



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103097417 B

(45)授权公告日 2019.04.09

(21)申请号 201180030540.9

(22)申请日 2011.04.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103097417 A

(43)申请公布日 2013.05.08

(30)优先权数据

PA201000330 2010.04.20 DK

201001066 2010.11.24 DK

61/326082 2010.04.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.12.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/056388 2011.04.20

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2011/131746 EN 2011.10.27

(73)专利权人 根马布股份公司

地址 丹麦哥本哈根

(72)发明人 A.F.拉布里恩 J.米斯特斯

E.v.d.布雷默 J.J.内杰森

P.v.伯克尔 B.d.戈伊杰 T.文克

J.范德温克尔 J.舒尔曼 P.帕伦

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 孔青 权陆军

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

C07K 16/10(2006.01)

C07K 16/32(2006.01)

(56)对比文件

US 5807706 A,1998.09.15,

EP 1870459 A1,2007.12.26,

WO 2008/119353 A1,2008.10.09,

WO 2009/089004 A1,2009.07.16,

审查员 李影

权利要求书3页 说明书63页

序列表3页 附图55页

(54)发明名称

含异二聚体抗体Fc的蛋白及其制备方法

(57)摘要

本文公开了新的含异二聚体抗体Fc的蛋白(比如双特异性抗体)和用于制备此类蛋白的新方法。

1. 一种用于产生异二聚体抗体的体外方法,所述方法包含以下步骤:

a) 提供包含第一CH3区的第一同二聚体IgG抗体,其中所述第一同二聚体IgG抗体在409位具有氨基酸Arg,

b) 提供包含第二CH3区的第二同二聚体IgG抗体,其中所述第二同二聚体IgG抗体具有选自下列的氨基酸取代:

(i) 第368位的Ala, Glu, Gly, His, Ile, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val或Trp,或

(ii) 第399位的Ala, Phe, Arg, Tyr, His或Lys,或

(iii) 第405位的Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr,Val, Tyr, Leu, Lys, Ser或Trp,或

(iv) 第407位的Gly, Leu, Met或Trp;

其中所述第一CH3区与第二CH3区的序列不同,并使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用,和其中所述第一同二聚体抗体和所述第二同二聚体抗体两者在铰链区都包含Cys-Pro-Pro-Cys序列;

c) 在足以允许铰链区的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述第一蛋白与所述第二蛋白一起孵育,和

d) 获得所述异二聚体抗体。

2. 权利要求1的体外方法,其中所述第一和第二同二聚体IgG抗体结合不同的表位。

3. 前述权利要求1-2中任一项的体外方法,其中第一同二聚体IgG抗体的Fc区是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型的,其中第二同二聚体IgG抗体的Fc区是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型的。

4. 前述权利要求1-2中任一项的体外方法,其中所述第一和所述第二同二聚体IgG抗体两者的Fc区都是IgG1同种型的。

5. 权利要求1的体外方法,其中氨基酸取代基是天然氨基酸或非天然氨基酸。

6. 前述权利要求1-2中任一项的体外方法,其中所述第一和第二CH3区除了指定突变以外包含在SEQ ID NO:1阐明的序列。

7. 前述权利要求1-2中任一项的体外方法,其中所述第一和第二同二聚体IgG抗体除了任何指定突变以外是人抗体。

8. 前述权利要求1-2中任一项的体外方法,其中所述第一和第二同二聚体IgG抗体都进一步包含轻链。

9. 权利要求1-2中任一项的体外方法,其中所述第一和/或所述第二同二聚体IgG抗体包含除去用于Asn连接的糖基化的受体位点的突变。

10. 前述权利要求1-2中任一项的体外方法,其中在步骤a) 和b) 提供的所述第一和第二同二聚体IgG抗体是纯化的。

11. 前述权利要求1-2中任一项的体外方法,其中所述第一和/或第二同二聚体IgG抗体与药物、前药或毒素缀合或者含有其受体基团。

12. 前述权利要求1-2中任一项的体外方法,其中第一IgG抗体结合至肿瘤细胞上的表位,另一IgG抗体是无关或无活性抗体,其对于预期应用没有任何相关的体内结合活性。

13. 前述权利要求1-2中任一项的体外方法,其中在步骤c)的还原条件包括加入选自下列的还原剂:2-巯基乙胺、二硫苏糖醇和三(2-羧乙基)膦或其化学衍生物、二硫赤藓糖醇、谷胱甘肽、L-半胱氨酸和 β -巯基-乙醇。

14. 前述权利要求1-2中任一项的体外方法,其中步骤c)在具有-150至-600 mV的氧化还原电位的还原条件下进行。

15. 前述权利要求1-2中任一项的体外方法,其中步骤c)包括在至少25 mM 2-巯基乙胺的存在下或者在至少0.5 mM二硫苏糖醇的存在下在至少20°C温度孵育至少90分钟。

16. 前述权利要求1-2中任一项的体外方法,其中步骤d)包括除去还原剂。

17. 一种用于选择具有期望的性质的双特异性抗体的方法,所述方法包括下列步骤:

a) 提供第一组包含具有不同可变区的抗体的同二聚体IgG抗体,其中所述第一组的所述IgG抗体包含完全相同的第一CH3区,

b) 提供第二组包含具有不同可变区或完全相同的可变区的抗体的同二聚体IgG抗体,其中所述第二组的所述IgG抗体包含完全相同的第二CH3区,和,

其中所述第一同二聚体IgG抗体在409位具有氨基酸Arg,和

第二同二聚体IgG抗体具有选自下列的氨基酸取代:

(i) 第368位的Ala, Glu, Gly, His, Ile, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val或Trp,或

(ii) 第399位的Ala, Phe, Arg, Tyr, His或Lys,或

(iii) 第405位的Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser或Trp,或

(iv) 第407位的Gly, Leu, Met或Trp;

其中所述第一CH3区与第二CH3区的序列不同,并使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用,和其中所述第一同二聚体抗体和所述第二同二聚体抗体两者在铰链区都包含Cys-Pro-Pro-Cys序列;

c) 在足以允许铰链区的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下孵育所述第一组抗体和所述第二组抗体的组合,从而产生一组双特异性抗体,以及其中所述第一和第二CH3区的序列在不同的位置含有氨基酸取代,

d) 任选恢复条件至非还原性,

e) 针对给定的期望性质测定所得双特异性抗体组,和

f) 选择具有期望性质的双特异性抗体。

18. 一种用于制备双特异性抗体的方法,所述方法包含以下步骤:

a) 提供编码包含第一CH3区的第一同二聚体IgG抗体的第一核酸构建体,

b) 提供编码包含第二CH3区的第二同二聚体IgG抗体的第二核酸构建体,

其中所述第一CH3区与第二CH3区的序列不同,并使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用,和其中所述第一抗体和所述第二抗体两者在铰链区都包含Cys-Pro-Pro-Cys序列;并且

其中所述第一同二聚体IgG抗体在409位具有氨基酸Arg;

第二同二聚体IgG抗体具有选自下列的氨基酸取代:

(i) 第368位的Ala, Glu, Gly, His, Ile, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val或Trp,或

(ii) 第399位的Ala, Phe, Arg, Tyr, His或Lys,或

(iii) 第405位的Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser或Trp,或

(iv) 第407位的Gly, Leu, Met或Trp;

c) 使所述第一和第二核酸构建体在宿主细胞中共表达,和

d) 从细胞培养物获得所述双特异性抗体。

19. 权利要求18的方法,其进一步包括权利要求2至12中任一项或多项的特征。

20. 一种表达载体,其包含在权利要求18至19中任一项指定的核酸构建体。

21. 一种宿主细胞,其包含在权利要求18至19中任一项指定的核酸构建体。

22. 一种异二聚体抗体,其通过前述权利要求1至19中任一项的方法获得。

23. 一种异二聚体抗体,其包含:含有第一IgG抗体的第一Fc区的第一多肽,所述第一Fc区包含第一CH3区;和含有第二IgG抗体的第二Fc区的第二多肽,所述第二Fc区包含第二CH3区,其中所述第一CH3区与第二CH3区的序列不同,并使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用;和其中所述异二聚体抗体在铰链区包含Cys-Pro-Pro-Cys序列

其中所述第一CH3区在409位具有氨基酸Arg,第二CH3区具有选自下列的氨基酸取代:

(i) 第368位的Ala, Glu, Gly, His, Ile, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val或Trp,或

(ii) 第399位的Ala, Phe, Arg, Tyr, His或Lys,或

(iii) 第405位的Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser或Trp,或

(iv) 第407位的Gly, Leu, Met或Trp。

24. 前述权利要求22至23中任一项的异二聚体抗体,其进一步包含权利要求1至2中任一项或多项的特征。

25. 权利要求22至24中任一项的异二聚体抗体,其用作药物。

26. 一种药物组合物,其包含权利要求22至24中任一项的异二聚体抗体和药学上可接受的载体。

含异二聚体抗体Fc的蛋白及其制备方法

发明领域

[0001] 本发明涉及新的含异二聚体抗体Fc的蛋白比如双特异性抗体,及制备此类蛋白的新方法。

[0002] 发明背景

[0003] 近年来单克隆抗体已成为成功的治疗分子,特别是用于治疗癌症。但是,不幸的是,当单克隆抗体用作单一疗法时,经常不能治愈疾病。双特异性抗体有可能克服单克隆抗体疗法的一些限制,如它们可用作介质以靶向药物或毒性化合物至靶细胞,用作介质以再靶向效应机制至疾病相关部位或用作介质以增加对肿瘤细胞的特异性,例如通过与只见于肿瘤细胞的靶分子的组合结合。

[0004] 最近关于双特异性抗体的不同形式和用途的综述见于Chames和Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12:276。开发双特异性抗体的主要障碍之一是通过传统技术难以制备足够质量和数量的材料,所述传统技术比如杂交瘤和化学缀合方法 (Marvin和Zhu (2005) Acta Pharmacol Sin 26:649)。由不同重链和轻链组成的两种抗体在宿主细胞中的共表达,除了产生期望的双特异性抗体以外,还产生可能的抗体产物的混合物。

[0005] 已描述数种策略以利于在不同抗体构建体共表达后形成异二聚的(即双特异性)产物。

[0006] Lindhofer等(1995) J Immunol 155:219 已描述产生不同抗体的大鼠和小鼠杂交瘤的融合导致功能性双特异性抗体的富集,因为优先的物种限制性重/轻链配对。另一种促使形成异二聚体超过同二聚体的策略是“进入孔中的隆突(knob-into-hole)”策略,其中在第一重链多肽的界面引入隆起,在第二重链多肽的界面引入对应的腔,使得隆起可位于腔内,以便促使异二聚体形成和阻碍同二聚体形成。“隆起”是通过用较大的侧链从第一多肽的界面置换小的氨基酸侧链而构建的。与隆起相同或相似大小的互补“腔”是通过用较小的氨基酸侧链置换大的氨基酸侧链而在第二多肽的界面建立的 (US专利5,731,168)。EP1870459 (Chugai) 和W02009089004 (Amgen) 描述了有利于在不同抗体域在宿主细胞中共表达后形成异二聚体的其它策略。在这些方法中,组成两个CH3域中的CH3-CH3界面的一个或更多个残基被荷电氨基酸置换,使得在静电上不利于形成同二聚体且在静电上利于异二聚体化。W02007110205 (Merck) 描述又一种策略,其中利用IgA与IgG CH3域之间的差异促使异二聚体化。

[0007] Dall'acqua等(1998) Biochemistry 37:9266 已鉴定五个参与CH3同二聚体界面中的 CH3-CH3接触的在能量上关键的氨基酸残基(366、368、405、407和409)。

[0008] W02008119353 (Genmab) 描述用于制备双特异性抗体的体外方法,其中在还原条件下孵育后,在两个单特异性IgG4抗体或IgG4样抗体之间通过“Fab臂”或“半分子”互换(重链与连接的轻链交换)形成双特异性抗体。这种Fab臂互换反应是二硫键异构化反应和CH3域解离-缔合的结果,其中在亲代(原来是单特异性)抗体较链区的重链二硫键被还原,所得游离半胱氨酸与另一个亲代抗体分子(原来具有不同的特异性)的半胱氨酸残基形成重链间二硫键,同时亲代抗体的CH3域通过解离-缔合释放和再形成。所得产物是具有两个Fab臂的

双特异性抗体,所述两个Fab臂可能包含不同序列。但是应当注意的是,该过程是随机的,Fab臂互换也可发生在具有相同序列的两个分子之间,或者两个双特异性分子可参加Fab臂互换以再产生包含原来的单特异性亲代抗体特异性的抗体。

[0009] 现在已惊奇地发现通过在两个单特异性起始蛋白的CH3区引入不对称突变,可迫使Fab臂互换反应变为定向的,从而得到高度稳定的异二聚体蛋白。

[0010] 发明概述

[0011] 因此,一方面,本发明提供基于稳定的含同二聚体Fc的原料制备高度稳定的含异二聚体Fc的蛋白的有效的体外方法。例如,可基于两种稳定的单特异性抗体作为原料形成具有高收率和纯度的高度稳定的双特异性抗体。

[0012] 因此,一方面,本发明涉及用于产生异二聚体蛋白的体外方法,所述方法包括以下步骤:

[0013] a) 提供包含免疫球蛋白Fc区的第一同二聚体蛋白,所述Fc区包含第一CH3区,

[0014] b) 提供包含免疫球蛋白Fc区的第二同二聚体蛋白,所述Fc区包含第二CH3区,

[0015] 其中所述第一CH3区与第二CH3区的序列不同,并使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用。

[0016] c) 在足以允许铰链区的半胱氨酸进行二硫键异构化的还原条件下将所述第一蛋白与所述第二蛋白一起孵育,和

[0017] d) 获得所述异二聚体蛋白。

[0018] 所述方法可以例如用于体外制备异二聚体蛋白,比如双特异性抗体,用于各种用途,比如治疗或诊断用途。这种体外方法的优点是重链/轻链配对在反应期间保持完整,所以在产物中不会得到不期望的重链与轻链的组合。这与现有技术描述的一些共表达方法(见上文)相反,所述共表达方法中因为在细胞中随机的重链/轻链配对所致,必须发现可与两种重链形成功能性抗体的共用轻链以避免形成非功能性重链/轻链产物。此外,体外方法可在实验室中进行,这与共表达相比允许对异二聚体蛋白更大的控制、更高的灵活性和收率。

[0019] 本发明的体外方法还可用于例如在筛选方法中建立更大大小的化合物文库,以鉴定有利的特异性组合。例如,对于抗体靶标的一些组合,并非任何双特异性抗体都将具有功能,即能够同时与两种靶标结合并介导期望的功能效应。在这样的情况下,具有期望的性质(例如最佳靶结合或细胞杀伤)的双特异性抗体,可通过以下步骤鉴定:

[0020] a) 提供第一组具有不同可变区的同二聚体抗体,其中所述第一组的所述抗体包含第一CH3区,

[0021] b) 提供第二组具有不同可变区的同二聚体抗体,其中所述第二组的所述抗体包含第二CH3区,

[0022] 其中所述第一CH3区与第二CH3区的序列不同,并使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用,

[0023] c) 在足以允许铰链区的半胱氨酸进行二硫键异构化的还原条件下孵育所述第一组抗体与所述第二组抗体的组合,由此产生一组双特异性抗体,

[0024] d) 任选恢复条件至非还原性,

[0025] e) 针对给定的期望性质测定所得双特异性抗体组,和

[0026] f) 选择具有期望性质的双特异性抗体。

[0027] 在另外的方面,本发明涉及通过本发明方法获得或可获得的异二聚体蛋白和通过在合适的宿主细胞中共表达而制备本发明异二聚体蛋白的方法。

[0028] 附图简述

[0029] 图1:通过种间Fab臂互换产生双特异性抗体。通过ELISA确定了在所示EGFR (2F8) 与CD20 (7D8) IgG4抗体之间GSH诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。在ELISA中分析0—1 μ g/mL的浓度系列(总抗体)。恒河猴(Rh)与人(Hu) IgG4抗体之间的Fab臂互换后的双特异性结合高于相同物种的两种抗体之间的Fab臂互换后的双特异性结合。

[0030] 图2:人和恒河猴抗体同种型的核心铰链(即包括两个可能形成重链间二硫键的半胱氨酸残基的人IgG1的CPPC序列,和其它人同种型或其它物种的对应残基)和CH3-CH3界面的氨基酸序列的比对。

[0031] 图3:用参加Fab臂互换的突变人IgG1产生双特异性抗体。通过ELISA确定了人CD20 (7D8) IgG4抗体与所示人EGFR (2F8) IgG1抗体之间GSH诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。呈现的图显示三个独立的Fab臂互换实验的平均数,其中1 μ g/mL的总抗体浓度用于ELISA。IgG1—2F8-CPSC-ITL与IgG4-7D8之间的Fab臂互换后的双特异性结合高于两种IgG4抗体之间的Fab臂互换后的双特异性结合。IgG4-7D8与IgG1—2F8-CPSC或IgG1—2F8-ITL组合在所用条件下不产生双特异性抗体。

[0032] 图4:通过人IgG4与突变IgG1抗体的体内Fab臂互换产生双特异性抗体。通过ELISA确定了在人CD20 (7D8) IgG4与所示人EGFR (2F8) IgG1和IgG4突变抗体之间在免疫缺陷小鼠体内Fab臂互换后双特异性抗体的产生。呈现的图显示平均数(n=4)。将双特异性反应性以相对于总IgG浓度的双特异性抗体浓度(百分数)表示。在CH3域具有稳定铰链(CPPC)或R409K突变的人IgG4不能参与Fab臂互换。在铰链中具有CPSC序列和在CH3域具有K409R突变两者的IgG1参加Fab臂互换。(*)对含有IgG1—2F8、IgG4-2F8-CPPC或IgG4-2F8-R409K的混合物的双特异性低于检测限,因此任意设为0。

[0033] 图5:使用2-巯基-乙胺·HCl-(2-MEA-)诱导的在人IgG1与IgG4抗体之间的Fab臂互换产生双特异性抗体。通过ELISA确定了在所示人EGFR (2F8) 与CD20 (7D8) 抗体之间2-MEA诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。测试0-40mM2-MEA浓度系列。呈现的图显示ELISA的结果,其中使用20 μ g/mL总抗体浓度。在含有稳定铰链(CPPC)的抗体之间,2-MEA也有效地诱导Fab臂互换。至于CH3域,与两种野生型IgG4抗体相比,具有三重突变体T350I-K370T-F405L的人IgG4x人IgG1的组合,导致产生更高水平的双特异性反应性。

[0034] 图6:使用在人IgG1与IgG4抗体之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生双特异性抗体。

[0035] 对于0-40mM2-MEA浓度系列的所有样品通过质谱法确定了在所示人EGFR (2F8) 与CD20 (7D8) 抗体之间2-MEA诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。(A)显示利用0mM、7mM和40mM2-MEA进行的IgG1—2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC之间Fab臂互换反应的样品的代表性质谱图实例。(B)在质谱数据量化后,计算双特异性抗体百分数,并针对Fab臂互换反应中的2-MEA浓度作图。IgG4-2F8x IgG4-7D8产生约50%双特异性抗体。IgG1—2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC产生约95%双特异性抗体。

[0036] 图7:通过2-MEA诱导的Fab臂互换所得的异二聚体双特异性抗体的稳定性分析。在所示浓度的无关IgG4的存在下,在GSH诱导的Fab臂互换反应后,通过在ELISA测量EGFR/

CD20双特异性结合,测试通过组合IgG1—2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC (A) 或者IgG4—2F8x IgG4-7D8 (B) 由2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性样品的稳定性。将双特异性结合相对于原料(对照)的双特异性结合(将其设定为100%)来表示。(A)从IgG1—2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC衍生的2-MEA诱导的双特异性产物的双特异性结合得以保留,提示在GSH条件下不参与Fab臂互换的稳定产物。(B)从IgG4-2F8x IgG4-7D8衍生的2-MEA诱导的双特异性产物的双特异性EGFR/CD20结合减少,提示产物在GSH条件下参与与无关IgG4的Fab臂互换。

[0037] 图8:通过2-MEA诱导的Fab臂互换产生的异二聚体双特异性抗体的血浆清除率。对三组小鼠(每组3只小鼠)注射所示抗体:(1)100 μ g通过IgG1—2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC之间体外2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体;(2)100 μ g双特异性抗体+1,000 μ g无关IgG4;(3)50 μ gIgG1—2F8-ITL+50 μ gIgG4-7D8-CPPC。(A)通过ELISA确定的随时间推移的总抗体浓度。所有抗体的总抗体血浆浓度曲线相同。(B)通过ELISA确定的双特异性抗体浓度。注射抗体的双特异性在加入和不加入过量的无关IgG4的情况下相同。(*) IgG1—2F8-ITL+IgG4-7D8-CPPC混合物的双特异性结合低于检测限,因此在该图不能绘出对应的符号。显示两个ELISA实验的均值。

[0038] 图9:通过人IgG1-2F8与IgG4-7D8-CPPC之间的Fab臂互换产生的双特异性抗体的纯度。(A)还原SDS-PAGE (a)显示双特异性样品和IgG1对照样品两者的重链和轻链的带。非还原SDS-PAGE (b)。(B)HP—SEC分析的峰结果显示>98%双特异性样品是均质的,几乎检测不到抗体聚集物。(C)质谱法显示Fab臂互换产生约100%双特异性产物。

[0039] 图10:三重突变体(ITL)、双重突变体(IT、IL、TL)和单突变体(L)人IgG1-2F8之间通过与IgG4-7D8的Fab臂互换产生双特异性抗体的比较。通过ELISA确定,在人IgG1—2F8三重突变体和双重突变体与具有CPSC铰链的野生型IgG4-7D8 (A) 或者具有稳定铰链的突变体IgG4-7D8-CPPC (B), 或者单突变体IgG1—2F8-F405L与具有野生型CPSC或稳定CPPC铰链的IgG4-7D8 (C) 之间,在2-MEA诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。在包括双重突变体和单突变体在内的实验中ELISA分析的浓度系列(总抗体)分别是0—20 μ g/mL或0—10 μ g/mL。与双重突变体IgG1—2F8-IL和IgG1—2F8-TL组合导致产生类似于三重突变体IgG1-ITL的双特异性EGFR/CD20结合。与IgG1—2F8-IT组合不产生双特异性产物。与单突变体IgG1—2F8-F405L组合导致产生双特异性EGFR/CD20结合。

[0040] 图11:在不同温度使用2-MEA诱导的Fab臂互换产生双特异性抗体。在0 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C在2-MEA诱导的体外Fab臂互换反应中通过合并所示人EGFR (2F8) 和CD20 (7D8) 抗体产生双特异性抗体,接着即时进行ELISA。双特异性结合在37 $^{\circ}$ C最有效,在20 $^{\circ}$ C较慢。在0 $^{\circ}$ C,测量不到双特异性结合的产生。

[0041] 图12:通过用不同还原剂诱导的体外Fab臂互换产生双特异性抗体。用ELISA测量用所示还原剂的浓度系列在还原反应中通过合并人IgG1—2F8-ITL和IgG4-7D8-CPPC的双特异性抗体产生。在与DTT(在2.5mM DTT获得最大值)和2-MEA(在25mM 2-MEA获得最大值)反应,但不与GSH反应后测量双特异性结合。(*)因为形成抗体聚集物所以排除GSH浓度>10mM的数据。

[0042] 图13:在IgG1-2F8-ITL与IgG1-7D8-K409X突变体之间2-MEA诱导的Fab臂互换。通过ELISA确定在IgG1—2F8-ITL与所示IgG1—7D8-K409X突变体之间2-MEA诱导的体外Fab臂

互换后双特异性抗体的产生。(A)分析0-20 μ g/mL的浓度系列(总抗体)。阳性对照是纯化批次的双特异性抗体,其从IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC衍生。(B)将互换用相对于阳性对照(黑条)的在20 μ g/mL的双特异性结合表示。深灰色条表示IgG4对照(IgG4-7D8x IgG4-2F8)、阴性对照(IgG1-2F8x IgG1-7D8-K409R)和IgG1-2F8-ITL与IgG4-7D8-CPPC之间的双特异性结合。浅灰色条表示在所示IgG1-7D8-K409X突变体与IgG1-2F8-ITL之间同时进行的Fab臂互换反应的结果。

[0043] 图14:抗体去糖基化不影响通过2-MEA诱导的Fab臂互换产生双特异性抗体。通过ELISA确定所示EGFR(2F8)与CD20(7D8)抗体之间2-MEA诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。比较与7D8抗体和与其酶促去糖基化变体的互换。在ELISA分析0-20 μ g/mL的浓度系列(总抗体)。涉及去糖基化(deglyc)抗体的Fab臂互换反应显示与它们所衍生自的糖基化变体相同的双特异性结合曲线。

[0044] 图15:参加Fab臂互换的能力与CH3-CH3相互作用强度相关。(A)、(B)和(C)通过在具有所示突变的IgG1-2F8与IgG1-7D8(A)或者IgG4-2F8与IgG4-7D8(B和C)构建体之间GSH诱导的Fab臂互换进行的双特异性抗体的产生,其在ELISA中用随时间推移的双特异性结合表示。将双特异性在24小时后与IgG4-2F8x IgG4-7D8对照相比表示。(D)和(E)对于基于IgG1(D)或基于IgG4(E)的分子在24小时后表观KD(表2)与双特异性抗体产生之间的关系(图15A/B/C)。

[0045] 图16:在IgG1、IgG4和(部分)IgG3主链中抗EGFr抗体2F8的序列比对。描述根据Kabat和根据EU索引的氨基酸编号(两者都描述于Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学关注的蛋白序列),第5版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。

[0046] 图17:通过用不同还原剂诱导的体外Fab臂互换产生双特异性抗体。用ELISA测量在用所示还原剂的浓度系列的还原反应中通过合并人IgG1-2F8-F405L和IgG1-7D8-K409R的双特异性抗体产生。将测量的OD值标准化至从IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC之间2-MEA诱导的Fab臂互换衍生的双特异性对照样品的信号,将其设定为100%。在与0.5-50 mM浓度范围DTT、25-50mM浓度范围2-MEA和0.5-5.0mM浓度范围三(2-羧乙基)膦(TCEP)但不与GSH反应后,测量最大的双特异性结合。(*)因为形成抗体聚集物所以排除GSH浓度 \geq 25mM的数据。

[0047] 图18:在人IgG1-2F8-F405L与IgG1-7D8-K409R之间用2-MEA诱导的Fab臂互换产生双特异性抗体。

[0048] (A)通过ELISA确定2-MEA诱导体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。呈现的图显示ELISA的结果,其中使用20 μ g/mL总抗体浓度。2-MEA有效地诱导Fab臂互换。(B)对于0-40mM 2-MEA浓度系列的所有样品通过质谱法确定在2-MEA诱导体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。在质谱数据量化后,计算双特异性抗体百分数,针对Fab臂互换反应中2-MEA的浓度作图。IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R产生约100%双特异性抗体,证实ELISA数据。

[0049] 图19:通过人IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R之间Fab臂互换产生的双特异性抗体的纯度。质谱法显示Fab臂互换产生约100%双特异性产物。

[0050] 图20:通过2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性抗体的血浆清除率。对两组小鼠

(每组3只小鼠)注射所示抗体:(1) 100 μ g通过IgG1—2F8—F405L x IgG1—7D8—K409R之间体外2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体;(2) 100 μ g双特异性抗体+1,000 μ g无关IgG4。(A)通过ELISA确定的随着时间推移的总抗体浓度。所有抗体的总抗体血浆浓度曲线相同。(B)如通过ELISA确定的双特异性抗体浓度。在加入和不加过量无关IgG4的情况下注射抗体的双特异性是相同的。

[0051] 图21:通过IgG1—2F8—F405L x IgG1—7D8—K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体对CD20表达细胞的CDC介导的细胞杀伤。所示抗体的浓度系列用于测试它们对Daudi (A) 和Raji (B) 细胞介导CDC的能力。两种细胞系都表达CD20而不表达EGFR。在IgG1—7D8中引入K409R不影响其诱导CDC的能力。从IgG1—2F8—F405L x IgG1—7D8—K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换衍生的双特异性抗体仍然能够诱导CDC。

[0052] 图22:通过IgG1—2F8—F405L x IgG1—7D8—K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体对EGFR表达细胞的ADCC介导的细胞杀伤。所示抗体的浓度系列用于测试它们对A431细胞介导ADCC的能力。IgG1—7D8不能结合CD20阴性A431细胞,因此不诱导ADCC。ADCC由EGFR抗体IgG1—2F8诱导,也在CH3域引入F405L突变后诱导。在通过IgG1—2F8—F405L x IgG1—7D8—K409R之间的Fab臂互换获得的双特异性形式中保留IgG1—2F8—F405L的ADCC效应子功能。

[0053] 图23:在IgG1—2F8—F405X突变体与IgG1—7D8—K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换。通过ELISA确定在所示IgG1—2F8—F405X突变体与IgG1—7D8—K409R之间2-MEA诱导体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。(A)在ELISA中分析0—20 μ g/mL的浓度系列(总抗体)。阳性对照是纯化批次的双特异性抗体,其从IgG1—2F8—F405L x IgG1—7D8—K409R衍生。(B)将互换用相对于阳性对照(黑条)的在20 μ g/mL抗体浓度的双特异性结合表示。深灰色条表示IgG4对照(IgG4—7D8x IgG4—2F8)与阴性对照(IgG1—2F8x IgG1—7D8—K409R)之间的双特异性结合。浅灰色条表示在所示IgG1—2F8—K405X突变体与IgG1—7D8—K409R或对照之间同时进行的Fab臂互换反应的结果。

[0054] 图24:在IgG1—2F8—Y407X突变体与IgG1—7D8—K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换。通过ELISA确定所示IgG1—2F8—Y407X突变体与IgG1—7D8—K409R之间2-MEA诱导体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。(A)在ELISA分析0—20 μ g/mL的浓度系列(总抗体)。阳性对照是纯化批次的从IgG1—2F8—F405L x IgG1—7D8—K409R衍生的双特异性抗体。(B)将互换以相对于阳性对照(黑条)的在20 μ g/mL抗体浓度的双特异性结合表示。深灰色条表示IgG4对照(IgG4—7D8x IgG4—2F8)与阴性对照(IgG1—2F8x IgG1—7D8—K409R)之间的双特异性结合。浅灰色条表示在所示IgG1—2F8—Y407X突变体与IgG1—7D8—K409R或对照之间同时进行的Fab臂互换反应的结果。

[0055] 图25:在非还原(图25(A))和还原(图25(B))条件下通过SDS—PAGE分析由2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性抗体。

[0056] 图26:同二聚体原料IgG1—2F8—F405L(图26(B))、同二聚体原料IgG1—7D8—K409R(图26(A))、两种同二聚体的混合物(1:1)(图26(C))和通过IgG1—2F8—F405L x IgG1—7D8—K409R之间2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性产物(图26(D))的HP—SEC曲线。

[0057] 图27:同二聚体原料IgG1—2F8—F405L(图27(B))、同二聚体原料IgG1—7D8—K409R(图27(A))、两种同二聚体的混合物(1:1)(图27(C))和通过IgG1—2F8—F405L x IgG1—

7D8-K409R之间2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性产物(图27(D))的质谱法(ESI-MS)。

[0058] 图28:同二聚体原料IgG1—2F8-F405L(图28(A))、同二聚体原料IgG1—7D8-K409R(图28(B))、两种同二聚体的混合物(1:1)(图28(C))和通过IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性产物(图28(D))的毛细管等电聚焦(cIEF)曲线图。

[0059] 图29:同二聚体原料IgG1—2F8-F405L(图29(A))、同二聚体原料IgG1—7D8-K409R(图29(B))、两种同二聚体的混合物(1:1)(图29(C))和通过IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性产物(图29(D))的HPLC-CIEF曲线图。

[0060] 图30:通过共转染编码IgG1—7D8-K409R或IgG1—2F8-F405重链和轻链的表达载体获得的IgG的电喷雾电离质谱分析。异二聚体峰用*表示。同二聚体峰用†表示。

[0061] 图31:同二聚体IgG1—2F8-F405L和IgG1—7D8-K409R的互换反应,如以不同间隔注射后通过高压液相层析阳离子交换(HPLC-CIEF)监测。

[0062] 图32:互换反应的残留同二聚体,如在图32中用CIEF方法检测显示(用箭头标识)。

[0063] 图33:如通过ELISA确定的在各种IgG浓度、2-MEA浓度、孵育温度和时间下双特异性抗体的产生。

[0064] 图34:如通过ELISA确定并与任意设定为100%的对照相比的在各种IgG浓度、2-MEA浓度、孵育温度和时间下双特异性抗体的产生。

[0065] 图35:如通过HPLC-CIEF分析的在各种IgG浓度、2-MEA浓度、孵育温度和时间下双特异性抗体的产生。

[0066] 图36:用0-20 μ g/mL浓度系列(总抗体)通过ELISA确定所示IgG1—2F8-L368X突变体与IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生(图37(A))。阳性对照是纯化批次的双特异性抗体,其从IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R衍生。图37(B)显示与阳性对照(黑色条)相比在20 μ g/mL的双特异性结合。深灰色条表示IgG4对照(IgG4-7D8x IgG4-2F8)与阴性对照(IgG1—2F8x IgG1—7D8-K409R)之间的双特异性结合。浅灰色条表示在所示IgG1—2F8-L368X突变体与IgG1—7D8-K409R同时进行的Fab臂互换反应的结果。

[0067] 图37:用0-20 μ g/mL浓度系列(总抗体)通过ELISA确定所示IgG1—2F8-K370X突变体与IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生(图37(A))。阳性对照是纯化批次的双特异性抗体,其从IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R衍生。图37(B)显示与阳性对照(黑色条)相比在20 μ g/mL的双特异性结合。深灰色条表示IgG4对照(IgG4-7D8x IgG4-2F8)与阴性对照(IgG1—2F8x IgG1—7D8-K409R)之间的双特异性结合。浅灰色条表示在所示IgG1—2F8-D370X突变体与IgG1—7D8-K409R之间同时进行的Fab臂互换反应的结果。

[0068] 图38:用0-20 μ g/mL浓度系列(总抗体)通过ELISA确定所示IgG1—2F8-D399X突变体与IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生(图38(A))。图37(B)显示与阳性对照(黑色条)相比在20 μ g/mL抗体浓度的双特异性结合。深灰色条表示IgG4对照(IgG4-7D8x IgG4-2F8)与阴性对照(IgG1—2F8x IgG1—7D8-K409R)之间的双特异性结合。浅灰色条表示在所示IgG1—2F8-D399X突变体与IgG1—7D8-K409R之间同时进行的Fab臂互换反应的结果。

[0069] 图39:如通过夹心ELISA确定的在15℃孵育0、30、60、105和200分钟后四种不同的IgG1突变体组合之间2-MEA诱导的Fab臂互换。

[0070] 图40:如通过夹心ELISA确定的将抗体在15℃孵育90分钟后不同IgG1突变体组合之间2-MEA诱导的Fab臂互换。

[0071] 图41:通过c-Met特异性抗体使c-Met磷酸化。将A549细胞与HGF或一组不同的抗体孵育15分钟。将蛋白通过SDS-page凝胶电泳分离,通过蛋白质印迹法转移至膜。通过抗磷酸化c-Met、总c-Met或 β -肌动蛋白的抗体检测磷酸化c-Met、总c-Met和 β -肌动蛋白。

[0072] 图42:用NCI-H441细胞进行的增殖测定。将NCI-H441细胞与单价双特异性IgG1069/b12孵育7天,对照抗体(IgG1-069,UniBody-069,IgG1-b12)未处理。确定细胞量并作为未处理样品(设为100%)的百分数作图。

[0073] 图43:通过IgG1-7D8-F405L或IgG1-2F8-F405L与IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体对CD20表达细胞的CDC介导的细胞杀伤。用所示抗体的浓度系列测试它们对Daudi (A) 和Raji (B) 细胞介导CDC的能力。两种细胞系都表达CD20而不表达EGFR。通过IgG1-7D8-F405L x IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性抗体与IgG1-7D8同样有效地诱导CDC介导的细胞杀伤。从IgG2-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换衍生的双特异性抗体产生单价的结合CD20的双特异性抗体,其轻微影响CDC介导的细胞杀伤的诱导。

[0074] 图44:由抗 κ -ETA' 预孵育HER2x HER2双特异性抗体诱导的A431细胞杀伤。在与用抗 κ -ETA' 预孵育的HER2抗体孵育3天后A431细胞的生存力。用Alamarblue量化细胞生存力。显示的数据是用抗 κ -ETA' 缀合的HER2抗体和HER2x HER2双特异性抗体处理A431细胞的一个实验的荧光强度(FI)。星形孢菌素用作阳性对照,而同种型对照抗体用作阴性对照。

[0075] 图45:HER2x HER2双特异性分子诱导的HER2受体下调。在与10 μ g/mL mAb孵育3天后在AU565细胞裂解物中HER2表达水平的相对百分数。用HER2特异性捕获ELISA将HER2的量量化,作为与未处理细胞相比的抑制百分数表示。显示的数据是两个实验的平均值加标准差。

[0076] 图46:HER2x HER2双特异性抗体(FITC)与溶酶体标记物LAMP1(Cy5)的共定位分析。各种单特异性HER2抗体和HER2x HER2双特异性抗体的与Cy5重叠的FITC像素强度(图46(B)),将每种被测抗体的三个不同图像的LAMP1/Cy5阳性像素中的FITC像素强度作图。单特异性抗体在LAMP1/Cy5阳性像素中比双特异性抗体显示较低的FITC像素强度。图46(B)表示根据三个不同图像计算的每个LAMP1/Cy5阳性像素的FITC像素强度平均值。这些结果一起提示在内化后与单特异性抗体相比,较高水平的双特异性抗体定位于Lamp1/Cy5阳性囊泡。

[0077] 图47:HER-2单特异性抗体和双特异性抗体对增殖的抑制。在10 μ g/mL HER2抗体或HER2x HER2双特异性抗体的存在下将AU565细胞接种在无血清细胞培养基中。3天后,用Alamarblue量化活细胞的量,将细胞生存力用与未处理细胞相比的百分数表示。同种型对照抗体用作阴性对照。显示的数据是与未处理细胞相比的活AU565细胞百分数,以5倍 \pm 标准差衡量。*表示只描述一个数据点。

[0078] 图48:单特异性和双特异性IgG1和铰链缺失的IgG1抗体在不同pH与人和小鼠FcRn的结合。将含有人和小鼠FcRn的板与不同的单特异性和双特异性IgG1抗体或铰链缺失的IgG1分子孵育。在405nm通过ELISA分析与FcRn的结合。(A)单特异性和双特异性IgG1抗体和

铰链缺失的IgG1 (Uni-G1) 分子在pH7.4和6.0与人FcRn的结合。在中性pH与人FcRn的结合非常低。在pH6.0 (双特异性) 抗体有效地结合人FcRn, 除非它们含有H435A突变。铰链缺失的IgG1 (Uni-G1) 分子以低效率与人FcRn结合。(B) 单特异性和双特异性IgG1抗体和铰链缺失的IgG1 (Uni-G1) 分子在pH7.4和6.0与小鼠FcRn的结合。在中性pH与小鼠FcRn的结合非常低。在pH6.0 (双特异性) 抗体非常有效地结合小鼠FcRn, 除非它们在两条Fab臂都含有H435A突变。只在一条Fab臂中具有H435A突变的双特异性分子仍然能够结合小鼠FcRn。铰链缺失的IgG1 (Uni-G1) 分子以中等效率结合小鼠FcRn, 只在一条Fab臂中具有H435A突变的铰链缺失的IgG1 (Uni-G1) 双特异性分子效率稍低。

[0079] 图49:Her2x CD3双特异性抗体以及Her2x CD3双特异性抗体的N297Q突变体对AU565细胞的T细胞介导的细胞毒性。

[0080] 发明详述

[0081] 定义

[0082] 术语“免疫球蛋白”指一类结构上相关的糖蛋白, 由两对多肽链即一对轻(L)的低分子量链和一对重(H)链构成, 所有四条链都通过二硫键互联。已充分表征免疫球蛋白的结构。见例如Fundamental Immunology Ch.7 (Paul, W编辑, 第2版, Raven Press, N.Y. (1989))。简言之, 每条重链通常由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区构成。重链恒定区通常包含三个域CH1、CH2和CH3构成。重链在所谓“铰链区”经由二硫键互联。每条轻链通常由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区构成。轻链恒定区通常由一个域CL构成。通常, 根据EU索引对恒定区的氨基酸残基编号, EU索引如描述于Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest (免疫学关注的蛋白序列), 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)。图16概述抗体2F8的不同同种型形式的EU和Kabat编号(W002/100348)。可将VH和VL区进一步细分为高度可变的区(或者在结构上限定的环的序列和/或形式上高变的高变区), 也称为互补决定区(CDR), 其散布在称为框架区(FR)的更保守的区中。每个VH和VL通常由以下列顺序从氨基端排列至羧基端的三个CDR和四个FR构成: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 (也见Chothia和Lesk J. Mol. Biol. 196, 901917 (1987))。

[0083] 当用于本文时, 术语“Fab臂”指一个重链-轻链对。

[0084] 当用于本文时, 术语“Fc区”指至少包含铰链区、CH2域和CH3域的抗体区。

[0085] 术语“抗体”(Ab)在本发明上下文指免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子片段或其任一种的衍生物, 它们具有在典型生理条件下与抗原特异性结合的能力, 具有显著时间段的半衰期, 比如至少约30分钟, 至少约45分钟, 至少约1小时, 至少约2小时, 至少约4小时, 至少约8小时, 至少约12小时, 约24小时或更久, 约48小时或更久, 约3、4、5、6、7或更多天等, 或者任何其它相关功能限定的时间段(比如足以诱导、促进、增强和/或调节与抗体结合抗原关联的生理反应的时间和/或抗体足以募集效应活性的时间)。免疫球蛋白分子的重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。抗体(Ab)的恒定区可介导免疫球蛋白结合至宿主组织或因子, 包括免疫系统的各种细胞(比如效应细胞)和补体系统的组分比如C1q, 补体活化经典途径的第一组分。抗体也可以是双特异性抗体、双抗体(diabody)或类似分子。术语“双特异性抗体”指对至少两种不同表位、通常是非重叠表位具有特异性的抗体。如上所示, 除非另外声明或者与上下文明确矛盾, 否则本文的术语抗体包括保留与抗原特异性结合的

能力的抗体片段。此类片段可通过任何已知的技术提供,比如酶促切割、肽合成和重组表达技术。已显示抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段例如F(ab')₂片段实施。还应理解除非另外指定,否则术语抗体还包括多克隆抗体、单克隆抗体(mAb)、抗体样多肽,比如嵌合抗体和人源化抗体。如此产生的抗体可具备任何同种型。

[0086] 术语“全长抗体”当用于本文时,指含有正常见于该同种型抗体的所有重链和轻链恒定域和可变域的抗体。

[0087] 本文所用的“同种型”指由重链恒定区基因编码的免疫球蛋白类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM)。

[0088] 本文所用的术语“人抗体”旨在包括具有从人种系免疫球蛋白序列衍生的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(如通过体外随机诱变或位点特异性诱变或者通过体内体细胞突变引入的突变)。但是,本文所用的术语“人抗体”并不旨在包括其中从另一哺乳动物物种比如小鼠种系衍生的CDR序列已移植在人框架序列上的抗体。

[0089] 当用于本文时,术语“重链抗体”指只由两条重链组成且缺乏通常见于抗体的两条轻链的抗体。重链抗体,自然存在于例如骆驼(camelid),可结合抗原,尽管只具有VH域。

[0090] 术语“表位”意指能够与抗体特异性结合的蛋白质决定簇。表位通常由表面集合的分子(例如氨基酸或糖侧链)组成,通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特性。构象和非构象表位的区别在于在变性溶剂存在时,与前者的结合而非与后者的结合丧失。表位可包含直接参与结合的氨基酸残基(亦称为表位的免疫显性组分)和不直接参与结合的其他氨基酸残基,例如被特异性抗原结合肽有效封闭的氨基酸残基(换句话说,氨基酸残基位于特异性抗原结合肽的覆盖区(footprint)内)。

[0091] 在抗体与预定抗原结合的情况下,本文所用术语“结合”通常是这样的结合,即在使用抗原作为配体,抗体作为分析物,通过例如表面等离子体共振(SPR)技术在BIAcore3000仪器中测定时,其亲和力相当于约 10^{-6} M或更小,如 10^{-7} M或更小,比如约 10^{-8} M或更小,比如约 10^{-9} M或更小,约 10^{-10} M或更小,或者约 10^{-11} M或甚至更小的 K_D ,且与所述预定抗原结合的亲和力相当于以下 K_D ,其是所述抗体与并非预定抗原或密切相关的抗原的非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)结合的亲和力的 K_D 的至多1/10、例如至多1/100、例如至多1/1,000、例如至多1/10,000、例如至多1/100,000。亲和力较低时的量取决于抗体的 K_D ,使得如果抗体的 K_D 非常低(即抗体是高特异性的),则对抗原的亲和力的量可为对非特异性抗原的亲和力的量的至多1/10,000。本文所用术语“ K_D ”(M)是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0092] 当用于本文时术语“第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用”指第一CH3/第二CH3异二聚体蛋白中第一CH3区与第二CH3区之间的相互作用。

[0093] 当用于本文时术语“第一CH3区与第二CH3区的同二聚体相互作用”指第一CH3/第一CH3同二聚体蛋白中第一CH3区与另一个第一CH3区之间的相互作用和第二CH3/第二CH3同二聚体蛋白中第二CH3区与另一个第二CH3区之间的相互作用。

[0094] 本文所用的“分离的抗体”表示材料已脱离其原来环境(例如如果它是自然存在的则是自然环境或者如果它是重组表达的则是宿主细胞)。还有利的是,抗体呈纯化形式。术语“纯化的”并不需要绝对纯度;相反,它旨在作为相对定义,表示与原料相比相对于组合物

中污染物的浓度的抗体浓度增加。

[0095] 本文所用的术语“宿主细胞”旨在指其中已引入表达载体如编码本发明抗体的表达载体的细胞。重组宿主细胞包括例如转染瘤,比如CHO细胞、HEK293细胞、NS/O细胞和淋巴细胞。

[0096] 当用于本文时,术语两种或更多种核酸构建体的“共表达”,指两种构建体在单个宿主细胞中表达。

[0097] 术语“肿瘤细胞蛋白”指位于肿瘤细胞的细胞表面上的蛋白。

[0098] 本文所用的术语“效应细胞”指参与与免疫应答的识别期和活化期相对的免疫应答效应期的免疫细胞。示例性免疫细胞包括骨髓或淋巴来源的细胞,例如淋巴细胞(比如B细胞和T细胞,包括溶细胞性T细胞(CTL))、杀伤细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、多形核细胞比如嗜中性粒细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞。一些效应细胞表达特异性Fc受体和执行特异性免疫功能。在一些实施方案中,效应细胞能够诱导抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC),比如自然杀伤细胞,能够诱导ADCC。在一些实施方案中,效应细胞可吞噬靶抗原或靶细胞。

[0099] 术语“还原条件”或“还原环境”指其中底物(这里是抗体铰链区的半胱氨酸残基)与被氧化相比更可能被还原的条件或环境。

[0100] 术语“二硫键异构化”指不同半胱氨酸之间二硫键的互换,即二硫键的改组。

[0101] 本发明的其它方面和实施方案

[0102] 如上所述,在第一方面本发明涉及用于产生异二聚体蛋白的体外方法,所述方法包含以下步骤:

[0103] a) 提供包含免疫球蛋白Fc区的第一同二聚体蛋白,所述Fc区包含第一CH3区,

[0104] b) 提供包含免疫球蛋白Fc区的第二同二聚体蛋白,所述Fc区包含第二CH3区,

[0105] 其中所述第一CH3区与第二CH3区的序列不同,并使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用,

[0106] c) 在足以允许铰链区的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述第一蛋白与所述第二蛋白一起孵育,和

[0107] d) 获得所述异二聚体蛋白。

[0108] 双特异性形式可以许多方式用于产生期望的双特异性抗体组合。除了能够以非常选择性的方式组合靶向不同抗原的抗体以外,它可用于通过组合两种靶向相同抗原的不同抗体来改变期望的性质,例如增加CDC。另外,它可用于通过用无关(无活性)抗体制备其双特异性抗体来除去拮抗抗体的部分激动活性或者将激动抗体转化为拮抗抗体。

[0109] 在一个实施方案中,同二聚体蛋白选自(i)Fc区,(ii)抗体,(iii)包含Fc区的融合蛋白,比如与受体、细胞因子或激素融合的Fc区,和(iv)与前药、肽、药物或毒素缀合的Fc区。

[0110] 在一些实施方案中,所述第一和/或第二同二聚体蛋白除了包含Fc区以外,还包含抗体的一个或更多个或所有其它区,即CH1区、VH区、CL区和/或VL区。因此,在一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白是全长抗体。在另一个实施方案中,所述第二同二聚体蛋白是全长抗体。

[0111] 在重要的实施方案中,所述第一和第二同二聚体蛋白都是抗体,优选全长抗体,并

结合不同的表位。在此类实施方案中,产生的异二聚体蛋白是双特异性抗体。所述表位可位于不同抗原或相同抗原上。

[0112] 但是,在其它实施方案中,只有一种同二聚体蛋白是全长抗体,另一种同二聚体蛋白不是全长抗体,如不含可变区的Fc区,其连同另一蛋白或肽序列如受体、细胞因子或激素一起表达,或者与前药、肽、药物或毒素缀合。在又一个实施方案中,同二聚体蛋白都不是全长抗体。例如,两种同二聚体蛋白可以是与另一蛋白或肽序列如受体、细胞因子或激素融合或者与前药、肽、药物或毒素缀合的Fc区。

[0113] 在一个实施方案中,第一同二聚体蛋白的Fc区是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型,第二同二聚体蛋白的Fc区是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型。在优选实施方案中,所述第一和所述第二同二聚体蛋白两者的Fc区都是IgG1同种型。在另一个优选实施方案中,所述同二聚体蛋白的Fc区之一是IgG1同种型,另一种是IgG4同种型。在后一个实施方案中,所得异二聚体包含IgG1的Fc区和IgG4的Fc区,因此可具有在效应子功能活化方面的引入关注的中间性质。如果所述第一和/或所述第二同二聚体蛋白包含除去用于Asn连接的糖基化的受体位点的突变或者另外操作以改变糖基化性质,则可获得类似产物。

