



(12) 发明专利  
(全文更正)

(10) 授权公告号 CN 103068846 B9

(45) 授权公告日 2016.06.22

(48) 更正文献出版日 2016.09.28

(21) 申请号 201180040675.3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011.08.23

C07K 16/00(2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 16/32(2006.01)

10173914.2 2010.08.24 EP

C07K 16/28(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

审查员 杜玉娟

2013.02.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/064476 2011.08.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/025530 EN 2012.03.01

(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 U·布林克曼 A·哈斯 S·麦茨

J·M·尚策

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 史文静 黄革生

权利要求书 3 页 说明书 32 页

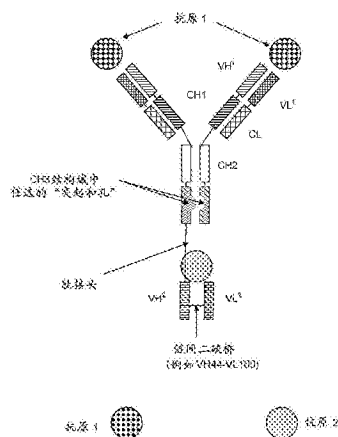
序列表 17 页 附图 30 页

(54) 发明名称

包含二硫键稳定性 Fv 片段的双特异性抗体

(57) 摘要

本发明涉及双特异性抗体,生产它们的方法,含有所述抗体的药物组合物以及它们的应用。



1. 双特异性抗体,其包含

a) 特异性地结合第一抗原并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成的全长抗体;

b) 特异性地结合第二抗原的 Fv 片段,所述 Fv 片段包含 VH<sup>2</sup> 结构域和 VL<sup>2</sup> 结构域,其中两个结构域通过二硫桥相连,并且其中 Fv 片段

通过 VH<sup>2</sup> 结构域和 VL<sup>2</sup> 结构域的 N- 端经由第一和第二肽接头与特异性地结合第一抗原的全长抗体的两重链的 C- 端融合,或

通过 VH<sup>2</sup> 结构域和 VL<sup>2</sup> 结构域的 C- 端经由第一和第二肽接头与特异性地结合第一抗原的全长抗体的一条重链和一条轻链两者的 N- 端融合,

其特征在于,

一个接头包括可被弗林蛋白酶切割的蛋白酶切割位点,其中可被弗林蛋白酶切割的所述蛋白酶切割位点是 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:14,而另一接头不包括蛋白酶切割位点;或者在于

一个接头包括可被 Prescission 蛋白酶切割的蛋白酶切割位点,其中可被 Prescission 蛋白酶切割的所述蛋白酶切割位点是 SEQ ID NO:15,而另一接头不包括蛋白酶切割位点。

2. 根据权利要求 1 的双特异性抗体,其特征在于所述双特异性抗体是三价的。

3. 根据权利要求 2 的双特异性抗体,其特征在于,

VH<sup>2</sup> 结构域和 VL<sup>2</sup> 结构域通过第一和第二肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的两 C- 端。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项的双特异性抗体,其特征在于,

VH<sup>2</sup> 结构域和 VL<sup>2</sup> 结构域通过在下述位置之间引入的二硫桥连接:

i) VH<sup>2</sup> 结构域位置 44 和 VL<sup>2</sup> 结构域位置 100,

ii) VH<sup>2</sup> 结构域位置 105 和 VL<sup>2</sup> 结构域位置 43, 或

iii) VH<sup>2</sup> 结构域位置 101 和 VL<sup>2</sup> 结构域位置 100。

5. 根据权利要求 1-3 中任一项的双特异性抗体,其特征在于,

VH<sup>2</sup> 结构域和 VL<sup>2</sup> 结构域通过在 VH<sup>2</sup> 结构域位置 44 和 VL<sup>2</sup> 结构域位置 100 之间引入的二硫桥连接。

6. 根据权利要求 1-3 中任一项的双特异性抗体,其特征在于,

完整抗体的重链的第一 CH3 结构域和完整抗体的第二 CH3 结构域各在包括了抗体 CH3 结构域之间的原始界面中的改变的界面处相遇;

其中 i) 在一条重链的 CH3 结构域中,

氨基酸残基被具有更大侧链体积的氨基酸残基所替代,由此在一条重链的 CH3 结构域的界面内产生突起,所述突起可定位在另一重链的 CH3 结构域的界面内的腔中,

和

ii) 在另一条重链的 CH3 结构域中,

氨基酸残基被具有更小侧链体积的氨基酸残基所替代,由此在第二 CH3 结构域的界面内产生腔,其中在第一 CH3 结构域的界面内的突起是可定位在所述腔内的。

7. 根据权利要求 6 的双特异性抗体,其特征在于,

所述具有更大侧链体积的氨基酸残基选自精氨酸 (R)、苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y) 和色

氨酸 (W), 并且所述具有更小侧链体积的氨基酸残基选自丙氨酸 (A)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T) 和缬氨酸 (V)。

8. 根据权利要求 6 的双特异性抗体, 其特征在于,

两个 CH3 结构域都进一步通过在每个 CH3 结构域的位置引入半胱氨酸 (C) 残基来进行改变以便能形成在 CH3 结构域之间的二硫桥。

9. 根据权利要求 4 的双特异性抗体, 其特征在于,

完整抗体的重链的第一 CH3 结构域和完整抗体的第二 CH3 结构域各在包括了抗体 CH3 结构域之间的原始界面中的改变的界面处相遇;

其中 i) 在一条重链的 CH3 结构域中,

氨基酸残基被具有更大侧链体积的氨基酸残基所替代, 由此在一条重链的 CH3 结构域的界面内产生突起, 所述突起可定位在另一重链的 CH3 结构域的界面内的腔中,

和

ii) 在另一条重链的 CH3 结构域中,

氨基酸残基被具有更小侧链体积的氨基酸残基所替代, 由此在第二 CH3 结构域的界面内产生腔, 其中在第一 CH3 结构域的界面内的突起是可定位在所述腔内的。

10. 根据权利要求 5 的双特异性抗体, 其特征在于,

完整抗体的重链的第一 CH3 结构域和完整抗体的第二 CH3 结构域各在包括了抗体 CH3 结构域之间的原始界面中的改变的界面处相遇;

其中 i) 在一条重链的 CH3 结构域中,

氨基酸残基被具有更大侧链体积的氨基酸残基所替代, 由此在一条重链的 CH3 结构域的界面内产生突起, 所述突起可定位在另一重链的 CH3 结构域的界面内的腔中,

和

ii) 在另一条重链的 CH3 结构域中,

氨基酸残基被具有更小侧链体积的氨基酸残基所替代, 由此在第二 CH3 结构域的界面内产生腔, 其中在第一 CH3 结构域的界面内的突起是可定位在所述腔内的。

11. 根据权利要求 9 或 10 的双特异性抗体, 其特征在于,

所述具有更大侧链体积的氨基酸残基选自精氨酸 (R)、苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y) 和色氨酸 (W), 并且所述具有更小侧链体积的氨基酸残基选自丙氨酸 (A)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T) 和缬氨酸 (V)。

12. 根据权利要求 9 或 10 的双特异性抗体, 其特征在于,

两个 CH3 结构域都进一步通过在每个 CH3 结构域的位置引入半胱氨酸 (C) 残基来进行改变以便能形成在 CH3 结构域之间的二硫桥。

13. 根据权利要求 1-3 和 7-10 中的任一项的双特异性抗体, 其特征在于一个接头包括可被弗林蛋白酶切割的蛋白酶切割位点。

14. 根据权利要求 4 的双特异性抗体, 其特征在于一个接头包括可被弗林蛋白酶切割的蛋白酶切割位点。

15. 根据权利要求 5 的双特异性抗体, 其特征在于一个接头包括可被弗林蛋白酶切割的蛋白酶切割位点。

16. 根据权利要求 6 的双特异性抗体, 其特征在于一个接头包括可被弗林蛋白酶切割

的蛋白酶切割位点。

17. 根据权利要求 11 的双特异性抗体,其特征在于一个接头包括可被弗林蛋白酶切割的蛋白酶切割位点。

18. 根据权利要求 12 的双特异性抗体,其特征在于一个接头包括可被弗林蛋白酶切割的蛋白酶切割位点。

19. 根据权利要求 1-3 和 7 至 10 的任一项的双特异性抗体,其特征在于一个接头包括可被 Prescission 蛋白酶切割的蛋白酶切割位点。

20. 根据权利要求 4 的双特异性抗体,其特征在于一个接头包括可被 Prescission 蛋白酶切割的蛋白酶切割位点。

21. 根据权利要求 5 的双特异性抗体,其特征在于一个接头包括可被 Prescission 蛋白酶切割的蛋白酶切割位点。

22. 根据权利要求 6 的双特异性抗体,其特征在于一个接头包括可被 Prescission 蛋白酶切割的蛋白酶切割位点。

23. 根据权利要求 11 的双特异性抗体,其特征在于一个接头包括可被 Prescission 蛋白酶切割的蛋白酶切割位点。

24. 根据权利要求 12 的双特异性抗体,其特征在于一个接头包括可被 Prescission 蛋白酶切割的蛋白酶切割位点。

25. 制备根据权利要求 1-24 中任一项的双特异性抗体的方法,包括步骤

A) 在哺乳动物细胞中表达编码根据权利要求 1-24 中任一项的双特异性抗体的核酸;  
和

B) 从所述细胞或细胞培养物上清中回收所述抗体。

26. 根据权利要求 25 的方法,其特征在于,

所述哺乳动物细胞是 CHO 细胞、NS0 细胞、SP2/0 细胞、HEK293 细胞、COS 细胞、PER. C6 细胞。

27. 抗体,其通过根据权利要求 25 或 26 的方法获得。

28. 药物组合物,其包含根据权利要求 1-24 中任一项的双特异性抗体。

## 包含二硫键稳定性 Fv 片段的双特异性抗体

[0001] 本发明涉及三价、双特异性抗体,生产它们的方法,含有所述抗体的药物组合物以及它们的应用。

[0002] 发明背景

[0003] 最近过去的几年,开发了多种多样的多特异性重组抗体形式,例如通过融合例如 IgG 抗体形式和单链结构域的四价双特异性抗体(参见,例如 Coloma, M. J., 等人, Nature Biotech 15(1997)159-163 ;W02001/077342 ;和 Morrison, S. L., Nature Biotech 25(2007)1233-1234)。

[0004] 另外开发了若干能够结合两种或更多种抗原的其他新的形式,其中不再保留抗体核心结构(IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM),例如二抗体、三抗体或四抗体、微抗体(minibody)、若干单链形式(scFv、Bis-scFv)(Holliger, P., 等人, Nature Biotech 23(2005)1126-1136 ;Fischer, N., 和 Léger, O., Pathobiology 74(2007)3-14 ;Shen, J., 等人, Journal of Immunological Methods 318(2007)65-74 ;Wu, C., 等人, Nature Biotech. 25(2007)1290-1297)。

[0005] 所有这些形式都使用接头来将抗体核心(IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM)与另外的结合蛋白(例如 scFv)融合或者融合例如两个 Fab 片段或 scFvs(Fischer, N., 和 Léger, O., Pathobiology 74(2007)3-14)。需要注意的是可能希望通过维持与天然发生的抗体的高度相似性来保留通过 Fc 受体结合而被介导的效应子功能,例如补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0006] 在 US6,897,044 中报道了制备生物活性抗体二聚体的方法。在 US7,129,330 中报道了具有至少四个通过肽接头而彼此连接的可变结构域的多价 Fv 抗体构建体。在 US2005/0079170 中报道了二聚和多聚抗原结合结构。在 US6,511,663 中报道了三价或四价单特异性抗原结合蛋白,其包括通过连接结构彼此共价结合的三个或四个 Fab 片段,该蛋白并不是天然免疫球蛋白。在 W02006/020258 中,报道了能够有效地在原核和真核细胞中表达并且可用于治疗和诊断方法的四价双特异性抗体。在 US2005/0163782 中报道了在包含两种类型的多肽二聚体的混合物中将通过至少一个链间二硫键连接的二聚体与不通过至少一个链间二硫键连接的二聚体分离或优选合成通过至少一个链间二硫键连接的二聚体的方法。在 US5,959,083 中报道了双特异性四价受体。在 W02001/077342 中报道了具有三个或更多个功能抗原结合位点的改造的抗体。在 W02007/109254 中报道了由稳定的 scFv 组成或包含稳定的 scFv 的稳定的结合分子。

[0007] 在 W02007/024715 中,报道了双可变结构域免疫球蛋白作为改造的多价和多特异性结合蛋白。

[0008] W02011/034605 涉及使用卷曲螺旋和/或 tether 构建的改造的蛋白复合物以及制造、使用和纯化此种复合物,如含有多特异性抗体或其他多特异性 Fc 的复合物的方法。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明涉及双特异性抗体,其包含

[0011] a) 特异性地结合第一抗原并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成的全长抗

体；

[0012] b) 特异性地结合第二抗原的 Fv 片段, 所述 Fv 片段包含 VH<sup>2</sup> 结构域和 VL<sup>2</sup> 结构域, 其中两个结构域通过二硫桥相连, 并且

[0013] 其中只有 VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域之一通过肽接头与特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链融合。

[0014] 在一个实施方式中, 根据权利要求 1 的双特异性抗体的特征在于, 所述双特异性抗体是三价的并且

[0015] 或者 MH<sup>2</sup> 结构域或者 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头与特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链融合。

[0016] 在一个实施方式中, 根据权利要求 2 的双特异性抗体的特征在于,

[0017] VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的 C- 端。

[0018] 在一个实施方式中, 根据权利要求 2 的双特异性抗体的特征在于, 所述双特异性抗体是三价的并且 VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头 C 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的 N- 端。

[0019] 在一个实施方式中, 根据本发明的双特异性抗体的特征在于, 所述双特异性抗体是三价的并且 VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链的 C- 端。

[0020] 在一个实施方式中, 根据本发明的双特异性抗体的特征在于,

[0021] VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头 C- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链的 N- 端。

[0022] 在一个实施方式中, 根据本发明的双特异性抗体的特征在于,

[0023] VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链的 C- 端, 或

[0024] VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头 C- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链的 N- 端。

[0025] 在一个实施方式中, 根据本发明的双特异性抗体的特征在于, 所述双特异性抗体是三价的并且或者 VH<sup>2</sup> 结构域或者 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头与特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链融合。

[0026] 在一个实施方式中, 根据本发明的三价双特异性抗体的特征在于, VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链的 C- 端。

[0027] 在一个实施方式中, 根据本发明的三价双特异性抗体的特征在于, VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头 C- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链的 N- 端。

[0028] 在一个实施方式中, 根据本发明的双特异性抗体的特征在于,

[0029] VH<sup>2</sup> 结构域和 VL<sup>2</sup> 结构域通过在下述位置之间引入的二硫桥 (disulfide bridge) 连接:

[0030] i) VH<sup>2</sup> 结构域位置 44 和 VL<sup>2</sup> 结构域位置 100,

[0031] ii) VH<sup>2</sup> 结构域位置 105 和 VL<sup>2</sup> 结构域位置 43, 或

[0032] iii) VH<sup>2</sup> 结构域位置 101 和 VL<sup>2</sup> 结构域位置 100。

[0033] (根据 kabat 编号)

[0034] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,

[0035]  $VH^2$  结构域和  $VL^2$  结构域通过在  $VH^2$  结构域位置 44 和  $VL^2$  结构域位置 100 之间引入的二硫桥连接。

[0036] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,

[0037] 完整抗体的重链的第一 CH3 结构域和完整抗体的第二 CH3 结构域各在抗体 CH3 结构域之间的原始界面中包含改变的界面处相遇;

[0038] 其中 i) 在一条重链的 CH3 结构域中,

[0039] 氨基酸残基被具有更大侧链体积的氨基酸残基所替代,由此在一条重链的 CH3 结构域的界面内产生突起 (protuberance),所述突起可定位在另一重链的 CH3 结构域的界面内的腔中,

[0040] 和

[0041] ii) 在另一条重链的 CH3 结构域中,

[0042] 氨基酸残基被具有更小侧链体积的氨基酸残基所替代,由此在第二 CH3 结构域的界面内产生腔,在第一 CH3 结构域的界面内的突起是可定位在所述腔内的。

[0043] 本发明的一个方面是制备本发明的双特异性抗体的方法,包括步骤

[0044] A) 在哺乳动物细胞中表达编码双特异性抗体的核酸,所述双特异性抗体包含

[0045] a) 特异性地结合第一抗原并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成的全长抗体;

[0046] b) 特异性地结合第二抗原的包括  $VH^2$  结构域和  $VL^2$  结构域的 Fv 片段,其中两个结构域都通过二硫桥连接,和

[0047] 其中 Fv 片段通过  $VH^2$  结构域和  $VL^2$  结构域的 N- 端经由第一和第二肽接头与特异性地结合第一抗原的全长抗体的两重链的 C- 端融合,或

[0048] 通过  $VH^2$  结构域和  $VL^2$  结构域的 C- 端经由第一和第二肽接头与特异性地结合第一抗原的全长抗体的一条重链和一条轻链两者的 N- 端融合,

[0049] 其特征在于一个接头包括可被弗林蛋白酶切割的蛋白酶切割位点,而另一接头不包括蛋白酶切割位点;

[0050] B) 从所述细胞或细胞培养物上清中回收所述抗体。

[0051] 本发明的另一方面是制备本发明的三价双特异性抗体的方法,包括步骤

[0052] A) 在哺乳动物细胞中表达编码双特异性抗体的核酸,所述双特异性抗体包括

[0053] a) 特异性地结合第一抗原并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成的全长抗体;

[0054] b) 特异性地结合第二抗原的包括  $VH^2$  结构域和  $VL^2$  结构域的 Fv 片段,其中两个结构域都通过二硫桥连接,和

[0055] 其中所述 Fv 片段

[0056] 通过  $VH^2$  结构域和  $VL^2$  结构域的 N- 端经由第一和第二肽接头与特异性地结合第一抗原的全长抗体的两重链的 C- 端融合,或

[0057] 通过  $VH^2$  结构域和  $VL^2$  结构域的 C- 端经由第一和第二肽接头与特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链的 N- 端融合,

- [0058] 其特征在于
- [0059] 一个接头包括可被 Prescission 蛋白酶切割的蛋白酶切割位点,而另一接头不包括蛋白酶切割位点;
- [0060] B) 从所述细胞或细胞培养物上清中回收所述抗体。
- [0061] 在一个实施方式中,所述方法的特征在于可被弗林蛋白酶切割的蛋白酶切割位点是 SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :14。
- [0062] 在一个实施方式中,所述方法的特征在于可被 Prescission 蛋白酶切割的蛋白酶切割位点是 SEQ ID NO :15。
- [0063] 在一个实施方式中,所述方法的特征在于哺乳动物细胞,在一个实施方式中,CHO 细胞、NS0 细胞、SP2/0 细胞、HEK293 细胞、COS 细胞、PER. C6 细胞,在另一个实施方式中,HEK293 细胞或 CHO 细胞。
- [0064] 本发明的一个方面是通过这种重组方法获得的抗体。
- [0065] 本发明的一个方面是包括本发明的双特异性抗体的药物组合物。
- [0066] 本发明的一个方面是用于治疗癌症的本发明的双特异性抗体。
- [0067] 本发明的一个方面是本发明的双特异性抗体在制造用于治疗癌症的药物中的应用。
- [0068] 本发明还提供治疗罹患如,例如癌症或炎症的疾病的患者的方法,包括向被诊断为具有此种疾病(并因此需要此种疗法)的患者施用有效量的本发明的抗体。该抗体优选以药物组合物被施用。
- [0069] 根据本发明的双特异性抗体一方面由于它们结合不同的抗原而显示出如生物活性的有价值的特性。结合第二抗原的被二硫键稳定的 Fv 片段由于高灵活性而显示出优异的结合特性(因为它仅通过一个肽接头融合至全长抗体)并且与接头长度完全无关。
- [0070] 另一方面,由于它们的稳定性、低聚集和药物代谢动力学及生物学特性,它们适于生产和药物配制。由于它们的 Ig 核心,它们仍旧保留着如 ADCC 和 CDC 的天然抗体的特性。

## 附图说明

- [0071] 图 1 不具有 CH4 结构域的全长抗体的示意性结构,所述全长抗体特异性地结合第一抗原 1,所述全长抗体以典型的顺序具有两对包含可变结构域和恒定结构域的重链和轻链。
- [0072] 图 2a-c 根据本发明的三价、双特异性抗体的示意性表示,所述抗体包括全长抗体(在 CH3 结构域中具有任意的突起进入孔修饰),所述全长抗体特异性地结合第一抗原 1 并且特异性地结合第二抗原 2 的二硫键稳定性 Fv 片段通过该二硫键稳定性 Fv 片段的 VH<sup>2</sup> 或 VL<sup>2</sup> 的 N-端与所述全长抗体的 C-端融合
- [0073] 图 2d 示例性地示意表示用于图 2a 所示的根据本发明的双特异性抗体的中间物
- [0074] 图 3a-b 示意性地表示根据本发明的三价、双特异性抗体,包括全长抗体(在 CH3 结构域中具有任意的突起进入孔修饰),所述全长抗体特异性地结合第一抗原 1 并且特异性地结合第二抗原 2 的二硫键稳定性 Fv 片段通过该二硫键稳定性 Fv 片段的 VH<sup>2</sup> 或 VL<sup>2</sup> 的 C-端与所述全长抗体的 N-端进行融合
- [0075] 图 3c 示例性地示意表示用于图 3a 所示的根据本发明的双特异性抗体的中间物



[0076] 图 3d-e 示意性地表示根据本发明的三价、双特异性抗体,包括全长抗体(在 CH3 结构域中具有任选的突起进入孔修饰),所述全长抗体特异性地结合第一抗原 1 并且特异性地结合第二抗原 2 的二硫键稳定性 Fv 片段通过该二硫键稳定性 Fv 片段的 VH2 或 VL2 的 C- 端与所述全长抗体的 N- 端进行融合

[0077] 图 4 :根据本发明的三价双特异性抗体衍生物的组成

[0078] a) 根据本发明的三价双特异性抗体衍生物的部分(modular) 组成

[0079] b) Fv 片段的直接组装

[0080] c) 通过具有带蛋白酶切割位点的第二接头的中间物的改善的组装,该中间物将在表达期间 / 或表达后被切割以得到根据本发明的双特异抗体

[0081] d) 具有识别序列的连接物-肽,用于在靶细胞(通过弗林蛋白酶)或在体外(通过 Prescission 蛋白酶)的蛋白水解加工,所述加工用于在 c) 下的中间物方法。

[0082] 图 5 :含 dsFv 的双特异性抗体衍生物的表达和纯化

[0083] (a) 蛋白制品在 Protein-A 和 SEC 纯化后的还原 SDS Page

[0084] 图 6 :蛋白酶切割前降低的结合亲和力 :

[0085] 双特异性抗体衍生物在蛋白酶切割前后的还原 SDS-Page。

[0086] (a) 含有 Prescission 切割位点的根据本发明的双特异性抗体被生成为具有降低的结合亲和力并且在暴露于 Prescission 蛋白酶时变为活化的。

[0087] (b) 含有弗林蛋白酶切割位点的根据本发明的双特异性抗体被生成为具有降低的结合亲和力并且随后在暴露于弗林蛋白酶时变为活化的。

[0088] 图 7 :限制性和未受限的三价 Her3-cMet 双特异性抗体与活细胞的结合。

[0089] 在左栏中示出二价未受限的 Her3- 部分对表达 Her3 的 cMet 阴性 T47D 细胞的结合。在右栏中示出不同的限制性 cMet- 部分对于 Her3- 阴性的表达 cMet 的 A549 细胞的结合。对于限制性部分,观察到较差的结合,而通过特异性蛋白酶的释放造成对细胞的完全结合和在细胞上积累。

[0090] 图 8 :在细胞信号传导测定中,三价 Her3-cMet 实体的抑制功能性

[0091] (a) 检测磷酸化的 Her3 的 Western 印迹证明未受限的 Her3- 实体对信号传导的干扰。

[0092] (b) 检测磷酸化的 ACT 的 ELISA 证明未受限的 cMet- 实体对 HGF/c-Met 信号传导的有效干扰,而限制形式的同一分子具有较低的活性。

[0093] 图 9 :对 Her3-cMet-3C-FS1 的还原 SDS PAGE 分析显示存在通过弗林蛋白酶加工而产生的产物(52kD, 12kD)。

[0094] 图 10 示意性地表示其他的单-和双特异性抗体。下栏示出根据本发明的双特异性抗体,其在被弗林蛋白酶(左)加工前和在被弗林蛋白酶(右)的过程中加工后,结合不同的靶标抗原。

[0095] 图 11 :双特异性的经弗林蛋白酶加工过的含 dsFv 的抗体衍生物 VEGFR\_Dig\_6C\_FS1 和 CD22\_Dig\_6C\_FS1 的表达和纯化。示出了大小排阻图谱,这证明纯化的蛋白质制品的均质性和聚集体在纯化的蛋白质制品中的几乎完全不存在。

[0096] 图 12 :在 Protein-A 和 SEC 纯化后对蛋白质制品的非还原和还原 SDSPage 证明在对纯化后的双特异性抗体衍生物加工后的均质性和正确组成。

[0097] 图 13 :在 Protein-A 和 SEC 纯化后对蛋白质制品的质谱分析证明在对纯化后的双特异性抗体衍生物 CD22-Dig 和 VEGFR-Dig 加工后的均质性和正确组成（完整的过程中弗林蛋白酶加工）。

[0098] 图 14 :通过表面等离子共振对根据本发明的其他双特异性抗体的结合分析。上栏 :对于 Biacore 分析,根据本发明的双特异性抗体和对照抗体都被抗 -Fc 抗体捕获到芯片并且暴露于可溶形式的细胞表面上的靶标抗原（=靶标 1）。通过标准技术从结合曲线计算结合率和去除率。下栏 :通过 LeY-Dig 双特异性抗体的表面等离子共振的结合分析证明同时结合靶标 1 和靶标 2 特异性。根据本发明的双特异性抗体被抗 -Fc 抗体捕获到芯片,暴露于可溶形式的靶标 1 抗原（第一结合曲线）并且此后暴露于靶标 2 抗原。在第一结合曲线的“上部”出现源自第二抗原的曲线证明了两种抗原同时结合到该双特异性抗体。

[0099] 图 15 :通过表面等离子共振对根据本发明的其他被弗林蛋白酶加工过的双特异性抗体 CD22-Dig 的结合分析。上栏 :对于 Biacore 分析,根据本发明的双特异性抗体和对照抗体都被固定化的靶标 1 抗原 CD22 捕获到芯片,并且随后暴露于作为靶标 2 抗原的 Dig-siRNA。通过标准技术从结合曲线计算结合率和去除率。下栏 :通过 CD22-Dig 双特异性抗体的表面等离子共振的结合分析证明同时结合靶标 1 和靶标 2 特异性。根据本发明的双特异性抗体通过 CD22 结合被捕获到芯片。在第一结合曲线的“上部”出现源自第二抗原的曲线证明了两种抗原同时结合到该双特异性抗体。

[0100] 图 16 :根据本发明的另外的双特异性抗体与活细胞的结合。对于 FACS 分析,首先将根据本发明的双特异性抗体与靶标细胞孵育并随后与或者抗 -huCkappa（以检测双特异性抗体）或者与地高辛配基化的荧光团（以检测第二结合实体的功能性）孵育。由此,可以同时评估两种特异性的结合功能性。只在双特异性结合细胞（针对靶标 1 的功能性）并且此后捕获 Dig- 有效荷载（针对靶标 2 的功能性）时才检测细胞相关的信号。在相同的实验设定下,不识别细胞表面靶标的双特异性不会（如预期地）产生显著的细胞相关信号。

#### [0101] 发明详细说明

[0102] 本发明涉及双特异性抗体,包括

[0103] a) 特异性地结合第一抗原并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成的全长抗体;

[0104] b) 特异性地结合第二抗原的 Fv 片段,所述 Fv 片段包含 VH<sup>2</sup> 结构域和 VL<sup>2</sup> 结构域,其中两个结构域通过二硫桥相连,和

[0105] 其中只有 VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域之一通过肽接头与特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链融合。

[0106] （并且 VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域中的另一个不通过肽接头与特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链融合）。

[0107] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,

[0108] VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链的 C- 端。

[0109] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,

[0110] VH<sup>2</sup> 结构域通过肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链的 C- 端。

