fc 融合多肽通常包含与异源多肽序列 (例如抗原结合结构域) 融合的 Fc 多肽 (或其片段),例如受体胞外结构域 (ECD) 与免疫球蛋白 Fc 多肽融合 (例如,Flt 受体 ECD 与 IgG2Fc 融合)。例如,在一个实施方案中,Fc 融合多肽包含 VEGF 结合结构域,所述 VEGF 结合结构域可以是 VEGF 受体,包括 flt、flk 等。本发明的异源多聚体蛋白质通常包含重链恒定区和轻链恒定区。在一个实施方案中,本发明的异源多聚体蛋白质包含用于形成重链间二聚体化或多聚体化的修饰 (例如但不限于,插入一个或多个氨基酸,以例如形成二聚体化序列例如亮氨酸拉链等)。在一些实施方案中,本发明的异源多聚体可以缺失 Fc 多肽的部分 (但不是全部),条件是其保留免疫球蛋白的铰链区。在一些这样的实施方案中,Fc 多肽的缺失序列是 C_H2 和 / 或 C_H3 结构域的部分或全部。在这样的实

施方案的一些中,异源多聚体蛋白质包含,例如与重链片段的 C 末端融合的,二聚体化结构域(例如亮氨酸拉链序列)。在这些实施方案的一些中,异源多聚体蛋白质包含二聚体化结构域,所述二聚体化结构域包含突变以提供“knob into hole”二聚体化结构域(下文中进一步定义)。

[0049] 在本发明的方法和异源多聚体蛋白质的一些实施方案中,含铰链的多肽具有至少一个这样的特征,所述特征促进第一和第二含铰链的多肽的异源多聚体化而最大程度降低同源二聚体化(例如,在重链的 Fc 多肽之间)。这样的特征提高通过本文中描述的本发明方法可以得到的异源多聚体蛋白质群体的产量和/或纯度和/或同质性。在一个实施方案中,第一含铰链的多肽和第二含铰链的多肽的 Fc 多肽在界面处相遇/相互作用。在一些实施方案中,其中第一和第二含铰链的多肽的 Fc 多肽在界面上相遇,第二 Fc 多肽的界面包含突起,所述突起可置入第一 Fc 多肽界面的腔洞中。在一个实施方案中,第一 Fc 多肽相对于模板/原始多肽已经被改变以编码腔洞,或第二 Fc 多肽相对于模板/原始多肽已经被改变以编码突起,或者两者均发生。在一个实施方案中,第一 Fc 多肽相对于模板/原始多肽已经被改变以编码腔洞,且第二 Fc 多肽相对于模板/原始多肽已经被改变以编码突起,或者两者均发生。在一个实施方案中,第二 Fc 多肽的界面包含突起,所述突起可置入第一 Fc 多肽界面的腔洞中,其中该腔洞或突起或两者是分别已经引入到第一和第二 Fc 多肽的界面中的。在一些实施方案中,其中第一和第二 Fc 多肽在界面上相遇,第一 Fc 多肽的界面包含突起,所述突起可置入第二 Fc 多肽界面的腔洞中。在一个实施方案中,第二 Fc 多肽相对于模板/原始多肽已经被改变以编码腔洞,或第一 Fc 多肽相对于模板/原始多肽已经被改变以编码突起,或两者均发生。在一个实施方案中,第二 Fc 多肽相对于模板/原始多肽已经被改变以编码腔洞,且第一 Fc 多肽相对于模板/原始多肽已经被改变以编码突起,或两者均发生。在一个实施方案中,第一 Fc 多肽的界面包含突起,所述突起可置入第二 Fc 多肽界面的腔洞中,其中该突起或腔洞或两者是分别已经引入到第一和第二 Fc 多肽的界面中的。

[0050] 在一个实施方案中,突起和腔洞都包含天然存在的氨基酸残基。在一个实施方案中,通过将模板/原始多肽界面的原始残基替代为比原始残基具有大的侧链体积的输入残基,产生包含突起的 Fc 多肽。在一个实施方案中,通过包括以下步骤的方法来产生包含突起的 Fc 多肽,在所述步骤中,所述多肽界面的原始残基的编码核酸,用具有比原始残基大的侧链体积的输入残基的编码核酸替代。在一个实施方案中,原始残基是苏氨酸。在一个实施方案中,输入残基是精氨酸(R)。在一个实施方案中,输入残基是苯丙氨酸(F)。在一个实施方案中,输入残基是酪氨酸(Y)。在一个实施方案中,输入残基是色氨酸(W)。在一个实施方案中,输入残基是 R、F、Y 或 W。在一个实施方案中,通过置换模板/原始多肽中的两个或更多个残基来产生突起。在一个实施方案中,包含突起的 Fc 多肽包含:以色氨酸对位置 366 的苏氨酸的取代,氨基酸编号根据 Kabat 等(Sequences of proteins of immunological interest, 第 5 版,卷 1(1991;NIH, Bethesda, MD) 中第 688-696 页)的 EU 编号方案进行。

[0051] 在一些实施方案中,通过以比原始残基具有小的侧链体积的输入残基置换模板/原始多肽界面中的原始残基,产生包含腔洞的 Fc 多肽。例如,可以通过包括这样的步骤的方法来产生包含腔洞的 Fc 多肽,在所述步骤中,以比原始残基具有小的侧链体积的输入残基的编码核酸,置换所述多肽界面的原始残基的编码核酸。在一个实施方案中,原始残基是苏氨酸。在一个实施方案中,原始残基是亮氨酸。在一个实施方案中,原始残基是酪氨酸。

酸。在一个实施方案中,输入残基不是半胱氨酸(C)。在一个实施方案中,输入残基是丙氨酸(A)。在一个实施方案中,输入残基是丝氨酸(S)。在一个实施方案中,输入残基是苏氨酸(T)。在一个实施方案中,输入残基是缬氨酸(V)。可以通过置换模板/原始多肽的一个或多个原始残基来产生腔洞。例如,在一个实施方案中,包含腔洞的Fc多肽包含对两个或更多个原始氨基酸的置换,所述原始氨基酸选自苏氨酸、亮氨酸和酪氨酸。在一个实施方案中,包含腔洞的Fc多肽包含两个或更多个输入残基,所述输入残基选自丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和缬氨酸。在一些实施方案中,包含腔洞的Fc多肽包含对两个或更多个原始氨基酸的置换,所述原始氨基酸选自苏氨酸、亮氨酸和酪氨酸,且其中以选自丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和缬氨酸的输入残基置换所述原始氨基酸。在一个实施方案中,包含腔洞的Fc多肽包含以丝氨酸对366位的苏氨酸的置换,氨基酸编号根据Kabat等(同上引文)的EU编号方案进行。在一个实施方案中,包含腔洞的Fc多肽包含以丙氨酸对第368位的亮氨酸的置换,氨基酸编号根据Kabat等(同上)的EU编号方案进行。在一个实施方案中,包含腔洞的Fc多肽包含以缬氨酸对第407位的酪氨酸的置换,氨基酸编号根据Kabat等(同上)的EU编号方案进行。在一个实施方案中,包含腔洞的Fc多肽包含两个或多个氨基酸置换,所述置换选自T366S、L368A和Y407V,氨基酸编号根据Kabat等(同上)的EU编号方案进行。在这些抗体片段的一些实施方案中,包含突起的Fc多肽包含以色氨酸对第366位的苏氨酸的置换,氨基酸编号根据Kabat等(同上)的EU编号方案进行。

[0052] 在多个实施方案中,第一和第二重链多肽的Fc多肽可以相同或可以不同,条件是它们能够二聚体化形成Fc区域(如本文中定义的)。第一Fc多肽通常在单个多肽中与免疫球蛋白重链的一个或多个结构域毗邻连接,例如与铰链区、恒定区和/或可变区序列连接。在一个实施方案中,第一Fc多肽包含铰链序列的至少一部分(包括全部)、C_H2结构域的至少一部分(包括全部)和/或C_H3结构域的至少一部分(包括全部)。在一个实施方案中,第一Fc多肽包含免疫球蛋白的铰链序列以及C_H2和C_H3结构域。在一个实施方案中,第二Fc多肽包含铰链序列的至少一部分(包括全部)、C_H2结构域的至少一部分(包括全部)和/或C_H3结构域的至少一部分(包括全部)。在一个实施方案中,第二Fc多肽包含免疫球蛋白的铰链序列以及C_H2和C_H3结构域。在一个实施方案中,本发明的抗体包含第一和第二Fc多肽,其各自包含至少一个抗体恒定区的至少一部分。在一个实施方案中,该抗体恒定区是C_H2和/或C_H3结构域。在包含恒定区的本发明抗体的任何实施方案中,抗体恒定区可以来自任何类型的免疫球蛋白,例如IgG。该免疫球蛋白来源可以为任何合适的物种来源(例如,IgG可以是人IgG₁)或可以是合成的。

[0053] 在一个实施方案中,分别在本发明抗体的第一和第二靶标分子结合臂中的第一轻链多肽和第二轻链多肽包含不同/截然不同的抗原结合决定簇(例如,不同/截然不同的可变区序列)。在一个实施方案中,分别位于本发明抗体的第一和第二靶标分子结合臂中的第一轻链多肽和第二轻链多肽包含相同的(即,共同的)抗原结合决定簇(例如,相同的可变区序列)。

[0054] 本发明的方法能够产生高同质性的异源多聚体分子。据此,本发明提供了这样的方法,其中至少约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的多肽是包含第一重链和轻链多肽对和第二重链和轻链多肽对的复合物。在一个实施方案中,本发明提供了这样的方法,其中约60至99%、70至98%、75至97%、80至96%、85至

96%、或 90 至 95% 的多肽是包含第一重链和轻链多肽对和第二重链和轻链多肽对的复合物。

[0055] 在一个实施方案中,本发明的抗体选自 IgG、IgE、IgA、IgM 和 IgD。在一些实施方案中,本发明抗体的铰链区优选是选自 IgG、IgA 和 IgD 的免疫球蛋白的。例如,在一些实施方案中,抗体或抗体的铰链区是 IgG 的,在一些实施方案中是 IgG1 或 IgG2 (例如 IgG2a 或 IgG2b)。在一些实施方案中,本发明的抗体选自 IgG、IgA 和 IgD。在一个实施方案中,抗体是人、人源化的、嵌合的或非人(例如鼠)来源的。

[0056] 本发明的异源多聚体蛋白质通常能够与抗原结合,优选特异性结合。这样的抗原包括例如肿瘤抗原、细胞存活调节因子、细胞增殖调节因子、与组织发育或分化相关(例如,已知或推测在功能上起作用)的分子、细胞表面分子、淋巴因子、细胞因子、涉及细胞周期调控的分子、涉及脉管发生的因子和与血管发生相关(例如,已知或推测在功能上起作用)的分子。能够与本发明的异源多聚体蛋白质结合的抗原可以是上述类别之一的子类的成员,其中所述类别的其它子类包括具有不同特征(相对于目的抗原而言)的其它分子/抗原。目的抗原也可以被认为属于两个或更多个类别。在一个实施方案中,本发明提供了结合,优选特异性结合,肿瘤抗原的异源多聚体蛋白质,所述肿瘤抗原不是细胞表面分子。在一个实施方案中,肿瘤抗原是细胞表面分子,例如受体多肽。在另一个实例中,在一些实施方案中,本发明的异源多聚体蛋白质结合,优选特异性结合,肿瘤抗原,所述肿瘤抗原不是分化群因子。在另一个实例中,本发明的异源多聚体蛋白质能够结合,优选特异性结合,分化群因子,所述分化群因子在一些实施方案中不是例如 CD3 或 CD4。在一些实施方案中,本发明的异源多聚体蛋白质是抗 VEGF 抗体。在一些实施方案中,本发明的异源多聚体蛋白质是双特异性抗体,选自 IL-1 α /IL-1 β 、IL-12/IL-18;IL-13/IL-9;IL-13/IL-4;IL-13/IL-5;IL-5/IL-4;IL-13/IL-1 β ;IL-13/IL-25;IL-13/TARC;IL-13/MDC;IL-13/MEF;IL-13/TGF- β ;IL-13/LHR 激动剂;IL-12/TWEAK、IL-13/CL25;IL-13/SPRR2a;IL-13/SPRR2b;IL-13/ADAM8、IL-13/PED2、IL17A/IL17F、CD3/CD19、CD138/CD20;CD138/CD40;CD19/CD20;CD20/CD3;CD38/CD138;CD38/CD20;CD38/CD40;CD40/CD20;CD-8/IL-6;CD20/BR3、TNF α /TGF- β 、TNF α /IL-1 β ;TNF α /IL-2、TNF α /IL-3、TNF α /IL-4、TNF α /IL-5、TNF α /IL6、TNF α /IL8、TNF α /IL-9、TNF α /IL-10、TNF α /IL-11、TNF α /IL-12、TNF α /IL-13、TNF α /IL-14、TNF α /IL-15、TNF α /IL-16、TNF α /IL-17、TNF α /IL-18、TNF α /IL-19、TNF α /IL-20、TNF α /IL-23、TNF α /IFN α 、TNF α /CD4、TNF α /VEGF、TNF α /MIF、TNF α /ICAM-1、TNF α /PGE4、TNF α /PEG2、TNF α /RANK 配体、TNF α /Te38;TNF α /BAFF;TNF α /CD22;TNF α /CTLA-4;TNF α /GP130;TNF α /IL-12p40;VEGF/HER2、VEGF-A/HER2、VEGF-A/PDGF、HER1/HER2、VEGF-A/VEGF-C、VEGF-C/VEGF-D、HER2/DR5、VEGF/IL-8、VEGF/MET、VEGFR/MET 受体、VEGFR/EGFR、HER2/CD 64、HER2/CD3、HER2/CD16、HER2/HER3;EGFR/HER2、EGFR/HER3、EGFR/HER4、IL-13/CD40L、IL4/CD40L、TNFR1/IL-1R、TNFR1/IL-6R、TNFR1/IL-18R、EpCAM/CD3、MAPG/CD28、EGFR/CD64、CSPGs/RGM A;CTLA-4/BTN02;IGF1/IGF2;IGF1/2/Erb2B;MAG/RGM A;NgR/RGM A;NogoA/RGMA;OMGp/RGM A;PDL-I/CTLA-4;和 RGM A/RGM B、IL1 β /IL18、NRP1/VEGFA、VEGFA/NRP2、cMET/EGFR、ALK1/BMP9、VEGFA/ α 5 β 1、HER1/HER3-BU 和 CMV。在一些实施方案中,本发明的异源多聚体蛋白质与至少两个靶标分子结合,所述靶标分子选自: α 5 β 1、ALK1、BMP9、IL-1 α 、IL-1 β 、TARC、MDC、MEF、TGF- β 、LHR 激动剂、TWEAK、CL25、SPRR2a、SPRR2b、ADAM8、PED2、CD3、CD4、CD16、CD19、CD20、CD22、CD28、

CD40、CD38、CD64、CD138、CD-8、BR3、TNF α 、TGF- β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-17A、IL-17F、IL-18、IL-19、IL-20、IL-23、IL-25、IFN α 、MIF、ICAM-1、PGE4、PEG2、RANK 配体、Te38、BAFF、CTLA-4、GP130、IL-12p40、VEGF、VEGF-A、PDGF、HER1、HER2、HER3、HER3-BU、HER4、VEGF-C、VEGF-D、DR5、cMET、MET、MET 受体、VEGFR、EGFR、CD40L、TNFR1、IL-1R、IL-6R、IL-18R、EpCAM、MAPG、CSPGs、BTN02、IGF1、IGF2、IGF1/2、Erb2B、MAG、NgR、NogoA、NRP1、NRP2、OMGp、PDL-I、RGM A 和 RGM B。在一些实施方案中，本发明的异源多聚体蛋白质与 CD3 和至少一个另外的靶标分子结合，所述另外的靶标分子选自 BLR1、BR3、CD19、CD20、CD22、CD72、CD79A、CD79B、CD180 (RP105)、CR2、FcRH1、FcRH2、FcRH5、FCER2、FCRL4、HLA-DOB 和 NAG14。

[0057] 可以在任何允许目的多肽表达和分离的环境下培养本发明方法的第一和第二宿主细胞。例如，在一个实施方案中，本发明方法的第一宿主细胞和第二宿主细胞作为分开的细胞培养物来生长。在另一个实施方案中，本发明方法的第一宿主细胞和第二宿主细胞作为包含这两种宿主细胞的混合培养物来生长。

[0058] 在一些实施方案中，至少 1 种、至少 2 种、至少 3 种或更多种表达另外的含铰链多肽的宿主细胞可以与第一和 / 或第二含铰链的宿主细胞，在相同的或分开的培养物中生长。在一些实施方案中，另外的含铰链多肽包含与第一含铰链多肽相同的异源二聚化区域。在一些实施方案中，另外的含铰链多肽包含与第二含铰链多肽相同的异源二聚化区域。

[0059] 可以对异源多聚体蛋白质进行修饰以增强和 / 或添加另外所需特性。这样的特性包括生物学功能，例如免疫效应子功能、期望的体内半衰期 / 清除率、生物利用度、生物分布或其它药代动力学特性。这样的修饰在本领域公知，也可以凭经验来确定，其可以包括：通过可以基于肽或不基于肽的结构部分进行的修饰。例如，抗体可以是糖基化或非糖基化的，这通常至少部分取决于宿主细胞的性质。优选，本发明的抗体是非糖基化的。通过本发明方法产生的非糖基化抗体随后可以例如使用本领域公知的体外糖基化方法进行糖基化。如上文所述，可以在原核细胞例如大肠杆菌中生产本发明的异源多聚体蛋白质。大肠杆菌产生的异源多聚体蛋白质通常是非糖基化的，缺乏与哺乳动物宿主细胞（例如 CHO）产生的异源多聚体蛋白质中的糖基化谱通常相关的生物学功能。

[0060] 本发明还提供了免疫缀合物，所述免疫缀合物包含与异源部分缀合的本发明的异源多聚体蛋白质。任何异源部分，只要其与抗体的缀合不显著降低抗体的所需功能和 / 或特性，都将是适宜的。例如，在一些实施方案中，免疫缀合物包含细胞毒性剂作为异源部分。在一些实施方案中，所述细胞毒性剂选自放射性同位素、化学治疗剂和毒素。在一些实施方案中，所述毒素选自加利车霉素 (calicheamicin)、美登素 (maytansine) 和单端孢素 (trichothene)。在一些实施方案中，免疫缀合物包含的异源部分是可检测标记。在一些实施方案中，所述可检测标记选自放射性同位素、配体 - 受体对的成员、酶 - 底物对的成员和荧光共振能量转移对的成员。

[0061] 在一个方面，本发明提供了组合物，所述组合物包含本发明的异源多聚体蛋白质和载体，所述载体在一些实施方案中是药学上可接受的。

[0062] 在另一个方面，本发明提供了组合物，所述组合物包含本文中描述的免疫缀合物和载体，所述载体在一些实施方案中是药学上可接受的。

[0063] 在一个方面，本发明提供了组合物，所述组合物包含本发明的多特异性异源多聚

体蛋白质群体。对本领域技术人员显而易见的是,通常,这样的组合物不会是完全(即100%)同质的。然而,如本文中所描述的,本发明的方法能够生产基本同质的多特异性异源多聚体蛋白质群。例如,本发明提供了组合物,所述组合物包含异源多聚体蛋白质,其中所述异源多聚体蛋白质的至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%是本文中描述的本发明的多特异性抗体(例如双特异性抗体等)。

[0064] 在一个方面,本发明提供了细胞培养物,所述细胞培养物包含第一宿主细胞和第二宿主细胞的混合物,其中第一宿主细胞包含第一含铰链多肽的编码核酸,第二宿主细胞包含第二含铰链多肽的编码核酸,其中这两对多肽具有不同的靶标结合特异性。在一个方面,本发明提供了细胞培养物,所述细胞培养物包含第一宿主细胞和第二宿主细胞的混合物,其中第一宿主细胞表达第一对重链和轻链多肽,第二宿主细胞表达第二对重链和轻链多肽,其中这两对多肽具有不同的靶标结合特异性。

[0065] 在另一个方面,本发明提供了制品,所述制品包括容器和其中包含的组合物,其中组合物包含本发明的异源多聚体蛋白质(例如抗体)。在另一个方面,本发明提供了制品,所述制品包括容器和其中包含的组合物,其中组合物包含本文中描述的免疫缀合物。在一些实施方案中,这些制品还包括使用所述组合物的说明书。

[0066] 在另一个方面,本发明提供了多核苷酸,所述多核苷酸编码本发明的异源多聚体蛋白质。在另一个方面,本发明提供了多核苷酸,所述多核苷酸编码本文中描述的免疫缀合物。

[0067] 在一个方面,本发明提供了用于表达本发明分子(例如抗体)的重组载体。在另一个方面,本发明提供了用于表达本发明的免疫缀合物的重组载体。

[0068] 多种宿主细胞都可以用于本发明方法中。这样的宿主细胞在本领域已知(本文中描述了其中的一些),或可以经验性地使用本领域已知的常规技术就其用于本发明方法的适宜性进行确定。在一个实施方案中,宿主细胞是原核的。在一些实施方案中,宿主细胞是革兰氏阴性细菌细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是大肠杆菌(*E. coli*)。在一些实施方案中,大肠杆菌是脂蛋白缺陷型(Δlpp)菌株。在一些实施方案中,大肠杆菌宿主细胞的基因型缺乏 *degP* 和 *prc* 基因,携带突变 *spr* 基因。在一个实施方案中,宿主细胞是哺乳动物,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0069] 在一个方面,本发明提供了包含本发明多核苷酸或重组载体的宿主细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是原核细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是革兰氏阴性细菌细胞,其在一些实施方案中是大肠杆菌。本发明的宿主细胞可以还包含编码这样的分子的多核苷酸或重组载体,所述分子在宿主细胞中的表达增强本发明方法中异源多聚体蛋白质的产量。例如,这样的分子可以是伴侣蛋白。在一个实施方案中,所述分子是原核多肽,其选自 DsbA、DsbC、DsbG 和 FkpA。在一些实施方案中,所述多核苷酸或重组载体编码 DsbA 和 DsbC 两者。在一些实施方案中,大肠杆菌宿主细胞是内源蛋白酶活性缺陷型菌株。在一些实施方案中,大肠杆菌宿主细胞的基因型是缺乏 *degP* 和 *prc* 基因并携带突变的 *spr* 基因的大肠杆菌菌株的基因型。在一些实施方案中,大肠杆菌宿主细胞的基因型是 Δlpp 。

[0070] 本发明的异源多聚体蛋白质具有用于多种情况中的多种用途。在一个实例中,本发明的异源多聚体蛋白质是治疗性抗体。在另一个实例中,本发明的异源多聚体蛋白质是

激动剂抗体。在另一个实例中,本发明的异源多聚体蛋白质是拮抗剂抗体。本发明的异源多聚体蛋白质也可以是诊断性抗体。在另一个实例中,本发明的异源多聚体蛋白质是封闭抗体。在另一个实例中,本发明的异源多聚体蛋白质是中和抗体。

[0071] 在一个方面,本发明提供了治疗或延缓受试者疾病的方法,所述方法包括给所述受试者施用本发明的异源多聚体蛋白质。在一个实施方案中,所述疾病是癌症。在另一个实施方案中,所述疾病与血管发生的失调相关。在另一个实施方案中,所述疾病是免疫失调,例如类风湿性关节炎、免疫性血小板减少性紫癜、系统性红斑狼疮等。

[0072] 在一个方面,本发明提供了本发明的异源多聚体蛋白质(例如,抗体)在制备药物中的应用,所述药物用于疾病的治疗和/或预防,所述疾病例如癌症、肿瘤、细胞增殖失调、免疫(例如自身免疫)失调和/或血管发生相关失调。

[0073] 在一个方面,本发明提供了本发明的核酸在制备药物中的应用,所述药物用于疾病的治疗和/或预防,所述疾病例如癌症、肿瘤、细胞增殖失调、免疫(例如自身免疫)失调和/或血管发生相关失调。

[0074] 在一个方面,本发明提供了本发明的表达载体在制备药物中的应用,所述药物用于疾病的治疗和/或预防,所述疾病例如癌症、肿瘤、细胞增殖失调、免疫(例如自身免疫)失调和/或血管发生相关失调。

[0075] 在一个方面,本发明提供了本发明的宿主细胞在制备药物中的应用,所述药物用于疾病的治疗和/或预防,所述疾病例如癌症、肿瘤、细胞增殖失调、免疫(例如自身免疫)失调和/或血管发生相关失调。

[0076] 在一个方面,本发明提供了本发明的制品在制备药物中的应用,所述药物用于疾病的治疗和/或预防,所述疾病例如癌症、肿瘤、细胞增殖失调、免疫(例如自身免疫)失调和/或血管发生相关失调。

[0077] 在一个方面,本发明提供了本发明的套盒在制备药物中的应用,所述药物用于疾病的治疗和/或预防,所述疾病例如癌症、肿瘤、细胞增殖失调、免疫(例如自身免疫)失调和/或血管发生相关失调。

[0078] 通过以下详细描述,本发明的其它目的、特征和优势将变得显而易见。然而,应理解的是,该详细描述和具体实例,尽管指出本发明的优选实施方案),但仅作为举例说明性目的而提供,本领域技术人员从该详细描述将明了落入本发明的范围和精神内的各种改变和变化。

[0079] 附图简述

[0080] 图 1A 图示完全氧化的半抗体。没有显示“鼓突”(knob)或“洞”(hole)或其它异源二聚化区域。该图中描述的半抗体是 IgG1 同种型。本领域技术人员将明了,可以将其它免疫球蛋白同种型看成具有相应的链间和链内键的半抗体。在完整的 Ab 中,铰链半胱氨酸将形成链间二硫键。

[0081] 图 1B 图示全长双特异性抗体。没有描绘铰链区中重链间二硫键。

[0082] 图 2A 和 B 分别图示编码鼓突和洞半抗体的质粒。

[0083] 图 3A 图示使用共同轻链方法生产异源多聚体蛋白质,例如双特异性抗体。所生产的 BsAb 具有两条不同的重链,每条重链分别与共同轻链配对。

[0084] 图 3B 图示使用分开构建和表达的半抗体生产异源多聚体蛋白质,例如双特异性

抗体。所生产的 BsAb 典型地具有两条不同的重链,每条重链各自与其关联 (cognate) 轻链配对。在该方法中,各半抗体的各轻链不必相同。

[0085] 图 4A 是使用分开构建和表达的半抗体生产双特异性抗体的流程图。在该方法中,使用了氧化还原化学。

[0086] 图 4B 显示了考马斯染色的凝胶。通过 SDS-PAGE 在还原和非还原条件下分析两个半抗体。在非还原条件下,主要级分是每个半抗体的 75kD 轻链 - 重链对。在还原条件下 (例如,以 DTT 处理),每条链作为分开的条带可见。

[0087] 图 4C 显示,在用和不用 1mM N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 处理时,半抗体的 ESI-TOF 质谱结果。在用 NEM 处理后,没有观察到半抗体质量的改变,表明所有的半胱氨酸被完全氧化。在所描述的氨基酸序列中,将氧化的铰链半胱氨酸表示为环状二硫键。半抗体的预期质量是 72,548 道尔顿,这也是通过质谱观察到的,表示没有共价加合物。

[0088] 图 4D 显示抗 EGFR/抗 c-met 双特异性抗体产生的羧甲基 (CM) 色谱、SDS-PAGE 凝胶照片和去褶皱后的质量。CM 色谱产生单个峰,随后以 SDS-PAGE 对该峰进行分析。凝胶上的主要条带是全长 (即,完整的) 双特异性抗体。在 75kD 处也可以看见弱带。随后以质谱对主要条带进行分析,表明该唯一的可检测完整抗体产物与抗 EGFR/抗 c-met 双特异性抗体的理论 MW 一致。

[0089] 图 5A 是使用分开构建和表达的半抗体大规模生产双特异性抗体的流程图。

[0090] 图 5B 是凝胶照片,其显示纯化的半抗体在非还原条件下主要是约 75kD 物质。在还原条件下 (即,以 DTT 处理),每条链作为分开的条带可见。

[0091] 图 5C 显示在去除聚集物后纯化的双特异性抗体的 SDS-PAGE 分析结果,表明主要物是在 150kD 的完整双特异性抗体。也显示了在还原条件下的相同样品,其表明,所有分离的产物是抗体轻链或重链。

[0092] 图 6A 图示在 TF-2 细胞增殖试验中抗体的生物学活性,所述试验检查对细胞因子 IL-4 和 IL-13 的中和作用。该图显示,双特异性抗体具有与一起或分开添加的两个由哺乳动物生产的全长抗体相同的活性。

[0093] 图 6B 是一组 3 个图,其显示,对于野生型 Fc 和突变 Fc,通过 ELISA 测定的食蟹猴 (cynomolgous monkey) 中抗 IL-4/抗 IL-13 双特异性抗体的药代动力学 (PK) 性质。第一图显示,对于野生型 Fc,在 2mg/kg 剂量的 PK 特性。中间的图显示在 20mg/kg 剂量的 PK 特性,也针对野生型 Fc。最后一个图显示,对于突变 Fc,在 20mg/kg 剂量的 PK 特性。在测试的动物中,双特异性抗体表现出预期的双室清除。封闭的符号表示雌性,开放的符号表示雄性。在三个动物中,观察到了抗治疗剂反应,表现为在第 21 天血清中测量到的抗体的急剧降低。

[0094] 图 7 是聚丙烯酰胺凝胶照片。在裂解前,以变化的比率混合全发酵肉汤。在裂解后,提取蛋白质,并在非还原条件下上样到凝胶上。在该过程中形成的纯化的双特异性抗体作为在凝胶顶部的条带可见。

[0095] 图 8A 是两块聚丙烯酰胺凝胶的照片,其比较了在将表达半抗体的细胞分开培养和共培养时双特异性抗体的产生。在共培养条件下,完整的双特异性抗体的形成水平要高得多。当将半抗体分别表达和纯化后再混合时,半抗体形成低于 5% 的完整双特异性抗体。在共培养条件下,使用 Li-Core 蛋白质测定法,按照 150kD/(150kD+75kD) 进行测定,高于

40% 的是完整的双特异性抗体。

[0096] 图 8B 是改变起始接种的细胞群体的共培养实验示意图。在图的底部显示了所使用的比率和全长双特异性抗体的相对量。

[0097] 图 8C 是针对 1:1 细胞比率的抗 EGFR 和抗 c-Met 的 3 个分开的 10 升发酵反应的凝胶图。每个反应均产生全长双特异性抗体作为主产物,表明该过程的可重复性。

[0098] 图 8D 是用于生产异源多聚体蛋白质例如双特异性抗体的共培养方法的流程图。

[0099] 图 8E 是 280nm 处 UV 吸收色谱,其鉴定出了在滞留时间 91.79 和 102.35 处的两个显著的峰。随后的质谱分析表明,完整的双特异性抗体与过量的半抗体有效地分开。

[0100] 图 8F 显示通过 SDS-PAGE 和质谱对来自图 8E 的峰 91.79 进行的分析。质谱数据的去褶皱产生在 146,051.89 道尔顿处的单个峰,这与双特异性抗体的预期质量一致。没有检测到污染的同二聚体种类。

[0101] 图 8G 比较用于异源多聚体蛋白质的独立生产和共培养生产的工作流程。

[0102] 图 9A 显示 3 个色谱图。顶部的色谱图显示在不含 EDTA 的样品洗脱期间无吸收峰。中间的色谱图显示含 EDTA 的样品具有明显的洗脱峰,从该峰中回收了约 1.5mg 蛋白质。底部的色谱图显示以 EDTA 和 Mg 处理的样品也表现出类似的洗脱峰,从该峰中回收了 1.1mg 蛋白质。在还原和非还原条件下,以 SDS-PAGE,分析了从 EDTA 样品、EDTA 加 Mg 样品回收的蛋白质、以及来自未 EDTA 处理的样品的相同滞留时间的级分的合并物。

[0103] 图 9B 是图 9A 中所描述的 SDS-PAGE 凝胶的照片。以 EDTA 处理的样品产生了完整的双特异性抗体,所述抗体已经被释放到了培养基中。

[0104] 图 9C-1、图 9C-2 和图 9C-3 显示图 9A 中回收和描述的样品的质谱图。含 EDTA 的样品显示出了双特异性抗体的预期质量和过量的半抗体的质量。

[0105] 图 9D 是所指条带的 SDS-PAGE 凝胶图和质谱图。第 1 泳道是 MW 标记,第 2 泳道是独立表达的抗 IL-13,第 3 泳道是独立表达的抗 IL-4,第 4 泳道是两种细胞的共培养。所有三个样品的质谱分析显示,共培养产生完整的双特异性抗体和过量的一种半抗体,抗 IL-4。这表明抗 IL-13 半抗体是化学计量限制性的。当将半抗体分别表达和纯化后再混合,半抗体形成约 2% (抗 IL-13) 和 3% (抗 IL-4) 的完整双特异性抗体。在共培养条件下,使用 Li-Core 蛋白质测定法,以 150kD/(150kD+75kD) 测定,约 60% 为完整的双特异性抗体。

[0106] 图 9E-1 和图 9E-2 显示在起始发酵接种物中具有所示不同细胞比率的两个共培养物的两个 HIC 色谱。观察到了产物的明显不同,这反映了起始接种物的比率。使用该方法,显而易见的是,可以通过改变起始接种物的比率来实现异源多聚体蛋白质的最优生产。

[0107] 图 9F 是一组 4 个图片,其显示在还原和非还原条件下,对通过本文中描述的共培养方法生产的 8 个不同的双特异性抗体,进行的 SDS-PAGE 分析。没有显示抗 CD3/ 抗 CD19 异源多聚体蛋白质在非还原条件下的凝胶。箭头指示完整的双特异性抗体。

[0108] 图 10 是筛选异源多聚体蛋白质的矩阵方法的示意图。

[0109] 图 11 的两个图显示使用本文中描述的方法生产的双特异性抗体的体外活性。

[0110] 图 12 图示抗 EGFR/ 抗 c-met 双特异性抗体在 KP4 胰腺异种移植物体内模型中拥有抗肿瘤活性。

[0111] 图 13 图示抗 EGFR/ 抗 c-met 双特异性抗体在 A431 鳞状细胞癌异种移植物体内模型中拥有抗肿瘤活性。

[0112] 图 14 显示 A) 组装前鼓突、B) 组装前洞、C) 组装后双特异性抗体的 HIC。图 14D 是组装前的每个臂的凝胶。

[0113] 图 15 显示组装后物质的电泳图,表明 86% 的物质是完全氧化的。

[0114] 图 16 :对组装的双特异性抗体的表征。A) 退火的 (annealed) 双特异性抗体的 HIC 色谱,其表明物质中多于 90.5% 的是双特异性抗体,B) 最终样品的质谱去褶皱,C) 纯化后的物质的凝胶图,和 D) 理论质量表。

[0115] 图 17 是氧化还原程序 (有加热) 的示意图 :a) 将样品加热 1 小时以允许二硫键环化,b) 然后冷却和使用 2mM DTT 还原半胱氨酸 2 小时,和 c) 然后浓缩和通过室温进行透析来空气氧化半胱氨酸。

[0116] 图 18 是氧化还原程序 (无加热) 的示意图 :a) 将样品混合 2 个小时,b) 使用 2mM DTT 还原半胱氨酸 2 小时,和 c) 然后浓缩、和通过室温进行透析来除去 EDTA,同时空气氧化半胱氨酸。

[0117] 图 19 :对组装的双特异性抗体的分析, A) 使用有加热步骤的氧化还原程序的 HIC 色谱,B) 使用无加热步骤的氧化还原程序的 HIC 色谱。缩略词

[0118] ADCC= 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)

[0119] API= 抗病原体免疫粘附素 (Anti-pathogen immunoadhesins)

[0120] BPI= 杀细菌 / 通透性增加蛋白 (Bactericidal/permeability-increasing protein)

[0121] C1q= 补体因子 1q (Complement factor 1q)

[0122] CD= 分化群 Cluster of Differentiation)

[0123] CDC= 补体依赖性细胞毒性 Complement-dependent cytotoxicity)

[0124] CH1 或 C_H1= 重链第 1 恒定区 (Heavy chain first constant domain)

[0125] CH2 或 C_H2= 重链第 2 恒定区 (Heavy chain second constant domain)

[0126] CH3 或 C_H3= 重链第 3 恒定区 (Heavy chain third constant domain)

[0127] CH4 或 C_H4= 重链第 4 恒定区 (Heavy chain fourth constant domain)

[0128] CL 或 C_L= 轻链恒定区 (Light chain constant domain)

[0129] CTLA= 细胞毒性 T 淋巴细胞相关分子 (Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule)

[0130] Fc= 可结晶片段 (Fragment crystallizable)

[0131] Fc γ R= IgG 的 Fc 部分的 γ 受体 (Receptor gamma for the Fc portion of IgG)

[0132] HIV= 人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus)

[0133] ICAM= 细胞间粘附分子 (Intercellular adhesion molecule)

[0134] BsAb= 双特异性抗体 (Bispecific antibody)

[0135] BsDb= 双特异性双抗体 (Bispecific diabody)

[0136] dsFv= 二硫键稳定的 Fv (Disulfide-stabilized Fv)

[0137] Fc= 抗体的恒定片段 (Constant fragment of an antibody)

[0138] Fd= 抗体的 V_H+C_H1 (VH+CH1 of an antibody)

[0139] FcR= Fc 受体 (Fc receptor)

[0140] Fv= 抗体的可变片段 (Variable fragment of an antibody)

[0141] IgG= 免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G)

[0142] mAb= 单克隆抗体 (Monoclonal antibody)

[0143] PBL= 外周血淋巴细胞 (Peripheral blood lymphocyte)

[0144] scDb= 单链双抗体 (Single-chain diabody)

[0145] scFv= 单链 Fv (Single-chain Fv)

[0146] (scFv)₂=scFv-scFv 串联物 (scFv-scFv tandem)

[0147] Tandab= 串联双抗体 (Tandem diabody)

[0148] VH 或 V_H= 抗体重链的可变区 (Variable domain of the heavy chain of an antibody)

[0149] VL 或 V_L= 抗体轻链的可变区 (Variable domain of the light chain of an antibody)

[0150] 发明详述

[0151] 现使用以下定义和实施例,以举例说明的方式,详细描述本发明。通过参考引用的方式明确地并入本文所提及的所有专利和出版物,包括这些专利和出版物中公开的所有序列。

[0152] 除非在本文中另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语均具有本发明所属领域中技术人员所通常理解的含义。Singleton 等, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2d Ed., John Wiley and Sons, New York (1994), 以及 Hale 和 Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) 为技术人员提供了有关本发明使用的许多术语的一般词典。本文描述了优选的方法和材料,但在实施或测试本发明中可以使用与本文中所描述的方法和材料类似或相同的任何方法和材料。数值范围涵盖定义该范围的数值。除非另有说明,核酸按 5' 至 3' 方向从左到右书写;氨基酸按氨基至羧基方向从左到右书写。关于本领域的定义和术语,实施者尤其可以参考 Sambrook 等, 1989, 和 Ausubel FM 等, 1993。应理解的是,本发明不限于所描述的具体方法、操作程序和试剂,因为它们是可以改变的。

[0153] 数值范围涵盖定义该范围的数值。

[0154] 除非另有说明,核酸按 5' 至 3' 方向从左到右书写;氨基酸按氨基至羧基方向从左到右书写。

[0155] 对于本发明的各个方面和实施方案,本文中提供的标题并不对其构成限制,而是可以参考说明书整体而获得。因此,以下定义的术语通过参考说明书整体,获得更全面的定义。

[0156] I. 定义

[0157] “异源多聚体”、“异源多聚体复合物”或“异源多聚体蛋白质”指包含至少第一含铰链的多肽和第二含铰链的多肽的分子,其中第二含铰链的多肽与第一含铰链的多肽在氨基酸序列上至少有一个氨基酸残基的不同。异源多聚体可以包括由第一和第二含铰链的多肽形成的“异源二聚体”,或在除了第一和第二含铰链的多肽之外还存在其它多肽时,可以形成更高级的三级结构。异源多聚体的多肽可以通过非肽共价键(例如二硫键)和/或非共价相互作用(例如,氢键、离子键、范德华力和/或疏水性相互作用)而在彼此之间发生相

互作用。

[0158] 本文中所使用的“异源多聚化结构域”指,对生物学分子进行改变和添加,以促进异源多聚体的形成和阻碍同源多聚体的形成。具有强烈的形成异二聚体而非同二聚体的倾向的任何异源二聚化结构域均涵盖在本发明范围内。举例说明性例子包括但不限于,例如美国专利申请 20030078385(Arathoon 等 - Genentech; 描述了鼓突位于洞中);W02007147901(**Kjærgaard** 等 - Novo Nordisk; 描述了离子相互作用);W02009089004(Kannan 等 - Amgen; 描述了静电引导效应);美国临时专利申请 61/243,105(Christensen 等 - Genentech; 描述了卷曲螺旋)。也见,例如 Pack, P. 和 Plückthun, A., Biochemistry 31, 1579-1584(1992) 描述了亮氨酸拉链,或 Pack 等, Bio/Technology 11, 1271-1277(1993) 描述了螺旋-转角-螺旋基序。在本文中,表述“异源多聚化结构域”和“异源二聚化结构域”可互换使用。

[0159] 本文中使用的短语“含铰链的多肽”指这样的多肽,其包含相应于本领域中所理解的免疫球蛋白铰链区的区域,例如重链 C_H1 和 C_H2 区之间的区域。本文中使用的“铰链区”、“铰链序列”和它们的变体包括本领域已知的含义,该含义在例如 Janeway's Immunobiology, (Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, NY) (第 7 版, 2008); Bloom 等, Protein Science(1997), 6:407-415; Humphreys 等, J. Immunol. Methods(1997), 209:193-202 中进行了说明。也见,例如 Burton, Molec. Immunol. 22:161-206(1985) 以及 Papadea, C. 和 I. J. Check(1989) “Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects.” Crit Rev Clin Lab Sci 27(1):27-58。本领域技术人员知道,氨基酸的数量以及可用于形成链间二硫键的半胱氨酸残基的数量在不同类和同种型的免疫球蛋白之间是不同的。所有这些铰链区均可以用于含铰链的多肽中,落入本发明范围内。

[0160] 本文中的术语“抗体”按最广义使用,指包含两个重链和两个轻链的任何免疫球蛋白(Ig)分子,以及其任何片段、突变体、变体或衍生物,只要该片段、突变体、变体或衍生物表现出所需要的生物学活性(例如,表位结合活性)即可。抗体的例子包括本文中描述的单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段。抗体可以是人的、人源化的和/或亲和力成熟的。

[0161] 作为一个参考,本文中使用的抗体指免疫球蛋白 G(IgG) 的结构。然而,本领域技术人员将理解/认识到,任何免疫球蛋白类别的抗体都可以用于本文中描述的本发明方法中。清楚地讲, IgG 分子包含一对相同的重链(HCs)和一对相同的轻链(LCs)。每个 LC 具有一个可变区(V_L)和一个恒定区(C_L),而每个 HC 具有一个可变区(V_H)和 3 个恒定区(C_H1, C_H2 和 C_H3)。C_H1 和 C_H2 区通过铰链区相连接。该结构在本领域公知。参见图 1B。

[0162] 本文中使用的“半抗体”指与一个免疫球蛋白轻链结合的一个免疫球蛋白重链。图 1A 中描绘了示例性半抗体。本领域技术人员将容易理解,半抗体也可以具有由单个可变区组成的抗原结合区。

[0163] 术语“maxibody”指包含与 Fc 多肽融合的 scFv 的融合蛋白。参见 W02009089004 的图 8a。关于双特异性 maxibody,参见 W0 2009089004 的图 2。

[0164] 根据 EU 编号系统,术语人 IgG Fc 区的“C_H2 区”通常从 IgG 的约 231 位残基延伸到约 340 位残基。该 C_H2 区是独特的,因为其不与别的区域紧密配对。相反地,两

个 N 连接的分支碳水化合物链介于完整的天然 IgG 分子的两个 C_H2 区之间。具推测,该碳水化合物可能提供对结构域-结构域配对的替代,和帮助稳定 C_H2 区。Burton, Molec. Immunol. 22:161-206(1985)。

[0165] 术语“C_H3 区”包括 Fc 区中位于 C_H2 区 C 端的该残基链(即,根据 EU 编号系统,从 IgG 的约第 341 位氨基酸残基至约第 447 位氨基酸残基)。

[0166] 本文中使用的术语“Fc 区”通常指包含免疫球蛋白重链 C 端多肽序列的二聚体复合物,其中 C 端多肽序列是可通过以木瓜蛋白酶消化完整的抗体而获得的多肽序列。Fc 区可以包含天然的或变异的 Fc 序列。尽管免疫球蛋白重链的 Fc 序列的界限可以变化,人 IgG 重链 Fc 序列通常被定义为从约位置 Cys226 或从约位置 Pro230 的氨基酸残基延伸到 Fc 序列的羧基末端。除非本文另有说明,Fc 区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据 EU 编号系统来进行的,EU 编号系统也称为 EU 索引,其描述于 Kabat 等,Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中。免疫球蛋白的 Fc 序列通常包含两个恒定区,即 C_H2 区和 C_H3 区,和可选地包含 C_H4 区。本文中,“Fc 多肽”意指组成 Fc 区的多肽之一,例如单体 Fc。Fc 多肽可以从任何合适的免疫球蛋白例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚类,IgA、IgE、IgD 或 IgM 获得。Fc 区包含通过二硫键而被抓在一起的两个 H 链的羧基端部分。抗体的效应子功能由 Fc 区中的序列决定;该区也是存在于某些类型细胞中的 Fc 受体(FcR)所识别的部分。在一些实施方案中,Fc 多肽(通常在其 N 端)包含野生型铰链序列的部分或全部。在一些实施方案中,Fc 多肽不包含功能性或野生型铰链序列。

[0167] “功能性 Fc 区”拥有天然序列 Fc 区的“效应子功能”。示例性“效应子功能”包括 C1q 结合;CDC;Fc 受体结合;ADCC;吞噬作用;细胞表面受体(例如 B 细胞受体;BCR)的下调,等。这样的效应子功能通常需要 Fc 区与结合区(例如抗体可变区)组合,并可以使用例如在本文的定义中公开的多种测定试验来进行评估。

[0168] “天然序列 Fc 区”包含与天然发现的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人 Fc 区包括天然序列人 IgG₁Fc 区(非 A 和 A 同种异型);天然序列人 IgG₂Fc 区;天然序列人 IgG₃Fc 区;和天然序列人 IgG₄Fc 区,以及它们的天然存在的变体。

[0169] “变体 Fc 区”包含由于至少一个氨基酸的改变,优选一个或多个氨基酸置换,而与天然序列 Fc 区不同的氨基酸序列。优选地,与天然序列 Fc 区或亲本多肽的 Fc 区相比较,变体 Fc 区具有至少一个氨基酸置换,例如在天然序列 Fc 区或亲本多肽的 Fc 区中约 1 个至约 10 个氨基酸置换,优选约 1 个至 5 个氨基酸置换。本文中的变体 Fc 区与天然序列 Fc 区和/或与亲本多肽的 Fc 区优选具有至少约 80% 的同源性,和更优选具有至少约 90% 的同源性,更优选具有至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98% 或至少约 99% 的同源性。

[0170] 本文中使用的“Fc 组分”指 Fc 区的铰链区、C_H2 区或 C_H3 区。

[0171] 在某些实施方案中,含铰链的多肽包含 IgG Fc 区,优选来自野生型人 IgG Fc 区。“野生型”人 IgG Fc 意指在人类群体内天然存在的氨基酸序列。当然,正如 Fc 序列在个体间可以稍微不同一样,对野生型序列可以进行一个或多个改变而仍然落入本发明的范围内。例如,Fc 区可以包含与本发明不相关的另外改变,例如糖基化位点的突变或非天然氨基酸的纳入。

[0172] 术语“可变区”或“可变结构域”指抗体重链或轻链中参与抗体与抗原结合的结合

构域。天然抗体的重链和轻链的可变区（分别以 V_H 和 V_L 表示）通常具有相似的结构，每个结构域包含 4 个保守的构架区 (FRs) 和 3 个超变区 (HVRs)。见例如，Kindt 等. *Kuby Immunology*, 第 6 版, W.H. Freeman and Co., 第 91 页 (2007)。单个 V_H 或 V_L 区足以赋予抗原结合特异性。此外，可以使用来自结合抗原的抗体的 VH 或 VL 区，分别筛选互补的 VL 或 VH 区的文库，分离结合特定抗原的抗体。见例如，Portolano 等, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson 等, *Nature* 352:624-628 (1991)。

[0173] 本文中使用的术语“Fab”指抗体的抗原结合片段。如上所述，可以使用木瓜蛋白酶消化完整的抗体。抗体经木瓜蛋白酶消化后产生两个相同的抗原结合片段，即“Fab”片段，和残余的“Fc”片段（即 Fc 区，同上）。Fab 片段由一条完整的 L 链与一条重链的可变区和该 H 链 (V_H) 的第一恒定区 (C_H1) 组成。

[0174] 本文中使用的短语“抗原结合臂”、“靶标分子结合臂”、“靶标结合臂”以及它们的变体，指本发明的异源多聚体蛋白质的组成部分，其具有特异性结合目的靶标的能力。通常和优选地，抗原结合臂是免疫球蛋白多肽序列，例如免疫球蛋白轻链和重链的 CDR 和 / 或可变区序列，的复合物。

[0175] “靶标”或“靶标分子”指异源多聚体蛋白质的结合臂所识别的结构部分。例如，如果异源多聚体蛋白质是抗体，则根据情况，靶标可以是单个分子上或不同分子上的表位、或病原体或肿瘤细胞。类似地，如果异源多聚体蛋白质是受体-Fc 融合蛋白，则靶标将是该受体的关联结合配偶体。本领域技术人员知道，靶标由靶标结合臂的结合特异性决定，不同的靶标结合臂可以识别不同的靶标。靶标优选以高于 1 μ M Kd 的亲和力（根据斯卡查德 (scatchard) 分析），与本发明的异源多聚体蛋白质结合。靶标分子的实例包括但不限于血清可溶性蛋白质和 / 或它们的受体，例如细胞因子和 / 或细胞因子受体、粘附素、生长因子和 / 或它们的受体、激素、病毒颗粒（例如，RSV F 蛋白、CMV、StaphA、流感病毒、C 型肝炎病毒）、微生物（例如，细菌细胞蛋白、真菌细胞）、粘附素、CD 蛋白和它们的受体。

[0176] “完整”或“全长”抗体的一个例子是包含抗原结合臂以及 C_L 和至少重链恒定区 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 的抗体。这些恒定区可以是天然序列恒定区（例如人天然序列恒定区）或其氨基酸序列变体。

[0177] 本文中使用的术语“偶联”指，将第一和第二含铰链的多肽彼此连接起来，例如形成共价键，所需要的步骤。这样的步骤可以包括：对第一和第二含铰链的多肽中的半胱氨酸残基进行的还原、退火和 / 或氧化，以形成链间二硫键。偶联可以通过化学交联或使用氧化还原体系来实现。见例如，Humphreys 等, *J. Immunol. Methods* (1998) 217:1-10 和 Zhu 等, *Cancer Lett.*, (1994) 86:127-134。

[0178] 术语“多特异性抗体”按其最广义使用，尤其涵盖具有多表位特异性的抗体。这样的多特异性抗体包括但不限于：包含重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 的抗体，其中该 $V_H V_L$ 单元具有多表位特异性；具有两个或多个 V_L 和 V_H 区的抗体，每个 $V_H V_L$ 单元与不同的表位结合；具有两个或更多个单可变区的抗体，每个单可变区与不同的表位结合；全长抗体，抗体片段，例如 Fab、Fv、dsFv、scFv，双抗体 (diabodies)，双特异性双抗体和三抗体 (triabodies)，已共价或非共价连接在一起的抗体片段。“多表位特异性”指与相同或不同靶标上的两个或更多个不同的表位特异性结合的能力。“单特异性”指仅与一个表位结合的能力。根据一个实施方案，多特异性抗体是 IgG 抗体，其与每个表位以 5 μ M 至 0.001pM、

3 μ M 至 0.001pM、1 μ M 至 0.001pM、0.5 μ M 至 0.001pM、或 0.1 μ M 至 0.001pM 的亲合力结合。图 1B 提供了双特异性的示意图。

[0179] “抗体片段”包括完整抗体的部分,优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段;双抗体 (Db);串联双抗体 (taDb);线性抗体 (例如美国专利号 5,641,870;Zapata 等,Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995));单臂抗体;单可变区抗体;微型抗体;单链抗体分子;以及从抗体片段形成的多特异性抗体 (例如,包括但不限于 Db-Fc、taDb-Fc、taDb-C_H3 和 (scFV)₄-Fc)。

[0180] 表述“单域抗体”(sdAbs)或“单可变区 (SVD) 抗体”通常指其中的单个可变区 (V_H 或 V_L) 能够赋予抗原结合的抗体。换句话说,单可变区不需要通过与另一个可变区相互作用来识别靶标抗原。单域抗体由每个抗原结合臂上的单个单体可变抗体区 (V_H 或 V_L) 组成。单域抗体的实例包括那些源自驼科动物 (美洲驼和骆驼) 和软骨鱼 (例如护士鲨) 的抗体和那些通过重组方法来自人和小鼠抗体的抗体 (Ward 等, Nature (1989) 341:544-546; Dooley 和 Flajnik, Dev Comp Immunol (2006) 30:43-56; Muyldermans 等, Trend Biochem Sci (2001) 26:230-235; Holt 等, Trends Biotechnol (2003):21:484-490; WO 2005/035572; WO 03/035694; Davies 和 Riechmann, Febs Lett (1994) 339:285-290; W000/29004; WO 02/051870)。单可变区抗体可以和其它不是单域抗体的可变区或可变结构域一起存在于抗原结合臂中 (例如,同源或异源多聚体)。

