



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118359707 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 19

(21) 申请号 202410422718.3

(22) 申请日 2022.04.27

(30) 优先权数据

63/180,969 2021.04.28 US

(62) 分案原申请数据

202280030416.0 2022.04.27

(71) 申请人 恩格姆生物制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 程儒进 范斌 西蒙·汉森

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 徐爱文 张奎燕

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

权利要求书1页 说明书73页

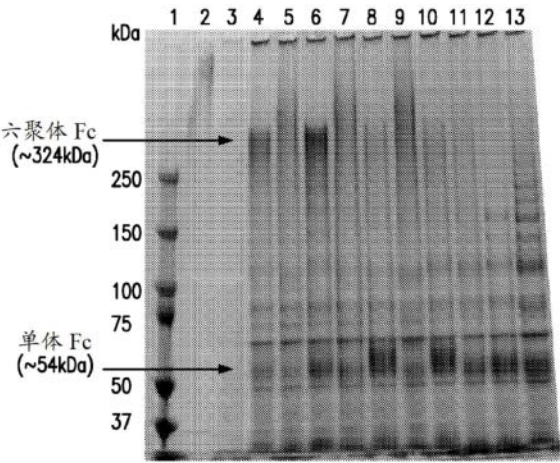
序列表 (电子公布) 附图12页

(54) 发明名称

具有抗体恒定区变体的结合分子的多聚化

(57) 摘要

本发明涉及具有抗体恒定区变体的结合分子的多聚化。本发明还涉及经工程化以形成寡聚物的分子,其中所述分子中的每一种包含根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸的IgG CH2区,和/或人 $\mu$ 尾段。



1. 一种包含IgG C<sub>H</sub>2区的分子,其中在所述IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。
2. 如权利要求1所述的分子,其中所述分子还包含(a) IgG铰链区,(b) IgG C<sub>H</sub>3区,(c) IgG C<sub>H</sub>1区,和/或(d) 人μ尾段。
3. 如权利要求2所述的分子,其中所述人μ尾段包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少75%、80%、85%或90%同一性的氨基酸序列。
4. 如权利要求2或权利要求3所述的分子,其中所述人μ尾段与所述IgG C<sub>H</sub>2区的C-末端或所述IgG C<sub>H</sub>3区的C-末端缀合。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的分子,其中所述IgG是人IgG、人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的分子,其中所述分子还包含特异性结合至靶标的结合结构域。
7. 如权利要求6所述的分子,其中所述结合结构域是抗体片段。
8. 如权利要求1至6中任一项所述的分子,其中所述分子是抗体或其抗原结合片段。
9. 一种寡聚物,其包含两个或多个如权利要求1至8中任一项所述的分子。
10. 一种包含两个或多个分子的寡聚物,每个分子包含IgG C<sub>H</sub>2区,其中在所述IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。

## 具有抗体恒定区变体的结合分子的多聚化

[0001] 本申请是申请日为2022年4月27日、发明名称为“具有抗体恒定区变体的结合分子的多聚化”、申请号为202280030416.0的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请要求于2021年4月28日提交的美国临时申请号63/180,969的权益,该临时申请的公开内容以引用方式全文并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请通过引用整体并入作为文本文件与本申请一起提交的序列表,该序列表的标题为“13370-120-228\_Sequence\_Listing\_ST25.txt”,创建于2022年4月25日,并且大小为26,426字节。

### 1. 技术领域

[0006] 本文提供了一种包含工程化IgG C<sub>H</sub>2区的分子和包含该分子的寡聚物复合物。本文还提供了一种包含本文所述的分子或寡聚物的药物组合物、与本文所述的分子相关的宿主细胞、核酸、载体,以及产生和使用此类分子和寡聚物的方法。

### 2. 背景技术

[0007] 在抗体治疗领域,新型重组抗体或衍生物的设计和产生引起了极大的关注并不断取得进展。具体而言,需要新的设计来克服天然抗体的局限性,并提供诸如抗体半衰期、药代动力学、稳定性、亲合力、血液清除率、组织或靶细胞穿透和保留等方面的改进的优点。本文所述的组合物和方法满足了这种需要并提供了相关优点。

### 3. 发明内容

[0008] 在一方面,本文提供了一种包含IgG C<sub>H</sub>2区的分子,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。

[0009] 在一些实施方案中,该分子还包含IgG铰链区。在其他实施方案中,该分子还包含IgG C<sub>H</sub>3区。在又其他实施方案中,该分子还包含人 $\mu$ 尾段(tailpiece)。在又其他实施方案中,该分子还包含IgG C<sub>H</sub>1区。

[0010] 在一些具体实施方案中,人 $\mu$ 尾段包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少75%、80%、85%或90%同一性的氨基酸序列。在其他具体实施方案中,人 $\mu$ 尾段与IgG C<sub>H</sub>2区的C-末端缀合。在又其他具体实施方案中,人 $\mu$ 尾段与IgG C<sub>H</sub>3区的C-末端缀合。

[0011] 在一些实施方案中,IgG是人IgG。在一些具体实施方案中,人IgG是人IgG1。在其他具体实施方案中,人IgG是人IgG2。在又其他具体实施方案中,人IgG是人IgG3。在又其他具体实施方案中,人IgG是人IgG4。

[0012] 在一些实施方案中,该分子还包含特异性结合至靶标的结合结构域。在一些具体实施方案中,该结合结构域是抗体片段。在其他实施方案中,该分子是抗体或其抗原结合片段。

[0013] 在另一方面,本文提供了一种包含如本文所述的两个或多个分子的寡聚物。在另一方面,本文提供了一种编码如本文所述分子的经分离的核酸。在另一方面,本文提供了一种包含如本文所述的核酸的载体。

[0014] 在另一方面,本文提供了一种寡聚物,该寡聚物包含两个或多个分子,并且每个分子包含IgG C<sub>H</sub>2区,其中在IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。

[0015] 在一些实施方案中,该分子还包含IgG铰链区。在其他实施方案中,该分子还包含IgG C<sub>H</sub>3区。在又其他实施方案中,该分子还包含人 $\mu$ 尾段(tailpiece)。在又其他实施方案中,该分子还包含IgG C<sub>H</sub>1区。

[0016] 在一些具体实施方案中,人 $\mu$ 尾段包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少75%、80%、85%或90%同一性的氨基酸序列。在其他具体实施方案中,人 $\mu$ 尾段与IgG C<sub>H</sub>2区的C-末端缀合。在又其他具体实施方案中,人 $\mu$ 尾段与IgG C<sub>H</sub>3区的C-末端缀合。

[0017] 在一些实施方案中,IgG是人IgG。在一些具体实施方案中,人IgG是人IgG1。在其他具体实施方案中,人IgG是人IgG2。在又其他具体实施方案中,人IgG是人IgG3。在又其他具体实施方案中,人IgG是人IgG4。

[0018] 在一些实施方案中,该分子还包含特异性结合至靶标的结合结构域。在一些具体实施方案中,该结合结构域是抗体片段。在其他实施方案中,该分子是抗体或其抗原结合片段。

[0019] 在一些实施方案中,该寡聚物是五聚体。在其他实施方案中,该寡聚物是六聚体。

[0020] 在一些实施方案中,该寡聚物是同聚的并且两个或多个分子结合至同一靶标。在其他实施方案中,该寡聚物是异聚的。在一些具体实施方案中,两个或多个分子结合至两个或多个不同靶标。

[0021] 在另一方面,本文提供了一种药物组合物,该药物组合物包含如本文所述的分子、如本文所述的寡聚物、如本文所述的分离的核酸或如本文所述的载体,以及药学上可接受的赋形剂。在另一方面,本文提供了一种用于治疗受试者的疾病或病症的方法,该方法包括向受试者施用如本文所述的药物组合物。

[0022] 在另一方面,本文提供了一种制备寡聚物的方法,该寡聚物包含两个或多个分子,每个分子包含IgG C<sub>H</sub>2区,并且该方法包括向每个分子中引入在IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253处的半胱氨酸氨基酸取代。

[0023] 在又一方面,本文提供了一种产生寡聚分子的方法,该方法包括(i)将如实施方案40所述的载体引入宿主细胞;(ii)在适合产生寡聚分子条件下培养宿主细胞;以及(iii)纯化寡聚分子。

#### 4. 附图说明

[0024] 图1A至图1B:人IgG1及其变体的瞬时表达的分析。图1A:通过SDS-PAGE分析不同人IgG1(huIgG1)Fc- $\mu$ tp和huIgG1 Fc- $\alpha$ tp变体和对照的瞬时表达。泳道1描绘了蛋白质阶梯;泳道2描绘了IgM阳性对照(250mg/L);泳道3描绘了未经转染的Expi293表达系统;泳道6描绘了具有I253C突变的huIgG1 Fc,其后是免疫球蛋白 $\mu$ 链尾段( $\mu$ tp)(SEQ ID NO:3);泳道7描绘了具有I253C突变的huIgG1 Fc,其后是免疫球蛋白 $\alpha$ 链尾段( $\alpha$ tp);泳道8描绘了具有Q438C突变的huIgG1 Fc,其后是 $\mu$ tp(SEQ ID NO:5);泳道9描绘了具有Q438C突变的huIgG1

Fc,其后是 $\alpha$ tp;泳道10描绘了具有Y436C突变的huIgG1Fc,其后是 $\mu$ tp (SEQ ID NO:4);泳道11描绘了具有Y436C突变的huIgG1 Fc,其后是 $\alpha$ tp;泳道12描绘了huIgG1 Fc,其后是 $\mu$ tp;泳道13描绘了huIgG1 Fc,其后是 $\alpha$ tp。图1B:通过SDS-PAGE分析不同人IgG1(huIgG1)Fc- $\mu$ tp变体和对照的瞬时表达。泳道1描绘了蛋白质阶梯;泳道2描绘了纯化的IgG1阳性对照(100mg/L);泳道3描绘了纯化的IgG1阳性对照(200mg/L);泳道4描绘了来自未经转染的Expi293表达系统的条件培养基;泳道5描绘了具有H310C突变的huIgG1 Fc,其后是免疫球蛋白 $\mu$ 链尾段( $\mu$ tp) [huIgG1 Fc (H310C) - $\mu$ tp];泳道6描绘了具有L251C、I253G和S254C突变的huIgG1 Fc,其后是免疫球蛋白 $\mu$ 链尾段( $\mu$ tp) [huIgG1 Fc (L251C、I253G和S254C) - $\mu$ tp];泳道7描绘了具有S254C和N434C突变的huIgG1 Fc,其后是免疫球蛋白 $\mu$ 链尾段( $\mu$ tp) [huIgG1 Fc (S254C和N434C) - $\mu$ tp];泳道8描绘了具有L251C和S254C突变的huIgG1 Fc,其后是免疫球蛋白 $\mu$ 链尾段( $\mu$ tp) [huIgG1 Fc (L251C和S254C) - $\mu$ tp]。图1C:通过SDS-PAGE分析不同人IgG1(huIgG1)Fc- $\mu$ tp变体和对照的瞬时表达。泳道1描绘了蛋白质阶梯;泳道2描绘了纯化的IgG1阳性对照(100mg/L);泳道3描绘了纯化的IgG1阳性对照(200mg/L);泳道4描绘了来自未经转染的Expi293表达系统的条件培养基;泳道5描绘了具有N286C突变的huIgG1 Fc,其后是免疫球蛋白 $\mu$ 链尾段( $\mu$ tp) [huIgG1 Fc (N286C) - $\mu$ tp]。

[0025] 图2A至图2C:具有I253C的huIgG1 Fc,其后是 $\mu$ tp(huIgG1 Fc (I253C) - $\mu$ tp)的纯化。图2A:使用MabSelect<sup>TM</sup>蛋白A树脂的纯化。图2B:使用CaptureSelect<sup>TM</sup>FcXL亲和基质的纯化。图2C:使用阴离子交换色谱法的纯化。

[0026] 图3A至图3D:huIgG1 Fc (I253C) - $\mu$ tp的表征。图3A:纯化的huIgG1 Fc (I253C) - $\mu$ tp的完整质量分析;图3B:与BioRad凝胶过滤蛋白标准品重叠的huIgG1 Fc (I253C) - $\mu$ tp的HPLC-SEC分析;图3C:huIgG1 Fc (I253C) - $\mu$ tp的HPLC-SEC分析:通过积分定量纯度。图3D:通过纳米形式的差示扫描荧光法(nano DSF)分析huIgG1 Fc (I253C) - $\mu$ tp的热稳定性。

[0027] 图4:通过SDS-PAGE表达IgG六聚体。泳道1描绘了纯化的人IgG1阳性对照(100mg/L);泳道2描绘了纯化的人IgG1六聚体阳性对照(100mg/L);泳道3描绘了来自未经转染的Expi293表达系统的条件培养基;泳道4描绘了抗 $\beta$ blotho huIgG1六聚体;泳道5描绘了抗GDNF家族受体 $\alpha$ 样(GFRAL)huIgG1六聚体;泳道6描绘了抗血管内皮生长因子(VEGF)huIgG1六聚体。

## 5. 具体实施方式

[0028] 本公开部分基于令人惊讶的发现,即抗体恒定区处的某些氨基酸取代(即,在IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253处被取代为半胱氨酸)可以增加寡聚物诸如六聚体的形成,如下文第6节所证明的。分子聚集体之间分子间键的数量决定了可能形成的相应寡聚物的复杂程度。如果分子仅含有一个分子间结合位点,则仅可以形成二聚体,因为在与二聚体的其他组分形成键后,每个分子的仅有的分子间结合位点被占据,并且没有其他结合位点可用于形成具有更复杂结构的寡聚物。相比之下,如果一个分子含有多个分子间结合位点,则对于该给定分子,可以与多个结合配偶体形成多个键。因此,可以在这些分子的聚集体中形成具有更复杂结构的寡聚物。此外,分子内可形成分子间键的氨基酸残基的性质和位置显著影响寡聚物的形成效率。

[0029] 在一方面,本文提供了工程化以形成寡聚物的分子。本文还提供了由所公开的分

子形成的寡聚物。本文还提供了包含本文提供的分子和寡聚物的药物组合物。本文还提供了包括本文提供的组合物的试剂盒。本文还提供了表达所公开的分子的核酸分子、载体和宿主细胞。本文还提供了产生本文提供的分子和寡聚物的方法。在又一方面,本文提供了使用本发明分子和寡聚物的方法。

#### [0030] 5.1定义

[0031] 本文描述或引用的技术和方法包括本领域技术人员通常充分理解和/或通常使用常规方法采用的那些,例如以下文献中描述的广泛使用的方法学:Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版2001);Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等人编辑,2003);Therapeutic Monoclonal Antibodies:From Bench to Clinic(An编辑2009);Monoclonal Antibodies:Methods and Protocols(Albitar编辑2010);以及Antibody Engineering第1卷和第2卷(Kontermann和Dübel编辑,第2版2010)。除非本文另有定义,否则本说明书中使用的技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。出于解释本说明书的目的,将应用以下术语描述,并且在适当时,以单数形式使用的术语也将包括复数形式,反之亦然。如果所阐述的术语的任何描述与以引用方式并入本文的任何文献相冲突,则以下文所阐述的术语描述为准。

[0032] 如本文所用,术语“二硫键”或“二硫键键合”是指分子的某些残基中硫醇基团(-SH)的硫原子之间的共价连接。该键在两个硫醇氧化时形成,从而通过共价二硫键连接两个残基和它们各自的分子主体。具体地,当该分子涉及多肽或其衍生物时,二硫键通常呈连接两个氨基酸残基的六个原子的构型, $C\alpha-C\beta-S\gamma-S'\gamma-C'\beta-C'\alpha$ 。

[0033] 如本文所用,术语“EU编号”是指广泛使用的恒定结构域(包括 $C_H1$ 、铰链和Fc的部分)的编号方案。参见Kabat,E.A.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest:Tabulation and Analysis of Amino Acid and Nucleic Acid Sequences of Precursors,V-Regions,C-Regions,J-Chain,T-Cell Receptors for Antigen T-Cell Surface Antigens,[Beta]2-Microglobulins,Major Histocompatibility Antigens,Thy-1,Complement,C-Reactive Protein,Thymopoietin,Integrins,PostGamma Globulin,[Alpha]2-Macroglobulins,and Other Related Proteins,第5版,National Institutes of Health.

[0034] 如本文所用,本文所用的术语“寡聚物”、“寡聚分子”或“多聚分子”是指由若干类似或相同的重复单元组成的复合物的结构。寡聚物可以是二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体、十聚体、十一聚体、十二聚体、十三聚体、十四聚体、十五聚体、十六聚体、十七聚体、十八聚体、十九聚体、二十聚体等,其对应于由两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个等类似或相同的重复单元组成的复合物。

[0035] 术语“抗体”、“免疫球蛋白”或“Ig”在本文中可互换使用,并且以最广泛的含义使用,并且具体地涵盖例如单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂、中和抗体、全长或完整单克隆抗体)、具有多表位或单表位特异性的抗体组合物、多克隆或单价抗体、多价抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如,双特异性抗体,只要它们表现出所需的生物活性)、单链抗体,以及它们的片段(例如,结构域抗体),如下所述。该术语还包括所有抗体变体,包括携带各种突变(例如,在恒定区或Fc区中)和其他修饰(例如,在C-末端或N-末端具有另外的

肽序列)的那些。抗体可以是人的、人源化的、嵌合的和/或亲和力成熟的,以及来自其他物种例如小鼠、兔、美洲驼等的抗体。术语“抗体”旨在包括免疫球蛋白类多肽内的B细胞的多肽产物,其能够结合特定的分子抗原并由两对相同的多肽链组成,其中每对具有一条重链(约50-70kDa)和一条轻链(约25kDa),每条链的每个氨基末端部分包括约100至约130个或更多个氨基酸的可变区,并且每条链的每个羧基末端部分包括恒定区。参见例如Antibody Engineering (Borrebaeck编辑,第2版,1995);以及Kuby, Immunology (第3版,1997)。抗体还包括但不限于合成抗体、重组产生的抗体、单结构域抗体(包括来自骆驼科物种(例如,美洲驼或羊驼))或它们的人源化变体、胞内抗体、抗独特型(抗Id)抗体和任何上述抗体的功能片段(例如,抗原结合片段),其是指抗体重链或轻链多肽的一部分,其保留了衍生该片段的抗体的一些或全部结合活性。功能片段(例如,抗原结合片段)的非限制性实例包括单链Fv(scFv)(例如,包括单特异性、双特异性等)、Fab片段、F(ab')片段、F(ab)<sub>2</sub>片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、Fd片段、Fv片段、双抗体、三抗体、四抗体和微型体。特别地,本文提供的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,例如,抗原结合结构域或含有与抗原结合的抗原结合位点(例如,抗体的一个或多个CDR)的分子。此类抗体片段可见于例如Harlow和Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1989); Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers编辑,1995); Huston等人,1993, Cell Biophysics 22:189-224; Plückthun和Skerra,1989, Meth. Enzymol. 178:497-515;以及Day, Advanced Immunochimistry (第2版,1990)。本文公开的免疫球蛋白可以为任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)的免疫球蛋白分子。抗体可以是激动性抗体或拮抗性抗体。抗体可能既不是激动性的也不是拮抗性的。

[0036] “抗原”是抗体可以选择性结合的结构。靶抗原可以是多肽、碳水化合物、核酸、脂质、半抗原或其他天然存在的或合成的化合物。在一些实施方案中,靶抗原是多肽。在某些实施方案中,抗原与细胞相关,例如存在于细胞上或细胞中。

[0037] 术语“结合”是指分子之间的相互作用,包括例如形成复合物。相互作用可以是例如非共价相互作用,包括氢键、离子键、疏水相互作用和/或范德华相互作用。复合物还可以包括通过共价或非共价键、相互作用或力保持在一起的两个或多个分子的结合。抗体上的单个抗原结合位点与靶分子(诸如抗原)的单个表位之间的总非共价相互作用的强度是抗体或功能片段对该表位的亲和力。结合分子(例如,抗体)与单价抗原的解离速率( $k_{\text{解离}}$ )与缔合速率( $k_{\text{缔合}}$ )的比率( $k_{\text{解离}}/k_{\text{缔合}}$ )是解离常数 $K_D$ ,其与亲和力成反比。 $K_D$ 值越小,抗体的亲和力越大。 $K_D$ 值因抗体和抗原的不同复合物而异,并且取决于 $k_{\text{缔合}}$ 和 $k_{\text{解离}}$ 。本文提供的抗体的解离常数 $K_D$ 可以使用本文提供的任何方法或本领域技术人员熟知的任何其他方法来测定。一个结合位点处的亲和力并不总是反映抗体于抗原之间相互作用的真实强度。当含有多个重复抗原决定簇的复合抗原(诸如多价抗原)与含有多个结合位点的抗体接触时,抗体与抗原在一个位点处的相互作用将增加在第二个位点处发生反应的可能性。多价抗体与抗原之间的这种多重相互作用的强度称为亲合力。

[0038] 关于本文所述的结合分子,术语诸如“结合”、“特异性结合”和类似术语在本文中也可互换使用,并且是指特异性结合抗原(诸如多肽)的抗原结合结构域的结合分子。结合或特异性结合抗原的结合分子或抗原结合结构域可以通过例如免疫测定法、

Octet®、Biacore®或本领域技术人员已知的其他技术来鉴定。在一些实施方案中,当结合分子或抗原结合结构域以比任何交叉反应性抗原更高的亲和力与抗原结合时,结合分子或抗原结合结构域与抗原结合或特异性结合,如使用实验技术诸如放射免疫测定法(RIA)和酶联免疫吸附测定法(ELISA)所测定的。通常,特异性或选择性反应将是背景信号或噪声的至少两倍,并且可以是背景的10倍以上。参见例如Fundamental Immunology 332-36 (Paul编辑,第2版1989)关于结合特异性的讨论。在某些实施方案中,结合分子或抗原结合结构域与“非靶”蛋白的结合程度小于结合分子或抗原结合结构域与其特定靶抗原的结合的约10%,例如,如通过荧光激活细胞分选(FACS)分析或RIA所测定的。结合抗原的结合分子或抗原结合结构域包括能够以足够亲和力结合抗原的结合分子或抗原结合结构域,使得结合分子可用作例如靶向抗原的治疗剂和/或诊断剂。在某些实施方案中,与抗原结合的结合分子或抗原结合结构域具有小于或等于1 $\mu$ M、800nM、600nM、550nM、500nM、300nM、250nM、100nM、50nM、10nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM或0.1nM的解离常数( $K_D$ )。在某些实施方案中,结合分子或抗原结合结构域与不同物种的抗原中保守的抗原表位结合。

[0039] 在某些实施方案中,本文所述的分子的抗体或抗原结合片段可以包含“嵌合”序列,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而一条或多条链的其余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及此类抗体的片段中的相应序列相同或同源,只要它们表现出所需的生物活性(参见美国专利号4,816,567;以及Morrison等人,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81: 6851-55)。

[0040] 在某些实施方案中,本文所述的分子的抗体或抗原结合片段可以包含非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式的部分,所述非人抗体是包括人免疫球蛋白(例如,受体抗体)的嵌合抗体,其中天然CDR残基被来自具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(例如,供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的相应CDR的残基替代。在一些情况下,人免疫球蛋白的一个或多个FR区残基被相应的非人残基替代。此外,人源化抗体可以包含受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。人源化抗体重链或轻链可以包含至少一个或多个可变区中的基本上全部,其中所有或基本上所有CDR对应于非人免疫球蛋白的那些,并且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白序列的那些。在某些实施方案中,人源化抗体将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。有关更多详细信息,参见Jones等人,1986,Nature 321:522-25;Riechmann等人,1988,Nature 332:323-29;Presta,1992,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-96;Carter等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285-89;美国专利号:6,800,738、6,719,971、6,639,055、6,407,213和6,054,297。

[0041] 在某些实施方案中,本文所述的分子的抗体或抗原结合片段可以包含“完全人抗体”或“人抗体”的部分,其中这些术语在本文中可互换使用并且是指包含人可变区和例如人恒定区的抗体。在具体实施方案中,该术语是指包含人来源的可变区和恒定区的抗体。在某些实施方案中,“完全人”抗体还可以涵盖结合多肽并且由核酸序列编码的抗体,所述核酸序列是人种系免疫球蛋白核酸序列的天然存在的体细胞变体。术语“完全人抗体”包括具有对应于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体,如Kabat等人(参见Kabat等人

(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 公开号 91-3242) 中所描述的。“人抗体”是具与人产生的抗体的氨基酸序列相对于的氨基酸序列和/或已经使用任何制备人抗体的技术制备的氨基酸序列的抗体。人抗体的该定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可以使用本领域已知的各种技术产生, 包括噬菌体展示文库 (Hoogenboom 和 Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks 等人, 1991, J. Mol. Biol. 222:581) 和酵母展示文库 (Chao 等人, 2006, Nature Protocols 1:755-68)。关于制备人单克隆抗体还可利用以下文献中描述的方法: Cole 等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 77 (1985); Boerner 等人, 1991, J. Immunol. 147 (1):86-95; 以及 van Dijk 和 van de Winkel, 2001, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74。人抗体可以通过将抗原施用于转基因动物来制备, 所述转基因动物已被修饰以响应抗原攻击而产生此类抗体, 但其内源基因座已被禁用, 例如小鼠 (关于 XENOMOUSE™ 技术, 参见例如 Jakobovits, 1995, Curr. Opin. Biotechnol. 6 (5):561-66; Brüggemann 和 Taussing, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8 (4):455-58; 以及美国专利号 6,075,181 和 6,150,584)。关于通过人 B 细胞杂交瘤技术产生的人抗体, 还参见例如 Li 等人, 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-62。

[0042] 典型的 4-链抗体单元是由两条相同的轻 (L) 链和两条相同的重 (H) 链组成的异四聚体糖蛋白。就 IgG 而言, 4-链单元通常为约 150,000 道尔顿。每条 L 链通过一个共价二硫键与一条 H 链连接, 而两条 H 链根据 H 链同种型通过一个或多个二硫键彼此连接。每条 H 和 L 链还具有规则间隔的链内二硫键。每条 H 链在 N-末端具有一个可变结构域 (VH), 对于  $\alpha$  和  $\gamma$  链中的每一个, 后跟三个恒定结构域 (CH), 而对于  $\mu$  和  $\epsilon$  同种型, 后跟四个 CH 结构域。每条 L 链在 N 末端具有一个可变结构域 (VL), 另一端具有一个恒定结构域 (CL)。VL 与 VH 对齐, CL 与重链的第一个恒定结构域 (CH1) 对齐。人们认为, 特定的氨基酸残基在轻链与重链可变结构域之间形成界面。VH 和 VL 的配对一起形成单个抗原结合位点。对于不同类别的抗体的结构和性质, 参见例如 Basic and Clinical Immunology 71 (Stites 等人编辑, 第 8 版 1994); 以及 Immunobiology (Janeway 等人编辑, 第 5 版 2001)。

[0043] 术语“Fab”或“Fab 区”是指结合抗原的抗体区。常规的 IgG 通常包含两个 Fab 区, 每个 Fab 区位于 Y 形 IgG 结构的两个臂之一上。每个 Fab 区通常由重链和轻链各自的一个可变区和一个恒定区组成。更具体地, Fab 区中重链的可变区和恒定区是 VH 和 CH1 区, 并且 Fab 区中轻链的可变区和恒定区是 VL 和 CL 区。Fab 区中的 VH、CH1、VL 和 CL 可以以多种方式排列以赋予根据本公开的抗原结合能力。例如, VH 和 CH1 区可以位于一个多肽上, 并且 VL 和 CL 区可以位于单独的多肽上, 类似于常规 IgG 的 Fab 区。替代地, VH、CH1、VL 和 CL 区都可以位于相同的多肽上并以不同的顺序取向。

[0044] 术语“可变区”、“可变结构域”、“V 区”或“V 结构域”是指抗体的轻链或重链的一部分, 其通常位于轻链或重链的氨基末端, 并且在重链中具有约 120 至 130 个氨基酸的长度并在轻链中具有约 100 至 110 个氨基酸的长度, 并且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。重链的可变区可称为“VH”。轻链的可变区可称为“VL”。术语“可变”是指抗体中可变区的某些片段在序列上存在很大不同的事实。V 区介导抗原结合并定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而, 可变性在可变区的 110 个氨基酸的跨度上分布并不均匀。相反, V 区由约 15-30 个氨基酸的称为框架区 (FR) 的变异性较小 (例如, 相对不变) 的区段组成, 这些区段

由各为约9-12个氨基酸长的称为“高变区”的较大可变性(例如,极大可变性)的较短区域隔开。重链和轻链的可变区各自包含四个FR,大部分采用 $\beta$ 片层构型,由三个高变区连接,形成连接 $\beta$ 片层构型的环,并且在一些情况下形成 $\beta$ 片层结构的一部分。每条链中的高变区通过FR紧密结合在一起,并且与另一条链的高变区一起有助于形成抗体的抗原结合位点(参见例如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (第5版1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出多种效应子功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。不同抗体之间的可变区在序列上有很大不同。在具体实施方案中,可变区是人可变区。

[0045] 术语“重链”当用于指代抗体时是指约50-70kDa的多肽链,其中氨基末端部分包括约120至130或更多个氨基酸的可变区,并且羧基末端部分包括恒定区。基于重链恒定区的氨基酸序列,恒定区可以是被称为阿尔法( $\alpha$ )、德尔塔( $\delta$ )、伊普西隆( $\epsilon$ )、伽玛( $\gamma$ )和缪( $\mu$ )的五种不同类型(例如,同种型)之一。不同的重链大小不同: $\alpha$ 、 $\delta$ 和 $\gamma$ 含有约450个氨基酸,而 $\mu$ 和 $\epsilon$ 含有约550个氨基酸。当与轻链组合时,这些不同类型的重链分别产生五种众所周知的抗体类别(例如,同种型),IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,包括四个IgG亚类,即IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0046] 术语“轻链”当用于指代抗体时是指约25kDa的多肽链,其中氨基末端部分包括约100至约110或更多个氨基酸的可变区,并且羧基末端部分包括恒定区。轻链的大致长度为211至217个氨基酸。基于恒定结构域的氨基酸序列,存在两种不同类型,称为卡帕( $\kappa$ )或兰姆达( $\lambda$ )。

[0047] 如本文所用,术语“高变区”、“HVR”、“互补决定区”和“CDR”可互换使用。“CDR”是指免疫球蛋白(Ig或抗体)VH $\beta$ -片层框架的非框架区内的三个高变区(H1、H2或H3)之一,或抗体VL $\beta$ -片层框架的非框架区内的三个高变区(L1、L2或L3)之一。因此,CDR是散布在框架区序列内的可变区序列。CDR区是本领域技术人员众所周知的,并且由众所周知的编号系统定义。

[0048] 术语“恒定区”或“恒定结构域”是指轻链和重链的羧基末端部分,其不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出多种效应子功能,诸如与Fc受体的相互作用。该术语是指免疫球蛋白分子的这样的部分,其相对于免疫球蛋白的另一部分(可变区,其含有抗原结合位点)具有更保守的氨基酸序列。恒定区可以含有重链的C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2和C<sub>H</sub>3区以及轻链的C<sub>L</sub>区。如本文所用,术语“IgG C<sub>H</sub>1”、“IgG C<sub>H</sub>2”和“IgG C<sub>H</sub>3”分别指IgG重链恒定区中通常定义的第一结构域、第二结构域和第三结构域。IgG的重链通常含有三个恒定结构域IgG C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>3,以及C<sub>H</sub>1结构域与C<sub>H</sub>2结构域之间的间隔铰链区。

[0049] 本文中的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C-末端区域,包括例如天然序列Fc区、重组Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链Fc区的边界可能不同,但人IgG重链Fc区通常被定义为从Cys226或Pro230位置处的氨基酸残基延伸至其羧基末端。Fc区的C-末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)可以例如在抗体的生产或纯化过程中去除,或通过重组工程化编码抗体重链的核酸来去除。因此,完整抗体的组合物可以包含除去所有K447残基的抗体群、没有除去K447残基的抗体群,以及具有含和不含K447残基的抗体混合物的抗体群。“功能性Fc区”具有天然序列Fc区的“效应子功能”。示例性“效应子功能”包括C1q结合; CDC; Fc受体结合; ADCC; 吞噬作用; 细胞表面受体(例如, B细胞受体)的下调等。此类效应子

功能通常需要Fc区与结合区或结合结构域(例如,抗体可变区或结构域)组合,并且可以使用本领域技术人员已知的各种测定法进行评估。“变体Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失)而不同于天然序列Fc区的氨基酸序列。在某些实施方案中,变体Fc区与天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区相比具有至少一个氨基酸取代,例如,在天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区中约一至约十个氨基酸取代,或约一至约五个氨基酸取代。本文的变体Fc区可与天然序列Fc区和/或亲本多肽的Fc区具有至少约80%同源性,或与其具有至少约90%同源性,例如与其具有至少约95%同源性。

[0050] 术语“框架”或“FR”是指位于CDR侧翼的那些可变区残基。FR残基存在于例如嵌合抗体、人源化抗体、人结构域抗体(例如,单结构域抗体)、双抗体、线性抗体和双特异性抗体中。FR残基是除了高变区残基或CDR残基之外的那些可变结构域残基。

[0051] 如本文所用,“表位”是本领域中的术语,并且是指结合分子(例如,包含单结构域抗体序列的抗体)可以特异性结合的抗原的局部区域。表位可以是线性表位或构象、非线性或不连续表位。就多肽抗原而言,例如,表位可以是多肽的连续氨基酸(“线性”表位),或者表位可以包含来自多肽的两个或多个非连续区域的氨基酸(“构象”、“非线性”或“不连续”表位)。本领域技术人员应当理解,通常,线性表位可以依赖于或不依赖于二级、三级或四级结构。例如,在一些实施方案中,结合分子与一组氨基酸结合,而不管它们是否折叠成天然三维蛋白质结构。在其他实施方案中,结合分子需要构成表位的氨基酸残基呈现特定构象(例如,弯曲、扭曲、转动或折叠)以识别并结合表位。

[0052] 术语“靶向区域”或“结合结构域”在本文中以最广泛的意义使用,并且是指可以特异性结合靶标(或抗原)的分子的区域。靶向区域可以是没有C<sub>H</sub>1区的抗原结合片段,或任何重新格式化的抗原结合片段,诸如单链可变片段(scFv)、任何非免疫球蛋白但通过酶-底物、受体-配体或其他蛋白质-蛋白质相互作用与靶标形成特异性结合的多肽。靶向区域也可以是通过反向互补结合与靶标形成特异性结合的核酸序列。靶向区域也可以是能够与靶标形成任何共价或非共价连接的实体。在一些实施方案中,靶向区域或结合结构域源自抗体,诸如抗原结合结构域或抗体片段。术语“抗原结合片段”、“抗原结合结构域”、“抗原结合区”和类似术语当在抗体的上下文中使用时是指抗体的包含与抗原相互作用并赋予结合剂其对抗原(例如,CDR)的特异性和亲和力的氨基酸残基的部分。如本文所用,“抗原结合片段”包括“抗体片段”,其包含完整抗体的一部分,诸如完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例如上所述,并且包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双抗体和双-双抗体;单链抗体分子;双可变结构域抗体;单可变结构域抗体(sdAb);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0053] 如本文所用,术语“多肽”和“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,并且是指任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是直链或支链的,它可以包含修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸中断。这些术语还涵盖已被天然修饰或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰。该定义还包括例如含有一种或多种氨基酸类似物的多肽,包括但不限于非天然氨基酸,以及本领域已知的其他修饰。应当理解,因为本公开的多肽可以基于抗体或免疫球蛋白超家族的其他成员,所以在某些实施方案中,“多肽”可以作为单链或作为两条或更多条相关链存在。