- [0111] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,
- [0112]  $VH^2$  结构域通过肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链的 C- 端。
- [0113] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,
- [0114]  $VH^2$  结构域通过肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的轻链的 C- 端。
- [0115] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,
- [0116]  $VL^2$  结构域通过肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链的 C- 端。
- [0117] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,
- [0118]  $VL^2$  结构域通过肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链的 C- 端。
- [0119] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,
- [0120]  $VL^2$  结构域通过肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的轻链的 C- 端。
- [0121] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,
- [0122]  $VH^2$  结构域或  $VL^2$  结构域通过肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链的 C- 端 ;和
- [0123]  $CH1$  结构域 N- 端融合至 C- 端  $VH^2$  结构域并且  $CL$  结构域 N- 端融合至 C- 端  $VL^2$  结构域 ( 参见,例如图 2c)。
- [0124] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,
- [0125]  $VH^2$  结构域或  $VL^2$  结构域通过肽接头 C- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链的 N- 端。
- [0126] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,
- [0127]  $VH^2$  结构域通过肽接头 C- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链的 N- 端。
- [0128] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,
- [0129]  $VH^2$  结构域通过肽接头 C- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链的 N- 端。
- [0130] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,
- [0131]  $VH^2$  结构域通过肽接头 C- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的轻链的 N- 端。
- [0132] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,
- [0133]  $VL^2$  结构域通过肽接头 C- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链的 N- 端。
- [0134] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,
- [0135]  $VL^2$  结构域通过肽接头 C- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链的 N- 端。
- [0136] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于,

[0137] VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头 C- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的轻链的 N- 端。

[0138] 在一个实施方式中, 根据本发明的双特异性抗体的特征在于,

[0139] a) 双特异性抗体是三价的并且

[0140] b) 或者 VH<sup>2</sup> 结构域或者 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头与特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链融合。

[0141] 在一个实施方式中, 此种三价双特异性抗体的特征在于, VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头 N- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链的 C- 端。

[0142] 在一个实施方式中, 此种三价双特异性抗体的特征在于, VH<sup>2</sup> 结构域或 VL<sup>2</sup> 结构域通过肽接头 C- 端融合至特异性地结合第一抗原的全长抗体的重链的 N- 端。

[0143] 在一个实施方式中, 根据本发明的双特异性抗体的特征在于,

[0144] VH<sup>2</sup> 结构域和 VL<sup>2</sup> 结构域通过在下述位置之间引入的二硫桥连接:

[0145] i) VH<sup>2</sup> 结构域位置 44 和 VL<sup>2</sup> 结构域位置 100,

[0146] ii) VH<sup>2</sup> 结构域位置 105 和 VL<sup>2</sup> 结构域位置 43, 或

[0147] iii) VH<sup>2</sup> 结构域位置 101 和 VL<sup>2</sup> 结构域位置 100 (总是根据 Kabat 的 EU 索引编号)。

[0148] 在一个实施方式中, 根据本发明的双特异性抗体的特征在于,

[0149] VH<sup>2</sup> 结构域和 VL<sup>2</sup> 结构域通过在 VH<sup>2</sup> 结构域位置 44 和 VL<sup>2</sup> 结构域位置 100 之间引入的二硫桥连接 (总是根据 Kabat 的 EU 索引编号)。

[0150] 为了稳定而引入非天然的二硫桥的技术描述于, 例如 W094/029350, US5, 747, 654, Rajagopal, V., 等人, Prot. Engin. 10(1997) 1453-1459; Reiter, Y., 等人, Nature Biotechnology 14(1996) 1239-1245; Reiter, Y., 等人, Protein Engineering; 8(1995) 1323-1331; Webber, K. O., 等人, Molecular Immunology 32(1995) 249-258; Reiter, Y., 等人, Immunity 2(1995) 281-287; Reiter, Y., 等人, JBC 269(1994) 18327-18331; Reiter, Y., 等人, Inter. J. of Cancer 58(1994) 142-149 或 Reiter, Y., Cancer Res. 54(1994) 2714-2718。在一个实施方式中, 在 b) 和 c) 下, 多肽的可变结构域之间的任选的二硫键是在重链可变结构域位置 44 和轻链可变结构域位置 100 之间。在一个实施方式中, 在 b) 和 c) 下, 多肽的可变结构域之间的任选的二硫键是在重链可变结构域位置 105 和轻链可变结构域位置 43 之间 (总是按照 Kabat 的 EU 索引编号)。在一个实施方式中, 优选在单链 Fab 片段的可变结构域 VH 和 VL 之间是没有所述任选的二硫键稳定的三价、双特异抗体。

[0151] 术语“全长抗体”意指由两条“全长抗体重链”和两条“全长抗体轻链”组成的抗体 (见图 1)。“全长抗体重链”是这样的多肽, 其在 N- 端到 C- 端方向上由抗体重链可变结构域 (VH)、抗体恒定重链结构域 1 (CH1)、抗体铰链区 (HR)、抗体重链恒定结构域 2 (CH2) 和抗体重链恒定结构域 3 (CH3) 组成, 缩写为 VH-CH1-HR-CH2-CH3; 并且在 IgE 亚类的抗体的情形中, 任选地还包括抗体重链恒定结构域 4 (CH4)。优选地“全长抗体重链”是在 N- 端到 C- 端方向上由 VH、CH1、HR、CH2 和 CH3 组成的多肽。“全长抗体轻链”是在 N- 端到 C- 端方向上由抗体轻链可变结构域 (VL) 和抗体轻链恒定结构域 (CL) 组成的多肽, 缩写为 VL-CL。所述抗体轻链恒定结构域 (CL) 可以是  $\kappa$  (kappa) 或  $\lambda$  (lambda)。两条全长抗体链通过在 CL 结构域和 CH1 结构域之间的多肽间二硫键和全长抗体重链的铰链区之间的多

肽间二硫键连接在一起。典型的全长抗体的实例是天然抗体如 IgG(例如, IgG1 和 IgG2)、IgM、IgA、IgD 和 IgE)。根据本发明的全长抗体可以来自单一物种,例如人,或者它们可以是嵌合的或人源化的抗体。根据本发明的全长抗体包含分别由 VH 和 VL 对形成的两个抗原结合位点,这两个抗原结合位点都特异性地结合相同的抗原。所述全长抗体的重链或轻链的 C- 端意指在所述重链或轻链的 C- 端的最后一个氨基酸。

[0152] b) 中的多肽的抗体重链可变结构域 (VH) 和 c) 中的多肽的抗体轻链可变结构域 (VL) 的 N- 端意指在 VH 或 VL 结构域的 N- 端的最后一个氨基酸。

[0153] 如本文使用的术语“Fv 片段”指特异性地结合抗原的抗体的 VH<sup>2</sup> 结构域和 VL<sup>2</sup> 结构域,两结构域一起形成 Fv 片段。本发明双特异性抗体内的结合第二抗原的 Fv 片段包括在两个结构域 VH<sup>2</sup> 和 VL<sup>2</sup> 之间的(链间)二硫桥,即,结构域 VH<sup>2</sup> 和结构域 VL<sup>2</sup> 都通过非天然的二硫桥来连接用于稳定,该二硫桥是通过描述于,例如 W094/029350, US5, 747, 654, Rajagopal, V., 等人, Prot. Engin. 10(1997) 1453-1459; Reiter, Y., 等人, Nature Biotechnology 14(1996) 1239-1245; Reiter, Y., 等人, Protein Engineering; 8(1995) 1323-1331; Webber, K. O., 等人, Molecular Immunology 32(1995) 249-258; Reiter, Y., 等人, Immunity 2(1995) 281-287; Reiter, Y., 等人, JBC 269(1994) 18327-18331; Reiter, Y., 等人, Inter. J. of Cancer 58(1994) 142-149 或 Reiter, Y., Cancer Res. 54(1994) 2714-2718 中的技术被引入的。

[0154] 本发明双特异性抗体内的结合第二抗原的 Fv 片段的 VH<sup>2</sup> 和 VL<sup>2</sup> 结构域并不是通过肽接头彼此连接(即, VH<sup>2</sup> 和 VL<sup>2</sup> 不形成单链 Fv 片段)。因此,术语“特异性结合第二抗原的包括 VH<sup>2</sup> 结构域和 VL<sup>2</sup> 结构域的 Fv 片段,其中两结构域都通过二硫桥连接”指这样的 Fv 片段,其中两结构域都通过二硫桥作为在两结构域之间的唯一共价键来连接并且不通过其它的共价键而连接(例如在单链 Fv 片段时,通过肽接头)。

[0155] Fv 片段的结构域 VH<sup>2</sup> 和 VL<sup>2</sup> 可以源自全长抗体或者其他技术如,例如噬菌体展示。

[0156] 在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体是三价双特异性抗体并且 Fv 片段(结合第二抗原)融合到结合第一抗原的全长抗体的重链。如在本申请中使用的术语“价”指在抗体分子中存在特定数量的结合位点。例如,根据本发明的天然抗体或者全长抗体具有两个结合位点并且是二价的。如此,术语“三价”指在抗体分子中存在三个结合位点。如本文使用的术语“三价,三特异性”抗体指具有三个抗原结合位点,每个都结合另一抗原(或抗原的另一表位)的抗体。本发明的抗体具有三个至四个结合位点,即,是三价或四价(优选三价)并且是双特异性的。

[0157] 抗体特异性指抗体对于抗原特定表位的选择性识别。例如,天然抗体是单特异性的。双特异性的抗体是具有两种不同的抗原结合特异性的抗体。当抗体具有一种以上的特异性时,所识别的表位可与单个抗原或与一个以上的抗原缔合。

[0158] 如本文使用的术语“单特异性”抗体意指具有一个或多个结合位点,每个结合位点结合相同抗原的相同表位的抗体。

[0159] 根据本发明的典型三价双特异性抗体示出于,例如图 2a 和 2b、3d 和 3c。

[0160] 对于根据本发明的三价、双特异性抗体,在 CH3 结构域内增强两条不同重链的异二聚化的修饰(参见图 2a 和 2b、3d 和 3c)是尤其有用的。

[0161] 因此,对于此种三价、双特异性抗体,所述根据本发明的全长抗体的 CH3 结构域可

以通过“突起到孔”技术而改变,该技术以若干实例详细描述于例如 W096/027011, Ridgway, J. B., 等人, Protein Eng 9(1996)617-621; 和 Merchant, A. M., 等人, Nat Biotechnol 16(1998)677-681。在这一方法中,两 CH3 结构域的相互作用表面改变以增加含有这两个 CH3 结构域的两条重链的异二聚化。(两条重链的)两个 CH3 结构域中的一个可以是“突起”,而另一个是“孔”。二硫桥的引入进一步稳定了异二聚体 (Merchant, A. M., 等人, Nature Biotech 16(1998)677-681; Atwell, S., 等人, J. Mol. Biol. 270(1997)26-35) 并增加产量。

[0162] 因此,在本发明的一个方面,所述三价、双特异性抗体进一步的特征在于

[0163] 全长抗体的一条重链的 CH3 结构域和全长抗体的另一条重链的 CH3 结构域各在包括抗体 CH3 结构域之间的原始界面的界面处相遇;

[0164] 其中所述界面被改变以促进二价双特异性抗体的形成,其中所述改变的特征在于:

[0165] a) 改变一条重链的 CH3 结构域,

[0166] 使得在所述二价、双特异抗体内,在与另一条重链的 CH3 结构域的原始界面相遇的一条重链的 CH3 结构域的原始界面中,

[0167] 氨基酸残基被具有更大侧链体积的氨基酸残基替代,由此在一条重链的 CH3 结构域的界面内产生突起,所述突起可定位于另一条重链的 CH3 结构域的界面内的腔中,

[0168] 和

[0169] b) 改变另一条重链的 CH3 结构域,

[0170] 使得在所述三价、双特异抗体内,在与第一 CH3 结构域的原始界面相遇的该第二 CH3 结构域的原始界面内,氨基酸残基被具有更小侧链体积的氨基酸残基替代,由此在第二 CH3 结构域的界面内产生腔,其中第一 CH3 结构域的界面内的突起可定位于所述腔中。

[0171] 优选地,所述具有更大侧链体积的氨基酸残基选自精氨酸 (R)、苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W)。

[0172] 优选地,所述具有更小侧链体积的氨基酸残基选自丙氨酸 (A)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)、缬氨酸 (V)。

[0173] 在本发明的一个方面,将两个 CH3 结构域进一步通过引入半胱氨酸 (C) 作为每个 CH3 结构域的相应位置的氨基酸以便可以形成在两 CH3 结构域之间的二硫桥来改变。

[0174] 在优选的实施方式中,所述三价、双特异性包括在“突起链 (knobs chain)”的 CH3 结构域中的 T366W 突变,和在“孔链 (hole chain)”的 CH3 结构域中的 T366S、L368A、Y407V 突变。还可以使用另外的在 CH3 结构域之间的链间二硫桥 (Merchant, A. M., 等人, Nature Biotech 16(1998)677-681), 例如通过在“突起链”的 CH3 结构域中引入 Y349C 突变,在“孔链”的 CH3 结构域中引入 E356C 突变或 S354C 突变来进行。因此,在另一个优选的实施方式中,所述三价、双特异性抗体包括在两个 CH3 结构域之一中的 Y349C、T366W 突变,在该两个 CH3 结构域的另一一个中的 E356C、T366S、L368A、Y407V 突变,或所述三价、双特异性抗体包括在两个 CH3 结构域之一中的 Y349C、T366W 突变,在该两个 CH3 结构域的另一一个中的 S354C、T366S、L368A、Y407V 突变(在一个 CH3 结构域中的另外的 Y349C 突变和在另一个 CH3 结构域中的另外的 E356C 或 S354C 突变,形成链间二硫桥)(编号总是根据 Kabat 的 EU 索引进行)。然而还可以替代地或另外地使用如由 EP1870459A1 所述的其它突起到孔中技术。关于所述三价、双特异性抗体的优选实例是在“突起链”的 CH3 结构域中

的 R409D ;K370E 突变和在“孔链”的 CH3 结构域中的 D399K ;E357K 突变（编号总是根据 Kabat 的 EU 索引进行）。

[0175] 在另一优选的实施方式中,所述三价、双特异性抗体包括在“突起链”的 CH3 结构域中的 T366W 突变和在“孔链”的 CH3 结构域中的 T366S、L368A、Y407V 突变以及另外地,在“突起链”的 CH3 结构域中的 R409D ;K370E 突变和在“孔链”中的 CH3 结构域中的 D399K ;E357K 突变。

[0176] 在另一优选的实施方式中,所述三价、双特异性抗体包括在两个 CH3 结构域之一中的 Y349C、T366W 突变和在两个 CH3 结构域的另一个中的 S354C、T366S、L368A、Y407V 突变或者所述三价、双特异性抗体包括在两个 CH3 结构域之一中的 Y349C、T366W 突变和在两个 CH3 结构域的另一个中的 S354C、T366S、L368A、Y407V 突变以及另外的在“突起链”的 CH3 结构域中的 R409D ;K370E 突变和在“孔链”中的 CH3 结构域中的 D399K ;E357K 突变。

[0177] 本发明的双特异性抗体包括不同的抗原结合位点。本发明的全长抗体包括两个相同的特异性地结合第一抗原的抗原结合位点,以及二硫键稳定的 Fv 片段的抗体重链可变结构域 VH<sup>2</sup> 和抗体轻链可变结构域 VL<sup>2</sup> 一起形成特异性地结合第二抗原的一个抗原结合位点。

[0178] 如本文所述,术语“结合位点”或“抗原结合位点”意指各个抗原实际上所特异性结合的根据本发明的双特异性抗体的区域。在全长抗体中的或在 Fv 片段中的抗原结合位点各自是由抗体轻链可变结构域 (VL) 和抗体重链可变结构域 (VH) 组成的对所形成。

[0179] 特异性地结合于所要抗原的抗原结合位点可以源自 a) 针对抗原的已知抗体或 b) 通过使用抗原蛋白或核酸或核酸或其片段等的从头免疫方法或通过噬菌体展示获得的新抗体或抗体片段。

[0180] 本发明的抗体的抗原结合位点包含六个互补性决定区 (CDRs),其在不同程度上有助于结合位点对于抗原的亲和力。存在三种重链可变结构域 CDRs (CDRH1、CDRH2 和 CDRH3) 和三种轻链可变结构域 CDRs (CDRL1、CDRL2 和 CDRL3)。CDR 和框架区 (FRs) 的程度通过与氨基酸序列的汇编数据库进行比较来确定,所述数据库中已根据序列之间的可变性而定义了所述区域。

[0181] 抗体特异性指抗体对于抗原的特定表位的选择性识别。天然抗体,例如是单特异性的。根据本发明所述的“双特异性抗体”是具有两种不同的抗原结合特异性的抗体。如果抗体具有一种以上的特异性,所识别的表位可以与单抗原或一种以上的抗原缔合。如本文使用,术语“单特异性”抗体意指具有一个或多个各自结合于相同抗原的相同表位的结合位点的抗体。

[0182] 如在本申请使用的术语“价”意指结合位点在抗体分子上存在的具体数量。例如,天然抗体或根据本发明的全长抗体具有两个结合位点并且是二价的。如此,术语“三价”意指在抗体分子中存在三个结合位点。如此,术语“四价”意指在抗体分子中存在四个结合位点。在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体是三价或四价的。在一个实施方式中,根据本发明的双特异性抗体是三价的。

[0183] 本发明的全长抗体包括一个或多个免疫球蛋白种类的免疫球蛋白恒定区。免疫球蛋白种类包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE 同种型,并且在 IgG 和 IgA 的情形中,包括它们的亚型。在优选的实施方式中,本发明的全长抗体具有 IgG 型抗体的恒定结构域结构。

[0184] 如在本文使用,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指单一氨基酸组成的抗体分子制品。

[0185] 术语“嵌合抗体”指一种抗体,其包括来自一种来源或物种的可变区,即结合区,以及源自不同来源或物种的恒定区的至少一部分,所述抗体通常通过重组 DNA 技术进行制备。优选包括鼠可变区和人恒定区的嵌合抗体。本发明涵盖的“嵌合抗体”的其它优选形式是那些,其中恒定区已经相比初始抗体的恒定区而被修饰或改变以产生根据本发明的特性,特别是关于 C1q 结合和 / 或 Fc 受体 (FcR) 结合。也将这种嵌合抗体称作“类别转换抗体”。嵌合抗体是被表达的免疫球蛋白基因的产物,该基因包括编码免疫球蛋白可变区的 DNA 区段和编码免疫球蛋白恒定区的 DNA 区段。生产嵌合抗体的方法包括在本领域公知的常规重组 DNA 和基因转染技术。参见,例如, Morrison, S. L., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(1984)6851-6855 和 US5, 202, 238 和 US5, 204, 244。

[0186] 术语“人源化抗体”指这样的抗体,其中的框架或“互补性决定区”(CDR) 已经被修饰为包括与亲本免疫球蛋白相比特异性不同的免疫球蛋白的 CDR。在一个优选实施方式中,将鼠 CDR 移植到人抗体的框架区以制备“人源化抗体”。参见例如, Riechmann, L., 等人, Nature 332(1988)323-327; 和 Neuberger, M. S., 等人, Nature 314(1985)268-270。特别优选的 CDRs 对应于识别以上指出的关于嵌合抗体的抗原的那些代表性序列。本发明涵盖的“人源化抗体”的其它形式是那些,其中恒定区已经相比于初始抗体的恒定区而另外被修饰或改变以产生按照本发明的特性,特别是关于 C1q 结合和 / 或 Fc 受体 (FcR) 结合。

[0187] 如在本文使用,术语“人抗体”意欲包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。人抗体是现有技术中公知的 (van Dijk, M. A., 和 van de Winkel, J. G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5(2001)368-374)。人抗体还可以在转基因动物 (例如小鼠) 中产生,所述转基因动物在免疫时能够在缺乏内源免疫球蛋白生成的条件下产生人抗体的全部所有组成成分或选定部分 (selection)。在此种种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在抗原攻击时产生人抗体 (参见例如 Jakobovits, A., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(1993)2551-2555; Jakobovits, A., 等人, Nature 362(1993)255-258; Brüggemann, M., 等人, Year Immunol. 7(1993)33-40)。人抗体还可以在噬菌体展示文库中产生 (Hoogenboom, H. R., 和 Winter, G. J., Mol. Biol. 227(1992)381-388; Marks, J. D., 等人, J. Mol. Biol. 222(1991)581-597)。Cole, S. P. C., 等人, 和 Boerner, P., 等人, 的技术也可以用于制备人单克隆抗体 (Cole, S. P. C., 等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, (1985)77-96) 和 Boerner, P., 等人, J. Immunol. 147(1991)86-95)。如已经对根据本发明的嵌合和人源化抗体所提及的,如在本文中使用的术语“人抗体”还包括这样的抗体,其在恒定区内被修饰以产生根据本发明的特性,特别是关于 C1q 结合和 / 或 FcR 结合,例如通过“类别转换”即改变或突变 Fc 部分 (例如自 IgG1 到 IgG4 和 / 或 IgG1/IgG4 突变)。

[0188] 如在本文使用,术语“重组人抗体”意欲包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体,诸如分离自宿主细胞,诸如 HEK293 细胞和 CHO 或 CHO 细胞的抗体或分离自针对人免疫球蛋白基因是转基因的动物 (例如小鼠) 的抗体,或利用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体。这种重组人抗体具有处于重排形式的可变区和恒定区。根据本发明的重组人抗体已经经历了体内体细胞高变。因此,重组抗体的 VH 和 VL 区域的氨基



酸序列是尽管源自并涉及人种系 VH 和 VL 序列,但在体内可能不天然存在于人抗体种系所有组成成分中的序列。

[0189] 如本文使用,“可变结构域”(轻链(VL)可变结构域,重链(VH)的可变区)意指直接参与抗体与抗原结合的每对轻链和重链对。可変人轻链和重链的结构域具有相同的一般结构且每个结构域包括 4 个框架(FR)区,所述框架区的序列是普遍保守的,其通过 3 个“高变区”(或互补性决定区,CDRs)相连接。框架区采用  $\beta$ -折叠构象且 CDR 可以形成连接  $\beta$ -折叠结构的环。每条链中的 CDR 通过框架区保持其三维结构并与来自另一条链的 CDR 一起形成抗原结合位点。抗体重链和轻链 CDR3 区在根据本发明的抗体的结合特异性/亲和力方面发挥特别重要的作用并因此提供本发明的另一个目的。

[0190] 用于本文时,术语“高变区”或“抗体的抗原结合部分”指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区包括来自“互补性决定区”或“CDRs”的氨基酸残基。“框架”或“FR”区是除本文中定义的高变区残基之外的那些可变结构域区域。因此,抗体的轻链和重链从 N 端到 C 端包括结构域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。各条链上的 CDR 通过此种框架氨基酸分开。特别地,重链的 CDR3 是最有助于抗原结合的区域。按照 Kabat, E. A., 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 的标准定义确定 CDR 和 FR 区域。

[0191] 如在本文使用,术语“结合”或“特异性结合”指在体外测定法中,优选地在用纯化的野生型抗原的等离振子共振测定(BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, 瑞典)中,抗体与抗原的表位的结合。结合的亲和力由术语  $k_a$  (来自抗体/抗原复合物的抗体的缔合的速率常数)、 $k_d$  (解离常数)和  $K_D$  ( $k_d/k_a$ ) 定义。结合或特异性结合意为  $10^8 M$  或更低,例如  $10^8 M$  到  $10^{13} M$ , 优选  $10^9 M$  到  $10^{13} M$  的结合亲和力 ( $K_D$ )。因此,根据本发明的双特异性抗体以  $10^8 M$  或更低,例如  $10^8 M$  到  $10^{13} M$ , 优选  $10^9 M$  到  $10^{13} M$  的结合亲和力 ( $K_D$ ) 特异性结合于对其具有特异性的每种抗原。

[0192] 术语“表位”包括能够特异性结合抗体的任何多肽决定簇。在某些实施方式中,表位决定簇包括分子的化学活性表面基团,诸如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,以及在某些实施方式中,可以具有特定的三维结构特征,和/或特定的电荷特性。表位是被抗体结合的抗原区域。

[0193] 在某些实施方式中,当抗体在蛋白和/或大分子的复合体混合物中优先识别其靶抗原时,将该抗体称为与抗原特异性结合。

[0194] 如在本文中使用的用于根据本发明的抗体的术语“肽接头”指具有氨基酸序列的肽,所述肽优选地是合成来源的。将根据本发明的这些肽连接物用于将结合第二抗原的二硫键稳定性 Fv 片段与全长抗体的重链 C-端或 N-端融合从而形成根据本发明的双特异性抗体。优选地,所述肽接头是具有长度为至少 5 个氨基酸的氨基酸序列的肽,优选地长度为 10 至 100 个氨基酸,更优选地长度为 25 至 50 个氨基酸。在一个实施方式中,所述肽接头是例如,  $(GxS)_n$  或  $(GxS)_n G_m$ , 其中 G = 甘氨酸, S = 丝氨酸, 并且 ( $x = 3, n = 3, 4, 5$  或  $6$ , 并且  $m = 0, 1, 2$  或  $3$ ) 或 ( $x = 4, n = 2, 3, 4, 5$  或  $6$ , 并且  $m = 0, 1, 2$  或  $3$ ), 优选地,  $x = 4$  且  $n = 2, 3, 4, 5$  或  $6$ , 并且  $m = 0$ 。在一个实施方式中,在根据本发明的抗体内使用的“肽接头”不包括蛋白酶切割位点。肽接头的每个末端缀合一条多肽链(例如, VH 结构域、VL 结构域、

抗体重链、抗体轻链、CH1-VH 链等)。

[0195] 如下面所述的用于中间物抗体(其在表达期间或在表达后被加工成根据本发明的抗体)的术语“肽接头”指具有氨基酸序列的肽,所述肽例如是合成来源的。优选地,下面的所述肽接头是具有至少 5 个氨基酸长度的氨基酸序列的肽,优选地具有 5 至 100 个氨基酸长度,更优选地具有 10 至 50 个氨基酸长度。肽接头的每个末端缀合一条多肽链(例如, VH 结构域、VL 结构域、抗体重链、抗体轻链、CH1-VH 链等)。

[0196] 在所述中间物双特异性抗体中的肽接头之一不包括蛋白酶切割位点并且与如上所述的根据本发明的最终双特异性抗体的肽接头相同。在一个实施方式中,所述没有蛋白酶切割位点的肽接头是例如  $(GxS)_n$  或  $(GxS)_nG_m$ , 其中 G = 甘氨酸, S = 丝氨酸, 并且  $(x = 3, n = 3, 4, 5$  或  $6, \text{ 并且 } m = 0, 1, 2$  或  $3)$  或  $(x = 4, n = 2, 3, 4, 5$  或  $6, \text{ 并且 } m = 0, 1, 2$  或  $3)$ , 优选地,  $x = 4$  且  $n = 2, 3, 4, 5$  或  $6, \text{ 并且 } m = 0$ 。

[0197] 如下所述的中间物抗体的另一肽接头包括蛋白酶切割位点,例如,该位点在表达期间(例如通过弗林蛋白酶)或在表达(/和纯化)后是可切割的。通常,在肽接头内的蛋白酶切割位点是被蛋白酶切割的氨基酸序列或基序。用于不同蛋白酶的天然或人工的蛋白酶切割位点描述于,例如 Database, Vol. 2009, Article ID bap015, doi:10.1093/database/bap015 以及所参考的 MEROPS 肽数据库 (<http://merops.sanger.ac.uk/>)。弗林蛋白酶特异的蛋白酶切割位点是例如, QSSRHRRAL (SEQ ID NO. 13 的弗林蛋白酶特异的蛋白酶切割位点变体 1-FS1), 或 LSHRSKRSL (SEQ ID NO. 14 的弗林蛋白酶特异的蛋白酶切割位点变体 2-FS2)。Prescission 特异的蛋白酶切割位点是例如, QSSRHRRAL (SEQ ID NO. 15 的 Prescission 特异的蛋白酶切割位点) LEVLFQGP。