[0181] 表述“线性抗体”通常指描述于 Zapata 等, Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995) 中的抗体。简单地说,这些抗体包含一对串联的 Fd 片段 (VH-CH1-VH-CH1), 其与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

[0182] 本文中所提及的术语“鼓突入洞”(“knob-into-hole”)或“KnH”技术指,在体外或体内引导两个多肽配对到一起的技术,其通过在两多肽相互作用的界面上,将突起 (鼓突) 引入到一个多肽中和将腔 (洞) 引入到另一多肽中而实现。例如,已经将 KnHs 引入到了抗体的 Fc:Fc 结合界面、C_L:C_H1 界面或 V_H/V_L 界面中 (例如, US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431 和 Zhu 等, (1997) Protein Science 6:781-788)。这对于在多特异性抗体的制备过程中促使两个不同的重链配对到一起特别有用。例如,在其 Fc 区具有 KnH 的多特异性抗体可以进一步包括与每个 Fc 区连接的可变区,或进一步包括与类似的或不同的轻链可变区配对的不同重链可变区。KnH 技术也可以用于将两个不同的受体胞外区配对到一起或使包含不同靶标识别序列的任何其它多肽序列 (例如,包括亲和体、肽体和其它 Fc 融合体) 配对。

[0183] “Fv”为一个重链可变区和一个轻链可变区以紧密、非共价结合的方式形成的二聚体。由这两个区域的折叠生出 6 个超变环 (3 个环来自 H 链, 3 个环来自 L 链), 所述超变环贡献用于抗原结合的氨基酸残基和赋予抗体对抗原的结合特异性。然而,即使是单可变区 (或包含仅 3 个对抗原特异的 CDRs 的 Fv 的一半,) 也具有识别和结合抗原的能力,尽管其通常以比完整结合位点低的亲和力进行结合。

[0184] “单链 Fv” (也缩写为 “sFv” 或 “scFv”) 是包含连接到单个多肽链中的 V_H 和 V_L 抗体区的抗体片段。优选地, sFv 多肽还包含 VH 和 VL 区之间的多肽接头, 所述接头使 sFv 形成用于抗原结合所需的结构。关于 sFv 的综述, 参见 Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编辑, Springer-Verlag, New

York, 第 269-315 页 (1994); Malmberg 等, J. Immunol. Methods 183:7-13, 1995。

[0185] 术语“双抗体”(“diabodies”)指小的抗体片段,其通过构建在 VH 和 VL 区之间具有短接头(约 5-10 个残基)的 sFv 片段(见上述段落)来制备,其中该短接头使得所述 V 区发生链间而不是链内配对,从而形成二价片段,即具有两个抗原结合位点。双特异性双抗体是两个“交叉”sFv 片段的异二聚体,其中两个抗体的 VH 和 VL 区存在于不同的多肽链上。双抗体更详细地描述于例如 EP404, 097; W093/11161; 和 Holliger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6444-6448(1993) 中。

[0186] 术语“单臂抗体”指这样的抗体,其包含:(1) 通过肽键与包含 CH₂区、CH₃区或 CH₂-CH₃区的多肽连接的可变区,和(2) 第二 CH₂、CH₃或 CH₂-CH₃区,其中可变区与包含第二 CH₂、CH₃或 CH₂-CH₃区的多肽不通过肽键连接。在一个实施方案中,单臂抗体包含 3 个多肽:(1) 包含可变区(例如 V_H)、CH₁、CH₂和 CH₃的第一多肽,(2) 包含可变区(例如 V_L)和 C_L区的第二多肽,以及(3) 包含 CH₂和 CH₃区的第三多肽。在另一个实施方案中,单臂抗体具有部分铰链区,所述铰链区包含两个半胱氨酸残基,它们形成连接恒定重链的二硫键。在一个实施方案中,单臂抗体的可变区形成抗原结合区。在另一个实施方案中,单臂抗体的可变区是单可变区,其中每个单可变区都是抗原结合区。在另一个实施方案中,单臂抗体是单可变区抗体。

[0187] 本发明的抗体可以是“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与来自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,而链的其余部分与来自另一个物种或属于另一个抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源;本发明的抗体可以是这样的嵌合抗体的片段,只有它们表现出所需的生物学活性(美国专利号 4,816,567; 和 Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA81:6851-6855(1984))。本文中有用的嵌合抗体包括含有来自非人灵长类动物(例如,旧大陆猴、猿等)的可变区抗原结合序列和人恒定区序列的灵长类抗体。

[0188] 非人(例如啮齿类动物)抗体的“人源化”形式是包含来自非人抗体的最小量序列的嵌合抗体。就大部分而言,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中受体的超变区的残基被具有所需抗体特异性、亲和力和能力的来自小鼠、大鼠、兔子或非人灵长类动物等非人物种的抗体(供体抗体)的超变区的残基置换。在一些例子中,人免疫球蛋白的构架区(FR)残基被相应的非人残基置换。此外,人源化抗体可以包含受体抗体和供体抗体中没有的残基。进行这些改变以进一步精细化抗体的性能。一般来说,人源化抗体将包含至少一个和通常两个可变区的基本上全部,其中所有或基本上所有的超变环对应于非人免疫球蛋白的,而所有或基本上所有的 FRs 是人免疫球蛋白序列的。人源化抗体可选地还可以包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多详情见 Jones 等, Nature321:522-525(1986); Riechmann 等, Nature332:323-327(1988); 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。

[0189] “肽体”指随机产生的肽与 Fc 区的融合体。见美国专利号 6,660,843,2003 年 12 月 9 日授予 Feige 等(就其全部内容通过参考引用的方式并入本文)。它们包括一个或多个肽连接到 N 末端、C 末端、氨基酸侧链或这些位点的多个上。肽体技术使得能够设计并入了靶向一个或多个配体或受体的肽、肿瘤导航肽(tumor-homing peptide)、膜转运肽等的治疗剂。已证明肽体技术在许多这样的分子的设计中 useful,包括线性和二硫键约束的肽、“串联

肽多聚体”(即,多个肽在Fc区的单链上)。见例如,美国专利号 6,660,843;美国专利申请号 2003/0195156,2003 年 10 月 16 日公布(对应于 W002/092620,2002 年 11 月 21 日公布);美国专利申请号 2003/0176352,2003 年 9 月 18 日公布(对应于 W003/031589,2003 年 4 月 17 日公布);美国系列号 09/422,838,1999 年 10 月 22 日申请(对应于 W000/24770,2000 年 5 月 4 日公布);美国专利申请号 2003/0229023,2003 年 12 月 11 日公布;W003/057134,2003 年 7 月 17 日公布;美国专利申请号 2003/0236193,2003 年 12 月 25 日公布(对应于 PCT/US04/010989,2004 年 4 月 8 日申请);美国系列号 10/666,480,2003 年 9 月 18 日申请(对应于 W004/026329,2004 年 4 月 1 日公布),其每一项均就其全部内容通过参考引用的方式并入本文。

[0190] “亲和体”指使用通过肽键与 Fc 区连接的蛋白质,其中蛋白质用作支架以提供靶标分子的结合表面。所述蛋白质通常是天然存在的蛋白质,例如葡萄球菌 A 蛋白或 IgG 结合性 B 结构域,或来自它们的 Z 蛋白(见 Nilsson 等(1987),*Prot Eng* 1,107-113, 和美国专利号 5,143,844) 或它们的片段或衍生物。例如,可以从具有改变的靶标分子结合亲和力的 Z 蛋白变体来产生亲和体,其中通过随机诱变,对 Z 蛋白的一段进行突变,以产生能够结合靶标分子的变体的文库。亲和体的实例包括美国专利号 6,534,628, Nord K 等, *Prot Eng* 8:601-608(1995) 和 Nord K 等, *Nat Biotech* 15:772-777(1997). *Biotechnol Appl Biochem*. 2008 Jun; 50(Pt 2):97-112。

[0191] 本文中使用的术语“免疫粘附素”指这样的分子,其组合了异源蛋白质(“粘附素”)的结合特异性和免疫球蛋白恒定区的效应子功能。在结构上,免疫粘附素包含具有所需结合特异性的氨基酸序列与免疫球蛋白恒定区序列(例如, IgG 的 CH2 和 / 或 CH3 序列)的融合,其中所述氨基酸序列不是抗体的抗原识别和结合位点(即,其与抗体的恒定区是“异源的”)。示例性粘附素序列包括这样的连续氨基酸序列,所述氨基酸序列包含与目的蛋白质结合的受体或配体的一部分。粘附素序列也可以是与目的蛋白质结合的序列但不是受体或配体序列(例如,肽体中的粘附素序列)。可以通过多种方法选择或鉴定这样的多肽序列,所述方法包括噬菌体展示技术和高通量分选技术。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定区可以获自任何免疫球蛋白,例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚类, IgA(包括 IgA1 和 IgA2)、IgE、IgD 或 IgM。

[0192] 本文中使用的“复合物”或“复合的”指两个或更多个分子的缔合,其中这些分子通过不是肽键的键和 / 或作用力(例如,范德华力、疏水作用力、亲水作用力)彼此发生相互作用。在一个实施方案中,复合物是异源多聚体。应理解的是,本文中使用的术语“蛋白质复合物”或“多肽复合物”包括这样的复合物,在该蛋白质复合物中具有与蛋白质缀合的非蛋白质实体(例如,包括但不限于,化学分子,例如毒素或检测试剂)。

[0193] “与目的抗原结合”的本发明异源多聚体蛋白质是这样的蛋白质,其与靶标以足够的亲和力结合,以致于该异源多聚体蛋白质可以用作诊断和 / 或治疗剂以靶向蛋白质或表达该靶标的细胞或组织,而不显著地与其它蛋白质交叉反应。在这样的实施方案中,在通过荧光激活细胞分选(FACS)分析或放射免疫沉淀法(RIA)或 ELISA 进行测定时,异源多聚体蛋白质与“非靶标”蛋白质结合的程度将低于抗体与其特定靶标蛋白质的结合的大约 10%。关于异源多聚体蛋白质与靶标分子的结合,术语“特异性结合”、“特异地结合至”、或“特异于”特定多肽或特定多肽靶标上的表位,是指:该结合与非特异相互作用(例如,非特异性

相互作用可以是与牛血清白蛋白或酪蛋白的结合)具有测量上的差异。可以例如通过测定分子的结合并与对照分子的结合相比较来测定特异性结合。例如,可以通过与类似靶标的对照分子(例如过量的非标记靶标)的竞争来测定特异性结合。在这样的情况下,如果标记的靶标与探针的结合被过量的非标记靶标竞争性抑制,则表明特异性结合。本文中使用的术语“特异性结合”、“特异地结合至”、或“特异于”特定多肽或特定多肽靶标上的表位,可以例如表现为:分子对靶标具有至少约 200nM 的 K_d 、或者至少约 150nM、或者至少约 100nM、或者至少约 60nM、或者至少约 50nM、或者至少约 40nM、或者至少约 30nM、或者至少约 20nM、或者至少约 10nM、或者至少约 8nM、或者至少约 6nM、或者至少约 4nM、或者至少约 2nM、或者至少约 1nM 或更高的 K_d 。在一个实施方案中,术语“特异性结合”指这样的结合,其中异源多聚体蛋白质与特定多肽或特定多肽上的表位结合,而基本上不与任何其它多肽或多肽表位结合。

[0194] “结合亲和力”通常指分子(例如抗体)的单个结合位点和其结合配偶体(例如抗原)之间非共价相互作用的总和力量。除非另有说明,本文中使用的“结合亲和力”指内在的结合亲和力,其反映了结合对(例如抗体和抗原)成员之间 1:1 的相互作用。通常可以用解离常数(K_d)来表示分子 X 与其配偶体 Y 的亲和力。例如, K_d 可以是约 200nM、150nM、100nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、8nM、6nM、4nM、2nM、1nM、或更强。可以通过本领域已知的普通方法来测定亲和力,所述方法包括本文中描述的那些方法。低亲和力的抗体通常与抗原结合缓慢并倾向于易于解离,而高亲和力的抗体通常与抗原结合更快并倾向于较长时间保持结合。本领域已知多种测量结合亲和力的方法,为本发明目的,可以使用任何这些方法。

[0195] 在一个实施方案中,使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), 利用表面等离子体共振测定法,以约 10 个反应单位 (RU), 以固定的靶标(例如抗原)CM5 芯片,在 25° C 测定根据本发明的“ K_d ”或 K_d 值。简言之,根据供应商的说明书,以 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片 (CM5, BIAcore 公司)。以 10mM 乙酸钠 (pH 4.8) 将抗原稀释到 5 μ g/ml (约 0.2 μ M) 后以 5 μ l/min 的流速进行注射,以获得约 10 个反应单位 (RU) 的偶联蛋白质。在注射抗原后,注射 1M 乙醇胺以封闭未反应的基团。为了进行动力学测量,在 25° C, 以约 25 μ l/min 的流速,注射在含 0.05% 吐温 20 的 PBS (PBST) 中两倍系列稀释的 Fab (例如,0.78nM 至 500nM)。通过同时拟合结合和解离传感图,使用简单的一对一 Langmuir 结合模型 (BIAcore 评估软件第 3.2 版), 计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (K_d) 计算为 k_{off}/k_{on} 。见例如 Chen 等, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)。如果通过以上表面等离子体共振测定法测得的结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$, 则可以使用荧光淬灭技术来测定结合速率,所述荧光淬灭技术是在 25° C, 在存在递增浓度的抗原时,以分光计测量于 PBS (pH 7.2) 中的 20nM 抗抗原抗体 (Fab 形式) 的荧光发射强度 (激发 = 295nm; 发射 = 340nm, 16nm 带通) 的增加或降低,所述分光计例如装备了停流 (stop-flow) 的分光光度计 (Aviv Instruments) 或具有搅拌比色杯 (stirred cuvette) 的 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计 (ThermoSpectronic)。

[0196] 除非另有说明,就本发明的异源多聚体蛋白质例如抗体、其片段或衍生物而言,“生物学活性的”、“生物学活性”和“生物学特性”,意指具有与生物分子结合的能力。

[0197] 当用来描述各种异源多聚体多肽时,“分离的”意指异源多聚体已从表达它的细胞或细胞培养物中分离和/或回收。其天然环境中的污染成分是干扰异源多聚体的诊断或治疗用途的物质,可以包括酶、激素和其它蛋白质性或非蛋白质性的溶质。在某些实施方案中,异源多聚体将被纯化至(1)以Lowry方法测量,蛋白质的95%以上重量,最优选99%以上重量,(2)足以通过旋杯测序仪获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)在还原或非还原条件下通过SDS-PAGE、使用考马斯蓝或优选地银染确定的同质。然而,通常,通过至少一个纯化步骤来制备分离的多肽。

[0198] 通常,本发明的异源多聚体被纯化至基本上同质。短语“基本上同质”、“基本上同质的形式”用来表示,产物基本上没有源自不需要的多肽组合的副产物(例如同源多聚体)。

[0199] 以纯度来表述,基本上同质意指副产物的量按重量计不超过10%、9%、8%、7%、6%、4%、3%、2%或1%,或按重量计低于1%。在一个实施方案中,副产物低于5%。

[0200] “生物分子”指核酸、蛋白质、碳水化合物及其组合。在一个实施方案中,生物分子天然存在。

[0201] 本文中使用的“连接”意指第一和第二氨基酸序列之间直接的肽键连接,或涉及第三氨基酸序列的连接,所述第三氨基酸序列是位于第一和第二氨基酸序列之间并与它们键接的肽。例如,与一个氨基酸序列的C末端以及另一个氨基酸序列的N末端键接的接头肽。

[0202] 本文中使用的“接头”意指两个或更多个氨基酸长度的氨基酸序列。接头可以由不带电荷的极性氨基酸或非极性氨基酸组成。接头可以长例如2至100个氨基酸,例如长2至50个氨基酸,例如长3、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸。接头可以是“可切割的”,例如自我切割或酶促或化学切割。氨基酸序列中的切割位点、以及在这样的位点上切割的酶和化学试剂在本领域公知并也描述于本文中。

[0203] 本文中使用的“系链”(tether)意指连接两个其它氨基酸序列的氨基酸接头。本文中描述的系链可以将免疫球蛋白重链可变区的N端和免疫球蛋白轻链恒定区的C端连接起来。在特定的实施方案中,系链长约15至50个氨基酸,例如长约20至26个氨基酸(例如长20、21、22、23、24、25或26个氨基酸)。系链可以是“可切割的”,例如自我切割,或使用本领域的标准方法和试剂进行酶促或化学切割。

[0204] “接头”或“系链”的酶促切割可以涉及使用内肽酶,例如Lys-C、Asp-N、Arg-C、V8、Glu-C、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、凝血酶、Genenase、Xa因子、TEV(烟草蚀刻病毒半胱氨酸蛋白酶)、肠激酶、HRV C3(人鼻病毒C3蛋白酶)、激肽原酶以及枯草杆菌蛋白酶样蛋白原转化酶(例如Furin(PC1)、PC2或PC3)/或N-精氨酸二元转化酶(N-arginine dibasic convertase)。化学切割可以涉及使用例如羟胺、N-氯代琥珀酰亚胺、N-溴代琥珀酰亚胺或溴化氰。

[0205] 本文中使用的“Lys-C内肽酶切割位点”是可以在C端一侧被Lys-C内肽酶切割的氨基酸序列中的赖氨酸残基。Lys-C内肽酶在赖氨酸残基的C端一侧进行切割。

[0206] “离液剂”意指这样的水溶性物质,其通过干扰起稳定作用的分子内相互作用(例如,氢键、范德华作用力或疏水效应),破坏蛋白质(例如抗体)的三维结构。示例性离液剂包括但不限于尿素、胍-HCl、高氯酸锂、组氨酸和精氨酸。

[0207] “温和洗涤剂”意指这样的水溶性物质,其通过干扰起稳定作用的分子内相互作用

(例如,氢键、范德华作用力或疏水效应),破坏蛋白质(例如抗体)的三维结构,但其不永久地破坏蛋白质结构以致生物学活性丢失(即,不变性蛋白质)。示例性温和洗涤剂包括但不限于,吐温(Tween)(例如吐温 20)、Triton(例如 Triton X-100)、NP-40(壬基酚聚氧乙烯醚)、Nonidet P-40(辛基酚聚氧乙烯醚)和十二烷基硫酸钠(SDS)。

[0208] 抗体“效应子功能”指归因于抗体的 Fc 区(天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区)的生物学活性,其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括: C1q 结合和补体依赖性细胞毒性; Fc 受体结合; 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC); 吞噬作用; 细胞表面受体(例如, B 细胞受体)的下调; 以及 B 细胞活化。

[0209] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指一种形式的细胞毒性,其中分泌的 Ig 与存在于某些细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上的 Fc 受体(FcRs)结合,使这些细胞毒性效应细胞能特异地与携带抗原的靶细胞结合,并随后以细胞毒性物杀死该靶细胞。抗体“武装”细胞毒性细胞,其对于这种杀伤作用是绝对需要的。用于介导 ADCC 的原代细胞、NK 细胞仅表达 Fc γ RIII,而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。FcR 在造血细胞上的表达概述于 Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991) 第 464 页的表 3 中。为了评估目的分子的 ADCC 活性,可以进行例如美国专利号 5, 500, 362 或 5, 821, 337 中描述的体外 ADCC 测定。用于这样的测定的有用效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可选地或此外,可以在例如 Clynes 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656(1998) 中公开的动物模型中,对目的分子的 ADCC 活性进行体内评估。

[0210] “Fc 受体”或“FcR”指与抗体的 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是人 FcR。此外,优选的 FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR(γ 受体),其包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA(“激活性受体”)和 Fc γ RIIB(“抑制性受体”),它们具有类似的氨基酸序列,主要差异在于其胞质区。激活性受体 Fc γ RIIA 在其胞质区包含免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)。抑制性受体 Fc γ RIIB 在其胞质区包含免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)(见 M. **Daëron**, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997) 的综述)。Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492(1991); Capel 等, *Immunomethods* 4:25-34(1994); 和 de Haas 等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41(1995) 中对 FcRs 进行了综述。本文中的术语“FcR”涵盖其它 FcRs,包括以后将被鉴定出的 FcRs。该术语也包括新生儿受体 FcRn,其负责将母体的 IgGs 转运到胎儿中(Guyer 等, *J. Immunol.* 117:587(1976) 和 Kim 等, *European J. Immunol.* 24:2429-2434(1994))。

[0211] “人效应细胞”是表达一个或多个 FcRs 和执行效应子功能的白细胞。优选地,该细胞表达至少 Fc γ RIII 和执行 ADCC 效应子功能。介导 ADCC 的人白细胞的实例包括外周血单个核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、单个核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞; 优选 PBMCs 和 NK 细胞。可以从天然来源例如血液中分离效应细胞。

[0212] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指靶细胞在补体存在时的裂解。经典补体途径的活化起始于:补体系统的第一成分(C1q)与结合到关联抗原上的抗体(适当的亚类)的结合。为了评估补体的激活,可以进行例如 Gazzano-Santoro 等, *J. Immunol. Methods* 202:163(1996) 中描述的 CDC 测定试验。

[0213] 术语“治疗有效量”指可以治疗受试者的疾病或失调的抗体、抗体片段或衍生物的量。在肿瘤（例如，癌性肿瘤）的情况下，抗体或抗体片段（例如，多特异性抗体或抗体片段）的治疗有效量可以减少癌细胞的数量；缩小原发瘤的大小；抑制（即在一定程度上减缓和优选停止）癌细胞浸润到周围器官中；抑制（即在一定程度上减缓和优选停止）肿瘤转移；在一定程度上抑制肿瘤生长；和/或在一定程度上减轻与失调相关的一个或多个症状。如果抗体或抗体片段可以阻止已存在的癌细胞的生长和/或将其杀死，则其可以是细胞抑制性的和/或细胞毒性的。对于癌症治疗，可以例如通过评价存活持续时间，到达疾病进展的时间（TTP）、反应率（RR）、反应持续时间和/或生活质量，测量体内功效。

[0214] “减少或抑制”意指，导致优选 20% 或更高、更优选 50% 或更高、和最优选 75%、85%、90%、95% 或更高的总体降低的能力。减少或抑制可以针对所治疗的失调的症状、转移灶的存在或大小、原发瘤的大小、或血管发生失调中血管的大小或数量。

[0215] 术语“癌”和“癌性”指或描述哺乳动物的生理状况，其典型地具有不受控制的细胞生长/增殖的特征。该定义包括良性和恶性癌。癌（cancer）的实例包括但不限于：上皮癌（carcinoma）、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。这些癌症的更具体实例包括，鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌，包括肠胃癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳房癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌（例如，肾细胞癌）、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、黑素瘤，以及各种类型的头颈癌。“早期癌症”意指不具侵略性或转移性的癌症或分类为第 0、I 或 II 阶段的癌症。术语“癌前”指典型地在癌症之前或发展为癌症的状况或生长。“非转移性的”意指癌是良性的或保留在原发位置而没有透入淋巴或血管系统或除了原发位置以外的其它组织中。通常，非转移性癌是任何第 0、I 或 II 阶段的癌症，和偶尔是第 III 阶段的癌症。

[0216] 本文中，“变应性或炎性疾病”是由个体的免疫系统过度激活引起的疾病或失调。示例性变应性或炎性疾病包括但不限于，哮喘、银屑病、类风湿性关节炎、特应性皮炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮、湿疹、器官移植、年龄相关性黄斑变性、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、嗜酸细胞性食管炎、和与炎症相关的自身免疫性疾病。

[0217] 本文中，“自身免疫病”是指，由个体自身组织引起并对抗该组织的疾病或失调、或与其共分离的状况或其表现形式、或由其导致的状况。自身免疫疾病或失调的实例包括但不限于：关节炎（类风湿性关节炎，例如急性关节炎、慢性类风湿性关节炎、痛风性关节炎、急性痛风性关节炎、慢性炎症性关节炎、退行性关节炎、感染性关节炎、莱姆关节炎、增生性关节炎、银屑病关节炎、脊椎关节炎、和少年发病类风湿性关节炎、骨关节炎、慢性进行性关节炎、关节炎畸形、原发性慢性多关节炎、反应性关节炎和强直性脊柱炎），炎性过度增生性皮肤病，银屑病例如斑块状银屑病、滴状银屑病、脓疱性银屑病和指甲银屑病，皮炎包括接触性皮炎、慢性接触性皮炎、变应性皮炎、变应性接触性皮炎、疱疹样皮炎和特应性皮炎，x-连锁高 IgM 综合症，荨麻疹例如慢性变应性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹，包括慢性自身免疫性荨麻疹，多肌炎/皮肌炎，幼年型皮肌炎，中毒性表皮坏死松解，硬皮病（包括系统性硬皮病），硬化症例如系统性硬化病，多发性硬化（MS）例如 spino-optical MS、原发进行性 MS（PPMS）和复发缓解型 MS（RRMS），进行性系统性硬化病，动脉粥样硬化，动脉硬化，弥漫性硬化（sclerosis disseminate）和共济失调硬化（ataxic sclerosis），炎性肠病（IBD）（例

如,克罗恩氏病、自身免疫介导性胃肠疾病,结肠炎例如溃疡性结肠炎、colitis ulcerosa、显微镜性结肠炎、胶原性结肠炎、息肉状结肠炎、坏死性小肠结肠炎、透壁性结肠炎和自身免疫性炎症性肠病),坏疽性脓皮症,结节性红斑,原发性硬化性胆管炎,巩膜外层炎,呼吸窘迫综合征,包括成人或急性呼吸窘迫综合征(ARDS),脑膜炎,葡萄膜的全部或部分的炎症,虹膜炎,脉络膜炎,自身免疫血液学紊乱,类风湿性脊柱炎,突发性耳聋,IgE介导的疾病例如过敏反应、变应性和特应反应性鼻炎,脑炎例如Rasmussen脑炎和边缘性脑炎和/或脑干脑炎,眼色素层炎例如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、晶状体抗原性葡萄膜炎、后葡萄膜炎或自身免疫葡萄膜炎,伴有和无肾病综合征的肾小球肾炎(GN),例如慢性或急性肾小球肾炎例如原发性GN、免疫介导的GN、膜性GN(膜性肾病)、特发性膜性GN或特发性膜性肾病、膜性增生性GN(MPGN),包括I型和II型,和急性GN,变应性病状,变应性反应,湿疹,包括变应性或特应性湿疹,哮喘,例如支气管哮喘、自身免疫哮喘,涉及T细胞浸润和慢性炎症反应的病状,慢性肺炎疾病,自身免疫心肌炎,白细胞粘附缺陷病,系统性红斑狼疮(SLE)例如皮肤型SLE、亚急性皮肤型红斑狼疮、新生儿期狼疮综合征(NLE)、播散性红斑狼疮,狼疮(包括肾炎、脑炎、小儿、非肾性、肾外、盘状、脱发),幼年型(I型)糖尿病,包括小儿胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)、成人型糖尿病(II型糖尿病)、自身免疫性糖尿病,特发性尿崩症,与细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫反应,结核,结节病,肉芽肿病,包括淋巴瘤样肉芽肿病、韦格纳肉芽肿病,粒细胞缺乏症,血管炎病,包括脉管炎(大血管的血管炎(包括风湿性多肌痛和巨细胞(Takayasu's)动脉炎)、中型血管的血管炎(包括Kawasaki病和结节性多动脉炎)、显微型多动脉炎、CNS脉管炎,坏死性、皮肤性或超敏性脉管炎,系统性坏死性血管炎,和ANCA相关血管炎例如Churg-Strauss血管炎或综合征(CSS),颞动脉炎,再生障碍性贫血,自身免疫性再生障碍性贫血,库氏试验阳性贫血,Diamond Blackfan贫血,溶血性贫血,或免疫性溶血性贫血,包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA),恶性贫血(anemia perniciosa),Addison病,纯红细胞贫血或再生障碍(PRCA),VIII因子缺乏症,血友病A,自身免疫性中性粒细胞减少,全血细胞减少症,白细胞减少症,涉及白细胞渗出的疾病,中枢神经系统炎症疾病,多脏器损伤综合征例如继发于败血症、创伤或大出血的那些,抗原-抗体复合物介导的疾病,抗肾小球基底膜病,抗磷脂抗体综合征,变应性神经炎,Bechet's或Behcet's病,Castleman's综合征,Goodpasture's综合征,Reynaud's综合征,Sjogren's综合征,Stevens-Johnson综合征,类天疱疮例如大疱性类天疱疮和皮肤类天疱疮,天疱疮(包括寻常性天疱疮、落叶性天疱疮、天疱疮黏膜类天疱疮、和红斑性天疱疮),自身免疫多内分泌腺病,Reiter's病或综合征,免疫复合物性肾炎,抗体介导的肾炎,视神经脊髓炎,多发性神经病,慢性神经病例如IgM多发性神经病或IgM介导的神经病,血小板减少症(例如,心肌梗死患者产生的),包括血栓性血小板减少性紫癜(TTP)和自身免疫性或免疫性血小板减少症,例如特发性血小板减少性紫癜(ITP),包括慢性或急性ITP,睾丸和卵巢自身免疫性疾病,包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎,原发性甲状腺功能减退,甲状旁腺机能减退,自身免疫性内分泌疾病,包括甲状腺炎例如自身免疫性甲状腺炎、Hashimoto's病、慢性甲状腺炎(Hashimoto's甲状腺炎)或亚急性甲状腺炎,自身免疫性甲状腺病,特发性甲状旁腺机能减退,Grave's病,多腺体综合征例如自身免疫性多腺体综合征(或多腺体内分泌病综合征),副肿瘤综合征,包括神经学副肿瘤综合征,例如Lambert-Eaton肌无力综合征或

Eaton-Lambert 综合征, 僵人综合征, 脑脊髓炎例如变态反应性脑脊髓炎或变应性脊髓炎和试验性变应性脑脊髓炎 (EAE), 重症肌无力例如胸腺瘤相关重症肌无力, 小脑退化, 神经性肌强直, 视性眼阵挛或视性眼阵挛肌阵挛综合征 (OMS) 和感觉神经病, 多灶性运动神经病, Sheehan's 综合征, 自身免疫性肝炎, 慢性肝炎, 狼疮样肝炎, 巨细胞性肝炎, 慢性活动性肝炎或自身免疫性慢性活动性肝炎, 淋巴间质性肺炎, 闭塞性细支气管炎 (非移植) 对 NSIP, Guillain-Barré 综合征, Berger's 病 (IgA 肾病), 特发性 IgA 肾病, 线性 IgA 皮肤病, 原发性胆汁性肝硬化, 肺硬化, 自身免疫性肠病综合征, 乳糜泻, 乳糜泄, 口炎性腹泻 (麸质性肠病), 难治性口炎性腹泻, 特发性口炎性腹泻, 冷球蛋白血症, 肌萎缩性侧索硬化症 (ALS; Lou Gehrig's 病), 冠心病, 自身免疫性耳病例如自身免疫性内耳病 (AIED), 自身免疫性听力损失, 视性眼阵挛肌阵挛综合征 (OMS), 多软骨炎例如顽固性或复发性多软骨炎, 肺泡蛋白沉着症, 淀粉样变性, 巩膜炎, 非癌性淋巴细胞增多, 原发性淋巴细胞增多, 包括单克隆 B 细胞淋巴细胞增多 (例如, 良性单克隆丙种球蛋白病和意义不明性单克隆丙种球蛋白病, MGUS), 周围神经病, 副肿瘤综合征, 通道病 (channelopathy) 例如癫痫、偏头痛、心律失常、肌疾病、耳聋、目盲、周期性瘫痪、和中枢神经系统的通道病, 孤独症, 炎性肌病, 局灶性节段性肾小球硬化症 (FSGS), 内分泌性眼病, 葡萄膜视网膜炎, 脉络膜视网膜炎, 自身免疫性肝失调, 纤维性肌痛 (fibromyalgia), 多内分泌功能衰竭, Schmidt's 综合征, 肾上腺炎, 胃萎缩, 老年性痴呆, 脱髓鞘疾病例如自身免疫性脱髓鞘疾病, 糖尿病性肾病, Dressler's 综合征, 斑秃, CREST 综合征 (钙质沉着症、Raynaud's 现象, 食道运动功能障碍、指端硬化和毛细血管扩张), 男性和女性自身免疫性不孕, 混合性结缔组织病, Chagas' 病, 风湿热, 习惯性流产, 农民肺, 多形红斑, 心切开后综合征, Cushing's 综合征, 养鸟者肺, 变应性肉芽肿性血管炎, 良性淋巴细胞血管炎, Alport's 综合征, 肺炎泡例如变应性肺炎泡和纤维化肺炎泡, 间质性肺病, 输血反应, 麻风病, 疟疾, 利什曼病, kpanosomiasis, 血吸虫病, 蛔虫病, 曲霉病, Sampter's 综合征, Caplan's 综合征, 登革热, 心内膜炎, 心内膜心肌纤维化, 弥漫性肺间质纤维化, 间质性肺纤维化, 特发性肺纤维化, 囊性纤维化, 眼内炎, 持久性隆起性红斑, 胎儿成红细胞增多, 嗜酸性筋膜炎, Shulman's 综合征, Felty's 综合征, 丝虫病 (filariasis), 睫状体炎 (cyclitis), 例如慢性睫状体炎、异色性睫状体炎、虹膜睫状体炎或 Fuch's 睫状体炎, 过敏性紫癜 (Henoch-Schönlein purpura), 人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染, 艾柯病毒感染, 心肌病, Alzheimer's 病, 细小病毒感染, 风疹病毒感染, 免疫接种后综合征, 先天性风疹感染, Epstein-Barr 病毒感染, 腮腺炎, Evan's 综合征, 自身免疫性性腺衰竭, Sydenham 舞蹈症, 链球菌感染后肾炎, 闭塞性血栓性血管炎 (thromboangitis obliterans)、甲状腺毒症, 脊髓痨, 脉络膜炎, 巨细胞多肌痛, 内分泌性眼病, 慢性超敏性肺炎, 干燥性角结膜炎, 流行性角结膜炎, 特发性肾炎综合征, 微小病变性肾病, 良性家族性和缺血再灌注损伤, 视网膜自身免疫, 关节炎, 支气管炎, 慢性阻塞性气道疾病, 硅肺病, 口疮, 口疮性口炎, 动脉硬化病, aspermogenesis, 自身免疫性溶血, Boeck's 病, 冷球蛋白血症, Dupuytren's 挛缩, 晶状体过敏性眼内炎 (endophthalmitis phacoanaphylactica), 变应性小肠炎, 麻风结节性红斑, 特发性面瘫, 慢性疲劳综合征, 风湿热 (febris rheumatica), Hamman-Rich's 病, 感觉神经性耳聋, 阵发性血红蛋白尿, 性腺机能减退, 区域性回肠炎, 白细胞减少症, 传染性单核细胞增多症, 横贯性脊髓炎, 原发性特发性粘液性水肿, 肾变病, 交感性眼炎 (ophthalmiasymphatica), 肉芽肿性睾丸炎、胰腺炎, 急性多神经根炎

(polyradiculitisacuta), 坏疽性脓皮症, Quervain's 甲状腺炎, 获得性脾萎缩, 由抗精子抗体引起的不育, 非恶性的胸腺瘤, 白癜风, SCID 和 Epstein-Barr 病毒相关的疾病, 获得性免疫缺损综合征 (AIDS), 寄生虫病例如利什曼原虫, 中毒性休克综合征, 食物中毒, 涉及 T 细胞浸润的疾病, 白细胞粘附缺陷病, 与细胞因子和 T 淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫反应, 涉及白细胞渗出的疾病, 多器官损伤综合征, 抗原-抗体复合物介导的疾病, 抗肾小球基底膜病, 变应性神经炎, 自身免疫性多内分泌腺病, 卵巢炎, 原发性黏液水肿, 自身免疫性萎缩性胃炎, 交感性眼炎, 风湿性疾病, 混合性结缔组织病, 肾病综合征, 胰岛炎, 多内分泌缺陷, 周围神经病, I 类自身免疫性多腺体综合征, 成人发作特发性甲状旁腺机能减退 (AOIH), 全秃, 扩张性心肌病, 获得性大疱性表皮松解 (EBA), 血色沉着病, 心肌炎, 肾病综合征, 原发性硬化性胆管炎, 脓性或非脓性鼻窦炎, 急性或慢性鼻窦炎, 筛窦炎, 额窦炎、上颌窦炎、或蝶窦炎, 嗜酸性粒细胞相关疾病例如嗜酸性粒细胞增多、嗜酸性粒细胞增多性肺浸润, 嗜酸性粒细胞增多-肌痛综合征, Löffler's 综合征, 慢性嗜酸性肺炎, 热带肺嗜酸细胞增多症, 支气管肺炎曲霉病, 曲霉肿, 或包含嗜酸性粒细胞的肉芽肿, 过敏反应, 血清阴性脊柱关节病 (seronegative spondyloarthritides), 多内分泌自身免疫病, 硬化性胆管炎, 巩膜炎、巩膜外层炎, 慢性皮肤粘膜念珠菌病, Bruton's 综合征, 婴儿期短暂性低丙种球蛋白血症, Wiskott-Aldrich 综合征, 共济失调性毛细血管扩张症, 与胶原病相关的自身免疫性疾病, 风湿病, 神经病, 缺血再灌注障碍, 血压降低反应, 血管功能障碍, angiectasis, 组织损伤, 心血管缺血, 痛觉过敏, 脑缺血, 伴随血管化的疾病, 变应性超敏疾病, 肾小球肾炎, 再灌注损伤, 心肌或其它组织的再灌注损伤, 具有急性炎症成分的皮肤病, 急性化脓性脑膜炎或其他中枢神经系统炎症疾病, 眼及眼眶炎性疾病, 粒细胞输血相关综合征, 细胞因子诱导的毒性, 急性严重炎症, 慢性顽固性炎症, 肾盂炎, 肺硬化, 糖尿病视网膜病, 糖尿病大动脉障碍, 动脉内膜增生 (endarterialhyperplasia), 胃溃疡, 心瓣炎以及子宫内膜异位。

[0218] 本文中使用的术语“细胞毒性剂”指抑制或阻止细胞的功能和/或导致细胞破坏的物质。该术语旨在包括放射性同位素(例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、Ra²²³、P³², 和 Lu 的放射性同位素), 化疗剂例如甲氨蝶呤、阿霉素 (adriamycin)、长春花生物碱(长春花新碱、长春花碱、依托泊甙), 阿霉素 (doxorubicin), 美法仑, 丝裂霉素 C, 苯丁酸氮芥, 柔红霉素 (daunorubicin) 或其它嵌入剂, 酶和其片段例如核溶解酶, 抗生素, 以及毒素, 例如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶促激活毒素, 包括其片段和/或变体, 和本文中公开的各种抗肿瘤、抗癌和化疗试剂。本文描述了其它细胞毒性剂。杀肿瘤剂导致肿瘤细胞破坏。

[0219] “化疗剂”是用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括烷化剂, 例如噻替派和 **CYTOXAN®** 环磷酰胺; 烷基磺酸盐例如白消安、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (piposulfan); 氮丙啶类例如 benzodopa、卡波醌、meturedopa 和 uredopa; 乙烯亚胺类和甲基蜜胺类 (methylamelamines), 包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、乙胺硫磷和三羟甲蜜胺; 番荔枝内酯类 (acetogenins) (特别是布拉它辛 (bullatacin) 和布拉它辛酮 (bullatacinone)); δ -9- 四氢大麻醇 (屈大麻酚 (Dronabinol), **MARINOL®**); β - 拉帕醌 (β -lapachone); 拉帕醇 (lapachol); 秋水仙素类; 桦木酸; 喜树碱 (包括合成的类似物拓扑替康 (**HYCAMTIN®**),

CPT-11(依立替康, **CAMPTOSAR®**), 乙酰基喜树碱, 莨菪亭(scopolectin) 和 9-氨基喜树碱; 苔藓抑制素; callystatin; CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物); 鬼臼毒素; 鬼臼酸; 替尼泊苷(Teniposide); 念珠藻环肽类(cryptophycins)(特别是念珠藻环肽1和念珠藻环肽8); 多拉司他汀(dolastatin); 倍癌霉素(包括合成的类似物、KW-2189和CB1-TM1); 软珊瑚醇; 水鬼蕉碱(pancratistatin); 葡枝珊瑚醇; 海绵抑制素; 氮芥例如苯丁酸氮芥, 萘氮芥(Chlornaphazine), cholophosphamide, 雌莫司汀(estramustine), 异环磷酰胺(ifosfamide), 氮芥, 盐酸氧化氮芥, 美法仑, 新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard); 亚硝基脲类(nitrosureas), 例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine); 抗生素, 例如烯二炔类抗生素(例如, 加利车霉素(calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ 1(见例如 Agnew, Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994))); 达内霉素(dynemicin), 包括达内霉素A; 埃斯波霉素(esperamicin); 以及新抑癌蛋白生色团(neocarzinostatin chromophore)和相关的生色蛋白烯二炔抗生素生色团类); 阿克拉霉素(aclacinomysins), 放线菌素(actinomycin), authramycin, 偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycins)、cactinomycin、卡柔比星(carabycin)、洋红霉素(carinomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、**ADRIAMYCIN®**多柔比星(包括吗啉代-多柔比星, 氰基吗啉代-多柔比星, 2-吡咯啉代-多柔比星和脱氧多柔比星), 表柔比星(epirubicin), 依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、马赛罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素例如丝裂霉素C, 麦考酚酸(mycophenolic acid)、nogalarnycin、橄榄霉素(olivomycins)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin); 抗代谢物类, 例如, 甲氨蝶呤(Methotrexate)和5-氟尿嘧啶(5-FU); 叶酸类似物, 例如二甲叶酸(denopterin), 甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate); 嘌呤类似物, 例如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine); 嘧啶类似物, 例如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮杂尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine); 雄激素类, 例如, 卡鲁睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiothane)、睾内酯(testolactone); 抗肾上腺素类(anti-adrenals), 例如, 氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane); 叶酸补充物, 例如, 亚叶酸(frolic acid); 醋葡萄糖内酯(aceglatone); 醛磷酰胺糖苷(aldophosphamidglycoside); 氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶(eniluracil); 安吡啶(amsacrine); bestabucil; 比生群(bisantrene); e

datraxate; defofamine; 秋水仙胺 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); 依氟鸟氨酸 (elfornithine); 依利醋铵 (elliptinium acetate); 埃博霉素 (epothilone); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖; 氯尼达明 (lonidainine); 美登木素生物碱, 例如美登素和美坦西醇类; 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌; 莫哌达醇 (mopidanmol); 二胺硝吡啶 (nitraerine); 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 2-乙基酰肼; 丙卡巴肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natureal Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 利索新 (rhizoxin); 西佐喃 (sizofiran); 锗螺胺 (spriogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢霉烯类 (尤其是 T-2 毒素, verracurin A, 杆孢菌素 A 和蛇形菌素 (anguidine)); 乌拉坦 (urethan); 长春地辛 (vindesine) (**ELDISINE®**, **FILDESIN®**); 达卡巴嗪 (DACARBAZINE); 甘露莫司汀 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿拉伯糖苷 ("Ara-C"); 噻替派 (thiotepa); 紫杉烷类 (taxoids) 例如 **TAXOL®** 紫杉醇 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), ABRAXANETM Cremophor-free, 紫杉醇的白蛋白改造纳米粒 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), 和 **TAXOTERE®** 紫杉醇 (**Rhône**-Poulenc Rorer, Antony, 法国); 苯丁酸氮芥; 吉西他滨 (**GEMZAR®**); 6-硫鸟嘌呤; 巯嘌呤; 甲氨蝶呤; 铂类似物, 例如顺铂和卡铂; 长春碱 (**VELBAN®**); 铂; 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酰胺; 米托蒽醌; 长春新碱 (**ONCOVIN®**); 奥沙利铂; 亚叶酸 (leucovorin); 长春瑞滨 (**NAVELBINE®**); 诺安托 (novantrone); 依达曲沙 (edatrexate); 柔红霉素; 氨基蝶呤; 伊班膦酸盐; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 类视黄醇例如视黄酸; 卡培他滨 (**XELODA®**); 以上任何物质的药学可接受的盐、酸或衍生物; 以及以上两个或多个的组合, 例如 CHOP (环磷酰胺、阿霉素、长春新碱、泼尼松龙组合疗法的缩写), 和 FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATIN™) 结合 5-FU 和 leucovorin 的治疗方案的缩写)。

[0220] 该定义还包括抗激素剂, 其通过调节、降低、阻碍或抑制能够促进癌生长的激素的效应来起作用, 并常为系统性或全身性治疗形式。它们可以自身就是激素。实例包括抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂 (SERMs), 包括, 例如它莫西芬 (包括 **NOLVADEX®** 它莫西芬), **EVISTA®** 雷洛西芬 (raloxifene), 屈洛昔芬 (droloxifene), 4-羟基它莫昔芬, 曲沃昔芬 (trioxifene), keoxifene, LY117018, 奥那司酮 (onapristone) 和 **FARESTON®** 托瑞米芬 (toremifene); 抗孕酮类 (anti-progesterones); 雌激素受体下调剂 (ERDs); 起作用而抑制或关闭卵巢的药物, 例如黄体生成素释放激素 (LHRH) 激动剂, 例如 **LUPRON®** 和 **ELIGARD®** 醋酸亮丙瑞林 (leuprolide acetate), 醋酸性瑞林 (goserelin acetate), 醋酸布舍瑞林 (buserelin acetate) 和曲普瑞林 (tripterelin); 其它抗雄激素类例如氟他米特 (flutamide), 尼鲁米特 (nilutamide) 和比卡鲁胺 (bicalutamide); 和抑制芳化酶的芳化酶抑制剂, 其调节肾上腺中雌激素的产生, 例如 4(5)-咪唑类, 氨鲁米特, **MEGASE®** 醋酸甲地孕酮, **AROMASIN®** 依西美坦, formestane, 法倔唑 (fadrozole), **RIVISOR®** 伏氯唑 (vorozole), **FEMARA®** 来曲唑 (letrozole) 和 **ARIMIDEX®** 阿纳托唑 (anastrozole)。此外,

化疗剂的该定义包括二膦酸盐,例如氯屈膦酸盐(clodronate)(例如**BONEFOS®**或**OSTAC®**), **DIDROCAL®**依替膦酸钠(etidronate), NE-58095, **ZOMETA®**唑来膦酸(zoledronic acid/zoledronate), **FOSAMAX®**阿仑唑奈(alendronate), **AREDIA®**帕米膦酸(pamidronate), **SKELID®**替鲁膦酸盐(tiludronate)或**ACTONEL®**利塞膦酸盐(risedronate);以及曲沙他滨(troxacitabine)(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,特别是那些抑制异常细胞增殖所涉及的信号途径中的基因,例如 PKC- α 、Raf、H-Ras 和表皮生长因子受体(EGF-R),表达的反义寡核苷酸;疫苗例如**THERATOPE®**疫苗和基因治疗疫苗,例如**ALLOVECTIN®**疫苗, **LEUVECTIN®**疫苗和 **VAXID®**疫苗;**LURTOTECAN®**拓扑异构酶 1 抑制剂;**ABARELIX®** rmRH;二甲苯磺酸拉帕替尼(lapatinib ditosylate)(ErbB-2 和 EGFR 双酪氨酸激酶小分子抑制剂,也称为 GW572016);和以上任何的药学可接受盐、酸或衍生物。

[0221] 当在本文中使用时,“生长抑制剂”指在体外或体内抑制细胞生长的化合物或组合物。因此,生长抑制剂可以是显著减少 S 期细胞的百分比的药剂。生长抑制剂的实例包括(在 S 期以外的位置)阻碍细胞周期进程的试剂,例如诱导 G1 停滞和 M- 期停滞的试剂。典型的 M- 期阻滞剂包括长春花生物碱(例如长春新碱和长春碱),紫杉烷类和拓扑异构酶 II 抑制剂例如阿霉素,表柔比星,柔红霉素,依托泊甙和博来霉素。停滞 G1 的试剂也可以溢出到 S- 期停滞,例如 DNA 烷化剂,例如它莫西芬,泼尼松,达卡巴嗪,氮芥,顺铂,氨甲蝶呤,5- 氟尿嘧啶和 ara-C。更多信息可见于 The Molecular Basis of Cancer 中, Mendelsohn 和 Israel 编辑,第 1 章,标题为“Cell cycleregulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”, Murakami 等著(WB Saunders: Philadelphia, 1995),特别是第 13 页。紫杉烷类(紫杉醇和多西他赛)是都源自紫杉树的抗癌药物。来自欧洲紫杉的多西他赛(**TAXOTERE®**, Rhone-Poulenc Rorer)是紫杉醇的半合成类似物(**TAXOL®**, Bristol-Myers Squibb)。紫杉醇和多西他赛促进自微管蛋白二聚体组装成微管和通过阻止解聚来稳定微管,这导致抑制细胞有丝分裂。

[0222] 本文中使用的“抗癌疗法”指减轻或抑制受试者癌症的治疗。抗癌疗法的实例包括细胞毒性放射疗法以及给受试者施用治疗有效量的细胞毒性剂、化疗剂、生长抑制剂、癌症疫苗、血管发生抑制剂、前体药物、细胞因子、细胞因子拮抗剂、皮质类固醇、免疫抑制剂、镇吐药、抗体或抗体片段、或镇痛剂。

[0223] 本申请中使用的术语“前体药物”指,药学上有效物质的前体或衍生物形式,与母体药物相比,其对肿瘤细胞的毒性较低,能够被酶促激活或被转化为更活跃的母体形式。见例如, Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” Biochemical Society Transactions, 14, 第 375-382 页, 615th Meeting Belfast (1986) 和 Stella 等, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,” Directed Drug Delivery, Borchardt 等, (ed.), 第 247-267 页, Humana Press (1985)。前体药物包括但不限于,含磷酸盐的前体药物、含硫代磷酸盐的前体药物、含硫酸盐的前体药物、含肽的前体药物、经 D- 氨基酸修饰的前体药物、糖基化的前体药物、含 β - 内酰胺的前体药物、含可取代的苯氧基乙酰胺的前体药物、或含可取代的苯乙酰胺的前体药物、可以被转化为更活跃的无细胞毒性药物的 5- 氟胞嘧啶和其它 5- 氟尿嘧啶前体药物。能够被衍生为用于本发明的前体药物形式的细胞毒性药物的例子,包括但不限于上述那些化疗剂。

[0224] 术语“细胞因子”是由一个细胞群体释放并作为细胞间调节物对另一个细胞起作用的蛋白质的通称。这样的细胞因子的实例有淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子包括生长激素例如人生长激素 (HGH)、N- 甲硫氨酰人生长激素, 和牛生长激素; 甲状旁腺素; 甲状腺素; 胰岛素; 胰岛素原; 松弛素; 松弛素原; 糖蛋白激素, 例如促滤泡激素 (FSH)、促甲状腺激素 (TSH) 和促黄体生成素 (LH); 表皮生长因子 (EGF); 肝细胞生长因子; 成纤维细胞生长因子 (FGF); 催乳素; 胎盘催乳素; 肿瘤坏死因子 α 和 β ; 苗勒抑制物质 (mullerian-inhibiting substance); 小鼠促性腺激素相关肽; 抑制素; 活化素; 血管内皮生长因子; 整联蛋白; 促血小板生成素 (TPO); 神经生长因子例如 NGF - α ; 血小板生长因子; 转化生长因子 (TGFs) 例如 TGF- α 和 TGF- β ; 胰岛素样生长因子 I 和 II; 红细胞生成素 (EPO); 骨诱导因子; 干扰素例如干扰素 α 、 β 和 γ ; 集落刺激因子 (CSFs) 例如巨噬细胞 CSF (M-CSF)、粒细胞 - 巨噬细胞 CSF (GM-CSF) 和粒细胞 CSF (G-CSF); 白细胞介素 (ILs) 例如 IL-1、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-18; 肿瘤坏死因子例如 TNF- α 或 TNF- β ; 以及其它多肽因子包括 LIF 和 kit 配体 (KL)。本文中使用的术语细胞因子包括, 来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列细胞因子的生物学活性等效物。

[0225] “细胞因子拮抗剂”意指部分或完全阻断、抑制或中和至少一种细胞因子的生物学活性的分子。例如, 细胞因子拮抗剂可以通过抑制细胞因子的表达和 / 分泌, 或通过与细胞因子或细胞因子受体结合, 从而抑制细胞因子的活性。细胞因子拮抗剂包括抗体、合成的或天然序列的肽、免疫粘附素、和与细胞因子或细胞因子受体结合的小分子拮抗剂。细胞因子拮抗剂可选地与细胞毒性剂缀合或融合。示例性 TNF 拮抗剂有依那西普(**ENBREL®**)、英夫利昔单抗(**REMICADE®**)和阿达木单抗 (HUMIRATM)。

