



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113260626 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 13

(21) 申请号 201980086175.X

(22) 申请日 2019.11.04

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113260626 A

(43) 申请公布日 2021.08.13

(30) 优先权数据  
62/755,915 2018.11.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.06.24

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2019/059661 2019.11.04

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/096959 EN 2020.05.14

(73) 专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司  
地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 K·维拉瓦利 R·麦肯纳

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
专利代理师 岑晓东

(51) Int.Cl.  
C07K 16/00 (2006.01)  
C07K 16/24 (2006.01)  
C12N 9/90 (2006.01)  
C12N 15/70 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 108064308 A, 2018.05.22  
CN 107075548 A, 2017.08.18  
审查员 王鹏

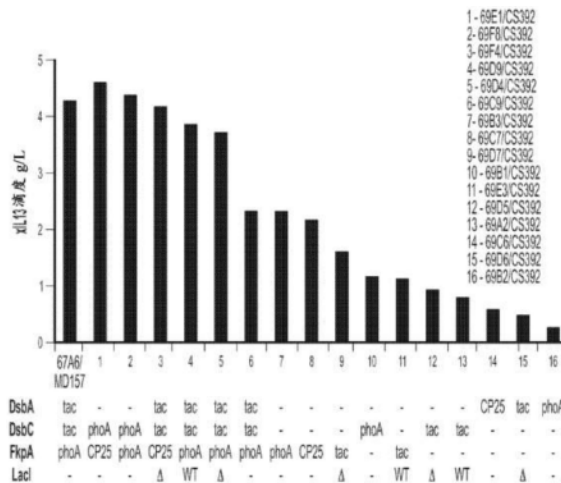
权利要求书5页 说明书52页  
序列表4页 附图18页

(54) 发明名称

在原核宿主细胞中产生双链蛋白质的方法

(57) 摘要

本文提供了用于产生含有两条链的多肽诸如抗体、半抗体、抗体片段或单臂抗体的方法和宿主细胞。所述方法和宿主细胞允许使用以下方式来产生双链多肽:表达编码来自染色体外多核苷酸的多肽链的多核苷酸,以及使用启动子和编码伴侣蛋白质的翻译单元的非天然组合来表达一种或多种来自宿主细胞染色体的伴侣蛋白质(例如,肽基脯氨酰异构酶和/或蛋白质二硫键氧化还原酶)。



1. 一种在包含宿主细胞染色体的原核宿主细胞中产生包含两条链的多肽的方法,所述方法包括:

(a) 在适合于表达所述多肽的两条链的条件下在培养基中培养所述宿主细胞以表达所述多肽的两条链,从而在表达后所述两条链即折叠并组装以在所述宿主细胞中形成生物活性多肽,其中所述多肽是单臂抗体、半抗体或Fab;

其中所述宿主细胞是内源蛋白酶活性不足的大肠杆菌菌株,且其中所述大肠杆菌菌株包含:

(1) 第一多核苷酸,其包含编码所述多肽的第一链的第一翻译单元;

(2) 第二多核苷酸,其包含编码所述多肽的第二链的第二翻译单元,其中所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸是一个或多个染色体外多核苷酸的一部分;

(3) 第三多核苷酸,其包含编码蛋白质二硫键氧化还原酶的第三翻译单元,其中所述第三翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第三翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第三翻译单元转录的第一启动子可操作地组合,并且其中所述第三翻译单元和所述第一启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的;和

(4) 第四多核苷酸,其包含编码肽基脯氨酰异构酶的第四翻译单元,其中所述第四翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第四翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第四翻译单元转录的第二启动子可操作地组合,并且其中所述第四翻译单元和所述第二启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的;以及

(b) 从所述宿主细胞中回收所述生物活性多肽,

其中

所述蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbC,所述第一启动子是当所述培养基中的磷酸盐耗尽时驱动所述第三翻译单元转录的PhoA

启动子,所述肽基脯氨酰异构酶是大肠杆菌FkpA,并且所述第二启动子是CP25启动子;或

所述蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbC,所述第一启动子是当所述培养基中的磷酸盐耗尽时驱动所述第三翻译单元转录的PhoA

启动子,所述肽基脯氨酰异构酶是大肠杆菌FkpA,并且所述第二启动子是当所述培养基中的磷酸盐耗尽时驱动所述第四翻译单元转录的PhoA启动子。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述宿主细胞进一步包含:

(5) 第五多核苷酸,其包含编码第二蛋白质二硫键氧化还原酶的第五翻译单元,其中所述第五翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第五翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第五翻译单元转录的第三启动子可操作地组合,并且其中所述第五翻译单元和所述第三启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述第二蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbA蛋白质。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述第二蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbA。

5. 根据权利要求2-4中任一项所述的方法,其中所述第三启动子是诱导型启动子。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述第三启动子是当IPTG存在于所述培养基中时驱动所述第五翻译单元转录的异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导型启动子。

7. 根据权利要求2-4中任一项所述的方法,其中所述第五翻译单元对于所述宿主细胞染色体是天然的。

8. 根据权利要求2-4中任一项所述的方法,其中所述第五翻译单元对于所述宿主细胞染色体是非天然的。

9. 根据权利要求2-4中任一项所述的方法,其中所述宿主细胞进一步包含:

(6) 第六多核苷酸,其包含编码所述多肽的第三链的第六翻译单元,其中所述第六多核苷酸是所述一个或多个染色体外多核苷酸的一部分;从而在表达后所述三条链即折叠并组装以在所述宿主细胞中形成生物活性多肽。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述第一翻译单元编码免疫球蛋白重链,其中所述第二翻译单元编码免疫球蛋白轻链,其中所述第六翻译单元编码免疫球蛋白Fc片段,并且其中所述三条链折叠并组装以形成生物活性单价抗体。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述单价抗体能够特异性结合抗原。

12. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸两者均是单个染色体外表达载体的一部分。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述染色体外表达载体进一步包含编码促进选择剂抗性的可选择标志物的多核苷酸,其中所述宿主细胞在适合于表达所述可选择标志物的条件下培养,并且其中所述培养基进一步包含所述选择剂。

14. 根据权利要求12所述的方法,其中所述染色体外表达载体进一步包含适合于在所述原核宿主细胞中复制所述染色体外表达载体的复制起点。

15. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述多肽的两条链通过至少一个二硫键彼此连接。

16. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述多肽是异二聚体的单体。

17. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述多肽是半抗体,其中所述第一链和所述第二链包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述半抗体能够特异性结合抗原。

19. 根据权利要求1所述的方法,其中所述大肠杆菌是具有degPS210A突变的菌株。

20. 根据权利要求1所述的方法,其中所述大肠杆菌是具有增强的LacI产生或活性的菌株。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述大肠杆菌是具有lacIQ突变的菌株。

22. 根据权利要求1所述的方法,其中所述大肠杆菌属于菌株  $\Delta$  fhuA  $\Delta$  phoA ilvG2096 (IlvG+;Valr)  $\Delta$  prc spr43H1  $\Delta$  manA lacIQ  $\Delta$  ompT  $\Delta$  menE742 degPS210A。

23. 一种产生包含能够结合第一抗原的第一半抗体和能够结合第二抗原的第二半抗体的双特异性抗体的方法,所述方法包括:

根据权利要求1-4中任一项所述的方法产生所述第一半抗体,其中所述第一翻译单元编码所述第一半抗体的重链,且所述第二翻译单元编码所述第一半抗体的轻链,并且其中所述第一半抗体包含至少一个杆形成突变;

根据权利要求1-4中任一项所述的方法产生所述第二半抗体,其中所述第一翻译单元编码所述第二半抗体的重链,且所述第二翻译单元编码所述第二半抗体的轻链,并且其中

所述第二半抗体包含至少一个白形成突变；

在还原条件下,将所述第一半抗体与所述第二半抗体结合以产生所述双特异性抗体。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述第一抗原和所述第二抗原是不同的抗原。

25. 根据权利要求23所述的方法,其进一步包括添加还原剂以达到所述还原条件的步骤。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述还原剂是谷胱甘肽。

27. 一种包含宿主细胞染色体的原核宿主细胞,其中所述原核宿主细胞是内源蛋白酶活性不足的大肠杆菌菌株,且其中所述大肠杆菌菌株包含:

(1) 第一多核苷酸,其包含编码肽基脯氨酰异构酶的第一翻译单元,其中所述第一翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第一翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第一翻译单元转录的第一启动子可操作地组合,并且其中所述第一翻译单元和所述第一启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的;和

(2) 第二多核苷酸,其包含编码蛋白质二硫键氧化还原酶的第二翻译单元,其中所述第二翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第二翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第二翻译单元转录的第二启动子可操作地组合,并且其中所述第二翻译单元和所述第二启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的,其中

所述肽基脯氨酰异构酶是FkpA蛋白质,所述第一启动子是CP25启动子,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbC蛋白质,并且所述第二启动子是PhoA启动子;或

所述肽基脯氨酰异构酶是FkpA蛋白质,所述第一启动子是PhoA启动子,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbC蛋白质,并且所述第二启动子是PhoA启动子。

28. 根据权利要求27所述的原核宿主细胞,其进一步包含:

(3) 第三多核苷酸,其包含编码第二蛋白质二硫键氧化还原酶的第三翻译单元,其中所述第三翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,并且其中所述第三翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第三翻译单元转录的第三启动子可操作地组合,其中所述第三翻译单元和所述第三启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的。

29. 根据权利要求28所述的原核宿主细胞,其中所述第二蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbA蛋白质。

30. 根据权利要求29所述的原核宿主细胞,其中所述第二蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbA。

31. 根据权利要求28所述的原核宿主细胞,其中所述第二蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbC蛋白质。

32. 根据权利要求31所述的原核宿主细胞,其中所述第二蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbC。

33. 根据权利要求28-32中任一项所述的原核宿主细胞,其中所述第三启动子是第三诱导型启动子。

34. 根据权利要求33所述的原核宿主细胞,其中所述第三诱导型启动子是异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导型启动子。

35. 根据权利要求28所述的原核宿主细胞,其中所述肽基脯氨酰异构酶是FkpA蛋白质,其中所述第一启动子是CP25启动子,其中所述第一蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbC蛋白

质,其中所述第二启动子是异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导型启动子,其中所述第二蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbA蛋白质,并且其中所述第三启动子是异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导型启动子。

36. 根据权利要求27所述的原核宿主细胞,其中所述大肠杆菌是具有degPS210A突变的菌株。

37. 根据权利要求27所述的原核宿主细胞,其中所述大肠杆菌是具有增强的LacI产生或活性的菌株。

38. 根据权利要求37所述的原核宿主细胞,其中所述大肠杆菌是具有lacIQ突变的菌株。

39. 根据权利要求27所述的原核宿主细胞,其中所述大肠杆菌属于菌株  $\Delta$  fhuA  $\Delta$  phoA ilvG2096 (IlvG+;Valr)  $\Delta$  prc spr43H1  $\Delta$  manA lacIQ  $\Delta$  ompT  $\Delta$  menE742 degPS210A。

40. 权利要求27-32和35-39中任一项所述的原核宿主细胞,其进一步包含染色体外表达载体,所述染色体外表达载体包含:

(a) 第一染色体外多核苷酸,其包含编码双链多肽的第一链的第一染色体外翻译单元;和

(b) 第二染色体外多核苷酸,其包含编码所述双链多肽的第二链的第二染色体外翻译单元;

从而在表达后所述两条链即折叠并组装以在所述宿主细胞中形成生物活性双链多肽,其中所述双链多肽是单臂抗体、半抗体或Fab。

41. 根据权利要求40所述的原核宿主细胞,其中所述染色体外表达载体进一步包含适合于在所述原核宿主细胞中复制所述染色体外表达载体的复制起点。

42. 根据权利要求40所述的原核宿主细胞,其中所述染色体外表达载体进一步包含编码促进选择剂抗性的可选择标志物的多核苷酸。

43. 根据权利要求40所述的原核宿主细胞,其中所述双链多肽的两条链通过至少一个二硫键彼此连接。

44. 根据权利要求40所述的原核宿主细胞,其中所述双链多肽是异二聚体的单体。

45. 根据权利要求40所述的原核宿主细胞,其中所述多肽是半抗体,其中所述第一链和所述第二链包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链。

46. 根据权利要求45所述的原核宿主细胞,其中所述半抗体能够特异性结合抗原。

47. 根据权利要求40所述的原核宿主细胞,其中所述分泌蛋白质是从所述宿主细胞的周质中回收的。

48. 根据权利要求40所述的原核宿主细胞,其中所述染色体外表达载体进一步包含第三染色体外多核苷酸,所述第三染色体外多核苷酸包含编码双链多肽的第三链的第三染色体外翻译单元,从而在表达后所述三条链即折叠并组装以在所述宿主细胞中形成生物活性多肽。

49. 根据权利要求48所述的原核宿主细胞,其中所述第一染色体外翻译单元编码免疫球蛋白重链,其中所述第二染色体外翻译单元编码免疫球蛋白轻链,其中所述第三染色体外翻译单元编码免疫球蛋白Fc片段,并且其中所述三条链折叠并组装以形成生物活性单价

抗体。

50. 根据权利要求49所述的原核宿主细胞,其中所述单价抗体能够特异性结合抗原。

## 在原核宿主细胞中产生双链蛋白质的方法

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年11月5日提交的美国临时申请号62/755,915的优先权,该美国临时申请各自通过引用整体并入本文。

[0003] 以ASCII文本文件提交序列列表

[0004] 以下提交的ASCII文本文件的内容全文以引用方式并入本文:序列列表的计算机可读格式(CRF)(文件名:146392044040SEQLIST.TXT,记录日期:2019年10月28日,大小:6KB)。

### 技术领域

[0005] 本公开涉及产生重组多肽的方法,例如抗体(例如,双特异性抗体、半抗体、单臂抗体、抗体片段等),以及可以在所述方法中找到用途的原核宿主细胞。

### 背景技术

[0006] 自1978年在大肠杆菌中生产人胰岛素以来,原核宿主细胞中重组蛋白质的产生一直是许多重要治疗剂的来源。随着分子生物学工具和知识的发展,重组疗法的复杂性也增加了。这些重组蛋白质的产生要求产物表现出适当的特性,诸如翻译、折叠、组装、二硫键结合和转运至周质的特性。已知许多重组蛋白质,特别是具有二硫键的重组蛋白质(例如,双链蛋白质,包括但不限于抗体和抗体片段)的表达导致原核宿主细胞中包涵体的形成(Spadiut等人,Trends in Biotechnology,32:54,2014)。因此,需要用于以工业规模在原核宿主细胞中重组产生适当折叠和组装的双链蛋白质的表达系统和方法。

[0007] 单克隆抗体代表了增长最快的重组治疗剂类型之一,已经批准或正在审查用于治疗各种疾病的众多单克隆抗体(Nelson等人,Nature Review Drug Discovery,9:767,2010)。传统的单克隆抗体结合单个靶抗原。对于许多疾病,采用结合一种以上靶抗原的抗体,即多特异性抗体可能是有利的。此类抗体可以用于针对多种治疗靶标的组合方法中(参见,例如,Bostrom等人,Science,323:1610,2009;和Wu等人,《自然生物技术》(Nature Biotechnology),25:1290,2007)。例如,可以产生双特异性抗体,其同时结合在癌细胞表面上表达的表位和在T细胞上表达的表位以诱导T细胞介导的肿瘤细胞杀伤(Shalaby等人,《临床免疫学》(Clinical Immunology),74:185,1995)。还已经使用了其他单克隆抗体形式,例如抗体片段和单臂抗体(参见例如,Merchant等人,Proc.Natl.Acad.Sci.110:E2987-E2996,2013)。

[0008] 在临床中使用抗体需要具有以工业上相关的量产生双链蛋白质的能力。已经描述了改善原核宿主细胞中重组蛋白质产生的载体组分(参见,例如,Protein Engineering, Design and Selection,19:385,2006;和Simmons等人,Journal of Immunological Methods,263:133,2002),特别是伴侣蛋白质的表达已被用于增加抗体滴度。然而,这些伴侣蛋白质通常由宿主细胞中的质粒表达。这意味着对于每个要表达的新重组蛋白质,必须花费大量时间和成本来构建编码重组产物和伴侣蛋白质的独特表达质粒,并调节其表达(例如,通过测试不同的启动子和/或翻译起始区域)。这也需要使用更大的质粒尺寸,以适

应伴侣蛋白质的编码序列和相关的调控元件。质粒表达通常还导致伴侣蛋白质的较高表达水平(因为质粒可以每细胞至少10-15个拷贝存在),在某些情况下,这需要额外的纯化步骤以去除来自重组产物滴度的伴侣蛋白质。

[0009] 本文所引用的所有参考文献,包括专利申请、专利公开和UniProtKB/Swiss-Prot登录号通过引用整体并入本文,如同每个单独参考文献特定地和个别地指示为通过引用并入一样。

## 发明内容

[0010] 仍然需要用于以制备规模有效产生重组双链蛋白质的最佳方法。特别地,将编码伴侣蛋白质的翻译单元整合入原核宿主细胞染色体中,和/或整合非天然启动子以驱动天然伴侣蛋白质的表达将允许单个宿主细胞可用于表达多种重组蛋白质产物,并简化产生所需的质粒工程和蛋白质纯化方案。

[0011] 为了满足这些和其他需求,本文提供了原核宿主细胞及使用相同的原核宿主细胞以产生双链多肽的方法。有利地,例如,这些宿主细胞和方法允许更有效地产生双链多肽,而不需要前期时间和费用来优化伴侣蛋白质表达质粒或下游纯化步骤以去除伴侣蛋白质。

[0012] 一方面,本文提供了在包含宿主细胞染色体的原核宿主细胞中产生包含两条链的多肽的方法,所述方法包括:(a)在适合于表达所述多肽的两条链的条件下在培养基中培养所述宿主细胞以表达所述多肽的两条链,从而在表达后所述两条链即折叠并组装以在所述宿主细胞中形成生物活性多肽;其中所述宿主细胞包含:(1)第一多核苷酸,其包含编码所述多肽的第一链的第一翻译单元;(2)第二多核苷酸,其包含编码所述多肽的第二链的第二翻译单元,其中所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸是一个或多个染色体外多核苷酸的一部分;以及(3)第三多核苷酸,其包含编码伴侣蛋白质的第三翻译单元,所述伴侣蛋白质选自肽基脯氨酰异构酶和蛋白质二硫键氧化还原酶组成的组,其中所述第三翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第三翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第三翻译单元转录的启动子可操作地组合,并且其中所述第三翻译单元和所述启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的;以及(b)从所述宿主细胞中回收所述生物活性多肽。

[0013] 在一些实施例中,所述启动子是诱导型启动子。在一些实施例中,所述诱导型启动子是当所述培养基中的磷酸盐耗尽时驱动所述第三翻译单元转录的Pho启动子。在一些实施例中,所述诱导型启动子是当IPTG存在于所述培养基中时驱动所述第三翻译单元转录的异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导型启动子。在一些实施例中,所述启动子是组成型启动子。在一些实施例中,所述组成型启动子是CP25启动子。在一些实施例中,所述第三翻译单元对于宿主细胞染色体是天然的。在一些实施例中,所述第三翻译单元对于宿主细胞染色体是非天然的。在一些实施例中,所述伴侣蛋白质是肽基脯氨酰异构酶。在一些实施例中,所述肽基脯氨酰异构酶是FkpA蛋白质。在一些实施例中,所述FkpA是大肠杆菌FkpA。在一些实施例中,所述伴侣蛋白质是蛋白质二硫键氧化还原酶。在一些实施例中,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbC蛋白质。在一些实施例中,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbC。在一些实施例中,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbA蛋白质。在一些实施例中,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbA。

[0014] 另一方面,本文提供了在包含宿主细胞染色体的原核宿主细胞中产生包含两条链的多肽的方法,所述方法包括:(a)在适合于表达所述多肽的两条链的条件下在培养基中培养所述宿主细胞以表达所述多肽的两条链,从而在表达后所述两条链即折叠并组装以在所述宿主细胞中形成生物活性多肽;其中所述宿主细胞包含:(1)第一多核苷酸,其包含编码所述多肽的第一链的第一翻译单元;(2)第二多核苷酸,其包含编码所述多肽的第二链的第二翻译单元,其中所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸是一个或多个染色体外多核苷酸的一部分;以及(3)第三多核苷酸,其包含编码蛋白质二硫键氧化还原酶的第三翻译单元,其中所述第三翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第三翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第三翻译单元转录的第一启动子可操作地组合,并且其中所述第三翻译单元和所述第三启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的;以及(4)第四多核苷酸,其包含编码肽基脯氨酰异构酶的第四翻译单元,其中所述第四翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第四翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第四翻译单元转录的第二启动子可操作地组合,并且其中所述第四翻译单元和所述第二启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的;以及(b)从所述宿主细胞中回收所述生物活性多肽。

[0015] 在一些实施例中,所述第一启动子和所述第二启动子两者均是诱导型启动子。在一些实施例中,当所述第一启动子和所述第二启动子两者均是当所述培养基中的磷酸盐耗尽时分别驱动所述第三翻译单元和所述第四翻译单元转录的Pho启动子。在一些实施例中,所述第一启动子和所述第二启动子中的一者是诱导型启动子,并且所述第一启动子和所述第二启动子中的另一者是组成型启动子。在一些实施例中,所述第一启动子是当所述培养基中的磷酸盐耗尽时驱动所述第三翻译单元转录的Pho启动子,并且所述第二启动子是CP25启动子。在一些实施例中,所述第二启动子是诱导型启动子,并且所述第一启动子是组成型启动子。在一些实施例中,所述第三翻译单元和所述第四翻译单元中的一个或两个对于所述宿主细胞染色体是天然的。在一些实施例中,所述第三翻译单元和所述第四翻译单元对于所述宿主细胞染色体两者均是天然的。在一些实施例中,所述第三翻译单元和所述第四翻译单元中的一个或两个对于所述宿主细胞染色体是非天然的。在一些实施例中,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbC蛋白质。在一些实施例中,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbC。在一些实施例中,所述肽基脯氨酰异构酶是FkpA蛋白质。在一些实施例中,所述FkpA是大肠杆菌FkpA。在一些实施例中,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbC,其中所述第一启动子是当所述培养基中的磷酸盐耗尽时驱动所述第三翻译单元转录的Pho启动子,其中所述肽基脯氨酰异构酶是大肠杆菌FkpA,并且其中所述第二启动子是CP25启动子。在一些实施例中,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbC,其中所述第一启动子是当所述培养基中的磷酸盐耗尽时驱动所述第三翻译单元转录的Pho启动子,其中所述肽基脯氨酰异构酶是大肠杆菌FkpA,并且其中所述第二启动子是当所述培养基中的磷酸盐耗尽时驱动所述第四翻译单元转录的Pho启动子。在一些实施例中,所述宿主细胞进一步包含:(5)第五多核苷酸,其包含编码第二蛋白质二硫键氧化还原酶的第五翻译单元,其中所述第五翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第五翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第五翻译单元转录的第三启动子可操作地组合,其中所述第五翻译单元和所述第三启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的。在一些实

施例中,所述第二蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbA蛋白质。在一些实施例中,所述第二蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbA。在一些实施例中,所述第三启动子是诱导型启动子。在一些实施例中,所述第三启动子是当IPTG存在于所述培养基中时驱动所述第五翻译单元转录的异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导型启动子。在一些实施例中,所述第五翻译单元对于宿主细胞染色体是天然的。在一些实施例中,所述第五翻译单元对于宿主细胞染色体是非天然的。在一些实施例中,所述第一蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbC,其中所述第一启动子是当IPTG存在于所述培养基中时驱动所述第三翻译单元转录的异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导型启动子,其中所述肽基脯氨酰异构酶是大肠杆菌FkpA,其中所述第二启动子是CP25启动子,其中所述第二蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbA,其中所述第三启动子是当IPTG存在于所述培养基中时驱动所述第五翻译单元转录的异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导型启动子。在一些实施例中,所述宿主细胞进一步包含:  
(6)第六多核苷酸,其包含编码所述多肽的第三链的第六翻译单元,其中所述第六多核苷酸是所述一个或多个染色体外多核苷酸的一部分;从而在表达后所述三条链即折叠并组装以在所述宿主细胞中形成生物活性多肽。在一些实施例中,所述第一翻译单元编码免疫球蛋白重链,其中所述第二翻译单元编码免疫球蛋白轻链,其中所述第六翻译单元编码免疫球蛋白Fc片段,并且其中所述三条链折叠并组装以形成生物活性单价抗体。在一些实施例中,所述单价抗体能够特异性结合抗原。

[0016] 在任何上述实施例的一些实施例中,所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸两者均是单个染色体外表达载体的一部分。在一些实施例中,其中所述染色体外表达载体进一步包含编码促进选择剂抗性的可选择标志物的多核苷酸,其中所述宿主细胞在适合于表达所述可选择标志物的条件下培养,并且其中所述培养基进一步包含选择剂。在一些实施例中,所述染色体外表达载体进一步包含适合于在所述原核宿主细胞中复制所述染色体外表达载体的复制起点。在一些实施例中,所述多肽的两条链通过至少一个二硫键彼此连接。在一些实施例中,所述多肽是异二聚体的单体。在一些实施例中,所述多肽是半抗体,其中所述第一链和所述第二链包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链。在一些实施例中,所述半抗体能够特异性结合抗原。在一些实施例中,所述多肽是分泌蛋白质。在一些实施例中,所述分泌蛋白质是从所述宿主细胞的周质中回收的。在一些实施例中,所述原核宿主细胞是革兰氏阴性细菌。在一些实施例中,所述革兰氏阴性细菌是大肠杆菌。在一些实施例中,所述大肠杆菌是内源蛋白酶活性不足的菌株。在一些实施例中,所述大肠杆菌是具有degPS210A突变的菌株。在一些实施例中,所述大肠杆菌是具有增强的LacI产生或活性的菌株。在一些实施例中,所述大肠杆菌是具有lacI<sup>Q</sup>突变的菌株。在一些实施例中,所述大肠杆菌属于菌株  $\Delta$  fhuA  $\Delta$  phoA ilvG2096 (IlvG<sup>+</sup>;Valr)  $\Delta$  prc spr43H1  $\Delta$  manA lacI<sup>Q</sup>  $\Delta$  ompT  $\Delta$  menE742 degPS210A。

[0017] 另一方面,本文提供了产生包含能够结合第一抗原的第一半抗体和能够结合第二抗原的第二半抗体的双特异性抗体的方法,所述方法包括:根据上述实施例中的任一项所述的方法产生所述第一半抗体,其中所述第一翻译单元编码所述第一半抗体的重链,所述第二翻译单元编码所述第一半抗体的轻链,并且其中所述第一半抗体包含至少一个杵(knob-forming)形成的突变;根据上述实施例中的任一项所述的方法产生所述第二半抗体,其中所述第一翻译单元编码所述第二半抗体的重链,所述第二翻译单元编码所述第二

半抗体的轻链,并且其中所述第二半抗体包含至少一个白形成(hole-forming)的突变;病区在还原条件下,将所述第一半抗体与所述第二半抗体结合以产生所述双特异性抗体。

[0018] 在一些实施例中,所述第一抗原和所述第二抗原是不同的抗原。在一些实施例中,所述方法进一步包括添加还原剂以达到所述还原条件的步骤。在一些实施例中,所述还原剂是谷胱甘肽。

[0019] 另一方面,本文提供了包含宿主细胞染色体的宿主细胞(例如原核宿主细胞),其中所述原核宿主细胞包含:(1)第一多核苷酸,其包含编码肽基脯氨酰异构酶的第一翻译单元,其中所述第一翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第一翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第一翻译单元转录的第一启动子可操作地组合,并且其中所述第一翻译单元和所述第一启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的;以及(2)第二多核苷酸,其包含编码蛋白质二硫键氧化还原酶的第二翻译单元,其中所述第二翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第二翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第二翻译单元转录的第二启动子可操作地组合,并且其中所述第二翻译单元和所述第二启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的。

[0020] 在一些实施例中,所述第一翻译单元和所述第二翻译单元中的一个或两个对于所述原核宿主细胞染色体是天然的。在一些实施例中,所述第一翻译单元和所述第二翻译单元对于所述原核宿主细胞染色体两者均是天然的。在一些实施例中,所述第一翻译单元和所述第二翻译单元中的一个或两个对于所述原核宿主细胞染色体是非天然的。在一些实施例中,所述第一启动子是第一诱导型启动子。在一些实施例中,所述第一诱导型启动子是Pho启动子。在一些实施例中,所述第一诱导型启动子是异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导型启动子。在一些实施例中,所述第一启动子是第一组成型启动子。在一些实施例中,所述第一组成型启动子是CP25启动子。在一些实施例中,所述第二启动子是第二诱导型启动子。在一些实施例中,所述第二诱导型启动子是Pho启动子。在一些实施例中,所述第二诱导型启动子是异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导型启动子。在一些实施例中,所述第二启动子是第二组成型启动子。在一些实施例中,所述第二组成型启动子是CP25启动子。在一些实施例中,所述肽基脯氨酰异构酶是FkpA蛋白质。在一些实施例中,所述FkpA是大肠杆菌FkpA。在一些实施例中,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbC蛋白质。在一些实施例中,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbC。在一些实施例中,所述肽基脯氨酰异构酶是FkpA蛋白质,其中所述第一启动子是CP25启动子,其中所述蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbC蛋白质,并且其中所述第二启动子是Pho启动子。在一些实施例中,所述肽基脯氨酰异构酶是FkpA蛋白质,其中所述第一启动子是Pho启动子,其中所述蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbC蛋白质,并且其中所述第二启动子是Pho启动子。在一些实施例中,所述宿主细胞进一步包含:(3)第三多核苷酸,其包含编码第二蛋白质二硫键氧化还原酶的第三翻译单元,其中所述第三翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第三翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第三翻译单元转录的第三启动子可操作地组合,其中所述第三翻译单元和所述第三启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的。在一些实施例中,所述第二蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbA蛋白质。在一些实施例中,所述第二蛋白质二硫键氧化还原酶是大肠杆菌DsbA。在一些实施例中,所述第三启动子是第三诱导型启动子。在一些实施例中,所述第三诱导型启动子是异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导型