[0114] 在又一个实施方案中,通过例如按US2009317869所述或按van Berkel等(2010) *Biotechnol. Bioeng.* 105:350所述,在抗体产生期间向培养基中加入化合物,或者例如按Yamane-Ohnuki等(2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614所述,使用FUT8敲除细胞,对同二聚体蛋白中的一种或两种进行糖改造以减少岩藻糖,因此提高ADCC。可采用Umaña等(1999) *Nature Biotech.* 17:176所述方法,备选地使ADCC最优化。

[0115] 在又一个实施方案中,例如按照Natsume等(2009) *Cancer Sci.* 100:2411所述改造同二聚体蛋白中的一种或两种以增强补体活化。

[0116] 在又一个实施方案中,已改造同二聚体蛋白中的一种或两种以减少或增加对新生儿Fc受体(FcRn)的结合以便操纵异二聚体蛋白的血清半衰期。

[0117] 在又一个实施方案中,已将同二聚体起始蛋白中的一种改造为不结合蛋白A,从而允许通过使产物穿过蛋白A柱让异二聚体蛋白与所述同二聚体起始蛋白分离。对于其中与作为原料的另一同二聚体蛋白相比使用过量的一种同二聚体蛋白的实施方案这可能特别有用。在此类实施方案中,可能有用的是,改造过量的同二聚体蛋白以便免除其结合蛋白A的能力。在异二聚体化反应后,异二聚体蛋白可通过穿过蛋白A柱与过剩的未互换同二聚体蛋白分离。

[0118] 在又一个实施方案中,一种同二聚体蛋白是Fc区或者识别无关表位的全长抗体或者含有不经历体细胞高度突变且不结合自身抗原的种系衍生序列的全长抗体。在此类实施方案中异二聚体蛋白发挥单价抗体的功能。在另一个实施方案中,两种同二聚体蛋白包含相同的重链,但只有一种同二聚体蛋白含有与所述重链形成功能性抗原结合位点的轻链,而另一种同二聚体蛋白含有非功能性轻链,其不与所述重链组合结合任何抗原。在此类实施方案中,异二聚体蛋白发挥单价抗体的功能。此类非功能性轻链可以是例如不经历体细胞高度突变且不结合自身抗原的种系衍生序列。

[0119] 待用作本发明同二聚体原料的抗体可以例如通过首先由Kohler等, *Nature* 256, 495 (1975) 描述的杂交瘤方法制备,或者可通过重组DNA方法制备。单克隆抗体也可从噬菌体抗体文库用描述于例如Clackson等, *Nature* 352, 624-628 (1991) 和Marks等,

J.Mol.Biol.222,581-597 (1991)的技术分离。单克隆抗体可从任何合适来源获得。因此,例如,单克隆抗体可从自用目标抗原(其例如呈在表面上表达该抗原的细胞或者编码目标抗原的核酸形式)免疫的小鼠获得的鼠脾脏B细胞制备的杂交瘤获得。单克隆抗体还可从自经免疫的人或非人哺乳动物比如大鼠、狗、灵长类等的抗体表达细胞衍生的杂交瘤获得。

[0120] 待用作本发明同二聚体原料的抗体可以是例如嵌合或人源化抗体。在另一个实施方案中,同二聚体起始蛋白中的一种或两种除了任何指定突变以外是人抗体。人单克隆抗体可用转基因或转染色体小鼠如HuMAb小鼠(其携带人免疫系统而不是小鼠系统的部分)产生。HuMAb小鼠含有人免疫球蛋白基因小基因座(miniloci),其编码非重排人重链(μ 和 γ)和 κ 轻链免疫球蛋白序列以及灭活内源性 μ 和 κ 链基因座的靶定突变(Lonberg,N.等,Nature368,856-859(1994))。因此,小鼠具有降低的小鼠IgM或 κ 表达,且在响应免疫时,所引入的人重链和轻链转基因进行类别转换和体细胞突变以产生高亲和力人IgG, κ 单克隆抗体(Lonberg,N.等(1994),同上;综述见Lonberg,N.Handbook of Experimental Pharmacology113,49-101(1994),Lonberg,N.和Huszar,D.,Intern.Rev.Immunol.第13卷6593(1995)和Harding,F.和Lonberg,N.Ann.N.Y. Acad.Sci764-536-546(1995))。HuMAb小鼠的制备详细描述于Taylor,L.等,Nucleic Acids Research20,62876295(1992),Chen,J.等,International Immunology5,647656(1993),Tuailon等,J.Immunol.152,2912-2920(1994),Taylor,L.等,International Immunology6,579-591(1994),Fishwild,D.等,Nature Biotechnology14,845-851(1996)。还见US5,545,806、US5,569,825、US5,625,126、US5,633,425、US5,789,650、US5,877,397、US5,661,016、US5,814,318、US5,874,299、US5,770,429、US5,545,807、W098/24884、W094/25585、W093/1227、W092/22645、W092/03918和W001/09187。这些转基因小鼠的脾细胞可用于按照熟知的技术产生分泌人单克隆抗体的杂交瘤。

[0121] 此外,本发明的人抗体或者来自其它物种的本发明抗体可使用本领域熟知的技术通过展示型技术鉴定,包括但不限于噬菌体展示、逆转录病毒展示、核糖体展示、哺乳动物展示及其它技术,所得分子可进行另外的成熟,比如亲和力成熟,因为此类技术在本领域众所周知。

[0122] 在本发明又一个实施方案中,抗体或其部分如一个或更多个CDR,是骆驼科(Camelidae)物种的(见W02010001251),或者是软骨鱼物种比如较口鲨的,或者是重链抗体或域抗体。

[0123] 在本发明方法的一个实施方案中,在步骤a)和b)提供的所述第一和第二同二聚体蛋白是纯化的。

[0124] 在一个实施方案中,第一和/或第二同二聚体蛋白与药物、前药或毒素缀合或者含有药物、前药或毒素的受体基团。此类受体基团可以是例如非天然氨基酸。

[0125] 如上所述,同二聚体起始蛋白的第一CH3区与第二CH3区的序列不同,并使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用。

[0126] 在一个实施方案中,与各种同二聚体相互作用相比异二聚体相互作用的强度增加,是因为CH3修饰,而非因为引入共价键、半胱氨酸残基或荷电残基。

[0127] 在一些实施方案中,本发明的产物高度稳定,在体外的温和还原条件下或者重要

地 在体内给予人类后在体内,不经历Fab臂互换。因此,在一个实施方案中,所得异二聚体蛋白中所述第一与第二蛋白之间的异二聚体相互作用使得在描述于实施例13的条件下在0.5mM GSH下不能发生Fab臂互换。

[0128] 在另一个实施方案中,所得异二聚体蛋白中所述第一与第二蛋白之间的异二聚体相互作用使得在描述于实施例14的条件下在小鼠体内不发生Fab臂互换。

[0129] 在另一个实施方案中,例如在按实施例30所述确定时,所得异二聚体蛋白中所述第一与第二蛋白之间的异二聚体相互作用强度为两种同二聚体相互作用中的最强相互作用强度的大于2倍,比如大于3倍,如大于5倍。

[0130] 在又一个实施方案中,所述第一CH3区与第二CH3区的序列使得所得异二聚体蛋白中所述第一与第二蛋白之间的异二聚体相互作用的解离常数低于0.05微摩尔,如按实施例30描述测定时。

[0131] 在又一个实施方案中,所述第一CH3区与第二CH3区的序列使得如按实施例21描述测定时,两种同二聚体相互作用的解离常数高于0.01微摩尔,比如高于0.05微摩尔,优选0.01—10微摩尔,比如0.05—10微摩尔,更优选0.01—5,比如0.05—5微摩尔,甚至更优选0.01—1微摩尔,比如0.05—1微摩尔,0.01—0.5或者0.01—0.1。其中同二聚体起始蛋白相对稳定的实施方案可具有更容易制备大量起始蛋白和例如避免聚集或错折叠的优点。

[0132] 在一些实施方案中,可基于两种在CH3区只含有少数相当保守的不对称突变的同二聚体起始蛋白,利用本发明的方法以高收率获得稳定的异二聚体蛋白。

[0133] 因此,在一个实施方案中,所述第一CH3区与第二CH3区的序列在不完全相同的位置含有氨基酸取代。

[0134] 氨基酸取代基可以是天然氨基酸或非天然氨基酸。非天然氨基酸的实例例如公开于Xie J和Schultz P. G.,*Current Opinion in Chemical Biology* (2005),9:548—554,和Wang Q.等,*Chemistry&Biology* (2009),16:323—336。

[0135] 在一个实施方案中,氨基酸是天然氨基酸。

[0136] 在一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白在CH3区具有不超过1个氨基酸取代,第二同二聚体蛋白在CH3区具有不超过1个氨基酸取代,与野生型CH3区相比。

[0137] 在一个实施方案中,第一同二聚体蛋白在选自下列的位置具有氨基酸取代:366、368、370、399、405、407和409,所述第二同二聚体蛋白在选自下列的位置具有氨基酸取代:366、368、370、399、405、407和409,其中所述第一同二聚体蛋白与所述第二同二聚体蛋白不在相同位置取代。

[0138] 在一个实施方案中,第一同二聚体蛋白在366位具有氨基酸取代,所述第二同二聚体蛋白在选自下列的位置具有氨基酸取代:368、370、399、405、407和409。在一个实施方案中366位氨基酸选自Arg、Lys、Asn、Gln、Tyr、Glu和Gly。

[0139] 在一个实施方案中,第一同二聚体蛋白在368位具有氨基酸取代,所述第二同二聚体蛋白在选自下列的位置具有氨基酸取代:366、370、399、405、407和409。

[0140] 在一个实施方案中,第一同二聚体蛋白在370位具有氨基酸取代,所述第二同二聚体蛋白在选自下列的位置具有氨基酸取代:366、368、399、405、407和409。

[0141] 在一个实施方案中,第一同二聚体蛋白在399位具有氨基酸取代,所述第二同二聚体蛋白在选自下列的位置具有氨基酸取代:366、368、370、405、407和409。

[0142] 在一个实施方案中,第一同二聚体蛋白在405位具有氨基酸取代,所述第二同二聚体蛋白在选自下列的位置具有氨基酸取代:366、368、370、399、407和409。

[0143] 在一个实施方案中,第一同二聚体蛋白在407位具有氨基酸取代,所述第二同二聚体蛋白在选自下列的位置具有氨基酸取代:366、368、370、399、405和409。

[0144] 在一个实施方案中,第一同二聚体蛋白在409位具有氨基酸取代,所述第二同二聚体蛋白在选自下列的位置具有氨基酸取代:366、368、370、399、405和407。

[0145] 因此,在一个实施方案中,所述第一CH3区与第二CH3区的序列含有不对称突变,即在两个CH3区的不同位置的突变,如在一个CH3区的405位的突变而另一个CH3区的409位的突变。

[0146] 在一个实施方案中,第一同二聚体蛋白在409位具有非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白在选自下列的位置具有氨基酸取代:366、368、370、399、405和407。

[0147] 在一个此类实施方案中,所述第一同二聚体蛋白在409位具有非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白在405位具有非Phe的氨基酸。在又一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白在409位具有非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白在405位具有非Phe、Arg或Gly的氨基酸。

[0148] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白在405位包含Phe和在409位包含非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白在405位包含非Phe的氨基酸和在409位包含Lys。在本文的又一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白在405位包含Phe和在409位包含非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白在405位包含非Phe、Arg或Gly的氨基酸和在409位包含Lys。

[0149] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白在405位包含Phe和在409位包含非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白包含405位的Leu和409位的Lys。在又一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白包含405位的Phe和409位的Arg,所述第二同二聚体蛋白包含405位的非Phe、Arg或Gly的氨基酸和409位的Lys。

[0150] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白包含405位的Phe和409位的Arg,所述第二同二聚体蛋白包含405位的Leu和409位的Lys。

[0151] 在又一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白包含409位的非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白包含409位的Lys、370位的Thr和405位的Leu。

[0152] 在又一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白包含409位的Arg,所述第二同二聚体蛋白包含409位的Lys、370位的Thr和405位的Leu。

[0153] 在甚至又一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白包含370位的Lys、405位的Phe和409位的Arg,所述第二同二聚体蛋白包含409位的Lys、370位的Thr和405位的Leu。

[0154] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白包含409位的非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白包含409位的Lys和:a) 350位的Ile和405位的Leu,或者b) 370位的Thr和405位的Leu。

[0155] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白包含409位的Arg,所述第二同二聚体蛋白包含409位的Lys和:a) 350位的Ile和405位的Leu,或者b) 370位的Thr和405位的Leu。

[0156] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白包含350位的Thr、370位的Lys、405位的Phe和409位的Arg,所述第二同二聚体蛋白包含409位的Lys和:a) 350位的Ile和405位

的Leu,或者b) 370位的Thr和405位的Leu。

[0157] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白包含350位的Thr、370位的Lys、405位的Phe和409位的Arg,所述第二同二聚体蛋白包含350位的Ile、370位的Thr、405位的Leu和409位的Lys。

[0158] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白在409位具有非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白在407位具有非Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr的氨基酸。

[0159] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白在409位具有非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白在407位具有Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp。

[0160] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白在409位具有非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白在407位具有Gly、Leu、Met、Asn或Trp。

[0161] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白具有407位的Tyr和409位的非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白具有407位的非Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr的氨基酸和409位的Lys。

[0162] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白具有407位的Tyr和409位的非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白具有407位的Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp和409位的Lys。

[0163] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白具有407位的Tyr和409位的非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白具有407位的Gly、Leu、Met、Ash或Trp和409位的Lys。

[0164] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白具有407位的Tyr和409位的Arg,所述第二同二聚体蛋白具有407位的非Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr的氨基酸和409位的Lys。

[0165] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白具有407位的Tyr和409位的Arg,所述第二同二聚体蛋白具有407位的Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp和409位的Lys。

[0166] 在另一个实施方案中,所述第一同二聚体蛋白具有407位的Tyr和409位的Arg,所述第二同二聚体蛋白具有407位的Gly、Leu、Met、Asn或Trp和409位的Lys。

[0167] 在一个实施方案中,第一同二聚体蛋白在409位具有非Lys、Leu或Met的氨基酸,第二同二聚体蛋白具有:

[0168] (i) 在368位非Phe、Leu和Met的氨基酸,或者

[0169] (ii) 在370位的Trp,或者

[0170] (iii) 在399位的非Asp、Cys、Pro、Glu或Gln的氨基酸。

[0171] 在一个实施方案中,第一同二聚体蛋白在409位具有Arg、Ala、His或Gly,第二同二聚体蛋白具有:

[0172] (i) 在368位的Lys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、Val或Trp,或者

[0173] (ii) 在370位的Trp,或者

[0174] (iii) 在399位的Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、Arg或

Tyr。

[0175] 在一个实施方案中,第一同二聚体蛋白在409位具有Arg,第二同二聚体蛋白具有:

[0176] (i) 在368位的Asp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、Val或Trp,或者

[0177] (ii) 在370位的Trp,或者

[0178] (iii) 在399位的Phe、His、Lys、Arg或Tyr。

[0179] 除了上文指定的氨基酸取代以外,所述第一和第二同二聚体蛋白可含有相对于野生型Fc序列的其它氨基酸取代、缺失或插入。

[0180] 在又一个实施方案中,所述第一和第二CH3区除了包含指定的突变以外,还包含在SEQ ID NO:1 (IgG1m(a)) 阐明的序列:

[0181] SEQ IDNO:1:

[0182] GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0183] 在又一个实施方案中,所述第一和第二CH3区除了包含指定的突变以外,还包含在SEQ ID NO:2 (IgG1m(f)) 阐明的序列:

[0184] SEQ IDNO:2:

[0185] GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0186] 在又一个实施方案中,所述第一和第二CH3区,除了包含指定的突变以外,还包含在SEQ ID NO:3 (IgG1m(ax)) 阐明的序列:

[0187] SEQ IDNO:3:

[0188] GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK

[0189] 在其它实施方案中,提供的同二聚体蛋白可以是显示优先配对的大鼠抗体和小鼠抗体(如描述于Lindhofer等(1995) J Immunol155:219(见上文)),或者所谓进入孔中的隆突变体抗体(如描述于美国专利5,731,168(见上文))。但是,有时,后一种同二聚体起始蛋白可能更难制备,因为同二聚体CH3-CH3相互作用太弱。因此,可优选本文所述的在350、370、405和409位具有突变的变体。

[0190] 同二聚体起始蛋白铰链区的序列可变化。但是,所得异二聚体蛋白在一些情况下可能更稳定,如果铰链区不是IgG4样的,优选为IgG1样的。

[0191] 因此,在一个实施方案中,所述第一或所述第二同二聚体蛋白在(核心)铰链区都不包含Cys-Pro-Ser-Cys序列。

[0192] 在又一个实施方案中,所述第一和所述第二同二聚体蛋白在(核心)铰链区都包含Cys-Pro-Pro-Cys序列。

[0193] 在其中第一和所述第二同二聚体蛋白是抗体的许多实施方案中,所述抗体还包含轻链。如上文所解释的,所述轻链可能不同,即序列不同且各自只与一条重链形成功能性抗原结合域。但是,在另一个实施方案中,所述第一和第二同二聚体蛋白是重链抗体,其不需要轻链用于抗原结合,见例如Hamers-Casterman(1993) Nature363:446。

[0194] 如上所述,本发明方法的步骤c) 包括在足以允许在铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述第一蛋白与所述第二蛋白一起孵育。本文给出合适条件的实

例。对用于经历二硫键异构化的铰链区中的半胱氨酸的最低要求可根据同二聚体起始蛋白,特别是根据铰链区中的确切序列而不同。重要的是,所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用足够弱以允许铰链区中的半胱氨酸在给定条件下经历二硫键异构化。

[0195] 在一个实施方案中,步骤c)的还原条件包括加入还原剂,如选自下列的还原剂:2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二流赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸和 β -巯基-乙醇,优选选自下列的还原剂:2-巯基乙胺、二硫苏糖醇和三(2-羧乙基)膦。

[0196] 在一个实施方案中,以所需氧化还原电位的方式描述使受控Fab臂互换成为可能的还原条件。三肽谷胱甘肽(GSH)是在细胞中的主要低分子量硫醇,并控制硫醇-二硫化物氧化还原状态,其为体内正常氧化还原信号转导必需。通过维持还原型GSH及其氧化形式GSSG的硫醇-至-二硫化物状态来实现细胞氧化还原平衡的动力学。可测量还原电位的数值,如参见Rost和Rapoport,Nature201:185(1964)和Aslund等,J.Biol.Chem.272:30780—30786(1997)。将每个GSSG氧化两个GSH的化学计量加以考虑的氧化还原电位 E_h 为对氧化还原状态的定量衡量。通过能斯特方程式计算 E_h : $E_h = E_o + (RT/nF) \ln ([GSSG(\text{氧化型})]/[GSH(\text{还原型})]^2)$ 。 E_o 是在限定pH下氧化还原对的标准电位, R 是气体常数, T 是绝对温度, F 是法拉第常数, n 是转移的电子数。GSH/GSSG对的 E_h 的体内估测值是-260至-200mV(Aw,T.,News Physiol.Sci.18:201—204(2003))。因此终末分化的细胞维持-200mV等级的 E_h ,而活跃增殖的细胞维持约-260mV的更为还原的 E_h 。

[0197] DTT的标准氧化还原电位是-330mV(Cleland等Biochemistry3:480-482(1964))。TCEP已显示在溶液中还原DTT,因此具有比DTT更负的氧化还原电位。但是精确数值尚未报道。因此可以所需氧化还原电位 E_h 的方式描述允许受控Fab臂互换条件的还原条件,所需氧化还原电位 E_h 最好低于在体内在正常血浆条件下获得的数值,并且高于还原位于铰链区且参与重链间二硫键形成的抗体二硫键以外的抗体二硫键的氧化还原电位。

[0198] 因此,在又一个实施方案中,步骤c)在具有低于-50mV,比如低于-150mV,优选-150至-600mV,比如-200至-500mV,更优选-250至-450mV,比如-250至-400mV,甚至更优选-260至-300mV的氧化还原电位的还原条件下进行。

[0199] 在又一个实施方案中,步骤c)包括在至少25mM2-巯基乙胺存在下或者至少0.5mM二硫苏糖醇存在下在至少20°C温度孵育至少90分钟。孵育可在5至8的pH,比如pH7.0或pH7.4进行。

[0200] 在又一个实施方案中,步骤d)包括例如通过除去还原剂如通过脱盐将条件恢复至非还原性或较小还原性。

[0201] 在一些实施方案中,本发明的方法得到抗体产物,其中超过80%,比如超过90%,如超过95%,比如超过99%抗体分子是期望的双特异性抗体。

[0202] 与基于共表达的现有技术方法相比后生产(post-production)更灵活和更容易控制。

[0203] 如本文公开的在还原条件(比如通过加入2-MEA)下通过Fab互换制备双特异性抗体的后生产性质使其成为用于(高通量)筛选多种特异性组合用于双特异性抗体发现的非常合适的策略。此外,体外方法可在文库中进行,这与共表达相比允许对异二聚体蛋白更大的控制、更高的灵活性和收率。该策略另外的优点是筛选可以最终的治疗形式进行,排除先

导选择后对改造的需要。

[0204] 如上文所解释的,在又一方面,本发明的方法可用于“矩阵”筛选,即基于两组抗体产生大量的结合特异性的不同组合,一组抗体具有完全相同的第一CH3区和另一组具有完全相同的第二CH3区,其中所述第一CH3区与第二CH3区的序列不同,并使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用。

[0205] 因此,在一个实施方案中本发明涉及选择具有期望性质的异二聚体蛋白的方法,所述方法包括下述步骤:

[0206] a) 提供第一组包含Fc区的同二聚体蛋白,其中同二聚体蛋白具有完全相同的第一CH3区,

[0207] b) 提供第二组包含Fc区的同二聚体蛋白,其中同二聚体蛋白具有完全相同的第二CH3区,

[0208] 其中所述第一CH3区与第二CH3区的序列不同,并使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用,

[0209] c) 将所述第一组同二聚体蛋白与所述第二组同二聚体蛋白的组合孵育在足以允许在铰链区的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下,由此产生一组双特异性抗体,

[0210] d) 任选恢复条件至非还原性,

[0211] e) 针对给定的期望性质测定所得异二聚体蛋白组,和

[0212] f) 选择具有期望性质的异二聚体蛋白。

[0213] 在一个实施方案中,本发明涉及选择具有期望性质的双特异性抗体的方法,所述方法包括下述步骤:

[0214] a) 提供第一组包含具有不同可变区的抗体的同二聚体抗体,其中所述第一组的所述抗体包含完全相同的第一CH3区,

[0215] b) 提供第二组包含具有不同可变区或完全相同可变区的抗体的同二聚体抗体,其中所述第二组的所述抗体包含完全相同的第二CH3区,

[0216] 其中所述第一CH3区与第二CH3区的序列不同,并使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用,

[0217] c) 将所述第一组抗体与所述第二组抗体的组合孵育在足以允许在铰链区的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下,由此产生一组双特异性抗体,

[0218] d) 任选恢复条件至非还原性,

[0219] e) 针对给定的期望性质测定所得双特异性抗体组,和

[0220] f) 选择具有期望性质的双特异性抗体。

[0221] 在一个实施方案中,第二组同二聚体抗体具有不同的可变区。

[0222] 在一个实施方案中,第二组同二聚体抗体具有完全相同的可变区,但在抗原结合区外具有不同的氨基酸或结构变异。

[0223] 可根据期望以许多不同方式组成所述两组。因此,所述两组可靶向在相同抗原上的相同表位或不同的表位。所述两组还可靶向不同抗原,每组可含有与所述抗原上相同表位或不同表位结合的抗体。而且,所述组之一或所述两组可各自含有靶向不同抗原的抗体。

[0224] 在另一个实施方案中,所述期望的性质是细胞杀伤、细胞裂解、抑制细胞增殖,或

者与表达两种抗原靶标的细胞结合。

[0225] 筛选策略包括两组含有一定范围特异性的抗体载体,其中将一组克隆入能够在还原条件(比如通过加入2-MEA)下参与第二组主链的Fab臂互换的主链内。例如,将第一组克隆入IgG1-F405L主链,将第二组克隆入IgG1-K409R主链(关于其它可能的主链组合还见实施例19、28、29、30、35、36、37、38和39)。

[0226] 然后将两组抗体载体的每个成员各自小规模表达。例如,将所有抗体载体瞬时转染在HEK293细胞中,在24孔板的2.3mL培养物中表达。或者,可使用本领域已知的其它合适的小规模制备系统。

[0227] 然后将两组抗体的表达抗体以矩阵样方式等摩尔地比成对混合。例如,将所有单独抗体通过小规模蛋白A层析纯化,通过在280nm波长的吸光度测量抗体浓度。或者可使用其它合适的(小规模)纯化方法或者本领域已知的用于确定蛋白浓度的方法。在另一个实施方案中,如果表达培养基不影响下游应用则可省略纯化步骤。随后,标准化抗体浓度以便合适的体积包含等摩尔量的两种抗体。例如,将一组8种在F405L主链中的抗体各自与8种在K409R主链中的抗体混合以便64种100 μ l混合物含有80 μ g/mL抗体A(F405L)和80 μ g/mL抗体B(K409R)。或者,如果策略包含下游双特异性抗体特异性纯化步骤,则可省略标准化抗体量的步骤。

[0228] 向抗体的混合物内,加入合适量的还原剂,并在允许的温度下孵育合适的时间段。例如,向含80 μ g/mL抗体A(F405L)和80 μ g/mL抗体B(K409R)的100 μ l内,加入25 μ l125mM2-MEA(终浓度25mM2-MEA)并在25 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0229] 于是从混合物(现在含有双特异性抗体)除去还原剂以促进二硫键的氧化和避免筛选测定时还原剂的干扰。例如,使用Zeba Spin96孔脱盐板(Pierce Biotechnology,#89807)通过进行64种混合物的缓冲液交换除去2-MEA。或者,可使用本领域已知的除去还原剂的其它合适方法。

[0230] 然后将双特异性抗体在生化上或功能上表征以鉴定先导候选物。例如,评估64种双特异性抗体对合适细胞系增殖的抑制或者对合适细胞系的结合。然后将鉴定的先导候选物以较大规模制备并更详细地表征。

[0231] 通过共表达制备

[0232] 本发明的异二聚体蛋白还可通过使编码第一和第二多肽的构建体在单一细胞中共表达获得。

[0233] 因此,又一方面,本发明涉及制备异二聚体蛋白的方法,所述方法包含以下步骤:

[0234] a) 提供编码包含免疫球蛋白第一Fc区的第一多肽的第一核酸构建体,所述第一Fc区包含第一CH3区,

[0235] b) 提供编码包含免疫球蛋白第二Fc区的第二多肽的第二核酸构建体,所述第二Fc区包含第二CH3区,

[0236] 其中所述第一CH3区与第二CH3区的序列不同,并使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用,和

[0237] 其中所述第一同二聚体蛋白在409位具有非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二同二聚体蛋白在选自下列的位置具有氨基酸取代:366、368、370、399、405和407。

[0238] 和/或

[0239] 其中所述第一和第二CH3区的序列使得当按实施例21所述测定时,每个CH3区的同二聚体相互作用的解离常数为0.01—10微摩尔,比如0.05—10微摩尔,更优选0.01—5,比如0.05—5微摩尔,甚至更优选0.01—1微摩尔,比如0.05—1微摩尔,0.01—0.5或者0.01—0.1。

[0240] c) 使所述第一和第二核酸构建体在宿主细胞中共表达,和

[0241] d) 从细胞培养物中获得所述异二聚体蛋白。

[0242] 用于制备抗体的合适表达载体(包括促进子、增强子等)和合适的宿主细胞在本领域众所周知。宿主细胞的实例包括酵母、细菌和哺乳动物细胞,比如CHO或HEK细胞。

[0243] 在该方法的一个实施方案中,所述第一CH3区在409位具有非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二CH3区在405位具有非Phe的氨基酸。

[0244] 和/或

[0245] 所述第一和第二CH3区的序列使得当按实施例21所述测定时,每个CH3区的同二聚体相互作用的解离常数为0.01—10微摩尔,比如0.05—10微摩尔,更优选0.01—5,比如0.05—5微摩尔,甚至更优选0.01—1微摩尔,比如0.05—1微摩尔,0.01—0.5或者0.01—0.1。

[0246] 在该方法的另一个实施方案中:

[0247] 所述第一CH3区在409位具有非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二CH3区具有在405位的非Phe的氨基酸,比如在405位的非Phe、Arg或Gly的氨基酸

[0248] 或者

[0249] 所述第一CH3区在409位具有非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二CH3区在407位具有非Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr的氨基酸。

[0250] 在一些实施方案中,所述第一和第二多肽是结合不同表位的两种抗体的全长重链(即所述第一和第二核酸构建体编码结合不同表位的两种抗体的全长重链),因此异二聚体蛋白是双特异性抗体。这种双特异性抗体可以是重链抗体,或者所述宿主细胞可另外表达编码轻链的一种或多种核酸构建体。如果只有一种轻链构建体与重链构建体共表达,则只有在轻链序列使得它可与每条重链形成功能性抗原结合域时,才形成功能性双特异性抗体。如果两种或更多种不同的轻链构建体与重链共表达,将形成多种产物。

[0251] 在其它实施方案中,本发明的共表达方法包括在上文体外方法下描述的任何其它特征。

[0252] 又一方面,本发明涉及包含上文指定的第一和第二核酸构建体的表达载体。在甚至又一方面,本发明涉及包含上文指定的第一和第二核酸构建体的宿主细胞。

[0253] 异二聚体蛋白

[0254] 又一方面,本发明涉及通过本发明方法获得或可获得的异二聚体蛋白。

[0255] 另外,本发明的方法能够形成不对称分子,在每条Fab臂或者每个CH3域上具有不同特征的分子或者在整个分子内具有不同修饰的分子,例如具有用于缀合的非天然氨基酸取代的分子。此类不对称分子可以任何合适的组合产生。这在下文通过一些非限制性实例进一步说明。

[0256] 双特异性抗体可用于预靶向目标靶细胞,包括但不限于肿瘤细胞。靶细胞的预靶向可用于成像研究或者免疫治疗目的。

[0257] 在本发明方法的实施方案中,双特异性分子的第一Fab臂结合肿瘤细胞,比如肿瘤细胞表面蛋白或者肿瘤细胞表面碳水化合物,比如本文列出的肿瘤细胞表面蛋白中的一种,第二Fab臂识别放射活性效应分子,包括但不限于与肽或半抗原偶联或连接(经由螯合剂)的放射性标记。此类放射性标记肽的实例是铟标记的二乙烯三胺五乙酸(抗DTPA(In) van Schaijk等*Clin.Cancer Res.*2005;11:7230s-7126s)。另一种实例是使用携带放射性核素比如铟-99的半抗原标记的胶粒比如脂质体、聚合物胶束的纳米粒(Jestin等*Q J Nucl Med Mol Imaging*2007;51:51—60)。

[0258] 在另一个实施方案中,使用半抗原偶联的备选细胞生长抑制分子比如毒素。

[0259] 在本发明方法的又一个实施方案中,将双特异性分子的第一Fab臂在N297位置(EU编号)糖基化,将双特异性分子的第二Fab臂去糖基化(aglycosylated)(非糖基化,例如通过将N297突变为Q或A或E突变(Bolt S等,*Eur J Immunol*1993,23:403-411))。在Fc区的不对称糖基化影响与Fc γ -受体的相互作用,影响抗体的抗体依赖性细胞毒性效应(Ha等,*Glycobiology*2011年4月5号)以及与其它效应子功能分子比如C1q的相互作用。

[0260] 在本发明方法的另一个实施方案中,双特异性分子的第一Fab臂与FcRn(新生儿Fc受体)相互作用(Roopenian DC等*Nat.Rev.Immunol.*2007,7:715—725),通过使分子上FcRn相互作用位点突变例如通过产生H435A突变,来损害第二Fab臂与FcRn结合(Shields,R.L等,*J Biol Chem*,2001,Firan,M.等,*Int Immunol*,2001)。

[0261] 在本发明方法的另一个实施方案中,双特异性分子的第一Fab臂与经常用于抗体纯化的葡萄球菌蛋白A(蛋白A,Deisenhofer等,*Biochemistry*20,2361—2370(1981)和链球菌蛋白G(蛋白G, Derrick等,*Nature*359,752-754(1992)相互作用,双特异性分子第二Fab臂与蛋白A或G的相互作用受损。结果是,通过用蛋白A或G纯化双特异性分子,容易清除在互换成异二聚体后残留量的具有受损的蛋白A或G结合的同二聚体。

[0262] 在另一个实施方案中,在双特异性分子两条Fab臂中的一条上改善或减少与Fc γ -受体或FcRn的结合。

[0263] 在另一个实施方案中,在双特异性分子两条Fab臂中的一条上改善或减少与C1q的结合。

[0264] 在另一个实施方案中,已将蛋白改造为在分子的两条Fab臂中的一条或两条上增强补体活化。

[0265] 在另一个实施方案中,存在于双特异性分子中的每条Fab臂从不同的IgG亚类衍生。

[0266] 在另一个实施方案中,存在于双特异性分子中的每条Fab臂携带不同的异型突变(Jefferis&Lefranc,2009,MABs1:332—8)。

[0267] 在另一个实施方案中,另一类不对称免疫治疗分子通过用免疫活性细胞因子、免疫刺激性细胞因子或免疫抑制性细胞因子置换双特异性分子的一条Fab臂的Fab产生。此类细胞因子的非限制性实例是IL-2、IFN— α 、IFN— β 、IFN— γ 、TNF— α 、G-CSF、GM-CSF、IL-10、IL-4、IL-6、IL-13。或者,在分子中包括(生长)因子或激素刺激剂或抑制剂。

[0268] 在另一个实施方案中,一条Fab臂的Fab被裂解肽置换,裂解肽即能够裂解肿瘤细胞、细菌、真菌等的肽,包括但不限于抗微生物肽如爪蟾抗菌肽、蜂毒肽(mellitin)、天蚕杀菌肽、KLAKKLAK及其变体(Schweizer等*Eur.J.Pharmacology*2009;625:190—194,

Javadpour, J. Med. Chem., 1996, 39: 3107-3113, Marks等, Cancer Res 2005; 65: 2373-2377, Rege等, Cancer Res. 2007; 67: 6368-6375) 或阳离子裂解肽 (CLYP技术, US2009/0269341)。

[0269] 在另一个实施方案中, Fab臂上的Fab中之一或两者被细胞因子和/或生长因子的受体置换, 产生所谓诱饵受体, 其中靶向TNF- α 的Enbrel® (依那西普) 和靶向VEGF的VEGF-trap是众所周知的实例。将这两种诱饵受体合并入一个分子内显示优于单一诱饵受体的优秀活性 (Jung, J. Biol. Chem. 2011; 286: 14410-14418)。

[0270] 在另一个实施方案中, 另一类不对称免疫治疗分子通过将免疫活性细胞因子、免疫刺激性细胞因子或免疫抑制性细胞因子与存在于双特异性分子中的Fab臂中的一条或两条的N-端或C-端融合而产生。这可对双特异性分子的抗肿瘤活性产生积极影响。此类分子的实例是 (但不限于下文列表) IL-2 (Fournier等, 2011, Int. J. Oncology, doi: 10.3892/ijo.2011.976)、IFN- α 、IFN- β 或IFN- γ (Huan等, 2007; J. Immunol. 179: 6881-6888, Rossie等, 2009; Blood 114: 3864-3871)、TNF- α 。或者, 细胞因子比如G-CSF、GM-CSF、IL-10、IL-4、IL-6或IL-13的N-端或C-端融合可积极地影响双特异性抗体分子效应子功能。或者将(生长)因子或激素刺激剂或抑制剂包括在分子的N-端或C-端。

[0271] 在另一个实施方案中, 裂解肽比如抗微生物肽如爪蟾抗菌肽、蜂毒肽、天蚕杀菌肽、KLAKKLAK及其变体 (Schweizer等Eur. J. Pharmacology 2009; 625: 190-194, Javadpour, J. Med. Chem., 1996, 39: 3107-3113, Marks等, Cancer Res 2005; 65: 2373-2377, Rege等, Cancer Res. 2007; 67: 6368-6375) 或阳离子裂解肽 (CLYP技术, US2009/0269341) 在一条或两条Fab臂上的N-端或C-端融合可增强分子的活性。

[0272] 在另一个实施方案中, 另一类别的不对称免疫治疗分子是单价抗体, 该分子以一条Fab臂与选择的靶标相互作用。在此类分子中, 存在于双特异性分子中的一条Fab臂针对选择的靶分子, 分子的第二条Fab臂不携带Fab或者具有非结合/非功能性Fab比如对MetMab所述的 (Genentech; W096/38557)。或者, 可产生单体的Fc-融合蛋白比如对因子VIII和IX所述的那些 (Peters等, Blood 2010; 115: 2057-2064)。

[0273] 或者, 可通过本发明方法产生任何上述不对称分子的组合。

[0274] 在甚至又一方面, 本发明涉及异二聚体蛋白, 其包含含有免疫球蛋白第一Fc区的第一多肽, 所述第一Fc区包含第一CH3区; 和含有免疫球蛋白第二Fc区的第二多肽, 所述第二Fc区包含第二CH3区, 其中所述第一CH3区与第二CH3区的序列不同, 并使得所述第一CH3区与第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一CH3区与第二CH3区各自的同二聚体相互作用,

[0275] 其中所述第一同二聚体蛋白在409位具有非Lys、Leu或Met的氨基酸, 所述第二同二聚体蛋白在选自下列的位置具有氨基酸取代: 366、368、370、399、405和407

[0276] 和/或

[0277] 其中所述第一和第二CH3区的序列使得当按实施例21所述测定时, 各个CH3区的同二聚体相互作用的解离常数为0.01-10微摩尔, 比如0.05-10微摩尔, 更优选0.01-5, 比如0.05-5微摩尔, 甚至更优选0.01-1微摩尔, 比如0.05-1微摩尔, 0.01-0.5或者0.01-0.1。

[0278] 在一个实施方案中, 所述第一CH3区具有在409位的非Lys、Leu或Met的氨基酸并且所述第二CH3区具有在405位的非Phe的氨基酸

[0279] 和/或

[0280] 所述第一和第二CH3区的序列使得当按实施例21所述测定时,各个CH3区的同二聚体相互作用的解离常数为0.01—10微摩尔,比如0.05—10微摩尔,更优选0.01—5,比如0.05—5微摩尔,甚至更优选0.01—1微摩尔,比如0.05—1微摩尔,0.01—0.5或者0.01—0.1。

[0281] 在异二聚体蛋白的又一个实施方案中

[0282] 所述第一CH3区具有在409位的非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二CH3区具有在405位的非Phe的氨基酸,比如在405位的非Phe、Arg或Gly的氨基酸

[0283] 或者

[0284] 所述第一CH3区具有在409位的非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二CH3区具有在407位的非Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr的氨基酸。

[0285] 在其它实施方案中,本发明的异二聚体蛋白包含上文关于制备方法描述的任何其它特征。

[0286] 因此,在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述第一多肽是抗体(优选人抗体)的全长重链。

[0287] 在本发明异二聚体蛋白的另一个实施方案中,所述第二多肽是抗体(优选人抗体)的全长重链。

[0288] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述第一和第二多肽都是两种抗体(优选结合不同表位的两种人抗体)的全长重链,因此所得异二聚体蛋白是双特异性抗体。这种双特异性抗体可以是重链抗体,或者是除了重链以外还包含两条全长轻链(其可相同或不同)的抗体。

[0289] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,第一多肽的Fc区是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型的(除了指定突变以外),第二多肽的Fc区是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型的(除了指定突变以外)。

[0290] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述第一多肽和所述第二多肽两者的Fc区都是IgG1同种型的。

[0291] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述多肽的一个Fc区是IgG1同种型的,另一个是IgG4同种型的。

[0292] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,异二聚体相互作用与各个同二聚体相互作用相比的强度增加归因于CH3修饰,而非归因于共价键、半胱氨酸残基或荷电残基的引入。

[0293] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,异二聚体蛋白中所述第一与第二多肽之间的异二聚体相互作用使得在描述于实施例13的条件下在0.5mM GSH时不会发生Fab臂互换。

[0294] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所得异二聚体蛋白中所述第一与第二多肽之间的异二聚体相互作用使得在描述于实施例14的条件下在小鼠体内不会发生Fab臂互换。

[0295] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述第一CH3区包含在405位的Phe和在409位的非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二CH3区包含在405位的非Phe的氨基酸和在

409位的Lys。

[0296] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述第一CH3区包含在405位的Phe和在409位的非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二CH3区包含在405位的Leu和在409位的Lys。

[0297] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述第一CH3区包含在405位的Phe和在409位的Arg,所述第二CH3区包含在405位的Leu和在409位的Lys。

[0298] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述第一CH3区包含在409位的非Lys、Leu或Met的氨基酸,所述第二CH3区包含在409位的Lys和:a)在350位的Ile和在405位的Leu,或者b)在370位的Thr和在405位的Leu。

[0299] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述第一CH3区包含在409位的Arg,所述第二CH3区包含在409位的Lys和:a)在350位的Ile和在405位的Leu,或者b)在370位的Thr和在405位的Leu。

[0300] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述第一CH3区包含在350位的Thr、在370位的Lys、在405位的Phe和在409位的Arg,所述第二CH3区包含在409位的Lys和:a)在350位的Ile和在405位的Leu,或者b)在370位的Thr和在405位的Leu。

[0301] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述第一CH3区包含在350位的Thr、在370位的Lys、在405位的Phe和在409位的Arg,所述第二CH3区包含在350位的Ile、在370位的Thr、在405位的Leu和在409位的Lys。

[0302] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述第一多肽或所述第二多肽在铰链区都不含Cys-Pro-Ser-Cys序列。

[0303] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述第一多肽和所述第二多肽两者在铰链区都包含Cys-Pro-Pro-Cys序列。

[0304] 在本发明异二聚体蛋白的又一个实施方案中,所述第一多肽和/或所述第二多肽包含除去用于Asn-连接的糖基化的受体位点的突变。

[0305] 靶抗原

[0306] 如上文所解释的,在本发明的重要实施方案中,异二聚体蛋白是包含两个具有不同结合特异性(即结合不同表位)的可变区的双特异性抗体。

[0307] 原则上,任何特异性组合都是可能的。如上文提到,双特异性抗体有可能用于克服单特异性抗体的一些局限性。单特异性抗体一种可能的局限性是缺乏对期望的靶细胞的特异性,这是因为靶抗原表达在对其不期望抗体结合的其它细胞类型上。例如,在肿瘤细胞上过度表达的靶抗原也可表达在健康组织,这可导致在用针对该抗原的抗体治疗后产生不期望的副作用。对只表达在靶细胞类型上的蛋白具有进一步特异性的双特异性抗体有可能改善与肿瘤细胞的特异性结合。

[0308] 因此,在本发明一个实施方案中,所述第一和第二表位位于同一细胞如肿瘤细胞上。肿瘤细胞上的合适靶标包括但不限于下列靶标:erbB1 (EGFR)、erbB2 (HER2)、erbB3、erbB4、MUC-1、CD19、CD20、CD4、CD38、CD138、CXCR5、c-Met、HERV-包膜蛋白、骨膜蛋白(periostin)、Bigh3、SPARC、BCR、CD79、CD37、EGFrvIII、L1-CAM、AXL、组织因子(TF)、CD74、EpCAM和MRP3。肿瘤细胞靶标的可能组合包括但不限于:erbB1+erbB2、erbB2+erbB3、erbB1+erbB3、CD19+CD20、CD38+CD34、CD4+CXCR5、CD38+RANKL、CD38+CXCR4、CD20+CXCR4、CD20+

CCR7、CD20+CXCR5、CD20+RANKL、erbB2+AXL、erbB1+cMet、erbB2+c-Met、erbB2+EpCAM、c-Met+AXL、c-Met+TF、CD38+CD20、CD38+CD138。

[0309] 在又一个实施方案中,所述第一和第二表位可位于同一靶抗原上,其中两个表位在靶抗原上的位置使得抗体与一个表位的结合不干扰抗体与另一表位的结合。在本文又一个实施方案中,所述第一和第二同二聚体蛋白是结合位于同一靶抗原上两个不同表位,但具有不同的靶细胞如肿瘤细胞杀伤作用模式的抗体。例如,在一个实施方案中,靶抗原是erbB2 (HER2),双特异性抗体组合培妥珠单抗和曲妥珠单抗抗原结合位点。在另一个实施方案中,靶抗原是erbB1 (EGFr),双特异性抗体组合扎芦木单抗和尼妥珠单抗抗原结合位点。

[0310] 双特异性抗体还可作为介质用于将效应机制再靶向疾病相关组织如肿瘤。因此,在又一个实施方案中,所述第一表位或所述第二表位位于肿瘤细胞比如肿瘤细胞蛋白或肿瘤细胞碳水化合物上,另一表位位于效应细胞上。

[0311] 在一个实施方案中,效应细胞是T细胞。

[0312] 效应细胞上的可能靶标包括下列靶标:Fc γ RI (CD64):表达在单核细胞和巨噬细胞和活化的嗜中性粒细胞上;Fc γ RIII (CD16):表达在自然杀伤细胞和巨噬细胞上;CD3:表达在循环T细胞上;CD89:表达在PMN(多形核嗜中性粒细胞)、嗜酸性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞;CD32a:表达在巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞上;表达在嗜碱性粒细胞和肥大细胞上的Fc ϵ RI。在一个实施方案中表位位于表达在T细胞上的CD3上。

[0313] 在另一个实施方案中,第一抗体对病原微生物具有结合特异性,第二抗体对效应细胞蛋白(比如CD3、CD4、CD8、CD40、CD25、CD28、CD16、CD89、CD32、CD64、Fc ϵ RI或CD1)具有结合特异性。

[0314] 另外,双特异性抗体可用于使化疗剂更特异性地靶向该化疗剂应对其发挥作用的细胞。因此,在一个实施方案中,同二聚体蛋白中的一种是识别小分子或肽的抗体,或者能够例如根据描述于Rader等,(2003)PNAS100:5396的原理与此类分子形成共价键。在本发明方法的又一个实施方案中,第一抗体对肿瘤细胞或肿瘤细胞表面蛋白(比如erbB1、erbB2、erbB3、erbB4、EGFR3vIII、CEA、MUC-1、CD19、CD20、CD4、CD38、EPCAM、c-Met、AXL、L1-CAM、组织因子、CD74或者CXCR5)具有结合特异性(即结合所述肿瘤细胞或肿瘤细胞表面蛋白上的表位),第二抗体对化疗剂比如毒素(包括放射性标记肽)、药物或前药具有结合特异性。

[0315] 双特异性抗体还可用于靶向囊泡,如电子致密囊泡,或者含有针对肿瘤的毒素、药物或前药的微细胞。参见例如MacDiarmid等(2009)Nature Biotech27:643。微细胞是非染色体细胞,其是不含有染色体DNA的异常细胞分裂产物。因此,在另一个实施方案中,其中所述第一或所述第二表位位于肿瘤细胞,比如肿瘤细胞蛋白或肿瘤细胞碳水化合物上,另一表位位于电子致密囊泡或微细胞上。

[0316] 另外,通过对血清蛋白的结合特异性包括在双特异性抗体中可改变抗体的血清半衰期。例如,通过对血清白蛋白的结合特异性包括在双特异性抗体中可延长血清半衰期。因此,在本发明方法又一个实施方案中,第一抗体对肿瘤细胞或肿瘤细胞蛋白比如erbB1 (EGFR)、erbB2 (HER2)、erbB3、erbB4、MUC-1、CD19、CD20、CD4、CD38、CD138、CXCR5、c-Met、HERV-包膜蛋白、骨膜蛋白、Bigh3、SPARC、BCR、CD79、CD37、EGFrvIII、L1-CAM、AXL、组织因子(TF)、CD74、EpCAM或MRP3、CEA具有结合特异性,第二抗体对血液蛋白比如血清白蛋白具有结合特异性。第二结合特异性还可用于使抗体靶向特定组织,比如中枢神经系统或脑

(跨越血脑屏障)。因此,在本发明方法又一个实施方案中,第一抗体对脑特异性靶标具有结合特异性,脑特异性靶标比如淀粉样蛋白- β (如用于治疗阿尔茨海默病)、Her-2(如用于治疗乳腺癌脑转移)、EGFR(如用于治疗原发性脑癌)、Nogo A(如用于治疗脑损伤)、TRAIL(如用于治疗HIV)、 α -突触核蛋白(如用于治疗帕金森病)、Htt(如用于治疗亨廷顿病)、朊病毒(如用于治疗疯牛病)、西尼罗病毒蛋白;第二抗体对血脑屏障蛋白具有结合特异性,血脑屏障蛋白比如转铁蛋白受体(TfR)、胰岛素受体、黑素转铁蛋白受体(MTfR)、乳铁蛋白受体(LfR)、载脂蛋白E受体2(ApoER2)、LDL受体相关蛋白1和2(LRP1和LRP2)、高级糖基化终产物的受体(RAGE)、白喉毒素受体=肝素结合表皮生长因子样生长因子(DTR=HB-EGF)、gp190(Abbott等,Neurobiology of Disease 37(2010) 13—25)。

[0317] 对血脑屏障蛋白的结合特异性还可用于使另一种非抗体分子靶向特定组织,比如中枢神经系统或脑(跨越血脑屏障)。因此,在又一个实施方案中,一种同二聚体蛋白是对血脑屏障蛋白(比如TfR、胰岛素受体、MTfR、LfR、ApoER2、LRP1、LRP2、RAGE、DTR(=HB-EGF)或gp190)具有结合特异性的全长抗体,另一种同二聚体蛋白是在N-或C-端连接另一种蛋白的Fc区,所述蛋白比如细胞因子、可溶性受体或者其它蛋白,如VIP(血管活性肠肽)、BDNF(脑衍生的神经营养因子)、FGF(成纤维细胞生长因子)、多种FGF、EGF(表皮生长因子)、PNA(肽核酸)、NGF(神经生长因子)、神经营养蛋白(NT)-3、NT-4/5、胶质细胞衍生的神经营养因子、睫状神经营养因子、神养蛋白、神经调节蛋白、白介素、转化生长因子(TGF)- α 、TGF- β 、促红细胞生成素、肝细胞生长因子、血小板衍生的生长因子、artemin、persephin、导蛋白、心肌营养蛋白-1、干细胞因子、中期因子、多效营养因子、骨形态发生蛋白、脑信号蛋白、脑信号蛋白、白细胞抑制因子、 α -L-艾杜糖苷酸酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、N-乙酰基-半乳糖胺-6-硫酸酯酶、芳香基硫酸酯酶B、酸性 α -葡萄糖苷酶或者鞘磷脂酶(Pardridge, Biopharmaceutical drug targeting to the brain(靶向脑的生物药物), Journal of Drug Targeting 2010, 1—11; Pardridge, Re-engineering Biopharmaceuticals for delivery to brain with molecular Trojan horses(用于利用分子特洛伊木马递送至脑的再改造生物药物). Bioconjugate Chemistry 2008, 19:1327—1338。