[0198] 弗林蛋白酶是在人类中由 FURIN 基因 编码的蛋白并且属于内肽酶 (Endopeptidases: 丝氨酸蛋白酶 / 丝氨酸内肽酶 (EC3. 4. 21))。将其命名为弗林蛋白酶是因为它是在被称作 FES 的癌基因 的上游区域。该基因别称作 FUR (FES Upstream Region) 并因此将该蛋白称为弗林蛋白酶 (furin)。弗林蛋白酶也被称作 PACE (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme)。由这一基因编码的蛋白是属于 枯草杆菌蛋白酶-样前蛋白转变酶 家族的酶。这一家族的成员是将潜在的前体蛋白加工成它们的生物学活性产物的前蛋白转变酶。这一编码蛋白是钙依赖性丝氨酸内切蛋白酶, 该内切蛋白酶可以在它们配对的碱性氨基酸加工位点处有效地切割前体蛋白。其底物中的一些是: 甲状旁腺激素原, 转化生长因子  $\beta$ -1 前体, 白蛋白原 (proalbumin), 前- $\beta$ -分泌酶, 膜型 1-基质金属蛋白酶, 前-神经生长因子的  $\beta$  亚基 以及 von Willebrand 因子。弗林蛋白酶-样前蛋白转变酶涉及 RGMc (也称作血幼素 (Hemojuvelin)) 的加工, 该 RGMc 是参与被称作青少年血色病的严重的铁过载疾病的基因。Ganz 和 Rotwein 小组都证实了弗林蛋白酶-样前蛋白转变酶 (PPC) 负责在保守的多碱基 RNRR 位点处, 50kDa HJV 向带有截短的 COOH-末端的 40kDa 蛋白的转换。这表明产生可溶形式的 HJV/血幼素 (s-血幼素) 的潜在机制, 该 HJV/血幼素 (s-血幼素) 在啮齿类动物和人类的血液中被发现。弗林蛋白酶存在于胞吞小泡和分泌小泡中, 在反式高尔基体网络中以及在某些情形下, 在许多哺乳动物的细胞(例如 HEK293, CHO) 表面上。其识别位点通常含有基序 RXK/RR, 该基序 RXK/RR 存在于多种分泌前体蛋白中, 例如前-TGF  $\beta$  1 或前-von Willebrand 因子。因此, 选择这些识别序列用来产生含有连接物序列的两个弗林蛋白酶位点 (SEQ ID NO:13 的弗林蛋白酶特异性蛋白酶切割位点变体 1-FS1, 和 SEQ ID

NO:14 的弗林蛋白酶特异性蛋白酶切割位点变体 2-FS2)。

[0199] Prescission Protease (GE Healthcare Catalogue No. 27-0843-01) 是遗传改造的融合蛋白,由人鼻病毒 3C 蛋白酶和 GST 组成。这一蛋白酶被特异设计为通过允许同时进行 GST 融合蛋白的蛋白酶固定化和切割来促进除去该蛋白酶,该 GST 融合蛋白是从 pGEX-6P 载体 pGEX-6P-1、pGEX-6P-2 和 pGEX-6P-3 产生的;参见 pGEX Vectors (GST Gene Fusion System)。Prescission Protease 特异性地在 LeuGluValLeuPheGln/GlyPro 识别序列的 Gln 和 Gly 残基之间进行切割 (Walker, P. A., 等人 *BIO/TECHNOLOGY* 12, (1994) 601-605; Cordingley, M. G. 等人 *J. Biol. Chem.* 265, (1990) 9062-9065)。

[0200] 根据本发明的双特异性抗体具有有价值的特征如生物学或药理学活性,药物代谢动力学性质。它们可以例如用于诸如癌症的疾病的治疗。

[0201] 在另一个实施方案中,根据本发明的双特异性抗体的特征在于特异性地结合 ErbB3 和 c-Met。

[0202] 如在本申请中使用,术语“恒定区”意指除了可变区之外的抗体的结构域的总合。恒定区不直接参与抗原的结合,但是显示多种效应子功能。取决于抗体重链的恒定区的氨基酸序列,将抗体分为下述类别: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,并且这些中的一些可以被进一步分为亚类如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4、IgA1 和 IgA2。对应于不同种类的抗体的重链恒定区分别被称为  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  和  $\mu$ 。可以在所有 5 种抗体种类中发现的轻链恒定区 (CL) 被称为  $\kappa$  (kappa) 和  $\lambda$  (lambda)。

[0203] 如本申请所使用,术语“源自人来源的恒定区”意指亚类 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的人抗体的恒定重链区和 / 或恒定轻链  $\kappa$  或  $\lambda$  区域。这样的恒定区是现有技术中公知的并且例如由 Kabat, E. A., 描述 (参见,例如 Johnson, G., 和 Wu, T. T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218; Kabat, E. A., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2785-2788)。

[0204] 当 IgG4 亚类的抗体显示出减少的 Fc 受体 (Fc  $\gamma$  RIIIa) 结合时,其它 IgG 亚类的抗体显示出强烈的结合。然而,Pro238、Asp265、Asp270、Asn297 (失去 Fc 糖类)、Pro329、Leu234、Leu235、Gly236、Gly237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434 和 His435 是这样的残基,其如果改变的话,还提供减少的 Fc 受体结合 (Shields, R. L., 等人, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., 等人, *FASEB J.* 9 (1995) 115-119; Morgan, A., 等人, *Immunology* 86 (1995) 319-324; EP0307434)。

[0205] 在一个实施方式中,根据本发明的抗体与 IgG1 抗体比较具有减少的 FcR 结合,并且全长亲本抗体涉及 IgG4 亚类的 FcR 结合或具有 S228、L234、L235 和 / 或 D265 中突变的 IgG1 或 IgG2 亚类的 FcR 结合,和 / 或包含 PVA236 突变。在一个实施方式中,在全长亲本抗体中的突变是 S228P、L234A、L235A、L235E 和 / 或 PVA236。在另一个实施方式中,在全长亲本抗体中的突变在 IgG4 中是 S228P,在 IgG1 中是 L234A 和 L235A。

[0206] 抗体的恒定区直接涉及 ADCC (抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用) 和 CDC (补体依赖的细胞毒性)。补体激活 (CDC) 由补体因子 C1q 与大多数 IgG 抗体亚类的恒定区结合而起始。C1q 与抗体的结合由在所谓的结合位点的限定的蛋白-蛋白相互作用所引起。这样的恒定区结合位点是现有技术中已知的,并且例如由 Lukas, T. J., 等人, *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R. 和 Cebra, J. J.,

Mol. Immunol. 16(1979)907-917 ;Burton, D. R. , 等 人, Nature 288(1980)338-344 ; Thommesen, J. E. , 等 人, Mol. Immunol. 37(2000)995-1004 ;Idusogie, E. E. , 等 人, J. Immunol. 164(2000)4178-4184 ;Hezareh, M. , 等 人, J. Virol. 75(2001)12161-12168 ; Morgan, A. , 等人, Immunology 86(1995)319-324 ;和 EP0307434 所描述。所述恒定区结合位点例如特征在于氨基酸 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 P329( 根据 Kabat 的 EU 索引编号)。

[0207] 术语“ 抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC) ” 指在存在效应细胞时,由根据本发明的抗体裂解人靶细胞。ADCC 优选地通过用根据本发明的抗体在存在效应细胞时处理表达抗原的细胞的制备物进行测量,所述效应细胞如新鲜分离的 PBMC 或来自血沉棕黄层的纯化的效应细胞,如单核细胞或天然杀伤 (NK) 细胞或永久生长的 NK 细胞系。

[0208] 术语“ 补体依赖性细胞毒性 (CDC) ” 指由补体因子 C1q 与大多数 IgG 抗体亚类的 Fc 部分结合而起始的过程。C1q 与抗体的结合由在所谓的结合位点的限定的蛋白-蛋白相互作用所引起。这些 Fc 部分结合位点是现有技术已知的( 见上)。这些 Fc 部分结合位点例如特征在于氨基酸 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 P329( 根据 Kabat 的 EU 索引编号)。亚类 IgG1、IgG2 和 IgG3 的抗体通常显示包括 C1q 和 C3 结合的补体激活,而 IgG4 不激活补体系统并且不结合 C1q 和 / 或 C3。

[0209] 单克隆抗体的细胞介导的效应子功能可以通过改造它们的寡糖组分而得以增强,如在 Umana, P. , 等人, Nature Biotechnol. 17(1999)176-180 和 US6,602,684 中所述。IgG1 型抗体是最常用的治疗性抗体,其是在每个 CH2 结构域的 Asn297 具有保守的 N- 连接的糖基化位点的糖蛋白。与 Asn297 附着的两个复合双触角寡糖嵌入在 CH2 结构域之间,形成了与多肽骨架的广泛接触,并且它们的存在对于抗体介导效应子功能诸如抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC) 是必要的 (Lifely, M. R. , 等人, Glycobiology 5(1995)813-822 ; Jefferis, R. , 等人, Immunol. Rev. 163(1998)59-76 ;Wright, A. , 和 Morrison, S. L. , Trends Biotechnol. 15(1997)26-32)。Umana, P. , 等人 Nature Biotechnol. 17(1999)176-180 和 W099/154342 显示,  $\beta$  (1,4)-N- 乙酰葡萄糖胺转移酶 III (“ Gn TIII ” ), 一种催化平分型 (bisected) 寡糖形成的糖基转移酶,在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中的过量表达,显著增加了抗体的体外 ADCC 活性。在 Asn297 糖类的组成上的改变或其消除也影响 Fc  $\gamma$  R 和 C1q 的结合 (Umana, P. , 等人, Nature Biotechnol. 17(1999)176-180 ;Davies, J. , 等人, Biotechnol. Bioeng. 74(2001)288-294 ;Mimura, Y. , 等 人, J. Biol. Chem. 276(2001)45539-45547 ; Radaev, S. , 等人, J. Biol. Chem. 276(2001)16478-16483 ;Shields, R. L. , 等人, J. Biol. Chem. 276(2001)6591-6604 ;Shields, R. L. , 等人, J. Biol. Chem. 277(2002)26733-26740 ; Simmons, L. C. , 等人, J. Immunol. Methods 263(2002)133-147)。

[0210] 增强单克隆抗体的细胞介导的效应子功能的方法例如在 W02005/044859、W02004/065540、W02007/031875、Umana, P. , 等人, Nature Biotechnol. 17(1999)176-180、W099/154342、W02005/018572、W02006/116260、W02006/114700、W02004/065540、W02005/011735、W02005/027966、W01997/028267、US2006/0134709、US2005/0054048、US2005/0152894、W02003/035835 和 W02000/061739 中 或者 例如 在 Niwa, R. , 等 人, J. Immunol. Methods 306(2005)151-160 ;Shinkawa, T. , 等 人, J. Biol. Chem. 278(2003)3466-3473 ;W003/055993 和 US2005/0249722 中进行报道。

[0211] 在本发明的一个实施方式中,双特异性抗体在 Asn297 被糖链糖基化(如果其包含 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚类的 Fc 部分,优选地 IgG1 或 IgG3 亚类的 Fc 部分),由此在所述糖链中的岩藻糖的量是 65%或更低(根据 Kabat 的编号)。在另一个实施方式中,岩藻糖在所述糖链中的量在 5%和 65%之间,优选在 20%和 40%之间。在替代的实施方式中,在 Asn297 的岩藻糖的量是 Fc 区域的寡糖的 0%。根据本发明的“Asn297”意为在 Fc 区域的约位置 297 定位的氨基酸天冬酰胺。基于抗体的微小序列变化,Asn297 也可以定位在位置 297 上游或下游的一些氨基酸上(通常不超过  $\pm 3$  个氨基酸),即在位置 294 和 300 之间。在一个实施方式中,根据本发明的糖基化的抗体 IgG 亚类是人 IgG1 亚类的,具有突变 L234A 和 L235A 的人 IgG1 亚类的,或 IgG3 亚类的。在另一个实施方案中,在所述糖链中 N-羟乙酰神经氨酸(NGNA)的量是 1%或更低和/或 N-端  $\alpha$ -1,3-半乳糖的量是 1%或更低。糖链优选地显示出与在 CHO 细胞中重组表达的抗体的 Asn297 连接的 N-连接的聚糖的特征。

[0212] 术语“糖链显示出与在 CHO 细胞中重组表达的抗体的 Asn297 连接的 N-连接的聚糖的特征”指在根据本发明的全长亲本抗体的 Asn297 的糖链具有与在未修饰的 CHO 细胞中表达的相同抗体,例如如在 W02006/103100 中报道的那些抗体相同的结构和糖残基序列,除了岩藻糖残基之外。

[0213] 如在本申请中使用,术语“NGNA”意指糖残基 N-羟乙酰神经氨酸。

[0214] 人 IgG1 或 IgG3 在 Asn297 发生糖基化,如核心岩藻糖基化的双触角复合寡糖糖基化,末端为多至两个 Gal 残基。IgG1 或 IgG3 亚类的人恒定重链区由 Kabat, E. A., 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), 以及由 Brüggemann, M., 等人, J. Exp. Med. 166(1987)1351-1361; Love, T. W., 等人, Methods Enzymol. 178(1989)515-527 中详细报道。根据末端 Gal 残基的量,将这些结构称为 G0, G1( $\alpha$ -1,6- 或  $\alpha$ -1,3-) 或 G2 聚糖残基(Raju, T. S., Bioprocess Int. 1(2003)44-53)。抗体 Fc 部分的 CHO 型糖基化例如由 Routier, F. H., Glycoconjugate J. 14(1997)201-207 描述。在未进行糖修饰的 CHO 宿主细胞中重组表达的抗体通常在 Asn297 进行岩藻糖基化,量为至少 85%。全长亲本抗体的修饰的寡糖可以是杂合的或复合的。优选地,所述平分型、还原/未岩藻糖基化的寡糖是杂合的。在另一个实施方式中,所述平分型、还原/未岩藻糖基化的寡糖是复合的。

[0215] 根据本发明“岩藻糖的量”意为与在 Asn297 附着的所有糖结构的总和(例如,复合、杂合和高甘露糖结构)相比的在 Asn297 的糖链中所述糖的量,所述糖的量通过 MALDI-TOF 质谱测量并且计算为平均值(参见,例如 W02008/077546)。岩藻糖的相对量是在 N-糖苷酶 F 处理的样品中由 MALDI-TOF 鉴定的包含岩藻糖的结构相对于所有糖结构(例如,分别为复合、杂合和低聚和高甘露糖结构)的百分比。

[0216] 根据本发明的抗体由重组方法产生。因此,本发明的一个方面是编码根据本发明抗体的核酸,并且另一个方面是包含编码根据本发明抗体的核酸的细胞。用于重组生产的方法是现有技术中公知的并且包括在原核细胞和真核细胞中的蛋白表达,以及随后的抗体分离和通常纯化为药学可接受纯度。对于将前述抗体在宿主细胞中的表达,将编码各个修饰的轻链和重链的核酸通过标准方法插入表达载体中。在适合的原核或真核宿主细胞如 CHO 细胞、NS0 细胞、SP2/0 细胞、HEK293 细胞、COS 细胞、PER. C6 细胞、酵母或大肠杆菌细

胞中进行表达,并且将所述抗体从细胞(上清液或裂解后的细胞)中回收。在一个实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞,选自例如 CHO 细胞、NS0 细胞、SP2/0 细胞、HEK293 细胞、COS 细胞、PER. C6 细胞,优选地 HEK293 细胞或 CHO 细胞。用于重组生产抗体的一般方法是现有技术中公知的,并且例如在 Makrides, S. C., *Protein Expr. Purif.* 17(1999)183-202; Geisse, S., 等人, *Protein Expr. Purif.* 8(1996)271-282; Kaufman, R. J., *Mol. Biotechnol.* 16(2000)151-160; Werner, R. G., *Drug Res.* 48(1998)870-880 的综述文章中描述。

[0217] 根据本发明的双特异性抗体适当地从培养基中通过常规免疫球蛋白纯化方法分离,所述纯化方法如,例如蛋白 A 琼脂糖、羟基磷灰石层析法、凝胶电泳、透析或亲和层析法。编码单克隆抗体的 DNA 和 RNA 容易地使用常规方法进行分离和测序。杂交瘤细胞可以充当 DNA 和 RNA 的来源。一旦被分离,可以将 DNA 插入表达载体中,所述表达载体接着被转染到本不产生免疫球蛋白的宿主细胞如 HEK293 细胞、CHO 细胞或骨髓瘤细胞中,从而在宿主细胞中获得重组单克隆抗体的合成。

[0218] 所述双特异性抗体的氨基酸序列变体(或突变体)通过将适合的核苷酸变化引入到抗体 DNA 中,或通过核苷酸合成进行制备。然而,这样的修饰可以仅在例如如上述的非常有限的范围内进行。例如,修饰不改变上述抗体特征如 IgG 同种型和抗原结合,但是可以提高重组生产的产率、蛋白稳定性或有利于纯化。

[0219] 如在本申请中使用,术语“宿主细胞”意指可以被改造以产生根据本发明的抗体的任何种类的细胞体系。在一个实施方式中,将 HEK293 细胞和 CHO 细胞用作宿主细胞。如在本文中使用时,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可交替使用,且全部这些名称都包括后代。因此,措词“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试细胞和由其来源的培养物,而不考虑转移数。还应理解由于有意或无意的突变,所有的后代的 DNA 内容可能并不精确一致。包括在最初转化的细胞中筛选的具有相同功能或生物学活性的变异后代。

[0220] 在 NS0 细胞中的表达记载在,例如, Barnes, L. M., 等人, *Cytotechnology* 32(2000)109-123; Barnes, L. M., 等人, *Biotech. Bioeng.* 73(2001)261-270 中。瞬时表达记载在,例如, Durocher, Y., 等人, *Nucl. Acids. Res.* 30(2002)E9 中。可变结构域的克隆记载在 Orlandi, R., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(1989)3833-3837; Carter, P., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(1992)4285-4289; 和 Norderhaug, L., 等人, *J. Immunol. Methods* 204(1997)77-87 中。优选的瞬时表达系统(HEK 293)记载在 Schlaeger, E.-J., 和 Christensen, K. 的 *Cytotechnology* 30(1999)71-83 和 Schlaeger, E.-J. 的 *J. Immunol. Methods* 194(1996)191-199 中。

[0221] 适合用于原核生物的控制序列,例如包括启动子,任选地操纵子序列,和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、增强子和多腺苷酸化信号。

[0222] 当核酸被置于与另一条核酸序列具有功能性关系的位置时,该核酸为“有效连接的”。例如,前序列或分泌前导序列的 DNA 与多肽的 DNA 为有效连接的,当前者作为参与多肽的分泌的前蛋白表达时;启动子或增强子与编码序列为有效连接的,如果前者影响序列的转录;或核糖体结合位点与编码序列为有效连接的,如果前者被置于的位置能促进翻译。一般的,“有效连接的”意为连接的 DNA 序列为相邻的,在分泌前导序列的情况下为相邻的且符合读框的。但是增强子不需要为相邻的。使用合适的限制性位点的连接来实现连接。如

果这样的位点不存在,则依照常规做法使用合成的寡核苷酸衔接头或接头。

[0223] 通过标准技术,包括碱/SDS处理、CsCl 显带法(CsCl banding)、柱层析法、琼脂糖凝胶电泳和其它本领域公知的技术,进行抗体的纯化从而消除细胞组分或其它污染物,例如其它细胞核酸或蛋白。参见 Ausubel, F 等人编辑, *Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York(1987)。不同的方法是充分建立的并且广泛用于蛋白纯化,如用微生物蛋白进行的亲和层析法(例如,蛋白 A 或蛋白 G 亲和层析法),离子交换层析法(例如阳离子交换(羧甲基树脂)、阴离子交换(氨基乙基树脂)和混合模式的交换)、亲硫吸附(例如,用  $\beta$ -巯基乙醇和其它 SH 配体)、疏水相互作用或芳香吸附层析法(例如用苯基琼脂糖、氮杂-arenophilic 树脂或间氨基苯基硼酸),金属螯合亲和层析法(例如用 Ni(II)-和 Cu(II)-亲和力材料)、大小排阻层析法和电泳方法(如凝胶电泳、毛细管电泳)(Vijayalakshmi, M. A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75(1998)93-102)。

[0224] 本发明的一个方面是包括根据本发明的抗体的药物组合物。本发明的另一个方面是根据本发明的抗体在制造药物组合物中的应用。本发明的另一个方面是用于制造包括根据本发明的抗体的药物组合物的方法。在另一个方面中,本发明提供包括与药物载体一起配制的根据本发明的抗体的组合物,例如药物组合物。

[0225] 本发明的一个实施方案是本发明的三价双特异性抗体,用于治疗癌症。

[0226] 本发明的另一方面是所述药物组合物,用于治疗癌症。

[0227] 本发明的另一方面是本发明的双抗体在制造用于治疗癌症的药物中的应用。

[0228] 本发明的另一个方面是通过向需要此类治疗的患者施用根据本发明的抗体以治疗罹患癌症的患者方法。

[0229] 如此处所使用的,“药用载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、和生理上相容的类似物。优选地,载体适用于静脉内的、肌内的、皮下的、肠胃外的、脊柱的或表皮的施用(例如通过注射或输注)。

[0230] 本发明的组合物可通过本领域公知的多种方法施用。熟练技术人员应当理解,施用的途径和/或模式将根据想要的结果而变化。为了以某种施用品施用本发明的化合物,可能必须使用物质包被化合物、或将所述物质和化合物共同施用以避免其失活。例如可在合适的载体中对受试者施用化合物,所述载体例如脂质体或稀释剂。可药用的稀释剂包括盐水和水性缓冲溶液。药用载体包括无菌水溶液或分散体,和用于临时配制无菌可注射用的溶液或分散体的无菌粉末。这些用于药用活性物质的介质和活性剂的用途为本领域公知的。

[0231] 如本文所用的短语“肠胃外给药”和“经肠胃外给药”,表示不同于肠和局部给药的给药方式,通常是通过注射,包括但不限于:静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0232] 如在本文中使用的,术语癌症指增生性疾病,如淋巴瘤、淋巴细胞性白血病、肺癌、非小细胞肺(NSCL)癌、支气管肺泡细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、结肠癌、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、

前列腺癌、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、肝细胞癌、胆癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、脊柱轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、施万细胞瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、鳞状上皮细胞癌、垂体腺瘤和 Ewings 肉瘤, 包括上述癌症任何的难治性形式, 或一种或多种上述癌症的组合。

[0233] 这些组合物还可以含有佐剂, 如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过前述灭菌操作, 以及通过纳入多种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等, 均可以确保防止微生物的存在。还可能期望在组合物中纳入等渗剂, 如糖、氯化钠等。另外, 可注射药物形式的延迟吸收可以通过纳入延迟吸收的活性剂如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0234] 无论所选的施用路径如何, 可以以适宜水合物形式使用的本发明的化合物和 / 或本发明的药物组合物通过本领域公知的常规方法配制为可药用剂型。

[0235] 根据本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可有变动, 以获得有效量的活性成分, 从而对于特定的患者、组合物和给药方式实现期望的治疗反应, 而对患者没有毒性。所选的剂量水平将取决于多种药代动力学因素, 包括所采用的本发明特定组合物的活性、给药路径、给药时间、所采用特定化合物的排泄速率、治疗持续时间、与所采用特定组合物组合使用的其他药物、化合物和 / 或材料、所治疗患者的年龄、性别、体重、病情、总体健康和既往病史、以及医学领域众所周知的类似因素。

[0236] 组合物必需是无菌和流动的, 其程度使得组合物可以通过注射器递送。除了水之外, 载体优选地是等渗缓冲盐溶液。

[0237] 例如, 可以通过使用包衣如卵磷脂, 分散剂的情况下通过维持所需的颗粒大小, 通过使用表面活性剂, 来维持适当的流动性。在许多情况下, 优选地在组合物中纳入等渗剂, 例如糖, 多元醇如甘露醇或山梨糖醇, 和氯化钠。

[0238] 如在本文使用, 术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可交替使用, 且全部这些名称都包括子代。因此, 措词“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试细胞和由其来源的培养物, 而不考虑转移的次数。还应理解归因于有意或无意的突变, 所有的子代的 DNA 内容可能不精确一致。包括在最初转化的细胞中筛选的具有相同功能或生物学活性的变异子代。在意指不同名称时, 通过上下文其将是清楚的。

[0239] 如本文使用的术语“转化”, 指将载体 / 核酸转移到宿主细胞中的过程。如果将没有强大的细胞壁屏障的细胞用作宿主细胞, 那么例如, 通过如 Graham, F. L., 和 van der Eb, A. J., *Virology* 52 (1973) 456-467 所述的磷酸钙沉淀法来进行转染。然而, 也可使用其他用于将 DNA 导入细胞中的方法, 例如通过核注射或通过原生质体融合。如果使用原核细胞或含有实质细胞壁结构的细胞, 例如, 一种转染方法是如 Cohen, S. N, 等人, *PNAS* 69 (1972) 2110-2114 所述的使用氯化钙的钙处理。

[0240] 如本文使用, “表达”指将核酸转录为 mRNA 的过程和 / 或随后将转录的 mRNA ( 也称作转录本 ) 翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。转录本和编码的多肽统称为基因产物。如果多核苷酸是源自基因组 DNA, 那么在真核细胞中的表达可包括 mRNA 的剪接。

[0241] “载体”是核酸分子, 特别是自主复制的, 其将插入的核酸分子转移到宿主细胞中和 / 或在宿主细胞之间转移。该术语包括主要用作将 DNA 或 RNA 插入细胞 ( 例如染色体整合 ) 的载体、主要用作复制 DNA 或 RNA 的复制载体、和用作 DNA 或 RNA 转录和 / 或翻译的表



达载体。还包括提供一种以上所述功能的载体。

[0242] “表达载体”是多核苷酸,其在被引入到适当的宿主细胞时,能够被转录并翻译成多肽。“表达体系”通常指包括能够用作产生理想的表达产物的表达载体的适当的宿主细胞。

[0243] 提供下面的实施例、序列表和附图帮助理解本发明,本发明的真实范围在所附的权利要求书中给出。应理解的是可以在不背离本发明精神的情况下对提出的方法进行修改。

#### [0244] 氨基酸序列描述

[0245] SEQ ID NO :1Her3/MetSS\_KHSS\_FS1-HC1 (SS\_KnobsHC1\_VHcMet)

[0246] SEQ ID NO :2Her3/MetSS\_KHSS\_FS1-HC2 (SS\_HolesHC2\_VLcMet\_FS1)

[0247] SEQ ID NO :3Her3/MetSS\_KHSS\_FS1-LC (Her3 克隆 29\_K01\_LC)

[0248] SEQ ID NO :4Her3/MetSS\_KHSS\_FS2-HC1 (SS\_KnobsHC1\_VHcMet)

[0249] SEQ ID NO :5Her3/MetSS\_KHSS\_FS2-HC2 (SS\_HolesHC2\_VLcMet\_FS2)

[0250] SEQ ID NO :6Her3/MetSS\_KHSS\_FS2-LC (Her3 克隆 29\_K01\_LC)

[0251] SEQ ID NO :7Her3/MetSS\_KHSS\_PreSci-HC1 (SS\_KnobsHC1\_VHcMet)

[0252] SEQ ID NO :8Her3/MetSS\_KHSS\_PreSci-HC2 (SS\_HolesHC2\_VLcMet\_PreSci)

[0253] SEQ ID NO :9Her3/MetSS\_KHSS\_PreSci-LC (Her3 克隆 29\_K01\_LC)

[0254] SEQ ID NO :10Her3/MetSS-3C-FS1-HC1 (SS\_KnobsHC1\_VHcMet)

[0255] SEQ ID NO :11Her3/MetSS-3C-FS1-HC2 (SS\_HolesHC2\_VLcMet\_FS1)

[0256] SEQ ID NO :12Her3/MetSS-3C-FS1-LC (Her3 克隆 29\_K01\_LC)

[0257] SEQ ID NO :13 弗林蛋白酶特异性蛋白酶切割位点变体 1-FS1

[0258] SEQ ID NO :14 弗林蛋白酶特异性蛋白酶切割位点变体 2-FS2

[0259] SEQ ID NO :15Prescission 特异性蛋白酶切割位点

#### [0260] 实验方法

### 实施例

[0261] 重组 DNA 技术

[0262] 将标准方法用于操作 DNA,如在 Sambrook, J., 等人, Molecular cloning :A laboratory manual ;Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 中所述。根据生产商的说明书来使用分子生物学试剂。

[0263] DNA 和蛋白质序列分析以及序列数据管理

[0264] 在 Kabat, E. A. 等人, (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, NIH 出版号 91-3242 中提供关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息。根据 EU 编号 (Edelman, G. M., 等人, PNAS63(1969)78-85 ;Kabat, E. A., 等人, (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, NIH 出版号 91-3242) 对抗体链的氨基酸进行编号。使用 GCG' s (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) 软件包 10.2 版本和 Infomax' s Vector NTI Advance suite 版本 8.0 来用于序列产生、作图、分析、注释和举例说明。

[0265] DNA 测序

[0266] DNA序列通过在sequiServe (Vaterstetten, 德国) 和 Geneart AG (Regensburg, 德国) 进行的双链测序来确定。

[0267] 基因合成

[0268] 需要的基因区段由 GeneartAG (Regensburg, 德国) 从合成的寡核苷酸和 PCR 产物通过自动的基因合成进行制备。将侧翼为单一限制性内切核酸酶切割位点的基因区段克隆到 pGA18 (ampR) 质粒中。从转化的细菌纯化质粒 DNA, 并且通过 UV 光谱法测定浓度。通过 DNA 测序证实亚克隆的基因片段的 DNA 序列。适当时候或者必要时, 使用 5'-BamHI 和 3'-XbaI 限制性位点。设计所有的构建体具有编码前导肽的 5' 末端 DNA 序列, 所述前导肽靶向蛋白用于在真核细胞中分泌。

[0269] 表达质粒的构建

[0270] 将 Roche 表达载体用于构建编码所有的重链 VH/ 或 VL 融合蛋白和轻链蛋白的表达质粒。所述载体由下述元件构成:

