



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107337734 A

(43)申请公布日 2017. 11. 10

(21)申请号 201710604956.6

(22)申请日 2010.12.03

(30)优先权数据

61/267,006 2009.12.04 US

61/346,566 2010.05.20 US

(62)分案原申请数据

201080055004.X 2010.12.03

(71)申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 J·舍尔 R·L·范德伦

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 柴云峰 黄革生

(51)Int. Cl.

C07K 16/46(2006.01)

权利要求书1页 说明书90页

序列表27页 附图26页

(54)发明名称

多特异性抗体、抗体类似物、组合物和方法

(57)摘要

本发明提供了特异性结合至少两个不同表位的多特异性抗体。还提供了天然抗体的结构性变体(抗体类似物)。另外,提供了具有一系列生物学活性的多特异性抗体和抗体类似物。提供了激动剂及拮抗剂多特异性抗体和激动剂及拮抗剂抗体类似物。还提供了与治疗剂和/或诊断剂缀合的多特异性抗体和抗体类似物,还提供了与下述试剂缀合的多特异性抗体和抗体类似物,与缺少这类试剂的多特异性抗体和抗体类似物相比,所述试剂用来增加体内半寿期。此外,提供了制造多特异性抗体及抗体类似物和包含多特异性抗体及抗体类似物的组合物的方法。也提供了多特异性抗体和抗体类似物的治疗用途、研究用途和诊断用途。

1. 合成一组抗体类似物的方法,其包括步骤(i)具有单个游离硫氢基的第一抗体片段与巯基反应性交联剂反应以产生抗体片段-交联剂部分,(ii)所述抗体片段-交联剂部分与两个或更多个额外抗体片段的每一者配对,所述每个额外抗体片段具有单个游离硫氢基,以产生所述的抗体类似物组,其中所述抗体片段的每一者从单一亲本抗体获得,和(iii)筛选所述抗体类似物组以获得具有所需活性抗体类似物,

其中所述第一抗体片段的游离硫氢基定位在选自以下的位置:轻链的110位置、轻链的205位置、重链的118位置和铰链区中半胱氨酸的位置,并且

其中所述两个或更多个额外抗体片段的游离硫氢基各自定位在选自以下的位置:轻链的110位置、轻链的205位置、重链的118位置和铰链区中的半胱氨酸位置,其中两个或更多个额外抗体片段的游离硫氢基位于这些位置的至少两个不同位置,

其中残基的编号根据EU编号系统。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述亲本抗体选自抗Her1、抗Her2、抗FcεRIα和抗FcγRIIb。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述抗Her2选自曲妥珠单抗和帕妥珠单抗。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述抗Her1选自D1-5和C3-101。

5. 根据权利要求2所述的方法,其中所述抗FcγRIIb是5A6。

6. 根据权利要求2所述的方法,其中所述抗FcεRIα是22E7。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述巯基反应性交联剂选自双马来酰亚氨基卤、双烷基卤、吡啶基二硫化物、双汞盐、5-巯基-2-硝基苯甲酸介导的交联和双硫代磺酸酯。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述巯基反应性交联剂是双马来酰亚胺。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述亲本抗体是半胱氨酸工程化抗体。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述半胱氨酸工程化抗体包含在所述轻链的位置110或在位置205处的置换,其中所述的残基编号根据EU编号系统,并且其中所述置换是半胱氨酸。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述半胱氨酸工程化抗体包含在所述重链的位置118或在位置121处的置换,其中所述的残基编号根据EU编号系统,并且其中所述置换是半胱氨酸。

多特异性抗体、抗体类似物、组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2010年12月3日、发明名称为“多特异性抗体、抗体类似物、组合物和方法”的中国专利申请201080055004.X(国际申请号PCT/US2010/058958)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2009年12月4日提交的临时美国申请号61/267,006和2010年5月20日提交的临时美国申请号61/346,566的优先权益,这两篇文献的内容因而通过引用的方式完整并入。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有已经以ASCII格式经EFS-Web提交并且因而通过引用方式完整并入的序列表。在2010年11月30日创建的所述ASCII副本命名为P4377R1W0.txt并且大小是53,549比特。

发明领域

[0006] 本发明提供了特异性结合至少两个不同表位的多特异性抗体。还提供了天然抗体的结构性变体(抗体类似物)。另外,提供了具有一系列生物学活性的多特异性抗体和抗体类似物。提供了激动剂及拮抗剂多特异性抗体和激动剂及拮抗剂抗体类似物。还提供了与治疗剂和/或诊断剂缀合的多特异性抗体和抗体类似物,还提供了与意在增加体内半寿期的试剂缀合的多特异性抗体和抗体类似物,与缺少这种试剂的多特异性抗体和抗体类似物相比,所述试剂意在增加体内半寿期。此外,提供了制造多特异性抗体及抗体类似物和包含多特异性抗体及抗体类似物的组合物的方法。也提供了多特异性抗体和抗体类似物的治疗用途、研究用途和诊断用途。

[0007] 背景

[0008] 单克隆抗体已经为治疗多种疾病提供了新疗法,所述疾病包括癌症、免疫学疾病和神经学疾病并且还包括传染病。Newsome,B.W.等人,Br J Clin Pharmacol 66(1):6-19(2008);Chames,P.等人,Br J Pharmacol 157(2):220-33(2009);Dimitrov,D.S.等人,Methods Mol Biol 525:1-27,xiii(2009)。这些疗法已经获得成功,至少部分因为单克隆抗体提供与靶蛋白的稳健和强烈相互作用及单一特异性。单克隆抗体相对长的体内半寿期和稳定性允许合乎需要的给药方案,并且细胞介导的毒性可以由抗体的Fc区引起(Tabrizi,M.A.等人,Drug Discov Today 11(1-2):81-8[2006])。在某些情况下,治疗性抗体已经用来通过结合于并中和分泌蛋白和细胞表面蛋白的重要功能区域而阻断细胞信号。目前正在利用单克隆抗体的此类基本特性来设计与传统抗体相比作用机制不同的分子疗法(Dimitrov,D.S.等人,Methods Mol Biol 525:1-27,xiii[2009])。某些的此类技术目前正处于临床开发中并且显示有前景的迹象(Chames,P.等人,Br J Pharmacol 157(2):220-33[2009])。

[0009] 例如,一种方法涉及使用抗体以递送细胞毒性剂至肿瘤的细胞特异靶向法。Carter,P.J.等人,Cancer J 14(3):154-69(2008);Junutula,J.R.等人,Nat Biotechnol 26(8):925-32(2008);Senter,P.D.,Curr Opin Chem Biol 13(3):235-44(2009)。在这种情

况下,单克隆抗体特异性引导细胞毒分子至靶细胞,从而在需要高毒性的情况下集结细胞毒部分的高毒性,同时对非靶细胞的影响最小化。此类抗体-药物缀合物允许增加杀死肿瘤细胞的效力,同时维持了使脱靶毒性最小化的给药窗口。

[0010] 另一个实例是递送如含有物质如siRNA的纳米粒子和在粒子表面上包括单克隆抗体用于打靶的功能性复合物。Schiffelers,R.M.等人,Nucleic Acids Res 32(19):e149(2004);Vornlocher,H.P.,Trends Mol Med 12(1):1-3(2006);Davis,M.E.,Mol Pharm 6(3):659-68(2009)。

[0011] 又一个方法使用抗体的双价结构来构建与两个靶同时结合的双特异性分子(Fischer,N.等人,Pathobiology 74(1):3-14[2007])。双特异性抗体为增加特异性、拓宽效力和利用不能以传统单克隆抗体实现的新作用机制提供了机会。Drakeman,D.L.,Expert Opin Investig Drugs 6(9):1169-78(1997);Kontermann,R.E.,Acta Pharmacol Sin 26(1):1-9(2005);Marvin,J.S.等人,Acta Pharmacol Sin 26(6):649-58(2005);Marvin,J.S.等人,Curr Opin Drug Discov Devel 9(2):184-93(2006);Shen,J.等人,J Biol Chem 281(16):10706-14(2006);Chames,P.等人,Curr Opin Drug Discov Devel 12(2):276-83(2009)。用双特异性抗体交联两个不同的受体以抑制信号传导途径已经在众多应用中显示了应用。在一个实例中,将细胞表面酪氨酸磷酸酶招募至IgE受体复合物中以减少磷酸化IgE受体的活性(Jackman等人,J.Biol.Chem.285:20850-20859(2010))。这种方法比阻断配体结合位点更有效,原因是甚至在高浓度配体存在下,也出现双特异性抗体抑制信号传导。见上文。

[0012] 在通过双特异性抗体同时结合两个不同细胞类型上的受体在肿瘤细胞附近实现T细胞活化的情况下,双特异性抗体招募细胞毒T细胞的用途也已经显示出临床可能性。Bargou,R.,E.等人,Science 321(5891):974-7(2008);Shekhar,C.,Chem Biol 15(9):877-8(2008);Baeuerle,P.A.等人,Cancer Res 69(12):4941-4(2009)。在一种方法中,开发了具有结合Fc γ RIII的一条臂和与HER2受体结合的另一条臂的双特异性抗体用于治疗过量表达HER2抗原的卵巢肿瘤和乳腺肿瘤。(Hseih-Ma等人Cancer Research 52:6832-6839[1992]和Weiner等人Cancer Research 53:94-100[1993])。双特异性抗体也可以介导T细胞杀伤。一般,双特异性抗体将T细胞上的CD3复合物与肿瘤相关抗原连接。由连接至抗p185^{HER2}的抗CD3组成的完全人源化的F(ab')₂双特异性抗体用来引导T细胞靶向以杀死过量表达HER2受体的肿瘤细胞。Shalaby等人,J.Exp.Med.175(1):217(1992)。双特异性抗体已经在几种早期阶段临床试验中进行测试,取得令人鼓舞的结果。在一个试验中,12位肺癌、卵巢癌或乳腺癌患者用输注活化的T淋巴细胞来治疗,其中所述T淋巴细胞用抗CD3/抗肿瘤(MOC31)双特异性抗体引导靶向。deLeij等人Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity(双特异性抗体和定向细胞性细胞毒),Romet-Lemonne,Fanger和Segal编著,Lienhart(1991)第249页。被引导靶向的细胞引起肿瘤细胞的明显局部裂解、轻微炎症反应,但是没有有毒副作用或抗小鼠抗体应答。

[0013] 此外,双特异性抗体可以用于传染病的治疗(例如,用于将效应细胞靶向至病毒如HIV或流感病毒感染的细胞,或原生动物如岗地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)感染的细胞),用来递送免疫毒素至肿瘤细胞,或将免疫复合物靶向至细胞表面受体。见,例如,Fanger等人,Crit.Rev.Immunol.12:101-124(1992)。例如,就HIV感染而言,Berg等人,PNAS(USA) 88:

4723-4727 (1991) 制备了衍生自鼠CD4-IgG的双特异性抗体-免疫黏附素嵌合体。这些作者构建一种具有两条臂的四聚体分子。一条臂由与抗体重链恒定域融合的CD4连同CD4与抗体轻链恒定域的融合物组成。另一条臂由抗CD3抗体的完整重链连同该抗体的完整轻链组成。借助所述CD4-IgG臂,这种双特异性分子与细胞毒T细胞表面上的CD3结合。细胞毒细胞与HIV感染的细胞并置导致特异性杀死后一种细胞。

[0014] 已经描述了用于合成多特异性抗体(包括双特异性抗体)的众多方法。用于合成二价抗体片段的方法已经在WO 99/64460中描述。然而,这些方法中许多存在各种问题。例如,已经报道了蛋白质表达与大规模生产、稳定性及体内半寿期、折叠和聚集方面的难题。Morimoto,K.等人,J Immunol Methods 224(1-2):43-50(1999);Kriangkum,J.等人,Biomol Eng18(2):31-40(2001);Segal,D.M.和B.J.Bast(2001)。“Production of bispecific antibodies(双特异性抗体的产生)。”Curr Protoc Immunol第2章:第213单元;Graziano,R.F.等人,Methods Mol Biol 283:71-85(2004);Kontermann,R.E.等人,Methods Mol Biol 248:227-42(2004);Das,D.等人,Methods Mol Med 109:329-46(2005);Fischer,N.等人,Pathobiology74(1):3-14(2007);Shen,J.等人,J Immunol Methods 318(1-2):65-74(2007)。此外,这些方法中的许多方法繁琐且费时,因而限制了可以构建和筛选所需活性的分子的数目和种类。本文所述的方法解决了这些问题,并且本文所述的方法、组合物、多特异性抗体及抗体类似物提供了额外的益处。

[0015] 本文中提到的全部参考文献,包括专利申请和出版物,通过引用的方式完整并入本文用于任何目的。

[0016] 概述

[0017] 本发明的方法和组合物至少部分地基于开发用于可靠和可重复地产生高纯度多特异性抗体和抗体类似物的方法。在某些实施方案中,可以容易地制备大量的多特异性或单特异组合并且对它们筛选所需的活性。在一个方面,基于令人惊讶和出人意料的以下研究结果提供了工程化抗体功能的新方法:天然抗体的结构性变体可以拥有广谱的范围从强力拮抗剂至强力激动剂的生物学活性,伴有在其间变化水平的活性。在另一个方面,使用本文所述的方法,提供了从预存亲本抗体获得的多特异性抗体和抗体类似物,它们拥有与亲本抗体不相关的新功能。本文所述的方法和多特异性抗体和抗体类似物至少部分地提供了用于产生、筛选、鉴定及开发新治疗剂和诊断剂的新方法以及研究工具。

[0018] 在一个方面,提供了合成多特异性抗体的方法,其中从具有第一单特异性和游离巯氢基的第一亲本抗体获得的第一抗体片段与巯基反应性交联剂(thio-reactive crosslinker)反应以产生抗体片段-交联剂部分,并且其中所述抗体片段-交联剂部分与从具有第二单特异性和游离巯氢基的第二亲本抗体获得的第二抗体片段反应以产生多特异性抗体,并且其中所述第一单特异性与第二单特异性不同。在某些实施方案中,第一亲本抗体选自抗Her1和抗Her2。在某些实施方案中,第一亲本抗体是抗Her2并且第二亲本抗体是抗Her1,或者第一亲本抗体是抗Her1并且第二亲本抗体是抗Her2。在某些实施方案中,抗Her2选自**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)和2C4(帕妥珠单抗)。在某些实施方案中,第一亲本抗体是抗Her2并且第一抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:1、2、3、6和7的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:4、5和8的重链序列。在某些实施方案中,抗Her1选自D1-5和C3-101。在某些实施方案中,第一亲本抗体是抗Her1并且第一抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:18、19、21和22的轻

链序列和/或选自SEQ ID NOs.:17和20的重链序列。在某些实施方案中,抗Her2选自曲妥珠单抗和帕妥珠单抗,并且抗Her1选自D1-5和C3-101。在某些实施方案中,从抗Her2获得的抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:1、2、3、6和7的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:4、5和8的重链序列;并且从抗Her1获得的抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:18、19、21和22的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:17和20的重链序列。

[0019] 在上述方法的又一个方面,第一亲本抗体选自抗Fc γ RIIb和抗Fc ϵ RI α 。在某些实施方案中,第一亲本抗体是抗Fc γ RIIb并且第二亲本抗体是抗Fc ϵ RI α ,或者第一亲本抗体是抗Fc ϵ RI α 并且第二亲本抗体是抗Fc γ RIIb。在某些实施方案中,抗Fc γ RIIb是5A6。在某些实施方案中,第一亲本抗体是抗Fc γ RIIb并且第一抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:11和12的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:9和10的重链序列。在某些实施方案中,抗Fc ϵ RI α 是22E7。在某些实施方案中,第一亲本抗体是抗Fc ϵ RI α 并且第一抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:15和16的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:13和14的重链序列。在某些实施方案中,从抗Fc γ RIIb获得的抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:11和12的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:9和10的重链序列;并且从抗Fc ϵ RI α 获得的抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:15和16的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:13和14的重链序列。

[0020] 在又一个方面,所述巯基反应性交联剂选自双马来酰亚氨基卤、双烷基卤、吡啶基二硫化物、双汞盐、5-巯基-2-硝基苯甲酸介导的交联和双硫代磺酸酯。在一个实施方案中,所述交联剂是双马来酰亚胺。在某些实施方案中,第一抗体片段和/或第二抗体片段从半胱氨酸工程化抗体获得。在某些此类实施方案中,第一抗体片段和/或第二抗体片段是硫代Fab。在某些实施方案中,所述半胱氨酸工程化抗体包含在所述轻链的位置110或在位置205处的半胱氨酸置换,其中所述的残基编号根据EU编号系统。在某些实施方案中,所述半胱氨酸工程化抗体包含在所述重链的位置118或在位置121处的半胱氨酸置换,其中所述的残基编号根据EU编号系统。在某些实施方案中,第一抗体片段和/或第二抗体片段从天然抗体获得,其中所述天然抗体用胃蛋白酶消化以产生F(ab')₂片段,其中所述F(ab')₂片段经纯化并且用还原剂并随后用氧化剂在其中Fab重链和轻链之间的二硫键重新形成及铰链区中的半胱氨酸残基仍是未氧化的条件下处理。

[0021] 在另一个方面,提供了合成抗体类似物的方法,其中具有游离硫氢基的第一抗体片段与巯基反应性交联剂反应以产生抗体片段-交联剂部分,并且其中所述抗体片段-交联剂部分与具有游离硫氢基的第二抗体片段反应以产生所述抗体类似物,并且其中所述第一抗体片段和所述第二抗体片段从单一亲本抗体获得。在某些实施方案中,所述抗体类似物具有在结构上与亲本抗体的抗原结合区不同的抗原结合区。在某些实施方案中,所述亲本抗体选自抗Her1、抗Her2、抗Fc ϵ RI α 和抗Fc γ RIIb。在某些实施方案中,抗Her2选自**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)和2C4(帕妥珠单抗)。在某些实施方案中,所述亲本抗体是抗Her2并且第一抗体片段和第二抗体片段包含相同的轻链序列,其中所述轻链序列选自SEQ ID NOs.:1、2、3、6和7,和/或相同的重链序列,其中所述重链序列选自SEQ ID NOs.:4、5和8。在某些实施方案中,抗Her1选自D1-5和C3-101。在某些实施方案中,所述亲本抗体是抗Her1并且第一抗体片段和第二抗体片段包含相同的轻链序列,其中所述轻链序列选自SEQ ID NOs.:18、19、21和22,和/或相同的重链序列,其中所述重链序列选自SEQ ID NOs.:17和20。在某些实施方案中,抗Fc γ RIIb是5A6。在某些实施方案中,所述亲本抗体是抗Fc γ RIIb并

且第一抗体片段和第二抗体片段包含相同的轻链序列,其中所述轻链序列选自SEQ ID NOs.:11和12,和/或相同的重链序列,其中所述重链序列选自SEQ ID NO.:9和10。在某些实施方案中,抗FcεRIα是22E7。在某些实施方案中,所述亲本抗体是抗FcεRIα并且第一抗体片段和第二抗体片段包含相同的轻链序列,其中所述轻链序列选自SEQ ID NOs.:15和16,和/或相同的重链序列,其中所述重链序列选自SEQ ID NO.:13和14。在某些实施方案中,所述亲本抗体是半胱氨酸工程化抗体。在某些实施方案中,所述亲本抗体是天然抗体。

[0022] 在又一个方面,提供了如上合成多特异性抗体或抗体类似物的方法,其中所述交联剂是包含受保护的SH基团的改性交联剂。在一个实施方案中,所述改性交联剂是双马来酰亚氨基-乙酰乙酸酯(BMata)。在某些实施方案中,包含所述改性交联剂的多特异性抗体或抗体类似物进一步与包含官能团的试剂反应。在某些实施方案中,所述试剂选自聚乙二醇(PEG)、白蛋白结合肽(ABP)、荧光标签、放射成像剂、细胞毒性剂和siRNA。在某些实施方案中,包含所述改性交联剂的多特异性抗体或抗体类似物进一步与PEG反应。在某些实施方案中,所述PEG是2000mw (2K) PEG、12,000mw (12K) PEG和20,000mw (20K) PEG。

[0023] 在又一个方面,提供了合成一组多特异性抗体的方法,其中从具有第一单特异性和游离硫氢基的第一亲本抗体获得的第一抗体片段与巯基反应性交联剂反应以产生抗体片段-交联剂部分,并且其中所述抗体片段-交联剂部分与从与所述第一亲本抗体具有不同单特异性的一个或多个亲本抗体获得的两个或更多个额外抗体片段中每一者配对反应,所述每个额外抗体片段具有游离硫氢基,以产生多特异性抗体组。在某些实施方案中,所述抗体片段-交联剂部分与三个或更多个额外抗体片段中的每一者、或四个或更多个额外抗体片段中的每一者、或五个或更多个额外抗体片段中的每一者、或十个或更多个额外抗体片段中的每一者、或15个或更多个额外抗体片段中的每一者、或20个或更多个额外抗体片段中的每一者、或25个或更多个额外抗体片段中的每一者、或50个或更多个额外抗体片段中的每一者或100个或更多个额外抗体片段中的每一者配对反应,在每种情况下,所述的额外抗体片段均从在每种情况下与第一亲本抗体具有不同单特异性的一种或更多种亲本抗体、或两个或更多个亲本抗体、或三种或更多种亲本抗体、或四种或更多种亲本抗体、或五种或更多种亲本抗体、或十种或更多种亲本抗体、或15种或更多种亲本抗体、或20种或更多种亲本抗体、或25种或更多种亲本抗体、或50种或更多种亲本抗体、或100种或更多种亲本抗体中获得。在某些实施方案中,第一亲本抗体选自抗Her1、抗Her2、抗FcεRIα和抗FcγRIIb。在某些实施方案中,第一抗体片段从抗Her2获得并且所述两个或更多个额外抗体片段中的每一者从抗Her1获得,或第一抗体片段从抗Her1获得并且所述两个或更多个额外抗体片段中的每一者从抗Her2获得,或者第一抗体片段从抗FcεRIα获得并且所述两个或更多个额外抗体片段中的每一者从抗FcγRIIb获得,或第一抗体片段从抗FcγRIIb获得并且所述两个或更多个额外抗体片段中的每一者从抗FcεRIα获得。在某些实施方案中,抗Her2选自**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)和2C4(帕妥珠单抗)。在某些实施方案中,抗Her1选自D1-5和C3-101。在某些实施方案中,抗Her2选自曲妥珠单抗和帕妥珠单抗,并且抗Her1选自D1-5和C3-101。在某些实施方案中,抗FcγRIIb是5A6。在某些实施方案中,抗FcεRIα是22E7。在某些实施方案中,抗FcγRIIb是5A6并且抗FcεRIα是22E7。在某些实施方案中,所述巯基反应性交联剂选自双马来酰亚氨基卤、双烷基卤、吡啶基二硫化物、双汞盐、5-巯基-2-硝基苯甲酸介导的交联和双硫代磺酸酯。在一个实施方案中,所述巯基反应性交联剂是双马来酰亚胺。在

某些实施方案中,第一抗体片段和/或两个或更多个额外抗体片段中的每一者从半胱氨酸工程化抗体获得。在某些的此类实施方案中,所述半胱氨酸工程化抗体包含在所述轻链的位置110或在位置205处的置换,其中所述的残基编号根据EU编号系统,并且其中所述置换是半胱氨酸。在某些实施方案中,所述半胱氨酸工程化抗体包含在所述重链的位置118或在位置121处的置换,其中所述的残基编号根据EU编号系统,并且其中所述置换是半胱氨酸。

[0024] 在仍就另一个方面,提供了合成一组抗体类似物的方法,其中具有游离硫氢基的第一抗体片段与巯基反应性交联剂反应以产生抗体片段-交联剂部分,并且其中所述抗体片段-交联剂部分与两个或更多个额外抗体片段的每一者配对反应,所述每个额外抗体片段具有游离硫氢基,以产生所述的抗体类似物组,其中所述抗体片段的每一者从单一亲本抗体获得。在某些实施方案中,所述抗体片段-交联剂部分与三个或更多个额外抗体片段中的每一者、或四个或更多个额外抗体片段中的每一者、或五个或更多个额外抗体片段中的每一者、或十个或更多个额外抗体片段中的每一者、或15个或更多个额外抗体片段中的每一者、或20个或更多个额外抗体片段中的每一者、或25个或更多个额外抗体片段中的每一者、或50个或更多个额外抗体片段中的每一者配对反应,其中所述抗体片段的每一者从单一亲本抗体获得。在某些实施方案中,所述组的一个或多个抗体类似物有在结构上与亲本抗体的抗原结合区不同的抗原结合区。在某些实施方案中,所述亲本抗体选自抗Her1、抗Her2、抗FcεRIα和抗FcγRIIb。在某些实施方案中,抗Her2选自曲妥珠单抗和帕妥珠单抗。在某些实施方案中,抗Her1选自D1-5和C3-101。在某些实施方案中,抗FcγRIIb是5A6。在某些实施方案中,抗FcεRIα是22E7。在某些实施方案中,所述巯基反应性交联剂选自双马来酰亚氨基卤、双烷基卤、吡啶基二硫化物、双汞盐、5-巯基-2-硝基苯甲酸介导的交联和双硫代磺酸酯。在一个实施方案中,所述巯基反应性交联剂是双马来酰亚胺。在某些实施方案中,所述亲本抗体是半胱氨酸工程化抗体。在某些的此类实施方案中,所述半胱氨酸工程化抗体包含在所述轻链的位置110或在位置205处的置换,其中所述的残基编号根据EU编号系统,并且其中所述置换是半胱氨酸。在某些实施方案中,所述半胱氨酸工程化抗体包含在所述重链的位置118或在位置121处的置换,其中所述的残基编号根据EU编号系统,并且其中所述置换是半胱氨酸。

[0025] 在又一个方面,提供了通过下述方法合成的多特异性抗体,所述方法使得从具有第一单特异性和游离硫氢基的第一亲本抗体获得的第一抗体片段与巯基反应性交联剂反应以产生抗体片段-交联剂部分,并且使得所述抗体片段-交联剂部分与从具有第二单特异性和游离硫氢基的第二亲本抗体获得的第二抗体片段反应以产生多特异性抗体,并且其中所述第一单特异性与第二单特异性不同。在某些实施方案中,第一亲本抗体选自抗Her1和抗Her2。在某些实施方案中,第一亲本抗体是抗Her2并且第二亲本抗体是抗Her1,或者第一亲本抗体是抗Her1并且第二亲本抗体是抗Her2。在某些实施方案中,抗Her2选自**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)和2C4(帕妥珠单抗)。在某些实施方案中,第一亲本抗体是抗Her2并且第一抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:1、2、3、6和7的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:4、5和8的重链序列。在某些实施方案中,抗Her1选自D1-5和C3-101。在某些实施方案中,第一亲本抗体是抗Her1并且第一抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:18、19、21和22的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:17和20的重链序列。在某些实施方案中,抗Her2选自曲妥珠单抗和帕妥珠单抗,并且抗Her1选自D1-5和C3-101。在某些实施方案中,从抗Her2获得的抗体片段

包含选自SEQ ID NOs.:1、2、3、6和7的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:4、5和8的重链序列;并且从抗Her1获得的抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:18、19、21和22的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:17和20的重链序列。

[0026] 在上述多特异性抗体的又一个方面,第一亲本抗体选自抗Fc γ RIIb和抗Fc ϵ RI α 。在某些实施方案中,第一亲本抗体是抗Fc γ RIIb并且第二亲本抗体是抗Fc ϵ RI α ,或者第一亲本抗体是抗Fc ϵ RI α 并且第二亲本抗体是抗Fc γ RIIb。在某些实施方案中,抗Fc γ RIIb是5A6。在某些实施方案中,第一亲本抗体是抗Fc γ RIIb并且第一抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:11和12的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:9和10的重链序列。在某些实施方案中,抗Fc ϵ RI α 是22E7。在某些实施方案中,第一亲本抗体是抗Fc ϵ RI α 并且第一抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:15和16的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:13和14的重链序列。在某些实施方案中,从抗Fc γ RIIb获得的抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:11和12的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:9和10的重链序列;并且从抗Fc ϵ RI α 获得的抗体片段包含选自SEQ ID NOs.:15和16的轻链序列和/或选自SEQ ID NOs.:13和14的重链序列。

[0027] 在又一个方面,提供了由如上文所述的方法合成的多特异性抗体,其中所述第一亲本抗体特异性结合T细胞上的靶,并且所述第二亲本抗体特异性结合肿瘤细胞上的靶。在某些实施方案中,第一亲本抗体是抗CD3,并且第二亲本抗体选自抗BLR1、抗BR3、抗CD19、抗CD20、抗CD22、抗CD72、抗CD79A、抗CD79B、抗CD180、抗CR2、抗FCER2、抗FcRH1、抗FcRH2、抗FcRH5、抗FCRL4、抗Her2、抗HLA-DOB和抗NAG14。在一个实施方案中,第一亲本抗体是抗CD3,并且第二亲本抗体是抗CD19。在一个实施方案中,第一亲本抗体是抗CD3,并且第二亲本抗体是抗CD20。在一个实施方案中,第一亲本抗体是抗CD3,并且第二亲本抗体是抗CD22。在一个实施方案中,第一亲本抗体是抗CD3,并且第二亲本抗体是抗FcRH5。在一个实施方案中,第一亲本抗体是抗CD3,并且第二亲本抗体是抗Her2。在某些实施方案中,所述多特异性抗体展示多表位特异性。在某些实施方案中,所述多特异性抗体展示与所述亲本抗体的每一者不可区分的一种或多种生物学活性。在某些实施方案中,所述多特异性抗体展示与所述亲本抗体的至少之一者可区分的一种或多种生物学活性。

[0028] 在另一个方面,提供了通过下述方法合成的抗体类似物,所述方法包括使具有游离硫氢基的第一抗体片段与巯基反应性交联剂反应以产生抗体片段-交联剂部分,并且使所述抗体片段-交联剂部分与具有游离硫氢基的第二抗体片段反应以产生所述抗体类似物,并且其中所述第一抗体片段和所述第二抗体片段从单一亲本抗体获得。在某些实施方案中,所述亲本抗体选自抗Her1、抗Her2、抗Fc ϵ RI α 和抗Fc γ RIIb。在某些实施方案中,抗Her2选自**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)和2C4(帕妥珠单抗)。在某些实施方案中,所述亲本抗体是抗Her2并且第一抗体片段和第二抗体片段包含相同的轻链序列,其中所述轻链序列选自SEQ ID NOs.:1、2、3、6和7,和/或相同的重链序列,其中所述重链序列选自SEQ ID NOs.:4、5和8。在某些实施方案中,抗Her1选自D1-5和C3-101。在某些实施方案中,所述亲本抗体是抗Her1并且第一抗体片段和第二抗体片段包含相同的轻链序列,其中所述轻链序列选自SEQ ID NOs.:18、19、21和22,和/或相同的重链序列,其中所述重链序列选自SEQ ID NOs.:17和20。在某些实施方案中,抗Fc γ RIIb是5A6。在某些实施方案中,所述亲本抗体是抗Fc γ RIIb并且第一抗体片段和第二抗体片段包含相同的轻链序列,其中所述轻链序列选自SEQ ID NOs.:11和12,和/或相同的重链序列,其中所述重链序列选自SEQ ID NO.:9和10。在某

些实施方案中,抗FcεRIα是22E7。在某些实施方案中,所述亲本抗体是抗FcεRIα并且第一抗体片段和第二抗体片段包含相同的轻链序列,其中所述轻链序列选自SEQ ID NOs.:15和16,和/或相同的重链序列,其中所述重链序列选自SEQ ID NO.:13和14。在某些实施方案中,所述亲本抗体是半胱氨酸工程化抗体。在某些实施方案中,所述亲本抗体是天然抗体。在某些实施方案中,所述多特异性抗体展示与所述亲本抗体不可区分的一种或多种生物学活性。在某些实施方案中,所述多特异性抗体展示与所述亲本抗体可区分的一种或多种生物学活性。在某些实施方案中,所述生物学活性是细胞增殖作用。在某些实施方案中,所述抗体类似物是表达Her2的细胞的拮抗剂,并且所述亲本抗体是**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)。在某些的此类实施方案中,所述抗体类似物选自双Fab 1324、双Fab 1328和双Fab 1329。在某些实施方案中,所述抗体类似物的生物学活性是拮抗的,并且所述亲本抗体的生物学活性是激动的。在某些实施方案中,所述抗体类似物的生物学活性是激动的,并且所述亲本抗体的生物学活性是拮抗的。在某些实施方案中,所述抗体类似物是表达Her2的细胞的激动剂,并且所述亲本抗体是**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)。在某些的此类实施方案中,所述抗体类似物选自双Fab 1188、双Fab 1321、双Fab 1322、双Fab 1323和双Fab 1325。

[0029] 在另一个方面,提供了包含一个或多个多特异性抗体的组合物。在某些实施方案中,所述一个或多个多特异性抗体选自双Fab 1187、双Fab 1189、双Fab 1190、双Fab 1191、双Fab 1192、双Fab 1193、双Fab 1299、双Fab 1300、双Fab 1301、双Fab 1302、双Fab 1303、双Fab 1304、双Fab 1305、双Fab 1306和双Fab 1307。

[0030] 在又一个方面,提供了包含一种或多种抗体类似物的组合物。在某些实施方案中,所述一种或多种抗体类似物选自双Fab 1188、双Fab 1204、双Fab 1321、双Fab 1322、双Fab 1323、双Fab 1324、双Fab 1325、双Fab 1326、双Fab 1327、双Fab 1328、双Fab 1329、双Fab 1400和双Fab 1401。

[0031] 在仍然另一个方面,提供治疗癌症的方法,其中将治疗有效量的如上文所述的多特异性抗体施用至需要治疗的受试者。在某些实施方案中,第一抗体片段是抗Her2,并且第二抗体片段是抗Her1。在某些实施方案中,抗Her2选自**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)和2C4(帕妥珠单抗)。在某些实施方案中,抗Her1选自D1-5和C3-101。在某些实施方案中,第一抗体片段是抗CD3,并且第二抗体片段选自抗BLR1、抗BR3、抗CD19、抗CD20、抗CD22、抗CD72、抗CD79A、抗CD79B、抗CD180、抗CR2、抗FCER2、抗FcRH1、抗FcRH2、抗FcRH5、抗FCRL4、抗Her2、抗HLA-DOB和抗NAG14。在一个实施方案中,第一抗体片段是抗CD3,并且第二抗体片段是抗CD19。在一个实施方案中,第一抗体片段是抗CD3,并且第二抗体片段是抗CD20。在一个实施方案中,第一抗体片段是抗CD3,并且第二抗体片段是抗CD22。在一个实施方案中,第一抗体片段是抗CD3,并且第二抗体片段是抗FcRH5。在一个实施方案中,第一抗体片段是抗CD3,并且第二抗体片段是抗Her2。

[0032] 在另一个方面,提供了用于杀死肿瘤细胞或癌细胞或抑制其增殖的方法,所述方法包括用某个量的如上文所述的多特异性抗体或其可药用盐或溶剂化物处理所述细胞,所述量有效杀死肿瘤细胞或癌细胞或抑制其增殖。

[0033] 提供了又一个方面,其包括用于治疗自身免疫病或传染病的方法,所述方法包括施用有效量的如上文所述的多特异性抗体或其可药用盐或溶剂化物至有需求的受试者。

[0034] 附图简述

[0035] 图1显示用于合成如实施例1中所述的双Fab的方法。小图1,通过还原和氧化除去硫代加合物;小图2,第一硫代Fab或较合部-cys-Fab与双马来酰亚氨基交联剂的反应;小图3,通过大小排阻层析(SEC)分离含有交联剂的单体种类,小图插页;小图4,单体性交联种类与第二硫代Fab或较合部-cys-Fab的反应,上半个小图插页显示100kD双Fab产物的质谱结果和分离,下半个小图插页显示通过SEC分离二聚体双Fab;小图5,双Fab终产物的示意图,两个不同的双Fab, α VEGF/ α Her2 (1) 和 α VEGF/ α VEGF (2),在非还原和还原(+DTT)条件下的SDS-PAGE分析结果。

[0036] 图2显示实施例2中所述的某些双Fab的纯度和某些生物学特性。(A) 左侧,某些双Fab的示意图和提供双Fab鉴定编号及每个硫代Fab来源的表格;右侧,该表中列出的双Fab的非还原SDS-PAGE分析结果;(B) 上侧小图,NR-gD-EGFR细胞中TGF α 刺激的EGFR磷酸化被某些双Fab抑制,所述双Fab含有衍生自抗EGFR抗体的Fab;下侧小图,MCF7细胞中调蛋白诱导的Her3磷酸化被某些双Fab抑制,所述双Fab含有衍生自抗Her2抗体的Fab;(C) 比较所示双Fab和Fab分子对MDA-175细胞生长的影响;(D) 比较所示双Fab、Fab和抗体分子对NR6-EGFR细胞生长的影响;(E) 比较帕妥珠单抗和双Fab 1204对MDA-175细胞生长的影响;(F) 比较曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-Fab和双Fab 1188对BT474细胞生长的影响。

[0037] 图3显示如实施例3中所述的曲妥珠单抗衍生的双Fab结构性变体的产生和表征。(A) 显示硫代连接点的四种曲妥珠单抗衍生的Fab的示意图(上半部分)和显示每个双Fab的独特标识及每个硫代Fab的来源的表格(下半部分);(B) 双Fab的非还原SDS-PAGE;(C) 浓度变化的双Fab对BT474细胞生长的影响;(D) 双Fab 1325(向上斜纹棒)与亲本抗体**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)(空心棒)相比随时间推移对BT474细胞生长的影响。向下斜纹棒是未处理的。

[0038] 图4显示如实施例3中所述的所示双Fab的凝胶过滤分析结果。显示了相对保留时间(横轴)(RT)和流体动力学半径(Rh)。

[0039] 图5显示如实施例3中所述分析BT474细胞中Her2双Fab和**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)的信号传导途径的结果。(A) 应答于用**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)、激动剂双Fab 1325、拮抗剂双Fab1329或gD处理的AKT磷酸化的ELISA分析结果;(B) 探测用**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)、激动剂双Fab 1325、拮抗剂双Fab 1329或gD(pHER3、pAKT、pMAPK:磷酸特异性抗体;HER3、AKT、MAPK:非磷酸特异性抗体;微管蛋白:对照)处理的BT474细胞中某些Her信号传导途径酶(HER3、AKT和MAPK)的磷酸化状态的蛋白质印迹分析;(C) 源自胰蛋白酶裂解Her2的磷酸化肽的表格。每种肽中磷酸化的目的残基在肽序列中以粗斜字形的小体大写字母显示。该表格还提供如通过绝对定量法(AQUA)或通过无标记物定量法定量时,在无处理(基础)、用**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)处理、用激动剂双Fab 1325(双Fab)处理或用10nM调蛋白处理后,Her2中磷酸肽位点的总磷酸化作用的质谱分析结果。数据代表了三个独立生物学及技术重复的均数并且包括标准差(SD);(D) 列出合成肽的表格,所述合成肽含有用于AQUA的重原子(AQUA肽);“+13C”:AQUA肽中重碳原子的数目;“+15N”:AQUA肽中重氮原子的数目;“增加的质量”:AQUA肽相对于天然肽质量的总质量增加;“重单同位素MH+”处于单一充电状态下的重肽的总质量;AQUA肽中含有重原子的残基由大体大写的粗斜体加下划线字母显示;AQUA肽中的磷酸化位点由小体大写的粗斜体字母显示;(E) 三个处理组双Fab 1325(BF激动

剂,顶图)、曲妥珠单抗 (Herc, 中图) 和调蛋白 (Hrg, 底图) 的配对比较,每一个处理组与未处理比较。磷酸化位点沿底图的横轴显示;平均磷酸化百分数的差异沿每幅图的纵轴显示。

[0040] 图6A和6B显示增加浓度的所示双Fab对来自表达FcεRIα和FcγRIIb的RBL细胞的组胺释放的影响,这通过如实施例4中所述的ELISA测量。

[0041] 图7显示了如实施例5中所述的改性交联剂BMata的合成(A)和用于合成PEG化双Fab的总体方案(B)。

[0042] 图8显示了如实施例5中所述,经修饰以含有大小变动的PEG或ABP的双Fab C3-101^{V110C}/Herc^{V110C}的SDS-PAGE分析(A)和S-200凝胶过滤分析(B)。

[0043] 图9显示了如实施例5中所述,未修饰(裸的)或经修饰以含有大小变动的PEG或ABP的双Fab C3-101^{V110C}/Herc^{V110C}施用至小鼠(A)或裸大鼠(B)后的药物代谢动力学分析。

[0044] 图10显示了如实施例5中所述,纯化的20K PEG-双Fab 2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}的SDS-PAGE分析(A)和使用Calu3细胞的细胞生长抑制测定法(B)。

[0045] 图11显示如实施例5中所述的20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab(双硫代Fab)在SCID Beige小鼠中的药物代谢动力学实验。(A)血清浓度对时间的图;(B)血清浓度/剂量对时间的图。

[0046] 图12显示如实施例5中所述,20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab和每种亲本抗体2C4和D1-5对Calu3异种移植小鼠模型中肿瘤细胞生长的影响。

[0047] 图13显示如实施例5中所述,20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab和每种亲本抗体2C4和D1-5对Calu3异种移植小鼠模型中肿瘤细胞生长的影响,其中将所述的肿瘤细胞生长分析为肿瘤达到两倍大小(2xVo)所花费的时间。(A)Kaplan-Meier分析;(B)单因素分析。

[0048] 图14显示如实施例5中所述,20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab和每种亲本抗体2C4和D1-5对Calu3异种移植小鼠模型中肿瘤细胞生长的影响,其中将所述的肿瘤细胞生长分析为肿瘤达到1500mm³体积所花费的时间。(A)Kaplan-Meier分析;(B)单因素分析。

[0049] 某些实施方案的详细描述

[0050] 现在将详细地参照本发明的某些实施方案,所述实施方案的实例在随附的结构和式中说明。尽管将结合列举的实施方案描述本发明,应当理解它们不意在将本发明限于这些实施方案。相反,本发明意图涵盖全部替代形式、修改和等同物,它们可以被包括于如权利要求书所定义的本发明范围内部。

[0051] 本领域技术人员会认出与本文所述的那些方法和材料相似或等同的许多方法和材料,它们可以用于本发明的实施。本发明无论如何不限于所述的方法和材料。

[0052] 除非另外限定,本文中所用的技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology第2版,J.Wiley&Sons(New York,N.Y.1994);March,Advanced Organic Chemistry Reactions第4版,John Wiley&Sons(New York,N.Y.1992)和Janeway,C.,Travers,P.,Walport,M.,Shlomchik(2001)Immunobiology,第4版,Garland Publishing,New York为本领域技术人员提供了本申请中所用多个术语的一般指南。

[0053] 一些定义

[0054] 为了解释本说明书的目的,以下定义将适用,并且在适宜的任何时候,以单数使用的术语还将包括复数形式并且反之亦然。在下文所述的任何定义与通过引用方式并入本文

的任何文献抵触的情况下,下文所述的定义应当起主导作用。

[0055] 当本文中使用时,申请人意在独立地包括该商品名称产品配方、通用的药物和该商品名称产品的活性药物成分。

[0056] 术语“抗体”在本文中以最广意义使用并且指包含两条重链和两条轻链的任何免疫球蛋白(Ig)分子及其任何片段、突变体、变体或衍生物,只要它们显示出合乎需要的生物学活性(例如,表位结合活性)。见,例如,Miller等人*Jour.of Immunology* 170:4854-4861 (2003)。抗体的实例包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体、抗体类似物和抗体片段。抗体可以是鼠的、人的、人源化的、嵌合的或源自其他物种。

[0057] 本文中的抗体残基根据Kabat编号系统和EU编号系统编号。当提到可变域中的残基(大约第1-107位轻链残基和第1-113位重链残基)时,通常使用Kabat编号系统(例如,Kabat等人,*Sequences of Immunological Interest*,第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。当提到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,Kabat等人上文中报道的EU索引)。“如Kabat中那样的EU索引”指人IgG1 EU抗体的残基编号法。除非本文中另外说明,谈及抗体的可变域中的残基编号意指借助Kabat编号系统的残基编号。除非本文中另外说明,谈及抗体的恒定域中的残基编号意指借助EU编号系统的残基编号。

[0058] 术语“多特异性抗体”在本文中以最广意义使用并且特别地涵盖具有多表位特异性的抗体。多特异性抗体包括但不限于包含重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)的其中所述 V_HV_L 单元具有多表位特异性的抗体;具有两个或更多个 V_L 和 V_H 结构域的其中每个 V_HV_L 单元与不同表位结合的抗体、具有两个或更多个单一可变域而每个单一可变域与不同表位结合的抗体;全长抗体;和包含一个或多个抗体片段的抗体以及包含已经共价或非共价连接的抗体片段的抗体。根据一个实施方案,所述多特异性抗体是以 $5\mu\text{M}$ 至 0.001pM 、 $3\mu\text{M}$ 至 0.001pM 、 $1\mu\text{M}$ 至 0.001pM 、 $0.5\mu\text{M}$ 至 0.001pM 、或 $0.1\mu\text{M}$ 至 0.001pM 的亲和力与每个表位结合的IgG抗体。

[0059] 术语“多表位特异性”指多特异性抗体与相同靶上或不同靶上的两个或更多个不同表位特异性结合的能力。

[0060] 术语“单特异的”和“单特异性”指抗体仅结合一个表位的能力并且特别地涵盖特异性结合靶分子的分子。

[0061] 术语“抗体类似物”在本文中以最广意义使用并且特别地涵盖以单特异性特异地结合靶分子并且结构上与天然抗体不同的分子。抗体类似物可以包含来自天然抗体的一个或多个抗体片段。抗体类似物包括但不限于包含重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)的其中所述 V_HV_L 单元为单特异性的抗体类似物;具有两个或更多个 V_L 和 V_H 结构域的其中每个 V_HV_L 单元对相同表位为单特异性的抗体类似物、具有两个或更多个单一可变域而每个单一可变域与相同表位结合的抗体类似物、包含一个或多个抗体片段的抗体类似物、包含已经共价或非共价连接的抗体片段的抗体类似物、和其中 V_HV_L 单元、单一可变域和/或抗体片段在构型上与天然抗体不同的抗体类似物。

[0062] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,一般是完整抗体的抗原结合区或可变域。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、Fv、双体抗体(diabodies, Db);串联双体抗体(taDb)、线性抗体(见美国专利号5,641,870,实施例2;Zapata等人,*Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995));单臂抗体、单一可变域抗体、微型抗体(minibodies) (Olafsen等人

(2004) Protein Eng. Design&Sel. 17 (4) :315-323)、单一链抗体分子、由Fab表达文库产生的片段、抗独特型(抗Id)抗体、CDR(互补决定区)和表位结合片段。

[0063] 术语“Fab”指由一条完整L链(V_L 和 C_L)连同一条H链的可变区结构域(V_H)和一条重链的第一恒定域(C_H1)组成的抗体片段。完整抗体的木瓜蛋白酶消化法可以用来产生两个Fab片段,其中每一者含有单一抗原结合位点。一般,由木瓜蛋白酶消化法产生的Fab的L链和H链片段由一个链间二硫键连接。

[0064] 术语“Fc”指包含由二硫键维持在一起的两条H链的羧基端部分(C_H2 和 C_H3)和一部分铰链区的抗体片段。抗体的效应子功能由Fc区中的序列决定;该区域还是由某些类型细胞上存在的Fc受体(FcR)识别的部分。一个Fc片段可以通过木瓜蛋白酶消化完整抗体而获得。

[0065] 术语“ $F(ab')_2$ ”指通过胃蛋白酶消化完整抗体所产生的抗体片段。 $F(ab')_2$ 片段含有由二硫键维持在一起的两个Fab片段和部分铰链区。 $F(ab')_2$ 片段具有二价抗原结合活性并且能够交联抗原。

[0066] 术语Fab'指作为还原 $F(ab')_2$ 片段的产物的抗体片段。Fab'片段因在 C_H1 结构域的羧基端处具有额外几个残基(包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸)而与Fab片段不同。Fab'-SH在本文中是其中恒定域的半胱氨酸残基携带游离巯基的Fab'的名称。

[0067] 术语“铰链区”指从人IgG1的Glu216延伸至Pro230的抗体部分(Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985))。其他IgG同种型的铰链区可以通过在相同位置放置形成重链间S-S键的第一和最末半胱氨酸残基与IgG1序列比对。

[0068] 术语“Fv”指由处于紧密、非共价缔合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成的抗体片段。贡献用于抗原结合的氨基酸残基并向该抗体赋予抗原结合特异性的6个高变环(分别来自H和L链的3个环)源自这两个结构域的折叠。然而,甚至单一可变域(或包含对一个抗原特异的仅3个CDR的半个Fv)具有识别并结合抗原的能力,虽然经常以小于完整结合部位的亲和力进行。

[0069] 术语“单一链Fv”,也缩写为“sFv”或“scFv”,指抗体片段,其包含连接为单条多肽链的 V_H 和 V_L 抗体结构域。一般,scFv多肽还包含在 V_H 结构域和 V_L 结构域之间的多肽接头,所述多肽接头能够使scFv形成合乎需要的结构用于抗原结合。关于scFv的综述,见Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenberg和Moore编著, Springer-Verlag, New York, 第269-315页(1994); Malmberg等人, J. Immunol. Methods 183:7-13, 1995。

[0070] 术语“双体抗体”指通过以下方式制备的小抗体片段:构建在 V_H 结构域和 V_L 结构域之间具有短接头(一般约5-10个残基)的scFv片段,从而实现V结构域的链间而非链内配对,产生双价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双体抗体是两个“交叉”sFv片段的异源二聚体,其中这两个抗体的 V_H 结构域和 V_L 结构域存在于不同的多肽链上。示例性双体抗体是在例如EP 404,097; WO 93/11161; 和Hollinger等人, Proc Natl Acad Sci USA 90: 6444-6448 (1993) 中描述。

[0071] 术语“单臂抗体”指这样的抗体,其包含(1)由肽键将可变域接合至多肽,所述多肽包含CH2结构域、CH3结构域或CH2-CH3结构域,和(2)缺少可变域的第二CH2、CH3或CH2-CH3结构域。单臂抗体可以包含3种多肽(1)包含可变域(例如, V_H)、CH1、CH2和CH3的第一多肽,

(2) 包含可变域(例如,VL)和CL结构域的第二多肽,和(3)包含CH2和CH3结构域的第三多肽。单臂抗体可以具有含有两个半胱氨酸残基的部分铰链区,其中所述半胱氨酸残基形成连接恒定重链的二硫键。一般地,单臂抗体的可变域形成抗原结合区。在某些情况下,单臂抗体的可变域是单一可变域,其中每个单一可变域是抗原结合区。

[0072] 术语“单一结构域抗体”(sdAbs)或“单一可变域(SVD)抗体”指其中单一可变域(VH或VL)赋予抗原结合作用的抗体。换言之,单一可变域不需要与另一个可变域相互作用来识别并且结合靶抗原。单一结构域抗体的实例包括源自骆驼科动物的(羊驼和骆驼)和软骨鱼(例如,护士鲨)的那些单一结构域抗体和源自重组方法来自人和小鼠抗体的那些单一结构域抗体(Nature (1989) 341:544-546;Dev Comp Immunol (2006) 30:43-56;Trend Biochem Sci (2001) 26:230-235;Trends Biotechnol (2003):21:484-490;WO 2005/035572;WO 03/035694;Febs Lett (1994) 339:285-290;WO00/29004;WO 02/051870)。

[0073] 术语“线性抗体”指在Zapata等人,Protein Eng.8 (10):1057-1062 (1995)中描述的抗体。简而言之,这些抗体包含一对串联Fd区段(V_H - C_H1 - V_H - C_H1),它们与互补性轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异的或单特异的。

[0074] 术语“单克隆抗体”指从基本上同质的抗体群体中获得的抗体,即,构成该群体的各个抗体是基本上相同的,除了可能以微小量出现的可能天然存在的突变之外。单克隆抗体是高度特异的,即针对单一抗原位点。另外,与包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体是有利的,在于它们可以不混杂有其他抗体地合成。修饰语“单克隆的”表明该抗体的特征为从基本上同质的抗体群体获得,并且不得解释为要求通过任何具体方法产生该抗体。例如,根据本发明待使用的单克隆抗体可以通过由Kohler等人(1975)Nature 256:495首次描述的杂交瘤方法产生,或可以通过重组DNA方法产生(见例如:US 4816567;US 5807715)。单克隆抗体也可以使用例如在Clackson等人(1991)Nature,352:624-628;Marks等人(1991)J.Mol.Biol.,222:581-597中描述的技术从噬菌体抗体文库分离。

[0075] “完整抗体”指包含VL和VH结构域以及轻链恒定域(CL)和重链恒定域CH1、CH2和CH3的抗体。恒定域可以是天然序列恒定域(例如,人天然序列恒定域)或其氨基酸序列变体。完整抗体可以具有一种或多种“效应子功能”,所述效应子功能指归因于抗体Fc恒定区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物学活性。抗体效应子功能的实例包括C1q结合;依赖补体的细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC);胞吞;和细胞表面受体如B细胞受体的下调。

[0076] 根据抗体重链恒定域的氨基酸序列,完整抗体可以划分成不同的“类别”。存在五个主要类别的完整免疫球蛋白抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类型中的几种可以进一步划分成“亚类”(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。与不同抗体类别相对应的重链恒定域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。Ig形式包括铰合部修饰形式或无铰合部形式(Roux等人(1998)J.Immunol.161:4083-4090;Lund等人(2000)Eur.J.Biochem.267:7246-7256;US 2005/0048572;US 2004/0229310)。

[0077] “ErbB受体”是一种属于ErbB受体家族的受体蛋白酪氨酸激酶,所述ErbB受体家族的成员是细胞生长、分化和存活的重要介质。ErbB受体家族包括4个不同成员,包括表皮生

长因子受体 (EGFR、ErbB1、HER1)、HER2 (ErbB2或p185neu)、HER3 (ErbB3) 和HER4 (ErbB4或tyro2)。一组抗ErbB2抗体已经使用人乳腺肿瘤细胞系SKBR3予以表征 (Hudziak等人 (1989) Mol. Cell. Biol. 9 (3):1165-1172。用称作4D5的抗体获得最大抑制作用,所述抗体抑制细胞增殖达56%。该组中的其他抗体在这个测定法中较小程度地降低细胞增殖。进一步发现抗体4D5使过量表达ErbB2的乳腺肿瘤细胞系对TNF- α 的细胞毒效应敏感 (美国专利号5,677,171)。在Hudziak等人中讨论的抗ErbB2抗体进一步在Fendly等人 (1990) Cancer Research 50:1550-1558;Kotts等人 (1990) In Vitro 26 (3):59A;Sarup等人 (1991) Growth Regulation 1:72-82;Shepard等人J. (1991) Clin. Immunol. 11 (3):117-127;Kumar等人 (1991) Mol. Cell. Biol. 11 (2):979-986;Lewis等人 (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263;Pietras等人 (1994) Oncogene 9:1829-1838;Vitetta等人 (1994) Cancer Research 54:5301-5309;Sliwkowski等人 (1994) J. Biol. Chem. 269 (20):14661-14665;Scott等人 (1991) J. Biol. Chem. 266:14300-5;D'souza等人 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:7202-7206;Lewis等人 (1996) Cancer Research 56:1457-1465;和Schaefer等人 (1997) Oncogene 15:1385-1394中表征。

[0078] ErbB受体通常将包含一个细胞外结构域,其可以结合ErbB配体;一个亲脂性跨膜结构域;一个保守的胞内酪氨酸激酶结构域;和羧基端信号传导结构域,其携带几个可以磷酸化的酪氨酸残基。ErbB受体可以是“天然序列”ErbB受体或其“氨基酸序列变体”。ErbB受体家族的几个成员是已知的并且包括EGFR (ErbB1、HER1)、ErbB2 (HER2)、ErbB3 (HER3) 和ErbB4 (HER4)。

[0079] 术语“ErbB1”、“表皮生长因子受体”、“EGFR”和“HER1”在本文中可互换地使用并且指如在例如Carpenter等人 (1987) Ann. Rev. Biochem., 56:881-914中公开的EGFR,包括其天然存在的突变体形式 (例如,如Humphrey等人 (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 87:4207-4211中所述的缺失突变体EGFR)。术语erbB1指编码EGFR蛋白质产物的基因。针对HER1的抗体例如在Murthy等人 (1987) Arch. Biochem. Biophys., 252:549-560中和例如在W0 95/25167中描述。

[0080] 术语“ERRP”、“EGF受体相关蛋白”、“EGFR相关蛋白”和“表皮生长因子受体相关蛋白”在本文中可互换地使用并且指如在例如美国专利号6,399,743和美国公开号2003/0096373中公开的ERRP。

