



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105177091 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201510498322. 8

(22) 申请日 2007. 03. 30

(30) 优先权数据

2006-097795 2006. 03. 31 JP

2006-275804 2006. 10. 06 JP

(62) 分案原申请数据

200780020126. 3 2007. 03. 30

(71) 申请人 中外制药株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 井川智之 角田浩行

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 刘力

(51) Int. Cl.

C12P 21/00(2006. 01)

C07K 1/16(2006. 01)

权利要求书3页 说明书36页

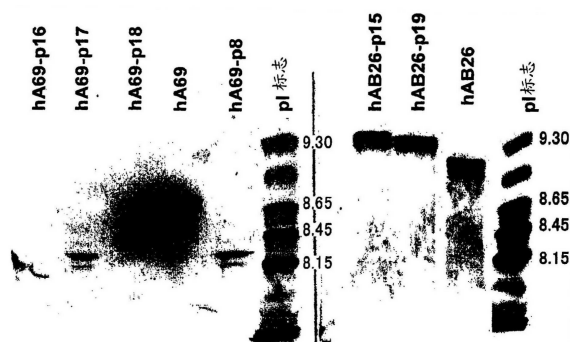
序列表17页 附图17页

(54) 发明名称

用于纯化双特异性抗体的抗体修饰方法

(57) 摘要

本发明涉及用于纯化双特异性抗体的抗体修饰方法。本发明发现了高效纯化双特异性抗体的方法:对于构成双特异性抗体的2种抗体,通过修饰存在于抗体可变区表面的氨基酸,在2种抗体的H链之间导入等电点差异,利用等电点差异,用色谱柱高效纯化双特异性抗体。还发现:向等电点有差异的抗体的恒定区整合各抗原结合部位(重链可变区),使它们共表达,用色谱柱高效纯化双特异性抗体。



1. 双特异性抗体的制备方法,所述双特异性抗体含有第1多肽和第2多肽,其分别包含重链可变区,该制备方法包含以下步骤:

(a) 选择暴露在双特异性抗体 FR 的表面上的氨基酸残基,所述氨基酸残基能改变等电点;

(b) 修饰编码由步骤(a)中选择的第1多肽的氨基酸残基的核酸和编码由步骤(a)中选择的第2多肽的氨基酸残基的核酸两者或其中之一,使第1多肽与第2多肽的等电点产生差异;

(c) 培养宿主细胞,使其表达该核酸;和

(d) 通过抗体表面电荷差异,从宿主细胞培养物中回收所述双特异性抗体,

其中,暴露在双特异性抗体表面上的氨基酸残基选自该重链可变区的按照 Kabat 编号的第 10,12,23,39,43 和 105 位氨基酸残基,

其中所述双特异性抗体包含含轻链可变区的第3多肽,且其中所述第1多肽和第2多肽分别与所述第3多肽形成多聚体。

2. 权利要求1所述的方法,其中,暴露在双特异性抗体表面上的氨基酸残基是选自该重链可变区的按照 Kabat 编号的第 10,12,23,39,43,和 105 位氨基酸残基的至少 2 个氨基酸残基。

3. 权利要求2所述的方法,其中所述至少 2 个氨基酸残基是下述(i)-(vi)的组合的任意一项:

(i) 重链可变区的按照 Kabat 编号的第 43 和 105 位氨基酸残基;

(ii) 重链可变区的按照 Kabat 编号的第 12,43 和 105 位氨基酸残基;

(iii) 重链可变区的按照 Kabat 编号的第 23,43 和 105 位氨基酸残基;

(iv) 重链可变区的按照 Kabat 编号的第 12,23,43 和 105 位氨基酸残基;

(v) 重链可变区的按照 Kabat 编号的第 39,43 和 105 位氨基酸残基;和

(vi) 重链可变区的按照 Kabat 编号的第 10,43 和 105 位氨基酸残基。

4. 权利要求1所述的方法,其中,步骤(b)的修饰是修饰核酸,使第1多肽的均多聚体、第2多肽的均多聚体、以及第1多肽与第2多肽的杂合多聚体通过使用标准的色谱法进行分析而形成分离的峰。

5. 双特异性抗体的制备方法,所述双特异性抗体含有第1多肽和第2多肽,其分别包含重链恒定区,该制备方法包含以下步骤:

(a) 选择暴露在双特异性抗体表面上的氨基酸残基,所述氨基酸残基能改变等电点;

(b) 修饰编码由步骤(a)中选择的第1多肽的氨基酸残基的核酸和编码由步骤(a)中选择的第2多肽的氨基酸残基的核酸两者或其中之一,使第1多肽与第2多肽的等电点产生差异;

(c) 培养宿主细胞,使其表达该核酸;和

(d) 通过抗体表面电荷差异,从宿主细胞培养物中回收所述双特异性抗体,

其中,暴露在双特异性抗体的表面上的氨基酸残基选自该重链恒定区的按照 EU 编号的第 137,196,203,214,217,233,268,274,276,297,355,392,419,和 435 位氨基酸残基。

6. 权利要求5所述的方法,其中,(b)步骤的修饰是修饰所述的核酸以使第1多肽的均多聚体、第2多肽的均多聚体、以及第1多肽与第2多肽的杂合多聚体在标准的色谱法进行

分析中形成分离的峰。

7. 权利要求 5 所述的方法, 其中, (b) 步骤的修饰是上述第 1 多肽和第 2 多肽中所含的重链恒定区中的取代, 所述的第 1 多肽和第 2 多肽的等电点互不相同。

8. 权利要求 7 所述的方法, 其中, 上述等电点不同的重链恒定区是 IgG1 和 IgG4、或 IgG1 和 IgG2。

9. 双特异性抗体的纯化方法, 该双特异性抗体含有第 1 多肽和第 2 多肽, 其分别包含重链可变区, 该方法包括如下步骤:

(a) 选择暴露在双特异性抗体 FR 的表面上的氨基酸残基, 所述氨基酸残基能改变等电点;

(b) 修饰编码由步骤 (a) 中选择的第 1 多肽的氨基酸残基的核酸和编码由步骤 (a) 中选择的第 2 多肽的氨基酸残基的核酸两者或其中之一, 使第 1 多肽与第 2 多肽的等电点产生差异;

(c) 培养宿主细胞, 使其表达该核酸; 和

(d) 利用抗体表面电荷差异, 通过用于分离的标准的色谱法从宿主细胞培养物中纯化该双特异性抗体,

其中, 暴露在双特异性抗体的表面上的氨基酸残基选自该重链可变区的按照 Kabat 编号的第 10, 12, 23, 39, 43 和 105 位氨基酸残基,

其中所述双特异性抗体包含含轻链可变区的第 3 多肽, 且其中所述第 1 多肽和第 2 多肽分别与所述第 3 多肽形成多聚体。

10. 权利要求 9 所述的方法, 其中, 暴露在双特异性抗体的表面上的氨基酸残基是选自该重链可变区的按照 Kabat 编号的第 10, 12, 23, 39, 43, 和 105 位氨基酸残基的至少 2 个氨基酸残基。

11. 权利要求 10 所述的方法, 其中所述至少 2 个氨基酸残基是下述 (i)-(vi) 的组合的任意一项:

(i) 重链可变区的按照 Kabat 编号的第 43 和 105 位氨基酸残基;

(ii) 重链可变区的按照 Kabat 编号的第 12, 43 和 105 位氨基酸残基;

(iii) 重链可变区的按照 Kabat 编号的第 23, 43 和 105 位氨基酸残基;

(iv) 重链可变区的按照 Kabat 编号的第 12, 23, 43 和 105 位氨基酸残基;

(v) 重链可变区的按照 Kabat 编号的第 39, 43 和 105 位氨基酸残基; 和

(vi) 重链可变区的按照 Kabat 编号的第 10, 43 和 105 位氨基酸残基。

12. 权利要求 9 所述的方法, 其中, 步骤 (b) 的修饰是修饰核酸, 使第 1 多肽的均多聚体、第 2 多肽的均多聚体、以及第 1 多肽与第 2 多肽的杂合多聚体通过使用标准的色谱法进行分析而形成分离的峰。

13. 双特异性抗体的纯化方法, 所述双特异性抗体含有第 1 多肽和第 2 多肽, 其分别包含重链恒定区, 该方法包含以下步骤:

(a) 选择暴露在双特异性抗体表面上的氨基酸残基, 所述氨基酸残基能改变等电点;

(b) 修饰编码由步骤 (a) 中选择的第 1 多肽的氨基酸残基的核酸和编码由步骤 (a) 中选择的第 2 多肽的氨基酸残基的核酸两者或其中之一, 使第 1 多肽与第 2 多肽的等电点产生差异;

(c) 培养宿主细胞,使其表达该核酸;和

(d) 利用抗体表面电荷差异,通过用于分离的标准的色谱法从宿主细胞培养物中纯化该双特异性抗体,

其中,暴露在双特异性抗体表面上的氨基酸残基选自该重链恒定区的按照 EU 编号的第 137,196,203,214,217,233,268,274,276,297,355,392,419,和 435 位氨基酸残基。

14. 权利要求 13 所述的方法,其中,(b) 步骤的修饰是修饰所述的核酸以便第 1 多肽的均多聚体、第 2 多肽的均多聚体、以及第 1 多肽与第 2 多肽的杂合多聚体在标准的色谱法进行分析中形成分离的峰。

15. 权利要求 13 所述的方法,其中,(b) 步骤的修饰是上述第 1 多肽和第 2 多肽中所含的重链恒定区中的取代,所述的第 1 多肽和第 2 多肽的等电点互不相同。

16. 权利要求 15 所述的方法,其中,上述等电点不同的重链恒定区是 IgG1 和 IgG4、或 IgG1 和 IgG2。

17. 双特异性抗体的制备方法,该方法包含通过权利要求 9 或 13 所述的方法进行纯化的步骤。



## 用于纯化双特异性抗体的抗体修饰方法

[0001] 本申请是国际申请日为 2007 年 3 月 30 日的国际申请 PCT/JP2007/057058 进入中国、申请号为 200780020126.3 的题为“用于纯化双特异性抗体的抗体修饰方法”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及用于纯化双特异性抗体的抗体修饰方法、该双特异性抗体的分离方法、以及含有该双特异性抗体作为有效成分的药物组合物等。

### 背景技术

[0003] 抗体在血液中的稳定性高、副作用小,因此作为药物受到人们的关注。其中有可同时识别两种抗原(抗原 A 和抗原 B)的双特异性抗体(非专利文献 1)。目前,正在进行临床实验的 MDX-210 是将表达 Fc $\gamma$ RI 的单核细胞等对表达 HER-2/neu 的癌细胞重构的 IgG 型双特异性抗体(非专利文献 2)。抗体的制备通常大多采用基因重组技术。具体来说,是从杂交瘤、生成抗体的致敏淋巴细胞等抗体生成细胞或呈递抗体基因的噬菌体文库中克隆编码抗体的蛋白质的 DNA,整合到适当的载体中,将其导入宿主细胞而生成的技术。使用基因重组技术的 IgG 型双特异性抗体的制备是将作为目标的两种构成 IgG 的 H 链和 L 链的基因、共四种基因导入到细胞中,通过共表达来分泌。上述表达中,在表达野生型 H 链和 L 链的构成基因时,随机发生两种 H 链的缔合或 H 链与 L 链的缔合,因此,目标双特异性抗体的比例极少。具体来说,目标双特异性抗体只是十种中的一种,生产效率降低。目标抗体的生成效率低下不仅成为目标抗体纯化的障碍,也使批次之间的差异等的不均匀性增大,导致生产成本增大。

[0004] 作为用于开发双特异性抗体的有效的双特异性抗体的制备方法,有报道报告了用于获得两个 H 链中共通的 L 链的共通 L 链获得技术、以及用于使 H 链异种缔合化的 Knobs-into-holes 技术。具体来说,从噬菌体文库(Phage library)等中找出可对识别抗原 A 和抗原 B 的各 H 链保持两种抗原结合活性的共通的 L 链,再将存在于一种 H 链的 CH3 区域的氨基酸支链置换为更大的支链(knob,突起),将存在于另一个 H 链的 CH3 区域的氨基酸支链置换为更小的支链(hole,空隙),由此使突起配置在空隙内,促进 H 链杂合二聚体的形成,可有效地获得目标双特异性抗体(专利文献 1、非专利文献 3、非专利文献 4)。

[0005] 但是,为了获得 H 链杂合二聚体而使用 Knobs-into-holes 技术时,如非专利文献 3、非专利文献 4 所示,通过 Knobs-into-holes 技术可以将目标 A 链 B 链杂合二聚体的含有率提高至最大 95%程度左右,其余的 5%是 A 链均二聚体、B 链均二聚体,成为杂质。为了开发双特异性抗体作为药物,必需从使用共通 L 链(非专利文献 3、非专利文献 4)时所生成的三种分子种类(A 链均二聚体、B 链均二聚体、A 链 B 链杂合二聚体)中尽可能地高纯度纯化 A 链 B 链杂合二聚体。因此,必需要除去残留的 5%的杂质-A 链均二聚体、B 链均二聚体,将 A 链 B 链杂合二聚体纯化为可以作为药物开发的高纯度。使用共通 L 链而不采用 Knobs-into-holes 技术时,理论上 A 链均二聚体、A 链 B 链杂合二聚体、B 链均二聚体以

1 : 2 : 1 生成, 必须除去 50% 的杂质 -A 链均二聚体、B 链均二聚体。

[0006] 在药物制造水平的色谱分离中, 目前已经有几种分离 A 链 B 链杂合二聚体和 A 链均二聚体、B 链均二聚体的方法。作为选择性地纯化 A 链 B 链杂合二聚体的方法, 非专利文献 5 中报道了以下方法: A 链使用小鼠 IgG2a、B 链使用大鼠 IgG2b, 利用蛋白 A 与小鼠 IgG2a 和大鼠 IgG2b 的各 H 链的亲亲和性的不同, 控制蛋白 A 的洗脱 pH, 由此纯化 A 链 B 链杂合二聚体, 但是由于是使用小鼠和大鼠的恒定区, 因此从免疫原性的观点来考虑, 该方法难以应用于对人的药物。该方法无法分离含有相同同种型的 H 链的 A 链 B 链杂合二聚体, 因此其利用受到限制。

[0007] 非专利文献 6 中报道了利用疏水相互作用色谱的 A 链 B 链杂合二聚体的纯化方法, 但是含有抗 CD3 小鼠 IgG2a 和抗 CD19 小鼠 IgG1 的目标 A 链 B 链杂合二聚体难以充分进行峰的分离, 另外, 考虑到是使用不同的同种型的 H 链、利用其疏水性不同进行分离, 因此, 未必可以分离含有相同同种型的 H 链的 A 链 B 链杂合二聚体。

[0008] 非专利文献 7 中报道了利用嗜疏性亲和色谱纯化 A 链 B 链杂合二聚体的方法, 由于是使用小鼠 IgG1 和大鼠 IgG2a、利用该铰链区的游离半胱氨酸 (硫醇基), 因此难以用作分离含有相同同种型的 H 链的 A 链 B 链杂合二聚体, 另外游离的半胱氨酸与保存中的聚集有关, 因此不适合于稳定的药物制剂的开发。

[0009] 非专利文献 8 中报道了使用抗原的亲亲和色谱。但是, 使用蛋白质或肽抗原的亲亲和色谱存在柱的成本或稳定性的课题, 因此使用亲和色谱制备药物并不是常规方法。另外, 为了纯化与两种抗原结合的 A 链 B 链杂合二聚体, 必须实施两次亲和色谱, 可以预见成本升高。还报道了只识别抗原的立体结构的抗体或低亲和性、具有目标功能的抗体, 具有上述性质的抗体难以采用利用抗原的亲亲和色谱。因此, 使用亲和色谱的双特异性抗体的纯化并不通用。

[0010] 如上所述, 双特异性抗体的 A 链 B 链杂合二聚体的纯化只能在有限的范围内进行, 对于将含有相同 H 链同种型、恒定区序列的双特异性抗体的 A 链 B 链杂合体纯化至可作为药物接受的高纯度的方法尚未见报道。构成双特异性抗体的两种抗体具有相同恒定区序列时, 必须只根据可变区序列的不同来分离 A 链 B 链杂合二聚体, 但抗体的可变区的氨基酸序列在抗体之间的同源性非常高 (非专利文献 9), 只凭可变区序列的不同来将 A 链 B 链杂合二聚体纯化至可药用的高纯度是困难的。

[0011] 专利文献 1: 国际公开第 96/27011 号。

[0012] 非专利文献 1: Marvin JS 和 Zhu Z, "Recombinant approaches to IgG-like bispecific antibodies.", *Acta. Pharmacol. Sin.*, June 2005, Vol. 26(6), p. 649-58.

[0013] 非专利文献 2: Segal D.M. 等人., *Current Opinion in Immunology*, 1999, Vol. 11, p. 558-562.

[0014] 非专利文献 3: Merchant AM 等 7 人., "An efficient route to human bispecific IgG.", *Nat. Biotechnol.*, Jul 1998, Vol. 16(7), p. 677-81.

[0015] 非专利文献 4: Carter P, "Bispecific human IgG by design.", *J. Immunol. Methods.*, Feb 2001, Vol. 248(1-2), p. 7-15.

[0016] 非专利文献 5: Lindhofer H 等 4 人., "Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step

purification of bispecific antibodies.”, J. Immunol., Jul 1, 1995, Vol. 155(1), p. 219-25.

[0017] 非专利文献 6:Manzke O 等 4 人., “Single-step purification of bispecific monoclonal antibodies for immunotherapeutic use by hydrophobic interaction chromatography.”, J. Immunol. Methods., Oct 13, 1997, Vol. 208(1), p. 65-73.

[0018] 非专利文献 7:Kreutz FT 等 3 人., “Efficient bispecific monoclonal antibody purification using gradient thiophilic affinity chromatography.”, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., Sep 4, 1998, Vol. 714(2), p. 161-70.

[0019] 非专利文献 8:Gupta S 和 Suresh M, “Affinity chromatography and co-chromatography of bispecific monoclonal antibody immunoconjugates.”, J. Biochem. Biophys. Methods., May 31, 2002, Vol. 51(3), p. 203-16. Review.

[0020] 非专利文献 9:Carl Branden, Introduction to Protein Structure 2nd edition, Newton Press.

## 发明内容

[0021] 本发明针对上述状况而设,其目的在于提供用于高效地纯化双特异性抗体的抗体可变区的氨基酸修饰的方法、含有修饰的双特异性抗体的药物组合物、以及双特异性抗体药物组合物的制备方法。本发明还提供重链恒定区发生修饰的双特异性抗体、含有修饰的双特异性抗体的药物组合物、以及双特异性抗体药物组合物的制备方法。

[0022] 作为可通过使用常用的色谱柱高效地纯化以往难以进行目标物纯化的双特异性抗体的方法,本发明人对于抗体可变区的氨基酸置换的方法进行了深入的研究。

[0023] 结果发现,对于构成双特异性抗体的两种抗体,通过修饰存在于抗体可变区表面的氨基酸、在两种抗体的 H 链之间导入等电点差异、利用等电点的差异来用色谱柱高效率地纯化双特异性抗体的方法。具体来说,在抗体的 H 链中发现了不会使抗体的功能(活性)降低而可只控制等电点的修饰位置。本发明人还确认了通过本发明的方法获得的双特异性抗体实际保持有功能。

[0024] 如上所述,作为使用常用的色谱柱高效率地纯化任意的双特异性抗体的方法,本发明人成功地开发了通过抗体可变区氨基酸置换进行的方法,从而完成了本发明。

[0025] 本发明人还发现,对于构成双特异性抗体的两种 H 链的恒定区,通过在各个 H 链中使用原本等电点有差异的不同的同种型的恒定区、利用等电点的不同、可以通过色谱柱高效地纯化双特异性抗体的方法。本发明人又确认了通过本发明的方法获得的双特异性抗体实际保有功能。

[0026] 本发明涉及为了使用色谱柱进行高效率纯化的抗体可变区的氨基酸置换方法、以及含有修饰的双特异性抗体的药物组合物、以及双特异性抗体药物组合物的制备方法,进一步涉及重链恒定区发生修饰的双特异性抗体、以及含有修饰的双特异性抗体的药物组合物、以及双特异性抗体药物组合物的制备方法,更具体地说,涉及以下内容:

[0027] [1] 多特异性抗体的制备方法,所述多特异性抗体含有第 1 多肽和第 2 多肽,该制备方法包含以下步骤:

[0028] (a) 修饰编码第 1 多肽的氨基酸残基的核酸和编码第 2 多肽的氨基酸残基的核酸

两者或其中之一,使第 1 多肽与第 2 多肽的等电点产生差异;

[0029] (b) 培养宿主细胞,使其表达该核酸;

[0030] (c) 从宿主细胞培养物中回收多特异性抗体。

[0031] [2][1] 所述的方法,其中,步骤 (a) 的修饰是修饰核酸,使第 1 多肽的均多聚体、第 2 多肽的均多聚体、以及第 1 多肽与第 2 多肽的杂合多聚体通过使用标准的色谱法进行分析而形成分离的峰。

[0032] [3][1] 所述的方法,其中,上述第 1 多肽和上述第 2 多肽含有重链可变区。

[0033] [4][3] 所述的方法,其中,上述多特异性抗体含有含轻链可变区的第 3 多肽,上述第 1 多肽和第 2 多肽分别与该第 3 多肽形成多聚体。

[0034] [5][1]-[4] 中任一项所述的方法,其中,上述第 1 多肽和上述第 2 多肽含有重链恒定区。

[0035] [6][5] 所述的方法,其中,上述第 1 多肽和第 2 多肽中所含的重链恒定区是等电点互不相同的重链恒定区。

[0036] [7][6] 所述的方法,其中,上述等电点不同的重链恒定区是 IgG1 和 IgG4、或 IgG1 和 IgG2。

[0037] [8][1] 所述的方法,其中,上述多特异性抗体是双特异性抗体。

[0038] [9] 多特异性抗体,该多特异性抗体通过 [1] 所述的方法制备。

[0039] [10] 多特异性抗体的纯化方法,该多特异性抗体含有第 1 多肽和第 2 多肽,其纯化方法如下:

[0040] (a) 修饰编码第 1 多肽的氨基酸残基的核酸和编码第 2 多肽的氨基酸残基的核酸两者或其中之一,使第 1 多肽与第 2 多肽的等电点产生差异;

[0041] (b) 培养宿主细胞,使其表达该核酸;

[0042] (c) 通过标准的色谱法从宿主细胞培养物中纯化该多特异性抗体。

[0043] [11][10] 所述的方法,其中,步骤 (a) 的修饰是修饰核酸,使第 1 多肽的均多聚体、第 2 多肽的均多聚体、以及第 1 多肽与第 2 多肽的杂合多聚体通过使用标准的色谱法进行分析而形成分离的峰。

[0044] [12][10] 所述的方法,其中,上述第 1 多肽和上述第 2 多肽含有重链可变区。

[0045] [13][12] 所述的方法,其中,上述多特异性抗体含有含轻链可变区的第 3 多肽,上述第 1 多肽和第 2 多肽分别与该第 3 多肽形成多聚体。

[0046] [14][10]-[13] 中任一项所述的方法,其中,上述第 1 多肽和上述第 2 多肽含有重链恒定区。

[0047] [15][14] 所述的方法,其中,上述第 1 多肽和第 2 多肽中所含的重链恒定区是等电点互不相同的重链恒定区。

[0048] [16][15] 所述的方法,其中,上述等电点不同的重链恒定区是 IgG1 和 IgG4、或 IgG1 和 IgG2。

[0049] [17][10] 所述的方法,其中,上述多特异性抗体是双特异性抗体。

[0050] [18] 多特异性抗体的制备方法,该方法包含通过 [10] 所述的方法进行纯化的步骤。

[0051] [19] 多特异性抗体,该抗体通过 [18] 所述的方法制备。

[0052] [20] 多特异性抗体,该多特异性抗体含有第 1 多肽和第 2 多肽,第 1 多肽含有重链可变区和 / 或重链恒定区,选自该重链可变区的按照 Kabat 编号的第 10 号、12 号、23 号、39 号、43 号和 105 号氨基酸残基、或者该重链恒定区的按照 EU 编号的第 137 号、196 号、203 号、214 号、217 号、233 号、268 号、274 号、276 号、297 号、355 号、392 号、419 号、435 号氨基酸残基的至少一种氨基酸残基具有电荷,第 1 多肽与第 2 多肽的等电点互不相同。

[0053] [21][20] 所述的多特异性抗体,其中,第 2 多肽含有重链可变区和 / 或重链恒定区,选自该重链可变区的按照 Kabat 编号的第 10 号、12 号、23 号、39 号、43 号和 105 号氨基酸残基、或者该重链恒定区的按照 EU 编号的第 137 号、196 号、203 号、214 号、217 号、233 号、268 号、274 号、276 号、297 号、355 号、392 号、419 号、435 号氨基酸残基的至少一种氨基酸残基,具有与选自上述第 1 多肽中所含的重链可变区和 / 或重链恒定区中的具有电荷的氨基酸残基相反的电荷、或者不具有电荷。

[0054] [22][20] 所述的多特异性抗体,其中,上述具有电荷的氨基酸残基和与该氨基酸残基具有相反电荷的氨基酸残基的组合分别选自下述 (a) 或 (b) 的任意组中所含的氨基酸残基:

[0055] (a) 谷氨酸 (E)、天冬氨酸 (D);

[0056] (b) 赖氨酸 (K)、精氨酸 (R)、组氨酸 (H)

[0057] [23] 多特异性抗体,该多特异性抗体中的第 1 多肽和第 2 多肽的等电点有差异,第 1 多肽的均多聚体、第 2 多肽的均多聚体、以及第 1 多肽与第 2 多肽的杂合多聚体通过使用标准的色谱法进行分析而形成分离的峰。

[0058] [24][23] 所述的多特异性抗体,其中,上述第 1 多肽和上述第 2 多肽含有重链可变区。

[0059] [25][24] 所述的多特异性抗体,其中,上述多特异性抗体含有含轻链可变区的第 3 多肽,上述第 1 多肽和上述第 2 多肽分别与该第 3 多肽形成多聚体。

[0060] [26][23]-[25] 中任一项所述的多特异性抗体,其中,上述第 1 多肽和上述第 2 多肽含有重链恒定区。

[0061] [27][26] 所述的多特异性抗体,其中,上述第 1 多肽和第 2 多肽中所含的重链恒定区是等电点互不相同的重链恒定区。

[0062] [28][27] 所述的多特异性抗体,其中,上述等电点不同的重链恒定区是 IgG1 和 IgG4、或 IgG1 和 IgG2。

[0063] [29][23] 所述的多特异性抗体,其中,上述多特异性抗体是双特异性抗体。

[0064] [30] 组合物,该组合物含有 [23]-[29] 中任一项所述的多特异性抗体和可药用的载体。

[0065] [31] 核酸,该核酸编码构成 [23]-[29] 中任一项所述的多特异性抗体的多肽。

[0066] [32] 宿主细胞,该宿主细胞具有 [31] 中所述的核酸。

[0067] [33][23]-[29] 中任一项所述的多特异性抗体的制备方法,该制备方法包含培养 [32] 所述的宿主细胞的步骤;从细胞培养物中回收多肽的步骤。

[0068] [34][25] 所述的多特异性抗体,其中,第 1 多肽的可变区含有以下 (a1)-(a7) 中任一项所述的氨基酸序列,第 2 多肽的可变区含有以下 (b1)-(b3) 中任一项所述的氨基酸序列,第 3 多肽的可变区含有以下 (c1) 或 (c2) 中所述的氨基酸序列:

- [0069] (a1)SEQ ID NO. 7  
[0070] (a2)SEQ ID NO. 8  
[0071] (a3)SEQ ID NO. 9  
[0072] (a4)SEQ ID NO. 10  
[0073] (a5)SEQ ID NO. 11  
[0074] (a6)SEQ ID NO. 12  
[0075] (a7)SEQ ID NO. 13  
[0076] (b1)SEQ ID NO. 14  
[0077] (b2)SEQ ID NO. 15  
[0078] (b3)SEQ ID NO. 16  
[0079] (c1)SEQ ID NO. 17  
[0080] (c2)SEQ ID NO. 18。

[0081] [35][34] 所述的多特异性抗体,其中,第 1 多肽的可变区含有 SEQ ID NO. 11 的氨基酸序列,第 2 多肽的可变区含有 SEQ ID NO. 16 的氨基酸序列,第 3 多肽的可变区含有 SEQ ID NO. 17 的氨基酸序列。

[0082] [36][34] 所述的多特异性抗体,其中,第 1 多肽的可变区含有 SEQ ID NO. 12 所述的氨基酸序列,第 2 多肽的可变区含有 SEQ ID NO. 16 的氨基酸序列,第 3 多肽的可变区含有 SEQ ID NO. 18 的氨基酸序列。

[0083] [37][34]-[36] 中任一项所述的多特异性抗体,其中,第 1 多肽和第 2 多肽含有人 IgG4 恒定区,第 3 多肽含有人  $\kappa$  恒定区。

#### 附图说明

[0084] 图 1 是表示对于人源化双特异性抗体(人源化 A69(hA69a)/人源化 B26(hB26-F123e4)/人源化 BBA(hAL-F123j4))的凝固活性进行评价的结果的图。评价结果显示了与嵌合双特异性抗体具有同等以上的凝固活性。

[0085] 图 2 是表示使用人源化 A69-H 链可变区(hA69a)和人源化 BBA(hAL-F123j4)、以及人源化 hB26-H 链可变区(hB26-F123e4)和人源化 BBA(hAL-F123j4)实施抗体建模的结果的图。对于可以使表面电荷变化的氨基酸着重表示支链。编号采用 Kabat 数据库的序列编号(Kabat EA 等人,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,NIH)。

[0086] 图 3 是表示使用未修饰的和使可变区修饰的人源化 A69 抗体均二聚体、以及未修饰的和使可变区修饰的人源化 B26 抗体均二聚体实施等电聚焦电泳分析的结果的照片。分析结果确认:通过修饰,等电点发生变化。

[0087] 图 4 是表示使用使可变区修饰的人源化 A69 抗体均二聚体实施阳离子交换色谱分析的结果的图。分析结果确认:与未修饰的抗体相比,峰发生移动。

[0088] 图 5 是表示使用使可变区修饰的人源化 B26 抗体均二聚体实施阳离子交换色谱分析的结果的图。分析结果确认:与未修饰的抗体相比,峰发生移动。

[0089] 图 6 是表示使用使可变区修饰的人源化双特异性抗体(H 链恒定区利用 knobs-into-holes 技术)评价凝固活性的结果的图。评价结果显示了与未修饰的抗体同等的凝固活性。

[0090] 图 7 是表示使用使可变区 (CDR) 修饰的人源化 A69 抗体均二聚体实施等电聚焦电泳分析的结果的照片。分析结果确认 :与未修饰的抗体比较,条带发生移动。

[0091] 图 8 是表示使用使可变区 (CDR) 修饰的人源化 A69 抗体均二聚体评价与作为抗原的因子 IXa 的结合活性的结果的图。评价结果显示,与未修饰的抗体保有同等的结合活性。

[0092] 图 9 是表示使用人源化 A69-H 链 -hA69a、人源化 B26-H 链 -hB26-F123e4 和人源化 BBA-L 链 -hAL-F123j4 作为未修饰抗体制备的未修饰的人源化双特异性抗体实施阳离子交换色谱分析的结果的图。分析结果中,两种均二聚体与双特异性抗体不分离,以一个峰的形式洗脱。

[0093] 图 10 是表示使用人源化 A69-H 链修饰体 -hA69-PF、和人源化 B26-H 链的修饰体 -hA26-PF、和人源化 BBA-L 链 -hAL-s8 制备的人源化双特异性 PF 抗体实施阳离子交换色谱分析的结果的图。分析结果中,两种均二聚体与双特异性抗体分别分离,依次按照 hA69-PF 均二聚体、人源化双特异性 PF 抗体、hB26-PF 均二聚体的顺序、以三个峰的形式洗脱。

[0094] 图 11 是表示使用纯化的人源化 A69 抗体 -PF 均二聚体和人源化 B26-PF 抗体均二聚体、人源化双特异性 PF 抗体实施等电聚焦电泳分析的结果的照片。分析结果确认 :可纯化目标双特异性抗体。

[0095] 图 12 是表示使用纯化的人源化双特异性 PF 抗体 (H 链恒定区为野生型) 评价凝固活性的结果的图。评价结果显示了与在 H 链恒定区利用 konds-into-holes 技术得到的双特异性抗体 (KiH) 同等的凝固活性。

[0096] 图 13 表示使用制备中常用的柱、从含有人源化 A69 抗体均二聚体和人源化 B26 抗体均二聚体、人源化双特异性抗体三种抗体的培养上清中纯化双特异性抗体时的色谱图。

[0097] 图 14 是表示使用用制备中常用的柱纯化的人源化双特异性抗体 (H 链恒定区为野生型) 评价凝固活性的结果的图。评价结果显示了与人源化双特异性 PF 抗体同等的凝固活性。

[0098] 图 15 是表示使用未修饰、IgG2 化和 IgG4 化人源化 PM-1 抗体实施等电聚焦电泳分析的结果的照片。分析结果中确认 :通过修饰使等电点发生了变化。A 表示未修饰人源化 PM-1 抗体、B 表示 IgG2 化人源化 PM-1 抗体、C 表示 IgG4 化人源化 PM-1 抗体。

[0099] 图 16 是表示使用未修饰、IgG2 化和 IgG4 化人源化 PM-1 抗体的各个共表达抗体实施等电聚焦电泳分析的结果的照片。分析结果显示,各同种型抗体和同种型杂合抗体可通过 pI 差分离。A 表示未修饰人源化 PM-1 抗体 /IgG2 化人源化 PM-1 抗体共表达抗体, B 表示未修饰人源化 PM-1 抗体 /IgG4 化人源化 PM-1 抗体共表达抗体, C 表示人源化 PM-1 抗体纯化品 ( 批量 )。

[0100] 图 17 是表示使用单独表达的未修饰、IgG2 化、IgG4 化人源化 PM-1 抗体实施阳离子交换色谱分析的结果的图。分析结果确认 :与未修饰的抗体相比,峰发生移动。

[0101] 图 18 是表示实施未修饰、IgG2 化和 IgG4 化人源化 PM-1 抗体的各个共表达抗体的阳离子交换色谱分析的结果的图。分析结果中,在未修饰人源化 PM-1 抗体 /IgG2 化人源化 PM-1 抗体的组合、以及未修饰人源化 PM-1 抗体 /IgG4 化人源化 PM-1 抗体的组合中,主要可观察到各同种型的均二聚体、杂合二聚体的三个主峰。A 表示未修饰人源化 PM-1 抗体 /IgG2 化人源化 PM-1 抗体共表达抗体, B 表示未修饰人源化 PM-1 抗体 /IgG4 化人源化 PM-1

抗体共表达抗体。

[0102] 图 19 是表示通过阳离子交换色谱,从共表达未修饰人源化 PM-1 抗体 /IgG4 化人源化 PM-1 抗体的抗体中纯化均二聚体、杂合二聚体的结果的图。结果,依次以三个峰的形式洗脱了 IgG4 化人源化 PM-1 抗体均二聚体、未修饰人源化 PM-1/IgG4 化人源化 PM-1 杂合抗体、未修饰人源化 PM-1 抗体均二聚体,因此可将它们分离。箭头表示大致的组分范围。

[0103] 图 20 是表示使用通过阳离子交换色谱纯化的未修饰人源化 PM-1 抗体均二聚体、未修饰人源化 PM-1/IgG4 化人源化 PM-1 杂合抗体、IgG4 化人源化 PM-1 抗体均二聚体进行二次色谱的结果的图。结果确认:可以纯化目标同种型杂合抗体。

[0104] 图 21 是表示使用通过阳离子交换色谱纯化的未修饰人源化 PM-1 抗体均二聚体、未修饰 /IgG4 化人源化 PM-1 杂合抗体、IgG4 化人源化 PM-1 抗体均二聚体实施等电聚焦电泳分析的结果的照片。分析结果确认:可以纯化目标同种型杂合抗体。A 表示未修饰人源化 PM-1 抗体 /IgG4 化人源化 PM-1 抗体共表达抗体,B 表示未修饰人源化 PM-1 抗体分离组分,C 表示未修饰人源化 PM-1/IgG4 化人源化 PM-1 杂合抗体分离组分,D 表示 IgG4 化人源化 PM-1 抗体分离组分。

[0105] 图 22 是使用通过阳离子交换色谱纯化的未修饰人源化 PM-1 抗体均二聚体、未修饰人源化 PM-1/IgG4 化人源化 PM-1 杂合抗体、IgG4 化人源化 PM-1 抗体均二聚体评价人 IL-6 中和活性的结果的图。评价结果显示了任何抗体均与人源化 PM-1 纯化抗体同等的中和活性。A 和 B 表示表达人 gp130 的 BaF3 细胞株,C 和 D 表示共表达人 gp130/人 IL-6 受体的 BaF3 细胞株。黑色圆圈(●)表示人源化 PM-1 抗体纯化品(批量),白色方框(□)表示未修饰人源化 PM-1 抗体,白色三角(△)表示 IgG4 化人源化 PM-1 抗体,× 表示未修饰人源化 PM-1/IgG4 化人源化 PM-1 杂合抗体。

## 具体实施方式

[0106] 首先,本发明提供用于制备多特异性抗体的抗体修饰方法。本发明的制备方法的优选方案是包含修饰编码第 1 多肽的氨基酸残基的核酸和编码第 2 多肽的氨基酸残基的核酸两者或其中一方,使第 1 多肽与第 2 多肽的等电点产生差异的方法。即,可以通过改变第 1 多肽和第 2 多肽的氨基酸残基的电荷,向多肽中导入等电点(pI)的差异,利用该等电点的差异制备多特异性抗体。具体来说包含以下的(a)-(c)的步骤的制备方法。

[0107] (a) 修饰编码第 1 多肽的氨基酸残基的核酸和编码第 2 多肽的氨基酸残基的核酸两者或其中一方,使第 1 多肽和第 2 多肽的等电点产生差异;

[0108] (b) 培养宿主细胞,使其表达该核酸;

[0109] (c) 从宿主细胞培养物中回收多特异性抗体。

[0110] 本发明中的多肽通常是指具有 10 个氨基酸左右以上的长度的多肽以及蛋白质。通常是来自生物的多肽,但没有特别限定,例如也可以是含有人工设计的序列的多肽。还可以是天然多肽、或合成多肽、重组多肽等任意形式。并且,上述多肽的片段也包含在本发明的多肽中。

[0111] 本发明中,“多肽的等电点产生差异”是指在两种以上的多肽中,通过进行表面氨基酸电荷的改变,使它们等电点互相不相等。等电点的差异例如可通过使用等电聚焦电泳等方法观察。本发明中,优选不改变该多肽的结构或功能(活性)地控制等电点。



[0112] 即,本发明提供多特异性抗体的制备方法,该多特异性抗体含有第1多肽和第2多肽,所述多特异性抗体的制备方法包含以下步骤:

[0113] (a) 修饰编码第1多肽的氨基酸残基的核酸和编码第2多肽的氨基酸残基的核酸两者或其中一方,使第1多肽与第2多肽的等电点的差为0.5以上,优选0.7或以上,进一步优选0.9或以上;

[0114] (b) 培养宿主细胞,使其表达该核酸;

[0115] (c) 从宿主细胞培养物中回收多特异性抗体。

[0116] 本发明还提供用于纯化多特异性抗体的抗体修饰方法。本发明的纯化方法的优选方案是包含修饰编码第1多肽的氨基酸残基的核酸和编码第2多肽的氨基酸残基的核酸两者或其中一方进行,使第1多肽和第2多肽的等电点产生差异的方法。即,通过改变第1多肽和第2多肽的氨基酸残基的电荷,向多肽中导入等电点(pI)的差异,可利用该等电点的差异纯化多特异性抗体。具体来说是有以下的(a)-(c)的步骤的纯化方法。

[0117] (a) 修饰编码第1多肽的氨基酸残基的核酸和编码第2多肽的氨基酸残基的核酸两者或其中一方,使第1多肽和第2多肽的等电点产生差异;

[0118] (b) 培养宿主细胞,使其表达该核酸;

[0119] (c) 通过标准的色谱法,从宿主细胞培养物中纯化该多特异性抗体。

[0120] 包含通过上述纯化方法进行纯化的步骤的多特异性抗体的制备方法也包含在本发明中。

[0121] 本发明的核酸通常是被克隆(插入)到适当的载体中,导入到宿主细胞中。该载体只要可稳定保有插入的核酸即可,没有特别限定,例如,宿主如果使用大肠杆菌则克隆用的载体优选pBluescript载体(Stratagene制备)等,还可利用市场销售的各种载体。为了生产本发明的多特异性抗体(多肽),使用载体时表达载体特别有效。表达载体只要是在试管内、大肠杆菌内、培养细胞内、生物个体内表达多肽的载体即可,没有特别限定,例如,如果在试管内表达则优选pBEST载体(プロメガ制备),如果在大肠杆菌中表达则优选pEP载体(Invitrogen制备),如果在培养细胞中表达则优选pME18S-SL3载体(GenBank登记号No. AB009864),如果在生物个体中表达则优选pME18S载体(Mol Cell Biol. 8: 466-472(1988))等。本发明的DNA向载体中的插入可通过常规方法,例如可通过使用限制酶切位点的连接酶反应进行(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel等人.(1987) Publish. John Wiley&Sons. Section 11.4-11.11)。

[0122] 上述宿主细胞没有特别限定,可以根据目的使用各种宿主细胞。用于表达多肽的细胞例如有细菌细胞(例如链球菌、葡萄球菌、大肠杆菌、链霉菌、枯草杆菌)、真菌细胞(例如酵母、曲霉)、昆虫细胞(例如黑腹果蝇S2、夜蛾SF9)、动物细胞(例如CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes黑素瘤细胞)和植物细胞。载体对宿主细胞的导入例如可通过磷酸钙沉淀法、电脉冲穿孔法(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel等人.(1987) Publish. John Wiley&Sons. Section 9.1-9.9)、脂转染法、显微注射法等公知的方法进行。

[0123] 为了使在宿主细胞中表达的多肽在内质网的内腔中、周质中、或者细胞外的环境中分泌,可以将适当的分泌信号整合到目标多肽中。这些信号对于目标多肽可以是内源性,也可以是不同种的信号。

[0124] 上述制备方法中,对于多特异性抗体(多肽)的回收,当本发明的多肽分泌到培养基中时则回收培养基。本发明的多肽在细胞内产生时,首先溶解该细胞,然后回收多肽。

[0125] 从重组细胞培养物中回收本发明的多肽并纯化时,可以采用包含磷酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水性相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱等公知的方法。

[0126] 本发明还涉及含有本发明的多特异性抗体以及可药用的载体的组合物(药物)。

[0127] 本发明中,药物组合物通常是指用于疾病的治疗或预防、或者检查、诊断的药物。

[0128] 本发明的药物组合物可以按照本领域所公知的方法制成制剂。例如,可以以与水或除此之外的可药用的液体形成的无菌性溶液或混悬剂的注射剂形式非口服使用。例如,可以与可药用的载体或介质、具体来说灭菌水或生理盐水、植物油、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、香味剂、赋形剂、载体、防腐剂、粘结剂等适当组合,以通常认可的制药实施所要求的单元用量形式混合,制成制剂。这些制剂中的有效分量设定为可获得所指示的范围的适当的容量。

[0129] 用于注射的灭菌组合物可使用如注射用蒸馏水的载体,按照通常的制剂实施进行处方。

[0130] 注射用的水溶液例如有:含有生理盐水、葡萄糖或含有其它辅助试剂(例如D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露糖醇、氯化钠)的等渗液。也可以结合使用适当的溶解助剂例如醇(乙醇等)、多元醇(丙二醇、聚乙二醇等)、非离子性表面活性剂(聚山梨醇80(TM)、HCO-50等)。

[0131] 油性液体有芝麻油、大豆油,溶解助剂可以结合使用苯甲酸苄酯和/或苄醇。还可以配合缓冲剂(例如磷酸盐缓冲液和乙酸钠缓冲液)、止痛剂(例如盐酸普鲁卡因)、稳定剂(例如苄醇和苯酚)、抗氧化剂。制备的注射液通常填充在适当的安瓿瓶中。

[0132] 本发明的药物组合物优选非口服给予。例如可以制成注射剂型、经鼻给予剂型、经肺给予剂型、透皮给予型的组合物。例如通过静脉内注射、肌肉注射、腹腔内注射、皮下注射等可以全身或局部给予。

[0133] 给予方法可根据患者的年龄、症状适当选择。含有抗体或编码抗体的多核苷酸的药物组合物的给予量例如可设定为每次按照1公斤体重为0.0001mg-1000mg的范围。或者例如每位患者可以是0.001-100000mg的给予量,本发明并不限于这些数值。给予量和给予方法根据患者的体重、年龄、症状等变化,本领域技术人员可考虑这些条件适当设定给予量和给予方法。

[0134] 还可以根据需要将本发明的多特异性抗体与其它药物成分组合,制成制剂。

[0135] 本发明还提供编码构成本发明的多特异性抗体的多肽的核酸。并且,担载有该核酸的载体也包含在本发明中。

[0136] 本发明进一步提供具有上述核酸的宿主细胞。该宿主细胞没有特别限定,例如有大肠杆菌或各种动物细胞等。宿主细胞例如可以以用于本发明的抗体或多肽的制备或表达的生产体系的形式使用。用于制备多肽的生产体系中有体外和体内的生产体系。体外的生产体系有使用真核细胞的生产体系和使用原核细胞的生产体系。

[0137] 可作为宿主细胞使用的真核细胞例如有动物细胞、植物细胞、真菌细胞。动物细胞例如有哺乳类细胞,例如CHO(J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、HEK293、3T3、骨髓瘤、

BHK (baby hamster kidney, 幼鼠肾细胞)、HeLa、Vero 等、两栖类细胞例如非洲爪蟾卵细胞 (Valle, 等人., Nature (1981) 291 :338-340)、以及昆虫细胞例如 Sf9、Sf21、Tn5。本发明的抗体的表达中, 优选采用 CHO-DD44、CHO-DX11B、COS7 细胞、HEK293 细胞、BHK 细胞。动物细胞中, 为了大量表达, 特别优选 CHO 细胞。载体对宿主细胞的导入例如可通过磷酸钙法、DEAE 葡聚糖法、使用阳离子性脂质体 DOTAP (Boehringer Mannheim 制备) 的方法、电穿孔法、脂转染等方法进行。

[0138] 植物细胞例如已知有来自烟草 (*Nicotiana tabacum*) 的细胞和浮萍 (*Lemna minor*) 作为蛋白质生产体系, 通过将该细胞进行愈伤组织培养可以生产本发明的抗体。公知有使用酵母例如糖酵母 (*Saccharomyces*) 属的细胞 (啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母 (*Saccharomyces pombe*) 等); 和丝状菌例如曲霉 (*Aspergillus*) 属的细胞 (黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 等) 的蛋白质表达体系, 可用作本发明的抗体生成的宿主。

[0139] 使用原核细胞时, 有使用细菌细胞的生产体系。细菌细胞除上述大肠杆菌 (*E. coli*) 之外, 还已知使用枯草杆菌的生产体系, 也可用于本发明的抗体生成。

[0140] 使用本发明的宿主细胞生产抗体时, 可以进行宿主细胞的培养, 使多核苷酸表达, 其中, 所述宿主细胞用含有编码本发明抗体的多核苷酸的表达载体转化。例如以动物细胞为宿主时, 培养液例如可使用 DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM。此时, 可以结合使用 FBS、胎牛血清 (FCS) 等血清补液, 通过无血清培养进行细胞培养。培养时的 pH 优选约 6-8。培养通常在约 30-40°C 下进行约 15-200 小时, 可以根据需要进行培养基的更换、通气、搅拌。

[0141] 体内生产多肽的体系中例如有使用动物的生产系统或使用植物的生产系统。向这些动物或植物中导入目标多核苷酸, 在动物或植物的体内生成多肽并回收。本发明的“宿主”包含这些动物、植物。

[0142] 使用动物时, 有使用哺乳类动物、昆虫的生产体系。哺乳类动物可以使用山羊、猪、绵羊、小鼠、牛等 (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications (1993))。使用哺乳类动物时, 可以使用转基因动物。

[0143] 例如将编码本发明的抗体的多核苷酸和编码如山羊  $\beta$  酪蛋白等乳汁中特有生产的多肽的基因以融合基因的形式制备。接着, 将含有该融合基因的多核苷酸片段注入到山羊的胚胎中, 将该胚胎移植到雌山羊体内。从接受了胚胎的山羊所生产的转基因山羊、或其子孙所生产的乳汁中可以获得目标抗体。为了使含有由转基因山羊生产的抗体的乳汁量增加, 可以对转基因山羊适当给予激素 (Ebert 等人., Bio/Technology (1994) 12 :699-702)。

[0144] 生产本发明的抗体的昆虫例如可以使用蚕。使用蚕时, 将插入了编码目标抗体的多核苷酸的杆状病毒感染蚕, 由此可从蚕的体液中获得目标抗体 (Susumu 等人., Nature (1985) 315 :592-594)。

[0145] 将植物用于本发明的抗体生产时, 例如可以使用烟草。使用烟草时, 将编码目标抗体的多核苷酸插入到植物表达用的载体例如 pMON 530 中, 将该载体导入到根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 等的细菌中。将该细菌感染烟草、例如烟草 (*Nicotiana tabacum*), 可由该烟叶获得所需抗体 (Ma 等人., Eur. J. Immunol. (1994) 24 :131-138)。将同样的细菌感染浮萍, 进行克隆后可由浮萍的细胞中获得所需抗体 (Cox K. M. 等人., Nat. Biotechnol. 2006Dec ;24(12) :1591-1597)。

[0146] 上述得到的抗体可从宿主细胞内或细胞外（培养基、乳汁等）中分离，纯化为实质上纯粹、均匀的抗体。抗体的分离、纯化可以使用通常在多肽的纯化中使用的分离、纯化方法，并没有任何限定。例如可以将色谱柱、过滤器、超滤、盐析、溶剂沉淀、溶剂提取、蒸馏、免疫沉淀、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳法、透析、重结晶等适当选择、组合，分离并纯化抗体。

[0147] 色谱例如有：亲和色谱、离子交换色谱、疏水性色谱、凝胶过滤、反相色谱、吸附色谱等 (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak 等人., (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press)。这些色谱可以使用液相色谱例如 HPLC、FPLC 等液相色谱进行。亲和色谱中使用的柱有蛋白 A 柱、蛋白 G 柱。例如使用蛋白 A 的柱有：Hyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia) 等。

[0148] 还可以根据需要，在抗体的纯化前或纯化后使适当的蛋白质改性酶作用，由此可以施加任意的改性，或可部分地除去肽。蛋白质改性酶例如可使用胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、赖氨酰肽链内切酶、蛋白激酶、葡萄糖苷酶等。

[0149] 如上所述，包含培养本发明的宿主细胞、由该培养物中回收多肽的步骤的本发明的多特异性抗体的制备方法也是本发明的优选方案之一。

[0150] 本发明的“多特异性抗体”是可以与至少两种不同的抗原特异性结合的抗体。通过本发明的制备方法或纯化方法得到的优选的多特异性抗体有：可与两种抗原特异性结合的双特异性抗体 (BsAb)（也可称为两类特异性抗体）。

[0151] 本发明中，“不同的抗原”不必是抗原本身不同，抗原决定基不同的情况等也包含在本发明的“不同的抗原”中。因此，例如单一分子内的不同的抗原决定基团包含在本发明的不同的抗原中，分别识别上述单一分子内的不同的抗原决定基的两种抗体在本发明中可作为识别不同的抗原的抗体使用。

[0152] 本发明的多特异性抗体是含有与两种以上不同的抗原具有特异性的抗体或抗体片段的分子。

[0153] 本发明的上述方法中，“核酸的修饰”包含修饰核酸，以得到通过使用标准的色谱法进行分析，将第 1 多肽和第 2 多肽分离形成的峰。

[0154] 本发明的方法中，“修饰核酸”是指修饰核酸，与通过本发明的“修饰”而导入的氨基酸残基对应。更具体地说，对于编码原有的（修饰前）氨基酸残基的核酸，修饰为编码通过修饰导入的氨基酸残基的核酸。

[0155] 通常是指对于原有的核酸进行至少一个碱基的插入、缺失或置换等基因操作或突变处理，形成编码目标氨基酸残基的密码子。即，编码原有氨基酸残基的密码子被编码通过修饰导入的氨基酸残基的密码子置换。上述核酸的修饰可使用本领域公知的技术、例如位点专一诱变法、PCR 突变导入法等适当实施。

[0156] 本发明中的修饰位置例如有：(1) 位于多肽的表面的氨基酸残基、(2) 位于可变区、优选 FR 区的氨基酸残基、(3) 位于恒定区的氨基酸残基。

[0157] “位于多肽的表面的氨基酸”是其支链可以与溶剂分子（通常为水分子）相接触的氨基酸，不一定是整个支链都与溶剂分子接触，支链的一部分与溶剂分子接触时，该氨基酸是位于表面的氨基酸。本领域技术人员通过使用市售的软件进行的同源性建模等，可以制

备多肽或抗体的同源模型,由此可以选择使适当的残基位于表面的氨基酸。

[0158] 本领域技术人员可以通过由同源性建模等制备的同源性模型,适当选择抗体可变区中的表面氨基酸,例如在 H 链 FR 区,可例举 H1、H3、H5、H8、H10、H12、H13、H15、H16、H19、H23、H25、H26、H39、H42、H43、H44、H46、H68、H71、H72、H73、H75、H76、H81、H82b、H83、H85、H86、H105、H108、H110、H112 为表面氨基酸,但本发明并不限于此。H 链的 CDR 区同样可通过同源性模型选择表面氨基酸,例如 H97 几乎整个抗体暴露在表面。在 L 链的 FR 区可以例举 L1、L3、L7、L8、L9、L11、L12、L16、L17、L18、L20、L22、L38、L39、L41、L42、L43、L45、L46、L49、L57、L60、L63、L65、L66、L68、L69、L70、L74、L76、L77、L79、L80、L81、L85、L100、L103、L105、L106、L107、L108 作为表面氨基酸,但本发明并不限于此。L 链的 CDR 区同样可通过同源模型选择表面氨基酸。

[0159] 本发明中,位于可变区的氨基酸残基包含位于重链可变区 (VH) 或轻链可变区 (VL) 的氨基酸残基,优选位于支架区 (FR) 的氨基酸残基。

[0160] 本发明中,在 CDR 以外的 FR 区,暴露在表面的氨基酸例如有:H10、H12、H23、H39、H43、H105,但并不限于此。

[0161] 本发明中,修饰核酸得到的多肽优选为第 1 多肽的均多聚体、第 2 多肽的均多聚体、以及第 1 多肽与第 2 多肽的杂合多聚体。例如如下述实施例所述,第 1 多肽的均多聚体有:人源化 A69-H 链与人源化 BBA-L 链的均二聚体,第 2 多肽的均多聚体有:人源化 B26-H 链与人源化 BBA-L 链的均二聚体,第 1 多肽和第 2 多肽的杂合多聚体有:人源化 A69-H 链以及人源化 B26-H 链与人源化 BBA-L 链的杂合二聚体,但并不限于此。