[0318] 此外,第二结合特异性可用于使凝血因子靶向特别期望的作用位点。例如,具有对肿瘤细胞的第一结合特异性和对凝血因子的第二结合特异性的双特异性抗体可把血液凝固指向肿瘤,由此停止肿瘤生长。因此,在本发明方法又一个实施方案中,第一抗体对肿瘤细胞或肿瘤细胞蛋白比如erbB1、erbB2、erbB3、erbB4、MUC-1、CD19、CD20、CD4或CXCR5具有结合特异性,第二抗体对参与凝血的蛋白比如组织因子具有结合特异性。

[0319] 其它特别引入关注的结合特异性组合包括:CD3+HER2、CD3+CD20、IL-12+IL18、IL-1a+IL-1b、VEGF+EGFR、EpCAM+CD3、GD2+CD3、GD3+CD3、HER2+CD64、EGFR+CD64、CD30+CD16、NG2+CD28、HER2+HER3、CD20+CD28、HER2+CD16、Bc12+CD3、CD19+CD3、CEA+CD3、EGFR+CD3、IgE+CD3、EphA2+CD3、CD33+CD3、MCSP+CD3、PSMA+CD3、TF+CD3、CD19+CD16、CD19+CD16a、CD30+CD16a、CFA+HSG、CD20+HSG、MUC1+HSG、CD20+CD22、HLA-DR+CD79、PDGFR+VEGF、IL17a+IL23、CD32b+CD25、CD20+CD38、HER2+AXL、CD89+HLA类别II、CD38+CD138、TF+cMet、Her2+EpCAM、HER2+HER2、EGFR+EGFR、EGFR+c-Met、c-Met+非结合臂以及G-蛋白偶联受体的组合。

[0320] 在又一个实施方案中,本发明的双特异性抗体可基本按照Taylor等J. Immunol. 158:842-850(1997)和Taylor和Ferguson, J. Hematother. 4:357-362, 1995所

述,通过靶向红细胞而用于清除病原体、病原性自身抗体或者有害化合物比如来自循环的毒液和毒素。所述第一表位位于红细胞(红血球)蛋白(包括但不限于红细胞补体受体1)上,所述第二表位位于待靶定清除的化合物或生物体上。

[0321] 在又一个实施方案中,第二Fab臂包含代表自身抗原或者连接自身抗原的缀合位点比如dsDNA的融合蛋白。因此通过本发明的双特异性抗体靶向病原体、自身抗体或有害化合物以及接着的红细胞介导的清除,可在各种疾病和综合征的治疗中具有治疗效用。

[0322] 缀合

[0323] 在本发明的其它实施方案中,第一和/或第二同二聚体蛋白连接至选自下列的化合物:毒素(包括放射性同位素)、前药或药物。此类化合物可例如在癌症疗法中更有效地杀伤靶细胞。因此所得异二聚体蛋白是免疫缀合物。或者化合物可与所得异二聚体蛋白偶联,即在已发生Fab臂互换之后。

[0324] 用于形成本发明免疫缀合物的合适化合物包括泰素、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、tenoposide、长春新碱、长春碱、秋水仙素、多柔比星、柔红霉素、二羟蒽醌二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素、抗代谢药(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨(fludarabine)、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪(decarbazine)、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨、克拉屈滨)、烷化剂(例如氮芥、噻替派(thioepa)、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴肼、丝裂霉素C、顺铂和其它铂衍生物,例如卡铂)、抗生素(例如放线菌素D(旧称放线菌素)、博来霉素、柔红霉素(旧称道诺霉素)、多柔比星、伊达比星、光神霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素、安曲霉素(AMC))、白喉毒素和相关分子(例如白喉A链和其活性片段和杂交分子)、蓖麻毒蛋白毒素(例如蓖麻毒蛋白A或去糖基化蓖麻毒蛋白A链毒素)、霍乱毒素、志贺样毒素(SLT-I、SLT-II、SLT-IIIV)、LT毒素、C3毒素、志贺毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆Bowman-Birk蛋白酶抑制剂、假单胞菌属(Pseudomonas)外毒素、alorin、肥皂草蛋白、塑莲根毒蛋白II、gellanin、相思豆毒蛋白A链、塑莲根毒蛋白II A链、 α -帚曲霉素、油桐(Aleurites fordii)蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆(Phytolacca americana)蛋白(PAPI、PAPII和PAP—S)、苦瓜(momordica charantia)抑制剂、麻风树毒蛋白、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、酚霉素和伊诺霉素毒素。其它合适的缀合分子包括核糖核酸酶(RNase)、脱氧核糖核酸酶I、葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白喉毒素、假单胞菌内毒素、美登木素生物碱、Auristatins(MMAE、MMAF)、刺孢霉素和Duocarmycin类似物(Ducry和Stump, Bioconjugate Chem. 2010, 21:5—13)、Dolostatin-10、Dolostatin-15、伊立替康或其活性代谢物SN38、吡咯并苯并二氮杂草(PBD's)。

[0325] 在本发明又一个实施方案中,第一和/或第二同二聚体蛋白连接至 α 发射体,包括但不限于钷-227、镭-223、铋-212和铯-225。

[0326] 在本发明又一个实施方案中,第一和/或第二同二聚体蛋白连接至 β 发射放射性核素,包括但不限于碘-313、钷-90、氟-18、镱-186、镓-68、铟-99、铟-111和镅-177。

[0327] 在另一个实施方案中,待缀合化合物包括核酸或核酸相关分子。在本发明一个这样的方面,缀合的核酸是细胞毒性核糖核酸酶、反义核酸、抑制性RNA分子(如siRNA分子)或

免疫刺激性核酸(如免疫刺激性含CpG基序的DNA分子)。

[0328] 可采用本领域已知用于缀合的任何方法,包括描述于Hunter等,Nature 144,945 (1962),David等,Biochemistry 13,1014 (1974),Pain等,J. Immunol. Meth. 40,219 (1981) 和 Nygren,J. Histochem. and Cytochem. 30,407 (1982) 的方法。可通过使其它部分与蛋白的N-端侧或C-端侧在化学上缀合制备缀合物(参见例如Antibody Engineering Handbook, Osamu Kanemitsu编辑,Chijin Shokan出版(1994))。在适当的情况下,还可通过在内部残基或糖处缀合产生此类缀合的抗体衍生物。作用剂可直接或间接与本发明的蛋白偶联。第二作用剂间接偶联的一个实例是通过间隔基部分偶联。用于药物缀合物的连接技术最近已概括于Ducry和Stump (2010) Bioconjugate Chem. 21:5。

[0329] 组合物和用途

[0330] 在又一个主要方面,本发明涉及包含如本文所述的本发明异二聚体蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0331] 可按照常规技术配制药物组合物,所述常规技术例如公开于下述文献中的常规技术:Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第19版,Gennaro主编,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1995。本发明的药物组合物可包含例如稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、洗涤剂(例如非离子型洗涤剂,例如吐温-20 (Tween-20) 或吐温-80)、稳定剂(例如不含糖或蛋白质的氨基酸)、防腐剂、组织固定剂、增溶剂和/或适于纳入药物组合物中的其它物质。

[0332] 药学上可接受的载体包括与本发明的化合物在生理上相容的任何和所有合适的溶剂、分散介质、包衣材料、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂、抗氧化剂和吸收延缓剂等。可用于本发明药物组合物的合适的水性和非水性载体的实例包括水、盐水、磷酸缓冲盐溶液、乙醇、葡萄糖、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇)。药学上可接受的载体包括无菌水性溶液剂或分散剂和用于临时配制无菌注射用溶液剂或分散剂的无菌粉剂。可通过例如使用包衣材料(例如卵磷脂)、在分散剂的情况下通过保持所需粒径和通过使用表面活性剂,来保持适当的流动性。

[0333] 本发明的药物组合物还可包含药学上可接受的抗氧化剂,例如(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚、丁基化羟基甲苯、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0334] 本发明的药物组合物还可在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇,例如甘露醇、山梨糖醇、甘油或氯化钠。

[0335] 本发明的药物组合物还可含有适于所选给药途径的可提高药物组合物的保存期限或有效性的一种或多种辅助剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、防腐剂或缓冲剂。可将本发明的化合物与可防止化合物快速释放的载体一起制备,例如控释制剂,包括植入物、透皮贴剂和微囊化递送系统。这类载体可包括明胶、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、生物可降解的生物相容性聚合物例如乙烯乙酸乙酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和单独的或与蜡一起的聚乳酸,或者本领域众所周知的其它物质。用于制备这类制剂的方法一般为本领域技术人员所知。

[0336] 可根据需要通过将所需量的活性化合物与例如上文列举的一种成分或成分的组

合一起掺入适当溶剂中,接着除菌微量过滤,来制备无菌注射用溶液剂。

[0337] 药物组合中活性成分的实际剂量水平可以变化,以便获得对于特定患者、组合物和给药方式有效实现所需治疗反应而又对患者无毒的活性成分的量。所选的剂量水平将取决于多个药代动力学因素,包括所用的本发明具体组合物的活性、给药途径、给药时间、所用具体化合物的排泄率、治疗持续时间、与所用具体组合物联用的其它药物、化合物和/或物质、待治疗患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康状况和既往病史等医学领域众所周知的因素。

[0338] 可通过任何合适的途径和方式给予药物组合物。在一个实施方案中,胃肠外给予本发明的药物组合物。本文所用“胃肠外给予”意指非肠内和局部给药的给予方式,通常通过注射给予,包括表皮、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、真皮内、腹膜内、腱内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、颅内、胸内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0339] 在一个实施方案中,通过静脉内或皮下注射或输注而给予药物组合物。

[0340] 在一个主要方面,本发明涉及用作药物的本发明异二聚体蛋白比如本发明的双特异性抗体。本发明的异二聚体蛋白可用于多种目的。具体来讲,如上文解释的,本发明的异二聚体蛋白可用于治疗各种形式的癌症,包括转移癌和难治性癌。

[0341] 因此,一方面,本发明涉及抑制肿瘤细胞的生长和/或增殖和/或杀伤肿瘤细胞的方法,其包括将如本文描述的本发明异二聚体蛋白给予有需要的个体。

[0342] 在另一个实施方案中本发明的异二聚体蛋白用于治疗免疫疾病和自身免疫疾病、炎性疾病、感染性疾病、心血管疾病、CNS和肌肉骨骼疾病。

[0343] 调整上述治疗方法和用途中的剂量方案以提供最佳的所需反应(例如治疗反应)。例如,可给予单次推注,可随时间给予若干分剂量,或可按治疗情况危急程度所示,按比例减少或增加剂量。

[0344] 异二聚体蛋白的有效剂量和剂量方案取决于待治疗的疾病或病况,可由本领域技术人员决定。本发明双特异性抗体的治疗有效量的示例性、非限制性范围为约0.1—100mg/kg,比如约0.1—50mg/kg,例如约0.1—20mg/kg,比如约0.1—10mg/kg,例如约0.5,约比如0.3,约1、约3、约5或者约8mg/kg。

[0345] 具有本领域普通技能的医生或兽医可容易决定和处方开给有效量的所需药物组合物。例如,医生或兽医可以低于达到所需治疗效果所需的水平开始给予用于药物组合物中的异二聚体蛋白的剂量,逐渐增加剂量直到达到所需效果。一般而言,本发明组合物的合适日用量是有效产生治疗效果的最低剂量的化合物的量。给药可以是例如胃肠外,例如静脉内、肌内或皮下。

[0346] 本发明的异二聚体蛋白还可预防性给药以减小发生疾病比如癌症的危险,在疾病进展中延迟事件出现的开始时间,和/或当疾病比如癌症缓解时减小复发的危险。

[0347] 本发明的异二聚体蛋白比如双特异性抗体还可在组合疗法中给药,即与其它与待治疗疾病或病况有关的治疗剂组合。因此,在一个实施方案中,含异二聚体蛋白的药物与一种或更多种其它治疗剂比如细胞毒性剂、化疗剂或抗血管生成剂组合。此类组合给药可以同时、单独或序贯给予。在又一个实施方案中,本发明提供治疗或预防疾病比如癌症的方法,该方法包括给予有需要的受试者治疗有效量的与放疗和/或手术组合的异二聚体蛋白,

比如本发明的双特异性抗体。

[0348] 本发明的异二聚体蛋白比如双特异性抗体还可用于诊断目的。

实施例

[0349] 实施例1:用于表达人IgG1-2F8和IgG1-7D8的表达载体

[0350] 将HuMab2F8 (W002/100348) 和HuMab7D8 (W004/035607) 的VH和VL编码区克隆在表达载体pConG1f (含有人IgG1f异型恒定区的基因组序列 (Lonza Biologics)) 中用于制备人IgG1重链, 和克隆在pConKappa (含有人κ轻链恒定区, Lonza Biologics) 中用于制备κ轻链。对于IgG4抗体, 将VH区插入pTomG4载体 (含有在pEE12.4载体 (Lonza Biologics) 中的人IgG4恒定区的基因组序列) 中。或者, 在随后的构建体中, 使用含有在pEE12.4载体中的重链 (IgG1或IgG4) 的完全密码子优化编码区或者在pEE6.4载体 (Lonza Biologics) 中的HuMab2F8或HuMab7D8的人κ轻链的载体。

[0351] 实施例2:用于表达铰链缺失的IgG1-2F8和含有特定突变的人IgG1和IgG4CH2-CH3片段的表达载体

[0352] 为了在抗体重链的铰链和CH3区引入突变, 根据制造商的推荐使用Quickchange定向诱变试剂盒 (Stratagene, La Jolla, CA)。或者完全合成构建体或将VH区克隆在已含有编码取代的特定氨基酸的载体中。

[0353] 通过PCR或者合成构建完全密码子优化的编码CH2和CH3片段的构建体。这些构建体具有N-端信号肽和6个氨基酸的His标签, 含有人IgG1/4恒定区的341—447位氨基酸。将构建体克隆在pEE12.4中。

[0354] 为了构建铰链缺失的IgG1 (Uni-G1) 分子, 制备编码具有EGFR特异性的人IgG1同种型的Uni-G1形式的合成DNA构建体。在该构建体中天然铰链区 (如由铰链外显子所限定的) 缺失。在IgG1构建体中在158位制造额外的Ser至Cys突变以补救该亚型中HC链与LC链之间的Cys键。蛋白序列显示如下。将构建体插入到pEE6.4载体中, 称为pHG1—2F8。

[0355] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSLSAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGGSYKYYGDSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KRVAPPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0356] 实施例3:用于表达恒河猴IgG4-2F8和IgG4-7D8的表达载体

[0357] 合成含有中国恒河猴IgG4重链和κ轻链的编码区和Humab2F8和7D8的VH和VL区的载体, 将其完全密码子优化并插在pEE12.4 (重链) 和pEE6.4 (轻链) 中。所用重链恒定区序列 (基于由Scinicariello等, Immunology111:66—74, 2004描述的序列) 如下 (与人序列比对):

[0358]	人IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
[0359]	恒河猴 (Ch) 1gG4	STKGPSVFPLASCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
[0360]	人IgG4	TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNHNKPSNTKVDKRVESK YG

[0361] 恒河猴 (Ch) IgG4 TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYVCNVVHEPSNTKVDKRVEFT
 [0362] 人IgG4 PPCPSCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV
 [0363] 恒河猴 (Ch) IgG4 PPCPACPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV
 [0364] 人IgG4 QPXWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHDQWLNGKEYKCKV
 [0365] 恒河猴 (Ch) IgG4 QFNWYVDGAEVHHAQTRPRERQFNSTYRVVSVLTVLHDQWLNGKEYTCKV
 [0366] 人IgG4 SNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVRGFY
 [0367] 恒河猴 (Ch) IgG4 SNKGLPAPIEKTIKAKGQPREPQVYILPPPQEELTKNQVSLTCLVTGFY
 [0368] 人IgG4 PSDLAVEWESNGQPENNYRTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
 [0369] 恒河猴 (Ch) IgG4 PSDLAVEWESAGQPENTYKTTTPVLDSDGSYLLYSKLTVNKSRWQPGNIF
 [0370] 人IgG4 SCSVMHENLHNHYTQKSLSLSLGK
 [0371] 恒河猴 (Ch) IgG4 TCSYMHEALHNHYTQKSLSVSPGK
 [0372] 所用恒河猴轻链恒定区 (CL) 序列是:
 [0373] AVAAPS VFIFPPSE DQVKS GTVSVVCLLN NFYPREAS VKWKVDGVLK TGN SQESVTEQ DSKDNTYSLSS
 TLTLSS TDYQSHNVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0374] 实施例4:通过瞬时表达在HEK-293F细胞中制备抗体

[0375] 按照制造商说明书,使用293fectin (Invitrogen),通过在HEK-293F细胞 (Invitrogen)中共转染相关的重链和轻链表达载体,在无血清条件下制备了抗体。

[0376] 实施例5:IgG1和IgG4抗体的纯化

[0377] 通过蛋白A亲和层析纯化了IgG1和IgG4抗体。将细胞培养上清液用0.20 μ M死端式过滤器过滤,接着上样5mL蛋白A柱 (rProtein A FF, GE Healthcare,Uppsala,Sweden)上,用0.1M柠檬-NaOH,pH3洗脱IgG。将洗脱液立即用2M Tris-HCl,pH9中和,针对12.6mM磷酸钠,140mM NaCl,pH7.4 (B.Braun,Oss,The Netherlands)透析过夜。在透析后,将样品用0.20 μ M死端式过滤器无菌过滤。通过比浊法和280nm处的吸光度确定了纯化IgG的浓度。将纯化的蛋白用SDS-PAGE、IEF、质谱法和糖分析法 (glycoanalysis) 分析。

[0378] 实施例6:CH2-CH3片段的纯化

[0379] 将His标记的CH2-CH3蛋白通过固定金属离子 (Ni^{2+}) 亲和层析 (Macherey-Nagel GmbH,Düren,Germany) 纯化,用PBS平衡的PD-10柱 (GE Healthcare) 脱盐,用0.2 μ M死端式过滤器无菌过滤。通过280nm处的吸光度确定了纯化蛋白的浓度。通过SDS-PAGE分析了纯化蛋白的质量。

[0380] 实施例7:通过人与恒河猴IgG4抗体之间GSH诱导的Fab臂互换产生双特异性抗体

[0381] 如上所述,W02008119353 (Genmab) 描述制备双特异性抗体的体外方法,其中双特异性抗体是在还原条件下孵育后通过两种单特异性IgG4抗体或IgG4样抗体之间的“Fab臂”或“半分子”互换 (重链和连接的轻链交换) 形成的。这种Fab臂互换反应是二硫键异构化反应的结果,其中单特异性抗体铰链区的重链间二硫键被还原,所得游离半胱氨酸与具有不同特异性的另一抗体分子的半胱氨酸残基形成新的重链间二硫键。所得产物是具有两条具有不同序列的Fab臂的双特异性抗体。

[0382] 为了测试人与恒河猴IgG4抗体之间的Fab臂互换,用人IgG4-2F8 (抗EGFR)、人IgG4-7D8 (抗CD20)、恒河猴IgG4-2F8和恒河猴IgG4-7D8制备两种抗体所有可能的组合。关于体外Fab臂互换,将抗体混合物 (在0.5mL PBS中以4 μ g/mL终浓度含有各种抗体) 与0.5mM

还原型谷胱甘肽 (GSH) 在37℃孵育24小时。为终止还原反应,将0.5mL PBS/0.05%吐温20 (PBST) 加至反应混合物。

[0383] 用夹心酶联免疫吸附测定 (ELISA) 通过确定双特异性结合测试双特异性抗体的存在情况。将ELISA板 (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany) 用2μg/mL (100μL/孔) 重组EGFR细胞外域在PBS中在4℃包被过夜。将板用PBST洗涤1次。将系列稀释的抗体样品 (0—1μg/mL, 在3倍稀释液中) 在PBST/0.2%BSA (PBSTB) 中转移至包被的ELISA板 (100μL/孔), 在室温 (RT) 在平板振荡器 (300rpm) 上孵育60分钟。弃去样品, 将板用PBS/0.05%吐温20 (PBST) 洗涤1次。接着, 将板在平板振荡器 (300rpm) 上用含2μg/mL小鼠抗独特型单克隆抗体2F2SAB1.1 (针对7D8; Genmab) 的PBST (100μL/孔) 孵育60分钟。将板用PBS/0.05%吐温20 (PBST) 洗涤1次。接着, 将板在平板振荡器 (300rpm) 上用含HRP缀合的山羊抗小鼠IgG (15G; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA, USA; 1:5.000) 的PBSTB (100μL/孔) 在室温孵育60分钟。将板用PBS/0.05%吐温20 (PBST) 洗涤1次。加入ABTS (50mg/mL; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) (100μL/孔), 在室温避光孵育30分钟。用2%草酸 (100μL/孔; Riedel de Haen Seelze, Germany) 终止反应。在室温10分钟后, 在ELISA读板器中测量405nm处的吸光度。

[0384] 图1显示人和恒河猴IgG4的组合与相同物种的IgG4分子的各个组合相比产生更大的双特异性结合 (更高的OD405nm)。这些数据显示Fab臂互换发生在人IgG4与恒河猴IgG4之间。而且, 更高的双特异性结合提示人IgG4半分子显示优先与恒河猴IgG4半分子二聚体化 (异二聚体化), 导致Fab臂互换反应的平衡转向双特异性异二聚体而不是转向50%异二聚体和50%同二聚体的随机互换。

[0385] 实施例8: 人和恒河猴IgG4的序列分析

[0386] 抗体参加Fab臂互换的能力已被描述为涉及第三恒定域 (CH3) 以及对活化只需要还原环境的所谓允许性 (例如含CPSC的) 铰链区 (Van der Neut Kolfshoten, 2007, Science)。对于人抗体, 发现Fab臂互换是IgG4的固有特征, IgG4的特征在于CH3域的409位的精氨酸 (R) 和允许性铰链 (226-CPSC-229) (见W02008145142 (Genmab))。相反, 人IgG1, 不参加Fab臂互换, 具有在409位的赖氨酸 (K) 和稳定的 (即非允许性) 铰链 (226-CPPC-229) (EU编号, 还见图16)。

[0387] 为了尝试阐明与相同物种的IgG4分子之间的Fab臂互换相比的人与恒河猴IgG4之间的Fab臂互换增加, 分析了人和恒河猴抗体的核心铰链和CH3-CH3界面氨基酸 (关于人CH3-CH3界面残基的综述参见例如Da11' Acqua等 (1998) Biochemistry37:9266)。图2显示中国恒河猴IgG4的核心铰链序列是226-CPAC-229, 并且CH3域含有在409位的赖氨酸 (K)。此外, 序列比对显示恒河猴IgG4的特征在于与人IgG4相比在CH3-CH3界面的更多的三个氨基酸取代: 在350位恒河猴为异亮氨酸 (I) 对比人的苏氨酸 (T); 在370位恒河猴为苏氨酸 (T) 对比人的赖氨酸 (K); 和在405位恒河猴为亮氨酸 (L) 对比人的苯丙氨酸 (F)。

[0388] 实施例9: 用人IgG4与含有恒河猴IgG4CH3序列的人IgG1之间GSH诱导的Fab臂互换产生双特异性抗体

[0389] 已对人抗体描述了, 为了允许Fab臂互换发生在IgG1分子中, 通过P228S取代用人IgG4序列 (CPSC) 代替IgG1核心铰链序列 (CPPC) 无效果, 但CH3突变为IgG4样序列是Fab臂互换活性所必需的 (Van der Neut Kolfshoten, 2007, Science)。

[0390] 基于实施例7所述人与恒河猴IgG4之间的Fab臂互换,分析了人IgG4CH3序列是否可参与人IgG1的Fab臂互换。因此,除了产生铰链序列CPSC的P228S突变以外,将三重突变T350I-K370T-F405L(下文称为ITL)引入人IgG1—2F8中。将人IgG1—2F8突变体与人IgG4-7D8组合用于体外GSH诱导的Fab臂互换。将以4 μ g/mL终浓度在0.5mL PBS中含有各种抗体以及0.5mM GSH的抗体混合物在37 $^{\circ}$ C孵育0-3-6-24小时。为了终止还原反应,将0.5mL PBS/0.05%吐温20(PBST)加至反应混合物。按照实施例7所述在ELISA中进行双特异性结合的测量。

[0391] 图3证实与人IgG4-7D8组合时,单独引入CPSC铰链不使人IgG1—2F8参与GSH诱导的Fab臂互换。另外将恒河猴IgG4特异性CH3界面氨基酸(ITL)引入人IgG1—2F8并同时保留野生型IgG1铰链,在这些条件下与人IgG4-7D8组合时也不导致参加Fab臂互换。相反,具有在铰链中的CPSC序列和恒河猴IgG4特异性CH3界面氨基酸(ITL)的变体人IgG1—2F8主链序列,在与IgG4-7D8发生GSH诱导的Fab臂互换后,显示比两种人IgG4抗体增加的双特异性结合。这些数据显示含CPSC的铰链与在350、370和405位分别含有I、T和L的CH3域组合,足以使人IgG1参加GSH诱导的Fab臂互换,并且与人IgG4组合时,互换反应的平衡向经互换的双特异性产物移动。

[0392] 实施例10:通过人IgG4与IgG1或IgG4突变体之间的体内Fab臂互换产生双特异性抗体

[0393] 为了进一步鉴定参与Fab臂互换需要的特征,体内分析了人IgG4和IgG1变体。对每组4只雌性SCID小鼠(Charles River, Maastricht, The Netherlands) i.v.注射抗体混合物,其在300 μ L总体积中含有600 μ g抗体(500 μ g7D8+100 μ g2F8)。在注射后3、24、48和72小时从隐静脉抽取血液样品。将血液收集在含肝素的瓶中,以10,000g离心5分钟使细胞与血浆分离。产生双特异性抗体,接着按实施例7所述用在PBSTB中系列稀释的血浆样品在ELISA中评估CD20和EGFR双特异性反应性。用体外经互换的抗体混合物作为参考物,通过非线性回归曲线拟合(GraphPad Software, San Diego, CA)将血浆样品中的双特异性抗体量化。

[0394] 图4显示其中铰链或CH3序列转化为相应的人IgG1序列(分别是CPPC或R409K)的人IgG4-2F8不再参加体内Fab臂互换。反之亦然,其中铰链区和CH3界面序列两者转化为相应的人IgG4序列(CPSC和K409R)人IgG1能够参与体内Fab臂互换。这些数据显示含CPSC的铰链(在228位的S)与在409位含精氨酸(R)的CH3域组合,足以使通过人IgG1在体内的Fab臂互换能够进行。

[0395] 实施例11:通过2-MEA诱导的Fab臂互换产生双特异性抗体:稳定铰链的绕开/破坏

[0396] 2-巯基乙胺·HCl(2-MEA)是温和的还原剂,已被描述为选择性裂解抗体铰链区的二硫键,同时保留重链与轻链之间的二硫键。因此,测试一系列浓度的2-MEA通过两种含有CPSC或CPPC铰链区的抗体之间的Fab臂互换诱导双特异性抗体产生的能力。抗体混合物(含有各种0.5mg/mL终浓度的抗体)与一系列浓度的2-MEA(0、0.5、1.0、2.0、5.0、7.0、10.0、15.0、25.0和40.0mM)以100 μ L TE总体积在37 $^{\circ}$ C孵育90分钟。为了终止还原反应,按照制造商推荐用离心柱(Microcon离心过滤器,30k, Millipore)通过使样品脱盐除去还原剂2-MEA。按照实施例7所述在ELISA中测量双特异性结合。

[0397] 对组合IgG4-2F8x IgG4-7D8(其含有CPSC铰链区且已知参与GSH诱导的Fab臂互换)和组合IgG1—2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC(其因为稳定的铰链区所以不参与GSH诱导的

Fab臂互换(描述于实施例9,图3))测试2-MEA诱导的Fab臂互换。令人惊奇地是,如通过非还原性SDS-PAGE(数据未显示)所确定的,发现2-MEA诱导轻链与重链分离。但是,如图5所示产生功能性双特异性抗体。在2.0mM2-MEA浓度下达到在野生型人IgG4-2F8与IgG4-7D8之间的Fab臂互换后双特异性结合的最大水平,其与实施例9所述的用0.5mM GSH所达到的水平(图3)可相比。但是,2-MEA能够以剂量依赖性方式诱导人抗体IgG1-2F8-ITL与IgG4-7D8-CPPC(具有稳定的铰链区)之间的Fab臂互换。虽然在低2-MEA浓度形成很少或不形成双特异性抗体(这可能是由于两种抗体的铰链区都存在CPPC序列所致),但在更高浓度的2-MEA下非常有效地产生双特异性抗体。在25mM2-MEA达到最大的双特异性结合,其超过在两种野生型IgG4抗体之间的Fab臂互换后的最大结合。这些最大结合水平与实施例9(图3)关于对含有CPSC铰链的相应抗体(IgG1-2F8-CPSC-ITL)的GSH处理所述的最大结合水平可相比。因为IgG1-2F8-ITL和IgG4-7D8-CPPC两者都含有CPPC铰链,所以这些数据提示2-MEA可绕过体外Fab臂互换对CPSC铰链的需要。

[0398] 实施例12:在通过2-MEA诱导Fab臂互换产生双特异性抗体后的质谱分析

[0399] 通过2-MEA诱导Fab臂互换产生双特异性抗体描述于实施例11,其中双特异性结合通过ELISA显示(图5)。为了证实形成双特异性抗体,通过电喷雾电离质谱法(ESI-MS)分析样品以确定分子量。首先,通过将200 μ g抗体与0.005U N-聚糖酶(目录号GKE-5006D; Prozyme)在180 μ L PBS中在37 $^{\circ}$ C孵育过夜使样品去糖基化。将样品在Aquity UPLCTM(Waters, Milford, USA)上用BEH300C18, 1.7 μ m, 2.1x50mm柱在60 $^{\circ}$ C脱盐,用含0.05%甲酸(Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Germany)的MQ水(洗脱剂A)和LC-MS级乙腈(洗脱剂B)(Biosolve, Valkenswaard, The Netherlands)的混合物梯度洗脱。在以正离子模式操作的micrOTOFTM质谱仪(Bruker, Bremen, Germany)上联机记录飞行时间电喷雾电离质谱。在分析前,用ES调谐混合物(tuning mix)(Agilent Technologies, Santa Clara, USA)校准500-4000m/z标度。通过用由DataAnalysisTM软件3.4版本(Bruker, Bremen, Germany)提供的最大熵(Maximal Entropy)对质谱解卷积。基于在本实验用于Fab臂互换的抗体分子量,可将双特异性抗体与原来的抗体区别开来(还描述于实施例15,关于IgG1-2F8-ITLxIgG4-7D8-CPPC的图9C)。对于双特异性抗体的峰,确定曲线下面积,并除以曲线下总面积以计算各样品中的双特异性抗体百分数。

[0400] 图6A显示用0mM2-MEA(对应于亲代抗体的两个峰)、7mM2-MEA(对应于亲代和双特异性抗体的三个峰)和40mM2-MEA(对应于双特异性抗体的一个峰)进行的IgG1-2F8-ITL与IgG4-7D8-CPPC之间的Fab臂互换反应的三个代表性质谱曲线。双特异性产物的均匀峰提示不发生轻链错配,这会导致再分的峰。定量数据在图6B中呈现,显示IgG1-2F8-ITL与IgG4-7D8-CPPC之间的Fab臂互换产生接近100%双特异性抗体。相反,野生型IgG4抗体之间的Fab臂互换产生少于50%双特异性产物。这些数据证实描述于实施例11的双特异性结合ELISA的结果(图5)。

[0401] 实施例13:通过2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性抗体的稳定性

[0402] 测试通过2-MEA诱导的体外Fab臂互换产生的双特异性抗体的稳定性。因此,将2 μ g用7.0mM2-MEA从IgG1-2F8-ITL和IgG4-7D8-CPPC产生的双特异性样品(如实施例11所述,图5)在一系列浓度(0、2、20、100 μ g)的无关IgG4(抗乙酰胆碱受体的IgG4-MG)的存在下用于GSH诱导的Fab臂互换反应,所述一系列浓度的无关IgG4代表与2 μ g双特异性测试样品相比

0、1、10、50x过量的IgG4-MG。在该反应中的Fab臂互换会导致双特异性EGFR/CD20结合的丧失。GSH还原反应的条件与实施例7所述相同(在37°C在0.5mLPBS/0.5mM GSH中24小时)。为了终止还原反应,将0.5mL PBSTB加至反应混合物。按照实施例7所述在ELISA中测量双特异性结合。将GSH还原反应后的双特异性结合与在原料(对照)中测量的双特异性结合(将其设为100%)相比表示。

[0403] 图7A显示对于IgG1—2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC衍生的双特异性样品,在无关IgG4的存在下GSH诱导的Fab臂互换后的EGFR/CD20双特异性结合无明显改变。这提示双特异性产物稳定,即不参与GSH诱导的Fab臂互换。作为对照,图7B显示IgG4-2F8x IgG4—7D8衍生的样品显示在无关IgG4的存在下GSH诱导的Fab臂互换后减少的EGFR/CD20双特异性结合,提示该产物不稳定。这些数据显示由在CH3域含有三重突变T350I-K370T-F405L的人IgG1重链和含有产生稳定铰链(CPPC)的S228P取代的人IgG4重链组成的异二聚体是稳定的。

[0404] 实施例14:通过2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性抗体的药代动力学和稳定性的体内分析

[0405] 将通过IgG1—2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC之间体外2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体注射在SCID小鼠中以分析其与亲代抗体IgG1—2F8-ITL和IgG4-7D8-CPPC比较的稳定性(体内Fab臂互换)和药代动力学性质(血浆清除率)。对三组小鼠(每组3只小鼠)尾静脉内注射200μL纯化抗体:(1) 100μg双特异性抗体;(2) 100μg双特异性抗体+1,000μg无关IgG4(那他珠单抗,抗-α4-整联蛋白);(3) 50μgIgG1—2F8-ITL+50μgIgG4-7D8-CPPC。在抗体给药后以预定时间间隔(10分钟、3小时、1、2、7、14、21天)通过颊穿刺收集血液样品(50—100μL)。将血液收集在含肝素的小瓶内,以14,000g离心10分钟。在进一步分析以前将血浆贮存于-20°C。

[0406] 通过ELISA测定血浆样品中的总IgG浓度。后续步骤的测定条件与实施例7所述ELISA的相同。用于总IgG测量的具体化合物如下:用2μg/mL小鼠抗人IgG(克隆MH16—1; CLB;目录号M1268)包被;血清样品稀释液(第1和3组为1:500和1:2,500)和(第2组为1:2,500和1:10,000);缀合物:HRP缀合的山羊抗人IgG(克隆11H; Jackson;目录号109-035—098;1:10,000)。测定血浆样品中双特异性抗体的存在,通过如实施例10所述ELISA中的CD20和EGFR双特异性反应性来量化。

[0407] 图8A显示总抗体血浆浓度。所有各组的血浆清除曲线形状完全相同,提示在分析时间间隔期间双特异性抗体的血浆清除与亲代抗体IgG1—2F8-ITL和IgG4-7D8-CPPC相同。图8B显示随着时间推移双特异性抗体的血浆浓度。将10倍过量的无关IgG4加至双特异性抗体不影响双特异性抗体浓度,提示不发生体内Fab臂互换。在注射亲代抗体(IgG1—2F8-ITL+IgG4-7D8-CPPC)后,血浆中检测不到双特异性抗体,证实这些抗体不参与体内Fab臂互换。这些数据提示通过IgG1—2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC之间的体外2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性抗体产物,在体内稳定(无Fab臂互换)并显示与亲代单价抗体可相比的药代动力学性质(血浆清除率)。

[0408] 实施例15:通过两种抗体之间2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性抗体的纯度将通过人IgG1—2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC之间2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性抗体批次,在PD-10脱盐柱(目录号17-0851—01;GE Healthcare)上纯化。接着,通过十二烷基硫酸

钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、高效大小排阻层析 (HP-SEC) 和质谱法分析双特异性产物的纯度。通过在ELISA中的双特异性结合 (数据未显示) 证实了产生的双特异性抗体的功能性。

[0409] 用改良的Laemli法 (Laemli1970Nature227 (5259) :680-5) 在4—12%NuPAGE Bis-Tris凝胶 (Invitrogen, Breda, The Netherlands) 上在还原和非还原条件下进行SDS-PAGE, 其中在中性pH跑样。将SDS-PAGE凝胶用考马斯染色, 用GeneGenius (Synoptics, Cambridge, UK) 数字成像。图9A显示在Fab臂互换后的抗体样品由完整IgG和在非还原凝胶上可检测到的痕量半分子 (H1L1) 构成 (图9A-b)。

[0410] 用连接TSK HP-SEC柱 (G3000SW_{x1}; Toso Biosciences, via Omnilabo, Breda, The Netherlands) 和Waters2487双重 λ 吸光度检测器 (Waters) 的Waters Alliance2695分离装置 (Waters, Etten-Leur, The Netherlands) 进行HP-SEC分级分离。使样品以1mL/min运行。将结果用2002版Empower软件处理, 并将每个峰表示为总峰高的百分数。图9B显示>98%的样品由完整IgG构成, 几乎不形成聚集物。

[0411] 按照实施例12所述进行质谱测定。图9C显示原料IgG1-2F8-ITL和IgG4-7D8-CPPC以及通过IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC之间的Fab臂互换产生的双特异性产物的质谱曲线。在Fab臂互换的样品中的产物是145,901kDa, 其与从IgG1-2F8-ITL (146,259.5/2=73,130) + IgG4-7D8-CPPC (145,542.0/2=72,771) 衍生的双特异性产物完全相配。而且, 双特异性抗体产物显示均匀的峰, 提示不发生会导致产生再分的峰的轻链错配。这些数据显示Fab臂互换产生100%双特异性抗体。除了IgG4-7D8-CPPC和双特异性样品的主峰 (K0) 以外所检测到的小峰可归因于存在一个 (K1) 或两个 (K2) C-端赖氨酸。

[0412] 这些数据显示约100%功能性双特异性抗体样品是通过IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC之间的2-MEA诱导Fab臂互换产生的。

[0413] 实施例16: 阐明人IgG1进行Fab臂互换对T35I、K37T和F45L取代的需要为了进一步鉴定IgG1参与Fab臂互换所需要的在IgG1CH3域中的决定簇 (determinant), 将含有三重突变T350I-K370T-F405L (ITL) 的IgG1与双重突变体T350I-K370T (IT)、T350I-F405L (IL) 和K370T-F405L (TL) 比较。还测试单突变体F405L (L)。用2-MEA作为还原剂以诱导体外Fab臂互换 (50 μ g各种抗体在100 μ L PBS/25mM2-MEA中在37 $^{\circ}$ C达90分钟)。对于单突变体F405L抗体, 在使用Amicon Ultra离心装置 (30k, Millipore, 目录号UFC803096) 将缓冲液交换为PBS后使用来自瞬时转染上清液的未纯化抗体。为了终止还原反应, 按照实施例11所述使用离心柱通过使样品脱盐除去还原剂2-MEA。通过在按照实施例7所述的ELISA中测量的双特异性结合来确定双特异性抗体的产生。

[0414] 将三重突变 (ITL)、双重突变 (IT、IL和TL) 和单突变 (L) 引入IgG1-2F8。将这些突变体与含有CPSC铰链 (野生型) 或稳定铰链 (IgG4-7D8-CPPC) 的IgG4-7D8组合, 在37 $^{\circ}$ C用25mM2-MEA进行Fab臂互换90分钟。图10A-B显示IgG1-2F8-IL和IgG1-2F8-TL突变体显示与三重突变体ITL相同水平的Fab臂互换, 与组合的IgG4-7D8 (CPSC或CPPC铰链) 无关。相比之下, 对于与IgG1-2F8-IT突变体的组合未发现双特异性结合。图10C显示IgG1-2F8-F405L突变体也显示Fab臂互换, 与组合的IgG4-7D8 (CPSC或CPPC铰链) 无关。这些数据提示在上述条件下F405L突变足以使人IgG1参与Fab臂互换。

[0415] 实施例17: 在不同温度下通过2-MEA诱导Fab臂互换产生双特异性抗体

[0416] 在不同温度下测试2-MEA诱导通过两种不同抗体之间的Fab臂互换产生双特异性抗体的能力。通过在0℃、20℃ (RT) 或37℃将160μg人IgG1—2F8-ITL与160μgIgG4—7D8-CPPC孵育在320μl PBS/25mM2-MEA (各抗体终浓度为0.5mg/mL) 中,开始Fab臂互换反应。从这些反应中,在不同时间点(0、2.5、5、10、15、30、45、60、75、90、120、150、180和240分钟)取出20μL样品。将20μL PBS加至各样品,然后按照制造商的推荐,用Zeba96孔离心脱盐板(7k,目录号89808Thermo Fisher Scientific)通过使样品脱盐,除去还原剂2-MEA。使用Nanodrop ND-1000分光光度计(Isogen Life Science, Maarssen, The Netherlands)通过测量280nm波长的吸光度确定总抗体浓度。按照实施例7所述在ELISA中使用系列稀释的抗体样品(总抗体浓度0-20μg/mL,在25倍稀释液中)测量双特异性结合。

[0417] 图11显示发现通过人IgG1—2F8-ITL与IgG4—7D8-CPPC之间的2-MEA诱导的Fab臂互换产生双特异性抗体在37℃最有效,45分钟后达到最大双特异性结合。在室温,双特异性抗体的产生更慢,240分钟后达到最大双特异性结合。在0℃,在分析时间过程期间观察不到双特异性结合的产生。

[0418] 实施例18:分析不同还原剂诱导通过体外Fab臂互换产生双特异性抗体的能力

[0419] 上文已显示0.5mM GSH可在体外诱导人IgG4与IgG1-CPSC-ITL之间而不是人IgG4与含有稳定铰链的IgG1-ITL之间的Fab臂互换(图3)。此外,发现2-MEA能够诱导具有稳定铰链区的抗体比如IgG1-ITL x IgG4-CPPC之间的Fab臂互换(图5)。为了测试是否其它浓度的GSH或2-MEA或者其它还原剂能够体外诱导两种不同抗体之间的Fab臂互换,测试一系列浓度的2-MEA、GSH和DTT(二硫苏糖醇)。因此,将10μg人IgG1—2F8-ITL和10μgIgG4—7D8-CPPC在20μl PBS(各抗体终浓度为0.5mg/mL)中的组合与一系列浓度的不同还原剂(0.0、0.04、0.1、0.2、0.5、1.0、2.5、5.0、12.5、25.0和50.0mM)在37℃孵育。90分钟后,将20μL PBS加至各样品,按照实施例17所述用离心脱盐板通过使样品脱盐除去还原剂。按照实施例17所述确定总抗体浓度。按照实施例7所述在ELISA中使用抗体样品的系列稀释液(总抗体浓度0-20μg/mL,在3倍稀释液中)测量双特异性结合。

[0420] 图12证实2-MEA在25mM2-MEA浓度下诱导最大双特异性结合。发现DTT非常有效地产生双特异性抗体,在2.5mM DTT下达到最大双特异性结合。在0—5mM范围的GSH浓度不能诱导通过IgG1-ITL与IgG4-CPPC抗体(两者都含有稳定铰链区)之间的Fab臂互换产生双特异性抗体。更高的GSH浓度(12.5—50mM)导致形成抗体聚集物,如通过非还原性SDS-PAGE(数据未显示)所确定的。因此,从分析中排除这些样品。这些数据显示不同还原剂可诱导通过两种不同抗体之间的Fab臂互换产生双特异性抗体。

[0421] 实施例19:用于与IgG1-ITL组合参加2-MEA诱导的Fab臂互换的在IgG149位的决定簇

[0422] 2-MEA可诱导人IgG1-ITL与IgG4-CPPC之间的Fab臂互换,如实施例11所述(图5)。人IgG1与IgG4的CH3界面残基区别只在于409位: IgG1为赖氨酸(K)和IgG4为精氨酸(R)(描述于实施例8,图2)。因此,测试在409位用精氨酸或任何其它氨基酸(K409X)取代赖氨酸,是否可使IgG1能够参加与IgG1-ITL的2-MEA诱导的Fab臂互换。将10μg人IgG1—2F8-ITL和10μgIgG1—7D8-K409X在20μl PBS/25mM2-MEA(各抗体终浓度为0.5mg/mL)中的组合在37℃孵育90分钟。在用Amicon Ultra离心装置(30k, Millipore, 目录号UFC803096)将缓冲液更换为PBS后,使用来自瞬时转染上清液的未纯化抗体。在Fab臂互换反应后,将20μL PBS加至各

样品,按照实施例17所述使用离心脱盐板通过使样品脱盐除去还原剂。按照实施例7所述在ELISA中使用抗体样品的系列稀释液(总抗体浓度0-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在3倍稀释液中)测量双特异性结合。

[0423] 图13A显示在IgG1-2F8-ITL x IgG1-7D8-K409X之间2-MEA诱导Fab臂互换后双特异性结合的结果。在图13B中,将互换表示为相对于纯化批次的双特异性抗体(将其设为100%)的双特异性结合,所述双特异性抗体从IgG1-2F8-ITL与IgG4-7D8-CPPC之间的2-MEA诱导的Fab臂互换衍生。如表1表示,还将这些数据评分为(-)无Fab臂互换、(+/-)低度、(+)中度或(++)高度Fab臂互换。当IgG1-7D8的409位是K(=野生型IgG1)、L或M时无Fab臂互换(-)。发现Fab臂互换当IgG1-7D8的409位是F、I、N或Y时是中度(+),当IgG1-7D8的409位是A、D、E、G、H、Q、R、S、T、V或W时为高度(++).

