



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102802661 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201080027743. 8

(22) 申请日 2010. 06. 21

(30) 优先权数据

61/219, 225 2009. 06. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 12. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/039351 2010. 06. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/005481 EN 2011. 01. 13

(73) 专利权人 米迪缪尼有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 N·迪马斯 C·高

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

A61K 39/00(2006. 01)

C12P 21/08(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2008070593 A2, 2008. 06. 12, 说明书第

【0007】-【0009】、【0026】、【0048】、【0054】、【0059】、【0069】、【0072】-【0074】、【0276】-【0277】、【0295】、【0388】段, 图 2-4、图 11.

WO 2008070593 A2, 2008. 06. 12, 说明书第

【0007】-【0009】、【0026】、【0048】、【0054】、【0059】、【0069】、【0072】-【0074】、【0276】-【0277】、【0295】、【0388】段, 图 2-4、图 11.

US 2006275283 A1, 2006. 12. 07, 说明书第

【0015】、【0078】、【0121】-【0126】、【0204】、【0218】、【0230】、【0270】、【0477】、【0492】、【0513】、【0568】段.

审查员 王胜佳

权利要求书1页 说明书67页 附图30页

(54) 发明名称

用于位点特异性偶联的工程改造的 Fc 区

(57) 摘要

提供用于位点特异性偶联于多种药剂的 Fc 区。还提供用于设计、制备、筛选、选择和使用所述 Fc 区的方法。



1. 一种抗体的 Fc 区,其中所述 Fc 区在位置 289 包含一个取代,其中,所述取代包括取代成半胱氨酸残基或硒半胱氨酸残基;其中,所述 Fc 区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型;其中,异源药剂偶联于该取代的氨基酸。

2. 如权利要求 1 所述的 Fc 区,其特征在于,所述 Fc 区还包含选自位置 330、339、359、440 和 442 的一个氨基酸的取代,其中,所述取代包括取代成半胱氨酸或硒半胱氨酸。

3. 根据权利要求 2 所述的 Fc 区,其中所述 Fc 区包含选自以下的取代对:

a) 289 和 440;

b) 289 和 359;

c) 289 和 339;和

d) 289 和 330。

4. 根据权利要求 2 所述的 Fc 区,其中所述 Fc 区包含选自以下的取代组:

a) 289、339 和 442;

b) 289、330 和 339;和

c) 289、330 和 442。

5. 如权利要求 1、2、3 或 4 所述的 Fc 区,其中异源药剂选自细胞毒性剂、化学治疗剂、毒素、放射性核素、DNA、RNA、肽核酸、非天然氨基酸、肽、酶、荧光标签和生物素。

6. 如权利要求 5 所述的 Fc 区,所述 RNA 是 siRNA。

7. 如权利要求 5 所述的 Fc 区,所述 RNA 是微 RNA。

8. 如权利要求 1—4 中任一项所述的 Fc 区,其中,所述 Fc 区还包含选自位置 234、235 和 331 中的一个或多个氨基酸的取代。

9. 如权利要求 5 所述的 Fc 区,其中,所述 Fc 区还包含选自位置 234、235 和 331 中的一个或多个氨基酸的取代。

10. 如权利要求 8 所述的 Fc 区,其中,所述取代选自 234F、235F、235Y 和 331S。

11. 如权利要求 9 所述的 Fc 区,其中,所述取代选自 234F、235F、235Y 和 331S。

12. 一种 Fc 融合蛋白,其含有权利要求 1—11 中任一项所述的 Fc 区。

13. 一种抗体或其抗原结合片段,其包含根据权利要求 1—11 中任一项所述的 Fc 区。

14. 根据权利要求 13 所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体还包含选自所述抗体的 CH1 结构域的位置 131、132、133、134、135、136、137、138 和 139 的一个或多个氨基酸的取代,所述取代为取代成半胱氨酸残基。

15. 一种组合物,含有权利要求 1—11 中任一项所述的 Fc 区。

16. 一种药物组合物,其包含根据权利要求 13 或 14 所述的抗体或其抗原结合片段。

17. 权利要求 13 或 14 所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于检测受试者的癌症、自体免疫性、炎症性或感染性疾病或病症的试剂盒中的用途。

18. 权利要求 13 或 14 所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗有需要的受试者的癌症、自体免疫性、炎症性或感染性疾病或病症的药物中的用途。

用于位点特异性偶联的工程改造的 Fc 区

[0001] 1. 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2009 年 6 月 22 日提交的美国临时申请 No. 61/219, 225 的优先权, 所述申请的全部内容以引用的方式并入本文。

[0003] 2. 序列表参考

[0004] 本申请以引用的方式并入以文本文件形式与本申请一起提交的序列表, 所述文本文件的名称为“MED0455.PCT_ST25”, 于 2010 年 6 月 14 日创建并且大小为 69 千字节。

[0005] 3. 发明领域

[0006] 本发明涉及产生用于偶联反应的基团的 Fc 区。还提供设计、修饰、制备和使用所述 Fc 区的方法。

[0007] 4. 发明背景

[0008] 4.1 癌症和癌症疗法

[0009] 每年有超过一百二十万美国人患上癌症。在美国癌症是死亡的第二主要病例, 并且如果按照当前趋势继续下去, 那么预期到 2010 年, 癌症将成为死亡的主要原因。在美国, 肺癌和前列腺癌是男性的最大癌症杀手。而肺癌和乳癌是美国女性的最大癌症杀手。在美国, 每两名男性中就有一名在他生命中的某一时间被诊断患有癌症。而在美国, 每三名女性中就有一名在她生命中的某一时间被诊断患有癌症。当前的治疗选择, 如手术、化学疗法和辐射治疗, 经常无效或者存在严重的副反应。

[0010] 开发抗转移剂的一个障碍是用于设计和评估这些药物的测定系统。最常规的癌症疗法靶向快速生长的细胞。然而, 癌细胞并不一定生长得较快, 而是能够在不允许正常细胞存活和生长的条件下存活和生长 (Lawrence 和 Steeg, 1996, World J. Urol. 14 :124-130)。正常细胞和恶性细胞行为之间的这些基本差异对于治疗靶向提供了机会。微转移肿瘤已在体内散布的范例强调需要在外来和三维微环境的情形中评估潜在化学治疗药物。许多标准癌症药物测定测量在典型细胞培养条件 (即, 单层生长) 下的肿瘤细胞生长或存活。然而, 二维测定中的细胞行为通常并不能可靠地预测体内的肿瘤细胞行为。

[0011] 当前, 癌症疗法可能涉及手术、化学疗法、激素疗法和 / 或辐射治疗来根除患者体内的赘生性细胞 (参见, 例如 Stockdale, 1998, “Principles of Cancer Patient Management”, Scientific American :Medicine, 第 3 卷, Rubenstein 和 Federman 编著, 第 12 章, 第 IV 节)。所有这些方法都对患者造成明显的缺陷。例如, 手术可能因患者的健康原因而不能使用或者可能不为患者所接受。另外, 手术可能不能完全去除赘生性组织。辐射疗法仅在赘生性组织显示比正常组织对辐射的敏感性高的时候有效, 并且辐射疗法通常也会引起严重的副作用。激素疗法极少作为单一药剂给予, 并且尽管可能有效, 但通常用于在其它治疗已去除了大部分癌细胞后预防或延迟癌症的复发。

[0012] 关于化学疗法, 有多种可用于治疗癌症的化学治疗剂。很大部分的癌症化学治疗剂是通过抑制 DNA 合成来起作用 (参见, 例如 Gilman 等, Goodman and Gilman's :The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第八版 (Pergamon Press, New York, 1990))。因而, 化学治疗剂在本质上是非特异性的。此外, 几乎所有的化学治疗剂都是有毒性的, 并

且化学疗法会引起明显的并且通常是危险的副作用,包括严重恶心、骨髓抑制、免疫抑制等(参见,例如Stockdale,1998,“Principles Of Cancer Patient Management”,Scientific American Medicine,第3卷,Rubenstein和Federman编著,第12章,第10节)。此外,即使是在施用化学治疗剂的组合时,许多肿瘤细胞也对化学治疗剂具有抗性或者是发展出抗性。

[0013] 癌症疗法现在也可包括生物疗法或免疫疗法。生物疗法/免疫疗法的数量有限,并且尽管相比于化学治疗剂更具特异性,但许多仍同时靶向健康细胞和癌细胞。另外,这些疗法可能产生副作用,如皮疹或肿胀、流感样症状(包括发热、寒颤和疲劳)、消化道问题或过敏反应。

[0014] 4.2 用于治疗癌症的抗体

[0015] 抗体是结合特定抗原的免疫蛋白质。在大多数哺乳动物(包括人和小鼠)中,抗体由成对的多肽重链和轻链构成。各条链由两个不同区构成,称为可变(Fv)区和恒定(Fc)区。轻链和重链Fv区含有分子的抗原结合决定簇并且负责结合靶抗原。Fc区界定抗体(例如IgG)的类别(或同种型)并且负责结合多种天然蛋白质以引发重要的生物化学事件。

[0016] 抗体的Fc区与多种配体(包括Fc受体和其它配体)相互作用,从而赋予一系列重要的功能能力,称为效应功能。IgG类别的一个重要的Fc受体家族是Fc γ 受体(Fc γ R)。这些受体介导抗体与免疫系统的细胞免疫部分之间的通信(Raghavan等,1996,Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220;Ravetch等,2001,Annu Rev Immunol 19:275-290)。在人中,此蛋白质家族包括Fc γ RI(CID64),包括亚型Fc γ RIA、Fc γ RIB和Fc γ RIC;Fc γ RII(CD32),包括亚型Fc γ RIIA、Fc γ RIIB和Fc γ RIIC;和Fc γ RIII(CD16),包括亚型Fc γ RIIIA和Fc γ RIIIB(Jefferis等,2002,Immunol Lett 82:57-65)。这些受体通常具有介导与Fc的结合的细胞外结构域、跨膜区和可能介导细胞内的一些信号转导事件的细胞内结构域。这些不同的Fc γ R亚型在不同的细胞类型上表达(在Ravetch等,1991,Annu Rev Immunol 9:457-492中综述)。例如,在人中,Fc γ RIIIB仅发现于嗜中性粒细胞,而Fc γ RIIIA发现于巨噬细胞、单核细胞、天然杀伤(NK)细胞和T细胞亚群上。

[0017] Fc/Fc γ R复合物的形成将效应细胞募集到被结合抗原的位点,通常在细胞内产生信号转导事件并产生重要的后续免疫反应,如炎症介质释放、B细胞活化、内吞作用、吞噬作用和细胞毒性攻击。介导细胞毒性和吞噬效应功能的能力是抗体破坏靶细胞的潜在机制。其中表达Fc γ R的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上结合的抗体并随后引起靶细胞溶解的细胞介导的反应称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)(Raghavan等,1996,Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220;Ghetie等,2000,Annu Rev Immunol 18:739-766;Ravetch等,2001,Annu Rev Immunol 19:275-290)。很明显,介导ADCC的原代细胞(NK细胞)仅表达Fc γ RIIIA,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII(Ravetch等,1991,同上)。

[0018] 另一重要的Fc配体是补体蛋白C1q。与C1q结合的Fc介导称为补体依赖性细胞毒性(CDC)的过程(在Ward等,1995,Ther Immunol 2:77-94中综述)。C1q能够结合六个抗体,不过与两个IgG结合即足以活化补体级联。C1q与C1r和C1s丝氨酸蛋白酶形成复合物以形成补体路径的C1复合物。

[0019] 抗体的若干种关键特征,包括但不限于对靶标的特异性、介导免疫效应机制的能

力和在血清中的长半衰期,使得抗体和相关免疫球蛋白分子成为功效强大的治疗剂。当前有多种单克隆抗体正在开发,或者正在治疗上用于治疗包括癌症在内的多种病状。其实例包括Herceptin® (Genentech),一种批准用于治疗乳腺癌的人源化抗 Her2/neu 抗体(例如, U. S. 5, 677, 171);CNT0 95 (Centocor),一种人整联蛋白 αv 抗体(PCT 公布 W0 02/12501);Rituxan® (IDEC/Genentech/Roche),一种批准用于治疗非霍奇金氏淋巴瘤的嵌合抗 CD20 抗体(例如, U. S. 5, 736, 137);和 Erbitux® (ImClone),一种嵌合抗 EGFR 抗体(例如, U. S. 4, 943, 533)。

[0020] 存在多种抗体借以破坏肿瘤细胞的可能机制,包括通过阻断需要的生长路径的抗增殖、引起细胞凋亡的细胞内信号转导、增强受体的下调和/或周转、ADCC、CDC 和促进适应性免疫反应(Cragg 等,1999, Curr Opin Immunol 11:541-547;Glennie 等,2000, Immunol Today 21:403-410)。然而,尽管使用广泛,但抗体对于临床使用来说并未得到充分优化并且许多具有并非最理想的抗癌效力。因此,明显需要增强抗体破坏靶标癌细胞的能力。

[0021] 4.3 抗体偶联物

[0022] 在癌症的治疗中使用抗体偶联物(即免疫偶联物)进行细胞毒性剂或细胞抑制剂(即药物)的局部递送以杀死或抑制肿瘤细胞(Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549;Wu 等(2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146;Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212;Syrigos 和 Epenetos(1999) Anticancer Research 19:605-614;Niculescu-Duvaz 和 Springer(1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172;美国专利 No. 4, 975, 278) 可以允许将药物部分靶向递送到肿瘤并在其中发生细胞内积累,其中这些未偶联药剂的全身性施用可能对正常细胞以及试图被消除的肿瘤细胞造成程度上不可接受的毒性(Baldwin 等(1986) Lancet 第(1986年3月15日):603-05页;Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review," in Monoclonal Antibodies / 84:Biological And Clinical Applications, A. Pinchera 等(编著),第475-506页)。由此试图以最低的毒性达到最大的功效。设计和改进抗体偶联物的努力已集中于单克隆抗体(mAb)的选择性以及药物连接和药物释放性质(Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549)。已报道多克隆抗体和单克隆抗体都适用于这些策略中(Rowland 等(1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)。这些方法中所用的药物包括道诺霉素(daunomycin)、多柔比星(doxorubicin)、甲氨蝶呤(methotrexate)和长春地辛(vindesine)(Rowland 等(1986))。抗体-毒素偶联物中所用的毒素包括细菌毒素(如白喉毒素)、植物毒素(如蓖麻毒素和白树毒素(gelonin))、小分子毒素(如格尔德霉素(geldanamycin)(Mandler 等(2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581;Mandler 等(2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028;Mandler 等(2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、类美坦素(maytansinoid)(EP 1391213;Liu 等(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)和卡奇霉素(calicheamicin)(Lode 等(1998) Cancer Res. 58:2928;Hinman 等(1993) Cancer Res. 53:3336-3342)。毒素可以通过包括微管蛋白结合、DNA 结合或拓扑异构酶抑制在内的机制影响其细胞毒性和细胞抑制作用。一些细胞毒性药物在偶联于较大抗体或蛋白质受体配体时倾向于不具活性或活性较低。

[0023] 已有若干种抗体偶联物获得了 FDA 的批准或者正在进行临床试验。例如,

ZEVALIN® (替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idex) 由针对发现于正常和恶性 B 淋巴细胞表面上的 CD20 抗原的鼠 IgG1 κ 单克隆抗体与通过硫脲连接子 - 螯合剂结合的 ¹¹¹In 或 ⁹⁰Y 放射性同位素构成 (Wiseman 等 (2000) Eur. J. Nucl. Med. 27(7) :766-77; Wiseman 等 (2002) Blood 99(12) :4336-42; Witzig 等 (2002) J. Clin. Oncol. 20(10) :2453-63; Witzig 等 (2002) J. Clin. Oncol. 20(15) :3262-69)。尽管 ZEVALIN® 具有针对 B 细胞非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL) 的活性, 但施用在大多数患者中造成严重和长期的血球减少。MYLOTARG® (吉妥单抗 (gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals), 一种由人 CD33 抗体连接于卡奇霉素构成的抗体 - 药物偶联物, 也在 2000 年被批准用于通过注射治疗急性骨髓性白血病 (Drugs of the Future (2000) 25(7) :686; 美国专利 No. 4,970,198; No. 5,079,233; No. 5,585,089; No. 5,606,040; No. 5,693,762; No. 5,739,116; No. 5,767,285; No. 5,773,001)。

[0024] 奥瑞他汀 (auristatin) 肽, 奥瑞他汀 E(AE) 和单甲基奥瑞他汀 (MMAE) 是多拉司他汀 (dolastatin) 的合成类似物 (WO 02/088172), 已被偶联于: (i) 嵌合单克隆抗体 cBR96 (对肿瘤上的 Lewis Y 具有特异性); (ii) cAC10, 其对血液恶性肿瘤上的 CD30 具有特异性 (Klussman 等 (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4) :765-773; Doronina 等 (2003) Nature Biotechnology 21(7) :778-784; Francisco 等 (2003) Blood 102(4) :1458-1465; US 2004/0018194; (iii) 抗 CD20 抗体, 如 RITUXAN® (WO 04/032828) 用于治疗表达 CD20 的癌症和免疫病症; (iv) 抗 EphB2R 抗体 2H9 和抗 IL-8, 用于治疗结肠直肠癌 (Mao 等 (2004) Cancer Research 64(3) :781-788); (v) E-选择素抗体 (Bhaskar 等 (2003) Cancer Res. 63 :6387-6394); 和 (vi) 其它抗 CD30 抗体 (WO 03/043583)。奥瑞他汀 E 的变体公开于美国专利 No. 5,767,237 和美国专利 No. 6,124,431 中。偶联于单克隆抗体的单甲基奥瑞他汀 E 公开于 2004 年 3 月 28 日提交的 Senter 等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, 第 45 卷, 第 623 号摘要中。奥瑞他汀类似物 MMAE 和 MMAF 已被偶联于各种抗体 (WO 2005/081711)。

[0025] 连接 (即通过共价键连接) 药物部分与抗体的常规手段可能产生其中药物部分连接于抗体上多个位点的分子的异质混合物。例如, 细胞毒性药物一般通过抗体中通常大量的赖氨酸或半胱氨酸残基偶联于抗体, 从而产生异质抗体 - 药物偶联物混合物。根据反应条件, 异质混合物通常含有具有 0 至约 8 个或者更多的连接接药物部分的抗体的分布。此外, 在药物部分与抗体具有特定整数比率的偶联物的各亚群中, 可能存在其中药物部分连接于抗体上的不同位点的异质混合物。

[0026] 半胱氨酸硫醇在中性 pH 值下具有反应性, 这一点不同于在 pH7 附近被质子化并且具有较低亲核性的大多数胺。因为硫醇基 (R-SH, 巯基) 相对具有反应性, 所以具有半胱氨酸残基的蛋白质通常以其氧化形式作为二硫键连接的寡聚物存在或者具有内部桥接二硫键。细胞外蛋白质一般不具有游离硫醇 (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling : A Practical Approach, Academic Press, London, 第 55 页)。蛋白质中游离硫醇的量可通过标准埃尔曼测定进行估算。IgM 是二硫键连接的五聚体的一个实例, 而 IgG 是具有将亚单位结合在一起的内部二硫桥的蛋白质的一个实例。在如此的蛋白质中, 可使用试剂 (如二硫苏糖醇 (DTT)、硒醇 (Singh 等 (2002) Anal. Biochem. 304 :147-156) 和三-(2-羧基乙基) 膦 (TCEP)) 将二硫键还原产生反应性硫醇。

[0027] 抗体半胱氨酸硫醇基对于亲电子性偶联试剂一般比抗体氨基或羟基更具反应性,即更具亲核性。已通过基因工程技术在蛋白质中引入半胱氨酸残基以与配体形成共价连接或形成新的分子内二硫键 (Better 等 (1994) *J. Biol. Chem.* 13 :9644-9650 ;Bernhard 等 (1994) *Bioconjugate Chem.* 5 :126-132 ;Greenwood 等 (1994) *Therapeutic Immunology* 1 :247-255 ;Tu 等 (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 :4862-4867 ;Kanno 等 (2000) *J. of Biotechnology*, 76 :207-214 ;Chmura 等 (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98(15) :8480-8484 ;美国专利 No. 6, 248, 564)。然而,通过使蛋白质的各种氨基酸残基突变成半胱氨酸氨基酸来设计半胱氨酸硫醇基可能存在问题,尤其是在不配对(游离 Cys) 残基或者相对易于发生反应或氧化的情况下。在蛋白质浓溶液中,不管是在大肠杆菌 (*E. coli*) 的周质、培养物上清液或是在部分或是在完全纯化的蛋白质中,蛋白质表面上的未配对 Cys 残基都可以配对和氧化以形成分子间二硫键,并因此形成蛋白质二聚体或多聚体。二硫键二聚体的形成使得新 Cys 对于与药物、配体或其它标记的偶联不起反应。此外,如果蛋白质在新近工程改造的 Cys 与现有 Cys 残基之间氧化形成分子内二硫键,那么这两个 Cys 基团都不可用于参与活性位点和相互作用。此外,通过错误折叠或丧失三级结构可能使蛋白质失活或无特异性 (Zhang 等 (2002) *Anal. Biochem.* 311 :1-9)。

[0028] 半胱氨酸不是唯一可用于偶联的氨基酸,并且也可以使用其它氨基酸,如赖氨酸、酪氨酸、组氨酸、硒半胱氨酸、硒甲硫氨酸和其它氨基酸。

[0029] 先前已经尝试试图将偶联位点工程改造到抗体中。美国专利 No. 5, 219, 916 描述对“表面口袋”残基进行的修饰,如 Ser 156 或 Thr173(根据 Kabat 等, *Sequences of Immunological Interest*, 第4版, US Dept. of Health and Human Services, 1987)。在相关研究中,研究人员确定仅“表面口袋”上的残基能够支持试图工程改造偶联位点的半胱氨酸取代 (Lyons 等 (1990) *Protein Eng.* 3 :8 pg 703-708)。

[0030] 因此,需要开发提供能够与各种药剂偶联的反应性基团的稳定的工程改造的抗体,包括提供能够与各种药剂偶联的硫醇基的工程改造的抗体。

[0031] 本文中对参考文献的引述或论述不应解释为承认这些参考文献是本发明的现有技术。

[0032] 5. 概述

[0033] 本发明提供含有能够与各种药剂偶联的非天然存在的(即,它们通常不存在于蛋白质中的那个位置)氨基酸残基(其可为天然的和/或合成的)的 Fc 区。这种取代的一个实例是使用半胱氨酸,然而如下文所述,也可以使用其它取代,如赖氨酸、酪氨酸、组氨酸、硒半胱氨酸、硒甲硫氨酸和其它氨基酸。

[0034] 本发明的 Fc 区包含被一个或多个非天然存在的氨基酸取代的来自抗体的重链的 Fc 区的一个或多个氨基酸,由此提供能够偶联的基团。在本发明的一个方面,取代是用半胱氨酸,由此取代的半胱氨酸氨基酸残基提供硫醇基用于偶联。

[0035] 在一个实施方案中,本发明的 Fc 区包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 个或更多个取代的氨基酸。在其它实施方案中,本发明的 Fc 区包括以下 Fc 区,其中选自亲本或天然抗体的抗体重链的位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 个或更多个氨基酸或者可选地被非天然存在的氨基酸

取代,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 等 (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA, 下文称为“Kabat”) 中所述的 EU 指数编号系统。“如 Kabat 中所述的 EU 指数”是指如 Kabat 等 (同上) 中所述的人 IgG1 EU 抗体的残基编号。

[0036] 在一个实施方案中,本发明的 Fc 区构成抗体。

[0037] 在一个实施方案中,本发明提供包含 SEQ ID NO :1-24 的氨基酸序列的 Fc 区。在另一实施方案中,本发明提供包含由 SEQ ID NO :1-24 所例示的任何取代的任何组合的 Fc 区。

[0038] 在一个实施方案中,本发明提供包含 SEQ ID NO :1-24 的氨基酸序列的抗体。在另一实施方案中,本发明提供包含由 SEQ ID NO :1-24 所例示的任何取代的任何组合的 Fc 区。

[0039] 本发明的另一方面提供用于产生 Fc 区的核酸、载体和宿主细胞。

[0040] 本发明的另一方面提供 Fc 区偶联物和制备包含偶合于一种或多种其它物质的本发明的 Fc 区的所述偶联物的方法。在一个实施方案中,所述物质是药物,其中所述药物选自细胞毒性剂、化学治疗剂、肽、模拟肽、蛋白质骨架、酶、毒素、放射性核素、DNA、RNA、siRNA、微 RNA、肽核酸、荧光标签或生物素。

[0041] 本发明的另一方面提供包含本发明的 Fc 区的抗体,其中所述抗体在结合至细胞表面受体时能够内化。在所述方面,本发明的抗体适用于将货物分子和 / 或药剂递送到细胞内。

[0042] 本发明的另一方面提供利用本发明的抗体偶联物治疗、检测和诊断癌症、自体免疫性疾病、炎症性疾病或感染性疾病的方法。

[0043] 本发明的另一方面提供包含本发明的 Fc 区的组合物。

[0044] 6. 附图简述

[0045] 图 1. Fc 区表面半胱氨酸工程改造。此图为 IgG1 Fc 结构域的带状表示,其中对表面位点特异性突变进行了图形标记并且以棒状形式显示。在此带状表示中,对 CH2 和 CH3 结构域进行了图形标记。糖链显示为棒状表示。二十个半胱氨酸工程改造突变 ND2 至 ND21 显示为棒状表示并且在括号中用各自的克隆名称进行了图形标记,其中 ND1 代表天然抗体。其编号基于如 Kabat 中所述的 EU 指数。

[0046] 图 2. 蛋白质 A 纯化的 Fc- 半胱氨酸突变体在还原条件下的 SDS-PAGE。所有突变体和野生型蛋白质利用蛋白质 A 进行纯化,透析至 PBS 1X 10mM EDTA (pH 7.2) 中,并在还原和非还原条件下在 10% 均质 SDS-PAGE 上进行分析。使用 SeeBlue Plus2 (Invitrogen) 分子量标准 (kDa, 如图中所示)。装载 3 μ g 各样品并使用 SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) 对凝胶进行染色。样品在图上进行图形标记并且对应于图 1 中所呈现的克隆名称。此 SDS-PAGE 分析证实,重组蛋白质保留其预期的分子量。

[0047] 图 3(a-d). 抗体突变体的尺寸排阻色谱。所有突变型蛋白质利用蛋白质 A 进行纯化,透析至 PBS 1X 10mM EDTA (pH 7.2) 中,并在 SEC-HPLC 上进行分析。样品的标识对应于图 1 中呈现的克隆名称。标准蛋白质的峰位置 (虚线色谱图) 从右至左为甲状腺球蛋白 670KDa ;2, 牛 γ -球蛋白 158KDa ;3, 鸡卵清蛋白 44KDa ;4, 马肌红蛋白 17KDa ;5, 维生素 B12 13.5KDa。突变型抗体的保留时间为约 8.6 分钟,此对应于约 150KDa 的分子量。还示出了各突变体的单体含量的百分比。此分析证实,重组蛋白质除保留其预期分子量外,并不因所

引入的半胱氨酸而形成二硫键连接的同源二聚体。

[0048] 图 4(a-c). 重链恒定结构域序列。图 4 示出 ND1(天然)的重链恒定结构域序列的序列。图 4a 示出变体 ND2 至 ND6 的序列。图 4b 示出变体 ND7 至 ND11 的序列。图 4c 示出变体 ND12 至 ND16 的序列。图 4d 示出变体 ND17 至 ND21 的序列。ND2 至 ND21 中所引入的点突变以下划线和粗体显示。

[0049] 图 5. Fc 结构域变体的表达。示出 Fc 半胱氨酸变体的重组表达。各变体的表达水平和天然 ND1 相似。除变体 ND5 外的所有变体还以等于或大于 93% 的单体表达(通过 SEC-HPLC 测定)。

[0050] 图 6. Fc 结构域变体与 FcRn 的结合。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)来测定半胱氨酸 Fc 工程改造变体与 FcRn 的结合。除呈 70% 单体的变体 ND5(D312C)和非糖基化变体 ND20(N297C)以外,所有变体保持与天然抗体 ND1 类似的与 FcRn 的结合信号。

[0051] 图 7. 差示扫描热量法(DSC)分析。使用缓冲液 25mM His(pH 6.0)在 15°C 至 110°C 的范围内以 1°C/min 的速率进行 ND1-21 的 DSC 分析。除变体 ND5(D312C)、ND11(E356C)和 ND20(N297C)外的变体具有与天然 ND1 类似的 DSC 曲线。

[0052] 图 8. 偶联方案。示出 1mg 标度的 D1-21 的使生物素-PEG2-马来酰亚胺与抗体 Fc 半胱氨酸偶联的各种方案。除非另外规定外,否则所示的摩尔过量相对于抗体摩尔数。

[0053] 图 9. 来自偶联方案 D 的样品的还原蛋白质凝胶的蛋白质印迹。变体和天然蛋白质利用蛋白质 A 进行纯化,并透析至 PBS 1X 10mMEDTA(pH 7.2)中。编号 1-21 分别对应于 ND1-21。M 是分子量标准。首先在 NuPage 10%凝胶上通过 SDS-PAGE 对样品进行分析。具有转移的蛋白质的印迹在 TBST 2% BSA 中阻断,与抗生物素蛋白-HRP 一起孵育,并用 HRP 的显色底物使其显色。HC 是对应于抗体重链的蛋白质条带,而 LC 是对应于抗体轻链的蛋白质条带。多个变体的重链上存在明显偶联(尤其是 ND2、3、4、6、7、8、9、10、11、12、18、19),而 ND1(天然)的 HC 上没有可以检测到的偶联。在包括 ND1 在内的所有变体的 LC 上存在一些偶联。

[0054] 图 10. 来自偶联方案 D 的样品的考马斯亮蓝染色的非还原蛋白质凝胶。变体和野生型蛋白质利用蛋白质 A 进行纯化,透析至 PBS 1X10mM EDTA(pH 7.2)中,并在非还原条件下在 10%均质 SDS-PAGE 上进行分析。使用 SeeBlue Plus2(Invitrogen)分子量标准。装载 3 μg 各样品并使用 SimplyBlue™ SafeStain(Invitrogen)对凝胶进行染色。编号 1-21 分别对应于 ND1-21。M 是分子量标准。大部分偶联变体显示类似于天然 ND1 的电泳迁移率图谱。若干偶联变体含有一些明显的二聚体(ND 3、5、13、15、17、18、19),而一种变体显示一些明显的断裂(ND 20)。

[0055] 图 11. 通过方案 D 偶联的 ND 变体的完整质量和肽图数据汇总。变体 ND4、7、10、12、18 在工程改造半胱氨酸上具有接近或大于 90% 的偶联,且显示没有或极少寡聚化。DAR 是偶联样品的药物与抗体摩尔比。

[0056] 图 12. 双重变体。基于所选单一变体设计十一个双重变体。图上方左边的表格示出用于产生双重变体的单一变体的组合。

[0057] 图 13. 双重变体的表达。基于所选单一变体 ND4、ND7、ND10、ND12、ND18 制备一组 11 种双重 ND 变体,并基于 ND10 和 ND19 制备另一组双重变体。所有双重变体通过瞬时转染充分表达。这些双重变体中仅四种 DM8、DM9、DM10、DM11 以高于 93% 的单体水平表达和纯化

(通过尺寸排阻色谱连同紫外线检测 (SEC-UV) 进行测定)。

[0058] 图 14. 非还原 SDS-PAGE 上双重 ND 变体的比较。“C”是用作对照的天然 ND1。“M”是分子量标准。编号 1-10 对应于 DM1-10。SDS-PAGE 结果与 SEC-UV 结果一致。变体 DM4 所具有的单体量最少,而 DM8 所含的单体的百分比最大。

[0059] 图 15. 双重变体的 DSC 分析。四种单体最多 (> 93%) 的双重变体显示 DSC 曲线极其类似于天然蛋白质和单一变体 ND10。

[0060] 图 16. 双重变体的偶联。使用方案 D(参见图 8)、10 : 1 的生物素 - 马来酰亚胺 : 抗体比率和 20 : 1 的生物素 - 马来酰亚胺 : 抗体比率的双重变体 DM8 (ND4 和 ND10) 和 DM11 (ND10 和 ND19) 的偶联。示出进行了蛋白质印迹和考马斯亮蓝染色的还原凝胶。

[0061] 图 17. 如图 16 中所述偶联的双重变体的完整质量和肽图数据。DM8 (ND4 和 ND10) 和 DM11 (ND10 和 ND19) 在利用 10 : 1 生物素 - 马来酰亚胺 : 抗体比率或 20 : 1 生物素 - 马来酰亚胺 : 抗体比率时在工程改造半胱氨酸处具有接近或大于 90% 的偶联。DAR 是偶联样品的药物与抗体摩尔比。

[0062] 图 18. 单一和双重 ND 变体的偶联。使用偶联方案 D(图 8), 例外为在 TCEP 处理后采用强度更高的过夜透析和在室温下偶联 1 小时。单一变体的药物 : mAb 摩尔比是 10 : 1, 而双重变体的药物 : mAb 摩尔比是 20 : 1。示出进行了蛋白质印迹和考马斯亮蓝染色的还原凝胶以及用考马斯亮蓝染色的非还原凝胶。

[0063] 图 19. 单一和双重变体的肽图。通过肽图分析对上图 18 示出的偶联样品进行分析。此表汇总工程改造半胱氨酸处的偶联效率, 以及总体药物与抗体比率 (DAR)。DM9”是使用相同突变第二次制备的 DM9。

[0064] 图 20. 规模放大的偶联实验。以 (a) 2.5、(b) 5、(c) 10、(d) 20 和 (e) 40mg/ml 的抗体进行偶联。使用如图 18 所述的偶联方案。药物 : mAb 摩尔比是 10 : 1。在蛋白质凝胶中, C 是天然 ND1。示出进行了蛋白质印迹和考马斯亮蓝染色的还原凝胶以及用考马斯亮蓝染色的非还原凝胶。

[0065] 图 21. 规模放大的偶联的肽图。通过肽图分析对来自前述 20 的偶联样品进行分析。示出偶联效率结果。

[0066] 图 22. 三重变体。此图说明在基于单一变体的四种三重变体中选择用于突变的残基。图上方左边的表格示出用于产生三重变体的变体组合。

[0067] 图 23. 四种三重变体的表达和单体水平。由 0.5L 培养物纯化蛋白质。单体水平利用 SEC-HPLC 进行测定。为进行比较, 天然抗体 ND1 具有 99% 单体。

[0068] 图 24. 三重变体与生物素马来酰亚胺的偶联。使用方案 D 以及在室温下偶联 1 小时和 1 : 20 的抗体 : 药物摩尔比。偶联 T1 的两种不同蛋白质制剂。天然 ND1 和双重变体 DM11 包括在内作为偶联特异性和效率的对照。示出进行了蛋白质印迹和考马斯亮蓝染色的还原凝胶以及用考马斯亮蓝染色的非还原凝胶。

[0069] 图 25. 三重变体的肽图。通过肽图分析对来自上图 24 的偶联三重变体进行分析。呈现工程改造半胱氨酸处的偶联效率。

[0070] 图 26. 三重变体的 DSC 分析。T1 显示在第一次转变时解链温度有稍许程度的降低, CH2。T2 显示在 85°C 下有一些沉淀。T3 在高温下沉淀。T4 近乎与天然蛋白质相同。

[0071] 7. 详细描述

[0072] 本发明是基于如下的发现,存在于抗体的 CH2 或 CH3 结构域的表面上的残基(参见图 1)适合于用例如半胱氨酸取代天然氨基酸,并且用于对能够与各种药剂偶联的位点进行工程改造。

[0073] 除半胱氨酸以外的其它氨基酸,包括天然和/或非天然氨基酸,也可用于取代以允许各种药剂的偶联。这些其它氨基酸包括赖氨酸(描述于 Benhar 等,(1994)Bioconjug. Chem. 55,321-326 中)、酪氨酸(描述于 Byers 和 Baldwin,(1988)Immunology. 65,329-335 中)、组氨酸(描述于 Waibel 等(1999)Nature Biotechnol. 17 :897-901 中)、硒半胱氨酸、硒甲硫氨酸和/或非天然氨基酸。因此,在本文中描述一个或多个半胱氨酸取代的情况中,本领域的普通技术人员可以任选地采用这些天然和/或非天然氨基酸中的一个或多个替代半胱氨酸。本领域的普通技术人员还可以在取代中使用氨基酸的任何组合,如用半胱氨酸和赖氨酸取代以产生在一些位置被半胱氨酸取代而在其它位置被赖氨酸取代的抗体变体。

[0074] 本发明的 Fc 区包括工程改造的抗体,其中选自亲本、天然或野生型抗体的抗体重链的位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 个或多个氨基酸被另一种氨基酸(包括天然和合成氨基酸)取代,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 等(1991,NIH Publication 91-3242,National Technical Information Service, Springfield,VA,下文称为“Kabat”)所述的 EU 指数编号系统。应注意,单一取代,例如半胱氨酸残基,通常由于 IgG 分子的同源二聚体性质而导致在所得抗体中呈现两个相应的残基。本发明的所得工程改造的抗体可呈现至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40 个或多个反应性基团用于偶联药物或化合物的目的。在一实施方案中,一个或多个取代是半胱氨酸取代,并且所得工程改造的抗体可呈现至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40 个或多个硫醇基用于偶联药物或化合物的目的。

[0075] 在一些实施方案中,本发明的工程改造的抗体在选自抗体重链的 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的位置包含至少一个取代,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 等(同上)中所述的 EU 指数编号系统。在其它实施方案中,本发明的工程改造的抗体包含选自抗体重链的位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的至少两个取代,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。在其它实施方案中,本发明的工程改造的抗体包含选自抗体重链的位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的至少三个取代,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。在其它实施方案中,本发明的工程改造的抗体包含选自抗体重链的位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的至少四个取代,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。在其它实施方案中,本发明的工程改造的抗体包含选自抗体重链的位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的至少五个取代,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。

282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 中的每一者处包含取代,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。

[0076] 在一个实施方案中,工程改造的抗体包含以下取代对:

[0077] a) 289 和 440 ;

[0078] b) 330 和 440 ;

[0079] c) 339 和 440 ;

[0080] d) 359 和 440 ;

[0081] e) 289 和 359 ;

[0082] f) 330 和 359 ;

[0083] g) 339 和 359 ;

[0084] h) 289 和 339 ;

[0085] i) 330 和 339 ;

[0086] j) 289 和 330 ;和

[0087] k) 339 和 442。

[0088] 在另一实施方案中,工程改造的抗体包含一个或多个以下取代组:

[0089] a) 289、339 和 442 ;

[0090] b) 289、330 和 339 ;

[0091] c) 330、339 和 442 ;和

[0092] d) 289、330 和 442。

[0093] 上述取代如下对应于如下 SEQ ID NO :1 中的位置,并且预期本发明通篇关于 Kabat 的编号可与 SEQ ID NO :1 中取代的位置互换使用来描述本发明的组合物:

[0094]

ND	Kabat 位置	SEQ ID NO :1 中的位置
2	239	121
3	282	164
4	289	171
5	312	194
6	324	206
7	330	212
8	335	217
9	337	219
10	339	221

11	356	238
12	359	241
13	361	243
14	383	265
15	384	266
16	398	280
17	422	304
18	440	322
19	442	324
20	297	179
21	400	282

[0095] 在其它实施方案中,本发明的工程改造的抗体包含选自抗体重链的 Ser239、Val282、Thr289、Asn297、Asp312、Ser324、Ala330、Thr335、Ser337、Ala339、Glu356、Thr359、Asn361、Ser383、Asn384、Leu398、Ser400、Ser440、Val422 和 Ser442 的至少一个天然存在氨基酸的取代,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。

[0096] 在一些实施方案中,本发明的工程改造的抗体在选自抗体重链的 Ser239、Val282、Thr289、Asn297、Asp312、Ser324、Ala330、Thr335、Ser337、Ala339、Glu356、Thr359、Asn361、Ser383、Asn384、Leu398、Ser400、Ser440、Val422 和 Ser442 的一个或多个位置不包含取代,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。

[0097] 在其它实施方案中,本发明的工程改造的抗体在位置 297 包含天然存在氨基酸的取代,其中所述取代减少和 / 或消除位置 297 处的糖基化。在特定实施方案中,本发明的抗体在抗体重链的位置 297 包含半胱氨酸取代天冬酰胺。在其它实施方案中,本发明提供在抗体重链的位置 297 缺乏糖基化的抗体。在这些实施方案的每一者中,恒定区的编号系统都是如 Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。

