



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104583239 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201380035170. 7 *C07K 16/18*(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 05. 10 *G01N 33/53*(2006. 01)

(30) 优先权数据 *C12N 15/13*(2006. 01)

61/645, 302 2012. 05. 10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/040575 2013. 05. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/170168 EN 2013. 11. 14

(71) 申请人 生物蛋白有限公司

地址 美国加州

(72) 发明人 格那德·弗雷 华文昌

杰·M·少特

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限

公司 11002

代理人 王朋飞 刘成春

(51) Int. Cl.

C07K 16/46(2006. 01)

权利要求书2页 说明书27页 附图2页

(54) 发明名称

多特异单克隆抗体

(57) 摘要

本发明涉及多特异性抗体的产生, 该抗体的特征在于其以特异性和亲和性与多个抗原结合的能力。尤其是, 本发明涉及双特异性抗体。

1. 一种产生多特异性抗体的方法,所述方法包括:
 - (a) 鉴别在功能上补充两个不同的免疫球蛋白重链 (HC) 可变抗体区的单个免疫球蛋白轻链 (LC) 可变抗体区;
 - (b) 在修饰了 IgG 恒定结构域的情况下在框架中克隆所述两个不同的免疫球蛋白重链 (HC) 可变抗体区,从而使其不再组装形成免疫球蛋白重链同源二聚体;
 - (c) 在宿主细胞中共表达所述免疫球蛋白轻链 (LC) 可变抗体区和所述两个不同的免疫球蛋白重链 (HC) 可变抗体区以产生多特异性抗体。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,步骤 (b) 中的所述修饰是向一免疫球蛋白重链的 CH3 结构域内引入氨基酸侧链,所述氨基酸侧链匹配另一免疫球蛋白重链的 CH3 结构域中的适当设计的腔。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,还包括演化演化所述轻链或任一重链以改善所述多特异性抗体的一种或多种特性的额外步骤。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中,所述一种或多种特性选自:平衡解离常数 (K_D)、稳定性、解链温度 (T_m);pI、溶解度、表达水平、降低的免疫原性和改善的效应器功能。
5. 根据权利要求 3 所述的方法,其中,所述额外的演化步骤包括以下之一:综合位置演化 (CPE);综合位置插入演化 (CPI)、综合位置缺失演化 (CPD);由组合蛋白合成 (CPS) 跟随的综合位置演化 (CPE);由组合蛋白合成 (CPS) 跟随的综合位置缺失演化 (CPD);或者由组合蛋白合成 (CPS) 跟随的综合位置缺失演化 (CPD)。
6. 根据权利要求 1 所述的方法,还包括使所述多特异性抗体与有机部分缀合以产生缀合的多特异性抗体。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述重链均源自相同的亲本抗体。
8. 根据权利要求 1 所述的方法表达的多功能性抗体。
9. 权利要求 3 所述的缀合的多特异性抗体。
10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述多特异性抗体特异性地结合 3 个表位。
11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述多特异性抗体特异性地结合 4 个表位。
12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述宿主细胞选自真核宿主细胞系,所述真核宿主细胞系选自:3T3 小鼠成纤维细胞;BHK21 叙利亚仓鼠成纤维细胞;MDCK、犬上皮细胞;HeLa 人体上皮细胞;PtK1 大鼠袋鼠上皮细胞;SP2/0 小鼠浆细胞;以及 NSO 小鼠浆细胞;HEK 293 人胚胎肾细胞;COS 猴肾细胞;CHO、CHO-S 中国仓鼠卵巢细胞;R1 小鼠胚胎细胞;E14.1 小鼠胚胎细胞;HI 人类胚胎细胞;H9 人类胚胎细胞;PF. R C. 6. 人类胚胎细胞;酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 细胞;以及毕赤酵母 (*picchia*) 细胞。
13. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述宿主细胞是原核宿主细胞。
14. 一种鉴别和修饰多特异性抗体的方法,所述方法包括:
 - a. 产生抗体文库;
 - b. 筛选所述文库以鉴别特异性结合表位的抗体;
 - c. 演化来自步骤 b 的所述抗体,以产生一组经修饰的抗体;
 - d. 筛选所述经修饰的抗体,以鉴别还特异性结合不同的表位的多特异性抗体,从而鉴别多特异性抗体;
 - c. 进一步修饰所述多特异性抗体,使得所述多特异性抗体包含有机部分。

