



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101802015 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 06

(21) 申请号 200880018280. 1

代理人 罗天乐

(22) 申请日 2008. 03. 28

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07K 16/46(2006. 01)

PA200700491 2007. 03. 29 DK

C07K 16/28(2006. 01)

60/920, 840 2007. 03. 29 US

(56) 对比文件

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

WO 2005062916 A2, 2005. 07. 14,

2009. 11. 30

WO 2005000899 A2, 2005. 01. 06,

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2005062916 A2, 2005. 07. 14,

PCT/DK2008/000124 2008. 03. 28

US 6994853 B1, 2006. 02. 07,

(87) PCT国际申请的公布数据

WO 2006047340 A2, 2006. 05. 04,

W02008/119353 EN 2008. 10. 09

EP 1693386 A1, 2006. 08. 23,

(73) 专利权人 根马布股份公司

CN 1842538 A, 2006. 10. 04,

地址 丹麦哥本哈根

DE 19859115 A1, 2000. 03. 30,

审查员 刘铮

(72) 发明人 贾尼·舒尔曼 汤姆·文克

简·V·D·温克尔

阿兰·F·拉布里金 罗布·阿伯斯

马里金·V·D·N·科尔夫肖滕

保罗·帕伦

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

权利要求书2页 说明书43页

序列表13页 附图36页

(54) 发明名称

双特异性抗体及其制造方法

(57) 摘要

本发明涉及产生双特异性抗体的体外方法, 包括如下步骤 :a) 提供具有第一结合特异性的第一抗体, 其中所述第一抗体包含 IgG4- 样 CH3 区, b) 提供具有不同于所述第一结合特异性的第二结合特异性的第二抗体, 其中所述第二抗体包含 IgG4- 样 CH3 区, c) 在允许核心铰链区的半胱氨酸发生二硫键异构化的还原条件下共同温育所述第一和第二抗体, 和 d) 获得双特异性抗体。本发明进一步涉及通过本发明的方法获得的双特异性抗体。

CN 101802015 B

1. 一种用于产生双特异性抗体的体外方法,所述方法包括如下步骤:
 - a) 提供具有第一结合特异性的第一抗体,其中所述第一抗体包含 IgG4 CH3 区或 SEQ ID NO:19 的 CH3 区,其中 292 位的 Lys(K) 已被 Arg(R) 取代,
 - b) 提供具有不同于所述第一结合特异性的第二结合特异性的第二抗体,其中所述第二抗体包含 IgG4 CH3 区或 SEQ ID NO:19 的 CH3 区,其中 292 位的 Lys(K) 已被 Arg(R) 取代,
 - c) 在允许核心铰链区中的半胱氨酸发生二硫键异构化的还原条件下共同温育所述第一和第二抗体,和
 - d) 获得双特异性抗体,其中核心铰链区及 CH3 区外部的序列属于选自下组的同种型: IgG1、IgG2、和 IgG3。
2. 权利要求 1 的体外方法,其中所述第一抗体在核心铰链区中包含 CPPC 序列。
3. 前述权利要求中任一项的体外方法,其中所述第一抗体包含 IgG4- 样核心铰链区。
4. 权利要求 1 或 3 中任一项的体外方法,其中所述第一抗体是在核心铰链区中包含 CSPC、CPSC、CRPC、CPRC、CGHC 或 CPHC 序列的抗体。
5. 前述权利要求中任一项的体外方法,其中所述第二抗体在核心铰链区中包含 CPPC 序列。
6. 权利要求 1-4 中任一项的体外方法,其中所述第二抗体包含 IgG4- 样核心铰链区。
7. 权利要求 1-4 或 6 中任一项的体外方法,其中所述第二抗体是在核心铰链区中包含 CSPC、CPSC、CRPC 或 CPRC 序列的抗体。
8. 前述权利要求中任一项的体外方法,其中所述第一抗体和 / 或所述第二抗体是人类抗体。
9. 前述权利要求中任一项的体外方法,其中对步骤 c) 中的条件进行选择,使核心铰链区之外不发生显著的二硫桥还原或异构化。
10. 前述权利要求中任一项的体外方法,其中步骤 c) 包括添加还原剂。
11. 前述权利要求中任一项的体外方法,其中步骤 c) 包括添加从下组选出的作用剂: 谷胱甘肽、L- 半胱氨酸、二硫苏糖醇、 β - 巯基乙醇和半胱胺。
12. 前述权利要求中任一项的体外方法,还包括使步骤 c) 中获得的组合物处于非还原性条件下,以便停止进一步的半分子交换的步骤。
13. 前述权利要求中任一项的体外方法,还包括使双特异性抗体稳定化的步骤。
14. 权利要求 13 的体外方法,其中所述使双特异性抗体稳定化的步骤是化学交联铰链区中半胱氨酸的方法。
15. 权利要求 13 的体外方法,其中所述使双特异性抗体稳定化的步骤是化学交联半分子上碳水化合物侧链的方法。
16. 权利要求 13 的体外方法,其中所述使双特异性抗体稳定化的步骤是交联 CH3 区中不对称地引入的半胱氨酸的方法。
17. 前述权利要求中任一项的体外方法,还包括纯化双特异性抗体的步骤。
18. 权利要求 17 的体外方法,包括在非还原性条件下实施纯化双特异性抗体的步骤。
19. 前述权利要求中任一项的体外方法,还包括将所得的双特异性抗体配制成用于治疗应用的药物组合物的步骤。
20. 前述权利要求中任一项的体外方法,其中第一抗体具有针对肿瘤细胞或肿瘤细胞

蛋白的结合特异性。

21. 权利要求 20 的体外方法,其中第一抗体具有针对 erbB1、erbB2、erbB3、erbB4、MUC-1、CD19、CD20、CD38、CD4 或 CXCR5 或针对 CD79a 或 CD79b 的结合特异性。

22. 权利要求 1-19 中任一项的体外方法,其中第一抗体具有针对病原微生物的结合特异性。

23. 权利要求 20 或 21 的体外方法,其中第二抗体具有针对化疗剂的结合特异性。

24. 前述权利要求中任一项的体外方法,其中第一和 / 或第二抗体连接于从下组选出的化合物:放射性同位素;药物;细胞因子;趋化因子和补体。

25. 权利要求 24 的体外方法,其中第一和 / 或第二抗体连接于选自下组的化合物:细胞毒剂、前体药物、和 C1q。

26. 权利要求 25 的体外方法,其中所述第一和 / 或第二抗体与紫杉烷连接。

27. 一种分离的双特异性抗体,其包括两个选自下组的 CH3 区: IgG4 CH3 区和 / 或 SEQ ID NO:19 的 CH3 区,其中 292 位的 Lys(K) 已被 Arg(R) 取代,其中核心铰链区及 CH3 区外部的序列属于选自下组的同种型: IgG1、IgG2、和 IgG3。

28. 权利要求 27 的双特异性抗体,其中该抗体在核心铰链区中包含一个或两个 CPPC 序列。

29. 权利要求 27 的双特异性抗体,其中该抗体在核心铰链区中包含一个或两个 CSPC、CPSC、CRPC 或 CPRC 序列。

30. 一种药物组合物,其包括权利要求 27-29 中任一项的双特异性抗体。

31. 权利要求 30 的组合物,其用作药物。

32. 权利要求 30 的组合物,其用作用于治疗癌症的药物。

33. 通过权利要求 1-26 中任一项的方法获得的双特异性抗体或者权利要求 27-29 中任一项的双特异性抗体在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

34. 一种用于选择具有期望性质的双特异性抗体的方法,所述方法包括如下步骤:

a) 提供一系列抗体,其中每种抗体具有不同的靶标特异性,并且其中每种抗体包含 IgG4 CH3 区或 SEQ ID NO:19 的 CH3 区,其中 292 位的 Lys(K) 已被 Arg(R) 取代,其中核心铰链区及 CH3 区外部的序列属于选自下组的同种型: IgG1、IgG2、和 IgG3

b) 在还原条件下将所述系列中的每种抗体与所述系列中的另一种抗体进行温育,从而产生一系列的抗体混合物,其中每种混合物包含不同的双特异性抗体,

c) 测定所得的一系列抗体混合物的给定的期望性质,和

d) 选择具有所述期望性质的双特异性抗体混合物。

35. 权利要求 34 的方法,其中对步骤 b) 中的条件进行选择,使核心铰链区之外不发生显著的二硫桥还原或异构化。

36. 权利要求 34-35 中任一项的方法,其中步骤 b) 包括添加还原剂。

37. 权利要求 34-36 中任一项的方法,其中步骤 c) 包括添加从下组选出的作用剂:谷胱甘肽、L-半胱氨酸、二硫苏糖醇、 β -巯基乙醇和半胱胺。

38. 权利要求 34 的方法,其中所述期望性质是肿瘤细胞杀伤。

双特异性抗体及其制造方法

发明领域

[0001] 本发明涉及产生双特异性抗体的新方法,并涉及可以通过这些方法获得的双特异性抗体。

[0002] 发明背景

[0003] 人免疫球蛋白 G (IgG) 抗体存在 4 种具有不同结构和功能性质的亚型。IgG 包括两个重链-轻链对(半分子),它们通过位于铰链区中的重链间二硫键连接。人 IgG4 分子存在多种分子形式,它们的区别在于位于铰链区中的重链间二硫键的有无。IgG4 分子以两个重链间二硫键均已形成或者均未形成的形式存在(6,7)。然而,不论是否存在这些链间二硫键(6,8),人 IgG4 在溶液中均以由两个 Ig 重链和两个轻链组成的四聚体形式存在,这是免疫球蛋白 G 分子的共同性质,因为在 CH3 结构域之间和在 CH1 和 CH2 结构域之间存在相对强的非共价相互作用(4)。只有在非还原条件下发生变性时,两个非共价关联的半分子才会解离,如大小测定分析(size-determination analysis)例如 SDS-PAGE 所表现的(6,9)。

[0004] 几年来人们已经知道,人 IgG4 分子与其它 IgG 亚类不同,以单价分子形式与抗原相互作用。已经发现,血清来源的人 IgG4 不能沉淀纯化的抗原,因为它不能交联。虽然这种血清来源的 IgG4 在功能上是单价的(1,2),但与之形成对照的是,重组产生的 IgG4 在与抗原相互作用中的行为表现为二价(3)。根据这些观察结果,有人提出,血清中的 IgG4 分子能够交换半分子(即,由一个重链和一个轻链构成的分子),结果产生双特异性分子,这样的分子不能交联相同的抗原(3-5)。这种半分子交换过程在本文也被称作“Fab 臂交换”。

[0005] 双特异性抗体作为治疗药物的潜力是令人感兴趣的,因为它们可以用作例如调节物,使效应物机制重新靶向于疾病相关的位点。然而,开发双特异性抗体的其中一个主要的障碍就是通过传统的技术,例如杂交瘤和化学偶联方法,难以产生足够量和品质的材料(10)。

[0006] WO 2005/062916 介绍了用于在小鼠体内基于 IgG4 形成多聚分子的方法。此外,WO 2005/062916 还介绍,在盐缓冲液中体外共同温育两种具有不同抗原结合特异性的 IgG4 抗体可形成能够同时与两种抗原反应的产物。然而,WO 2005/062916 中没有证明,这些产物是聚集体还是双特异性的抗体,并且反应的产出在所用条件下较低。

发明概要

[0007] 现在人们惊奇地发现,在还原条件下,两种具有不同抗原结合特异性的 IgG4- 或 IgG4- 样抗体能够进行高效的半分子交换,从而形成双特异性抗体,而不会伴随形成聚集体(aggregates)。

[0008] 因此,在第一个主要方面中,本发明涉及一种用于产生双特异性抗体的体外方法,所述方法包括如下步骤:

[0009] a) 提供具有第一结合特异性的第一抗体,其中所述第一抗体包含 IgG4- 样 CH3 区,

[0010] b) 提供具有不同于所述第一结合特异性的第二结合特异性的第二抗体,其中所述第二抗体包含 IgG4- 样 CH3 区,

[0011] c) 在允许核心铰链区的半胱氨酸发生二硫键异构化的还原条件下共同温育所述第一和第二抗体,和

[0012] d) 获得双特异性抗体。

[0013] 不受限于任何具体的理论,我们认为抗体的两个区域对其进行半分子交换的能力具有重要的影响。

[0014] 首先,半分子交换的能力可能受到分子的核心铰链区中的序列差异的影响,因为在核心铰链区中具有 CPSC 序列的抗体,例如 IgG4,比具有 CPPC 核心铰链序列的抗体,例如 IgG1,更容易交换。不受限于任何理论,提出这样的假设,即 CPSC 序列导致核心铰链(core-hinge) 更有柔性(flexible),并使链内二硫键的形成成为可能。值得一提的是,核心铰链的结构与蛋白质-二硫化物-异构酶(PDI) 的活性结构域 CXXC 相似。不同同种型的 PDI 的这些 CXXC 基序催化蛋白质中二硫键的形成、还原和重排。因此,不受限于任何具体的理论,认为具有 IgG4-样核心铰链序列的抗体可能具有内在的重排二硫键的活性,这种活性被本发明方法中所用的条件所激发。

[0015] 第二,同样不受限于任何理论,结果显示为了允许交换反应发生,CH3 区的序列应当是 IgG4-样,即使得不会形成强的半分子间相互作用。

[0016] 在另一个主要方面中,本发明涉及通过本发明的方法获得的或者可以通过本发明的方法获得的分离的双特异性抗体,并涉及包含这样的抗体的药物组合物。

[0017] 在进一步的方面中,本发明涉及一种包含两个 IgG4-样 CH3 区的分离的双特异性抗体,并涉及包含这样的抗体的药物组合物。

[0018] 在更进一步的方面中,本发明涉及一种用于选择具有期望性质的双特异性抗体的方法,所述方法包括如下步骤:

[0019] a) 提供一系列抗体,其中每种抗体具有不同的靶标特异性,并且其中每种抗体包含 IgG4-样 CH3 区,

[0020] b) 在还原条件下将所述系列中的每种抗体与所述系列中的另一种抗体进行温育,从而产生一系列的抗体混合物,其中每种混合物包含不同的双特异性抗体(a different bispecific antibody),

[0021] c) 测定所得的一系列抗体混合物的给定的期望性质,和

[0022] d) 选择具有期望性质的双特异性抗体混合物。

[0023] 附图简述

[0024] 图 1. 经纯化的重组 IgG1 和 IgG4 的 SDS-PAGE 分析。纯化之后,将 Betv1 和 Feld1, IgG1 和 IgG4 抗体在非还原 SDS-PAGE 上进行分析。

[0025] 图 2. nu/nu Balb/c 小鼠体内,在不同时间点上双特异性 IgG 的水平。将异源交联测定确定的双特异性 IgG 的量对 Betv1 结合测定确定的 Betv1 特异性 IgG 的量进行作图。含 IgG1 血浆样品和含 IgG4 血浆样品的数据分别用空心 and 实心符号表示。虚线代表在 IgG 半分子交换是随机且完全的条件下双特异性 IgG 的计算量。

[0026] 图 3. 在体内产生双特异性人 IgG4 分子。(A) 各组 SCID 小鼠(n = 5) 注射嵌合抗体混合物:100 μg IgG1-Betv1/100 μg IgG1-Feld1(正方形),100 μg IgG4-Betv1/100 μg IgG4-Feld1(圆形),或 3)100 μg IgG4-Betv1/100 μg IgG4-Feld1+2,000 μg 无关重组 IgG4(IgG4-EGFR;三角形)。通过评估血浆中针对 Betv1 和 Feld1 的双特异性活性来随时间

追踪双特异性抗体的产生。双特异性 IgG 相对于总 IgG-Betv1 浓度的分数用百分比表示。带星号的箭头指示在过量的无关 IgG4 的存在下接受 IgG4-Betv1/IgG4-Feld1 的小鼠体内预期的双特异反应性水平 (4%)，不带星号的箭头指示接受 IgG4-Betv1/IgG4-Feld1 混合物的小鼠体内预期的双特异反应性水平 (50%)。误差棒代表 SEM。(B) 通过评估小鼠血浆中放射性标记的 Feld1 与 Feld1 偶联 Sepharose 的交联来测试单特异交联活性。单特异反应性表示为通过交联结合的放射性标记 Feld1 的量与总 IgG-Feld1 的比值，以便校正 IgG 的清除。误差棒表示 SEM。

[0027] 图 4. 小鼠血浆中双特异活性的 SEC 分析。

[0028] 将在 $t = 24\text{h}$ 时从给予了一种 IgG4 混合物的小鼠获得的血浆 ($10\ \mu\text{l}$) 在 Superdex200 柱上进行分离。小鼠被给予了含有 $300\ \mu\text{g}$ Betv1 结合性 IgG4 和 $300\ \mu\text{g}$ Feld1 结合性 IgG4 的混合物。在级分中 Feld1 特异性 IgG (■) 的浓度在抗原结合试验中测量，双特异性 IgG Betv1-Feld1 (•) 的浓度在 Betv1-Feld1 交联测定中确定。用 IVIg 对柱进行校准，结果显示单体、双体和聚集型 IgG 分别在 12.9, 11.0 和 8.4ml 洗脱 (数据未显示)。

[0029] 图 5. IgG 在全血组分中的交换

[0030] 是将嵌合 IgG 混合物在 37°C 的全血、血细胞、血浆和血清中温育 24h，之后在异源交联测定 (Feld1-Betv1) 中测量双特异活性，来评估 IgG4 和 IgG1 的交换。血液从两个供体获得：A (黑色条形) 和 B (灰色条形)。确定在添加了嵌合 IgG4 (图 A)、嵌合 IgG1 (图 B) 或者没有添加 IgG (图 C) 的混合物中的双特异性活性。所有提供的数据均是在 37°C 温育 24h 后测量的。

[0031] 图 6. 人血细胞的 IgG 交换

[0032] 在 37°C 将嵌合 IgG 混合物与单个核细胞 (MNC)、血小板 (Thr) 和红细胞 (Ery) 温育 48h，之后在异源交联测定 (Feld1-Betv1) 中测量双特异活性，来评估 IgG4 (黑色条形) 和 IgG1 (灰色条形) 的交换。作为对照，还在无血清培养基 (SFC) 中温育抗体混合物。双特异性表示为被结合的 ^{125}I -Betv1 相对于总添加量的百分比。

[0033] 图 7. HEK 和小鼠细胞系的 IgG4 交换

[0034] 在 37°C 将嵌合 IgG 混合物与 HEK 细胞、小鼠 B 细胞 (J558) 或杂交瘤细胞温育，来评估 IgG4 半分子的交换。在异源交联测定 (Feld1-Betv1) 中对分别在 $t = 0\text{h}$ (灰色条形) 和 $t = 24\text{h}$ (黑色条形) 获取的 $1\ \mu\text{l}$ 样品中的双特异活性进行测量。双特异性表示为被结合的 ^{125}I -Betv1 与总添加量的百分比。

[0035] 图 8. 红细胞介导的 IgG4 交换

[0036] 将 IgG4-Betv1/IgG4-Feld1 混合物与新鲜纯化的红细胞 (ery, 实心符号) 温育产生了双特异性抗体，而对于 IgG1 同种型的混合物没有观察到双特异性。作为对照，将抗体混合物在无红细胞的 PBS 中温育 (空心符号)。箭头指示双特异性 IgG 的最大预期百分比 (50%)。误差棒表示重复测量结果的范围。

[0037] 图 9. IgG4 在 PBS 中的交换

[0038] 通过测量双特异活性 (图 A)、二价性和抗原结合来评估 IgG1 (白柱)，IgG4 (灰色条形) 和 IgG4 在过量的无关 IgG4 (黑色条形) 存在下在 PBS 中的交换。图 A 中 IgG 半分子的交换是从双特异 IgG 的浓度 (在异源交联测定中确定) 和假设 IgG 半分子的交换是随机且完全的情况下双特异 IgG 的最大预期浓度计算而得的。交换表示为占最大交换的百分

比,最大交换为 100%。在图 B 中描绘了随时间变化的 FeId1 二价性,其是在同源交联测定中测得的。将 $t = 0$ 时的二价 IgG 的浓度设定为 100%,将二价 IgG 的浓度标准化。

[0039] 图 10. 红细胞裂解物的 IgG4 交换

[0040] 在来自红细胞的裂解物中 37°C 温育嵌合 IgG4 混合物来评估 IgG4 半分子的交换。将 IgG4 与递增稀释度的裂解物一起温育。在异源交联测定中对在所示时间点获取的样品进行双特异性 (Betv1-FeId1) 测量。双特异性表达为被结合的 ^{125}I -Betv1 相对于添加量的百分比。

[0041] 图 11. 受红细胞裂解物诱导的双特异活性的 SEC 分析

[0042] 将 IgG4 与新鲜制备的红细胞裂解物在 37°C 温育 24h,随后在 Superdex200 柱上进行分级。Superdex200 柱在 ÄKTA HPLC 单元 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 上以 0.5ml/min 运行。级分中 Betv1 特异性 IgG (■) 的浓度在抗原结合测定中进行测量,双特异性 IgG FeId1-Betv1 (•) 的浓度在 Betv1-FeId1 交联测定中加以确定。对该柱进行校准,结果显示单体、双体和聚集型 IgG 分别在 12.1, 10.3 和 8.3ml 洗脱 (数据未显示)。

[0043] 图 12. GSH 介导的 IgG4 交换

[0044] 通过在 PBS/ 叠氮化物 (Azide) 中递增浓度 GSH 的存在下温育 IgG4 来评估 GSH 介导的 IgG4 半分子交换。在所示的时间点采取样品,测量其中的抗原结合和双特异性。IgG4 半分子的交换是从双特异性 IgG 的测得浓度 (在异源交联测定中确定) 以及假定 IgG4 半分子的交换是随机且完全的情况下双特异性 IgG4 的最大预期浓度计算而得的。交换表示为占最大交换的百分比,最大交换设定为 100%。

[0045] 图 13. GSH 介导的 IgG4 半分子交换的 SEC

[0046] IgG4 与 GSH (0.5mM) 温育,随后在 Superdex200 柱上进行分离。Superdex200 柱在 ÄKTA HPLC 单元 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 上以 0.5ml/min 运行。级分中 Betv1 特异 IgG (■) 的浓度在抗原结合测定中进行测量,双特异性 IgG FeId1-Betv1 (•) 的浓度在 Betv1-FeId1 交联测定中加以确定。对该柱进行校准,结果显示单体、双体和聚集型 IgG 分别在 12.1, 10.3 和 8.3ml 洗脱 (数据未显示)。

[0047] 图 14. GSH 介导的 IgG4 交换的温度依赖性

[0048] 将 IgG4-Betv1 及 IgG4-FeId1 混合物在示明的温度下在 PBS 中与 GSH 温育。在 $t = 0\text{h}$ (灰色条形) 和 $t = 24\text{h}$ (黑色条形),对双特异性 IgG4 的浓度进行评估。由这些数据计算双特异性 IgG 相对于 IgG4Betv1 浓度的分数,并表示为百分比。误差棒表示重复测量的范围。

[0049] 图 15. 由一组还原剂介导的 IgG4 交换

[0050] 将 PBS 中的 IgG4-Betv1 和 IgG4-FeId1 在不同作用剂 (全部为还原性, GSSG 除外) 的存在下在 37°C 温育 24h。Betv1 特异性 IgG 的浓度在 Betv1 结合测定中进行测量,双特异性 IgG 的浓度在异源交联测定 (FeId1-Betv1) 中进行测量。计算双特异性 IgG 相对于 IgG-Betv1 浓度的百分比。标准误差棒表示从三次测量计算出的 SEM。

[0051] 图 16. 使用 GSH 的完全人类 IgG4 抗体的交换

[0052] (A) 将 IgG4-CD20/IgG4-EGFr 或 IgG1-CD20/IgG1-EGFr 混合物在有或者没有 0.5mM GSH 的条件下在 37°C 进行温育。在示明的时间点采取样品。在夹心式 ELISA 中测量双特异性抗体的形成。Y 轴表示 405nm 的光密度,作为双特异性 CD20/EGFR 抗体形成的量度。

[0053] (B) GSH 剂量依赖性的 IgG4 交换。将 IgG4-CD20 和 IgG4-EGFr 的混合物与所示浓度的 GSH 37°C 温育 24h。双特异性抗体的形成在夹心式 ELISA 中测量。在 Y 轴上绘制 405nm 的光密度, 作为双特异性 CD20/EGFR 抗体形成的量度。

[0054] (C) GSH- 介导的 IgG4 半分子交换受到反应中所用成分的影响, 并且在较低 GSH 浓度的培养基 (Freestyle 293) 中发生。

[0055] (D) GSH- 介导的 IgG4 半分子交换在 0.5mM GSH 比在 5mM GSH 更高。

[0056] (E/F) 通过 ESI-TOF 质谱检测 IgG4-EGFR 和 IgG4-CD20 之间的 Fab 臂交换。IgG4 混合物在不存在 (E) 或存在 (F) 0.5mM GSH 的条件下温育 24 小时, 之后用 PNGase F 使抗体去糖基化, 并通过 ESI-TOF 质谱确定所得抗体的分子量。图中显示的是经去卷积 (deconvoluted) ESI-TOF 质谱。数据代表 2 次实验的结果。

[0057] 图 17. 猕猴 IVIg 参与重组人 IgG4 抗体的 Fab 臂交换

[0058] A) 将两种重组人 IgG4 抗体 (IgG4-CD20 和 IgG4-EGFr) 的混合物在存在或不存在纯化猕猴免疫球蛋白或人 IVIg 的条件下在 37°C 与 GSH 温育 24h。双特异性抗体通过 Fab 臂交换的形成在夹心式 ELISA. 中进行测量。

[0059] B) 将两种重组人 IgG4 抗体 (IgG4-CD20 和 IgG4-EGFr) 的混合物在存在或不存在过量 (圆括号内所示) 的来自数种动物 (来源也示于圆括号中) 的纯化猕猴免疫球蛋白或人 IVIg 的条件下在 37°C 与 GSH 温育 24h。在夹心式 ELISA. 中测量双特异性抗体通过 Fab 臂交换的形成。

[0060] C) 将两种重组人 IgG4 抗体 (IgG4-CD20 和 IgG4-EGFr) 的混合物在存在或不存在过量 (圆括号内所示) 的经纯化的黑猩猩、狒狒、食蟹猴 (cynomolgous monkey)、马和猪免疫球蛋白 (圆括号内也指示了来源) 或人 IVIg 的条件下在 37°C 与 GSH 温育 24h。在夹心式 ELISA 中测量双特异性抗体通过 Fab 臂交换的形成。

[0061] 图 18. 恒定区序列下划线的序列代表 CH3 区

[0062] 图 19. IgG1 突变体的 GSH 介导的半分子交换

[0063] (A) 用 0、0.1、1 和 10mM GSH 测试 GSH 浓度对不同 IgG1 突变体的半分子交换的影响。交换的测试使用如下的混合物:

[0064] -IgG4a-feld1 wt 和 IgG4 a-betv1 wt (图中表示为 IgG4 wt)

[0065] -IgG1 a-feld1 wt 和 IgG4a-betv1 wt (表示为 IgG1 wt)

[0066] -IgG1a-feld1 CPSC 和 IgG1a-betv1 CPSC (表示为 IgG1-CPSC)

[0067] -IgG1a-feld1 CH3(IgG4) 和 IgG1a-betv1CH3(IgG4) (表示为 IgG1-CH3(IgG4))

[0068] -IgG1a-feld1 CPSC-CH3(IgG4) 和 a-betv1 IgG1CPSC-CH3(IgG4) (表示

[0069] 为 IgG1-CPSC-CH3(IgG4))

[0070] (B) 用 0.5 和 5mM GSH 测试 GSH 浓度对不同 IgG1 突变体与野生型 IgG4(IgG4 wt) 分子的半分子交换的影响。交换的测试使用如下的混合物:

[0071] -IgG1a-feld1 wt 和 IgG4a-betv1 wt (表示为 IgG1)

[0072] -IgG1a-feld1 CPSC 和 IgG4a-betv1 wt (表示为 IgG1-CPSC)

[0073] -IgG1a-feld1 CH3(IgG4) 和 IgG4a-betv1 wt (表示为 IgG1-CH3(IgG4))

[0074] -IgG1a-feld1 CPSC-CH3(IgG4) 和 IgG4a-betv1 wt (表示为 IgG1-CPSC-CH3(G4))

[0075] -IgG1a-feld1 R238Q 和 IgG4a-betv1 wt (表示为 IgG1-R238Q)

- [0076] -IgG1a-feld1 K292R 和 IgG4a-betv1 wt(表示为 IgG1-K292R)
- [0077] -IgG1a-feld1 Q302E 和 IgG4a-betv1 wt(表示为 IgG1-Q302E)
- [0078] -IgG1a-feld1 P328L 和 IgG4a-betv1 wt(表示为 IgG1-P328L)
- [0079] -IgG1a-feld1 CPSC-K292R 和 IgG4 a-betv1 wt(表示为 IgG1-CPSC-K292R)
- [0080] -IgG4a-feld1 wt 和 IgG4a-betv1 wt(表示为 IgG4)
- [0081] (C) 用 0.5 和 5mM GSH 测试 GSH 浓度对不同 IgG1 突变体的半分子交换的影响。交换的测试使用如下的混合物：
- [0082] -IgG1a-feld1 wt 和 IgG1a-betv1 wt(表示为 IgG1)
- [0083] -IgG1a-feld1 CPSC 和 IgG1a-betv1 CPSC(表示为 IgG1-CPSC)
- [0084] -IgG1a-feld1 CH3(IgG4) 和 IgG1a-betv1 CH3(IgG4)(表示为 IgG1-CH3(IgG4))
- [0085] -IgG1a-feld1 CPSC-CH3(IgG4) 和 IgG1a-betv1 CPSC-CH3(IgG4)(表示为 IgG1-CPSC-CH3(IgG4))
- [0086] -IgG1a-feld1 R238Q 和 IgG1a-betv1 R238Q(表示为 IgG1-R238Q)
- [0087] -IgG1a-feld1 K292R 和 IgG1a-betv1 K292R(表示为 IgG1-K292R)
- [0088] -IgG1a-feld1 Q302E 和 IgG1a-betv1 Q302E(表示为 IgG1-Q302E)
- [0089] -IgG1a-feld1 P328L 和 IgG1a-betv1 P328L(表示为 IgG1-P328L)
- [0090] -IgG1a-feld1 CPSC-K292R 和 IgG1a-betv1 CPSC-K292R(表示为 IgG1-CPSC-K292R)
- [0091] -IgG4a-feld1 wt 和 IgG4a-betv1 wt(表示为 IgG4)
- [0092] 图 20. 在 0.5mM GSH 下, 具有野生型 (IgG4) 核心铰链的 IgG4 分子参与重组人 IgG4 抗体的 Fab 臂交换, 而具有 IgG1 核心铰链的分子不参与。(A) 两种重组人 IgG4 抗体 (IgG4-CD20 和 IgG4-EGFr, 如上文说明的) 的混合物在存在或不存在过量 (50 和 100 微克/ml) 的那他珠单抗 (Tysabri) 的条件下在 37°C 与 0.5mM GSH 温育 24h。在夹心式 ELISA 中测量双特异性抗体通过 Fab 臂交换的形成。(B) 将两种重组人 IgG4 抗体 (IgG4-CD20 和 IgG4-EGFr, 如上所述) 的混合物在存在或不存在等摩尔量 (10 微克/ml) 的那他珠单抗 (Tysabri) 或吉妥单抗 (Mylotarg) 的条件下在 37°C 与 0.5mM GSH 温育 24h。在夹心式 ELISA 中测量双特异性抗体通过 Fab 臂交换的形成。
- [0093] 图 21. 在 292 位点具有额外突变的 IgG1-CPSC 构建体的半分子交换。用 0.5mM GSH 测试不同 IgG1 突变体的半分子交换。交换的测试使用如下的混合物：
- [0094] -IgG1-2F8 wt 和 IgG1-7D8 wt(表示为 IgG1)
- [0095] -IgG1-2F8-CPSC 和 IgG1-7D8-CPSC(表示为 IgG1-CPSC)
- [0096] -IgG1-2F8-CH3(IgG4) 和 IgG1-7D8-CH3(IgG4)(表示为 IgG1-CH3(IgG4))
- [0097] -IgG1-2F8-CPSC-CH3(IgG4) 和 IgG1-7D8-CPSC-CH3(IgG4)(表示为 IgG1-CPSC-CH3(IgG4))
- [0098] -IgG1-2F8-CPSC-R238Q 和 IgG1-7D8-CPSC-R238Q(表示为 IgG1-CPSC-R238Q)
- [0099] -IgG1-2F8-CPSC-K292R 和 IgG1-7D8-CPSC-K292R(表示为 IgG1-CPSC-K292R)
- [0100] -IgG1-2F8-CPSC-K292Y 和 IgG1-7D8-CPSC-K292Y(表示为 IgG1-CPSC-K292Y)
- [0101] -IgG1-2F8-CPSC-K292F 和 IgG1-7D8-CPSC-K292F(表示为 IgG1-CPSC-K292F)
- [0102] -IgG1-2F8-CPSC-K292W 和 IgG1-7D8-CPSC-K292W(表示为 IgG1-CPSC-K292W)

[0103] -IgG1-2F8-CPSC-Q302E 和 IgG1-7D8-CPSC-Q302E (表示为 IgG1-CPSC-Q302E)

[0104] -IgG1-2F8-CPSC-P328L 和 IgG1-7D8-CPSC-P328L (表示为 IgG1-CPSC-P328L)

[0105] -IgG4-2F8 wt 和 IgG4-7D8 wt (表示为 IgG4)

[0106] 在夹心式 ELISA 中测量双特异性抗体通过 Fab 臂交换的形成。

[0107] 图 22. 核心铰链的稳定化可在体内保护 IgG4 抗体治疗剂免于遭受 Fab 臂交换。

[0108] (A) 通过 ESI-TOF 质谱检测 IgG4-EGFR-CPPC 和 IgG4-CD20 之间的 Fab 臂交换。将 IgG4-EGFR-CPPC/IgG4-CD20 混合物在 5mM GSH 的存在下 (F) 温育 24 小时,之后用 PNGase F 使抗体去糖基化,并通过 ESI-TOF 质谱确定所得抗体的分子量。图中显示了去卷积后的 ESI-TOF 谱。在使用 5mM GSH 时可以检测到双特异性 EGFR/CD20 抗体 (在没有 GSH 或 0.5mM GSH 的条件下温育未产生双特异性抗体 (数据未显示))。

[0109] (B) 将数组 ($n = 4$) SCID 小鼠用 IgG4-CD20/IgG4-EGFR (空心圆)、IgG4-CD20/IgG1-EGFR 和 IgG4-CD20/IgG4-EGFR-CPPC 等抗体混合物 (每种 300 μ g) 进行注射。通过 ELISA 对双特异性抗体的产生进行经时追踪和定量。双特异性抗体的定量使用体外交换的抗体混合物作为对照。数据点代表 4 只小鼠的在不同的实验中至少测量 2 次的平均值 \pm SEM。在 IgG4-CD20/IgG1-EGFR 和 IgG4-CD20/IgG4-EGFR-CPPC 混合物中未能检测到双特异性抗体。示明了测定的检测限 (虚线),代表 2000ng/ml 的血清水平。

[0110] 图 23. CXXC- 突变体的经时 Fab 臂交换

[0111] 将 CXXC- 突变抗体的混合物在 37°C 与 0.5mM GSH 温育。在示明的时间点采取样品。测量双特异性抗体的形成。交换的测试使用如下的混合物:

[0112] -IgG1a-feld1 wt 和 IgG1a-betv1 wt (表示为 IgG1)

[0113] -IgG4a-feld1 wt 和 IgG4a-betv1 wt (表示为 IgG4)

[0114] -IgG4a-feld1 CGHC 和 IgG4a-betv1 CGHC (表示为 CGHC)

[0115] -IgG4a-feld1 CGC 和 IgG4a-betv1 CGC (表示为 CGC)

[0116] -IgG4a-feld1 CPRC 和 IgG4a-betv1 CPRC (表示为 CPRC)

[0117] -IgG4a-feld1 CPHC 和 IgG4a-betv1 CPHC (表示为 CPHC)

[0118] 图 24 :CXXC 突变体的 GSH 介导的 Fab 臂交换

[0119] 用 1-20,000 μ M GSH 测试 GSH 浓度对 CXXC 突变体的 Fab 臂交换的影响。交换的测试使用如下的混合物:

[0120] -IgG1a-feld1 wt 和 IgG1a-betv1 wt (表示为 IgG1)

[0121] -IgG4a-feld1 wt 和 IgG4a-betv1 wt (表示为 IgG4)

[0122] -IgG4a-feld1 CGHC 和 IgG4a-betv1 CGHC (表示为 CGHC)

[0123] -IgG4a-feld1 CGC 和 IgG4a-betv1 CGC (表示为 CGC)

[0124] -IgG4a-feld1 CPRC 和 IgG4a-betv1 CPRC (表示为 CPRC)

[0125] -IgG4a-feld1 CPHC 和 IgG4a-betv1 CPHC (表示为 CPHC)

[0126] 发明详细说明

[0127] 定义

[0128] 术语“免疫球蛋白”是指一类结构相关的糖蛋白,由两对多肽链,一对低分子量轻链(L)和一对重链(H)所构成,所有4条链均通过二硫键相互连接。免疫球蛋白的结构已经得到了详尽的表征。见例如《Fundamental Immunology》第七章 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven

Press, N. Y. (1989)) (11)。简而言之,每条重链典型地由一个重链可变区(本文缩写为 V_H 或 VH)和一个重链恒定区构成。重链恒定区通常由三个结构域构成:CH1、CH2和CH3。每条轻链典型地由一个轻链可变区(本文缩写为 V_L 或 VL)和一个轻链恒定区构成。轻链恒定区通常由一个结构域 C_L 构成。 V_H 和 V_L 区可以进一步分为高可变性区(或高变区,其在序列和/或结构限定的环的形式上具有高度可变性),也称作补体决定区(CDR),它们之间散布着更加保守的区,称作框架区(FRs)。每个 V_H 和 V_L 通常由三个CDR和4个FR构成,从氨基端向羧基端的排列顺序是:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(另见(12))。典型地,该区中氨基酸残基用Kabat(13)所述的方法进行编号。使用该编号系统,肽的实际线性氨基酸序列可以包含更少或更多的氨基酸,相应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入。例如,重链可变结构域可以在 V_H CDR2的52位残基之后包含单氨基酸插入(依照Kabat的残基52a),和在重链FR的82位残基之后插入残基(例如依照Kabat的残基82a,82b和82c等)。对于给定的抗体,可以通过将该抗体序列与一条“标准的”Kabat编号序列在同源区域处进行比对,来确定其残基的Kabat编号。