[0271] - 作为选择标记的潮霉素抗性基因,

[0272] -EB 病毒 (Epstein-Barr virus, (EBV)) 的复制起点, oriP,

[0273] - 载体 pUC18 的复制起点, 其允许该质粒在大肠杆菌中复制,

[0274] -  $\beta$ -内酰胺酶基因, 其在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性,

[0275] - 来自人巨细胞病毒 (HCMV) 的即时早期增强子和启动子,

[0276] - 人 1-免疫球蛋白多腺苷酸化 (" poly A" ) 信号序列, 和

[0277] - 独特的 BamHI 和 XbaI 限制性位点。

[0278] 如所描述的, 通过基因合成制备免疫球蛋白融合基因并将该融合基因克隆到 pGA18 (ampR) 质粒中。将带有合成的 DNA 区段和 Roche 表达载体的 pG18 (ampR) 质粒用 BamHI 和 XbaI 限制性酶 (Roche Molecular Biochemicals) 消化并进行琼脂糖凝胶电泳。然后将纯化的重链和轻链编码 DNA 区段连接到分离的 Roche 表达载体 BamHI/XbaI 片段, 产生最终的表达载体。将最终的表达载体转化到大肠杆菌细胞中, 分离表达质粒 DNA (Miniprep) 并进行限制性酶分析和 DNA 测序。将正确的克隆在 150ml LB-Amp 培养基中生长, 再次分离质粒 DNA (Maxiprep) 并通过 DNA 测序确认序列完整性。

[0279] 免疫球蛋白变体在 HEK293 细胞中的瞬时表达

[0280] 根据生产商的说明书, 使用 FreeStyle™293 Expression System (Invitrogen, 美国) 通过人胚肾 293-F 细胞的瞬时转染来表达重组免疫球蛋白变体。简言之, 将悬液 FreeStyle™293-F 细胞在 Freestyle™293 表达培养基中, 在 37°C /8% CO<sub>2</sub> 进行培养, 并在转染当天将细胞以 1-2x10<sup>6</sup> 活细胞 /ml 的密度接种在新鲜的培养基中。使用 325  $\mu$ l 的 293fectin™ (Invitrogen, 德国) 和 250  $\mu$ g 以 1 : 1 摩尔比率的重链和轻链质粒 DNA 在 **Opti-MEM**® I 培养基 (Invitrogen, 美国) 中制备 DNA-293fectin™ 复合物, 最终转染体积为 250ml。使用 325  $\mu$ l 的 293fectin™ (Invitrogen, 德国) 和 250  $\mu$ g 以 1 : 1 : 2 摩尔比率的 "突起进入孔" 重链 1 和 2 和轻链质粒 DNA 在 **Opti-MEM**® I 培养基 (Invitrogen, 美国) 中制备 "突起进入孔" DNA-293fectin 复合物, 最终转染体积为 250ml。在转染后 7 天, 通过在 14000g 离心 30 分钟并通过无菌过滤器 (0.22  $\mu$ m) 过滤收集包含抗体的细胞培养物上清液。将上清液贮存在 -20°C 直到纯化。

[0281] 双特异性抗体和对照抗体的纯化

[0282] 通过使用 Protein A-Sepharose™(GE Healthcare, 瑞典) 的亲和层析法和 Superdex200 大小排阻层析法, 将双特异性抗体和对照抗体从细胞培养物上清液中纯化出来。简言之, 将无菌过滤的细胞培养物上清液施加到 HiTrapProteinA HP(5ml) 柱上, 所述柱用 PBS 缓冲液 (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137mM NaCl 和 2.7mM KCl, pH7.4) 平衡。将未结合的蛋白用平衡缓冲液洗出。将抗体和抗体变体用 0.1M 柠檬酸盐缓冲液, pH2.8 洗脱, 并将包含蛋白的级分用 0.1ml 1M Tris, pH8.5 中和。接着, 合并洗脱的蛋白级分, 用 Amicon 超离心机装置 (MWC0 :30K, Millipore) 将其浓缩到 3ml 的体积, 并负载到用 20mM 组氨酸, 140mM NaCl, pH 6.0 平衡的 Superdex200HiLoad 120ml 16/60 凝胶过滤柱 (GE Healthcare, 瑞典) 上。将具有低于 5% 的高分子量聚集体的包含纯化的双特异性抗体和对照抗体的级分合并并以 1.0mg/ml 的等分试样贮存在 -80°C。

[0283] 纯化蛋白的分析

[0284] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数, 通过测量 280nm 的光密度 (OD) 来测定纯化的蛋白样品的蛋白浓度。通过在存在和不存在还原剂 (5mM 1,4-二硫苏糖醇) 进行 SDS-PAGE, 并用考马斯亮蓝染色来分析双特异性抗体和对照抗体的纯度和分子质量。根据生产商的说明书使用 NuPAGE® Pre-Cast 凝胶系统 (Invitrogen, 美国) (4-20% Tris-甘氨酸凝胶)。在 25°C, 使用在 200mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250mM KCl, pH7.0 运行缓冲液中的 Superdex200 分析大小排阻柱 (GE Healthcare, 瑞典), 通过高效 SEC 分析双特异性抗体和对照抗体样品的聚集体含量。将 25 μg 蛋白以 0.5ml/min 的流速注入柱中, 并在 50 分钟内等度洗脱。对于稳定性分析, 将 1mg/ml 浓度的纯化蛋白在 4°C 和 40°C 温育 7 天, 接着通过高效 SEC 评估。在通过用肽-N-糖苷酶 F (Roche Molecular Biochemicals) 酶促处理去除 N-聚糖之后, 通过 NanoElectrospray Q-TOF 质谱来证实还原的双特异性抗体轻链和重链的氨基酸骨架的完整性。

[0285] 实施例 1

[0286] 本发明双特异性抗体的设计

[0287] 在首次尝试时, 基于结合第一抗原的全长抗体来产生衍生物, 该抗体携带一个另外的 Fv 作为对于第二抗原特异的第二结合部分 (moiety) (参见图 2a)。在 VHCys44 和 VLCys100 参照之间引入链间二硫化物。参见第 17-18 页 A-M。dsFv 的 VHCys44 与全长抗体的第一重链的 CH3 结构域融合, 相应的 VLCys100 部分 (module) 与全长抗体的第二重链的 CH3 结构域融合。

[0288] 前面示出了通过细菌包涵体重折叠或周质分泌, 可以以合理的产量从单独表达的部分组装 dsFvs (W094/029350, US5, 747, 654, Rajagopal, V., 等人, Prot. Engin. 10(1997)1453-1459; Reiter, Y., 等人, Nature Biotechnology 14(1996)1239-1245; Reiter, Y., 等人, Protein Engineering; 8(1995)1323-1331; Webber, K. O., 等人, Molecular Immunology 32(1995)249-258; Reiter, Y., 等人, Immunity 2(1995)281-287; Reiter, Y., 等人, JBC 269(1994)18327-18331; Reiter, Y., 等人, Inter. J. of Cancer 58(1994)142-149; Reiter, Y., Cancer Res. 54(1994)2714-2718)。

[0289] 在哺乳动物分泌系统中生产无接头 dsFvs 的一个瓶颈可能是在没有伴侣帮助下, VH 和 VL 结构域的无效组装: dsFv 组分不含有被 BIP 识别的恒定区域。(参见图 4b)。为了

克服这一局限,进行了通过中间物来组装 VH 和 VL 结构域(图 4c)。因此,将 dsFv 的一个组分(VH 或 VL)通过连接物肽与一条 H-链的 C-端连接,而相应的另一组分通过另一连接物肽与第二 H-链的 C-端相连,然而,该另一连接物肽含有一个或多个蛋白酶切割位点,该位点能够在细胞表达期间被切割(例如通过弗林蛋白酶)或者能够在体外纯化后被切割。中间物双特异性抗体的实例示出于图 2d(对于抗体如图 2a 所示)。

[0290] 这一方法的基本原理是 H-链的有效二聚化将 dsFv 组分带到一起并促进其杂二聚化。为了降低含有 2 个 VH 和 2 个 VL 部分的分子非生产性的组装,将互补的突起-进入-孔突变设在 IgG 的 H-链中。这些突变是由 Merchant, A. M., 等人, Nat Biotechnol 16(1998)677-681 和 Ridgway, J. B., 等人, Protein Eng 9(1996)617-621 提出的以推动不同 H-链的杂二聚化并且在一条 H-链中由 T366W 突变组成而在相应的另一链中由 T366S、L368A 和 Y407V 突变组成。本发明的用于产生含 dsFv 的双特异物的设计在与 VHCys44 融合的 CH3 结构域上具有“突起(knobs),,并将互补的“孔(holes)”引入到带有 VLCys100 的 H-链中。

[0291] 杂二聚 dsFv 的两个组分都系留(tether)到 CH3。这一将 VH 和 VL 的 N-端与大体积 CH3 结构域的同时结合并不影响 Fv 的结构。然而,由于 CDR 区指向 CH3 定位的方向,因此取决于(例如取决于接头长度或者各抗原结构),会限制针对抗原的可接近性。此外,在两个连接点的系留只为 Fv 留下非常有限的自由度来转动或者挨着 CH3 移动。由于此,抗原需要在 CH3 和 Fv 之间挤压。这可能影响对于抗原的可接近性并降低亲和力,确实针对于双特异抗体的双连接 dsFv 部分观察到了这些(参见表 2 的 SPR 数据。由于空间位阻,与抗原可接近性问题一致,亲和力测定揭示了对于双系留的 dsFv 的结合率(on-rate)的显著降低。然而,Fv 的结构整体性似乎未受影响,因为一旦抗原结合,去除率(off-rate)与未修饰的抗体的去除率相同。用于结合双特异性抗体的 IgG-样可接近臂(预期其具有全亲和力)以及用于另外的双系留 dsFv 的亲和力值在表 2 中列出。由于双-系留后的空间位阻,使用术语“限制的或降低的结合模式”用于具有降低的结合率的 dsFv 部分。

[0292] 示例性地,基于下面的中间物抗体序列,可以通过切割在表达并纯化后被加工的一个接头,来重组表达根据本发明的表达抗体,所述抗体仅通过二硫键稳定性 Fv 片段的一个结构域与全长抗体连接(也参见图 2 和下面的实验说明):

[0293]

双特异性中间物抗体	没有蛋白酶切割位点的重链构建体	具有蛋白酶切割位点的重链构建体	轻链(2x)
Her3/MetSS_KHSS_PreSci (蛋白酶位点切割= Precission 切	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9

[0294]

割位点)			
------	--	--	--

[0295] 示例性地,基于下面的中间物抗体序列,可以通过切割在表达期间被加工的一个接头,来重组表达根据本发明的抗体,所述抗体仅通过二硫键稳定性 FV 片段的一个结构域与全长抗体连接(也参见图 2 和下面的实验说明):

[0296]

双特异性中间物抗体	没有蛋白酶切割位点的重链构建体	具有蛋白酶切割位点的重链构建体	轻链(2x)
Her3/MetSS_KHSS_FS1 (蛋白酶切割 = 弗林蛋白酶切割位点-变体 1)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
Her3/MetSS_KHSS_FS2 (蛋白酶切割位点 = 弗林蛋白酶切割位点-变体 2)	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6

[0297] 实施例 2

[0298] a) 以两步法或一步法来表达并纯化本发明的双特异性抗体两步法:

[0299] 步骤 1:瞬时表达

[0300] 应用瞬时表达来生产分泌的双特异性抗体衍生物。将编码 L-链和修饰的 H-链的质粒共转染到 HEK 293 悬浮细胞中。一周后收获含有分泌抗体衍生物的培养物上清。这些上清液可以在纯化前被冷冻并在 -20C 存储而不影响产量。通过 Protein A 和 SEC 以与常规 IgG 相同的方式从上清液中纯化双特异性抗体,这证明它们对于结合 Protein A 是完全胜任的。在细胞培养物上清中的表达产量比瞬时表达的未修饰抗体低但是仍旧在合理的范围内。在完成所有纯化步骤后,获得产量在 4 和 10mg/L 之间的均一蛋白。尽管在其他 dsFv 部分的 VH 和 VL 之间没有肽接头,但是稳定性分析揭示了没有对于非常规浓度-或温度依赖的分解或聚集的指示。蛋白是稳定的并且冻融是完全耐受的。在图 5 和 6 中示出了在还原和非还原条件下,三价双特异性抗体衍生物及其组分的大小、均质性和组成。每种蛋白的同一性和组成由质谱来确认(表 1)。

[0301] dsFv 组分对于 CH3-结构域的双-系留降低了抗原接近并由此使得 dsFv 的功能性失活。Fv 绕一个连接物肽的自由转动会最可能地显著增加对于抗原的接近,但是在两连接点处的 dsFv 融合不允许大的灵活度或转动度。为了重新激活此种受限制的 dsFv 部分的失活的结合功能性,将特异的蛋白酶识别位点引入到连接物肽之一(示意性地示出于图 4d)。该方法的原理是利用蛋白水解切割来仅仅释放所述两个连接之一。在蛋白水解加工时,dsFv 仍旧通过它的其他的连接物来共价连接双特异性抗体的 IgG 骨架。但与双连接相反,就在一个灵活的连接点处的结合可以提高灵活性而允许自由转动来促进对抗原的接近。图 1b 示出了所应用的使得能够通过蛋白酶进行加工的不同的连接物序列。标准的非可切割的连接物由六个 Gly4Ser 重复组成,该连接物是被经常用于产生由不同结构域组成

的融合蛋白的基序。对于蛋白水解加工,将特异的识别序列引入到这一连接物的中心区域中:

[0302] 一个连接物含有被 Prescission 蛋白酶切割的位点。这一蛋白酶可以释放以限制性形式表示的 Fv 部分的功能性。Prescission Protease(GE Healthcare Catalogue No. 27-0843-01) 是遗传改造的融合蛋白,由人鼻病毒 3C 蛋白酶和 GST 组成。这一蛋白酶是特异设计的以通过允许同时进行 GST 融合蛋白的蛋白酶固定化和切割来促进除去该蛋白酶,该 GST 融合蛋白是通过 pGEX-6P 载体 pGEX-6P-1、pGEX-6P-2 和 pGEX-6P-3 产生的;参见 pGEX Vectors(GST Gene Fusion System)。Prescission 蛋白酶特异性地在 LeuGluValLeuPheGln/GlyPro 识别序列的 Gin 和 Gly 残基之间进行切割 (Walker, P. A., 等人 BIO/TECHNOLOGY 12, (1994)601-605 ;Cordingley, M. G. 等人 J. Biol. Chem. 265, (1990)9062-9065.)

[0303] 步骤 2 :蛋白水解工艺 (切割)

[0304] 可以在纯化后或在纯化期间应用以 Prescission 的加工。

[0305] 一步法:

[0306] 为了在表达步骤期间实现蛋白水解切割,使用接头序列是可以被弗林蛋白酶识别和切割的。弗林蛋白酶是存在于哺乳动物细胞 (包括 HEK293) 的胞内体和分泌区室和反式高尔基体网络中的蛋白酶。选择这样的蛋白酶位点以使得在表达过程中进行 dsFv 加工。带有限制性 dsFv 的双特异性实体将在分泌期间遇到弗林蛋白酶。由此,可以通过所述细胞来制造已经被切割的全功能性蛋白。

[0307] 含有 Prescission 位点的双特异性抗体以限制性形式表达并且可以在下游加工中被活化

[0308] 含有限制性的结合部分的双特异性抗体形式的一种应用是以限制性形式表达它们并且随后在下游加工中以一步法来活化它们。在结合部分的高活性对于表达引发问题,例如,由于全功能性会干扰细胞生长,干扰分泌过程或对于生产细胞是有毒性的时候,这一应用具有优势。

[0309] 作为这一设置的实例,表达并纯化含有限制性的 cMet dsFv 部分的 Her3-cMet 双特异性抗体,并且随后通过用 Prescission 来加工而释放 dsFv 活性。图 5 示出了在从细胞培养物上清液中表达并纯化后,获得了 dsFv 的组分与 H-链紧密相连的双特异性 Her3-cMet 实体。还原性 SDS-PAGE 显示出 (除了 Her3- 实体的标准 L-链以外),存在 65kD 高度的蛋白 (双-)带。这一带代表在它们的 C-末端携带有另外的连接物肽 (2kd) 和 VH 或 VL 结构域 (13kd) 的 H-链 (50kd)。

[0310] 这些双特异性分子对于它们的 Her3 的完全可接近的结合实体的亲和力 (在 Prescission 加工之前) 与野生型抗体的相同 (表 1)。相反,限制性 dsFv 部分对于 cMet 的亲和力由于空间位阻而妥协。Biacore 分析显示比野生型 Fab 的亲和力降低了 > 20 倍 (表 1)。

[0311] 表 1 :双特异性抗体衍生物的示例性表达和纯化

[0312]

分子	连接物	处理	产 量 (mg/L)	SDS-PAGE & 质谱
Her3/MetSS_KHSS_PreSci	Prescission 位 点	无	4-20 mg/L	L + 延伸的 H
Her3/MetSS_KHSS_PreSci	Prescission 位 点	Prescission		L + 延伸的 H + 切 割的 H+VL
Her3/MetSS_KHSS_F1	弗林蛋白酶位点 变体 1	表达期间	4 mg/L	L + H + 延伸的 H + VL

[0313] 在 CH3 和 VL 之间连接物中的 Prescission 位点的切割消除了 dsFv 的限制并且只通过一个连接物就产生具有与 IgG 相连的 dsFv 的分子。还原型 SDS PAGE 证明在切割后,延伸的 H-链之一被转变成正常大小 (52kd) 和另外的 13k 的 VL 结构域 (参见图 6a)。在切割时,分子仍旧由稳定的二硫键保持在一起,如通过大小排阻层析和质谱显示。

[0314] 双特异性抗体的限制性形式和加工形式的亲和力比较列出于表 2:如所预期,在 dsFv 部分处的加工没有改变对之前已经完全接近的抗原 Her3 的结合。另一方面,通过切割一个连接物而对于空间位阻的消除极大地提高了无接头 dsFv 部分的结合率:释放的 dsFv 的亲和力提高了 > 30 倍并且完全被恢复到亲本抗体的亲和力水平 (表 2)。

[0315] 表 2:根据本发明的双特异性抗体衍生物的结合亲和力 (以及在蛋白酶切割前,与亲本抗体的比较,以及尽可能地 (例如对于 Prescission 位点),与相应中间物的比较)

[0316]

本发明的双特异性抗体	HER3 结合亲和力(KD)			cMet 结合亲和力(KD)		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Her3_MetSS_KH SS_FS1 (表达期间的蛋白酶切割)	1.65E+05	3.38E-04	2,05E-09	3.12E+04	1.88E-04	6.05E-09
Her3_MetSS_KH SS_FS2 (表达期间的蛋白酶切割)	n.d.	n.d.	n.d.	2.74E+04	1.93E-04	7.05E-09
Her3-cMet-3C-FS 1 (表达期间的蛋白酶切割)	1,63E+05	3,41E-04	2,09E-09	1.74E+04	3,31E-04	1,90E-08
Her3_MetSS_KH SS_PreSci 消化的 (纯化和蛋白酶切割后)	1,76E+05	3,56E-04	2,02E-09	2.43E+04	2.03E-04	8.35E-09
用于根据本发明的双特异性抗体的中间物						
Her3_MetSS_KH SS_PreSci (纯化的中间物)	1,72E+05	4,14E-04	2,40E-09	5.33E+02	1.97E-04	3.69E-07
亲本单克隆抗体						
亲本 cMet-Fab	-	-	-	6,92E+04	1,59E-04	2,29E-09
亲本 Mab_Her3_001 克隆 29	1,52E+05	3,60E-04	2,36E-09	-	-	-

[0317] 在表达期间,含有弗林蛋白酶位点的双特异性抗体被有效地加工并显示出无接头 dsFv 的全功能性

[0318] 在连接物内的弗林蛋白酶位点可以用于具有无限制的功能性的含有无接头 dsFv 的双特异性抗体的直接表达。弗林蛋白酶存在于胞吞小泡和分泌小泡中,在反式高尔基体网络中以及在一些情形下,在许多哺乳动物的细胞(例如如用于这些实验中的 HEK293)表面上。其识别位点通常含有基序 RXK/RR,该基序 RXK/RR 存在于多种分泌前体蛋白中,例如前-TGF $\beta$ 1 或前-van Willebrand 因子。因此,选择这些识别序列用来产生含有连接物序列的两个弗林蛋白酶位点(SEQ ID NO:13 的弗林蛋白酶特异性蛋白酶切割位点变体 1-FS1,和 SEQ ID NO:14 的弗林蛋白酶特异性蛋白酶切割位点变体 2-FS2)。

[0319] 由于弗林蛋白酶存在于反式高尔基体网络和分泌小泡中,切割可以在生产期间发生在细胞内。获得的弗林蛋白酶加工后的无限制的且全功能的分子表达产量与对于限制性分子观察到的相似(表 1),这是由于 dsFv 在遇到具有弗林蛋白酶活性的区室前变为完全折叠并且是组装的。图 5 和 6b 证明表达和纯化后,获得了已经被定量加工的分子。还原型 PAGE 显示(除了标准 <Her3>L-链),携带 dsFv 的 VH 的一条 65kD 的延伸 H-链和被弗林蛋



白酶转变成正常大小 (52kd) 的另一条 H- 链。另外的 13kd 的 VL 结构域也是可检测到的。由于纯化过程涉及 ProteinA 和 SEC (都不会恢复未连接的 VL 结构域), 对这些结构域的检测表明产生完全被加工的功能双特异性。大小排阻层析和质谱进一步确认了所有结构域都被稳定的二硫化物保持在一起的事实 (在图 2 和 3 示意性地示出)。

[0320] 由于通过弗林蛋白酶的加工是在表达过程期间发生, 在纯化后获得的制品应由具有释放形式的完全活性无接头 dsFv 的双特异性实体组成。这可通过 SPR 分析来确认 (表 2)。双特异性抗体的所有的结合实体, 即识别 Her3 的那些以及结合 cMet 的 dsFv, 都具有未受限的结合能力。它们对于 Her3 和 cMet 的亲合力可与未修饰的抗体或 Fab 相比较 (表 2)。

[0321] 应用质谱来分析在哺乳动物细胞中在表达期间双特异性抗体衍生物的弗林蛋白酶介导的加工

[0322] 在这一申请中描述的双特异性抗体衍生物被翻译成前体形式的蛋白。这需要在生产细胞的分泌路径内通过弗林蛋白酶的切割以转换成未受限的形式。为了确定双特异性抗体的限制性前体形式向未受限的分子的弗林蛋白酶介导的转换的程度, 应用质谱。这一技术可以用来测定蛋白和蛋白片段的准确分子量。

[0323] 在质谱分析之前, 使用 N-糖苷酶 F 应用标准方法对抗体脱糖基化以便减小光谱复杂性并帮助数据解释。作为帮助数据解释的进一步措施, 通过 IdeS 蛋白酶将待分析的分子切割成二硫键桥接的 Fc 和 F(ab)<sub>2</sub> 片段。随后用 TCEP 还原该片段以分离它们的不同组分来帮助鉴别和表征。由此, 相关的弗林蛋白酶切割事件作为限定量的脱糖基化的和还原的 IdeS- 衍生的 Fc 片段而可被检测到。

[0324] 样品脱盐并随后在 Quadrupole Time-of-Flight 仪器 (Q-Star, (ABI, Darmstadt) 或 Maxis (Waters, Manchester) 上进行电喷射离子化 (ESI) 质谱。使用 NanoMate 系统 (Triversa NanoMate System, Advion, Ithaca, USA) 将样品导入 ESI 钠喷射源 (nanospray source)。使用标准的 MS 方法来分析样品中的脱糖基化的和还原的抗体、所述方法提供了稳定的喷射、适当的去溶剂化以及分析物的非片段化。使用 5 秒的扫描持续期来获得质谱。

[0325] 这些分析的结果表明被翻译成前体形式的双特异性抗体衍生物此后在生产细胞的分泌途径内被弗林蛋白酶加工。蛋白质制品 Her3\_MetSS\_KHSS\_FS1 和 Her3\_MetSS\_KHSS\_FS2 在它们的连接物内插入有两个不同的弗林蛋白酶识别序列 (在重链融合蛋白中, 对于 FS1, SEQ ID NO :2 和对于 FS2, SEQ ID NO :4)。在两制品中, 观察到被弗林蛋白酶的完整加工并且没有检测到未被加工的前体片段 (延伸的 IdeS-Fc 片段)。此外, 质量分析表明弗林蛋白酶切割的蛋白部分的进一步的羧基端加工。开始切割位点并形成部分弗林蛋白酶识别序列的精氨酸和 / 或赖氨酸残基被从弗林蛋白酶加工的产物中定量除去。

[0326] 分析的双特异性抗体衍生物的另一蛋白质制品拥有长度减少的连接物序列 (Her3-cMet-3C-FS1)。

[0327]

双特异性中间物抗体	没有蛋白酶切割位点的重链构建体	具有蛋白酶切割位点的重链构建体	轻链(2x)
Her3/MetSS-3C-FS1 (蛋白酶切割 = 弗林蛋白酶切割位点-变体 1)	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12

[0328] 在这一制品中,再次毫无疑义地检测到弗林蛋白酶加工的产物。此外,并且以与上述相同的方式,也从弗林蛋白酶加工产物中定量除去了开始并形成部分弗林蛋白酶识别序列的精氨酸和 / 或赖氨酸残基。这一制品除了弗林蛋白酶加工产物外还含有另外的延伸的 Fc 片段。这表明这一蛋白批次仍含有一些未被加工的前体分子。

[0329] 为了进一步分析在这一 Her3-cMet-3C-FS1 制品中加工程度 vs 未被加工的前体分子的存在,在还原条件下执行 SDS-PAGE 分析。这些分析的结果 (图 9) 表明也用于这一制品的弗林蛋白酶加工的显著程度:弗林蛋白酶切割仅将延伸的 H 链 (63kD) 之一转变成正常尺寸的 H 链 (50kD) 并且释放 12kD 的蛋白片段。这一加工过程的两个产物明显是可检测到的。

[0330] 由于互补的 (未被切割的) 延伸 H- 链与前体在凝胶中位于相同的位置,所以不能通过这一方法以准确的方式来测定完全被加工的产物和任何剩余的未被加工的前体 - 材料的比例。然而,可检测的量的加工产物,特别是 12kD 片段的清晰可见性 (由于其小尺寸比更大的蛋白片段更难于可视化),表明即使在这一制品中,也发生了非常有效的加工。

[0331] 获得的根据本发明的双特异性抗体的功能性

[0332] 进一步以细胞测定来检查所获得的根据本发明的双特异性抗体 (仅通过二硫键稳定性 Fv 片段的一个结构域与全长抗体连接) 的功能性: FACS 实验 (图 7) 显示出双特异性抗体的未受限臂特异性地结合表达 Her3 的癌细胞并且造成在此细胞上的聚集。通过 FACS 以相似的方式在表达 cMet 的 A549 细胞上分析在限制性的 dsFv cMet 部分对比释放的 dsFv cMet 部分的结合。图 7 示出在表达期间用弗林蛋白酶的切割或在表达后用 Precission 的切割,相比于限制性的 dsFv 部分,显著提高在 A549 细胞上的 c-Met 依赖性聚集。此外,可针对识别 cMet 的释放的 dsFv 部分证明对于 cMet 部分与干扰信号传导通路有关的功能性:未受限的 cMet dsFv (通过弗林蛋白酶切割或 Precission 切割) 干扰由 HGF- 介导的 ACT 信号传导,与源于亲本抗体的单价 Fab 同样有效 (图 8)。相反,限制性的 dsFv 部分显著降低活性,这与它们降低的亲和力相关联。

[0333] 实施例 3

[0334] 在表达期间被加工的其他双特异性抗体的产生和生化表征

[0335] 为了证明根据本发明的双特异性抗体的设计和生产过程是可普及的,设计、生产并表征了多种其它的双特异性抗体。所有这些都产生为前体分子,该前体分子含有二硫键稳定性 Fv 实体 (如上所述),其通过一个弗林蛋白酶可切割的以及一个不可切割的肽序列与 IgG 衍生物相连。这些双特异性抗体衍生物由在肿瘤上针对 (address) 细胞表面抗

原（作为靶标 1）的结合部分以及抗-地高辛配基结合实体（如靶标 2）组成。细胞表面靶向特异性针对也在癌细胞上表达的癌症相关的 LeY 糖类抗原（LeY）、CD22、CD33、Her2 或 IGF1R 抗原，或者在许多肿瘤中表达的 VEGFR2。具有这些结合特异性的抗体序列，以及相应的 Dig- 结合抗体衍生物之前已被描述（参见 W02011/003557），并且可从其中得到。具有根据本发明的双功能性的组合分子的组成示例性地示出于图 10 中。