[0098] 在一个实施方案中,本发明的工程改造的抗体包括在选自抗体重链的 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的位置具有天然存在氨基酸被取代(例如半胱氨酸)的 IgG1,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。在其它实施方案中,本发明的工程改造的抗体来源于 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 形式。在其它实施方案中,本发明的工程改造的抗体来源于非 IgG 形式(如 IgA1、IgA2、IgM、IgD 或 IgE)。在其它实施方案中,本发明的抗体包含通过将天然存在的残基取代为半胱氨酸和 / 或其它氨基酸来对 IgG1 分子或其等同物的 CH2 和 / 或 CH3 区的表面残基进行工程改造。

[0099] 本领域的普通技术人员能够容易地选择在取代中使用的适合的氨基酸。可能需要选择类似于非天然存在残基的残基以使蛋白质结构的变化减至最小。例如,对于半胱氨酸取代,半胱氨酸取代天然存在的丙氨酸或丝氨酸是合意的。

[0100] 在 IgG2、IgG3 和 IgG4 中进行取代的情况下,本领域的普通技术人员可以使用与 IgG1 的序列比对来确定期望同种型的哪些残基对应于抗体重链的上述位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。IgG2、IgG3 和 IgG4 的重链恒定结构域 (HC Fc) 在本文中分别公开为 SEQ IDNO :22、23 和 24。

[0101] 在其它实施方案中,本发明包括包含工程改造残基的分离 Fc 区的表达。所述分离 Fc 区可适用作骨架用于呈现目的或单独作为二聚化结构域,或在与另一药剂组合时适用。

[0102] 在其它实施方案中,本发明提供包含 Fc 区的融合蛋白,所述 Fc 区在选自 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的位置含有至少一个或多个取代,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。

[0103] 在其它实施方案中,本发明的工程改造的抗体还可在抗体的 CH1 结构域的 131-139 区中包含至少一个或多个非天然存在的半胱氨酸氨基酸。在一些实施方案中,本发明的工程改造的抗体在选自抗体的 CH1 结构域的 131、132、133、134、135、136、137、138 和 139 的位置包含至少一个取代,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。其它实施方案可见于对应于 2009 年 1 月 16 日提交的 PCT 申请 PCT/US09/31294 和 2008 年 1 月 18 日提交的美国临时申请 61/022,073 的“Cysteine engineered antibodies for site-specific conjugation”,为所有目的将上述各申请的全部内容以引用的方式并入本文。

[0104] 本文所用的术语“抗体”也称为免疫球蛋白,涵盖包含 Fc 区的任何以下抗体,包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、由至少两个不同的表位结合片段形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、骆驼抗体、嵌合抗体、单链 Fv(scFv)、单链抗体、单结构域抗体、结构域抗体、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、表现期望的生物活性的抗体片段(例如,抗原结合部分)、二硫键连接的 Fv(dsFv) 和抗独特型(抗 Id) 抗体(包括例如针对本发明抗体的抗 Id 抗体)、胞内抗体和任何上述抗体的表位结合片段。具体来说,抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段,即含有至少一个抗原结合位点的分子。免疫球蛋白分子可为任何同种型(例如, IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、亚型(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2) 或同种异型(例如, Gm, 例如 G1m(f、z、a 或 x)、G2m(n)、G3m(g、b 或 c)、Am、Em 和 Km(1、2 或 3))。抗体可来源于任何哺乳动物,包括但不限于人、猴、猪、马、兔、狗、猫、小鼠等,或来源于其它动物,如禽类(例如鸡)。在一个实施方案中,本发明的抗体包括具有本文所公开的任何或全部取代的美国专利申请公布 No. 20090144275 A1 中所公开的双特异性抗体。美国专利申请公布 No. 20090144275 A1 以引用的方式整体并入本文。

[0105] 抗体亲和力

[0106] 本发明的工程改造的抗体保留它的天然对应物的抗原结合能力。在一个实施方案中,本发明的工程改造的抗体显示与工程改造之前的抗体相比基本上相同的亲和力。在另

一实施方案中,本发明的工程改造的抗体显示与工程改造之前的抗体相比降低的亲和力。在另一实施方案中,本发明的工程改造的抗体显示与工程改造之前的抗体相比增强的亲和力。

[0107] 本发明的抗体对一种或多种其同源抗原可具有高结合亲和力。例如,本文所述的抗体的结合速率常数或 k_{on} 速率 (抗体 (Ab) + 抗原 \rightarrow Ab-Ag) 可为至少 $2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、至少 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、至少 $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 或至少 $10^8 M^{-1} s^{-1}$ 。

[0108] 在另一实施方案中,本发明的抗体的 k_{off} 速率 (Ab-Ag \rightarrow Ab+Ag) 可为小于 $5 \times 10^1 s^{-1}$ 、小于 $10^1 s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^2 s^{-1}$ 、小于 $10^2 s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^3 s^{-1}$ 、小于 $10^3 s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^4 s^{-1}$ 或小于 $10^4 s^{-1}$ 。在另一实施方案中,本发明的抗体的 k_{off} 为小于 $5 \times 10^5 s^{-1}$ 、小于 $10^5 s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^6 s^{-1}$ 、小于 $10^6 s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^7 s^{-1}$ 、小于 $10^7 s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^8 s^{-1}$ 、小于 $10^8 s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^9 s^{-1}$ 、小于 $10^9 s^{-1}$ 或小于 $10^{10} s^{-1}$ 。

[0109] 在另一实施方案中,本发明的抗体的亲和力常数或 $K_a (k_{on}/k_{off})$ 可为至少 $10^2 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^2 M^{-1}$ 、至少 $10^3 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^3 M^{-1}$ 、至少 $10^4 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^4 M^{-1}$ 、至少 $10^5 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5 M^{-1}$ 、至少 $10^6 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6 M^{-1}$ 、至少 $10^7 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7 M^{-1}$ 、至少 $10^8 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、至少 $10^9 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、至少 $10^{10} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、至少 $10^{11} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、至少 $10^{12} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{12} M^{-1}$ 、至少 $10^{13} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{13} M^{-1}$ 、至少 $10^{14} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{14} M^{-1}$ 、至少 $10^{15} M^{-1}$ 或至少 $5 \times 10^{15} M^{-1}$ 。在另一实施方案中,本发明的抗体的解离常数或 $K_d (k_{off}/k_{on})$ 可为小于 $5 \times 10^2 M$ 、小于 $10^2 M$ 、小于 $5 \times 10^3 M$ 、小于 $10^3 M$ 、小于 $5 \times 10^4 M$ 、小于 $10^4 M$ 、小于 $5 \times 10^5 M$ 、小于 $10^5 M$ 、小于 $5 \times 10^6 M$ 、小于 $10^6 M$ 、小于 $5 \times 10^7 M$ 、小于 $10^7 M$ 、小于 $5 \times 10^8 M$ 、小于 $10^8 M$ 、小于 $5 \times 10^9 M$ 、小于 $10^9 M$ 、小于 $5 \times 10^{10} M$ 、小于 $10^{10} M$ 、小于 $5 \times 10^{11} M$ 、小于 $10^{11} M$ 、小于 $5 \times 10^{12} M$ 、小于 $10^{12} M$ 、小于 $5 \times 10^{13} M$ 、小于 $10^{13} M$ 、小于 $5 \times 10^{14} M$ 、小于 $10^{14} M$ 、小于 $5 \times 10^{15} M$ 或小于 $10^{15} M$ 。

[0110] 根据本文所述的方法使用的抗体的解离常数 (K_d) 可为小于 3000pM、小于 2500pM、小于 2000pM、小于 1500pM、小于 1000pM、小于 750pM、小于 500pM、小于 250pM、小于 200pM、小于 150pM、小于 100pM、小于 75pM, 如使用本文所述或本领域的技术人员已知的方法 (例如 BIAcore 测定、ELISA) (Biacore International AB, Uppsala, Sweden) 所评估。

[0111] 抗体特异性

[0112] 在一些实施方案中,本发明的工程改造的抗体包括含有选自以下的表位结合结构域 (例如但不限于具有全部 6 个 CDR 的抗体可变区,或与抗体可变区至少 90% 一致的等同区) 的抗体: 阿巴伏单抗 (abagovomab)、阿巴西普 (abatacept) (也称为 ORENCIA®)、阿昔单抗 (abciximab) (也称为 REOPRO®, c7E3 Fab)、阿达木单抗 (adalimumab) (也称为 HUMIRA®)、阿德姆单抗 (adecatumumab)、阿来组单抗 (alemtuzumab) (也称为 CAMPATH®, MabCampath 或 Campath-1H)、阿妥莫单抗 (altumomab)、阿非莫单抗 (afelimomab)、麻安莫单抗 (anatumomab mafenatox)、安内木单抗 (anatumumab)、安陆珠单抗 (anrukizumab)、阿波珠单抗 (apolizumab)、阿西莫单抗 (arcitumomab)、阿塞珠单抗 (aselizumab)、阿丽珠单抗 (atlizumab)、阿托木单抗 (atorolimumab)、巴内珠单抗 (bapineuzumab)、巴利昔单抗 (basiliximab) (也称为 SIMULECT®)、巴图昔单抗 (bavituximab)、贝妥莫单抗 (bectumomab) (也称为 LYMPHOSCAN®)、贝利

木单抗 (belimumab) (也称为 **LYMPHO-STAT-B®**)、柏替木单抗 (bertilimumab)、贝西索单抗 (besilesomab)、贝伐单抗 (bevacizumab) (也称为 **AVASTIN®**)、比西单抗 溴希比妥 (biciromab brallobarbitol)、比伐单抗 (bivatuzumab mertansine)、阿伦单抗 (campath)、康纳单抗 (canakinumab) (也称为 **ACZ885**)、坎图珠单抗 (cantuzumab mertansine)、卡罗单抗 (capromab) (也称为 **PROTASCINT®**)、卡妥索单抗 (catumaxomab) (也称为 **REMOVAB®**)、西丽珠单抗 (cedelizumab) (也称为 **CIMZIA®**)、塞妥珠单抗 (certolizumab pegol)、西妥昔单抗 (cetuximab) (也称为 **ERBITUX®**)、克利昔单抗 (clenoliximab)、达塞珠单抗 (dacetuzumab)、达昔单抗 (dacliximab)、达利珠单抗 (daclizumab) (也称为 **ZENAPAX®**)、地诺单抗 (denosumab) (也称为 **AMG 162**)、地莫单抗 (detumomab)、阿度莫单抗 (dorlimomab aritox)、多西珠单抗 (dorlixizumab)、顿图木单抗 (duntumumab)、度里姆单抗 (durimulumab)、度姆鲁单抗 (durmulumab)、依美昔单抗 (ecromeximab)、依库珠单抗 (eculizumab) (也称为 **SOLIRIS®**)、埃巴单抗 (edobacomab)、依决洛单抗 (edrecolomab) (也称为 **Mab17-1A**、**PANOREX®**)、依法珠单抗 (efalizumab) (也称为 **RAPTIVA®**)、依芬古单抗 (efungumab) (也称为 **MYCOGRAB®**)、伊利莫单抗 (elsilimomab)、恩莫单抗 (enlimomab pegol)、西依匹莫单抗 (epitumomab cituxetan)、伊法利单抗 (efalizumab)、依匹莫单抗 (epitumomab)、依帕珠单抗 (epratuzumab)、厄利珠单抗 (erlizumab)、厄妥索单抗 (ertumaxomab) (也称为 **REXOMUN®**)、依那西普 (etanercept) (也称为 **ENBREL®**)、艾瑞珠单抗 (etaracizumab) (也称为 **艾瑞图单抗** (etaratumumab)、**VITAXIN®**、**ABEGRINTM**)、艾韦单抗 (exbivirumab)、法诺索单抗 (fanolesomab) (也称为 **NEUTROSPEC®**)、法拉莫单抗 (faralimomab)、泛维珠单抗 (felvizumab)、芳妥珠单抗 (fontolizumab) (也称为 **HUZAF®**)、加利昔单抗 (galiximab)、刚奈鲁单抗 (gantenerumab)、加维莫单抗 (gavilimomab) (也称为 **ABX-CBL®**)、吉妥珠单抗 (gemtuzumab ozogamicin) (也称为 **MYLOTARG®**)、戈利木单抗 (golimumab) (也称为 **CNT0 148**)、戈利昔单抗 (gomiliximab)、伊利珠单抗 (ibalizumab) (也称为 **TNX-355**)、伊图莫单抗 (ibritumomab tiuxetan) (也称为 **ZEVALIN®**)、伊戈伏单抗 (igovomab)、英西单抗 (imciromab)、英利昔单抗 (infliximab) (也称为 **REMICADE®**)、伊诺莫单抗 (inolimomab)、沃伊图珠单抗 (inotuzumab ozogamicin)、伊匹珠单抗 (ipilimumab) (也称为 **MDX-010**、**MDX-101**)、依拉木单抗 (iratumumab)、凯利昔单抗 (keliximab)、拉贝珠单抗 (labetuzumab)、来马索单抗 (lemalesomab)、莱利珠单抗 (lebrilizumab)、乐德木单抗 (lerdelimumab)、来沙莫单抗 (lexatumumab) (也称为 **HGS-ETR2**、**ETR2-ST01**)、莱西珠单抗 (lexitumumab)、利韦单抗 (libivirumab)、林妥珠单抗 (lintuzumab)、鲁图莫单抗 (lucatumumab)、鲁昔单抗 (lumiliximab)、马帕莫单抗 (mapatumumab) (也称为 **HGS-ETR1**、**TRM-1**)、马司莫单抗 (maslimomab)、马妥珠单抗 (matuzumab) (也称为 **EMD72000**)、美泊珠单抗 (mepolizumab) (也称为 **BOSATRIA®**)、美替木单抗 (metelimumab)、米拉图单抗 (milatuzumab)、明瑞莫单抗 (minretumomab)、米妥莫单抗 (mitumomab)、莫罗木单抗 (morolimomab)、莫维珠单抗 (motavizumab) (也称为 **NUMAX™**)、穆罗单抗 (muromonab) (也称为 **OKT3**)、他那罗单抗 (nacolomab tafenatox)、伊那图莫单抗 (naptumomab estafenatox)、那他珠单抗 (natalizumab) (也称为 **TYSABRI®**、**ANTEGREN®**)、奈巴库单抗 (nebacumab)、奈瑞莫单抗 (nerelimomab)、尼

莫珠单抗 (nimotuzumab) (也称为 THERACIM hR3®、THERA-CIM-hR3®、THERALOC®)、疏诺莫单抗 (nofetumomabmerpentan) (也称为 VERLUMA®)、奥瑞珠单抗 (ocrelizumab)、奥度莫单抗 (odulimomab)、奥法木单抗 (ofatumumab)、奥马珠单抗 (omalizumab) (也称为 XOLAIR®)、奥戈伏单抗 (oregovomab) (也称为 OVAREX®)、奥西珠单抗 (otelixizumab)、帕基昔单抗 (pagibaximab)、帕利珠单抗 (palivizumab) (也称为 SYNAGIS®)、帕木单抗 (panitumumab) (也称为 ABX-EGF、VECTIBIX®)、帕考珠单抗 (pascolizumab)、培图莫单抗 (pemtumomab) (也称为 THERAGYN®)、培妥珠单抗 (pertuzumab) (也称为 2C4、OMNITARG®)、培克珠单抗 (pexelizumab)、匹图莫单抗 (pintumomab)、普立昔单抗 (priliximab)、普林木单抗 (pritumumab)、雷珠单抗 (ranibizumab) (也称为 LUCENTIS®)、雷西巴单抗 (raxibacumab)、瑞加韦单抗 (regavirumab)、瑞利珠单抗 (reslizumab)、利妥昔单抗 (rituximab) (也称为 RITUXAN®、MabTHERA®)、罗维珠单抗 (rovelizumab)、卢利珠单抗 (ruplizumab)、沙妥莫单抗 (satumomab)、司韦单抗 (sevirumab)、西罗珠单抗 (sibrotuzumab)、西利珠单抗 (siplizumab) (也称为 MEDI-507)、桑图珠单抗 (sontuzumab)、斯达卢单抗 (stamulumab) (也称为 MY0-029)、硫索单抗 (sulesomab) (也称为 LEUKOSCAN®)、他珠单抗 (tacatuzumabtetraxetan)、他西珠单抗 (tadocizumab)、他利珠单抗 (talizumab)、帕他利莫单抗 (taplitumomab paptox)、替巴珠单抗 (tefibazumab) (也称为 AUREXIS®)、阿替利莫单抗 (telimomab aritox)、替奈昔单抗 (teneliximab)、替丽珠单抗 (teplizumab)、替奇木单抗 (ticilimumab)、托珠单抗 (tocilizumab) (也称为 ACTEMRA®)、托利珠单抗 (toralizumab)、托西莫单抗 (tositumomab)、曲司珠单抗 (trastuzumab) (也称为 HERCEPTIN®)、曲利木单抗 (tremelimumab) (也称为 CP-675,206)、图考珠单抗 (tucotuzumab celmoleukin)、妥韦单抗 (tuvirumab)、乌珠单抗 (urtoxazumab)、乌泰努单抗 (ustekinumab) (也称为 CNT0 1275)、伐利昔单抗 (vapaliximab)、维图珠单抗 (veltuzumab)、维帕莫单抗 (vepalimomab)、维西珠单抗 (visilizumab) (也称为 NUVION®)、伏罗希单抗 (volociximab) (也称为 M200)、伏妥莫单抗 (votumumab) (也称为 HUMASPECT®)、扎图莫单抗 (zalutumumab)、扎木单抗 (zanolimumab) (也称为 HuMAX-CD4)、齐拉木单抗 (ziralinumab) 或阿佐利莫单抗 (zolimomab aritox)。

[0113] 在其它实施方案中,本发明的抗体包含具有六个 CDR 的重链和轻链可变结构域,并且与选自上述所列抗体竞争结合。在其它实施方案中,本发明的工程改造的抗体包含具有总共六个 CDR 的重链和轻链可变结构域并且与上述所列抗体结合相同抗原。

[0114] 在其它实施方案中,本发明的工程改造的抗体包含具有总共 6 个 CDR 的重链和轻链可变结构域,并且特异性结合选自以下的抗原:PDGFR α 、PDGFR β 、PDGF、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、FGF、FGF2、HGF、KDR、f1t-1、FLK-1 Ang-2、Ang-1、PLGF、CEA、CXCL13、Baff、IL-21、CCL21、TNF- α 、CXCL12、SDF-1、bFGF、MAC-1、IL23p19、FPR、IGFBP4、CXCR3、TLR4、CXCR2、EphA2、EphA4、EphrinB2、EGFR(ErbB1)、HER2(ErbB2 或 p185neu)、HER3(ErbB3)、HER4 ErbB4 或 tyro2)、SC1、LRP5、LRP6、RAGE、Nav1.7、GLP1、RSV、RSV F 蛋白、流感 HA 蛋白、流感 NA 蛋白、HMGB1、CD16、CD19、CD20、CD21、CD28、CD32、CD32b、CD64、CD79、CD22、ICAM-1、FGFR1、FGFR2、HDGF、EphB4、GITR、 β -淀粉样蛋白、hMPV、PIV-1、PIV-2、OX40L、IGFBP3、cMet、PD-1、PLGF、脑啡肽酶

(Neprolysin)、CTD、IL-18、IL-6、CXCL-13、IL-1R1、IL-15、IL-4R、IgE、PAI-1、NGF、EphA2、uPARt、DLL-4、 α v β 6、 α 5 β 1、I 型和 II 型干扰素受体。CD19、ICOS、IL-17、因子 II、Hsp90、IGF、IGF-I、IGF-II、CD19、GM-CSFR、PIV-3、CMV、IL-13、IL-9 和 EBV。

[0115] 在其它实施方案中,本发明的工程改造的抗体特异性结合 TNF 超家族的成员(受体或配体)。各种分子包括但不限于肿瘤坏死因子 α (“TNF- α ”)、肿瘤坏死因子 β (“TNF- β ”)、淋巴毒素- α (“LT- α ”)、CD30 配体、CD27 配体、CD40 配体、4-1 BB 配体、Apo-1 配体(也称为 Fas 配体或 CD95 配体)、Apo-2 配体(也称为 TRAIL)、Apo-3 配体(也称为 TWEAK)、骨保护素(OPG)、APRIL、RANK 配体(也称为 TRANCE)、TALL-1(也称为 BlyS、BAFF 或 THANK)、DR4、DR5(也称为 Apo-2、TRAIL-R2、TR6、Tango-63、hAPO8、TRICK2 或 KILLER)、DR6、DcR1、DcR2、DcR3(也称为 TR6 或 M68)、CAR1、HVEM(也称为 ATAR 或 TR2)、GITR、ZTNFR-5、NTR-1、TNFL1、CD30、LTBr、4-1BB 受体和 TR9。

[0116] 在另一实施方案中,本发明的工程改造的抗体能够结合选自以下的一种或多种靶标:5T4、ABL、ABCF1、ACVR1、ACVR1B、ACVR2、ACVR2B、ACVRL1、ADORA2A、聚集蛋白聚糖(AggreCAN)、AGR2、AICDA、AIFI、AIG1、AKAP1、AKAP2、AMH、AMHR2、ANGPT1、ANGPT2、ANGPTL3、ANGPTL4、ANPEP、APC、APOC1、AR、芳香酶、ATX、AX1、AZGP1(锌- α -糖蛋白)、B7.1、B7.2、B7-H1、BAD、BAFF、BAG1、BAI1、BCR、BCL2、BCL6、BDNF、BLNK、BLR1(MDR15)、BlyS、BMP1、BMP2、BMP3B(GDF10)、BMP4、BMP6、BMP8、BMPR1A、BMPR1B、BMPR2、BPAG1(网蛋白)、BRCA1、C19orf10(IL27w)、C3、C4A、C5、C5R1、CANT1、CASP1、CASP4、CAV1、CCBP2(D6/JAB61)、CCL1(1-309)、CCL11(嗜酸粒细胞趋化因子)、CCL13(MCP-4)、CCL15(MIP-Id)、CCL16(HCC-4)、CCL17(TARC)、CCL18(PARC)、CCL19(MIP-3b)、CCL2(MCP-1)、MCAF、CCL20(MIP-3a)、CCL21(MEP-2)、SLC、exodus-2、CCL22(MDC/STC-I)、CCL23(MPIF-I)、CCL24(MPIF-2/嗜酸粒细胞趋化因子-2)、CCL25(TECK)、CCL26(嗜酸粒细胞趋化因子-3)、CCL27(CTACK/ILC)、CCL28、CCL3(MIP-Ia)、CCL4(MIP-Ib)、CCL5(RANTES)、CCL7(MCP-3)、CCL8(mcp-2)、CCNA1、CCNA2、CCND1、CCNE1、CCNE2、CCR1(CKR1/HM145)、CCR2(mcp-1RB/RA)、CCR3(CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5(CMKBR5/ChemR13)、CCR6(CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、CCR7(CKR7/EBI1)、CCR8(CMKBR8/TER1/CKR-L1)、CCR9(GPR-9-6)、CCRL1(VSHK1)、CCRL2(L-CCR)、CD164、CD19、CD1C、CD20、CD200、CD-22、CD24、CD28、CD3、CD33、CD35、CD37、CD38、CD3E、CD3G、CD3Z、CD4、CD40、CD40L、CD44、CD45RB、CD52、CD69、CD72、CD74、CD79A、CD79B、CD8、CD80、CD81、CD83、CD86、CD137、CDH1(E-钙粘蛋白)、CDH10、CDH12、CDH13、CDH18、CDH19、CDH20、CDH5、CDH7、CDH8、CDH9、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK9、CDKN1A(p21Wap1/Cip1)、CDKN1B(p27Kip1)、CDKN1C、CDKN2A(p16INK4a)、CDKN2B、CDKN2C、CDKN3、CEBPB、CER1、CHGA、CHGB、几丁质酶、CHST10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、CLDN3、CLDN7(紧密连接蛋白-7(claudin-7))、CLN3、CLU(簇集蛋白(clusterin))、CMKLR1、CMKOR1(RDC1)、CNR1、COL18A1、COL1A1、COL4A3、COL6A1、CR2、Cripto、CRP、CSF1(M-CSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(GCSF)、CTLA4、CTL8、CTNNB1(b-连环蛋白)、CTSB(组织蛋白酶B)、CX3CL1(SCYD1)、CX3CR1(V28)、CXCL1(GR01)、CXCL10(IP-I0)、CXCL11(I-TAC/IP-9)、CXCL12(SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、CXCL2(GR02)、CXCL3(GR03)、CXCL5(ENA-78/LIX)、CXCL6(GCP-2)、CXCL9(MIG)、CXCR3(GPR9/CKR-L2)、CXCR4、CXCR6(TYMSTR/STRL33/Bonzo)、CYB5、CYC1、CYSLTR1、DAB2IP、DES、DKFZp451J0118、DNCL1、

DPP4、E2F1、ECGF1、EDG1、EFNA1、EFNA3、EFNB2、EGF、EGFR、ELAC2、ENG、ENO1、ENO2、ENO3、EPA1、EPA2、EPA3、EPA4、EPA5、EPA6、EPA7、EPA8、EPA9、EPA10、EPHB1、EPHB2、EPHB3、EPHB4、EPHB5、EPHB6、EHRIN-A1、EHRIN-A2、EHRIN-A3、EHRIN-A4、EHRIN-A5、EHRIN-A6、EHRIN-B1、EHRIN-B2、EHRIN-B3、EPHB4、EPG、ERBB2 (Her-2)、EREG、ERK8、雌激素受体、ESR1、ESR2、F3 (TF)、FADD、法尼基转移酶、FasL、FASNf、FCER1A、FCER2、FCGR3A、FGF、FGF1 (aFGF)、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF2 (bFGF)、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3 (int-2)、FGF4 (HST)、FGF5、FGF6 (HST-2)、FGF7 (KGF)、FGF8、FGF9、FGFR3、FIGF (VEGFD)、FIL1 (EPSILON)、FBL1 (ZETA)、FLJ12584、FLJ25530、FLRT1 (纤连蛋白)、FLT1、FLT-3、FOS、FOSL1 (FRA-I)、FY (DARC)、GABRP (GABAa)、GAGEB1、GAGEC1、GALNAC4S-6ST、GATA3、GD2、GDF5、GFI1、GGT1、GM-CSF、GNAS1、GNRH1、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR44、GPR81 (FKSG80)、GRCC10 (C10)、GRP、GSN (凝溶胶蛋白)、GSTP1、HAVCR2、HDAC、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、Hedgehog、HGF、HIF1A、HIP1、组胺和组胺受体、HLA-A、HLA-DRA、HM74、HMOX1、HSP90、HUMCYT2A、ICEBERG、ICOSL、ID2、IFN-a、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、EFNA6、BFNA7、IFNB1、IFN γ 、IFNW1、IGBP1、IGF1、IGF1R、IGF2、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP6、DL-I、IL10、IL10RA、IL10RB、IL-1、IL1R1 (CD121a)、IL1R2 (CD121b)、IL-1RA、IL-2、IL2RA (CD25)、IL2RB (CD122)、IL2RG (CD132)、IL-4、IL-4R (CD123)、IL-5、IL5RA (CD125)、IL3RB (CD131)、IL-6、IL6RA (CD126)、IR6RB (CD130)、IL-7、IL7RA (CD127)、IL-8、CXCR1 (IL8RA)、CXCR2 (IL8RB/CD128)、IL-9、IL9R (CD129)、IL-10、IL10RA (CD210)、IL10RB (CDW210B)、IL-11、IL11RA、IL-12、IL-12A、IL-12B、IL-12RB1、IL-12RB2、IL-13、IL13RA1、IL13RA2、IL14、IL15、IL15RA、IL16、IL17、IL17A、IL17B、IL17C、IL17R、IL18、IL18BP、IL18R1、IL18RAP、IL19、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、DL1F9、IL1HY1、IL1R1、IL1R2、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RL1、IL1RL2、IL1RN、IL2、IL20、IL20RA、IL21R、IL22、IL22R、IL22RA2、IL23、DL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3、IL30、IL3RA、IL4、IL4R、IL6ST (糖蛋白 130)、ILK、INH A、INHBA、INSL3、INSL4、IRAK1、IRAK2、ITGA1、ITGA2、ITGA3、ITGA6 ($\alpha 6$ 整合素)、ITGAV、ITGB3、ITGB4 ($\beta 4$ 整合素)、JAG1、JAK1、JAK3、JTB、JUN、K6HF、KAI1、KDR、KITLG、KLF5 (GC Box BP)、KLF6、KLK10、KLK12、KLK13、KLK14、KLK15、KLK3、KLK4、KLK5、KLK6、KLK9、KRT1、KRT19 (角蛋白 19)、KRT2A、KRTHB6 (毛发特异性 II 型角蛋白)、LAMA5、LEP (瘦素 (leptin))、Lingo-p75、Lingo-Troy、LPS、LIA (TNF-b)、LTB、LTB4R (GPR16)、LTB4R2、LTBR、MACMARCKS、MAG 或 Omgp、MAP2K7 (c-Jun)、MCP-1、MDK、MIB1、中期因子 (midkine)、MIF、MISR II、MJP-2、MK、MKI67 (Ki-67)、MMP2、MMP9、MS4A1、MSMB、MT3 (金属硫粘连蛋白 -UI (metallothionectin-UI))、mTOR、MTSS1、MUC1 (粘液素)、MYC、MYD88、NCK2、神经聚糖、NFKB1、NFKB2、NGFB (NGF)、NGFR、NgR-Lingo、NgR-Nogo66 (Nogo)、NgR-p75、NgR-Troy、NME1 (NM23A)、NOTCH、NOTCH1、NOX5、NPPB、NR0B1、NR0B2、NR1D1、NR1D2、NR1H2、NR1H3、NR1H4、NR1I2、NR1I3、NR2C1、NR2C2、NR2E1、NR2E3、NR2F1、NR2F2、NR2F6、NR3C1、NR3C2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、NR5A1、NR5A2、NR6A1、NRP1、NRP2、NT5E、NTN4、ODZ1、OPRD1、P2RX7、PAP、PART1、PATE、PAWR、PCA3、PCDGF、PCNA、PDGFA、PDGFB、PDGFRA、PDGFRB、PECAM1、peg- 天冬酰胺酶、PF4 (CXCL4)、PGF、PGR、磷酸粘蛋白 (phosphacan)、PIAS2、PI3 激酶、PIK3CG、PLAU (uPA)、PLG、PLXDC1、PKC、PKC- β 、PPBP (CXCL7)、PPID、PR1、PRKCQ、PRKD1、PRL、PROC、

PROK2、PSAP、PSCA、PTAFR、PTEN、PTGS2(COX-2)、PTN、RAC2(P21Rac2)、RANK、RANK 配体、RARB、RGS1、RGS13、RGS3、RNFI10(ZNF144)、Ron、ROBO2、RXR、S100A2、SCGB 1D2(亲脂素 B(lipophilin B))、SCGB2A1(乳腺珠蛋白 2(mammaglobin 2))、SCGB2A2(乳腺珠蛋白 1)、SCYE1(内皮单核细胞活化细胞因子)、SDF2、SERPENA1、SERPINA3、SERPINB5(乳腺丝抑蛋白(maspin))、SERPINE1(PAI-I)、SERPINF1、SHIP-1、SHIP-2、SHB1、SHB2、SHBG、SfcAZ、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、SLIT2、SPP1、SPRR1B(Spr1)、ST6GAL1、STAB1、STAT6、STEAP、STEAP2、TB4R2、TBX21、TCP10、TDGF1、TEK、TGFA、TGFB1、TGFB1I1、TGFB2、TGFB3、TGFB1、TGFB1R1、TGFB2R2、TGFB3R3、TH1L、THBS1(血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1))、THBS2、THBS4、THPO、TIE(Tie-1)、TIMP3、组织因子、TLR10、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TNF、TNF- α 、TNFAIP2(B94)、TNFAIP3、TNFRSF11A、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF21、TNFRSF5、TNFRSF6(Fas)、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF11(TRANCE)、TNFSF12(APO3L)、TNFSF13(April)、TNFSF13B、TNFSF14(HVEM-L)、TNFSF15(VEGI)、TNFSF18、TNFSF4(OX40 配体)、TNFSF5(CD40 配体)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27 配体)、TNFSF8(CD30 配体)、TNFSF9(4-1BB 配体)、TOLLIP、钟样受体(Toll-like receptors)、TOP2A(拓扑异构酶 Iia)、TP53、TPM1、TPM2、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5、TRAF6、TRKA、TREM1、TREM2、TRPC6、TSLP、TWEAK、酪氨酸酶、uPAR、VEGF、VEGFB、VEGFC、多能蛋白聚糖(versican)、VHL C5、VLA-4、Wnt-1、XCL1(淋巴细胞趋化因子(lymphotactin))、XCL2(SCM-Ib)、XCR1(GPR5/CCXCR1)、YY1 和 ZFPM2。

[0117] Fc 区的其它改变

[0118] 本发明还提供具有可与上述任何或所有变体 Fc 区组合的其它改变的 Fc 区的工程改造的抗体。已知 Fc 区的变体(例如,氨基酸取代、插入和/或添加和/或缺失)增强或减弱效应功能(参见 Presta 等,2002,Biochem Soc Trans 30:487-490;美国专利 5,624,821、5,885,573 和 PCT 公布 No. WO 00/42072、WO 99/58572 和 WO 04/029207)。在一个实施方案中,与天然 Fc 相比,抗体的变体 Fc 区表现相似的诱导效应功能的水平。在另一实施方案中,与天然 Fc 相比,变体 Fc 区表现较高的效应功能诱导。在另一实施方案中,与天然 Fc 相比,变体 Fc 区表现较低的效应功能诱导。在另一实施方案中,与天然 Fc 相比,变体 Fc 区表现较高的 ADCC 诱导。在另一实施方案中,与天然 Fc 相比,变体 Fc 区表现较低的 ADCC 诱导。在另一实施方案中,与天然 Fc 相比,变体 Fc 区表现较高的 CDC 诱导。在另一实施方案中,与天然 Fc 相比,变体 Fc 区表现较低的 CDC 诱导。变体 Fc 区的特定实施方案在下文详细描述。

[0119] 还已知可修饰 Fc 区的糖基化以增强或降低效应功能(参见例如 Umana 等,1999,Nat.Biotechnol 17:176-180;Davies 等,2001,Biotechnol Bioeng 74:288-294;Shields 等,2002,J Biol Chem 277:26733-26740;Shinkawa 等,2003,J Biol Chem 278:3466-3473)美国专利 No. 6,602,684;美国 No. 10/277,370;美国 No. 10/113,929;PCTWO 00/61739A1;PCT WO 01/292246A1;PCT WO 02/311140A1;PCTWO 02/30954A1;Potillegent™技术(Biowa, Inc.Princeton, N. J.);GlycoMAb™糖基化工程改造技术(GLYCART biotechnology AG,Zurich, Switzerland)。

[0120] 因此,在一个实施方案中,本发明抗体的 Fc 区包含氨基酸残基的改变的糖基化。在另一实施方案中,氨基酸残基的改变的糖基化导致效应功能降低。在另一实施方案中,

氨基酸残基的改变的糖基化导致效应功能增强。在一特定实施方案中，Fc 区具有减少的岩藻糖基化。在另一实施方案中，Fc 区未被岩藻糖基化（参见例如美国专利申请公布 No. 2005/0226867）。

[0121] 近来的研究表明，向 IgG 分子上的寡糖添加唾液酸可增强它们的抗炎活性和改变它们的细胞毒性 (Keneko 等, *Science* 313, 670-673 (2006), Scallan 等, *Mol. Immuno.* 2007 年 3 月 ;44(7) :1524-34)。因此，可以通过选择适于预期应用的糖型对抗体治疗剂的功效进行优化。插入抗体的两个 CH2 结构域之间的两个寡糖链参与 Fc 区与其受体的结合。上文所引用的研究证明，唾液酸化增加的 IgG 分子具有抗炎性质，而唾液酸化减少的 IgG 分子具有增强的免疫刺激性质。因此，抗体治疗剂可“定制”成具有适当唾液酸化特征以用于特定应用。调节抗体的唾液酸化状态的方法出现在名称为“Methods And Compositions With Enhanced Therapeutic Activity”的 W02007/005786 和名称为“Polypeptides With Enhanced Anti-Inflammatory And Decreased Cytotoxic Properties And Related Methods”的 W02007/117505 中，为所有目的所述每个文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0122] 在一个实施方案中，本发明抗体的 Fc 区包含与参考未改变 Fc 区相比改变的唾液酸化特征。在一个实施方案中，本发明抗体的 Fc 区包含与参考未改变 Fc 区相比增加的唾液酸化特征。在一些实施方案中，本发明抗体的 Fc 区包含与参考未改变 Fc 区相比唾液酸化增加约 5%、约 10%、约 15%、约 20%、约 25%、约 30%、约 35%、约 40%、约 45%、约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 100%、约 125%、约 150% 或更多。在一些实施方案中，本发明抗体的 Fc 区包含唾液酸化增加至未改变参考 Fc 区的约 2 倍、约 3 倍、约 4 倍、约 5 倍、约 10 倍、约 20 倍、约 50 倍或更多。

[0123] 在另一实施方案中，本发明抗体的 Fc 区包含与参考未改变 Fc 区相比减少的唾液酸化特征。在一些实施方案中，本发明抗体的 Fc 区包含与参考未改变 Fc 区相比唾液酸化减少约 5%、约 10%、约 15%、约 20%、约 25%、约 30%、约 35%、约 40%、约 45%、约 50%、约 60%、约 65%、约 70%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 100%、约 125%、约 150% 或更多。在一些实施方案中，本发明抗体的 Fc 区包含唾液酸化减少至未改变参考 Fc 区的约 1/2、约 1/3、约 1/4、约 1/5、约 1/10、约 1/20、约 1/50 或更少。

[0124] 在本领域中还已知可对 Fc 区进行修饰以增加蛋白质的半衰期。半衰期增加允许减少所给予患者的药物量以及降低施用频率。因此，具有增加的半衰期的本发明抗体可通过修饰（例如取代、缺失或添加）鉴定为参与 Fc 与 FcRn 受体之间的相互作用的氨基酸残基来产生（参见例如 PCT 公布 No. 97/34631 和 No. 02/060919，所述每个文献的全部内容以引用的方式并入本文）。另外，可利用本领域中广泛使用的技术通过与 PEG 或白蛋白偶联使本发明抗体的半衰期增加。在一些实施方案中，本发明抗体的 Fc 区包含与参考未改变 Fc 区相比半衰期增加约 5%、约 10%、约 15%、约 20%、约 25%、约 30%、约 35%、约 40%、约 45%、约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 100%、约 125%、约 150% 或更多。在一些实施方案中，本发明抗体的 Fc 区包含半衰期增加至未改变参考 Fc 区的约 2 倍、约 3 倍、约 4 倍、约 5 倍、约 10 倍、约 20 倍、约 50 倍或更多。

[0125] 在替代实施方案中，本发明抗体的 Fc 区包含半衰期的减少。在一些实施方案中，

本发明抗体的 Fc 区包含与参考未改变 Fc 区相比半衰期减少约 5%、约 10%、约 15%、约 20%、约 25%、约 30%、约 35%、约 40%、约 45%、约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 100%、约 125%、约 150% 或更多。在一些实施方案中,本发明抗体的 Fc 区包含半衰期减少至未改变参考 Fc 区的约 1/2、约 1/3、约 1/4、约 1/5、约 1/10、约 1/20、约 1/50 或更多。

[0126] 本发明涵盖相对于类似分子(例如,除具有天然 Fc 区外具有相同氨基酸序列的蛋白质)与 Fc 配体(例如,Fc 受体、C1q)的结合性质改变的 Fc 变体蛋白。结合性质的实例包括但不限于结合特异性、平衡解离常数(K_D)、解离和结合速率(分别为 k_{off} 和 k_{on})、结合亲和力和/或亲和性。一般认为,具有低 K_D 的结合分子(例如,Fc 变体蛋白,如抗体)可优选为具有高 K_D 的结合分子。然而,在一些情况下, k_{on} 或 k_{off} 值可能比 K_D 值更相关。本领域的技术人员可以确定哪种动力学参数对于给定的抗体应用最重要。