[0081] 术语“ErbB2”和“HER2”在本文中可互换地使用并且指例如在Semba等人 (1985) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 82:6497-6501和Yamamoto等人 (1986) Nature, 319:230-234 (Genebank登录号X03363) 中描述的人HER2蛋白。术语“erbB2”指编码人ErbB2的基因,并且“neu”指编码大鼠p185neu的基因。

[0082] 术语“ErbB3”和“HER3”在本文中可互换地使用并且指例如在美国专利号5,183,884和5,480,968中以及在Kraus等人 (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 86:9193-9197中公开的受体多肽。针对ErbB3的抗体是本领域已知的并且例如在美国专利号5,183,884,5480968中和W0 97/35885中描述。

[0083] 术语“ErbB4”和“HER4”在本文中可互换地使用并且指例如在EP专利申请号599,274;Plowman等人 (1993) Proc Natl Acad Sci USA90:1746-1750;和Plowman等人 (1993) Nature 366:473-475中公开的受体多肽,包括例如W0 99/19488中公开的其同工型。针对

HER4的抗体例如在WO 02/18444中描述。

[0084] 针对ErbB受体的抗体是从多个来源可商业获得的,包括例如Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA。

[0085] 术语“氨基酸序列变体”指具有某种程度上与天然序列多肽不同的氨基酸序列的多肽。通常,氨基酸序列变体将与天然ErbB配体的至少一个受体结合结构域或与天然ErbB受体的至少一个配体结合结构域拥有至少约70%序列同一性,或它们将在序列上与此类受体或配体结合结构域至少约80%或至少约90%同源。氨基酸序列变体在天然氨基酸序列的氨基酸序列内部的某些位置处拥有置换、缺失和/或插入。氨基酸由常规名称、单字母代码和三字母代码命名。

[0086] “序列同一性”定义为氨基酸序列变体中在比对序列并且根据需要导入空位以实现最大序列同一性百分数后相同的残基的百分数。用于比对的方法和计算机程序是本领域熟知的。一种这样的计算机程序是Genentech, Inc.编写的“Align 2”,该程序连同用户文档在1991年12月10日提交至美国版权局(United States Copyright Office), Washington, DC 20559。

[0087] “抗体依赖的细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒细胞(例如,天然杀伤(NK)细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体并且随后造成靶细胞的裂解。用于介导ADCC的主要细胞即NK细胞,仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达在Ravetch和Kinet, (1991) “Annu. Rev. Immunol.” 9:457-92第464页的表3中总结。为了评估目的分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定法,如美国专利号5,500,362和5,821,337中描述的测定法。用于此类测定法的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地或额外地,目的分子的ADCC活性可以在体内评估,例如,在动物模型中,如在Clynes等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) 公开中的那种动物模型中。

[0088] “人效应细胞”是表达一种或多种恒定区受体(FcR)并执行效应子功能的白细胞。一般地,效应细胞至少表达Fc γ RIII并且执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人白细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒T细胞和中性粒细胞。效应细胞可以从其天然来源分离,例如,从血液或PBMC分离。

[0089] 术语“Fc受体”或“FcR”用来描述与抗体的Fc恒定区结合的受体。一般,FcR是结合IgG抗体的一种受体(γ 受体)并且包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类受体,包括这些受体的等位变体和可变剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“激活性受体”)和Fc γ RIIB(“抑制性受体”),它们具有主要在其胞质域内不同的相似氨基酸序列。激活性受体Fc γ RIIA在其胞质域中含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。抑制性受体Fc γ RIIB在其胞质域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。(综述,见M. in **Daëron**, “Annu. Rev. Immunol.” 15:203-234 (1997))。FcR综述于Ravetch和Kinet, “Annu. Rev. Immunol.”, 9:457-92 (1991); Capel等人(1994) Immunomethods 4:25-34; 和de Haas等人(1995) J. Lab. Clin. Med. 126:330-41中。其他FcR由本文中的术语“FcR”包括。该术语还包括新生儿受体FcRn,其负责转移母体IgG至胎儿(Guyer等人(1976) J. Immunol., 117:587和Kim等人(1994) J. Immunol. 24:249)。

[0090] “依赖补体的细胞毒性”或“CDC”指分子在补体存在下裂解靶细胞的能力。补体激

活途径始于补体系统的第一组分 (C1q) 与复合于相应抗原的分子 (例如, 抗体) 的结合。为评估补体激活, 可以进行CDC测定法, 例如, 如Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996) 中所述。

[0091] 术语“天然抗体”指天然存在的基本4链抗体单元, 其是由两条相同轻链 (L) 和两个相同重链 (H) 组成的异源四聚体的糖蛋白 (IgM抗体由5个基本异源四聚体单元连同称作J链的额外多肽组成, 并且因此含有10个抗原结合位点, 而分泌型IgA抗体可以聚合以形成包含2-5个基本4链单元连同J链的多价装配物)。在IgG的情况下, 该4-链单元通常是约150,000道尔顿。每条L链由一个共价二硫键连接至H链, 而根据H链同种型, 两条H链由一个或多个二硫键彼此连接。每条H和L链还具有规则间隔的链内二硫键。在N端, 每条H链具有一个可变域 (V_H), 后接对每条 α 链和 γ 链而言的3个恒定域 (C_H), 以及对 μ 和 ϵ 同种型而言的4个 C_H 结构域。在N端, 每条L链具有一个可变域 (V_L), 后接在其另一端的恒定域 (C_L)。 V_L 与 V_H 对齐, 并且 C_L 与重链的第一恒定域 (CH_1) 对齐。认为特定的氨基酸残基形成轻链可变域和重链可变域之间的界面。 V_H 和 V_L 的配对共同形成单一抗原结合位点。对于不同抗体类别的结构和特征, 见, 例如, *Basic and Clinical Immunology*, 第8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr和Tristram G. Parslow (编著), Appleton&Lange, Norwalk, CT, 1994, 第71页和第6章。任何脊椎动物物种的L链可以基于其恒定域的氨基酸序列划分成的两个明显不同类型 (称作 κ 和 λ) 之一。

[0092] 术语“可变的”指这样的事实: 可变域的某些部分在序列方面于抗体之间明显不同并且用于每个特定抗体对其特定抗原的结合作用和特异性中。然而, 变异性并不在抗体的可变域范围内均匀分布。它集中于轻链可变域和重链可变域的三个区段 (称作高变区) 中。可变域的较高度保守的部分称作构架区 (FR)。天然重链和轻链的可变域各自包含由3个高变区连接的大体上采取 β 折叠构型的4个FR, 所述高变区形成环, 所述环连接该 β 折叠结构和在一些情况下形成该 β 折叠结构的部分。每条链中的高变区由FR密切接近地维持在一起, 并且在高变区来自其他链的情况下, 对形成抗体的抗原结合部位作出贡献 (见Kabat等人 (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)。恒定域不直接参与抗体与抗原结合, 但是展示多种效应子功能, 如使抗体参与依赖抗体的细胞毒性 (ADCC)。

[0093] 术语“高变区”、“HVR”或“HV”指抗体可变域中在序列方面高度变化和/或形成结构上限定的环的区域。通常, 抗体包含六个HVR; V_H 中的三个 (H_1 , H_2 , H_3) 和 V_L 中的三个 (L_1 , L_2 , L_3)。在天然抗体中, H_3 和 L_3 显示这六个HVR的大部分多样性, 并且尤其认为 H_3 在赋予精细特异性至抗体方面发挥独特作用。见, 例如, Xu等人, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson和Wu, 在*Methods in Molecular Biology* 248:1-25中 (Lo编著, Human Press, Totowa, NJ, 2003)。实际上, 仅由重链组成的天然存在的骆驼科动物的抗体在轻链不存在的情况下是有功能和稳定的。见, 例如, Hamers-Casterman等人, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff等人, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)。

[0094] 本文中使用的和包括了众多的HVR描述。Kabat互补决定区 (CDR) 基于序列变异性并且是最常使用的 (Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。相反, Chothia指结构环的位置 (Chothia和Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM HVR代表了Kabat HVR和Chothia结构环之间的折中方案, 并且被Oxford Molecular's AbM抗体

建模软件使用。“接触”HVR基于可获得的复合物晶体结构的分析结果。下文指出来自这些HVR的每一者中的残基。

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
[0095]	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32
		(Kabat 编号)		H30-H35B
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Chothia 编号)		H30-H35
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101
				H93-H101

[0096] HVR可以包含如下“延长的HVR”：VL中的24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2) 和89-97或89-96 (L3) 和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者，可变域残基根据上文Kabat等人编号。

[0097] “构架区” (FR) 是除CDR残基之外的那些可变域残基。每个可变域一般具有标识为FR1、FR2、FR3和FR4的四个FR。如果CDR根据Kabat来定义，则轻链FR残基约位于残基1-23 (LCFR1)、35-49 (LCFR2)、57-88 (LCFR3) 和98-107 (LCFR4) 处，并且重链FR残基约位于重链残基中的残基1-30 (HCFR1)、36-49 (HCFR2)、66-94 (HCFR3) 和103-113 (HCFR4) 处。如果CDR包含来自高变环的氨基酸残基，则轻链FR残基约位于轻链中的残基1-25 (LCFR1)、33-49 (LCFR2)、53-90 (LCFR3)、和97-107 (LCFR4) 处，并且重链FR残基约位于重链残基中的残基1-25 (HCFR1)、33-52 (HCFR2)、56-95 (HCFR3) 和102-113 (HCFR4) 处。在一些情况下，当CDR包含来自如Kabat所定义的CDR和高变环的那些CDR中的氨基酸时，将相应调整FR残基。例如，当CDRH1包括氨基酸H26-H35时，重链FR1残基处于位置1-25，并且FR2残基处于位置36-49。

[0098] “人共有构架”是这样的构架，其代表在人免疫球蛋白VL或VH构架序列的选择中最常出现的氨基酸残基。通常，人免疫球蛋白VL或VH构架序列的选择来自可变域序列的亚组。通常，所述的序列亚组是如Kabat中那样的亚组。在某些情况下，对于VL，该亚组是如Kabat中那样的亚组kI。在某些情况下，对于VH，该亚组是如Kabat中那样的亚组III。

[0099] “嵌合抗体”指这样的抗体，在所述抗体中重链和/或轻链的部分与源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，同时所述链的其余部分与源自另一个物种或属于另一个抗体类别或亚类的抗体以及这种抗体的片段中的相应序列相同或同源，条件是它们展示想要的生物学活性(美国专利号4,816,567；和Morrison等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855 (1984))。嵌合抗体包括灵长源化抗体，所述灵长源化抗体包含源自非人灵长类(例如，旧世界猴、猿等)的可变域抗原结合序列和人恒定区序列。

[0100] 非人(例如，啮齿类)抗体的“人源化”形式是含有衍生自非人抗体中最少序列的嵌

合抗体。对于大部分情况来说,人源化抗体是人免疫球蛋白(接受方抗体)其中来自所述接受方抗体的高变区中的残基由来自非人物种(提供方抗体)如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的具有所需抗体特异性、亲和力和能力的高变区中的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的构架区(FR)残基由相应的非人残基替换。另外,人源化抗体可以包含在接受方抗体中或在提供方抗体中不存在的残基。作出这些修饰以进一步改进抗体性能。通常,人源化抗体将包含至少1个、并且一般2个可变域的基本上全部,其中全部或基本上全部的高变环与非人免疫球蛋白的那些高变环对应并且全部或基本上全部的FR是人免疫球蛋白序列的那些FR。人源化抗体任选地也将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,一般是人免疫球蛋白恒定区的部分。对于进一步细节,见Jones等人,Nature 321:522-525(1986); Reichmann等人,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。

[0101] 如本文中所用的“复合物”或“复合的”指借助键和/或不是肽键的力(例如,范德华力、疏水力、亲水力)彼此相互作用的两个或更多个分子的缔合。在某些情况下,复合物是异源多聚体的。应当理解,如本文所用的术语“蛋白质复合物”或“多肽复合物”包括具有与蛋白质复合物中的蛋白质缀合的非蛋白质实体的复合物(例如,包括但不限于化学分子如毒素、交联剂或检测剂)。

[0102] 如本文所用的术语“异源多聚体”或“异源多聚体的”描述了通过非肽的共价键(例如,二硫键)和/或非共价相互作用(例如,氢键、离子键、范德华力和疏水相互作用)彼此相互作用的两个或更多个多肽,其中至少两个肽具有彼此不同的氨基酸序列。

[0103] “结合”分子靶或目的抗原的抗体是能够以充足亲和力结合该抗原的一种抗体,从而所述抗体用于靶向某蛋白质或表达该抗原的细胞或组织,并且不与其他蛋白质明显交叉反应。此类抗体例如用作诊断剂和/或治疗剂和/或研究工具是有用的。一般地,抗体与“非靶”蛋白结合的程度将小于该抗体与其特定靶蛋白的结合作用的约10%,如常见测量方法(例如,荧光激活细胞分选(FACS)分析或放射免疫沉淀(RIA)或ELISA)所测定。

[0104] 术语“特异性结合”或“特异性结合于”或者是“对……特异的”指抗体与靶分子(例如,特定多肽)或特定多肽靶上的表位结合,并且意指可度量地与非特异性相互作用不同的结合(例如,非特异性相互作用可以是与牛血清白蛋白或酪蛋白的结合)。可以例如通过与对照分子的结合作用相比确定靶分子的结合作用,测量特异性结合。例如,可以通过与类似于靶的对照分子(例如过量的未标记靶)竞争来测定特异性结合。在这种情况下,如果标记的靶与探针的结合受过量未标记的靶竞争性抑制,则证实特异性结合。如本文所用的术语“特异性结合”或“特异性结合于”或者是“特异于”特定多肽或特定多肽靶上的表位,可以例如通过对靶具有至少约200nM、备选地至少约150nM、备选地至少约100nM、备选地至少约60nM、备选地至少约50nM、备选地至少约40nM、备选地至少约30nM、备选地至少约20nM、备选地至少约10nM、备选地至少约8nM、备选地至少约6nM、备选地至少约4nM、备选地至少约2nM、备选地至少约1nM或更大Kd的分子显示。在某些情况下,术语“特异性结合”指这样的结合,其中某分子与特定多肽或特定多肽上的表位结合而基本上不与任何其他多肽或多肽表位结合。靶分子的实例包括但不限于血清可溶性蛋白和它们的受体,如细胞因子和细胞因子受体、黏附素、生长因子和它们的受体、激素、病毒颗粒(例如,RSV F蛋白、CMV、StaphA、流感病毒、丙型肝炎病毒)、微生物(例如,细菌细胞蛋白、真菌细胞)、黏附素、CD蛋白和它们的受

体。

[0105] “结合亲和力”指分子(例如,抗体)的单一结合位点与其结合配偶物(例如,抗原)之间非共价相互作用的总和的强度。除非另外指出,否则如本文所用,“结合亲和力”指反映结合对子的成员(例如,抗体和抗原)之间1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶物Y的亲和力可以通常由解离常数(K_d)代表。例如,K_d可以是约200nM、150nM、100nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、8nM、6nM、4nM、2nM、1nM或更强。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量,包括本文所述的那些方法。低亲和力抗体通常缓慢结合抗原并且倾向于轻易解离,而高亲和力抗体通常较快地结合抗原并且倾向于更长地保持结合。测量结合亲和力的多种方法是本领域已知的。

[0106] 如本文所用,“K_d”或“K_d值”指通过使用表面等离子体共振测定法,例如使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)在25℃采用固定抗原CM5芯片以约10个响应单位(RU)所测量的解离常数。简而言之,这种方法使用以盐酸N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)根据供应商说明书活化的羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore Inc.)。抗原用10mM乙酸钠, pH 4.8稀释至5μg/ml (~0.2μM),随后以5μl/分钟的流速上样以实现偶联蛋白的大约10个响应单位(RU)。在抗原注射后,注入1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量,将Fab的两倍连续稀释物(例如,0.78nM至500nM)在25℃以大约25μl/分钟的流速注射于具有0.05%吐温20(PBST)的PBS中。使用简单的一对一朗姆尔结合模型(BIAcore评价软件3.2版)通过同时拟合缔合和解离传感图(sensorgram),计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。将平衡解离常数(K_d)计算为比率k_{off}/k_{on}。见,例如,Chen等人,J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)。如果通过以上表面等离子体共振测定法显示缔合速率超过10⁶M⁻¹S⁻¹,则缔合速率可以使用荧光猝灭技术测定,其中所述的荧光猝灭技术在如光谱仪(如配备止流法(stop-flow)的分光光度计(Aviv Instruments)或具有搅拌型比色皿的8000-系列SLM-Aminco分光光度计(ThermoSpectronic))中所测量的那样,在增加浓度的抗原存在下,在25℃测量在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。

[0107] “游离半胱氨酸氨基酸”指多肽例如抗体或抗体片段中具有巯基官能团(-SH)并且不配对为分子内或分子间二硫键的半胱氨酸氨基酸残基。在某些情况下,已经将游离半胱氨酸氨基酸残基工程化至亲本抗体中,如在例如美国专利公开号2007/0092940和Junutula, J.R.等人, J Immunol Methods 332(1-2):41-52(2008)中所述。

[0108] 术语“巯基反应性值”是游离半胱氨酸氨基酸的反应性的定量性表征。巯基反应性值是半胱氨酸工程化抗体中与巯基反应试剂反应并且换算成最大值1的游离半胱氨酸氨基酸的百分数。例如,半胱氨酸工程化抗体上以100%产率与巯基反应试剂如生物素-马来酰亚胺试剂反应以形成生物素标记抗体的游离半胱氨酸氨基酸具有巯基反应性值1.0。例如,另一个工程化至相同或不同亲本抗体中的以80%产率与巯基反应试剂反应的半胱氨酸氨基酸具有0.8的巯基反应性值。另一个工程化至相同或不同亲本抗体中的完全不与巯基反应试剂反应的半胱氨酸氨基酸具有0的巯基反应性值。确定特定半胱氨酸的巯基反应性值可以由ELISA测定法、质谱法、液相色谱法、放射自显影法或其他定量分析试验实施。

[0109] “亲本抗体”是作为一个或多个抗体片段的来源的抗体。亲本抗体可以包含天然或

野生型序列。亲本抗体可以包含其中一个或多个氨基酸残基由一个或多个半胱氨酸残基替换的氨基酸序列。相对于抗体的其他天然、野生型或修饰形式,亲本抗体可以具有预先存在的氨基酸序列修饰(如添加、缺失和/或置换)。亲本抗体可以针对目的靶抗原,例如生物学重要的多肽。亲本抗体可以针对非多肽抗原(如肿瘤相关糖脂抗原;见,例如,美国专利号5,091,178。示例性亲本抗体包括但不限于,对细胞表面受体及跨膜受体和肿瘤相关抗原(TAA)具有亲和力和选择性的抗体。

[0110] “分离的”抗体或多肽是已经鉴定过并且从其自然环境的组分中分离和/或回收的一种抗体或多肽。其自然环境的杂质组分是一般将干扰例如诊断性或治疗性用途并且可以包括酶、激素和其他蛋白质性或非蛋白质性溶质。一般地,将所述抗体或多肽(1)纯化至以蛋白质重量计大于95%,如Lowry法所测定,或以重量计大于99%,(2)纯化至通过转杯测序仪(spinning cup sequenator)获得至少15个N端残基或内部氨基酸序列的程度,或(3)纯化至通过还原或非还原条件下使用考马斯蓝染或银染法的SDS-PAGE所确定的均一性。分离的抗体或多肽包括重组细胞内部在原位的抗体或多肽,因为该抗体或多肽的自然环境的至少一种组分将不存在。然而,一般将通过至少一个纯化步骤制备分离的抗体或多肽。

[0111] 短语“基本上均一的”、“基本上均一形式”和“基本均一性”是用来表示,该产物基本上没有源自不希望的多肽组合中的副产物(例如同型多聚体)。以纯度表述时,基本上均一性意指副产物的量不超过以重量计10%、9%、8%、7%、6%、4%、3%、2%或1%或是小于以重量计1%。一般地,副产物低于5%。

[0112] 如本文所用的“Lys-C内肽酶切割位点”是在氨基酸序列中可以由Lys-C内肽酶在C端侧切割的赖氨酸残基。Lys-C内肽酶在赖氨酸残基的C端侧切割。

[0113] 除非另外指出,否则术语“单克隆抗体4D5”指具有鼠4D5抗体(ATCC CRL 10463)或衍生自其中的抗原结合残基的抗体。例如,单克隆抗体4D5可以是鼠单克隆抗体4D5或其变体,如人源化4D5。示例性人源化4D5抗体包括如美国专利号5,821,337中的huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7和huMAb4D5-8(曲妥珠单抗,**HERCEPTIN®**)。

[0114] 术语“治疗”或“疗法”指治疗性治疗和预防性或防止性措置,其中目的是防止或减缓(减轻)不想要的生理学变化或病症。有益或合乎需要的临床结果包括但不限于症状减轻、发病程度减弱、疾病的稳定(即,未加重)状态、延迟或减缓病情进展、疾病状态的改善或缓和和消退(无论是部分或全部消退),无论是可检测的或不可检测的。“治疗”也可以意指与如果未接受治疗的预期存活相比,延长存活(例如,如在癌症治疗中)。需要治疗的那些患者包括已经患有该病状或病症的那些患者以及易于患有该病状或病症的那些患者或其中待预防病状或病症的那些患者。

[0115] “治疗有效量”指抗体、抗体片段或衍生物例如多特异性抗体或抗体类似物治疗受试者中疾病或病症的量。在肿瘤(例如,癌性肿瘤)的情况下,抗体或抗体片段(例如,多特异性抗体或抗体类似物)的治疗有效量可以减少癌细胞的数目;缩减原发肿瘤大小;抑制(即,某种程度减缓并且优选地终止)癌细胞浸润至外周器官中;抑制(即,某种程度减缓并且优选地终止)肿瘤转移;某种程度抑制肿瘤生长和/或某种程度减轻一种或多种与该病症相关的症状。某种程度上,抗体或抗体片段(例如,多特异性抗体或抗体类似物)可以防止生长和/或杀死现存的癌细胞,它可以是抑制细胞的和/或细胞毒的。对于癌症疗法,体内功效可

以例如通过评估存活持续期、至疾病进展时间 (TTP)、应答率 (RR)、应答的持续期和/或生活质量来度量。

[0116] “缩减或抑制”意指引起总体减少20%或更多、或50%或更多、或75%、85%、90%、95%或更多的能力。缩减或抑制可以指正在治疗的疾病的症状、转移的存在或大小、原发肿瘤的大小或生血管性疾病中血管的大小或数目。

[0117] 术语“生物利用率”指施用至患者的药物的给定量的全身性利用率(即,血液/血浆水平)。生物利用率是一个绝对术语,其表示从所施用剂型到达总循环的药物时间(速率)和总量(程度)的度量。

[0118] 术语“癌症”和“癌性的”指或描述哺乳动物中一般以失调的细胞生长/增殖为特征的生理病状。“肿瘤”包含一个或多个癌细胞。癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、胚胎瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶变(lymphoid malignancy)。此类癌的更多具体实例包括鳞状细胞癌(例如,上皮鳞状细胞癌)、肺癌,包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌(“NSCLC”)、肺腺癌和肺鳞状癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌或胃部癌症,包括胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝细胞瘤(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾脏或肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝脏癌(hepatic carcinoma)、肛门癌、阴茎癌以及头颈癌。

[0119] “表达ErbB的癌症”是一种癌症,其包含使得ErbB蛋白质在其细胞表面存在的细胞。“表达ErbB2的癌症”是一种癌症,所述癌症在其细胞的表面产生充足水平的ErbB2,从而抗ErbB2抗体可以与之结合并且针对该癌症具有治疗效果。

[0120] “过量表达”抗原性受体的癌症是与相同组织类型的非癌性细胞相比,在其细胞表面处具有显著更高水平的所述受体如ErbB2的癌症。此类过量表达可以由基因扩增或由增加的转录或翻译引起。可以在诊断性或预测性测定法(例如,通过免疫组织化学测定法;IHC)中通过评价细胞表面上存在的受体蛋白水平增加,确定受体过量表达。备选地或额外地,可以测量细胞中编码受体的核酸水平,例如,通过荧光原位杂交(FISH;见WO 96/23874)、DNA印迹法或聚合酶链反应(PCR)技术如实时定量PCR(RT-PCR)测量。

[0121] 过量表达ErbB2(HER2)的肿瘤由与每个细胞表达的HER2分子的拷贝数相对应的免疫组织化学评分定级,并且可以以生物化学方式测定:0=0-10,000个拷贝/细胞,1+=至少约200,000个拷贝/细胞,2+=至少约500,000个拷贝/细胞,3+=约 $1-2 \times 10^6$ 个拷贝/细胞。在3+水平的HER2过量表达,其导致酪氨酸激酶不依赖配体的活化(Hudziak等人(1987)Proc Natl Acad Sci USA,84:7159-7163),在大约30%乳腺癌中出现,并且在这些患者中,无复发存活期和总生存期缩减(Slamon等人(1989)Science,244:707-712;Slamon等人(1987)Science,235:177-182)。

[0122] 如本文所用的术语“细胞毒性剂”指抑制或阻碍细胞功能和/或造成细胞破坏的物质。该术语意在包括放射性同位素(例如, ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{60}Co 和Lu的放射性同位素)、化疗药和毒素如小分子毒素或细菌源、真菌源、植物源或动物源的酶活性毒素,包括它们的合成类似物及衍生物。

[0123] 本文中的“过敏性或炎性疾病”是因个体免疫系统的过度活化引起的疾病或病症。示例的过敏性或炎性疾病包括但不限于哮喘、银屑病、类风湿性关节炎、遗传过敏性皮炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮、湿疹、器官移植、年龄相关性黄斑变性、节段性回肠炎、溃疡

性结肠炎、嗜酸性粒细胞食管炎和与炎症相关的自身免疫病。

[0124] 本文中的“自身免疫病”是源自并且针对个体自身组织或器官或者共分离物的疾病或病症或其表现或从其中所致的病状。在这些自身免疫病和炎性疾病的多种疾病中,众多临床标记物和实验室标记物可能存在,包括但不限于高丙种球蛋白血症、高水平的自身抗体、抗原-抗体复合物沉积在组织中、从皮质类固醇或免疫抑制性治疗中获益和淋巴样细胞聚集于受累组织中。不限于任一种关于B细胞介导的自身免疫病的理论,认为B细胞在人自身免疫病中通过多种机理性途径展示致病作用,所述机理性途径包括自身抗体产生、免疫复合物形成、树突状细胞和T细胞活化、细胞因子合成、直接趋化因子释放和为异位性新淋巴生成提供滋生地。这些途径的每一者可以不同程度地参与自身免疫病的病理学。自身免疫病可以是器官特异性疾病(即,免疫应答特异性地针对器官系统如内分泌系统、造血系统、皮肤、心肺系统、胃肠及肝脏系统、肾系统、甲状腺、耳、神经肌肉系统、中枢神经系统等)或可以影响多个器官系统的全身性疾病(例如,系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎、多发性肌炎等)。

[0125] 术语“抑制细胞的”指限制细胞功能(如限制细胞生长或细胞增殖)的作用。

[0126] “化疗药”是用于治疗癌症中的化学化合物。化疗药的实例包括厄洛替尼(**TARCEVA®**, Genentech/OSI Pharm.)、硼替佐米(Bortezomib) (**VELCADE®**, Millennium Pharm.)、氟维司群(Fulvestrant) (**FASLODEX®**, Astrazeneca)、马来酸舒尼替尼(Sutent) (SU11248, Pfizer)、来曲(Letrozole) (**FEMARA®**, Novartis)、甲磺酸伊马替尼(**GLEEVEC®**, Novartis)、PTK787/ZK 222584 (Novartis)、奥沙利铂(**Eloxatin®**, Sanofi)、5-FU(5-氟尿嘧啶)、甲酰四氢叶酸、雷帕霉素(Sirolimus, **RAPAMUNE®**, Wyeth)、拉帕替尼(Lapatinib) (GSK572016, GlaxoSmithKline)、氯那法尼(Lonafarnib) (SCH 66336)、索拉非尼(Sorafenib) (BAY43-9006, Bayer Labs.)和吉非替尼(**IRESSA®**, Astrazeneca)、AG1478、AG1571 (SU 5271; Sugen); 烷基化剂如塞替派(Thiotepa)和**CYTOXAN®**环磷酰胺; 烷基磺酸酯如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡; 氮丙啶类如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa); 乙撑亚胺类和甲基蜜胺类, 包括六甲蜜胺(altretamine)、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺; 乙酸原类(acetogenins) (尤其布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone)); 喜树碱(包括合成性类似物拓扑替康; 苔藓抑素; 海绵多烯酮类化合物(callystatin); CC-1065(包括它的阿多来新、卡折来新和比折来新合成性类似物); 隐藻素(尤其隐藻素1和隐藻素8); 多拉司他汀; 多达霉素(duocarmycin) (包括合成性类似物KW-2189和CB1-TM1); 艾榴素; 水鬼蕉碱; 匍枝珊瑚醇A(sarcodictyin); 海绵素; 氮芥类如苯丁酸氮芥、蔡氮芥、cholophosphamide、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥; 亚硝基脲类如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、罗莫司汀、尼莫司汀、和雷莫司汀; 抗生素如烯二炔类抗生素(例如, 刺孢霉素, 尤其刺孢霉素 λ II和刺孢霉素 Ω II (Angew Chem Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); 达内霉素, 包括达内霉素A; 二膦酸盐类如氯膦酸盐; 埃斯波霉素; 以及新制癌菌素发色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素发色团、阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素(anthramycin)、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线

菌素C、卡柔比星(carabycin)、去甲柔红霉素、嗜癌霉素、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D、多柔比星、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、**阿霉素®**多柔比星(包括吗啉基-多柔比星、氰基吗啉-多柔比星、2-吡咯啉-多柔比星和去氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、马塞罗霉素、丝裂霉素类如丝裂霉素C、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他汀、佐柔比星;抗代谢物如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤和曲美沙特;嘌呤类似物如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素类如卡鲁睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺药如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂如亚叶酸;醋葡萄糖内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;噁尿嘧啶;安吡啶;bestrabucil;比生群;依达曲沙;地磷酰胺;秋水仙胺;地吡醌;依氟鸟氨酸;依利醋铵;埃坡霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟脲;香菇多糖;氯尼达明;美坦生类化合物如美坦生和安斯菌素;米托胍脲;米托蒽醌;莫哌达醇;尼曲吡啶(nitraerine);喷司他丁;蛋氨酸芥(phenamet);吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙基肼;丙卡巴肼;**PSK®**多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR);丙亚胺;利索新;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯族化合物(尤其T-2毒素、疣孢菌素A(verracurin A)、杆孢菌素A和蛇形菌素);乌拉坦;长春地辛(**ELDISINE®**, **FILDESIN®**);达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿糖胞苷("Ara-C";环磷酰胺;塞替派;紫杉烷类化合物,例如,**TAXOL®**紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)、**ABRAXANE™**紫杉醇的无乳浮、白蛋白工程化纳米粒子制剂(American Pharmaceutical Partners,Schaumburg,Illinois)和**泰索帝®**紫杉萜(doxetaxel)(**Rhône-Poulenc Rorer**, Antony,France);苯丁酸氮芥;**GEMZAR®**吉西他滨;6-巯鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;**NAVELBINE®**长春瑞滨;诺安托;替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);维甲类如维甲酸;卡培他滨;以上任意药物的可药用盐、酸或衍生物。

[0127] 另外,在“化疗药”的这个定义中包括:(i)起到调节或抑制针对肿瘤的激素作用的抗激素药,如抗雌激素药和选择性雌激素受体调节物(SERMs),包括例如他莫昔芬(包括**NOLVADEX®**他莫昔芬)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮和**FARESTON®**托瑞米芬;(ii)抑制芳香酶的芳香酶抑制剂,其调节肾上腺中的雌激素产生,例如4(5)-咪唑类、氨鲁米特、**MEGASE®**醋酸甲地孕酮、**AROMASIN®**依西美坦、福美坦、法倔唑、**RIVISOR®**伏氯唑、**FEMARA®**来曲唑和**ARIMIDEX®**阿那曲唑;(iii)抗雄激素药如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙立德和戈舍瑞林;以及曲他沙滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);(iv)芳香酶抑制剂;(v)蛋白激酶抑制剂;(vi)脂质激酶抑制剂;(vii)反义寡核苷酸,尤其那些抑制了参与异常细胞增殖的信号传导途径中的基因(例如PKC- α 、Raf、H-Ras)表达的

反义寡核苷酸；(viii) 核酶，如VEGF表达抑制剂（例如，**ANGIOZYME®**核酶）和HER2表达抑制剂；(ix) 疫苗，如基因治疗疫苗，例如，**ALLOVECTIN®**疫苗、**LEUVECTIN®**疫苗和**VAXID®**疫苗；**PROLEUKIN®** r I L - 2；**LURTOTECAN®**拓扑异构酶I抑制剂；**ABARELIX®**rmRH；(x) 抗血管生成剂，如贝伐单抗(**AVASTIN®**, Genentech)，和(xi) 上述药物中任意者的可药用盐、酸或衍生物。

[0128] 在本文中使用时，“生长抑制剂”指在体外或在体内抑制细胞生长的化合物或组合物。因而，生长抑制剂可以是一种显著减少处于S期的细胞的百分数的物质。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期进程（在除S期之外的位置）的物质，如诱导G1停滞和M期停滞的药物。经典的M期阻断剂包括长春碱类（例如，长春新碱和长春碱）、紫杉烷和拓扑异构酶II抑制剂如多柔比星、表柔比星、佐柔比星、依托泊苷及博来霉素。使G1停滞的药物还导致S期停滞，例如DNA烷基化剂如他莫西芬、泼尼松、达卡巴嗪、氮芥、顺铂、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶和阿糖胞苷(ara-C)。其他信息可以在The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn和Israel编著, Murakami等人, 第1章, 标题“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs (细胞周期调节、癌基因和抗肿瘤药物)” (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 尤其第13页中找到。紫杉烷类（紫杉醇和多西紫杉醇）是均源自紫杉的抗癌药物。源自欧洲紫杉的多西紫杉醇(**TAXOTERE®**, Rhone-Poulenc Rorer)是紫杉醇的一种半合成性类似物(**TAXOL®**, Bristol-Myers Squibb)。紫杉醇和多西紫杉醇促进微管从微管蛋白二聚体中装配并且通过阻止解聚而稳定微管，这导致细胞中的有丝分裂抑制。

[0129] 如本文所用的“抗癌疗法”指减少或抑制受试者中癌症的治疗。抗癌疗法的实例包括细胞毒性放疗法以及施用治疗有效量的细胞毒性剂、化疗药、生长抑制剂、癌疫苗、血管生成抑制剂、前药、细胞因子、细胞因子拮抗剂、皮质类固醇、免疫抑制剂、抗呕吐药、抗体或抗体片段或者镇痛药至所述受试者。

[0130] “细胞因子拮抗剂”意指部分地或完全阻断、抑制或中和至少一种细胞因子的生物学活性的分子。例如，细胞因子拮抗剂可以通过抑制细胞因子表达和/或分泌物或通过结合至细胞因子或结合至细胞因子受体来抑制细胞因子活性。细胞因子拮抗剂包括与细胞因子或细胞因子受体结合的抗体、合成肽或天然序列肽、免疫黏附素和小分子拮抗剂。细胞因子拮抗剂任选地与细胞毒性剂缀合或融合。示例性TNF拮抗剂是依那西普(**ENBREL®**)、英利昔单抗(**REMICADE®**)和阿达木单抗(HUMIRA™)。

[0131] 如本文所用的术语“免疫抑制剂”指作用在于抑制或掩蔽正在治疗的受试者的免疫系统的物质。这包括抑制细胞因子产生、下调或抑制自身抗原表达或掩蔽MHC抗原的物质。免疫抑制剂的实例包括2-氨基-6-芳基-5取代的嘧啶（见美国专利号4,665,077）；麦考酚酸酯如**CELLCEPT®**；硫唑嘌呤(**IMURAN®**, **AZASAN®**)/6-巯基嘌呤；溴隐亭(bromocryptine)；达那唑；氨苯砒；戊二醛（其掩蔽MHC抗原，如美国专利号4,120,649中描述）；针对MHC抗原和MHC片段的抗独特型抗体；环孢菌素A；类固醇类如皮质类固醇和糖皮质激素类，例如，泼尼松、泼尼松龙如**PEDIAPRED®**（泼尼松龙磷酸钠）或

ORAPRED® (泼尼松龙磷酸钠口服溶液剂)、甲泼尼龙和地塞米松;甲氨蝶呤(口服或皮下) (**RHEUMATREX®**, TREXALL™);羟氯喹/氯喹;柳氮磺吡啶;来福米特;细胞因子或细胞因子受体拮抗剂,包括抗干扰素- γ 、- β 或- α 抗体,抗肿瘤坏死因子- α 抗体(英利昔单抗或阿达木单抗),抗TNF- α 免疫黏附素 (**ENBREL®**, 依那西普),抗肿瘤坏死因子- β 抗体,抗白介素-2抗体和抗IL-2受体抗体;抗LFA-1抗体,包括抗CD11a和抗CD18抗体;抗L3T4抗体;异源抗淋巴细胞球蛋白;多克隆或泛T抗体或单克隆抗CD3或抗CD4/CD4a抗体;含有LFA-3结合结构域的可溶性肽(WO 90/08187);链激酶;TGF- β ;链道酶;来自宿主的RNA或DNA;FK506;RS-61443;脱氧精胍菌素;雷帕霉素;T细胞受体(Cohen等人,美国专利号5,114,721);T细胞受体片段(Offner等人Science 251:430-432(1991);WO 90/11294;Ianeway, Nature 341:482(1989);和WO 98/07409);T细胞受体抗体(EP 340,109)如T10B9;环磷酰胺 (**CYTOXAN®**);氨苯砒;青霉胺(**CUPRIMINE®**);血浆交换;或静脉内免疫球蛋白(IVIG)。这些免疫抑制剂可以单独或彼此组合地使用,尤其类固醇与另一种免疫抑制剂的组合,或在此类组合后,随后采用非类固醇药物维持给药以减少对类固醇的需求。

[0132] “镇痛药”指作用在于抑制或压制受试者中疼痛的药物。示例性镇痛药包括非甾体抗炎药(NSAID),包括布洛芬(**MOTRIN®**)、萘普生(**NAPROSYN®**)、乙酰水杨酸、吲哚美辛、舒林酸和托美丁,包括它们的盐及衍生物、以及用来减少可能出现的刺激的多种其他药物,包括抗惊厥药(加巴喷丁、苯妥英、卡马西平)或三环类抗抑郁药。具体实例包括对乙酰氨基酚、阿斯匹灵、阿米替林(**ELAVIL®**)、卡马西平(**TEGRETOL®**)、苯妥英(**DILANTIN®**)、加巴喷丁(**NEURONTIN®**)、(E)-N-香草基-8-甲基-6-壬烯酰胺(**CAPSAICIN®**)或神经阻滞剂。

[0133] “皮质类固醇”指模拟或增进天然存在的皮质类固醇的作用的具有类固醇总体化学结构的几种合成物质或天然存在物质中的任一种物质。合成的皮质类固醇的实例包括泼尼松、泼尼松龙(包括甲泼尼龙)、地塞米松、曲安西龙和倍他米松。

[0134] 如本文所用,“癌疫苗”是在受试者中刺激针对癌症的免疫应答的组合物。癌疫苗一般由癌相关材料或细胞(抗原)的来源连同进一步刺激和增强针对该抗原的免疫应答的其他组分(例如,佐剂)组成,所述的来源可以是自体的(来自自身)或相对于该受试者是同种异体的(来自其他)。癌疫苗可以导致刺激受试者的免疫系统以产生针对一种或几种特异性抗原的抗体,和/或产生杀伤性T细胞以攻击具有那些抗原的癌细胞。

[0135] “细胞毒放疗法”如本文所用指抑制或阻碍细胞功能和/或造成细胞破坏的辐射疗法。辐射疗法可以包括例如,外部束照射或采用放射性标记物(如抗体)治疗。该术语意在包括使用放射性同位素(例如,At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、Ra²²³、P³²和Lu的放射性同位素)。

[0136] 如本文所用,术语“靶向EGFR的药物”指与EGFR结合和任选地抑制EGFR活化的治疗剂。这种治疗剂的实例包括与EGFR结合的抗体和小分子。与EGFR结合的抗体的实例包括MAb 579(ATCC CRL HB 8506)、MAb 455(ATCC CRL HB8507)、MAb 225(ATCC CRL 8508)、MAb 528(ATCC CRL 8509)(见,美国专利号4,943,533,Mendelsohn等人)及其变体,如嵌合化225(C225或西妥昔单抗;**ERBITUX®**)和重构的人225(H225)(见WO 96/40210,Imclone

Systems Inc.) ; 结合II型突变体EGFR的抗体(美国专利号5,212,290) ; 如US 5891996中所述的结合EGFR的人源化和嵌合抗体 ; 和结合EGFR的人抗体如ABX-EGF (见WO 96/50433, Abgenix) 。抗EGFR抗体可以与细胞毒性剂缀合, 因而产生免疫缀合物(见, 例如, EP 659, 439A2, Merck Patent GmbH) 。与EGFR结合的小分子的实例包括ZD1839或吉非替尼(IRESSA™; Astra Zeneca) 、厄洛替尼HCl (CP-358774, TARCEVA™; Genentech/OSI) 和AG1478、AG1571 (SU 5271; Sugen) 。

[0137] 蛋白激酶抑制剂包括某种程度抑制酪氨酸激酶(如ErbB受体) 的酪氨酸激酶活性的酪氨酸激酶抑制剂。此类抑制剂的实例包括前述段落中指出的EGFR靶向药物以及喹唑啉类如PD 153035、4-(3-氯苯胺基) 喹唑啉、吡啶并嘧啶类、嘧啶并嘧啶类、吡咯并嘧啶类、如CGP 59326、CGP 60261和CGP 62706, 和吡唑并嘧啶类、4-(苯基氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶、姜黄素(二阿魏酰基) 甲烷、4,5-双(4-氟苯胺基) 邻苯二甲酰胺、含有硝基噻吩部分的酪氨酸磷酸化抑制剂(tyrphostine) ; PD-0183805 (Warner-Lambert) ; 反义分子(例如, 与编码ErbB的核酸结合的那些) ; 喹喔啉类(美国专利号5,804,396) ; 酪氨酸磷酸化抑制剂类(美国专利号5,804,396) ; ZD6474 (Astra Zeneca) ; PTK-787 (Novartis/Schering AG) ; 泛ErbB抑制剂如CI-1033 (Pfizer) ; Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly) ; 甲磺酸伊马替尼(Gleevec; Novartis) ; PKI 166 (Novartis) ; GW2016 (Glaxo SmithKline) ; CI-1033 (Pfizer) ; EKB-569 (Wyeth) ; 司马沙尼(Sugen) ; ZD6474 (AstraZeneca) ; PTK-787 (Novartis/Schering AG) ; INC-1C11 (Imclone) ; 或如以下专利中任一者中描述的抑制剂: WO 99/09016 (American Cyanamid) ; WO 98/43960 (American Cyanamid) ; WO 97/38983 (Warner Lambert) ; WO 99/06378 (Warner Lambert) ; WO 99/06396 (Warner Lambert) ; WO 96/30347 (Pfizer, Inc) ; WO 96/33978 (Zeneca) ; WO 96/3397 (Zeneca) 和WO 96/33980 (Zeneca) 。

[0138] “抗血管生成剂”指某种程度地阻断或干扰血管形成的化合物。抗血管生成因子可以例如是与参与促进血管生成的生长因子或生长因子受体结合的小分子或抗体。在某些情况下, 本文中的抗血管生成因子是与血管内皮生长因子(VEGF) 结合的抗体。

[0139] “抗呕吐药”是在受试者中减少或预防恶心的化合物。抗呕吐化合物包括例如, 神经激肽-1受体拮抗剂、5HT3受体拮抗剂(如昂丹司琼、格拉司琼、托烷司琼和扎托司琼)、G A B A B 受体激动剂, 如巴氯芬、皮质类固醇如地塞米松、**KENALOG®**、**ARISTOCORT®**或**NASALIDE®**、抗多巴胺能药、吩噻嗪类(例如丙氯拉嗪、氟奋乃静、硫利达嗪和美索达嗪)、屈大麻酚、甲氧氯普胺、多潘立酮、氟哌啶醇、赛克力嗪、劳拉西泮、丙氯拉嗪和左美丙嗪。

[0140] 术语“细胞因子”是用于一个细胞群体所释放的蛋白质的类属术语, 所述蛋白质作为细胞间介质作用于另一种细胞。此类细胞因子的实例是淋巴因子类、单核因子类和常规的多肽激素。在细胞因子当中包括生长激素如人生长激素、N-甲硫酰人生长激素和牛生长激素; 副甲状腺激素; 甲状腺素; 胰岛素; 胰岛素原; 松弛素; 松弛素原; 糖蛋白激素类如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH) 和促黄体激素(LH) ; 肝生长因子; 成纤维细胞生长因子; 催乳素; 胎盘催乳素; 肿瘤坏死因子- α 和- β ; 缪勒管抑制物质; 小鼠促性腺激素相关肽; 抑制素; 活化素; 血管内皮生长因子; 整联蛋白; 促血小板生成素(TPO) ; 神经生长因子类如NGF- β ; 血小生长因子; 转化生长因子(TGF) 如TGF- α 和TGF- β ; 胰岛素样生长因子-I和-II; 促红细胞生成素(EPO) ; 骨诱导因子; 干扰素如干扰素- α 、- β 和- γ ; 集落刺激因子类(CSF) 如巨

噬细胞-CSF (M-CSF) ;粒细胞-巨噬细胞-CSF (GM-CSF) ;和粒细胞-CSF (G-CSF) ;白介素 (IL) 如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12;肿瘤坏死因子如TNF- α 或TNF- β ;和其他多肽因子,包括LIF和kit配体(KL)。如本文所用,术语“细胞因子”包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列细胞因子的生物学活性等同物。

[0141] 如本文所用的术语“前药”指药理学活性物质的前体或衍生物形式,所述前体或衍生物与亲本药物相比,对肿瘤细胞具有较低细胞毒性并且能够酶促或水解活化或转变成更有活性的亲本形式。见,例如,Wilman,“Prodrugs in Cancer Chemotherapy (癌症化疗中的前药)”*Biochemical Society Transactions*,14,第375-382页,615th Meeting Belfast (1986)和Stella等人“Prodrugs:A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery (前药:定向药物递送的化学手段)”,*Directed Drug Delivery*,Borchardt等人(编著),第247-267页,Human Press (1985)。示例性前药包括但不限于含有磷酸酯的前药、含有硫代磷酸酯的前药、含有硫酸酯的前药、含有肽的前药、D-氨基酸修饰的前药、糖基化前药、含有 β -内酰胺的前药,任选地含有取代的苯氧乙酰胺的前药或任选地含有取代的苯乙酰胺的前药、5-氟胞嘧啶和其他5-氟尿苷前药,它们可以转变成细胞毒性更强的游离药物。可以衍生成前药形式的细胞毒药物的实例包括但不限于上述那些化疗药。

[0142] “脂质体”是由多种类型的脂类、磷脂和/或表面活性剂组成的小囊泡,其用于递送药物(如本文中公开的抗ErbB2抗体和任选地化疗药)至哺乳动物。脂质体的组分通常以双层形式排列,其类似于生物膜的脂质排列形式。

[0143] “包装插页”用来指治疗产品的商业包装中习惯性包含的说明书,所述说明书含有关于适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或涉及使用此类治疗产品之警告的信息。

[0144] “噬菌体展示法”是一项技术,借助所述技术,将变体多肽作为融合蛋白展示至噬菌体例如丝状噬菌体、颗粒表面上的外壳蛋白,。噬菌体展示法的一项用途在于以下事实:巨大的随机化蛋白质变体文库可以针对那些以高亲和力与靶分子结合的序列快速和高效地分选。肽文库和蛋白质文库在噬菌体上的展示已经用于筛选数百万个多肽以寻找具有特异结合特性的那些多肽。多价噬菌体展示方法已经用于展示随机小肽和小蛋白,一般借助与丝状噬菌体pIII或pVIII的融合进行(Wells和Lowman, (1992) *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 3:355-362,及其中引用的参考文献)。在单价噬菌体展示法中,蛋白质文库或肽文库与噬菌体外壳蛋白或其部分融合,并且在野生型蛋白存在下以低水平表达。相对于多价噬菌体,亲合力作用降低,从而分选过程基于固有的配体亲和力,并且使用简化DNA操作的噬菌粒载体。Lowman和Wells, *Methods:A companion to Methods in Enzymology*,3:205-0216 (1991)。噬菌体展示法包括用于产生抗体样分子的技术(Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immunobiology*, 第5版, Garland Publishing, New York, 第627-628页; Lee等人)。

[0145] “噬菌粒”是具有细菌复制起点例如CoIE1和噬菌体基因间区副本的质粒载体。可以在任何已知噬菌体(包括丝状噬菌体和 λ 样噬菌体)上使用噬菌粒。所述质粒通常还将含有抗生素耐药性的选择标记。克隆至这些载体中的DNA区段可以作为质粒增殖。当为携带这些载体的细胞提供产生噬菌体粒子所需要的全部基因时,质粒的复制模式变成滚环复制以产生质粒DNA的一条链及包装噬菌体粒子的副本。噬菌粒可以形成感染性或非感染性噬菌

体粒子。该术语包括这样的噬菌粒,其含有与异源多肽基因连接的噬菌体外壳蛋白基因或其片段作为基因融合物,从而所述异源多肽展示在噬菌体粒子的表面上。

[0146] 本文中可互换使用的术语“接头”、“接头单元”、“连接”、“交联剂”和“交联物”意指这样的化学部分,其包含将抗体或抗体片段与另一个抗体、抗体片段或与药物部分共价连接的共价键或原子链。接头包括二价基团如烷基二基(alkyldiyl)部分、亚芳基部分、杂亚芳基部分,如:-(CR₂)_nO(CR₂)_n-、烷氧基重复单元(例如聚乙烯氧基(polyethylenoxy)、PEG、聚亚甲基氧基)和烷基氨基(例如聚亚乙基氨基、Jeffamine™);和二酸酯和酰胺,包括琥珀酸酯、琥珀酰胺、二甘醇酸酯、丙二酸酯和己酰胺。额外的接头或交联剂包括双马来酰亚胺和双烷基卤、吡啶基二硫化物、双汞盐、5-巯基-2-硝基苯甲酸介导的交联和双硫代磺酸酯。示例性的市售交联剂包括但不限于1,4-双(马来酰亚胺)丁烷、(1,4-双马来酰亚胺)-2,3-二羟基丁烷、双(马来酰亚胺)己烷、双(马来酰亚胺)乙烷、1,4-二-[3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基]丁烷、1,6-己烷-双-乙烯基砷、二硫代双马来酰亚胺乙烷、1,8-双马来酰亚胺基-二乙二醇和1,11-双马来酰亚胺基-三乙二醇。在某些情况下,同型三官能性试剂可以用作交联剂,例如,三[2-马来酰亚胺乙基]胺。

[0147] 术语“标记物”意指可以与抗体共价连接并发挥以下作用的任何部分:(i)提供可检测信号;(ii)与第二标记物相互作用以调整第一或第二标记物提供的可检测信号,例如FRET(荧光共振能量转移);(iii)稳定相互作用或增加与抗原或配体结合的亲和力;(iv)通过电荷、疏水性、形状或其他物理参数影响迁移率例如电泳迁移率或细胞通透性,或(v)提供捕获部分以调节配体亲和力,抗体结合作用或离子络合。

[0148] 本文所用的立体化学定义和惯例通常遵循S.P.Parker编著McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(1984)McGraw-Hill Book Company,New York;以及Eliel.E.和Wilens.S.,Stereochemistry of Organic Compounds(1994)John Wiley&Sons, Inc.,New York。许多有机化合物以光学活性形式存在,即,它们具有转动平面偏振光的平面的能力。在描述光学活性化合物时,前缀D和L或R和S用来指明分子围绕其手性中心的绝对构型。前缀d和l或(+)和(-)用来命名该化合物转动平面偏振光的符号,其中(-)或l意指该化合物是左旋的。带有前缀(+)或d的化合物是右旋的。对于给定的化学结构,这些立体异构体是相同的,除了它们彼此是镜像之外。一种特殊的立体异构体也可以称作对映异构体,并且此类异构体的混合物经常称作对映体混合物。对映异构体的50:50混合物称作消旋混合物或消旋物,这可以在化学反应或过程中不存在立体选择或立体专一性的情况下出现。术语“消旋混合物”和“消旋物”指两个对映异构种类的等摩尔混合物,缺少光学活性。

[0149] 如本文所用,短语“可药用盐”指可药用的有机盐或无机盐。示例性盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、鞣酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆盐、延胡索酸酯、葡萄糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖二酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即,1,1'-亚甲基双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))。可药用盐可以涉及纳入另一个分子如乙酸盐离子、琥珀酸盐离子或其他反离子。反离子可以是稳定亲本化合物上电荷的任何有机或无机部分。另外,可药用盐可以在其结构中具有多于一个带电原子。其中多个带电原子是可药用盐的部分的例子可以具有多个反离子。因而,可药用盐可以具有一个

或多个带电原子和/或一个或多个反离子。

[0150] “可药用的溶剂化物”指一个或多个溶剂分子和抗体的缔合。形成可药用溶剂化物的溶剂的实例包括但不限于水、异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

[0151] 本文中使用以下缩写并且具有所示的定义：BME是β-巯基乙醇，Boc是N-(叔丁氧羰基)，cit是瓜氨酸(2-氨基-5-脲基戊酸)，dap是多拉脯氨酸(dolaproine)，DCC是1,3-二环己基碳二亚胺，DCM是二氯甲烷，DEA是二乙胺，DEAD是偶氮二甲酸二乙酯，DEPC是氰基磷酸二乙酯，DIAD是偶氮二甲酸二异丙酯，DIEA是N,N-二异丙基乙胺，dil是多拉异亮氨酸(dolaisoleucine)，DMA是二甲基乙酰胺，DMAP是4-二甲氨基吡啶，DME是乙二醇二甲醚(或1,2-二甲氧基乙烷)，DMF是N,N-二甲基甲酰胺，DMSO是二甲基亚砷，doe是dolaphenine，dov是N,N-二甲基缬氨酸，DTNB是5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)，DTPA是二乙三胺五乙酸，DTT是二硫苏糖醇，EDCI是1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基盐酸碳二亚胺，EEDQ是2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉，ES-MS是电喷雾质谱法，EtOAc是乙酸乙酯，Fmoc是N-(9-芴基甲氧羰基)，gly是甘氨酸，HATU是O-(7-氮杂苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脒鎓六氟磷酸盐)，HOBt是1-羟基苯并三唑，HPLC是高压液相色谱，ile是异亮氨酸，lys是赖氨酸，MeCN(CH₃CN)是乙腈，MeOH是甲醇，Mtr是4-甲氧苄基二苯甲基(或4-甲氧基三苯甲基)，nor是(1S,2R)-(+)-去甲麻黄碱，PAB是对氨基苄基氨基甲酰基，PBS是磷酸盐缓冲盐水(pH7)，PEG是聚乙二醇，Ph是苯基，Pnp是对硝基苄基，MC是6-马来酰亚胺己酰基，phe是L-苯丙氨酸，PyBrop是溴化三吡咯烷基脒鎓六氟磷酸盐，SEC是大小排阻层析，Su是琥珀酰亚胺，TFA是三氟乙酸，TLC是薄层层析，UV是紫外线并且val是缬氨酸。

[0152] “受试者”是脊椎动物，如哺乳动物，例如，人。哺乳动物包括但不限于农场动物(如奶牛)、竞赛动物、宠物(如猫、犬和马)、灵长类、小鼠和大鼠。

[0153] 除非另外说明，否则实施例中提到的市售试剂根据制造商的说明书使用。以下实施例中遍及本说明书中用ATCC登录号所标识的那些细胞的来源是美国典型培养物保藏中心，Manassas,VA。除非另外指出，否则本发明使用重组DNA技术的标准方法，如上文和以下教材中所述的那些方法：Sambrook等人，上文；Ausubel等人，Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, NY, 1989)；Innis等人，PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc., NY, 1990)；Harlow等人，Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988)；Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press, Oxford, 1984)；Freshney, Animal Cell Culture, 1987；Coligan等人，Current Protocols in Immunology, 1991。

[0154] 遍及本说明书，词汇“包含”或其变异形式如“包括了”或“包含有”应理解为表示纳入所陈述的整数或整数群，但不排除任何其它整数或整数群。

[0155] 本文中定义或另外表征了许多其他术语。

[0156] 组合物和方法

[0157] 多特异性抗体和抗体类似物

[0158] 为构建如本文所述的多特异性抗体，包括双特异性抗体和抗体类似物，获得了具有至少一个游离巯氢基的抗体片段。该抗体片段可以从如上文定义的亲本抗体(包括半胱氨酸工程化抗体)获得。亲本抗体可以经酶促消化以产生抗体片段。示例性酶促消化方法包