[0226] 本文中使用的术语“免疫抑制剂”指, 起抑制或遮蔽所治疗的受试者的免疫系统的作用的物质。这包括抑制细胞因子产生、下调或抑制自体抗原表达、或遮蔽 MHC 抗原的物质。免疫抑制剂的实例包括 2- 氨基 -6- 芳基 -5- 取代的嘧啶 (见美国专利号 4, 665, 077); 霉酚酸酯 (mycophenolate mofetil) 例如 **CELLCEPT®**; 硫唑嘌呤 (azathioprine) (**IMURAN®**、**AZASAN®**); 6- 巯基嘌呤; 溴隐亭 (bromocriptine); 达那唑 (danazol); 氨苯砒 (dapsone); 戊二醛 (其遮蔽 MHC 抗原, 如美国专利号 4, 120, 649 中所描述); MHC 抗原和 MHC 片段的抗独特型抗体; 环孢菌素 A (cyclosporin A); 类固醇, 例如皮质类固醇和糖皮质类固醇, 例如泼尼松 (prednisone), 泼尼松龙 (prednisolone), 例如 **PEDIAPRED®** (泼尼松龙磷酸钠) 或 **ORAPRED®** (泼尼松龙磷酸钠口服液), 甲基泼尼松龙和地塞米松; 甲氨蝶呤 (口服或皮下) (**RHEUMATREX®**、**TREXALL™**); 羟氯喹 / 氯喹; 柳氮磺吡啶; 来氟洛米 (leflunomide); 细胞因子或细胞因子受体拮抗剂, 包括抗干扰素 γ 、 β 或 α 抗体, 抗肿瘤坏死因子 α 抗体 (英夫利昔单抗或阿达木单抗), 抗 TNF α 免疫粘附素 (**ENBREL®**、依那西普), 抗肿瘤坏死因子 β 抗体, 抗白细胞介素 2 抗体和抗 IL-2 受体抗体; 抗 LFA-1 抗体, 包括抗 CD11a 和抗 CD18 抗体; 抗 L3T4 抗体; 异源抗淋巴细胞球蛋白; 多克隆或 pan-T 抗体, 或单克隆抗 CD3 或抗 CD4/CD4a 抗体; 包含 LFA-3 结合结构域的可溶性肽 (WO 90/08187); 链激酶; TGF- β ; 链道酶; 来自宿主的 RNA 或 DNA; FK506; RS-61443; 脱氧精脒菌素; 雷帕霉素; T 细胞受体 (Cohen 等, 美国专利号 5, 114, 721); T 细胞受体片段 (Offner 等 . Science 251:430-432(1991); WO

90/11294; Ianeway, Nature 341:482 (1989); 和 WO 91/01133); T 细胞受体抗体 (EP 340, 109) 例如 T10B9; 环磷酰胺(**CYTOXAN®**); 氨苯砒; 青霉胺(**CUPRIMINE®**); 血浆更换; 或静脉免疫球蛋白 (IVIG)。这些物质可以单独或互相组合使用, 特别是类固醇和另一种免疫抑制剂的组合, 或在这样的组合后给予维持剂量的非类固醇药, 以降低对类固醇的需要。

[0227] “镇痛剂”指起抑制或压制受试者疼痛的作用的药物。示例性镇痛剂包括非类固醇抗炎药 (NSAIDs), 包括布洛芬(**MOTRIN®**), 萘普生 (**NAPROSYN®**), 乙酰水杨酸, 吲哚美辛, 舒林酸 (sulindac) 和托美汀 (tolmetin), 包括它们的盐和衍生物, 以及各种用于减轻可能发生的刺激的其它药物, 包括抗惊厥药物 (加巴喷丁 (gabapentin), 苯妥英 (phenytoin), 酰胺咪嗪 (carbamazepine)) 或三环抗抑郁药。具体实例包括醋氨酚 (acetaminophen), 阿司匹林 (aspirin), 阿密曲替林 (amitriptyline) (**ELAVIL®**), 酰胺咪嗪 (**TEGRETOL®**), 苯妥英 (phenytoin) (**DILANTIN®**), 加巴喷丁 (**NEURONTIN®**), (E)-N-香草基-8-甲基-6-壬烯酰胺(**CAPSAICIN®**), 或神经阻断剂。

[0228] “皮质类固醇”指几种合成的或天然存在的具有类固醇通用化学结构的物质之一, 其模拟或放大天然存在的皮质类固醇的效应。合成的皮质类固醇的实例包括泼尼松, 泼尼松龙 (包括甲基泼尼松龙), 地塞米松, 曲安西龙 (triamcinolone) 和倍他米松 (betamethasone)。

[0229] 本文中使用的“癌症疫苗”是刺激受试者的抗癌免疫反应的组合物。癌症疫苗的组成典型地是与癌症相关的物质或细胞 (抗原) 的来源 (其对受试者可以是自体的 (来自其自身) 或同种异体的 (来自别人)、以及其它组分 (例如免疫佐剂) (以进一步刺激和提升对抗原的免疫反应)。癌症疫苗可以导致刺激受试者的免疫系统, 以产生抗一种或几种特定抗原的抗体、和 / 或产生杀伤 T 细胞而攻击具有这些抗原的癌细胞。

[0230] 本文中使用的“细胞毒性放射性治疗”指抑制或阻止细胞的功能和 / 或导致细胞破坏的放射性治疗。放射性治疗可以包括, 例如体外射束照射或以放射性标记的试剂例如抗体进行治疗。该术语旨在包括使用放射线同位素 (例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、Ra²²³、P³² 和 Lu 的放射性同位素)。

[0231] “受试者”是脊椎动物, 例如哺乳动物, 例如人。哺乳动物包括但不限于农畜 (例如母牛)、运动动物、宠物 (例如猫、狗和马)、灵长类动物、小鼠和大鼠。

[0232] 除非上下文另有说明, 否则术语“第一”多肽和“第二”多肽及其变体只是通用表述, 其不应被理解为标识本发明抗体的具体的或特定的多肽或组分。

[0233] 除非另有说明, 按生产商的用法说明使用实施例中提及的商业获取的试剂。在以下实施例中整个说明书中通过 ATCC 保藏号标识的细胞来源于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), Manassas, VA。除非另有说明, 本发明使用重组 DNA 技术的标准程序, 例如上文和以下教科书中描述的程序: Sambrook 等, 同上; Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, NY, 1989); Innis 等, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc., NY, 1990); Harlow 等, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988); Gait, Oligonucleoti

de Synthesis (IRL Press, Oxford, 1984); Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan 等, Current Protocols in Immunology, 1991。

[0234] 在整个本说明书和权利要求中,表述“包含”或其变体应被理解为暗指包括所述及的整体或整体组,但不排除任何其它整体或整体组。

[0235] II. 异源多聚体蛋白质的构建

[0236] 典型地,本文中描述的异源多聚体蛋白质将包含抗体 Fc 区的显著部分。然而,在其它方面,重链包含 C_H1、C_H2 和 / 或 C_H3 区的仅一部分。

[0237] 异源多聚化区域

[0238] 异源多聚体蛋白质包含异源多聚化区域。为了产生基本上同质的异源二聚体分子群体,异源二聚化区域必须具有形成异源二聚体超过同源二聚体的强烈偏向。尽管本文中示例的异源多聚体蛋白质使用鼓突入洞技术来促进异源多聚化,但本领域技术人员将明了可以用于本发明的其它异源多聚化区域。

[0239] 鼓突入洞

[0240] 使用鼓突入洞作为生产多特异性抗体的方法在本领域公知。见美国专利号 5,731,168,1998 年 3 月 24 日授予并转让给 Genentech;PCT 公布号 W02009089004,2009 年 7 月 16 日公布,转让给 Amgen;和美国专利公开号 20090182127,2009 年 7 月 16 日公布,转让给 Novo Nordisk A/S。也见 Marvin 和 Zhu,Acta Pharmacologica Sincia(2005)26(6):649-658 和 Kontermann(2005)Acta Pharmacol. Sin.,26:1-9。在此提供简单讨论。

[0241] “突起”指从第一多肽的界面伸出并因此可以置入相邻界面(即第二多肽的界面)中的互补性洞腔中的至少一个氨基酸侧链,该置入使得可以例如稳定异源多聚体化、和由此相对于同源多聚体的形成更利于异源多聚体的形成。突起可以存在于原始界面中或可以通过合成引入(例如,通过改变编码界面的核酸)。通常,对编码第一多肽的界面的核酸进行改变以编码突起。为了达到该目的,以至少一个“输入”氨基酸残基的编码核酸,置换第一多肽界面中的至少一个“原始”氨基酸残基的编码核酸,所述“输入”氨基酸具有比原始氨基酸残基大的侧链体积。应理解的是,可以有一个以上的原始和对应输入残基。可以被置换的原始残基的数量的上限是第一多肽界面中残基的总数。各种氨基酸的侧链体积显示于下表中。

[0242] 表 1、氨基酸残基的特性

[0243]

氨基酸	单字母缩写	MASS ^a (道尔顿)	体积 ^b (埃 ³)	可及表面积 ^c (埃 ²)
丙氨酸 (Ala)	A	71.08	88.6	115
精氨酸 (Arg)	R	156.20	173.4	225
天冬酰胺 (Asn)	N	114.11	117.7	160
天冬氨酸 (Asp)	D	115.09	111.1	150
半胱氨酸 (Cys)	C	103.14	108.5	135
谷氨酰胺 (Gln)	Q	128.14	143.9	180
谷氨酸 (Glu)	E	129.12	138.4	190
甘氨酸 (Gly)	G	57.06	60.1	75
组氨酸 (His)	H	137.15	153.2	195
异亮氨酸 (Ile)	I	113.17	166.7	175
亮氨酸 (Leu)	L	113.17	166.7	170
赖氨酸 (Lys)	K	128.18	168.6	200
甲硫氨酸 (Met)	M	131.21	162.9	185
苯丙氨酸 (Phe)	F	147.18	189.9	210
脯氨酸 (Pro)	P	97.12	122.7	145
丝氨酸 (Ser)	S	87.08	89.0	115
苏氨酸 (Thr)	T	101.11	116.1	140
色氨酸 (Trp)	W	186.21	227.8	255
酪氨酸 (Tyr)	Y	163.18	193.6	230
缬氨酸 (Val)	V	99.14	140.0	155

[0244] ^a氨基酸的分子量减去水的分子量。数值来自 Handbook of Chemistry and Physics, 43rd ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961。

[0245] ^b值来自 A. A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972。

[0246] ^c值来自 C. Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975。该参考文献的图 6-20 中定义

了可及表面积。

[0247] 用于形成突起的优选输入残基通常是天然存在的氨基酸残基,其优选选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)。最优选的是色氨酸和酪氨酸。在一个实施方案中,用于形成突起的原始残基具有小的侧链体积,例如丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。

[0248] “**洞腔**”指从第二多肽的界面凹入并因此可以容纳相邻第一多肽的界面上的对应突起的至少一个氨基酸侧链。洞腔可以存在于原始界面中或可以通过合成引入(例如通过改变编码界面的核酸)。通常,对编码第二多肽的界面的核酸进行改变以编码洞腔。为了达到该目的,以编码至少一个“**输入**”氨基酸残基的DNA置换编码第二多肽界面中的至少一个“**原始**”氨基酸残基的核酸,所述“**输入**”氨基酸残基具有比原始氨基酸残基小的侧链体积。应理解的是,可以有一个以上的原始和对应输入残基。可以被置换的原始残基的数量的上限是第二多肽的界面中残基的总数。各种氨基酸的侧链体积显示于以上表1中。用于形成洞腔的优选输入残基通常是天然存在的氨基酸残基,其优选选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)。最优选的是丝氨酸、丙氨酸或苏氨酸。在一个实施方案中,用于形成洞腔的原始残基具有大的侧链体积,例如酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

[0249] “**原始**”氨基酸残基是被“**输入**”残基置换的氨基酸残基,所述输入残基可以具有比原始残基小或大的侧链体积。输入氨基酸残基可以是天然存在或非天然存在的氨基酸残基,但优选是前者。“**天然存在的**”氨基酸残基是那些由遗传密码编码和在上表1中列出的残基。“**非天然存在的**”氨基酸残基意指不由遗传密码编码、但其能够在多肽链中与邻近的氨基酸残基共价结合的残基。非天然存在的氨基酸残基的实例有正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸,以及其它氨基酸残基类似物,例如Ellman等, *Meth. Enzym.* 202:301-336(1991)中所描述的。为了产生这样的非天然存在的氨基酸残基,可以使用Noren等, *Science* 244:182(1989)和Ellman等, (同上)中的程序。简单地说,这涉及化学激活携带非天然存在的氨基酸残基的阻抑型tRNA,接着进行RNA的体外转录和翻译。本发明的方法涉及置换至少一个原始氨基酸残基,但可以置换一个以上原始残基。通常,第一或第二多肽的界面中不超过全部的残基将包含被置换的原始氨基酸残基。典型地,用于置换的原始残基是“**被埋藏的**”。“**被埋藏**”意指残基基本上是溶剂不可及的。通常,输入残基不是半胱氨酸,以防止二硫键的可能氧化或错配。

[0250] 突起“**可置入**”洞腔中,意指:分别位于第一多肽和第二多肽的界面上的突起和洞腔,它们的空间位置以及大小使得突起可以被放入洞腔中而不显著干扰界面上第一和第二多肽的正常缔合。由于突起例如Tyr、Phe和Trp典型地不从界面的轴垂直地伸出并具有优选的构象,故突起与对应的洞腔的对齐(alignment)依赖于基于三维结构对突起/洞腔对进行建模,所述三维结构例如通过X射线晶体学或核磁共振(NMR)获得的。这可以使用本领域广泛接受的技术实现。

[0251] “**原始或模板核酸**”意指编码目的多肽的核酸,其可以被“**改变**”(即遗传改造或突变)以编码突起或洞腔。原始或起始核酸可以是天然存在的核酸或可以包括之前已经进行过改变的核酸(例如,人源化抗体片段)。“**改变**”核酸意指,通过插入、缺失或置换编码目的氨基酸残基的至少一个密码子来突变原始核酸。通常,以编码输入残基的密码子置换编码原始残基的密码子。以该方式对DNA进行遗传修饰的技术已经综述于

Mutagenesis: a Practical Approach, M. J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, UK. (1991) 中,其包括例如定点诱变、盒式诱变和聚合酶链式反应 (PCR) 诱变。通过突变原始 / 模板核酸,由此相应地改变由原始 / 模板核酸编码的原始 / 模板多肽。

[0252] 可以通过合成的手段,将突起或洞腔“引入”到第一或第二多肽的界面中,例如通过重组技术、体外肽合成、上述那些用于引入非天然氨基酸残基的技术,通过肽的酶促或化学偶联,或这些技术的一些组合。因此,“引入的”突起或洞腔是“非天然存在的”或“非原生的”,意指其天然不存在或不存在于原始多肽(例如,人源化单克隆抗体)中。

[0253] 通常,用于形成突起的输入氨基酸残基具有相对较少数量的“旋转异构体”(例如约 3-6 个)。“旋转异构体”是氨基酸侧链的能量上有利的构象。Ponders 和 Richards, J. Mol. Biol. 193:775-791(1987) 中综述了各种氨基酸残基的旋转异构体的数量。

[0254] III. 载体、宿主细胞和重组方法

[0255] 为了重组产生本发明的异源多聚体蛋白质(例如抗体),可以分离编码异源多聚体蛋白质的核酸并插入到可复制载体中,用于进一步克隆(DNA 的扩增)或用于表达。对编码抗体的 DNA 很容易使用传统方法来进行分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。许多载体可利用。载体的选择部分取决于所使用的宿主细胞。通常,优选的宿主细胞是原核或真核(通常是哺乳动物,但也包括真菌(例如酵母)、昆虫、植物和来自其它多细胞生物体的有核细胞)来源的。应理解的是,任何同种型的恒定区都可以用于该目的,包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE 恒定区,而且这样的恒定区可以来自任何人或动物物种。

[0256] a. 使用原核宿主细胞产生异源多聚体蛋白质

[0257] i. 载体构建

[0258] 可以使用标准的重组技术,获得编码本发明异源多聚体蛋白质(例如抗体)的多肽组分的多核苷酸序列。可以从例如产生抗体的细胞,例如杂交瘤细胞中,分离所需的多核苷酸序列并对其进行测序。或者,可以使用核苷酸合成仪或 PCR 技术,合成多核苷酸。在得到编码多肽的序列后,将其插入到能够在原核宿主中复制和表达异源多核苷酸的重组载体中。许多本领域可得和已知的载体可以用于本发明的目的。对合适载体的选择将主要取决于待插入到载体中的核酸的大小和待以载体进行转化的特定宿主细胞。每个载体包含多种组分,这取决于其功能(扩增或表达异源多核苷酸,或两者)和其与其所栖居的特定宿主细胞的兼容性。载体的组分通常包括但不限于:复制起点、选择标记基因、启动子、核糖体结合位点(RBS)、信号序列、异源核酸插入片段和转录终止序列。

[0259] 通常,将包含来自与宿主细胞相容的物种的复制子和控制序列的质粒载体,与这些宿主一同使用。载体通常具有复制位点、以及能够在转化的细胞中提供表型选择的标记序列。例如,通常使用 pBR322 转化大肠杆菌,pBR322 是衍生自大肠杆菌物种的质粒。pBR322 包含编码氨苄青霉素(Amp)和四环素(Tet)抗性的基因,由此提供了用于鉴定已转化细胞的容易手段。pBR322、其衍生物或其它微生物质粒或噬菌体也可以包含,或经改变后包含,可以被该微生物用来表达内源蛋白质的启动子。可以用于表达特定抗体的 pBR322 衍生物的实例详细描述于 Carter 等,美国专利号 5,648,237 中。

[0260] 此外,可以将包含与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体,作为转化载体与这些宿主一同使用。例如,可以利用噬菌体例如 λ GEM. TM. -11 来构建重组载体,

所述重组载体可用来转化感受态宿主细胞例如大肠杆菌 LE392。

[0261] 本发明的表达载体可以包含两个或多个启动子-顺反子对,编码多肽组分之每一个。启动子是非翻译的调控序列,其位于顺反子的上游(5'),调节顺反子的表达。原核启动子典型地分为两类,即诱导型和组成型。诱导型启动子是这样的启动子,其对培养条件的改变作出反应而使在其控制下的顺反子的转录水平增加,所述培养条件例如存在或缺乏营养物质或温度的改变。

[0262] 本领域熟知可以被多种潜在的宿主细胞识别的大量启动子。可以通过以限制性内切酶消化从来源 DNA 中移出启动子,并将该分离的启动子序列插入到本发明的载体中,使所选择的启动子与编码例如轻链或重链的顺反子 DNA 有效连接。天然启动子序列和许多异源启动子都可用于指导靶基因的扩增和/或表达。在一些实施方案中,使用异源启动子,这是因为与天然靶多肽启动子相比,它们通常允许所表达的靶基因达到更强的转录和更高的产量。

[0263] 适于原核宿主使用的启动子包括 PhoA 启动子, β -galactamase 和乳糖启动子系统,色氨酸(trp)启动子系统,和杂种启动子例如 tac 或 trc 启动子。然而,在细菌中起作用的其它启动子(例如其它已知的细菌或噬菌体启动子)也是合适的。它们的核苷酸序列已经被公布,由此本领域技术人员可以通过使用衔接物或接头提供任何所需的限制性位点,将它们与编码异源多聚体蛋白质例如靶轻链和重链的基因的顺反子有效连接(Siebenlist et al., (1980)Cell 20:269)。

[0264] 在本发明的一个方面,重组载体中的每个顺反子包含分泌信号序列组分,该分泌信号序列组分指导表达的多肽跨膜转运。通常,信号序列可以是载体的组分,或其可以是插入到载体中的靶多肽 DNA 的一部分。为本发明目的选择的信号序列应该是被宿主细胞识别和加工的(即,被信号肽酶切割)。对于不识别和加工异源多肽原有的信号序列的原核宿主细胞,可以以原核信号序列替换该信号序列,所述原核信号序列选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp 或热稳定肠毒素 II(STII) 引导序列, LamB、PhoE、PelB、OmpA 和 MBP。在本发明的一个实施方案中,在表达系统的两个顺反子中使用的信号序列都是 STII 信号序列或其变体。

[0265] 在另一个方面,可在宿主细胞的细胞质中生产根据本发明的免疫球蛋白,由此不需要每个顺反子中存在分泌信号序列。在该情况下,免疫球蛋白轻链和重链在细胞质中表达、折叠和组装形成功能性免疫球蛋白。某些宿主株(例如,大肠杆菌 trxB⁻菌株)提供有利于二硫键形成的细胞质条件,由此允许所表达的蛋白质亚基正确折叠和组装。见 Proba 和 PluckthunGene, 159:203(1995)。

[0266] 适用于表达本发明的异源多聚体蛋白质(例如抗体)的原核宿主细胞包括古细菌和真细菌,例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物。有用的细菌的实例包括埃希氏菌属(Escherichia)(例如大肠杆菌)、芽孢杆菌属(Bacilli)(例如枯草芽孢杆菌(B. subtilis))、肠杆菌属(Enterobacteria)、假单胞菌属(Pseudomonas)物种(例如铜绿假单胞菌(P. aeruginosa))、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)、粘质沙雷氏菌(Serratia marcescans)、克雷伯氏菌属(Klebsiella)、变形杆菌属(Proteus)、志贺氏菌属(Shigella)、根瘤菌属(Rhizobia)、透明颤菌属(Vitreoscilla)或副球菌属(Paracoccus)。一个实施方案中,使用革兰氏阴性细胞。一个实施方案中,使用大肠杆

菌细胞作为本发明的宿主。大肠杆菌株的实例包括菌株 W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D. C. : American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC 保藏号 27, 325) 及其衍生物, 包括具有基因型 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kan^R 的菌株 33D3 (U. S. Pat. No. 5, 639, 635)。其它菌株及其衍生物, 例如大肠杆菌 294 (ATCC 31, 446)、大肠杆菌 B、大肠杆菌 Δ 1776 (ATCC 31, 537) 和大肠杆菌 RV308 (ATCC 31, 608) 也是合适的。在一个实施方案中, 特别使用大肠杆菌 Δ lpp。这些实例是举例说明性的而不起限定作用。用于构建具有规定基因型的任何上述细菌的衍生物的方法, 在本领域已知和描述于例如 Bass 等, *Proteins*, 8:309-314 (1990) 中。通常需要考虑到复制子在细菌细胞中的复制能力来选择适当的细菌。例如, 当使用熟知的质粒例如 pBR322、pBR325、pACYC177 或 pKN410 来提供复制子时, 大肠杆菌、沙雷氏菌或沙门氏菌物种可以适宜地用作宿主。典型地, 宿主细胞应该分泌微少量的蛋白水解酶, 并且如果期望, 可以在细胞培养物中添加额外的蛋白酶抑制剂。

[0267] ii. 生产多肽

[0268] 以上述表达载体转化宿主细胞, 在常规营养培养基中进行培养, 所述培养基经过改动以适用于诱导启动子、选择转化体、或扩增编码所需序列的基因。

[0269] 转化意指将 DNA 引入到原核宿主中以使 DNA 可作为染色体外元件或通过染色体整合进行复制。根据所使用的宿主细胞, 使用适合于该细胞的标准技术进行转化。使用氯化钙进行的钙处理通常用于包含坚实细胞壁屏障的细菌细胞。用于转化的另一种方法使用聚乙二醇 / DMSO。可以使用的另一种技术是电穿孔。

[0270] 在本领域已知和适合于培养所选宿主细胞的培养基中生长用于生产本发明多肽的原核细胞。适合的培养基的实例包括 Luria broth (LB) 加必需的营养补充物。在一些实施方案中, 培养基还包含根据表达载体的构建而选择的选择试剂, 以选择性地允许包含表达载体的原核细胞生长。例如, 向培养基中添加氨苄青霉素, 用于生长表达氨苄青霉素抗性基因的细胞。

[0271] 除了碳、氮和无机磷酸盐源以外, 还可以包括适当浓度的任何必要的补充物, 它们可以单独或作为与其它补充物或培养基的混合物例如复合氮源来引入。可选地, 培养基可以包含一种或多种还原剂, 其选自谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、巯基乙酸、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇。

[0272] 在合适的温度下培养原核宿主细胞。例如, 对于大肠杆菌的生长, 优选的温度范围为约 20° C 至约 39° C, 更优选从约 25° C 至约 37° C, 更优选约 30° C。培养基的 pH 可以是范围从约 5 至约 9 的任何 pH, 这主要取决于宿主生物。对于大肠杆菌, pH 优选从约 6.8 至约 7.4, 更优选约 7.0。

[0273] 如果在本发明的表达载体中使用可诱导启动子, 则在适于激活启动子的条件下诱导蛋白质表达。在本发明的一个方面, 使用 PhoA 启动子控制多肽的转录。据此, 在磷酸盐限制性培养基上培养转化的宿主细胞以进行诱导。优选, 磷酸盐限制性培养基是 C. R. A. P 培养基 (见, 例如 Simmons 等, *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147)。如本领域所知, 根据所使用的载体构建体, 可以使用多种其它诱导剂。

[0274] 在一个实施方案中, 分开地培养第一和第二包含铰链的宿主细胞, 所表达的本发

明多肽分别地分泌到宿主细胞的周质中,从周质中回收多肽。在第二实施方案中,分开培养第一和第二包含铰链的宿主细胞,并在分离含铰链的多肽之前,将两个细胞培养物混合到一起,沉淀细胞。在第三个实施方案中,分开培养第一和第二包含铰链的宿主细胞,分别进行离心和重悬,然后混合在一起,之后分离含铰链的多肽。在第四个实施方案中,第一和第二包含铰链的宿主细胞在相同的培养容器中一起培养。蛋白质回收典型地涉及破坏微生物细胞膜,通常使用例如渗透压震扰、超声或裂解等手段来破坏微生物细胞膜。在破碎细胞后,通过离心或过滤除去细胞碎片或完整细胞。可以例如通过亲和树脂色谱,进一步纯化蛋白质。或者,蛋白质可以被转运到培养基中,并从培养基中分离蛋白质。可以从培养基中除去细胞,过滤培养物上清液并进行浓缩用于进一步纯化所生产的蛋白质。可以使用公知的方法例如聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和Western印迹分析,进一步分离和鉴定所表达的多肽。所分离的多肽可以用于生产异源多聚体蛋白质。

[0275] 在本发明的一个方面,通过发酵过程大量生产异源多聚体蛋白质(例如抗体)。可利用多种大规模分批补料发酵程序生产重组蛋白质。大规模发酵具有至少1000升的容量,优选约1,000至100,000升的容量。这些发酵罐使用搅拌叶轮来分配氧气和营养物质特别是葡萄糖(优选碳/能量源)。小规模发酵通常指在容量不超过约100升的发酵罐中进行的发酵,发酵罐可从约1升至约100升。

[0276] 在发酵过程中,典型地在细胞于合适的条件下生长至所需的密度(例如OD₅₅₀为约180-220,在该阶段,细胞处于稳定期早期)后,开始诱导蛋白质表达。根据所使用的载体构建体,可以使用多种诱导剂,如本领域已知的和上文所述的。细胞在诱导前可以生长较短的时间。通常诱导细胞约15-20小时,尽管也可以使用更长或更短的诱导时间。

[0277] 可以改变各种发酵条件来提高本发明多肽的生产产量和质量。例如,为了改善所分泌的异源多聚体蛋白(例如抗体)的正确组装和折叠,可以使用过量表达陪伴蛋白质的另外载体,共转化该宿主原核细胞,所述陪伴蛋白质例如Dsb蛋白质(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD和/或DsbG)或FkpA(具有陪伴分子活性的肽基脯氨酰基顺反异构酶)。陪伴蛋白已被证明促进细菌宿主细胞中产生的异源蛋白质的正确折叠和溶解性。Chen等(1999) J BioChem 274:19601-19605;Georgiou等,美国专利号6,083,715;Georgiou等,美国专利号6,027,888;Bothmann和Pluckthun(2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105;Ramm和Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113;Arie等(2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

[0278] 为了最大程度降低所表达的异源蛋白质(特别是那些对蛋白水解敏感的蛋白质)的蛋白水解,可以将某些蛋白水解酶缺陷的宿主菌株用于本发明。例如,可以对宿主细胞菌株进行改变,以在编码已知的细菌蛋白酶的基因中产生遗传突变,所述细菌蛋白酶例如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI以及它们的组合。一些大肠杆菌蛋白酶缺陷型菌株可以获得,描述于例如Joly等.(1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2773-2777;Georgiou等,美国专利号5,264,365;Georgiou等,美国专利号5,508,192;Hara等, Microbial Drug Resistance, 2:63-72(1996)中。

[0279] 在一个实施方案中,在本发明的表达系统中,使用转化了过量表达一种或多种陪伴蛋白质的质粒的、蛋白水解酶缺陷型大肠杆菌菌株作为宿主细胞。在第二实施方案中,大肠杆菌菌株缺乏外膜脂蛋白(Δ lpp)。

[0280] iii. 纯化异源多聚体蛋白质

[0281] 在一个实施方案中,对本文中生产的异源多聚体蛋白质进行进一步的纯化,以得到基本上同质的制品用于进一步的测定和使用。可以使用本领域已知的标准蛋白质纯化方法。以下程序是合适的纯化程序的实例:在免疫亲和柱或离子交换柱上分级分离、乙醇沉淀、反相 HPLC、在硅胶或阳离子交换树脂(例如 DEAE)上层析、色谱聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀和使用例如 Sephadex G-75 进行的凝胶过滤。

[0282] 在一个方面,使用固定在固相上的蛋白 A,对例如本发明的全长抗体产物进行免疫亲和纯化。蛋白 A 是来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的 41kD 细胞壁蛋白,其与抗体的 Fc 区高亲和性结合。Lindmark 等.(1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13。固定蛋白 A 的固相优选是包含玻璃或二氧化硅表面的柱子,更优选可控多孔玻璃柱或硅酸柱。在一些申请中,该柱包被了例如甘油等试剂,以防止污染物的非特异性粘附。

[0283] 纯化的第一步,将来自上述细胞培养物的制备物施加到固定有蛋白 A 的固相上,以允许目的抗体与蛋白 A 特异结合。然后洗涤固相,以除去与固相非特异结合的污染物。通过洗脱从固相上回收异源多聚体蛋白质(例如抗体)。

[0284] b. 使用真核宿主细胞产生异源多聚体蛋白质

[0285] 载体组分通常包括但不限于以下之一或多个:信号序列,复制起点,一个或多个标记基因,增强子元件,启动子和转录终止序列。

[0286] i. 信号序列组分

[0287] 用于在真核宿主细胞中使用的载体也可以在成熟的目的蛋白质或多肽的 N 末端包含信号序列、或具有特异性切割位点的其它多肽。所选择的异源信号序列优选是被宿主细胞识别和加工(即,被信号肽酶切割)的信号序列。在哺乳动物细胞表达中,可以利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌引导序列例如单纯疱疹 gD 信号。将编码这样的前体区的 DNA 在读框内与编码所需的异源多聚体蛋白质(例如抗体)的 DNA 连接。

[0288] ii. 复制起点

[0289] 通常,对于哺乳动物表达载体,复制起点组分不是必须的。例如,通常可以使用 SV40 起点,但仅仅是因为其包含早期启动子。

[0290] iii. 选择基因组分

[0291] 表达载体和克隆载体可以包含选择基因,也称为选择标记。典型的选择基因编码这样的蛋白质:(a) 其赋予对抗生素或其它毒素的抗性,所述抗生素或毒素例如氨苄青霉素、新霉素、氨甲蝶呤或四环素,(b) 弥补相关的营养缺陷,或(c) 提供从复杂培养基中不可得到的关键营养物。

[0292] 选择方案的一个实例是,利用药物来阻滞宿主细胞的生长。那些成功转化了异源基因的细胞可以产生赋予药物抗性的蛋白质,并因此在该选择方案中存活下来。这样的显性选择的实例为:使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0293] 用于哺乳动物细胞的合适选择标记的另一个实例是,能够鉴定有能力摄取抗体核酸的细胞的选择基因,例如 DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白 -I 和 -II、优选灵长类动物的金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0294] 例如,可以通过在包含 DHFR 的竞争性拮抗剂氨甲蝶呤 (Mtx) 的培养基中培养所有转化体,从而首先鉴定转化了 DHFR 选择基因的细胞。当使用野生型 DHFR 时,适当的宿主细

胞是缺乏 DHFR 活性的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系 (例如 ATCC CRL-9096)。

[0295] 可选地,转化或共转化了编码抗体、野生型 DHFR 蛋白质和另一个选择标记例如氨基糖苷-3'-磷酸转移酶 (APH) 的 DNA 序列的宿主细胞 (特别是包含内源 DHFR 的野生型宿主细胞),可以通过在包含针对选择标记例如氨基糖苷抗生素 (例如卡那霉素、新霉素或 G418) 的选择试剂的培养基中生长细胞,而进行选择。见例如,美国专利号 4,965,199。

[0296] iv. 启动子组分

[0297] 表达载体和克隆载体通常包含启动子,所述启动子被宿主生物体识别,并与目的含铰链的多肽 (例如抗体) 核酸有效连接。已知用于真核生物的启动子序列。几乎所有真核基因都具有富 AT 区域,该区域位于转录起始位点上游约 25 至 30 个碱基处。在许多基因的转录起始点上游 70 至 80 个碱基处发现的另一个序列是 CNCAAT 区,其中 N 可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的 3' 末端为 AATAAA 序列,该序列可能是用于向编码序列的 3' 末端添加多聚 A 尾巴的信号。所有这些序列都适于插入到真核表达载体中。

[0298] 可以通过例如启动子控制哺乳动物宿主细胞中期望的含铰链多肽 (例如抗体) 自载体的转录,所述启动子可以获自病毒基因组 (例如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒 (例如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒 40 (SV40))、来自异源的哺乳动物启动子 (例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子)、或来自热激启动子,条件是这样的启动子与宿主细胞系统相容。

[0299] SV40 病毒的早期和晚期启动子可以方便地作为 SV40 限制性片段获得,所述片段也包含 SV40 病毒复制起点。人巨细胞病毒的立即早期启动子可以方便地作为 HindIII E 限制性片段获得。使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达 DNA 的体系,描述于美国专利号 4,419,446 中。对该系统的改进描述于美国专利号 4,601,978 中。也见 Reyes 等, *Nature* 297:598-601 (1982), 述及在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下于小鼠细胞中表达人 β 干扰素 cDNA。可选地,可以使用劳氏肉瘤病毒长末端重复作为启动子。

[0300] v. 增强子元件组分

[0301] 可以通过向载体中插入增强子序列,增加高等真核生物中编码所需含铰链的多肽 (例如抗体) 的 DNA 的转录。已知许多来自哺乳动物基因 (例如珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素基因) 的增强子序列。也可以使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括在复制起点后侧 (bp100-270) 的 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、在复制起点后侧的多瘤病毒增强子、以及腺病毒增强子。也见 Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982), 关于用于增强真核启动子活性的元件的描述。只要可以达到增强作用,可以在抗体多肽编码序列的 5' 或 3' 位置将增强子拼接到载体中,但通常是在启动子的 5'。

[0302] vi. 转录终止组分

[0303] 在真核宿主细胞中使用的表达载体通常还包含终止转录和稳定 mRNA 所必需的序列。这样的序列通常可以从真核或病毒 DNAs 或 cDNAs 的 5' 和偶尔地 3' 的非翻译区得到。这些区域包含在编码抗体的 mRNA 的非翻译部分中转录为多聚腺苷酸化片段的核苷酸片段。一个有用的转录终止组分是牛生长激素多聚腺苷酸化区域。见 W094/11026 和本文中公开的表达载体。

[0304] vii. 宿主细胞的选择和转化

[0305] 在本文中用于克隆或表达载体中的 DNA 的合适宿主细胞,包括本文所描述的

高等真核细胞,包括脊椎动物宿主细胞。脊椎动物细胞在培养基中的繁殖(组织培养)已成为常规程序。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例有:转化有 SV40 的猴肾 CV1 株系(COS-7, ATCC CRL 1651);人胚肾株系(293 或经亚克隆在悬浮培养基中生长的 293 细胞, Graham 等, J. Gen Virol. 36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980));小鼠塞尔托利细胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);buffalo 大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳房瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI 细胞(Mather 等, Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982));MRC 5 细胞;FS4 细胞;和人肝细胞瘤系(Hep G2)。

[0306] 以上述用来生产所需含铰链的多肽(例如抗体)的表达或克隆载体转化宿主细胞,在常规营养培养基中培养宿主细胞,所述培养基经过修改以适合于诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因。

[0307] viii. 培养宿主细胞

[0308] 可以在多种培养基中培养用于生产所需的本发明含铰链的多肽(例如抗体)的宿主细胞。可商业获取的培养基例如 Ham's F10(Sigma)、极限基础培养基(Minimal Essential Medium)((MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)和 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基((DMEM), Sigma)适合于培养宿主细胞。此外,描述于 Ham 等, Meth. Enz. 58:44(1979), Barnes 等, Anal. Biochem. 102:255(1980), 美国专利号 4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;或 5,122,469;WO 90/03430;WO 87/00195;或美国专利 Re. 30,985 中的任何培养基,也可以用作宿主细胞的培养基。如果需要,可以在任何这些培养基中补充激素和/或其它生长因子(例如胰岛素、铁传递蛋白或表皮生长因子)、盐(例如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(例如 HEPES)、核苷酸(例如腺苷和胸苷)、抗生素(例如 GENTAMYCIN™ 药物)、微量元素(定义为通常以微摩尔终浓度存在的无机化合物),和葡萄糖或等效的能量源。也可以包括适当浓度的本领域技术人员已知的任何其它必需补充物。培养条件,例如温度、pH 等,可以是此前用于该所选的表达宿主细胞的条件下,其对于技术人员而言将是显而易见的。

[0309] ix. 纯化异源多聚体蛋白质

[0310] 当使用重组技术时,含铰链的多肽可以在细胞内产生,或直接分泌到培养基中。如果含铰链的多肽在细胞内产生,则第一步,通过例如离心和超滤,除去颗粒碎片(宿主细胞或裂解的碎片)。当含铰链的多肽分泌到培养基中时,通常首先使用可商业获取的蛋白质浓缩滤器例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤部件,浓缩来自这样的表达体系的上清液。可以在任何前述步骤中包括蛋白酶抑制剂例如 PMSF 以抑制蛋白水解,并可以包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0311] 可以使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和色谱,纯化从细胞制备的异源多聚体组合物,其中亲和色谱为优选纯化技术。蛋白 A 作为亲和配体的适合性取决于抗体中存在的免疫球蛋白 Fc 区的种类和同种型。可以使用蛋白 A 来纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark 等, J. Immunol. Meth. 62:1-13(1983))。对于所有小鼠同种型和对于

人 γ 3, 则推荐使用蛋白 G (Guss 等, EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖, 但也可以使用其它基质。机械稳定的基质例如可控多孔玻璃或聚(苯乙烯-二乙烯苯), 比琼脂糖, 允许更快的流速和更短的处理时间。当抗体包含 C_H3 区时, 可用 Bakerbond ABX™ 树脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) 进行纯化。根据待回收的抗体, 也可以利用其它蛋白质纯化技术, 例如离子交换柱分级分离、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅胶层析、肝素 SEPHAROSE™ 层析、阴离子或阳离子交换树脂 (例如聚天冬氨酸柱) 层析、色谱聚焦、SDS-PAGE、和硫酸铵沉淀。

[0312] 在任何初步纯化步骤后, 可以使用 pH 约 2.5 至 4.5 之间的洗脱缓冲液, 优选在低盐浓度 (例如约 0 至 0.25M 的盐) 下, 对包含目的抗体和污染物的混合物进行低 pH 疏水相互作用色谱。可选或此外 (对于任何上述具体方法), 异源多聚体蛋白质的生产可以包括对包含多肽的混合物的溶液进行透析。

[0313] x. 使用杆状病毒生产抗体

[0314] 可以通过使用例如 lipofectin (可从 GIBCO-BRL 商业获取), 将编码抗体或抗体片段的质粒与 BaculoGold™ 病毒 DNA (Pharmingen) 共转染到昆虫细胞例如草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞 (例如, Sf9 细胞; ATCC CRL 1711) 或果蝇 (*Drosophila melanogaster*) S2 细胞中, 构建重组杆状病毒。在一个特定的实例中, 将抗体序列融合到包含在杆状病毒表达载体中的表位标签的上游。这样的表位标签包括多聚 His 标签。可以使用多种质粒, 包括来自可商业获取的质粒, 例如 pVL1393 (Novagen) 或 pAcGP67B (Pharmingen)。简单地说, 编码抗体或其片段的序列可以用与 5' 和 3' 区互补的引物进行 PCR 扩增。5' 引物可以并入侧翼 (选择的) 限制性酶位点。然后可以以该选择的限制性酶消化产物, 并亚克隆到表达载体中。

[0315] 在以表达载体转染后, 将宿主细胞 (例如 Sf9 细胞) 在 28° C 培养 4-5 天, 收获所释放的病毒和用于进一步扩增。可以例如按照 O'Reilley 等 (Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual. Oxford: Oxford University Press (1994)) 所描述的, 进行病毒感染和蛋白质表达。

[0316] 然后, 可以通过例如以下的 Ni^{2+} -螯合亲和色谱, 纯化所表达的多聚 His 标签的抗体。可以如 Rupert 等 (Nature 362:175-179 (1993)) 所描述, 从重组病毒感染的 Sf9 细胞制备提取物。简单地说, 洗涤 Sf9 细胞, 重悬浮于超声缓冲液 (25mL HEPES pH 7.9; 12.5mM $MgCl_2$; 0.1mM EDTA; 10% 甘油; 0.1% NP-40; 0.4M KCl) 中, 在冰上超声两次 20 秒。通过离心澄清超声物, 将上清液在上样缓冲液 (50mM 磷酸盐; 300mM NaCl; 10% 甘油 pH 7.8) 中稀释 50 倍, 以 0.45 μ m 滤器过滤。制备 5mL 柱床体积的 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖柱 (可从 Qiagen 商业获取), 以 25mL 水洗涤, 以 25mL 上样缓冲液进行平衡。以每分钟 0.5mL 的速度将过滤的细胞提取物加载到柱上。以上样缓冲液洗涤柱至基线 A280, 在该点开始收集级分。接下来, 以第二洗涤缓冲液 (50mM 磷酸盐; 300mM NaCl; 10% 甘油 pH 6.0) 洗涤柱子, 以洗脱非特异性结合的蛋白质。在再次到达 A280 基线后, 以第二洗涤缓冲液中的 0 至 500mM 咪唑梯度, 洗脱柱子。收集 1mL 级分, 通过 SDS-PAGE 和银染、或以缀合了碱性磷酸酶的 Ni^{2+} -NTA (Qiagen) 进行的 Western 印迹, 实施分析。将包含洗脱的 His10 标签抗体的级分混合后对上样缓冲液透析。

[0317] 可选地, 可以使用已知的层析技术 (包括例如蛋白 A 或蛋白 G 柱层析) 进行抗体

纯化。在一个实施方案中,通过洗脱到包含离液剂或温和洗涤剂的溶液中,从柱子的固相回收目的抗体。示例性离液剂和温和洗涤剂包括但不限于,胍-HCl、尿素、高氯酸锂、精氨酸、组氨酸、SDS(十二烷基硫酸钠)、吐温(Tween)、Triton 和 NP-40,它们所有均可以从商业获取。

[0318] IV. 异源多聚体蛋白质的形成 / 组装

[0319] 完整的异源多聚体蛋白质的形成涉及第一和第二含铰链的多肽通过二硫键的形成而重新组装,在本发明中这被称为重折叠。重折叠包括第一含铰链的多肽与第二含铰链的多肽缔合和形成链间二硫键。在本发明中,在体外,不添加还原剂,进行重折叠(也称为复性)。

[0320] 可以使用上述方法,作为分开的培养物或作为单个培养物,培养宿主细胞。在一个方法中,第一宿主细胞和第二宿主细胞在相同的培养容器中培养(在本文中有时称为共培养或混合培养)。在另一个方法中,第一和第二宿主细胞在分开的培养容器中生长。在一个方法中,分别加工这些分开的培养物,然后将它们混合 / 组合,之后破坏细胞膜。在另一个方法中,将分开的培养物混合,然后进行加工,之后破坏细胞膜。在一个方法中,将分开的培养物混合但不进行进一步加工,之后破坏细胞膜。在一个方法中,加工包含第一和第二宿主细胞的单个培养物,之后破坏细胞膜。在另一个方法中,在破坏细胞膜之前不加工共培养的细胞。细胞的加工包括离心和在合适的缓冲液(例如提取缓冲液)中重悬浮。

[0321] 提取缓冲液在本领域已知,技术人员将能够确定使用哪种缓冲液而不需要进行过度的实验。

[0322] 使用本领域已知的方法,破坏宿主细胞膜。这样的方法包括细胞膜通透化和细胞膜解体。细胞膜通透化指,例如通过引入孔洞,使膜是“漏的”,而不破坏膜的整体完整性,这样细胞保持存活。换句话说,通透化使得大分子可以跨细胞膜移动,并充分地保持细胞结构以允许细胞继续生存。相比之下,细胞膜解体导致细胞内容物释放到细胞外环境中并导致细胞死亡。

[0323] 用于破坏细胞膜的方法包括但不限于酶裂解,超声,渗透压震扰,通过微流化装置,加入 EDTA,使用各种洗涤剂、溶剂(例如甲苯、二甲基亚砜等)、表面活性剂(例如 Triton-X 100、吐温 20 等)、低渗缓冲液,使用冻 / 融技术,电穿孔、和通过不锈钢球匀浆器。

[0324] 一旦含铰链的多肽从细胞中释放出来(通过通透化或解体),异源多聚化区域将驱使异源多聚体蛋白质的缔合。不需要添加还原剂,接着发生缔合的含铰链的多肽的链间二硫键形成。然后纯化所获得的二硫键连接的异源多聚体蛋白质。可选地,可以将其配制成制剂用于研究、诊断、治疗或其它目的。

[0325] V. 靶标分子

[0326] 可以作为本发明异源多聚体蛋白质的靶标的分子的实例包括但不限于,可溶性血清蛋白和它们的受体以及其它膜结合蛋白质(例如粘附素)。

[0327] 在另一个实施方案中,本发明的异源多聚体蛋白质能够结合一个、两个或两个以上细胞因子、细胞因子相关蛋白质和细胞因子受体,选自 BMP1、BMP2、BMP3B(GDF10)、BMP4、BMP6、BMP8、CSF1(M-CSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(G-CSF)、EPO、FGF1(aFGF)、FGF2(bFGF)、FGF3(int-2)、FGF4(HST)、FGF5、FGF6(HST-2)、FGF7(KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、

IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNB1、IFNG、IFNW1、FEL1、FEL1 (EPSELON)、FEL1 (ZETA)、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17B、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、PDGFA、PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、LTA (TNF-b)、LTB、TNF (TNF-a)、TNFSF4 (OX40 配体)、TNFSF5 (CD40 配体)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27 配体)、TNFSF8 (CD30 配体)、TNFSF9 (4-1BB 配体)、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (APO3L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF15 (VEGI)、TNFSF18、HGF (VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、IL1R1、IL1R2、IL1RL1、LL1RL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、IL1HY1、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、AIF1、HGF、LEP (瘦蛋白)、PTN 和 THPO。

[0328] 在另一个实施方案中,靶标分子是趋化因子、趋化因子受体或趋化因子相关蛋白质,选自 CCL1 (I-309)、CCL2 (MCP-1/MCAF)、CCL3 (MIP-Ia)、CCL4 (MIP-Ib)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (mcp-2)、CCLH (eotaxin)、CCL13 (MCP-4)、CCL15 (MIP-Id)、CCL16 (HCC-4)、CCL17 (TARC)、CCL18 (PARC)、CCL19 (MDP-3b)、CCL20 (MIP-3a)、CCL21 (SLC/exodus-2)、CCL22 (MDC/STC-I)、CCL23 (MPIF-1)、CCL24 (MPIF-2/eotaxin-2)、CCL25 (TECK)、CCL26 (eotaxin-3)、CCL27 (CTACK/ILC)、CCL28、CXCL1 (GR01)、CXCL2 (GR02)、CXCL3 (GR03)、CXCL5 (ENA-78)、CXCL6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG)、CXCL10 (IP 10)、CXCL11 (I-TAC)、CXCL12 (SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、PF4 (CXCL4)、PPBP (CXCL7)、CX3CL1 (SCYD1)、SCYE1、XCL1 (lymphotactin)、XCL2 (SCM-Ib)、BLR1 (MDR15)、CCBP2 (D6/JAB61)、CCR1 (CKR1/HM145)、CCR2 (mcp-1RB/RA)、CCR3 (CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5 (CMKBR5/ChemR13)、CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、CCR7 (CKR7/EBI1)、CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1)、CCR9 (GPR-9-6)、CCRL1 (VSHK1)、CCRL2 (L-CCR)、XCR1 (GPR5/CCXCR1)、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1)、CX3CR1 (V28)、CXCR4、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR81 (FKSG80)、CXCR3 (GPR9/CKR-L2)、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、HM74、IL8RA (IL8Ra)、IL8RB (IL8Rb)、LTB4R (GPR16)、TCP10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、BDNF、C5R1、CSF3、GRCC10 (C10)、EP0、FY (DARC)、GDF5、HDF1A、DL8、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SLIT2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2 和 VHL。

[0329] 在另一个实施方案中,本发明的异源多聚体蛋白质能够结合一个或多个选自以下的靶标:ABCF1;ACVR1;ACVR1B;ACVR2;ACVR2B;ACVRL1;ADORA2A;Aggrecan;AGR2;AICDA;AIF1;AIG1;AKAP1;AKAP2;AMH;AMHR2;ANGPT1;ANGPT2;ANGPTL3;ANGPTL4;ANPEP;APC;APOC1;AR;AZGP1 (锌-a-糖蛋白);B7.1;B7.2;BAD;BAFF (BLys);BAG1;BAI1;BCL2;BCL6;BDNF;BLNK;BLR1 (MDR15);BMP1;BMP2;BMP3B (GDF10);BMP4;BMP6;BMP8;BMPR1A;BMPR1B;BMPR2;BPAG1 (网蛋白);BRCA1;C19orf10 (IL27w);C3;C4A;C5;C5R1;CANT1;CASP1;CASP4;CAV1;CCBP2 (D6/JAB61);CCL1 (1-309);CCL11 (eotaxin);CCL13 (MCP-4);CCL15 (MIP-Id);CCL16 (HCC-4);CCL17 (TARC);CCL18 (PARC);CCL19 (MIP-3b);CCL2 (MCP-1);MCAF;CCL20 (MIP-3a);CCL21 (MTP-2);SLC;exodus-2;CCL22 (MDC/STC-I);CCL23 (MPIF-1);CCL24 (MPIF-2/eotaxin-2);CCL25 (TECK);CCL26 (eotaxin-3);