15. 一种鉴别和修饰多特异性抗体的方法,所述方法包括:
- 产生抗体文库;
 - 筛选所述文库以鉴别结合两个以上的表位的多特异性抗体;
 - 演化所述多特异性抗体以产生一组修饰的抗体;
 - 筛选所述修饰的抗体,以优化结合所述两个以上的表位中的一个或以上表位;
 - 修饰所述多特异性抗体,从而使得所述多特异性抗体包含有机部分。
16. 根据权利要求 1 所述的方法,还包括制造所述修饰的多特异性抗体蛋白。
17. 一种在制造宿主中表达修饰的多特异性抗体蛋白的方法,所述方法包括:
- 演化模板多特异性抗体蛋白,以在制造宿主中产生一组演化的多特异性抗体蛋白;
- 以及
- 为了优化的特性,筛选所述一组演化的多特异性抗体蛋白;
 - 修饰所述演化的多特异性抗体,使得所述演化的多特异性抗体包含有机部分;以及
 - 在所述制造宿主中产生所述修饰的多特异性抗体蛋白。
18. 权利要求 17 所述的方法,其中,所述真核宿主选自:3T3 小鼠成纤维细胞;BHK21 叙利亚仓鼠成纤维细胞;MDCK、犬上皮细胞;HeLa 人体上皮细胞;PtK1 大鼠袋鼠上皮细胞;SP2/0 小鼠浆细胞;以及 NS0 小鼠浆细胞;HEK 293 人胚胎肾细胞;COS 猴肾细胞;CHO、CHO-S 中国仓鼠卵巢细胞;R1 小鼠胚胎细胞;E14.1 小鼠胚胎细胞;HI 人胚胎细胞;H9 人胚胎干细胞;PF. R C. 6. 人胚胎细胞;酿酒酵母细胞;以及毕赤酵母细胞。
19. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述筛选步骤包括荧光激活细胞分选 (FACS)。
20. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述轻链或重链均来源于获得伦理许可的蛋白治疗药物。
21. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述筛选步骤选自定量 ELISA、亲和 ELISA、EUSPOT、流式细胞仪、免疫细胞学、**BIACORE**[®] 表面等离子共振分析、Sapidyne KinExA[™] 动能排除测定、SDS-PAGE、蛋白质印迹和 HPLC。
22. 根据权利要求 15 所述的方法,其中,所述筛选步骤选自定量 ELISA、亲和 ELISA、EUSPOT、流式细胞仪、免疫细胞学、**BIACORE**[®] 表面等离子共振分析、Sapidyne KinExA[™] 动能排除测定、SDS-PAGE、蛋白质印迹和 HPLC。
23. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述多特异性抗体特异性地结合 5 个以上的表位。

多特异单克隆抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及多特异性抗体的产生,该抗体的特征在于,其以特异性和亲和性与多个抗原结合的能力。尤其是,本发明涉及双特异性抗体。本发明还涉及结合一个以上靶标的其他多特异蛋白质。

背景技术

[0002] 虽然众所周知,低亲和性(大约 $>1\mu\text{M}$)抗体通常结合多个抗原,但是通常将天然和人工的亲合性成熟和优化方法(定向演化或者分子演化)设计成增加仅仅针对处于高亲和性的分子的单个表位的亲和性和特异性。通常,对于大部分应用,特异性是重要的特性;例如,在治疗学中特异性可以防止可能降低分子的安全性的脱靶效应。然而,结合有限数量(例如2、3、4、5、6、7、8、9或者10,但是优选2或者3)的选定的靶抗原的能力具有实质的用途,尤其是例如用于治疗其中存在多个活化路径的疾病,诸如与癌症相关的疾病。定期用单克隆抗体对癌症进行免疫治疗,并不激活T-细胞,因为它们不表达Fc-受体。双特异性抗体(一条臂结合肿瘤标志物,一条臂结合T-细胞特异表面抗原,例如CD3)可以克服该问题并且连接肿瘤细胞和T-细胞。另外,三功能性抗体(具有2种不同的结合特异性和完整Fc结构域的IgG)还可以结合至Fc受体表达细胞,如巨噬细胞和树突细胞。然后肿瘤细胞被连接至免疫系统的一个或多个细胞,该免疫系统随后消灭肿瘤细胞。