包括但不限于胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和Lys-C。示例性抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、双体抗体(Db)；串联双体抗体(taDb)、线性抗体(见美国专利号5,641,870,实施例2; Zapata等人, Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995))；单臂抗体、单一可变域抗体、微型抗体(Olafsen等人(2004) Protein Eng. Design&Sel. 17(4):315-323)、单一链抗体分子、由Fab表达文库产生的片段、抗独特型(抗Id)抗体、CDR(互补决定区)和表位结合片段。抗体片段也可以作为编码所述抗体片段的DNA片段被克隆至质粒表达载体或噬菌粒载体中并且直接在大肠杆菌(E. Coli)中表达。抗体酶促消化方法、DNA克隆和重组蛋白表达方法是本领域技术人员熟知的,并且本文中提供了示例性方法。

[0159] 抗体片段可以使用常规技术予以纯化并且经过还原以产生游离巯基。具有游离巯基的抗体片段与交联剂例如双马来酰亚胺反应。将此类交联的抗体片段纯化并且随后与具有游离巯基的第二抗体片段反应。将其中这两个抗体片段交联的终产物纯化。在某些实施方案中,每个抗体片段是Fab,并且其中这两个Fab经双马来酰亚胺交联的终产物在本文称作双马来酰亚胺基-(硫代-Fab)₂或双Fab。

[0160] 此类多特异性抗体和抗体类似物,包括双Fab,可以用来快速地合成大量抗体片段组合或天然抗体的结构性变体或特定抗体片段组合,并且用来在生物学测定法中筛选具有所需要活性的那些。

[0161] 半胱氨酸工程化抗体

[0162] 已经先前描述了半胱氨酸工程化抗体。美国专利公开号2007/0092940和Junutula, J.R.等人, J Immunol Methods 332(1-2):41-52(2008)。半胱氨酸工程化抗体可以是亲本抗体。这些亲本抗体用于产生在特定位置内、一般在恒定区例如C_L或C_{H1}中具有游离半胱氨酸的抗体片段。经工程化以含有半胱氨酸的亲本抗体在本文中称作“ThioMab”,并且从此类半胱氨酸工程化抗体产生的Fab片段,无论产生方法是什么,均在本文中称作“ThioFab”。如先前描述(美国专利公开号2007/0092940和Junutula, J.R.等人, J Immunol Methods 332(1-2):41-52[2008]),对具有替换的(“工程化”)半胱氨酸(Cys)残基的突变体评价新导入的工程化半胱氨酸巯基的反应性。巯基反应性值是一个相对的在0至1.0范围内的数字术语并且可以对任何半胱氨酸工程化抗体进行测量。除具有反应性巯基之外,还应当选择ThioMab从而它们保留抗原结合能力。先前详细描述了半胱氨酸工程化抗体的设计、选择和制备。美国专利公开号2007/0092940和Junutula, J.R.等人, J Immunol Methods 332(1-2):41-52(2008)。

[0163] 下文列出此类半胱氨酸工程化抗体的某些示例性轻链(LC)和重链(HC)的氨基酸序列和相应的野生型序列(工程化半胱氨酸的位置以粗斜体显示并且加下划线)。因为将工程化的半胱氨酸导入重链或轻链的恒定区中,所以应当理解下文为导入半胱氨酸至那些指明的抗体中所提供的位置可以用于含有这些恒定区或基本上相似的恒定区的任何抗体。

[0164] 1.HercLC(野生型)(SEQ ID NO.:1)

[0165] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF^{110Cys}FLYSGVPSRFS^{110Cys}SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQG^{110Cys}TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC^{110Cys}LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0166] 1.HercLC^{110Cys}(SEQ ID NO.:2)

[0167]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS
L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T C
AAPSVMIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0168] 2.HercLC^{205Cys} (SEQ ID NO.:3)

[0169]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVMIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0170] 4.HercHC (野生型) (SEQ ID NO.:4)

[0171] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0172] 5.HercHC^{118Cys} (SEQ ID NO.:5)

[0173]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C S R W G G D G F Y A M D Y W G Q G T L V T C
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0174] 6.2C4LC (野生型) (SEQ ID NO.:6)

[0175] DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVMIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0176] 7.2C4LC^{110Cys} (SEQ ID NO.:7)

[0177]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTIS
L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T C
AAPSVMIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0178] 8.2C4HC (VH-CH1) (野生型) (SEQ ID NO.:8)

[0179] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLEWVADVNPNSSGGSIYNQRFKGRFT
LSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHT

[0180] 9.5A6HC (VH-CH1) (野生型) (SEQ ID NO.:9)

[0181] EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSDAWMDWVRQSPERGLEWVAEIRSKPNNHATYYAESVKGR
FTISRDDSKSSVYLQMTSLRPEDTGIIYYCTHFDYWGGQTTLTVSSAKTTGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

[0182] 10.5A6HC^{121C} (SEQ ID NO.:10)

[0183]

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSDAWMDWVRQSPERGLEWVAEIRSKPNNHATYYAESVKGRFTISRDDS
K S S V Y L Q M T S L R P E D T G I Y Y C T H F D Y W G Q G T T L T V S S C
KTTGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

[0184] 11.5A6LC (野生型) (SEQ ID NO.:11)

[0185] DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLSWFQQKPDGTIKRLIYAASALDSGVPKRFSGSWSGS
DYSLTISSLESEDFADYYCLQYVSYP LTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0186] 12.5A6LC^{110Cys} (SEQ ID NO.:12)

[0187]

DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLSWFQQKPDGTIKRLIYAASALDSGVPKRFSGSWSGSDYSLTISS
L E S E D F A D Y Y C L Q Y V S Y P L T F G A G T K V E I K R T C
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0188] 13.22E7HC (VH-CH1) (野生型) (SEQ ID NO.:13)

[0189] EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPEKRLEWVATISGGNNYTFYPDNLKGRFT
ISRDNANKILYLQISSLSVD TALYYCASLWYRASFA YWGQGT LVT VSS C
VVDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
KTHT

[0190] 14.22E7HC^{121C} (SEQ ID NO.:14)

[0191]

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPEKRLEWVATISGGNNYTFYPDNLKGRFTISRDNANK
I L Y L Q I S S L R S V D T A L Y Y C A S L W Y R A S F A Y W G Q G T L V T V S S C
KTTGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

[0192] 15.22E7LC (野生型) (SEQ ID NO.:15)

[0193] DIMMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLISRANRLVDGVPSRFSGSGSGQ
DYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0194] 16.22E7LC^{110Cys} (SEQ ID NO.:16)

[0195]

DIMMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLISRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISS
L E Y E D M G I Y Y C L Q Y D D F P F T F G G G T K V E I K R T C
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0196] 17.D1-5HC (VH-CH1) (野生型) (SEQ ID NO.:17)

[0197] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTGNWIHWVRQAPGKGLEWVGEISPSGGYTDYADSVKGRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARESRVSYEAAAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTH

[0198] 18.D1-5LC (野生型) (SEQ ID NO.:18)

[0199] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0200] 19.D1-5LC^{110Cys} (SEQ ID NO.:19)

[0201]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y P T P Y T F G Q G T K V E I K R T C
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0202] 20.C3-101HC (VH-CH1) (野生型) (SEQ ID NO.:20)

[0203] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVGTINPYSGATDYADSVKGRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARLAVGVFANRYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTH

[0204] 21.C3-101LC (野生型) (SEQ ID NO.:21)

[0205] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0206] 22.C3-101LC^{110Cys} (SEQ ID NO.:22)

[0207]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P R T F G Q G T K V E I K R T C
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0208] 因为选择半胱氨酸工程化抗体以保留它们的野生型亲本抗体对应物的抗原结合能力,因此它们能够与抗原特异性结合。此类抗原包括例如肿瘤相关抗原(TAA)、细胞表面受体蛋白和其他细胞表面分子、跨膜蛋白、信号传导蛋白、细胞存活调节因子、细胞增殖调节因子、与(例如已知或疑似在功能上有助于)组织发育或分化相关的分子、淋巴因子、细胞

因子、参与细胞周期调节的分子、参与血管发生的分子和与(例如已知或疑似在功能上有助于)血管生成相关的分子。肿瘤相关抗原可以是簇分化因子(即,CD蛋白)。半胱氨酸工程化抗体能够结合的抗原可以是上述分类之一的子类中的成员,其中所述分类的其它子类包含(相对于目的抗原)具有不同特征的其他分子/抗原。

[0209] 亲本抗体也可以是选自如通过引用方式明确并入本文的美国专利号5,821,337的表3中所述的huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7和huMAb4D5-8(曲妥珠单抗,**HERCEPTIN®**)的人源化抗体;人源化520C9(WO 93/21319)和人源化2C4抗体。

[0210] 多功能的多特异性抗体和抗体类似物

[0211] 多特异性抗体和抗体类似物可以用改性交联剂合成,从而额外的功能部分可以与所述多特异性抗体或抗体类似物连接。改性交联剂允许任何硫氢基反应性部分的连接。在一个实施方案中,N-琥珀酰亚氨基-S-乙酰硫代乙酸酯(SATA)与双马来酰亚胺连接以形成双马来酰亚氨基-乙酰硫代乙酸酯(BMata)。在掩蔽的巯基脱保护后,可以连接具有硫氢基反应性(或巯基反应性)部分的任何官能团。

[0212] 示例性巯基反应性试剂包括多功能接头试剂、捕获剂即亲和力标记物试剂(例如,生物素-接头试剂)、检测标记物(例如荧光团试剂)、固相固定试剂(例如SEPHAROSE™、聚苯乙烯或玻璃)或药物-接头中间体。巯基反应性试剂的一个实例是N-乙基马来酰亚胺(NEM)。具有改性交联剂的此类多特异性抗体或抗体类似物可以进一步与药物部分试剂或其他标记物反应。多特异性抗体或抗体类似物与药物-接头中间体的反应分别地提供了多特异性抗体-药物缀合物或抗体类似物-药物缀合物。

[0213] 这种方法可以适用于缀合其中反应基团是例如马来酰亚胺、碘乙酰胺、吡啶基二硫化物的其他巯基反应试剂或其他巯基反应性缀合配偶物(Haugland,2003,Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals,Molecular Probes,Inc.;Brinkley,1992,Bioconjugate Chem.3:2;Garman,1997,Non-Radioactive Labelling:A Practical Approach,Academic Press,London;Means(1990)Bioconjugate Chem.1:2;Hermanson,G.引自Bioconjugate Techniques(1996)Academic Press,San Diego,第40-55,643-671页)。配偶物可以是细胞毒性剂(例如毒素如多柔比星或百日咳毒素)、荧光团如荧光染料如荧光素或罗丹明、用于成像性金属或放疗性金属的螯合剂、肽酰基或非肽酰基标记物或检测标签、或清除率调节剂如聚乙二醇的多种异构体、与第三组分结合的肽或者另一种碳水化合物或亲脂物质。

[0214] 白蛋白结合肽(ABP)序列(Dennis等人(2002)“Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins(作为一般策略用于改善蛋白质的药物代谢动力学的白蛋白结合作用).”J Biol Chem.277:35035-35043;WO 01/45746)也可以与具有改性交联剂的多特异性抗体或抗体类似物反应。示例性ABP序列在(i) Dennis等人(2002)J Biol Chem.277:35035-35043的表III和IV处,第35038页中;(ii) US 20040001827的[0076]SEQ ID NOS:9-22处;和(iii)WO 01/45746在第12-13页SEQ ID NOS: z1-z14处描述。

[0215] 诱变

[0216] 编码起始多肽的氨基酸序列变体的DNA由本领域已知的多种方法制备。这些方法

包括但不限于通过位点定向(或寡核苷酸介导)诱变、PCR诱变和盒诱变早期制备的编码所述多肽的DNA来制备。也可以通过限制性片段操作或通过采用合成性寡核苷酸的重叠延伸PCR,构建重组抗体的变体。诱变引物编码了半胱氨酸密码子替换。标准的诱变技术可以用来产生编码此类突变体半胱氨酸工程化抗体的DNA。一般指导可以在Sambrook等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 和Ausubel等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993中找到。

[0217] 位点定向诱变法是一种制备置换变体即突变体蛋白的方法。该技术是本领域熟知的(见例如, Carter (1985) 等人, *Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443; Ho等人, (1989) *Gene (Amst.)* 77:51-59; 和Kunkel等人 (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 82:488)。简而言之, 在实施DNA的位点定向诱变时, 首先通过编码所需突变的寡核苷酸与起始DNA的单链杂交, 改变这种起始DNA。在杂交后, 使用杂交的寡核苷酸作为引物并且使用起始DNA的单链作为模板, 用DNA聚合酶来合成完整的第二链。因而, 将编码所需突变的寡核苷酸掺入所得到的双链DNA中。位点定向诱变可以在表达质粒中表达待诱变蛋白质的基因内部实施, 并且所得到的质粒可以进行测序以证实导入合乎需要的半胱氨酸替换突变 (Liu等人, 1998) *J. Biol. Chem.* 273:20252-20260)。位点定向诱变的操作方案和模式包括那些市售操作方案和模式, 例如Quik**Change**®多重位点定向诱变试剂盒 (Stratagene, La Jolla, CA)。

[0218] PCR诱变也适于制造起始多肽的氨基酸序列变体。见Higuchi, (1990) *PCR Protocols*, 第177-183页, Academic Press; Ito等人 (1991) *Gene* 102:67-70; Bernhard等人 (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132; 和Vallette等人 (1989) *Nuc. Acids Res.* 17:723-733中。简而言之, 当使用少量模板DNA作为PCR中的起始材料时, 可以使用在序列方面与模板DNA中相应区域略微不同的引物以产生相对大的量的特定DNA片段, 所述特定DNA片段与模板序列仅在该引物与所述模板不同的位置处不同。

[0219] 用于制备变体的另一种方法即盒诱变法基于Wells等人 (1985) *Gene* 34:315-323描述的技术。起始材料是包含待突变的起始多肽DNA的质粒(或其他载体)。确定起始DNA中待突变的密码子。在确定的突变位点的每一侧必须有独特的限制性核酸内切酶位点。如果不存在此类限制性位点, 则可以通过这种方式产生它们: 使用上述的寡核苷酸诱变方法以在起始多肽DNA中的适宜位置导入此类限制性位点。将质粒DNA在这些位点处切割以使质粒线性化。使用标准方法合成这样的双链寡核苷酸, 其编码所述DNA在限制性位点之间的序列, 但是含有合乎需要的突变, 其中分别合成所述寡核苷酸的两条链并且随后使用标准技术使它们杂交在一起。这种双链寡核苷酸称作盒。这种盒设计为具有与线性化质粒的末端相容的5'和3'端, 从而它可以与该质粒直接连接。这种质粒现在含有突变的DNA序列。可以通过DNA测序证实含有所编码的半胱氨酸替换的突变体DNA。

[0220] 使用双链质粒DNA作为模板, 借助基于PCR的诱变, 还通过寡核苷酸定向诱变法产生单一突变 (Sambrook和Russel, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版; Zoller等人 (1983) *Methods Enzymol.* 100:468-500; Zoller, M.J. 和Smith, M. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10:6487-6500)。

[0221] 寡核苷酸由亚磷酰胺合成法制备 (US 4415732; US 4458066; Beaucage, S. 和Iyer, R. (1992) "Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite

approach (亚磷酰胺法合成寡核苷酸的进展)”, Tetrahedron 48:2223-2311)。亚磷酰胺方法能够轮换添加具有反应性3'亚磷酰胺部分的核苷酸单体单元至固相支持物上正在生长的寡核苷酸链,所述固相支持物由可控孔度玻璃或高度交联的聚苯乙烯组成,并且最常见地以3'端核苷在合成开始时与固相支持物连接的3'至5'方向添加(US 5047524;US 5262530)。该方法通常使用自动化市售合成仪(Applied Biosystems,Foster City,CA)实施。可以将寡核苷酸用非同位素部分以化学方式标记用于检测、捕获、稳定或其他目的(Andrus,A.“Chemical methods for 5'non-isotopic labeling of PCR probes and primers (用于5'非同位素标记PCR探针和引物的化学方法)”(1995),引自PCR 2:A Practical Approach,Oxford University Press,Oxford,第39-54页;Hermanson,G.引自Bioconjugate Techniques(1996)Academic Press,San Diego,第40-55,643-671页;Keller,G.和Manak,M.引自DNA Probes第2版(1993),Stockton Press,New York,第121-23页)。

[0222] 对抗体中反应性半胱氨酸基团的检测可以使用如美国专利公开号2007/0092940和Junutula,J.R.等人,J Immunol Methods 332(1-2):41-52(2008)中所述的ELISA噬菌体模式(PHESELECTOR[用于选择反应性巯基的噬菌体ELISA])来实施。

[0223] 蛋白质表达和纯化

[0224] 使用常规方法(例如,通过使用能够与编码鼠抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针),轻易地分离编码抗体或抗体片段的DNA。杂交瘤细胞可以充当此DNA的来源。一旦分离,可以将所述DNA置于表达载体中,随后将所述表达载体转染至不产生抗体蛋白的宿主细胞如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或其他哺乳动物宿主细胞如骨髓瘤细胞(美国专利号5,807,715;美国公开号2005/0048572和2004/0229310)中,以获得单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成。关于细菌中重组表达编码抗体的DNA的综述包括Skerra等人(1993)Curr.Opinion in Immunol.5:256-262和Plückthun(1992)Immunol.Revs.130:151-188。

[0225] 可以通过(i)在细菌系统(例如大肠杆菌)或哺乳动物细胞培养系统(WO 01/00245)例如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中表达;并且(ii)使用常见的蛋白质纯化技术(Lowman等人(1991)J.Biol.Chem.266(17):10982-10988)纯化,产生具有高度反应的非配对Cys残基的半胱氨酸工程化抗体(例如ThioFab)。

[0226] 示例性纯化方法包括:在免疫亲和层析柱或离子交换柱上分级、乙醇沉淀、反相HPLC、在二氧化硅或阳离子交换树脂(例如DEAE)上层析、聚焦层析、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀和例如使用Sephadex G-75的凝胶过滤。

[0227] 在一个方面,在固相上固定的蛋白A用于本发明全长抗体产物的免疫亲和纯化。蛋白A是来自黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的41kD胞壁蛋白,其以高亲和力与抗体的Fc区结合。Lindmark等人,(1983)J.Immunol.Meth.62:1-13。固定有蛋白A的固相优选地是包含玻璃或二氧化硅表面的柱,更优选地是可控孔度玻璃柱或硅胶柱。在一些应用中,所述柱已经用试剂如甘油涂敷,试图防止杂质的非特异性黏附。

[0228] 作为纯化的第一步骤,将源自如上文所述的细胞培养物的制备物施加到蛋白A固定的固相上,以允许目的抗体与蛋白A特异性结合。随后洗涤该固相以除去与固相非特异性结合的杂质。目的抗体可以通过洗脱入含有离液剂或温和洗涤剂的溶液从固相回收。示例

性离液剂和温和洗涤剂包括但不限于盐酸胍、脲、高氯酸锂、精氨酸、组氨酸、SDS(十二烷基硫酸钠)、吐温、Triton和NP-40,它们全部均是市售的。抗体从该柱(例如,mAbSure柱)洗脱后稀释至含有离液剂或温和洗涤剂的溶液中维持了洗脱后抗体的稳定性并且允许如本文所述的进一步操作。

[0229] 标记的多特异性抗体和抗体类似物

[0230] 本发明的多特异性抗体和抗体类似物,尤其是用具有游离硫氢基的改性交联剂合成的那些,可以与任何标记物部分缀合,所述标记物部分可以通过反应性半胱氨酸巯基与抗体共价连接(Singh等人(2002) *Anal. Biochem.* 304:147-15; Harlow E. 和 Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R. L. (1991) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 第2版 CRC Press, Boca Raton, FL)。连接的标记物可以发挥以下功能: (i) 提供可检测信号; (ii) 与第二标记物相互作用以调整第一或第二标记物提供的可检测信号,例如,以产生FRET(荧光共振能量转移); (iii) 稳定相互作用或增加与抗原或配体结合的亲和力; (iv) 通过电荷、疏水性、形状或其他物理参数影响迁移率例如电泳迁移率或细胞通透性,或(v) 提供捕获部分以调节配体亲和力,抗体/抗原结合作用或离子络合。

[0231] 标记的多特异性抗体可以用于诊断测定中,例如,用于检测特定细胞、组织或血清中目的抗原的表达。对于诊断性应用,抗体一般将用可检测的部分标记。众多标记物是可用的,它们通常可以划分成以下类别:

[0232] (a) 放射性同位素(放射性核素), ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{133}Xe 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 或 ^{213}Bi 。放射性同位素标记的抗体用于受体靶向的成像实验中。使用 *Current Protocols in Immunology*, 第1和第2卷, Coligen等人编著, Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991) 中所述的技术, 抗体可以用结合、螯合或络合了放射性同位素金属的配体试剂标记, 其中所述试剂与抗体的工程化半胱氨酸巯基反应。可以络合金属离子的螯合配体包括DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA和TETA (Macrocyclics, Dallas, TX)。放射性核素可以与本发明的抗体-药物缀合物络合被导引靶向(Wu等人(2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146)。

[0233] 合适作为成像实验用抗体标记物的金属-螯合物(Metal-chelate complexe)在以下文献中公开: 美国专利号5,342,606; 5,428,155; 5,316,757; 5,480,990; 5,462,725; 5,428,139; 5,385,893; 5,739,294; 5,750,660; 5,834,456; Hnatowich等人(1983) *J. Immunol. Methods* 65:147-157; Meares等人(1984) *Anal. Biochem.* 142:68-78; Mirzadeh等人(1990) *Bioconjugate Chem.* 1:59-65; Meares等人(1990) *J. Cancer, Suppl.* 10:21-26; Izard等人(1992) *Bioconjugate Chem.* 3:346-350; Nikula等人(1995) *Nucl. Med. Biol.* 22:387-90; Camera等人(1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:955-62; Kukis等人(1998) *J. Nucl. Med.* 39:2105-2110; Verel等人(2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Camera等人(1994) *J. Nucl. Med.* 21:640-646; Ruegg等人(1990) *Cancer Res.* 50:4221-4226; Verel等人(2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Lee等人(2001) *Cancer Res.* 61:4474-4482; Mitchell, 等人(2003) *J. Nucl. Med.* 44:1105-1112; Kobayashi等人(1999) *Bioconjugate Chem.* 10:103-111; Miederer等人(2004) *J. Nucl. Med.* 45:129-137; DeNardo等人(1998) *Clinical Cancer Research* 4:2483-90; Blend等人(2003) *Cancer Biotherapy&Radiopharmaceuticals* 18:

355-363; Nikula等人(1999) J. Nucl. Med. 40:166-76; Kobayashi等人(1998) J. Nucl. Med. 39:829-36; Mardirossian等人(1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74; Roselli等人(1999) Cancer Biotherapy&Radiopharmaceuticals, 14:209-20。

[0234] (b) 荧光标记物如稀土元素螯合物(钆螯合物)、荧光素型, 包括FITC、5-羧基荧光素、6-羧基荧光素; 罗丹明型, 包括TAMRA; 丹磺酰; 丽丝胺; 花菁; 藻红蛋白; 得克萨斯红; 及其类似物。荧光标记物可以使用在例如上文Current Protocols in Immunology中公开的技术与抗体缀合。荧光染料和荧光标记物试剂包括从Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) 和Pierce Biotechnology, Inc (Rockford, IL) 市售的那些。

[0235] (c) 多种酶-底物标记物是可获得的或公开的(美国专利号4,275,149)。酶通常催化生色底物的化学改变, 其中可以使用多种技术测量所述化学改变。例如, 酶可以催化底物中可以按分光光度形式测量的颜色变化。备选地, 酶可以改变底物的荧光或化学发光。上文描述了用于量化荧光变化的技术。化学发光底物因化学反应被电子激发并且可以随后发射(例如使用化学发光计)可测量的光或馈赠能量至荧光受体。酶标记物的实例包括萤光素酶(例如, 萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶; US 4737456)、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮、苹果酸脱氢酶、脲酶、过氧化物酶如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如, 葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。用于酶与抗体缀合的技术在O'Sullivan等人(1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay (制备用于酶免疫测定法中的酶缀合物的方法)", 引自Methods in Enzym. (J.Langone和H.Van Vunakis编著), Academic Press, New York, 73:147-166中描述。

[0236] 酶-底物组合的实例包括, 例如:

[0237] (i) 辣根过氧化物酶(HRP) 连同作为底物的过氧化氢酶, 其中所述过氧化氢酶氧化染料前体(例如, 邻苯二胺(OPD) 或3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(TMB));

[0238] (ii) 碱性磷酸酶(AP) 连同对硝基苯磷酸酯作为生色底物; 和

[0239] (iii) β -D-半乳糖苷酶(β -D-Gal) 连同生色底物(例如, 对硝基苯基- β -D-半乳糖苷酶) 或荧光底物4-甲基伞形基- β -D-半乳糖苷酶。

[0240] 众多其他酶-底物组合是本领域技术人员可获得的。对于一般综述, 见美国专利号4,275,149和4,318,980。

[0241] 标记物可以间接地与多特异性抗体或抗体类似物缀合。例如, 抗体可以与生物素缀合并且上文提到的三大类别标记物中任一者可以与抗生物素蛋白或链霉亲和素缀合, 或反之亦然。生物素选择性地与链霉亲和素结合, 并且因而标记物可以以这种间接方式与抗体缀合。备选地, 为实现标记物与多肽变体间接缀合, 多肽变体与小的半抗原(例如, 地高辛) 缀合并且上文提到的不同类型的标记物之一与抗半抗原多肽变体(例如, 抗地高辛抗体) 缀合。因而, 可以实现标记物与多肽变体的间接缀合(Hermanson, G. (1996), 引自Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego)。

[0242] 此类标记的多特异性抗体或标记的抗体类似物可以用于任何已知的测定法中, 如ELISA、竞争性结合测定法、直接和间接夹心测定法和免疫沉淀测定(Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 第147-158页, CRC Press, Inc.)。

[0243] 检测标记物可以用于定位、可视化和量化结合事件或识别事件。本发明的标记的多特异性抗体和标记的抗体类似物可以检测细胞表面受体。以可检测方式标记的抗体的另一个用途是基于珠的免疫捕获法,其包括将珠与荧光标记的抗体缀合并一旦结合配体则检测到荧光信号。类似的结合作用检测方法利用表面等离子体共振 (SPR) 效应以测量并检测抗体-抗原相互作用。

[0244] 检测标记物如荧光染料和化学发光染料 (Briggs等人 (1997) “Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids (官能化荧光染料的合成和它们与胺和氨基酸的偶联)”, J.Chem.Soc., Perkin-Trans.1: 1051-1058) 提供了可检测的信号,并且通常适用于标记抗体,一般具有以下特性: (i) 标记的抗体应当在低背景情况下产生极高信号,从而可以在无细胞和基于细胞的测定法中灵敏地检测到少量抗体;和 (ii) 标记的抗体应当是光稳定的,从而可以观察、监测和记录荧光信号,而没有明显的光漂白。对于涉及标记抗体与膜或细胞表面 (尤其活细胞) 的细胞表面结合作用的应用,标记物一般 (iii) 具有良好的水溶性以实现有效的缀合物浓度和检测灵敏度和 (iv) 对活细胞无毒,从而不破坏细胞的正常代谢过程或造成成熟前细胞死亡。

[0245] 直接定量细胞荧光强度和列举荧光标记事件,例如肽-染料缀合物的细胞表面结合可以在采用活细胞或珠的自动混合和读取、非放射性测定的系统 (**FMAT®** 8100HTS 系统, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) 上实施 (Miraglia, “Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology (使用荧光计量微体积分析技术高通量筛选的基于细胞和基于珠的均相测定法)”, (1999) J.of Biomolecular Screening 4:193-204)。标记抗体的用途还包括细胞表面受体结合测定、免疫捕获测定法、荧光关联的免疫吸附测定 (FLISA)、胱天蛋白酶切割测定法 (Zheng, “胱天蛋白酶-3 控制与 Fas 介导的体内凋亡相关的胞质事件和胞核事件”, (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:618-23; US 6372907)、凋亡测定法 (Vermes, “A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V (一种新的凋亡测定法: 使用荧光素标记的膜联蛋白 V 流式细胞检测早期凋亡细胞上的磷脂酰丝氨酸表达)”, (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51) 和细胞毒测定法。借助靶向细胞表面的分子, 荧光计量微体积测定技术可以用来鉴定上调或下调 (Swartzman, “A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology (使用荧光计量微体积分析技术高通量筛选的均相和多重免疫测定法)”, (1999) Anal. Biochem. 271:143-51)。

[0246] 本发明的标记的多特异性抗体和标记的抗体类似物被生物医学成像和分子成像的多种方法和技术用作成像用生物标记物和探针, 如: (i) MRI (磁共振成像术); (ii) MicroCT (计算机化断层X射线照相法); (iii) SPECT (单光子发射计算机化断层X射线照相法); (iv) PET (正电子发射断层照相术) Chen等人 (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49; (v) 生物发光; (vi) 荧光; 和 (vii) 超声波。免疫闪烁照相术是一种成像方法, 其中将放射性物质标记的抗体施用至动物或人患者并且拍摄身体内抗体存在的部位的画面 (US 6528624)。成像用生物标记物可以客观地测量并且作为正常生物学过程、发病过程或治疗性介入的药理学反应的指示物进行评价。生物标记物可以具有几个类型: 0 型是疾病的自然历史标记物并

且与已知的临床指标纵向相关,例如类风湿性关节炎中MRI评价滑膜炎;I型标记物根据作用机制捕获介入治疗的效果,即便该机制可能与临床结果不相关;II型标记充当替代终点,其中生物标记物的变化或来自生物标记的信号预测出“确认”靶向应答的临床益处,如类风湿性关节炎中由CT测量的骨侵蚀。成像用生物标记物因而可以提供关于以下方面的药物动力学(PD)治疗信息:(i)靶蛋白的表达、(ii)治疗药与靶蛋白的结合,即选择性、和(iii)清除率和半寿期药物代谢动力学数据。相对于基于标记物的生物标记物而言,体内成像用生物标记物的优点包括:非侵入性治疗、可定量、完整身体评估、反复给药和评估(即多个时间点)和从临床前结果(小动物)至临床结果(人)结果的潜在可转移效果。对于一些应用,生物成像法取代了临床前研究中的动物实验或使其数目最小化。

[0247] 放射性核素成像标记物包括放射性核素如 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{133}Xe 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 或 ^{213}Bi 。放射性核素金属离子可以与螯合接头如DOTA络合。接头试剂如DOTA-马来酰亚胺(4-马来酰亚氨基丁酰氨基苄基-DOTA)可以通过氨基苄基-DOTA与氯甲酸异丙酯(Aldrich)活化的4-马来酰亚氨基丁酸(Fluka)的反应,遵循Axworthy等人(2000)Proc Natl Acad Sci USA97(4):1802-1807)的方法来制备。DOTA-马来酰亚胺试剂与本发明的多特异性抗体或抗体类似物的改性交联剂的游离巯基反应并且产生在抗体上的金属络合配体(Lewis等人(1998)Bioconj.Chem.9:72-86)。螯合接头标记试剂如DOTA-NHS(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸单(N-羧琥珀酰亚胺酯)是市售的(大环类,Dallas,TX)。采用放射性核素标记抗体的受体靶成像法可以通过检测和量化抗体在肿瘤组织中进行性积累而提供途径活化的标记(Albert等人(1998)Bioorg.Med.Chem.Lett.8:1207-1210)。缀合的放射性金属可以在溶酶体降解后留在胞内。

[0248] 肽标记方法是熟知的。见Haugland,2003,Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals,Molecular Probes,Inc.;Brinkley,1992,Bioconjugate Chem.3:2;Garman,(1997)Non-Radioactive Labelling:A Practical Approach,Academic Press,London;Means(1990)Bioconjugate Chem.1:2;Glazer等人(1975)Chemical Modification of Proteins.Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology(T.S.Work和E.Work编著)American Elsevier Publishing Co.,New York;Lundblad,R.L.和Noyes,C.M.(1984)Chemical Reagents for Protein Modification,第I卷和第II卷,CRC Press,New York;Pfleiderer,G.(1985)“Chemical Modification of Proteins”,Modern Methods in Protein Chemistry,H.Tschesche编著,Walter DeGryter,Berlin and New York;和Wong(1991)Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking,CRC Press,Boca Raton,Fla.);De Leon-Rodriguez等人(2004)Chem.Eur.J.10:1149-1155;Lewis等人(2001)Bioconjugate Chem.12:320-324;Li等人(2002)Bioconjugate Chem.13:110-115;Mier等人(2005)Bioconjugate Chem.16:240-237。

[0249] 用足够接近的两个部分即荧光报道分子和猝灭剂标记的肽和蛋白质发生荧光共振能量转移(FRET)。报道分子基团一般是荧光染料,所述荧光染料由光在某些波长上激发并且将能量转移至受体或猝灭剂基团,伴随以最大亮度发射的适宜斯托克位移。荧光染料包括具有延长的芳香度的分子,如荧光素和罗丹明,及它们的衍生物。荧光报道分子可以部分地或明显地被完整肽中的猝灭剂部分猝灭。在所述肽由肽酶或蛋白酶裂解后,则可以测

量到荧光的可检测增加 (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes (蛋白裂解酶的荧光计量测定)", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248: 18-34)。

[0250] 本发明的标记的多特异性抗体和标记的抗体类似物也可以用作亲和纯化剂。在这种方法中,使用本领域熟知的方法,将标记的抗体固定在固相如Sephadex树脂或滤纸上。固定抗体与含有待纯化抗原的样品接触,并且支持物此后用将除去样品中除待纯化抗原之外的基本上全部物质的合适溶剂洗涤,其中所述的待纯化抗原与固定的多肽变体结合。最后,支持物用另一种将使抗原从多肽变体中释放的合适溶剂如甘氨酸缓冲液, pH5.0洗涤。

[0251] 标记试剂一般地携带反应性官能团,其可以 (i) 与改性交联剂的游离硫氢基直接反应以形成标记的多特异性抗体或标记的抗体类似物或 (ii) 与接头抗体反应以形成标记的抗体。标记试剂的反应性官能团包括:马来酰亚胺、卤代乙酰基、碘乙酰胺琥珀酰亚胺酯(例如NHS、N-羟琥珀酰亚胺)、异硫氰酸酯、磺酰氯、2,6-二氯三嗪基、五氟苯基酯和亚磷酰胺,不过也可以使用其他官能团。

[0252] 示例的反应性官能团是可检测标记物例如生物素或荧光染料的羧基取代基的N-羟琥珀酰亚胺酯(NHS)。标记物的NHS酯可以预形成、分离、纯化和/或表征,或它可以原位形成并且与抗体的亲核基团反应。一般,通过以下方式活化标记物的羧基形式:与碳二亚胺试剂(例如二环己基碳二亚胺、二异丙基碳二亚胺)或脲试剂(例如TSTU (O-(N-琥珀酰亚氨基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐)、HBTU (O-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐)或HATU (O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐)、活化剂(如1-羟基苯并三唑(HOBt)和N-羟基琥珀酰亚胺)的一些组合反应以产生标记物的NHS酯。在一些情况下,可以通过以下方式偶联标记物和抗体:原位活化标记物并且与抗体反应以在一个步骤中形成标记物缀合物。其他活化和偶联试剂包括TBTU (2-(1H-苯并三唑)-1-基-1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐)、TFFH (N,N',N'',N'''-四甲基脲2-氟-六氟磷酸盐)、PyBOP (苯并三唑-1-基-氧基-三吡咯烷基-磷六氟磷酸盐)、EEDQ (2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢-喹啉)、DCC (二环己基碳二亚胺);DIPCDI (二异丙基碳二亚胺)、MSNT (1-(1,3,5-三甲基苯-2-磺酰)-3-硝基-1H-1,2,4-三唑和芳基磺酰卤例如三异丙基苯磺酰氯。

[0253] 含有白蛋白结合肽(ABP)的多特异性抗体和抗体类似物

[0254] 血浆蛋白结合可以是改善短寿命分子的药物代谢动力学特性的有效手段。白蛋白是血浆中最丰富的蛋白质。血清白蛋白结合肽(ABP)可以改变融合活性结构域蛋白质的药物动力学,包括改变组织摄入、渗透和扩散。这些药物动力学参数可以通过特别选择适宜的血清白蛋白结合肽序列予以调节(美国专利公开号20040001827)。一系列白蛋白结合肽由噬菌体展示筛选法鉴定(Dennis等人(2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins (作为一般策略用于改善蛋白质的药物代谢动力学的白蛋白结合作用)" *J Biol Chem.* 277:35035-35043; WO 01/45746)。本发明的化合物包含由 (i) Dennis等人(2002) *J Biol Chem.* 277:35035-35043的表III和IV处,第35038页中; (ii) US 20040001827的[0076] SEQ ID NOS:9-22处;和 (iii) WO 01/45746在第12-13页SEQ ID NOS:z1-z14处教导的ABP序列。

[0255] 通过马来酰亚氨基-ABP与含有改性交联剂的多特异性抗体或抗体类似物反应,合

成含有白蛋白结合肽 (ABP) 的多特异性抗体,其中所述改性交联剂携带游离硫氢基。

[0256] 示例性白蛋白结合肽序列包括但不限于SEQ ID NOS:23-27中所列的氨基酸序列:

[0257] CDKTHTGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO:23

[0258] QRLMEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO:24

[0259] QRLIEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO:25

[0260] RLIEDICLPRWGCLWEDD SEQ ID NO:26

[0261] DICLPRWGCLW SEQ ID NO:27

[0262] 白蛋白结合肽 (ABP) 序列以 $K_d(\text{兔}) = 0.3\mu\text{M}$ 结合来自多个物种 (小鼠、大鼠、兔、牛、猕猴、狒狒和人) 的白蛋白。白蛋白结合肽不与已知结合白蛋白并且在兔中具有2.3小时半寿期 ($T^{1/2}$) 的配体竞争。

[0263] 药物缀合物

[0264] 本发明的多特异性抗体和抗体类似物,尤其是用具有游离硫氢基的改性交联剂合成的那些,可以与治疗剂即药物部分缀合,所述治疗剂可以通过反应性硫氢基与抗体共价连接。

[0265] 抗体-药物缀合 (ADC) 化合物的示例性实施方案包含多特异性抗体或抗体类似物 (每一者以下讨论中称作Ab) 和药物部分 (D),其中所述多特异性抗体或抗体类似物已经用具有游离硫氢基 (L) 的改性交联剂合成并且该抗体经游离硫氢基与D连接;所述组合物具有式I:

[0266] $\text{Ab}-(\text{L}-\text{D})_p$ I

[0267] 其中p是1、2、3或4。可以经巯基反应性接头部分与多特异性抗体或抗体类似物缀合的药物部分的数目受通过本文所述方法导入的反应性巯基的数目限制。

[0268] 抗体-药物缀合化合物 (ADC) 的另一个示例性实施方案包含多特异性抗体或抗体类似物 (Ab)、白蛋白结合肽 (ABP) 和药物部分 (D),其中抗体通过接头部分 (L) 与药物部分连接并且抗体通过酰胺键或第二接头部分与白蛋白结合肽连接;所述组合物具有式Ia:

[0269] $\text{ABP}-\text{Ab}-(\text{L}-\text{D})_p$ Ia

[0270] 其中p是1、2、3或4。

[0271] 本发明的ADC化合物包括具有抗癌活性的那些ADC化合物。具体而言,所述化合物包含通过接头与药物部分即毒素缀合即共价连接的抗体。当药物不与抗体缀合时,该药物具有细胞毒作用或抑制细胞作用。药物部分的生物学活性因而受与抗体的缀合作用调节。本发明的多特异性抗体-药物缀合物和抗体类似物-药物缀合物 (ADC) 选择性地递送有效剂量的细胞毒性剂至肿瘤组织,因而可以实现更大的选择性,即更低的有效剂量。

[0272] 在一个实施方案中,在哺乳动物中,本发明的ADC或ADC的胞内代谢物的生物利用率与包含所述ADC的药物部分并且缺少抗体组分的药物化合物相比时改进。另外,在哺乳动物中,所述ADC或ADC的胞内代谢物的生物利用率与缺少药物部分的ADC的抗体组分相比时改进。

[0273] 药物部分

[0274] 抗体-药物缀合物 (ADC) 的药物部分 (D) 包括具有细胞毒作用或抑制细胞作用的任何化合物、部分或基团。药物部分包括: (i) 可以充当微管蛋白抑制剂、有丝分裂抑制剂、拓扑异构酶抑制剂或DNA嵌入剂的化疗药; (ii) 可以以酶促方式发挥作用的蛋白质毒素;和

(iii) 放射性同位素。

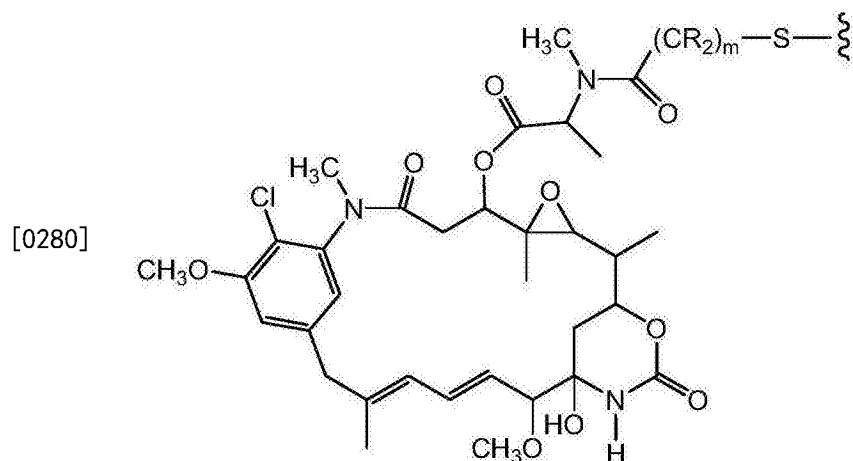
[0275] 示例性药物部分包括但不限于美坦生类、澳瑞司他汀 (auristatin)、多拉司他汀、单端孢霉烯族化合物、CC1065、刺孢霉素和其他烯二炔类抗生素、紫杉烷、蒽环类及其立体异构体、电子等排体、类似物或衍生物。

[0276] 适合用作美坦生类药物部分的美坦生化合物是本领域熟知的,并且可以根据已知的方法从天然来源分离,使用基因工程技术产生(见Yu等人(2002) Proc. NAT. Acad. SCI. (USA) 99:7968-7973),或根据已知方法合成地制备美登醇和美登醇类似物。

[0277] 示例的美坦生类药物部分包括具有修饰的芳香族环的那些,如:C-19-脱氯(US 4256746)(通过氢化锂铝还原美登木素(ansamycin) P2而制备);C-20-羟基(或C-20-去甲)+/-C-19-脱氯(美国专利号4361650和4307016)(使用链霉菌(*Streptomyces*)或放线菌(*Actinomyces*)去甲基化或使用LAH脱氯而制备);和C-20-去甲氧基,C-20-酰氧基(-OCOR)、+/-脱氯(美国专利号4,294,757)(使用酰氯酰化而制备)和在其他位置处具有修饰的那些。

[0278] 示例的美坦生类药物部分还包括具有修饰的那些,如:C-9-SH(美国专利号4,424,219)(美登醇与H₂S或P₂S₅反应而制备);C-14-烷氧甲基(去甲氧基/CH₂OR)(US4331598);C-14-(羟甲基)或酰氧甲基(CH₂OH或CH₂OAc)(美国专利号4,450,254)(从诺卡氏菌(*Nocardia*)制备);C-15-羟基/酰氧基(美国专利号4,364,866)(通过链霉菌转化美登醇而制备);C-15-甲氧基(美国专利号4,313,946和4,315,929)(从*Trewia nudiflora*分离);C-18-N-去甲(美国专利号4,362,663和4,322,348)(美登醇由链霉菌去甲基化而制备)和4,5-脱氧(U.S. 4,371,533)(通过三氯化钛/LAH还原美登醇而制备)。取决于连接的类型,美坦生化合物上的多个位置已知可用作连接位置。例如,为形成酯键,具有羟基的C-3位置,用羟甲基修饰的C-14位置、用羟基修饰的C-15位置和具有羟基的C-20位置均是合适的。

[0279] 式I的抗体-药物缀合物(ADC)的药物部分(D)包括具有以下结构的美坦生类化合物:

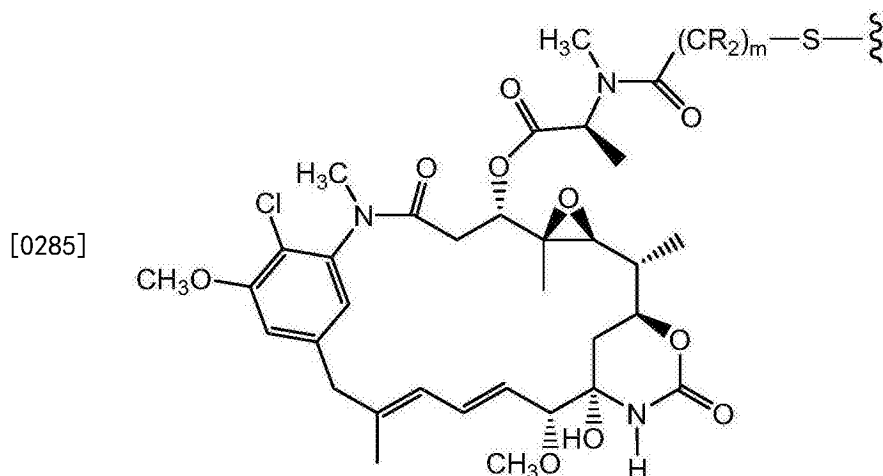


[0281] 其中波浪线表示D的硫原子与抗体-药物缀合物(ADC)的接头(L)共价连接。R可以独立地是H或C₁-C₆烷基,C₁-C₆烷基选自甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-甲基-1-丙基、2-丁基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、和3,3-二甲基-2-丁基。使酰胺基团与硫原子连接的亚烷基链可以是甲基、乙基或丙基,即,m是1、2或3。

[0282] 通过抑制微管蛋白质即微管蛋白(tubulin)聚合而抑制有丝分裂期间微管形成,美坦生化合物抑制细胞增殖(Remillard等人(1975) Science189:1002-1005)。美坦生和美坦生类具有高度细胞毒性,但是它们在癌症治疗中的临床使用已经因其严重全身性副作用而大大受限,这主要归咎于它们对肿瘤的低劣选择性。采用美坦生的临床试验已经由于对中枢神经系统和胃肠系统造成严重副作用而中止(Isse1等人(1978) Can.Treatment.Rev.5:199-207)。

[0283] 美坦生类药物部分是抗体-药物缀合物中有吸引力的药物部分,因为它们:(i) 相对容易通过发酵或化学修饰、衍生化发酵产物来制备,(ii) 适合于采用适合经非二硫键接头与抗体缀合的官能团衍生化,(iii) 在血浆中稳定,和(iv) 有效对抗多个肿瘤细胞系(US 2005/0169933;WO 2005/037992;美国专利号5,208,020)。

[0284] 对于其他药物部分,将美坦生类药物部分的全部立体异构体构思为本发明的化合物,即,在D的手性碳处R和S构型的任何组合。在一个实施方案中,美坦生类药物部分(D)将具有以下立体化学:



[0286] 美坦生类药物部分的示例性实施方案包括:DM1, $(CR_2)_m = CH_2CH_2$; DM3, $(CR_2)_m = CH_2CH_2CH(CH_3)$; 和DM4, $(CR_2)_m = CH_2CH_2C(CH_3)_2$,其具有结构:

[0287] 错误!不能通过编辑域代码创建对象。

[0288] 错误!不能通过编辑域代码创建对象。

[0289] 错误!不能通过编辑域代码创建对象。

[0290] 取决于连接的类型,接头可以在多个位置与美坦生类分子连接。例如,酯键接可以通过使用常规偶联技术与羟基反应而形成。该反应可以在具有羟基的C-3位置,用羟甲基修饰的C-14位置、用羟基修饰的C-15位置和具有羟基的C-20位置处进行。在优选的实施方案中,该键接在美登醇或美登醇类似物的C-3位置处形成。

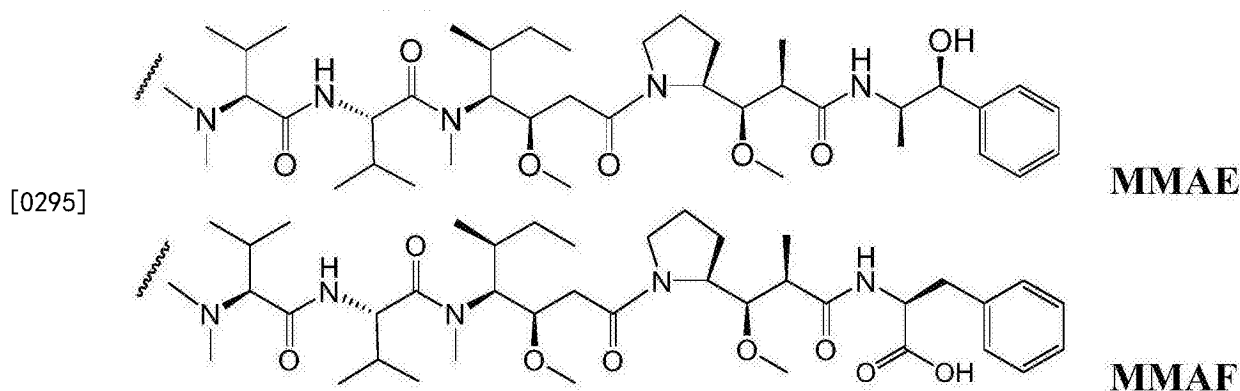
[0291] 式I的抗体-药物缀合物(ADC)的药物部分(D)包括多拉司他汀和它们的肽状类似物和衍生物澳瑞司他汀(美国专利号5,635,483;5,780,588)。已经显示多拉司他汀和澳瑞司他汀干扰微管动力学、GTP水解以及胞核和细胞分裂(Woyke等人(2001) Antimicrob.Agents and Chemother.45(12):3580-3584)并且具有抗癌活性(美国专利号5,663,149)和抗真菌药活性(Pettit等人(1998) Antimicrob.Agents Chemother.42:2961-2965)。多种形式的多拉司他汀或澳瑞司他汀药物部分可以经肽状药物部分的N(氨基)端或C(羧基)端与抗体共价连接(WO 02/088172;Doronina等人(2003) Nature Biotechnology

21 (7):778-784;Francisco等人(2003)Blood102(4):1458-1465)。

[0292] 药物部分包括多拉司他汀、澳瑞司他汀(美国专利号5,635,483;5,780,588;5,767,237;6,124,431)及其类似物和衍生物。已经显示多拉司他汀和澳瑞司他汀干扰微管动力学、GTP水解以及胞核和细胞分裂(Woyke等人(2001)Antimicrob.Agents and Chemother.45(12):3580-3584)并且具有抗癌活性(美国专利号5663149)和抗真菌药活性(Pettit等人(1998)Antimicrob.Agents Chemother.42:2961-2965)。多拉司他汀或澳瑞司他汀药物部分可以经肽状药物部分的N(氨基)端或C(羧基)端与抗体连接(W002/088172)。

[0293] 示例性澳瑞司他汀实施方案包括N端连接的单甲基澳瑞司他汀药物部分DE和DF,它们在W0 2005/081711;2004年3月28发表的Senter等人,Proceedings of the American Association for Cancer Research,第45卷,摘要编号623中公开。

[0294] 式I的抗体-药物缀合物(ADC)的药物部分(D)包括经N端与抗体连接并具有以下结构的单甲基澳瑞司他汀药物部分MMAE和MMAF:



[0296] 一般,基于肽的药物部分可以通过在两个或更多个氨基酸和/或肽片段之间形成肽键而制备。此类肽键可以例如根据肽化学领域熟知的液相合成方法制备(见E. Schröder和K.Lübke,“The Peptides”,第1卷,第76-136页,1965,Academic Press)。

[0297] 所述药物部分包括刺孢霉素及其类似物和其衍生物。抗生素的刺孢霉素家族能够以亚皮摩尔浓度引起双链DNA断裂。对于制备刺孢霉素家族的缀合物,见美国专利号5,712,374;5,714,586;5,739,116;5,767,285;5,770,701,5,770,710;5,773,001;5,877,296。可以使用的刺孢霉素的结构类似物包括但不限于 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙酰基- γ_1^I 、PSAG和 θ^I_1 (Hinman等人Cancer Research 53:3336-3342(1993),Lode等人Cancer Research58:2925-2928(1998))。

[0298] 蛋白质毒素包括白喉A链,白喉毒素的无结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒蛋白A链(Vitetta等人(1987)Science,238:1098)、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒蛋白A链、 α -帚曲菌素、油桐(Aleurites fordii)蛋白、香石竹毒蛋白、垂序商陆(Phytolaca americana)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制剂、多花白树毒蛋白、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯族类化合物(WO 93/21232)。

[0299] 治疗性放射性同位素包括: ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{153}Sm 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 和Lu的放射性同位素。

[0300] 放射性同位素或其他标记物可以按已知方式掺入缀合物中(Fraker等人(1978)Biochem Biophys Res Commun.80:49-57;“Monoclonal Antibodies in

Immunoscintigraphy" Chatal, CRC Press 1989)。碳-14-标记的1-异硫氰酸根合苄基-3-甲基二乙三胺五乙酸(MX-DTPA)是将放射性核素与抗体缀合的示例性螯合剂(W094/11026)。

[0301] 接头

[0302] “接头”(L)是可以用来连接一个或多个药物部分(D)和抗体单元(Ab)以形成式I的多特异性抗体-药物缀合物或抗体类似物-药物缀合物(ADC)的双功能或多功能部分。可以使用具有与药物并与Ab结合的反应性官能团的接头便利地制备ADC。Ab可以与接头试剂、药物部分或药物-接头中间体的官能团形成键。

[0303] 在一个方面,接头具有反应位点,所述反应位点具有与抗体或抗体片段上存在的亲核半胱氨酸反应的亲电基团。抗体或抗体片段的半胱氨酸巯基与接头上的亲电基团反应并且与接头形成共价键。有用的亲电基团包括但不限于马来酰亚胺和卤代乙酰胺基团。

[0304] 根据在Klussman等人(2004), Bioconjugate Chemistry 15 (4):765-773的第766页处的缀合方法和根据实施例中描述的方法,半胱氨酸工程化的抗体或抗体片段与带有亲电官能团(如马来酰亚胺或 α -卤代羰基)的接头试剂或药物-接头中间体反应。

[0305] 在一个实施方案中,ADC的接头L具有以下式:

[0306] $-A_a-W_w-Y_y-$

[0307] 其中:

[0308] -A-是与抗体(Ab)的半胱氨酸巯基共价连接的伸张(Stretcher)单元;

[0309] a是0或1;

[0310] 每个-W-独立地是氨基酸单元;

[0311] w独立地是范围从0至12的整数;

[0312] -Y-是与药物部分共价连接的间隔单元;并且

[0313] y是0、1或2。

[0314] 伸张单元

[0315] 当存在时,伸张单元(-A-)能够将抗体单元连接至氨基酸单元(-W-)。在这个方面,抗体(Ab)具有可以与伸张单元的亲电官能团形成键的游离半胱氨酸巯基或其他游离巯基。这个实施方案的代表性伸张单元在式IIIa和IIIb的方括号内描述,其中Ab-、-W-、-Y-、-D、w和y如上文定义,并且 R^{17} 是二价基团,选自 $(CH_2)_r$ 、 C_3 - C_8 碳环基、 $O-(CH_2)_r$ 、亚芳基、 $(CH_2)_r$ -亚芳基、-亚芳基- $(CH_2)_r$ -、 $(CH_2)_r$ -(C_3 - C_8 碳环基)、(C_3 - C_8 碳环基)- $(CH_2)_r$ 、 C_3 - C_8 杂环基、 $(CH_2)_r$ -(C_3 - C_8 杂环基)、-(C_3 - C_8 杂环基)- $(CH_2)_r$ -、-(CH_2) $_r$ C(O)NR^b(CH₂) $_r$ -、-(CH₂CH₂O) $_r$ -、-(CH₂CH₂O) $_r$ -CH₂-、-(CH₂) $_r$ C(O)NR^b(CH₂CH₂O) $_r$ -、-(CH₂) $_r$ C(O)NR^b(CH₂CH₂O) $_r$ -CH₂-、-(CH₂CH₂O) $_r$ C(O)NR^b(CH₂CH₂O) $_r$ -、-(CH₂CH₂O) $_r$ C(O)NR^b(CH₂CH₂O) $_r$ -CH₂-和-(CH₂CH₂O) $_r$ C(O)NR^b(CH₂) $_r$ -;其中R^b是H、 C_1 - C_6 烷基、苯基或苄基;并且r独立地是范围从1-10的整数。