[0127] Fc 区与其配体的亲和力和结合性质可以通过本领域中已知用于测定 Fc-Fc γ R 相互作用(即 Fc 区与 Fc γ R 的特异性结合)的多种体外测定方法(基于生物化学或免疫学的测定)进行测定,所述方法包括但不限于平衡方法(例如,酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射性免疫测定(RIA))或动力学(例如,BIACORE®分析),和其它方法,如间接结合测定、竞争抑制测定、荧光共振能量转移(FRET)、凝胶电泳和色谱(例如,凝胶过滤)。这些和其它方法可以利用一种或多种所检验组分上的标记和/或采用多种检测方法,包括但不限于发色、荧光、发光或同位素标记。结合亲和力和动力学的详细描述可见于 Paul, W. E. 编著, *Fundamental Immunology*, 第 4 版, Lippincott-Raven, Philadelphia (1999) 中,所述文献着重于介绍抗体-免疫原相互作用。

[0128] 在一个实施方案中, Fc 变体蛋白相对于类似分子与一种或多种 Fc 配体的结合增强。在另一实施方案中, Fc 变体蛋白对 Fc 配体的亲和力是类似分子的至少 2 倍、或至少 3 倍、或至少 5 倍、或至少 7 倍、或至少 10 倍、或至少 20 倍、或至少 30 倍、或至少 40 倍、或至少 50 倍、或至少 60 倍、或至少 70 倍、或至少 80 倍、或至少 90 倍、或至少 100 倍、或至少 200 倍。在一特定实施方案中, Fc 变体蛋白与 Fc 受体的结合增强。在另一特定实施方案中, Fc 变体蛋白与 Fc 受体 Fc γ RIIIA 的结合增强。在另一特定实施方案中, Fc 变体蛋白与 Fc 受体 Fc γ RIIB 的结合增强。在另一特定实施方案中, Fc 变体蛋白与 Fc 受体 FcRn 的结合增强。在另一特定实施方案中, Fc 变体蛋白相对于类似分子与 C1q 的结合增强。

[0129] 可以测定任何特定 Fc 变体蛋白通过 ADCC 介导靶细胞溶解的能力。为评估 ADCC 活性,将目标 Fc 变体蛋白添加到与免疫效应细胞组合的靶细胞中,所述免疫效应细胞可以被抗原抗体复合物活化,由此导致靶细胞的细胞溶解。细胞溶解通常通过从溶解的细胞释放的标记(例如,放射性底物、荧光染料或天然细胞内蛋白质)进行检测。适用于所述测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。体外 ADCC 测定的特定实例描述于以下文献中: Wisecarver 等, 1985 *J Exp Med* 166:1351-1361; Wilkinson 等, 2001, *J Immunol Methods* 258:183-191; Patel 等, 1995 *J Immunol Methods* 184:29-38。目标 Fc 变体蛋白的 ADCC 活性还可在体内评估,例如,在动物模型中评估,如 Clynes 等, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656 中所公开的动物模型。

[0130] 在一个实施方案中, Fc 变体蛋白相对于类似分子具有增强的 ADCC 活性。在一特

定实施方案中, Fc 变体蛋白的 ADCC 活性是类似分子的至少 2 倍、或至少 3 倍、或至少 5 倍、或至少 10 倍、或至少 50 倍、或至少 100 倍。在另一特定实施方案中, Fc 变体蛋白相对于类似分子与 Fc 受体 Fc γ RIIIA 的结合增强并且具有增强的 ADCC 活性。在另一实施方案中, Fc 变体蛋白相对于类似分子同时具有增强的 ADCC 活性和增强的血清半衰期。

[0131] 在一个实施方案中, Fc 变体蛋白相对于类似分子具有降低的 ADCC 活性。在一特定实施方案中, Fc 变体蛋白的 ADCC 活性是类似分子的至多 1/2、或至多 1/3、或至多 1/5、或至多 1/10、或至多 1/50、或至多 1/100。在另一特定实施方案中, Fc 变体蛋白相对于类似分子与 Fc 受体 Fc γ RIIIA 的结合减弱并且具有降低的 ADCC 活性。在另一实施方案中, Fc 变体蛋白相对于类似分子同时具有降低的 ADCC 活性和增加的血清半衰期。

[0132] 在一个实施方案中, Fc 变体蛋白相对于类似分子具有增强的 CDC 活性。在一特定实施方案中, Fc 变体蛋白的 CDC 活性是类似分子的至少 2 倍、或至少 3 倍、或至少 5 倍、或至少 10 倍、或至少 50 倍、或至少 100 倍。在另一实施方案中, Fc 变体蛋白相对于类似分子同时具有增强的 CDC 活性和增强的血清半衰期。在一个实施方案中, Fc 变体蛋白相对于类似分子与一种或多种 Fc 配体的结合减弱。在另一实施方案中, Fc 变体蛋白对 Fc 配体的亲和力是类似分子的至多 1/2、或至多 1/3、或至多 1/5、或至多 1/7、或至多 1/10、或至多 1/20、或至多 1/30、或至多 1/40、或至多 1/50、或至多 1/60、或至多 1/70、或至多 1/80、或至多 1/90、或至多 1/100、或至多 1/200。在一特定实施方案中, Fc 变体蛋白与 Fc 受体的结合减弱。在另一特定实施方案中, Fc 变体蛋白与 Fc 受体 Fc γ RIIIA 的结合减弱。在另一特定实施方案中, 本文所述的 Fc 变体与 Fc 受体 Fc γ RIIIA 的亲和力是类似分子的至多 1/5, 其中所述 Fc 变体与 Fc 受体 Fc γ RIIB 的亲和力在类似分子的约 2 倍以内。在另一特定实施方案中, Fc 变体蛋白与 Fc 受体 FcRn 的结合减弱。在另一特定实施方案中, Fc 变体蛋白相对于类似分子与 C1q 的结合减弱。

[0133] 在一个实施方案中, 本发明提供 Fc 变体, 其中 Fc 区还在一个或多个选自根据 Kabat 中所述的 EU 指数编号的以下的位置包含非天然存在的氨基酸残基(除了或不同于上文公开的取代): 234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、251、252、254、255、256、262、263、264、265、266、267、268、269、279、280、284、292、296、297、298、299、305、313、316、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、339、341、343、370、373、378、392、416、419、421、440 和 443。任选地, Fc 区可以在本领域的技术人员已知的其它和/或替代位置包含非天然存在的氨基酸残基(参见例如美国专利 5,624,821 ;6,277,375 ;6,737,056 ;7,217,797, 美国专利公布 No. US2007/0135620 ;PCT 专利公布 WO 01/58957 ;WO 02/06919 ;WO 04/016750 ;WO 04/029207 ;WO 04/035752 ;W004/074455 ;WO 04/099249 ;WO 04/063351 ;WO 05/070963 ;W005/040217, WO 05/092925 和 WO 06/020114, 所述每个专利的全部内容以引用的方式并入本文)。

[0134] 在一个特定实施方案中, 本发明提供 Fc 变体, 其中 Fc 区包含至少一个选自根据 Kabat 中所述的 EU 指数编号的以下的非天然存在的氨基酸残基: 234D、234E、234N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、234F、235A、235D、235R、235W、235P、235S、235N、235Q、235T、235H、235Y、235I、235V、235F、236E、239D、239E、239N、239Q、239F、239T、239H、239Y、240I、240A、240T、240M、241W、241L、241Y、241E、241R、243W、243L、243Y、243R、243Q、244H、245A、247L、247V、247G、251F、252Y、254T、255L、256E、256M、262I、262A、262T、262E、263I、

263A、263T、263M、264L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264Y、264E、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、265L、265H、265T、266I、266A、266T、266M、267Q、267L、268E、269H、269Y、269F、269R、270E、280A、284M、292P、292L、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、296L、296I、296H、269G、297S、297D、297E、298H、298I、298T、298F、299I、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、305I、313F、316D、325Q、325L、325I、325D、325E、325A、325T、325V、325H、327G、327W、327N、327L、328S、328M、328D、328E、328N、328Q、328F、328I、328V、328T、328H、328A、329F、329H、329Q、330K、330G、330T、330C、330L、330Y、330V、330I、330F、330R、330H、331G、331A、331L、331M、331F、331W、331K、331Q、331E、331S、331V、331I、331C、331Y、331H、331R、331N、331D、331T、332D、332S、332W、332F、332E、332N、332Q、332T、332H、332Y、332A、339T、370E、370N、378D、392T、396L、416G、419H、421K、440Y 和 443W。任选地，Fc 区可以包含本领域的技术人员已知的其它和 / 或替代的非天然存在的氨基酸残基（参见例如美国专利 5, 624, 821 ;6, 277, 375 ;6, 737, 056 ;PCT 专利公布 WO 01/58957 ;WO 02/06919 ;WO 04/016750 ;WO 04/029207 ;WO 04/035752 和 WO 05/040217）。

[0135] 在一特定实施方案中，本发明提供 Fc 变体抗体，其中 Fc 区在一个或多个选自 234、235 和 331 的位置包含至少一个修饰（例如，氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失、氨基酸添加）。在一个实施方案中，非天然存在的氨基酸选自 234F、235F、235Y 和 331S。在另一特定实施方案中，本发明提供 Fc 变体，其中 Fc 区在一个或多个选自 239、330 和 332 的位置包含至少一个非天然存在的氨基酸。在一个实施方案中，非天然存在的氨基酸是选自由 239D、330L 和 332E 中选出的组。

[0136] 在一特定实施方案中，本发明提供 Fc 变体抗体，其中 Fc 区在一个或多个选自 252、254 和 256 的位置包含至少一个非天然存在的氨基酸。在一个实施方案中，非天然存在的氨基酸选自由 252Y、254T 和 256E 中选出的组（称为“YTE 修饰”），如 Dall' Acqua 等, J. Biol. Chem. , 281, 23514-23524 (2006) 和美国专利 No. 7, 083, 784 中所述，所述文献的全部内容都以引用的方式并入本文。

[0137] 产生抗体的方法

[0138] 本发明的工程改造的抗体可以通过本领域中已知用于合成抗体的任何方法，特别是通过化学合成或者优选通过重组表达技术来产生。

[0139] 单克隆抗体可以使用本领域中已知的多种技术（包括使用杂交瘤、重组体和噬菌体展示技术或其组合）来制备。例如，单克隆抗体可以使用杂交瘤技术，包括本领域中已知和例如以下文献中教示的技术来产生：Harlow 等, Antibodies :A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版 1988) ;Hammerling 等, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)（所述参考文献的全部内容以引用的方式并入本文）。本文中所述的术语“单克隆抗体”并不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指来源于单一克隆的抗体，包括任何真核生物、原核生物或噬菌体克隆，而不是指产生所述抗体的方法。

[0140] 使用杂交瘤技术产生和筛选特定抗体的方法在本领域中是常规的并且是众多周知的。简单地说，可用靶抗原（全长蛋白质或其结构域，例如，细胞外结构域或配体结合结构域）免疫小鼠，并且一旦检测到免疫反应后，例如在小鼠血清中检测到对靶抗原具有特异性的抗体，就收集小鼠脾脏并分离脾细胞。接着通过熟知的技术使脾细胞与任何适合骨

髓瘤细胞（例如来自可从 ATCC 获得的细胞系 SP20 的细胞）融合。通过限制稀释法选择和克隆杂交瘤。然后通过本领域中已知的方法测定杂交瘤克隆中分泌能够结合本发明的多肽的抗体的细胞。可以通过用阳性杂交瘤克隆免疫小鼠来产生一般含有高水平抗体的腹水。

[0141] 因此,可以通过培养分泌本发明抗体的杂交瘤细胞来产生单克隆抗体,其中所述杂交瘤优选是通过以下方式产生,将从用靶抗原免疫的小鼠分离的脾细胞与骨髓瘤细胞融合,并接着筛选由所述融合产生的杂交瘤中分泌能够结合特定靶抗原的抗体的杂交瘤克隆。

[0142] 识别特定靶抗原的表位的抗体片段可以通过本领域的技术人员已知的任何技术产生。例如,可以通过使用酶（如木瓜蛋白酶（以产生 Fab 片段）或胃蛋白酶（以产生 F(ab')₂ 片段）对免疫球蛋白分子进行蛋白水解裂解来产生本发明的 Fab 和 F(ab')₂ 片段。F(ab')₂ 片段含有可变区、轻链恒定区和重链的 CH1 结构域。此外,本发明的抗体还可以使用本领域中已知的各种噬菌体展示方法产生。

[0143] 在噬菌体展示方法中,将功能性抗体结构域展示于携带编码它的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。具体来说,从动物 cDNA 文库（例如,淋巴组织的人或鼠 cDNA 文库）扩增编码 VH 和 VL 结构域的 DNA 序列。通过 PCR 将编码 VH 和 VL 结构域的 DNA 用 scFv 连接器重组到一起并克隆到噬菌粒载体（例如,pCANTAB 6 或 pComb 3HSS）中。将载体电穿孔到大肠杆菌（E. coli）中并且将所述大肠杆菌用辅助噬菌体感染。这些方法中所用的噬菌体通常是丝状噬菌体（包括 fd 和 M13）并且 VH 和 VL 结构域通常重组融合于噬菌体基因 III 或基因 VIII。可以用抗原,例如使用被标记的抗原或结合或捕捉于固体表面或珠粒的抗原来选择或鉴别表达与目标表位结合的抗原结合结构域的噬菌体。可用于制备本发明抗体的噬菌体展示方法的实例包括以下文献中公开的方法:Brinkman 等,1995, J. Immunol. Methods 182:41-50;Ames 等,1995, J. Immunol. Methods 184:177;Kettleborough 等,1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958;Persic 等,1997, Gene 187:9;Burton 等,1994, Advances in Immunology 57:191-280;国际申请 No. PCT/GB91/01134;国际申请 No. WO 90/02809、WO 91/10737、WO92/01047、WO 92/18619、WO 93/11236、WO 95/15982、WO 95/20401 和 WO97/13844;和美国专利 No. 5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727、5,733,743 和 5,969,108;每个文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0144] 如上述参考文献中所述,在噬菌体选择后,可从噬菌体分离抗体编码区并用于产生完整抗体,包括人抗体,或任何其它期望的抗原结合片段,并在任何期望宿主中表达,所述宿主包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌,例如如下文所述。还可使用本领域中已知的方法采用重组产生 Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段的技术,所述方法如以下文献中公开的方法:国际公布 No. WO 92/22324;Mullinax 等,1992, BioTechniques 12:864;Sawai 等,1995,AJRI 34:26;和 Better 等,1988,Science 240:1041(所述参考文献的全部内容以引用的方式并入本文)。

[0145] 为产生完整抗体,可使用包含 VH 或 VL 核苷酸序列、限制性位点和用于保护限制性位点的侧接序列的 PCR 引物来扩增 scFv 克隆中的 VH 或 VL 序列。利用本领域中的技术人员所已知的克隆技术,可将通过 PCR 扩增的 VH 结构域克隆到表达 VH 恒定区（例如,人 γ 4 恒定区）的载体中,并可将通过 PCR 扩增的 VL 结构域克隆到表达 VL 恒定区（例如,人 κ 或

λ 恒定区)的载体中。优选地,用于表达 VH 或 VL 结构域的载体包含 EF-1 α 启动子、分泌信号、用于可变结构域、恒定结构域和选择标记(如新霉素)的克隆位点。还可将 VH 和 VL 结构域克隆到表达必需恒定区的一个载体中。然后使用本领域的技术人员已知的技术将重链转换载体和轻链转换载体共转染到细胞系中以产生表达全长抗体(例如,IgG)的稳定或瞬时细胞系。

[0146] 对于一些使用,包括抗体在人中的体内使用和体外检测测定,可能优选使用人或嵌合抗体。完全人抗体尤其适用于人受试者的治疗性治疗。可通过本领域中已知的多种方法(包括上述使用来源于人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示法)制备人抗体。也参见美国专利 No. 4, 444, 887 和 4, 716, 111 ;和国际公布 No. WO 98/46645、No. W098/50433、No. WO 98/24893、No. WO 98/16654、No. WO 96/34096、No. WO 96/33735 和 No. WO 91/10741 ;所述文献的全部内部以引用的方式并入本文。

[0147] 人抗体还可以使用不能表达功能性内源免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白的转基因小鼠来产生。例如,可将人重链和轻链免疫球蛋白基因复合物随机或通过同源重组引入小鼠胚胎干细胞中。或者,除了人重链和轻链基因以外,还可以将人可变区、恒定区和多变区引入小鼠胚胎干细胞中。可以通过同源重组引入人免疫球蛋白基因座而使小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因分别或同时变得没有功能。具体来说, J_H 区的纯合子缺失防止内源性抗体产生。将修饰过的胚胎干细胞扩增并显微注射到胚泡中以产生嵌合小鼠。然后培养嵌合小鼠以产生表达人抗体的纯合子后代。以正常方式用所选抗原(例如,本发明多肽的全部或一部分)使转基因小鼠免疫。可使用常规杂交瘤技术从免疫过的转基因小鼠获得针对所述抗原的单克隆抗体。由转基因小鼠携带的人免疫球蛋白转基因在 B 细胞分化期间重排,并随后进行类别转换和体细胞突变。因此,使用这种技术,有可能产生在治疗上有用的 IgG、IgA、IgM 和 IgE 抗体。关于产生人抗体的这种技术的综述,参见 Lonberg 和 Huszar(1995, *Iht. Rev. Immunol.* 13 :65-93)。关于产生人抗体和人单克隆抗体和产生所述抗体的方案的详细论述,参见例如国际公布 No. WO 98/24893、No. WO 96/34096 和 No. WO 96/33735 ; 和 美国 专 利 No. 5, 413, 923、No. 5, 625, 126、No. 5, 633, 425、No. 5, 569, 825、No. 5, 661, 016、No. 5, 545, 806、No. 5, 814, 318 和 No. 5, 939, 598, 这些文献的全部内容以引用的方式并入本文。另外,可以使公司(如 Medarex(Princeton,NJ))使用类似于上文所述的技术提供针对所选抗原的人抗体。

[0148] 嵌合抗体是抗体的不同部分来源于不同免疫球蛋白分子的分子,所述不同的免疫球蛋白分子如具有来源于非人抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体。产生嵌合抗体的方法在本领域中是已知的。参见例如 Morrison,1985, *Science* 229 :1202 ;O'i 等,1986, *BioTechniques* 4 :214 ;Gillies 等,1989, *J. Immunol. Methods* 125 :191-202 ;和美国专利 No. 6, 311, 415、No. 5, 807, 715、No. 4, 816, 567 和 No. 4, 816, 397, 所述文献的全部内容以引用的方式并入本文。包含一个或多个来自非人物种的 CDR 和来自人免疫球蛋白分子的框架区的嵌合抗体可以使用多种本领域中已知的技术产生,所述技术包括例如 CDR 移植(EP 239, 400 ;国际公布 No. WO 91/09967 ;和美国专利 No. 5, 225, 539、No. 5, 530, 101 和 No. 5, 585, 089)、镶饰(veneering)或表面重修(resurfacing)(EP592, 106 ;EP 519, 596 ;Padlan,1991, *Molecular Immunology* 28(4/5) :489-498 ;Studnicka 等,1994, *Protein Engineering* 7 :805 ;和 Roguska 等,1994, *PNAS* 91 :969)和链改组(美国专利

No. 5, 565, 332)。

[0149] 通常, 框架区中的框架残基将用来自 CDR 供体抗体的相应残基取代以改变 (优选改善) 抗原结合。这些框架取代可通过本领域中熟知的方法进行鉴别, 例如通过对 CDR 与框架残基的相互作用进行建模来鉴别对于抗原结合来说重要的框架残基和通过进行序列比较来鉴别特定位置的稀有的框架残基。(参见例如美国专利 No. 5, 585, 089 ;和 Riechmann 等, 1988, Nature 332 :323, 所述文献的全部内容以引用的方式并入本文)。

[0150] 人源化抗体是能够结合预定抗原并且包含具有基本上人免疫球蛋白的氨基酸序列的框架区和具有基本上非人免疫球蛋白的氨基酸序列的 CDR 的抗体或其变体或其片段。人源化抗体包含至少一个并且通常两个以下的可变结构域的基本上全部, 在所述可变结构域中, 全部或基本上全部 CDR 区对应于非人免疫球蛋白 (即, 供体抗体) 的 CDR 区并且全部或基本上全部框架区是具有人免疫球蛋白共有序列的框架区。优选地, 人源化抗体还包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) (通常人免疫球蛋白的恒定区) 的至少一部分。一般来说, 抗体将同时含有轻链以及至少重链的可变结构域。抗体还可以包含重链的 CH1 区、铰链区、CH2 区、CH3 区和 CH4 区。人源化抗体可以选自免疫球蛋白的任何类别, 包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE, 和任何同种型, 包括 IgG₁、IgG₂、IgG₃和 IgG₄。一般在期望人源化抗体表现细胞毒性活性时, 恒定结构域是补体固定恒定结构域, 并且类别通常是 IgG₁。在这种细胞毒性活性不合需要时, 恒定结构域可以是 IgG₂类别。人源化抗体可以包含来自多于一种类别或同种型的序列, 并且选择特定的恒定结构域以优化期望的效应功能在本领域的普通技术人员的技能范围内。人源化抗体的框架和 CDR 区无需精确对应于亲本序列, 例如可以通过取代、插入或缺失至少一个残基来对供体 CDR 或共有框架进行诱变以使该位点的 CDR 或框架残基不对应于共有序列或输入抗体。然而, 这些突变将不广泛存在。一般来说, 至少 75%, 更通常 90%, 或甚至多于 95% 的人源化抗体残基将对应于亲本框架区 (FR) 和 CDR 序列的残基。

[0151] 人源化抗体可以使用本领域中已知的多种技术来产生, 所述技术包括但不限于: CDR 移植 (欧洲专利 No. EP 239, 400 ;国际公布 No. W091/09967 ;和美国专利 No. 5, 225, 539、No. 5, 530, 101 和 No. 5, 585, 089)、镶饰或表面重修 (欧洲专利 No. EP 592, 106 和 No. EP 519, 596 ;Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5) :489-498 ;Studnicka 等, 1994, Protein Engineering 7(6) :805-814 ;和 Roguska 等, 1994, PNAS91 :969-973)、链改组 (美国专利 No. 5, 565, 332), 和以下文献中公开的技术: 例如美国专利 No. 6, 407, 213、No. 5, 766, 886、No. 5, 585, 089、国际公布 No. W0 9317105 ;Tan 等, 2002, J. Immunol. 169 : 1119-25 ;Caldas 等, 2000, Protein Eng. 13 :353-60 ;Morea 等, 2000, Methods 20 :267-79 ;Baca 等, 1997, J. Biol. Chem. 272 :10678-84 ;Roguska 等, 1996, Protein Eng. 9 :895-904 ;Couto 等, 1995, Cancer Res. 55(23 Supp) :5973s-5977s ;Couto 等, 1995, Cancer Res. 55 : 1717-22 ;Sandhu, 1994, Gene 150 :409-10 ;Pedersen 等, 1994, J. Mol. Biol. 235 :959-73 ;Jones 等, 1986, Nature 321 :522-525 ;Riechmann 等, 1988, Nature 332 :323 ;和 Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2 :593-596。通常, 框架区中的框架残基将用来自 CDR 供体抗体的相应残基取代以改变 (优选改善) 抗原结合。这些框架取代可用过本领域中熟知的方法进行鉴别, 例如通过对 CDR 与框架残基的相互作用进行建模来鉴别对于抗原结合来说重要的框架残基和通过进行序列比较来鉴别特定位置的稀有框架残基。(参见例如 Queen 等, 美国专利 No. 5, 585, 089 ;和 Riechmann 等, 1988, Nature 332 :323, 所述文献的全部内容以

引用的方式并入本文)。

[0152] 此外,本发明的抗体可转而用于使用本领域中的技术人员熟知的技术产生抗个体基因型抗体。(参见例如 Greenspan 和 Bona,1989,FASEB J.7:437-444;和 Nissinoff,1991,J. Immunol.147:2429-2438)。本发明提供采用包含编码本发明抗体的核苷酸序列或其片段的多核苷酸的用途的方法。

[0153] 另外,各种公布描述获得半衰期通过以下方式进行了改变的生理活性分子的方法:将 FcRn 结合多肽引入分子中(WO 97/43316;美国专利 No.5,869,046;美国专利 No.5,747,035;WO 96/32478;WO91/14438),或使分子与 FcRn 结合亲和力得到保留但对其它 Fc 受体的亲和力大为降低的抗体融合(WO 99/43713),或与抗体的 FcRn 结合结构域融合(WO 00/09560;美国专利 No.4,703,039)。增加生理活性分子的半衰期的具体技术和方法还可见于 2006 年 8 月 1 日授予的名称为“Antibodies with Increased Half-lives”的美国专利 No.7,083,784 中,所述专利为所有目的在此以引用的方式并入本文。具体来说,预期本发明抗体包含含有以下氨基酸残基突变的 Fc 区(根据 Kabat 中的 EU 指数进行编号):M252Y/S254T/T256E 或 H433K/N434F/Y436H。

[0154] 编码抗体的多核苷酸

[0155] 可以利用本领域中已知的任何方法获得多核苷酸和测定多核苷酸的核苷酸序列。因为抗体的氨基酸序列是已知的,所以编码这些抗体的核苷酸序列可以使用本领域中熟知的方法进行测定,即将已知编码特定氨基酸的核苷酸密码子以特定方式组装以产生编码本发明抗体或其片段的核酸。编码抗体的这种多核苷酸可以从化学合成的寡核苷酸组装(例如如 Kutmeier 等,1994,BioTechniques 17:242 中所述),这种方法简单来说涉及合成含有编码抗体的序列的部分的重叠寡核苷酸,将这些寡核苷酸退火和连接,并接着通过 PCR 对所连接的寡核苷酸进行扩增。

[0156] 或者,编码抗体的多核苷酸可以从来自适合来源的核酸产生。如果没有含有编码特定抗体的核酸的克隆,但是所述抗体的序列是已知的,那么编码免疫球蛋白的核酸可以化学合成或从适合来源(例如,抗体 cDNA 文库,或 cDNA 文库或核酸(优选 poly A+RNA),其中通过 PCR 扩增使用可与序列的 3' 和 5' 端杂交的合成引物或者通过使用对特定基因序列具有特异性用于鉴别例如来自编码所述抗体的 cDNA 文库的 cDNA 克隆的寡核苷酸探针进行克隆以从表达所述抗体的任何组织或细胞产生所述 cDNA 文库或分离所述核酸)获得。接着可使用本领域中熟知的任何方法将通过 PCR 所产生的扩增核酸克隆到可复制克隆载体中。

[0157] 一旦确定了抗体的核苷酸序列,就可以使用本领域中熟知用于操纵核苷酸序列的方法,例如重组 DNA 技术、定点诱变、PCR 等(参见,例如以下文献中所述的技术:Sambrook 等,1990,Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第 2 版,Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 和 Ausubel 等,编著,1998,Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY,这些文献的全部内容都以引用的方式并入本文),对抗体的核苷酸序列进行操纵以产生具有不同氨基酸序列的抗体,例如以产生氨基酸取代、缺失和/或插入。

[0158] 在一特定实施方案中,使用常规重组 DNA 技术将一个或多个 CDR 插入框架区中。框架区可以是天然存在的或者是共有框架区,并且优选是人框架区(关于人框架区的列表,

参见例如 Chothia 等, 1998, *J. Mol. Biol.* 278 :457-479)。优选地, 通过组合框架区和 CDR 所产生的多核苷酸编码特异性结合 EphA2 或 EphA4 的抗体。优选地, 如上文所论述, 可在框架区中进行一个或多个氨基酸取代, 并且优选地, 所述氨基酸取代改善抗体与其抗原的结合。另外, 所述方法可用于对参与链内二硫键的一个或多个可变区半胱氨酸残基进行氨基酸取代或缺失以产生缺乏一个或多个链内二硫键的抗体。对多核苷酸的其它改变由本发明涵盖并且在本领域的技能范围内。

[0159] 抗体的重组表达

[0160] 本发明的抗体、其衍生物、类似物或片段的重组表达需要构建含有编码所述抗体的多核苷酸的表达载体。一旦获得了编码本发明的抗体或抗体重链或轻链或其部分的多核苷酸, 就可以使用本领域中熟知的技术通过重组 DNA 技术产生用于产生抗体的载体。因此, 本文中描述通过表达含有抗体编码核苷酸序列的多核苷酸制备蛋白质的方法。可以使用本领域中的技术人员熟知的方法来构建含有抗体编码序列和适当转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组 DNA 技术、合成技术和体内遗传重组。

[0161] 本发明因此提供包含编码本发明抗体、抗体的重链或轻链、抗体的重链或轻链可变结构域或其部分、或重链或轻链 CDR 的核苷酸序列可操作地连接于启动子的可复制载体。所述载体可包含编码抗体的恒定区的核苷酸序列 (参见例如, 国际公布 No. WO 86/05807 和 W089/01036 ; 和美国专利 No. 5, 122, 464), 并且可将抗体的可变结构域克隆到所述载体以便表达完整重链、完整轻链或完整重链和轻链两者。

[0162] 通过常规技术将表达载体转移到宿主细胞并接着通过常规技术培养转染的细胞以产生本发明的抗体。因此, 本发明包括含有编码本发明抗体或其片段、或其重链或轻链、或其部分、或本发明的单链抗体的多核苷酸可操作地连接于异源启动子的宿主细胞。在表达双链抗体的某些实施方案中, 可在宿主细胞中共表达编码重链和轻链的载体以便表达完整的免疫球蛋白分子, 如下文所详细描述。

[0163] 多种宿主 - 表达载体系统可用于表达本发明的抗体 (参见例如。美国专利 No. 5, 807, 715)。所述宿主表达载体系统代表可借以产生并随后纯化目标编码序列的媒介, 而且还代表在用适当核苷酸编码序列转化或转染时可以原位表达本发明的抗体的细胞。这些包括但不限于微生物, 如用含有抗体编码序列的重组细菌噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌 (例如, 大肠杆菌 (*E. coli*) 和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)); 用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母 (例如酿酒酵母 (*Saccharomyces*)、毕赤酵母 (*Pichia*)); 用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体 (例如, 杆状病毒) 感染的昆虫细胞系统; 用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体 (例如, 花椰菜花叶病毒 CaMV ; 烟草花叶病毒 TMV) 感染或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体 (例如, Ti 质粒) 转化的植物细胞系统; 或带有含有来源于哺乳动物细胞基因组的启动子 (例如, 金属硫蛋白启动子) 或来源于哺乳动物病毒的启动子 (例如, 腺病毒晚期启动子 ; 牛痘病毒 7.5K 启动子) 的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统 (例如, COS、CHO、BHK、293、NS0 和 3T3 细胞)。优选地, 对于重组抗体的表达使用细菌细胞 (如大肠杆菌), 并且更优选使用真核细胞, 尤其在表达完整重组抗体的情况下。

[0164] 例如, 哺乳动物细胞 (如中国仓鼠卵巢细胞, CHO) 与载体 (如来自人巨细胞病毒的主要极早期基因启动子元件) 的结合是抗体的有效表达系统 (Foecking 等, 1986, *Gene* 45 :

101 ;和 Cockett 等,1990, *BioTechnology* 8 :2)。

[0165] 在细菌系统中,根据所表达抗体的预定用途对多种表达载体进行有利的选择。例如,当要产生大量这种蛋白质以供产生抗体的药物组合物时,可能需要指导容易纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体。所述载体包括但不限于大肠杆菌表达载体 pUR278(Ruther 等,1983, *EMBO* 12 :1791),其中抗体编码序列可个别地连接到载体中与 lac Z 编码区同框以便产生融合蛋白;pIN 载体(Inouye 和 Inouye,1985, *Nucleic Acids Res.* 13 :3101-3109;Van Heeke 和 Schuster,1989, *J. Biol. Chem.* 24 :5503-5509);等。也可使用 PGEX 载体来将外源多肽表达为与谷胱甘肽 S-转移酶(GST)的融合蛋白。一般来说,这些融合蛋白是可溶的并且能够通过吸附和结合于基质谷胱甘肽-琼脂糖珠粒并随后在游离谷胱甘肽存在下洗脱容易地从溶解细胞中纯化出来。设计 pGEX 载体以包含凝血酶或因子 Xa 蛋白酶裂解位点,以便可从 GST 部分释放所克隆的靶基因产物。

[0166] 在昆虫系统中,使用苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)作为表达外源基因的载体。病毒在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。抗体编码序列可个别地克隆到病毒的非必需区中并使其受 AcNPV 启动子控制。

[0167] 在哺乳动物宿主细胞中,可以利用多种基于病毒的表达系统。在使用腺病毒作为表达载体的情况下,可将目标抗体编码序列连接于腺病毒转录/翻译控制复合物,例如晚期启动子和三联前导序列。接着可通过体外或体内重组将这一嵌合基因插入到腺病毒基因组中。插入病毒基因组的非必需区(例如,区 E1 或 E3)将产生在感染宿主中有活力并且能够表达抗体的重组病毒(例如,参见 Logan 和 Shenk,1984, *PNAS* 81 :6355-6359)。所插入抗体编码序列的有效翻译还可能需特定起始信号。这些信号包括 ATG 起始密码子和相邻序列。此外,起始密码子必须与期望编码序列的阅读框同步以确保完整插入序列的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可具有多种来源,不论是天然的还是合成的。表达效率可通过纳入适当转录增强子元件、转录终止子等进行增强(参见例如 Bittner 等,1987, *Methods in Enzymol.* 153 :516-544)。

[0168] 另外,可选择以期望的特定方式调节所插入序列的表达或修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的所述修饰(例如,糖基化)和加工(例如,裂解)对于蛋白质的功能来说可能是重要的。不同宿主细胞对于蛋白质和基因产物翻译后加工和修饰具有特征性且特定机制。可选择适当细胞系或宿主系统以确保所表达外源蛋白质的正确修饰和加工。为此,可使用具有适当加工初级转录物、糖基化和磷酸化基因产物的细胞机构的真核宿主细胞。这些哺乳动物宿主细胞包括但不限于 CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、NS1 和 T47D、NS0(不产生任何内源性免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030 和 HsS78Bst 细胞。

[0169] 在一个实施方案中,根据美国专利 No. 7, 521, 541 和美国专利公布 No. 12/399, 241 中所公开的方法产生本发明的抗体,所述文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0170] 对于重组蛋白的长期高产量产生,优选使用稳定表达。例如,可以工程改造稳定表达抗体的细胞系。可以用受适当表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)控制的 DNA 和可选择标记转化宿主细胞,而不是使用含有病毒复制起点的表达载体。在引入外源 DNA 后,可使工程改造的细胞在富集培养基中生长 1 至 2 天,并接着转换到选择性培养基。重组质粒中的可选择标记赋予选择抗性并允许细胞将质粒稳定

整合到其染色体中,并且生长以形成基因座,细胞转而可进行克隆并扩增成细胞系。此方法可有利地用于工程改造表达抗体的细胞系。这种工程改造过的细胞系可能特别适用于筛选和评估与抗体直接或间接相互作用的组合物。

[0171] 可使用多种选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶 (Wigler 等, 1977, Cell 11 :223)、谷氨酰胺合成酶、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (Szybalska 和 Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 :202) 和腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (Lowy 等, 1980, Cell 22 :8-17) 基因可分别用于 tk⁻、gs⁻、hgprt⁻ 或 aprt⁻ 细胞中。同样,可以使用抗代谢物抗性作为以下基因的选择基础: dhfr, 其赋予对甲氨蝶呤的抗性 (Wigler 等, 1980, PNAS 77 :357 ; O' Hare 等, 1981, PNAS 78 :1527) ; gpt, 其赋予对霉酚酸的抗性 (Mulligan 和 Berg, 1981, PNAS 78 :2072) ; neo, 其赋予对氨基糖苷 G-418 的抗性 (Wu 和 Wu, 1991, Biotherapy 3 :87 ; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 :573 ; Mulligan, 1993, Science 260 :926 ; 和 Morgan 和 Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62 :191 ; May, 1993, TIB TECH 11 :155-) ; 和 hyg^r, 其赋予对潮霉素的抗性 (Santerre 等, 1984, Gene 30 :147)。可按常规应用重组 DNA 技术领域通常已知的方法来选择期望的重组克隆, 并且所述方法描述于以下文献中: 例如 Ausubel 等 (编著), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(1993) ; Krieglger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY(1990) ; 和 Dracopoli 等 (编著), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY(1994) 中第 12 章和第 13 章; Colberre-Garapin 等, 1981, J. Mol. Biol. 150 :1, 这些参考文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0172] 可通过载体扩增增加抗体的表达水平 (关于综述, 请参见 Bebbington 和 Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, 第 3 卷. (Academic Press, New York, 1987))。当表达抗体的载体系统中的标记是可扩增的时, 宿主细胞培养物中存在的抑制剂的水平增加将使标记基因的拷贝数增加。因为所扩增的区域与抗体基因相关联, 所以抗体的产生也将增加 (Crouse 等, 1983, Mol. Cell. Biol. 3 :257)。

[0173] 宿主细胞可以用本发明的两个表达载体共转染, 其中第一载体编码重链来源的多肽而第二载体编码轻链来源的多肽。两个载体可含有相同的可选择标记, 从而使得重链和轻链多肽能同等地表达。或者, 可以使用同时编码重链和轻链多肽并且能够同时表达重链和轻链多肽的单一载体。在这种情况下, 轻链应置于重链之前以避免过量的游离重链 (Proudfoot, 1986, Nature 322 :52 ; 和 Kohler, 1980, PNAS 77 :2197)。重链和轻链的编码序列可包含 cDNA 和基因组 DNA。

[0174] 一旦通过重组表达产生了本发明的工程改造的抗体, 那么其就可以通过本领域中已知用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法进行纯化, 例如通过色谱法 (例如, 离子交换色谱、亲和色谱, 尤其是通过蛋白质 A 后对特定抗原的亲和力, 和分级柱色谱)、离心、差异溶解度或通过用于纯化蛋白质的任何其它标准技术。另外, 本发明的抗体或其片段可与本文所述或本领域中本来已知的异源多肽序列融合以有助于纯化。

[0175] a. 工程改造的抗体的缩放产生

[0176] 为试图获得大量本发明的工程改造的抗体, 可通过缩放方法 (下文称为“本发明

的缩放方法”)产生这些抗体。在一些实施方案中,可在研究实验室中通过本发明的缩放方法产生工程改造的抗体,所述方法可扩大规模以在分析规模生物反应器(例如,但不限于5L、10L、15L、30L或50L生物反应器)中产生本发明的蛋白质,同时保持所述蛋白质的功能活性。例如,在一个实施方案中,通过本发明的缩放方法产生的蛋白质如通过HPSEC或rCGE所测量显示低水平至不可检测得到的水平的聚集,即蛋白质聚集体按重量不超过5%、不超过4%、不超过3%、不超过2%、不超过1%或不超过0.5%,和/或低水平至不可检测的水平断裂,即代表完整的工程改造的抗体的峰占总峰面积的80%或更高、85%或更高、90%或更高、95%或更高、98%或更高、或99%或更高、或99.5%或更高。

[0177] 在其它实施方案中,可在研究实验室中利用本发明的缩放方法产生工程改造的抗体,所述方法可扩大规模以在生产规模生物反应器(例如但不限于75L、100L、150L、300L或500L生物反应器)中产生本发明的蛋白质。在一些实施方案中,本发明的缩放方法与在研究实验室中所执行的产生方法相比,使生产效率降低极少或没有降低。在其它实施方案中,本发明的缩放方法以约10mg/L、约20mg/L、约30mg/L、约50mg/L、约75mg/L、约100mg/L、约125mg/L、约150mg/L、约175mg/L、约200mg/L、约250mg/L、约300mg/L或更高的生产效率产生工程改造的抗体。

[0178] 在其它实施方案中,本发明的缩放方法以至少约10mg/L、至少约20mg/L、至少约30mg/L、至少约50mg/L、至少约75mg/L、至少约100mg/L、至少约125mg/L、至少约150mg/L、至少约175mg/L、至少约200mg/L、至少约250mg/L、至少约300mg/L或更高的生产效率产生工程改造的抗体。

[0179] 在其它实施方案中,本发明的缩放方法以约10mg/L至约300mg/L、约10mg/L至约250mg/L、约10mg/L至约200mg/L、约10mg/L至约175mg/L、约10mg/L至约150mg/L、约10mg/L至约100mg/L、约20mg/L至约300mg/L、约20mg/L至约250mg/L、约20mg/L至约200mg/L、20mg/L至约175mg/L、约20mg/L至约150mg/L、约20mg/L至约125mg/L、约20mg/L至约100mg/L、约30mg/L至约300mg/L、约30mg/L至约250mg/L、约30mg/L至约200mg/L、约30mg/L至约175mg/L、约30mg/L至约150mg/L、约30mg/L至约125mg/L、约30mg/L至约100mg/L、约50mg/L至约300mg/L、约50mg/L至约250mg/L、约50mg/L至约200mg/L、50mg/L至约175mg/L、约50mg/L至约150mg/L、约50mg/L至约125mg/L、约50mg/L至约100mg/L的生产效率产生工程改造的抗体。