CCL27 (CTACK/ILC) ; CCL28 ; CCL3 (MTP-Ia) ; CCL4 (MDP-Ib) ; CCL5 (RANTES) ; CCL7 (MCP-3) ; CCL8 (mcp-2) ; CCNA1 ; CCNA2 ; CCND1 ; CCNE1 ; CCNE2 ; CCR1 (CKR1/HM145) ; CCR2 (mcp-1RB/RA) ; CCR3 (CKR3/CMKBR3) ; CCR4 ; CCR5 (CMKBR5/ChemR13) ; CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6) ; CCR7 (CKR7/EBI1) ; CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1) ; CCR9 (GPR-9-6) ; CCRL1 (VSHK1) ; CCRL2 (L-CCR) ; CD164 ; CD19 ; CD1C ; CD20 ; CD200 ; CD22 ; CD24 ; CD28 ; CD3 ; CD37 ; CD38 ; CD3E ; CD3G ; CD3Z ; CD4 ; CD40 ; CD40L ; CD44 ; CD45RB ; CD52 ; CD69 ; CD72 ; CD74 ; CD79A ; CD79B ; CD8 ; CD80 ; CD81 ; CD83 ; CD86 ; CDH1 (E- 钙粘蛋白) ; CDH10 ; CDH12 ; CDH13 ; CDH18 ; CDH19 ; CDH20 ; CDH5 ; CDH7 ; CDH8 ; CDH9 ; CDK2 ; CDK3 ; CDK4 ; CDK5 ; CDK6 ; CDK7 ; CDK9 ; CDKN1A (p21Wap1/Cip1) ; CDKN1B (p27Kip1) ; CDKN1C ; CDKN2A (P16INK4a) ; CDKN2B ; CDKN2C ; CDKN3 ; CEBPB ; CER1 ; CHGA ; CHGB ; 几丁质酶 ; CHST10 ; CKLFSF2 ; CKLFSF3 ; CKLFSF4 ; CKLFSF5 ; CKLFSF6 ; CKLFSF7 ; CKLFSF8 ; CLDN3 ; CLDN7 (密蛋白-7) ; CLN3 ; CLU (簇蛋白) ; CMKLR1 ; CMKOR1 (RDC1) ; CNR1 ; COL18A1 ; COL1A1 ; COL4A3 ; COL6A1 ; CR2 ; CRP ; CSF1 (M-CSF) ; CSF2 (GM-CSF) ; CSF3 (GCSF) ; CTLA4 ; CTNNB1 (b- 联蛋白) ; CTSB (组织蛋白酶 B) ; CX3CL1 (SCYD1) ; CX3CR1 (V28) ; CXCL1 (GR01) ; CXCL10 (IP-10) ; CXCL11 (I-TAC/IP-9) ; CXCL12 (SDF1) ; CXCL13 ; CXCL14 ; CXCL16 ; CXCL2 (GR02) ; CXCL3 (GR03) ; CXCL5 (ENA-78/LIX) ; CXCL6 (GCP-2) ; CXCL9 (MIG) ; CXCR3 (GPR9/CKR-L2) ; CXCR4 ; CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo) ; CYB5 ; CYC1 ; CYSLTR1 ; DAB2IP ; DES ; DKFZp451J0118 ; DNCL1 ; DPP4 ; E2F1 ; ECGF1 ; EDG1 ; EFNA1 ; EFNA3 ; EFNB2 ; EGF ; EGFR ; ELAC2 ; ENG ; ENO1 ; ENO2 ; ENO3 ; EPHB4 ; EPO ; ERBB2 (Her-2) ; EREG ; ERK8 ; ESR1 ; ESR2 ; F3 (TF) ; FADD ; FasL ; FASN ; FCER1A ; FCER2 ; FCGR3A ; FGF ; FGF1 (aFGF) ; FGF10 ; FGF11 ; FGF12 ; FGF12B ; FGF13 ; FGF14 ; FGF16 ; FGF17 ; FGF18 ; FGF19 ; FGF2 (bFGF) ; FGF20 ; FGF21 ; FGF22 ; FGF23 ; FGF3 (int-2) ; FGF4 (HST) ; FGF5 ; FGF6 (HST-2) ; FGF7 (KGF) ; FGF8 ; FGF9 ; FGFR3 ; FIGF (VEGFD) ; FEL1 (EPSILON) ; FIL1 (ZETA) ; FLJ12584 ; FLJ25530 ; FLRT1 (纤连蛋白) ; FLT1 ; FOS ; FOSL1 (FRA-I) ; FY (DARC) ; GABRP (GABAa) ; GAGEB1 ; GAGEC1 ; GALNAC4S-6ST ; GATA3 ; GDF5 ; GF11 ; GGT1 ; GM-CSF ; GNAS1 ; GNRH1 ; GPR2 (CCR10) ; GPR31 ; GPR44 ; GPR81 (FKSG80) ; GRCC10 (C10) ; GRP ; GSN (凝溶胶蛋白) ; GSTP1 ; HAVCR2 ; HDAC4 ; HDAC5 ; HDAC7A ; HDAC9 ; HGF ; HIF1A ; HDP1 ; 组胺和组胺受体 ; HLA-A ; HLA-DRA ; HM74 ; HMOX1 ; HUMCYT2A ; ICEBERG ; ICOSL ; ID2 ; IFN-a ; IFNA1 ; IFNA2 ; IFNA4 ; IFNA5 ; IFNA6 ; IFNA7 ; IFNB1 ; IFN γ ; IFNW1 ; IGBP1 ; IGF1 ; IGF1R ; IGF2 ; IGFBP2 ; IGFBP3 ; IGFBP6 ; IL-I ; IL10 ; IL10RA ; IL10RB ; IL11 ; IL11RA ; IL-12 ; IL12A ; IL12B ; IL12RB1 ; IL12RB2 ; IL13 ; IL13RA1 ; IL13RA2 ; IL14 ; IL15 ; IL15RA ; IL16 ; IL17 ; IL17B ; IL17C ; IL17R ; IL18 ; IL18BP ; IL18R1 ; IL18RAP ; IL19 ; IL1A ; IL1B ; IL1F10 ; IL1F5 ; IL1F6 ; IL1F7 ; IL1F8 ; IL1F9 ; IL1HY1 ; IL1R1 ; IL1R2 ; IL1RAP ; IL1RAPL1 ; IL1RAPL2 ; IL1RL1 ; IL1RL2 ; IL1RN ; IL2 ; IL20 ; IL20RA ; IL21R ; IL22 ; IL22R ; IL22RA2 ; IL23 ; IL24 ; IL25 ; IL26 ; IL27 ; IL28A ; IL28B ; IL29 ; IL2RA ; IL2RB ; IL2RG ; IL3 ; IL30 ; IL3RA ; IL4 ; IL4R ; IL5 ; IL5RA ; IL6 ; IL6R ; IL6ST (糖蛋白 130) ; EL7 ; EL7R ; EL8 ; IL8RA ; DL8RB ; IL8RB ; DL9 ; DL9R ; DLK ; INHA ; INHBA ; INSL3 ; INSL4 ; IRAK1 ; ERAK2 ; ITGA1 ; ITGA2 ; ITGA3 ; ITGA6 (a6 整联蛋白) ; ITGAV ; ITGB3 ; ITGB4 (b 4 整联蛋白) ; JAG1 ; JAK1 ; JAK3 ; JUN ; K6HF ; KAI1 ; KDR ; KITLG ; KLF5 (GC Box BP) ; KLF6 ; KLK10 ; KLK12 ; KLK13 ; KLK14 ; KLK15 ; KLK3 ; KLK4 ; KLK5 ; KLK6 ; KLK9 ; KRT1 ; KRT19 (角蛋白 19) ; KRT2A ; KHTHB6 (毛发特异类型 H 角蛋白) ; LAMAS ; LEP (瘦蛋白) ; Lingo-p75 ;

Lingo-Troy ;LPS ;LTA (TNF-b) ;LTB ;LTB4R (GPR16) ;LTB4R2 ;LTBR ;MACMARCKS ;MAG 或 Omgp ;MAP2K7 (c-Jun) ;MDK ;MIB1 ;midkine ;MEF ;MIP-2 ;MKI67 ;(Ki-67) ;MMP2 ;MMP9 ;MS4A1 ;MSMB ;MT3 (metallothionein-III) ;MTSS1 ;MUC1 (黏蛋白) ;MYC ;MYD88 ;NCK2 ;神经蛋白聚糖 ;NFKB1 ;NFKB2 ;NGFB (NGF) ;NGFR ;NgR-Lingo ;NgR-Nogo66 (Nogo) ;NgR-p75 ;NgR-Troy ;NME1 (NM23A) ;NOX5 ;NPPB ;NROB1 ;NROB2 ;NR1D1 ;NR1D2 ;NR1H2 ;NR1H3 ;NR1H4 ;NR1I2 ;NR1I3 ;NR2C1 ;NR2C2 ;NR2E1 ;NR2E3 ;NR2F1 ;NR2F2 ;NR2F6 ;NR3C1 ;NR3C2 ;NR4A1 ;NR4A2 ;NR4A3 ;NR5A1 ;NR5A2 ;NR6A1 ;NRP1 ;NRP2 ;NT5E ;NTN4 ;ODZ1 ;OPRD1 ;P2RX7 ;PAP ;PART1 ;PATE ;PAWR ;PCA3 ;PCNA ;PDGFA ;PDGFB ;PECAM1 ;PF4 (CXCL4) ;PGF ;PGR ;磷酸蛋白聚糖 (phosphacan) ;PIAS2 ;PIK3CG ;PLAU (uPA) ;PLG ;PLXDC1 ;PPBP (CXCL7) ;PPID ;PR1 ;PRKCQ ;PRKD1 ;PRL ;PROC ;PROK2 ;PSAP ;PSCA ;PTAFR ;PTEN ;PTGS2 (COX-2) ;PTN ;RAC2 (p21Rac2) ;RARB ;RGS1 ;RGS13 ;RGS3 ;RNFI10 (ZNF144) ;ROBO2 ;S100A2 ;SCGB1D2 (亲脂素 B) ;SCGB2A1 (mammaglobin 2) ;SCGB2A2 (mammaglobin 1) ;SCYE1 (内皮单核细胞活化细胞因子) ;SDF2 ;SERPINA1 ;SERPINA3 ;SERP1NB5 (乳腺丝抑蛋白) ;SERPINE1 (PAI-I) ;SERPDMF1 ;SHBG ;SLA2 ;SLC2A2 ;SLC33A1 ;SLC43A1 ;SLIT2 ;SPP1 ;SPRR1B (Spr1) ;ST6GAL1 ;STAB1 ;STAT6 ;STEAP ;STEAP2 ;TB4R2 ;TBX21 ;TCP10 ;TDGF1 ;TEK ;TGFA ;TGFB1 ;TGFB1I1 ;TGFB2 ;TGFB3 ;TGFB1 ;TGFB1R1 ;TGFB1R2 ;TGFB1R3 ;TH1L ;THBS1 (血小板反应蛋白-1) ;THBS2 ;THBS4 ;THP0 ;TIE (Tie-1) ;TMP3 ;组织因子 ;TLR10 ;TLR2 ;TLR3 ;TLR4 ;TLR5 ;TLR6 ;TLR7 ;TLR8 ;TLR9 ;TNF ;TNF-a ;TNFAEP2 (B94) ;TNFAIP3 ;TNFRSF11A ;TNFRSF1A ;TNFRSF1B ;TNFRSF21 ;TNFRSF5 ;TNFRSF6 (Fas) ;TNFRSF7 ;TNFRSF8 ;TNFRSF9 ;TNFSF10 (TRAIL) ;TNFSF11 (TRANCE) ;TNFSF12 (APO3L) ;TNFSF13 (April) ;TNFSF13B ;TNFSF14 (HVEM-L) ;TNFSF15 (VEGI) ;TNFSF18 ;TNFSF4 (OX40 配体) ;TNFSF5 (CD40 配体) ;TNFSF6 (FasL) ;TNFSF7 (CD27 配体) ;TNFSF8 (CD30 配体) ;TNFSF9 (4-1BB 配体) ;TOLLIP ;To11 样受体 ;TOP2A (拓扑异构酶 Ea) ;TP53 ;TPM1 ;TPM2 ;TRADD ;TRAF1 ;TRAF2 ;TRAF3 ;TRAF4 ;TRAF5 ;TRAF6 ;TREM1 ;TREM2 ;TRPC6 ;TSLP ;TWEAK ;VEGF ;VEGFB ;VEGFC ;多能聚糖 ;VHL C5 ;VLA-4 ;XCL1 (lymphotactin) ;XCL2 (S CM-Ib) ;XCR1 (GPR5/C CXCR1) ;YY1 ;和 ZFPM2。

[0330] 本发明涵盖的抗体的优选分子靶标分子包括 CD 蛋白,例如 CD3、CD4、CD8、CD16、CD19、CD20、CD34、CD64、CD200 ;ErbB 受体家族的成员例如 EGF 受体、HER2、HER3 或 HER4 受体 ;细胞粘附分子例如 LFA-1、Mac1、p150. 95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、 α 4/ β 7 整联蛋白、和 α v/ β 3 整联蛋白,包括其 α 或 β 亚基 (例如抗 CD11a、抗 CD18 或抗 CD11b 抗体) ;生长因子例如 VEGF-A、VEGF-C ;组织因子 (TF) ; α 干扰素 (α IFN) ;TNF α ,白细胞介素例如 IL-1 β 、IL-3、IL-4、IL-5、IL-8、IL-9、IL-13、IL17A/F、IL-18、IL-13R α 1、IL13R α 2、IL-4R、IL-5R、IL-9R, IgE ;血型抗原 ;f1k2/f1t3 受体 ;肥胖 (OB) 受体 ;mp1 受体 ;CTLA-4 ;RANKL, RANK, RSV F 蛋白,蛋白 C 等。

[0331] 在一个实施方案中,本发明的异源多聚体蛋白质结合低密度脂蛋白受体相关蛋白质 (LRP)-1 或 LRP-8 或铁传递蛋白受体,和至少一个选自以下的靶标:1) β 分泌酶 (BACE1 或 BACE2),2) α 分泌酶,3) γ 分泌酶,4) τ 分泌酶,5) 淀粉样蛋白前体蛋白 (APP),6) 死亡受体 6 (DR6),7) 淀粉样蛋白 β 肽,8) α 突触核蛋白,9) Parkin,10) Huntingtin,11) p75NTR 和 12) 胱天蛋白酶-6。

[0332] 在一个实施方案中,本发明的异源多聚体蛋白质与至少两个选自以下的靶标分子

结合:IL-1 α 和IL-1 β ,IL-12和IL-18;IL-13和IL-9;IL-13和IL-4;IL-13和IL-5;IL-5和IL-4;IL-13和IL-1 β ;IL-13和IL-25;IL-13和TARC;IL-13和MDC;IL-13和MEF;IL-13和TGF- β ;IL-13和LHR激动剂;IL-12和TWEAK,IL-13和CL25;IL-13和SPRR2a;IL-13和SPRR2b;IL-13和ADAM8,IL-13和PED2,IL17A和IL17F,CD3和CD19,CD138和CD20;CD138和CD40;CD19和CD20;CD20和CD3;CD38和CD138;CD38和CD20;CD38和CD40;CD40和CD20;CD-8和IL-6;CD20和BR3,TNF α 和TGF- β ,TNF α 和IL-1 β ;TNF α 和IL-2,TNF α 和IL-3,TNF α 和IL-4,TNF α 和IL-5,TNF α 和IL6,TNF α 和IL8,TNF α 和IL-9,TNF α 和IL-10,TNF α 和IL-11,TNF α 和IL-12,TNF α 和IL-13,TNF α 和IL-14,TNF α 和IL-15,TNF α 和IL-16,TNF α 和IL-17,TNF α 和IL-18,TNF α 和IL-19,TNF α 和IL-20,TNF α 和IL-23,TNF α 和IFN α ,TNF α 和CD4,TNF α 和VEGF,TNF α 和MIF,TNF α 和ICAM-1,TNF α 和PGE4,TNF α 和PEG2,TNF α 和RANK配体,TNF α 和Te38;TNF α 和BAFF;TNF α 和CD22;TNF α 和CTLA-4;TNF α 和GP130;TNF α 和IL-12p40;VEGF和HER2,VEGF-A和HER2,VEGF-A和PDGF,HER1和HER2,VEGF-A和VEGF-C,VEGF-C和VEGF-D,HER2和DR5,VEGF和IL-8,VEGF和MET,VEGFR和MET受体,VEGFR和EGFR,HER2和CD64,HER2和CD3,HER2和CD16,HER2和HER3;EGFR(HER1)和HER2,EGFR和HER3,EGFR和HER4,IL-13和CD40L,IL4和CD40L,TNFR1和IL-1R,TNFR1和IL-6R,和TNFR1和IL-18R,EpCAM和CD3,MAPG和CD28,EGFR和CD64,CSPGs和RGM A;CTLA-4和BTN02;IGF1和IGF2;IGF1/2和Erb2B;MAG和RGM A;NgR和RGM A;NogoA和RGM A;OMGp和RGM A;PDL-I和CTLA-4;以及RGM A和RGM B。

[0333] 可将可溶性抗原或其片段(可选与其它分子连接)用作免疫原来产生抗体。对于跨膜分子例如受体,可以将它们的片段(例如受体的胞外结构域)用作免疫原。可选地,可以将表达跨膜分子的细胞用作免疫原。这样的细胞可以来自天然来源(例如癌细胞系)或可以是通过重组技术进行了转化以表达跨膜分子的细胞。其它用于制备抗体的抗原及其形式对技术人员将是显而易见的。

[0334] VI. 活性测定试验

[0335] 可以通过多种本领域已知的测定试验,对本发明的异源多聚体蛋白质的物理/化学特性和生物学功能进行表征。

[0336] 可以通过一系列测定试验,对纯化的异源多聚体蛋白质进行进一步的表征,包括但不限于N末端测序、氨基酸分析、非变性大小排阻高压液相色谱(HPLC)、质谱、离子交换色谱和木瓜蛋白酶消化。

[0337] 在本发明的某些实施方案中,对本文中生产的免疫球蛋白的生物学活性进行分析。在一些实施方案中,测试本发明的免疫球蛋白的抗原结合活性。本领域已知和在本文中可以使用的抗原结合测定试验包括但不限于,使用例如western印迹、放射性免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“三明治”免疫测定、免疫沉淀测定、荧光免疫测定和蛋白A免疫测定等技术进行的任何直接或竞争性结合测定试验。

[0338] 在一个实施方案中,本发明涉及改变的抗体,其拥有部分而非全部效应子功能,这使其成为许多应用的理想候选,在这些应用中,虽然抗体的体内半衰期重要,但某些效应子功能(例如补体和ADCC)是不需要的或有害的。在某些实施方案中,测量所生产的异源多聚体蛋白质的Fc活性,以保证只保留了所需要的特性。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定,以确认CDC和/或ADCC活性的降低/丧失。例如,可以进行Fc受体(FcR)

结合测定,以保证异源多聚体蛋白质缺乏 Fc γ R 结合(由此可能缺乏 ADCC 活性),但保留了 FcRn 结合能力。介导 ADCC 的原代细胞, NK 细胞,仅表达 Fc γ RIII,然而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ R II 和 Fc γ RIII。FcR 在造血细胞上的表达概述于 Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991) 的第 464 页的表 3 中。评估目的分子的 ADCC 活性的体外测定试验的实例描述于美国专利号 5,500,362 或 5,821,337 中。用于这样的测定试验的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可选地或此外,可以在例如 Clynes 等, *PNAS(USA)* 95:652-656(1998) 中公开的动物模型中,对目的分子的 ADCC 活性进行体内评估。也可以进行 C1q 结合测定试验,确认抗体不能结合 C1q 和由此缺乏 CDC 活性。为了评估补体活化,可以进行例如 Gazzano-Santoro 等, *J. Immunol. Methods* 202:163(1996) 中描述的 CDC 测定试验。也可以使用本领域已知的方法,进行 FcRn 结合和体内清除/半衰期测定。

[0339] VII. 缀合蛋白质

[0340] 本发明还提供了缀合蛋白质例如缀合抗体或免疫缀合物(例如,“抗体-药物缀合物”或“ADC”),其包含本文中描述的任何异源多聚体蛋白质(例如根据本文中描述的方法制备的抗体),其中轻链或重链的一个恒定区与化学分子缀合,所述化学分子例如染料或细胞毒性剂例如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶学活性毒素,或其片段)、或放射性同位素(即,放射性缀合物)。特别是,如本文中所描述,异源多聚化区域的使用使得能够构建包含两个不同重链(HC1 和 HC2)以及两个不同轻链(LC1 和 LC2)的抗体。使用本文中描述的方法构建的免疫缀合物可以包含与仅重链之一(HC1 或 HC2)或仅轻链之一(LC1 或 LC2)的恒定区缀合的细胞毒性剂。此外,因为该免疫缀合物可以具有与仅一个重链或轻链连接的细胞毒性剂,故,施用给受试者的细胞毒性剂的量,与具有连接到两条重链或轻链的细胞毒性剂的抗体的施用相比,降低了。降低施用到受试者的细胞毒性剂的量,可以限制与细胞毒性剂相关的不良副作用。

[0341] 当未缀合的药物的全身性给药可能对正常细胞以及待寻求清除的肿瘤细胞导致不可接受的毒性水平时,使用抗体-药物缀合物局部递送细胞毒性或细胞抑制性试剂,即在癌症治疗中杀死或抑制肿瘤细胞的药物(Syrigos 和 Epenetos, *Anticancer Research* 19:605-614(1999); Niculescu-Duvaz 和 Springer, *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172(1997); 美国专利号 4,975,278)),可以允许将药物组分靶向递送到肿瘤并在其中进行细胞内积累(Baldwin 等, *Lancet* (Mar. 15, 1986):603-605(1986); Thorpe, (1985) “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,” 于 *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera 等(编辑),第 475-506 页中)。由此可以达到最大功效和最小毒性。多克隆抗体和单克隆抗体都已被报道用于这些策略中(Rowland 等, *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-187(1986))。用于这些方法中的药物包括阿霉素、柔红霉素、氮甲蝶呤和长春地辛(Rowland 等, (1986) 同上)。用于抗体-毒素缀合物中的毒素包括细菌毒素例如白喉毒素,植物毒素例如蓖麻毒素,小分子毒素例如格尔德霉素(Mandler 等, *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581(2000); Mandler 等, *Bioorganic and Med. Chem. Letters* 10:1025-1028(2000); Mandler 等, *Bioconjugate Chem.* 13:786-791(2002)),美登木素生物碱(maytansinoids)(EP 1391213; Liu 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623(1996)),和加利车霉素(calicheamicin)(Lode

等, CancerRes. 58:2928(1998);Hinman 等, Cancer Res. 53:3336-3342(1993))。这些毒素可以通过包括微管蛋白结合、DNA 结合或拓扑异构酶抑制的机制,发挥细胞毒性和抑制细胞的效应。当与大的抗体或蛋白质受体配体缀合时,一些细胞毒性药物倾向于失活或活性降低。

[0342] 本文描述了用于构建免疫缀合物的化疗剂(例如上文)。可以使用的酶学活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链,白喉毒素的非结合活性片段,外毒素 A 链(来自绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)),蓖麻毒素 A 链,相思豆毒素 A 链,塑莲根毒蛋白 A 链, α -帚曲霉素,油桐(*Aleurites fordii*)蛋白,香石竹毒蛋白,美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S),苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂,麻疯树毒蛋白,巴豆毒蛋白,肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂,多花白树毒蛋白(gelonin),mitogellin,局限曲菌素,酚霉素,依诺霉素和单端孢霉烯类(tricothecenes)。见例如 WO 93/21232,1993 年 10 月 28 日公布。多种放射性核素可用于制备放射性缀合抗体。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。可以使用多种双官能蛋白质偶联试剂制备抗体和细胞毒性剂的缀合物,所述双官能蛋白质偶联剂例如 3-(2-吡啶二硫基)丙酸 N-琥珀酰亚胺酯(SPDP),亚氨基硫杂环戊烷(iminothiolane)(IT),亚氨酸酯的双官能衍生物(例如己二酰亚胺酸二甲酯 HCl),活性酯(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯),醛类(例如戊二醛),双叠氮化合物(例如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺),双重氮衍生物(例如双(对重氮苯甲酰基)乙二胺),二异氰酸酯(例如甲苯-2,6-二异氰酸酯),和双活性氟化合物(例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如 Vitetta 等, Science238:1098(1987) 中描述,制备蓖麻毒素免疫毒素。碳 14 标记的 1-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于放射性核酸与抗体缀合的示例性螯合剂。见例如 WO94/11026。

[0343] 本文也涉及抗体与一个或多个小分子毒素的缀合物,所述小分子毒素例如加利车霉素、美登木素生物碱、多拉司他汀、aurostatins、单端孢霉烯,和 CC1065,以及这些毒素的具有毒素活性的衍生物。

[0344] i. 美登素和美登木素生物碱

[0345] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含本发明的抗体(全长或片段)与一个或多个美登木素生物碱分子缀合。

[0346] 美登木素生物碱是有丝分裂抑制剂,其通过抑制微管蛋白聚合而起作用。美登素最先从东非灌木齿叶美登木(*Maytenus serrata*)中分离出来(美国专利号 3,896,111)。随后,发现某些微生物也产生美登木素生物碱,例如美登木醇和 C-3 美登木醇酯(美国专利号 4,151,042)。合成的美登木醇及其衍生物和类似物公开于例如美国专利号 4,137,230;4,248,870;4,256,746;4,260,608;4,265,814;4,294,757;4,307,016;4,308,268;4,308,269;4,309,428;4,313,946;4,315,929;4,317,821;4,322,348;4,331,598;4,361,650;4,364,866;4,424,219;4,450,254;4,362,663;和 4,371,533 中。

[0347] 美登木素生物碱药物组分是抗体药物缀合物中具有吸引力的药物组分,因为它们:(i) 通过发酵或对发酵产物进行化学修饰、衍生而相对容易制备,(ii) 易于被适用于通过非二硫键与抗体缀合的官能基团衍生化,(iii) 在血浆中稳定,和(iv) 对多种肿瘤细胞系有效。

[0348] 包含美登木素生物碱的免疫缀合物、其制备方法和它们的治疗用途公开于例如美

国专利号 5,208,020、5,416,064 和欧洲专利 EP 0425235B1 中,其公开内容通过参考引入明确并入本文。Liu 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) 描述了抗人结肠直肠癌的免疫缀合物,其包含与单克隆抗体 C242 连接的、被称为 DM1 的美登木素生物碱。发现该缀合物对培养的结肠癌细胞具有高度细胞毒性,并在体内肿瘤生长测定试验中显示出抗肿瘤活性。Chari 等,Cancer Research 52:127-131 (1992) 描述了美登木素生物碱通过二硫键接头与鼠抗体 A7 或与另一个鼠单克隆抗体 TA.1 缀合的免疫缀合物,所述鼠抗体 A7 与人结肠癌细胞系上的抗原结合,所述鼠单克隆抗体 TA.1 与 HER-2/neu 致癌基因结合。在人乳房癌细胞系 SK-BR-3 上对 TA.1-美登木素生物碱缀合物的细胞毒性进行了体外测试,所述人乳房癌细胞系每个细胞表达 3×10^5 个 HER-2 表面抗原。该药物缀合物达到了与游离美登木素生物碱药物类似的细胞毒性程度,所述细胞毒性程度可以通过增加每抗体分子的美登木素生物碱分子的数量来增加。A7-美登木素生物碱缀合物在小鼠中显示出低的全身性细胞毒性。

[0349] 可以通过化学连接抗体与美登木素生物碱分子而不显著降低抗体或美登木素生物碱分子的生物学活性,以制备抗体-美登木素生物碱缀合物。见例如,美国专利号 5,208,020 (由此通过参考引用的方式将其公开内容明确并入本文)。每抗体分子缀合平均 3-4 个美登木素生物碱分子,已经显示出在增强对靶标细胞的细胞毒性方面的功效而不负面影响抗体的功能或可溶性,但即使一个分子的毒素/抗体也预期会增强细胞毒性,超过使用裸抗体。美登木素生物碱在本领域公知,其可以通过已知的技术进行合成或从天然来源中分离。合适的美登木素生物碱公开于例如美国专利号 5,208,020 中和上文提及的其它专利和非专利出版物中。优选的美登木素生物碱是美登木醇和在美登木醇分子的芳香环或其它位置上经过修饰的美登木醇类似物,例如各种美登木醇酯。

[0350] 本领域已知许多连接基团可以用于制备抗体-美登木素生物碱缀合物,包括例如那些于美国专利号 5,208,020 或 EP 专利 0425235B1、Chari 等,Cancer Research 52:127-131 (1992) 和美国专利申请公布号 2005/0169933 中公开的连接基团,由此通过参考引用的方式将这些出版物的公开内容明确并入本文。可以按美国专利申请公布号 2005/0169933 中的公开内容,制备包含接头组分 SMCC 的抗体-美登木素生物碱缀合物。如上述专利中公开的,连接基团包括二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团、或酯酶不稳定基团,优选二硫化物和硫醚基团。本文中描述和例示了另外的连接基团。

[0351] 可使用多种双官能蛋白质偶联试剂制备抗体和美登木素生物碱的缀合物,所述双官能蛋白质偶联试剂例如 3-(2-吡啶二硫基)丙酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPDP),4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯 (SMCC),亚氨基硫杂环戊烷 (iminothiolane) (IT),亚氨酸酯的双官能衍生物 (例如己二酰亚胺酸二甲酯 HCl),活性酯 (例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯),醛类 (例如戊二醛),双叠氮化合物 (例如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺),双重氮衍生物 (例如双(对重氮苯甲酰基)乙二胺),二异氰酸酯 (例如甲苯-2,6-二异氰酸酯),和双活性氟化合物 (例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。特别优选的偶联试剂包括 3-(2-吡啶二硫基)丙酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPDP) (Carlsson 等,Biochem. J. 173:723-737 (1978)) 和 4-(2-吡啶硫基)戊酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPP),以提供二硫化物连接。

[0352] 取决于接头的类型,可以将接头连接在美登木素生物碱分子的多个位置。例如,可以通过使用常规偶联技术,与羟基反应形成酯键。该反应可以发生在具有羟基的 C-3 位、以羟甲基修饰的 C-14 位、以羟基修饰的 C-15 位、和具有羟基的 C-20 位。在优选的实施方案中,在美登木醇或美登木醇类似物的 C-3 位形成连接。

[0353] ii. Auristatins 和海兔毒素 (dolastatins)

[0354] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含本发明的抗体,所述抗体缀合到海兔毒素或 dolostatin 肽类似物和衍生物,auristatins(美国专利号 5,635,483 和 5,780,588)。已发现,海兔毒素和 auristatins 干扰微管动力学、GTP 水解及核与细胞分裂 (Woyke 等, *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584(2001)) 并具有抗癌 (美国专利号 5,663,149) 和抗真菌活性 (Pettit 等, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965(1998))。海兔毒素或 auristatin 药物组分可以通过该肽药物组分的 N(氨基)端或 C(羧基)端与抗体连接 (WO 02/088172)。

[0355] 示例性 auristatin 实施方案包括 N 末端连接的单甲基 auristatin 药物组分 DE 和 DF,其公开于“Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands,”美国申请公布号 2005/0238649 中,就其全部内容通过参考引用的方式明确并入本文。

[0356] 典型地,可以通过在两个或更多个氨基酸和 / 或肽片段之间形成肽键来制备基于肽的药物组分。可以例如根据在肽化学领域公知的液相合成方法 (见 E. **Schröder** 和 K. Lübke, “The Peptides,” 第 1 卷,第 76-136 页,1965,Academic Press), 生成这样的肽键。可以根据美国专利号 5,635,483 和 5,780,588; Pettit 等, *J. Nat. Prod.* 44:482-485(1981); Pettit 等, *Anti-Cancer Drug Design* 13:47-66(1998); Poncet, *Curr. Pharm. Des.* 5:139-162(1999); 和 Pettit, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 70:1-79(1997) 中的方法,制备 auristatins/ 海兔毒素药物组分。也见 Doronina, *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784(2003); 和“Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands,”美国申请公布号 2005/0238649,特此就其全部内容通过参考引用的方式并入本文 (其公开,例如制备与接头缀合的单甲基缬氨酸化合物例如 MMAE 和 MMAF 的接头和方法)。

[0357] iii. 加利车霉素 (Calicheamicin)

[0358] 在其它实施方案中,免疫缀合物包含本发明的抗体与一个或多个加利车霉素分子的缀合。加利车霉素家族的抗生素能够在亚皮摩尔浓度下产生双链 DNA 断裂。关于加利车霉素家族的缀合物的制备,见美国专利号 5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001 和 5,877,296 (均属于 American Cyanamid Company)。可以使用的加利车霉素的结构类似物包括但不限于 γ 1^I、 α 2^I、 α 3^I、N-乙酰- γ 1^I、PSAG 和 θ 1^I (Hinman 等, *Cancer Research* 53:3336-3342(1993), Lode 等, *Cancer Research* 58:2925-2928(1998) 和上述 American Cyanamid 的美国专利)。另一个可以和抗体缀合的抗肿瘤药物是 QFA,其是抗叶酸剂。加利车霉素和 QFA 都具有细胞内作用位点和不容易穿过质膜。因此,细胞通过抗体介导的内化作用对这些药物的吸收大大地增强了它们的细胞毒性效应。

[0359] iv. 其它细胞毒性剂

[0360] 其它能够与本发明的或根据本文中描述的方法制备的抗体缀合的抗肿瘤剂包括

BCNU、链脲菌素 (streptozocin)、长春花新碱和 5- 氟尿嘧啶, 美国专利号 5, 053, 394 和 5, 770, 710 中描述的统称为 LL-E33288 复合物的药物家族, 以及 esperamicins (美国专利号 5, 877, 296)。

[0361] 可以使用的酶学活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链, 白喉毒素的非结合活性片段, 外毒素 A 链 (来自绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)), 蓖麻毒素 A 链, 相思豆毒素 A 链, 塑莲根毒蛋白 A 链, α - 帚曲霉素, 油桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白, 香石竹毒蛋白, 美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S), 苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制剂, 麻疯树毒蛋白, 巴豆毒蛋白, 肥皂草 (*Saponaire officinalis*) 抑制剂, 多花白树毒蛋白 (gelonin), mitogellin, 局限曲菌素, 酚霉素, 依诺霉素和单端孢霉烯类 (trichothecenes) (见例如, WO 93/21232, 1993 年 10 月 28 日公布)。

[0362] 本发明还涉及在抗体和具有细胞核溶解活性的化合物 (例如, 核糖核酸酶或 DNA 核酸内切酶例如脱氧核糖核酸酶; DNase) 之间形成的免疫缀合物。

[0363] 为了选择性破坏肿瘤, 抗体可以包含高放射性原子。多种放射性同位素可用于制备放射性缀合的抗体。实例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和 Lu 的放射性同位素。当缀合物用于检测时, 其可以包含用于闪烁照相研究的放射性原子, 例如 Tc^{99m} 或 I^{123} , 或自旋标记用于核磁共振 (NMR) 成像 (也称为磁共振成像, MRI), 例如碘 123、碘 131、碘 111、氟 19、碳 13、氮 15、氧 17、钆、锰或铁。

[0364] 可以通过已知的方法将放射性或其它标记物掺入到缀合物中。例如, 可以使用包括例如以氟 19 置换了氢的合适氨基酸前体, 通过生物合成或通过氨基酸化学合成, 以合成肽。可以通过肽中的半胱氨酸残基来连接例如 Tc^{99m} 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 和 In^{111} 等标记。可以通过赖氨酸残基连接钪 90。可以使用 IODOGEN 方法 (Fraker 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57 (1978)) 来掺入碘 123。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy” (Chatal, CRC Press 1989) 中详细描述了其它方法。

[0365] 可是使用多种双官能蛋白质偶联剂制备抗体和细胞毒性剂的缀合物, 所述双官能蛋白质偶联剂例如 3-(2- 吡啶二硫基) 丙酸 N- 琥珀酰亚胺酯 (SPDP), 4-(N- 马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1- 羧酸琥珀酰亚胺酯 (SMCC), 亚氨基硫杂环戊烷 (iminothiolane) (IT), 亚氨酸酯的双官能衍生物 (例如己二酰亚胺酸二甲酯 HCl), 活性酯 (例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯), 醛类 (例如戊二醛), 双叠氮化合物 (例如双 (对叠氮基苯甲酰基) 己二胺), 双重氮衍生物 (例如双 (对重氮苯甲酰基) 乙二胺), 二异氰酸酯 (例如甲苯-2, 6- 二异氰酸酯), 和双活性氟化合物 (例如 1, 5- 二氟-2, 4- 二硝基苯)。例如, 可以按 Vitetta 等, Science 238:1098 (1987) 中的描述, 制备蓖麻毒素免疫毒素。碳 14 标记的 1- 异硫氰基苄基-3- 甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于放射性核酸与抗体缀合的示例性螯合剂。见例如 WO94/11026。接头可以是“可切割的接头”, 从而利于细胞毒性药物在细胞中释放。例如, 可以使用酸不稳定接头、肽酶敏感性接头、光不稳定接头、二甲基接头或包含二硫键的接头 (Chari 等, Cancer Research 52:127-131 (1992); 美国专利号 5, 208, 020)。

[0366] 本发明的化合物明确包括但不限于以交联试剂制备的 ADC, 所述交联剂为: BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC、和磺基-SMPB、和 SVSB (琥珀酰亚胺基-(4- 乙烯基苄基) 苯甲酸酯), 它们可以商业获取 (例如从 Pierce Biotechnology, Inc.,

Rockford, IL., 美国)。见第 467-498 页, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog。

[0367] v. 缀合抗体的制备

[0368] 在本发明的缀合抗体中, 抗体, 可选地通过接头, 与一个或多个组分 (例如药物组分) 缀合, 例如每个抗体约 1 至约 20 个组分。可以使用本领域技术人员已知的有机化学反应、条件和试剂, 通过几个途径制备缀合抗体, 包括: (1) 抗体的亲核基团与双价接头试剂通过共价键反应, 随后与目的组分反应; 和 (2) 组分的亲核基团与双共价接头试剂通过共价键反应, 随后与抗体的亲核基团反应。本文中描述了用于制备缀合抗体的其它方法。

[0369] 接头试剂可以由一个或多个接头组分组成。示例性接头组分包括 6-马来酰亚氨基己酰基 (“MC”)、马来酰亚氨基丙酰基 (“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸 (“val-cit”)、丙氨酸-苯丙氨酸 (“ala-phe”)、对氨基苄氧羰基 (“PAB”)、N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶硫基) 戊酸酯 (“SPP”)、4-(N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-羧酸 N-琥珀酰亚胺酯 (“SMCC”) 和 N-琥珀酰亚氨基 (4-碘-乙酰基) 氨基苯甲酸酯 (“SIAB”)。本领域已知其它接头组分, 其中一些在本文中描述。也见 “Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands,” 美国申请公布号 2005/0238649, 特此就其全部内容通过参考引用的方式并入本文。

[0370] 在一些实施方案中, 接头可以包含氨基酸残基。示例性氨基酸接头组分包括二肽、三肽、四肽或五肽。示例性二肽包括: 缬氨酸-瓜氨酸 (vc 或 val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸 (af 或 ala-phe)。示例性三肽包括: 甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸 (gly-val-cit) 和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸 (gly-gly-gly)。组成氨基酸接头组分的氨基酸残基包括天然存在的氨基酸, 以及次要氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物, 例如瓜氨酸。可以设计氨基酸接头组分, 优化其对特定酶的酶学切割的敏感性, 所述酶例如肿瘤相关蛋白酶、组织蛋白酶 B、C 和 D, 或纤维蛋白溶酶蛋白酶。

[0371] 抗体上的亲核基团包括但不限于: (i) N 末端胺基团, (ii) 侧链胺基团, 例如赖氨酸, (iii) 侧链硫醇基团, 例如半胱氨酸, 和 (iv) 在抗体被糖基化时糖羟基或氨基。胺、硫醇和羟基基团是亲核的, 它们能够与接头组分和接头试剂上的亲电子基团反应形成共价键, 所述亲电子基团包括: (i) 活性酯例如 NHS 酯、HOBt 酯、卤代甲酸酯和酰基卤; (ii) 烷基和苄基卤, 例如卤代乙酰胺, (iii) 醛、酮、羧基和马来酰亚胺基团。某些抗体具有可还原链间二硫键, 即半胱氨酸桥。可以通过以还原剂例如 DTT (二硫苏糖醇) 处理, 使抗体具有反应性, 用于与接头试剂缀合。理论上, 每个半胱氨酸桥将因此形成两个反应性硫醇亲核体。可以通过赖氨酸与 2-亚氨基硫杂环戊烷 (Traut 试剂) 反应导致胺转化为硫醇, 向抗体中引入另外的亲核基团。可以通过引入 1 个、2 个、3 个、4 个或更多半胱氨酸残基, 将反应性硫醇基团引入到抗体 (或其片段) 中 (例如, 制备包含一个或多个非原生的半胱氨酸氨基酸残基的突变抗体)。

[0372] 也可以通过对抗体进行修饰, 以引入能够与接头试剂或药物或其它组分上的亲核取代基进行反应的亲电子组分, 而产生本发明的缀合抗体。可以以例如高碘酸盐氧化试剂, 氧化糖基化抗体的糖, 以形成可以与接头试剂或药物或其它组分上的胺基反应的醛或酮基。所产生的亚胺席夫碱基团可以形成稳定的键, 或可以被例如硼氢化物试剂还原而形成稳定的胺连接。在一个实施方案中, 糖基化抗体的碳水化合物部分与乳糖氧化酶或偏高碘酸钠反应, 可以在蛋白质中产生羰基 (醛和酮) 基, 所述羰基能够与药物或其它组分上合适的

基团反应 (Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一个实施方案中,包含 N 末端丝氨酸或苏氨酸残基的蛋白质能够与偏高碘酸钠反应,导致产生醛以代替该第一个氨基酸 (Geoghegan 和 Stroh, Bioconjugate Chem. 3:138-146 (1992); 美国专利号 5,362,852)。这样的醛可以与药物组分或接头亲核体反应。

[0373] 同样,组分(例如药物组分)上的亲核基团包括但不限于:胺、硫醇、羟基、酰肼、肟、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯、芳基酰肼基团,它们能够与接头组分和接头试剂上的亲电子基团反应形成共价键,所述亲电子基团包括:(i) 活性酯例如 NHS 酯、HOBt 酯、卤代甲酸酯和酰基卤;(ii) 烷基和苄基卤例如卤代乙酰胺;和 (iii) 醛、酮、羧基和马来酰亚胺基团。

[0374] 可选地,可以例如通过重组技术或肽合成,制备包含抗体和细胞毒性剂的融合蛋白质。DNA 的长度可以包含编码缀合物的两个部分的相应区域,这些区域互相紧邻或被编码接头肽的区域分开,所述接头肽不破坏缀合物的所需特性。在另一个实施方案中,抗体可以与“受体”(例如链霉亲和素)缀合,用于肿瘤前靶向,其中将抗体-受体缀合物施用给个体,随后使用清除剂从血液循环中清除未结合的缀合物,然后施用与细胞毒性剂(例如放射性核苷酸)缀合的“配体”(例如抗生物素蛋白)。

[0375] VIII. 实用性

[0376] 本文中提供的本发明方法在异源多聚体蛋白质的生产上具有工业实用性。本发明方法降低了涉及两个分开发酵和分离的工作量,以及两个分开发酵固有的技术困难。此外,摒弃此前方法程序中的退火和氧化还原步骤能够增加产量和降低工艺的复杂性及成本。

[0377] 本文中描述的异源多聚体蛋白质可用于例如体外、离体和体内治疗方法中。本发明提供了多种基于使用一个或多个这样的分子的方法。在某些病理条件下,需要和/或期望利用异源多聚体蛋白质例如多特异性抗体。本发明提供了这些异源多聚体蛋白质,其可以用于多种用途,例如用作治疗、预防和诊断剂。例如,本发明提供了治疗疾病的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者施用本发明的异源多聚体蛋白质,以此治疗疾病。本文描述的本发明的任何异源多聚体蛋白质均可以用于本文描述的治疗(或预防或诊断)方法中。

[0378] 例如,当异源多聚体蛋白质是多价的时,一个有用的优势是它们对其抗原的增强亲和性(avidity)。除了在结合单元(即 Fab)上对抗原具有内在的高亲和力外,正常 IgG 抗体也可以由于它们对靶标的二价结合,而利用亲和性效应来增加它们与抗原的结合。

[0379] 抗相同抗原分子上的两个分开表位的异源多聚体蛋白质可以不仅提供增强的结合亲和性的优势(因为双价结合),而且也可以获得与亲本抗体之任一无关的新特性。由此,本发明的异源多聚体蛋白质可用于例如封闭受体-配体相互作用。

[0380] 本文中描述的异源多聚体蛋白质也可用于以一个分子同时阻断两个靶标的信号途径。

[0381] IX. 治疗用途

[0382] 本文中描述的异源多聚体蛋白质例如抗体和抗体片段(例如,根据本文中描述的方法制备的抗体和/或其片段)可以用于治疗用途。例如,这样的异源多聚体蛋白质可用于治疗肿瘤,包括癌前的、非转移性的、转移性的和癌性肿瘤(例如,早期癌),用于治疗变应性或炎症性失调,或用于治疗自身免疫疾病,或用于治疗有罹患癌(例如乳房癌、结肠直肠癌、肺癌、肾细胞癌、神经胶质瘤或卵巢癌)、变应性或炎症性失调或自身免疫疾病风险的受试者。

[0383] 术语癌症包括许多增生性失调,包括但不限于癌前生长、良性肿瘤和恶性肿瘤。良性肿瘤保持在其起源位置上,其不具有浸润、侵入或转移到远处的能力。恶性肿瘤将侵入和破坏其周围的其它组织。它们也可以获得脱离其起始位置和(通常通过血流或通过淋巴结所在的淋巴系统)扩散到身体其它部位(转移)的能力。原发性肿瘤按它们产生自的组织类型进行分类;转移性肿瘤按癌细胞源自的组织类型进行分类。随时间推移,恶性肿瘤的细胞会变得更加异常和更不像正常的细胞。癌细胞这种外观上的改变称为肿瘤分级,将癌细胞描述为高度分化的、中度分化的、低度分化的或未分化的。高度分化的细胞具有完全正常的外观和类似于其起源的正常细胞。未分化的细胞是这样的细胞,其已经变得如此异常以致于不再可能确定这些细胞的起源。

[0384] 肿瘤可以是实体瘤或非实体或软组织瘤。软组织瘤的实例包括白血病(例如,慢性髓性白血病、急性髓性白血、成人急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、成熟B细胞型急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、幼淋巴细胞白血病或多毛细胞白血病),或淋巴瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金病)。实体瘤包括除了血液、骨髓或淋巴系统以外的身体组织的任何癌症。实体瘤可进一步分为上皮细胞起源的和非上皮细胞起源的实体瘤。上皮细胞实体瘤的实例包括胃肠道、结肠、乳房、前列腺、肺、肾脏、肝脏、胰腺、卵巢、头和颈、口腔、胃、十二指肠、小肠、大肠、肛门、胆囊、阴唇、鼻咽、皮肤、子宫、雄性生殖器、泌尿器官、膀胱、和皮肤的肿瘤。非上皮起源的实体瘤包括肉瘤、脑瘤、和骨肿瘤。

[0385] 上皮癌通常从良性肿瘤演化至侵袭前阶段(例如原位癌)、至恶性癌,恶性癌已经穿透基底膜和侵入了上皮下基质中。

[0386] 多特异性蛋白质复合物也可用于这些治疗应用中,结合HER2的抗体尤其可以用于治疗乳房癌、结肠直肠癌、肺癌、肾细胞癌、神经胶质瘤或卵巢癌。

[0387] 可以作为本发明组合物的候选接受者的其它受试者患有或有风险罹患以下疾病: 维管组织异常增殖、酒糟鼻、获得性免疫缺损综合征、动脉闭塞、特应性角膜炎、细菌溃疡、Bechets病、血源性肿瘤、颈动脉阻塞性疾病、脉络膜新生血管形成、慢性炎症、慢性视网膜脱离、慢性葡萄膜炎、慢性玻璃体炎、隐形眼镜超戴症、角膜移植片排斥、角膜新生血管形成、角膜移植新生血管形成、Crohn's病、Eales病、流行性角膜结膜炎、真菌溃疡、单纯疱疹感染、带状疱疹感染、高黏滞综合征、Kaposi's肉瘤、白血病、脂质退化、Lyme's病、边缘角质层分离症、角膜蚕蚀性溃疡、除麻风病外的分枝杆菌感染、近视、新生血管性眼病、视盘小凹(optic pit)、Osler-Weber综合征(Osler-Weber-Rendu)、骨关节炎、Paget's病、平坦部炎、类天疱疮、phlyctenulosis、多动脉炎、激光术后并发症、原生动物感染、弹性假黄瘤、翼状胬肉干燥性角膜炎、角膜放射状切开术、视网膜新生血管形成、早产儿视网膜病、晶状体后纤维组织形成、肉样瘤、巩膜炎、镰状细胞性贫血、Sogren's综合征、实体瘤、Stargart's病、Steven's Johnson病、上方角膜缘角膜炎(superior limbic keratitis)、梅毒、全身性红斑狼疮、Terrien角膜边缘性变性(Terriens Marginal Degeneration)、弓形虫病(Toxoplasmosis)、尤因肉瘤肿瘤、神经母细胞瘤肿瘤、骨肉瘤肿瘤、视网膜母细胞瘤肿瘤、横纹肌肉瘤肿瘤、溃疡性结肠炎、静脉阻塞、维生素A缺乏病、Wegener结节病、与糖尿病相关的不期望的血管发生、寄生虫病、异常伤口愈合、术后肥大、损伤或创伤(例如急性肺损伤/ARDS)、毛发生长抑制、排卵和黄体形成的抑制、植入抑制、和胚胎在子宫中发育的抑制。

[0388] 可以使用根据本文中描述的方法制备的抗体治疗的变应性或炎症性失调或自身免疫性疾病或紊乱的实例包括但不限于, 关节炎 (类风湿性关节炎, 例如急性关节炎、慢性类风湿性关节炎、痛风性关节炎、急性痛风性关节炎、慢性炎症性关节炎、退行性关节炎、感染性关节炎、莱姆关节炎、增生性关节炎、银屑病关节炎、脊椎关节炎、和少年发病类风湿性关节炎、骨关节炎、慢性进行性关节炎、关节炎畸形、原发性慢性多关节炎、反应性关节炎和强直性脊柱炎), 炎性过度增生性皮肤病, 银屑病例如斑块状银屑病、滴状银屑病、脓疱性银屑病和指甲银屑病, 皮炎包括接触性皮炎、慢性接触性皮炎、变应性皮炎、变应性接触性皮炎、疱疹样皮炎和特应性皮炎, x-连锁高 IgM 综合症, 荨麻疹例如慢性变应性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹, 包括慢性自身免疫性荨麻疹, 多肌炎 / 皮肌炎, 幼年型皮肌炎, 中毒性表皮坏死松解, 硬皮病 (包括系统性硬皮病), 硬化症例如系统性硬化病, 多发性硬化 (MS) 例如 spino-optical MS、原发进行性 MS (PPMS) 和复发缓解型 MS (RRMS), 进行性系统性硬化病, 动脉粥样硬化, 动脉硬化, 弥漫性硬化 (sclerosis disseminate) 和共济失调硬化 (ataxic sclerosis), 炎性肠病 (IBD) (例如, 克罗恩氏病、自身免疫介导性胃肠疾病, 结肠炎例如溃疡性结肠炎、colitis ulcerosa、显微镜性结肠炎、胶原性结肠炎、息肉状结肠炎、坏死性小肠结肠炎、透壁性结肠炎和自身免疫性炎症性肠病), 坏疽性脓皮症, 结节性红斑, 原发性硬化性胆管炎, 巩膜外层炎, 呼吸窘迫综合征, 包括成人或急性呼吸窘迫综合征 (ARDS), 脑膜炎, 葡萄膜的全部或部分的炎症, 虹膜炎, 脉络膜炎, 自身免疫血液学紊乱, 类风湿性脊柱炎, 突发性耳聋, IgE 介导的疾病例如过敏反应、变应性和特应反应性鼻炎, 脑炎例如 Rasmussen 脑炎和边缘性脑炎和 / 或脑干脑炎, 眼色素层炎例如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、晶状体抗原性葡萄膜炎、后葡萄膜炎或自身免疫葡萄膜炎, 伴有和无肾病综合征的肾小球肾炎 (GN), 例如慢性或急性肾小球肾炎例如原发性 GN、免疫介导的 GN、膜性 GN (膜性肾病)、特发性膜性 GN 或特发性膜性肾病、膜性增生性 GN (MPGN), 包括 I 型和 II 型, 和急进性 GN, 变应性病状, 变应性反应, 湿疹, 包括变应性或特应性湿疹, 哮喘, 例如支气管哮喘、自身免疫哮喘, 涉及 T 细胞浸润和慢性炎症反应的病状, 慢性肺炎疾病, 自身免疫心肌炎, 白细胞粘附缺陷病, 系统性红斑狼疮 (SLE) 例如皮肤型 SLE、亚急性皮肤型红斑狼疮、新生儿期狼疮综合征 (NLE)、播散性红斑狼疮, 狼疮 (包括肾炎、脑炎、小儿、非肾性、肾外、盘状、脱发), 幼年型 (I 型) 糖尿病, 包括小儿胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM)、成人型糖尿病 (II 型糖尿病)、自身免疫性糖尿病, 特发性尿崩症, 与细胞因子和 T 淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫反应, 结核, 结节病, 肉芽肿病, 包括淋巴瘤样肉芽肿病、韦格纳肉芽肿病, 粒细胞缺乏症, 血管炎病, 包括脉管炎 (大血管的血管炎 (包括风湿性多肌痛和巨细胞 (Takayasu's) 动脉炎)、中型血管的血管炎 (包括 Kawasaki 病和结节性多动脉炎)、显微镜多动脉炎、CNS 脉管炎, 坏死性、皮肤性或超敏性脉管炎, 系统性坏死性血管炎, 和 ANCA 相关血管炎例如 Churg-Strauss 血管炎或综合征 (CSS), 颞动脉炎, 再生障碍性贫血, 自身免疫性再生障碍性贫血, 库氏试验阳性贫血, Diamond Blackfan 贫血, 溶血性贫血, 或免疫性溶血性贫血, 包括自身免疫性溶血性贫血 (AIHA), 恶性贫血 (anemiaperniciosa), Addison 病, 纯红细胞贫血或再生障碍 (PRCA), VIII 因子缺乏症, 血友病 A, 自身免疫性中性粒细胞减少, 全血细胞减少症, 白细胞减少症, 涉及白细胞渗出的疾病, 中枢神经系统炎症疾病, 多脏器损伤综合征例如继发于败血症、创伤或大出血的那些, 抗原-抗体复合物介导的疾病, 抗肾小球基底膜病, 抗磷脂抗体综合