[0316] 亚芳基包括6-20个碳原子的二价芳烃基团,其源自从亲本芳香环系统移除两个氢原子。常见的亚芳基包括但不限于源自苯、取代苯、萘、蒽、联苯基等的基团。

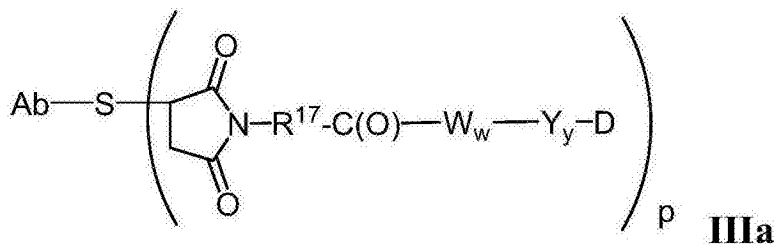
[0317] 杂环基包括其中一个或多个环原子是杂原子(例如氮、氧和硫)的环系统。杂环基团包含1至20个碳原子和1至3个选自N、O、P和S的杂原子。杂环可以是具有3至7个环成员(2至6个碳原子和1至3个选自N、O、P和S的杂原子)的单环或具有7至10个环成员(4至9个碳原子和1至3个选自N、O、P和S的杂原子)的双环,例如,双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系统。在Paquette、Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin,

New York, 1968), 尤其第1、3、4、6、7和9章; “The Chemistry of Heterocyclic Compounds,” (John Wiley & Sons, New York, 1950至今), 尤其第13、14、16、19和28卷; 和 J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566中描述中的杂环。

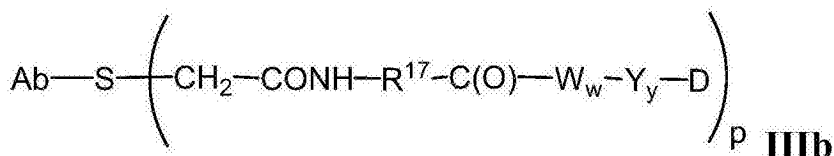
[0318] 杂环的实例例如包括并且不限于吡啶基、二氢吡啶基、四氢吡啶基(哌啶基)、噻唑基、四氢噻吩基、硫氧化的四氢噻吩基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯并呋喃基、硫茛基、吲哚基、吲哚烯基(indolenyl)、喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、哌啶基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、2-吡咯烷酮基、吡咯啉基、四氢呋喃基、双四氢呋喃基、四氢吡喃基、双四氢吡喃基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、八氢异喹啉基、吡辛基(azocinyl)、三嗪基、6H-1,2,5-噻二嗪基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、噻吩基、噻蒎基、吡喃基、异苯并呋喃基、色烯基、咕吨基、酚黄素基(phenoxathinyl)、2H-吡咯基、异噻唑基、异噻唑基、吡嗪基、哒嗪基、吡嗪基、异吡嗪基、3H-吡嗪基、1H-吡嗪基、嘌呤基、4H-喹啉基、酞嗪基、茶啶基、喹啉基、喹啉基、噌啉基、蝶啶基、4Ah-咪唑基、咪唑基、β-咪唑基、菲啶基、吡啶基、嘧啶基、菲咯啉基、吩嗪基、吩噻嗪基、呋喃基、吩噻嗪基、异色满基(isochromanyl)、色满基(chromanyl)、咪唑烷基、咪唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、哌嗪基、二氢吡嗪基、异二氢吡嗪基、奎宁环基、吗啉基、噻唑烷基、苯并三唑基、苯并异噻唑基、羟吡啶基、苯并噻唑啉基和靛红酰基(isatinoyl)。

[0319] 碳环基包括作为单环具有3至7个碳原子或作为双环具有7至12个碳原子的饱和或不饱和环。单环碳环具有3至6个环原子, 仍更典型具有5或6个环原子。双环碳环具有7-12个环原子, 例如排列为双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系统; 或9或10个环原子, 排列为双环[5,6]或[6,6]系统。单环碳环的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、1-环戊-1-烯基、1-环戊-2-烯基、1-环戊-3-烯基、环己基、1-环己-1-烯基、1-环己-2-烯基、1-环己-3-烯基、环庚基和环辛基。

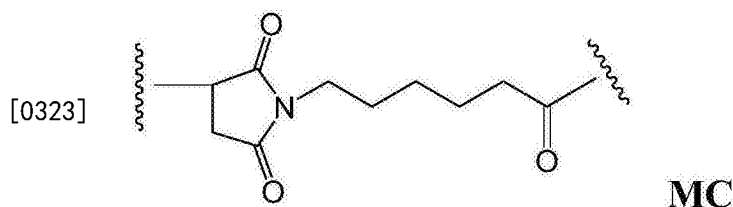
[0320] 从式I ADC的全部示例性实施方案如III-VI中应当理解, 即便没有明确指出, 根据反应性巯基的数目, 1至4个药物部分与抗体(p=1-4)连接。



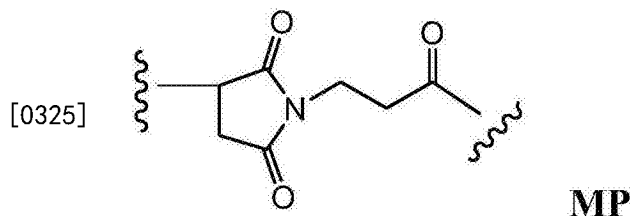
[0321]



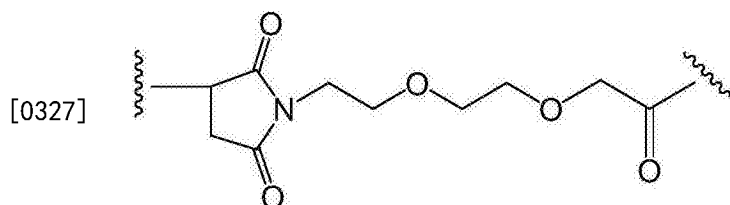
[0322] 一个说明性伸张单元是式IIIa的伸张单元, 并且源自马来酰亚氨基-己酰基(MC), 其中R¹⁷是-(CH₂)₅-:



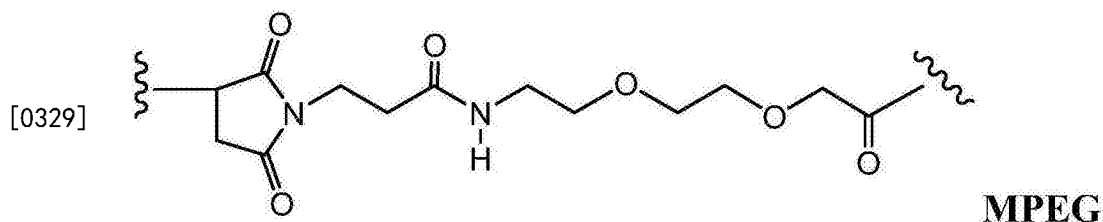
[0324] 一个说明性伸张单元是式IIIa的伸张单元,并且源自马来酰亚氨基-丙酰基(MP),其中 R^{17} 是 $-(CH_2)_2-$:



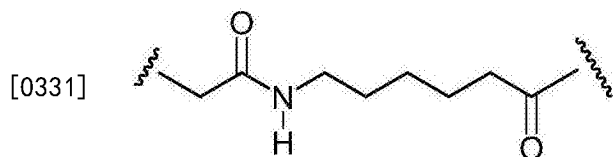
[0326] 另一个说明性伸张单元是式IIIa的伸张单元,其中 R^{17} 是 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 并且 r 是2:



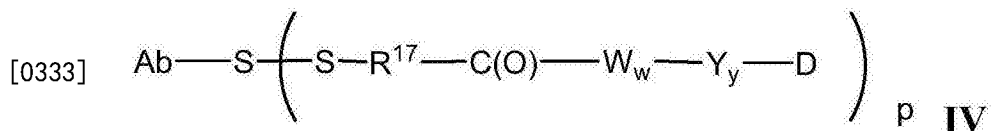
[0328] 另一个说明性伸张单元是式IIIa的伸张单元,其中 R^{17} 是 $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$,其中 R^b 是H并且每个 r 是2:



[0330] 另一个说明性伸张单元是式IIIb的伸张单元,并且其中 R^{17} 是 $-(CH_2)_5-$:

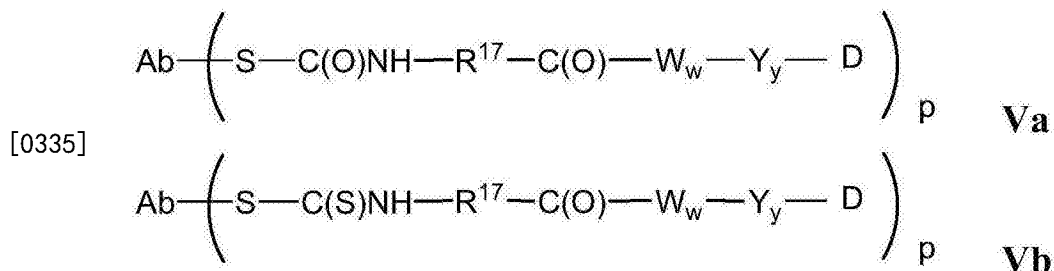


[0332] 在另一个实施方案中,伸张单元经抗体单元的硫原子和伸张单元的硫原子之间的二硫键与抗体单元连接。这个实施方案的代表性伸张单元在式IV的方括号内描述,其中 R^{17} 、Ab-、-W-、-Y-、-D、w和y如上文定义。



[0334] 在又一个实施方案中,伸张单元的反应基团含有可以与抗体的游离半胱氨酸巯基或其他游离巯基形成键的巯基反应性官能团。巯基反应性官能团的实例包括但不限于马来酰亚胺、 α -卤代乙酰基、活化酯如琥珀酰亚胺酯、4-硝基苯酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯、酞、酸

性氯化物、磺酰氯、异氰酸酯和异硫氰酸酯。这个实施方案的代表性伸张单元在式Va和Vb的方括号内描述,其中 $-R^{17}-$ 、 $-Ab-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D-$ 、 w 和 y 如上文定义。

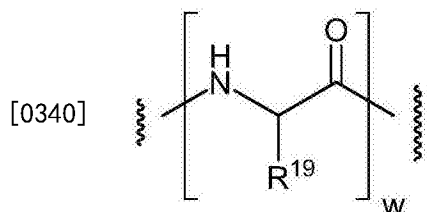


[0336] 在另一个实施方案中,接头可以是用于超过一个药物部分经分枝的多功能接头部分与抗体共价结合的树枝型接头(Sun等人(2002) *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215;Sun等人(2003) *Bioorganic&Medicinal Chemistry* 11:1761-1768;King(2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990)。树枝状接头可以增加药物对抗体的摩尔比,即,载量,这与ADC的效力相关。因而,在半胱氨酸工程化抗体仅携带一个反应性半胱氨酸巯基的情况下,可以通过树枝状接头连接多个药物部分。

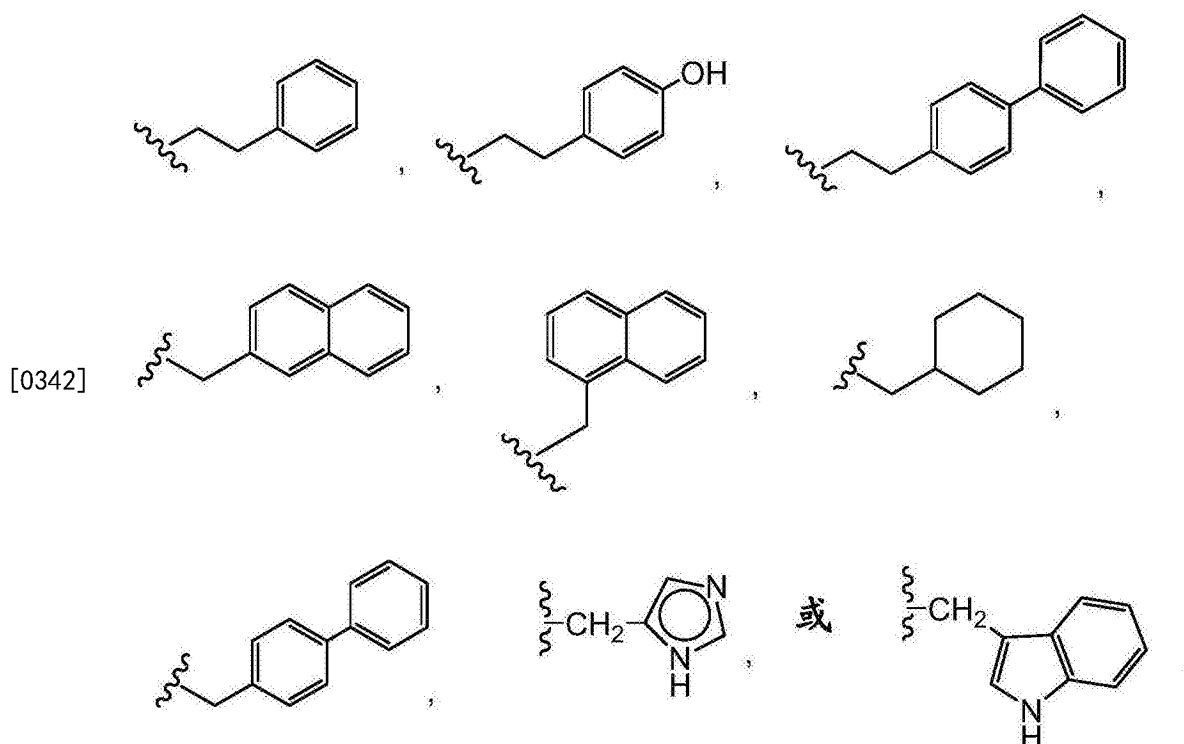
[0337] 氨基酸单元

[0338] 接头可以包含氨基酸残基。当存在时,氨基酸单元($-W_w-$)将抗体(Ab)与本发明的抗体-药物缀合物(ADC)的药物部分(D)连接。

[0339] $-W_w-$ 是二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元。包含氨基酸单元的氨基酸残基包括天然存在的那些以及稀少氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物,如瓜氨酸。每个 $-W-$ 单元独立地具有下文在方括号中所指的式,和 w 是范围从0至12的整数。



[0341] 其中 R^{19} 是氢、甲基、异丙基、异丁基、仲丁基、苄基、对羟苄基、 $-CH_2OH$ 、 $-CH(OH)CH_3$ 、 $-CH_2CH_2SCH_3$ 、 $-CH_2CONH_2$ 、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CONH_2$ 、 $-CH_2CH_2COOH$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=O)CH_3$ 、 $-(CH_2)_3NHCHO$ 、 $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_4NH_2$ 、 $-(CH_2)_4NHC(=O)CH_3$ 、 $-(CH_2)_4NHCHO$ 、 $-(CH_2)_3NHCONH_2$ 、 $-(CH_2)_4NHCONH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$ 、2-吡啶基甲基、3-吡啶基甲基、4-吡啶基甲基、苯基、环己基。



[0343] 氨基酸单元可以被一种或多种酶(包括肿瘤相关蛋白酶)酶促地切割,以释放药物部分(-D),在一个实施方案中一旦释放,则所述药物部分在体内质子化以提供药物(D)。

[0344] 有用的 $-W_w-$ 单元可以在它们被特定酶(例如肿瘤相关蛋白酶)酶促裂解的选择性方面设计和优化。在一个实施方案中, $-W_w-$ 单元是由组织蛋白酶B、C和D或纤溶酶催化其裂解的单元。

[0345] 示例性 $-W_w-$ 氨基酸单元包括二肽、三肽、四肽或五肽。示例性二肽包括:缬氨酸-瓜氨酸(vc或val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(af或ala-phe)。示例性三肽包括:甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。

[0346] 当 R^{19} 不是氢时,与 R^{19} 连接的碳原子是手性的。与 R^{19} 连接的每个碳原子独立地为(S)或(R)构型或是消旋混合物。氨基酸单元因而可以是对映体纯的,消旋的或立体异构的。

[0347] 间隔单元

[0348] 当存在的($y=1$ 或 2)时,间隔单元($-Y_y-$)将氨基酸单元($-W_w-$)连接至药物部分(D),此时存在氨基酸单元($w=1-12$)。备选地,当氨基酸单元不存在时,间隔单元将伸张单元连接至药物部分。当氨基酸单元和伸张单元均不存在时($w, y=0$),间隔单元还将药物部分连接至抗体单元。间隔单元具有两个通用类型:自脱落型(self-immolative)和非自脱落型(non self-immolative)。非自脱落型间隔单元是这样的间隔单元,其中在氨基酸单元自抗体-药物缀合物或药物部分-接头中切下后、尤其酶促切下后,间隔单元的部分或全部仍与药物部分结合。当含有甘氨酸-甘氨酸间隔单元或甘氨酸间隔单元的ADC经历肿瘤细胞相关蛋白酶、癌细胞相关蛋白酶或淋巴细胞相关蛋白酶的酶促裂解切割时,从Ab-Aa- W_w -中切下甘氨酸-甘氨酸药物部分或甘氨酸-药物部分。在一个实施方案中,独立的水解反应在靶细胞内部发生,从而切割甘氨酸-药物部分的键并且释放药物。

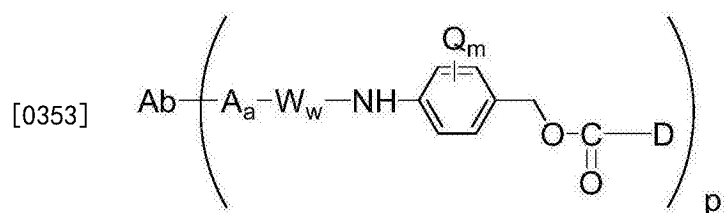
[0349] 在另一个实施方案中, $-Y_y-$ 是对氨基苄基氨基甲酰基(PAB)单元(见方案2和3),所述单元的亚苄基部分被 Q_m 取代,其中Q是 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、-卤素、-硝基或-氰基;

并且m是范围从0-4的整数。

[0350] 非自脱落型间隔单元(-Y-)的示例性实施方案是:-Gly-Gly-;-Gly-;-Ala-Phe-;-Val-Cit-。

[0351] 在一个实施方案中,提供了间隔单元不存在(y=0)的药物部分-接头或ADC或其可药用盐或溶剂化物。

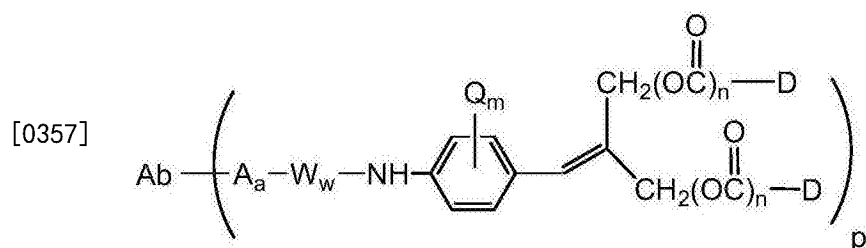
[0352] 备选地,含有自脱落型间隔单元的ADC可以释放-D。在一个实施方案中,-Y-是PAB基团,所述PAB基团经PAB基团的氨基氮原子与-W_w-连接并且经碳酸酯、氨基甲酸酯或醚基团与-D直接连接,其中所述ADC具有示例性结构:



[0354] 其中Q是-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-卤素、-硝基或-氰基;m是范围从0-4的整数;并且p是1-4。

[0355] 自脱落型间隔物的其他实例包括但不限于在电子上与PAB基团相似的芳香族化合物如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人(1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)和邻氨基苄基乙缩醛或对氨基苄基乙缩醛。可以使用当酰胺键水解时发生环化的间隔物,如取代和未取代的4-氨基丁酸酰胺(Rodrigues等人(1995) Chemistry Biology 2:223)、适度取代的双环[2.2.1]和双环[2.2.2]环系统(Storm等人(1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815)和2-氨基苯基丙酸酰胺(Amsberry, 等人(1990) J. Org. Chem. 55:5867)。消除在甘氨酸处取代的含胺药物(Kingsbury等人(1984) J. Med. Chem. 27:1447)也是用于ADC中的自脱落型间隔物的实例。

[0356] 在一个实施方案中,间隔单元是可以用来掺入和释放多种药物的分枝的双(羟甲基)苯乙烯(BHMS),其具有以下结构:



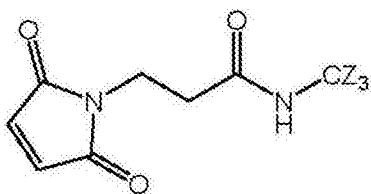
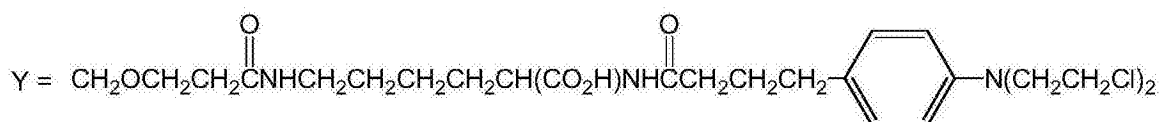
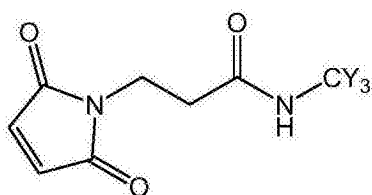
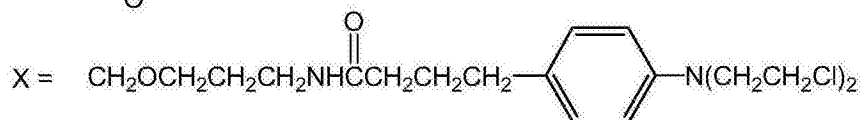
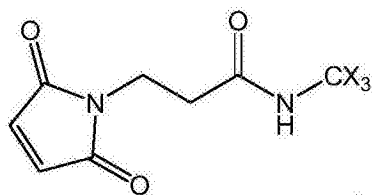
[0358] 所述结构包含2-(4-氨基亚苄基)丙烷-1,3-二醇树状物(dendrimer)单元(WO 2004/043493; de Groot等人(2003) Angew. Chem. Int. 编著42:4490-4494),其中Q是-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-卤素、-硝基或-氰基;m是范围从0-4的整数;n是0或1;并且p是1-4。

[0359] 树枝状接头

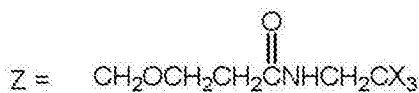
[0360] 在另一个实施方案中,接头L可以是用于超过一个药物部分经分枝的多功能接头部分与抗体共价结合的树枝型接头(Sun等人(2002) Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun等人(2003) Bioorganic&Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。树枝状接头可以增加药物对抗体的摩尔比,即,载量,这与ADC的效力相关。因而,在抗体仅携带一个反应性巯基的情况下,可以通过树枝状接头连接多个药物部分。

[0361] 树枝状接头试剂的以下示例性实施方案允许达九个亲核药物部分的试剂通过与氯乙基氮芥官能团的反应缀合：

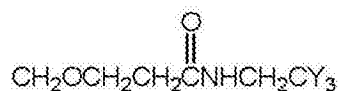
[0362]



[0363]



或

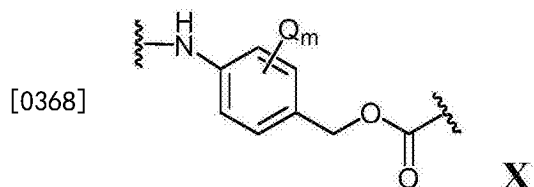


[0364] 在间隔单元的另一个实施方案中,带有自脱落型2,6-双(羟甲基)-对甲酚和2,4,6-三(羟甲基)-苯酚树状物单元的分枝的树枝状接头(WO 2004/01993;Szalai等人(2003) J.Amer.Chem.Soc.125:15688-15689;Shamis等人(2004) J.Amer.Chem.Soc.126:1726-1731;Amir等人(2003) Angew.Chem.Int.Ed.42:4494-4499)可以用作本发明化合物中的接头。

[0365] 在另一个实施方案中,D部分是相同的。

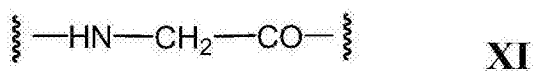
[0366] 在又一个实施方案中,D部分是不同的。

[0367] 在一个方面,间隔单元(-Y_y-)由式(X)-(XII)代表:

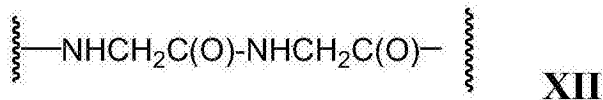


[0368]

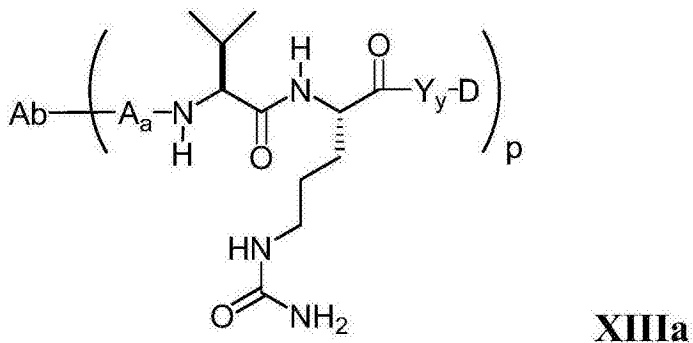
[0369] 其中Q是-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-卤素、-硝基或-氰基；并且m是范围从0-4的整数；



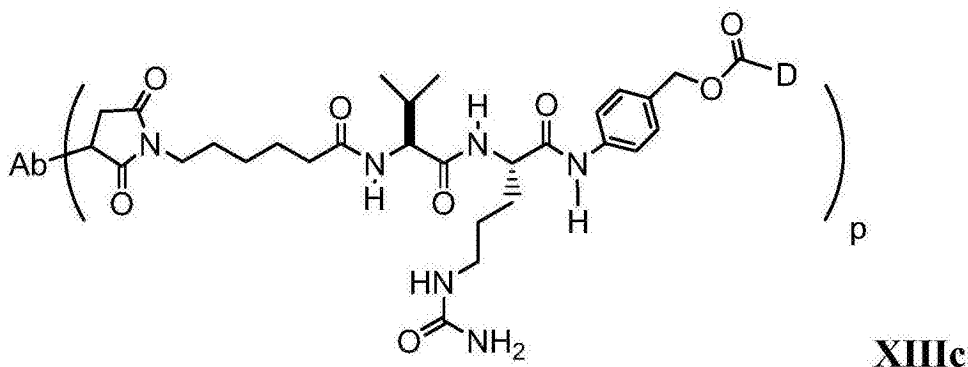
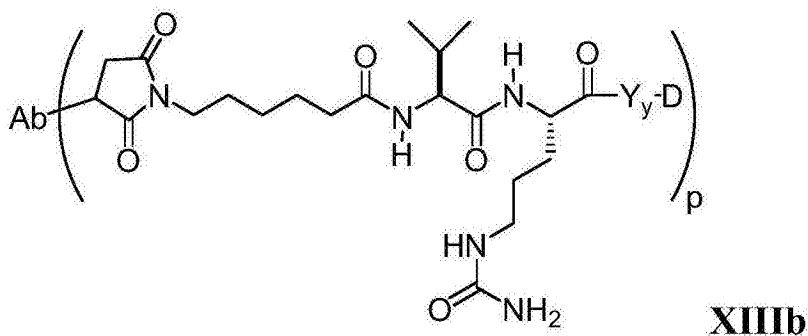
[0370]



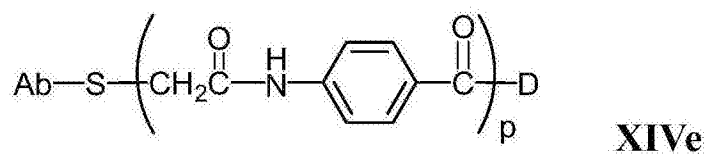
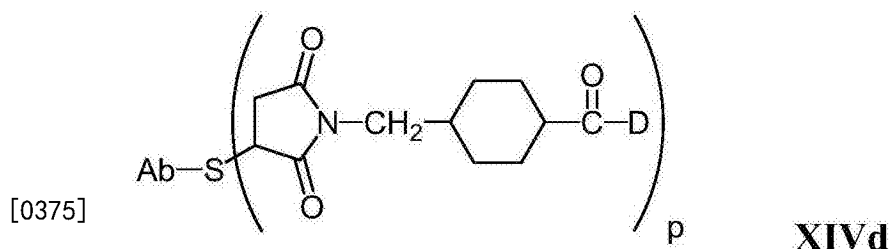
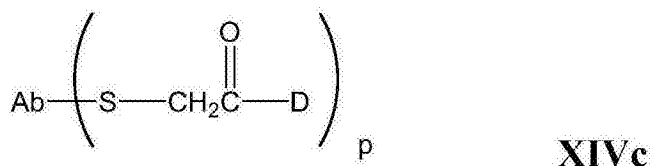
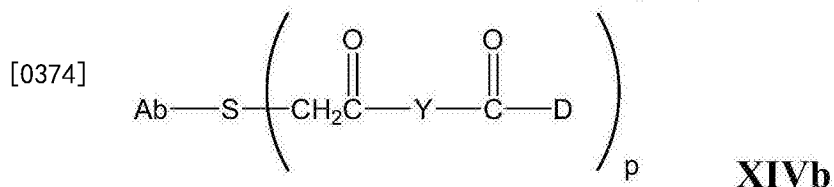
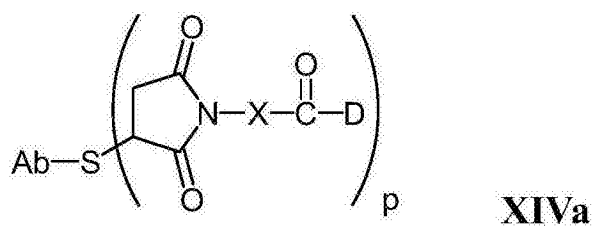
[0371] 式I抗体-药物缀合化合物的实施方案包括XIIIa (val-cit)、XIIIb (MC-val-cit)、XIIIc (MC-val-cit-PAB)：



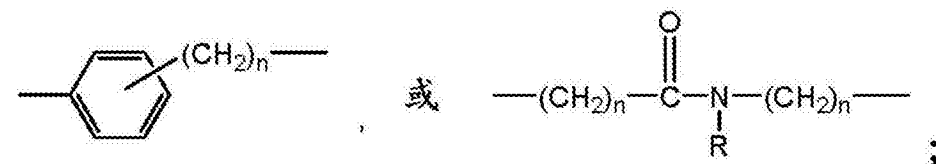
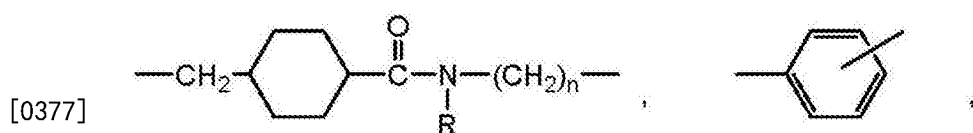
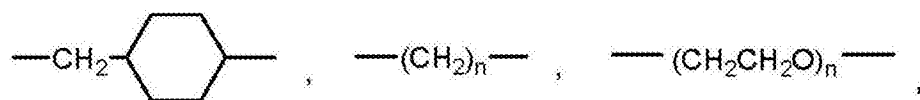
[0372]



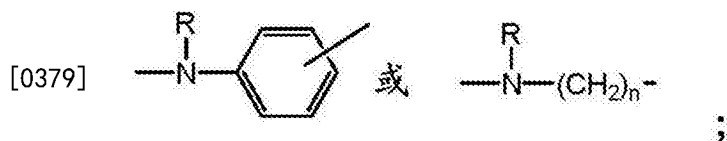
[0373] 式Ia抗体-药物缀合化合物的其他示例性实施方案包括XIVa-e：



[0376] 其中X是:



[0378] Y是:



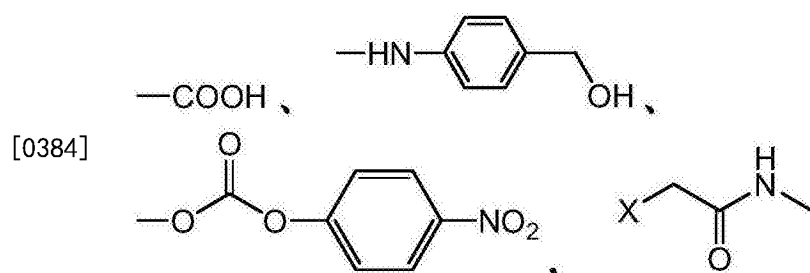
[0380] 并且R独立地是H或C₁-C₆烷基;并且n是1至12。

[0381] 在另一个实施方案中,接头具有反应性官能团,所述反应性官能团具有与抗体上

存在的亲电基团反应的亲核基团。抗体上有用的亲电基团包括但不限于醛基和酮羰基。接头的亲核基团的杂原子可以与抗体上的亲电基团反应并与抗体单元形成共价键。接头上有用的亲核基团包括但不限于酰肼、肟、氨基、肼、硫代半卡巴腓、肼羧酸酯和芳酰肼。抗体上的亲电基团为与接头的连接提供便利位点。

[0382] 一般,肽型接头可以通过在两个或更多个氨基酸和/或肽片段之间形成肽键而制备。此类肽键可以例如根据肽化学领域熟知的液相合成方法制备(E. **Schröder**和K. Lübke (1965), "The Peptides", 第1卷, 第76-136页, Academic Press)。

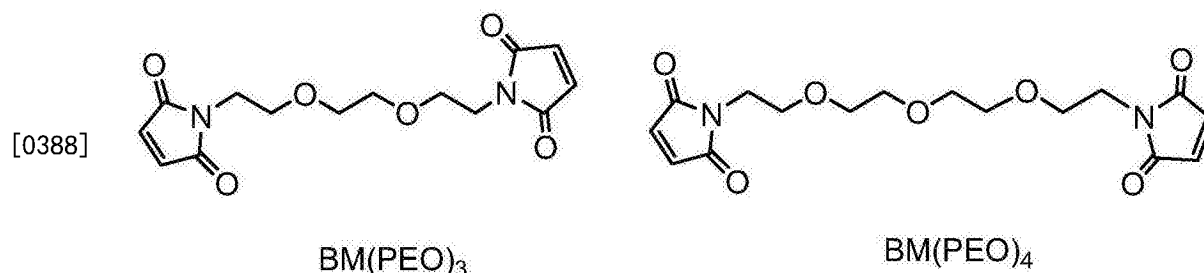
[0383] 接头中间体可以采用包括间隔单元、伸张单元和氨基酸单元的反应的任何组合或顺序进行装配。间隔单元、伸张单元和氨基酸单元可以利用本身为亲电、亲核基团或自由基的反应性官能团。反应性官能团包括但不限于:



[0385] 其中X是离去基团,例如O-甲磺酰基、O-甲苯磺酰基、-Cl、-Br、-I;或马来酰亚胺。

[0386] 在另一个实施方案中,接头可以用调节溶解性或反应性的基团取代。例如,带电取代基如磺酸盐(-SO₃⁻)或铵,可以增加试剂的水溶解性和促进接头试剂与抗体或药物部分的偶联反应,或根据用来制备ADC的合成途径,促进Ab-L(抗体-接头中间体)与D或者D-L(药物-接头中间体)与Ab的偶联反应。

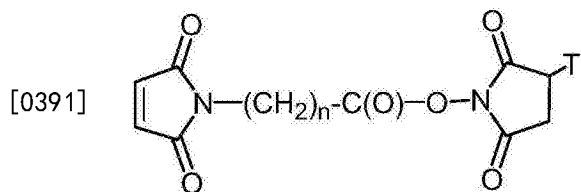
[0387] 本发明的化合物明确地构思了,但不限于这样的ADC,其采用以下接头试剂: BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、硫代-EMCS、硫代-GMBS、硫代-KMUS、硫代-MBS、硫代-SIAB、硫代-SMCC、和硫代-SMPB和SVSB(琥珀酰亚氨基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯)制备,并且包括以下双马来酰亚胺试剂:DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、BM(PEO)₃和BM(PEO)₄,所述双马来酰亚胺试剂是从Pierce Biotechnology, Inc., 客户服务部, 邮政信箱117, Rockford, IL 61105 U.S.A, U.S.A 1-800-874-3723, 国际拨号+815-968-0747可商业获得的。见2003-2004年使用手册及目录第467-498页。双马来酰亚胺试剂允许半胱氨酸工程化抗体或抗体片段的巯基与含巯基的药物部分、标记物或接头中间体以依次或同时方式连接。除马来酰亚胺之外,与半胱氨酸工程化抗体、药物部分、标记物或接头中间体的巯基反应的其他官能团还包括包括碘乙酰胺、溴乙酰胺、乙烯基吡啶、二硫化物、吡啶基二硫化物、异氰酸酯和异硫氰酸酯。



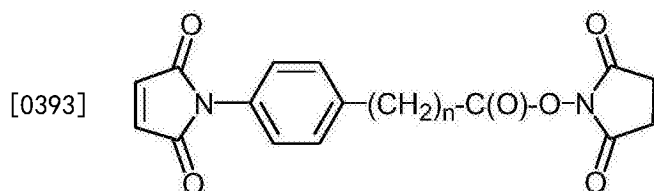
[0389] 有用的接头试剂也可以通过其他商业来源如Molecular Biosciences Inc.

(Boulder, CO) 获得, 或根据 Toki 等人 (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Walker, M. A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch 等人 (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; 和 WO 04/032828 中所述的方法合成。

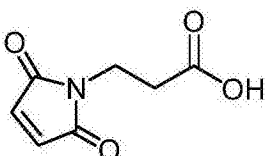
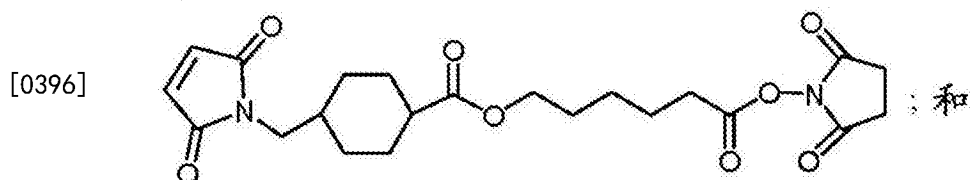
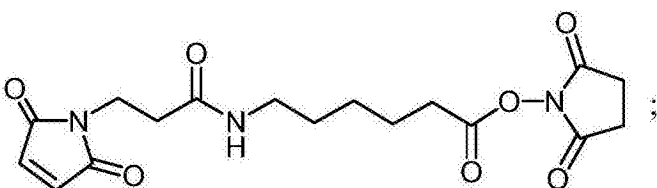
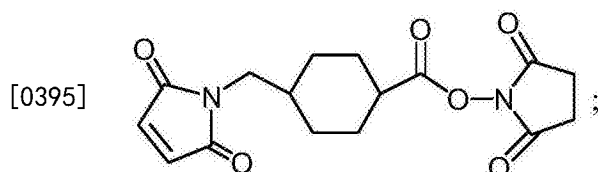
[0390] 式 (IIIa) 的伸张物可以通过以下接头试剂与氨基酸单元 N 端的反应导入接头中:



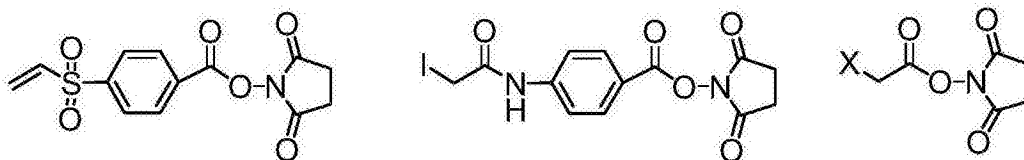
[0392] 其中 n 是范围从 1-10 的整数并且 T 是 -H 或 -SO₃Na;



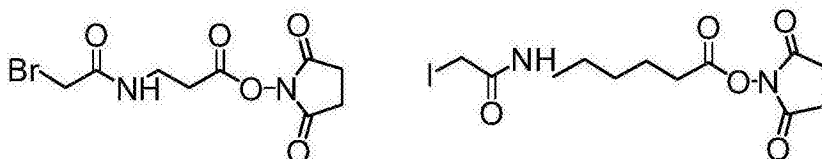
[0394] 其中 n 是范围从 0-3 的整数;



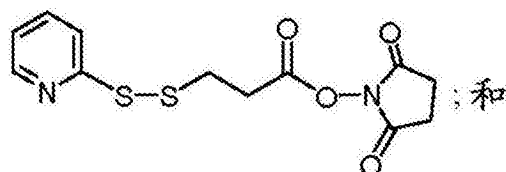
[0397] 伸张单元可以通过以下双官能试剂与氨基酸单元 N 端反应导入接头中:



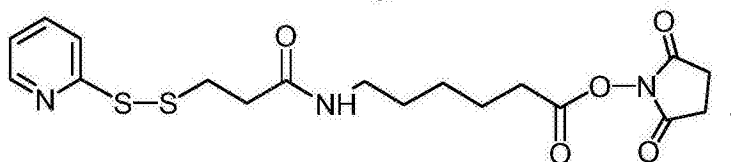
[0398]



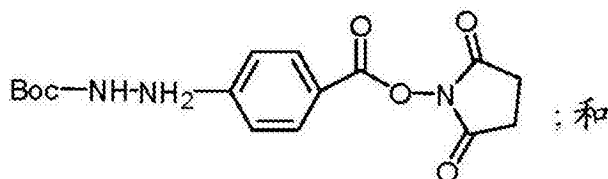
[0399] 其中X是Br或I。式的伸张单元也可以通过以下双官能试剂与氨基酸单元N端反应导入接头中：



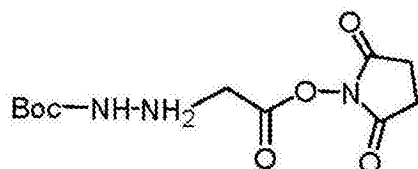
[0400]



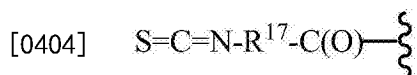
[0401] 式(Va)的伸张单元可以通过以下中间体与氨基酸单元N端反应导入接头中：



[0402]

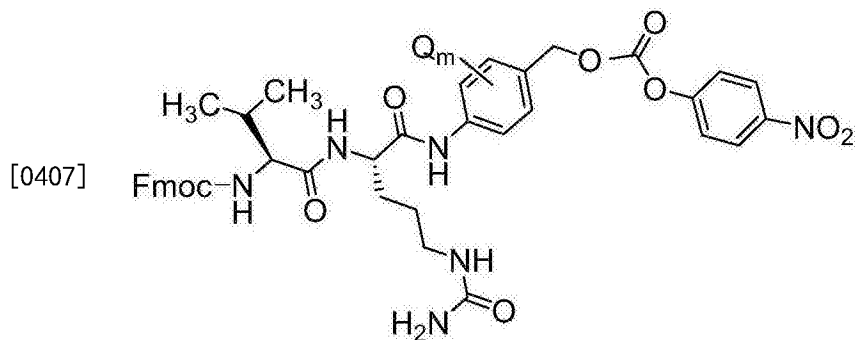


[0403] 下文所示的式异硫氰酸酯可以从异硫氰基羧酸氯化物(isothiocyanatocarboxylic acid chloride)中如Angew.Chem., (1975) 87 (14), 517中所述制备。



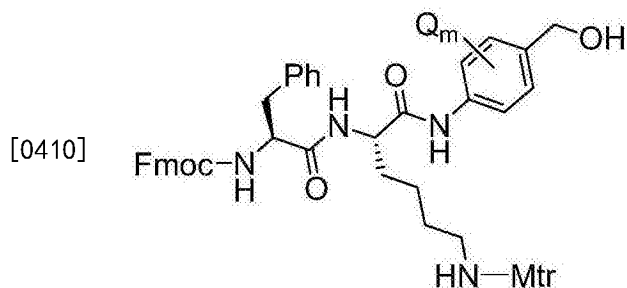
[0405] 其中 R^{17} -如本文所述。

[0406] 含有马来酰亚胺伸张物和对氨基苄基氨基甲酰基(PAB)自脱落型间隔物的示例性缬氨酸-瓜氨酸(val-cit或vc)二肽接头试剂具有以下结构：



[0408] 其中Q是-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-卤素、-硝基或-氰基；并且m是范围从0-4的整数。

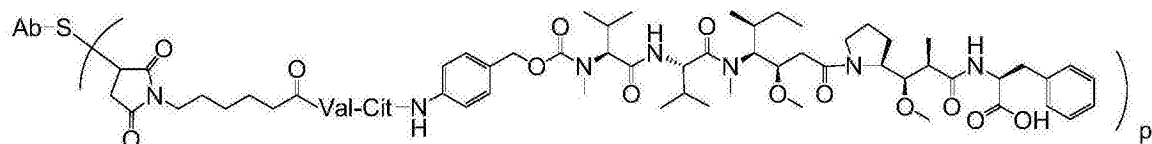
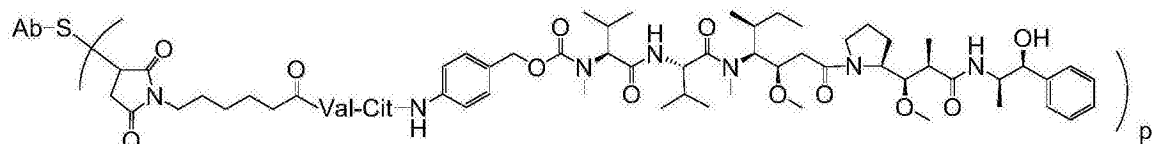
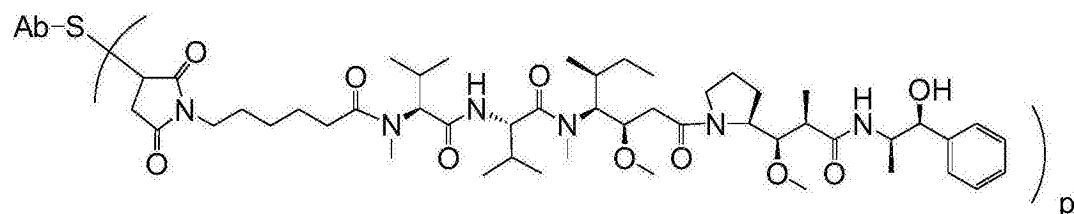
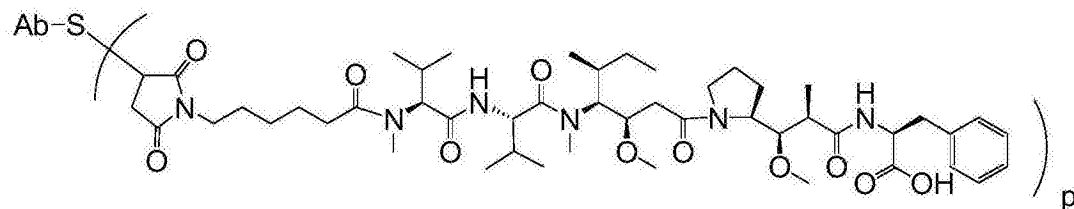
[0409] 具有马来酰亚胺伸张单元和对氨基苄基自脱落型间隔单元的示例性phe-lys(Mtr) 二肽接头试剂可以根据Dubowchik等人(1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60制备,并且具有以下结构:



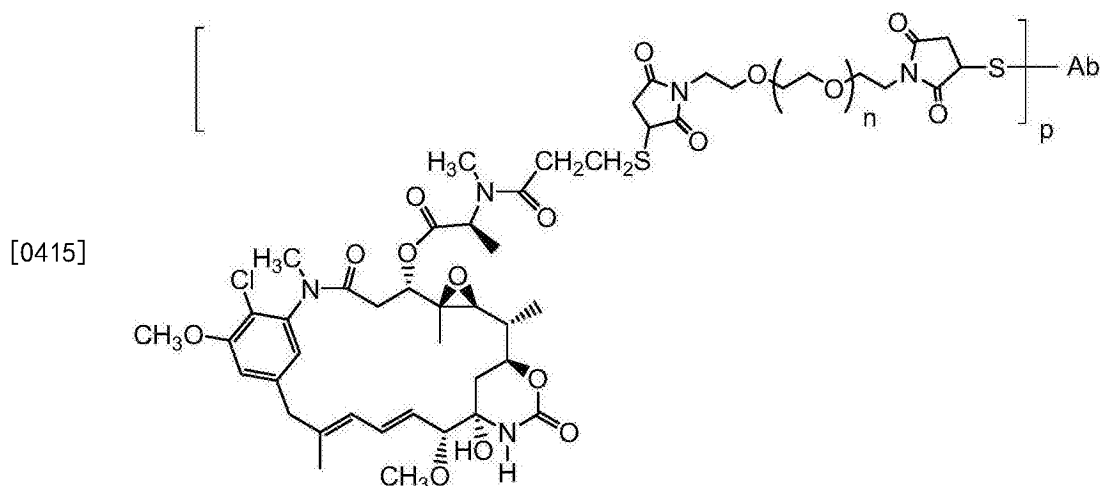
[0411] 其中Mtr是单-4-甲氧基三苯甲基,Q是-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-卤素、-硝基或-氰基；并且m是范围从0-4的整数。

[0412] 本发明的示例性抗体-药物缀合化合物包括:

[0413]

**Ab-MC-vc-PAB-MMAF****Ab-MC-vc-PAB-MMAE****Ab-MC-MMAE****Ab-MC-MMAF**

[0414] 其中Val是缬氨酸；Cit是瓜氨酸；p是1、2、3或4；并且Ab是多特异性抗体或抗体类似物。美坦生类药物部分DM1经BMPEO接头与曲妥珠单抗的巯基连接的其他示例性抗体药物缀合物具有以下结构：



[0416] 其中Ab是抗体；n是0、1或2；并且p是1、2、3或4。

[0417] 抗体-药物缀合物的制备

[0418] 式I的ADC可以使用本领域技术人员已知的有机化学反应、条件和试剂，通过几个途径制备，包括：(1) 半胱氨酸工程化抗体或抗体片段的半胱氨酸基团与接头试剂反应，以经共价键形成抗体-接头中间体Ab-L，随后与活化的药物部分D反应；和(2) 药物部分的亲核基团与接头试剂反应，以经共价键形成药物-接头中间体D-L，随后与半胱氨酸工程化抗体的半胱氨酸基团反应。缀合方法(1)和(2)可以采用多种半胱氨酸工程化抗体、药物部分和接头以制备式(I)的抗体-药物缀合物。

[0419] 抗体半胱氨酸巯基是亲核的，并且能够与接头试剂和药物-接头中间体上的亲电基团反应以通过硫化物交换形成共价键，所述接头试剂和药物-接头中间体包括：(i) 活性酯如NHS酯、HOBt酯、卤代甲酸酯和酸性卤化物；(ii) 烷基和苄基卤化物，如卤代乙酰胺；(iii) 醛、酮、羧基和马来酰亚胺基团；和(iv) 二硫化物，包括吡啶基二硫化物。药物部分上的亲核基团包括但不限于能够与接头部分和接头试剂上的亲电基团反应以形成共价键的胺、巯基、羟基、酰肼、肟、肼、硫代半卡巴腓、肼羧酸酯和芳酰肼基团。

[0420] 美坦生可以例如转变成May-SSCH₃，后者可以还原成游离巯基May-SH并且与修饰的抗体反应(Chari等人(1992) Cancer Research 52:127-131)以产生带有二硫键接头的美坦生类-抗体免疫缀合物。已经报道了带有二硫键接头的抗体-美坦生类缀合物抗体(WO 04/016801; US 6884874; US 2004/039176 A1; WO 03/068144; US 2004/001838 A1; 美国专利号6441163, 5208020, 5416064; WO 01/024763)。二硫键接头SPP用接头试剂N-琥珀酰亚胺基(2-吡啶基硫代)戊酸酯构建。

[0421] 在某些条件下，半胱氨酸工程化抗体或抗体片段可以用还原剂如DTT(Cleland试剂，二硫苏糖醇)或TCEP(三(2-羧乙基)膦盐酸盐; Getz等人(1999) Anal. Biochem. 第273: 73-80卷; Soltec Ventures, Beverly, MA)处理而变得与接头试剂缀合具有反应性。在CHO细胞中表达的全长、半胱氨酸工程化的单克隆抗体或Fab(ThioMab; ThioFab)可以在37°C用约50倍过量的TCEP还原3小时以还原可能在新导入的半胱氨酸残基和培养基中存在的半胱氨酸之间形成的二硫键。可以将还原的ThioMab或ThioFab稀释并加载到10mM乙酸钠, pH 5中的HiTrap S柱上, 并且用含有0.3M氯化钠的PBS洗脱。可以用稀(200nM)硫酸铜(CuSO₄)水溶液在室温过夜, 在亲本Mab中存在的半胱氨酸残基之间重建二硫键。可以使用本领域已知的

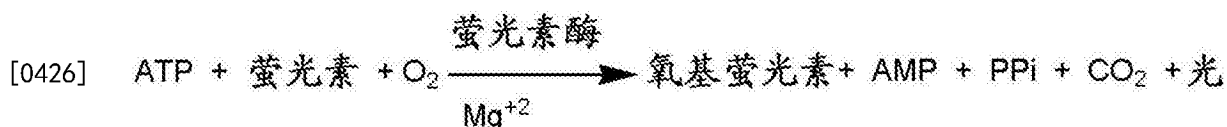
其他氧化剂,即氧化试剂,和氧化条件。环境空气氧化也是有效的。这种温和的部分氧化还原步骤以高度忠实性高效地形成链内二硫键。大约10倍过量的药物-接头中间体例如BM (PEO)₄-DM1可以添加、混合并且在室温静置约1小时以实现缀合并形成抗体-药物缀合物。可以将缀合混合物进行凝胶过滤并且在HiTrap S柱加载并洗脱以除去过量的药物-接头中间体和杂质。

[0422] 体外细胞增殖测定法

[0423] 通常,通过以下方式测量抗体(例如,本发明的多特异性抗体或抗体类似物)或本发明抗体-药物缀合物(ADC)的细胞毒或抑制细胞活性:使具有受体蛋白(例如HER2)的哺乳动物细胞暴露于细胞培养基中的抗体或ADC;培养所述细胞约6小时至约5日时间;并且测量细胞生存力。细胞体外测定法用来至测量生存力(增殖)、细胞毒性和本发明的多特异性抗体、抗体类似物和ADC对凋亡的诱导(胱天蛋白酶活化)。

[0424] 通过细胞增殖测定法测量多特异性抗体,抗体类似物和ADC的体外效力。The **CellTiter-Glo[®]**发光细胞生存力测定法是一种市售的(Promega Corp.,Madison,WI)、均相分析方法,其基于鞘翅目昆虫(Coleoptera)萤光素酶的重组表达(美国专利号5583024;5674713和5700670)。基于量化现存的ATP(一种代谢活跃细胞的指示物),这种细胞增殖测定法确定培养的活细胞数目(Crouch等人(1993) J. Immunol. meth. 160:81-88; US 6602677)。The **CellTiter-Glo[®]**测定法可以按96孔模式实施,这使该测定法适合于自动化高通量筛选(HTS)(Cree等人(1995) AntiCancer Drugs 6:398-404)。均相测定方法涉及直接添加单一试剂(**CellTiter-Glo[®]**试剂)至培养于补充血清的培养基中的细胞。不需要细胞洗涤、移除培养基和多个抽吸步骤。在添加试剂和混合后,该系统检测在10分钟内以384孔模式检测少达每孔15个细胞。细胞可以用多特异性抗体、抗体类似物或ADC连续处理,或它们可以经过处理并且与抗体或ADC分离。通常,短暂(即3小时)处理的细胞显示与连续处理的细胞相同的效力效果(potency effect)。

[0425] 均相“添加-混合-测量”模式导致细胞裂解和与存在的ATP量成正比的发光信号生成。ATP的量与培养物中存在的细胞数目完全成正比。**CellTiter-Glo[®]**测定法生成由萤光素酶反应产生的“辉光型”发光信号,根据所用细胞类型和培养基,所述发光信号具有通常大于五小时的半寿期。活细胞以相对荧光单位(RLU)反映。甲虫萤光素底物由重组萤火虫萤光素酶氧化脱羧,同时ATP转变成AMP并生成光子。延长的半寿期消除了使用试剂上样器的需要并且为多块平板的连续或间歇模式处理提供灵活性。这种细胞增殖测定法可以在各种多孔模式下使用,例如96或384孔模式。数据可以由冷光仪或CCD照相机成像设备记录。发光输出表述为相对光单位(RLU),随时间推移测量。备选地,来自发光的光子可以在闪烁计数器中在闪烁体存在下计数。光单位可以随后表述为CPS-计数/秒。