[0336] 按实施例 2 所述进行这些弗林蛋白酶-加工的双特异性抗体衍生物的表达和纯化。每升细胞培养物上清中的表达产量与针对许多未修饰的抗体所观察到的那些范围相同（7-40mg/L）。所有双特异性抗体衍生物可被纯化至均质性并且所有蛋白质制品都不含或者仅含少量聚集体。在许多制品中，根本没有检测到聚集体，如图 11 中通过对这些制品的 SEC 分析所示。每升培养上清液的纯化的均质抗体的表达产量为对于 LeY-Dig 是 15mg/L，对于 CD22-Dig 是 19.5mg/L，对于 CD33-Dig 是 40mg/L，对于 VEGFR2-Dig 是 40.2mg/L，对于 Her2-Dig 是 25mg/L 以及对于 IGF1R-Dig 是 7mg/L。

[0337] 在将 dsFv 与 IgG 骨架融合的肽连接物之一中存在弗林蛋白酶识别位点按所需地导致在表达过程期间的完整蛋白水解加工。这通过还原和非还原 SDS-PAGE 分析得到证明：在非还原条件下看到大尺寸的二硫化物键合的双特异性抗体，其在还原时分离成预期分子量的单独链（图 12）。弗林蛋白酶切割仅将延伸的 H 链之一（63kD）转变成正常尺寸的 H-链（50kD）并且释放 12kD 的蛋白片段。这一加工过程的两种产物都在还原胶中清楚地被检测到。

[0338] 进一步通过质谱（图 13）来确认蛋白产物的限定的组成和均质性以确定蛋白和蛋白片段的精确分子量。在质谱分析之前，使用 N-糖苷酶 F 应用标准方法对抗体脱糖基化以便减小光谱复杂性并帮助数据解释。作为帮助数据解释的进一步措施，通过 IdeS 蛋白酶将待分析的分子切割成二硫化物桥接的 Fc 和 F(ab)<sub>2</sub> 片段。随后用 TCEP 还原该片段以分离它们的不同组分来帮助如上所述的鉴别和表征，此后对其脱盐和随后进行电喷射离子化（ESI）质谱。这些分析的结果表明所有被翻译成前体形式的被分析的双特异性抗体衍生物此后在生产细胞的分泌途径中被弗林蛋白酶加工。蛋白质制品显示出被弗林蛋白酶的完全加工（在检测极限内）并且没有检测到未被加工的前体片段（延伸的 IdeS-Fc 片段）。此外，质量分析表明弗林蛋白酶切割的蛋白部分的进一步的羧基端加工。开始切割位点并形成部分弗林蛋白酶识别序列的精氨酸和 / 或赖氨酸残基被从弗林蛋白酶加工的产物中定量除去。

[0339] 这些结果证明根据本发明的双特异性抗体的设计和生产过程是可普及的：可以产生、生产在连接物肽中含有弗林蛋白酶识别位点的各种双特异性抗体并将其纯化至均质。

#### [0340] 实施例 Y

[0341] 在表达期间被加工的其他双特异性抗体的功能表征。

[0342] 通过表面等离子共振以结合测定调查其他双特异性抗体（仅通过二硫键稳定性 Fv 片段的一个结构域与全长抗体连接）的功能性。由于通过弗林蛋白酶的加工是在表达过程期间发生，在纯化后获得的制品应由具有完全活性无接头 dsFv 的双特异性实体组成。完全结合能力可通过 SPR 分析来确认，其示出双特异性抗体的所有结合实体以及结合地高辛配基的 dsFv 具有无限制的结合能力。它们对于靶标抗原 1 和对于靶标抗原 2 地高辛配基的亲和力与未修饰的抗体或 Fab 的亲和力是可比较的。例如，相比于亲本抗体，根据本发

明的双特异性抗体衍生物对于地高辛配基化的荷载 (digoxigeninylated payload) 的单独结合亲和力为, 对于对照分子是  $K_d$  22nM 并且对于弗林蛋白酶加工的分子是 19nM (图 14)。此外, 在图 14b 和图 15b 中的这些 SPR 实验清楚地证明了双特异性抗体衍生物同时结合两种不同抗原。这对于靶标 1 抗原 LeY 以及 CD22 而被显示 (图 14 和图 15)。

[0343] 进一步在细胞测定中调查结合 LeY 以及 Dig 的双特异性抗体 (仅通过二硫键稳定性 Fv 片段的一个结构域与全长抗体连接) 的功能性: FACS 实验 (图 16) 显示出根据本发明设计并产生的双特异性抗体特异性地结合表达 LeY 抗原的 MCF7 靶标细胞。这通过二抗显示出 (图 16a), 其证明了弗林蛋白酶加工的双特异性抗体的 LeY- 结合能力与原始 LeY- 结合抗体并无不同。此外, 这些双特异性抗体能够将通过第二特异性 (Dig-Cy5) 结合的直接荧光荷载指引到这些靶标细胞, 其示出于图 16b。由此, Dig- 缀合的荷载富集在靶标细胞上但不在不表达靶标抗原的细胞上。对 Dig- 荷载的定量结合和细胞聚集进一步通过下面的事实证明: 相比于只形成一个 Dig- 结合实体的双特异性, 对于具有两个 Dig- 结合实体的部分, 在细胞上的靶标荧光性有两倍高。

[0344] 这些结果证明根据本发明的双特异性抗体的设计和生产过程是可普及的: 可以产生在连接物肽中含有弗林蛋白酶识别位点的各种双特异性抗体, 这些抗体保留了针对靶标 1 以及针对靶标 2 的完全结合活性。

[0001]

序列表															
<110> 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司(P. Hoffmann-La Roche AG)															
<120> 包含二硫键稳定性Fv片段的双特异性抗体															
<130> 26968 #0															
<150> EP10173914.2															
<151> 2010-08-24															
<160> 15															
<170> PatentIn 版本 3.5															
<210> 1															
<211> 597															
<212> PRI															
<213> 人工															
<220>															
<223> Her3/MetSS_KHSS_PSI - HCl (SS_Knobs(HCl_VlicMet)															
<400> 1															
Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala
			20					25						30	
Tyr	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Trp
		35					40					45			
Met	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Tyr	Ala	Pro	Ser	Leu
	50					55						60			
Lys	Asn	Arg	Phe	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe
65					70					75					80
Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
					85				90						95
Ala	Arg	Glu	Ser	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100						105					110	
Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
			115					120					125		
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
		130				135						140			
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150					155					160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
					165				170						175
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180					185					190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
		195					200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
		210				215						220			
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
					245				250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		

[0002]

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350  
 Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys  
 355 360 365  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400  
 Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 450 455 460  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val  
 465 470 475 480  
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu  
 485 490 495  
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu  
 500 505 510  
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly Met  
 515 520 525  
 Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys Asp  
 530 535 540  
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln  
 545 550 555 560  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr  
 565 570 575  
 Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 580 585 590  
 Val Thr Val Ser Ser  
 595  
 <210> 2  
 <211> 592  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> Her3/MetSS\_KHSS\_FS1 - HC2 (SS\_HolesHC2\_VLcMet\_FS1)  
 <400> 2  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

[0003]

1	5	10	15
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala	20	25	30
Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp	35	40	45
Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu	50	55	60
Lys Asn Arg Phe Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe	65	70	75
Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	100	105	110
Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro	115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly	130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn	145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr	210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser	225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu	340	345	350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys	355	360	365
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			

[0004]

				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
		435					440					445			
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gln	Ser	Ser	Arg	His
		450				455					460				
Arg	Arg	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile
465				470					475					480	
Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg
				485					490					495	
Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ser	Ser
			500					505					510		
Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
		515					520					525			
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
		530				535					540				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
545				550					555					560	
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr
				565					570					575	
Ala	Tyr	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
			580					585					590		

<210> 3  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> Her3/MetSS\_KHSS\_PS1 - LC (Her3克隆29\_R01\_LC)

<400> 3

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Arg	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr
		20					25					30			
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Arg	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50				55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln
65				70					75					80	
Gln	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Phe	Pro	Trp
			85						90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
		100					105						110		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
		115				120						125			
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
	130					135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
	145				150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser

[0005]



165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 <210> 4  
 <211> 597  
 <212> PKT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> Her3/MetSS\_KHSS\_FS2 - HCl (SS\_KnobsHCl\_VHcMet)  
 <400> 4  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala  
 20 25 30  
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Asn Arg Phe Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Gln Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Glu Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

[0006]

290 295 300  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350  
 Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys  
 355 360 365  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 450 455 460  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val  
 465 470 475 480  
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu  
 485 490 495  
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu  
 500 505 510  
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly Met  
 515 520 525  
 Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys Asp  
 530 535 540  
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln  
 545 550 555 560  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr  
 565 570 575  
 Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 580 585 590  
 Val Thr Val Ser Ser  
 595  
 <210> 5  
 <211> 592  
 <212> PRI  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> Her3/Met\_SS\_RHSS\_PS2 - HC2 (SS\_HolesHC2\_VLeMet\_FS2)  
 <400> 5  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala  
 20 25 30  
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

[0007]

35 40 45  
Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu  
50 55 60  
Lys Asn Arg Phe Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
65 70 75 80  
Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110  
Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
115 120 125  
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
130 135 140  
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
145 150 155 160  
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
165 170 175  
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
180 185 190  
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
195 200 205  
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
210 215 220  
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
225 230 235 240  
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
245 250 255  
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
260 265 270  
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
275 280 285  
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
290 295 300  
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
305 310 315 320  
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
325 330 335  
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu  
340 345 350  
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys  
355 360 365  
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
370 375 380  
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
385 390 395 400  
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
405 410 415  
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
420 425 430  
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

[0008]

序 列 表

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Ser His Arg Ser  
 450 455 460

Lys Arg Ser Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile  
 465 470 475 480

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg  
 485 490 495

Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser  
 500 505 510

Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 515 520 525

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser  
 530 535 540

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 545 550 555 560

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr  
 565 570 575

Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 580 585 590

<210> 6  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> Her3/MetSS\_KHSS\_FS2 - LC (Her3克隆29\_K01 LC)

<400> 6

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Arg Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Gln Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

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

[0009]

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 <210> 7  
 <211> 597  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> Her3/MetSS\_KHSS\_PreSci - HCl (SS\_KnobsHCl\_VHcMet)  
 <400> 7  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala  
 20 25 30  
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Asn Arg Phe Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

[0010]

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys  
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Gln Trp Glu Ser  
 370 375 380

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val  
 465 470 475 480

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu  
 485 490 495

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu  
 500 505 510

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly Met  
 515 520 525

Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys Asp  
 530 535 540

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln  
 545 550 555 560

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr  
 565 570 575

Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 580 585 590

Val Thr Val Ser Ser  
 595

<210> 8  
 <211> 592  
 <212> PKI  
 <213> 人.I

<220>  
 <223> Her3/MetSS\_KHSS\_PreSci - HC2 (SS\_HolesHC2\_VlcMet\_PreSci)

<400> 8

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala  
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Asn Arg Phe Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80

[0011]

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu  
 340 345 350  
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys  
 355 360 365  
 Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Glu Val Leu Phe  
 450 455 460  
 Gln Gly Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile  
 465 470 475 480

[0012]

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg  
 485 490 495  
 Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser  
 500 505 510  
 Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 515 520 525  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser  
 530 535 540  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 545 550 555 560  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr  
 565 570 575  
 Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 580 585 590

<210> 9  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> Her3/MetSS\_KHSS\_PreSci - LC (Her3克隆29\_K01\_LC)

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Arg Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Glc Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 10  
 <211> 582  
 <212> PRT

[0013]



<213> 人工

<220>

<223> Her3/MetSS-3C-FS1 - HCl (SS\_KnobshCl\_VHcMet)

<400> 10

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala  
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Asn Arg Phe Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Glu Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys  
 355 360 365

[0014]

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380  
 Asn Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 450 455 460  
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 465 470 475 480  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp  
 485 490 495  
 Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly  
 500 505 510  
 Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys  
 515 520 525  
 Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu  
 530 535 540  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 545 550 555 560  
 Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 565 570 575  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 580  
 <210> II  
 <211> 577  
 <212> PRF  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> Her3/MetSS-3C-FS1 - HC2 (SS\_HolesHC2\_YLcMet\_FS1)  
 <400> II  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala  
 20 25 30  
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Asn Arg Phe Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

[0015]

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu  
 340 345 350  
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys  
 355 360 365  
 Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp  
 450 455 460  
 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp  
 465 470 475 480  
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser  
 485 490 495  
 Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
 500 505 510  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro  
 515 520 525  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

[0016]

530 535 540  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
 545 550 555 560  
 Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 565 570 575  
 Arg  
 <210> 12  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> Her3/MetSS-3C-FSI - LC (Her3克隆29\_K01\_LC)  
 <400> 12  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Arg Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 <210> 13  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 弗林蛋白酶特异性蛋白酶切割位点变体1 - FSI  
 <400> 13  
 Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu  
 1 5

[0017]

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 弗林蛋白酶特异性蛋白酶切割位点变体2 - FS2

<400> 14  
Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu  
1 5

<210> 15  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> PreScission特异性蛋白酶切割位点