征,变应性神经炎,Bechet's 或 Behcet's 病,Castleman's 综合征,Goodpasture's 综合征,Reynaud's 综合征,Sjogren's 综合征,Stevens-Johnson 综合征,类天疱疮例如大疱性类天疱疮和皮肤类天疱疮,天疱疮(包括寻常性天疱疮、落叶性天疱疮、天疱疮黏膜类天疱疮、和红斑性天疱疮),自身免疫多内分泌腺病,Reiter's 病或综合征,免疫复合性肾炎,抗体介导的肾炎,视神经脊髓炎,多发性神经病,慢性神经病例如 IgM 多发性神经病或 IgM 介导的神经病,血小板减少症(例如,心肌梗死患者产生的),包括血栓性血小板减少性紫癜(TTP)和自身免疫性或免疫性血小板减少症,例如特发性血小板减少性紫癜(ITP),包括慢性或急性 ITP,睾丸和卵巢自身免疫性疾病,包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎,原发性甲状腺功能减退,甲状旁腺机能减退,自身免疫性内分泌疾病,包括甲状腺炎例如自身免疫性甲状腺炎、Hashimoto's 病、慢性甲状腺炎(Hashimoto's 甲状腺炎)或亚急性甲状腺炎,自身免疫性甲状腺病,特发性甲状腺机能减退,Grave's 病,多腺体综合征例如自身免疫性多腺体综合征(或多腺体内分泌病综合征),副肿瘤综合征,包括神经学副肿瘤综合征,例如 Lambert-Eaton 肌无力综合征或 Eaton-Lambert 综合征,僵人综合征,脑脊髓炎例如变态反应性脑脊髓炎或变应性脊髓炎和试验性变应性脑脊髓炎(EAE),重症肌无力例如胸腺瘤相关重症肌无力,小脑退化,神经性肌强直,视性眼阵挛或视性眼阵挛肌阵挛综合征(OMS)和感觉神经病,多灶性运动神经病,Sheehan's 综合征,自身免疫性肝炎,慢性肝炎,狼疮样肝炎,巨细胞性肝炎,慢性活动性肝炎或自身免疫性慢性活动性肝炎,淋巴间质性肺炎,闭塞性细支气管炎(非移植)对 NSIP,Guillain-Barré 综合征,Berger's 病(IgA 肾病),特发性 IgA 肾病,线性 IgA 皮肤病,原发性胆汁性肝硬化,肺硬化,自身免疫性肠病综合征,乳糜泻,乳糜泄,口炎性腹泻(麸质性肠病),难治性口炎性腹泻,特发性口炎性腹泻,冷球蛋白血症,肌萎缩性侧索硬化症(ALS;Lou Gehrig's 病),冠心病,自身免疫性耳病例如自身免疫性内耳病(AIED),自身免疫性听力损失,视性眼阵挛肌阵挛综合征(OMS),多软骨炎例如顽固性或复发性多软骨炎,肺泡蛋白沉着症,淀粉样变性,巩膜炎,非癌性淋巴细胞增多,原发性淋巴细胞增多,包括单克隆 B 细胞淋巴细胞增多(例如,良性单克隆丙种球蛋白病和意义不明性单克隆丙种球蛋白病, MGUS),周围神经病,副肿瘤综合征,通道病(channelopathy)例如癫痫、偏头痛、心律失常、肌疾病、耳聋、目盲、周期性瘫痪、和中枢神经系统的通道病,孤独症,炎性肌病,局灶性节段性肾小球硬化症(FSGS),内分泌性眼病,葡萄膜视网膜炎,脉络膜视网膜炎,自身免疫性肝失调,纤维性肌痛(fibromyalgia),多内分泌功能衰竭,Schmidt's 综合征,肾上腺炎,胃萎缩,早发性痴呆,脱髓鞘疾病例如自身免疫性脱髓鞘疾病,糖尿病性肾病,Dressler's 综合征,斑秃,CREST 综合征(钙质沉着症-Raynaud's 现象,食道运动功能障碍、指端硬化和毛细血管扩张),男性和女性自身免疫性不孕,混合性结缔组织病,Chagas' 病,风湿热,习惯性流产,农民肺,多形红斑,心切开后综合征,Cushing's 综合征,养鸟者肺,变应性肉芽肿性血管炎,良性淋巴细胞血管炎,Alport's 综合征,肺泡炎例如变应性肺泡炎和纤维化肺泡炎,间质性肺病,输血反应,麻风病,疟疾,利什曼病,kypanosomiasis,血吸虫病,蛔虫病,曲霉病,Sampter's 综合征,Caplan's 综合征,登革热,心内膜炎,心内膜心肌纤维化,弥漫性肺间质纤维化,间质性肺纤维化,特发性肺纤维化,囊性纤维化,眼内炎,持久性隆起性红斑,胎儿成红细胞增多,嗜酸性筋膜炎,Shulman's 综合征,Felty's 综合征,丝虫病(flariasis),睫状体炎(cyclitis),例如慢性睫状体炎、异色性睫状体炎、虹膜睫状体炎或 Fuch's 睫状体炎,过敏性紫癜(Henoch-Schonleinpurpura),

人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染, 艾柯病毒感染, 心肌病, Alzheimer's 病, 细小病毒感染, 风疹病毒感染, 免疫接种后综合征, 先天性风疹感染, Epstein-Barr 病毒感染, 腮腺炎, Evan's 综合征, 自身免疫性性腺衰竭, Sydenham 舞蹈症, 链球菌感染后肾炎, 闭塞性血栓性血管炎 (thromboangitis obliterans)、甲状腺毒症, 脊髓痨, 脉络膜炎, 巨细胞多肌痛, 内分泌性眼病, 慢性超敏性肺炎, 干燥性角结膜炎, 流行性角结膜炎, 特发性肾炎综合征, 微小病变性肾病, 良性家族性和缺血再灌注损伤, 视网膜自身免疫, 关节炎, 支气管炎, 慢性阻塞性气道疾病, 硅肺病, 口疮, 口疮性口炎, 动脉硬化病, aspermiogenesis, 自身免疫性溶血, Boeck's 病, 冷球蛋白血症, Dupuytren's 挛缩, 晶状体过敏性眼内炎 (endophthalmitis anaphylactica), 变应性小肠炎, 麻风结节性红斑, 特发性面瘫, 慢性疲劳综合征, 风湿热 (febris rheumatica), Hamman-Rich's 病, 感觉神经性耳聋, 阵发性血红蛋白尿, 性腺机能减退, 区域性回肠炎, 白细胞减少症, 传染性单核细胞增多症, 横贯性脊髓炎, 原发性特发性粘液性水肿, 肾变病, 交感性眼炎 (ophthalmia sympathica), 肉芽肿性睾丸炎、胰腺炎, 急性多神经根炎 (polyradiculitis acuta), 坏疽性脓皮症, Quervain's 甲状腺炎, 获得性脾萎缩, 由抗精子抗体引起的不育, 非恶性的胸腺瘤, 白癜风, SCID 和 Epstein-Barr 病毒相关的疾病, 获得性免疫缺陷综合征 (AIDS), 寄生虫病例如利什曼原虫, 中毒性休克综合征, 食物中毒, 涉及 T 细胞浸润的疾病, 白细胞粘附缺陷病, 与细胞因子和 T 淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫反应, 涉及白细胞渗出的疾病, 多器官损伤综合征, 抗原-抗体复合物介导的疾病, 抗肾小球基底膜病, 变应性神经炎, 自身免疫性多内分泌腺病, 卵巢炎, 原发性黏液水肿, 自身免疫性萎缩性胃炎, 交感性眼炎, 风湿性疾病, 混合性结缔组织病, 肾病综合征, 胰岛炎, 多内分泌缺陷, 周围神经病, I 类自身免疫性多腺体综合征, 成人发作性甲状腺旁腺机能减退 (A01H), 全秃, 扩张性心肌病, 获得性大疱性表皮松解 (EBA), 血色沉着病, 心肌炎, 肾病综合征, 原发性硬化性胆管炎, 脓性或非脓性鼻窦炎, 急性或慢性鼻窦炎, 筛窦炎, 额窦炎、上颌窦炎、或蝶窦炎, 嗜酸性粒细胞相关疾病例如嗜酸性粒细胞增多、嗜酸性粒细胞增多性肺浸润, 嗜酸性粒细胞增多-肌痛综合征, Löffler's 综合征, 慢性嗜酸性肺炎, 热带肺嗜酸细胞增多症, 支气管肺炎曲霉病, 曲霉肿, 或包含嗜酸性粒细胞的肉芽肿, 过敏反应, 血清阴性脊柱关节病 (seronegative spondyloarthritides), 多内分泌自身免疫病, 硬化性胆管炎, 巩膜炎、巩膜外层炎, 慢性皮肤粘膜念珠菌病, Bruton's 综合征, 婴儿期短暂性低丙种球蛋白血症, Wiskott-Aldrich 综合征, 共济失调性毛细血管扩张症, 与胶原病相关的自身免疫性疾病, 风湿病, 神经病, 缺血再灌注障碍, 血压降低反应, 血管功能障碍, angiectasis, 组织损伤, 心血管缺血, 痛觉过敏, 脑缺血, 伴随血管化的疾病, 变应性超敏疾病, 肾小球肾炎, 再灌注损伤, 心肌或其它组织的再灌注损伤, 具有急性炎症成分的皮肤病, 急性化脓性脑膜炎或其他中枢神经系统炎症疾病, 眼及眼眶炎性疾病, 粒细胞输血相关综合征, 细胞因子诱导的毒性, 急性严重炎症, 慢性顽固性炎症, 肾盂炎, 肺硬化, 糖尿病视网膜病, 糖尿病大动脉障碍, 动脉内膜增生 (endarterial hyperplasia), 胃溃疡, 心瓣炎以及子宫内膜异位。

[0389] 除了治疗用途以外, 本发明的抗体可用于其它目的, 包括诊断方法, 例如用于本文中描述的疾病和状况的诊断方法。

[0390] X. 剂量、制剂和持续时间

[0391] 以符合良好医疗实践的方式对本发明的蛋白质进行制剂配制、分配剂量和给药。

关于这点,需考虑的因素包括待治疗的特定病症、待治疗的特定哺乳动物、个体受试者的临床状态、病症的起因、药物递送的部位、给药方法、给药方案和医师所知的其它因素。待给药的蛋白质的“治疗有效量”受这些因素控制,其是预防、改善或治疗特定病症(例如癌、变应性或炎症性病症、或自身免疫性病症)所需的最小量。蛋白质不必,但可选地,与一种或多种当前使用来预防或治疗该病症的药物配制在一起。这样的其它药物的有效量取决于制剂中所存在的蛋白质的量、病症或治疗的类型、以及上述其它因素。它们通常以之前使用的相同剂量和给药途径、或此前使用剂量的约 1-99% 来使用。通常,癌症的缓解或治疗涉及减轻一个或多个与癌症相关的症状或医学问题。药物的治疗有效量可以实现以下之一或其组合:减少(至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 或更多)癌细胞的数量;减小或抑制肿瘤的大小或肿瘤负荷;抑制(即在一定程度上降低和/或停止)癌细胞浸润到周围器官中;在腺瘤的情况下降低激素的分泌;降低血管密度;抑制肿瘤转移;降低或抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上减轻一种或多种与癌症相关的症状。在一些实施方案中,蛋白质用来预防受试者中癌症或自身免疫病症的发生或复发。

[0392] 在一个实施方案中,本发明可用于增加易患或被诊断患有癌症或自身免疫病症的人受试者的存活期。存活期定义为从第一次给药到死亡的时间。也可以通过治疗群体对对照群体的分层风险比例(stratified hazard ratio)(HR)来测量存活期,所述分层风险比例代表受试者在治疗期间死亡的风险。

[0393] 在另一个实施方案中,本发明的治疗显著增加了易患癌症或经诊断患有癌症的人受试者群体中对各种抗癌治疗的反应率。反应率定义为对治疗产生反应的受治者的百分比。在一个方面,与仅以手术、放射性治疗或化疗剂治疗的群体相比,使用本发明的蛋白质与手术、放射性治疗或一种或多种化疗剂进行的本发明组合治疗显著地增加治疗的受试者群体中的反应率,所述增加具有小于 0.005 的卡方 p 值。癌症治疗中疗效的其它度量描述于美国专利申请出版号 20050186208 中。

[0394] 使用本领域已知的标准方法,通过将具有所需纯度的活性成分与可选的生理可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合,制备治疗制剂(Remington's Pharmaceutical Sciences(第 20 版),ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams&Wilkins, Philadelphia, PA)。可接受的载体包括盐水溶液、或缓冲液例如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸;低分子量(小于约 10 个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮,氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖,和其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合剂例如 EDTA;糖醇例如甘露醇或山梨醇;成盐抗衡离子例如钠;和/或非离子型表面活性剂例如 TWEEN™、PLURONICS™ 或 PEG。

[0395] 可选地,但优选地,制剂包含药用可接受的盐,优选氯化钠,和优选地大约生理浓度。可选地,本发明的制剂包含药用可接受的防腐剂。在一些实施方案中,防腐剂的浓度范围为 0.1 至 2.0%,通常是 v/v。适合的防腐剂包括那些在制药领域已知的防腐剂。苯甲醇、苯酚、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯是优选的防腐剂。可选地,本发明的制剂可以包括 0.005 至 0.02% 浓度的药用可接受的表面活性剂。

[0396] 本文中的制剂也可以包含多种为治疗特定适应症所需的活性化合物,优选那些活性互补而不相互产生不利影响的化合物。这样的分子适于以对预期目的有效的量、组合地

存在。

[0397] 可以将活性成分截留在微囊中,所述微囊例如通过凝聚技术或通过界面聚合而制备,例如羟甲基纤维素或明胶微囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微囊,分别地在胶态药物递送系统中(例如脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米粒和纳米囊)或在巨乳液中。这样的技术描述于 Remington's Pharmaceutical Sciences(同上引文)中。

[0398] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括:包含异源多聚体蛋白质的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质为具有形状的物体,例如膜或微囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利号 3,773,919)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯醋酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物例如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。乙烯醋酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸等的聚合物可以使分子的释放超过 100 天,而某些水凝胶则在较短的时间内释放蛋白质。当胶囊包裹的异源多聚体蛋白质长时间保留在身体中时,它们可能由于暴露在 37°C 潮湿环境中而变性或聚集,从而导致生物学活性丧失和免疫原性的可能改变。可以根据所涉及的机制,设计合理的策略用于稳定。例如,如果发现聚集机制是通过巯基-二硫键互换导致分子间 S-S 键形成,则可以通过改变巯基残基、从酸性溶液冻干、控制水分含量、使用适当的添加剂和开发特殊的聚合物基质组合物,实现稳定。

[0399] 可以根据已知的方法,将本文中描述的蛋白质(例如异源多聚体蛋白质,例如根据本文中描述的方法制备的多特异性抗体)施用给人受试者,所述方法例如以快速浓注形式或通过连续输液一段时间来进行静脉给药,通过肌肉、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口腔、局部或吸入途径给药。如果广泛的副作用或毒性与拮抗蛋白质所识别的靶标分子有关,则局部给药可能是特别期望的。离体策略也可用于治疗用途。离体策略涉及以编码本发明蛋白质的多核苷酸转染或转导来自受试者的细胞。然后将转染或转导的细胞输送回受试者。这些细胞可以是类型广泛的任何细胞,包括但不限于造血细胞(例如骨髓细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、T 细胞或 B 细胞)、成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、角质形成细胞或肌肉细胞。

[0400] 在一个实例中,当病症或肿瘤的位置允许时,可以对蛋白质复合物(例如异源多聚体蛋白质,例如根据本文中描述的方法制备的多特异性抗体)进行局部给药,例如直接注射,并且可以周期性重复注射。为了防止或降低局部复发或转移,也可以将蛋白质复合物全身性递送至受试者、或直接至肿瘤细胞,例如至肿瘤或至外科手术切除肿瘤后的瘤床。

[0401] XI. 制品 (articles of manufacture)

[0402] 本发明的另一个实施方案是制品,其包含一种或多种本文中描述的蛋白质复合物和用于治疗或诊断病症(例如,自身免疫疾病或癌症)的材料。制品包括容器和在容器上或伴随容器的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可以由多种材料例如玻璃或塑料制成。容器装载对治疗疾病有效的组合物,并可以带有无菌的进口(例如,容器可以是具有可被皮下注射针头穿透的塞子的静脉输液袋或小瓶)。组合物中至少一种活性剂是本发明的异源多聚体蛋白质(例如抗体或抗体片段)。标签或包装插页指示组合物用于治疗特定的疾病。标签或包装插页还可以包括用于将异源多聚体蛋白质组合物施用给受试者的说明书。也考虑包含本文中描述的组合治疗剂的制品和套盒。

[0403] 包装插页指习惯上包括在治疗产品的商业包装中的说明书,其包含与使用该治疗产品有关的适应症、用法、剂量、施用、禁忌和 / 或警告方面的信息。在某些实施方案中,包装插页指示组合物用于治疗乳房癌、结肠直肠癌、肺癌、肾细胞癌、神经胶质瘤或卵巢癌。

[0404] 此外,制品还可以包括第二容器,所述容器包含药用可接受的缓冲液,例如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水溶液、Ringer's 溶液和葡萄糖溶液。其还可以包括从商业和使用角度考虑的其它材料,包括其它缓冲液、稀释液、过滤器、针头和注射器。

[0405] 也提供用于多种目的的套盒,例如用于从细胞中纯化或免疫沉淀抗原(例如 HER2 或 EGFR)。为了分离和纯化抗原(例如 HER2 或 EGFR),套盒可以包含与小珠(例如琼脂糖小珠)偶联的异源多聚体蛋白质(例如 EGFR/HER2 抗体)。可以提供这样的套盒,其包含用于例如以 ELISA 或 Western 印迹对抗原进行体外检测和定量的异源多聚体蛋白质。和制品一样,套盒也包括容器和在容器上或伴随容器的标签或包装插页。容器装载组合物,所述组合物包含至少一种本发明的异源多聚体蛋白质(例如,多特异性抗体或抗体片段)。可包括另外的容器,所述容器装有例如稀释液和缓冲液或对照抗体。标签或包装插页可以提供对组合物的描述以及用于预期的体外或诊断用途的说明书。

[0406] 可以认为,前面的详述足以使本领域技术人员能够实施本发明。提供以下实施例,其仅为举例说明目的,而不旨在以任何方式限制本发明的范围。事实上,从上述描述中,除了本文中显示和描述的内容之外,本发明的各种变化方案对本领域技术人员而言也是显而易见的,并落入后附权利要求的范围内。

[0407] 在随后的实验公开中,使用了以下缩写:eq(当量);M(摩尔); μ M(微摩尔);N(正,Normal);mol(摩尔);mmol(毫摩尔); μ mol(微摩尔);nmol(纳摩尔);g(克);mg(毫克);kg(千克); μ g(微克);L(升);ml(毫升); μ l(微升);cm(厘米);mm(毫米); μ m(微米);nm(纳米); $^{\circ}$ C(摄氏度);h(小时);min(分钟);sec(秒);msec(毫秒);ADCC(抗体依赖性细胞毒性);BsAb(双特异性抗体); C_L (轻链恒定区); C_H (重链恒定区);CMC(补体介导的细胞毒性);Fab(抗原结合片段);Fc(结晶片段);Fv(可变片段(V_L+V_H));EGFR(表皮生长因子受体);HC(重链);IGFR(胰岛素样生长因子受体);LC(轻链);scFv(单链可变区(通过氨基酸接头连接的 V_L 和 V_H));VEGF(血管内皮生长因子);VEGFR2(血管内皮生长因子受体 2); V_H (重链可变区); V_L (轻链可变区)。

实施例

[0408] 在下列实施例中对本发明进行了更详细的描述,所述实施例不旨在以任何方式限制所要求保护的本发明的范围。附图应被视为本发明说明书的一个部分。为了本文所述的所有目的,本文中引用的所有参考文献均特此并入此处作为参考。提供以下实施例以进行举例说明,但不是来限制所要求保护的本发明。

[0409] 实施例 1

[0410] 构建表达载体

[0411] 该实施例举例说明了用于转化宿主细胞的核酸构建体。

[0412] 通常,将重链和轻链 DNA 编码序列都克隆到表达质粒中,所述表达质粒包含分别用于各序列的分开的启动子元件和用于选择包含表达质粒的细菌细胞的抗生素抗性。载体构建体也编码热稳定肠毒素 II(STII) 分泌信号(Picken 等,1983, Infect.

Immun. 42:269-275, 和 Lee 等, 1983, Infect. Immun. 42:264-268), 用于将抗体多肽输出到细菌细胞的周质间隙中。每个链的转录受 *phoA* 启动子 (Kikuchi 等, 1981, Nucleic Acids Res., 9:5671-5678) 控制, 并通过具有经测量的相对翻译强度的前述 STII 信号序列的变体, 提供对翻译的控制, 所述 STII 信号序列变体在翻译起始区 (TIR) 中包含沉默密码子改变 (Simmons 和 Yansura, 1996, Nature Biotechnol. 14:629-634 和 Simmons 等, 2002, J. Immunol Methods, 263:133-147)。鼓突和洞质粒的示意图分别显示于图 2A 和 2B 中。

[0413] 本发明不依赖于特定的抗体结合序列, 并适用于任何半抗体组合, 但本文实施例涉及抗 c-met、EGFR、IL-4 和 IL-13 的异源多聚体抗体。美国专利号 7, 472, 724 和美国专利号 7, 498, 420 中给出了抗 c-met 抗体的实例。美国临时申请 61/210, 562 (2009 年 3 月 20 日申请)、美国专利申请公布号 20080274114 (2008 年 11 月 6 日公布) 和美国专利号 5, 844, 093 (1998 年 12 月 1 日授权) 中给出了抗 EGFR 抗体的实例。美国专利号 7, 501, 121 (2009 年 3 月 10 日授权)、美国专利号 7, 615, 213 (2009 年 11 月 10 日授权)、WO2006/085938 (2006 年 8 月 17 日公布)、美国专利申请公布号 20090214523 (2009 年 8 月 27 日公布) 和美国专利号 7, 674, 459 (2010 年 3 月 9 日授权) 中描述了抗 IL-13 抗体的实例。美国专利申请公布号 US 20080241160 (2008 年 10 月 2 号公布) 和美国专利号 6, 358, 509 (2002 年 3 月 19 日授权) 中描述了抗 IL-4 抗体的实例。

[0414] 每个半抗体各具有鼓突 (突起) 或洞 (腔), 其中所述鼓突或洞如美国专利号 7, 642, 228 中描述经改造而引入到重链中。简单地说, 首先产生 C_H3 鼓突突变体。然后通过对残基 366、368 和 407 进行随机化, 产生 C_H3 洞突变体文库, 其中所述残基与配偶体 C_H3 结构域上的鼓突靠近。在以下实施例中, 鼓突突变是 IgG1 骨架中 T366W, 而洞具有突变 T366S、L368A 和 Y407V。本领域技术人员容易确定其它免疫球蛋白同种型中的等效突变。此外, 技术人员将容易理解, 用于双特异性的两个半抗体优选是相同同种型。可以使用不同同种型的半抗体, 但可能需要另外的突变。

[0415] 尽管本实施例中描述的载体是用于抗 c-Met 或抗 EGFR 半抗体的, 但本领域技术人员将容易理解, 在质粒中可以编码任何抗体。对于本文中使用的所有构建体, 起始质粒是以前描述过的抗组织因子分开的顺反子质粒 paTF50, 其具有 1 的相对 TIR 用于重链和 1 的相对于 TIR 用于轻链 (Simmons 等, 2002, J. Immunol Methods, 263:133-147 和美国专利号 6, 979, 556)。通过增加相对 TIR 强度, 增加这些半抗体的表达滴度。

[0416] 实施例 2

[0417] 使用分开的细胞培养物生产异源多聚体蛋白质

[0418] 以下实施例显示了异源多聚体蛋白质的生产, 其中表达单体组分的细胞在分开的培养中生长。在该方法中, 在分开的培养物中生长细胞和诱导半抗体表达。在一个方法中, 可以在纯化蛋白质之前将宿主细胞培养物混合。在另一个方法中, 可以先纯化组分, 再将组合混合以形成异源多聚体蛋白质。

[0419] 在两种方法中, 将编码第一含铰链的多肽 (例如半抗体 (鼓突)) 的核酸引入到第一宿主细胞中, 将编码第二含铰链的多肽 (例如半抗体 (洞)) 的核酸引入到第二宿主细胞中。尽管本实施例举例说明 BsAb 的形成, 但本领域技术人员将容易理解, 所描述的方法将适用于任何包含铰链区的异源多聚体蛋白质, 例如亲和体等。

[0420] 方法 #1——在分开的培养物中独立生产鼓突半抗体和洞半抗体, 分开纯化这些半

抗体、混合、氧化还原以形成完整的 BsAb

[0421] 使用实施例 1 中描述的构建体,在细菌宿主细胞例如大肠杆菌中表达重链和轻链,在分开的培养物中产生了包含鼓突或洞突变的半抗体。见图 3B 和 4A。在该方法 1 中,鼓突半抗体是抗 EGFR 抗体,洞半抗体是抗 c-met 抗体。将实施例 1 的表达质粒引入到大肠杆菌宿主菌株 33D3(Ridgway 等 Cancer Res, (1999) 59(11):2718) 或 64B4(W3110 Δ fhuA Δ phoA ilvG+ Δ prc spr43H1 Δ degP Δ manA lacI^q Δ ompT) 中,在包含羧苄青霉素的 LB 平板上选择转化体。然后使用转化体接种包含羧苄青霉素的 LB 起子培养物,将其在 30° C 摇动生长过夜。将起子培养物在包含羧苄青霉素的磷酸盐限制性培养基 C. R. A. P. (Simmons 等, 2002, J. Immunol Methods, 263:133-147) 中稀释 100 倍,将其在 30° C 摇动生长 24 小时。离心培养物,冷冻细胞沉淀直到开始纯化抗体。融化沉淀;并在包含 25mM Tris 碱(以盐酸调节 pH 至 7.5)、125mM NaCl 和 5mM EDTA 的提取缓冲液(TEB 或 Tris 提取缓冲液)中,按每 5 克细胞沉淀 100mL TEB 的体积/重量比,悬浮沉淀;使重悬的混合物通过 Microfluidics Corporation 的 110F 型微流化仪(microfluidizer)(Newton, MA) 三次,利用微流化装置破坏细胞,进行提取。然后,通过在 15,000X g 离心 20 分钟,澄清细菌细胞提取物,收集上清液,在纯化前以 0.22 微米乙酸酯滤膜进行过滤。

[0422] 通过蛋白 A 捕获和随后的阳离子交换色谱,纯化每个半抗体。以 2mL/min 将来自鼓突半抗体的澄清细胞提取物加载到 GE Healthcare(Piscataway, NJ) 的 1mL HiTrap MabSelect SURE 柱上。加载后,以 10 倍柱体积(CV)的 40mM 柠檬酸钠(pH 6.0)、125mM 氯化钠和 5mM EDTA 清洗柱,随后以 5 倍体积的 20mM 柠檬酸钠(pH 6.0)洗柱,以利于通过阳离子交换柱的捕获。以 10 倍柱体积(CV)的 0.2M 醋酸(pH 2-3),洗脱亲和捕获的半抗体,并直接捕获在 GE Healthcare 的 1mL HiTrap SP-HP 强阳离子交换柱上。以 10CV 的含 25mM 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)的缓冲液 A(pH 5.8)洗涤柱子。以线性梯度的 0-50% 缓冲液 B(25mM MES, pH5.8 和 1M 氯化钠(NaCl))洗脱半抗体。两个蛋白质均在 20-40%B 之间洗脱,将根据所收集的级分在 280nm 处的 UV 吸收值和非还原 SDS-PAGE 分析而确定的洗脱峰分别合并为鼓突或洞半抗体。两个蛋白质通常表现为主洗脱峰,并且含有相互氧化的重链和轻链的所有级分被包括在合并物中。通过还原和非还原 SDS-PAGE 对纯化的半抗体进行分析,显示于图 4B 中。结果表明,大部分表达和捕获的蛋白质是 75kD 大小。这由显示于图 4C 中的 ESI-TOF 质谱得到确认。半抗体的质量是预期的质量,表明任何半胱氨酸(包括铰链区中的两个半胱氨酸残基)上都没有二硫键加合物。为了确定铰链半胱氨酸是否被还原而显示出反应性自由硫醇,在质谱分析前,将蛋白质在中性 pH 下与 1mM N-乙基马来酰亚胺(NEM)反应 1 小时。蛋白质的质量未改变,表明铰链半胱氨酸彼此氧化,最可能在链内二硫键,例如环形二硫化物中。为了使用这两个半抗体(鼓突和洞)组装完整的双特异性抗体,需要先还原铰链区的链内二硫键,以释放半胱氨酸自由硫醇,这样它们能够随后被氧化到另一重链上,从而形成 150kD 的双特异性抗体。

[0423] 为了实现两个互补半抗体的退火、还原和再氧化以形成完整的双特异性分子,开发了以下程序。在进行独立分离后,在程序的合并步骤(示于图 5A)中,将纯化的蛋白质按相等质量组合在一起,通过添加十分之一体积的 1M Tris(pH 7.5),将合并物的 pH 调节至 7.5,在室温以 0.5mM Tris[2-羧乙基]磷化氢(TCEP)还原蛋白质。在还原 2 小时后,使用 5mL Zeba 脱盐离心柱(Pierce, Rockford, IL),对合并的蛋白质进行缓冲液更换,到 25mM

Tris(pH 7.5) 和 125mM NaCl 中,获得体积约 4mLs、浓度为 1mg/mL 的蛋白质。然后将混合物在 52° C 加热 25 分钟,接着冷却到室温(约 20° C),使蛋白质退火。使用 10kD MW 截断值离心浓缩器,将退火的抗体浓缩到 0.5mL 体积,蛋白质浓度为约 8mg/mL,通过向反应混合物中添加 300 微摩尔脱氢抗坏血酸(DHAA)(来自溶解在二甲基亚砷中的 100mM DHAA 储备液),进行氧化。所添加用于氧化的 DHAA 量为约 10 倍过量于蛋白质摩尔浓度。在室温氧化过夜后,将氧化的产物在含 25mM MES(pH 6.0) 和 300mM NaCl 的缓冲液中过 S-200 凝胶过滤柱(22mLS200Tricorn,来自 GE Healthcare)。将完整抗体合并,在水中稀释 10 倍。然后使用羧甲基(CM)树脂(1mL HiTrap CM-FF, GE Healthcare),通过弱阳离子交换色谱,纯化 BsAb 蛋白质,以 4.5 至 9.2 的 pH 梯度洗脱。缓冲液 A 和 B 的组成为 20mM 柠檬酸钠、30mM MES、20mM HEPES、20mM 咪唑、20mM Tris、20mM CAPS 和 25mM NaCl,其中以 HCl 将 A 缓冲液的 pH 调至 4.2,以 NaOH 将 B 缓冲液的 pH 调至 9.2(或 10.4)。通过质谱分析 CM 层析后获得的纯化产物,以确定确切的分子组成(图 4D)。质谱分析显示,唯一可检测的完整抗体产物具有 146,051.89 的分子量(MW),这与理论 MW 为 145,051.75 的异源二聚体鼓突-洞抗 EGFR/ 抗 c-met 抗体几乎完全匹配。从约 2mg 的鼓突和 2mg 的洞起始,该程序的产量为约 0.5-1mg。

[0424] 为了大规模生产抗体用于体内实验,例如测定在非人灵长类动物中的药代动力学特性,需要 100mg 至克级别的抗体量。我们开发了针对每个半抗体使用分开的独立培养物的程序(示于图 5A 中),以生产这些量的完整双特异性抗体。为了进行这些制备,需要 10 升发酵来生产含有足够量抗体的细胞沉淀或全培养液(Simmons 等, 2002. J. Immunol. Methods, 263:133-147, 和美国专利号 6,979,556)。在实验过程中,对于包含所表达半抗体的生物质,使用了细胞沉淀或细菌全培养液。在一些情况下,相当一部分的抗体已经漏出到培养基中,这时全培养液产生更高的产量。对于细胞沉淀,将该物质重悬浮在提取缓冲液中(所述提取缓冲液包含 25mM Tris(pH 7.5)、5mM EDTA 和 125mM NaCl),通过使用来自 Microfluidics 的 HC80003A 型微流化仪(Newton, MA)进行微流化(microfluidization)以裂解。对全培养液直接进行微流化而不需要加入添加剂。在两种情况下,使物质通过仪器 3 次。在本实施例中,我们制备了 500mg 的两个版本的靶向细胞因子白细胞介素 4(鼓突)和白细胞介素 3(洞)的双特异性抗体。

[0425] 第一个版本的双特异性抗体包含仅具有鼓突和洞突变的人 IgG1a Fc,而第二个版本包含具有两个突变 T307Q 和 N434A 的进一步改变的 Fc(这导致对新生儿 Fc 受体(FcRn)具有更强的亲和力)。预期第二版本将赋予抗体更慢的清除和更长的半衰期。将两个 Fc 版本的洞抗体(靶向 IL-4)和鼓突抗体(靶向 IL-13)(WT-Fc 用于前者, FcRn 变体用于后者)在 10 升发酵中分开生长,对包含生长培养基和细菌细胞的全培养液独立进行匀浆和纯化。在对全培养液进行微流化后,以相等体积的 0.4% 聚乙烯亚胺(PEI)(pH 9.0)处理提取物,以制备提取物用于离心澄清。将混合物在室温搅拌 3 小时或在 4° C 搅拌过夜。PEI 导致提取物的大量沉淀,通过在 15,000X g 离心 45 分钟来澄清提取物。随后以 0.22 微米滤器过滤上清液,之后加载到 100mL Mab Select SURE 蛋白 A 捕获柱上。按 20ml/min 加载提取物,以 40mM 柠檬酸钠(pH 6.0)和 100mM NaCl 洗涤直至 280 处的 UV 吸收值达到稳定基线,通常约 10 倍柱体积(CV)。将洗涤缓冲液改变为 20mM 柠檬酸钠(pH 6.0),洗涤约 2CV。使用 0.2M 醋酸洗脱所捕获的半抗体。在通过蛋白 A 分离后,通过使用 S-FF 树脂(GE Healthcare)的

阳离子交换色谱或使用 S200 树脂 (GE Healthcare) 的凝胶过滤色谱,纯化抗体以除去杂质和聚集物。纯化的半抗体主要是约 75kD 的种类,如图 5B 所示。在第二分离步骤后,将每个半抗体各 500mg 按 1mg/mL 的浓度合并在一起,使用 1MTris(pH 7.5) 将 pH 调至 7.5。在孵育箱中将混合物加热至 37° C,通过凝胶过滤监测 150kD 抗体种类的出现。2 小时后,退火完成,显示完全转化为二聚化的 150kD 种类,使混合物冷却至室温。通过加入 2mM DTT,在 24° C 放置两小时来还原蛋白质,随后使用 10kD 截断值离心过滤器将其浓缩至 20mg/mL。通过在仅包含 25mM Tris(pH 8.0) 的缓冲液中透析过夜,氧化经浓缩的溶液。随后对氧化产物的纯度和聚集情况进行分析。通过质谱确定完整抗体种类是完整的、完全氧化的异源二聚体双特异性分子,然而凝胶过滤和 SDS-PAGE 分析显示存在显著量的聚集物,其中一些显然是由二硫键连接的多聚体导致(数据未显示)。为了进一步纯化双特异性抗体用于体内实验,将抗体在 S-200 凝胶过滤柱上于 Tris(pH 7.5) 和 125mMNaCl 中进行分离。由于除去了所引入的聚集物,纯化的产物显示出 30% 以上的物质丧失。在制备的最后阶段中,将蛋白质附着到阳离子交换柱上,用 50mM 的乙酸钠 (pH 5.0) 中 0.1%TX114 进行洗涤,以除去污染性内毒素,以含 50mM Tris 的高 pH 缓冲液 (pH 8.0) 进行洗脱。然后通过透析至适合于体内实验的缓冲液中,配制洗脱的蛋白质,于 4° C 贮存。通过 SDS-PAGE、质谱、LAL 测定分析(以确定污染性内毒素水平)和凝胶过滤分析法,分析了由 WT-Fc 和 FcRn 变体组成的最终产物。SDS-PAGE 的结果示于图 5C 中,其表明主要的种类是 150kD 的完整双特异性抗体。图 6A 显示了抗体在测试细胞因子 IL-4 和 IL-13 的中和作用的 TF-2 细胞增殖测定试验中的生物学活性。为了进行测定,以起始浓度 25ug/ml 使用抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体、抗 IL-4 抗体和抗 IL-13 抗体,将其于 96 孔培养板 (Falcon, Cat#353072) 中在测定介质(不含 rhGM-CSF 的培养基)或含 0.4ng/ml 人 IL-4(R&D Systems, Catalog#204-IL) 加 20ng/ml 人 IL-13(Genentech Inc.) 的测定介质中系列稀释 10 倍至终浓度 0.025pg/ml,终体积为 50ul/孔。将稀释的抗体在 37° C 预孵育 30 分钟。

[0426] 预孵育后,以测定介质洗涤在含 10% 胎牛血清 (HyClone, Cat#SH300071.03)、2mM L-谷氨酰胺、100 单位/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素 (Gibco, Cat#10378) 和 2ng/mL rhGM-CSF (R&D Systems, Cat#215-GM) 的 RPMI 1640 (Genentech, Inc.) 中培养的 TF-1 细胞 2 次,重悬浮于测定介质中,以得到终浓度 2×10^5 个细胞/mL。向包含稀释的抗体、测定介质加 IL-4 和 IL-13 细胞因子(最大增殖对照)或仅测定介质(背景对照)的各孔中加入 50ul 细胞。所有样品一式两份。将平板于 37°C 在 5%CO₂ 中孵育 4 天。在最后 4 小时的孵育中,向每个孔加入 1uCi ³H 胸苷 (PerkinElmer, Cat#NET027005MC)。使用 Packard Filtermate 收获平板到 Unifilter-96GF/C (Perkin Elmer, Cat#6005174) 上,使用 TopCount NXT (Perkin Elmer) 测量 ³H 胸苷的掺入。使用 KaleidaGraph 绘制数据。结果显示,在中和 IL-4 和 IL-13 活性上,WT 抗 IL-4/抗 IL-13 双特异性抗体与 IL-4 和 IL-13 的 IgG 抗体组合一样有效。

[0427] 然后在食蟹猴中测试两个抗体 (WT 抗 IL-4/抗 IL-13 和 FcRn 变体抗 -IL-4/抗 IL-13) 的药代动力学 (PK) 特性。使用单剂注射,通过 IV 注射施用配制在 20mM 组氨酸醋酸盐 (pH 5.5)、240mM 蔗糖和 0.02% 吐温 20 中 10.8mg/mL 和 1mg/mL 的 WT 分子、以及在 20mM 磷酸钠 (pH 7.5)、240mM 蔗糖和 0.02% 吐温 20 中 10.5mg/mL 的 FcRn 变体。两个 WT 浓度的剂量水平为 20mg/kg 和 2mg/kg, FcRn 变体的剂量水平为 20mg/kg。在 42 天期间,从注射了这 3 个处理的两只雌性和两只雄性猴中周期性采取血清样品。通过 ELISA 测定血清样品中

的完整双特异性抗体, 其中将一个抗原 IL-4 或 IL-13 包被到平板上, 随后从血清中捕获抗体。通过以第二生物素化的配体 IL-13 或 IL-4 (没有被包被到平板上的那个配体) 和酶联链霉亲和素进行检测, 以测量所捕获的双特异性抗体的量。图 6B 中的结果显示 3 个样品的预期双室清除。两个不同版本的抗体的 PK 特性显示于表 2 中, 其与来自 CHO 生产宿主并包含 Fc 糖基化的另外两个抗体 (安维汀和赫赛汀) 进行了比较。显然, 大肠杆菌生产的双特异性抗体类似于通过标准程序从 CHO 获得的抗体, 且 FcRn 变体具有较长的半衰期。

[0428] 表 2

[0429]

群体平均值 (% RSE)	Vc (mL/kg)	CL (mL/kg/天)	T1/2 (天)
WT	29.0 (9.48)	4.49 (7.66)	~ 10
FcRn	15.8 (5.72)	2.11 (2.47)	~ 18
安维汀(Avastin)		4.3	~ 12
赫赛汀(Herceptin)		5.5	~ 9

[0430] 方法 #2-在分开的 (即独立的) 培养物中生产鼓突半抗体和洞半抗体, 将全培养液混合, 之后裂解和纯化半抗体、不添加还原剂以形成完整的 BsAb

[0431] 该方法意图通过同时纯化鼓突和洞半抗体来减少程序中的步骤数。因此, 在沉淀和重悬浮于提取缓冲液之前, 将发酵培养液混合。据认为, 在细胞膜破坏后, 每个宿主细胞将释放其表达的半抗体 (在铰链区内包含环形二硫键) 到提取缓冲液中。随后, 可以同时纯化两个半抗体, 接着进行氧化还原-退火步骤以形成完整的 BsAb。令人惊奇的是, 我们发现鼓突-洞抗体自身发生了异二聚化和氧化, 以形成全长抗体 (约 150kD), 其达到完整抗体和半抗体 (约 75kD) 的组合总量的 20% 以上 (见表 3)。

[0432] 使用方法 1 中描述的程序 (同上), 将表达鼓突半抗体和洞半抗体的宿主细胞在分开的培养物中进行生长和诱导。按 3 种不同的体积比, 将来自两个培养物的全细胞发酵培养液混合, 然后离心以形成单个细胞沉淀物。已知在相同条件下抗 EGFR 半抗体与 cMet 抗体类似地表达, 为了以相对等同的丰度匹配两个抗体的回收物, 按 (抗 c-met): (抗 EGFR) 比例为 1:1、2:1 或 1:2, 将全细胞发酵培养液混合到一起至终体积为 500mL。将每个细胞沉淀重悬浮在提取缓冲液中并进行裂解。提取蛋白质, 按实施例 2 的方法 1 中的描述, 通过蛋白 A 色谱和随后的阳离子交换色谱来纯化。提取缓冲液含有 25mM Tris (pH 7.5)、125mM NaCl 和 5mM EDTA。当分开纯化时, 鼓突半抗体和洞半抗体各自在铰链区内形成环形二硫键, 即链内二硫键, 这阻止了鼓突和洞重链的共价结合。然而, 发现当在共培养后或 在混合全发酵培养液后于离心前将第一和第二宿主细胞一起裂解时, 存在一定水平的完整抗体种类的组装。图 7 显示了在 3 个比率中观察到的完整抗体种类。这提示, 对程序的改变能导致完整双特异性抗体的自发形成, 这可能实质性地消除对额外化学步骤的需要。

[0433] 使用 Novex 4-20%Tris- 甘氨酸凝胶 (Invitrogen, Carlsbad CA), 通过 SDS-PAGE 分离 5 微克蛋白质, 对两个蛋白质种类进行定量。在电泳后, 用在水中包含 150mM 硫酸铵、

1. 74M 醋酸、10% 甲醇和 0. 4g/L 考马斯染料 R250 的胶态考马斯染液, 染色凝胶。以于水中的 10% 醋酸对凝胶进行脱色, 随后在 Gel-Dry 干燥溶液 (Invitrogen) 中平衡, 在两层玻璃纸之间干燥。凝胶干燥后, 通过 Odyssey IR 成像系统 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE), 在 700nm 处对蛋白质条带进行定量。

[0434] 表 3、在将来自两个分开生长的鼓突和洞培养物的分离物混合后完整抗体和半抗体的 Licore 荧光信号 [这是对铰链的测量]

[0435]

体 积 比 (c-met:EGFR)	150 kD RFUs	75 kD RFUs	组 合 的 RFUs	150 RFU/总体的%
1:1	36.01	98.78	134.8	26.72
2:1	36.8	107	143.8	25.59
1:2	34.64	107.83	142.5	24.31

[0436] 方法 #3-在独立的培养物中生产鼓突半抗体和洞半抗体, 独立离心, 沉淀混合并重悬, 之后裂解, 不添加还原剂而纯化 BsAb

[0437] 该方法意在通过同时纯化鼓突和洞来减少程序中的步骤数。

[0438] 独立培养细胞, 通过离心进行沉淀。将沉淀混合, 在提取缓冲液中重悬浮在一起。据认为, 在细胞膜破坏后, 半抗体将被释放到提取缓冲液中, 将会看到和以上方法 2 中类似的产物谱。

[0439] 实施例 3

[0440] 使用单个混合的细胞培养物生产异源多聚体蛋白质

[0441] 本实施例举例说明, 从包含两个宿主细胞群体的培养物形成异源多聚体蛋白质, 其中在该过程中不添加还原剂。

[0442] 方法 #4 - 在不添加还原剂下, 从相同培养物中的不同细胞群体生产鼓突半抗体和洞半抗体以形成完整的 BsAb

[0443] 首先在 0. 5 升摇瓶中以包含鼓突或洞半抗体的两种不同的大肠杆菌转化体进行共培养实验。为了进行该实验, 于 LB 培养基 (100 μ g/ml 羧苄青霉素) 中将 5mL 培养物在 30° C 过夜培养, 产生鼓突 (抗 EGFR) 和洞 (抗 cMet) 半抗体的起子培养物。使用相等 OD600 的过夜培养物, 按 3 个不同比率 (抗 EGFR: 抗 cMet ; 1. 5:1、1:1 和 1:1. 5) 接种 500ml 完全 CRAP 培养基 (100 μ g/ml 羧苄青霉素), 保持总种子体积为培养物的 1/100。使细胞在 30° C、200rpm 下生长 24 小时。然后通过离心 (6750xg、10 分钟、4° C) 沉淀细胞, 用于纯化。

[0444] 按每 10g 细胞沉淀物 100mL 的比率, 将细胞重悬浮于包含 25mM Tris (pH 7. 5)、5mM EDTA 和 125mM NaCl 的提取缓冲液中。在进行如实施例 2 中所描述的微流化提取和色谱制备后, 纯化 3 个不同比率的细胞提取物。首先在 Mab Select SURE 1mL HiTrap 柱 (GE Healthcare, S. San Francisco, CA) 上捕获双特异性抗体, 柱洗涤缓冲液仅包含 40mM 柠檬酸钠 (pH 6. 0)。在进行如实施例 2 中所描述的洗涤和洗脱后, 将蛋白 A 捕获合并物加载到 SP-HP 阳离子交换柱上, 进行如实施例 2 中所描述的纯化。在通过阳离子交换分离后, 对

于3个纯化物的每一个,将色谱峰混合并浓缩至体积约50-100微升,其中蛋白质浓度为约15mg/mL。起始接种比率看起来造成完整抗体最终量的差异,并且与在37°C培养过夜后将细胞沉淀混合到一起时所观察到的相比,这导致完整双特异性抗体对较低分子量形式的更高比例。见表4。

[0445] 表4

[0446]

接种比率	150 kD RFUs	75 kD RFUs	组合的 RFUs	150 RFU/总体的%
1.5 比 1	11.71	10.28	22.0	53.25
1 比 1	9.09	8.96	18.1	50.36
1 比 1.5	7.28	8.71	16.0	45.53

[0447] 为了确定共培养是否能够扩展到10升发酵规模(这对规模扩大工艺是非常关键的),以抗EGFR和抗cMet半抗体进行了几个实验。为了进行10升发酵,使用了包含1:1细胞比例的抗EGFR和抗cMet的接种起始培养物。在与实施例2中所述用于单个半抗体培养物的相同条件下,生长该10升共培养物。将细胞沉淀或全培养液用于提取和分离抗体产物,也如上所述。为了从细胞沉淀中提取产物,从一个10升发酵中产生了约2.5kg的糊。在包含25mM Tris(pH 7.5)和125mM NaCl的5升缓冲液中重悬浮该细胞沉淀。以polytron混合器处理沉淀2分钟,之后重悬浮该沉淀,然后进行微流化、澄清和准备如实施例2中描述的蛋白A捕获。该发酵实验被重复了2次以上,来自10升发酵罐的共培养分离的结果显示于图8C中。使用质谱表征约150kD的蛋白质和约75kD的蛋白质,以确定分子组分。令人惊奇的是,占优势的较高MW蛋白质是双特异性抗体,而约75kD蛋白质主要是cMet半抗体,这是由于其差异的表达谱所致。这表明,双特异性抗体已完全形成而不需要额外的化学步骤。因为双特异性抗体是鼓突和洞半抗体的1:1化学计量组合,因此仅有的75kD蛋白质的存在表明,该限制性半抗体的大多数已经自发掺入到完整的双特异性抗体中。

[0448] 该观察导致了开发简化的表达和纯化方案,如图8D中所示。在进行蛋白A捕获后,以含1.5M硫酸铵和25mM磷酸钠的缓冲液(pH 6.5)按1:1稀释抗体,将其加载到疏水相互作用柱(HIC)Dionex Pro Pac HIC-104.6mmx100mm(Sunnyvale, CA)上。30-60%梯度的B,A缓冲液由25mM磷酸钠(pH 6.95)和1.5M硫酸铵组成,B缓冲液由25mM磷酸钠(pH 6.95)和25%异丙醇组成。以15CV梯度分离蛋白质。蛋白质分成两个主要种类,一类包含完整双特异性抗体,另一类包含过量的抗EGFR半抗体。色谱分离的结果显示于图8E中。将包含完整抗体的级分混合,通过如下方式处理该混合物以除去任何残留的污染内毒素:在25mM醋酸钠缓冲液(pH 5.0)中附着到S-FF柱上,以含0.1%Triton X114的相同醋酸盐缓冲液洗涤,然后通过以起始醋酸盐缓冲液洗涤来除去该洗涤剂。使用25mMTris(pH 8.0),从S-FF柱洗脱蛋白质,合并,以SDS-PAGE、质谱和LAL测定法分析内毒素。在最终的制备物中,蛋白质包含0.076EU/mg的内毒素,表明其适于体内应用。最终的表征显示于图8F中。SDS-PAGE分析显示,大部分蛋白质是最终的完整双特异性抗体,质谱分析显示双特异性抗体的预期分子量,并且缺乏任何污染种类,特别是可能存在的同源二聚体形式。将使用共培养的改良

程序与需要退火和氧化还原化学的程序进行了比较,显示于图 8G 中。

[0449] 方法 #5-使用不同的鼓突: 洞腔比率,在相同的培养物中生产鼓突半抗体和洞腔半抗体以形成完整的 BsAb

[0450] 本实施例显示,使用类似的表达构建体(不同仅在待表达的半抗体上)的宿主细胞彼此生长相当,产生完整的 BsAb。

[0451] 实验已经证明,通过在扩大和表达前调节接种比率,可以容易地控制两条链的比例。

[0452] 为了确定共培养发酵期间接种比率是否得到维持,以不同细胞比率进行了试验,以确定在 24 小时共培养发酵结束时存在的鼓突或洞重链的量。将包含鼓突(抗 EGFR)或洞(抗 c-Met)质粒的细胞分开在 LB 培养基(100 μ g/ml 羧苄青霉素)中于 30° C 下生长过夜。使用该起子培养物,以不同的过夜培养物比率,接种完全 CRAP 培养基(100 μ g/ml 羧苄青霉素),保持组合的接种体积为最终培养物的 1:100。针对抗 EGFR: 抗 c-Met,测试比率为 10:1、5:1、2:1、1:1、1:2、1:5 和 1:10。在 30° C 培养 24 小时后,获得细胞样品,以非还原性 SDS-PAGE(12%Tris 甘氨酸),接着以 HRP 缀合的山羊抗人 IgG-Fc 抗体(Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX)进行 Western 印迹,分析了细胞样品。通过 SDS-PAGE 解析了两种重链,结果显示于图 8B 中。每个半抗体的量与共培养的接种比率相关,表明包含编码不同半抗体的质粒的细胞在共培养中不出现彼此超越的生长。

[0453] 方法 #6- 在相同培养物中生产鼓突半抗体和洞半抗体以形成完整的 BsAb - 膜通透化

[0454] 本实施例显示,膜通透化使半抗体释放到培养基中,随后形成完整的 BsAb 而不需要额外化学(例如,氧化还原或偶联)

[0455] 已知,导致脂蛋白合成缺陷的突变可以改变大肠杆菌的细胞膜,使周质蛋白质渗漏到培养基中,也使大肠杆菌对 EDTA 超敏感(Hirota, Y. 等. PNAS 74:1417-1420(1977))。比较了在添加和不添加 EDTA 时从菌株 65G4(W3110 Δ fhuA Δ phoA ilvG+ Δ prc spr43H1 Δ degP Δ manA lacI^q Δ ompT Δ lpp)释放的表达抗体。以 1:1 比率按方法 4 中的描述共培养表达 α -IL-4(洞)或 α -IL-13(鼓突)的细胞,在振动培养箱中于 30° C、200rpm 下生长 20 小时。在培养结束后,将培养物分成 3 等份。一个样品作为对照,不添加 EDTA。向其它两个样品添加 EDTA(pH 8.0)至终浓度为 10mM。将所有样品继续孵育 30 分钟,其后,向一个 EDTA 处理的样品加入 MgCl₂ 至终浓度为 20mM。将所有的样品在振荡培养箱中另外再孵育 30 分钟,随后通过离心(9200x g, 20 分钟, 4° C)除去细胞,上清液通过 GF/F 滤器(Whatman, Piscataway, NJ)和 0.2 μ m PES 滤器(Nalgene, Rochester, NY)过滤。可以加入牛胰 DNA 酶 I(Sigma, St. Louis, MO)至 4mg/l 来改善过滤。

[0456] 然后,如上所述,将过滤的上清液直接加载到 1mL 蛋白 A MabSelectSURE HiTrap 柱(GE Healthcare)上。如上所述,以醋酸洗脱捕获的蛋白质,蛋白质的峰回收可见于图 9A 中。结果显示,在 EDTA 处理的样品中,总 UV 吸收值增加。该吸收值是完整双特异性抗体和过量的半抗体。见图 9B 和 9C。

[0457] 在分开的试验中,将抗 IL-4 和抗 IL-13 半抗体分开表达或作为 65G4 细胞的 1:1 共培养物表达。按上述(方法 4)培养细胞,但是向完全 CRAP 培养基中补加有机硅消泡剂(Silicone Antifoam)(Fluka, Buchs, Switzerland)至 0.02%(v/v)。将细胞在振荡培