[0180] 为确保本发明抗体的稳定性,已经开发了适合的测定法。在一个实施方案中,本发明蛋白质的稳定性通过本领域中的已知技术进行表征。在其它实施方案中,本发明蛋白质的稳定性可以通过聚集和/或断裂速率或特征进行评估。为测定聚集或断裂的水平,可以使用多种技术。在一个实施方案中,可通过使用以下技术对聚集和/或断裂特征进行评估:分析型超离心(AUC)、尺寸排阻色谱(SEC)、高效尺寸排阻色谱(HPSEC)、熔融温度(T_m)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、毛细管凝胶电泳(CGEC)、光散射(SLS)、傅立叶变换红外光谱(FTIR)、圆二色性(CD)、尿素诱导的蛋白质解折叠技术、内源性色氨酸荧光、差示扫描量热测定或1-苯胺基-8-萘磺酸(ANS)蛋白质结合技术。在另一实施方案中,本发明蛋白质的稳定性通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析进行表征。在另一实施方案中,本发明蛋白质的稳定性通过尺寸排阻色谱(SEC)特征分析进行表征。

[0181] 抗体偶联物和融合蛋白

[0182] 本发明涵盖重组融合或化学偶联（包括共价或非共价偶联）于异源药剂的 Fc 区的用途、工程改造的抗体的用途。适于连接至抗体的物质包括但不限于氨基酸、肽、蛋白质、多糖、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、半抗原、药物、激素、脂质、脂质组合、合成聚合物、聚合物微粒、生物细胞、病毒、荧光团、发色团、染料、毒素、半抗原、酶、抗体、抗体片段、放射性同位素、固体基质、半固体基质和其组合。将另一物质偶联或共价连接至抗体的方法在本领域中众所周知。融合或偶联不必是直接的，而是可经由连接子序列进行。融合或偶联于异源药剂的抗体可使用本领域中已知的方法在体内用于检测、治疗、管理或监测病症的进展。参见例如国际公布 WO 93/21232 ;EP439, 095 ;Naramura 等,1994, Immunol. Lett. 39 :91-99 ;美国专利 5,474,981 ;Gillies 等,1992, PNAS 89 :1428-1432 ;和 Fell 等,1991, J. Immunol. 146 :2446-2452, 这些文献的全部内容以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,要检测、治疗、管理或监测的病症是自体免疫性、炎症性、感染性疾病或癌症相关病症。将多肽融合或偶联于抗体部分的方法在本领域中是已知的。参见例如美国专利 No. 5,336,603、No. 5,622,929、No. 5,359,046、No. 5,349,053、No. 5,447,851 和 No. 5,112,946 ;EP 307,434 ;EP 367,166 ;国际公布 No. WO 96/04388 和 WO 91/06570 ;Ashkenazi 等,1991, PNAS 88 :10535-10539 ;Zheng 等,1995, J. Immunol. 154 :5590-5600 ;和 Vil 等,1992, PNAS 89 :11337-11341 (所述参考文献的全部内容以引用的方式并入本文)。

[0183] 可通过基因改组、基元改组、外显子改组和 / 或密码子改组 (统称为 “DNA 改组”) 技术产生其它融合蛋白。DNA 改组可用于改变本发明的工程改造的抗体的活性 (例如, 具有较高亲和力和较低解离速率的抗体)。大体参见美国专利 No. 5,605,793 ;No. 5,811,238 ;No. 5,830,721 ;No. 5,834,252 和 No. 5,837,458, 和 Patten 等,1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8 :724-33 ;Harayama,1998, Trends Biotechnol. 16 :76 ;Hansson 等,1999, J. Mol. Biol. 287 :265 ;和 Lorenzo 和 Blasco,1998, BioTechniques 24 :308 (这些专利和出版物的全部内容在此以引用的方式并入本文)。抗体或其片段、或者所编码抗体或其片段可通过在重组之前通过易错 PCR、随机核苷酸插入或其它方法进行随机诱变进行改变。编码抗体或抗体片段的多核苷酸的一个或多个部分可与一种或多种异源药剂的一个或多个组分、基元、区段、部分、结构域、片段等进行重组。

[0184] 在某些实施方案中,本发明的 Fc 区或抗体偶联于固体支撑物。抗体可偶联于固体支撑物作为筛选和 / 或纯化和 / 或制造方法的一部分。或者,本发明抗体可偶联于固体支撑物作为诊断方法或组合物的一部分。适用于本发明的固体支撑物通常在液相中实质上不可溶。有大量支撑物可用并且为本领域中的普通技术人员所已知。因此,固体支撑物包括固体和半固体基质,如气凝胶和水凝胶、树脂、珠粒、生物芯片 (包括薄膜涂布生物芯片)、微流体芯片、硅芯片、多孔板 (也称为微量滴定板或微板)、膜、导体和非导体金属、玻璃 (包括显微镜载玻片) 和磁性支撑物。固体支撑物的更具体实例包括硅胶、聚合物膜、粒子、衍生化塑胶膜、玻璃珠、棉花、塑胶珠粒、氧化铝凝胶、多糖 (如琼脂糖凝胶)、聚 (丙烯酸酯)、聚苯乙烯、聚 (丙烯酰胺)、多元醇、琼脂糖、琼脂、纤维素、葡聚糖、淀粉、聚蔗糖 (FICOLL)、肝素、糖原、支链淀粉、甘露聚糖、菊糖、硝酸纤维素、重氮纤维素、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯 (包括聚 (乙二醇))、尼龙、乳胶珠粒、磁性珠粒、顺磁性珠粒、超顺磁性珠粒、淀粉等。

[0185] 在一些实施方案中,固体支撑物可包括反应性官能团,包括但不限于羟基、羧基、

氨基、硫醇基、醛、卤素、硝基、氰基、酰胺基、脲、碳酸酯、氨基甲酸酯、异氰酸酯、砒、磺酸酯、磺酰胺、亚砒等,用于连接本发明的抗体。

[0186] 适合的固相支撑物可根据期望的最终用途和对于各种合成方案的适合性进行选择。例如,在需要形成酰胺键以便将本发明抗体连接至固体支撑物的情况下,可采用一般适用于肽合成的树脂,如聚苯乙烯(例如,获自 Bachem Inc., Peninsula Laboratories 的 PAM 树脂等)、POLYHIPE™树脂(获自 Aminotech, Canada)、聚酰胺树脂(获自 Peninsula Laboratories)、接枝有聚乙二醇的聚苯乙烯树脂(TentaGel™, Rapp Polymere, Tubingen, Germany)、聚二甲基-丙烯酰胺树脂(可获自 Milligen/Biosearch, California)或 PEGA 珠粒(获自 Polymer Laboratories)。

[0187] 在一个实施方案中,本发明的工程改造的抗体或其片段或变体偶联或融合于标记序列(如肽)以有助于纯化。在某些实施方案中,标记氨基酸序列是六组氨酸肽,如 pQE 载体(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)中所提供的标签,其中许多标记序列都可商购获得。如 Gentz 等,1989,PNAS 86:821 中所述,例如,六组氨酸使得可便利地纯化融合蛋白。适用于纯化的其它肽标签包括但不限于血球凝集素“HA”标签,其对应于来源于流感血球凝集素蛋白的表位(Wilson 等,1984,Cell 37:767);和“flag”标签。

[0188] 在其它实施方案中,其本发明抗体偶联或融合于诊断剂或检测剂。这些抗体适用于监测或预测病症(如但不限于癌症)的发展或进展,作为临床测试程序的一部分,如测定特定疗法的功效。

[0189] 所述诊断和检测可通过将抗体与可检测物质融合或偶联来实现,所述可检测物质包括但不限于:各种酶,如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,如但不限于抗生蛋白链菌素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;荧光材料,如但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,如但不限于生物发光材料,如但不限于萤光素酶、荧光素和水母发光蛋白;放射性材料,如但不限于铋(^{213}Bi)、碳(^{14}C)、铬(^{51}Cr)、钴(^{57}Co)、氟(^{18}F)、钆(^{153}Gd 、 ^{159}Gd)、镓(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、锗(^{68}Ge)、钬(^{166}Ho)、铟(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、镧(^{140}La)、镱(^{177}Lu)、锰(^{54}Mn)、钼(^{99}Mo)、钯(^{103}Pd)、磷(^{32}P)、镨(^{142}Pr)、钷(^{149}Pm)、铼(^{186}Re 、 ^{188}Re)、铑(^{105}Rh)、钌(^{97}Ru)、钐(^{153}Sm)、钪(^{47}Sc)、硒(^{75}Se)、锶(^{85}Sr)、硫(^{35}S)、锝(^{99}Tc)、钛(^{201}Ti)、锡(^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、氦(^3H)、氙(^{133}Xe)、镱(^{169}Yb 、 ^{175}Yb)、钇(^{90}Y)、锌(^{65}Zn);使用各种正电子发射断层摄影法检测的正电子发射金属;和非放射性顺磁性金属离子。

[0190] 在其它实施方案中,本发明的工程改造的抗体偶联于治疗剂(如细胞毒素,例如细胞抑制剂或杀细胞剂)、治疗剂或放射性金属离子(例如 α -发射体)。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害的任何药剂。实例包括紫杉醇(paclitaxel)、细胞松弛素 B(cytochalasin B)、短杆菌肽 D(gramicidin D)、溴化乙锭、依米丁(emetine)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicin)、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羟基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神霉素(mithramycin)、放线菌素 D(actinomycin D)、1-去氢睾酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)、嘌呤霉素(puromycin)、表柔比星

(epirubicin) 和环磷酰胺和其类似物或同系物。治疗剂包括但不限于抗代谢物 (例如, 甲氨蝶呤、6- 巯基嘌呤、6- 硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5- 氟尿嘧啶氮烯咪胺、烷基化剂 (例如, 二氯甲基二乙胺、塞替派苯丁酸氮芥 (thioepa chlorambucil)、美法仑 (melphalan)、卡莫司汀 (carmustine) (BCNU) 和洛莫司汀 (lomustine) (CCNU)、环磷酰胺、白消安 (busulfan)、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素 C 和顺二氯二胺铂 (II) (DDP) 顺铂、蒽环霉素 (anthracyclines) (例如, 柔红霉素 (以前称为道诺霉素) 和多柔比星)、抗生素 (例如更生霉素 (dactinomycin) (以前称为放线菌素)、博来霉素、光神霉素和安曲霉素 (anthramycin) (AMC)) 和抗有丝分裂剂 (例如, 长春新碱和长春花碱)。化学毒素也可从选自以下的组取得: 倍癌霉素 (duocarmycin) (美国专利 No. 5, 703, 080 ;No. 4, 923, 990)、甲氨蝶呤、多柔比星、美法仑、苯丁酸氮芥、ARA-C、长春地辛 (vindesine)、丝裂霉素 C、顺铂、依托泊苷、博来霉素和 5- 氟尿嘧啶。化学治疗剂的实例还包括阿霉素 (Adriamycin)、多柔比星、5- 氟尿嘧啶、胞嘧啶阿拉伯糖苷 (Ara-C)、环磷酰胺、塞替派 (Thiotepa)、泰索帝 (Taxotere) (多西他赛 (docetaxel))、白消安、细胞毒素、泰素、甲氨蝶呤、顺铂、美法仑、长春花碱、博来霉素、依托泊苷、异环磷酰胺、丝裂霉素 C、米托蒽醌、长春新碱、长春瑞宾 (Vinorelbine)、卡铂 (Carboplatin)、替尼泊苷、道诺霉素、洋红霉素 (Carminomycin)、氨基蝶呤 (Aminopterin)、更生霉素、丝裂霉素、埃斯培拉霉素 (Esperamicin) (美国专利 No. 4, 675, 187)、美法仑和其它相关氮芥。

[0191] 在一个实施方案中, 细胞毒性剂选自烯二炔 (enediyne)、lexitropsin、倍癌霉素、紫杉烷、嘌呤霉素、多拉司他汀、类美坦素和长春花生物碱。在其它实施方案中, 细胞毒性剂是紫杉醇、多西他赛、CC-1065、SN-38、拓扑替康 (topotecan)、吗啉基 - 多柔比星、根霉素 (rhizoxin)、氰基吗啉基 - 多柔比星、多拉司他汀 -10、棘霉素 (echinomycin)、考布他汀 (combretastatin)、卡奇霉素、美登素、DM-1、奥瑞他汀或其它多拉司他汀衍生物, 如奥瑞他汀 E 或奥瑞他汀 F、AEB、AEVB、AEFP、MMAE (单甲基奥瑞他汀 E)、MMAF (单甲基奥瑞他汀 F)、软珊瑚醇 (eleutherobin) 或纺锤菌素 (netropsin)。奥瑞他汀 E (在本领域中也称为多拉司他汀 -10) 和其衍生物的合成和结构描述于以下文献中: 美国专利申请公布 No. 2003/0083263 A1 和 No. 2005/0009751 A1 ; 国际专利申请 No : PCT/US02/13435 ; 美国专利 No. 6, 323, 315 ; No. 6, 239, 104 ; No. 6, 034, 065 ; No. 5, 780, 588 ; No. 5, 665, 860 ; No. 5, 663, 149 ; No. 5, 635, 483 ; No. 5, 599, 902 ; No. 5, 554, 725 ; No. 5, 530, 097 ; No. 5, 521, 284 ; No. 5, 504, 191 ; No. 5, 410, 024 ; No. 5, 138, 036 ; No. 5, 076, 973 ; No. 4, 986, 988 ; No. 4, 978, 744 ; No. 4, 879, 278 ; No. 4, 816, 444 ; 和 No. 4, 486, 414, 所有这些文献的全部内容都以引用的方式并入本文。

[0192] 在某些实施方案中, 细胞毒性剂是美登素或类美坦素和其衍生物, 其中本发明的抗体 (全长或片段) 偶联于一个或多个类美坦素分子。类美坦素是通过抑制微管蛋白聚合来起作用的有丝分裂抑制剂。类美坦素最早是从东非灌木齿叶美登木 (Maytenus serrata) 分离的 (美国专利 No. 3, 896, 111)。随后, 发现某些微生物也产生类美坦素, 如美登醇和 C-3 美登醇酯 (美国专利 No. 4, 151, 042)。合成美登醇和其衍生物和类似物公开于例如: 美国专利 No. 4, 137, 230 ; No. 4, 248, 870 ; No. 4, 256, 746 ; No. 4, 260, 608 ; No. 4, 265, 814 ; No. 4, 294, 757 ; No. 4, 307, 016 ; No. 4, 308, 268 ; No. 4, 308, 269 ; No. 4, 309, 428 ; No. 4, 313, 946 ; No. 4, 315, 929 ; No. 4, 317, 821 ; No. 4, 322, 348 ; No. 4, 331, 598 ;

No. 4, 361, 650 ;No. 4, 364, 866 ;No. 4, 424, 219 ;No. 4, 450, 254 ;No. 4, 362, 663 和 No. 4, 371, 533。

[0193] 为试图改善其治疗指数,将美登素和类美坦素偶联于特异性结合肿瘤细胞抗原的抗体。含有类美坦素的免疫偶联物和其治疗用途公开于例如美国专利 No. 5, 208, 020、No. 5, 416, 064 和欧洲专利 EP 0 425 235B1 中。Liu 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 8618-8623(1996) 描述了包含指定为 DM1 的类美坦素连接于针对人结肠直肠癌的单克隆抗体 C242 的免疫偶联物。发现所述偶联物对培养的结肠癌细胞具有高度毒性,并且在体内肿瘤生长测定中显示抗肿瘤活性。Chari 等 Cancer Research 52 :127-131(1992) 描述了免疫偶联物,其中类美坦素通过二硫连接子偶联于结合人结肠癌细胞系上的抗原的鼠抗体 A7 或偶联于结合 HER-2/neu 致癌基因的另一鼠单克隆抗体 TA. 1。TA. 1-类美坦素偶联物的细胞毒性在每个细胞表达 3×10^5 个 HER-2 表面抗原的人乳癌细胞系 SK-BR-3 上进行体外测试。所述药物偶联物达到的细胞毒性程度类似于游离类美坦素药物,这种细胞毒性可以通过增加每个抗体分子所携带的类美坦素分子数而增强。A7-类美坦素偶联物在小鼠中显示较低的全身性细胞毒性。因此,本发明涵盖与类美坦素药剂偶联用于某些癌症的治疗性治疗的抗体。

[0194] 在其它实施方案中,本发明抗体偶联物的细胞毒性剂是抗微管蛋白剂。抗微管蛋白剂是已充分确定的一类癌症治疗化合物。抗微管蛋白剂的实例包括但不限于紫杉烷(例如, Taxol® (泰素)、多西他赛)、T67(Tularik)、长春花和奥瑞他汀(例如,奥瑞他汀 E、AEB、AEVB、MMAE、MMAF、AEFP)。此类别中所包括的奥瑞他汀剂还有:长春花生物碱,包括长春新碱和长春花碱、长春地辛和长春瑞宾;紫杉烷,如紫杉醇和多西他赛和浆果赤霉素(baccatin)衍生物、埃博霉素(epithilone)A 和 B、诺考达唑(nocodazole)、5-氟尿嘧啶和秋水仙胺(colcimid)、雌氮芥(estramustine)、cryptophysin、西马多丁(cemadotin)、类美坦素、考布他汀(combretastatins)、多拉司他汀、盘皮海绵内酯(discodermolide)和软珊瑚醇。在更特定实施方案中,细胞毒性剂是选自长春花生物碱、鬼臼毒素(podophyllotoxin)、紫杉烷、浆果赤霉素衍生物、cryptophysin、类美坦素、考布他汀和多拉司他汀。在更特定实施方案中,细胞毒性剂是长春新碱、长春花碱、长春地辛、长春瑞宾、VP-16、喜树碱、紫杉醇、多西他赛、埃博霉素 A、埃博霉素 B、诺考达唑、秋水仙碱、秋水仙胺、雌氮芥、西马多丁、盘皮海绵内酯、美登素、DM-1、奥瑞他汀或其它多拉司他汀衍生物,如奥瑞他汀 E 或奥瑞他汀 F、AEB、AEVB、AEFP、MMAE(单甲基奥瑞他汀 E)、MMAF(单甲基奥瑞他汀 F)、软珊瑚醇或纺锤菌素。

[0195] 在一特定实施方案中,药物是类美坦素,其为一组抗微管蛋白剂。在一更特定实施方案中,药物是美登素。另外,在一特定实施方案中,细胞毒性剂或细胞抑制剂是 DM-1(ImmunoGen, Inc. ;还参见 Chari 等 1992, Cancer Res 52 :127-131)。美登素是一种天然产物,其抑制微管蛋白聚合,从而导致有丝分裂阻断和细胞死亡。因此,美登素的作用机制似乎类似于长春新碱和长春花碱。然而,美登素在体外的细胞毒性为这些长春花生物碱的约 200 至 1,000 倍。在另一特定实施方案中,药物是 AEFP。

[0196] 在一些实施方案中,抗体可偶联或融合于其它小分子或蛋白质毒素,诸如但不限于相思豆毒素(abrin)、马钱子碱(brucine)、毒芹素(cicutoxin)、白喉毒素(diphtheria toxin)、蟾毒素(batrachotoxin)、肉毒杆菌毒素(botulism toxin)、志贺

毒素 (shiga toxin)、内毒素 (endotoxin)、假单胞菌外毒素 (*Pseudomonas* exotoxin)、假单胞菌内毒素 (*Pseudomonas* endotoxin)、破伤风毒素 (tetanus toxin)、百日咳毒素 (pertussis toxin)、炭疽毒素 (anthrax toxin)、霍乱毒素 (cholera toxin)、镰叶芹醇 (falcarinol)、伏马毒素 B1 (fumonisin B1)、伏马毒素 B2、黄曲霉毒素 (aflatoxin)、莫鲁蝎毒素 (maurotoxin)、金蝎毒素 (agitoxin)、北非蝎毒素 (charybdotoxin)、玛格斑蝎毒素 (margatoxin)、中美毒蝎毒素 (slotoxin)、黄蝎毒素 (scyllatoxin)、黑蝎毒素 (hefutoxin)、钙抑蛋白 (calciseptine)、太卡毒素 (taicatoxin)、曼巴蛇毒素 (calcicludein)、格尔德霉素 (geldanamycin)、白树毒素 (gelonin)、百脉根苷 (lotaustralin)、赭曲霉毒素 A (ochratoxin A)、棒曲霉素 (patulin)、蓖麻毒素 (ricin)、番木鳖碱 (strychnine)、单端孢霉烯 (trichothecene)、玉米赤霉烯酮 (zearalenone) 和河豚毒素 (tetrodotoxin)。可使用的酶活性毒素和其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链 (来自绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、蒴莲根毒素 A 链 (modeccin A chain)、 α -帚曲菌素 (alpha-sarcin)、油桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白、石竹素 (dianthin) 蛋白、美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制剂、麻风树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒素 (crotonin)、肥皂草 (*Saponaire officinalis*) 抑制剂、白树毒素、mitogellin、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin) 和单端孢霉烯。

[0197] 毒素、间隔子、连接子、延伸子等的其它实例和它们的结构可见于：美国专利申请公布 No. 2006/0074008 A1、No. 2005/0238649 A1、No. 2005/0123536 A1、No. 2005/0180972 A1、No. 2005/0113308 A1、No. 2004/0157782 A1、美国专利 No. 6,884,869 B2、美国专利 No. 5,635,483, 这些文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0198] 如本文所论述,用于偶联于本发明的抗体偶联物的化合物可包括常规化学治疗剂,如多柔比星、紫杉醇、卡铂、美法仑、长春花生物碱、甲氨蝶呤、丝裂霉素 C、依托泊苷和其它。另外,如 CC-1065 类似物、卡奇霉素、美登素、多拉司他汀 10 的类似物、根霉素 (rhizoxin) 和水螅毒素 (palytoxin) 等有效药剂可使用条件稳定连接子连接至抗体以形成有效的免疫偶联物。

[0199] 在某些实施方案中,细胞毒性剂或细胞抑制剂是多拉司他汀。在更特定实施方案中,所述多拉司他汀属于奥瑞他汀类别。在本发明的一特定实施方案中,细胞毒性剂或细胞抑制剂是 MMAE。在本发明的另一特定实施方案中,细胞毒性剂或细胞抑制剂是 AEFP。在本发明的另一特定实施方案中,细胞毒性剂或细胞抑制剂是 MMAF。

[0200] 在其它实施方案中,本发明的抗体偶联或融合于修改给定生物反应的治疗剂或药物部分。治疗剂或药物部分不应解释为限于典型的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有期望生物活性的蛋白质或多肽。所述蛋白质可以包括例如毒素,如相思豆毒素、蓖麻毒素 A、假单胞菌外毒素、霍乱毒素或白喉毒素;蛋白质,如肿瘤坏死因子、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织纤溶酶原激活物;细胞凋亡剂,例如 TNF- α 、TNF- β 、AIM I (参见国际公布 No. WO 97/33899)、AIM II (参见国际公布 No. WO 97/34911)、Fas 配体 (Takahashi 等,1994, *J. Immunol.*, 6:1567) 和 VEGF (参见国际公布 No. WO 99/23105);血栓形成剂或抗血管生成剂,例如血管抑素或内皮抑素;或生物反应调节剂,如淋巴因子 (例如,白介素 -1 (“IL-1”)、白介素 -2 (“IL-2”)、白介素 -4 (“IL-4”)、

白介素-6(“IL-6”)、白介素-7(“IL-7”)、白介素-9(“IL-9”)、白介素-15(“IL-15”)、白介素-12(“IL-12”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)和粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)或生长因子(例如,生长激素(“GH”))。

[0201] 在其它实施方案中,本发明的抗体偶联或融合于包含聚精氨酸或聚赖氨酸残基的多肽。在一些实施方案中,所述多肽包含5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15个或更多个氨基酸残基。在一些实施方案中,聚精氨酸多肽可包含至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15个或更多个精氨酸残基。在其它实施方案中,聚赖氨酸多肽可包含至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15个或更多个赖氨酸残基。在其它实施方案中,多肽可包含精氨酸和赖氨酸残基的任何组合。

[0202] 在其它实施方案中,本发明的抗体偶联于治疗剂,如放射性物质或适用于偶联放射性金属离子的大环螯合剂(参见上文放射性物质的实例)。在某些实施方案中,大环螯合剂是1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA),其可通过连接子分子连接于抗体。所述连接子分子在下文进一步讨论,通常为本领域中已知,且描述于以下文献中:Denardo等,1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90;Peterson等,1999, Bioconjug. Chem. 10:553;和Zimmerman等,1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50,各文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0203] 在其它实施方案中,将本发明的抗体偶联于核酸。核酸可选自DNA、RNA、短干扰RNA(siRNA)、微RNA、发夹或核酸模拟物,如肽核酸。在一些实施方案中,偶联的核酸具有至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少100个、至少200个、至少500个、至少1000个、至少5000个或更多个碱基对。在一些实施方案中,偶联的核酸是单链核酸。在替代实施方案中,偶联的核酸是双链核酸。

[0204] 在一些实施方案中,偶联的核酸编码开放阅读框。在一些实施方案中,由偶联的核酸编码的开放阅读框对应于细胞凋亡诱导蛋白、病毒蛋白、酶或肿瘤抑制蛋白。将这种核酸递送到细胞中的技术可见于Song等Nature Biotechnology,2005,第23:6卷第709-717页以及美国专利No. 6,333,396,所述文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0205] 用于将治疗部分与抗体偶联的技术是众所周知的。可通过本领域中已知的任何方法将部分偶联于抗体,所述方法包括但不限于醛/希夫碱连接、巯基连接、酸不稳定性连接、顺乌头基连接、腓连接、酶可降解连接(大体参见Gamett,2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216)。用于偶联治疗部分与抗体的其它技术是众所周知的,参见例如Arnon等,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy,”在Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等(编著)中第243-56页(Alan R. Liss, Inc. 1985);Hellstrom等,“Antibodies For Drug Delivery,”在Controlled Drug Delivery(第2版),Robinson等(编著)中第623-53页(Marcel Dekker, Inc. 1987);Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review,”在Monoclonal Antibodies '84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等(编著)中第475-506页(1985);“Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy,”在Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等(编著)中第303-16页(Academic Press 1985);和Thorpe等,1982, Immunol. Rev. 62:119-58。将抗体融

合或偶联于多肽部分的方法在本领域中是已知的。参见例如美国专利 No. 5, 336, 603、No. 5, 622, 929、No. 5, 359, 046、No. 5, 349, 053、No. 5, 447, 851 和 No. 5, 112, 946 ;EP 307, 434 ;EP 367, 166 ;国际公布 No. WO 96/04388 和 No. WO 91/06570 ;Ashkenazi 等, 1991, PNAS 88 :10535-10539 ;Zheng 等, 1995, J. Immunol. 154 :5590-5600 ;和 Vil 等, 1992, PNAS 89 :11337-11341。抗体与部分的融合不必是直接的, 而是可经由连接子序列进行。所述连接子分子通常为本领域中所已知, 并且描述于以下文献中 :Denardo 等, 1998, Clin Cancer Res. 4 :2483-90 ;Peterson 等, 1999, Bioconjug. Chem. 10 :553 ;Zimmerman 等, 1999, Nucl. Med. Biol. 26 :943-50 ;Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53 :171-216, 各文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0206] 采取两种示例性方法来使本发明的抗体偶联物所靶向的细胞外部的药物活性降至最低 :第一, 可使用结合细胞膜受体而非可溶性受体的抗体, 以使药物 (包括由前药转化酶的作用所产生的药物) 集中于细胞 (如活化的淋巴细胞) 的细胞表面 ;第二, 除非药物水解或裂解抗体, 否则药物以会使它的活性降低的方式偶联。所述方法将采用连接子将药物连接至抗体, 所述连接子对活化的淋巴细胞的细胞表面的环境 (例如, 存在于活化的淋巴细胞的细胞表面的蛋白酶活性) 或对偶联物在被活化的淋巴细胞吸收时所遇到的活化的淋巴细胞内部的环境 (例如, 在内体环境中, 或者在溶酶体环境中例如因 pH 值敏感性或蛋白酶敏感性) 敏感。可用于本发明的连接子的实例公开于 :美国专利申请公布 No. 2005/0123536 A1、No. 2005/0180972 A1、No. 2005/0113308 A1、No. 2004/0157782 A1 和美国专利 No. 6, 884, 869B2, 所述文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0207] 在一个实施方案中, 连接子是在溶酶体中水解的酸不稳定性胺基或酰肼基 (参见例如美国专利 No. 5, 622, 929)。在替代的实施方案中, 药物可通过其它酸不稳定性连接子 (如顺乌头酰胺、原酸酯、缩醛和缩酮) 偶联于抗体 (Dubowchik 和 Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83 :67-123 ;Neville 等, 1989, Biol. Chem. 264 :14653-14661)。所述连接子在中性 pH 值条件 (如血液中的条件) 下相对稳定, 但在低于 pH 5 (溶酶体的近似 pH 值) 时不稳定。

[0208] 在其它实施方案中, 使用被细胞内蛋白酶裂解的肽间隔子将药物连接至本发明的抗体。靶标酶包括组织蛋白酶 B 和 D 和纤溶酶, 这些酶已知都水解二肽药物衍生物, 从而导致活性药物在靶细胞内部释放 (Dubowchik 和 Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83 :67-123)。使用细胞内蛋白水解药物释放的优势在于药物在偶联时毒性高度衰减并且偶联物的血清稳定性可非常高。

[0209] 在其它实施方案中, 连接子是丙二酸连接子 (Johnson 等, 1995, Anticancer Res. 15 :1387-93)、马来酰亚胺基苯甲酰基连接子 (Lau 等, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10) :1299-1304) 或 3' -N- 酰胺类似物 (Lau 等, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10) :1305-12)。

[0210] 采用马来酰亚胺基和间隔子 (如聚乙二醇 (PEG) 等) 的连接化学适于半胱氨酸、赖氨酸、硒半胱氨酸和硒甲硫氨酸取代。对于组氨酸取代, 可以使用与金属 (如铜、锌、铁、镍等) 偶合的间隔子用于偶联。对于酪氨酸, 可以偶联于糖或其它羟基化合物中存在的官能团。这些和其它适合的偶联技术的详情为本领域的普通技术人员所已知并且可见于例如 Greg T. Hermanson 的 Bioconjugate Techniques, 第 2 版, Academic Press (2008) 中。

[0211] 如上文所论述, 抗体偶联物一般是通过将化合物或药物利用连接子偶联于抗体来

制备。本发明的偶联物中可使用本领域中已知的任何连接子,例如双官能剂(如二醛或酰亚胺酯)或分支脞连接子(参见,例如美国专利 No. 5, 824, 805, 所述专利的全部内容以引用的方式并入本文)。

[0212] 在本发明的某些非限制性实施方案中,偶联物部分与抗体部分之间的连接子区在某些条件下可裂解,其中连接子的裂解或水解导致药物部分从抗体部分释放。在一些实施方案中,连接子在细胞内条件下易于裂解或水解。

[0213] 在一个实施方案中,偶联物部分与抗体部分之间的连接子区在 pH 值改变某一值或超过某一值时可裂解。在本发明的另一实施方案中,连接子在溶酶体的环境中,例如在酸性条件下(即,约 5-5.5 或更低的 pH 值)可裂解。在其它实施方案中,连接子是可被肽酶或蛋白酶裂解的肽基连接子,所述酶包括但不限于溶酶体蛋白酶、膜结合蛋白酶、细胞内蛋白酶或内体蛋白酶。通常,连接子长度为至少两个氨基酸,更通常为至少三个氨基酸。例如,可使用可被组织蛋白酶-B(一种在癌组织中大量表达的硫醇依赖性蛋白酶)裂解的肽基连接子(例如,Gly-Phe-Leu-Gly 连接子)。其它此类连接子描述于例如美国专利 No. 6, 214, 345 中,所述专利的全部内容以引用的方式并入本文。

[0214] 在本发明的其它不互相排斥的实施方案中,本发明的抗体偶联物的抗体和化合物借以偶联的连接子促进细胞内化。在某些实施方案中,连接子-药物部分促进细胞内化。在某些实施方案中,选择连接子以使得整个抗体偶联物的结构促进细胞内化。在一个实施方案中,连接子是硫醚连接子(参见例如 Willner 等的美国专利 No. 5, 622, 929, 所述专利的全部内容以引用的方式并入本文)。在一个实施方案中,连接子是脞连接子(参见例如 Greenfield 等的美国专利 No. 5, 122, 368 和 King 等的美国专利 No. 5, 824, 805, 所述专利的全部内容以引用的方式并入本文)。

[0215] 在其它实施方案中,连接子是二硫连接子。多种二硫连接子在本领域中是已知的,包括但不限于可使用以下形成的连接子:SATA(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和 SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)甲苯)。SPDB 和 SMPT(参见例如 Thorpe 等,1987, *Cancer Res.*, 47:5924-5931; Wawrzynczak 等,1987, *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer*, C. W. Vogel 编著, Oxford U. Press, 第 28-55 页;还参见 Thorpe 等的美国专利 No. 4, 880, 935, 所述文献的全部内容以引用的方式并入本文)。

[0216] 可与本发明的组合物和方法一起使用的多种连接子描述于美国专利申请公布 No. US 2004/0018194 A1 中,所述专利申请公布的全部内容以引用的方式并入本文。

[0217] 在本发明的其它实施方案中,抗体偶联物的连接子单元连接细胞毒性剂或细胞抑制剂(药物单元;-D)与抗体单元(-A)。在某些实施方案中,连接子单元具有以下通式:

[0218] i. -Ta-Ww-Yy-, 其中:

[0219] ii. -T- 是延伸子单元;

[0220] iii. a 为 0 或 1;

[0221] iv. 各 -W- 独立地为氨基酸单元;

[0222] v. w 独立地为 2 至 12 范围内的整数;

[0223] vi. -Y- 为间隔子单元;并且

[0224] vii. y 为 0、1 或 2。

[0225] 延伸子单元 (-T-) 在存在时连接抗体单元与氨基酸单元 (--W--)。可存在于抗体上 (天然存在的或者通过化学操作) 的适用官能团包括但不限于巯基、氨基、羟基、碳水化合物的异头羟基和羧基。已经引入了半胱氨酸的本发明的工程改造的抗体提供至少一个巯基以供偶联。引入巯基的其它方法涉及还原抗体的分子内二硫键。或者, 可通过使抗体的赖氨酸部分 (其是天然的或者是引入的) 的氨基与 2-亚氨基硫杂环戊烷 (特劳特试剂 (Traut's reagent)) 或其它巯基产生试剂反应来产生巯基。

[0226] 氨基酸单元 (--W--) 在间隔子单元存在的情况下将延伸子单元 (-T-) 连接至间隔子单元 (--Y--), 并且在间隔子单元不存在的情况下将延伸子单元连接至细胞毒性剂或细胞抑制剂 (药物单元 ;D)。

[0227] 在一些实施方案中, $-W_w-$ 是二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽。连接子单元的氨基酸单元可利用酶 (包括但不限于肿瘤相关性蛋白酶) 酶促裂解以释放药物单元 (-D), 所述药物单元在体内释放时质子化以提供细胞毒性药物 (D)。

[0228] 在一个实施方案中, 氨基酸单元是苯丙氨酸-赖氨酸二肽 (phe-lys 或 FK 连接子)。在另一实施方案中, 氨基酸单元是缬氨酸-瓜氨酸二肽 (val-cit 或 VC 连接子)。

[0229] 间隔子单元 (--Y--) 在存在时将氨基酸单元连接至药物单元。间隔子单元具有两种一般类型: 自我牺牲型和非自我牺牲型。非自我牺牲型间隔子单元是部分或全部间隔子单元在氨基酸单元从抗体-连接子-药物偶联物或药物-连接子化合物酶促裂解后仍保持结合于药物单元的间隔子单元。非自我牺牲型间隔子单元的实例包括但不限于 (甘氨酸-甘氨酸) 间隔子单元和甘氨酸间隔子单元。当含有甘氨酸-甘氨酸间隔子单元或甘氨酸间隔子单元的本发明的抗体-连接子-药物偶联物通过肿瘤细胞相关性蛋白酶、癌细胞相关性蛋白酶或淋巴细胞相关性蛋白酶经历酶促裂解时, 甘氨酸-甘氨酸-药物部分或甘氨酸-药物部分从 A-T- W_w - 裂解。为释放药物, 应在靶细胞内发生独立的水解反应以裂解甘氨酸-药物单元键。

[0230] 自我牺牲型间隔子的其它实例包括但不限于电子性质等同于 PAB 基团的芳香族化合物, 如 2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物 (参见例如 Hay 等, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, 9, 2237) 和邻-或对-氨基苄基缩醛。可使用在酰胺键水解时容易发生环化的间隔子, 如取代和未取代的 4-氨基丁酸酰胺 (Rodrigues 等, Chemistry, Biology, 1995, 2, 223)、适当取代的环体系 (Storm 等, J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815) 和 2-氨基苄基丙酸酰胺 (Amsberry 等, J. Org. Chem., 1990, 55, 5867)。在甘氨酸的 α -位被取代的含胺药物的消除 (Kingsbury 等, J. Med. Chem., 1984, 27, 1447) 也是可应用于本发明的抗体-连接子-药物偶联物的自我牺牲型间隔子策略的实例。

[0231] 偶联异源分子与抗体的方法

[0232] 诸如本文所述的异源分子可通过工程改造氨基酸残基所提供的反应性基团有效地偶联于本发明的抗体或 Fc 区。一方面, 本发明提供用于有效地偶联异源分子与半胱氨酸工程改造的抗体的方法。在一个实施方案中, 异源分子的偶联可在由选自 Fc 区或抗体的位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的至少一个工程改造残基所提供的反应性基团处进行, 其中恒定区的编号系统是如

Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。另一方面,反应性基团是硫醇,并且异源分子的偶联可在由选自 Fc 区或抗体的位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的至少一个工程改造半胱氨酸残基所提供的硫醇基处进行,其中恒定区的编号系统是如 Kabat 中所述的 EU 指数编号系统。

[0233] 将非天然存在的半胱氨酸残基工程改造至抗体中可能改变重链和轻链的二硫键配对,使得作为二硫键的部分的天然存在的半胱氨酸残基释放并且提供能够进行偶联的硫醇基。在另一实施方案中,所述方法包括在不是由选自 Fc 区或抗体的位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的至少一个工程改造半胱氨酸残基所提供的硫醇基处的异源分子与半胱氨酸工程改造的抗体的有效偶联。

[0234] 抗体中游离硫醇基的存在可以利用各种业内公认的技术进行测定,如实施例 1 中所述的技术。异源分子与抗体的偶联效率可以通过评估偶联反应后保留的游离硫醇基的存在进行测定。在一个实施方案中,本发明提供有效偶联异源分子与半胱氨酸工程改造的抗体的方法。在一个实施方案中,如通过偶联反应后保留的自由硫醇基的含量所测量,偶联效率是至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 或更高,如通过偶联反应后保留的游离硫醇基的水平所测定。

[0235] 在另一实施方案中,本发明提供偶联异源分子与抗体或 Fc 区的方法,其中所述抗体或 Fc 区包含至少一个氨基酸取代,使得形成 2 个或多于 2 个反应性基团。在另一实施方案中,所述方法包括含有至少一个氨基酸取代的 Fc 区或抗体,使得形成至少 2 个、至少 4 个、至少 6 个、至少 8 个、至少 10 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个、至少 18 个、至少 20 个、至少 22 个、至少 24 个、至少 26 个、至少 28 个、至少 30 个、至少 32 个、至少 34 个、至少 36 个、至少 38 个、至少 40 个或更多个新引入的反应性基团。在另一实施方案中,至少一个取代是半胱氨酸取代,并且反应性基团是硫醇基。

[0236] 能够进行偶联的本发明的 Fc 区和抗体可含有包含被阻断或加帽封端的巯基的半胱氨酸残基。所述加帽包括蛋白质、肽、离子和与巯基相互作用并且阻止或抑制偶联物形成的其它物质。在一些实施方案中,本发明的抗体在偶联反应之前可能需要脱帽。在特定实施方案中,本发明的抗体被脱帽并且呈现能够进行偶联的巯基。在其它特定实施方案中,本发明的抗体进行不干扰或重排天然存在的二硫键的脱帽反应。在其它实施方案中,本发明的抗体进行如 2009 年 1 月 16 日提交的 PCT 申请 PCT/US09/31294 的实施例 9 或 10 中所提供的脱帽反应。