[0427] 体内施用

[0428] 本发明的多特异性抗体、抗体类似物和抗体-药物缀合物(ADC)可以通过适用于待治疗病状的任何途径施用。此类抗体一般将肠胃外地施用,即输注、皮下、肌肉、静脉内、皮

内、鞘内和硬膜外施用。

[0429] 药物制剂

[0430] 通常将本发明治疗性多特异性抗体、抗体类似物和抗体-药物缀合物(ADC)的药物制剂制备为用于随可药用的肠胃外运载体(vehicle)并且以单位剂量可注射形式肠胃外施用,即大丸剂、静脉内、肿瘤内注射。具有合乎需要程度的纯度的多特异性抗体、抗体类似物或抗体-药物缀合物(ADC)任选地以冻干制剂或水溶液剂的形式与可药用的稀释剂、载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences(1980)第16版,Osol,A.编著)混合。

[0431] 可接受的稀释剂、载体(carrier)、赋形剂和稳定剂在所用的剂量和浓度上对接受者无毒,并且包括并且包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂(包括抗坏血酸和甲硫氨酸);防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵、苯扎溴铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基尼泊金酯如尼泊金甲酯或丙酯;儿茶酚;雷琐辛;环己醇;3-戊醇和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;形成盐的反离子如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物)和/或非离子表面活性剂如**TWEEN™®**、**PLURONICS™®**或聚乙二醇(PEG)。例如,冻干的抗ErbB2抗体制剂在通过引用方式明确并入本文的WO 97/04801中描述。

[0432] 活性药物成分也可以包封于例如分别通过凝聚技术或界面聚合制备的微胶囊(例如,羟甲基纤维素微胶囊或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、胶态药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)或粗滴乳状液中。此类技术在Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编著(1980)中公开。

[0433] 可以制备持续释放制品。持续释放制品的合适的实例包括含有ADC的固态疏水性聚合物半通透性基质,所述基质处于成型物品(例如薄膜或微胶囊)形式。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)或聚(乙烯醇)、聚乳酸(US 3773919)、L-谷氨酸和 γ -乙基-谷氨酸酯的共聚物、不可降解性乙烯-乙酸乙烯酯、可降解性乳酸-乙醇酸共聚物如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和亮丙瑞林乙酸酯组成的可注射微球体)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0434] 待用于体内施用的制剂必须是无菌的,这通过经无菌滤膜过滤轻易地完成。

[0435] 制剂包括适于前述施用途径的那些制剂。制剂可以便利地以单位剂量形式提供,并且可以采用制药领域熟知的任何方法制备。一般在Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co.,Easton,PA)中找到技术和制剂。此类方法包括步骤:使有效成分与构成一种或多种附属成分的载体结合。通常,通过这样的方式制备制剂:使有效成分与液体载体或精细分散的固体载体或这两者均匀且密切地结合,并且随后根据需要使该产物成形。

[0436] 本发明的水混悬剂含有与适于制造水混悬剂的赋形剂混合的活性材料。此类赋形剂包括助悬剂,例如,羧甲基纤维素钠、交联羧甲基纤维素、聚维酮、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄芪胶和阿拉伯胶;分散剂或润湿剂,如天然存在的磷脂(例如卵磷脂)、烯化氧与脂肪酸的缩合产物(例如,聚氧乙烯硬脂酸酯)、环氧乙烷与长

链脂族醇的缩合产物(例如,十七碳乙烯氧鲸蜡醇)、环氧乙烷与从脂肪酸和己糖醇酐衍生的偏酯的缩合产物(例如,聚乙烯失水山梨糖醇酐单油酸酯)。所述水混悬剂也可以含有一种或多种防腐剂如对羟基苯甲酸乙酯或正丙酯、一种或多种着色剂、一种或多种矫味剂和一种或多种甜味剂如蔗糖或糖精。

[0437] 所述药物组合物可以是无菌可注射制品形式,如无菌可注射水混悬剂或油状混悬剂。这种混悬剂可以根据已知技术,使用上文已经提到的那些合适的分散剂或润湿剂和助悬剂进行配制。无菌可注射制品也可以是在无毒的肠胃外可接受稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液剂或混悬剂,如1,3-丁二醇中的溶液剂,或制备为冻干粉剂。在可以使用的可接受溶媒和溶剂中有水、林格液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的固定油可以常规地用作溶剂或助悬介质。出于该目的,可以使用任何刺激性低的固定油,包括合成性单酰甘油或二酰甘油。此外,脂肪酸如油酸可以同样用于注射剂的制备中。

[0438] 可以与载体材料组合以产生单一剂型的有效成分的量将根据正在治疗的受试者和具体施用模式变动。例如,意图用于静脉内输注的水溶液剂可以含有每毫升溶液剂约3至500 μ g的有效成分,以便可以进行以约30mL/小时的速率输注合适体积。

[0439] 适于肠胃外施用的制剂包括水性和非水性无菌注射溶液剂,其中所述的溶液剂可以含有使该制剂与预定接受者的血液等渗的抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质;以及水性和非水性无菌混悬剂,所述的混悬剂可以含有助悬剂和增稠剂。

[0440] 虽然蛋白质治疗剂的口服施用因在肠中水解或变性而是不利的,但是可以将适于口服施用的多特异性抗体、抗体类似物或ADC制剂制备为各自含有预定量的抗体或ADC的分立单位,如胶囊剂、扁囊剂(cachet)或片剂。

[0441] 所述制剂可以包装在单位剂量或多剂量容器例如密闭安瓿和小瓶中,并且可以在冷冻干燥(冻干)的条件下储存,仅需要在临用前才添加注射用无菌液态载体,例如水。现场用注射溶液剂和混悬剂从前述种类的无菌粉剂、颗粒剂和片剂中制备。某些单元剂量制剂是这些制剂,它们含有如上文所提到的有效成分日剂量或每日亚剂量单位(unit daily sub-dose)或其适宜的一部分。

[0442] 因此,也提供包含如上文定义的至少一种有效成分连同兽医载体的兽医组合物。兽医载体是用于施用所述组合物目的的材料,并且可以是呈惰性或在兽医领域可接受并与有效成分相容的固态、液态或气态材料。这些兽医组合物可以肠胃外地、口服地或通过任何其他合乎需要的途径施用。

[0443] 治疗性用途

[0444] 本文所述的多特异性抗体、抗体类似物和ADC可以用于治疗性应用。例如,此类抗体和抗体片段和抗体-药物缀合物可以用于治疗肿瘤,包括癌前、非转移性、转移性和癌性肿瘤(例如,早期阶段癌症),用于治疗过敏性或炎性疾病,或用于治疗自身免疫病,或用于治疗存在形成癌症(例如,乳腺癌、结直肠癌、肺癌、肾细胞癌、胶质瘤或卵巢癌)、过敏性或炎性疾病或自身免疫病的风险的受试者。

[0445] 术语“癌症”包括增生性病症的总称,包括但不限于癌前生长、良性肿瘤和恶性肿瘤。良性肿瘤在发源部位保持局限并且不具有浸润、侵入或转移至远处部位的能力。恶性肿瘤将侵入并损伤在它们周围的其他组织。它们也可以赢得突破其起源部位并且扩展(转移)至身体其他部的能力,这通常经血流或经其中存在淋巴结的淋巴系统进行。原发肿瘤根据

原发肿瘤起源的组织类型分类;转移性肿瘤根据从中衍生癌细胞的组织类型分类。随时间推移,恶性肿瘤细胞变得更为异常并且显得更不像正常细胞。癌细胞外观的这种变化称作肿瘤分级,并且将癌细胞描述为良好分化的、中等分化的、不良分化的或未分化的。良好分化的细胞在外观上相当正常并且与它们从中起源的正常细胞相似。未分化的细胞是这样的细胞,它们已经变得如此异常,从而不再可能确定细胞的起源。

[0446] 肿瘤可以是实体肿瘤或非实体或软组织肿瘤。软组织肿瘤的实例包括白血病(例如,慢性髓性白血病、急性髓性白血病、成人急性成淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病、成熟B细胞急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞白血病、幼淋巴细胞白血病、或毛状细胞白血病)或淋巴瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤或霍奇金病)。实体肿瘤包括除血液、骨髓或淋巴系统之外的身体组织的任何癌。实体肿瘤可以进一步分成上皮细胞来源的那些实体肿瘤和非上皮细胞来源的那些实体肿瘤。上皮细胞实体肿瘤的实例包括胃肠道、结肠、乳腺、前列腺、肺、肾、肝脏、胰、卵巢、头与颈、口腔、胃、十二指肠、小肠、大肠、肛门、胆囊、唇、鼻咽、皮肤、子宫、男性生殖器官、泌尿器官、膀胱和皮肤的肿瘤。非上皮来源的实体肿瘤包括肉瘤、脑肿瘤和骨肿瘤。

[0447] 上皮癌症通常从良性肿瘤演进至侵入前期(例如,原位癌),演进至恶性癌,其已经渗透基底膜并且侵入上皮间质。

[0448] 多特异性抗体、抗体类似物和ADC也可以用于这些治疗性应用中,并且结合HER2的抗体特别可以用来治疗乳腺癌、结直肠癌、肺癌、肾细胞癌、胶质瘤或卵巢癌。

[0449] 作为接受本发明组合物的候选者的其他受试者患有以下病症或具有形成所述病症的风险:纤维血管组织异常增生、痤疮酒渣鼻、获得性免疫缺陷综合征、动脉阻塞、特应性角膜炎、细菌性溃疡、Bechet病、血性(blood borne)肿瘤、颈动脉闭锁病、脉络膜新生血管化、慢性炎症、慢性视网膜脱落、慢性眼色素层炎、慢性玻璃体炎、隐形眼镜过度磨损、角膜移植排斥、角膜新生血管化、角膜移植新生血管化、节段性回肠炎、Eales病、流行性角结膜炎、真菌性溃疡、单纯疱疹病毒感染、带状疱疹病毒感染、高粘稠度综合征、卡波西肉瘤、白血病、脂质变性、莱姆病、边缘角质层分离、Mooren溃疡、除麻风之外的分枝杆菌感染、近视、眼新生血管性疾病、视盘先天性小凹(optic pit)、Osler-Weber综合征(Osler-Weber-Rendu)、骨关节炎、Paget病、睫状体平坦部炎(pars planitis)、类天疱疮、phlyctenulosis、多发性动脉炎、激光后并发症、原虫感染、弹性假黄瘤、翼状赘肉、干性角膜炎、放射状角膜切开术、视网膜新生血管化、早产儿视网膜病变、晶体后纤维增生症、类肉瘤(sarcoid)、巩膜炎、镰状细胞贫血、Sjogren综合征、实体肿瘤、Stargardt病、Steven-Johnson病、上部角膜缘角膜炎、梅毒、系统性狼疮、Terrien角膜边缘性变性、弓形体病、尤文氏肉瘤的肿瘤、成神经细胞瘤的肿瘤、骨肉瘤的肿瘤、视网膜母细胞瘤的肿瘤、横纹肌肉瘤的肿瘤、溃疡性结肠炎、静脉闭塞、维生素A缺乏症、Wegener肉状瘤病、与糖尿病相关的不希望的血管生成、寄生虫病、异常伤口愈合、术后肥大、损伤或创伤(例如,急性肺损伤/ARDS)、抑制毛发生长、抑制排卵与黄体形成、抑制植入、和抑制子宫内胚发育。

[0450] 可以使用根据本文所述方法制得的多特异性抗体、抗体类似物、双Fab、ADC或任何其他抗体治疗过敏性或炎性疾病或者自身免疫疾病或病症的实例包括,但是不限于关节炎(类风湿性关节炎如急性关节炎、慢性类风湿性关节炎、痛风性关节炎、急性痛风性关节炎、慢性炎性关节炎、变性关节炎、感染性关节炎、莱姆关节炎、增生性关节炎、银屑病关节炎、

椎骨关节炎,和幼年发作型类风湿性关节炎、骨关节炎、慢性进行性关节炎、变形性关节炎、慢性原发多发性关节炎、反应性关节炎和强直性脊柱炎)、炎症过度增生性皮肤病、银屑病如斑块状银屑病、滴状银屑病、脓疱性银屑病和趾甲银屑病、皮炎,包括接触性皮炎、慢性接触性皮炎、过敏性皮炎、过敏性接触性皮炎、疱疹样皮炎,和特异性皮炎、X连锁的IgM过多综合征、荨麻疹如慢性过敏性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹,包括慢性自身免疫性荨麻疹、多发性肌炎/皮肌炎、幼年型皮肌炎、中毒性表皮坏死松解症、硬皮病(包括全身性硬皮病)、硬化如系统性硬化病、多发性硬化(MS)如脊髓-视神经MS、原发性进行性MS(PPMS)和复发缓解性MS(RRMS)、进行性系统性硬化病、动脉粥样硬化、动脉硬化、散播性硬化和共济失调性硬化、炎症性肠病(IBD)(例如,节段性回肠炎、自身免疫介导的胃肠病、结肠炎如溃疡性结肠炎、溃疡性结肠炎(colitis ulcerosa)、显微镜性结肠炎、胶原性结肠炎、息肉状结肠炎、坏死性小肠结肠炎和透壁性结肠炎与自身免疫炎症性肠病)、坏疽性脓皮病、结节性红斑、原发性硬化胆管炎、表层巩膜炎)、呼吸窘迫综合征、包括成人或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、脑膜炎、全部或部分葡萄膜的炎症、虹膜炎、脉络膜炎、自身免疫血液病、类风湿性脊椎炎、突发性听力丧失、IgE-介导的疾病如过敏反应和过敏性与特应性鼻炎、脑炎如Rasmussen脑炎和边缘性和/或脑干脑炎、葡萄膜炎、如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、晶状体抗原性葡萄膜炎、后葡萄膜炎,或自身免疫性葡萄膜炎、伴有和不伴有肾病综合征的肾小球肾炎(GN),如慢性或急性肾小球肾炎如原发性GN、免疫介导的GN、膜性GN(膜性肾病)、特发性膜性GN或特发性膜性肾病、膜性(membrano)或膜性增生性GN(MPGN),包括I型和II型,和快速进行性GN、过敏性体质、变态反应、湿疹,包括变应性或特发性湿疹、哮喘,如支气管哮喘、支气管哮喘和自身免疫性哮喘、涉及T细胞浸润和慢性炎症反应的病状、慢性肺部炎症性疾病、自身免疫性心肌炎、白细胞黏附性缺陷、系统性红斑狼疮(SLE)或系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematoses)如皮肤SLE、亚急性皮肤型红斑狼疮、新生儿期狼疮综合征(NLE)、播散性红斑狼疮、狼疮(包括肾炎、脑炎、儿科、非肾、肾外、盘状、秃顶性狼疮)、幼年发作型(I型)糖尿病,包括儿科胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)、成人发作型糖尿病(II型糖尿病)、自身免疫性糖尿病、特发性尿崩症、与细胞因子及T淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫反应、结核病、结节病、肉芽肿,包括淋巴瘤样肉芽肿、韦格纳肉芽肿病、粒细胞缺乏症、血管炎类,包括血管炎(包括大血管血管炎(包括风湿性多肌痛和巨细胞(Takayasu's)动脉炎)、中等血管血管炎(包括Kawasaki病和结节性多动脉炎)、显微镜下多动脉炎、CNS血管炎、坏死性、皮肤型或超敏性血管炎、系统性坏死性血管炎,和ANCA相关的血管炎,如Churg-Strauss血管炎或综合征(CSS)、颞动脉炎、再生障碍性贫血、自身免疫性再生障碍性贫血、Coombs阳性贫血、先天性再生障碍性贫血、溶血性贫血或免疫性溶血性贫血,包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、恶性贫血(anemia perniosa)、Addison病、纯红细胞贫血或发育不良(PRCA)、因子VIII缺乏症、血友病A、自身免疫性嗜中性白血球减少症、泛白细胞减少症、白细胞减少症、涉及白细胞渗出的疾病、CNS炎症性疾病、多器官损伤综合征,如继发于败血症、创伤或出血的那些多器官损伤综合征、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜病、抗磷脂抗体综合征、变应性神经炎、Bechet或Behcet病、Castleman综合征、Goodpasture综合征、Reynaud综合征、Sjogren综合征、Stevens-Johnson综合征、类天疱疮,如大疱性类天疱疮和皮肤类天疱疮、天疱疮(包括寻常性天疱疮、落叶状天疱疮、天疱疮粘膜类天疱疮(pemphigus mucus-membrane

pemphigoid) 和红斑性天疱疮)、自身免疫性多内分泌腺病、Reiter病或综合征、免疫复合物肾炎、抗体-介导的肾炎、视神经脊髓炎、多发性神经病、慢性神经病如IgM多发性神经病或IgM-介导的神经病、血小板减少症(如由心肌梗死患者发展),包括血栓性血小板减少性紫癜(TTP),和自身免疫性或免疫介导的血小板减少症,如特发性血小板减少性紫癜(ITP)(包括慢性或急性ITP)、睾丸和卵巢的自身免疫病,包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎、原发性甲状腺功能减退症、甲状旁腺功能减退症、自身免疫性内分泌疾病(包括甲状腺炎如自身免疫性甲状腺炎、桥本病、慢性甲状腺炎(桥本甲状腺炎)或亚急性甲状腺炎、自身免疫性甲状腺疾病、特发性甲状腺功能减退症、Grave病、多内分泌腺综合征,如自身免疫性多内分泌腺综合征(或多内分泌腺内分泌病综合征)、副肿瘤性综合征,包括神经系统副肿瘤综合征如Lambert-Eaton肌无力综合征或Eaton-Lambert综合征、僵人或僵者综合征(stiff-man or stiff-person syndrome)、脑脊髓炎,如变应性脑脊髓炎或过敏性脑脊髓炎和实验性变应性脑脊髓炎(EAE)、重症肌无力如胸腺肿瘤相关重症肌无力、小脑变性、神经性肌强直、视性眼阵挛或视性眼阵挛肌阵挛综合征(OMS),和感觉神经病、多灶性运动神经病、Sheehan综合征、自身免疫性肝炎、慢性肝炎、类狼疮肝炎、巨细胞肝炎、慢性活动性肝炎或自身免疫性慢性活动性肝炎、淋巴细胞间质性肺炎、闭塞性细支气管炎(非移植物)抗NSIP、Guillain-Barre综合征、Berger病(IgA神经病)、特发性IgA神经病、线状IgA皮肤病(linear IgA dermatosis)、原发性胆汁性肝硬化、肺硬变、自身免疫性肠病综合征、腹腔疾病、腹腔疾病、乳糜泻(谷蛋白肠病)、难治性口炎性腹泻、特发性口炎性腹泻、冷球蛋白血症、肌萎缩侧索硬化(ALS;Lou Gehrig病)、冠状动脉病、自身免疫性耳病如自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫性听力丧失、视性眼阵挛肌阵挛综合征(OMS)、多软骨炎如难治性或复发性多软骨炎、肺泡蛋白沉着症、淀粉样变性病、巩膜炎、非癌性淋巴细胞增多、原发性淋巴细胞增多,其包括单克隆B细胞淋巴细胞增多(例如,良性单克隆免疫球蛋白病和意义不确定性单克隆免疫球蛋白病,MGUS)、外周神经病、副肿瘤性综合征、离子通道病,如癫痫、偏头痛、心律失常、肌肉病(muscular disorder)、耳聋、失明、周期性麻痹,和CNS的离子通道病、自闭症、炎性肌病、局灶节段性肾小球硬化(FSGS)、内分泌眼病、葡萄膜视网膜炎、脉络膜视网膜炎、自身免疫性肝病(autoimmune hepatological disorder)、纤维肌痛、多发性内分泌衰竭(multiple endocrine failure)、Schmidt综合征、肾上腺炎、胃萎缩、早老性痴呆、脱髓鞘病,如自身免疫性脱髓鞘病、糖尿病性肾病、Dressler综合征、斑秃、CREST综合征(钙化、雷诺现象、食管运动功能失常、指端硬化和毛细血管扩张症)、男性和女性自身免疫性不育、混合型结缔组织病、Chaga病、风湿热、反复流产、霉菌肺(farmer's lung)、多形红斑、心脏切开术后综合征、库欣综合征、养鸟人肺(bird-fancier's lung)、变应性肉芽肿性血管炎、良性淋巴细胞血管炎、Alport综合征、肺泡炎,如过敏性肺泡炎和纤维化肺泡炎、间质性肺病、输血反应、麻风病、疟疾、利什曼病、kypanosomiasis、血吸虫病、蛔虫病、曲霉病、Sampter综合征、Caplan综合征、登革热、心内膜炎、心肌内膜纤维化、弥漫性间质性肺纤维化、间质性肺纤维化、特发性肺纤维化、囊性纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑(erythema elevatum et diutinum)、胎儿幼红细胞增多症、嗜酸性细胞增多性肌膜炎、Shulman综合征、Felty综合征、丝虫病(fiariasis)、睫状体炎,如慢性睫状体炎、异色性睫状体炎(heterochronic cyclitis)、虹膜睫状体炎或Fuch睫状体炎、Henoch-Schonlein紫癜、人免疫缺陷病毒(HIV)感染、艾柯病毒感染、心肌病、阿尔茨海默病、细小病毒感染、风疹病毒感染、接种后综合征、

先天性风疹感染、Epstein-Barr病毒感染、腮腺炎、Evan综合征、自身免疫性性腺衰竭、Sydenham舞蹈病、链球菌感染后肾炎、闭塞性血栓性血管炎(thromboangitis obliterans)、甲状腺毒症、脊髓痨(tabes dorsalis)、脉络膜炎、巨细胞多肌痛、内分泌眼病、慢性超敏性肺炎、干燥性角膜结膜炎、流行性角膜结膜炎、特发性肾病综合征、微小病变性肾病、良性家族性和缺血-再灌注损伤、视网膜自体免疫(retinal autoimmunity)、关节炎、支气管炎、慢性阻塞性气道疾病、矽肺病、口疮、口疮性口炎、动脉硬化性疾病、aspermogenesis、自身免疫性溶血、Boeck病、冷球蛋白血症、Dupuytren挛缩、晶状体蛋白过敏性眼内炎(endophthalmitis phacoanaphylactica)、过敏性肠炎、麻风结节性红斑、特发性面瘫、慢性疲劳综合征、风湿热(febris rheumatica)、Hamman-Rich病、感觉神经性听力丧失、阵发性血红蛋白尿(haemoglobinuria paroxysmatica)、性腺功能减退症、局限性回肠炎、白细胞减少症、传染性单核细胞增多症、横贯性脊髓炎、原发性特发性粘液性水肿、肾变病、交感性眼炎(ophthalmia sympathica)、肉芽肿性睾丸炎、胰腺炎、急性多发性神经根炎、坏疽性脓皮病、奎汶氏甲状腺炎、获得性脾萎缩(acquired splenic atrophy)、因抗精子抗体所致的不育、非恶性胸腺肿瘤、白癜风、SCID和Epstein-Barr病毒相关性疾病、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、寄生虫病如利什曼原虫、中毒性休克综合征、食物中毒、涉及T细胞浸润的病状、白细胞黏附性缺陷、与细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫应答、涉及白细胞渗出的疾病、多器官损伤综合征、抗原-抗体复合物-介导的疾病、抗肾小球基底膜病、变应性神经炎、自身免疫性多内分泌腺病、卵巢炎、原发性粘液水肿、自身免疫性萎缩性胃炎、交感性眼炎、风湿性疾病、混合型结缔组织病、肾病综合征、胰岛炎、多内分泌腺衰竭、外周神经病、自身免疫性多内分泌腺综合征I型、成年发作型特发性甲状旁腺功能减退症(AOIH)、全秃、扩张型心肌病、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、血色素沉着症、心肌炎、肾病综合征、原发性硬化胆管炎、化脓性或非化脓性鼻窦炎、急性或慢性鼻窦炎、筛窦炎、额窦炎、上颌窦炎或蝶窦炎、嗜酸细胞相关病症如嗜酸粒细胞增多症、嗜酸细胞增多性肺浸润、嗜酸粒细胞增多-肌痛综合征、Löffler综合征、慢性嗜酸细胞性肺炎、热带肺嗜酸粒细胞增多症、支气管肺曲霉病、曲霉肿,或含有嗜酸性细胞的曲霉肿、过敏反应、血清阴性脊柱关节炎、多内分泌腺自身免疫病、硬化胆管炎、巩膜念珠菌病、巩膜外层念珠菌病、慢性粘膜皮肤念珠菌病、Bruton综合征、婴儿期暂时性低 γ 球蛋白血症、Wiskott-Aldrich综合征、共济失调毛细血管扩张症、与胶原病相关的自身免疫功能紊乱、风湿病、神经学疾病、缺血性再灌注病、血压下降反应、血管功能障碍、脉管扩张(angiectasis)、组织损伤、心血管缺血、痛觉过敏、脑缺血,和伴血管化疾病、变应性超敏病(allergic hypersensitivity disorder)、肾小球肾炎(glomerulonephritides)、再灌注损伤、心肌或其他组织的再灌注损伤、具有急性炎症组分的皮肤病、急性紫癜性脑膜炎或其他中枢神经系统炎性疾病、眼和眼眶炎性疾病、粒细胞输血相关综合征、细胞因子诱导的中毒、急性严重炎症、慢性顽固性炎症、肾盂炎、肺硬变、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性大动脉病、动脉内增生、消化性溃疡、心瓣炎和子宫内膜异位。

[0451] 除治疗性用途之外,本发明的抗体还可以用于其他目的,包括诊断方法,如用于本文所述疾病和病状的诊断方法。

[0452] 联合疗法

[0453] 本发明的多特异性抗体、抗体类似物或抗体-药物缀合物(ADC)可以在药物联合制

剂或作为联合疗法的给药方案中与具有例如抗癌特性的第二化合物组合。药物联合制剂或给药方案的第二化合物优选地与该联合的抗体或ADC具有互补活性,从而它们没有彼此不利地影响。

[0454] 第二化合物可以是化疗药、细胞毒性剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素药和/或保心药。此类分子以有效用于预期目的量适当地联合。含有本发明多特异性抗体、抗体类似物或ADC的药物组合物也可以具有治疗有效量的化疗药如微管蛋白形成抑制剂、拓扑异构酶抑制剂或DNA结合剂。

[0455] 其他治疗方案可以与抗癌药的施用组合。联合疗法可以作为同时或依次方案施用。当依次施用时,该联合可以在两次或更多次施用中施用。组合的施用可以包括使用各个制剂或单一药物制剂的共同施用,和以任何顺序的连续施用,其中优选地存在两种(或全部)活性物质同时发挥其生物学活性的一段时间。

[0456] 在一个实施方案中,用多特异性抗体、抗体类似物或ADC的治疗包括组合地施用本文中鉴定的抗癌药和一种或多种化疗药或生长抑制剂,包括共施用不同化疗药的混合物。化疗药包括紫杉烷(如紫杉醇和多西紫杉醇)和/或蒽环类抗生素。此类化疗药的制品和给药方案可以根据制造商的说明书或如技术人员经验确定那样使用。此类化疗药的制品和给药方案也在“Chemotherapy Servicee”, (1992) 编者M.C.Perry, Williams&Wilkins, Baltimore, Md. 中描述。

[0457] 所述多特异性抗体、抗体类似物或ADC可以与抗激素化合物;例如抗雌激素化合物如他莫西芬;抗孕酮药如奥那司酮(EP 616812);或抗雄激素药如氟他胺,以已知用于此类分子的剂量组合。在待治疗的癌症是不依赖激素的癌症时,患者可能先前已经经历过抗激素疗法,并且在癌症变得不依赖激素后,可以将所述抗体或ADC(和任选地如本文所述的其他药物)施用至该患者。还可能有益的是共施用保心药(与预防或减少与疗法相关的心肌功能紊乱)或一种或多种细胞因子至该患者。除以上治疗性方案之外,患者还可以经历手术去除癌细胞和/或放射疗法。

[0458] 上述共施用的药物中任意者的合适剂量是目前使用的那些剂量并且可以因新鉴定的药物和其他化疗药或治疗法的联合作用(协同作用)而降低。

[0459] 联合疗法可以提供“协同”并且证明是“协同的”,即,当所述有效成分一起使用时所实现的作用大于因分别使用所述化合物所产生的作用的总和。将有效成分(1)共配制并且以组合的单元剂量制剂同时施用或递送;(2)作为单独制剂交替或同时递送;或(3)通过一些其他方案施用时,可以获得协同效应。当以交替疗法递送时,可以在依次(例如通过在各自注射器中的不同注射)施用或递送化合物时获得协同效应。通常,在交替疗法期间,将有效剂量的每种有效成分依次地即顺次地施用,而在联合疗法中,将有效剂量的两种或更多种有效成分一起施用。

[0460] 某些示例性靶分子

[0461] 可以由本发明多特异性抗体和抗体类似物靶向的分子的实例包括但不限于可溶性血清蛋白和它们的受体及其他的膜结合蛋白(例如,黏附素)。

[0462] 在其他实施方案中,本发明的抗体类似物能够结合一种,并且本发明的多特异性抗体能够结合一种、两种或更多种选自以下的细胞因子、细胞因子相关的蛋白质和细胞因子受体:BMP1、BMP2、BMP3B (GDF10)、BMP4、BMP6、BMP8、CSF1 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (G-

CSF)、EPO、FGF1 (aFGF)、FGF2 (bFGF)、FGF3 (int-2)、FGF4 (HST)、FGF5、FGF6 (HST-2)、FGF7 (KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNB1、IFNG、IFNW1、FEL1、FEL1 (EPSELON)、FEL1 (ZETA)、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17B、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、PDGFA、PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、LTA (TNF-b)、LTB、TNF (TNF-a)、TNFSF4 (OX40配体)、TNFSF5 (CD40配体)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27配体)、TNFSF8 (CD30配体)、TNFSF9 (4-1BB配体)、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (APO3L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF15 (VEGI)、TNFSF18、HGF (VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、IL1R1、IL1R2、IL1RL1、LL1RL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、IL1HY1、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、AIF1、HGF、LEP (瘦蛋白)、PTN 和THPO。

[0463] 在另一个实施方案中,靶分子是选自以下的趋化因子、趋化因子受体或趋化因子蛋白:CCL1 (I-309)、CCL2 (MCP-1/MCAF)、CCL3 (MIP-Ia)、CCL4 (MIP-Ib)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (mcp-2)、CCLH (嗜酸细胞趋化因子)、CCL13 (MCP-4)、CCL15 (MIP-Id)、CCL16 (HCC-4)、CCL17 (TARC)、CCL18 (PARC)、CCL19 (MDP-3b)、CCL20 (MIP-3a)、CCL21 (SLC/次级非淋巴组织趋化因子-2)、CCL22 (MDC/STC-I)、CCL23 (MPIF-I)、CCL24 (MPIF-2/嗜酸细胞趋化因子-2)、CCL25 (TECK)、CCL26 (嗜酸细胞趋化因子-3)、CCL27 (CTACK/ILC)、CCL28、CXCL1 (GR01)、CXCL2 (GR02)、CXCL3 (GR03)、CXCL5 (ENA-78)、CXCL6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG)、CXCL10 (IP10)、CXCL11 (I-TAC)、CXCL12 (SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、PF4 (CXCL4)、PPBP (CXCL7)、CX3CL1 (SCYD1)、SCYE1、XCL1 (淋巴细胞趋化因子)、XCL2 (SCM-Ib)、BLR1 (MDR15)、CCBP2 (D6/JAB61)、CCR1 (CKR1/HM145)、CCR2 (mcp-1RB/RA)、CCR3 (CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5 (CMKBR5/ChemR13)、CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、CCR7 (CKR7/EBI1)、CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1)、CCR9 (GPR-9-6)、CCRL1 (VSHK1)、CCRL2 (L-CCR)、XCR1 (GPR5/CCXCR1)、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1)、CX3CR1 (V28)、CXCR4、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR81 (FKSG80)、CXCR3 (GPR9/CKR-L2)、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、HM74、IL8RA (IL8Ra)、IL8RB (IL8Rb)、LTB4R (GPR16)、TCP10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、BDNF、C5R1、CSF3、GRCC10 (C10)、EPO、FY (DARC)、GDF5、HDF1A、DL8、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SLIT2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2和VHL。

[0464] 在其他实施方案中,本发明的抗体类似物能够结合一个,并且本发明的多特异性抗体能够结合一个、两个或更多个选自以下的靶:ABCF1;ACVR1;ACVR1B;ACVR2;ACVR2B;ACVRL1;ADORA2A;聚集蛋白聚糖;AGR2;AICDA;AIF1;AIG1;AKAP1;AKAP2;AMH;AMHR2;ANGPT1;ANGPT2;ANGPTL3;ANGPTL4;ANPEP;APC;APOC1;AR;AZGP1 (锌-a-糖蛋白);B7.1;B7.2;BAD;BAFF (BLys);BAG1;BAI1;BCL2;BCL6;BDNF;BLNK;BLR1 (MDR15);BMP1;BMP2;BMP3B (GDF10);BMP4;BMP6;BMP8;BMPIR1A;BMPIR1B;BMPIR2;BPAG1 (网蛋白);BR3;BRCA1;C19orf10 (IL27w);C3;C4A;C5;C5R1;CANT1;CASP1;CASP4;CAV1;CCBP2 (D6/JAB61);CCL1 (1-309);CCL11 (嗜酸性粒细胞趋化因子);CCL13 (MCP-4);CCL15 (MIP-Id);CCL16 (HCC-4);CCL17

(TARC); CCL18 (PARC); CCL19 (MIP-3b); CCL2 (MCP-1); MCAF; CCL20 (MIP-3a); CCL21 (MTP-2); SLC; 次级非淋巴组织趋化因子-2; CCL22 (MDC/STC-I); CCL23 (MPIF-1); CCL24 (MPIF-2/嗜酸性粒细胞趋化因子-2); CCL25 (TECK); CCL26 (嗜酸性粒细胞趋化因子-3); CCL27 (CTACK/ILC); CCL28; CCL3 (MTP-1a); CCL4 (MDP-1b); CCL5 (RANTES); CCL7 (MCP-3); CCL8 (mcp-2); CCNA1; CCNA2; CCND1; CCNE1; CCNE2; CCR1 (CKR1/HM145); CCR2 (mcp-1RB/RA); CCR3 (CKR3/CMKBR3); CCR4; CCR5 (CMKBR5/ChemR13); CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6); CCR7 (CKR7/EBI1); CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1); CCR9 (GPR-9-6); CCRL1 (VSHK1); CCRL2 (L-CCR); CD164; CD19; CD1C; CD20; CD180 (RP105); CD200; CD307 (FcRH5); CD22; CD24; CD28; CD3; CD37; CD38; CD3E; CD3G; CD3Z; CD4; CD40; CD40L; CD44; CD45RB; CD52; CD69; CD72; CD74; CD79A; CD79B; CD8; CD80; CD81; CD83; CD86; CDH1 (E-钙黏着蛋白); CDH10; CDH12; CDH13; CDH18; CDH19; CDH20; CDH5; CDH7; CDH8; CDH9; CDK2; CDK3; CDK4; CDK5; CDK6; CDK7; CDK9; CDKN1A (p21Wap1/Cip1); CDKN1B (p27Kip1); CDKN1C; CDKN2A (P16INK4a); CDKN2B; CDKN2C; CDKN3; CEBPB; CER1; CHGA; CHGB; 几丁质酶; CHST10; CKLFSF2; CKLFSF3; CKLFSF4; CKLFSF5; CKLFSF6; CKLFSF7; CKLFSF8; CLDN3; CLDN7 (密蛋白-7); CLN3; CLU (簇集蛋白); CMKLR1; CMKOR1 (RDC1); CNR1; COL18A1; COL1A1; COL4A3; COL6A1; CR2; CRP; CSF1 (M-CSF); CSF2 (GM-CSF); CSF3 (GCSF); CTLA4; CTNNB1 (b-联蛋白); CTSB (组织蛋白酶B); CX3CL1 (SCYD1); CX3CR1 (V28); CXCL1 (GR01); CXCL10 (IP-10); CXCL11 (I-TAC/IP-9); CXCL12 (SDF1); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2 (GR02); CXCL3 (GR03); CXCL5 (ENA-78/LIX); CXCL6 (GCP-2); CXCL9 (MIG); CXCR3 (GPR9/CKR-L2); CXCR4; CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo); CYB5; CYC1; CYSLTR1; DAB2IP; DES; DKFZp451J0118; DNCL1; DPP4; E2F1; ECGF1; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFN2; EGF; EGFR; ELAC2; ENG; ENO1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB2 (Her-2); EREG; ERK8; ESR1; ESR2; F3 (TF); FADD; FasL; FASN; FCER1A; FCER2; FCGR3A; FcRH1; FcRH2; FCRL4; FGF; FGF1 (aFGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13; FGF14; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2 (bFGF); FGF20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3 (int-2); FGF4 (HST); FGF5; FGF6 (HST-2); FGF7 (KGF); FGF8; FGF9; FGFR3; FIGF (VEGFD); FEL1 (EPSILON); FIL1 (ZETA); FLJ12584; FLJ25530; FLRT1 (纤连蛋白); FLT1; FOS; FOSL1 (FRA-I); FY (DARC); GABRP (GABAa); GAGEB1; GAGEC1; GALNAC4S-6ST; GATA3; GDF5; GFI1; GGT1; GM-CSF; GNAS1; GNRH1; GPR2 (CCR10); GPR31; GPR44; GPR81 (FKSG80); GRCC10 (C10); GRP; GSN (凝溶胶蛋白); GSTP1; HAVCR2; HDAC4; HDAC5; HDAC7A; HDAC9; HGF; HIF1A; HDP1; 组胺和组胺受体; HLA-A; HLA-DOB; HLA-DRA; HM74; HMOX1; HUMCYT2A; ICEBERG; ICOSL; ID2; IFN-a; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFN γ ; DFNW1; IGBP1; IGF1; IGF1R; IGF2; IGFBP2; IGFBP3; IGFBP6; IL-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11RA; IL-12; IL12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL13; IL13RA1; IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; IL17; IL17B; IL17C; IL17R; IL18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP; IL19; IL1A; IL1B; IL1F10; IL1F5; IL1F6; IL1F7; IL1F8; IL1F9; IL1HY1; IL1R1; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2; IL1RL1; IL1RL2; IL1RN; IL2; IL20; IL20RA; IL21R; IL22; IL22R; IL22RA2; IL23; IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29; IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL6ST (糖蛋白130); EL7; EL7R; EL8; IL8RA; DL8RB; IL8RB; DL9; DL9R; DLK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAK1; ERAK2; ITGA1; ITGA2; ITGA3; ITGA6 (a6整联蛋白); ITGAV; ITGB3; ITGB4 (b4整联蛋白); JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAI1; KDR; KITLG; KLF5 (GCB α BP);

KLF6;KLK10;KLK12;KLK13;KLK14;KLK15;KLK3;KLK4;KLK5;KLK6;KLK9;KRT1;KRT19(角蛋白19);KRT2A;KHTHB6(毛发特异性H型角蛋白);LAMAS;LEP(瘦蛋白);Lingo-p75;Lingo-Troy;LPS;LTA(TNF-b);LTB;LTB4R(GPR16);LTB4R2;LTBR;MACMARCKS;MAG或Omgp;MAP2K7(c-Jun);MDK;MIB1;中期因子;MEF;MIP-2;MKI67;(Ki-67);MMP2;MMP9;MS4A1;MSMB;MT3(金属硫蛋白-III);MTSS1;MUC1(黏蛋白);MYC;MYD88;NAG14;NCK2;神经聚糖;NFKB1;NFKB2;NGFB(NGF);NGFR;NgR-Lingo;NgR-Nogo66(Nogo);NgR-p75;NgR-Troy;NME1(NM23A);NOX5;NPPB;NR0B1;NR0B2;NR1D1;NR1D2;NR1H2;NR1H3;NR1H4;NR1I2;NR1I3;NR2C1;NR2C2;NR2E1;NR2E3;NR2F1;NR2F2;NR2F6;NR3C1;NR3C2;NR4A1;NR4A2;NR4A3;NR5A1;NR5A2;NR6A1;NRP1;NRP2;NT5E;NTN4;ODZ1;OPRD1;P2RX5;P2RX7;PAP;PART1;PATE;PAWR;PCA3;PCNA;PDGFA;PDGFB;PECAM1;PF4(CXCL4);PGF;PGR;磷酸聚糖(phosphacan);PIAS2;PIK3CG;PLAU(uPA);PLG;PLXDC1;PPBP(CXCL7);PPID;PR1;PRKCQ;PRKD1;PRL;Proc;PROK2;PSAP;PSCA;PTAFR;PTEN;PTGS2(COX-2);PTN;RAC2(p21Rac2);RARB;RGS1;RGS13;RGS3;RNFI10(ZNF144);ROB02;S100A2;SCGB1D2(亲脂素B);SCGB2A1(乳球蛋白2);SCGB2A2(乳球蛋白1);SCYE1(内皮单核细胞-活化细胞因子);SDF2;SERPINA1;SERPINA3;SERP1NB5(乳腺丝抑蛋白);SERPINE1(PAI-I);SERPDMF1;SHBG;SLA2;SLC2A2;SLC33A1;SLC43A1;SLIT;SPP1;SPRR1B(Spr1);ST6GAL1;STAB1;STAT6;STEAP;STEAP2;TB4R2;TBX21;TCP10;TDGF1;TEK;TGFA;TGFB1;TGFB1I1;TGFB2;TGFB3;TGFB1;TGFB1R1;TGFB1R2;TGFB1R3;TH1L;THBS1(血小板反应蛋白-1);THBS2;THBS4;THPO;TIE(Tie-1);TMP3;组织因子;TLR10;TLR2;TLR3;TLR4;TLR5;TLR6;TLR7;TLR8;TLR9;TNF;TNF-a;TNFAEP2(B94);TNFAIP3;TNFRSF11A;TNFRSF1A;TNFRSF1B;TNFRSF21;TNFRSF5;TNFRSF6(Fas);TNFRSF7;TNFRSF8;TNFRSF9;TNFSF10(TRAIL);TNFSF11(TRANSE);TNFSF12(APO3L);TNFSF13(April);TNFSF13B;TNFSF14(HVEM-L);TNFSF15(VEGI);TNFSF18;TNFSF4(OX40配体);TNFSF5(CD40配体);TNFSF6(FasL);TNFSF7(CD27配体);TNFSF8(CD30配体);TNFSF9(4-1BB配体);TOLLIP;To11样受体;TOP2A(拓扑异构酶Ea);TP53;TPM1;TPM2;TRADD;TRAF1;TRAF2;TRAF3;TRAF4;TRAF5;TRAF6;TREM1;TREM2;TRPC6;TSLP;TWEAK;VEGF;VEGFB;VEGFC;多能聚糖;VHLC5;VLA-4;XCL1(淋巴细胞趋化因子);XCL2(SCM-Ib);XCR1(GPR5/CCXCR1);YY1;和ZFPM2。

[0465] 在某些实施方案中,本发明所包括抗体的一个或多个分子靶分子包括选自CD3、CD4、CD8、CD16、CD19、CD20、CD34、CD64、CD79A、CD79B、CD180(RP105)、CD200和CD307(FcRH5)的CD蛋白;选自EGF受体(HER1)、HER2、HER3或HER4受体的ErbB受体家族成员;选自LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、 α 4/ β 7整联蛋白和 α v/ β 3整联蛋白(包括其 α 或 β 亚基)(例如抗CD11a、抗CD18或抗CD11b抗体)的细胞黏附分子;选自VEGF-A、VEGF-C的生长因子;组织因子(TF); α 干扰素(α IFN);TNF α ;选自IL-1 β 、IL-3、IL-4、IL-5、IL-8、IL-9、IL-13、IL17A/F、IL-18、IL-13Ra1、IL13Ra2、IL-4R、IL-5R、IL-9R的白介素、IgE;血型抗原;flk2/flt3受体;肥胖症(OB)受体;mpl受体;CTLA-4;RANKL、RANK、RSV F蛋白质、蛋白C。

[0466] WO 96/16673描述了一种双特异性抗ErbB2/Fc γ RIII抗体,并且美国专利号5,837,234公开了一种双特异性抗ErbB2/Fc γ RI抗体。一种双特异性抗ErbB2/Fc α 抗体在W098/02463显示。美国专利号5,821,337和6,407,213教授了双特异性抗ErbB2/抗CD3抗体。已经描述了结合CD3抗原上的表位及第二表位的额外双特异性抗体。见例如,美国专利号5,078,998(抗CD3/肿瘤细胞抗原);5,601,819(抗CD3/IL-2R;抗CD3/CD28;抗CD3/CD45);6,

129,914 (抗CD3/恶性B细胞抗原);7,112,324 (抗CD3/CD19);6,723,538 (抗CD3/CCR5);7,235,641 (抗CD3/EpCAM);7,262,276 (抗CD3/卵巢肿瘤抗原)和5,731,168 (抗CD3/CD4IgG)。

[0467] 在一个实施方案中,本发明的多特异性抗体与选自以下的至少两种靶分子结合:IL-1 α 和IL-1 β ;IL-12和IL-18;IL-13和IL-9;IL-13和IL-4;IL-13和IL-5;IL-5和IL-4;IL-13和IL-1 β ;IL-13和IL-25;IL-13和TARC;IL-13和MDC;IL-13和MEF;IL-13和TGF- β ;IL-13和LHR激动剂;IL-12和TWEAK;IL-13和CL25;IL-13和SPRR2a;IL-13和SPRR2b;IL-13和ADAM8;IL-13和PED2;IL17A和IL17F;CD3和CD19、CD138和CD20;CD138和CD40;CD19和CD20;CD20和CD3;CD38和CD138;CD38和CD20;CD38和CD40;CD40和CD20;CD-8和IL-6;CD20和BR3、TNF α 和TGF- β 、TNF α 和IL-1 β ;TNF α 和IL-2、TNF α 和IL-3、TNF α 和IL-4、TNF α 和IL-5、TNF α 和IL6、TNF α 和IL8、TNF α 和IL-9、TNF α 和IL-10、TNF α 和IL-11、TNF α 和IL-12、TNF α 和IL-13、TNF α 和IL-14、TNF α 和IL-15、TNF α 和IL-16、TNF α 和IL-17、TNF α 和IL-18、TNF α 和IL-19、TNF α 和IL-20、TNF α 和IL-23、TNF α 和IFN α 、TNF α 和CD4、TNF α 和VEGF、TNF α 和MIF、TNF α 和ICAM-1、TNF α 和PGE4、TNF α 和PEG2、TNF α 和RANK配体、TNF α 和Te38;TNF α 和BAFF;TNF α 和CD22;TNF α 和CTLA-4;TNF α 和GP130;TNF α 和IL-12p40;VEGF和HER2、VEGF-A和HER2、VEGF-A和PDGF、HER1和HER2、VEGF-A和VEGF-C、VEGF-C和VEGF-D、HER2和DR5、VEGF和IL-8、VEGF和MET、VEGFR和MET受体、VEGFR和EGFR、HER2和CD64、HER2和CD3、HER2和CD16、HER2和HER3;EGFR (HER1) 和HER2、EGFR和HER3、EGFR和HER4、IL-13和CD40L、IL4和CD40L、TNFR1和IL-1R、TNFR1和IL-6R和TNFR1和IL-18R、EpCAM和CD3、MAPG和CD28、EGFR和CD64、CSPGs和RGM A;CTLA-4和BTNO2;IGF1和IGF2;IGF1/2和Erb2B;MAG和RGM A;NgR和RGM A;NogoA和RGM A;OMGp和RGMA;PDL-I和CTLA-4;和RGM A和RGM B。

[0468] 在一个实施方案中,本发明的多特异性抗体与CD3和选自以下的至少一种额外靶分子结合:BLR1、BR3、CD19、CD20、CD22、CD72、CD79A、CD79B、CD180 (RP105)、CR2、FcRH1、FcRH2、FcRH5、FCER2、FCRL4、HLA-DOB和NAG14。

[0469] 其可溶性抗原或片段,任选地与其他分子缀合,可以用作产生抗体的免疫原。对于跨膜分子如受体,这些分子的片段(例如受体的胞外结构域)可以用作免疫原。备选地,表达所述跨膜分子的细胞可以用作免疫原。此类细胞可以源自天然来源(例如癌细胞系)或可以是已经通过重组技术转化以表达所述跨膜分子的细胞。其他抗原及其用于制备抗体的形式对本领域技术人员是显而易见的。

[0470] 抗体-药物缀合物的代谢物

[0471] 另外,本文所述ADC化合物的体内代谢产物落入本发明的范围内至如此程度,从而该产物相对于现有技术是新颖和非显而易见的。此类产物可以例如因所施用化合物的氧化、还原、水解、酰胺化、酯化、酶促裂解等而产生。因而,本发明包括由以下方法产生的新颖的和非显而易见的化合物,所述方法包括将本发明的化合物与哺乳动物接触,持续足以产生其代谢产物的时间段。

[0472] 一般通过以下方式鉴定代谢产物:制备放射标记(例如¹⁴C或³H)的ADC,将其以可检测的剂量(例如大于约0.5mg/kg)肠胃外地施用至动物如大鼠、小鼠、豚鼠、猴或施用至人,允许代谢发生的足够时间(一般约30秒至30小时)并且从尿、血液或其他生物学样品分离其转化产物。这些产物是容易分离的,因为它们被标记(通过使用能够结合代谢物中存留的表位的抗体分离其他产物)。代谢物结构以常规方式测定,例如通过MS、LC/MS或NMR分析。通

常,以与本领域技术人员熟知的常规药物代谢研究相同的方式进行代谢物的分析。只要转化产物不在体内存在,则它们用于治疗性给予本发明ADC化合物的诊断测定法中。

[0473] 成像方法

[0474] 在其他实施方案中,多特异性抗体或抗体类似物可以经反应性巯基用放射性核素、荧光染料、生物发光触发的底物部分、化学发光触发的底物部分、酶和其他检测标记物标记,用于诊断应用、药物动力学应用和治疗性应用的成像实验。通常,标记的多特异性抗体或标记的抗体类似物即“生物标记物”或“探针”,通过注射、灌注或口服摄取法施用至活生物,例如人、啮齿类或其他小动物、灌注的器官或组织样品。随时间进程检测探针的分布并且将其成像。

[0475] 制造品

[0476] 在另一个实施方案中,提供了含有用于治疗上述疾病的材料的制造品或“试剂盒”。该制造品包含容器和在该容器上或与之结合的标签或包装插页。合适的容器包括,例如,瓶、小瓶、注射器、泡罩包装等。容器可以从多种材料如玻璃或塑料中形成。该容器容纳了有效治疗所述疾病的多特异性抗体、抗体类似物或ADC组合物并且可以具有无菌接入口(例如该容器可以是静脉内输液袋或是具有皮下注射针头可穿透的瓶塞的小药瓶)。组合物中的至少一种活性物质是多特异性抗体、抗体类似物或ADC。标签或包装插页说明该组合物用于治疗所选的疾病,如癌症。备选地或额外地,该制造品可以还包含第二(或第三)容器,其包含可药用缓冲液,如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格液和葡萄糖溶液。它可以还包括从商业和用户观点看受欢迎的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、滤器、针头和注射器。

实施例

[0477] 以下是本发明方法和组合物的实例。应当理解,鉴于上文提供的总体描述,可以实施多种其他实施方案。

[0478] 实施例1-硫代Fab和铰合部-cys-Fab的制备、蛋白质产生和双特异性双Fab的合成

[0479] 硫代Fab和铰合部-cys-Fab的制备

[0480] 几种方法用来产生带有用于后续反应中的游离硫氢基的抗体片段。在一种方法中,将半胱氨酸置换通过位点定向诱变在轻链或重链的恒定域内的多个位置导入抗体构建体以产生先前如Junutula等人J Immunol Methods 332(1-2):41-52(2008)中所述的硫代Mab。通过在25mM Tris,pH 8.0中稀释硫代Mab至1mg/mL并且使用Lys-C(Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, VA)以酶对抗体1:1000(wt:wt)的比率在37°C酶促消化1小时,从硫代Mab酶促地产生硫代Fab。所述Lys-C消化用5 μ M蛋白酶抑制剂对甲苯磺酰基-L-赖氨酸氯甲基酮(TLCK)(Bachem, Torrence, CA)终止并且在5mL Hi-Trap SP FF柱(GE Healthcare, Piscataway, NJ)上,使用50mM乙酸钠缓冲液和0-300mM NaCl 10CV梯度,通过阳离子交换层析来纯化。由这种方法产生的硫代Fab在本文中有时称作“酶促硫代Fab”。在另一个方法中,将编码具有工程化的cys残基的Fab的DNA构建体或编码含有一个在铰链区中的天然cys残基的重链片段的DNA构建体亚克隆至质粒表达载体中并且直接在大肠杆菌中表达。由这种方法产生的硫代Fab在本文中有时称作“重组硫代Fab”。第三种方法用于缺少工程化cys残基的抗体并且依赖于IgG铰链区中存在的天然cys残基。这种方法用来产生“铰合部-cys-

Fab”并且在下文进一步详细描述。

[0481] 为了从不含有用于合成反应中的工程化半胱氨酸的天然抗体制备较合部-cys-Fab,我们使用以下酶促方法。尽管以下方法用于曲妥珠单抗,但是该方法总体上适用于任何IgG。将曲妥珠单抗通过在乙酸钠缓冲液中于pH 4.5时处理而用胃蛋白酶(1%w/w)消化。消化1小时后,通过在SP-HP阳离子交换树脂上捕获,从消化混合物中分离F(ab')₂并且通过0-1M NaCl的10CV盐梯度纯化。F(ab')₂随后在含有25mM MES,pH 5.8,2mM EDTA和300mM NaCl的缓冲液中还原。用1mM TCEP还原后,Fab因添加5mM DHAA而氧化以在重链和轻链之间重新形成二硫键。我们例行地观察到,在这些反应条件下,仅重链和轻链之间二硫键的重新形成;铰链区中的两个半胱氨酸残基仍未氧化。

[0482] 在铰合部处的两个游离巯基(cys残基)随后与1摩尔当量的N-乙基马来酰亚胺(NEM)(Sigma Aldrich,St.Louis,MO)反应。含有单一修饰、双重修饰和未修饰的Fab的所得混合物随后与过量的双马来酰亚胺交联剂反应。这些反应条件产生三种产物:带有一个交联剂和一个NEM的Fab,带有两个NEM的Fab,和仅含有一个交联剂的Fab。发现仅含有一个交联剂的Fab没有具有游离半胱氨酸。因而,在这些反应条件下,单一交联剂十分高效地与两个半胱氨酸反应,导致产生了所述半胱氨酸已经被该交联剂环化的分子。将包含以上三种反应产物的材料从反应混合物中经凝胶过滤纯化(以除去不想要的反应组分),并且用于与按照相似方式制备的其他较合部-cys-Fab的偶联中或与硫代Fab的偶联中。仅如所述制备并且含有一个交联剂、一个游离马来酰亚胺和一个游离巯基的较合部-cys-Fab或硫代Fab能够在下文详细描述的双Fab合成反应中反应。

[0483] 蛋白质表达和纯化

[0484] 大肠杆菌中的蛋白质表达通过在摇瓶中或在10升发酵罐中过夜培养如前所述那样实施。见,例如,Carter等人,Biotechnology(N Y)10(2):163-7(1992);Simmons等人,J Immunol Methods 263(1-2):133-47(2002)。在曲妥珠单抗(全长**赫赛汀®**)经工程化以含有反应性半胱氨酸残基(hu4D5-thio-Mab)的情况下,如Junutula等人J Immunol Methods 332(1-2):41-52(2008)中所述那样表达和纯化抗体。表达重组硫代Fab或重组较合部-cys-Fab的大肠杆菌细胞沉淀重悬于含有25mM Tris,pH 7.5,125mM NaCl,5mM EDTA(TEB)的缓冲液中并且使用微流化器裂解。提取物用调节至pH 9.0的絮凝剂聚乙烯亚胺(0.4%)搅拌处理1小时,随后以15,000xg离心45分钟。使用蛋白G和阳离子交换层析,通过本领域已知的标准方法纯化硫代Fab或较合部-cys-Fab。具体而言,上清液经0.22微米滤器过滤并且随后直接施加至蛋白G树脂,一般是Hi-Trap蛋白G(GE Healthcare,Piscataway,NJ)。洗脱用0.2M乙酸进行,随后用SP-HP阳离子交换树脂(GE Healthcare,Piscataway,NJ)捕获。硫代Fab或较合部-cys-Fab用0-1M NaCl的10CV梯度洗脱。纯化的硫代Fab由SDS-PAGE和质谱法表征。这些表征经常显示275Da和306Da的质量增加。发现这些质量增加是未配对的半胱氨酸上的二硫化物加合物,所述二硫化物加合物由还原和氧化而移除以制备用来与双马来酰亚胺交联的硫代Fab。如下实施硫代Fab的还原和氧化。首先,通过在含有25mM MES,pH 5.8,300mM NaCl和5mM EDTA的缓冲液中添加2mM三(2-羧乙基)膦HCl(TCEP-HCl;也称作TCEP)(Pierce[Thermo Fisher Scientific],Rockford,IL),将硫代Fab还原24小时。在还原后,通过添加5mM脱氢抗坏血酸(DHAA)(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO),氧化该蛋白质。分离的硫代Fab由SDS-PAGE和质谱法分析以确保该蛋白质恰当地还原和氧化。