[0003] 数个团队已经尝试设计双特异性抗体,例如通过双硫键还原拆分两个独立的抗体的抗体重链,然后在氧化环境下再聚集抗体来制造异源抗体,从而Fab的二价IgG分子不同并且结合至单独的抗原。该方法的缺点在于对相同的目标分子无亲合力,并且带来成本高的产品生产及纯化过程。也开发了其他方案,其包括Fab内的序列扩增,有效地复制抗体上的抗原结合口袋,从而每个结合口袋可以具有对单个抗体分子的不同抗原特异性。虽然这简化了生产和纯化,但是该结构对于人体是外来的并且存在刺激患者内的负免疫反应的风险。其他团队利用新颖的共价连接以实现多表位结合,从而产生“抗体类”分子。

[0004] 可能难以生产传统的双特异或者多特异性抗体。例如,通过表达同一细胞中的两个单独的重链和两个单独的轻链可以构建这些抗体(Quadroma technology, Milstein et al, 1983),然而,该方法存在问题,因为除了期望的轻链1/重链1-重链2/轻链2异二聚体,将总共形成10个可能的重链和轻链组合(Suresh et al., 1986)。多余的轻链/重链配对的结合亲和性和特异性是未知的。为了降低得到的种群的可能的轻链/重链组装的复杂性作出的努力包括诸如“杵臼”设计(“knob in hole” design, Ridgeway et al., 1996, 通过引用并入本文)的方法,其中可以修饰重链的Fc部分以消除一些同源二聚体的形成。然而,即便是有这些改变,利用传统技术该种群仍然复杂。期望的双特异(或者多特异)产物只是混合物的一小部分,使得双特异(多特异)抗体的纯化困难并且有时在许多情况下以商业规模是不可取的。

[0005] 本发明的多特异性抗体的特征在于其以特异性和亲和性(例如, $<10\text{nM}$)结合至多个抗原的能力。在一个方面,本发明的多特异性抗体包含两个不同的重链可变结构域(结

合两个或以上的不同抗原)、匹配两个重链可变结构域或者已经被优化以匹配两个重链的单个轻链可变结构域、以及形成异源二聚体或者已经被优化以形成异源二聚体的 Fc。可以以若干途径实现本发明的多特异性抗体的构建。例如,在一种途径中,利用若干方法(包括本文描述的方法)中的其中一种演化两个亲本单克隆抗体的可变结构域,从而同一单条轻链可以在功能上补充来自亲本抗体的两条重链。还可以演化单个亲本抗体的重链,从而其可以结合第二靶标,产生新的重链,随后用来自亲本抗体的轻链配对新的重链。在又一途径中,可以演化单个亲本抗体的轻链,从而其可以结合第二靶标,产生新的轻链,然后用来自亲本抗体的重链配对新的轻链。采用“杵臼”型途径或者促使 Fc 形成或者导致 Fc 形成异源二聚体的任何其他途径,可以产生形成本发明的多特异性抗体的异源二聚体的 Fc 部分。

[0006] 本文进一步描述了构建本发明的多特异性抗体的实例。

[0007] 在一个实施方案中,在分离本发明的多特异性抗体之后,通过演化方法可以进一步改善多特异性抗体与一个或多个抗原或者靶标的亲和性,例如综合演化方法(comprehensive evolution process)。在综合演化方法的一个方面中,在筛选期间鉴别高表达突变体(up-mutant),因为这些突变体改善与至少一个或两个抗原的结合而不会导致降低与其中任一抗原的结合。然后可以进一步例如组合地混合和匹配这些高表达突变体(改变可以位于重链和/或轻链内)。