[0237] 在一些实施方案中,本发明的抗体可进行偶联反应,其中待偶联抗体是以至少 1mg/ml、至少 2mg/ml、至少 3mg/ml、至少 4mg/ml、至少 5mg/ml 或更高的浓度存在。

[0238] 使用抗体偶联物的方法

[0239] 预期本发明的偶联物可用于治疗各种疾病或病症,例如特征为肿瘤抗原过度表达的疾病或病症。示例性病状或过度增生性病症包括良性或恶性肿瘤、白血病和淋巴恶性肿瘤。其它包括神经元、神经胶质、星形胶质细胞、下丘脑、腺体、巨噬细胞、上皮、内皮和基质恶性肿瘤。其它癌症或过度增生性病症包括:头部、颈部、眼睛、口、喉、食道、胸部、皮肤、

骨骼、肺部、结肠、直肠、结肠直肠、胃部、脾脏、肾脏、骨骼肌、皮下组织、转移性黑素瘤、子宫内膜、前列腺、乳房、卵巢、睾丸、甲状腺、血液、淋巴结、肾脏、肝脏、胰腺、脑部或中枢神经系统的癌症。可根据本发明的方法预防、管理、治疗或改善的癌症的实例包括但不限于头部、颈部、眼睛、口、喉、食道、胸部、骨骼、肺部、结肠、直肠、胃部、前列腺、乳房、卵巢、肾脏、肝脏、胰腺和脑部的癌症。其它癌症包括但不限于以下：白血病，如但不限于急性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病，如成髓细胞性、早幼粒细胞性、髓单核细胞性、单核细胞性、红白血病性白血病和骨髓增生异常综合症，慢性白血病，如但不限于慢性髓细胞性（粒细胞性）白血病、慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病；真性红细胞增多症；淋巴瘤，如但不限于霍奇金氏病 (Hodgkin' s disease)、非霍奇金氏病 (non-Hodgkin' s disease)；多发性骨髓瘤，如但不限于郁积型多发性骨髓瘤、非分泌型骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、浆细胞性白血病、孤立性浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤；沃尔丹斯特伦巨球蛋白血症 (Waldenstrom' s macroglobulinemia)；意义未明的单克隆丙种球蛋白病；良性单克隆丙种球蛋白病；重链疾病；骨癌和结缔组织肉瘤，如但不限于骨肉瘤、骨髓瘤骨病、多发性骨髓瘤、胆脂瘤诱导的骨骼骨肉瘤、骨骼佩吉特氏病 (Paget' s disease of bone)、骨肉瘤、软骨肉瘤、尤因氏肉瘤 (Ewing' s sarcoma)、恶性巨细胞肿瘤、骨骼纤维肉瘤、脊索瘤、骨膜肉瘤、软组织肉瘤、血管肉瘤（血管内皮瘤）、纤维肉瘤、卡波济氏肉瘤 (Kaposi' s sarcoma)、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、神经鞘瘤、横纹肌肉瘤和滑膜肉瘤；脑肿瘤，如但不限于神经胶质瘤、星形细胞瘤、脑干神经胶质瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、非神经胶质瘤、听神经瘤、颅咽管瘤、成髓细胞瘤、脑膜瘤、松果体细胞瘤、成松果体细胞瘤和原发性脑淋巴瘤；乳癌，包括但不限于腺癌、小叶（小细胞）癌、管内癌、髓性乳癌、粘液性乳癌、管性乳癌、乳头状乳癌、佩吉特氏病（包括青少年佩吉特氏病）和发炎性乳癌；肾上腺癌，如但不限于嗜铬细胞瘤和肾上腺皮质癌；甲状腺癌，如但不限于乳头状或滤泡性甲状腺癌、髓性甲状腺癌和甲状腺未分化癌；胰腺癌，如但不限于胰岛瘤、胃泌素瘤、胰升糖素瘤、血管活性肠肽瘤、生长抑素分泌性肿瘤和类癌瘤或胰岛细胞瘤；垂体癌，如但不限于库欣氏病 (Cushing' s disease)、催乳激素分泌性肿瘤、肢端肥大症和尿崩症；眼癌，如但不限于眼部黑素瘤，如虹膜黑素瘤、脉络膜黑素瘤和睫状体黑素瘤和成视网膜细胞瘤；阴道癌，如鳞状细胞癌、腺癌和黑素瘤；外阴癌，如鳞状细胞癌、黑素瘤、腺癌、基底细胞癌、肉瘤和佩吉特氏病；子宫颈癌，如但不限于鳞状细胞癌和腺癌；子宫癌，如但不限于子宫内膜癌和子宫肉瘤；卵巢癌，如但不限于卵巢上皮癌、交界瘤、生殖细胞瘤和基质肿瘤；食道癌，如但不限于鳞癌、腺癌、腺囊癌、粘液表皮样癌、腺鳞癌、肉瘤、黑素瘤、浆细胞瘤、疣状癌和燕麦细胞（小细胞）癌；胃癌，如但不限于腺癌、蕈状癌（息肉状癌）、溃疡性癌、表层扩散性癌、弥漫扩散性癌、恶性淋巴瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和癌肉瘤；结肠癌；直肠癌；肝癌，如但不限于肝细胞癌和肝胚细胞瘤，胆囊癌，如腺癌；胆管癌，如但不限于乳头状、结节性和弥漫性胆管癌；肺癌，如非小细胞肺癌、鳞状细胞癌（表皮样癌）、腺癌、大细胞癌和小细胞肺癌；睾丸癌，如但不限于生殖细胞瘤、精原细胞瘤、未分化型、经典性（典型性）、精母细胞性睾丸癌、非精原细胞瘤、胚胎性癌、畸胎瘤、绒毛膜癌（卵黄囊瘤）；前列腺癌，如但不限于腺癌、平滑肌肉瘤和横纹肌肉瘤；阴茎癌；口腔癌，如但不限于鳞状细胞癌；基底细胞癌；唾液腺癌，如但不限于腺癌、粘液表皮样癌和腺囊癌；咽癌，如但不限于鳞状细胞癌和疣状癌；皮肤癌，如但不限于基底细胞癌、鳞状细胞癌和黑素瘤、表层扩散性黑素瘤、结节性黑素瘤、小痣恶

性黑素瘤、肢端雀斑样黑素瘤；肾癌，如但不限于肾细胞癌、腺癌、肾上腺样瘤、纤维肉瘤、移行细胞癌（肾盂和 / 或输尿管）；威尔姆斯氏肿瘤（Wilms' tumor）；膀胱癌，如但不限于移行细胞癌、鳞状细胞癌、腺癌、癌肉瘤。另外，癌症包括粘液肉瘤、骨源性肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、间皮瘤、滑膜瘤、成血管细胞瘤、上皮癌、囊腺癌、支气管癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌和乳头状腺癌（关于这些病症的综述，请参见 Fishman 等，1985, *Medicine*, 第 2 版, J.B. Lippincott Co., Philadelphia 和 Murphy 等，1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., inc., United States of America)。还预期由细胞凋亡异常引起的癌症也可以利用本发明的方法和组合物治疗。这些癌症可包括但不限于滤泡性淋巴瘤、具有 p53 突变的癌瘤、乳房、前列腺和卵巢的激素依赖性肿瘤、癌前病变（如家族性腺瘤息肉症）和骨髓增生异常综合症。

[0240] 本发明的蛋白质和包含其的组合物适用于多种目的，例如用作对抗多种慢性和急性疾病和病症的治疗剂，所述疾病和病症包括但不限于自体免疫性和 / 或发炎性病症，其包括肖格伦氏综合症（Sjogren' s syndrome）、类风湿性关节炎、牛皮癣样狼疮、动脉粥样硬化、糖尿病性和其它视网膜病、晶体后纤维增生症、年龄相关性黄斑变性、新生血管性青光眼、血管瘤、甲状腺肥大（包括格雷夫氏病（Grave' s disease））、角膜和其它组织移植和慢性炎症、脓毒病、类风湿性关节炎、腹膜炎、克罗恩氏病（Crohn' s disease）、再灌注损伤、败血症、内毒素性休克、囊性纤维化、心内膜炎、牛皮癣、关节炎（例如，牛皮癣性关节炎）、过敏性休克、器官缺血、再灌注损伤、脊髓损伤和同种异体移植排斥反应。自体免疫性和 / 或发炎性病症的其它实例包括但不限于斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合症、自体免疫性阿狄森氏病（autoimmune Addison' s disease）、肾上腺自体免疫性疾病、自体免疫性溶血性贫血、自体免疫性肝炎、自体免疫性卵巢炎和睾丸炎、肖格伦氏综合症、牛皮癣、动脉粥样硬化、糖尿病性和其它视网膜病、晶体后纤维增生症、年龄相关性黄斑变性、新生血管性青光眼、血管瘤、甲状腺肥大（包括格雷夫氏病）、角膜和其它组织移植和慢性炎症、脓毒病、类风湿性关节炎、腹膜炎、再灌注损伤、败血症、内毒素性休克、囊性纤维化、心内膜炎、牛皮癣、关节炎（例如牛皮癣性关节炎）、过敏性休克、器官缺血、再灌注损伤、脊髓损伤和同种异体移植排斥反应。自体免疫性血小板减少症、贝塞氏病（Behcet' s disease）、大疱性类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻 - 皮炎、慢性疲劳免疫功能异常综合症（CFIDS）、慢性发炎性脱髓鞘性多神经病、齐格 - 斯特劳斯综合症（Churg-Strauss syndrome）、疤痕性类天疱疮、CREST 综合症、冷凝集素病、盘状狼疮、特发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛 - 纤维肌炎、肾小球性肾炎、格雷夫氏病、古 - 巴二氏综合症（Guillain-Barre）、桥本氏甲状腺炎（Hashimoto' s thyroiditis）、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜（ITP）、IgA 神经病、青少年关节炎、扁平苔癣、红斑狼疮、美尼尔氏病（Meniere' s disease）、混合型结缔组织病、多发性硬化症、1 型或免疫介导型糖尿病、重症肌无力、寻常型天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺性综合症、风湿性多肌痛、多肌炎和皮炎、原发性无病种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、雷诺氏现象（Raynaud' s phenomenon）、莱特氏综合症（Reiter' s syndrome）、类风湿性关节炎、类肉瘤病、硬皮病、全身肌强直综合症（stiff-man syndrome）、全身性红斑狼疮、红斑狼疮、高安氏动脉炎（takayasu arteritis）、颞动脉炎 / 巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎（如

皮炎型疱疹性血管炎)、白癜风和韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。发炎性病症的实例包括但不限于哮喘、脑炎、发炎性肠病、慢性阻塞性肺病(COPD)、过敏性病症、败血性休克、肺纤维化、未分化型脊椎关节病、未分化型关节病、关节炎、发炎性骨质溶解和由慢性病毒或细菌感染引起的慢性炎症。本发明的组合和方法可以与一种或多种用于预防、管理或治疗上述疾病的常规疗法一起使用。

[0241] 本发明还提供使用本发明的组合物来使各种致病原(如病毒、真菌、真核微生物和细菌)失活的方法。在一些实施方案中,本发明的组合物可用于使RSV、hMPV、PIV或流感病毒失活。在其它实施方案中,本发明的组合物可用于使真菌病原体失活,所述真菌病原体如但不限于纳氏虫属(Naegleria)、曲霉属(Aspergillus)、芽生菌属(Blastomyces)、组织胞浆菌属(Histoplasma)、念珠菌属(Candida)或癣菌属(Tinea)的成员。在其它实施方案中,本发明的组合物可用于使真核微生物失活,所述真核微生物如但不限于贾第鞭毛虫属(Giardia)、弓形虫属(Toxoplasma)、疟原虫属(Plasmodium)、锥虫属(Trypanosoma)和内阿米巴属(Entamoeba)的成员。在其它实施方案中,本发明的组合物可用于使细菌病原体失活,所述细菌病原体如但不限于葡萄球菌属(Staphylococcus)、链球菌属(Streptococcus)、假单胞菌属(Pseudomonas)、梭菌属(Clostridium)、疏螺旋体属(Borrelia)、弧菌属(Vibro)和奈瑟菌属(Neisseria)的成员。

[0242] 本发明的组合物适用于多种目的,例如用作对抗多种慢性和急性疾病和病症的治疗剂,所述疾病和病症包括但不限于感染性疾病,包括病毒性、细菌性和真菌性疾病。病毒病原体的实例包括但不限于:腺病毒科(adenoviridae)(例如,哺乳动物腺病毒和禽腺病毒)、疱疹病毒科(herpesviridae)(例如,单纯疱疹病毒1、单纯疱疹病毒2、单纯疱疹病毒5和单纯疱疹病毒6)、光滑病毒科(leviviridae)(例如,轻小病毒、肠杆菌噬菌体MS2、异型小病毒(allolevirus))、痘病毒科(poxviridae)(例如,脊椎动物痘病毒亚科(chordopoxvirinae)、副痘病毒、禽痘病毒、羊痘病毒、兔痘病毒、猪痘病毒、软疣痘病毒和昆虫痘病毒亚科(entomopoxvirinae))、乳多空病毒科(papovaviridae)(例如,多瘤病毒和乳头瘤病毒)、副粘病毒科(paramyxoviridae)(例如,副粘病毒、副流感病毒1、麻疹病毒属(例如,麻疹病毒)、腮腺炎病毒属(例如,腮腺炎病毒)、肺炎病毒亚科(pneumonovirinae)(例如肺炎病毒、人呼吸道合胞病毒)和肺偏病毒属(例如,禽肺炎病毒和人肺偏病毒))、小核糖核酸病毒科(picornaviridae)(例如,肠病毒、鼻病毒、肝病毒(例如,人甲型肝炎病毒)、心病毒和口蹄疫病毒)、呼肠孤病毒科(reoviridae)(例如,正呼肠孤病毒、环状病毒、轮状病毒、质型多角体病毒、斐济病毒、植物呼肠病毒和水稻病毒)、逆转录病毒科(retroviridae)(例如哺乳动物B型逆转录病毒、哺乳动物C型逆转录病毒、禽C型逆转录病毒、D型逆转录病毒组、BLV-HTLV逆转录病毒、满病毒(例如人免疫缺陷病毒1和人免疫缺陷病毒2)、泡沫病毒)、黄病毒科(flaviviridae)(例如丙型肝炎病毒)、肝DNA病毒科(hepadnaviridae)(例如,乙型肝炎病毒)、披膜病毒科(togaviridae)(例如,甲病毒属(例如,辛德毕斯病毒)和风疹病毒属(例如风疹病毒))、弹状病毒科(rhabdoviridae)(例如,水疱病毒、狂犬病毒、短暂热病毒、质型弹状病毒和核型弹状病毒)、沙粒病毒科(arenaviridae)(例如沙粒病毒、淋巴细胞性脉络膜丛脑膜炎病毒、伊派病毒(Ippy virus)和拉沙病毒(lassa virus))和冠状病毒科(coronaviridae)(例如冠状病毒和环曲病毒)。细菌病原体的实例包括但

不限于：水螺菌科 (Aquaspirillum family)、固氮螺菌科 (Azospirillum family)、固氮菌科 (Azotobacteraceae family)、拟杆菌科 (Bacteroidaceae family)、巴通体属 (Bartonella species)、蛭弧菌科 (Bdellovibrio family)、弯曲杆菌属 (Campylobacter species)、衣原体属 (Chlamydia species) (例如,肺炎衣原体 (Chlamydia pneumoniae))、梭菌属 (Clostridium)、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae family) (例如,柠檬酸杆菌属 (Citrobacter species)、爱德华菌属 (Edwardsiella)、产气肠杆菌 (Enterobacter aerogenes)、欧文氏菌属 (Erwinia species)、大肠杆菌 (Escherichia coli)、哈夫尼菌属 (Hafnia species)、克雷伯菌属 (Klebsiella species)、摩根菌属 (Morganella species)、普通变形杆菌 (Proteus vulgaris)、普罗维登斯菌属 (Providencia)、沙门氏菌属 (Salmonella species)、粘质沙雷氏菌 (Serratia marcescens) 和弗氏志贺菌 (Shigella flexneri)、加蒂奈菌科 (Gardinerella family)、流感嗜血杆菌 (Haemophilus influenzae)、盐细菌科 (Halobacteriaceae family)、螺杆菌科 (Helicobacter family)、军团菌科 (Legionellaceae family)、李斯特菌属 (Listeria species)、甲基球菌科 (Methylococcaceae family)、分枝杆菌 (Mycobacteria) (例如结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis))、奈瑟菌科 (Neisseriaceae family)、海洋螺菌科 (Oceanospirillum family)、巴斯德菌科 (Pasteurellaceae family)、肺炎球菌属 (Pneumococcus species)、假单胞菌属 (Pseudomonas species)、根瘤菌科 (Rhizobiaceae family)、螺旋菌科 (Spirillum family)、螺状菌科 (Spirosomaceae family)、葡萄球菌 (Staphylococcus) (例如,甲氧苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌 (methicillin resistant Staphylococcus aureus) 和酿脓葡萄球菌 (Staphylococcus pyrogenes))、链球菌 (Streptococcus) (例如,肠炎链球菌 (Streptococcus enteritidis)、粪链球菌 (Streptococcus faecalis) 和肺炎链球菌 (Streptococcus pneumoniae))、蝙蝠螺杆菌科 (Vampirovibrionaceae family) 和蝙蝠弧菌科 (Vampirovibrionaceae family)。真菌病原体的实例包括但不限于：犁头霉属 (Absidia species) (例如伞状犁头霉 (Absidia corymbifera) 和分支犁头霉 (Absidia ramosa))、曲霉属 (Aspergillus species) (例如黄曲霉 (Aspergillus flavus)、烟曲霉 (Aspergillus fumigatus)、构巢曲霉 (Aspergillus nidulans)、黑曲霉 (Aspergillus niger) 和土曲霉 (Aspergillus terreus))、蛙粪霉 (Basidiobolus ranarum)、皮炎芽生菌 (Blastomyces dermatitidis)、念珠菌属 (Candida species) (例如白色念珠菌 (Candida albicans)、光滑念珠菌 (Candida glabrata)、克尔念珠菌 (Candida kerr)、克鲁斯念珠菌 (Candida krusei)、近平滑念珠菌 (Candida parapsilosis)、拟热带念珠菌 (Candida pseudotropicalis)、吉利蒙念珠菌 (Candida quillermondii)、皱褶假丝酵母 (Candida rugosa)、星状念珠菌 (Candida stellatoidea) 和热带念珠菌 (Candida tropicalis))、粗球孢子菌 (Coccidioides immitis)、耳霉属 (Conidiobolus species)、新型隐球菌 (Cryptococcus neoforms)、小克银汉霉属 (Cunninghamella species)、皮肤真菌 (dermatophytes)、荚膜组织胞浆菌 (Histoplasma capsulatum)、石膏样小孢子菌 (Microsporum gypsum)、微小毛霉 (Mucor pusillus)、巴西副球孢子菌 (Paracoccidioides brasiliensis)、波氏假阿利什菌 (Pseudallescheria boydii)、西伯鼻孢子菌 (Rhinosporidium seeberi)、卡氏肺囊虫 (Pneumocystis carinii)、根霉属 (Rhizopus species) (例如少根根霉 (Rhizopus arrhizus))、(Rhizopus

oryzae) 和 (*Rhizopus microsporus*)、酵母属 (*Saccharomyces species*)、申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*)、接合菌纲 (*zygomycetes*) 和如接合菌纲 (*Zygomycetes*)、子囊菌纲 (*Ascomycetes*)、担子菌纲 (*Basidiomycetes*)、半知菌纲 (*Deuteromycetes*) 和卵菌纲 (*Oomycetes*) 等纲。

[0243] 本发明还提供使用抗体来消耗细胞群的方法。在一个实施方案中,本发明的方法适用于消耗以下细胞类型:嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、T 细胞、B 细胞、肥大细胞、单核细胞、内皮细胞和肿瘤细胞。在一些实施方案中,本发明的抗体与对照非工程改造的抗体或其偶联物相比将各自细胞群体消耗至少 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或更多。

[0244] 本发明的抗体和其偶联物还可用于诊断和检测疾病或其症状。在另一实施方案中,本发明的组合物可用于监测疾病进展。在另一实施方案中,本发明的组合物可用于监测治疗方案。在另一实施方案中,本发明的组合物适用于在离体应用中用于诊断,如诊断试剂盒。

[0245] 本发明的组合物可用于观测靶抗原。在一些实施方案中,靶抗原是用于内化的细胞表面受体。在其它实施方案中,靶抗原是细胞内抗原。在其它实施方案中,靶标是核内抗原。

[0246] 在一个实施方案中,本发明的抗体或抗体-药物偶联物在结合后即内化至细胞中,其中内化比如本文所述的对照抗体高至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80% 或至少约 90%、至少约 100%、至少约 110%、至少约 130%、至少约 140%、至少约 150%、至少约 160% 或至少约 170%。

[0247] 在另一实施方案中,本发明的抗体在结合后即内化至细胞中,其中内化比如本文所述的对照抗体高 1-10%、10-20%、20-30%、30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80%、80-90%、90-100%、100-110%、110-120%、120-130%、130-140%、140-150%、150-160% 或 160-170%。

[0248] 在另一实施方案中,本发明的抗体在结合后即内化至细胞中,其中根据使用二抗进行的内化测定所测定,内化比对照抗体高 1-10%、10-20%、20-30%、30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80%、80-90%、90-100%、100-110%、110-120%、120-130%、130-140%、140-150%、150-160% 或 160-170%。

[0249] 药物组合物

[0250] 另一方面,本发明提供含有一种组合物,例如但不限于药物组合物,其含有本发明抗体或本发明抗体的组合或抗体偶联物,与药学上可接受的载体一起配制。所述组合物可包括一种本发明抗体或例如但不限于两种或多于两种不同本发明抗体的组合。例如,本发明的药物组合物可包含结合靶抗原上的不同表位或具有互补活性的抗体的组合。

[0251] 本发明的药物组合物还可以组合疗法,如与其它药剂组合施用。例如,组合疗法可包括与至少一种其它疗法的组合的本发明的抗体,其中所述疗法可以是手术、免疫疗法、化学疗法、辐射疗法或药物疗法。

[0252] 本发明的药物化合物可以包括一种或多种药学上可接受的盐。所述盐的实例包含酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括衍生自无毒无机酸(如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等)以及无毒有机酸(如脂肪族单羧酸和二羧酸、被苯基取代的烷酸、羟

基烷酸、芳香族酸、脂肪族和芳香族磺酸等)的盐。碱加成盐包括衍生自碱土金属(如钠、钾、镁、钙等)以及无毒有机胺(如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等)的盐。

[0253] 本发明的药物组合物还可以包括药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0254] 可用于本发明的药物组合物中的适合水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)和其适合混合物、植物油(如橄榄油)和可注射有机酯(如油酸乙酯)。可以通过使用涂层材料(如卵磷脂)、在分散液的情况下通过维持所需粒度和通过使用表面活性剂来维持适当流动性。

[0255] 这些组合物还可含有佐剂,如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可以同时通过灭菌程序和通过纳入各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)来确保防止微生物的存在。还可能需要在组合物中纳入等渗剂,如琼脂、氯化钠等。此外,可注射药物形式的延长的吸收可以通过纳入延迟吸收的药剂(如单硬酯酸铝和明胶)来达成。

[0256] 药物组合物在制造和储存的条件下必须是无菌和稳定的。组合物可以配制成溶液、微乳液、脂质体或适于高药物浓度的其它有序结构。载体可为含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和其适合混合物的溶剂或分散介质。可以通过使用涂层(如卵磷脂)、在分散液的情况下通过维持所需粒度和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,在组合物中纳入等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化钠是合适的。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中纳入延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸盐和明胶)来达成。

[0257] 无菌注射溶液可以通过将所需量的活性化合物并入适当溶剂(根据需要具有一种上述列举的成分或者上述列举的成分的组合),随后进行灭菌微过滤来制备。一般来说,分散剂是通过将活性化合物并入含有基本分散介质和来自上述列举的所需要的其它成分的无菌媒介物中来制备。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),这些方法产生活性成分加上来自先前无菌过滤的其溶液的任何其它期望成分的粉末。

[0258] 在一个实施方案中,本发明的组合物是基本上不含内毒素和/或相关致热性物质的无致热原制剂。内毒素包括局限于微生物体内并且在微生物破裂或死亡时释放的毒素。致热性物质还包括来自细菌和其它微生物的外膜的诱导发热的热稳定性物质(糖蛋白)。这些物质在施用于人时都可以引起发热、低血压和休克。由于潜在的有害作用,甚至少量的内毒素从静脉内施用的药物溶液中去掉是有利的。食品药物管理局("FDA")已经设定了静脉内药物施用中内毒素的上限是一个小时的时间段内每公斤体重每剂5个内毒素单位(EU)(The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26(1): 223(2000))。当治疗性蛋白质是以每公斤体重数百至数千毫克的量施用时,去除甚至痕量的内毒素是有利的。在一个实施方案中,组合物中的内毒素和致热原水平少于10EU/mg、或

少于 5EU/mg、或少于 1EU/mg、或少于 0.1EU/mg、或少于 0.01EU/mg、或少于 0.001EU/mg。在另一实施方案中,组合物中的内毒素和致热原水平少于约 10EU/mg、或少于约 5EU/mg、或少于约 1EU/mg、或少于约 0.1EU/mg、或少于约 0.01EU/mg、或少于约 0.001EU/mg。

[0259] 在一个实施方案中,本发明包括施用组合物,其中所述施用是口服、胃肠外、肌肉内、鼻内、阴道、直肠、舌侧、舌下、口腔、口内、静脉内、皮肤、皮下或透皮施用。

[0260] 在另一实施方案中,本发明还包括施用组合物与其它疗法的组合,所述其它疗法如手术、化学疗法、激素疗法、生物疗法、免疫疗法或辐射疗法。

[0261] 给药 / 施用

[0262] 为制备包含本发明的抗体或抗体偶联物的药物或无菌组合物,将抗体 / 抗体偶联物与药学上可接受的载体或赋形剂混合。治疗剂或诊断剂的制剂可以通过与生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合制备成例如冻干粉末、浆液、水溶液、洗剂或悬浮液形式(参见例如 Hardman 等 (2001) Goodman and Gilman' s The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N. Y. ; Gennaro (2000) Remington : The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N. Y. ; Avis 等 (编著) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms : Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY ; Lieberman 等 (编著) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms : Tablets, Marcel Dekker, NY ; Lieberman 等 (编著) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms : Disperse Systems, Marcel Dekker, NY ; Weiner 和 Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc. , New York, N. Y.)。

[0263] 治疗剂施用方案的选择取决于若干因素,包括实体的血清或组织周转率、症状水平、实体的免疫原性和生物基质中靶细胞的可达性。在某些实施方案中,施用方案使得符合可接受水平的副作用的递送到患者体内的治疗剂的量达到最大。因此,所递送生物剂的量部分取决于特定实体和所治疗病状的严重程度。能够获得关于选择抗体、细胞因子和小分子的适当剂量的指南(参见例如 Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK ; Kresina (编著) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N. Y. ; Bach (编著) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N. Y. ; Baert 等 (2003) New Engl. J. Med. 348 : 601-608 ; Milgrom 等 (1999) New Engl. J. Med. 341 : 1966-1973 ; Slamon 等 (2001) New Engl. J. Med. 344 : 783-792 ; Beniaminovitz 等 (2000) New Engl. J. Med. 342 : 613-619 ; Ghosh 等 (2003) New Engl. J. Med. 348 : 24-32 ; Lipsky 等 (2000) New Engl. J. Med. 343 : 1594-1602)。

[0264] 适当剂量的确定由临床医师例如使用本领域中已知或怀疑影响治疗或预测会影响治疗的参数或因素来进行。一般来说,剂量始于在一定程度上少于最佳剂量的量,并且此后其以较小增量增加直至相对于任何负面副作用达成期望的或最佳效果。重要的诊断指标包括例如炎症的症状或所产生发炎性细胞因子的含量的指标。

[0265] 本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以改变以便获得对于特定患者、组合物和施用模式有效达成期望治疗效果而不会对患者造成毒性的量的活性成分。所选剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括所用本发明特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、施用途径、施用时间、所用特定化合物的排泄速率、治疗持续时间、与所用特定组合

物组合使用的其它药物、化合物和 / 或物质、所治疗患者的年龄、性别、体重、病状、一般健康状况和先前的病史,和医学领域中熟知的类似因素。

[0266] 包含本发明的抗体或抗体偶联物的组合物可通过连续输注,或通过以例如一天、一周或每周 1 至 7 次的时间间隔给药来提供。剂量可静脉内、皮下、局部外用、口服、经鼻、直肠、肌肉内、大脑内或通过吸入来提供。特定剂量方案是涉及避免显著不良副作用的最大剂量或剂量频率的方案。总每周剂量可以是每公斤体重至少 $0.05 \mu\text{g}$ 、至少 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、至少 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、至少 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、至少 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、至少 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、至少 $0.2\text{mg}/\text{kg}$ 、至少 $1.0\text{mg}/\text{kg}$ 、至少 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、至少 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、至少 $25\text{mg}/\text{kg}$ 或至少 $50\text{mg}/\text{kg}$ (参见例如 Yang 等 (2003) *New Engl. J. Med.* 349 :427-434 ;Herold 等 (2002) *New Engl. J. Med.* 346 :1692-1698 ;Liu 等 (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67 :451-456 ;Portielji 等 (2000) *Cancer Immunol. Immunother.* 52 :133-144)。剂量可以是至少 $15 \mu\text{g}$ 、至少 $20 \mu\text{g}$ 、至少 $25 \mu\text{g}$ 、至少 $30 \mu\text{g}$ 、至少 $35 \mu\text{g}$ 、至少 $40 \mu\text{g}$ 、至少 $45 \mu\text{g}$ 、至少 $50 \mu\text{g}$ 、至少 $55 \mu\text{g}$ 、至少 $60 \mu\text{g}$ 、至少 $65 \mu\text{g}$ 、至少 $70 \mu\text{g}$ 、至少 $75 \mu\text{g}$ 、至少 $80 \mu\text{g}$ 、至少 $85 \mu\text{g}$ 、至少 $90 \mu\text{g}$ 、至少 $95 \mu\text{g}$ 或至少 $100 \mu\text{g}$ 。施用于受试者的剂量可以是总共至少 1 剂、2 剂、3 剂、4 剂、5 剂、6 剂、7 剂、8 剂、9 剂、10 剂、11 剂或 12 剂或更多。

[0267] 对于本发明的抗体或抗体偶联物,施用于患者的剂量可为每公斤患者体重 0.0001mg 至 100mg 。剂量可以在每公斤患者体重 0.0001mg 与 20mg 之间、 0.0001mg 与 10mg 之间、 0.0001mg 与 5mg 之间、 0.0001mg 与 2mg 之间、 0.0001mg 与 1mg 之间、 0.0001mg 与 0.75mg 之间、 0.0001mg 与 0.5mg 之间、 0.0001mg 至 0.25mg 、 0.0001mg 至 0.15mg 、 0.0001mg 至 0.10mg 、 0.001mg 至 0.5mg 、 0.01mg 至 0.25mg 或 0.01mg 至 0.10mg 之间。

[0268] 本发明的抗体或抗体偶联物的剂量可以使用患者体重 (公斤 (kg)) 乘以所要施用的剂量 (mg/kg) 进行计算。本发明抗体的剂量可以是每公斤患者体重 $150 \mu\text{g}$ 或更少、 $125 \mu\text{g}$ 或更少、 $100 \mu\text{g}$ 或更少、 $95 \mu\text{g}$ 或更少、 $90 \mu\text{g}$ 或更少、 $85 \mu\text{g}$ 或更少、 $80 \mu\text{g}$ 或更少、 $75 \mu\text{g}$ 或更少、 $70 \mu\text{g}$ 或更少、 $65 \mu\text{g}$ 或更少、 $60 \mu\text{g}$ 或更少、 $55 \mu\text{g}$ 或更少、 $50 \mu\text{g}$ 或更少、 $45 \mu\text{g}$ 或更少、 $40 \mu\text{g}$ 或更少、 $35 \mu\text{g}$ 或更少、 $30 \mu\text{g}$ 或更少、 $25 \mu\text{g}$ 或更少、 $20 \mu\text{g}$ 或更少、 $15 \mu\text{g}$ 或更少、 $10 \mu\text{g}$ 或更少、 $5 \mu\text{g}$ 或更少、 $2.5 \mu\text{g}$ 或更少、 $2 \mu\text{g}$ 或更少、 $1.5 \mu\text{g}$ 或更少、 $1 \mu\text{g}$ 或更少、 $0.5 \mu\text{g}$ 或更少或者 $0.5 \mu\text{g}$ 或更少。

[0269] 本发明的抗体或抗体偶联物的单位剂量可以是 0.1mg 至 20mg 、 0.1mg 至 15mg 、 0.1mg 至 12mg 、 0.1mg 至 10mg 、 0.1mg 至 8mg 、 0.1mg 至 7mg 、 0.1mg 至 5mg 、 0.1mg 至 2.5mg 、 0.25mg 至 20mg 、 0.25mg 至 15mg 、 0.25mg 至 12mg 、 0.25mg 至 10mg 、 0.25mg 至 8mg 、 0.25mg 至 7mg 、 0.25mg 至 5mg 、 0.5mg 至 2.5mg 、 1mg 至 20mg 、 1mg 至 15mg 、 1mg 至 12mg 、 1mg 至 10mg 、 1mg 至 8mg 、 1mg 至 7mg 、 1mg 至 5mg 或 1mg 至 2.5mg 。

[0270] 本发明的抗体或抗体偶联物的剂量可以在受试者中达到以下血清效价:至少 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $125 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $175 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $225 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $275 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $325 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $350 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $375 \mu\text{g}/\text{ml}$ 或至少 $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。或者,本发明抗体的剂量可以在受试者中达到以下血清效价:至少 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、至

少 6 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 10 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 15 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 20 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 25 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 50 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 100 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 125 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 150 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 175 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 200 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 225 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 250 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 275 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 300 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 325 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 350 $\mu\text{g/ml}$ 、至少 375 $\mu\text{g/ml}$ 或至少 400 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0271] 本发明的抗体或抗体偶联物的剂量可以重复并且施用可以间隔至少 1 天、2 天、3 天、5 天、10 天、15 天、30 天、45 天、2 个月、75 天、3 个月或至少 6 个月。

[0272] 用于特定患者的有效量可以根据如所治疗的病状、患者的总体健康状况、施用的方法途径和剂量以及副作用的严重程度而改变（参见例如 Maynard 等 (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, Fla. ; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., London, UK)。

[0273] 施用途径可以是例如局部外用或皮肤施用、静脉内注射或输注、腹膜内、大脑内、肌肉内、眼内、动脉内、脑脊髓内、病灶内或利用持续释放系统或植入物进行施用（参见例如 Sidman 等 (1983) *Biopolymers* 22 :547-556 ; Langer 等 (1981) *J. Biomed. Mater. Res.* 15 : 167-277 ; Langer (1982) *Chem. Tech.* 12 :98-105 ; Epstein 等 (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 :3688-3692 ; Hwang 等 (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 :4030-4034 ; 美国专利 No. 6, 350466 和 No. 6, 316, 024)。必要时, 组合物还可以包含增溶剂和局部麻醉剂（如利多卡因）以减轻注射部位的疼痛。另外, 还可以采用肺部施用, 例如通过使用吸入器或喷雾器以及具有雾化剂的制剂。参见例如美国专利 No. 6, 019, 968、No. 5, 985, 320、No. 5, 985, 309、No. 5, 934, 272、No. 5, 874, 064、No. 5, 855, 913、No. 5, 290, 540 和 No. 4, 880, 078 ; 和 PCT 公布 No. WO92/19244、No. WO 97/32572、No. WO 97/44013、No. WO 98/31346 和 No. WO 99/66903, 所述文献的全部内容以引用的方式并入本文。在一个实施方案中, 抗体、组合疗法或本发明的组合物使用 Alkermes AIRTM 肺部药物递送技术 (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.) 进行施用。

[0274] 本发明的组合物还可以通过一种或多种施用途径使用本领域中已知的多种方法中的一种或多种施用。如本领域的技术人员所了解, 施用的途径和 / 或模式将根据期望结果而变化。所选的本发明的抗体的施用途径包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其它胃肠外施用途径, 例如注射或输注。胃肠外施用可表示除肠内施用和局部外用施用以外的施用模式, 通常通过注射进行, 并且包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、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。或者, 本发明的组合物可以通过非胃肠外途径施用, 如局部外用、表皮或粘膜施用途径, 例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部外用施用。

[0275] 如果本发明的抗体或其偶联物是以控制释放或持续释放系统施用, 那么可以使用泵来实现控制或持续释放（参见 Langer, 同上 ; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14 :20 ; Buchwald 等, 1980, *Surgery* 88 :507 ; Saudek 等, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321 : 574)。可以使用聚合材料来实现本发明的疗法的控制或持续释放（参见例如 *Medical Applications of Controlled Release*, Langer 和 Wise (编著), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974) ; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen 和 Ball (编著), Wiley, New York (1984) ; Ranger 和 Peppas, 1983, *J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23 :61 ; 还参见 Levy 等, 1985, *Science* 228 :

190 ;During 等,1989, Ann. Neurol. 25 :351 ;Howard 等,1989, J. Neurosurg. 71 :105) ;美国专利 No. 5,679,377 ;美国专利 No. 5,916,597 ;美国专利 No. 5,912,015 ;美国专利 No. 5,989,463 ;美国专利 No. 5,128,326 ;PCT 公布 No. W099/15154 ;和 PCT 公布 No. W099/20253。持续释放制剂中所用的聚合物的实例包括但不限于聚(甲基丙烯酸 2-羟基乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯 (PLG)、聚酸酐、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯 (PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯) (PLGA) 和聚原酸酯。在一个实施方案中,持续释放制剂中所用的聚合物呈惰性、不含可浸出的杂质、储存时稳定、无菌并且可生物降解。控制或持续释放系统可安置于预防或治疗靶标附近,因此仅需要一部分全身性剂量(参见例如 Goodson, Medical Applications of Controlled Release, 同上,第 2 卷,第 115-138 页 (1984))。

[0276] 控制释放系统在 Langer 的综述中进行了论述 (1990, Science 249 :1527-1533)。本领域中的技术人员已知的任何技术都可用于制备包含一种或多种本发明抗体或其偶联物的持续释放制剂。参见例如美国专利 No. 4,526,938 ;PCT 公布 W091/05548 ;PCT 公布 W096/20698 ;Ning 等,1996, " Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel, " Radiotherapy & Oncology 39 :179-189 ;Song 等,1995, " Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions, " PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50 :372-397 ;Cleek 等,1997, " Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application, " Pro. Int' l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24 :853-854 ;和 Lam 等,1997, " Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery, " Proc. Int' l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24 :759-760, 所述文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0277] 如果本发明的抗体或抗体偶联物是局部外用施用,那么其可以配制成软膏、乳膏、透皮贴片、洗剂、凝胶、洗发剂、喷雾、气雾剂、溶液、乳液形式或本领域的技术人员熟知的其它形式。参见例如 Remington' s Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 第 19 版, Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)。对于非喷雾局部外用剂型,通常采用包含可与局部外用应用相容的载体或一种或多种赋形剂并且具有动态粘度(在一些情况下比水高的动态粘度)的粘性至半固体或固体形式。适合的制剂包括但不限于溶液、悬浮液、乳液、乳膏、软膏、散剂、擦剂、药膏等,若需要其可进行灭菌或与助剂(例如,防腐剂、稳定剂、湿润剂、缓冲剂或盐)混合以便影响各种性质,如渗透压。其它适合的局部外用剂型包括可喷雾气雾剂制剂,其中活性成分(在一些情况下与固体或液体惰性载体组合)与加压挥发物(例如,气态推进剂,如氟利昂 (freon)) 混合包装或包装于挤瓶中。若需要还可向药物组合物和剂型中添加增湿剂或保湿剂。这些附加成分的实例在本领域中是众所周知的。

[0278] 如果包含抗体或抗体偶联物的组合物是鼻内施用,那么其可以配制成气雾剂形式、喷雾、细雾或滴剂形式。具体来说,根据本发明使用的预防剂或治疗剂宜使用适合的推进剂(例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适合的气体)从加压包装或喷雾器以气雾剂形式递送。在加压气雾剂的情况下,可通过提供阀门来