[0054] 本文可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物,并且包

括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或它们的类似物,或可以通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应掺入聚合物中的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,诸如甲基化的核苷酸及其类似物。如本文所用,“寡核苷酸”是指短的、通常单链的、合成的多核苷酸,其长度通常(但不一定)少于约200个核苷酸。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并不互相排斥。上文关于多核苷酸的描述同样且完全适用于寡核苷酸。产生本公开的结合分子的细胞可以包括亲本杂交瘤细胞,以及已将编码抗体的核酸引入其中的细菌和真核宿主细胞。除非另有说明,否则本文公开的任何单链多核苷酸序列的左侧末端是5'末端;双链多核苷酸序列的左手方向称为5'方向。新生RNA转录物的5'至3'添加的方向称为转录方向;DNA链上与RNA转录物具有相同序列的、位于RNA转录物5'至5'端的序列区域称为“上游序列”;DNA链上与RNA转录物具有相同序列的、位于RNA转录物的3'至3'端的序列区域称为“下游序列”。

[0055] “分离的核酸”是基本上与其他基因组DNA序列以及蛋白质或复合物诸如核糖体和聚合酶分离的核酸,例如RNA、DNA或混合核酸,其天然伴随天然序列。“分离的”核酸分子是与存在于核酸分子的天然来源中的其他核酸分子分离的核酸分子。此外,“分离的”核酸分子,诸如cDNA分子,当通过重组技术产生时,可以基本上不含其他细胞物质或培养基,或者当化学合成时,基本上不含化学前体或其他化学物质。在一个具体实施方案中,分离或纯化编码本文所述的单结构域抗体或抗体的一种或多种核酸分子。该术语涵盖已从其自然存在的环境中除去的核酸序列,并且包括重组或克隆的DNA分离物和化学合成的类似物或通过异源系统生物合成的类似物。基本上纯的分子可以包括分离形式的分子。

[0056] 除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此为简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可以包括内含子,其程度使得编码该蛋白质的核苷酸序列可以在一些形式中含有一个或多个内含子。

[0057] 如本文所用,术语“载体”是指用于携带或包含核酸序列的物质,该核酸序列包括例如编码如本文所述的抗体或抗原结合片段的核酸序列,以便将核酸序列引入宿主细胞。适用的载体包括例如表达载体、质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体和人工染色体,其可包括可操作于稳定整合到宿主细胞染色体中的选择序列或标记。另外,载体可以包括一种或多种选择标记基因和适当的表达控制序列。可以包括的选择标记基因例如提供对抗生素或毒素的抗性、补充营养缺陷型缺陷、或提供培养基中没有的关键营养物。表达控制序列可以包括本领域众所周知的组成型和诱导型启动子、转录增强子、转录终止子等。当要共表达两个或多个核酸分子(例如,抗体重链和轻链或抗体VH和VL)时,可以将两个核酸分子插入例如单个表达载体或单独的表达载体中。对于单一载体表达,编码核酸可以可操作地连接到一个共同的表达控制序列或连接到不同的表达控制序列,诸如一个诱导型启动子和一个组成型启动子。将核酸分子引入宿主细胞可以使用本领域众所周知的方法来证实。此类方法包括例如核酸分析,诸如RNA印迹或mRNA的聚合酶链式反应(PCR)扩增、用于基因产物表达的免疫印迹,或测试引入的核酸序列或其相应基因产物的表达的其他合适的分析方法。本领域技术人员应当理解,核酸分子以足以产生所需产物的量表达,并且还应当理解,可以使用本领域众所周知的方法优化表达水平以获得足够的表达。

[0058] 如本文所用,术语“宿主细胞”是指可用核酸分子转染的特定受试细胞以及此类细胞的后代或潜在后代。由于在随后的世代中或将核酸分子整合到宿主细胞基因组中可能发

生的突变或环境影响,这种细胞的后代可能与用核酸分子转染的亲本细胞不同。

[0059] 如本文所用,术语“同一性”是指两个或多个多肽分子或两个或多个核酸分子的序列之间的关系,如通过比对和比较序列所确定的。关于参考多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”被定义为在比对序列并引入间隙(如果需要)以实现最大百分比序列同一性并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分之后,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。出于确定百分比氨基酸序列同一性的目的的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用公开可用的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN (DNASar, Inc.) 软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0060] 术语“特异性”是指抗原结合分子(诸如抗体)对抗原的特定表位的选择性识别。例如,天然抗体是单特异性的。如本文所用,术语“多特异性”表示抗原结合蛋白具有两个或多个抗原结合位点,其中至少两个结合不同的抗原。如本文所用,“双特异性”表示抗原结合分子具有两种不同的抗原结合特异性。本文使用的术语“单特异性”表示具有一个或多个结合位点的抗原结合分子,每个结合位点结合相同的抗原。

[0061] 如本文所用,术语“化合价”表示抗原结合分子中存在特定数量的结合位点。例如,天然抗体或全长抗体具有两个结合位点并且是二价的。因此,术语“三价”、“四价”、“五价”和“六价”分别表示在抗原结合分子中存在两个结合位点、三个结合位点、四个结合位点、五个结合位点和六个结合位点。

[0062] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指经联邦或州政府监管机构批准,或在美国药典、欧洲药典或其他普遍认可的药典中列出的,用于动物,更具体地用于人。

[0063] 如本文所用,术语“赋形剂”意指药学上可接受的材料、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、溶剂或包封材料。赋形剂包括例如包封材料或添加剂,诸如吸收促进剂、抗氧化剂、粘合剂、缓冲剂、载剂、包衣剂、着色剂、稀释剂、崩解剂、乳化剂、增量剂、填充剂、调味剂、湿润剂、润滑剂、香料、防腐剂、推进剂、释放剂、灭菌剂、甜味剂、增溶剂、润湿剂以及它们的混合物。术语“赋形剂”还可以指稀释剂、佐剂(例如,弗氏佐剂(完全或不完全))或媒介物。

[0064] 在一些实施方案中,赋形剂是药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂的实例包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(例如,少于约10个氨基酸残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露醇或山梨醇;成盐抗衡离子,诸如钠;和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN<sup>TM</sup>、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS<sup>TM</sup>。药学上可接受的赋形剂的其他实例在Remington and Gennaro, Remington's Pharmaceutical Sciences(第18版1990)中进行了描述。

[0065] 在一个实施方案中,每种组分在与药物制剂的其他成分相容的意义上是“药学上可接受的”,并且适合于与人和动物的组织或器官接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或其他问题或并发症,与合理的益处/风险比相称。参见例如Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2005; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第6版; Rowe 等人编辑; The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical

Association:2009;Handbook of Pharmaceutical Additives,第3版;Ash和Ash编辑;Gower Publishing Company:2007;Pharmaceutical Preformulation and Formulation,第2版;Gibson编辑;CRC Press LLC:Boca Raton,FL,2009。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂在所采用的剂量和浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂是pH缓冲水溶液。

[0066] 在一些实施方案中,赋形剂是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用组合物(例如,药物组合物)时,水是示例性赋形剂。盐水溶液以及葡萄糖水溶液和甘油溶液也可以用作液体赋形剂,特别是用于可注射溶液。赋形剂还可以包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。组合物可以采用溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释制剂等形式。口服组合物,包括制剂,可以包括标准赋形剂,诸如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0067] 如本文所用,术语“约”和“大约”意指在给定值或范围的20%内、15%内、10%内、9%内、8%内、7%内、6%内、5%内、4%内、3%内、2%内、1%内或更少。

[0068] 如本公开和权利要求书中所用,除非上下文另外明确指示,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数形式。

[0069] 如本文所用,在短语中使用的术语“在……之间”诸如“在A与B之间”或“在A-B之间”是指包括A和B两者的范围。

[0070] 本文在短语中使用的术语“和/或”诸如“A和/或B”旨在包括:A和B二者;A或B;A(单独);以及B(单独)。同样地,在短语中使用的术语“和/或”诸如“A、B和/或C”旨在涵盖以下实施方案中的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0071] 5.2工程化形成寡聚物的分子

[0072] 5.2.1包含工程化恒定区的分子

[0073] 在一方面,本文提供了一种能够与两个或多个具有相同或相似结构的其他分子形成连接,从而形成包含两个或多个单元的寡聚物的分子。更具体地,在一些实施方案中,本文提供的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区,其中位置253(根据EU编号)处的氨基酸残基被取代为半胱氨酸残基,从而产生能够与具有相同氨基酸取代的另一个分子形成二硫键的位点。

[0074] 在一些实施方案中,除了C<sub>H</sub>2区的位置253处的半胱氨酸残基之外,本文提供的分子还包含至少一个能够与相同或相似结构的其他分子形成连接的其他位点。本文提供的连接类型可以是共价的或非共价的,并且本文提供的连接可以是直接的或间接的。在一些实施方案中,本文提供的连接是经由半胱氨酸残基的二硫键。半胱氨酸残基可以例如通过点突变或通过添加尾段引入分子中。替代地,半胱氨酸残基可以天然存在于抗体区,诸如铰链区。在一些实施方案中,上述性质以组合形式存在于分子中。

[0075] 在一些实施方案中,本文提供的分子之间的连接类型是经由共价键。在一些具体实施方案中,本文提供的分子之间的连接类型是通过二硫键。在一些其他具体实施方案中,本文提供的分子之间的连接类型是通过电子共享。在其他实施方案中,本文提供的分子之

间的连接类型是通过非共价键。在一些具体实施方案中,本文提供的分子之间的连接类型是通过氢键。在一些其他具体实施方案中,本文提供的分子之间的连接类型是通过离子相互作用。在一些其他具体实施方案中,本文提供的分子之间的连接类型是通过范德华力。在一些其他具体实施方案中,本文提供的分子之间的连接类型是通过疏水键。

[0076] 在一些实施方案中,本文提供的分子彼此形成直接连接。在其他实施方案中,本文提供的分子彼此形成间接连接。在一些具体实施方案中,本文提供的分子通过直接形成的二硫键彼此连接。在其他实施方案中,本文提供的分子通过间接形成的二硫键彼此连接。在一些具体实施方案中,本文提供的分子通过一个或多个连接位点彼此连接,其中连接分子与本文提供的分子形成二硫键。在一个具体实施方案中,连接分子是在聚合IgA和IgM中发现的J链。

[0077] 在某些实施方案中,本文提供了一种通过二硫键彼此形成连接的分子,所述二硫键可以在两个天然氨基酸或不常见氨基酸之间形成。在一些实施方案中,本文提供的分子之间形成的连接是两个天然氨基酸之间的二硫键。在一些具体实施方案中,本文提供的分子之间形成的连接是两个半胱氨酸残基之间的二硫键。在一些实施方案中,本文提供的分子之间形成的连接是两个不常见氨基酸之间的二硫键。在一些具体实施方案中,不常见氨基酸各自处理反应性巯基。在一些具体实施方案中,不常见的氨基酸是具有不同长度的对位取代的脂肪族硫醇的酪氨酸衍生物(参见Liu等人,PNAS,113(21)5910-5915(2016))。

[0078] 形成二硫键的点突变

[0079] 在一些实施方案中,本文提供了一种通过引入的点突变之间的二硫键彼此形成连接的分子。在一个实施方案中,丙氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,精氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,天冬酰胺被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,天冬氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,谷氨酰胺被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,谷氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,甘氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,组氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,异亮氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,亮氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,赖氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,甲硫氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,苯丙氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,脯氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,丝氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,苏氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,色氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,酪氨酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,缬氨酸被半胱氨酸取代。

[0080] 在一些实施方案中,本文提供了一种在促进彼此形成稳定二硫键的位置处具有引入的点突变的分子。在一些实施方案中,引入的点突变的位置满足稳定二硫键的几何约束和参数。在一些具体实施方案中,引入的点突变的位置确保形成的二硫键中 $C\alpha-C\alpha'$ 之间的近距离。在一些具体实施方案中,引入的点突变的位置确保形成的二硫键中 $C\beta-C\beta'$ 之间的近距离。在一些具体实施方案中,引入的点突变的位置确保形成的二硫键中 $C\alpha-C\beta-S\gamma$ 之间的适当键角。在其他具体实施方案中,引入的点突变的位置确保形成的二硫键中 $C\beta-S\gamma-S'\gamma$ 之间的适当键角。在其他具体实施方案中,引入的点突变的位置确保 $C\beta$ 原子围绕形成的二硫键中S-S键的适当旋转角度。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgG C<sub>H</sub>1区中包含至半胱氨酸的点突变。

[0081] 在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgG C<sub>H</sub>2区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgG C<sub>H</sub>3区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在铰链区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgE C<sub>ε</sub>1区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgE C<sub>ε</sub>2区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgE C<sub>ε</sub>3区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgE C<sub>ε</sub>4区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgD C<sub>H</sub>1区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgD C<sub>H</sub>2区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgD C<sub>H</sub>3区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgM C<sub>μ</sub>1区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgM C<sub>μ</sub>2区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgM C<sub>μ</sub>3区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgM C<sub>μ</sub>4区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgA C<sub>α</sub>1区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgA C<sub>α</sub>2区中包含至半胱氨酸的点突变。在一些具体实施方案中,本文提供的分子在IgA C<sub>α</sub>3区中包含至半胱氨酸的点突变。在一个具体实施方案中,本文提供的分子在IgG CH2区中包含在根据EU编号的位置Ile 253处至半胱氨酸的点突变。

[0082] 在一些实施方案中,本文提供的分子包含两个或多个上述点突变。在一些实施方案中,本文提供的分子在IgG C<sub>H</sub>2区中在根据EU编号的位置Ile 253处包含至半胱氨酸的点突变和至少一个上述其他点突变。

[0083] 用于形成二硫键的添加尾段

[0084] 在某些实施方案中,本文提供的分子还包含促进彼此形成稳定二硫键的添加尾段。在一些实施方案中,添加的尾段包含十八个氨基酸长的μ尾段(SEQ ID NO:1)。在其他实施方案中,添加的尾段与SEQ ID NO:1具有90%同一性,并且保留SEQ ID NO:1中的半胱氨酸残基。在其他实施方案中,添加的尾段与SEQ ID NO:1具有85%同一性,并且保留SEQ ID NO:1中的半胱氨酸残基。在其他实施方案中,添加的尾段与SEQ ID NO:1具有70%同一性,并且保留SEQ ID NO:1中的半胱氨酸残基。在其他实施方案中,添加的尾段与SEQ ID NO:1具有65%同一性,并且保留SEQ ID NO:1中的半胱氨酸残基。在其他实施方案中,添加的尾段与SEQ ID NO:1具有50%同一性,并且保留SEQ ID NO:1中的半胱氨酸残基。

[0085] 在一些实施方案中,添加的尾段包含IgAα重链中的尾段(α尾段)。在其他实施方案中,添加的尾段与α尾段具有85%同一性,并且保留α尾段中的半胱氨酸残基。在其他实施方案中,添加的尾段与α尾段具有70%同一性,并且保留α尾段中的半胱氨酸残基。在其他实施方案中,添加的尾段与α尾段具有65%同一性,并且保留α尾段中的半胱氨酸残基。在其他实施方案中,添加的尾段与α尾段具有50%同一性,并且保留α尾段中的半胱氨酸残基。在其他实施方案中,添加的尾段与α尾段具有35%同一性,并且保留α尾段中的半胱氨酸残基。在其他实施方案中,添加的尾段与α尾段具有20%同一性,并且保留α尾段中的半胱氨酸残基。在其他实施方案中,添加的尾段与α尾段具有5%同一性,并且保留α尾段中的半胱氨酸残基。

[0086] 在某些实施方案中,本文所述的某些多肽包含相对于参考多肽具有一定同一性百

分比的氨基酸序列。可以使用数学算法来确定两个序列(例如,氨基酸序列或核酸序列)之间的同一性百分比。用于比较两个序列的数学算法的优选的非限制性实例是Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:2264-2268 (1990), 如Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5877 (1993) 中进行了改进的算法。这种算法被结合到Altschul等人, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990) 的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST核苷酸程序参数集进行,例如,评分=100,字长=12,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以用XBLAST程序参数集进行,例如,评分为50,字长=3,以获得与本文所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以使用如Altschul等人, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997) 中所述的空位BLAST。替代地,PSI-BLAST可用于执行检测分子之间距离关系的迭代搜索(Id.)。当使用BLAST、Gapped-BLAST和PSI-Blast程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数(参见例如万维网上的国家生物技术信息中心(NCBI), [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov))。用于比较序列的数学算法的另一个非限制性实例是Myers和Miller, *CABIOS* 4:11-17 (1998) 的算法。这种算法被结合到ALIGN程序(2.0版)中,该ALIGN程序是GCG序列比对软件包的一部分。当使用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4。在允许或不允许空位的情况下,可以使用与上述技术类似的技术来确定两个序列之间的同一性百分比。在计算同一性百分比时,通常只计算完全匹配。

[0087] 在其他实施方案中,本文提供了一种具有含有一个或多个半胱氨酸的添加的短多肽的分子。在一些具体实施方案中,添加的短多肽的长度小于五个氨基酸。在一些具体实施方案中,添加的短多肽的长度为六、七、八、九或十个氨基酸。在一些具体实施方案中,添加的短多肽的长度为十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九或二十个氨基酸。在一些具体实施方案中,添加的短多肽的长度为二十一、二十二、二十三、二十四、二十五、二十六、二十七、二十八、二十九、三十个氨基酸。在一些具体实施方案中,添加的短多肽的长度超过三十个氨基酸。

[0088] 本文提供了一种在促进彼此形成稳定二硫键的位置处具有添加的尾段的分子。在一些实施方案中,尾段被添加到分子的C-末端。在一些具体实施方案中,尾段被添加到C<sub>H</sub>1区的C-末端。在一些具体实施方案中,尾段被添加到铰链区的C-末端。在一些具体实施方案中,尾段被添加到C<sub>H</sub>2区的C-末端。在一些具体实施方案中,尾段被添加到C<sub>H</sub>3区的C-末端。在一些实施方案中,尾段被添加到分子的N-末端。在一些具体实施方案中,尾段被添加到C<sub>H</sub>1区的N-末端。在一些具体实施方案中,尾段被添加到铰链区的N-末端。在一些具体实施方案中,尾段被添加到C<sub>H</sub>2区的N-末端。在一些具体实施方案中,尾段被添加到C<sub>H</sub>3区的N-末端。

[0089] 工程化分子的构型

[0090] 在一些实施方案中,本文提供了一种包含一个上述点突变和一个上述添加的尾段的分子。在其他实施方案中,本文提供的分子具有两个或多个上述点突变和一个上述添加的尾段。在又其他实施方案中,本文提供的分子具有一个上述点突变和两个或多个上述添加的尾段。在又其他实施方案中,本文提供的分子具有两个或多个上述点突变和两个或多个上述添加的尾段。

[0091] 在一些实施方案中,本文提供了一种包含被工程化用于多聚化的不同抗体恒定区的分子。在一些实施方案中,本文所述的分子在C<sub>H</sub>2区中包含一个或多个点突变,并且因此

可以在此类分子之间形成一个或多个工程化二硫键。在其他实施方案中,本文所述的分子包含一个或多个添加的尾段,并且因此可以在此类分子之间形成一个或多个工程化二硫键。在其他实施方案中,本文所述的分子在C<sub>H</sub>2区中包含一个或多个点突变和一个或多个添加的尾段,并且因此可以在此类分子之间形成多个工程化二硫键。

[0092] 在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区和IgG铰链区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区和IgG C<sub>H</sub>3区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区和IgG C<sub>H</sub>1区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。

[0093] 在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区、IgG铰链区和C<sub>H</sub>3区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区、IgG铰链区和IgG C<sub>H</sub>1区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区、IgG C<sub>H</sub>3区和IgG C<sub>H</sub>1区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区、IgG铰链区、IgG C<sub>H</sub>3区和IgG C<sub>H</sub>1区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。

[0094] 在上述实施方案中,不同区的顺序可以遵循野生型IgG中的顺序,或者可以不同于野生型IgG中的顺序。

[0095] 在一些实施方案中,本文所述的分子还包含一个或多个如上所述的添加的尾段。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)或其变体。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)和IgG铰链区。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)和IgG C<sub>H</sub>2区。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)和IgG C<sub>H</sub>3区。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG C<sub>H</sub>1区。

[0096] 在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG铰链区和IgG C<sub>H</sub>2区。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG铰链区和IgG C<sub>H</sub>3区。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG铰链区和IgG C<sub>H</sub>1区。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG C<sub>H</sub>2区和IgG C<sub>H</sub>3区。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG C<sub>H</sub>2区和IgG C<sub>H</sub>1区。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG C<sub>H</sub>3区和IgG C<sub>H</sub>1区。

[0097] 在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG铰链区、IgG C<sub>H</sub>2区和IgG C<sub>H</sub>3区。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG铰链区、IgG C<sub>H</sub>2区和IgG C<sub>H</sub>1区。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG铰链区、IgG C<sub>H</sub>3区和IgG C<sub>H</sub>1区。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG C<sub>H</sub>2区、IgG C<sub>H</sub>3区和IgG C<sub>H</sub>1区。

[0098] 在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG铰链区、IgG C<sub>H</sub>2区、IgG C<sub>H</sub>3区和IgG C<sub>H</sub>1区。

[0099] 在上述实施方案中,不同区的顺序可以遵循野生型IgG中的顺序,或者可以不同于野生型IgG中的顺序,并且人 $\mu$ 尾段可以与本发明分子的C-末端或N-末端缀合。

[0100] 在一些实施方案中,本文所述的分子包含一个或多个点突变和一个或多个添加的尾段,并且因此可以在此类分子之间形成多个工程化二硫键。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区和人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1),其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区、人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)和IgG铰链区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区、人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)和IgG C<sub>H</sub>3区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区、人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)和IgG C<sub>H</sub>1区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区、人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG铰链区和IgG C<sub>H</sub>3区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区、人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG铰链区和IgG C<sub>H</sub>1区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区、人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG C<sub>H</sub>3区和IgG C<sub>H</sub>1区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在一些具体实施方案中,本文所述的分子包含IgG C<sub>H</sub>2区、人 $\mu$ 尾段(SEQ ID NO:1)、IgG铰链区、IgG C<sub>H</sub>3区和IgG C<sub>H</sub>1区,其中在该IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。在上述实施方案中,不同区的顺序可以遵循野生型IgG中的顺序,或者可以不同于野生型IgG中的顺序,并且人 $\mu$ 尾段可以与分子的C-末端或N-末端缀合。

[0101] 对于本文所述的所有IgG、IgE、IgD、IgM、IgA区,变异可以是编码抗体或多肽的一个或多个密码子的取代、缺失或插入,其导致与天然序列抗体或多肽相比氨基酸序列的变化。氨基酸取代可以用具有相似结构和/或化学性质的另一种氨基酸取代一种氨基酸的结果,诸如用丝氨酸替换亮氨酸,例如保守氨基酸替换。本领域技术人员已知的标准技术可用于在编码本文提供的分子的核苷酸序列中引入突变,包括例如导致氨基酸取代的定点诱变和PCR介导的诱变。插入或缺失可以任选地在约1至5个氨基酸的范围内。在某些实施方案中,相对于原始分子,取代、缺失或插入包括少于25个氨基酸取代、少于20个氨基酸取代、少于15个氨基酸取代、少于10个氨基酸取代、少于5个氨基酸取代、少于4个氨基酸取代、少于3个氨基酸取代或少于2个氨基酸取代。在一个具体实施方案中,取代是在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处进行的保守氨基酸取代。允许的变异可以通过系统地在序列中进行氨基酸的插入、缺失或取代并测试所得变体的全长或成熟天然序列所表现出的活性来确定。

[0102] 除了IgG C<sub>H</sub>2区之外,本发明分子还可以包含其他IgG区。在一些实施方案中,本文提供的分子包含IgG C<sub>H</sub>1区。在一些实施方案中,本文提供的分子包含IgG铰链区。在一些实施方案中,本文提供的分子包含IgG C<sub>H</sub>3区。在一些实施方案中,本文提供的分子包含IgG C<sub>H</sub>1和C<sub>H</sub>2区。在一些实施方案中,本文提供的分子包含IgG C<sub>H</sub>1和C<sub>H</sub>3区。在一些实施方案中,本文提供的分子包含IgG铰链和C<sub>H</sub>2区。在一些实施方案中,本文提供的分子包含IgG铰链和C<sub>H</sub>3区。在一些实施方案中,本文提供的分子包含IgG C<sub>H</sub>2和C<sub>H</sub>3区。在一些实施方案中,本文提供的分子包含IgG C<sub>H</sub>1、铰链和C<sub>H</sub>2区。在一些实施方案中,本文提供的分子包含IgG C<sub>H</sub>1、

铰链和C<sub>H</sub>3区。在一些实施方案中,本文提供的分子包含IgG C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2和CH3区。在一些实施方案中,本文提供的分子包含IgG C<sub>H</sub>1、铰链、C<sub>H</sub>2和CH3区。

[0103] 在一些实施方案中,上一段中公开的IgG区来自人IgG。在一些具体实施方案中,上一段中公开的IgG区来自人IgG1。在一些具体实施方案中,上一段中公开的IgG区来自人IgG2。在一些具体实施方案中,上一段中公开的IgG区来自人IgG3。在一些具体实施方案中,上一段中公开的IgG区来自人IgG4。在一些具体实施方案中,上一段中公开的一个分子中的IgG区与不同的人IgG同种型混合。在其他实施方案中,上一段中公开的IgG区来自小鼠IgG。在其他实施方案中,上一段中公开的IgG区来自大鼠IgG。在其他实施方案中,上一段中公开的IgG区来自猴IgG、驴IgG、绵羊IgG、山羊IgG、豚鼠IgG、骆驼IgG、马IgG或鸡IgG。

#### [0104] 5.2.2结合分子

[0105] 除了如上文所公开的用于形成寡聚物的性质和结构之外,本文提供的分子还包含其他性质和功能。在某些实施方案中,本发明的分子是包含结合结构域的结合分子。在一些实施方案中,本发明的分子是抗体或其片段。在其他实施方案中,本文提供的分子的结合结构域包含非免疫球蛋白结合剂。在其他实施方案中,本文提供的分子的结合结构域包含通过反向互补结合与靶标形成特异性结合的核酸序列。

[0106] 在一些实施方案中,本文提供的分子的结合结构域包含抗体片段。示例性片段包括Fab片段(例如,含有抗原结合结构域并且包含由二硫键桥接的轻链和部分重链的抗体片段);Fab'(例如,含有单个抗原结合结构域的抗体片段,该抗原结合结构域包含Fab和通过铰链区的重链的附加部分);F(ab')<sub>2</sub>(例如,通过重链铰链区中的链间二硫键连接的两个Fab'分子;Fab'分子可以针对相同或不同的表位);双特异性Fab(例如,具有两个抗原结合结构域的Fab分子,每个抗原结合结构域可以针对不同的表位);包含可变区的单链(也称为scFv)(例如,通过10-25个氨基酸的链连接在一起的抗体的单条轻链和重链的可变抗原结合决定区);二硫键连接的Fv或dsFv(例如,通过二硫键连接在一起的抗体的单条轻链和重链的可变抗原结合决定区);骆驼化VH(例如,抗体的单条重链的可变抗原结合决定区,其中VH界面处的一些氨基酸是天然存在的骆驼抗体的重链中发现的那些);双特异性scFv(例如,具有两个抗原结合结构域的scFv或dsFv分子,每个抗原结合结构域可以针对不同的表位);双抗体(例如,当第一scFv的VH结构域与第二scFv的VL结构域组装并且第一scFv的VL结构域与第二scFv的VH结构域组装时形成的二聚化scFv;双抗体的两个抗原结合区可以针对相同或不同的表位);三抗体(例如,三聚化scFv,以类似于双抗体的方式形成,但其中在单个复合物中产生三个抗原结合结构域;三个抗原结合结构域可以针对相同或不同的表位);以及四抗体(例如,四聚化scFv,以类似于双抗体的方式形成,但其中在单个复合物中产生四个抗原结合结构域;四个抗原结合结构域可以针对相同或不同的表位)。

[0107] 已经开发了多种用于产生抗体片段的技术。传统上,这些片段是通过完整抗体的蛋白水解消化衍生的(参见例如Morimoto等人,1992,J.Biochem.Biophys.Methods 24:107-17;以及Brennan等人,1985,Science 229:81-83)。然而,这些片段现在可以由重组宿主细胞直接产生。Fab、Fv和scFv抗体片段均可以在大肠埃希氏菌或酵母细胞中表达和分泌,从而可以轻松地产生产大量这些片段。可以从抗体噬菌体文库中分离抗体片段。替代地,Fab'-SH片段可以直接从大肠埃希氏菌中回收并化学偶联以形成F(ab')<sub>2</sub>片段(Carter等人,1992,Bio/Technology 10:163-67)。根据另一种方法,F(ab')<sub>2</sub>片段可以直接从重组宿

主细胞培养物中分离。包含补救受体结合表位残基的具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段在例如美国专利号5,869,046中进行了描述。用于产生抗体片段的其他技术对于技术人员来说是显而易见的。在某些实施方案中,抗体是单链Fv片段(scFv)(参见例如WO 93/16185;美国专利号5,571,894和5,587,458)。Fv和scFv具有无恒定区的完整结合位点;因此,它们可能适于在体内使用期间减少非特异性结合。可以构建scFv融合蛋白以在scFv的氨基或羧基末端产生效应蛋白的融合(参见例如Borrebaeck编辑,同上)。抗体片段也可以是“线性抗体”,例如,如上文引用的参考文献中所描述的。此类线性抗体可以是单特异性的或多特异性的,诸如双特异性的。

[0108] 较小的抗体衍生结合结构是单独的可变结构域(V结构域),也称为单可变结构域抗体(sdAb)。某些类型的生物体,骆驼科动物和软骨鱼,具有安装在Fc等效结构域结构上的高亲和力的单个V样结构域,作为它们的免疫系统的一部分。(Woolven等人,1999, Immunogenetics 50:98-101;以及Streltsov等人,2004, Proc Natl Acad Sci USA. 101: 12444-49)。V样结构域(在骆驼科动物中称为VhH,在鲨鱼中称为V-NAR)通常显示出长的表面环,其允许穿透靶抗原的空腔。它们还通过掩蔽疏水性表面块来稳定分离的VH结构域。

[0109] 这些VhH和V-NAR结构域已用于工程化sdAb。已经使用从噬菌体文库中的选择和已经产生稳定高结合的VL和VH衍生的结构域的其他方法设计了人V结构域变体。

[0110] 本文提供的分子中的抗体片段可以为任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)的免疫球蛋白分子。

[0111] 本文所述的抗体可以例如包括人源化抗体,例如去免疫化的或复合的人抗体。

[0112] 人源化抗体可以包含人框架区和人恒定区序列。例如,人源化抗体可以包含人恒定区序列。在某些实施方案中,人源化抗体可以选自任何类别的免疫球蛋白,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何同种型,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4(例如,IgG4和IgG4无效抗体的变体)。在某些实施方案中,人源化抗体可以包含κ或λ轻链恒定序列。

[0113] 人源化抗体可以使用本领域已知的多种技术来产生,包括但不限于CDR移植(欧洲专利号EP 239,400;国际公开号WO 91/09967;以及美国专利号5,225,539、5,530,101和5,585,089)、镶面或表面重修(欧洲专利号EP 592,106和EP 519,596;Padlan,1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498;Studnicka等人,1994, Protein Engineering 7(6):805-814;以及Roguska等人,1994, PNAS 91:969-973)、链改组(美国专利号5,565,332)以及例如以下文献中公开的技术:美国专利号6,407,213、美国专利号5,766,886、WO 93/17105、Tan等人, J. Immunol. 169:1119-25(2002)、Caldas等人, Protein Eng. 13(5):353-60(2000)、Morea等人, Methods 20(3):267-79(2000)、Baca等人, J. Biol. Chem. 272(16):10678-84(1997)、Roguska等人, Protein Eng. 9(10):895-904(1996)、Couto等人, Cancer Res. 55(23Supp):5973s-5977s(1995)、Couto等人, Cancer Res. 55(8):1717-22(1995)、Sandhu JS, Gene 150(2):409-10(1994)和Pedersen等人, J. Mol. Biol. 235(3):959-73(1994)。还参见美国专利公开号US2005/0042664 A1(2005年2月24日),这些文献中的每一者以引用方式全文并入本文。

[0114] 用于人源化非人抗体的各种方法是本领域已知的。例如,人源化抗体可以具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。人源化可以例如按照Jones等人,1986, Nature 321:

522-25、Riechmann等人,1988,Nature 332:323-27和Verhoeyen等人,1988,Science 239:1534-36的方法进行,通过用高变区序列取代人抗体的相应序列。

[0115] 在一些情况下,人源化抗体通过CDR移植来构建,其中将亲本非人抗体(例如,啮齿动物)的六个CDR的氨基酸序列移植到人抗体框架上。例如,Padlan等人确定CDR中只有约三分之一的残基实际接触抗原,并将这些残基称为“特异性决定残基”或SDR(Padlan等人,1995,FASEB J.9:133-39)。在SDR移植技术中,仅将SDR残基移植到人抗体框架上(参见例如Kashmiri等人,2005,Methods 36:25-34)。

[0116] 用于制备人源化抗体的人可变结构域(轻链和重链)的选择对于降低抗原性可能非常重要。例如,根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知人可变结构域序列的整个文库筛选非人(例如,啮齿动物)抗体的可变结构域的序列。可以选择最接近啮齿动物的人序列作为人源化抗体的人框架(Sims等人,1993,J.Immunol.151:2296-308;以及Chothia等人,1987,J.Mol.Biol.196:901-17)。另一种方法使用源自轻链或重链的特定亚组的所有人抗体的共有序列的特定框架。相同的框架可用于几种不同的人源化抗体(Carter等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285-89;以及Presta等人,1993,J.Immunol.151:2623-32)。在一些情况下,框架源自最丰富的人类亚类VL6亚组I(VL6I)和VH亚组III(VHIII)的共有序列。在另一种方法中,使用人种系基因作为框架区的来源。

[0117] 在基于CDR比较的替代范例(称为超人源化)中,FR同源性是无关紧要的。该方法包括将非人序列与功能性人种系基因库进行比较。然后选择那些编码与鼠序列相同或密切相关的规范结构的基因。其次,在与非人抗体共有规范结构的基因中,选择那些在CDR内具有最高同源性的基因作为FR供体。最后,将非人CDR接枝到这些FR上(参见例如Tan等人,2002,J.Immunol.169:1119-25)。

[0118] 通常还希望将抗体人源化以保留其对抗原的亲合力和其他有利的生物学性质。为了实现该目的,根据一种方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产品的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是通常可获得的并且是本领域技术人员所熟悉的。可以获得说明和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。这些包括例如WAM(Whitelegg和Rees,2000,Protein Eng.13:819-24)、Modeller(Sali和Blundell,1993,J.Mol.Biol.234:779-815)和Swiss PDB Viewer(Guex和Peitsch,1997,Electrophoresis 18:2714-23)。检查这些显示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,例如,分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,可以从受体序列和输入序列中选择并组合FR残基,从而获得所需的抗体特征,诸如对一种或多种靶抗原的亲合力增加。通常,高变区残基直接且最显著地参与影响抗原结合。

[0119] 抗体人源化的另一种方法是基于称为Human String Content(HSC)的抗体人性度量。该方法将小鼠序列与人种系基因库进行比较,并将差异记为HSC。然后通过最大化其HSC而不是使用全局同一性测量来人源化靶序列以产生多种不同的人源化变体(Lazar等人,2007,Mol.Immunol.44:1986-98)。

[0120] 除了上述方法之外,还可以使用经验方法来产生和选择人源化抗体。这些方法包括基于产生人源化变体大型文库和使用富集技术或高通量筛选技术选择最佳克隆的方法。可以从噬菌体、核糖体和酵母展示文库以及通过细菌菌落筛选来分离抗体变体(参见例如

Hoogenboom, 2005, *Nat. Biotechnol.* 23:1105-16; Dufner 等人, 2006, *Trends Biotechnol.* 24:523-29; Feldhaus 等人, 2003, *Nat. Biotechnol.* 21:163-70; 以及 Schlapschy 等人, 2004, *Protein Eng. Des. Sel.* 17:847-60)。

[0121] 在FR文库方法中,在FR中的特定位置引入一组残基变体,随后筛选文库以选择最佳支持接枝的CDR的FR。待取代的残基可以包括一些或全部被鉴定为对CDR结构有潜在贡献的“Vernier”残基(参见例如Foote和Winter, 1992, *J. Mol. Biol.* 224:487-99),或来自Baca 等人(1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84)鉴定的更有限的一组目标残基。