[0162] 本发明的标准的色谱法有:阳离子交换色谱、阴离子交换色谱、疏水色谱、羟基磷灰石色谱、疏水电荷相互作用色谱、色谱聚焦等。

[0163] 本发明的上述方法中,第 1 多肽和第 2 多肽优选含有重链可变区 (VH)。该可变区可含有例如互补决定区 (CDR)、支架区 (FR)。

[0164] 本发明的方法中,供给修饰的氨基酸残基的数目没有特别限定,例如,使抗体的可变区修饰时,为了不使与抗原的结合活性降低、为了不提高免疫原性,优选使实现目标多肽分离所必须的最低限度的氨基酸残基修饰。

[0165] 为了不提高免疫原性,还优选修饰后氨基酸序列为人序列,但本发明并不限于此。并且,还可以将突变导入到可使修饰后的 FR (FR1、FR2、FR3、FR4) 作为 FR 分别为人序列、使等电点发生变化而导入的修饰以外的位置。上述将各 FR 置换为人序列的方法在非专利文献 (Ono K. 等人., Mol. Immunol. 1999Apr ;36(6) :387-395) 中有报道。为了使各 FR 的等电点变化,也可以修饰为等电点变化之外的人的 FR (例如将 FR3 与等电点低的以外的人 FR 交换)。上述人源化方法在非专利文献 (Dall' Acqua WF., Methods. 2005May ;36(1) :43-60) 中有报道。

[0166] 如果较少的表面电荷改变无法实现目标多肽的分离,则通过反复进行表面电荷的改变和多肽的分离的评价,可以获得所需多特异性抗体。

[0167] 本发明的上述方法中,多特异性抗体优选含有含轻链可变区的第 3 多肽。优选第 1 多肽和第 2 多肽分别与第 3 多肽形成多聚体。

[0168] 本发明的上述方法中,优选第 1 多肽和第 2 多肽含有重链恒定区。更优选重链恒定区中,第 1 多肽与第 2 多肽产生 pI 差。上述重链恒定区有:具有 pI 差的抗体的重链恒定

区,可以使用原来具有 pI 差的 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 的重链恒定区,向第 1 和第 2 多肽导入 pI 差;还可以通过只将引起第 1 和第 2 多肽的重链恒定区中这些同种型间的等电点差异的氨基酸、或者对这些等电点没有影响的相邻氨基酸同时进行修饰,制备非野生型人恒定区,向两个恒定区导入 pI 差。根据 H 链恒定区的 EU 编号,用于向恒定区导入 pI 差的修饰位置例如有:H 链的第 137 号、第 196 号、第 203 号、第 214 号、第 217 号、第 233 号、第 268 号、第 274 号、第 276 号、第 297 号、第 355 号、第 392 号、第 419 号、第 435 号。

[0169] 通过除去重链恒定区的糖链可以产生 pI 差。因此糖链施加部位的第 297 号也作为用于导入 pI 差的修饰位置。

[0170] 本发明中,对于上述第 1 多肽和第 2 多肽含有重链恒定区的方法,也包含上述第 1 多肽和第 2 多肽含有重链可变区的方法,和/或与将上述多特异性抗体含有含轻链可变区的第 3 多肽、上述第 1 多肽和上述第 2 多肽分别与该第 3 多肽形成多聚体的方法组合而成的方法。

[0171] 通过上述方法制备的多特异性抗体也包含在本发明中。

[0172] 由本发明提供的多特异性抗体中,第 1 多肽含有重链可变区和/或重链恒定区时,为了实现上述的“等电点产生差异”,例如可以是使该重链可变区的 Kabat 编号的 10 号、12 号、23 号、39 号、43 号和 105 号的氨基酸残基,或者该重链恒定区的 EU 编号的 137 号、196 号、203 号、214 号、217 号、233 号、268 号、274 号、276 号、297 号、355 号、392 号、419 号、435 号氨基酸残基的至少一种氨基酸残基具有电荷。上述编号中所示的第 1 多肽的氨基酸残基中,只要第 1 多肽和第 2 多肽的等电点有差异,具有该电荷的氨基酸残基以外的氨基酸残基可以是与具有该电荷的氨基酸残基为同种电荷,也可以不具有电荷,还可以具有相反的电

荷。

[0173] 本发明的上述多特异性抗体优选的特征在于:第 2 多肽具有与第 1 多肽的具有电荷的氨基酸残基为相反的电荷,或者不具有电荷。具体有以下的多特异性抗体:第 2 多肽含有重链可变区和/或重链恒定区,选自该重链可变区的 Kabat 编号的 10 号、12 号、23 号、39 号、43 号和 105 号的氨基酸残基、或该重链恒定区的 EU 编号的 137 号、196 号、203 号、214 号、217 号、233 号、268 号、274 号、276 号、297 号、355 号、392 号、419 号、435 号氨基酸残基的至少一种氨基酸残基与上述第 1 多肽中所含的重链可变区和/或重链恒定区中的具有电荷的氨基酸残基具有相反的电荷,或不具有电荷。上述编号所示的第 2 多肽的氨基酸残基中,只要第 1 多肽和第 2 多肽有等电点差异,则具有该电荷的氨基酸残基以外的氨基酸残基可以与具有该电荷的氨基酸残基为同种电荷,也可以不具有电荷,或具有相反的电荷。

[0174] 为了使等电点降低,例如优选 137 号采用 IgG2 或 IgG4 序列、196 号采用 IgG1 或 IgG2 或 IgG4 的序列、203 号采用 IgG2 或 IgG4 的序列、214 号采用 IgG2 的序列、217 号采用 IgG1 或 IgG3 或 IgG4 的序列、233 号采用 IgG1 或 IgG3 或 IgG4 的序列、268 号采用 IgG4 的序列、274 号采用 IgG2 或 IgG3 或 IgG4 的序列、276 号采用 IgG1 或 IgG2 或 IgG4 的序列、355 号采用 IgG4 的序列、392 号采用 IgG3 的序列、419 号采用 IgG4 的序列、435 号采用 IgG1 或 IgG2 或 IgG4 的序列。为了使等电点升高,例如优选 137 号采用 IgG1 或 IgG3 的序列、196 号采用 IgG3 的序列、203 号采用 IgG1 或 IgG3 的序列、214 号采用 IgG1 或 IgG3 或 IgG4 的序列、217 号采用 IgG2 的序列、233 号采用 IgG2 的序列、268 号采用 IgG1 或 IgG2 或 IgG3 的序列、274 号采用 IgG1 的序列、276 号采用 IgG3 的序列、355 号采用 IgG1 或 IgG2 或 IgG3 的序

列、392 号采用 IgG1 或 IgG2 或 IgG4 的序列、419 号采用 IgG1 或 IgG2 或 IgG3 的序列、435 号采用 IgG3 的序列。

[0175] 这些序列的应用只要可以使两个 H 链产生足够的等电点差异即可,未必采用所有的序列。

[0176] 氨基酸中已知有带有电荷的氨基酸。通常带有正电荷的氨基酸(正电荷氨基酸)有赖氨酸(K)、精氨酸(R)、组氨酸(H)。带有负电荷的氨基酸(负电荷氨基酸)已知有天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)等。

[0177] 上述“具有电荷的氨基酸残基”优选从以下的(a)或(b)的任意一组中所含的氨基酸残基中适当选择,没有特别限定。

[0178] (a) 谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)

[0179] (b) 赖氨酸(K)、精氨酸(R)、组氨酸(H)

[0180] 上述抗体中,“具有同种电荷”是指例如重链可变区的上述 Kabat 编号的氨基酸残基、或重链恒定区的上述 EU 编号的氨基酸残基的任意一种具有上述(a)或(b)中任意一组所含的氨基酸残基。

[0181] “具有相反的电荷”是指例如具有重链可变区和/或重链恒定区的第 2 多肽中,上述 Kabat 编号或上述 EU 编号的氨基酸残基的至少一种氨基酸残基是第 1 多肽中所含的重链可变区和/或重链恒定区的对应位置的氨基酸残基,具有上述(a)或(b)中任一组所含的氨基酸残基时,其余的氨基酸残基具有不同组中所含的氨基酸残基。

[0182] 即,本发明提供多特异性抗体,其中,上述具有同种电荷的氨基酸残基选自上述(a)或(b)中任意一组所含的氨基酸残基。

[0183] 原有的(修饰前的)氨基酸残基已经具有电荷时,修饰为不具有电荷的氨基酸残基,这也是本发明的优选方案之一。

[0184] 本发明中,优选氨基酸残基进行修饰,以使第 1 多肽和第 2 多肽的等电点(pI)产生差异,通过修饰导入的氨基酸残基为多个时,这些氨基酸残基中可以以少数含有不具有电荷的氨基酸残基。

[0185] 本发明还提供多特异性抗体,其中,第 1 多肽的可变区含有下述(a1)-(a7)中任一项所述的氨基酸序列,第 2 多肽的可变区含有以下(b1)-(b3)中任一项所述的氨基酸序列,第 3 多肽的可变区含有以下(c1)或(c2)所述的氨基酸序列。

[0186] (a1)SEQ ID NO. 7

[0187] (a2)SEQ ID NO. 8

[0188] (a3)SEQ ID NO. 9

[0189] (a4)SEQ ID NO. 10

[0190] (a5)SEQ ID NO. 11

[0191] (a6)SEQ ID NO. 12

[0192] (a7)SEQ ID NO. 13

[0193] (b1)SEQ ID NO. 14

[0194] (b2)SEQ ID NO. 15

[0195] (b3)SEQ ID NO. 16

[0196] (c1)SEQ ID NO. 17

[0197] (c2)SEQ ID NO. 18

[0198] 上述氨基酸序列是为了更具体地例举本发明中可用于修饰的氨基酸,并不限定为可变区为这些氨基酸的情形。

[0199] 上述多特异性抗体的优选方案之一有以下多特异性抗体:第1多肽的可变区含有 SEQ ID NO. 11 的氨基酸序列、第2多肽的可变区含有 SEQ ID NO. 16 的氨基酸序列、第3多肽的可变区含有 SEQ ID NO. 17 的氨基酸序列。

[0200] 另外一个优选的方案之一例如有以下多特异性抗体:第1多肽的可变区含有 SEQ ID NO. 12 的氨基酸序列、第2多肽的可变区含有 SEQ ID NO. 16 的氨基酸序列、第3多肽的可变区含有 SEQ ID NO. 18 的氨基酸序列。

[0201] 上述多特异性抗体的又一优选方案之一有以下多特异性抗体:第1多肽和第2多肽含有人 IgG4 恒定区、第3多肽含有人  $\kappa$  恒定区。

[0202] 本发明中,“抗体”的术语以最广泛意义使用,只要显示所需生物学活性即可,包含单克隆抗体、多克隆抗体、抗体突变体(嵌合抗体、人源化抗体、低分子化抗体(也包含抗体片段)、多特异性抗体等)。本发明中,在获得这些抗体时,优选采用本发明的抗体修饰方法。

[0203] 如上所述,本发明中的“抗体”包含对使氨基酸残基的电荷改变的抗体进一步通过氨基酸的置换、缺失、附加和/或插入等使氨基酸序列发生改变的抗体。还包含对于通过氨基酸的置换、缺失、附加和/或插入,或者嵌合化或人源化等使氨基酸序列发生了改变的抗体进一步发生氨基酸残基的电荷改变的抗体。即,可以与使小鼠抗体人源化的步骤同时修饰,或者将人源化抗体进一步修饰。

[0204] 氨基酸的置换、缺失、附加和/或插入,以及人源化、嵌合化等氨基酸序列的改变可按照本领域所公知的方法进行。同样,以重组抗体的形式制备本发明的抗体时所利用的抗体的可变区和恒定区也可通过氨基酸的置换、缺失、附加和/或插入,或嵌合化或人源化等来改变其氨基酸序列。

[0205] 本发明的抗体可以是小鼠抗体、人抗体、大鼠抗体、兔抗体、山羊抗体、骆驼抗体等来自任何动物的抗体。并且,例如可以是将嵌合抗体、其中的人源化抗体等氨基酸序列进行置换的修饰抗体。还可以是结合有各种分子的抗体修饰物、抗体片段、低分子抗体等任何抗体。

[0206] “嵌合抗体”是指将来自不同的动物的序列组合制备的抗体。例如,可以是含有小鼠抗体的重链、轻链的可变(V)区和人抗体的重链、轻链的恒定(C)区的抗体。嵌合抗体的制备是公知的,例如可以将编码抗体V区的DNA与编码人抗体C区的DNA连接,将其整合到表达载体中,导入宿主并生成,由此可获得嵌合抗体。

[0207] “人源化抗体”也称为重构(reshaped)人抗体,是将来自人以外的哺乳动物的抗体、例如小鼠抗体的互补决定区(CDR)移植到人抗体的CDR所得。鉴定CDR的方法是公知的(Kabat等人., Sequence of Proteins of Immunological Interest(1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia等人., Nature(1989)342:877)。另外,其常规的基因重组方法也是公知的(欧洲专利申请公开编号 EP125023 号公报、W096/02576 号公报)。因此,通过公知的方法,可以确定例如小鼠抗体的CDR,获得编码该CDR与人抗体的支架区(FR)连接而得的抗体,通过使用通常的表达载体所得的系统生产人源化抗体。



上述 DNA 可以使用制备的在 CDR 和 FR 两者的末端区具有重叠部分的多个寡核苷酸作为引物,通过 PCR 法合成(参照 W098/13388 号公报所述方法)。经由 CDR 连接而成的人抗体的 FR 可以进行选择,使 CDR 形成良好的抗原结合部分。还可根据需要使抗体可变区中的 FR 的氨基酸修饰,以使重构人抗体的 CDR 形成适当的抗原结合部位(Sato, K. 等人., Cancer Res. (1993) 53 :851-856)。可修饰的 FR 中的氨基酸残基包含与抗原直接、或以非共价键结合的部分(Amit 等人., Science(1986) 233 :747-53)、对于 CDR 的结构有影响或作用的部分(Chothia 等人., J. Mol. Biol. (1987) 196 :901-17) 以及与 VH-VL 相互作用相关的部分(EP239400 号专利公报)。

[0208] 本发明的抗体为嵌合抗体或人源化抗体时,这些抗体的 C 区优选使用来自人抗体的区。例如, H 链可以使用 C $\gamma$  1、C $\gamma$  2、C $\gamma$  3、C $\gamma$  4、L 链可以使用 C $\kappa$ 、C $\lambda$ 。为了改善抗体或其生产的稳定性,可以根据需要修饰人抗体 C 区。本发明中的嵌合抗体优选含有来自人以外的哺乳动物的抗体的可变区和来自人抗体的恒定区。人源化抗体优选含有来自人以外的哺乳动物的抗体的 CDR、以及来自人抗体的 FR 和 C 区。来自人抗体的恒定区是每种 IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA、IgD 和 IgE 等同型中具有特有的氨基酸序列。本发明的人源化抗体中使用的恒定区可以是属于任意同型的抗体的恒定区。优选使用人 IgG 的恒定区,但并不限于此。另外,在人源化抗体中所利用的来自人抗体的 FR 也没有特别限定,可以是属于任意同型的抗体。

[0209] 本发明的嵌合抗体和人源化抗体的可变区和恒定区在可显示原有抗体的结合特异性的范围内,可以通过缺失、置换、插入和 / 或附加等进行修饰。

[0210] 利用来自人的序列得到的嵌合抗体和人源化抗体中,在人体内的免疫原性降低,因此可根据治疗目的等给予人。

[0211] 低分子化抗体从体内动力学的性质角度考虑,以及从可使用大肠杆菌、植物细胞等以低成本制备考虑,可用作抗体。

[0212] 抗体片段是低分子化抗体的一种。低分子化抗体包含将抗体片段作为其结构的一部分的抗体。本发明中的低分子化抗体只要具有与抗原的结合能力即可,对其结构、制备方法等没有特别限定。低分子化抗体中也存在比全长抗体具有更高活性的抗体(Orita 等人., Blood(2005) 105 :562-566)。本说明书中,“抗体片段”只要是全长抗体(例如全长 IgG 等)的一部分即可,没有特别限定,优选含有重链可变区(VH)或轻链可变区(VL)。优选的抗体片段的例子例如有: Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fv 等。抗体片段中的 VH 或 VL 的氨基酸序列可以通过置换、缺失、附加和 / 或插入进行修饰。并且只要保持与抗原的结合能力即可,可以使 VH 和 VL 的一部分缺损。例如,上述抗体片段中的“Fv”是含有完全的抗原识别部位和结合部位的最小抗体片段。“Fv”是一个 VH 和一个 VL 通过非共价键强力结合的二聚体(VH-VL 二聚体)。根据各可变区的三个互补链决定区(CDR),可以在 VH-VL 二聚体的表面形成抗原结合部位。六个 CDR 使抗体具有抗原结合部位。但是,一个可变区(或者为只含有抗原特异性的三个 CDR 的 Fv 的一半),其亲和性比与全部结合部位低,但仍具有识别抗原并结合的能力。因此,上述比 Fv 小的分子也包含在本发明的抗体片段中。抗体片段的可变区可以进行嵌合化或人源化。

[0213] 低分子化抗体优选含有 VH 和 VL 两者。低分子化抗体的例子有:利用 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和 Fv 等抗体片段、以及可利用抗体片段制备的 scFv(信号链 Fv)

等 (Huston 等人., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1988) 85 :5879-83 ;Pluckthun “The Pharmacology of Monoclonal Antibodies” Vol. 113, Resenburb and Moore(eds.), Springer Verlag, New York, pp. 269-315, (1994)) ;diabodies(Holliger 等人., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1993) 90 :6444-8 ;EP 404097 ;W093/11161 ;Johnson 等人., Method in Enzymology(1991) 203 :88-98 ;Holliger 等人., Protein Engineering(1996) 9 :299-305 ;Perisic 等人., Structure(1994) 2 :1217-26 ;John 等人., Protein Engineering(1999) 12(7) :597-604 ;Atwell 等人., Mol. Immunol. (1996) 33 :1301-12) ;sc(Fv) 2(Hudson 等人., J Immunol. Methods(1999) 231 :177-89 ;Orita 等人., Blood(2005) 105 :562-566) ;triabodies(Journal of Immunological Methods(1999) 231 :177-89) ;tandem diabodies(Cancer Research(2000) 60 :4336-41)。

[0214] 抗体片段可通过酶例如木瓜蛋白酶、胰蛋白酶蛋白酶等对抗体进行处理获得 (参照 Morimoto 等人., J. Biochem. Biophys. Methods(1992) 24 :107-17 ;Brennan et al., Science(1985) 229 :81)。可以以该抗体片段的氨基酸序列为基础,通过基因重组制备。

[0215] 具有使抗体片段修饰的结构低分子化抗体可以利用由酶处理或基因重组得到的抗体片段进行构建。或者可以构建编码低分子化抗体全体的基因,将其导入表达载体中,然后在适当的宿主细胞中表达 (例如参照 Co 等人., J. Immunol. (1994) 152 :2968-76 ;Better 和 Horwitz, Methods Enzymol. (1989) 178 :476-96 ;Pluckthun 和 Skerra, Methods Enzymol. (1989) 178 :497-515 ;Lamoyi, Methods Enzymol. (1986) 121 :652-63 ;Rousseaux 等人., Methods Enzymol. (1986) 121 :663-9 ;Bird 和 Walker, Trends Biotechnol. (1991) 9 :132-7)。

[0216] 上述“scFv”是将两个可变区根据需要经由接头等结合而成的单链多肽。scFv 中所含的两个可变区通常是一个 VH 和一个 VL,也可以是两个 VH 或两个 VL。通常,scFv 多肽在 VH 和 VL 结构域之间含有接头,由此可以形成为结合抗原而必须的 VH 和 VL 的成对的部分。通常,在同一分子内,为了在 VH 和 VL 之间形成成对的部分,通常是将连接 VH 和 VL 的接头制成 10 个氨基酸以上长度的肽接头。只要不妨碍 scFv 的形成,本发明的 scFv 的接头并不限于上述多肽接头。scFv 的总论可参考 Pluckthun “The Pharmacology of Monoclonal Antibody”, Vol. 113(Rosenburg and Moore ed., Springer Verlag, NY, PP. 269-315(1994))。

[0217] 另外,“双价小抗体 (diabody, Db)”是指通过基因融合构建的双价的抗体片段 (P. Holliger 等人., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448(1993) ;EP 404,097 号 ;W093/11161 号等)。双价小抗体是由两根多肽链构成的二聚体,多肽链是在个自、相同的链中,轻链可变区 (VL) 和重链可变区 (VH) 经由短的、例如 5 个残基左右的接头结合在互相不能结合的位置上。被编码在同一多肽链上的 VL 和 VH,由于它们之间的接头短,因此无法形成单链 V 区片段,而形成二聚体,因此双价小抗体具有两个抗原结合部位。此时,如果同时表达将两个不同的表位 (a、b) 所对应的 VL 和 Vh 以 VL<sub>a</sub>-VH<sub>b</sub> 和 VL<sub>b</sub>-VH<sub>a</sub> 的组合、以 5 个残基左右的接头连接所得,则以双特异性 Db 的形式分泌。

[0218] 双价小抗体含有两个分子的 scFv,因此含四个可变区。结果具有两个抗原结合部位。与未形成二聚体的 scFv 的情形不同,为了形成双价小抗体,如果通常各 scFv 分子内的连接 VH 和 VL 之间的接头制成多肽接头,则可以制成 5 个氨基酸左右。但是,形成双价小抗

体的 scFv 的接头只要不妨碍 scFv 的表达、不妨碍双价小抗体的形成即可,并不限于上述肽接头。

[0219] 本发明中进一步优选双特异性抗体作为多特异性抗体。

[0220] 上述“双特异性抗体”是指重链可变区和轻链可变区连接成一条链的结构的抗体(例如可以是 sc(Fv)<sub>2</sub>)。还可以是重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)连接成 scFv(或 sc(Fv)<sub>2</sub>)、将其与 Fc 区(欠缺 CH1 结构域的恒定区)结合而成的抗体样分子(例如 scFv-Fc)。含有 scFv-Fc 的多特异性抗体具有(scFv)<sub>2</sub>-Fc 型的结构,该结构由以下形成:第 1 多肽为 VH1-接头-VL1-Fc、第 2 多肽为 VH2-接头-VL2-Fc。还可以是单结构域抗体与 Fc 区结合而成的抗体样分子(Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2006, 9(2), 184-93)。

[0221] 本发明的方法中,编码导入突变前的抗体(本说明书中可简称为“本发明的抗体”)的 H 链或 L 链的基因可使用已知的序列,还可以按照本领域公知的方法获得。例如可以从抗体文库中获得,还可以从生产单克隆抗体的杂交瘤中克隆编码抗体的基因来获得。

[0222] 关于抗体文库,已公知很多抗体文库,还公知抗体文库的制备方法,因此,本领域人员可以获得适当的抗体文库。例如对于抗体噬菌体文库可以参照 Clackson 等人., Nature 1991, 352:624-8; Marks 等人., J. Mol. Biol. 1991, 222:581-97; Waterhouses 等人., Nucleic Acids Res. 1993, 21:2265-6; Griffiths 等人., EMBO J. 1994, 13:3245-60; Vaughan 等人., Nature Biotechnology 1996, 14:309-14; 以及日本特表平 20-504970 号公报等文献。其它还可以使用将真核细胞制成文库的方法(W095/15393 号说明书)或核糖体展示法等公知的方法。并且还已知由使用人抗体文库、通过淘选获得人抗体的技术。例如,可以将人抗体的可变区制成单链抗体(scFv),通过噬菌体展示法在噬菌体的表面表达,选择与抗原结合的噬菌体。对所选择的噬菌体的基因进行分析,则可以确定编码与抗原结合的人抗体的可变区的 DNA 序列。如果了解了与抗原结合的 scFv 的 DNA 序列,则可以以该序列为基础制备适当的表达载体,获得人抗体。这些方法是已知的,可以参考 W092/01047、W092/20791、W093/06213、W093/11236、W093/19172、W095/01438、W095/15388。

[0223] 由杂交瘤获得编码抗体的基因的方法基本上可以使用公知技术,可如下获得:使用所需抗原或表达所需抗原的细胞作为致敏抗原,将其按照常规的免疫方法进行免疫,将所得免疫细胞通过通常的细胞融合与公知的母细胞融合,通过通常的筛选法筛选单克隆的抗体生成细胞(杂交瘤),使用反转录酶,从所得杂交瘤的 mRNA 中合成抗体的可变区(V 区)的 cDNA,将其与编码抗体恒定区(C 区)的 DNA 连接。

[0224] 更具体地说,用于获得编码上述 H 链和 L 链的抗体基因的致敏抗原包含具有免疫原性的完全抗原和含有不显示免疫原性的半抗原等的不完全抗原两者,但并不限于该例举。例如可以使用目标蛋白质的全长蛋白或部分肽等。除此之外还已知由多糖类、核酸、脂质等构成的物质可以作为抗原,本发明的抗体的抗原没有特别限定。抗原的制备可按照本领域公知的方法进行,例如可按照使用杆状病毒的方法(例如 W098/46777 等)进行。杂交瘤的制备例如可按照 Milstein 等人.(G. Kohler 和 C. Milstein, Methods Enzymol. 1981, 73:3-46)的方法等进行。抗原的免疫原性低时,可以与白蛋白等具有免疫原性的巨大分子结合,进行免疫。还可根据需要使抗原与其它分子结合,制成可溶性抗原。使用受体等的跨膜分子作为抗原时,可以使用受体胞外区部分作为片段,或使用在细胞表面上表达跨膜分子的细胞作为免疫原。

[0225] 抗体生成细胞可使用上述适当的致敏抗原免疫动物获得。或者将可生成抗体的淋巴细胞进行体外免疫,制成抗体生成细胞。被免疫的动物可使用各种哺乳动物,通常使用啮齿目、兔目、灵长目动物。可例举小鼠、大鼠、仓鼠等啮齿目。兔等兔目。食蟹猴、猕猴、狒狒、黑猩猩等的灵长目动物。除此之外还已知具有人抗体基因的所有组成成分的转基因动物,使用上述动物也可以获得人抗体(参照 W096/34096 ;Mendez 等人., Nat. Genet. 1997, 15 :146-56)。例如体外用所需抗原或表达所需抗原的细胞对人淋巴细胞致敏,将致敏淋巴细胞与人骨髓瘤细胞例如 U266 融合,以此代替上述转基因动物的使用,可以获得与抗原具有结合活性的所需的人抗体(参照日本特公平 1-59878 号)。另外,具有人抗体基因的所有组成成分的转基因动物用所需抗原免疫,则可以获得所需的人抗体(参照 W093/1227、W092/03918、W094/02602、W096/34096 和 W096/33735)。

[0226] 动物的免疫例如可如下进行:用磷酸盐缓冲液(PBS)或生理盐水等将致敏抗原稀释并悬浮,根据需要混合佐剂进行乳化,然后注射到动物的腹腔内或皮下。然后优选每隔 4-21 天给予数次混合在氟氏不完全佐剂中的致敏抗原。抗体生成的确认可通过常用的方法测定动物血清中的目标抗体效价来进行。

[0227] 杂交瘤可以用常用的融合剂(例如聚乙二醇),将从用所需抗原免疫了的动物或由淋巴细胞中得到的抗体生成细胞与骨髓瘤细胞融合制备(Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, Academic Press, 1986, 59-103)。还可根据需要培养杂交瘤细胞,使其增殖,通过免疫沉淀、放射免疫分析(RIA)、酶联免疫吸附分析(ELISA)等公知的分析方法测定由该杂交瘤生成的抗体的结合特异性。然后根据需要测定了目标特异性、亲和性或活性的生成抗体的杂交瘤通过极限稀释法等方法进行亚克隆。