[0129] 在本发明语境中,术语“抗体(Ab)”是指这样的免疫球蛋白分子,免疫球蛋白分子的片段,或两者之任一的衍生物,其能够在典型的生理条件下以相当长时间的半衰期特异性结合抗原,例如至少大约30分钟,至少大约45分钟,至少大约1小时,至少大约2小时,至少大约4小时,至少大约8小时,至少大约12小时,大约24小时或者更长,大约48小时或者更长,大约3、4、5、6或更多天等,或者其它任何相关的功能上定义的时间段(例如足以诱导、促进、提高和/或调节与抗体结合抗原相关联的生理响应的时间,和/或足以供抗体招募Fc介导的效应物活性的时间)。免疫球蛋白分子的重链和轻链可变区包含可以和抗原相互作用的结合结构域。抗体(Abs)的恒定区可以介导免疫球蛋白结合宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞),和补体系统的成分,例如C1q,经典补体激活途径的第一个成分。如上文指出的,除非在另外指出或明显与上下文矛盾,本文中的术语“抗体”包括含有突变的或野生型的核心铰链区并保留特异性结合抗原的能力的抗体片段。

[0130] 已经显示,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段来实施。术语“抗体”中涵盖的结合性片段的实例包括例如 $F(ab')_2$ 片段,它们是二价片段,包括两条Fab片段,这两条片段通过位于铰链区的一个二硫键相连。尽管这些片段一般包含在抗体的含义之内,但是它们作为总体以及各个独立的个体都是本发明的独特特征,展示不同的生物性质和效用。还应当理解,除非另外具体指出,术语“抗体”还包括通过任何已知的技术,例如酶切、肽合成和重组技术,所提供的多克隆抗体、单克隆抗体(mAbs)、类抗体多肽例如嵌合抗体和人源化抗体,以及保留特异性结合抗原能力的抗体片段(抗体结合片段)。所产生的抗体可以具有任何同种型。

[0131] 如本文所使用的,术语“人抗体”或“人类抗体”意图包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如由于体外随机或定点突变或由于体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所使用的,术语“人抗体”或“人类抗体”不意图包括如下的抗体,其中来自另一哺乳动物物种(例如小鼠)的种系的CDR序列被移植到人类框架序列上。

[0132] 如本文所使用的,“分离的抗体”意图指示如下的抗体,其基本上不含其它具有不同抗原特异性的抗体。然而,特异性结合某种特定人靶抗原的表位、同种型或变异体的分离

抗体可能具有与其它相关抗原（例如来源于其它物种的抗原（例如物种同源物））的交叉反应性。而且，分离的抗体可以基本不含其它的细胞材料和 / 或化学品。在本发明的一个实施方案中，将一组具有不同特异性的“分离”单克隆抗体组合在明确限定的组合物中。

[0133] 如本文所使用的，术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指抗体分子单一分子组合物的制备物。单克隆抗体组合物显示针对特定表位的单一结合特异性和亲和性。因此，术语“人单克隆抗体”是指显示单一结合特异性、且具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。人单克隆抗体可以由杂交瘤产生，杂交瘤包括相互融合的 B 细胞和永生化细胞，其中 B 细胞是从基因组中包含人重链转基因和轻链转基因的转基因或转染色体非人动物（例如转基因小鼠）获得的。

[0134] 如本文使用的，术语“结合”在某一抗体结合预定抗原的语境中通常是亲和力相当于 K_D 为大约 $10^{-7}M$ 或者更低，例如大约 $10^{-8}M$ 或者更低，例如大约 $10^{-9}M$ 或者更低，大约 $10^{-10}M$ 或者更低，或者大约 $10^{-11}M$ 或者更低的结合，所述 K_D 例如使用 BIAcore 3000 设备，以抗原作为配体，并以抗体作为分析物，通过表面等离子体共振 (SPR) 技术来加以确定；其结合预定抗原的亲和力，相当于比其针对除该预定抗原或紧密相关抗原之外的非特异抗原（例如 BSA、酪蛋白）的结合亲和力的 K_D 至少低 10 倍，例如至少低 100 倍，例如至少低 1000 倍，例如至少低 10,000 倍，例如至少低 100,000 倍的 K_D 。亲和力相差的量取决于抗体的 K_D ，从而当抗体 K_D 非常低（即抗体特异性很高）时，针对抗原的亲和力较针对非特异抗原的亲和力相差的量可以是至少 10,000 倍。

[0135] 如本文所使用的，术语“ k_d ” (sec^{-1}) 是指特定抗体 - 抗原相互作用的解离速度常数。该值又称为 k_{off} 值。

[0136] 如本文所使用的，术语“ k_a ” ($M^{-1} \times \text{sec}^{-1}$) 是指特定抗体 - 抗原相互作用的结合速度常数。

[0137] 如本文所使用的，术语“ K_D ” (M) 是指特定抗体 - 抗原相互作用的解离平衡常数。

[0138] 如本文所使用的，术语“ K_A ” (M^{-1}) 是指特定抗体 - 抗原相互作用的结合平衡常数，是通过 k_a 除以 k_d 获得的。

[0139] 如本文所使用的，“同种型”是指由重链恒定区基因编码的免疫球蛋白类型（例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE 或 IgM）。

[0140] 术语“表位”是指能够特异结合抗体的蛋白决定簇。表位通常由表面分子集团 (surface groupings of molecules) 构成，例如氨基酸或糖侧链，并且通常具有特异的三维结构特征，以及特异的电荷特征。构象性和非构象性表位的区别在于，在变性溶剂的存在下，与前者的结合会丧失，而后者不会。表位可以包括直接参与结合的氨基酸残基（也称作表位的免疫显性组分）和不直接参与结合的其他氨基酸残基，例如被特异性抗原结合肽有效封闭的氨基酸残基（换言之，该氨基酸残基位于特异抗原结合肽的足迹 (footprint) 内）。

[0141] 如本文所使用的，人抗体如果满足下述条件，则是“来源于”或“衍生自” (derive from) 特定的种系序列的：该抗体是从使用人免疫球蛋白序列的系统获得的，例如通过免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或通过筛选人免疫球蛋白基因库，且其中所选择的人抗体的氨基酸序列与由该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少 90%，例如至少 95%，例如至少 96%，例如至少 97%，例如至少 98%，或者例如至少 99% 的同一性。典型

地,在重链 CD3 之外,来源于特定人种系序列的人抗体将显示与由该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列不超过 20 个氨基酸的差异,例如不超过 10 个氨基酸的差异,例如不超过 5 个,例如不超过 4、3、2 或 1 个氨基酸的差异。

[0142] 术语“双特异性抗体”意图包括任何具有两种不同的结合特异性的抗体,即该抗体结合两种不同的表位,这两种表位可以位于相同的靶抗原上,或者更一般地,位于不同的靶抗原上。

[0143] 如本文所使用的,术语“效应细胞”是指免疫响应效应期中,而不是免疫响应的识别期和激活期中所涉及的免疫细胞。免疫细胞的实例包括骨髓或淋巴来源的细胞,例如淋巴细胞(例如 B 细胞和 T 细胞,包括溶细胞性 T 细胞(CTL))、杀伤细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、多形核细胞,例如嗜中性粒细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱细胞。一些效应细胞表达特异的 Fc 受体,并执行特异的免疫功能。在一些实施方案中,效应细胞能够诱导抗体依赖的细胞毒性(ADCC),例如自然杀伤细胞能够诱导 ADCC。例如,表达 FcR 的单核细胞、巨噬细胞参与特异杀伤靶细胞、将抗原呈递给免疫系统的其它成分、或结合呈递抗原的细胞等作用。在一些实施方案中,效应细胞可以吞噬靶抗原或靶细胞。特定 FcR 在效应细胞上的表达可以被体液因子例如细胞因子所调节。例如,已经发现,Fc γ RI 的表达被干扰素 γ (IFN- γ) 和 / 或 G-CSF 上调。这种提高的表达可增加带有 Fc γ RI 的细胞对靶标的细胞毒活性。效应细胞可以吞噬或裂解靶抗原或靶细胞。

[0144] “治疗”是指以缓解、减轻、阻止或根除(治愈)症状或疾病状态为目的施用有效量的本发明治疗活性化合物。

[0145] “有效量”是指在必要的给药剂量(dosage)或时程下,可有效获得期望的治疗结果的量。抗体的治疗有效量可随多种因素变化,例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,和抗体在个体内引发期望的响应的能力。治疗有效量同时还指抗体或抗体部分的治疗有益效应超过任何毒性或有害效应。术语“IgG4-样核心铰链区”是指如下的核心铰链区,其中半胱氨酸残基与抗体分子中其它半胱氨酸 / 二硫桥相比显著地更容易被还原和 / 或二硫键异构体化。因此,对于具有 IgG4-样核心铰链区的抗体,可以找到这样的还原性条件,在该条件下核心区半胱氨酸残基 / 二硫桥可以被还原,继而与另一个半分子中的核心铰链半胱氨酸形成二硫桥,而同时抗体内的其它二硫桥以及抗体的整体结构仍保持完整。例如,IgG4-样核心铰链区可以是 IgG4 核心铰链区,或者是另一种同种型抗体的核心铰链序列,其中核心区 CPPC 序列的其中一个脯氨酸被突变,例如突变成丝氨酸,如 CPPC 突变成 CPSC。

[0146] 在本专利申请的语境中,术语“IgG4-样 CH3 区”是指与 IgG4(例如人 IgG4) 的 CH3 相同的 CH3 区,或者在功能上与 IgG4CH3 区等价的 CH3 区。在此语境中,“功能上等价”的意思是所述 CH3 区与 IgG4 的 CH3 区相似,不形成稳定的半分子间相互作用。给定的 CH3 区的稳定的半分子间相互作用的形成,可以通过用该 CH3 区替换 IgG4 的 CH3,然后在实施例 31 或 32 给定的条件下进行交换测试来加以检验。如果观察到交换,则没有形成稳定的半分子间相互作用。例如,IgG4-样 CH3 区可以是这样的 CH3 区,其容许半分子交换的效率与来自 IgG4 的 CH3 区相当。由此,IgG4-样 CH3 区可以在结构上与 IgG4 的 CH3 区相似,例如与 IgG4 的 CH3 区的序列有超过 75%,例如超过 90%的相似性。然而,作为附加条件或者替代条件,在此语境下 IgG4-样 CH3 区可以是这样的 CH3 区,它在结构上与 IgG4 的 CH3 区不相近,但具有相似的功能特征,即它不含任何参与和其它包含相同的 CH3 区氨基酸序列的肽

形成二硫键或共价或稳定非共价重链间键（例如盐桥）的氨基酸残基。例如，IgG4-样 CH3 区可以是突变的 IgG1CH3 区，其中可参与半分子间 CH3-CH3 相互作用的一个或多个氨基酸残基已被改变或删除。

[0147] 术语“还原性条件”或“还原性环境”是指如下的条件或环境，其中底物，在这里是抗体核心区中的半胱氨酸残基，更可能被还原而不是被氧化。

[0148] 术语“还原剂”是指这样的化合物，它还原它的环境中的分子，即改变其环境中的分子，使之更加被还原 (more reduced) 或者更具有还原性 (more reducing)。还原剂通过提供电子发挥作用，这样其自身在还原了底物之后被氧化。因此，还原剂是提供电子的作用剂。还原剂的实例包括二硫苏糖醇 (DTT)、巯基乙醇、半胱氨酸、巯基乙醇酸盐（或酯）、半胱胺 (cysteamine)、谷胱甘肽和硼氢化钠。在一个实施方案中，还原剂不包括酶。

[0149] “二硫键形成”是指在一个或两个多肽内存在的两个半胱氨酸之间形成共价键的过程，其可图示为“-S-S-”。

[0150] “二硫键还原”是指断裂二硫键，从而形成两个巯基(-SH 基团)的过程。

[0151] 术语“二硫键异构化”是指不同半胱氨酸之间二硫键的交换，即二硫键改组 (shuffling)。

[0152] “蛋白质二硫键异构酶”是指催化蛋白质中二硫键的异构化的酶。

[0153] 在二硫桥还原的语境中使用的“无显著还原”一般是指，在溶液中发生还原的所述二硫桥少于 10%，例如少于 5%，例如少于 2%，或者少于 1%。

[0154] 发明的各方面和实施方案

[0155] 如上文所述，在第一个主要方面中，本发明涉及一种用于产生双特异性抗体的体外方法，所述方法包括如下步骤：

[0156] a) 提供具有第一结合特异性的第一抗体，其中所述第一抗体包含 IgG4-样 CH3 区，

[0157] b) 提供具有不同于所述第一结合特异性的第二结合特异性的第二抗体，其中所述第二抗体包含 IgG4-样 CH3 区，

[0158] c) 在允许核心铰链区的半胱氨酸发生二硫键异构化的还原条件下共同温育所述第一和第二抗体，和

[0159] d) 获得双特异性抗体。

[0160] 在优选实施方案中，本发明方法中使用的第一和第二抗体是单克隆抗体。单克隆抗体可以，例如，通过首先由 Kohler et al. (14) 描述的杂交瘤方法产生，或者可以通过重组 DNA 方法产生。单克隆抗体还可以用例如 Clackson 等 (15) 和 Marks 等 (16) 介绍的技术从噬菌体抗体文库中分离。单克隆抗体可以从任何合适的来源获得。因此，例如，可以用感兴趣的抗原，例如以在表面上表达该抗原的细胞或者编码感兴趣的抗原的核酸的形式，免疫小鼠，从该小鼠获得脾 B 细胞，从该小鼠脾 B 细胞制备杂交瘤，从该杂交瘤获得单克隆抗体。还可以从来自经过免疫的人或非人哺乳动物（例如大鼠、狗、灵长动物等）的抗体表达性细胞衍生的杂交瘤获得单克隆抗体。

[0161] 在一个实施方案中，本发明的抗体是人抗体。指定的人单克隆抗体可用携带部分人免疫系统而非小鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生。这些转基因和转染色体小鼠包括在本文中分别被称作 HuMAb 小鼠和 KM 小鼠的小鼠，并在本文中统称为“转基因小鼠”。

[0162] HuMAb 小鼠含有人免疫球蛋白基因迷你座位 (miniloci)，其编码未重排的人重

链 (μ 和 γ) 和 κ 轻链免疫球蛋白序列, 以及使内源 μ 和 κ 链座位失活的靶定突变 (targeted mutations) (17)。因此, 所述小鼠表现出小鼠 IgM 或 κ 表达降低, 在应答于免疫时, 被引入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变而产生高亲和性的人 IgG, κ 单克隆抗体 (17-20)。HuMAb 小鼠的制备在参考文献 21-25 中有详细介绍。另见 US 5, 545, 806、US 5, 569, 825、US 5, 625, 126、US 5, 633, 425、US 5, 789, 650、US 5, 877, 397、US 5, 661, 016、US 5, 814, 318、US 5, 874, 299、US 5, 770, 429、US 5, 545, 807、WO 98/24884、WO 94/25585、WO 93/1227、WO 92/22645、WO 92/03918 和 WO 01/09187。

[0163] HCo7 小鼠在它们的内源轻链 (kappa) 基因中有一个 JKD 中断 (disruption) (如 Chen 等 (26) 所述), 在它们的内源重链基因中有一个 CMD 中断 (如 WO 01/14424 的实施例 1 所述), 一个 KCo5 人 kappa 轻链转基因 (如 Fishwild 等 (25) 所述), 和一个 HCo7 人重链转基因 (如 US 5, 770, 429 所述)。

[0164] HCo12 小鼠在其内源轻链 (kappa) 基因中有一个 JKD 中断 (如 Chen 等 (26) 所述), 在其内源重链基因中有一个 CMD 中断 (如 WO 01/14424 的实施例 1 所述), 一个 KCo5 人 kappa 轻链转基因 (如 Fishwild 等 (25) 所述), 和一个 HCo12 人重链转基因 (如 WO 01/14424 的实施例 2 所述)。

[0165] 在 KM 小鼠品系中, 内源小鼠 kappa 轻链基因如 Chen 等 (26) 所述的那样被纯合地中断, 并且内源小鼠重链基因如 WO 01/09187 的实施例 1 所述那样被纯合地中断。这种小鼠品系携带一个人 kappa 轻链转基因, KCo5, 如 Fishwild 等 (25) 所述。该小鼠种系还携带一个人重链转染色体, 其包括染色体 14 的片段 hCF(SC20), 如 WO 02/43478 所述。

[0166] 来自这些转基因小鼠的脾细胞可用于根据众所周知的技术产生分泌人单克隆抗体的杂交瘤。这些转基因非人类动物、包含编码表达本发明所用抗体的可操作核酸序列的非人类动物、用一个或多个编码靶标的核酸序列稳定转染的非人类动物等, 是本发明的额外特征。

[0167] 本发明使用的人单克隆或多克隆抗体或者本发明使用的来源于其它物种的抗体, 还可以用转基因方式来产生, 其是通过产生另一种用目的免疫球蛋白重链和轻链序列转基因的非人类哺乳动物或植物, 并由所述动物或植物生产可回收的形式的抗体。就哺乳动物中的转基因生产而言, 抗体可以在山羊、牛或其他哺乳动物的奶中产生并回收。见例如 US 5, 827, 690、US 5, 756, 687、US 5, 750, 172 和 US 5, 741, 957。

[0168] 进一步, 本发明使用的人类或其它抗体可以通过展示型 (display-type) 技术产生, 这类技术包括但不限于噬菌体展示、逆转录病毒展示、核糖体展示和其它技术, 使用本领域众所周知的技术, 并且可以对所得的分子进行额外的突变, 例如亲和性突变, 因为这些技术是本领域熟知的 (见例如参考文献 27, 28 和 30 (噬菌体展示), 29 (核糖体展示), 31-35 和 US 5, 733, 743)。如果使用展示技术产生非人类抗体, 则这些抗体可以被来源化。

[0169] 如上文解释的, 在一些实施方案中, 本发明方法中使用的第一和 / 或第二抗体是 IgG4 抗体。然而, 本发明使用的抗体理论上可以是任何同种型, 只要 CH3 区中的序列允许半分子交换即可。例如, 本发明方法中使用或获得的抗体可以包括在 SEQ ID NO : 19-22 中显示的任何恒定区序列 (在任何指明的突变位置之外)。

[0170] 因此, 在本发明的一个实施方案中, 第一和 / 或第二抗体在核心铰链区中包含 CPPC 序列。在另一个实施方案中, 第一和 / 或第二抗体包含 IgG4- 样核心铰链区。例如, 在

一些实施方案中,所述第一和/或第二抗体是在核心铰链区中包含 CX_1X_2C 序列的抗体,其中 X_1 和 X_2 可以是任何氨基酸,但 X_1 和 X_2 不能都是脯氨酸。在另一个实施方案中,所述第一和/或第二抗体是在核心铰链区中包含 CX_3PC 或 CPX_3C 序列的抗体,其中 X_3 可以是除脯氨酸之外的任何氨基酸。在进一步的实施方案中,所述第一和/或第二抗体是在核心铰链区中包含 $CSPC$ 、 $CPSC$ 、 $CRPC$ 、 $CPRC$ 、 $CGHC$ 或 $CPHC$ 序列的抗体。上述突变可以通过例如本领域众所周知的定点突变来引入。

[0171] 同种型的选择通常由期望的效应功能(例如CDC诱导作用或ADCC中的活性)来指导。同种型的实例包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4(见例如SEQ ID NO:19-22)。可以使用人轻链恒定区kappa或lambda中的任何一种。如果希望的话,本发明使用的抗体类型可以通过已知的方法加以转换。例如,本发明使用的原本为IgM、IgG1或IgG2的抗体可以被类型转换为本发明的IgG4抗体。因此,本发明抗体的效应物功能可以通过同种型转换而变为例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM抗体,用于各种治疗用途。

[0172] 在一个实施方案中,本发明使用的第一和/或第二抗体是全长抗体。在另一个实施方案中,本发明使用的第一和/或第二抗体是抗体片段。

[0173] 在本发明的方法的一个实施方案中,第一和/或第二抗体包含IgG4CH3区,例如具有图18所示序列(SEQ ID NO:22)的IgG4CH3区。

[0174] 然而,在本发明的方法的另一个实施方案中,第一和/或第二抗体包含非IgG4同种型的CH3区,其中该CH3区不包含,或者经过了修饰而不包含任何这样的氨基酸残基:所述氨基酸残基可以参与和包含相同的CH3区氨基酸序列的其它肽形成二硫键或者共价的或稳定非共价的重链间键。

[0175] 例如,在此处的一个进一步的实施方案中,第一和/或第二抗体包含具有图18所示序列(SEQ ID NO:19)的CH3区,其中该CH3区已被修饰从而发生了一种或多种如下的氨基酸替换:238位的Arg(R)已被Gln(Q)取代;239位的Asp(D)已被Glu(E)取代;292位的Lys(K)已被Arg(R)取代;302位的Gln(Q)已被Glu(E)取代;和328位的Pro(P)已被Leu(L)取代。

[0176] 在一个优选实施方案中,第一和/或第二抗体包含具有如图18所示序列(SEQ ID NO:19)的CH3区,其中292位的Lys(K)已被Arg(R)取代。

[0177] 在另一个实施方案中,第一和/或第二抗体包含具有如图18所示序列(SEQ ID NO:19)的CH3区,但是其中292位的Lys(K)已被Tyr(W)或Phe(F)取代。

[0178] 在另一个进一步的实施方案中,第一和/或第二抗体包含具有如图18所示序列(SEQ ID NO:20)的CH3区,其中CH3区已被修饰从而发生了下列氨基酸替换中的一种或多种或者全部5种:234位的Arg(R)已被Gln(Q)取代;276位的Met(M)已被Val(V)取代;288位的Lys(K)已被Arg(R)取代;298位的Gln(Q)已被Glu(E)取代;和324位的Pro(P)已被Leu(L)取代。

[0179] 在一个优选的实施方案中,第一和/或第二抗体包含具有如图18所示序列(SEQ ID NO:20)的CH3区,其中234位的Arg(R)已被Gln(Q)取代。

[0180] 在一个进一步优选的实施方案中,第一和/或第二抗体包含具有如图18所示序列(SEQ ID NO:20)的CH3区,其中234位的Arg(R)已被Gln(Q)取代;且324位的Pro(P)已被Leu(L)取代。

[0181] 在另一个进一步的实施方案中,第一和 / 或第二抗体包含具有如图 18 所示序列 (SEQ ID NO :21) 的 CH3 区,其中 CH3 区已被修饰从而发生了下列氨基酸替换中的一种或多种或全部 10 种 :285 位的 Arg(R) 已被 Gln(Q) 取代 ;314 位的 Ser(S) 已被 Asn(N) 取代 ;322 位的 Asn(N) 已被 Lys(K) 取代 ;327 位的 Met(M) 已被 Val(V) 取代 ;339 位的 Lys(K) 已被 Arg(R) 取代 ;349 位的 Gln(Q) 已被 Glu(E) 取代 ;352 位的 Ile(I) 已被 Val(V) 取代 ;365 位的 Arg(R) 已被 His(H) 取代 ;366 位的 Phe(F) 已被 Tyr(Y) 取代 ;和 375 位的 Pro(P) 已被 Leu(L) 取代。

[0182] 在一个优选实施方案中,第一和 / 或第二抗体包含具有如图 18 所示序列 (SEQ ID NO :21) 的 CH3 区,其中 285 位的 Arg(R) 已被 Gln(Q) 取代。

[0183] 在一个优选的实施方案中,第一和 / 或第二抗体包含具有如图 18 所示序列 (SEQ ID NO :21) 的 CH3 区,其中 285 位的 Arg(R) 已被 Gln(Q) 取代 ;且 375 位的 Pro(P) 已被 Leu(L) 取代。

[0184] 在本发明方法的一个进一步的实施方案中,所述第一抗体在核心铰链区中包含 CPPC 并包含 IgG4- 样 CH3 区,且其中所述第二抗体在核心铰链区中包含 CPPC 并包含 IgG4- 样 CH3 区。

[0185] 如上文解释的,在一个主要方面中,本发明涉及一种用于产生双特异性抗体的体外方法,所述方法包括如下步骤 :

[0186] a) 提供具有第一结合特异性的第一抗体,其中所述第一抗体包含 IgG4- 样 CH3 区,

[0187] b) 提供具有不同于所述第一结合特异性的第二结合特异性的第二抗体,其中所述第二抗体包含 IgG4- 样 CH3 区,

[0188] c) 在允许核心铰链区中的半胱氨酸发生二硫键异构化的还原条件下共同温育所述第一和第二抗体,和

[0189] d) 获得双特异性抗体。

[0190] 在本发明方法的一个实施方案中,选择步骤 c) 中的条件,使得核心铰链区之外不发生显著的二硫桥还原或异构化。

[0191] 在另一个实施方案中,步骤 c) 中的还原条件是这样的条件 :所述条件刺激核心铰链区的进行二硫键交换的内在活性。

[0192] 在本发明进一步的实施方案中,步骤 c) 包括还原剂的添加。在进一步的实施方案中,步骤 c) 包括添加一种从下组选出的作用剂 :谷胱甘肽、L-半胱氨酸、二硫苏糖醇、 β -巯基乙醇和半胱胺 (cysteamine)。

[0193] 在本发明的方法的一个实施方案中,所述作用剂的浓度使得步骤 c) 中产生的溶液的氧化还原势等于 (equal to) 或者还原性更高于 (more reducing than) 在实施例 31 所述的条件下由 $1 \mu\text{M}$ 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于在实施例 31 所述的条件下由 $10 \mu\text{M}$ 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 $50 \mu\text{M}$ 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 0.1mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势。

[0194] 在进一步的实施方案中,所述作用剂的浓度使得步骤 c) 中产生的溶液的氧化还原势

[0195] - 等于或者还原性更高于在实施例 31 所述的条件下由 $1 \mu\text{M}$ 谷胱甘肽产生的氧化

还原势,例如等于或者还原性更高于在实施例 31 所述的条件下由 10 μ M 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 50 μ M 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 0.1mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势。且

[0196] - 等于或者还原性低于 (less reducing than) 在实施例 31 所述的条件下由 1M 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性低于由 100mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势,等于或者还原性低于由 15mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势。

[0197] 在一个实施方案中,其中第一抗体在核心铰链区中具有 CPPC 序列且 / 或第二抗体在核心铰链区中具有 CPPC 序列,优选的是,在步骤 c) 中产生的溶液的氧化还原势等于或者还原性更高于在实施例 35 所述的条件下由 1mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 2mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 4mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 6mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 8mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 10mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势。

[0198] 在进一步的实施方案中,所述还原剂的浓度使得步骤 c) 中产生的溶液的氧化还原势

[0199] - 等于或者还原性更高于在实施例 35 所述的条件下由 1mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 2mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 4mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 6mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 8mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由 10mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势,且

[0200] - 等于或者还原性更低于由 1M 谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性低于由 100mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势,等于或者还原性低于由 15mM 谷胱甘肽产生的氧化还原势。

[0201] 在本发明方法的一个实施方案中,步骤 c) 包括将所述抗体在还原型谷胱甘肽的存在下在 20°C 或更高的温度下,例如在 37°C 下,温育至少一个小时,例如至少 2 个小时,例如至少 5 个小时,例如至少 10 个小时。

[0202] 在本发明方法的进一步的实施方案中,选择步骤 c) 中的条件,使得用本文所述的大小排阻色谱进行确定时(其中先于起始材料的抗体洗脱的峰表示聚集物的形成),在所得的组合物中有少于 10%,例如少于 5%,例如少于 2%,例如少于 1% 的抗体分子处于聚集状态。

[0203] 在本发明的体外方法的一个实施方案中,该方法包括添加具有蛋白质二硫键异构酶活性的蛋白质,例如 PDI。在本发明的体外方法的另一个实施方案中,该方法不包括添加具有蛋白质二硫键异构酶活性的蛋白质,例如 PDI。

[0204] 在本发明的体外方法的一个实施方案中,该方法不包括添加活细胞或细胞提取物。

[0205] 如上文解释的,本发明方法中使用的第一和第二抗体在结合特异性方面有不同,即结合不同的表位。原则上,任何特异性的组合 (any combination of specificities) 均可用作本发明方法的起始材料。另外,本发明的方法并不限于仅以两种不同的抗体作为起始材料。因此,本发明的方法还可以用三种或更多种抗体作为起始材料来实施。在这样的

实施方案中,本发明方法的步骤 d) 中获得的组合物可以含有多种双特异性抗体。

[0206] 在本发明方法的一个实施方案中,第一抗体具有针对肿瘤细胞或肿瘤细胞蛋白,例如 erbB1、erbB2、erbB3、erbB4、MUC-1、CD19、CD20、CD4、CD38 或 CXCR5,或者针对 B 细胞受体信号成分 CD79a 或 CD79b,的结合特异性。在另一个实施方案中,第一抗体具有针对肿瘤细胞或肿瘤细胞蛋白,例如 erbB1、erbB2、erbB3、erbB4、MUC-1、CD19、CD20、CD4、CD38 或 CXCR5,的结合特异性;而第二抗体具有针对肿瘤细胞蛋白,例如 erbB1、erbB2、erbB3、erbB4、MUC-1、CD19、CD20、CD4 或 CXCR5,的结合特异性。

[0207] 在一个进一步的实施方案中,第一抗体具有针对 erbB1 的结合特异性,而第二抗体具有针对 erbB2 的结合特异性。

[0208] 在另一个实施方案中,第一抗体具有针对 CD19 的结合特异性,而第二抗体具有针对 CD20 的结合特异性。

[0209] 在一个进一步的实施方案中,第一抗体具有针对 CD38 的结合特异性,而第二抗体具有针对 CD34 的结合特异性。

[0210] 在一个更进一步的实施方案中,第一抗体具有针对 CD4 的结合特异性,而第二抗体具有针对 CXCR5 的结合特异性。

[0211] 在本发明方法的另一个实施方案中,第一抗体具有针对病原微生物的结合特异性。在一个进一步的实施方案中,第一抗体具有针对病原微生物的结合特异性,而第二抗体具有针对效应细胞蛋白,例如 CD3、CD25、CD28、CD16、CD89、CD32 或 CD1,的结合特异性。

[0212] 双特异性抗体还可以用于将化疗剂更特异性地靶定到该药剂要作用的细胞。因此,在本发明方法的进一步实施方案中,第一抗体具有针对肿瘤细胞或肿瘤细胞蛋白,例如 erbB1、erbB2、erbB3、erbB4、MUC-1、CD19、CD20、CD4 或 CXCR5,的结合特异性,而第二抗体具有针对化疗剂的结合特异性。

[0213] 此外,通过使双特异性抗体包含针对血清蛋白质的结合特异性,可以改变抗体的血清半衰期。例如,可以通过使双特异性抗体包含针对血清白蛋白的结合特异性而延长血清半衰期。因此,在本发明方法的一个进一步的实施方案中,第一抗体具有针对肿瘤细胞或肿瘤细胞蛋白,例如 erbB1、erbB2、erbB3、erbB4、MUC-1、CD19、CD20、CD4 或 CXCR5,的结合特异性,而第二抗体具有针对血液蛋白,例如血清白蛋白,的结合特异性。

[0214] 第二结合特异性还可用于将抗体靶定到特定的组织,例如脑或肝脏。因此,在本发明方法的一个进一步的实施方案中,第一抗体具有针对肿瘤细胞或肿瘤细胞蛋白,例如 erbB1、erbB2、erbB3、erbB4、MUC-1、CD19、CD20、CD4 或 CXCR5,的结合特异性,而第二抗体具有针对脑蛋白如铁传递蛋白,或肝蛋白的结合特异性。

[0215] 而且,第二结合特异性可用于将凝血因子靶定到特定的期望作用位点。例如,具有针对肿瘤细胞的第一结合特异性和针对凝血因子的第二结合特异性的双特异性抗体能够将凝血作用导向肿瘤,从而制止肿瘤生长。因此,在本发明方法的一个进一步实施方案中,第一抗体具有针对肿瘤细胞或肿瘤细胞蛋白,例如 erbB1、erbB2、erbB3、erbB4、MUC-1、CD19、CD20、CD4 或 CXCR5,的结合特异性,第二抗体具有针对参与凝血作用的蛋白,例如组织因子,的结合特异性。

[0216] 在本发明进一步的实施方案中,第一和 / 或第二抗体与从下组选出的化合物相连:细胞毒剂;放射性同位素;前药或药物,例如紫杉烷;细胞因子;趋化因子和补体,例如

C1q。这些化合物可以使针对靶细胞的杀伤更有效,例如在癌症治疗中。或者,可以将化合物与所得的双特异性抗体偶联,即在发生了半分子交换之后偶联。

[0217] 在本发明方法的进一步的实施方案中,该方法还包括使步骤 c) 中获得的化合物处于非还原或还原性较低条件下,以便终止进一步的半分子交换。这可以通过本领域已知的各种方法实现,例如对所得组合物进行透析或者基于大小的色谱,以除去小分子还原剂。

[0218] 在本发明方法的更进一步的实施方案中,通过进行两个半分子的化学交联使所得的双特异性抗体稳定化,从而阻止任何进一步的交换的发生,即便该双特异性抗体随后被用于本会使抗体发生半分子交换的条件,例如体内条件。因此,在一个实施方案中,本发明的方法包括进一步的步骤:

[0219] a) 使较链区中的半胱氨酸化学交联,例如通过使用含有马来酰亚胺的化合物,例如双马来酰亚胺己烷 (bis-maleimidohexane),

[0220] b) 使半分子上的碳水化合物侧链化学交联,例如通过高碘酸盐 (periodate) 氧化,随后使醛基与合适的交联剂如己二酸二酰肼 (adipinedihydrazide) 反应,

[0221] 或

[0222] c) 使 CH3 区中不对称引入的半胱氨酸交联,例如以 Merchant 等 (36) 一文 (本文通过提述纳入该文) 中描述的方式,例如使用一种或多种如下的组合 (援引 SEQ ID NO:19):

[0223] - 第一抗体中的 D282C 与第二抗体中的 K275C,

[0224] - 第一抗体中的 D282S 与第二抗体中的 K275S,

[0225] - 第一抗体中的 Y232C 与第二抗体中的 S237C,

[0226] - 第一抗体中的 Y232C 与第二抗体中的 D239C,

[0227] - 第一抗体中的 Y232C 与第二抗体中的 E240C,

[0228] - 第一抗体中的 L234C 与第二抗体中的 S237C,

[0229] - 第一抗体中的 T277C 与第二抗体中的 V280C,

[0230] - 第一抗体中的 V280C 与第二抗体中的 K275C,

[0231] 在进一步的方面中,本发明涉及使通过交联方法,例如上述三种交联方法中的任何一种,获得的或者可以获得的稳定化的双特异性抗体。

[0232] 不论所得的双特异性抗体是否已通过交联被稳定化,本发明的方法,在一些实施方案中,可以进一步包含纯化双特异性抗体的步骤。含有双特异性抗体的混合物可以用标准色谱技术加以纯化,例如 (但不限于) 标准蛋白 A 色谱,蛋白 G,蛋白 L,阳离子/阴离子交换色谱,大小排阻色谱,疏水相互作用色谱,嗜硫 (thiophilic) 色谱,或使用旨在用于捕获 IgG 分子的配体 (蛋白 A 模拟物, Llama V_{HH} 配体等)。或者,可以用标准技术沉淀 IgG 混合物,例如盐促沉淀 (硫酸铵),添加有机溶剂 (DMSO, 乙醇),改变 pH 或非离子聚合物 (聚乙二醇)。在另一种情境下,可以使用能浓集 IgG 分子的膜用过滤技术处理混合物。为了将双特异性抗体纯化到完全同质,可能需要将所有这些技术组合使用,因为某些混合物可能仍然含有非常接近于 (next to) 双特异性抗体的亲本 IgG 分子。然后可能需要额外的纯化步骤以将双特异性抗体与亲本单特异性 IgG 分子分离开来。这可以通过,例如,先使用针对第一结合亲和特异性的亲和柱进行结合和洗脱,然后使用针对第二结合特异性的亲和柱进行结合和洗脱的纯化方法来实现。在一个优选的实施方案中,特别是在没有实施化学交联

的情况下,纯化在可防止进一步半分子交换的条件,例如非还原条件下进行。

[0233] (纯化的)双特异性抗体的数量、质量和纯度可以用常规的生物化学技术加以分析,这些技术例如吸附测量、HP-SEC、SDS-PAGE、非变性PAGE和RP-HPLC。能够区分双特异性抗体与亲本IgG分子的技术是特别感兴趣的。这些技术的实例包括(但不限于)IEF、cIEF、CIEX和质谱(ESI、MALDI),它们可以基于电荷和/或质量高精度地分离和检测分子。双特异性抗体的双重结合特异性可以用多种不同的结合测定模式进行估计,例如使用ELISA、RIA、表面等离子体共振(SPR)、生物膜层干扰测定(Boi-layer Interferometry)技术、DELFI A、FRET、ECL、Gyros和AlfaScreen。

[0234] 在一个实施方案中,半分子交换可以在有利于形成针对两种目的抗原之一的双特异性抗体的条件下实施。例如,考虑针对抗原X和Y的抗体。如果用过量的针对抗原X的抗体实施交换,例如5倍过量或10倍过量,那么大多数或者全部针对抗体Y的抗体将变成双特异性(即识别抗原X和Y)。

[0235] 在这个步骤之后,可以在基质固定的抗原Y和亲和柱色谱上对双特异性抗体进行纯化。被结合的抗体中高度富集了期望的双特异性抗体。未结合的针对抗原X的抗体可用于重复上述循环。

[0236] 在需要稳定化以防止体内交换的情况下,可以如上所述地对双特异性抗体进行交联。在化学交联之后,可以通过用过量的针对抗原Z的抗体进行额外的交换反应,随后用固定在基质上的抗原Z吸附含有抗Z的抗体(例如通过亲和柱色谱),将未稳定化的抗体从稳定化的抗体中纯化出来。这样,未结合的组分将含有期望的稳定化双特异性抗体。