[0122] 在FR改组中,整个FR与非人CDR组合而不是创建所选残基变体的组合文库(参见例如Dall’Acqua 等人, 2005, *Methods* 36:43-60)。可以以两步法筛选文库的结合,首先人源化VL,然后人源化VH。可替代地,可以使用一步FR改组法。这种方法已被证明比两步筛选更有效,因为所得抗体表现出改善的生物化学和物理化学性质,包括增强的表达、增加的亲和力和热稳定性(参见例如Damschroder 等人, 2007, *Mol. Immunol.* 44:3049-60)。

[0123] “人工程化”方法基于必需最小特异性决定簇(MSD)的实验鉴定,并且基于将非人片段顺序替换到人FR文库中并评估结合。它从非人VH和VL链的CDR3区开始,并逐渐将非人抗体的其他区替换为人FR,包括VH和VL的CDR1和CDR2。这种方法通常会保留表位并识别来自具有不同人V区段CDR的多个亚类的抗体。人工程化允许分离与人种系基因抗体91%-96%同源的抗体(参见例如Alfenito, Cambridge Healthtech Institute’s Third Annual PEGS, The Protein Engineering Summit, 2007)。

[0124] “人工程化”方法涉及通过对抗体的氨基酸序列进行特异性改变来改变非人抗体或抗体片段,诸如小鼠或嵌合抗体或抗体片段,从而产生在人体内免疫原性降低但仍保留原始非人抗体所需的结合特性的修饰抗体。通常,该技术涉及将非人(例如,小鼠)抗体的氨基酸残基分类为“低风险”、“中风险”或“高风险”残基。该分类是使用总体风险/回报计算进行的,该计算评估进行特定取代(例如,针对人的免疫原性)的预测益处与取代将影响所得抗体折叠的风险。可以通过将非人抗体可变区的氨基酸序列与特定或共有人抗体序列的相应区域进行比对来选择在非人(例如,小鼠)抗体序列的给定位置(例如,低风险或中风险)处待取代的特定人氨基酸残基。根据比对,非人序列中处于低风险或中风险位置的氨基酸残基可以取代人抗体序列中的相应残基。用于制备人类工程化蛋白质的技术在Studnicka 等人, 1994, *Protein Engineering* 7:805-14、美国专利号5,766,886、5,770,196、5,821,123和5,869,619以及PCT公开W0 93/11794中进行了更详细的描述。

[0125] 复合人抗体可以使用例如Composite Human Antibody<sup>TM</sup>技术(Antitope Ltd., Cambridge, United Kingdom)来产生。为了产生复合人抗体,以避免T细胞表位的方式从多个人抗体可变区序列的片段设计可变区序列,从而最小化所得抗体的免疫原性。此类抗体可包含人恒定区序列,例如人轻链和/或重链恒定区。

[0126] 在一些实施方案中,本文提供的分子含有去免疫化的抗体片段,其T细胞表位已被去除。已经描述了用于制备去免疫化抗体的方法。参见例如Jones 等人, *Methods Mol Biol.* 2009;525:405-23, xiv和De Groot 等人, *Cell. Immunol.* 244:148-153 (2006)。去免疫化抗体包含T细胞表位缺失的可变区和人恒定区。简而言之,克隆抗体的VH和VL,随后通过在T细胞增殖测定中测试源自抗体的VH和VL的重叠肽来鉴定T细胞表位。通过计算机模拟方法鉴定T细胞表位,以鉴定与人MHC II类结合的肽。在VH和VL中引入突变以消除与人MHC II

类的结合。然后利用突变的VH和VL产生去免疫化抗体。

[0127] 在具体实施方案中,本文所述的分子源自全人抗人抗体。全人抗体可以通过本领域已知的任何方法产生。本文提供的人抗体片段可以通过将选自人来源的噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列与已知的人恒定结构域序列组合来构建。替代地,本公开的人单克隆抗体可以通过杂交瘤方法制备。用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异质骨髓瘤细胞系已由例如Kozbor,1984,J.Immunol.133:3001-05;Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63(1987)和Boerner等人,1991,J.Immunol.147:86-95进行了描述。

[0128] 还可以产生转基因动物(例如,小鼠),其在免疫后能够在没有内源性免疫球蛋白产生的情况下产生完整的人抗体库。表达人抗体库的转基因小鼠已被用于产生针对多种潜在药物靶标的高亲和力人序列单克隆抗体(参见例如Jakobovits,A.,1995,Curr.Opin.Biotechnol.6(5):561-66;Brüggemann和Taussing,1997,Curr.Opin.Biotechnol.8(4):455-58;美国专利号6,075,181和6,150,584;以及Lonberg等人,2005,Nature Biotechnol.23:1117-25)。

[0129] 可替代地,可以通过产生针对靶抗原的抗体的人B淋巴细胞的永生化来制备人抗体(例如,此类B淋巴细胞可以从个体回收或者可以已在体外免疫)(参见例如Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy(1985);Boerner等人,1991,J.Immunol.147(1):86-95;以及美国专利号5,750,373)。

[0130] 基因改组也可用于从非人(例如,啮齿动物)抗体衍生人抗体,其中人抗体与起始非人抗体具有相似的亲和力和特异性。根据该方法,也称为“表位印记”或“导向选择”,用人V结构域基因库替换通过本文所述的噬菌体展示技术获得的非人抗体片段的重链或轻链可变区,从而产生非人链/人链scFv或Fab嵌合体群体。用抗原进行选择导致非人链/人链嵌合scFv或Fab的分离,其中人链恢复了在去除初级噬菌体展示克隆中的相应非人链后被破坏的抗原结合位点(例如,表位导向(印记)人链配偶体的选择)。当重复该过程以替换剩余的非人链时,获得了人抗体(参见例如PCT WO 93/06213;以及Osborn等人,2005,Methods 36:61-68)。与传统的通过CDR移植对非人抗体进行人源化不同,该技术提供了全人抗体,其没有非人来源的FR或CDR残基。使针对细胞表面抗原的小鼠抗体人源化的导向选择的实例包括卵巢癌细胞上存在的叶酸结合蛋白(参见例如Figini等人,1998,Cancer Res.58:991-96)和在肝细胞癌上高度表达的CD147(参见例如Bao等人,2005,Cancer Biol.Ther.4:1374-80)。

[0131] 导向选择方法的一个潜在缺点是,改组一条抗体链同时保持另一条抗体链不变可能会导致表位漂移。为了维持非人抗体识别的表位,可以应用CDR保留(参见例如Klimka等人,2000,Br.J.Cancer.83:252-60;以及Beiboer等人,2000,J.Mol.Biol.296:833-49)。在该方法中,通常保留非人VH CDR3,因为该CDR可以位于抗原结合位点的中心,并且可以是用于抗原识别的抗体的最重要区域。然而,在一些情况下,可以保留非人抗体的VH CDR3和VL CDR3以及VH CDR2、VL CDR2和VL CDR1。

[0132] 多特异性抗体诸如双特异性抗体是对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,本文提供的多特异性抗体是双特异性抗体。在某些实施方案中,双特异性抗体是小鼠抗体、嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。在某些实施方案中,结合特

异性中的一种是针对一种靶标/抗原,而另一种是针对另一种靶标/抗原。在某些实施方案中,双特异性抗体可以结合同一靶标/抗原的两个不同表位。双特异性抗体可以制备为全长抗体或抗体片段(例如,F(ab')<sub>2</sub>双特异性抗体)。

[0133] 用于制备多特异性抗体的方法是本领域已知的,诸如通过两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中这两个重链具有不同的特异性(参见例如Milstein和Cuello,1983, Nature 305:537-40)。关于产生多特异性抗体(例如,双特异性抗体)的更多详细信息,参见例如双特异性抗体(Kontermann编辑,2011)。

[0134] 如果本文所述的分子含有C<sub>H</sub>1区、铰链区、C<sub>H</sub>2区和/或C<sub>H</sub>3区,则可能需要通过Fc工程化修饰本文所述的分子。在某些实施方案中,对本文所述的分子中上述区域的修饰导致抗体效应子功能的降低或消除。在某些实施方案中,效应子功能是抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。在一些实施方案中,效应子功能是ADCC。在其他实施方案中,效应子功能是ADCP。在其他实施方案中,效应子功能是CDC。在一个实施方案中,效应子功能是ADCC和ADCP。在一个实施方案中,效应子功能是ADCC和CDC。在一个实施方案中,效应子功能是ADCP和CDC。在一个实施方案中,效应子功能是ADCC、ADCP和CDC。这可以通过在本文所述的分子的Fc区中引入一个或多个氨基酸取代来实现。

[0135] 为了增加本文所述的分子的血清半衰期,可以将补救受体结合表位掺入分子中,例如,如美国专利号5,739,277中所描述的。术语“补救受体结合表位”是指负责增加IgG分子的体内血清半衰期的IgG分子(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc区的表位。

[0136] 在一些实施方案中,考虑了本文提供的分子的氨基酸序列修饰。例如,可能需要改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学性质,包括但不限于特异性、热稳定性、表达水平、效应子功能、糖基化、降低的免疫原性或溶解度。因此,除了本文所述的分子及其抗体片段之外,还考虑可以制备抗体变体。例如,可以通过将适当的核苷酸变化引入编码DNA中和/或通过合成所需抗体或多肽来制备抗体变体。本领域技术人员将理解,氨基酸变化可以改变抗体的翻译后过程,诸如改变糖基化位点的数量或位置或改变膜锚定特性。

[0137] 在一些实施方案中,本文提供的分子是化学修饰的,例如通过将任何类型的其他分子共价连接至该分子。抗体衍生物可以包括已经被化学修饰的抗体,例如,通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团的衍生化、蛋白水解裂解、与细胞配体或其他蛋白质的连接等。多种化学修饰中的任一种可以通过已知的技术进行,包括但不限于衣霉素的特定化学裂解、乙酰化、配制、代谢合成等。另外,抗体可以含有一个或多个非经典氨基酸。

[0138] 变异可以是编码抗体或多肽的一个或多个密码子的取代、缺失或插入,其导致与天然序列抗体或多肽相比氨基酸序列的变化。氨基酸取代可以用具有相似结构和/或化学性质的另一种氨基酸取代一种氨基酸的结果,诸如用丝氨酸替换亮氨酸,例如保守氨基酸替换。本领域技术人员已知的标准技术可用于在编码本文提供的分子的核苷酸序列中引入突变,包括例如导致氨基酸取代的定点诱变和PCR介导的诱变。插入或缺失可以任选地在约1至5个氨基酸的范围内。在某些实施方案中,相对于原始分子,取代、缺失或插入包括少于25个氨基酸取代、少于20个氨基酸取代、少于15个氨基酸取代、少于10个氨基酸取代、少于5个氨基酸取代、少于4个氨基酸取代、少于3个氨基酸取代或少于2个氨基酸取代。在一个

具体实施方案中,取代是在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处进行的保守氨基酸取代。允许的变异可以通过系统地在序列中进行氨基酸的插入、缺失或取代并测试所得变体的全长或成熟天然序列所表现出的活性来确定。

[0139] 氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基至含有一百或更多个残基的多肽的氨基-和/或羧基-末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N-末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N-或C-末端与酶(例如,用于抗体导向的酶前药治疗)或延长抗体的血清半衰期的多肽的融合。

[0140] “保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基取代的取代。具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 $\beta$ -支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。替代地,可以沿着全部或部分编码序列随机引入突变,诸如通过饱和诱变,并且可以筛选所得突变体的生物活性以鉴定保留活性的突变体。诱变后,可以表达编码的蛋白质并且可以测定蛋白质的活性。

[0141] 抗体生物学特性的实质性修饰是通过选择取代来实现的,所述取代在对维持(a)取代区域中多肽主链的结构(例如,以片状或螺旋构象形式)、(b)靶位点处分子的电荷或疏水性或(c)侧链的大小的效果方面显著不同。替代地,可以进行保守(例如,在具有相似性质和/或侧链的氨基酸基团内)取代,以便维持或不显著改变性质。氨基酸可以根据它们的侧链的性质的相似性进行分组(参见例如Lehninger, Biochemistry 73-75(第2版1975)): (1) 非极性:Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M); (2) 不带电荷的极性:Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q); (3) 酸性:Asp(D)、Glu(E); 以及(4) 碱性:Lys(K)、Arg(R)、His(H)。

[0142] 替代地,天然存在的残基可以基于共同的侧链性质进行分组: (1) 疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile; (2) 中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln; (3) 酸性:Asp、Glu; (4) 碱性:His、Lys、Arg; (5) 影响链取向的残基:Gly、Pro; 以及(6) 芳香性:Trp、Tyr、Phe。

[0143] 不参与维持本文提供的抗体的正确构象的任何半胱氨酸残基也可以例如用另一种氨基酸诸如丙氨酸或丝氨酸取代,以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。

[0144] 在一些实施方案中,可以通过体外亲和力和成熟来制备具有抗体变体的分子,所述抗体变体与亲本分子相比具有改善的性质,诸如亲和力、稳定性或表达水平。与天然原型一样,体外亲和力成熟基于突变和选择的原理。抗体文库展示在生物体(例如,噬菌体、细菌、酵母或哺乳动物细胞)的表面上或与其编码mRNA或DNA结合(例如,共价或非共价)。展示的抗体的亲和力选择允许分离携带编码抗体的遗传信息的生物体或复合物。使用展示方法诸如噬菌体展示进行两轮或三轮突变和选择通常会产生亲和力在低纳摩尔范围内的抗体片段。具有亲和力成熟抗体的分子可以对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。

[0145] 噬菌体展示是一种用于展示和选择抗体的普遍方法。抗体作为与噬菌体外壳蛋白的融合体展示在Fd或M13噬菌体的表面上。选择涉及暴露于抗原以使噬菌体展示的抗体结合它们的靶标,该过程称为“淘选”。回收与抗原结合的噬菌体并用于感染细菌以产生噬菌

体用于更多轮数的筛选。关于综述,参见例如Hoogenboom,2002,Methods.Mol.Biol.178:1-37;以及Bradbury和Marks,2004,J.Immunol.Methods 290:29-49。

[0146] 在酵母展示系统中(参见例如Boder等人,1997,Nat.Biotech.15:553-57;以及Chao等人,2006,Nat.Protocols 1:755-68)中,抗体可以与酵母凝集素蛋白Aga2p的粘附亚基融合,后者通过与Aga1p的二硫键附着于酵母细胞壁。通过Aga2p展示蛋白质使蛋白质远离细胞表面,最小化与酵母细胞壁上其他分子的潜在相互作用。使用磁性分离和流式细胞术来筛选文库以选择具有改善的亲合力或稳定性的抗体。通过用生物素化抗原和与荧光团缀合的二级试剂诸如链霉抗生物素标记酵母来确定与目标可溶性抗原的结合。可以通过免疫荧光标记位于scFv侧翼的血凝素或c-Myc表位标签来测量抗体表面表达的变化。已证明表达与展示蛋白质的稳定性相关,并且因此可以选择抗体以改善稳定性以及亲合力(参见例如Shusta等人,1999,J.Mol.Biol.292:949-56)。酵母展示的另一个优点是,利用内质网伴侣和质量控制机制,展示的蛋白质在真核酵母细胞的内质网中折叠。成熟完成后,抗体亲合力可以方便地“滴定”,同时展示在酵母表面,从而无需表达和纯化每个克隆。酵母表面展示的一个理论限制是功能文库的大小可能比其他展示方法更小;然而,最近的一种方法使用酵母细胞的交配系统来产生大小估计为 $10^{14}$ 的组合多样性(参见例如美国专利公开2003/0186374;以及Blaise等人,2004,Genes 342:211-18)。

[0147] 在核糖体展示中,产生抗体-核糖体-mRNA (ARM) 复合物,用于在无细胞系统中进行选择。编码特定抗体文库的DNA文库与缺乏终止密码子的间隔序列基因融合。该间隔序列在翻译后仍然附着于肽基tRNA上并占据核糖体通道,从而使目标蛋白质伸出核糖体并折叠。所得的mRNA、核糖体和蛋白质的复合物可以与表面结合的配体结合,从而允许通过与配体的亲和捕获同时分离抗体及其编码mRNA。然后核糖体结合的mRNA被逆转录回cDNA,其然后可以经历诱变并用于下一轮选择(参见例如Fukuda等人,2006,Nucleic Acids Res.34:e127)。在mRNA展示中,使用嘌呤霉素作为接头分子在抗体与mRNA之间建立共价键(Wilson等人,2001,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98:3750-55)。

[0148] 由于这些方法完全在体外进行,因此它们提供了优于其他选择技术的两个主要优点。首先,文库的多样性不受细菌细胞转化效率的限制,而仅受试管中存在的核糖体和不同mRNA分子的数量限制。其次,可以在每轮选择后轻松地引入随机突变,例如通过非校对聚合酶,因为在任何多样化步骤后不必转化文库。在一些实施方案中,可以使用哺乳动物展示系统。

[0149] 还可以以靶向方式或通过随机引入将多样性引入抗体文库的CDR中。前一种方法包括通过高水平或低水平的诱变顺序靶向抗体的所有CDR或靶向体细胞超突变的分离热点(参见例如Ho等人,2005,J.Biol.Chem.280:607-17)或基于实验或结构原因怀疑影响亲和力的残基。还可以通过DNA改组或类似技术替换天然多样性的区域来引入多样性(参见例如Lu等人,2003,J.Biol.Chem.278:43496-507;美国专利号5,565,332和6,989,250)。替代技术针对延伸至框架区残基中的高变环(参见例如Bond等人,2005,J.Mol.Biol.348:699-709),采用CDR中的环缺失和插入或使用基于杂交的多样化(参见例如美国专利公开号2004/0005709)。在CDR中产生多样性的其他方法公开于例如美国专利号7,985,840中。可用于产生抗体文库和/或抗体亲合力成熟的其他方法公开于例如美国专利号8,685,897和8,603,930以及美国公开2014/0170705、2014/0094392、2012/0028301、2011/0183855和2009/

0075378中,这些文献中的每一篇以引用方式并入本文。

[0150] 文库的筛选可以通过本领域已知的各种技术来完成。例如,可以将抗体固定在固相支持物、柱、针或纤维素/聚(偏二氟乙烯)膜/其他滤膜上,在附着于吸附板的宿主细胞上表达或用于细胞分选,或与生物素缀合以用链霉亲和素包被的珠捕获,或用于任何其他方法以淘选展示文库。

[0151] 关于体外亲和力成熟方法的综述,参见例如Hoogenboom,2005,Nature Biotechnology 23:1105-16;Quiroz和Sinclair,2010,Revista Ingenieria Biomedica 4: 39-51;以及其中的参考文献。

[0152] 本文提供的分子的一个或多个抗体片段的共价修饰包括在本公开的范围。共价修饰包括使抗体的靶氨基酸残基与有机衍生剂反应,该有机衍生剂能够与分子的抗体片段的选定侧链或N-或C-末端残基反应。其他修饰包括谷氨酰胺和天冬酰胺残基分别脱酰胺为相应的谷氨酰和天冬氨酰残基,脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酰或苏氨酰残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 $\alpha$ -氨基的甲基化(参见例如Creighton, Proteins:Structure and Molecular Properties 79-86(1983)),N-末端胺的乙酰化和任何C-末端羧基的酰胺化。

[0153] 包括在本公开范围内的本文提供的分子的抗体片段的其他类型的共价修饰包括改变抗体或多肽的天然糖基化模式(参见例如Beck等人,2008,Curr.Pharm.Biotechnol.9: 482-501;以及Walsh,2010,Drug Discov.Today 15:773-80),并且以例如美国专利号4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192或4,179,337中所述的方式将抗体连接至多种非蛋白质聚合物例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯中的一种。

[0154] 本公开的分子的抗体片段还可以被修饰以形成嵌合分子,所述嵌合分子包含与另一种异源多肽或氨基酸序列(例如,表位标签)融合的分子的抗体片段(参见例如Terpe, 2003,Appl.Microbiol.Biotechnol.60:523-33)或IgG分子的另一个Fc区(参见例如Aruffo,Antibody Fusion Proteins 221-42(Chamow和Ashkenazi编辑,1999))。

[0155] 本公开还提供了缀合物,其包含通过合成接头与一种或多种非抗体药剂共价结合的本公开的任一种抗体。

[0156] 在一些实施方案中,本文提供的分子的一种或多种抗体片段与例如治疗剂(例如,细胞毒性剂)或诊断或可检测分子缀合或重组融合。该分子的一种或多种缀合或重组融合抗体片段可用于例如治疗或预防疾病或病症。缀合的或重组融合的抗体可用于例如监测或预测疾病的发作、发展、进展和/或严重程度。

[0157] 这样的诊断和检测可以例如通过将分子的一种或多种抗体片段与可检测物质偶联来完成,所述可检测物质包括但不限于各种酶,例如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,例如但不限于链霉亲和素/生物素或亲和素/生物素;荧光材料,例如但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,例如但不限于鲁米诺;生物发光材料,例如但不限于荧光素酶、荧光素或水母发光蛋白;化学发光材料,例如但不限于吖啶鎓基化合物或HALOTAG;放射性材料,例如但不限于碘( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 和 $^{121}\text{I}$ )、碳( $^{14}\text{C}$ )、硫( $^{35}\text{S}$ )、氚( $^3\text{H}$ )、铟( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 和 $^{111}\text{In}$ )、锝( $^{99}\text{Tc}$ )、钛( $^{201}\text{Ti}$ )、镓( $^{68}\text{Ga}$ 和 $^{67}\text{Ga}$ )、钯( $^{103}\text{Pd}$ )、钼( $^{99}\text{Mo}$ )、氙( $^{133}\text{Xe}$ )、氟( $^{18}\text{F}$ )、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、

186Re、188Re、142Pr、105Rh、97Ru、68Ge、57Co、65Zn、85Sr、32P、153Gd、169Yb、51Cr、54Mn、75Se、113Sn或117Sn；使用各种正电子发射断层扫描技术的正电子发射金属；以及非放射性顺磁性金属离子。

[0158] 本文还提供了与异源蛋白或多肽(或其片段,例如,与约10、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90或约100个氨基酸的多肽)重组融合或化学缀合(共价或非共价缀合)以产生融合蛋白的分子的一种或多种抗体片段及其用途。具体地,本文提供了包含靶向区域和异源蛋白质、多肽或肽的融合蛋白。在一个实施方案中,抗体所融合的异源蛋白质、多肽或肽可用于将抗体靶向特定细胞类型。

[0159] 此外,本文提供的抗体可以与标记或“标签”序列(诸如肽)融合,以促进纯化。在具体实施方案中,标记或标签氨基酸序列是六组氨酸肽,诸如pQE载体(参见例如QIAGEN, Inc.)中提供的标签,其中许多是可商购的。例如,如Gentz等人,1989, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:821-24中所描述的,六组氨酸方便了融合蛋白的纯化。可用于纯化的其他肽标签包括但不限于血凝素(“HA”)标签(其对应于源自流感血凝素蛋白的表位(Wilson等人,1984,Cell 37:767-78)) and “FLAG”标签。

[0160] 用于将部分(包括多肽)与抗体融合或缀合的方法是已知的(参见例如Arnon等人, Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 243-56 (Reisfeld等人编辑,1985); Hellstrom等人, Antibodies for Drug Delivery, Controlled Drug Delivery 623-53 (Robinson等人编辑,第2版1987); Thorpe, Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review, Monoclonal Antibodies: Biological and Clinical Applications 475-506 (Pinchera等人编辑,1985); Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy, Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy 303-16 (Baldwin等人编辑,1985); Thorpe等人, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58; 美国专利号5,336,603、5,622,929、5,359,046、5,349,053、5,447,851、5,723,125、5,783,181、5,908,626、5,844,095 和5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; EP 394,827; PCT公开WO 91/06570、WO 96/04388、WO 96/22024、WO 97/34631 和 WO 99/04813; Ashkenazi 等人, 1991, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88:10535-39; Traunecker 等人, 1988, Nature, 331:84-86; Zheng 等人, 1995, J. Immunol. 154:5590-600; 以及 Vil 等人, 1992, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89: 11337-41)。

[0161] 融合蛋白可以例如通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为“DNA改组”)的技术产生。DNA改组可用于改变本文提供的抗体的活性,包括例如具有较高亲和力和较低解离速率的抗体(参见例如美国专利号5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252 和 5,837,458; Patten 等人, 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson 等人, 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; 以及 Lorenzo 和 Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-13)。抗体或编码的抗体可以通过在重组前通过易错PCR、随机核苷酸插入或其他方法进行随机诱变来改变。编码本文提供的抗体的多核苷酸可以与一种或多种异源分子的一种或多种组分、基序、区段、部分、结构域、片段等重组。

[0162] 本文提供的分子的一种或多种抗体片段还可与第二抗体缀合以形成抗体杂缀合物,如例如美国专利号4,676,980中所描述的。

[0163] 如本文所提供的分子的一种或多种抗体片段也可以附着于固体支持物,这对于免疫测定或纯化靶抗原特别有用。此类固体支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0164] 接头可以是促进缀合剂在细胞中释放的“可裂解接头”,但本文也考虑了不可裂解接头。用于本公开的缀合物的接头包括但不限于酸不稳定接头(例如,脲接头)、含二硫键的接头、肽酶敏感性接头(例如,包含氨基酸例如缬氨酸和/或瓜氨酸的肽接头,诸如瓜氨酸-缬氨酸或苯丙氨酸-赖氨酸)、光不稳定接头、二甲基接头(参见例如Chari等人,1992, *Cancer Res.* 52:127-31;以及美国专利号5,208,020)、硫醚接头或设计用于逃避多药物转运蛋白介导的抗性的亲水性接头(参见例如Kovtun等人,2010, *Cancer Res.* 70:2528-37)。

[0165] 抗体和药剂的缀合物可以使用多种双功能蛋白偶联剂制备,诸如BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC、磺基-SMPB和SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基磺)苯甲酸酯)。本公开还考虑了可以使用本领域公开的任何合适的方法来制备抗体和药剂的缀合物(参见例如Bioconjugate Techniques(Hermanson编辑,第2版2008))。

[0166] 用于抗体和药剂的常规缀合策略基于涉及Lys残基的 $\epsilon$ -氨基或Cys残基的硫醇基的随机缀合化学,这产生异质缀合物。最近开发的技术允许与抗体进行位点特异性缀合,从而实现均匀负载并避免具有改变的抗原结合或药代动力学的缀合物亚群体。这些包括“thiomabs”的工程化,在重链和轻链上的提供反应性硫醇基团并且不破坏免疫球蛋白折叠和组装或改变抗原结合的位置处包含半胱氨酸取代(参见例如Junutula等人,2008, *J. Immunol. Meth.* 332:41-52;以及Junutula等人,2008, *Nature Biotechnol.* 26:925-32)。在另一种方法中,通过从终止到硒代半胱氨酸插入重新编码终止密码子UGA将硒代半胱氨酸共翻译地插入到抗体序列中,从而允许在存在其他天然氨基酸情况下在硒代半胱氨酸的亲核硫醇基团处进行位点特异性共价缀合(参见例如Hofer等人,2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:12451-56;以及Hofer等人,2009, *Biochemistry* 48(50):12047-57)。

[0167] 在一些实施方案中,本文提供的分子的靶向区域包含非免疫球蛋白结合剂。非免疫球蛋白结合剂通过酶-底物、受体-配体或其他蛋白质-蛋白质相互作用与靶标形成特异性结合。在一些实施方案中,非免疫球蛋白结合剂被鉴定为在竞争性结合测定中置换被本公开的分子或被本公开的分子置换的药剂。这些替代结合剂可以包括例如本领域已知的任何工程化蛋白质支架。此类支架包括例如抗运载蛋白,其基于脂质运载蛋白支架,该脂质运载蛋白支架是一种以刚性 $\beta$ -桶为特征的蛋白质结构,其支持形成配体结合位点的四个高变环。新的结合特异性可以通过环区域中的靶向随机诱变,结合功能展示和导向选择来工程化(参见例如Skerra,2008, *FEBS J.* 275:2677-83)。其他合适的支架可以包括例如基于人纤连蛋白III的第十个胞外结构域的adnectin或单抗体(参见例如Koide和Koide,2007, *Methods Mol. Biol.* 352:95-109);基于葡萄球菌蛋白A的Z结构域的亲抗体(参见例如Nygren等人,2008, *FEBS J.* 275:2668-76);基于锚蛋白重复蛋白的DARPin(参见例如Stumpp等人,2008, *Drug Discov. Today* 13:695-701);基于人Fyn蛋白激酶的SH3结构域的fynomer

(参见例如Grabulovski等人,2007,J.Biol.Chem.282:3196-204);基于来自嗜酸热硫化叶菌(*Sulfolobus acidolarius*)的Sac7d的亲合素(参见例如Krehenbrink等人,2008,J.Mol.Biol.383:1058-68);基于人 $\gamma$ -B-晶状体蛋白的亲合素(参见例如Ebersbach等人,2007,J.Mol.Biol.372:172-85);基于膜受体蛋白的A结构域的avimer(参见例如Silverman等人,2005,Biotechnol.23:1556-61);富含半胱氨酸的knottin肽(参见例如Kolmar,2008,FEBS J.275:2684-90);以及工程化kunitz型抑制剂(参见例如Nixon和Wood,2006,Curr.Opin.Drug.Discov.Dev.9:261-68)。关于综述,参见例如Gebauer和Skerra,2009,Curr.Opin.Chem.Biol.13:245-55。

[0168] 为了确保从宿主细胞分泌的本文所述分子的最大产量水平,可以添加信号肽片段。在一些实施方案中,本文公开的分子包含信号肽(SEQ ID NO.2)。在其他实施方案中,本文公开的分子与SEQ ID NO.2具有至少95%的同一性。在其他实施方案中,本文公开的分子与SEQ ID NO.2具有至少90%的同一性。在其他实施方案中,本文公开的分子与SEQ ID NO.2具有至少85%的同一性。在其他实施方案中,本文公开的分子与SEQ ID NO.2具有至少80%的同一性。在其他实施方案中,本文公开的分子与SEQ ID NO.2具有至少70%的同一性。在其他实施方案中,本文公开的分子与SEQ ID NO.2具有至少60%的同一性。在其他实施方案中,本文公开的分子与SEQ ID NO.2具有至少50%的同一性。

[0169] 本发明分子的结合结构域能够结合一种或多种抗原。在一些实施方案中,抗原可以作为与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标记。在一些实施方案中,抗原是肿瘤抗原。

[0170] 在一些实施方案中,靶细胞的抗原是癌细胞表面上的抗原。在一些实施方案中,抗原是肿瘤特异性抗原、肿瘤相关抗原或新抗原。在一些实施方案中,靶细胞是癌细胞,例如肾上腺癌、肛门癌、阑尾癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、胆囊癌、妊娠滋养层细胞癌、头颈癌、霍奇金淋巴瘤、肠癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤(MM)、神经内分泌肿瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、鼻窦癌、皮肤癌、软组织肉瘤、脊柱癌、胃癌、睾丸癌、喉癌、甲状腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、阴道癌或外阴癌的细胞。在一些实施方案中,癌症是肾上腺癌、肛门癌、阑尾癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、胆囊癌、妊娠滋养层细胞癌、头颈癌、霍奇金淋巴瘤、肠癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤(MM)、神经内分泌肿瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、鼻窦癌、皮肤癌、软组织肉瘤、脊柱癌、胃癌、睾丸癌、喉癌、甲状腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、阴道癌或外阴癌。在一些实施方案中,癌症是肾上腺癌。在一些实施方案中,癌症是肛门癌。在一些实施方案中,癌症是阑尾癌。在一些实施方案中,癌症是胆管癌。在一些实施方案中,癌症是膀胱癌。在一些实施方案中,癌症是骨癌。在一些实施方案中,癌症是脑癌。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌。在一些实施方案中,癌症是宫颈癌。在一些实施方案中,癌症是结肠直肠癌。在一些实施方案中,癌症是食道癌。在一些实施方案中,癌症是胆囊癌。在一些实施方案中,癌症是妊娠滋养层细胞癌。在一些实施方案中,癌症是头颈癌。在一些实施方案中,癌症是霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是肠癌。在一些实施方案中,癌症是肾癌。在一些实施方案中,癌症是白血病。在一些实施方案中,癌症是肝癌。在一些实施方案中,癌症是肺癌。在一些实施方案中,癌症是黑色素瘤。在一些实施方案中,癌症是间皮瘤。在一些实施方案

中,癌症是多发性骨髓瘤(MM)。在一些实施方案中,癌症是神经内分泌肿瘤。在一些实施方案中,癌症是非霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是口腔癌。在一些实施方案中,癌症是卵巢癌。在一些实施方案中,癌症是胰腺癌。在一些实施方案中,癌症是前列腺癌。在一些实施方案中,癌症是鼻窦癌。在一些实施方案中,癌症是皮肤癌。在一些实施方案中,癌症是软组织肉瘤、脊柱癌。在一些实施方案中,癌症是胃癌。在一些实施方案中,癌症是睾丸癌。在一些实施方案中,癌症是喉癌。在一些实施方案中,癌症是甲状腺癌。在一些实施方案中,癌症是子宫癌、子宫内膜癌。在一些实施方案中,癌症是阴道癌。在一些实施方案中,癌症是外阴癌。

[0171] 在一些实施方案中,肾上腺癌是肾上腺皮质癌(ACC)、肾上腺皮质癌、嗜铬细胞瘤或成神经细胞瘤。在一些实施方案中,肛门癌是鳞状细胞癌、泄殖腔癌、腺癌、基底细胞癌或黑素瘤。在一些实施方案中,阑尾癌是神经内分泌肿瘤(NET)、粘液性腺癌、杯状细胞类癌、肠型腺癌或印戒细胞腺癌。在一些实施方案中,胆管癌是肝外胆管癌、腺癌、肝门胆管癌、肝门周围胆管癌、远端胆管癌或肝内胆管癌。在一些实施方案中,膀胱癌是移行细胞癌(TCC)、乳头状癌、扁平癌、鳞状细胞癌、腺癌、小细胞癌或肉瘤。在一些实施方案中,骨癌是原发性骨癌、肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、骨巨细胞瘤、脊索瘤或转移性骨癌。在一些实施方案中,脑癌是星形细胞瘤、脑干神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、脑膜瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、混合性神经胶质瘤、垂体瘤、垂体腺瘤、颅咽管瘤、生殖细胞肿瘤、松果体区肿瘤、成神经管细胞瘤或原发性CNS淋巴瘤。在一些实施方案中,乳腺癌是乳腺腺癌、浸润性乳腺癌、非浸润性乳腺癌、乳腺肉瘤、化生性癌、腺囊性癌、叶状肿瘤、血管肉瘤、HER2阳性乳腺癌、三阴性乳腺癌或炎性乳腺癌。在一些实施方案中,宫颈癌是鳞状细胞癌或腺癌。在一些实施方案中,结肠直肠癌是结肠直肠腺癌、原发性结肠直肠淋巴瘤、胃肠道间质瘤、平滑肌肉瘤、类癌瘤、粘液性腺癌、印戒细胞腺癌、胃肠道类癌瘤或黑素瘤。在一些实施方案中,食管癌是腺癌或鳞状细胞癌。在一些实施方案中,胆囊癌是腺癌、乳头状腺癌、腺鳞癌、鳞状细胞癌、小细胞癌或肉瘤。在一些实施方案中,妊娠滋养层细胞疾病(GTD)是葡萄胎、妊娠滋养层细胞瘤形成(GTN)、绒毛膜癌、胎盘部位滋养层细胞肿瘤(PSTT)或上皮样滋养层细胞肿瘤(ETT)。在一些实施方案中,头颈癌是喉癌、鼻咽癌、下咽癌、鼻腔癌、鼻窦癌、唾液腺癌、口腔癌、口咽癌或扁桃体癌。在一些实施方案中,霍奇金淋巴瘤是典型霍奇金淋巴瘤、结节性硬化、混合细胞性、富含淋巴细胞、缺乏淋巴细胞或结节性淋巴细胞为主的霍奇金淋巴瘤(NLPHL)。在一些实施方案中,肠癌是小肠癌(small intestine cancer)、小肠癌(small bowel cancer)、腺癌、肉瘤、胃肠道间质瘤、类癌瘤或淋巴瘤。在一些实施方案中,肾癌是肾细胞癌(RCC)、透明细胞RCC、乳头状RCC、嫌色细胞RCC、集合管RCC、未分类RCC、移行细胞癌、尿路上皮癌、肾盂癌或肾肉瘤。在一些实施方案中,白血病是急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、毛细胞白血病(HCL)或骨髓增生异常综合征(MDS)。在一个具体的实施方案中,白血病是AML。在一些实施方案中,肝癌是肝细胞癌(HCC)、纤维板层HCC、胆管癌、血管肉瘤或肝转移。在一些实施方案中,肺癌是小细胞肺癌、小细胞癌、复合性小细胞癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、鳞状细胞肺癌、大细胞未分化癌、肺结节、转移性肺癌、腺鳞癌、大细胞神经内分泌癌、唾液腺型肺癌、肺类癌、间皮瘤、肺肉瘤样癌或恶性颗粒细胞肺肿瘤。在一些实施方案中,黑素瘤是浅表扩散性黑素瘤、结节性黑素瘤、肢端雀斑样黑素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、

