[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
C12N 15/13
C07K 16/46 C07K 17/00
A61K 39/395

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96192224.9

[43]公开日 1998 年 3 月 18 日

[11] 公开号 CN 1176659A

[22]申请日 96.2.5
[30]优先权
[32]95.3.1 [33]US[31]08/399,106
[86]国际申请 PCT/US96/01598 96.2.5
[87]国际公布 WO96/27011 英 96.9.6
[85]进入国家阶段日期 97.8.28
[71]申请人 基因技术股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州
[72]发明人 P·J·卡特 L·G·普雷斯塔
J·B·里奇韦

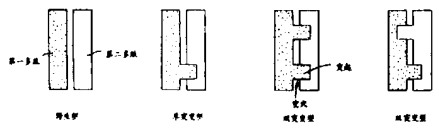
[74]专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 徐 迅

权利要求书 3 页 说明书 51 页 附图页数 11 页

[54]发明名称 制备异多聚体多肽的方法

[57]摘要

本发明涉及一种制备异多聚体多肽如双特异性抗体、双特异性免疫粘附素和抗体—免疫粘附素嵌合体的方法。本发明还涉及用该方法制得的异多聚体。一般而言，该方法涉及在第一多肽界面上引入突起和在第二多肽界面上引入相应的空穴，从而使该突起可置于空穴中，以便促进异多聚体的形成并抑制同多聚体的形成。“突起”的构建是用侧链更大的氨基酸（如酪氨酸或色氨酸）替换第一多肽界面上小侧链的氨基酸。大小相同或相似的、作为突起的补偿性“空穴”是用侧链更小的氨基酸（如丙氨酸或苏氨酸）替换第二多肽界面上大侧链的氨基酸而形成的。突起和空穴可用人工合成方法形成，如改变编码多肽的核酸或通过肽合成。



权　利　要　求　书

1.一种制备异多聚体的方法，其特征在于，该异多聚体包括在界面处相接触的第一多肽和第二多肽，其中第一多肽的界面上含有突起，该突起可置于第二多肽界面上的空穴中，该方法包括:

(a)培养含有编码第一多肽和第二多肽的核酸的宿主细胞，其中编码第一多肽的核酸已从最初的核酸被改变从而编码突起，或者编码第二多肽的核酸已从最初的核酸被改变从而编码空穴，或两者都改变，而且该培养使核酸被表达;

(b)从宿主细胞培养物中回收异多聚体。

2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，编码第一多肽的核酸已从最初的核酸被改变从而编码突起，而且编码第二多肽的核酸已从最初的核酸被改变从而编码空穴。

3.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤(a)之前有一步骤：编码第一多肽界面上原始残基的核酸，被编码侧链体积大于原始残基侧链体积的引入残基的核酸所替换。

4.如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，该引入残基是精氨酸(R)。

5.如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，该引入残基是苯丙氨酸(F)。

6.如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，该引入残基是酪氨酸(Y)。

7.如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，该引入残基是色氨酸(W)。

8.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤(a)之前有一步骤：编码第二多肽界面上原始残基的核酸，被编码侧链体积小于原始残基侧链体积的引入残基的核酸所替换。

9.如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，该引入残基不是半胱氨酸(C)。

10.如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，该引入残基是丙氨酸(A)。

11.如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，该引入残基是丝氨酸(S)。

12.如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，该引入残基是苏氨酸(T)。

13.如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，该引入残基是缬氨酸(V)。

14.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，第一多肽和第二多肽都含有抗体恒定区。

15.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，抗体恒定区是 C_H3 区。

16.如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，该抗体恒定区来自 IgG 。

17.如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，该 IgG 是人 IgG_1。

18.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该异多聚体是双特异性抗体。

19.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该异多聚体是双特异性免疫粘附素。

20.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该异多聚体是抗体-免疫粘附素嵌合体。

21.如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，第一多肽中的一个原始残基被引入残基所替换。

22.如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，第二多肽中的一个原始残基被引入残基所替换。

23.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤(a)之前有一步骤：将编码第一多肽和第二多肽的核酸引入宿主细胞。

24.用权利要求 1 所述的方法制备的异多聚体。

25.一种异多聚体，其特征在于，它包括在界面处相接触的第一多肽和第二多肽，其中第一多肽的界面上含有突起，该突起可置于第二多肽界面上的空穴中，其中该突起、空穴或两者被分别引入第一多肽和第二多肽的界面。

26.如权利要求 25 所述的异多聚体，其特征在于，该突起和空穴已被分别引入第一多肽和第二多肽的界面。

27.如权利要求 26 所述的异多聚体，其特征在于，该突起和空穴各包括天然存在的氨基酸残基。

28.一种组合物，其特征在于，它含有权利要求 25 所述的异多聚体和药学上可接受的载体。

29.一种宿主细胞，其特征在于，它含有编码权利要求 25 所述异多聚体的核酸。

30.如权利要求 29 所述的宿主细胞，其特征在于，编码第一多肽的核酸和编码第二多肽的核酸存在于一个载体中。

31.如权利要求 29 所述的宿主细胞，其特征在于，编码第一多肽的核酸和编码第二多肽的核酸存在于不同的载体中。

32.一种制备异多聚体的方法，其特征在于，它包括培养权利要求 29 所述的宿主细胞使核酸被表达，以及从细胞培养物中回收异多聚体。

33.如权利要求 32 所述的方法，其特征在于，该宿主细胞是哺乳动物细胞。

34.如权利要求 32 所述的方法，其特征在于，该异多聚体是从细胞培养基中回收的。

35.一种制备异多聚体的方法，其特征在于，它包括：

(a)改变编码第一多肽的第一核酸，使第一多肽界面上的氨基酸残基被具有更大侧链体积的氨基酸所置换，从而在第一多肽上产生突起；

(b)改变编码第二多肽的第二核酸，使第二多肽界面上的氨基酸残基被具有更小侧链体积的氨基酸所置换，从而在第二多肽上产生空穴，其中该突起可置于该空穴中；

(c)将第一核酸和第二核酸引入宿主细胞，培养宿主细胞从而表达第一和第二核酸，以及

(d)从细胞培养物中回收异多聚体。

36.如权利要求 35 所述的方法，其特征在于，该第一多肽和第二多肽都含有抗体恒定区。

37.如权利要求 35 所述的方法，其特征在于，抗体恒定区是 C_H3 区。

38.如权利要求 37 所述的方法，其特征在于，该抗体恒定区来自人 IgG 。

说　明　书

制备异多聚体多肽的方法

发明背景

发明领域

本发明涉及制备异多聚体多肽(heteromultimeric polypeptide)(也称异多亚基多肽)例如多特异性抗体(如双特异性抗体)、多特异性免疫粘附素(如双特异性免疫粘附素)和抗体-免疫粘附素嵌合体的方法，以及用这种方法制得的异多聚体多肽。

相关技术的描述

双特异性抗体

双特异性抗体(Bispecific antibodies, BsAbs)具有对至少 2 种不同抗原的结合特异性，它们在大量的临床应用上有巨大的潜力，如在体外或体内免疫诊断和治疗中以及诊断性的免疫分析中用作靶向剂。

在诊断领域中，双特异性抗体在探查细胞表面分子的功能特性以及确定不同 Fc 受体介导细胞毒的能力方面非常有用(Fanger 等人，免疫学重要回顾(Crit. Rev. Immunol.)12:101-124[1992])。Nolan 等人在 Biochem. Biophys. Acta. 1040：1-11(1990)中描述了 BsAb 的其他诊断应用。具体地，可构建 BsAb 以便使酶固定化，从而用于酶免疫分析。为了实现该目的，可将 BsAb 的一个臂设计成能与酶上的一个特异性表位结合，该结合不会抑制酶，而 BsAb 的另一臂与固定基质结合从而保证在所需部位有高密度的酶。这种诊断性的 BsAb 例子包括，Hammerling 等人在 J. Exp. Med. 128:1461-1473(1968)中所述的兔抗-IgG/抗-铁蛋白 BsAb，它被用于确定表面抗原。还开发出了对辣根过氧化物酶(HRP)和激素有结合特异性的 BsAb 。BsAb 的另一种潜在的免疫化学应用是将它们用于双位点免疫分析。例如，产生两种与被分析蛋白质上 2 个不同表位结合的 BsAb-一种 BsAb 使复合物结合于不溶性基质，而另一种则结合指示酶(参见 Nolan 等人，同上)。

双特异性抗体还可用于各种疾病如癌症的体外或体内免疫诊断(Songsivilai 等人，Clin. Exp. Immunol. 79:315[1990])。为了便于 BsAb 的这种诊断应用，BsAb 的一个臂与肿瘤相关抗原结合，而另一臂与可检测的标记物如可牢固结合放射性核素的螯合剂结合。采用这种方法，Le Doussal 等人制造了一种可用于放射性免疫检测结肠癌和甲状腺(thryoid)癌的 BsAb，它的一个臂结合癌胚抗原(CEA)而另一臂结合而二亚乙基三胺五乙酸(DPTA)。参见 Le Doussall 等人，Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62(1992)和 Le Doussal 等人，J. Nucl. Med. 34:1662-1671(1993)。Stickney 等人类似地描述了一种用放射免疫检测法检测表达 CEA 的结肠癌的策

略。这些研究者描述的 BsAb 可结合 CEA 和羟乙基硫脲-苄基-EDTA(EOTUBE)。参见 Stickney 等人，癌症研究 51： 6650-6655(1991)。

通过使其一个臂结合靶目标(如病原体或肿瘤细胞)而另一臂结合细胞毒触发剂分子如 T 细胞受体或 Fcγ 受体，还可将双特异性抗体用于重定向的(redirected)细胞毒性的人体治疗中。因此，双特异性抗体可用于使病人的细胞免疫防御机制特异性地针对肿瘤细胞或感染物。用这种策略，已表明可结合 FcγRIII(即 CD16)的双特异性抗体可介导天然杀伤(NK)细胞/大颗粒淋巴细胞(LGL)在体外杀死肿瘤细胞，并可在体内有效地防止肿瘤生长。 Segal等人，化学免疫学 47: 179(1989)和 Segal 等人，癌症的生物疗法(Biologic Therapy of Cancer) 2(4) DeVita 等人编辑， J. B. Lippincott, Philadelphia(1992) p.1 。类似地，已开发出了一个臂结合 FcγRIII 而另一臂结合 HER2 受体的双特异性抗体，它用于治疗过度表达 HER2 抗原的卵巢和乳房肿瘤。(Hseih-Ma 等人，癌症研究， 52： 6832-6839[1992]和 Weiner 等人,癌症研究， 53： 94-100[1993])。双特异性抗体还可介导 T 细胞的杀伤作用。一般而言，双特异性抗体将 T 细胞上的 CD3 复合物与肿瘤相关抗原相连。一种由连于抗-$p185^{HER2}$ 的抗-CD3 所构成的完全人源化 $F(ab')_2$ BsAb，已被用于使 T 细胞定向地杀灭过度表达 HER2 受体的肿瘤细胞。 Shalaby 等人，J. Exp. Med. 175(1):217(1992)。双特异性抗体还在数种早期阶段的临床试验中进行测试，并获得了令人鼓舞的结果。在一个试验中，给 12 位患肺癌、卵巢癌或乳房癌的病人输入激活的 T-淋巴细胞，该 T 淋巴细胞用抗-CD3/抗-肿瘤(MOC31)双特异性抗体定向。 deLeij 等人，双特异性抗体与定的细胞毒性(Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity), Romet- Lemonne, Fanger 和 Segal 编辑，Lienhart(1991) p. 249 。定向细胞诱导相当程度的局部肿瘤细胞的裂解，一种轻微的炎症反应，但是没有毒副作用也没有抗-小鼠抗体应答反应。在抗-CD3/抗-CD19 双特异性抗体在患 B 细胞恶性肿瘤病人中的非常初步的试验中，还实现了外周肿瘤细胞数目的明显下降。 Clark 等人，双特异性抗体与定向细胞毒性(Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity), Romet- Lemonne, Fanger 和 Segal 编辑，Lienhart(1991) p. 243 。对于 BsAb 的治疗应用，还可参见 Kroesen 等人,Cancer Immunol. Immunother. 37:400-407(1993), Kroesen 等人，Br. J. Cancer, 70:652-66191994)和 Weiner 等人,免疫学杂志， 152： 2385(1994)。

双特异性抗体还可用作纤溶剂或疫苗佐剂。此外，这些抗体可用于治疗感染疾病(如使效应细胞定向于被病毒感染的细胞如 HIV 或流感病毒或原生动物如兔弓形虫(*Toxoplasma gondii*))，用于将免疫毒素送递给肿瘤细胞，或使免疫复合物定向于细胞表面受体 (参见 Fanger 等人，同上)。

因为难以获得足够数量和纯度的 BsAb ，所以 BsAb 的使用受到了严重的妨碍。传统上，双特异性抗体是用杂交体-杂交瘤技术产生的(Millstein 和 Cuello, 自然， 305： 537-539[1983])。因为免疫球蛋白重链和轻链的随机组配(assortment),

所以这些杂交瘤(四瘤(quadromas))产生潜在的由 10 种不同抗体分子构成的混合物，而其中只有一种分子有正确的双特异性结构(参见此处的图 1)。对正确分子进行纯化，通常是通过亲和性色谱步骤完成，但是相当麻烦而且产物的产率低。因此，已开发能生产更大数量 BsAb 的技术。它们被描述在此处的图 2A-2E 中。

如图 2A 所示，双特异性抗体可用化学连接方法制备。为了实现抗体片段的化学偶联，Brennan 等人，科学，229:81(1985)描述了一种方法，其中完整的抗体被蛋白酶解切断，产生 $F(ab')_2$ 片段。这些片段在二硫酚复合剂亚砷酸钠存在下被还原，从而稳定连位的二硫酚并防止形成分子间的二硫键。产生的 Fab'接着被转变成硫代硝基苯甲酸(thionitrobenzoate, TNB)衍生物。Fab'-TNB 衍生物中的一种然后通过用巯基乙胺还原而被再转变成 Fab'-巯基，再与等摩尔量的另一种 Fab'-TNB 衍生物相混合，从而形成 BsAb 。产生的 BsAb 可用作选择性地固定酶的试剂。

最近的进展已便于从大肠杆菌中直接回收 Fab'-SH 片段，这些片段然后被化学偶联形成双特异性抗体(参见图 2B)。Shalaby 等人，J. Exp. Med., 175 : 217-225(1992)描述了产生一种完全人源化的 BsAb $F(ab's)_2$ 分子，该分子的一个臂结合 $p185^{HER2}$，而另一臂结合 CD3 。每个 Fab'片段都是独立地由大肠杆菌所分泌，然后在体外进行直接的化学偶联以形成 BsAb 。这样形成的 BsAb 能够结合过度表达 HER2 受体的细胞和正常的人 T 细胞，并引发人细胞毒淋巴细胞对人乳房肿瘤靶目标的裂解活性。还可参见 Rodrigues 等人，Int. J. Cancers (Suppl.) 7:45-50(1992)。

用于从重组细胞培养物中直接制造和分离 BsAb 片段的各种不同技术已有描述。例如，已经用亮氨酸拉链产生了双特异性 $F(ab')_2$ 异二聚体(见图 2C)。Kostelny 等人，J.Immunol. 14895):1547-1553 (1992)。通过基因融合，将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽连于抗-CD3 和抗-白细胞介素-2 受体(IL-2R)抗体的 Fab'部分。抗体同二聚体在铰链区被还原以形成单体，然后再次被氧化以形成抗体异二聚体。这种 BsAb 被发现可高效地召集细胞毒 T 细胞在体外裂解 HuT-102 细胞。Hollinger 等人，PNAS(USA), 90:6444-6448(1993)描述的“二体(diabody)”技术提供了另一种制造 BsAb 片段的方法。这些片段含有一重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)，它们通过一接头相连，该接头过短以致不能使相同链上的两个区之间发生配对。所以，一个片段上的 V_H 和 V_L 区被迫与另一片段上互补的 V_L 和 V_H 区配对，从而形成两个抗原结合位点(参见此处的 2D)。还报道了另一种使用单链 Fv(sFv)二聚体而制造 BsAb 片段的方法。参见 Gruber 等人，J.Immunol. 152:5368(1994)。这些研究者设计的抗体含有直接针对 T 细胞受体的抗体的 V_H 和 V_L 区，它们通过一个 25 氨基酸残基的接头与抗荧光素抗体的 V_H 和 V_L 区相连。重新折叠的分子(参见此处的图 2E)可结合荧光素和 T 细胞受体，而且可重新介导那些表面上共价地连有荧光素的人肿瘤细胞的裂解。

很明显，已报道了数种制造双特异性抗体片段的技术，其中片段可从重组细胞培养物中直接回收。但是，对于许多临床应用而言，全长的 BsAb 优于 BsAb 片段，因为它们有更长的血清半衰期和可能的效应子功能。

免疫粘附素

免疫粘附素(Ia)是类似抗体的分子，它可与蛋白质如细胞表面受体或配体的结合域结合(“粘附素”)，并且有免疫球蛋白恒定区的效应子功能。免疫粘附素具有人抗体的多种有价值的化学和生物特性。因为免疫粘附素可根据具有所需特异性并连于合适的人免疫球蛋白铰链和恒定区(Fc)序列的人蛋白质序列加以构建，所以完全用人的组件便可获得所需的结合特异性。这种免疫粘附素对病人的免疫原性最小，因而对于长期使用或重复使用是安全的。

在文献中已报道的免疫粘附素包括融合T细胞受体(Gascoigne等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940 [1987])；CD4 (Capan 等人, 自然 337:525-531 [1989]；Traunecker等人, 自然 339:68-70 [1989]；Zettmeissl 等人, DNA 细胞生物学 USA 9:347-353[1990] ;和 Byrn 等人, 自然 344:667-670 [1990])；L-选择蛋白或归巢受体(Watson 等人, J. Cell. Biol. 110:2221-2229 [1990] ;和 Watson 等人, 自然 349:164-167 [1991])；CD44 (Aruffo 等人,细胞 61:1303-1313 [1990])；CD28 和 B7 (Linsley 等人, J. Exp. Med. 173:721-730 [1991])；CTLA-4 (Lisley 等人, J. Exp. Med. 174:561-569 [1991])；CD22 (Stamenkovic等人, 细胞 66:1133-1144 [1991])；TNF 受体(Ashkenazi 等人, 美国科学院院报 USA 88:10535-10539 [1991] ; Lesslauer 等人, 欧洲免疫学杂志(Eur. J. Immunnl.) 27:2883-2886 [1991];和 Peppel 等人, J. Exp. Med. 174:1483-1489 [1991])；NP 受体(Bennett 等人, J. Biol . Chem. 266 : 23060-23067 [1991])；干扰素 γ 受体(Kurschner 等人, J.Biol. Chem. 267:9354- 9360 [1992])；4-1BB (Chalupny 等人,PNAS [USA] 89:10360-10364 [1992])和 IgE 受体 α (Ridgway 和 Gorman, J. Cell. Biol.Vol. 115, 摘要 No. 1448 [1991])。

已描述的用于治疗用途的免疫粘附素例子包括，用于阻断 HIV 与细胞表面 CD4 结合的 CD4-IgG 免疫粘附素。从一期临床试验(其中将 CD4-IgG 用于生产前的孕妇)获得的数据暗示，该免疫粘附素可用于防止HIV在母亲与胎儿之间传播。Ashkenazi 等人,Intern. Rev. Immunol., 10:219-227(1993)。还开发了与肿瘤坏死因子(TNF)结合的免疫粘附素。 TNF 是促炎细胞因子，已表明它是败血症性休克的主要中介体。根据败血症性休克的小鼠模型，已表明 TNF 受体免疫粘附素可候选用于临床治疗败血症性休克(Ashkenazi 等人,同上)。免疫粘附素还有非治疗性的用途。例如， L-选择蛋白受体免疫粘附素可用作对外周淋巴结的高内皮小静脉(high endothelial venules, HEV)进行组织化学染色时的试剂。该试剂还可用于 L 选择蛋白配体的分离和定性(Ashkenazi 等人,同上)。

如果免疫粘附素结构中的两个臂具有不同的特异性，那么与双特异性抗体相类似，这种免疫粘附素可称为“双特异性免疫粘附素”。 Dietsch 等人在免疫学方法杂志， 162： 123(1993)中描述了这样的一种双特异性免疫粘附素，它合并了粘附分子 E-选择蛋白和 P-选择蛋白的胞外域。结合研究表明，与产生它们的单特异性免疫粘附素相比，这样形成的双特异性免疫球蛋白融合蛋白具有更高的结合骨髓样(myeloid)细胞系的能力。

抗体-免疫粘附素嵌合体

抗体-免疫粘附素(Ab/Ia)嵌合体在文献中也已有描述。这些分子合并了免疫粘附素的结合区域和抗体的结合区域。

Berg 等人，PNAS (USA), 88: 4723-4727 (1991)制造了一种双特异性抗体-免疫粘附素嵌合体，它衍生自鼠 CD4-IgG 。这些工作者构建了具有两个臂的四聚体分子。一个臂由与抗体重链恒定区融合的 CD4 以及与抗体轻链恒定区融合的 CD4 所构成。而另一臂由抗-CD3 抗体的完整重链以及同一抗体的完整轻链所构成。依靠 CD4-IgG 臂，该双特异性分子结合细胞毒 T 细胞表面的 CD3 。将细胞毒细胞和 HIV 感染的细胞并列起来，但是特异性地杀死后者细胞。