[0237] 在本发明方法的一个更进一步的实施方案中,该方法还包括将所得的双特异性抗体配制供治疗应用的步骤。这包括将治疗有效量的双特异性抗体配制在适于人体使用,特别是适合于肠胃外给药,例如静脉内注射的水溶液中。

[0238] 在进一步的方面中,本发明涉及一种产生双特异性抗体的体外方法,所述方法包括如下步骤:

[0239] a) 提供具有第一结合特异性的第一抗体,其中所述第一抗体包含核心铰链区中的CPPC序列,以及IgG4-样CH3区,

[0240] b) 提供具有不同于所述第一结合特异性的第二结合特异性的第二抗体,其中所述第二抗体包含核心铰链区中的CPPC序列,以及IgG4-样CH3区,和

[0241] c) 在允许核心铰链区中的半胱氨酸发生二硫键异构化的还原条件下共同温育所述第一和第二抗体,和

[0242] d) 获得双特异性抗体。

[0243] 优选地,在步骤c)中已经添加了还原剂,其中该作用剂的浓度使得步骤c)中产生的溶液的氧化还原势等于或者还原性更高于在实施例35所述的条件下由1mM谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由2mM谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由4mM谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由6mM谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由8mM谷胱甘肽产生的氧化还原势,例如等于或者还原性更高于由10mM谷胱甘肽产生的氧化还原势。

[0244] 在一个进一步的方面中,本发明涉及一种组合物,其包含通过本文所述任何一种本发明方法获得或可以获得的双特异性抗体。

[0245] 在另一个的主要方面中,本发明涉及一种分离的双特异性抗体,其包含两个 IgG4-样 CH3 区。

[0246] 在一个实施方案中,所述抗体在核心铰链区中包含一个或两个 CPPC 序列。

[0247] 在另一个实施方案中,所述抗体在核心铰链区中包含一个或两个 CX₁X₂C 序列,其中 X₁和 X₂可以是任何氨基酸,但 X₁和 X₂不能都是脯氨酸。

[0248] 在一个进一步的实施方案中,所述抗体在核心铰链区包含一个或两个 CX₃PC 或 CPX₃C 序列,其中 X₃可以是除脯氨酸之外的任何氨基酸。

[0249] 在一个更进一步的实施方案中,所述抗体在核心铰链区包含一个或两个 CSPC、CPSC、CRPC 或 CPRC 序列。

[0250] 在所述分离的双特异性抗体的一些实施方案中,第一和 / 或第二 CH3 区属于非 IgG4 同种型,其中该 CH3 序列不包含,或经过修饰而不包含,任何这样的氨基酸残基:所述氨基酸残基可以参与和包含相同 CH3 区氨基酸序列的其它肽形成二硫键或共价或稳定的非共价重链间键。

[0251] 在其一个进一步的实施方案中,第一和 / 或第二 CH3 区具有如图 18 中所示的序列 (SEQ ID NO:19),其中该 CH3 区已被修饰从而发生了一种或多种如下的氨基酸替换:238 位的 Arg(R) 已被 Gln(Q) 取代;239 位的 Asp(D) 已被 Glu(E) 取代;292 位的 Lys(K) 已被 Arg(R) 取代;302 位的 Gln(Q) 已被 Glu(E) 取代;和 328 位的 Pro(P) 已被 Leu(L) 取代。

[0252] 在另一个进一步的实施方案中,所述第一和 / 或第二 CH3 区具有如图 18 中所示的序列 (SEQ ID NO:20),其中该 CH3 区已被修饰从而发生了一种或多种如下的氨基酸替换:234 位的 Arg(R) 已被 Gln(Q) 取代;276 位的 Met(M) 已被 Val(V) 取代;288 位的 Lys(K) 已被 Arg(R) 取代;298 位的 Gln(Q) 已被 Glu(E) 取代;和 324 位的 Pro(P) 已被 Leu(L) 取代。

[0253] 在一个更进一步的实施方案中,所述第一和 / 或第二 CH3 区具有如图 18 中所示的序列 (SEQ ID NO:21),其中该 CH3 区已被修饰从而发生了一种或多种如下的氨基酸替换:285 位的 Arg(R) 已被 Gln(Q) 取代;314 位的 Ser(S) 已被 Asn(N) 取代;322 位的 Asn(N) 已被 Lys(K) 取代;327 位的 Met(M) 已被 Val(V) 取代;339 位的 Lys(K) 已被 Arg(R) 取代;349 位的 Gln(Q) 已被 Glu(E) 取代;352 位的 Ile(I) 已被 Val(V) 取代;365 位的 Arg(R) 已被 His(H) 取代;366 位的 Phe(F) 已被 Tyr(Y) 取代;375 位的 Pro(P) 已被 Leu(L) 取代。

[0254] 在一个更进一步的实施方案中,本发明抗体的第一和 / 或第二 CH3 区是 IgG4CH3 区。

[0255] 在一个更进一步的方面中,本发明涉及一种组合物,例如包含本发明的双特异性抗体或者通过如上所述的任何一种本发明的方法获得或者可以获得的双特异性抗体的药物组合物,其用于作为药物,例如用于治疗癌症或感染性疾病的药物。

[0256] 在一个更进一步的方面中,本发明涉及包含本发明的双特异性抗体或者通过如上所述的任何一种本发明的方法获得或者可以获得的双特异性抗体的组合物用于制备治疗癌症或感染性疾病的药剂的用途。

[0257] 本发明的方法还可用于选择特别令人感兴趣的或有效的靶结合特异性组合 (combination of target binding specificities)。例如使用本发明的方法,可以由一系列具有不同结合特异性的抗体制备一系列或“阵列” (matrix) 不同的双特异性抗体。然后可以测试所得的双特异性抗体系列或阵列的期望的生物学性质,从而选择出最佳的组合。

[0258] 因此,在一个更进一步的方面中,本发明涉及一种用于选择具有期望性质的双特异性抗体的方法,所述方法包括如下步骤:

[0259] a) 提供一系列抗体,其中每种抗体均具有不同的靶点特异性 (each antibody has a different target specificity),并且其中每种抗体均包含 IgG4-样 CH3 区,

[0260] b) 将所述系列中的每种抗体与所述系列中的另一种抗体在还原条件下一起进行温育,从而产生一系列的抗体混合物,其中每种混合物均包含不同的双特异性抗体 (each mixture contains a different bispecific antibody),

[0261] c) 测定所得系列抗体混合物的给定的期望性质,和

[0262] d) 选择具有所述期望性质的双特异性抗体混合物。

[0263] 上述方法中的步骤 b) 可以按照上文关于步骤 c) 的描述加以实施。

[0264] 在一个实施方案中,所测试的期望性质是肿瘤细胞杀伤。

[0265] 参考文献

[0266] 1. Aalberse, R. C., R. van der Gaag, and J. van Leeuwen. 1983. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J Immunol* 130 :722.

[0267] 2. van der Zee, J. S., P. van Swieten, and R. C. Aalberse. 1986. Serologic aspects of IgG4 antibodies. II. IgG4 antibodies form small, nonprecipitating immune complexes due to functional monovalency. *J Immunol* 137 : 3566.

[0268] 3. Schuurman, J., R. Van Ree, G. J. Perdok, H. R. Van Doorn, K. Y. Tan, and R. C. Aalberse. 1999. Normal human immunoglobulin G4 is bispecific: it has two different antigen-combining sites. *Immunology* 97 :693.

[0269] 4. Aalberse, R. C., and J. Schuurman. 2002. IgG4 breaking the rules. *Immunology* 105 :9.

[0270] 5. Aalberse, R. C., J. Schuurman, and R. van Ree. 1999. The apparent monovalency of human IgG4 is due to bispecificity. *Int Arch Allergy Immunol* 118 :187.

[0271] 6. Schuurman, J., G. J. Perdok, A. D. Gorter, and R. C. Aalberse. 2001. The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds. *Mol Immunol* 38 :1.

[0272] 7. Bloom, J. W., M. S. Madanat, D. Marriott, T. Wong, and S. Y. Chan. 1997. Intrachain disulfide bond in the core hinge region of human IgG4. *Protein Sci* 6 : 407.

[0273] 8. Gregory, L., K. G. Davis, B. Sheth, J. Boyd, R. Jefferis, C. Nave, and D. R. Burton. 1987. The solution conformations of the subclasses of human IgG deduced from sedimentation and small angle X-ray scattering studies. *Mol Immunol* 24 :821.

[0274] 9. Deng, L., D. Wylie, Y. S. Tsao, B. Larkin, M. Voloch, and W. L. Ling. 2004. Detection and quantification of the human IgG4 half-molecule, HL, from unpurified cell-culture supernatants. *Biotechnol Appl Biochem* 40 :261.

- [0275] 10. Marcin and Zhu(2005)Acta Pharmacol Sin. 26 :649
- [0276] 11. Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W. , ed. , 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989))
- [0277] 12. Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)
- [0278] 13. Kabat et al. , Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)
- [0279] 14. Kohler et al. , Nature 256, 495 (1975)
- [0280] 15. Clackson et al. , Nature 352, 624-628 (1991)
- [0281] 16. Marks et al. , J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)
- [0282] 17. Lonberg, N. et al. , Nature 368, 856-859 (1994)
- [0283] 18. Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994)
- [0284] 19. Lonberg, N. and Huszar, D. , Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995)
- [0285] 20. Harding, F. and Lonberg, N. Ann. N. Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)).
- [0286] 21. Taylor, L. et al. , Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992)
- [0287] 22. Chen, J. et al. , International Immunology 5, 647-656 (1993)
- [0288] 23. Tuailon et al. , J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994)
- [0289] 24. Taylor, L. et al. , International Immunology 6, 579-591 (1994)
- [0290] 25. Fishwild, D. et al. , Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)
- [0291] 26. Chen et al. , EMBO J. 12, 821-830 (1993)
- [0292] 27. Hoogenboom et al. , J. Mol. Biol. 227, 381 (1991)
- [0293] 28. Vaughan et al. , Nature Biotech 14, 309 (1996)
- [0294] 29. Hanes and Pluchthau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997)
- [0295] 30. Parmley and Smith, Gene 73, 305-318 (1988)
- [0296] 31. Scott TIBS 17, 241-245 (1992)
- [0297] 32. Cwirla et al. , PNAS USA 87, 6378-6382 (1990)
- [0298] 33. Russel et al. , Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993),
- [0299] 34. Hoogenboom et al. , Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992)
- [0300] 35. Chiswell and McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992)
- [0301] 36. Merchant et al. (1998) Nature Biotech 16 :677-681
- [0302] 37. Sambrook, Russell et al. 2000 Molecular cloning. A laboratory manual (third edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [0303] 38. Akkerdaas, van Ree et al. 1995 Allergy 50 (3), 215-220
- [0304] 39. de Groot et al. 1988 J. Allergy Clin. Immunol. 82, 778
- [0305] 进一步通过如下的实施例进行举例说明本发明, 这些实施例不应理解为对本发明的进一步限制。

实施例

- [0306] 实施例 1 :寡核苷酸引物和 PCR 扩增
- [0307] 寡核苷酸引物由 Isogen Bioscience (Maarssen, 荷兰) 合成并定量。引物在 H₂O

中溶解为 100pmol/ μ l, 并保存于 -20°C 。下面给出了全部 PCR 引物和测序引物的汇总。PCR 根据制造商的说明使用 **PfuTurbo®** Hotstart DNA 聚合酶 (Stratagene, Amsterdam, 荷兰)。每个反应混合物含有 200 μ M 混合 dNTP (Roche Diagnostics, Almere, 荷兰), 正向和反向引物各 6.7pmol, 100ng 基因组 DNA 或 1ng 质粒 DNA, 和 1 单位 **PfuTurbo®** Hotstart DNA 聚合酶, 溶于总体积 20 μ l 的 PCR 反应缓冲液 (与聚合酶一起提供) 中。PCR 反应使用 TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, 德国), 进行 32 个循环的程序: 95°C 变性 2min、 95°C 30sec、 $60-70^{\circ}\text{C}$ 梯度 (或另一特定退火温度) 30sec、和 72°C 3min 共 30 个循环; 最后在 72°C 延伸 10min。如果合适, 将 PCR 混合物保存于 4°C 直至进一步的分析或处理。

[0308] 实施例 2: 琼脂糖凝胶电泳

[0309] 琼脂糖凝胶电泳根据 Sambrook (37) 使用 50ml 凝胶在 1x Tris 乙酸 EDTA 缓冲液中进行。通过在凝胶中掺入溴化乙锭, 并在 UV 光下进行观察来使 DNA 可视化。使用 CCD 相机和图像分析系统 (GeneGnome; Syngene, via Westburg B. V., Leusden, 荷兰) 记录凝胶图像。

[0310] 实施例 3: PCR 产物的分析、纯化及酶解

[0311] 使用 MinElute PCR 提纯试剂盒 (Qiagen, via Westburg, Leusden, 荷兰; 产品号 28006) 根据制造商的使用说明提纯期望 PCR 片段。用 UV 分光光度计定量分离的 DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳估计品质。

[0312] 或者, 使用 1% Tris 乙酸 EDTA 琼脂糖凝胶进行琼脂糖凝胶电泳来分离 PCR 或消化产物 (例如当存在多种片段时), 将期望的片段从凝胶中切下, 用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒 (Qiagen; 产品编号 20051) 根据制造商的使用说明进行回收。

[0313] 实施例 4: 通过 UV 分光光度计对 DNA 进行定量

[0314] 用 NanoDrop ND-1000 分光光度计 (Isogen Life Science, Maarssen, 荷兰) 根据制造商的使用说明测定核酸的光密度。通过分析 260nm 的光密度 (OD) ($10D_{260\text{nm}}$ 单位 = $50 \mu\text{g/ml}$) 来测量 DNA 的浓度。对于所有样品, 使用溶解核酸的缓冲液作为参考。

[0315] 实施例 5: 限制性酶消化

[0316] 限制酶和补充材料系从 New England Biolabs (Beverly, MA, USA) 或 Fermentas (Vilnius, 立陶宛) 获得, 并根据制造商的使用说明来使用。

[0317] 在最终体积为 10 μ l (反应体积视需要比例放大) 的合适缓冲液中使用 5 单位的酶消化 DNA (100ng)。将消化体系在推荐的温度下温育至少 60min。对于需要使用不相容的缓冲液或不同温度要求的限制酶进行双重消化的片段, 顺次进行消化。如果需要, 通过琼脂糖凝胶电泳和凝胶提取对消化产物进行纯化。

[0318] 实施例 6: DNA 片段的连接

[0319] 用 Quick Ligation Kit (New England Biolabs) 根据制造商的使用说明进行 DNA 片段的连接。对于每个连接体系, 将载体 DNA 与大约 3 倍摩尔过量的插入 DNA 进行混合。

[0320] 实施例 7: 大肠杆菌 (E. coli) 的转化

[0321] 根据制造商的说明使用热激法将质粒 DNA (1-5 μ l DNA 溶液, 通常为 2 μ l DNA 连接混合物) 转化到 One Shot DH5 α -T1^R 或 MACH-1T1^R 感受态大肠杆菌细胞 (Invitrogen, Breda, 荷兰; 产品编号 12297-016) 中。接着, 将细胞涂布在含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的

Luria-Bertani (LB) 琼脂平板上。平板在 37°C 温育 16-18h, 直到细菌菌落变得明显。

[0322] 实施例 8 : 通过 PCR 筛选细菌菌落

[0323] 使用 HotStarTaq Master Mix 试剂盒 (Qiagen ; 产品编号 203445) 和合适的正向和反向引物 (附录 1), 通过菌落 PCR 筛选细菌菌落中含有期望序列的载体的存在。用 20 μ l 吸液管尖端轻轻碰触所选克隆, 并 2ml LB 中短暂碰触以进行小量培养, 然后重新悬浮在 PCR 混合物中。PCR 使用 TGradientThermocycler 96, 使用 35 个循环的程序 : 95°C 变性 15min ; 35 个循环的 94°C 30sec、55°C 30sec、和 72°C 2min ; 然后在 72°C 进行 10min 的最终延伸步骤。如果合适, 将 PCR 混合物保存于 4°C 直至通过琼脂糖凝胶电泳进行分析。

[0324] 实施例 9 : 从大肠杆菌培养物分离质粒 DNA

[0325] 使用下列的 Qiagen 产试剂盒 (购自 Westburg, Leusden, 荷兰) 根据制造商的说明从大肠杆菌培养物分离质粒 DNA。对于大量质粒制备 (50-150ml 培养物), 使用 HiSpeed Plasmid Maxi 试剂盒 (产品编号 12663) 或 HiSpeedPlasmid Midi 试剂盒 (产品编号 12643)。对于小量质粒制备 (\pm 2ml 培养物), 使用 Qiaprep Spin Miniprep 试剂盒 (产品编号 27106), 将 DNA 洗脱于 50 μ l 洗脱缓冲液 (与试剂盒一起提供) 中。

[0326] 实施例 10 : DNA 测序

[0327] 质粒 DNA 用本领域已知的标准程序进行测序。使用 Vector NTI 软件 (Informax, Oxford, UK) 进行序列分析。

[0328] 实施例 11 : 在 HEK-293F 细胞中瞬时表达

[0329] 从 Invitrogen 获得 Freestyle™ 293-F (一种适于悬浮生长和化学限定 Freestyle 培养基的 HEK-293 亚克隆, 例如 HEK-293F) 细胞, 并用 293fectin (Invitrogen) 根据制造商的规程进行转染。

[0330] 实施例 12 : pTomG4, 一种用于表达可变重链区和人 IGG4 恒定区的载体, 的构建

[0331] 从一名志愿者血液样品中分离基因组 DNA, 用其作为模板, 使用引物 IGG4gene2f 和 IGG4gene2r (见下表) PCR 扩增 IgG4 重链的完整基因组恒定区, 同时引入合适的用于克隆进入哺乳动物表达载体 pEE6.4 (LonzaBiologics) 的限制位点。对 PCR 片段进行纯化并克隆到 pEE6.4 中。为此, 用 HindIII 和 EcoRI 消化 PCR 产物, 随后将限制酶热失活。用 HindIII 和 EcoRI 消化 pEE6.4 载体, 随后将该限制酶热失活, 并用虾碱性磷酸酶 (shrimpalkaline phosphatase) 使载体片段去磷酸化, 随后将该磷酸酶热失活。连接 IgG4 片段和 pEE6.4 HindIII/EcoRI 去磷酸化载体, 并转化进入感受态 MACH1-T1^R 细胞 (Invitrogen)。使 3 个克隆在 LB 中生长, 并从小培养物 (1.5mL) 分离质粒 DNA。限制性消化显示出与将 IgG4 片段克隆到 pEE6.4 载体中一致的模式。将来自 2 个克隆的质粒 DNA 转化进入 DH5 α -T1^R 大肠杆菌, 分离质粒 DNA, 并通过分析插入物的序列对构建体进行检查, 发现一个克隆与一种来自 Genbank 数据库的基因组 IgG4 克隆相同, 只是在内含子中有一些微小差异。这些差异可能是由于多态性或者 Genbank 序列的序列错误导致的。将该质粒命名为 pTomG4。

[0332] 表 1 : 引物序列

[0333]

名称	寡序列

VLexbetv1rev	AGCCACCGTACGTTTGATTTCAGCTTGGTGCCTCC (SEQ ID NO :1)
VLexbetv1for	GATGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAGTCACAGATTC AGGCATTT (SEQ ID NO :2)
VHexbetv1rev	CGATGGGCCCTTGGTGCTGGCTGAGGAGACGGTGA CTGAGGT (SEQ ID NO :3)
VHexbetv1for	GATGCAAGCTTGCCGCCACCATGAAATGCAGCTGGG TTATCTTC (SEQ ID NO :4)
VLexfeld1rev	AGCCACCGTACGTTTTATTTCCTCACTTTGTCCCCGA (SEQ ID NO :5)
VLexfeld1for	GATGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAATCACAGACTC AGGCCTC (SEQ ID NO :6)
VHexfeld1rev	CGATGGGCCCTTGGTGCTGGCTGCAGAGAAAGTGA CCAGAGT (SEQ ID NO :7)
VHexfeld1for	GATGCAAGCTTGCCGCCACCATGGGATGGAGCTATA TCATCCTC (SEQ ID NO :8)
IGG4gene2r	TGAGAATTCGGTGGGTGCTTTATTTCCATGCT (SEQ ID NO :9)
IGG4gene2f	GTAGAAGCTTACCATCGCGGATAGACAAGAACC (SEQ ID NO :10)
RACEKmm1	TGTAACTGCTCACTGGATGGTGGGA (SEQ ID NO :11)
RACEG1mm1	TCCCTGGGCACAATTTCTTGTCCACC (SEQ ID NO :12)
ShortUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGC (SEQ ID NO :13)
LongUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT (SEQ ID NO :14)

[0334] 实施例 13 :小鼠抗 Betv1 抗体和抗 Feld1 抗体可变区的克隆

[0335] 用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen, Westburg, Leusden, 荷兰) 根据制造商的方案从 0.3×10^5 (Betv1) 或 0.9×10^5 (Feld1) 小鼠杂交瘤细胞 (对于 Betv1 :来自参考文献 38 的克隆 2H8, 对于 Feld1 :来自参考文献 39 的克隆 4F7) 制备总 RNA。

[0336] 使用 SMART RACE cDNA Amplification 试剂盒 (BD BiosciencesClontech,

Mountain View, CA, USA), 根据制造商的方案从大约 100ng 总 RNA 制备 RNA 的 5' -RACE- 互补 DNA (cDNA)。

[0337] 通过 PCR 扩增 Betv1 和 Feld1 抗体的 VL 和 VH 区。为此, 根据制造商的说明使用 **PfuTurbo®** Hotstart DNA 聚合酶 (Stratagene)。每个反应混合物含有 200 μ M 混合 dNTP (Roche Diagnostics), 12pmol 反向引物 (用于 VH 区的 RACEG1mm1, 用于 VL 区的 RACEKmm1), 7.2pmol UPM-Mix (UPM-Mix : 2 μ M ShortUPMH3 和 0.4 μ M LongUPMH3 寡核苷酸), 0.6 μ l 如上所述的 5' RACE cDNA 模板, 和 1.5 单位 **PfuTurbo®** Hotstart DNA 聚合酶, 溶于总体积为 30 μ l 的 PCR 反应缓冲液 (与聚合酶一起提供) 中。

[0338] PCR 反应使用 TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra) 进行, 使用 35 个循环的程序 : 95°C 变性 2min ; 35 个循环的 95°C 30sec, 55°C 30sec, 和 72°C 1.5min ; 最后在 72°C 延伸 10min。反应产物通过琼脂糖凝胶电泳在 1% TAE 琼脂糖凝胶上进行分离, 并用溴化乙锭染色。从凝胶上切下大小正确的条带, 用 QiaexII 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从琼脂糖中分离 DNA。

[0339] 将凝胶分离的 PCR 片段与 200 μ M dATP 和 2.5 单位 Amplitaq (PerkinElmer) 在 72°C 温育 10min 以添加 A 尾巴, 并用微型洗脱柱 (Qiagen) 进行纯化。使用 pGEMT easy 载体系统 II 试剂盒 (Promega) 按照制造商的方案将添加了 A 尾巴的 PCR 片段克隆到 pGEMTeasy 载体 (Promega) 中。将 2 μ l 连接混合物转化到 OneShot DH5 α T1R 感受态大肠杆菌 (Invitrogen) 中, 并涂布在 LB/Amp/IPTG/Xgal 平板上。为每个 VH 和 VL 序列挑取 4 个含有插入序列的白色克隆, 并对插入序列进行测序。SEQ ID NO : 15 和 16 给出了 Betv1VH 和 VL 的推导氨基酸序列, SEQ ID NO : 17 和 18 给出了 Feld1 的推导氨基酸序列。

[0340] VH 序列 Betv1 (SEQ ID NO : 15) :

[0341] mkcswviffllmavvtgvnsevqlqqsgaelvkpgasvklscstasgfnikdtyihWvkqrpeqglewvgr
idpatgntrydpkfqqkatitadtssntaylqlssltsedtavyycasfrpgyaldywgqgtsvtvss

[0342] VL 序列 Betv1 (SEQ ID NO : 16) :

[0343] mesqiqafvfvflwlsqvgdivmtqshkfmstsvgdrvsftckasqdvftavawyqqkpgqspklliy
wastrrtgvpdrftgsgsgtdytlstissvqaedlalyycqhfstppftfgggtkleik

[0344] VH 序列 Feld1 (SEQ ID NO : 17) :

[0345] mgwsyiilflvatatdvhsqqlqqpgaelvkpgasvklscskasgsftsymbhwkqrpgqglewige
inpnngertynefkfktkatltvdkssstaymqlnsltsedsavyycarrlmtvesfaywgqgtlvtfsa

[0346] VL 序列 Feld1 (SEQ ID NO : 18) :

[0347] mesqtqvlmsllfwvsgtcgdivmtqspsslvtagekvtmsckssqslnsgnqknyltwyqqkpgqp
pklliywastresgvpdrftgsgsgtdfslstissvqaedlaiyyqcndysypftfgsggtkleik

[0348] 实施例 14 : pConG1fBetV1 : 用于产生 Betv1-IgG1 重链的载体的构建

[0349] 使用引物 VHexbetv1for 和 VHexbetv1rev 从含有小鼠抗 BetV1 抗体的 V_H 编码区的质粒 (实施例 13) 中 PCR 扩增该区, 同时引入用于克隆到 pConG1f0.4 中的合适的限制性位点和理想的 Kozak 序列。凝胶纯化 VH 片段并克隆到 pConG1f0.4 中。为此, 用 HindIII 和 ApaI 消化 PCR 产物和 pConKappa0.4 载体并加以纯化。将 VH 片段和 pConG1f0.4HindIII-ApaI 消化载体加以连接, 并转化到感受态 DH5 α -T1^R 细胞中。选择含有正确插入序列大小的克隆, 并确认正确的序列。将该质粒命名为 pConG1fBetv1。

[0350] 实施例 15 :pConKBetv1 :用于产生 Betv1 轻链的载体的构建

[0351] 使用引物 VLexbetv1for 和 VLexbetv1rev 从含有小鼠抗 BetV1 抗体的 V_L 编码区的质粒 (实施例 13) 中扩增该区,同时引入用于克隆到 pConK0.4 中的合适的限制性位点和理想的 Kozak 序列。用 HindIII 和 BsiWI 对 PCR 产物和 pConKappa0.4 载体进行消化,并加以纯化。将 V_L 片段和 pConKappa0.4HindIII-BsiWI 消化的载体加以连接,并转化到感受态 DH5 α -T1^R 大肠杆菌中。选择含有正确插入序列大小的克隆,并对序列进行确认。将该质粒命名为 pConKBetv1。

[0352] 实施例 16 :pTomG4Betv1 :用于产生 Betv1-IgG4 重链的载体的构建

[0353] 为了构建用于表达 Betv1-IgG4 的载体,将 BetV1 的 VH 区克隆到 pTomG4 中。为此,用 HindIII 和 ApaI 消化 pTomG4 和 pConG1fBetv1,并分离相关片段。将 Betv1V_H 片段和 pTomG4HindIII-ApaI 消化的载体加以连接,并转化到感受态 DH5 α -T1^R 细胞中。选择含有正确插入序列大小的克隆,并确认序列。将该质粒命名为 pTomG4Betv1。

[0354] 实施例 17 :pConG1fFeld1 :用于产生 Feld1-IgG1 重链的载体的构建

[0355] 使用引物 VHexfeld1for 和 VHexfeld1rev 从含有小鼠抗 Feld1 抗体的 V_H 编码区的质粒 (实施例 13) 中 PCR 扩增该区,同时引入用于克隆到 pConG1f0.4 中的合适的限制性位点和理想的 Kozak 序列。将 VH 片段进行凝胶纯化并克隆到 pConG1f0.4 中。为此,用 HindIII 和 ApaI 对 PCR 产物和 pConKappa0.4 载体进行消化,并进行纯化。将 V_H 片段和 pConG1f0.4HindIII-ApaI 消化的载体进行连接,并转化到感受态 DH5 α -T1^R 细胞中。选择含有正确插入序列大小的克隆,并确认序列。将该质粒命名为 pConG1fFeld1。

[0356] 实施例 18 :pConKFeld1 :用于产生 Feld1 轻链的载体的构建

[0357] 使用引物 VLexfeld1for 和 VLexfeld1rev 从含有小鼠抗 Feld1 抗体的 V_L 编码区的质粒 (实施例 13) 中通过 PCR 扩增该区,同时引入用于克隆到 pConK0.4 中的合适的限制性位点和理想的 Kozak 序列。用 HindIII 和 BsiWI 对 PCR 产物和 pConKappa0.4 载体进行消化,并加以纯化。将 V_L 片段和 pConKappa0.4HindIII-BsiWI 消化的载体加以连接,并转化到感受态 DH5 α -T1^R 大肠杆菌中。选择含有正确插入序列大小的克隆,并确认序列。将该质粒命名为 pConKFeld1。

[0358] 实施例 19 :pTomG4Feld1 :用于产生 Feld1-IgG4 重链的载体的构建

[0359] 为了构建用于表达 Feld1-IgG4 的载体,将 Feld1 的 VH 区克隆到 pTomG4 中。为此,用 HindIII 和 ApaI 对 pTomG4 和 pConG1fFeld1 进行消化,并分离相关片段。连接 Feld1V_H 片段和 pTomG4HindIII-ApaI 消化的载体,并转化到感受态 DH5 α -T1^R 细胞中。选择含有正确插入序列大小的克隆,并确认序列。将该质粒命名为 pTomG4Feld1。

[0360] 实施例 20 :用于表达 2F8-IgG4 和 7D8-IgG4 的抗体表达载体的构建

[0361] 构建了用于表达 HuMab 2F8 (IgG1-EGFR) 和 HuMab 7D8 (IgG1-CD20) 的表达载体。将 HuMab 2F8 (WO 02/100348) 和 HuMab 7D8 (WO 04/035607) 的 VH 和 VL 编码区克隆到用于产生 IgG1 重链的表达载体 pConG1f (LonzaBiologics) 和用于产生 kappa 轻链的 pConKappa 中,产生载体 pConG1f2F8、pConG1f7D8、pConKappa2F8 和 pConKappa7D8。通过 HindIII/ApaI 消化从 pConG1f2F8 和 pConG1f7D8 中移出这些载体的 VH 区,并插入到 HindIII/ApaI 消化的 pTomG4 载体中,分别产生 pTomG42F8 和 pTomG47D8。

[0362] 实施例 21 :通过在 HEK-293F 细胞中进行瞬时表达产生 Betv1-IgG1、Betv1-IgG4、

Feld1-IgG1 和 Feld1-IgG4

[0363] 根据制造商的使用说明,使用 293fectin 在 HEK-293F 细胞中共转染相关的重链和轻链载体,以从所有构建体产生抗体。对于 Betv1-IgG1,共表达 pConG1Betv1 和 pConKBetv1。对于 Betv1-IgG4,共表达 pTomG4Betv1 和 pConKBetv1。对于 Feld1-IgG1,共表达 pConG1Feld1 和 pConKFeld1。对于 Feld1-IgG4,共表达 pTomG4Feld1 和 pConKFeld1。对于 IgG1-EGFr,共表达 pConG1f2F8 和 pConKappa2F8。对于 IgG4-EGFr,共表达 pTomG42F8 和 pConKappa2F8。对于 IgG1-CD20,共表达 pConG1f7D8 和 pConKappa7D8。对于 IgG4-CD20,共表达 pTomG47D8 和 pConkappa7D8。

[0364] 实施例 22 :IgG1 和 IgG4 抗体的纯化

[0365] 通过蛋白 A 亲和色谱纯化 IgG1 和 IgG4 抗体。用 0.20 μ M 盲端滤膜 (dead-end filter) 过滤细胞培养上清,随后上样到 5ml 蛋白 A 柱 (rProtein A FF, GE Healthcare) 上,并用 0.1M 柠檬酸-NaOH, pH 3 对 IgG 进行洗脱。洗脱物立即用 2M Tris-HCl, pH 9 中和,并对 12.6mM 磷酸钠,140mM NaCl, pH7.4 (B. Braun, Oss, 荷兰) 中过夜透析。透析后,用 0.20 μ M 盲端滤膜进行无菌过滤。经纯化的 IgG 的浓度通过浊度测定法和 280nm 吸光度加以测定。纯化的蛋白通过 SDS-PAGE、IEF、质谱和糖分析 (Glycoanalysis) 进行分析。

[0366] 实施例 23 :经纯化的 IgG 的 SDS-PAGE 分析

[0367] 提纯之后,对 Betv1 和 Feld1, IgG1 和 IgG4 抗体进行非还原性 SDS-PAGE 分析。所用的 Bis-Tris 电泳方法是 Laemmli 方法的修改形式 (Laemmli 1970 *Nature* 227 (5259) : 680-5), 其中样品在中性 pH 下运行。SDS-PAGE 凝胶用考马斯染色,并用 GeneGenius (Synoptics, Cambridge, UK) 进行数字成像。

[0368] 如图 1 所示,Betv1 和 Feld1 IgG1 显示 1 条主带,代表全长四聚体型 (2 条重链和 2 条轻链) Feld1 和 Betv1 IgG1 分子。Betv1 和 Feld1 IgG4 除了代表四聚体 IgG4 分子的主带之外,还显示有相当量的半分子 (即一条重链和一条轻链)。

[0369] 实施例 24 :小鼠中 IgG4 半分子交换的估计

[0370] 使用 5 只 6-8 周龄 nu/nu Balb/c 小鼠来追踪 IgG4 半分子交换。将小鼠圈养在中央实验动物设施 (Central Laboratory Animal Facility) (Utrecht, 荷兰) 的屏障单位 (barrier unit) 中,置于滤盖笼 (filter-top cages) 内,水和食物自由摄取。所有的实验均得到 Utrecht 大学动物伦理委员会的批准。

[0371] 腹膜内施用嵌合抗体。在施用后 4.25 小时、24 小时、48 小时和 72 小时采取血液样品 (75-100 μ l)。将血液收集在含有肝素的小瓶中,并在 10,000g 离心 5 分钟以分离血浆和细胞。将血浆保存在 -20°C,用于确定抗原特异性抗体和双特异性抗体水平。

[0372] 在本实验中,将嵌合 IgG4 半分子 (n = 2) 的交换与 IgG1 半分子 (n = 3) 的交换相比较。将 Betv1 和 Feld1 特异性抗体 (IgG1 或 IgG4) 的混合物以每只小鼠 200 μ l 计 600 μ g (每种抗原特异性抗体 300 μ g) 的剂量施用给小鼠。

[0373] 在抗原结合试验中测量 Betv1 或 Feld1 结合性抗体的血浆浓度。为此,将血浆样品与 0.75mg 蛋白 G Sepharose (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 温育在 750 μ l PBS-IAT (PBS 添加 1 μ g/ml IVIg, 0.3% 牛血清白蛋白, 0.1% Tween-20 和 0.05% (w/v) NaN₃) 中,在 ¹²⁵I 标记的 Betv1 或 ¹²⁵I 标记的 Feld1 存在条件下温育 24h。接着,用 PBS-T (PBS 添加 0.1% Tween-20 和 0.05% (w/v) NaN₃) 清洗 Sepharose,测量结合的放射性的量相对

于添加的放射性的量的比。用纯化的 Betv1 特异性抗体或 Feld1 特异性抗体作为标准（每个试验的范围 0-200ng, 由浊度测量法确定）计算 Betv1 或 Feld1 特异性 IgG 的浓度。双特异性 IgG 的浓度在异源交联测定的两种变型中加以测量。在第一种测定中, 在总体积 300 μ l 的 PBS-IAT 中将血浆与 Sepharose 偶联的 Betv1 (0.5mg) 温育 24h。随后, 用 PBS-T 清洗 Sepharose, 并与 125 I 标记的 Feld1 温育 24h, 之后用 PBS-T 清洗 Sepharose, 测量结合的放射性的量相对于所添加放射性的量。用 Feld1 结合试验的校正曲线计算双特异性 IgG (Betv1-Feld1) 的浓度, 该校正曲线是由纯化的 Feld1 结合性 rIgG 获得的。在第二种测定中, 使用 Sepharose 偶联的 rFeld1 (0.5mg) 和 125 I 标记的 Betv1 通过相似的程序测量 Feld1-Betv1 交联活性。用纯化的 Betv1 特异性 rIgG 作为标准（与 Betv1 结合试验中的曲线相同）计算双特异性 IgG (Feld1-Betv1) 的浓度。

[0374] 在图 2 中, 双特异性 IgG (Feld1-Betv1) 的浓度相对于不同时间点上的 Betv1 结合性 IgG 的浓度作图。与给予 IgG4 的小鼠形成对照的是, 给予 IgG1 混合物的小鼠体内没有观察到双特异性 IgG。24h 后, 双特异性 IgG4 的产生达到最大, 对应于 100% 交换。

[0375] 在图 3A 中, 随时间追踪双特异性人 IgG4 的形成。在注射了 IgG4 而非 IgG1 的混合物的小鼠血浆中经过一段时间出现了双特异性抗体, 双特异性反应力在温育 1-2 天后达到最大值即大约 50%（注意: 如果等量的 IgG4-Betv1 和 IgG4-Feld1 被交换, 在半抗体的随机和完全交换之后最多会有 50% 的 IgG4-Betv1 半抗体被掺入到双特异性部分中）。等量的 IgG4-Betv1 和 IgG4-Feld1 之间的随机 Fab 臂交换可相当于大约一半的 IgG4 分子获得双特异性。作为对照, 将 20 倍过量的针对无关抗原的 IgG4 (从抗 EGFR 抗体 2F8 产生的 IgG4) 与 IgG4-Betv1 和 IgG4-Feld1 一起注射到小鼠体内。过量的无关 IgG4 与 Betv1-Feld1 双特异性 IgG4 的产生相竞争。

[0376] 在另一个实验中 (图 3B), 对相同的小鼠血浆样品测试其将放射性标记的可溶性 Feld1 交联到 Sepharose 固定的 Feld1 上的能力。结果发现, 在给予等量 IgG4 而非 IgG1 混合物的小鼠体内单特异性交联活性被降低, 表明单特异性交联活性的损失。在大约 1 天后, 达到最大减少即 \sim 50%。在给予额外的过量无关 IgG4 的小鼠体内, 单特异性交联活性以相似的动力学几乎完全消失。