无黑素性黑素瘤、促结缔组织增生性黑素瘤、眼部黑素瘤或转移性黑素瘤。在一些实施方案中,间皮瘤是胸膜间皮瘤、腹膜间皮瘤、心包间皮瘤或睾丸间皮瘤。在一些实施方案中,多发性骨髓瘤是活动性骨髓瘤或冒烟性骨髓瘤。在一些实施方案中,神经内分泌肿瘤是胃肠神经内分泌肿瘤、胰腺神经内分泌肿瘤或肺神经内分泌肿瘤。在一些实施方案中,非霍奇金淋巴瘤是间变性大细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、MALT淋巴瘤、小细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、前体T淋巴细胞白血病/淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、成人T细胞淋巴瘤/白血病(ATLL)、毛细胞白血病、B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区B细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、B细胞非霍奇金淋巴瘤、T细胞非霍奇金淋巴瘤、自然杀伤细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、阿利伯特-巴赞综合征(Alibert-Bazin syndrome)、塞扎里综合征(Sezary syndrome)、原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤(AITL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、系统性ALCL、肠病型T细胞淋巴瘤(EATL)或肝脾 $\gamma/\delta$ T细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,口腔癌是鳞状细胞癌、疣状癌、小唾液腺癌、淋巴瘤、良性口腔肿瘤、嗜酸性肉芽肿、纤维瘤、颗粒细胞瘤、角化棘皮瘤、平滑肌瘤、骨软骨瘤、脂肪瘤、神经鞘瘤、神经纤维瘤、乳头状瘤、尖锐湿疣、疣状黄瘤、化脓性肉芽肿、横纹肌瘤、牙源性肿瘤、粘膜白斑、粘膜红斑、鳞状细胞唇癌、基底细胞唇癌、口腔癌、牙龈癌或舌癌。在一些实施方案中,卵巢癌是卵巢上皮癌、粘液性上皮性卵巢癌、子宫内膜样上皮性卵巢癌、透明细胞上皮性卵巢癌、未分化上皮性卵巢癌、卵巢低恶性潜能肿瘤、原发性腹膜癌、输卵管癌、生殖细胞肿瘤、畸胎瘤、无性细胞瘤、卵巢生殖细胞癌、内胚层窦肿瘤、性索-基质肿瘤、性索-性腺基质肿瘤、卵巢基质肿瘤、颗粒细胞肿瘤、颗粒-膜肿瘤、支持-间质肿瘤、卵巢肉瘤、卵巢癌肉瘤、卵巢腺肉瘤、卵巢平滑肌肉瘤、卵巢纤维肉瘤、克鲁肯伯格肿瘤或卵巢囊肿。在一些实施方案中,胰腺癌是胰腺外分泌腺癌、胰腺内分泌腺癌或胰腺腺癌、胰岛细胞肿瘤或神经内分泌肿瘤。在一些实施方案中,前列腺癌是前列腺腺癌、前列腺肉瘤、移行细胞癌、小细胞癌或神经内分泌肿瘤。在一些实施方案中,鼻窦癌是鳞状细胞癌、粘膜细胞癌、腺样囊性细胞癌、腺泡细胞癌、鼻窦未分化癌、鼻腔癌、鼻旁窦癌、上颌窦癌、筛窦癌或鼻咽癌。在一些实施方案中,皮肤癌是基底细胞癌、鳞状细胞癌、黑素瘤、梅克尔细胞癌、卡波西肉瘤(KS)、光化性角化病、皮肤淋巴瘤或角化棘皮瘤。在一些实施方案中,软组织癌是血管肉瘤、皮肤纤维肉瘤、上皮样肉瘤、尤因氏肉瘤、纤维肉瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、卡波西肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、去分化脂肪肉瘤(DL)、粘液样/圆细胞脂肪肉瘤(MRCL)、高分化脂肪肉瘤(WDL)、恶性纤维组织细胞瘤、神经纤维肉瘤、横纹肌肉瘤(RMS)或滑膜肉瘤。在一些实施方案中,脊柱癌是脊柱转移性肿瘤。在一些实施方案中,胃癌是胃腺癌、胃淋巴瘤、胃肠道间质瘤、类癌瘤、胃类癌瘤、I型ECL细胞类癌、II型ECL细胞类癌或III型ECL细胞类癌。在一些实施方案中,睾丸癌是精原细胞瘤、非精原细胞瘤、胚胎瘤、卵黄囊瘤、绒毛膜瘤、畸胎瘤、性腺基质瘤、间质细胞瘤或支持细胞瘤。在一些实施方案中,喉癌是鳞状细胞癌、腺癌、肉瘤、喉癌、咽癌、鼻咽癌、口咽癌、下咽癌、喉癌、喉鳞状细胞癌、喉腺癌、淋巴上皮瘤、梭形细胞癌、疣状癌、未分化癌或淋巴结癌。在一些实施方案中,甲状腺癌是乳头状癌、滤泡状癌、Hürthle细胞癌、甲状腺髓样癌或间变

性癌。在一些实施方案中,子宫癌是子宫内膜癌、子宫内膜腺癌、子宫内膜样癌、浆液性腺癌、腺鳞癌、子宫癌肉瘤、子宫肉瘤、子宫平滑肌肉瘤、子宫内膜基质肉瘤或未分化肉瘤。在一些实施方案中,阴道癌是鳞状细胞癌、腺癌、黑素瘤或肉瘤。在一些实施方案中,外阴癌是鳞状细胞癌或腺癌。

[0172] 肿瘤抗原是由肿瘤细胞产生的蛋白质,其可以引发免疫响应,特别是T细胞介导的免疫响应。示例性肿瘤抗原包括但不限于神经胶质瘤相关抗原、癌胚抗原(CEA)、 $\beta$ -人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CAIX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶、前列腺特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、前列腺素、PSMA、HER2/neu、生存素和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白B2、胰岛素生长因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体和间皮素。

[0173] 在一些实施方案中,癌抗原是CEA、未成熟的层粘连蛋白受体、TAG-72、HPV E6、HPV E7、BING-4、钙激活的氯离子通道2、细胞周期蛋白-B1、9D7、EpCAM、EphA3、Her2/neu、端粒酶、间皮素、SAP-1、存活的、BAGE家族抗原、CAGE家族抗原、GAGE家族抗原、MAGE家族抗原、SAGE家族抗原、XAGE家族抗原、NY-ESO-1/LAGE-1、PRAME、SSX-2、Melan-A、MART-1、Gp100、pml17、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2、P.多肽、MC1R、前列腺特异性抗原、 $\beta$ -连环蛋白、BRCA1、BRCA2、CDK4、CML66、纤连蛋白、MART-2、p53、Ras、TGF- $\beta$ RII或MUC1。在一些实施方案中,癌抗原是CEA。在一些实施方案中,癌抗原是未成熟的层粘连蛋白受体。在一些实施方案中,癌抗原是TAG-72。在一些实施方案中,癌抗原是HPV E6。在一些实施方案中,癌抗原是HPV E7。在一些实施方案中,癌抗原是BING-4。在一些实施方案中,癌抗原是钙激活的氯离子通道2。在一些实施方案中,癌抗原是细胞周期蛋白-B1。在一些实施方案中,癌抗原是9D7。在一些实施方案中,癌抗原是EpCAM。在一些实施方案中,癌抗原是EphA3。在一些实施方案中,癌抗原是Her2/neu。在一些实施方案中,癌抗原是端粒酶。在一些实施方案中,癌抗原是间皮素。在一些实施方案中,癌抗原是SAP-1。在一些实施方案中,癌抗原是存活的。在一些实施方案中,癌抗原是BAGE家族抗原。在一些实施方案中,癌抗原是CAGE家族抗原。在一些实施方案中,癌抗原是GAGE家族抗原。在一些实施方案中,癌抗原是MAGE家族抗原。在一些实施方案中,癌抗原是SAGE家族抗原。在一些实施方案中,癌抗原是XAGE家族抗原。在一些实施方案中,癌抗原是NY-ESO-1/LAGE-1。在一些实施方案中,癌抗原是PRAME。在一些实施方案中,癌抗原是SSX-2。在一些实施方案中,癌抗原是Melan-A。在一些实施方案中,癌抗原是MART-1。在一些实施方案中,癌抗原是Gp100。在一些实施方案中,癌抗原是pml17。在一些实施方案中,癌抗原是酪氨酸酶。在一些实施方案中,癌抗原是TRP-1。在一些实施方案中,癌抗原是TRP-2。在一些实施方案中,癌抗原是P.多肽。在一些实施方案中,癌抗原是MC1R。在一些实施方案中,癌抗原是前列腺特异性抗原。在一些实施方案中,癌抗原是 $\beta$ -连环蛋白。在一些实施方案中,癌抗原是BRCA1。在一些实施方案中,癌抗原是BRCA2。在一些实施方案中,癌抗原是CDK4。在一些实施方案中,癌抗原是CML66。在一些实施方案中,癌抗原是纤连蛋白。在一些实施方案中,癌抗原是MART-2。在一些实施方案中,癌抗原是p53。在一些实施方案中,癌抗原是Ras。在一些实施方案中,癌抗原是TGF- $\beta$ RII。在一些实施方案中,癌抗原是MUC1。

[0174] 在一些实施方案中,肿瘤抗原包含一个或多个与恶性肿瘤相关的抗原性癌症表位。恶性肿瘤表达许多可以作为免疫攻击的靶抗原的蛋白质。这些分子包括但不限于组织

特异性抗原,诸如黑素瘤中的MART-1、酪氨酸酶和gp100以及前列腺癌中的前列腺酸性磷酸酶(PAP)和前列腺特异性抗原(PSA)。其他靶分子属于转化相关分子组,诸如癌基因HER2/Neu/ErbB-2。另一组靶抗原是癌胚胎抗原,诸如癌胚抗原(CEA)。

[0175] 在一些实施方案中,肿瘤抗原是肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。TSA是肿瘤细胞所特有的,并且不存在于体内的其他细胞上。TAA相关抗原不是肿瘤细胞所特有的,相反,在不能诱导对该抗原的免疫耐受状态的条件下,其也在正常细胞上表达。抗原在肿瘤上的表达可以在使免疫系统能够对抗原作出响应的条件下发生。TAA可能是胚胎发育期间免疫系统不成熟且无法作出响应时在正常细胞上表达的抗原,也可能是通常在正常细胞上以极低水平存在的抗原,但在肿瘤细胞上以高得多的水平表达。

[0176] TSA或TAA抗原的非限制性实例包括:分化抗原,诸如MART-1/MelanA(MART-I)、gp100(Pmel 17)、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2和肿瘤特异性多谱系抗原,诸如MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15;过表达的胚胎抗原,诸如CEA;过表达的癌基因和突变的肿瘤抑制基因,诸如p53、Ras、HER2/neu;由染色体易位产生的独特肿瘤抗原;诸如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;以及病毒抗原,诸如爱泼斯坦-巴尔病毒抗原EBVA和人乳头瘤病毒(HPV)抗原E6和E7。

[0177] 其他基于蛋白质的大抗原包括TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23HI、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 $\beta$ -连环蛋白、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、 $\alpha$ -胎蛋白、 $\beta$ -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733\EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90\Mac-2结合蛋白\亲环蛋白C相关蛋白、TAAL6、TAG72、TLP和TPS。

[0178] 本文提供的结合分子的另外的非限制性示例性靶标包括GPC2、CD276、 $\delta$ 样蛋白配体3(DLL3)、NY-ESO-1、黑素瘤相关抗原4;生存素蛋白、滑膜肉瘤X断点蛋白2、CD3、表皮生长因子受体(EGFR)、erbb2酪氨酸激酶受体、HER2、CEA、CD66、CD66e、ROR1、ntrkr1酪氨酸激酶受体、GPC3、间皮素、谷氨酸羧肽酶II、PMSA、PD-L1、叶酸受体 $\alpha$ 、PSCA、粘蛋白1、HLA抗原(诸如HLA I类抗原A-2 $\alpha$ 、HLA I类抗原A-11 $\alpha$ 和HLA II类抗原)、c-Met、肝细胞生长因子受体、K-Ras GTP酶(KRAS)、IL-15受体、Kit酪氨酸激酶、PDGF受体 $\beta$ 、RET酪氨酸激酶受体;Raf 1蛋白激酶、Raf B蛋白激酶、胸苷酸合酶、拓扑异构酶II、Brachyury蛋白、Flt3酪氨酸激酶、VEGF、VEGF受体(VEGF-1受体、VEGF-2受体和VEGF-3受体)、雌激素受体、新抗原、人乳头瘤病毒E6和热休克蛋白。

[0179] 在一些实施方案中,本文提供的结合分子结合B细胞抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD2、CD5、CD6、CD9、CD11a、CD11b、CD11c、CD17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD29、CD30、CD31、CD32a、CD32b、CD35、CD37、CD38、CD39、CD40、CD45、CD45RA、CD45RB、CD45RC、CD45RO、CD46、CD47、CD48、CD49b、CD49c、CD49d、CD50、CD52、CD53、CD54、CD55、CD58、CD60a、CD62L、CD63、CD68、CD69、CD70、CD72、CD73、CD74、CD75、CD75S、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85E、CD85I、CD85J、CD86、CD92、CD95、CD97、CD98、CD99、CD100、CD102、CD108、CD119、CD120a、CD120b、CD121b、CD122、CD124、CD125、CD126、CD130、CD132、CD137、CD138、CD139、CD147、CD148、CD150、CD152、CD162、CD164、CD166、CD167a、CD170、CD171、CD175、CD175s、CD180、CD184、

CD185、CD192、CD196、CD197、CD200、CD205、CD201a、CDw210b、CD212、CD213a1、CD213a2、CD215、CD217、CD218a、CD218b、CD220、CD221、CD222、CD224、CD225、CD226、CD227、CD229、CD230、CD232、CD252、CD252、CD254、CD255、CD256、CD257CD258、CD259、CD260、CD261、CD262、CD263、CD264、CD267、CD268、CD269、CD270、CD272、CD274、CD275、CD277、CD279、CD283、CD289、CD290、CD295、CD298、CD300、CD300c、CD305、CD306、CD307a、CD307b、CD307c、CD307d、CD307e、CD314、CD215、CD316、CD317、CD319、CD321、CD327、CD328、CD329、CD338、CD351、CD352、CD353、CD354、CD355、CD356、CD357、CD358、CD360、CD361、CD362或CD363抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD1a抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD1b抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD1c抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD1d抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD2抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD5抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD6抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD9抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD11a抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD11b抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD11c抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD17抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD18抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD19抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD20抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD21抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD22抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD23抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD24抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD25抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD26抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD27抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD29抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD30抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD31抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD32a抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD32b抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD35抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD37抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD38抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD39抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD40抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD45抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD45RA抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD45RB抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD45RC抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD45R0抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD46抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD47抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD48抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD49b抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD49c抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD49d抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD50抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD52抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD53抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD54抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD55抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD58抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD60a抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD62L抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD63抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD68抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD69抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD70抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD72抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD73抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD74抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD75抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD75S抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD77抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD79a抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD79b抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD80抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是

CD81抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD82抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原  
是CD83抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD84抗原。在一些实施方案中,B细胞抗  
原是CD85E抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD85I抗原。在一些实施方案中,B细  
胞抗原是CD85J抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD86抗原。在一些实施方案中,  
B细胞抗原是CD92抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD95抗原。在一些实施方  
案中,B细胞抗原是CD97抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD98抗原。在一些实  
施方案中,B细胞抗原是CD99抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD100抗原。在  
一些实施方案中,B细胞抗原是CD102抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD108抗  
原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD119抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是  
CD120a抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD120b抗原。在一些实施方案中,B细  
胞抗原是CD121b抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD122抗原。在一些实施方  
案中,B细胞抗原是CD124抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD125抗原。在一  
些实施方案中,B细胞抗原是CD126抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD130抗  
原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD132抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原  
是CD137抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD138抗原。在一些实施方案中,B细  
胞抗原是CD139抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD147抗原。在一些实施方  
案中,B细胞抗原是CD148抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD150抗原。在一  
些实施方案中,B细胞抗原是CD152抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD162抗  
原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD164抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原  
是CD166抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD167a抗原。在一些实施方案中,  
B细胞抗原是CD170抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD171抗原。在一些实  
施方案中,B细胞抗原是CD175抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD175s抗原。  
在一些实施方案中,B细胞抗原是CD180抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原  
是CD184抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD185抗原。在一些实施方案中,B  
细胞抗原是CD192抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD196抗原。在一些实  
施方案中,B细胞抗原是CD197抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD200抗原。  
在一些实施方案中,B细胞抗原是CD205抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是  
CD201a抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CDw210b抗原。在一些实施方案中,  
B细胞抗原是CD212抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD213a1抗原。在一  
些实施方案中,B细胞抗原是CD213a2抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD  
215抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD217抗原。在一些实施方案中,B细  
胞抗原是CD218a抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD218b抗原。在一  
些实施方案中,B细胞抗原是CD220抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD221  
抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD222抗原。在一些实施方案中,B细胞  
抗原是CD224抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD225抗原。在一  
些实施方案中,B细胞抗原是CD226抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原  
是CD227抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD229抗原。在一  
些实施方案中,B细胞抗原是CD230抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD232  
抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD252抗原。在一些实施方案中,B  
细胞抗原是CD254抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD255抗原。在一  
些实施方案中,B细胞抗原是CD256抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD257 CD258  
抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD259抗原。在一些实施方案中,B细胞  
抗原是CD260抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD261抗原。在一些实

案中,B细胞抗原是CD263抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD264抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD267抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD268抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD269抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD270抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD272抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD274抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD275抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD277抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD279抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD283抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD289抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD290抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD295抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD298抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD300抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD300c抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD305抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD306抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD307a抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD307b抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD307c抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD307d抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD307e抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD314抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD215抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD316抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD317抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD319抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD321抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD327抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD328抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD329抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD338抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD351抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD352抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD353抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD354抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD355抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD356抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD357抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD358抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD360抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD361抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD362抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原是CD363抗原。

[0180] 在一个实施方案中,本发明结合分子的靶标是病原体。在某些实施方案中,靶细胞是包含病原体的细胞。

[0181] 在一些实施方案中,病原体引起感染性疾病,该感染性疾病选自由以下组成的组:急性弛缓性脊髓炎(AFM)、无形体病、炭疽、巴贝西虫病、肉毒中毒、布鲁氏菌病、弯曲菌病、耐碳青霉烯性感染、西加鱼毒、艰难梭菌感染、产气荚膜梭菌、球孢子菌病真菌感染、冠状病毒感染、Covid-19(SARS-CoV-2)、克雅氏病/传染性海绵状脑病、隐孢子虫病(Crypto)、环孢子虫病、登革热1、2、3或4、白喉、大肠埃希氏菌感染/产志贺毒素(STEC)、东方马脑炎、出血热(埃博拉)、埃利希体病、脑炎、虫媒病毒或副感染性疾病、非脊髓灰质炎肠道病毒、D68肠道病毒(EV-D68)、贾第虫病、鼻疽病、淋球菌感染、腹股沟肉芽肿、B型流感嗜血杆菌疾病(Hib或H-flu)、汉坦病毒肺综合征(HPS)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、甲型肝炎(Hep A)、乙型肝炎(Hep B)、丙型肝炎(Hep C)、丁型肝炎(Hep D)、戊型肝炎(Hep E)、疱疹、带状疱疹(Shingles)、组织胞浆菌病感染、人免疫缺陷病毒/AIDS(HIV/AIDS)、人乳头瘤病毒(HPV)、流感(Flu)、军团杆菌病(军团病)、麻风病(汉森病)、钩端螺旋体病、李斯特菌病(Listeria)、莱姆病、性病淋巴肉芽肿感染(LGV)、疟疾、麻疹、类鼻疽、脑膜炎(病毒性)、脑膜炎球菌病(脑膜炎(细菌性))、中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)、流行性腮腺炎、诺如

病毒、虱病、盆腔炎性疾病 (PID)、百日咳 (Whooping Cough)、瘟疫 (腺鼠疫、败血症、肺炎)、肺炎球菌病 (肺炎)、脊髓灰质炎 (Polio)、玻瓦桑、鹦鹉热、阴虱病、脓疱性皮疹疾病 (天花、猴痘、牛痘)、Q-热病、狂犬病、立克次氏体病 (落基山斑疹热)、风疹 (德国麻疹)、沙门氏菌性胃肠炎 (沙门氏菌属)、疥疮、鲑鱼中毒、败血症、严重急性呼吸综合征 (SARS)、志贺氏菌性胃肠炎 (志贺氏菌属)、天花、耐甲氧西林葡萄球菌感染 (MRSA)、葡萄球菌食物中毒肠毒素B中毒 (葡萄球菌食物中毒)、葡萄球菌感染万古霉素中间体 (VISA)、耐万古霉素葡萄球菌感染 (VRSA)、A组链球菌病 (侵袭性) (Strep A (侵袭性))、链球菌疾病、B组 (Strep-B)、链球菌中毒性休克综合征STSS中毒性休克、梅毒 (原发性的、继发性的、早期潜伏的、晚期潜伏的、先天性的)、破伤风感染、滴虫病、毛滴虫病感染、结核病 (TB)、潜伏性结核病 (LTBI)、兔热病、D组伤寒、阴道病、水痘 (Chickenpox)、霍乱弧菌 (霍乱)、弧菌病 (Vibrio)、埃博拉病毒出血热、拉沙病毒出血热、马堡病毒出血热、西尼罗河病毒、黄热病、耶尔森氏菌和寨卡病毒感染。在一些实施方案中,感染性疾病是急性弛缓性脊髓炎 (AFM)。在一些实施方案中,感染性疾病是无形体病。在一些实施方案中,感染性疾病是炭疽。在一些实施方案中,感染性疾病是巴贝西虫病。在一些实施方案中,感染性疾病是肉毒中毒。在一些实施方案中,感染性疾病是布鲁氏菌病。在一些实施方案中,感染性疾病是弯曲菌病。在一些实施方案中,感染性疾病是耐碳青霉烯性感染。在一些实施方案中,感染性疾病是软性下疳。在一些实施方案中,感染性疾病是基孔肯雅病毒感染。在一些实施方案中,感染性疾病是衣原体。在一些实施方案中,感染性疾病是西加鱼毒。在一些实施方案中,感染性疾病是艰难梭菌感染。在一些实施方案中,感染性疾病是产气荚膜梭菌。在一些实施方案中,感染性疾病是球孢子菌病真菌感染。在一些实施方案中,感染性疾病是冠状病毒。在一些实施方案中,感染性疾病是Covid-19 (SARS-CoV-2)。在一些实施方案中,感染性疾病是克雅氏病/传染性海绵状脑病。在一些实施方案中,感染性疾病是隐孢子虫病 (Crypto)。在一些实施方案中,感染性疾病是环孢子虫病。在一些实施方案中,感染性疾病是登革热1、2、3或4。在一些实施方案中,感染性疾病是白喉。在一些实施方案中,感染性疾病是大肠埃希氏菌感染/产志贺毒素 (STEC)。在一些实施方案中,感染性疾病是东方马脑炎。在一些实施方案中,感染性疾病是出血热 (埃博拉)。在一些实施方案中,感染性疾病是埃利希体病。在一些实施方案中,感染性疾病是脑炎。在一些实施方案中,感染性疾病是虫媒病毒或副感染性疾病。在一些实施方案中,感染性疾病是非脊髓灰质炎肠道病毒。在一些实施方案中,感染性疾病是D68肠道病毒 (EV-D68)。在一些实施方案中,感染性疾病是贾第虫病。在一些实施方案中,感染性疾病是鼻疽病。在一些实施方案中,感染性疾病是淋球菌感染。在一些实施方案中,感染性疾病是腹股沟肉芽肿。在一些实施方案中,感染性疾病是B型流感嗜血杆菌疾病 (Hib或H-flu)。在一些实施方案中,感染性疾病是汉坦病毒肺综合征 (HPS)。在一些实施方案中,感染性疾病是溶血性尿毒症综合征 (HUS)。在一些实施方案中,感染性疾病是甲型肝炎 (Hep A)。在一些实施方案中,感染性疾病是乙型肝炎 (Hep B)。在一些实施方案中,感染性疾病是丙型肝炎 (Hep C)。在一些实施方案中,感染性疾病是丁型肝炎 (Hep D)。在一些实施方案中,感染性疾病是戊型肝炎 (Hep E)。在一些实施方案中,感染性疾病是疱疹。在一些实施方案中,感染性疾病是带状疱疹 (Shingles)。在一些实施方案中,感染性疾病是组织胞浆菌病感染。在一些实施方案中,感染性疾病是人免疫缺陷病毒/AIDS (HIV/AIDS)。在一些实施方案中,感染性疾病是人乳头瘤病毒 (HPV)。在一些实施方案中,感染性疾病是流感 (Flu)。在一些实施方案中,

感染性疾病是军团杆菌病(军团病)。在一些实施方案中,感染性疾病是麻风病(汉森病)。在一些实施方案中,感染性疾病是钩端螺旋体病。在一些实施方案中,感染性疾病是李斯特菌病(Listeria)。在一些实施方案中,感染性疾病是莱姆病。在一些实施方案中,感染性疾病是性病淋巴肉芽肿感染(LGV)。在一些实施方案中,感染性疾病是疟疾。在一些实施方案中,感染性疾病是麻疹。在一些实施方案中,感染性疾病是类鼻疽。在一些实施方案中,感染性疾病是脑膜炎(病毒性)。在一些实施方案中,感染性疾病是脑膜炎球菌病(脑膜炎(细菌性))。在一些实施方案中,感染性疾病是中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)。在一些实施方案中,感染性疾病是流行性腮腺炎。在一些实施方案中,感染性疾病是诺如病毒。在一些实施方案中,感染性疾病是虱病。在一些实施方案中,感染性疾病是盆腔炎性疾病(PID)。在一些实施方案中,感染性疾病是百日咳(Whooping Cough)。在一些实施方案中,感染性疾病是瘟疫(腺鼠疫)。在一些实施方案中,感染性疾病是败血症。在一些实施方案中,感染性疾病是肺炎。在一些实施方案中,感染性疾病是肺炎球菌病(肺炎)。在一些实施方案中,感染性疾病是脊髓灰质炎(Polio)。在一些实施方案中,感染性疾病是玻瓦桑。在一些实施方案中,感染性疾病是鹦鹉热。在一些实施方案中,感染性疾病是阴虱病。在一些实施方案中,感染性疾病是脓疱性皮疹疾病(天花)。在一些实施方案中,感染性疾病是猴痘。在一些实施方案中,感染性疾病是牛痘。在一些实施方案中,感染性疾病是Q-热病。在一些实施方案中,感染性疾病是狂犬病。在一些实施方案中,感染性疾病是立克次氏体病(落基山斑疹热)。在一些实施方案中,感染性疾病是风疹(德国麻疹)。在一些实施方案中,感染性疾病是沙门氏菌性胃肠炎(沙门氏菌属)。在一些实施方案中,感染性疾病是疥疮。在一些实施方案中,感染性疾病是鲭鱼中毒。在一些实施方案中,感染性疾病是败血症。在一些实施方案中,感染性疾病是严重急性呼吸综合征(SARS)。在一些实施方案中,感染性疾病是志贺氏菌性胃肠炎(志贺氏菌属)。在一些实施方案中,感染性疾病是天花。在一些实施方案中,感染性疾病是耐甲氧西林葡萄球菌感染(MRSA)。在一些实施方案中,感染性疾病是葡萄球菌食物中毒肠毒素B中毒(葡萄球菌食物中毒)。在一些实施方案中,感染性疾病是葡萄球菌感染万古霉素中间体(VISA)。在一些实施方案中,感染性疾病是耐万古霉素葡萄球菌感染(VRSA)。在一些实施方案中,感染性疾病是A组链球菌病(侵袭性)(Strep A(侵袭性))。在一些实施方案中,感染性疾病是链球菌疾病。在一些实施方案中,感染性疾病是B组(Strep-B)。在一些实施方案中,感染性疾病是链球菌中毒性休克综合征STSS中毒性休克。在一些实施方案中,感染性疾病是梅毒(原发性的)。在一些实施方案中,感染性疾病是继发性的。在一些实施方案中,感染性疾病是早期潜伏的。在一些实施方案中,感染性疾病是晚期潜伏的。在一些实施方案中,感染性疾病是先天性的。在一些实施方案中,感染性疾病是破伤风感染。在一些实施方案中,感染性疾病是滴虫病。在一些实施方案中,感染性疾病是毛滴虫病感染。在一些实施方案中,感染性疾病是结核病(TB)。在一些实施方案中,感染性疾病是潜伏性结核病(LTBI)。在一些实施方案中,感染性疾病是兔热病。在一些实施方案中,感染性疾病是D组伤寒。在一些实施方案中,感染性疾病是阴道病。在一些实施方案中,感染性疾病是水痘(Chickenpox)、霍乱弧菌(霍乱)。在一些实施方案中,感染性疾病是弧菌病(Vibrio)。在一些实施方案中,感染性疾病是埃博拉病毒出血热。在一些实施方案中,感染性疾病是拉沙病毒出血热。在一些实施方案中,感染性疾病是马堡病毒出血热。在一些实施方案中,感染性疾病是西尼罗河病毒。在一些实施方案中,感染性疾病是黄热病。在一些实施方案中,感染

性疾病是耶尔森氏菌。在一些实施方案中,感染性疾病是寨卡病毒感染。

[0182] 在一些实施方案中,病原体是细菌。在一些实施方案中,细菌是芽孢杆菌属、巴尔通氏体属、博德特氏菌属、疏螺旋体属、布鲁氏菌属、弯曲杆菌属、衣原体属、嗜衣原体属、梭菌属、棒状杆菌属、肠球菌属、埃希氏菌属、弗朗西斯菌属、嗜血杆菌属、螺杆菌属、军团菌属、钩端螺旋体属、李斯特菌属、分枝杆菌属、支原体属、奈瑟氏球菌属、假单胞菌属、立克次氏体属、沙门氏菌属、志贺氏菌属、葡萄球菌属、链球菌属、密螺旋体属、脲原体属、弧菌属或耶尔辛氏菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是芽孢杆菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是巴尔通氏体属的细菌。在一些实施方案中,细菌是博德特氏菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是疏螺旋体属的细菌。在一些实施方案中,细菌是布鲁氏菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是弯曲杆菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是衣原体属的细菌。在一些实施方案中,细菌是嗜衣原体属的细菌。在一些实施方案中,细菌是梭菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是棒状杆菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是肠球菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是埃希氏菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是弗朗西斯菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是嗜血杆菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是螺杆菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是军团菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是钩端螺旋体属的细菌。在一些实施方案中,细菌是李斯特菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是分枝杆菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是支原体属的细菌。在一些实施方案中,细菌是奈瑟氏球菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是假单胞菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是立克次氏体属的细菌。在一些实施方案中,细菌是沙门氏菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是志贺氏菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是葡萄球菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是链球菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是密螺旋体属的细菌。在一些实施方案中,细菌是脲原体属的细菌。在一些实施方案中,细菌是弧菌属的细菌。在一些实施方案中,细菌是耶尔辛氏菌属的细菌。

[0183] 在一些实施方案中,病原体是寄生虫。在一些实施方案中,寄生虫是原生动物、蠕虫或体外寄生虫。在一些实施方案中,原生动物是内阿米巴属、贾第虫属、利什曼原虫属、小袋虫属、疟原虫属或隐孢子虫属。在一些实施方案中,蠕虫是吸虫、绦虫、棘头虫或圆虫。在一些实施方案中,体外寄生虫是节肢动物。

[0184] 在一些实施方案中,病原体是病毒。在一些实施方案中,病毒是腺病毒科、沙粒病毒科、星状病毒科、布尼亚病毒科、杯状病毒科、冠状病毒科、线状病毒科、黄病毒科、肝病毒科、肝炎病毒科、正黏液病毒科、乳头瘤病毒科、副黏液病毒科、细小病毒科、微小核糖核酸病毒科、多瘤病毒科、痘病毒科、呼肠孤病毒科、逆转录病毒科、炮弹病毒科或披膜病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是腺病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是沙粒病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是星状病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是布尼亚病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是杯状病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是冠状病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是丝状病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是黄病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是肝病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是肝炎病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是正黏液病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是乳头瘤病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是副黏液病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是细小病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是微小核糖核酸病毒科的

病毒。在一些实施方案中,病毒是多瘤病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是痘病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是呼肠孤病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是逆转录病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是炮弹病毒科的病毒。在一些实施方案中,病毒是披膜病毒科的病毒。

[0185] 在一些实施方案中,病毒是腺病毒、冠状病毒、柯萨奇病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、2型单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、人疱疹病毒8型、人免疫缺陷病毒、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人乳头瘤病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒、风疹病毒或水痘-带状疱疹病毒。在一些实施方案中,病毒是腺病毒。在一些实施方案中,病毒是冠状病毒。在一些实施方案中,冠状病毒是Covid-19(SARS-CoV-2)。在一些实施方案中,病毒是柯萨奇病毒。在一些实施方案中,病毒是爱泼斯坦-巴尔病毒。在一些实施方案中,病毒是甲型肝炎病毒。在一些实施方案中,病毒是乙型肝炎病毒。在一些实施方案中,病毒是丙型肝炎病毒。在一些实施方案中,病毒是2型单纯疱疹病毒。在一些实施方案中,病毒是巨细胞病毒。在一些实施方案中,病毒是人疱疹病毒8型。在一些实施方案中,病毒是人免疫缺陷病毒。在一些实施方案中,病毒是流感病毒。在一些实施方案中,病毒是麻疹病毒。在一些实施方案中,病毒是腮腺炎病毒。在一些实施方案中,病毒是人乳头瘤病毒。在一些实施方案中,病毒是副流感病毒。在一些实施方案中,病毒是脊髓灰质炎病毒。在一些实施方案中,病毒是狂犬病病毒。在一些实施方案中,病毒是呼吸道合胞病毒。在一些实施方案中,病毒是风疹病毒。在一些实施方案中,病毒是水痘-带状疱疹病毒。

### [0186] 5.3寡聚物

[0187] 在另一方面,本文提供了一种由本文提供的分子诸如第5.2节中公开的那些形成的寡聚物。在一些实施方案中,当分子与两个其他分子或多于两个其他分子连接时,可以形成本文公开的寡聚物。本文公开的寡聚物可以由同聚或异聚分子组成。本文公开的寡聚物可以由不同数量的分子组成。因此,本公开提供了一种用于形成多特异性和/或多价结合寡聚物的有效平台。