[0424] 表1:2-MEA诱导的IgG1-2F8-ITL与IgG1-7D8-K49X突变体之间的Fab臂互换。通过夹心ELISA确定2-MEA诱导的IgG1-2F8-ITL与IgG1-7D8-K409X突变体之间的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。(-)无,(+/-)低度,(+)中度,(++)高度Fab臂互换。

[0425]

IgG1-7D8-K409X	Fab臂互换 x IgG1-2F8-ITL
A	++
D	++
E	++
F	+
G	++
H	++
I	+
K	-
L	-
M	-
N	+
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	+

[0426] 实施例2:抗体去糖基化不影响通过2-MEA诱导Fab臂互换产生双特异性抗体

[0427] 通过将200 μg 抗体与0.005U N-聚糖酶(目录号GKE-5006D;Prozyme)在180 μL PBS中在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜使IgG4-7D8和IgG4-7D8-CPPC样品去糖基化。这些样品直接用于Fab臂互换反应。通过将50 μg 各抗体在100 μl PBS/25mM2-MEA(各抗体终浓度为0.5mg/mL)中在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育90分钟进行Fab臂互换。按照实施例11所述用离心柱通过使样品脱盐来除去还原剂2-MEA。按照实施例7所述在夹心ELISA中用抗体样品的系列稀释液(总抗体浓度0-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在3倍稀释液中)测量双特异性结合。

[0428] 质谱分析显示去糖基化反应产生100%去糖基化抗体产物(数据未显示)。图14显示涉及去糖基化抗体的Fab臂互换与用相应糖基化抗体的Fab臂互换无区别(IgG4-2F8x

IgG4—7D8-去糖基化的对比IgG4-2F8x IgG4-7D8和IgG1—2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC-去糖基化的对比IgG1—2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC)。这些数据提示去糖基化不影响通过2-MEA诱导Fab臂互换产生双特异性抗体。

[0429] 实施例21:非共价CH3-CH3相互作用的量化

[0430] 在CH3界面的相互作用的强度应当使得亲代抗体的两条重链在Fab臂互换反应中都有可能解离并且它们接着有可能在异二聚体化反应中缔合。因此,分析了参与Fab臂互换的能力与非共价CH3-CH3相互作用强度(解离常数, K_D)之间的相关性。对于下列人抗体组合按照实施例9所述(在37°C 0.5mM GSH下)进行GSH诱导的Fab臂互换:

[0431] IgG1—2F8x IgG1—7D8

[0432] IgG1—2F8-CPSC x IgG1-7D8-CPSC

[0433] IgG1—2F8-CPSC-T350I x IgG1-CPSC-7D8-T350I

[0434] IgG1—2F8-CPSC-K370T x IgG1—7D8-CPSC-K370T

[0435] IgG1—2F8-CPSC-ITL x IgG1—7D8-CPSC-ITL

[0436] IgG1—2F8-CPSC-K409R x IgG1—7D8-CPSC-K409R

[0437] IgG4-2F8x IgG4-7D8

[0438] IgG4-2F8-R409K x IgG4-7D8-R409K

[0439] IgG4-2F8-R409A x IgG4-7D8-R409A

[0440] IgG4-2F8-R409L x IgG4-7D8-R409L

[0441] IgG4-2F8-R409M x IgG4-7D8-R409M

[0442] IgG4-2F8-R409T x IgG4-7D8-R409T

[0443] IgG4-2F8-R409W x IgG4-7D8-R409W

[0444] IgG4-2F8-F405A x IgG4-7D8-F405A

[0445] IgG4-2F8-F405L x IgG4-7D8-F405L

[0446] IgG4-2F8-Y349D x IgG4-7D8-Y349D

[0447] IgG4-2F8-L351K x IgG4-7D8-L351K

[0448] IgG4-2F8-E357T x IgG4-7D8-E357T

[0449] IgG4-2F8-S364D x IgG4-7D8-S364D

[0450] IgG4-2F8-K370Q x IgG4-7D8-K370Q

[0451] IgG4-2F8-K370E x IgG4-7D8-K370E

[0452] 通过按照实施例7所述在夹心ELISA中确定双特异性结合,来测量双特异性抗体的产生。

[0453] 图15A/B/C显示Fab臂互换反应后双特异性结合的结果。

[0454] 为了测量上述CH3突变对CH3-CH3相互作用强度的作用,制备只由CH2-CH3域组成的片段。在这些片段中缺乏铰链区防止共价的重链间二硫键。通过天然质谱法分析片段。使用10kDa MWC0离心过滤柱将样品缓冲液交换为100mM乙酸铵pH7。将系列稀释的样品(20 μ M-25nM;单体当量)的等分试样(约1 μ L)装入镀金硼硅酸盐毛细管中用于在LCT质谱仪(Waters)上分析。将单体信号 M_s 定义为单体峰面积占波谱中所有峰面积的分数的($M_s/(M_s+D_s)$),其中 D_s =二聚体信号)。将平衡时的单体浓度 $[M]_{eq}$ 定义为 $M_s/[M]_0$,其中 $[M]_0$ 是就单体而言的总蛋白浓度。将平衡时的二聚体浓度 $[D]_{eq}$ 定义为 $([M]_0-[M]_{eq})/2$ 。然后从 $[D]_{eq}$ 对比

$[M]_{eq}^2$ 的曲线的斜率求出 K_D 。表2呈现非共价CH3-CH3相互作用的 K_D 。

[0455] 分析参与Fab臂互换的能力与非共价CH3-CH3相互作用强度之间的关系。图15D/E显示针对相应CH2-CH3片段的测量 K_D 作图的在Fab臂互换后的双特异性结合百分数(图15D关于IgG1;图15E关于IgG4)。这些数据提示在测试条件下有允许有效Fab臂互换的CH3-CH3相互作用的表观 K_D 值的具体范围。

[0456] 表2:非共价CH3-CH3相互作用的 K_D

CH2-CH3 构建体	K_D (M)	倍数差异*
G1	3.0×10^{-7}	1.0000
G1-T350I	7.0×10^{-9}	0.4000
G1-K370T	4.5×10^{-8}	0.0700
G1-ITL	1.0×10^{-6}	0.0030
G1-K409R	1.1×10^{-7}	0.0300
G4	4.8×10^{-8}	1.0000
G4-R409K	8.0×10^{-9}	6.0000
G4-R409A	1.6×10^{-7}	0.3000
G4-R409L	1.5×10^{-8}	3.2000
[0457] G4-R409M	3.0×10^{-9}	16.0000
G4-R409T	7.2×10^{-7}	0.0700
G4-R409W	3.4×10^{-5}	0.0014
G4-F405A	1.9×10^{-5}	0.0025
G4-F405L	2.5×10^{-5}	0.0019
G4-L351K	7.4×10^{-7}	0.0600
G4-E357T	4.1×10^{-5}	0.0012
G4-S364D	4.7×10^{-6}	1.0200
G4-K370Q	1.1×10^{-8}	4.3000
G4-K370E	2.0×10^{-9}	24.0000

* 与野生型 IgG1 或 IgG4 相应的 CH2-CH3 片段相比

[0458] 实施例22:分析不同还原剂(reductantia)诱导通过IgG1-2F8-F405L与IgG1-7D8-K409R之间体外Fab臂互换产生双特异性抗体的能力

[0459] 发现2-MEA和DTT能诱导人IgG1-ITL与IgG4-CPPC之间的体外Fab臂互换(图12)。测试这些还原剂是否也可诱导人IgG1-2F8-F405L与IgG1-7D8-K409R之间的体外Fab臂互换。测试了一系列浓度的2-MEA、DTT、GSH和TCEP(三(2-羧乙基)膦)。按照实施例18所述进行Fab臂互换。不同还原剂的测试浓度系列如下:0.0、0.04、0.1、0.2、0.5、1.0、5.0、25.0、50.0mM2-MEA、GSH、DTT或TCEP。

[0460] 图17证实2-MEA在25mM2-MEA的浓度下诱导最大Fab臂互换,在50.0mM2-MEA的更高浓度下持续。发现DTT非常有效地产生双特异性抗体,在0.5mM DDT下达到最大Fab臂互换,在更高浓度的DTT(1.0-50.0mM)也持续。发现TCEP也非常有效地产生双特异性抗体,在0.5mM下达到最大Fab臂互换。在 ≥ 25.0 mM的浓度,通过TCEP的Fab臂互换受到干扰。0.0-5.0mM范围的GSH浓度不能诱导通过Fab臂互换产生双特异性抗体。更高的GSH浓度(25.0-50.0mM)导致抗体聚集物形成(数据未显示)。因此,从分析中排除这些样品。这些数据显示不同还原剂可诱导通过两种不同抗体之间的Fab臂互换产生双特异性抗体。

[0461] 实施例23:通过IgG1-2F8-F405L与IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生双特异性抗体

[0462] 为了证实通过人IgG1-2F8-F405L与IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换形成双特异性抗体,通过ESI-MS确定来自一系列浓度的2-MEA进行的Fab臂互换反应的样品的分子量。测试的浓度系列如下:0.0、0.5、1.0、2.0、5.0、7.0、10.0、15.0、25.0和40.0mM2-MEA。按照实施例11所述进行Fab臂互换(在PBS中)和夹心ELISA。按照实施例12所述进行ESI-MS。

[0463] 图18A显示2-MEA以剂量依赖性方式诱导IgG1-2F8-F405L与IgG1-7D8-K409R之间的Fab臂互换,有效地导致产生双特异性抗体,在15.0mM2-MEA浓度下达到最大水平的双特异性结合。图18B呈现量化的ESI-MS数据,显示IgG1-2F8-F405L与IgG1-7D8-K409R之间的Fab臂互换产生接近100%双特异性抗体,证实双特异性结合ELISA的结果。

[0464] 实施例24:通过人IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体的纯度

[0465] 用PD-10脱盐柱(目录号17-0851-01;GE Healthcare)纯化通过人IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体批次。接着,按照实施例12所述通过质谱分析双特异性产物的纯度。

[0466] 图19显示原料IgG1-2F8-F405L和IgG1-7D8-K409R以及通过IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R之间的Fab臂互换产生的双特异性产物的质谱曲线图。Fab臂互换的样品中的产物是146,160.7kDa,其与从IgG1-2F8-F405L (146,606.8/2=73,303.3) x IgG1-7D8-K409R (146,312.2/2=73,156.1)=146,459.4kDa衍生的双特异性产物相配。而且,双特异性抗体产物显示均匀的峰,提示不发生会导致产生再分的峰的轻链错配。这些数据显示Fab臂互换产生大约100%双特异性抗体。

[0467] 实施例25:通过2-MEA诱导Fab臂互换从IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R产生的双特异性抗体的稳定性和药代动力学的体内分析

[0468] 按照实施例14所述将通过IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R之间的体外2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体注射在SCID小鼠中以分析其稳定性(体内Fab臂互换)和药代动力学性质。分析两组小鼠(每组3只小鼠):(1)100 μ g双特异性抗体;(2)100 μ g双特异性抗体+1,000 μ g无关IgG4(IgG4-637,描述于W02007068255)。按照实施例14所述通过ELISA测定血浆样品中的总IgG浓度,但在本实施例中,用HRP缀合的山羊抗人IgG(Jackson,目录号109-035-098,1/10,000)作为缀合物用于检测。通过在按照实施例14所述的夹心ELISA中的CD20和EGFR双特异性反应性来测定和量化血浆样品中双特异性抗体的存在情况。

[0469] 图20A显示随时间推移的总抗体血浆浓度。两组的血浆清除曲线形状完全相同。图20B显示随时间推移双特异性抗体的血浆浓度。将10倍过量的无关IgG4加至双特异性抗体不影响双特异性抗体浓度,提示体内不发生Fab臂互换。这些数据提示通过IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R之间的体外2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体产物在体内是稳定的(无Fab臂互换)。

[0470] 实施例26:通过人IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体的CDC介导的细胞杀伤

[0471] CD20抗体IgG1—7D8可通过补体依赖性细胞毒性(CDC)有效地杀伤CD20表达细胞。相反,EGFR抗体IgG1—2F8对表达EGFR的靶细胞不介导CDC。测试突变体IgG1—7D8-K409R和通过IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体是否仍然能够对CD20表达细胞诱导CDC。将 10^5 个Daudi或Raji细胞与一系列浓度的抗体在80 μ L补充0.1%BSA的RPMI培养基中在振荡器上在室温预孵育15分钟。加入20 μ L正常人血清(NHS)作为补体来源(20%NHS终浓度),在37 $^{\circ}$ C孵育45分钟。加入30 μ L补充0.1%BSA的冰冷RPMI培养基以终止CDC反应。通过加入10 μ L10 μ g/mL碘化丙锭(PI)(1 μ g/mL终浓度)和FACS分析区分死细胞和活细胞。

[0472] 图21显示IgG1—7D8对表达CD20的Daudi(图21A)和Raji(图21B)细胞的CDC介导的细胞杀伤不受引入K409R突变的影响。Daudi和Raji细胞两者都不表达EGFR,导致通过IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体的单价结合。但是,双特异性抗体仍然诱导CD20表达细胞的CDC介导的细胞杀伤。这些数据提示在双特异性形式中保留亲代抗体的CDC能力。

[0473] 实施例27:通过人IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体的ADCC介导的细胞杀伤

[0474] EGFR抗体IgG1—2F8可通过抗体依赖性细胞毒性(ADCC)杀伤EGFR表达细胞,比如A431。A431细胞不表达CD20,因此CD20抗体IgG1—7D8不对这些细胞诱导ADCC。测试突变体IgG1—2F8-F405L和通过IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体是否仍然能够对A431细胞诱导ADCC。对于效应细胞分离,按照制造商推荐用Leucosep[®]管(Greiner Bio-one,目录号227290)从健康供体的全血分离外周血单核细胞(PBMC)。通过在1mL补充0.1%BSA的RPMI培养基中将100 μ Ci⁵¹Cr加至 5×10^6 个A431细胞中,并在37 $^{\circ}$ C振荡水浴中孵育60分钟,来标记靶细胞。将标记的细胞洗涤,再悬浮于补充0.1%BSA的RPMI中。将在补充0.1%BSA的RPMI中的 5×10^4 个标记靶细胞与一系列浓度的抗体(在ADCC测定中终浓度范围为0—10 μ g/mL,在3倍稀释液中)以100 μ L在室温下预孵育15分钟。通过以E:T比率100:1加入50 μ L效应细胞(5×10^6 个细胞)开始ADCC测定。在37 $^{\circ}$ C4小时后,按照每分钟计数(cpm)在闪烁计数器中测量一式三份实验的⁵¹Cr释放。用以下公式计算细胞毒性的百分数:特异性裂解的百分数=(实验cpm-基础cpm)/(最大cpm-基础cpm) x 100。通过将50 μ L5%Triton x-100加至50 μ L靶细胞(5×10^4 个细胞)确定最大⁵¹Cr释放,在不存在致敏抗体和效应细胞的情况下测量基础释放。

[0475] 图22显示CD20特异性抗体IgG1—7D8不对CD20阴性A431细胞诱导ADCC。IgG1—2F8和突变体IgG1—2F8-F405L两者都能够对A431细胞诱导ADCC,提示在IgG1—2F8中引入F405L突变不影响其ADCC效应子功能。从IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R衍生的双特异性抗体也以剂量依赖性方式对A431细胞诱导ADCC,提示在双特异性形式中保留ADCC效应子功能。

[0476] 实施例28:用于与IgG1-K409R组合参加2-MEA诱导的Fab臂互换的在IgG1405位的决定簇

[0477] 在实施例16中描述了当与IgG4-7D8组合时,F405L突变足以使人IgG1能够参加Fab臂互换。为了进一步测试与人IgG1-K409R组合参加2-MEA诱导的Fab臂互换的在IgG1405位的决定簇,将所有可能的IgG1—2F8-F405X突变体(除了C和P以外)与IgG1—7D8-K409R组

合。按照实施例19所述用纯化的抗体进行操作。

[0478] 图23显示在IgG1—2F8-F405X x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换后双特异性结合的结果。如表3所呈现的,还将这些数据评分为(-)无Fab臂互换、(+/-)低度、(+)中度或(++)高度Fab臂互换。当IgG1—2F8的405位是F(=野生型IgG1)时未发现Fab臂互换(-)。发现当IgG1—2F8的405位是G或R时Fab臂互换是低度的(+/-)。发现当IgG1—2F8的405位是A、D、E、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、V、W或Y时Fab臂互换是高度的(++)。这些数据提示当与IgG1-K409R组合时,在IgG1405位的特定突变允许IgG1参加2-MEA诱导的Fab臂互换。

[0479] 表3:在IgG1-2F8-F405X突变体与IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换

[0480] 通过夹心ELISA确定在IgG1—2F8-F405X突变体与IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。(-)无, (+/-)低度, (+)中度, (++)高度Fab臂互换。

[0481]

IgG1-2F8-F405X	Fab臂互换 x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	+/-
H	++
I	++
K	++
L	++
M	++
N	++
Q	++
R	+/-
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	++

[0482] 实施例29:用于与IgG1-K409R组合参加2-MEA诱导的Fab臂互换的在IgG1407位的决定簇

[0483] 在实施例28中,描述了当与IgG1-K409R组合时,在F405位的某些单突变足以使人IgG1能够参加Fab臂互换。为了测试其它涉及CH3域中的Fc:Fc界面位置的決定簇是否也可介导Fab臂互换机制,进行了IgG1407位的诱变,并针对与人IgG1-K409R组合参加2-MEA诱导的Fab臂互换而测试突变体。将所有可能的IgG1—2F8-Y407X突变体(除了C和P以外)与IgG1—7D8-K409R组合。按照实施例19所述用纯化的抗体进行操作。

[0484] 图24显示在IgG1—2F8-Y407X x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换后双特异性结合的结果。如表4所呈现,也将这些数据评分为(-)无Fab臂互换、(+/-)低度、(+)中度或(++)高度Fab臂互换。发现当IgG1—2F8的407位是Y(=野生型IgG1)、E、K、Q或R时无Fab臂互换(-)。发现Fab臂互换当IgG1—2F8的407位是D、F、I、S或T时为低度的(+/-),当IgG1—2F8的407位是A、H、N或V时为中度的(+),当IgG1—2F8的407位是G、L、M或W时为高度

的(++)。这些数据提示当与IgG1-K409R组合时在IgG1407位的特定单突变允许IgG1参加2-MEA诱导的Fab臂互换。

[0485] 表4:在IgG1-2F8-Y407X突变体与IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换

[0486] 通过夹心ELISA确定在IgG1-2F8-Y407X突变体与IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。(–)无, (+/-)低度, (+)中度, (++)高度Fab臂互换。

[0487]

IgG1-2F8-Y407X	Fab臂互换 x IgG1-7D8-K409R
A	+
D	+/-
E	-
F	+/-
G	++
H	+
I	+/-
K	-
L	++
M	++
N	+
Q	-
R	-
S	+/-
T	+/-
V	+
W	++
Y	-

[0488] 实施例30:在IgG1异二聚体中非共价CH3-CH3相互作用的量化

[0489] 在实施例21中描述了有允许有效的Fab臂互换的CH3-CH3同二聚体相互作用强度的具体范围。在CH3界面的相互作用的强度应当使得亲代抗体(同二聚体)中两条重链在Fab臂互换反应都有可能解离并且接着在异二聚体反应中有可能缔合。为了产生稳定的异二聚体,异二聚体相互作用的强度应当大于同二聚体相互作用的强度,使得相对于同二聚体而言利于异二聚体化。为了证实此,测量异二聚体中CH3-CH3相互作用的强度并与同二聚体的强度比较。按照实施例21所述测量从IgG1-K409R、IgG1-F405L和IgG1-ITL同二聚体衍生的CH2-CH3片段的 K_D 。对于异二聚体中 K_D 的确定,将CH2-CH3域片段(G1-F405L和G1-ITL)和含有除铰链外的所有抗体域的IgG1-7D8-K409R的IgG1 Δ 铰链片段混合。在两条片段中都缺乏铰链区防止共价的重链间二硫键。将片段混合,24小时后如实施例21所述通过天然质谱分析。表5呈现在所示CH2-CH3片段或者CH2-CH3片段与IgG1 Δ 铰链混合物中非共价CH3-CH3相互作用的 K_D 值。这些数据提示在测试条件下,异二聚体相互作用的强度大于(更低 K_D)相应的同二聚体相互作用。

[0490] 表5

	CH2-CH3 构建体/(IgG1A 较链)	相互作用	K_D (M)
	G1-F405L/G1-K409R	异二聚体	1.2×10^{-8}
[0491]	G1-ITL/G1-K409R	异二聚体	1.7×10^{-8}
	G1-K409R	同二聚体	1.1×10^{-7}
	G1-F405L	同二聚体	8.5×10^{-7}
	G1-ITL	同二聚体	1.2×10^{-6}

[0492] 实施例31:通过2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性抗体的生物化学分析

[0493] 在PD-10脱盐柱(目录号17-0851-01;GE Healthcare)上纯化通过人IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体批次。接着,通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、高效大小排阻层析(HP-SEC)、质谱法、HPLC阳离子交换层析(HPLC-CIEX)、毛细管等电聚焦(cIEF)分析双特异性产物的纯度。

[0494] 按照实施例15所述在非还原(图25A)和还原(图25B)条件下进行SDS-PAGE。图25A显示在2-MEA诱导Fab臂互换后的抗体样品由完整IgG和在非还原凝胶上可检测到的痕量半分子(H1L1)组成。

[0495] 按照实施例15所述进行HP-SEC。图26(B)和图26(A)分别显示原料IgG1—2F8-F405L和IgG1—7D8-K409R的HP-SEC曲线。图26C和图26D分别显示两种抗体的混合物(1:1)和通过IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性产物。此外,图26D显示>99%样品由完整IgG组成,几乎不形成聚集物。

[0496] 按照实施例12所述进行质谱法(ESI-MS)。图27(B)和图27(A)分别显示原料IgG1—2F8-F405L和IgG1—7D8-K409R的质谱曲线图。图27C和图27D分别显示两种抗体的混合物(1:1)和通过IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性产物。在2-MEA诱导Fab臂互换的样品中的产物是146,159.7kDa,其与从IgG1—2F8-F405L ($146,289.0/2=73,145$) x IgG1—7D8-K409R ($146,028.0/2=73,014$) 衍生的双特异性产物完全相配。而且,双特异性抗体产物显示均匀的峰,提示不发生会导致产生再分的峰的轻链错配。这些数据显示2-MEA诱导的Fab臂互换产生双特异性IgG。用(*)表示的小峰来自分析前的不完全去糖基化。这些数据显示通过IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生双特异性抗体样品。

[0497] 用iCE280分析仪(Convergent Biosciences)进行毛细管等电聚焦(cIEF)。图28A和图28B分别显示原料IgG1—2F8-F405L和IgG1—7D8-K409R的cIEF曲线图。图28C和图28D分别显示两种抗体的混合物(1:1)以及通过IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R之间的Fab臂互换产生的双特异性产物。使用之前将所有样品脱盐。测定混合物的终浓度是0.3mg/mL IgG (0.35%甲基纤维素;2%载体两性电解质3-10;6%载体两性电解质8-10.5;0.5%pI标记物7.65和0.5%pI标记物10.10)。在3000V进行聚焦7分钟,通过电荷偶联的装置照相机获取全毛细管吸收图像。在校正峰曲线后,通过EZChrom软件分析数据。将pI标记物用(*)表示。这些数据显示通过IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生双特异性抗体样品。

[0498] 另一种研究单克隆抗体荷电同种型的技术是高压液相层析阳离子交换(HPLC-CIEX)。图29A和图29B分别显示原料IgG1—2F8-F405L和IgG1—7D8-K409R的HPLC-CIEX曲线图。图29C和图29D分别显示两种抗体的混合物(1:1)以及通过IgG1—2F8-F405L x IgG1—

7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性产物。将样品在流动相A (10mM NaPO₄, pH7.0) 中稀释至1mg/mL用于注入HPLC上。将不同荷电的IgG分子用ProPac®WCX-10, 4mm x250mm, 分析柱分离, 流速为1mL/min。用流动相A至流动相B (10mM NaPO₄, pH7.0, 0.25M NaCl) 的梯度进行洗脱, 在280nm进行检测。这些数据显示通过IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导Fab臂互换产生双特异性抗体样品。还显示阳离子交换是从异二聚体中分离残留同二聚体的有力工具。因此阳离子交换层析的另一种应用是精炼双特异性异二聚体, 即纯化掉互换后的任何残留的同二聚体。

[0499] 实施例32: 通过同时共表达两种同二聚体重组表达异二聚体

[0500] 为了说明当重组地共表达两种同二聚体时也发生异二聚体形成, 将HEK-293F细胞用编码IgG1-7D8-K409R和IgG1-2F8-F405重链和轻链的四种表达载体 (见实施例1) 以1:1:1:1比率共转染。按照实施例4所述在无血清条件下瞬时制备抗体。接着, 按照实施例5所述通过蛋白A层析纯化IgG。将纯化的IgG去糖基化, 然后按照实施例12所述通过电喷雾电离质谱法进行分析。

[0501] 表6显示IgG1-7D8-K409R和IgG1-2F8-F405重链和轻链的理论质量。

[0502] 表6: IgG1-7D8-K409R和IgG1-2F8-F405重链和轻链的理论质量

同二聚体	L-链 (Da)	H-链 (Da)
[0503] IgG1-2F8-F405	23252.8	49894.6
IgG1-7D8-K409R	23438.1	49579.0

[0504] 基于这些质量, 在理论上可以检测到下列IgG分子 (表7)。在最后一列中显示测量的质量 (图30)。

[0505] 表7: IgG1-7D8-K409R和IgG1-2F8-F40重链和轻链的理论检测值

IgG1-2F8-F405		IgG1-7D8-K409R		理论质量 (Da)	测量质量 (Da)
H-链	L-链	H-链	L-链		
2	2			146287	146284
		2	2	146026	146026
2			2	146657	146664
	2	2		145656	145660
2	1		1	146472	146477
	1	2	1	145841	145846
1	1	1	1	146157	146159
1	2	1		145971	145972
1		1	2	146342	146345

[0507] 146345和146159Da两种最丰富的峰分别代表掺入单条 (来自IgG1-7D8-K409R) 或两条轻链的异二聚体。检测到IgG1-7D8-K409R或IgG1-2F8-F405两者重链的同二聚体, 但只有少量。这些数据显示当两种同二聚体共表达时也发生异二聚体化。

[0508] 实施例33: 通过使用HPLC-CIEX监测2-MEA诱导的Fab臂互换的动力学和量化互换后的残留同二聚体

[0509] 按照实施例11所述通过2-MEA诱导Fab臂互换产生双特异性抗体。在本实施例中通

过在互换反应期间的各个时间点进行高压液相层析阳离子交换 (HPLC-CIEX; 如实施例31描述) 监测互换反应。

[0510] 将各自浓度为1mg/mL的同二聚体IgG1—2F8-F405L和IgG1—7D8-K409R以1:1摩尔比混合。在加入25mM2-MEA后,将样品置于HPLC的自动采样机中,在25°C预加温。图31A至31H分别显示在加入2-MEA后从t=0分钟至t=450分钟通过HPLC-CIEX获得的以不同时间间隔的八次连续注射。数据显示相当迅速地形成双特异性IgG,在135分钟后互换大部分同二聚体。在45分钟后出现的非均相异二聚体峰在接近180分钟后分辨为更均匀的峰,提示互换以不同阶段发生。另外,图32A显示用CIEX法检测到约3%残留同二聚体(箭头所示)。如所示,这种方法适合量化残余的同二聚体含量(同二聚体的洗脱显示于图32B),当互换反应几乎完成时)。

[0511] 实施例34:在各种2-MEA浓度、温度和孵育时间在高抗体浓度下通过2-MEA诱导的Fab臂互换产生双特异性抗体

[0512] 在高IgG浓度进行2-MEA诱导的Fab臂互换。研究2-MEA浓度、孵育温度和时间对互换量的影响。

[0513] 用IgG1—7D8-K409R x IgG1—2F8-F405L组合进行互换过程。将两种材料都用蛋白A亲和层析纯化。在材料的浓度>20mg/mL后,用HiPrep Q FF16/10(GE Health Care,#28—9365-43)进行相继的阴离子交换步骤(以流过的方式)。将最终的纯化材料缓冲液交换为PBS。

[0514] 在PBS中以20mg/mL(各种同二聚体终浓度为10mg/mL)和10mg/mL(各种同二聚体终浓度为5mg/mL)的终IgG浓度研究双特异性互换。对两种IgG浓度制备包括终浓度为10、25、50和100mM的2-MEA在内的单独混合物。将混合物以100 μ L等分试样分在eppendorf管中,贮存于15、25和37°C。单独的管用于在各种温度孵育90分钟、5小时和24小时的不同时间。

[0515] 对于两种IgG浓度还制备不含2-MEA的混合物,贮存于4°C作为未处理对照。在适当的孵育时间后,将90分钟和5小时样品收集用于脱盐以除去2-MEA(将90分钟样品最初放在冰上以终止互换反应)。用Zeba96孔脱盐板(7k,目录号89808,Thermo Fisher Scientific)使样品脱盐。在孵育24小时后使24小时样品单独脱盐。

[0516] 按照实施例7所述在夹心ELISA中用抗体样品的系列稀释液(对于90分钟和5小时样品,在3倍稀释液中的总抗体浓度10—0.123 μ g/mL;对于24小时样品,在3倍稀释液中的10—0.041 μ g/mL)测量双特异性结合。对于每个板,将对照包括为从IgG1—2F8-ITL与IgG4—7D8-CPPC之间2-MEA诱导的Fab臂互换衍生的双特异性抗体纯化批次(如描述于实施例15)。图34(A)–(F)显示在各自的ELISA板中测量的双特异性结合结果。最高的OD405值(如在ELISA中对10 μ g/mL浓度所确定的)用于计算与对照(将其任意设定为100%)相比的双特异性结合。这得到与对照相比受控Fab臂互换的百分数(%cFAE),如关于每种2-MEA浓度的图34(A)–(D)所示。

[0517] 数据显示在所有温度-时间条件下对于两种IgG浓度都在100mM2-MEA浓度达到最大水平的双特异性结合(与对照相比为89—109%)。在50mM2-MEA,最大结合(88—107%) 在25°C和37°C实现,在15°C孵育24小时后也实现。对于25mM和10mM2-MEA的更低浓度,互换在更高温度更有效,随着孵育时间延长而增加,在25mM2-MEA在37°C孵育24小时后导致最大互换。在10mM2-MEA下测试的条件不产生100%双特异性产物。与20mg/mL总IgG相比10mg/mL的

IgG浓度的互换过程稍微更快。

[0518] 为了证实形成双特异性抗体和更详细地研究双特异性产物,用阳离子交换(HPLC—CIEX)分析对样品进行分析。按照实施例31所述对5小时和24小时孵育后的使用20mg/mL IgG浓度和所有2-MEA浓度的样品进行HPLC—CIEX分析。

[0519] 图35(A)–(D)的CIEX层析图显示最高收率的双特异性产物在50和100mM 2-MEA下获得,证实双特异性ELISA的结果。但是,在50和100mM 2-MEA下仍然检测到少量残留同二聚体(对于在25°C和37°C孵育的样品为2—3.5%各种同二聚体)。在更高温度、更长(24小时)孵育时间和渐增的2-MEA浓度的互换导致在CIEX曲线图中在22–24分钟出现附加峰。

[0520] 当互换在5小时内结束时获得最少量附加峰。为了鉴定这些峰的性质,进行SDS—PAGE分析和HP—SEC分析。HP—SEC显示对于所有条件聚集物的量都低于1%,提示附加峰不代表聚集物。但是,非还原性SDS—PAGE显示额外的峰可代表缺乏一条或两条轻链的异二聚体。还检测到少量半分子。

[0521] 实验显示互换反应在高同二聚体浓度下发生(这使该方法对于商业规模具有吸引力),以及双特异性抗体的收率取决于2-MEA浓度、温度和孵育时间。

[0522] 实施例35:用于与IgG1-K409R组合参加2-MEA诱导的Fab臂互换的在IgG1368位的决定簇

[0523] 实施例28和29显示当与IgG1-K409R组合时在F405和Y407位的某些单突变足以使人IgG1能够参加Fab臂互换。如本实施例说明,其它涉及CH3域的Fc:Fc界面位置的决定簇也可介导Fab臂互换机制。为此目的,进行了IgG1368位的诱变,并测试了与人IgG1-K409R组合参加2-MEA诱导的Fab臂互换的突变体。将所有可能的IgG1—2F8-L368X突变体(除了C和P以外)与IgG1—7D8-K409R组合。按照实施例19所述用纯化的抗体进行操作。

[0524] 图36显示在IgG1—2F8-L368X x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换后双特异性结合的结果。如表8所呈现,还将这些数据评分为(-)无Fab臂互换、(+/-)低度、(+)中度或(++)高度Fab臂互换。发现当IgG1—2F8的368位是L(=野生型IgG1)、F或M时无Fab臂互换(-)。发现Fab臂互换当IgG1—2F8的368位是Y时为低度的(+/-)。发现Fab臂互换当IgG1—2F8的368位是K时为中度的(+),当IgG1—2F8的368位是A、D、E、G、H、I、N、Q、R、S、T、V或W时为高度的(++)。这些数据提示当与IgG1-K409R组合时在IgG1368位的特定突变允许IgG1参加2-MEA诱导的Fab臂互换。

[0525] 表8: IgG1-2F8-L368X突变体与IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换通过夹心ELISA确定IgG1—2F8-L368X突变体与IgG1—7D8-K409R之间的2-MEA诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。(-)无、(+/-)低度、(+)中度或(++)高度Fab臂互换。

[0526]

	Fab 臂互换 Fab 臂互换
IgG1-2F8-L368X	x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	++
H	++
I	++
K	+
L	-
M	-
N	++
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++

[0527] 实施例36:用于与IgG1-K409R组合参加2-MEA诱导的Fab臂互换的在IgG1370位的决定簇

[0528] 实施例28、29和35显示当与IgG1-K409R组合时在F405、Y407或L368位的某些单突变足以使人IgG1能够参加Fab臂互换。如本实施例说明,其它涉及CH3域的Fc:Fc界面位置的决定簇也可介导Fab臂互换机制。为此目的,进行了IgG1370位的诱变,并测试了与人IgG1-K409R组合参加2-MEA诱导的Fab臂互换的突变体。将所有可能的IgG1-2F8-K370X突变体(除了C和P以外)与IgG1-7D8-K409R组合。按照实施例19所述用纯化的抗体进行操作。

[0529] 图37显示在IgG1-2F8-K370X x IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的Fab臂互换后双特异性结合的结果。如表9所呈现,还将这些数据评分为(-)无Fab臂互换、(+/-)低度、(+)中度或(++)高度Fab臂互换。发现当IgG1-2F8的370位是K(=野生型IgG1)、A、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、R、S、T、V或Y时无Fab臂互换(-)。只有K370被W取代导致中度Fab臂互换(+)。这些数据提示当与IgG1-K409R组合时在IgG1370位只有一种突变(K370W)允许IgG1参加2-MEA诱导的Fab臂互换。

[0530] 表9: IgG1-2F8-K370X突变体与IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换通过夹心ELISA确定IgG1-2F8-K370X突变体与IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。(-)无、(+/-)低度、(+)中度或(++)高度Fab臂互换。

[0531]

IgG1-2F8-K370X	Fab 臂互换
	x IgG1-7D8-K409R
A	-
D	-
E	-
F	-
G	-
H	-
I	-
K	-
L	-
M	-
N	-
Q	-
R	-
S	-
T	-
V	-
W	+
Y	-

[0532] 实施例37:用于与IgG1-K409R组合参加2-MEA诱导的Fab臂互换的在IgG1399位的决定簇

[0533] 实施例28、29、35和36显示当与IgG1-K409R组合时在F405、Y407、L368或K370位的某些单突变足以使人IgG1能够参加Fab臂互换。如本实施例说明,其它涉及CH3域的Fc:Fc界面位置的決定簇也可介导Fab臂互换机制。为此目的,进行了IgG1399位的诱变,并测试了与人IgG1-K409R组合参加2-MEA诱导的Fab臂互换的突变体。将所有可能的IgG1-2F8-D399X突变体(除了C和P以外)与IgG1-7D8-K409R组合。按照实施例19所述用纯化的抗体进行操作。

[0534] 图38显示在IgG1-2F8-D399X x IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换后双特异性结合的结果。如表10所呈现,还将这些数据评分为(-)无、(+/-)低度、(+)中度或(++)高度Fab臂互换。发现当IgG1-2F8的399位是D(=野生型IgG1)、E和Q时无Fab臂互换(-)。发现Fab臂互换当IgG1-2F8的399位是V时为低度的(+/-),当IgG1-2F8的399位是G、I、L、M、N、S、T或W时为中度的(+)。发现Fab臂互换当IgG1-2F8的399位是A、F、H、K、R或Y时为高度的(++)。这些数据提示当与IgG1-K409R组合时在IgG1399位的特定突变允许IgG1参加2-MEA诱导的Fab臂互换。

[0535] 表10: IgG1-2F8-D399X突变体与IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换通过夹心ELISA确定IgG1-2F8-D399X突变体与IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的体外Fab臂互换后双特异性抗体的产生。(-)无、(+/-)低度、(+)中度或(++)高度Fab臂互换。

[0536]

IgG1-2F8-D399X	Fab 臂互换 x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	-
E	-
F	++
G	+
H	++
I	+
K	++
L	+
M	+
N	+
Q	-
R	++
S	+
T	+
V	+/-
W	+
Y	++

[0537] 实施例38:确定其中2-MEA诱导的Fab臂互换亚最佳地发生的条件范围以区分高度有效的IgG1突变体

[0538] 当使用25mM 2-MEA时在37°C有效地发生2-MEA诱导的Fab臂互换的过程。在这些条件下,大多数允许的IgG1突变体(如实施例19、28、29和35—37所述在368、370、399、405和407和/或409位具有某些单突变的IgG1)显示高水平的2-MEA诱导的Fab臂互换(80%—100%)。为了鉴定允许以最高效率区分IgG1突变体的实验条件,分别在15°C和20°C随时间推移研究四种不同的突变体组合(IgG1—2F8-F405S x IgG1—7D8-K409A、IgG1—2F8-D399R x IgG1—7D8-K409G、IgG1—2F8-L368R x IgG1—7D8-K409H和IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R)的2-MEA诱导的Fab臂。除温度、时间段和抗体稀释液(20、2、0.2和0.02μg/mL)的改变以外,按照实施例19所述进行操作。

[0539] 与最大互换(阳性对照)相比,在20°C四种突变体组合以不同速率发生2-MEA诱导的Fab臂互换。在孵育105分钟后IgG1—2F8-L368R x IgG1—7D8-K409H达到最大水平的互换,而在200分钟后IgG1—2F8-F405S x IgG1—7D8-K409A、IgG1—2F8-D399R x IgG1—7D8-K409G和IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R分别达到90%、85%和85%的最大值。

[0540] 将不同IgG1突变体组合在15°C孵育显示最明显的互换速率的差异(显示于图39)。在孵育60和105分钟后,四种突变体组合之间2-MEA诱导的Fab臂互换的差异是最极端的。与阳性对照相比,在孵育200分钟后Fab臂互换显示效率为100%(IgG1—2F8-L368R x IgG1—7D8-K409H)、85%(IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R和IgG1—2F8-D399R x IgG1—7D8-K409G)或65%(IgG1—2F8-F405S x IgG1—7D8-K409A)。

[0541] 实施例39:分析在亚最佳条件下突变体的2-MEA诱导的Fab臂互换效率

[0542] 当使用25mM 2-MEA时在37°C有效地发生2-MEA诱导的Fab臂互换过程。在这些条件下,大多数允许的IgG1突变体(如实施例19、28、29和35—37所述在368、370、399、405和407

和/或409位具有某些单突变的IgG1)显示高水平的2-MEA诱导的Fab臂互换(80—100%)。在实施例38中描述了在所谓亚最佳条件下孵育后,即在15℃孵育60至105分钟后,2-MEA诱导的Fab臂互换效率的差异最明显。选择总计24种显示与IgG1—7D8-K409R有>90%2-MEA诱导的Fab臂互换(实施例28、29和35—37)的在L368、D399、F405和Y407的IgG1—2F8突变体(见表11),并将其与IgG1—7D8-K409A、G、H或R(基于实施例19报道的结果进行Fab臂互换分析)。为了根据这些突变体组合产生双特异性抗体的效率将其分类,在15℃将2-MEA诱导的Fab臂互换进行90分钟(亚最佳条件)。将在与IgG1—7D-K409R孵育后显示弱2-MEA诱导的Fab臂互换的两种IgG1—2F8突变体(Y407Q和D399Q)(实施例29和37),一起作为额外的阴性对照,用于研究与在K409位的另一种氨基酸(G、H或W)孵育是否导致不同结果。除了改变温度和改变抗体稀释液(20、2、0.2和0.02ug/mL)外,按照实施例19所述进行操作。

[0543] 将所有不同IgG1突变体组合(如根据表11变得清楚)在15℃孵育90分钟显示一定范围的不同2-MEA诱导的Fab臂互换效率。在20μg/mL抗体浓度的双特异性结合结果显示于表11。将结果分为4类:无(-)、低度(+/-)、中度(+)和高度(++)双特异性结合效率,如在表11下方的说明所规定的。从这些结果清楚的是,在亚最佳条件下IgG1分子中一些氨基酸突变的组合将有利于2-MEA诱导的Fab臂互换。

[0544] 表11:在15℃达90分钟在允许的IgG1突变体(20μg/mL)之间的双特异性结合(相对于阳性对照的%)

[0545]

Fab 臂互换	IgG1-7D8-K409A	IgG1-7D8-K409G	IgG1-7D8-K409R	IgG1-7D8-K409H
IgG1-2F8-L368A	33	33	25	37
IgG1-2F8-L368D	49	50	41	54
IgG1-2F8-L368E	32	38	37	42
IgG1-2F8-L368G	46	53	44	53
IgG1-2F8-L368H	26	25	21	29
IgG1-2F8-L368N	47	52	43	54
IgG1-2F8-L368R	55	64	52	91
IgG1-2F8-L368S	39	45	37	53
IgG1-2F8-L368T	42	51	39	56
IgG1-2F8-L368V	42	49	33	51
IgG1-2F8-L368W	56	56	41	60
IgG1-2F8-D399F	13	15	14	15
IgG1-2F8-D399H	12	14	10	19
IgG1-2F8-D399K	40	43	34	46
IgG1-2F8-D399R	47	45	38	52
IgG1-2F8-D399Q	0	0	0	0
IgG1-2F8-F405I	32	49	39	60
IgG1-2F8-F405K	29	48	47	40
IgG1-2F8-F405L	31	44	39	46
IgG1-2F8-F405S	34	51	45	39
IgG1-2F8-F405T	35	47	42	46
IgG1-2F8-F405V	36	46	37	43
IgG1-2F8-F405W	17	20	16	18
IgG1-2F8-Y407L	44	41	49	49
IgG1-2F8-Y407W	48	53	47	62
IgG1-2F8-Y407Q	4	9	1	44

关于表 11 的说明
无(0-3%)双特异性结合(-)
低度(4-39%)双特异性结合(+/-)
中度(40-69%)双特异性结合(+)
高度(70-100%)双特异性结合(++)

[0546] 从测试的突变IgG1—2F8分子(表11)中,选择了六种进行第二次分析以证实之前获得的结果(表11)。针对它们的高度(IgG1—2F8-L368R)和中度(IgG1—2F8-L368W、IgG1—2F8-F405I、IgG1—2F8-F405L和IgG1—2F8-Y407W) 2-MEA诱导的Fab臂互换的效率,选择了数种突变体。还第二次分析了IgG1—2F8-Y407Q,因为它与IgG1—7D8-K409H显示意想不到的阳性2-MEA诱导的Fab臂互换反应。大体上,这些结果(在图40中呈现)证实了初期的分析(表11),显示突变IgG1—2F8分子与IgG1—7D8-K409H的2-MEA诱导的Fab臂互换反应具有最高效率。此外,在实施例28、29和35—37报道为阴性的突变IgG1—2F8分子与IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换反应,仍然引人关注,因为有可能促进IgG12-MEA 诱导的Fab臂互换。

[0547] 实施例40:使用双特异性形式除去拮抗性c-Met抗体的不良激动性活性,从而将其

转化为单价、双特异性形式

[0548] 几种开发用于单克隆抗体疗法的二价抗体在与其靶标结合后显示不良的激动性活性。对于大部分靶向受体酪氨酸激酶c-Met的基于IgG1的受体也是这样。这些激动性抗体诱导受体二聚体化,然后活化几种下游信号转导途径。结果诱导(肿瘤)细胞的生长和分化。使用单价抗体形式可防止诱导受体二聚体化。抗-c-Met抗体Fab臂与无关抗体Fab臂的组合产生在功能上为单价并因此完全拮抗性的双特异性抗体。这里我们将部分-(IgG1—069)或完全(IgG1—058)激动性抗体与IgG1-b12(首先描述于Burton DR等,“Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody (重组人单克隆抗体有效中和HIV-1的初级分离物)”, Science. 1994年11月; 266 (5187): 1024—1027)组合在双特异性抗体中。将IgG1-b12视为无关的非结合抗体,因为它针对病毒蛋白(HIV-gp120)而产生。用于本实施例的抗-c-Met抗体是在转基因小鼠产生的完全人单克隆抗体。IgG1—058和IgG1—069结合至c-Met上的不同表位。

[0549] 所用的两种抗-c-Met抗体是如进一步公开的在其Fc区有修饰的IgG1, κ抗体。它们具有下列重链和轻链可变序列。

[0550] 058:

[0551] VH 058	EVQLVESGGGLV KPGGSLKLS CAASGFTFS DYYMYWVRQTPEKRLEWVATISD DGSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSLKSEDTAMY YCAREGLYYYYGS GSYYNQDYWGQGT LVTVSS
VL 058	AIQLTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIYDASS LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFTSYPQITFGQGT RLE IK

[0552] 069:

[0553] VH 069	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLEWGMWISA YNGYTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYF DYWGQGT LVTVSS
VL 069	DIQMTQSPSSVSASV GDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASS LLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGT RLEI K

[0554] 受体磷酸化

[0555] 单价双特异性c-Met抗体利用25mM2-MEA通过如实施例23所述的IgG1—058-F405L或IgG1—069-F405L与IgG1-b12-K409R的Fab臂互换反应产生。评价双特异性抗体对c-Met磷酸化的作用。在通过天然配体HGF或通过激动性二价抗体使两个相邻c-Met受体二聚体化后,在c-Met胞内域中的三个酪氨酸残基(1230、1234和1235位)交叉磷酸化。这导致c-Met胞内域中几个其它氨基酸磷酸化和多个信号转导级联活化。可通过使用对在这些位置的磷酸化受体具有特异性的抗体监测c-Met的二聚体化和活化,这作为抗-c-Met抗体可能的激动性的读出起作用。

[0556] 使A549细胞(从ATCC获得的CCL-185),在含血清的DMEM培养基中生长直至达到70%汇合。将细胞用胰蛋白酶消化,洗涤,以 1×10^6 个细胞/孔接种在6孔培养板的含血清的培养基中。孵育过夜后,将细胞用HGF(R&D系统;目录号294-HG)(50ng/mL)或抗体组(30μg/

mL) 处理,在37℃孵育15分钟。将细胞用冰冷PBS洗涤2次,用裂解缓冲液(Cell Signaling; 目录号9803)裂解,所述裂解缓冲液补充有蛋白酶抑制剂混合物(Roche; 目录号11836170001)。将细胞裂解物样品贮存于-80℃。用磷酸化c-Met特异性抗体通过在蛋白质印迹法检测c-Met磷酸化来确定受体活化。将存在于细胞裂解物中的蛋白在4—12%SDS—PAGE凝胶上分离,转移至硝酸纤维素膜,接着将其用对磷酸化c-Met特异的抗体(Y1234/1235)(Cell Signaling, 目录号3129)染色。作为对凝胶上样的对照,用抗c-Met(Cell Signaling, 目录号3127)和抗β-肌动蛋白(Cell Signaling, 目录号4967)抗体确定总β-肌动蛋白和c-Met水平。蛋白质印迹法的结果显示于图41。

[0557] 组织培养基对照和用抗体5D5(Genentech; W096/38557)的单价形式UniBody®(Genmab, W02007059782和W02010063785)处理的细胞不显示任何c-Met受体磷酸化。用于本文的单价UniBody形式是IgG4,其中铰链区已缺失以及其中CH3区已在405和407位突变。相反,用阳性对照HGF或激动性抗体IgG1—058处理的细胞的蛋白质印迹分析在磷酸化c-Met的预期高度显示清楚的带。部分激动性抗体IgG1—069显示较小、但可检测的受体磷酸化,提示受体发生一些交联。但是,双特异性IgG1058/b12和双特异性069/b12抗体两者都一点也不诱导c-Met磷酸化,显示完全不存在与亲代抗体关联的激动活性(图41)。

[0558] c-Met抗体对NCI-H441体外增殖的作用

[0559] 在肺腺癌细胞系NCI-H441(ATCC, HTB-174™)体外测试c-Met抗体可能的增殖激动活性。这种细胞系表达高水平的c-Met,但不产生其配体HGF。将NCI-H441细胞接种在96孔组织培养板(Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany)(5,000个细胞/孔)的不含血清的RPMI(Lonza)中。将抗c-Met抗体在不含血清的RPMI培养基中稀释至66,7nM,并加至细胞。在37℃/5%CO₂孵育7天后,按照制造商说明书用Alamarblue(BioSource International, San Francisco, US)量化活细胞的量。用具有标准Alamarblue设置的EnVision2101Multilabel 读数器(PerkinElmer, Turku, Finland)监测荧光。

[0560] 与IgG1—069相反的是,将NCI-H441细胞与双特异性IgG1—069/b12孵育后不诱导增殖,如图42所示。UniBody-069对照也不诱导增殖,与无处理或IgG1-b12处理的可相比。

[0561] 实施例41:通过人IgG1-2F8-F405L或IgG1-7D8-F405L与IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性抗体的CDC介导的细胞杀伤

[0562] CD20抗体IgG1—7D8可通过补体依赖性细胞毒性(CDC)有效地杀伤CD20表达细胞。相反,EGFR抗体IgG1—2F8对表达EGFR的靶细胞不介导CDC。IgG1—7D8-K409R和通过IgG1—2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体两者都能够对CD20表达细胞诱导CDC(如描述于实施例26)。测试通过IgG1—7D8-F405L与IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性抗体是否也可对CD20表达细胞诱导CDC。将10⁵个Daudi或Raji细胞与一系列浓度的抗体在100μL补充0.1%BSA的RPMI培养基中在振荡器上在室温预孵育15分钟。加入25μL正常人血清(NHS)作为补体来源(20%NHS终浓度),在37℃孵育45分钟。在孵育后,将板置于冰上以终止CDC反应。通过加入10μL10μg/mL碘化丙啶(PI)(0.6μg/mL终浓度)和FACS分析区分死细胞和活细胞。

[0563] 图43显示IgG1—7D8和通过IgG1—7D8-F405L与IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生的双特异性产物,具有相同的诱导表达CD20的Daudi(图43A)和Raji(图43B)的CDC介导的细胞杀伤的功效。Daudi和Raji细胞两者都不表达EGFR,导致通过IgG2—

2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R之间2-MEA诱导Fab臂互换产生的双特异性抗体的单价结合。这种双特异性产物也诱导CDC介导的细胞杀伤,虽然有效性稍低。这些数据提示亲代抗体的CDC能力保留在双特异性形式中。与单价双特异性产物(IgG2-2F8-F405L x IgG1—7D8-K409R)相比,通过二价双特异性产物(IgG1—7D8-F405L x IgG1—7D8-K409R)诱导CDC介导的细胞杀伤稍微更有效。靶向CD20的11B8抗体不能诱导CDC介导的细胞杀伤,并发挥阴性对照的作用。

[0564] 实施例42:在体外κ定向的ETA' 杀伤测定中测试的HER2x HER2双特异性抗体本实施例显示使用κ定向的假单胞菌外毒素A(抗-κ—ETA') 在一股的体外基于细胞的杀伤测定中,在内化后HER2x HER2双特异性抗体可将细胞毒性剂递送入肿瘤细胞内。该测定使用与截短形式的假单胞菌外毒素A缀合的高亲和力抗κ域抗体。先前已报道类似的抗体结合蛋白(来自链球菌蛋白A或蛋白G的IgG-结合基序)和白喉毒素或假单胞菌外毒素A的融合蛋白(Mazor Y.等,J.Immunol.Methods2007;321:41—59);Kuo SR.等,2009Bioconjugate Chem.2009;20:1975—1982)。与抗-κ—ETA' 相反,这些分子结合完整抗体的Fc部分。在内化和细胞内吞分选后,抗-κ—ETA' 域抗体发生蛋白水解和二硫键还原,将催化域和结合域分离。然后将催化域从高尔基体经KDEL保留基序转运至内质网,接着易位至胞质,在此抑制蛋白合成和诱导凋亡(Kreitman RJ.等,BioDrugs2009;23:1—13)。

[0565] 用于本实施例和以下实施例43-45的抗-HER2抗体是在转基因小鼠中产生的完全人单克隆抗体。它们结合至HER2上的不同表位。

[0566] 它们全都是如进一步公开的在其Fc区被修饰的IgG1,κ抗体。它们具有下列重链和轻链可变序列。

[0567] 005:

[0568] VH 005	EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKASGYSFHFYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPG DSDTRYRPSFQGGVTTISADKSI STAYLQWTSCLKASDTAIYYCARQRGDYFFYFG MDVWGQGTITVTVSS
VL 005	EIVLTQSPGTL SLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQVPRLLIYGASS RATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYQSS-LTFGGGTKVEIK

[0569] 025:

[0570] VH 025	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGETIHH GSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYYDSGVYFFD YWAQGTITVTVSS
VL 025	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSL RSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTTRLEIK

[0571] 153:

[0572] VH 153	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYV IHWVRQAPGKGLEWTVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSAEDTAMYYCARGGITGTTGVF DYWGQGTITVTVSS
VL 153	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYDASSL QSGVPSRFSGSGYGTDFSLTISLQPEDFAIYYCQQYKSYPIITFGQGTTRLEIK

[0573] 169:

[0574]	VH 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWSAY SGNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYF DYWGQGTLLVTVSS
	VL 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFLTLTSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGGQTKVEIK

[0575] 在与A431细胞孵育之前,将HER2x HER2双特异性抗体与抗- κ -ETA' 预孵育。A431细胞表达~15,000HER2抗体/细胞(经由Qifi分析确定),对用“裸”HER2-抗体处理不敏感。

[0576] 首先,确定各细胞系抗- κ -ETA' 的最佳浓度,即不诱导非特异性细胞死亡的最大耐受剂量。将A431细胞(2500个细胞/孔)接种在96孔组织培养板(Greiner bio-one)的正常细胞培养基中,让其附着至少4小时。将这些细胞与抗- κ -ETA' 系列稀释液(100、10、1、0.1、0.01、0.001和0 μ g/mL)孵育在正常细胞培养基中。3天后,根据制造商说明书用Alamarblue (BioSource International, San Francisco, US) 量化活细胞的量。用具有标准Alamarblue 设置的EnVision2101Multilabel 读数器(PerkinElmer, Turku, Finland) 监测荧光。自身不杀伤细胞的最高浓度的抗- κ -ETA' (对于A431细胞为1 μ g/mL) 用于以下实验。

[0577] 接着,针对它们诱导细胞杀伤的能力测试与抗- κ -ETA' 预孵育的HER2x HER2双特异性抗体和HER2单特异性抗体的效应。如上所述接种A431细胞。制备HER2特异性抗体(单特异性和双特异性抗体)的系列稀释液,与预定浓度的抗- κ -ETA' 预孵育30分钟,然后将其加至细胞。在37 $^{\circ}$ C孵育3天后,如上所述量化活细胞的量。将与抗体预孵育的抗- κ -ETA' 处理的细胞的Alamarblue信号与无抗体处理的细胞相比作图。用GraphPad Prism5软件计算EC₅₀值和最大细胞死亡。星形孢菌素(23.4 μ g/mL) 用作细胞杀伤的阳性对照。同种型对照抗体(IgG1/ κ ; IgG1-3G8-QITL) 用作阴性对照。

[0578] 图44显示所有抗- κ -ETA' 预孵育的HER2双特异性抗体都能够以剂量依赖性方式杀伤A431细胞。这些结果证明,大多数被测HER2双特异性抗体在该抗- κ -ETA' 测定中比存在于组合中的单特异性抗体更有效。此外,双特异性抗体005X169、025X169和153X169的功效显示,在这种体外 κ -定向的ETA' 杀伤中缺乏活性的单特异性抗体(HER2特异性抗体169)的功效可通过与另一种HER2特异性抗体的双特异性组合而得以增加。

[0579] 实施例43:通过与靶向不同HER2表位的双特异性抗体孵育下调HER2受体

[0580] HER2x HER2双特异性抗体可在两个空间不同的HER2受体上结合两个不同表位。这可允许其它HER2x HER2双特异性抗体结合这些受体上的剩余表位。这可导致多价受体交联(与通过单价抗体诱导的二聚体化相比)并从而增强受体下调。为了研究HER2x HER2双特异性抗体是否诱导HER2下调增强,将AU565细胞与抗体和双特异性抗体孵育3天。确定HER2的总水平和抗体结合的HER2的水平。

[0581] 将AU565细胞接种在24孔组织培养板(100,000个细胞/孔)的正常细胞培养基中,在10 μ g/mL HER2抗体或HER2x HER2双特异性抗体的存在下在37 $^{\circ}$ C培养3天。在用PBS洗涤后,通过将细胞与25 μ L Surefire裂解缓冲液(Perkin Elmer, Turku, Finland) 在室温孵育30分钟使细胞裂解。按照制造商的方案用二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA) 蛋白测定试剂(Pierce) 量化总蛋白水平。用HER2-特异性夹心ELISA分析裂解物中的HER2蛋白水平。兔抗人HER2胞内域抗体(Cell Signaling) 用于捕获HER2和生物素化山羊抗人HER2多克隆抗体(R&D system, Minneapolis, USA),然后将链霉抗生物素蛋白-聚-HRP用于检测结合的

HER2。用2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS:将1小片ABTS稀释于50mL ABTS缓冲液[Roche Diagnostics,Almere,Netherlands])显示反应,并用草酸(Sigma—Aldrich,Zwijndrecht,The Netherlands)终止。在微量滴定板读数器(Biotek Instruments,Winooski,USA)上测量405nm处的荧光,将HER2的量用与未处理细胞相比的百分数表示。

[0582] 结果显示于图45,其证明所有被测HER2x HER2双特异性抗体诱导 $\geq 40\%$ HER2下调。有趣的是,所有HER2x HER2双特异性抗体与其单特异性对应物两者相比都显示HER2下调增加。

[0583] 实施例44:通过共聚焦显微术分析的HER2x HER2双特异性抗体与溶酶体标记物LAMP1的共定位

[0584] 在实施例43描述的HER2下调测定显示HER2x HER2双特异性抗体能够增加HER2的溶酶体降解。为了证实这些发现,应用了共聚焦显微术。使AU565细胞在盖玻片(厚度1.5微米,Thermo Fisher Scientific,Braunschweig,Germany)上在标准组织培养基中在37°C生长3天。将细胞与亮抑酶肽(Sigma)预孵育1小时以阻断溶酶体活性,然后加入10ug/mL HER2单特异性抗体或HER2x HER2双特异性抗体。将细胞在37°C再孵育3或18小时。此后将其用PBS洗涤,在室温与4%甲醛(Klinipath)孵育30分钟。将玻片用封闭缓冲液(补充0.1%皂苷[Roche]和2%BSA[Roche]的PBS)洗涤,与含20mM NH_4Cl 的封闭缓冲液孵育20分钟以猝灭甲醛。将玻片再用封闭缓冲液洗涤,在室温与小鼠抗人CD107a(LAMP1)(BD Pharmingen)孵育45分钟使溶酶体染色。在用封闭缓冲液洗涤后,将玻片在室温与第二抗体混合物:山羊抗小鼠IgG-Cy5(Jackson)和山羊抗人IgG-FITC(Jackson)孵育30分钟。将玻片再用封闭缓冲液洗涤,用20 μL 固定介质(使6克甘油[Sigma]和2.4克Mowiol4—88[Omnilabo]溶于6mL蒸馏水中,向其内加入12mL0.2M Tris[Sigma]pH8.5,然后在50—60°C孵育10分钟。将固定介质分成等份,贮存于-20°C。)在显微镜玻片上固定过夜。将玻片用配备63x1.32-0.6油浸物镜和LAS-AF软件的Leica SPE-II共聚焦显微镜(Leica Microsystems)成像。为了允许量化重叠的像素强度,应当避免像素饱和。因此将FITC激光强度降低至10%,智能(smart)增益设为830V,智能偏移设为-9.48%。通过使用这些设置,在没有像素饱和的情况下清楚地呈现双特异性抗体,但单特异性抗体有时难以检测。为了比较单特异性与双特异性抗体之间的溶酶体共定位,对所有分析的共聚焦玻片都保持相同的这些设置。

[0585] 用MetaMorph[®]软件(版本Meta Series6.1,Molecular Devices Inc,Sunnyvale California,USA)分析12比特图像的共定位。将FITC和Cy5图像层叠输入,减去背景。对所有FITC图像和所有Cy5图像使用完全相同的阈值设置(手工设定)。将共定位描述为重叠区(ROI)d FITC的像素强度,其中ROI由所有Cy5阳性区构成。为了比较用几种HER2抗体或HER2x HER2双特异性抗体染色的不同玻片,用Cy5的像素强度标准化图像。山羊抗小鼠IgG—Cy5用于使溶酶体标记物LAMP1(CD107a)染色。LAMP1的像素强度在测试的各种HER2抗体或HER2x HER2双特异性抗体之间不应不同(一个细胞具有大约200.000的Cy5像素强度)。

[0586] FITC和Cy5共定位的标准化值=

[0587] $[(\text{TPI}-\text{FITC} \times \text{百分数FITC}-\text{Cy5共定位})/100] \times [200.000/\text{TPI}-\text{Cy5}]$

[0588] 在该式中,TPI代表总像素强度。

[0589] 对各种单特异性HER2抗体和HER2x HER2双特异性抗体呈现活细胞的百分数,如通

过与Cy5重叠的FITC像素强度所测量。对于描述的每种抗体或双特异性分子,从一片含有~1、3或>5个细胞的玻片分析3个不同图像。在每个玻片内的不同图像之间观察到显著差异。但是,当与其单特异性对应物相比时,显然所有HER2x HER2双特异性抗体都表现与溶酶体标记物LAMP1的共定位增加。这些结果提示一旦内化,HER2x HER2双特异性抗体有效地向溶酶体腔分选,使其适合双特异性抗体药物缀合方法。

[0590] 实施例45:在与HER2单特异性抗体或HER2X HER2双特异性抗体孵育后抑制AU565细胞的增殖

[0591] 测试HER2双特异性抗体体外抑制AU565细胞增殖的能力。由于在AU565细胞上的高HER2表达水平(如用Qifi-kit确定的每细胞~1.000.000拷贝),所以在这些细胞中HER2组成性地有活性,因此不依赖于配体诱导的异二聚体化。在96孔组织培养板(Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany)中,将每孔9.000AU565细胞在10 μ g/mL HER2抗体或HER2x HER2双特异性抗体的存在下接种在无血清的培养基中。作为对照,将细胞接种在不含抗体或双特异性抗体的无血清培养基中。3天后,按照制造商说明书用Alamarblue (BioSource International, San Francisco, US) 量化活细胞的量。用具备标准Alamarblue设置的EnVision2101Multilabel读数器(PerkinElmer, Turku, Finland) 监测荧光。将抗体处理细胞的Alamarblue信号作图为与未处理细胞相比的百分比。

[0592] 图47描述与HER2抗体和HER2XHER2双特异性抗体孵育后AU565细胞的Alamarblue荧光强度。包括Herceptin®(曲妥珠单抗)作为阳性对照,如由Juntilla TT.等,Cancer Cell 2009;15:429-440所述已证明Herceptin®抑制增殖。所有HER2x HER2双特异性抗体都能够抑制AU565细胞的增殖。在该测定中双特异性抗体:IgG1—005-ITL x IgG1—169-K409R和IgG1—025-ITL x IgG1—005-K409R都比其单特异性抗体对应物更有效。

[0593] 实施例46:在Fc区含有一个或两个FcRn结合位点的双特异性IgG1抗体和铰链缺失的IgG1双特异性抗体的FcRn结合的体外和体内分析

[0594] 本实施例说明不对称双特异性分子(即本发明的在每条Fab臂具有不同特征的分子)的制备。

[0595] 新生儿Fc受体(FcRn)是通过保护IgG免受降解而造成IgG的长血浆半衰期的原因。在抗体内化后,FcRn在内体中与抗体Fc区结合,其中在温和酸性环境(pH6.0)下相互作用稳定。在再循环至中性环境(pH7.4)的质膜后,相互作用丧失,抗体释放回循环内。抗体的Fc区含有2个FcRn结合位点,在CH2-CH3界面的每条重链中有一个结合位点。在抗体Fc区的H435A突变取消与FcRn的结合(Shields,R.L.等,J Biol Chem,2001,Firan,M.等,Int Immunol,2001),而且还认为铰链区影响FcRn结合(Kim,J.K.,等,Mol Immunol.,1995)。另外,已提出双价抗体与FcRn的结合在有效再循环中的作用超过单价抗体(Kim,J.K.,等,Scand J Immunol.,1994)。

[0596] 在本实施例中通过含有单个FcRn结合位点的不对称双特异性IgG1分子评价FcRn结合价的影响。通过不对称双特异性铰链缺失的IgG1(Uni-G1)分子评价铰链区的额外作用。

[0597] 通过人和小鼠FcRn ELISA测量不含或含有1或2个FcRn结合位点的双特异性IgG1或铰链缺失的IgG1(Uni-G1)分子的FcRn结合。按照实施例2、3、4和5所述制备抗体IgG1—2F8-ITL、IgG1—7D8-K409R和IgG1—7D8-K409R-H435A单特异性分子。按照实施例11所述制

备铰链缺失的IgG1分子Uni-G1—2F8-ITL、Uni-G1—7D8-K409R和Uni-G1—7D8-K409R—H435A单特异性分子。通过IgG1—2F8-ITL与IgG1—7D8-K409R或IgG1—7D8-K409R—H435A分子之间2-MEA诱导的Fab臂互换产生双特异性IgG1分子。通过将Uni-G1—2F8-ITL与Uni-G1—7D8-K409R或Uni-G1—7D8-K409R—H435A孵育制备双特异性铰链缺失的IgG1分子。将3倍稀释系列的单特异性和双特异性IgG1分子和铰链缺失的IgG1分子加至捕获在链霉抗生物素蛋白包被的elisa板上的生物素化人FcRn或小鼠FcRn中,接着在pH6.0和7.4孵育1小时。使用辣根过氧化物酶标记的山羊抗人(Fab')₂作为缀合物和ABTS作为底物,呈现结合的抗体和铰链缺失的IgG1分子。用EL808-Elisa-读数器测量结果为在405nm波长处的光密度。

[0598] 图48显示单价或二价IgG1抗体和铰链缺失的IgG1分子与人FcRn (A) 和小鼠FcRn (B) 在pH6.0和pH7.4的结合结果。正如预期,所有被测抗体((双特异性) IgG1和铰链缺失的IgG1分子两者)在pH7.4都不有效地结合FcRn(人和小鼠两者)。在微酸性条件(pH6.0)单特异性IgG1—2F8-ITL和从IgG1—2F8-ITL和IgG1—7D8-K409R产生的双特异性IgG1显示与FcRn的双价结合效率,虽然小鼠FcRn为人的3倍,它模拟FcRn结合的阳性对照(IgG1—2F8)。这提示ITL突变和K409R不妨碍与FcRn的结合。

[0599] 当在pH6.0比较IgG1分子与人和小鼠FcRn的结合时,可看到2对比1对比0个FcRn相互作用位点的明显作用(图XXA和B,pH6,左图)。IgG1—2F8-ITL、IgG1—7D8-K409R和IgG1—2F8-ITL/IgG1—7D8-K409R(2个FcRn结合位点)与对照(IgG1—2F8)可比地结合。具有0个FcRn结合位点的分子IgG1—7D8-K409R—H435A根本不显示结合。具有1个FcRn结合位点的分子IgG1—2F8-ITL/IgG1—7D8-K409R—H435A与具有2个FcRn结合位点的分子相比显示中度结合。

[0600] 图48(A),pH6.0,右图显示铰链缺失的IgG1分子(Uni-G1)与人FcRn的结合。当与对照IgG1分子(IgG1—2F8)相比时,所有铰链缺失的分子与人FcRn的相互作用受损,提示当在FcRn结合ELISA中评价时,铰链确实影响与FcRn的相互作用。当在pH6.0比较这些铰链缺失的分子与人FcRn的结合时,可看到2对比1对比0个FcRn相互作用位点无明显作用。

[0601] 但是,因为人IgG与小鼠FcRn的结合更强,所以当在pH6.0比较这些铰链缺失的IgG分子与小鼠FcRn的结合时,可看到2对比1对比0个FcRn相互作用位点的明显作用(图48(B),pH6.0,右图)。当与Uni-G1—2F8-ITL、Uni-G1—7D8-409R和Uni-G1—2F8-ITL/Uni—G1—7D8-K409R(2个FcRn结合位点)和Uni-G1—2F8-ITL—H435A(0个FcRn结合位点,无结合)的结合比较时,Uni-G1—7D8-K409R—H435A/Uni—G1—2F8-ITL(1个FcRn结合位点)的结合为中度的。

[0602] 实施例47:在体外细胞毒性测定中测试的Her2x CD3双特异性抗体

[0603] CD3是在成熟T细胞上表达的T细胞受体复合物的共受体。在双特异性抗体中CD3特异性抗体Fab臂与肿瘤抗原特异性抗体Fab臂的组合将导致T细胞对肿瘤细胞的特异性靶向,引起T细胞介导的肿瘤细胞裂解。同样,CD3阳性T细胞可靶向体内其他异常细胞、靶向受感染细胞或直接靶向病原体。

[0604] 产生了Her2x CD3双特异性抗体。Her2特异性Fab臂的重链和轻链可变区序列如关于实施例42的抗体153和169所示。CD3特异性Fab臂使用下列重链和轻链可变区序列:YTH12.5(序列如Routledge等,Eur J Immunol.1991,21(11):2717-25所述)

[0605]	VH YTH12.5	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSFPMAWVRQAPGKGLEWVSTIST SGGRYYRDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFRQYSGGF DYWGQGT LVTVSS
	VL YTH12.5	DIQLTQPNSVSTSLGSTVKLSCTLSSGNIENNYVHWYQLYEGRSPTTMIYDDD KRPDGV PDRFSGSIDRSSNSAFLT IHNVAIEDEAIYFCHSYVSSFN VFGGGTK LTVL

[0606] huCLB—T3/4 (序列Parren等, Res Immunol.1991,142 (9):749-63. Minor amino acid substitutions were introduced to make the sequence resemble the closest human germline (引入少量氨基酸取代以使序列类似于最接近的人种系) 如所述)

[0607]	VH huCLB- T3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSSYGMFWVRQAPGKGLEWVATI SRYSRYIYYPDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRPLY GSSPDYWGQGT LVTVSS
	VL huCLB- T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWYQQKPGQAPRLLIYDTS KLSGIPARFSGSGTDFLT ISSLPEDFAVYYCFQGSYPLTFGSGTK LEMR

[0608] 将所有抗体表达为如下所述在其Fc区修饰的IgG1, κ : IgG1-Her2—153-K409R和IgG1-Her2—153-N297Q-K409R, IgG1-Her2—169-K409R, IgG1-hu-CLB—T3/4-F405L和IgG1-hu-CLB—T3/4-N297Q-F405L, IgG1-YTH12.5-F405L和IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L。

[0609] 按照实施例11所述从这些Her2和CD3特异性抗体产生双特异性抗体, 用AU565细胞在体外细胞毒性测定中对其进行测试。

[0610] 将AU565细胞培养至接近汇合。将细胞用PBS洗涤2次, 在37°C用胰蛋白酶消化5分钟。加入12mL培养基以钝化胰蛋白酶, 使细胞以800rpm离心5分钟。使细胞再悬浮于10mL培养基中, 通过使细胞穿过细胞滤网 (cellstrainer) 制造单细胞混悬液。将100 μ L 5×10^5 个细胞/mL混悬液加至96孔培养板的各孔, 将细胞在37°C、5%CO₂孵育至少3小时以让其贴板。

[0611] 根据制造商的方案 (Greiner Bio-one), 将外周血单核细胞 (PBMC) 用Leucosep30mL管从健康志愿者的血液分离出。将T细胞用非接触式人T细胞动态珠粒试剂盒 (Untouched Human T-cells Dynabead kit) (Dyna1) 通过阴性选择从PBMC制备物中分离出。使分离的细胞再悬浮于培养基中至 7×10^6 个细胞/mL终浓度。

[0612] 将培养基从附着的AU565细胞中除去, 用50 μ L/孔2x浓缩抗体稀释液和50 μ L/孔 7×10^6 个T细胞/mL (效应器: 靶标比=7:1) 替换。将板在37°C、5%CO₂孵育3天。弃去上清液, 将板用PBS洗涤2次。向各孔内加入150 μ L培养基和15 μ L Alamar蓝。将板在37°C、5%CO₂孵育4小时, 测量吸光度 (Envision, Perkin Elmer)。

[0613] 图49显示虽然对照抗体 (Her2单特异性IgG1-Herceptin、CD3单特异性IgG1-YTH12.5和单特异性IgG1-huCLB—T3/4、无关抗原单特异性IgG1-b12、和CD3x b12双特异性抗体) 不诱导T细胞介导的细胞毒性, 但双特异性 (Duo) Her2x CD3抗体huCLB/Her2—153、huCLB/Her2—169、YTH12.5/Her2—153和YTH12.5/Her2—169诱导AU565细胞的剂量依赖性T细胞介导的细胞毒性。含有Her2—169的双特异性抗体比含有Her2—153的双特异性抗体更有效。

[0614] 制备了IgG1-hu-CLB—T3/4、IgG1-YTH12.5和Her2—153的突变体, 其含有N297Q突

变以除去糖基化位点；在该位点的糖基化对IgG-Fc γ 受体相互作用是关键的关键的 (Bolt S等, Eur J Immunol1993,23:403-411)。图49显示Her2x CD3双特异性抗YTH12.5/Her2—153和 huCLB/Her2—153的N297Q突变和因此的Fc糖基化缺乏不影响诱导AU565细胞的剂量依赖性 T细胞介导的细胞毒性的潜能。

<211> 107
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 2

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

[0002]

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35

40

45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

[0003]

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

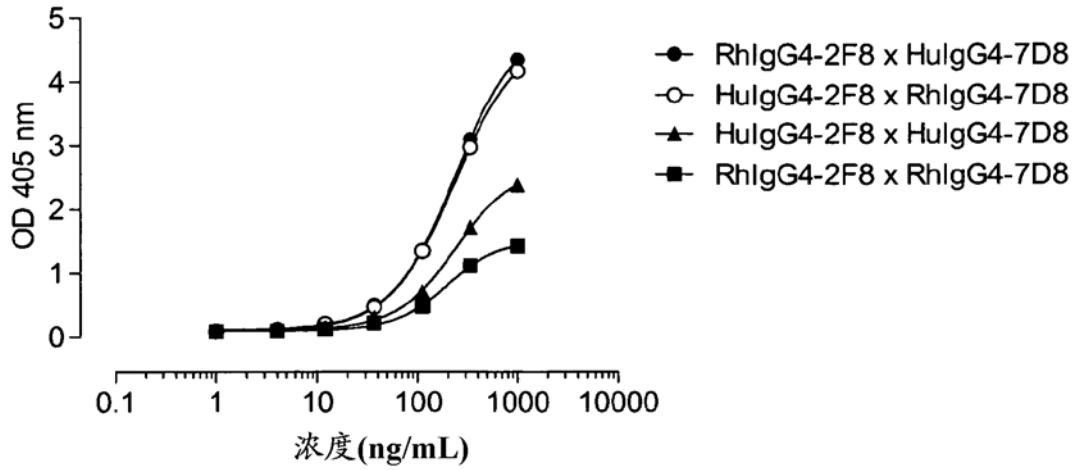


图 1

物种 (通用名)	同种型	氨基酸位置*																					
		核心铰链					CH3-CH3 界面																
		226	227	228	229	230	347	349	350	351	366	368	370	392	394	395	397	398	399	405	407	409	
人类(<i>Homo sapiens</i>)	IgG1	C	P	P	C	P	Q	Y	T	L	T	L	K	K	T	P	V	L	D	F	Y	K	
	IgG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	
	IgG3	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	M	-	-	-	-	-	
	IgG4	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R
猕猴(<i>Macaca mulatta</i>) (恒河猴)	IgG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	IgG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	IgG3	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	IgG4 (In)**	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-
	IgG4 (Ch)***	-	-	A	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-

*EU 编号 **In, 印度 ***Ch, 中国

图 2

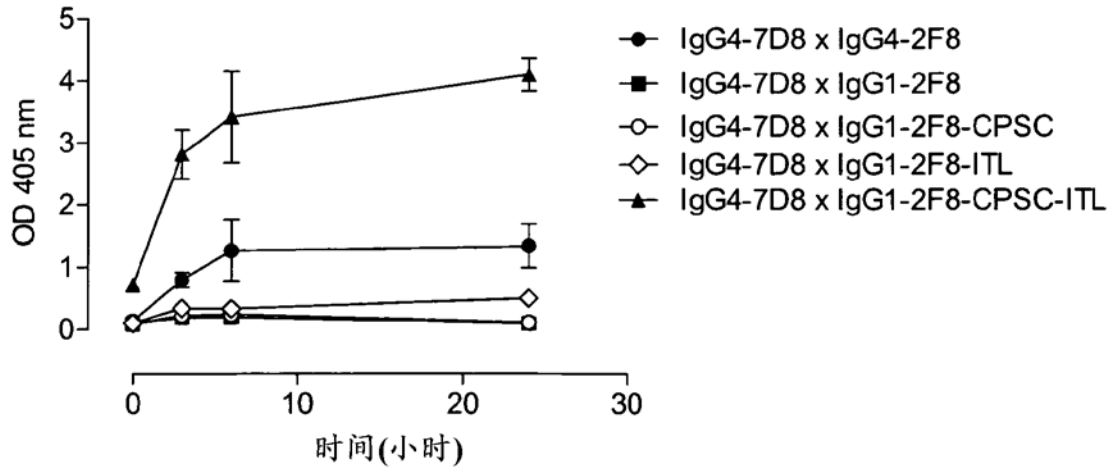


图 3

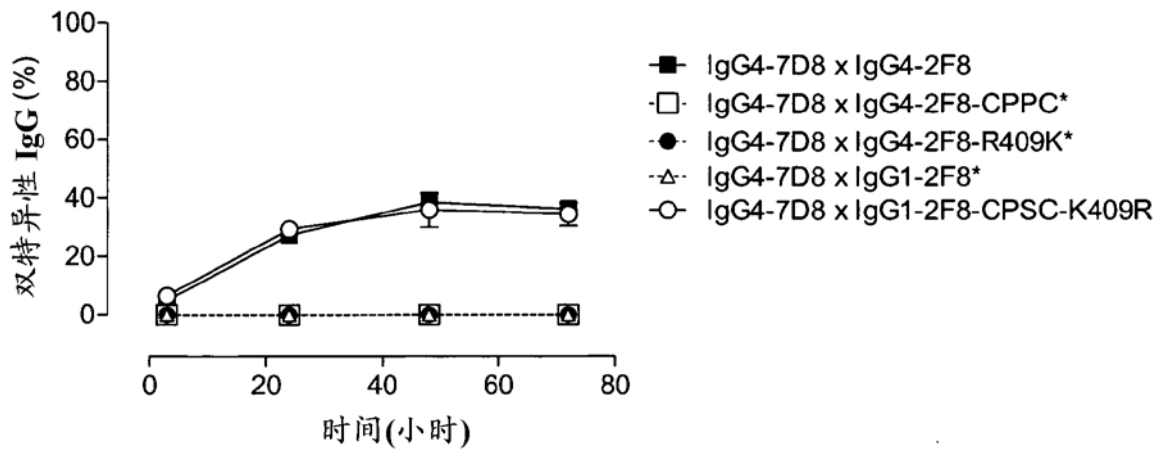


图 4

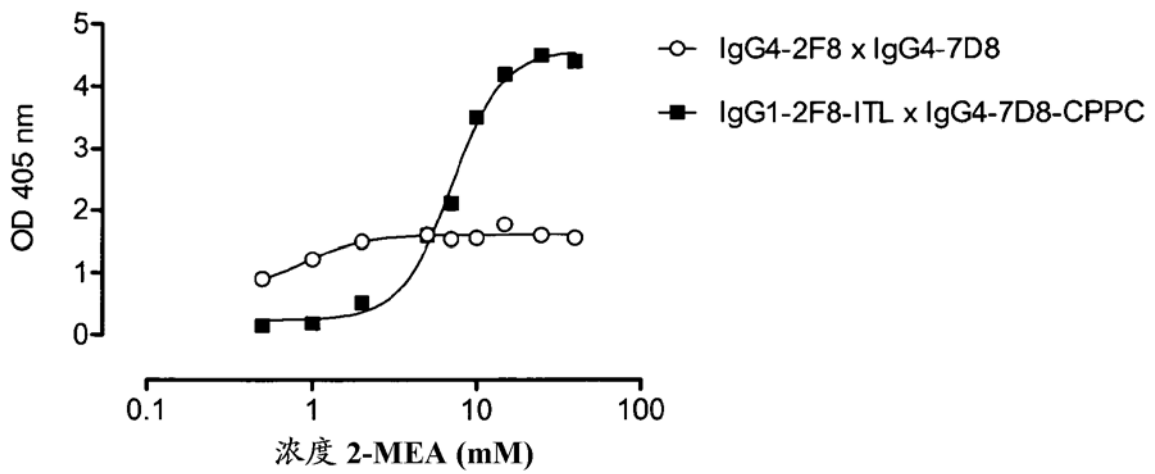


图 5

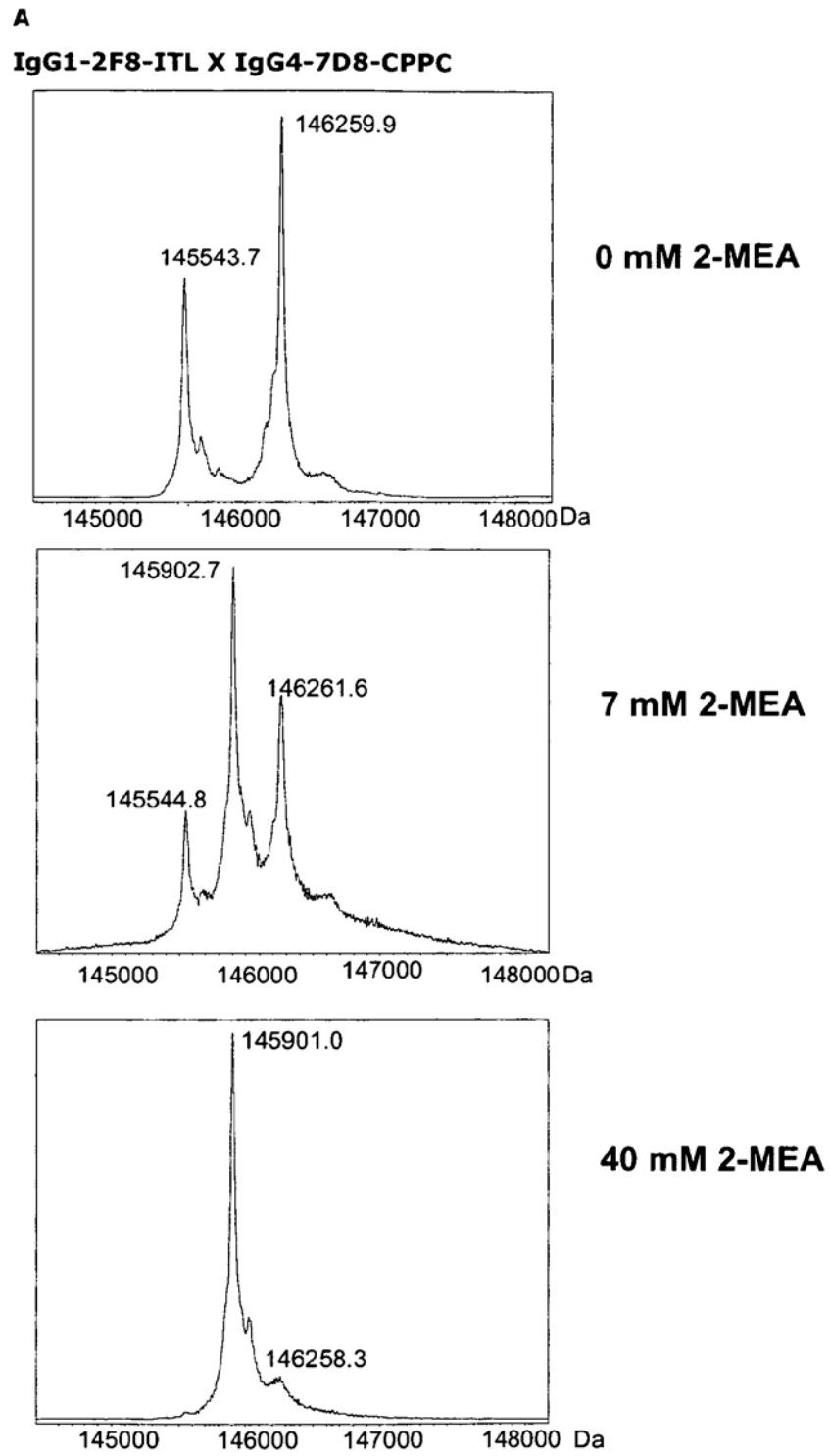


图 6

B

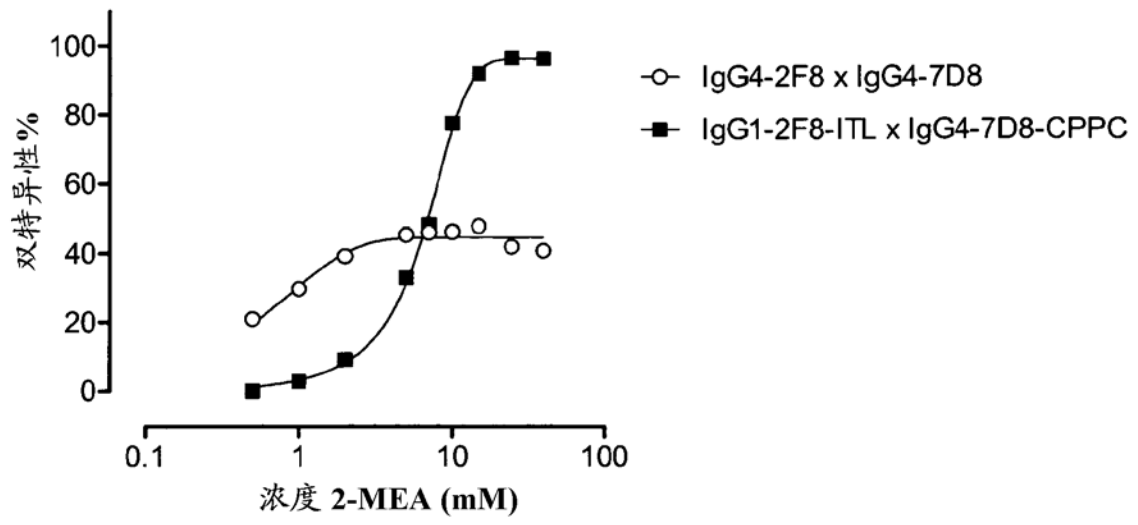


图 6 (续)

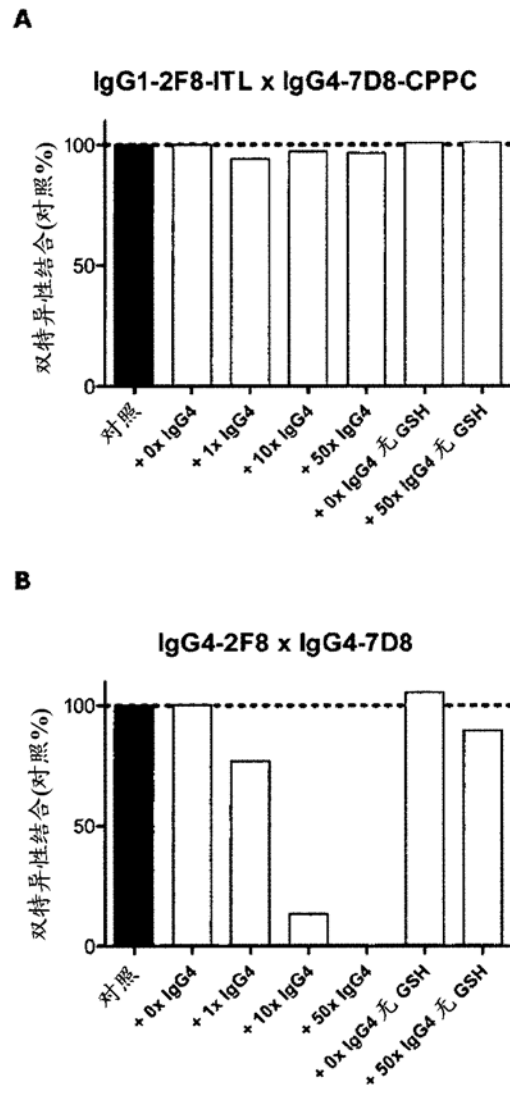
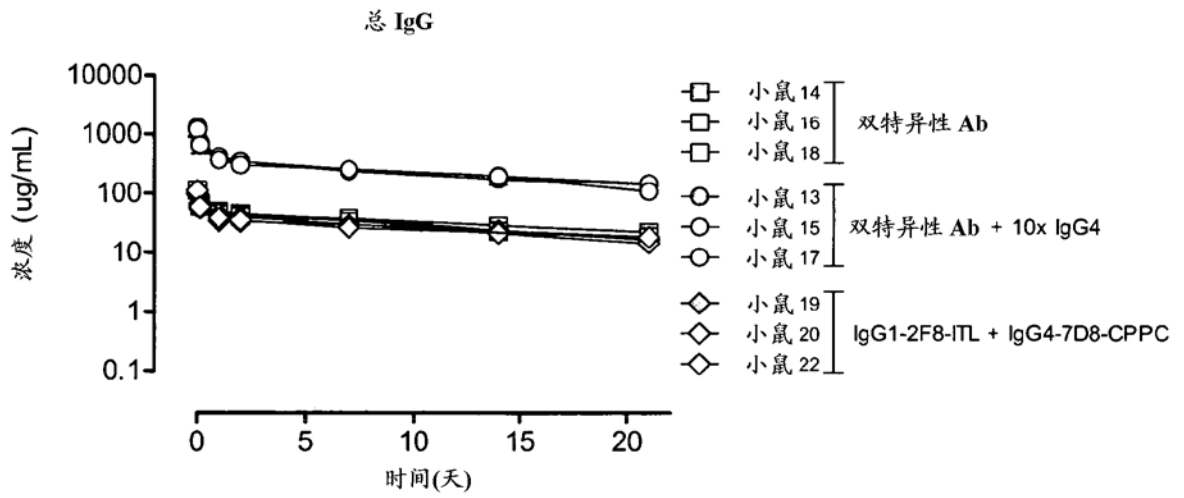


图 7

A



B

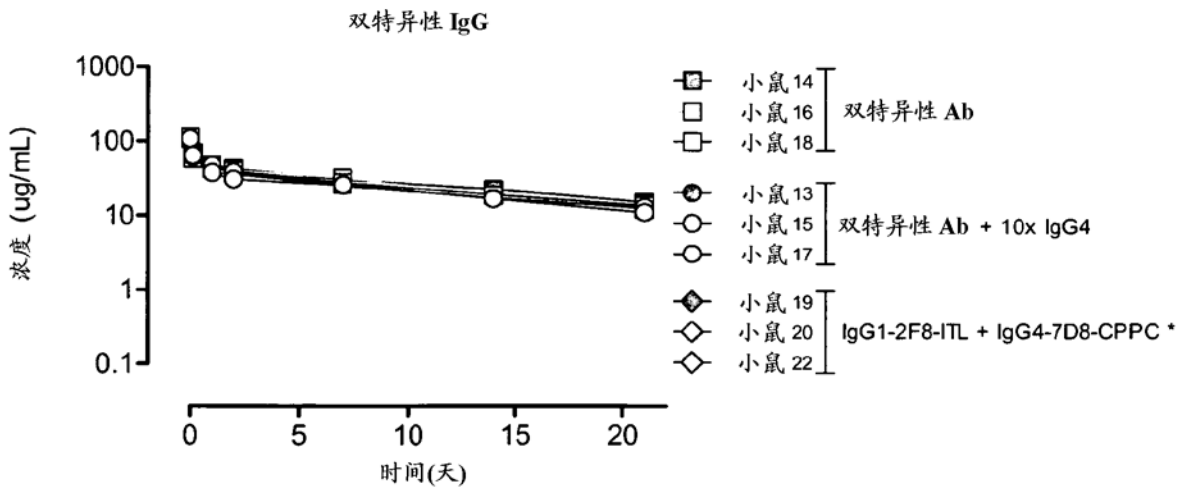


图 8

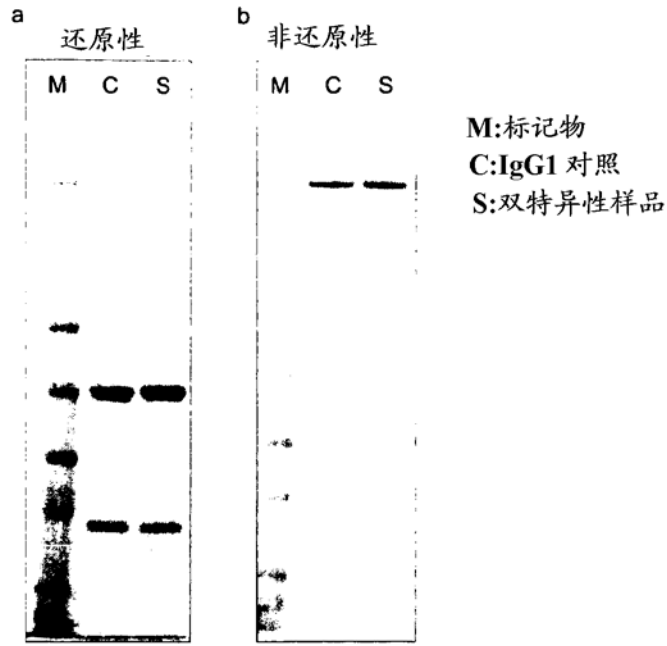
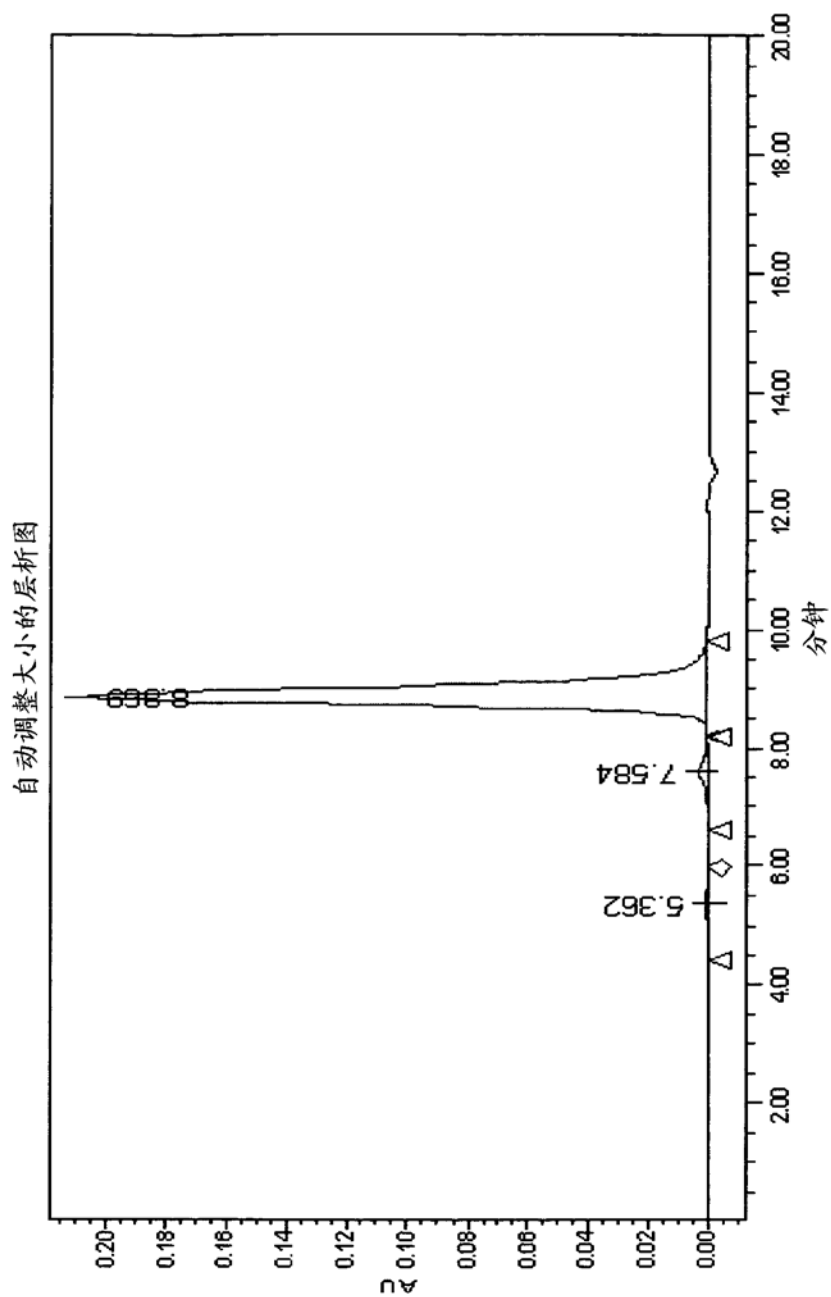


图 9A



峰结果:

	RT (分钟)	面积	高度	高度%
1	5.362	18309	448	0.21
2	7.584	82197	2876	1.36
3	8.869	4431069	207416	98.42

图 9B

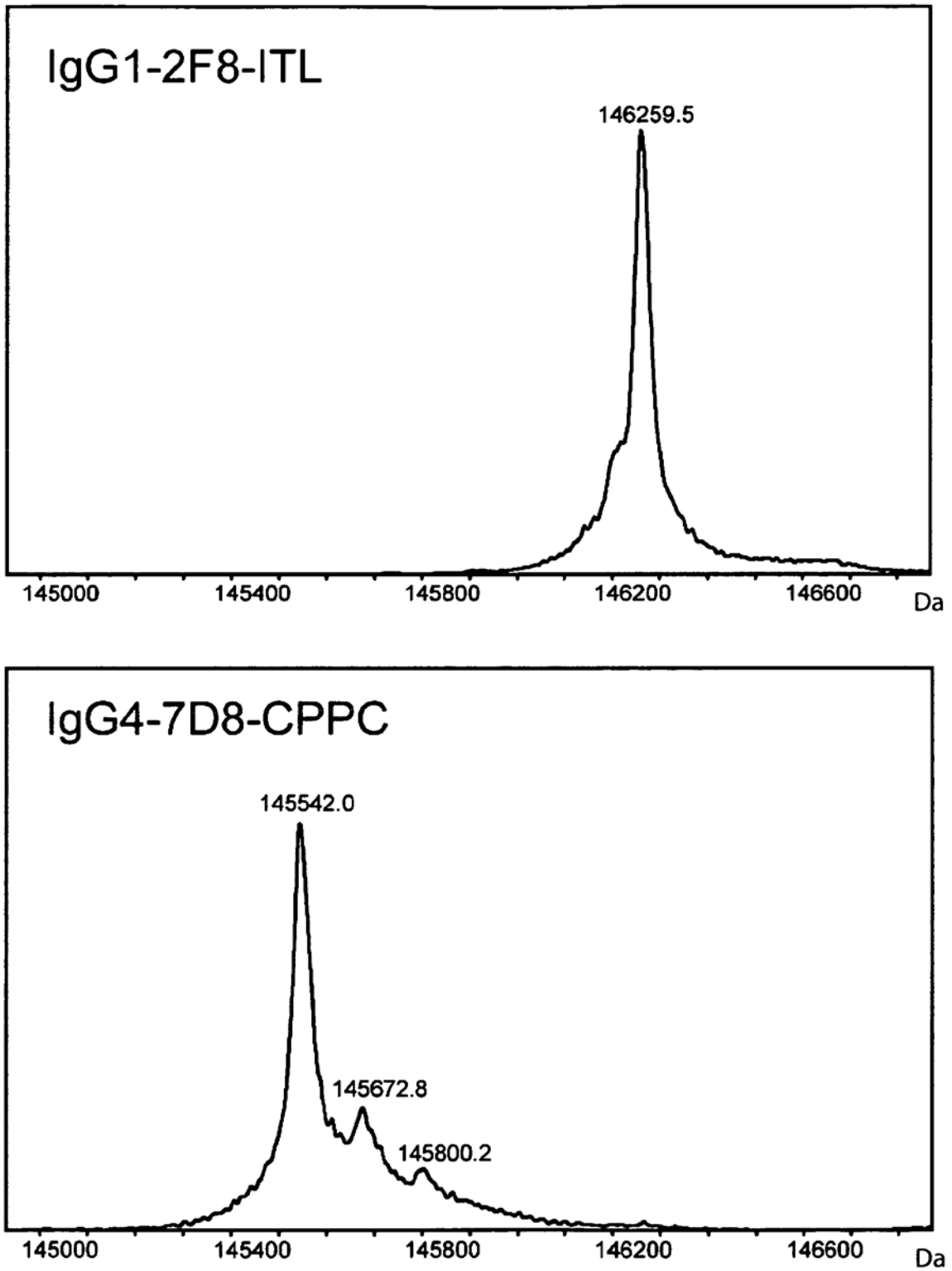
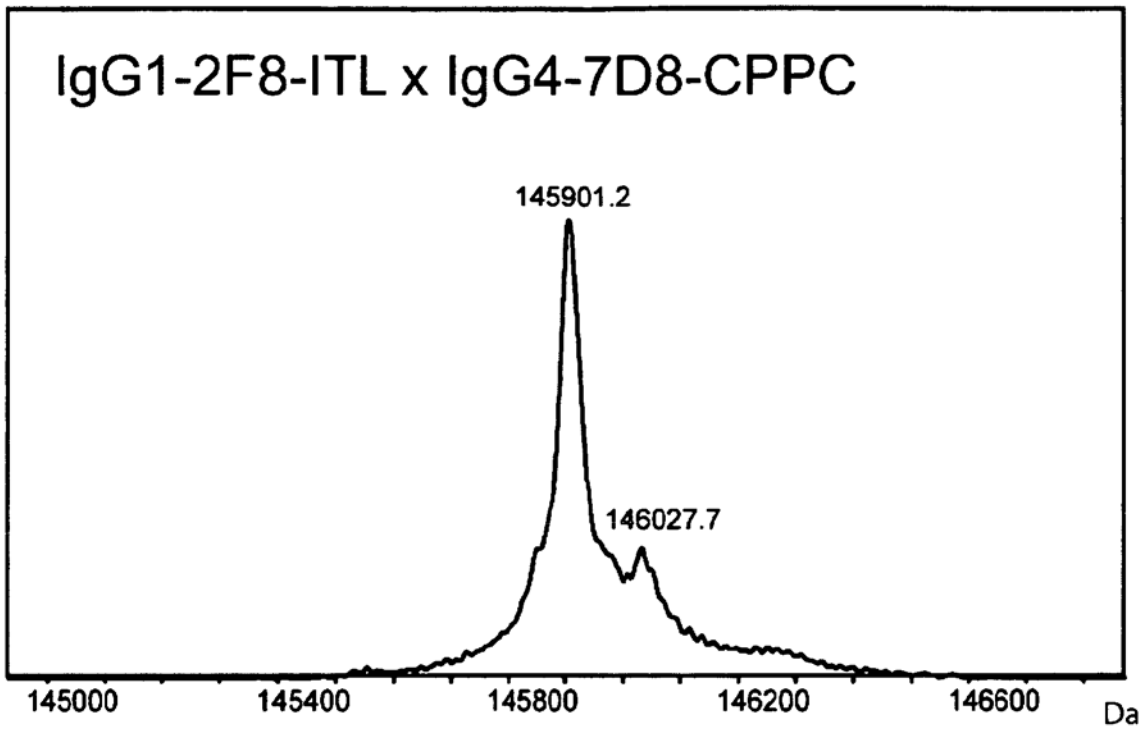