尽管 Berg 等人描述的双特异性分子在结构上是四聚体，但是可以产生仅含有一个 CD4-IgG 融合物的三聚体式的杂交分子。参见 Chamow 等人，免疫学杂志，153： 4268(1994)。该构建物的第一个臂可用人源化的抗-CD3 κ 轻链与人源化的抗-CD3 γ 重链形成。第二个臂是与 CD4 的部分胞外域合并的 CD4-IgG 免疫粘附素，它负责 IgG 的 Fc 区与 gp120 的结合。用纯的细胞毒 T 细胞制剂或用全外周血淋巴细胞(PBL)组分(它还含有具有 Fc 受体的大颗粒淋巴细胞效应细胞)，形成的 Ab/Ia 嵌合体介导杀死被 HIV 感染的细胞。

在制造所述的异多聚体(heteromultimer)中，需要提高所需的异多聚体相对于同多亚基体的产率。此处描述的本发明提供了一种实现该目的的手段。

发明概述

本申请描述了一种“突起-进入-空穴”策略，它用于对第一和第二多肽间的界面进行工程化，以便进行异寡聚化。参见图 4 ，示意性地显示了所采用的策略。优选的界面含有抗体恒定区的至少一部分 C_H3 区。“突起”是通过将第一多肽界面上的小氨基酸侧链用更大的侧链(如酪氨酸或色氨酸)加以替换而构建的。针对突起的、大小相同或相似的、补偿性的“空穴”可任选地在第二多肽的界面上形成，即将大的氨基酸侧链用更小的侧链(如丙氨酸或苏氨酸)加以替换。当位置和大小适当的突起或空穴存在于第一或第二多肽的界面上时，只需在相邻的界面上工程化地改造出一个相应的空穴或突起。

因此，可以说本发明涉及一种制备异多聚体的方法，该异多聚体包括在一界面处相接触的第一多肽和第二多肽，其中，在第一多肽的界面上有一突起，其置于第二多肽界面上的空穴中。在一个方面，该方法包括：(a)培养含有编码第一多肽和第二多肽的核酸的宿主细胞，从而表达核酸，其中编码第一多肽的核酸已从最初的核酸被改变从而编码突起，或者编码第二多肽的核酸已从最初的核酸被改变从而编码空穴，或者都改变；(b)从宿主细胞培养物中回收异多聚体。

一般，编码第一多肽和第二多肽的核酸都被改变以便分别编码突起和空穴。较佳地，第一和第二多肽都含有抗体恒定区如人 IgG_1 的 C_H3 区。

本发明还提供了异多聚体(如双特异性抗体、双特异性免疫粘附素或抗体/免疫粘附素嵌合体)，它包括在一界面处相接触的第一多肽和第二多肽。第一多肽界面上具有突起，该突起可置于第二多肽界面上的空穴中，而且突起或空穴或两者已被分别引入第一和第二多肽的界面。异多聚体还可以组合物形式提供，该组合物含有药学上可接受的载体。

本发明还涉及一种宿主细胞，它含有编码上述段落中的异多聚体的核酸，其中编码第一多肽和第二多肽的核酸存在于一个载体中或不同的载体中。宿主细胞可用于制备异多聚体的方法中，该方法包括培养宿主细胞从而表达该核酸，以及从细胞培养物中回收异多聚体。

在另一方面，本发明提供了一种制备异多聚体的方法，它包括：

(a)改变编码第一多肽的第一核酸，使第一多肽界面上的氨基酸残基被具有更大侧链体积的氨基酸所置换，从而在第一多肽上产生突起；

(b)改变编码第二多肽的第二核酸，使第二多肽界面上的氨基酸残基被具有更小侧链体积的氨基酸所置换，从而在第二多肽上产生空穴，其中该突起可置于该空穴中；

(c)将第一核酸和第二核酸引入宿主细胞，培养宿主细胞从而表达第一和第二核酸，以及

(d)从细胞培养物中回收异多聚体。

本发明提供了一种提高异多聚体相对于不需要的终产物如同多聚体的产率的方法。较佳地，与副产物同多聚体相比，从重组细胞培养物中回收的异多聚体的产率至少大于 80%，更佳地大于 90%。

附图简述

图 1 是各种抗体分子，当传统的 Millstein 和 Cuello 的杂交体-杂交瘤技术(同上)被用于制造全长的 BsAb 时，可形成这些抗体分子。

图 2A-2E 显示了背景领域中的各种制造 BsAb 片段的技术，它们总结于上述的背景章节中。

图 3A-3C 显示了制造免疫粘附素二聚体(图 3C)的典型策略，该二聚体含有受体的结合域(图 3A)和 IgG_1 免疫球蛋白的恒定区(图 3B)。

图 4 示意性地显示了本申请的用于产生异多聚体的突起-进入-空穴策略。

图 5 显示了免疫球蛋白 IgG(SEQ ID NO:1-3)、IgA(SEQ ID NO:4)、IgD(SEQ ID NO:5)、IgE(SEQ ID NO:6)和 IgM(SEQ ID NO:7)的 C_H3 结构域的界面残基。这些免疫球蛋白中每个的 C_H3 结构域都是由“β-夹心”所构成，该β-夹心由两个单独的和平行的“β-折叠”所构成。β-折叠中的一个提供了界面残基，而另一个则是“外部β-折叠”。形成界面的β-折叠由 4 个“β-链”形成。7 种不同免疫球蛋白的 C_H3 结构域的β-链中每种的残基用虚线在上方标出。标出了位于界面中间和边缘的β-链，还标出了外部β-折叠的β-链。残基编号按照 Fc 晶体结构(Deisenhofer, Biochem. 20:2361[1981])。埋在 C_H3 结构域内部的残基用“B”表示，那些部分埋在 C_H3 结构域内部的残基用“b”表示，那些部分埋在界面处的“接触”残基(即暴露 26 %-10%)用“i”表示，而那些埋在界面处的残基(即暴露<6%)用“I”表示。粗体残基是用引入残基加以替换的最佳候选的最初残基。

图 6 鉴别了人(h)(SEQ ID NO:8-11 和 16)或鼠(m)(SEQ ID NO:12-15)IgG 亚型的界面残基(B = ASX 和 Z = GLX)。在界面边缘和中间处的β-链残基用括号标出，而“接触”残基用箭头指出。序列得自 Miller 等人，分子生物学杂志，216：965(1990)和 Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 5 版(1991)。很明显，接触残基是高度保守的。

图 7 显示了人 IgG_1 的 C_H3 结构域的界面残基。数据得自 Miller 等人，分子生物学杂志，216：965(1990)。显示了“接触”残基，并且在实施例中被突变的残基用框标出。

图 8 示意性地显示了实施例中所描述的、检测 Fc 异多聚体化的共转染分析。

图 9 描绘了基于人 IgG_1 Fc 的 2.9 埃结构的 C_H3 二聚体(Deisenhofer, Biochem. 20:2361[1981])，突出了位于界面相对侧的 T366Y 和 Y407T 突变以及残基 Phe^{405} 和 Thr^{394}("Kabat numbering"- Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 5 版[1991])。

图 10A-10E 显示了用抗体(Ab)重链(H)和轻链(L)与免疫粘附素(Ia)共转染而获得的产物，经 SDS-PAGE 扫描光密度分析结果。图 10A 是野生型；图 10B 是突变体 Ab Y407T，Ia T366Y；图 10C 是 Ab T366Y, Ia Y407T；图 10D 是 Ab F405A, Ia T394W；图 10E 是 Ab T366Y:F405A, Ia T394W:Y407T。呈现的数据是至少二次独立试验的平均值。用紧密相关的人源化抗体 huMAb 4D5-8(Carter 等人，美国科学院院报，89：4285[1992])进行的对照试验加以判断，发现光密度信号反应在所用的试验范围(0.02-10 微克)内是线性的(R = 0.9993)。

I. 定义

一般，当用于说明书、实施例和权利要求书中时，下列词语具有所给出的定义。

“异多聚体”或“异多亚基多肽”是一种至少含有第一多肽和第二多肽的分子，其中第二多肽与第一多肽的氨基酸序列至少有一个氨基酸残基不同。较佳地，异多聚体有对至少 2 种不同配体或结合位点的结合特异性。异多聚体包括由第一多肽和第二多肽形成的“异二聚体”，或者可形成更高级的三级结构，其中除了第一多肽和第二多肽外还存在多肽。异多聚体的代表性结构包括：异二聚体(如 Dietsch 等人(同上)所描述的双特异性免疫粘附素)、异三聚体(如 Chamow 等人(同上)所描述的 Ab/Ia 嵌合体)、异四聚体(如双特异性抗体)和其他的寡聚体结构。

如本文所用，“多肽”指具有大于约 10 个氨基酸的肽或蛋白质。较佳地，使用哺乳动物多肽(最初衍生于哺乳动物有机体的多肽)，更佳地，使用直接被分泌入介质中的多肽。细菌多肽的例子包括：碱性磷酸酶和 β-内酰胺酶。哺乳动物多肽的例子包括：诸如肾素(renin)之类的分子，生长激素如人生长激素；牛生长激素；生长激素释放因子；甲状旁腺素；促甲状腺素；脂蛋白；α-1-抗胰蛋白；胰岛素 A-链；胰岛素 B-链，胰岛素原；促卵泡激素；降钙素；促黄体素；胰高血糖素；凝血因子如因子 VIIIC 、因子 IX 、组织因子和 von Willebrands 因子；抗凝血因子如蛋白质 C ；心钠素；肺表面活性剂(fung surfactant)；纤溶酶原激活物，如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活物(t-PA)；铃蟾肽；凝血酶；造血生长因子；α-和 β-肿瘤坏死因子；脑啡肽酶；RANTES(活化后可调节的、正常 T 细胞表达并分泌的)；人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-2-α)；血清白蛋白如人血清白蛋白；Muellerian 抑制物；松弛素 A 链；松弛素 B 链；松弛素原(prorelaxin)；鼠促性腺素相关肽；微生物蛋白，如 β-内酰胺酶；DNase ；抑制素；活化素；血管内皮生长因子(VEGF)；激素或生长因子的受体；整联蛋白；蛋白质 A 或 D ；类风湿因子；神经营养因子如骨衍生神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3 ，-4 ，-5 或-6(NT-3 、NT-4 、NT-5 或 NT-6)、或神经生长因子如 NGF-β；血小板衍生生长因子(PDGF)；成纤维细胞生长因子如 aFGF 和 bFGF ；上皮生长因子(EGF)；转化生长因子(TGF)如 TGF-α 和 TGF-β，包括 TGF-β1 、TGF-β2 、TGF-β3 、TGF-β4 或 TGF-β5 ；胰岛素样生长因子-I 和-II(IGF-I 和 IGF-II)；脱(1-3)-IGF-I(脑 IGF-I)，胰岛素样生长因子结合蛋白；CD 蛋白如 CD-3 、CD-4 、CD-8 和 CD-19 ；促红细胞生成素；骨诱导因子(osteoinductive factors)；免疫毒素；骨形态形成蛋白(BMP)；干扰素如 α-，β-和 γ-干扰素；集落刺激因子(CFS)，如 M-CFS 、GM-CFS 和 G-CFS ；白细胞介素(IL)如 IL-1 至 IL-10 ；超氧化物歧化酶；T 细胞受体；表面膜蛋白；衰变加速因子；病毒抗原如 AIDS 包膜的部分；转运蛋白；归巢受体；地址素；调节蛋白；抗体；以及上述所列多肽的片段。

“第一多肽”是任何与第二多肽相结合的多肽。第一和第二多肽在“界面”(在下面定义)处接触。除了界面之外，第一多肽可含有一个或多个额外的结构域，如

“结合域”（如抗体可变区、受体结合域、配体结合域或酶域(enzymatic domain)）或包括 C_H2 、 C_H1 和 C_L 结构域在内的抗体恒定区(或其部分)。一般，第一多肽可含有至少一个来自抗体的结构域。方便地，该结构域可以是恒定区如抗体的 C_H3 结构域，并且可构成第一多肽的界面。代表性的第一多肽包括：抗体重链多肽、含有抗体恒定区和异源多肽的结合域的嵌合体(即免疫粘附素，参见下面的定义)、受体多肽(尤其是那些与其他受体多肽如白细胞介素-8 受体[IL-8R]和整联蛋白异二聚体[如 LFA-1 或 GPIIIb/IIIa]形成二聚体的种类)、配体多肽(如神经生长因子[NGF]、神经营养蛋白-3[NT-3]、和脑衍生神经营养因子[BDNF]-参见 Arakawa 等人，生物化学杂志，269(45): 27833-27839[1994]和 Radziejewski 等人，生物化学，32(48): 1350[1993])和抗体可变区多肽(如二体(diabodies))。优选的第一多肽选自抗体重链和免疫粘附素。

“第二多肽”是通过“界面”与第一多肽相结合的任何多肽。除了界面之外，第二多肽可含有额外的结构域，如“结合域”（如抗体可变区、受体结合域、配体结合域或酶域)或包括 C_H2 、 C_H1 和 C_L 结构域在内的抗体恒定区(或其部分)。一般，第二多肽可含有至少一个来自抗体的结构域。方便地，该结构域可以是恒定区如抗体的 C_H3 结构域，并且可构成第二多肽的界面。代表性的第二多肽包括：抗体重链多肽、含有抗体恒定区和异源多肽的结合域的嵌合体(即免疫粘附素，参见下面的定义)、受体多肽(尤其是那些与其他受体多肽如白细胞介素-8 受体[IL-8R]和整联蛋白异二聚体[如 LFA-1 或 GPIIIb/IIIa]形成二聚体的种类)、配体多肽(如神经生长因子[NGF]、神经营养蛋白-3[NT-3]、和脑衍生神经营养因子[BDNF]-参见 Arakawa 等人，生物化学杂志，269(45): 27833-27839[1994]和 Radziejewski 等人，生物化学，32(48): 1350[1993])和抗体可变区多肽(如二体(diabodies))。优选的第二多肽选自抗体重链和免疫粘附素。

“结合域”是多肽中负责与感兴趣的分子(如抗原、配体、受体、底物或抑制物)发生选择性结合的任何区域。代表性的结合域包括：抗体可变区、受体结合域、配体结合域和酶域。

术语“抗体”指含有一个或多个能结合感兴趣的抗原上表位的结构域的多肽，其中这样的结构域来自抗体的可变区或与之同源。抗体的例子包括：全长的抗体、抗体片段、单链分子、双特异性或双功能分子、二体、和嵌合体抗体(如人源化和 Primatized ™抗体)。“抗体片段”包括 Fv 、 Fv'、 Fab 、 Fab'、和 $F(ab')_2$ 片段

“人源化”形式的非人(如啮齿动物或灵长动物)抗体是含有来自非人免疫球蛋白的最小序列的特异性嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段。对于绝大多数情况，人源化抗体是这样的人免疫球蛋白(受体抗体)，其中受体的互补决定区(CDR)中的残基被来自非人种类(供体抗体)如小鼠、大鼠、兔或灵长动物的、具有所需特异性、亲和性和容量的 CDR 的残基所置换。在某些情况下，人免疫球蛋白的 Fv 框架区域(FR)残基被相应的非人残基所置换。此外，人源化抗体可含有既不在受体抗体中也不在引入的 CDR 或框架序列中的残基。进行这些修饰是为

了进一步地改善和优化抗体的性能。一般，人源化抗体可含有几乎所有的至少一个(典型地为 2 个)可变区，其中所有或几乎所有的 CDR 区域对应于非人免疫球蛋白的 CDR 区域，而且所有或几乎所有的 FR 区域是人免疫球蛋白序列的 FR 区域。人源化抗体最好还含有至少一部分免疫球蛋白(一般是人免疫球蛋白)的恒定区(Fc)。人源化抗体包括 Primatized ™抗体，其中抗体的抗原结合区来自用感兴趣抗原免疫猕猴而产生的抗体。

“多特异性抗体”是具有针对至少 2 种不同抗原的结合特异性的分子。尽管这样的分子一般仅结合 2 种抗原(即双特异性抗体， BsAb)，但是具有额外特异性的抗体如三特异性抗体也被此处所用的该术语所包括。 BsAb 的例子包括那些一个臂针对肿瘤细胞抗原而另一臂针对细胞毒触发分子的种类，如抗 FcγRI/抗-CD15 、抗-p185^{HER2}/Fc γ RIII(CD16)、抗-CD3/抗-恶性 B 细胞(1D10)、抗-CD3/抗-p185^{HER2} 、 抗-CD3/抗-p97 、抗-CD3/抗-肾细胞癌、抗-CD3/抗-OVCAR-3 、抗-CD3/L-D1(抗-结肠癌)、抗-CD3/抗-促黑激素类似物、抗-EGF 受体/抗-CD3 、抗-CD3/抗-CAMA1 、抗-CD3/抗-CD19 、抗-CD3/MoV18 、抗-神经细胞粘着分子(NCAM)/抗-CD3 、抗-叶酸结合蛋白(FBP)/抗-CD3 、抗-泛癌相关抗原(pan carcinoma associated antigen)(AMOC-31)/抗-CD3;一个臂特异性地与肿瘤抗原结合而另一臂结合毒素的 BsAb，如抗-皂草素/抗-Id-1 、抗-CD22/抗-皂草素、抗-CD7/抗-皂草素、抗-CD38/抗-皂草素、抗-CEA/抗-蓖麻毒蛋白 A 链、抗-干扰素-α(IFN-α)/抗-杂交瘤独特型、抗-CEA/抗-长春花生物碱; 用于转变酶激活的药物前体的 BsAb，如抗-CD30/抗-碱性磷酸酶(它催化磷酸丝裂霉素药物前体转变成丝裂霉素醇); 可用作纤溶剂的 BsAb，如抗-血纤蛋白/抗-组织纤溶酶原激活物(tPA)、抗-血纤蛋白/抗-尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA); 用于使免疫复合物定向于细胞表面受体的 BsAb，如抗-低密度脂蛋白(LDL)/抗-Fc 受体(如 Fc γ RI 、 Fc γ RII 或 Fc γ RIII); 用于治疗感染疾病的 BsAb，如抗-CD3/抗-单纯疱疹病毒(HSV)、抗-T 细胞受体: CD3 复合物/抗-流感病毒、抗-Fc γ R/抗-HIV ; 用于在体外或体内检测肿瘤的 BsAb，如抗-CEA/抗-EOTUBE 、抗-CEA/抗-DPTA 、抗-p185^{HER2}/抗-半抗原; 作为疫苗佐剂的 BsAb(参见 Fanger 等人、 同上); 和用作诊断工具的 BsAb，如抗-兔 IgG/抗-铁蛋白、抗-辣根过氧化物酶(HRP)/抗-激素、抗-抑生长素/抗-P 物质、抗-HRP/抗-FITC 、抗-CEA/抗-β 半乳糖苷酶(见 Nolan 等人，同上)。三特异性抗体的例子包括: 抗-CD3/抗-CD4/抗-CD37 、抗-CD3/抗-CD5/抗-CD37 和抗-CD3/抗-CD8/抗-CD37 。

如本文所用，术语“免疫粘附素”指类似抗体的分子，它将异源蛋白(“粘附素”，如受体、配体或酶)的“结合域”与免疫球蛋白恒定区的效应子功能相合并。结构上，免疫粘附素是具有所需结合特异性的粘附素氨基酸序列(它不同于抗体的抗原识别和结合位点(抗原合并位点))(即是“异源的”)与免疫球蛋白恒定区序列的融合形式。在免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定区序列可以来自免疫球蛋白如 IgG_1 、 IgG_2 、 IgG_3 、或 IgG_4 亚型、 IgA 、 IgE 、 IgD 或 IgM 。

如本文所用，术语“配体结合域”指任何天然的细胞表面受体，或保留至少一定性质的配体结合能力，更佳地保留相应天然受体的生物活性的其区域或其衍生物。在一个具体例子中，受体来自与免疫球蛋白超基因家族成员同源的、具有胞外域的细胞表面多肽。其他尽管不是免疫球蛋白超基因家族的成员，但是却被该定义所特意涵盖的典型受体是，细胞因子的受体尤其是具有酪氨酸激酶活性的受体(受体酪氨酸激酶)、血细胞生成素和神经生长因子受体超家族的成员、以及细胞粘着分子如(E-、 L-和 P-)选择蛋白。

术语“受体结合域”指任何天然的针对受体的配体包括细胞粘着分子、或保留至少一定性质的受体结合能力，更佳地保留相应天然配体的生物活性的这种天然配体的任何区域或衍生物。其中，该定义特意包括针对上述受体的配体的结合序列。

如本文所用，词语“多特异性免疫粘附素”指具有至少 2 种结合特异性(即组合了 2 个或多个粘附素结合域)的免疫粘附素(定义如上)。多特异性免疫粘附素可被装配成异二聚体、异三聚体或异四聚体，基本上如 WO89/02922(1989 年 4 月 6 日出版)、 EP 314,317(1989 年 5 月 3 日出版)和美国专利 No. 5,116,964(1992 年 5 月 2 日授权)中所揭示的那样。优选的多特异性免疫粘附素是双特异性的。双特异性免疫粘附素的例子包括: CD4-IgG/TNF 受体-IgG 和 CD4-IgG/L-选择蛋白-IgG 。后面提到的分子将淋巴细胞归巢受体(LHR， L-选择蛋白)的淋巴结结合功能与 CD4 的 HIV 结合功能合并在一起，并且发现在预防或治疗 HIV 感染、相关症状方面，或者作为诊断试剂方面有潜在的应用。

“抗体-免疫粘附素嵌合体(Ab/Ia 嵌合体)”指合并了抗体(如此处定义)的至少一个结合域和至少一个免疫粘附素(如本申请所定义)的分子。代表性的 Ab/Ia 嵌合体是 Berg 等人(同上)和 Chamow 等人(同上)所描述的双特异性 CD4-IgG 嵌合体。

“界面”指在第一多肽中的那些“接触”氨基酸残基(或其他非氨基酸基团如碳水化合物基团、 NADH 、生物素、 FAD 或血红素基团)，它们与第二多肽的一个或多个“接触”氨基酸残基(或其他非氨基酸基团)在界面上相互作用。优选的界面是免疫球蛋白的结构域如可变区或恒定区(或其区域)，但是在构成异多聚体受体的多肽之间的界面或者在 2 个或多个配体如 NGF 、 NT-3 和 BDNF 之间的界面可以被包括在该术语的范围之内。优选的界面包括免疫球蛋白的 C_H3 结构域，它较佳地来自 IgG 抗体，最佳地来自人 IgG_1 抗体。

“突起”指这样的至少一个氨基酸侧链，它从第一多肽的界面上突出，因而可以被置于相邻界面(即第二多肽的界面)上补偿性的空穴中，从而稳定异多聚体，进而例如使异多聚体结构优于同多聚体结构。突起可以存在于最初的界面上或者通过人工方法引入(如改变编码界面的核酸)。一般，改变编码第一多肽界面的核酸以编码突起。为了得到该目的，编码第一多肽界面上至少一个“最初的”氨基酸残基的核酸，被编码至少一个“引入的”、侧链体积大于最初的氨基酸残基体积的氨基酸残基的核酸所

置换。应理解，可以有一个以上的最初残基和相应的引入残基。可被置换的最初残基的数目上限是第一多肽界面上残基的总数。各种氨基残基的侧链体积示于下表。

表 1

氨基酸残基的性质

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

[a] 分子量氨基酸减去水的分子量，数值来自 Handbook of Chemistry and Physics, 43 版， Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961.