<400> 15  
Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro  
1 5

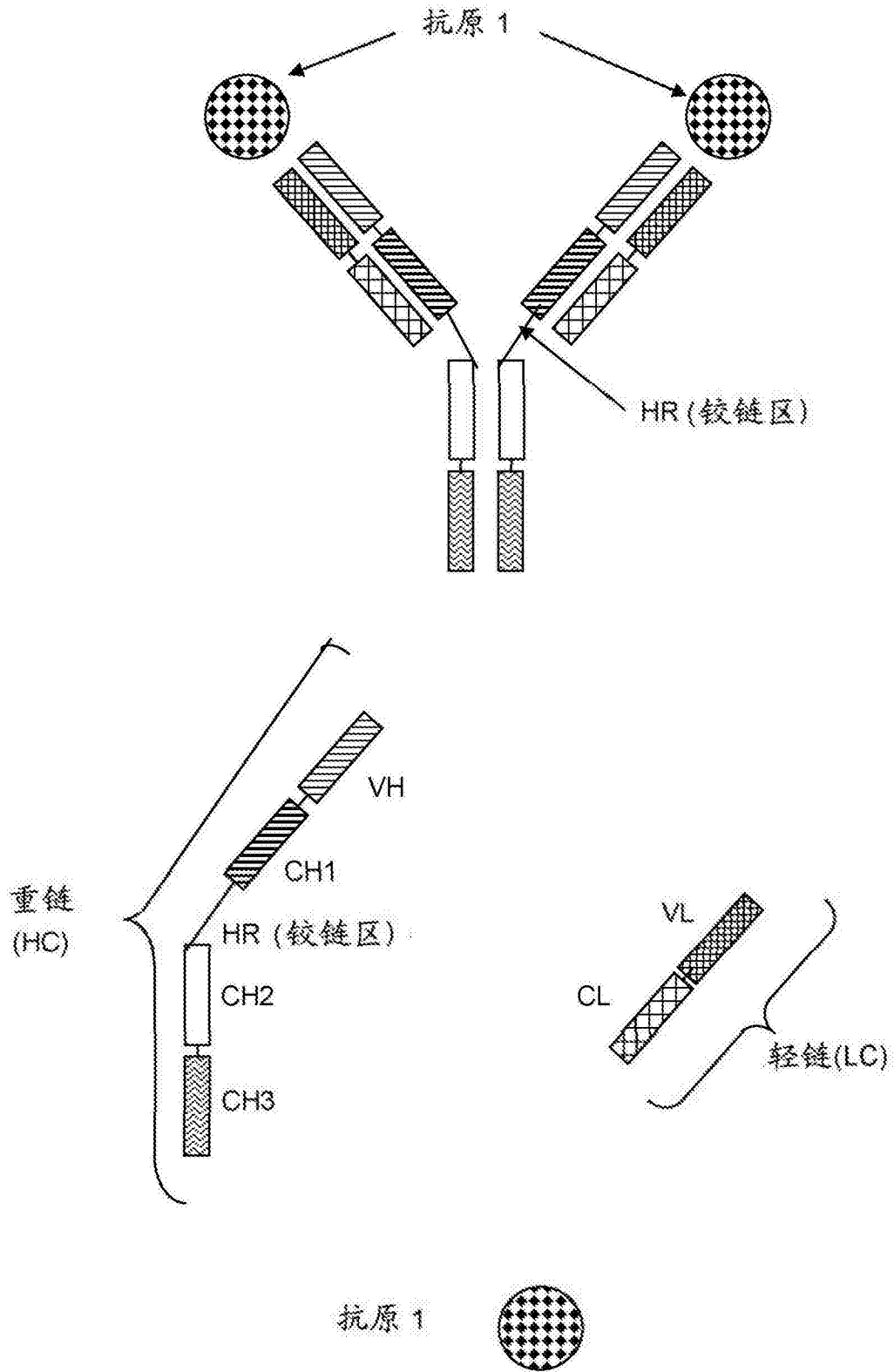


图 1

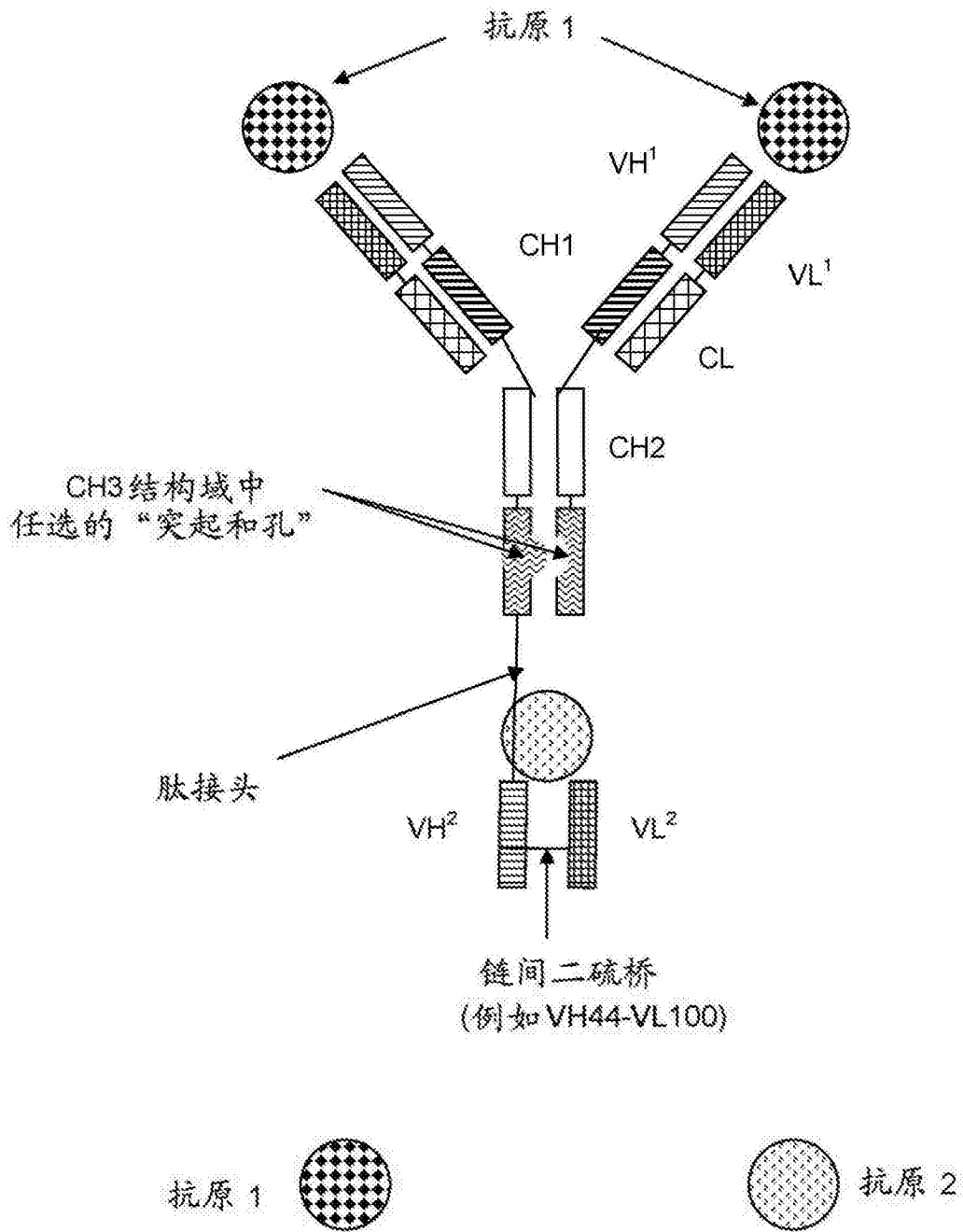


图 2a

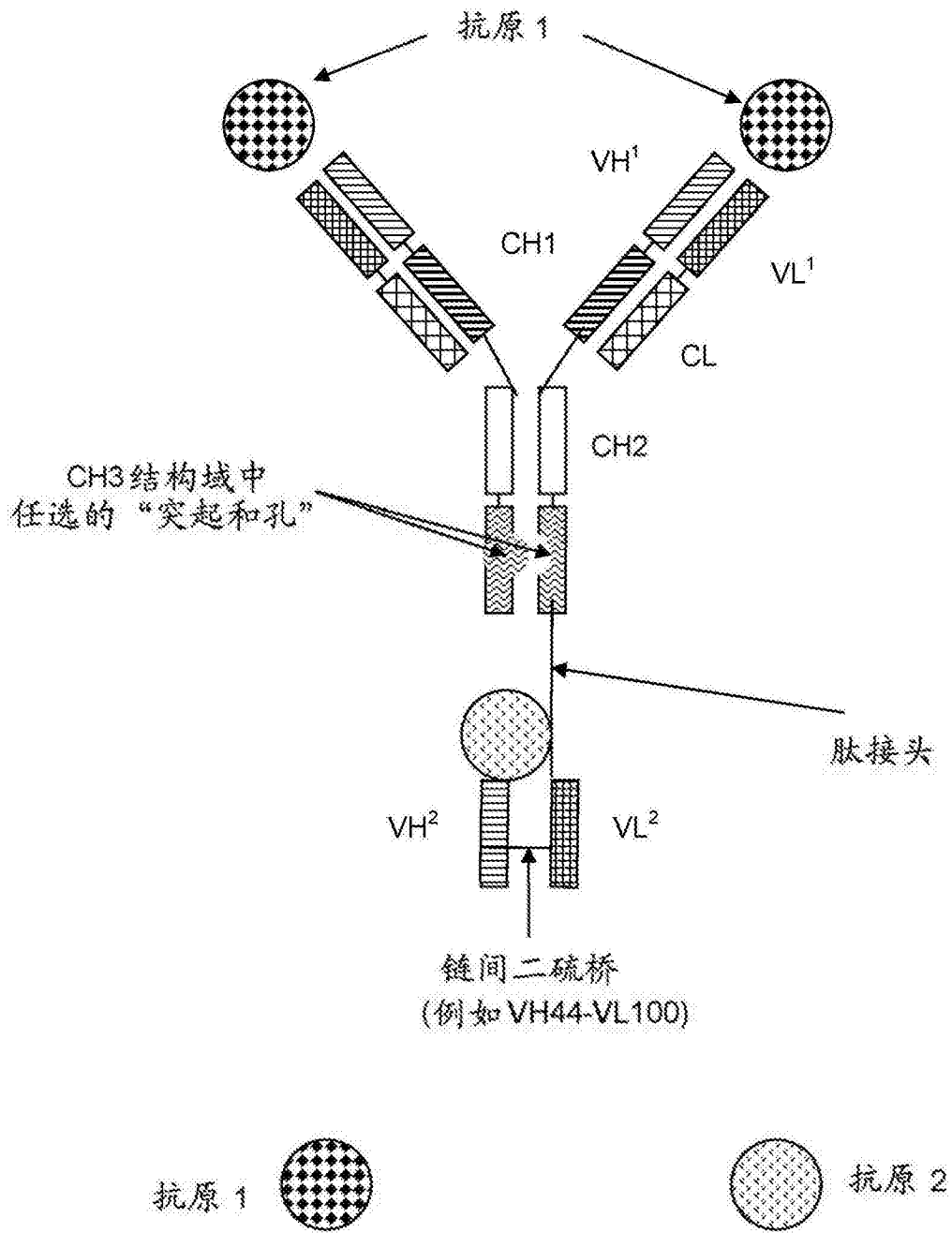


图 2b



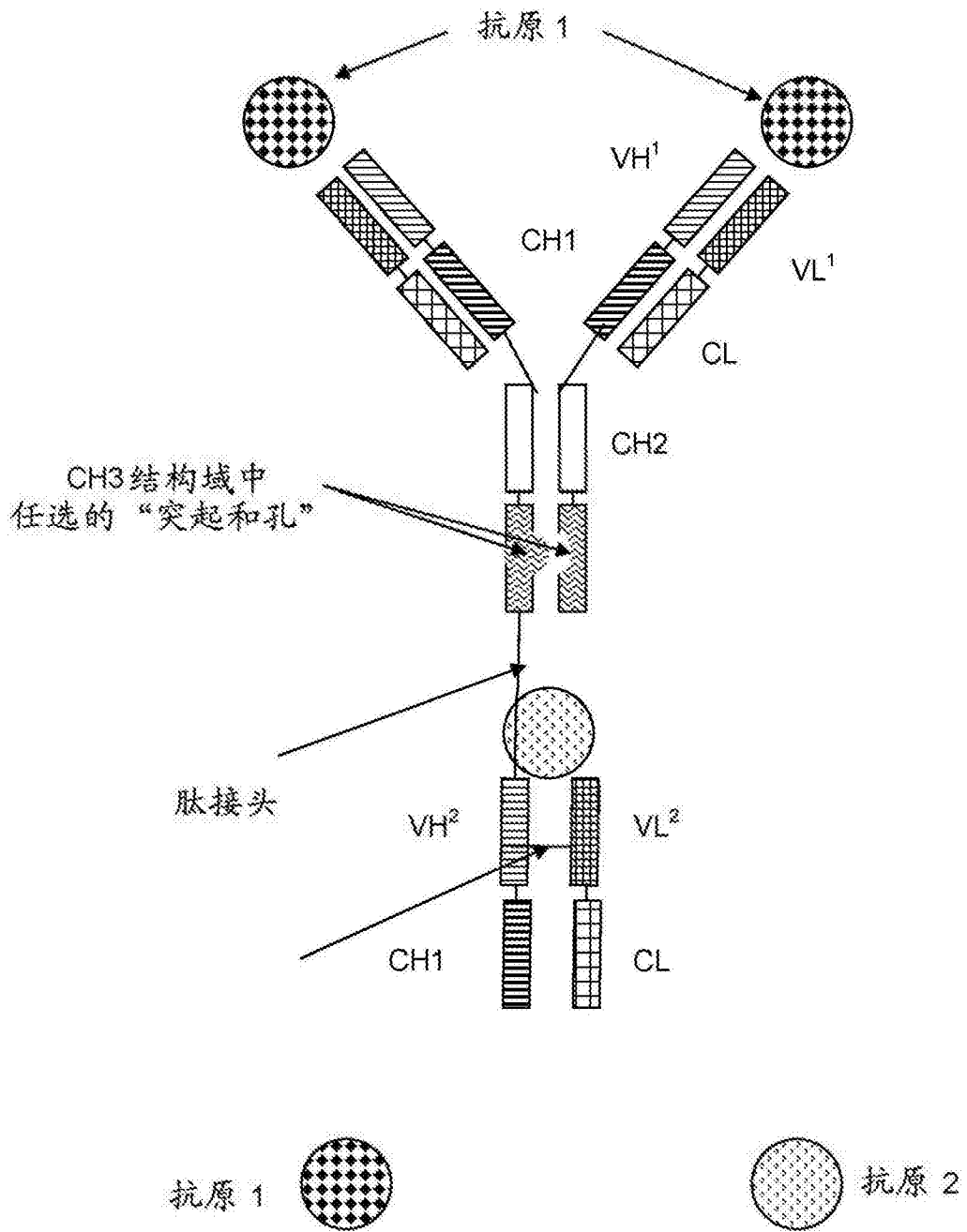


图 2c

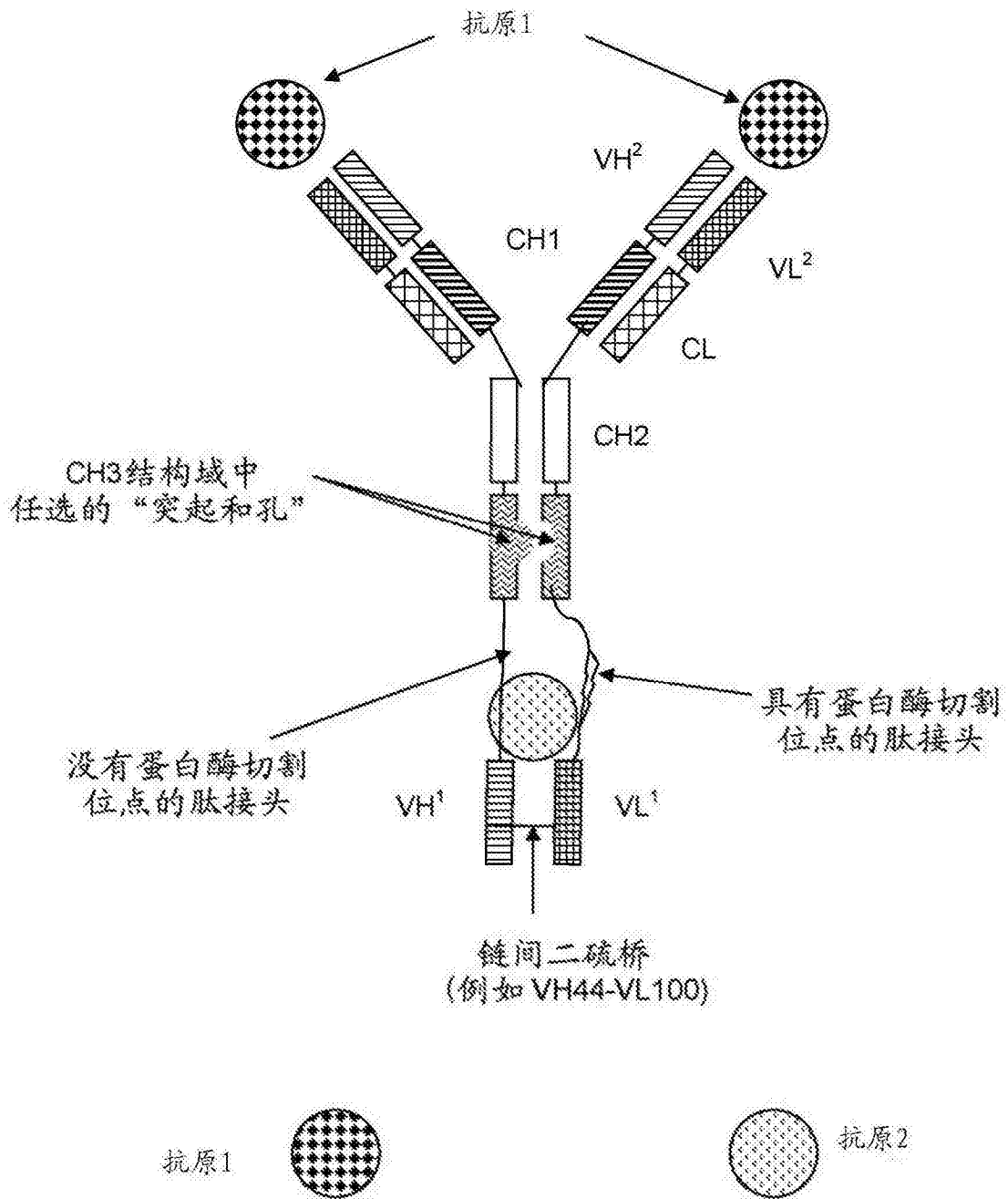


图 2d

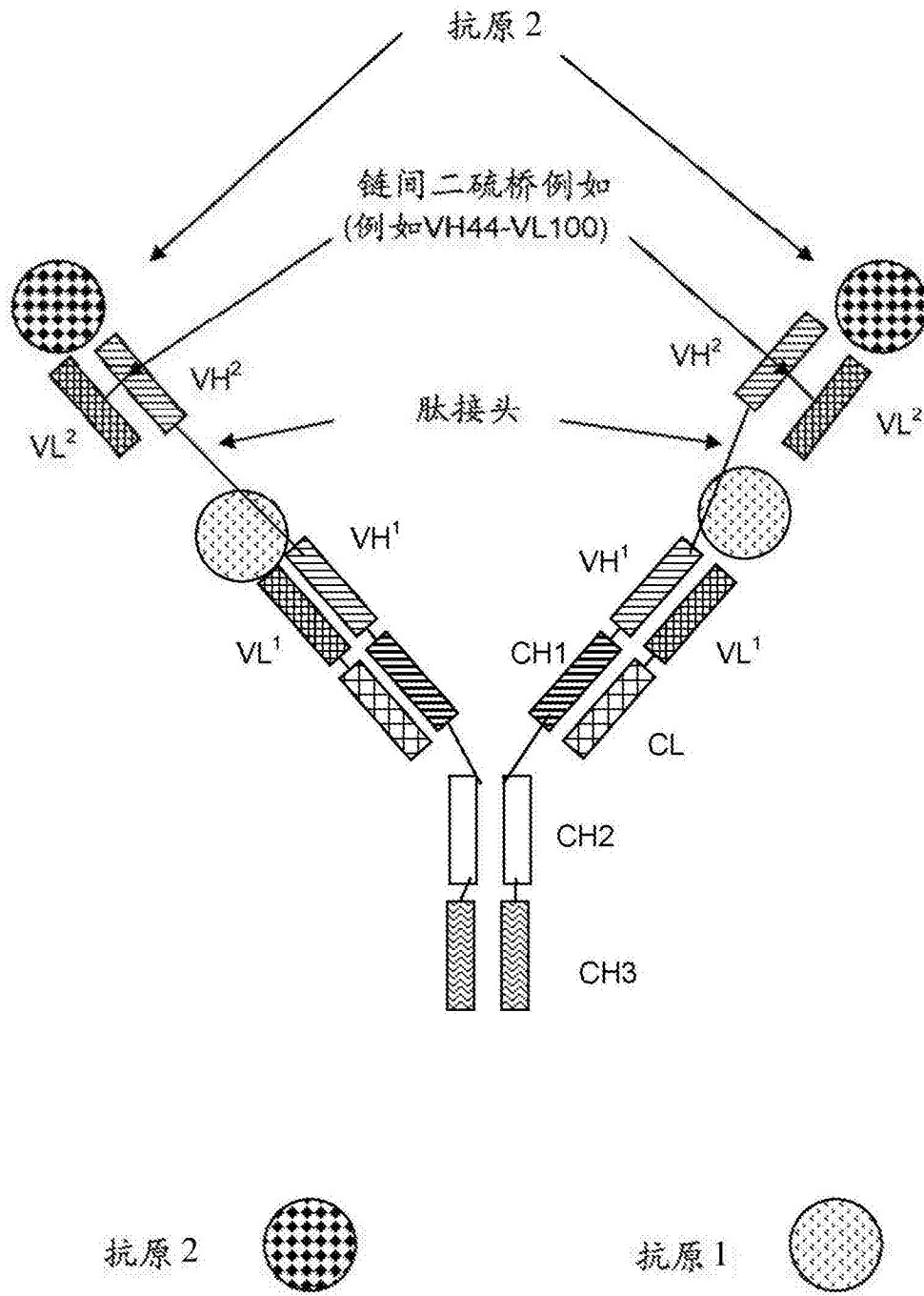


图 3a

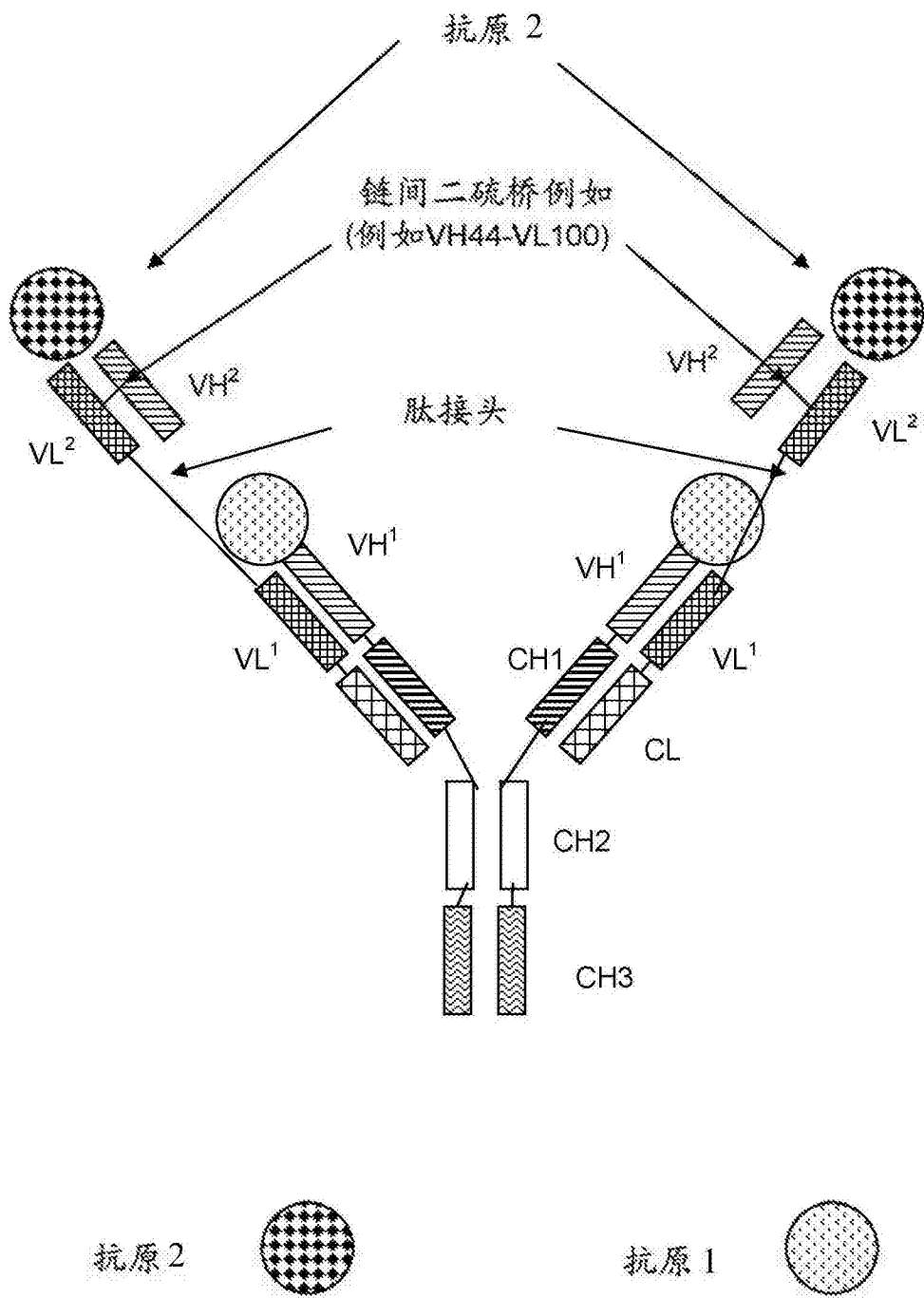


图 3b

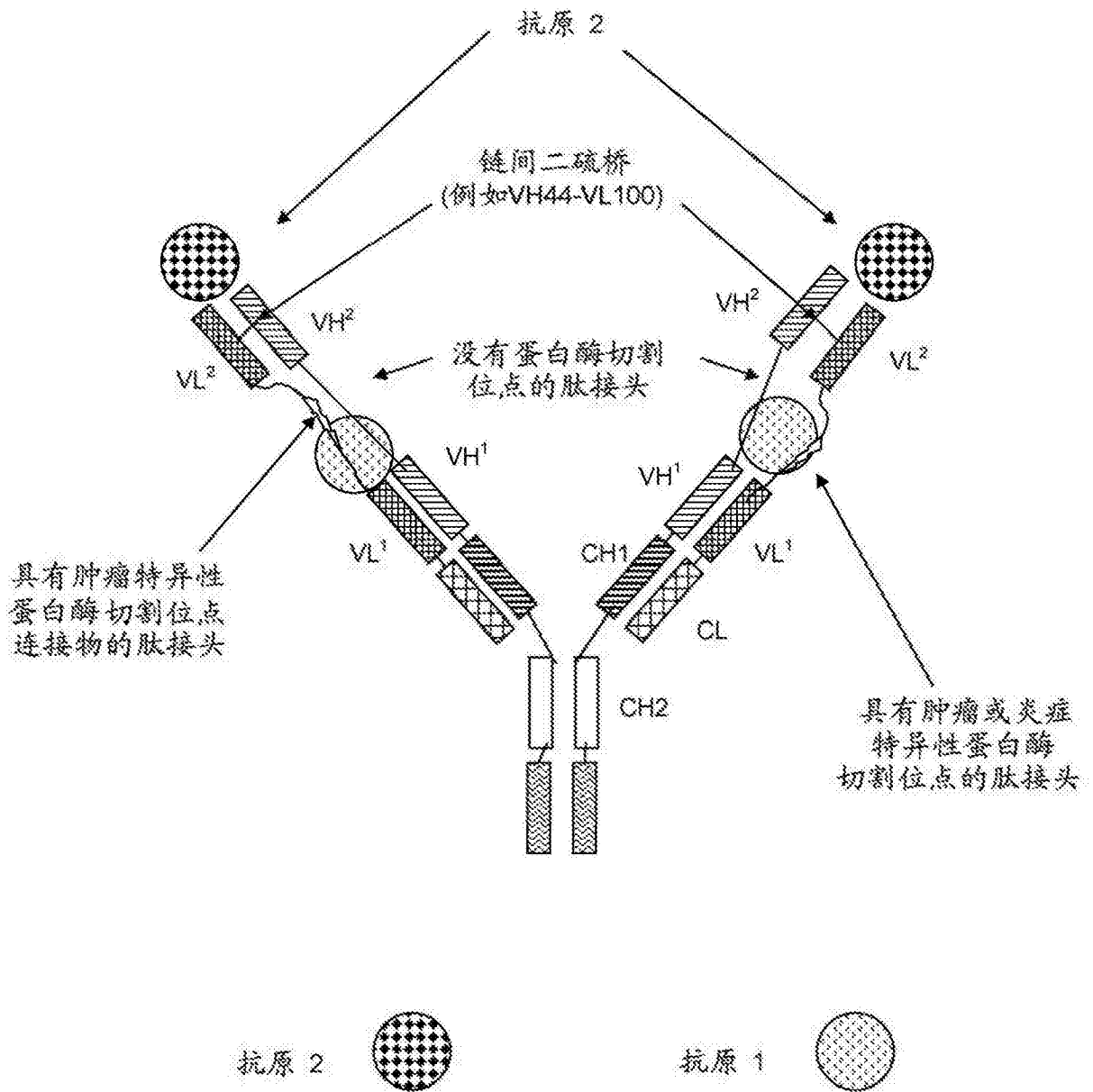


图 3c

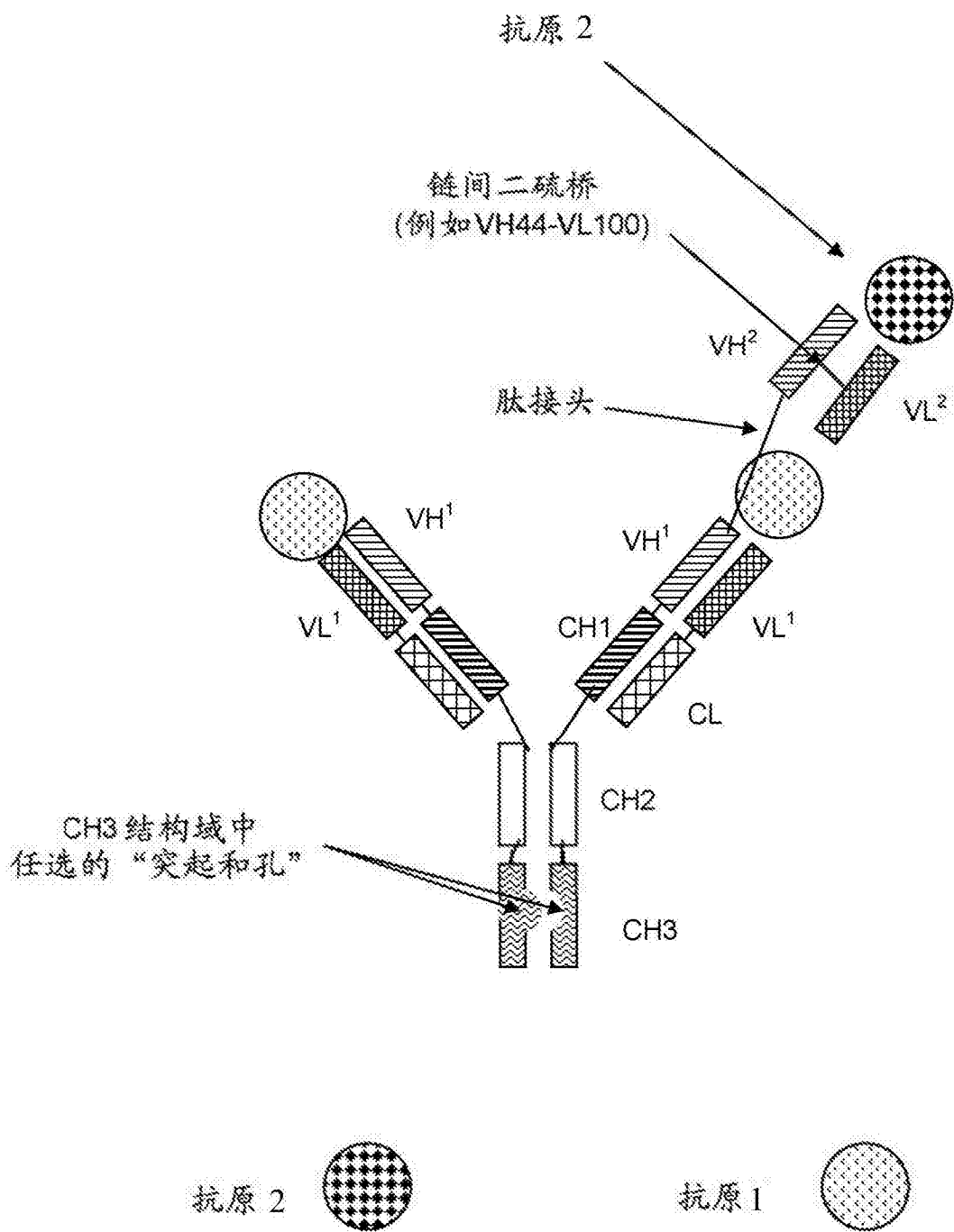


图 3d

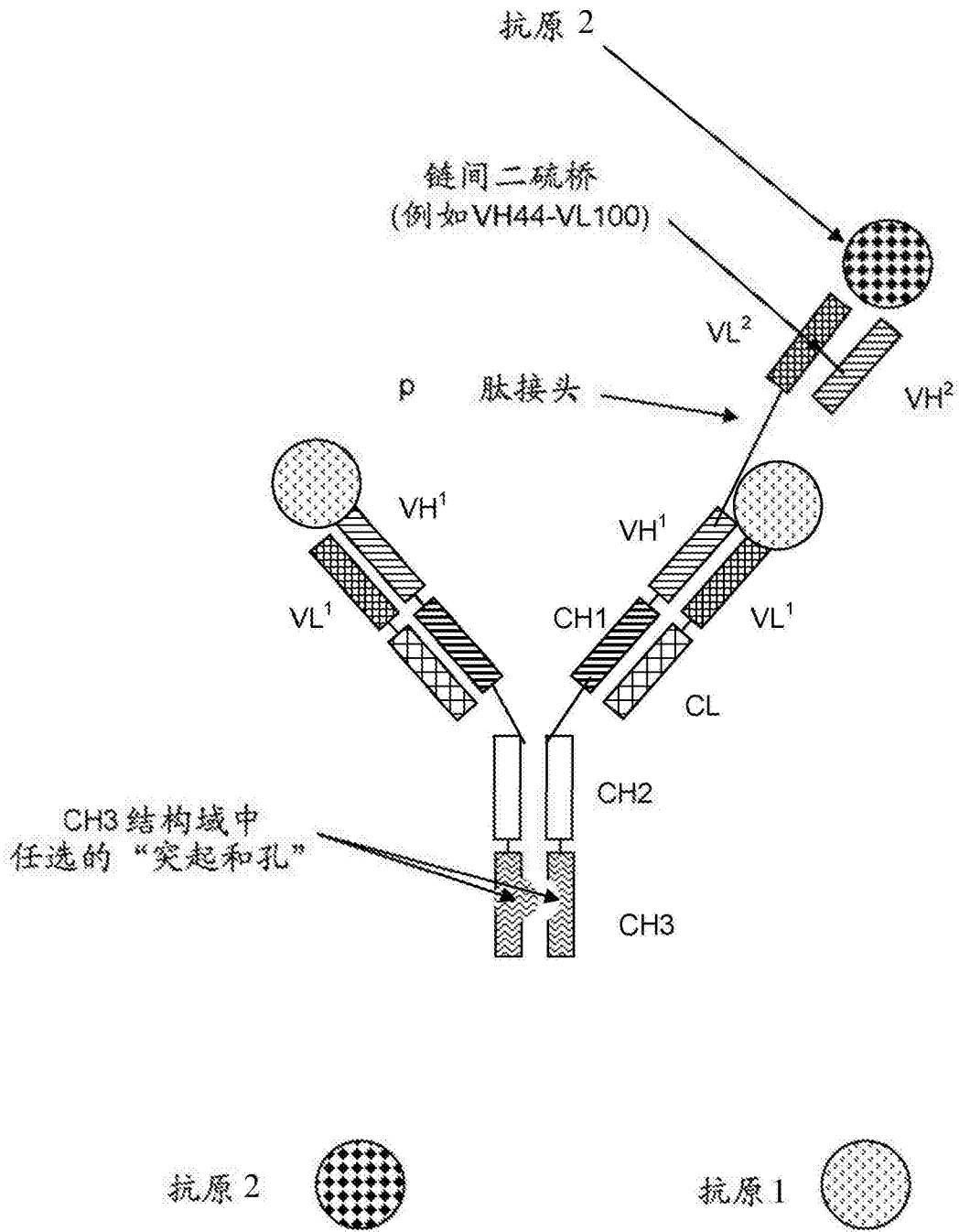


图 3e

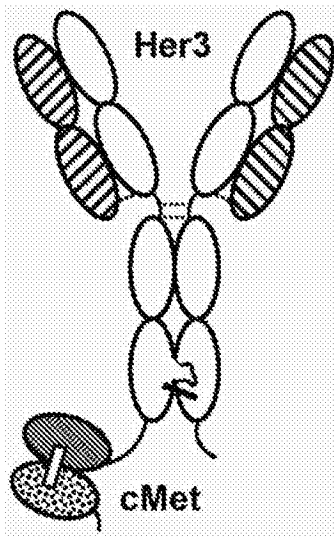


图 4a

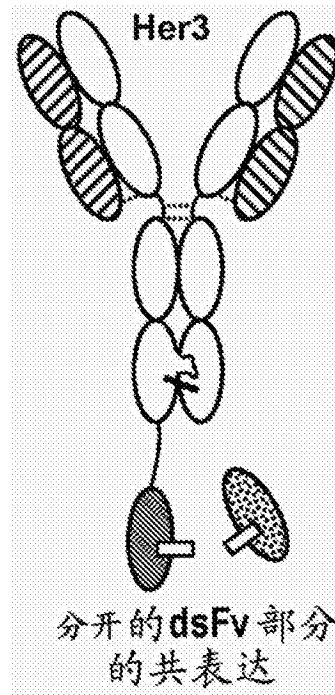


图 4b

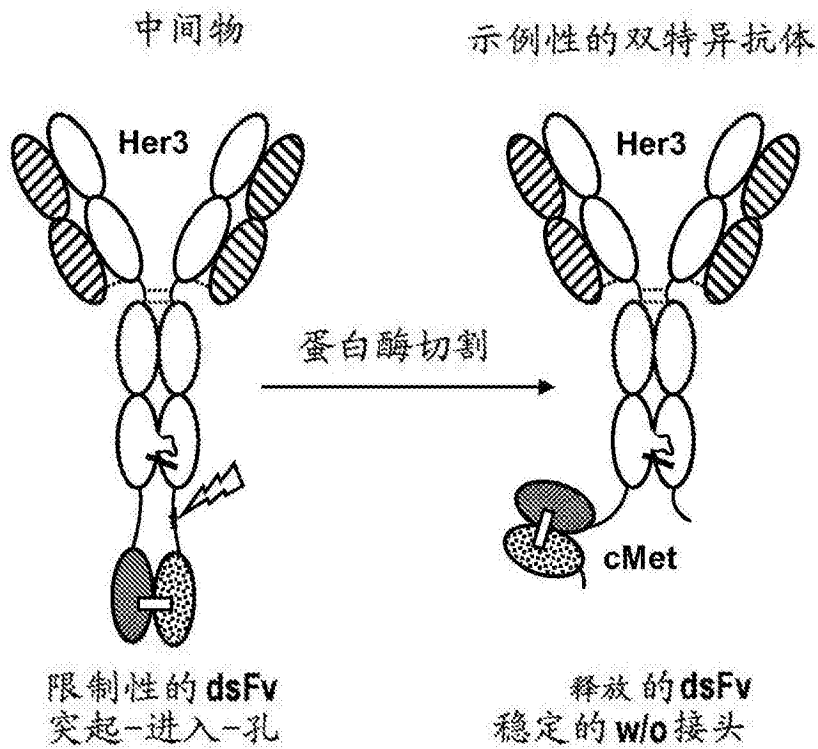
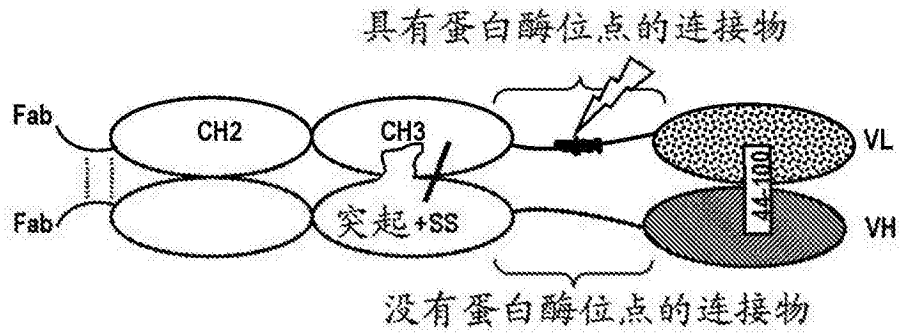


图 4c





连接物 w/o 蛋白酶位点	CH3(突起)(GGGGS) <sub>2</sub> -GGGSGGGGS(GGGGS) <sub>2</sub> VH <sub>cys44</sub>
Precession 识别位点	CH3(孔)(GGGGS) <sub>2</sub> -GLEVL <sup>FQ</sup> GPS(GGGGS) <sub>2</sub> VL <sub>cys100</sub>
弗林蛋白酶识别位点	CH3(孔)(GGGGS) <sub>2</sub> -GQSSRHRR AL(GGGGS) <sub>2</sub> VL <sub>cys100</sub>