[0228] 接着,使用可与抗体特异性结合的探针(例如与编码抗体恒定区的序列互补的寡核苷酸等),从杂交瘤或抗体生成细胞(致敏淋巴细胞等)中克隆编码被选择的抗体的基因。还可以通过 RT-PCR 从 mRNA 中克隆。免疫球蛋白分为 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM 五个不同的类。并且这些类又分为几种同种型(同型)(例如 IgG-1、IgG-2、IgG-3 和 IgG-4 ; IgA-1 和 IgA-2 等)。本发明中,在抗体的制备中使用的 H 链和 L 链可以来自属于这些任意的类和同种型的抗体,没有特别限定,特别优选 IgG。

[0229] 这里,可以通过基因工程的方法将使编码 H 链和 L 链的基因修饰。例如对于小鼠抗体、大鼠抗体、兔抗体、仓鼠抗体、绵羊抗体、骆驼抗体等抗体,为了降低与人的异种免疫原性等,可以适当制备人工修饰的基因重组型抗体、例如嵌合抗体、人源化抗体等。嵌合抗体是含有人以外的哺乳动物例如小鼠抗体的 H 链、L 链的可变区和人抗体的 H 链、L 链的恒定区的抗体,可如下获得:将编码小鼠抗体可变区的 DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 连接,将其整合到表达载体中,导入宿主并生产。人源化抗体也称为重构人抗体,如下合成:通过 PCR 法,由制备的末端部具有重叠部分的多个寡核苷酸合成设计成连接有人以外的哺乳动物例如小鼠抗体的互补决定区(CDR)的 DNA 序列。将所得 DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 连接,接着整合到表达载体中,将其导入宿主并生成(参照 EP239400, W096/02576)。经由 CDR 连接的人抗体的 FR 选择互补决定区形成良好的抗原结合部位的 FR。还可以根据需要,置换抗体的可变区的支架区的氨基酸,使重构人抗体的互补决定区形成适当的抗原结合部位(K. Sato 等人., Cancer Res. 1993, 53 :851-856)。

[0230] 除上述人源化之外,还可以为了改善与抗原的结合性等抗体的生物学特性而进行

修饰。本发明的修饰可通过位点专一性突变（例如参照 Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488）、PCR 突变、盒突变法等方法进行。通常，生物学特性得到改善的抗体突变体与原有的抗体的可变区的氨基酸序列具有 70% 或以上、更优选 80% 以上、进一步优选 90% 以上（例如 95% 以上、97%、98%、99% 等）的氨基酸序列同源性和 / 或以类似性。本说明书中，序列的同源性和 / 或类似性是根据需要使序列重整以及导入缺口，使序列同源性获得最大值，然后以与原有的抗体残基相同（相同残基）或类似（通常根据氨基酸支链的特性被分类为同一组的氨基酸残基）的氨基酸残基的比例定义。通常，天然的氨基酸残基根据其支链的性质被分类为（1）疏水性：丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸和亮氨酸；（2）中性亲水性：天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、苏氨酸和丝氨酸；（3）酸性：天冬氨酸和谷氨酸；（4）碱性：精氨酸、组氨酸和赖氨酸；（5）对链的取向有影响的残基：甘氨酸和脯氨酸；以及（6）芳族性：酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸。

[0231] 通常，存在于 H 链和 L 链可变区中的全部中，六个互补决定区（超可变部；CDR）相互作用，形成抗体的抗原结合部位。已知其中的一个可变区的亲和性比含有全部结合部位的低，但是仍具有识别抗原并结合的能力。因此，对于本发明的编码 H 链和 L 链的抗体基因，只要由该基因所编码的多肽可以保持与所需抗原的结合性即可，可以编码含有 H 链和 L 链各抗原结合部位的片段部分。

[0232] 根据本发明的方法，如上所述，例如可以保持实际活性，有效地获得双特异性抗体。

[0233] 重链可变区如上所述，通常由 3 个 CDR 区和 4 个 FR 区构成。本发明的优选方案中，进行“修饰”的氨基酸残基可以从位于 CDR 区或 FR 区的氨基酸残基中适当选择。通常 CDR 区的氨基酸残基的修饰可以使其与抗原的结合能力降低。因此，本发明中，进行“修饰”的氨基酸残基并没有特别限定，优选从位于 FR 区的氨基酸残基中适当选择。

[0234] 在人或小鼠等生物中，本领域技术人员可以利用公共数据库等适当获得可用作抗体的可变区的 FR 的序列。更具体地说，通过后述实施例的方法，可以获得 FR 区的氨基酸序列信息。

[0235] 本说明书中引用的所有现有技术文献均作为参照原引到本说明书中。

[0236] 实施例

[0237] 以下通过实施例具体说明本发明，但本发明并不受这些实施例的限定。

[0238] [实施例 1] 具有杂合 L 链的双特异性抗体的人源化

[0239] 在日本特愿 2005-112514 中，对于含有凝血时间缩短效果最高的抗 Factor IXa 抗体 A69-VH、抗 Factor X 抗体 B26-VH、杂合 L 链（BBA）的组合的双特异性抗体如下进行人源化。

[0240] 1-1 人抗体的同源性检索

[0241] 由一般公开的 Kabat 数据库 (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) 和 IMGT 数据库 (<http://imgt.cines.fr/>) 获得人抗体氨基酸序列数据，使用构建的数据库，分成小鼠 A69-H 链可变区（氨基酸序列：SEQ ID NO. 19）、小鼠 B26-H 链可变区（氨基酸序列：SEQ ID NO. 20）、小鼠 BBA-L 链可变区（氨基酸序列：SEQ ID NO. 21）进行同源性检索。结果可以确认：与以下所示人抗体序列具有较高的同源性，由此决定在人源化抗体的支架区（以下称为 FR）使用。

[0242] (1)A69-H 链可变区 :KABATID-000064(Kabat 数据库 )

[0243] (Kipps 等人., J. Clin. Invest. 1991 ;87 :2087-2096)

[0244] (2)B26-H 链可变区 :EMBL 登记号 AB063872(IMG T 数据库 )

[0245] (未公开数据 )

[0246] (3)BBA-L 链可变区 :KABATID-024300(Kabat 数据库 )

[0247] (Welschof 等人., J. Immunol. Method. 1995 ;179 :203-214)

[0248] 将各小鼠抗体的互补性抗原决定区 ( 以下称为 CDR ) 移植到 (1)-(3) 的人抗体的 FR, 制备人源化抗体。

[0249] 使用 NCBI 中一般公开的同源性检索网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 检索与 (4)-(6) 的人抗体的同源性高的人抗体分泌信号序列。使用检索得到的、以下所示的分泌信号序列。

[0250] (4)A69-H 链可变区 :Genbank 登记号 AF062257。

[0251] (5)B69-H 链可变区 :Genbank 登记号 AAC18248。

[0252] (6)BBA-L 链可变区 :Genbank 登记号 AAA59100。

[0253] 1-2 人源化抗体基因表达载体的构建

[0254] 在编码由分泌信号序列至抗体可变区的氨基酸序列的碱基序列中, 交互制备 12 条 50 个碱基左右的寡 DNA, 使 3' 末端一侧有约 20 个碱基左右杂合。合成寡 DNA 设计成在 5' 末端一侧编码人序列, 在 3' 末端一侧编码小鼠序列, 或者全部碱基编码人序列。并且, 在抗体可变区基因的 5' 末端退火, 与具有 XhoI 切断序列的引物一起在抗体可变区基因的 3' 末端退火, 制备具有 SfiI 切断序列且编码内含子序列的 5' 末端序列的引物。

[0255] 将各 1  $\mu$  L 制备成 2.5  $\mu$  M 的合成寡 DNA 混合, 加入 1 $\times$  TaKaRa Ex Taq 缓冲液、0.4mM dNTPs、0.5 单位 TaKaRa Ex Taq ( 均为宝酒造制备 ), 制备成 48  $\mu$  L 反应液。在 94 $^{\circ}$ C 下保温 5 分钟后, 将含有 94 $^{\circ}$ C 2 分钟、55 $^{\circ}$ C 2 分钟、72 $^{\circ}$ C 2 分钟的反应进行 2 个循环, 实施各合成寡 DNA 的装配和链延伸反应。接着, 添加 1  $\mu$  L 在抗体基因的 5' 末端和 3' 末端退火的引物 ( 各 10  $\mu$  M ), 将含有 94 $^{\circ}$ C 30 秒、50 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分钟的反应进行 35 个循环, 在 72 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟, 扩增抗体可变区基因。PCR 后, 将反应液总量供给 1% 琼脂糖凝胶电泳。使用 QIAquick Gel Extraction 试剂盒 (QIAGEN), 按照所附说明书的方法纯化目标大小 ( 约 400dp ) 的扩增片段, 用 30  $\mu$  L 灭菌水洗脱。使用 pGEM-T Easy 载体系统 (Promega), 按照所附说明书的方法对该片段进行克隆。各 DNA 片段的碱基序列是使用 BigDye 终止子循环测序试剂盒 (Applied Biosystems), 通过 DNA 测序仪 ABI PRISM 3730xL DNA 测序仪或 ABI PRISM 3700DNA 测序仪 (Applied Biosystems), 按照所附说明书的方法确定各 DNA 片段的碱基序列。

[0256] 将插入了确认为正确的人源化抗体可变区基因序列的 H 链可变区片段的质粒用 XhoI 和 SfiI、将插入了 L 链可变区片段的质粒用 EcoRI 消化, 然后将反应液供给 1% 琼脂糖凝胶电泳。使用 QIAquick 凝胶纯化试剂盒 (QIAGEN), 按照所附说明书的方法纯化目标尺寸 ( 约 400bp ) 的 DNA 片段, 用 30  $\mu$  L 灭菌水洗脱。然后如下制备动物细胞用表达载体。为了使 H 链为杂合组合的 IgG4 优先表达, 参考 IgG1 的 knobs-into-hole 技术 (Merchant AM 等人., Nature Biotechnology, 1998 年, Vol. 16, p. 677-681), 使用 IgG4 的 CH3 部分的氨基酸置换体。并为了促进 H 链的二聚体形成, 向铰链导入氨基酸置换 (-ppcpScp-  $\rightarrow$  -ppcpPcp-)。

在具有鸡  $\beta$  肌动蛋白启动子的 pCAGGS (Niwa 等人., Gene, 1991 年, Vol. 108, 193-199 页) 中整合置换为 Y39C、T366W 的恒定区基因, 向所得表达载体中插入人源化 A69H 链可变区抗体基因片段, 制备人源化 A69H 链表达载体。另外, 在 pCAGGS 中整合置换为 E356C、T366S、L368A、Y407V 的恒定区基因, 向所得表达载体中插入人源化 B26H 链可变区抗体基因片段, 制备人源化 B26H 链表达载体。另外, 在 pCAGGS 中插入了野生型抗体 L 链恒定区得到的质粒 (pCAG-g  $\kappa$  DNA) 用 EcoII 消化, 制备插入了人源化 BBA L 链可变区抗体基因片段的表达载体。连接反应是使用 Rapid DNA 连接试剂盒 (Roche Diagnostics), 转化大肠杆菌 DH5  $\alpha$  株 (东洋纺绩制备)。

#### [0257] 1-3 人源化双特异性抗体的表达

[0258] 采用以下方法进行人源化双特异性抗体的表达。来自人胎' 肾癌细胞的人源化双特异性抗体的表达使用实施例 1-2 所述方法或以下方法进行。将来自人胎肾癌细胞的 HEK293H 株 (Invitrogen) 悬浮于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (Invitrogen) 中, 以  $5-6 \times 10^5$  个 /mL 的细胞密度、以 10mL 接种于粘着细胞用培养皿 (直径 10cm, CORNING) 的各皿中, 在 CO<sub>2</sub> 培养箱 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) 内培养一昼夜, 然后吸引除去培养基, 添加 6.9mL 含有 1% 胎牛血清 (Invitrogen) 的 CHO-S-SFM-II (Invitrogen) 培养基。将在 1-2 中制备的质粒 DNA 混合液 (合计 13.8  $\mu$ g) 与 20.7  $\mu$ L 1  $\mu$ g/mL 聚乙烯亚胺 (Polysciences Inc.) 和 690  $\mu$ L CHO-S-SFM-II 培养基混合, 在室温下静置 10 分钟, 将其加入到各培养皿的细胞中, 在 CO<sub>2</sub> 培养箱 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 内培养 4-5 小时。然后添加 6.9mL 含有 1% 胎牛血清 (Invitrogen) 的 CHO-S-SFM-II (Invitrogen) 培养基, 在 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 3 天。回收培养上清, 然后离心 (约 2000g, 5 分钟, 室温) 除去细胞, 进一步过 0.22  $\mu$ m 滤器 MILLEX<sup>(R)</sup>-GV (Millipore) 进行灭菌, 该样品在使用之前在 4°C 下保存。

#### [0259] 1-4 人源化双特异性抗体的纯化

[0260] 向按照实施例 1-2 所述方法得到的培养上清中添加 100  $\mu$ L 的 rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences), 在 4°C 下颠倒混合 4 小时以上。将该溶液转移至 0.22  $\mu$ m 的滤器杯 Ultrafree<sup>(R)</sup>-MC (Millipore), 用 500  $\mu$ L 含有 0.01% 吐温<sup>(R)</sup> 20 的 TBS 洗涤三次, 将 100  $\mu$ L 含有 0.01% 吐温<sup>(R)</sup> 20 的 50mM 乙酸钠溶液悬浮于 rrProtein A Sepharose<sup>TM</sup> 树脂中, 使 pH 为 3.3, 静置 2 分钟, 然后使抗体溶出。立即加入 6.7  $\mu$ L 的 1.5M Tris-HCl pH 7.8 进行中和。

#### [0261] 1-5 人源化双特异性抗体的浓度定量

[0262] 如下所示按照两种方法进行测定。

[0263] 用包被缓冲液将山羊 Goat 抗人 IgG (Biosource International) 制备成 1  $\mu$ g/mL, 固定于 Nunc-Immuno 板上 (Nunc)。用稀释缓冲液 (D.B.) 进行封闭, 然后添加用 D.B. 适当稀释的培养上清样品。同样地添加由 2000ng/mL 以 3 倍系列、用 D.B. 稀释为 11 个梯度的人 IgG4 (人源化抗 TF 抗体, 参照 WO 99/51743), 作为用于计算抗体浓度的标准品。洗涤 3 次后, 使其与山羊抗人 IgG、碱性磷酸酶反应 (Biosource International)。洗涤 5 次后, 以 Sigma 104<sup>(R)</sup> 磷酸酶底物 (Sigma-Aldrich) 作为底物进行显色, 通过吸光度读数仪型号 3550 (Bio-Rad Laboratories)、以 665nm 作为参照波长测定 405nm 的吸光度。使用微量板管理 III (Bio-Rad Laboratories) 软件, 由标准品的校正曲线计算培养上清中人 IgG 的浓度。

[0264] 还使用 Biacore 1000 (BIACORE), 使用固定有蛋白 A 的传感芯片 CM5 (BIACORE) 进行定量。具体来说, 按照生产商的说明书, 将用 10mM 乙酸钠水溶液 (pH 4.0, BIACORE) 稀释为 50  $\mu$ g/mL 的蛋白 A (SIGMA) 溶液以 5  $\mu$ L/分钟在活化的传感芯片反应 30 分钟, 然后实施封闭操作, 制备固定有蛋白 A 的传感芯片。使用该传感芯片、使用 Biacore 1000 (BIACORE), 测定培养上清和纯化品的浓度。传感芯片的固定和浓度测定是使用 HBS-EP 缓冲液 (BIACORE)。浓度测定时的标准品使用由 4000ng/mL 按照 2 倍系列用 HBS-EP 缓冲液稀释为 6 个梯度的人源化 IgG4 抗体 (人源化抗 TF 抗体, 参照 W099/51743)。

[0265] 1-6 人源化双特异性抗体的凝血活性评价

[0266] 为了明确双特异性抗体对血友病 A 血液的凝固能力是否有改变, 研究该抗体对使用乏因子 VIII 血浆的活化部分凝血酶时间 (APTT) 的影响。将 50  $\mu$ L 各种浓度的抗体溶液、50  $\mu$ L 乏因子 VIII 血浆 (Biomerieux) 和 50  $\mu$ L APTT 试剂 (Dade Behring) 的混合液在 37°C 下加温 3 分钟。凝固反应是通过将 50  $\mu$ L 20mM 的  $\text{CaCl}_2$  (Dade Behring) 加入到该混合液中引发。通过连接有 CR-A (Amelung) 的 KC10A (Amelung) 测定至凝固所需时间。

[0267] 以乏因子 VIII 血浆的凝固时间为 0%, 以正常血浆的凝固时间为 100%, 制作校正曲线, 使用该校正曲线, 由添加了双特异性抗体时的凝固时间计算双特异性抗体的因子 VIII 样活性 (%)。

[0268] 1-7 保持凝血活性的人源化双特异性抗体的获得

[0269] 在上述凝血活性评价中, 对于凝血能力低的人源化双特异性抗体, 关注其活性的升高, 使人源化抗体 FR 的氨基酸修饰。具体来说, 使用 QuikChange 位点专一性突变试剂盒 (Stratagene), 按照所附说明书记载的方法向人源化抗体可变区导入突变。将插入了确认为目标人源化抗体可变区基因序列的 H 链可变区片段的质粒用 XhoI 和 SfiI、将插入了 L 链可变区片段的质粒用 EcoRI 消化, 然后将反应液供给 1% 琼脂糖凝胶电泳。使用 QIAquick 凝胶纯化试剂盒 (QIAGEN), 按照所附说明书记载的方法纯化目标大小 (约 400bp) 的 DNA 片段, 用 30  $\mu$ L 灭菌水洗脱。然后按照实施例 1-2 所示方法制备动物细胞用表达质粒。按照实施例 1-3、1-4、1-5 所示方法制备人源化双特异性抗体, 按照实施例 1-6 所示方法评价凝血活性。

[0270] 将 FR 序列的氨基酸修饰和血液凝固能力的评价反复进行, 获得与嵌合双特异性抗体 (A69/B26/BBA) 具有同等活性的人源化双特异性抗体 (人源化 A69 (hA69a)/人源化 B26 (hB26-F123e4)/人源化 BBA (hAL-F123j4)) (图 1)。将各抗体可变区序列表示为以下的 SEQ ID NO。

[0271] (1) 人源化 A69 抗体 VH (hA69a) SEQ ID NO. 1 (碱基序列)、SEQ ID NO. 2 (氨基酸序列)

[0272] (2) 人源化 B26 抗体 VH (hB26-F123e4) SEQ ID NO. 3 (碱基序列)、SEQ ID NO. 4 (氨基酸序列)

[0273] (3) 人源化 BBA 抗体 VHL (hAL26-F123j4) SEQ ID NO. 5 (碱基序列)、SEQ ID NO. 6 (氨基酸序列)

[0274] [实施例 2] 为了双特异性抗体的分离而确定可变区氨基酸修饰位置

[0275] 在制备双特异性抗体时的表达中, 使用两种 H 链和一种 L 链, 则人源化 A69-H 链和人源化 BBA-L 链的均二聚体、人源化 B26-H 链和人源化 BBA-L 链的均二聚体、人源化 A69-H



链和人源化 B26-H 链与人源化 BBA-L 链的杂合二聚体三种抗体表达。将该三种抗体分离,为了只纯化双特异性抗体,使人源化 A69H 链可变区的等电点降低,使人源化 B26H 链可变区的等电点升高,进行氨基酸修饰。

[0276] 首先,为了确认暴露在人源化 A69 抗体和人源化 B26 抗体的可变区表面的氨基酸残基,使用 MOE 软件 (Chemical Computing Group Inc.),通过同源性建模制备人源化 A69 抗体和人源化 B26 抗体的抗体 Fv 区模型。模型如图 2 所示,通过该模型的详细分析,在 CDR 以外的 FR 序列中,在露出于表面的氨基酸中, H10、H12、H23、H39、H43、H105 (Kabat 编号, Kabat EA 等人. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH) 是不会使活性降低、而可以使等电点变化的候选氨基酸。

[0277] [实施例 3] 人源化双特异性抗体的可变区氨基酸的修饰

[0278] 在实施例 2 中所选定的位置,为了制备修饰抗体而进行氨基酸修饰。具体来说,使用 QuikChange 位点专一性突变试剂盒 (Stratagene),按照所附说明书记载的方法制备人源化 A69 抗体 H 链可变区 (hA69a, SEQ ID NO. 1) 和人源化 B26 抗体 H 链可变区 (hB26-F123e4, SEQ ID NO. 3),向其中导入突变。将插入了确认为目标人源化抗体可变区基因序列的 H 链可变区的片段的质粒用 XhoI 和 SfiI 消化,然后将反应液供给 1% 琼脂糖凝胶电泳。使用 QIAquick 凝胶纯化试剂盒 (QIAGEN),按照所附说明书记载的方法纯化目标大小 (约 400bp) 的 DNA 片段,用 30  $\mu$ L 灭菌水洗脱。按照实施例 1-2 所示的方法,参考 konbs-into-hole 技术,将制备的 DNA 片段插入到置换了恒定区氨基酸的表达质粒和具有野生型恒定区的表达质粒中,制备 H 链表达载体。然后按照实施例 1-3、1-4、1-5 所示方法制备人源化双特异性抗体。修饰的人源化抗体的可变区序列如以下表 1 所述 SEQ ID NO 所示。

[0279] 表 1

[0280]

名称	人源化 A69-H 链可变区	
	变异位置	氨基酸 SEQ ID No.
hA69a	—	2
hA69-p18	Q43E, Q105E	7
hA69-p8	K12V, Q43E, Q105E	8
hA69-p17	K23T, Q43E, Q105E	9
hA69-p16	K12V, K23T, Q43E, Q105E	10
hA69-PFL	Q1E, K12V, K23T, G27Y, Q43E, N97L, Q105E	11
hA69-KQ	Q1E, K12Q, G16A, G27Y, S30T, Q43E, N97Q, Q105E	12
hA69-N97R	N97R	13
名称	人源化 B26-H 链可变区	
	变异位置	氨基酸 SEQ ID No.
hB26-F123e4	—	4
hB26-p19	Q43K, Q105R	14
hB26-p15	Q39K, Q43K, Q105R	15
hB26-PF	Q1E, P9A, D10Q, M28T, A37V, Q43K, Q105R	16

[0281] [实施例 4] 修饰的人源化抗体的等电聚焦电泳分析

[0282] 为了对可变区的氨基酸修饰导致的表面电荷变化进行评价,实施修饰抗体的制备以及等电聚焦电泳的分析

[0283] 将人源化 BBA-L 链 (hAL-F123j4) 表达载体与使人源化 A69-H 链修饰得到的 hA69-p18、hA69-p8、hA69-p17、hA69-p16 和未修饰的 hA69a 的各 H 链表达载体组合,同时表达,由此制备由 hA69、hA69a-p18、hA69-p8、hA69-p17、hA69-p16 五种均二聚体构成的抗体。同样,将人源化 BBA-L 链表达载体与使人源化 B26-H 链修饰得到的 hB26-p19、hB26-p15 和未修饰的 hB26-F123e4 的各 H 链表达载体组合,同时表达,由此制备由 hB26-F123e4、hB26-p19、hB26-p15 三种均二聚体构成的抗体。等电聚焦电泳如下进行。使用 Phastsystem Cassette(Amercham Bioscience 制备),用以下的溶胀液用使 Phast-Gel Dry IEF(Amercham Bioscience 制备)凝胶溶胀约 30 分钟。

[0284]

20%甘油	0.95 mL
milliQ 水	0.95 mL
Bio-Lyte7/9 (BioRad 制备)	10 $\mu$ L
Bio-Lyte3/10 (BioRad 制备)	10 $\mu$ L

[0285] Pharmalyte 8-10.5for IEF(Amercham Bioscience 制备)80  $\mu$ L

[0286] 使用溶胀的凝胶,通过 Phastsystem(Amercham Bioscience 制备),按照以下程序进行电泳。样品是在步骤 2 添加到凝胶中。pI 标志使用 pI 校正曲线试剂盒 (Amersham Biosciences)。

[0287]

步骤 1:	2000 V	2.5 mA	3.5 W	15°C	75 Vh
步骤 2:	200 V	2.5 mA	3.5 W	15°C	15 Vh
步骤 3:	2000 V	2.5 mA	3.5 W	15°C	410 Vh

[0288] 电泳后的凝胶用 20 % TCA 固定,然后用 Silver staining 试剂盒、蛋白质 (Amersham Biosciences),按照试剂盒所附的说明书进行银染。染色后,由 pI 标志的已知等电点计算样品的等电点。

[0289] 未修饰和修饰的人源化 A69 抗体的均二聚体、人源化 B26 抗体的均二聚体的分析结果如图 3 所示。通过表面电荷的改变,在等电聚焦电泳中观察到条带的移动。以 pI 标志为参考推测的各抗体的等电点是相对于未修饰的 hA69a 均二聚体的 8.8,修饰的 hA69-p18 约为 8.4,hA69-p17 约为 8.2,hA69-p8 约为 8.1,通过修饰可以产生最大约 0.7 的等电点差。人源化 B26 均二聚体也同样,相对于未修饰的 hB26-F123e4 的 9.1,修饰的 hB26-p19 约为 9.3,hB26-p15 约为 9.4,通过修饰产生了最大约 0.3 的等电点差。本研究显示,将所选择的可变区 H12、H23、H39、H43、H105 的表面氨基酸进行电荷改变,可以使等电点发生变化。

[0290] [实施例 5] 修饰的人源化抗体的阳离子交换色谱分析

[0291] 使用在实施例 4 中制备的修饰抗体,按照以下方法进行阳离子交换色谱的分析,评价修饰对两种抗体分离带来的影响。阳离子交换色谱分析条件如下,计算人源化 A69 抗体的均二聚体、人源化 B26 抗体的均二聚体的保留时间。

[0292] 柱:ProPac WCX-10, 4x 250mm, (Dionex)

[0293] 流动相:A:10mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.25

[0294] B:10mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 500mmol/L NaCl, pH 6.25

[0295] 流速:1.0mL/min

[0296] 梯度:10% B(5 分钟) → (40 分钟) → 60% B → (5 分钟) → 100% B(5 分钟)

[0297] 检测:220nm

[0298] 未修饰和修饰的五种人源化 A69 抗体的均二聚体的分析结果如图 4 所示,未修饰和修饰的三种人源化 B26 抗体的均二聚体的分析结果如图 5 所示。未修饰人源化 A69 抗体的均二聚体和入源化 B26 抗体的均二聚体的保留时间均为 25 分钟左右,无法进行两种均二聚体的分离、乃至目标双特异性抗体的分离。发生了使未修饰抗体等电点降低的改变所得的人源化 A69 抗体与未修饰的抗体相比,可观察到峰的移动,伴随着改变的数目,保留时间缩短为约 22.4 分钟、约 21.2 分钟、约 20.2 分钟。进行使可变区等电点升高的改变所得的人源化 B26 抗体与未改变的抗体比较可观察到峰的移动,伴随着改变的数目不同,保留时间延长至约 28.4 分钟、约 29.4 分钟。通过本研究中所选择的可变区 H12、H23、H39、H43、H105 的表面氨基酸电荷的改变,两种抗体表面电荷发生变化,由此可使保留时间改变。