[0485] 双Fab合成

[0486] 图1显示用于合成双Fab的方案。在双Fab合成的第一阶段,使用具有未配对的半胱氨酸的硫代Fab或铰合部-cys-Fab。通常,硫代Fab或铰合部-cys-Fab以蛋白质浓度1mg/mL处于进行还原和氧化的相同缓冲液(MES,pH 5.8,2mM EDTA和300mM NaCl)中(图1,小图1)。在这个阶段,存在两种潜在的不想要的反应产物,二硫化物二聚体和交联的二聚体。我们发现在合成的这个阶段,蛋白质浓度1mg/mL是该反应的重要特征,因为二聚化在这个蛋白质浓度上最小化。此外,通过使用带有EDTA的低pH缓冲液控制反应,有助于使二聚化最小化。添加五倍过量的双马来酰亚氨基交联剂(Quanta BioDesign,Powell,OH)至反应混合物(图1,小图2)。这种五倍过量的交联剂也有助于使不想要的二聚化最小化。该反应在室温(RT)或37℃孵育4小时直至完成反应。随后将混合物浓缩至适于凝胶过滤的体积(图1,小图3)。我们一般使用22mL S-200Tricorn柱(GE Healthcare,Piscataway,NJ)用于μg至mg量的合成。这个第一凝胶过滤步骤允许移除未使用的交联剂,产生与交联剂缀合的纯化的硫代Fab或铰合部-cys-Fab。上述条件一般地产生至少90%或更多的合乎需要的产物。没有硫代Fab或铰合部-cys-Fab仍保持为游离巯基,因为全部巯基均与交联剂缀合或借助未配对的半胱氨酸由二硫键结合至另一个硫代Fab或铰合部-cys-Fab。

[0487] 随后将分离和纯化的硫代Fab(或铰合部-cys-Fab)外加交联剂类添加至第二硫代Fab(或铰合部-cys-Fab)并且浓缩至5mg/mL或更高,通常浓缩至适于凝胶过滤的体积(图1,小图4)。我们发现在这个合成阶段期间,至少5mg/mL的蛋白质浓度对于驱动反应完成是重要的。较低的蛋白质浓度导致仅少量交联的双Fab二聚体形成。不受理论约束,我们假设通过增加反应物的浓度克服了阻碍交联的双Fab二聚体形成的位阻效应或粘度相关变量。此外,我们测试了至多到并包括65mg/mL的蛋白质浓度范围。我们发现了蛋白质浓度和反应时间之间的相关性,从而蛋白质浓度越高,反应越快地达到完成(数据未显示)。在室温或37℃ 2-24小时后,反应完成,如质谱法所测定(图1,小图4)。通常,一种试剂过量并且在终末混合物中仍保持未偶联。再次通过凝胶过滤纯化完成的反应;这次,我们收集了含有经游离半胱氨酸氨基酸(在硫代Fab的情况下)或经位于铰链区中的未配对半胱氨酸(在未工程化的铰合部-cys-Fab情况下)不可逆交联的100kD双Fab二聚体峰(图1,小图4)。两个步骤期间的反应进程经常通过质谱法监测,所述质谱法清晰地显示两种反应物的存在和双Fab产物的形成(图1,小图4)。通过质谱法和SDS-PAGE确定第二次凝胶过滤后合乎需要的产物的纯度。当还原和SDS-PAGE分析时,因存在代表不可还原性交联链的50kD条带而观察到不可逆性交联(图1,小图5)。以小规模使用上述方法,我们一般用微克量起始材料实现微克产量。此外,在较大的规模上,我们一般从毫克量的起始材料实现毫克产量。

[0488] 实施例2-靶向Her2和Her1的双Fab的合成和双Fab体外生物学活性的分析

[0489] 为探索双Fab的多种生物学活性,我们合成了靶向Her轴的组分、特别是Her2和Her1的双Fab。Her轴在推动癌细胞生长的重要性已经充分地进行文献报道,并且多种有效的抑制性抗体是轻易可获得的。见,例如,Kumar,R.等人,Semin Oncol 27(6Suppl 11):84-91;在92-100(2000)处的讨论;Yarden,Y.等人,Nat Rev Mol Cell Biol 2(2):127-37(2001);Takai,N.等人,Cancer 104(12):2701-8(2005);Patel,D.等人,Int J Oncol Oncol34(1):25-32(2009)。已经提出,组合分子可能提供超过单一抗体疗法的相加或甚至协同益处。见,例如,Ranson等人,Oncology 63Suppl 1:17-24(2002);Jackson,J.等人,

Cancer Res 64 (7) :2601-9 (2004) ;Lee-Hoeflich, S.T. 等人, Cancer Res 68 (14) :5878-87 (2008)。在这一点上,当两种受体活跃地协作以推动肿瘤细胞生长时,情况尤其如此。

[0490] 我们从两个靶向Her2的不同抗体并从两个靶向Her1 (EGFR) 的不同抗体产生双特异性双Fab。这两个靶向Her2的抗体是帕妥珠单抗 (2C4) 和曲妥珠单抗 (Herc)。这两种抗体均是充分表征的分子,包括已知它们怎样结合其靶。Nature 421 (6924) :756-60 (2003) ; Cancer Cell (4) :317-28 (2004)。两个靶向Her1的抗体是D1-5和C3-101。这两个抗体与EGFR的胞外结构域 (ECD) 结合,并且它们在EGFR的ECD上结合的区域是已知的 (国际专利申请公开号W0 2010/108127)。

[0491] 对于这四个抗体的每一者,如所述在大肠杆菌中产生重组硫代Fab。随后使用合成矩阵,我们从这四个硫代Fab中以组合的形成合成双Fab。我们以大约5mg每种硫代Fab为开始。我们组合不同的硫代Fab以合成下表1中以粗体字显示的10种独特分子。

[0492] 表1. 双Fab合成矩阵

[0493]

步骤 1(+双马来酰亚胺基交联剂以形成双-Mal-硫代 Fab)				
步骤 2 (与来自步骤 1 的双-Mal-硫代 Fab 反应)	2C4 ^{VT10C}	Herc ^{VT10C}	D1-5 ^{VT10C}	C3-101 ^{VT10C}
2C4 ^{VT10C}	2C4 ^{VT10C} /2C4 ^{VT10C} (1204)	Herc ^{VT10C} /2C4 ^{VT10C}	D1-5 ^{VT10C} /2C4 ^{VT10C}	C3-101 ^{VT10C} /2C4 ^{VT10C}
Herc ^{VT10C}	2C4 ^{VT10C} /Herc ^{VT10C} (1191)	Herc ^{VT10C} /Herc ^{VT10C} (1188)	D1-5 ^{VT10C} /Herc ^{VT10C}	C3-101 ^{VT10C} /Herc ^{VT10C}
D1-5 ^{VT10C}	2C4 ^{VT10C} /D1-5 ^{VT10C} (1192)	Herc ^{VT10C} /D1-5 ^{VT10C} (1189)	D1-5 ^{VT10C} /D1-5 ^{VT10C} (1400)	C3-101 ^{VT10C} /D1-5 ^{VT10C}
C3-101 ^{VT10C}	2C4 ^{VT10C} /C3-101 ^{VT10C} (1187)	Herc ^{VT10C} /C3-101 ^{VT10C} (1190)	D1-5 ^{VT10C} /C3-101 ^{VT10C} (1193)	C3-101 ^{VT10C} /C3-101 ^{VT10C} (1401)

[0494] 从合成过程回收大约1mg在表1中所列的每种双Fab。给予双Fab中每一者如表1中所示的独特识别码(括号中的编号)。每种双Fab的纯度由SDS-PAGE (图2A中所示) 和质谱法(数据未显示) 分析。测试这些分子以确定它们是否保留与亲本抗体相似的抑制细胞信号传导和细胞增殖的能力。我们测试了细胞信号传导活性的两个特定读出结果:EGFR在应答于转化生长因子(TGFα)时的磷酸化和Her3在用调蛋白(HRG)处理后的磷酸化。Her3磷酸化测定法特别检测Her2在应答于调蛋白时与Her3二聚化的能力(Junttila, T.T. 等人, Cancer Cell 15 (5) :429-40 (2009))。二聚化允许Her2磷酸化Her3并且允许其激活信号传导途径,并且这受赫赛汀®和赫赛汀®Fab抑制。见上文。

[0495] 为测定所述双Fab的抗EGFR(抗Her1) 活性,将NR6-EGFR细胞用5nM TGFα处理以刺

激EGFR的酪氨酸磷酸化,随后用所示的双Fab(图2B,上半部小图)以50nM单一剂量处理。所测试的每个双Fab,1187、1189、1190和1192,均含有衍生自抗EGFR(抗Her1)抗体D1-5或C3-101的一个Fab。如Junttila,T.T.等人,Cancer Cell 15(5):429-40(2009)中所述,通过用 α -pTyr探测蛋白质印迹物分析磷酸化活性。如图2B上半部小图中所示,所测试的每个双Fab均显示出强力地抑制NR6-EGFR细胞中EGFR的磷酸化。**爱必妥®**(西妥昔单抗)是由Bristol-Meyers Squibb Co.销售的单克隆抗体,其与EGFR的ECD特异性结合,并且被用作阳性对照。印迹物用 α -微管蛋白探测以归一化每条泳道中的蛋白质载量。

[0496] 为测定对Her2-Her3二聚化的抑制作用,通过如Junttila,T.T.等人,Cancer Cell 15(5):429-40(2009)中所述的抗酪氨酸蛋白质印迹法监测MCF7细胞中调蛋白(HRG)诱导的Her3的酪氨酸磷酸化。MCF7细胞用5nM HRG处理以刺激Her3的磷酸化,随后用所示的双Fab(图2B,下半部小图)以50nM单一剂量处理。所测试的每个双Fab,1187、1191、1192和1204,均含有衍生自抗Her2抗体2C4的至少一个Fab。如图2B下半部小图中所示,所测试的每个双Fab均显示出强力地抑制Her3磷酸化,这是阻止Her2-Her3二聚化的结果。亲本抗体2C4(帕妥珠单抗)用作阳性对照。印迹物用 α -微管蛋白探测以归一化每条泳道中的蛋白质载量。对分子的双Fab滴定显示,所述分子保留与亲本抗体Fab相似的有效抑制浓度(数据未显示)。

[0497] 接下来,我们检查了多种双Fab对培养物中细胞生长的影响。乳腺肿瘤细胞系MDA-175(ATCC HTB-25)或BT474(ATCC No.HTB-20)用来测试含有抗Her2衍生的Fab的双Fab。在本文未显示的实验中,我们已经确定MDA-175细胞表达Her2受体。一个用人EGFR稳定转染的小鼠成纤维细胞细胞系NR6-EGFR细胞(见Glading等人,J.Biol.Chem.275:2390-98[2000];Cancer Res.67(3):1228-38[2007])用来测试含有抗Her1衍生的Fab的双Fab。使用标准细胞培养物方法维持和增殖这些细胞系中的每一者。对于细胞增殖测定法,将细胞培育至汇合,并将培养基更换为新鲜培养基(DMEM:F12,10%FCS,PenStrep,Glutamax)。将细胞经胰蛋白酶消化收获,通过离心洗涤并且交换至含有1%血清的新培养基中。将细胞调整至密度为每毫升20,000个细胞,并且添加250 μ L至96孔平板的每个孔(5,000个细胞/孔)。将铺种的细胞培育过夜,并且次日随后通过直接添加抗体试剂(例如,双Fab)至孔进行攻击。细胞在这些条件下培育五日,此后将培养基从孔中吸出并替换为250 μ L新鲜培养基。将阿尔玛蓝(25 μ L)添加至每个孔并且在37 $^{\circ}$ C孵育3-4小时。平板在荧光平板读数仪中在545/590nm(激发/发射)处读取。细胞增殖的量直接以相对荧光单位(RFU)报告或通过相对于对照归一化来报道。

[0498] 图2C和2D显示了在所示细胞系上测试多种双Fab对细胞生长影响的结果。图2C表明,各自含有两个抗Her2 Fab的双Fab 1191和1204是MDA-175细胞生长的最有力抑制剂。单Fab分子2C4-Fab和Herc-Fab是最不强力的抑制剂,并且含有一个抗Her2 Fab和一个抗Her1 Fab的双Fab 1192在该实验中在其抑制MDA-175细胞生长的能力方面是中等的。图2D表明,含有两个抗Her1 Fab的双Fab 1193是NRG-EGFR细胞生长的有力抑制剂,类似于D1-5(抗Her1)单克隆抗体。含有一个抗Her1 Fab以及C3-101-Fab的双Fab,尽管仍展示出生长抑制性活性,然而却是较不强力的抑制剂。因此,这些结果表明,含有2C4和含有Herc的双Fab(1192、1204和1191)能够在表达Her2的MDA-175细胞中抑制细胞增殖。并且,含有抗EGFR Fab的双Fab(1187、1190、1192和1193)能够在表达EGFR的细胞系(NR6-EGFR)中抑制细胞增殖。

[0499] 接下来,我们直接将作为其亲本抗体的结构类似物的两个双Fab的体外细胞生长抑制性活性与其亲本抗体的体外细胞生长抑制性活性比较。在MDA-175细胞上在帕妥珠单抗(2C4)和双Fab 1204(2C4^{V110C}/2C4^{V110C})之间进行第一个比较。图2E表明,LC-110C-连接的2C4双Fab显然在该实验中在抑制MDA-175细胞增殖方面显出双相活性。在较低浓度(1nM),该双Fab显然刺激生长,而在较高浓度,它具有抑制性。在约2nM的半数最大抑制作用与亲本抗体帕妥珠单抗比较。

[0500] 在过量表达Her2的BT474细胞上在曲妥珠单抗和双Fab 1188(Herc^{V110C}/Herc^{V110C})之间进行第二个比较。在该实验中,我们还包括曲妥珠单抗Fab。图2F中显示结果。基于我们用上文讨论的帕妥珠单抗和双Fab 1204所观察的结果,我们预期在该实验中观察到,双Fab 1188将抑制BT474细胞增殖,这类似于亲本抗体曲妥珠单抗。图2F表明,如所预期那样,曲妥珠单抗强烈地抑制BT474细胞增殖并且曲妥珠单抗-Fab是细胞生长的较不强力的抑制剂。然而令人惊讶地,我们观察到双Fab 1188对细胞增殖具有正好相反的作用。如图2F中清晰地显示,双Fab 1188强烈地促进BT474细胞生长。BT474细胞快速增殖,即便不存在任何外源激动剂,并且实际上,不存在这种细胞系的已知激动剂。鉴于BT474细胞系的这些增殖特性,发现双Fab 1188可能充当这些细胞系的激动剂,这是特别令人惊讶和出乎意料的。

[0501] 曲妥珠单抗的Fab臂和双Fab 1188的Fab之间的一个结构差异是缀合的部位。与具有Fab经其重链连接的典型IgG结构的亲本抗体相反,双Fab 1188的两个硫代Fab经它们的轻链在可变域和第一恒定域之间的位置缀合。因为未曾鉴定到直接活化Her2受体的Her2的配体(Yarden,Y.等人,Nat Rev Mol Cell Biol 2(2):127-37(2001);Jackson,J.等人,Cancer Res64(7):2601-9(2004)),出乎意料的是,所述双Fab和亲本抗体之间的这个结构差异导致该双Fab具有激动剂活性而非其亲本的拮抗剂活性。因此,鉴定到在这些条件下具有激动剂活性的曲妥珠单抗类似物是相当令人惊讶的。我们想知道结构中的其他变异是否可能影响该分子的生物学活性。我们因此通过产生衍生自曲妥珠单抗的4种不同硫代Fab而开发了交联变体的结构性阵列或类似物文库。下文进一步详细讨论这些变体。

[0502] 实施例3-曲妥珠单抗衍生的双Fab结构性变体的合成及表征。

[0503] 使用上述的矩阵重组方法,我们合成一系列曲妥珠单抗衍生的双Fab结构性变体。我们选择4个不同的硫代连接点来合成双Fab;所述位置的两个位于重链中并且所述位置的两个位于轻链中。含有硫代连接点的Fab衍生自三个不同来源;1)带有半胱氨酸置换的硫代Mab,其用赖氨酸-C消化以从抗体释放所述硫代Fab,2)直接在大肠杆菌中表达并且纯化的带有半胱氨酸置换的硫代Fab,和3)铰合部-cys-Fab,其通过将单个交联剂与用胃蛋白酶消化后的非工程化抗体的铰链区连接的上述酶促方法产生。这种方法在硫代Fab中产生四个不同置换点用于与其他硫代Fab重组,因而产生一组结构性变体(图3A)。这四个不同的置换位置处于轻链中的位置110(LC^{110Cys})处、轻链中的位置205(LC^{205Cys})处、重链中的位置118(HC^{118Cys})处和重链中的铰链区(HC^{Hg-Cys})处。合成以矩阵模式进行,在所述矩阵模式中,四个硫代Fab的集合首先与交联剂缀合并随后彼此再重组以产生16种分子,其中10种在质量和结构上是独特的。所述硫代Fab在图3A中示意性显示,连同合成的双Fab的独特识别码和每个双Fab的每个硫代Fab的来源的清单。来自合成反应的纯化的终产物由质谱法表征以确保试验材料的纯度。此外,我们通过非还原SDS-PAGE分析双Fab的分子量(图3B)。如图3B中所示,全部双Fab结构性变体均具有十分不同的表观分子量,考虑到来源硫代Fab的每一

者具有相同的分子量并且相同的交联剂用来合成每个双Fab,这是一个有趣的结果。不同表观分子量的最可能解释是所述连接位点(硫代连接点)产生在变性条件下出现的线性延长的多肽中所观察到的结构性变体。

[0504] 接下来,我们测试双Fab结构性变体的每一者与曲妥珠单抗相比对BT474细胞增殖的影响。图3C显示以(横轴上显示的)变动浓度测试时,所述双Fab中每一者和亲本抗体曲妥珠单抗对BT474细胞生长的影响。活细胞通过阿尔玛蓝染色确定并且报道为相对于未处理的对照作归一化的最大值百分数(纵轴上的Max%)。如图3C中所示,曲妥珠单抗双Fab结构性变体显示出宽泛的活性范围,其从展示出与亲本抗体相似的活性的拮抗剂(双Fab 1324、1328和1329)至十分强力的激动剂(双Fab 1321、1322、1323和1325)。有趣地,这些激动剂双Fab中的四种是比已鉴定的原始激动剂双Fab 1188更强力的激动剂(图3C)。在这个测定法中,最强力的激动剂是双Fab 1325,它是HercHC^{118Cys}和HercLC^{205Cys}的组合。最后,进行一项时间过程实验,其测试双Fab 1325与**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)相比对BT474细胞生长的影响。如图3D中所示,**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)(空心棒)在整个实验过程期间抑制细胞生长,而双Fab 1325(上斜纹棒)促进细胞生长,与上述细胞生长测定法一致。向下斜纹棒显示未接受处理的对照细胞。

[0505] 我们考虑了与分子的某些物理属性相关的双Fab的多种连接组合。如图3B中所示,SDS-PAGE分析揭示出不同双Fab之间表观分子量的差异。然而,这不是双Fab的BT474细胞增殖活性的可靠预测物。最引人注目地,在BT474测定法中的最强力激动剂HercHC^{118Cys}-HercLC^{205Cys}显示出与强力拮抗剂的表观分子量十分接近的表观分子量。除SDS-PAGE上观察到的迁移率差异(这可能归因于连接位点的位置)之外,我们还分析了其他物理特性。我们通过Scatchard分析、SEC-MALS洗脱和分子量及流体动力学半径对内化、靶受体的亲和力进行测试。下表2中显示分析细胞表面解离常数(Kd)和每个细胞对所示分子的位点数的结果。在激动剂和拮抗剂分子之间没有观察到显著差异。图4提供在Shodex SEC上的凝胶过滤分析结果,其显示了所示分子的相对保留时间(在横轴上显示)(RT)和流体动力学半径(Rh)。再次,在激动剂和拮抗剂分子之间没有观察到显著差异。因此,这些实验没有揭示激动剂和拮抗剂分子之间在这些物理特性方面的任何显著差异,仅揭示了SDS-PAGE上迁移率的差异(图3B)和SEC上保留的轻微偏移(图4)。

[0506] 表2. 拮抗剂和激动剂细胞表面Kd和每细胞位点数

[0507]

分子	Kd1(nM)	Kd2(nM)	平均数 (nM)	每细胞位 点数	细胞系
双 Fab 1188 (激动剂)	3.2	3.3	3.3	1.70×10^6	Calu3
赫赛汀(曲妥 珠单抗) (拮抗剂)	3.6	3.8	3.7	1.50×10^6	Calu3
赫赛汀-Fab (曲妥珠单抗) (拮抗剂)	7.3	9.2	8.3	2.10×10^6	Calu3
双 Fab 1325 (激动剂)	3.9	4.0	4.0	0.98×10^6	BT474

[0508]

赫赛汀(曲妥 珠单抗) (拮抗剂)	4.4	4.5	4.5	0.86×10^6	BT474
-------------------------	-----	-----	-----	--------------------	-------

[0509] 接下来,我们分析Her信号传导途径,特别地通过检查在激动剂处理后的BT474细胞中的受体活化来分析。在过量表达Her2的细胞系如BT474中,赫赛汀®(曲妥珠单抗)抑制Her2和Her3之间不依赖配体的相互作用,这是所述抗体在细胞培养物中抗增殖作用的原因(Junttila, T. T. 等人Cancer Cell 15 (5) :429-40 (2009))。Her2/Her3相互作用遭赫赛汀®(曲妥珠单抗)破坏导致Her3的磷酸化丧失和丝氨酸/苏氨酸激酶AKT的活性下降。见上文。

[0510] 我们比较了激动剂双Fab 1325、拮抗剂双Fab 1329、亲本抗体赫赛汀®(曲妥珠单抗)和缺少磷酸化作用的对照抗体gD对AKT及Her3的磷酸化的影响。BT474细胞用这些分子中的每一者处理。细胞在处理开始后10分钟、30分钟和2小时收获。通过ELISA,用抗磷酸化AKT抗体测量细胞裂解物的AKT磷酸化。图5A中显示结果。拮抗剂赫赛汀®(曲妥珠单抗)和双Fab 1329减少磷酸化AKT的量,如ELISA所测量,而激动剂双Fab1325增加磷酸化AKT的量(图5A)。所述抗体和双Fab 1329的抑制性活性在10分钟时观察到并且继续略微地增加直至两小时。双Fab拮抗剂1329在本实验的头30分钟内较亲本抗体效力略低,但是在2小后达到相同抑制水平。(图5A)。然而,激动剂双Fab 1325在10分钟后导致磷酸化AKT的水平增加,并且磷酸化AKT的水平在2小时处理期间继续略微上升(图5A)。用gD观察到抗体作用,其中磷酸化AKT水平在处理後略微升高。然而,这种作用处于未处理的变异性范围内。使用磷酸化AKT抗体的蛋白质印迹分析还显示,磷酸化AKT的水平应答于激动剂双Fab 1325而增加(图5B,比较pAKT列与AKT列)。

[0511] 我们还检验了Her3磷酸化的水平,因为赫赛汀®(曲妥珠单抗)处理已知降低磷酸化Her3的水平(Cancer Cell 15 (5) :429-40 [2009])。对于这些实验,BT474细胞用

赫赛汀® (曲妥珠单抗)、双Fab 1325、双Fab 1329、或gD在96孔平板中处理达两小时。在所示的时间(10分钟、30分钟或2小时)上,将细胞增溶。如下实施细胞裂解物的蛋白质印迹分析。将细胞裂解物通过SDS-PAGE分离并且转移至硝酸纤维素膜。硝酸纤维素膜用所示的磷酸化特异性抗体(pHER3、pAKT或pMAPK)或非磷酸化特异性抗体(HER3、AKT或MAPK)探测,以评估所示Her信号传导途径酶的活化状态。使用抗微管蛋白抗体作为对照。如图5B中所示,使用抗Her3磷酸酪氨酸抗体的蛋白质印迹法分析显示应答于拮抗剂**赫赛汀®** (曲妥珠单抗)和双Fab 1329的磷酸化Her3的特征性和预期减少,这在两小时期间出现(图5B,比较pHER3列与HER3列)。用gD抗体处理细胞没有影响Her3磷酸化的水平(图5B,比较pHER3列与HER3列)。令人惊讶地,我们没有观察到因激动剂双Fab 1325处理所致的磷酸化Her3的预期增加(图5B,比较pHER3列与HER3列)。实际上,在2小时时间期间,磷酸化Her3的量存在轻微下降,这类似于采用拮抗剂时所观察到的情况(图5B)。观察到的MAPK应答于双Fab 1325处理时的磷酸化(图5B,比较pMAPK列与MAPK列)表明,该激动剂可以活化通常与配体诱导的活化相关的途径。这令人惊讶的结果提出了Her2双Fab激动剂借助何种机制发挥作用的问题。

[0512] 因此接下来,我们研究了当细胞用激动剂双Fab 1325处理时,对Her2的磷酸化是否存在直接影响。先前已经显示,**赫赛汀®** (曲妥珠单抗)处理没有显著地改变Her2的磷酸化状态。Kito, K.等人, Curr Genomics 9 (4) :263-74 (2008)。因为Her2在基态下高度磷酸化(见上文),所以我们使用定量质谱法检测Her2应答于不同分子时的磷酸化位点变化。使用磷酸化作图技术,我们确定在未处理的BT474细胞中的Her2内的多个位点磷酸化至不同水平(图5C, 基柱)。图5C中的表提供了源自胰蛋白酶裂解Her2的一系列磷酸化肽。每个肽序列中以小体大写粗斜体字母显示的氨基酸表示磷酸化的目的残基。对这些位点的定量测量表明,用**赫赛汀®** (曲妥珠单抗)处理后,与未处理的细胞相比,磷酸肽的磷酸化水平存在少量变化(图5C和5E)。但是用激动剂双Fab 1325处理显示了与未处理的细胞相比,磷酸化量增加的几个磷酸化位点(图5C和5E)。用PI3K途径的已知激动剂调蛋白处理后,一些磷酸化位点在磷酸化水平方面也增加(图5C和5E)。我们还进行了统计检验。对于每种肽,将混合效应模型对相对磷酸化水平拟合,以处理作为固定效应并且以样品作为随机效应。如图5E中所示,用Tukey-Kramer法以调节多重比较,实施组的配对比较。这控制了与进行每种肽的多重统计检验相关的总体假阳性率。总之,这些结果揭示了细胞信号传导途径不依赖配体和不依赖Her3的可能活化,其导致增殖。此外,此类结果可能导致鉴定参与细胞增殖的额外的信号传导组分,因而导致形成细胞增生性病症(如,但不限于癌症)的新治疗靶。

[0513] 实施例4—靶向Fc γ RIIb和Fc ϵ RI的双Fab的合成和表征

[0514] 为检验双Fab合成方法对其他分子靶的总体适用性,使用衍生自靶向Fc γ RIIb的一种抗体(5A6)的硫代Fab或较合部-cys-Fab和衍生自靶向Fc ϵ RI α 的一种抗体(22E7)的硫代Fab或较合部-cys-Fab,我们设计了双特异性双Fab矩阵。5A6和22E7抗体在美国专利公开号20060073142和Jackman等人, J. Biol. Chem. 285:20850-20859 (2010) 中描述。Fc γ RIIb细胞表面蛋白是一种可以使附近酪氨酸激酶受体如Fc ϵ RI α 脱磷酸以抑制其活性的蛋白酪氨酸磷酸酶。我们先前已经描述了一种靶向肥大细胞表面上这两种受体的双特异性IgG(见上文)。此外,我们显示,所述双特异性抗体与Fc ϵ RI α 和Fc γ RIIb结合并使它们交联,以形成异源二聚体受体复合物,其强力抑制由IgE与Fc ϵ RI α 结合启动的细胞信号传导和组胺释放。见

上文。基于所述双特异性IgG的作用机制,我们推测,靶向肥大细胞表面上Fc γ RIIb和Fc ϵ RI α 的双Fab可能具有类似的作用机制。因而,不受理论约束,我们假设用靶向Fc γ RIIb和Fc ϵ RI α 的双Fab处理将导致招募Fc γ RIIb至活化的受体复合物并导致组胺释放的抑制。

[0515] 为合成靶向Fc γ RIIb和Fc ϵ RI α 的双Fab,我们从每一个在轻链中位置110和重链中位置121处具有cys置换的亲本抗体产生硫代Fab。我们还从每一个在铰链区中仅具有一个cys的亲本抗体产生铰合部-cys-Fab。这些铰合部-cys-Fab使用重组DNA方法制备,即,通过亚克隆亲本抗体Fab的DNA片段并且在大肠杆菌中表达它,随后进行纯化。全部重组DNA方法和蛋白质纯化方法均是本领域技术人员熟知和上文通常描述的标准方法。下表3显示双Fab合成矩阵,该矩阵显示硫代连接点并为每个双Fab提供独特标识编号(括号内)。

[0516] 表3双Fab合成矩阵

[0517]

步骤 1(+双马来酰亚胺交联剂以形成双-Mal-硫代 Fab)			
步骤 2 (与来自步骤 1 的 双-Mal-硫代 Fab 反应)	Fc γ RIIb ^{110C}	Fc γ RIIb ^{121C}	Fc γ RIIb ^{Hg-Cys}
Fc ϵ RI α ^{110C}	Fc γ RIIb ^{110C} /Fc ϵ RI α ^{110C} (1307)	Fc γ RIIb ^{121C} /Fc ϵ RI α ^{110C} (1301)	Fc γ RIIb ^{Hg-Cys} /Fc ϵ RI α ^{110C} (1304)
Fc ϵ RI α ^{121C}	Fc γ RIIb ^{110C} /Fc ϵ RI α ^{121C} (1305)	Fc γ RIIb ^{121C} /Fc ϵ RI α ^{121C} (1299)	Fc γ RIIb ^{Hg-Cys} /Fc ϵ RI α ^{121C} (1302)
Fc ϵ RI α ^{Hg-Cys}	Fc γ RIIb ^{110C} /Fc ϵ RI α ^{Hg-Cys} (1306)	Fc γ RIIb ^{121C} /Fc ϵ RI α ^{Hg-Cys} (1300)	Fc γ RIIb ^{Hg-Cys} /Fc ϵ RI α ^{Hg-Cys} (1303)

[0518] 我们先前描述了表达Fc ϵ RI α 和Fc γ RIIb的RBL细胞系变体的产生(Jackman等人, J.Biol.Chem.285:20850-20859(2010))。我们检验了表3中所列每种双Fab对来自表达Fc ϵ RI α 和Fc γ RIIb的RBL细胞的组胺释放的影响。细胞用增加浓度的每种双Fab处理,并且通过ELISA测量组胺释放。图6A-B中显示结果。如可以见到,不同的双Fab显示一系列活性。对于有效拮抗剂中的几种,在370-110ng/mL的浓度观察到最高活性水平的抑制。这据推测可能是形成最大数目抑制性复合物的浓度。在更高的浓度上,双Fab的一条臂可以与其受体结合,而另一条臂可以不结合抑制性复合物的另一个其他受体。这将类似于需要受体二聚化以产生胞内信号时一些二聚体激素具有的钟形活性曲线(例如VEGF和其受体)。此外,所述分子中的几种不显示任何抑制性活性,而一种分子显示非凡的抑制作用。图6B中显示这些结果。不展示强力抑制作用的四个分子(1299、1300、1301、1302)含有至少一个重链121Cys连接。最强力的抑制性分子1303通过铰合部-cys与两个硫代fab连接。

[0519] 实施例5-修饰的双Fab和体内活性

[0520] 上述双Fab的一个特征是体内预期的短半寿期,原因至少部分地在于分子中缺少Fc区。对于某些体内应用,需要双Fab拥有与天然抗体相似的药物代谢动力学特性。因此,我们已经设计一种用于产生改性交联剂的方法,其中所述改性交联剂用于双Fab的合成中。如下文详述,此类改性交联剂的使用允许添加用于调节体内半寿期的试剂,例如但不限于聚乙二醇(PEG)。此外,如本文所述的改性交联剂允许添加用作成像剂或检测剂的试剂,例如

但不限于,荧光标签或细胞毒性剂,例如但不限于单甲基溴瑞司他汀E (MMAE),或拥有其他合乎需要的特性或功能的试剂,例如但不限于siRNA。

[0521] 合成改性交联剂和修饰的双Fab

[0522] 我们设计了合成改性交联剂的方法,所述改性交联剂将允许任何硫氢反应性部分的连接。在下文中,我们描述了一种用于连接N-琥珀酰亚氨基-S-乙酰硫代乙酸酯(SATA)至双马来酰亚胺以形成具有受保护的SH基团的双马来酰亚胺乙酰硫代乙酸酯(BMata)的方法,所述受保护的SH基团可以在进一步的反应中用于连接合乎需要的官能团。

[0523] 我们用从Quanta BioDesign Limited, Powell, OH获得的双马来酰亚胺(MW 546.62)开始。将六十微摩尔(32mg)溶解于100 μ l二甲胺(DMA)中并且用1ml乙腈稀释。将130微摩尔(31mg) SATA (N-琥珀酰亚氨基-S-乙酰硫代乙酸酯, MW 231.23, Thermo Fisher Scientific)溶解于1ml乙腈中并且添加至双马来酰亚胺溶液。添加Hepes缓冲液(钾盐, pH 7.1, 0.5M)至终浓度0.15M, 并且将反应混合物在黑暗下在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。该混合物用0.1%三氟乙酸(TFA)稀释4倍,随后在10x250mm C4柱(Vydac)上用0.1% TFA中15-50%的乙腈梯度分离。将如通过电喷雾质谱法(Agilent 6210 TOF)所评估的含有双马来酰亚胺乙酰硫代乙酸酯(MW 662.29)的级分合并、在真空离心下干燥并且在-20 $^{\circ}$ C贮存。图7A中显示了合成这种改性交联剂BMata的反应。

[0524] 可以与BMata连接的一种试剂是PEG,我们研究了它对修饰的双Fab的体内半寿期的影响。我们遵循以下方法以产生一种双Fab,其含有用于随后与PEG反应的BMata。

[0525] 用所述BMata交联剂产生一个批次的靶向EGFR (Her1) (C3-101硫代Fab^{V110C})和Her2 (曲妥珠单抗(Herc)硫代Fab^{V110C})的双Fab。使用500mg每种硫代Fab作为起始材料,合成约500mg修饰的双Fab。将硫代Fab在大肠杆菌中表达并且如上文所述纯化。通过BMata首先与曲妥珠单抗硫代Fab^{V110C}化学反应,合成双Fab。该复合物由凝胶过滤法分离并且与C3-101硫代Fab^{V110C}反应以产生交联的双特异性多肽。终末复合物再次由凝胶过滤法分离并且如上文所述通过质谱法和SDS-PAGE表征特征。

[0526] 因为BMata中巯基掩蔽(图7A),所以使用这种交联剂产生的双Fab适合于含有马来酰亚胺基的聚合物在用羟胺使封闭基团脱保护后的PEG化。为做到这一点,首先将双Fab分成几个等分试样,每个约50-60mg。向每个等分试样添加十分之一体积的在pH 7.2的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的0.5M羟胺, 25mM EDTA。脱保护在室温继续约2小时。通过羟胺移除保护基,导致丢失42道尔顿分子量,这可以通过质谱法,借助双Fab质量的变化来观察到(数据未显示)。在脱保护后,将1:1摩尔当量的PEG-马来酰亚胺添加至双Fab等分试样并且允许反应2-20小时。这导致双Fab几乎完全转化成含有单个PEG的高分子量种类(数据未显示)。在图7B中显示了通用的反应方案。

[0527] 从BMata交联的双Fab C3-101^{V110C}/Herc^{V110C}开始,在上述合成反应中使用几个不同大小的PEG聚合物以产生携带具有不同分子量的PEG的PEG化双Fab。多种PEG聚合物作为马来酰亚胺基衍生物从NOF公司(日本)购买。在与PEG试剂反应后,在25mM MES, pH 5.8, 300mM NaCl和1mM EDTA中通过S-200凝胶过滤法纯化PEG化的双Fab。图8A显示纯化的双Fab的SDS-PAGE分析。从左至右显示5种不同的反应产物。从左开始是BMata双Fab与N-乙基马来酰亚胺(NEM)帽反应,随后BMata双Fab与2kDa、12kDa和20kDa的线性PEG链分别反应,并且最终,BMata双Fab与马来酰亚胺基白蛋白结合肽ABP、mal-H、QRLMEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID

NO.:24) 反应。Nguyen等人, Prot. Engineering, Design and Selection 19:291-97 (2006)。合成双Fab-ABP以研究ABP部分作为PEG替代物成为一种手段以通过增加与血清白蛋白结合来增加双Fab的半寿期。见上文。

[0528] 这五种修饰的双Fab由凝胶过滤层析分析, 并且显示具有大大增加的流体动力学半径。观察到含有20K PEG和12K PEG的双Fab和含有ABP的双Fab在S-200凝胶过滤时比常见的人IgG (保留时间25.2分钟) 明显更早洗脱 (图8B)。接下来, 我们研究这5种修饰的C3-101^{V110C}/Herc^{V110C}双Fab的每一者在小鼠和裸大鼠中的药物代谢动力学参数, 包括半寿期。下文详细描述这些实验和结果。

[0529] 双Fab药物代谢动力学

[0530] 进行两个独立实验以评估上述BMata-PEG或BMata-ABP修饰形式对C3-101^{V110C}/Herc^{V110C}双Fab的体内血清半寿期的影响。将单个5mg/kg IV大丸剂剂量施用至小鼠或裸大鼠, 并且分析血清中存在的双Fab达14日。将各只小鼠用于每个数据点, 而在大鼠中, 在整个实验过程期间从相同动物取得血清样品。

[0531] 开发了一种ELISA测定法以检测小鼠血清和大鼠血清中的完整双特异性双Fab。该ELISA的细节如下。

[0532] 使用ELISA测定双Fab在啮齿类血清中的浓度。简而言之, 将EGFR-Fc (Genentech Reagent) 在PBS中稀释至1μg/ml, 包被到384孔Maxisorb聚苯乙烯平板 (Nalgate Nunc International目录号464718) 上。在16至72小时后, 移除包被液, 并且将平板用封闭缓冲液 (PBS/0.5%BSA/Proclin 300) 封闭0.5至3小时。在测定缓冲液 (PBS/0.5%BSA/0.05%吐温20/0.25%CHAPS/5mM EDTA/0.2%BGG/0.35M NaCl/15ppm Proclin 300) 中制备双Fab标准品的稀释物 (0.156至20ng/ml)。将样品 (含有双Fab的大鼠或小鼠血清) 稀释至测定缓冲液中到最小稀释度1/100, 并且随后连续稀释8次至测定范围内。将封闭的平板用洗涤缓冲液 (PBS/0.05%吐温20) 洗涤3次, 并且将标准品和样品添加至适宜的测定孔。在1小时孵育后, 平板用洗涤缓冲液洗涤6次。使用生物素酰化的HER2ECD检测结合的双Fab (Genentech Reagent批号39575-15-生物素酰化使用NHS-琥珀酰亚胺化学 (生物素-X-NHS研究有机物10554B-2) 进行)。在1小时孵育后, 平板用洗涤缓冲液洗涤6次, 并且将缀合物缓冲液 (PBS/0.5%BSA/0.05%吐温20/15ppm Proclin 300) 中1/40,000稀释的链霉亲和素连接的辣根过氧化物酶 (GE Healthcare RPN1231) 添加至全部测定孔。在30分钟孵育后, 将平板洗涤, 并且将底物TMB (KPL目录号50-65-02) 添加至全部测定孔。在15-20分钟后, 底物反应用1M磷酸终止。使用参比波长620nm, 在450nm处读取平板。使用4-参数曲线拟合算法, 通过将结果与标准品比较来确定样品浓度。

[0533] 在小鼠和大鼠中, 添加PEG至双Fab降低了清除所述分子的速率 (图9A-B, 表4)。观察到2K PEG化降低清除率到一半 (图9A-B, 表4)。通过添加20K PEG, 所述双Fab的半寿期可以延长30-35小时 (图9A-B, 表4)。这些结果表明, 可以实现双Fab的给药范围, 并且可以通过变动所连接的PEG的大小来调整分子的PK以适应不同的需要。未PEG化的双Fab的清除率大约是对F(ab')₂所预期的那样, 并且20K PEG化的双Fab拥有更接近于IgG的半寿期和清除率。此外, 在12K-双Fab和20K-双Fab之间几乎不存在半寿期方面的差异 (图9A-B, 表4), 这表明较大的PEG可能并不明显地增加半寿期。最后, ABP-双Fab的半寿期在这些实验中没有显著地延长超过未修饰的双Fab。(图9A-B, 表4)。下表4中提供额外的药物代谢动力学数据。

[0534] 表4. 基于双室模型的药物代谢动力学参数

[0535]

	α_{HL}	AUC	β_{HL}	CL	Cmax	V1	Vss
处理	小时	日 *ng/mL	小时	mL/日/kg	ng/mL	mL/kg	mL/kg
小鼠							
未标记的	1.55	23239	10.8	215	99660	50.2	103.6
2 PEG	5.85	41986	17.2	119	87946	56.9	74.2

[0536]

12 PEG	7.18	104356	27.7	47.9	161283	31.0	47.3
20 PEG	6.78	91896	31.1	54.4	126336	39.6	66.9
ABP	2.94	47753	11.4	105	128186	39.0	56.3
大鼠							
未标记的	4.1	30855	16.4	163.3	N/A	52.2	70.2
2 PEG	5.0	49272	18.3	106	N/A	52.5	76.9
12 PEG	6.1	83665	26.4	61.1	N/A	43.3	68.7
20 PEG	4.7	96669	32.2	53.1	N/A	41.7	80.2
ABP	6.8	76078	19.2	70.6	N/A	43.2	51.4

[0537] α_{HL} = α 期半寿期; β_{HL} = β 期半寿期; AUC = 至最后观察点的血清浓度-时间曲线下面积; CL = 清除率; Cmax = 在给药时段期间的最大观察浓度; V_{ss} = 稳态分布容积; N/A = 不可获得。

[0538] 双Fab体内活性

[0539] 对于体内小鼠异种移植模型研究, 我们构建了如下的PEG化双Fab。我们首先产生BMata交联的双Fab, 其含有靶向Her2的硫代Fab (2C4^{V110C}) 和靶向EGFR (Her1) 的硫代Fab (D1-5^{V110C})。这种BMata交联的双Fab随后与羟胺和1:1摩尔当量的20K ma1-PEG反应以产生PEG化的双Fab。将PEG化的双Fab纯化并且通过SDS-PAGE分析 (图10A)。测试PEG化的双Fab在体外抑制Calu3细胞增殖的能力。已知Calu3细胞表达Her2和EGFR (数据未显示)。对于该测定法, 每孔接种8500个细胞并且用2nM调蛋白和5nM TGF α 处理。我们随后测试变动浓度的双Fab和亲本抗体 (浓度在图10的横轴上显示) 阻断配体刺激的细胞生长的能力。将阿尔玛蓝 (25 μ L) 添加至每个孔并且在37 $^{\circ}$ C孵育3-4小时。平板在荧光平板读数仪中在545/590nm处读取。细胞增殖的量直接以相对荧光单位 (RFU) 报告或通过相对于对照归一化来报道。图10表明, PEG化的双Fab在该实验中是Calu3增殖的强力抑制剂。实际上, 它比任一亲本抗体2C4和D1-5更强力。

[0540] 接下来, 我们在SCID Beige小鼠中评估20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab的药物代谢动力学。使用如上文对C3-101^{V110C}/Herc^{V110C}双Fab所述的相似的基于ELISA的捕获测定法来确定血清中该分子的量。图11A显示了血清浓度对时间作图的结果, 而图11B显示血清浓度/剂量对时间作图的结果。20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab比20K-PEG-C3-101^{V110C}/Herc^{V110C}双Fab更快地从血清中清除 (比较图11A-B与图9A)。我们认为, 宿主交叉反应性解释了20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab的更快速清除。下表5中提供数字数据, 其进一步显示该

实验中220K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab相对短的半寿期。

[0541] 表5. 药物代谢动力学参数

[0542]

剂量 (mg/kg)	HL-λ _z (小时)	CL _{obs} (mL/日/kg)	由剂量归一化的 AUC _{inf-obs}
0.5*	4.61	200	5.01
5.0	3.84	102	9.81
50	7.27	53.1	18.8

[0543] *从数据分析中排除2小时时间点。

[0544] HL-λ_z指与消除期相关的半寿期,CL_{obs}指观察到的清除率,AUC_{inf-obs}指观察的外推至无限的血清浓度-时间曲线下面积。

[0545] 接下来,与亲本抗体2C4和D1-5相比,我们在SCID Beige小鼠的Calu3异种移植模型中检查20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab的作用。我们注射5百万个Calu3细胞,随后每日注射20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab (50mg/kg)、2C4 (25mg/kg) 或D1-5 (25mg/kg)。在实验过程期间定期测量肿瘤体积(时间点如图12中显示)。图12中所示的结果表明,20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab在这个浓度上有效减慢肿瘤的生长,这类似于用每种亲本抗体观察到的有效性。

[0546] 我们随后进行一项扩展研究以在上述的Calu3异种移植小鼠模型中并且与亲本抗体2C4 (帕妥珠单抗) 和D1-5相比,评估20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab对肿瘤细胞生长的影响。首先,我们分析了肿瘤进程花费的时间段,其定义为肿瘤在大小上加倍(2xVo)所花费的时间或如果没有肿瘤体积进展则定义为存活时间。

[0547] 为实施这些实验,将5百万个Calu3细胞(悬浮于HBSS中)皮下接种至SCID beige小鼠中(小鼠从Charles River Labs, San Diego机构获得)。亲本抗体2C4和D1-5以25mg/kg腹膜内给予(物质浓度是5mg/ml),每周1次,施与4周。20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab以50mg/kg腹膜内给予(物质浓度是7.5mg/ml),每日1次,持续28日。在全部情况下,首次给药是2X加载剂量(即50mg/kg 2C4和D1-5[物质浓度是10mg/ml]和100mg/kg 20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}[物质浓度是7.5mg/ml])。

[0548] 图13A中显示Kaplan-Meier分析结果,并且图13B中显示单因素分析结果。接着,我们分析了肿瘤进程花费的时间段,其定义为肿瘤达到1500mm³体积所花费的时间或如果没有肿瘤体积进展则定义为存活时间。图14A中显示Kaplan-Meier分析结果,并且图14B中显示单因素分析结果。这些研究的结果表明,20K PEG-2C4^{V110C}/D1-5^{V110C}双Fab以治疗剂量有效抑制肿瘤细胞生长,接近于亲本抗体中每一者的有效性。因而,本文所述的双特异性抗体形式是开发治疗性分子的有用平台。

[0549] 讨论

[0550] Her2参与心脏、乳腺和神经组织中的正常发育和细胞生长并且与其他器官系统的发育相关。Falls, D.L. 等人, Exp Cell Res 284 (1):14-30 (2003); Casalini, P. 等人, J Cell Physiol 200 (3):343-50 (2004); Negro, A. 等人, Recent Prog Horm Res 59:1-12

(2004); Britsch, S. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 190:1-65 (2007)。最引人注目的是Her2过量表达参与乳腺癌细胞增殖并且使用Her2过量表作为诊断标记物以鉴定将从**赫赛汀®** (曲妥珠单抗) 获益的乳腺癌患者。Lee, K.F. 等人, *Nature* 378 (6555):394-8 (1995); Erickson, S.L. 等人, *Development* 124 (24):4999-5011 (1997); Britsch, S. 等人, *Genes Dev* 12 (12):1825-36 (1998); Morris, J.K. 等人, *Neuron* 23 (2):273-83 (1999); Woldeyesus, M.T. 等人, *Genes Dev* 13 (19):2538-48 (1999); Lin, W. 等人, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (3):1299-304 (2000); Park, S.K. 等人, *J Cell Biol* 154 (6):1245-58 (2001); Leu, M. 等人, *Development* 130 (11):2291-301 (2003); Brufsky, A. *Am J Clin Oncol*. 2009年8月11日, (EPub PMID:19675448)。**赫赛汀®** (曲妥珠单抗) 是与受体的胞外部分靠近跨膜区的第四结构域结合的单克隆抗体 (Cho, H.S., 等人, *Nature* 421 (6924):756-60 [2003])。Her2是对细胞生长和发育有贡献并且还作为疾病治疗靶的四种受体家族成员之一 (Casalini, P. 等人, *J Cell Physiol* 200 (3):343-50 [2004])。多于一种受体的协调作用经常是驱动肿瘤细胞生长的原因 (Yarden, Y. 等人, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2):127-37 (2001); Lee-Hoeflich, S.T. 等人, *Cancer Res* 68 (14):878-87 [2008])。在这个方面, 可能希望中和多于一种受体的活性以对某些癌症提供特别有效的疗法。建立和设计此类分子的一种方法是使用双特异性抗体技术, 其中单个抗体分子拥有两种独特的单克隆活性 (Drakeman, D.L. 等人, *Expert Opin Investig Drugs* 6 (9):1169-78 (1997); Kontermann, R.E. *Acta Pharmacol Sin* 26 (1):1-9 (2005); Chames, P. 等人, *Curr Opin Drug Discov Devel* 12 (2):276-83 [2009])。

[0551] 我们开发本文所述的双Fab技术至少部分地作为手段以筛选此类分子和搜索这样一些分子, 它们可以提供胜过单个抗体或胜过抗体组合的功效。我们已经展示, 所述双Fab合成方法是产生双特异性分子的稳健和简单的方法。我们确定, 双Fab分子通常拥有两种亲本抗体的组合生物化学活性。我们观察到一些双Fab的细胞表面亲和力略微降低, 这可能归因于所述分子的单价结构。然而, 这种降低可能以多种方式抵消。例如, 可以合成靶向一个细胞的表面上两种受体的双Fab, 可以靶向相同受体中的两个结构域, 或可以增加单价Fab亲和力。使用本文所述的矩阵方法时, 一组靶向Her2和EGFR的双Fab的合成以足够用于各种测定法的量产生高纯度的分子。

[0552] 在细胞测定法中使用双Fab, 我们观察到一些独特的活性。例如, 双Fab 1191以异常陡峭的抑制曲线显示出强力的细胞增殖抑制作用 (图2C)。该分子的一个有趣方面在于它同时结合Her2的两个不同结构域。双Fab的2C4臂靶向ECD的结构域II并且双Fab的Herc臂靶向结构域IV (Franklin, M.C. 等人, *Cancer Cell* 5 (4):317-28 (2004); Schmitz, K.R. 等人, *Exp Cell Res* 315 (4):659-70 [2009])。该曲线似乎是协同的并且可以表明一种对结合相同靶中两个结构域分子为独特的作用机制。这种分子可以在某些治疗环境下提供在功效方面胜过单一抗体或两种独立单克隆抗体组合的优点。

[0553] 然而, 另一项更引人注目的研究结果在于彼此连接以形成双Fab 1188的曲妥珠单抗硫代Fab。在这种情况下, 这种双Fab在结构上类似于单一亲本抗体, 除了它缺少Fc部分并且Fab共价地在与天然铰合部二硫键不同的位点处连接之外。双Fab 1188, Herc LC^{110Cys}-Herc LC^{110Cys}, 在细胞增殖方面显示出出乎意料的增强作用, 充当激动剂而非强力的拮抗剂

(图2F)。这是令人惊讶的,不仅因为这种活性与其结构上相似的亲本抗体的活性相反,还因为过量表达Her2的BT474细胞中的细胞增殖不是配体依赖的并且认为在基态下受到最大刺激。此外,将两个2C4Fab连接在一起的一个不同双Fab具有与其亲本抗体相似的活性(图2E)。不受理论约束,以下情况是可能的:衍生自不同抗体的Fab的不同作用机制导致随所述双Fab观察到的不同结果。尽管2C4与结构域II结合并且抑制Her2与自身及其他Her家族成员二聚化,曲妥珠单抗似乎不同地影响复合物形成,因为结构域IV不是二聚化结构域。曲妥珠单抗表位十分接近于跨膜区,是一个其中该抗体可能显著影响跨膜区取向,从而影响两个激酶结构域取向的位置(Cho, H.S.等人, *Nature* 421 (6924):756-60[2003])。与所述激酶活性部位的别构相互作用或其他直接相互作用可能受抗体或双Fab与密切接近的两个受体分子的结合影响(Bocharov, E.V.等人, *J Biol Chem* 283 (11):6950-6 (2008); Schmitz, K.R.等人, *Exp Cell Res* 315 (4):659-70[2009])。

[0554] 由于1188双Fab是**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)的结构类似物,所以我们研究了改变键连接位点是否会进一步改变这些分子的功能。我们还研究了从不同来源制备的硫代Fab的作用。我们证实,使用胃蛋白酶消化后的天然抗体铰链区可能获得良好结果。这允许人们用任何抗体来源作为建立双Fab的起点,而无需产生的分子的突变体(cys-工程化的)形式。当然,因为硫连接点限于铰链区,所以仅可以产生某些结构性变体。我们还证实,可以通过使用衍生自硫代Mab的硫代Fab获得良好结果,其中通过采用赖氨酸-C蛋白酶水解消化制备所述硫代Fab。此外,构建重组硫代Fab、在大肠杆菌中表达、纯化并且成功地用来创建也产生良好结果的双Fab。因而,全部的这些方法均为新双Fab合成和发现提供普遍机会。

[0555] 我们研究了变动Herc双Fab的键合,这导致鉴定到完整的活性谱,其范围涵盖强力激动剂、拮抗剂和对细胞生长几乎不显示作用的分子。因而,可能鉴定到与亲本抗体拥有不同活性的分子。先前,已经显示抗体铰链区中的变化影响抗体功能(Dillon, Tm.等人, *J Biol Chem* 283 (23):16206-15[2008])。并不总是可能鉴定到拥有所需要活性(无论是活化性或抑制性)的抗体,或并不总是可能鉴定到具有改变的活性水平的抗体。因而,双Fab键合变体提供了进一步工程化所需活性的方法。此外,采用抗CD20抗体的先前研究已经显示,在抗体与表位相互作用的方式方面的细微变化可以影响功能(Ernst, J.A.等人, *Biochemistry* 44 (46):15150-8[2005])。常见的抗体工程化计划因而可以扩展至包括Fab的共价缔合以帮助建立更强力的、有效治疗性候选分子。

[0556] 与一种强力的双Fab拮抗剂(1329)和**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)相比,我们还研究了双Fab激动剂1325和1188的某些物理和生物化学特征。我们没有发现激动剂和拮抗剂之间在BT474细胞表面上的受体结合位点数目方面存在差异。另外,所述分子对细胞表面的亲和力方面不存在差异,如Scatchard分析所确定。两个类型分子的kD均是约3nM。我们还通过凝胶过滤法评估每种所述分子的分子量、保留时间和流体动力学半径,不过再一次地,我们没有观察到这些物理特性的明显差异。通过SEC-MALS分析表明,存在激动剂分子具有较大流体动力学半径的微弱趋势;然而观察到的差异处于误差边际范围内。在SDS-PAGE上观察到结构方面的一个主要分析差异,其中分子量几乎相同的这些分子在凝胶上显示大的迁移率差异。SDS-PAGE的变性条件与我们的溶液状态分析不相关。例如,在凝胶上所观察的差异没有揭示与活性相关的模式,因为最强力的激动剂1325在端值之间迁移并且与强力拮抗剂

1324相似。这些分子中的一个主要差异是Fv区彼此相对的取向。这可能解释所述分子之间的不同活性。现有分析没有揭示预测的结构功能模式,但是更详细的结构功能研究可能允许设计3D建模方法以理解活性关系。目前,可以使用以本文所述的合成性矩阵方法和可用于目的抗体的功能活性测定法为基础的经验方法,轻易地鉴定任何抗体或抗体组合的功能性变体。