图 4d

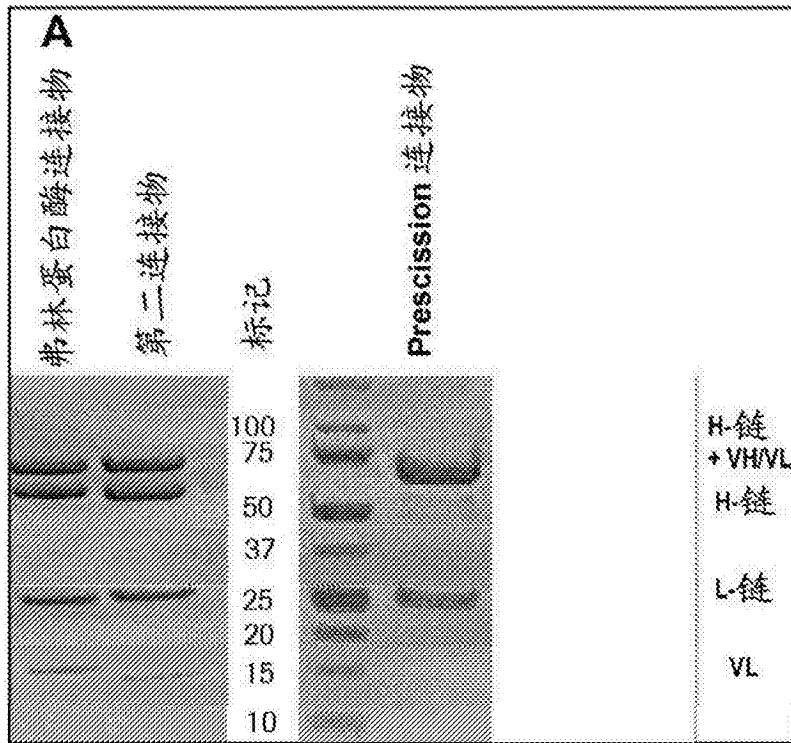


图 5

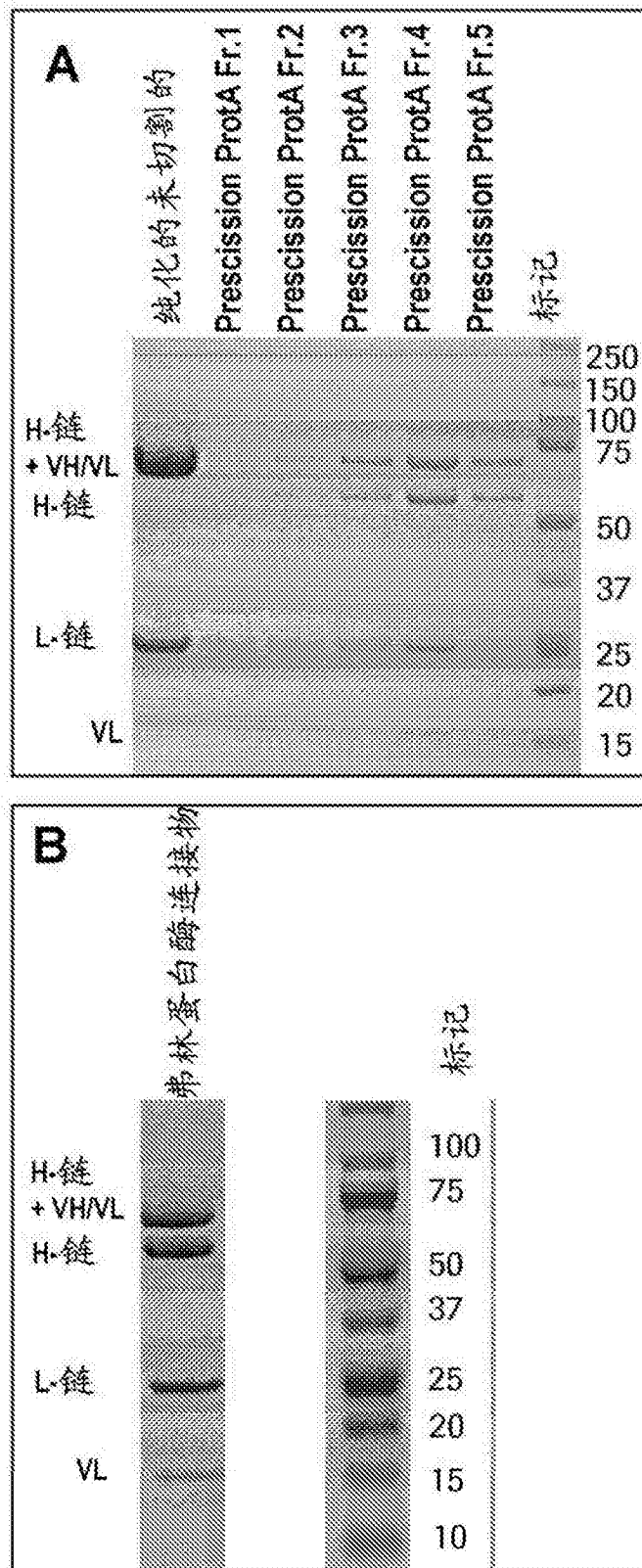


图 6

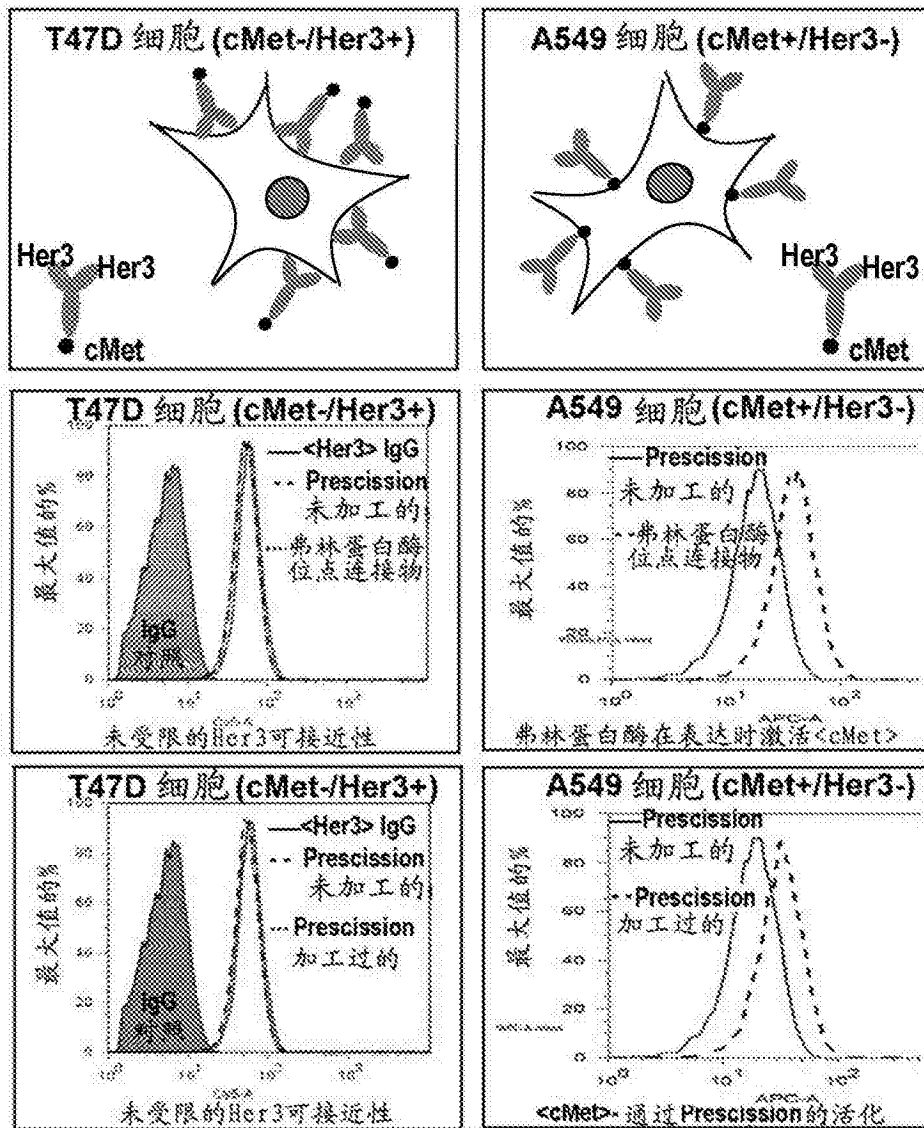


图 7

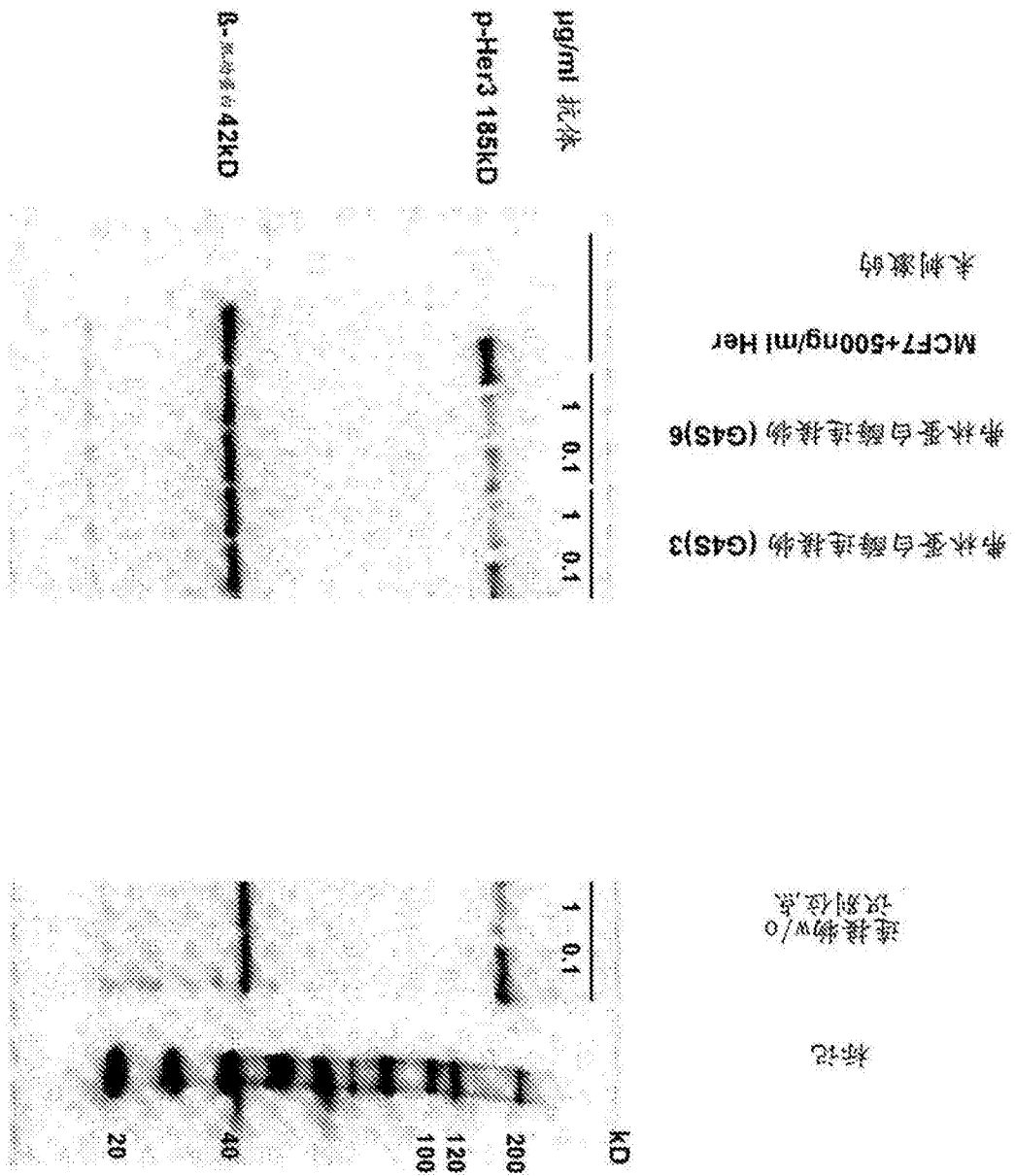


图 8A

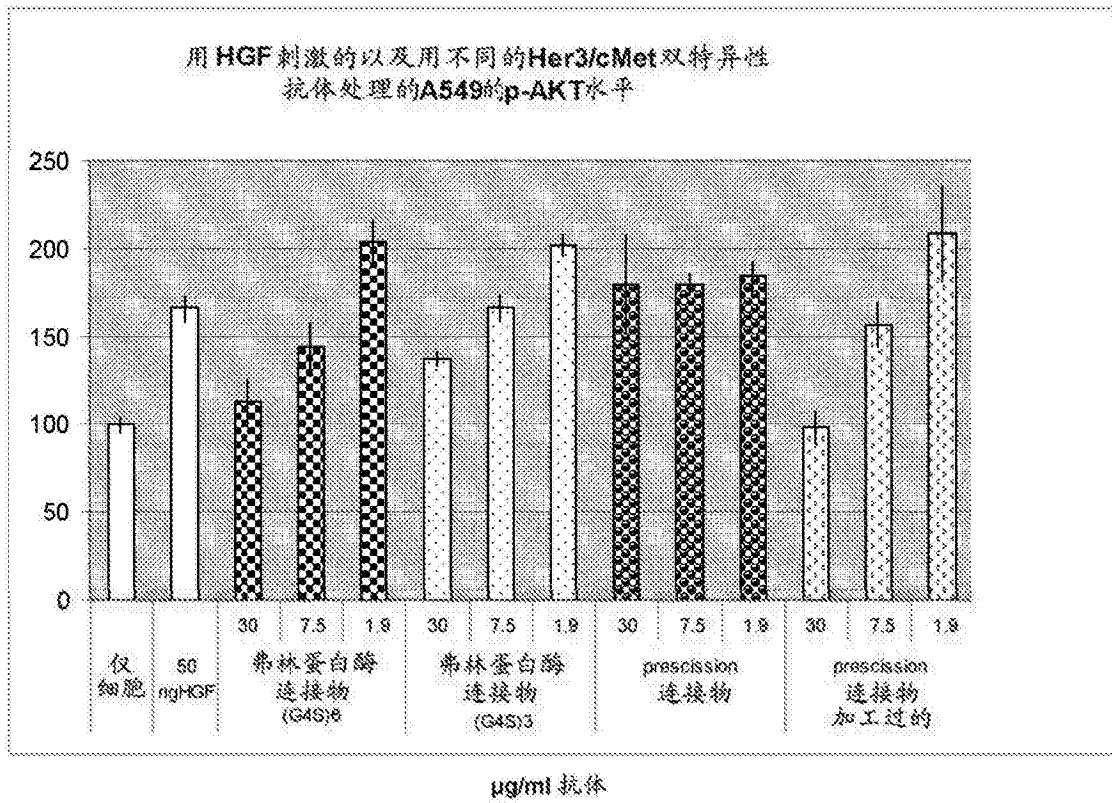


图 8B

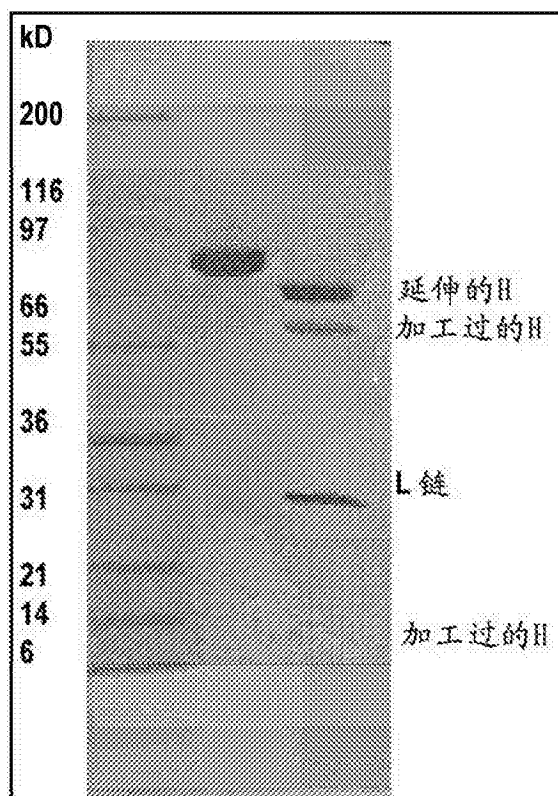


图 9

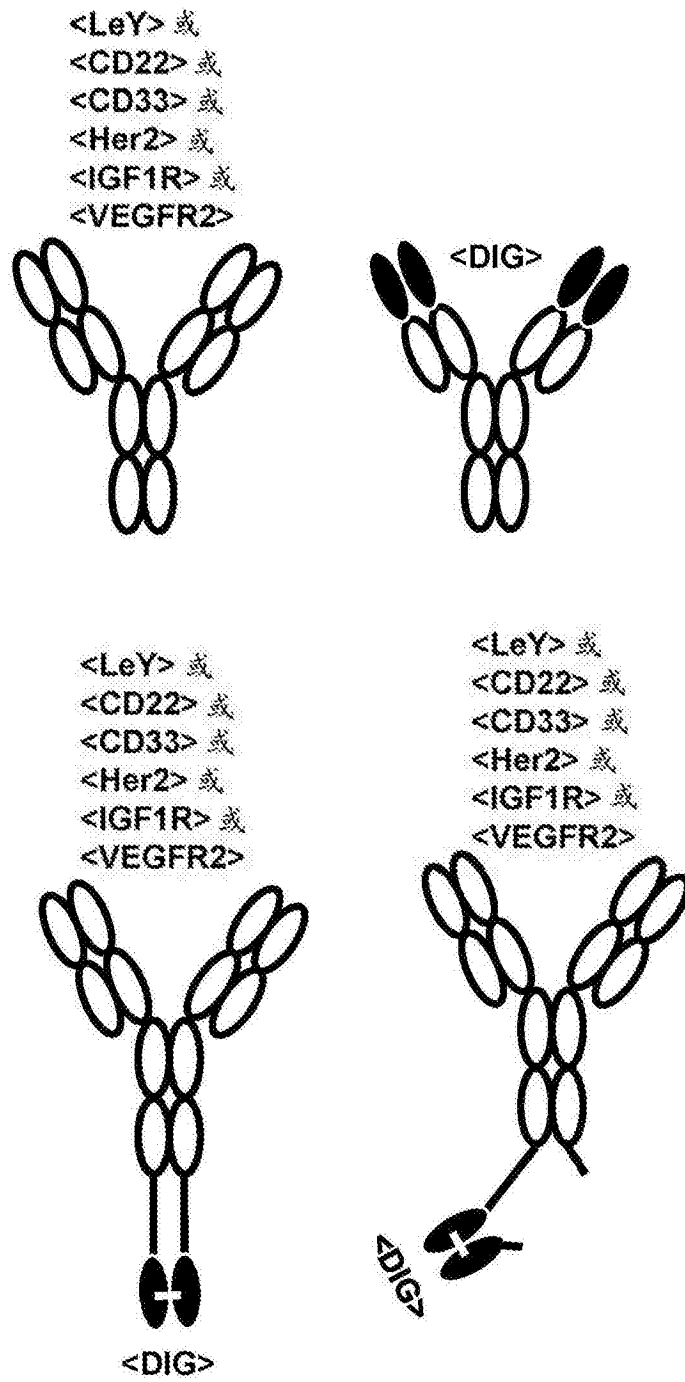


图 10

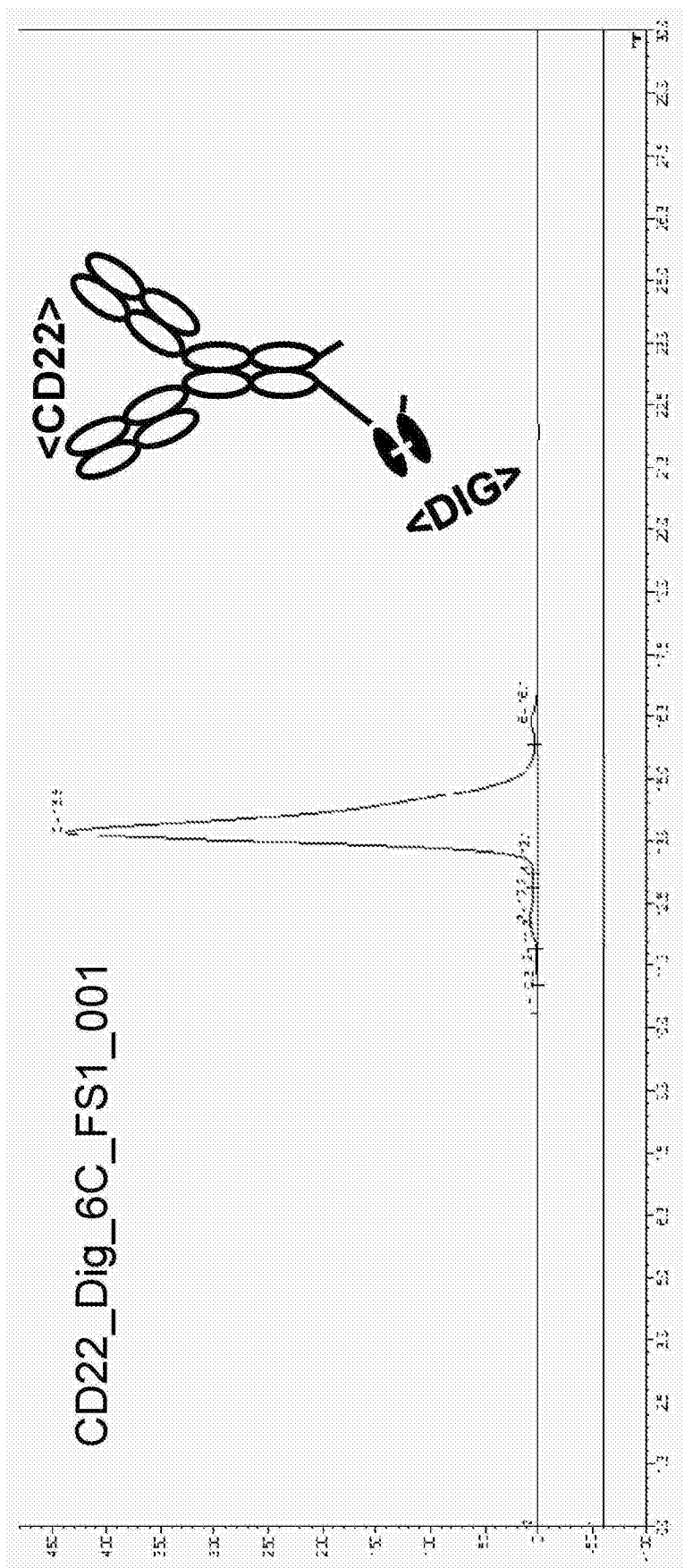


图 11a



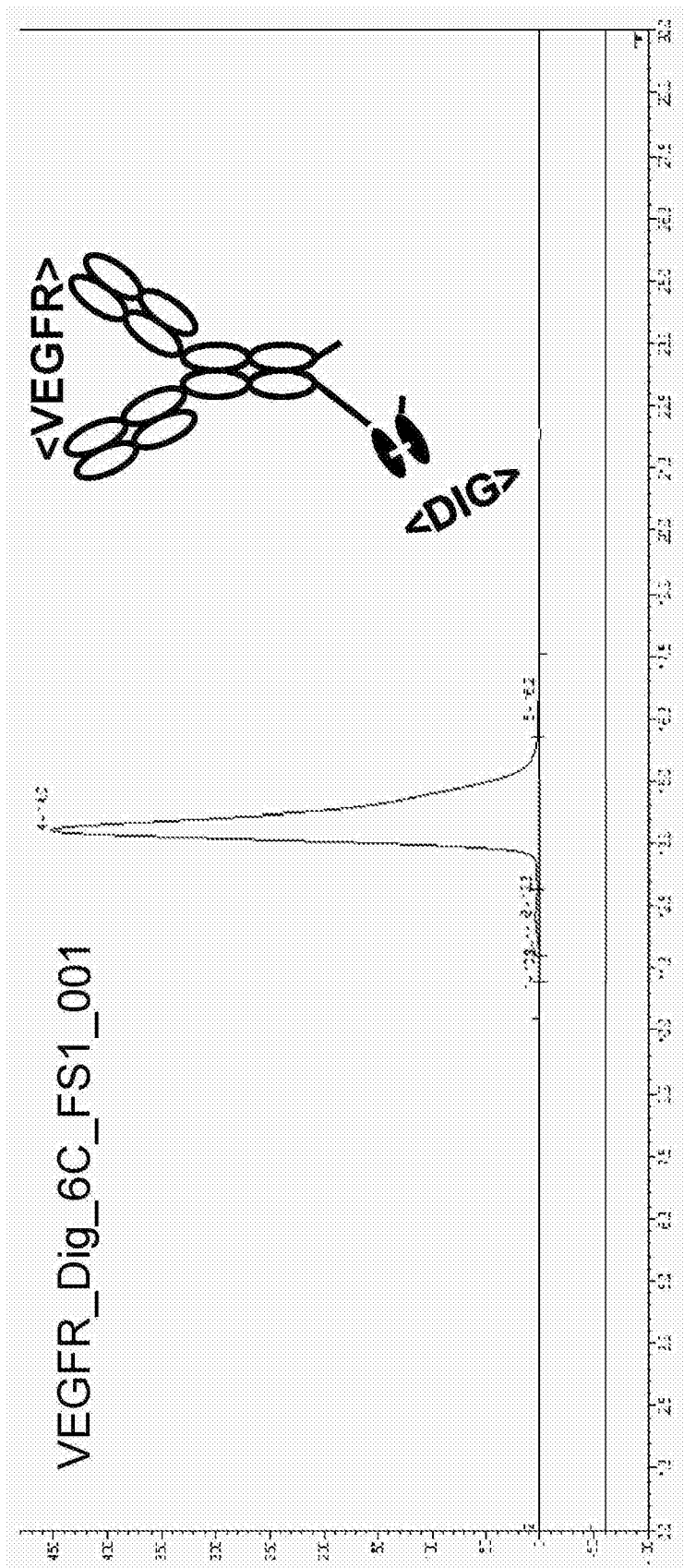


图 11b

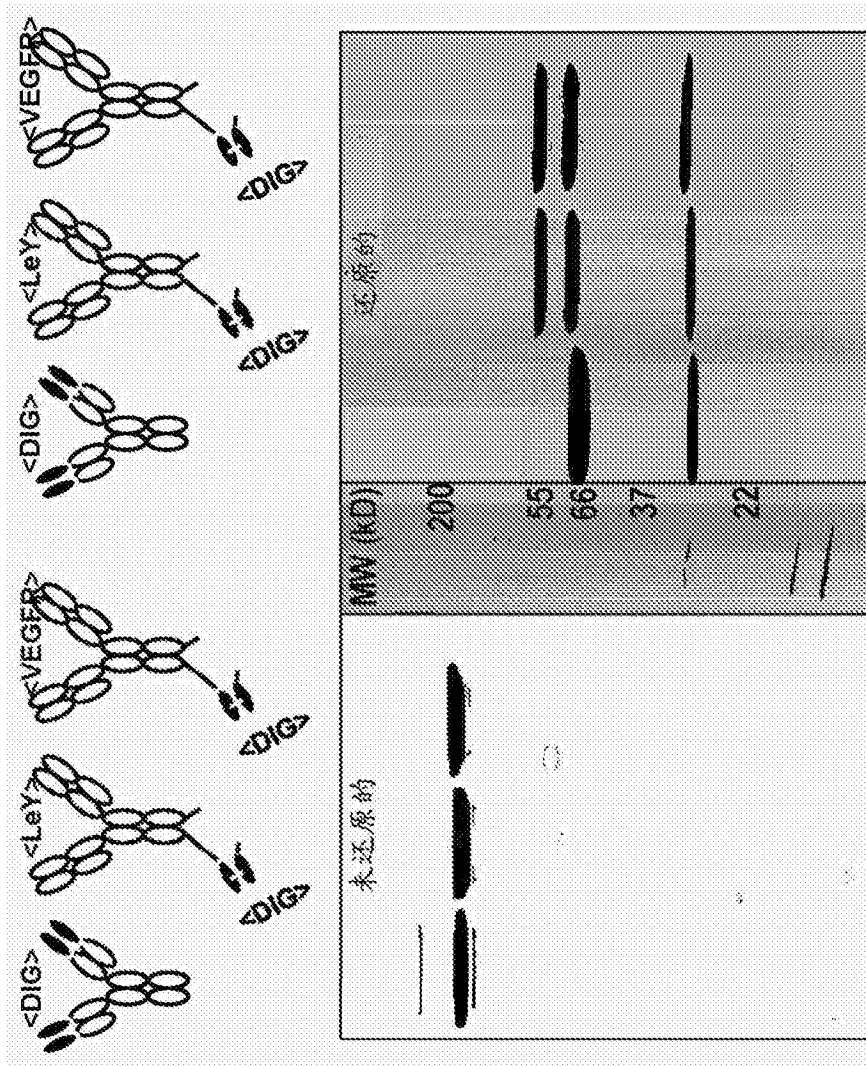