[0299] 根据实施例 4 中所测定的等电点,未修饰的 hA69a 均二聚体和未修饰的 hB26-F123e4 均二聚体的 pI 有 0.3 的差异,但两者的保留时间均为 25 分钟左右,无法分离(图 9),而未修饰的 hA69 均二聚体与 hB26-p19 的 pI 有 0.5 的差异,结果两者以保留时间约 2.6 分钟的差异分离, hA69-p18 和 hB26 均二聚体的 pI 有 0.7 的差异,结果两者以保留时间约 3.4 分钟的差异分离,最大的是 hA69-p16 和 hB26-p15 的 pI 有 1.3 的差异,结果保留时间以约 9.2 分钟的差异分离。这样,通过修饰使两种均二聚体分离首次成为可能。

[0300] [实施例 6] 修饰的人源化双特异性抗体的凝固活性评价

[0301] 通过实施例 4、实施例 5 的分析,我们可以观察到表面电荷的变化,使修饰的两种人源化抗体 H 链(hA69-p8、hB26-p15)和人源化 L 链(hAL-F123j4)表达,制备人源化双特异性抗体。为了有效地促进杂合二聚体,H 链载体使用整合了利用 konbs-into-holes 技术的 IgG4 恒定区的表达载体。使用制备的人源化双特异性抗体,按照以下所示方法评价凝固活性。

[0302] 为了明确双特异性抗体是否可改变血友病 A 血液的凝固能力,研究该抗体对使用乏因子 VII 血浆的活化部分凝血酶时间(APTT)的影响。将 50  $\mu\text{L}$  各种浓度的抗体溶液、50  $\mu\text{L}$  乏因子 VIII 血浆(Biomerieux)和 50  $\mu\text{L}$  APTT 试剂(Dade Behring)的混合液在 37°C 下加温 3 分钟。凝固反应是通过将 50  $\mu\text{L}$  20mM 的  $\text{CaCl}_2$ (Dade Behring)加入到该混合液中引发。通过连接有 CR-A(Amelung)的 KC10A(Amelung)测定至凝固所需时间。

[0303] 以乏因子 VIII 血浆的凝固时间为 0%,以正常血浆的凝固时间为 100%,制作校正曲线,使用该校正曲线,由添加了双特异性抗体时的凝固时间计算双特异性抗体的因子 VIII 样活性(%)。

[0304] 活性评价结果如图 6 所示。使可变区修饰的人源化双特异性抗体与未修饰的人源化双特异性抗体显示同等的凝固活性,因此显示本实施例的可变区的修饰对于抗体的活性没有影响。

[0305] [实施例 7] 使 CDR 修饰的人源化抗体的制备和评价

[0306] 对实施例 2 制备的人源化抗 A69 抗体的模型进行分析,结果确认 H97 是暴露于表面的氨基酸。表 1 所示的抗体中,人源化 A69-H 链的 hA69-N97R 具有将存在于 CDR3 的第 97 号天冬酰胺修饰为精氨酸的序列。按照实施例 1-2 的方法制备具有 hA69-N97R 的表达载体,与人源化 BBA-L 链 hAL-F123j4 一起表达,制备修饰抗体。对该抗体的表面电荷的变化进行评价,按照实施例 4 的方法进行等电聚焦电泳。如图 7 所示,未修饰的抗体 (hA69a/hAL-F123j4) 的等电点为 8.9,而修饰抗体 (hA69a-N97R/hAL-F123j4) 为 9.1,在 CDR 的氨基酸置换中观察到表面电荷的变化。

[0307] 为了评价修饰抗体的功能,按照以下方法评价与抗原-因子 IXa 的结合活性。将用包被缓冲液 (100mM 二碳酸钠, pH 9.6, 0.02% 叠氮化钠) 稀释为 1  $\mu$ g/mL 的因子 IXa  $\beta$  (Enzyme Research Laboratories) 以 100  $\mu$ L/孔分注到 Nunc-Immuno 板 (Nunc-Immuno™ 96MicroWell™ MaxiSorp™ (Nalge Nunc International)), 在 4℃ 下温育过夜。用含有吐温<sup>(R)</sup>20 的 PBS(-) 洗涤 3 次,然后用稀释缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 8.1, 1% 牛血清白蛋白, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15M NaCl, 0.05% 吐温<sup>(R)</sup>20, 0.02% 叠氮化钠) 将板在室温下封闭 2 小时。除去缓冲液,然后添加 100  $\mu$ L/孔用稀释缓冲液稀释的纯化抗体,在室温下温育 1 小时。将板洗涤 3 次,然后添加 100  $\mu$ L/孔用稀释缓冲液稀释为 1/4000 的碱性磷酸酶标记山羊抗小鼠 IgG (BIOSOURCE), 在室温下温育 1 小时。将板洗涤 5 次,添加 100  $\mu$ L/孔显色底物 (Sigma), 在室温下温育 30 分钟。用微量板读板仪型号 3550 (Bio-Rad Laboratories) 测定 405nm (对照 655nm) 的吸光度。结果如图 8 所示,由于改变电荷而使 CDR 修饰的抗体与修饰前的抗体显示同等的结合活性。还显示:如上述改变表面电荷时,修饰的位置不只是实施例 5 所示的 FR,也显示可以是 CDR。

[0308] [实施例 8] 人源化双重特异性 PF 抗体的制备和评价

[0309] 在表 1 所示的抗体中,使用人源化 A69-H 链 hA69a、人源化 B26-H 链 hB26-F123e4 和人源化 BBA-L 链 hAL-F123j4 (SEQ ID NO. 5) 作为未修饰的抗体,制备未修饰的人源化双特异性抗体。在表 1 所示的抗体中,使用人源化 A69-H 链的修饰体 hA69a-PFL、人源化 B26-H 链的修饰体 hB26-PF 和人源化 BBA-L 链 hAL-s8 (SEQ ID NO. 17) 作为修饰抗体,制备人源化双特异性 PF 抗体。H 链使用具有野生型恒定区的表达载体,按照实施例 1-2 所示构建表达载体,按照实施例 1-3、实施例 1-4、实施例 1-5 的方法制备抗体。使用含有该两种均二聚体和双特异性抗体的混合溶液,按照实施例 5 所示的方法实施阳离子交换色谱分析。

[0310] 未修饰的人源化双特异性抗体和人源化双特异性 PF 抗体分析结果如图 9、图 10 所示。该结果中,在未修饰的人源化双特异性抗体中,两种均二聚体与双特异性抗体不分离,以一个峰的形式洗脱,而人源化双特异性 PF 抗体中,两种均二聚体和目标双特异性抗体分别分离,依次以 hA69-PF 均二聚体、人源化双特异性 PF 抗体、hB26-PF 均二聚体的顺序洗脱出三个峰。阳离子交换色谱分析时获得三种峰,由此可以纯化两种均二聚体和人源化双特异性 PF 抗体。将该组分通过 Amicon Ultra, MWC0 10000 (Millipore) 浓缩后,用 20mM 乙酸钠、150mM NaCl、pH6.0 在低温处透析过夜,进行浓度测定。

[0311] 将各抗体纯化后,按照实施例 4 所示的方法进行等电聚焦电泳。如图 1 所示,进行阳离子交换色谱分析之前的抗体存在三条条带,通过阳离子交换色谱,确认可以纯化各抗体。人源化 A69-PF 抗体的均二聚体、人源化双特异性 PF 抗体、人源化 B26-PF 抗体的均二聚体的等电点约为 7.9、约 8.6、约 9.2,人源化 A69-PF 抗体的均二聚体与人源化双重特异性

PF 抗体等电点的差约为 0.7, 人源化 B26-PF 抗体的均二聚体与人源化双重特异性 PF 抗体等电点的差约为 0.6。

[0312] 接着, 按照实施例 6 所示的方法, 对纯化的双特异性 PF 抗体的凝固活性进行评价, 与以下三种抗体进行凝固活性的比较: 使用利用上述 knobs-into-holes 技术的 IgG4 恒定区进行表达的双特异性抗体; 含有未使可变区修饰的 hA69a (SEQ ID NO. 2)、hB26-F123e4 (SEQ ID NO. 4)、hAL-F123i4 (SEQ ID NO. 6) 的双特异性抗体; 与纯化的双特异性 PF 抗体相同具有可变区、使用利用 knobs-into-holes 技术的 IgG4 恒定区的双特异性抗体。评价结果如图 12 所示。具有利用 knobs-into-holes 技术的 IgG4 恒定区的双特异性 PF 抗体与具有野生型恒定区、通过离子交换色谱纯化的双特异性 PF 抗体的凝固活性同等, 显示本实施例的 H10、H12、H23、H39、H43、H105 的可变区修饰对于活性没有影响, 可以以高纯度纯化双特异性抗体。

[0313] [ 实施例 8] 人源化双特异性抗体表达细胞株的构建

[0314] 为了制备修饰的人源化双特异性抗体, 如下构建抗体表达细胞株。

[0315] 以人 IgG4 的野生型 H 链恒定区基因为模板, 使用与设计成编码 H 链恒定区的 N 末端一侧的两个氨基酸 (Ala-Ser) 的碱基序列为 NheI 识别序列 (GCTAGC) 的 5' 末端一侧引物, 和设计成与 3' 末端一侧退火、且具有 NotI 识别位点的引物, PCR 扩增 H 链恒定区, 与将 pBluescriptKS+ 载体 (东洋纺) 用 NheI、NotI (均为宝酒造制备) 消化所得的载体连接, 制备 pBCH4 (包含 IgG4 恒定区基因)。使用表 1 所示的与人源化 A69-H 链抗体 (hA69-KQ) 和人源化 B26-H 链抗体 (hB26-PF) 的 H 链可变区 5' 末端一侧碱基序列互补、具有 Kozak 序列 (CCACC) 和 EcoRI 识别序列的引物, 以及具有 NheI 识别序列的 3' 末端一侧碱基序列的相辅的引物进行 PCR, 将所得 PCR 产物用 EcoRI、NheI (均为宝酒造制备) 消化, 插入到同样用 EcoRI、NheI 消化的 pBCH4 中, 连接可变区和恒定区。将制备的人源化 A69-H 链抗体载体用 EcoRI、NotI (均为宝酒造制备) 消化, 克隆到同样用 EcoRI、NotI 消化的动物细胞用表达载体 pCXND3 中。

[0316] 该载体 pCXND3 的构建流程如下所示。为了将 DHFR- $\Delta$ E- $\gamma$ VH-PM1-f (参照 W092/19759) 的抗体 H 链基因与载体分割, 用限制酶 EcoRI、SmaI 位点进行消化, 只回收载体一侧, 然后克隆 EcoRI-NotI-BamHI 适配子 (宝酒造制备)。将该载体命名为 pCHOI。将 pCHOI 的 DHFR 基因表达位点克隆到 pCXN (Niwa 等人, Gene 1991, 108:193-200) 的限制酶 HindIII 位点上, 将所得载体命名为 pCXND3。将制备的人源化 B26-H 链抗体载体用 EcoRI、NotI (均为宝酒造制备) 消化, 克隆到同样用 EcoRI、NotI 消化的动物细胞用表达载体 pCXZD1 中。pCXZD1 载体是将 pCXND3 载体的新霉素抗性基因置换为博来霉素抗性基因得到的表达载体。使用与人源化 BBA-L 链抗体 (hAL-AQ, SEQ ID NO. 18) 的 L 链可变区的 5' 末端一侧碱基序列互补、具有 Kozak 序列的合成寡核苷酸, 以及与 BsiWI 位点的 3' 末端侧碱基序列互补的合成寡核苷酸进行 PCR, 将所得 PCR 产物克隆到人 kappa 恒定区插入到 pBluescriptKS+ 载体中所得的 pBCL 载体中。通过 BsiWI 位点使人 L 链可变区与恒定区连接。将制备的 L 链基因片段克隆到表达载体 pUCAG 中。该载体 pUCAG 是将 pCXN (Niwa 等人, Gene 1991, 108:193-200) 用限制酶 BamHI 消化所得到的 2.6kbp 的片段与 pUC19 载体 (东洋纺) 的限制酶 BamHI 位点连接并克隆得到的载体。将 L 链克隆到 pUCAG 中, 将所得的载体用限制酶 BamHI 消化, 克隆到含有潮霉素抗性基因的表达载体 pHycDHFR-4b 中。将制备的三种表达载

体通过限制酶制成直链连接,然后基因导入 CHO-DG44 细胞中,建立抗体表达细胞株。

[0317] 稳定表达细胞株的制备如下进行。通过使用 GenePulserII (Bio-Rad) 的电穿孔法导入基因。将各抗体表达载体与 0.75mL 悬浮于 PBS 中的 CHO 细胞 ( $1 \times 10^7$  细胞/mL) 混合,将混合物在冰上冷却 10 分钟,转移到样品杯中,然后以 1.5kV、25  $\mu$ FD 的容量给予脉冲。在室温下恢复 10 分钟后,将电穿孔处理过的细胞悬浮于 40mL 以 1 倍浓度含有 HT supplement (Invitrogen) 的 CHO-S-SFMII 培养基 (Invitrogen) 中。用同样的培养基制备 10 倍稀释液,以 100  $\mu$ L/孔分注到 96 孔培养板中。在 CO<sub>2</sub> 培养箱 (5% CO<sub>2</sub>) 中培养 24 小时,然后添加 0.5mg/mL 遗传霉素 (Invitrogen)、0.6mg/mL 博来霉素 (Invitrogen)、0.4mg/mL 潮霉素 B (Invitrogen),培养 2 周。将显示抗药性的转化细胞的集落依次放大培养,使用建立的高生产细胞株进行大量的培养,得到培养上清。

[0318] [实施例 9] 通过制备用的常用柱对人源化双特异性抗体的分离纯化

[0319] 按照以下方法,从实施例 8 得到的培养上清中纯化双特异性抗体。将培养上清添加到用平衡缓冲液 (20mmol/L 磷酸钠缓冲液、1mol/L NaCl) 平衡的 rProtein A Sepharose Fast Flow 柱 (Amersham Biosciences, 50mm I.D.  $\times$  9.9cm H. = 194.3mL-树脂) 中,用洗涤缓冲液 1 (20mmol/L 磷酸钠缓冲液, 1mol/L NaCl, pH 7.0)、洗涤缓冲液 2 (50mmol/L 乙酸钠缓冲液, pH 6.0) 洗涤,然后用 100mmol/L 乙酸洗脱。洗脱后立即用 20mmol/L 乙酸钠缓冲液、pH 6.0 稀释 3 倍。

[0320] 将所得纯化溶液添加到用 Solvent A (20mmol/L 乙酸钠缓冲液, pH6.0) 平衡的制备用常用柱 SP TOYOPERL 650M 柱 (東ソー、26mm I.D.  $\times$  22.3cm H. = 118.3mL-树脂) 中。在以下所示的溶液和梯度中通过抗体表面电荷差进行分离。

[0321] 溶剂 A : 20mmol/L 乙酸钠缓冲液, pH6.0

[0322] 溶剂 B : 20mmol/L 乙酸钠缓冲液, 1mol/L NaCl, pH6.0

[0323] 流速 : 10mL/分钟 (113cm/小时) 只在洗脱时为 5.3mL/分钟 (60cm/小时)

[0324]

梯度: 0 $\rightarrow$ 15%B	台阶梯度	3 柱容积(CV)冲洗液体
15 $\rightarrow$ 22 %B	梯度	2.5 CV
22 $\rightarrow$ 30 %B	梯度	6 CV
30 $\rightarrow$ 100 %B	台阶梯度	3 CV 冲洗液体

[0325] 洗脱的结果显示,检测出图 13 所示的三个峰,在使用制备常用柱时也可以分离纯化双特异性抗体。

[0326] [实施例 10] 修饰的人源化双特异性抗体的活性评价

[0327] 对于实施例 9 制备的人源化双特异性抗体,按照实施例 6 所示的方法评价凝固活性。评价结果如图 14 所示。与实施例 8 中制备的人源化双特异性 PF 抗体比较,与在实施例 9 中纯化的人源化双特异性抗体的凝固活性同等。如 hA69-PFL 和 hA69-KQ,可变区的氨基酸序列即使有些不同,使用制备常用的柱纯化的抗体对活性也没有影响。

[0328] 以上表明,在制备双特异性抗体时,通过 H 链可变区的修饰,无需改变结构或抗体的功能 (活性),只改变表面电荷,即可以分离纯化目标人源化双特异性抗体和形成两种均二聚体的抗体。通过使用本方法,显示制备用常用柱也可以分离纯化双特异性抗体,由此可

用作含有双特异性抗体的药物的制备方法。

[0329] [实施例 11] 同种型杂合抗体的制备

[0330] 11-1. 人 IgG2 抗体 H 链恒定区基因的克隆

[0331] 为了克隆人 IgG2 抗体 H 链恒定区的基因,进行以下操作。

[0332] 为了扩增 cDNA 片段,制备 50  $\mu$ L 的各反应液(各 1  $\mu$ L 20  $\mu$ M K62 引物(5' cac cgt ctc ctc agc ctc cac caa 3' /SEQ ID NO.22)、K63 引物(5' gtg gca ctc att tac ccg gag aca 3' /SEQ ID NO.23)、5  $\mu$ L MTC 多组织 cDNA 组(外周血白细胞)(Clontech 制备)、4  $\mu$ L 5 $\times$ Prime STAR 缓冲液、4  $\mu$ L 2.5mM dNTPs、1  $\mu$ L Prime STAR HS DNA 聚合酶(以上由 TaKaRa 制备)),进行 PCR。PCR 是使用热循环 GeneAmp PCR 系统 9700(Parkin Elmer),在 98 $^{\circ}$ C 下加热 2 分钟,然后将含有 98 $^{\circ}$ C 10 秒、60 $^{\circ}$ C 5 秒、72 $^{\circ}$ C 2 分钟的反应进行 30 个循环,最后在 72 $^{\circ}$ C 下加热 10 分钟。PCR 后,将反应液供给 1% 琼脂糖凝胶电泳。按照 QIAquick 凝胶纯化试剂盒(QIAGEN)、按照所附说明书的方法纯化目标大小(约 1000bp)的扩增片段,用 50  $\mu$ L 灭菌水洗脱,然后为了在扩增片段的末端附加 A(腺苷)而进行  $\gamma$ -Taq 处理。 $\gamma$ -Taq 处理是将所得扩增片段的 10  $\mu$ L  $\gamma$ -Taq 反应液(1  $\mu$ L 10 $\times$   $\gamma$ -Taq 反应溶液,1  $\mu$ L 2.5mM dNTPs、1  $\mu$ L  $\gamma$ -Taq、7  $\mu$ L 上述扩增片段)在 72 $^{\circ}$ C 下保温 30 分钟。将经  $\gamma$ -Taq 处理的片段克隆到 pCR2.1-TOPO 载体(Invitrogen)上,确定碱基序列。各 DNA 片段的碱基序列是使用 BigDye 终端 3.1 循环测序试剂盒(Applied Biosystems),通过 DNA 测序仪 ABI PRISM3730xL Genetic 分析仪(Applied Biosystems)、按照所附说明书记载的方法确定。

[0333] 将确定的碱基序列与 Accession. No. BX640623 比较,所翻译的氨基酸序列不同的碱基可以认为是在 PCR 扩增时由于插入而发生的突变,使用 QuickChange 位点专一性突变试剂盒(Stratagene)进行氨基酸置换,修饰为与 BX640623 的氨基酸序列相同的序列。QuickChange 位点专一性突变试剂盒(Stratagene)按照所附说明书记载的方法进行。并且,为了连接人 IgG2-H 链恒定区基因和目标可变区基因,使其突变为人 IgG2-H 链恒定区的最初的两个氨基酸(Ala-Ser)为限制酶 NheI 识别序列(GCTAGC)。本实验中使用的 IgG2-H 链恒定区的碱基序列和氨基酸序列分别如 SEQ ID NO. 24 和 SEQ ID NO. 25 所示。

[0334] 11-2. 同种型置换抗体的表达载体的构建

[0335] 将人源化 PM-1 抗体的 H 链可变区与人 IgG1、人 IgG2、人 IgG4、的各种 H 链恒定区连接而成的抗体表达载体如下制备。

[0336] 使用与非专利文献(Sato K 等人,Cancer Research 1993,53:851-856)所示的人源化抗人白细胞介素 6 受体抗体(人源化 PM-1 抗体)的 H 链可变区的 5' 末端一侧碱基序列互补、具有 Kozak 序列的合成寡核苷酸,以及具有限制酶 NheI 识别序列、与 3' 末端一侧碱基序列互补的合成寡核苷酸,进行 PCR,将所得 PCR 产物克隆到人 IgG1-H 链恒定区(参照 Sato K 等人,Cancer Research 1993,53:851-856)插入到 pBluescript KS+ 载体(TOYOBO)所得的 pB-CH 载体上。将 H 链可变区和恒定区连接而成的 H 链基因片段插入到通过鸡  $\beta$  肌动蛋白启动子控制表达的 pCAGGS 载体(Niwa 等人,1991Gene,108:193-199)中。将 PCR 扩增的人源化 PM-1 抗体的 H 链可变区基因与人 IgG4 恒定区基因(参照 W099/51743)和实施例 11-1 中制备的人 IgG2-H 链基因的 5' 末端的 NheI 连接,插入到 pCAGGS 载体中。各种 H 链表达载体是通过 NheI 序列使人源化 PM-1 抗体的 H 链可变区与人 H 链恒定区连接,表达 H 链。

[0337] 同样,使用与人源化 PM-1 抗体的 L 链可变区的 5' 末端侧碱基序列互补、具有 Kozak 序列的合成寡核苷酸,以及具有与限制酶 BsiWI 识别序列的 3' 末端一侧碱基序列互补的合成寡核苷酸进行 PCR,将所得 PCR 产物克隆到人 kappa 恒定区插入到 pBluescript KS+ 载体 (TOYOBO) 中得到的 pB-CL 载体中。将 L 链可变区和恒定区连接而成的 L 链基因片段插入到通过鸡  $\beta$  肌动蛋白启动子控制表达的 pCAGGS 载体中。通过 BsiWI 序列使人源化 PM-1 抗体的 L 可变区与人 kappa 链恒定区连接,表达 L 链。

#### [0338] 11-3. 同种型杂合抗体的表达

[0339] 同种型杂合抗体可以分别将 2 种具有人 IgG1、人 IgG2、人 IgG4 的各种恒定区的人源化 PM-1 抗体 H 链表达载体组合,与人源化 PM-1 抗体 L 链表达载体一起在表达用细胞中共表达。各抗体的表达可使用实施例 4-2 的方法或以下方法进行。将来自人胎肾癌细胞的 HEK293H 株 (Invitrogen) 悬浮于含有 10% 胎牛血清 (Invitrogen) 的 DMEM 培养基 (Invitrogen) 中,以各 10mL、 $5-6 \times 10^5$  个/mL 细胞密度接种于粘着细胞用培养皿 (直径 10cm, CORNING) 的各皿中,在 CO<sub>2</sub> 培养箱 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 内培养一昼夜,然后吸引除去培养基,添加 6.9mL CHO-S-SFM-II (Invitrogen) 培养基。使用 11-2 中制备的质粒 DNA,如下制备各同种型抗体表达用混合液和杂合抗体表达用的混合液 (共 13.8  $\mu$ g)。

[0340] (1) 6.9  $\mu$ g L 链表达载体、6.9  $\mu$ g IgG1-H 链表达载体

[0341] (2) 6.9  $\mu$ g L 链表达载体、6.9  $\mu$ g IgG2-H 链表达载体

[0342] (3) 6.9  $\mu$ g L 链表达载体、6.9  $\mu$ g IgG4-H 链表达载体

[0343] (4) 6.9  $\mu$ g L 链表达载体、3.45  $\mu$ g IgG1-H 链表达载体、3.45  $\mu$ g IgG2-H 链表达载体

[0344] (5) 6.9  $\mu$ g L 链表达载体、3.45  $\mu$ g IgG2-H 链表达载体、3.45  $\mu$ g IgG4-H 链表达载体

[0345] (6) 6.9  $\mu$ g L 链表达载体、3.45  $\mu$ g IgG1-H 链表达载体、3.45  $\mu$ g IgG4-H 链表达载体

[0346] 将各混合液与 20.7  $\mu$ L 1  $\mu$ g/mL 聚乙烯亚胺 (Polysciences Inc.) 和 690  $\mu$ L CHO-S-SFMII 培养基混合,在室温下静置 10 分钟,将所得加入到各培养皿的细胞中,在 CO<sub>2</sub> 培养箱 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 内培养 4-5 小时。然后添加 6.9mL CHO-S-SFM-II (Invitrogen) 培养基,在 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 3 天。回收培养上清,然后离心 (约 2000g, 5 分钟,室温) 除去细胞,再过 0.22  $\mu$ m 滤器 MILLEX (R)-GV (Millipore) 进行灭菌。该样品在使用之前保存在 4°C 下。

#### [0347] 11-4. 亚单元杂合抗体的纯化

[0348] 在实施例 11-3 中所述的方法得到的培养上清中添加 100  $\mu$ L rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences),在 4°C 下颠倒混合 4 小时以上。将该溶液转移至 0.22  $\mu$ m 的滤杯 Ultrafree<sup>(R)</sup>-MC (Millipore) 中,用 500  $\mu$ L TBS 洗涤 3 次,然后悬浮于 rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> 树脂的 100  $\mu$ L 的 50mM 乙酸钠水溶液、pH 3.0 中,静置 2 分钟,然后洗脱抗体。立即加入 6.7  $\mu$ L 1.5M Tris-HCl、150mM NaCl, pH 8.0,进行中和。所得抗体溶液如果作为活性测定用则用 PBS 透析、如果作为 DSC 测定用则用含有 150mM NaCl 的 20mM 乙酸缓冲液 pH 6.0 透析,置换缓冲液。以下,将具有纯化的人 IgG1 的 H 链恒定区的抗体称为“未修饰人源化抗 PM-1 抗体”,将具有人 IgG2 的 H 链恒定区的抗体称为“IgG2



化人源化抗 PM-1 抗体”，将具有人 IgG4 的 H 链恒定区的抗体称为“IgG4 化人源化抗 PM-1 抗体”。

[0349] 11-5. 同种型杂合抗体的浓度定量

[0350] 将 2  $\mu$ L 含有实施例 11-4 所得抗体的溶液供给 ND-1000 光谱仪 (NanoDrop), 或将 50  $\mu$ L 供给分光光度计 DU-600 (BECKMAN), 测定 280nm 下的吸光度。用以下算式, 由所得值计算抗体浓度。空白是使用 PBS 或含有 150mM NaCl 的 20mM 乙酸缓冲液, pH 为 6.0。

[0351] 抗体浓度 (mg/mL) = 吸光度  $\times$  稀释倍率  $\div 14.6 \times 10$

[0352] [ 实施例 12] 同种型杂合抗体的分析

[0353] 12-1. 同种型杂合抗体的等电聚焦电泳分析

[0354] 为了对恒定区置换导致的表面电荷的变化进行评价, 通过等电聚焦电泳进行分析。

[0355] 等电聚焦电泳如下进行。使用 Phastsystem Cassette (Amersham Bioscience 制备), 用以下的溶胀液用使 Phast-Gel Dry IEF (Amersham Bioscience 制备) 凝胶溶胀约 30 分钟。

[0356] 20% 甘油 1.5mL

[0357] Pharmalyte 8-10.5 for IEF (Amersham Bioscience 制备) 100  $\mu$ L

[0358] 使用溶胀的凝胶, 通过 Phastsystem (Amersham Bioscience 制备), 按照以下程序进行电泳。样品是在步骤 2 添加到凝胶中。pI 标志使用 pI 校正曲线试剂盒 (Amersham Biosciences)。

[0359]