[0377] 进行大小排阻色谱以排除在给予 IgG4 的小鼠体内观察到的双特异活性是 IgG 聚集的结果的可能性 (见图 4)。为此, 将血浆样品 (在 $t = 24h$ 获取) 在 Superdex200 柱上分级, 之后测量级分中的 Feld1 结合性 IgG 和 Betv1-Feld1 交联性 IgG。Feld1 结合性抗体洗脱出一个峰, 保留体积为 \sim 12.9ml, 其对应于单体 IgG 的保留体积。在相同的级分中检测到了异源 Betv1-Feld1 交联活性, 表明双特异活性与单体 IgG 有关。在含有 rIgG1 的血浆中, 在分级之前不存在 Betv1-Feld1 交联活性。同样, 在洗脱的级分中, 没有测量出异源交联活性 (数据未显示)。

[0378] 实施例 25: 评估全血 (成分) 中的交换活性

[0379] 将嵌合抗体混合, 随后与全血、血细胞、血浆或血清温育, 以研究全血 (成分) 的交换活性。

[0380] 在本实验中, 对来自两个健康血液供体 A 和 B 的全血中的 IgG4 半分子的交换进行评估, 所述全血中 IgG4 的内源血浆水平通过浊度测量加以确定 (分别为 346 和 554 μ g/ml)。将全血采取在添加有终浓度为 40 μ g/ml 的 TFPI (组织因子通道抑制剂, 来自 Chiron

Corporation, Emeryville, California) 的采血管中。通过全血离心获得血细胞和血浆。将细胞级分用 Optimem (Invitrogen, Breda, 荷兰) 清洗 3 次, 随后重悬在 Optimem 中。将全血在含有促凝剂的玻璃采血管中 37°C 温育 30min, 之后将凝血离心下来, 获得血清。评估 IgG4 半分子的交换, 并与 IgG1 半分子的交换进行比较。作为对照, 还将血液样品在没有嵌合抗体的条件下进行温育。在 PBS 中制备如下的抗体混合物:

[0381] 1. Betv1 特异性 IgG4 (10 μ g) 和 Feld1 特异性 IgG4 (10 μ g)

[0382] 2. Betv1 特异性 IgG1 (10 μ g) 和 Feld1 特异性 IgG1 (10 μ g)

[0383] 将这些抗体混合物与血液、血细胞、血浆或血清一起在水平回转振荡器 (125rpm) 上 37°C 温育, 总体积为 100 μ l (每种抗体的终浓度为 0.1 μ g/ml)。与全血或血细胞的温育混合物中的最终血细胞比容为大约 ~ 40%。24h 后, 将温育混合物在 Eppendorf 离心机中以 2800rpm 离心 1min, 之后吸取 10 μ l 样品至 500 μ l PBS-AT (PBS 添加 0.3% 牛血清白蛋白, 0.1% Tween-20 和 0.05% (w/v) NaN₃) 中。如果需要, 将样品存储在 4°C。

[0384] 在异源交联测定中测量双特异活性 (即 Feld1-Betv1 交联活性)。在此测定中, 将样品与 0.5mg Sepharose 偶联的重组 Feld1 在总体积为 300 μ l 的 PBS-IAT (PBS-AT 添加 1 μ g/ml IVIg) 中温育 24h。随后, 用 PBS-T 清洗 Sepharose, 并与 ¹²⁵I 标记的 Betv1 温育 24h, 之后用 PBS-T 清洗 Sepharose, 并测量结合的放射性的量相对于所添加放射性的量。

[0385] 在图 5 中, 双特异活性用结合的 ¹²⁵I 标记 Betv1 的百分比表示, 其是在异源交联测定中加以确定的。双特异活性是 IgG4 半分子交换的量度。IgG4 半分子交换主要在全血和全血的细胞级分中观察到 (图 5a)。细胞级分中的双特异性水平甚至高于全血。对于这一点最有可能的解释是, 在细胞级分中, 内源 IgG4- 其也能够与所添加的嵌合 IgG4 抗体发生交换 - 不再存在了。在血浆和血清中也能够观察到一些双特异活性, 但是这个活性远远低于在血浆中观察的水平, 仅略高背景水平 1.7%, 后者是通过在 Optimem 中温育 IgG4 混合物获得的。在任何含 IgG1 的温育物中均没有观察到双特异活性 (图 5b)。同样在没有嵌合抗体的对照温育物中, 也没有观察到双特异活性 (图 5c)。进行了大小排阻色谱以排除在 IgG4 混合物中观察到的双特异活性是 IgG 聚集的结果的可能性。为此, 将样品 (在 t = 24h 获取) 在 Superdex200 柱上分级, 然后测量级分中的 Feld1 结合性 IgG 和 Betv1-Feld1 交联性 IgG。Feld1 结合抗体洗脱出一个峰, 保留体积为 ~ 12.9ml, 其对应于单体 IgG 的保留体积。在相同的级分中检测到了异源的 Betv1-Feld1 交联性活性, 表明双特异活性与单体 IgG 有关 (数据未显示)。

[0386] 实施例 26: 评估血细胞介导的 IgG4 交换活性

[0387] 将嵌合抗体混合, 随后与三个不同类型的人血细胞 (即单个核细胞 (MNC)、红细胞和血小板) 温育, 以研究 IgG4 的交换活性。

[0388] 将来自一个匿名供体的全血抽入含有肝素的采血管中, 随后在 Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) 中离心以分离 MNC。将分离的 MNC 重悬在 Optimem 无血清培养基 (Invitrogen, Breda, 荷兰) 中备用。新鲜纯化的血细胞和血小板 (由 Blood Cell Research Department of Sanquin 提供) 获自两个不同的匿名供体。这些细胞在清洗 3 次之后也重悬在 Optimem 中。此外, 向血小板中补充 10mM 葡萄糖。

[0389] 评估 IgG4 半分子的交换, 并与 IgG1 半分子的交换进行比较。在 PBS 中制备了如下的抗体混合物:

[0390] -Betv1 特异性 IgG4(10 μ g) 和 Feld1 特异性 IgG4(10 μ g)

[0391] -Betv1 特异性 IgG1(10 μ g) 和 Feld1 特异性 IgG1(10 μ g)

[0392] 在水平回转振荡器(125rpm)上将这些抗体混合物与 1.8×10^4 的 MNC, 4.0×10^8 的红细胞或 3.5×10^4 的血小板(每种抗体的终浓度均为 0.1 μ g/ml)在 100 μ l 总体积中于 37°C 温育。48h 后,将温育混合物在 Eppendorf 离心机中以 2800rpm 离心 1min,之后吸取 10 μ l 样品至 500 μ l PBS-AT(PBS 添加 0.3% 牛血清白蛋白,0.1% Tween-20 和 0.05% (w/v) NaN_3) 中。如果需要,将样品保存在 4°C。

[0393] 在异源交联测定中测量双特异活性(即 Feld1-Betv1 交联活性)。在此测定中,将样品与 0.5mg Sepharose 偶联的重组 Feld1 在 PBS-IAT(PBS-AT 添加 1 μ g/ml IVIg)中(总体积为 300 μ l)温育 24h。随后,用 PBS-T 清洗 Sepharose,并与 ^{125}I 标记的 Betv1 温育 24h,之后用 PBS-T 清洗 Sepharose,并测量结合的放射性的量相对于所添加放射性的量。

[0394] 在图 6 中,双特异活性用结合的 ^{125}I 标记 Betv1 的百分比显示,其是在异源交联测定中测得的。所有三种细胞类型均能够诱导双特异活性。在 Optimem 无血清培养基中也可观察到一些双特异活性,但是这个活性远远低于有血细胞存在时观察到的水平。所有测试细胞均不能交换 IgG1 半分子。

[0395] 实施例 27:通过人和小鼠细胞系评估 IgG4 交换

[0396] 将嵌合 IgG4 抗体混合,然后与三个不同的细胞系(即人胚胎肾(HEK)细胞、小鼠 B 细胞或杂交瘤)温育,以研究 IgG4 的交换活性。

[0397] 选择细胞系 J558(由 Antigen Presentation Research Group of Sanquin 提供)作为小鼠 B 细胞来源。产生抗 C1 酯酶抑制剂的杂交瘤获自 Autoimmune Research Group of Sanquin。悬浮 HEK(293F)细胞从 Invitrogen, Breda, 荷兰获得。所有细胞用 PBS 清洗 3 次,之后将细胞重悬在 PBS 中。

[0398] 通过将含有 Betv1 特异性 IgG4(2 μ g) 和 Feld1 特异性 IgG4(2 μ g) 的抗体混合物与前述细胞一起温育评估 IgG4 半分子的交换。将抗体混合物在水平回转振荡器(125rpm)上与 24×10^5 HEK 细胞、 25×10^5 小鼠 B 细胞或 21×10^5 杂交瘤在 50 μ l 总体积中(每种抗体的终浓度为 80 μ g/ml)37°C 温育。0h 和 24h 后,将温育混合物在 Eppendorf 离心机中以 2800rpm 离心 1min,之后吸取样品至 PBS-AT(PBS 添加 0.3% 牛血清白蛋白,0.1% Tween-20 和 0.05% (w/v) NaN_3) 中。如果需要,将样品保存在 4°C。

[0399] 在异源交联测定中测量双特异活性(即 Feld1-Betv1 交联活性)。在此测定中,将样品的稀释物与 0.5mg Sepharose 偶联的重组 Feld1 在 PBS-IAT(PBS-AT 添加 1 μ g/ml IVIg)中(总体积为 300 μ l)温育 24h。然后,用 PBS-T 清洗 Sepharose,并与 ^{125}I 标记的 Betv1 温育 24h,之后用 PBS-T 清洗 Sepharose,并测量结合的放射性的量相对于所添加放射性的量。

[0400] 在图 7 中,双特异活性用结合的 ^{125}I 标记 Betv1 的百分比显示,其是在所述异源交联测定中确定的。所有三种细胞类型均能够交换 IgG4 半分子。

[0401] 实施例 28:红细胞介导的 IgG4 半分子交换的评估

[0402] 将嵌合抗体混合,然后与人红细胞温育,以研究 IgG4 半分子的交换。从单个供体纯化红细胞,并在 SAGM(盐水、腺苷、葡萄糖、甘露醇)缓冲液中于 4°C 保存。使用之前,用 PBS 清洗细胞 3 次。

[0403] 在本实验中,将 IgG4 半分子的交换与 IgG1 的交换进行比较。另外,对在过量无关 IgG4 存在下的 IgG4 交换进行评估。在 PBS 中制备如下的抗体混合物:

[0404] -Betv1 特异性 IgG4(4 μ g) 和 Feld1 特异性 IgG4(4 μ g)

[0405] -Betv1 特异性 IgG1(4 μ g) 和 Feld1 特异性 IgG1(4 μ g)

[0406] -Betv1 特异性 IgG4(4 μ g), Feld1 特异性 IgG4(4 μ g) 和对抗原 X 特异的无关 IgG4(80 μ g)

[0407] 将这些混合物与红细胞在总体积 100 μ l 的添加有 0.05% (w/v) NaN_3 的 PBS 中(最终的血细胞比容为大约~40%)温育,然后在水平回转振荡器(125rpm)上 37°C 温育。在示明的时间点,在 Eppendorf 离心机中以 2800rpm 对红细胞离心 1min,之后吸取 10 μ l 样品到 500 μ l PBS-AT(添加了 0.3% 牛血清白蛋白,0.1% Tween-20 和 0.05% (w/v) NaN_3 的 PBS) 中。在测量双特异活性、二价性和抗原结合之前将样品保存于 4°C。作为对照,还将相同的混合物温育在没有红细胞的 PBS 中。

[0408] 在抗原结合试验中测量 Betv1 结合性抗体的水平。为此目的,在 ^{125}I 标记 Betv1 的存在下,将样品在 750 μ l PBS-IAT(添加了 1 μ g/ml IVIg 的 PBS-AT) 中与 0.75mg 蛋白 G Sepharose(Amersham Biosciences,Uppsala,Sweden) 一起温育 24h。接着,用 PBS-T(添加了 0.1% Tween-20 和 0.05% (w/v) NaN_3 的 PBS) 清洗 Sepharose,并测量结合的放射性的量相对于所添加放射性的量。用纯化的 Betv1 特异性抗体(每个试验的范围是 0-200ng,用浊度计确定)作为标准品计算 Betv1 特异性 IgG 的浓度。对于使用 Feld1 和 Betv1 双特异性抗体的实验中的双特异活性,在 Feld1-Betv1 交联测定中加以测量。在该测定中,将含有 IgG 的样品与 Sepharose 偶联的 cat 提取物(0.5mg)在总体积 300 μ l 的 PBS-AT 中温育 24h。然后,用 PBS-T 清洗 Sepharose,并与 ^{125}I 标记的 Betv1 温育 24h,然后用 PBS-T 清洗 Sepharose,并测量结合的放射性的量相对于所添加的放射性的量。用纯化的 IgG1-Betv1(在 Betv1 结合试验中利用蛋白 G Sepharose 获得的)作为标准计算双特异性 IgG(Feld1-Betv1) 的浓度。

[0409] 在图 8 中,提供了从红细胞介导的交换获得的数据。在红细胞存在下,没有观察到 IgG1 半分子的交换,而在 72h 后观察到大约最大的 IgG4 半分子交换(图 A)(注意:如果等量的 IgG4-Betv1 和 IgG4-Feld1 被交换,则在随机和完全的半分子交换之后,最多有 50% 的 IgG4-Betv1 半抗体会被掺入到双特异性级分中)。在过量的无关 IgG4 的存在下,基本上没有测量到 IgG4 半分子的交换,这与预期的 Betv1 与 Feld1 特异性 IgG4 与无关 IgG4 的交换相符。进行了大小排阻色谱以排除在 IgG4 混合物中观察到的双特异活性是 IgG 聚集的结果的可能性。为此,将样品(在 $t = 72\text{h}$ 获取)在 Superdex200 柱上进行分级,然后测量级分中的 Feld1 结合性 IgG 和 Betv1-Feld1 交联性 IgG。Feld1 结合抗体洗脱为一个峰,保留体积为~12.9ml,其对应于单体 IgG 的保留体积。在相同的级分中检测到了异源 Betv1-Feld1 交联活性,表明双特异活性与单体 IgG 有关(数据未显示)。

[0410] 理论上,IgG4 半分子的交换也伴随着二价性的降低。为了检验这一点,对温育混合物中的二价性进行测量。在 IgG1 混合物中基本上没有观察到 Feld1 二价性降低,而在 IgG4 混合物中观察到了~50% 的降低。这种降低与按照 1:1 比例混合的两个不同 IgG4 分子的最大交换是相符的。与预期的一样,在存在过量的无关 IgG4 时 IgG4 混合物中的二价性降低得更多(~80%),这是由于存在过量的无关 IgG4 半分子时,两个同源半分子(Betv1

或 Feld1 特异) 发生重新杂交的可能性降低。二价性的强烈降低不是由于温育期间抗原结合丧失的结果, 因为抗原结合在温育 72h 之后只有微弱的降低 (~ 10%) (数据未显示)。

[0411] 同时评估了 IgG 在 PBS (添加了 0.05% (w/v) NaN_3) 中的交换, 以研究 IgG4 半分子是否能够自发交换。该实验的条件与有红细胞存在时的交换相似, 只是没有添加红细胞。在 PBS 中 37°C 温育期间没有观察到 IgG1 或 IgG4 半分子的自发交换, 如图 9A 所示。然而, 在 IgG4 混合物中观察到一些背景, 该背景在与红细胞温育的期间也存在。在 PBS 中温育期间没有观察到二价性降低 (图 9B)。

[0412] 实施例 29: 红细胞裂解物介导的 IgG4 交换的评估

[0413] 将嵌合 IgG4 抗体混合, 然后与稀释度递增的红细胞裂解物温育。从健康供体分离红细胞, 并在 SAGM (盐水、腺苷酸、葡萄糖、甘露醇) 缓冲液中保存于 4°C, 血细胞比容为 60.7%。为了获得裂解物, 用 PBS-叠氮化物 (PBS 中添加 0.05% (w/v) NaN_3) 清洗细胞 3 次, 并重悬在体积二倍于存储缓冲液的体积的水中。结果, 未稀释的红细胞裂解物相当于血细胞比容为 30%。

[0414] 通过将由 Betv1 特异性 IgG4 (1 μg) 和 Feld1 特异性 IgG4 (1 μg) 的 IgG4 组成的抗体混合物与 50 μl 新鲜制备的裂解物 (添加 PBS/叠氮化物到总体积为 100 μl) 在 37°C 一起温育进行 IgG4 半分子交换的评估。每种抗体的最终浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 。在示明的时间点, 从温育混合物采取样品至 PBS-AT (PBS 添加 0.3% 牛血清白蛋白, 0.1% Tween-20 和 0.05% (w/v) NaN_3) 中以测量双特异活性。如果需要, 将样品保存于 4°C。

[0415] 双特异活性 (即 Betv1-Feld1 交联性活性) 的测量在异源交联测定中进行。在该测定中, 样品稀释物与 0.5mg Sepharose 偶联的桦木提取物 (birch extract) 在总体积为 300 μl 的 PBS-IAT (PBS-AT 中添加 $\mu\text{g/ml}$ IVIg) 中温育 24h。然后, 用 PBS-T 清洗 Sepharose, 并与 ^{125}I 标记的 Feld1 温育 24h, 然后用 PBS-T 清洗 Sepharose, 并测量结合的放射性的量相对于所添加的放射性的量。双特异性 IgG (Betv1-Feld1) 的浓度用 Feld1 结合性 rIgG 获得的校正曲线加以计算, 该标准曲线是用纯化的 Feld1 结合性 rIgG 获得的。

[0416] 在图 10 中, 经时 (in time) 的双特异活性产生用结合的 ^{125}I 标记 Feld1 的百分比来表示, 后者是在异源交联测试中确定的。从这些数据显然可见红细胞的裂解物含有交换活性。在未稀释的裂解物中观察到最高的交换速度, 而稀释度越高, 交换速度越低。在 PBS 中进行的对照温育中几乎没有观察到双特异活性。

[0417] 实施大小排阻色谱以排除红细胞裂解物所诱导的双特异活性是 IgG 聚集的结果的可能性 (图 11)。为此目的, 制备温育混合物, 其由 10 μg Betv1 结合性 IgG4、10 μg Feld1 结合性 IgG4 和 50 μl 红细胞裂解物组成, 并添加 PBS/叠氮化物到最终体积为 100 μl 。将该混合物在 37°C 温育 24h, 然后将 70 μl 在 Superdex200 柱上进行分级。在级分中, 测量 Betv1 结合性 IgG 和 Feld1-Betv1 交联性 IgG。在抗原结合试验中测量 Betv1 结合性抗体的水平。将样品与 0.75mg 蛋白 G Sepharose (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 一起在 ^{125}I 标记的 Betv1 的存在下, 在 750 μl PBS-IAT (PBS 添加 1 $\mu\text{g/ml}$ IVIg、0.3% 牛血清白蛋白、0.1% Tween-20 和 0.05% (w/v) NaN_3) 中温育 24h。接着, 用 PBS-T (PBS 添加 0.1% Tween-20 和 0.05% (w/v) NaN_3) 清洗 Sepharose, 并测量已结合的放射性的量相对于所添加放射性的量。使用纯化的 Betv1 特异抗体作为标准 (每个试验的范围是 0-200ng, 用浊度计确定) 计算 Betv1 特异 IgG 的浓度。在异源交联测定中测量双特异 IgG 的浓度 (即 Feld1-Betv1 交

联活性)。在该测定中,将样品在总体积 300 μ l 的 PBS-IAT 中与 0.5mg 的 Sepharose 偶联 cat 提取物 (其中存在 Feld1 抗原) 温育 24h。然后,用 PBS-T 清洗 Sepharose,并与 125 I 标记的 Betv1 温育 24h,之后用 PBS-T 清洗 Sepharose,并测量已结合的放射性的量相对于所添加的放射性的量。双特异性 IgG(Feld1-Betv1) 的浓度的计算使用与 Betv1 结合试验中所用相同的校正曲线,其是由纯化的 Betv1 结合性 rIgG 获得的。

[0418] Betv1 结合抗体在一个峰内洗脱,保留体积为 \sim 12.6ml,对应于单体 IgG 的保留体积 (图 11)。在相同的级分中检测到了异源 Feld1-Betv1 交联活性,表明双特异活性与单体 IgG 有关。

[0419] 实施例 30 :经过透析的红细胞裂解物中 IgG4 交换的评估

[0420] 从健康供体分离红细胞,并以 60.7% 的血细胞比容在 SAGM (盐水、腺苷酸、葡萄糖、甘露醇) 缓冲液中保存于 4 $^{\circ}$ C。为了获得裂解物,用 PBS-叠氮化物 (PBS 中添加 0.05% (w/v) NaN_3) 清洗细胞 3 次,并重悬在体积 2 倍于存储缓冲液的体积的水中。因此,未稀释的红细胞裂解物相当于血细胞比容为 30%。将一部分裂解物用 Pierce 产的透析膜盒 (3.5kD 截留) 对 PBS-叠氮化物进行透析。将未透析的裂解物在 Amicon 过滤器 (3.5kD 截留) 中进行离心,获得超滤液。

[0421] 通过将 IgG4 抗体混合物 (Betv1 特异性 IgG4 (0.5 μ g) 和 Feld1 特异性 IgG4 (0.5 μ g)) 与新鲜制备的红细胞裂解物 (25 μ l) 或经透析的裂解物 (25 μ l) 在 37 $^{\circ}$ C 一起温育来评估 IgG4 半分子的交换。每个温育体系的总体积为 50 μ l,这样每种抗体的终浓度为 10 μ g/ml。使用如下的添加物:Sigma 产的还原型谷胱甘肽 (GSH),葡萄糖-6 磷酸 (G-6-P) 和 NADPH (均由 Roche 产)。这些化合物在使用之前溶解于水中。温育 24h 后,从温育混合物采取样品到 PBS-AT (PBS 添加 0.3% 牛血清白蛋白、0.1% Tween-20 和 0.05% (w/v) NaN_3) 中,以测量双特异活性。如果需要,将样品保存于 4 $^{\circ}$ C。

[0422] 在异源交联测定中测量双特异活性 (即 Betv1-Feld1 交联活性)。在该测定中,将样品稀释物与 0.5mg 的 Sepharose 偶联 cat 提取物在总体积为 300 μ l 的 PBS-IAT (PBS-AT 添加 μ g/ml IVIg) 中温育 24h。然后,将 Sepharose 用 PBS-T 清洗,与 125 I 标记的 Feld1 温育 24h,之后用 PBS-T 清洗 Sepharose,并测量结合的放射性的量相对于所添加的放射性的量。

[0423] 将交换水平与新鲜制备的裂解物产生的双特异活性进行比较 (表 2)。

[0424]

交换源	添加物	交换活性
裂解物	-	++
透析裂解物	-	-
透析裂解物	超滤液	+
透析裂解物	G-6-P, NADPH, GSH	++
透析裂解物	G-6-P	-

透析裂解物	NADPH	-
透析裂解物	GSH	++

[0425] 表 2. 透析红细胞裂解物中恢复双特异活性的因子的概览将经透析的红细胞裂解物的交换活性与新鲜制备的裂解物进行比较。透析裂解物添加 5 μ l 超滤液。G-6-P、NADPH 和 GSH 的终浓度分别为 5mM、0.1mM 和 0.5mM。

[0426] 从这些数据显然可见,红细胞裂解物的活性在透析之后损失掉了。添加超滤液恢复了大部分的交换。这一结果提示,在透析期间某种组分 (< 3.5kD) 损失了,而该组分对于交换反应是至关重要的。这一组分很可能参与氧化还原循环,因为二硫桥还原和氧化是 IgG4 半分子交换必需的。因此,向透析裂解物添加氧化还原循环中的三种“辅因子”(G-6-P、NADPH 和 GSH),以研究这些化合物是否能够恢复交换活性。如果同时补充 G-6-P、NADPH 和 GSH,则交换活性可以被恢复。在各别的因子存在下温育经透析的裂解物显示,GSH 可恢复交换活性,G-6-P 或 NADPH 则不能。

[0427] 实施例 31:还原型谷胱甘肽介导的 IgG4 半分子交换的评估

[0428] 将嵌合抗体混合,然后与还原型谷胱甘肽 (GSH) 温育,以研究 IgG4 的交换。将 GSH(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 溶解于水中备用。

[0429] 在本实验中,IgG4 半分子的交换是通过将由 Betv1 特异性 IgG4(1 μ g) 和 Feld1 特异性 IgG4(1 μ g) 的 IgG4 组成的抗体混合物在含有 GSH 的 PBS/叠氮化物中 37°C 温育来评估的。总温育体积为 100 μ l,这样每种抗体的终浓度为 10 μ g/ml。在示明的时间点,从温育混合物采取样品到 PBS-AT(添加了 0.3% 牛血清白蛋白、0.1% Tween-20 和 0.05% (w/v) NaN_3 的 PBS) 中。将样品保存在 4°C,用于测量抗体结合和双特异活性。

[0430] 在抗原结合试验中测量 Betv1 结合性抗体的水平。在 ^{125}I -标记的 Betv1 的存在下,将样品与 0.75mg 蛋白 G Sepharose (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 在 750 μ l 的 PBS-IAT (PBS-AT 添加 μ g/ml IVIg) 中温育 24h。接着,用 PBS-T (PBS 添加 0.1% Tween-20 和 0.05% (w/v) NaN_3) 清洗 Sepharose,并测量结合的放射性的量相对于所添加的放射性的量。使用纯化的 Betv1 结合性抗体作为标准(每个试验的范围是 0-200ng,由浊度计确定)计算 Betv1 特异性 IgG 的浓度。在异源交联测定中测量双特异性 IgG 的浓度(即 Feld1-Betv1 交联活性)。在该测定中,将样品与 0.5mg 的 Sepharose 偶联 cat 提取物(其中存在 Feld1 抗原)在总体积 300 μ l 的 PBS-IAT 中温育 24h。然后,将 Sepharose 用 PBS-T 清洗,并与 ^{125}I -标记的 Betv1 温育 24h,之后用 PBS-T 清洗 Sepharose,测量已结合的放射性的量相对于所添加的放射性的量。双特异 IgG (Feld1-Betv1) 的浓度的计算使用在 Betv1 结合试验中所用相同的校正曲线,其是由纯化的 Betv1 结合性 IgG 获得的。

[0431] 在图 12 中,提供了 GSH 介导的 IgG4 半分子交换的时间过程。从这些数据显然可见,IgG4 半分子在 GSH 的存在下被交换了。在本实验中,在 0.1-1mM GSH 之间观察到了最佳的交换,使用 0.5mM GSH,在 24h 后达到了最高的交换 (~90%)。

[0432] 实施大小排阻色谱,以排除在 GSH 介导的 IgG4 交换之后观察到的双特异活性是 IgG 聚集的结果的可能性(图 13)。为此,将 Betv1 结合性 IgG4 与 Feld1 结合性 IgG4(每种抗体 10 μ g) 的混合物在 PBS/叠氮化物中与 0.5mM GSH 温育。将该混合物(最终体积 100 μ l) 在 37°C 温育 24h,之后将 70 μ l 在 Superdex200 柱上进行分级。在级分中,测量

Betv1 结合性 IgG 和 Feld1-Betv1 交联性 IgG。Betv1 结合性抗体在一个峰中洗脱,保留体积为~ 12.6ml,对应于单体 IgG 的保留体积。在相同的级分中检测到了异源 Feld1-Betv1 交联活性,提示双特异活性与单体 IgG 有关。发现 GSH 存在下的双特异 IgG4 分子的产生是温度依赖性的,因为在 37°C 下比在 4°C 下交换发生效率更高(图 14)。

[0433] 实施例 32. 其他作用剂存在下双特异 IgG 的产生

[0434] 混合 IgG1-Betv1 与 IgG1-Feld1 或 IgG4-Betv1 与 IgG4-Feld1,使每种抗体的终浓度为 10 μ g/ml,并在总体积 50 μ l 中与还原剂一起温育。除了 GSH 之外,对如下的作用剂进行测试(温育混合物中的终浓度):Sigma 产的 L-半胱氨酸(100 μ M),Biorad 产的二硫苏糖醇(50 μ M),Biorad 产的 β -巯基-乙醇(BME)(100 μ M),和 Sigma 产的氧化型谷胱甘肽(GSSG,注意在该组作用剂中这种作用剂是非还原性的,而其它的则是还原性的)(100 μ M)。将混合物在 37°C 温育 24h,并采取样品到 PBS/AT 中,在其中对(双)特异 IgG 的浓度进行测量。图 15 显示,向纯化的 IgG4-Betv1 和 IgG4-Feld1 的混合物中添加 GSH 或其它还原剂(但非 GSSG)足以诱导 Fab 臂交换和双特异 IgG4 的产生。相比之下,在对照 IgG1 混合物中没有诱导出双特异反应性。

[0435] 实施例 33. 使用 GSH 的全人 IGG4 抗体的交换

[0436] 混合 IgG1-CD20、IgG4-CD20、IgG1-EGFr 和 IgG4-EGFr,并与 GSH 在 1ml 总体积中温育。每种抗体的终浓度为 50 μ g/ml;GSH 的终浓度为 0.5mM。将混合物在 37°C 温育 24h,采取样品在 PBS-AT 中,对其中的(双)特异 IgG 的浓度进行测量。

[0437] 双特异活性用夹心式 ELISA 测定。该测定用含 1 μ g/ml EGFR 重组胞外域的 PBS(100 μ l/孔)在 4°C 下对 ELISA 板(Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany)包被过夜。用 PBS/0.05% Tween 20(PBT)清洗板 3 次。将样品稀释在 PBT/0.2% BSA(PBTB)中,并转移到 ELISA 板(100 μ l/孔)。在平板振荡器(300rpm)上室温(RT)下温育 90 分钟之后,弃去样品,用 PBT 清洗板 3 次。接着,添加 100 μ l 溶于 PBTB 中的 2 μ g/ml 小鼠抗独特型单克隆抗体 2F2SAB1.1(针对抗-CD20 抗体 7D8;Genmab),RT 下在平板振荡器(300rpm)上温育 90 分钟。弃去抗独特型抗体,用 PBT 清洗板 3 次,然后添加 100 μ l/孔的在 PBTB 中稀释 1000x 的 HRP 偶联山羊抗小鼠 IgG(JacksonImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA, USA),并在 RT 下在平板振荡器(300rpm)上温育 90 分钟。弃去检测抗体,用 PBT 清洗板 3 次。将 50mgABTS 药片(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)溶解在 ABTS 缓冲液(Roche)中,添加到 ELISA 板上(100 μ l/孔)。将 ELISA 板用铝箔覆盖,在 RT 下平板振荡器(300rpm)上温育 30 分钟(或者更长时间,如果需要的话),用 100 μ l 每孔的草酸(Riedel de Haen Seelze, Germany)终止反应。将 ELISA 板置于 RT 下 10 分钟,然后在 ELISA 酶标仪内阅读 405nm 吸光度。

[0438] 图 16A 显示,在 GSH 存在下温育 IgG4-EGFr 和 IgG4-CD20 混合物时,经过一段时间形成双特异性的抗 EGFR/CD20 抗体,而在不存在 GSH 时则不会形成。而在 IgG1 抗体的混合物中,无论是否存在 GSH 均没有发生 Fab 臂交换。

[0439] 为了探索 GSH 介导的 IgG4 半分子交换的动态范围,使用 GSH 的完全浓度曲线(0.5-1,000 μ M)对交换进行分析。混合 IgG4-CD20 和 IgG4-EGFr,并在总体积 1ml 中与 GSH 温育。每种抗体的终浓度为 50 μ g/ml;GSH 的终浓度如图 16B 所示。将混合物在 37°C 温育 24h,并将样品采取到 PBS-AT 中,测量其中的(双)特异 IgG 的浓度。

[0440] 图 16B 显示出 IgG4 半分子交换的明显的 GSH 剂量依赖性。为了探索反应组分对 GSH 介导的 IgG4 半分子交换有何影响,在 PBS 和无血清和蛋白的化学限定培养基 (FreeStyle 293 表达培养基, GIBCO/Invitrogen Corporation) 中对交换进行了测试。结果发现,在该组织培养基中, GSH 介导的交换在更低的 GSH 浓度下发生 (图 16C)。还发现,在 GSH 介导的 IgG4 半分子交换中存在一个最优值,因为与 5mM GSH 温育的交换明显导致低于与 0.5mM 温育的交换 (图 16D)。

[0441] 在有或无 GSH 的条件下将一个 IgG4-EGFr 和 IgG4-CD20 的混合物温育 24h,并通过质谱 (ESI-TOF MS) 进行评估。含有 200 μ g/ml 每种抗体的 50 μ l 样品用 1 μ l N-糖苷酶 F (Roche Diagnostics NL BV, Almere, 荷兰) 过夜去糖基化。样品在 Acquity UPLC™ (Waters, Milford, USA) 上用 BEH C8, 1.7 μ m, 2.1x50mm 柱在 60°C 进行脱盐。注射 50 μ l, 用 5%–95% 的洗脱液 B 梯度进行洗脱。洗脱液 A 是 MilliQ 水 (Millipore Synthesis A10 装置), 洗脱液 B 是 LC-MS 级乙腈 (Biosolve, Valkenswaard, 荷兰)。两种洗脱液均含 0.05% 甲酸作为有机修饰剂 (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Germany)。飞行时间电喷雾电离质谱在线 (on-line) 地记录在以阳离子模式工作的 micrOTOF™ 质谱仪 (Bruker, Bremen, Germany) 上。在每次分析中,用 ES 调节混合物 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) 对 500–5000m/z 的范围 (scale) 进行内部校准。使用极大熵 (Maximum Entropy) 算法将质谱去卷积,该算法由 DataAnalysis™ 软件 v. 3.3 (Bruker) 提供。

[0442] 图 16E 显示,在没有 GSH 存在的条件下, IgG4-CD20 的分子量 (145.5kD) 和 IgG4-EGFR 的分子量 (145.9kD) 均保持不变。然而,在 GSH 存在下 (图 16F), 出现了一个新峰,其质量相应于一个经 Fab 臂交换的分子 (145.7kD)。这个新质量对应于双特异性抗 EGFR/CD20 抗体的预期质量。然而,从 MS 谱的峰高度可以估计,双特异抗体占了混合物中总抗体质量的 50%,表明发生了随机交换,其在 24h 内达到平衡。

[0443] 实施例 34. 来自猕猴 (和其它物种) 的多克隆免疫球蛋白参与重组人 IGG4 抗体的 Fab 臂交换

[0444] 将两种重组人 IgG4 抗体 (IgG4-CD20 和 IgG4-EGFr, 如上所述) 的混合物在存在或不存在来自猕猴 (6x)、黑猩猩 (2x)、食蟹猴、狒狒、马和猪的纯化免疫球蛋白或人 IVIg 的条件下与 GSH 在 37°C 温育 24h。在如上所述的夹心式 ELISA 中测量通过 Fab 臂交换的双特异性抗体形成。此外,此测定中也测试了山羊、家兔和绵羊免疫球蛋白。

[0445] 图 17a 显示,,猕猴多克隆免疫球蛋白与人多克隆免疫球蛋白 (IVIg) 在体外抑制重组抗体在还原型谷胱甘肽的存在下的 Fab 臂交换的能力相当。这意味着猕猴免疫球蛋白的某个组分参与了 Fab 臂交换。猕猴免疫球蛋白,可能是猕猴 IgG4,能够与重组人 IgG4 交换 Fab 臂。

[0446] 图 17b 显示,来自其它数只猕猴的多克隆免疫球蛋白在体外以不同的效力抑制重组抗体在还原型谷胱甘肽存在下的 Fab 臂交换。这意味着,所述参与 Fab 臂交换的猕猴免疫球蛋白组分以不同的浓度存在,或者该组分并不存在于所有的猕猴体内。

[0447] 图 17c 显示,来自数种其它猴类 (狒狒、黑猩猩、食蟹猴) 的多克隆免疫球蛋白,以及来自马和猪的免疫球蛋白,在体外以不同的效力抑制重组抗体在还原型谷胱甘肽存在下的 Fab 臂交换。这意味着,所述参与 Fab 臂交换的成分以不同的浓度存在于这些物种中。山羊、家兔和绵羊免疫球蛋白对重组免疫球蛋白在还原型谷胱甘肽存在下的体外 Fab 臂交换

无影响（数据未显示）。

[0448] 实施例 35. 铰链区或 CH3 结构域突变体的半分子交换

[0449] 制备了三种 IgG1 突变体：具有 IgG4 核心铰链的 IgG1 (IgG1-CPSC) 和两个 CH3 结构域互换突变体 (swap mutants) 即 (IgG1-CH3 (IgG4) 和 IgG1-CPSC-CH3 (IgG4))。

[0450] 使用 pEE-G1-wt a Betv1 作为模板 (228 表示抗体氨基酸残基的 EU 编号。相同的位置在 Kabat 编号法中为 241 号, 在 SEQ ID NO:19 中为 111 号 (CPPC 核心铰链序列中的第三个位置)), 利用定点诱变在 IgG1 的铰链中引入一个 P228S 突变。突变引物, 正向和反向, 用 Vector NTI Advance 10 设计:

[0451] P228S 正向突变引物 (Mut primer-F): SEQ ID NO:22

[0452] P228S 反向突变引物 (Mut primer-R): SEQ ID NO:23

[0453]

<p>P228S Mut primer-F 5' -CTTgTgACAAAACCTCACACCTgCCCATCgTgCCCAggTAAgCCAg-3'</p> <p>P228S Mut primer-R 5' -CTggCTTACCTgggCACgATgggCAggTgTgAgTTTTgTCACAAg-3'</p>
--