[B] 数值来自 A.A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972.

[C] 数值来自 C.Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975 。可进入的表面积由该文献的图 6-20 中所定义。

用于形成突起的优选引入残基一般是天然存在的氨基酸残基，而且较佳地选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)。最佳的是色氨酸和酪氨酸。在优选例子中，对于形成突起的最初残基具有小的侧链体积，如丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。

"空穴"指这样的至少一个氨基酸侧链，它从第二多肽的界面凹进去，因而能够容纳第一多肽相邻界面上的相应突起。空穴可以存在于最初的界面上或者通过人工方法引入(如改变编码界面的核酸)。一般，改变编码第二多肽界面的核酸以编码空穴。为了得到该目的，编码第二多肽界面上至少一个"最初的"氨基酸残基的核酸，被编码至少一个"引入的"、侧链体积小于最初的氨基酸残基体积的氨基酸残基的核酸所置换。应理解，可以有一个以上的最初残基和相应的引入残基。可被置换的最初残基的数目上限是第二多肽界面上残基的总数。各种氨基残基的侧链体积示于上表 1 。用于形成空穴的优选引入残基一般是天然存在的氨基酸残基，而且较佳地选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)。最佳的是丝氨酸、丙氨酸或苏氨酸。在优选例子中，对于形成空穴的最初残基具有大的侧链体积，如酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

"最初的"氨基酸残基是被"引入的"残基所置换的残基，引入的残基的侧链体积可以小于或大于最初的残基。引入残基可以是天然存在的或非天然存在的氨基酸残基，但优选前者。"天然存在的"氨基酸残基是那些被遗传密码所编码并且列于上表 1 中的残基。"非天然存在的"氨基酸指不被遗传密码所编码但是能够在多肽链中共价地与相邻氨基酸相连的残基。非天然存在的氨基酸的例子是正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸和其他的氨基酸残基类似物，例如在 Ellman 等人，学酶方法(Meth. Enzym).202： 301-336(1991)中所描述的种类。为了产生这些非天然存在的氨基酸残基，可使用 Noren 等人，科学， 244： 182(1989)和 Ellman 等人(同上)的方法。简而言之，它涉及用非天然存在的氨基酸残基化学激活抑制因子(suppressor)tRNA ，然后进行 RNA 的体外转录和翻译。本发明的方法涉及置换至少一个最初的氨基酸残基，但是可以置换一个以上最初的氨基酸残基。一般，可被置换的最初的氨基酸残基不超过第一或第二多肽界面中的全部残基。优选的被置换的最初残基是"隐蔽的"。"隐蔽的"指该残基基本上不能让溶剂进入。为了防止可能的氧化或二硫键的错配，优选的引入残基不是半胱氨酸。

突起"可置于"空穴中，这意味着分别在第一多肽和第二多肽界面上的突起和空穴的空间位置，以及突起和空穴的大小使得突起能被置于空穴中，而不会明显干扰第一和第二多肽在界面处的正常缔合。因为突起如 Tyr 、 Phe 和 Trp 一般并不是垂直于界面轴而突出的，其具有较佳的构象，所以将突起与相应空穴配对起来应依赖于根据三维结构(如通过 X 光晶体图或核磁共振(NMR)而获得的三维结构)而对突起/空穴对进行的塑造。这可用本领域广泛接受的技术来完成。

“最初的核酸”指编码感兴趣多肽的、能够被“改变”(即被遗传工程化或突变)以编码突起或空穴的核酸。最初的或起始的核酸可以是天然存在的核酸，或者可包括早先已被改变过的核酸(如人源化的抗体片段)。“改变”核酸指通过插入、缺失或置换而突变至少一个编码感兴趣的氨基酸残基的密码子。一般，编码最初残基的密码子被编码引入残基的密码子所置换。以这种方式对 DNA 进行基因修饰的技术总结于诱变: 一种实用方法(Mutagenesis: a Practical Approach)，M.J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, UK.(1991)，例如包括定点诱变、盒式诱变和聚合酶链反应(PCR)诱变。

通过使用人工合成的方法，如通过重组技术、体外肽合成、那些引入非天然存在氨基酸残基的技术、肽的酶偶联或化学偶联技术、以及这些技术的组合，可以将突起或空穴“引入”第一或第二多肽的界面中。因此，被“引入的”突起或空穴是“非天然存在的”或“非天然的”，这意味着它在自然界或起初的多肽(如人源化的单克隆抗体)中不存在。

较佳地，用于构成突起的引入氨基酸残基具有较小数目的“旋转异构体(rotamer)”(如约 3-6 个)。“旋转异构体”是氨基酸侧链在能量上优选的构象。各种氨基酸残基的旋转异构体的数目总结于 Ponders 和 Richards, 分子生物学杂志 193: 775-791(1987)。

“分离的”异多聚体指已经从其天然细胞培养物环境的组成中被鉴别和分开和/或回收出来。其天然环境的污染成分是会干扰异多聚体的诊断和治疗用途的材料，包括酶、激素和其他蛋白质类或非蛋白质类的溶质。在优选例子中，异多聚体被(1)纯化至用 Lowry 法测定时纯度大于 95 重量%蛋白质，最佳地大于 99 重量%，(2)纯化至足以用转杯式蛋白质测序仪获得 N 末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度，或(3)纯化至同质，其中在还原或非还原条件下进行 SDS-PAGE 并采用考马斯蓝或更佳地采用银染。

本发明的异多聚体一般被纯化至基本同质。词语“基本均一”、“基本均一的形式”和“基本同质”被用于表明产物基本上没有来自不想要的多肽混合物中的副产物(如同多聚体)。用纯度表示，基本同质意味着副产物的数量不超过 10%，较佳地小于 5%，更佳地小于 1%，最佳地小于 0.5%，其中百分比为重量百分比。

词语“控制序列”指对于在特定的宿主生物体中表达可操作地相连的编码序列而所需的 DNA 序列。适用于原核生物的控制序列包括例如启动子、任选的操纵子序列、核糖体结合位点、以及其他可能的、还未充分知晓的序列。已知真核细胞采用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。

当一核酸与另一核酸序列在功能上相关联时，则称该核酸是“可操作地相连的(或连于)”。例如，前序列(presequence)或分泌前导序列的 DNA 与多肽 DNA 是可操作地相连的，如果作为前蛋白表达时它参与多肽的分泌；启动子或增强子与编码序列是可操作地相连的，如果它影响序列的转录；核糖体结合位点与编码序列地可操作地相连的，如果其位置便于翻译。一般，“可操作地相连”指被相连的 DNA 序列是邻近的，

而且在分泌前导序列的情况下是邻近的而且处于可阅读状态。然而，增强子不必是邻近的。相连可通过在便利的限制性位点处加以连接而实现。如果不存在这样的位点，可按照常规的操作使用寡核苷酸衔接头或接头。

II. 制备异多聚体

1. 制备原料

第一步骤，选择第一和第二多肽(以及任何构成异多聚体的额外多肽)。一般，编码这些多肽的核酸需要被分离，从而可以改变它们以编码此处所定义的突起或空穴或两者。但是，可以用人工方法引入突变，如用肽合成仪。而且，在引入残基是非天然存在的残基时，可用 Noren 等人的方法来制备具有这种取代残基的多肽。此外，异多聚体的一部分可合适地用细胞培养重组制备，而分子的其他部分用上述提到的技术制备。

用于分离抗体和制备免疫粘附素的技术如下。但是，应理解，可以用本领域已知的技术用其他多肽构成异多聚体，或者在异多聚体中掺入其他多肽。例如，编码感兴趣多肽(如配体、受体或酶)的核酸可以从 cDNA 文库中分离出，而该 cDNA 文库是用据信具有该多肽 mRNA 并以可检测水平表达该多肽的组织制备的。用设计用于鉴别感兴趣的基因或其编码的蛋白质的探针(如抗体或约 20-80 碱基的寡核苷酸)，筛选文库。用选定的探针来筛选 cDNA 或基因组文库可采用 Sambrook 等人， 分子克隆: 实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)10-12 章中所描述的标准程序进行。

(i)制备抗体

多种产生抗体的技术已经被描述过，其中包括: 制备单克隆抗体的常规杂交瘤法、制备抗体(包括嵌合抗体，如人源化抗体)的重组技术、在转基因动物中产生抗体，以及最近描述的制备“完全人化”抗体的噬菌体展示技术。下面简要地描述这些技术。

针对感兴趣抗原的多克隆抗体，一般通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射抗原和佐剂而在动物中产生。用双官能试剂即衍生剂(derivatizing agent)如马来酰亚胺苯甲酰基硫代琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基偶联)、 N-巯基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 $SOCl_2$、或 $R^1N=C=NR$(其中 R 和 R^1 是不同的烷基)，将抗原(或含有靶氨基酸序列的片段)偶联于在待免疫的动物中有免疫原性的蛋白质如匙孔蜈血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白抑制剂上，是有用的。通过将 1 毫克 1 微克偶联物(分别对兔或小鼠)与 3 份体积的 Freud 完全佐剂混合，然后将溶液在多个部位进行皮内注射，使动物对免疫原性偶联物或衍生物免疫。一个月后，用 1/5 至 1/10 最初数量的 Freud 佐剂中的偶联物，在多个部位进行皮下注射，对动物进行加强免疫。 7-14 天后，对动物放血，分析血清的抗体效价。继续对动物进行加强免疫直至效价呈平台。较佳地，用相同抗原的、但是偶联于不同的蛋白质和/或通过不同的交

联剂偶联物来加强免疫动物。偶联物还可在重组细胞培养物中以融合蛋白形式制造。而且，可使用聚集剂如明矾来增强免疫应答。

用 Kohler & Milstein, 自然, 256： 495(1975)首先描述的杂交瘤方法，可以从一群基本均质的抗体中获得单克隆抗体，或者用重组 DNA 方法(Cabilly 等人，美国专利 No. 4,816,567)制备单克隆抗体。在杂交瘤法中，按上述那样免疫小鼠或其他合适的宿主动物如仓鼠，以获得产生或能够产生抗体的淋巴细胞，该抗体可特异性地结合于免疫中所用的蛋白质。或者，在体外免疫淋巴细胞。然后用合适的融合剂如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，形成杂交瘤细胞(Goding, 单克隆抗体: 原则和实践(Monoclonal Antibodies: Principles and Pracice), pp. 59-103[Academic Press, 1986])。将这样制备的杂交瘤细胞进行接种，并在合适的培养基中生长，其中培养基优选地含有一种或多种抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞生长或存活的物质。例如，如果亲代骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT)，那么用于杂交瘤的培养基一般含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT 培养基)，这些物质可防止 HGPRT-缺陷型细胞的生长。优选的骨髓瘤细胞是那些可有效地融合、支持选定的产生抗体的细胞稳定而高水平地表达抗体、并且对培养基如 HAT 培养基敏感的细胞。其中，优选的骨髓瘤细胞是鼠骨髓瘤细胞系如衍生自 MOPC-21 和 MPC-11 鼠肿瘤的细胞系(可从 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA 获得)和 SP-2 细胞(可从美国典型培养物保藏中心， Rockiville, Maryland USA 获得)。已有描述将人骨髓瘤和鼠-人杂合骨髓瘤细胞系用于产生人单克隆抗体(Kozbor, J. Immunol., 133:3001[1984];和 Brodeur 等人, 单克隆抗体生产技术和应用， pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。对于产生人单克隆抗体的技术，还可参见 Boerner 等人，免疫学杂志，147(1):86-95(1991)和 WO 91/17769(1991 年 11 月 28 日出版)。对其中生长杂交瘤细胞的培养基，分析其是否产生了针对有关抗原的单克隆抗体。较佳地，由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性，用免疫沉淀法或体外结合测试如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)加以测定。单克隆抗体的结合亲和力可以用例如 Munson & Pollard, Anal. Biochem. 107:220(1980)中的 Scatchard 分析法确定。在鉴别出可产生具有所需特异性、亲和力、和/或活性的抗体的杂交瘤细胞之后，可用有限稀释程序对克隆进行亚克隆，并用标准方法进行生长。 Goding, 单克隆抗体: 原则和实践(Monoclonal Antibodies: Principles and Pracice), pp. 59-104 (Academic Press, 1986)。用于该目的的合适培养基包括例如， Dulbecco 改进的 Eagle 培养基或 RPMI-1640 培养基。此外，杂交瘤细胞还可在动物体内作为腹水瘤而生长。由亚克隆分泌的单克隆抗体可适当地从培养基、腹水液或血清中，用常规的免疫球蛋白纯化方法而分离出，如蛋白质 A-Sepharose 、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱。

或者，现在可以产生转基因动物(如小鼠)，一旦免疫，它们能够在没有内源免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的全部所有组成成分。例如，已有报道，在嵌合的种系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合缺失，会导致完全抑制内源抗体的产生。

将人种系免疫球蛋白基因群(array)转入这种种系突变的小鼠中，会导致在抗原攻击时产生人的抗体。参见例如 Jakobovits 等人，美国科学院院报，90:2551-255(1993)和 Jakobovits 等人，自然：362：255-258(1993)。

在另一例子中，用感兴趣的抗原来选择合适的抗体或抗体片段，可从抗体噬菌体文库中分离出抗体或抗体片段，而这种噬菌体文库是用 McCafferty 等人,自然，348:552-554(1990)中所述的技术而产生的。Clackson 等人，自然,352:624-628(1991)和 Mark 等人，分子生物学杂志,222:581-597(1991)分别描述了用噬菌体文库分离鼠和人的抗体。随后的出版物描述了用链改组(Mark 等人，Bio/Technol. 10:779-783[1992])、以及组合感染和体内重组等作为构建非常大的噬菌体文库(Waterhouse 等人，核酸研究，21:2265-2266[1993])的策略，产生高亲和性(nM 范围)的人抗体。因此，对于分离“单克隆”抗体(尤其是人抗体)，这些技术是传统的单克隆抗体杂交瘤技术的有力替代技术，它们被本发明所包括。

用常规程序(如使用能特异性地与编码鼠抗体重链和轻链的基因结合的寡核苷酸探针)，可以方便地分离出编码本发明抗体的 DNA，并加以测序。本发明的杂交瘤细胞可作为这些 DNA 的优选来源。一旦被分离，可将 DNA 置于表达载体，然后将表达载体转入原本不产生免疫球蛋白的宿主细胞中如猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞，从而在重组的宿主细胞中合成单克隆抗体。DNA 还可被修饰，如用人重链和轻链恒定区的编码序列替换同源的鼠序列，Morrison 等人,美国科学院院报, 81:6851(1984)。用这种方法，可制造出“嵌合的”抗体，它具有抗-抗原单克隆抗体的结合特异性。

使非人的抗体人源化的方法是本领域中公知的。一般，人源化的抗体具有一个或多个来自非人来源并被引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基一般被称为“引入的”残基，它们通常来自“引入的”可变区。人源化过程可基本上按 Winter 及同行的方法(Jones 等人,自然, 321-522-525[1986]; Riechmann 等人,自然 332:323-327[1988]; Verhoeyen 等人,科学, 239:1534-1536[1988])，通过用啮齿动物 CDR 或 CDR 序列替换人抗体的相应序列而进行。因此，这种“人源化”抗体是嵌合抗体(Cabilly,同上)，其中大体小于完整的人可变区被来自非人物种的相应序列所替换。实践中，人源化抗体通常是这样的人抗体，其中某些 CDR 残基或可能某些 FR 残基被啮齿动物抗体中类似部位的残基所替换。重要的是被人源化的抗体应保留对抗原的高亲和性和其他有利的生物特性。为了实现该目的，在一种优选方法中，通过用亲代序列和人源化序列的三维模型，分析亲代序列和各种概念的人源化产物，从而制备人源化抗体。这些免疫球蛋白的空间模型是本领域技术人员所熟悉的。已有计算机程序可阐述和显示所选定的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构。检查这些显示可以分析残基在候选免疫球蛋白序列功能中的可能起的作用，即分析会影响候选免疫球蛋白结合抗原的能力的残基。用这种方法，可从共有区和引入序列中选择出并合并 FR 残基，从而实现所需

的抗体特性，如增加对靶抗原的亲和性。对于进一步的细节，可参见 1992 年 12 月 23 日出版的 WO 92/22653 。

(ii) 制备免疫粘附素

免疫球蛋白(Ig)及其某些变化形式是已知的，而且许多已经在重组细胞培养中被制备。例如参见美国专利 No. 4,745,055; EP 256,654; Faulkner 等人，自然 298:286(1982); EP 120,694; EP 125,023; Morrison, 免疫学杂志 123:793 (1979); Kohler等人,美国科学院院报 77:2197 (1980); Raso等人, 癌症研究 41:2073(1981) ; Norrison 等人, Ann. Rev. Immununol. 2:239 (1984) ; Morrison, 科学, 229:1202 (1985) ; Morrison等人, 美国科学院院报 81:6851(1984) ; EP 255,694 ; EP 266,663 ; 和 WO 88/03559 。重配的免疫球蛋白链也是已知的。参见例如美国专利 No. 4,444,878; WO 88/03565;和 EP 68, 763 以及本文中提及的文献。

将粘附素结合域序列连于合适的免疫球蛋白恒定区序列而构成出的嵌合体(免疫粘附素)，在本领域中是已知的。在文献中报道的免疫粘附素包括: 融合 T 细胞受体(Gascoigne等人, 美国科学院院报 84:2936-2940 [1987]); CD4 (Capon等人, 自然 337:525-531 [1989] ;Traunecker等人, 自然 339:68-70 [1989]; Zettmeissl等人, 美国A细胞生物学(DNA Cell Biol. USA) 9:347-353 [1990] ;和 Byrn等人, 自然 344:667-670 [19903) ;L-选择蛋白(归巢受体) (Watson 等人, 细胞生物学杂志 110:2221-2229[1990] ;和 Watson 等人, 自然 349:164-167 [1991]) ; CD44 (Aruffo 等人, 细胞 61:1303-1313 [1990]); CD28 和 B7 (Linsley 等人, J. Exp. Med. 173:721-730 [1991]) ; CTLA-4 (Lisley 等人, J. Exp. Med. 174:561-569[1991]); CD22 (Stamenkovic 等人, 细胞 66:1133-1144 [1991]); TNF 受体(Ashkenazi 等人, 美国科学院院报 88;10535-10539 [1991];Lesslauer 等人, 欧洲免疫学杂志(Eur. J. Immunol.) 27:2883-2886 [1991];和 Peppel 等人,J.Exp.Med.174:1483-1489 [1991]); 和 IgE 受体α (Ridgway 和 Gorman, 细胞生物学杂志, Vol. 115, 摘要 No. 1448 [1991]) 。

最简单和最直接的免疫粘附素设计是将粘附素的结合域(如受体的胞外域[ECD])与免疫球蛋白重链的绞链区和 Fc 组合在一起(见图 3)。一般，在制备本发明的免疫粘附素时，可将编码粘附素结合域的核酸通过 C 末端而融合于编码免疫球蛋白恒定区序列的 N 末端的核酸，然而 N 末端的融合也是可行的。