步骤 1:	2000 V	2.5 mA	3.5 W	15°C	75 Vh
步骤 2:	200 V	2.5 mA	3.5 W	15°C	15 Vh
步骤 3:	2000 V	2.5 mA	3.5 W	15°C	410 Vh

[0360] 电泳后的凝胶用 20 % TCA 固定, 然后用 Silver staining 试剂盒、蛋白质 (Amersham Biosciences), 按照试剂盒所附的说明书进行银染。染色后, 由 pI 标志的已知等电点计算样品的等电点。

[0361] 未修饰、IgG2 化和 IgG4 化人源化 PM-1 抗体的分析结果如图 15 所示。通过同种型的置换, 在等电聚焦电泳中观察到条带的移动。以 pI 标志为参考推测的各抗体的等电点是相对于未修饰人源化 PM-1 抗体的 9.3, IgG2 化人源化 PM-1 抗体约为 8.9, IgG4 化人源化 PM-1 抗体约为 8.7, 通过置换可以产生最大约 0.7 的等电点差。本研究显示, 通过置换抗体同种型的恒定区, 可以使等电点发生变化。

[0362] 未修饰、IgG2 化人源化 PM-1 抗体, 以及未修饰、IgG4 化人源化 PM-1 抗体的共表达抗体分析结果如图 16 所示。由此, 任何组合中, 各同种型的均二聚体、杂合二聚体都可以 3 个主条带的形式观察到, 以 pI 标志为参考推测的各抗体的等电点是相对于未修饰人源化 PM-1/IgG2 化人 PM-1 抗体的 9.2, 未修饰人源化 PM-1/IgG2 化人 PM-1 的杂合抗体为 9.0。本研究中显示, 通过将各同种型抗体的表达载体组合共表达, 可以制备同种型杂合抗体, 它们通过等电点进行分离。

[0363] 12-2. 同种型杂合抗体的阳离子交换色谱分析

[0364] 使用在实施例 11 中制备的同种型杂合抗体,按照以下方法进行阳离子交换色谱的分析,评价同种型置换对分离的影响。阳离子交换色谱分析条件如下,计算未修饰人源化 PM-1 抗体、IgG2 化人源化 PM-1 抗体、IgG4 化人源化 PM-1 抗体,以及未修饰人源化 PM-1 抗体 /IgG2 化人源化 PM-1 抗体的杂合抗体、未修饰人源化 PM-1 抗体 /IgG4 化人源化 PM-1 抗体的杂合抗体的保留时间。

[0365] 柱:ProPac WCX-10,4x 250mm, (Dionex)

[0366] 流动相:A:25mmol/L MES/NaOH, pH 6.1

[0367] B:25mmol/L MES/NaOH,250mmol/L NaCl, pH 6.1

[0368] 流速:0.5mL/min

[0369] 梯度:10% B(5 分钟) → (105 分钟) → 67% B → (1 分钟) → 100% B(5 分钟)

[0370] 检测:280nm

[0371] 单独表达的未修饰、IgG2 化和 IgG4 化人源化 PM-1 抗体的分析结果如图 17 所示。未修饰人源化 PM-1 抗体、IgG2 化人源化 PM-1 抗体和 IgG4 化人源化 PM-1 抗体的保留时间分别约为 60.2 分钟、30.5 分钟和 30.3 分钟,通过同种型置换,保留时间变化了稍低于 30 分钟。另一方面,等电聚焦电泳中,可见 pI 差异的 IgG2 化人源化 PM-1 抗体和 IgG4 化人源化 PM-1 抗体的保留时间大致相同。未修饰、IgG2 化,以及未修饰、IgG4 化人源化 PM-1 抗体共表达抗体分析结果如图 18 所示。在未修饰人源化 PM-1 抗体 /IgG2 化人源化 PM-1 抗体的组合,以及未修饰人源化 PM-1 抗体 /IgG4 化人源化 PM-1 抗体的组合中,观察到了各同种型的均二聚体、杂合二聚体的三个主峰。关于保留时间,未修饰人源化 PM-1/IgG2 化人源化 PM-1 的杂合抗体约为 43.8 分钟,未修饰人源化 PM-1/IgG4 化人源化 PM-1 的杂合抗体约为 45.1 分钟,以 10 分钟以上的保留时间差与各均二聚体分离。本研究显示,通过将各同种型抗体的表达载体组合共表达,可以制备同种型杂合抗体,它们可以通过离子交换色谱分离。

[0372] [实施例 13] 同种型杂合抗体通过阳离子交换色谱的分离纯化

[0373] 将实施例 1 所得的抗体溶液用 Amicon-Ultra4(Amicon) 浓缩,封装到 EasySep(トミ一精工)中,用 5mM 柠檬酸缓冲液(pH 6.5)进行透析,置换缓冲液,按以下条件纯化同种型杂合抗体。

[0374] 柱:Poly GAT A,4.6×100mm,粒径 3 μ m,孔径 150nm(Poly LC)

[0375] 流动相:A:25mmol/L MES/NaOH, pH 6.1

[0376] B:25mmol/L MES/NaOH,250mmol/L 乙酸钠, pH 6.1

[0377] 流速:1.0mL/min

[0378] 梯度:35% B(5 分钟) → (54 分钟) → 65% B → (1 分钟) → 100% B(5 分钟)

[0379] 检测:280nm

[0380] 每次注入约 100-200 μ g,制备未修饰人源化 PM-1 抗体、未修饰人源化 PM-1 抗体 /IgG4 化人源化 PM-1 同种型杂合抗体、IgG4 化人源化 PM-1 抗体峰。制备时的色谱谱如图 19 所示。将多次的峰的制备组分分别混合,用 Amicon-Ultra4(Amicon) 浓缩后封装到 EasySep(トミ一精工)中,如果是测定活性用则用 PBS 透析、如果是 DSC 测定用则用含有 150mMNaCl 的 20mM 乙酸缓冲液、pH 6.0 透析,置换缓冲液。制备峰在上述同样的条件下进行重分析,结果如图 20 所示。由此显示同种型杂合抗体可通过离子交换色谱法制备纯化。

[0381] 本技术可利用 pI 值不同的同种型的恒定区分离具有共通的 H 链可变区的抗体,因

此即使是没有 pI 差的不同的 H 链可变区,通过与 pI 值不同的同种型的 H 链恒定区连接,也可以通过离子交换色谱分离双特异性抗体。另外,具有不同的 H 链可变区时,通过与实施例 9 所示的向可变区导入突变的技术组合,可以使分子间的 pI 差进一步增大,可以更容易地分离纯化。难以向 H 链可变区导入突变时,可以将它们变换为天然存在的 IgG 同种型序列,无需考虑免疫原性而可以通过离子交换色谱分离纯化双特异性抗体。

[0382] [实施例 14] 同种型杂合抗体制备纯化品的等电聚焦电泳

[0383] 为了评价制备品的纯度,通过等电聚焦电泳实施分析。

[0384] 等电聚焦电泳如下进行。使用 Phastsystem Cassette(Amercham Bioscience 制备),用以下的溶胀液用使 Phast-Gel Dry IEF(Amercham Bioscience 制备)凝胶溶胀约 30 分钟。

[0385] MilliQ 水 1.5mL

[0386] Pharmalyte 5-8for IEF(Amercham Bioscience 制备) 50  $\mu$ L

[0387] Pharmalyte 8-10.5for IEF(Amercham Bioscience 制备) 50  $\mu$ L

[0388] 使用溶胀的凝胶,通过 Phastsystem(Amercham Bioscience 制备),按照以下程序进行电泳。样品是在步骤 2 添加到凝胶中。pI 标志使用 pI 校正曲线试剂盒(Amersham Biosciences)。

[0389]

步骤 1: 2000 V 2.5 mA 3.5 W 15°C 75 Vh

步骤 2: 200 V 2.5 mA 3.5 W 15°C 15 Vh

步骤 3: 2000 V 2.5 mA 3.5 W 15°C 410 Vh

[0390] 电泳后的凝胶用 20 % TCA 固定,然后用 Silver staining 试剂盒、蛋白质(Amersham Biosciences),按照试剂盒所附的说明书进行银染。

[0391] 同种型杂合抗体制备纯化品的分析结果如图 21 所示。通过离子交换色谱,可以纯化至几乎不含有各同种型的均二聚体。

[0392] [实施例 15] 同种型杂合抗体制备纯化品的活性评价

[0393] 15-1. 表达人 gp130 的 BaF3 细胞株、共表达人 gp130/ 人 IL-6 受体的 BaF3 细胞株的建立

[0394] 为了获得显示依赖 IL-6 的增殖性的细胞株,如下所示,建立表达人 gp130 的 BaF3 细胞株。

[0395] 通过 PCR 扩增全长人 gp130cDNA(Hibi 等人,Cell 1990,63 : 1149-1157(GenBank#NM\_002184)),除去 pCHO1 的 DHFR 基因表达位点,克隆到插入了博来霉素抗性基因表达位点的表达载体 pCOS2Zeo 上,构建 pCOS2Zeo/gp130。

[0396] 将 10  $\mu$ g pCOS2Zeo/gp130 与悬浮在 PBS 中的 BaF3 细胞( $0.8 \times 10^7$  个细胞)混合,用 GenePulser(Bio-Rad)、以 0.33kV、950  $\mu$ FD 的容量施加脉冲。通过电穿孔处理导入基因的 BaF3 细胞在含有 0.2ng/mL 小鼠白细胞介素 -3(Peprotech)、10%胎牛血清(以下称为 FBS, HyClone) 的 RPMI16540 培养基(Invitrogen) 中培养过夜,加入 10ng/mL 人白细胞介素 -6(R&D)、100ng/mL 人白细胞介素 -6 可溶性受体(R&D 系统) 和含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基进行筛选,建立表达人 gp130 的 BaF3 细胞株(以下称为 BaF3/gp130)。

[0397] 15-2. 同种型杂合抗体制备纯化品对人 IL-6 的中和活性的评价

[0398] 使用显示 IL-6 依赖性增殖的 BaF3/gp130, 如下所示评价 IL-6 中和活性。将纯化的未修饰人源化 PM-1 抗体、未修饰 /IgG4 化人源化 PM-1 同种型杂合抗体以及 IgG4 化人源化 PM-1 抗体用含有 10% FBS 的 RPMI1640 稀释为 10  $\mu$ g/mL, 使用该溶液, 制备稀释倍率 3、共 7 个系列的稀释液, 以各 50  $\mu$ L 分注到 96 孔板 (CORNING) 的各孔中。接着, 将 BaF3/gp130 用含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基洗涤 3 次, 悬浮于 60ng/mL 人白细胞介素 -6 (TORAY)、60ng/mL 可溶性人 IL-6 受体 (本公司制备) 和含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中, 浓度为  $5 \times 10^4$  个细胞 /mL, 以各 50  $\mu$ L 在各孔中混合后分注抗体样品。人可溶性 IL-6 受体按以下方法制备。将编码人可溶性受体 IL-6 受体的第 1 号至第 344 号氨基酸的基因导入到 CHO 细胞中, 然后从培养上清中纯化并制备。在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 72 小时, 以 20  $\mu$ L/孔加入用 PBS 稀释为 2 倍的 WST-8 试剂 (Cell Counting Kit-8、株式会社同仁化学研究所), 立即使用 SUNRISE CLASSIC (TECAN) 测定 450nm 的吸光度 (参照波长 620nm)。培养 2 小时后再次测定 450nm 的吸光度 (参照波长 620nm), 以 2 小时的吸光度变化作为指标评价 IL-6 的中和活性。

[0399] 结果如图 22 所示, 制备纯化的未修饰人源化 PM-1 抗体、未修饰 /IgG4 化人源化 PM-1 同种型杂合抗体、以及 IgG4 化人源化 PM-1 抗体与人源化 PM-1 抗体纯化品 (批量) 的中和活性同等。以上显示, 同种型杂合抗体未丧失原来的抗原结合能力, 并具有中和抗体的功能。

[0400] 产业实用性

[0401] 本发明的方法中, 氨基酸的置换数为少数即可不使其结构、功能 (活性) 改变, 可以控制等电点, 由此, 通过使用常用的色谱柱, 可以高效地且达到作为药物开发的高纯度地纯化双特异性抗体, 在开发双特异性抗体作为药物方面的有用性非常高。

[0402] 通过使用本发明的方法, 可以高效地获得实际保持活性的双特异性抗体。

## [0001]

## 序列表

<110> 中外制药株式会社

<120> 用于纯化双特异性抗体的抗体变异方法

<130> C1-A0603Y1P

<150> JP 2006-097795

<151> 2006-03-31

<150> JP 2006-275804

<151> 2006-10-06

<160> 25

<170> PatentIn 版本 3.3

<210> 1

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 1

```
cagggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtt      60
tcttgcaagg cctctggagg caccttcagt gactactata tgcactgggt gcgccaggcc      120
cccgacaag ggcttgagt gatgggatac attaatccta gcagtgggta tactaagtac      180
aatcggaagt tcaggacag agtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagaggggt      300
aacggttact accttgacta ctggggccag ggcaccacgg tcaccgtctc ctca          354
```

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 2

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1              5              10              15
```