启动子。在一些实施例中,所述肽基脯氨酰异构酶是FkpA蛋白质,其中所述第一启动子是CP25启动子,其中所述第一蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbC蛋白质,其中所述第二启动子是异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导型启动子,其中所述第二蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbA蛋白质,并且其中所述第三启动子是异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导型启动子。在一些实施例中,所述原核宿主细胞是革兰氏阴性细菌。在一些实施例中,所述革兰氏阴性细菌是大肠杆菌。在一些实施例中,所述大肠杆菌是内源蛋白酶活性不足的菌株。在一些实施例中,所述大肠杆菌是具有degPS210A突变的菌株。在一些实施例中,所述大肠杆菌是具有增强的LacI产生或活性的菌株。在一些实施例中,所述大肠杆菌是具有lacI<sup>Q</sup>突变的菌株。在一些实施例中,所述大肠杆菌属于菌株 $\Delta$  fhuA  $\Delta$  phoA ilvG2096 (IlvG<sup>+</sup>; Val<sup>r</sup>)  $\Delta$  prc spr43H1  $\Delta$  manA lacI<sup>Q</sup>  $\Delta$  ompT  $\Delta$  menE742 degPS210A。

[0021] 在一些实施例中,所述宿主细胞进一步包含染色体外表达载体,该表达载体包含:(a) 第一染色体外多核苷酸,其包含编码双链多肽的第一链的第一染色体外翻译单元;以及(b) 第二染色体外多核苷酸,其包含编码双链多肽的第二链的第二染色体外翻译单元;从而在表达后所述两条链即折叠并组装以在所述宿主细胞中形成生物活性双链多肽。在一些实施例中,所述染色体外表达载体进一步包含适合于在所述原核宿主细胞中复制所述染色体外表达载体的复制起点。在一些实施例中,所述染色体外表达载体进一步包含编码促进选择剂抗性的可选择标志物的多核苷酸。在一些实施例中,所述双链多肽的两条链通过至少一个二硫键彼此连接。在一些实施例中,所述双链多肽是异二聚体的单体。在一些实施例中,所述多肽是半抗体,其中所述第一链和所述第二链包含免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链。在一些实施例中,所述半抗体能够特异性结合抗原。在一些实施例中,所述双链多肽为分泌蛋白质。在一些实施例中,所述分泌蛋白质是从所述宿主细胞的周质中回收的。在一些实施例中,所述染色体外表达载体进一步包含第三染色体外多核苷酸,所述第三染色体外多核苷酸包含编码双链多肽的第三链的第三染色体外翻译单元,从而在表达后所述三条链即折叠并组装以在所述宿主细胞中形成生物活性多肽。在一些实施例中,所述第一染色体外翻译单元编码免疫球蛋白重链,其中所述第二染色体外翻译单元编码免疫球蛋白轻链,其中所述第三染色体外翻译单元编码免疫球蛋白Fc片段,并且其中所述三条链折叠并组装以形成生物活性单价抗体。在一些实施例中,所述单价抗体能够特异性结合抗原。

[0022] 应当理解,本文所述的各种实施例的一个、一些或所有特性可以组合形成本公开的其他实施例。本公开的这些和其他方面对于本领域技术人员将变得显而易见。通过下面的详细描述进一步描述本公开的这些和其他实施例。

## 附图说明

[0023] 图1显示了用于过表达伴侣蛋白质和双链蛋白质产物(在这种情况下,抗体或抗体片段的重链和轻链;分别为“HC”和“LC”)的表达载体(MD156;左),相较于用于在宿主细胞中表达双链蛋白质产物与相同的伴侣蛋白质的染色体过表达的表达载体(CS392;右图)的质粒图。载体大小以碱基对bp的形式提供。

[0024] 图2显示了具有指示的启动子-fkpA配对的菌株相较于具有基于质粒的FkpA表达的菌株的滴度(黑色)和FkpA表达水平(灰色)。

[0025] 图3A至图3C显示了在摇瓶中指示的菌株中的DsbA(图3A)、DsbC(图3B)或FkpA(图

3C)的相对伴侣蛋白质表达水平(相对于天然表达水平的倍数)。Sh.F1.代表摇瓶培养,+代表阳性对照(质粒伴侣蛋白质表达),-代表阴性对照(无伴侣蛋白质表达)以及Sh.F1.(-)指天然表达水平。

[0026] 图4A至图4C显示了来自10L发酵的指示的菌株中的DsbA(图4A)、DsbC(图4B)或FkpA(图4C)的相对伴侣蛋白质表达水平(相对于天然表达水平的倍数)。+代表阳性对照(质粒伴侣蛋白质表达),-代表阴性对照(无伴侣蛋白质表达),以及Ambr(-)指天然表达水平。

[0027] 图5显示了由具有指示的染色体工程改造的质粒对和天然伴侣蛋白质基因座的菌株产生的xIL13滴度(g/L)。67A6/MD157指没有染色体工程化并且具有在指定启动子下表达指定伴侣蛋白质的MD157质粒的菌株(参见图1的MD157质粒图)。

[0028] 图6A和图6B显示了产生xIL13的指定菌株/质粒组合的培养物随时间的光密度(OD;图6A)和重量克分子渗透压浓度(图6B)随时间的变化。

[0029] 图7A至图7C显示了由指示的菌株产生的xIL13滴度(g/L;图7A)、DsbC浓度(图7B)和FkpA浓度(图7C)随时间的变化。

[0030] 图8A和图8B显示了产生AF2的指定菌株/质粒组合的培养物随时间的光密度(OD;图8A)和重量克分子渗透压浓度(图8B)随时间的变化。

[0031] 图9显示了由所指示的菌株产生的AF2滴度(g/L)随时间的变化。

[0032] 图10A和图10B显示了产生MetMAb的指示菌株/质粒组合的光密度(OD;图10A)和重量克分子渗透压浓度(图10B)。

[0033] 图11显示了由所指示的菌株产生的MetMAb滴度(g/L)随时间的变化。

[0034] 图12A和图12B显示了产生抗VEGF抗体片段的指示菌株/质粒组合的培养物随时间的光密度(OD;图12A)和重量克分子渗透压浓度(图12B)随时间的变化。

[0035] 图13显示了所指示菌株产生的抗VEGF抗体片段滴度(g/L)随时间的变化。

## 具体实施方式

[0036] 本公开提供了具有整合的非天然启动子:伴侣蛋白质组合的宿主细胞(例如原核宿主细胞),其适合于大规模产生重组双链蛋白质产物,以及与其相关的方法。本文提供的实施例证明了表达来自宿主细胞染色体的伴侣蛋白质的原核宿主细胞产生与基于质粒的伴侣蛋白质表达相当的滴度。这些结果在多种抗体形式(例如半抗体、单臂抗体和抗体片段)中是一致的,并且几乎不需要或不需任何额外过程发展。重要的是,本文提供的数据表明,来自宿主细胞染色体而不是质粒的伴侣蛋白质表达导致较低的伴侣蛋白质表达水平(潜在地避免了进一步下游纯化以从产物中去除伴侣蛋白质的需要),但是具有相同或更高的产物滴度。这些结果表明,与使用表达来自质粒的伴侣蛋白质相比,而无需前期时间和成本来优化伴侣蛋白质表达质粒或下游纯化步骤以去除伴侣蛋白质的宿主细胞,使用本公开的宿主细胞和/或方法可以至少以同样的效率以工业规模产生产物。

[0037] 一方面,本文提供了在包含宿主细胞染色体的原核宿主细胞中产生包含两条链的多肽的方法,所述方法包括:在适合于表达所述多肽的两条链的条件下在培养基中培养所述宿主细胞以表达所述多肽的两条链,从而在表达后所述两条链即折叠并组装以在所述宿主细胞中形成生物活性多肽;以及(b)从所述宿主细胞中回收所述生物活性多肽;其中所述宿主细胞包含:(1)第一多核苷酸,其包含编码所述多肽的第一链的第一翻译单元;(2)第二

多核苷酸,其包含编码所述多肽的第二链的第二翻译单元,其中所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸是一个或多个染色体外多核苷酸的一部分;以及(3)第三多核苷酸,其包含编码伴侣蛋白质的第三翻译单元,所述伴侣蛋白质选自由肽基脯氨酰异构酶和蛋白质二硫键氧化还原酶组成的组,其中所述第三翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第三翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第三翻译单元转录的启动子可操作地组合且其中所述第三翻译单元和所述启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的。

[0038] 另一方面,本文提供了在包含宿主细胞染色体的原核宿主细胞中产生包含两条链的多肽的方法,所述方法包括:在适合于表达所述多肽的两条链的条件下在培养基中培养所述宿主细胞以表达所述多肽的两条链,从而在表达后所述两条链即折叠并组装以在所述宿主细胞中形成生物活性多肽;以及(b)从所述宿主细胞中回收所述生物活性多肽;其中所述宿主细胞包含:(1)第一多核苷酸,其包含编码所述多肽的第一链的第一翻译单元;(2)第二多核苷酸,其包含编码所述多肽的第二链的第二翻译单元,其中所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸是一个或多个染色体外多核苷酸的一部分;以及(3)第三多核苷酸,其包含编码蛋白质二硫键氧化还原酶的第三翻译单元,其中所述第三翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第三翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第三翻译单元转录的第一启动子可操作地组合,并且其中所述第三翻译单元和所述第三启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的;以及(4)第四多核苷酸,其包含编码肽基脯氨酰异构酶的第四翻译单元,其中所述第四翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第四翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第四翻译单元转录的第二启动子可操作地组合,并且其中所述第四翻译单元和所述第二启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的。

[0039] 另一方面,本文提供了包含宿主细胞染色体的原核宿主细胞,其中所述原核宿主细胞包含:(1)第一多核苷酸,其包含编码肽基脯氨酰异构酶的第一翻译单元,其中所述第一翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第一翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第一翻译单元转录的第一启动子可操作地组合,并且其中所述第一翻译单元和所述第一启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的;以及(2)第二多核苷酸,其包含编码蛋白质二硫键氧化还原酶的第二翻译单元,其中所述第二翻译单元是所述宿主细胞染色体的一部分,其中所述第二翻译单元与整合在所述宿主细胞染色体中并驱动所述第二翻译单元转录的第二启动子可操作地组合,并且其中所述第二翻译单元和所述第二启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的。

#### [0040] I. 定义

[0041] 在详细描述本公开之前,应当理解,本公开不限于特定的组合物或生物学系统,这些组合物或生物学系统当然可以变化。另外应当了解,本文使用的术语只是为了描述特定实施例的目的,并非旨在进行限制。

[0042] 如在本说明书和所附权利要求中所用,单数形式“一个”、“一种”、“该”和“所述”包括复数指代物,除非上下文另外明确规定。因此,例如,对“分子”的提及任选地包括两个或更多此类分子的组合等。

[0043] 如本文所用的术语“约”是指为此技术领域中的技术人员容易知晓的相应值的常

见误差范围。在本文中提及“约”值或参数包括(且描述)涉及该值或参数本身的实施例。在最大限度下,如本文所用关于某一值的术语“约”涵盖那个值的90%至110%(例如第一TIR和第二TIR的约1.0至约3.0的相对翻译强度是指相对翻译强度在0.9与3.3之间的范围内)。

[0044] 应理解,本文所述的公开的方面和实施例包括“包含”、“由以下组成”及“基本上由以下组成”所指的方面和实施例。

[0045] 如本文所用的术语“包含两条链的多肽”(术语“双链蛋白质”和“双链多肽”也可在本文中可互换使用)意指含有超过一个不同多肽链的任何多肽。在一些实施例中,双链蛋白质可包括通过一个或多个分子间键包括不限于二硫键连接在一起的两个或更多个多肽的大分子复合物。在一些实施例中,双链蛋白质可包括具有属于两条不同多肽链(例如抗体重链和抗体轻链)的由多肽连接基连接的氨基酸序列的单个多肽。在这个情况下,双链蛋白质可在实体上代表单链,但所述单链的两个或更多个部分可在功能上表现得好像它们是两个单独蛋白质链一样。举例来说,单链抗体可包括功能性重链和功能性轻链,其尽管由多肽连接基接合,但折叠和组装得好像它们是仅由分子间键(例如一个或多个二硫键)缔合的单独多肽一样。

[0046] 如本文所用,术语“天然”和“非天然”是指一个或多个遗传元件(例如,启动子、翻译单元或其组合),意指在宿主细胞染色体中的遗传元件存在于自然中时的基因组背景。例如,当翻译单元天然存在于宿主细胞的基因组中时,翻译单元相对于宿主细胞或宿主细胞染色体是“天然的”,而当翻译单元天然不存在于宿主细胞的基因组中时,翻译单元是“非天然的”。当启动子天然存在于宿主细胞的基因组中时,启动子相对于宿主细胞或宿主细胞染色体是“天然的”,而当启动子天然不存在于宿主细胞的基因组中时,启动子是“非天然的”。当启动子不是天然存在于宿主细胞的基因组中且与翻译单元具有相同的可操作连接时,启动子与翻译单元的可操作地组合是“非天然的”,反之亦然。例如,当启动子和翻译单元中的一个或两个不自然存在于宿主细胞基因组中时,当启动子和不与天然存在的宿主细胞基因组可操作地组合的翻译单元以可操作连接的方式存在于宿主细胞基因组中时(即使相同的启动子序列天然存在于宿主细胞基因组中的其他位置),或当翻译单元和与天然存在的宿主细胞基因组可操作地组合的启动子以可操作连接的方式存在于宿主细胞基因组中时(即使相同的翻译单元序列天然存在于宿主细胞基因组中的其他位置),启动子:翻译单元组合相对于宿主细胞或宿主细胞染色体是“非天然的”。

[0047] 如本文所用的术语“载体”意指能够转运已与其连接的另一核酸的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”,其是指另外的DNA链段可以连接到其中的环状双链DNA环。另一类型的载体是噬菌体载体。载体的另一种类型是病毒载体,其中另外的DNA链段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们所引入的宿主细胞(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加体哺乳动物载体)中自主复制。在导入宿主细胞中之后,其他载体(例如,非附加体哺乳动物载体)可以整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够引导与其可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“重组载体”)。通常,在重组DNA技术中有用的表达载体通常是质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最通常使用的载体形式。

[0048] 如本文所用的术语“顺反子”意指大致等效于包含编码多肽链和邻近控制区的核苷酸序列的翻译单元的遗传元件。“顺反子”可包括例如一个或多个开放阅读框、翻译起始

区(TIR;如下文所定义)、信号序列和终止区。

[0049] “多顺反子”表达载体是指含有和在一个单一启动子的调控下表达多个顺反子的单一载体。多顺反子载体的一个常见实例是“双顺反子”载体,其含有和在一个启动子的控制下表达两种不同多肽。在表达双顺反子或多顺反子载体后,多个基因首先作为单一转录单元被转录,然后分别翻译。

[0050] “转录单元”是指被转录成单一RNA转录物的多核苷酸。“翻译单元”是指编码并在翻译时产生多肽的多核苷酸。如上所述,多顺反子多核苷酸可含有具有多个翻译单元的单一转录单元。

[0051] 本公开的“单独顺反子”表达载体是指包含至少两对单独启动子-顺反子的单一载体,其中每个顺反子在它的自身启动子的控制下。在表达单独顺反子表达载体后,不同基因的转录过程与翻译过程均是单独的和独立的。

[0052] 如本文所用的“伴侣蛋白质”是指有助于其它大分子的折叠或组装的任何蛋白质,包括但不限于双链蛋白质。通常,伴侣蛋白质可通过许多不同机理来起促进蛋白质折叠或组装。例如,伴侣蛋白质可促进蛋白质折叠和/或组装,催化链内二硫键的形成,促进蛋白质解折叠和/或分解(例如聚集或错折叠的蛋白质或多蛋白质复合物),防止聚集,帮助蛋白质降解等。

[0053] “分泌信号序列”或“信号序列”是指编码短信号肽的核酸序列,所述短信号肽可用于指导新合成的目标蛋白质穿过细胞膜,通常是原核生物的内膜或内膜与外膜两者。因此,目标蛋白质诸如免疫球蛋白轻链或重链多肽被分泌至原核宿主细胞的周质中或培养基中。由分泌信号序列编码的信号肽对于宿主细胞可为内源性的,或它们可为外源性的,包括对于待表达的多肽是天然的信号肽。分泌信号序列通常存在于待表达的多肽的氨基末端,并且通常在生物合成与从细胞质分泌多肽之间被酶促移除。因此,信号肽通常不存在于成熟蛋白质产物中。

[0054] “可操作地连接”是指两个或更多个组分的并置,其中所述的组分处于允许它们以其预期方式起作用的关系。例如,如果启动子以顺式起控制或调节编码序列的转录的作用,那么它可操作地连接至编码序列或翻译单元。通常,但不是必须的,“可操作地连接”的DNA序列是连续的,并且在需要连接两个蛋白质编码区,或者在分泌前导的情况下,是连续的并且在阅读框中。然而,尽管可操作地连接的启动子通常位于编码序列或翻译单元的上游,但是它不一定与其连续。可操作地连接的增强子可以位于编码序列/翻译单元的上游、之内或下游,并且距启动子相当远。通过本领域已知的重组方法,例如使用PCR方法,通过退火或通过方便的限制性位点处的连接来完成连接。如果适宜限制性位点不存在,那么依照常规规范使用合成寡核苷酸衔接子或连接基。

[0055] 如本文所用,“调控元件”是指顺式存在的核苷酸序列,其是编码异源多肽的多核苷酸转录和翻译成多肽所必需的。转录调节元件通常包含要表达的基因序列的启动子5'、转录起始和终止位点以及聚腺苷酸化信号序列。术语“转录起始位点”是指构建体中对应于并入初级转录物(即mRNA前体)中的第一核酸的核酸;转录起始位点可与启动子序列重叠。

[0056] “启动子”是指控制与其可操作地连接的基因或序列的转录的多核苷酸序列。启动子包括RNA聚合酶结合和转录起始的信号。所使用的启动子将在预期所选择序列的在其中表达的宿主细胞的细胞类型中起作用。大量的启动子,包括来自各种不同来源的组成型、诱

导型和阻遏型启动子,在本领域中是众所周知的(并在诸如GenBank的数据库中进行了鉴定),并且可以作为克隆的多核苷酸或在其内使用(例如,来自诸如ATCC以及其他商业或个人来源)。在诱导型启动子的情况下,启动子的活性响应于信号例如IPTG的存在或磷酸盐耗尽而增加或降低。

[0057] 如本文所用,术语“宿主细胞”(或“重组宿主细胞”)意指已被遗传改变或能够通过引入外源或非天然多核苷酸而被遗传改变的细胞,例如重组质粒或载体。应当理解,这些术语不仅意指特定的对象细胞,而且还指该细胞的后代。因为由于突变或环境影响,某些修饰可能在后代中发生,所以这样的后代实际上可能与亲本细胞不同,但仍包括如本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0058] 术语“药物制剂”是指处于允许活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对于将被施用制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外组分的制备物。此类制剂为无菌制剂。“药学上可接受的”赋形剂(载体、添加剂)是指可合理地施用于哺乳动物以提供有效剂量的所用活性成分的赋形剂。

[0059] 用于治疗目的的“受试者”或“个体”是指被分类为哺乳动物的任何动物,包括人、家畜和农场动物以及动物园动物、运动动物或宠物,诸如狗、马、猫、牛等。优选地,哺乳动物是人。

[0060] 本文的术语“抗体”以最广泛的含义使用,并且具体地覆盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。

[0061] “经分离的”抗体是已经鉴定并且自其自然环境的组分中分离和/或回收的抗体。其自然环境的污染物组分是会干扰抗体研究、诊断或治疗用途的材料,并且可以包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在一些实施例中,将抗体纯化至(1)大于抗体重量的95%(例如通过Lowry方法测定),在一些实施例中,大于99%重量;(2)足以获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度(例如通过使用旋转杯测序仪),或(3)均质(在还原或非还原条件下进行SDS-PAGE,使用例如考马斯蓝或银染)。经分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为不会存在抗体天然环境的至少一种成分。然而,通常,分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0062] “天然抗体”通常是约150,000道尔顿的异源四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间变化。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫键。每条重链在一端具有可变结构域( $V_H$ ),其后是多个恒定结构域。每条轻链的一端具有可变结构域( $V_L$ ),另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。据信特定的氨基酸残基在轻链和重链可变结构域之间形成界面。

[0063] 术语“恒定结构域”是指免疫球蛋白分子的一部分,该部分相对于免疫球蛋白的另一部分(即可变结构域,其包含抗原结合位点)具有更保守的氨基酸序列。恒定结构域包含重链的 $C_H1$ 、 $C_H2$ 和 $C_H3$ 结构域(统称为CH)和轻链的 $CHL$ (或 $CL$ )结构域。

[0064] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链的可变结构域可以称为“ $V_H$ ”。轻链的可变结构域可以称为“ $V_L$ 。”这些结构域通常是抗体中变

化最大的部分,并且包含抗原结合位点。

[0065] 术语“可变的”是指以下事实:可变结构域的某些部分在抗体之间的序列差异很大,并用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。但是,可变性并非在抗体的可变结构域中均匀分布。它集中在轻链和重链可变结构域中的三个称为高变区(HVR)的区段中。可变结构域中保守性更高的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区,其主要采用 $\beta$ 折叠结构,由三个HVR连接,这三个HVR形成连接 $\beta$ 折叠结构的环并且在一些情况下形成 $\beta$ 折叠结构的一部分。每条链中的HVR通过FR区紧密保持在一起,并且与另一条链中的HVR一起,有助于抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人,《具有免疫学意义的蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,美国卫生与公众服务部,国立卫生研究院,马里兰州贝塞斯达(1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但具有各自效应子功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性作用。

[0066] 来自任何哺乳动物物种抗体(免疫球蛋白)的“轻链”基于其恒定结构域的氨基酸序列,可以配属为两种明显不同的类型中的一种,这两种类型分别称为卡帕(“ $\kappa$ ”)和兰姆达(“ $\lambda$ ”)。

[0067] 如本文所用,术语IgG“同种型”或“亚类”是指由免疫球蛋白恒定区的化学和抗原特征定义的免疫球蛋白的任何亚类。

[0068] 根据其重链恒定结构域的氨基酸序列,可以将抗体(免疫球蛋白)分为不同的类别。免疫球蛋白主要分为五类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且它们中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>,以及IgA<sub>2</sub>。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ 和 $\delta$ 。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的,并在例如以下文献中有一般描述:Abbas等人,《细胞和分子免疫学》(Cellular and Mol. Immunology),第四版(W.B. Saunders, Co., 2000)。抗体可以是较大融合分子的一部分,该融合分子是通过抗体与一个或多个其它蛋白质或肽的共价或非共价结合形成的。

[0069] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,是指其基本上完整形式的抗体而不是如下文定义的抗体片段。该术语特别是指具有包含Fc区的重链的抗体。

[0070] 出于本文目的的“裸抗体”是未与药物部分或放射性标记缀合的抗体。

[0071] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合区。在一些实施例中,本文所述的抗体片段是抗原结合片段。抗体片段的示例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双体抗体;线性抗体;单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0072] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同抗原结合片段,称为“Fab”片段,每个片段都有单个抗原结合位点和残留的“Fc”片段,其名称反映其是否容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生的F(ab')<sub>2</sub>片段具有两个抗原结合位点并且仍能与抗原交联。

[0073] “Fv”是包含完全的抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施例中,双链Fv种类由紧密和非共价结合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体组成。在单链Fv(scFv)物种中,一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域可通过柔性肽连接基共价连接,使得轻链和重链可缔合成类似于在双链Fv物种中的“二聚体”结构。以此构型,每个可变结构域的三个HVR相互作用以在VH-VL二聚体的表面上限定抗原结合位点。六个HVR共同赋予抗体以抗原结合特异性。但是,即使单个可变结构域(或仅包含三个对抗原具有特异性的HVR

的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管其亲和力低于完整结合位点。

[0074] “Fab”片段含有重链可变结构域和轻链可变结构域且亦含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab’片段与Fab片段的不同之处在于Fab’片段在重链CH1结构域的羧基末端添加了一些残基,这些残基包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab’-SH是本文中关于其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离硫醇基的Fab’的命名。F(ab’)<sub>2</sub>抗体片段最初是作为在其间具有铰链半胱氨酸的成对Fab’片段而产生的。抗体片段的其他化学偶合也是已知的。

[0075] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。一般地,scFv多肽在VH和VL结构域之间进一步包含多肽连接基,使scFv形成所需的抗原结合结构。有关scFv的综述,参见例如Pluckthun的《单克隆抗体的药理学》(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies),第113卷,Rosenburg和Moore主编,(Springer-Verlag,New York,1994),第269-315页。

[0076] 术语“双体抗体”是指具有两个抗原结合位点的抗体片段,其片段包含连接至与同一多肽链(VH-VL)中的轻链可变结构域(VL)的重链可变结构域(VH)。通过使用太短以至于不允许同一条链上两个结构域之间配对的连接基,这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。双体抗体可为二价抗体或双特异性抗体。双体抗体更全面地描述于例如:EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003);以及Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。三体抗体和四体抗体也在Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)中进行了描述。

[0077] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群中获得的抗体,例如,除了可能存在的少量突变例如天然存在的突变以外,该抗体群包含的单个抗体是相同的。因此,修饰语“单克隆的”表明抗体的特征不是离散抗体的混合物。在某些实施例中,这样的单克隆抗体通常包括含有结合靶标的多肽序列的抗体,其中靶标结合多肽序列通过包括从多个多肽序列中选择单个靶标结合多肽序列的过程获得。例如,选择过程可以从多个克隆,例如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆的集合中选择独特的克隆。应当理解,可以进一步改变选择的靶标结合序列,例如,以提高对靶标的亲和力、使靶标结合序列人源化、提高其在细胞培养物中的产生、降低其在体内的免疫原性、产生多特异性抗体等,并且包含改变的靶标结合序列的抗体也是本公开的单克隆抗体。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除其特异性外,单克隆抗体制剂的优势还在于其通常不受其他免疫球蛋白的污染。

[0078] 修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本公开使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括,例如在原核宿主细胞中表达,杂交瘤方法(例如,Kohler and Milstein, Nature,256:495-97(1975);Hongo等人,Hybridoma,14(3):253-260(1995),Harlow等人, Antibodies:ALaboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版1988);Hammerling等人,《单克隆抗体和T细胞杂交瘤》(Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas)563-681(Elsevier,N.Y.,1981))、重组DNA方法(参见,例如,美国专利号4,816,567)、噬菌体展示技术(参见,例如,Clackson等人,Nature,352:624-628(1991));

Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu等人, *J. Mol. Biol.* 338 (2):299-310 (2004); Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340 (5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34):12467-12472 (2004); 和Lee等人, *J. Immunol. Methods* 284 (1-2):119-132 (2004)、和在动物中产生具有编码人免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因座或基因的部分或全部的人抗体或类人抗体的技术(参见,例如,WO 1998/24893;WO 1996/34096;WO 1996/33735;WO 1991/10741;Jakobovits等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits等人, *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggemann等人, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); 美国专利号5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425和5,661,016;Marks等人, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg等人, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild等人, *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996) 以及 Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)。

[0079] 本文中的单克隆抗体具体地包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与来自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而一条或多条链的其余部分与来自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列以及这些抗体的片段相同或同源,只要它们表现出所需的生物活性即可(参见,例如美国专利号4,816,567;和Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。嵌合抗体包括 **PRIMATTZED<sup>®</sup>** 抗体,其中抗体的抗原结合区来源于通过例如用目标抗原免疫猕猴而产生的抗体。

[0080] “人源化”形式的非人(例如,鼠)抗体为包含来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在一个实施例中,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体HVR的残基被来自非人类物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠、兔或具有所需特异性、亲和力和/或能力的非人灵长类动物的HVR的残基替代。在某些情况下,人免疫球蛋白的FR残基被相应的非人残基代替。此外,人源化抗体可包含受体抗体或供体抗体中不存在的残基。可以进行这些修饰以进一步改善抗体性能。总体上,人源化抗体将基本上包含所有中的至少一个可变结构域,通常是两个可变结构域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,并且所有或基本上所有的FR为人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体还将任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,该免疫球蛋白通常为人免疫球蛋白。更多详情参见例如Jones等人, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988); 以及Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。也参见例如Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler和Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); 以及美国专利号6,982,321和7,087,409。

[0081] “人抗体”是具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体和/或使用本文所公开的用于制备人抗体的任何技术制得的抗体。人抗体的该定义特别地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术产生人抗体,包括噬菌体展示文库。Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)。还可用于制备人单克隆抗体的方法如以下文献所述: Cole等人,《单克隆抗体与癌症治疗》(*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*), Alan R. Liss, 第77页 (1985);

Boerner等人, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991)。也参见van Dijk和van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5:368-74 (2001)。可以通过向转基因动物施用抗原来制备人抗体, 该转基因动物已经修饰以对抗原攻击产生应答而产生此类抗体, 但其内源基因座已失效, 例如, 免疫异种小鼠 (参见, 例如, U.S. Pat. Nos. 6,075,181和6,150,584关于XENOMOUSE™技术)。也参见例如Li等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) 关于通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体。

[0082] “物种依赖性抗体”是对来自第一哺乳动物物种的抗原具有比对来自第二哺乳动物物种的该抗原同系物更强的结合亲和力的抗体。通常, 物种依赖性抗体与人抗原“特异性结合” (例如, 其结合亲和力 (Kd) 值不超过约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ , 优选不超过约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ , 优选不超过约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ), 但对来自第二非人哺乳动物物种的该抗原同系物的结合亲和力比其对该人抗原的结合亲和力弱至少约50倍, 或至少约500倍, 或至少约1000倍。物种依赖性抗体可以是如上定义的各种抗体中的任何一种, 但是优选地是人源化或人抗体。