[0454] 使用 Quickchange 定点诱变试剂盒 (Stratagene) 产生 pEE-G1-CPSC 突变体。聚合酶链式反应 (PCR) 混合物由 5 μ l pEE-G1a Betv1 DNA 模板 (\sim 35ng), 1,5 μ l 正向突变引物 (\sim 150ng), 1,5 μ l 反向突变引物 (\sim 150ng), 1 μ l dNTP 混合物, 5 μ l 反应缓冲液 (10x), 36 μ l H₂O 以及最后 1 μ l Pfu Turbo DNA 聚合酶组成。然后将混合物应用于 PCR: 30" 95°C, 30" 95°C (变性), 1' 55°C (退火) 和 17min 68°C (延伸)。该循环重复 20 次。

[0455] 利用 DNA 消化和连接产生 CH3 结构域互换突变构建体 IgG1-CH3 (IgG4) 和 IgG1-CPSC-CH3 (IgG4)。用于获得 CH3 结构域和无 CH3 结构域的载体的消化反应体系如下: \sim 1500ng DNA (pEE-G1-betv1, pEE-G1-CPSC 和 pEE-G4-betv1), 2 μ l BSA, 2 μ l Neb3 缓冲液, 1 μ l SalI, 加 H₂O 至体积 20 μ l。在 37°C 温育 30'。纯化 DNA 并用 30 μ l H₂O 洗脱, 之后添加 1 μ l SanDI 和 3 μ l 通用缓冲液, 在 37°C 温育 30'。将片段在含有溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳。在紫外光下将片段从凝胶上切下, 并用 DNA 纯化试剂盒 (Amersham) 溶解。用如下的程序将 pEE-G4-wt SalI/SanDI (其含有 IgG4 CH3 结构域) 片段连接到 pEE-G1-wt 和 pEE-G1-CPSC 中: 1 μ l 模板 DNA (SalI/SanDI 消化的 pEE-G1-wt 和 pEE-G1-CPSC), 5 μ l SalI/SanDI 插入序列, 4 μ l Ligate-it 缓冲液, 9 μ l H₂O 和 1 μ l 连接酶, 总体积为 20 μ l。5' 后终止连接反应。

[0456] 采用与上面相似的程序, 利用 DNA 消化 (使用 ApaI 和 HindIII) 和连接, 将 betv1 突变抗体的 VH 结构域替换为 pEE-G4-a-feld1 wt 的 VH 结构域。

[0457] 另外, 制备一种 IgG4 突变体: IgG4-S228Pnew。在该突变体中, 通过将 228 位丝氨酸 (SEQ ID NO:19 中的位置 111) 替换为脯氨酸 (IgG1 核心铰链) 来使铰链稳定化。定点诱变使用 QuickChange II XL 定点诱变试剂盒 (Stratagene, Amsterdam, 荷兰), 根据制造商的使用说明操作。该方法包括引入一个沉默的额外 XmaI 位点, 用于筛选成功的诱变。简而言之, 将 5 μ l 10x 反应缓冲液, 1 μ l 寡核苷酸 S228Pfcorrect (100pmol/ μ l), 1 μ l 寡核苷酸 S228Prorrect (100pmol/ μ l), 1 μ l dNTP 混合物, 3 μ l Quicksolution, 1 μ l 质粒 pTomG42F8HG (50ng/ μ l) (2006 年 11 月 28 日提交的 (RO/DK (Genmab)、题为 "Recombinant

monovalent antibodies and methods for production thereof”的PCT专利申请中有描述)以及1 μ l PfuUltra HF DNA聚合酶混合成总体积为50 μ l,并用TGradient Thermocycler 96(Whatman Biometra,Goettingen,Germany ;产品编号050-801)使用18个循环的程序进行扩增:95 $^{\circ}$ C变性1min;18个循环的95 $^{\circ}$ C 50sec,60 $^{\circ}$ C 50sec和68 $^{\circ}$ C 10min。将PCR混合物保存于4 $^{\circ}$ C直至进一步处理。接着,将PCR混合物与1 μ l DpnI在37 $^{\circ}$ C温育60min以消化pTomG42F8HGv载体,然后保存于4 $^{\circ}$ C直到进一步处理。将反应混合物用5 μ l 3M NaAc和125 μ l乙醇沉淀,在-20 $^{\circ}$ C温育20min,然后以14000xg在4 $^{\circ}$ C离心沉降20分钟。将DNA离心沉淀用70%乙醇清洗,干燥并溶解于4 μ l水中。按照制造商的使用说明(Invitrogen)将总共4 μ l反应体积转化到One Shot DNH5 α T1^R感受态大肠杆菌细胞(Invitrogen,Breda,荷兰)中。接着,将细胞涂布在含有50 μ g/ml氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)琼脂平板上。将平板在37 $^{\circ}$ C温育16-18小时,直到细菌菌落变得明显。

[0458] 通过菌落PCR和XmaI(突变将导致XmaI位点丢失)消化进行筛选之后,从细菌分离质粒,并通过DNA测序对突变进行确认。为了检查是否引入了非期望的额外突变,对整个HC编码区进行测序,发现没有包含任何额外突变。将最终的构建体命名为pTomG42F8S228PNew。

[0459]

名称	寡核苷酸序列
S228Pfcorrect (SEQ ID NO :24)	CCCCATGCCACCATGCCAGGTAAGCCAACCC AGGCCTCGC
S228Prcorrect (SEQ ID NO :25)	GCGAGGCCTGGGTTGGCTTACCTGGGCATGGTG GGCATGGGGG

[0460] 将来自这些构建体的重组抗体在3ml,6孔板(NUNC)内或者在125ml锥形瓶(erlenmeyers)(Corning)内于HEK 293细胞中瞬时表达,以293 Fectin(Invitrogen)作为转染试剂。

[0461] 将下述非纯化抗体的混合物(FreeStyle 293表达培养基,GIBCO/Invitrogen Corporation)与0.1mM GSH在37 $^{\circ}$ C温育24h,将样品吸取在PBS-AT中,按照先前实施例所述测量其中的(双)特异性IgG的浓度:

[0462] -IgG4a-feld1 wt与IgG4a-betv1 wt

[0463] -IgG1a-feld1 wt与IgG4a-betv1 wt

[0464] -IgG1a-feld1 CPSC与IgG1a-betv1 CPSC(下面表示为IgG1 CPSC-IgG1 CPSC)

[0465] -IgG1a-feld1 CPSC与IgG1a-betv1 CH3(IgG4)(IgG1 CPSC-IgG1CH3(IgG4))

[0466] -IgG1a-feld1 CPSC与IgG1a-betv1 CPSC/CH3(IgG4)(IgG1 CPSC-IgG1 CPSC/CH3(IgG4))

[0467] -IgG1a-feld1 CH3(IgG4)与IgG1a-betv1 CH3(IgG4)(IgG1 CH3(IgG4)-IgG1 CH3(IgG4))

[0468] -IgG1a-feld1 CH3(IgG4)与IgG1a-betv1 CPSC/CH3(IgG4)(IgG1CH3(IgG4)-IgG1CPSC/CH3(IgG4))

[0469] -IgG1a-feld1 CPSC/CH3(IgG4) 与 a-betv1 IgG1 CPSC/CH3(IgG4) (IgG1
 [0470] CPSC/CH3(IgG4)-IgG1 CPSC/CH3(IgG4))
 [0471] -IgG1a-feld1 CPSC/CH3(IgG4) 与 IgG4a-betv1 wt (IgG1CPSC/CH3(IgG4)-IgG4
 wt

[0472] -IgG4a-bet1 S228Pnew 与 IgG4 wt

[0473] 结果显示,在这些体外条件下 (0.1mM GSH),当其中一种抗体含有 CPSC 铰链且两种抗体均含有 IgG4-样 CH3 时,会发生半分子交换。另外,在含有 IgG1 铰链的 IgG4 分子与 IgG4 wt 分子之间也发生半分子交换:

[0474]	IgG1 wt	IgG4 wt	IgG1 CH3 (IgG4)	IgG1 CPSC	IgG1 CPSC/CH3 (IgG4)
[0476]	IgG1 wt	-	-	-	-
[0477]	IgG4 wt	-	+	+	-
[0478]	IgG1 CH3 (IgG4)	-	+	-	±
[0479]	IgG1 CPSC	-	-	-	-
[0480]	IgG1	-	+	±	-
[0481]	CPSC/CH3 (IgG4)	-	-	-	-
[0482]	IgG4S228Pnew	-	+	-	-

[0483] - = 无交换

[0484] + = 发生交换

[0485] ± = 有限的交换 (~ 5%)

[0486] 空白框 = 未测试

[0487] 用 0、0.1、1 和 10mM GSH 测试了 GSH 浓度对来自不同突变体的半分子交换的影响。交换的测试使用如下的混合物:

[0488] -IgG4a-feld1 wt 与 IgG4a-betv1 wt

[0489] -IgG1a-feld1 wt 与 IgG4a-betv1 wt

[0490] -IgG1a-feld1 CPSC 与 IgG1a-betv1 CPSC

[0491] -IgG1a-feld1 CH3 (IgG4) 与 IgG1a-betv1 CH3 (IgG4)

[0492] -IgG1a-feld1 CPSC/CH3 (IgG4) 与 a-betv1 IgG1 CPSC/CH3 (IgG4)

[0493] 对于浓度不大于 1mM 的 GSH,结果 (图 19A) 证实了上文的描述。在 10mM GSH 下,在含有 IgG1a-feld1 CH3 (IgG4) 和 IgG1a-betv1 CH3 (IgG4) 的反应中也见到了半分子交换。

[0494] 如前面实施例中所述实施大小排阻色谱,以排除在 GSH 介导的合适的 IgG1 突变体的交换之后所观察到的双特异活性是 IgG 聚集的结果的可能性。在相应于单体 IgG 的保留体积的级分中检测到了异源 Feld1-Betv1 交联活性。

[0495] 为了鉴定 CH3 结构域中负责半分子交换能力的氨基酸残基,将 IgG4-样残基引入到 IgG1 的 CH3 中的在 IgG1 和 IgG4 之间不同的位置上。这样,使用 pEE-G1-wt a Betv1 或 pEE-G1-wt a Feld1 作为模板,基本上按照如上所述将 R238Q、K292R、Q302E 或 P328L 突变 (编号参照 SEQ ID NO:19) 引入到 IgG1 的 CH3 结构域中。而且,还使用 pEE-G1-CPSC betv1 或 pEE-G1-CPSC feld1 作为模板将一个 K292R 突变引入到 IgG1 CPSC 的 CH3 结构域

内。简而言之,用 Vector NTI Advance 10 设计正向和反向诱变引物。使用 Quickchange 定点诱变试剂盒 (Stratagene) 产生构建体。将来自这些构建体的重组抗体在 3ml 6 孔板 (NUNC) 内或者在 125ml 锥形瓶 (Corning) 内在 HEK 293 细胞中瞬时表达,以 293 Fectin (Invitrogen) 作为转染试剂。将下述非纯化抗体的混合物 (FreeStyle 293 表达培养基, GIBCO/Invitrogen Corporation) 与 0.5 或 5mM GSH 在 37°C 温育 24h,将样品吸取在 PBS-AT 中,按照先前的实施例所述测量其中 (双) 特异性 IgG 的浓度:

- [0496] -IgG1a-feld1 wt 与 IgG4a-betv1 wt (图 19B 中表示为 IgG1)
- [0497] -IgG1a-feld1 CPSC 与 IgG4a-betv1 wt (图 19B 中表示为 IgG1-CPSC)
- [0498] -IgG1a-feld1 CH3(IgG4) 与 IgG4a-betv1 wt (图 19B 中表示为 IgG1-CH3(G4))
- [0499] -IgG1a-feld1 CPSC/CH3(IgG4) 与 IgG4a-betv1 wt (图 19B 中表示为 IgG1-CPSC/CH3(G4))
- [0500] -IgG1a-feld1 R238Q 与 IgG4a-betv1 wt (图 19B 中表示为 IgG1-R238Q)
- [0501] -IgG1a-feld1 K292R 与 IgG4a-betv1 wt (图 19B 中表示为 IgG1-K292R)
- [0502] -IgG1a-feld1 Q302E 与 IgG4a-betv1 wt (图 19B 中表示为 IgG1-Q302E)
- [0503] -IgG1a-feld1 P328L 与 IgG4a-betv1 wt (图 19B 中表示为 IgG1-P328L)
- [0504] -IgG1a-feld1 CPSC/K292R 与 IgG4a-betv1 wt (图 19B 中表示为 IgG1-CPSC/K292R)
- [0505] -IgG4a-feld1 wt 与 IgG4a-betv1 wt (图 19B 中表示为 IgG4)
- [0506] -IgG1a-feld1 wt 与 IgG1a-betv1 wt (图 19C 中表示为 IgG1)
- [0507] -IgG1a-feld1 CPSC 与 IgG1a-betv1 CPSC (图 19C 中表示为 IgG1-CPSC)
- [0508] -IgG1a-feld1 CH3(IgG4) 与 IgG1a-betv1 CH3(IgG4) (图 19C 中表示为 IgG1-CH3(G4))
- [0509] -IgG1a-feld1 CPSC/CH3(IgG4) 与 IgG1a-betv1 CPSC/CH3(IgG4) (图 19C 中表示为 IgG1-CPSC/CH3(G4))
- [0510] -IgG1a-feld1 R238Q 与 IgG1a-betv1 R238Q (图 19C 中表示为 IgG1-R238Q)
- [0511] -IgG1a-feld1 K292R 与 IgG1a-betv1 K292R (图 19C 中表示为 IgG1-K292R)
- [0512] -IgG1a-feld1 Q302E 与 IgG1a-betv1 Q302E (图 19C 中表示为 IgG1-Q302E)
- [0513] -IgG1a-feld1 P328L 与 IgG1a-betv1 P328L (图 19C 中表示为 IgG1-P328L)
- [0514] -IgG1a-feld1 CPSC/K292R 与 IgG1a-betv1 CPSC/K292R (图 19C 中表示为 IgG1-CPSC/K292R)

[0515] -IgG4a-feld1 wt 与 IgG4a-betv1 wt (图 19C 中表示为 IgG4)

[0516] 结果显示,在被测试的体外条件下 (0.5mM 和 5mM GSH),当两种抗体均在 292 位含有一个 R 时,可发生半分子交换 (图 19B+C)。在该实验条件下,238 位的 R 或 Q,302 位的 Q 或 E,以及 328 位的 P 或 L 对于 IgG1 不能交换半分子均无影响。

[0517] 实施例 36. 在 0.5mM GSH 下,具有稳定化的 IgG1-样核心铰链的 IgG4 分子不参与重组人 IgG4 抗体的 Fab 臂交换反应

[0518] 将两种重组人 IgG4 抗体 (IgG4-CD20 和 IgG4-EGFr,如上所述) 的混合物在存在或不存在过量 (10,50 和 100 微克/ml) 的那他珠单抗 (Tysabri) 或吉妥单抗 (Mylotarg) (10 微克/ml) 的条件下与 0.5mM GSH 在 37°C 温育 24h。那他珠单抗是一种可商购的含有野生型

IgG4 核心铰链的人源化 IgG4 抗体,而吉妥单抗是一种可商购的、含有一个稳定的 IgG1-样核心铰链的人源化 IgG4 抗体。在如上文所述的夹心式 ELISA 中测量双特异性抗体通过 Fab 臂交换的形成。

[0519] 图 20A 显示,在过量的那他珠单抗的存在下,重组 CD20 和 EGFR 抗体的 Fab 臂交换被抑制。

[0520] 图 20B 显示,在过量的那他珠单抗而非吉妥单抗的存在下,重组 CD20 和 EGFR 抗体的 Fab 臂交换被抑制。

[0521] 这表明,在使用 0.5mM GSH 的体外条件下,那他珠单抗而非吉妥单抗参与 Fab 臂交换反应,而且稳定化的 IgG1-样核心铰链不参与 Fab 臂交换。

[0522] 实施例 37. 在 292 位具有额外突变的 IgG1-CPSC 构建体的半分子交换

[0523] 与实施例 35 类似,在 pConG1f2F8(对 EGFR 特异)和 pConG1f7D8(对 CD20 特异)中制备了三种 IgG1 突变体:一个具有 IgG4 核心铰链的 IgG1(IgG1-CPSC)和两个 CH3 结构域互换突变体(IgG1-CH3(IgG4)和 IgG1-CPSC-CH3(IgG4)(即其中 IgG1 的 CH3 区被 IgG4 的 CH3 区替换的构建体))。这产生了如下的构建体:pG1f-2F8CPSC、pG1f-7D8CPSC、pG1f-2F8-CH3(G4)、pG1f-7D8-CH3(G4)、pG1f-2F8CPSC-CH3(G4)和 pG1f-7D8CPSC-CH3(G4)。

[0524] 然后,基本上与上文所述相同的方式,在 pG1f-2F8CPSC 和 pG1f-7D8CPSC 构建体的 CH3 结构域中引入 R238Q、K292R、K292Y、K292F、K292W、Q302E 或 P328L 突变(见 SEQ ID NO:19)。简而言之,用 Vector NTI Advance 10 设计正向和反向突变引物。使用 Quickchange 定点诱变试剂盒(Stratagene)产生构建体。

[0525] 将来自这些构建体的重组抗体于 3ml 的 6 孔板(NUNC)内或者在 125ml 锥形瓶(Corning)内在 HEK 293 细胞中瞬时表达,以 293 Fectin(Invitrogen)作为转染试剂。然后将培养物上清对 PBS 透析,并通过浊度计量法测量浓度(见上文)。将非纯化的、交换了缓冲液的抗体的下述混合物(FreeStyle 293 表达培养基, GIBCO/Invitrogen Corporation)与 0.5GSH 在 37°C 温育 24h,将样品吸取在 PBS-AT 中,按照先前实施例所述测量其中(双)特异性 IgG 的浓度:

[0526] -IgG1-2F8 wt 与 IgG1-7D8 wt(表示为 IgG1)

[0527] -IgG1-2F8-CPSC 与 IgG1-7D8-CPSC(表示为 IgG1-CPSC)

[0528] -IgG1-2F8-CH3(IgG4) 与 IgG1-7D8-CH3(IgG4)(表示为

[0529] IgG1-CH3(IgG4))

[0530] -IgG1-2F8-CPSC-CH3(IgG4) 与 IgG1-7D8-CPSC-CH3(IgG4)(表示为 IgG1-CPSC-CH3(IgG4))

[0531] -IgG1-2F8-CPSC-R238Q 与 IgG1-7D8-CPSC-R238Q(表示为 IgG1-CPSC-R238Q)

[0532] -IgG1-2F8-CPSC-K292R 与 IgG1-7D8-CPSC-K292R(表示为 IgG1-CPSC-K292R)

[0533] -IgG1-2F8-CPSC-K292Y 与 IgG1-7D8-CPSC-K292Y(表示为 IgG1-CPSC-K292Y)

[0534] -IgG1-2F8-CPSC-K292F 与 IgG1-7D8-CPSC-K292F(表示为 IgG1-CPSC-K292F)

[0535] -IgG1-2F8-CPSC-K292W 与 IgG1-7D8-CPSC-K292W(表示为 IgG1-CPSC-K292W)

[0536] -IgG1-2F8-CPSC-Q302E 与 IgG1-7D8-CPSC-Q302E(表示为 IgG1-CPSC-Q302E)

[0537] -IgG1-2F8-CPSC-P328L 与 IgG1-7D8-CPSC-P328L(表示为 IgG1-CPSC-P328L)

[0538] -IgG4-2F8 wt 与 IgG4-7D8 wt(表示为 IgG4)

[0539] 图 21 显示,在被测试的体外条件下 (0.5mM GSH),当存在 CPSC 铰链并且在 292 位为 R 时,可发生半分子交换。此外,结果显示,292 位上为 Y 或 F,但非 W,也有助于半分子交换,尽管程度低一些。238 位上的 R 或 Q,302 位上的 Q 或 E,以及 328 位上的 P 或 L 对 IgG1-CPSC 不能交换半分子没有影响。

[0540] 实施例 38. 具有稳定化的 CPPC 铰链的 IgG4 分子能够在体外 (存在 5mMGSH 时) 进行 Fab 臂交换,但在体内不能

[0541] 在 5mM GSH 的存在下,将 IgG4-EGFR-CPPC 和 IgG4-CD20 的混合物温育 24h,并通过质谱 (ESI-TOF MS) 进行评估。将含有每种抗体 200 μ g/ml 的 50 μ l 样品用 1 μ l N-糖苷酶 F (Roche Diagnostics NL BV, Almere, 荷兰) 去糖基化处理过夜。将样品在 Acquity UPLC™ (Waters, Milford, USA) 上用 BEHC8、1.7 μ m, 2.1x50mm 柱 60 °C 脱盐。注射 5 μ l, 用 5% -95% 的洗脱液 B 的梯度洗脱。洗脱液 A 是 MilliQ 水 (Millipore Synthesis A10 装置), 洗脱液 B 是 LC-MS 级乙腈 (Biosolve, Valkenswaard, 荷兰)。两种洗脱液均含有 0.05% 甲酸作为有机改性剂 (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Germany)。飞行时间电喷雾电离质谱在线地记录在以阳离子模式工作的 micrOTOF™ 质谱仪 (Bruker, Bremen, Germany) 上。每次分析中利用 ES 调节混合物 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) 内部校准 500-5000m/z 的范围。质谱使用 Maximum Entropy 算法去卷积,后者是由 DataAnalysis™ 软件 v. 3.3 (Bruker) 提供的。

[0542] 图 22A 显示,在 5mM GSH 的存在下出现了一个具有对应于 Fab 臂交换分子 (145.7kDa) 的中间质量的新峰。该新质量对应于双特异抗 EGFR/CD20 抗体的预期质量。当没有使用 GSH 或使用 0.5mM GSH 时,没有双特异抗体峰出现 (数据未显示)。这表明,在体外较高的 GSH 浓度下,可使得含有 IgG1-样、CPPC 铰链和 IgG4-样 CH3 区的突变体交换半分子 (在实施例 35、36、37 中也有说明)。

[0543] 为了研究含有 IgG1-样、CPPC 铰链和 IgG4-样 CH3 区的稳定化铰链突变体在体内是否发生 Fab 臂交换,我们向免疫缺陷小鼠体内注射了 IgG4-CD20 和 IgG1-EGFR、IgG4-EGFR、IgG4-EGFR-CPPC 的等量混合物。在不同时间点采取血液样品,在 ELISA 中定量双特异性抗体 (如上文所述),使用体外交换的混合物 (IgG4-EGFR/IgG4-CD20) 作为参考标准。

[0544] 图 22B 显示,在注射了含有野生型 IgG4 分子 (IgG4-EGFR) 的混合物的小鼠的血液出现了双特异性抗体。在包含铰链稳定化的 IgG4 (IgG4-EGFR-CPPC) 或 IgG1 分子 (IgG1-EGFR) 的混合物中没有检测到双特异性抗体 (符号在图中未显示)。这表明,核心铰链的稳定化会在体内阻止 IgG4Fab 臂交换,但是不能在体内交换半分子 (尽管我们不能排除铰链稳定化的 IgG4 确实可能发生低于检测水平 (72 小时内 < 8%) 的低水平交换)。

[0545] 这提示含有稳定化 CPPC 铰链的双特异性抗体能够通过体外 Fab 臂交换获得。经过后续的针对这些双特异性抗体的特异性纯化之后,这些抗体在体内注射时将保持稳定 (即不会发生 Fab 臂交换)。

[0546] 实施例 39. CXXC 突变体的 Fab 臂交换

[0547] 对核心铰链中含有不同 CXXC 基序的抗体的交换 Fab 臂的能力进行了测试。使用上文所述的定点诱变技术将如下的 CXXC 基序引入到 IgG4 betv1 和 IgG4 feld1 中:

[0548] -CGHC (就蛋白质-二硫化物-异构酶, PDI 描述过的活性位点序列)

[0549] -CGC(据称具有潜在的二硫化物还原能力的肽)

[0550] -CPRC(Gorilla IgG4 的核心铰链序列)

[0551] -CPHC(关于人硫氧还蛋白描述的活性位点序列)

[0552] 将如下的纯化抗体的混合物与 0.5mM GSH 在 37°C 温育,在 0-24h 之间的不同时间点吸取样品到 PBS-AT 中,按照前面实施例中的描述对其中的(双)特异 IgG 浓度进行测量:

[0553] -IgG1a-feld1 wt 与 IgG1a-betv1 wt(在图 23 和 24 中表示为 IgG1)

[0554] -IgG4a-feld1 wt 与 IgG4a-betv1 wt(在图 23 和 24 中表示为 IgG4)

[0555] -IgG4a-feld1 CGHC 与 IgG4a-betv1 CGHC(在图 23 和 24 中表示为 CGHC)

[0556] -IgG4a-feld1 CGC 与 IgG4a-betv1 CGC(在图 23 和 24 中表示为 CGC)

[0557] -IgG4a-feld1 CPRC 与 IgG4a-betv1 CPRC(在图 23 和 24 中表示为 CPRC)

[0558] -IgG4a-feld1 CPHC 与 IgG4a-betv1 CPHC(在图 23 和 24 中表示为 CPHC)

[0559] 结果(图 23)显示,在一段时间内,含有 CGC 基序或 IgG1 核心铰链的抗体没有发生 Fab 臂交换。含有 CGHC 基序的抗体的 Fab 臂交换的效力与 IgG4wt 抗体相同。在含有 CPRC 基序的抗体中也发生了 Fab 臂交换,尽管稍微慢一些,而且含有 CPHC 基序的抗体中也有程度低一些的 Fab 臂交换。

[0560] 另外,测试了 GSH 浓度(1-20,000 μ M)对于这些混合物在 37°C 温育 24h 之后进行 Fab 臂交换的能力的影响。发现含有 CPHC-,CPRC- 和 CGHC- 基序的抗体以及 IgG4 wt 抗体的 Fab 臂交换依赖于 GSH 浓度(图 24),在 100-1,000 μ M GSH 之间存在一个最佳值。

序列表

<110> 根马布股份公司 (Genmab A/S)

<120> 双特异性抗体及其制造方法

<130>P/31. W0

<160>22

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>36

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>1

agccaccgta cgtttgattt ccagcttggc gcctcc 36

<210>2

<211>44

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>2

gatgcaagct tgccgccacc atggagtcac agattcagc attt 44

<210>3

<211>42

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>3

cgatgggccc ttggtgctgg ctgaggagac ggtgactgag gt 42

<210>4

<211>44

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>4

gatgcaagct tgccgccacc atgaaatgca gctgggttat cttc 44

<210>5

<211>36

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>5

agccaccgta cgt tttattt ccaactttgt ccccca 36

<210>6

<211>44

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>6

gatgcaagct tgccgccacc atggaatcac agactcaggt cctc 44

<210>7

<211>42

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>7

cgatgggccc ttggtgctgg ctgcagagaa agtgaccaga gt 42

<210>8

<211>44

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>8

gatgcaagct tgccgccacc atgggatgga gctatatcat cctc 44

<210>9

<211>32

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>9

tgagaattcg gtgggtgctt tatttccatg ct 32

<210>10

<211>33

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>10

gtagaagctt accatcgcg atagacaaga acc 33

<210>11

<211>26

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>11

tgттаactgc tcactggatg gtggga 26

<210>12

<211>27

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>12

tcctgggca caattttctt gtccacc 27

<210>13

<211>31

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>13

tgaaagcttc taatagact cactataggg c 31

<210>14

<211>54

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>14

tgaaagcttc taatagcact cactataggg caagcagtg tatcaacgca gagt 54

<210>15

<211>137

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体可变区

<400>15

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

<210>16

<211>127

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体可变区

<400>16

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

<210>17

<211>138

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗体可变区

<400>17

Met	Gly	Trp	Ser	Tyr	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Asp
1				5					10					15	
Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe

35	40	45	
Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu			
50	55	60	
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asn Asn Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn			
65	70	75	80
Glu Lys Phe Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser			
85	90	95	
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val			
100	105	110	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Leu Thr Met Val Glu Ser Phe Ala Tyr Trp			
115	120	125	
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Phe Ser Ala			
130	135		

<210>18

<211>133

<212>PRT

<213>人工

<220>

<223>抗体可变区

<400>18

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

Lys Leu Glu Ile Lys

130

<210>19

<211>330

<212>PRT

<213>人 (homo sapiens)

<220>

<221>CONFLICT

<222>(239).. (239)

<223>239 位的 X 是 D 或 E

<220>

<221>CONFLICT

<222>(241).. (241)

<223>241 位的 X 是 L 或 M

<400>19

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg																				
1			5						10							15				
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			20						25						30					
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			35						40					45						
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			50						55					60						
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			65						70					75						80
Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys									85					90						95
Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro			100						105											110
Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg			115						120					125						
Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys			130						135					140						
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro			145						150					155						160
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys									165					170						175
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			180						185											190
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr			195						200					205						
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			210						215					220						
Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			225						230					235						240
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys									245					250						255
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln			260						265											270
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met			275						280					285						
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			290						295					300						
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn																				

305	310	315	320
Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	325	330	335
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile			
	340	345	350
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu HisAsn Arg Phe Thr Gln			
	355	360	365
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	370	375	

<210>22

<211>327

<212>PRT

<213> 人 (homo sapiens)

<400>22

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

	180		185		190										
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu
	195		200		205										
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
	210		215		220										
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
225			230		235										240
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
			245		250										255
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
	260		265		270										
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
	275		280		285										
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
	290		295		300										
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
305			310		315										320
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys									
			325												