典型地，在这种融合中，所编码的嵌合多肽会保留至少有功能活性的、免疫球蛋白重链恒定区的绞链、 C_H2 和 C_H3 区。融合还可连于恒定区 Fc 片段的 C 末端，或者刚好在重链 C_H1 或轻链相应区域的 N 末端。发生融合的确切位置并不重要；具体的位点是公知的而且可以选择以优化免疫粘附素的生物活性、分泌性或结合特性。

在一个优选例子中，将粘附素序列融合于免疫球蛋白 $G_1(IgG_1)$的 Fc 区的 N 末端。可以将整个重链恒定区融合于粘附素序列。然而，更佳地用于融合的是，从刚好位于

木瓜蛋白酶酶切位点(或其他免疫球蛋白的类似位点)上游的绞链区开始的序列，该位点在化学上定义了 IgG Fc(即残基 216，将重链恒定区的第一个残基定为残基 114 时)。在一个特别优选的例子中，粘附素氨基酸序列被融合于 IgG_1、IgG_2 或 IgG_3 重链的(a)绞链区以及 C_H2 和 C_H3，或(b)C_H1、绞链区、C_H2 和 C_H3 区。融合的确切位置并不重要，并且可通过常规的试验方法确定最佳位置。

对于双特异性免疫粘附素，免疫粘附素可以被装配成多聚体形式尤其是异二聚体或异四聚体。一般，这些装配的免疫球蛋白具有已知的单元结构。一种基本的 4 链结构单元是 IgG、IgD、和 IgE 存在的形式。4 链单元在分子量更大的免疫球蛋白中有重复；IgM 一般是由二硫键维持在一起的 4 种基本单元构成的五聚体。IgA 球蛋白以及偶尔 IgG 球蛋白也可以多聚体形式存在于血清中。在多聚体情况下，4 种单元中的每一种可以相同或不同。

在此处范围内的、各种代表性的、装配的免疫粘附素被示意性地如下表示:

(a)AC_L-AC_L;

(b)AC_H-[AC_H，AC_L-AC_H，AC_L-V_HC_H，或 V_LC_L-AC_H];

(c)AC_L-AC_H-[AC_L-AC_H，AC_L-V_HC_H，V_LC_L-AC_H，或 V_LC_L-V_HC_H];

(d)AC_L-V_HC_H-[AC_H，或 AC_L-V_HC_H，或 V_LC_L-AC_H];

(e)V_LC_L-AC_H-[AC_L-V_HC_H，或 V_LC_L-AC_H]；和

(f)[A-Y]n-[V_LC_L-V_HC_H]$_2$，

其中，每个 A 表示相同或不同的粘附素氨基酸序列;

V_L 是免疫球蛋白轻链可变区;

V_H 是免疫球蛋白重链可变区;

C_L 是免疫球蛋白轻链恒定区;

C_H 是免疫球蛋白重链恒定区;

n 是大于 1 的整数;

Y 是共价交联剂的残基。

为了简洁起见，上述结构中仅显示了关键特征，它们没有显示免疫球蛋白的连接(J)区或其他的区域，也没有显示二硫键。然而，当为了结合活性而需要这些区域时，它们应被构建成处于它们在免疫球蛋白分子中所处的常规位置。

或者，粘附素序列可插入免疫球蛋白重链和轻链之间，这样便获得了具有嵌合重链的免疫球蛋白。在这种情况下，粘附素序列被融合于免疫球蛋白每个臂中免疫球蛋白重链的 3'端，或者在绞链和 C_H2 区之间，或者在 C_H2 和 C_H3 区之间。类似的构建物已由 Hoogenboom 等人，分子免疫学 28:1027-1037(1991)报道过。

尽管在本发明的免疫粘附素中并不需要存在免疫球蛋白轻链，但是可以存在免疫球蛋白轻链，它或者共价地连于免疫粘附素重链融合多肽，或者直接融合于粘附素。在前一种情况下，编码免疫球蛋白轻链的 DNA 一般与编码粘附素-免疫球蛋白重链融合蛋白的 DNA 共表达。一旦分泌，杂合体的重链和轻链会共价相连，从而形成免疫

球蛋白样的结构，它含有 2 个由二硫键连接的免疫球蛋白重链-轻链对。适用于制备这种结构物的方法包括于例如美国专利 No. 8,816,567(1989 年 3 月 28 日授权)。

在一个优选例子中，用于构建本发明的免疫粘附素的免疫球蛋白序列来自 IgG 免疫球蛋白重链恒定区。对于人的免疫粘附素，优选使用人的 IgG_1 和 IgG_3 免疫球蛋白序列。使用 IgG_1 的一个主要优点是，IgG_1 免疫粘附素可以有效地在固定化的蛋白质 A 上被纯化。相反，IgG_3 纯化需要蛋白质 G，一种多用途性较差的介质。但是，当选择用于特定免疫粘附素构建的 Ig 融合配对物时，应考虑免疫球蛋白的其他结构和功能特性。例如，IgG_3 的绞链更长和更柔韧，所以它可容纳更大的“粘附素”结构域，而这些“粘附素”结构域融合于 IgG_1 时，可能不折叠或不能正常地发挥功能。另一考虑因素是价数；IgG 免疫粘附素是二价的同二聚体，而 Ig 亚型如 IgA 和 IgM 会分别产生有基本的 Ig 同二聚体单元构成的二聚体的或五聚体的结构。对于设计用于体内的免疫粘附素，药物动力学性质和 Fc 区导致的效应子功能也是重要的。尽管 IgG_1、IgG_2 和 IgG_4 都有 21 天的体内半衰期，但是它们激活补体系统的有关能力却不相同。IgG_4 不激活补体，而与 IgG_1 相比 IgG_2 激活补体的能力非常弱。此外，与 IgG_1 不同，IgG_2 不结合单核细胞或嗜中性白细胞上的 Fc 受体。尽管 IgG_3 对于补体激活是最佳的，但是其体内半衰期约为其他 IgG 同种型的 1/3 。对于用于人体治疗的免疫粘附素的另一重要的考虑因素是，某一同种型的同种异型变体的数目。一般优选按血清学上划分时同种异型较少的 IgG 同种型。例如，IgG_1 仅有 4 种血清学同种异型位点，其中 2 种(G1m 和 2)位于 Fc 区；而且这些位点中的一个即 G1m 是非免疫原性的。与之相反，IgG3 有 12 种血清学的同种异型，所有的都位于 Fc 区；这些位点中仅有 3 个(G3m5、11 和 21)具有一个非免疫原性的同种异型。这样，γ3 免疫粘附素潜在的免疫原性大于γ1 免疫粘附素。

最方便的是通过将编码读框内粘附素部分的 cDNA 序列融合于 Ig 的 cDNA 序列，而构建免疫粘附素。然而，还可以融合于基因组 Ig 片段(参见例如 Gascoigne 等人,同上；Aruffo 等人，细胞，61:1303-1313[1990];和 Stamenkovic 等人，细胞 66:1133-1144 [1991])。后一种类型的融合需要存在 Ig 调控序列以便表达。可以根据出版的序列，从来自脾或外周血淋巴细胞的 cDNA 文库中，通过杂交或聚合酶链反应(PCR)技术分离出编码 IgG 重链恒定区的 cDNA 。编码免疫粘附素的“粘附素”和 Ig 部分的 cDNA 被串联式地插入质粒载体中，该质粒载体在选定的宿主细胞中指导有效的表达。

2.产生突起和/或空穴

作为选择用于构成突起和/或空穴的最初残基的第一步骤，用本领域公知的技术如 X 光晶体衍射或 NMR 来获得异多聚体的三维结构。根据三维结构，本领域的技术人员能鉴别出界面残基。

优选的界面是免疫球蛋白恒定区的 C_H3 区。 IgG 、 IgA 、 IgD 、 IgE 和 IgM 的 C_H3 区的界面残基示于图 5，包括那些最佳的用于被引入残基所置换的残基。各种 IgG 亚型的界面残基示于图 6 。还鉴别了“隐蔽的”残基。对 C_H3 界面进行工程化的基础是 X 光晶体衍射已表明，在 Fc 区域中人 IgG_1 重链之间的分子间缔合包括 C_H3 区之间广泛的蛋白质/蛋白质相互作用，而糖基化的 C_H2 区通过它们的碳水化合物而相互作用(Deisenhofer, Biochem. 20:2361[1981])。此外，有 2 个重链间的二硫键，它们在哺乳动物细胞表达抗体时会有效地形成，除非截短重链而去除 C_H2 区和 C_H3 区(King 等人,Biochem. J. 281:317[1992])。因此，重链装配适合会促进二硫键的形成，而不是相反。综合考虑时，这些结构和功能数据导致了这样的假设：即抗体重链缔合由 C_H3 区所指导。还进一步推测， C_H3 区之间的界面可以被改造，以促进形成不同重链的异多聚体并阻止相应的同多聚体的装配。此处描述的试验表明，用这种方法可以促进异多聚体的形成优于同多聚体的形成。因此，可以产生一个多肽融合物，它含有感兴趣的多肽和抗体的 C_H3 区，从而形成第一或第二多肽。优选的 C_H3 区来自 IgG 抗体如人的 IgG_1 。人 IgG_1 的界面残基示于图 7 。

鉴别出那些可以作为形成突起或空穴的候选对象的界面残基。优选选择“隐蔽的”残基用于被替换。为了确定一个残基是否隐蔽，可使用 Lee 等人,分子生物学杂志 55:379-400(1971)中的表面可及程序，以计算界面中各残基的溶剂可及性(solvent accessibility, SA)。然后，第一和第二多肽中每一个多肽的残基 SA 值，在去除另一多肽之后，单独计算。各残基在单体形式和二聚体形式的界面之间的 SA 差异可以用：SA(二聚体)-SA(单体)而计算出。这提供了在形成二聚体时丧失 SA 的残基清单。将二聚体中每个残基的 SA 与三肽 Gly-X-Gly 中同一氨基酸的理论 SA 进行比较，其中 X = 感兴趣的氨基酸(Rose 等人,科学 229:834-838[1985])。(a)与单体相比在二聚体中丧失 SA 的残基，和(b)SA 比在相应的三肽中 SA 小 26%的残基，被认为是界面残基。描述了 2 类：一类是与相应的三肽相比时 SA<10%(即“隐蔽的”)；另一类是与相应的三肽相比， 25%>SA>10%(即“部分隐蔽的”)。

表 2

残基 No.[1]	单体→二聚体时丧失 SA		%三肽	
	多肽 A	多肽 B	多肽 A	多肽 B
Q347	22.1	31.0	25.0	26.5
Y349	79.8	83.9	5.2	5.7
L351	67.4	77.7	3.9	2.0
S354	53.4	52.8	11.3	11.7
E357	43.7	45.3	0.4	1.3
S364	21.5	15.1	0.5	1.4
T366	29.3	25.8	0.0	0.1
L368	25.5	29.7	1.0	1.1
K370	55.8	62.3	11.5	11.0
T394	64.0	58.5	0.6	1.4
V397	50.3	49.5	13.2	11.0
D399	39.7	33.7	5.7	5.7
F405	53.7	52.1	0.0	0.0
Y407	89.1	90.3	0.0	0.0
K409	86.8	92.3	0.7	0.6
T411	4.3	7.5	12.7	9.8

[1]残基在 IgG 晶体结构中的编号(Deisenhofer, Biochemistry 20:2361-2370[1981])

置换残基对多肽链结构的影响可以用分子图模型程序如 Insight™ 程序(Biosym Technologies)进行研究。使用程序，例如那些位于第一多肽界面上的、侧链体积小的隐蔽残基可以被替换成侧链体积更大的残基(即突起)。然后检查在第二多肽界面上的、靠近突起的残基，以寻找适合形成空穴的残基。一般，这个残基具有大的侧链体积而且被侧链体积小的残基所置换。在某些例子中，检查界面的三维结构可揭示出位置适当和大小适当的、第一多肽界面上的突起或第二多肽界面上的空穴。在这些情况下，仅需要塑造出一个突变体，即一个人工引入的突起或空穴。

至于选择潜在的用于置换的最初残基，当第一和第二多肽都含有 C_H3 区时，人 IgG_1 的 C_H3/C_H3 界面涉及位于每个区域上 16 个残基，它们位于 4 个反平行 β -链上，它包埋每个表面的 1090 平方埃(Deisenhofer 同上，和 Miller 等人,分子生物学杂志 216:965[1990])。参见本申请的图 7。突变最好针对位于 2 个中央反平行 β -链上残基。目的是降低这样的风险，即产生的突起能够通过伸入周围的溶液而不是伸入配对的 C_H3 区中的补偿性空穴就被容纳。

一旦优选的最初/引入残基通过分子模型而被鉴别出，那么可以用本领域中公知的技术将这些氨基酸置换引入多肽中。一般，可用 Mutagenesis: a Practical Approach,(同上)中所述的技术对编码多肽的 DNA 进行遗传工程改造。

寡核苷酸介导的诱变是一种优选的、制备编码第一或第二多肽的 DNA 置换变异体的方法。该技术是本领域中公知的，并且由 Adelman 等人, DNA, 2:183(1983)描述。简而言之，第一或第二多肽 DNA 的改变是通过，将编码所需突变的寡核苷酸与 DNA 模板相杂交，其中模板是含有异多聚体的未改变或天然 DNA 序列的单链形式的质粒或噬菌体。在杂交之后，用 DNA 聚合酶来合成模板的完整的第二条互补链，该互补链中掺入了寡核苷酸引物，因而会在异多聚体 DNA 中编码选定的改变。

可按 Wells 等人, Gene 34： 315(1985)中所述的盒式诱变方法，即通过使互补的寡核苷酸退火而产生的人工合成的突变片段，然后用该片段去替换感兴趣的 DNA 区域。 PCR 诱变也适用于制造第一或第二多肽 DNA 的变异体。尽管下面的论述针对 DNA，但是应理解这些技术也可用于 RNA。 PCR 技术一般指下列的程序(参见 Erlich, 科学, 252:1643-1650[1991], R. Higuchi 的章节， p 61-70)。

除了突起和空穴突变之外，本发明还包括通过将合适的核苷酸变化引入异多聚体 DNA ，或者通过合成所需的异多聚体多肽，而制得异多聚体氨基酸序列变异体。这些变异体包括例如对构成异多聚体的第一和第二多肽的氨基酸序列进行缺失、或插入或取代。只要最终的构建物具有所需的抗原结合性能，可以进行各种组合的缺失、插入和取代，并保留在最终的构建物中。氨基酸变化还可改变异多聚体的翻译后加工，如改变糖基化位点的数目或位置。

一种有用的、确定异多聚体多肽中那些残基或区域是适合诱变的优选位置的方法，是 Cunningham 和 Wells, 科学, 244:1081-1085(1989)中描述的“丙氨酸扫描诱变”。在该方法中，确定一个或一组靶残基(如带电荷的残基如 arg、 asp、 his、 lys 和 glu)，并用中性或带负电荷的氨基酸(最佳的是丙氨酸或聚丙氨酸)加以替换，以影响氨基酸与细胞中或细胞外周围水性环境的相互作用。那些在功能上表现出对替换敏感的区域，再通过在置换位点处引入进一步的或其他的突变而进行结构的精细研究。这样，尽管引入氨基酸序列变异的位点被预先确定，但是突变本身的性质不必被预先确定。

一般，突变涉及在异多聚体的非功能区域中保守氨基酸的置换。代表性的置换示于下表。

表 3

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	val;leu;ile	val
Arg (R)	lys;gln;asn	lys
Asn (N)	gln;his;lys;arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro;ala	ala
His (H)	asn;gln;lys;arg	arg
Ile (I)	leu;val;met;ala;phe;正亮氨酸	leu
Leu (L)	正亮氨酸;ile;val;met;ala;phe	ile
Lys (K)	arg;gln;asn	arg
Met (M)	leu;phe;ile	leu
Phe (F)	leu;val;ile;ala;tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr;phe	tyr
Tyr (Y)	trp;phe;thr;ser	phe
Val (V)	ile;leu;met;phe;ala;正亮氨酸	leu

异多聚体多肽的共价修饰形式在本发明范围之内。异多聚体的共价修饰形式可通过将异多聚体或其片段上的靶氨基酸残基与有机衍生剂反应而引入，其中该衍生剂可与选定的侧链或 N-或 C 末端残基反应。另一种异多聚体多肽的共价修饰形式也在本发明范围之内，它包括改变多肽的天然糖基化模式。改变指缺失一个或多个原始异多聚体中发现的碳水化合物部分，和/或增加一个或多个不存在于原始异多聚体中的糖基化位点。给异多聚体多肽添加糖基化位点，可方便地通过改变氨基酸序列使其含有一个或多个 N-连接的糖基化位点而实现。改变还可通过在原始的异多聚体序列中添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基，或被一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基所置换而实现(对于 O-连接的糖基化位点)。为了方便起见，异多聚体氨基酸序列优选可以在 DNA 水平上进行改变，尤其是在预定的碱基处突变编码异多聚体多肽的 DNA ，从而产生会翻译成所需氨基酸的密码子。另一

种增加异多聚体多肽中碳水化合物部分数目的方法是将糖苷通过化学法或酶法而偶联于多肽。这些方法描述在 1987 年 9 月 11 日出版的 WO 87/05330，以及 Aplin 和 Wriston，CRC Crit. Rev. Biochem.，pp. 259-306(1981)中。将异多聚体上存在的碳水化合物部分去除可以用化学法或酶法。

另一种异多聚体的共价修饰包括将异多聚体多肽连于各种非蛋白质的聚合物如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯，方法描述于美国专利 No. 4,640,835；4,496,689；4,301,144；4,670,417；4,791,192；4,179,337 中。

因为通常难以事先预测突变的异多聚体的性质，所以应理解要对回收的突变体进行一定的筛选以选择最佳的突变体。

3.表达异多聚体

在如上面的章节中所述的那样，对 DNA 进行突变之后，用本领域中已有的重组技术表达编码该分子的 DNA。通常，选择的表达系统是哺乳动物细胞表达载体和宿主，这样异多聚体可被合适地糖基化(如在异多聚体含有糖基化的抗体结构域时)。然而，也可以在下述的原核表达系统中产生这些分子。一般，宿主细胞用位于单一载体或独立载体上的、编码第一多肽和第二多肽及其他形成异多聚体所需的其他多肽的 DNA 进行转化。然而，可以在独立的表达系统中表达第一多肽和第二多肽，然后在体外将表达的多肽偶联在一起。

将编码异多聚体的核酸(如 cDNA 或基因组 DNA)插入可复制的载体，以便进一步克隆(扩增 DNA)或表达。已有许多种载体。载体的组件一般包括(但并不限于)一种或多种下列成分：信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

异多聚体多肽可以以融合蛋白形式产生，该融合蛋白含有信号序列或其他在成熟蛋白质或多肽的 N-末端处具有特异性切割位点的多肽。一般，信号序列可以是载体的一部分，或者它也可以作为 DNA 的一部分而插入载体。优选选择的异源信号序列是被宿主细胞所识别和加工(即被信号肽酶所切割)的信号序列。对于原核宿主细胞，信号序列可以被例如选自下组的原核信号序列所替换：碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp、或热稳定肠毒素 II 前导序列。对于酵母分泌，天然的信号序列可被例如酵母转化酶前导序列、α 因子前导序列(包括酵母属(*Saccharomyces*)和克鲁维酵母属(*kluyveromyces*)α-因子前导序列，后者描述于 1991 年 4 月 23 日授权的美国专利 No. 5,010,182 中)、或酸性磷酸酶前导序列、白色念珠菌(*C. albicans*)葡糖淀粉酶前导序列(EP 362,179，1990 年 4 月 4 日出版)或在 1990 年 11 月 15 日出版的 WO 90/13646 中所描述的信号序列。在哺乳动物细胞表达中，天然的信号序列(如一般在体内指导这些分子从人细胞中分泌出来的抗体或粘附素的前序列)是令人满意的，尽管其他的哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列如

单纯疱疹病毒 gD 信号序列也是合适的。将这些前体区域的 DNA 按阅读框连于编码形成异多聚体的多肽的 DNA 。

表达载体和克隆载体两者都含有能使载体在一种或多种选定的宿主细胞中复制的核酸序列。一般而言，在克隆载体中，这种序列是能使载体独立于宿主染色体 DNA 而进行复制的序列，而且它包括复制起点或自我复制序列。对于各种不同的细菌、酵母和病毒，这类序列是众所周知的。质粒 pBR322 的复制起点适用于绝大多数革兰氏阴性菌， 2μ 质粒起点适用于酵母，而各种不同的病毒起点(SV40 、多瘤病毒、腺病毒、 VSV 或 BPV)可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。一般，对于哺乳动物表达载体不需要使用复制起点组件(使用 SV40 起点仅仅是因为它含有早期启动子)。