[0083] 如本文所用的术语“高变区”、“HVR”或“HV”是指在序列上高变和/或形成结构上限定的环的抗体可变结构域的区域。通常, 抗体包含六个HVR; 三个在VH中 (H1、H2、H3), 并且三个在VL中的 (L1、L2、L3)。在天然抗体中, H3和L3在六个HVR中表现出最多的多样性, 尤其是H3被认为在赋予抗体精细特异性方面起着独特的作用。参见, 例如, Xu等人, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson和Wu, 《分子生物学方法》(Methods in Molecular Biology), 248:1-25 (Lo, 编辑, Human Press, Totowa, N.J., 2003)。实际上, 仅由重链组成的天然存在的骆驼科动物抗体在不存在轻链的情况下是有功能并稳定的。参见, 例如, Hamers-Casterman等人, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff等人, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)。

[0084] 许多HVR描述得到应用, 并且包含于本文中。Kabat互补决定区 (CDR) 基于序列变异性并且是最常用的 (Kabat等人, 《具有免疫学意义的蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第5版, 美国卫生与公众服务部, 国立卫生研究院, 马里兰州贝塞斯达 (1991))。相反, Chothia指的是结构环的位置 (Chothia和Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM HVR表示Kabat HVR和Chothia结构环之间的折衷, 并且被牛津分子公司 (Oxford Molecular) 的AbM抗体建模软件采用。“接触”HVR基于可用的复杂晶体结构的分析结果。这些HVR中的每个的残基如下文所述。

[0085] 表1a. 抗体高变区

| 环         | Kabat    | AbM      | Chothia  | 接触                      |
|-----------|----------|----------|----------|-------------------------|
| L1        | L24-L34  | L24-L34  | L26-L32  | L30-L36                 |
| L2        | L50-L56  | L50-L56  | L50-L52  | L46-L55                 |
| L3        | L89-L97  | L89-L97  | L91-L96  | L89-L96                 |
| [0086] H1 | H31-H35B | H26-H35B | H26-H32  | H30-H35B<br>(Kabat 编号)  |
| H1        | H31-H35  | H26-H35  | H26-H32  | H30-H35<br>(Chothia 编号) |
| H2        | H50-H65  | H50-H58  | H53-H55  | H47-H58                 |
| H3        | H95-H102 | H95-H102 | H96-H101 | H93-H101                |

[0087] HVR可以包括以下“扩展HVR”: VL中的24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2) 和89-97或89-96 (L3), 以及VH中的26-35 (H1)、50-65或49-65 (H2) 和93-102、94-102或95-102

(H3)。对于这些定义中的每一个,可变结构域残基均根据上述Kabat等人的方法进行编号。

[0088] “构架”或“FR”残基是除本文定义的HVR残基以外的那些可变结构域残基。

[0089] 术语“Kabat所述的可变结构域残基编号”或“Kabat所述的氨基酸位置编号”及其变型是指在上述Kabat等人的文献中提出的用于重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用该编号系统,实际线性氨基酸序列可能包含较少或附加的氨基酸,其对应于可变结构域的FR或HVR的缩短或插入。例如,重链可变结构域可在H2的残基52之后包括单个氨基酸插入片段(根据Kabat编号的残基52a)以及重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat编号的残基82a、82b和82c等)。可通过将抗体序列与“标准”Kabat编号序列的同源性区域进行比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。

[0090] 当提及可变结构域中的残基(大约是轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时,通常使用Kabat编号系统(例如,Kabat等人,《具有免疫学意义的蛋白质序列》(Sequences of Immunological Interest),第5版,美国卫生与公众服务部,国立卫生研究院,Bethesda, Md. (1991))。当提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号系统”或“EU索引”(例如,上述Kabat等人所报道的EU索引)。“Kabat所述的EU索引”是指人类IgG1 EU抗体的残基编号。

[0091] 表述“线性抗体”是指Zapata等人在(1995Protein Eng,8(10):1057-1062)中所述的抗体。简而言之,这些抗体包含一对串联的Fd区段(VH-CH1-VH-CH1),其与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以为双特异性或单特异性的。

[0092] II. 宿主细胞

[0093] 本文提供具有宿主细胞染色体的宿主细胞(例如原核宿主细胞),所述宿主细胞染色体包含编码至少一种伴侣蛋白质(例如肽基脯氨酰异构酶或蛋白质二硫键氧化还原酶)的翻译单元,所述伴侣蛋白质与驱动翻译单元转录的启动子(也是宿主细胞染色体的一部分)可操作地组合或连接,使得启动子和翻译单元的组合对于宿主细胞或宿主细胞染色体是非天然的。

[0094] 在一些实施例中,所述宿主细胞染色体包含:(1)第一多核苷酸,其包含编码肽基脯氨酰异构酶的第一翻译单元;以及(2)第二多核苷酸,其包含编码蛋白质二硫键氧化还原酶的第二翻译单元,其中第一翻译单元和第二翻译单元是宿主细胞染色体的一部分,并且与分别驱动第一翻译单元和第二翻译单元转录的第一启动子和第二(分别)启动子(也是宿主细胞染色体的一部分)可操作地组合或连接。在一些实施例中,第一翻译单元和第一启动子的组合和/或第二翻译单元和第二启动子的组合对于宿主细胞染色体是非天然的。例如,所述启动子的一个或两个对于宿主细胞染色体可以是非天然的,所述翻译单元的一个或两个对于宿主细胞染色体可以是非天然的,或者所述翻译单元的一个或两个对于宿主细胞染色体可以是天然的,但可与对于宿主细胞染色体是非天然的组合中的启动子可操作地组合。

[0095] 在一些实施例中,宿主细胞进一步包含一个或多个编码本公开的双链多肽的两条或多条链的染色体外多核苷酸。例如,在一些实施例中,所述宿主细胞包含:(1)第一多核苷酸,其包含编码本公开的双链多肽的第一链的第一翻译单元;(2)第二多核苷酸,其包含编码本公开的双链多肽的第二链的第二翻译单元;(3)第三多核苷酸,其包含编码伴侣蛋白质(例如肽基脯氨酰异构酶或蛋白质二硫键氧化还原酶)的第三翻译单元,所述第三翻译单元

与驱动所述第三翻译单元转录的启动子可操作地组合。在一些实施例中,所述第三翻译单元和所述启动子的组合对于所述宿主细胞染色体是非天然的。在一些实施例中,第一多核苷酸和第二多核苷酸(即分别编码第一翻译单元和第二翻译单元)是一个或多个染色体外多核苷酸(例如,质粒)的一部分,并且第三多核苷酸(和相关的启动子)是宿主细胞染色体的一部分。

[0096] 在一些实施例中,所述宿主细胞包含:(1) 第一多核苷酸,其包含编码本公开的双链多肽的第一链的第一翻译单元;(2) 第二多核苷酸,其包含编码本公开的双链多肽的第二链的第二翻译单元;(3) 第三多核苷酸,其包含编码蛋白质二硫键氧化还原酶的第三翻译单元,所述第三翻译单元与驱动所述第三翻译单元转录的启动子可操作地组合;以及(4) 第四多核苷酸,其包含编码肽基脯氨酰异构酶的第四翻译单元,所述第四翻译单元与驱动所述第四翻译单元转录的启动子可操作地组合。在一些实施例中,第三翻译单元和其相关的启动子的组合和/或第四翻译单元和其相关的启动子的组合对于宿主细胞染色体是非天然的。在一些实施例中,第一多核苷酸和第二多核苷酸(即分别编码第一翻译单元和第二翻译单元)是一个或多个染色体外多核苷酸(例如,质粒)的一部分,并且第三多核苷酸和第四多核苷酸(和相关的启动子)是宿主细胞染色体的一部分。

[0097] 在一些实施例中,所述宿主细胞包含:(1) 第一多核苷酸,其包含编码本公开的双链多肽的第一链的第一翻译单元;(2) 第二多核苷酸,其包含编码本公开的双链多肽的第二链的第二翻译单元;(3) 第三多核苷酸,其包含编码蛋白质二硫键氧化还原酶的第三翻译单元,所述第三翻译单元与驱动所述第三翻译单元转录的第一启动子可操作地组合;以及(4) 第四多核苷酸,其包含编码蛋白质二硫键氧化还原酶的第四翻译单元,所述第四翻译单元与驱动所述第四翻译单元转录的第二启动子可操作地组合。在一些实施例中,第三翻译单元和第一启动子的组合和/或第四翻译单元和第二启动子的组合对于宿主细胞染色体是非天然的。在一些实施例中,第一多核苷酸和第二多核苷酸(即分别编码第一翻译单元和第二翻译单元)是一个或多个染色体外多核苷酸(例如,质粒)的一部分,并且第三多核苷酸和第四多核苷酸(和相关的启动子)是宿主细胞染色体的一部分。

[0098] 在一些实施例中,所述宿主细胞包含:(1) 第一多核苷酸,其包含编码本公开的双链多肽的第一链的第一翻译单元;(2) 第二多核苷酸,其包含编码本公开的双链多肽的第二链的第二翻译单元;(3) 第三多核苷酸,其包含编码蛋白质二硫键氧化还原酶的第三翻译单元,所述第三翻译单元与驱动所述第三翻译单元转录的第一启动子可操作地组合;(4) 第四多核苷酸,其包含编码肽基脯氨酰异构酶的第四翻译单元,所述第四翻译单元与驱动所述第四翻译单元转录的第二启动子可操作地组合;(5) 第五多核苷酸,其包含编码第二蛋白质二硫键氧化还原酶的第五翻译单元,所述第五翻译单元与驱动所述第五翻译单元转录的第三启动子可操作地组合。在一些实施例中,第三翻译单元和第一启动子的组合,第四翻译单元和第二启动子的组合和/或第五翻译单元和第三启动子的组合对于宿主细胞染色体是非天然的。在一些实施例中,第一多核苷酸和第二多核苷酸(即分别编码第一翻译单元和第二翻译单元)是一个或多个染色体外多核苷酸(例如,质粒)的一部分,并且第三多核苷酸、第四多核苷酸和第五多核苷酸(和相关的启动子)是宿主细胞染色体的一部分。

[0099] 在一些实施例中,编码伴侣蛋白质(例如,肽基脯氨酰异构酶或蛋白质二硫键氧化还原酶)的本公开的多核苷酸或翻译单元对于宿主细胞染色体是天然的。例如,编码伴侣蛋

白质的多核苷酸或翻译单元可以是天然伴侣蛋白质基因或基因座。在一些实施例中,启动子已经插入宿主细胞基因组中(例如,通过插入或置换一个或多个天然调节序列或遗传元件),以便与天然伴侣蛋白质基因或基因座可操作地结合,从而产生对于宿主细胞染色体非天然的启动子:翻译单元组合。

[0100] 在其他实施例中,编码伴侣蛋白质(例如,肽基脯氨酰异构酶或蛋白质二硫键氧化还原酶)的本公开的多核苷酸或翻译单元对于宿主细胞染色体是非天然的(例如染色体整合到宿主细胞中)。

[0101] 在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体可以包含一个或多个编码本公开的伴侣蛋白质的天然翻译单元和一个或多个编码本公开的伴侣蛋白质的非天然翻译单元。在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体可以包含编码本公开的伴侣蛋白质的多个非天然翻译单元。另外,已知本公开的许多宿主细胞包含编码多种伴侣蛋白质(例如,大肠杆菌的FkpA、DsbA和DsbC)的宿主细胞染色体。在一些实施例中,将一个或多个编码本公开的伴侣蛋白质的天然翻译单元与对于宿主细胞或宿主细胞染色体非天然的组合中的本公开的启动子可操作地组合。

[0102] 将本公开的多核苷酸或翻译单元引入宿主细胞(例如原核宿主细胞)的方法是本领域已知的。下文更详细地描述了示例性方法,等位基因交换。有利地,等位基因交换方法在宿主细胞基因组上不留下“疤痕”。其他方法包括但不限于,描述于Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. 97:6640-6645中的方法。

[0103] 在任何上述实施例的一些实施例中,宿主细胞进一步包含编码本公开的双链多肽的第三链的翻译单元。在一些实施例中,翻译单元是编码双链多肽的第一链和/或第二链的染色体外多核苷酸的一部分。例如,在一些实施例中,双链多肽是单臂抗体,其包含例如组装以形成生物活性单价抗体(例如能够特异性结合抗原的单价抗体)的免疫球蛋白重链、免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白Fc片段。

[0104] 伴侣蛋白质

[0105] 本公开的某些方面涉及伴侣蛋白质。“伴侣蛋白质”可以指有助于其它大分子的折叠或组装的任何蛋白质,包括但不限于双链蛋白质。伴侣蛋白质的实例可包括但不限于肽基脯氨酰异构酶、蛋白质二硫键氧化还原酶和热休克蛋白质(例如Hsp60、Hsp70、Hsp90和Hsp100蛋白质)。伴侣蛋白质还可以帮助转运蛋白质跨膜,例如,多肽链易位跨质膜或内质网膜。

[0106] 在一些实施例中,伴侣蛋白质可以是肽基脯氨酰异构酶。肽基脯氨酰异构酶(术语“脯氨酰基异构酶”、“旋转异构酶”和“PPIase”在本文中可以互换使用)可以指催化脯氨酸或脯氨酰基-亚氨肽键的顺式和反式异构体相互转化的任何酶。该反应的EC编号为EC 5.2.1.8。已知或预测催化通过该EC编号描述的反应的任何蛋白质可以是本公开的肽基脯氨酰异构酶。肽基脯氨酰异构酶活性也可以通过GO术语ID GO:0003755来描述。已知或预测拥有通过该GO术语ID描述的分子功能的任何蛋白质可以是本公开的肽基脯氨酰异构酶。

[0107] 本领域已知肽基脯氨酰异构酶活性,以促进蛋白质折叠和组装。在一些实施例中,对于包括顺式脯氨酰键的适当折叠的结构蛋白质,肽基脯氨酰异构酶可通过将反式脯氨酰键转化为顺式脯氨酰键来帮助蛋白质折叠和组装。还已知一些肽基脯氨酰异构酶可增强缺乏顺式脯氨酰基键的蛋白质的折叠和组装(Bothmann H and Pluckthun A

2000J.Biol.Chem.275:17100)。在一些实施例中,肽基脯氨酰异构酶可以帮助缺乏顺式脯氨酰基键的蛋白质的折叠和组装。因此,尽管肽基脯氨酰异构酶活性可以用作鉴定用于本文所述方法的伴侣蛋白质的功能特征,但是肽基脯氨酰异构酶的效用并不一定限于其本身的催化活性。

[0108] 在一些实施例中,所述肽基脯氨酰异构酶是FkpA蛋白质。在一些实施例中,所述FkpA蛋白质是大肠杆菌FkpA。大肠杆菌FkpA可以指在属于菌种大肠杆菌的任何细菌菌株或分离株中由fkpA基因编码的任何多肽。在一些实施例中,大肠杆菌FkpA指由EcoGene登录号EG12900描述的fkpA基因编码的蛋白质。在一些实施例中,大肠杆菌FkpA指具有由NCBI RefSeq登录号NP\_417806描述的序列的蛋白质。

[0109] 其他FkpA蛋白质是本领域已知的。FkpA蛋白的实例可包括但不限于鲍氏志贺菌肽基脯氨酰异构酶(NCBI RefSeq编号WP\_000838252)、杨氏柠檬酸杆菌肽基脯氨酰异构酶(NCBI RefSeq编号WP\_006687366)、产酸克雷伯氏菌(*K. oxytoca*)肽基脯氨酰异构酶(NCBI RefSeq编号WP\_004125943)、肠道沙门菌肽基脯氨酰异构酶(NCBI RefSeq编号WP\_000838233)、肺炎克雷伯氏菌肽基脯氨酰异构酶(NCBI RefSeq编号WP\_019704642)、酿酒酵母FPR3p(NCBI RefSeq编号NP\_013637)、小家鼠Fkpb1a(NCBI RefSeq编号NP\_032045)、小家鼠Fkpb2(NCBI RefSeq编号NP\_032046)、智人FKBP2(NCBI RefSeq编号NP\_001128680)和黑腹果蝇CG14715(NCBI RefSeq编号NP\_650101)。在一些实施例中,本公开的FkpA蛋白质与大肠杆菌FkpA具有至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的同一性。

[0110] 在一些实施例中,伴侣蛋白质可以是蛋白质二硫键氧化还原酶。蛋白质二硫键氧化还原酶(术语“蛋白质二硫键异构酶”和“硫醇-二硫键异构酶”可在本文中可互换使用)可指催化蛋白质中二硫键的重排的任何酶。例如,蛋白质二硫键氧化还原酶可催化半胱氨酸的氧化以在蛋白质中形成二硫键。蛋白质二硫键氧化还原酶也可以催化蛋白质中错误配对的二硫键的异构化。该反应的EC编号为EC 5.3.4.1。已知或预测催化通过该EC编号描述的反应的任何蛋白质都可以是本公开的蛋白质二硫键氧化还原酶。蛋白质二硫键氧化还原酶活性也可以通过GO术语ID GO:0015035来描述。已知或预测拥有通过该GO术语ID描述的分子功能的任何蛋白质都可以为本公开的蛋白质二硫键氧化还原酶。

[0111] 本领域已知蛋白质二硫键氧化还原酶活性,以促进蛋白质折叠和组装。例如,蛋白质二硫键氧化还原酶活性促进在蛋白质折叠和组装期间形成适当分子内和分子间二硫键。特别地,蛋白质二硫键氧化还原酶活性对于在原核细胞的周质中表达的具有二硫键的蛋白质是重要的。

[0112] 在一些实施例中,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbA蛋白质。在一些实施例中,DsbA蛋白质是大肠杆菌DsbA。大肠杆菌DsbA可以指在属于菌种大肠杆菌的任何细菌菌株或分离株中由dsbA基因编码的任何多肽。在一些实施例中,大肠杆菌DsbA指由EcoGene登录号EG11297描述的dsbA基因编码的蛋白质。在一些实施例中,大肠杆菌DsbA指具有由NCBI RefSeq登录号NP\_418297描述的序列的蛋白质。

[0113] 其他DsbA蛋白质是本领域已知的。DsbA蛋白质的实例可以包括但不限于福氏志贺

菌硫醇-二硫键异构酶 (NCBI RefSeq编号WP\_000725335)、痢疾志贺菌硫醇-二硫键异构酶 (NCBI RefSeq编号WP\_000725348)、杨氏柠檬酸杆菌硫醇-二硫键异构酶 (NCBI RefSeq编号WP\_006686108) 和肠道沙门菌硫醇-二硫键异构酶 (NCBI RefSeq编号WP\_023240584)。在一些实施例中,本公开的DsbA蛋白质与大肠杆菌DsbA具有至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的同一性。

[0114] 在一些实施例中,所述蛋白质二硫键氧化还原酶是DsbC蛋白质。在一些实施例中,DsbC蛋白质是大肠杆菌DsbC。大肠杆菌DsbC可以指在属于菌种大肠杆菌的任何细菌菌株或分离株中由dsbC基因编码的任何多肽。在一些实施例中,大肠杆菌DsbC指由EcoGene登录号EG11070描述的dsbC基因编码的蛋白质。在一些实施例中,大肠杆菌DsbC指具有由NCBI RefSeq登录号NP\_417369描述的序列的蛋白质。

[0115] 其他DsbC蛋白质是本领域已知的。DsbC蛋白质的实例可以包括但不限于宋内志贺菌蛋白质二硫键异构酶 (NCBI RefSeq编号WP\_000715206)、痢疾志贺菌蛋白质-二硫键异构酶 (NCBI RefSeq编号WP\_000715209)、费格森埃希氏菌蛋白质-二硫键异构酶 (NCBI RefSeq编号WP\_000715225)、邦戈沙门菌硫醇:二硫键互换蛋白质DsbC (NCBI RefSeq编号WP\_020845161) 和肠道沙门菌蛋白质-二硫键异构酶DsbC (NCBI RefSeq编号WP\_023183515)。在一些实施例中,本公开的DsbC蛋白质与大肠杆菌DsbC具有至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的同一性。

[0116] 为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比,出于最优比较目的来比对序列(例如可在第一和第二氨基酸或核酸序列中的一个或两个中引入空位以进行最优比对,并且可出于比较目的来忽视非同源性序列)。在一个实施例中,出于比较目比对的参考序列的长度是所述参考序列的长度的至少50%,通常是至少75%,并且甚至更通常是至少80%、85%、90%、95%或100%。然后比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由与第二序列中的相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,分子在那个位置处是同一的(如本文所用,氨基酸或核酸“同一性”等效于氨基酸或核酸“同源性”)。

[0117] 考虑到每个空位的数目和空位的长度,两个序列之间的同一性百分比是序列共享的相同位置的数目的函数,这需要引入以实现两个序列的最佳比对。对于序列比较,通常以一条序列作为参考序列,用测试序列与其比较。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入电脑,指定子序列坐标,如有必要,指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或者可以指定替代参数。然后基于程序参数,序列比较算法计算相对于参考序列的测试序列的序列同一性百分比。当比较两个序列的同一性时,这些序列不必是连续的,但是任何空位都将携带会降低总体同一性百分比的罚分。对于blastn,缺省参数是空位开放罚分=5以及空位延伸罚分=2。对于blastp,缺省参数是空位开放罚分=11以及空位延伸罚分=1。

[0118] 如本文所用,“比较窗口”包括参考选自由以下项组成的组的任一数目连续位置的片段:20至600,通常约50至约200,更通常约100至约150,其中在两条序列最佳比对后序列

可以与相同数目连续位置的参考序列进行比较。用来比较的序列比对方法是本领域众所周知的。可使用已知算法进行供比较的序列的最优比对(例如通过Smith和Waterman, *Adv Appl Math*, 2:482, 1981的局部同源性算法;通过Needleman和Wunsch, *J Mol Biol*, 48:443, 1970的同源性比对算法;通过Pearson和Lipman, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:2444, 1988的类似性搜索方法;通过Wisconsin Genetics软件包(Genetics Computer Group, Madison, WI)中这些算法的计算机化执行程序FASTDB(Intelligenetics)、BLAST(National Center for Biomedical Information)、GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,或通过手动比对和目视检查)。

[0119] 适合于确定序列同一性百分比和序列类似性百分比的算法的一个优选实例是FASTA算法(Pearson and Lipman, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:2444, 1988; and Pearson, *Methods Enzymol*, 266:227-258, 1996)。在DNA序列的FASTA比对中用于计算同一性百分比的优选参数是优化的, BL50矩阵15: -5, k元组=2; 接合罚分=40, 优化=28; 空位罚分-12, 空位长度罚分=-2; 以及宽度=16。

[0120] 适合于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的另一个优选实例是BLAST和BLAST 2.0算法(分别在Altschul等人, *Nuc Acids Res*, 25:3389-3402, 1977; 和Altschul等人, *J Mol Biol*, 215:403-410, 1990)。以本文所述的参数使用BLAST和BLAST 2.0以确定本公开的核酸和蛋白质的序列同一性百分比。用于执行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心网站获得。该算法涉及: 首先通过在查询序列中识别长度W的短字段来识别高分序列对(HSP), 其在与数据库序列的相同长度字段比对时匹配或满足一定阳性阈值评分T。T称为邻近字段评分阈值。这些最初的邻近字段命中作为用于引发搜索的种子以发现包含它们的更长HSP。字段命中沿着各序列双向延伸, 只要累计的比对分数可增加。对于核苷酸序列, 使用参数M(用于匹配残基对的奖分; 始终>0)和N(用于错配残基的罚分; 始终<0)来计算累计分数。对于氨基酸序列, 使用评分矩阵以计算累计分数。当累计比对分数从其最大实现值降低数量X; 由于一个或多个负分残基比对的累积, 累计分数达到或低于零时; 或者到达任一序列的末端时, 字段命中在各方向上的延伸停止。BLAST算法参数W、T和X确定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)使用默认字长(W)11, 期望值(E)10, M=5, N=-4, 并比较两条链。对于氨基酸序列, BLASTP程序使用字长3, 期望值(E)10, 和BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1989)比对(B)50, 期望值(E)10, M=5, N=-4作为缺省值以及比较两条链。

[0121] BLAST算法也执行两条序列之间相似性的统计分析(参见例如Karlin and Altschul, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:5873-5787, 1993)。由BLAST算法提供的一种相似性度量是最小总和概率(P(N)), 其提供两条核苷酸或氨基酸序列之间匹配偶然发生的概率的指示。例如, 如果在测试核酸与参考核酸的比较中最小总和概率低于约0.2, 更优选低于约0.01, 以及最优选低于约0.001, 则核酸被认为与参考序列相似。

[0122] 适用算法的另一实例是PILEUP。PILEUP使用渐进的成对比对从一组相关序列中创建多序列比对, 以显示关系和序列同一性百分比。它还绘制了显示用于产生比对的聚类关系的树或树形图。PILEUP使用与已公开方法(Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-153, 1989)相似的方法, 简化了渐进比对方法(Feng and Doolittle, *J Mol Evol*, 35:351-360, 1987)。程序可比对多达300个序列, 各自具有5,000个核苷酸或氨基酸的最大长度。多重比

对程序以两个最类似序列的成对比对开始,从而产生两个比对的序列簇。然后将该簇与下一个最相关的序列或比对的序列簇进行比对。通过两个单独序列的成对比对的简单扩展,可以比对两个序列簇。最终的比对是通过一系列渐进的,成对的比对实现的。通过为序列比较区域指定特定序列及其氨基酸或核苷酸坐标,并指定程序参数来运行该程序。使用 PILEUP,利用以下参数:缺省空位权重(3.00)、缺省空位长度权重(0.10)和加权末端空位将参考序列与其它测试序列进行比较以确定序列同一性百分比关系。PILEUP可从GCG序列分析软件包例如7.0版(Devereaux等人,Nuc Acids Res,12:387-395,1984)获得。

[0123] 适合于多重DNA和氨基酸序列比对的算法的另一个优选实例是CLUSTALW程序(Thompson等人,Nucl Acids.Res,22:4673-4680,1994)。ClustalW在各组序列之间进行多重成对比较,并且基于同源性将它们组装成多重比对。空位开放罚分和空位延伸罚分分别是10和0.05。对于氨基酸比对,BLOSUM算法可用作蛋白质权重矩阵(Henikoff and Henikoff,Proc Natl Acad Sci USA,89:10915-10919,1992)。

[0124] 启动子

[0125] 表达和克隆载体通常包含被宿主生物识别并与编码抗体的核酸可操作连接的启动子。适用于原核宿主的启动子包括phoA启动子、 $\beta$ -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶启动子、色氨酸(trp)启动子系统以及杂合启动子诸如tac启动子。然而,其他已知的细菌启动子也适用。用于细菌系统的启动子还将包含与编码抗体的DNA可操作连接的Shine-Dalgarno(S.D.)序列。如上所讨论,可将启动子与翻译单元(例如,天然翻译单元,诸如编码本公开的伴侣蛋白质的翻译单元)以可操作的组合插入宿主细胞染色体中,以产生对于宿主细胞或宿主细胞染色体非天然的启动子:翻译单元组合。

[0126] 在一些实施例中,本公开的启动子是诱导型启动子。诱导型启动子的活性响应于信号而增加或降低。例如,诱导型启动子可响应于信号诸如IPTG的存在而促进转录。诱导型启动子可响应于信号诸如磷酸盐的缺乏而促进转录。在这两种情况下,转录量可以与信号量或其不足成正比,也可能不成比例。适合于原核宿主细胞的诱导型启动子的许多实例是本领域已知的。这些可以包括但不限于lac、tac、trc、trp、pho、recA、tetA、nar、噬菌体P<sub>L</sub>、cspA、T7和P<sub>BAD</sub>启动子(更详细的描述参见Terpe K.2006Appl.Microbiol.Biotechnol.72:211)。在一些实施例中,诱导型启动子的多个拷贝用于以协调的方式驱动单独的翻译单元的表达,例如编码诸如DsbC和FkpA的伴侣蛋白质的翻译单元。

[0127] 在一些实施例中,诱导型启动子是IPTG诱导型启动子。IPTG诱导型启动子可以指以对异丙基 $\beta$ -D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)或任何其他能够促进lac操纵子转录的乳糖衍生物(例如,异乳糖)响应的方式促进转录的多核苷酸序列。IPTG诱导型启动子的许多实例是本领域已知的,包括但不限于tac(例如,tacI、tacII等)启动子、lac启动子及其衍生物(例如,lacUV5、taclac等)。

[0128] 在一些实施例中,所述诱导型启动子是当所述培养基中的磷酸盐耗尽时驱动翻译单元转录的pho启动子。pho启动子可以指以对细胞外磷酸盐(例如,无机磷酸盐)响应的方式促进转录的任何多核苷酸序列。例如,大肠杆菌中的磷酸盐(Pho)调节子包括感知细胞外磷酸盐,并响应磷酸盐水平,通过Pho启动子调节众多下游基因的表达的蛋白质组分(更详细的描述参见Hsieh YJ and Wanner BL 2010 Curr.Opin.Microbiol.13(2):198)。当细菌在培养基中生长时,已知当培养基中存在磷酸盐(例如无机磷酸盐,Pi)时,该Pho调节子的

表达被抑制,并且当磷酸盐耗尽时被诱导。在本文描述的方法中使用的pho启动子的一个非限制性实例是大肠杆菌phoA启动子。该启动子是众所周知的,并且在本领域中以依赖于细胞培养基中磷酸盐浓度的方式用于调节原核宿主细胞中重组蛋白质的表达(更详细的描述参见Lubke C等人,1995Enzyme Microb.Technol.17(10):923)。

[0129] 在一些实施例中,本公开的启动子是组成型启动子。认为组成型启动子的活性保持在基因表达的恒定水平上,而与宿主细胞生长条件(例如营养条件、细胞密度等)的变化无关。例如,组成型启动子的活性可以取决于RNA聚合酶的可用性,而不是一个或多个转录因子的活性或表达。在一些实施例中,启动子是合成的或非天然存在的启动子。适合于多种原核宿主细胞的示例性组成型启动子描述于,例如,Jensen PR,Hammer K.Appl Environ Microbiol 1998;64:82-87。在一些实施例中,所述组成型启动子是CP25启动子。