确定剂量单位以递送测量的量。吸入器或吹入器中所用的胶囊和药筒（由例如明胶构成）可配制成含有化合物和适合粉末基剂（如乳糖或淀粉）的粉末混合物。

[0279] 与第二治疗剂（例如，细胞因子、类固醇、化学治疗剂、抗生素或辐射）共同施用或治疗的方法在本领域中是众所周知的（参见例如 Hardman 等（编著）(2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第 10 版, McGraw-Hill, New York, N. Y. ; Poole 和 Peterson（编著）(2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa. ; Chabner 和 Longo（编著）(2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.）。有效量的治疗剂可以使症状减轻至少 10%；至少 20%；至少约 30%；至少 40%；或至少 50%。

[0280] 可与本发明的抗体或其偶联物组合施用的附加疗法（例如，预防剂或治疗剂）可与本发明的抗体间隔少于 5 分钟、间隔少于 30 分钟、间隔 1 小时、间隔约 1 小时、间隔约 1 小时至约 2 小时、间隔约 2 小时至约 3 小时、间隔约 3 小时至约 4 小时、间隔约 4 小时至约 5 小时、间隔约 5 小时至约 6 小时、间隔约 6 小时至约 7 小时、间隔约 7 小时至约 8 小时、间隔约 8 小时至约 9 小时、间隔约 9 小时至约 10 小时、间隔约 10 小时至约 11 小时、间隔约 11 小时至约 12 小时、间隔约 12 小时至 18 小时、间隔 18 小时至 24 小时、间隔 24 小时至 36 小时、间隔 36 小时至 48 小时、间隔 48 小时至 52 小时、间隔 52 小时至 60 小时、间隔 60 小时至 72 小时、间隔 72 小时至 84 小时、间隔 84 小时至 96 小时或间隔 96 小时至 120 小时施用。两种或多于两种疗法可在同一次患者就诊期间施用。

[0281] 本发明的抗体或抗体偶联物和其它疗法可以周期性施用。周期性疗法涉及施用第一疗法（例如，第一预防剂或治疗剂）一定时间段，接着施用第二疗法（例如，第二预防剂或治疗剂）一定时间段，任选地接着施用第三疗法（例如，预防剂或治疗剂）一定时间段等，并重复此依序施用（即周期）以便减少对所述疗法之一的抗性的发展、避免或减少所述疗法之一的副作用和 / 或提高所述疗法的功效。

[0282] 在某些实施方案中，可配制本发明的抗体和抗体偶联物以确保适当的体内分布。例如，血脑屏障 (BBB) 阻挡许多高亲水性化合物。为确保本发明的治疗化合物穿过 BBB（如果需要），那么其可以配制到例如脂质体中。制造脂质体的方法请参见例如美国专利 4, 522, 811、5, 374, 548 和 5, 399, 331。脂质体可包含一个或多个选择性运输到特定细胞或器官中由此增强靶向药物递送的部分（参见例如 V. V. Ranade (1989) J. Clin Pharmacol. 29 : 685）。示例性靶向部分包含叶酸或生物素（参见例如 Low 等的美国专利 5, 416, 016）；甘露糖苷 (Umezawa 等 (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153 :1038)；抗体 (P. G. Bloeman 等 (1995) FEBS Lett. 357 :140；M. Owais 等 (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39 : 180)；表面活性蛋白 A 受体 (Briscoe 等 (1995) Am. J. Physiol. 1233 :134)；p120 (Schreier 等 (1994) J. Biol. Chem. 269 :9090)；还参见 K. Keinänen；M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346 :123；J. J. Killion；I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4 :273。

[0283] 本发明提供向有需要的受试者单独或与其它疗法组合施用包含本发明的抗体或抗体偶联物的药物组合物的方案。本发明的组合疗法的疗法（例如，预防剂或治疗剂）可同时或依序施用于受试者。本发明的组合疗法的疗法（例如，预防剂或治疗剂）还可以周期性地施用。周期性疗法涉及施用第一疗法（例如，第一预防剂或治疗剂）一定时间段，接

着施用第二疗法（例如，第二预防剂或治疗剂）一定时间段，并重复此依序施用（即周期）以便减少对所述疗法（例如，药剂）之一的抗性的发展、避免或减少所述疗法（例如，药剂）之一的副作用和 / 或提高所述疗法的功效。

[0284] 本发明的组合疗法的疗法（例如，预防剂或治疗剂）可同时施用于受试者。术语“同时”并不限于恰好在相同的时间施用疗法（例如，预防剂或治疗剂），而是指包含本发明的抗体或抗体偶联物的药物组合物按一定顺序和在一定时间间隔内施用于受试者，以使本发明的抗体或其偶联物可与其它疗法一起作用以提供比其以其它方式施用时增加的效益。例如，各疗法可在相同时间施用于受试者或以任何顺序在不同时间点依序施用于受试者；然而，如果不是同时施用，那么其应在足够接近的时间内施用以便提供期望的治疗或预防作用。各疗法可以任何适当的形式或通过任何适合的途径单独施用于受试者。在各个实施方案中，疗法（例如，预防剂或治疗剂）间隔少于 15 分钟、少于 30 分钟、少于 1 小时、间隔约 1 小时、间隔约 1 小时至约 2 小时、间隔约 2 小时至约 3 小时、间隔约 3 小时至约 4 小时、间隔约 4 小时至约 5 小时、间隔约 5 小时至约 6 小时、间隔约 6 小时至约 7 小时、间隔约 7 小时至约 8 小时、间隔约 8 小时至约 9 小时、间隔约 9 小时至约 10 小时、间隔约 10 小时至约 11 小时、间隔约 11 小时至约 12 小时、间隔 24 小时、间隔 48 小时、间隔 72 小时或间隔 1 周施用于受试者。在其它实施方案中，两种或多于两种疗法（例如，预防剂或治疗剂）在患者同一次就诊时施用。

[0285] 组合疗法的预防剂或治疗剂可在同一药物组合物中施用于受试者。或者，组合疗法的预防剂或治疗剂可在分开的药物组合物中同时施用于受试者。预防剂或治疗剂可通过相同或不同的施用途径施用于受试者。

[0286] 等同物

[0287] 认为前述书面说明书足以使本领域的技术人员能够实施本发明。前述描述和实例详述了本发明的某些示例性实施方案。然而应了解，不论前述内容在正文中呈现地多么详细，本发明都可以多种方式实施，并且本发明应根据随附权利要求书和其任何等同物进行解释。

[0288] 本文中引用的所有参考文献，包括专利、专利申请、论文、教科书等和其中所引用的参考文献，在某些其所不具备的程度上，其全部内容都以引用的方式并入本文。

[0289] 示例性实施方案

[0290] 1. 一种半胱氨酸工程改造的抗体，其中所述半胱氨酸工程改造的抗体在抗体重链的恒定区中的至少一个表面氨基酸残基中包含一个或多个氨基酸取代成半胱氨酸，其中所述半胱氨酸工程改造的抗体包含至少一个硫醇基。

[0291] 2. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体，其中所述抗体包含 2 个或多于 2 个硫醇基。

[0292] 3. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体，其中所述抗体包含 4 个或多于 4 个硫醇基。

[0293] 4. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体，其中所述抗体包含 6 个或多于 6 个硫醇基。

[0294] 5. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体，其中所述抗体包含 8 个或多于 8 个硫醇基。

[0295] 6. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 10 个或更多于 10 个硫醇基。

[0296] 7. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 12 个或更多于 12 个硫醇基。

[0297] 8. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 14 个或更多于 14 个硫醇基。

[0298] 9. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 16 个或更多于 16 个硫醇基。

[0299] 10. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 18 个或更多于 18 个硫醇基。

[0300] 11. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 20 个或更多于 20 个硫醇基。

[0301] 12. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 22 个或更多于 22 个硫醇基。

[0302] 13. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 24 个或更多于 24 个硫醇基。

[0303] 14. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 26 个或更多于 26 个硫醇基。

[0304] 15. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 28 个或更多于 28 个硫醇基。

[0305] 16. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 30 个或更多于 30 个硫醇基。

[0306] 17. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 32 个或更多于 32 个硫醇基。

[0307] 18. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 34 个或更多于 34 个硫醇基。

[0308] 19. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 36 个或更多于 36 个硫醇基。

[0309] 20. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 38 个或更多于 38 个硫醇基。

[0310] 21. 根据实施方案 1 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体包含 40 个或更多于 40 个硫醇基。

[0311] 22. 根据实施方案 1 至 21 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述表面氨基酸残基选自位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442。

[0312] 23. 根据实施方案 1 至 22 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体还包含在选自所述抗体的 CH1 结构域的位置 131、132、133、134、135、136、137、138 和 139 的位置取代成半胱氨酸残基。

[0313] 24. 根据实施方案 1 至 23 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中

所述半胱氨酸工程改造的抗体显示与半胱氨酸工程改造前的抗体相比相同或较高的对特定靶标的结合亲和力。

[0314] 25. 根据实施方案 1 至 4 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述半胱氨酸工程改造的抗体显示与半胱氨酸工程改造前的抗体相比较低的对特定靶标的结合亲和力。

[0315] 26. 根据实施方案 1 至 25 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述半胱氨酸工程改造的抗体显示与半胱氨酸工程改造前的抗体相比相同、较低或较高的对一种或多种 IgG Fc 受体的结合亲和力。

[0316] 27. 根据实施方案 1 至 26 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述半胱氨酸工程改造的抗体诱导与半胱氨酸工程改造前的抗体相比相同或较高水平的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。

[0317] 28. 根据实施方案 1 至 26 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述半胱氨酸工程改造的抗体诱导与半胱氨酸工程改造前的抗体相比较低水平的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。

[0318] 29. 根据实施方案 1 至 27 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述半胱氨酸工程改造的抗体诱导与半胱氨酸工程改造前的抗体相比相同或较高水平的抗体依赖性补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0319] 30. 根据实施方案 1 至 27 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述半胱氨酸工程改造的抗体诱导与半胱氨酸工程改造前的抗体相比相同或较低水平的抗体依赖性补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0320] 31. 根据实施方案 1 至 30 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述半胱氨酸工程改造的抗体显示与半胱氨酸工程改造前的抗体相比相同或较高水平的通过断裂、 T_m 和 / 或聚集特征所测得的稳定性。

[0321] 32. 根据实施方案 1 至 30 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述半胱氨酸工程改造的抗体显示与半胱氨酸工程改造前的抗体相比较低水平的通过断裂、 T_m 和 / 或聚集特征所测得的稳定性。

[0322] 33. 根据实施方案 1 至 32 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述工程改造的抗体显示与半胱氨酸工程改造前的抗体相比提高或减少的半衰期。

[0323] 34. 根据实施方案 1 至 33 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述硫醇基能够化学偶联于细胞毒性剂、化学治疗剂、毒素、放射性核素、DNA、RNA、siRNA、微 RNA、肽核酸、非天然氨基酸、肽、酶、荧光标签或生物素。

[0324] 35. 根据实施方案 34 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述细胞毒性剂选自抗微管蛋白剂、DNA 小沟结合剂、抗类美坦素 (anti-mitmaytansanoid) 和奥瑞他汀。

[0325] 36. 根据实施方案 34 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述化学治疗剂选自泰素、紫杉醇、多柔比星、甲氨蝶呤、多拉司他汀、长春花生物碱、甲氨蝶呤和倍癌霉素。

[0326] 37. 根据实施方案 34 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述毒素选自相思豆毒素、马钱子碱、毒芹素、白喉毒素、肉毒杆菌毒素、志贺毒素、内毒素、破伤风毒素、百日咳毒素、炭疽毒素、霍乱毒素、镰叶芹醇、黄曲霉毒素、格尔德霉素、白树毒素、百脉根苷、蓖麻毒素、番木鳖碱和河豚毒素。

[0327] 38. 根据实施方案 34 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述放射性核素选自铬 (^{51}Cr)、钴 (^{57}Co)、氟 (^{18}F)、钆 (^{153}Gd 、 ^{159}Gd)、锗 (^{68}Ge)、钬 (^{166}Ho)、铟 (^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、碘 (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、镧 (^{140}La)、镱 (^{177}Lu)、锰 (^{54}Mn)、钼 (^{99}Mo)、钯 (^{103}Pd)、磷 (^{32}P)、镨 (^{142}Pr)、钷 (^{149}Pm)、铼 (^{186}Re 、 ^{188}Re)、铑 (^{105}Rh)、钌 (^{97}Ru)、钐 (^{153}Sm)、钪 (^{47}Sc)、硒 (^{75}Se)、锶 (^{85}Sr)、硫 (^{35}S)、锝 (^{99}Tc)、钛 (^{201}Ti)、锡 (^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、氚 (^3H)、氙 (^{133}Xe)、镱 (^{169}Yb 、 ^{175}Yb)、钇 (^{90}Y) 和锌 (^{65}Zn)。

[0328] 39. 根据实施方案 34 所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体是内化抗体。

[0329] 40. 根据实施方案 1 至 39 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、完全人抗体、双特异性抗体、多特异性抗体或抗体样分子。

[0330] 41. 一种分离的核酸,其包含编码根据实施方案 1 至 40 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体的重链可变结构域或轻链可变结构域的核苷酸序列。

[0331] 42. 一种载体,其包含根据实施方案 41 所述的核酸。

[0332] 43. 一种宿主细胞,其包含根据实施方案 42 所述的载体。

[0333] 44. 一种根据实施方案 1 至 40 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体的抗体偶联物。

[0334] 45. 一种药物组合物,其包含根据实施方案 44 所述的抗体偶联物。

[0335] 46. 一种检测有需要的受试者的癌症、自体免疫性、炎症性或感染性疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据实施方案 45 所述的组合物。

[0336] 47. 根据实施方案 46 所述的方法,其中所述疾病或病症包含过度表达由所述抗体偶联物结合的细胞表面抗原的细胞。

[0337] 48. 一种抑制靶细胞增殖的方法,所述方法包括使所述细胞与有效量的根据实施方案 44 所述的抗体偶联物接触。

[0338] 49. 一种抑制受试者的靶细胞增殖的方法,所述方法包括施用有效量的根据实施方案 45 所述的组合物。

[0339] 50. 根据实施方案 48 或 49 所述的方法,其中所述靶细胞过度表达由所述抗体偶联物结合的细胞表面抗原。

[0340] 51. 一种治疗有需要的受试者的癌症、自体免疫性、炎症性或感染性疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方案 45 所述的组合物。

[0341] 52. 根据实施方案 51 所述的方法,其中所述疾病或病症包含过度表达由所述抗体偶联物结合的细胞表面抗原的细胞。

[0342] 53. 根据实施方案 51 所述的方法,其中所述方法包括杀死与所述疾病相关的细胞或降低所述细胞的生长速率。

[0343] 54. 根据实施方案 51 所述的方法,其中所述方法包括消耗 B 细胞或 T 细胞。

[0344] 55. 根据实施方案 51 所述的方法,包括施用附加疗法,其中所述附加疗法选自化学疗法、生物疗法、免疫疗法、辐射疗法、激素疗法和手术。

[0345] 56. 一种用于使异源分子有效偶联于根据实施方案 1 至 40 中任一实施方案所述的半胱氨酸工程改造的抗体的方法。

[0346] 57. 根据实施方案 56 所述的方法,其中所述方法包括使所述异源分子偶联于选自所述抗体的 Fc 区的 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的至少一个位置。

[0347] 58. 根据实施方案 56 或 57 所述的方法,其中所述异源分子选自细胞毒性剂、化学治疗剂、毒素、放射性核素、DNA、RNA、siRNA、微 RNA、肽核酸、肽、酶、荧光标签或生物素。

[0348] 59. 根据实施方案 58 所述的方法,其中所述细胞毒性剂选自抗微管蛋白剂、DNA 小沟结合剂、抗类美坦素和奥瑞他汀。

[0349] 60. 根据实施方案 58 所述的方法,其中所述化学治疗剂选自泰素、紫杉醇、多柔比星、甲氨蝶呤、多拉司他汀、长春花生物碱和甲氨蝶呤。

[0350] 61. 根据实施方案 58 所述的方法,其中所述毒素选自相思豆毒素、马钱子碱、毒芹素、白喉毒素、肉毒杆菌毒素、志贺毒素、内毒素、破伤风毒素、百日咳毒素、炭疽毒素、霍乱毒素、镰叶芹醇、黄曲霉毒素、格尔德霉素、白树毒素、百脉根苷、蓖麻毒素、番木鳖碱和河豚毒素。

[0351] 62. 根据实施方案 58 所述的方法,其中所述放射性核素选自铬 (^{51}Cr)、钴 (^{57}Co)、氟 (^{18}F)、钆 (^{153}Gd 、 ^{159}Gd)、锗 (^{68}Ge)、钷 (^{166}Ho)、铟 (^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、碘 (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、镧 (^{140}La)、镱 (^{177}Lu)、锰 (^{54}Mn)、钼 (^{99}Mo)、钯 (^{103}Pd)、磷 (^{32}P)、镨 (^{142}Pr)、钷 (^{149}Pm)、铼 (^{186}Re 、 ^{188}Re)、铑 (^{105}Rh)、钌 (^{97}Ru)、钐 (^{153}Sm)、钪 (^{47}Sc)、硒 (^{75}Se)、锶 (^{85}Sr)、硫 (^{35}S)、锝 (^{99}Tc)、钛 (^{201}Ti)、锡 (^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、氚 (^3H)、氙 (^{133}Xe)、镱 (^{169}Yb 、 ^{175}Yb)、钇 (^{90}Y) 和锌 (^{65}Zn)。

[0352] 63. 根据实施方案 56 至 62 中任一实施方案所述的方法,其中所述偶联效率根据利用偶联反应后保留的残余硫醇基所测量是至少 5%或更高。

[0353] 64. 根据实施方案 56 至 63 中任一实施方案所述的方法,其中所述效率根据利用偶联反应后保留的残余硫醇基所测量是至少 25%或更高。

[0354] 65. 根据实施方案 56 至 64 中任一实施方案所述的方法,其中所述效率根据利用偶联反应后保留的残余硫醇基所测量是至少 75%或更高。

[0355] 66. 一种工程改造的抗体,其中所述工程改造的抗体在抗体的 Fc 区的 CH2 和 / 或 CH3 结构域上的至少一个表面氨基酸残基中包含一个或多个氨基酸取代为非天然存在的残基,

[0356] 其中所述工程改造的抗体包含至少一个反应性基团,并且

[0357] 其中所述非天然存在的残基选自半胱氨酸、赖氨酸、酪氨酸、组氨酸、硒半胱氨酸、硒甲硫氨酸和非天然氨基酸。

[0358] 67. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 2 个或多于 2 个取代。

[0359] 68. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 4 个或多于 4 个取代。

[0360] 69. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 6 个或多于 6 个取代。

[0361] 70. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 8 个或多于 8 个取代。

[0362] 71. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 10 个或多于 10

个取代。

[0363] 72. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 12 个或多于 12 个取代。

[0364] 73. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 14 个或多于 14 个取代。

[0365] 74. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 16 个或多于 16 个取代。

[0366] 75. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 18 个或多于 18 个取代。

[0367] 76. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 20 个或多于 20 个取代。

[0368] 77. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 22 个或多于 22 个取代。

[0369] 78. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 24 个或多于 24 个取代。

[0370] 79. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 26 个或多于 26 个取代。

[0371] 80. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 28 个或多于 28 个取代。

[0372] 81. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 30 个或多于 30 个取代。

[0373] 82. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 32 个或多于 32 个取代。

[0374] 83. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 34 个或多于 34 个取代。

[0375] 84. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 36 个或多于 36 个取代。

[0376] 85. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 38 个或多于 38 个取代。

[0377] 86. 根据实施方案 66 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体包含 40 个或多于 40 个取代。

[0378] 87. 根据实施方案 66 至 86 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述表面氨基酸残基选自 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442。

[0379] 88. 根据实施方案 66 至 87 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述抗体还包含在选自所述抗体的 CH1 结构域的 131、132、133、134、135、136、137、138 和 139 的位置取代成半胱氨酸。

[0380] 89. 根据实施方案 66 至 88 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述工程改造的抗体显示与工程改造前的抗体相比相同或较高的对特定靶标的结合亲和力。

[0381] 90. 根据实施方案 66 至 89 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述工程改造的抗体显示与工程改造前的抗体相比较低的对特定靶标的亲和力。

[0382] 91. 根据实施方案 66 至 90 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述工程改造的抗体显示与工程改造前的抗体相比相同、较低或较高的对一种或多种 IgG Fc 受体的结合亲和力。

[0383] 92. 根据实施方案 66 至 91 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述工程改造的抗体诱导与工程改造前的抗体相比相同或较高水平的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。

[0384] 93. 根据实施方案 66 至 91 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述工程改造的抗体诱导与工程改造前的抗体相比较低水平的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。

[0385] 94. 根据实施方案 66 至 91 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述工程改造的抗体诱导与工程改造前的抗体相比相同或较高水平的抗体依赖性补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0386] 95. 根据实施方案 66 至 91 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述工程改造的抗体诱导与工程改造前的抗体相比较低水平的抗体依赖性补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0387] 96. 根据实施方案 66 至 95 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述工程改造的抗体显示与工程改造前的抗体相比相同或较高水平的通过断裂、 T_m 和 / 或聚集特征所测得的稳定性。

[0388] 97. 根据实施方案 66 至 95 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述工程改造的抗体显示与工程改造前的抗体相比较低水平的通过断裂、 T_m 和 / 或聚集特征所测得的稳定性。

[0389] 98. 根据实施方案 66 至 97 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述工程改造的抗体显示与工程改造前的抗体相比增加或减少的半衰期。

[0390] 99. 根据实施方案 66 至 98 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述硫醇基能够化学偶联于细胞毒性剂、化学治疗剂、毒素、放射性核素、DNA、RNA、siRNA、微 RNA、肽核酸、非天然氨基酸、肽、酶、荧光标签或生物素。

[0391] 100. 根据实施方案 99 所述的工程改造的抗体,其中所述细胞毒性剂选自抗微管蛋白剂、DNA 小沟结合剂、抗类美坦素和奥瑞他汀。

[0392] 101. 根据实施方案 99 所述的工程改造的抗体,其中所述化学治疗剂选自泰素、紫杉醇、多柔比星、甲氨蝶呤、多拉司他汀、长春花生物碱、甲氨蝶呤和倍癌霉素。

[0393] 102. 根据实施方案 99 所述的工程改造的抗体,其中所述毒素选自相思豆毒素、马钱子碱、毒芹素、白喉毒素、肉毒杆菌毒素、志贺毒素、内毒素、破伤风毒素、百日咳毒素、炭疽毒素、霍乱毒素、镰叶芹醇、黄曲霉毒素、格尔德霉素、白树毒素、百脉根苷、蓖麻毒素、番木鳖碱和河豚毒素。

[0394] 103. 根据实施方案 99 所述的工程改造的抗体,其中所述放射性核素选自铬 (^{51}Cr)、钴 (^{57}Co)、氟 (^{18}F)、钆 (^{153}Gd 、 ^{159}Gd)、锗 (^{68}Ge)、钬 (^{166}Ho)、铟 (^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、碘 (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、镧 (^{140}La)、镥 (^{177}Lu)、锰 (^{54}Mn)、钼 (^{99}Mo)、钯 (^{103}Pd)、磷 (^{32}P)、镨 (^{142}Pr)、钷 (^{149}Pm)、铼 (^{186}Re 、 ^{188}Re)、铑 (^{105}Rh)、钌 (^{97}Ru)、钐 (^{153}Sm)、钪 (^{47}Sc)、硒 (^{75}Se)、锶 (^{85}Sr)、硫 (^{35}S)、锝 (^{99}Tc)、钛 (^{201}Ti)、锡 (^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、氚 (^3H)、氙 (^{133}Xe)、镱 (^{169}Yb 、 ^{175}Yb)、钇

(⁹⁰Y) 和锌 (⁶⁵Zn)。

- [0395] 104. 根据实施方案 99 所述的工程改造的抗体,其中所述抗体是内化抗体。
- [0396] 105. 根据实施方案 66 至 104 中任一实施方案所述的工程改造的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、完全人抗体、双特异性抗体、多特异性抗体或抗体样分子。
- [0397] 106. 一种分离的核酸,其包含编码根据实施方案 66 至 105 中任一实施方案所述的工程改造的抗体的重链可变结构域或轻链可变结构域的核苷酸序列。
- [0398] 107. 一种载体,其包含根据实施方案 106 所述的核酸。
- [0399] 108. 一种宿主细胞,其包含根据实施方案 107 所述的载体。
- [0400] 109. 一种根据实施方案 66 至 105 中任一实施方案所述的工程改造的抗体的抗体偶联物。
- [0401] 110. 一种药物组合物,其包含根据实施方案 109 所述的抗体偶联物。
- [0402] 111. 一种检测有需要的受试者的癌症、自体免疫性、炎症性或感染性疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据实施方案 110 所述的组合物。
- [0403] 112. 根据实施方案 111 所述的方法,其中所述疾病或病症包含过度表达由所述抗体偶联物结合的细胞表面抗原的细胞。
- [0404] 113. 一种抑制靶细胞增殖的方法,所述方法包括使所述细胞与有效量的根据实施方案 109 所述的抗体偶联物接触。
- [0405] 114. 一种抑制受试者的靶细胞增殖的方法,所述方法包括施用有效量的根据实施方案 110 所述的组合物。
- [0406] 115. 根据实施方案 113 或 114 所述的方法,其中所述靶细胞过度表达由所述抗体偶联物结合的细胞表面抗原。
- [0407] 116. 一种治疗有需要的受试者的癌症、自体免疫性、炎症性或感染性疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方案 110 所述的组合物。
- [0408] 117. 根据实施方案 116 所述的方法,其中所述疾病或病症包含过度表达由所述抗体偶联物结合的细胞表面抗原的细胞。
- [0409] 118. 根据实施方案 116 所述的方法,其中所述方法包括杀死与所述疾病相关的细胞或降低所述细胞的生长速率。
- [0410] 119. 根据实施方案 116 所述的方法,其中所述方法包括消耗 B 细胞或 T 细胞。
- [0411] 120. 根据实施方案 116 所述的方法,包括施用附加疗法,其中所述附加疗法选自化学疗法、生物疗法、免疫疗法、辐射疗法、激素疗法和手术。
- [0412] 121. 一种用于使异源分子有效偶联于根据实施方案 66 至 105 中任一实施方案所述的工程改造的抗体的方法。
- [0413] 122. 根据实施方案 121 所述的方法,其中所述方法包括使所述异源分子偶联于选自所述抗体的 Fc 区的 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的至少一个位置。
- [0414] 123. 根据实施方案 121 或 122 所述的方法,其中所述异源分子选自细胞毒性剂、化学治疗剂、毒素、放射性核素、DNA、RNA、siRNA、微 RNA、肽核酸、肽、酶、荧光标签或生物素。
- [0415] 124. 根据实施方案 123 所述的方法,其中所述细胞毒性剂选自抗微管蛋白剂、DNA

小沟结合剂、抗类美坦素和奥瑞他汀。

[0416] 125. 根据实施方案 123 所述的方法,其中所述化学治疗剂选自泰素、紫杉醇、多柔比星、甲氨蝶呤、多拉司他汀、长春花生物碱和甲氨蝶呤。

[0417] 126. 根据实施方案 123 所述的方法,其中所述毒素选自相思豆毒素、马钱子碱、毒芹素、白喉毒素、肉毒杆菌毒素、志贺毒素、内毒素、破伤风毒素、百日咳毒素、炭疽毒素、霍乱毒素、镰叶芹醇、黄曲霉毒素、格尔德霉素、白树毒素、百脉根苷、蓖麻毒素、番木鳖碱和河豚毒素。

[0418] 127. 根据实施方案 123 所述的方法,其中所述放射性核素选自铬 (^{51}Cr)、钴 (^{57}Co)、氟 (^{18}F)、钆 (^{153}Gd 、 ^{159}Gd)、锗 (^{68}Ge)、钷 (^{166}Ho)、铟 (^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、碘 (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、镧 (^{140}La)、镱 (^{177}Lu)、锰 (^{54}Mn)、钼 (^{99}Mo)、钯 (^{103}Pd)、磷 (^{32}P)、镨 (^{142}Pr)、钷 (^{149}Pm)、铼 (^{186}Re 、 ^{188}Re)、铑 (^{105}Rh)、钌 (^{97}Ru)、钐 (^{153}Sm)、钪 (^{47}Sc)、硒 (^{75}Se)、锶 (^{85}Sr)、硫 (^{35}S)、锝 (^{99}Tc)、钛 (^{201}Ti)、锡 (^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、氦 (^3H)、氙 (^{133}Xe)、镱 (^{169}Yb 、 ^{175}Yb)、钇 (^{90}Y) 和锌 (^{65}Zn)。

[0419] 128. 根据实施方案 121 至 127 中任一实施方案所述的方法,其中所述效率根据利用偶联反应后保留的残余硫醇基所测量是至少 5%或更高。

[0420] 129. 根据实施方案 121 至 128 中任一实施方案所述的方法,其中所述效率根据利用偶联反应后保留的残余硫醇基所测量是至少 25%或更高。

[0421] 130. 根据实施方案 121 至 129 中任一实施方案所述的方法,其中所述效率根据利用偶联反应后保留的残余硫醇基所测量是至少 75%或更高。

[0422] 131. 一种抗体的 Fc 区,其中所述 Fc 区包含选自位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的一个或多个氨基酸的取代。

[0423] 132. 根据实施方案 131 所述的 Fc 区,其中所述 Fc 区包含一个或多个以下取代对:

[0424] a) 289 和 440 ;

[0425] b) 330 和 440 ;

[0426] c) 339 和 440 ;

[0427] d) 359 和 440 ;

[0428] e) 289 和 359 ;

[0429] f) 330 和 359 ;

[0430] g) 339 和 359 ;

[0431] h) 289 和 339 ;

[0432] i) 330 和 339 ;

[0433] j) 289 和 330 ;和

[0434] k) 339 和 442。

[0435] 133. 根据实施方案 131 和 132 中任一实施方案所述的 Fc 区,其中所述 Fc 区包含一个或多个以下取代组:

[0436] a) 289、339 和 442 ;

[0437] b) 289、330 和 339 ;

[0438] c) 330、339 和 442 ;和

- [0439] d) 289、330 和 442。
- [0440] 134. 根据实施方案 131 至 133 中任一实施方案所述的 Fc 区,其中所述 Fc 区选自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型。
- [0441] 135. 根据实施方案 131 至 134 中任一实施方案所述的 Fc 区,其中所述取代包括取代成选自半胱氨酸、赖氨酸、酪氨酸、组氨酸、硒半胱氨酸和硒甲硫氨酸的氨基酸。
- [0442] 136. 根据实施方案 1 至 134 中任一实施方案所述的 Fc 区,其中所述取代包括半胱氨酸。
- [0443] 137. 根据实施方案 136 所述的 Fc 区,其中所述半胱氨酸包含硫醇基。
- [0444] 138. 根据实施方案 137 所述的 Fc 区,其中所述硫醇基能够进行化学偶联。
- [0445] 139. 根据权利要求 138 所述的 Fc 区,其中所述 Fc 区偶联于细胞毒性剂、化学治疗剂、毒素、放射性核素、DNA、RNA、siRNA、微 RNA、肽核酸、非天然氨基酸、肽、酶、荧光标签和生物素中的一者或多者。
- [0446] 140. 一种抗体或其抗原结合片段,其包含根据实施方案 1 至 139 中任一实施方案所述的 Fc 区。
- [0447] 141. 根据实施方案 140 所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、完全人抗体、双特异性抗体、多特异性抗体或抗体样分子。
- [0448] 142. 根据实施方案 140 所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体还包含选自所述抗体的 CH1 结构域的位置 131、132、133、134、135、136、137、138 和 139 的一个或多个氨基酸的取代。
- [0449] 143. 一种药物组合物,其包含根据实施方案 131 至 142 中任一实施方案所述的抗体或其抗原结合片段。
- [0450] 144. 一种检测有需要的受试者的癌症、自体免疫性、炎症性或感染性疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用抗体或其抗原结合片段,其中所述工程改造的抗体或其抗原结合片段包含选自重链的位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的一个或多个氨基酸的取代。
- [0451] 145. 一种治疗有需要的受试者的癌症、自体免疫性、炎症性或感染性疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其结合片段包含选自重链的位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的一个或多个氨基酸的取代。
- [0452] 146. 一种核酸,其包含编码根据实施方案 1 至 145 中任一实施方案所述的 Fc 区的序列。
- [0453] 147. 根据实施方案 146 所述的核酸,其中所述核酸包含编码选自 SEQ ID NO :1-24 的序列的氨基酸序列的序列。
- [0454] 148. 一种宿主细胞,其包含根据实施方案 146 和 147 中任一实施方案所述的核酸。
- [0455] 149. 根据实施方案 148 所述的宿主细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。
- [0456] 150. 一种制备抗体或其抗原结合片段的方法,包括在适于表达所述抗体或抗原结合片段的条件下孵育根据实施方案 148 所述的宿主细胞,和分离所述抗体或抗原结合片段。
- [0457] 151. 一种组合物,其包含抗体的 Fc 区,其中所述 Fc 区包含选自位置 239、282、

289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的一个或多个氨基酸的取代。

[0458] 152. 根据实施方案 151 所述的 Fc 区,其中所述 Fc 区包含一个或多个以下取代对:

[0459] a) 289 和 440 ;

[0460] b) 330 和 440 ;

[0461] c) 339 和 440 ;

[0462] d) 359 和 440 ;

[0463] e) 289 和 359 ;

[0464] f) 330 和 359 ;

[0465] g) 339 和 359 ;

[0466] h) 289 和 339 ;

[0467] i) 330 和 339 ;

[0468] j) 289 和 330 ;和

[0469] k) 339 和 442。

[0470] 153. 根据实施方案 151 和 152 中任一实施方案所述的 Fc 区,其中所述 Fc 区包含一个或多个以下取代组:

[0471] a) 289、339 和 442 ;

[0472] b) 289、330 和 339 ;

[0473] c) 330、339 和 442 ;和

[0474] d) 289、330 和 442。

[0475] 154. 根据实施方案 151 至 153 中任一实施方案所述的 Fc 区,其中所述 Fc 区选自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型。

[0476] 155. 根据实施方案 151 至 154 中任一实施方案所述的 Fc 区,其中所述取代包含取代成选自半胱氨酸、赖氨酸、酪氨酸、组氨酸、硒半胱氨酸和硒甲硫氨酸的氨基酸。

[0477] 156. 根据实施方案 1 至 154 中任一实施方案所述的 Fc 区,其中所述取代包括半胱氨酸。

[0478] 157. 根据实施方案 156 所述的 Fc 区,其中所述半胱氨酸包含硫醇基。

[0479] 158. 根据实施方案 157 所述的 Fc 区,其中所述硫醇基能够进行化学偶联。

[0480] 159. 根据权利要求 158 所述的 Fc 区,其中所述 Fc 区偶联于细胞毒性剂、化学治疗剂、毒素、放射性核素、DNA、RNA、siRNA、微 RNA、肽核酸、非天然氨基酸、肽、酶、荧光标签和生物素中的一者或多者。

[0481] 160. 一种抗体或其抗原结合片段,其包含根据实施方案 1 至 159 中任一实施方案所述的 Fc 区。

[0482] 161. 根据实施方案 160 所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、完全人抗体、双特异性抗体、多特异性抗体或抗体样分子。

[0483] 162. 根据实施方案 160 所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体还包含选自所述抗体的 CH1 结构域的位置 131、132、133、134、135、136、137、138 和 139 的一个或多个氨基酸的取代。

[0484] 163. 一种药物组合物,其包含根据实施方案 151 至 162 中任一实施方案所述的抗

体或其抗原结合片段。

[0485] 164. 一种检测有需要的受试者的癌症、自体免疫性、炎症性或感染性疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用抗体或其抗原结合片段,其中所述工程改造的抗体或其抗原结合片段包含选自重链的位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的一个或多个氨基酸的取代。

[0486] 165. 一种治疗有需要的受试者的癌症、自体免疫性、炎症性或感染性疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其结合片段包含选自重链的位置 239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422 和 442 的一个或多个氨基酸的取代。

[0487] 166. 一种核酸,其包含编码根据实施方案 131 至 165 中任一实施方案所述的 Fc 区的序列。

[0488] 167. 根据实施方案 166 所述的核酸,其中所述核酸包含编码选自 SEQ ID NO :1-24 的序列的氨基酸序列的序列。

[0489] 168. 一种宿主细胞,其包含根据实施方案 166 和 167 中任一实施方案所述的核酸。

[0490] 169. 根据实施方案 168 所述的宿主细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

[0491] 170. 一种制备抗体或其抗原结合片段的方法,包括在适合表达所述抗体或抗原结合片段的条件下孵育根据实施方案 168 所述的宿主细胞,和分离所述抗体或抗原结合片段。

[0492] 171. 一种组合物,其包含选自 SEQ ID NO :1-24 的氨基酸序列。

[0493] 8. 实施例

[0494] 现在参考以下实施例描述本发明。这些实施例仅出于说明的目的而提供,并且本发明绝不应解释为限于这些实施例,而应解释为涵盖由于本文所提供的教义而变得显而易见的任何和所有变化形式。

[0495] 8.1 实施例 1. 单一变体半胱氨酸工程改造的抗体的表达和表征

[0496] 对 IgG1 分子(参见图 1)的 CH2 和 CH3 结构域的表面区域以及 Fc 空腔的表面暴露区域(例如,Leu398)进行一系列半胱氨酸取代。使用标准 DNA 重组技术(参见,例如 Sambrook 等 Molecular Cloning-A Laboratory Manual,2000 年 12 月,Cold Spring Harbor Lab Press)产生半胱氨酸工程改造的 IgG1 分子。IgG1 分子中存在的 CH2 和 CH3 结构域的表面区域代表暴露于溶剂的区域。这些区域所呈现的溶剂暴露允许试剂偶联于这些区域内的特定残基。预测位于 CH2 和 / 或 CH3 结构域的表面上的各种氨基酸是欲用半胱氨酸残基取代的特定候选氨基酸。

[0497] 在图 2 中,表达 ND1 野生型和其半胱氨酸工程改造的衍生物,对其纯化并进行 PAGE 分析。ND1 天然抗体(泳道 1)和其各种半胱氨酸工程改造的变体(泳道 2-21,对应于克隆 ND2-21)在还原条件下显示非常类似的分子量特征。这些结果表明,重组半胱氨酸工程改造的抗体充分表达并且与对照泳道相比保持其预测分子量。

[0498] 在图 3 中,所有重组半胱氨酸工程改造的蛋白质利用蛋白质 A 进行纯化,透析至 PBS 1X 10mM EDTA(pH 7.2)中,并在 SEC-HPLC 上进行分析。样品的标识以图示标示于图上。标准蛋白质的峰位置(虚线色谱图)从右至左为甲状腺球蛋白 670KDa ;2,牛 γ -球蛋白 158KDa ;3,鸡卵清蛋白 44KDa ;4,马肌红蛋白 17KDa ;5,维生素 B12 13.5KDa。突变型抗体

的保留时间为约 8.6 分钟,此对应于约 150KDa 的分子量。示出了各突变体的单体含量的百分比。各变体 (ND2-21) 呈现与天然抗体 (ND-1) 相比类似的 SEC 洗脱曲线。此分析证实,重组蛋白质除保留其预期分子量外,并不因所引入的半胱氨酸而形成二硫键连接的同源二聚体。

[0499] 图 4 示出 ND1 (天然) 的重链恒定结构域序列的序列。图 4a 示出变体 ND2 至 ND6 的序列。图 4b 示出变体 ND7 至 ND11 的序列。图 4c 示出变体 ND12 至 ND16 的序列。图 4d 示出变体 ND17 至 ND21 的序列。ND2 至 ND21 中所引入的点突变以加下划线和粗体显示。

[0500] ND1 至 ND21 分别具有 SEQ ID NO :1 至 21。各自来源于人 IgG1 的 HC Fc。

[0501] 图 5 示出 Fc 半胱氨酸变体的重组表达。各变体的表达水平类似于天然 ND1。此外,除 ND5 外的各变体表达等于或大于 93% 的单体 (通过 SEC-HPLC 测定)。其还具有类似于天然 ND1 的分子量和流体动力学半径 (通过 MALLS 测定) (数据未显示)。

[0502] 图 6 示出通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 所测定的半胱氨酸 Fc 工程改造变体的 FcRn 结合。除呈 70% 单体的变体 ND5 (D312C) 和非糖基化变体 ND20 (N297C) 以外的变体保持与天然抗体 ND1 类似的与 FcRn 的结合信号。