养箱中于 30° C、200rpm 培养 24 小时后,加入 EDTA (pH 8.0) 至终浓度为 10mM,继续孵育 1 小时后加入 MgCl₂ 至 20mM。通过离心 (6750xg、10 分钟、4° C) 收获细胞,过滤上清液 (0.2 μ PES, Nalgene, Rochester, NY),如上所述以蛋白 A 捕获抗体,通过 SDS-PAGE 和质谱分析抗体。显示于图 9D 的结果表明,仅在双特异性抗体的两个半抗体都存在时才观察到完整双特异性抗体的形成。此外,由于质谱分析表明 75kD 蛋白质条带主要是抗 IL-4 半抗体,故不需要任何另外的氧化还原化学,大多数抗 IL-13 抗体都掺入了双特异性抗体。以硫酸铵缓冲液将蛋白 A 纯化的双特异性抗体 1:1 稀释,使用实施例 3 中描述的相同程序,以 7.5mmX150mm ProPac HIC-10 柱 (Dionex, Sunnyvale, CA) 进一步纯化。发现完整的双特异性抗体在滞留时间 99.68 洗脱。将该峰合并,以 SDS-PAGE 在非还原条件下进行分析,发现其几乎完全由完整的抗体种类组成。为了确认该蛋白质是纯的异源二聚体双特异性分子,通过 ESI-TOF LC/MS 对该蛋白质进行了分析。将约 10 微克的该双特异性抗体注入到 PLRP-S 300A 3 微米 50x2.1mm 反相柱 (Polymer Laboratories) 上,通过 4.3 分钟梯度的 34-45%0.05%TFA 和乙腈,使用 Agilent 1200 系列 HPLC、0.5mL/min 的流速和柱加热器在 80° C,进行了分离。通过 Agilent 6210TOF 分析了从 LC 洗脱的蛋白质。观察到了包含蛋白质的单个峰,使用 Agilent Mass Hunter 软件 B.02.00 版对该峰去褶合,其中使用 50,000-160,000 的质量范围、1.0Da 步骤、30.0S/N 阈值、平均质量 90、无限制质量范围、和设置为自动的同位素宽度。大部分信号代表双特异性分子的预期质量。从氨基酸序列计算的完整异源二聚体双特异性抗体的质量为 144,044,这在测定质量的 1-2 道尔顿范围内,而可能的同源二聚体蛋白质的计算质量对于抗 IL-4 为 144,954.6,对于抗 IL-13 为 145,133.4。

[0458] 对该组抗体,以及也在 65G4 的 1pp 缺失情况下,我们测试了不同的接种比率是否会在整个培养期间保持。使用含相等 OD600 的抗 IL-4 (洞) 或抗 IL-13 (鼓突) 的种子培养物,按 2:1 和 1:2 接种 500ml CRAP 培养基,如前述 (见方法 6),进行培养和在发酵结束后通透化处理。除了将 HIC A 和 B 缓冲液的 pH 降低至 6.5 外,如上述,通过蛋白 A 捕获和随后通过 HIC 分离,纯化这两个不同的培养基制备物。两个不同起始培养物比率的结果显示于图 9E 中。观察到,大部分蛋白质是完整双特异性抗体。通过质谱对其它峰进行了表征并标记在图 9E 上。微弱检测到抗 IL-13 半抗体,可见显著更多量的抗 IL-4。在 33/66 比率的抗 IL-4 比抗 IL-13 中,观察到了更多的抗 IL-13 和少量的抗 IL-4 剩余。由此我们发现,接种的比率在整个培养期间被维持,可以通过操纵起始培养物的比率来平衡所表达的半抗体的比率,从而实现程序的优化。

[0459] 我们继续以许多不同的抗体变体在 Δ 1pp 细胞中测试了该共培养表达程序。图 9F 显示了几个示例性半抗体在 HIC 色谱后制备后最终纯化的蛋白质。

[0460] 实施例 4

[0461] 异源多聚体蛋白质文库

[0462] 本实施例举例说明了异源多聚体蛋白质文库的构建。

[0463] 可以使用某些方法来筛选双特异性抗体的混合物,或使用所述方法快速产生大的双特异性抗体阵列。

[0464] 方法 #7

[0465] 在一些情况下,对双特异性抗体的选择是未知的,但可以是许多不同的半抗体的

组合的结果。或者,特定的靶标组合可能是所需要的,例如抗 IL-4/ 抗 IL-13,但是有许多候选半抗体待选择。可以通过以矩阵的形式组合半抗体,以找到产生最好结合或功效的特定半抗体组合,可以快速产生许多双特异性抗体变体。在本实验中,可以以约 10 倍(或更高)过量于筛选所需要的抗体量,生产一种抗体例如抗 CD3。然后,可以使用实施例 1 中描述的程序将该分子退火和氧化。可以使用该第一抗体的总量的约十分之一,与等量的约 10 个靶向不同抗原的半抗体(例如抗 CD19、抗 CD20)组合,如图 10 所示。如果需要其它第一半抗体与该第二半抗体库组合,则可以产生一组筛选分子。

[0466] 在该方法的第二变型中,可以使用“正常的”大肠杆菌宿主细胞或使用具有非功能性脂蛋白表型的突变体菌株,以共培养物的形式产生第一抗体(例如抗 CD3)。然后,可以将该半抗体系统地添加到每个可变半抗体中,以产生一批双特异性分子,所有分子都包含该第一靶向半抗体。

[0467] 方法 #8

[0468] 可以将第一半抗体,与许多的可选择配偶体半抗体组合,组合方式使得可以产生足够量的该第一半抗体以与待组合的所有那些配偶体半抗体进行组合。然后在单个反应中进行批量退火,其中第一半抗体是鼓突或洞形式的重链,而该组第二靶向半抗体是互补突变体。由此,可以产生复杂的抗体混合物,可以用作组合以治疗疾病。

[0469] 可选地,可以使用以上实施例中描述的共培养方法,产生具有一组第一半抗体和可变的第二半抗体的双特异性抗体复杂混合物。然后可以批量分离这样的混合物和用作筛选物质,之后可以对双特异性变体混合物中的阳性结果进行去褶皱,以确定活性的双特异性抗体种类,或可以将该组合的混合物用作更有效的治疗混合物。

[0470] 实施例 5

[0471] 体外活性

[0472] 在本实施例中显示,本文中描述的双特异性抗体在体外系统中具有活性。在实施例 5 和实施例 6 中使用了两个细胞系。在这些试验中,胰腺导管癌细胞系 KP4 和鳞状细胞癌细胞系 A431 可以分别由 Met 或 EGFR 强力驱动,因此,它们是探究 bsAb 抗每个靶标的功效的合适细胞系和肿瘤异种移植。

[0473] 从 Riken BioResource Center Cell Bank 获得 KP4 细胞系(细胞系 #:RCB100 5;3-1-1Koyadai,Tsukuba-shi,Ibaraki 305-0074 日本)。从美国典型培养物保藏中心(ATCC,Manassas,VA)获得 A431 细胞系(CRL-1555)。

[0474] 以 PBS 洗涤癌细胞 A431 一次,重悬浮于无血清培养基中,计数,然后加到 96 孔板中(2500 细胞/孔)。然后以人 HGF(0.5nM)和 TGF α (0.05nM),单独地或与剂量范围的(1)抗 EGFR,(2)抗 c-met 抗体(“单臂”c-met)、(3)抗 EGFR 和抗 c-met 抗体的组合、或(4)双特异性抗 EGFR/抗 c-met 抗体一起地,处理细胞。按照生产商的建议(BioSource International;Camarillo,CA)进行 3 天的 AlamarBlue™测定。通过非线性回归分析以 4 参数模型(KaleidaGraph ver. 3.6, Synergy 软件;Reading,PA)测定 IC₅₀值。

[0475] 在 Met 依赖的体外和体内 KP4 细胞测定中,通过 TGF- α 和 HGF 处理刺激的生长可以被抗 c-met 抗体、抗 c-met 抗体和抗 EGFR 的组合、以及双特异性抗体抑制。以抗 EGFR 作为单一活性剂的处理在这些细胞中表现出有限的活性。然而,与添加抗 c-met 单独或抗 c-met 加抗 EGFR Abs 相比,双特异性抗体在 KP4 细胞中导致更有利的抑制。在主要由 EGFR

驱动的 A431 细胞中,抗 EGFR 抗体单独和抗 c-met 抗体单独都不能显著抑制细胞增殖。两个分子的组合显示出对细胞增殖一定程度的抑制,然而双特异性抗体在相同的浓度下显示出更强的活性。除了抗增殖外,细胞还表现出凋亡。

[0476] 在这些测定中,与分别添加抗 c-Met 和抗 EGFR 抗体的组合或单独这些抗体相比,双特异性抗体显示出改善的性能。这些数据说明,正是抗 c-Met 和抗 EGFR 抗体组合于一个抗体上的排列方式,使得该双特异性抗体更优越。结果显示于图 11 中。

[0477] 实施例 6

[0478] 体内活性

[0479] 本实施例证明本文中描述的双特异性抗体在体内模型中具有活性。

[0480] 从 Charles River Laboratories, Inc. (Hollister, CA) 获得 6-8 周龄重 22-30g 的雌性裸鼠。将小鼠在 Genentech 于标准的啮齿类动物小隔间笼子中笼养,在肿瘤细胞移植前使其适应研究条件至少 3 天。仅将看起来健康和无明显异常的动物用于研究。所有的试验程序均符合美国生理协会 (American Physiology Society) 的指导原则,经过 Genentech 机构动物管理及使用委员会 (Genentech's Institutional Animal Care and Use Committee) 的批准。以人 KP4 胰腺癌细胞 (每只小鼠,于 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 加 Matrigel (BD Biosciences) 中的 5 百万个细胞),或人 A431 鳞状细胞癌细胞 (每只小鼠,于 HBSS 加 Matrigel 中的 5 百万个细胞),对小鼠进行皮下注射。当肿瘤达到约 150mm³ 时,小鼠随机分组,以媒介物或双特异性 EGFR/c-met (bsEGFR/c-met) (50mg/kg IP 1x/周) 处理 2 周。

[0481] 使用 Ultra Cal-IV 测径器 (Model 54-10-111; Fred V. Fowler Co.; Newton, MA) 测量肿瘤的二维 (长和宽) 体积,使用 Excel 第 11.2 版 (Microsoft Corporation; Redmond WA) 进行分析。使用 KaleidaGraph, 第 3.6 版 (Synergy Software; Reading, PA) 绘制肿瘤抑制图。按下列公式计算肿瘤体积:

[0482] 肿瘤大小 (mm³) = (较长测量 × 较短测量²) × 0.5

[0483] 通过下述混合模型方法,分析数据。在此,没有计算严格的平均值和标准差。未提供标准差来解释变异,而是使用了置信区间。将其在表中在 AUC/天 %TGI 后的括号中作为上限和下限报告。使用 Adventura ProAV812 秤 (Ohaus Corporation; Pine Brook, NJ) 测量动物体重。使用 KaleidaGraph 第 3.6 版绘图。使用下列公式计算百分比体重改变:

[0484] 组百分比体重改变 = (新体重 - 起始重量) / 起始重量 × 100

[0485] 为了适当分析从相同动物随时间重复测量的肿瘤体积,使用了混合模型方法 (Pinheiro 等, Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. (2008) R 包, 第 3.1-89 版)。该方法考虑了重复测量和由于在研究结束之前任何非处理相关的动物死亡导致的适度流失。

[0486] 使用三次样条回归 (cubic regression splines), 拟合在每个剂量水平上 log₂ 肿瘤体积的时间进程的非线性曲线。然后将这些非线性曲线与混合模型中的剂量进行关联。使用下列公式计算按媒介物的百分比 (%TGI) 表示的肿瘤生长抑制, 表示为相对于媒介物, 每天相应剂量组的拟合曲线下面积 (AUC) 的百分比:

[0487] $\%TGI = 100 \times (1 - AUC_{\text{剂量}} / AUC_{\text{媒介物}})$

[0488] 为了确定 %TGI 的不确定区间 (uncertainty intervals, UIs), 使用拟合曲线和拟

合协方差矩阵产生随机样品作为对 %TGI 分布的近似。随机样品由拟合混合模型的 1000 个模拟实现组成,其中对于每个实现,重新计算了 %TGI。所报告的 UIs 是这样的值,对于该值,考虑到该拟合模型,95% 次的该重新计算的 %TGI 值将落于该区间中。使用该模拟分布的 2.5 和 97.5 百分点作为 UIs 的上限和下限。

[0489] 使用 R, 第 2.8.1 版 (R Development Core Team 2008; R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria) 和 Excel, 第 12.0.1 版 (Microsoft Corporation) 绘图。使用 R, 第 2.8.1 版分析数据,使用 nlme 包第 3.1-89 版 (Pinheiro 等, 2008), 在 R 中拟合该混合模型。

[0490] 图 12 和 13 显示了抗 EGFR/c-met 双特异性抗体分别在 KP4 胰腺异种移植物模型和 A431 鳞状细胞癌异种移植物模型中的体内活性。对于两个模型,与仅接受媒介物处理的对照动物相比,双特异性抗体能够抑制体内肿瘤生长。该图表明,以线性混合效应 (LME) 拟合,通过施用双特异性抗体,肿瘤的体积缩减了,在 KP4 异种移植物中,处理后第 20 天,肿瘤体积为 505mm^3 ,与之相比,仅施用媒介物为 1710mm^3 ;在 A431 异种移植物中,20 天后为 328mm^3 ,与之相比,在仅媒介物对照中为 495mm^3 。总的来说,在以 %TGI 表示的 AUC/ 天上存在显著的改变。对于在 KP4 异种移植物中的双特异性抗体处理,存在 85% 的肿瘤生长抑制 (TGI),在 A431 异种移植模型中存在 68% 的 TGI。

[0491] 实施例 7

[0492] 使用 CHO 细胞培养物生产异源多聚体蛋白质

[0493] 本实施例举例说明从包含两个宿主 CHO 细胞群体的培养物形成异源多聚体蛋白质。

[0494] 通过使用本领域公知的构建体和技术 (见例如, Ye 等, Biotechnol Bioeng. 2009 Jun 15; 103 (3): 542-51.), 瞬时表达重链和轻链, 在分开的培养物中产生了包含鼓突或洞突变的半抗体。在 1 升培养基中培养细胞 (见例如, Wong 等, J. Biol. Chem. 2007 282 (31): 22953-22963), 14 天后收获细胞。

[0495] 在 5mL MabSURE SELECT 柱上捕获各半抗体。然后以 10 倍柱体积 (CV) 的平衡缓冲液洗,接着以 10CV 柠檬酸钠低电导率 (conductivity) 缓冲液洗涤柱 (平衡缓冲液由 50mM TRIS pH 8.0、150mM NaCl、0.05% Triton X-100 和 0.05% Triton X-114 组成; 低电导洗涤缓冲液由 25mM 醋酸钠 pH 6.0 组成)。以 0.15M 醋酸钠 (pH 2.7) 洗脱每个臂。

[0496] 将每个半抗体在室温下按 1 比 300 的比例过夜透析到 50mM TRIS pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA 中。然后离心每个臂,使用 0.22 微米醋酸纤维素滤膜过滤,按 1 比 1 的比例将两个臂混合在一起 (总浓度小于 2mg/mL)。然后,按以下两种方法之一处理混合物:

[0497] 氧化还原 (进行水浴): 然后在 37°C 水浴中对混合物进行加热。一小时后,从水浴中移出氧化还原混合物,冷却至室温。一旦混合物到达室温,加入新鲜制备的还原剂二硫苏糖醇 (DTT) 至终浓度为 2mM DTT。将混合物于室温放置 2 小时,然后使用 Amicon Ultracell 离心滤器 (10K) 将其浓缩至 11mg/mL,过夜透析到 50mM TRIS pH 8.0, 150mL NaCl (1:300) 中。

[0498] 氧化还原 (不进行水浴): 将混合物于室温放置 3 小时,然后加入新鲜制备的还原剂二硫苏糖醇 (DTT) 至终浓度为 2mM DTT。将混合物于室温放置 2 小时,然后使用 Amicon Ultracell 离心滤器 (10K) 将其浓缩至 11mg/mL,过夜透析到 50mM TRIS pH 8.0, 150mL

NaCl (1:300) 中。

[0499] 在氧化还原后,类似前部分,在 15mL HIC ProPac 10 柱上,使用 20CV 梯度纯化组装的产物。过柱缓冲液是 25mM 磷酸钾、0.7M 硫酸铵 pH 6.5,洗脱缓冲液是 25mM 磷酸钾 pH 6.5、25% 异丙醇。收集 1mL 级分,通过 4-20%Tris- 甘氨酸 SDS PAGE 分离峰级分,以分析纯度和根据结果进行合并。然后使用 Amicon Ultracell 离心滤器 (10K) 将合并物浓缩到约 1.5mg/mL,透析到 50mM TRIS pH 8.0, 150mM NaCl 中,进行 0.22 μ m 过滤。

[0500] 通过质谱确认了每个组装的双特异性抗体的身份。通过 4-20%Tris- 甘氨酸 SDS PAGE 凝胶和生物分析仪分析了纯度。通过 SEC-MALS 确定了聚合物水平。

[0501] 结果显示于图 14-19 中。本实施例证明,可以使用 CHO 宿主细胞生产双特异性抗体。本领域技术人员将明了,可以用该方法生产其它异源多聚体蛋白质。