[0188] 在一些实施方案中,本文提供的寡聚物由各自具有一个连接位点的分子形成,因此该寡聚物是二聚体。在一些实施方案中,本文提供的寡聚物由各自具有两个连接位点的分子形成。在一些具体实施方案中,一个分子的两个连接位点指向另一个分子的两个连接位点,因此该寡聚物是二聚体。在一些具体实施方案中,一个分子的两个连接位点指向两个其他分子的两个连接位点,因此该寡聚物比二聚体更大。在一些实施方案中,本文提供的寡聚物由各自具有三个连接位点的分子形成。在一些具体实施方案中,一个分子的三个连接位点指向另一个分子的三个连接位点,因此该寡聚物是二聚体。在一些具体实施方案中,一个分子的三个连接位点指向两个其他分子的两个连接位点,因此该寡聚物比二聚体更大。在一些具体实施方案中,一个分子的三个连接位点指向三个其他分子的两个连接位点,因此该寡聚物比二聚体更大。在一些实施方案中,本文提供的寡聚物包含3个单元。在一些实施方案中,本文提供的寡聚物包含4个单元。在一些实施方案中,本文提供的寡聚物包含5个单元。在一些实施方案中,本文提供的寡聚物包含6个单元。在一些实施方案中,本文提供的寡聚物包含多于6个单元。在一些实施方案中,该寡聚物是三聚体。在一些实施方案中,该寡聚物是四聚体。在一些实施方案中,该寡聚物是五聚体。在其他实施方案中,该寡聚物是六聚体。在其他

实施方案中,本文提供的寡聚物是七聚体。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是八聚体。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是九聚体。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是十聚体。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是十一聚体。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是十二聚体。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是十三聚体。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是十四聚体。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物为十五聚体。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是十六聚体。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是十七聚体。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是十八聚体。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是十九聚体。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是二十聚体。

[0189] 本文提供的寡聚物可以由相同或不同的分子形成。在一些实施方案中,该寡聚物是同聚的。在其他实施方案中,该寡聚物是异聚的。

[0190] 在一些实施方案中,本文提供的寡聚物中的各个分子都与相同的抗原(或靶标)结合,因此该寡聚物是单特异性的;然而,至少两个分子彼此不同,例如在结合结构域处。例如,分子在结合结构域的形式或结构方面不同,或者分子在结合结构域的序列方面不同。

[0191] 在一些实施方案中,本文提供的寡聚物中的所有分子都与相同抗原结合,并且因此该寡聚物是单特异性的。在其他实施方案中,并非本文提供的寡聚物中的所有分子都与相同的抗原结合,并且因此该寡聚物是多特异性的。在一些实施方案中,该寡聚物是双特异性的。在一些实施方案中,该寡聚物是三特异性的。在其他实施方案中,该寡聚物是四特异性的。在其他实施方案中,该寡聚物是五特异性的。在其他实施方案中,该寡聚物是六特异性的。

[0192] 在一些实施方案中,本文提供的寡聚物中的所有分子与相同的抗原结合,但在不同的表位上。在一些实施方案中,本文提供的寡聚物是多价的。在一些实施方案中,该寡聚物是二价的。在一些实施方案中,该寡聚物是三价的。在其他实施方案中,该寡聚物是四价的。在其他实施方案中,该寡聚物是五价的。在其他实施方案中,该寡聚物是六价的。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是七价的。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是八价的。在其他实施方式中,本文提供的寡聚物是九价的。在其他实施方案中,本文提供的寡聚物是十价的。

#### [0193] 5.4 药物组合物

[0194] 在一方面,本公开还提供了包含至少本公开的分子的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物包含治疗有效量的本文提供的分子和药学上可接受的赋形剂。在一些具体实施方案中,药物组合物包含治疗有效量的本文提供的寡聚物和药学上可接受的赋形剂。

[0195] 在一个具体实施方案中,术语“赋形剂”还可以指稀释剂、佐剂(例如,弗氏佐剂(完全或不完全))、载剂或媒介物。药物赋形剂可以是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。盐水溶液以及葡萄糖水溶液和甘油溶液也可以用作液体赋形剂。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。这些组合物可以采用溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释制剂等形式。合适的药物赋形剂的实例在Remington's Pharmaceutical Sciences(1990) Mack

Publishing Co., Easton, PA 中进行了描述。此类组合物将含有预防或治疗有效量的诸如以纯化形式的本文提供的活性成分以及适量的赋形剂, 以提供适合向患者施用的形式。制剂应适合施用方式。

[0196] 在一些实施方案中, 赋形剂的选择部分由特定细胞和/或由施用方法决定。因此, 存在多种合适的制剂。

[0197] 通常, 可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的, 并且包括缓冲剂、抗氧化剂, 包括抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E、焦亚硫酸钠; 防腐剂、等渗剂、稳定剂、金属络合物 (例如Zn-蛋白质络合物); 螯合剂诸如EDTA和/或非离子表面活性剂。

[0198] 缓冲剂可用于将pH控制在优化治疗效果的范围内, 特别是当稳定性依赖于pH时。适用于本公开的缓冲剂包括有机酸和无机酸以及它们的盐。例如, 柠檬酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、草酸盐、乳酸盐、乙酸盐。另外, 缓冲液可包含组氨酸和三甲胺盐, 诸如Tris。

[0199] 可以添加防腐剂以减缓微生物生长。适用于本公开的防腐剂包括十八烷基二甲基苄基氯化铵; 六甲双铵氯化物; 苯扎氯铵卤化物 (例如, 氯化物、溴化物、碘化物)、苄索氯铵; 硫柳汞、苯酚、丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯, 诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯; 儿茶酚; 间苯二酚; 环己醇、3-戊醇和间甲酚。

[0200] 可存在张度剂 (有时称为“稳定剂”), 以调节或维持组合物中液体的张度。当与大的带电生物分子诸如蛋白质和抗体一起使用时, 它们通常被称为“稳定剂”, 因为它们可以与氨基酸侧链的带电基团相互作用, 从而降低分子间和分子内相互作用的可能性。示例性的张度剂包括多羟基糖醇、三元或更多元糖醇, 诸如甘油、赤藓糖醇、阿糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。

[0201] 另外的示例性赋形剂包括: (1) 填充剂、(2) 溶解增强剂、(3) 稳定剂和(4) 防止变性或粘附于容器壁的试剂。此类赋形剂包括: 多羟基糖醇 (上文列举); 氨基酸, 诸如丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等; 有机糖或糖醇, 诸如蔗糖、乳糖、乳糖醇、海藻糖、水苏糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、myoinositol、肌醇 (myoinositol)、半乳糖、半乳糖醇、甘油、环糖醇 (例如, 肌醇)、聚乙二醇; 含硫还原剂, 诸如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、巯基乙酸钠、硫代甘油、 $\alpha$ -单硫代甘油和硫代硫酸钠; 低分子量蛋白质, 诸如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或其他免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 诸如聚乙烯吡咯烷酮; 单糖 (例如, 木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖; 二糖 (例如, 乳糖、麦芽糖、蔗糖); 三糖, 诸如棉子糖; 以及多糖, 诸如糊精或葡聚糖。

[0202] 可以存在非离子表面活性剂或洗涤剂 (也称为“润湿剂”), 以帮助溶解治疗剂并保护治疗性蛋白质免于搅动引起的聚集, 这也允许制剂暴露于剪切表面应力而不引起活性治疗性蛋白质或抗体的变性。合适的非离子表面活性剂包括例如聚山梨醇酯 (20、40、60、65、80等)、泊洛沙姆 (184、188等)、PLURONIC®多元醇、TRITON®、聚氧乙烯脱水山梨醇单醚 (TWEEN®-20、TWEEN®-80等)、聚桂醇400、聚乙二醇40硬脂酸酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油10、50和60、单硬脂酸甘油酯、蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。可以使用的阴离子洗涤剂包括月桂基硫酸钠、二辛基磺基琥珀酸钠和二辛基磺酸钠。阳离子洗涤剂包括苯扎氯铵或苄索氯铵。

[0203] 施用途是根据已知和接受的方法,诸如以合适的方式单次或在长时间内多次推注或输注,例如通过皮下、静脉内、腹膜内、肌内、动脉内、病灶内或关节内途径注射或输注、局部施用、吸入或通过持续释放或延长释放方式。

[0204] 在另一个实施方案中,药物组合物可以作为控释或缓释系统提供。在一个实施方案中,可以使用泵来实现控释或缓释(参见例如Sefton,Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201-40(1987);Buchwald等人,Surgery 88:507-16(1980);以及Saudek等人,N.Engl.J.Med.321:569-74(1989))。在另一个实施方案中,聚合物材料可用于实现预防性或治疗性药剂(例如,本文所述的融合蛋白)或本文提供的组合物的控释或缓释(参见例如Medical Applications of Controlled Release(Langer和Wise编辑,1974);Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance(Smolens和Ball编辑,1984);Ranger和Peppas,J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.23:61-126(1983);Levy等人,Science 228:190-92(1985);During等人,Ann.Neurol.25:351-56(1989);Howard等人,J.Neurosurg.71:105-12(1989);美国专利号5,679,377、5,916,597、5,912,015、5,989,463和5,128,326;PCT公开号W0 99/15154和W0 99/20253)。用于缓释制剂的聚合物的实例包括但不限于聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)、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)、聚酞、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙醇醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)和聚原酸酯。在一个实施方案中,缓释制剂中使用的聚合物是惰性的,不含可浸出的杂质,储存稳定,无菌且可生物降解的。在又一个实施方案中,可将控释或缓释系统置于特定靶组织例如鼻道或肺附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参见例如Goodson,Medical Applications of Controlled Release第2卷,115-38(1984))。控释系统例如在Langer,Science 249:1527-33(1990)中进行了讨论。本领域技术人员已知的任何技术均可用于制备包含如本文所述的一种或多种药剂的缓释制剂(参见例如美国专利号4,526,938、PCT公开号W0 91/05548和W0 96/20698;Ning等人,Radiotherapy&Oncology 39:179-89(1996);Song等人,PDA J.of Pharma.Sci.& Tech.50:372-97(1995);Cleek等人,Pro.Int'l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.24:853-54(1997);以及Lam等人,Proc.Int'l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.24:759-60(1997))。

[0205] 本文所述的药物组合物还可以根据所治疗的特定适应症的需要含有多于一种活性化合物或药剂。可替代地或另外,组合物可以包含细胞毒性剂、化疗剂、细胞因子、免疫抑制剂或生长抑制剂。此类分子适当地以有效达到预期目的的量组合存在。

[0206] 活性成分还可以包埋在微胶囊中,所述微胶囊例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备,例如羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊,分别在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中或在粗乳液中。这些技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第18版中。

[0207] 各种组合物和递送系统是已知的并且可以与本文提供的治疗剂一起使用,包括但不限于包封在脂质体、微粒、微胶囊、能够表达本文提供的抗体或治疗性分子的重组细胞中、构建作为逆转录病毒或其他载体的一部分的核酸等。

[0208] 在一些实施方案中,本文提供的药物组合物包含治疗或预防疾病或病症有效量的结合分子,诸如治疗有效量或预防有效量。在一些实施方案中,治疗或预防功效通过定期评

估治疗的受试者来监测。对于几天或更长时间的重复施用,根据病况、重复治疗直至出现所需的疾病症状抑制。然而,其他剂量方案可能是有用的并且可以被确定。

[0209] 在一个具体实施方案中,术语“赋形剂”还可以指稀释剂、佐剂(例如,弗氏佐剂(完全或不完全))、载剂或媒介物。药物赋形剂可以是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。盐水溶液以及葡萄糖水溶液和甘油溶液也可以用作液体赋形剂。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。这些组合物可以采用溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释制剂等形式。合适的药物赋形剂的实例在Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA中进行了描述。此类组合物将含有预防或治疗有效量的诸如以纯化形式的本文提供的活性成分以及适量的赋形剂,以提供适合向患者施用的形式。制剂应适合施用模式。

[0210] 在一些实施方案中,赋形剂的选择部分由特定细胞和/或由施用方法决定。因此,存在多种合适的制剂。

[0211] 通常,可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲剂、抗氧化剂,包括抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E、焦亚硫酸钠;防腐剂、等渗剂、稳定剂、金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);螯合剂诸如EDTA和/或非离子表面活性剂。

[0212] 缓冲剂可用于将pH控制在优化治疗效果的范围内,特别是当稳定性依赖于pH时。适用于本公开的缓冲剂包括有机酸和无机酸以及它们的盐。例如,柠檬酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、草酸盐、乳酸盐、乙酸盐。另外,缓冲液可包含组氨酸和三甲胺盐,诸如Tris。

[0213] 可以添加防腐剂以减缓微生物生长。适用于本公开的防腐剂包括十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲双铵氯化物;苯扎氯铵卤化物(例如,氯化物、溴化物、碘化物)、苜蓿氯铵;硫柳汞、苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇、3-戊醇和间甲酚。

[0214] 可存在张度剂(有时称为“稳定剂”),以调节或维持组合物中液体的张度。当与大的带电生物分子诸如蛋白质和抗体一起使用时,它们通常被称为“稳定剂”,因为它们可以与氨基酸侧链的带电基团相互作用,从而降低分子间和分子内相互作用的可能性。示例性的张度剂包括多羟基糖醇、三元或更多元糖醇,诸如甘油、赤藓糖醇、阿糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。

[0215] 另外的示例性赋形剂包括:(1)填充剂、(2)溶解增强剂、(3)稳定剂和(4)防止变性或粘附于容器壁的试剂。此类赋形剂包括:多羟基糖醇(上文列举);氨基酸,诸如丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等;有机糖或糖醇,诸如蔗糖、乳糖、乳糖醇、海藻糖、水苏糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、myoinositol、肌醇、半乳糖、半乳糖醇、甘油、环糖醇(例如,肌醇)、聚乙二醇;含硫还原剂,诸如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、巯基乙酸钠、硫代甘油、 $\alpha$ -单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量蛋白质,诸如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或其他免疫球蛋白;亲水

性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;单糖(例如,木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖;二糖(例如,乳糖、麦芽糖、蔗糖);三糖,诸如棉子糖;以及多糖,诸如糊精或葡聚糖。

[0216] 可以存在非离子表面活性剂或洗涤剂(也称为“润湿剂”),以帮助溶解治疗剂并保护治疗性蛋白质免于搅动引起的聚集,这也允许制剂暴露于剪切表面应力而不引起活性治疗性蛋白质或抗体的变性。合适的非离子表面活性剂包括例如聚山梨醇酯(20、40、60、65、80等)、泊洛沙姆(184、188等)、**PLURONIC®**多元醇、**TRITON®**、聚氧乙烯脱水山梨醇单醚(**TWEEN®**-20、**TWEEN®**-80等)、聚桂醇400、聚乙二醇40硬脂酸酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油10、50和60、单硬脂酸甘油酯、蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。可以使用的阴离子洗涤剂包括月桂基硫酸钠、二辛基磺基琥珀酸钠和二辛基磺酸钠。阳离子洗涤剂包括苯扎氯铵或苜索氯铵。

[0217] 施用途径是根据已知和接受的方法,诸如以合适的方式单次或在长时间内多次推注或输注,例如通过皮下、静脉内、腹膜内、肌肉、动脉内、病灶内或关节内途径注射或输注、局部施用、吸入或通过持续释放或延长释放方式。

[0218] 在另一个实施方案中,药物组合物可以作为控释或缓释系统提供。在一个实施方案中,可以使用泵来实现控释或缓释(参见例如Sefton, Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201-40 (1987); Buchwald等人, Surgery 88:507-16 (1980); 以及Saudek等人, N. Engl. J. Med. 321:569-74 (1989))。在另一个实施方案中,聚合物材料可用于实现预防性或治疗性药剂(例如,本文所述的融合蛋白)或本文提供的组合物的控释或缓释(参见例如Medical Applications of Controlled Release (Langer和Wise编辑, 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen和Ball编辑, 1984); Ranger和Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61-126 (1983); Levy等人, Science 228:190-92 (1985); During等人, Ann. Neurol. 25:351-56 (1989); Howard等人, J. Neurosurg. 71:105-12 (1989); 美国专利号5,679,377、5,916,597、5,912,015、5,989,463和5,128,326; PCT公开号W0 99/15154和W0 99/20253)。用于缓释制剂的聚合物的实例包括但不限于聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)、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)、聚酐、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)和聚原酸酯。在一个实施方案中,缓释制剂中使用的聚合物是惰性的,不含可浸出的杂质,储存稳定,无菌且可生物降解的。在另一个实施方案中,可将控释或缓释系统置于特定靶组织例如鼻道或肺附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参见例如Goodson, Medical Applications of Controlled Release第2卷, 115-38 (1984))。控释系统例如在Langer, Science 249:1527-33 (1990)中进行了讨论。本领域技术人员已知的任何技术均可用于制备包含如本文所述的一种或多种药剂的缓释制剂(参见例如美国专利号4,526,938、PCT公开号W0 91/05548和W0 96/20698; Ning等人, Radiotherapy & Oncology 39:179-89 (1996); Song等人, PDA J. of Pharma. Sci. & Tech. 50:372-97 (1995); Cleek等人, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-54 (1997); 以及Lam等人, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-60 (1997))。

[0219] 本文所述的药物组合物还可以根据所治疗的特定适应症的需要含有多于一种活性化合物或药剂。可替代地或另外,组合物可以包含细胞毒性剂、化疗剂、细胞因子、免疫抑

制剂或生长抑制剂。此类分子适当地以有效达到预期目的的量组合存在。

[0220] 活性成分还可以包埋在微胶囊中,所述微胶囊例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备,例如羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊,分别在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中或在粗乳液中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第18版中。

[0221] 各种组合物和递送系统是已知的并且可以与本文提供的治疗剂一起使用,包括但不限于包封在脂质体、微粒、微胶囊、能够表达本文提供的抗体或治疗性分子的重组细胞中、构建作为逆转录病毒或其他载体的一部分的核酸等。

[0222] 在一些实施方案中,本文提供的药物组合物包含治疗或预防疾病或病症有效量的结合分子,诸如治疗有效量或预防有效量。在一些实施方案中,治疗或预防功效通过定期评估治疗的受试者来监测。对于几天或更长时间的重复施用,根据病况、重复治疗直至出现所需的疾病症状抑制。然而,其他剂量方案可能是有用的并且可以被确定。

[0223] 5.5核酸分子、载体和宿主细胞

[0224] 在某些实施方案中,本公开涵盖编码本文所述分子的核酸分子。术语“编码多肽的核酸分子”涵盖包含多肽的编码序列的核酸分子以及包含另外的编码序列和/或非编码序列的核酸分子。本公开的核酸分子可以呈RNA的形式或呈DNA的形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合成DNA;并且可以是双链的或单链的,并且如果是单链的,则可以是编码链或非编码(反义)链。

[0225] 在某些实施方案中,核酸分子包含以相同阅读框架与有助于例如多肽从宿主细胞表达和分泌的核酸分子融合的多肽的编码序列(例如,起控制多肽转运的分泌序列作用的前导序列)。核酸分子可具有被宿主细胞切割的前导序列以形成“成熟”形式的多肽。

[0226] 在某些实施方案中,核酸分子包含以相同阅读框架与标记或标签序列融合的多肽的编码序列。例如,在一些实施方案中,标记序列是由载体提供的六组氨酸标签,其允许在细菌宿主的情况下有效纯化与标记融合的多肽。在一些实施方案中,标记与其他亲和标签结合使用。

[0227] 本文提供的分子的重组表达需要构建含有编码该分子的多核苷酸的表达载体。一旦获得了编码本文提供的分子的多核苷酸,就可以使用本领域熟知的技术通过重组DNA技术来生产用于生产该分子的载体。因此,本文描述了通过表达含有编码第5.2节所述分子的不同部分的核苷酸序列的多核苷酸来制备本文提供的分子的方法。可以使用本领域技术人员熟知的方法构建含有编码序列和适当的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、合成技术和体内基因重组。还提供了可复制载体,其包含与启动子可操作地连接的编码本文提供的分子的核苷酸序列。此类载体可以包含编码抗体分子恒定区的核苷酸序列(参见例如国际公开号WO 86/05807和WO 89/01036;以及美国专利号5,122,464),并且抗体的可变结构域可以被克隆至此类载体中以表达完整的重链、完整的轻链或完整的重链和轻链两者。

[0228] 通过常规技术将表达载体转移至宿主细胞,然后通过常规技术培养转染的细胞以产生本文提供的分子。因此,本文还提供了含有编码本文提供的分子的多核苷酸的宿主细胞,该多核苷酸与异源启动子可操作地连接。在表达具有本文所述的抗原结合片段的分子的某些实施方案中,编码重链和轻链的载体可以在宿主细胞中共表达以表达完整的免疫球

蛋白分子,如下文详述的。

[0229] 多种宿主表达载体系统可用于表达本文提供的分子(参见例如美国专利号5,807,715)。此类宿主表达系统代表这样的媒介物,通过这些媒介物可以产生目标编码序列并随后纯化,但也代表这样的细胞,当用合适的核苷酸编码序列转化或转染时,这些细胞可以原位表达本文提供的分子。这些包括但不限于微生物诸如用含有编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如,大肠埃希氏菌和枯草杆菌);用含有编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,毕赤酵母);用含有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;或含有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),所述重组表达构建体含有源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)。细菌细胞诸如大肠埃希氏菌或真核细胞,特别是用于表达完整重组分子的细胞,可用于表达重组分子。例如,哺乳动物细胞诸如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)与载体诸如来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件结合是抗体的有效表达系统(Foecking等人,1986,Gene 45:101;以及Cockett等人,1990,Bio/Technology 8:2)。在一些实施方案中,本文提供的分子是在CHO细胞中产生的。在一个具体实施方案中,编码本文提供的分子的核苷酸序列的表达由组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子调节。

[0230] 在细菌系统中,可以根据所表达的分子的预期用途有利地选择多种表达载体。例如,当要产生大量这种分子时,为了产生该分子的药物组合物,可能需要指导易于纯化的高水平融合蛋白产物表达的载体。这些载体包括但不限于大肠埃希氏菌表达载体pUR278(Ruther等人,1983,EMBO 12:1791),其中编码序列可以与lac Z编码区在框内单独地连接到载体中,从而产生融合蛋白;pIN载体(Inouye&Inouye,1985,Nucleic Acids Res.13:3101-3109;Van Heeke&Schuster,1989,J.Biol.Chem.24:5503-5509);等等。pGEX载体也可用于表达外源多肽作为与谷胱甘肽5-转移酶(GST)的融合蛋白。通常,此类融合蛋白是可溶的,并且可以通过吸附并结合到基质谷胱甘肽琼脂糖珠,随后在游离谷胱甘肽存在下洗脱而轻松地从裂解的细胞中纯化。pGEX载体被设计为包含凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点,使得克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0231] 在昆虫系统中,苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)被用作表达外源基因的载体。该病毒在草地贪夜蛾细胞中生长。可以将编码序列单独克隆到病毒的非必需区(例如多角体蛋白基因)中,并置于AcNPV启动子(例如多角体蛋白启动子)的控制下。

[0232] 在哺乳动物宿主细胞中,可以使用许多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,可以将目标编码序列连接到腺病毒转录/翻译控制复合物,例如晚期启动子和三联前导序列。然后通过体外或体内重组将该嵌合基因插入腺病毒基因组中。在病毒基因组的非必需区域(例如,区域E1或E3)中的插入将产生在感染的宿主中存活并且能够表达该分子的重组病毒(例如,参见Logan&Shenk,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:355-359)。插入的编码序列的有效翻译可能还需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。此外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同相,以确保整个插入片段的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然和合成的多种来源。可以

通过包含适当的转录增强子元件、转录终止子等来增强表达效率(参见例如Bittner等人, 1987, *Methods in Enzymol.* 153:51-544)。

[0233] 此外,可以选择调节插入序列的表达或以所需的特定方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的此类修饰(例如,糖基化)和加工(例如,裂解)对于蛋白质的功能可能很重要。不同的宿主细胞对蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰具有特征性和特异性机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统以确保表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此,可以使用具适当加工初级转录物、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030和HsS78Bst细胞。在一些实施方案中,本文提供的作为完全人抗体或其片段的分子在哺乳动物细胞诸如CHO细胞中产生。

[0234] 为了长期、高产率地生产重组蛋白,可以利用稳定的表达。例如,可以对稳定表达本文所述分子的细胞系进行工程化。宿主细胞可以用由合适的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)和选择标记控制的DNA转化,而不是使用含有病毒复制起点的表达载体。引入外源DNA后,可使工程化的细胞在富集培养基中生长1-2天,然后切换至选择性培养基。重组质粒中的选择性标记赋予对选择的抗性,并使细胞能够将质粒稳定地整合到其染色体中并生长形成病灶,进而可以将其克隆并扩增成细胞系。该方法可有利地用于对表达该分子的细胞系进行工程化。这种工程化的细胞系在筛选和评估与分子直接或间接相互作用的组合物方面可能特别有用。

[0235] 可以使用许多选择系统,包括但不限于可以分别在tk-、hgprt-或aprt-细胞中采用的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,1977, *Cell* 11:223)、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska&Szybalski,1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202)和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy等人,1980, *Cell* 22:8-17)基因。此外,抗代谢物抗性可用作选择以下基因的基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler等人,1980, *Natl. Acad. Sci. USA* 77:357; O'Hare等人,1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan&Berg,1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072);neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Wu和Wu,1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev,1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan,1993, *Science* 260:926-932;以及Morgan和Anderson,1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217;1993, *TIB TECH* 11(5):155-215);以及hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre等人,1984, *Gene* 30:147)。重组DNA技术领域公知的方法可以常规用于选择所需的重组克隆,并且此类方法在例如以下文献中进行了描述:Ausubel等人(编辑),*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley& Sons, NY(1993);Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY(1990);以及第12章和第13中,Dracopoli等人(编辑),*Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley& Sons, NY(1994);Colberre-Garapin等人,1981, *J. Mol. Biol.* 150:1,它们以引用方式全文并入本文。

[0236] 本文所述分子的表达水平可以通过载体扩增来增加(关于综述,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水平的增加将增加标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与编码本文所述分子的基因相关,因此分子的产生也将增加(Crouse等人,1983,Mol.Cell.Biol.3:257)。

[0237] 对于第5.2.2节中描述的包含抗原结合片段的分子,宿主细胞可以用本文提供的两种表达载体共转染,第一种载体编码重链来源的多肽,并且第二种载体编码轻链来源的多肽。这两种载体可以含有相同的选择标记,使得重链和轻链多肽能够同等表达。替代地,可以使用编码并能够表达重链和轻链多肽的单种载体。在这种情况下,轻链应置于重链之前,以避免过量的无毒重链(Proudfoot,1986,Nature322:52;以及Kohler,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:2197-2199)。重链和轻链的编码序列可以包含cDNA或基因组DNA。

#### [0238] 5.6产生寡聚分子的方法

[0239] 在另一方面,本文提供了用于生产寡聚物的方法。更具体地,本文提供的方法包括执行向一个或多个包含IgG C<sub>H</sub>2区的分子引入氨基酸取代的功能的第一步骤,例如,用半胱氨酸残基取代根据EU编号的位置253的氨基酸残基;以及执行表达此类分子的功能的第二步骤。在一些实施方案中,本文提供的方法还包括执行将人 $\mu$ 尾段引入分子的功能的步骤。在一些实施方案中,本文提供的方法包括进一步纯化或分离包含所述分子的寡聚物。在一些实施方案中,本文提供的方法包括构建编码本文提供的分子的载体。

[0240] 在一些具体实施方案中,本文提供了一种产生寡聚分子的方法,该方法包括:(a)将第5.5节公开的载体引入宿主细胞;(b)在适合产生寡聚分子的条件培养宿主细胞;以及(c)纯化宿主细胞的培养培养基中的寡聚分子。在一些实施方案中,在步骤(c)之前,本文提供的方法可以包括例如通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测宿主细胞的培养培养基中寡聚分子的存在。在一些实施方案中,本文提供的方法还可以包括用完整质谱或高效液相色谱发(HPLC)-尺寸排阻色谱发(SEC)表征纯化的寡聚分子。

[0241] 第5.2.1节中描述的点突变和第5.2.2节中描述的其他单残基修饰可以使用本领域已知的方法进行,诸如寡核苷酸介导的(定点)诱变、丙氨酸扫描和PCR诱变。可以对克隆的DNA进行定点诱变(参见例如Carter,1986,Biochem J.237:1-7;以及Zoller等人,1982,Nucl.Acids Res.10:6487-500)、盒式诱变(参见例如Wells等人,1985,Gene34:315-23)或其他已知技术以产生第5.2.1节中描述的靶向点突变。可以使用本领域技术人员已知的重组DNA技术来制备第5.2.1节中描述的添加的尾段和第5.2.2节中描述的其他遗传修饰(参见例如Zyskind和Berstein,1989,Recombinant DNA laboratory Manual;Rajagopal,2012,Recombinant DNA Technology and Genetic Engineering;Sambrook和Russel,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,第3版,2001,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Kostelny等人,Int.J.Cancer 93:556-565,2001;Cole等人,J.Immunol.159:3613-3621,1997;以及Tsurushita等人,Methods 36:69-83,2005)。

[0242] 获得编码如第5.5节公开的工程化分子的载体后,可以在宿主细胞中进行细胞转染或转导。将多核苷酸引入宿主细胞可以通过任何已知的方法进行,包括例如将多核苷酸包装在病毒中(或病毒载体中)并用病毒(或载体)转导宿主细胞,或通过本领域已知的转染方法。将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法是本领域众所周知的,包括葡聚糖介导的

转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将一种或多种多核苷酸包裹在脂质体中,以及将DNA直接显微注射到细胞核中。可用作表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域熟知的,并且包括但不限于CHO细胞、HeLa细胞和人肝细胞癌细胞。

[0243] 引入目标载体后,宿主细胞将含有单体形式的分子和不同水平的分子寡聚物的混合物分泌到培养基中。在一些实施方案中,在将载体引入宿主细胞后12小时收集培养基。在一些实施方案中,在将载体引入宿主细胞后24小时收集培养基。在一些实施方案中,在将载体引入宿主细胞后36小时收集培养基。在一些实施方案中,在将载体引入宿主细胞后48小时收集培养基。在一些实施方案中,在将载体引入宿主细胞后60小时收集培养基。在一些实施方案中,在将载体引入宿主细胞后72小时收集培养基。在一些实施方案中,在将载体引入宿主细胞后84小时收集培养基。在一些实施方案中,在将载体引入宿主细胞后96小时收集培养基。

[0244] 作为在进一步纯化和表征之前确认条件培养基中存在寡聚分子的初始步骤,检测混合物的不同组分的分子量分布。由于本文所述的分子的单体和寡聚物形式至少在质量方面不同,因此基于质量的检测技术是本领域众所周知的,包括但不限于凝胶电泳,诸如SDS-PAGE、离心和色谱法,诸如凝胶过滤柱。

[0245] 一旦通过重组表达产生了本文提供的分子,就可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法(例如,通过色谱法(例如,离子交换、亲和力,特别是通过蛋白A后对特定抗原的亲和力,以及尺寸柱色谱法)、离心、差异溶解度)或通过用于纯化蛋白的任何其他标准技术来纯化。此外,本文提供的分子可以与本文描述或本领域已知的异源多肽序列融合以促进纯化。

[0246] 纯化的寡聚分子需要进行表征并确认其身份。不同的方法是本领域已知的。在一些实施方案中,纯化的寡聚分子可以通过质谱法来表征。在具体实施方案中,纯化的寡聚分子可以通过完整的质谱法来表征。在其他实施方案中,纯化的寡聚分子可以通过HPLC来表征。在具体实施方案中,纯化的寡聚分子可以通过HPLC-SEC来表征。在其他实施方案中,纯化的寡聚分子可以通过x-射线晶体学来表征。在其他实施方案中,纯化的寡聚分子可以通过NMR光谱来表征。在其他实施方案中,纯化的寡聚分子可以通过冷冻电子显微术来表征。

[0247] 原核细胞中的重组生产

[0248] 编码本公开的分子(诸如抗体或其片段)的多核酸序列可以使用标准重组技术获得。所需多核酸序列可以从抗体产生细胞诸如杂交瘤细胞中分离并测序。替代地,可以使用核苷酸合成器或PCR技术合成多核苷酸。一旦获得,将编码多肽的序列插入能够在原核宿主中复制和表达异源多核苷酸的重组载体中。本领域可获得且已知的许多载体可用于本公开的目的。合适载体的选择将主要取决于待插入载体的核酸的大小和待用载体转化的特定宿主细胞。每种载体含有各种组分,取决于其功能(异源多核苷酸的扩增或表达,或两者)以及它与它所存在的特定宿主细胞的相容性。载体组分通常包括但不限于复制起点、选择标记基因、启动子、核糖体结合位点(RBS)、信号序列、异源核酸插入物和转录终止序列。

[0249] 通常,含有源自与宿主细胞相容的物种的复制子和控制序列的质粒载体与这些宿主结合使用。载体通常携带复制位点,以及能够在转化细胞中提供表型选择的标记序列。例如,通常使用pBR322(一种来源于大肠埃希氏菌物种的质粒)转化大肠埃希氏菌。用于表达特定抗体的pBR322衍生物的实例详细描述于Carter等人的美国专利号5,648,237中。

[0250] 此外,含有与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体可以用作与这些宿主相关的转化载体。例如,噬菌体诸如GEM<sup>TM</sup>-11可用于制备重组载体,该重组载体可用于转化易感宿主细胞诸如大肠埃希氏菌LE392。

[0251] 本申请的表达载体可以包含两个或多个启动子-顺反子对,其编码每种多肽组分。启动子是位于调节其表达的顺反子上游(5')的非翻译调控序列。原核启动子通常分为两类,诱导型和组成型。诱导型启动子是响应于培养条件的变化,例如营养物的存在或不存在或温度的变化,在其控制下启动顺反子转录水平增加的启动子。

[0252] 被多种潜在宿主细胞识别的大量启动子是众所周知的。通过限制酶消化从源DNA除去启动子并将分离的启动子序列插入本申请的载体中,可以将所选择的启动子与编码本发明抗体的顺反子DNA可操作地连接。天然启动子序列和许多异源启动子均可用于指导靶基因的扩增和/或表达。在一些实施方案中,使用异源启动子,因为与天然靶多肽启动子相比,它们通常允许更大的转录和更高的表达靶基因产量。

[0253] 适合与原核宿主一起使用的启动子包括PhoA启动子、半乳糖酶和乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统和杂合启动子诸如tac或trc启动子。然而,在细菌中有功能的其他启动子(诸如其他已知的细菌或噬菌体启动子)也是合适的。已经公开了它们的核酸序列,从而使得技术人员能够使用接头或衔接子将它们可操作地连接到编码靶肽的顺反子(Siebenlist等人Cell 20:269(1980)),以提供任何所需的限制性位点。

[0254] 在一方面,重组载体内的每个顺反子包含指导表达的多肽跨膜易位的分泌信号序列组分。通常,信号序列可以是载体的组分,或者它可以是插入到载体中的靶多肽DNA的一部分。为了本发明的目的而选择的信号序列应当是被宿主细胞识别并加工(即被信号肽酶切割)的序列。对于不识别并加工异源多肽天然信号序列的原核宿主细胞,信号序列可以被选自例如由碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定肠毒素II(STII)前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA和MBP组成的组的原核信号序列取代。

[0255] 在一些实施方案中,根据本公开的抗体的产生可以发生在宿主细胞的细胞质中,并且因此不需要每个顺反子内存在分泌信号序列。某些宿主菌株(例如,大肠埃希氏菌trxB<sup>-</sup>菌株)提供有利于二硫键形成的细胞质条件,从而允许表达的蛋白质亚基正确折叠和组装。

[0256] 适于表达本公开的分子(诸如抗体或其片段)的原核宿主细胞包括古细菌和真细菌,诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体。有用的细菌的实例包括埃希氏菌属(例如,大肠埃希氏菌)、芽孢杆菌属(例如,枯草芽孢杆菌)、肠杆菌科、假单胞菌属种(例如,铜绿假单胞菌)、鼠伤寒沙门氏菌、粘质沙雷氏菌、克雷伯氏菌属、变形杆菌属、志贺氏菌属、根瘤菌属、透明颤菌属或副球菌属。在一些实施方案中,使用革兰氏阴性细胞。在一个实施方案中,使用大肠埃希氏菌细胞作为宿主。大肠埃希氏菌菌株的实例包括菌株W3110(Bachmann, Cellular and Molecular Biology,第2卷(Washington,D.C.:American Society for Microbiology,1987),第1190-1219页;ATCC保藏号27,325)及其衍生物,包括具有基因型W3110 AfhuA(AtonA)ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-fepE)degP41 kan<sup>R</sup>的菌株33D3(美国专利号5,639,635)。其他菌株及其衍生物诸如大肠埃希氏菌294(ATCC 31,446)、大肠埃希氏菌B、大肠埃希氏菌1776(ATCC 31,537)和大肠埃希氏菌RV308(ATCC 31,608)也是合适的。这些实例是示例性的而非限制性的。用于构建任何上述具有确定基因型的细菌的衍