[0130] 如本文所述,本公开的宿主细胞染色体可以包含与编码本公开的伴侣蛋白质的翻译单元可操作地连接或组合的启动子的多个非天然组合。可以以任何数量或组合将不同类型的启动子插入宿主细胞染色体。例如,在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含诱导型启动子(例如,与编码本公开的伴侣蛋白质的翻译单元可操作地结合)和组成型启动子(例如与编码本公开的伴侣蛋白质的不同的翻译单元可操作地结合)。例如,在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含与编码本公开的伴侣蛋白质的翻译单元可操作地结合的本公开的诱导型启动子,以及与编码本公开的伴侣蛋白质的不同翻译单元可操作地连接的本公开的组成型启动子,其中启动子:翻译单元的两种组合对于宿主细胞或宿主细胞染色体是非天然的。

[0131] 在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含与编码本公开的伴侣蛋白质的翻译单元可操作地连接的本公开的Pho启动子,以及与编码本公开的伴侣蛋白质的不同翻译单元可操作地连接的本公开的CP25启动子。在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含与编码本公开的蛋白质二硫键氧化还原酶的翻译单元可操作地连接的本公开的Pho启动子,以及与编码本公开的肽基脯氨酰异构酶的不同翻译单元可操作地连接的本公开的CP25启动子。在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含与编码DsbC的翻译单元可操作地连接的本公开的Pho启动子,以及与编码FkpA的翻译单元可操作地连接的本公开的CP25启动子。在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含与编码大肠杆菌DsbC的翻译单元可操作地连接的本公开的Pho启动子,以及与编码大肠杆菌FkpA的翻译单元可操作地连接的本公开的CP25启动子。在一些实施例中,宿主细胞是大肠杆菌,并且编码DsbC和FkpA的翻译单元是天然的。在一些实施例中,宿主细胞进一步包含一个或多个包含编码本公开的双链多肽的两个或多个多肽链的两个或多个翻译单元的染色体外多核苷酸。

[0132] 在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含与编码本公开的伴侣蛋白质的翻译单元可操作地连接的本公开的Pho启动子,以及与编码本公开的伴侣蛋白质的不同翻译单元可操作地连接的本公开的Pho启动子。在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含与编码本公开的蛋白质二硫键氧化还原酶的翻译单元可操作地连接的本公开的Pho启动子,以及与编码本公开的肽基脯氨酰异构酶的不同翻译单元可操作地连接的本公开的Pho启动子。在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含与编码DsbC的翻译单元可操作地连接的本公开的Pho启动子,以及与编码FkpA的翻译单元可操作地连接的本公开的Pho启动子。在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含与编码大肠杆菌DsbC的翻译单元可操

作地连接的本公开的Pho启动子,以及与编码大肠杆菌FkpA的翻译单元可操作地连接的本公开的Pho启动子。在一些实施例中,宿主细胞是大肠杆菌,并且编码DsbC和FkpA的翻译单元是天然的。在一些实施例中,宿主细胞进一步包含一个或多个包含编码本公开的双链多肽的两个或多个多肽链的两个或多个翻译单元的染色体外多核苷酸。

[0133] 在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含与编码本公开的伴侣蛋白质的翻译单元可操作地连接的本公开的tac启动子,与编码本公开的伴侣蛋白质的第二翻译单元可操作地连接的本公开的tac启动子,以及与编码本公开的伴侣蛋白质的第三翻译单元可操作地连接的本公开的CP25启动子。在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含与编码本公开的蛋白质二硫键氧化还原酶的翻译单元可操作地连接的本公开的tac启动子,与编码本公开的蛋白质二硫键氧化还原酶的第二翻译单元可操作地连接的本公开的tac启动子,以及与编码本公开的肽基脯氨酰异构酶的第三翻译单元可操作地连接的本公开的CP25启动子。在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含与编码DsbC的翻译单元可操作地连接的本公开的tac启动子,与编码DsbA的翻译单元可操作地连接的本公开的tac启动子,以及与编码FkpA的翻译单元可操作地连接的本公开的CP25启动子。在一些实施例中,本公开的宿主细胞染色体包含与编码大肠杆菌DsbC的翻译单元可操作地连接的本公开的tac启动子,与编码大肠杆菌DsbA的翻译单元可操作地连接的本公开的tac启动子,以及与编码大肠杆菌FkpA的翻译单元可操作地连接的本公开的CP25启动子。在一些实施例中,宿主细胞是大肠杆菌,并且编码DsbC、DsbA和FkpA的翻译单元是天然的。在一些实施例中,宿主细胞进一步包含一个或多个包含编码本公开的双链多肽的两个或多个多肽链的两个或多个翻译单元的染色体外多核苷酸。

[0134] 染色体外多核苷酸和表达载体

[0135] 在一些实施例中,宿主细胞包含(1)第一多核苷酸,其包含编码本公开的双链多肽的第一链的第一翻译单元;以及(2)第二多核苷酸,其包含编码所述多肽的第二链的第二翻译单元。在一些实施例中,第一多核苷酸和第二多核苷酸是一个或多个染色体外多核苷酸的一部分。在一些实施例中,第一多核苷酸和第二多核苷酸是相同的染色体外多核苷酸的一部分。在一些实施例中,染色体外多核苷酸进一步包含编码双链多肽的第三链的第三翻译单元。在一些实施例中,染色体外多核苷酸包含一个或多个表达载体或质粒。

[0136] 在一些实施例中,编码双链多肽的第一链的第一翻译单元和编码双链多肽的第二链的第二翻译单元是单个染色体外多核苷酸的一部分(例如,质粒或其他表达载体)。在一些实施例中,编码双链多肽的第一链的第一翻译单元和编码双链多肽的第二链的第二翻译单元是由单独的染色体外多核苷酸表达的(例如,质粒或其他表达载体)。

[0137] 在一些实施例中,染色体外多核苷酸进一步包含可选择标志物(例如,编码可选择标志物蛋白质的翻译单元)。可选择标志物可以指编码当细胞经历选择,即用于相对于缺乏可选择标志物的细胞丰度,优先增加带有可选择标志物的细胞丰度的任何条件时促进宿主细胞存活的蛋白质的任何多核苷酸。典型的选择标记编码的蛋白,该蛋白(a)赋予对抗生素或其他毒素(例如,氨基青霉素、新霉素、氨基蝶呤或四环素)的耐药性,(b)补足营养缺陷型缺陷,或(c)供应无法从复合培养基中获得的关键营养素,例如,编码芽孢杆菌属(*Bacilli*) D-丙氨酸消旋酶的基因。具有单一抗生素的多种可选择标志物和相应的选择剂是本领域已知的。例如但不限于,在Jang CW and Magnuson T 2013PLoS ONE 8(2):e57075中描述和引

用了许多可选择标志物和相应的抗生素。在一些实施例中,可选择标志物可以指弥补宿主基因组内存在的基因缺失的基因(例如,由质粒表达的基因)。在这些实例中,当细胞进行选择时(即在需要从宿主基因组中缺失的基因具有活性的条件下生长)时,质粒提供的基因的拷贝弥补了宿主基因组的缺陷,从而选择了带有外源互补基因的细胞。此类基因可以包括营养缺陷型标记或产生细胞培养基中缺乏的特定营养物所需的基因,其实例在本文中进一步描述。本文进一步描述了几种示例性可选择标志物和抗生素。

[0138] 在一些实施例中,可选择标志物促进对选择剂的抗性,并且培养基包括使宿主细胞保留多核苷酸的选择剂。在一些实施例中,所述选择剂是抗生素。选择方案的一个实例利用一种药物来阻滞宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞产生赋予药物耐药性的蛋白质,从而在选择方案中生存下来。这种显性选择的实例使用新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0139] 另一个选择方案使用去除其基因产物对于在特定培养基中生长必不可少的基因的具有染色体缺失的原核宿主细胞。在这些实例中,那些用弥补宿主细胞的染色体缺失的异源基因成功转化的细胞在特定培养基中生长时将存活。在该方案中有用的基因的实例可以包括营养缺陷型标记基因或当宿主细胞在特定培养基中生长时需要产生必需营养的其他基因。

[0140] 在一些实施例中,染色体外多核苷酸进一步包含适合于在所述原核宿主细胞中复制所述染色体外表达载体的复制起点。通常,在克隆载体中,该序列是使载体能够独立于宿主染色体DNA复制的序列,并包括复制起点或自主复制序列。这样的序列对于多种原核宿主细胞是众所周知的。例如,质粒pBR322的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌。

[0141] 在原核宿主细胞中使用的表达载体还可以包含终止转录和稳定mRNA所必需的序列。在原核细胞中,终止子可以包括Rho依赖性或非依赖性终止子。在原核宿主细胞中有用的终止子的一个实例包括但不限于 $\lambda$ t0终止子(Scholtissek and Grosse, *Nucleic Acids Res.* 15:3185, 1987)。

[0142] 本公开的抗体不仅可以直接重组产生,而且可以作为与异源多肽的融合多肽重组产生,所述异源多肽优选为信号序列或在成熟蛋白质或多肽的N末端具有特定切割位点的其他多肽。优选地,所选择的异源信号序列是被宿主细胞识别和加工(例如,被信号肽酶裂解)的异源信号序列。对于不识别和加工天然抗体信号序列的原核宿主细胞,该信号序列被原核信号序列取代,该原核信号序列例如选自碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp或热稳定肠毒素II前导序列组成的组。

[0143] 重组多肽

[0144] 本公开的某些方面涉及产生双链多肽的方法。有利地,本文描述的方法可用于促进许多不同类型的蛋白质,特别是具有二硫键的蛋白质,例如如上描述的双链蛋白质的表达、折叠和组装。下面描述了特定的双链蛋白质,但是本文描述的方法不限于这些特定的实施例。如本文所用,双链蛋白质可包括含有一个以上不同多肽链的蛋白质。尽管本文所述的许多实施例涉及具有两条多肽链的双链蛋白质,但是考虑并且可以通过本文所述的方法产生具有两条以上多肽链的双链蛋白质(例如,三个或更多个多肽)。如上所述,也考虑并且可以通过本文所述的方法产生由单条多肽链组成的双链蛋白质,如果所述双链蛋白质是两条不同的多肽链(例如,单链抗体、单链可变片段等),它们将以其他方式缔合。

[0145] 在一些实施例中,本公开双链多肽的两条链通过至少一个二硫键彼此连接。二硫键可指连接两个硫醇基团的任何共价键。多肽中的二硫键通常在半胱氨酸残基的硫醇基团之间形成。本领域中已知多肽二硫键对于许多多肽例如本公开的双链蛋白质的折叠和组装是重要的。多肽二硫键可包括单个多肽链中半胱氨酸残基之间的二硫键(即分子内或链内二硫键)。多肽二硫键还可包括在单独的多肽链上发现的半胱氨酸残基之间的二硫键(即分子间或链间二硫键)。因此,在一些实施例中,双链多肽的两条链通过至少一个二硫键彼此连接。

[0146] 本领域已知二硫键对于抗体和抗体片段的折叠和组装是重要的。已知不同的抗体同位素和同位素内的不同亚类具有不同的二硫键模式。例如,取决于特定的IgG亚类,IgG抗体可包含12个链内二硫键,每个轻链与其对应的重链之间的一个链间二硫键,以及重链之间的2至11个链间二硫键(更详细的描述参见Liu H and May K 2012MAbs.4(1):17)。也已知IgM(参见例如Wiersma EJ and Shulman MJ 1995J.Immunol.154(10):5265)、IgE(参见例如Helm BA等人,1991Eur.J.Immunol.21(6):1543)、IgA(参见例如Chintalacharuvu KR等人,2002J.Immunol.169(9):5072)和IgD(参见例如Shin SU等人,1992Hum.Antibodies Hybridomas 3(2):65)在折叠和组装期间形成二硫键。

[0147] 在一些实施例中,本公开的双链多肽对于宿主细胞是异源的。如本文所用,异源多肽在关于宿主细胞使用时可以指在宿主细胞中未天然表达即当宿主细胞与自然界分离时的任何多肽。异源多肽还可以指可以由宿主细胞天然表达但与宿主细胞与自然界分离时相比在不同的调控下表达的多肽。不同调节的实例可以包括但不限于不同量的表达,响应于不同刺激的表达或任何其他改变的表达背景,例如通过使用异源启动子,例如诱导型启动子。

[0148] 在一些实施例中,本公开的双链多肽是异二聚体的单体。如本文所用,异二聚体可以指任何包含两个可操作连接的不同的多肽或多肽复合物的多肽复合物。异二聚体的非限制性实例是由两个不同的抗体单体(即,在可操作连接的轻链-重链对)组成的双特异性或二价抗体。在该实例中,识别第一抗原的第一重链-轻链对的折叠和组装产生第一抗体单体。识别第二抗原的第二重链-轻链对的折叠和组装产生第二抗体单体。这些单体可以通过本领域已知的任何方式组装(以下对于双特异性抗体更详细地描述)以形成异二聚体。有关异源二聚体抗体形成的说明性示例的更多详细信息,请参见Ridgway JBB等人,1996Protein Eng.9(7):617。

[0149] 在一些实施例中,本公开的双链多肽是单价抗体,其中第一链和第二链代表免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链。如本文所用,单价抗体可指由可操作地连接在一起以形成重链-轻链对的抗体重链和抗体轻链组成的任何多肽复合物,其中重链-轻链对不可操作地连接至第二重链-轻链对。术语“半抗体(hAb)”在本文可以互换使用。

[0150] 在一些实施例中,本公开的单价抗体能够特异性结合抗原。如本文所用,术语“结合”、“特异性结合”或“对...具有特异性”是指可测量和可重现的相互作用,诸如靶标与抗体之间的结合,所述结合确定在包括生物分子的分子的异源群体存在下存在所述靶标。例如,与靶标(可以是表位)结合或特异性地结合的抗体为与其结合至其他靶标相比具有更大亲和力、亲合力、更容易和/或持续时间更长的结合该靶标的抗体。在一个实施例中,抗体与无关靶标的结合程度小于所测得的抗体与靶标的结合(例如通过放射性免疫测定(RIA))的约

10%。在某些实施例中,与靶标特异性结合的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数(Kd)。在某些实施例中,抗体特异性结合蛋白质上的表位,所述表位在来自不同物种的蛋白质中是保守的。在另一实施例中,特异性结合可以包括但不要求排他结合。

[0151] 在一些实施例中,本公开的双链多肽是分泌蛋白质。如本文所用,分泌蛋白质可以指由宿主细胞分泌到宿主细胞周质或细胞外环境中的任何蛋白质。分泌蛋白质可以是由宿主细胞天然分泌的蛋白质,或者分泌蛋白质可以是并非由宿主细胞天然分泌但是以促进其分泌的方式被修饰的蛋白质。例如,通常在多肽的N端发现的信号序列的存在可以将多肽引导至分泌途径以进行分泌。许多信号序列是本领域已知的,并且可用于促进分泌蛋白质的分泌或允许宿主细胞非天然分泌的蛋白质的分泌,参见,例如,Picken等人, *Infect. Immun.* 42:269-275 (1983); Simmons and Yansura,《自然生物技术》(*Nature Biotechnology*), 14:629-634 (1996); 和Humphreys DP等人, 2000 *Protein Expr. Purif.* 20 (2):252。信号序列的一个非限制性实例是热稳定肠毒素II (STII) 信号序列。

[0152] 在一些实施例中,本公开的分泌蛋白质是从宿主细胞的周质中回收的。在本领域中已知周质是指革兰氏阴性细菌细胞的内膜或细胞质膜与外膜之间的空间。不希望受理论的束缚,认为周质是有利于二硫键形成的氧化环境。因此,将具有二硫键的多肽定位为周质适当折叠和组装结构(例如,本公开的两链蛋白质)的一部分可能是有利的(更详细的描述参见Schlappschy M等人, 2006 *Protein Eng. Des. Sel.* 19 (8):385)。

[0153] 回收周质蛋白质的许多方法是本领域已知的。大规模纯化周质蛋白质的一个非限制性实例描述于欧洲专利号EP1356052 B1(参见,例如,实例4)。可以通过从成球细胞制剂中提取周质级分来回收周质蛋白质(参见例如Schlappschy M等人, 2006 *Protein Eng. Des. Sel.* 19 (8):385)。一旦产生了周质提取物,就可以通过本领域已知的任何标准蛋白质纯化技术,例如亲和纯化,色谱法等来纯化周质蛋白质。

[0154] 宿主细胞

[0155] 本公开的某些方面涉及原核宿主细胞。本文的用于在载体中克隆或表达DNA的合适的原核生物包括真细菌诸如例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如,肠杆菌科,诸如埃希氏杆菌属(*Escherichia*) (例如大肠杆菌(*E. Coli*))、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*)、变形杆菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*) (例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌属(*Serratia*) (例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*))和志贺氏杆菌属(*Shigella*),以及芽孢杆菌属(*Bacilli*) 诸如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) (例如, 1989年4月12日公布的DD 266,710中公开的地衣芽孢杆菌(*B. Licheniformis*) 41P),假单胞菌属(*Pseudomonas*) 诸如绿脓假单胞菌(*P. aeruginosa*),和链霉菌属(*Streptomyces*)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌294 (ATCC 31,446),但其他菌株例如大肠杆菌B、大肠杆菌X1776 (ATCC 31,537) 和大肠杆菌W3110 (ATCC 27,325) 也是合适的。这些实例是说明性的而不是限制性的。

[0156] 在一些实施例中,所述原核宿主细胞是革兰氏阴性细菌。革兰氏阴性细菌是指任何含有通过革兰氏染色检测到的肽聚糖层周围的外膜的细菌。许多革兰氏阴性细菌宿主细胞是本领域已知的。例如,已知革兰氏阴性细菌包括但不限于变形菌,诸如 $\alpha$ -变形菌、 $\beta$ -变

形菌、 $\gamma$ -变形菌、 $\zeta$ -变形菌、 $\epsilon$ -变形菌、 $\delta$ -变形菌和酸杆菌；蓝细菌；以及螺旋体。众所周知的革兰氏阴性细菌可以包括诸如埃希氏菌、沙门氏菌、志贺氏菌、假单胞菌、螺旋杆菌、军团菌、奈瑟氏球菌和克雷伯氏菌的菌属的菌种。

[0157] 在一些实施例中，本公开的革兰氏阴性细菌是大肠杆菌。如本文所用，大肠杆菌可以指属于菌种大肠杆菌的任何菌株或分离株。大肠杆菌可包括天然存在的菌株或已被遗传修饰的菌株，例如通过本文所述的质粒的突变或转化而被遗传修饰的菌株。

[0158] 在一些实施例中，本公开的大肠杆菌是内源蛋白酶活性不足的菌株。不希望受理论的束缚，认为内源蛋白酶活性不足的菌株可允许重组蛋白质诸如本公开的周质蛋白质的产生增强，因为一些内源蛋白酶具有针对重组表达的底物的活性（一个此类实例参见 Baneyx F and Georgiu G 1990 *J. Bacteriol.* 172(1):491）。缺乏内源蛋白酶活性的菌株可以包括其中编码内源蛋白质酶的基因被突变、缺失或以其他方式失活的菌株。此类基因的实例可包括但不限于 degP、prc 和 ompT。在各种各样的原核宿主细胞中引入突变的方法（例如，内源蛋白酶活性不足的工程菌株）是本领域众所周知的，参见，例如，Snyder L 等人，2013 *Molecular Genetics of Bacteria* 4<sup>th</sup> ed. ASM Press）。在某些实施例中，本公开的大肠杆菌是具有 degpS210A 突变的菌株。

[0159] 在一些实施例中，本公开的大肠杆菌是具有增强的 LacI 产生或活性的菌株。示例性的 LacI 蛋白质的序列由 UniProt KB 登录号 P03023 代表。在某些实施例中，大肠杆菌是具有 lacI<sup>Q</sup> 突变的菌株（参见，例如，Muller-Hill, B. 等人，(1968) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 59: 1259-1264）。已知该突变导致 lac 操纵子的 LacI 阻遏物的过量产生。

[0160] 在某些实施例中，本公开的大肠杆菌属于菌株  $\Delta$  fhuA  $\Delta$  phoA ilvG2096 (IlvG<sup>+</sup>; Valr)  $\Delta$  prc spr43H1  $\Delta$  manA lacI<sup>Q</sup>  $\Delta$  ompT  $\Delta$  menE742degPS210A。

[0161] 抗体和抗体片段

[0162] 本文所述的双链蛋白质可以通过本领域已知的任何合适的技术来制备。一类示例性的双链蛋白质是抗体。如下所述，使用本领域中可用于产生抗体的技术来制备抗体，其示例性方法在以下部分中更详细地描述。本领域技术人员将认识到，以下描述的许多方法可以应用于除抗体之外的双链蛋白质。

[0163] 抗体针对目标抗原（例如但不限于 PD-L1（诸如人 PD-L1）、HER2 或 CD3（诸如人 CD3）、IL13、IL4、VEGFC、VEGFA 和 VEGF）。优选地，抗原是生物学上重要的多肽，并且向患有病症的哺乳动物施用抗体可以在该哺乳动物中产生治疗益处。

[0164] 在一些实施例中，本公开的抗体针对白介素-13（在本文中称为 IL-13 或 IL13）。例如，抗体可以是针对 IL13 的单价抗体或“半抗体”、包含针对 IL13 的两个单价重链-轻链对的完整抗体（例如，两个相同的单价重链-轻链对；两个单价重链-轻链对，每对包含识别 IL13 相同表位的不同 HVR 或 CDR；或两个单价重链-轻链对，每对包含识别 IL13 的非重叠或部分重叠表位的不同 HVR 或 CDR），或双特异性抗体，其包含针对 IL13 的重链-轻链对和针对不同抗原的重链-轻链对。

[0165] IL13 多肽的实例是本领域已知的。在一些实施例中，IL13 多肽是人 IL13 多肽。在一些实施例中，IL13 多肽是 IL13 的前体形式。IL13 多肽的前体形式的非限制性实例是人 IL13 前体，如 Swiss-Prot 登录号 P35225.2 所代表。在一些实施例中，IL13 多肽包含以下序列：

[0166] MALLLTTVIA LTCLGGFASP GPVPPSTALRELIEEL VNITQNKAP LCNGSMVWSI

NLTAGMYCAA LESLINVSGC SAIEKTQRML SGFCPHKVS A GQFSSLHVRD TKIEVAQFVK DLLLHLKFLF REGRFN(SEQ ID NO:1)。

[0167] 在其他实施例中,IL13是IL13的成熟形式(例如,缺乏信号序列)。在一些实施例中,IL13多肽包含以下序列:

[0168] SPGPVPPSTALR ELIEELVNIT QNQAAPLCNG SMVWSINLTA GMYCAALES INVSGCSAIE KTQRMLSGFC PHKVSAGQFS SLHVRDTKIE VAQFVKDLLL HLKFLFREGR FN(SEQ ID NO:2)。

[0169] 在一些实施例中,本文提供了包含重链可变结构域和轻链可变结构域的抗IL13抗体,其中:

[0170] (a) 重链可变结构域包含分别与AYSVN(SEQ ID NO:5)、MIWGDGKIVYNSALKS(SEQ ID NO:6)和DGYYPYAMDN(SEQ ID NO:7)具有至少85%序列同一性的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3序列,和/或

[0171] (b) 轻链可变结构域包含分别与RASKSVDSYGNSFMH(SEQ ID NO:8)、LASNLES(SEQ ID NO:9)和QQNNEDPRT(SEQ ID NO:10)具有至少85%序列同一性的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3序列。

[0172] 在特定方面,相较于参考序列的序列同一性为至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0173] 在一些实施例中,抗IL13抗体包含SEQ ID NO:3的重链可变结构域序列和/或SEQ ID NO:4的轻链可变结构域序列。在另一个实施例中,提供了一种分离的抗IL13抗体,其包含重链和/或轻链序列,其中:

[0174] (a) 重链可变结构域序列与参考重链序列具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性,其中所述参考重链序列如下:

[0175] EVTLRESGPALVKPTQTLTLCTVSGFSLAYSVNWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSRLT ISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCAGDGYYPYAMDNWGQGLVTVSS(SEQ ID NO:3),和/或

[0176] (b) 轻链可变结构域序列与参考重链序列具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性,所述参考轻链序列如下:

[0177] DIVLTQSPDSLVSLSGERATINCRASKSVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYASNLESVGPDRFSGSGSGTDFTLTISSLAQEDVAVYYCQQNNEDPRTFGGGTKVEIKR(SEQ ID NO:4)。

[0178] 在一些实施例中,本公开的抗体针对白介素-33(在本文中称为IL-33或IL33)。例如,抗体可以是针对IL33的单价抗体或“半抗体”、包含针对IL33的两个单价重链-轻链对的完整抗体(例如,两个相同的单价重链-轻链对;两个单价重链-轻链对,每对包含识别IL33相同表位的不同HVR或CDR;或两个单价重链-轻链对,每对包含识别IL33的非重叠或部分重叠表位的不同HVR或CDR),或双特异性抗体,其包含针对IL33的重链-轻链对和针对不同抗原的重链-轻链对。

[0179] IL33的各种同工型是已知的。例如,人IL33同工型包括例如但不限于由NCBI RefSeq登录号A0Z26495、ADR77828、AAH47085、NP\_254274、NP\_001186569、NP\_001300977、NP\_001340731、NP\_001300975、NP\_001300976和XP\_06870774代表的那些。

[0180] 在一个方面,提供了多特异性抗体,其中所述抗体包含第一单价抗体或半抗体和

第二单价抗体或半抗体,其中所述第一半抗体包含结合IL-33的第一VH/VL单元,并且所述第二半抗体包含结合IL-13的第二VH/VL单元。

[0181] 示例性抗IL33抗体(包括抗IL33/抗IL13双特异性抗体)的HVR和可变结构域序列可以在例如WO2016077381中找到。

[0182] 在一些实施例中,本公开的抗体的CH3和/或CH2结构域来自IgG(例如,IgG1亚型、IgG2亚型、IgG2A亚型、IgG2B亚型、IgG3亚型或IgG4亚型)。在一些实施例中,本公开的抗体的CH3和/或CH2结构域可包含一个或多个杆形成或臼形成的突变,例如下表2中所述的那些。

[0183] 在某些实施例中,本公开的抗体的CH3和/或CH2结构域来自IgG4亚型。在一些实施例中,本公开的抗体的IgG4 CH3和/或CH2结构域可包含一个或多个另外的突变,包括但不限于S228P突变(EU编号)。

[0184] 在一些实施例中,本公开的抗体是如下文更详细地讨论的抗体片段。如本文所用,抗体片段是指除了完整抗体以外的分子,其包括完整抗体的一部分且结合与完整抗体结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>;双体抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如,scFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0185] 在一些实施例中,本公开的抗体是单臂抗体。在一些实施例中,单臂抗体包含免疫球蛋白重链、免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白Fc片段,其中三个链折叠并组装以形成生物活性单价抗体。对于示例性和非限制性单臂抗体奥那妥组单抗(onartuzumab)(例如,MetMAb)的描述,参见,例如,Merchant, M.等人,(2013)Proc. Natl. Acad. Sci. 110:E2987-E2996。

[0186] 抗体性质

[0187] 在某些实施例中,本文提供的抗体的解离常数(Kd)为 $\leq 1\mu\text{M}$ ,  $\leq 150\text{nM}$ ,  $\leq 100\text{nM}$ ,  $\leq 50\text{nM}$ ,  $\leq 10\text{nM}$ ,  $\leq 1\text{nM}$ ,  $\leq 0.1\text{nM}$ ,  $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 $10^{-8}\text{M}$ 或更低,例如 $10^{-8}\text{M}$ 至 $10^{-13}\text{M}$ ,例如 $10^{-9}\text{M}$ 至 $10^{-13}\text{M}$ )。

[0188] 在一个实施例中,通过用如下测定所述的目标抗体及其抗原进行放射性标记的抗原结合测定(RIA)来测量Kd。Fabs对抗原的溶液结合亲和力通过在一系列未标记的抗原滴定下用最小浓度的(<sup>125</sup>I)标记的抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被的板捕获结合的抗原来测量的(参见,例如,Chen等人,J. Mol. Biol. 293:865-881(1999))。为了确定用于测定的条件,在用含5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 捕获抗Fab抗体(Cappel Labs)的50mM碳酸钠(pH 9.6)包被MICROTITER<sup>®</sup>多孔板(Thermo Scientific)过夜,且随后在室温(大约23 $^{\circ}\text{C}$ )在含2% (w/v)牛血清白蛋白的PBS中封闭二至五小时。在非吸附板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [<sup>125</sup>I]-抗原与目标Fab的系列稀释液混合。接着将目标Fab孵育过夜;然而,孵育可持续更长时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获板以在室温下孵育(例如,一小时)。然后移除溶液并用PBS中的0.1%聚山梨酯20(TWEEN-20<sup>®</sup>)洗涤该板八次。当板已干燥时,添加150 $\mu\text{l}$ /孔的闪烁体(MICROSCINT-20<sup>™</sup>; Packard),并且在TOPCOUNT<sup>™</sup>  $\gamma$ 计数器(Packard)上对板计数十分钟。选择给出小于或等于20%最大结合的各Fab的浓度以用于竞争性结合测定中。

[0189] 根据另一实施例,在25 $^{\circ}\text{C}$ ,用经固定化的抗原CM5芯片,在10个响应单位(RU)下,使用BIAcore<sup>®</sup>-2000或BIAcore<sup>®</sup>-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ),通过表面等