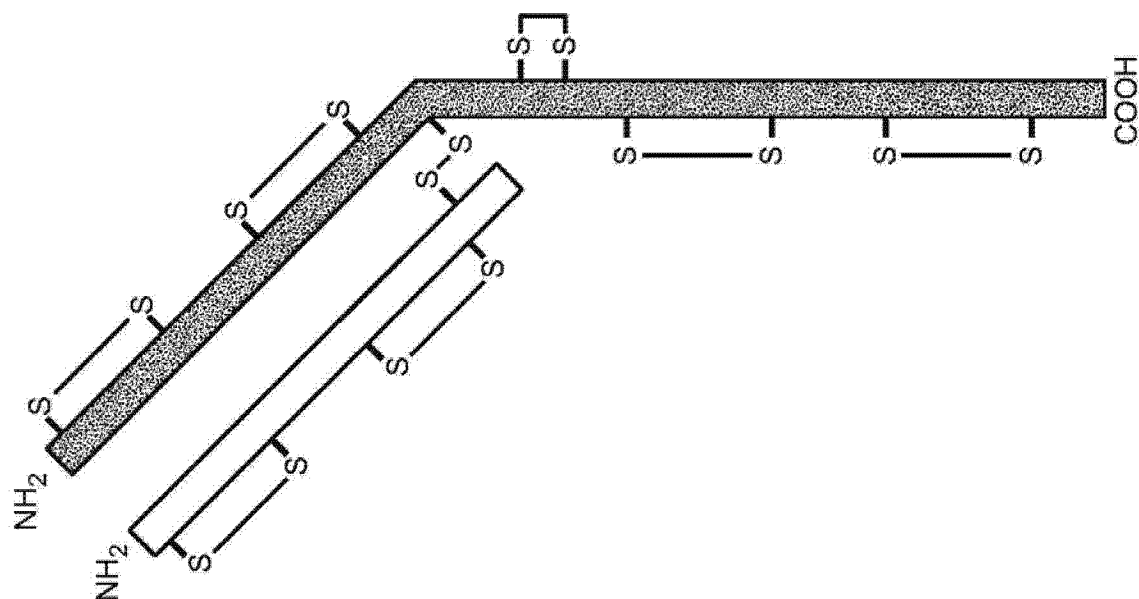


图 1A

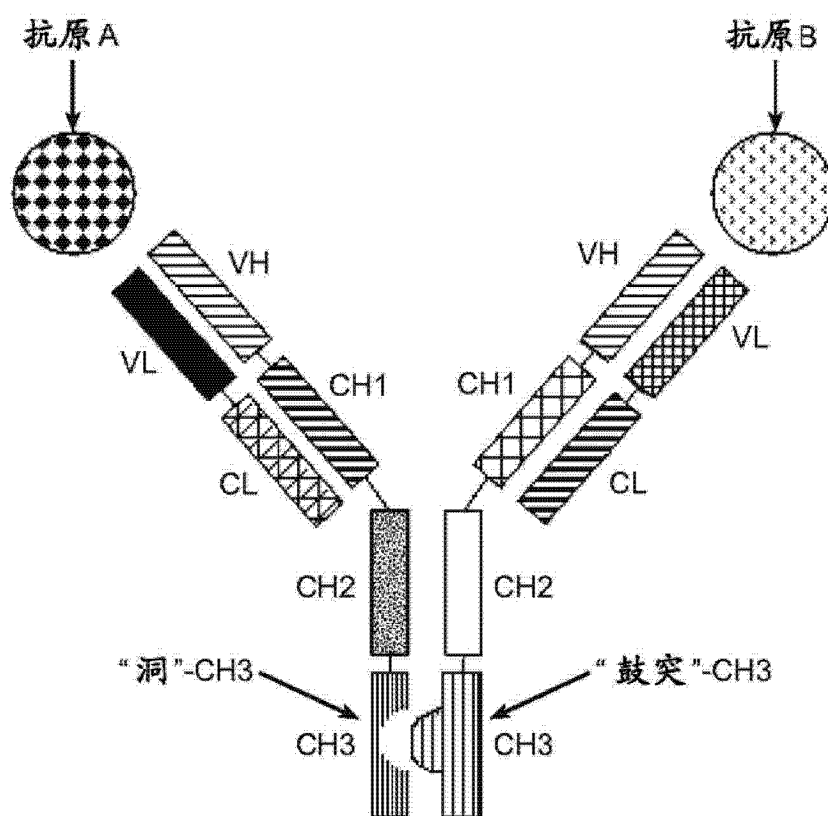


图 1B

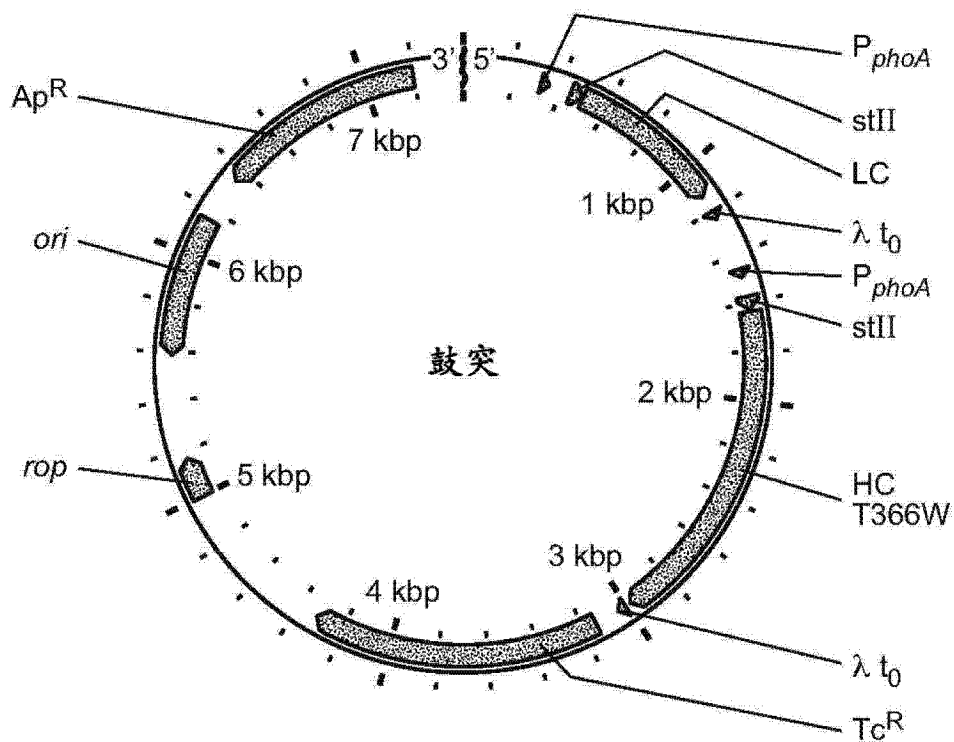


图 2A

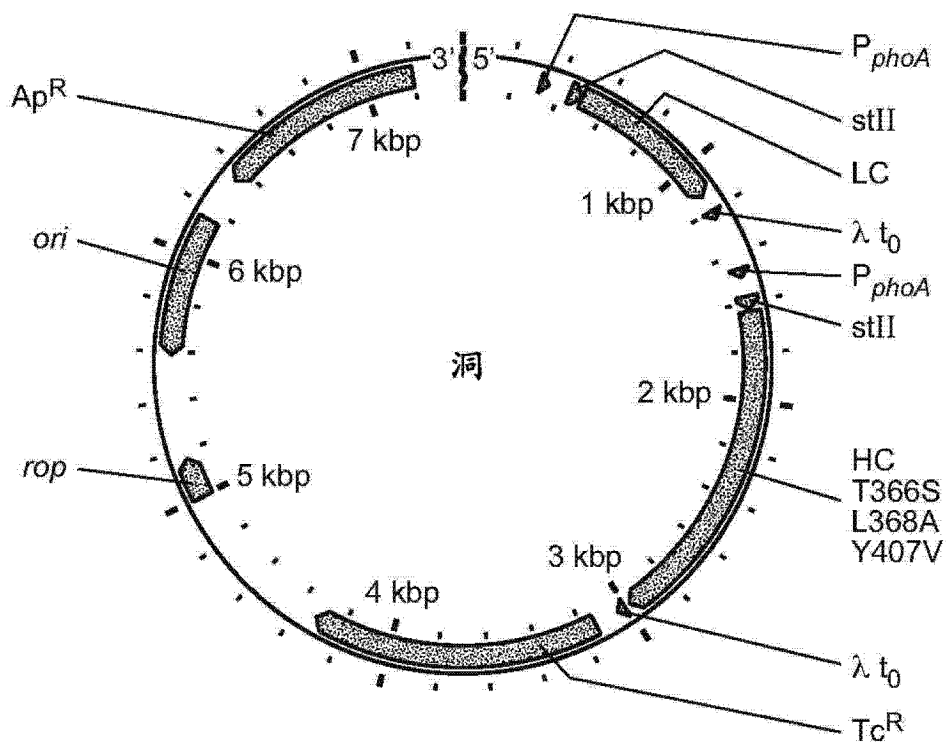


图 2B

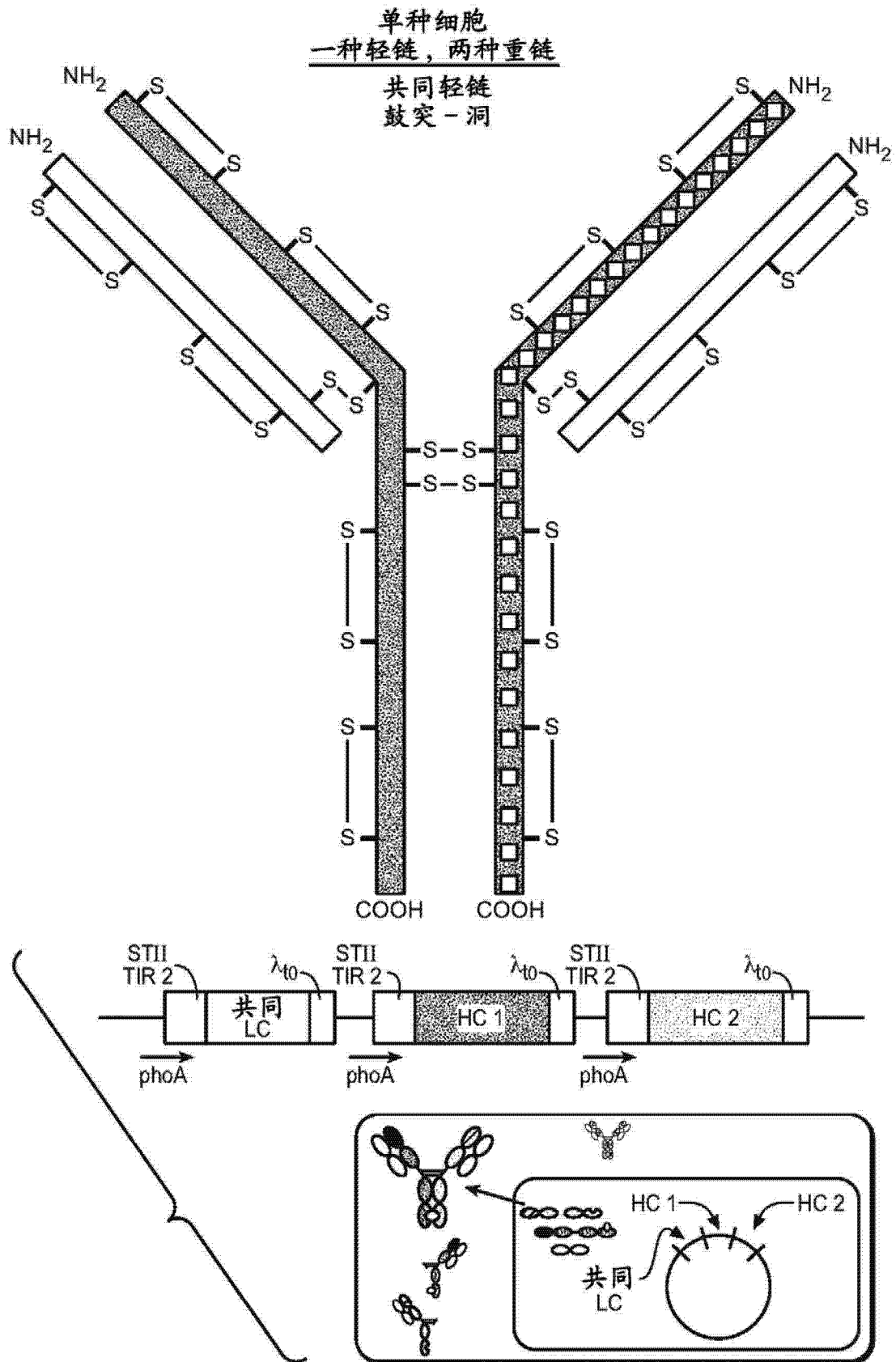


图 3A

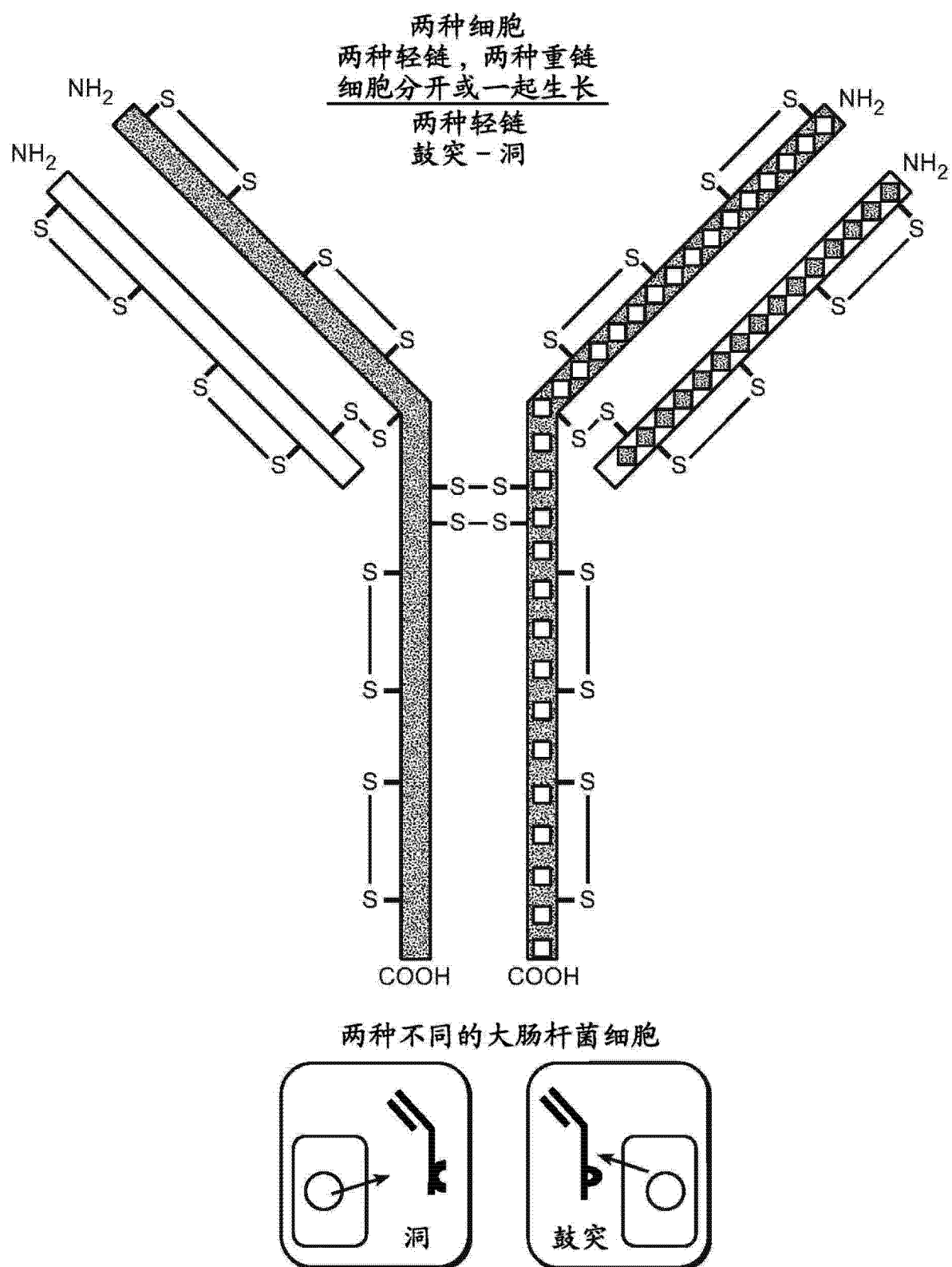


图 3B

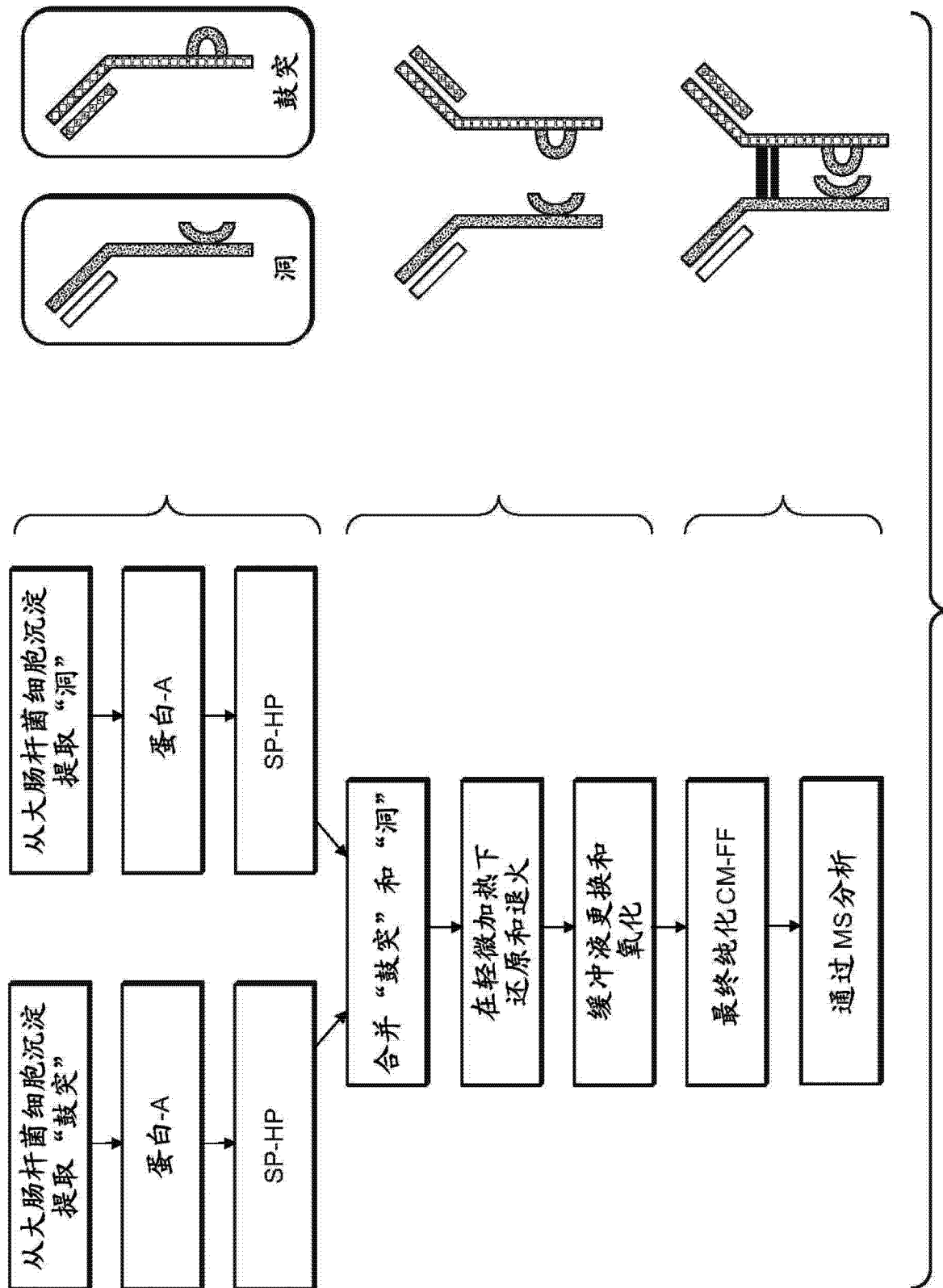


图 4A

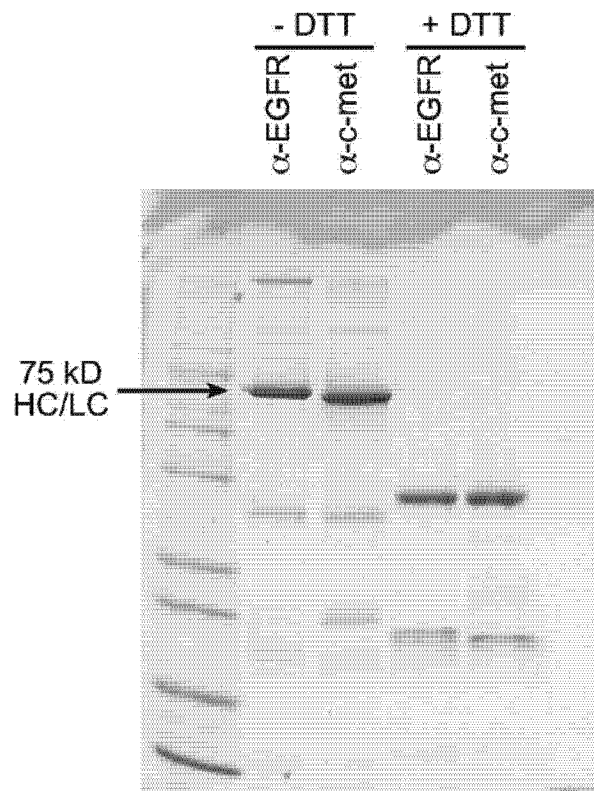


图 4B

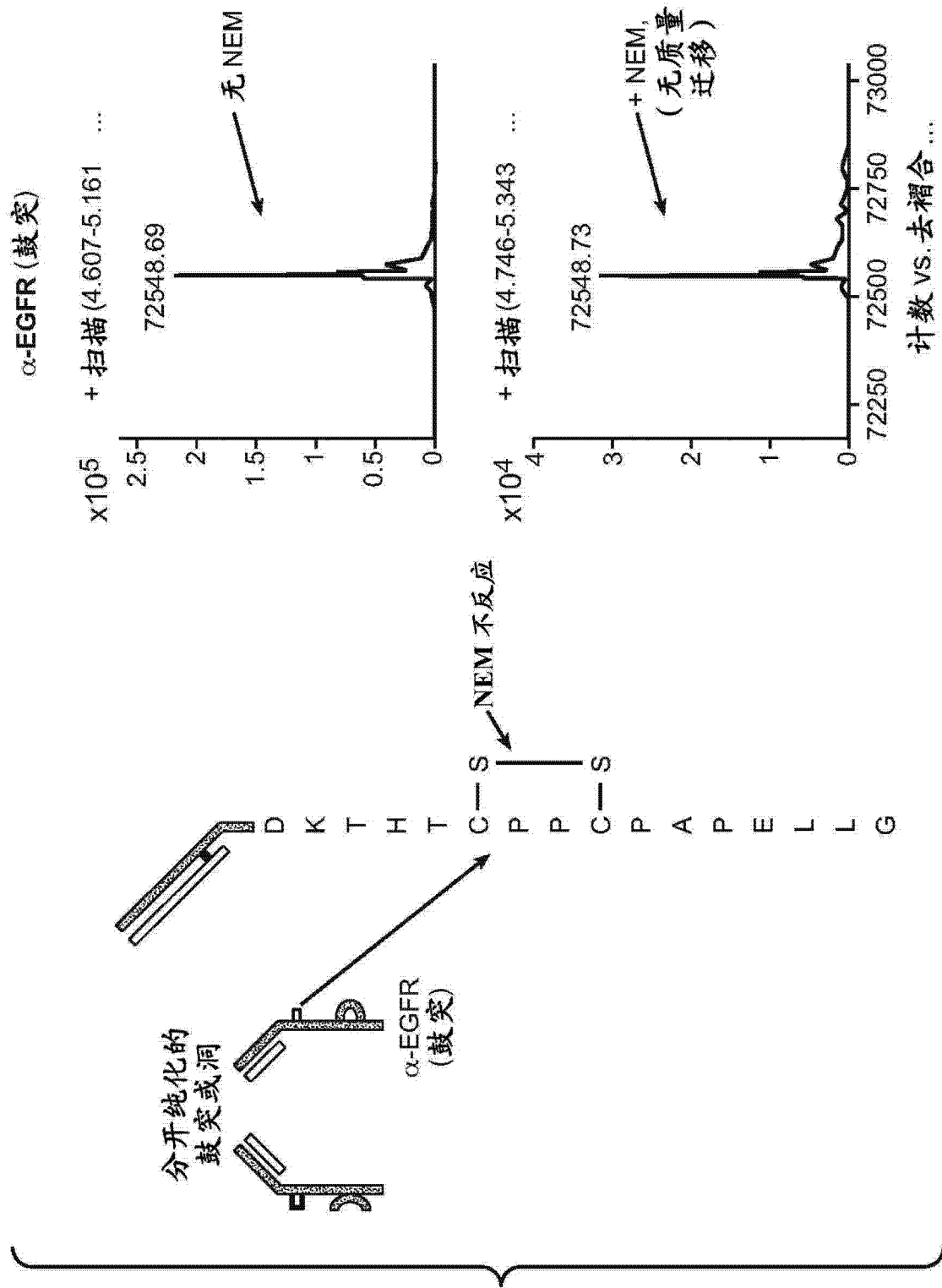


图 4C

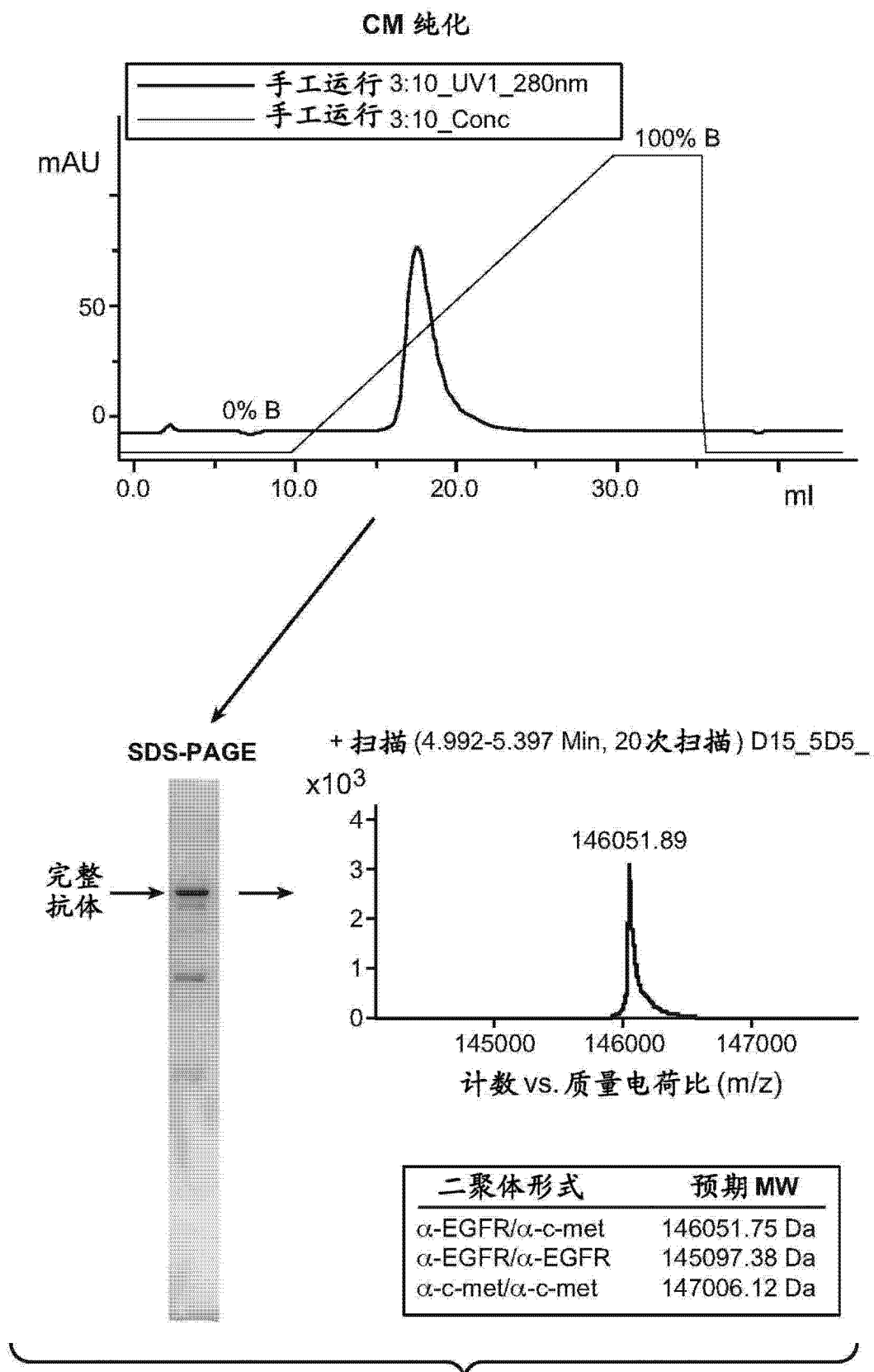


图 4D

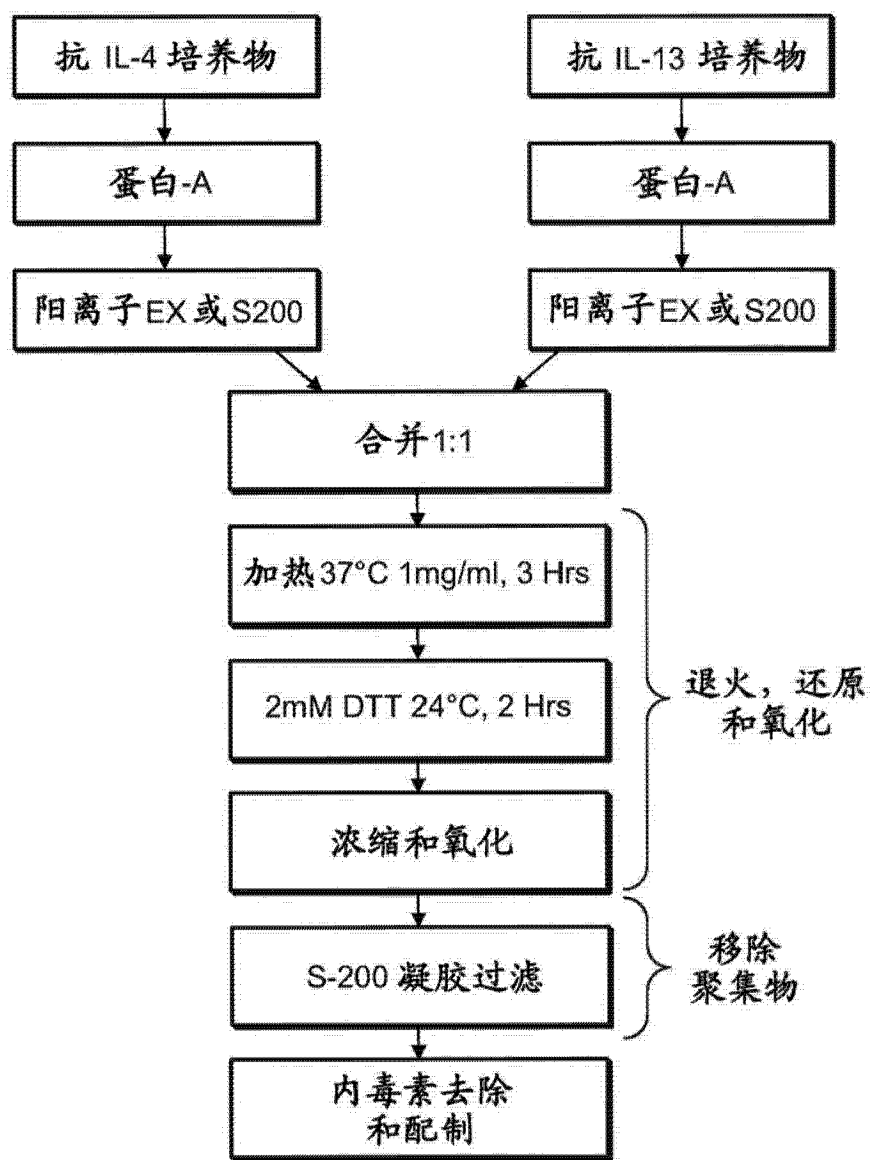


图 5A

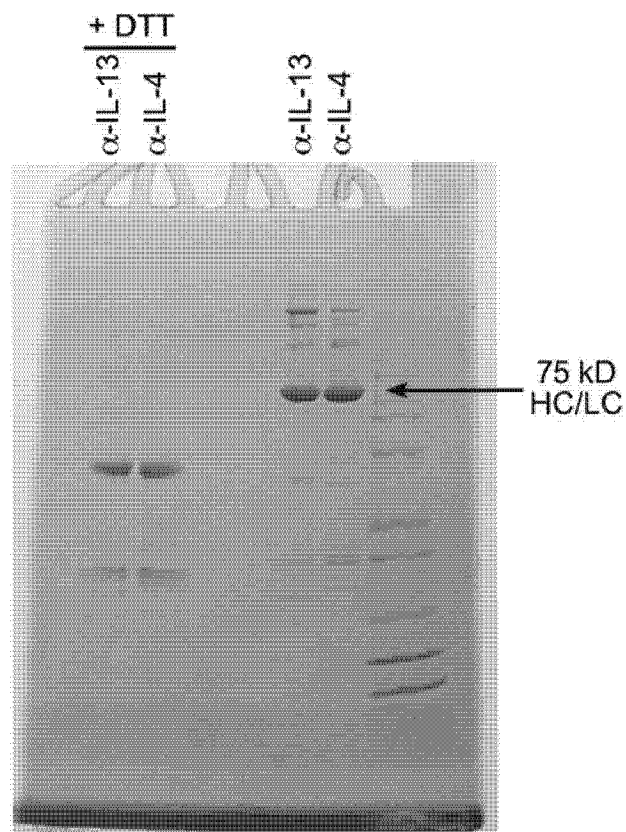


图 5B

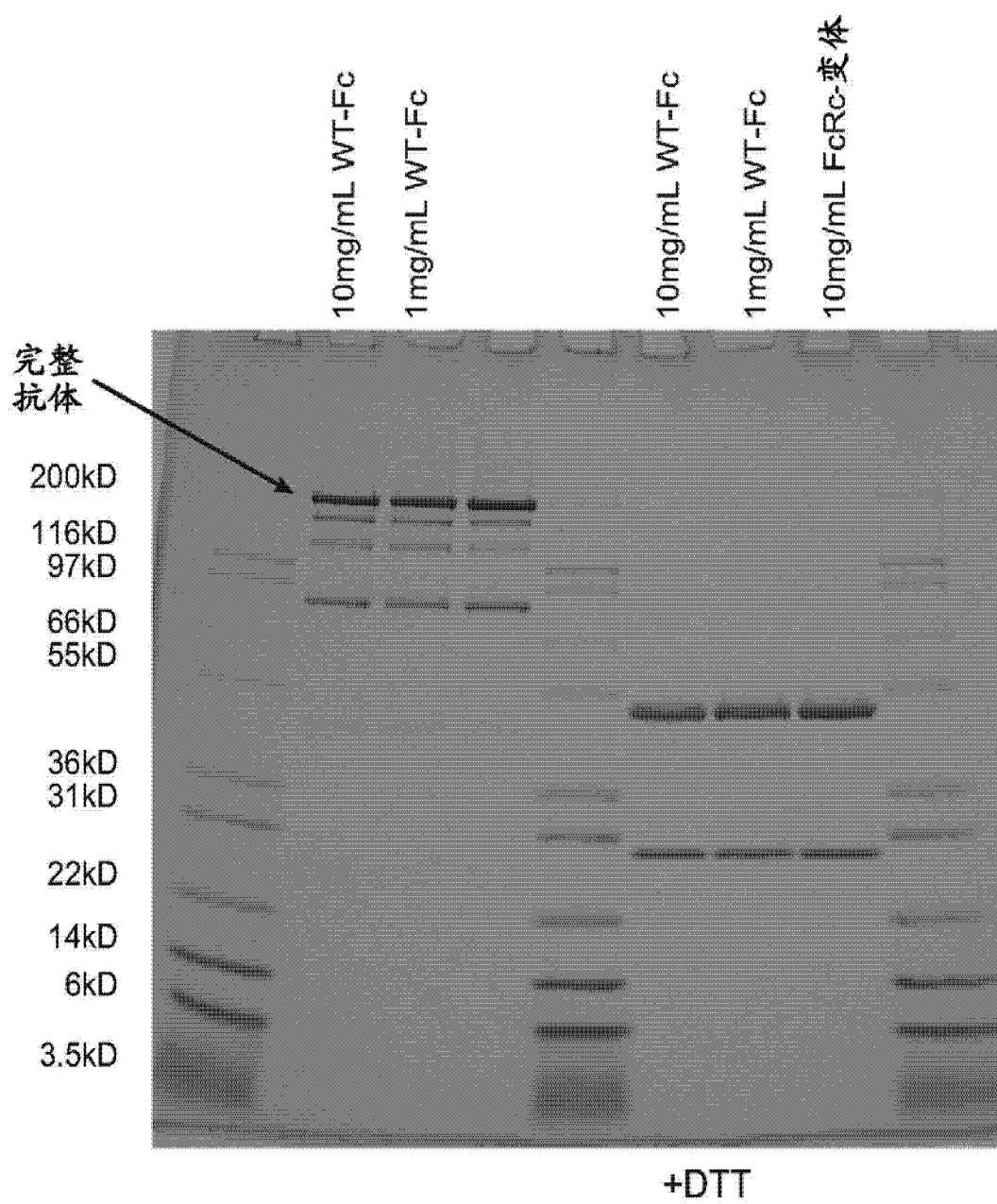


图 5C

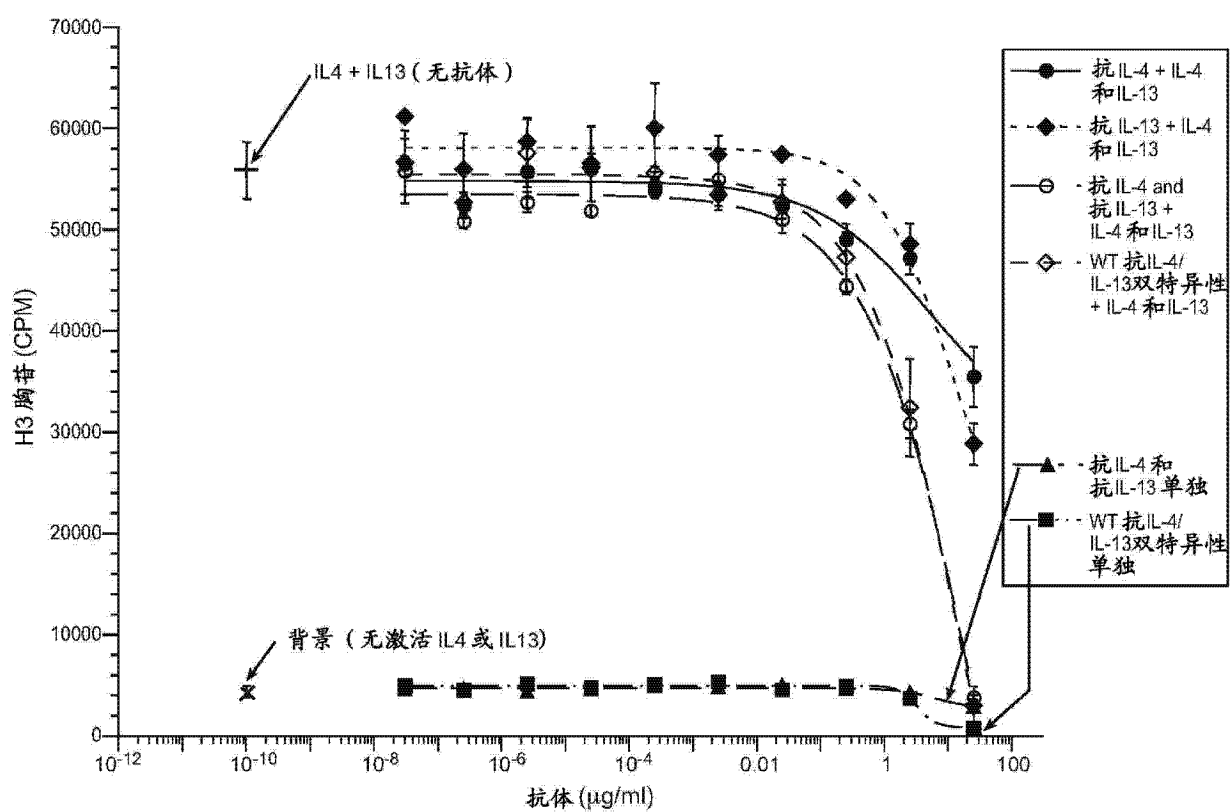


图 6A

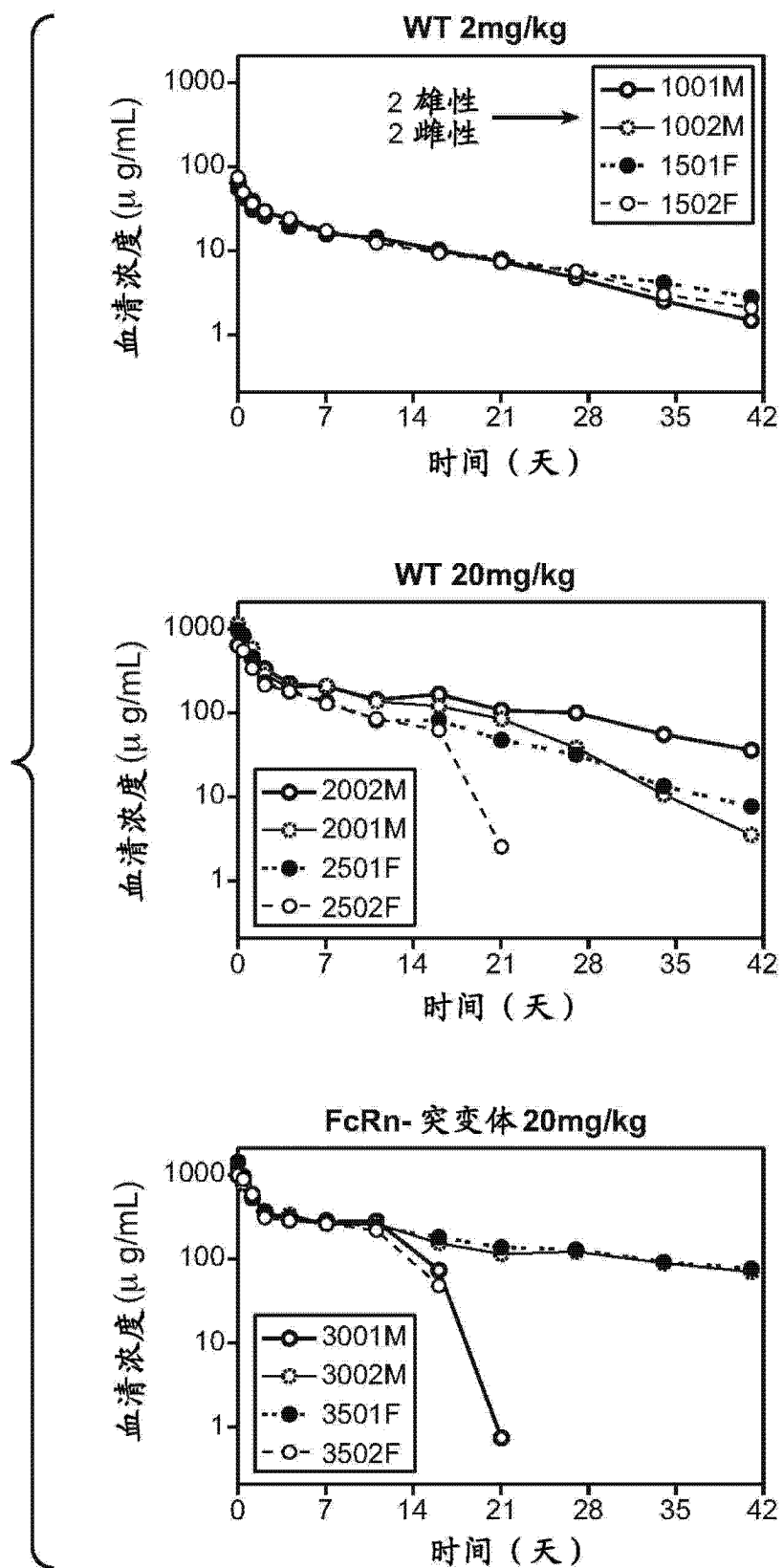


图 6B

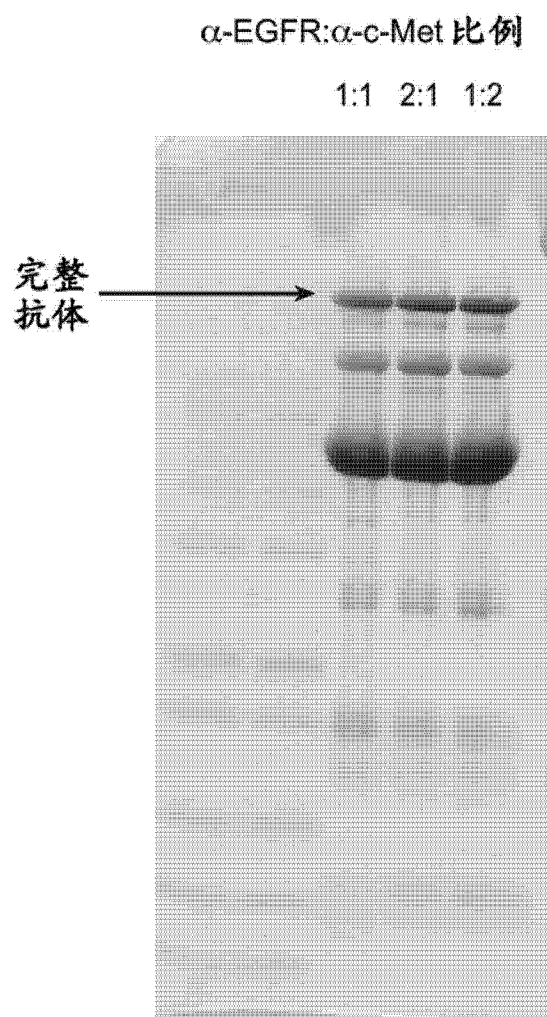


图 7

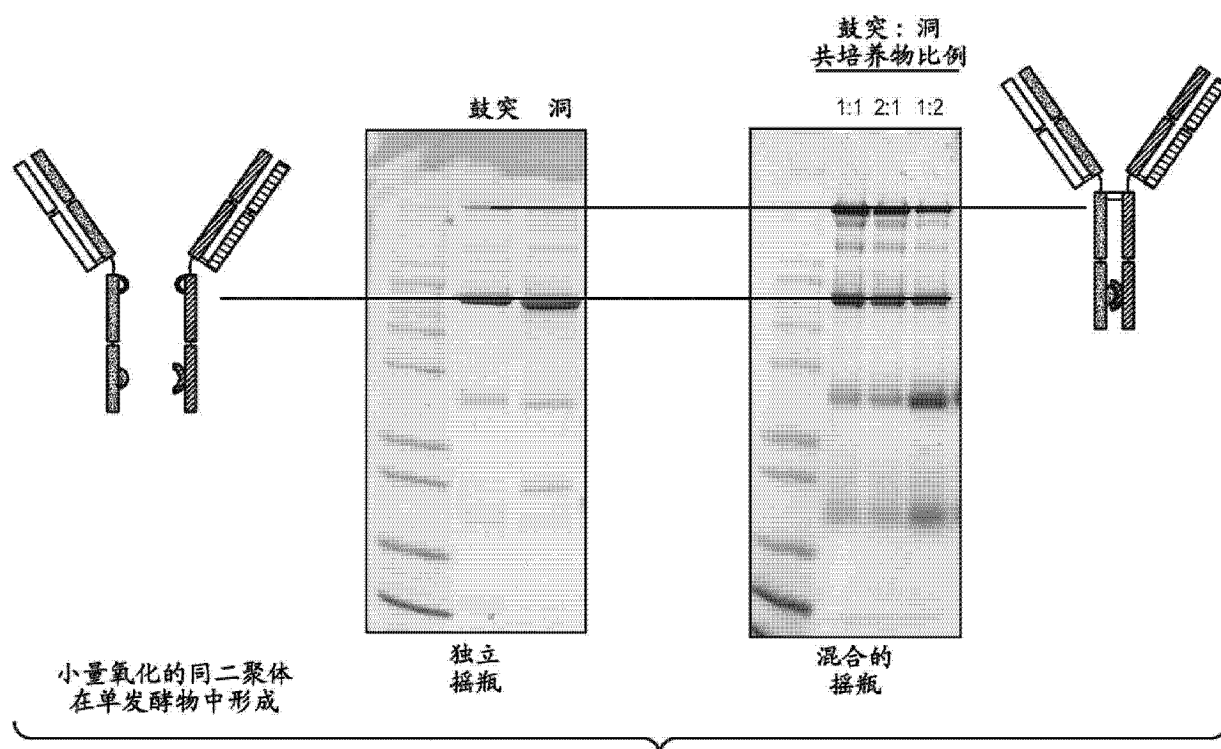


图 8A

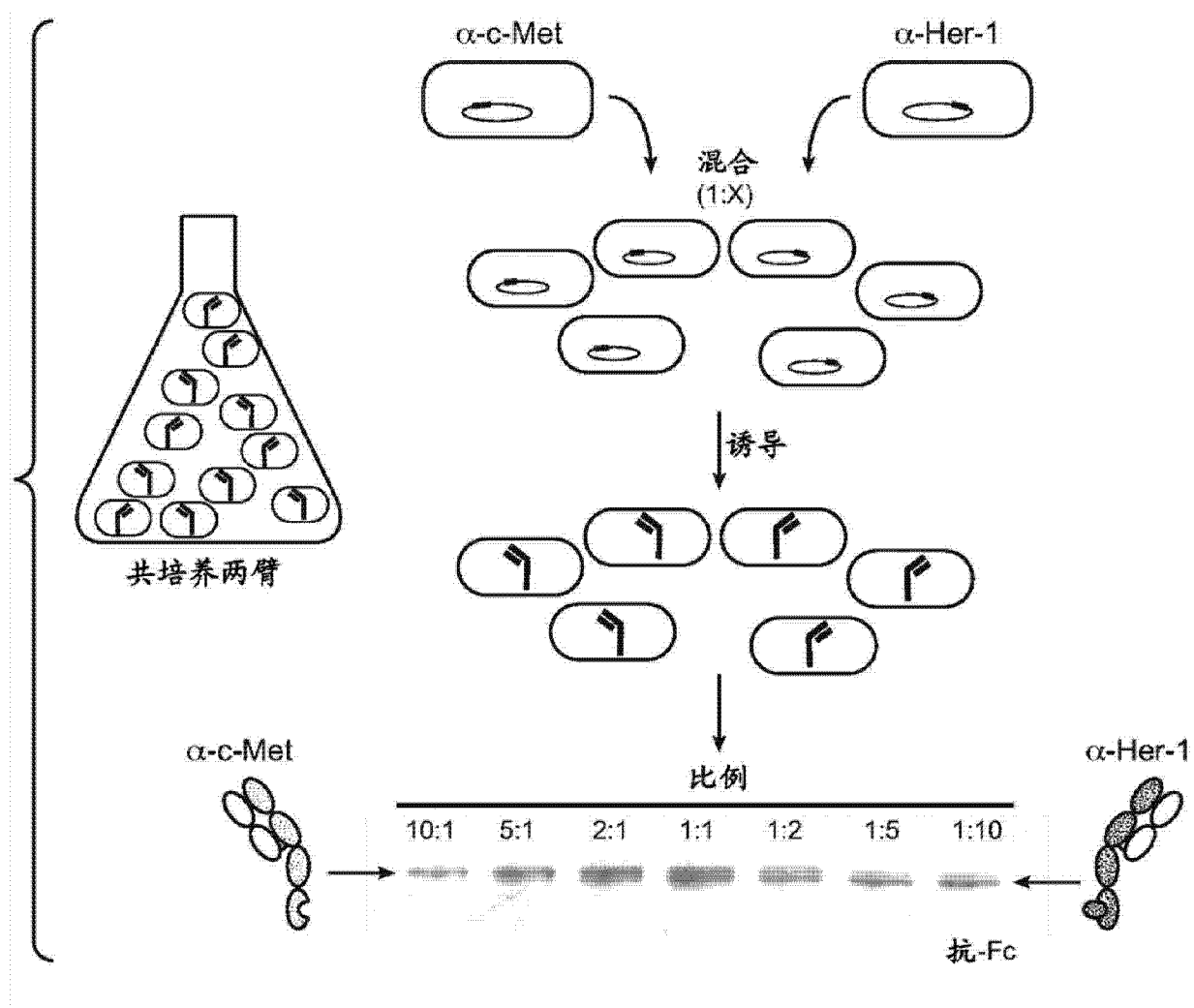


图 8B

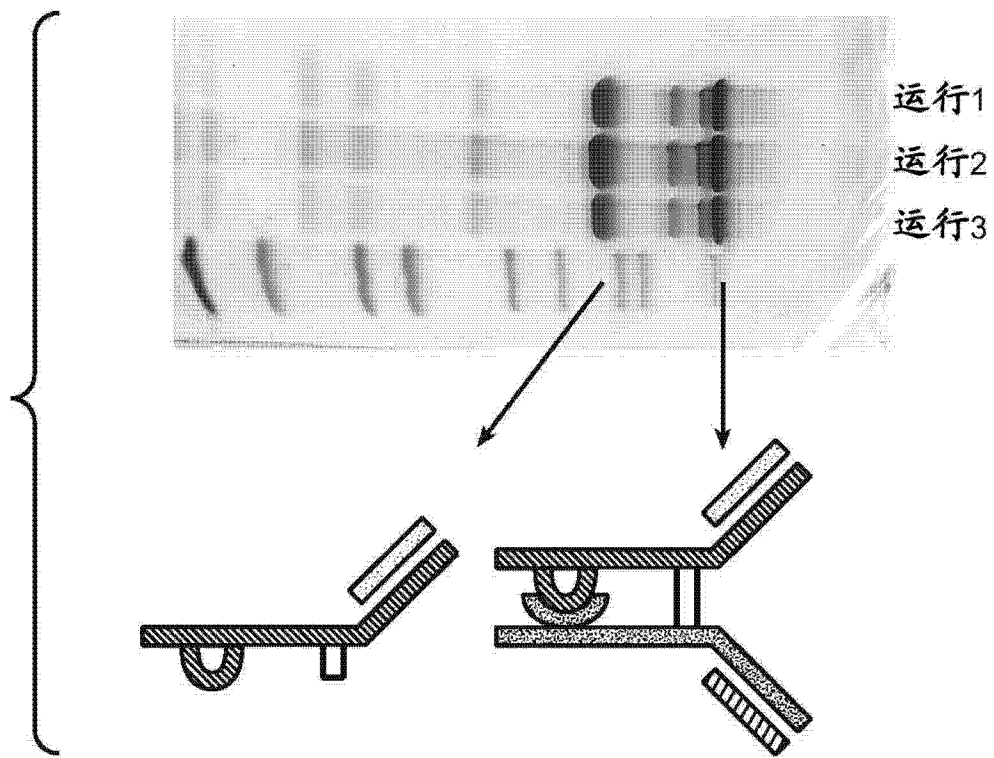


图 8C

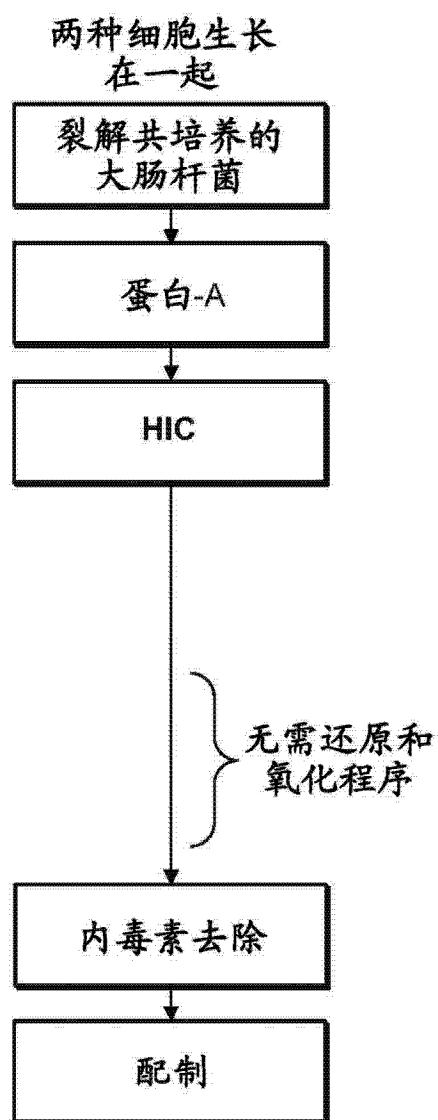


图 8D

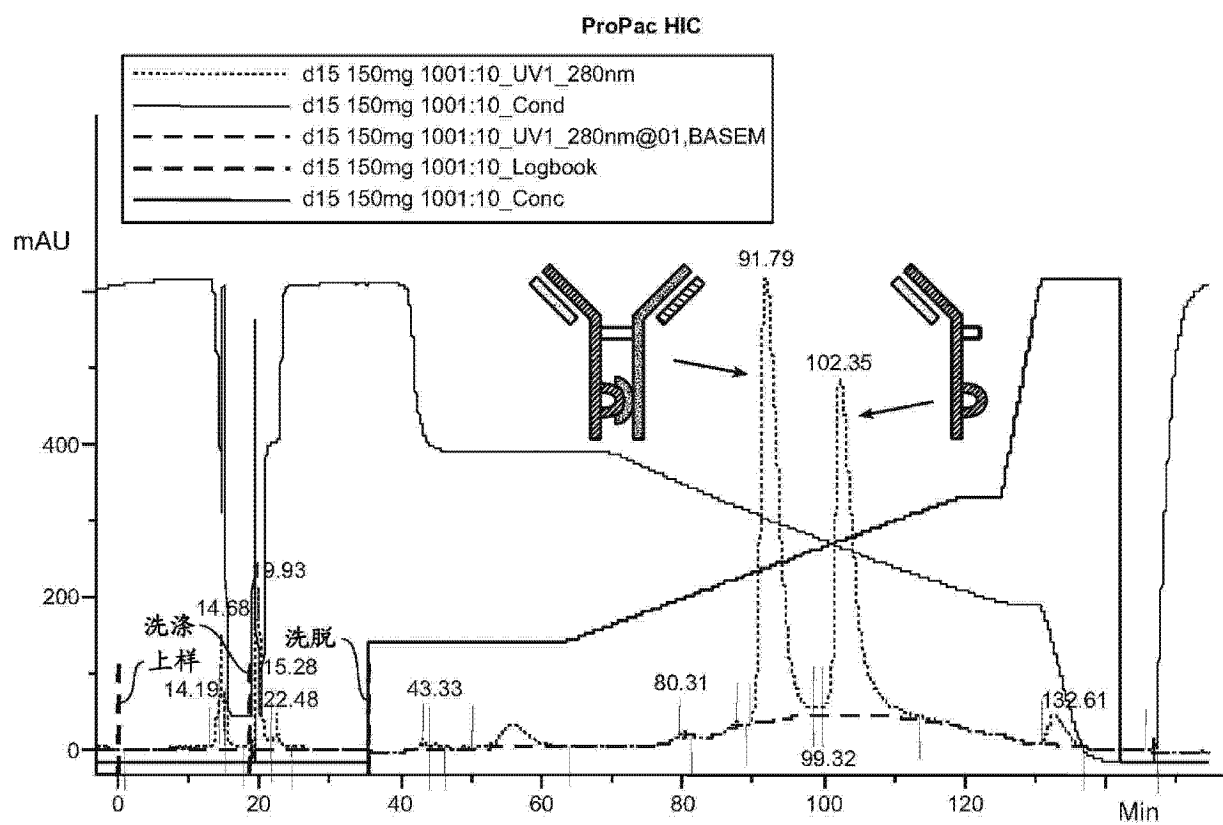


图 8E

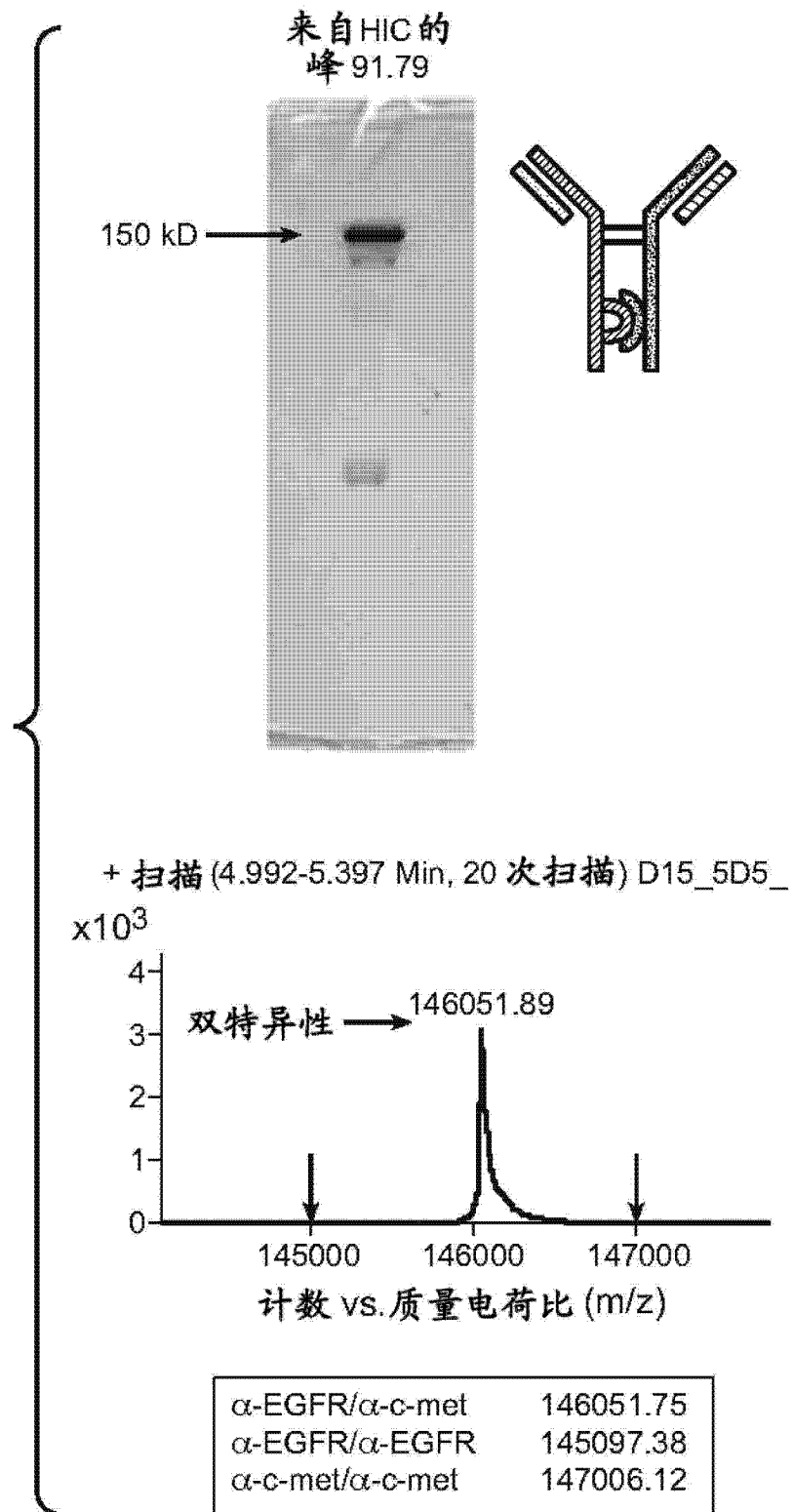


图 8F

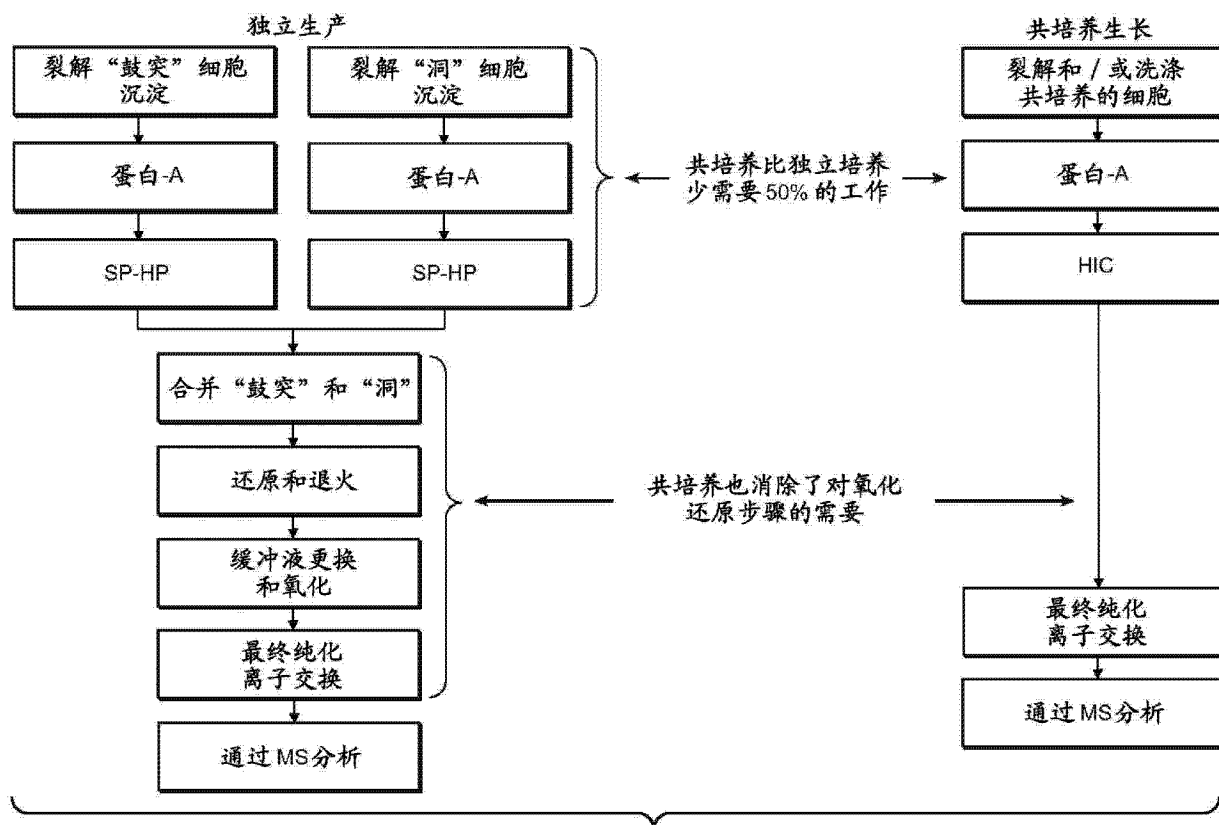


图 8G

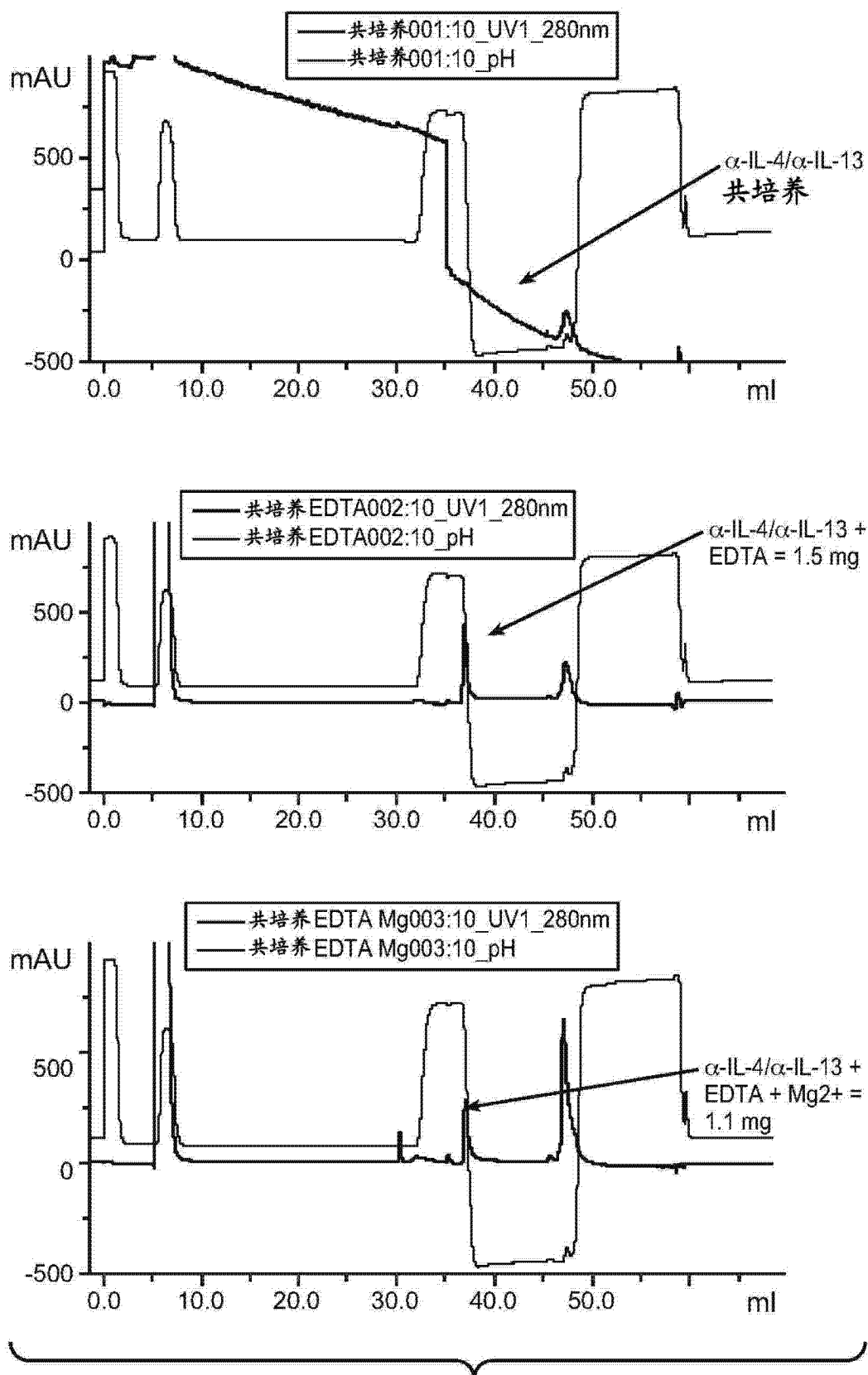
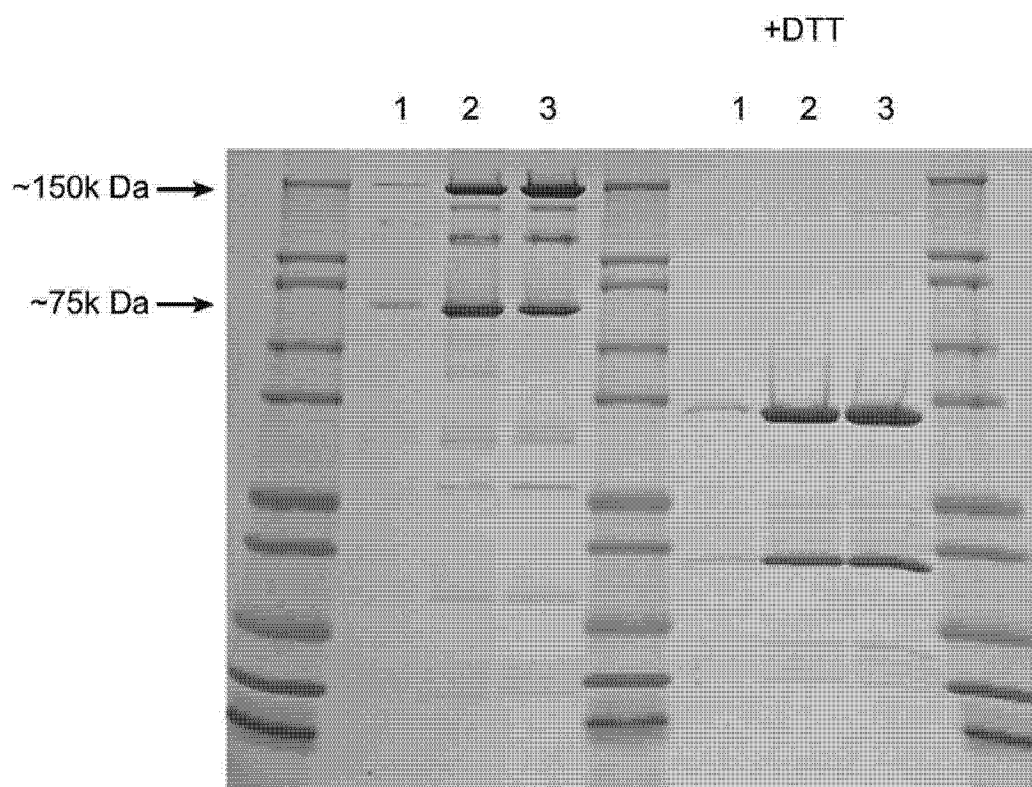
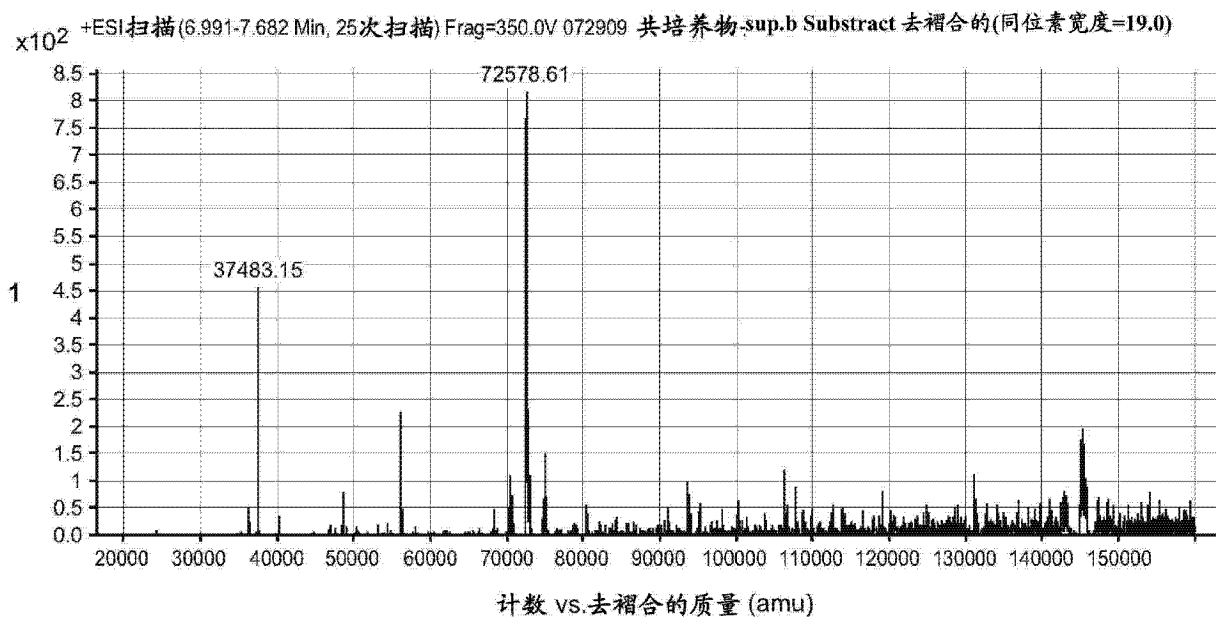


图 9A



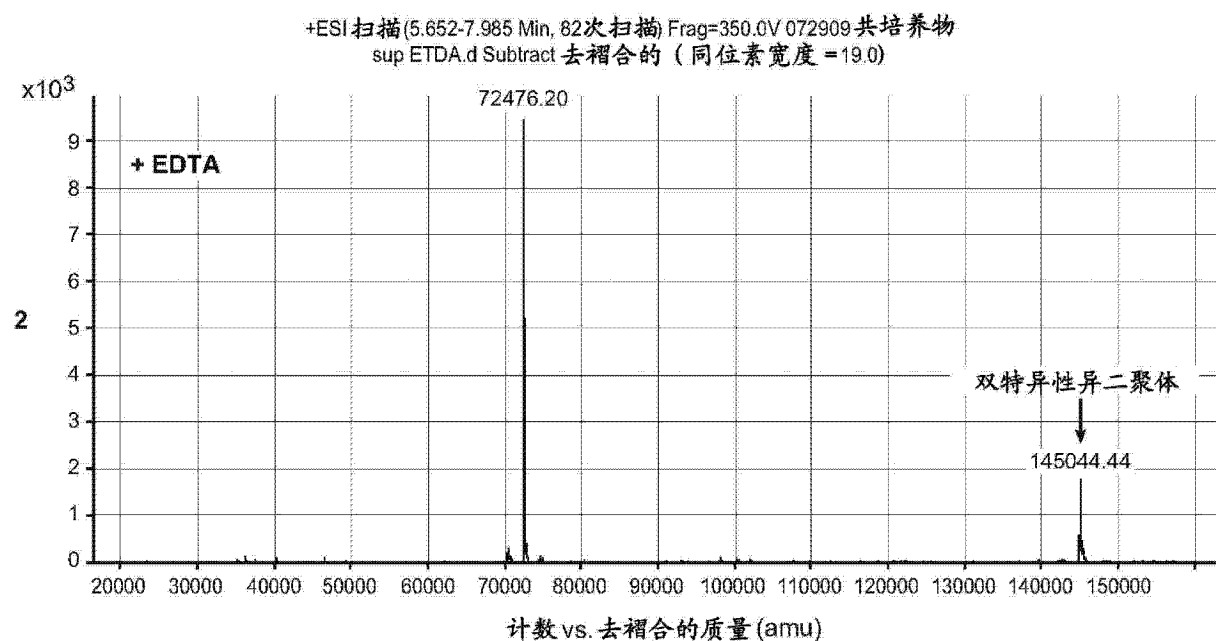
泳道 1) 对于共培养物带 -lpp 突变, 洗脱物 36.6-37.6 分钟的合并物
泳道 2) 对于共培养物带 -lpp 突变和 EDTA, 洗脱物 36.6-37.6 分钟的合并物
泳道 3) 对于共培养物带 -lpp 突变和 EDTA 及 Mg^{2+} , 洗脱物 36.6-37.6 分钟的合并物

图 9B



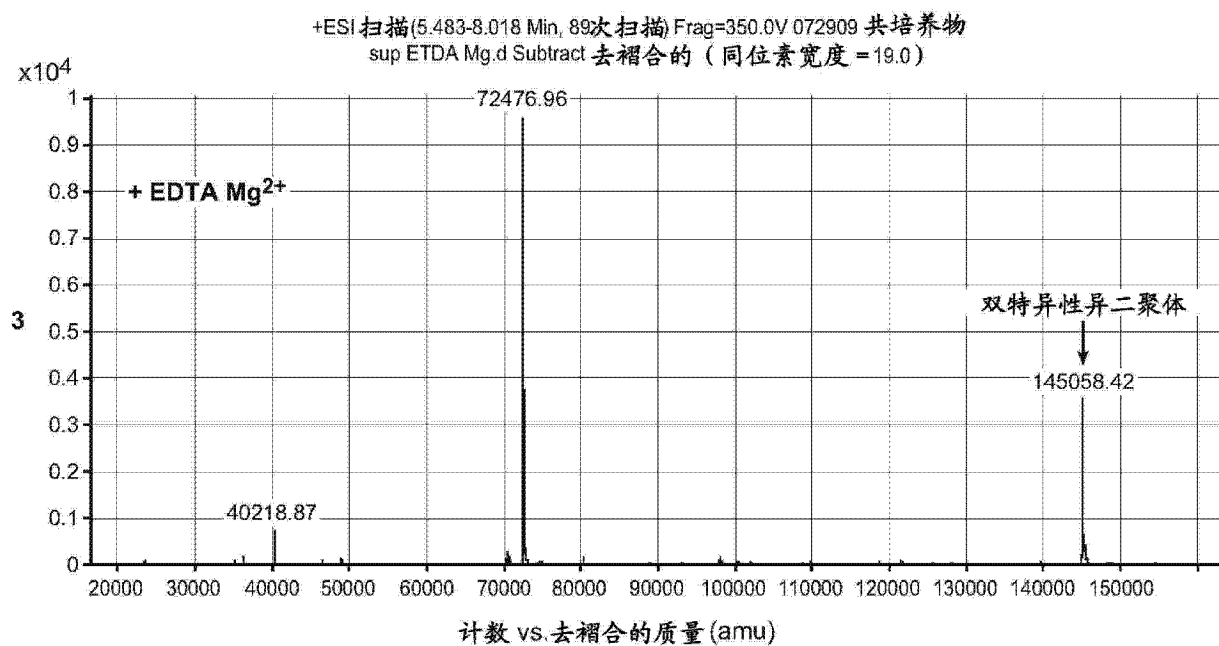
泳道 1) 对于 IL-4/IL-13 共培养物带 -lpp 突变, 洗脱物 36.6-37.6 分钟的合并物