图 12

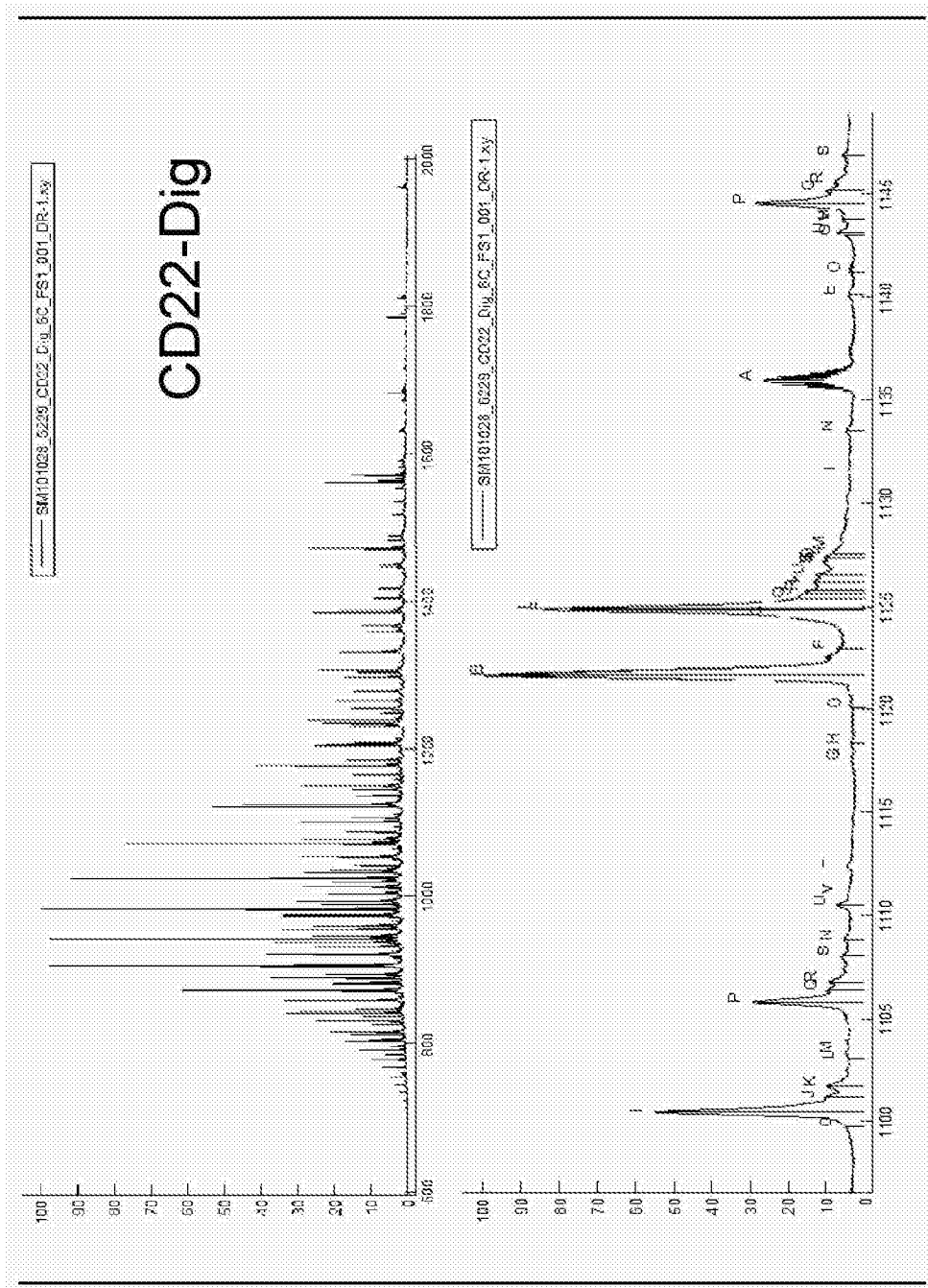


图 13a

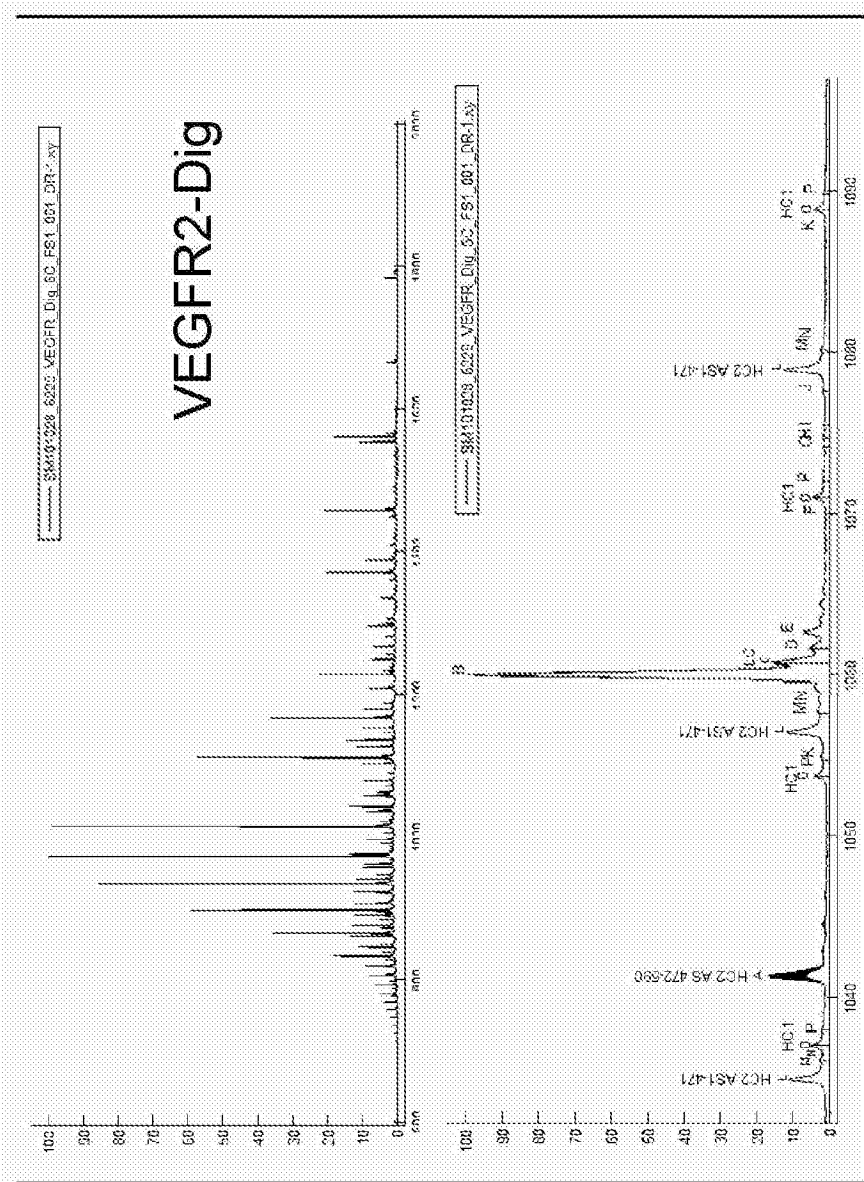


图 13b

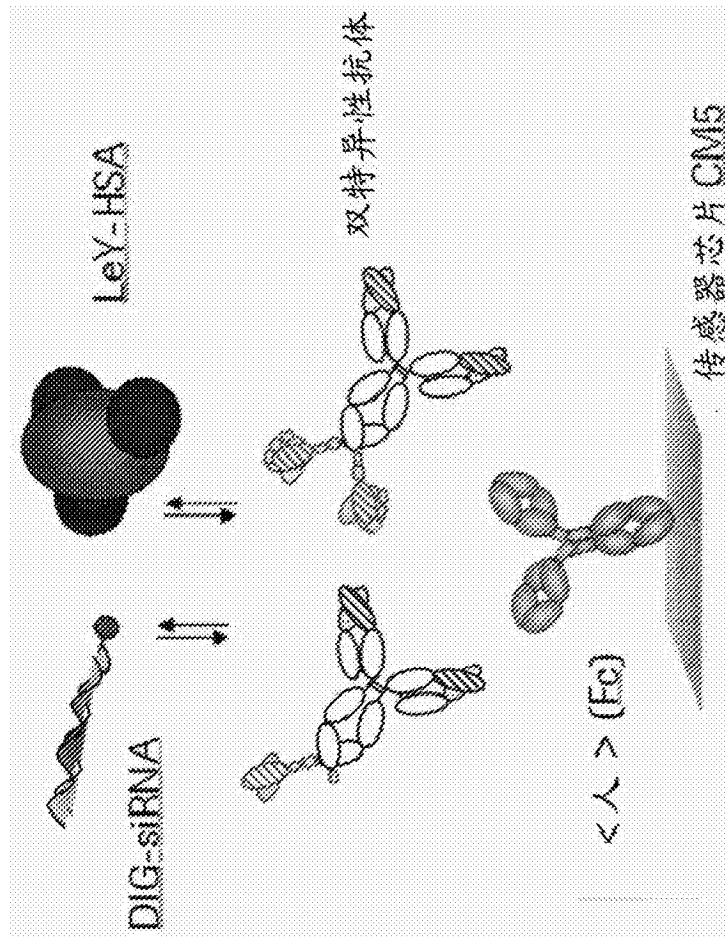


图 14a

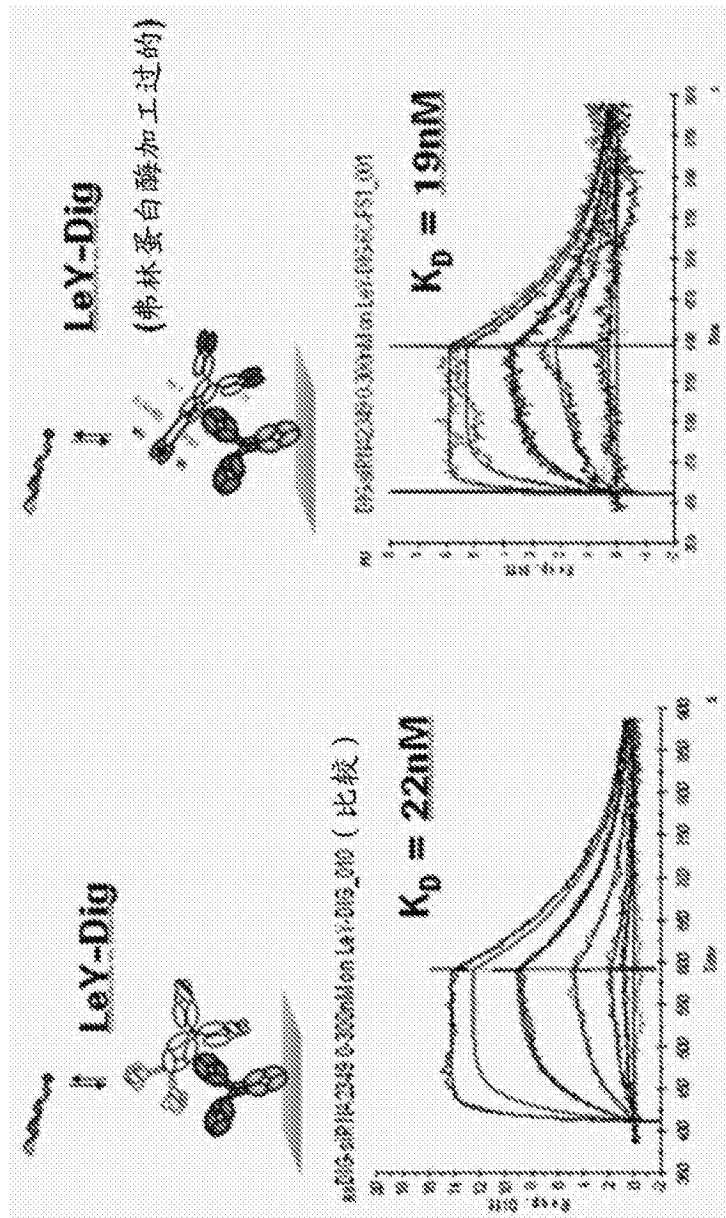


图 14b

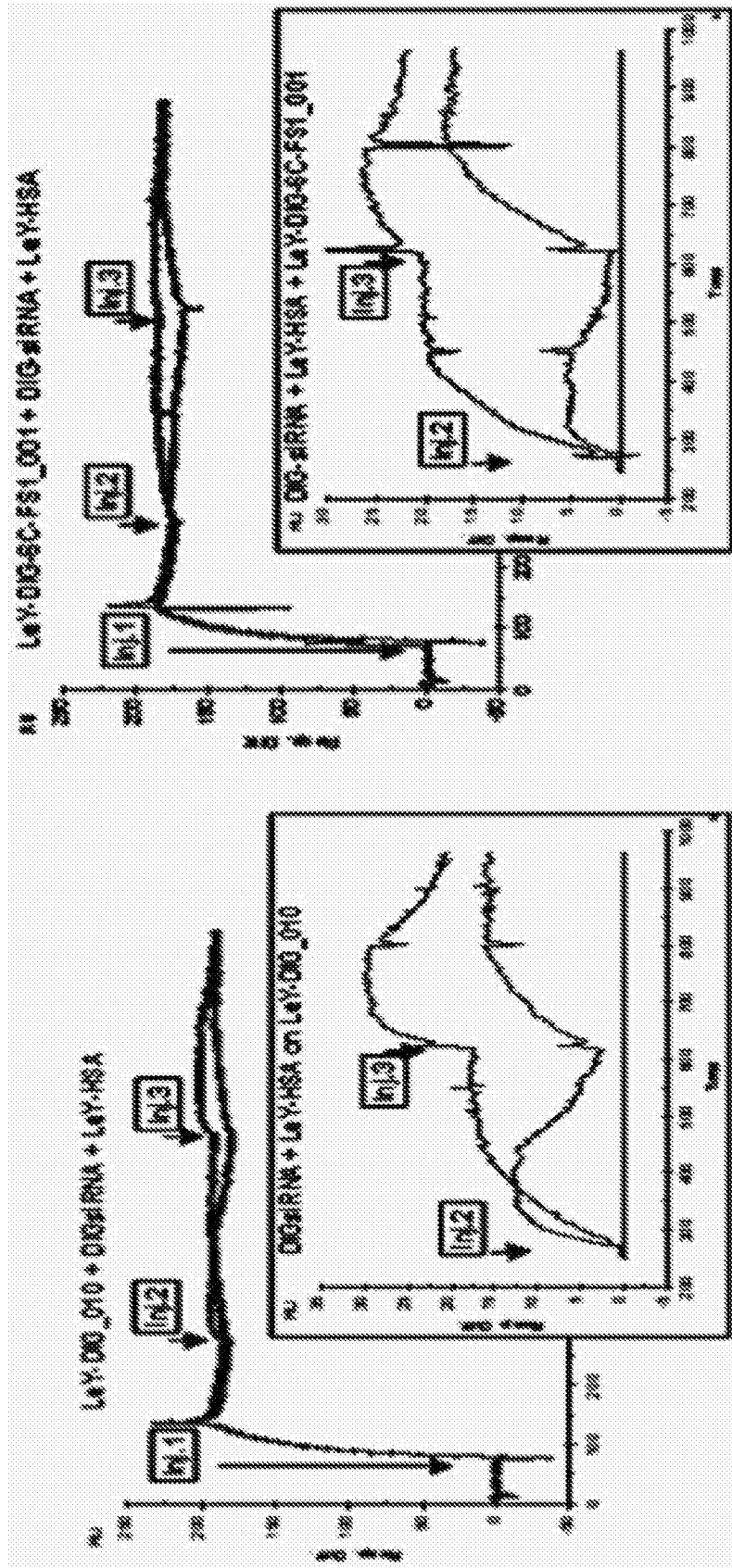


图 14c

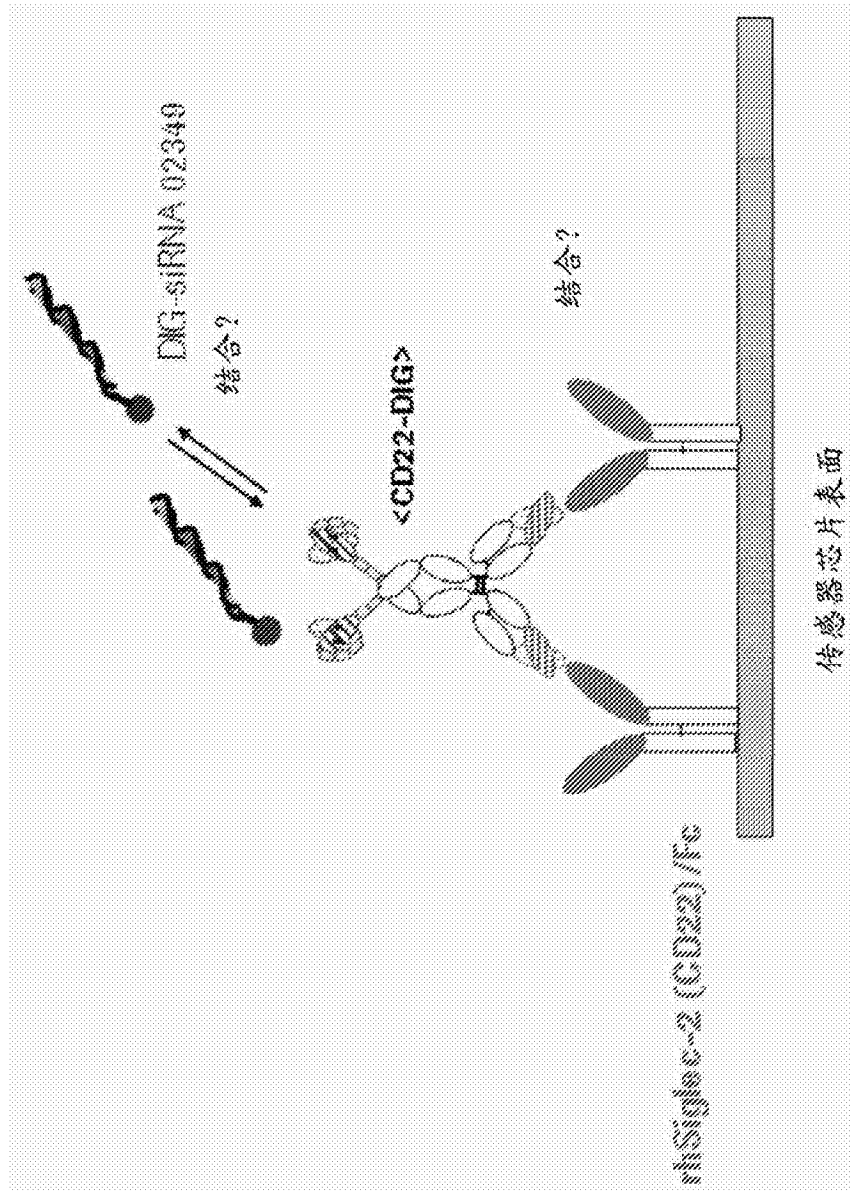


图 15a



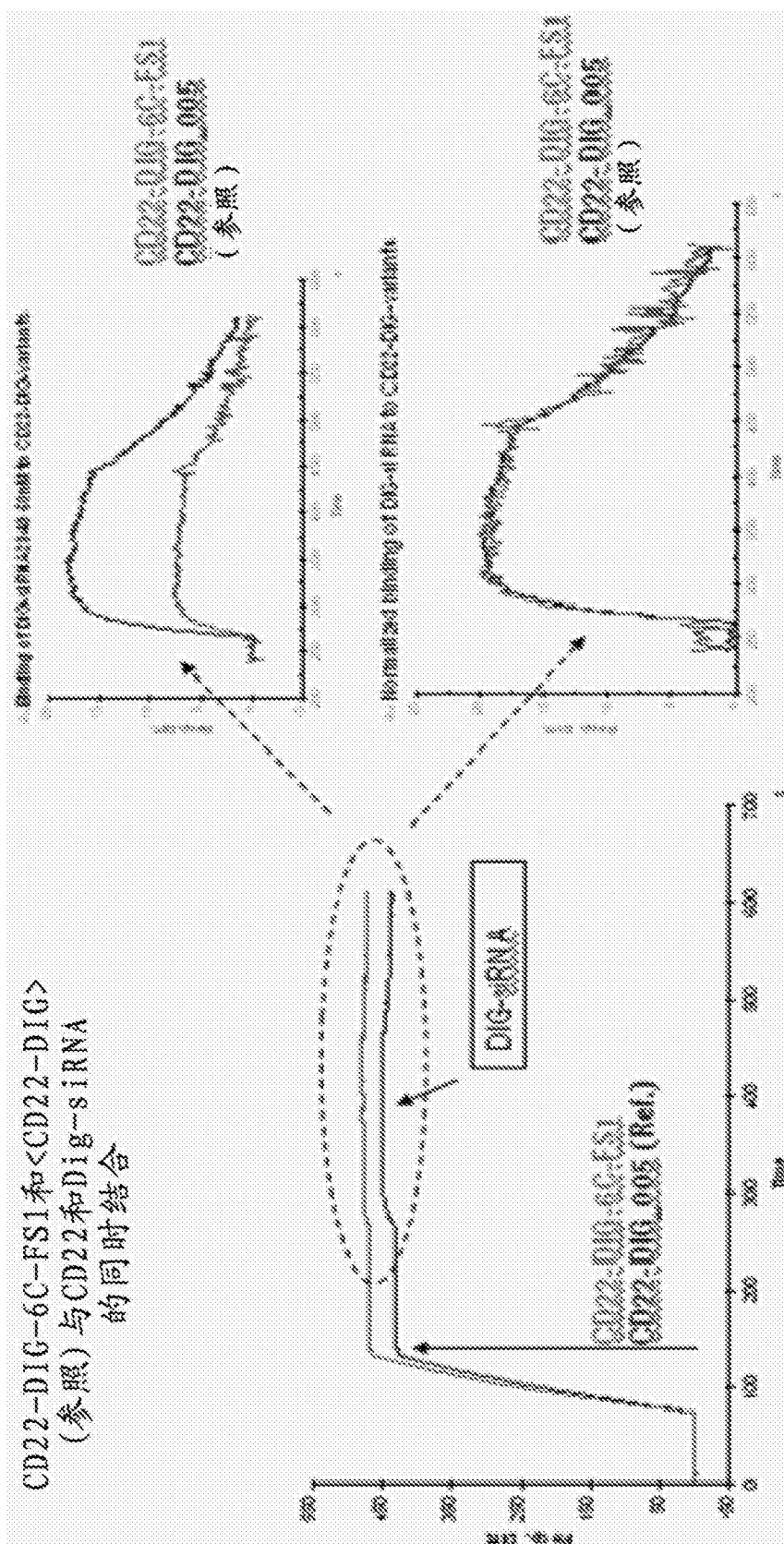


图 15b

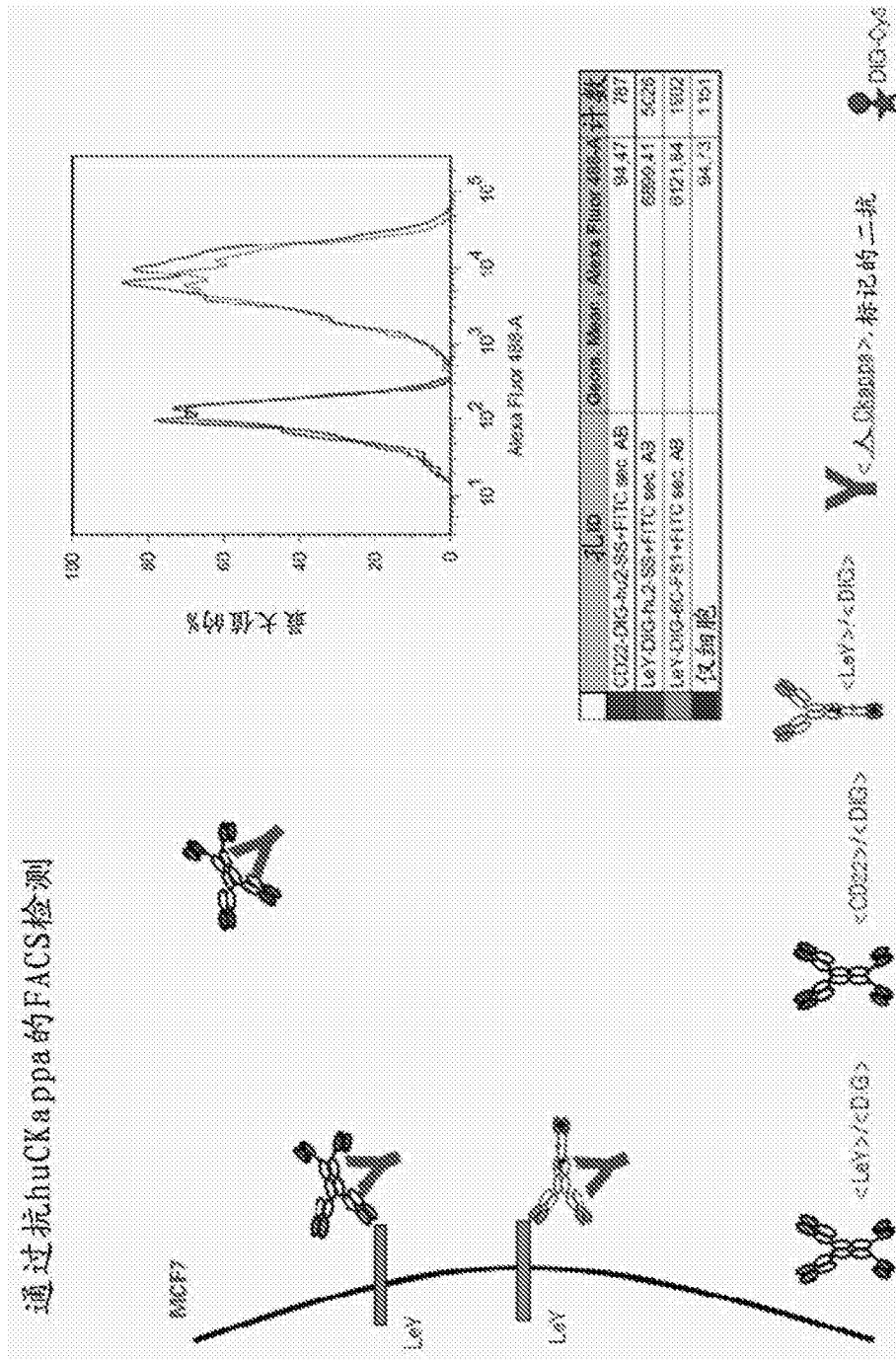


图 16a

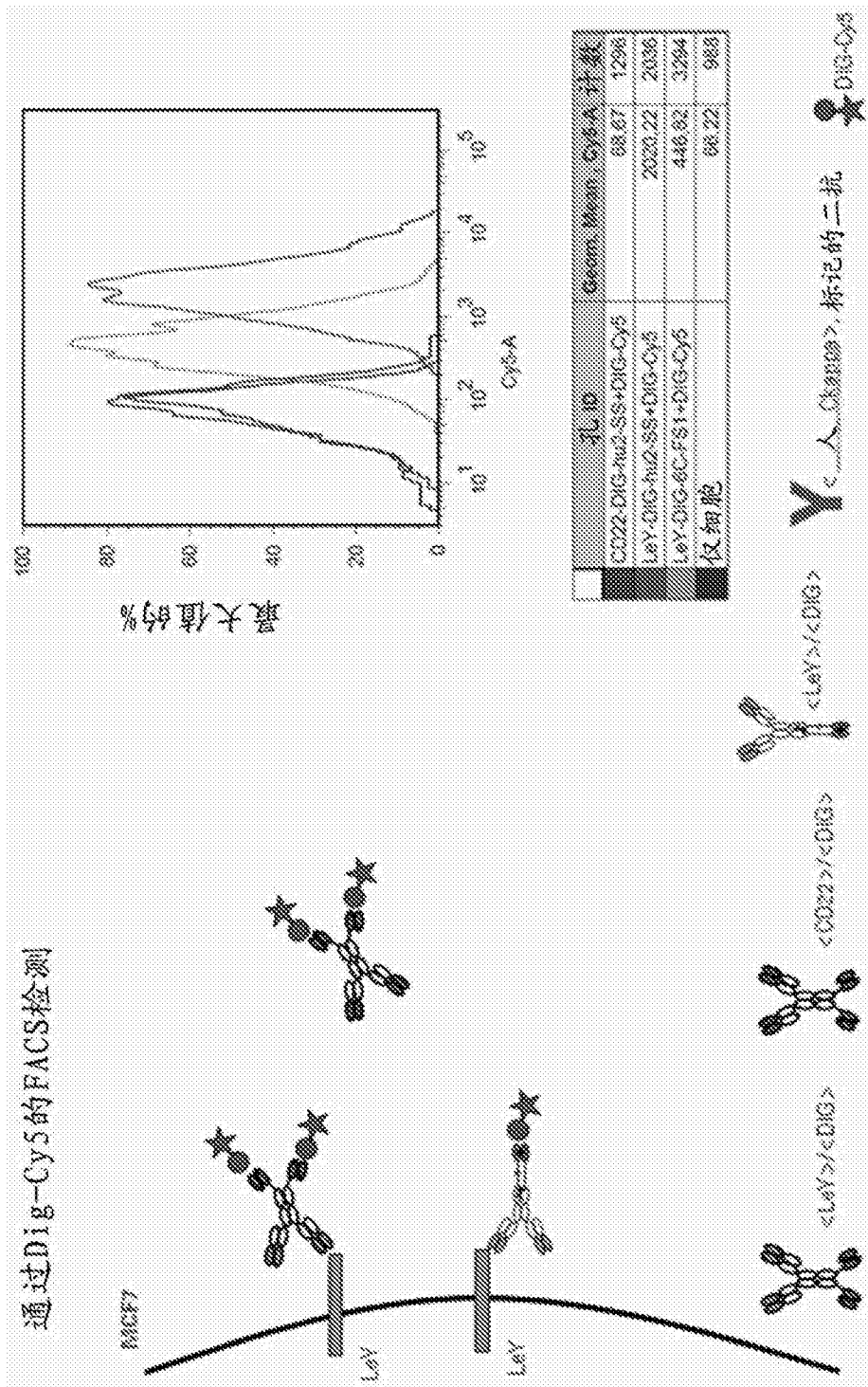


图 16b