[0503] 使用差示扫描热量法 (DSC) 来测定天然抗体和半胱氨酸工程改造的抗体的解链温度 (T_m),如图 7 中所示。DSC 实验测量在 10°C 至 110°C 范围内作为温度的函数的本发明抗体的热容量。使用 Microcal VP-DSC 超敏扫描微热量计进行 DSC 测量。在 25mM 组氨酸-HCl (pH6) 5mM EDTA 中进行 DSC 实验。用于 DSC 的溶液和样品在临装载到热量计之前使用 0.22 微米过滤器进行过滤和脱气。对于各组测量,首先获得缓冲液对照的基线操作。其后,立即从样品槽除去缓冲溶液。样品槽里装上 0.5ml 浓度在 0.5 至 1mg/ml 范围内的抗体 (天然抗体和半胱氨酸工程改造的抗体) 溶液。测量期间,参考槽用样品缓冲液填充。从各样品对缓冲液实验减去相应的缓冲液对缓冲液基线操作。对浓度和扫描速率的原始数据进行归一化。数据使用由 Microcal 提供的 Origin DSC 软件进行拟合。

[0504] 使用缓冲液 25mM His (pH 6.0) 在 15°C 至 110°C 的范围内以 1°C /min 的速率进行图 7 中所示的 ND1-21 的 DSC 分析。除变体 ND5 (D312C)、ND11 (E356C) 和 ND20 (N297C) 外的变体具有与天然 ND1 类似的 DSC 曲线。

[0505] 图 8 示出以 1mg 标度偶联生物素-PEG2-马来酰亚胺与工程改造的抗体和对照 ND1 的各种方案。这些实验中的生物素部分可以用药物置换并且生物素用作偶联的模型。PEG2 是连接子,并且马来酰亚胺部分与半胱氨酸反应。“TCEP”表示三-(2-羧乙基)膦。除非另外规定,否则所示摩尔过量是相对于抗体摩尔数。

[0506] 图 9 示出来自偶联方案 D 的样品的还原蛋白质凝胶的蛋白质印迹。变体和天然蛋白质利用蛋白质 A 进行纯化,透析至 PBS 1X 10mM EDTA (pH 7.2) 中。编号 1-21 分别对应于 ND1-21。M 是分子量标准。C 是在轻链和重链中的赖氨酸残基上与生物素偶联的对照抗体。首先在 NuPage 10% 凝胶上通过 SDS-PAGE 对样品进行分析。具有转移的蛋白质的印迹在 TBST 2% BSA 中阻断,与抗生物素蛋白-HRP 一起孵育,并用 HRP 的显色底物进行显色。HC 是对应于抗体重链的蛋白质条带,而 LC 是对应于抗体轻链的蛋白质条带。多个变体的重链上存在明显偶联 (尤其是 ND2、3、4、6、7、8、9、10、11、12、18、19),而 ND1 (天然) 的 HC 上没有可以检测到的偶联。在包括 ND1 在内的所有变体的 LC 上存在一些偶联。

[0507] 图 10 示出来自偶联方案 D 的样品的考马斯亮蓝染色的非还原蛋白质凝胶。所有变

体和天然蛋白质利用蛋白质 A 进行纯化,透析至 PBS 1X 10mM EDTA (pH 7.2) 中,并在还原和非还原条件下在 10% 均质 SDS-PAGE 上进行分析。使用 SeeBlue Plus2 (Invitrogen) 分子量标准 (kDa, 如图中所示)。装载 3 μ g 各样品并使用 SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) 对凝胶进行染色。编号 1-21 分别对应于 ND1-21。M 是分子量标准。大部分偶联变体显示类似于天然 ND1 的电泳迁移率图谱。若干偶联变体含有一些明显二聚体 (ND 3、5、13、15、17、18、19), 而一种变体显示一些明显断裂 (ND 20)。

[0508] 图 11 含有利用方案 D 偶联的 ND 变体的完整质量和肽图的结果。变体 ND4、7、10、12、18 在工程改造半胱氨酸上具有接近或大于 90% 的偶联, 且显示没有或极少寡聚化。DAR 是偶联样品的药物与抗体摩尔比。

[0509] 8.2 实施例 2. 双重变体半胱氨酸工程改造的抗体的表达和表征

[0510] 基于所选变体, 如图 12 所示构建十一种双重变体, 编号为 DM1 至 DM11。十种双重变体基于所选变体 ND4、ND7、ND10、ND12、ND18, 并且另一种双重变体基于 ND10 和 ND19。

[0511] 图 13 提供关于双重变体表达的数据。所有双重变体通过瞬时转染充分表达。这些双重变体中仅四种 DM8、DM9、DM10、DM11 以高于 93% 的单体水平表达和纯化 (通过尺寸排阻色谱连同紫外线检测 (SEC-UV) 进行测定)。这四种双重变体具有类似于天然 ND1 的 MW 和 Rh (数据未显示)。

[0512] 在非还原 SDS-PAGE 上对双重 ND 变体进行分析, 如图 14 中所见。“C”是用作对照的天然 ND1。“M”是分子量标准。编号 1-10 对应于 DM1-10。SDS-PAGE 结果与 SEC-UV 结果一致。变体 DM1-7 含有高百分比的聚集体。变体 DM4 所具有的单体量最少, 而 DM8 所含的单体的百分比最大。

[0513] 图 15 示出双重变体的 DSC 分析的结果。DSC 如上文所述执行, 例外为 His 缓冲液是 10mM。四种单体最多 (> 93%) 的双重变体显示 DSC 曲线极其类似于天然蛋白质和单一变体 ND10。

[0514] 图 16 提供用来分析双重变体的偶联的蛋白质印迹和考马斯亮蓝染色的凝胶的结果。使用方案 D (参见图 6)、10 : 1 的生物素 - 马来酰亚胺 : 抗体比率和 20 : 1 的生物素 - 马来酰亚胺 : 抗体比率的双重变体 DM8 (ND 4 和 ND10) 和 DM11 (ND10 和 ND19) 的偶联。

[0515] 对如图 16 所述偶联的双重变体进行完整质量和肽图分析, 且数据提供于图 17 中。两种双重变体 DM8 (ND4 和 ND10) 和 DM11 (ND10 和 ND19) 在工程改造半胱氨酸上的偶联接近或大于 90%。DAR 是偶联样品的药物与抗体摩尔比。

[0516] 8.3 实施例 3. 修改的偶联方案

[0517] 以规模扩大的偶联反应进行实验。图 18 示出对单一和双重 ND 变体进行的偶联的结果。使用偶联方案 D (图 8), 例外为在 TCEP 处理后采用强度更高的过夜透析和偶联本身在室温下进行 1 小时。单一变体的药物 : mAb 摩尔比是 10 : 1, 而双重变体的药物 : mAb 摩尔比是 20 : 1。

[0518] 图 19 示出如前述图 18 所示的单一和双重变体偶联样品的肽图分析的结果。此表汇总工程改造半胱氨酸处的偶联效率, 以及总体药物与抗体比率 (DAR)。DM9”是使用相同突变第二次制备的 DM9。

[0519] 8.4 实施例 4. 规模放大的偶联

[0520] 图 20 示出规模放大的偶联实验的结果。以 (a) 2.5、(b) 5、(c) 10、(d) 20 和 (e) 40mg/

ml 的抗体进行偶联。使用如图 18 所述的偶联方案。药物：抗体摩尔比是 10 : 1。在蛋白质凝胶中，“C”是天然 ND1。

[0521] 图 21 示出规模放大的偶联的肽图的结果。对来自前述图 20 的偶联样品进行肽图分析。示出偶联效率结果。浓度对应于 TCEP 预处理、dhAA 激发的再折叠和偶联期间的抗体浓度。

[0522] 8.5 实施例 5. 三重变体半胱氨酸工程改造的抗体的表达和表征

[0523] 基于所选变体开发四种三重变体。图 22 说明三重突变体中选择用于突变的残基，称为 T1 至 T4。

[0524] 图 23 提供四种三重变体的表达和单体水平。由 0.5L 培养物纯化蛋白质。单体水平利用 SEC-HPLC 进行测定。为进行比较，天然抗体 ND1 具有 99% 单体。

[0525] 图 24 含有三重变体与生物素马来酰亚胺的偶联的结果。使用 TCEP/dhAA 方案以及在室温下偶联 1 小时和 1 : 20 的抗体：药物摩尔比。偶联 T1 的两种不同蛋白质制剂。天然 ND1 和双重变体 DM11 包括在内作为偶联特异性和效率的对照。

[0526] 图 25 示出三重变体的肽图的结果。对来自前述图 24 的偶联三重变体样品进行肽图分析。呈现工程改造半胱氨酸处的偶联效率。

[0527] 图 26 示出如上所述利用 10mM His 缓冲液进行的三重变体的 DSC 分析。T1 显示在第一次转变时解链温度有稍许程度的降低，CH2。T2 显示在 85°C 下有一些沉淀。T3 在高温下沉淀。T4 近乎与天然蛋白质相同。

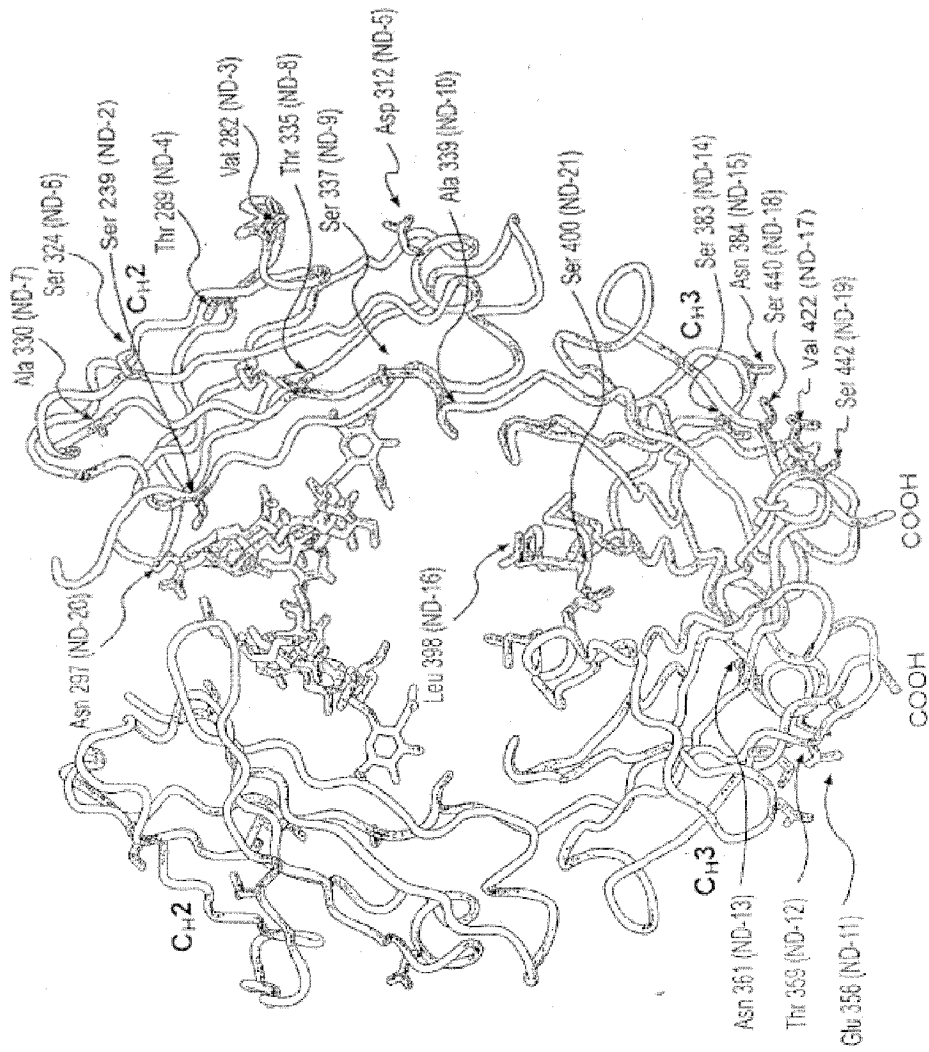


图 1

- M. SeeBlue Plus 2
- 1. ND-1 Fc-WT
- 2. ND-2 Fc-Ser239Cys
- 3. ND-3 Fc-Val282Cys
- 4. ND-4 Fc-Thr289Cys
- 5. ND-5 Fc-Asp312Cys
- 6. ND-6 Fc-Ser324Cys
- 7. ND-7 Fc-Ala330Cys
- 8. ND-8 Fc-Thr335Cys
- 9. ND-9 Fc-Ser337Cys
- 10. ND-10 Fc-Ala339Cys
- 11. ND-11 Fc-Glu356Cys
- 12. ND-12 Fc-Thr359Cys
- 13. ND-13 Fc-Ans361Cys
- 14. ND-14 Fc-Ser383Cys
- 15. ND-15 Fc-Asn384Cys
- 16. ND-16 Fc-Leu398Cys
- 17. ND-17 Fc-Val422Cys
- 18. ND-18 Fc-Ser440Cys
- 19. ND-19 Fc-Ser442Cys
- 20. ND-20 Fc-Asn297Cys
- 21. ND-21 Fc-Ser400Cys

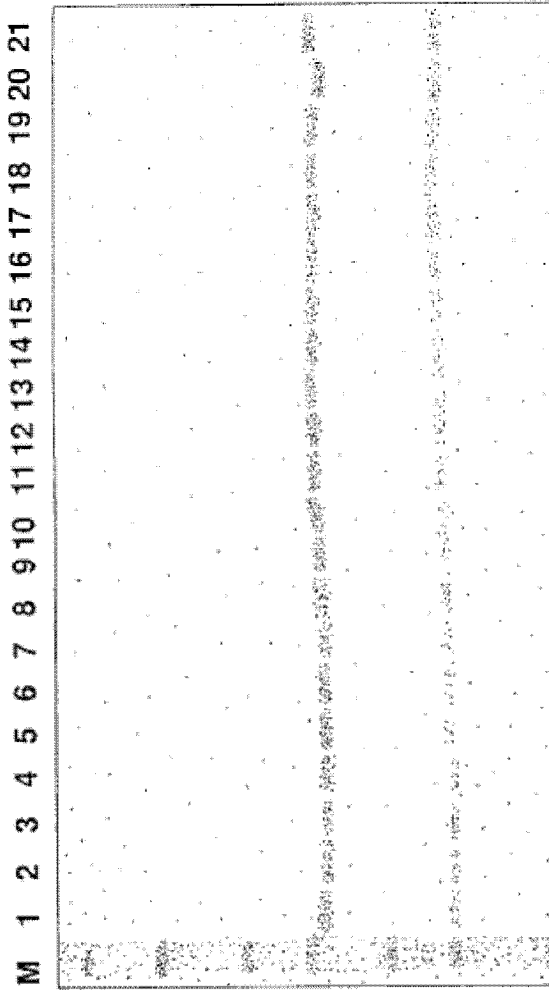


图 2

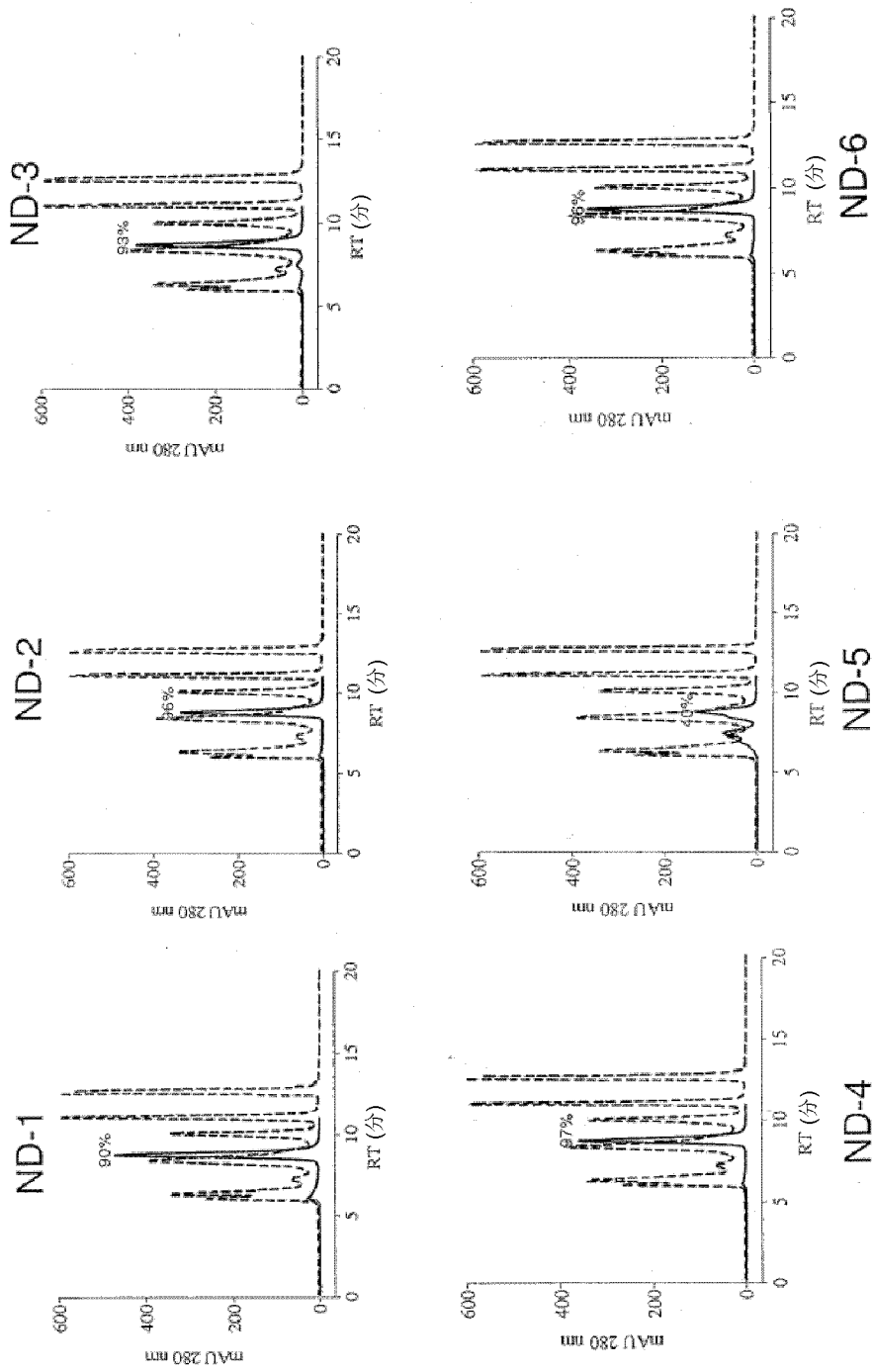


图 3a

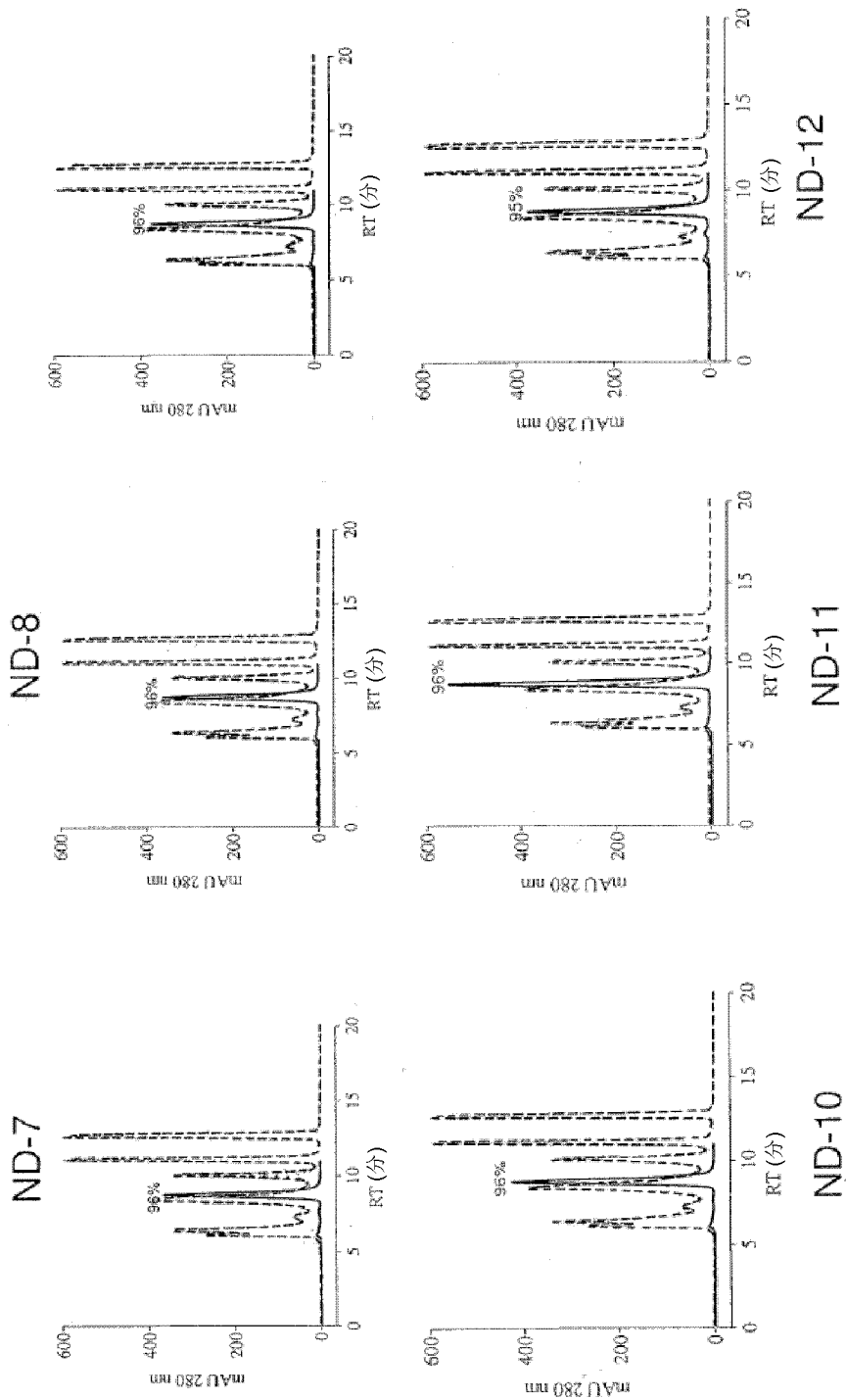


图 3b

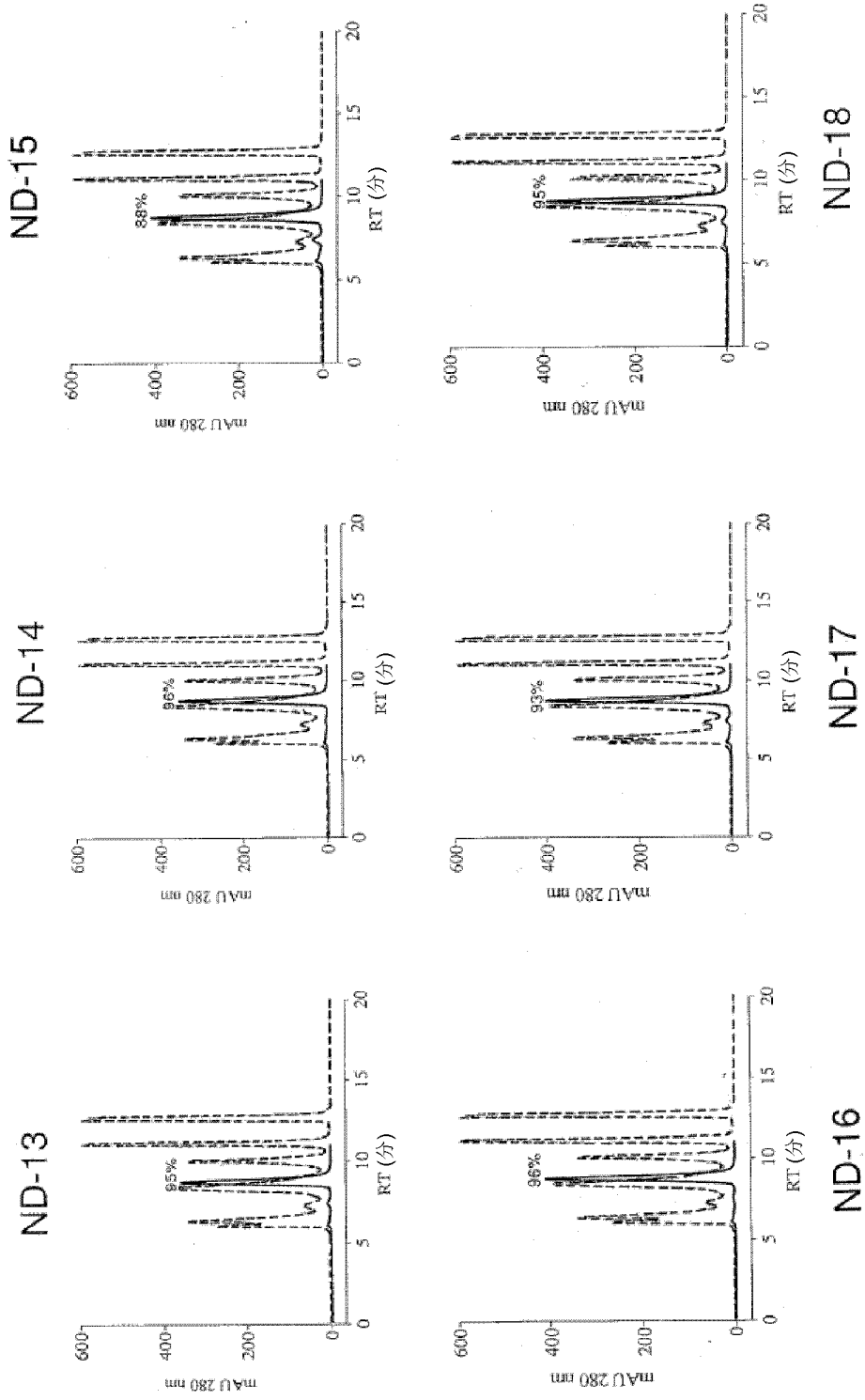
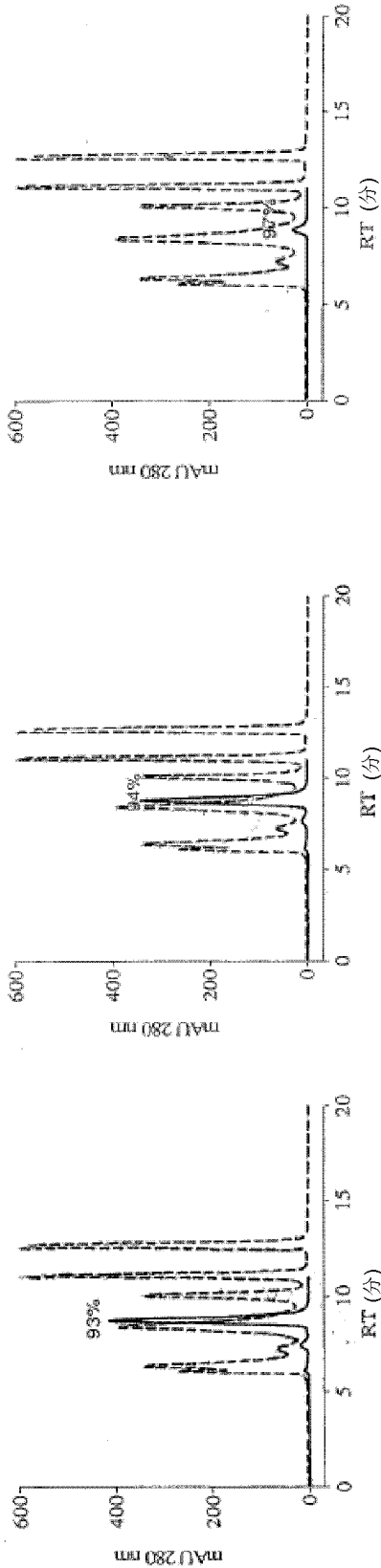


图 3c



ND-19

ND-20

ND-21

ND1的重链恒定结构域序列，野生型

STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
 SSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQVNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 4

图 3d

```

>ND2-Fc-Ser239Cys
STKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKHTHTCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMIKSRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSRHEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNYTQKLSLSLSPGK

>ND3-Fc-Val282Cys
STKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKHTHTCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMIKSRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSRHEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNYTQKLSLSLSPGK

>ND4-Fc-Thr289Cys
STKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKHTHTCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMIKSRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSRHEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNYTQKLSLSLSPGK

>ND5-Fc-Asp312Cys
STKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKHTHTCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMIKSRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSRHEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNYTQKLSLSLSPGK

>ND6-Fc-Ser324Cys
STKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKHTHTCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMIKSRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSRHEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNYTQKLSLSLSPGK

```

图 4a

```

>ND7-FC-Ala330Cys
STKGPSVFPLA330PSKSTSGGTAALGCLV331KDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH332TFPAVLQSSGLYSLSSV333TVFSSSLGTQ334TYICNVNHKPSNTK335
DKRVEPKSCDK336THCTCPAPPELLGGPSVFLFPPK337KDTLMISKRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV338VS
VLT339VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP340CI341EKTISKAKGQPREPQVY342TLPPSRHEM343TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA344AVESVNGQPENNYK345TTTPP
VLDSDGSEFFLYSKLTV346DKSRWQQGNV347FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>ND8-FC-Thr335Cys
STKGPSVFPLA335PSKSTSGGTAALGCLV336KDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH337TFPAVLQSSGLYSLSSV338TVFSSSLGTQ339TYICNVNHKPSNTK340
DKRVEPKSCDK341THCTCPAPPELLGGPSVFLFPPK342KDTLMISKRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV343VS
VLT344VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP345CI346EKTISKAKGQPREPQVY347TLPPSRHEM348TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA349AVESVNGQPENNYK350TTTPP
VLDSDGSEFFLYSKLTV351DKSRWQQGNV352FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>ND9-FC-Ser337Cys
STKGPSVFPLA337PSKSTSGGTAALGCLV338KDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH339TFPAVLQSSGLYSLSSV340TVFSSSLGTQ341TYICNVNHKPSNTK342
DKRVEPKSCDK343THCTCPAPPELLGGPSVFLFPPK344KDTLMISKRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV345VS
VLT346VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP347CI348EKTISKAKGQPREPQVY349TLPPSRHEM350TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA351AVESVNGQPENNYK352TTTPP
VLDSDGSEFFLYSKLTV353DKSRWQQGNV354FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>ND10-FC-Ala339Cys
STKGPSVFPLA339PSKSTSGGTAALGCLV340KDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH341TFPAVLQSSGLYSLSSV342TVFSSSLGTQ343TYICNVNHKPSNTK344
DKRVEPKSCDK345THCTCPAPPELLGGPSVFLFPPK346KDTLMISKRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV347VS
VLT348VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP349CI350EKTISKAKGQPREPQVY351TLPPSRHEM352TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA353AVESVNGQPENNYK354TTTPP
VLDSDGSEFFLYSKLTV355DKSRWQQGNV356FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>ND11-Fc-Glu356Cys
STKGPSVFPLA356PSKSTSGGTAALGCLV357KDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH358TFPAVLQSSGLYSLSSV359TVFSSSLGTQ360TYICNVNHKPSNTK361
DKRVEPKSCDK362THCTCPAPPELLGGPSVFLFPPK363KDTLMISKRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV364VS
VLT365VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP366CI367EKTISKAKGQPREPQVY368TLPPSRHEM369TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA370AVESVNGQPENNYK371TTTPP
VLDSDGSEFFLYSKLTV372DKSRWQQGNV373FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

图 4b

```

>ND12-Fc-Thr359Cys
STKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMTCQKQVSLTCLVKGFFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>ND13-Fc-Asn361Cys
STKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMTCQVSLTCLVKGFFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>ND14-Fc-Ser383Cys
STKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMTCNQVSLTCLVKGFFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>ND15-Fc-Asn384Cys
STKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMTCNQVSLTCLVKGFFPSDIAVEWESCGQPENNYKTTTPP
VLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>ND16-Fc-Leu398Cys
STKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMTCNQVSLTCLVKGFFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
CDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

图 4c

```

>ND17-Fc-VaI422Cys
STKGPSVFPLAPSSKSTSGCTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKTHTCPPEPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNCFCSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>ND18-Fc-Ser440Cys
STKGPSVFPLAPSSKSTSGCTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKTHTCPPEPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKCLSLSPGK

>ND19-Fc-Ser442Cys
STKGPSVFPLAPSSKSTSGCTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKTHTCPPEPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKCLSLSPGK

>ND20-Fc-Asn297Cys
STKGPSVFPLAPSSKSTSGCTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKTHTCPPEPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYCSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

>ND21-Fc-Ser400Cys
STKGPSVFPLAPSSKSTSGCTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKTHTCPPEPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDCDCGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

```

图 4d

变体名称	突变	第10天的瞬时表达(mg/l)	单体(%) SEC-UV
ND1	WT	283	100
ND2	S239C	331	100
ND3	V282C	322	98
ND4	T289C	335	100
ND5	D312C	131	70
ND6	S324C	332	99
ND7	A330C	313	98
ND8	T335C	314	99
ND9	S337C	297	98
ND10	A339C	285	100
ND11	E356C	238	98
ND12	T359C	225	94
ND13	N361C	194	93
ND14	S383C	214	99
ND15	N384C	210	93
ND16	L398C	218	98
ND17	V422C	215	97
ND18	S440C	216	95
ND19	S442C	220	97
ND20	N297C	210	96
ND21	S400C	250	99

图 5

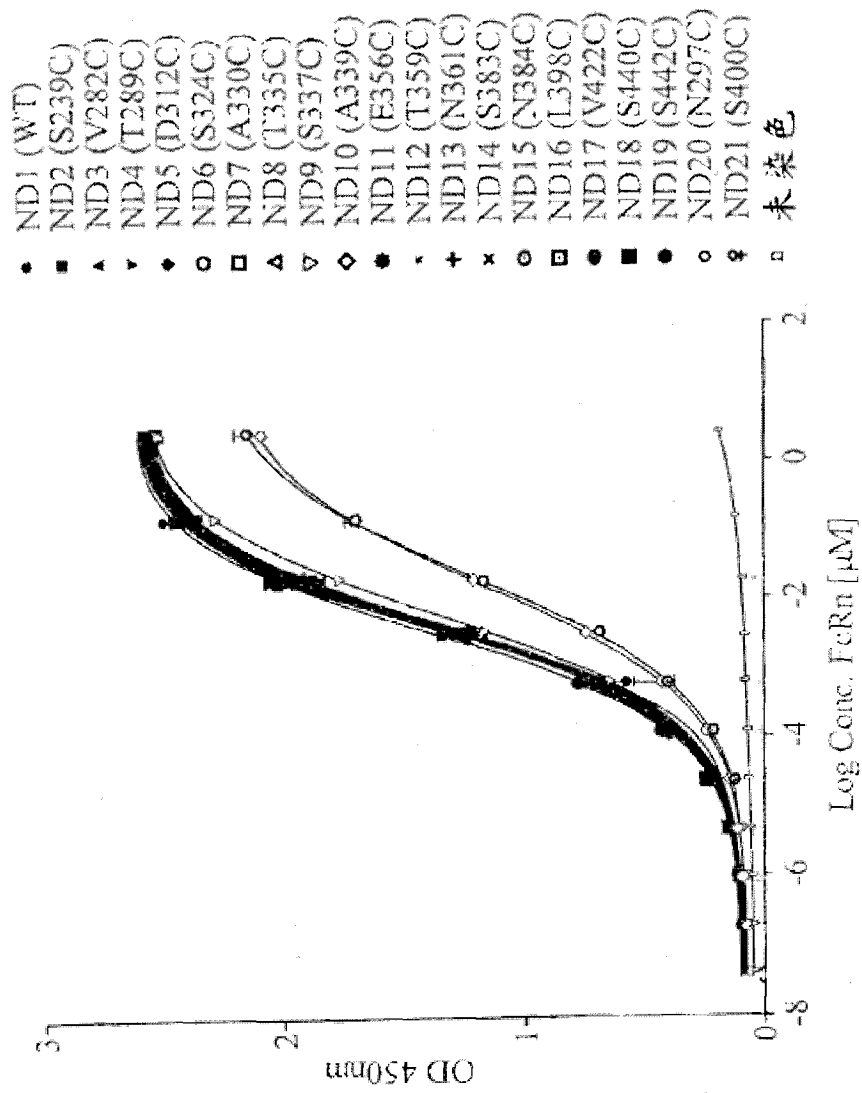


图 9

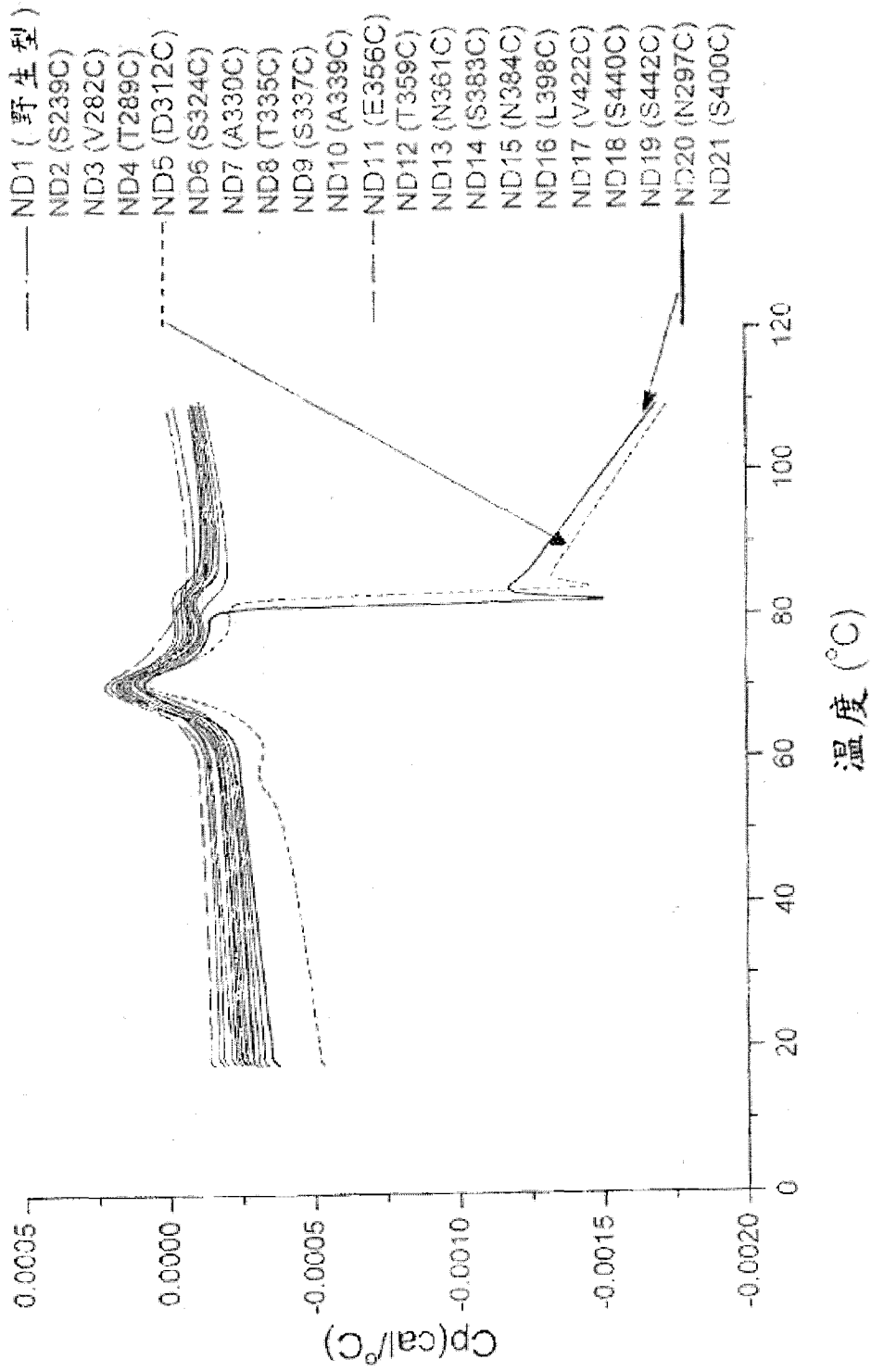


图 7

	A	B	C	D
1. 偶联前处理	TCEP, 1 μ M PBS, 10 mM EDTA, pH 7.2, 透析, 4°C	TCEP, 10 μ M PBS, 10 mM EDTA, pH 7.2, 透析, 4°C	L-半胱氨酸, 20倍摩尔过量, 37°C, 2小时	TCEP, 10倍 摩尔过量, 22°C, 2小时
2. 偶联前处理			在含10mM EDTA的 PBS (pH 7.2) 中 充分透析	在PBS (pH 7.2) 中充分透析
3. 偶联前处理				脱氧抗坏血酸, 20倍摩尔过量, 22°C, 3小时
4. 偶联	生物素-PEG2-马来 酰亚胺的DMSO溶液, 10倍摩尔过量, 4°C, 30分钟	生物素-PEG2-马来 酰亚胺的DMSO溶液, 10倍摩尔过量, 4°C, 30分钟	生物素-PEG2-马来 酰亚胺的DMSO溶液, 10倍摩尔过量, 4°C, 30分钟	生物素-PEG2-马来 酰亚胺的DMSO溶液, 10倍摩尔过量, 4°C, 30分钟
5. 偶联结束	N-乙酰基半胱氨酸, 相对于马来酰亚胺 5倍摩尔过量	N-乙酰基半胱氨酸, 相对于马来酰亚胺 5倍摩尔过量	N-乙酰基半胱氨酸, 相对于马来酰亚胺 5倍摩尔过量	N-乙酰基半胱氨酸, 相对于马来酰亚胺 5倍摩尔过量
6. 偶联后	10 mM His, pH 6.0, 透析, 4°C	10 mM His, pH 6.0, 透析, 4°C	10 mM His, pH 6.0, 透析, 4°C	10 mM His, pH 6.0, 透析, 4°C