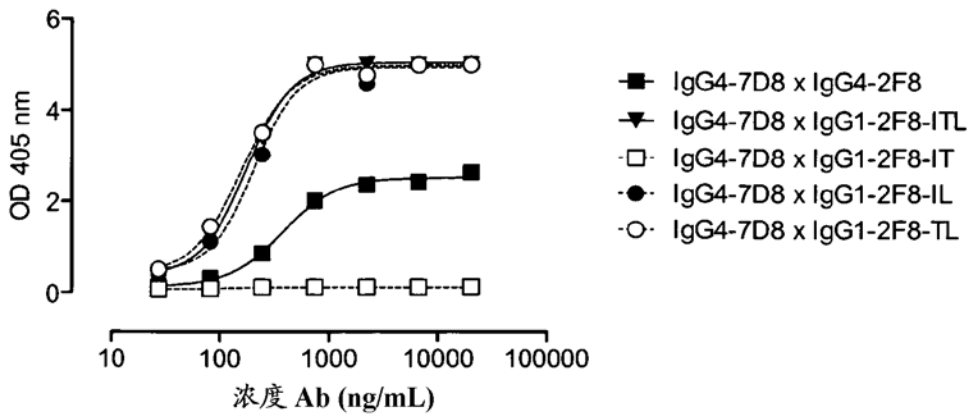
图 9C



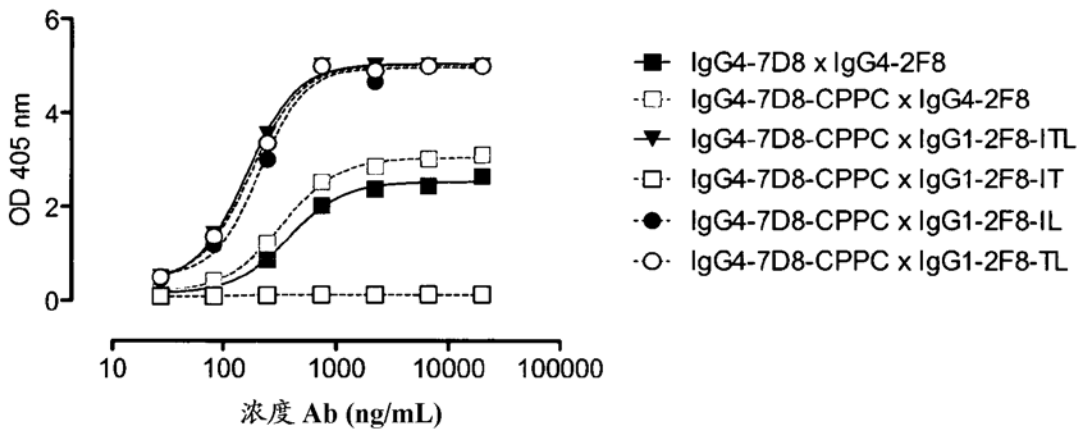
	测量的	测量的	测量的
IgG1-2F8-ITL	146259.5		
IgG4-7D8-CPPC	145542.0	145672.8	145800.2
IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-	145901.2	146027.7	

图 9C (续)

(A)



(B)



(C)

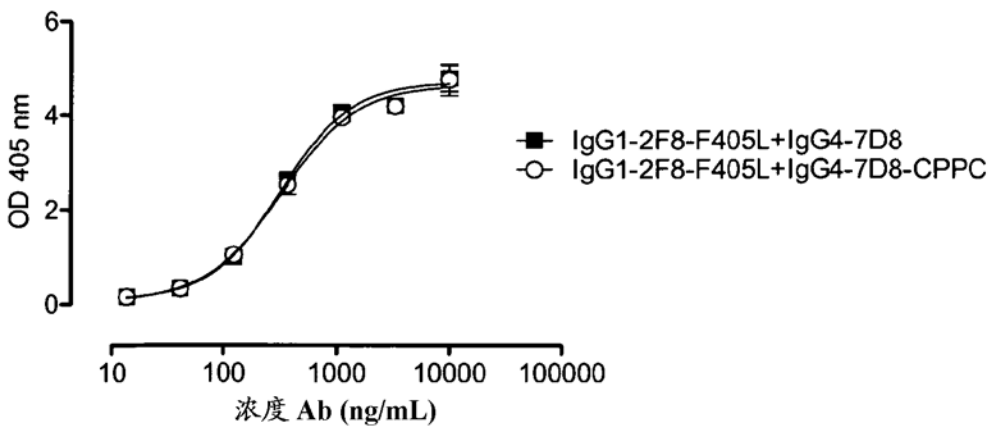


图 10

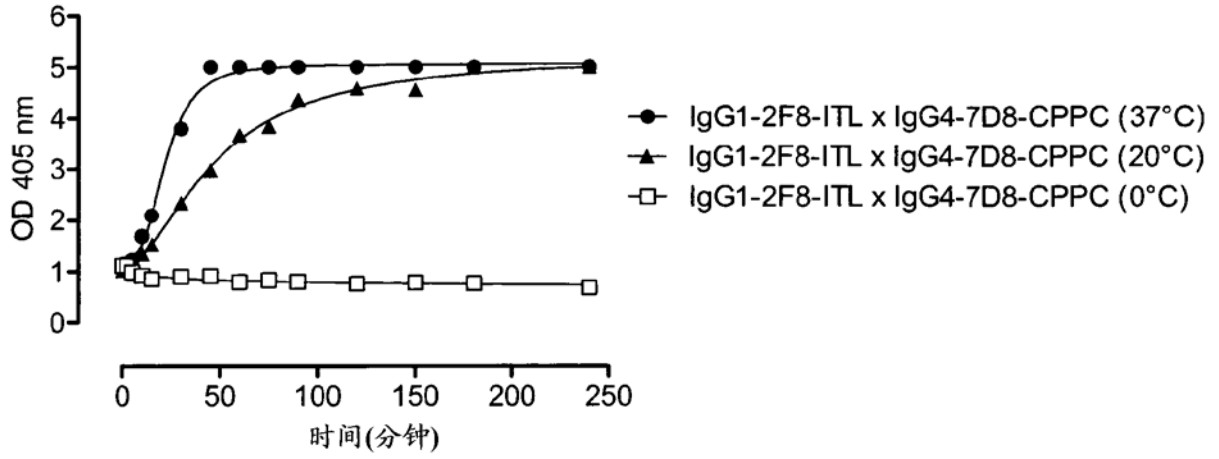


图 11

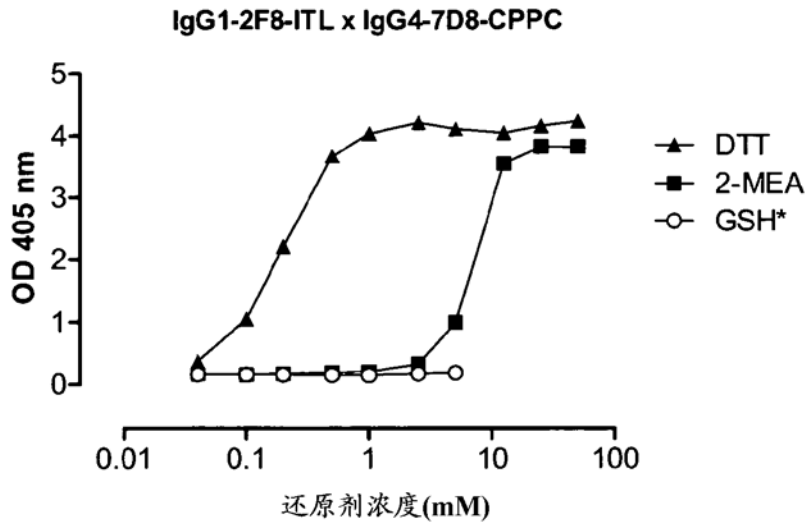
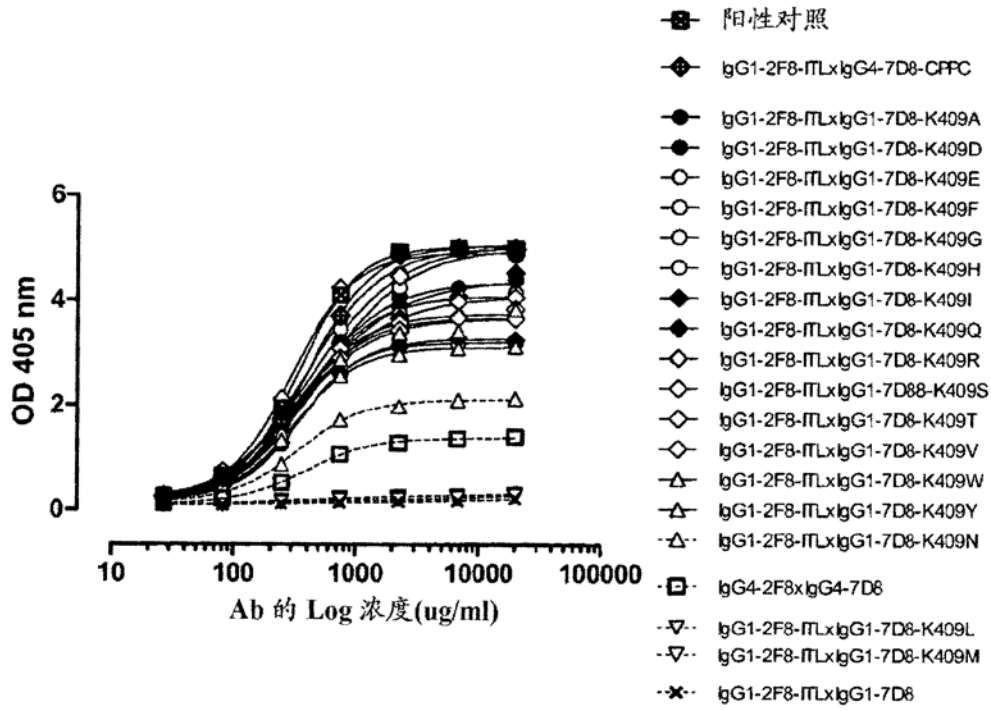


图 12

A



B

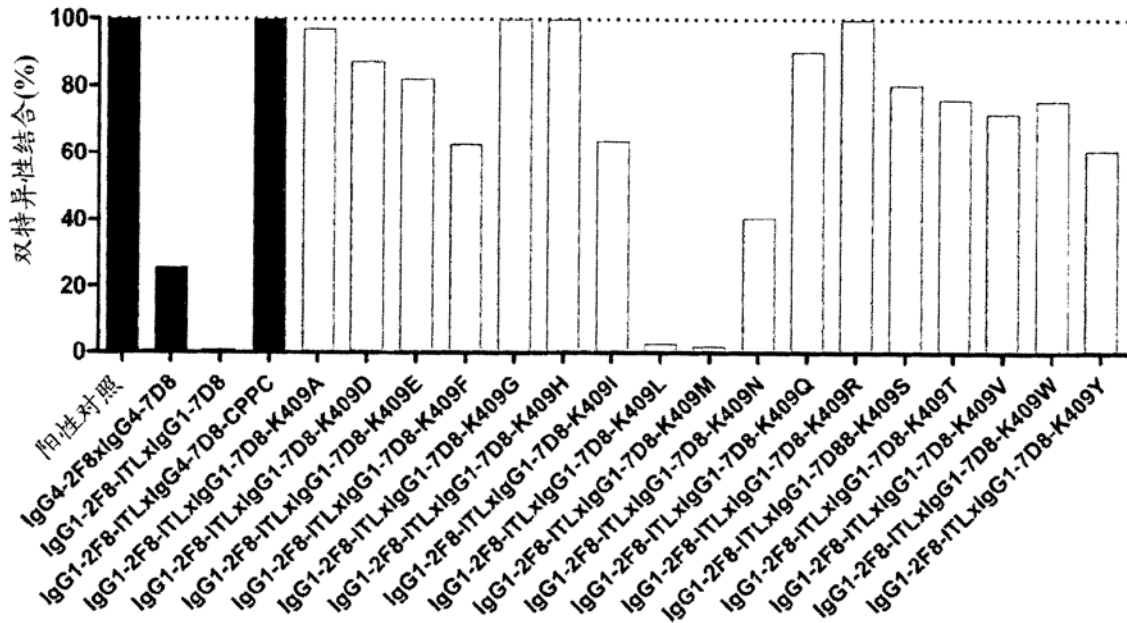


图 13

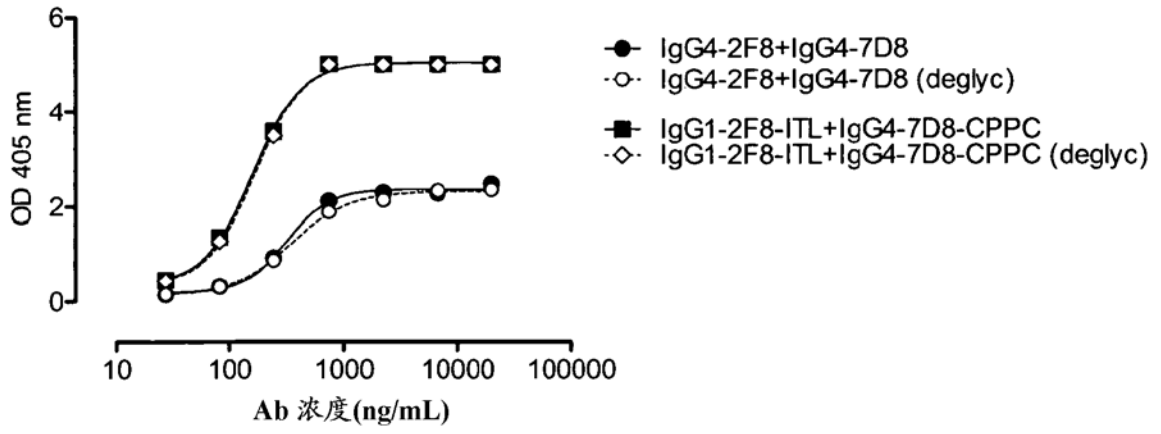
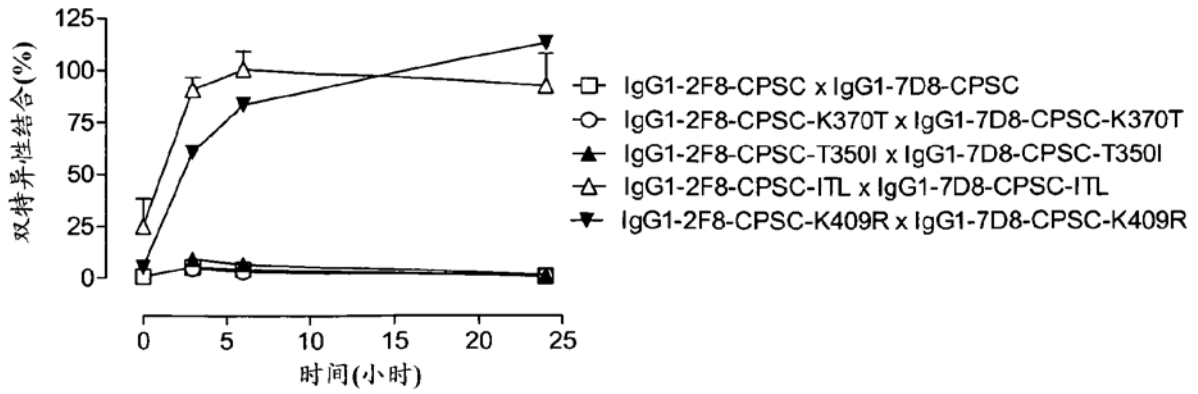
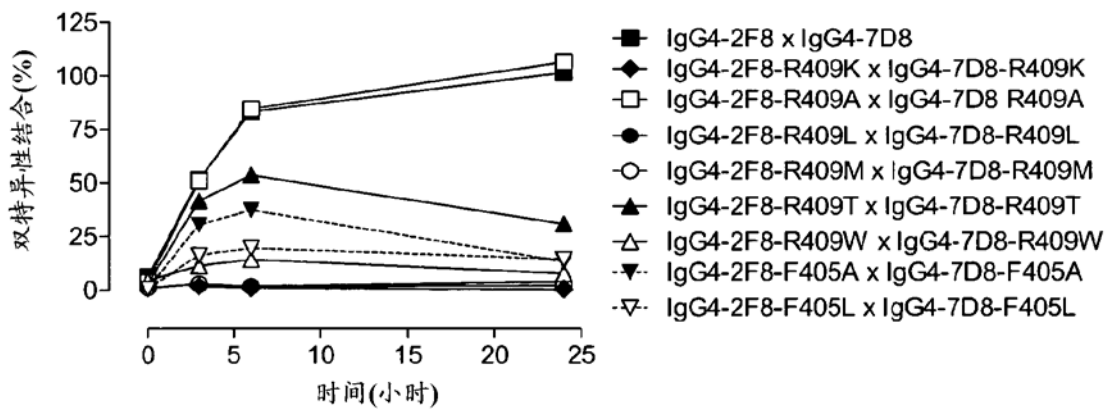


图 14

A



B



C

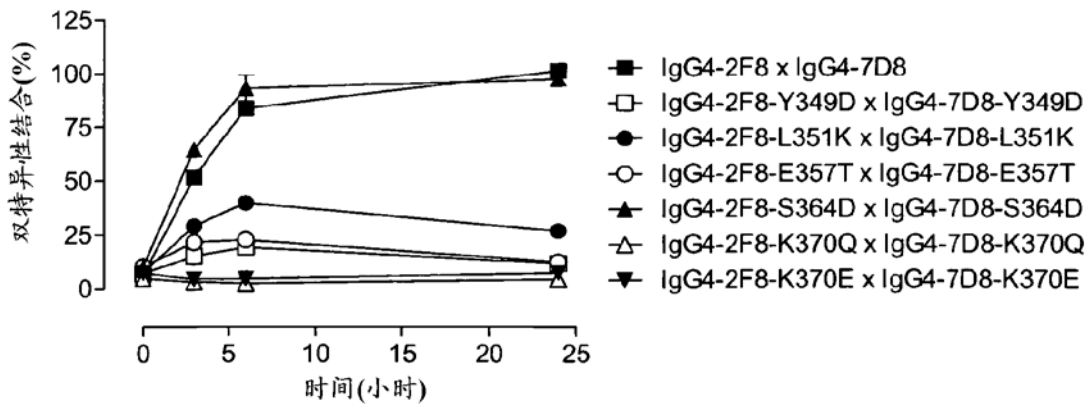
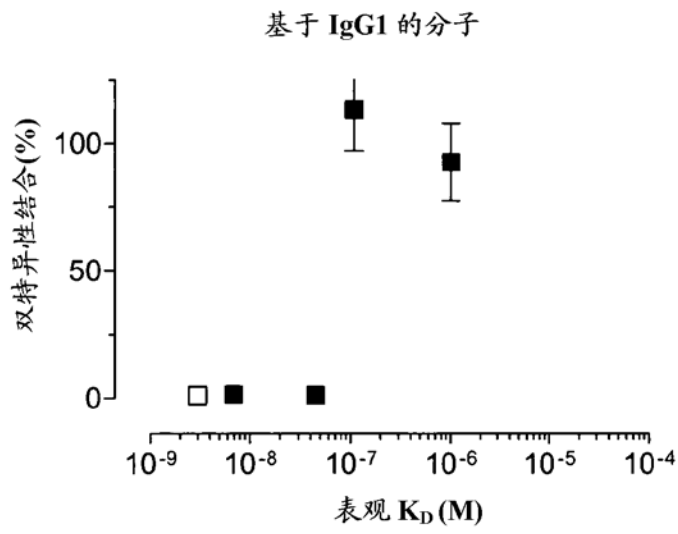


图 15

D



E

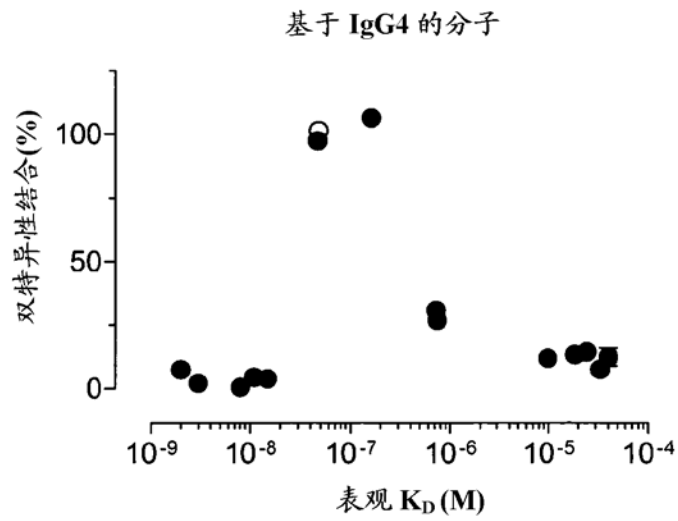


图 15 (续)

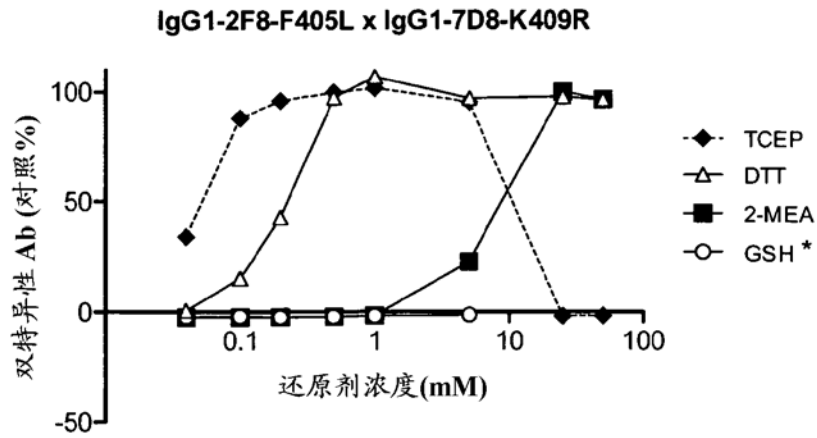
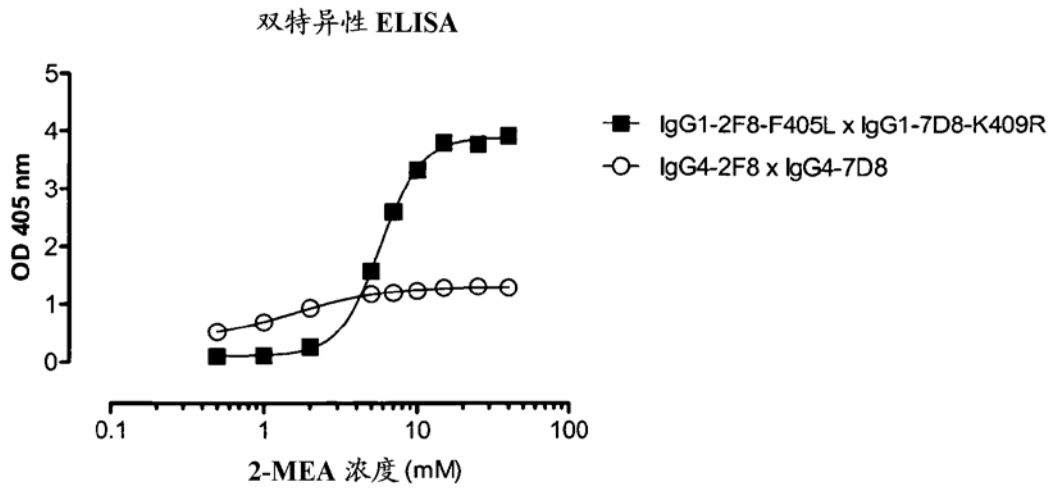


图 17

A



B

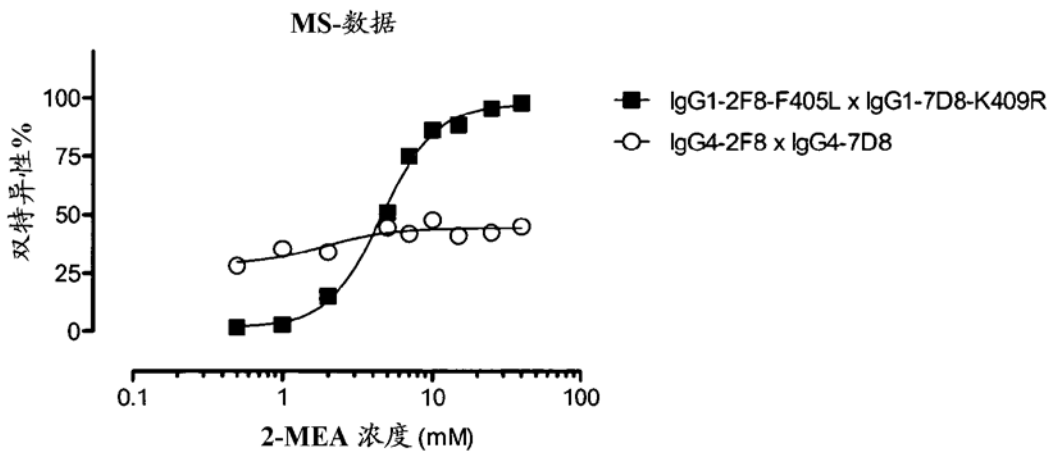


图 18

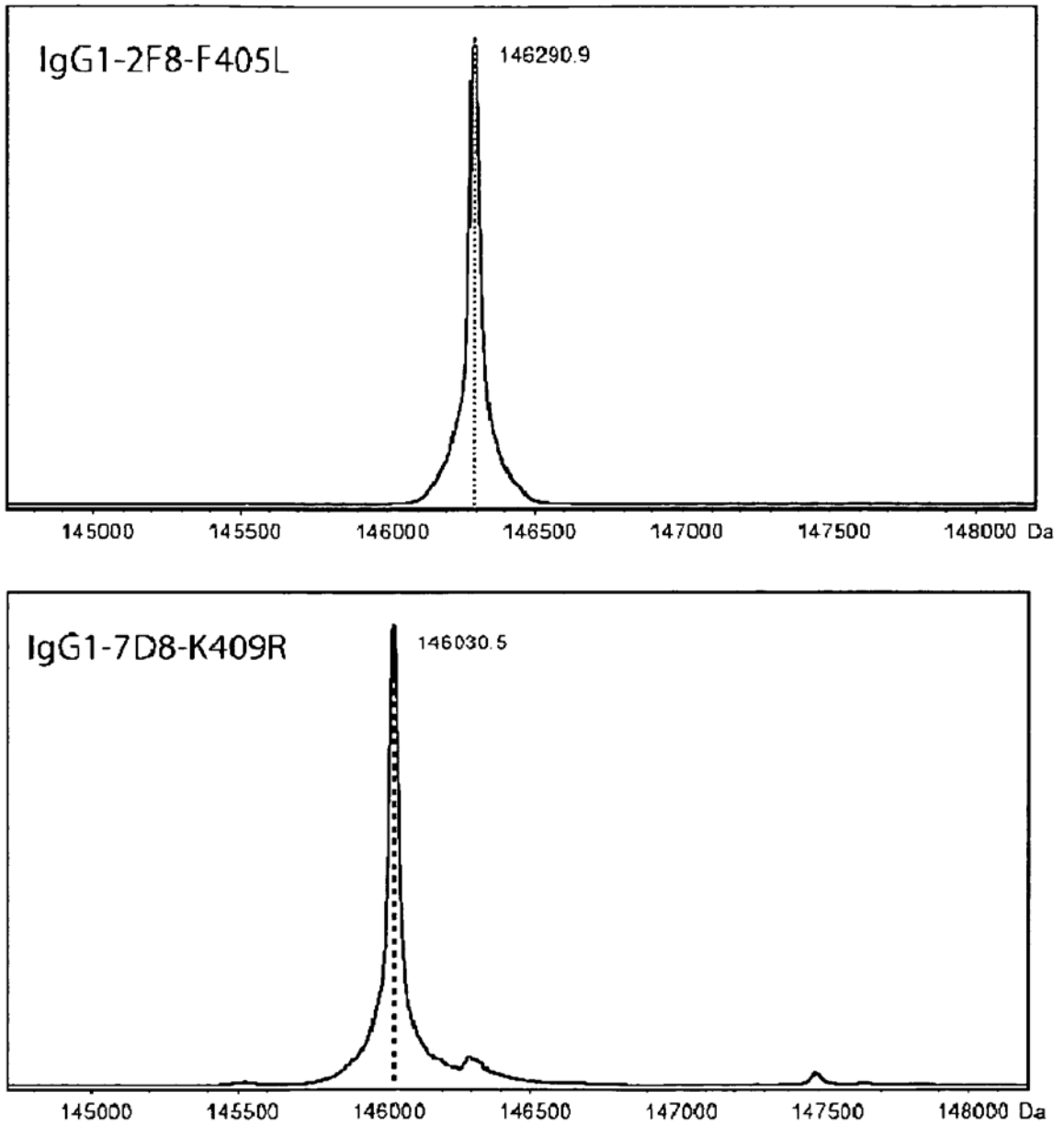
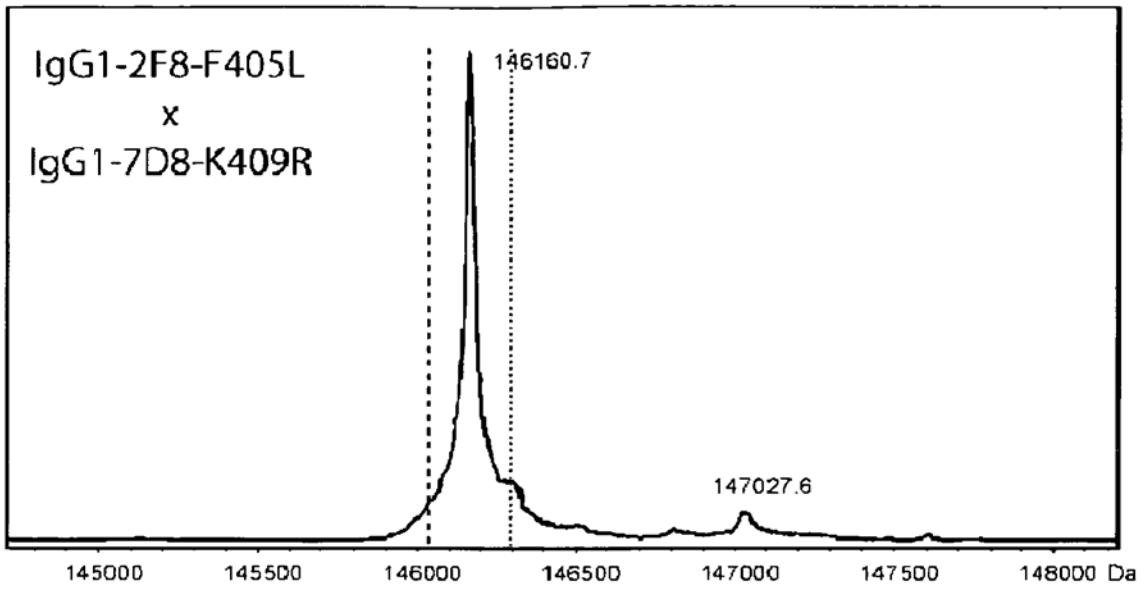


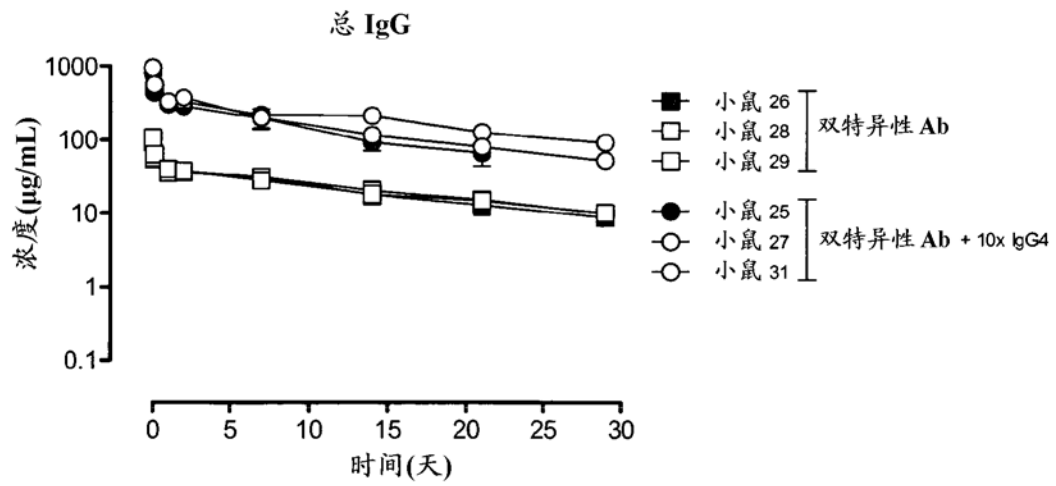
图 19



	测量的 MW
IgG1-2F8-F405L	146,290.9
IgG1-7D8-K409R	146,030.5
IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R	146,160.7

图 19 (续)

A



B

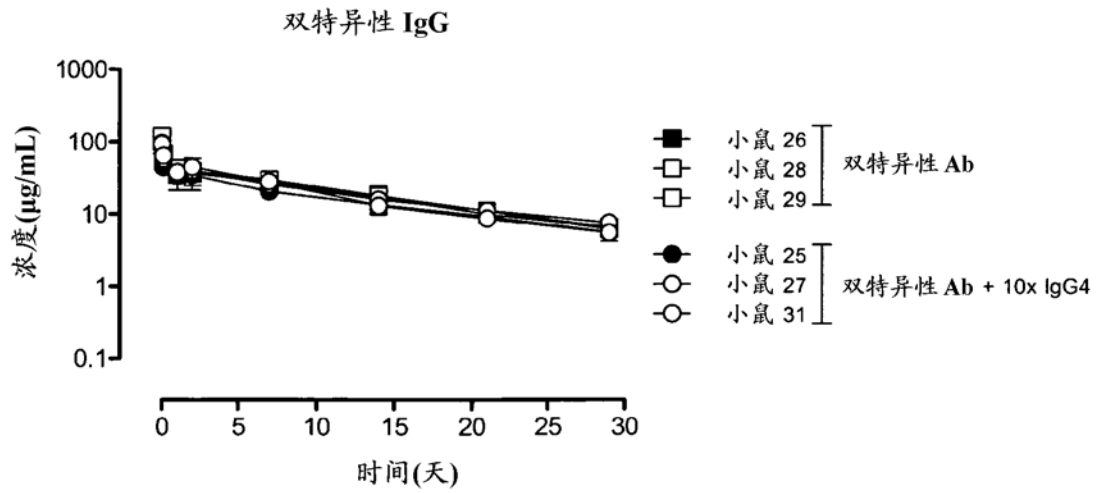
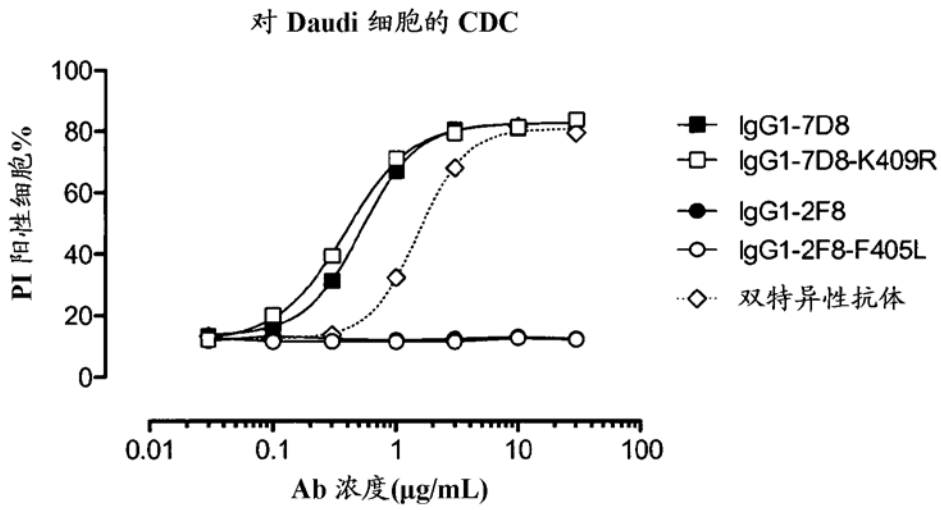


图 20

A



B

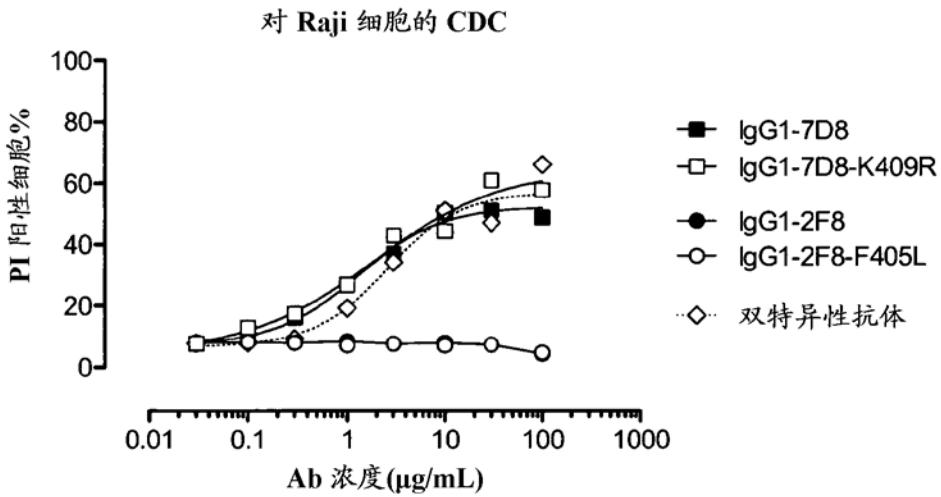


图 21

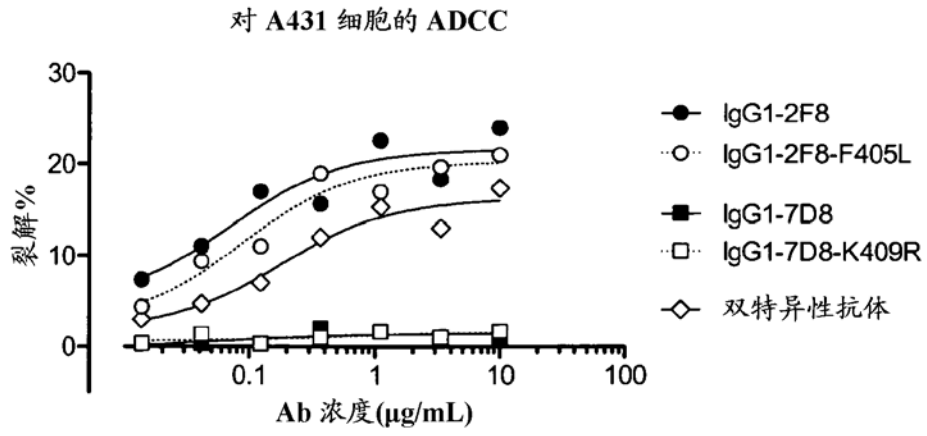
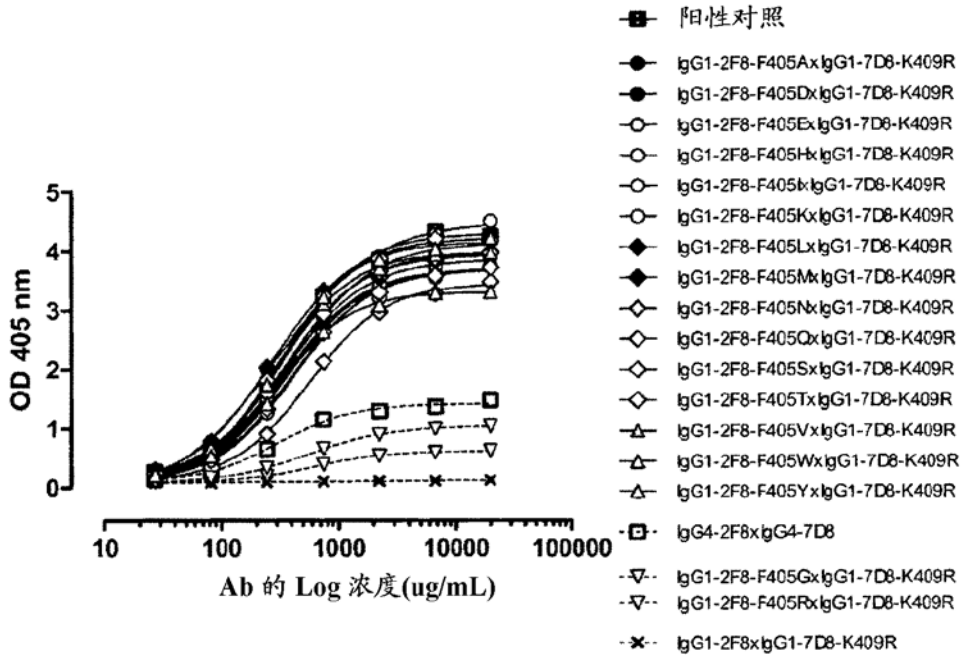


图 22

A



B

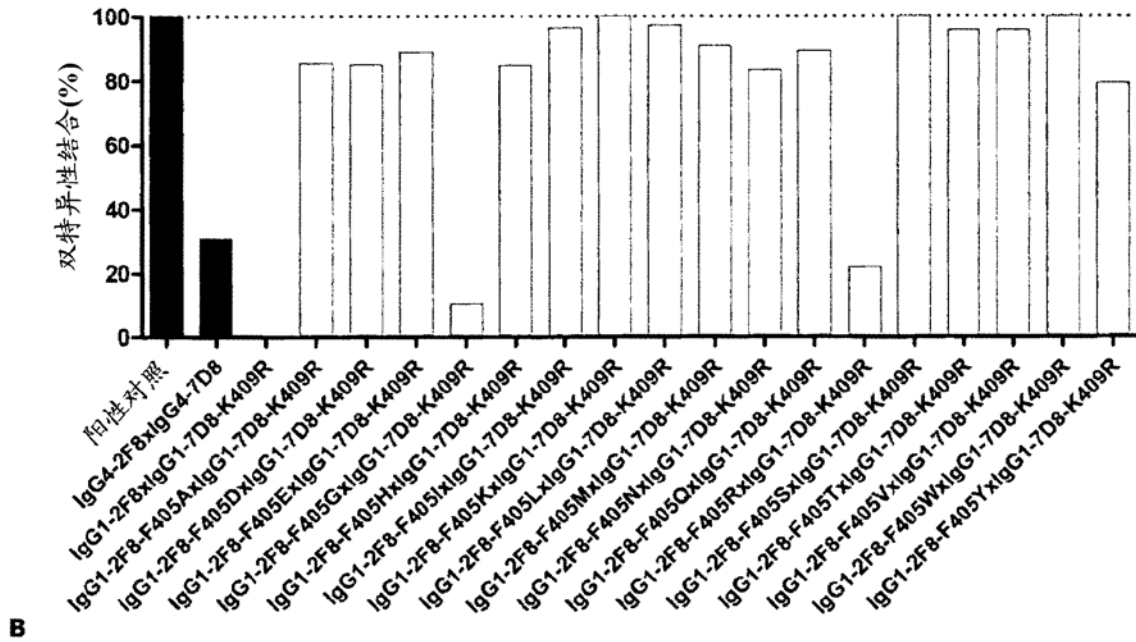
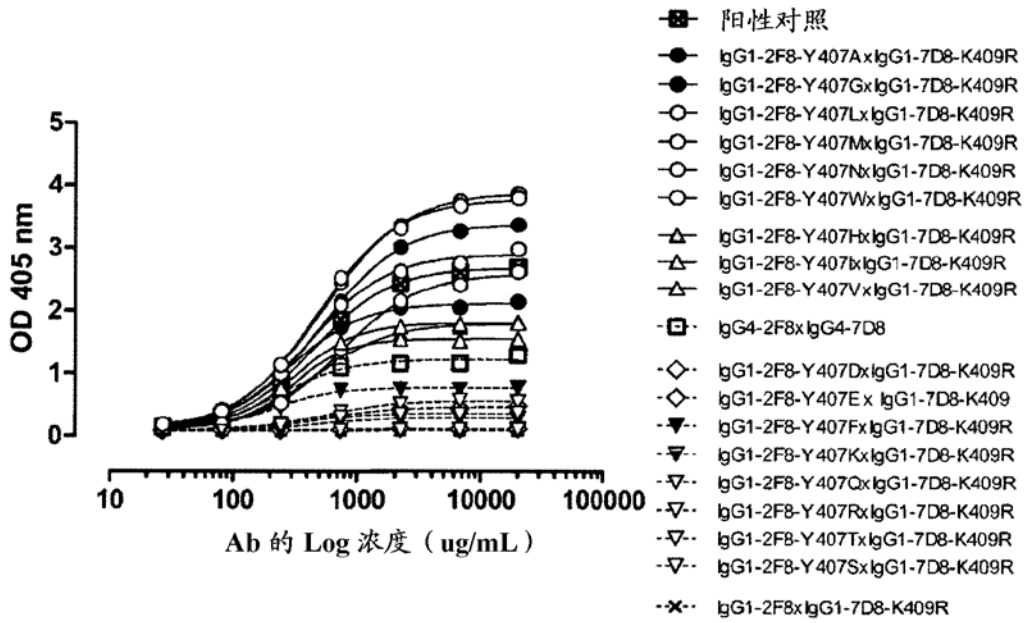