[0008] 在某些其他例子中,期望与其中一个靶抗原的较低亲和性和与另一靶抗原的较高亲和性。例如,Y. Joy Yu等在Science Translational Medicine, 25May 2011, Vol 3, Issue 8484ra44, “Boosting Brain Uptake of a Therapeutic Antibody by Reducing Its Affinity for a Transcytosis Target”上发表了一种双特异性抗体,其具有包含低亲和性抗转铁蛋白受体抗体的一条臂和包括高亲和性 BACE1 抗体的另一条臂,该双特异性抗体能够穿过血脑屏障并且在小鼠脑中达到治疗浓度。与亲本单特异抗体相比,该双特异性抗体有效得多。

[0009] 因此,在综合演化方法的另一方面中,在筛选期间鉴别高表达突变体,因为那些突变体改善与一个抗原的结合。虽然不优选导致与第二抗原的结合亲和性降低的突变体,但是这些突变体在以组合方法在突变组合方法期间与其他突变组合时失去抑制效应的情况下是有用的。基于候选物的整体亲和性以及其各自的与每一所选抗原的抗原:抗体结合的打开和关闭率(on and off rate),可以实施筛选以鉴别最重要的候选物。

[0010] 还可以优化本发明的多特异性抗体,以增加或者降低在其他条件中的活性或者稳定性,诸如 pH、氧化、温度、压力或者不同的离子浓度。

[0011] 附图简要说明

[0012] 图 1 示出本发明的 H₂L 抗体的一个实施方案。H₂L 抗体具有优化的可变结构域,其允许同一轻链与来自 2 个不同的亲本抗体(抗体 1 和抗体 2)的 2 条重链中的每一条组装而不改变对于特定抗原的结合特异性。轻链与来自抗体 1 的重链 1 组装而形成结合抗原 1 的“Fab-臂 1-H₂L”。同一轻链还与来自抗体 2 的重链 2 组装而形成结合抗原 2 的“Fab-臂 2-H₂L”。以只允许 HC1-HC2 二聚体在体内形成的方式修饰重链的 Fc 部分(例如,在本实例中通过“杵臼”设计促进,并且标记成 Fc 异源二聚体)。只形成异源二聚体的 2 条重链和单条轻链的表达导致仅仅形成单一产物,即本发明的“H₂L mAb”抗体。产生的每个分子具有结合抗原 1 的一条 Fab 臂和结合抗原 2 的另一条 Fab 臂。可以类似于普通的 IgG 一样生产

和纯化 H₂L mAb。

[0013] 图 2 示出筛选排列的人类免疫球蛋白轻链文库的实例。用重链 HC1 和完全的人轻链（不同的轻链位于每个孔中）组成的重组 IgG 孵育微量滴定板中固定的抗原靶标 A。在用抗人 IgG-HRP 缀合物清洗后检测结合的抗体。每个柱代表一独特的克隆。水平的黑线表示背景活性；水平的虚线表示 2x 背景。将具有 2x 背景之上的信号的克隆作为主要标的（primary hits）计数。X 轴代表孔位置；y 轴代表 OD₄₅₀ 值。

[0014] 图 2 示出双特异 H₂L mAb 与两个靶抗原的结合的 ELISA 数据。用靶标 A（灰柱）或者靶标 B（黑柱）涂覆微量滴定板的孔。与野生型轻链 wtLC1 或者新型轻链 LC-15D10 组合的重链 1（HC1）结合靶标 A 而不结合靶标 B，而与野生型轻链 wtLC2 或者新型轻链 LC-15D10 组合的 HC2 结合靶标 B。由 HC1、HC2 和新型轻链 LC-15D10 组成的双特异 H₂L mAb 结合靶标 A 和靶标 B 两者。X 轴代表克隆名称。Y 轴代表 OD₄₅₀ 值。

[0015] 术语定义

[0016] 为了有助于理解本文提供的实例，将说明某些频繁出现的方法和 / 或术语。

[0017] 本文使用的术语“氨基酸”是指包含氨基基团（-NH₂）和羧基基团（-COOH）的任何有机化合物；优选作为自由基团，或者可选地，在缩合之后作为肽键的一部分。“20 个天然编码的形成多肽的 α-氨基酸”按照本领域的理解并且是指：丙氨酸（ala 或 A）、精氨酸（arg 或 R）、天门冬酰胺（asn 或 N）、天冬氨酸（asp 或 D）、半胱氨酸（cys 或 C）、谷氨酸（glu 或 E）、谷氨酰胺（gln 或 Q）、甘氨酸（gly 或 G）、组氨酸（his 或 H）、异亮氨酸（ile 或 I）、亮氨酸（leu 或 L）、赖氨酸（lys 或 K）、蛋氨酸（met 或 M）、苯丙氨酸（phe 或 F）、脯氨酸（pro 或 P）、丝氨酸（ser 或 S）、苏氨酸（thr 或 T）、色氨酸（trp 或 W）、酪氨酸（tyr 或 Y）以及缬氨酸（val 或 V）。