离子体共振测定来测量Kd。简而言之,根据供应商说明书,用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)激活羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIACORE, Inc.)。将抗原用10mM醋酸钠pH 4.8稀释至5 $\mu$ g/mL(约0.2 $\mu$ M),之后以5 $\mu$ L/分钟的流量进行注射以获得大约10个响应单位(RU)的偶联蛋白。注射抗原之后,注射1M乙醇胺以阻断未反应的基团。关于动力学测量,在25 $^{\circ}$ C,以约25 $\mu$ L/min的流量,注射在含有0.05%聚山梨酯20(TWEEN-20<sup>TM</sup>)表面活性剂(PBST)的PBS中的Fab的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)。通过同时拟合缔合和解离传感图,使用简单的一对一朗缪尔结合模型(BIACORE<sup>®</sup>评估软件3.2版)计算缔合速率(kon)和解离速率(koff)。平衡解离常数(Kd)计算为比率koff/kon。参见例如Chen等人, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)。若通过上述表面等离子体共振测定得出缔合速率超过10<sup>6</sup>M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>,则可通过使用荧光淬灭技术测定缔合速率,即如在分光计诸如配备止流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-AMINCO<sup>TM</sup>分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯所测得的,在浓度渐增的抗原存在下,测量在25 $^{\circ}$ C PBS pH 7.2中的20nM抗抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的增加或减少。

#### [0190] (i) 抗原制备

[0191] 任选地与其他分子缀合的可溶性抗原或其片段可以用作产生抗体的免疫原。对于跨膜分子,诸如受体,可以将其片段(例如受体的细胞外结构域)用作免疫原。可替代地,可以将表达跨膜分子的细胞用作免疫原。这样的细胞可以源自天然来源(例如癌细胞系),或者可以是已经通过重组技术转化以表达跨膜分子的细胞。可用于制备抗体的其他抗原及其形式对于本领域技术人员将是显而易见的。

#### [0192] (ii) 某些基于抗体的方法

[0193] 优选地通过多次皮下(sc)或腹腔(ip)注射相关抗原和佐剂在动物体内产生多克隆抗体。使用双功能或衍生化试剂,例如,马来酰亚胺基苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester)(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基缀合)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl<sub>2</sub>或R<sup>1</sup>N=C=NR(其中R和R<sup>1</sup>是不同的烷基基团),将相关抗原缀合至要免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质(例如钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂),可能会很有用。

[0194] 通过将例如100 $\mu$ g或5 $\mu$ g的蛋白质或缀合物(分别用于兔或小鼠)与3体积的弗氏完全佐剂混合,并在多个部位皮内注射溶液,使动物对抗原、免疫原性缀合物或衍生物免疫。一个月后,通过在多个部位进行皮下注射,以弗氏完全佐剂中原始量的1/5至1/10的肽或缀合物对动物进行加强。7至14天后,给动物放血,并测定血清的抗体滴度。增强动物直至滴度稳定。优选地,用相同抗原的缀合物(但是缀合至不同的蛋白质和/或通过不同的交联剂)增强动物。缀合物也可以在重组细胞培养物中作为蛋白融合物制备。而且,聚集剂例如明矾适合用于加强免疫应答。

[0195] 可以使用杂交瘤方法制备本公开的单克隆抗体,所述杂交瘤方法首先描述于Kohler等人, Nature, 256:495(1975),并且进一步描述于例如Hongo等人, Hybridoma, 14(3):253-260(1995), Harlow等人, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版1988); Hammerling等人, Monoclonal Antibodies and

T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) 和关于人类-人类杂交瘤的 Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)。另外的方法包括例如关于从杂交瘤细胞系生产单克隆人类天然 IgM 抗体的美国专利号 7,189,826 中描述的那些。人类杂交瘤技术 (Trioma 技术) 描述于 Vollmers 和 Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 以及 Vollmers 和 Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)。一旦从杂交瘤中分离了所需的单克隆抗体, 就可以将编码它们的多核苷酸亚克隆到原核表达载体中, 并且可以通过本文所述的任何方法在原核宿主细胞中表达来产生抗体。

[0196] (iii) 文库衍生的抗体

[0197] 可以通过筛选组合文库中具有一个或多个所需活性的抗体来分离本公开的抗体。例如, 本领域已知多种方法用于产生噬菌体展示文库并筛选此类文库以获得具有所需结合特征的抗体, 例如实例 3 中所述的方法。另外的方法综述于例如 Hoogenboom 等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien 等人编辑, Human Press, Totowa, NJ, 2001) 中, 并进一步描述于例如 McCafferty 等人, 《自然》(Nature) 348:552-554 中; Clackson 等人, 《自然》(Nature) 352:624-628 (1991) 中; Marks 等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Marks 和 Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo 编辑, Human Press, Totowa, NJ, 2003) 中; Sidhu 等人, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004) 中; Lee 等人, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004) 中; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004) 中; 和 Lee 等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004) 中。

[0198] 在某些噬菌体展示方法中, 将 VH 和 VL 基因的所有组成成分通过聚合酶链式反应 (PCR) 分别克隆, 并在噬菌体文库中随机重组, 然后可以从所述噬菌体文库中筛选抗原结合噬菌体, 如在 Winter 等人, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994) 中所描述的。噬菌体通常将抗体片段展示为单链 Fv (scFv) 片段或 Fab 片段。来自经免疫的来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体, 而无需构建杂交瘤。或者, 可以克隆所有天然组成成分 (例如, 来自人的所有天然组成成分) 以提供针对广泛的非自身抗原和自身抗原的抗体的单一来源, 而无需任何免疫, 如由 Griffiths 等人, *EMBO J.*, 12:725-734 (1993) 所描述的。最后, 还可通过以下方式制得初始文库: 克隆来自干细胞的未重排的 V 基因区段; 以及使用含有随机序列的 PCR 引物来编码高度可变的 CDR3 区域并完成体外重排, 如由 Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992) 所描述。描述人抗体噬菌体文库的专利出版物包括, 例如: 美国专利号 5,750,373, 和美国公开号 2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936 和 2009/0002360。

[0199] 在本文中从人抗体文库分离出的抗体或抗体片段被认为是人抗体或人抗体片段。

[0200] (iv) 嵌合、人源化和人类抗体

[0201] 在某些实施例中, 本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于, 例如, 美国专利号 4,816,567 和 Morrison 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984) 中。在一个实例中, 嵌合抗体包含非人可变区 (例如, 源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物 (诸如猴) 的可变区) 和人恒定区。在另一个实例中, 嵌合抗体为其中类别或亚类已经与亲本抗体的类别或亚类改变的“类别转换”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0202] 在某些实施例中, 嵌合抗体是人源化抗体。通常, 将非人抗体人源化以减少对人的

免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR例如CDR(或其部分)衍生自非人抗体,而FR(或其部分)衍生自人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施例中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,HVR残基所来源的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0203] 人源化抗体及其制备方法在例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中综述,并且进一步描述于例如Riechmann等人,《自然》(Nature)332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,《方法》(Methods)36:25-34(2005)(描述了SDR(a-CDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述了“表面再塑”);Dall'Acqua等人,《方法》(Methods)36:43-60(2005)(描述了“FR改组”);以及Osbourn等人,《方法》(Methods)36:61-68(2005)和Klimka等人,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述了用于FR改组的“指导选择”方法)中。

[0204] 可用于人源化的人构架区包括但不限于:使用“最佳匹配”方法选择的构架区(参见例如Sims等人,J.Immunol.151:2296(1993));来源于具有轻链或重链可变区的特定子组的人抗体的共有序列的构架区(参见例如Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);以及Presta等人,J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟(体细胞突变)架构区或人类种系构架区(参见例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));以及来源于筛选FR文库的构架区(参见例如Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0205] 在某些实施例中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的各种技术来产生人抗体。人抗体一般描述于van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)和Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)中。人抗体可以例如但不限于通过本文所述的任何方法从原核表达载体在原核宿主细胞中表达而制得。

[0206] 人抗体还可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列产生。然后将此类可变结构域序列与预期的人恒定结构域结合。从抗体文库中选择人抗体的技术描述如下。

[0207] (v) 抗体片段

[0208] 抗体片段可以通过传统方法(例如酶消化)或通过重组技术产生。在某些情况下,使用抗体片段而不是完整抗体具有优势。片段的较小尺寸允许快速清除,并可以改善对实体瘤的进入。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人(2003)Nat.Med.9:129-134。

[0209] 已经开发了用于产生抗体片段的各种技术。传统上,这些片段通过完整抗体的蛋白水解消化而获得(参见,例如,Morimoto等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992)和Brennan等人,《科学》(Science),229:81(1985))。但是,这些片段现在可以直接由重组宿主细胞产生。Fab、Fv和scFv抗体片段均可在大肠杆菌中表达并从大肠杆菌中分泌出来,因此可轻松生产大量这些片段。可以从上述抗体噬菌体文库中分离抗体片段。可替代地,Fab'-SH片段可以直接从大肠杆菌中回收,并化学偶联形成F(ab')<sub>2</sub>片段(Carter等人,Bio/Technology 10:163-167(1992))。根据另一种方法,可以直接从重组宿主细胞培养物中分离F(ab')<sub>2</sub>片段。具有增加的体内半衰期的包

含挽救受体结合表位残基的Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段描述于美国专利号5,869,046中。产生抗体片段的其它技术对熟练技术人员将是显而易见的。在某些实施例中,抗体是单链Fv片段(scFv)。参见WO 93/16185;美国专利号5,571,894和5,587,458。Fv和scFv是具有完整结合位点没有恒定区的仅有的种类;因此,它们可能适合于在体内使用期间减少非特异性结合。可以构建scFv融合蛋白以在scFv的氨基末端或羧基末端产生效应蛋白的融合。参见Borrebaeck编撰的《抗体工程》(Antibody Engineering),同上。例如,该抗体片段也可以是“线性抗体”,例如美国专利号5,641,870中所述。这样的线性抗体可以是单特异性或双特异性的。

[0210] (vi) 多特异性抗体

[0211] 多特异性抗体对至少两个不同的表位具有结合特异性,其中这些表位通常来自不同的抗原。尽管这样的分子在正常情况下仅结合两个不同的表位(即双特异性抗体,BsAb),但是当在本文中使用时,这一表述涵盖具有其他特异性的抗体,例如三特异性抗体。可以将双特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段(例如F(ab')<sub>2</sub>双特异性抗体)。

[0212] 制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条链具有不同的特异性(Millstein等人,《自然》(Nature),305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机多样性,这些杂交瘤(四源杂交瘤)产生10种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤完成的正确分子的纯化相当麻烦,并且产物产率低。在WO 93/08829和Traunecker等人,EMBO J.,10:3655-3659(1991)中公开了类似的过程。

[0213] 用于制备双特异性抗体的本领域已知的一种方法是“杵入臼”(knobs-into-holes)或“突起入腔”(protuberance-into-cavity)法(参见,例如,美国专利号5,731,168)。在这种方法中,两个免疫球蛋白多肽(例如,重链多肽)各自包含界面。一个免疫球蛋白多肽的界面与另一免疫球蛋白多肽的相应界面相互作用,从而使两个免疫球蛋白多肽缔合。可以对这些界面进行工程化,使得位于一个免疫球蛋白多肽的界面上的“杵”(knob)或“突起”(这些术语在本文中可以互换使用)与位于另一个免疫球蛋白多肽的界面上的“臼”(hole)或“腔”(这些术语在本文中可以互换使用)相对应。在一些实施例中,臼具有与杵相同或相似的尺寸,并且适当地定位使得当两个界面相互作用时,一个界面的杵可定位在另一界面的对应臼中。不希望受理论的束缚,认为这使异源多聚体稳定并且比其它种类(如同源多聚体)更有利于异源多聚体的形成。在一些实施例中,该方法可用于促进两个不同的免疫球蛋白多肽的异源多聚化,产生包含两个对不同表位具有结合特异性的免疫球蛋白多肽的双特异性抗体。

[0214] 在一些实施例中,可通过用较大的侧链置换小氨基酸侧链来构建杵。在一些实施例中,可以通过用较小的侧链置换大氨基酸侧链来构建臼。杵或臼可能存在于原始界面中,或者可以合成地引入。例如,可以通过改变编码界面的核酸序列以用至少一个“输入”氨基酸残基置换至少一个“原始”氨基酸残基来合成地引入杵或臼。改变核酸序列的方法可以包括本领域众所周知的标准分子生物学技术。下表显示了各种氨基酸残基的侧链体积。在一些实施例中,原始残基具有小侧链体积(例如,丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸),并且形成杵的输入残基是天然存在的氨基酸,并且可以包括精氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。在一些实施例中,原始残基具有大的侧链体积(例如,精氨酸、

苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸),并且用于形成白的输入残基是天然存在的氨基酸,并且可以包括丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和缬氨酸。

[0215] 表1b.氨基酸残基的性质

| 氨基酸        | 一字母缩写 | 质量 <sup>a</sup><br>(道尔顿) | 体积 <sup>b</sup><br>(Å <sup>3</sup> ) | 可及的表面积 <sup>c</sup><br>(Å <sup>2</sup> ) |
|------------|-------|--------------------------|--------------------------------------|--|
| 丙氨酸 (Ala)  | A     | 71.08                    | 88.6                                 | 115                                      |
| 精氨酸 (Arg)  | R     | 156.20                   | 173.4                                | 225                                      |
| 天冬酰胺 (Asn) | N     | 114.11                   | 117.7                                | 160                                      |
| 天冬氨酸 (Asp) | D     | 115.09                   | 111.1                                | 150                                      |
| 半胱氨酸 (Cys) | C     | 103.14                   | 108.5                                | 135                                      |
| 谷氨酰胺 (Gln) | Q     | 128.14                   | 143.9                                | 180                                      |
| 谷氨酸 (Glu)  | E     | 129.12                   | 138.4                                | 190                                      |
| 甘氨酸 (Gly)  | G     | 57.06                    | 60.1                                 | 75                                       |
| 组氨酸 (His)  | H     | 137.15                   | 153.2                                | 195                                      |
| 异亮氨酸 (Ile) | I     | 113.17                   | 166.7                                | 175                                      |
| 亮氨酸 (Leu)  | L     | 113.17                   | 166.7                                | 170                                      |
| 赖氨酸 (Lys)  | K     | 128.18                   | 168.6                                | 200                                      |
| 蛋氨酸 (Met)  | M     | 131.21                   | 162.9                                | 185                                      |
| 苯丙氨酸 (Phe) | F     | 147.18                   | 189.9                                | 210                                      |
| 脯氨酸 (Pro)  | P     | 97.12                    | 122.7                                | 145                                      |
| 丝氨酸 (Ser)  | S     | 87.08                    | 89.0                                 | 115                                      |
| 苏氨酸 (Thr)  | T     | 101.11                   | 116.1                                | 140                                      |
| 色氨酸 (Trp)  | W     | 186.21                   | 227.8                                | 255                                      |
| 酪氨酸 (Tyr)  | 是     | 163.18                   | 193.6                                | 230                                      |
| 缬氨酸 (Val)  | V     | 99.14                    | 140.0                                | 155                                      |

[0217] <sup>a</sup>氨基酸分子量减去水的分子量。来自Handbook of Chemistry and Physics,第43版,Cleveland,Chemical Rubber Publishing Co.,1961中的值。

[0218] <sup>b</sup>来自A.A的值。Zamyatnin,Prog.Biophys.Mol.Biol.24:107-123,1972的数值。

[0219] <sup>c</sup>来自C.Chothia,J.Mol.Biol.105:1-14,1975的值。该参考文献的图6至图20中定义了可及的表面积。

[0220] 在一些实施例中,基于异源多聚体的三维结构识别用于形成杆或白的原始残基。用于获得三维结构的本领域已知技术可以包括X射线晶体学和NMR。在一些实施例中,界面是免疫球蛋白恒定结构域的CH3结构域。在这些实施例中,人IgG<sub>1</sub>的CH3/CH3界面涉及在位于四个反平行β链上的每个结构域上的十六个残基。不希望受理论的束缚,突变残基优选位于两个中央反平行β链上,以使杆被周围的溶剂而不是配偶体CH3结构域中的补偿白容纳的风险最小化。在一些实施例中,在两个免疫球蛋白多肽中形成相应的杆和白的突变对应于下表中提供的一对或多对。

[0221] 表2.相应的杆形成和白形成的突变的示例性集合

| 第一免疫球蛋白的CH3 | 第二免疫球蛋白的CH3       |
|-------------|-------------------|
| T366Y       | Y407T             |
| T366W       | Y407A             |
| T366W       | T366S:L368A:Y407V |

|             |             |
|-------------|-------------|
| F405A       | T394W       |
| Y407T       | T366Y       |
| T366Y:F405A | T394W:Y407T |
| T366W:F405W | T394S:Y407A |
| F405W:Y407A | T366W:T394S |
| F405W       | T394S       |

[0223] 突变由原始残基,随后是使用Kabat编号系统的位置,然后是输入残基来表示(所有残基均以单字母氨基酸代码给出)。多个突变由冒号分隔。

[0224] 在一些实施例中,免疫球蛋白多肽包含CH3结构域,所述CH3结构域包含以上表2中所列的一个或多个氨基酸取代。在一些实施例中,双特异性抗体包含第一免疫球蛋白多肽和第二免疫球蛋白多肽,所述第一免疫球蛋白多肽包含在表2的左列中列出的包含一个或多个氨基酸取代的CH3结构域,所述第二免疫球蛋白多肽包含在表2的右列中列出的包含一个或多个氨基酸取代的CH3结构域。作为杆形成和臼形成对的非限制性实例,在一些实施例中,双特异性抗体包含第一免疫球蛋白多肽和第二免疫球蛋白多肽,所述第一免疫球蛋白多肽包括包含T366W突变的CH3结构域,所述第二免疫球蛋白多肽包括包含T366S、L368A和Y407V突变的CH3结构域。

[0225] 如美国专利号7,642,228中所述,每个半抗体可以具有工程化至重链中杆(突起)或臼(腔)。简而言之,可以首先生成CH3杆突变体。然后通过随机化与配偶体CH3结构域上的杆相邻的残基366、368和407来创建CH3臼突变体库。在某些实施例中,在IgG1或IgG4主链中,杆突变包含T366W,臼突变包含T366S、L368A和Y407V。其他免疫球蛋白同种型的等效突变可以由本领域技术人员进行。此外,技术人员将容易理解,优选用于双特异性抗体的两个半抗体具有相同的同种型。

[0226] 第III部分提供了产生多特异性(例如双特异性)抗体的示例性和非限制性技术。

[0227] 考虑了具有两个以上价态的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tuft等人J. Immunol. 147:60(1991)。

[0228] 在一些实施例中,双链蛋白质是多特异性抗体或双特异性抗体的一部分。多特异性抗体或双特异性抗体可以包含两个或多个本公开的单价抗体。

[0229] 在一些实施例中,双特异性抗体的第一抗原结合结构域包含一个或多个重链恒定结构域,其中所述一个或多个重链恒定结构域选自第一CH1(CH<sub>1</sub>)结构域、第一CH2(CH<sub>2</sub>)结构域、第一CH3(CH<sub>3</sub>)结构域;双特异性抗体的第二抗原结合结构域包含一个或多个重链恒定结构域,其中所述一个或多个重链恒定结构域选自第二CH1(CH<sub>2</sub>)结构域、第二CH2(CH<sub>2</sub>)结构域和第二CH3(CH<sub>3</sub>)域。在一些实施例中,第一抗原结合结构域的一个或多个重链恒定结构域中的至少一者与第二抗原结合结构域的另一重链恒定结构域配对。在一些实施例中,CH<sub>3</sub><sub>1</sub>和CH<sub>3</sub><sub>2</sub>结构域各自包含突起或腔,并且其中CH<sub>3</sub><sub>1</sub>结构域中的突起或腔分别位于CH<sub>3</sub><sub>2</sub>结构域中的腔或突起中。在一些实施例中,CH<sub>3</sub><sub>1</sub>和CH<sub>3</sub><sub>2</sub>结构域在所述突起和腔之间的界面处相遇。CH<sub>3</sub><sub>1</sub>和CH<sub>3</sub><sub>2</sub>结构域中的氨基酸取代的示例性集合在本文的表2中示出。在一些实施例中,CH<sub>2</sub><sub>1</sub>和CH<sub>2</sub><sub>2</sub>结构域各自包含突起或腔,并且其中CH<sub>2</sub><sub>1</sub>结构域中的突起或腔分别位于CH<sub>2</sub><sub>2</sub>结构域中的腔或突起中。在一些实施例中,CH<sub>2</sub><sub>1</sub>和CH<sub>2</sub><sub>2</sub>结构域在所述突起和腔之间的界面处相遇。在一些实施例中,IgG的CH<sub>3</sub><sub>1</sub>和/或CH<sub>3</sub><sub>2</sub>结构域在根据美国专利号8,216,805的图5所示

的编号选自347、349、350、351、366、368、370、392、394、395、398、399、405、407和409组成的组的残基处包含一个或多个氨基酸取代。在一些实施例中,突起包含一个或多个引入的残基,所述残基选自精氨酸(R)残基、苯丙氨酸(F)残基、酪氨酸(Y)残基和色氨酸(W)残基组成的组。在一些实施例中,腔包含一个或多个引入的残基,所述残基选自丙氨酸(A)残基、丝氨酸(S)残基、苏氨酸(T)残基和缬氨酸(V)残基组成的组。在一些实施例中,CH3和/或CH2结构域来自IgG(例如,IgG1亚型、IgG2亚型、IgG2A亚型、IgG2B亚型、IgG3亚型或IgG4亚型)。在一些实施例中,双特异性抗体的一个CH3结构域包含氨基酸取代T366Y,另一个CH3结构域包含氨基酸取代Y407T。在一些实施例中,一个CH3结构域包含氨基酸取代T366W,另一个CH3结构域包含氨基酸取代Y407A。在一些实施例中,一个CH3结构域包含氨基酸取代F405A,另一个CH3结构域包含氨基酸取代T394W。在一些实施例中,一个CH3结构域包含氨基酸取代T366Y和F405A,另一个CH3结构域包含氨基酸取代T394W和Y407T。在一些实施例中,一个CH3结构域包含氨基酸取代T366W和F405W,另一个CH3结构域包含氨基酸取代T394S和Y407A。在一些实施例中,一个CH3结构域包含氨基酸取代F405W和Y407A,另一个CH3结构域包含氨基酸取代T366W和T394S。在一些实施例中,一个CH3结构域包含氨基酸取代F405W,另一个CH3结构域包含氨基酸取代T394S。突变由原始残基,随后是使用Kabat编号系统的位置,然后是输入残基来表示。也参见美国专利号8,216,805的图5中的编号。

[0230] (vii) 单结构域抗体

[0231] 在一些实施例中,本文所述的抗体为单结构域抗体。单结构域抗体为包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的单个多肽链。在某些实施例中,单结构域抗体为人类单结构域抗体(Domantis, Inc., Waltham, Mass.; 参见,例如,美国专利号6,248,516B1)。在一个实施例中,单结构域抗体由抗体的全部或部分重链可变结构域组成。

[0232] (viii) 抗体变体

[0233] 在一些实施例中,考虑了本文描述的抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能期望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的改变或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终构建体,前提条件是所述最终构建体具有所需特性。可以在形成序列时将氨基酸改变引入目标抗体的氨基酸序列中。

[0234] (ix) 取代、插入和删除变体

[0235] 在某些实施例中,提供了具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。用于取代诱变的目标位点包括HVR和FR。保守取代显示在表1的“保守取代”标题下。在表1中的“示例性取代”标题下提供了更实质性的变化,如下面参考氨基酸侧链类别所进一步描述的。可以将氨基酸取代引入目标抗体中,并对产物进行所需活性(例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性,或改善的ADCC或CDC)筛选。

[0236] 表3. 示例性取代。

| 原始残基    | 示例性取代                         | 优选的取代 |
|---------|-------------------------------|-------|
| Ala (A) | Val; Leu; Ile                 | Val   |
| Arg (R) | Lys; Gln; Asn                 | Lys   |
| Asn (N) | Gln; His; Asp; Lys; Arg       | Gln   |
| Asp (D) | Glu; Asn                      | Glu   |
| Cys (C) | Ser; Ala                      | Ser   |
| Gln (Q) | Asn; Glu                      | Asn   |
| Glu (E) | Asp; Gln                      | Asp   |
| Gly (G) | Ala                           | Ala   |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg            | Arg   |
| Ile (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸 | Leu   |
| Leu (L) | 正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile   |
| Lys (K) | Arg; Gln; Asn                 | Arg   |
| Met (M) | Leu; Phe; Ile                 | Leu   |
| Phe (F) | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr  | Tyr   |
| Pro (P) | Ala                           | Ala   |
| Ser (S) | Thr                           | Thr   |
| Thr (T) | Val; Ser                      | Ser   |
| Trp (W) | Tyr; Phe                      | Tyr   |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser            | Phe   |

| 原始残基    | 示例性取代                         | 优选的取代 |
|---------|-------------------------------|-------|
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸 | Leu   |

[0239] 可根据共同的侧链特性将氨基酸分组:

[0240] a. 疏水性: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0241] b. 中性亲水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0242] c. 酸性: Asp、Glu;

[0243] d. 碱性: His、Lys、Arg;

[0244] e. 影响链取向的残基: Gly、Pro;

[0245] f. 芳族: Trp、Tyr、Phe。

[0246] 非保守性取代将需要用这些类别中的一个的成员交换另一类别。

[0247] 一种类型的取代变体涉及取代亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,相对于亲本抗体,选为用于进一步研究的一个或多个所得变体将在某些生物学特性(例如,亲和力增加、免疫原性降低)方面有改变(例如,改善)和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。示例性取代变体是亲和力成熟抗体,其可例如使用诸如本文所述的那些基于噬菌体展示的亲和力成熟技术方便地生成。简言之,将一个或多个HVR残基突变并且将变体抗体展示在噬菌体上并针对特定生物活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0248] 可以在HVR中进行改变(例如取代),例如以改善抗体亲和力。可在HVR“热点”中作出此类改变,即,由在体细胞成熟过程期间经历高频突变的密码子编码的残基(参见例如, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008))和/或SDR(a-CDR),其中对所得变体VH或VL进行结合亲和力测试。通过构建并自二级文库重新选择而实现的亲和力成熟已被例如 Hoogenboom等人在Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等人, Human

Press, Totowa, NJ, (2001)) 中进行描述。在亲和力成熟的一些实施例中,通过多种方法(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定向突变)中的任一个将多样性引入出于成熟目的而挑选的可变基因中。接着创建二级文库。随后对该文库进行筛选以鉴别具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向方法,其中将若干HVR残基(例如,每次4-6个残基)随机化。参与抗原结合的HVR残基可例如使用丙氨酸扫描突变或建模来特异性地鉴定。具体而言,常常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0249] 在某些实施例中,取代、插入或缺失可发生在一个或多个HVR内,只要此类改变基本上不降低抗体结合抗原的能力即可。例如,可在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文提供的保守性取代)。此类改变可以在HVR“热点”或SDR之外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施例中,每个HVR要么保持不变,要么包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0250] 可用于鉴别可被靶向诱变的抗体残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells(1989),《科学》(Science),244:1081-1085所描述。在此方法中,鉴别残基或一组靶残基(例如,带电残基,诸如arg、asp、his、lys和glu)并用中性或带负电的氨基酸(例如,丙氨酸或多聚丙氨酸)置换以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可在对初始取代展示功能敏感性的氨基酸位置引入其他取代。另选地或另外地,利用抗原-抗体复合物的晶体结构鉴别抗体与抗原之间的接触点。可靶向或消除作为取代的候选的此类接触残基和相邻残基。可筛选变体以确定它们是否具备期望的特性。

[0251] 氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及一个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的示例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括将抗体的N末端或C末端与增加抗体的血清半衰期的酶(例如,对于ADEPT)或多肽融合。

[0252] (x)Fc区变体

[0253] 在某些实施例中,一个或多个氨基酸修饰可引入本文提供的抗体的Fc区中,从而生成Fc区变体。Fc区变体可包含人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),其在一个或多个氨基酸位置上包含氨基酸修饰(例如取代)。

[0254] 在某些实施例中,本公开考虑具有一些但不是全部效应子功能的抗体变体,这使其成为其中抗体的体内半衰期很重要而某些效应子功能(例如补体和ADCC)不必要或有害的应用的理想候选者。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定,以确认CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏Fc $\gamma$ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc(RIII,而单核细胞表达Fc(RI、Fc(RII和Fc(RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch和Kinet,《免疫学年评》(Annu. Rev. Immunol.) 9:457-492(1991)的第464页的表3中。用于评价目标分子的ADCC活性的体外测定的其他非限制性示例描述于美国专利号5,500,362(参见例如Hellstrom, I.等人,Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom, 等人, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann, M.等人, J. Exp. Med. 166:1351-1361(1987))。另选地,可以使用非放射性测定方法(参见例如,用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA);以及CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(Promega, Madison, WI))。用于此类测定的有用效应

细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和自然杀伤 (NK) 细胞。另选地或另外地, 可例如在诸如 Clynes 等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998) 中公开的动物模型中体内评定目标分子的ADCC活性。也可以进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q, 因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评定补体活化, 可以执行CDC测定 (参见例如Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M. S. 等人, 《血液》(Blood) 101:1045-1052 (2003); 以及Cragg, M. S. 和 M. J. Glennie, 《血液》(Blood) 103:2738-2743 (2004))。FcRn结合和体内清除/半衰期测定也可以使用本领域已知的方法执行 (参见例如Petkova, S. B. 等人, *Int' l. Immunol.* 18 (12): 1759-1769 (2006))。

[0255] 具有降低的效应子功能的抗体包括具有一个或多个Fc区残基238、265、269、270、297、327和329的取代的那些抗体 (美国专利No. 6, 737, 056)。此类Fc突变体包括在第265、269、270、297和327位氨基酸的两个或多个处具有取代的Fc突变体, 包括所谓的“DANA”Fc突变体, 其残基265和297被取代为丙氨酸 (美国专利号7, 332, 581)。

[0256] 描述了具有改善的或降低的与FcR的结合的某些抗体变体。(参见例如美国专利号6, 737, 056; WO 2004/056312, 以及Shields. 等人, *J. Biol. Chem.* 9 (2): 6591-6604 (2001))。

[0257] 在某些实施例中, 抗体变体包含具有一个或多个改善ADCC的氨基酸取代的Fc区, 例如, 在Fc区的298、333和/或334位的取代 (残基的EU编号)。在一个示例性的实施例中, 抗体在其Fc区中包含以下氨基酸取代: S298A、E333A和K334A。