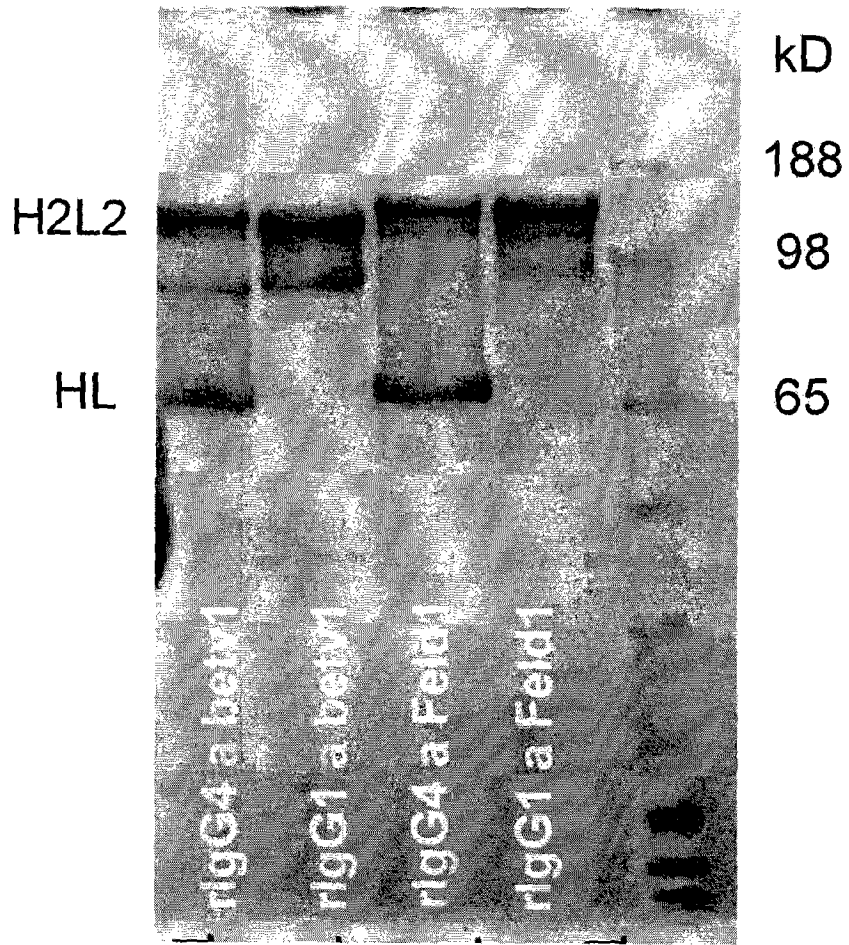


图 1

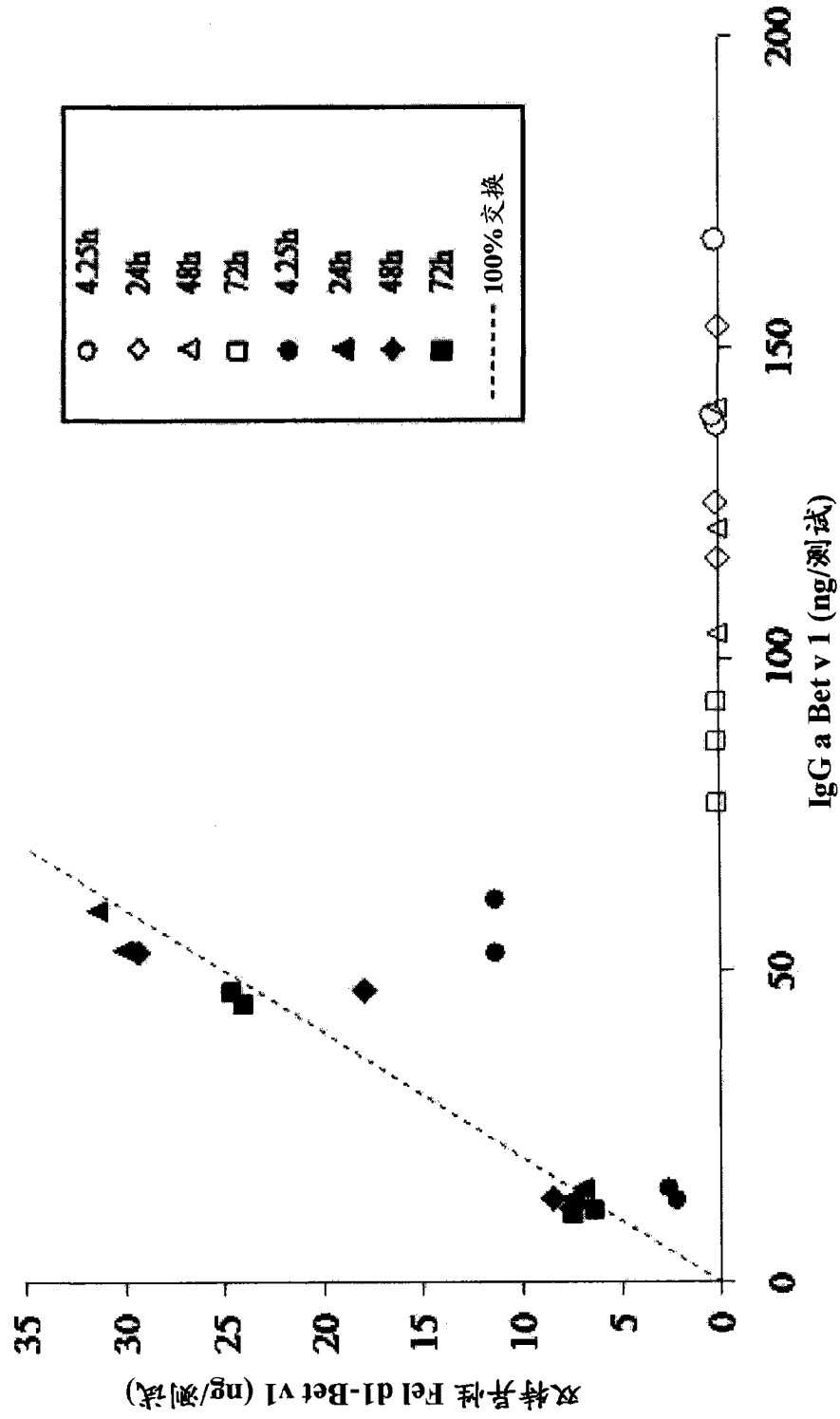


图 2

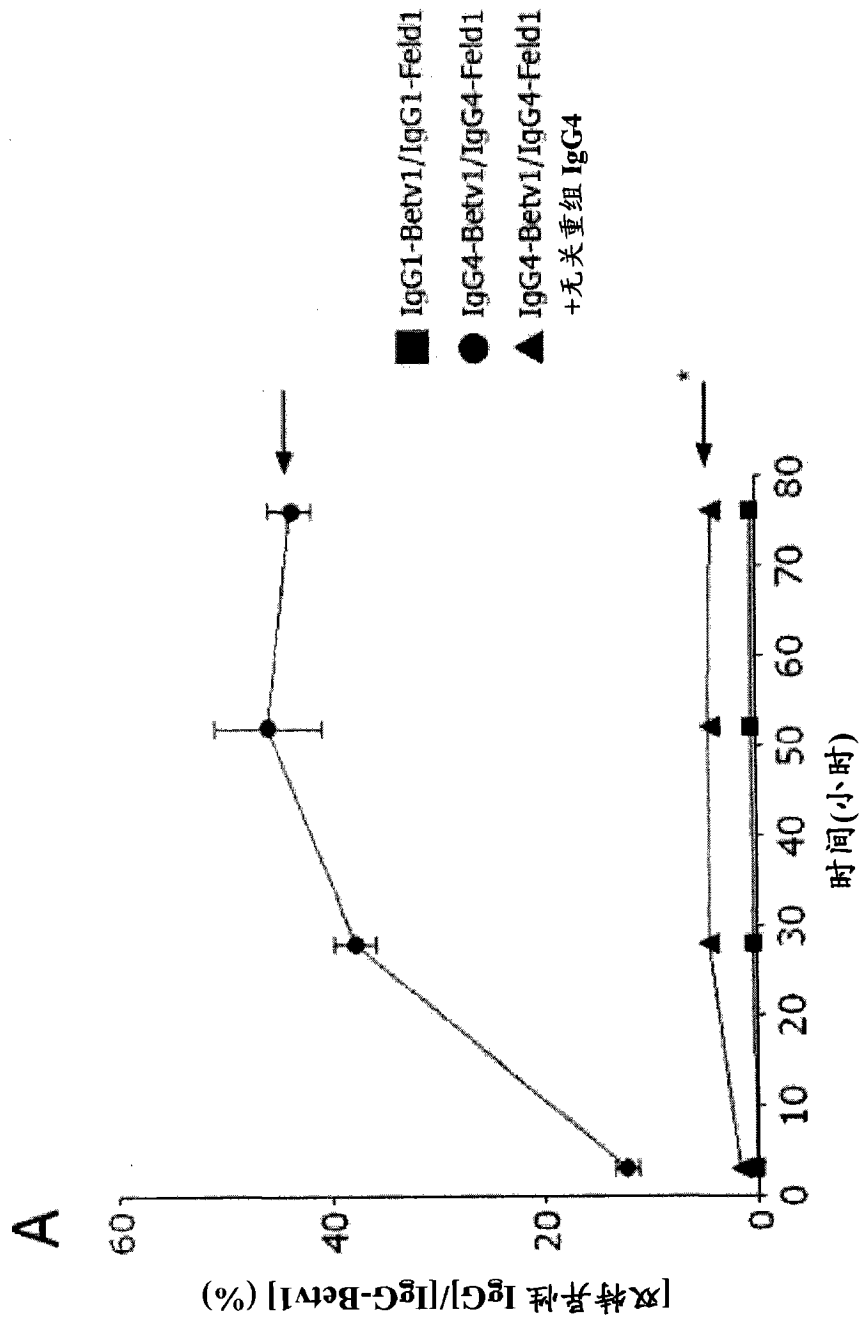


图 3A

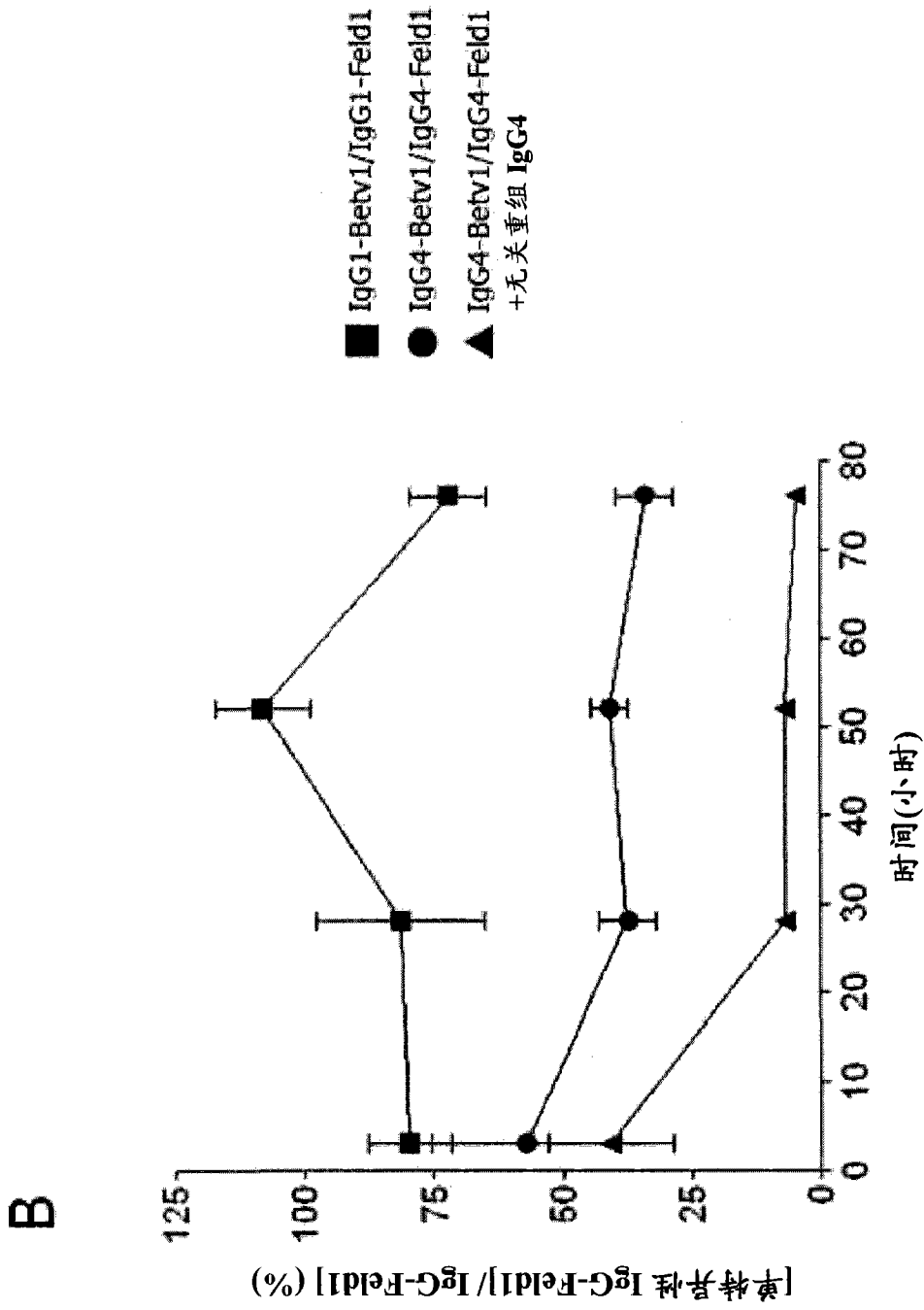


图 3B

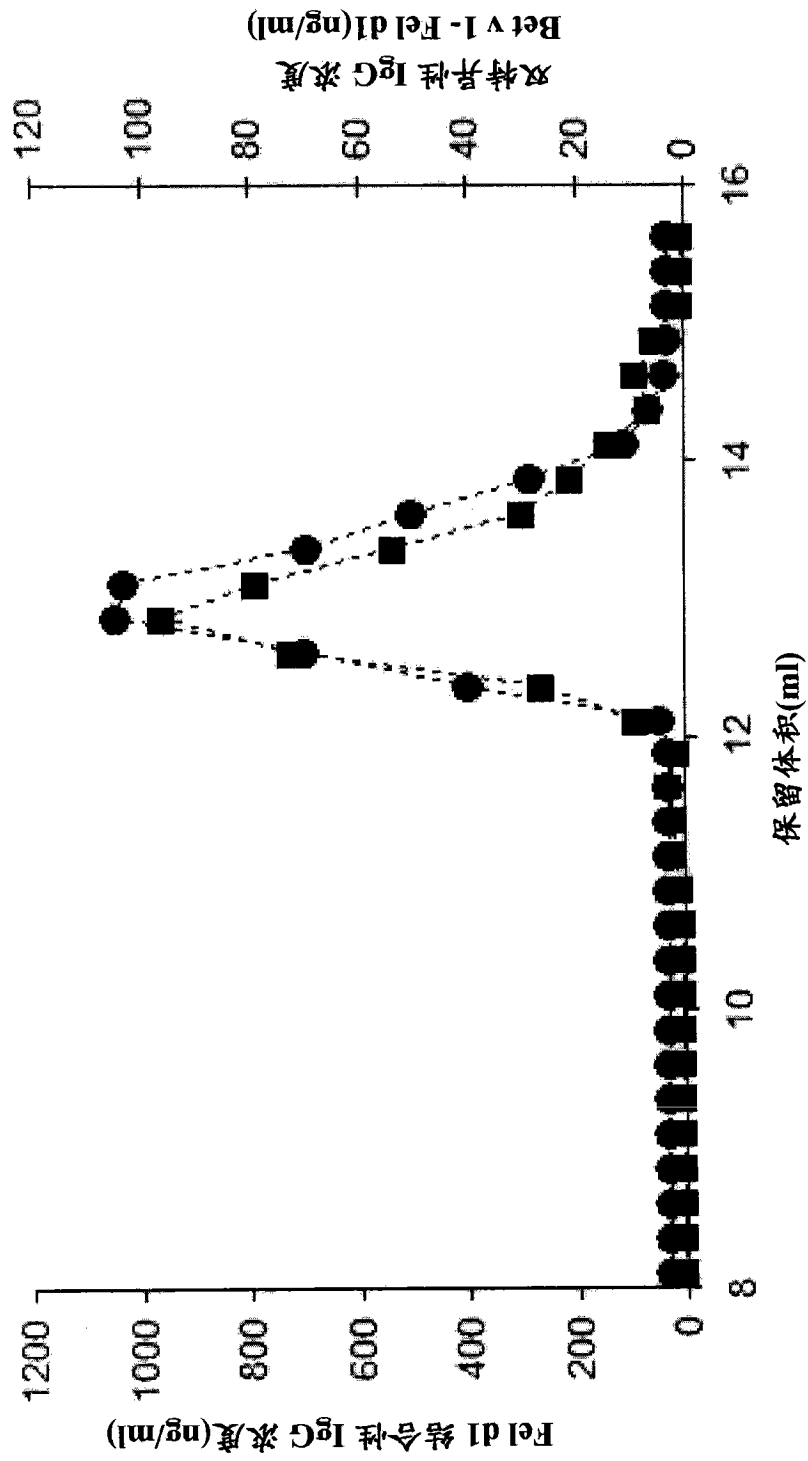


图 4

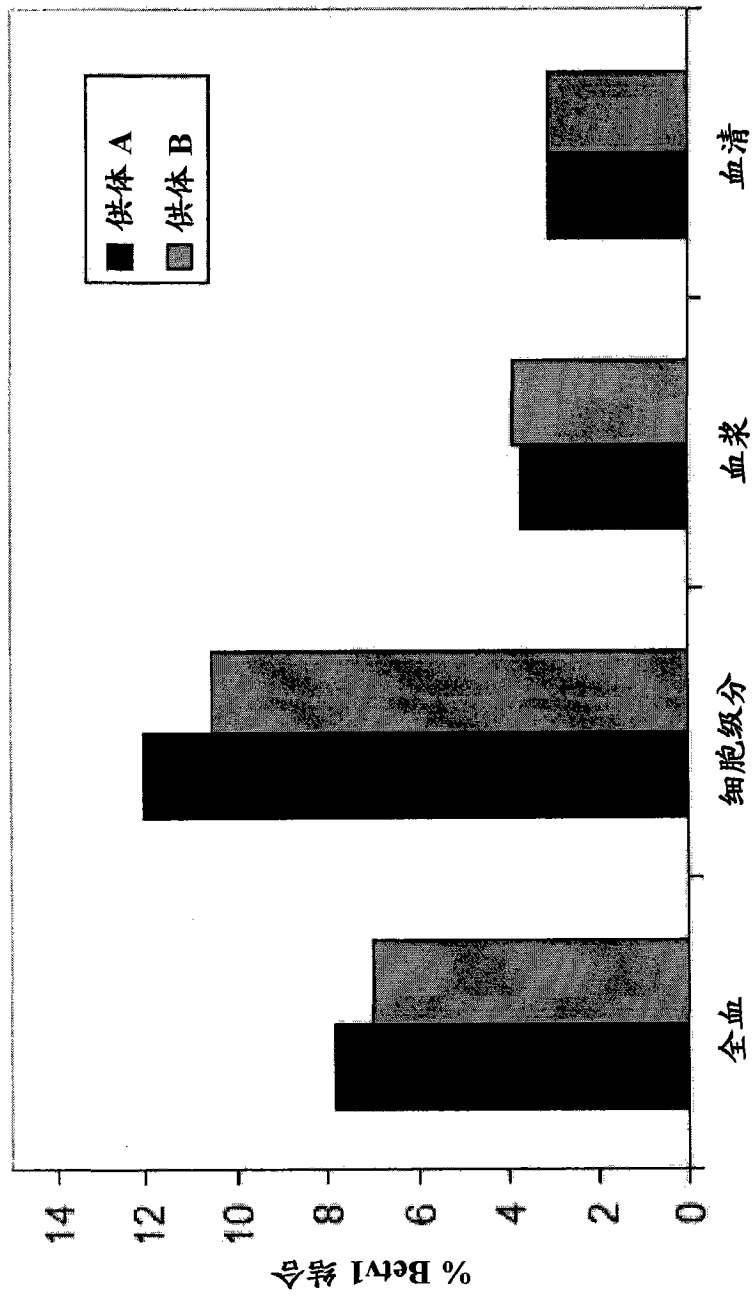


图 5A

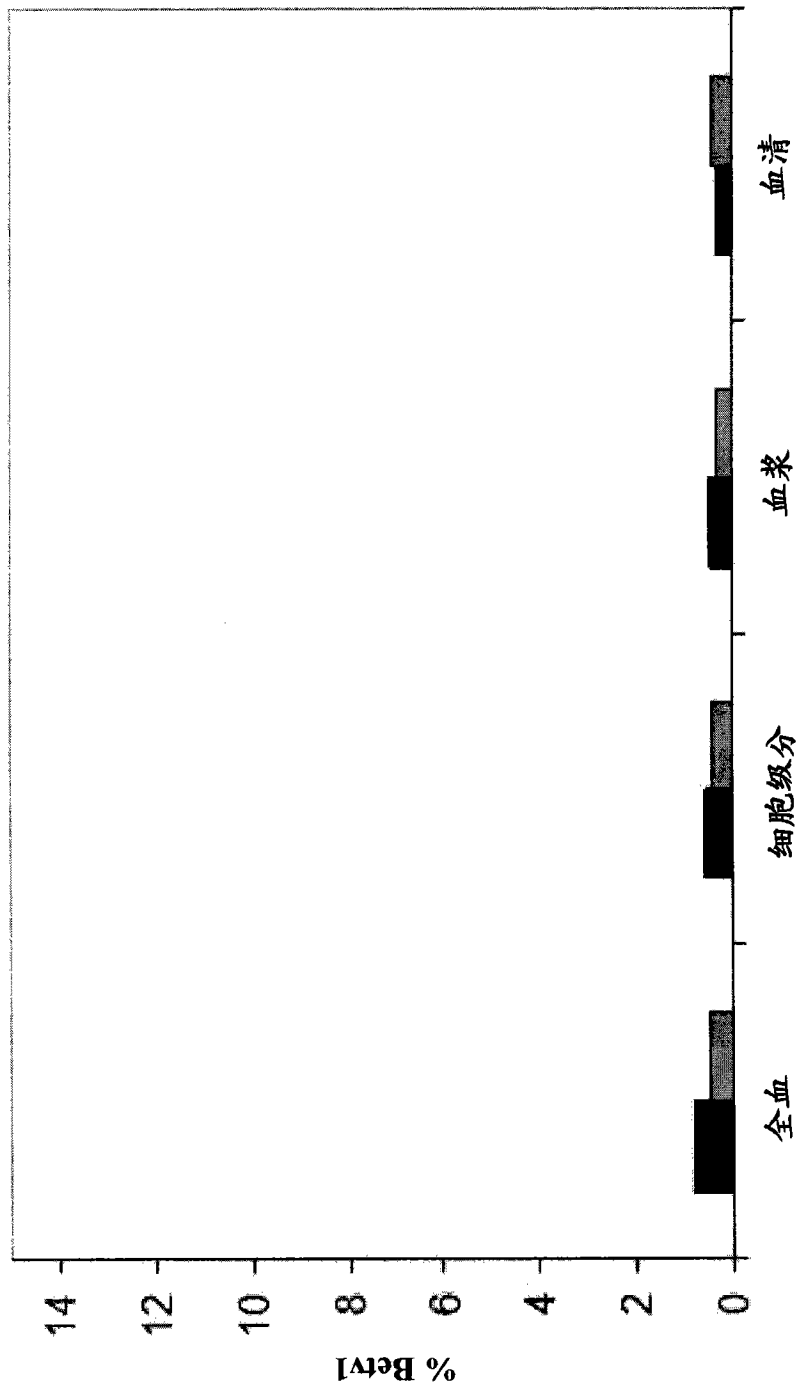


图 5B

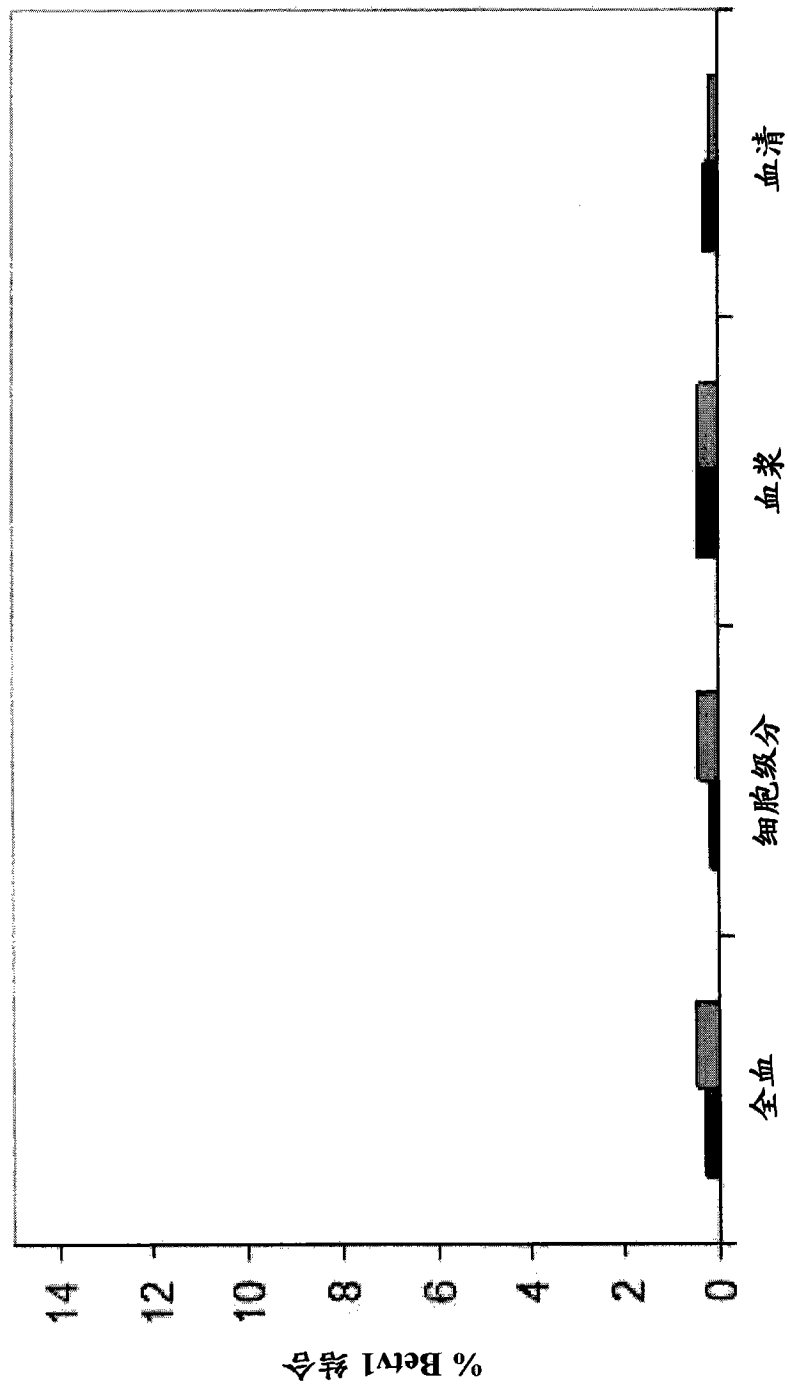


图 5C

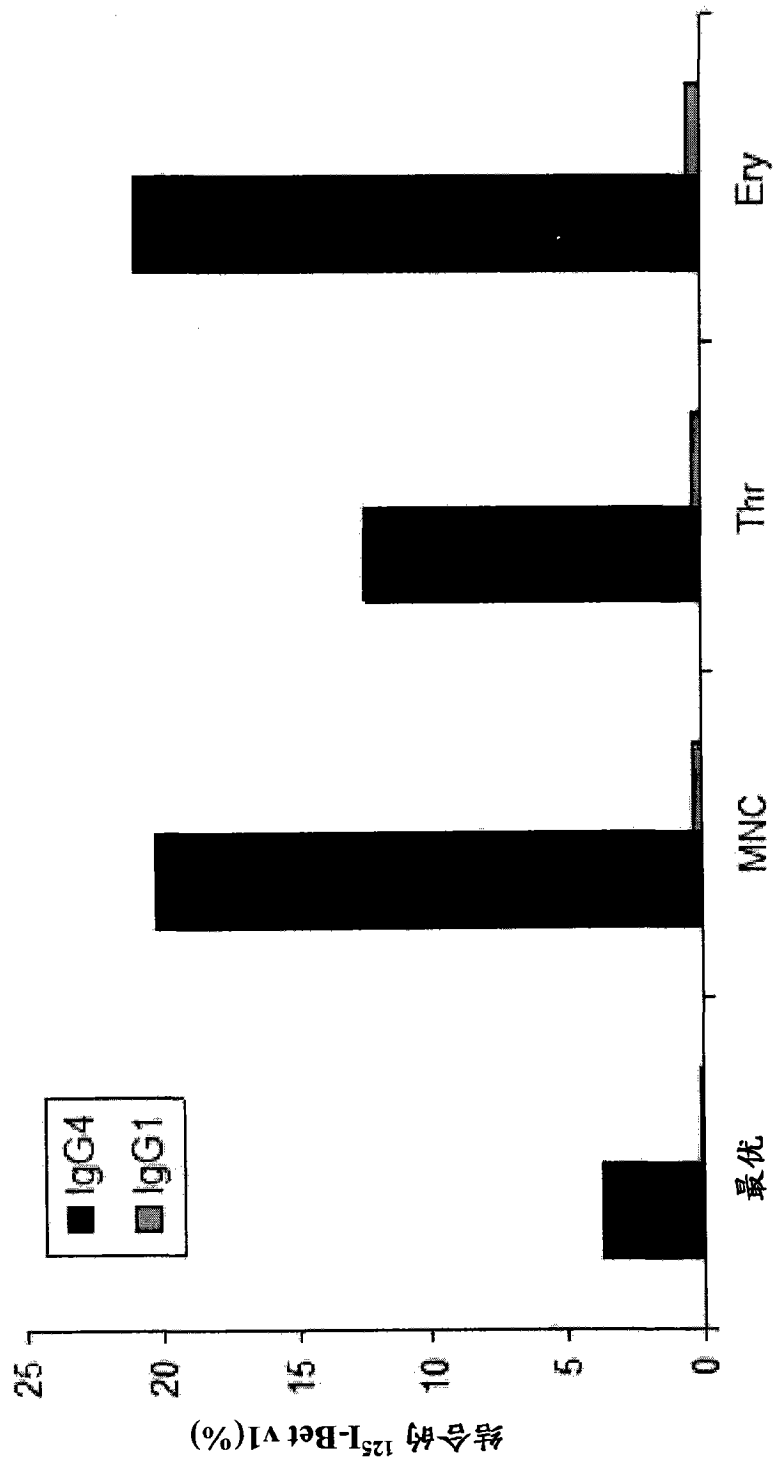


图 6

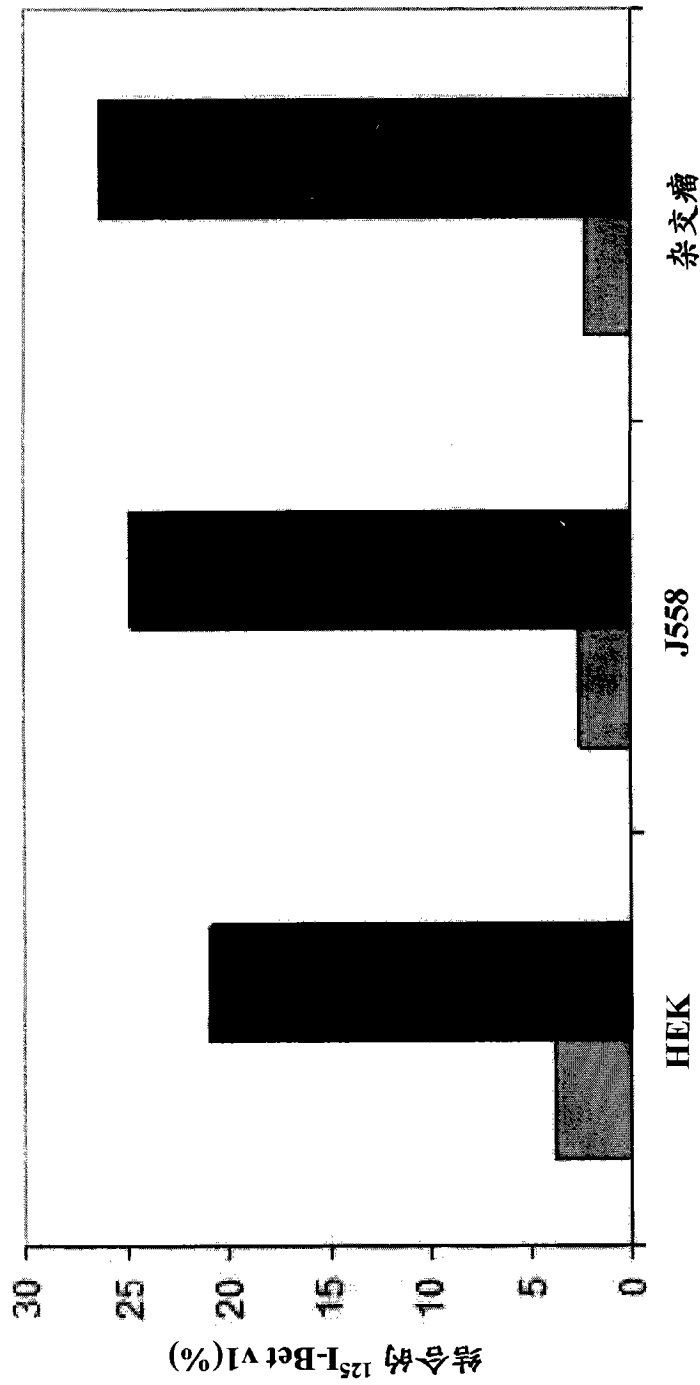


图 7

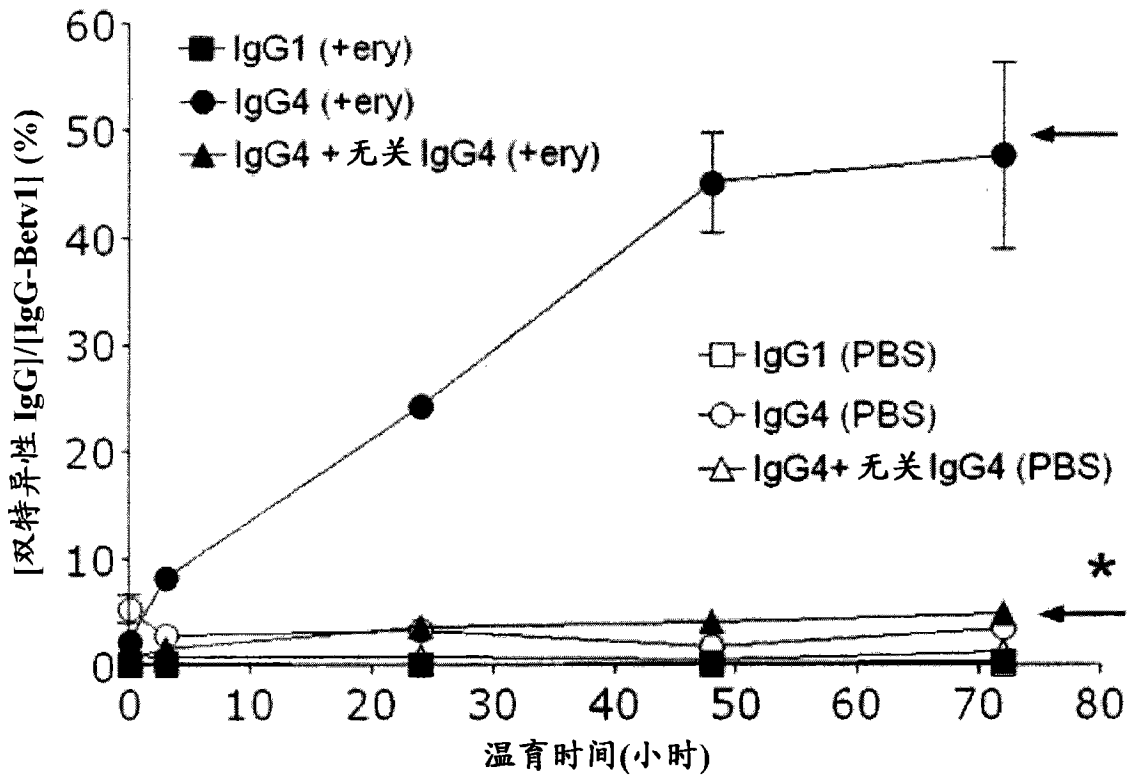


图 8

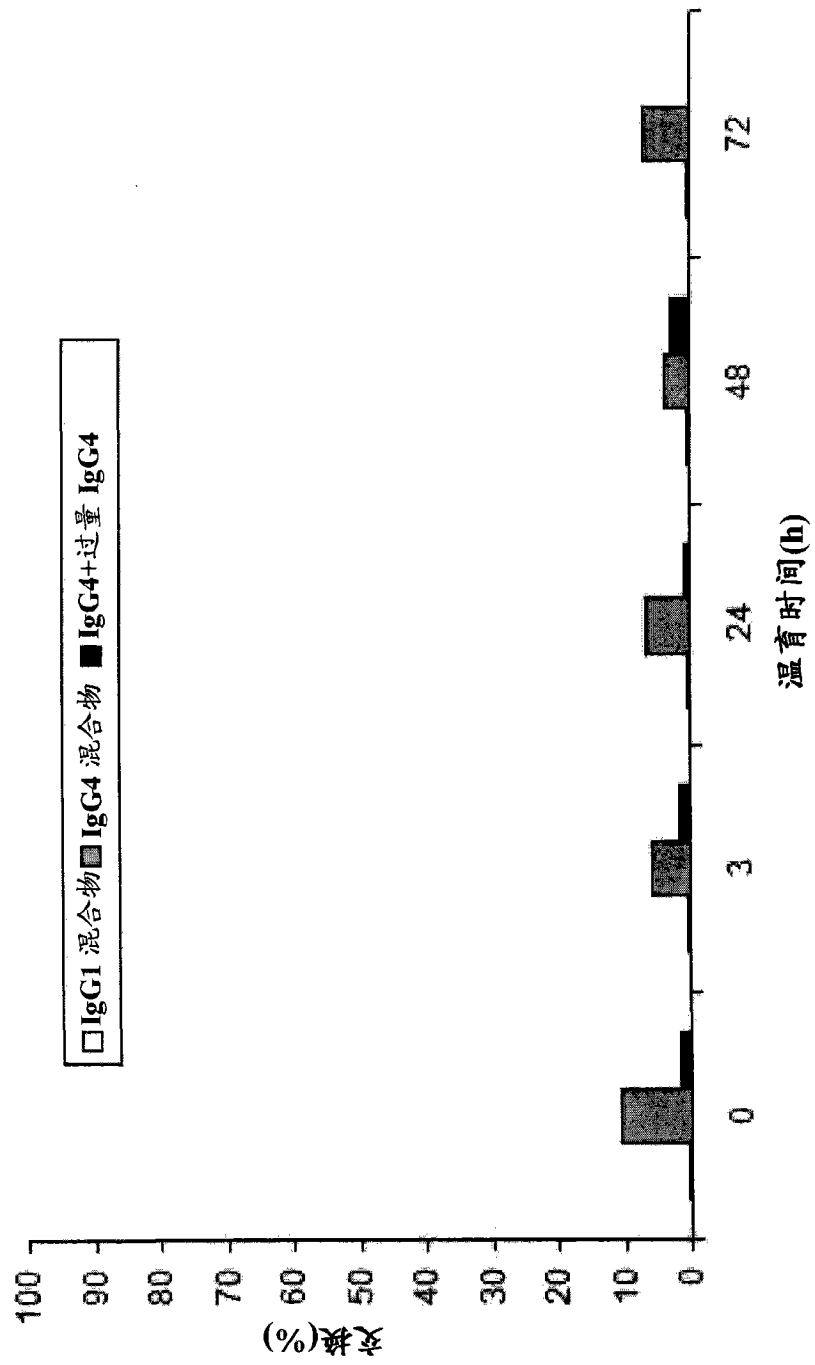


图 9A

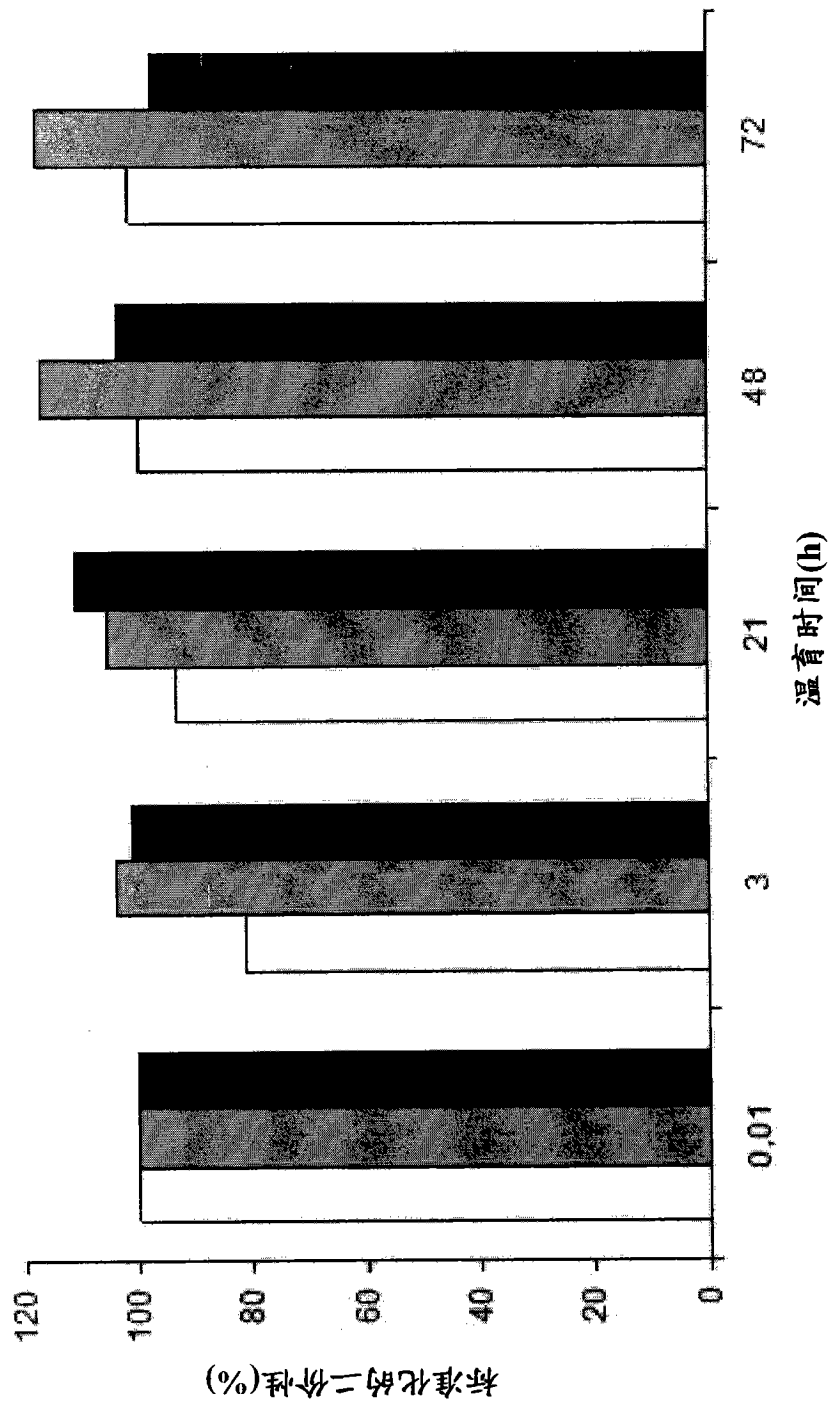


图 9B

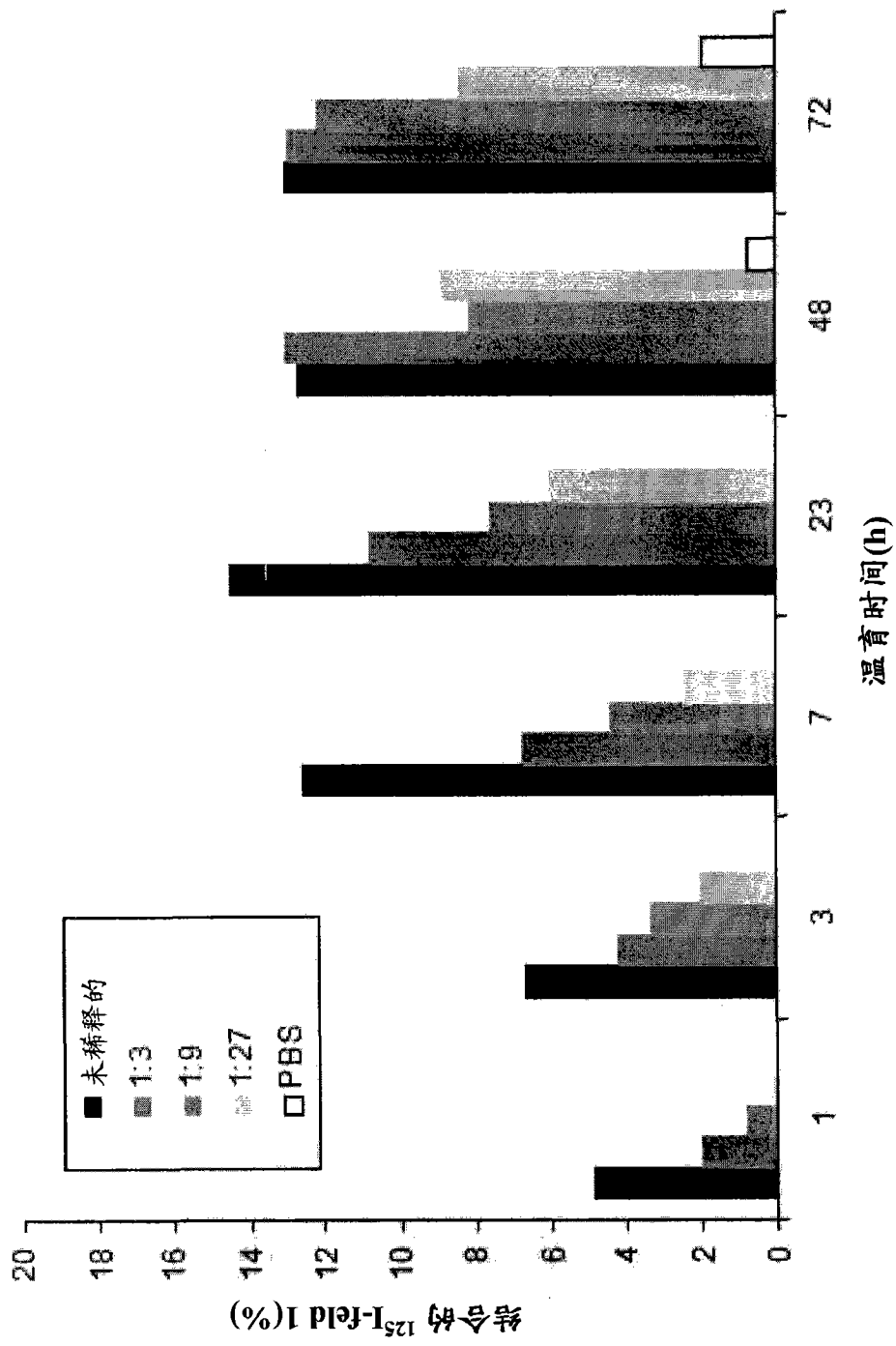


图 10

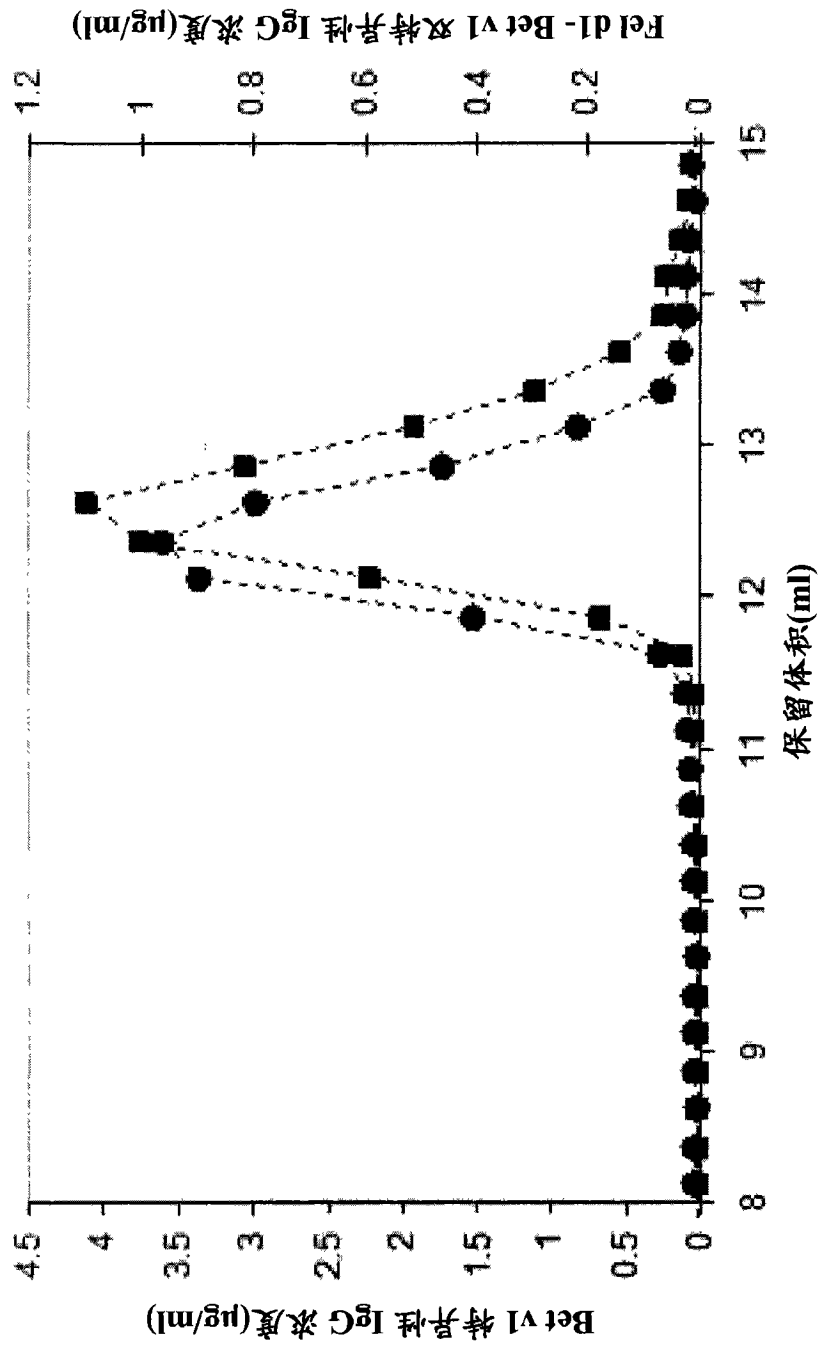