生物的方法是本领域已知的,并且描述于例如Bass等人,Proteins,8:309-314(1990)中。考虑到复制子在细菌细胞中的复制能力,通常需要选择合适的细菌。例如,当使用众所周知的质粒诸如pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410提供复制子时,大肠埃希氏菌、沙雷氏菌属或沙门氏菌属种可适合用作宿主。

[0257] 通常,宿主细胞应分泌最少量的蛋白水解酶,并且可以将另外的蛋白酶抑制剂理想地掺入细胞培养物中。

[0258] 宿主细胞用上述表达载体转化,并在常规营养培养基中培养,该常规营养培养基经适当修饰以诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因。转化是指将DNA引入原核宿主,使得DNA可以作为染色体外元件或通过染色体整合体进行复制。根据所使用的宿主细胞,使用适于此类细胞的标准技术进行转化。使用氯化钙的钙处理通常用于含有大量细胞壁屏障的细菌细胞。另一种转化方法采用聚乙二醇/DMSO。使用的另一种技术是电穿孔。

[0259] 用于产生本申请的抗体的原核细胞在本领域已知且适于培养所选择的宿主细胞的培养基中生长。合适的培养基的实例包括卢里亚肉汤(LB)加上必需的营养补充物。在一些实施方案中,培养基还含有基于表达载体的构建而选择的选择剂,以选择性地允许含有表达载体的原核细胞生长。例如,将氨苄青霉素添加到培养基中,以使表达氨苄青霉素抗性基因的细胞生长。

[0260] 除碳源、氮源和无机磷酸盐源之外的任何必要的补充物也可以以适当的浓度单独引入或作为与另一种补充物或介质诸如复合氮源的混合物引入。任选地,培养基可以含有一种或多种选自谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、巯基乙酸盐、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇的还原剂。原核宿主细胞在合适的温度和pH下培养。

[0261] 如果在本申请的表达载体中使用诱导型启动子,则在适于启动子激活的条件下诱导蛋白质表达。在本申请的一方面,PhoA启动子用于控制多肽的转录。因此,将转化的宿主细胞在磷酸盐限制培养基中培养以进行诱导。优选地,磷酸盐限制培养基是C.R.A.P培养基(参见例如Simmons等人,J.Immunol.Methods 263:133-147(2002))。根据所采用的载体构建体,可以使用本领域已知的多种其他诱导物。

[0262] 本公开的表达的抗体被分泌到宿主细胞的周质中并从其回收。蛋白质回收通常涉及破坏微生物,通常通过诸如渗透压休克、超声处理或裂解的方法。一旦细胞被破坏,可以通过离心或过滤除去细胞碎片或完整细胞。蛋白质可以进一步纯化,例如通过亲和树脂色谱法。替代地,可以将蛋白质转运到培养基中并在其中分离。可以从培养物中除去细胞,过滤并浓缩培养物上清液以进一步纯化产生的蛋白质。表达的多肽可以使用公知的方法诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和蛋白质印迹测定进一步分离和鉴定。

[0263] 可替代地,通过发酵方法大量进行蛋白质生产。多种大规模补料分批发酵程序可用于生产重组蛋白。为了提高本公开的抗体的产量和质量,可以改变各种发酵条件。例如,已经证明伴侣蛋白有助于细菌宿主细胞中产生的异源蛋白的正确折叠和溶解。Chen等人J Bio Chem274:19601-19605(1999);美国专利号6,083,715;美国专利号6,027,888;Bothmann和Pluckthun,J.Biol.Chem.275:17100-17105(2000);Ramm和Pluckthun,J.Biol.Chem.275:17106-17113(2000);Arie等人,Mol.Microbiol.39:199-210(2001)。

[0264] 为了使表达的异源蛋白(特别是对蛋白水解敏感的那些)的蛋白水解最小化,某些缺乏蛋白水解酶的宿主菌株可用于本发明,如例如美国专利号5,264,365、美国专利号5,

508,192、Hara等人, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996) 中描述的。缺乏蛋白水解酶并用过表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠埃希氏菌菌株可以用作编码本申请抗体的表达系统中的宿主细胞。

[0265] 本文产生的抗体可以进一步纯化以获得基本上均质的制剂以供进一步测定和使用。可以采用本领域已知的标准蛋白质纯化方法。以下程序是合适的纯化程序的实例:在免疫亲和柱或离子交换柱上分级、乙醇沉淀、反相HPLC、在二氧化硅或阳离子交换树脂诸如DEAE上色谱、色谱聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀和使用例如Sephadex G-75的凝胶过滤。固定在固相上的蛋白A例如可用于本公开的结合分子的免疫亲和纯化的一些实施方案中。固定蛋白A的固相优选是包含玻璃或二氧化硅表面的柱,更优选受控孔玻璃柱或硅胶柱。在一些实施方案中,柱已质试剂诸如甘油,以试图防止污染物的非特异性粘附。然后洗涤固相以除去非特异性结合到固相的污染物。最后,通过洗脱从固相中回收目标抗体。

#### [0266] 真核细胞中的重组生产

[0267] 对于真核表达,载体组分通常包括但不限于以下中的一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种标记基因和增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0268] 用于真核宿主的载体还可以具有编码信号序列或在成熟蛋白质或多肽的N末端具有特异性切割位点的其他多肽的插入片段。所选择的异源信号序列优选是被宿主细胞识别并加工(即,被信号肽酶切割)的异源信号序列。在哺乳动物细胞表达中,可使用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列,例如单纯疱疹gD信号。这种前体区域的DNA可以在阅读框中与编码本申请抗体的DNA连接。

[0269] 通常,对于哺乳动物表达载体而言并不需要复制起始点组分(通常仅使用SV40起始点,因为其包含早期启动子)。

[0270] 表达载体和克隆载体可包含选择基因,其也被称为可选择标记物。选择基因可以编码赋予对抗生素或其他毒素(例如,氨基青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素)的抗性的蛋白质;补体营养缺陷型缺陷;或提供复合培养基中不可获得的关键营养物。

[0271] 选择方案的一个实例利用药物来抑制宿主细胞的生长。那些用异源基因成功转化的细胞产生赋予抗药性的蛋白,并因此在选择方案中存活。这种显性选择的实例利用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0272] 用于哺乳动物细胞的合适选择标记的另一个实例是能够鉴定能够摄取编码本申请抗体的核酸的细胞的那些。例如,首先通过在含有氨甲喋呤(Mtx)(DHFR的竞争性拮抗剂)的培养基中培养所有的转化体来鉴定用DHFR选择基因转化的细胞。当使用野生型DHFR时,示例性的合适宿主细胞是缺乏DHFR活性的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。替代地,用编码多肽的DNA序列、野生型DHFR蛋白和另一种选择标记诸如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH)转化或共转化的宿主细胞(特别是含有内源性DHFR的野生型宿主)可以通过在含有选择标记的选择剂诸如氨基糖苷抗生素的培养基中的细胞生长来选择。

[0273] 表达和克隆载体通常含有被宿主生物识别并可操作地连接至编码所需多肽序列的核酸的启动子。真核基因具有富含AT的区域,位于转录起始位点上游大约25至30个碱基。可以包括在许多基因转录起始点上游70至80个碱基处发现的另一个序列。大多数真核生物的3'端可以是用于将聚A尾添加到编码序列的3'端的信号。所有这些序列均可以插入真核表达载体中。

[0274] 哺乳动物宿主细胞中载体的多肽转录可以例如通过从病毒基因组获得的启动子来控制,所述病毒诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(诸如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒40(SV40),来自异源哺乳动物启动子,例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子,来自热休克启动子,条件是此类启动子与宿主细胞系统相容。

[0275] 高等真核生物对编码本公开的抗体的DNA的转录通常通过将增强子序列插入载体中来增强。现在已知来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、 $\alpha$ -胎蛋白和胰岛素)的许多增强子序列。实例包括位于复制起始点后侧的SV40增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起始点后侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子。还参见Yaniv,Nature 297:17-18(1982)关于用于激活真核启动子的增强元件。增强子可以在多肽编码序列的位置5'或3'处剪接到载体中,但优选位于启动子的位点5'处。

[0276] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其他多细胞生物体的有核细胞)的表达载体还含有终止转录和稳定mRNA所必需的序列。此类序列通常可从真核或病毒DNA或cDNA的5'非翻译区获得,并且有时也可从3'非翻译区获得。这些区域含有在编码多肽的mRNA的非翻译部分中转录为聚腺苷酸化片段的核苷酸片段。一种有用的转录终止组分为牛生长激素聚腺苷酸化区。

[0277] 用于在本文载体中克隆或表达DNA的合适宿主细胞包括本文所述的高等真核细胞,包括脊椎动物宿主细胞。培养(组织培养)中脊椎动物细胞的增殖已经成为常规方法。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚胎肾系(亚克隆用于悬浮培养生长的293或293细胞,Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞-DHFR(CHO,Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));小鼠支持细胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);水牛大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TR1细胞(Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;以及人肝癌细胞系(Hep G2)。

[0278] 宿主细胞可以用上述用于抗体生产的表达或克隆载体转化,并在常规营养培养基中培养,该常规营养培养基经适当修饰以诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因。

[0279] 用于产生本申请的抗体的宿主细胞可以在多种培养基中培养。可商购获得的培养基,诸如Ham's F10(Sigma)、最小必需培养基((Minimal Essential Medium, MEM)、(Sigma))、RPMI-1640(Sigma)和杜尔贝科氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, (DMEM), Sigma)适于培养宿主细胞。此外,Ham等人,Meth.Enz.58:44(1979)、Barnes等人,Anal.Biochem.102:255(1980)、美国专利号4,767,704、4,657,866、4,927,762、4,560,655或5,122,469、WO 90/03430、WO 87/00195或美国专利再颁布30,985中描述的任何培养基可用作宿主细胞的培养基。这些培养基中的任何一种可根据需要用激素和/或其他生长因子(诸如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(诸如氯化钠、钙、镁及磷酸盐)、缓冲液(诸如HEPES)、核苷酸(诸如腺嘌呤核苷和胸腺嘧啶核苷)、抗生素(诸如

GENTAMYCIN<sup>TM</sup>药物)、微量元素(定义为通常以微摩尔范围的最终浓度存在的无机化合物),以及葡萄糖或等量的能量源进行补充。还可以包括本领域技术人员已知的适当浓度的任何其他必要的补充物。培养条件,诸如温度、pH等,是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些,并且对于普通技术人员而言是显而易见的。

[0280] 当使用重组技术时,抗体可以在细胞内、周质空间中产生,或直接分泌到培养基中。如果抗体在细胞内产生,作为第一步,例如通过离心或超滤除去颗粒碎片,宿主细胞或裂解片段。当抗体分泌到培养基中时,通常首先使用可商够获得的蛋白质浓缩过滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤装置浓缩来自此类表达系统的上清液。蛋白酶抑制剂诸如PMSF可以包含在任何前述步骤中以抑制蛋白水解,并且可以包含抗生素以防止外来污染物的生长。

[0281] 由细胞制备的蛋白质组合物可以使用例如羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析和亲和色谱来纯化,其中亲和色谱是优选的纯化技术。亲和配体所附着的基质通常是琼脂糖,但也可以使用其他基质。机械稳定的基质,诸如可控孔玻璃或聚(苯乙烯-二乙烯基)苯,可以比琼脂糖实现更快的流速和更短的处理时间。根据要回收的抗体,也可以使用其他蛋白质纯化技术,诸如离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅色谱法、肝素SEPHAROSE<sup>TM</sup>阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)色谱法、色谱聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。在任一个或多个初步纯化步骤之后,可以对包含目标抗体和污染物的混合物进行低pH疏水相互作用色谱。

[0282] 5.7使用方法

[0283] 5.7.1.治疗方法和用途

[0284] 在另一方面,本文提供了本文提供的分子和寡聚物的使用方法和用途。此类方法和用途包括治疗方法和用途,例如,涉及向患有疾病或病症的受试者施用分子或寡聚物或包含它们的组合物。在一些实施方案中,组合物以有效治疗疾病或病症的有效量施用。用途包括组合物在此类方法和治疗中的用途,以及在制备用于实施此类治疗方法的药物中的用途。在一些实施方案中,所述方法通过向患有或疑似患有该疾病或病况的受试者施用组合物来进行。在一些实施方案中,这些方法由此治疗受试者的疾病或病症。

[0285] 在一些实施方案中,本文提供的治疗引起疾病或病症或与其相关的症状、不良作用或结果或表型的完全或部分改善或减少。理想的治疗效果包括但不限于:防止疾病的发生或复发、缓解症状、消除疾病的任何直接或间接的病理学后果、防止转移、降低疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态以及缓解或改善预后。这些术语包括但不暗示完全治愈疾病或完全消除任一种或多种症状或对所有症状或结果的影响。

[0286] 如本文所用,在一些实施方案中,本文提供的治疗延迟疾病或病症的发展,例如延迟、阻碍、减缓、阻滞、稳定、遏制和/或推迟疾病(诸如癌症)的发展。这种延迟可以具有不同的时间长度,这取决于疾病史和/或接受治疗的个体。如本领域技术人员显而易见的,充分或显著的延迟实际上可以涵盖预防,因为个体不发展疾病或病症。例如,可以延迟晚期癌症,诸如转移的发展。在其他实施方案中,本文提供的方法或用途预防疾病或病症。

[0287] 在一些实施方案中,本发明的分子或寡聚物用于治疗实体瘤癌症。在其他实施方案中,本发明的分子或寡聚物用于治疗血癌。在其他实施方案中,疾病或病症是自身免疫疾病和炎性疾病。在其他实施方案中,疾病或病症是感染性疾病。

[0288] 在一些实施方案中,疾病或病症是异常细胞生长和/或细胞凋亡失调的疾病。此类疾病的实例包括但不限于癌症、间皮瘤、膀胱癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内黑素瘤、卵巢癌、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、骨癌、结肠癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌、胃肠(胃、结肠直肠和/或十二指肠)癌、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、睾丸癌、肝细胞(肝和/或胆管)癌、原发性或继发性中枢神经系统肿瘤、原发性或继发性脑肿瘤、霍奇金病、慢性或急性白血病、慢性髓性白血病、淋巴细胞淋巴瘤、淋巴细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、T细胞或B细胞来源的淋巴恶性肿瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、口腔癌、非小细胞肺癌、前列腺癌、小细胞肺癌、肾癌和/或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、肾上腺皮质癌、胆囊癌、脾癌、胆管癌、纤维肉瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤或它们的组合。

[0289] 在一些实施方案中,疾病或病症选自以下组成的组:膀胱癌、脑癌、乳腺癌、骨髓瘤、宫颈癌、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、食道癌、肝细胞癌、淋巴细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、T细胞或B细胞来源的淋巴恶性肿瘤、黑素瘤、骨髓性白血病、骨髓瘤、口腔癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、前列腺癌、小细胞肺癌和脾癌。

[0290] 在一些实施方案中,疾病或病症是血液癌症,诸如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,癌症选自以下组成的组:霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、皮肤B细胞淋巴瘤、活化B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性中心淋巴瘤、转化性淋巴瘤、中间分化的淋巴细胞性淋巴瘤、中间淋巴细胞性淋巴瘤(ILL)、弥漫性低分化淋巴细胞性淋巴瘤(PDL)、中心细胞淋巴瘤、弥漫性小裂细胞淋巴瘤(DSCCL)、外周T细胞淋巴瘤(PTCL)、皮肤T细胞淋巴瘤、套区淋巴瘤、低级滤泡性淋巴瘤、多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性T细胞白血病、急性髓性白血病(AML)、急性早幼粒细胞白血病、急性成髓细胞白血病、急性巨核细胞白血病、前体B急性成淋巴细胞白血病、前体T急性成淋巴细胞白血病、伯基特氏白血病(伯基特氏淋巴瘤)、急性双表型白血病、慢性髓性淋巴瘤、慢性髓性白血病(CML)和慢性单核细胞白血病。

[0291] 在其他实施方案中,疾病或病症是实体瘤癌症。在一些实施方案中,实体瘤癌症选自以下组成的组:癌、腺癌、肾上腺皮质癌、结肠腺癌、结肠直肠腺癌、结肠直肠癌、导管细胞癌、肺癌、甲状腺癌、鼻咽癌、黑素瘤、非黑素瘤皮肤癌、肝癌和肺癌。

[0292] 在一些实施方案中,癌症是肾上腺癌。在一些实施方案中,癌症是肛门癌。在一些实施方案中,癌症是阑尾癌。在一些实施方案中,癌症是胆管癌。在一些实施方案中,癌症是膀胱癌。在一些实施方案中,癌症是骨癌。在一些实施方案中,癌症是脑癌。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌。在一些实施方案中,癌症是宫颈癌。在一些实施方案中,癌症是结肠直肠癌。在一些实施方案中,癌症是食道癌。在一些实施方案中,癌症是胆囊癌。在一些实施方案中,癌症是妊娠滋养层细胞癌。在一些实施方案中,癌症是头颈癌。在一些实施方案中,癌症是霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是肠癌。在一些实施方案中,癌症是肾癌。在一些实施方案中,癌症是白血病。在一些实施方案中,癌症是肝癌。在一些实施方案中,癌症是肺癌。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤。在一些实施方案中,癌症是间皮瘤。在一些实施方案

中,癌症是多发性骨髓瘤(MM)。在一些实施方案中,癌症是神经内分泌肿瘤。在一些实施方案中,癌症是非霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是口腔癌。在一些实施方案中,癌症是卵巢癌。在一些实施方案中,癌症是胰腺癌。在一些实施方案中,癌症是前列腺癌。在一些实施方案中,癌症是鼻窦癌。在一些实施方案中,癌症是皮肤癌。在一些实施方案中,癌症是软组织肉瘤、脊柱癌。在一些实施方案中,癌症是胃癌。在一些实施方案中,癌症是睾丸癌。在一些实施方案中,癌症是喉癌。在一些实施方案中,癌症是甲状腺癌。在一些实施方案中,癌症是子宫癌、子宫内膜癌。在一些实施方案中,癌症是阴道癌。在一些实施方案中,癌症是外阴癌。

[0293] 在一些实施方案中,肾上腺癌是肾上腺皮质癌(ACC)、肾上腺皮质癌、嗜铬细胞瘤或成神经细胞瘤。在一些实施方案中,肛门癌是鳞状细胞癌、泄殖腔癌、腺癌、基底细胞癌或黑素瘤。在一些实施方案中,阑尾癌是神经内分泌肿瘤(NET)、粘液性腺癌、杯状细胞类癌、肠型腺癌或印戒细胞腺癌。在一些实施方案中,胆管癌是肝外胆管癌、腺癌、肝门胆管癌、肝门周围胆管癌、远端胆管癌或肝内胆管癌。在一些实施方案中,膀胱癌是移行细胞癌(TCC)、乳头状癌、扁平癌、鳞状细胞癌、腺癌、小细胞癌或肉瘤。在一些实施方案中,骨癌是原发性骨癌、肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、骨巨细胞瘤、脊索瘤或转移性骨癌。在一些实施方案中,脑癌是星形细胞瘤、脑干神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、脑膜瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、混合性神经胶质瘤、垂体瘤、垂体腺瘤、颅咽管瘤、生殖细胞肿瘤、松果体区肿瘤、成神经管细胞瘤或原发性CNS淋巴瘤。在一些实施方案中,乳腺癌是乳腺腺癌、浸润性乳腺癌、非浸润性乳腺癌、乳腺肉瘤、化生性癌、腺囊性癌、叶状肿瘤、血管肉瘤、HER2阳性乳腺癌、三阴性乳腺癌或炎性乳腺癌。在一些实施方案中,宫颈癌是鳞状细胞癌或腺癌。在一些实施方案中,结肠直肠癌是结肠直肠腺癌、原发性结肠直肠淋巴瘤、胃肠道间质瘤、平滑肌肉瘤、类癌瘤、粘液性腺癌、印戒细胞腺癌、胃肠道类癌瘤或黑素瘤。在一些实施方案中,食管癌是腺癌或鳞状细胞癌。在一些实施方案中,胆囊癌是腺癌、乳头状腺癌、腺鳞癌、鳞状细胞癌、小细胞癌或肉瘤。在一些实施方案中,妊娠滋养层细胞疾病(GTD)是葡萄胎、妊娠滋养层细胞瘤形成(GTN)、绒毛膜癌、胎盘部位滋养层细胞肿瘤(PSTT)或上皮样滋养层细胞肿瘤(ETT)。在一些实施方案中,头颈癌是喉癌、鼻咽癌、下咽癌、鼻腔癌、鼻窦癌、唾液腺癌、口腔癌、口咽癌或扁桃体癌。在一些实施方案中,霍奇金淋巴瘤是典型霍奇金淋巴瘤、结节性硬化、混合细胞性、富含淋巴细胞、缺乏淋巴细胞或结节性淋巴细胞为主的霍奇金淋巴瘤(NLPHL)。在一些实施方案中,肠癌是小肠癌(small intestine cancer)、小肠癌(small bowel cancer)、腺癌、肉瘤、胃肠道间质瘤、类癌瘤或淋巴瘤。在一些实施方案中,肾癌是肾细胞癌(RCC)、透明细胞RCC、乳头状RCC、嫌色细胞RCC、集合管RCC、未分类RCC、移行细胞癌、尿路上皮癌、肾盂癌或肾肉瘤。在一些实施方案中,白血病是急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、毛细胞白血病(HCL)或骨髓增生异常综合征(MDS)。在一个具体的实施方案中,白血病是AML。在一些实施方案中,肝癌是肝细胞癌(HCC)、纤维板层HCC、胆管癌、血管肉瘤或肝转移。在一些实施方案中,肺癌是小细胞肺癌、小细胞癌、复合性小细胞癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、鳞状细胞肺癌、大细胞未分化癌、肺结节、转移性肺癌、腺鳞癌、大细胞神经内分泌癌、唾液腺型肺癌、肺类癌、间皮瘤、肺肉瘤样癌或恶性颗粒细胞肺肿瘤。在一些实施方案中,黑素瘤是浅表扩散性黑素瘤、结节性黑素瘤、肢端雀斑样黑素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、

无黑素性黑素瘤、促结缔组织增生性黑素瘤、眼部黑素瘤或转移性黑素瘤。在一些实施方案中,间皮瘤是胸膜间皮瘤、腹膜间皮瘤、心包间皮瘤或睾丸间皮瘤。在一些实施方案中,多发性骨髓瘤是活动性骨髓瘤或冒烟性骨髓瘤。在一些实施方案中,神经内分泌肿瘤是胃肠神经内分泌肿瘤、胰腺神经内分泌肿瘤或肺神经内分泌肿瘤。在一些实施方案中,非霍奇金淋巴瘤是间变性大细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、MALT淋巴瘤、小细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、前体T淋巴细胞白血病/淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、成人T细胞淋巴瘤/白血病(ATLL)、毛细胞白血病、B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区B细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、B细胞非霍奇金淋巴瘤、T细胞非霍奇金淋巴瘤、自然杀伤细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、阿利伯特-巴赞综合征、塞扎里综合征、原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤(AITL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、系统性ALCL、肠病型T细胞淋巴瘤(EATL)或肝脾 $\gamma/\delta$ T细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,口腔癌是鳞状细胞癌、疣状癌、小唾液腺癌、淋巴瘤、良性口腔肿瘤、嗜酸性肉芽肿、纤维瘤、颗粒细胞瘤、角化棘皮瘤、平滑肌瘤、骨软骨瘤、脂肪瘤、神经鞘瘤、神经纤维瘤、乳头状瘤、尖锐湿疣、疣状黄瘤、化脓性肉芽肿、横纹肌瘤、牙源性肿瘤、粘膜白斑、粘膜红斑、鳞状细胞唇癌、基底细胞唇癌、口腔癌、牙龈癌或舌癌。在一些实施方案中,卵巢癌是卵巢上皮癌、粘液性上皮性卵巢癌、子宫内膜样上皮性卵巢癌、透明细胞上皮性卵巢癌、未分化上皮性卵巢癌、卵巢低恶性潜能肿瘤、原发性腹膜癌、输卵管癌、生殖细胞肿瘤、畸胎瘤、无性细胞瘤、卵巢生殖细胞瘤、内胚层窦肿瘤、性索-基质肿瘤、性索-性腺基质肿瘤、卵巢基质肿瘤、颗粒细胞肿瘤、颗粒-膜肿瘤、支持-间质肿瘤、卵巢肉瘤、卵巢癌肉瘤、卵巢腺肉瘤、卵巢平滑肌肉瘤、卵巢纤维肉瘤、克鲁肯伯格肿瘤或卵巢囊肿。在一些实施方案中,胰腺癌是胰腺外分泌腺癌、胰腺内分泌腺癌或胰腺腺癌、胰岛细胞肿瘤或神经内分泌肿瘤。在一些实施方案中,前列腺癌是前列腺腺癌、前列腺肉瘤、移行细胞癌、小细胞癌或神经内分泌肿瘤。在一些实施方案中,鼻窦癌是鳞状细胞癌、粘膜细胞癌、腺样囊性细胞癌、腺泡细胞癌、鼻窦未分化癌、鼻腔癌、鼻旁窦癌、上颌窦癌、筛窦癌或鼻咽癌。在一些实施方案中,皮肤癌是基底细胞癌、鳞状细胞癌、黑素瘤、梅克尔细胞癌、卡波西肉瘤(KS)、光化性角化病、皮肤淋巴瘤或角化棘皮瘤。在一些实施方案中,软组织癌是血管肉瘤、皮肤纤维肉瘤、上皮样肉瘤、尤因氏肉瘤、纤维肉瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、卡波西肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、去分化脂肪肉瘤(DL)、粘液样/圆细胞脂肪肉瘤(MRCL)、高分化脂肪肉瘤(WDL)、恶性纤维组织细胞瘤、神经纤维肉瘤、横纹肌肉瘤(RMS)或滑膜肉瘤。在一些实施方案中,脊柱癌是脊柱转移性肿瘤。在一些实施方案中,胃癌是胃腺癌、胃淋巴瘤、胃肠道间质瘤、类癌瘤、胃类癌瘤、I型ECL细胞类癌、II型ECL细胞类癌或III型ECL细胞类癌。在一些实施方案中,睾丸癌是精原细胞瘤、非精原细胞瘤、胚胎癌、卵黄囊瘤、绒毛膜癌、畸胎瘤、性腺基质瘤、间质细胞瘤或支持细胞瘤。在一些实施方案中,喉癌是鳞状细胞癌、腺癌、肉瘤、喉癌、咽癌、鼻咽癌、口咽癌、下咽癌、喉癌、喉鳞状细胞癌、喉腺癌、淋巴上皮瘤、梭形细胞癌、疣状癌、未分化癌或淋巴结癌。在一些实施方案中,甲状腺癌是乳头状癌、滤泡状癌、Hürthle细胞癌、甲状腺髓样癌或间变性癌。在一些实施方案中,子宫癌是子宫内膜癌、

子宫内膜腺癌、子宫内膜样癌、浆液性腺癌、腺鳞癌、子宫癌肉瘤、子宫肉瘤、子宫平滑肌肉瘤、子宫内膜基质肉瘤或未分化肉瘤。在一些实施方案中,阴道癌是鳞状细胞癌、腺癌、黑素瘤或肉瘤。在一些实施方案中,外阴癌是鳞状细胞癌或腺癌。

[0294] 在一些实施方案中,疾病或病症由病原体引起。在一些实施方案中,病原体引起感染性疾病,该感染性疾病选自以下组成的组:急性弛缓性脊髓炎 (AFM)、无形体病、炭疽、巴贝西虫病、肉毒中毒、布鲁氏菌病、弯曲菌病、耐碳青霉烯性感染、西加鱼毒、艰难梭菌感染、产气荚膜梭菌、球孢子菌病真菌感染、冠状病毒感染、Covid-19 (SARS-CoV-2)、克雅氏病/传染性海绵状脑病、隐孢子虫病 (Crypto)、环孢子虫病、登革热1、2、3或4、白喉、大肠埃希氏菌感染/产志贺毒素 (STEC)、东方马脑炎、出血热 (埃博拉)、埃利希体病、脑炎、虫媒病毒或副感染性疾病、非脊髓灰质炎肠道病毒、D68肠道病毒 (EV-D68)、贾第虫病、鼻疽病、淋球菌感染、腹股沟肉芽肿、B型流感嗜血杆菌疾病 (Hib或H-flu)、汉坦病毒肺综合征 (HPS)、溶血性尿毒症综合征 (HUS)、甲型肝炎 (Hep A)、乙型肝炎 (Hep B)、丙型肝炎 (Hep C)、丁型肝炎 (Hep D)、戊型肝炎 (Hep E)、疱疹、带状疱疹 (Shingles)、组织胞浆菌病感染、人免疫缺陷病毒/AIDS (HIV/AIDS)、人乳头瘤病毒 (HPV)、流感 (Flu)、军团杆菌病 (军团病)、麻风病 (汉森病)、钩端螺旋体病、李斯特菌病 (Listeria)、莱姆病、性病淋巴肉芽肿感染 (LGV)、疟疾、麻疹、类鼻疽、脑膜炎 (病毒性)、脑膜炎球菌病 (脑膜炎 (细菌性))、中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV)、流行性腮腺炎、诺如病毒、虱病、盆腔炎性疾病 (PID)、百日咳 (Whooping Cough)、瘟疫 (腺鼠疫、败血症、肺炎)、肺炎球菌病 (肺炎)、脊髓灰质炎 (Polio)、玻瓦桑、鹦鹉热、阴虱病、脓疱性皮肤病 (天花、猴痘、牛痘)、Q-热病、狂犬病、立克次氏体病 (落基山斑疹热)、风疹 (德国麻疹)、沙门氏菌性胃肠炎 (沙门氏菌属)、疥疮、鲭鱼中毒、败血症、严重急性呼吸综合征 (SARS)、志贺氏菌性胃肠炎 (志贺氏菌属)、天花、耐甲氧西林葡萄球菌感染 (MRSA)、葡萄球菌食物中毒肠毒素B中毒 (葡萄球菌食物中毒)、葡萄球菌感染万古霉素中间体 (VISA)、耐万古霉素葡萄球菌感染 (VRSA)、A组链球菌病 (侵袭性) (Strep A (侵袭性))、链球菌疾病、B组 (Strep-B)、链球菌中毒性休克综合征STSS中毒性休克、梅毒 (原发性的、继发性的、早期潜伏的、晚期潜伏的、先天性的)、破伤风感染、滴虫病、毛滴虫病感染、结核病 (TB)、潜伏性结核病 (LTBI)、兔热病、D组伤寒、阴道病、水痘 (Chickenpox)、霍乱弧菌 (霍乱)、弧菌病 (Vibrio)、埃博拉病毒出血热、拉沙病毒出血热、马堡病毒出血热、西尼罗河病毒、黄热病、耶尔森氏菌和寨卡病毒感染。

[0295] 在一些实施方案中,病原体是细菌。在一些实施方案中,细菌是芽孢杆菌属、巴尔通氏体属、博德特氏菌属、疏螺旋体属、布鲁氏菌属、弯曲杆菌属、衣原体属、嗜衣原体属、梭菌属、棒状杆菌属、肠球菌属、埃希氏菌属、弗朗西斯菌属、嗜血杆菌属、螺杆菌属、军团菌属、钩端螺旋体属、李斯特菌属、分枝杆菌属、支原体属、奈瑟氏球菌属、假单胞菌属、立克次氏体属、沙门氏菌属、志贺氏菌属、葡萄球菌属、链球菌属、密螺旋体属、脲原体属、弧菌属或耶尔辛氏菌属的细菌。

[0296] 在一些实施方案中,病原体是寄生虫。在一些实施方案中,寄生虫是原生动物、蠕虫或体外寄生虫。在一些实施方案中,原生动物是内阿米巴属、贾第虫属、利什曼原虫属、小袋虫属、疟原虫属或隐孢子虫属。在一些实施方案中,蠕虫是吸虫、绦虫、棘头虫或圆虫。在一些实施方案中,体外寄生虫是节肢动物。

[0297] 在一些实施方案中,病原体是病毒。在一些实施方案中,病毒是腺病毒科、沙粒病

毒科、星状病毒科、布尼亚病毒科、杯状病毒科、冠状病毒科、线状病毒科、黄病毒科、肝病毒科、肝炎病毒科、正黏液病毒科、乳头瘤病毒科、副黏液病毒科、细小病毒科、微小核糖核酸病毒科、多瘤病毒科、痘病毒科、呼肠孤病毒科、逆转录病毒科、炮弹病毒科或披膜病毒科的病毒。

[0298] 在一些实施方案中,病毒是腺病毒、冠状病毒、柯萨奇病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、2型单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、人疱疹病毒8型、人免疫缺陷病毒、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人乳头瘤病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒、风疹病毒或水痘-带状疱疹病毒。

[0299] 在其他实施方案中,疾病或病症是免疫或自身免疫病症。此类病症包括自身免疫性大疱病、无 $\beta$ 脂蛋白血症、获得性免疫缺陷相关疾病、与器官移植相关的急性免疫疾病、获得性手足发绀、急性和慢性寄生虫或感染过程、急性胰腺炎、急性肾衰竭、急性风湿热、急性横贯性脊髓炎、腺癌、空中异位搏动、成人(急性)呼吸窘迫综合征、AIDS痴呆综合征、酒精性肝硬化、酒精性肝损伤、酒精性肝炎、过敏性结膜炎、过敏性接触性皮炎、过敏性鼻炎、过敏和哮喘、同种异体移植排斥、 $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶缺乏症、阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化、贫血、心绞痛、强直性脊柱炎相关肺部疾病、前角细胞变性、抗体介导的细胞毒性、抗磷脂综合征、抗受体超敏反应、主动脉和外周动脉瘤、主动脉夹层、动脉高血压、动脉硬化、动静脉瘘、关节病、乏力、哮喘、共济失调、特应性过敏、心房颤动(持续性或阵发性)、心房扑动、房室传导阻滞、萎缩性自身免疫性甲状腺功能减退、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、1型自身免疫性肝炎(典型自身免疫性或狼疮样肝炎)、自身免疫性低血糖症、自身免疫性中性粒细胞减少症、自身免疫性血小板减少症、自身免疫性甲状腺疾病、B细胞淋巴瘤、骨移植排斥、骨髓移植(BMT)排斥、闭塞性细支气管炎、束支传导阻滞、烧伤、恶病质、心律失常、心脏顿抑综合征、心脏肿瘤、心肌病、心肺转流炎症反应、软骨移植排斥、小脑皮质变性、小脑病症、混乱性或多病灶性房性心动过速、化疗相关病症、衣原体、胆汁阻塞、慢性酒精中毒、慢性活动性肝炎、慢性疲劳综合征、与器官移植相关的慢性免疫疾病、慢性嗜酸性粒细胞性肺炎、慢性炎症病理、慢性粘膜皮肤念珠菌病、慢性阻塞性肺病(COPD)、慢性水杨酸盐中毒、结肠直肠常见变异性免疫缺陷(常见变异性低丙种球蛋白血症)、结膜炎、结缔组织疾病相关间质性肺病、接触性皮炎、库姆斯阳性溶血性贫血、肺源性心脏病、克雅氏病、隐源性自身免疫性肝炎、隐源性纤维化肺泡炎、培养阴性败血症、囊性纤维化、细胞因子治疗相关病症、克罗恩氏病、拳击员痴呆、脱髓鞘疾病、登革出血热、皮炎、皮炎硬皮病、皮肤病、皮肌炎/多发性肌炎相关肺病、糖尿病、糖尿病性动脉硬化性疾病、糖尿病、弥漫性路易体病、扩张型心肌病、扩张型充血性心肌病、盘状红斑狼疮、基底神经节病症、弥散性血管内凝血、中年唐氏综合征、药物性间质性肺病、药物性肝炎、由阻断CNS多巴胺受体的药物诱导的药物诱导型运动障碍、药物敏感性、湿疹、脑脊髓炎、心内膜炎、内分泌病、肠病性滑膜炎、会厌炎、爱泼斯坦-巴尔病毒感染、红斑性肢痛症、锥体外系和小脑病症、家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增生症、胎儿胸腺植入物排斥、弗里德赖希共济失调、功能性外周动脉病症、女性不孕症、纤维化、纤维化肺病、真菌性败血症、气性坏疽、胃溃疡、巨细胞动脉炎、肾小球肾炎、血管球形肾炎、古德帕斯彻氏综合症、甲状腺自身免疫性甲状腺功能减退症(桥本氏病)、痛风性关节炎、任何器官或组织的移植物排斥、移植物抗宿主病、革兰氏阴性败血症、革兰氏阳性败血症、由细胞内生物体引起的肉芽肿、B组链球菌(GBS)感染、格雷夫斯氏病、铁血黄素沉着症