图 9C-1



泳道 2) 对于 IL-4/IL-13 共培养物带 -lpp 突变和 EDTA, 洗脱物 36.6-37.6 分钟的合并物

图 9C-2



泳道 3) 对于 IL-4/IL-13 共培养物带 -lpp 突变和 EDTA 及 Mg^{2+} , 洗脱物 36.6-37.6 分钟的合并物

图 9C-3

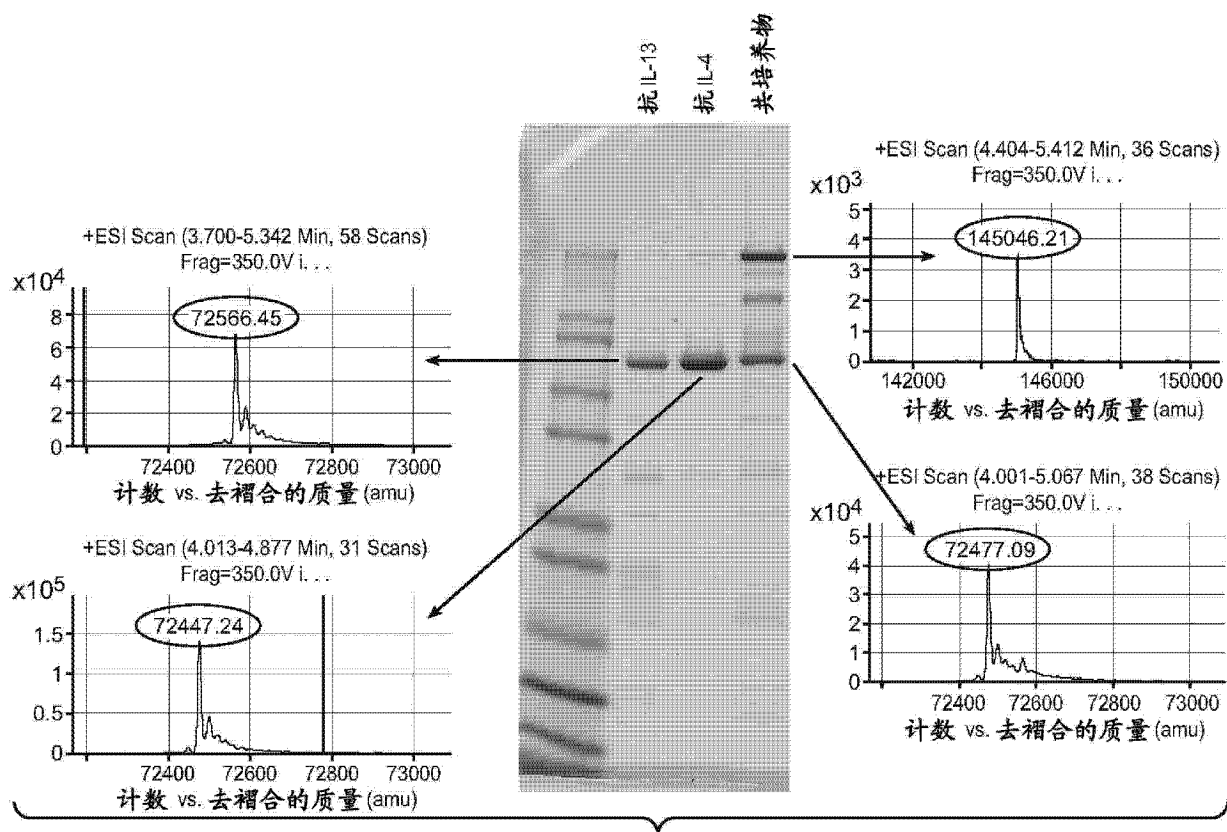


图 9D

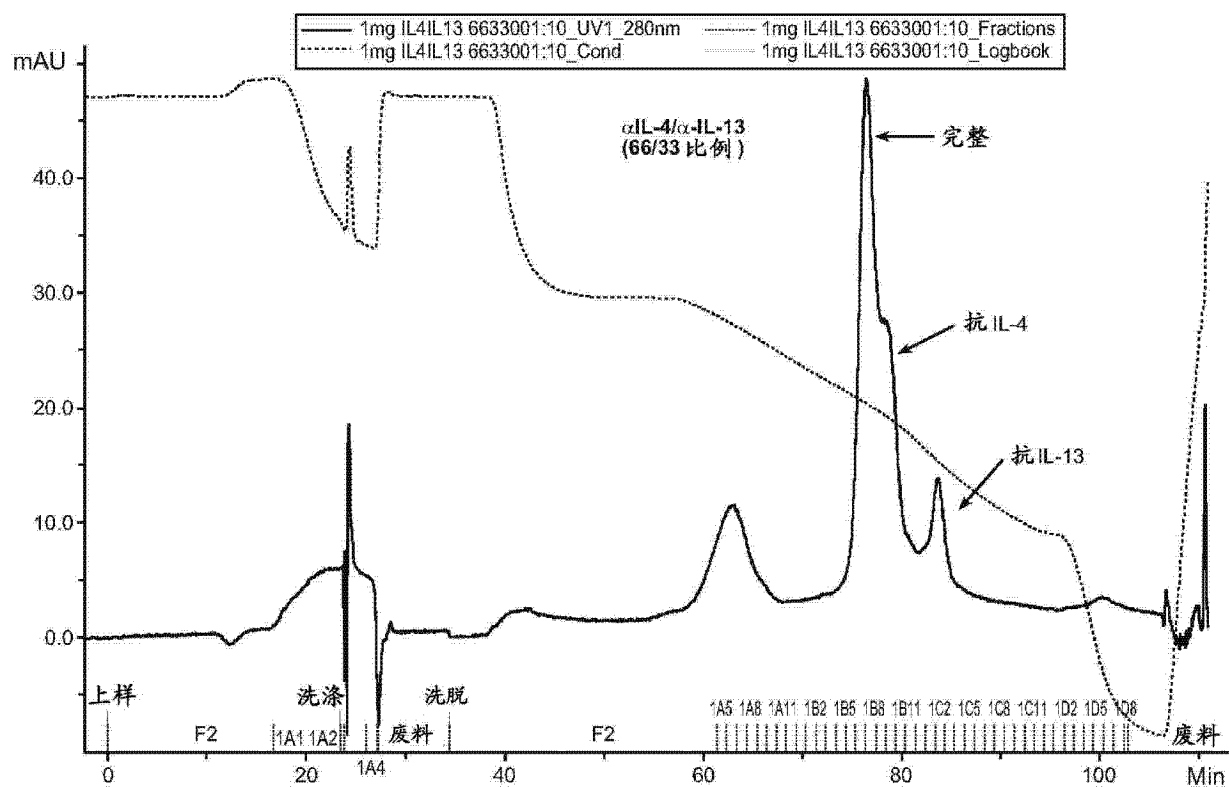


图 9E-1

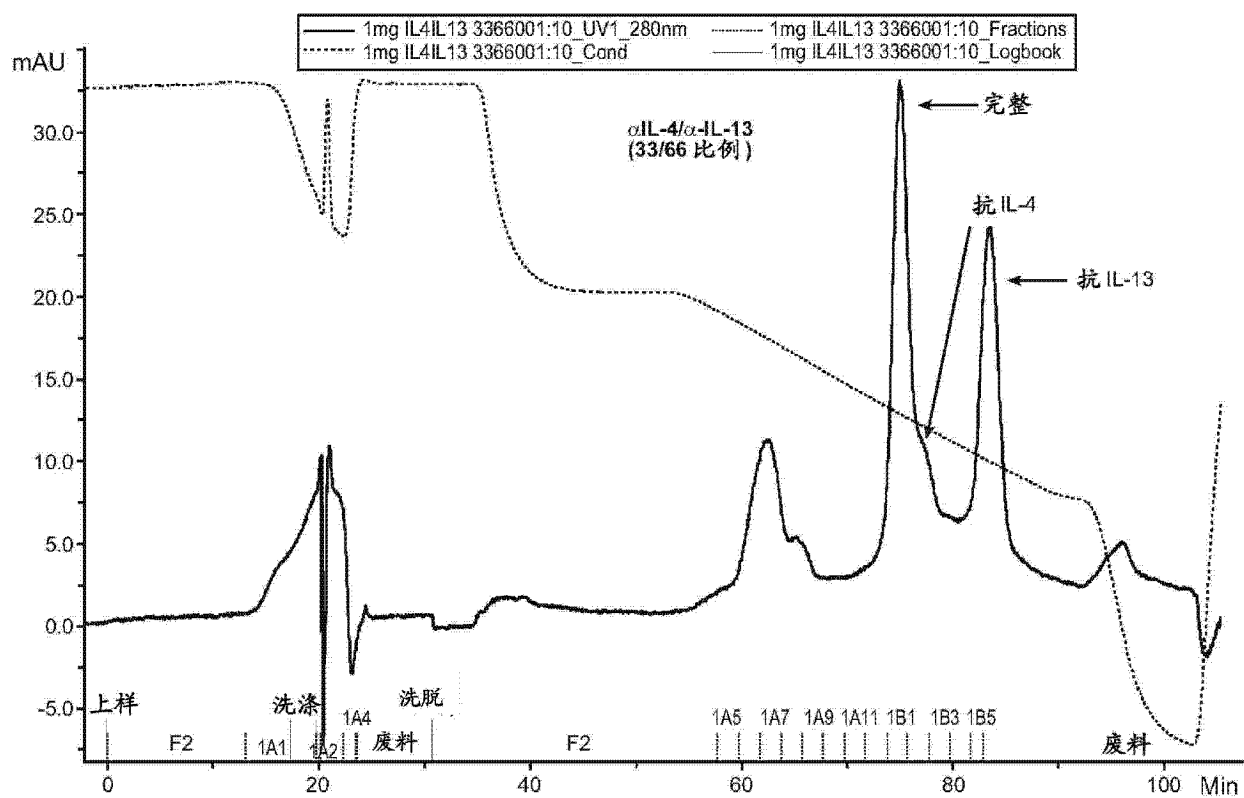


图 9E-2

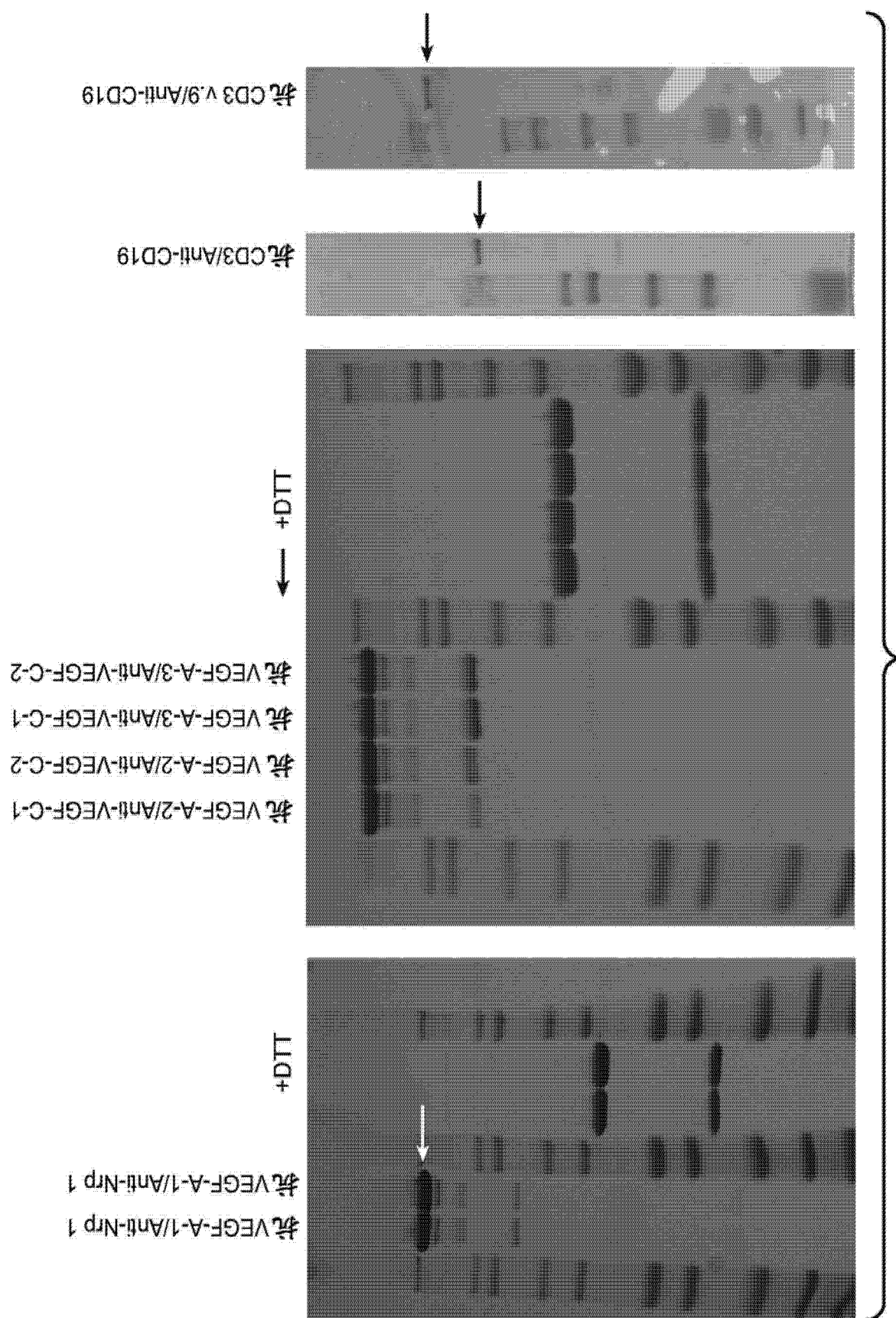


图 9F

利于发现：使用矩阵方法

例子：细胞毒性 T 细胞和肿瘤抗原靶标

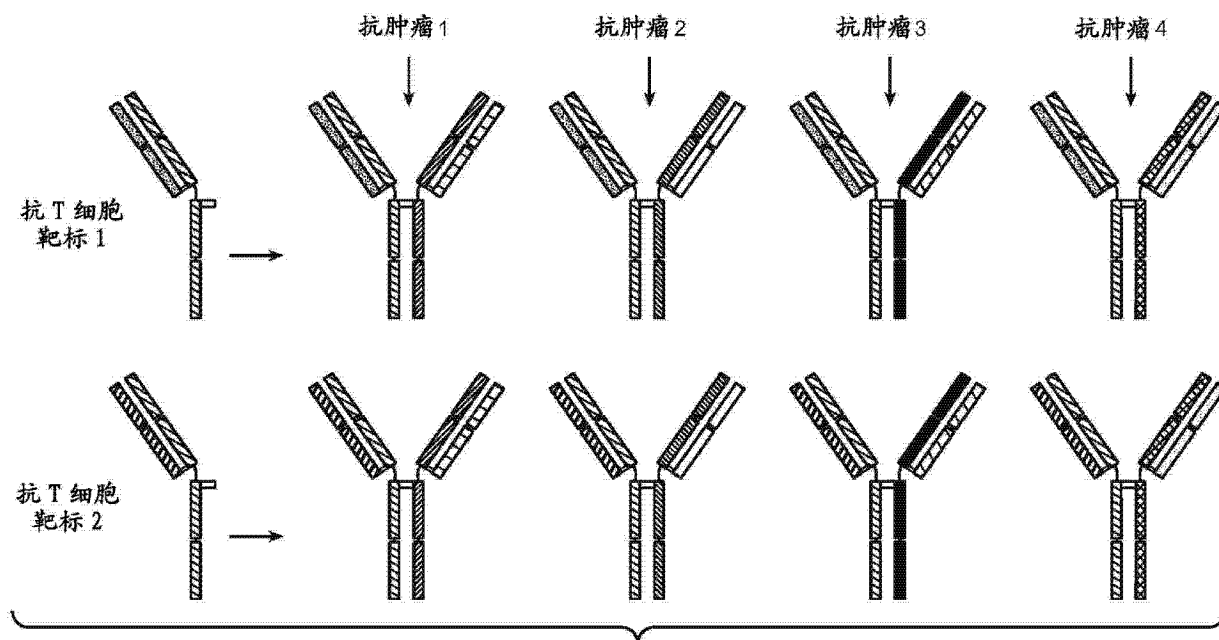


图 10

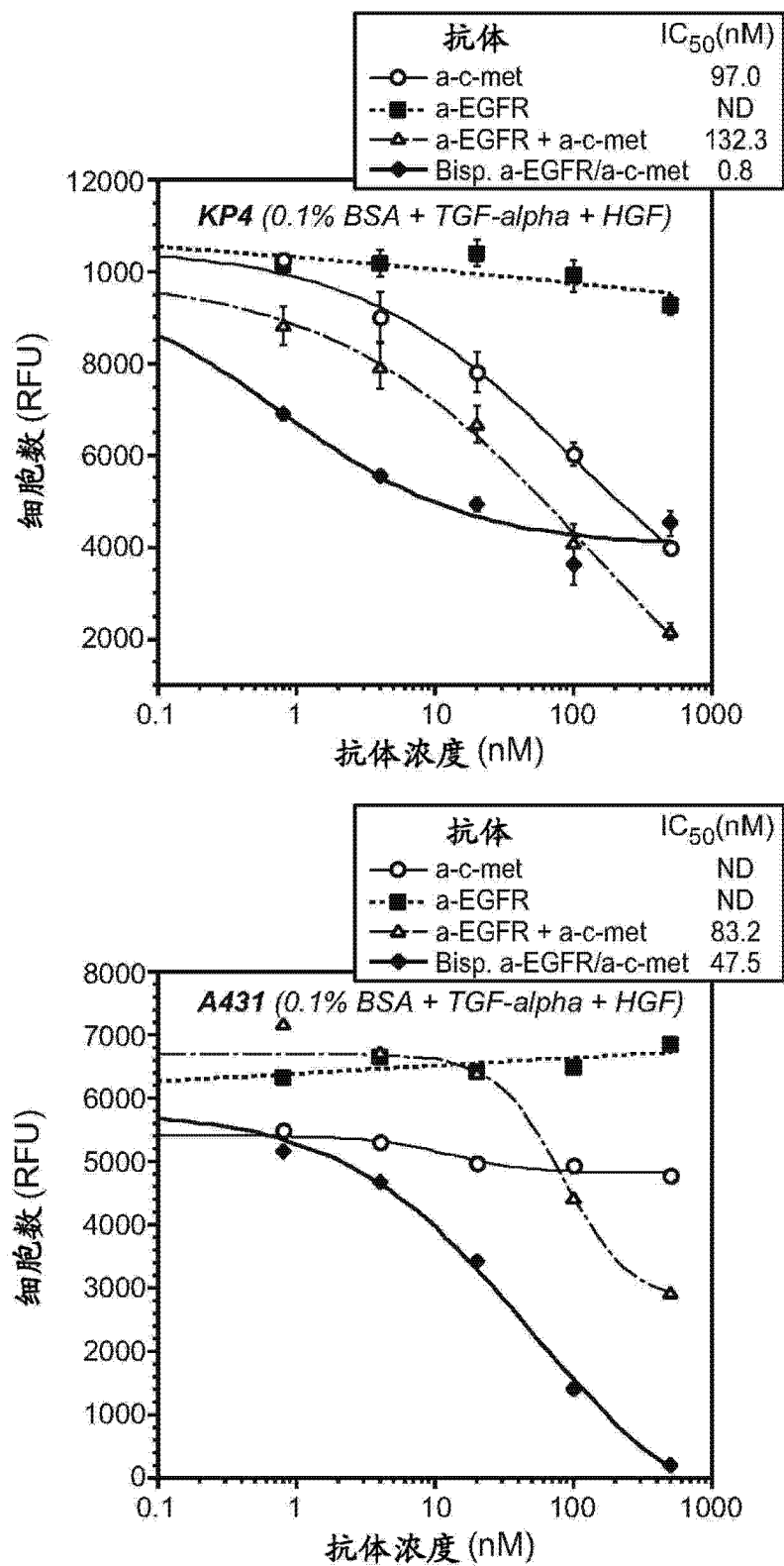


图 11

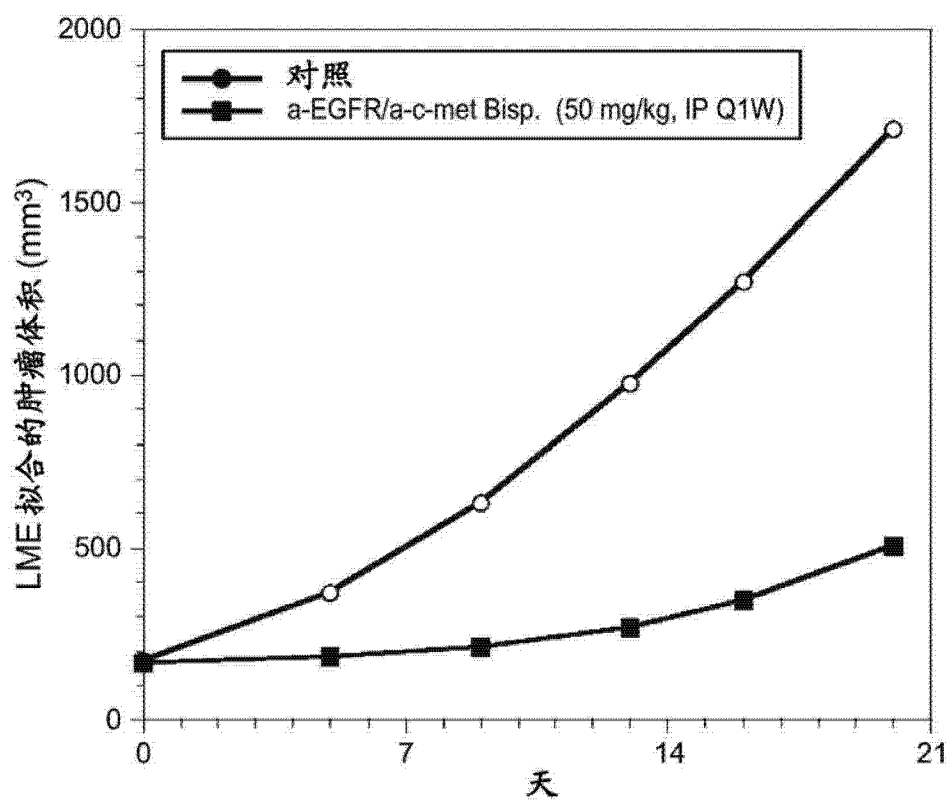


图 12

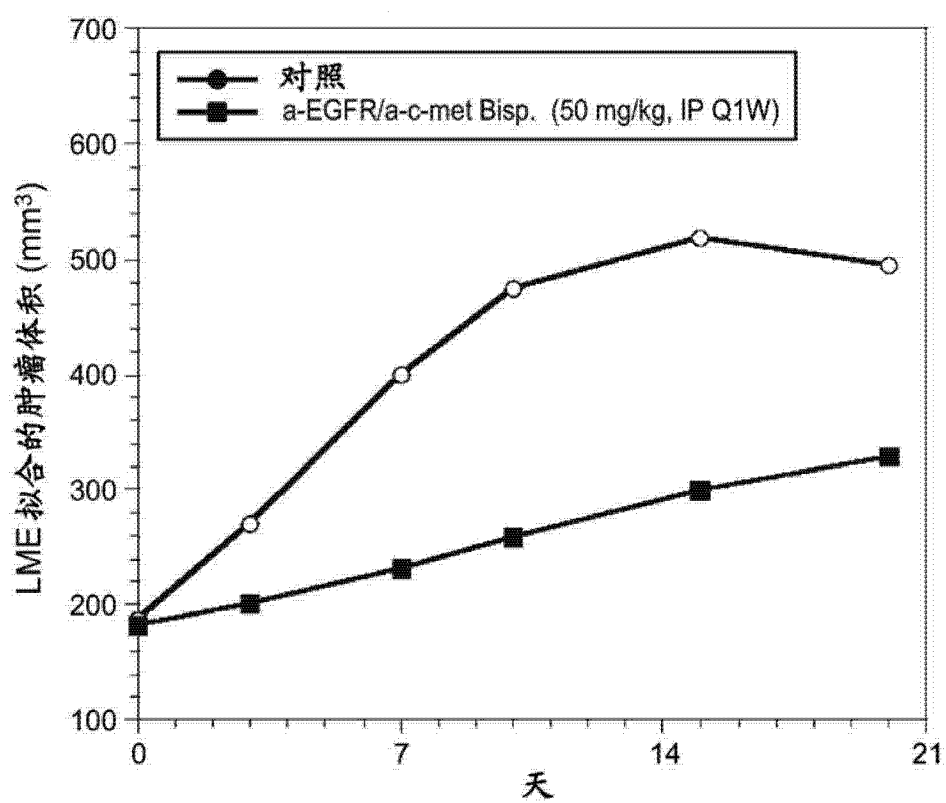


图 13

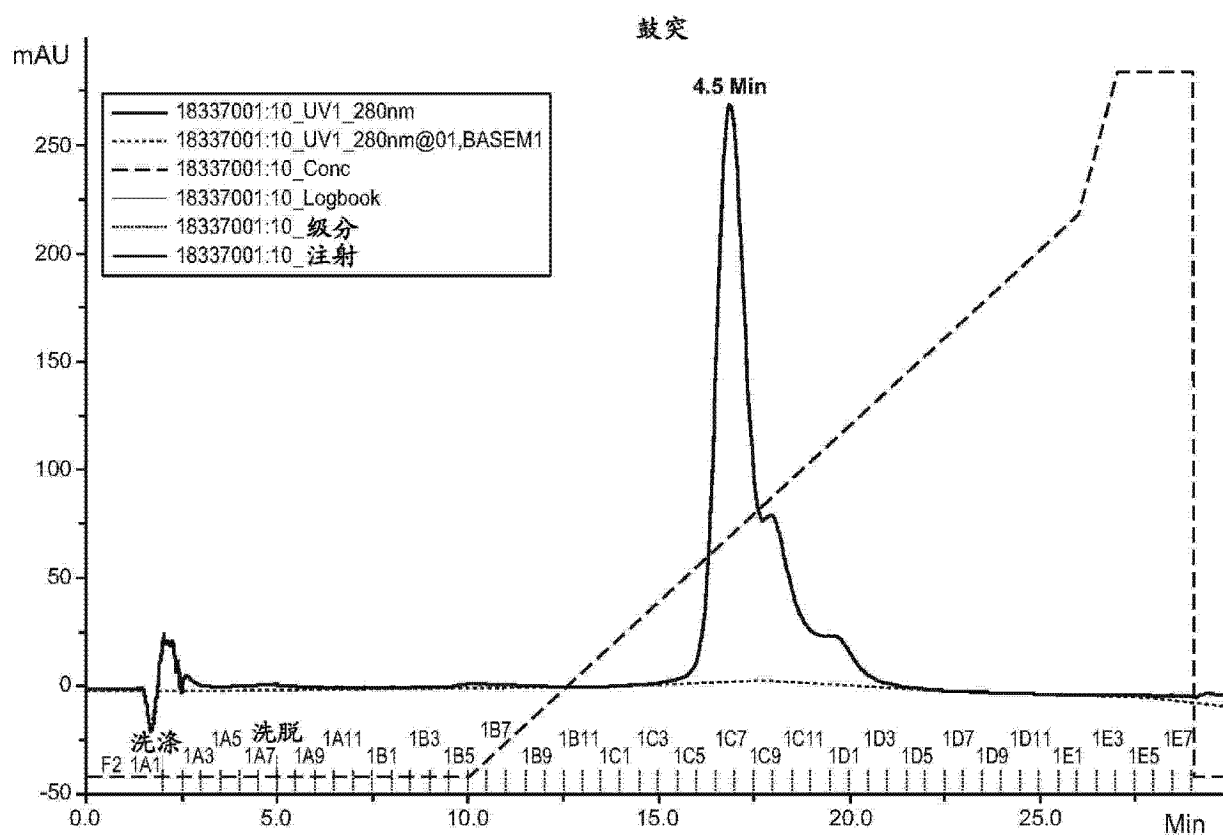


图 14A

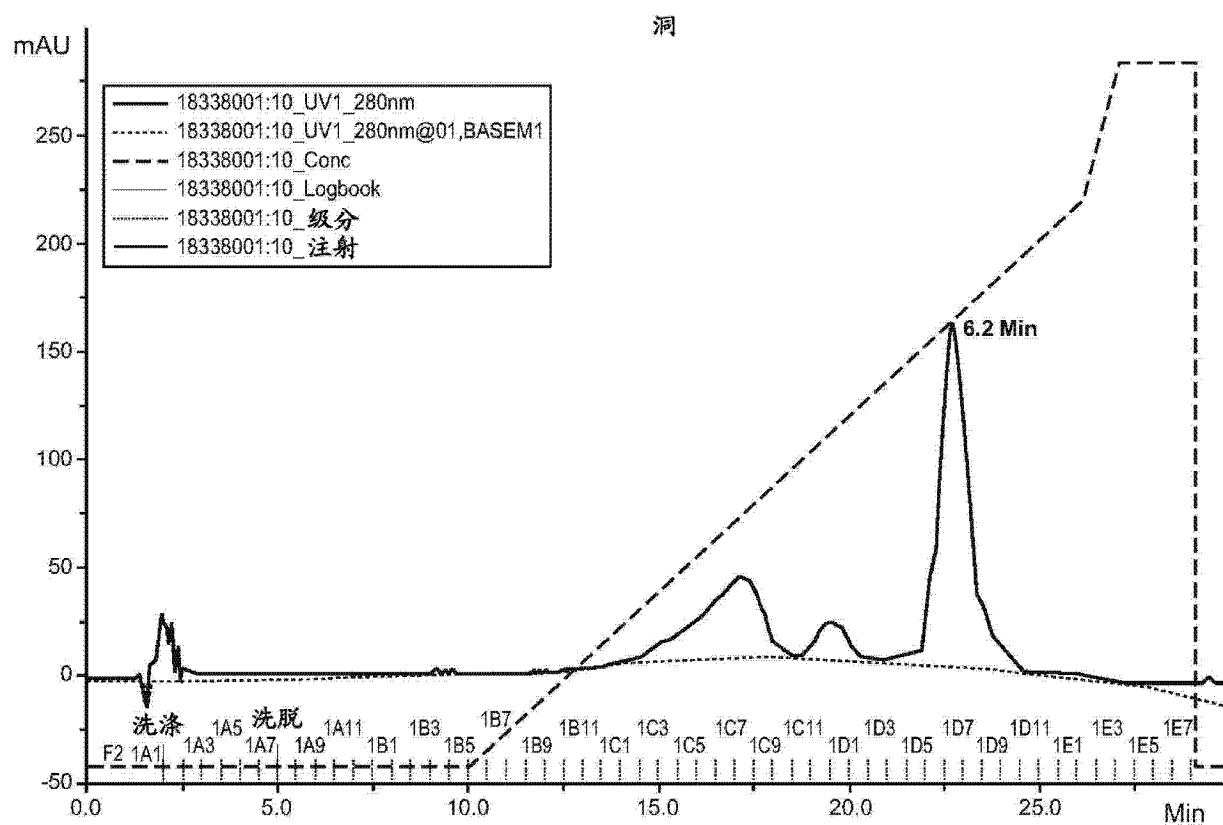


图 14B

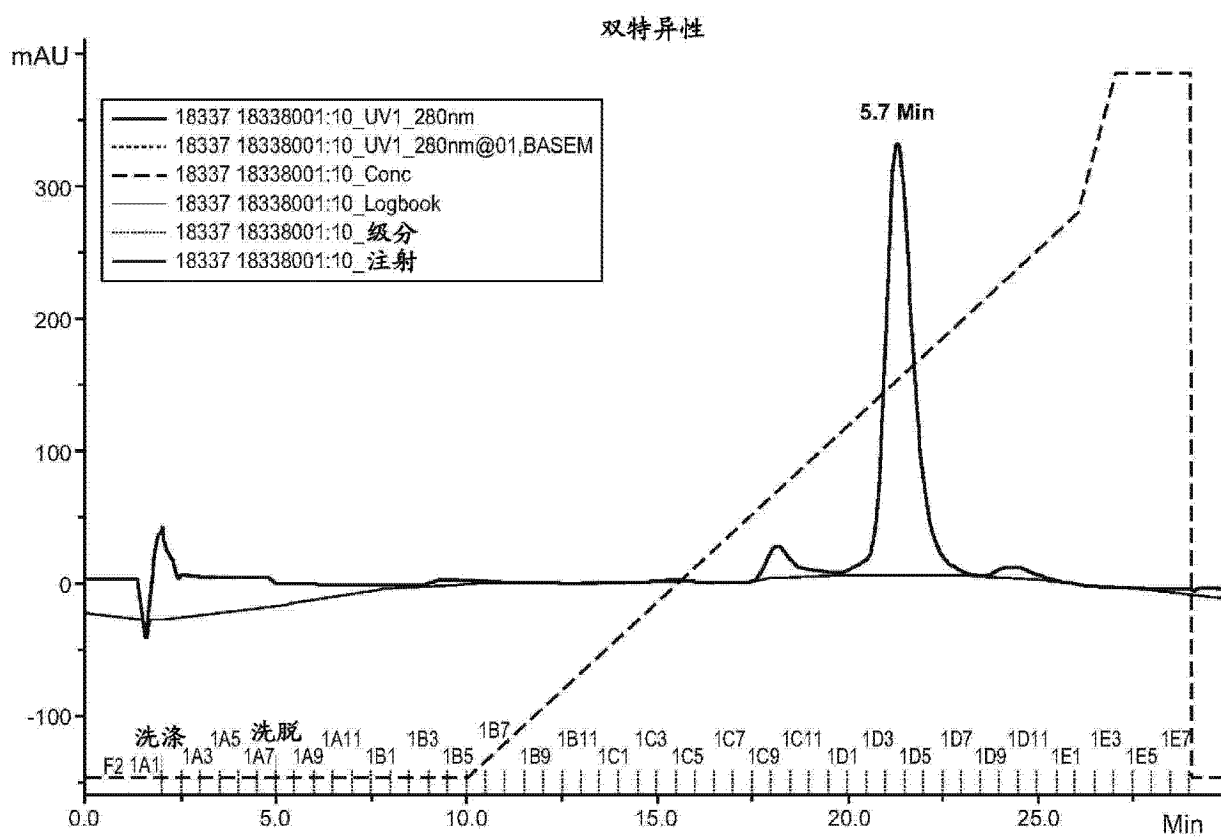


图 14C

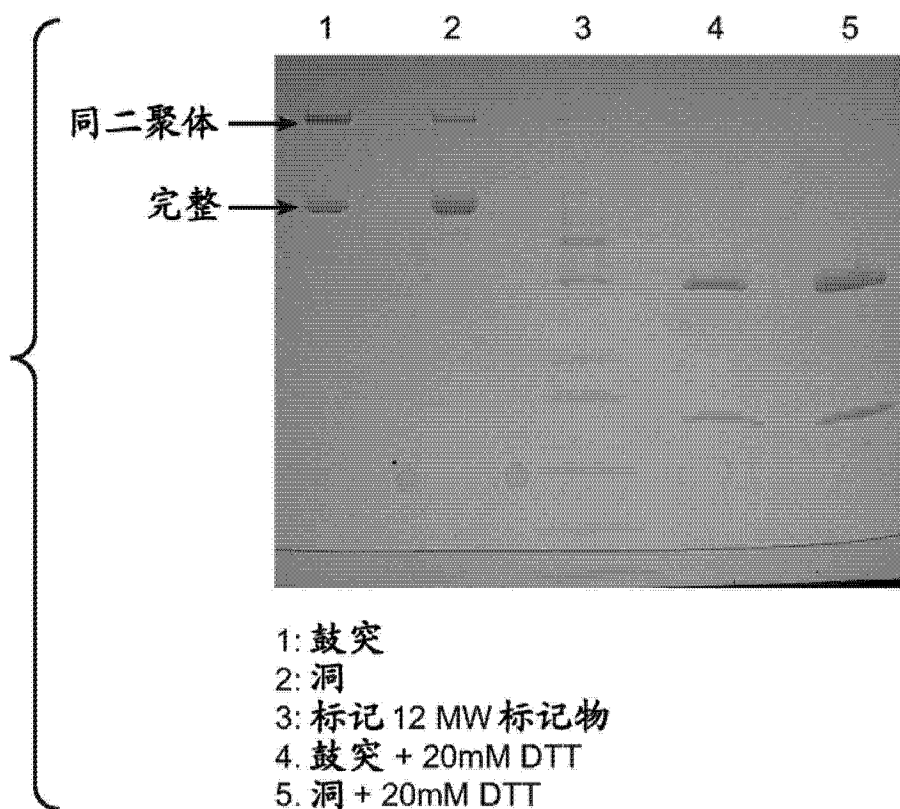


图 14D

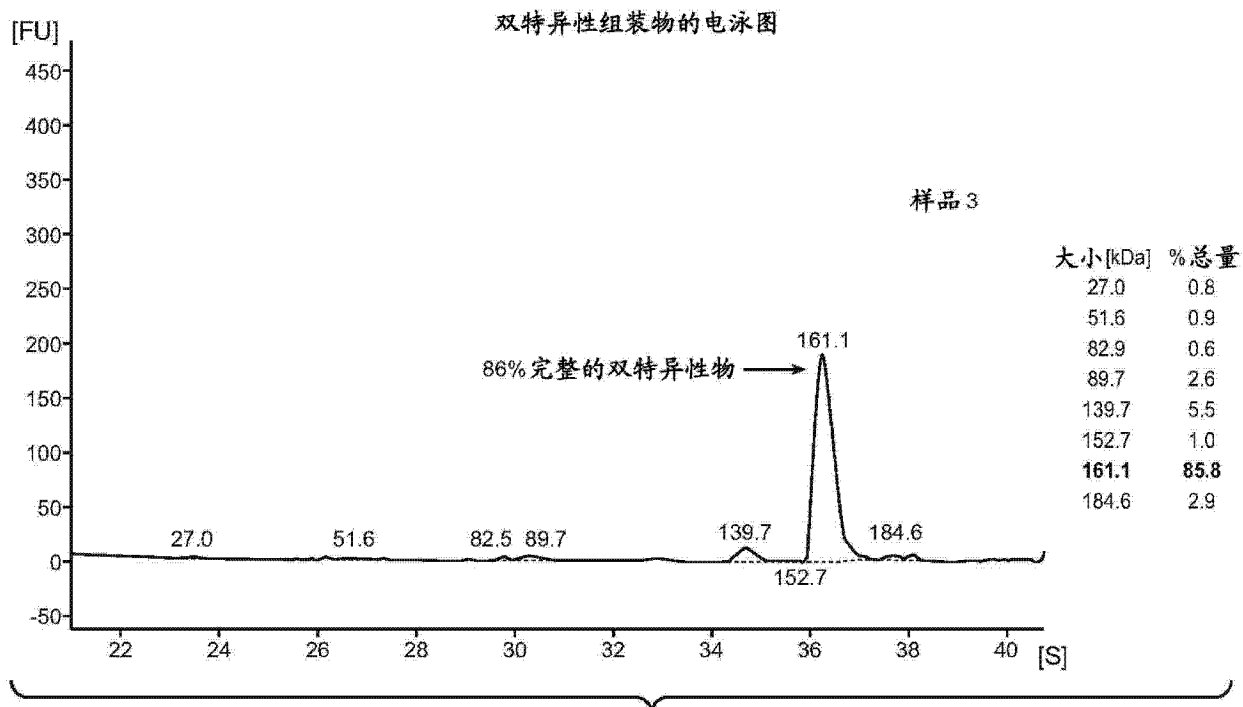


图 15

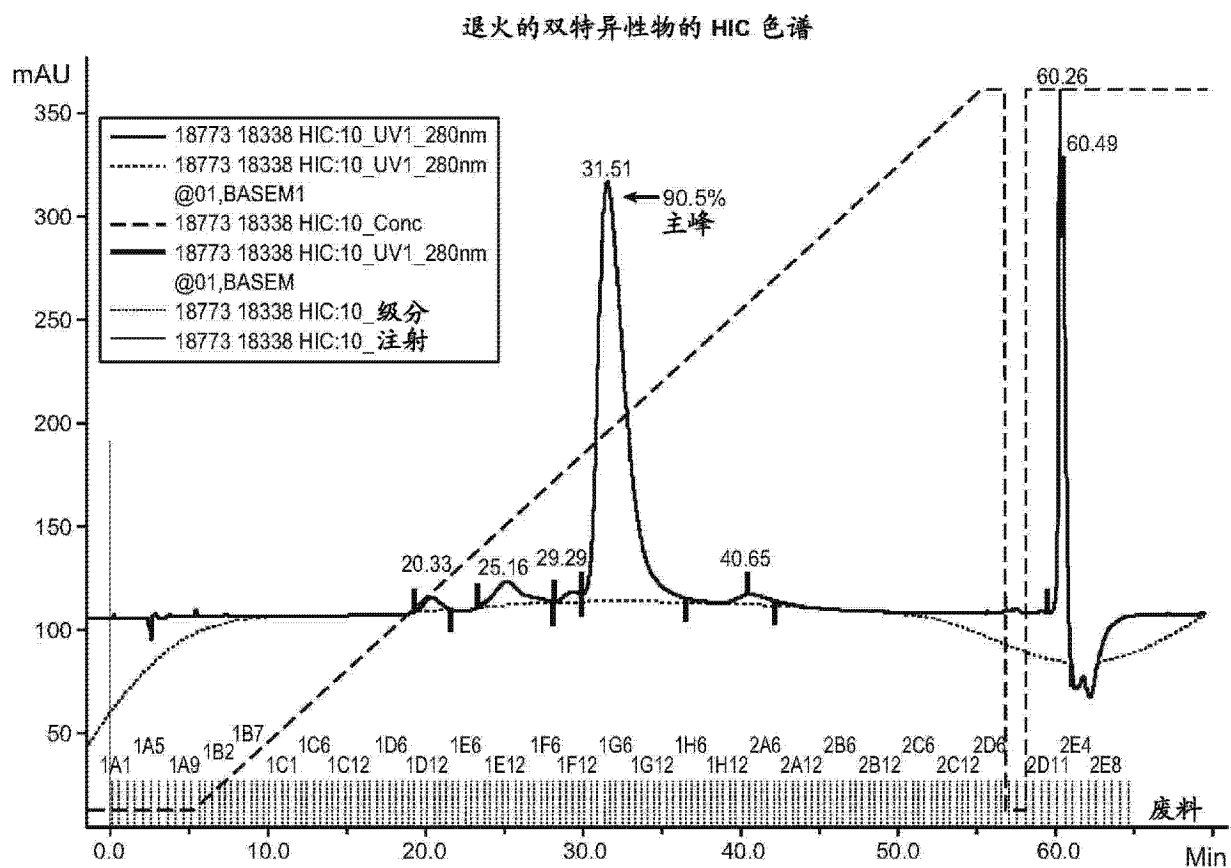


图 16A

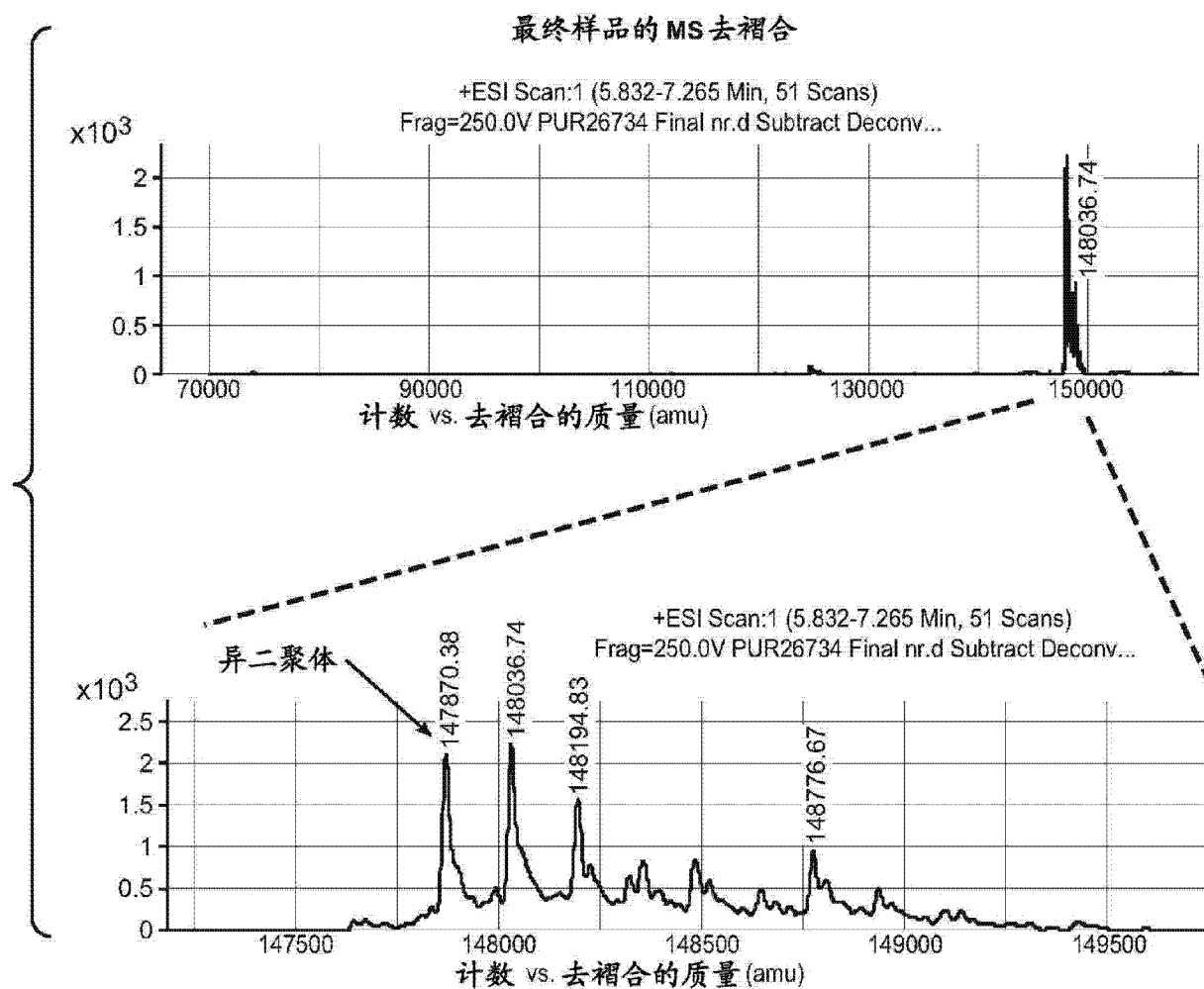


图 16B

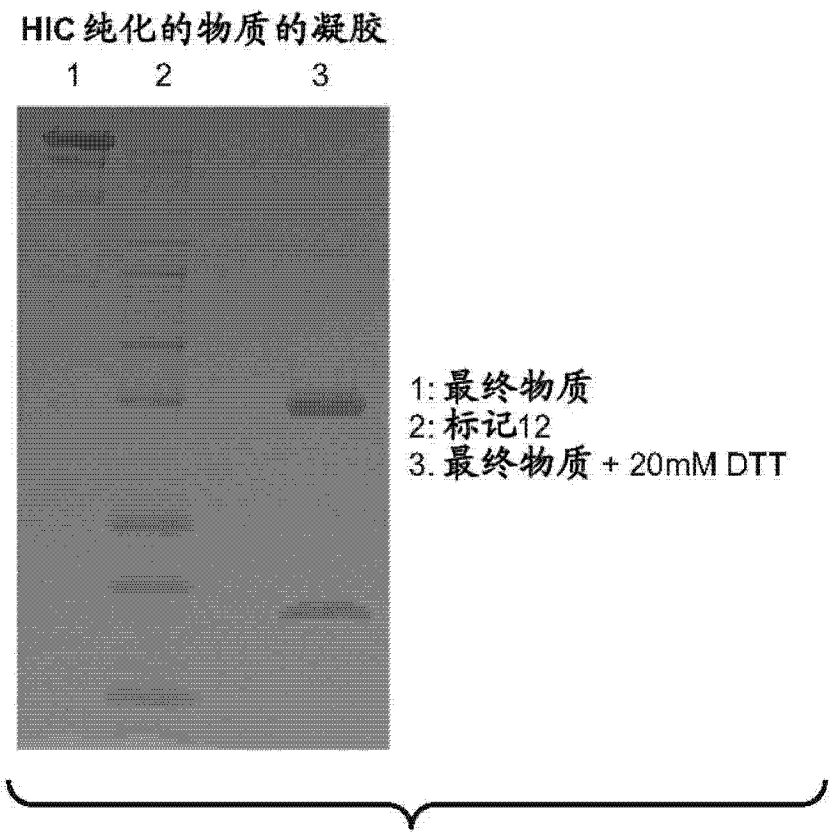


图 16C

	理论质量 (Da)	实测质量 (Da)
鼓突 / 鼓突	148,819.02	N/A
洞 / 洞	146,910.40	N/A
鼓突 / 洞	147,864.71	147,870.38

图 16D

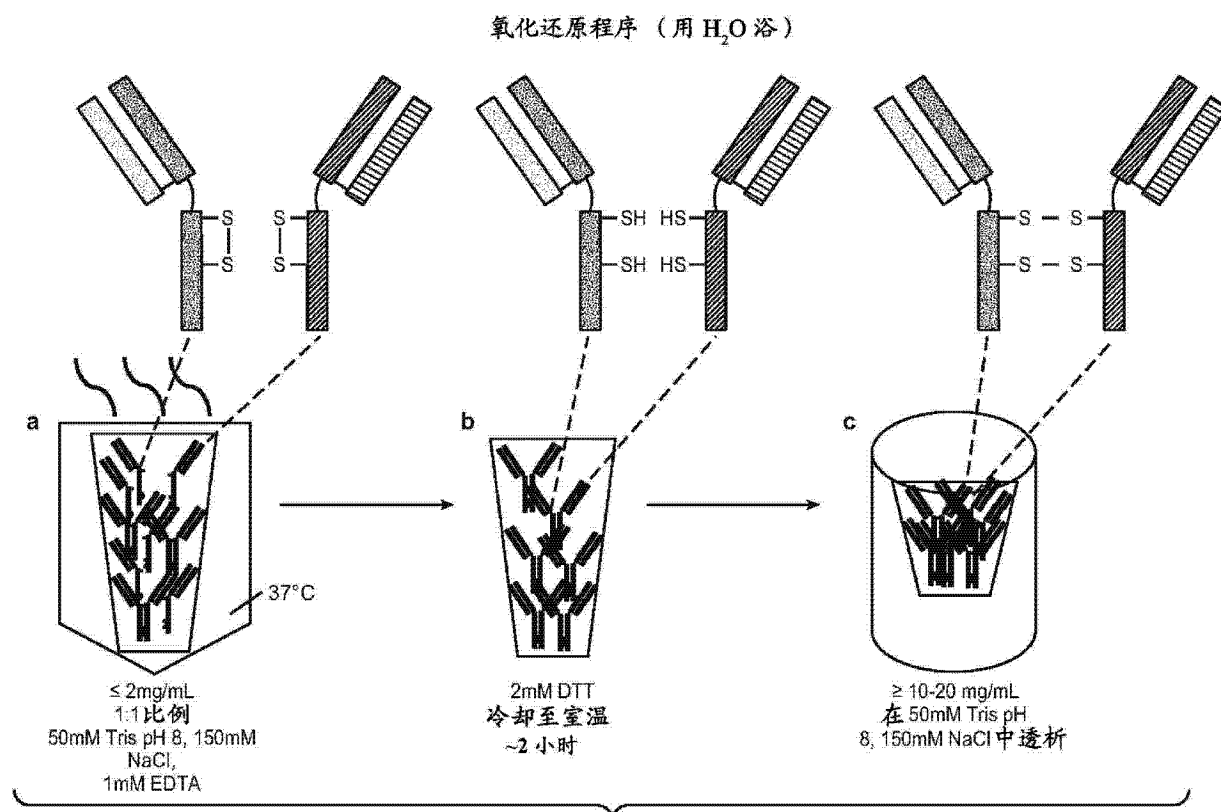


图 17

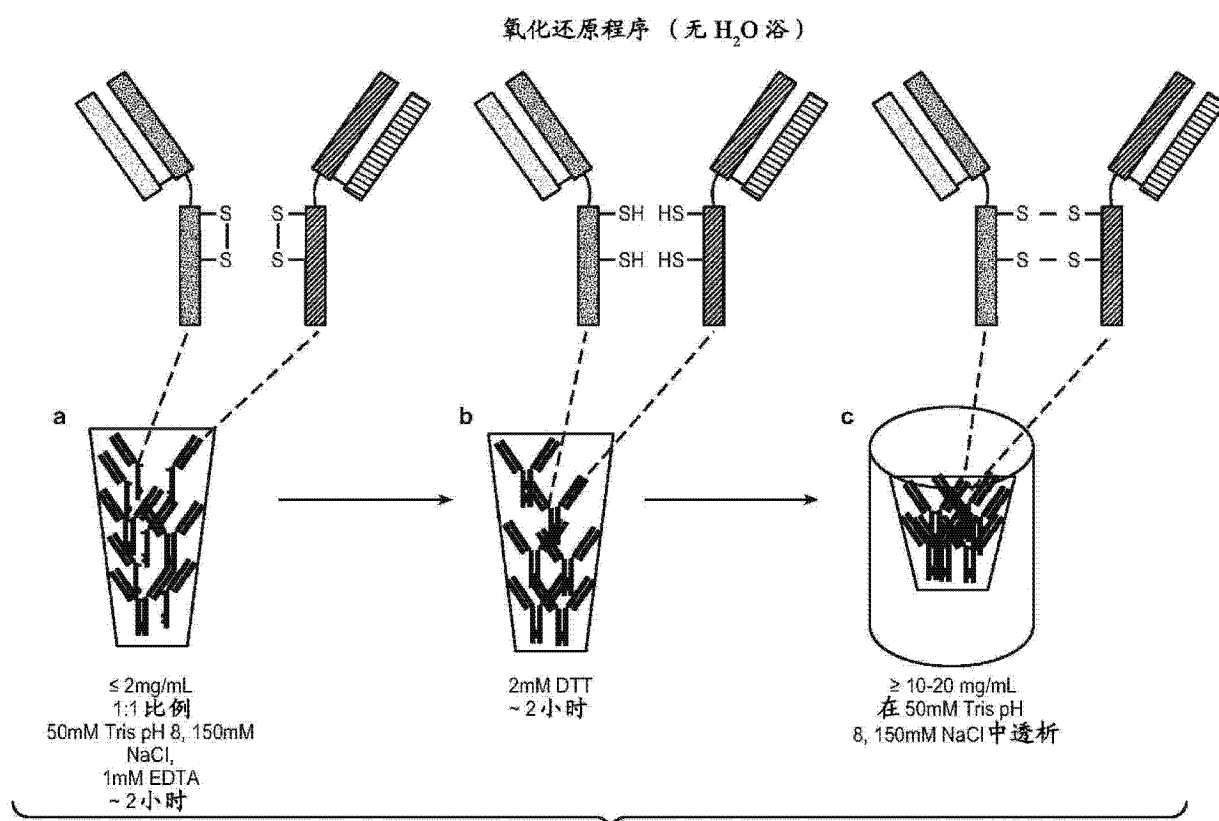


图 18

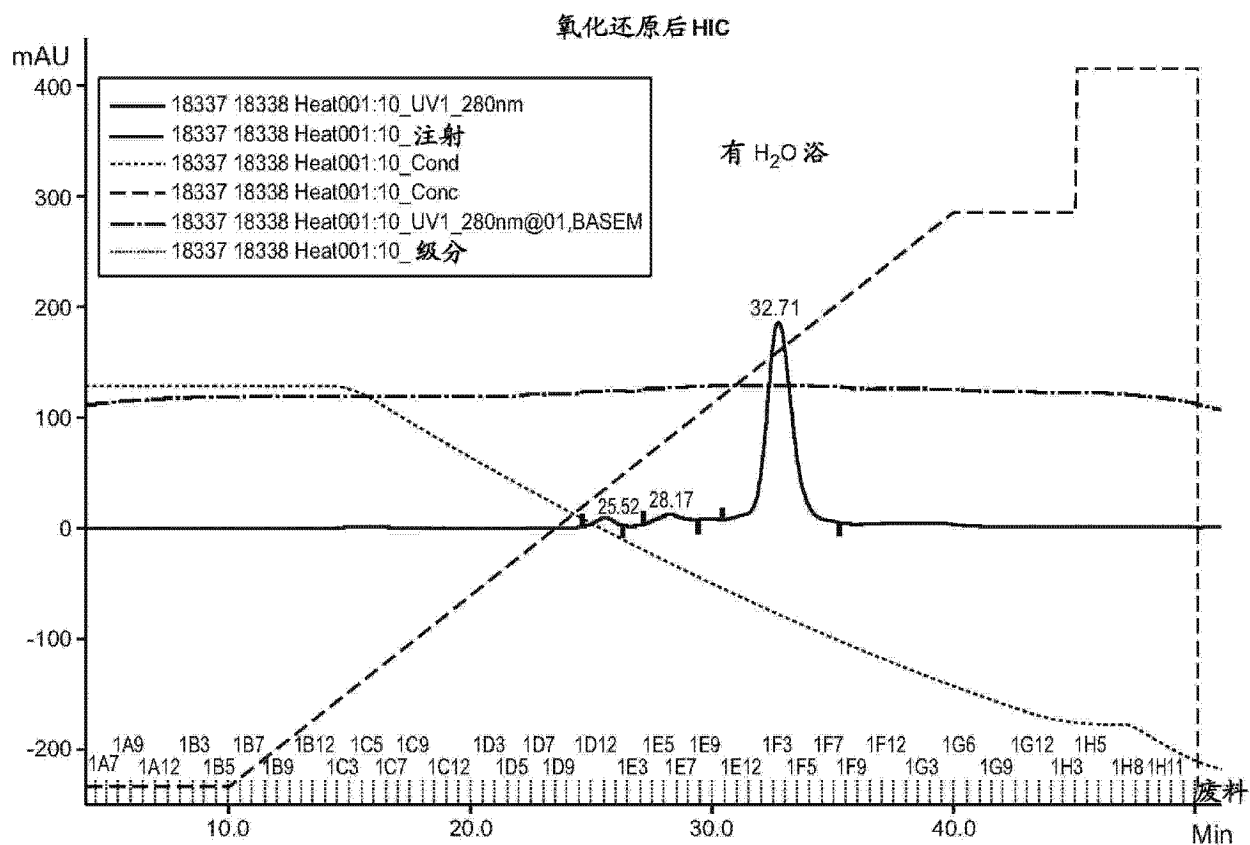


图 19A

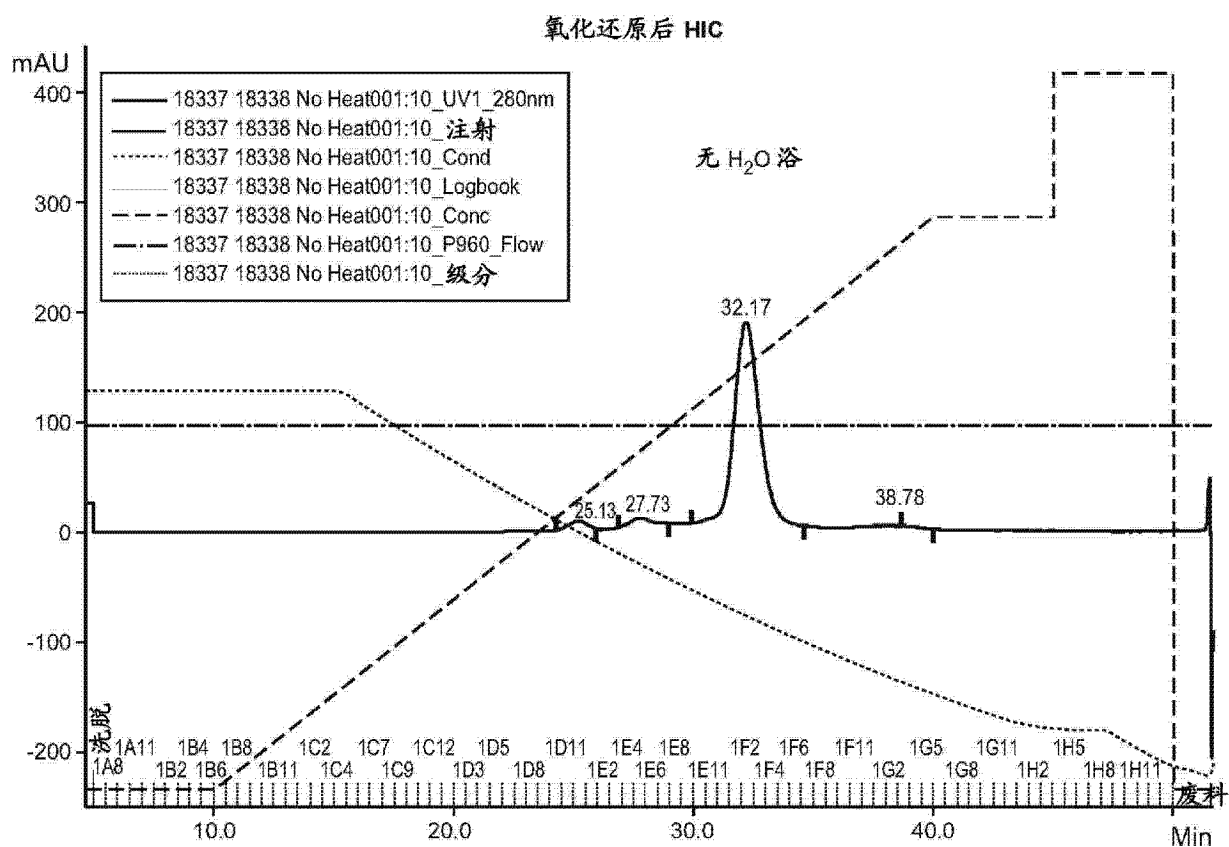


图 19B