表达载体和克隆载体应包含选择基因，也称为可(供)选择的标记(基因)。典型的选择基因所编码的蛋白质是(a)赋予对抗生素或其他毒素如氨苄青霉素、新霉素、氨甲蝶呤、或四环素的抗性的蛋白质，(b)互补营养缺陷型的缺陷的蛋白质，或(c)提供复合培养基中没有的关键营养物的蛋白质，如杆菌属(*Bacilli*)的编码 D-丙氨酸消旋酶的基因。一个选择方案的例子是，采用药物来抑制宿主细胞的生长。那些成功地被异源基因所转化的细胞会产生赋予抗药性的蛋白质，因而可以在选择方式中存活下来。这类显性选择的例子使用药物新霉素(Southern 等人 ,J.Molec. Appl. Genet. 1:327[1982]) 、 霉 酚 酸 (Mulligan 等 人 , 科 学 , 209:1422[1980])或潮霉素(Sugden 等人,分子细胞生物学， 5:410-413[1985])。上面给出的 3 个例子采用了在真核控制下的细菌基因，以分别赋予对合适药物 G418 即新霉素(遗传霉素(geneticin))、 xgpt(霉酚酸)、或潮霉素的抗性。

另一种对哺乳动物细胞合适的可选择标记基因的例子，是那些能够鉴别细胞有能力摄取异多聚体核酸的标记基因，如 DHFR 或胸苷激酶。将哺乳动物转化子置于选择压力下，使得仅有转化子因为摄取了标记基因而可以唯一地存活。选择压力的施加是通过在一定的条件下培养转化子，其中培养基中选择剂的浓度连续地变化，从而导致扩增选择基因和编码异多聚体的 DNA 。从扩增的 DNA 中合成出大量的异多聚体。其他可扩增基因的例子包括： 金属硫蛋白-I 和金属硫蛋白-II(较佳的是灵长目的金属硫蛋白基因)、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

例如，用 DHFR 选择基因转化的细胞，先通过将所有的转化子在含有氨甲蝶呤(Mtx)(一种 DHFR 的竞争性拮抗剂)的培养基中培养而被鉴别出。当采用野生型 DHFR 时，一种合适的宿主细胞是在 DHFR 活性方面有缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系，其制备和繁殖如 Urlaub 和 Chasin, 美国科学院院报, 77:4216(1980)中所述。再将转化的细胞暴露于更高浓度的氨甲蝶呤。这导致合成多拷贝的 DHFR 基因，同时还合成了多拷贝的构成表达载体的其他 DNA ， 如编码异多聚体组成成分的 DNA 。如果使用对 Mtx 高抗性的突变性 DHFR 基因，则这种扩增技术可用

于任何其他原本不合适的宿主细胞如 ATCC No. CCL61 CHO-K1，尽管该细胞存在内源的 DHFR(EP117,060)。

或者，用编码异多聚体、野生型 DHFR 蛋白和其他可选择标记如氨基糖苷 3'-磷酸转移酶(APH)的 DNA 序列所转化或共转化的宿主细胞(尤其是含有内源 DHFR 的野生型宿主)，可以通过在含有针对可选择标记的选择剂的培养基中让细胞生长而选择出，其中选择剂可以是例如氨基糖苷类抗生素如卡那霉素、新霉素或 G418。参见美国专利 No. 4,965,199。

合适的用于酵母中的选择基因是存在于酵母质粒 YRp7 中的 trp1 基因(Stinchcomb 等人，自然 282:39[1979]; Kingsman 等人,基因 7:141[1979]; 或 Tschemper 等人，基因 10:157[1980])。trp1 基因提供了一种用于不能在色氨酸中生长的酵母突变株如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1 的选择标记(Jones，遗传学 85:12[1977])。通过在没有色氨酸下的生长，在酵母宿主细胞基因组中存在的 trp1 损伤便提供了一种有效的、检测转化的环境。类似地，可用已知的含有 Leu2 基因的质粒来互补 Leu2-缺陷型的酵母株(ATCC 20,622 或 38,626)。

此外，衍生自 1.6μm 环状质粒 pKD1 的载体也可用于转化克鲁维酵母属的酵母。Bianchi 等人,Curr. Genet. 12: 185(1987)。最近，报道了一种用于乳克鲁维酵母(*K. lactis*)的、大规模生产重组牛凝乳酶的表达系统，Van den Berg, Bio/Technology 8:135(1990)。还公开了由克鲁维酵母属的工业菌株分泌成熟的重组人血清白蛋白的、稳定的多拷贝表达载体。Fleer 等人，Bio/Technology 9:968-975(1991)。

表达和克隆载体常含有启动子，它为宿主生物体所识别并可操作地连于异多聚体核酸。大量为各种潜在宿主细胞所识别的启动子是众所周知的。用限制性酶消化从源 DNA 中去除启动子，然后将分离出的启动子序列插入载体，这样便可将这些启动子可操作地连于编码异多聚体的 DNA。

适用于原核宿主的启动子包括 β-内酰胺酶和乳糖启动子系统(Chang 等人,自然 275:615[1978];和 Goeddel 等人，自然 281:544[1979])、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel，核酸研究 8:4057[1980]和 EP 36,776)以及杂合启动子如 tac 启动子(deBoer 等人，美国科学院院报 80:21-25[1983])。然而，其他已知的细菌启动子也是合适的。它们的核苷酸序列已经被出版，从而可使技术人员将它们可操作地连于编码异多聚体的 DNA(Siebenlist 等人，细胞 20:269[1980])，其中可使用接头或衔接头来提供任何所需的限制性位点。用于细菌系统启动子还可含有可操作地连于编码异多聚体的 DNA 的 Shine-Dalgarno (S.D.)序列。

用于真核生物的启动子序列是已知的。几乎所有的真核基因含有位于转录起始位点上游约 25-30 碱基处的富含 AT 的区域。另一种在许多基因的转录起始位置上游 70-80 碱基处发现的序列是 CXCAAT 区域，其中 X 可以是任何核苷酸。

在许多真核基因的 3'端的是 AATAAA 序列，它可能是向编码序列的 3'端添加 polyA 尾的信号。所有这些序列都适合插入于真核表达载体中。

适用于酵母宿主的启动序列的例子包括 3'-磷酸甘油酸激酶(Hitzeman 等人, J. Biol. Chem. 255:2073[1980])或其他糖酵解酶(Hess 等人, J. Adv. Enzyme Req. 7: 149[1968];和 Holland, 生物化学 17:4900[1978])如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、果糖磷酸激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、丙糖磷酸异构酶、葡糖磷酸异构酶和葡糖激酶的启动子。

其他的酵母启动子，即诱导型的启动子具有额外的由生长条件控制转录的优点，它们是乙醇脱氢酶 2、异细胞色素 C(isocytochrome C)、酸性磷酸酶、与氮代谢关联的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶等的启动子区域。用于酵母表达的合适载体和启动子还描述于 Hitzeman 等人,EP 73,657A 中。酵母增强子可与酵母启动子一起有利地使用。

在哺乳动物宿主细胞中从载体上转录出异多聚体，由从病毒如多瘤病毒、禽痘病毒(UK 2,211,504， 1989 年 7 月 5 日出版)、腺病毒(如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、反转录病毒、乙型肝炎病毒和最佳的猴病毒 40(SV40)的基因组中获得的，或者从异源哺乳动物启动子如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子中获得的，或者从热休克启动子中获得的启动子所控制。

SV40 病毒的早期和晚期启动子可方便地以 SV40 限制性片段的形式获得，它还含有 SV40 病毒复制起点。 Fiers 等人, 自然 273:113(1978); Mulligan 和 Berg, 科学 209:1422-1427(1980); Pavlaskis 等人,美国科学院院报 78:7398-7402(1981)。人巨细胞病毒的立即早期启动子可方便地以 HindIII E 限制性片段的形式获得。Greenaway 等人,基因 18:355-360(1982)。用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达 DNA 的系统公开于美国专利 No. 4,419,446。这种系统的一种改良形式描述于美国专利 No. 4,601,978。还可参见 Gray 等人,自然 295:503-508(1982)，内容为在猴细胞中表达免疫干扰素的 cDNA； Reyes 等人,自然 297:598-601(1982)，内容为在得自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下在小鼠细胞中表达人β-干扰素 cDNA； Canaani 和 Berg, 美国科学院院报 79:5166-5170(1982)，内容为在培养的小鼠和兔细胞中表达人干扰素-β 1 基因；以及 Gorman 等人, 美国科学院院报 79:6777-6781(1982)，内容为在 CV-1 猴肾细胞、鸡胚胎成纤维细胞、中国仓鼠卵巢细胞、 HeLa 细胞和小鼠 NIH-3T3 细胞中，用 Rous 肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子表达细菌的 CAT 序列。

通过将增强子序列插入载体，通常可以增加更高级真核生物中转录编码异多聚体的 DNA 的水平。增强子取向和位置是相对独立的，已发现位于转录单元的 5'(Laimins 等人, 美国科学院院报 78:993[1981])和 3'(Lusky 等人, Mol. Cell Bio. 3: 1108[1983])，可位于内含子(Banerji 等人, 细胞 33:729[1983])也可位于编码序列

本身(Osborne 等人, Mol. Cell Bio. 4:1293[1984])。现在许多哺乳动物基因的增强子序列是已知的(珠蛋白、弹性蛋白、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)。然而，典型地，人们可使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括在复制起点后侧(碱基对100-270)的 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起点后侧的多瘤病毒增强子，和腺病毒增强子。还可参见 Yaniv, 自然 297:17-18(1982)，内容为激活真核启动子的增强子元件。增强子可以被剪接入载体中异多聚体编码序列的 5'或 3'的位置，但是最好位于启动子 5'的位置。

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 所需的序列。这样的序列一般可从真核或病毒 DNA 或 cDNA 的 5'以及偶尔的 3'不翻译区域中获得。这些区域含有在编码异多聚体的 mRNA 的不翻译部分中以聚腺苷酸片段形式转录的片段。

构建含有一个或多个上述元件的合适载体可采用标准的连接技术。分离出的质粒或 DNA 片段被切割、剪裁和重新连接成所需的形式，从而产生所需的质粒。

为了分析以证实在构建的质粒中序列正确，用连接混合物转化大肠杆菌 K12 株 294(ATCC 31,446)，并且合适的话，用氨苄青霉素或四环素抗性选择出成功的转化子。制备转化子的质粒，用限制性内切酶消化法和/或用 Messing 等人,核酸研究 9:309(1981)或 Maxam 等人，酶学方法 65:499(1980)的方法测序而加以分析。

在实施本发明中特别有用的是在哺乳动物细胞中瞬时表达编码异多聚体的 DNA 的表达载体。一般，瞬时表达涉及使用能够在宿主细胞中有效复制的表达载体，从而在宿主细胞中积累许多拷贝的表达载体，并因而合成高水平的由表达载体编码的所需多肽。 Sambrook 等人,同上， pp 16.17-16.22 。瞬时表达系统包括合适的表达载体和宿主细胞，它可方便地正确鉴定出克隆的 DNA 所编码的多肽，以及快速地筛选具有所需结合特异性/亲和性的异多聚体。

适用于在重组脊椎动物细胞培养中合成异多聚体的其他方法、载体和宿主细胞描述于 Gething 等人,自然 293:620-625(1981); Mantei 等人,自然 281:40-46(1979); Levinson 等人; EP 117,060;和 EP 117, 058 。对于在哺乳动物细胞培养中表达异多聚体特别有用的质粒是 pRK5(EP 307,247)或 pSVI6B(PCT 出版物 No. WO/08291， 1991 年 6 月 13 日出版)。

选择表达异多聚体的宿主细胞系主要取决于表达载体。其他的考虑因素是所需要的蛋白质数量。用瞬时转染常可产生毫克级数量。例如，通过改进的磷酸钙法，用腺病毒 EIA 转化的 293 人胚肾细胞系可以用基于 pRK5 的载体进行瞬时转染，从而可有效地表达异多聚体。基于 CDM8 的载体可用于通过 DEAE-葡聚糖法(Aruffo 等人,细胞 61:1303-1313 [1990];和 Zettmeissl 等人, DNA 细胞生物学 USA 9:347-353[1990])转染 COS 细胞。如果需要更多数量的蛋白质，可在稳定转

染宿主细胞系之后表达免疫粘附素。例如，在编码二氢叶酸还原酶(DHFR)并赋予G418 抗性的额外质粒存在下，将基于 pRK5 的载体引入中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在培养物中选择出对 G418 有抗性的克隆。在存在水平上升的 DHFR 抑制剂氨甲蝶呤下使这些克隆生长，并选择克隆，这样编码 DHFR 和异多聚体序列的基因拷贝数目便一起增加了。如果免疫粘附素在 N-端含有疏水的前导序列，那么它可能被转染的细胞所加工和分泌。结构更复杂的免疫粘附素的表达会需要非常合适的宿主细胞。例如，诸如轻链或 J 链之类的元件可由某些骨髓瘤或杂交瘤宿主细胞所提供(Gascoigne 等人，同上；和 Martin 等人，病毒学杂志 67: 3561-3568[1993])。

用于克隆或表达此处载体的其他合适宿主细胞是上述的原核、酵母或其他更高级的真核细胞。用于该目的的合适原核生物包括真细菌如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体例如肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)如埃希氏杆菌属(*Escheriachia*)比如大肠杆菌，肠杆菌属，欧文氏菌属(*Erwinia*)，克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*)，变形杆菌属(*Proteus*)，沙门氏菌属如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)，沙雷氏菌属如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)，志贺氏菌属(*Shigella*)，以及芽胞杆菌属如枯草杆菌和蘚样芽胞杆菌(*B. licheniformis*)(如 1989 年 4 月 12 日出版的 DD 266，710 中所公开的蘚样芽胞杆菌 41P)，假单胞菌属如绿脓假单胞菌(*P. aeruginosa*)和链霉菌属。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294(ATCC 31,446)，尽管其他的菌株如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776(ATCC 31,537)和大肠杆菌 W3110(ATCC27,325)也是合适的。这些例子仅仅是阐述性的，不起限制作用。菌株 W3110 是特别优选的宿主或亲代宿主，因为它是用于重组 DNA 产品发酵的常用宿主菌株。较佳地，宿主细胞应分泌最少量的蛋白酶。例如，可以修饰菌株 W3110 从而在编码蛋白质的基因上造成遗传突变，其中这类宿主的例子包括大肠杆菌 W3110 株 27C7。27C7 的完整的基因型是 tonA Δ ptr3 phoA Δ E15 Δ (argF-lac) 169 ompT Δ degP41karf。菌株 27C7 于 1991 年 10 月 30 日保藏于美国典型培养物保藏中心，ATCC 号 No. 55,244。或者，使用公开于美国专利 No. 4,946,783(1990 年 8 月 7 日授权)中所公开的具有突变的外周质蛋白酶的大肠杆菌菌株。另外，克隆方法如 PCR 或其他核酸聚合酶反应是适用的。

除了原核生物，真核微生物如丝状真菌或酵母也是适用于异多聚体编码载体的克隆或表达宿主。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)，即常见的发面酵母，是低级真核宿主微生物中最常用的。然而，大量其他属、种或株通常是可供此处使用的，如裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)(Beach 和 Nurse，自然，290:140[1981]; EP 139,383，1985 年 5 月 2 日出版)；克鲁维酵母属宿主(美国专利 No. 4,943,529；Fleer 等人，同上)如乳克鲁维酵母(*K. lactis*) [MW98-8C、CBS683、CBS4574；Louvencourt 等人，细菌学杂志 737(1983)]、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*) (ATCC12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*) (ATCC 16,045)、

威克曼氏克鲁维酵母(*K. wicheramii*) (ATCC 24,178)、 *K. waltii*(ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilarum*) (ATCC 36,906; Van den Berg 等人,同上)、 *K. thermotolerans* 和马克斯克鲁维酵母(*K. marxianus*); *yarrowia* [EP 402,226]; 巴士德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sreekrishna等人, J. Basic Microbiol. 28: 265-278[1988]); 念珠菌属; *Trichoderma reesia*[EP 244,234]; 粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*)(Case 等人,美国科学院院报 76:5259-5263[1979]); 许旺氏酵母属(*Schwanniomyces*)如西方许旺氏酵母(*Schwanniomyces occidentalis*) (EP 394,538, 1990 年 10 月 31 日出版);和丝状真菌如链孢霉属(*Neurospora*)、青霉菌属(*penicillium*)、 *Tolypocladium*(WO 91/00357,1991 年 1 月 10 日出版)和曲霉属(*Aspergillus*)如构巢曲霉(*A.nidulans*)(Ballance 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 112:284-289[1983]; Tilburn 等人,基因 26:205-221[1983]; Yelton 等人,美国科学院院报 81:1470-1474[1984])和黑曲霉(*A.niger*)(Kelly 和 Hynes, 欧洲分子生物学协会杂志 4:475-479[1985])。

适用于表达糖基化异多聚体的宿主细胞衍生自多细胞生物体。这种宿主细胞能够进行复杂的加工并有糖基化活性。原则上，任何高级的真核生物细胞都可行，无论是来自脊椎动物还是来自无脊椎动物。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫的细胞。已经鉴别出许多杆状病毒株和变异体和相应的来自宿主的允许昆虫宿主细胞如草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (蠋)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、 白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)(果蝇)和家蚕(*Bombyx mori*)。可参见例如 Luckow 等人,Bio/Technology 6:47-55(1988); Miller 等人，遗传工程(Genetic Engineering), Setlow 等人编辑， Vol 8(Plenum Publishing, 1986), pp. 277-279;和 Maeda 等人，自然 315:592-594(1985)。用于转染的各种不同的病毒株是公众可以获得的，如苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变异体和家蚕 NPV 的 Bm-5 株，而且这类病毒可根据本发明在此处用作病毒，尤其是用于转染草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。

棉花、玉米、土豆、大豆、矮牵牛花、番茄和烟草的植物细胞培养物可以被用作宿主。典型地，通过将细菌根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的某些株与宿主细胞一起孵育而转染植物细胞，其中事先已对细菌进行操作使其含有异多聚体 DNA 。在将植物细胞培养物和根瘤农杆菌一起孵育时，将编码异多聚体的 DNA 转化入植物细胞宿主中，从而使其被转染并且在合适的条件下表达异多聚体 DNA 。此外，与植物细胞相容的调控序列和信号序列是可以获得的，如胭脂碱合成酶启动子和聚腺苷酸信号序列。 Depicker 等人,J. Mol. Appl. Gen. 1:561(1982)。此外，从 T-DNA 780 基因的上游区域中分离出的 DNA 片段能激活或增加在含重组 DNA 的植物组织中可被植物表达的基因的转录水平。 EP 321,196， 1989 年 6 月 21 日出版。

优选的宿主是脊椎动物细胞，而近年来通过培养繁殖脊椎动物细胞(组织培养)已经成为一种常规的程序(Tissue Culture，Academic Press, Kruse 和 Patterson, 编辑者[1973])。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子是被 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7，ATCC CRL 1651)；人胚肾细胞系(293 或亚克隆的悬浮培养生长的 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 和 Chasin, 美国科学院院报, 77:4216[1980])；小鼠 Sertoli 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 CCL2)；犬肾细胞(MDCK，ATCC CCL34)；水牛鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A，ATCC CRL 1442)；人肺细胞(W138，ATCC CCL75)；人肝细胞(Hep G2, HB 8065)；小鼠乳房肿瘤(MMT 060562，ATCC CCL51)；TRI 细胞(Mather 等人, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68[1982])；MRC 5 细胞；FS4 细胞；和人肝癌系(Hep G2)。

用本发明的上述表达或克隆载体转染宿主细胞，然后在常规的营养培养基上培养，其中培养基被加以改进以便诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因。取决于所用的宿主细胞，用适合该细胞的标准技术进行转染。常用氯化钙的钙处理法，如在 Sambrook 等人(同上)1.82 章节所描述的，一般可以用于原核或其他含有基本细胞壁屏障的细胞。用根瘤农杆菌进行感染，可用于转化某些植物细胞，如 Shaw 等人,基因 23:315(1983)和 WO 89/05859(1989 年 6 月 29 日出版)。此外，植物可用超声波处理进行转染，如 1991 年 1 月 10 日出版的 WO91/00358 中所述。

对于没有细胞壁的哺乳动物细胞，优选的是 Graham 和 van der Eb, Virology 52:456-457(1978)的磷酸钙沉淀法。哺乳动物细胞宿主系统转化的总体情况已经描述于 1983 年 8 月 16 日授权的 Axel 的美国专利 No. 4,399,216 中。转化入酵母通常是按 Van Solingen 等人,J. Bact. 130:946(1977)和 Hsiao 等人,美国科学院院报 76:3829(1979)的方法进行。然而，其他将 DNA 引入细胞的方法，如核微注射、电穿孔、用完整的细胞进行细菌原生质体融合、或聚阳离子如 1,5-二甲基-1，5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物(polybrene)、聚鸟氨酸等也可使用。对于用于转化哺乳动物细胞的各种技术，参见 Keown 等人,酶学方法(Methods in Enzymology) (1989), Keown 等人,酶学方法 185:527-537(1990)和 Mansour 等人,自然 336:348-352(1988)。

用于产生本发明的异多聚体多肽的原核细胞，在合适的培养基如在 Sambrook 等人(同上)中所述的培养基中进行培养。

用于产生本发明的异多聚体的哺乳动物细胞可在各种不同培养基中培养。市售的培养基如 Ham's F10(Sigma)、极限必需培养基(MEM，Sigma)、RPMI-1640(Sigma)和 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基(DMEM，Sigma)都适合培养这些宿