相关肺病、毛细胞白血病、哈勒沃登-施帕茨病、桥本氏甲状腺炎、花粉热、心脏移植排斥、血色素沉着症、造血系统恶性肿瘤(白血病和淋巴瘤)、溶血性贫血、溶血性尿毒综合征/溶血性血小板减少性紫癜、出血、过敏性紫癜、甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、HIV感染/HIV神经病变、霍奇金病、甲状旁腺功能减退症、亨廷顿舞蹈病、运动机能亢进性运动障碍、超敏反应、超敏性肺炎、甲状腺机能亢进、多动性运动障碍、下丘脑-垂体-肾上腺轴评估、特发性阿狄森氏病、特发性白细胞减少、特发性肺纤维化、特发性血小板减少、特异质性肝病、婴儿脊髓性肌萎缩、感染性疾病、主动脉炎症、炎性肠病、胰岛素依赖型糖尿病、间质性肺炎、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、缺血-再灌注损伤、缺血性中风、青少年恶性贫血、青少年类风湿性关节炎、青少年脊髓性肌萎缩、卡波西肉瘤、川崎病、肾移植排斥、军团病、利什曼病、麻风病、皮质脊髓系统病变、线性IgA疾病、脂血症、肝移植排斥、莱姆病、淋巴水肿、淋巴细胞浸润性肺病、疟疾、特发性或NOS男性不育症、恶性组织细胞增多症、恶性黑素瘤、脑膜炎、脑膜炎球菌血症、肾显微血管炎、偏头痛、线粒体多系统病症、混合性结缔组织病、混合性结缔组织病相关肺病、单克隆丙种球蛋白病、多发性骨髓瘤、多系统变性(Mencel、Dejerine-Thomas、Shy-Drager和Machado-Joseph)、肌痛性脑炎/肌痛性脑脊髓炎、重症肌无力、肾显微血管炎、鸟胞内分枝杆菌、结核分枝杆菌、骨髓增生异常综合征、心肌梗塞、心肌缺血性病症、鼻咽癌、新生儿慢性肺病、肾炎、肾病、肾病综合征、神经退行性疾病、神经源性肌肉萎缩、中性粒细胞减少性发热、非酒精性脂肪性肝炎、腹主动脉及其分支闭塞、闭塞性动脉病症、器官移植排斥、睾丸炎/附睾炎、睾丸炎/输精管结扎术、器官肿大、骨关节病、骨质疏松症、卵巢衰竭、胰腺移植排斥、寄生虫病、甲状旁腺移植排斥、帕金森氏病、盆腔炎性疾病、寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、类天疱疮、常年性鼻炎、心包疾病、外周动脉粥样硬化性疾病、外周血管疾病、腹膜炎、恶性贫血、晶状体性葡萄膜炎、卡氏肺孢子虫肺炎、肺炎、POEMS综合征(多神经病、器官肿大、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病和皮肤变化综合征)、灌注后综合征、泵后综合征、MI后心切开术综合征、感染后间质性肺病、卵巢早衰、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性肝炎、原发性粘液性水肿、原发性肺动脉高压、原发性硬化性胆管炎、原发性血管炎、进行性核上性麻痹、银屑病、1型银屑病、2型银屑病、银屑病性关节炎、继发于结缔组织病的肺动脉高压、结节性多动脉炎的肺表现、炎症后间质性肺病、放射性纤维化、放射治疗、雷诺氏现象和疾病、雷诺氏病、雷弗素姆氏病、规则性窄QRS心动过速、莱特尔氏病、肾病NOS、肾血管性高血压、再灌注损伤、限制性心肌病、类风湿性关节炎相关间质性肺病、类风湿性脊柱炎、结节病、施密特综合征、硬皮病、老年性舞蹈病、路易体型老年性痴呆、败血症综合征、败血性休克、血清阴性关节炎、休克、镰状细胞性贫血、T-细胞或FAB ALL、高安氏病/动脉炎、毛细血管扩张症、Th2-型和Th1-型介导的疾病、血栓闭塞性脉管炎、血小板减少症、甲状腺炎、毒性、中毒性休克综合征、移植、创伤/出血、2型自身免疫性肝炎(抗LKM抗体肝炎)、B型胰岛素抵抗伴黑棘皮病、III型超敏反应、IV型超敏反应、溃疡性结肠炎关节病、溃疡性结肠炎、不稳定型心绞痛、尿毒症、尿脓毒症、荨麻疹、葡萄膜炎、瓣膜性心脏病、静脉曲张、血管炎、血管炎性弥漫性肺病、静脉疾病、静脉血栓形成、心室颤动、白癩风急性肝病、病毒和真菌感染、病毒性脑炎/无菌性脑膜炎、病毒相关噬血细胞综合征、韦格纳肉芽肿病、韦尼克-科尔萨科夫综合征、威尔逊氏病、任何器官或组织的异种移植排斥、耶尔森菌和沙门氏菌相关关节病、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、自身免疫性淋巴组织增生综合征、溶血性贫血、炎性疾病、血小板减少症、器官移植相关急性和慢性免疫疾病、阿狄森氏病、过

敏性疾病、脱发、斑秃、动脉粥样硬化性疾病/动脉硬化、动脉粥样硬化、关节炎(包括骨关节炎、青少年慢性关节炎、化脓性关节炎、莱姆关节炎、银屑病关节炎和反应性关节炎)、干燥病相关肺病、干燥综合征、皮肤同种异体移植排斥、皮肤变化综合征、小肠移植排斥、精子自身免疫、多发性硬化(所有亚型)、脊髓共济失调、脊髓小脑变性、脊柱关节病、散发性多腺体缺乏I型、散发性多腺体缺乏II型、斯蒂尔氏病、链球菌性肌炎、中风、小脑结构性病变、亚急性硬化性全脑炎、交感性眼炎、晕厥、心血管系统梅毒、系统性过敏反应、系统性炎症响应综合征、系统性青少年类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、系统性红斑狼疮相关肺病、狼疮性肾炎、系统性硬化症和系统性硬化症相关间质性肺病。

[0300] 在一些实施方案中,疾病或病症是炎性疾病。炎症在宿主防御和免疫介导的疾病的进展中发挥着重要作用。炎症响应响应于损伤(例如,创伤、局部缺血和外来颗粒)和感染(例如,细菌或病毒感染)由一系列复杂的事件引发,包括化学介质(例如,细胞因子和前列腺素)和炎性细胞(例如,白细胞)。炎症响应的特征在于血流量增加、毛细血管通透性增加和吞噬细胞的流入。这些事件导致受伤或感染部位肿胀、发红、发热(热模式改变)和脓液形成。

[0301] 细胞因子和前列腺素控制炎症响应,并以有序且自限性级联的方式释放到血液或受影响的组织中。细胞因子和前列腺素的这种释放增加了受伤或感染区域的血流量,并可能导致发红和发热。这些化学物质中的一些导致流体渗漏到组织中,导致肿胀。这种保护过程可能刺激神经并引起疼痛。当这些变化在相关区域发生一段有限的时间时,会对身体有益。炎性响应中体液免疫元件与细胞免疫元件之间的微妙平衡的相互作用使得能够消除有害物质并启动受损组织的修复。当这种微妙平衡的相互作用被破坏时,炎性响应可能导致对正常组织造成相当大的损害,并且可能比引发反应的原始损伤更有害。在这些不受控制的炎性响应的情况下,需要临床干预以防止组织损伤和器官功能障碍。诸如银屑病、类风湿性关节炎、骨关节炎、银屑病关节炎、克罗恩氏病、哮喘、过敏或炎性肠病的疾病的特征在于慢性炎症。炎性疾病诸如关节炎、相关关节炎病症(例如,骨关节炎、类风湿性关节炎和银屑病关节炎)、炎性肠病(例如,克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、败血症、银屑病、特应性皮炎、接触性皮炎和慢性阻塞性肺病、慢性炎性肺病也是普遍且有问题的疾病。

#### [0302] 5.7.2. 诊断和检测方法及用途

[0303] 在另一方面,本文提供了涉及使用本文提供的结合分子进行检测、预后、诊断、分期、确定特定治疗与一种或多种组织或细胞类型的结合和/或告知受试者的治疗决定的方法,诸如通过检测抗原和/或其被抗体识别的表位的存在。

[0304] 在一些实施方案中,将样品(诸如细胞、组织样品、裂解物、组合物或源自其的其他样品)与本文提供的结合分子接触并测定或检测结合。当与相同组织类型的参照细胞相比证实或检测到测试样品中的结合时,其可指示相关疾病或病症的存在,和/或含有抗体的治疗剂将特异性结合与样品来源的组织或细胞或其他生物材料相同或类型相同的组织或细胞。在一些实施方案中,样品来自人体组织并且可以来自患病和/或正常组织,例如来自具有待治疗的疾病或病症的受试者和/或来自与该受试者相同物种但不患有待治疗的疾病或病症的受试者。在一些情况下,正常组织或细胞来自患有待治疗的疾病或病症的受试者,但其本身不是患病的细胞或组织,诸如来自与给定受试者中存在的癌症相同或不同的器官的正常组织。

[0305] 可以使用本领域已知的用于检测特异性抗体-抗原结合的各种方法。示例性免疫测定包括荧光偏振免疫测定 (FPIA)、荧光免疫测定 (FIA)、酶免疫测定 (EIA)、浊度抑制免疫测定 (NIA)、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和放射免疫测定 (RIA)。可以使用指示剂部分或标记基团以满足该方法的各種用途的需要, 这些用途通常由测定设备的可用性和相容的免疫测定程序来决定。示例性标记包括放射性核素 (例如  $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$  或  $^{32}\text{P}$  和/或铬 ( $^{51}\text{Cr}$ )、钴 ( $^{57}\text{Co}$ )、氟 ( $^{18}\text{F}$ )、钆 ( $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ )、锗 ( $^{68}\text{Ge}$ )、钬 ( $^{166}\text{Ho}$ )、铟 ( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )、碘 ( $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、镧 ( $^{140}\text{La}$ )、镱 ( $^{177}\text{Lu}$ )、锰 ( $^{54}\text{Mn}$ )、钼 ( $^{99}\text{Mo}$ )、钯 ( $^{103}\text{Pd}$ )、磷 ( $^{32}\text{P}$ )、镨 ( $^{142}\text{Pr}$ )、钷 ( $^{149}\text{Pm}$ )、铼 ( $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ )、铑 ( $^{105}\text{Rh}$ )、钌 ( $^{97}\text{Ru}$ )、钐 ( $^{153}\text{Sm}$ )、钪 ( $^{47}\text{Sc}$ )、硒 ( $^{75}\text{Se}$ )、( $^{85}\text{Sr}$ )、硫 ( $^{35}\text{S}$ )、锝 ( $^{99}\text{Tc}$ )、钛 ( $^{201}\text{Ti}$ )、锡 ( $^{113}\text{Sn}$ 、 $^{117}\text{Sn}$ )、氦 ( $^3\text{H}$ )、氙 ( $^{133}\text{Xe}$ )、镱 ( $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ )、钇 ( $^{90}\text{Y}$ )、酶 (例如, 碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光素酶或  $\beta$ -半乳糖苷酶)、荧光部分或蛋白质 (例如, 荧光素、罗丹明、藻红蛋白、GFP 或 BFP) 或发光部分 (例如, 由 Quantum Dot Corporation (Palo Alto, Calif.) 提供的 Qdot™ 纳米颗粒)。用于进行上述各种免疫测定的各种通用技术是已知的。

[0306] 在某些实施方案中, 提供了标记的抗体。标记包括但不限于直接检测的标记或部分 (诸如荧光标记、发色标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记), 以及例如通过酶反应或分子相互作用间接检测的部分, 诸如酶或配体。在其他实施方案中, 抗体未被标记, 并且可以使用与任何抗体结合的标记抗体来检测其存在。

[0307] 5.8 试剂盒和制品

[0308] 还提供了包含本文所述的任何分子和寡聚物的试剂盒、单位剂量和制品。在一些实施方案中, 提供了一种试剂盒, 其含有本文所述的任一种药物组合物并且优选地提供其使用说明书。

[0309] 本申请的试剂盒处于合适的包装中。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶子、广口瓶、柔性包装 (例如, 密封的聚酯薄膜或塑料袋) 等。试剂盒可以任选地提供另外的组分, 诸如缓冲液和解释信息。因此, 本申请还提供了制品, 其包括小瓶 (诸如密封小瓶)、瓶子、广口瓶、柔性包装等。

[0310] 制品可包括容器和位于容器上或与容器相关的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可以由多种材料诸如玻璃或塑料形成。通常, 容器容纳有效治疗本文所述的疾病或病症 (诸如癌症) 的组合物, 并且可以具有无菌进入端口 (例如, 容器可以是静脉溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。标签或包装说明书指出组合物用于治疗个体的特定病症。标签或包装说明书将还包括将向个体施用组合物的说明。标签可以指示重构和/或使用的说明。容纳药物组合物的容器可以是多次使用的小瓶, 其允许重复施用 (例如 2-6 次施用) 重构制剂。包装说明书是指治疗产品的商业包装中通常包括的说明书, 其包含关于适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或关于使用此类治疗产品的警告的信息。另外, 制品还可以包含第二容器, 其包含药学上可接受的缓冲液, 诸如抑菌注射用水 (BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。它还可以包括在商业和使用者看来所需的材料, 包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0311] 试剂盒或制品可以包括多个单位剂量的药物组合物和使用说明书, 以足以在药房例如医院药房和配药药房中储存和使用的量包装。

[0312] 为简洁起见, 本文使用了某些缩写。一个实例是表示氨基酸残基的单字母缩写。氨

氨基酸及其相应的三字母和单字母缩写如下：

|        |      |     |     |
|--------|------|-----|-----|
| [0313] | 丙氨酸  | Ala | (A) |
| [0314] | 精氨酸  | Arg | (R) |
| [0315] | 天冬酰胺 | Asn | (N) |
| [0316] | 天冬氨酸 | Asp | (D) |
| [0317] | 半胱氨酸 | Cys | (C) |
| [0318] | 谷氨酸  | Glu | (E) |
| [0319] | 谷氨酰胺 | Gln | (Q) |
| [0320] | 甘氨酸  | Gly | (G) |
| [0321] | 组氨酸  | His | (H) |
| [0322] | 异亮氨酸 | Ile | (I) |
| [0323] | 亮氨酸  | Leu | (L) |
| [0324] | 赖氨酸  | Lys | (K) |
| [0325] | 甲硫氨酸 | Met | (M) |
| [0326] | 苯丙氨酸 | Phe | (F) |
| [0327] | 脯氨酸  | Pro | (P) |
| [0328] | 丝氨酸  | Ser | (S) |
| [0329] | 苏氨酸  | Thr | (T) |
| [0330] | 色氨酸  | Trp | (W) |
| [0331] | 酪氨酸  | Tyr | (Y) |
| [0332] | 缬氨酸  | Val | (V) |

[0333] 本公开总体上在本文中使用肯定性语言描述多种实施方案来公开。本公开还具体包括其中完全或部分排除特定主题的实施方案，诸如物质或材料、方法步骤和条件、方案、程序、测定或分析。因此，尽管本公开一般不按照本公开不包括的内容来表达，但是没有明确包括在本公开中的方面仍然在本文中公开。

[0334] 以下为本公开的示例性实施方案：

[0335] 1. 一种包含IgG C<sub>H</sub>2区的分子，其中在所述IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。

[0336] 2. 如实施方案1所述的分子，其中所述分子还包含IgG铰链区。

[0337] 3. 如实施方案1或实施方案2所述的分子，其还包含IgG C<sub>H</sub>3区。

[0338] 4. 如实施方案1至3中任一项所述的分子，其还包含人μ尾段。

[0339] 5. 如实施方案4所述的分子，其中所述人μ尾段包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少75%、80%、85%或90%同一性的氨基酸序列。

[0340] 6. 如实施方案4或实施方案5所述的分子，其中所述人μ尾段与所述IgG C<sub>H</sub>2区的C-末端缀合。

[0341] 7. 如实施方案4或实施方案5所述的分子，其中所述人μ尾段与所述IgG C<sub>H</sub>3区的C-末端缀合。

[0342] 8. 如实施方案1至7中任一项所述的分子，其中所述分子还包含IgG C<sub>H</sub>1区。

[0343] 9. 如实施方案1至8中任一项所述的分子，其中所述IgG是人IgG。

- [0344] 10.如实施方案9所述的分子,其中所述人IgG是人IgG1。
- [0345] 11.如实施方案9所述的分子,其中所述人IgG是人IgG2。
- [0346] 12.如实施方案9所述的分子,其中所述人IgG是人IgG3。
- [0347] 13.如实施方案9所述的分子,其中所述人IgG是人IgG4。
- [0348] 14.如实施方案1至13中任一项所述的分子,其中所述分子还包含特异性结合至靶标的结合结构域。
- [0349] 15.如实施方案14所述的分子,其中所述结合结构域是抗体片段。
- [0350] 16.如实施方案1至14中任一项所述的分子,其中所述分子是抗体或其抗原结合片段。
- [0351] 17.一种寡聚物,其包含两个或多个如实施方案1至16中任一项所述的分子。
- [0352] 18.一种包含两个或多个分子的寡聚物,每个分子包含IgG C<sub>H</sub>2区,其中在所述IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253被取代为半胱氨酸。
- [0353] 19.如实施方案18所述的寡聚物,其中所述分子还包含IgG铰链区。
- [0354] 20.如实施方案18或实施方案19所述的寡聚物,其还包含IgG C<sub>H</sub>3区。
- [0355] 21.如实施方案18至20中任一项所述的寡聚物,其还包含人 $\mu$ 尾段。
- [0356] 22.如实施方案21所述的寡聚物,其中所述人 $\mu$ 尾段包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列。
- [0357] 23.如实施方案21或实施方案22所述的寡聚物,其中所述人 $\mu$ 尾段与所述IgG C<sub>H</sub>2区的C-末端缀合。
- [0358] 24.如实施方案21或实施方案22所述的寡聚物,其中所述人 $\mu$ 尾段与所述IgG C<sub>H</sub>3区的C-末端缀合。
- [0359] 25.如实施方案18至24中任一项所述的寡聚物,其中所述分子还包含IgG C<sub>H</sub>1区。
- [0360] 26.如实施方案18至25中任一项所述的寡聚物,其中所述IgG是人IgG。
- [0361] 27.如实施方案26所述的寡聚物,其中所述人IgG是人IgG1。
- [0362] 28.如实施方案26所述的寡聚物,其中所述人IgG是人IgG2。
- [0363] 29.如实施方案26所述的寡聚物,其中所述人IgG是人IgG3。
- [0364] 30.如实施方案26所述的寡聚物,其中所述人IgG是人IgG4。
- [0365] 31.如实施方案18至30中任一项所述的寡聚物,其中所述分子还包含特异性结合至靶标的结合结构域。
- [0366] 32.如实施方案31所述的寡聚物,其中所述结合结构域是抗体片段。
- [0367] 33.如实施方案18至32中任一项所述的寡聚物,其中所述分子是抗体或其抗原结合片段。
- [0368] 34.如实施方案18至33中任一项所述的寡聚物,其中所述寡聚物是五聚体。
- [0369] 35.如实施方案18至33中任一项所述的寡聚物,其中所述寡聚物是六聚体。
- [0370] 36.如实施方案18至35中任一项所述的寡聚物,其中所述寡聚物是同聚的并且所述两个或多个分子结合至同一靶标。
- [0371] 37.如实施方案18至35中任一项所述的寡聚物,其中所述寡聚物是异聚的。
- [0372] 38.如实施方案37所述的寡聚物,其中所述两个或多个分子结合至两个或多个不同靶标。

[0373] 39.一种分离的核酸,其编码如实施方案1至16中任一项所述的分子。

[0374] 40.一种载体,其包含如实施方案39所述的核酸。

[0375] 41.一种药物组合物,其包含如实施方案1至16中任一项所述的分子、如实施方案17至38中任一项所述的寡聚物、如实施方案39所述的分离核酸或如实施方案40所述的载体,以及药学上可接受的赋形剂。

[0376] 42.一种用于治疗受试者的疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案41所述的药物组合物。

[0377] 43.一种制备寡聚物的方法,所述寡聚物包含两个或多个分子,每个分子包含IgG C<sub>H</sub>2区,所述方法包括向每个分子中引入在所述IgG C<sub>H</sub>2区中根据EU编号的位置253处的半胱氨酸氨基酸取代。

[0378] 44.一种产生寡聚分子的方法,其包括:

[0379] i.将如实施方案40所述的载体引入宿主细胞;

[0380] ii.在适合产生所述寡聚分子的条件培养所述宿主细胞;和

[0381] iii.纯化所述寡聚分子。

[0382] 已经描述了本公开的多个实施方案。然而,应当理解,在不脱离本公开的实质和范围的情况下,可以进行各种修改。因此,以下实施例旨在说明而非限制权利要求中描述的公开内容的范围。

## [0383] 6. 实施例

[0384] 以下是对研究中使用的各种方法和材料的描述,并且其提出是为了向本领域普通技术人员提供如何制造和使用本发明的完整公开和描述,并且不旨在限制发明人认为是他们的发明的范围,也不旨在表示进行以下实验并且是可以进行的所有实验。应当理解,不必执行以现在时书写的示例性描述,而是可以执行这些描述以生成与本发明的教导相关联的数据等。我们已努力确保所用数字(例如,量、百分比等)的准确性,但应考虑一些实验误差和偏差。

[0385] 6.1 实施例1—huIgG1 Fc- $\mu$ tp变体的质粒构建。

[0386] 本实施例提供了恒定区中具有不同点突变的候选物的质粒构建体的设计,以测试六聚体的形成。

[0387] 制备构建体,其中基于EU编号将以下各组突变中的每一个引入人IgG1 Fc区。Ile 253被半胱氨酸(I253C)取代。Tyr 436被半胱氨酸(Y436C)取代。Gln 438被半胱氨酸(Q438C)取代。His 310被半胱氨酸(H310C)取代。Leu 251被半胱氨酸取代(L251C),Ile 253被甘氨酸(I253G)取代,并且Ser 254被半胱氨酸(S254C)取代。Ser 254被半胱氨酸(S254C)取代,并且Asn 434被半胱氨酸(N434C)取代。Leu 251被半胱氨酸(L251C)取代,并且Ser 254被半胱氨酸(S254C)取代。Asn286被半胱氨酸(N286C)取代。

[0388] 对于上述构建体中的每一个,将 $\mu$ tp(SEQ ID NO:1)添加到C<sub>H</sub>3区的C末端。对于上述构建体中的每一个,将信号肽(SEQ ID NO:2)添加到C<sub>H</sub>2区的N末端。具有I253C突变的huIgG1 Fc- $\mu$ tp的氨基酸序列是SEQ ID NO:3。具有Y436C突变的huIgG1 Fc- $\mu$ tp的氨基酸序列是SEQ ID NO:4。具有Q438C突变的huIgG1 Fc- $\mu$ tp的氨基酸序列是SEQ ID NO:5。具有H310C突变的huIgG1 Fc- $\mu$ tp的氨基酸序列是SEQ ID NO:6。具有L251C、I253G和S254C突变的huIgG1 Fc- $\mu$ tp的氨基酸序列是SEQ ID NO:7。具有S254C和N434C突变的huIgG1Fc- $\mu$ tp的

氨基酸序列是SEQ ID NO:8。具有L251C和S254C突变的huIgG1 Fc- $\mu$ tp的氨基酸序列是SEQ ID NO:9。具有N286C突变的huIgG1 Fc- $\mu$ tp的氨基酸序列是SEQ ID NO:10。上述各种序列示于下表1中。

[0389] 表1. 构建体序列

[0390]

| SEQ ID NO. | 描述                               | 序列                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1          | 免疫球蛋白 $\mu$ 链尾段( $\mu$ tp)       | PTLYNVSLVMSDTAGTCY                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 2          | 信号肽                              | MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 3          | 具有 I253C 突变的 huIgG1 Fc- $\mu$ tp | MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCCPPC<br>PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMCSRTP<br>EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV<br>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN<br>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS |

[0391]

| SEQ ID NO. | 描述                                             | 序列                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            |                                                | LSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 4          | 具有 Y436C 突变的 huIgG1 Fc- $\mu$ tp               | MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCCPPC<br>PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHCTQKS<br>LSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY |
| 5          | 具有 Q438C 突变的 huIgG1 Fc- $\mu$ tp               | MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCCPPC<br>PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTCKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY     |
| 6          | 具有 H310C 突变的 huIgG1 Fc- $\mu$ tp               | MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCCPPC<br>PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLCQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY |
| 7          | 具有 L251C、I253G 和 S254C 突变的 huIgG1 Fc- $\mu$ tp | MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCCPPC<br>PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTCMGCRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS                                                       |

[0392]

| SEQ ID NO. | 描述                                       | 序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            |                                          | RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 8          | 具有 S254C 和 N434C 突变的 huIgG1 Fc- $\mu$ tp | MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCCPPC<br>PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMICRTP<br>EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV<br>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN<br>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHCHYTQKS<br>LSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY |
| 9          | 具有 L251C 和 S254C 突变的 huIgG1 Fc- $\mu$ tp | MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCCPPC<br>PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTCMICRTP<br>EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV<br>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN<br>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY |
| 10         | 具有 N286C 突变的 huIgG1 Fc- $\mu$ tp         | MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCCPPC<br>PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP<br>EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHCAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ<br>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR<br>WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY |

[0393] 使用本领域熟知的标准分子生物学技术进行基因克隆、位点突变和质粒构建(参见例如Sambrook和Russel, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第3版, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Kostelny等人, Int.J.Cancer 93:556-565, 2001; Cole等人, J.Immunol.159:3613-3621, 1997; 以及

Tsurushita等人, Methods 36:69-83, 2005)。具体地, huIgG1 Fc- $\mu$ tp变体的氨基酸序列针对哺乳动物表达进行了密码子优化。合成密码子优化的DNA并将其亚克隆到哺乳动物表达载体pTT5中。

[0394] 6.2实施例2—huIgG1 Fc- $\mu$ tp变体的六聚体的生产、纯化和表征。

[0395] 使用Expi293表达系统(Thermo Fisher Scientific)瞬时表达各种huIgG1 Fc- $\mu$ tp构建体。按照制造商的方案进行转染。将转染的细胞培养物在37℃、5%CO<sub>2</sub>下孵育4天。将来自每种huIgG1 Fc- $\mu$ tp构建体和对照的10 $\mu$ L条件培养基与3.3 $\mu$ L 4X Laemmli缓冲液混合,并在95℃下加热5分钟。制备NuPAGE™3%-8%、Tris-醋酸盐蛋白凝胶,并用于观察条件培养基中靶蛋白的瞬时表达(参见图1)。

[0396] 如图1A所示,野生型huIgG1- $\mu$ tp主要以单体形式(54kDa,泳道12)出现。令人惊讶的是,对于huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp(324kDa,泳道6)观察到强烈的六聚体形成。然而,大多数huIgG1 Fc(Q438C)- $\mu$ tp和huIgG1 Fc(Y436C)- $\mu$ tp表达为单体(泳道8和10)。如图1B所示,huIgG1 Fc(H310C)- $\mu$ tp、huIgG1 Fc(L251C、I253G和S254C)- $\mu$ tp、huIgG1 Fc(S254C和N434C)- $\mu$ tp和huIgG1 Fc(L251C和S254C)- $\mu$ tp也表达为单体(泳道5、6、7和8)。如图1C所示,huIgG1Fc(N286C)- $\mu$ tp表达为单体(泳道5)。因此,使用huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp进行进一步纯化和分析。

[0397] huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp的纯化通过并排使用MabSelect™蛋白A树脂和CaptureSelect™FcXL亲和基质(Thermo Fisher Scientific)的亲下拉来手动启动。将200 $\mu$ L蛋白A和FcXL树脂填充在小型旋转柱中。通过移液将含有表达蛋白的培养基施加到柱上。结合后,通过以每次旋转700g离心0.5分钟进行流通、洗涤和洗脱过程。根据制造商的建议,缓冲液1(50mM乙酸钠,pH 3.5)用于蛋白A洗脱,而缓冲液2(20mM乙酸、100mM甘氨酸,pH 3.5)用于FcXL洗脱。PBS缓冲液(pH 7.5)用作两种树脂的洗涤缓冲液。每种洗脱级分的体积为200 $\mu$ L,并在洗脱后立即中和。为了通过电泳分析纯化,将20 $\mu$ L样品与7 $\mu$ L 4X Laemmli缓冲液(非还原性)混合,并在95℃下加热变性5分钟。使用4-20%Criterion™TGX Stain-Free™蛋白质凝胶来解析和显现纯化产物。在蛋白A树脂的任何洗脱级分中均未检测到huIgG1Fc(I253C)- $\mu$ tp的六聚体(参见图2A的泳道E1-E4),但其存在于流通级分中(数据未显示)。相反,在FcXL树脂的洗脱级分中检测到huIgG1Fc(I253C)- $\mu$ tp的六聚体(参见图2B的泳道E1)。这种观察结果表明huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp完全丧失了与蛋白A的结合,这需要C<sub>H</sub>2相互作用。huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp可以经由C<sub>H</sub>3相互作用与FcXL树脂结合。

[0398] 作为上述亲和纯化方法的替代方案,捕获huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp并使用渗滤随后阴离子交换色谱(AIEX)将其纯化。下面详细描述此类实例。过滤含有表达蛋白质的5ml培养基,并使用30kDa截留浓缩器(MilliporeSigma™ Amicon™ Ultra)通过渗滤将缓冲液更换为缓冲液A(50mM Tris、50mM NaCl,pH 8.0)。然后将蛋白质以1ml/min的流速加载到ÄKTA Avant FPLC系统上的1ml HiTrap™ Q XL柱(Cytiva)。用10倍柱体积(CV)的缓冲液A洗涤具有结合蛋白的柱,并使用从100%缓冲液A到100%缓冲液B和高盐(50mM Tris、500mM NaCl,pH 8.0)的线性梯度进行洗脱。收集250 $\mu$ L体积的洗脱级分。六聚体huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp表现出与Q XL树脂的强结合并且以75%缓冲液B或更高的梯度洗脱(注意,25%缓冲液A/75%缓冲液B含有370mM NaCl,并且电导率等于18.45mS/cm)。使用4-20%Criterion™TGX Stain-Free™蛋白凝胶通过电泳分析洗脱级分,如图2C所示。将合并的级

分(图2C中标记泳道的右侧)缓冲液更换为标准HBS缓冲液用于进一步表征。

[0399] 通过质谱、HPLC-SEC和纳米DSF对纯化的huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp六聚体进行表征。去糖基化和DTT还原后,通过完整质谱法测量huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp单链(同源六聚体的唯一亚基)的精确分子量。在完全去除N-糖基化并还原二硫键后,单个huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp链具有26905.70Da的检测分子量,如图3A所示,这与没有翻译后修饰的单链的计算摩尔质量(26904.50Da)匹配。还在非变性条件下通过HPLC-SEC(Agilent)分析了纯化的huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp六聚体。将15 $\mu$ l huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp(1mg/ml)注射到TSKgel G3000SW柱(TOSO)中,使用2X PBS作为流动相,以0.5ml/min的流速运行30分钟。在样品运行之前和之后使用BioRad凝胶过滤标准品。如图3B所示,牛甲状腺球蛋白(670kDa)的保留时间为13分钟,牛 $\gamma$ -球蛋白(158kDa)的保留时间为18分钟,鸡卵清蛋白(44kDa)的保留时间为20分钟。如通过完整质谱所证实的,huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp单体包含2条Fc链并且大小估计为54kDa,而六聚体包含12条Fc链并且大小估计为324kDa。明确的是,在HPLC-SEC色谱图(图3B和图3C)上,huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp六聚体的保留时间为15分钟,并且单体的保留时间为19分钟,而高级寡聚物的保留时间为13分钟。HPLC-SEC的定量分析(图3C)显示94.2%的huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp形成六聚体(来自一步AIEX)。为了评价huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp六聚体的热稳定性,通过纳米DSF对50 $\mu$ l蛋白质(1mg/ml)进行标准分析。由热解折叠引起的固有荧光变化(图3D)证明六聚huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp具有79.54 $^{\circ}$ C的单一解链温度。上述表征表明huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp形成所需的同源六聚体,纯化是可行的,并且其具有出色的热稳定性。

[0400] 6.3实施例3—IgG六聚体的生产和纯化。

[0401] 表达并纯化了包含huIgG1 Fc(I253C)- $\mu$ tp的示例性六聚体IgG抗体。示例性六聚体IgG抗体的抗原结合部分包含来自抗 $\beta$ 克洛素、抗-GFRAL或抗-VEGF的VH和VL,如表2所示。

[0402] 表2.