[0258] 在一些实施例中, 在Fc区中进行导致改变 (即, 改善或减少) C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的改变, 例如, 如美国专利号6, 194, 551、WO 99/51642以及Idusogie等人, *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000) 中所描述。

[0259] 具有延长的半衰期和改善的新生儿Fc受体 (FcRn) 结合、负责将母体IgG转移至胎儿 (Guyer, R. L. 等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976) 以及Kim等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) 的抗体描述于US2005/0014934A1 (Hinton等人) 中。那些抗体包含这样的Fc区, 所述Fc区中具有改善Fc区与FcRn的结合的一个或多个取代。此类Fc变体包括在以下Fc区残基中的一处或多处具有取代的Fc变体: 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434, 例如对Fc区残基434的取代 (美国专利号7, 371, 826)。另参见Duncan&Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); 美国专利号5, 648, 260; 美国专利号5, 624, 821; 和WO 94/29351关于Fc区变体的其他实例。

[0260] (xi) 抗体衍生物

[0261] 可以进一步修饰本公开的抗体以包含本领域已知的且容易获得的另外的非蛋白质部分。在某些实施例中, 适合于抗体衍生的部分是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性示例包括但不限于聚乙二醇 (PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1, 3-二氧戊环、聚-1, 3, 6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸 (均聚物或无规共聚物) 和葡聚糖或聚 (n-乙烯吡咯烷酮) 聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇 (例如甘油)、聚乙烯醇以及它们的混合物。由于其在水中的稳定性, 聚乙二醇丙醛在制造中可具有优势。聚合物可具有任何分子量, 并且可以具有支链或不具有支链。附接至抗体的聚合物的数目可变, 并且如果附接了多于一个聚合物, 那么它们可以为相同或不同的分子。通常, 可基于以下考虑因素确定用于衍

生化的聚合物的数目和/或类型,包括但不限于抗体待改善的特定特性或功能、双特异性抗体衍生物是否将用于限定条件下的疗法等。

### [0262] III. 产生方法

[0263] 本文提供了在本公开的原核宿主细胞中产生包含两条链的多肽(例如,双链多肽)的方法。在一些实施例中,所述方法包括:在适合于表达所述多肽的两条链的条件下在培养基中培养本公开的宿主细胞以表达所述多肽的两条链,从而在表达后所述两条链即折叠并组装以在所述宿主细胞中形成生物活性多肽;以及从所述宿主细胞中回收所述生物活性多肽。

[0264] 本公开的任何宿主细胞(例如,如第II部分中所述)可以用于在本公开的方法中。例如,在一些实施例中,宿主细胞包含本公开的一个或多个染色体外多核苷酸和本公开的一个或多个翻译单元(例如,可操作地连接至启动子并以非天然组合的形式存在于的宿主细胞染色体上)。在一些实施例中,宿主细胞包含第一多核苷酸,其包含编码所述多肽的第一链的第一翻译单元(染色体外多核苷酸的一部分);第二多核苷酸,其包含编码所述多肽的第二链的第二翻译单元(染色体外多核苷酸的一部分);以及第三多核苷酸,其包含编码伴侣蛋白质(例如,本公开的肽基脯氨酰异构酶或蛋白质二硫键氧化还原酶),并以非天然组合的形式与本公开的启动子可操作组合的第三翻译单元(宿主细胞染色体的一部分)。在一些实施例中,宿主细胞包含第一多核苷酸,其包含编码所述多肽的第一链的第一翻译单元(染色体外多核苷酸的一部分);第二多核苷酸,其包含编码所述多肽的第二链的第二翻译单元(染色体外多核苷酸的一部分);第三多核苷酸,其包含编码本公开的蛋白质二硫键氧化还原酶,并以非天然组合的形式与本公开的启动子可操作组合的第三翻译单元(宿主细胞染色体的一部分);以及第四多核苷酸,其包含编码本公开的肽基脯氨酰异构酶,并以非天然组合的形式与本公开的启动子可操作组合的第四翻译单元(宿主细胞染色体的一部分)。在一些实施例中,宿主细胞包含第一多核苷酸,其包含编码所述多肽的第一链的第一翻译单元(染色体外多核苷酸的一部分);第二多核苷酸,其包含编码所述多肽的第二链的第二翻译单元(染色体外多核苷酸的一部分);第三多核苷酸,其包含编码本公开的蛋白质二硫键氧化还原酶,并以非天然组合的形式与本公开的启动子可操作组合的第三翻译单元(宿主细胞染色体的一部分);第四多核苷酸,其包含编码本公开的肽基脯氨酰异构酶,并以非天然组合的形式与本公开的启动子可操作组合的第四翻译单元(宿主细胞染色体的一部分);以及编码本公开的第二蛋白质二硫键氧化还原酶,并以非天然组合的形式与本公开的启动子可操作组合的第五翻译单元(宿主细胞染色体的一部分)。在任何上述实施例的一些实施例中,宿主细胞进一步包含编码双链蛋白质(染色体外多核苷酸的一部分)的第三链的翻译单元。

[0265] 在一些实施例中,培养宿主细胞以表达多肽的两条链,其中表达后双链折叠并组装以在宿主细胞中形成生物活性多肽。如本文所用,双链折叠和组装可以指促进最终采用适当的三维双链蛋白质构象、双链蛋白质组装或两者的任何或所有步骤。折叠和组装可以指将每条链折叠和组装成其适当的构象和折叠,或者可以指通过两条蛋白质链的分子间连接产生的复合物的折叠和组装。类似地,每条链可以折叠并组装以形成生物活性多肽,或通过两条蛋白质链的分子间连接产生的复合物可以折叠并组装以整体形成生物活性多肽。

[0266] 生物活性多肽可以指能够执行归因于所述多肽的功能的任何多肽。生物活性多肽

的功能可以包括但不限于适当折叠或组装、与另一大分子的结合或其他相互作用以及酶活性。例如,生物活性抗体可以指能够执行至少一种归因于抗体的功能的抗体,包括但不限于与表位结合或具有抗体Fc区的性质,如本文进一步详细的描述。

[0267] 抗体可以使用重组方法产生。对于抗抗原抗体的重组生产,将编码抗体的核酸分离并插入可复制的载体中以进行进一步克隆(DNA的扩增)或表达。编码抗体的DNA可以使用常规过程容易地进行分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。许多载体可用。载体组分通常包括但不限于以下一个或多个:信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列,例如如上所述。

[0268] 多特异性(例如双特异性)抗体产生

[0269] 本公开的某些方面涉及产生双特异性抗体(例如,包含能够结合第一抗原的第一半抗体和能够结合第二抗原的第二半抗体,其中第一抗原和第二抗原任选地不同)的方法。在一些实施例中,所述方法包括产生如本文所述的第一半抗体,其中所述第一半抗体包含由本公开的翻译单元编码的重链和轻链(例如,一个或多个染色体外多核苷酸的部分);以及产生本文所述的第二种半抗体,其中所述第二半抗体包含由本公开的翻译单元(例如,一种或多种染色体外多核苷酸的一部分)编码的重链和轻链。在一些实施例中,第一半抗体和第二半抗体中的一者包括本公开的至少一个杆形成的突变,并且第一半抗体和第二半抗体中的另一者包括本公开的至少一个臼形成的突变。在一些实施例中,所述方法进一步包括在还原条件下,将所述第一半抗体与所述第二半抗体结合以产生双特异性抗体。下文提供了用于半抗体产生和双特异性抗体组装的示例性方法。

[0270] 可以使用本领域已知的标准重组技术和细胞系统表达和纯化编码具有一个或多个相应的杆形成或臼形成的突变的修饰的免疫球蛋白多肽的多核苷酸。参见,例如,美国专利号5,731,168;5,807,706;5,821,333;7,642,228;7,695,936;8,216,805;美国公开号2013/0089553;和Spiess等人,《自然生物技术》(Nature Biotechnology),31:753-758,2013。可以使用原核宿主细胞诸如大肠杆菌来产生修饰的免疫球蛋白多肽。相应的带有杆和臼的免疫球蛋白多肽可以在共培养的宿主细胞中表达,并作为异源多聚体一起纯化,或者它们可以在单一培养物中表达,分别纯化和体外组装。在一些实施例中,使用本领域已知的标准细菌培养技术共培养细菌宿主细胞的两种菌株(一种表达带有杆的免疫球蛋白多肽,另一种表达带有臼的免疫球蛋白多肽)。在一些实施例中,可以以特定比例混合两种菌株,例如以在培养物中达到相等的表达水平。在一些实施例中,两种菌株可以以50:50、60:40或70:30的比例混合。多肽表达后,可将细胞一起裂解,并提取蛋白质。本领域已知的允许测量同多聚体相对异多聚体物质的丰度的标准技术可以包括尺寸排阻色谱法。在一些实施例中,使用标准重组技术分别表达每种修饰的免疫球蛋白多肽,回收并在体外组装在一起。如下文更详细描述,可以例如通过纯化每种修饰的免疫球蛋白多肽,将它们以等质量合并一起孵育,还原二硫键(例如,通过用二硫苏糖醇处理),浓缩和再氧化多肽来实现组装。形成的双特异性抗体可以使用包括阳离子交换色谱法在内的标准技术进行纯化,并使用包括尺寸排阻色谱法在内的标准技术进行测量。有关这些方法的详细描述,参见Speiss等人,Nat Biotechnol 31:753-8,2013。

[0271] 通过在细菌宿主细胞(例如大肠杆菌)中表达重链和轻链构建体,可在单独的培养

物中产生包含杵或臼突变的半抗体。每个半抗体都可以通过蛋白质A亲和色谱法分别纯化。可通过HiTrap MabSelect SuRe™色谱柱纯化来自杵和臼半抗体中的澄清的细胞提取物。可以在还原剂存在下,在体外的氧化还原反应中组装具有不同特异性的蛋白质A纯化的半抗体,以形成双特异性抗体。

[0272] 可以使用任何合适的方法来制备所需的还原条件。例如,可以通过向反应(例如本公开的组装混合物)中添加还原剂来制备所需的还原条件。合适的还原剂包括但不限于二硫苏糖醇(DTT)、三(2-巯基乙基)磷(TCEP)、巯基乙酸、抗坏血酸、硫醇乙酸、谷胱甘肽(GSH)、 $\beta$ -巯基乙胺、半胱氨酸/胱氨酸、GSH/谷胱甘肽二硫化物(GSSG)、半胱胺/胱胺、甘氨酸半胱氨酸和 $\beta$ -巯基乙醇,优选GSH。在某些特定实施例中,所述还原剂是弱还原剂,包括但不限于GSH、 $\beta$ -巯基乙胺、半胱氨酸/半胱氨酸、GSH/GSSG、半胱胺/胱胺、甘氨酸半胱氨酸和 $\beta$ -巯基乙醇,优选GSH。在某些优选的实施例中,所述还原剂是GSH。在某些实施例中,所述还原剂是DTT。在合适的浓度和合适的实验条件下选择合适的还原剂以在反应中实现所需的还原条件在本领域普通技术人员的能力之内。例如,在20°C具有10g/L的双特异性抗体蛋白质浓度的溶液中10mM L-还原的谷胱甘肽将导致约-400mV的起始氧化还原电势。例如,将谷胱甘肽添加到组装混合物中会产生对于杵入臼双特异性组装有利的弱还原条件。相似类别的其他还原剂诸如BMEA( $\beta$ -巯基乙胺)可以具有相似的作用。参见W02013/055958,其通过引用整体并入本文。可以使用本领域已知的任何合适方法来估计和测量反应的还原条件。例如,可以使用刃天青指示剂测量还原条件(还原条件下从蓝色到无色的变色)。为了更精确地测量,可以使用氧化还原电位计(例如BROADLEY JAMES®制作的ORP电极)。

[0273] 在某些特定实施例中,所述还原条件是弱还原条件。如本文所用,术语“弱还原剂”或“弱还原条件”是指还原剂或由在25°C具有负氧化电位的还原剂制备的还原条件。当pH在7至9之间并且温度在15°C至39°C之间时,还原剂的氧化电位优选在-50mV至-600mV、-100mV至-600mV、-200mV至-600mV、-100mV至-500mV、-150mV至-300mV之间,更优选在约-300mV至-500mV之间,最优选约为-400mV。本领域技术人员将能够选择合适的还原剂以制备所需的还原条件。熟练的研究人员将认识到强还原剂,即在相同的浓度、pH和温度下,具有比上述还原剂更大的负氧化电位的还原剂可以在更低的温度下使用。在一个优选的实施例中,当在上述条件下孵育时,蛋白质将能够在还原剂存在下形成二硫键。弱还原剂的实例包括但不限于谷胱甘肽、 $\beta$ -巯基乙胺、胱氨酸/半胱氨酸、GSH/GSSG、半胱胺/胱胺、甘氨酸半胱氨酸和 $\beta$ -巯基乙醇。在某些实施例中,可以将类似于200X摩尔比的GSH:抗体的氧化电势用作弱还原条件的参考点,在该弱还原条件下可以预期使用其他还原剂的有效组装。

[0274] 谷胱甘肽浓度可以相对于组装混合物中存在的半抗体的摩尔数或摩尔比或摩尔过量表示。使用目标还原剂摩尔比控制组装混合物中的蛋白质浓度;这样可以防止由于蛋白质浓度变化而导致过度减少或减少不足。在某些其他实施例中,将还原剂相对于半抗体的总量以2-600X、2-200X、2-300X、2-400X、2-500X、2-20X、2-8X、20-50X、50-600X、50-200X或100-300X摩尔过量,优选50-400X,更优选100-300X,最优选200X摩尔过量添加到组装混合物。在某些实施例中,组装混合物的pH为7至9,优选为pH 8.5。

[0275] 在某些实施例中,可以将第一半抗体和第二半抗体的培养物组合,然后在合并的培养物中裂解。组合中释放的第一半抗体和第二半抗体可以在还原条件下形成双特异性抗体。参见W0 2011/133886,其通过引用整体并入本文。

[0276] 根据不同的方法,将具有所需结合特异性的抗体可变结构域(抗体-抗原结合位点)与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。融合优选地使用免疫球蛋白重链恒定结构域,包含铰链的至少一部分、CH<sub>2</sub>区和CH<sub>3</sub>区。通常具有至少一个融合物中存在的包含轻链结合所需位点的第一重链恒定区(CH<sub>1</sub>)。将编码免疫球蛋白重链融合物和(如果需要)免疫球蛋白轻链的DNA插入单独的表达载体中,并共转染到合适的宿主生物中。当在构建中使用的三个多肽链的不相等比例提供最佳产量时,这在实施例提供了调节三个多肽片段的相互比例的极大灵活性。然而,当至少两个多肽链以相等的比率表达导致高产量或当比率没有特别意义时,有可能在一个表达载体中插入两条或全部三条多肽链的编码序列。

[0277] 在该方法的一个实施例中,双特异性抗体由在一个臂中具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链和在另一臂中具有杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。已经发现,这种不对称结构促进了所需的双特异性化合物与不需要的免疫球蛋白链组合的分离,因为仅在双特异性分子的一半中存在免疫球蛋白轻链提供了一种简便的分离方式。该方法在W0 94/04690中公开。对于生成双特异性抗体的更多细节,参见,例如,Suresh等人,Methods in Enzymology,121:210(1986)。

[0278] 根据W096/27011中描述的另一方法,可以对一对抗体分子之间的界面进行工程化以最大化从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比。一个界面包含抗体恒定结构域的C<sub>H</sub> 3结构域的至少一部分。在该方法中,用较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换来自第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸侧链。具有与大侧链相同或相似大小的补偿性“腔”是通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链在第二抗体分子的界面上创建。这提供了一种机制,可以提高异二聚体而不是其它不需要的最终产物(如同二聚体)的产量。

[0279] 双特异性抗体包括交联抗体或“异源缀合”抗体。例如,异源缀合物中的一种抗体可以与抗生物素蛋白偶联,另一种与生物素偶联。例如,已经提出了这样的抗体以将免疫系统细胞靶向不需要的细胞(美国专利号4,676,980),以及用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373和EP 03089)。异源缀合物抗体可以使用任何方便的交联方法来制备。合适的交联剂是本领域众所周知的,并在美国专利号4,676,980以及许多交联技术中描述。

[0280] 从抗体片段产生双特异性抗体的技术也已在文献中描述。例如,可以使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan等人,《科学》(Science),229:81(1985)描述了一种过程,其中完整抗体被蛋白水解裂解以生成F(ab')<sub>2</sub>片段。在二硫醇络合剂亚砷酸钠的存在下还原这些片段,以稳定邻位二硫醇并防止分子间二硫化物的形成。然后将生成的Fab'片段转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺还原将Fab'-TNB衍生物之一转化为Fab'-硫醇,并与等摩尔量的另一种Fab'-TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可以用作选择性固定酶的试剂。

[0281] 最近的进展促进了从大肠杆菌中直接回收Fab'-SH片段,该片段可以化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby等人,J.Exp.Med.,175:217-225(1992)描述了完全人源化的双特异性抗体F(ab')<sub>2</sub>分子的产生。每个Fab'片段分别从大肠杆菌中分泌出来,并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。

[0282] 还已经描述了用于直接从重组细胞培养物中制备和分离双特异性抗体片段的各种技术。例如,已经使用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体。Kostelny等人,J.Immunol.,148

(5):1547-1553(1992)。通过基因融合,将来自Fos蛋白和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽连接至两种不同抗体的Fab'部分。抗体同源二聚体在铰链区还原形成单体,然后再氧化形成抗体同源二聚体。该方法也可以用于抗体同源二聚体的生产。Hollinger等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)描述的“双体抗体”技术已经提供了制备双特异性抗体片段的替代机制。片段包含通过接头连接至轻链可变结构域( $V_L$ )的重链可变结构域( $V_H$ ),该连接基太短以至于不允许同一条链上的两个结构域之间配对。因此,一个片段的 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域被迫与另一片段的互补的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。还已经报道了通过使用单链Fv(scFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994)。

[0283] 制备双特异性抗体片段的另一种技术是“双特异性T细胞衔接子”或BiTE®方法(参见,例如,W02004/106381、W02005/061547、W02007/042261和W02008/119567)。该方法利用排列在单个多肽上的两个抗体可变结构域。例如,单条多肽链包括两个单链Fv(scFv)片段,每个片段均具有被多肽连接基隔开的可变重链( $V_H$ )和可变轻链( $V_L$ )结构域,所述连接子的长度足以允许两个结构域之间的分子内缔合。该单个多肽还包括两个scFv片段之间的多肽间隔区序列。每个scFv识别不同的表位,并且这些表位可以对不同的细胞类型具有特异性,这样当每个scFv与其同源表位接合时,两种不同细胞类型的细胞会紧密接近或束缚在一起。该方法的一个特定实施例包括识别由免疫细胞,例如T细胞上的CD3多肽表达的细胞表面抗原的scFv,该scFv与另一个识别靶细胞,例如恶性或肿瘤细胞表达的细胞表面抗原的scFv连接。

[0284] 因为它是单个多肽,所以可以使用本领域已知的任何原核细胞表达系统表达双特异性T细胞衔接子。然而,可能需要特定的纯化技术(参见例如,EP1691833)以将单体双特异性T细胞衔接子与可能具有除单体的预期活性以外的生物活性的其他多聚体物质分离。在一个示例性的纯化方案中,首先将含有分泌的多肽的溶液进行金属亲和层析,并用咪唑浓度梯度洗脱多肽。使用阴离子交换色谱法将该洗脱液进一步纯化,并用氯化钠浓度梯度洗脱多肽。最后,将该洗脱液进行尺寸排阻色谱法以从多聚体物质中分离单体。

[0285] 宿主细胞的选择和转化

[0286] 双链蛋白质,例如全长抗体或半抗体、抗体融合蛋白、单臂抗体和抗体片段可在细菌中产生,尤其是在不需要糖基化和Fc效应子功能时,诸如当治疗性抗体与自身的细胞毒剂(例如,毒素)偶联时显示出对肿瘤细胞破坏的有效性。全长抗体在循环中具有更长的半衰期。在大肠杆菌中的生产速度更快且更具成本效益。关于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见,例如,美国专利号5,648,237(Carter等人)、美国专利号5,789,199(Joly等人)、美国专利号5,840,523(Simmons等人),这些专利描述了用于优化表达和分泌的翻译起始区(TIR)和信号序列。还可以参见Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo,ed.,Humana Press,Totowa,N.J.,2003),第245-254页,其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达。表达后,可以将抗体以可溶级分的形式从大肠杆菌细胞糊中分离出来,并可以根据同种型通过例如蛋白质A或G柱纯化。最终纯化可以类似于纯化例如在CHO细胞中表达的抗体的方法进行。

[0287] 用本公开的表达或克隆载体转化宿主细胞以产生双链蛋白质,并在常规营养培养基中培养,所述营养培养基经适当修饰以诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的

基因。

[0288] 培养宿主细胞

[0289] 本公开的宿主细胞可以在多种培养基中培养。如本文所用,“培养基”是指支持本公开的细菌的生长的任何组合物或肉汤。合适的培养基可以是液体或固体,并且包含任何支持细胞生长和生存能力的营养物质、盐、缓冲液、元素和其他化合物。培养基的常见营养物质可以包括氮、碳、氨基酸、碳水化合物、微量元素、维生素和矿物质。这些营养物可以作为单独的成分(如在定义的培养基中)或作为复合提取物(例如酵母提取物)的成分添加。培养基可以富含营养以支持快速生长,或者可以包含最少的营养以支持较慢的生长。培养基还可以包含用于抑制污染生物的生长或杀死污染生物的任何试剂(例如,抗生素)。培养基还可以包含用于控制诱导型启动子或酶的活性的任何化合物(作为一个实例,可包括IPTG以诱导由lac操纵子或功能相似的启动子控制的任何多核苷酸的表达)。合适的培养基的许多实例是本领域众所周知的,并且包括但不限于M9培养基、溶原性肉汤(LB)、极品肉汤(TB)、NZY肉汤、SOB培养基和YT肉汤。

[0290] 这些介质中的任何一种都可以根据需要补充盐(诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂(诸如HEPES)、核苷酸(诸如腺苷和胸苷)、抗生素、抗真菌剂、微量元素(定义为通常以微摩尔范围的最终浓度存在的无机化合物)、葡萄糖和/或适当的能源。在原核细胞培养基中发现的典型成分包括酵母提取物、盐(例如NaCl)、胰蛋白质、缓冲液(例如磷酸盐缓冲液)、甘油等。也可以以本领域技术人员已知的适当浓度包括任何其他必要的补充剂。培养条件诸如温度、pH值等,是先前与选择用于表达的原核宿主细胞一起使用的条件,对于普通技术人员而言是显而易见的。

[0291] 生物活性多肽的纯化

[0292] 本公开的某些方面涉及从宿主细胞回收生物活性多肽。通常回收(本文的术语“纯化(purifying/purification)”可以互换使用)本公开的生物活性多肽包括从宿主细胞(或如果将多肽排泄到培养基中,则为细胞培养基)中分离多肽,并从其他相关大分子,例如细胞碎片和其他多肽中纯化所述多肽。从多种宿主细胞区室中纯化多种蛋白质的多种技术是本领域已知的(参见例如Evans, Jr., TC和Xu MQ编辑, Heterologous Gene Expression in E. coli (2011) Methods in Molecular Biology Vol 705, Humana Press)。下面描述示例性技术,但是包括这些技术仅出于说明性目的,以补充对本领域技术人员的理解,并且绝不意味着对本公开的限制。

[0293] 当使用重组技术时,可以在胞质内、周质空间中或直接分泌到培养基中产生双链蛋白质,例如分泌蛋白质。如果分泌蛋白质在细胞内产生,则作为第一步,例如通过离心或超滤移除宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。

[0294] 在一些实施例中,所述分泌蛋白质是从所述宿主细胞的周质中回收的。Carter等人, Bio/Technology 10:163-167 (1992) 中描述了分离分泌到大肠杆菌周质间隙中的分泌蛋白质的方法。简而言之,将细胞糊状物在乙酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)的存在下解冻约30分钟。可以通过离心移除细胞碎片。在分泌蛋白质被分泌到培养基中的情况下,通常首先使用可商购的蛋白质浓缩过滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元,浓缩来自此类表达系统的上清液。蛋白酶抑制剂诸如PMSF可以包含在前述任何步骤中以抑制蛋白水解作用并且抗生素可以包含在内以防止外来污染物的生长。

[0295] 可以使用例如羟磷灰石层析、疏水相互作用色谱、凝胶电泳、透析和亲和层析纯化从细胞制备的分泌蛋白质组合物,其中亲和层析是通常优选的纯化步骤之一。关于抗体,蛋白质A作为亲和配体的适用性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的物质和同种型。蛋白质A可用于纯化基于人类 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark等人, J.Immunol.Meth.62:1-13(1983))。蛋白质G被推荐用于所有小鼠同种型和人类 $\gamma 3$ (Guss等人,EMBO J.5:15671575(1986))。亲和配体所附接的基质大多是琼脂糖,但也可以使用其他基质。机械稳定的基质,诸如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基),具有比琼脂糖更快的流速和更短的处理时间。当抗体包含 $C_H3$ 结构域时,Bakerbond ABX<sup>TM</sup>树脂(J.T.Baker, Phillipsburg,N.J.)可用于纯化。也可使用其他蛋白纯化技术诸如在离子交换柱上进行分级、乙醇沉淀、反相HPLC、硅胶色谱、肝素色谱、在阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上进行SEPHAROSE<sup>TM</sup>色谱、色谱聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀,取决于待回收的抗体。本领域技术人员将认识到,可用于抗体回收的许多这些技术可容易地应用于回收其他双链蛋白质,例如分泌蛋白质。

#### [0296] 实施例

[0297] 参考以下实例将更详细地理解本公开。然而,它们不应被解释为限制本公开的范围。应当理解,本文描述的实例和实施例仅用于说明目的,并且其各种修改或改变将被建议给本领域技术人员,并且将被包括在本申请的精神和界限内以及所附权利要求的范围内。

[0298] 实例1:用控制伴侣蛋白质DsbA、DsbC和FkpA表达的染色体整合的启动子工程化大肠杆菌菌株

[0299] 由质粒中过表达伴侣蛋白质DsbA、DsbC和FkpA可以改善细菌培养中基于抗体的产物的产生。但是,由质粒表达这些伴侣蛋白质有几个缺点。例如,这种方法需要发展和调节每种新产物的表达质粒。在某些情况下,大的质粒尺寸也会导致较低的产物滴度。另外,质粒通常以每个细胞10-15个拷贝存在,导致高水平的过表达,这可能需要下游纯化步骤从产物中去除伴侣蛋白质(例如,FkpA)。在某些情况下,一种或多种伴侣蛋白质的较低表达水平可以达到相同的产物滴度。

[0300] 在这里,将大肠杆菌基因组中dsbA、dsbC和fkpA的天然启动子与非天然组合中的启动子phoA、tac和CP25交换,以产生染色体过表达伴侣蛋白质的工程化菌株。研究了这些菌株用于产生两个半抗体(抗IL13半抗体,在本文中称为“xIL13”和AF2)、单臂抗体(MetMab)和抗体Fab片段(抗VEGF抗体片段)。

#### [0301] 方法

#### [0302] 载体构造

[0303] 如W02016073791中所述(参见例如,第278和279、281-284、285-288段),构建表达伴侣蛋白质和xIL13(MD157)或AF2(MD341)的载体。

#### [0304] 菌株工程化

[0305] 将phoA(参见Wanner B.L.(1990) Colloquium Mosbach, Mol.Basis Bact.Metab.P.41)、tac(参见de Boer H.A.等人,(1983) PNAS 80,P.21-5)和CP25(参见Jensen P.R.和Hammer K.(1998) Appl.Environ.Microbiol.64,P.82-87)启动子整合到大肠杆菌基因组中,以置换dsbA、dsbC和fkpA的天然启动子。这些启动子修饰通过等位基因交换进行(参见例如,Bass,S.等人,(1996) J.Bacteriol.178:1154-1161and Innes,D.等人,

(2001)Microbiology 147:1887-1896)。

[0306] 简而言之,使用NEBuilder®HiFi DNA Assembly Master Mix(Gibson Assembly)构建基于pS1080的自杀载体,以包括目标启动子,每侧接有500个碱基对的与大肠杆菌基因组中所需的插入区域相匹配的同源序列。在进行测序以确认后,使用噬菌体M13和P1用质粒序列感染菌株48C8,并将导入的序列转导至目标菌株(参见例如,Nakashima,N.和Miyazaki,K.,(2014)Int.J.Mol.Sci.15:2773-2793)。取自源质粒中的启动子置换伴侣蛋白质上游的基因间区域。这导致大肠杆菌基因组内的dsbA、dsbC和fkpA的天然启动子被来自pS1080自杀载体的phoA、tac和/或CP25启动子置换。还对lacI基因进行了修饰,以进一步增强tac启动子的表达。产生所得菌株的小瓶批次料,并将其储存在-80℃。

[0307] 摇瓶培养和发酵过程

[0308] 在标准摇瓶培养物(Sh.F1.)和10升发酵液(10L)中培养工程化菌株(参见表B)。如W02016073791(参见,例如,第289-292段)中所述进行10升发酵。仅包含从其天然启动子表达的伴侣蛋白质的菌株67A6和64B4被用作阴性对照(即,Sh.F1.(-)和Ambr(-))。对于阳性对照,这些菌株用表达DsbA、DsbC和FkpA的质粒转化(参见表A)(即Sh.F1.(+)、Ambr(+)和10L(+))。

[0309] 电泳、蛋白质印迹法和HPLC分析

[0310] 通过蛋白质印迹法测量DsbA、DsbC和FkpA的相对浓度,通过反相HPLC测量xIL13、AF2、MetMab和抗VEGF抗体片段的浓度。如W02016073791(参见例如,第293-299段)中所述进行电泳、蛋白质印迹法和HPLC分析方法。