图 11

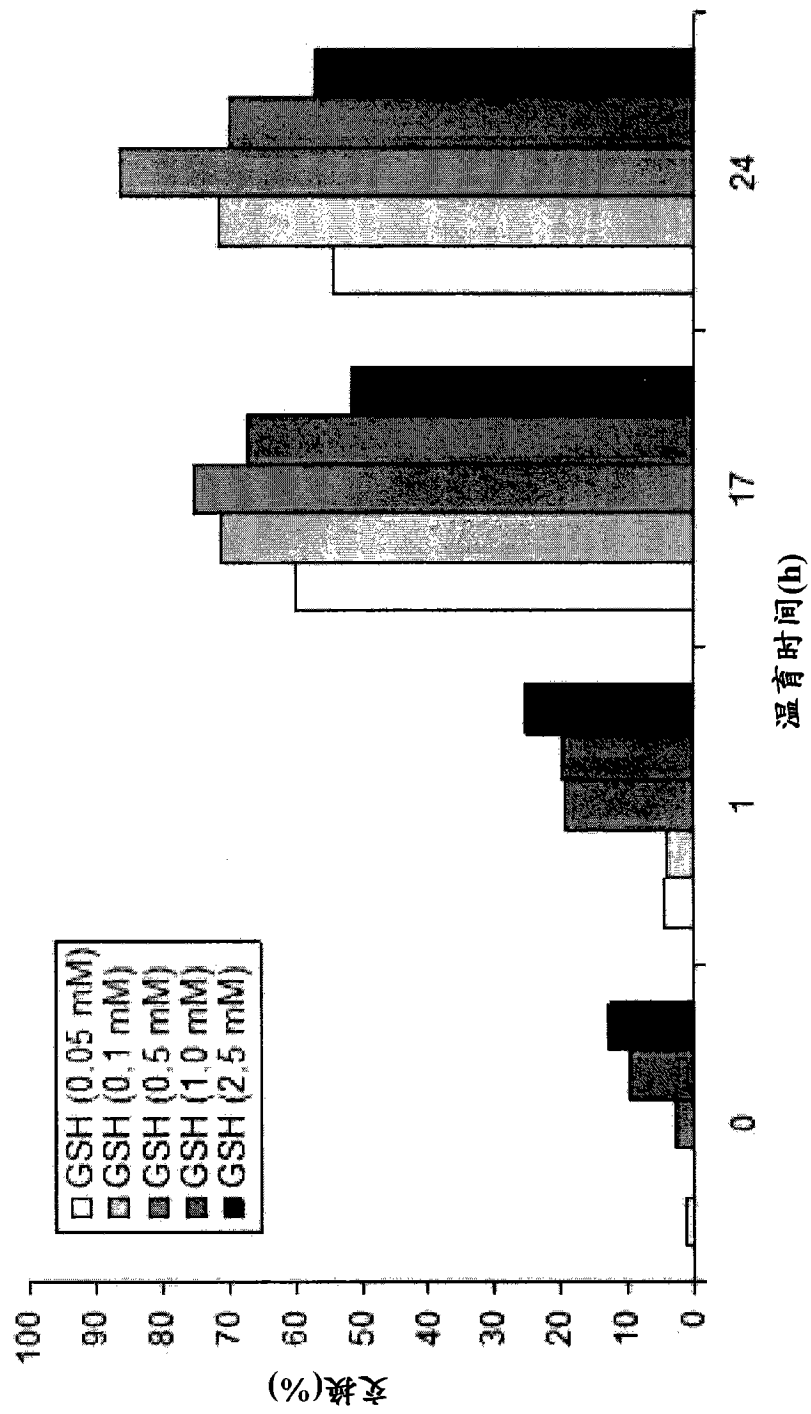


图 12

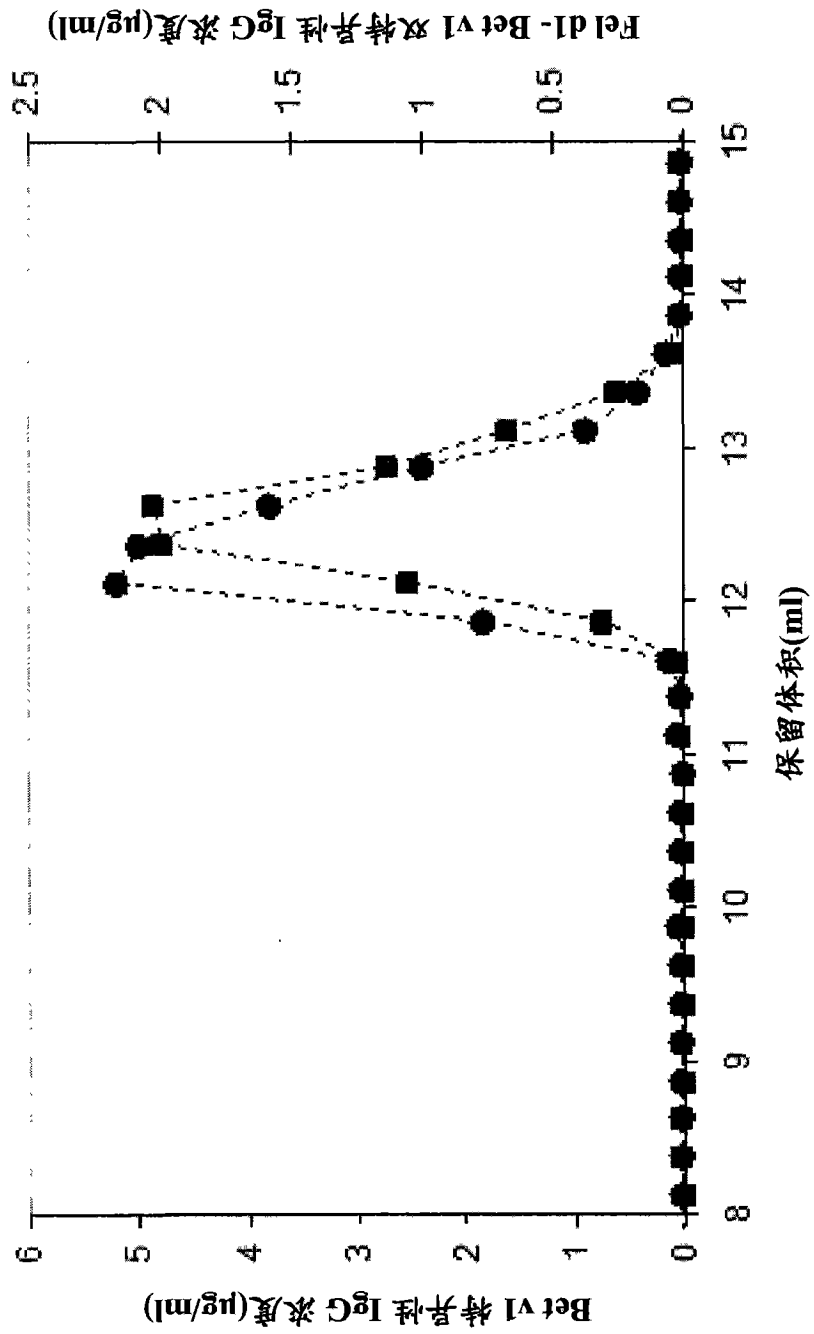


图 13

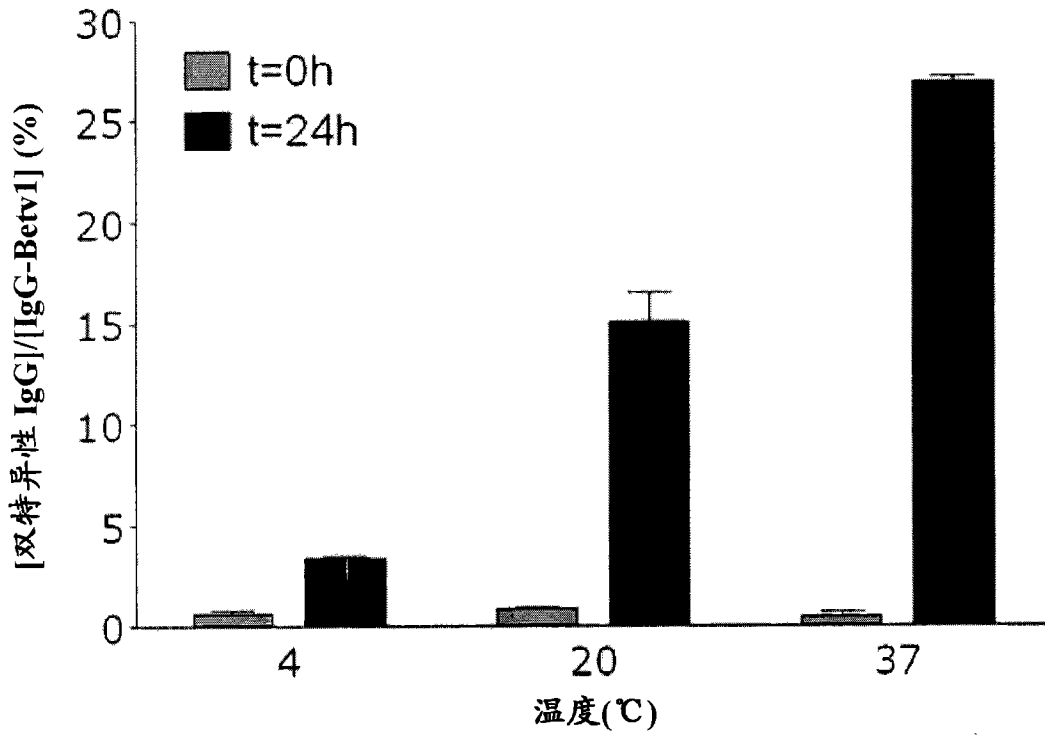


图 14

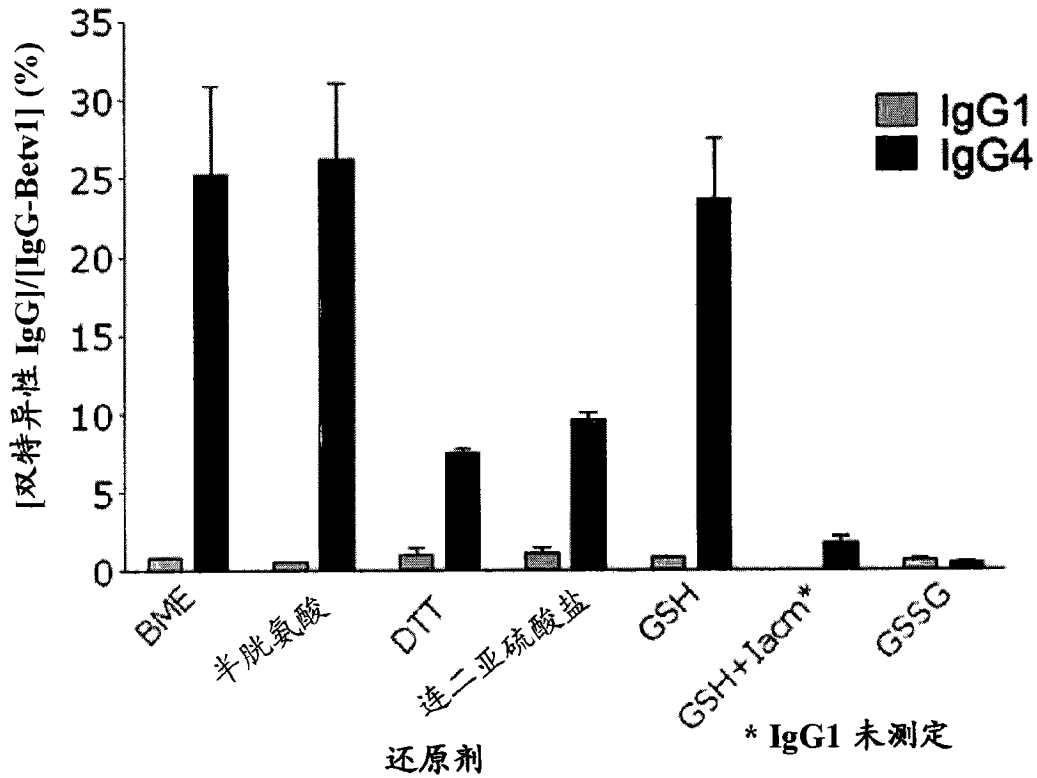


图 15

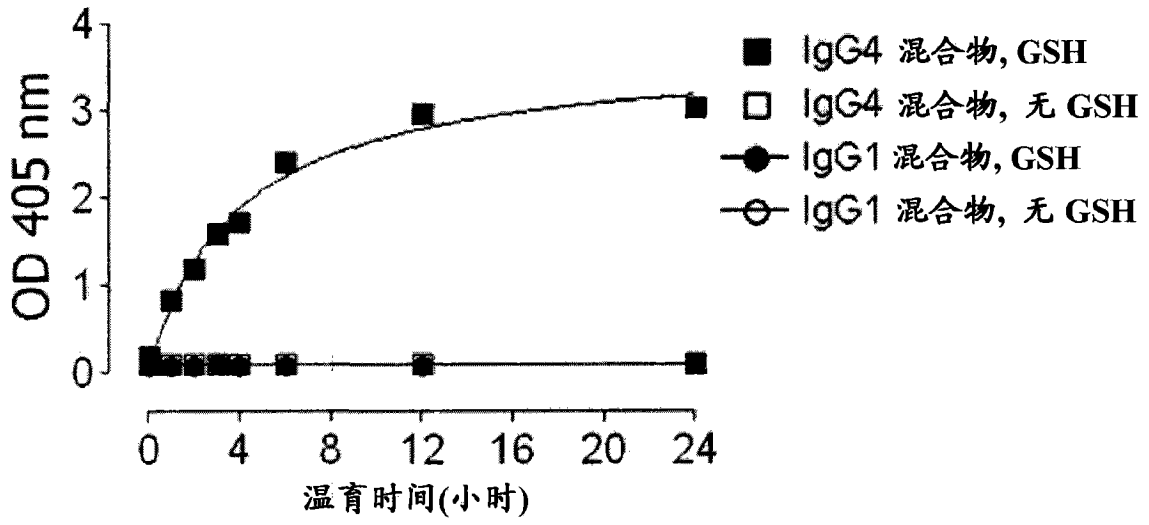


图 16A

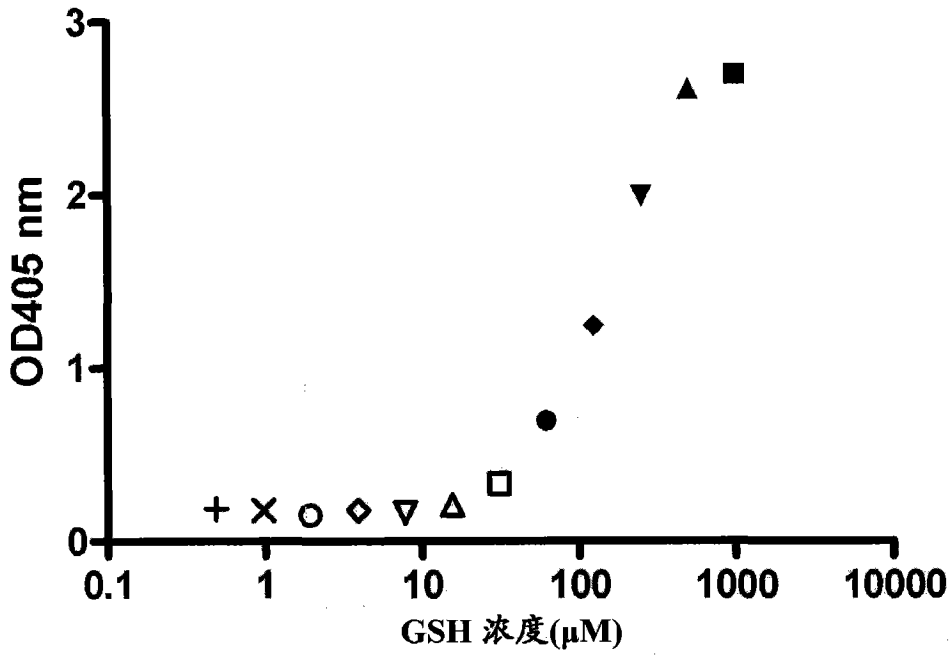


图 16B

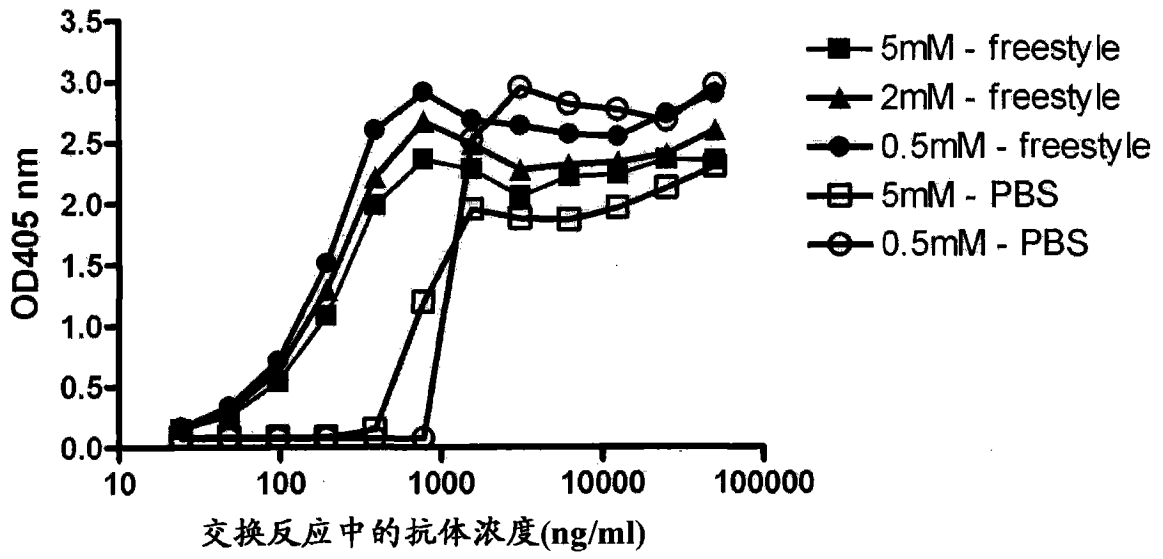


图 16C

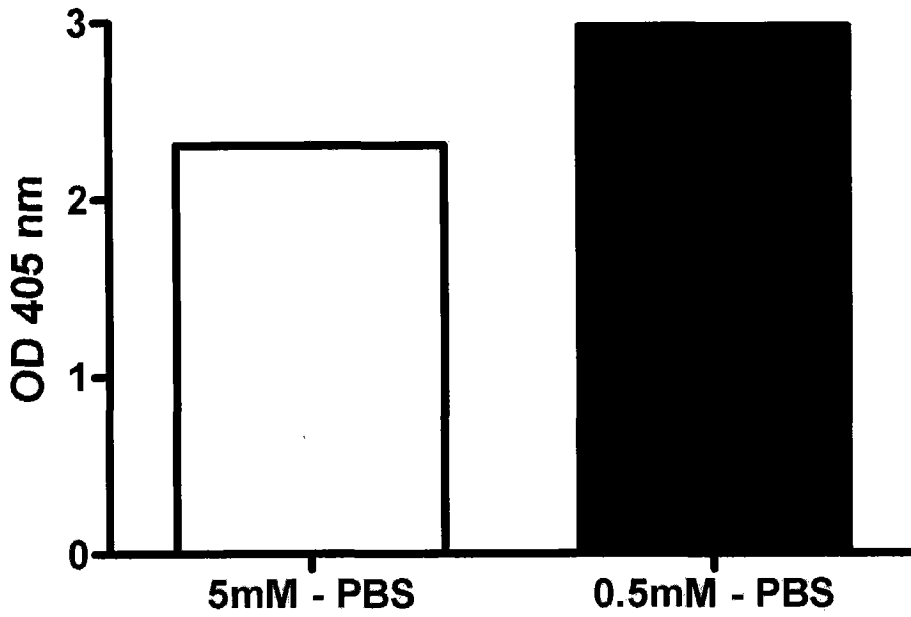


图 16D

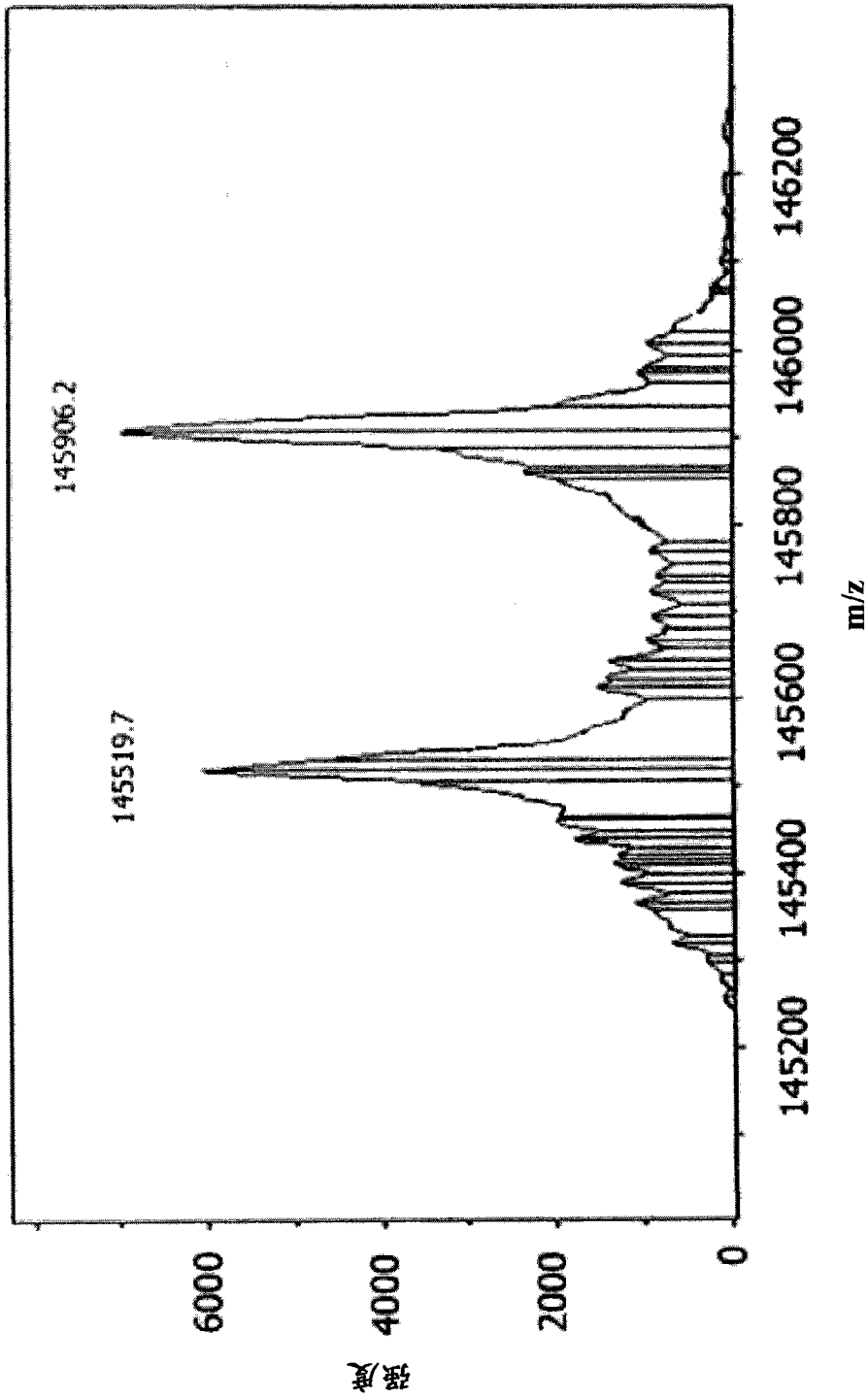


图 16E

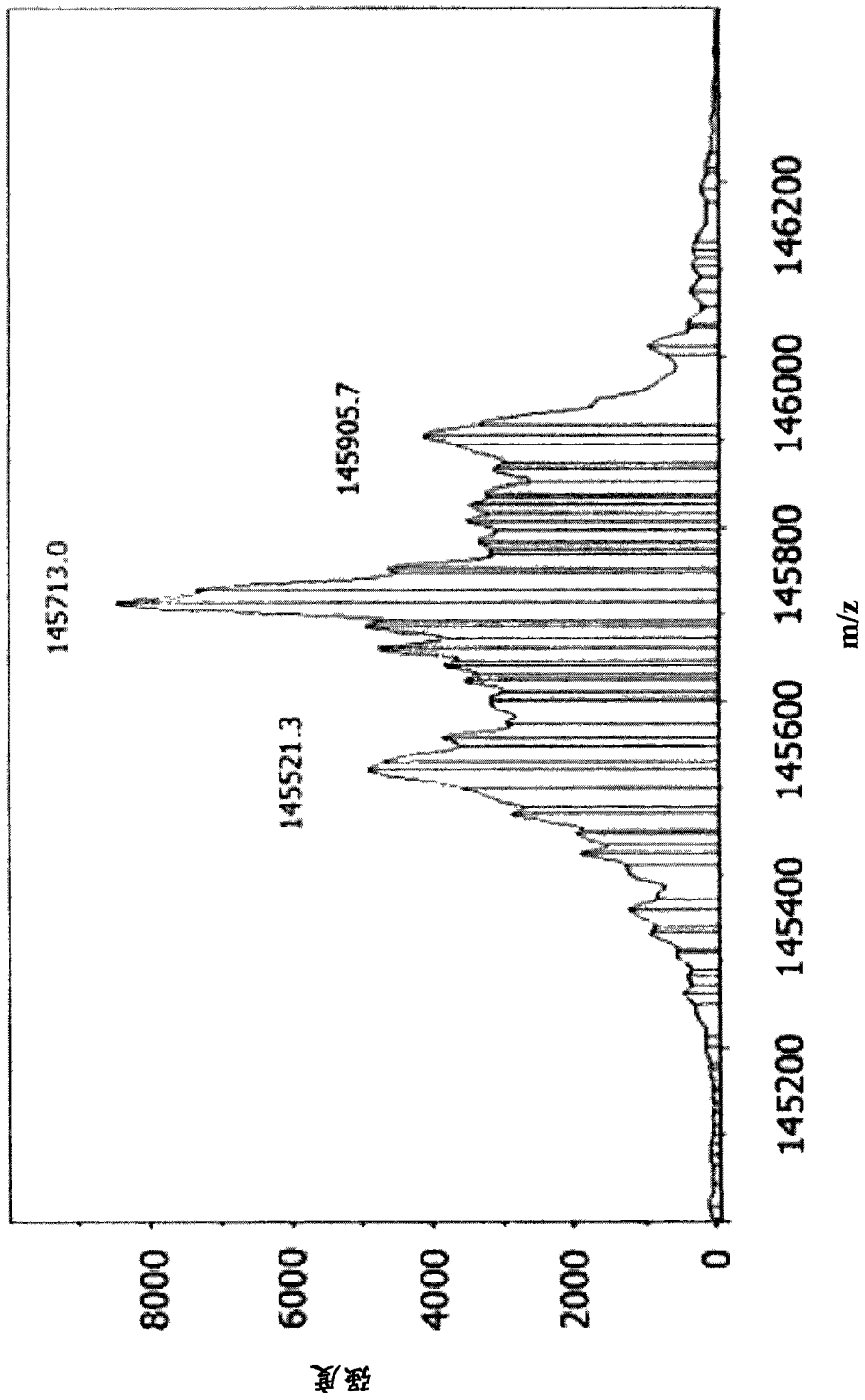


图 16F

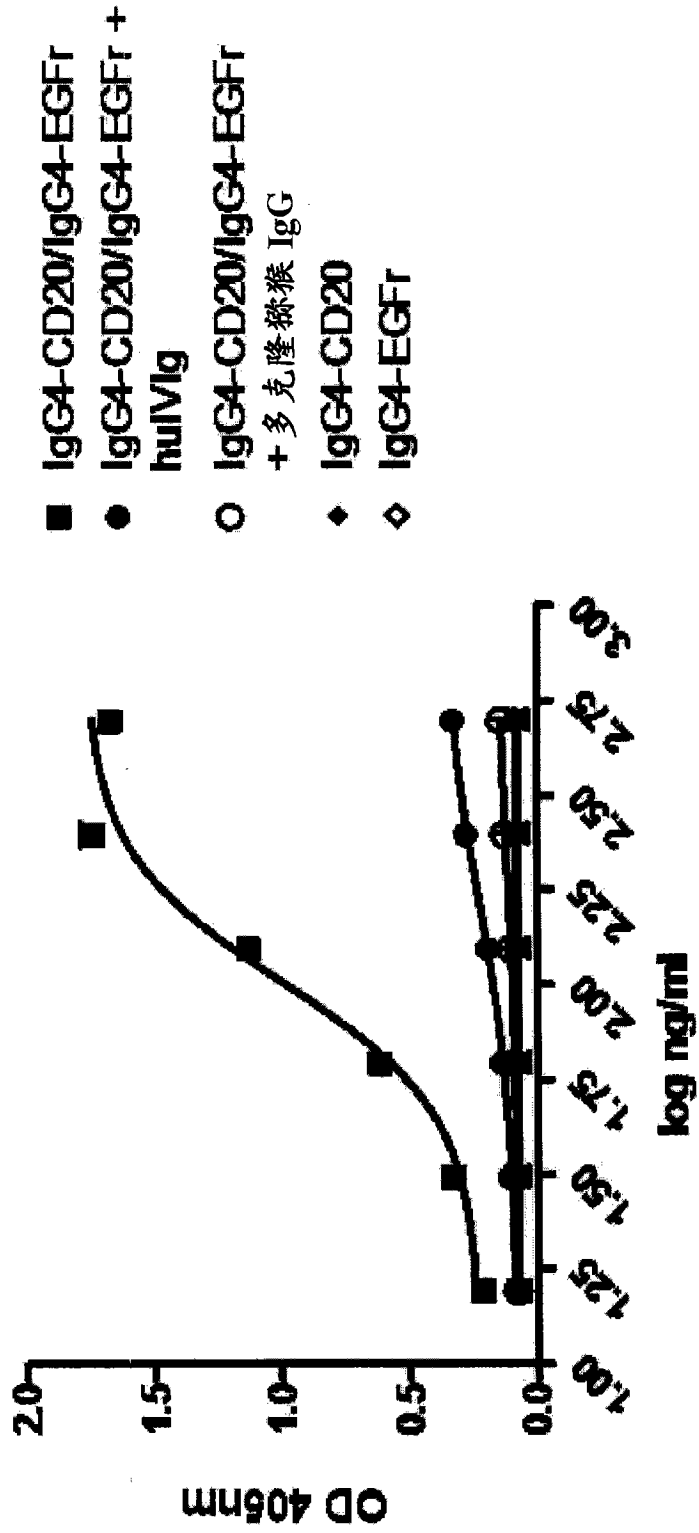


图 17A

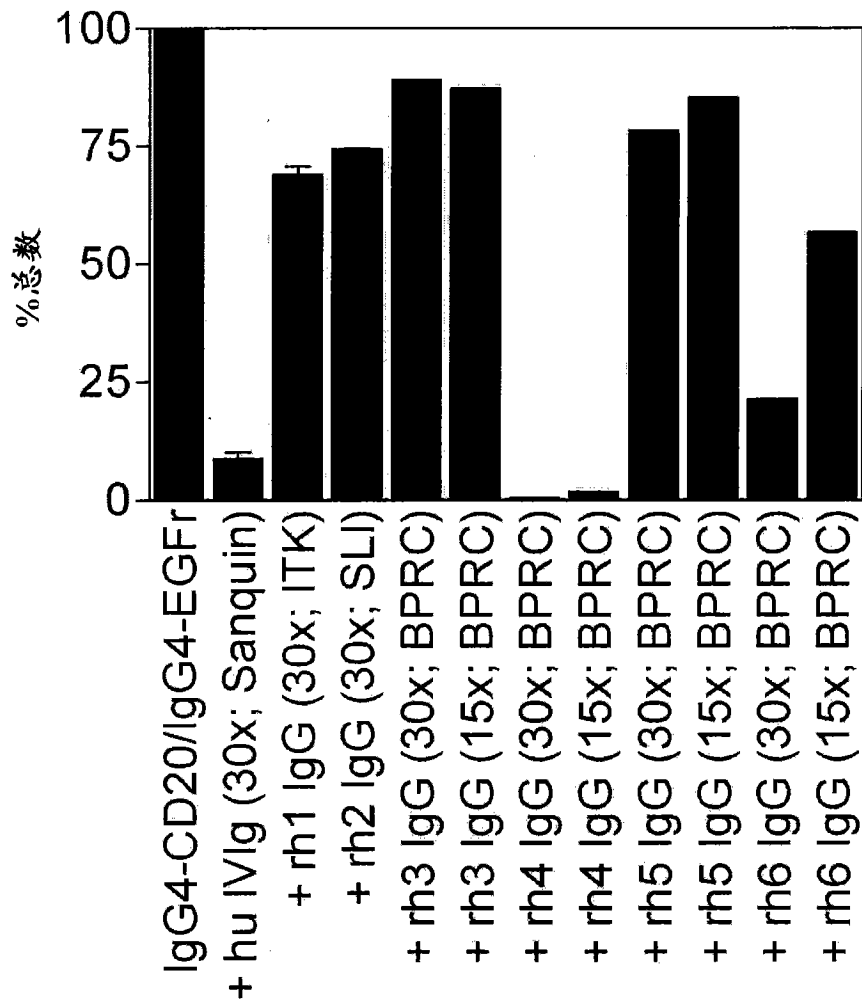


图 17B

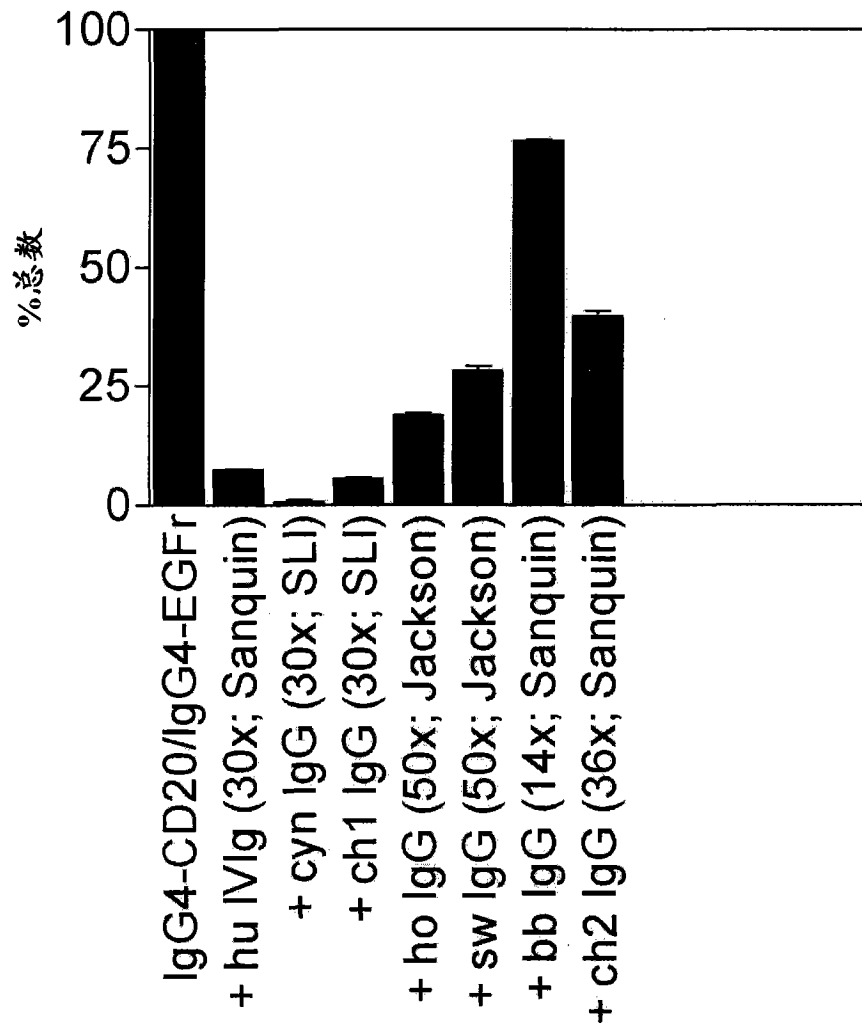


图 17C

SEQ ID NO: 19: IgG1 恒定区的氨基酸序列(登录号#P01857)