```
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr
20              25              30
```

## [0002]

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe  
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 3  
<211> 357  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成的序列

<400> 3  
caggtgcagc tgggtgcagtc tggacctgac gtgaagaagc cgggggcctc agtgaaggtc 60  
tcctgcaagg cctctggcta catgttttcc gacaacaaca tggactgggc gcgacaggcc 120  
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagat attaatacta aaagtgggtg ttctatctac 180  
aaccagaagt tcaagggcag agtcatcatg accatagaca aatccacggg cacagcctac 240  
atggaattga ggagcctgag atcagacgac acggccatat attactgtgc gaggaggagg 300  
agctacggct actactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 4  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成的序列

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

[0003]

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Ser Asp Asn  
20 25 30

Asn Met Asp Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Ile Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 5  
<211> 318  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成的序列

<400> 5  
gacatcgtga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgca aggccagtc gaatgtgggg actgctgtag cctggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctattcg gcacccacc ggtacagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtcgata tgggacagat ttactctca ccactcgaag cttgcaacct 240  
gaagatttag caacttacta ctgtcagcaa tatagcaact atatcacgtt cggcggaggg 300  
accaaggtgg agatcaaa 318

<210> 6  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

[0004]

<223> 人工合成的序列

<400> 6

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe  
50 55 60

[0005]



Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 8  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成的序列

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe  
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

[0006]

<210> 9  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成的序列

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe  
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 10  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成的序列

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

[0007]

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe  
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe  
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

[0008]

Ala Arg Gly Gly Leu Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 12  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成的序列

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Gln Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe  
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Gln Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 13  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

[0009]

<223> 人工合成的序列

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe  
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Arg Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 14

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Ser Asp Asn  
20 25 30

Asn Met Asp Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

[0010]

Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Ile Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 15  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成的序列

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Ser Asp Asn  
20 25 30

Asn Met Asp Trp Ala Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Ile Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly  
100 105 110

[0011]

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 16  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成的序列

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gln Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Asn  
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Ile Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 17  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成的序列

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

[0012]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
85 90 95

[0013]



Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 19  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 19

Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly  
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp  
20 25 30

Tyr Tyr Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Leu Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys  
50 55 60

Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala  
65 70 75 80

Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Tyr Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 20  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 20

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly  
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp  
20 25 30

[0014]

Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys  
50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala  
65 70 75 80

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 21  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

[0015]

100	105	
<210> 22		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的引物序列		
<400> 22		
caccgtctcc tcagcctcca ccaa		24
<210> 23		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的引物序列		
<400> 23		
gtggcactca ttaccgga gaca		24
<210> 24		
<211> 981		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 24		
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag		60
agcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg		120
tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtctca		180
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc		240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc		300
aaatgttgtg tcgagtgcc accgtgccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc		360
ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggacctga ggtcacgtgc		420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc		480
gtggaggtgc ataatgcca gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt		540
gtggtcagcg tcctaccgt cgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc		600
aaggtctcca acaaaggcct ccagcccc atcgagaaaa ccatctcca aaccaaagg		660
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac		720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaagc ttctaccca gcgacatgc cgtggagtgg		780

[0016]

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840  
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900  
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 960  
 tccctgtctc cgggtaaata a 981

<210> 25  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 25

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

[0017]

165	170	175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp 180	185	190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro 195	200	205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu 210	215	220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn 225	230	235
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 245	250	255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr 260	265	270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys 275	280	285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys 290	295	300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 305	310	315
Ser Leu Ser Pro Gly Lys 325		

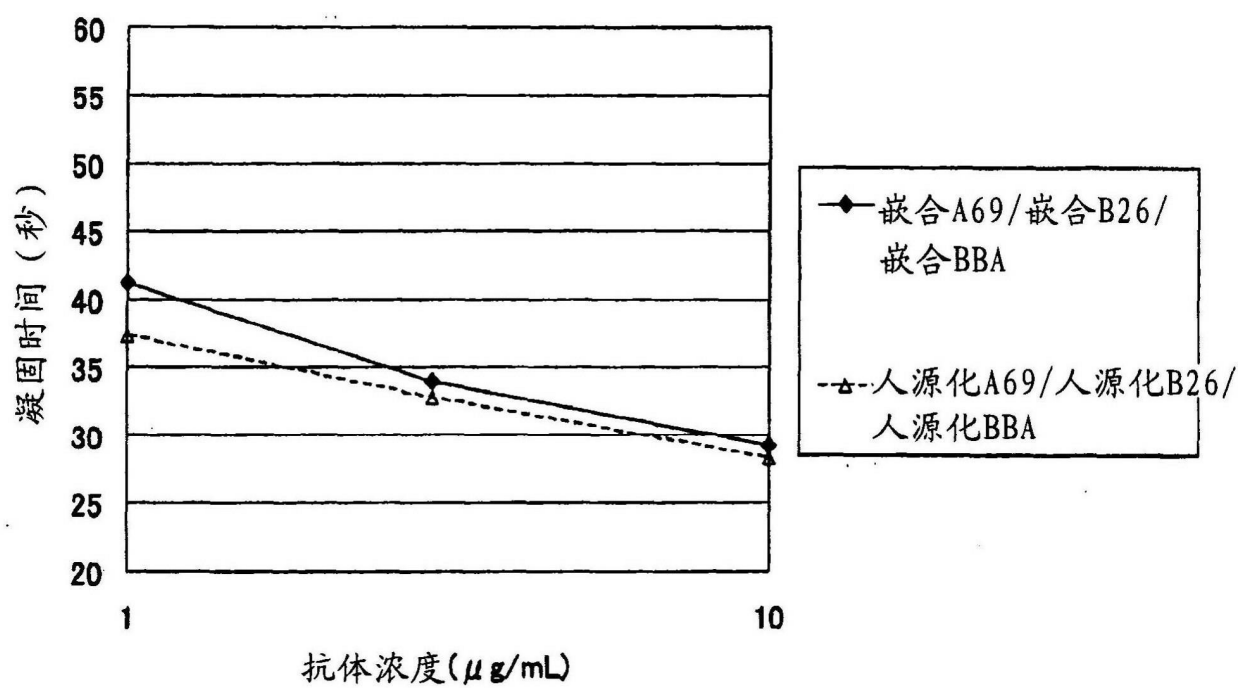


图 1

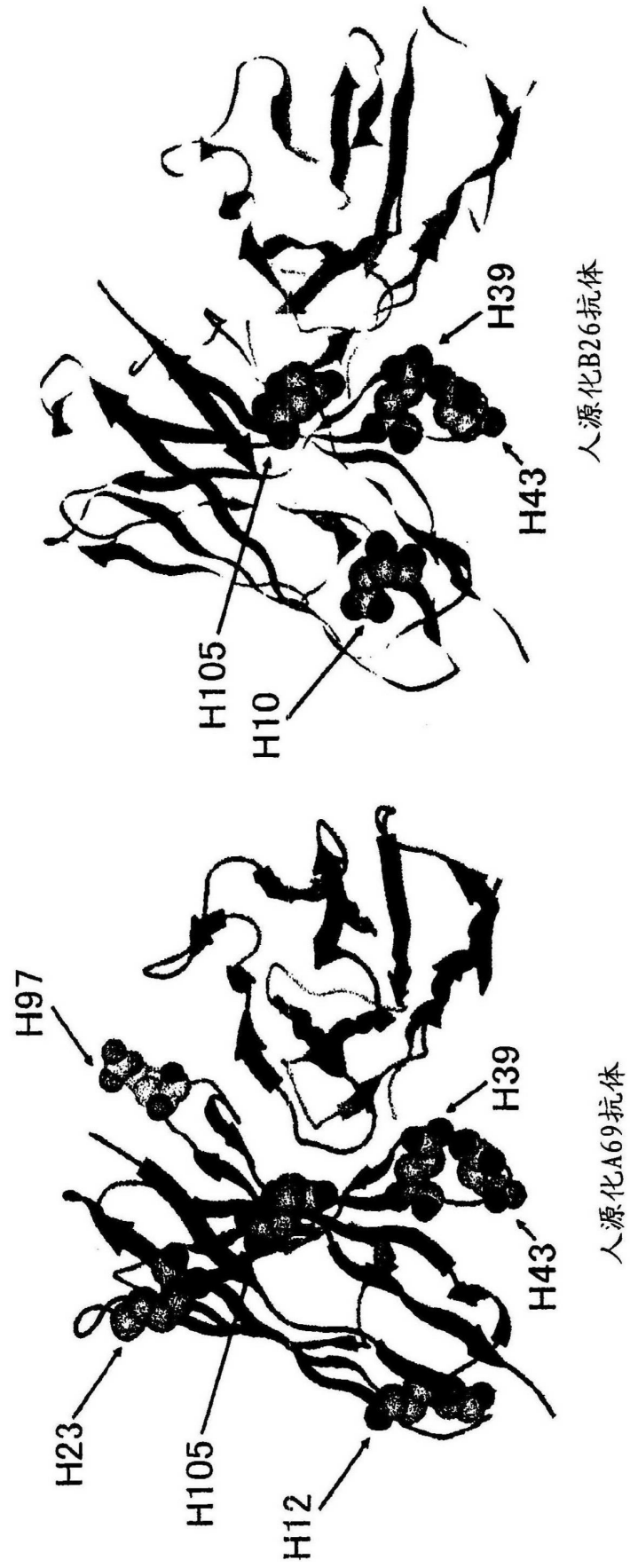


图 2

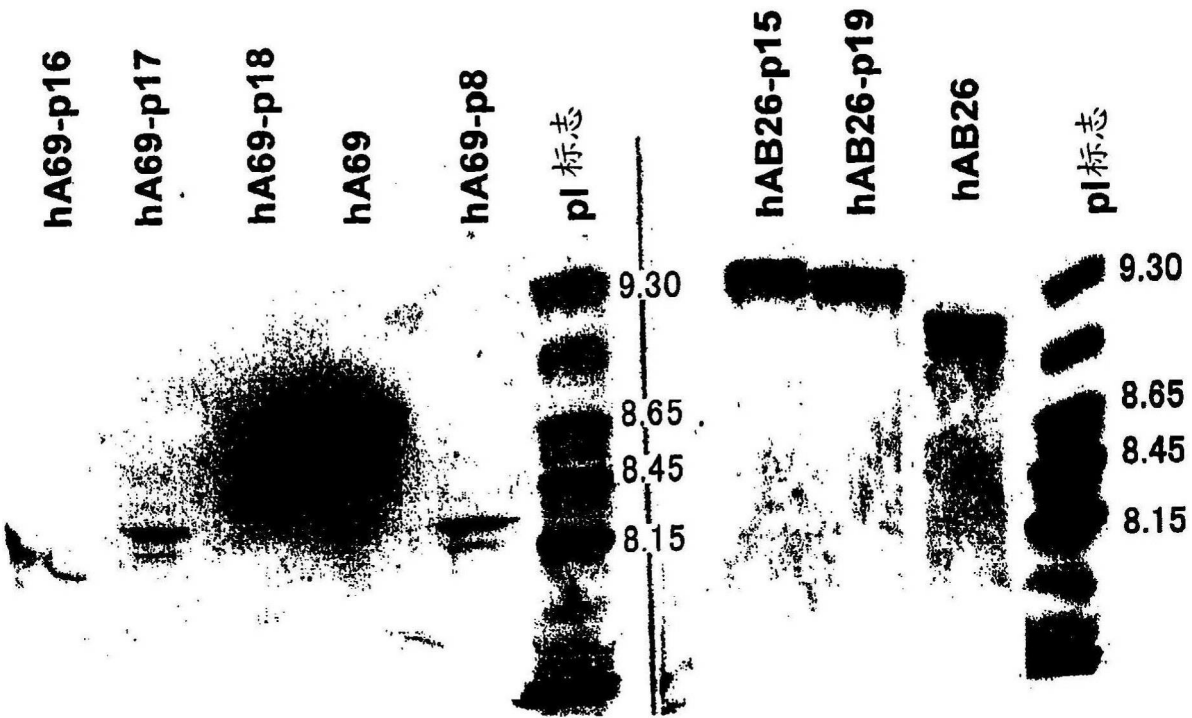


图 3



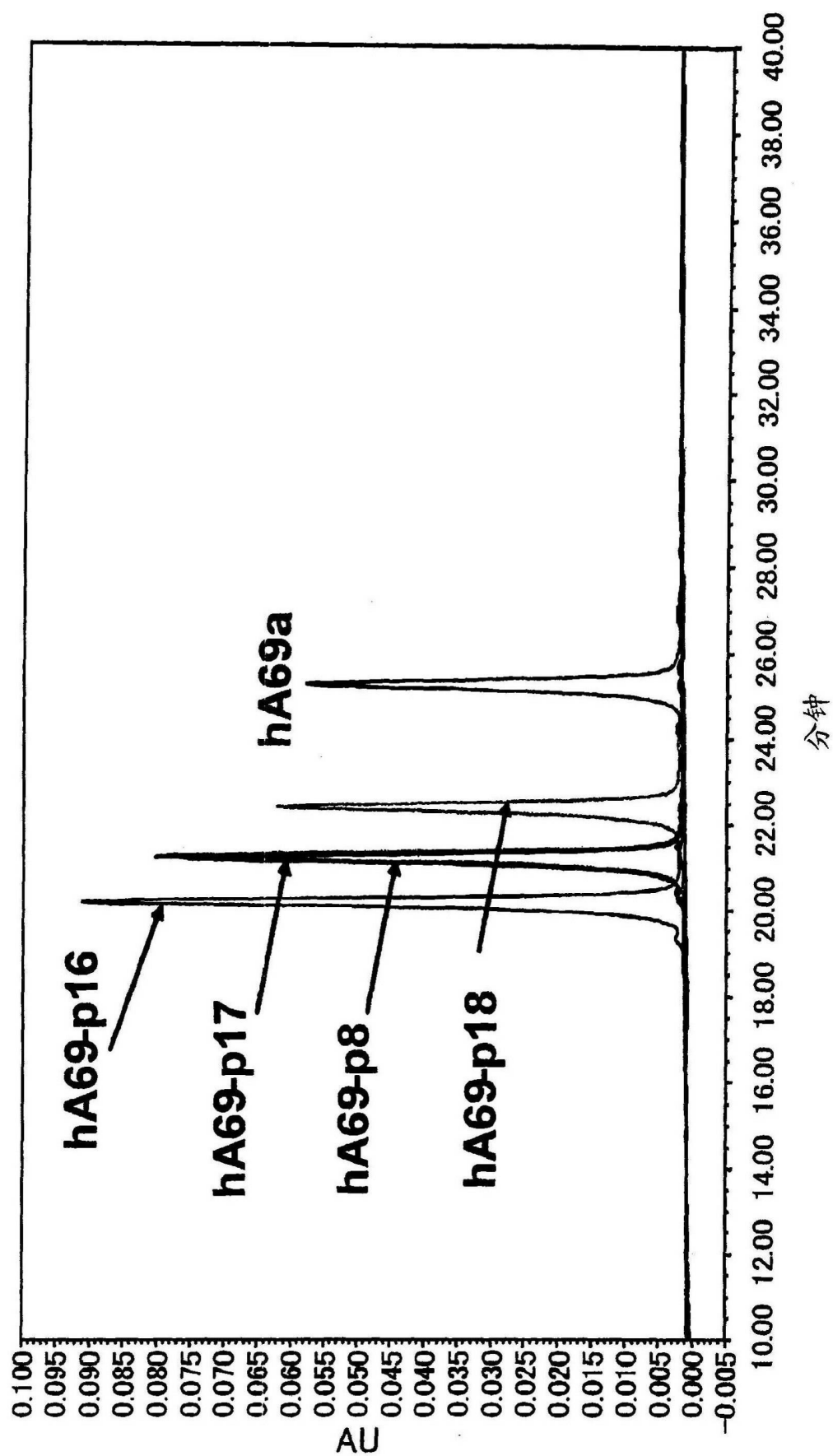


图 4

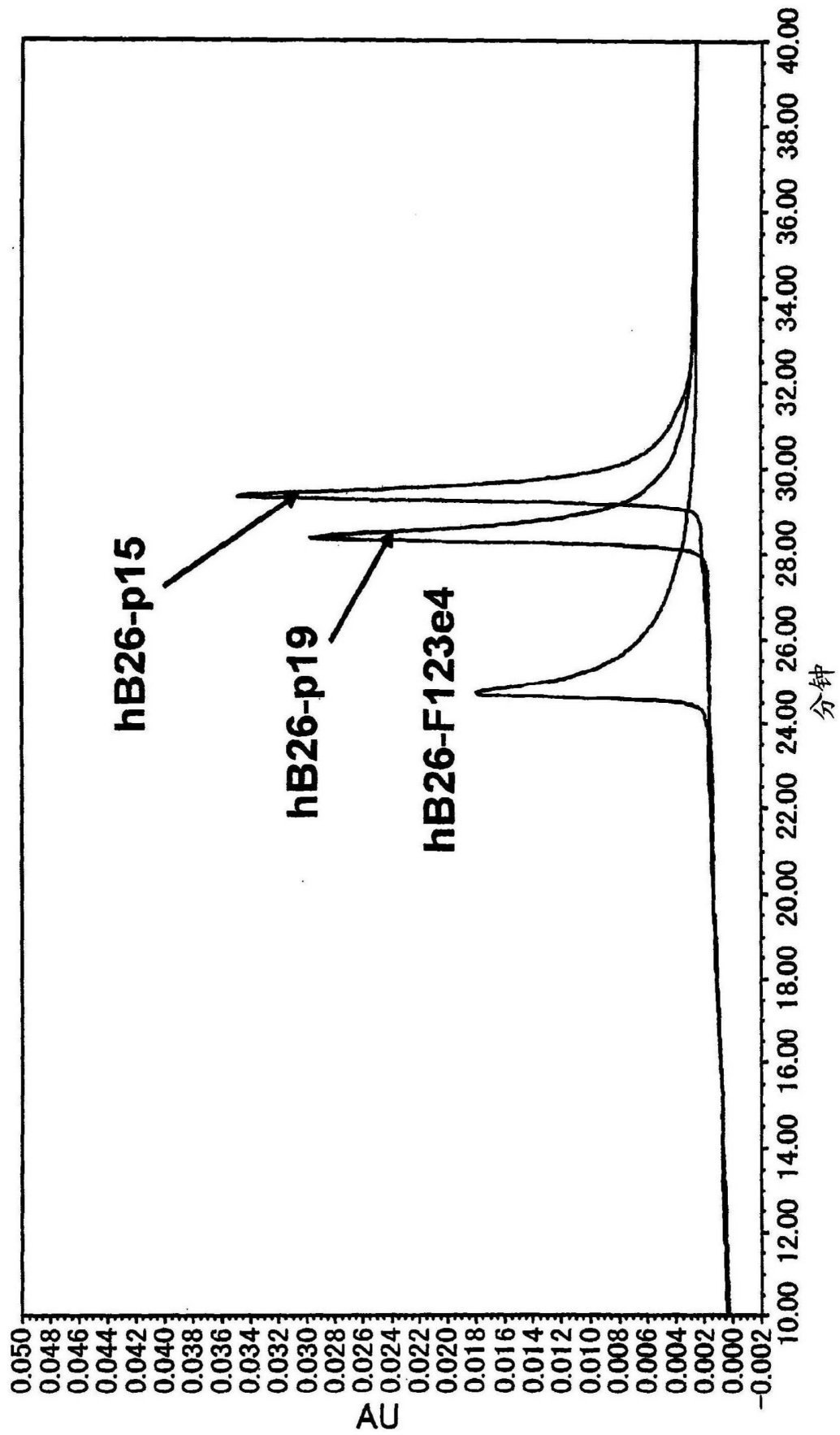


图 5

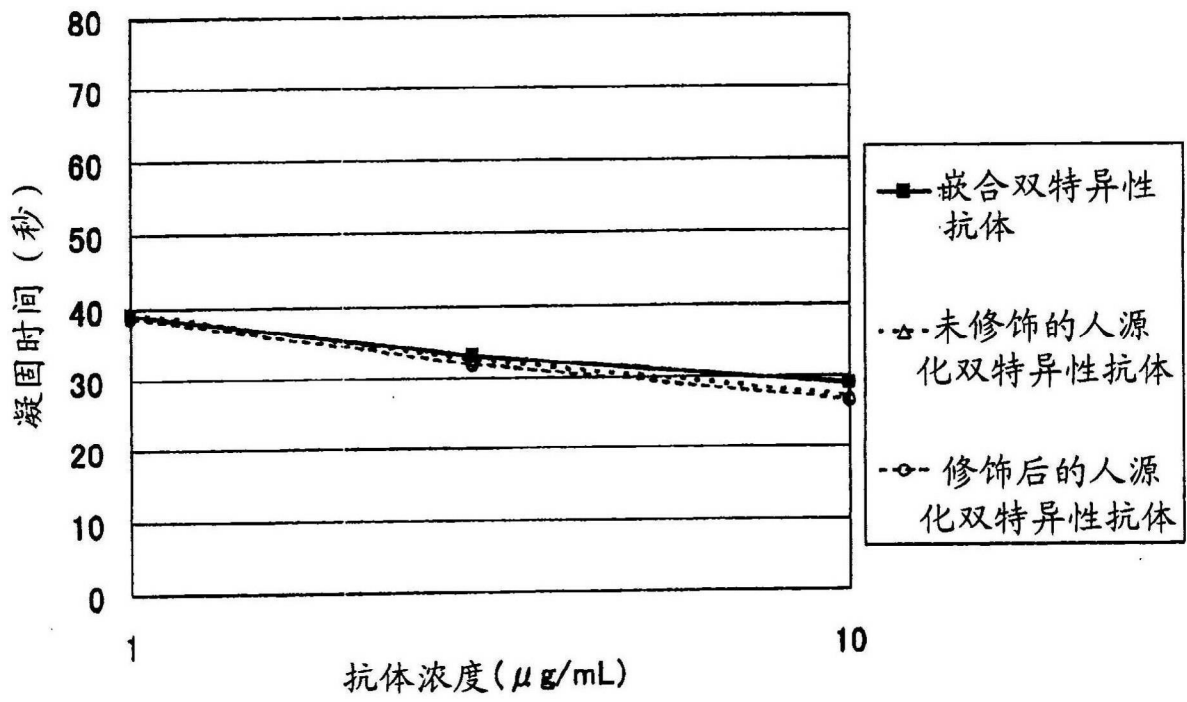


图 6

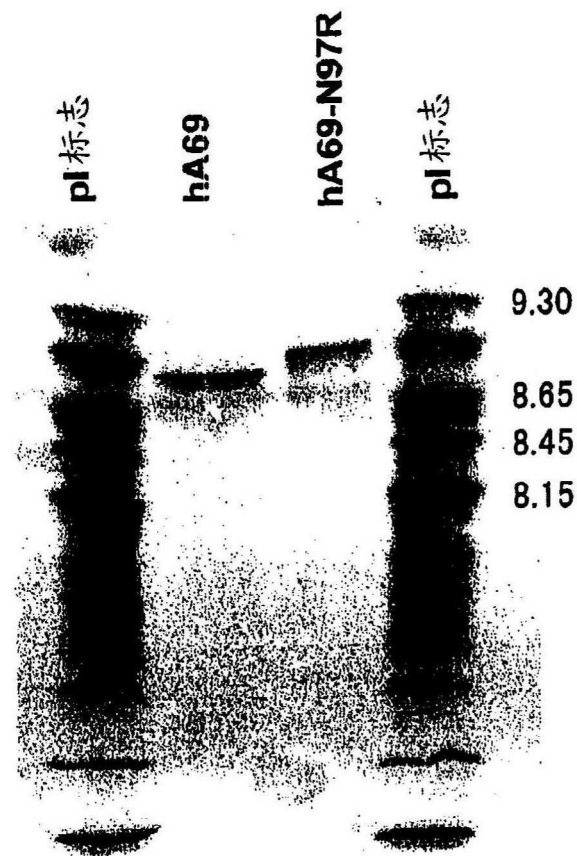


图 7

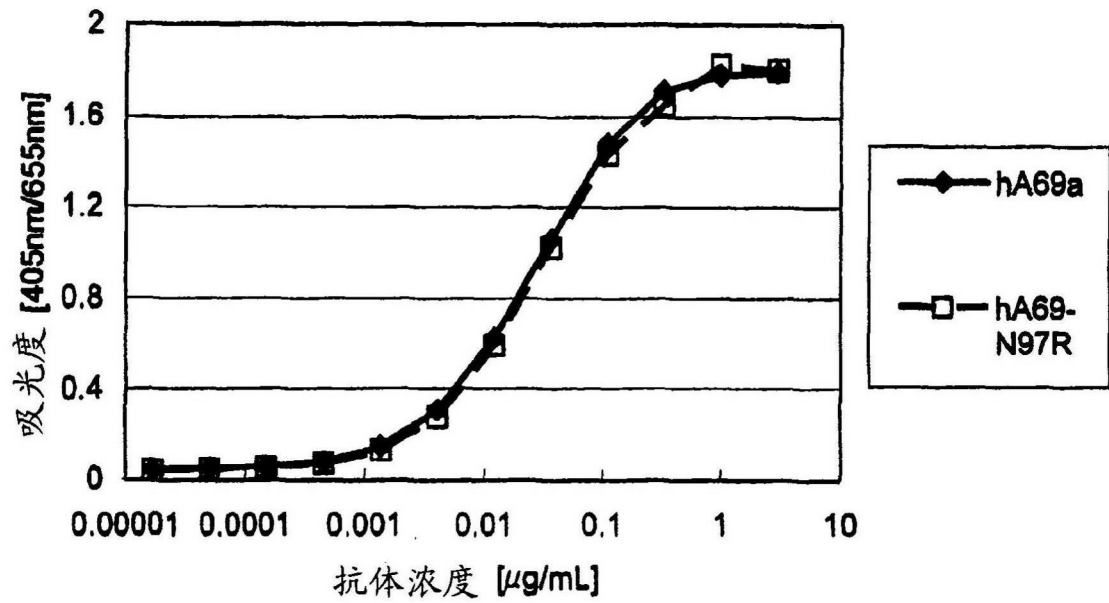


图 8

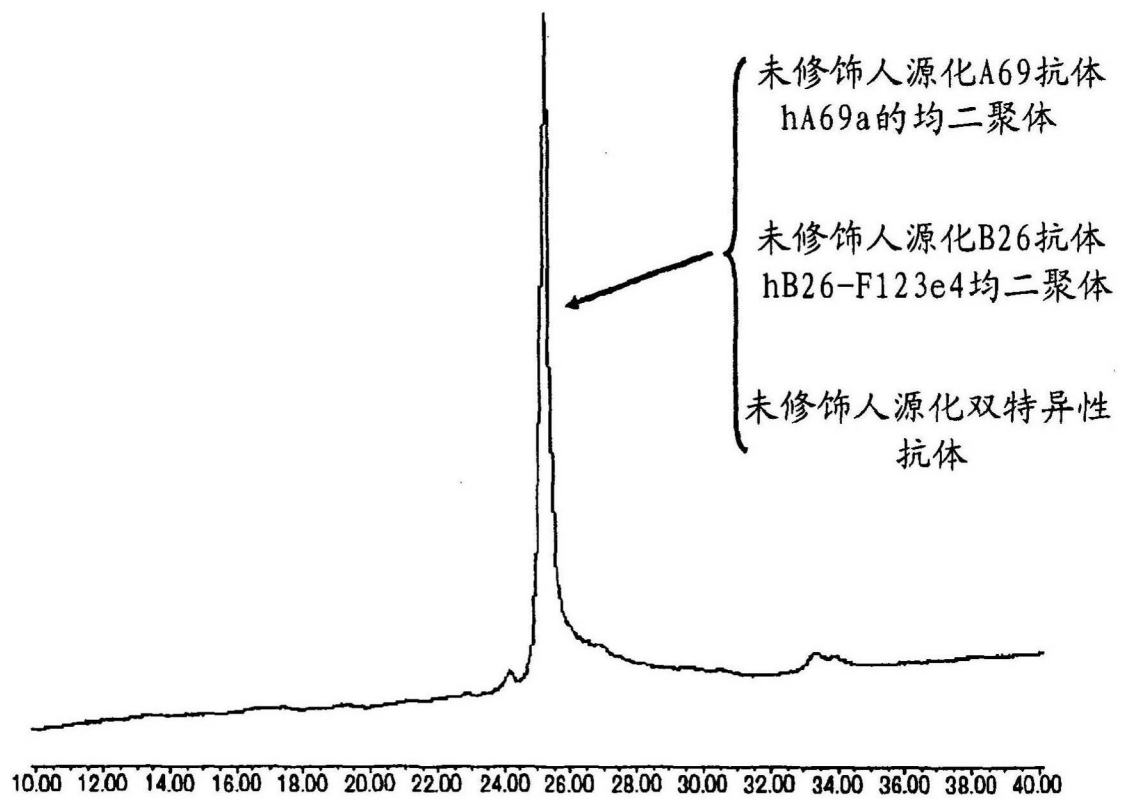


图 9

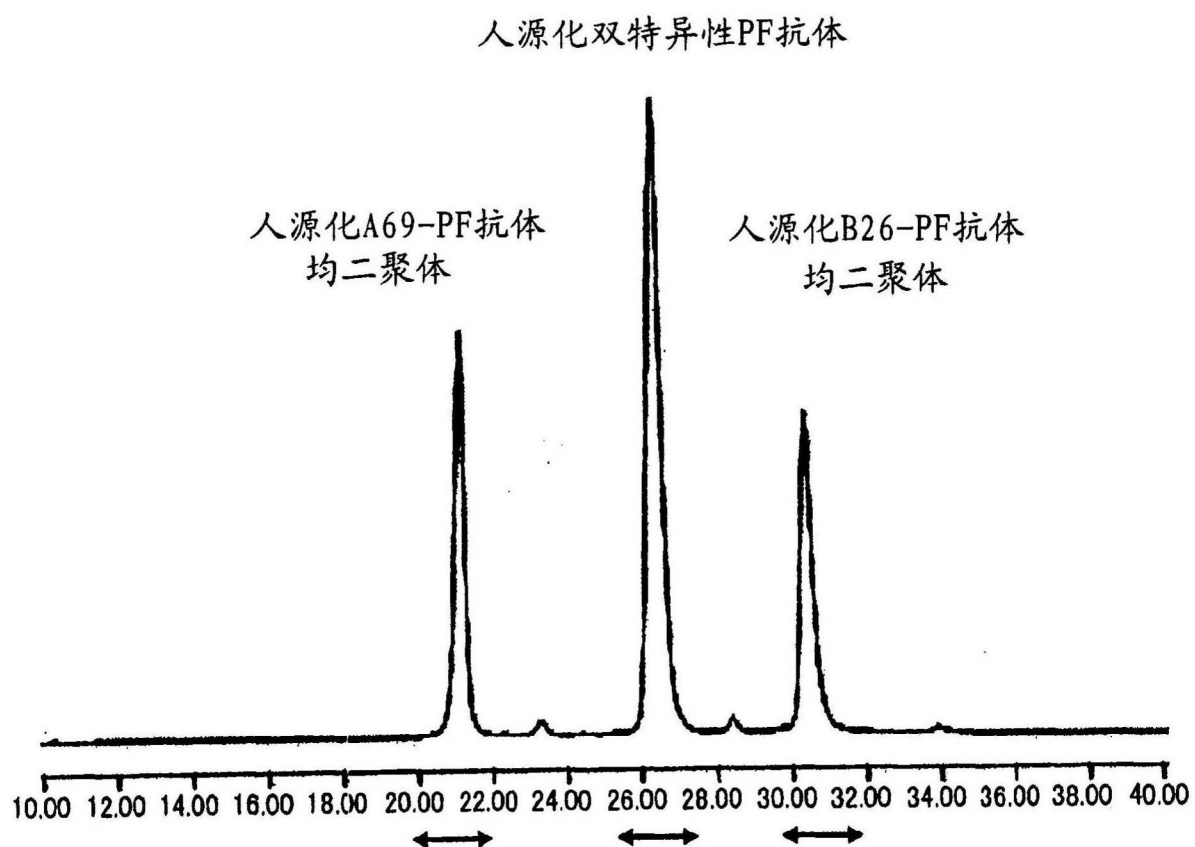


图 10

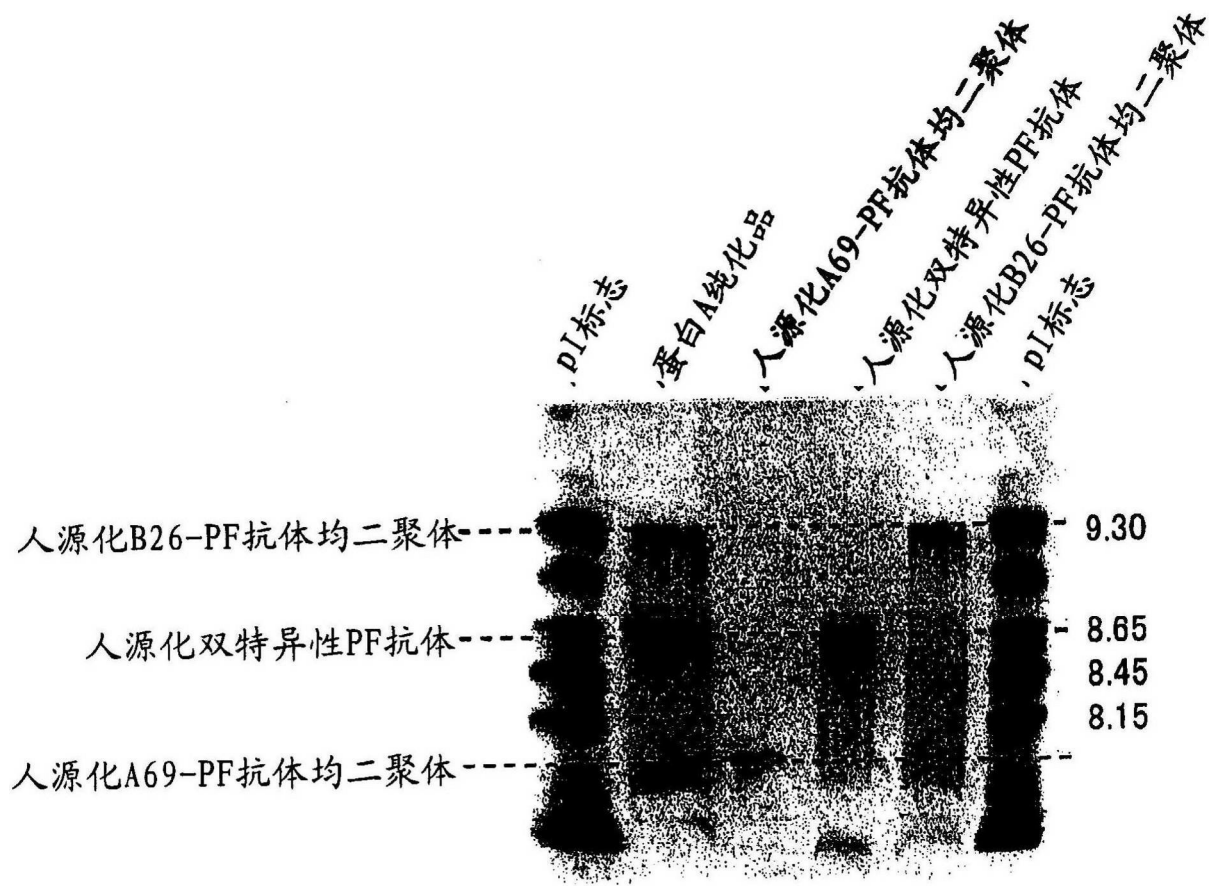


图 11

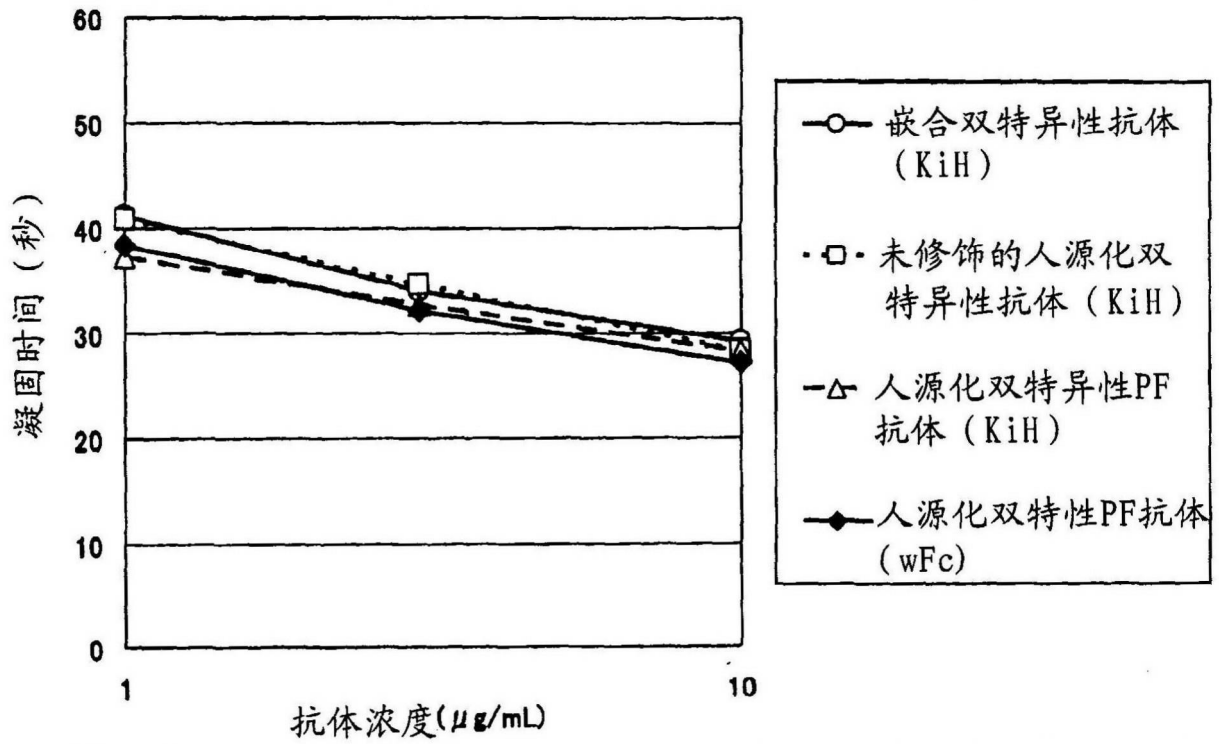


图 12

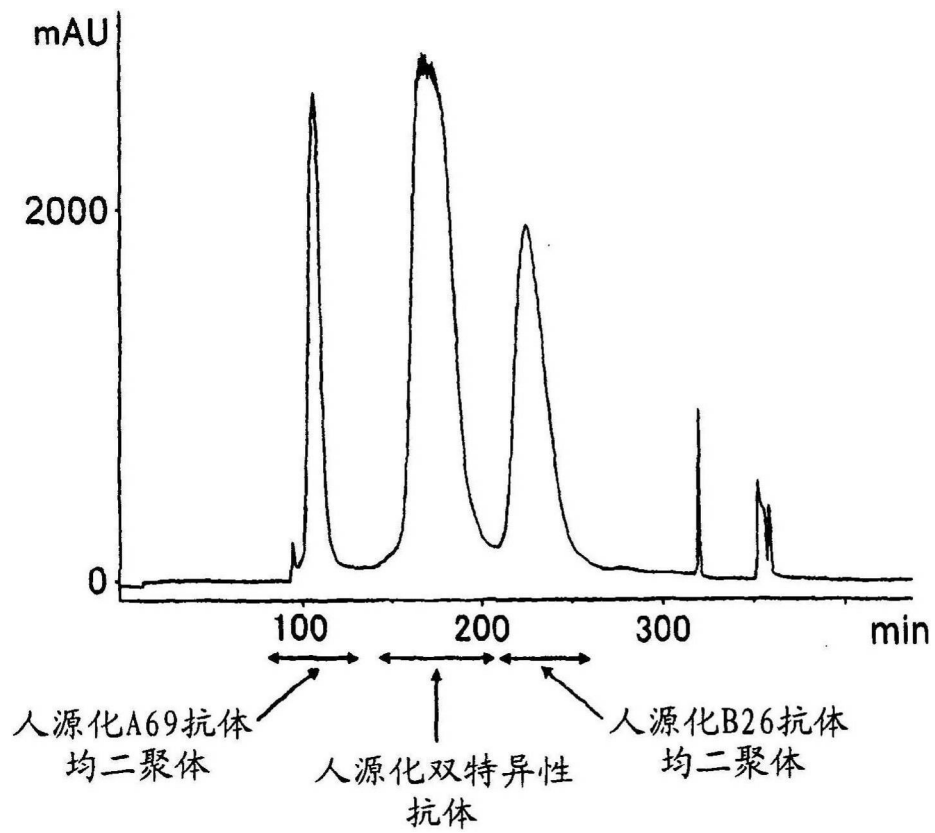


图 13

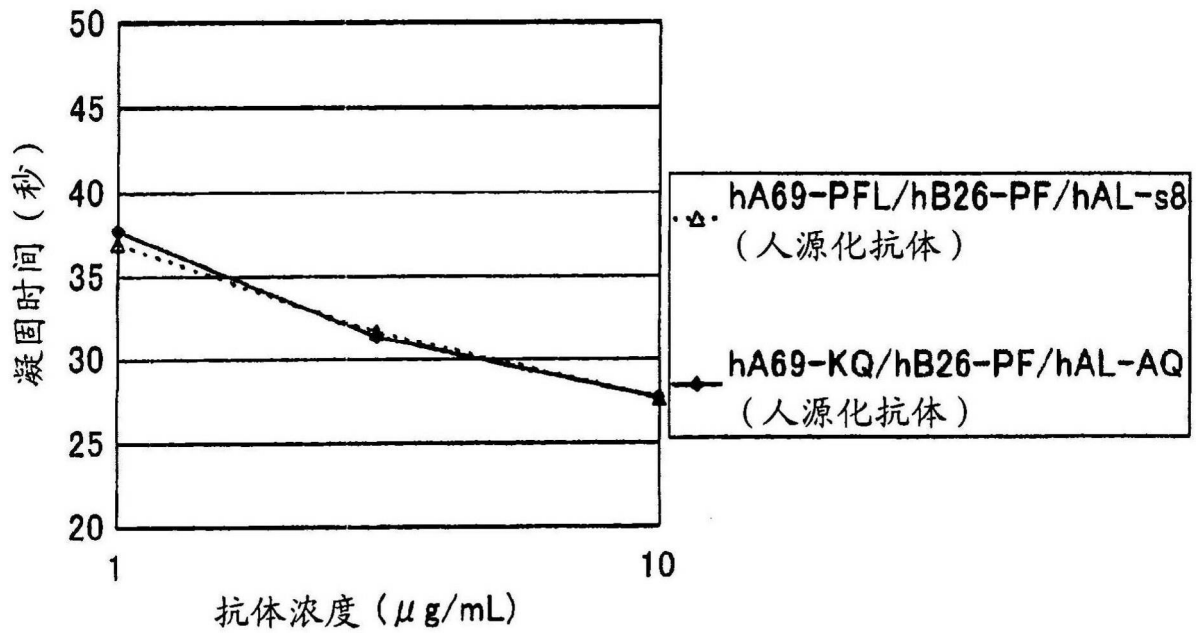


图 14

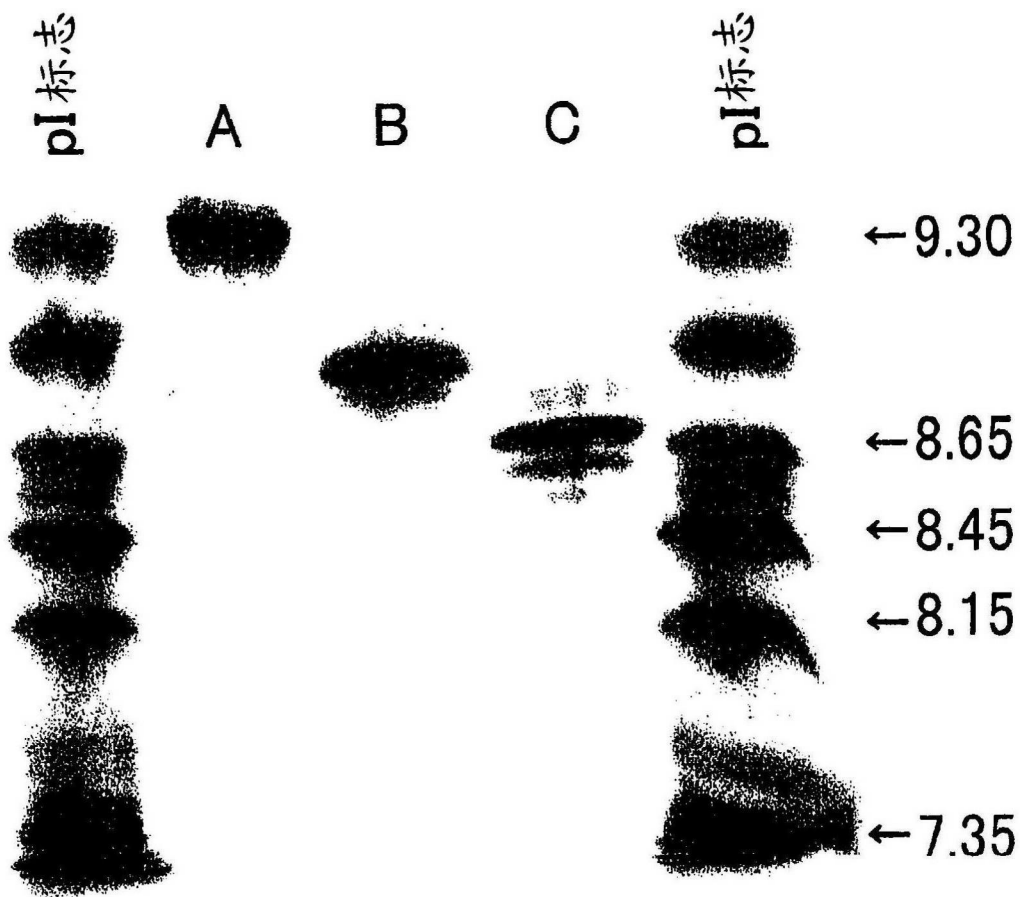


图 15



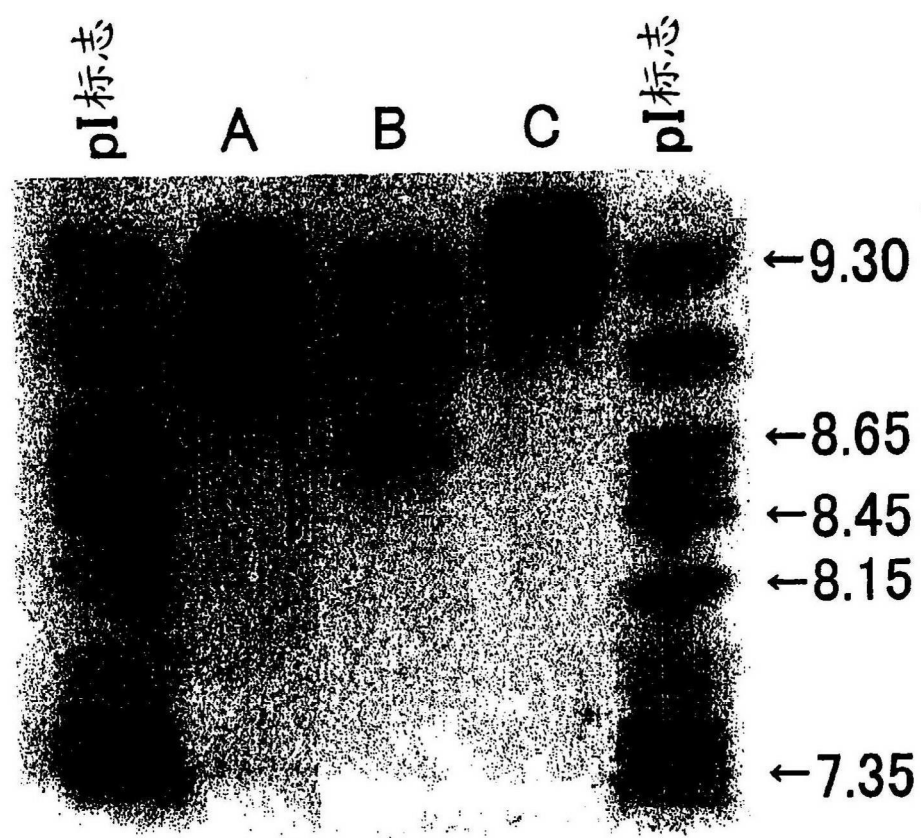


图 16

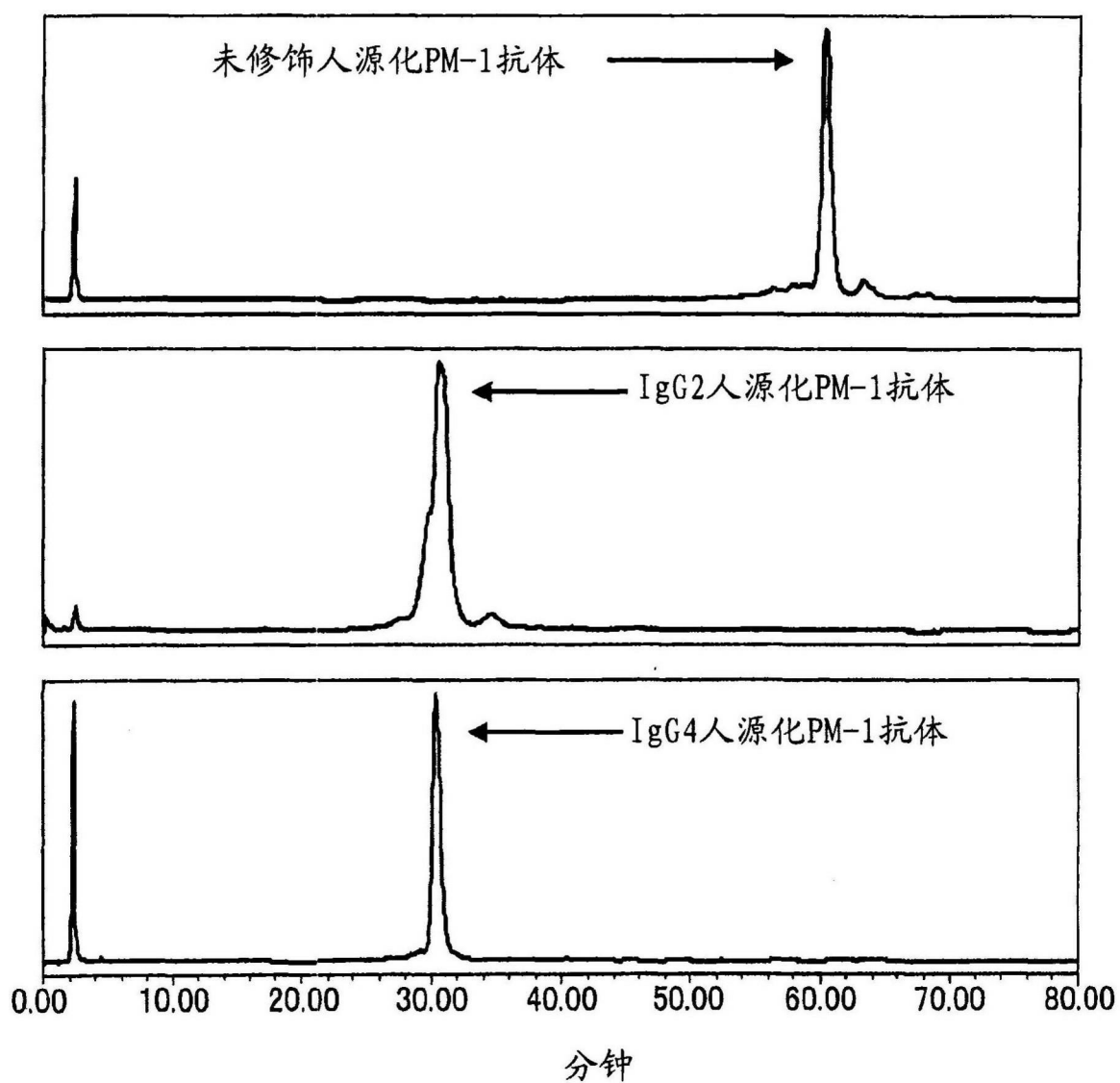


图 17

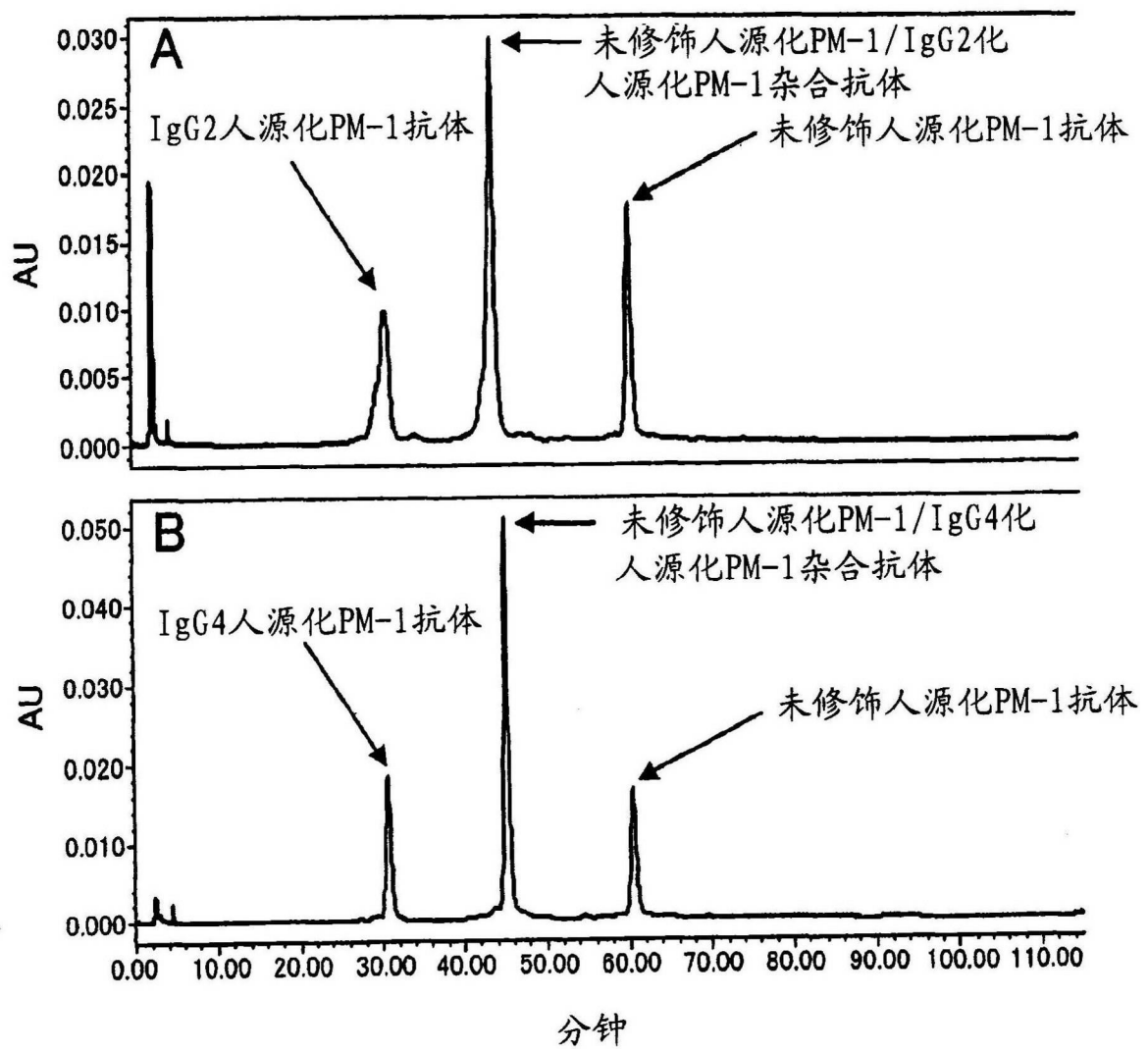


图 18

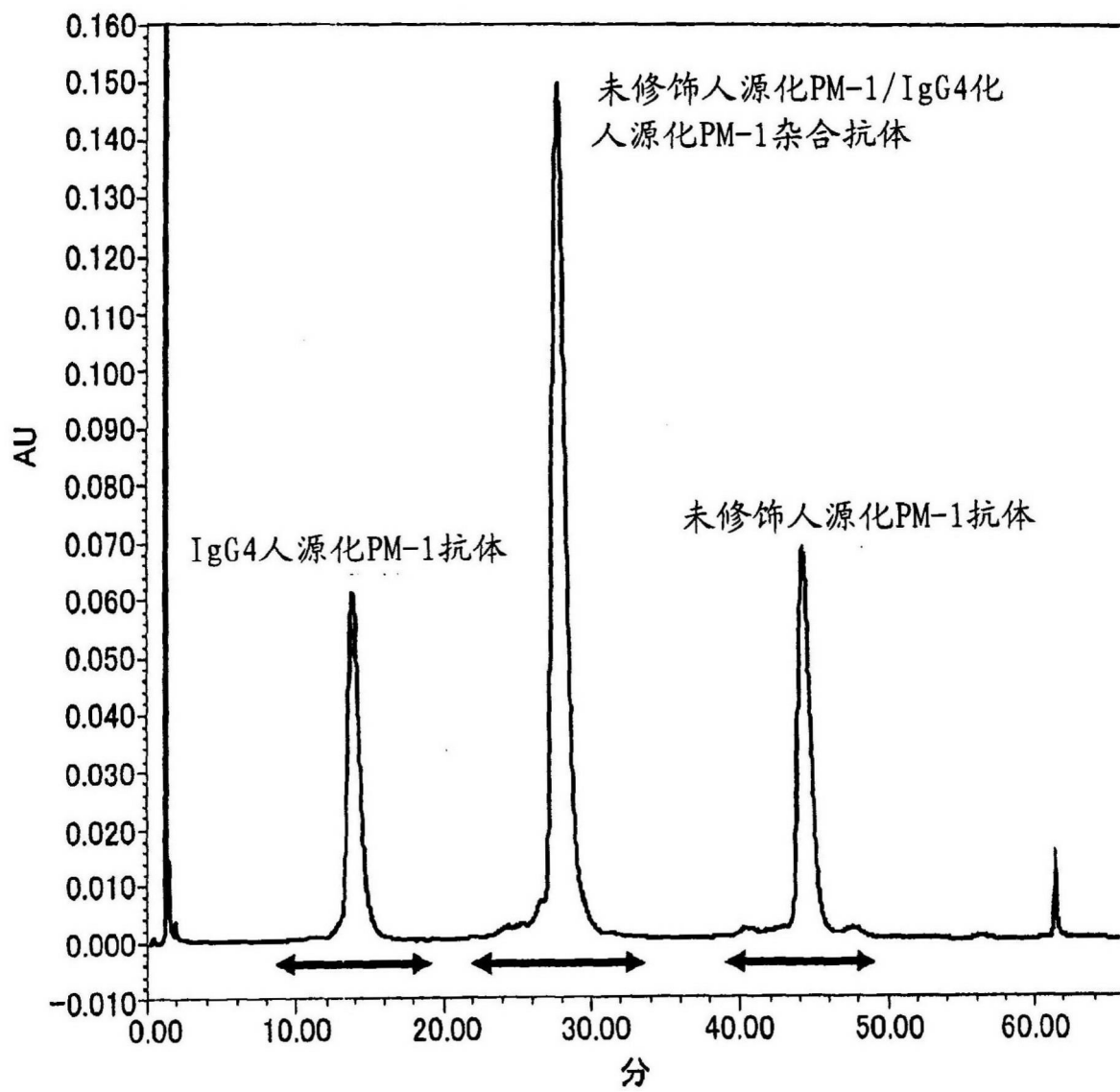


图 19

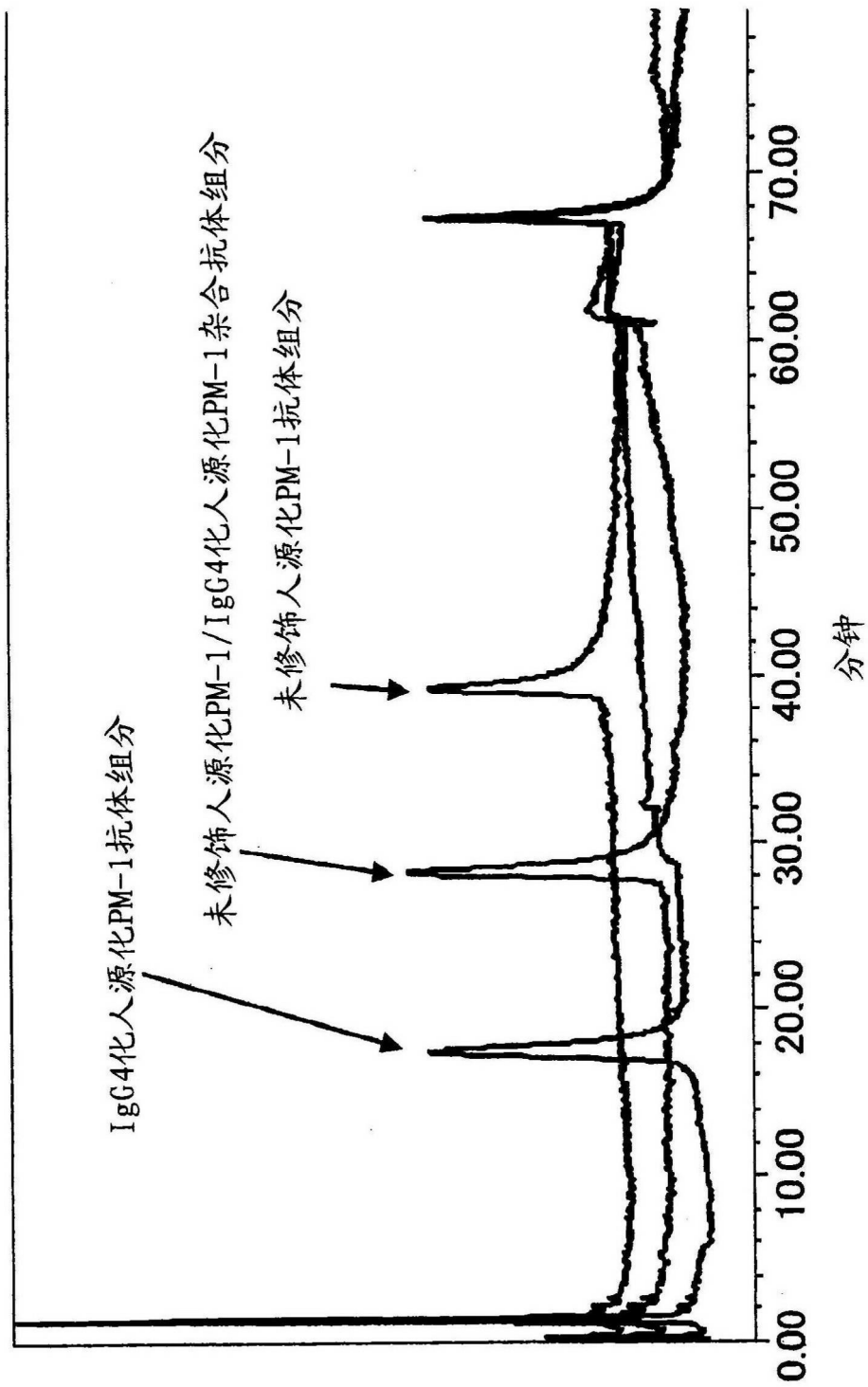


图 20

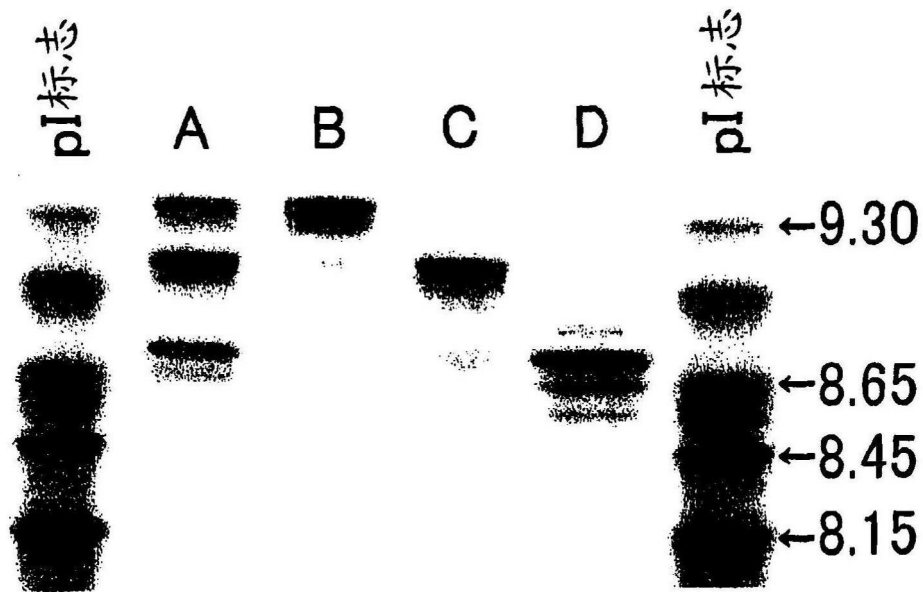


图 21

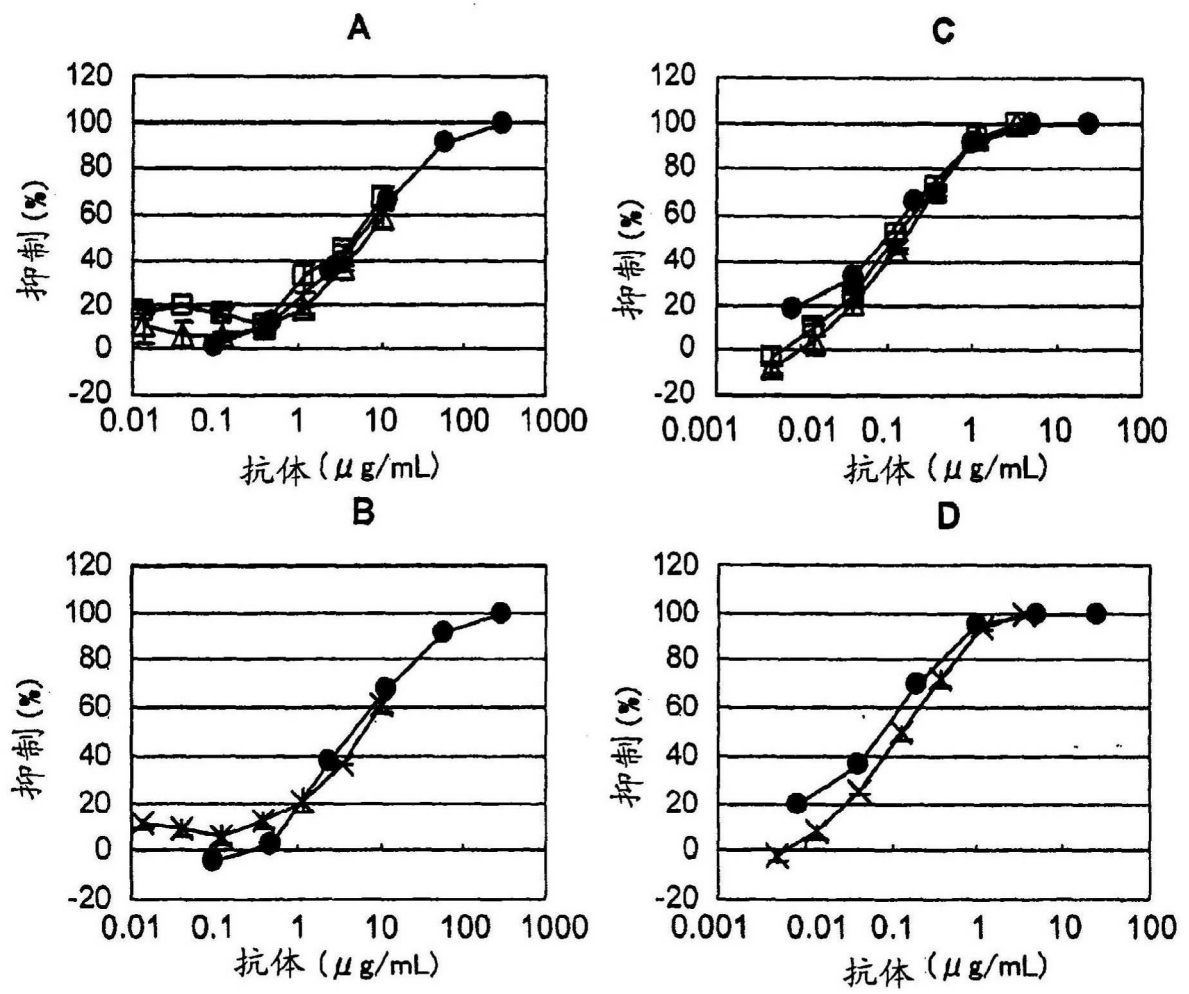


图 22

## **Abstract**

The invention relates to antibody modification method for purifying bispecific antibody. A method of efficiently purifying a bispecific antibody with the use of a chromatographic column which comprises modifying an amino acid occurring on the variable region surface of two kinds of antibodies constituting the bispecific antibody, thereby introducing a difference in isoelectric point between the H-chains of these two antibodies, and using this difference in isoelectric point. A method of efficiently purifying a bispecific antibody with the use of a chromatographic column which comprises integrating individual antigen-binding sites (heavy chain variable regions) into the constant regions of antibodies having different isoelectric points and expressing these antibodies at the same time.