主细胞。此外，任何在下列文献中描述的培养基也可用作宿主细胞的培养基：Ham 和 Wallace,Meth. Enz. 58:44(1979), Barnes 和 Sato 分析化学(Anal. Biochem) 102: 255(1980),美国专利 No. 4,767,704； 4,657,866； 4,927,762；或 4,560,655；WO 90/03430； WO 87/00195；美国专利 RE 30,985；或美国专利 No. 5,122,469，这些文献在此引用作为参考。所有这些培养基都可按需要添加激素和/或其他的生长因子(如胰岛素、运铁蛋白、或表皮生长因子)、盐类(如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(如 HEPES)、核苷(如腺苷和胸苷)、抗生素(如庆大霉素(Gentamycin™)药物)、痕量元素(定义为以微摩尔级的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等价的能量源。任何其他必要的补充物也可以合适的浓度加入，这是本领域技术人员知晓的。培养条件如温度、 pH 等是以往用于选择用于表达的宿主细胞的条件，这是一般技术人员所熟知的。

一般而言，用于扩大哺乳动物细胞培养产量的原则、方案和实际技术可在 Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed., IRL Press, 1991 中找到。

在该公开内容中所指的宿主细胞包括培养中的细胞以及在宿主动物中的细胞。

4.回收异多聚体

较佳地，一般以分泌的多肽形式从培养基中回收异多聚体，尽管也可从宿主细胞裂解液中回收(当不用分泌信号而直接产生时)。如果异多聚体是结合于膜的，可以用合适的去垢剂溶液(如 Triton X-100)将其从膜上释放出来。

当异多聚体是在非人来源的重组细胞中产生时，它可完全不含人的蛋白质或多肽。然而，有必要从重组细胞蛋白质或多肽中纯化异多聚体以获得对异多聚体而言基本同质的制剂。作为第一步骤，通常对培养基或裂解液进行离心以去除颗粒状的细胞碎片。

具有抗体恒定区的异二聚体可方便地用羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱进行纯化，其中亲和色谱是优选的纯化技术。当异多聚体含有 C_H3 区时，Bakerbond ABX™ 树脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)可用于纯化。其他的蛋白质纯化技术也是可行的，如在离子交换柱上分级、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅胶色谱、肝素 Sepharose 色谱、阴离子或阳离子交换树脂色谱(如聚天冬氨酸柱)、层析聚焦、 SDS-PAGE、和硫酸铵沉淀等，这取决于需回收的多肽。蛋白质 A 作为亲和配体的合适性取决于在嵌合体中所用的免疫球蛋白 Fc 区的种类和同种型。蛋白质 A 可用于纯化基于人γ1、γ2 或γ4 重链的免疫粘附素(Lindmark 等人, J. Immunol. Meth. 62:1-13[1983])。蛋白质 G 被推荐用于所有小鼠的同种型和人的γ3(Guss 等人,欧洲分子生物学协会杂志 5: 15671575[1986])。至于亲和配体所附着的基质，最常见的是琼脂糖，但是其他的基质也是可行的。与琼脂糖相比，机械上稳定的

基质如受控的多孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯允许更快的流速和更短的处理时间。使免疫粘附素结合于蛋白质 A 或 G 亲和柱的条件完全由 Fc 区的性质所决定；即，其种类和同种型。一般而言，当选择了合适的配体时，可与未处理的培养液中直接发生有效的结合。免疫粘附素的一种区别特征是，对于人γ1 分子，对蛋白质 A 的结合能力相对于相同 Fc 型的抗体而言有些下降。结合的免疫粘附素可有效地或者在酸性 pH(大于或等于 3.0)被洗脱，或者在适度地含有离液盐的中性 pH 缓冲液中被洗脱。该亲和色谱步骤能使异二聚体制剂纯度大于 95 %。

5.异多聚体的应用

异多聚体的许多治疗应用是在构思之中的。例如，异多聚体可用于重定向细胞毒(如为了杀死肿瘤细胞)、用作疫苗佐剂、用于将溶血栓剂输送给血块、将免疫毒素输送给肿瘤细胞、用于在靶定位置(如肿瘤处)转化可被酶激活的药物前体、用于治疗感染疾病或使免疫复合物定向于细胞表面受体。

将具有所需纯度的异多聚体与任选的生理上可接受的载体、赋形剂、或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 版， Osol, A., Ed., [1980])，以冻干的饼状物或水溶液形式进行混合，可以制得异多聚体的治疗制剂以便储藏。可接受的载体、赋形剂或稳定剂对接受者而言在所用的剂量和浓度下应是无毒的，并且可含有缓冲液如磷酸盐、柠檬酸盐或其他有机酸缓冲液；抗氧化剂如维生素 C；低分子量(小于约 10 个残基)多肽；蛋白质如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸如甘氨酸、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如葡萄糖、甘露糖、或糊精；螯合剂如 EDTA；糖醇如甘露糖醇或山梨糖醇；形成盐的反荷离子如钠；和/或非离子型表面活性剂如 Tween 、 Pluronics 或聚乙二醇(PEG)。

异多聚体还可被包于制备的微囊中，例如通过团聚技术或通过界面聚合作用(如分别采用羟甲基纤维素，或明胶-微囊和聚[甲基丙烯酸甲酯]微囊)，包于胶体药物输送系统中(如脂质体、白蛋白微球、微乳状液、纳米级颗粒和纳米级微囊)，或包于粗乳状液中。这些技术公开于 Remington's Pharmaceutical Sciences，同上。

用于体内给药的异多聚体必须是无菌的。这可通过灭菌过滤膜的过滤而实现，这可在冻干和重新组成(reconstitution)之前或之后进行。以便异多聚体可以冻干形式储藏或储藏在溶液中。

治疗性的异多聚体组合物一般被置于具有无菌入口的容器中，如具有可被皮下注射器针头穿刺的塞头的小瓶或静脉溶液包(intravenous solution bag)。

异多聚体的给药途径可根据已知的方法，如静脉内、腹膜内、大脑内、肌内、眼内、动脉内、或病灶内等途径的注射或输注，或者通过下述的缓释系统。通过输注或通过丸药注入可以连续地施用异多聚体。

缓释制剂的合适例子包括含有蛋白质的固态疏水聚合物的半渗透性基质，该基质为一定形状的制品，如膜或微囊。缓释基质的例子包括：聚酯、水凝胶[如聚(甲基丙烯酸2-羟基乙基酯)，如Langer等人，J.Biomed. Mater. Res. 15:167-277(1981)和 Langer, Chem. Tech. 12:98-105(1982)所述，或聚乙烯醇]、聚交酯(美国专利 No. 3,773,919 、 EP 58,481)、 L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ 乙基酯的共聚物(Sidman 等人，Biopolymer 22: 547-556[1983])、不可降解的乙烯-乙烯基乙酸酯(Langer 等人，同上)、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如 Lupron Depot™(可注射的微球，它由乳酸-乙醇酸共聚物和 leuprolide 乙酸酯构成)和聚 D-(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988)。

尽管聚合物如乙烯-乙烯基乙酸酯和乳酸-乙醇酸可在长达100天的时间内释放分子，但是某些水凝胶可在更短的时间内释放蛋白质。当被包裹的蛋白质在体内长时间停留时，它们可能会因暴露于 37 ℃的潮湿环境而变性或聚集，造成生物活性的下降并可能导致免疫原性的改变。根据所涉及的机制，可以设计出合理的方案使蛋白质稳定。例如，如果发现聚集机制是通过巯基-二硫键交换作用而在分子间形成 S-S 键，那么稳定化就可以通过修饰巯基残基、在酸性溶液中冻干、控制含水量、用合适的添加剂以及开发特异的聚合物基质组合物等而实现。

缓释的异多聚体组合物还包括被脂质体所包裹的异多聚体。含有异多聚体的脂质体可用已知的方法制备： DE 3,218,121; Epstein 等人，美国科学院院报 82：3688-3692(1985)； Hwang 等人，美国科学院院报 77:4030-4034(1980)； eP 52,322; EP 36,676; EP 88,046;EP143,949; EP 142,641； 日本专利申请 83-118008;美国专利 No. 4,485,045 和 4,544,545;和 EP 102,324 。一般，脂质体是小型的(约 200-800 埃)单层类型，其中脂类含量大于约 30mol%胆固醇，为了最佳的异多聚体治疗效果，可调节选定的比例。

异多聚体在治疗中所用的有效量取决于例如，治疗目的、给药途径和病人的状况。因此，治疗专家有必要测定剂量的效价并按需要对给药途径进行修改，以便获得最佳的治疗效果。一种典型的日剂量为约 1 微克/千克至 10 毫克/千克或更高，这取决于上述的因素。典型地，临床医师会施用异多聚体直至到达可实现所需效果的剂量。治疗的进程可方便地用常规分析方法加以监视。

此处所述的异多聚体还可用于酶免疫测定中。为了做到这一点，异多聚体的一个臂可被设计成结合酶上的特异性表位，从而使结合不会抑制酶，而异多聚体的另一臂可被设计成结合固定基质，从而保证在所需的表位有高密度的酶。这种诊断性的异多聚体包括：例如具有对 IgG 和铁蛋白有特异性的异多聚体，以及具有对辣根过氧化物酶(HRP)和激素的结合特异性的异多聚体。

异多聚体还可被设计成用于双位点免疫测定中。例如，产生 2 个双特异性的异多聚体，它们结合于待分析蛋白质的两个不同的表位-一个异多聚体将复合物结合于不溶性基质，而另一个异多聚体则结合指示酶。

异多聚体还可用于各种疾病如癌症的体外或体内免疫诊断。为了便于这种诊断用途，将异多聚体的一个臂设计成结合肿瘤相关抗原，而另一臂则结合可检测的标记(如结合放射性核素的螯合剂)。例如，具有对肿瘤相关抗原 CEA 和二价半抗原有特异性的异多聚体可用于结肠癌和甲状腺癌的成像。异多聚体其他的非治疗性诊断用途对于熟练技术人员而言是显而易见的。

对于诊断用途，一般异多聚体的至少一个臂被可检测的部分直接或间接标记。可检测的部分可以是任何能够直接或间接地产生可检测信号的物质。例如可检测的部分可以是放射性同位素如 ^{3}H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I ；荧光或化学发光化合物，如荧光素、异硫氰酸酯、罗丹明、或萤光素；或酶如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶(HRP)。

任何本领域中已知的单独地将异多聚体偶联于可检测部分的方法都可使用，包括 Hunter 等人,自然 144： 945(1962)； David 等人,生物化学 13:1014(1974)；Pain 等人, J. Immunol. Meth. 40:219(1981);和 Nygren, 组织化学和细胞化学杂志 30： 407(1982)中所述的方法。

本发明的异多聚体还可用于任何已知的分析方法，如竞争性结合分析、直接和间接的夹心分析、和免疫沉淀分析。 Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques , pp. 147-158(CRC Press, Inc., 1987)。

竞争性结合分析依赖标记的标准物与测试样品分析物竞争结合有限量异多聚体的能力。在测试样品中分析物的数量与结合于异多聚体的标准物的数量呈反比。为了便于确定结合的标准物的数量，一般在竞争之前或之后将异多聚体固定化，这样结合于异多聚体的标准物和分析物便可方便地与仍处于未结合状态的标准物和分析物分开。

异多聚体特别适用于夹心分析，这些夹心分析涉及使用两种分子，每种能够结合于待检测样品中不同的免疫原部分或表位。在荧光夹心分析中，测试样品分析物通过异多聚体的第一个臂而结合于固相载体，随后异多聚体的第二个臂结合于分析物，从而形成不溶性的三部分构成的复合物。参见例如美国专利 No. 4,376,110 。异多聚体的第二个臂本身可以被可检测的部分所标记(直接夹心分析)，或者用被可检测部分标记的抗-免疫球蛋白抗体进行测量(间接夹心分析)。例如，一种类型的夹心分析是 ELISA 分析，其中可检测部分是酶。

下面是实施本发明的具体例子。这些例子仅用于阐述目的而不以任何方式限制本发明范围。

此处引用的所有出版物、专利和专利申请(无论是上面的还是下面的)，都全部以引用方式参考。

实施例

对以前 Chamow 等人，免疫学杂志， 153： 4268(1994)所述的人源化抗-CD3/CD4-IgG 嵌合体之间的 C_H3 界面进行改造，以最大限度地提高可回收的异多聚体的百分比。比较突起-进入-空穴和野生型 C_H3 变异体在指导形成人源化的抗体-免疫粘附素嵌合体(Ab/Ia)抗-CD3/CD4-IgG 方面的能力。

因此，用错配的寡核苷酸通过定点诱变法(Kunkel 等人，Methods Enzymol. 154:367[1987]和 P. Carter, Mutagenesis:a Practical Approach, M.J. McPherson, Ed., IRL Press, Oxford, UK, pp. 1-25[1991])，在人源化抗-CD3 抗体重链和 CD4-IgG 的 C_H3 区中构建突变，并用双脱氧核苷酸测序法(Sanger 等人，美国科学院院报 74:5463[1977])加以验证。参见下表 4 和图 7 。

表 4

最优选的突变体	
抗-CD3 的 C_H3	CD4-IgG 的 C_H3
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y： F405A	T394W： Y407T
T366W： F405W	T394S： Y407A
F405W： Y407A	T366W： T394S

优选的突变体	
F405W	T394S

残基 T366 在配偶体 C_H3 区上残基 Y407 的氢键距离之内。事实上，对残基 T366 的主要的分子间接触是残基 Y407，反之亦然。通过将这些残基用交互突变加以替换，即一个 C_H3 区中的 T336Y 和配偶体结构域中 Y407T，产生一个突起－进入－空穴配对，这样维持界面上侧链的体积(图 9)。突变的表示方法是，野生型的残基加 Kabat 编号系统中的位置(Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, ed.5[1991])，随后是单字符的置换残基。多重突变的表示方法是，列出各个突变，中间以冒号隔开。

编码抗-CD3 轻链(L)和重链(H)变异体的噬菌粒(Shalaby 等人，J. Exp. Med. 175(1):217(1992)和 Rodrigues 等人, Int. J. Cancers (Suppl.) 7:45(1992))，被与编码 CD4-IgG 的噬菌粒(Byrn 等人，自然 344:667-670 [1990])一起，按以前所述的方法(Chamow 等人，免疫学杂志， 153： 4268[1994])共转染人人胚肾细胞 293S 。该程序示于图 8 。转染的噬菌粒 DNA 总量是固定的，而不同 DNA 的比例是不同的，以便

使 Ab/Ia 嵌合体的产率最高。输入 DNA(总计 15 微克)中 Ia： H 链： L 链之比(质量)的变化如下： 8:1:3； 7:1:3； 6:1:3； 5:1:3； 4:1:3； 3:1:3； 1:0:0； 0:1:3 。

在 SDS-PAGE 分析之前，产物用葡萄球菌 A 蛋白(ProSep A, BioPreocessing Ltd, UK)进行亲和纯化， SDS-PAGE 分析后，用扫描 LASER 光密度计检测(图 10A-10E)。使用相对 H 链而言过量的 L 链 DNA，以避免 L 链起限制作用。产物的身份通过 PVDF 膜上的电印迹法(Matsudaira, 生物化学杂志 262:10035 [1987])随后用氨基端测序加以确认。

如预期的那样，用 L 链的噬菌粒和 H 链及掺入野生型 C_H3 的 Ia 的噬菌粒进行的共转染导致形成 Ab/Ia 嵌合体、 IgG 和 Ia 同二聚体产物的混合物(Chamow 等人，免疫学杂志， 153： 4268(1994))。参见图 10A 。输入 DNA 中编码抗体 H 链加 L 链或 Ia 的比例越大，则回收的相应同二聚体的比例越大。 Ia:H:L 的输入 DNA 比为 6：1： 3 时，产生 54.5%Ab/Ia 嵌合体以及类似比例的 Ia 同二聚体(22.5%)和 IgG(23.0%)。这些比例与用分析方法得出的预期值非常符合，即等摩尔表达每条链，随后随机地与 H 链配对，其中不引入偏差： 50%Ab/Ia 嵌合体、 25%Ia 同二聚体和 25%IgG 。

与含有野生型 C_H3 的链相反，在用分别含有 Y407T 空穴和 T366Y 突起突变的抗 CD3 重链和 CD4-IgG Ia 进行的共转染中， Ab/Ia 嵌合体的回收率高达 92%(图 10B)。当这些交互突变是 H 链上为突起而 Ia 上为空穴时，获得了类似的 Ab/Ia 嵌合体产率(图 10C)。在这两种情况下，观察到含有突起的链，但是没有具有空穴的链。在不受任何理论限制的情况下，据信 T366Y 突起比 Y407T 空穴对同二聚体形成更具破坏性。增加突起和空穴的大小(Ab T366W, Ia Y407A)并不明显改变 Ab/Ia 杂合体的比例。第二种突起和空穴配对(Ab F405A, Ia T394W)产生了高达 71%Ab/Ia 嵌合体，其中使用小比例的 Ia 输入 DNA 以便抵消未预期到的 Ia T394W 突起变异体易形成同二聚体的倾向(图 10D)。将 2 个独立的突起-进入-空穴突变配对组合在一起(Ab T366Y: F405A, Ia T394W:Y407T), 与 Ab T366Y, Ia Y407T 配对相比，并不能增加 Ab/Ia 杂合体的产率(比较图 10C 和 10E)。

用 T366Y 和 Y407T 变异体对所获得的 Ab/Ia 嵌合体比例，事实上在所测试的范围内与所输入 DNA 的比例无关。此外，通过在单 S HR 5/5 柱(Pharmacia, Piscataway, NJ)上的离子交换色谱(0-300mM 氯化钠，在 20mM Tris-HCl 中， pH 8.0)，可以方便地将污染的种类去除。这表明对于用稳定的细胞系制备大量的 Ab/Ia 嵌合体是有利的，在这种场合下 Ab 和 Ia 的相对表达水平比瞬时表达系统中的更难进行操作。

鉴别出的突起-进入-空穴预期可增加含 Fc 的 BsAb 的潜在应用，因其将 10 种主要的可能种类(Suresh 等人, Methods Enzymol. 121:210[1990])中获得的产物混合物的复杂性降至 4 种或更少。可以预期， T366Y 和 Y407T 突变体对可用于产生其他的人 IgG 同种型的异多聚体，因为 T366 和 Y407 是完全保守的，而且在 IgG_1 的 C_H3 区界面中的其他残基也是高度保守的(参见图 6)。

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人: Genentech, Inc.

(ii) 发明名称: 制备异多聚体多肽的方法

(iii) 序列数目: 16

(iv) 通信地址:

(A) 收信人: Genentech, Inc.

(B) 街道: 460 Point San Bruno Blvd

(C) 城市: South San Francisco

(D) 州: California

(E) 国家: USA

(F) 邮编: 94080

(v) 计算机可读形式:

(A) 记录介质类型: 3.5 inch, 720kb 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容型

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: WinPatin (Genentech)

(vi) 本申请资料:

(A) 申请号:

(B) 申请日: 05-2 月-1996

(C) 分类:

(vii) 在先申请资料:

(A) 申请号: 08/399106

(B) 申请日: 01-3 月-1995

(viii) 律师/代理人信息:

(A) 姓名: Lee, Wendy M.