图 23

A



B

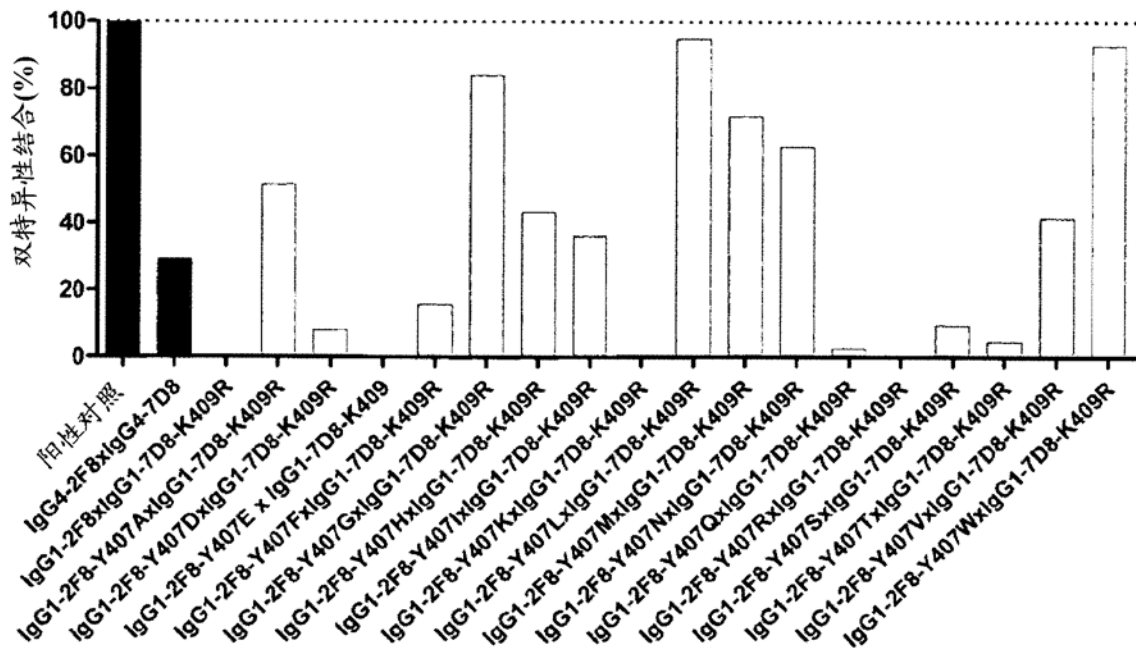


图 24

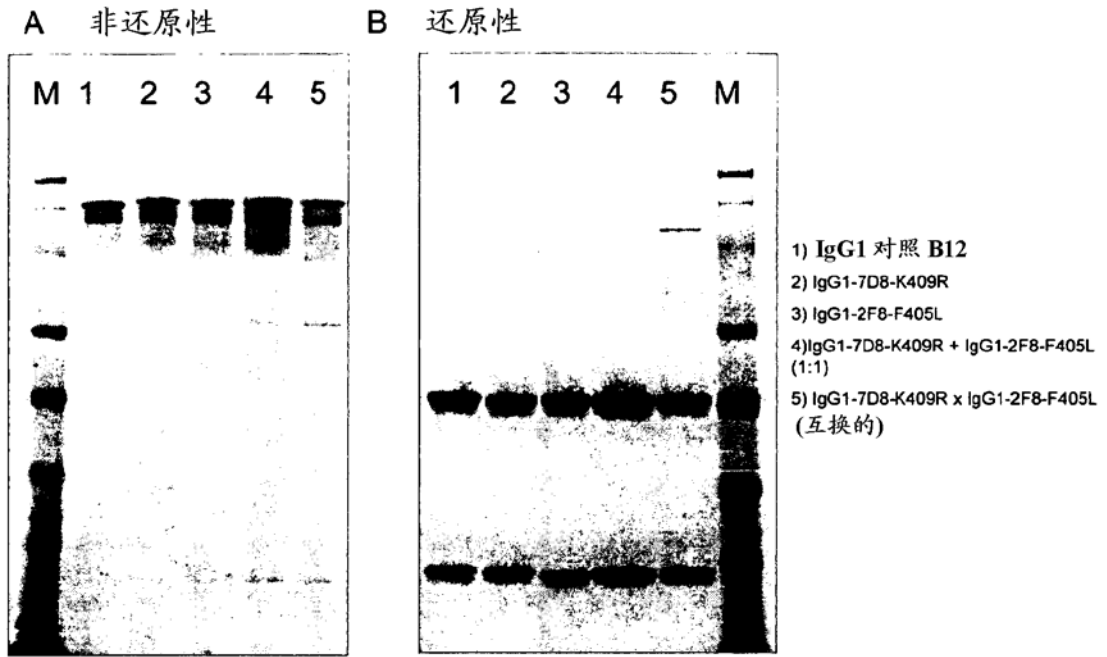


图 25

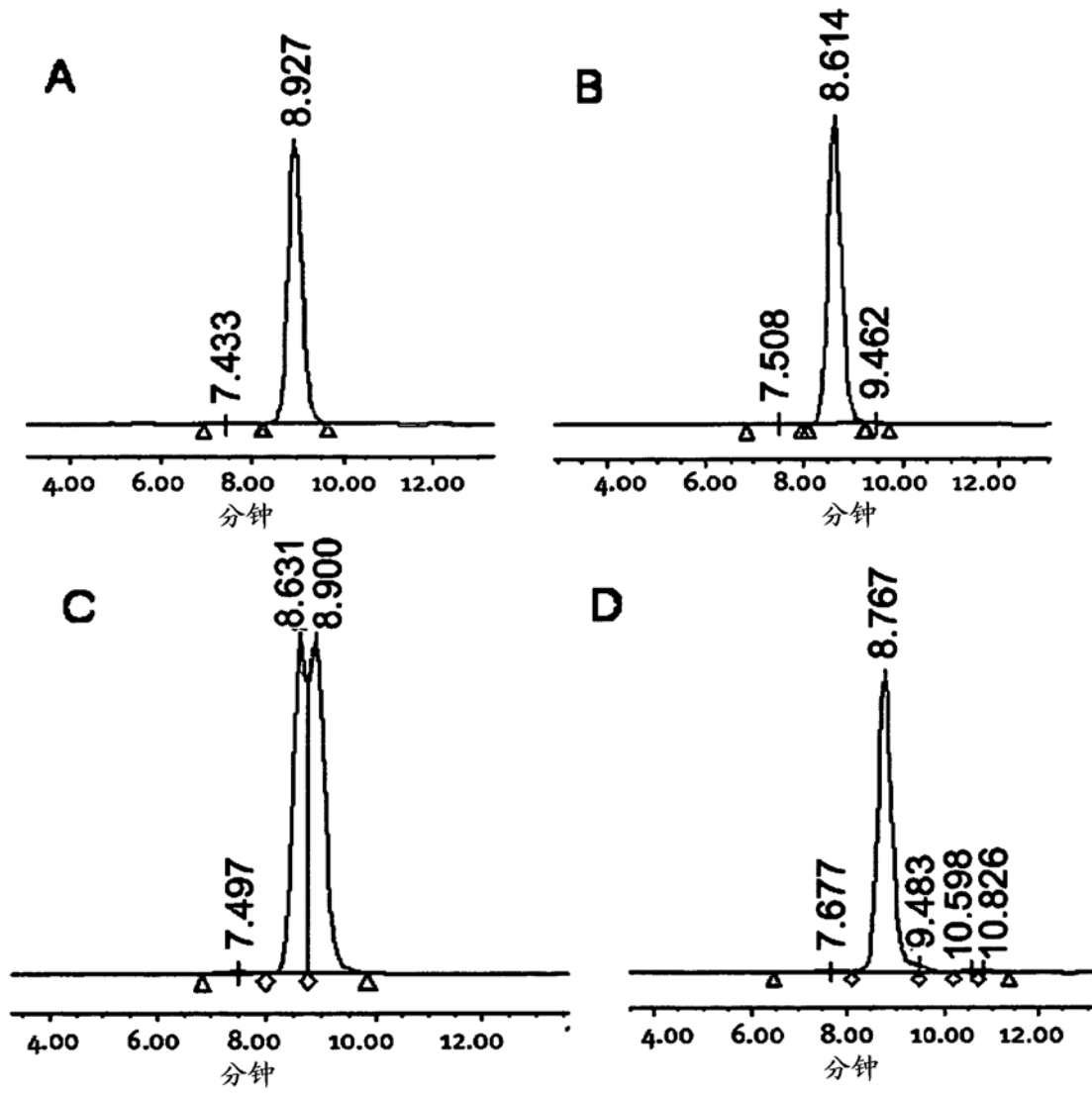


图 26

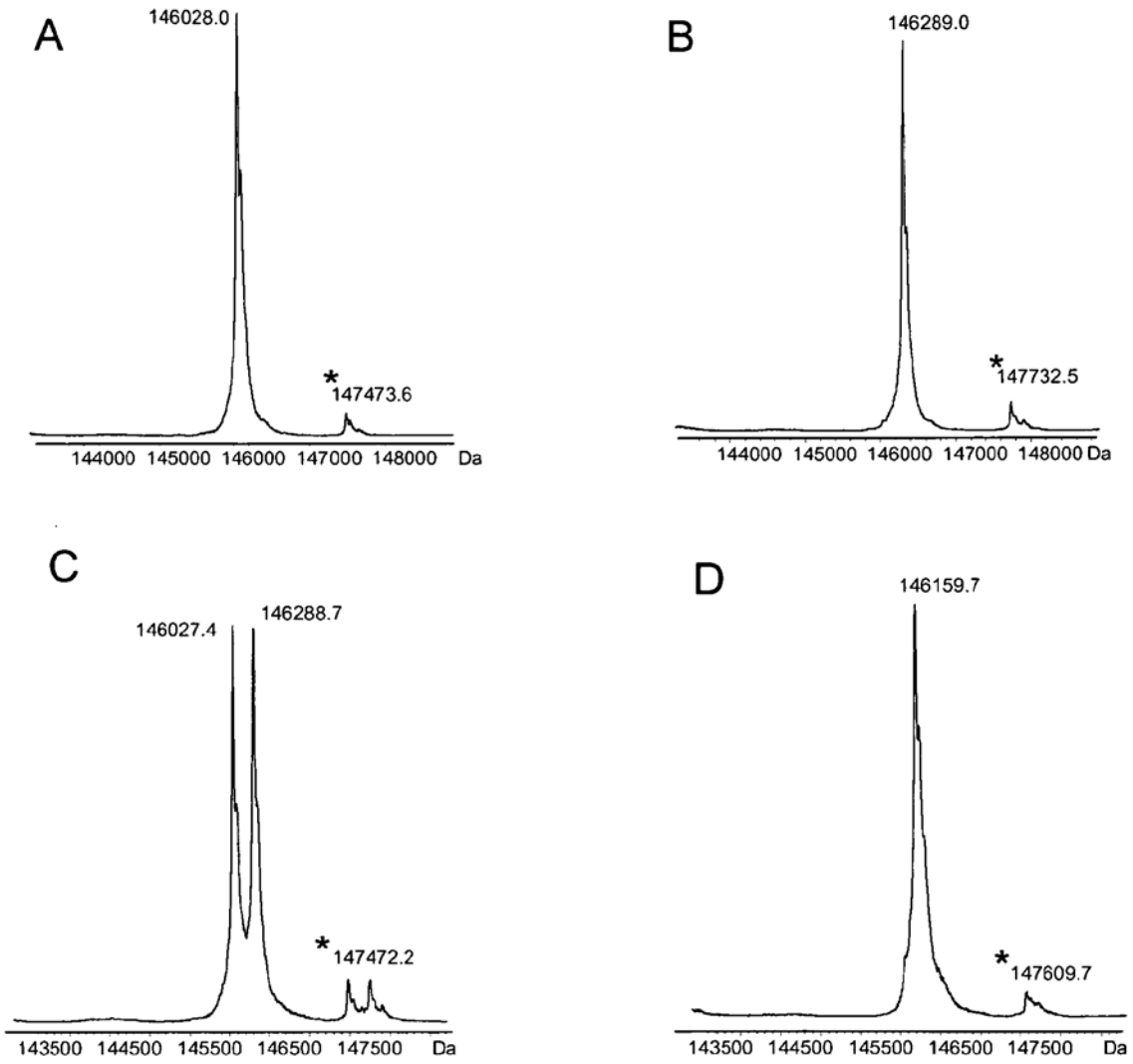
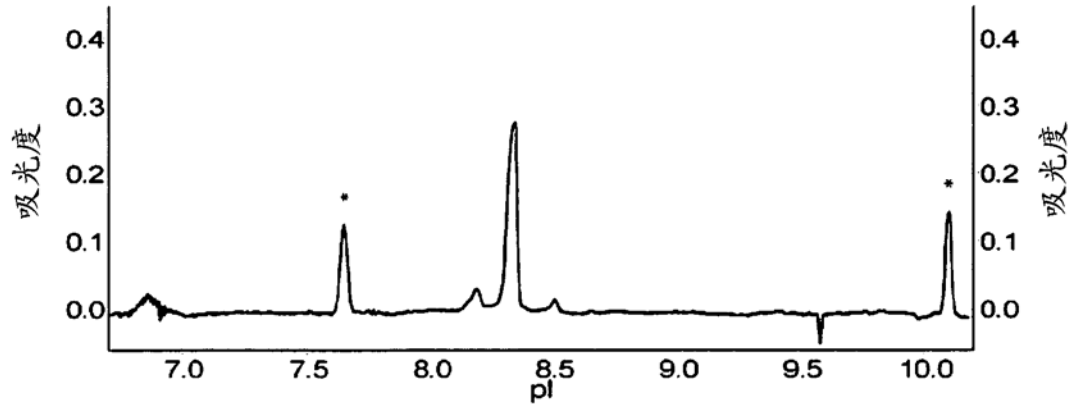
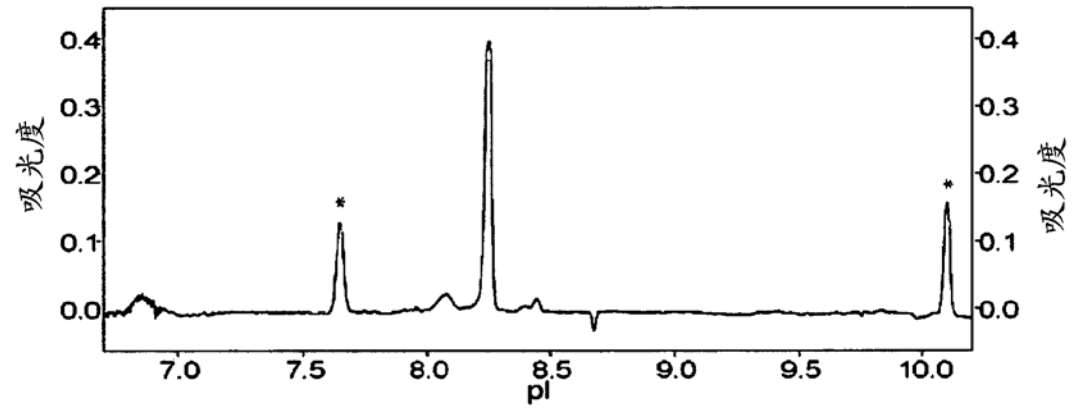


图 27

A



B



C

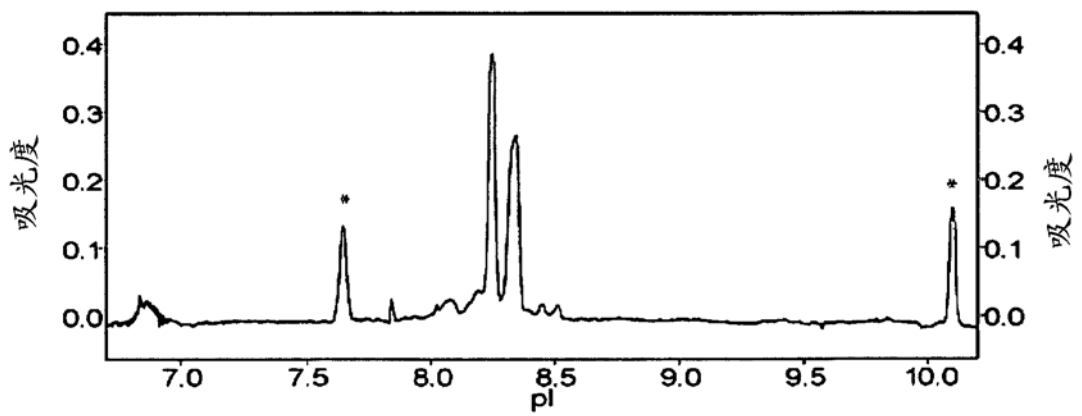


图 28

D

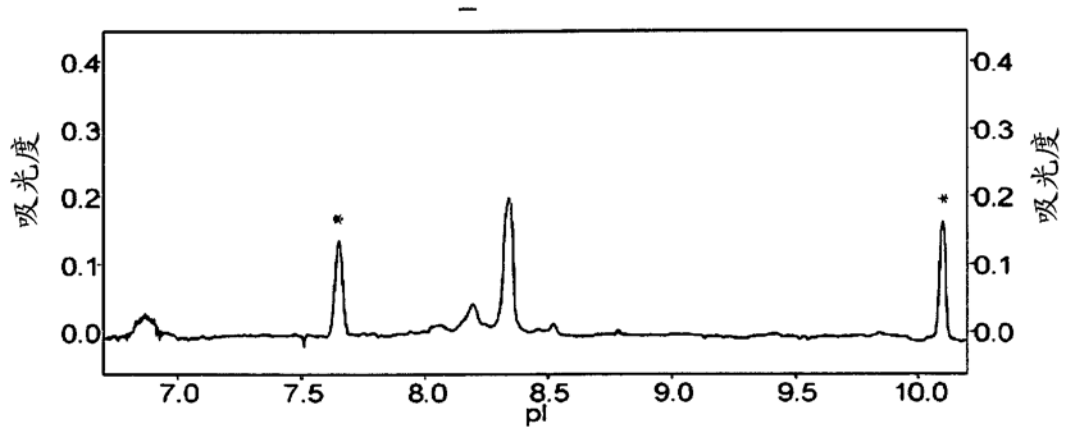


图 28(续)

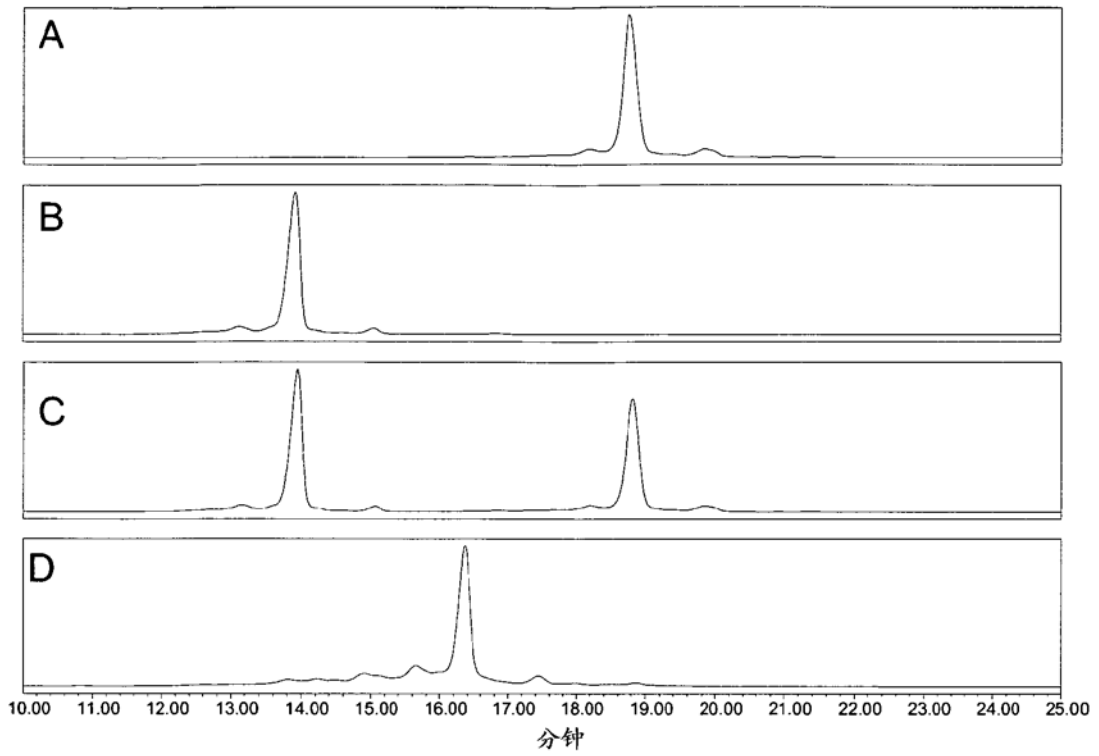


图 29

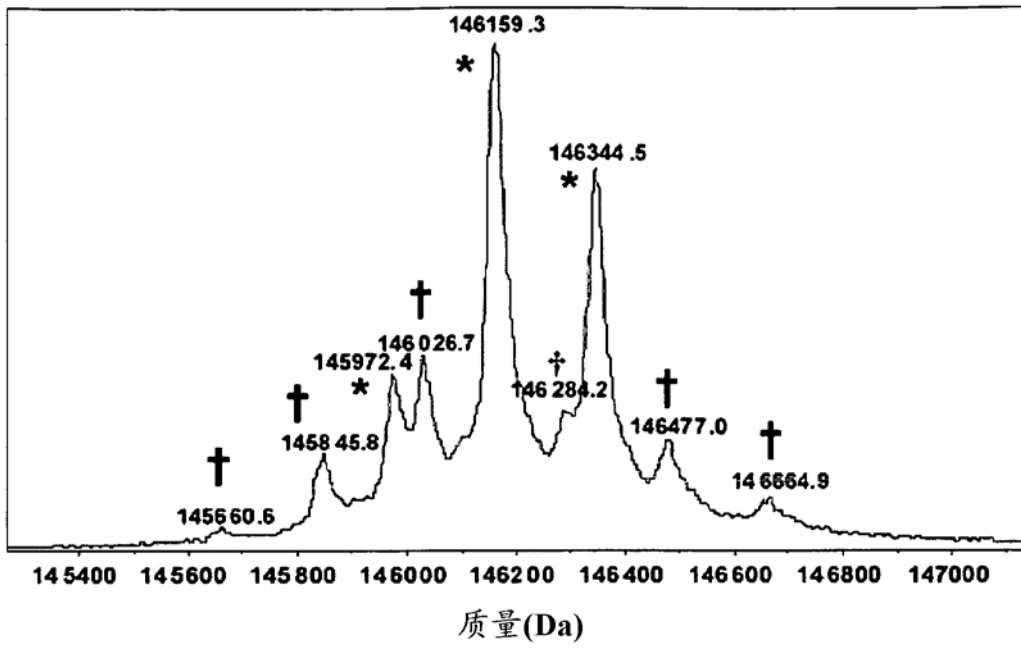


图 30

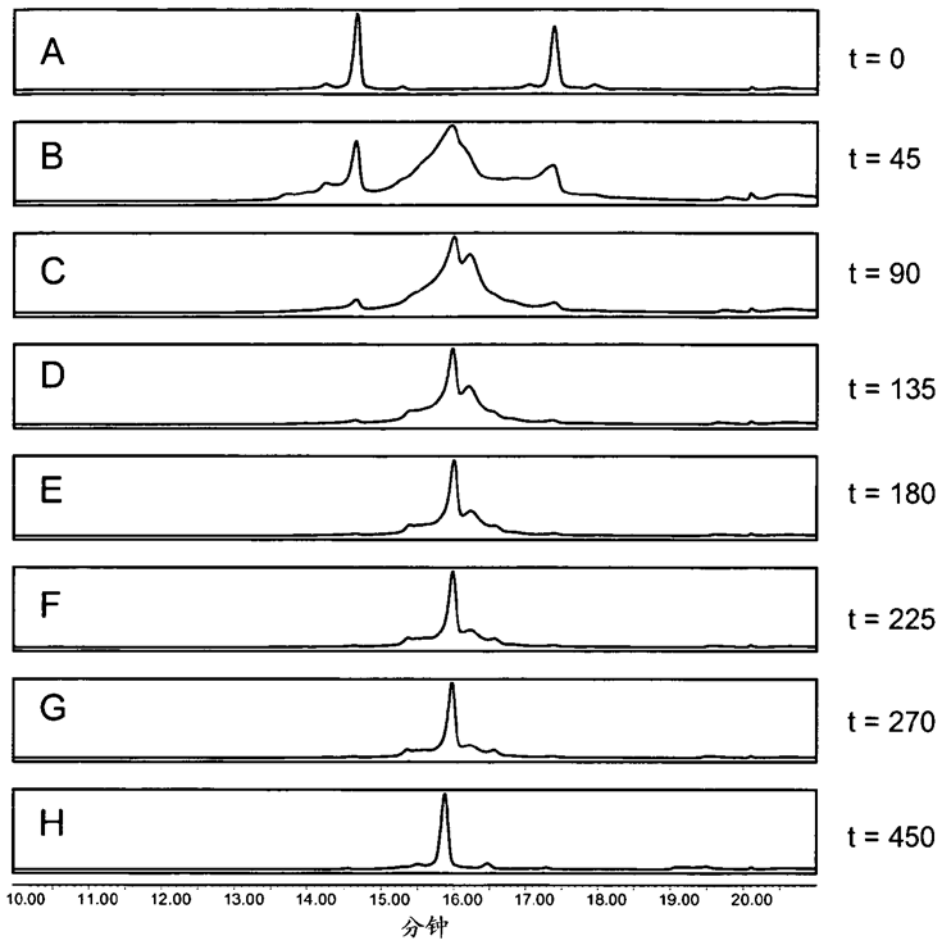


图 31

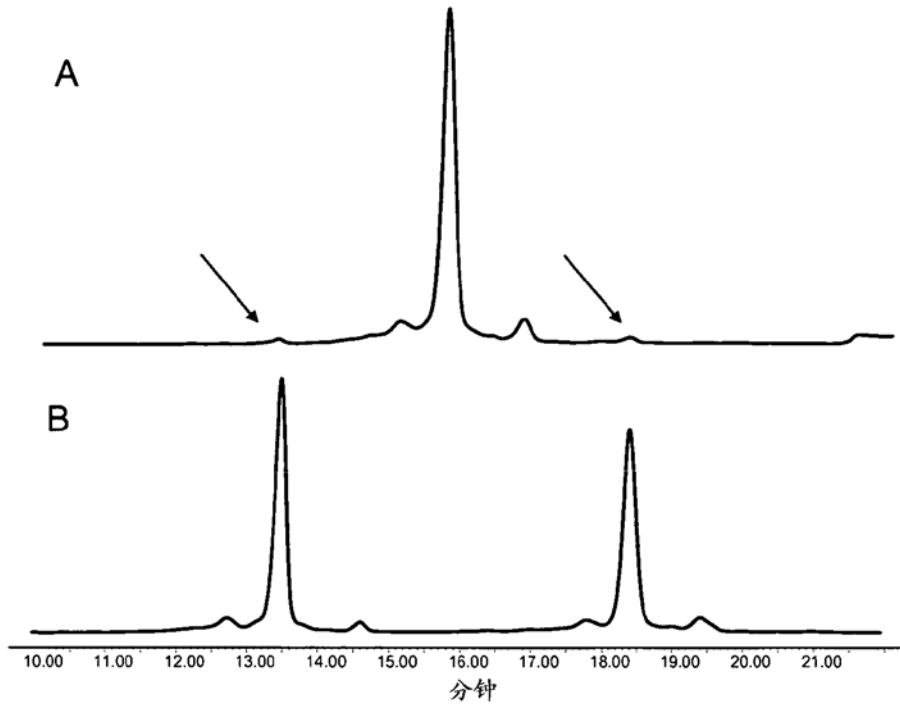
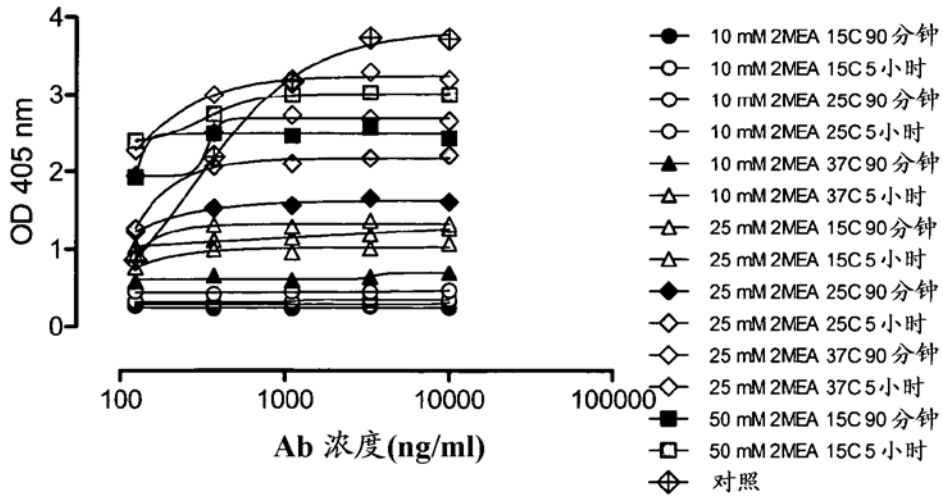


图 32

A

20 mg/mL IgG, 90 和 300 分钟



B

20 mg/mL IgG, 90 和 300 分钟

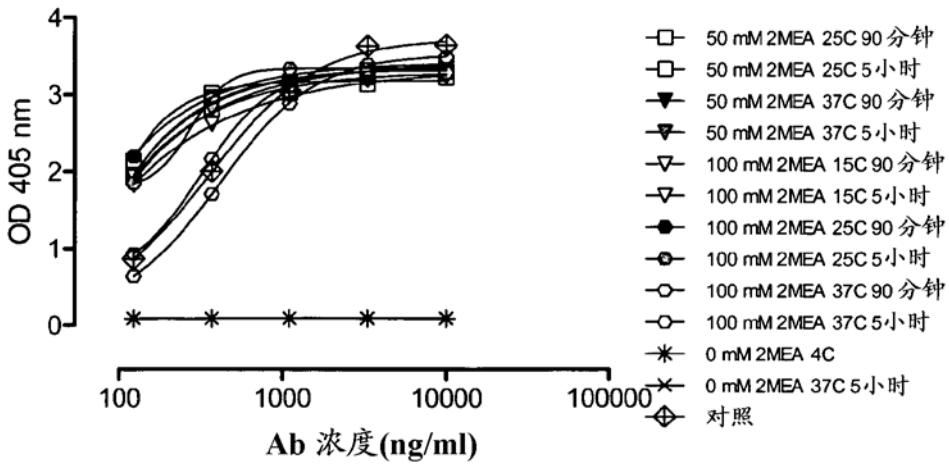
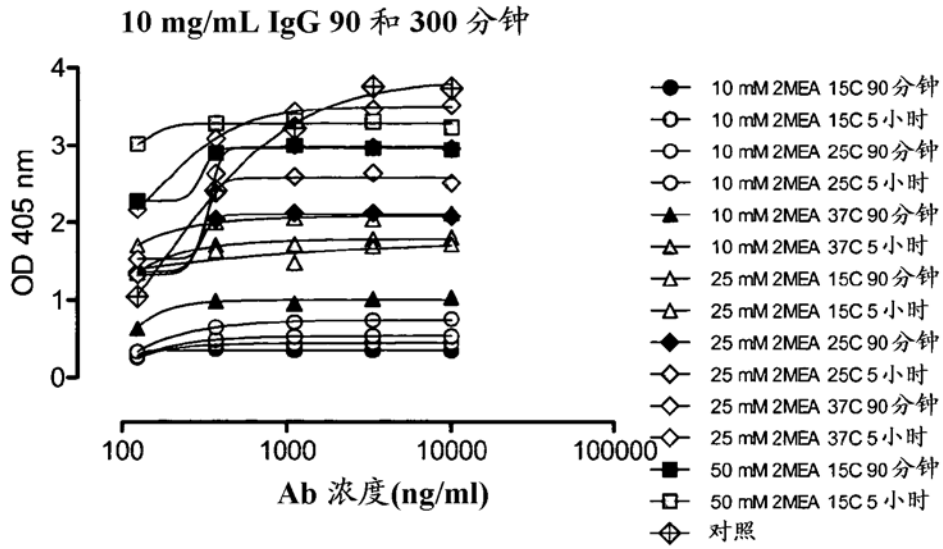


图 33

C



D

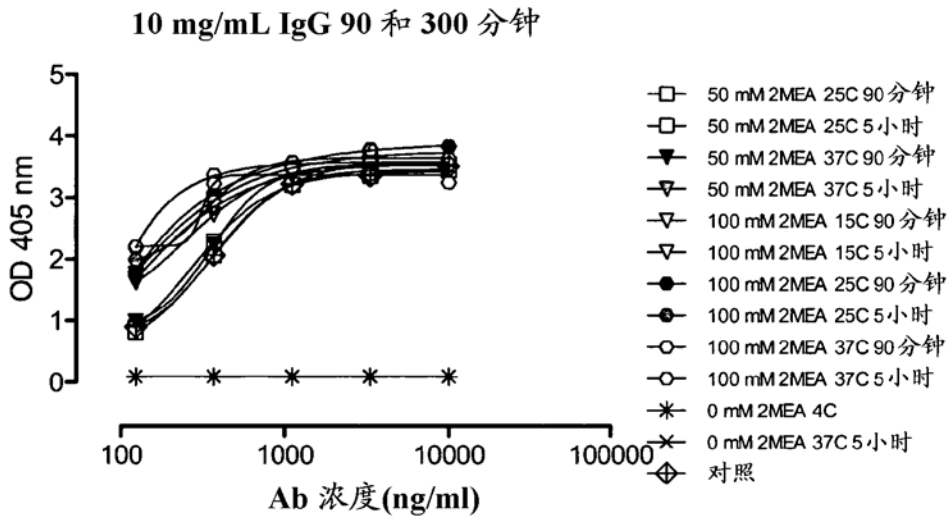
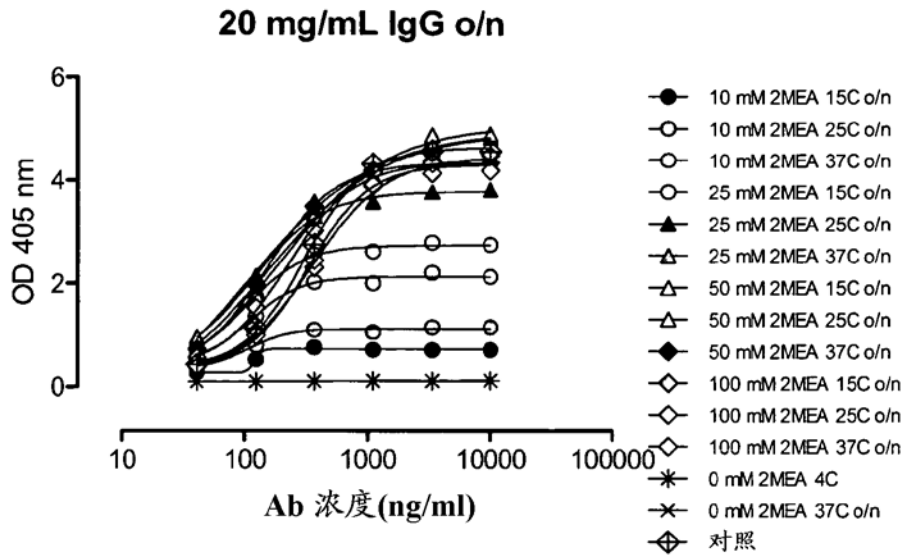


图 33 (续)

E



F

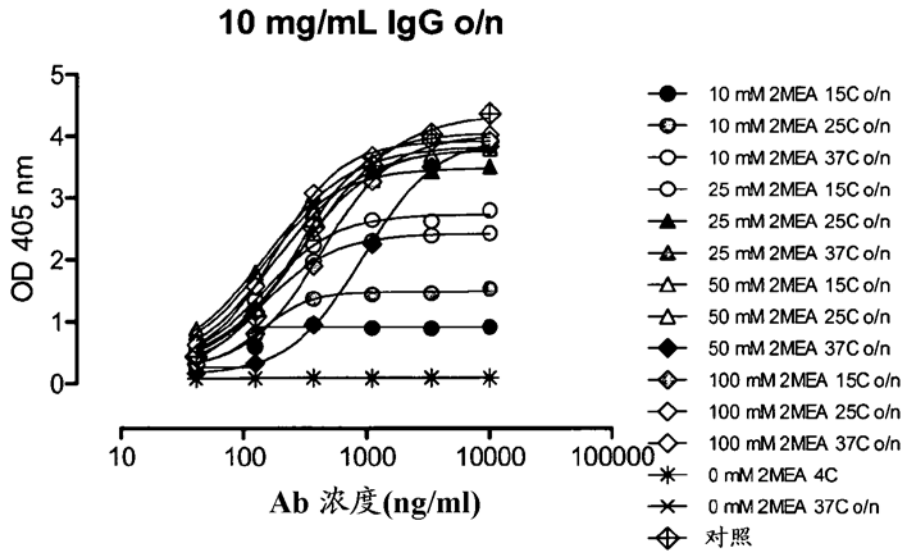


图 33 (续)

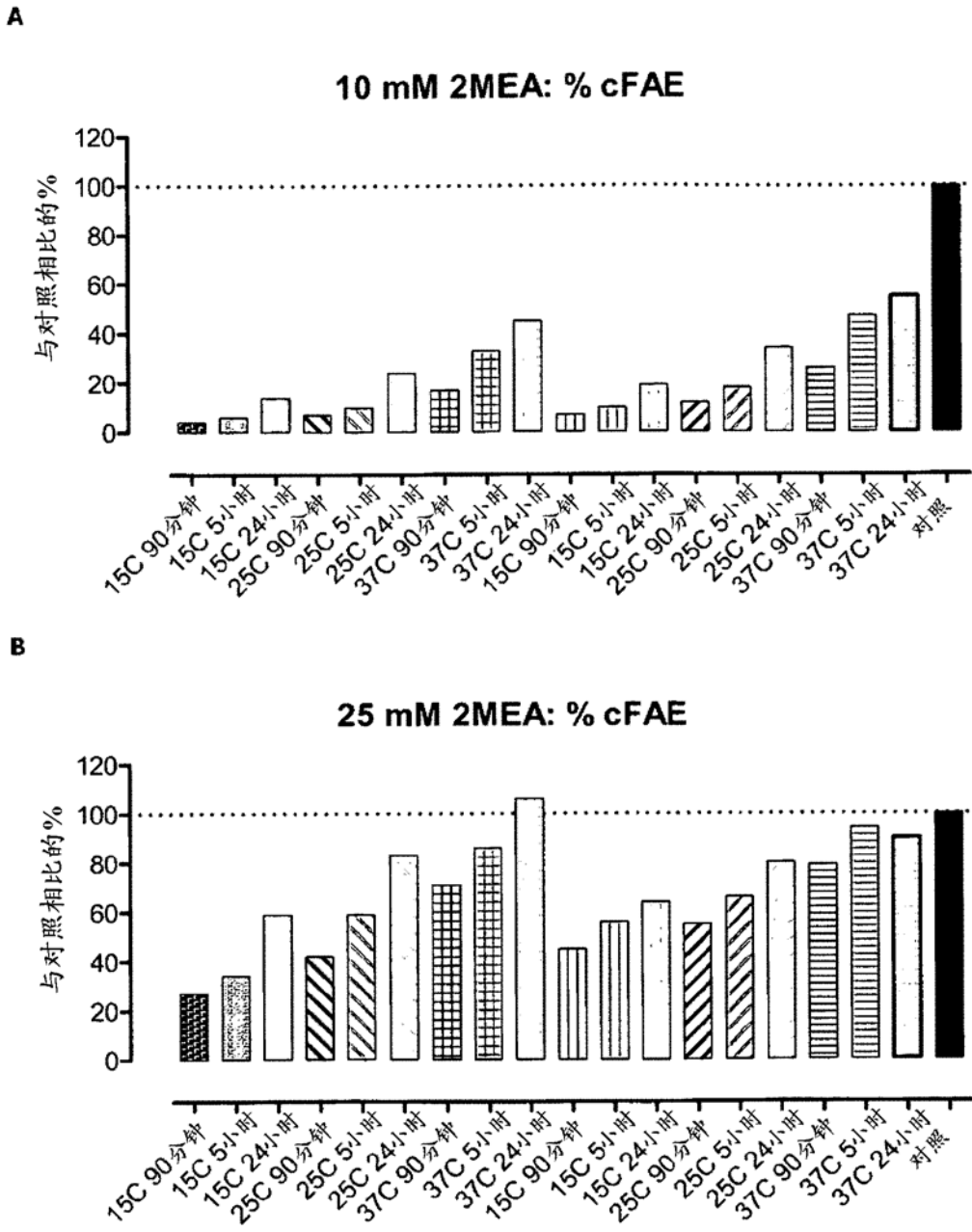
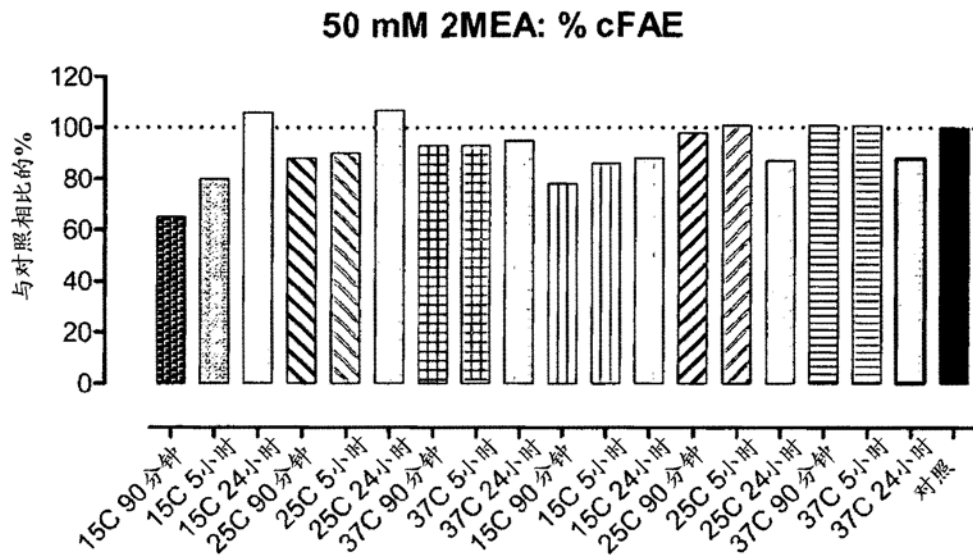


图 34

C



D

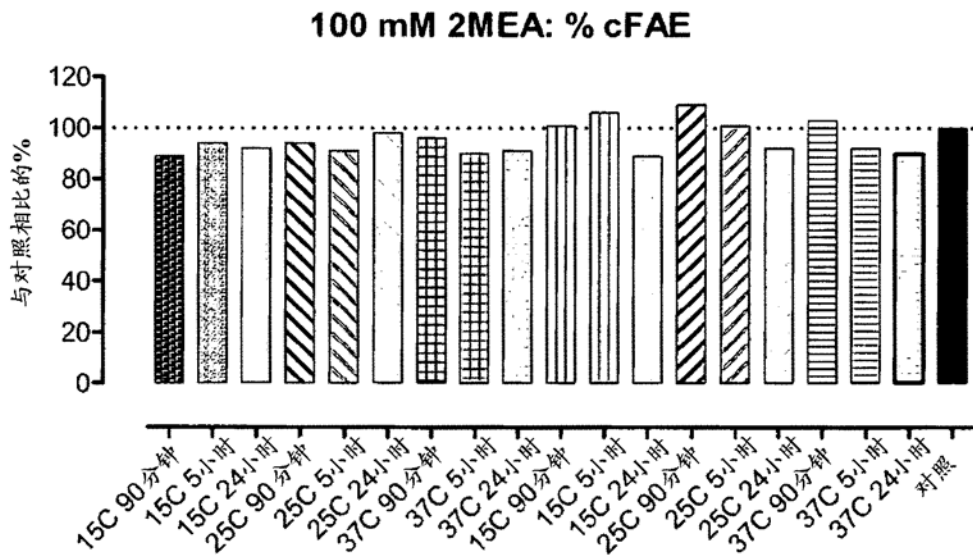


图 34 (续)

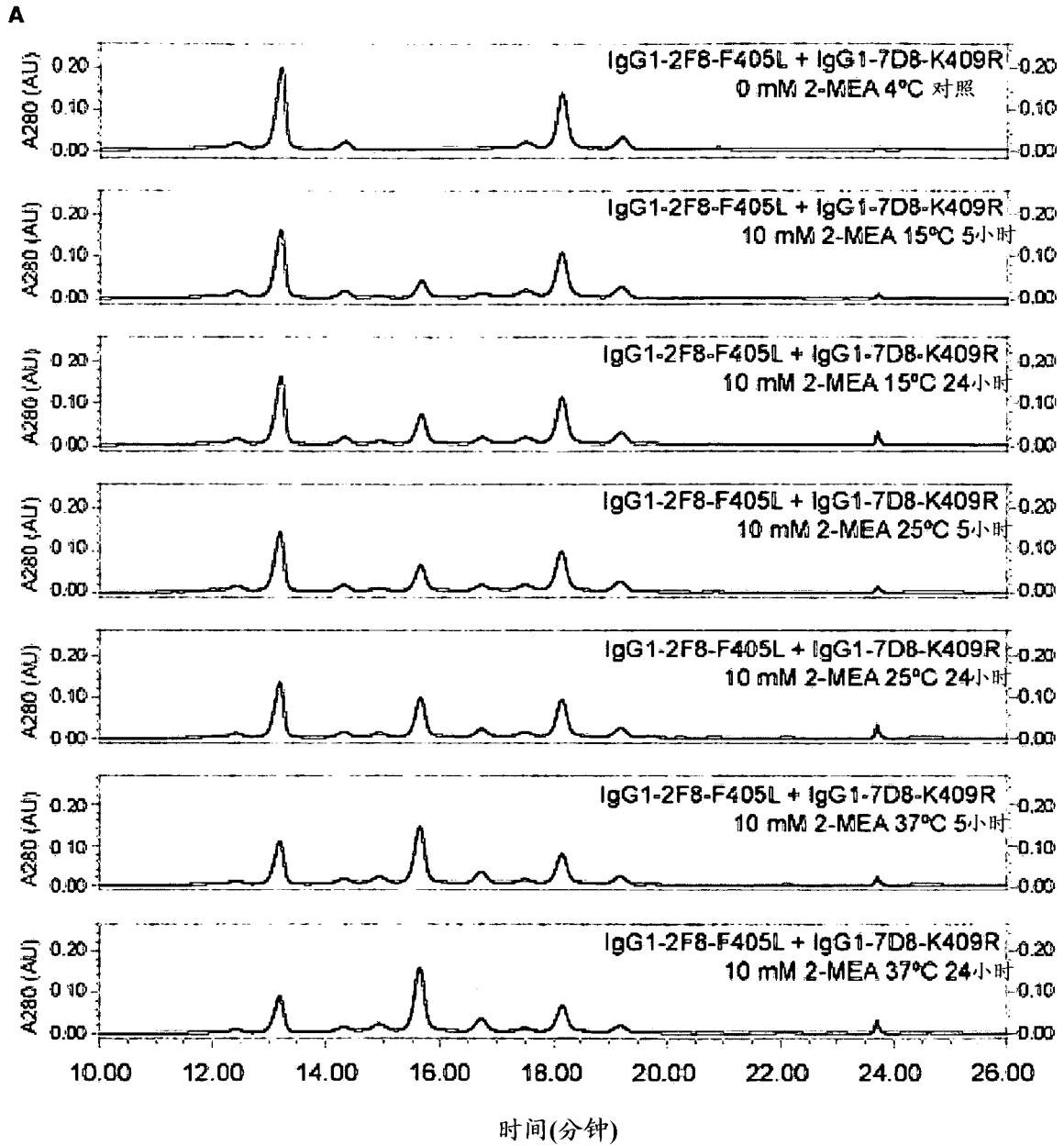


图 35

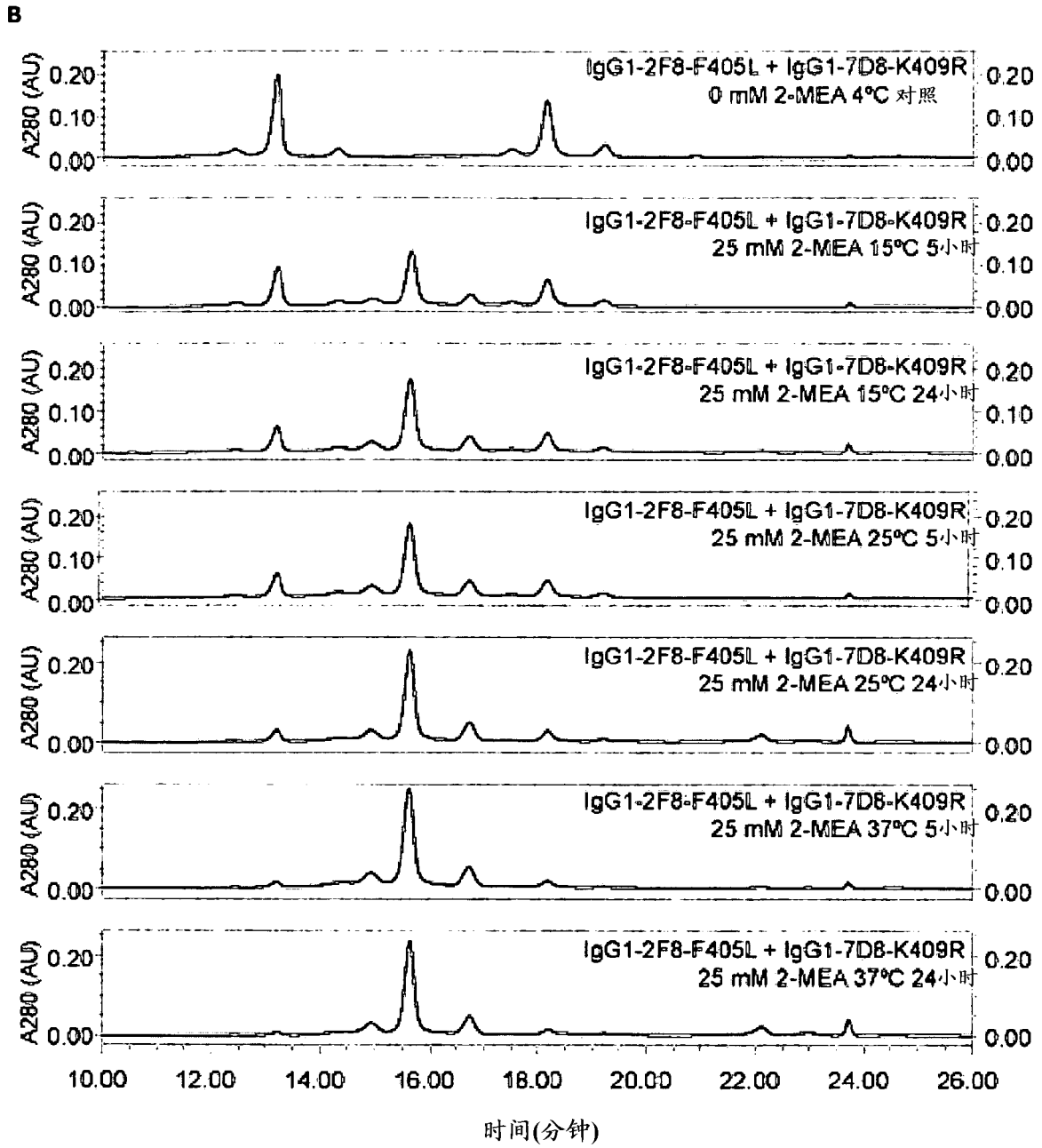


图 35

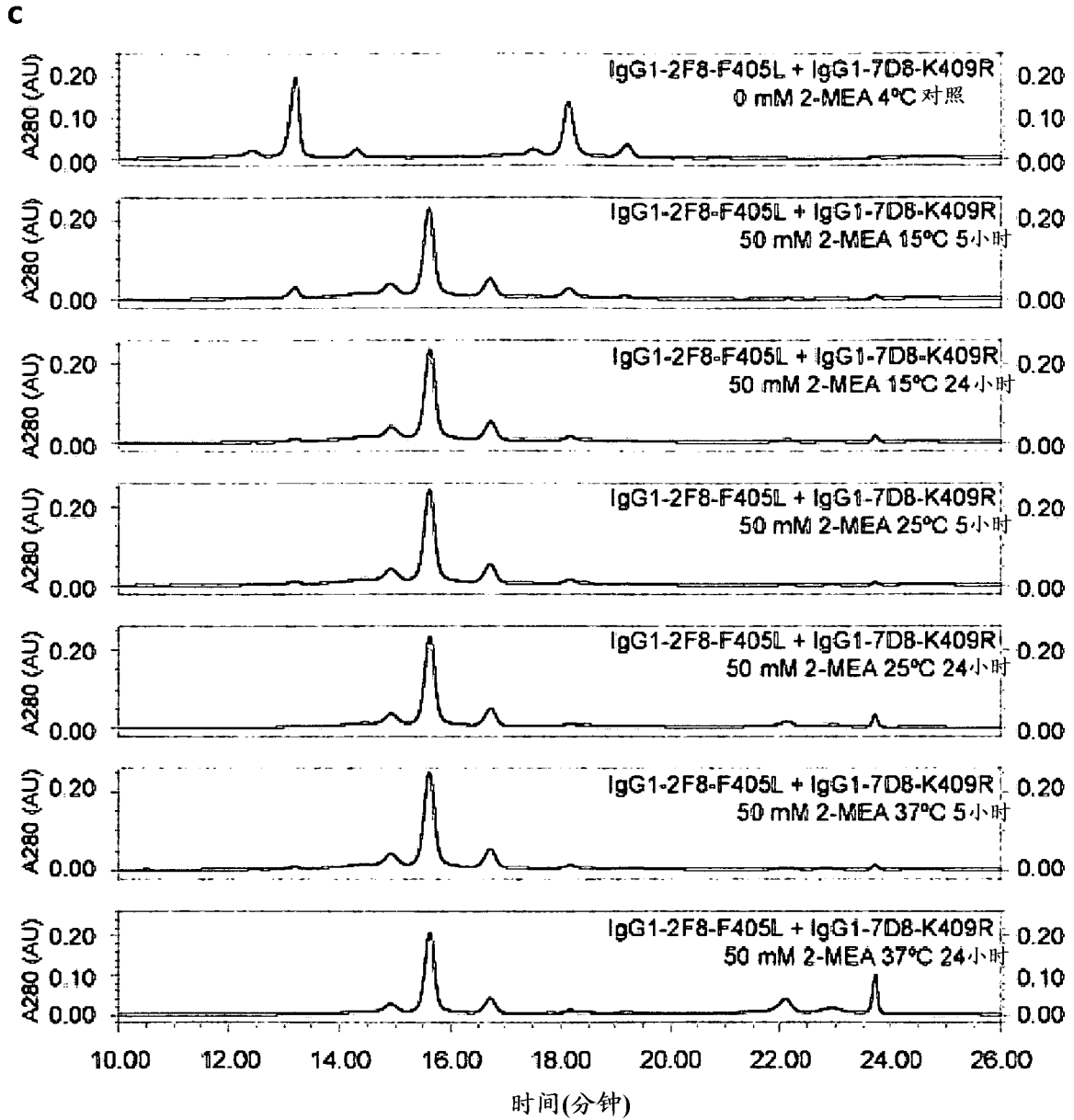


图 35

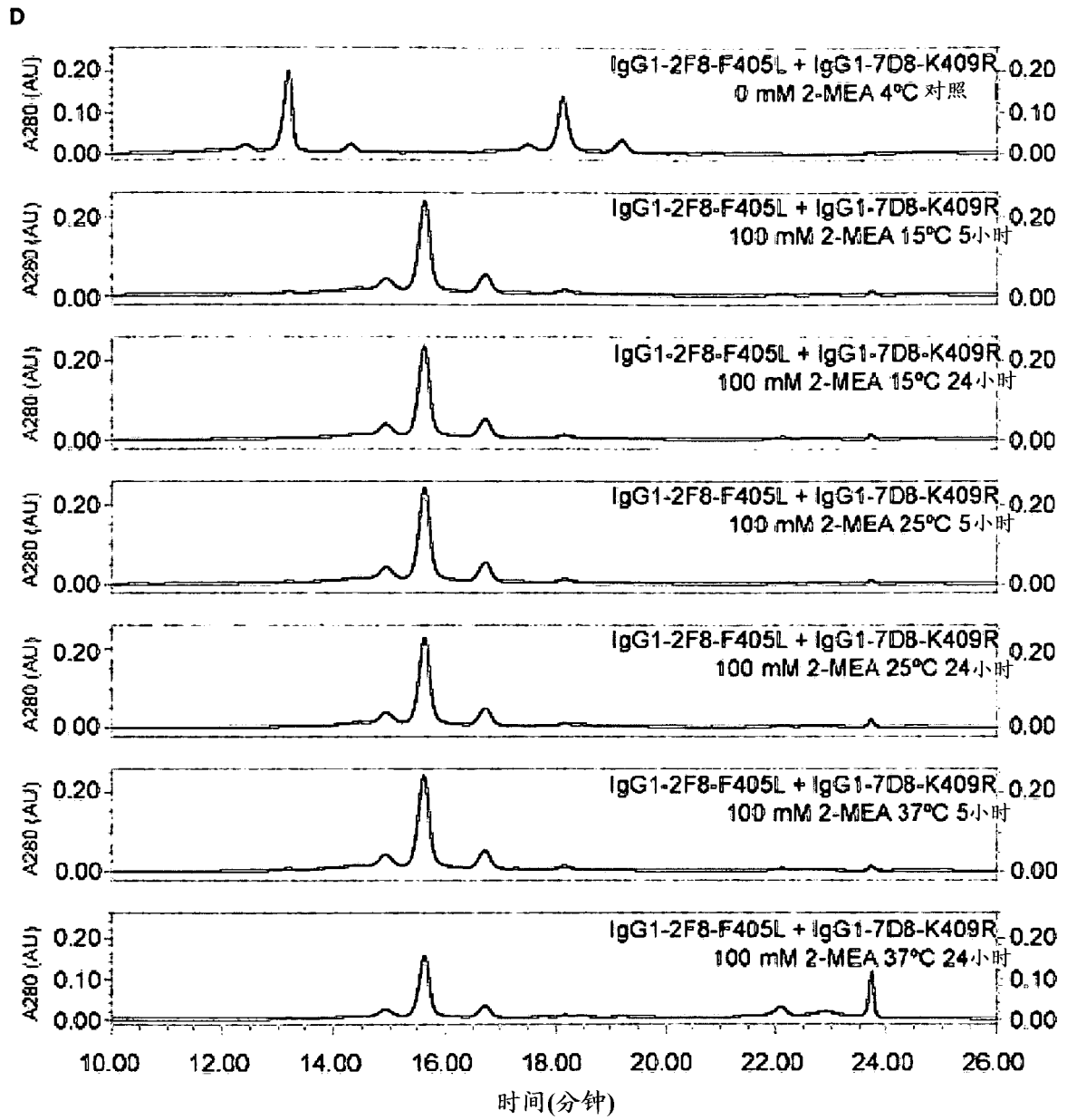
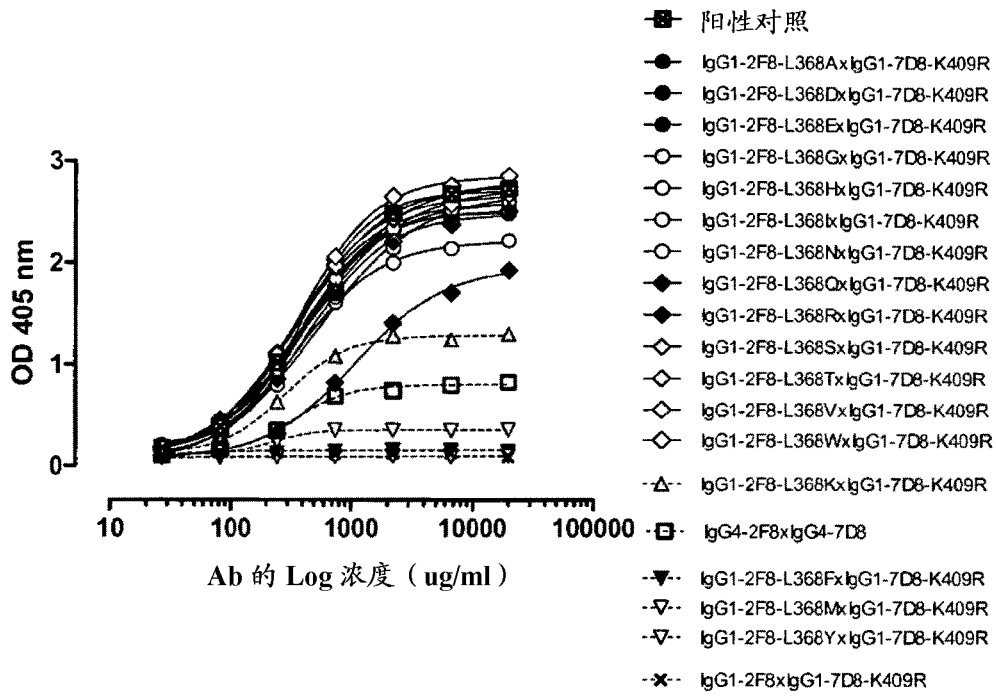