图 8

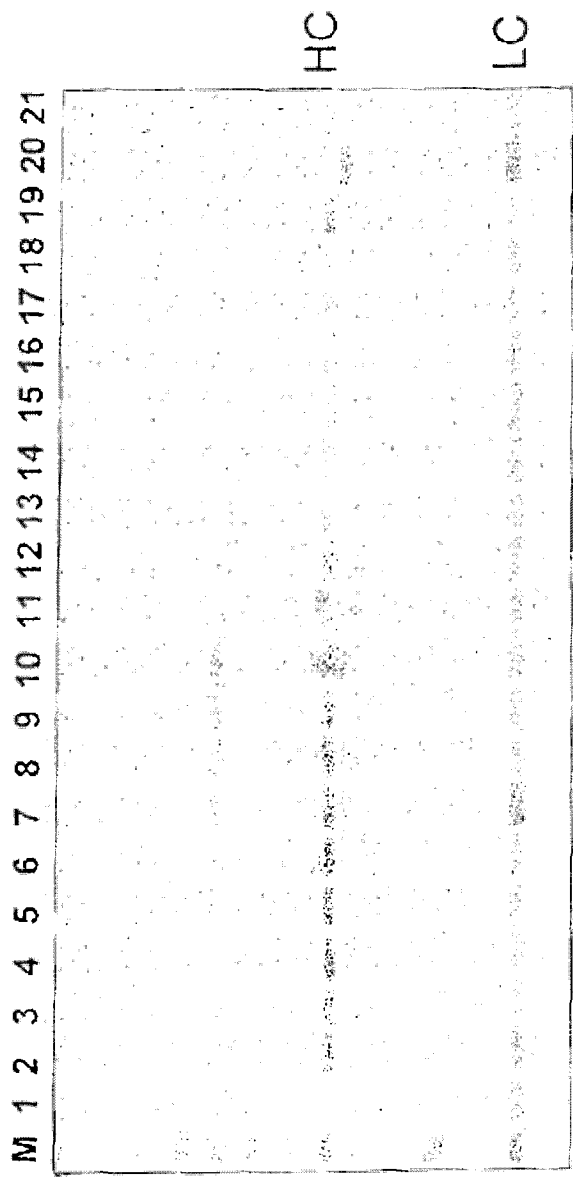


图 9

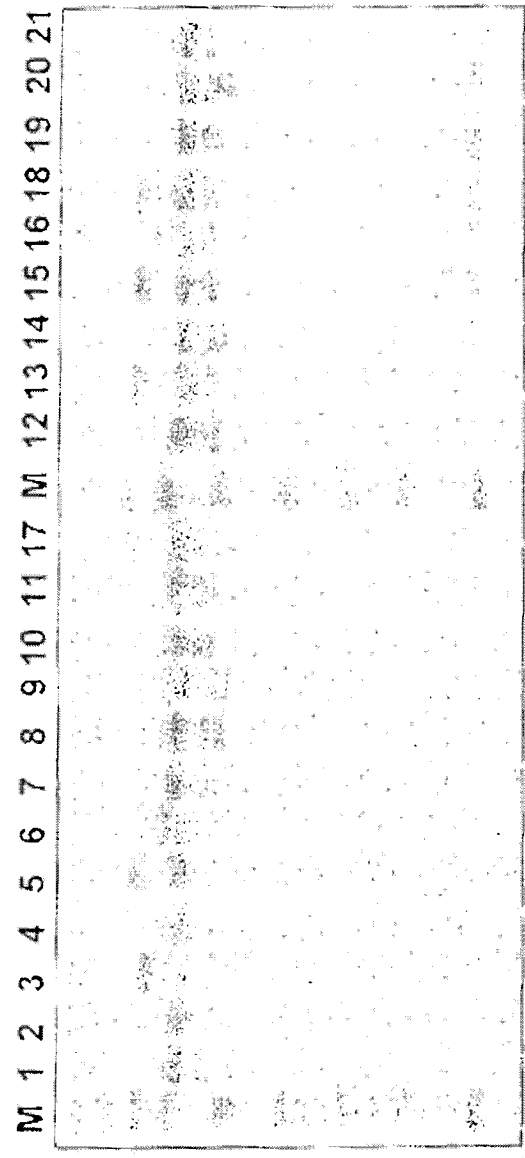


图 10

变体	突变	与生物素偶联的工程改造的半胱氨酸的百分比	肽链中与生物素偶联的天然半胱氨酸的百分比	肽链中与生物素偶联的天然半胱氨酸的百分比	DAR
ND1	WT	NA	0.1	2.1	NA
ND2	S239C	79.4	NA	4.7	1.6
ND3	V282C	91.5	0.4	8.2	1.8
ND4	T285C	94.9	0.1	3.1	1.9
ND5	D312C	88.7	0.8	6.1	1.4
ND6	S324C	63.1	0.3	6.3	1.3
ND7	A330C	96.4	7.9	1.2	1.9
ND8	T335C	57.6	4.2	7.3	1.2
ND9	S337C	4.7	0.3	3.6	0.1
ND10	A339C	89.1	0.6	3.7	1.8
ND11	E356C	55.4	0.1	3.2	1.1
ND12	T359C	92	0.1	3.2	1.8
ND13	N361C	49.9	0.1	3	1.0
ND14	S383C	36.4	0.1	2.5	0.7
ND15	N394C	91.7	0.1	3.9	1.8
ND16	L398C	65.7	0.4	4.4	1.3
ND17	V422C	83.3	0.1	3.5	1.7
ND18	S440C	90	0.1	2.7	1.8
ND19	S442C	34.1	0.1	3.3	0.7
ND20	N297C	24.2	22.1	23.9	0.6
ND21	S400C	71.8	0.2	4.2	1.4

图 11

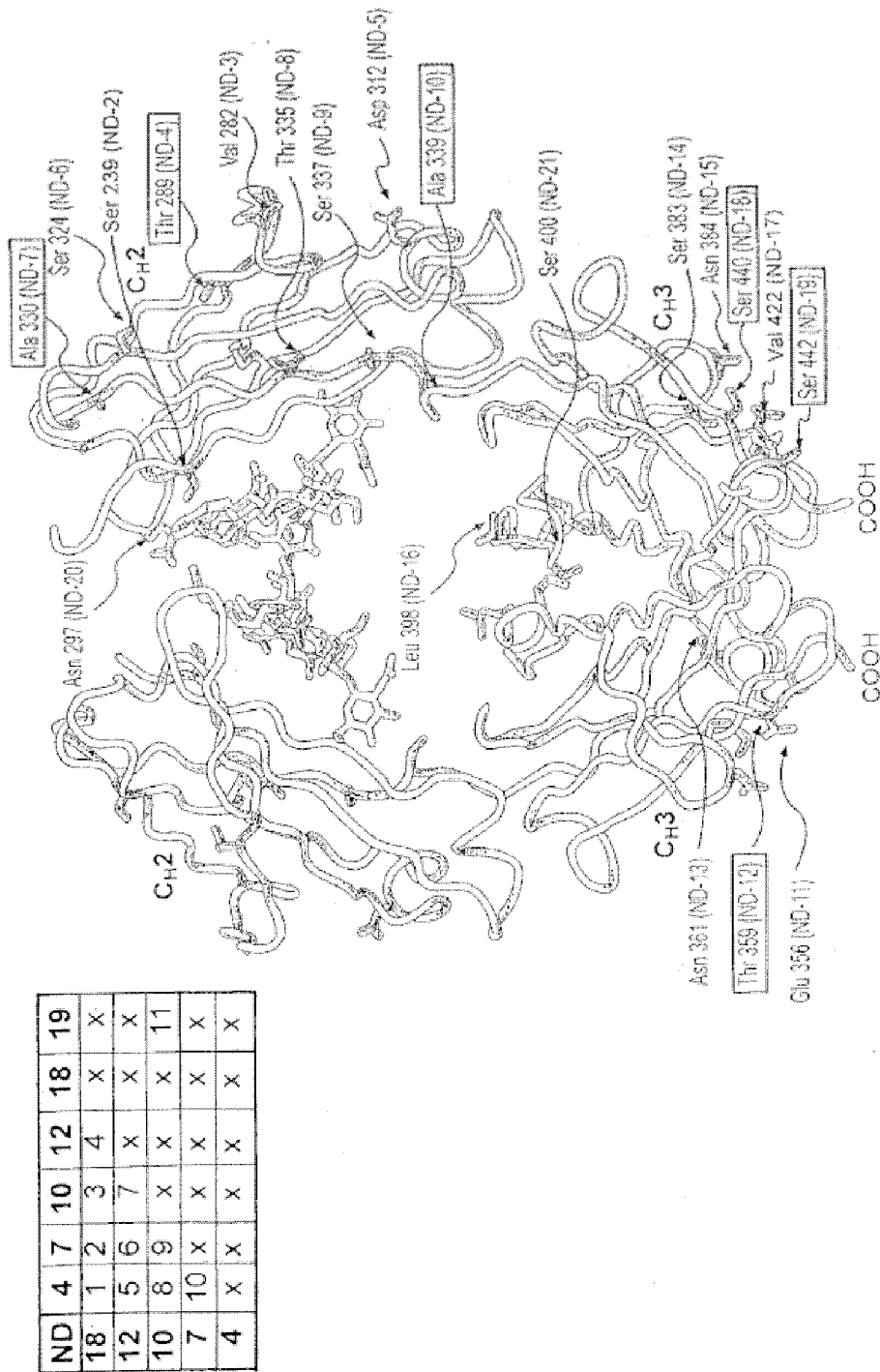


图 12

构建体	半胱氨酸突变	第11天的表达 (mg/L)	单体水平 (% SEC-UV)
DM1	ND4 (T289C) ND18 (S440C)	193	74.8
DM2	ND7 (A330C) ND18 (S440C)	231	73.0
DM3	ND10 (A339C) ND18 (S440C)	227	78.6
DM4	ND12 (T359C) ND18 (S440C)	199	43.8
DM5	ND4 (T289C) ND12 (T359C)	198	74.4
DM6	ND7 (A330C) ND12 (T359C)	190	67.8
DM7	ND10 (A339C) ND12 (T359C)	213	76.6
DM8	ND4 (T289C) ND10 (A339C)	229	98.7
DM9	ND7 (A330C) ND10 (A339C)	228	93.2
DM10	ND4 (T289C) ND7 (A330C)	212	94.8
DM11	ND10 (A339C) ND19 (S442C)	275	98.1

图 13

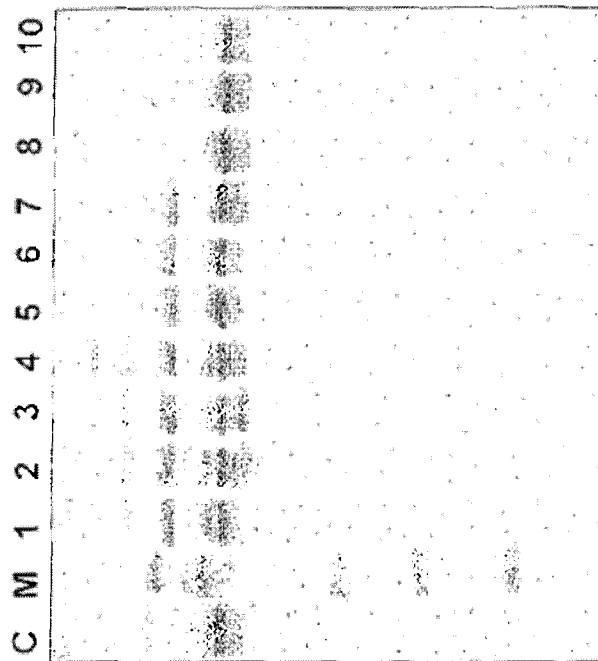


图 14

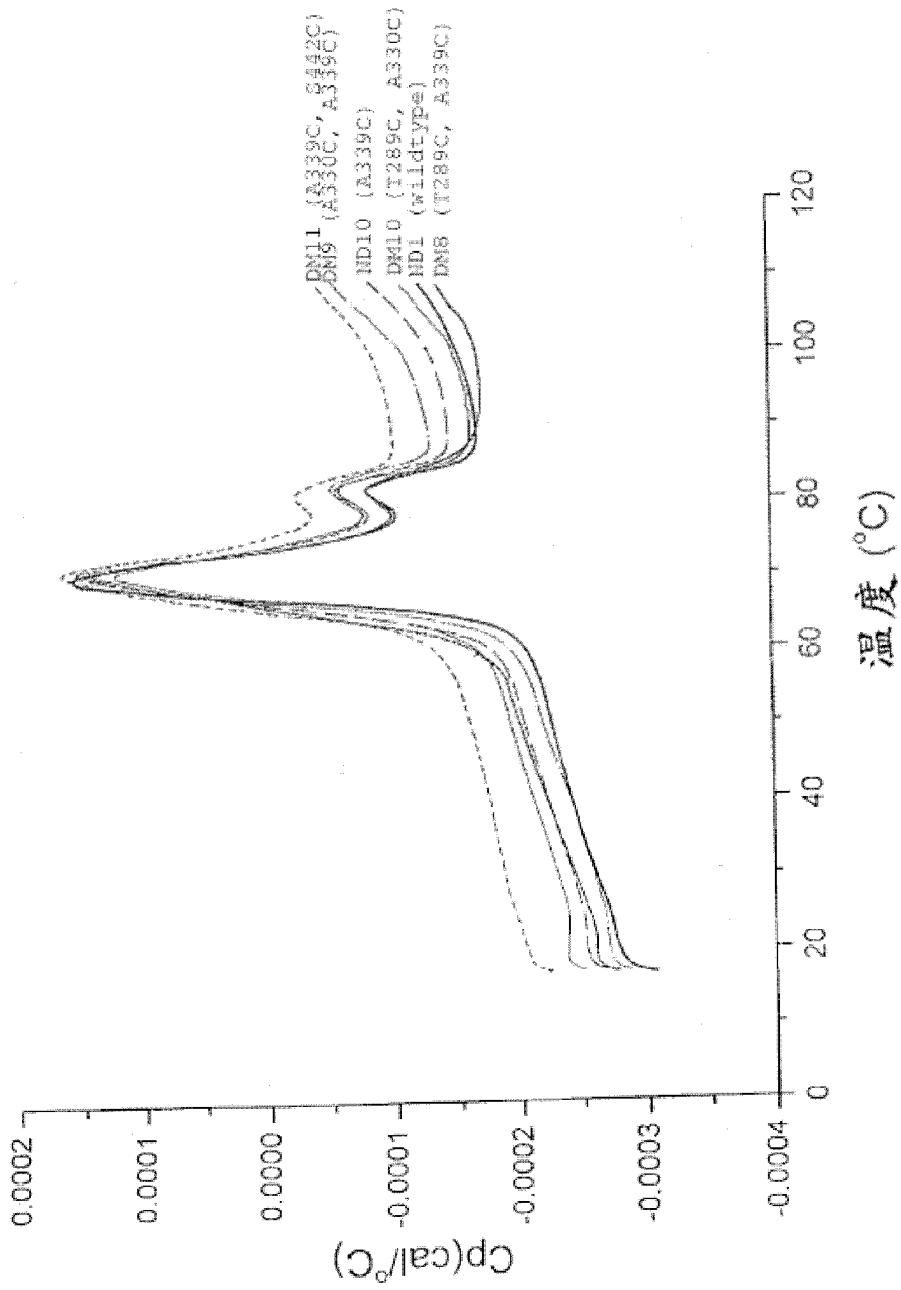


图 15

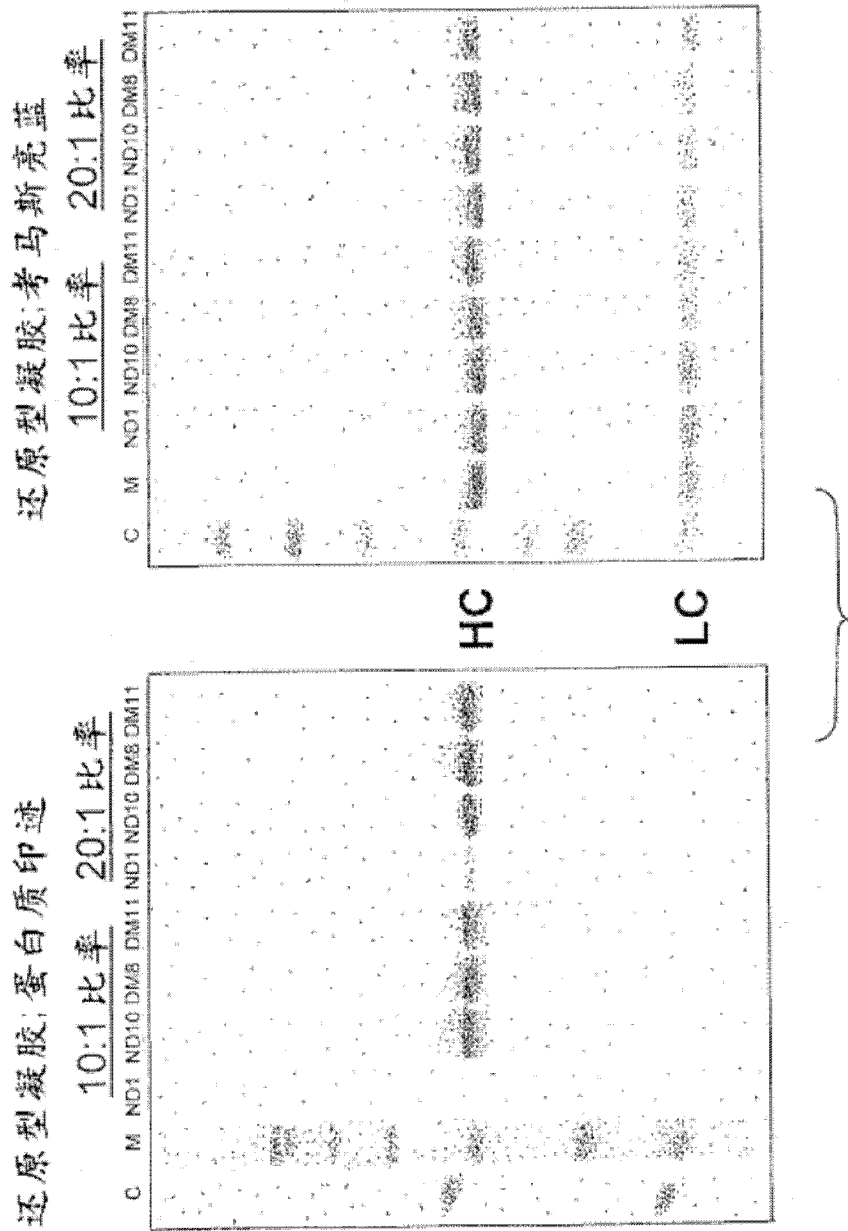


图 16

变体	偶联物摩尔 比率药物:MAb	突变	偶联的 生物素	所计算的 DAR	总 Dar
DM 8	1 : 10	T289C	89.8%	1.8	3.6
		A339C	91.6%	1.8	
DM 8	1 : 20	T289C	88.2%	1.8	3.5
		A339C	87.6%	1.8	
DM 11	1 : 10	S442C	89.2%	1.8	3.5
		A339C	84.0%	1.7	
DM 11	1 : 20	S442C	93.1%	1.9	3.6
		A339C	87.2%	1.7	

图 17

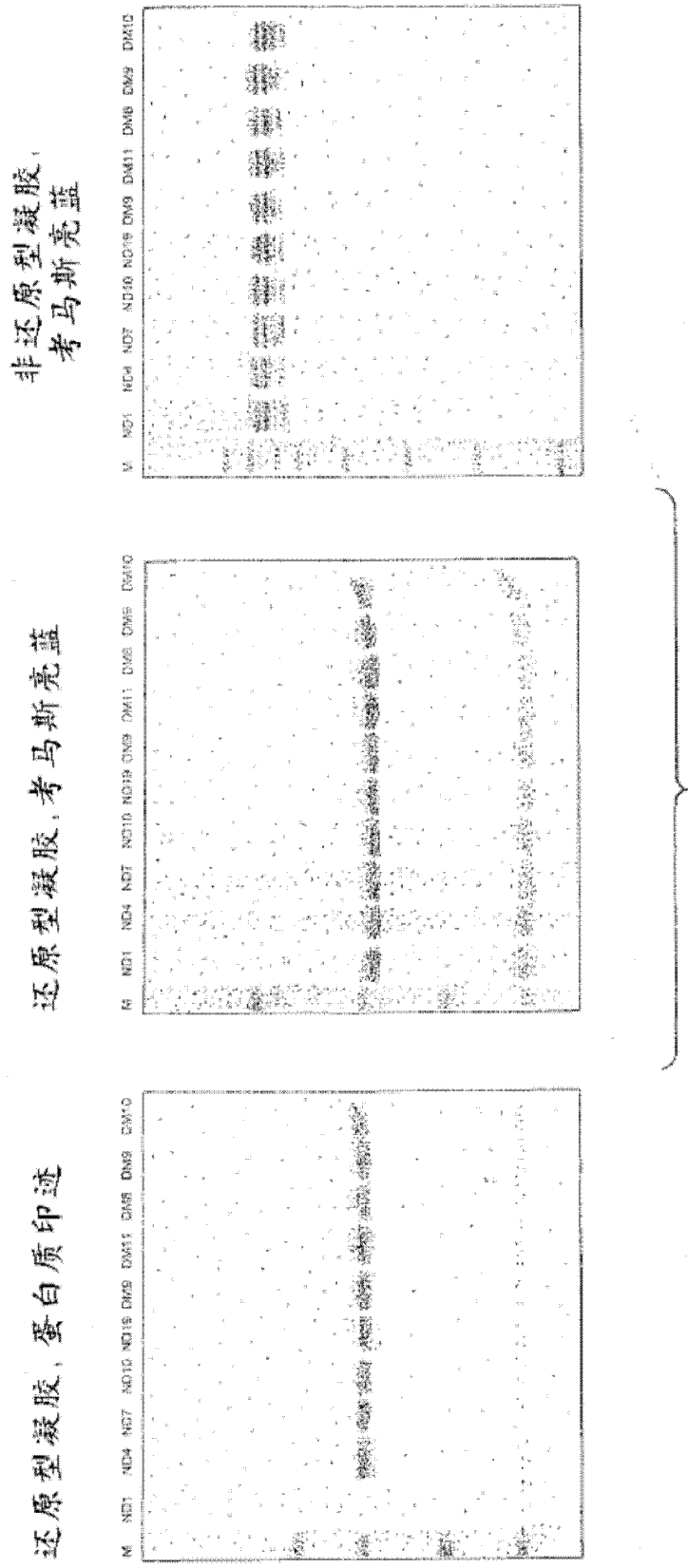


图 18

变体	突变	偶联的 生物素	所计算的 DAR	总 DAR
ND 4	T289C	82.2%	1.6	1.6
ND 7	A330C	87.8%	1.8	1.8
ND 10	A339C	87.8%	1.8	1.8
ND19	S442C	91.7%	1.8	1.8
DM 9" (7,10)	A330C	87.5%	1.7	3.4
	A339C	84.4%	1.7	
DM 11 (10,19)	A339C	86.4%	1.7	3.6
	S442C	93.8%	1.9	
DM 8 (4,10)	T289C	86.2%	1.7	3.5
	A339C	86.6%	1.7	
DM 9 (7,10)	A330C	88.6%	1.8	3.5
	A339C	86.8%	1.7	
DM 10 (4,7)	T289C	84.6%	1.7	3.4
	A330C	86.0%	1.7	

图 19

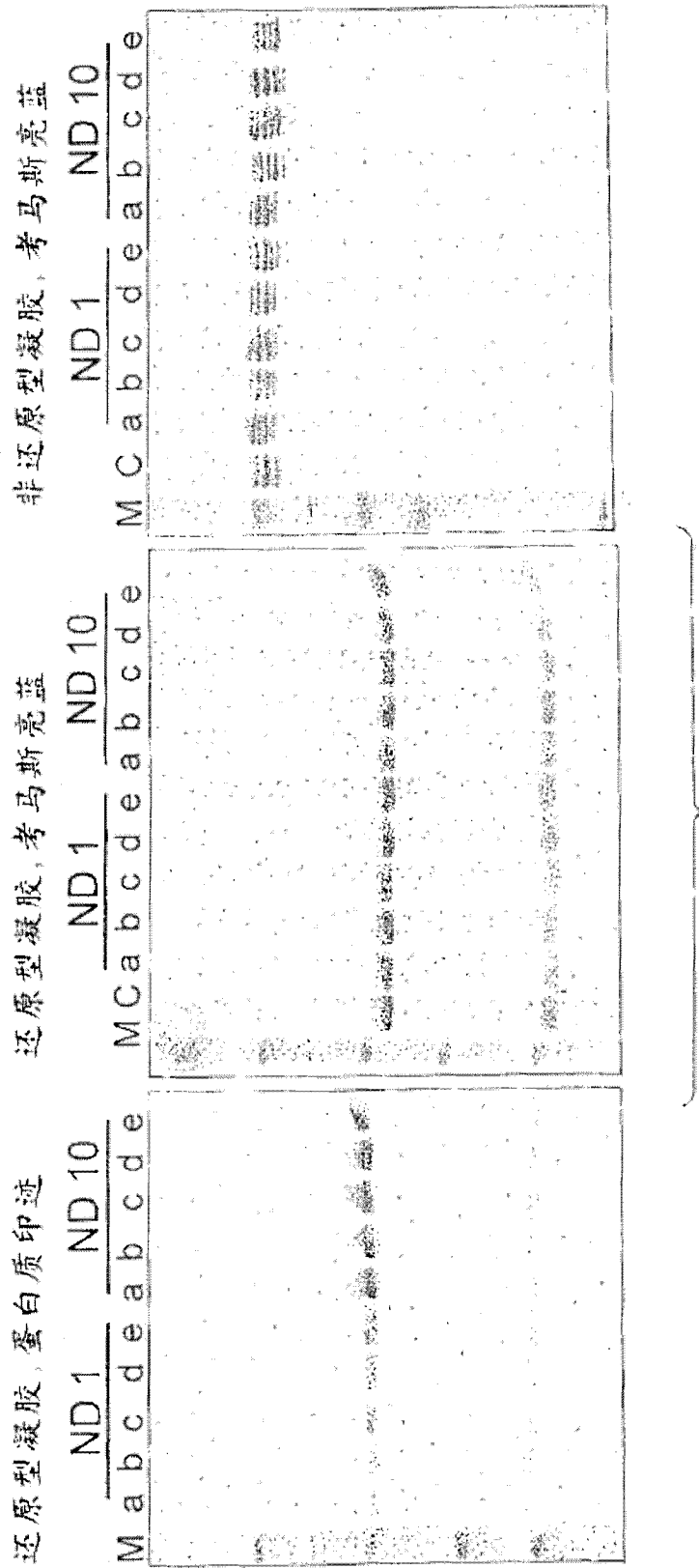
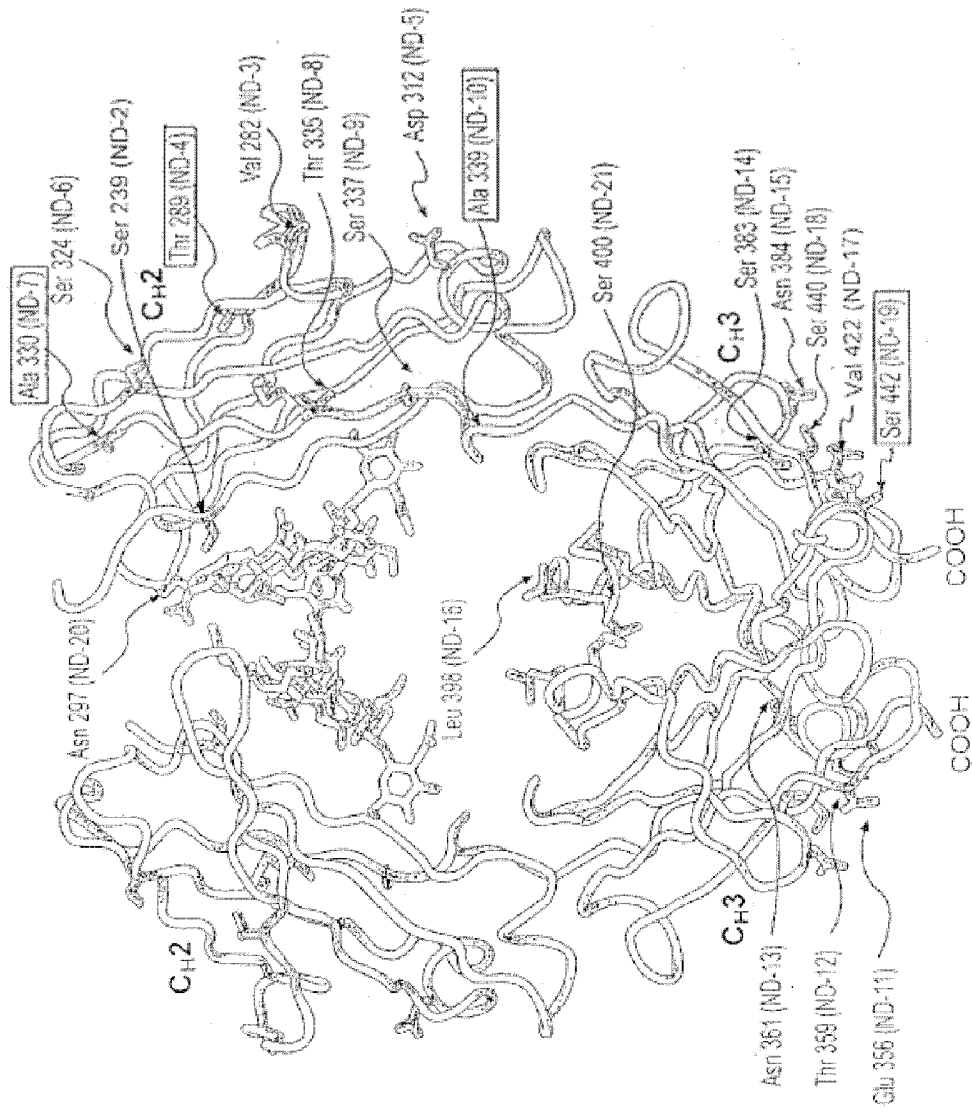


图 20

变体	突变	浓度 (mg/ml)	偶联的 生物素	DAR
ND10a	A339C	2.5	88.9%	1.8
ND10b	A339C	5.0	87.7%	1.8
ND10c	A339C	10	84.7%	1.7
ND10d	A339C	20	82.5%	1.6
ND10e	A339C	40	76.4%	1.5

图 21



ND	4	7	10	19
T1	4	x	10	19
T2	4	7	10	x
T3	x	7	10	19
T4	4	7	x	19

三重突变体, T1-T4.

图 22

变体名称	突变	第10天的表达 (mg/L)	单体 % SEC-UV
T1	T289C	204	97
	A339C		
	S442C		
T2	T289C	219	94
	A330C		
	A339C		
T3	A330C	206	92
	A339C		
	S442C		
T4	T289C	233	92
	A330C		
	S442C		

三重突变体, T1-T4

ND	4	7	10	19
T1	4	x	10	19
T2	4	7	10	x
T3	x	7	10	19
T4	4	7	x	19

Thr 289 (ND-4)

Ala 330 (ND-7)

Ala 339 (ND-10)

Ser 442 (ND-19)

图 23

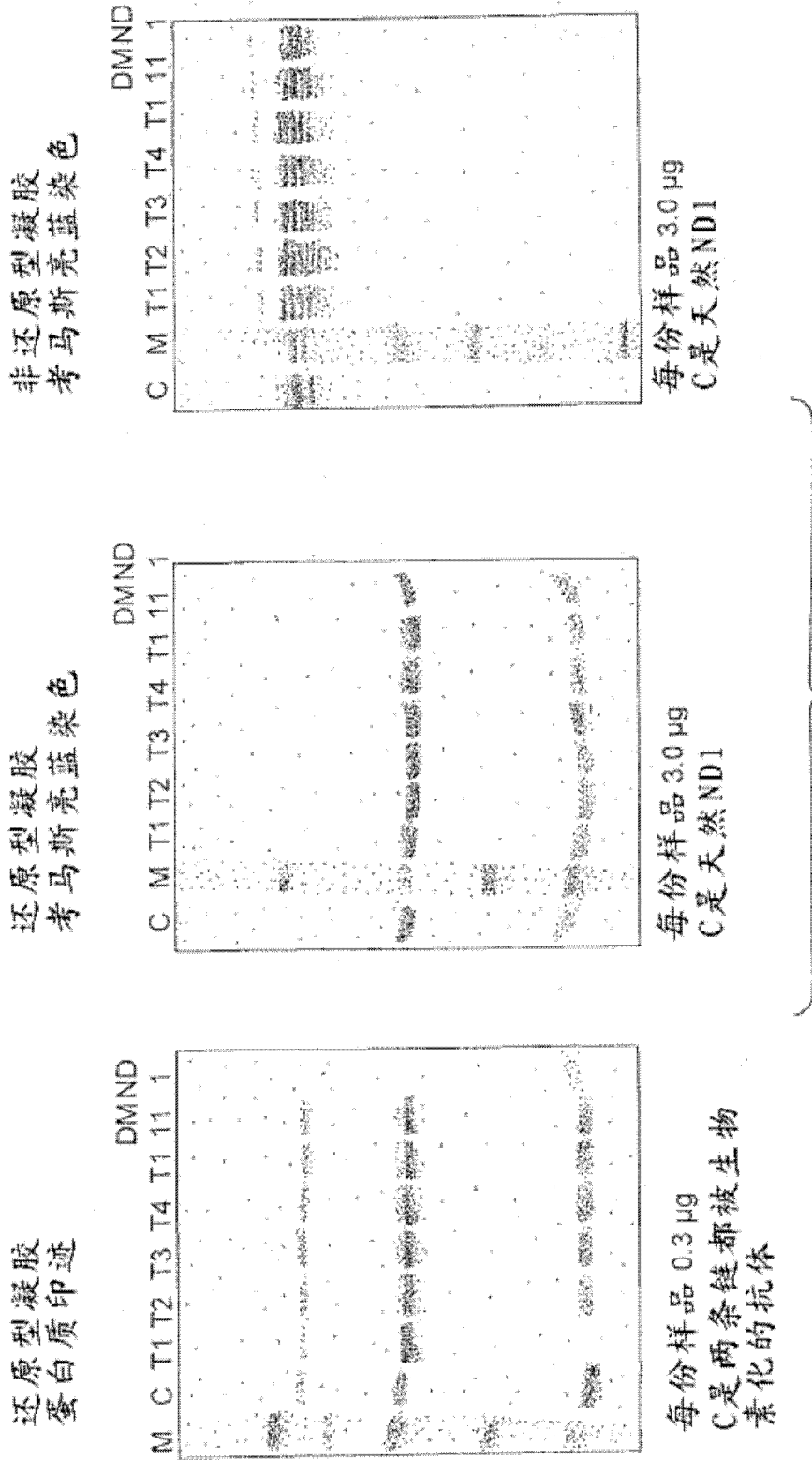


图 24

变体名称	突变	偶联的 生物素	DAR
T1 (4,10,19)	T289C	81.1%	1.6
	A339C	74.4%	1.5
	S442C	95.1%	1.9
T2 (4,7,10)	T289	81.5%	1.6
	A330	94.8%	1.9
	A339C	76.9%	1.5
T3 (7,10,19)	A330C	95.0%	1.9
	A339C	72.8%	1.5
	S442C	95.9%	1.9
T4 (4,7,19)	T289C	79.7%	1.6
	A330C	95.1%	1.9
	S442C	95.4%	1.9

三重突变体, T1-T4

ND	4	7	10	19
T1	4	x	10	19
T2	4	7	10	x
T3	x	7	10	19
T4	4	7	x	19

Thr 289 (ND-4)

Ala 330 (ND-7)

Ala 339 (ND-10)

Ser 442 (ND-19)

图 25

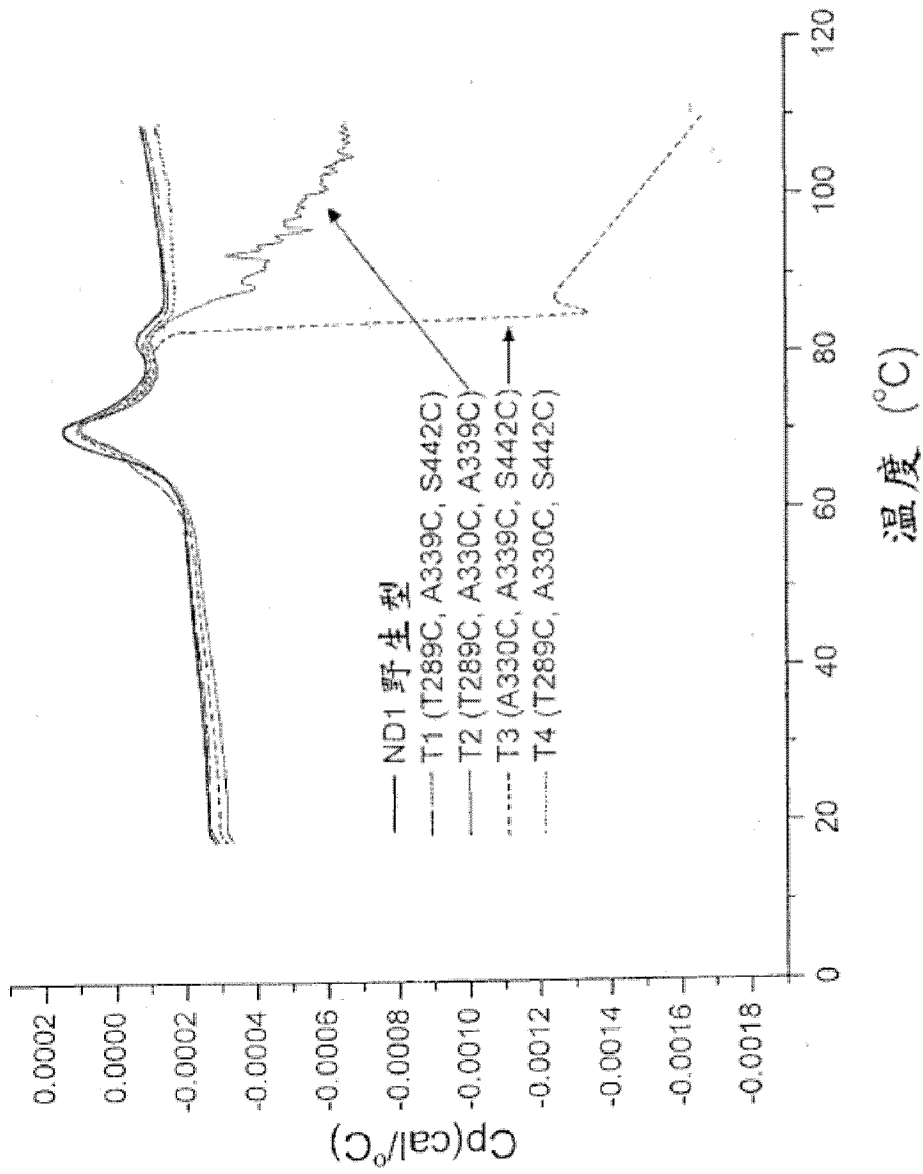


图 26