(B) 登记号: 00,000

(C) 参考/案卷号: P0927PCT

(ix) 通讯信息:

(A) 电话: 415/225-1994

(B) 传真: 415/952-9881

(C) 电传: 910/371-7168

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 108 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

```
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
341             345                 350                 355
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
                360                 365                 370
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Asp
                375                 380                 385
Gly Glx Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
                390                 395                 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
                420                 425                 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
                435                 440                 445
Pro Gly Lys
        448
```

(2) SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 108 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

```
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
341             345                 350                 355
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
                360                 365                 370
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Asp
                375                 380                 385
Gly Glx Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
                390                 395                 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
                420                 425                 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
                435                 440                 445
Pro Gly Lys
        448
```

(2) SEQ ID NO:3 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 108 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:3:

```
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
341             345                 350                 355
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
                360                 365                 370
```

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Asp
375 380 385
Gly Glx Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly Lys
448

(2) SEQ ID NO:4 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 113 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:

Gly Asn Thr Phe Arg Pro Gln Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser
341 345 350 355
Glu Glu Leu Ala Leu Asx Glx Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala
360 365 370
Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly
375 380 385
Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg
390 395 400
Gln Glx Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile
405 410 415
Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser
420 425 430
Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys
435 440 445

Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys
450 453

(2) SEQ ID NO:5 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 107 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5:

Gln Ala Pro Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp
341 345 350 355
Pro Pro Glu Ala Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe
360 365 370
Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu
375 380 385
Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro
390 395 400
Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala
405 410 415
Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr Cys Val Val Ser His
420 425 430
Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg Ser Leu Glu Val
435 440 445
Ser Tyr
447

(2) SEQ ID NO:6 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 110 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:6:

```
Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu
341             345                 350                 355
Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln
                360                 365                 370
Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu
                375                 380                 385
Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys
                390                 395                 400
Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr
                405                 410                 415
Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val
                420                 425                 430
His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser
                435                 440                 445
Val Asn Pro Gly Lys
                450
```

(2) SEQ ID NO:7 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 106 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:

```
Asp Glx Asx Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe
342         345                 350                 355
Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val
            360                 365                 370
Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asx Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg
            375                 380                 385
Glx Asp Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asx Ile Ser Glx Ser
            390                 395                 400
```

His Pro Asx Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys
405 410 415
Glu Asx Asx Trp Asx Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr
420 425 430
His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro
435 440 445
Lys
447

(2) SEQ ID NO:8 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 108 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8:

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
361 365 370 375
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
380 385 390
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asx Asp
395 400 405
Gly Glx Pro Glx Asx Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
410 415 420
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
425 430 435
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
440 445 450
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
455 460 465
Pro Gly Lys
468

(2) SEQ ID NO:9:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 107 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:9:

```
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
361                 365                 370                 375
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
                    380                 385                 390
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
                    395                 400                 405
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
                    410                 415                 420
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                    425                 430                 435
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
                    440                 445                 450
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                    455                 460                 465
Gly Lys
    467
```

(2) SEQ ID NO:10 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 107 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10:

```
Gly Gln Pro Arg Glx Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
361                 365                 370                 375
```

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
380 385 390
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly
395 400 405
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
410 415 420
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
425 430 435
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
440 445 450
Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
455 460 465
Gly Lys
467

(2) SEQ ID NO:11 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 107 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:11:

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
361 365 370 375
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
380 385 390
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glx Ser Asn Gly
395 400 405
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
410 415 420
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
425 430 435
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
440 445 450

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
455 460 465
Gly Lys
467

(2) SEQ ID NO:12 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 107 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:12:

Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
361 365 370 375
Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
380 385 390
Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asx Gly
395 400 405
Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asx Thr
410 415 420
Asx Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser
425 430 435
Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
440 445 450
Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
455 460 465
Gly Lys
467

(2) SEQ ID NO:13 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 107 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:13:

```
Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala
361             365                 370                 375
Glu Glu Met Thr Lys Lys Glx Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
                380                 385                 390
Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly
                395                 400                 405
Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr Val Leu Asp Ser
                410                 415                 420
Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glx Lys Ser
                425                 430                 435
Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val His Glu
                440                 445                 450
Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Phe Ser Arg Ser Leu
                455                 460                 465
Gly Lys
    467
```

(2) SEQ ID NO:14 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 107 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:14:

```
Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro Ala
361             365                 370                 375
Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val
                380                 385                 390
Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly
                395                 400                 405
```

```
His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asx Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser
                410                 415                 420
Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser
                425                 430                 435
Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu
                440                 445                 450
Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro
                455                 460                 465
Gly Lys
    467
```

(2) SEQ ID NO:15 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 107 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:15:

```
Gly Arg Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Arg
361             365                 370                 375
Glu Gln Met Ser Lys Lys Lys Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Thr
                380                 385                 390
Asn Phe Phe Ser Glu Ala Ile Ser Val Glu Trp Glu Arg Asn Gly
                395                 400                 405
Glu Leu Glu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Ile Leu Asp Ser
                410                 415                 420
Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Thr Asp
                425                 430                 435
Ser Trp Leu Gln Gly Glu Ile Phe Thr Cys Ser Val Val His Glu
                440                 445                 450
Ala Leu His Asn His His Thr Gln Lys Asn Leu Ser Arg Ser Pro
                455                 460                 465
Gly Lys
    467
```

(2) SEQ ID NO:16 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 29 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:16:

```
Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro
451             455                 460                 465
Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
                470                 475             479
```

说 明 书 附 图

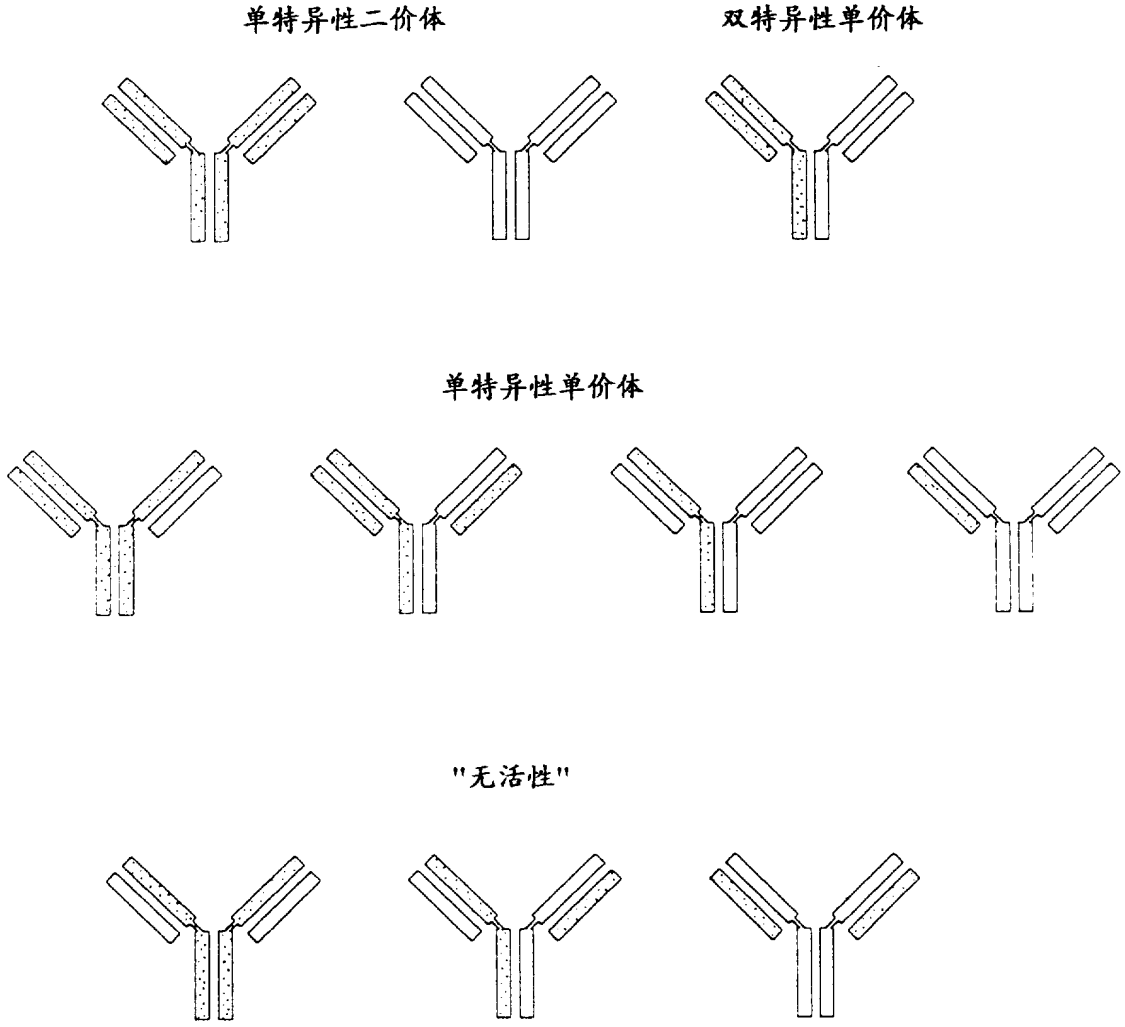


图 1

$BsF(ab')_2$

化学偶联的啮齿动物的片段

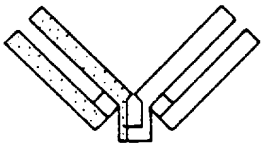


图 2A

$BsF(ab')_2$

化学偶联的大肠杆菌的片段

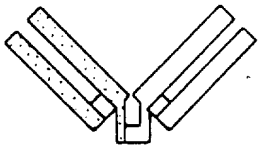


图 2B

$BsF(ab')_2$

亮氨酸拉链所装配的

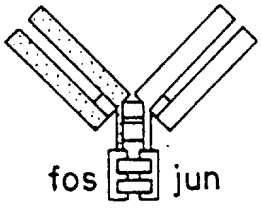
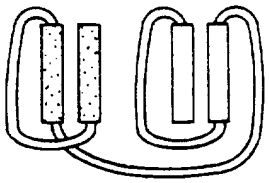
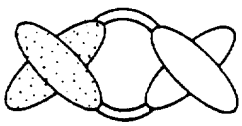


图 2C



sFv 二聚体

图 2E



二体

图 2D

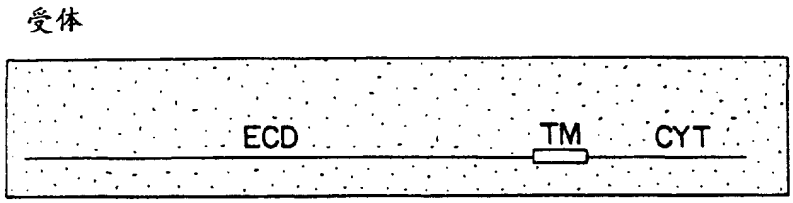

受体
ECD
TM
CYT

图 3A

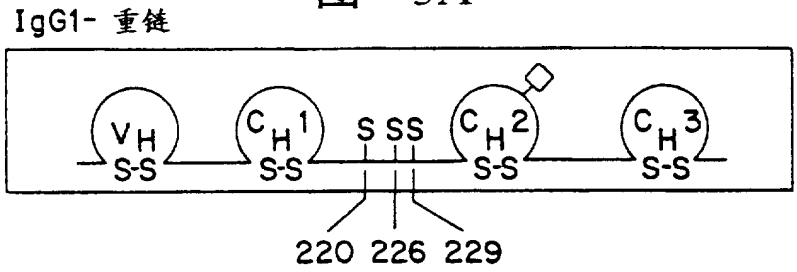

IgG1- 重链
VH
S-S
CH1
S-S
S SS
CH2
S-S
CH3
S-S
220 226 229

图 3B

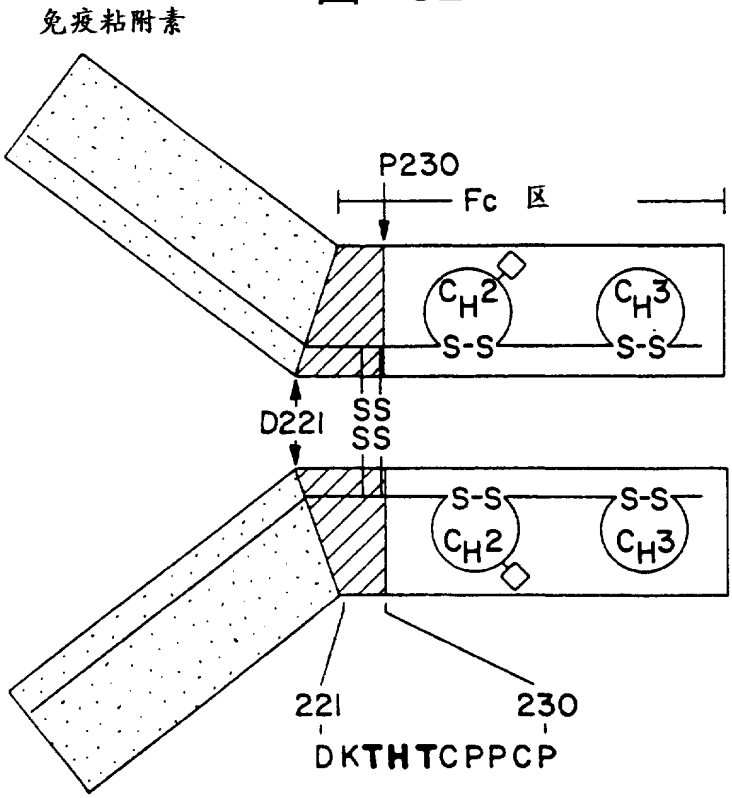

免疫粘附素
P230
Fc 区
CH2
S-S
CH3
S-S
D221
SS
SS
S-S
CH2
S-S
CH3
221
230
DKTHTCPPCP

图 3C

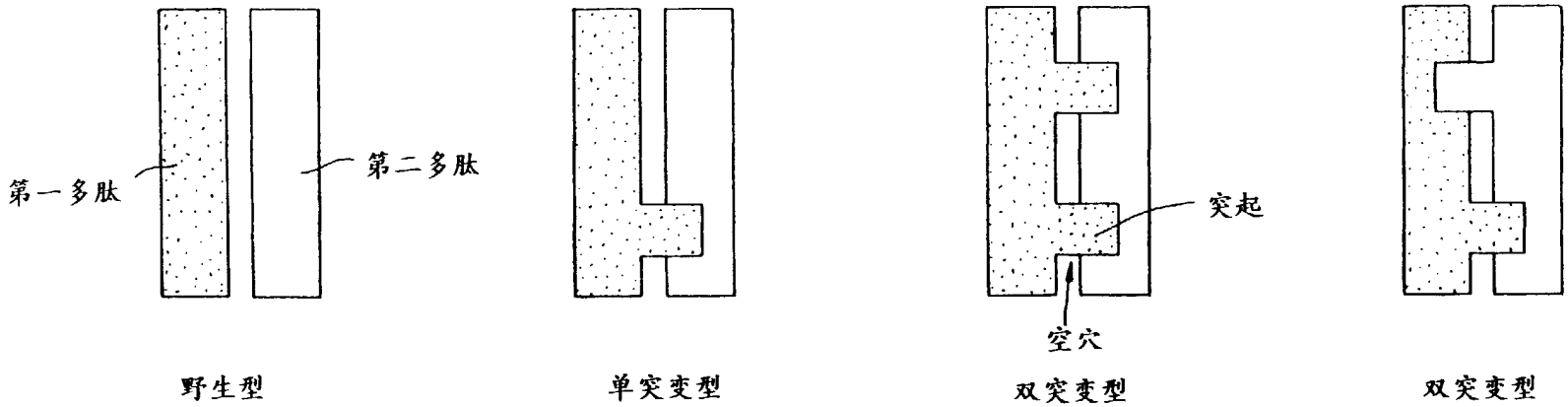


图 4

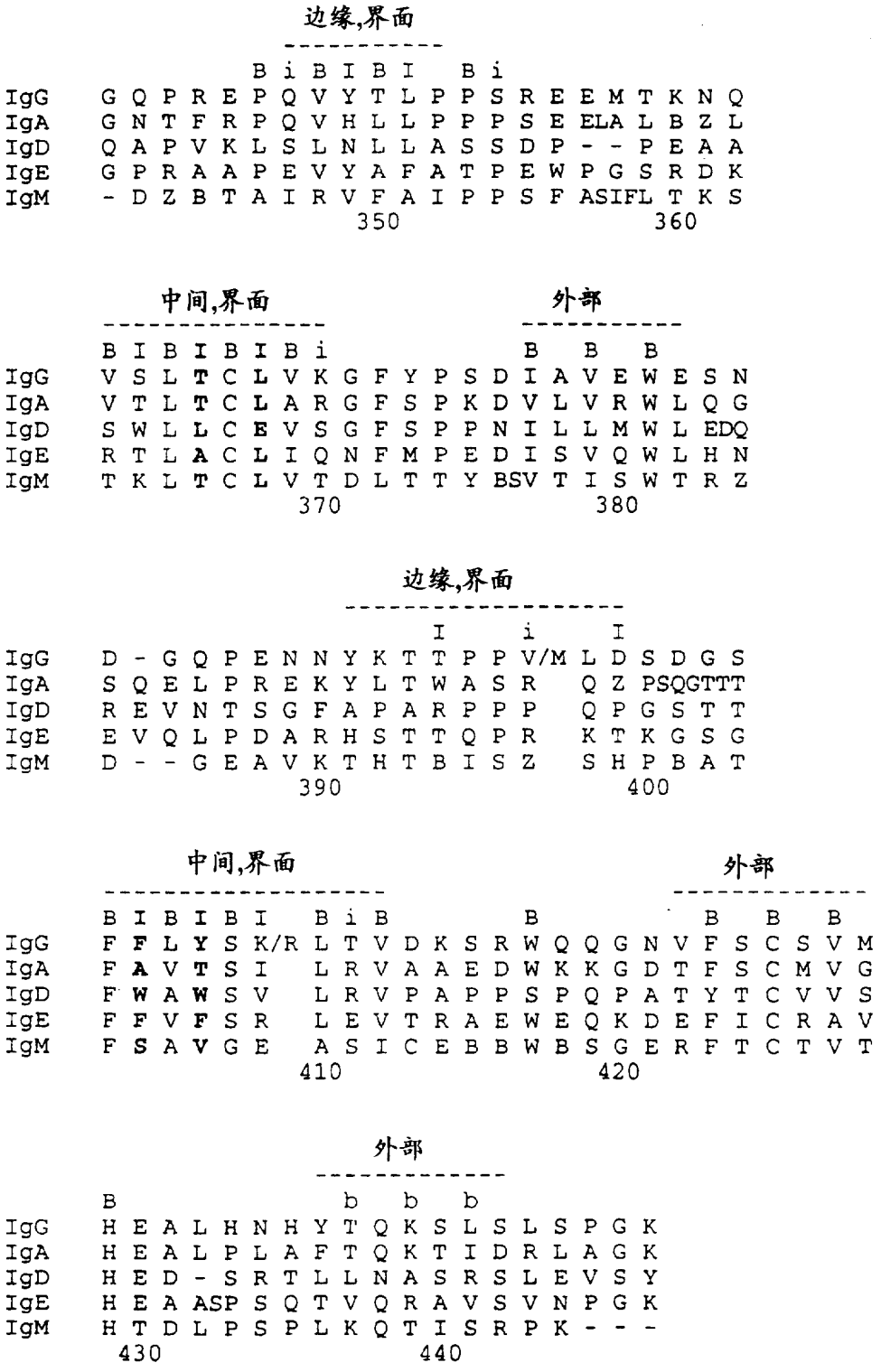

边缘,界面
B i B I B I B i
IgG G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q
IgA G N T F R P Q V H L L P P P S E ELA L B Z L
IgD Q A P V K L S L N L L A S S D P - - P E A A
IgE G P R A A P E V Y A F A T P E W P G S R D K
IgM - D Z B T A I R V F A I P P S F ASIFL T K S
350
360
中间,界面
外部
B I B I B I B i B B B
IgG V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N
IgA V T L T C L A R G F S P K D V L V R W L Q G
IgD S W L L C E V S G F S P P N I L L M W L EDQ
IgE R T L A C L I Q N F M P E D I S V Q W L H N
IgM T K L T C L V T D L T T Y BSV T I S W T R Z
370
380
边缘,界面
I i I
IgG D - G Q P E N N Y K T T P P V/M L D S D G S
IgA S Q E L P R E K Y L T W A S R Q Z PSQGTTT
IgD R E V N T S G F A P A R P P P Q P G S T T
IgE E V Q L P D A R H S T T Q P R K T K G S G
IgM D - - G E A V K T H T B I S Z S H P B A T
390
400
中间,界面
外部
B I B I B I B i B B B B B
IgG F F L Y S K/R L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M
IgA F A V T S I L R V A A E D W K K G D T F S C M V G
IgD F W A W S V L R V P A P P S P Q P A T Y T C V V S
IgE F F V F S R L E V T R A E W E Q K D E F I C R A V
IgM F S A V G E A S I C E B B W B S G E R F T C T V T
410
420
外部
B b b b
IgG H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
IgA H E A L P L A F T Q K T I D R L A G K
IgD H E D - S R T L L N A S R S L E V S Y
IgE H E A ASP S Q T V Q R A V S V N P G K
IgM H T D L P S P L K Q T I S R P K - - -
430
440