1 astkgpsvfp lap**S**skstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkkvcp
 101 kscdkthtcp pcpapellgg psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs
 151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvvsvlt vlhgdwlngk
 201 eykckvsnka lpapiektis kakggpprepq vytlpps**RX**₄e X₅tkngvsltc
 251 lvkgfypsdi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly s**K**ltvdksrw
 301 q**Q**gnvfscsv mhealthnhyt qkslsls**P**gk

其中 X4 是 D 或 E, X5 是 2 或 M

SEQ ID NO: 20: IgG2 恒定区的氨基酸序列(登录号#P01859)

1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssnfgtqt ytcnvdhkps ntkvdktver
 101 kccvecppcp appvagpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc vvdvshedp
 151 evqfnwyvdg vevhnaktk reeqfnstfr vsvltvvhq dwlngkeykc
 201 kvsnkglpap iektisktkg qprepqvyl pps**Re**emtkn qvsltclvkq
 251 fypsdiavew esngqpenny kttpp**M**lds gsffly**K**lt vdkswq**Q**gn
 301 vfscsvmhea lhnhytqksl sls**P**gk

SEQ ID NO: 21: IgG3 恒定区的氨基酸序列(登录号#A23511)

1 astkgpsvfp lapcsrstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt ytcnvnhkps ntkvdkrvel
 101 ktplgdtht cprcpepksc dtpppcprcp epkscdtppp cprcpepksc
 151 dtpppcprcp apellggspsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvdvshed
 201 pevqfkwyvd gvevhnaktk preeqfnstf rvsvltvlh qdwlngkeyk
 251 ckvsnkalka piektisktk gpprepqvyl lpps**Re**emtk nqvsltclvk
 301 gfypsdiave wes**S**gqpenn y**N**ttpp**M**lds dgsffly**K**l tvdkswq**Q**g
 351 n**I**fscsvmhe alhn**R**Ftqks ls sls**P**gk

SEQ ID NO: 22: IgG4 恒定区的氨基酸序列

1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
 51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
 101 KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
 151 PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 201 CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
 251 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
 301 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

图 18

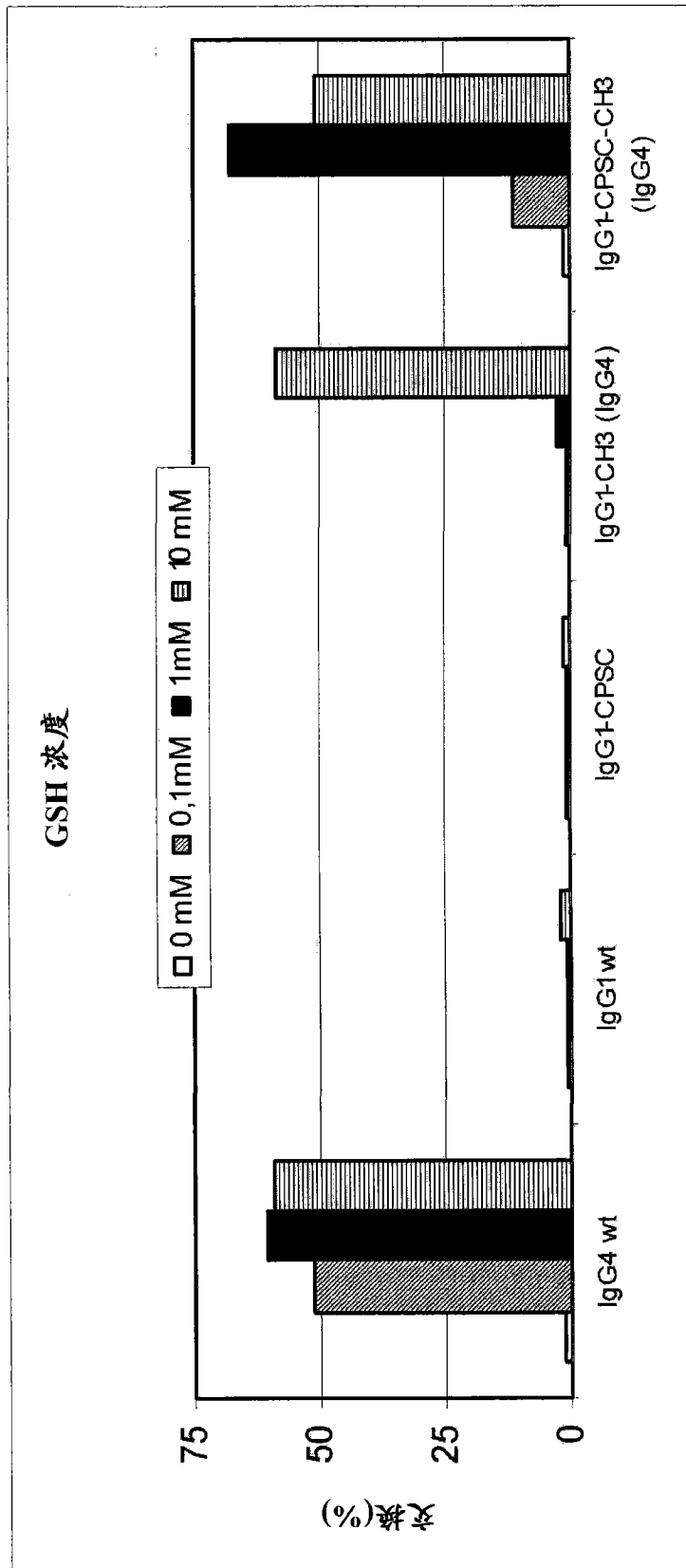


图 19A

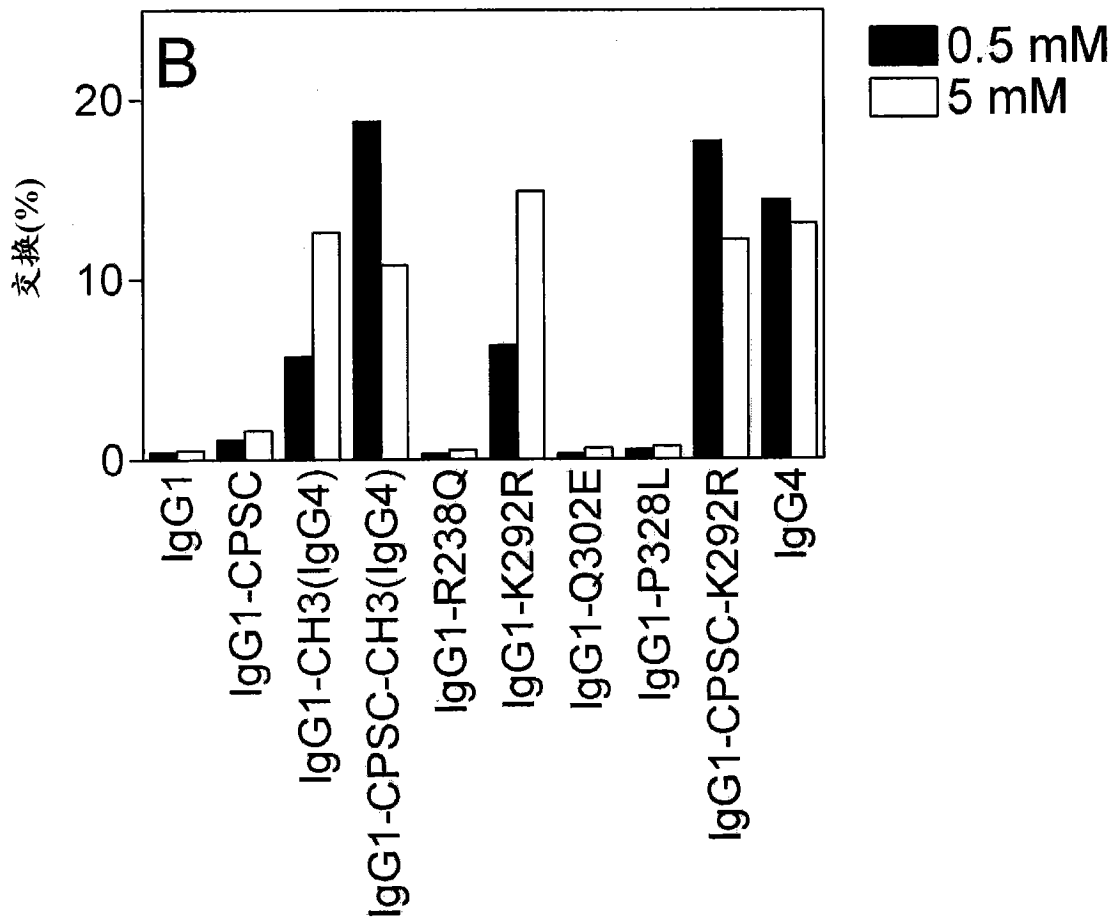


图 19B

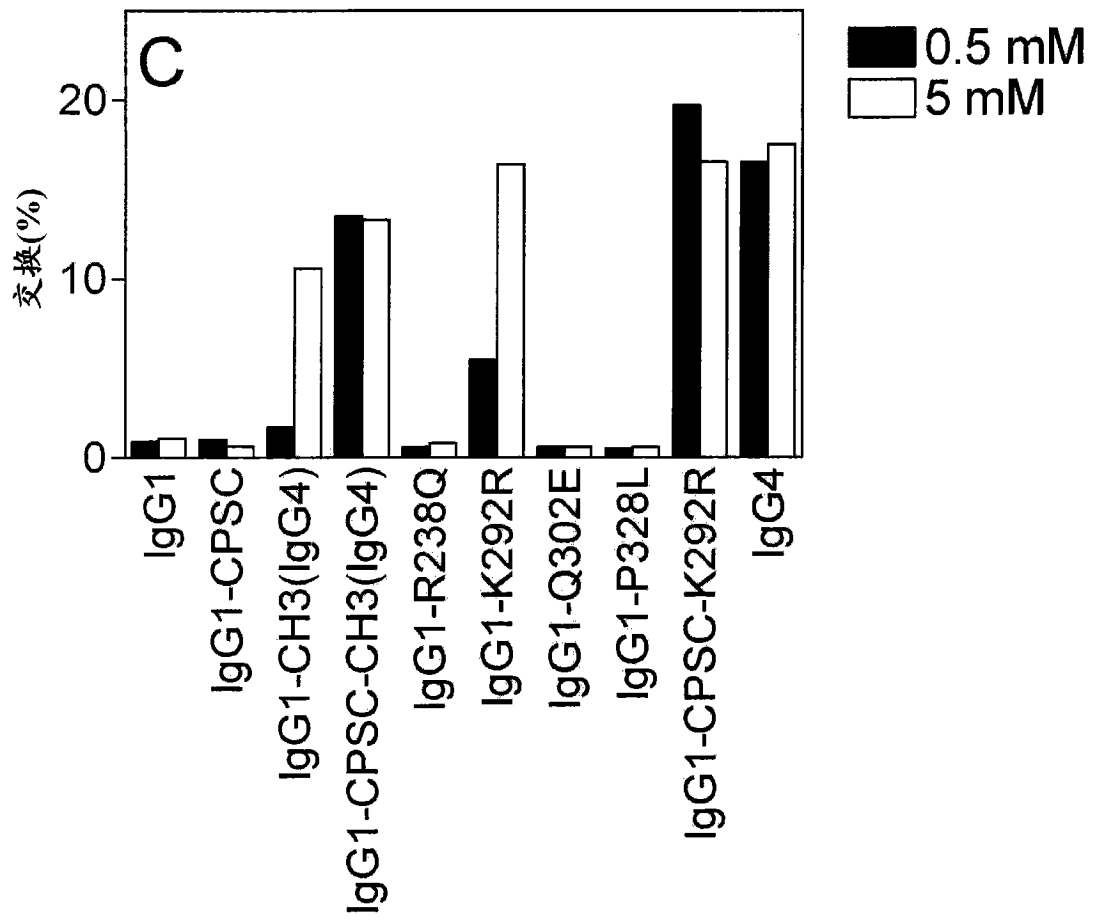


图 19C

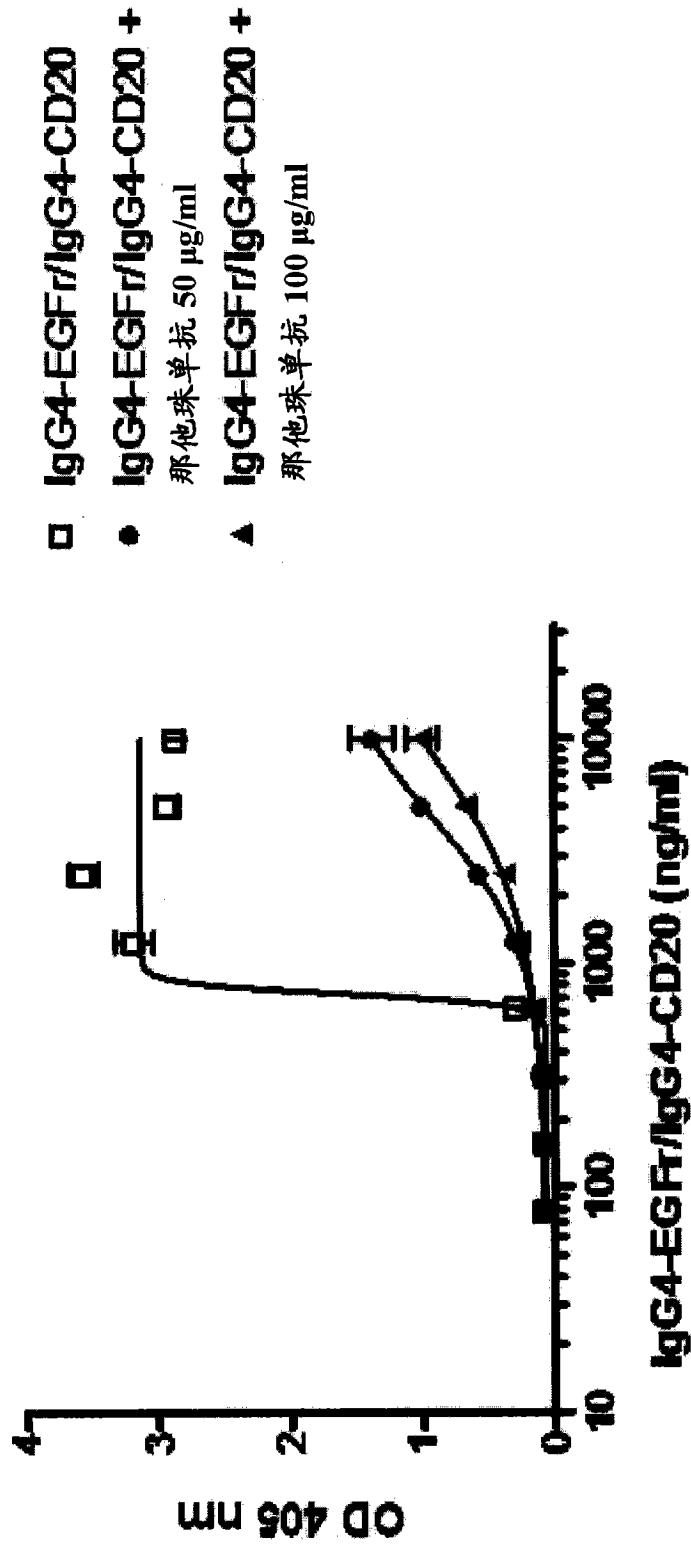


图 20A

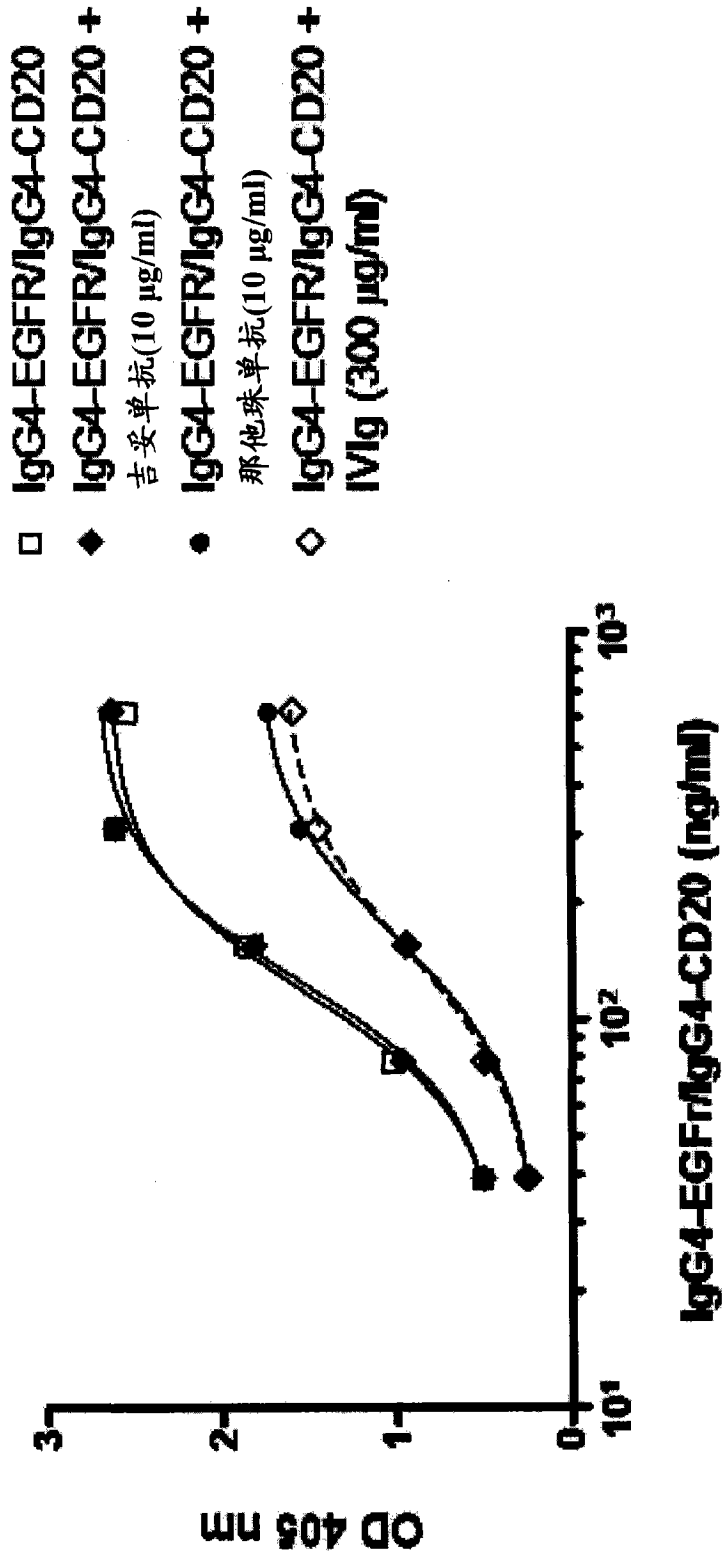


图 20B

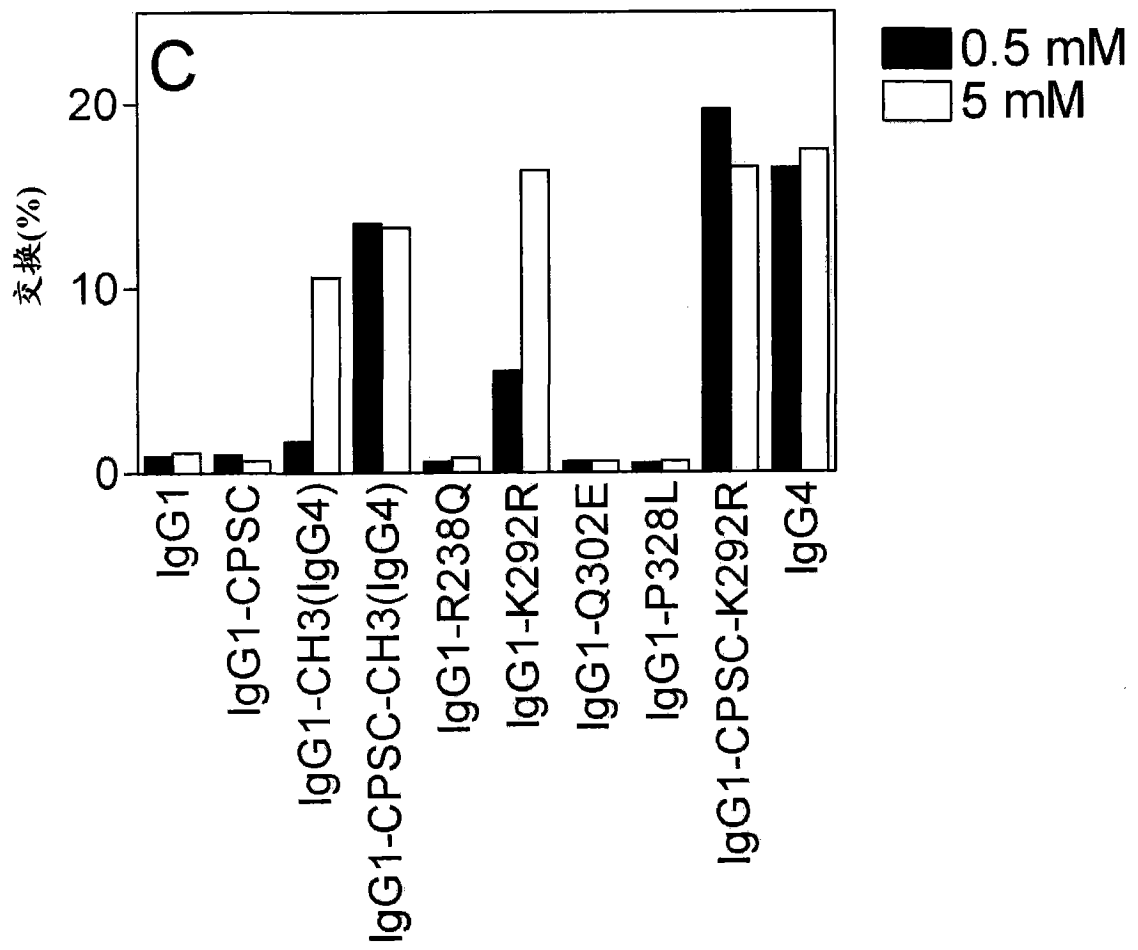


图 21

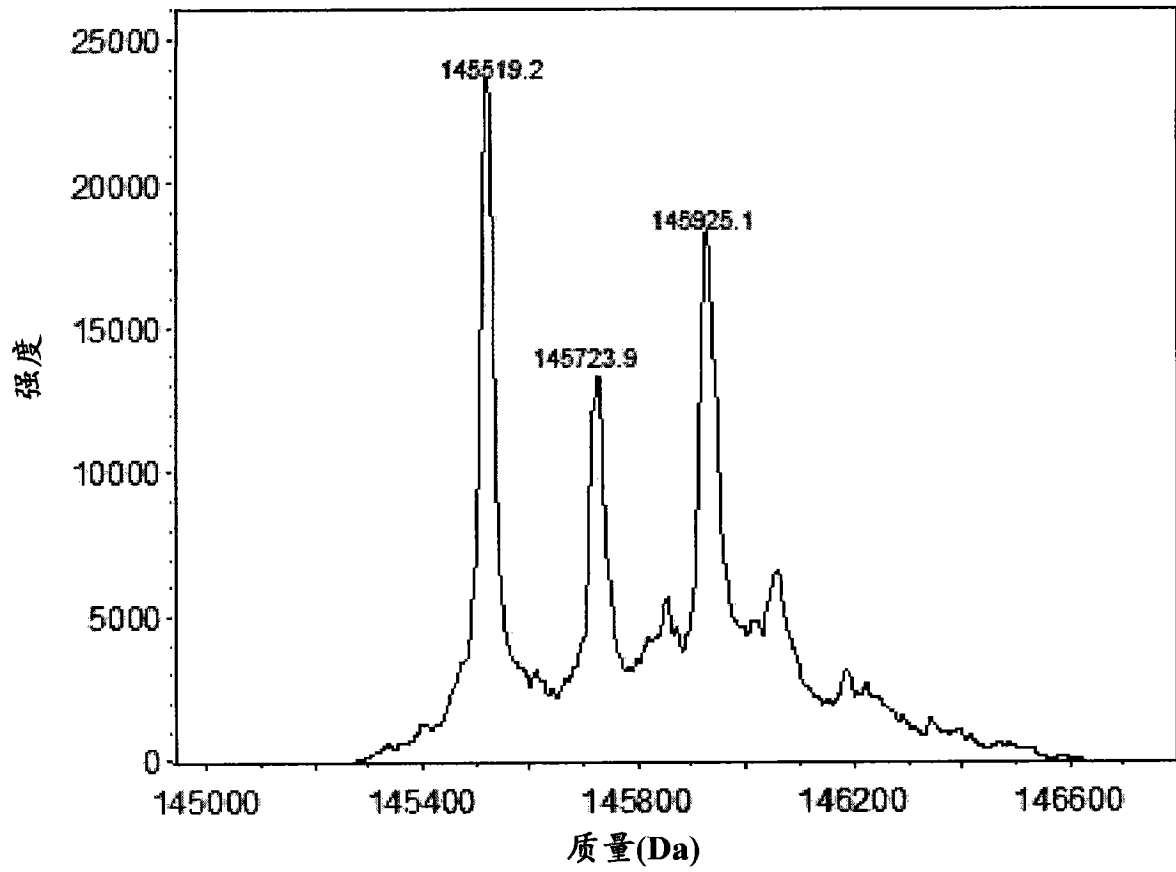


图 22A

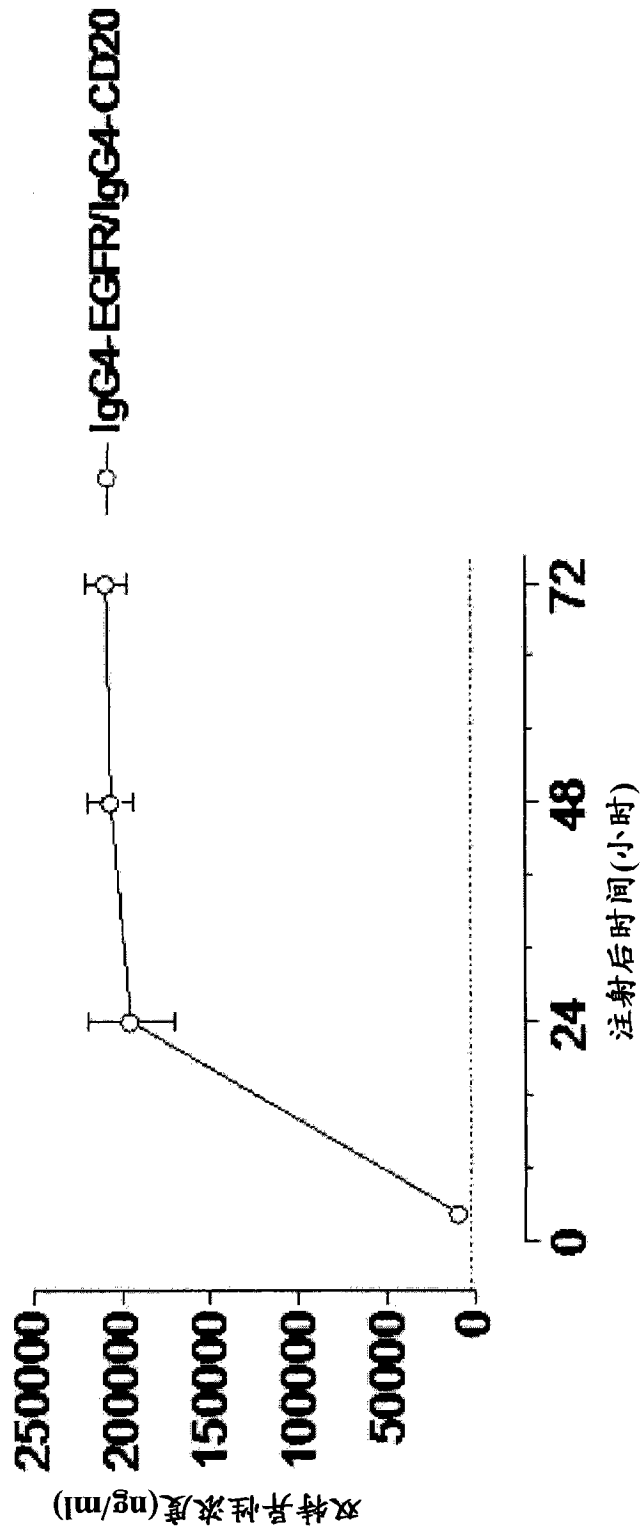


图 22B

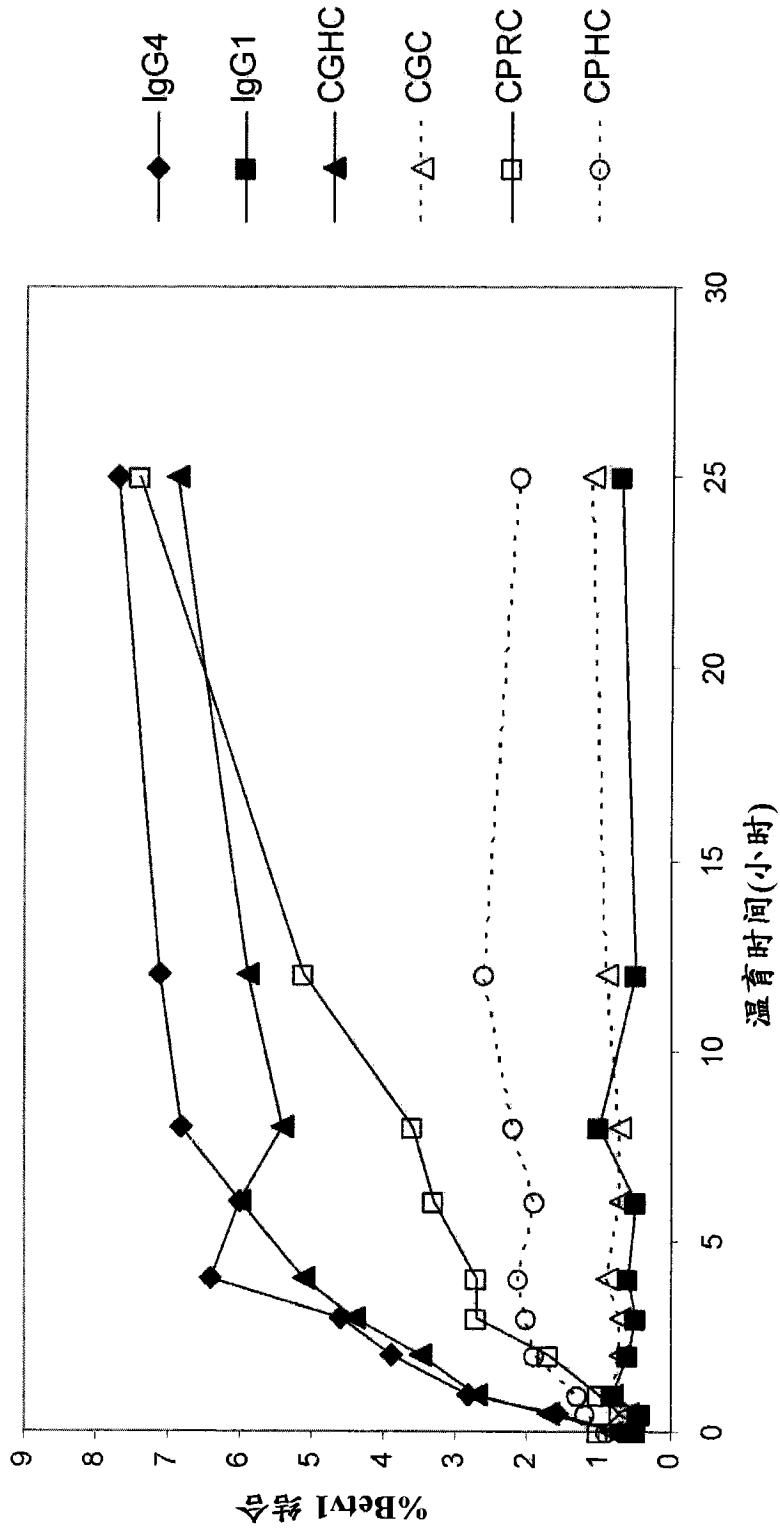


图 23

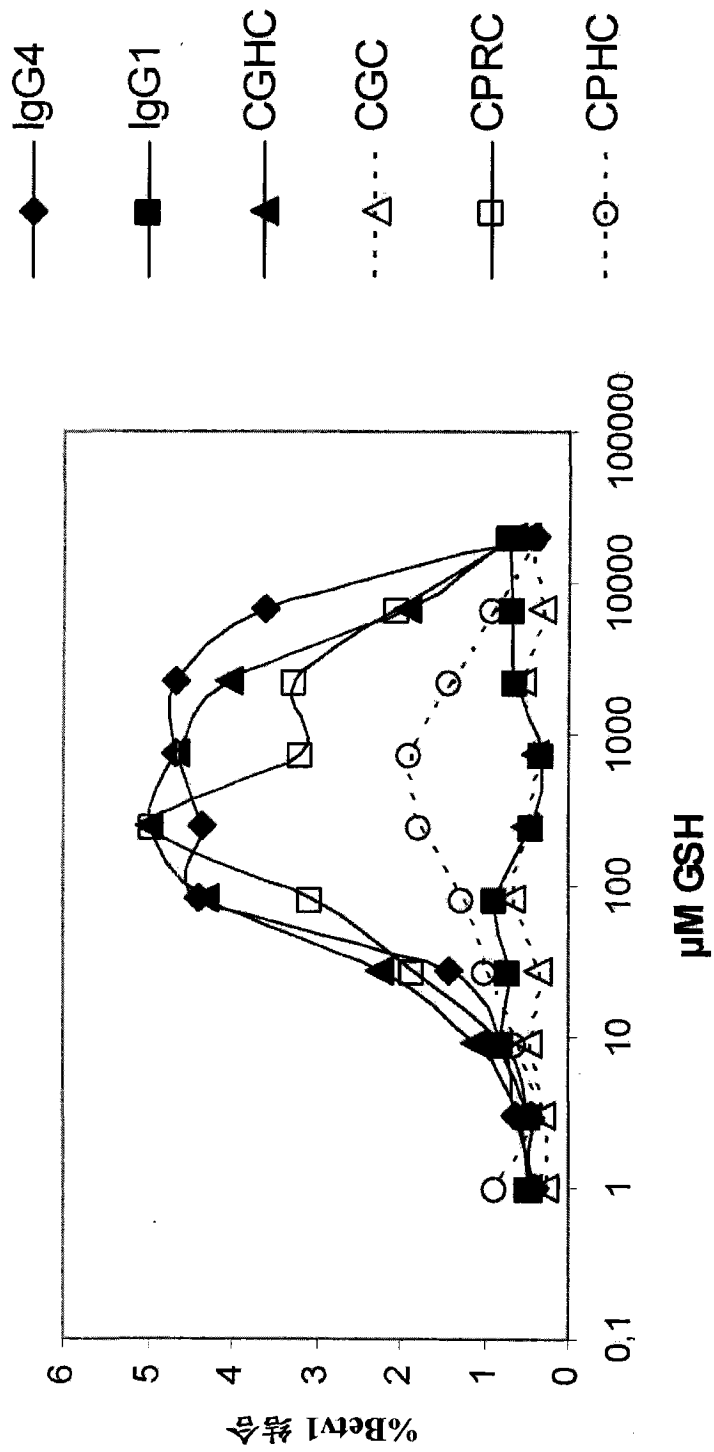


图 24