[0311] 结果

[0312] 构建用于在大肠杆菌中过表达基于抗体的产物xIL13、AF2、MetMab和抗VEGF抗体片段的载体。表达xIL13的载体的代表性质粒图谱显示在图1中。每个载体均包含编码xIL13、AF2、MetMab和抗VEGF抗体片段的基因,以及(1)无伴侣蛋白质基因(例如,图1,右),或(2)与dsbA、dsbC和fkpA的组合(例如,图1,左),如下表A所详述。当评估工程化菌株中的蛋白质表达时,包含这些载体的菌株可以用作阳性对照。

[0313] 表A.用于菌株评估的载体。

| 抗体产物<br>表达   | 没有伴侣<br>蛋白质基因<br>的质粒 | 包含伴侣蛋白质基因的质粒    |              |              |             |
|--------------|----------------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|
|              |                      | 名称              | dsbA 启<br>动子 | dsbC 启<br>动子 | fkpA 启动子    |
| [0314] xIL13 | CS392                | MD157           | <i>tac</i>   | <i>tac</i>   | <i>phoA</i> |
| AF2          | ERD046               | MD341           | <i>tac</i>   | <i>tac</i>   | <i>phoA</i> |
| MetMab       | p186                 | pOA5D<br>5.3630 | <i>tac</i>   | <i>tac</i>   | -           |
| 抗 VEGF       | HSK117               | HSK117          | -            | -            | -           |

[0315] -表示缺少指示的伴侣蛋白质基因。

[0316] 另外,通过用tac、phoA和CP25启动子交换大肠杆菌基因组中这些伴侣蛋白质的天然启动子,构建了十七种菌株用于过表达周质伴侣蛋白质DsbC、DsbA和FkpA中的一种或多种。通过删除lacI( $\Delta$ lacI和 $\Delta$ lacI::kan),插入lacI(lacI<sup>+</sup>或lacI<sup>WT</sup>)的野生型拷贝(lacI<sup>+</sup>或lad<sup>Wt</sup>)或完整保留亲本菌株的原始lacI<sup>0</sup>突变,还对菌株的lacI背景进行了工程

化,以进一步增强tac启动子的表达。lacI基因产物抑制tac启动子的表达,因此lacI缺失导致tac启动子的更高表达。lacI<sup>Q</sup>突变导致lacI转录水平增加,从而导致tac启动子的抑制增强(参见Calos (1978),《自然》(Nature),第274期,第762-765页)。另外,tac启动子可以用IPTG诱导。表B列出了工程化菌株,表明除了lacI基因修饰外的工程化启动子修饰。

[0317] 表B. 为DsbC、DsbA和FkpA的染色体表达而构建的菌株。

| 编号/位置 | 启动子-dsbC | 启动子-dsbA | 启动子-fkpA | lacI背景 <sup>a</sup> |
|-------|----------|----------|----------|---------------------|
| 69A2  | tac      | -        | -        | -                   |
| 69B1  | phoA     | -        | -        | -                   |
| 69B2  | -        | phoA     | -        | -                   |
| 69B3  | -        | -        | phoA     | -                   |
| 69C6  | -        | CP25     | -        | -                   |
| 69C7  | -        | -        | CP25     | -                   |
| 69C9  | tac      | tac      | phoA     | -                   |
| 69D4  | tac      | tac      | phoA     | $\Delta$ lacI::kan  |
| 69D5  | tac      |          |          | $\Delta$ lacI       |
| 69D6  | -        | tac      | -        | $\Delta$ lacI       |
| 69D7  | -        | -        | tac      | $\Delta$ lacI       |
| 69D9  | tac      | tac      | phoA     | lacI <sup>+</sup>   |
| 69E1  | phoA     |          | CP25     | -                   |
| 69E3  | -        | -        | tac      | lacI <sup>+</sup>   |
| 69F4  | tac      | tac      | CP25     | $\Delta$ lacI::kan  |
| 69F8  | phoA     |          | phoA     | -                   |

[0319] -破折号表示未修饰天然启动子序列。

[0320] <sup>a</sup>亲本菌株(67A6)的基因型具有lacI<sup>Q</sup>突变。

[0321] 实例2:染色体整合的启动子的控制下FkpA的过表达

[0322] 与携带表达FkpA的质粒的菌株相比,在如用过表达天然FkpA的整合启动子的实例1所述工程化的菌株中比较FkpA的过表达。

[0323] 为了评估FkpA在染色体过表达的能力,根据实例1的方法将FkpA的天然启动子与tac、phoA或CP25启动子交换。还对lacI启动子进行修饰以进一步增强tac启动子的强度。菌株在10升发酵中生长,并通过蛋白质印迹法评估FkpA的产生。

[0324] 由CP25启动子驱动的染色体表达显示最高水平的FkpA表达,随后是由phoA启动子驱动的表达(图2)。如所预期的,tac启动子显示最低水平的FkpA表达,在 $\Delta$  lacI背景中比在lacI WT背景中具有更高的FkpA表达。

[0325] 因而,与通过使用质粒表达的fkpA基因座的单水平高表达相比,通过染色体工程化产生一系列的FkpA表达。这些结果表明,FkpA的表达可以通过染色体过表达来控制 and 增强。

[0326] 实例3:摇瓶培养中在tac、phoA和CP25启动子的控制下伴侣蛋白质的染色体表达

[0327] 为了评估在具有DsbA、DsbC和FkpA的启动子修饰的菌株中伴侣蛋白质的表达,使培养物在摇瓶中生长,并使用蛋白质印迹法测量这些伴侣蛋白质的表达。

[0328] 观察到一定范围的表达水平(图3A至图3C)。对于DsbA,CP25启动子的表达最强,超过在阳性对照(Sh.F1.(+)和10L(+);质粒的DsbA表达)中看到的表达水平(图3A)。次最高的DsbA水平由phoA产生,随后为tac,并且tac启动子的IPTG诱导如预期的那样提高了DsbA的表达水平。单独来自tac启动子的表达低于阴性对照(Sh.F1.(-),无外源伴侣蛋白质表达)可能是由于该菌株的抑制lacI<sup>Q</sup>背景所致。类似地,与tac启动子相比,phoA启动子的DsbC表达更高,tac启动子的IPTG诱导导致DsbC表达增加(图3B)。单独来自tac启动子的DsbC表达也低于阴性对照(Sh.F1.(-))。

[0329] 有趣的是,当与DsbA和DsbC表达结果相比时,在工程化菌株中FkpA表达略有不同(图3C)。phoA启动子驱动FkpA的最高表达,然后是来自CP25启动子的表达。与DsbA和DsbC一样,tac启动子驱动最低的表达水平。通常,与天然水平(Sh.(-))相比,FkpA的表达水平高得多。F1.这意味着与天然DsbA和DsbC启动子相比,天然FkpA启动子是较弱的启动子。

[0330] 总之,这些结果表明,三种伴侣蛋白质DsbA、DsbC和FkpA的表达都可以通过染色体过表达而得到类似的控制和增强。

[0331] 实例4:ambr250发酵培养中在tac、phoA和CP25启动子的控制下伴侣蛋白质的染色体表达

[0332] 为了测试伴侣蛋白质的染色体过表达是否可以从摇瓶培养转化为更大的发酵培养,根据实例1中的方法使工程化菌株在ambr250高细胞密度发酵中生长,并通过蛋白质印迹法测量伴侣蛋白质的表达。

[0333] 与摇瓶培养一样,观察到一定范围的表达水平(图4A至图4C)。对于DsbA和DsbC,仅测试了具有不同lacI背景的tac启动子。对于DsbA和DsbC,如在摇瓶培养中所见,具有lacI<sup>Q</sup>背景的tac启动子产生最低水平的表达,而具有lacI WT背景的IPTG诱导的tac启动子具有最高表达(图4A和图4B)。与摇瓶中的FkpA表达不同,与phoA和tac启动子相比,CP25启动子在ambr250生物反应器中具有最高的FkpA表达(图4C)。

[0334] 总之,这些数据表明染色体表达的伴侣蛋白质的表达模式可以成功地从摇瓶放大到10L高细胞密度发酵过程。

[0335] 实例5:xIL13half抗体在工程化菌株中的表达

[0336] 测试了宿主菌株中伴侣蛋白质的过表达(参见表B)对半抗体xIL13产生的影响。

[0337] 用表达xIL13的质粒CS392转化宿主菌株。用质粒MD157转化不包含染色体过度表达的伴侣蛋白质的宿主菌株67A6,所述质粒表达xIL13以及DsbA、DsbC和FkpA(图1)。67A6/MD157用作阳性对照。如实例1中所述,所有菌株在10L发酵中生长,并通过反相HPLC滴度测定法评估xIL13的产生。

[0338] 与从质粒表达xIL13的阳性对照相比,前三个xIL13产生菌株(69E1、69F8和69F4)产生更大或相等的xIL13滴度(图5)。来自菌株69E1的最高表达包含分别由phoA和CP25启动子驱动的DsbC和FkpA。这些结果还表明,xIL13滴度不显著受DsbA表达的影响。

[0339] 因此,如在三个工程化菌株69E1、69F8和69F4中的染色体工程可以用作在质粒上共表达伴侣蛋白质与xIL13的替代方案,从而产生等效的xIL13滴度。

[0340] 实例6:伴侣蛋白质和xIL13半抗体在工程化菌株69E1、69F4和69F8中的表达

[0341] 为了进一步研究菌株69E1、69F4和69F8在基于抗体的产物产生中的用途,在72小时的过程中对这些菌株的xIL13和伴侣蛋白质表达进行了更密切的评估。如实例1和实例5

中所述,用质粒CS392转化实例5中所述的三种工程化菌株以表达xIL13。如实例1中所述,用质粒MD157作为阳性对照转化菌株67A6,以表达xIL13和伴侣蛋白质。如实例1中所述,所有菌株在10L发酵中生长,并通过反相HPLC滴度测定法评估xIL13的浓度。

[0342] 在发酵期间,测量光密度(图6A)和重量克分子渗透压浓度(图6B)。在实验菌株和质粒对照菌株之间没有观察到显著差异。

[0343] 对于所有三个实验菌株,xIL13表达类似于或略高于阳性对照,其中菌株69E1和69F8在72小时具有最高表达水平(图7A)。与大多数发酵的对照过程相比,工程化菌株发酵中的DsbC水平较低(图7B)。这是可以预料的,因为基于质粒的过程比从染色体表达伴侣蛋白质的过程具有更高的拷贝数。69E1和69F8菌株发酵之间的DsbC水平相似,这是可以预期的,因为两者都使用phoA启动子进行表达。有趣的是,该水平与发酵结束时的质粒表达水平相似。DsbC在69E1和69F8菌株中由phoA启动子表达,因此在发酵的最初阶段水平较低,因为由于磷酸盐的存在,直到发酵开始18小时才诱导启动子。磷酸盐在约18小时被完全消耗,此后启动子被完全诱导,导致更多的DsbC表达。与69E1和69F8菌株发酵相比,69F4发酵中的DsbC水平最初较高,因为69F4使用泄漏型tac启动子,并且与培养基中的磷酸盐水平无关。这些结果还表明,与tac启动子相比,phoA启动子是更强的启动子,类似于摇瓶培养中获得的表达结果。

[0344] 菌株69E1和69F4在CP25启动子下表达FkpA,而69F8在phoA启动子下表达FkpA。强组成型CP25启动子产生与质粒水平相当的高水平的FkpA(其中FkpA在phoA启动子之下;图7C)。与基于质粒的过程相比,69F8菌株的FkpA积累水平较低,这可能是由于拷贝数差异(质粒约为15,染色体为1),尽管这两种情况均使用phoA启动子来驱动FkpA表达。然而,基于阶段I质粒的过程之间和69F8菌株过程中的滴度相似(图7A),表明可能不需要另外的FkpA。由于纯化发展上的负担以降低最终池中的FkpA水平,因此降低的FkpA水平和实现高滴度的能力可被视为菌株69F8用于xIL13过程的优势。

[0345] 这些数据表明,与质粒对照相比,xIL13的表达不一定需要高水平的DsbC和FkpA。即使菌株通常表达较低水平的伴侣蛋白质(尽管该特征是有利的,因为它消除了进一步纯化去除FkpA的需要),也可以从所有三个菌株中产生相同或更高滴度的xIL13。

[0346] 实例7:AF2半抗体在工程化菌株69E1、69F4和69F8中的表达

[0347] 评估了菌株69E1、69F4和69F8产生半抗体AF2的能力。如实例1中所述,用质粒ERD046转化69E1、69F4和69F8菌株以表达AF2,并用质粒MD341转化菌株67A6作为阳性对照以表达AF2和伴侣蛋白质。如实例1中所述,使菌株在10L发酵中生长,并在72小时的过程中在不同的时间点评估AF2的浓度。

[0348] 在发酵期间,测量光密度(图8A)和重量克分子渗透压浓度(图8B)。在实验菌株和质粒对照菌株之间没有观察到显著差异。AF2的表达在菌株69E1中最高,超过在质粒对照中看到的滴度(图9)。与对照相比,菌株69F4和69F8具有稍低但相当的AF2滴度。

[0349] 这些数据表明,在产生AF2时,所有三种菌株,特别是菌株69E1,都可以用作在质粒上表达伴侣蛋白质的替代品。

[0350] 实例8:MetMAb单臂抗体在工程化菌株69E1、69F4和69F8中的表达

[0351] 评估菌株69E1、69F4和69F8产生单臂抗体MetMAb的能力。如实例1中所述,用质粒p186转化这三个菌株以表达MetMAb,并用质粒p0A5D5.3630转化菌株64B4作为阳性对照以

表达MetMAb和伴侣蛋白质。如实例1中所述,使菌株在10L发酵中生长,并在72小时的过程中在不同的时间点评估MetMAb的浓度。

[0352] 在发酵期间,测量光密度(图10A)和重量克分子渗透压浓度(图10B)。在实验菌株和质粒对照菌株之间没有观察到显著差异。

[0353] 在对照过程中,由质粒表达DsbA和DsbC,并且不使用FkpA。当与对照过程相比时,使用所有三种菌株的发酵具有相当或更高的滴度(图11)。与对照过程相比,使用69E1菌株的发酵的滴度大约增加2倍。出乎意料的是,使用69F4菌株的发酵未积累与69E1菌株相似的滴度。不希望受理论的束缚,这可能是由于与69E1菌株中的phoA启动子(更强的启动子)相比,该菌株中tac启动子下表达的DsbC处于次优水平。使用69E8菌株发酵的滴度与对照过程相似。不希望受到理论的束缚,这可能是由于FkpA的次优水平。

[0354] 实例9:在工程化菌株69E1中抗VEGF抗体片段的表达

[0355] 评估了菌株69E1产生抗VEGF Fab片段的能力。如实例1中所述,用质粒HSK117转化菌株69E1和对照菌株67A6以表达抗VEGF抗体片段。如实例1中所述,使菌株在10L发酵中生长,并在72小时的过程中在不同的时间点评估抗VEGF抗体片段的浓度。

[0356] 在发酵期间,测量光密度(图12A)和重量克分子渗透压浓度(图12B)。菌株69E1在72小时时显示出比对照稍高的光密度(图12A)。在测试的所有时间点,菌株69E1中抗VEGF抗体片段的表达也超过质粒对照的表达(图13)。

[0357] 这些数据表明,与使用基于质粒的伴侣蛋白质过表达的菌株相比,具有染色体伴侣蛋白质过表达的菌株可用于产生更高滴度的抗VEGF抗体片段。

[0358] 总之,实例5至实例9的结果表明,伴侣蛋白质的染色体过表达具有产生与基于质粒的伴侣蛋白质表达相当的滴度的潜力。测试了几种分子形式,包括双特异性半抗体xIL13和AF2、单臂抗体MetMAb和抗VEGF Fab片段。与对照过程相比,使用三种工程化菌株69E1、68F8和69F4的发酵具有相当或更高的滴度,其中几乎没有或没有另外的过程发展。此外,由于在一项案例研究中,除了在一个案例中的对照(针对具有69F8宿主的AF2)以外,没有进行另外开发,因此有可能在逐个分子的基础上进行进一步的过程发展,以进一步驱动滴度超过这里观察到的水平。除了获得高滴度外,这些菌株还提供了一种快速简便的方法来评估伴侣蛋白质的表达,而无需另外的质粒克隆工作。在一些情况下(例如,xIL13过程中的69F8菌株),以较低的水平获得相似的滴度,这对于下游纯化是期望的,因为不需要另外的柱纯化来清除FkpA。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 豪夫迈·罗氏有限公司
- [0003] <120> 在原核宿主细胞中产生双链蛋白质的方法
- [0004] <130> 14639-20440.40
- [0005] <140> 尚未分配
- [0006] <141> 同时附上
- [0007] <150> US 62/755,915
- [0008] <151> 2018-11-05
- [0009] <160> 10
- [0010] <170> 用于 Windows 的 FastSEQ,4.0 版
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 132
- [0013] <212> PRT
- [0014] <213> 人工序列
- [0015] <220>
- [0016] <223> 合成构建体
- [0017] <400> 1
- [0018] Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
- [0019] 1                   5                   10                   15
- [0020] Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu
- [0021]                   20                   25                   30
- [0022] Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys
- [0023]                   35                   40                   45
- [0024] Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys
- [0025]                   50                   55                   60
- [0026] Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu
- [0027] 65                   70                   75                   80
- [0028] Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
- [0029]                   85                   90                   95
- [0030] Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
- [0031]                   100                   105                   110
- [0032] Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
- [0033]                   115                   120                   125
- [0034] Gly Arg Phe Asn
- [0035]                   130
- [0036] <210> 2
- [0037] <211> 114
- [0038] <212> PRT

|        |   |       |
|--------|---|-------|
| [0039] | <213>   | 人工序列  |
| [0040] | <220>   |       |
| [0041] | <223>   | 合成构建体 |
| [0042] | <400>   | 2     |
| [0043] | Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu |       |
| [0044] | 1 5 10 15   |       |
| [0045] | Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly |       |
| [0046] | 20 25 30  |       |
| [0047] | Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala |       |
| [0048] | 35 40 45  |       |
| [0049] | Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr |       |
| [0050] | 50 55 60  |       |
| [0051] | Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln |       |
| [0052] | 65 70 75 80   |       |
| [0053] | Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe |       |
| [0054] | 85 90 95  |       |
| [0055] | Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg |       |
| [0056] | 100 105 110   |       |
| [0057] | Phe Asn   |       |
| [0058] | <210>   | 3     |
| [0059] | <211>   | 118   |
| [0060] | <212>   | PRT   |
| [0061] | <213>   | 人工序列  |
| [0062] | <220>   |       |
| [0063] | <223>   | 合成构建体 |
| [0064] | <400>   | 3     |
| [0065] | Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln |       |
| [0066] | 1 5 10 15   |       |
| [0067] | Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr |       |
| [0068] | 20 25 30  |       |
| [0069] | Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu |       |
| [0070] | 35 40 45  |       |
| [0071] | Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys |       |
| [0072] | 50 55 60  |       |
| [0073] | Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu |       |
| [0074] | 65 70 75 80   |       |
| [0075] | Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala |       |
| [0076] | 85 90 95  |       |
| [0077] | Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser |       |

|        |   |     |     |
|--------|---|-----|-----|
| [0078] | 100   | 105 | 110 |
| [0079] | Leu Val Thr Val Ser Ser   |     |     |
| [0080] | 115   |     |     |
| [0081] | <210> 4   |     |     |
| [0082] | <211> 112   |     |     |
| [0083] | <212> PRT   |     |     |
| [0084] | <213> 人工序列  |     |     |
| [0085] | <220>   |     |     |
| [0086] | <223> 合成构建体   |     |     |
| [0087] | <400> 4   |     |     |
| [0088] | Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly |     |     |
| [0089] | 1 5 10 15   |     |     |
| [0090] | Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr |     |     |
| [0091] | 20 25 30  |     |     |
| [0092] | Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro |     |     |
| [0093] | 35 40 45  |     |     |
| [0094] | Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp |     |     |
| [0095] | 50 55 60  |     |     |
| [0096] | Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser |     |     |
| [0097] | 65 70 75 80   |     |     |
| [0098] | Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn |     |     |
| [0099] | 85 90 95  |     |     |
| [0100] | Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg |     |     |
| [0101] | 100 105 110   |     |     |
| [0102] | <210> 5   |     |     |
| [0103] | <211> 5   |     |     |
| [0104] | <212> PRT   |     |     |
| [0105] | <213> 人工序列  |     |     |
| [0106] | <220>   |     |     |
| [0107] | <223> 合成构建体   |     |     |
| [0108] | <400> 5   |     |     |
| [0109] | Ala Tyr Ser Val Asn   |     |     |
| [0110] | 1 5   |     |     |
| [0111] | <210> 6   |     |     |
| [0112] | <211> 16  |     |     |
| [0113] | <212> PRT   |     |     |
| [0114] | <213> 人工序列  |     |     |
| [0115] | <220>   |     |     |
| [0116] | <223> 合成构建体   |     |     |

|        |             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|--------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| [0117] | <400> 6     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0118] | Met         | Ile | Trp | Gly | Asp | Gly | Lys | Ile | Val | Tyr | Asn | Ser | Ala | Leu | Lys | Ser |  |  |  |  |
| [0119] | 1           |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |  |  |  |
| [0120] | <210> 7     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0121] | <211> 10    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0122] | <212> PRT   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0123] | <213> 人工序列  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0124] | <220>       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0125] | <223> 合成构建体 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0126] | <400> 7     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0127] | Asp         | Gly | Tyr | Tyr | Pro | Tyr | Ala | Met | Asp | Asn |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0128] | 1           |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0129] | <210> 8     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0130] | <211> 15    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0131] | <212> PRT   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0132] | <213> 人工序列  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0133] | <220>       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0134] | <223> 合成构建体 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0135] | <400> 8     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0136] | Arg         | Ala | Ser | Lys | Ser | Val | Asp | Ser | Tyr | Gly | Asn | Ser | Phe | Met | His |     |  |  |  |  |
| [0137] | 1           |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |  |  |  |
| [0138] | <210> 9     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0139] | <211> 7     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0140] | <212> PRT   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0141] | <213> 人工序列  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0142] | <220>       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0143] | <223> 合成构建体 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0144] | <400> 9     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0145] | Leu         | Ala | Ser | Asn | Leu | Glu | Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0146] | 1           |     |     |     | 5   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0147] | <210> 10    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0148] | <211> 9     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0149] | <212> PRT   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0150] | <213> 人工序列  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0151] | <220>       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0152] | <223> 合成构建体 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0153] | <400> 10    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0154] | Gln         | Gln | Asn | Asn | Glu | Asp | Pro | Arg | Thr |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| [0155] | 1           |     |     |     | 5   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |

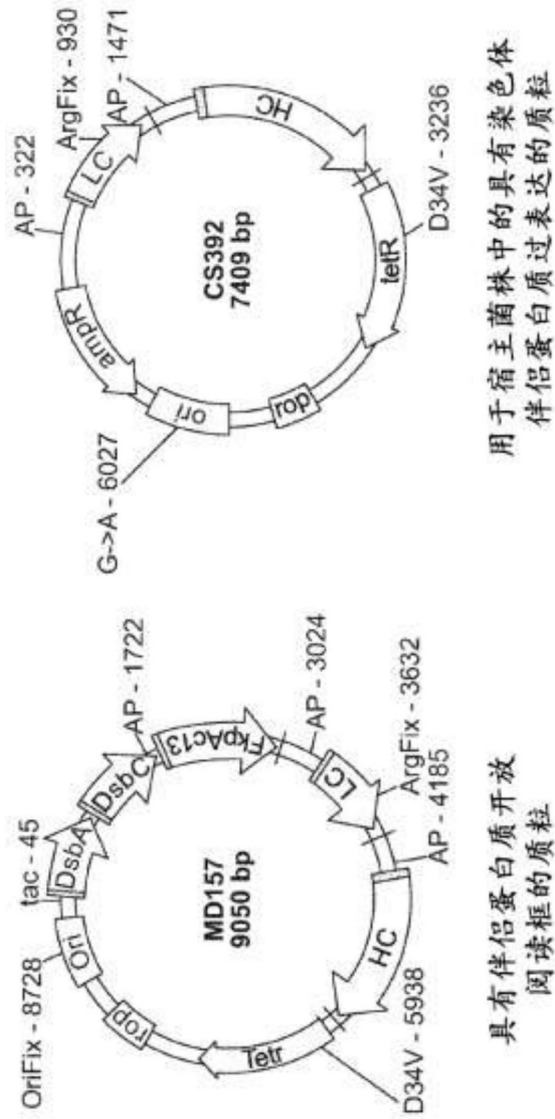


图1

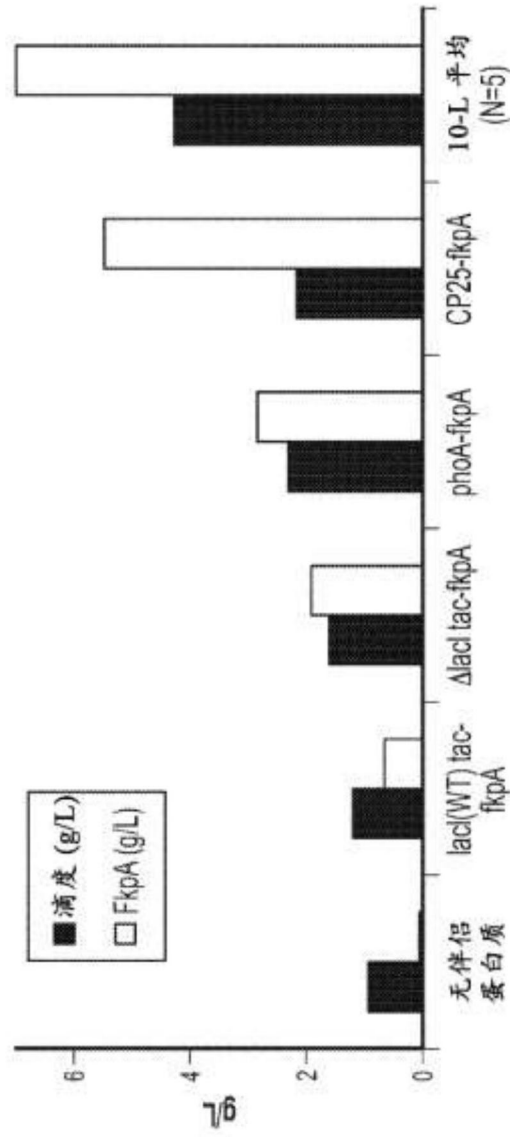


图2

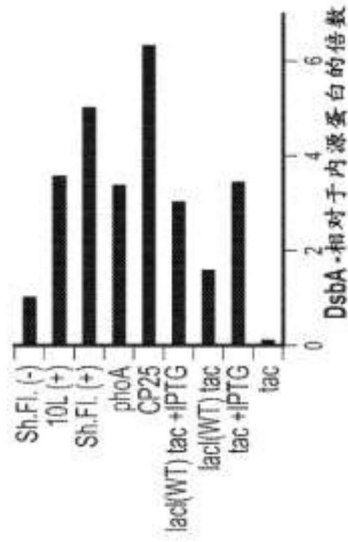


图3A

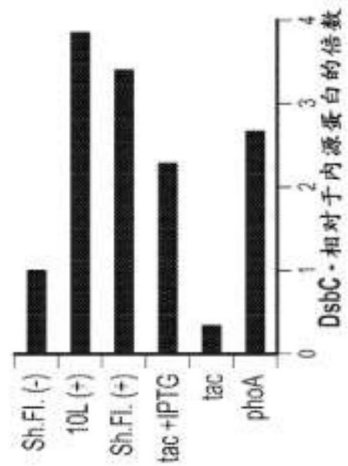


图3B

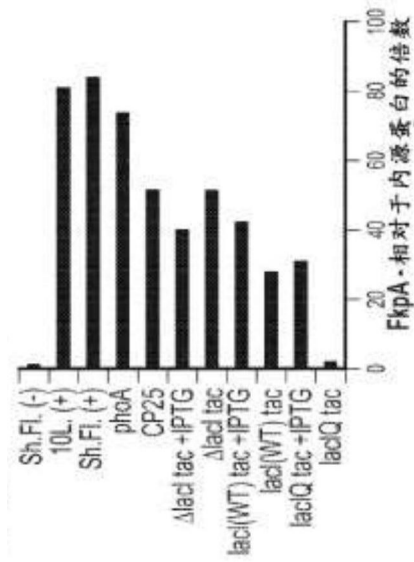


图3C

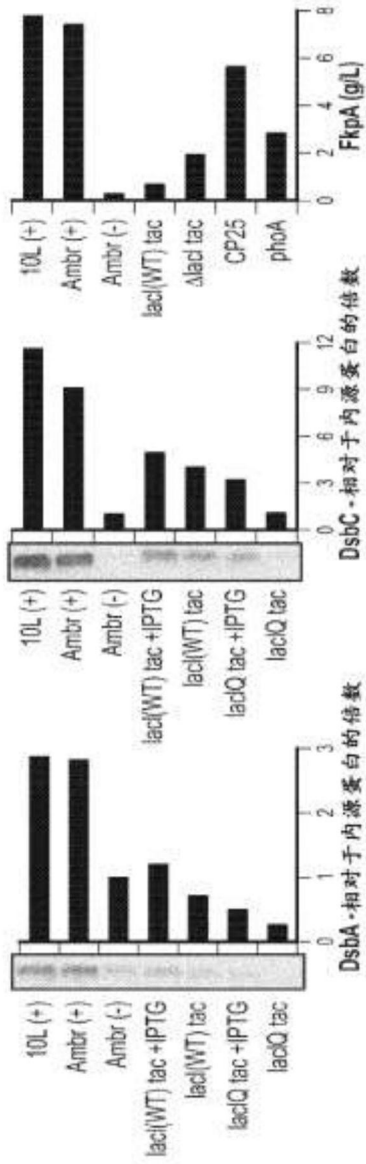


图 4A

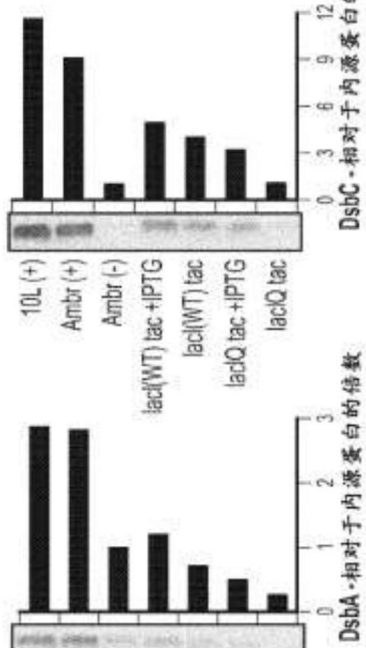


图 4B

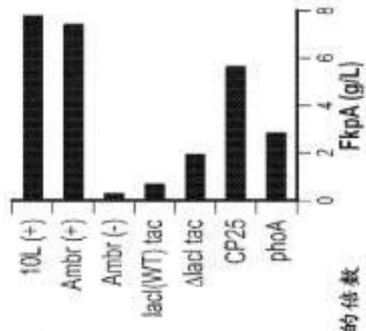


图 4C

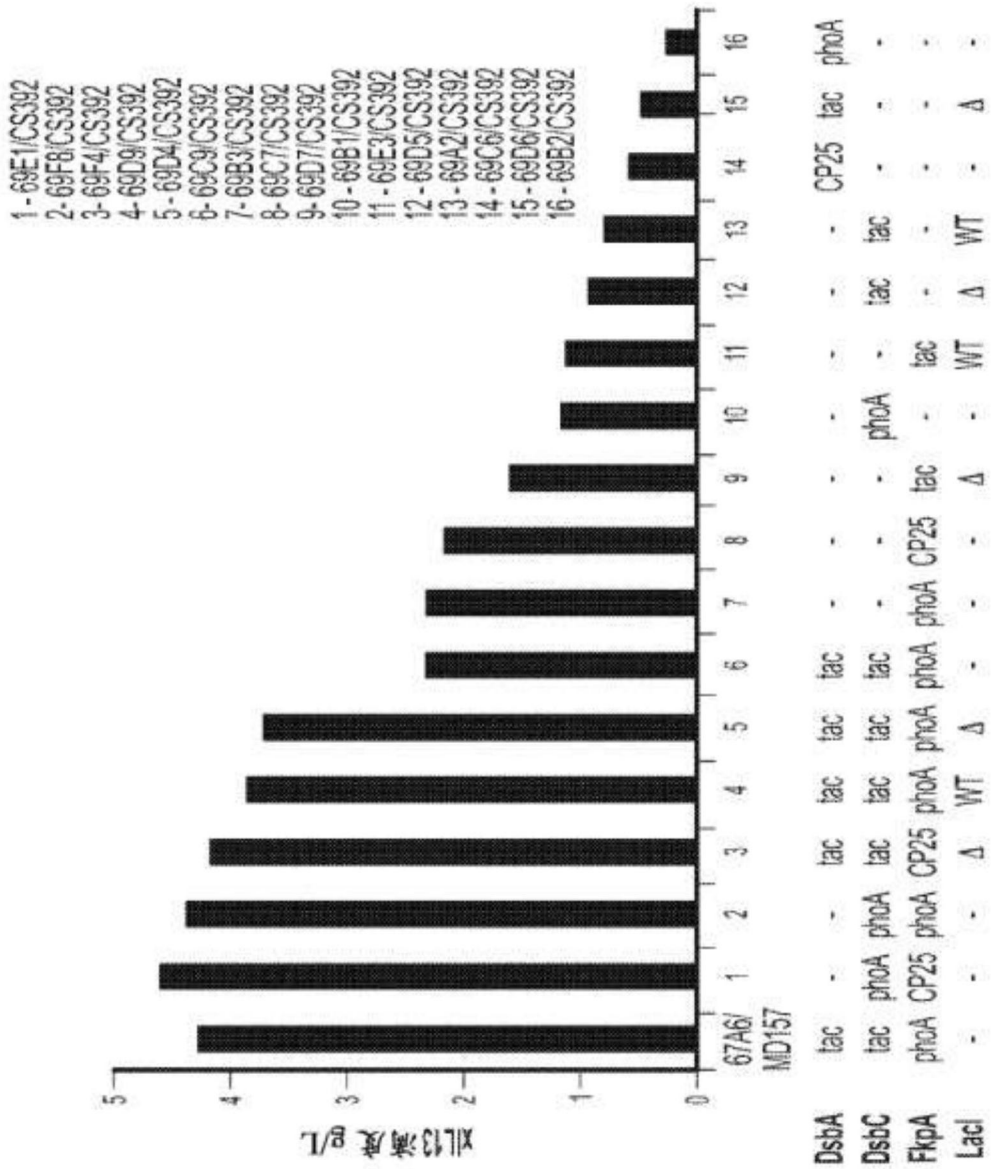


图5

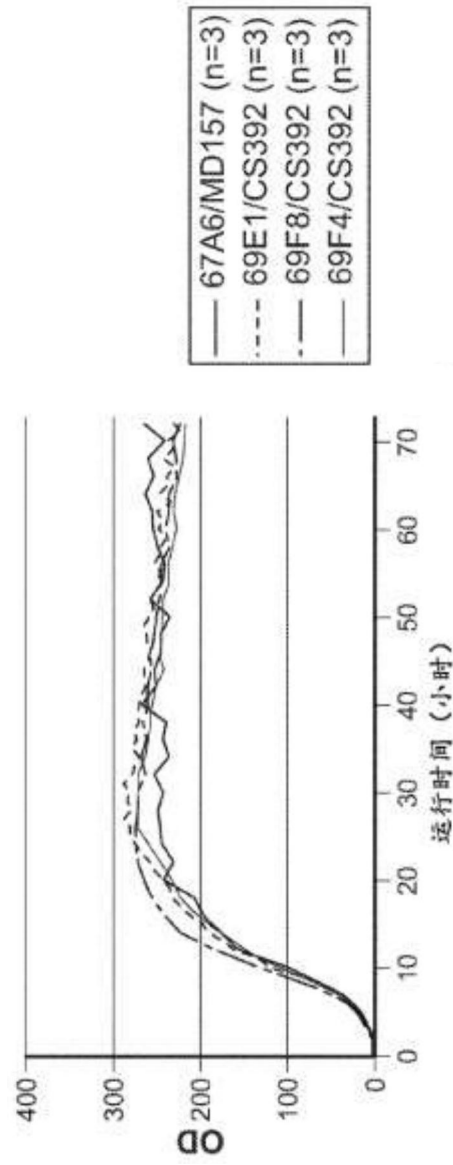


图6A

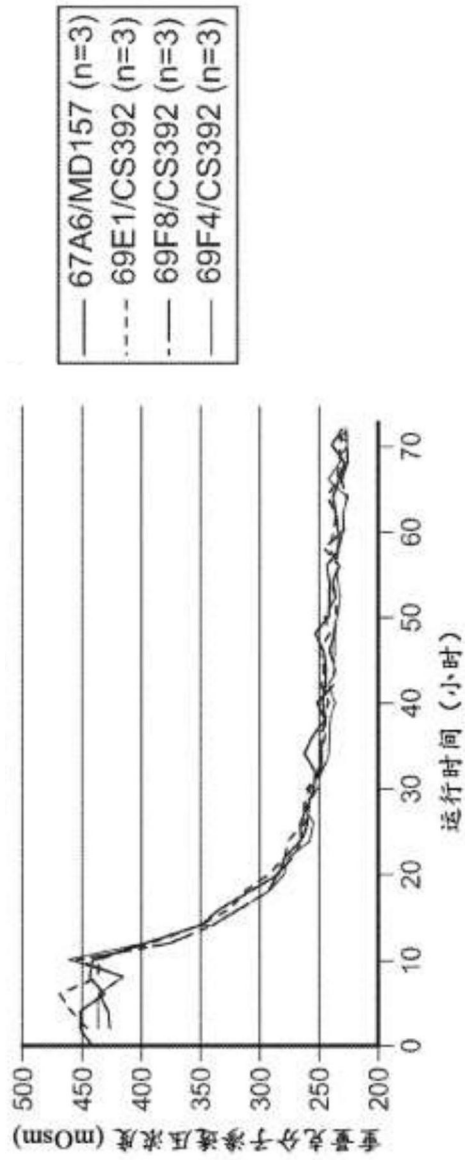


图6B

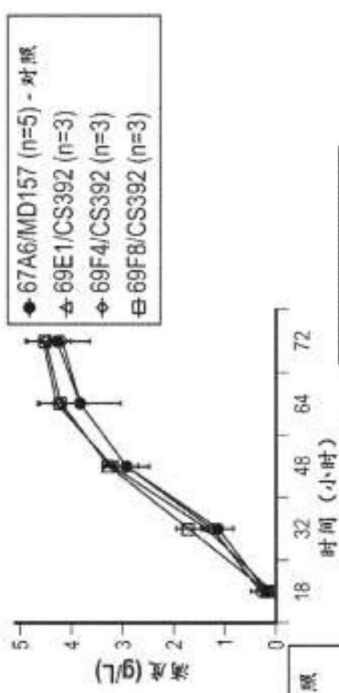


图 7A

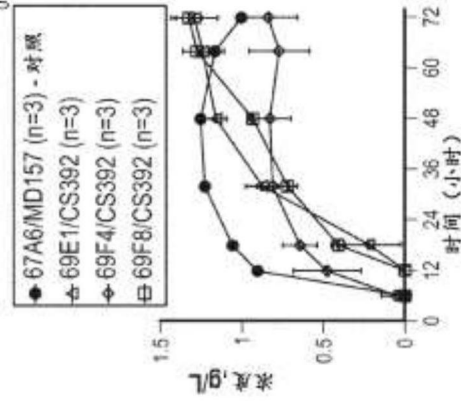


图 7B

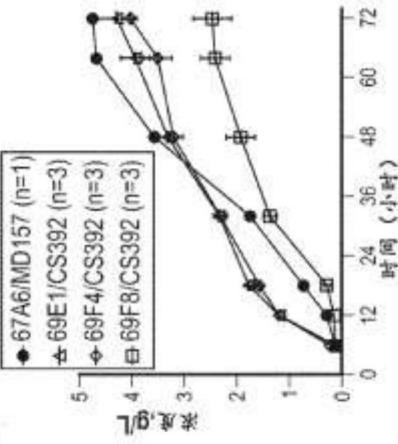


图 7C

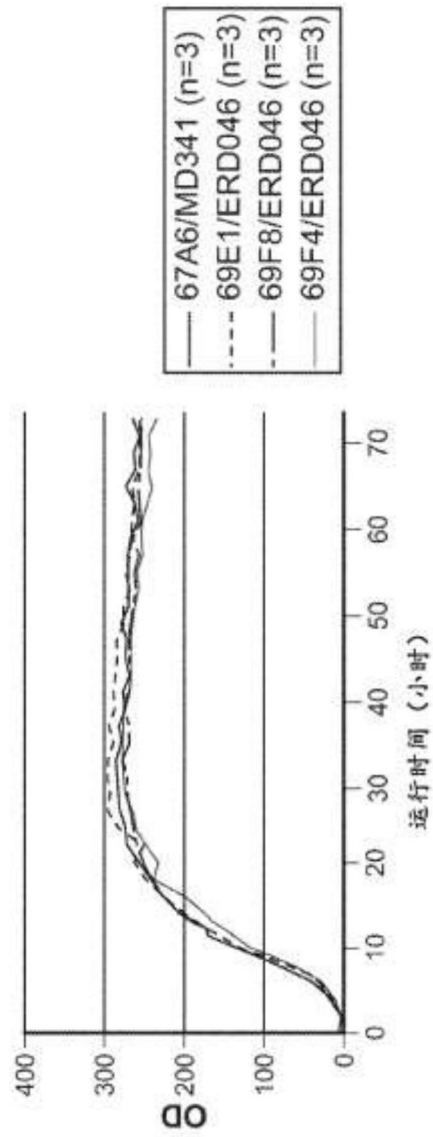


图8A

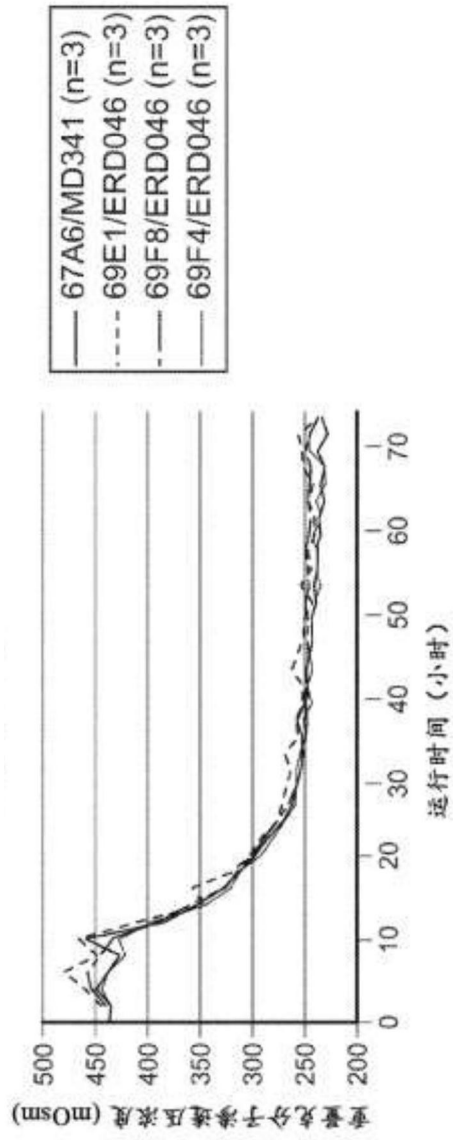


图8B

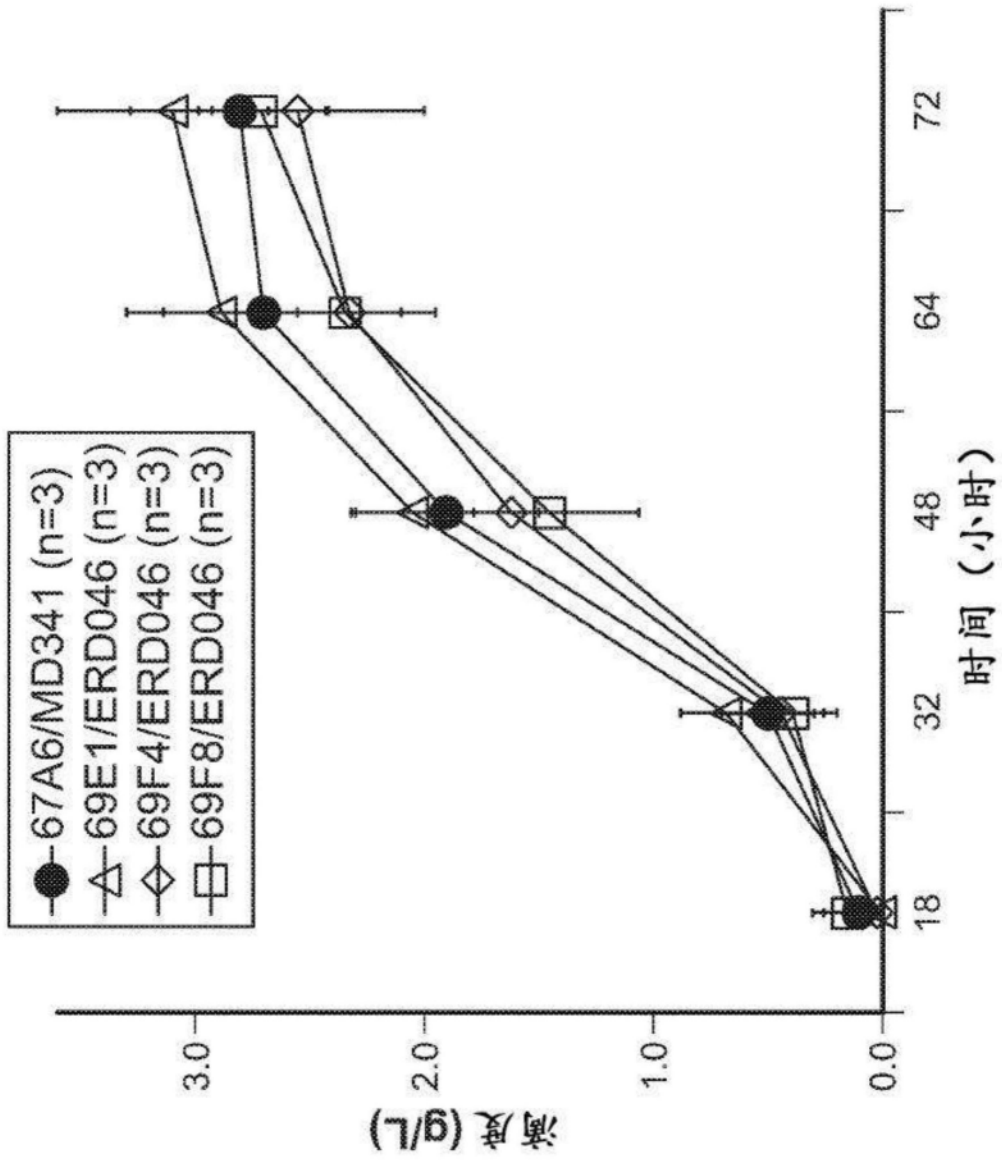


图9

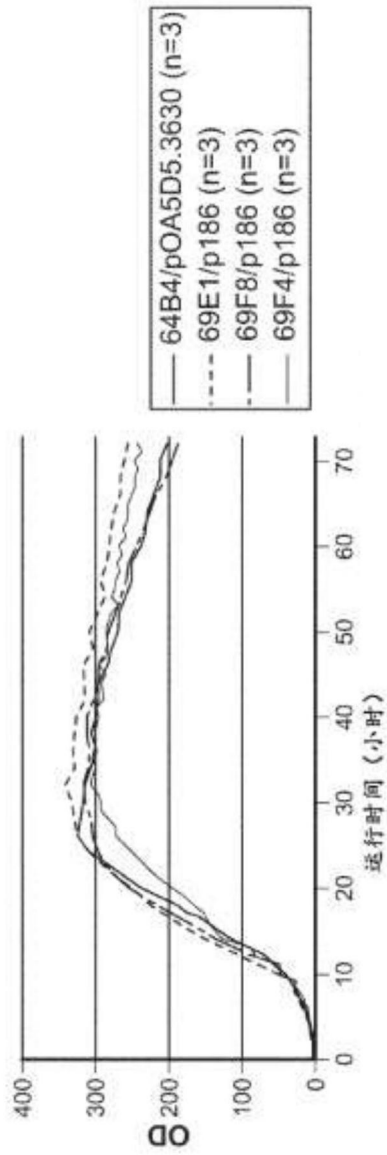


图10A

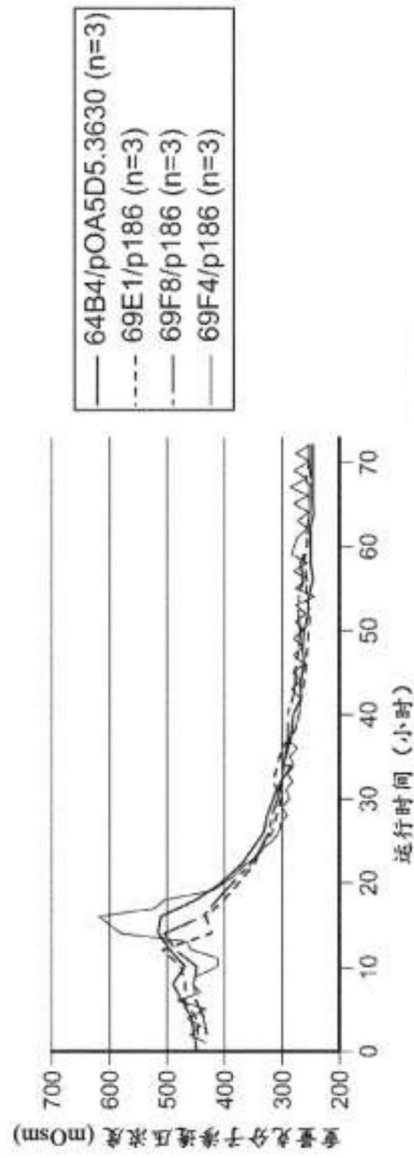


图10B

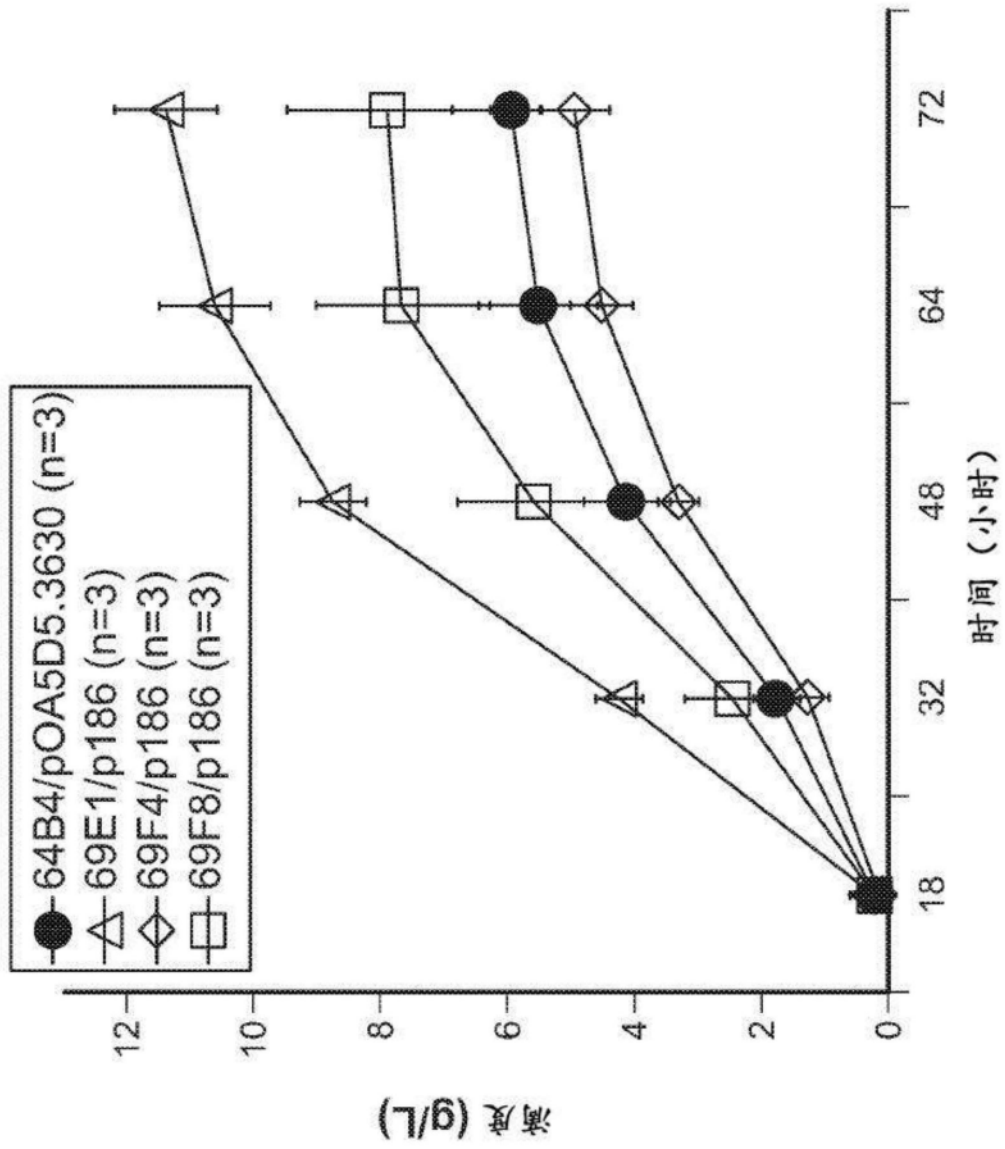


图11

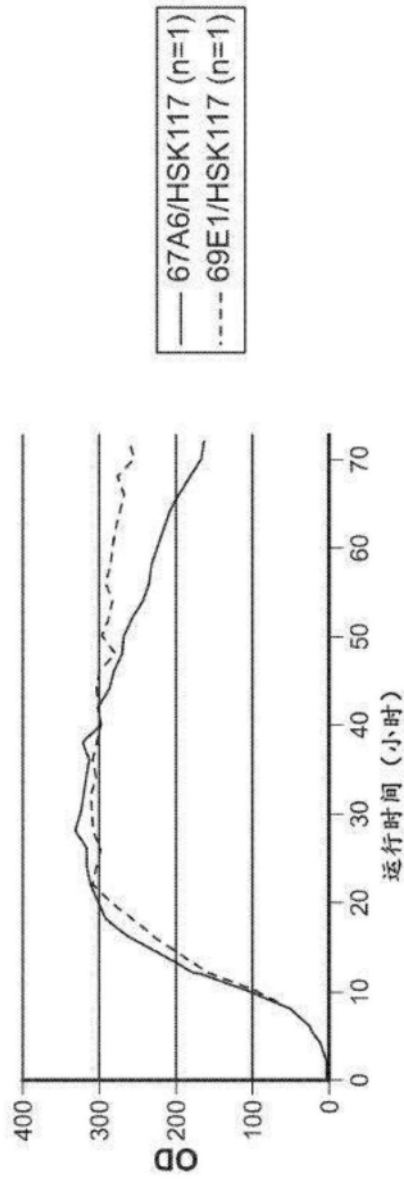


图12A

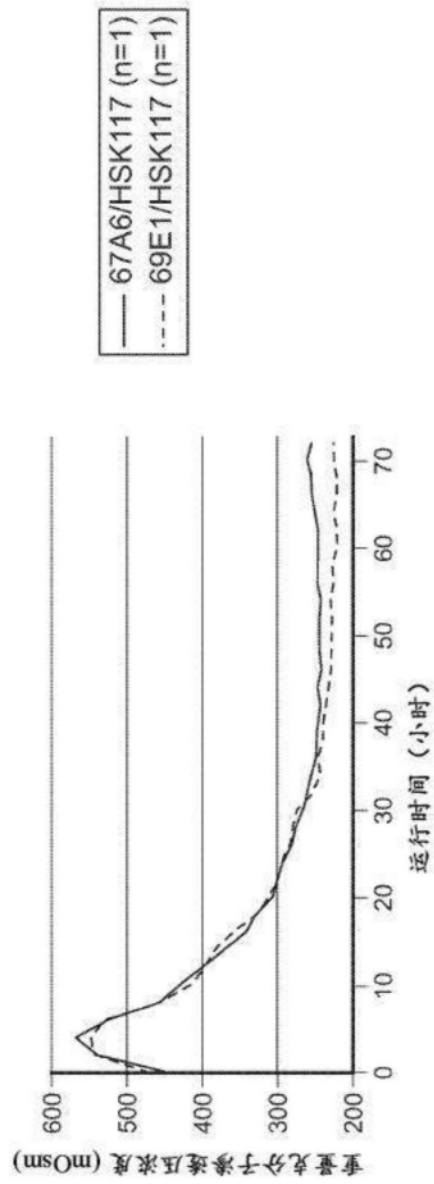


图12B

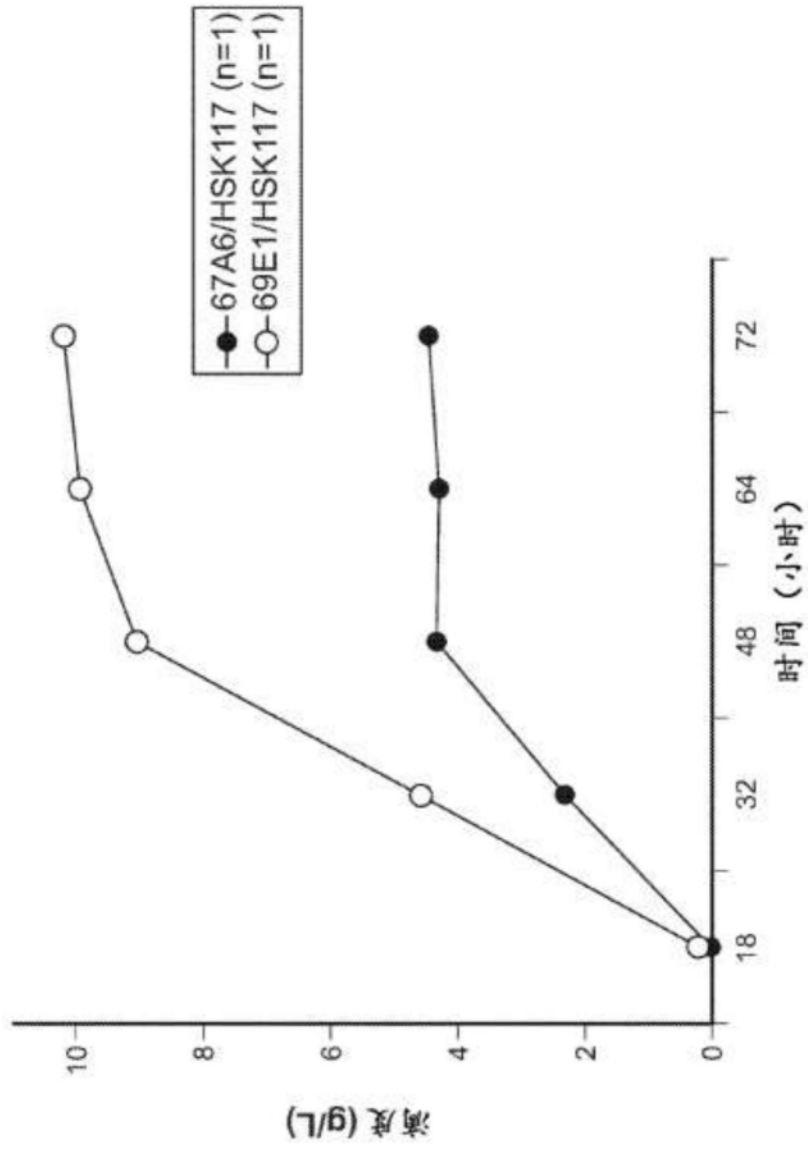


图13