[0557] 使用衍生自曲妥珠单抗硫代Fab组合矩阵的最强力激动剂1325,我们研究了参与传播细胞增殖信号的信号传导途径。为检验该信号传导途径,我们借助于最近已经报道的充分表征的曲妥珠单抗活性分析。这里,已经显示曲妥珠单抗抑制过量表达Her2的细胞上Her2和Her3的相互作用(Junttila,T.T.等人,Cancer Cell 15(5):429-40[2009])。这两个受体位于招募和激活基态PI3K的复合物中。这种激酶的活化导致关键信号传导激酶AKT的磷酸化和激活。在我们的上述检测中,AKT在用激动剂双Fab 1325处理的细胞中磷酸化至高得多的水平。这是我们所预期的并且与Her2的已知细胞信号传导途径一致。所不同和出乎意料的是Her3的磷酸化水平不随激动剂添加而变化。实际上,似乎在2小时时间过程范围内,Her3中的磷酸化酪氨酸水平存在轻微下降。这提示,该激动剂可能绕过Her2/Her3相互作用以刺激AKT的活性。这可能通过直接改变Her2的磷酸化状态来实现。我们通过质谱分析探测Her2的磷酸化状态以查看受体胞内结构域(ICD)内的各个磷酸化肽。首先,我们鉴定了BT474细胞中在基态下磷酸化的几种肽。随后,我们查看了Her2应答于曲妥珠单抗或1325激动剂处理时Her2的磷酸化百分数。我们观察到,总体上,这些磷酸化位点中的几种应答于该激动剂而改变,但是不应答于曲妥珠单抗而改变。似乎该激动剂进一步激活受体,但是这种激活不导致增加的Her3磷酸化。这表明,略微不同的活化复合物可能传播该信号,并且提示双Fab 1325可以用来甚至在Her3或配体不存在的情况下活化Her2。

[0558] 因而,我们研究了其中Her2激活可能有用的可能治疗领域。**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)和心脏组织健康之间的关联已经文献报道。Chien,K.R.N Engl J Med 354(8):789-90(2006);Perik,P.J.等人,Eur J Heart Fail9(2):173-7(2007);Suter,Tm.等人,J Clin Oncol 25(25):3859-65(2007)。在**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)疗法期间,可出现心脏毒性。在某些化疗药物(例如,蒽环类)存在下,已经显示**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)治疗期间的心脏毒性发生率显著上升(Morris,P.G.等人,Breast Cancer Res TreatD0110.1007/s10549-008-0172-5(2008);Popat,S.等人,Nat Clin Pract Oncol5(6):324-35[2008])。充分认识到单独的蒽环类造成心脏毒性,从而导致心肌病和充血性心力衰竭(Annals of Internal Medicine 125(1):47-58[1996])。与联合的蒽环类和**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)相关的损伤可能归咎于Her2在受损心脏组织的天然修复过程中破坏正常功能。因而,我们推断因为在使用**赫赛汀®**(曲妥珠单抗)治疗的患者对心脏组织有时观察到的作用并且因为Her2活性可能与心脏细胞生长相关(Freedman,N.J.等人,J Am Coll Cardiol 48(7):1448-50[2006]),Her2激动剂可能有益于患有心脏疾病的患者。最近确定地显示,与先前学说相反,心肌细胞在成年生活期间继续增殖(Bergmann,O.,R.等人,Science 324(5923):98-102(2009);Bersell,K.,S.等人,Cell138(2):257-70(2009);Doggen,K.等人,J Mol Cell Cardiol46(1):33-8[2009])。因此,我们提出,曲妥珠单抗衍生的激动剂双Fab分子如双Fab 1325可以激活正在生长的成年心肌细胞中的Her2,因而为治疗某些类型的心脏疾病提供可

能的治疗性先导(therapeutic lead)。

[0559] 几种其他细胞类型、组织和细胞过程也依赖性于Her2和其他HER家族成员的激活。这些受体由配体的神经调节蛋白家族激活,其中已经对所述家族观察到多种重要的信号传导功能。这些细胞类型、组织和过程包括肌肉细胞、心肌细胞、施旺细胞、少突胶质细胞、神经肌肉突触、脑感觉神经元、运动及感觉神经元、外周及脑神经、交感神经元、皮层神经元前体、小脑颗粒细胞、下丘脑、副交感组织、海马、心脏组织、心脏瓣膜发育、房室隔、心肌细胞生长、修复和存活、血管生成、肺上皮发育、肌生成、性腺发生和胃上皮增生。Falls,D.L.Exp Cell Res 284(1):14-30(2003);Falls,D.L.J.Neurocytol.32(5-8):619-47(2003); Britsch,S.Adv Anat Embryol Cell 190:1-65(2007)。因此,这些细胞类型是Her2激动剂的额外的潜在靶。另外,人胚胎干细胞(hECS)的维持和分化依赖于Her2活性并且可以提供Her2激动剂分子的另一项重要应用(Jones,F.E.等人,Oncogene 18(23):3481-90(1999); Leone,F.,E.等人,J Leukoc Biol74(4):593-601(2003)。

[0560] 我们也研究了通过开发双Fab,这项技术是否总体上适用于额外的分子靶。我们合成了靶向Fc γ RIIb和Fc ϵ RI α 的双Fab并且检验每种双Fab对来自表达Fc ϵ RI α 和Fc γ RIIb的RBL细胞的组胺释放的影响。结果显示,不同的双Fab显示一系列活性。

[0561] 此外,我们描述了一种用于产生改性交联剂的方法,其中所述改性交联剂用于双Fab的合成中。我们显示,此类改性交联剂用于添加用来调节体内半寿期的试剂,如PEG。我们还显示与缺少PEG的双Fab相比,含有PEG的双Fab具有改进的体内血清半寿期。最后,使用体内小鼠异种移植模型,我们显示,含有PEG的双Fab有效抑制肿瘤细胞生长,从而验证了它们作为靶向实体肿瘤的治疗性候选物的潜力。

[0562] 本文所述的用于合成抗体样分子(我们称之为双Fab)的这种新方法可以是在设计分子疗法和辅助基础研究中有用的新工具。作为筛选方法,这项技术可以用于例如为给定应用鉴定最有用的双特异性抗体组合或用作探测受体信号传导途径的工具。它还用于快速和稳健地产生发现的分子,并且提供新机会以产生采用天然免疫球蛋白结构时否则本不可能的广泛类型活性。

[0563] 本发明在范围方面不受本实施例中公开的具体实施方案限制,所述实施方案意在作为本发明一些方面的说明,并且功能上等同的任何实施方案均在本发明的范围内。实际上,除所显示和本文描述的那些之外,本发明的多种修改形式将因前文描述而对本领域技术人员变得显而易见并且意图落于所附权利要求书的范围内。

序列表

- <110> 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司
 <120> 多特异性抗体、抗体类似物、组合物和方法
 <130> P4377R1 WO
 <140>
 <141>
 <150> 61/346,566
 <151> 2010-05-20
 <150> 61/267,006
 <151> 2009-12-04
 <160> 38
 <170> PatentIn版本3.5
 <210> 1
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 未知的
 <220>
 <223> 对未知的进行描述：HercLC野生型多肽
 <400> 1

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5						10				15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	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	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50					55						60	
Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro
					85					90				95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
					100					105				110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
					115					120				125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
					130					135				140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln

145	150	155	160
Glu Ser Val Thr	Glu Gln Asp Ser Lys	Asp Ser Thr Tyr Ser	Leu Ser
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	Glu Lys His Lys	Val Tyr
	180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr	His Gln Gly Leu Ser Ser	Pro Val Thr Lys	Ser
	195	200	205
Phe Asn Arg Gly	Glu Cys		
210			
<210> 2			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述：合成的多肽			
<400> 2			
Asp Ile Gln Met Thr	Gln Ser Pro Ser Ser	Leu Ser Ala Ser	Val Gly
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Arg Ala Ser	Gln Asp Val Asn	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	Phe Leu Tyr Ser Gly Val	Pro Ser Arg Phe	Ser Gly
50	55	60	
Ser Arg Ser Gly	Thr Asp Phe Thr Leu Thr	Ile Ser Ser Leu	Gln Pro
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala	Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	His Tyr Thr Thr	Pro Pro
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln	Gly Thr Lys Val Glu Ile	Lys Arg Thr Cys	Ala Ala
	100	105	110
Pro Ser Val Phe	Ile Phe Pro Pro Ser Asp	Glu Gln Leu Lys	Ser Gly
	115	120	125
Thr Ala Ser Val	Val Cys Leu Leu Asn Asn	Phe Tyr Pro Arg	Glu Ala
	130	135	140
Lys Val Gln Trp	Lys Val Asp Asn Ala Leu	Gln Ser Gly Asn	Ser Gln
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr	Glu Gln Asp Ser Lys Asp	Ser Thr Tyr Ser	Leu Ser
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	Glu Lys His Lys	Val Tyr

	180		185		190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser					
195		200		205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
210					
<210> 3					
<211> 214					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 人工序列的描述：合成的多肽					
<400> 3					
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					
1	5	10	15		
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn 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 Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly					
50	55	60			
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro					
65	70	75	80		
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro					
85	90	95			
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala					
100	105	110			
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly					
115	120	125			
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala					
130	135	140			
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln					
145	150	155	160		
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser					
165	170	175			
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr					
180	185	190			
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser					
195	200	205			
Phe Asn Arg Gly Glu Cys					

210
 <210> 4
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 未知的
 <220>
 <223> 对未知的进行描述: HercHC野生型多肽
 <400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

	245		250		255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu					
	260		265		270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His					
	275		280		285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg					
	290		295		300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys					
305		310		315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu					
	325		330		335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr					
	340		345		350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu					
	355		360		365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp					
	370		375		380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val					
385		390		395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp					
	405		410		415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His					
	420		425		430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro					
	435		440		445
Gly Lys					
	450				
<210> 5					
<211> 450					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 人工序列的描述：合成的多肽					
<400> 5					
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
1		5		10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr					
	20		25		30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					

35					40					45						
Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
85					90					95						
Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
100					105					110						
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Cys	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
115					120					125						
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
130					135					140						
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
145					150					155					160	
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
165					170					175						
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
180					185					190						
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
195					200					205						
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
210					215					220						
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
245					250					255						
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
260					265					270						
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
275					280					285						
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
290					295					300						
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
305					310					315					320	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
325					330					335						
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
340					345					350						

Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
355				360				365							
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
370				375				380							
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
385				390				395				400			
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				405				410				415			
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420				425				430			
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
435				440				445							
Gly Lys															
450															
<210> 6															
<211> 214															
<212> PRT															
<213> 未知的															
<220>															
<223> 对未知的进行描述: 2C4LC野生型多肽															
<400> 6															
Asp	Ile	Gln	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	Asp	Val	Ser	Ile	Gly
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	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
50				55				60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65	70				75				80						
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr
85				90				95							
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
100				105				110							
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
115				120				125							
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
130				135				140							

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 8
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 未知的
 <220>
 <223> 对未知的进行描述: 2C4HC (VH-CH1)野生型多肽
 <400> 8
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr
 225
 <210> 9
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> 未知的
 <220>
 <223> 对未知的进行描述: 5A6HC (VH-CH1)野生型多肽
 <400> 9
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30
 Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Pro Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser Ala Lys Thr Thr Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 115 120 125
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 180 185 190
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 195 200 205
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

$\langle 400 \rangle$ 10

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

〈213〉 未知的

<220>

<223> 对未知的进行描述：5A6LC野生型多肽

<400> 11

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1           5           10           15
Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
           20           25           30
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
           35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ala Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Trp Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Leu
           85           90           95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
           100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
           115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
           130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
           165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
           180          185          190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
           195          200          205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
           210

```

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 12

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

```

1	5	10	15
Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr			
	20	25	30
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ala Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Trp Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Leu			
	85	90	95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala			
	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
	115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
	130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
	180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
	195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			

210

<210> 13

<211> 226

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 对未知的进行描述: 22E7HC (VH-CH1)野生型多肽

<400> 13

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

35					40					45						
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Asn	Asn	Tyr	Thr	Phe	Tyr	Pro	Asp	Asn	Leu	
50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ile	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	
85					90					95						
Ala	Ser	Leu	Trp	Tyr	Arg	Ala	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
100					105					110						
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
115					120					125						
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
130					135					140						
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
165					170					175						
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
180					185					190						
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
195					200					205						
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
210					215					220						
His Thr																
225																
<210> 14																
<211> 226																
<212> PRT																
<213> 人工序列																
<220>																
<223> 人工序列的描述：合成的多肽																
<400> 14																
Glu	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
1 5 10 15																
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
20 25 30																
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	
35 40 45																
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Asn	Asn	Tyr	Thr	Phe	Tyr	Pro	Asp	Asn	Leu	

50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Arg Ser Val Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Ser Leu Trp Tyr Arg Ala Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Lys Thr Thr Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr		
225		
<210> 15		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 未知的		
<220>		
<223> 对未知的进行描述：22E7LC野生型多肽		
<400> 15		
Asp Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly		
1	5	10
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr		
20	25	30
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile		
35	40	45
Ser Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr		

65	70	75	80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Phe			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
	115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
	130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
	180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
	195	200	205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 16

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 16

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

100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 17		
<211> 228		
<212> PRT		
<213> 未知的		
<220>		
<223> 对未知的进行描述: D1-5HC (VH-CH1) 野生型多肽		
<400> 17		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gly Asn		
20	25	30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Gly Glu Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Tyr Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		

130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
145	150	155
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
	165	170
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
	180	185
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
	195	200
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
210	215	220
Asp Lys Thr His		
225		
<210> 18		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 未知的		
<220>		
<223> 对未知的进行描述: D1-5LC野生型多肽		
<400> 18		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala		
	20	25
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
	35	40
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Thr Pro Tyr		
	85	90
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
	100	105
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
	115	120
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		

145	150	155	160
Glu Ser Val Thr	Glu Gln Asp Ser Lys	Asp Ser Thr Tyr	Ser Leu Ser
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala Asp	Tyr Glu Lys His	Lys Val Tyr
	180	185	190
Ala Cys Glu Val	Thr His Gln Gly Leu	Ser Ser Pro Val	Thr Lys Ser
	195	200	205
Phe Asn Arg Gly	Glu Cys		
210			
<210> 19			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述：合成的多肽			
<400> 19			
Asp Ile Gln Met Thr	Gln Ser Pro Ser	Ser Leu Ser Ala	Ser Val Gly
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Arg	Ala Ser Gln Asp	Val Ser 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	Phe Leu Tyr Ser	Gly Val Pro Ser	Arg Phe Ser Gly
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Phe Thr	Leu Thr Ile Ser	Ser Ser Leu Gln Pro
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala	Thr Tyr Tyr Cys	Gln Gln Ser Tyr	Pro Thr Pro Tyr
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln	Gly Thr Lys Val	Glu Ile Lys Arg	Thr Cys Ala Ala
	100	105	110
Pro Ser Val Phe	Ile Phe Pro Pro	Ser Asp Glu Gln	Leu Lys Ser Gly
	115	120	125
Thr Ala Ser Val	Val Cys Leu Leu	Asn Asn Phe Tyr	Pro Arg Glu Ala
	130	135	140
Lys Val Gln Trp	Lys Val Asp Asn	Ala Leu Gln Ser	Gly Asn Ser Gln
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr	Glu Gln Asp Ser	Lys Asp Ser Thr	Tyr Ser Leu Ser
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala	Asp Tyr Glu Lys	His Lys Val Tyr

180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 20		
<211> 229		
<212> PRT		
<213> 未知的		
<220>		
<223> 对未知的进行描述: C3-101HC (VH-CH1) 野生型多肽		
<400> 20		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr		
20 25 30		
Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Gly Thr Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val		
50 55 60		
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr		
65 70 75 80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Arg Leu Ala Val Gly Val Phe Ala Asn Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp		
100 105 110		
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
115 120 125		
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
130 135 140		
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
145 150 155 160		
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
165 170 175		
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
180 185 190		
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
195 200 205		
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 22