[0403]

| SEQ ID NO. | 描述               | 序列                                                                                                                                           |
|------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11         | 抗 $\beta$ 克洛索 VH | QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSC<br>KASGYTFTSYDINWVRQAPGQGL<br>EWIGWIYPGDGSTKYNEKFKGKA<br>TITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA<br>VYFCARSDYYGSRSFAYWGQGTL<br>VTVSS |
| 12         | 抗 $\beta$ 克洛索 VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR<br>ASKSVSTSGYVYMHVYQQKPGQ<br>PPKLLIYLAstyleSGVPDRFSGSG<br>SGTDFTLTISVQAEDVAVYYCQH<br>SRDLTFPFGGGGTKLEIK             |
| 13         | 抗 GFRAL VH       | QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKA<br>SGYTFTDYGVIWVKQAPGKALK<br>WMGWINTYTGEPTYADDLKGRF<br>AFSLETSASSASLQINNLIKNE<br>DLYFCARRYGPEDIDYWGQGTTLT           |

[0404]

| SEQ ID NO. | 描述         | 序列                                                                                                                                            |
|------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            |            | VSS                                                                                                                                           |
| 14         | 抗 GFRAL VL | DIVLTQSPVSLAVSLGQRATISCRA<br>SESVDNYGISFMSWFQQKPGQPP<br>KLLIYAASHQGSGVPARFSGSGSG<br>TDFSLNIHPMEEDDSAMYFCLQS<br>KEVPWTFGGGTKLEIK               |
| 15         | 抗 VEGF VH  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA<br>ASGYTFTNYGMNWRQAPGKGL<br>EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRF<br>TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA<br>VYYCAKYPHYGSSHWYFDVW<br>GQGTLLTVSS |
| 16         | 抗 VEGF VL  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS<br>ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKV<br>LIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVP<br>WTFGGGTKVEIK                   |

[0405] 使用Expi293表达系统瞬时表达蛋白质,并如上所述通过电泳进行分析。包含 huIgG1 Fc (I253C) - $\mu$ tp和抗- $\beta$ 克洛索的VH和VL的IgG六聚体显示在图4的泳道4中;包含

huIgG1 Fc (I253C) - $\mu$ tp和抗-GFRAL的VH和VL的IgG六聚体显示在泳道5中;并且包含huIgG1Fc (I253C) - $\mu$ tp和抗VEGF的VH和VL的IgG六聚体显示在泳道6中。

[0406] 这些六聚体通过蛋白L亲和色谱和随后的混合模式色谱纯化。将蛋白质样品通过0.2 $\mu$ m无菌过滤器单元过滤并通过亲和色谱纯化。在正确的缓冲液条件(缓冲液A:1xPBS)下,使用AKTA AVANT FPLC系统以5ml/min的流速将样品加载到5ml HiTrap ProL柱。将结合的蛋白质用5CV的缓冲液A洗涤,并用15CV的100%缓冲液B1 (0.1M甘氨酸、20mM乙酸盐,pH 3.5),然后用15CV的缓冲液B2 (0.1M甘氨酸、20mM乙酸盐,pH 3.0)从树脂洗脱。将洗脱的级分汇集并分别中和。然后将中和的汇集级分通过0.2 $\mu$ m无菌过滤器单元过滤并通过混合模式色谱纯化。在正确的缓冲液条件(缓冲液C:50mM HEPES、30mM NaCl、5mM  $PO_4$ )下,使用AKTA AVANT FPLC系统以5ml/min的流速将样品加载到EconoFit CHT II型40 $\mu$ m预填充柱中。用5CV的缓冲液C洗涤结合的蛋白质,并用0%至100%缓冲液D1 (50mM HEPES, 2M NaCl、5mM  $PO_4$ )的20CV线性梯度洗脱,然后用10CV线性梯度洗脱回到0%缓冲液D1。用缓冲液D2 (50mM HEPES、30mM NaCl、500mM  $PO_4$ )重复此操作。将级分收集在96深孔板中。单体以NaCl梯度洗脱,而六聚体以 $PO_4$ 梯度洗脱。

[0407] 从上文可以理解,尽管为了说明的目的在本文中描述了具体实施方案,但是在不脱离本文提供实质和范围的情况下可以进行各种修改。以上提及的所有参考文献以引用方式全文并入本文。

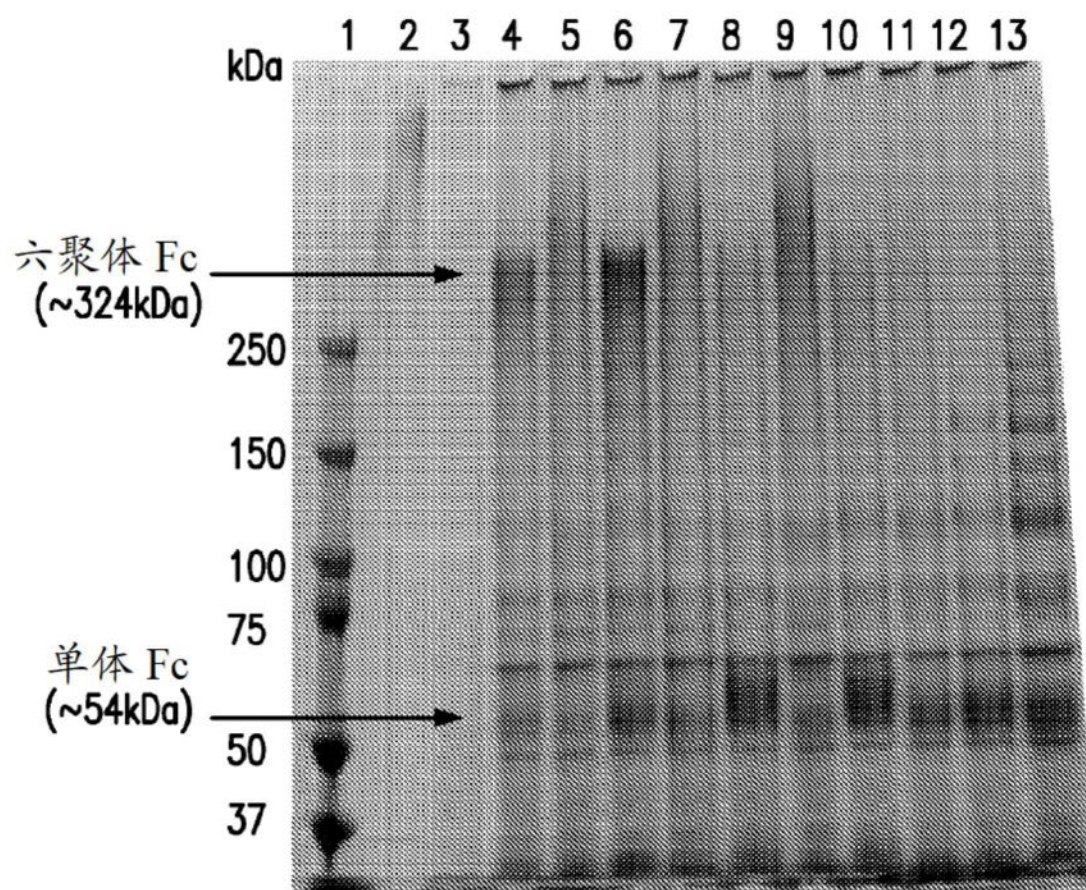


图1A

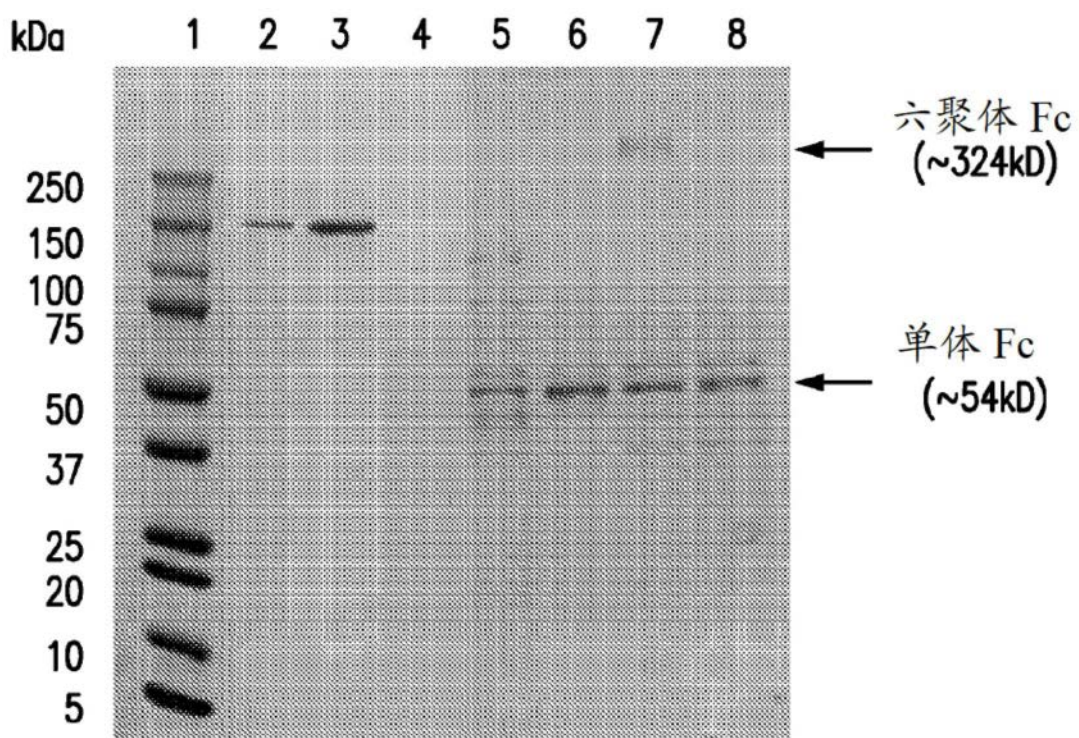


图1B

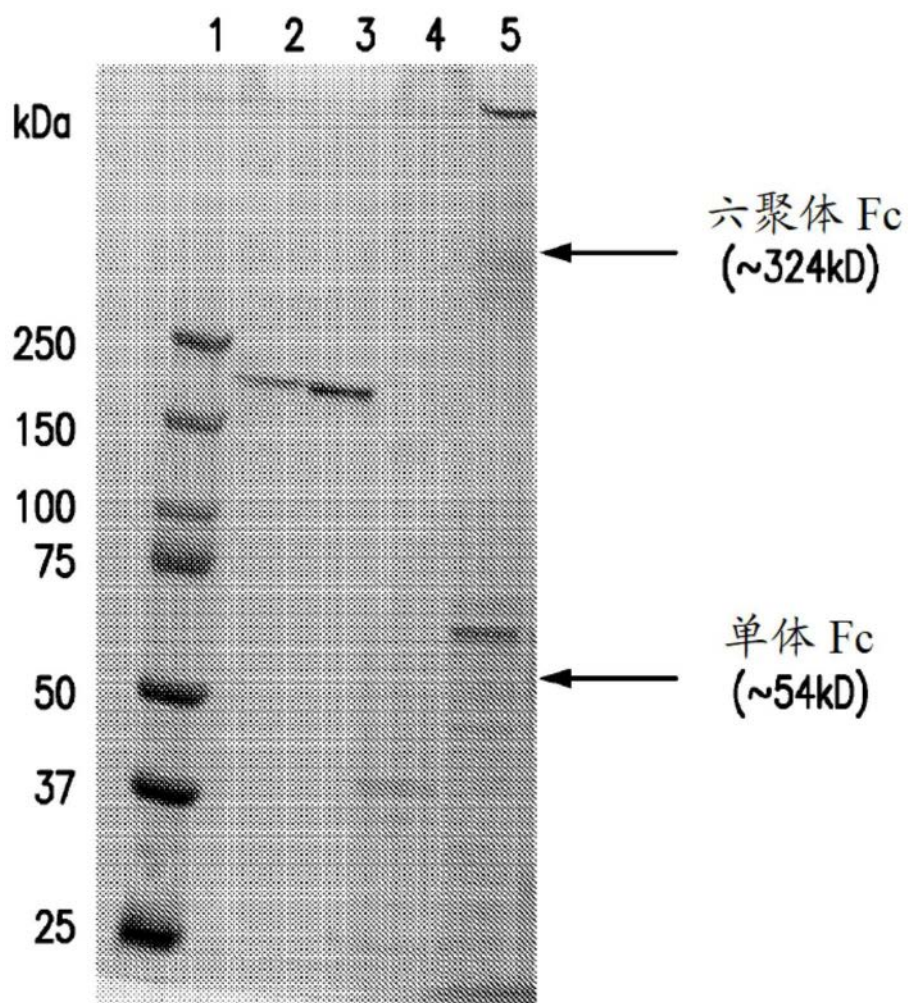


图1C

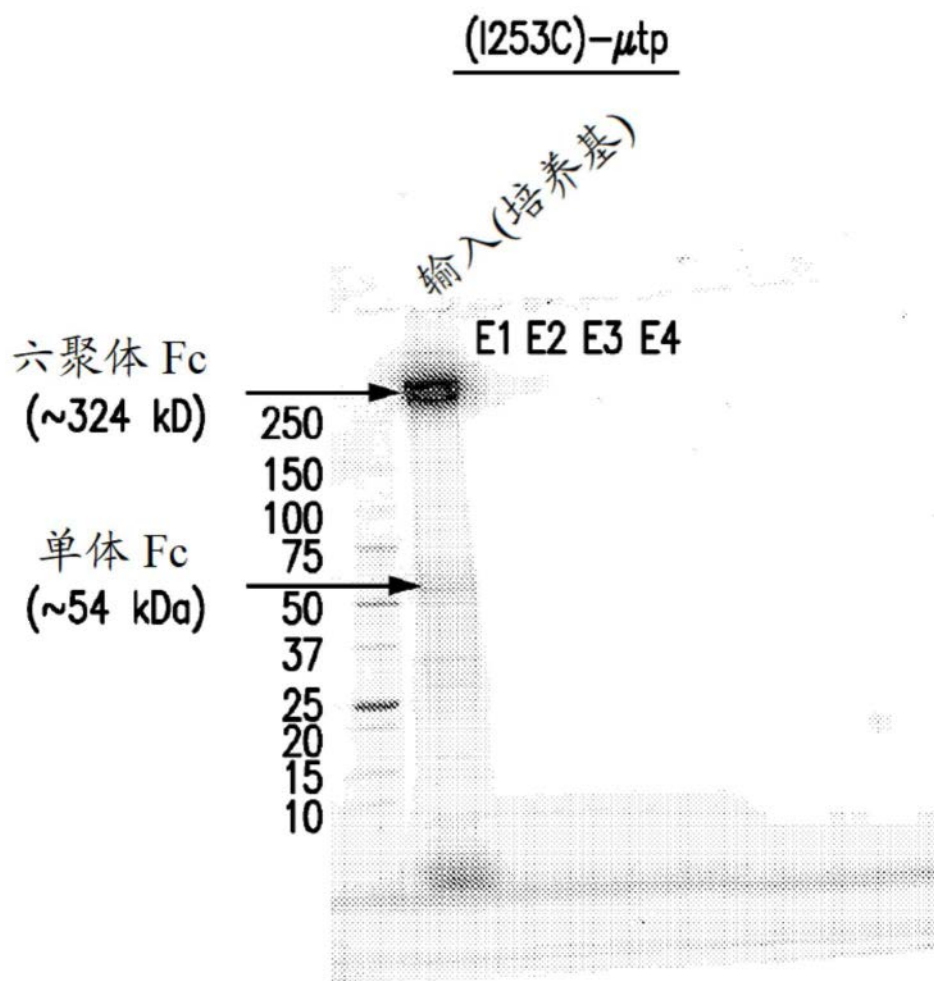


图2A

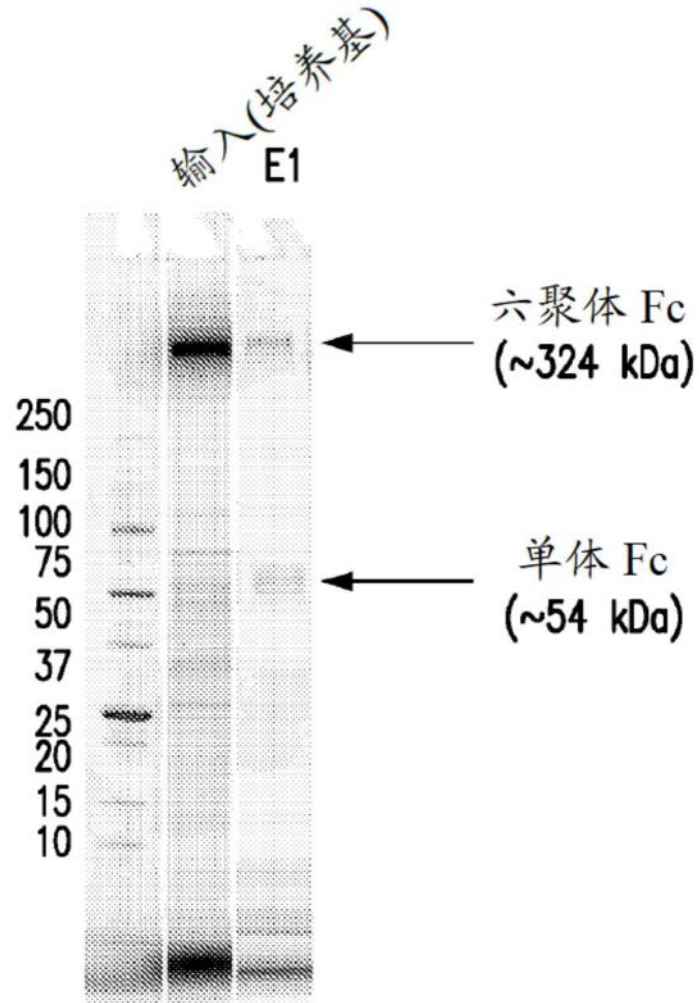


图2B

最浓缩的 huIgG1 Fc (I253C)- $\mu$ tp 的洗脱级分

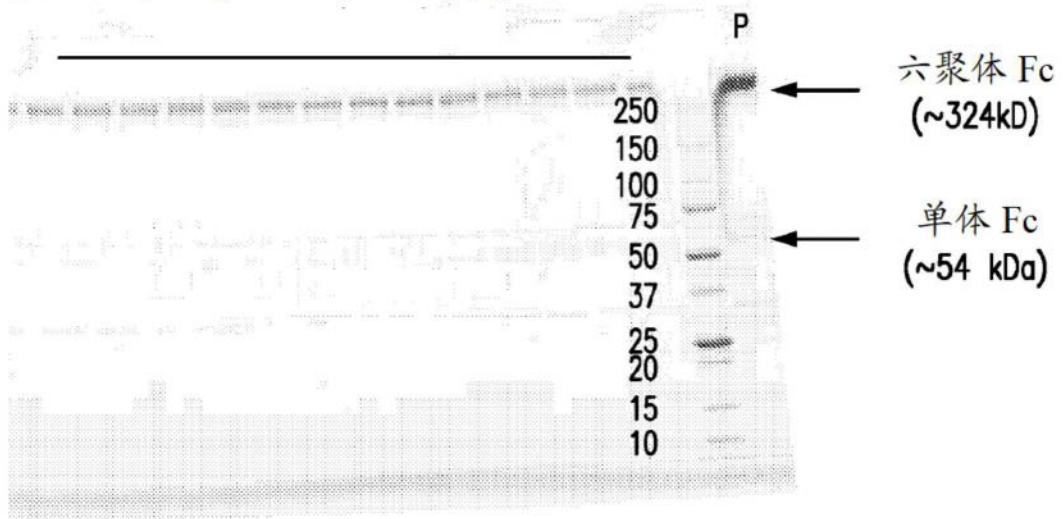


图2C

20210115-PSC0823-56.d 去卷积(同位素宽度=10.5)

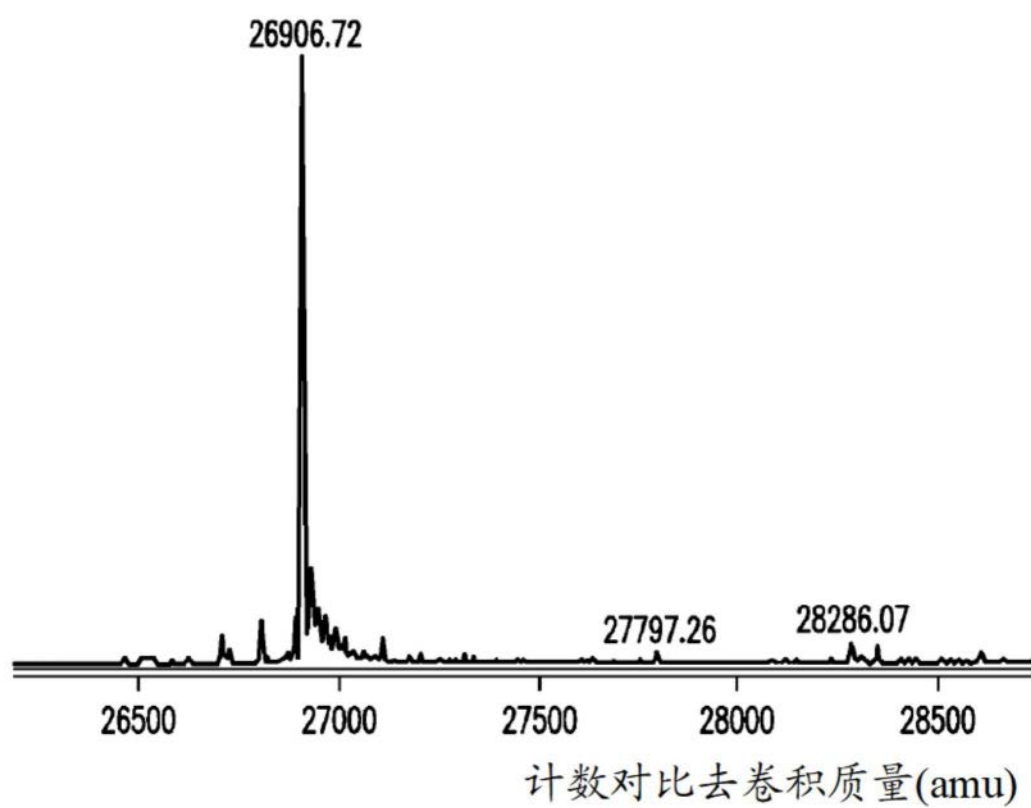


图3A

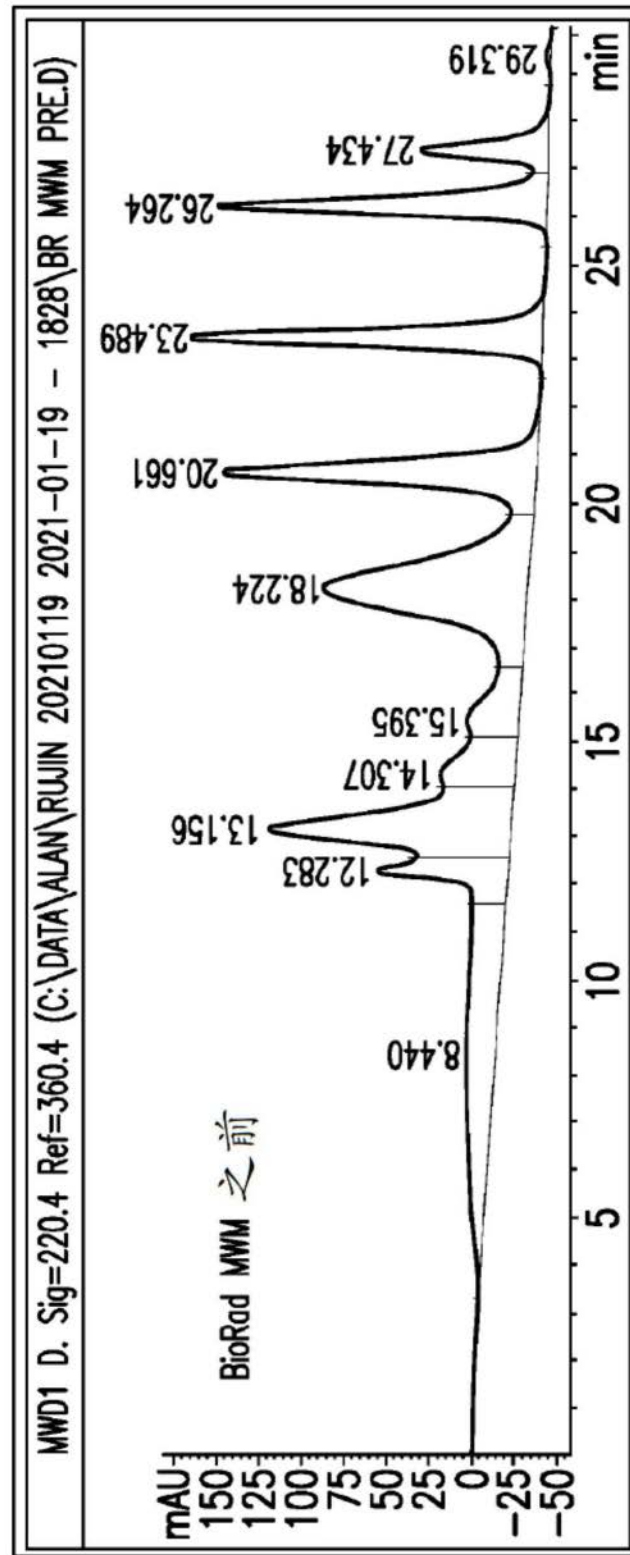


图3B

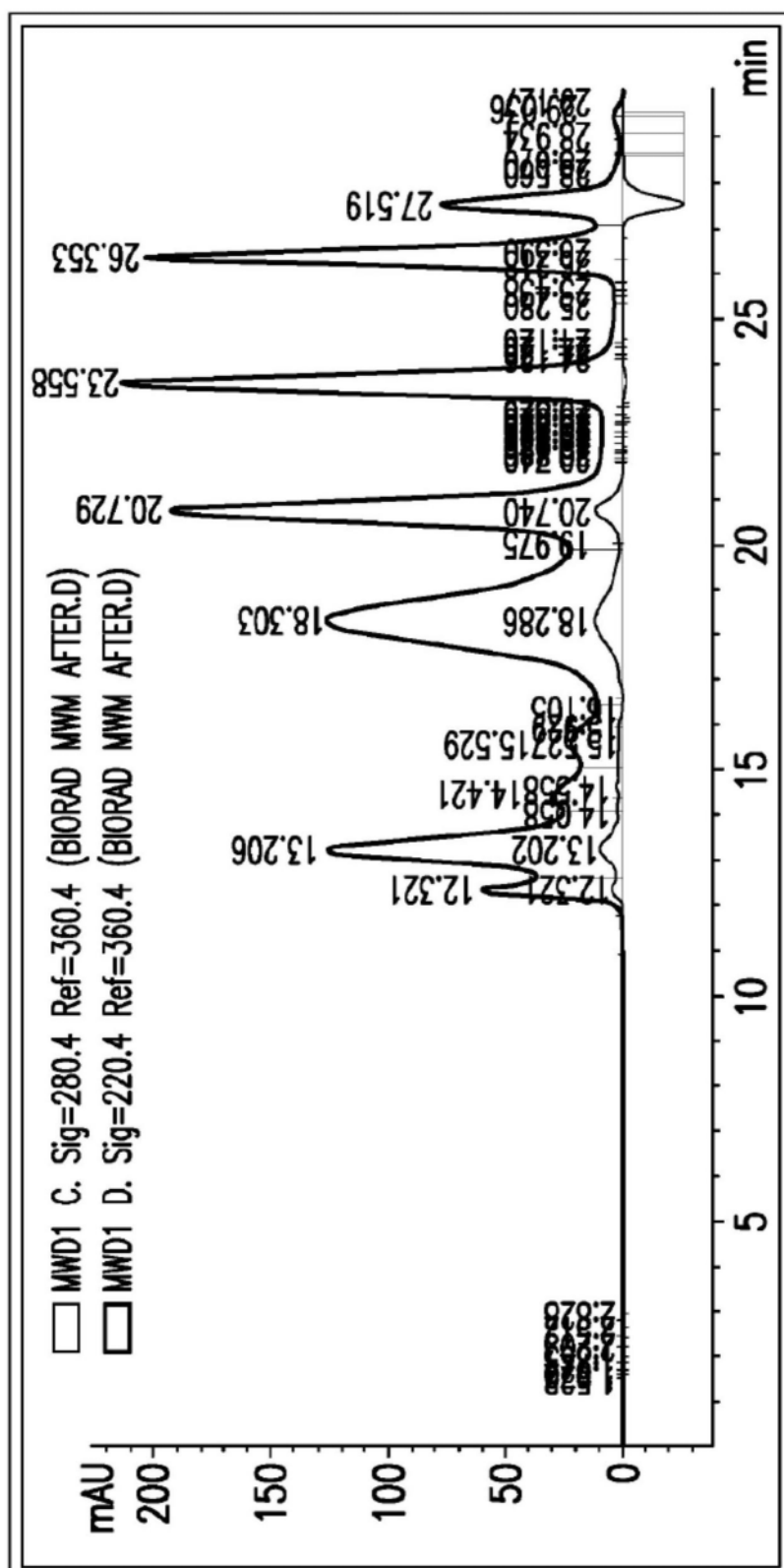


图3B续

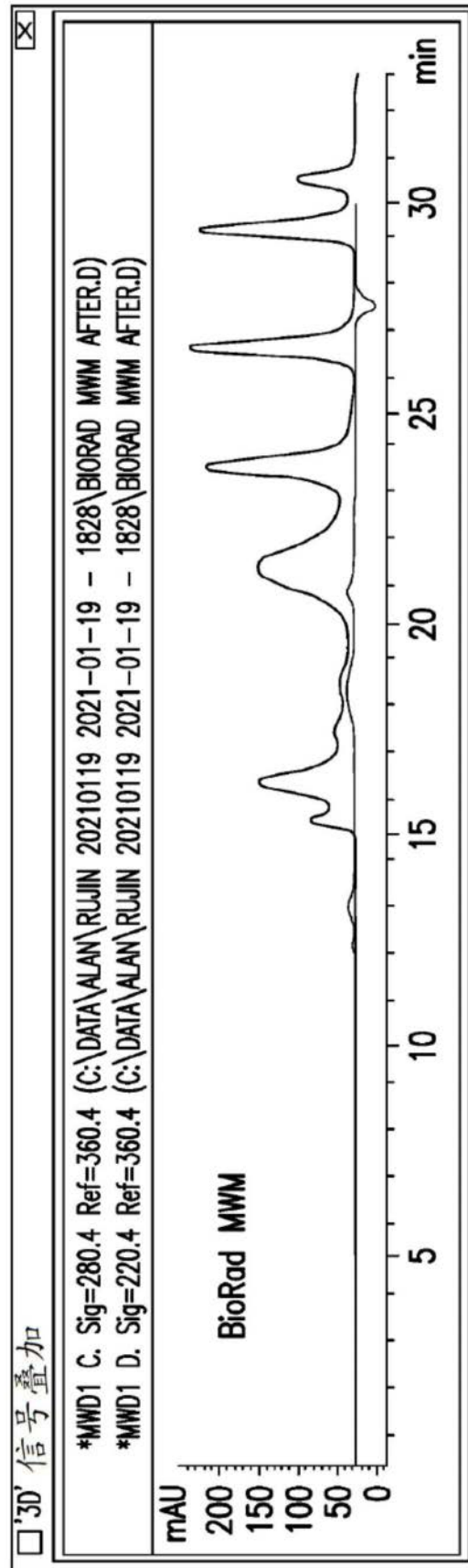


图3B续

纯化的 hulG1 Fe (I253C)-μtp

13 min: 高级寡聚物  
15 min: 六聚体(89%)  
19 min: 单体

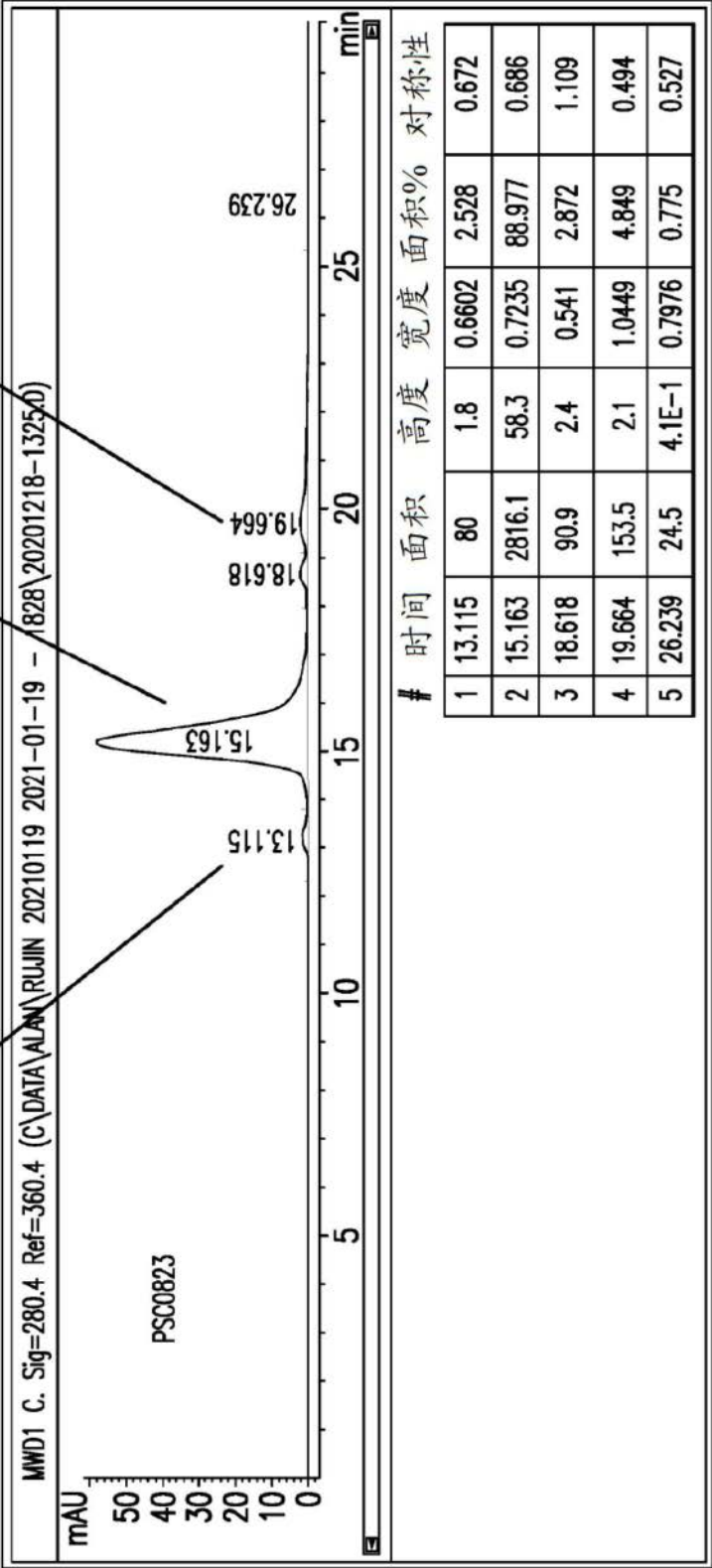


图3C



图3D

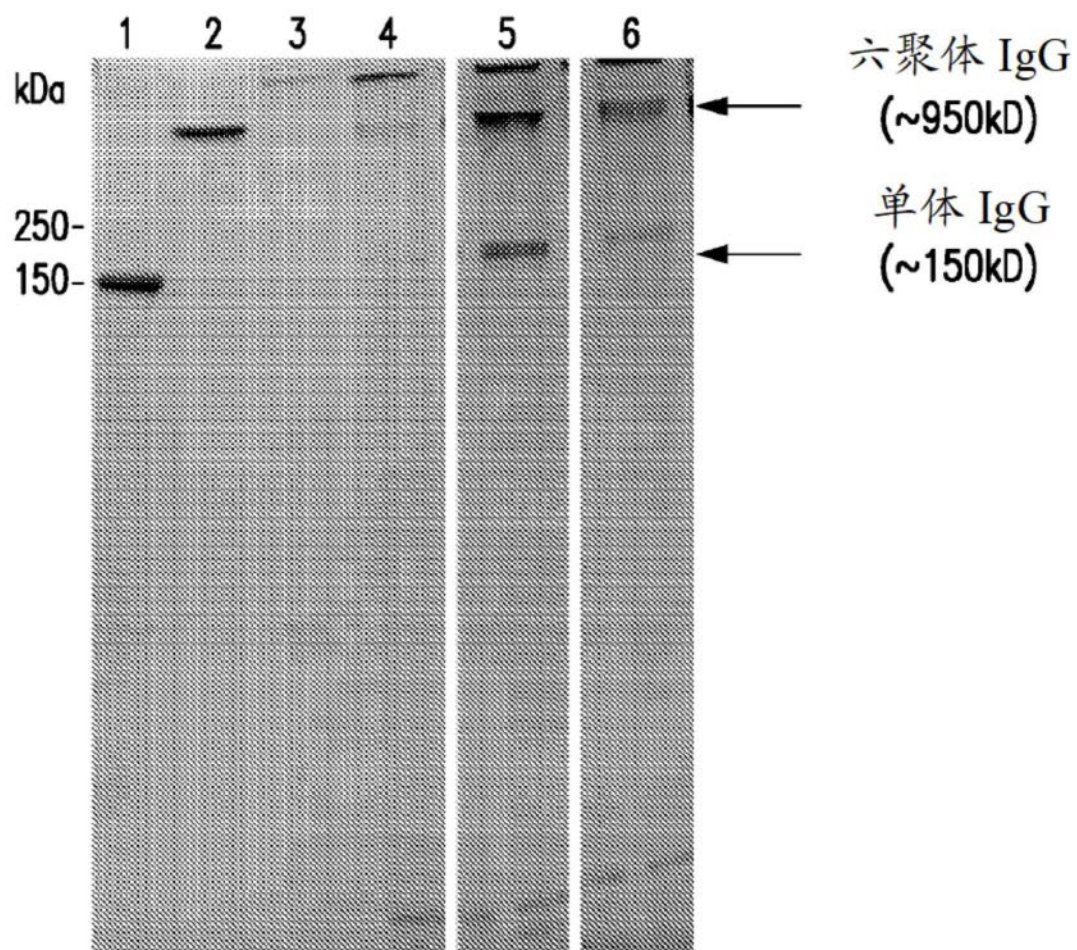


图4