图 35

A



B

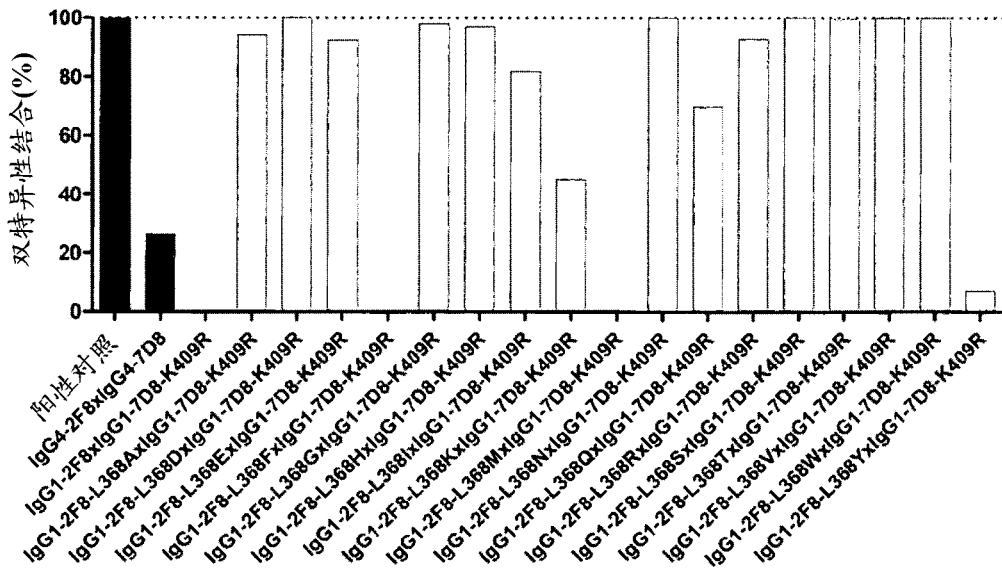
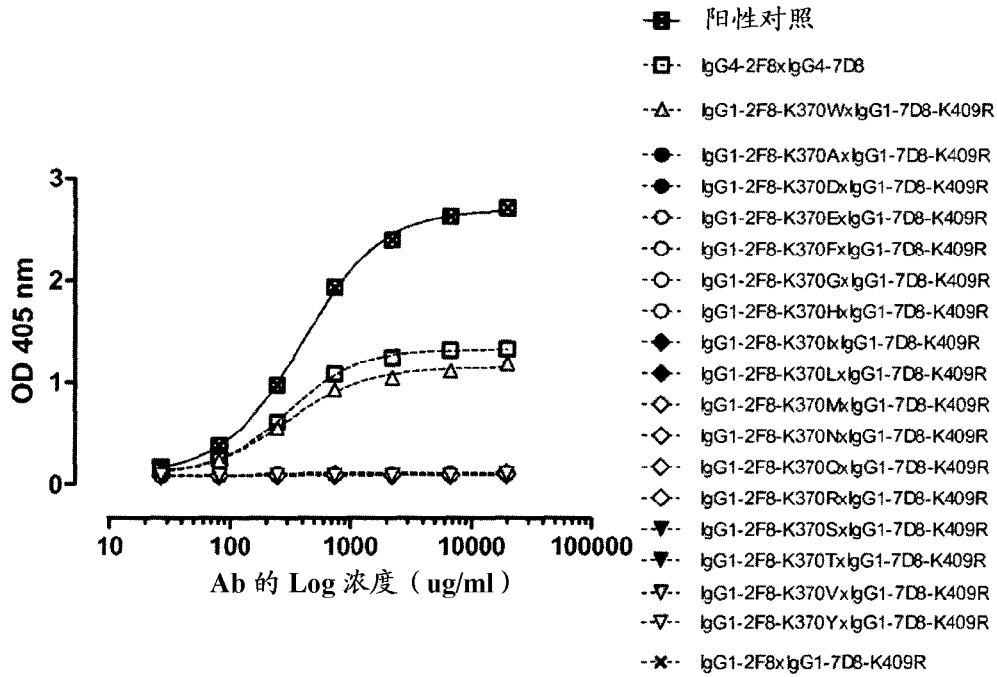


图 36

A



B

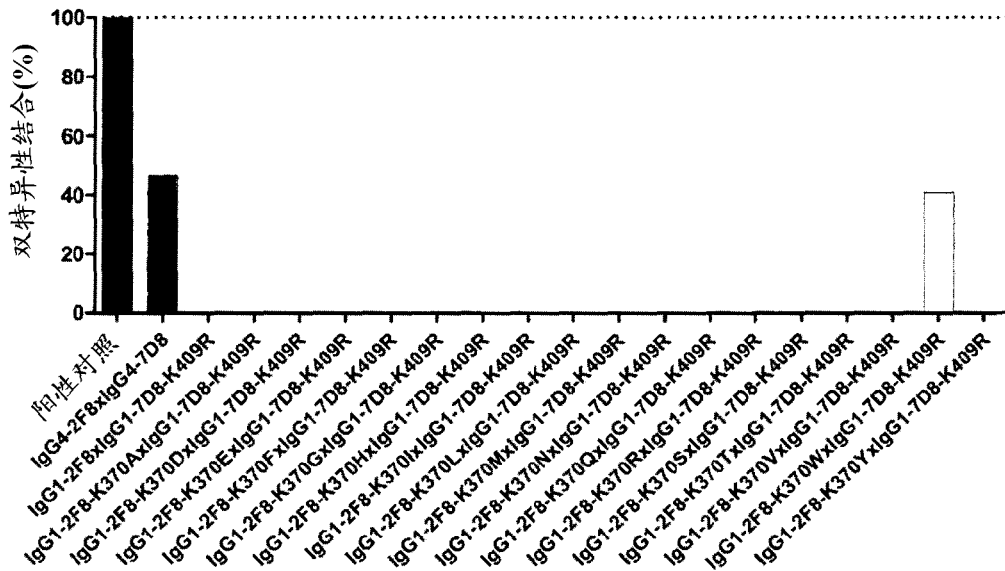
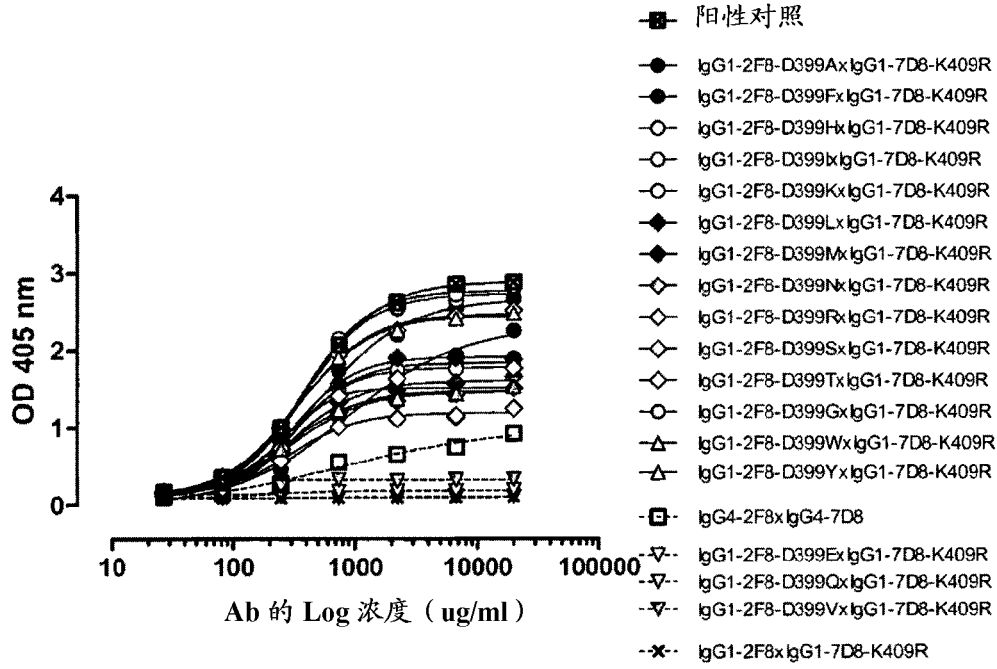


图 37

A



B

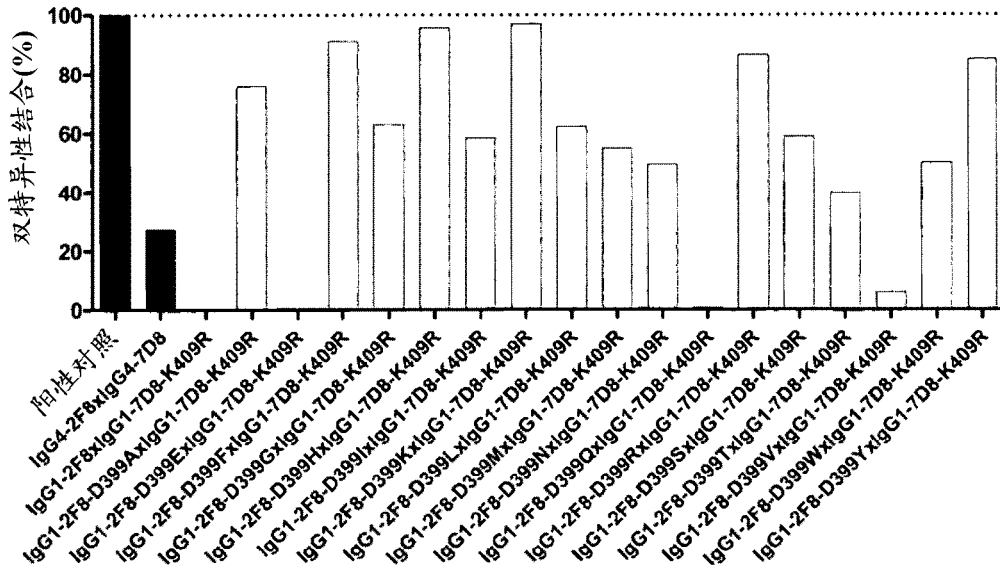


图 38

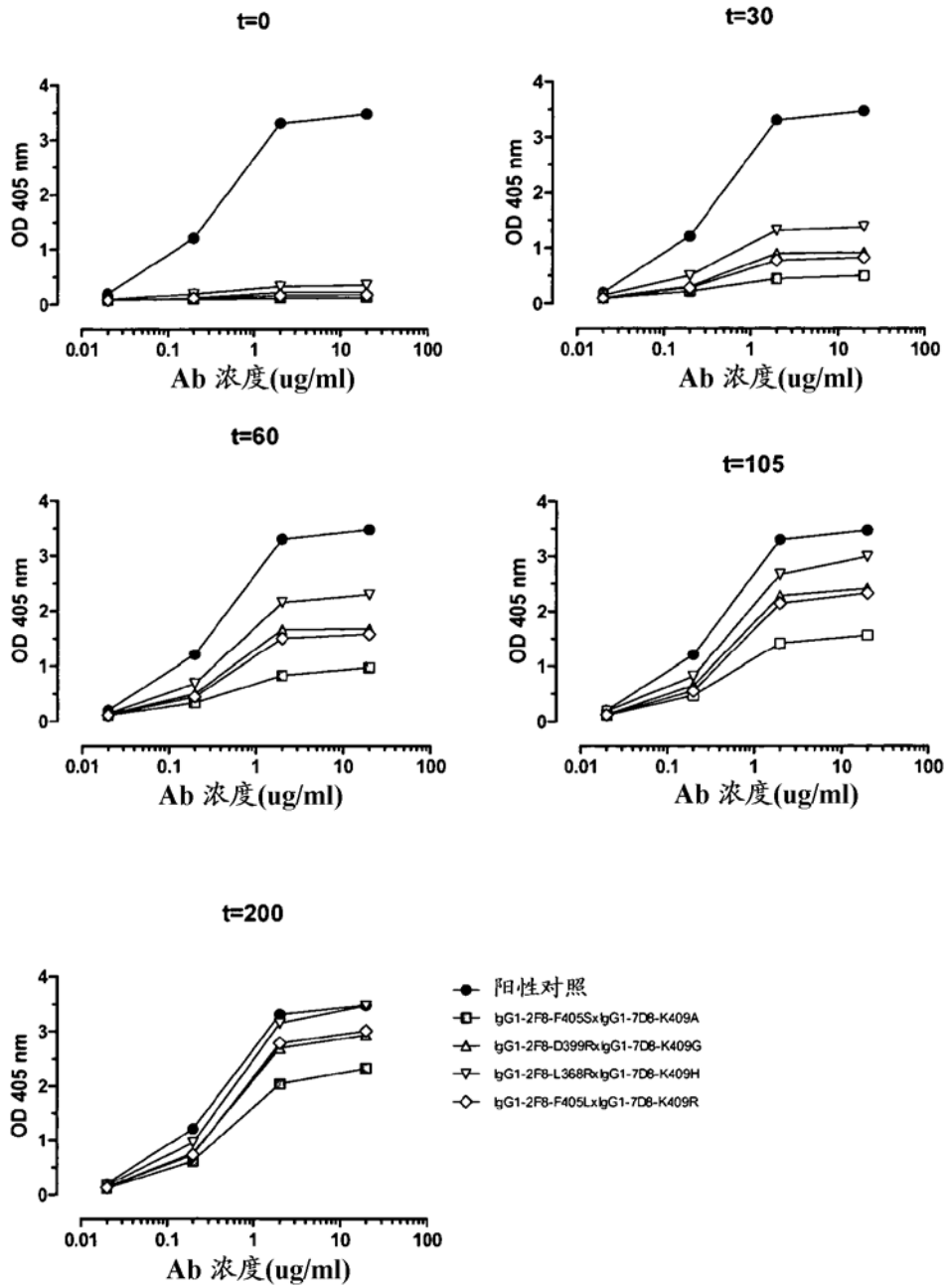


图 39

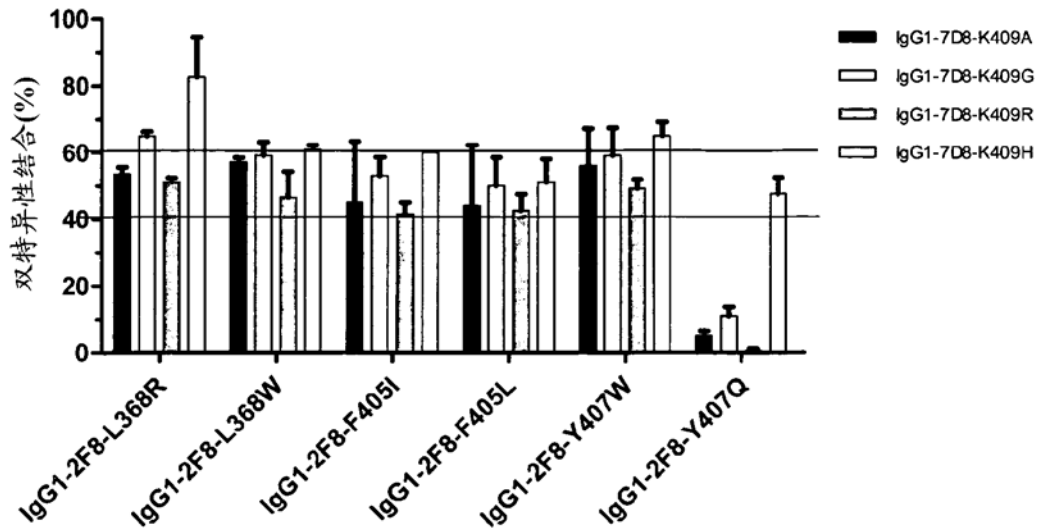


图 40

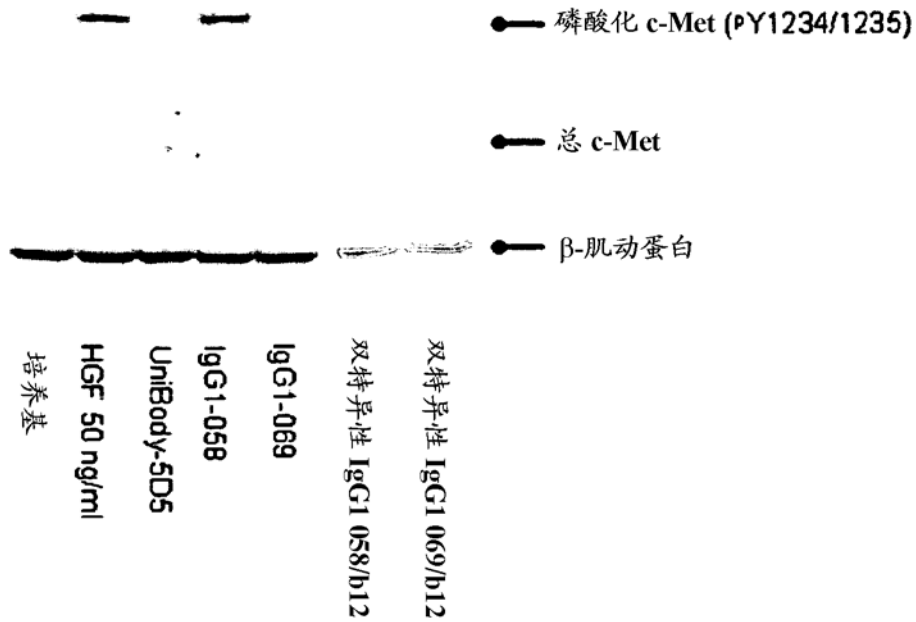


图 41

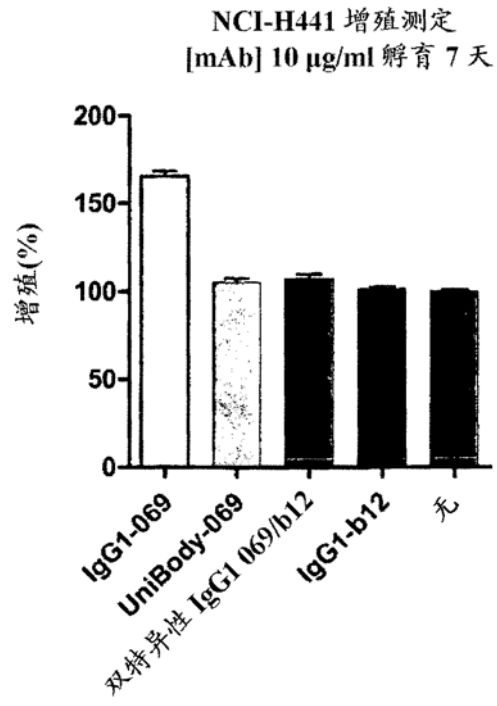
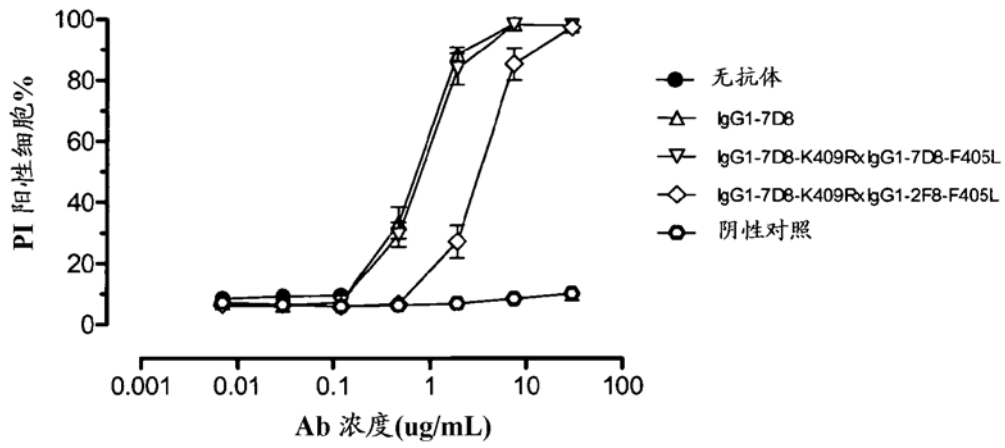


图 42

A

对 Daudi 细胞的 CDC



B

对 Raji 细胞的 CDC

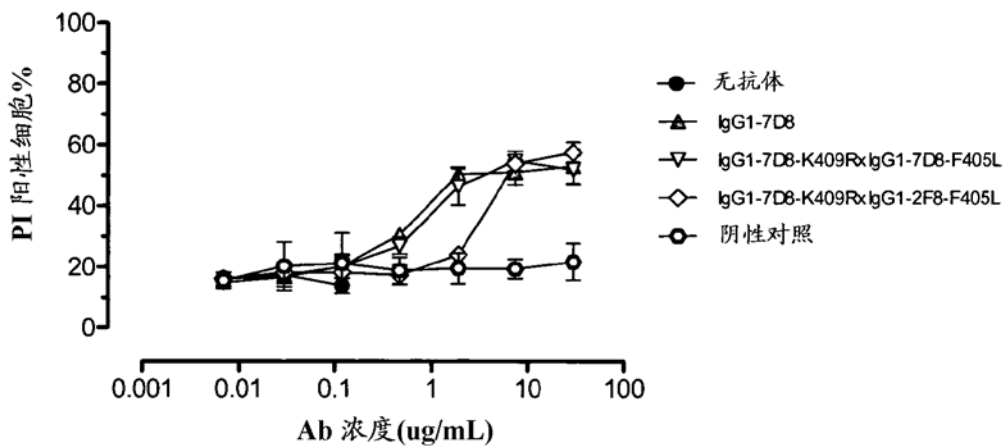


图 43

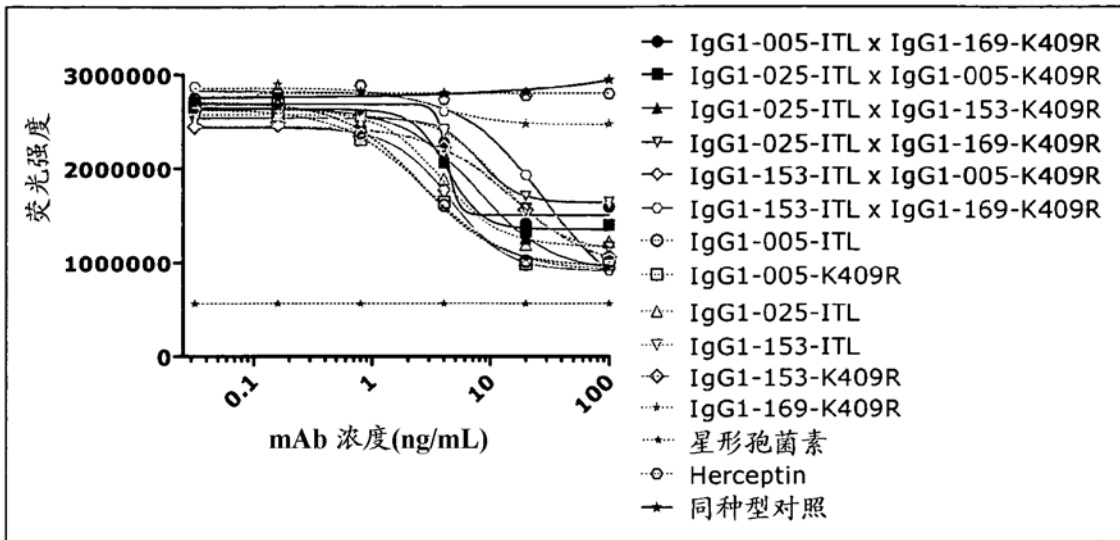


图 44

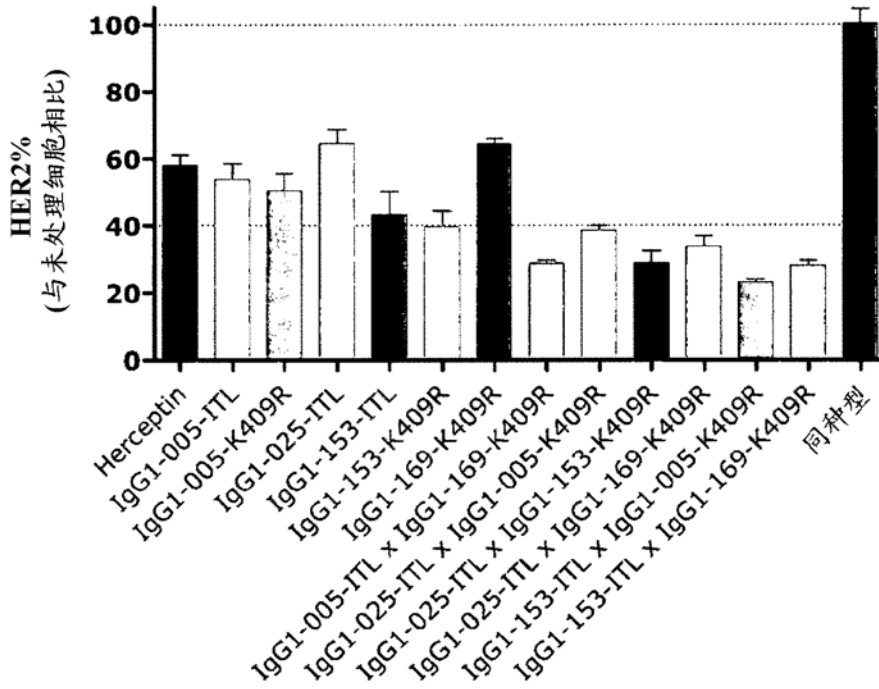
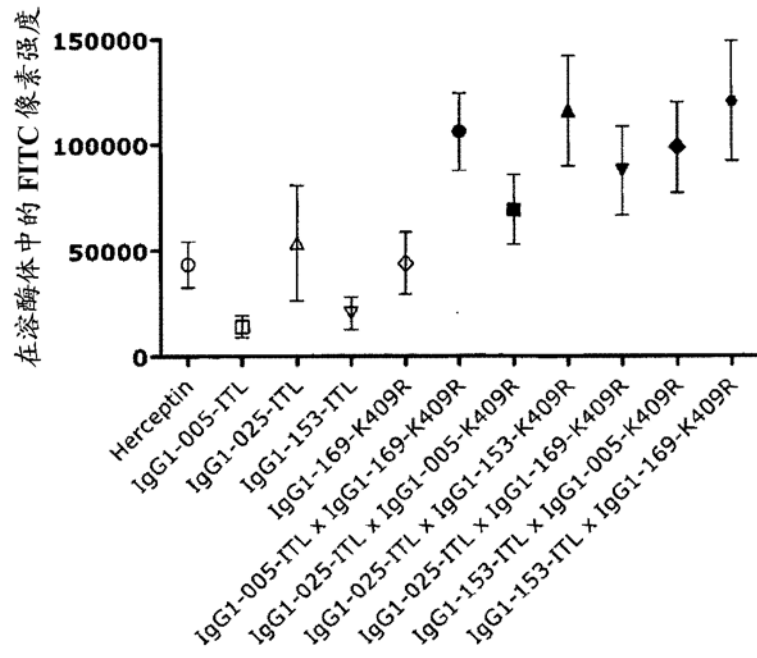


图 45

A



B

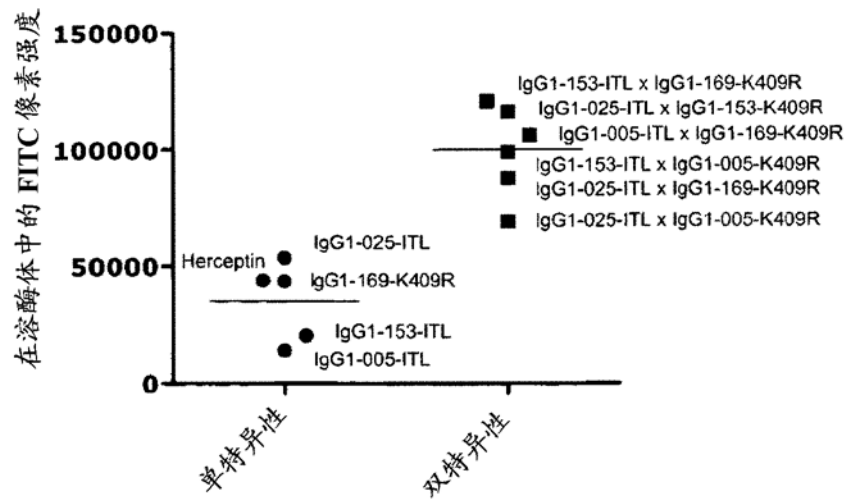


图 46

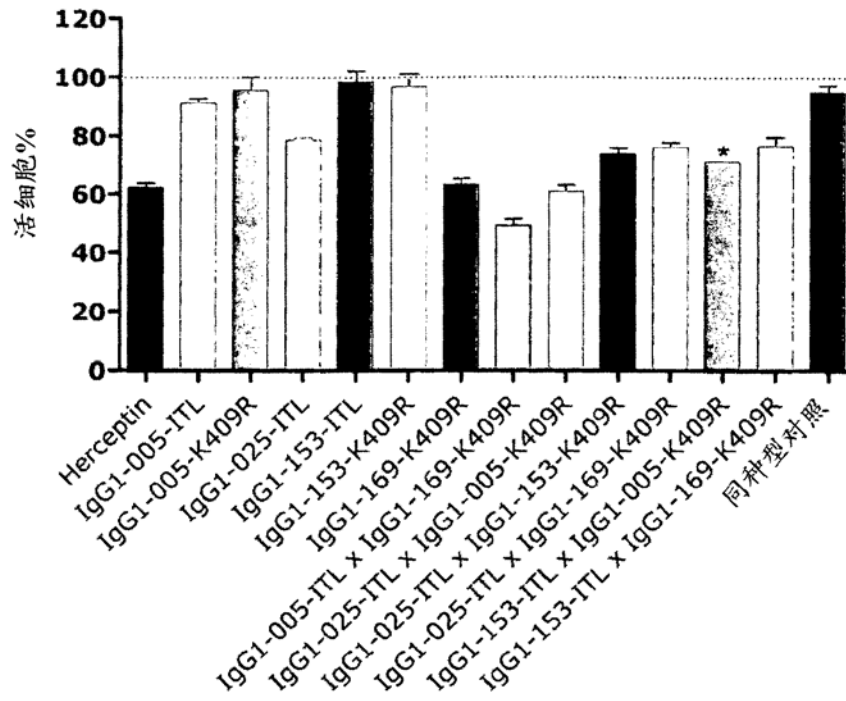


图 47

A

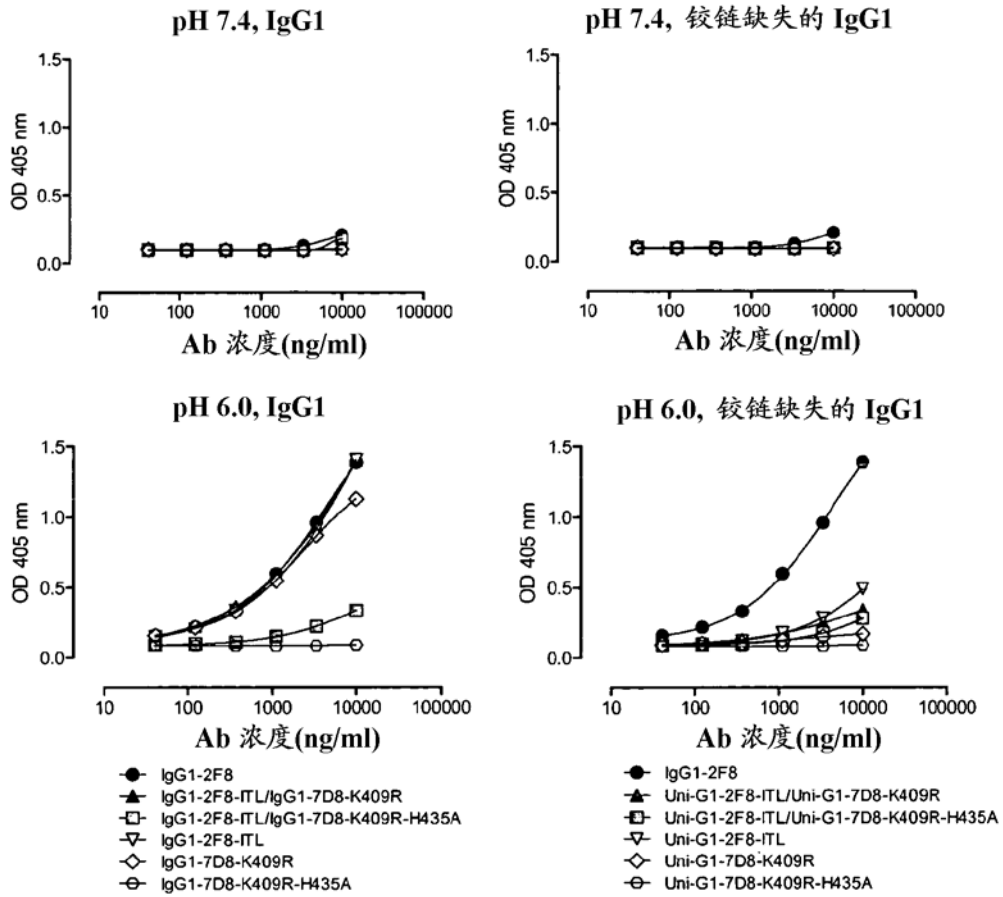


图 48

B

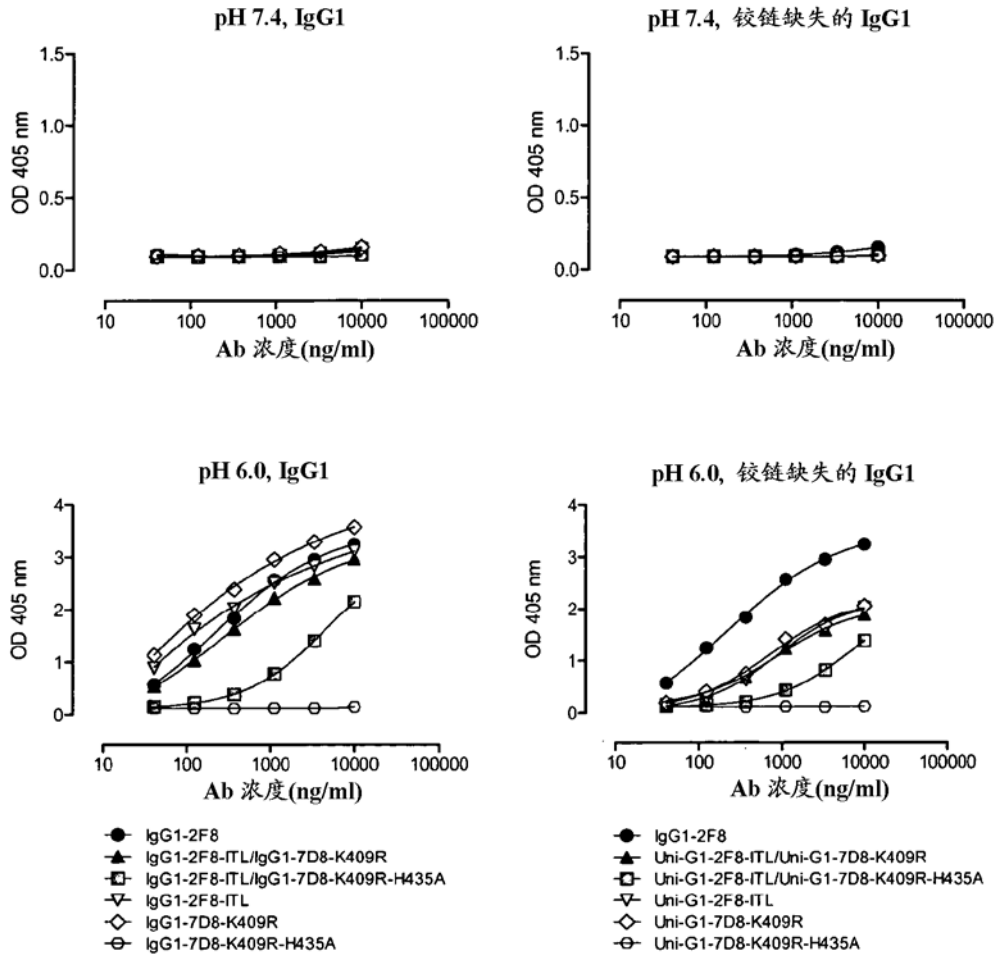


图 48 (续)

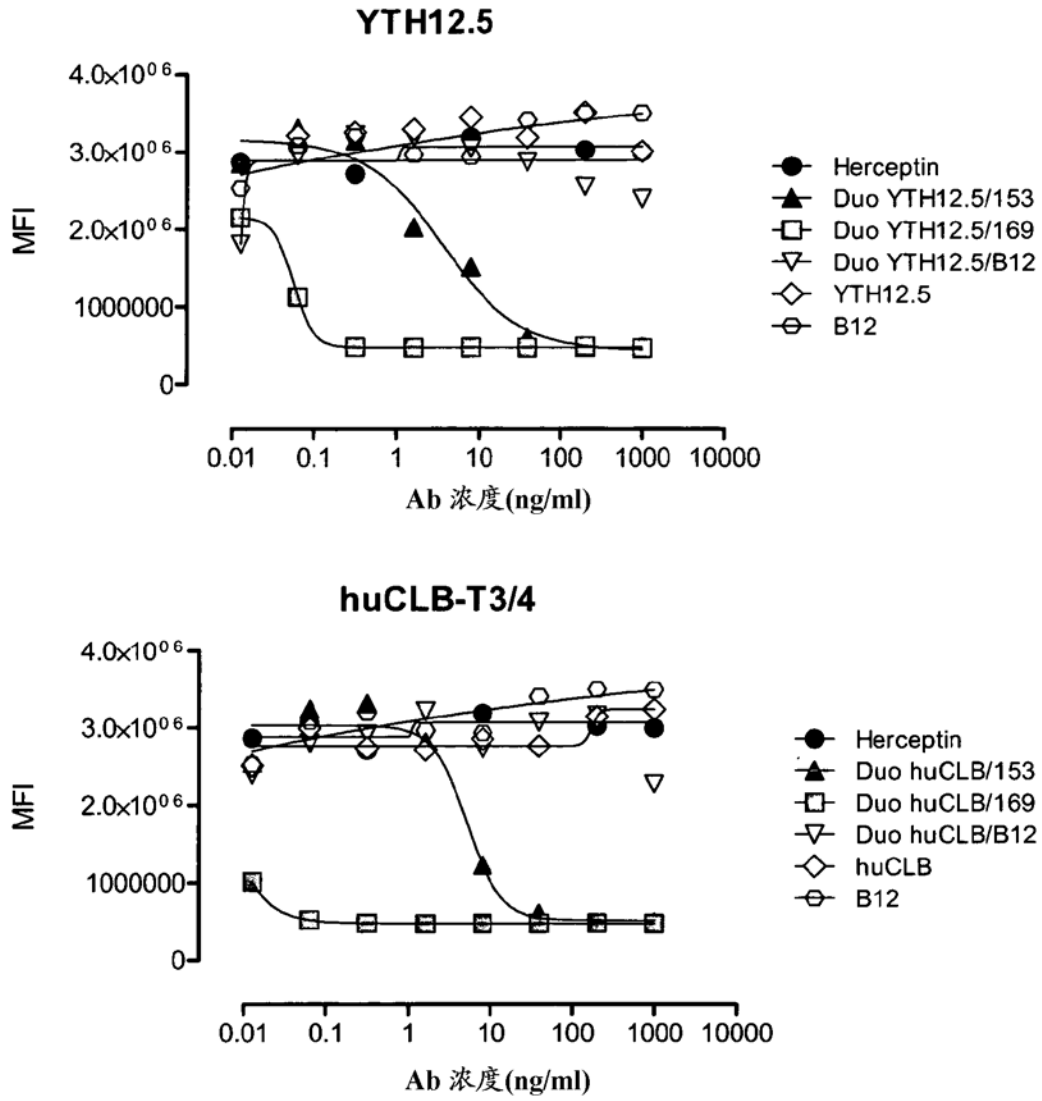


图 49

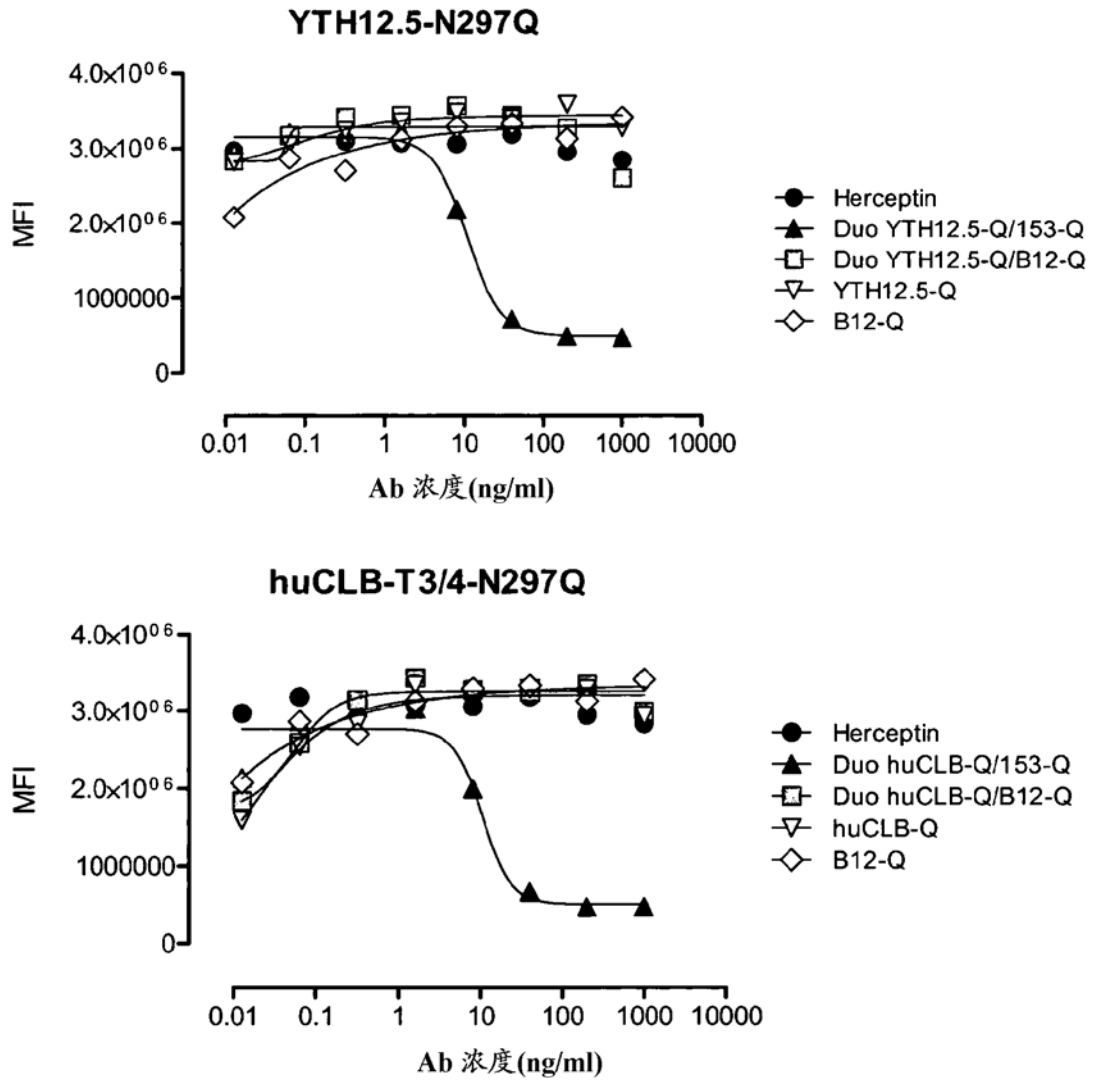


图 49 (续)