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser 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 Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Arg
           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala
           100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
           115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
           130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
           165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
           180          185          190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
           195          200          205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
           210

```

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 23

Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu Asp

1 5 10 15

Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe

20 25 30

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 24

Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe

20

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 25

Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe

20

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 26

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu

1 5 10 15

Asp Asp

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 27

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 28

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 28

Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala

1 5 10 15

Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg

20

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 29

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

1 5 10

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 30

Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly Lys

1 5 10 15

<210> 31

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 31

Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp
1 5 10 15
Ser Thr Phe Tyr Arg
20

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 32

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu
1 5 10 15
Ala Pro Arg

<210> 33

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 33

Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly
1 5 10 15
Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys
20

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 34

Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg
1 5 10 15

<210> 35

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 35

Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr

1 5 10 15

Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro

20 25 30

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg

35 40

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 36

Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg

1 5 10 15

Pro Lys

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 37

Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro

1 5 10 15

Val

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 38

Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro

1

5

10

15

Val

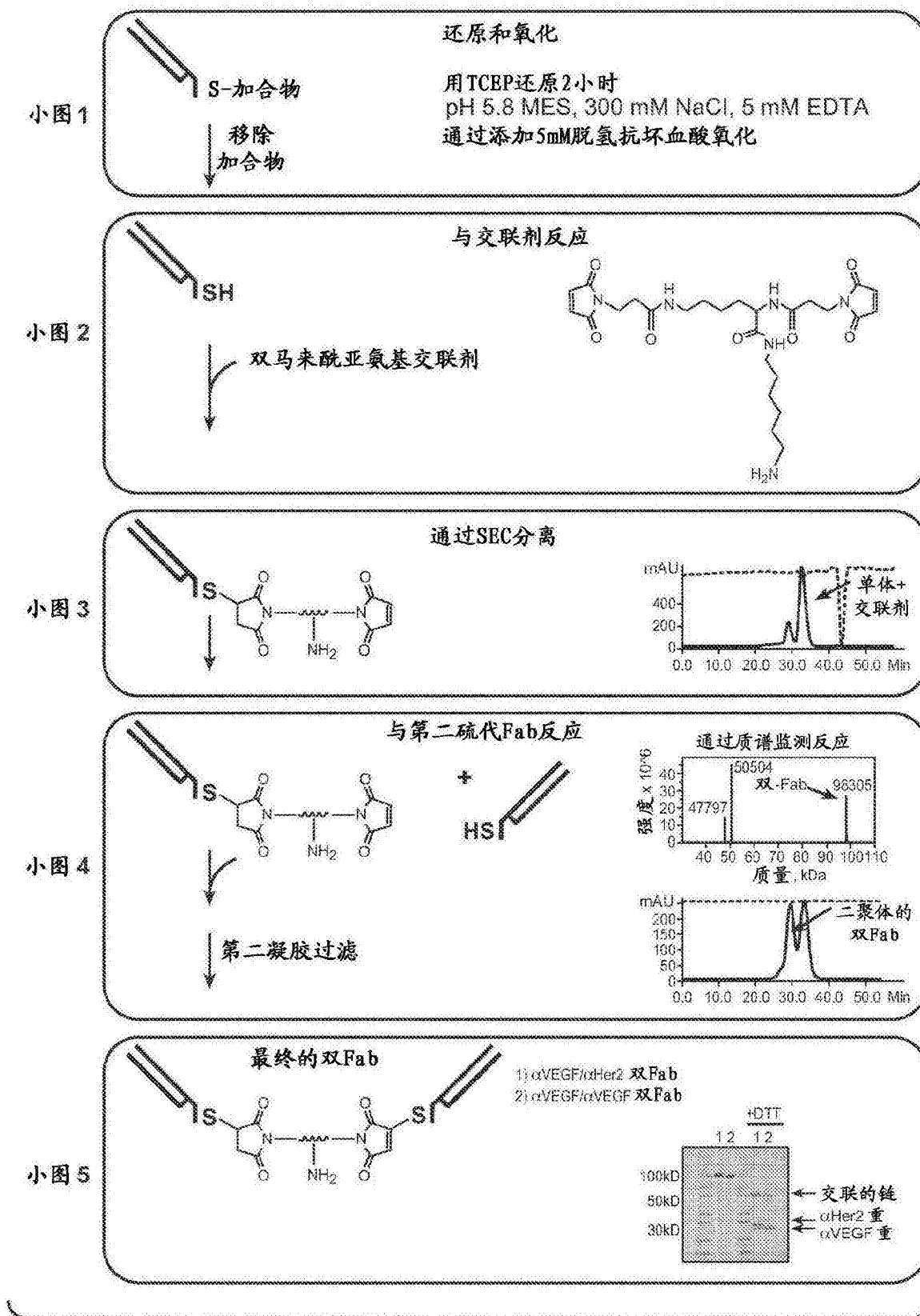


图 1

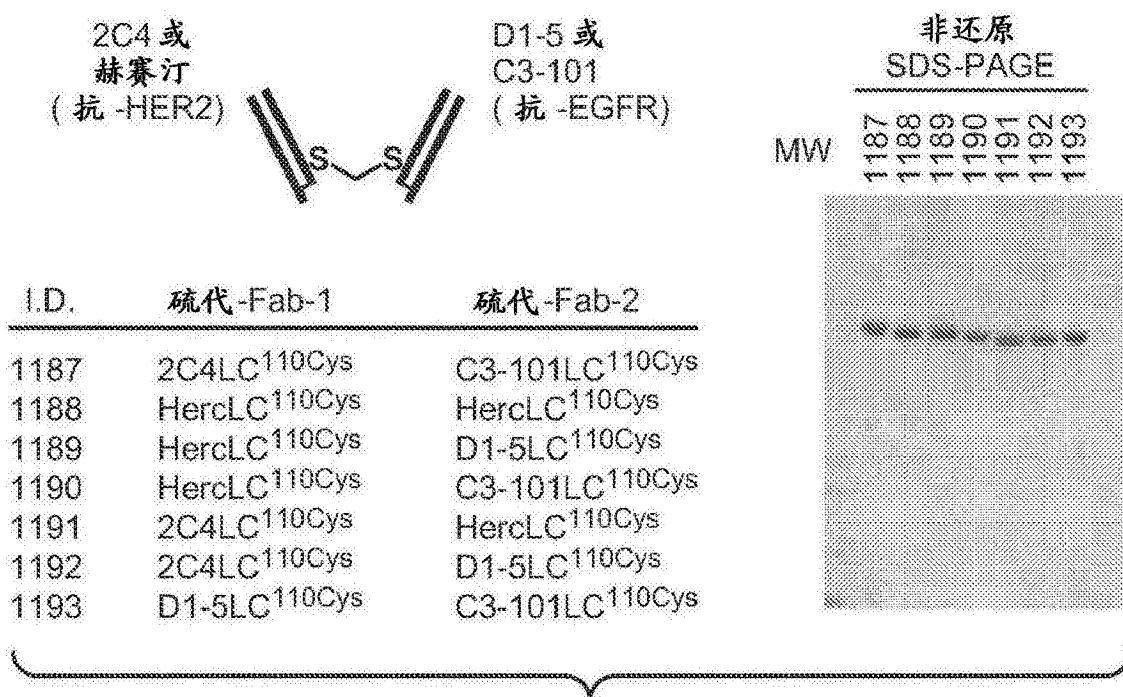


图 2A

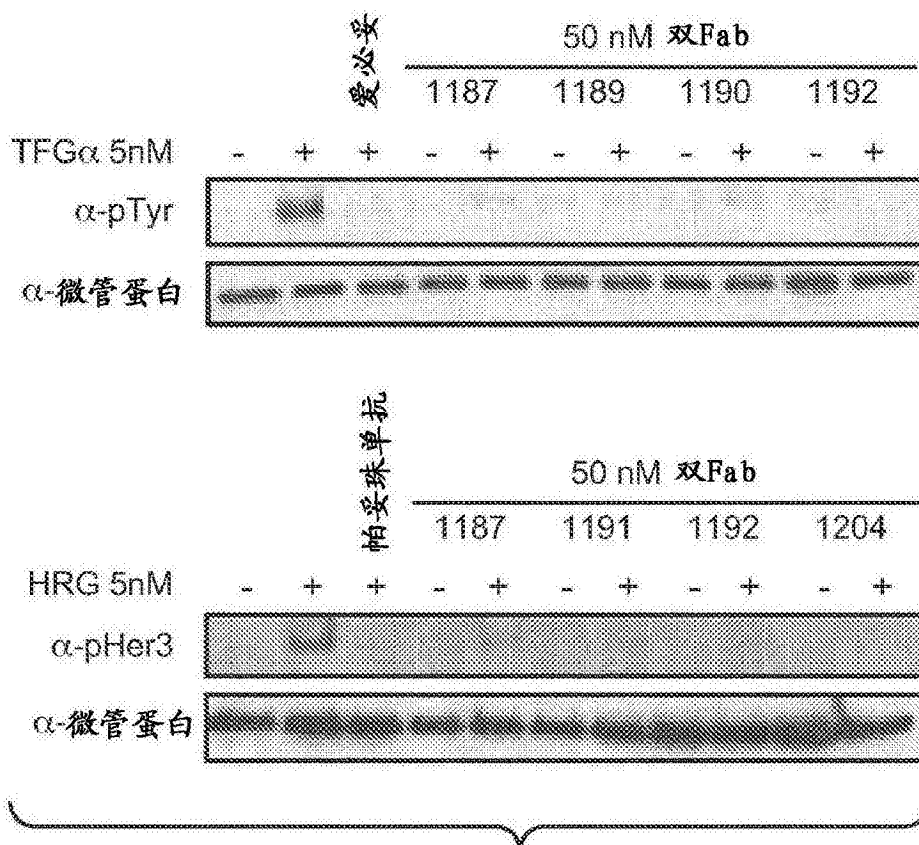


图 2B

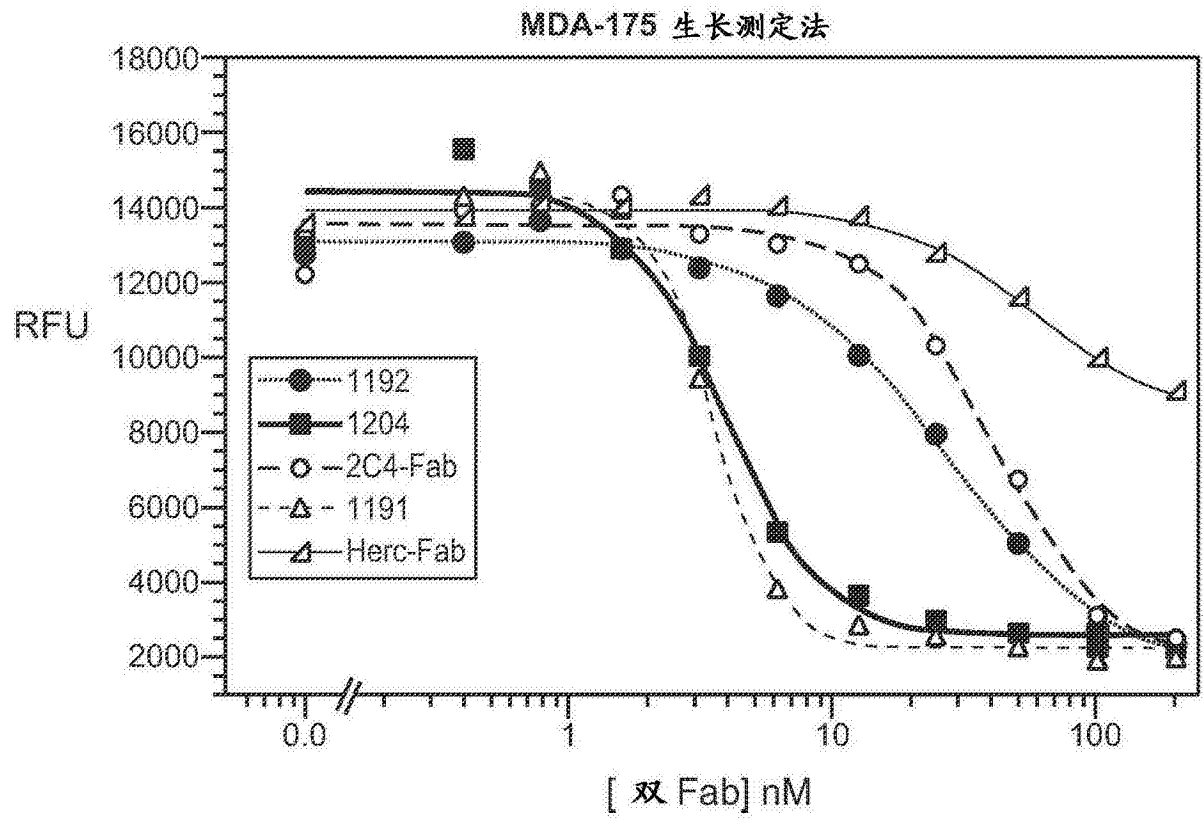


图2C

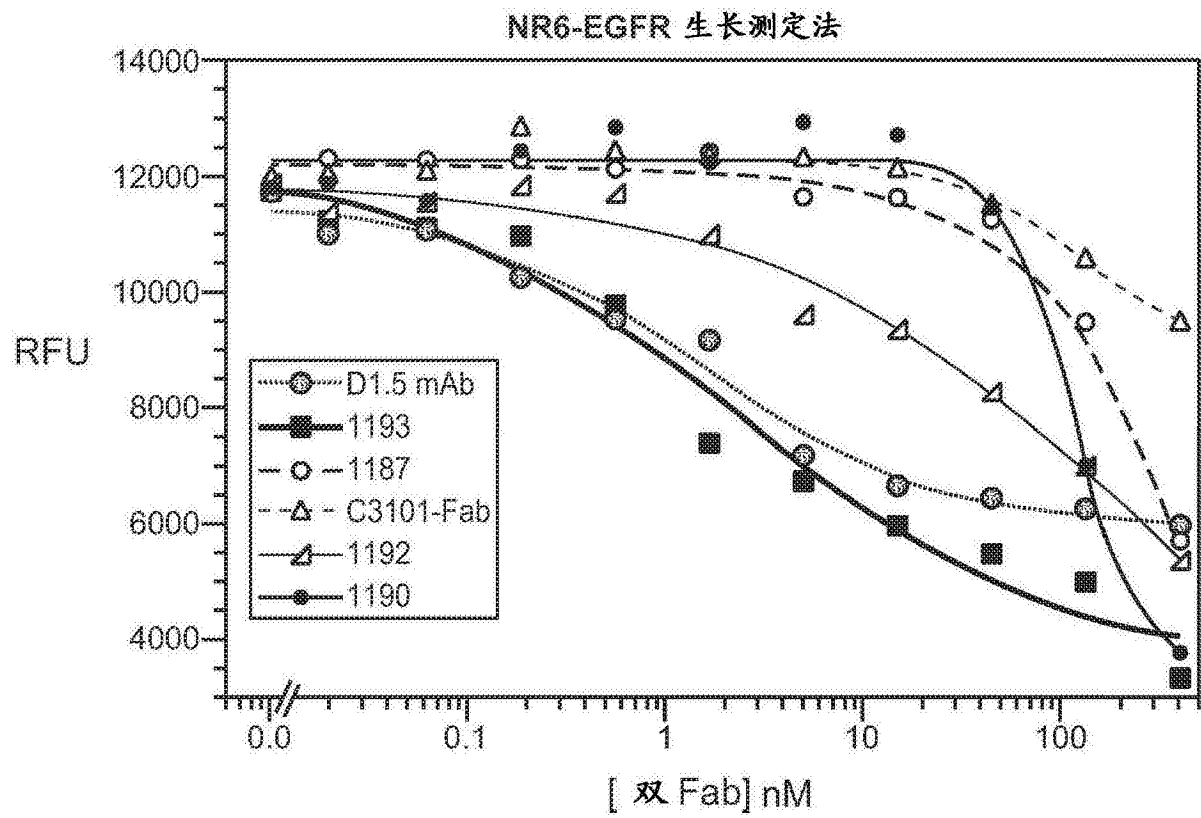


图2D

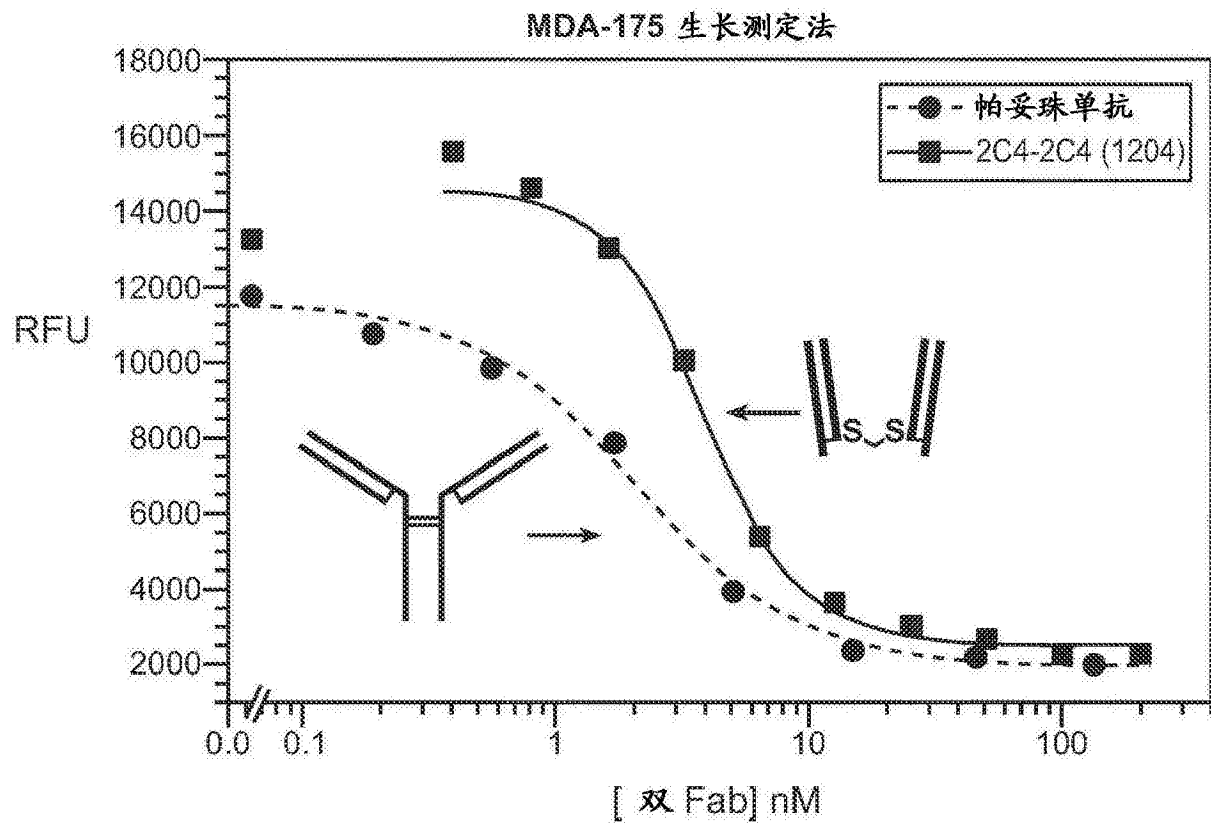


图2E

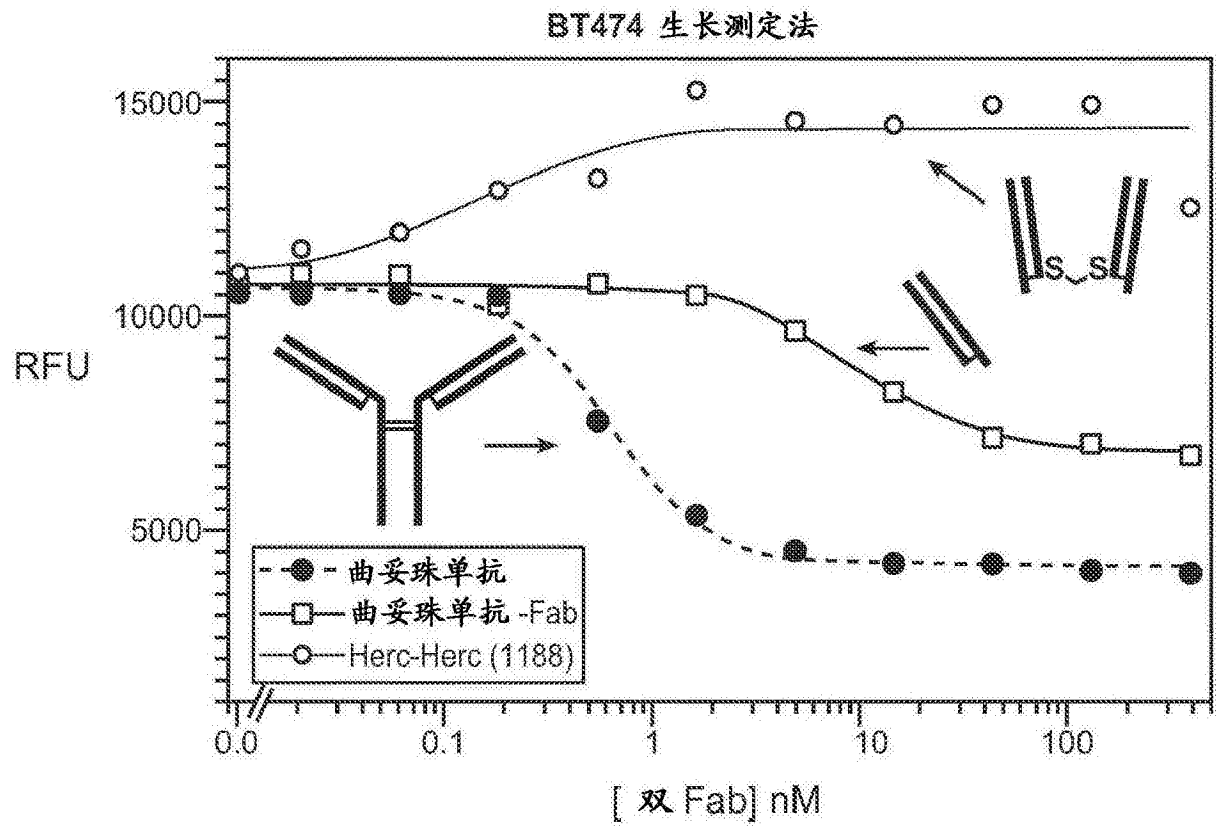


图2F

				
Cys-位点	LC-110	LC-205	HC-118	HC-Hg
来源	大肠杆菌	硫代-mAb	硫代-mAb	mAb

I.D.	硫代-Fab-1	硫代-Fab-2
1321	HercLC ¹¹⁰ Cys	HercLC ¹¹⁰ Cys
1322	HercLC ¹¹⁰ Cys	HercLC ²⁰⁵ Cys
1323	HercLC ¹¹⁰ Cys	HercHC ¹¹⁸ Cys
1324	HercLC ²⁰⁵ Cys	HercLC ²⁰⁵ Cys
1325	HercLC ¹¹⁸ Cys	HercLC ²⁰⁵ Cys
1326	HercLC ¹¹⁸ Cys	HercHC ¹¹⁸ Cys
1327	HercLC ¹¹⁰ Cys	HercHC ^{Hg} -Cys
1328	HercLC ²⁰⁵ Cys	HercHC ^{Hg} -Cys
1337	HercLC ¹¹⁸ Cys	HercHC ^{Hg} -Cys
1329	HercLC ^{Hg} -Cys	HercHC ^{Hg} -Cys
1188	HercLC ¹¹⁰ Cys	HercLC ¹¹⁰ Cys
1338	F(ab') ₂	来自赫赛汀

图 3A

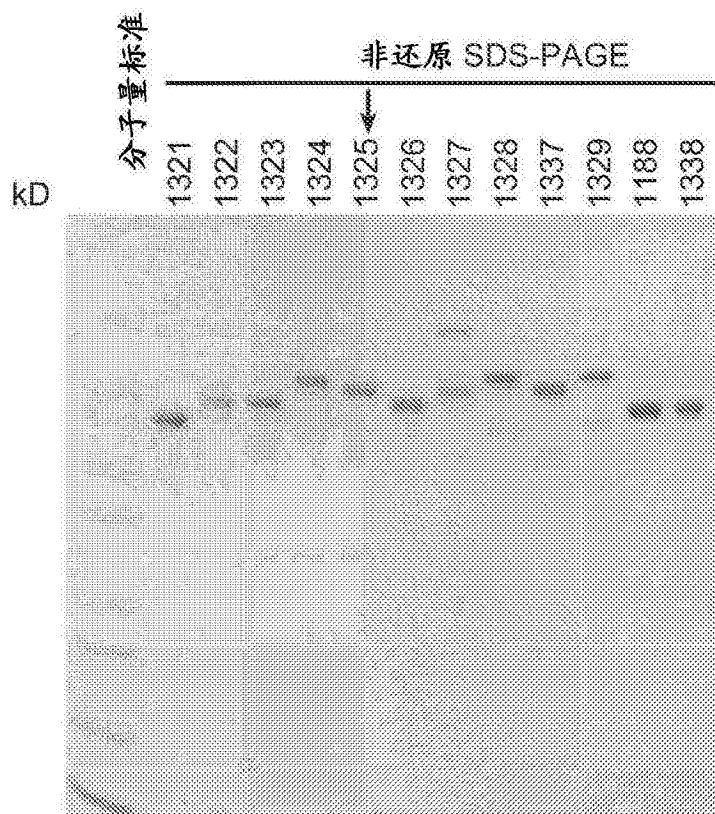


图3B

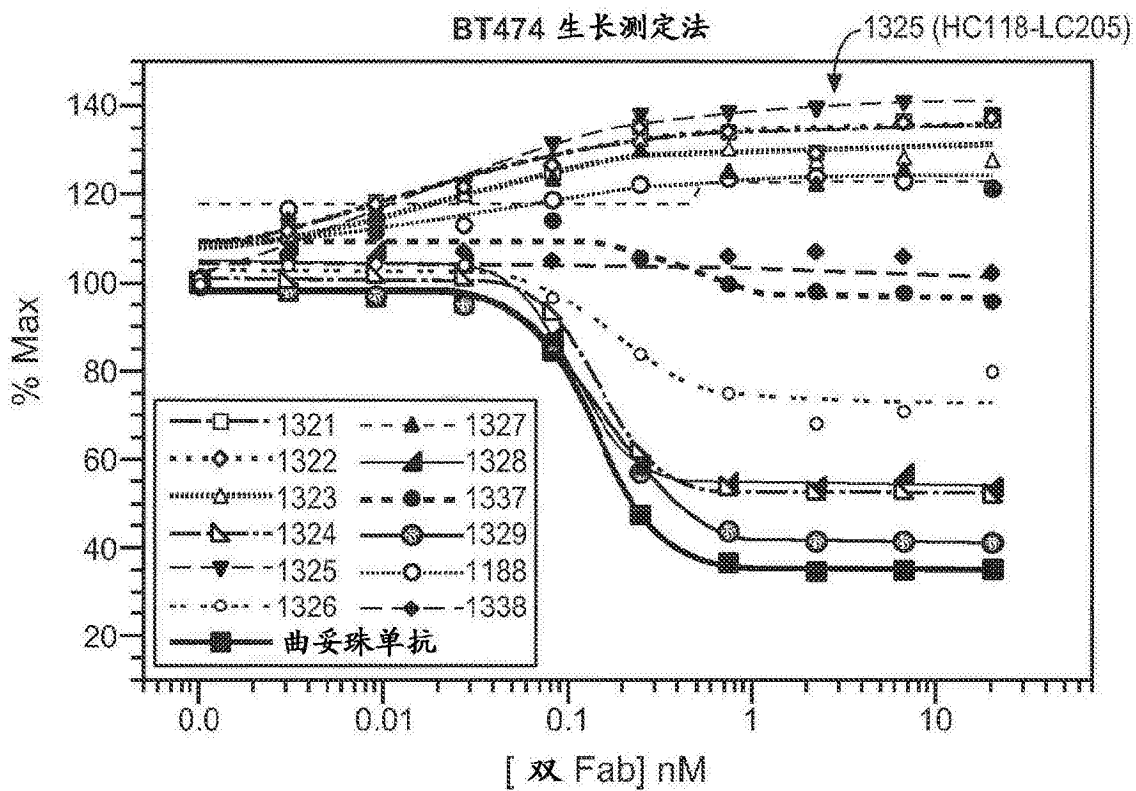


图3C

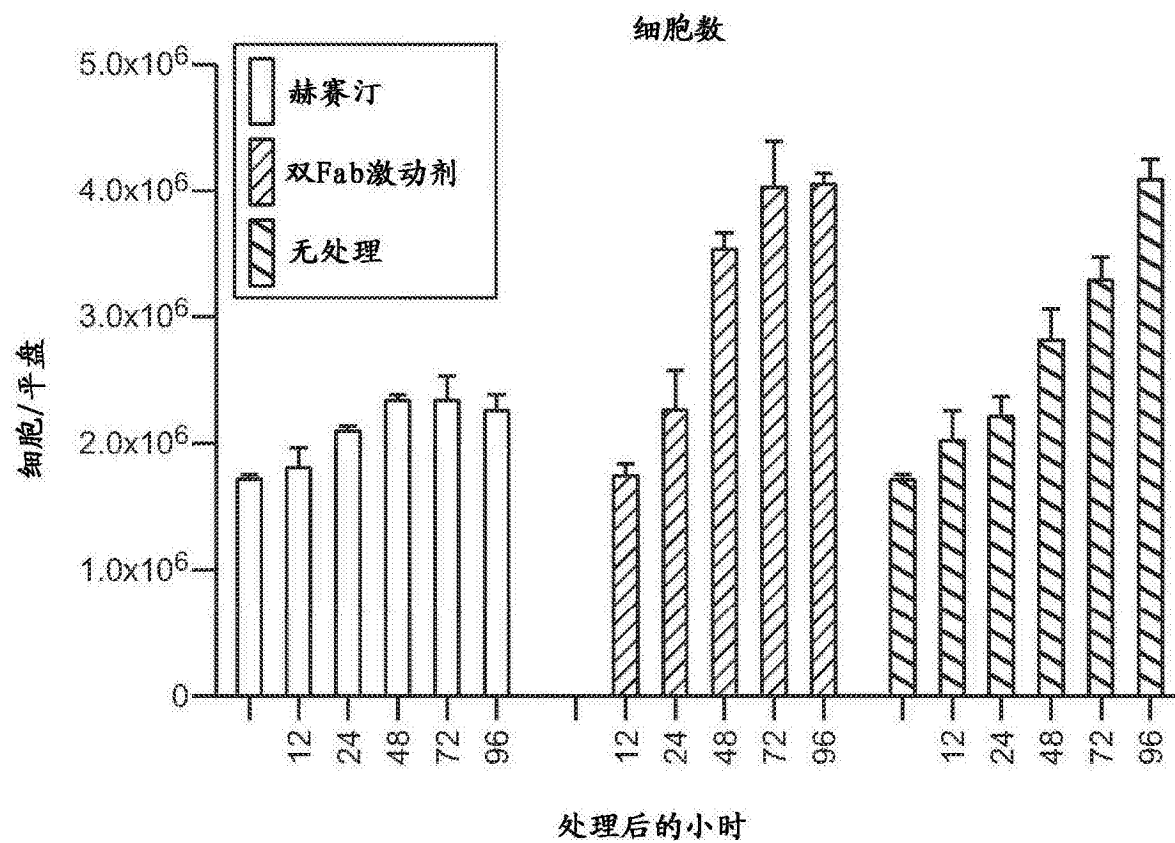


图3D

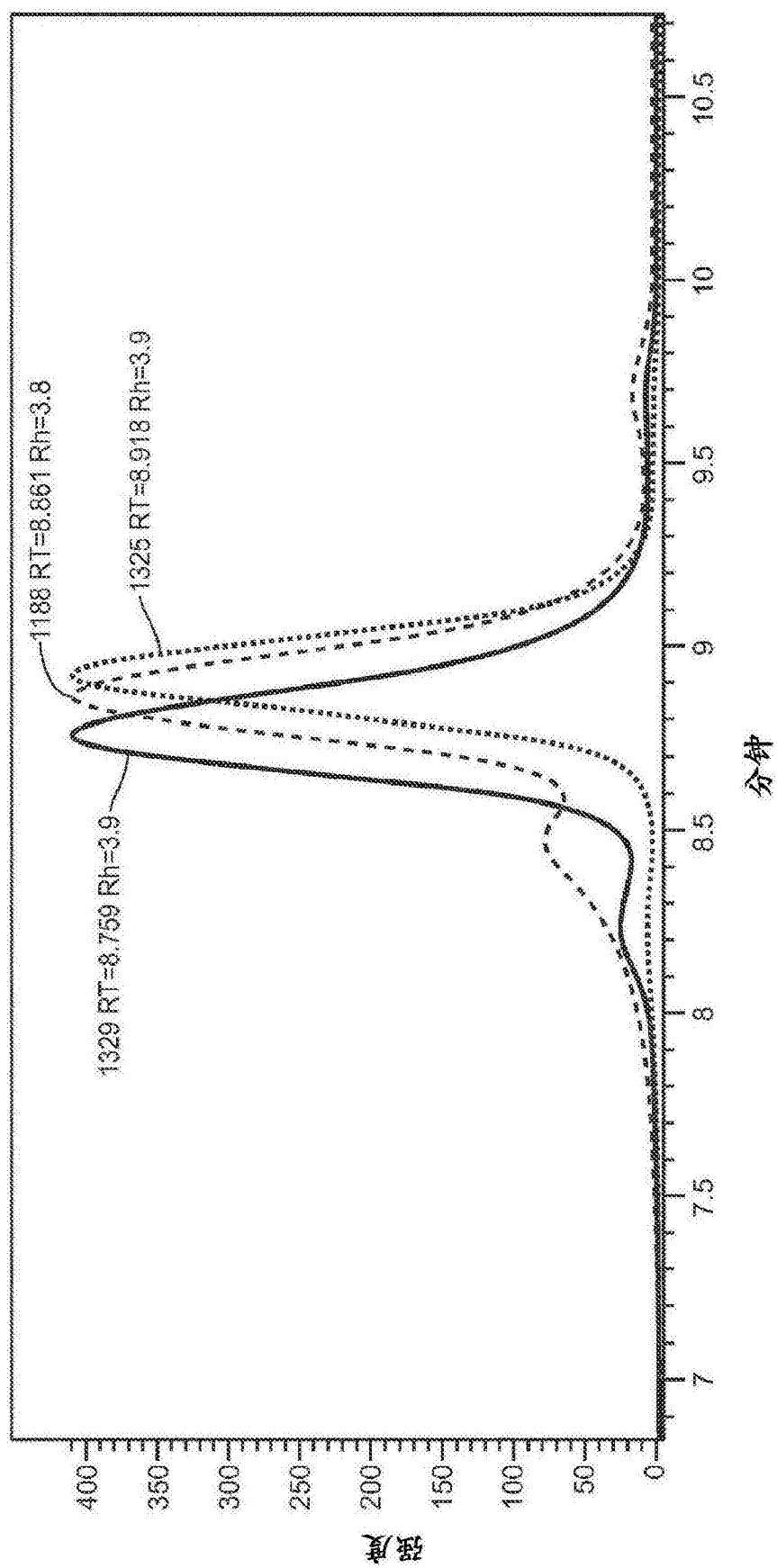


图4

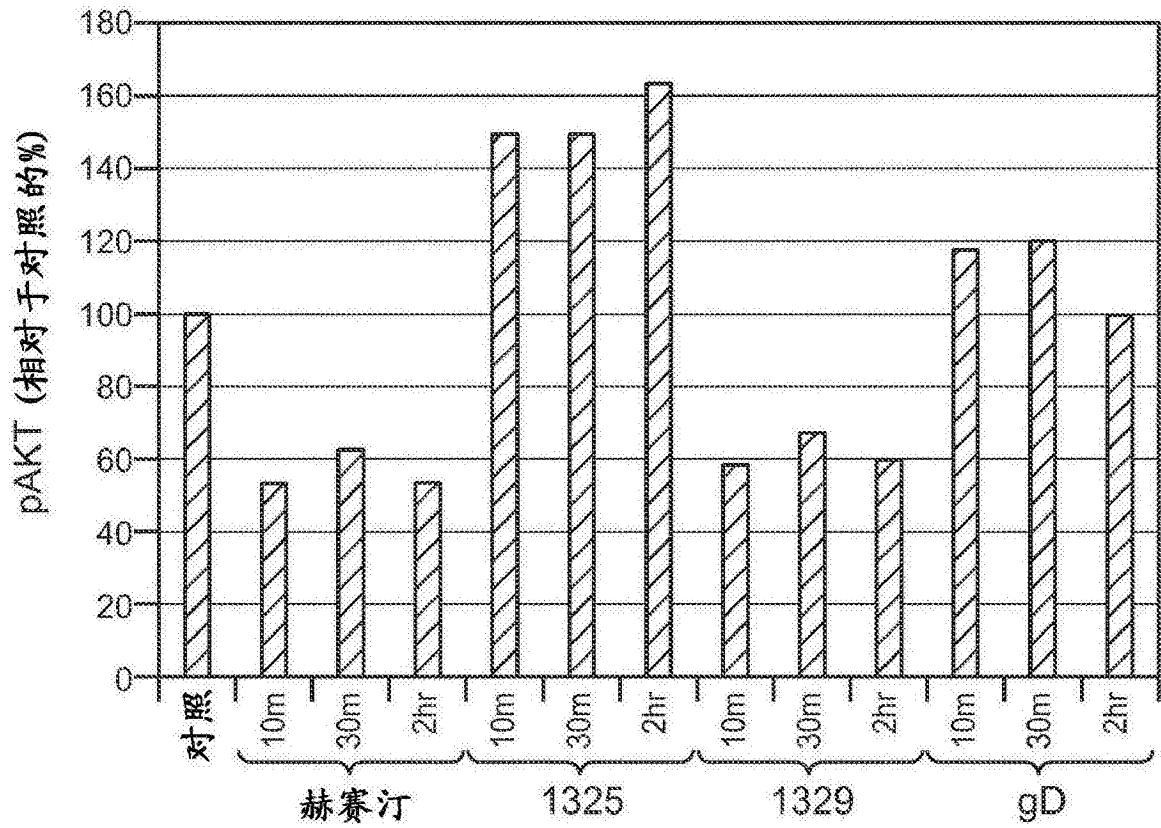


图5A

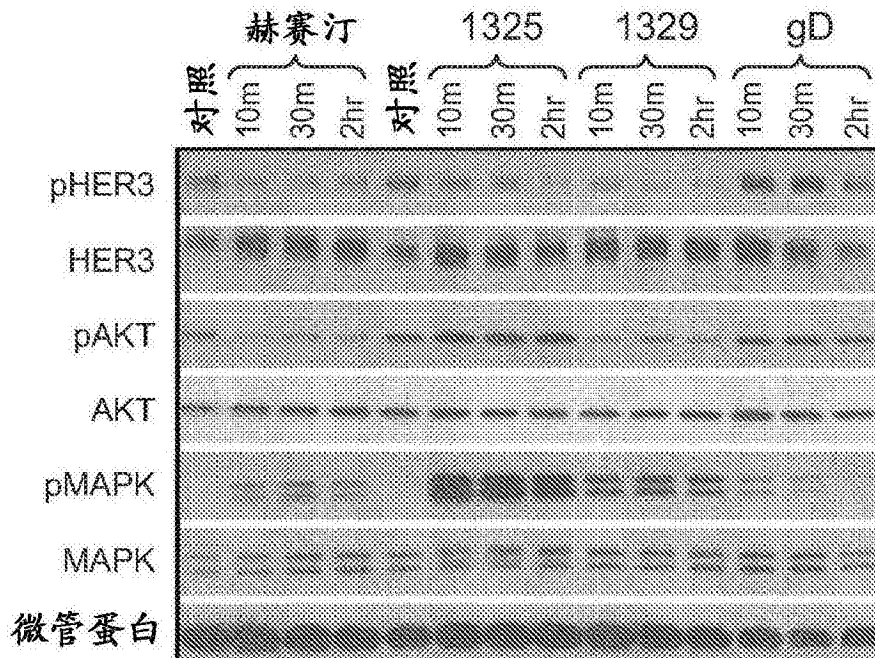


图5B

位点	肽	肽序列	定量 AQUA 或 无标记物?	基础的 %Phos $\pm$ SD	赫赛汀 %Phos $\pm$ SD	双 Fab %Phos $\pm$ SD	调蛋白 %Phos $\pm$ SD
i701	690-713	LLQETELVEPLPSGAMPNQAMR (SEQ ID NO.: 28)	AQUA	54.8 $\pm$ 5.6	47.8 $\pm$ 4.5	66.3 $\pm$ 1.5	68.5 $\pm$ 3.4
s728	725-736	VLGSAGFGTVYK (SEQ ID NO.: 29)	AQUA*	0.59 $\pm$ 0.20	0.65 $\pm$ 0.08	0.59 $\pm$ 0.11	0.54 $\pm$ 0.05
y735	725-736	VLGSAGFGTVYK (SEQ ID NO.: 29)	AQUA	0.09 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01
y877	869-883	LLDIDETETyHADGGK (SEQ ID NO.: 30)	AQUA	4.4 $\pm$ 0.9	4.2 $\pm$ 0.2	6.5 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 0.8
y1005	986-1006	FVVIQNEIDLGPASPLDSTFyR (SEQ ID NO.: 31)	AQUA	29.6 $\pm$ 4.7	22.7 $\pm$ 5.3	44.9 $\pm$ 3.0	48.3 $\pm$ 4.1
s1054	1054-1072	sGGGDLTLGLEPSEEEAPR (SEQ ID NO.: 32)	AQUA	90.8 $\pm$ 1.7	88.8 $\pm$ 1.5	91.4 $\pm$ 0.4	91.9 $\pm$ 0.6
s1054 和 s1066	1054-1072	sGGGDLTLGLEPSEEEAPR (SEQ ID NO.: 32)	没有	NA	NA	NA	NA
s1073	1073-1096	sPLAPSEGAGSDVFDGLGMGAk (SEQ ID NO.: 33)	AQUA*	16.9 $\pm$ 2.1	8.8 $\pm$ 1.7	31.6 $\pm$ 6.1	27.0 $\pm$ 5.3
s1078	1073-1096	sPLAPsEGAGSDVFDGLGMGAk (SEQ ID NO.: 33)	AQUA	0.82 $\pm$ 0.15	1.01 $\pm$ 0.42	0.84 $\pm$ 0.10	1.05 $\pm$ 0.23
s1083	1073-1096	sPLAPSEGAGsDVFDGLGMGAk (SEQ ID NO.: 33)	AQUA*	5.9 $\pm$ 0.64	8.6 $\pm$ 1.1	5.3 $\pm$ 0.5	5.4 $\pm$ 1.0
s1073 和 s1078	1073-1096	sPLAPsEGAGSDVFDGLGMGAk (SEQ ID NO.: 33)	AQUA*	3.9 $\pm$ 1.1	3.6 $\pm$ 0.7	6.2 $\pm$ 1.2	5.8 $\pm$ 0.9
s1078 和 s1083	1073-1096	sPLAPsEGAGsDVFDGLGMGAk (SEQ ID NO.: 33)	AQUA	22.7 $\pm$ 2.2	30.5 $\pm$ 3.5	28.0 $\pm$ 3.3	26.3 $\pm$ 2.7
s1073, s1078 和 s1083	1073-1096	sPLAPsEGAGsDVFDGLGMGAk (SEQ ID NO.: 33)	AQUA*	9.6 $\pm$ 2.8	8.5 $\pm$ 5.9	10.5 $\pm$ 2.1	13.2 $\pm$ 1.9
s1100	1097-1111	GLQsLPTHDPSPQR (SEQ ID NO.: 34)	AQUA	0.87 $\pm$ 0.08	0.92 $\pm$ 0.16	0.82 $\pm$ 0.05	0.88 $\pm$ 0.06
y1139	1112-1153	YSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSP	无标记物	76.8 $\pm$ 3.4	75.5 $\pm$ 3.9	82.4 $\pm$ 3.9	85.5 $\pm$ 2.4
s1139 和 s1151	1112-1153	QPEYVYNQPDVVRPQPPSPR (SEQ ID NO.: 35)	无标记物	6.8 $\pm$ 2.4	10.7 $\pm$ 2.5	12.1 $\pm$ 4.4	4.9 $\pm$ 1.9
11166	1154-1171	EGPLPAARPAAGALERPK (SEQ ID NO.: 36)	没有	NA	NA	NA	NA
11240/42	1239-1255	GPTAENPEYILGLDVPV(这些中的之一) (SEQ ID NO.: 37)	AQUA*	40.6 $\pm$ 4.6	25.5 $\pm$ 6.1	18.3 $\pm$ 2.9	30.7 $\pm$ 5.5
y1248	1239-1255	GTPTAENPEYILGLDVPV (SEQ ID NO.: 38)	AQUA	17.8 $\pm$ 1.0	38.8 $\pm$ 2.0	32.7 $\pm$ 3.0	13.8 $\pm$ 0.7

* = 使用的合成肽在同一肽上具有另一磷酸化位点

图5C

+13C +15N 增加的 ERBB2 合成肽 质量			重单 同位素的 MH+		
5	1	6.0138	VLGSGAFGT <u>V</u> YK	1204.6605	(SEQ ID NO.: 29)
5	1	6.0138	VLGSGAFGT <u>Vy</u> K	1284.6268	(SEQ ID NO.: 29)
4	2	6.0075	LLDIDET <u>E</u> YHAD <u>G</u> GK	1681.7885	(SEQ ID NO.: 30)
4	2	6.0075	LLDIDET <u>Ey</u> HAD <u>G</u> GK	1761.7548	(SEQ ID NO.: 30)
5	1	6.0138	EGPLPAARPAGATLER <u>P</u> K	1837.0323	(SEQ ID NO.: 36)
5	1	6.0138	EGPLPAARPAGAT <u>L</u> ER <u>P</u> K	1916.9986	(SEQ ID NO.: 36)
5	1	6.0138	SGGGDLTLGLEPSEEEE <u>A</u> <u>P</u> R	1919.9225	(SEQ ID NO.: 32)
5	1	6.0138	<u>s</u> GGGDLTLGLEPSEEEE <u>A</u> <u>P</u> R	1999.8888	(SEQ ID NO.: 32)
6	1	7.0171	GLQSLPTHDPSP <u>L</u> QR	1652.8827	(SEQ ID NO.: 34)
6	1	7.0171	GLQ <u>s</u> LPTHDPSP <u>L</u> QR	1732.8491	(SEQ ID NO.: 34)
5	1	6.0138	GTPTAENPEYLGLD <u>V</u> <u>P</u> V	1777.8887	(SEQ ID NO.: 37)
5	1	6.0138	GTPTAENPE <u>y</u> LGLD <u>V</u> <u>P</u> V	1857.8550	(SEQ ID NO.: 37)
5	1	6.0138	LLQETELVEPLTPSGAM <u>P</u> NQAQMR	2659.3462	(SEQ ID NO.: 28)
5	1	6.0138	LLQETELVEPL <u>t</u> PSGAM <u>P</u> NQAQMR	2739.3125	(SEQ ID NO.: 28)
6	1	7.0171	FVVIQNEDLGASP <u>L</u> DSTFYR	2375.1991	(SEQ ID NO.: 31)
6	1	7.0171	FVVIQNEDLGASP <u>L</u> DSTF <u>y</u> R	2455.1654	(SEQ ID NO.: 31)
6	1	7.0171	SPLAPSEGAGSDVFDGD <u>L</u> GMGAAG	2256.0562	(SEQ ID NO.: 33)
6	1	7.0171	SPLAP <u>s</u> EGAGSDVFDGD <u>L</u> GMGAAG	2336.0225	(SEQ ID NO.: 33)
6	1	7.0171	SPLAP <u>s</u> EGAG <u>s</u> DVFDGD <u>L</u> GMGAAG	2415.9888	(SEQ ID NO.: 33)

图5D

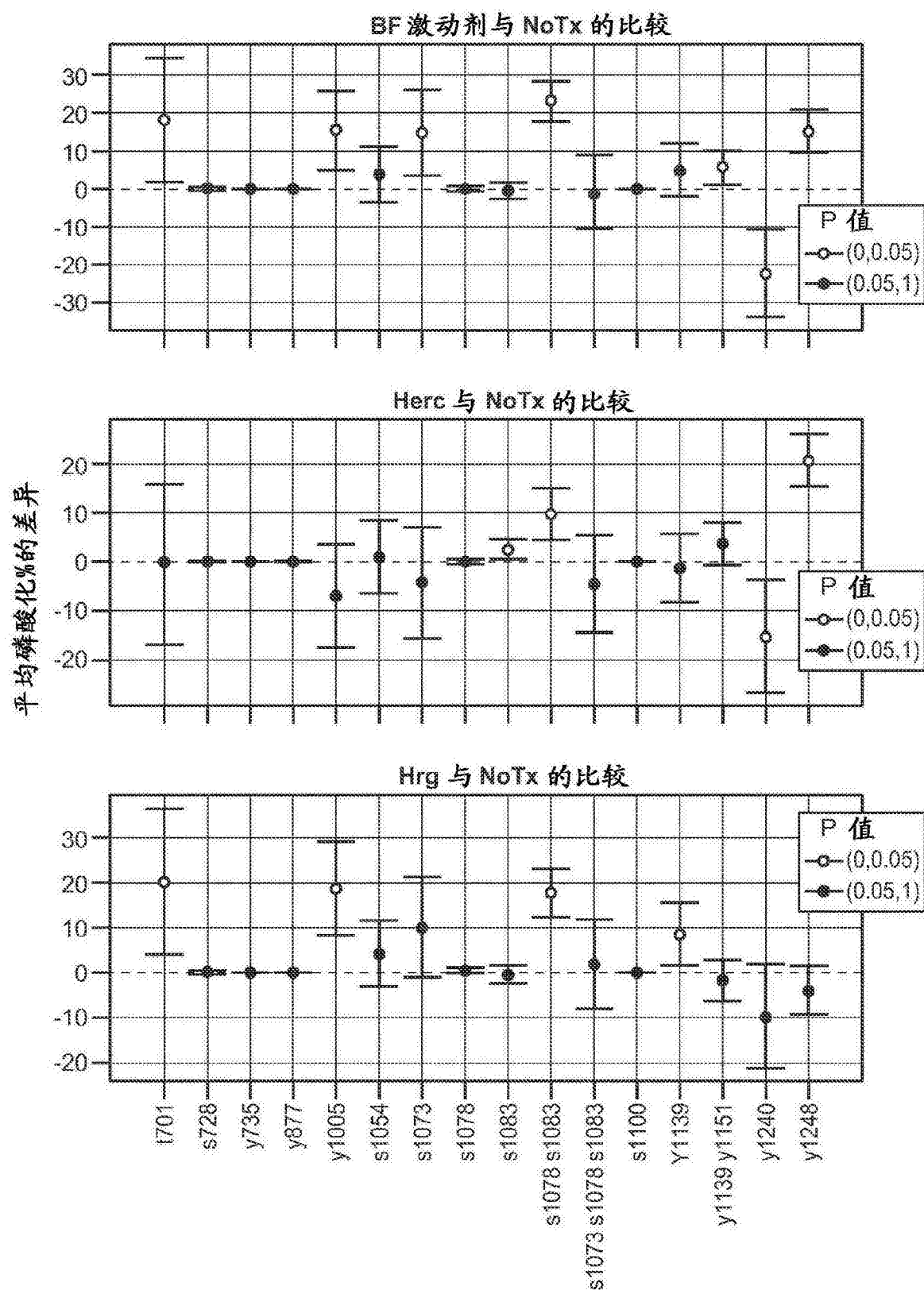


图 5E

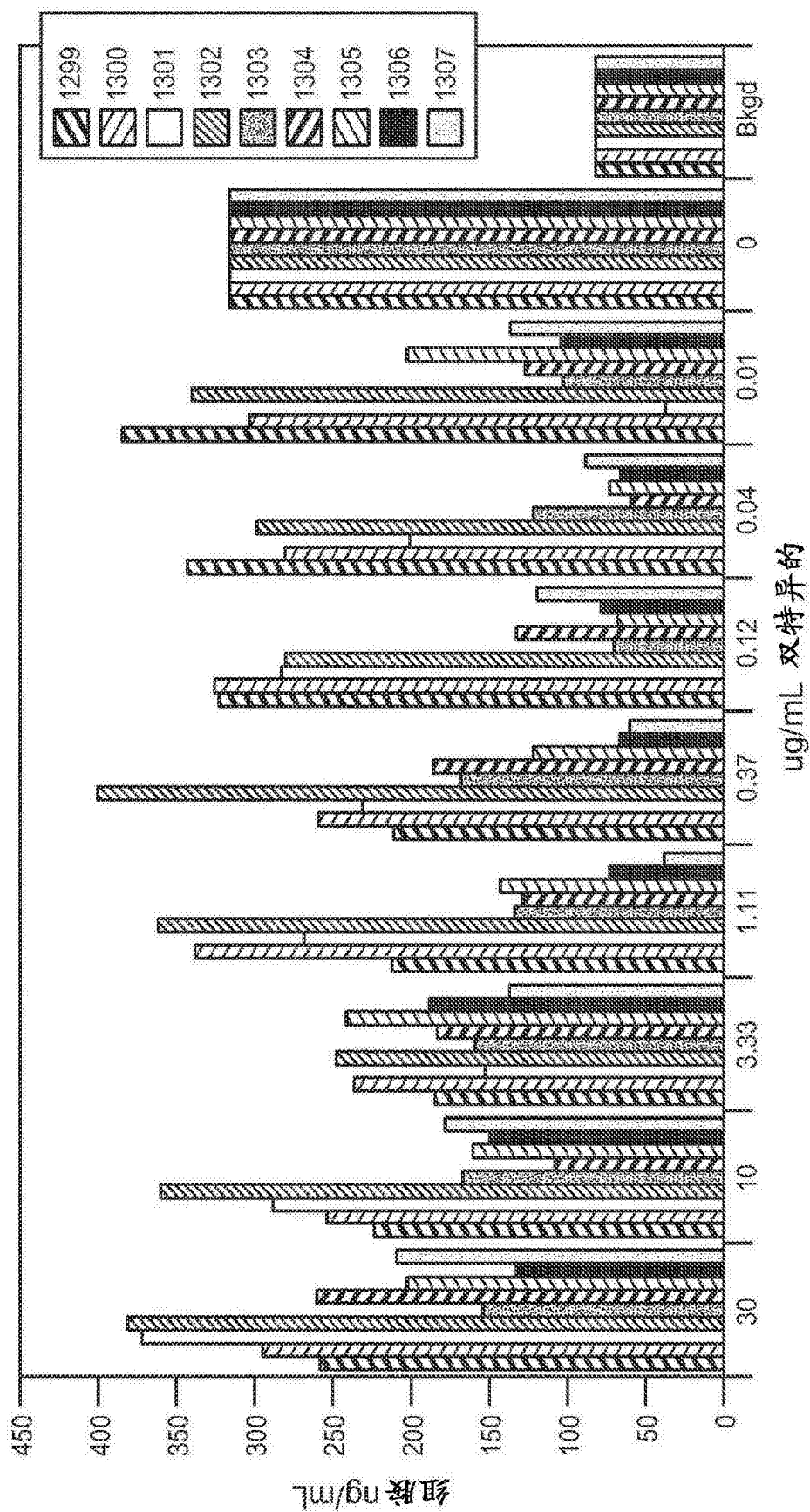


图6A

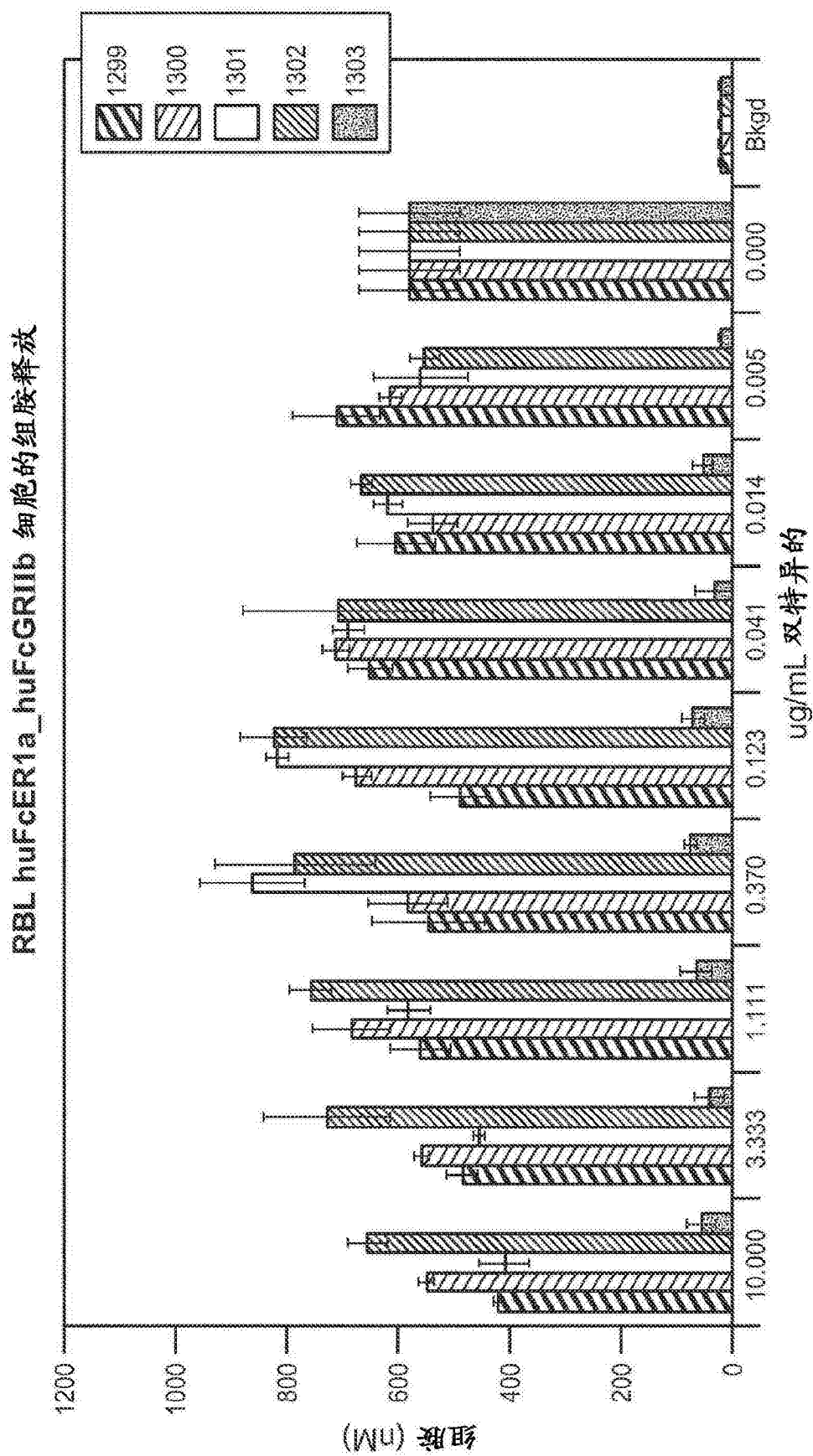


图6B

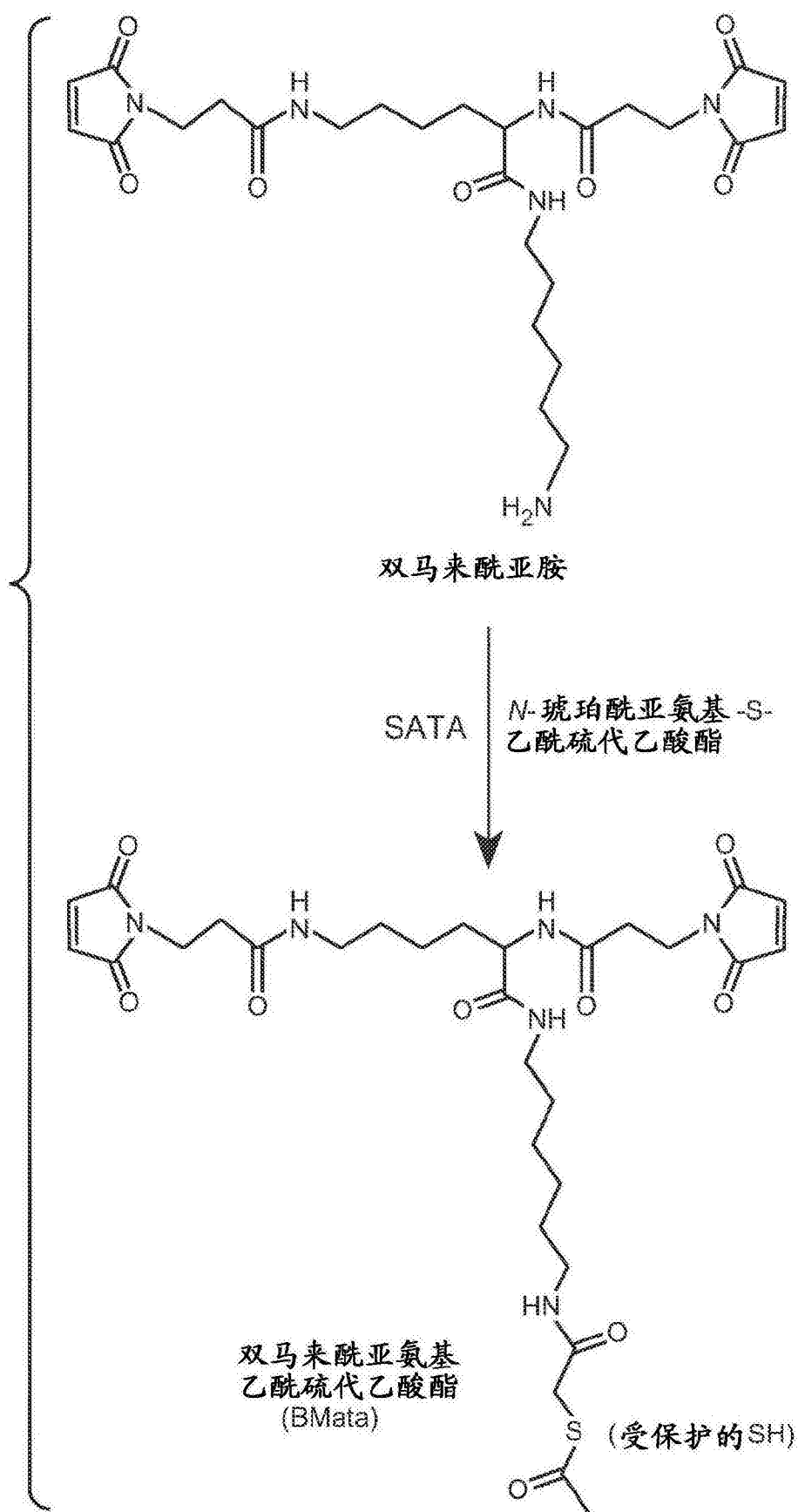


图7A

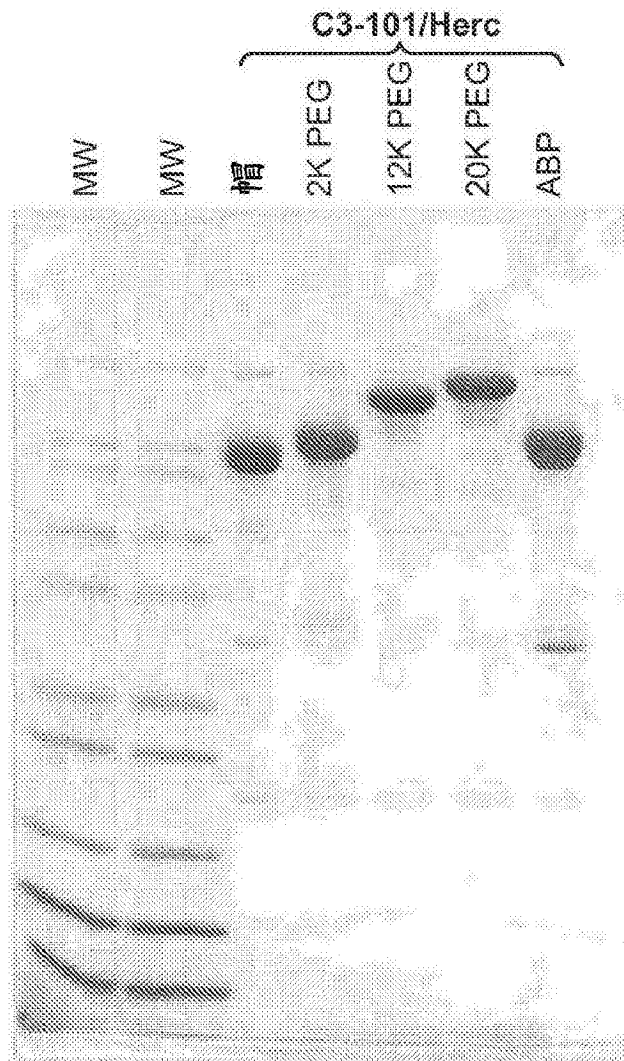
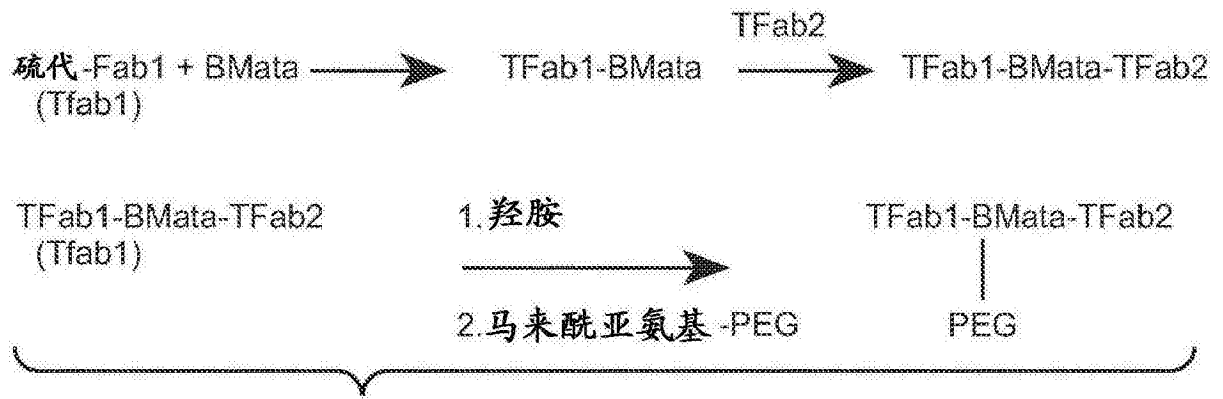


图8A

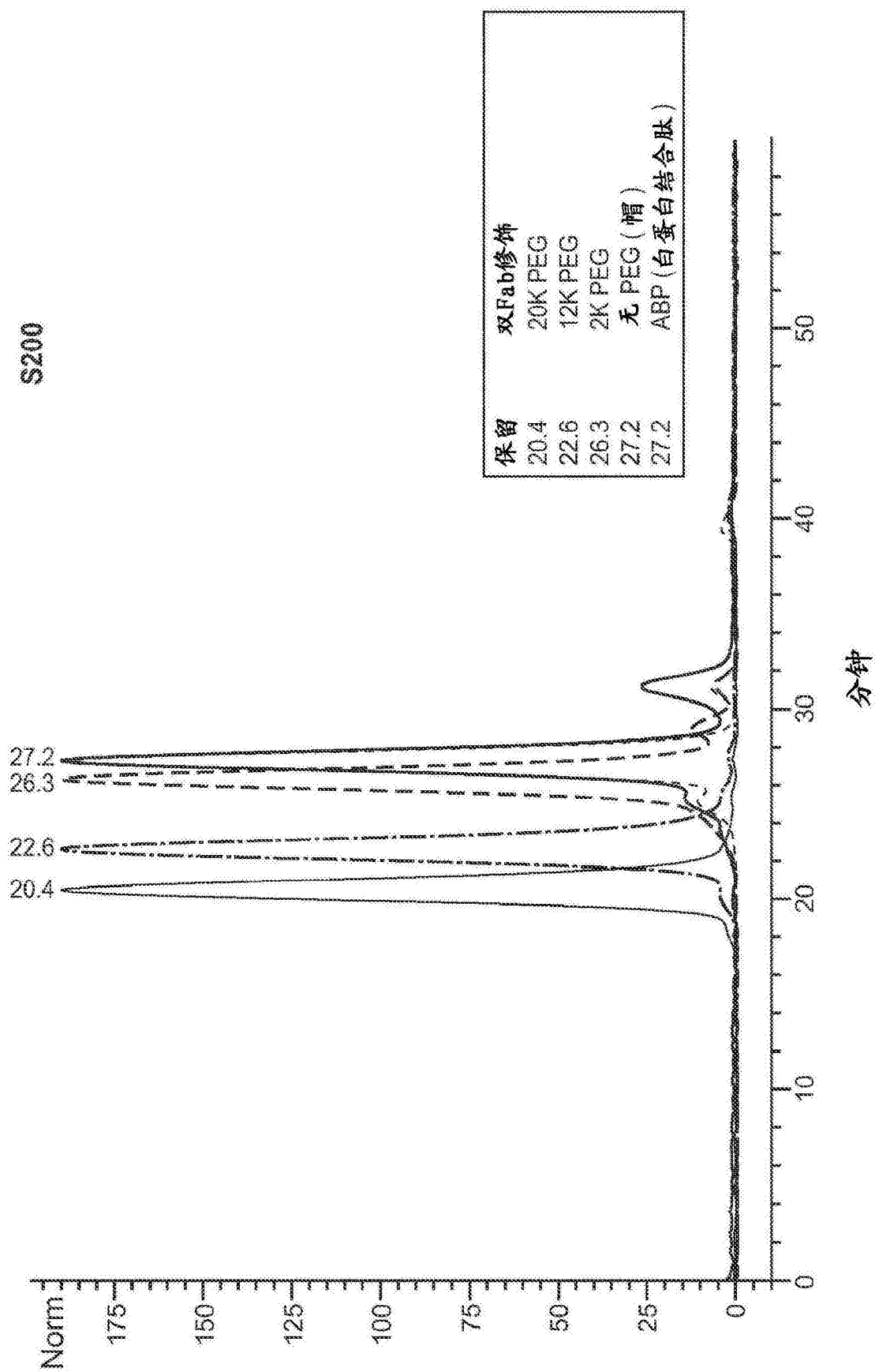


图8B

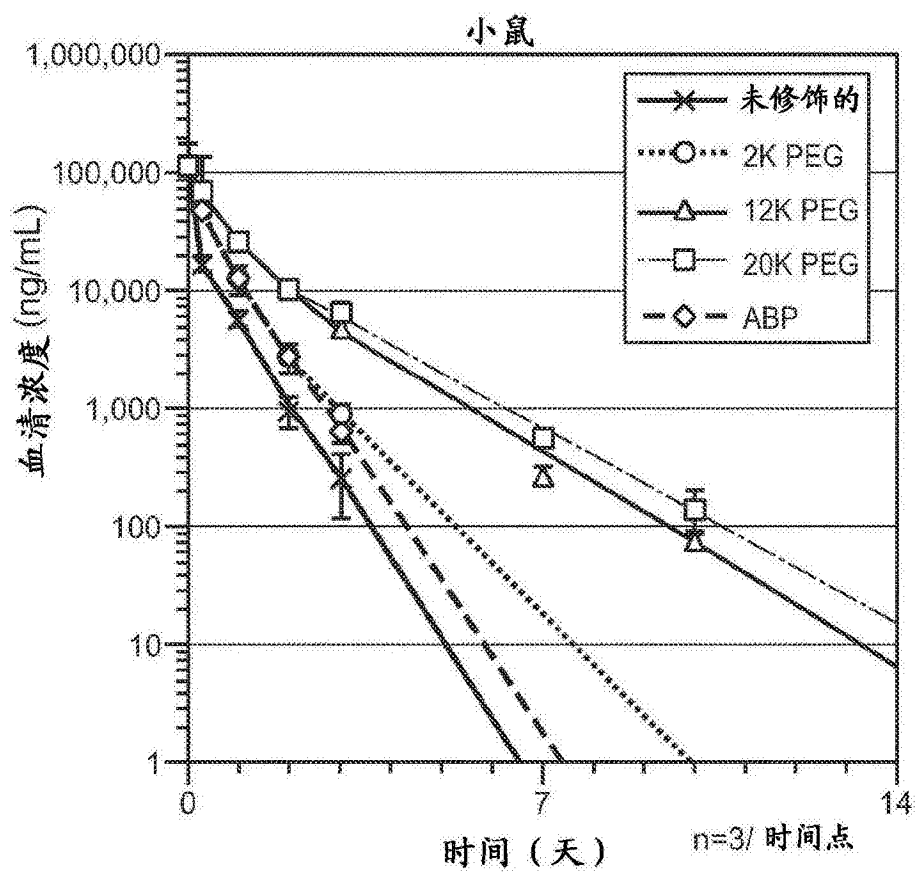


图9A

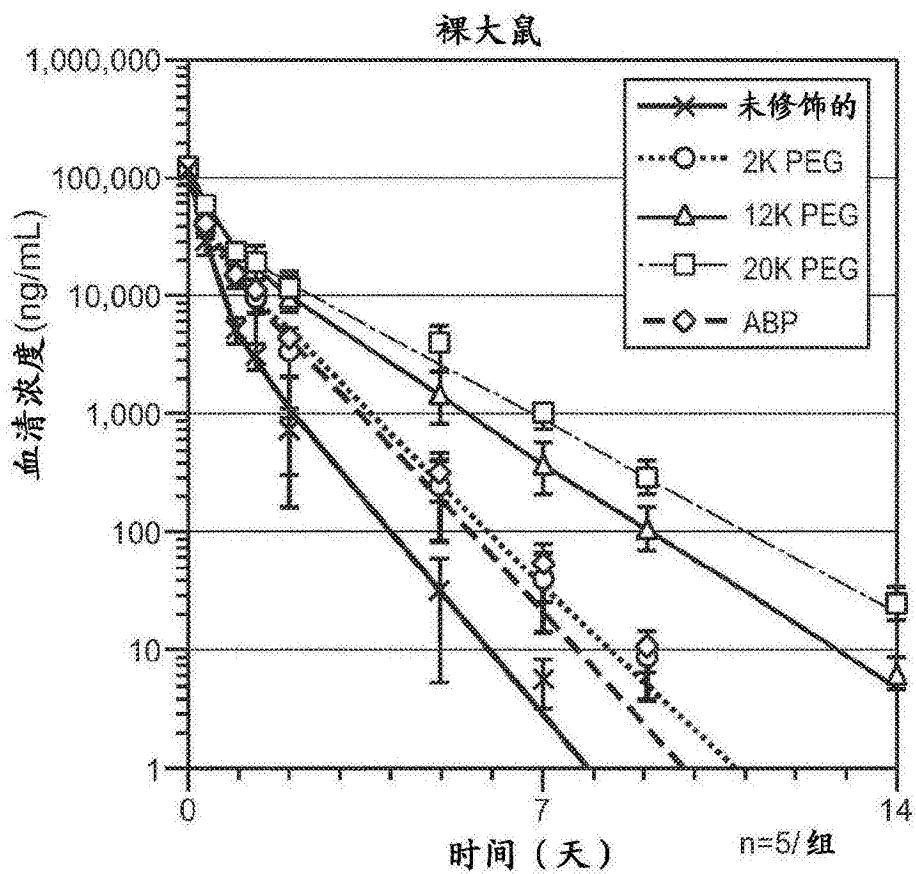


图9B

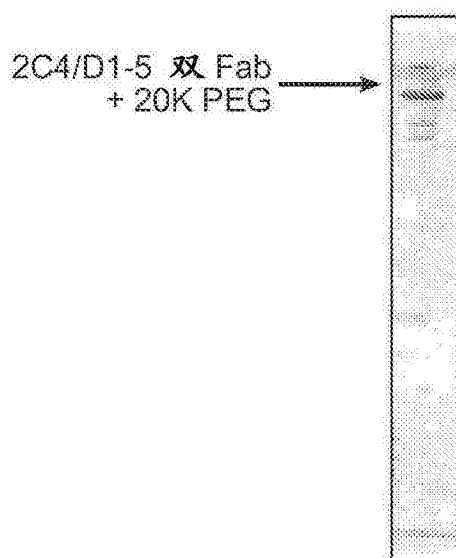


图10A

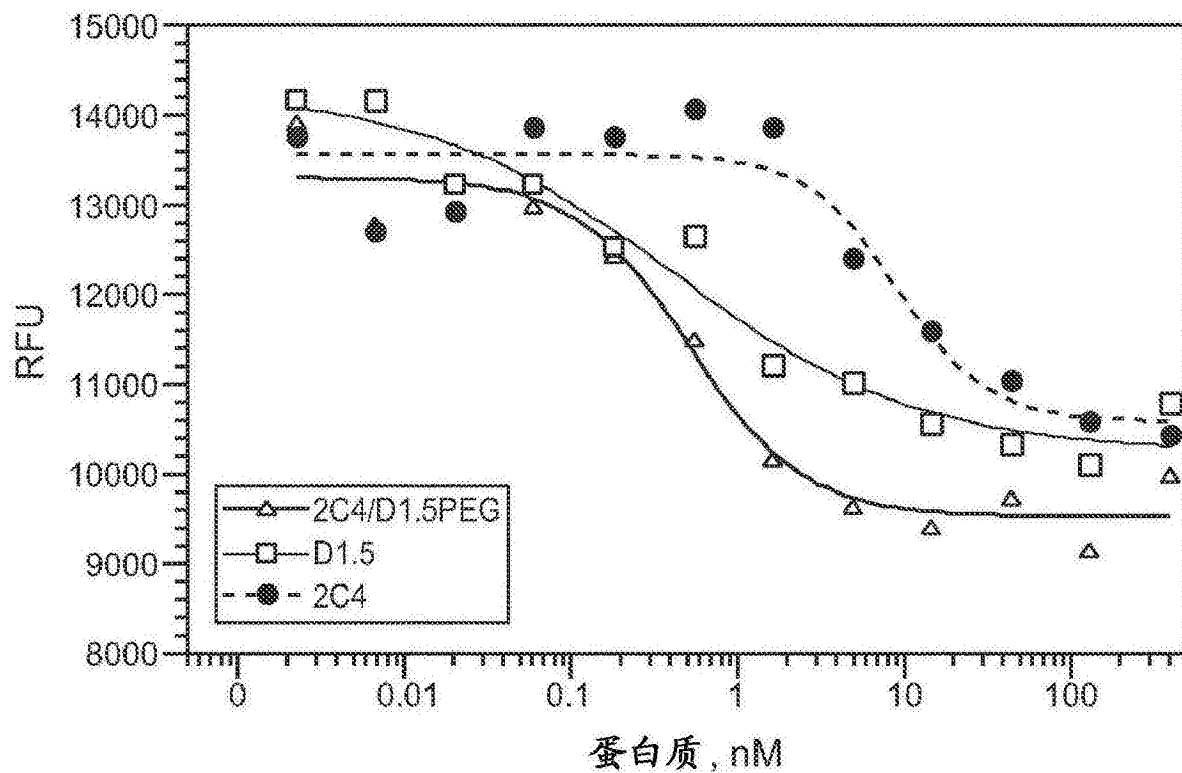


图10B

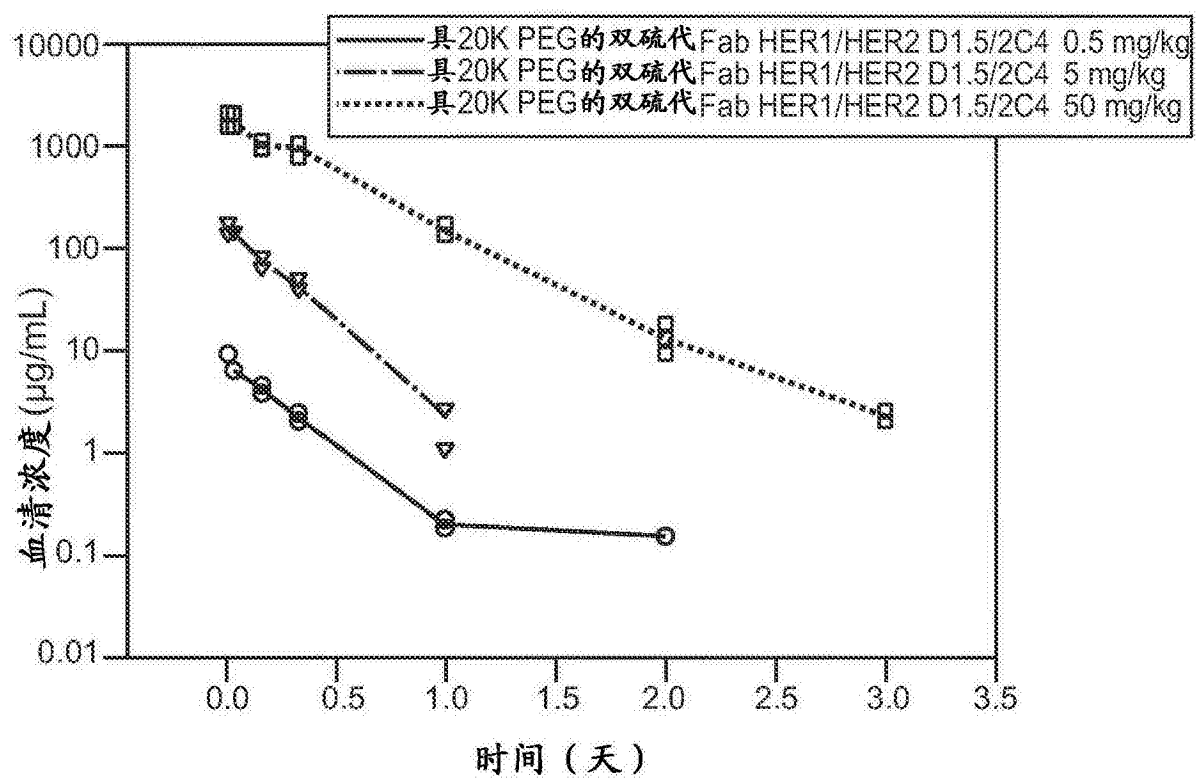


图11A

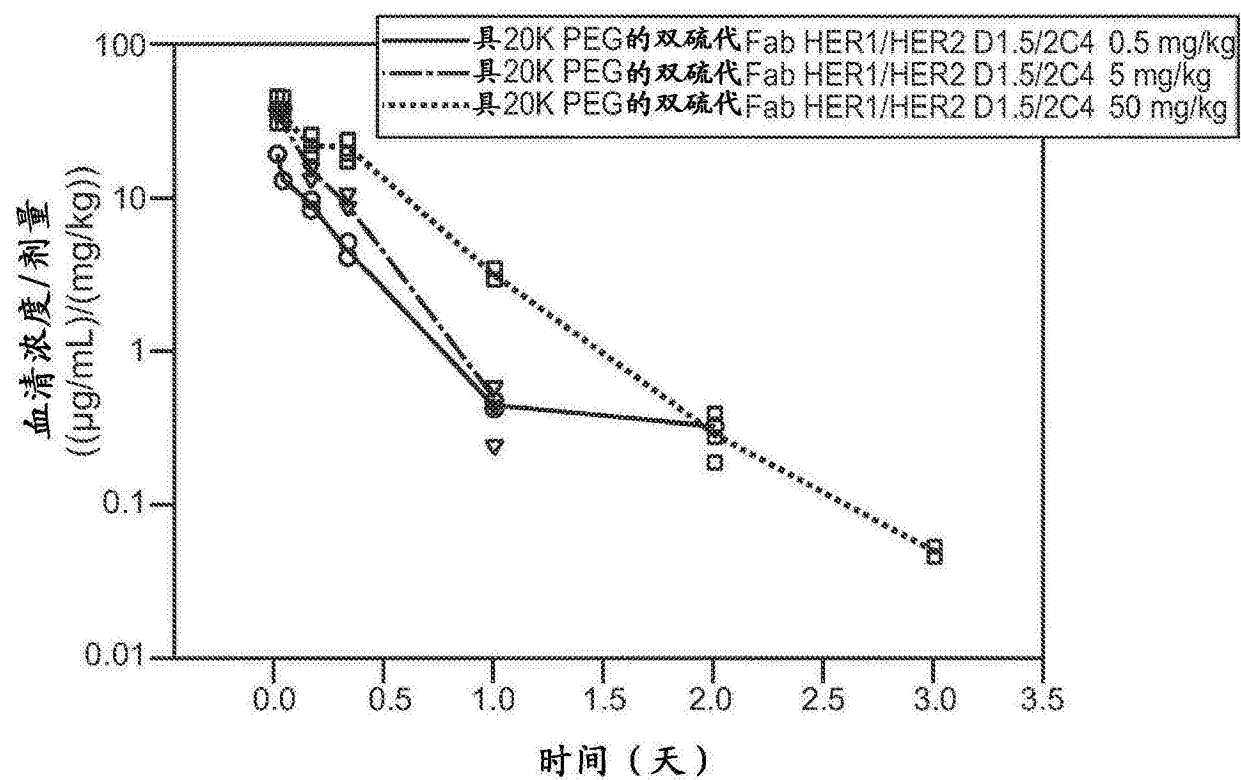


图11B

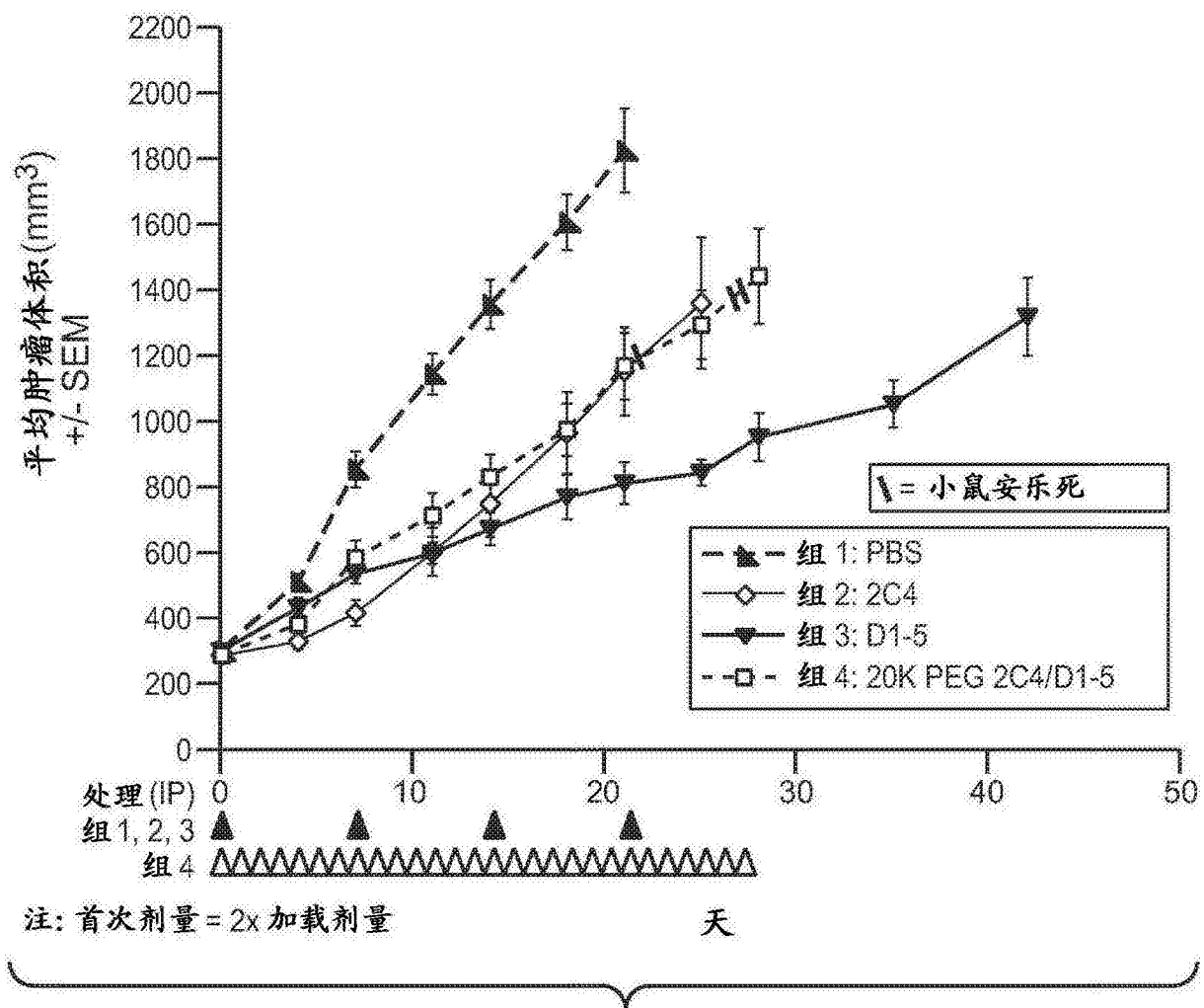


图12

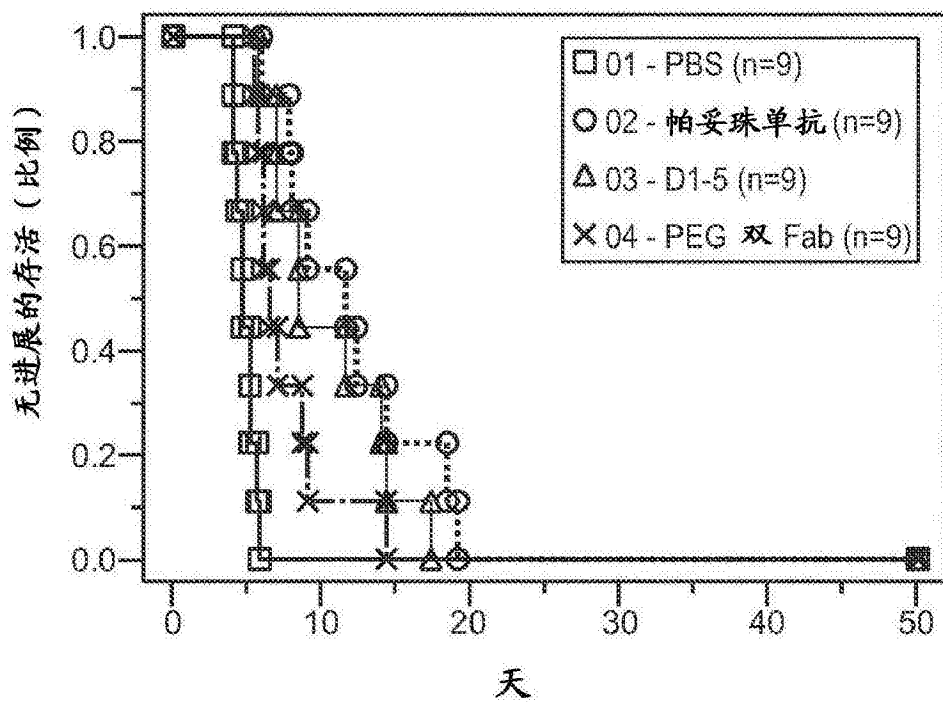


图13A

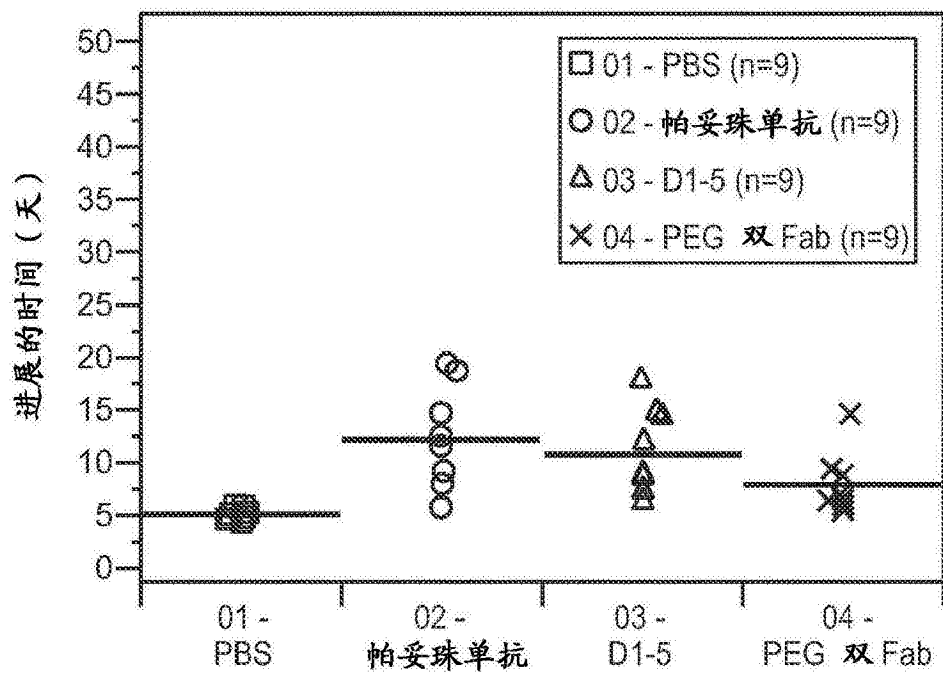


图13B

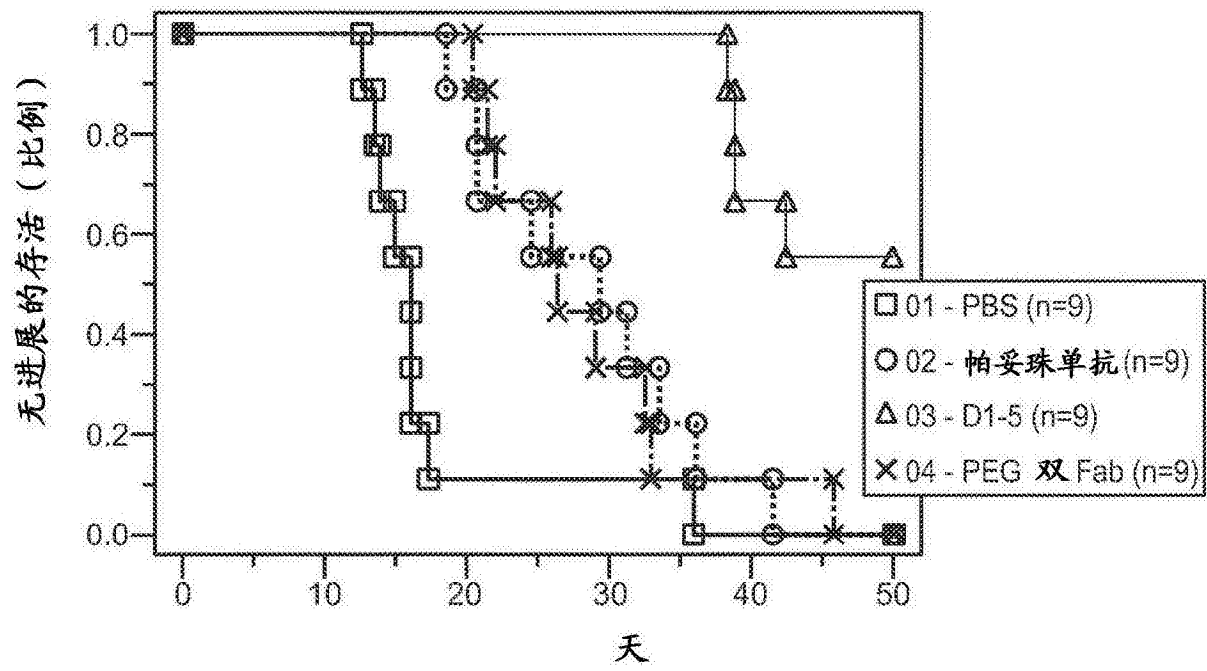


图14A

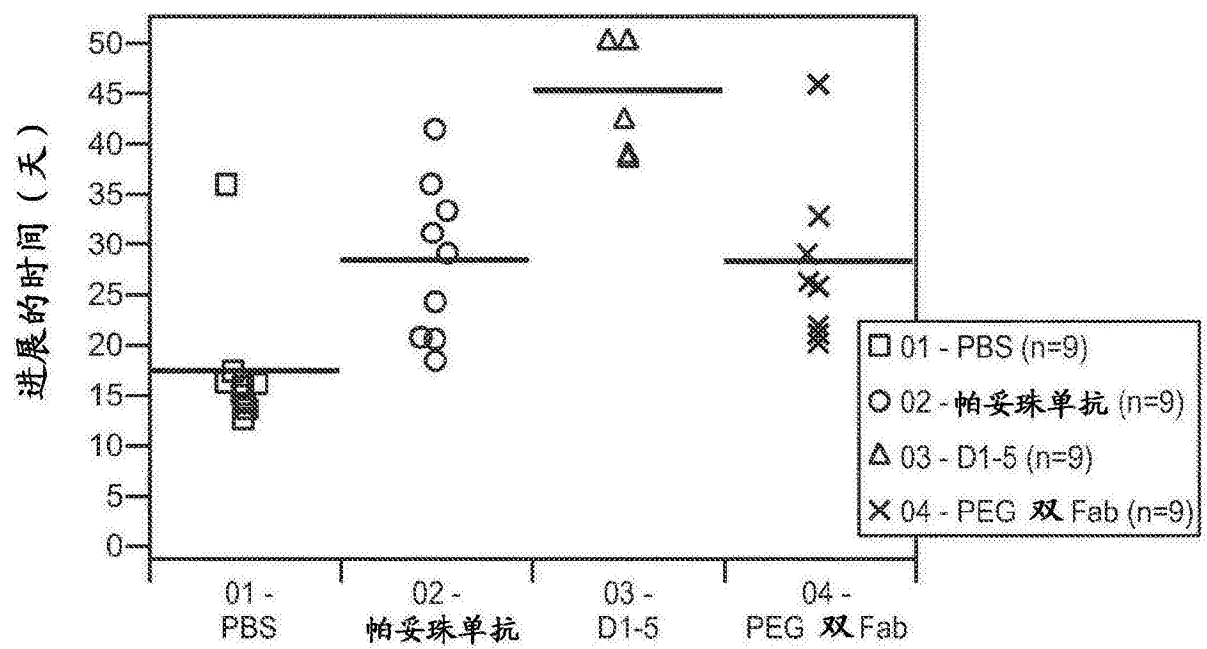


图14B