图 5

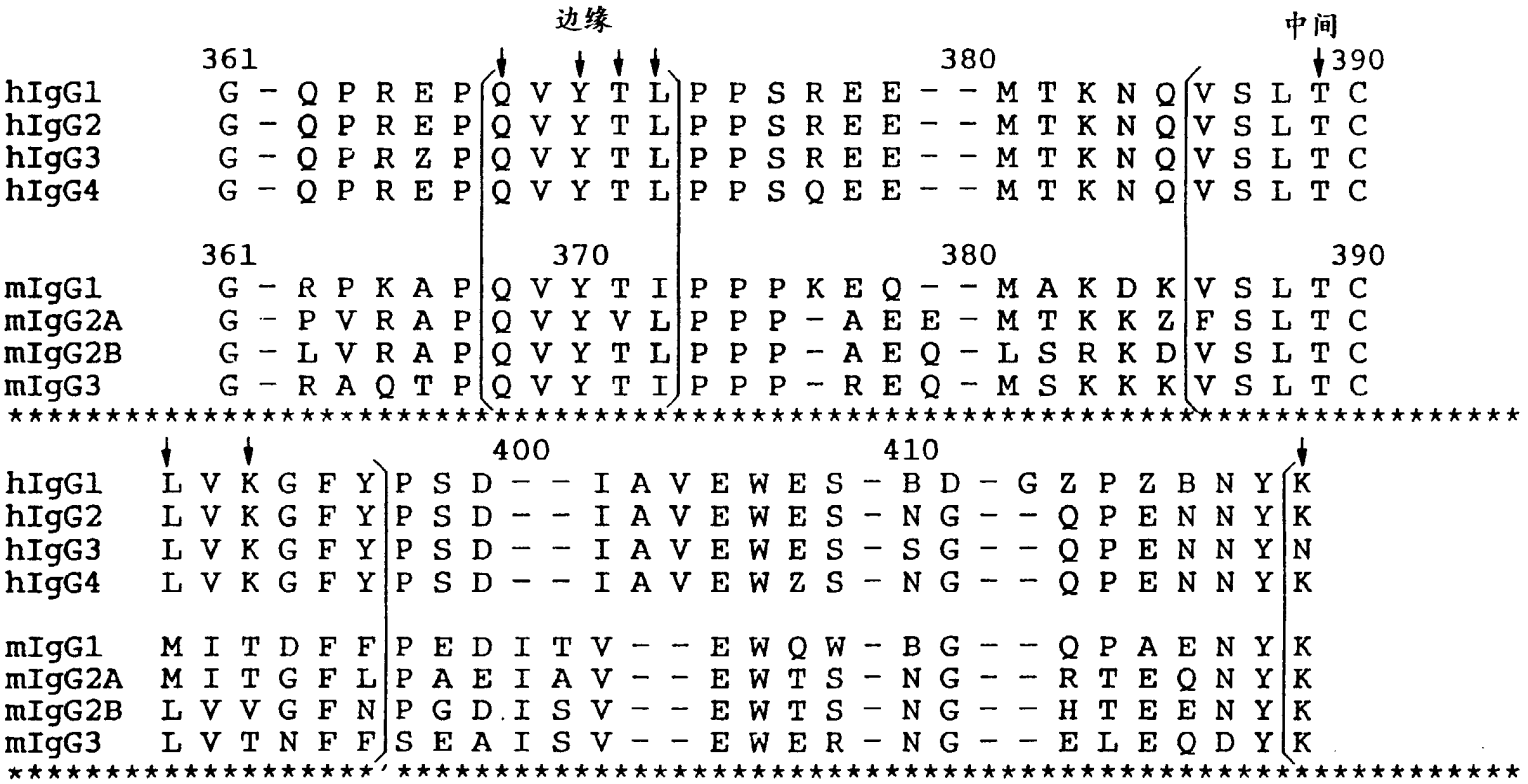

边缘
中间
361
380
390
hIgG1 G - Q P R E P Q V Y T L P P S R E E - - M T K N Q V S L T C
hIgG2 G - Q P R E P Q V Y T L P P S R E E - - M T K N Q V S L T C
hIgG3 G - Q P R Z P Q V Y T L P P S R E E - - M T K N Q V S L T C
hIgG4 G - Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E - - M T K N Q V S L T C
361
370
380
390
mIgG1 G - R P K A P Q V Y T I P P P K E Q - - M A K D K V S L T C
mIgG2A G - P V R A P Q V Y V L P P P - A E E - M T K K Z F S L T C
mIgG2B G - L V R A P Q V Y T L P P P - A E Q - L S R K D V S L T C
mIgG3 G - R A Q T P Q V Y T I P P P - R E Q - M S K K K V S L T C
400
410
hIgG1 L V K G F Y P S D - - I A V E W E S - B D - G Z P Z B N Y K
hIgG2 L V K G F Y P S D - - I A V E W E S - N G - - Q P E N N Y K
hIgG3 L V K G F Y P S D - - I A V E W E S - S G - - Q P E N N Y N
hIgG4 L V K G F Y P S D - - I A V E W Z S - N G - - Q P E N N Y K
mIgG1 M I T D F F P E D I T V - - E W Q W - B G - - Q P A E N Y K
mIgG2A M I T G F L P A E I A V - - E W T S - N G - - R T E Q N Y K
mIgG2B L V V G F N P G D I S V - - E W T S - N G - - H T E E N Y K
mIgG3 L V T N F F S E A I S V - - E W E R - N G - - E L E Q D Y K

图 6A

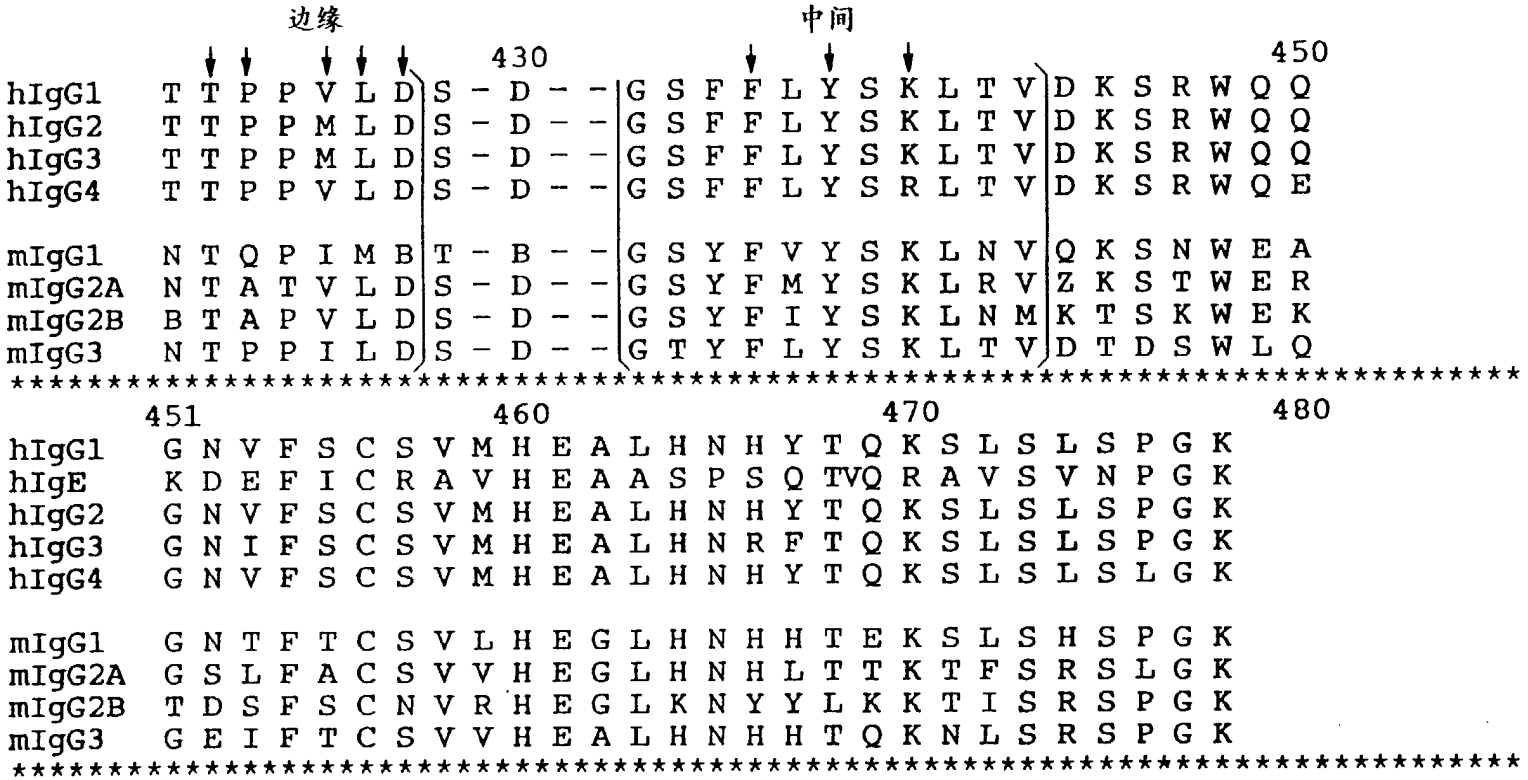

边缘
中间
430
450
hIgG1 T T P P V L D S - D - - G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q
hIgG2 T T P P M L D S - D - - G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q
hIgG3 T T P P M L D S - D - - G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q
hIgG4 T T P P V L D S - D - - G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E
mIgG1 N T Q P I M B T - B - - G S Y F V Y S K L N V Q K S N W E A
mIgG2A N T A T V L D S - D - - G S Y F M Y S K L R V Z K S T W E R
mIgG2B B T A P V L D S - D - - G S Y F I Y S K L N M K T S K W E K
mIgG3 N T P P I L D S - D - - G T Y F L Y S K L T V D T D S W L Q
451
460
470
480
hIgG1 G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
hIgE K D E F I C R A V H E A A S P S Q TVQ R A V S V N P G K
hIgG2 G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
hIgG3 G N I F S C S V M H E A L H N R F T Q K S L S L S P G K
hIgG4 G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K
mIgG1 G N T F T C S V L H E G L H N H H T E K S L S H S P G K
mIgG2A G S L F A C S V V H E G L H N H L T T K T F S R S L G K
mIgG2B T D S F S C N V R H E G L K N Y Y L K K T I S R S P G K
mIgG3 G E I F T C S V V H E A L H N H H T Q K N L S R S P G K

图 6B

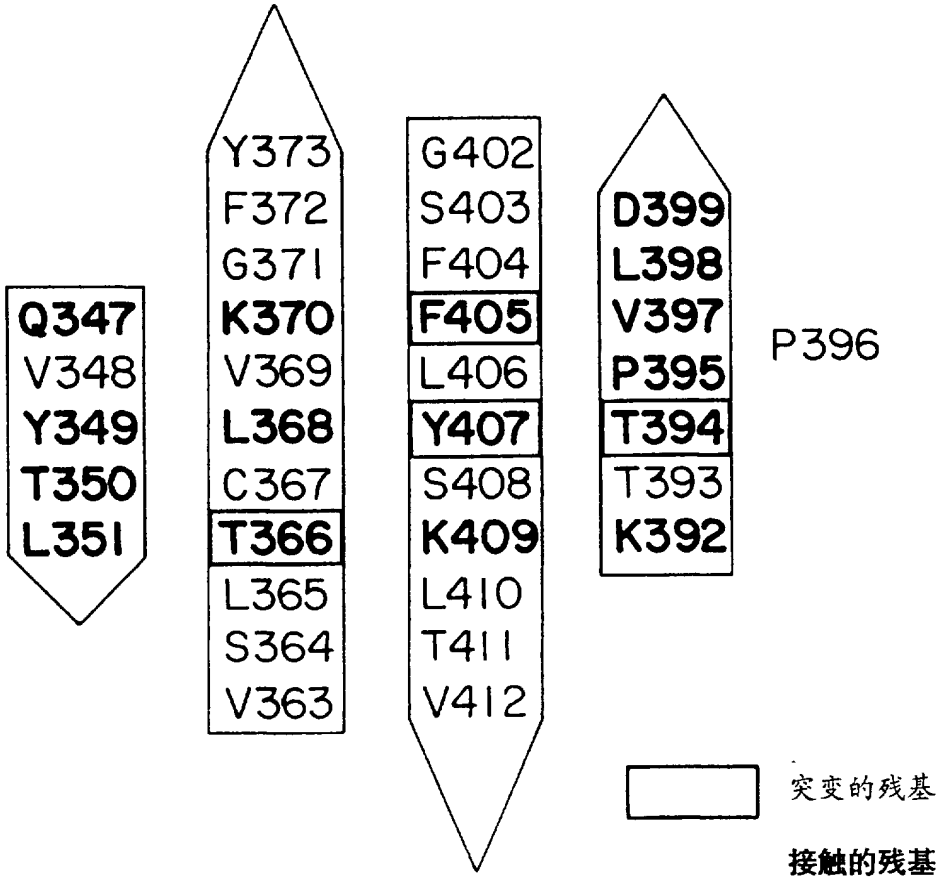

Q347
V348
Y349
T350
L351
Y373
F372
G371
K370
V369
L368
C367
T366
L365
S364
V363
G402
S403
F404
F405
L406
Y407
S408
K409
L410
T411
V412
D399
L398
V397
P395
T394
T393
K392
P396
突变的残基
接触的残基

图 7

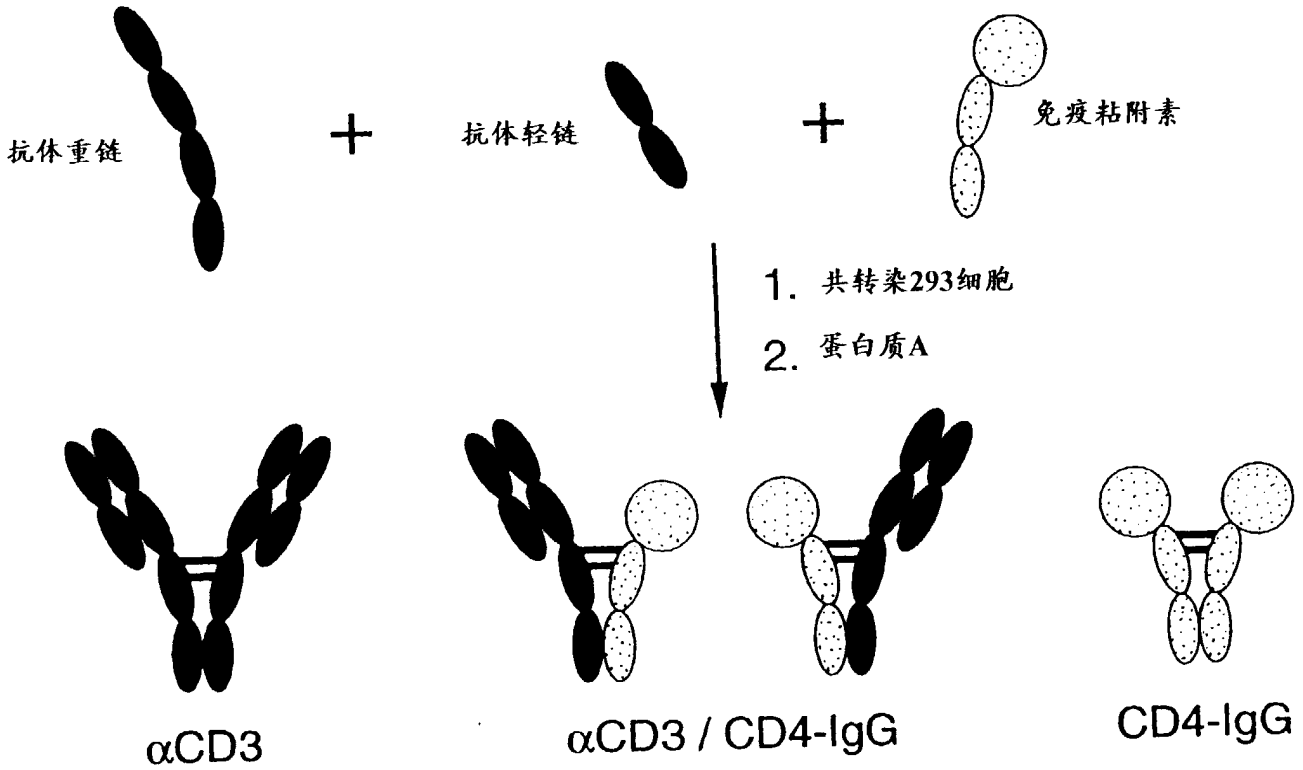


图 8

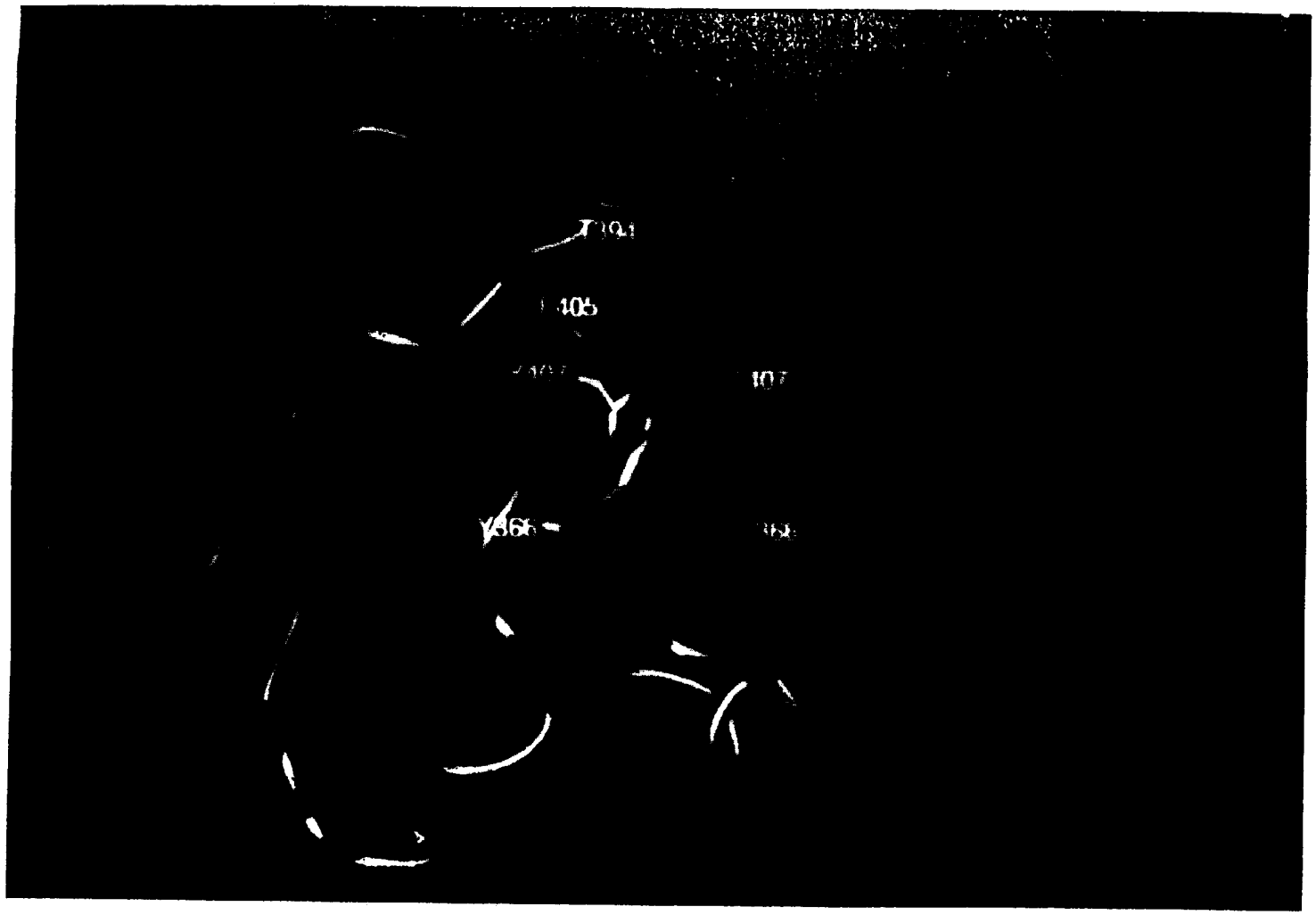
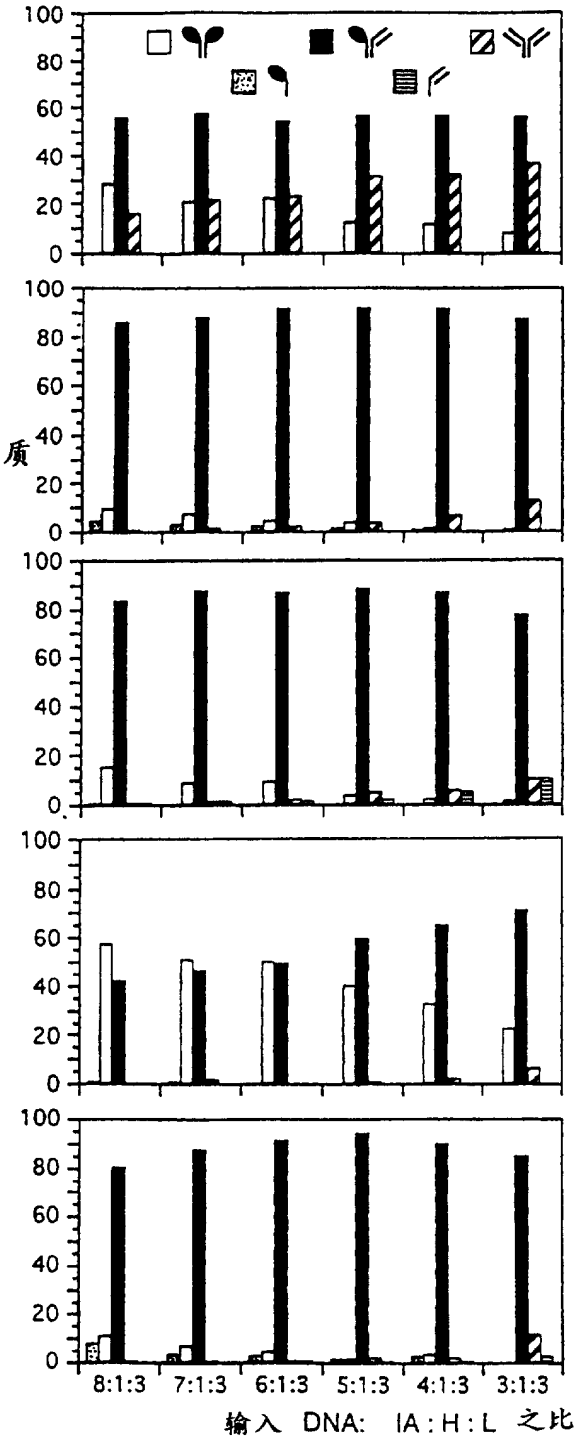


图 9



Ab/Ia

WT/WT

图 10A

Y407T/T366Y

图 10B

T366Y/Y407T

图 10C

F405A/T394W

图 10D

T366Y:F405A/
T394W:Y407T

图 10E