[0018] 术语“扩增”表示，多核苷酸的拷贝数量增加。

[0019] 本文使用的术语“抗体”是指完整的免疫球蛋白分子（包括 IgM、IgD、IgG、IgE 以及 IgA 同种型）以及免疫球蛋白分子的能够结合抗原表位的片段，诸如 Fab、Fab'、(Fab')₂ 以及 Fv 片段。利用本领域公知的方法（参见例如 Harlow and Lane, 同上）可以制作这些抗体片段，这些抗体片段保留一些能力以选择性地结合至其衍生自的抗体的抗原，以下进一步说明这些抗体片段。

[0020] (1) Fab 片段由抗体分子的单价抗原结合片段组成，并且该 Fab 片段可以通过木瓜蛋白酶消化整个抗体分子以产生由完整的轻链和一部分重链组成的片段而产生。

[0021] (2) 用胃蛋白酶处理整个抗体分子，然后还原，从而产生由完整的轻链和一部分重链组成的分子，可以获得抗体分子的 Fab' 片段。每一以该方式处理的抗体分子，获得两个 Fab' 片段。

[0022] (3) 用胃蛋白酶处理整个抗体分子而不进行随后的还原可以获得抗体的 (Fab)'₂ 片段。(Fab)'₂ 片段是两个 Fab' 片段通过两个二硫醚键连接在一起的二聚体。

[0023] (4) 将 Fv 片段定义成包含表达为两条链的轻链可变区和重链可变区的基因工程片段。

[0024] 具有“嵌合”性质的分子是以下分子：1) 与第一对照分子部分同源且部分异源；而 2) 同时与第二对照分子部分同源且部分异源；而没有 3) 排除同时与一个或多个其他的对照分子部分同源且部分异源的可能性。在非限制性实施方案中，通过组织部分分子序列的

重排可以制备嵌合分子。在非限制方面中,通过利用多个分子模板合成嵌合多核苷酸,可以制备嵌合多核苷酸分子,从而使得得到的嵌合多核苷酸具有多个模板的性能。

[0025] 本文使用的“比较窗口”是指连续的核苷酸位置的概念段,例如 20 个或者更多的连续的核苷酸位置,其中,多核苷酸序列可以与至少相同数量的连续核苷酸的对照序列相比,以及其中,比较窗口中的多核苷酸序列的部分与对照序列(其不包含添加或者缺失)相比,可以包括 20%或更少的添增或者缺失(即缺口),用于两条序列的最佳比对。用于比对比较窗口的最佳序列比对,可以通过以下方式进行:Smith and Waterman(1981)Adv. Appl. Math. 2:482 的局部同源性算法、Needleman and Wuncsch J. Mol. Biol. 48:443(1970)的同源性比对算法、Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)85:2444(1988)的相似法搜索、这些算法(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 中的 GAP、BESTFIT、FASTA、以及 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)的计算机实施或者通过检查,并且选择由各种方法产生的最佳比对(即导致比较窗口上的最高百分比的同源性)。

[0026] 本文所使用的术语“互补性决定区”和“CDR”是指 Kabat 和 Chothia 例证的本领域公认的术语。CDR 定义也通常公知为超变区或者高变环(Chothia and Leks, 1987; Chothia et al., 1989; Kabat et al., 1987; 以及 Tramontano et al., 1990)。可变区结构域通常包含天然存在的免疫球蛋白链的氨基端大约 105-115 个氨基酸(例如,氨基酸 1-110),但是稍微短些或者长些的可变结构域也适合用于形成单链抗体。CDR 是决定免疫球蛋白分子的特异性并且与特异性配体接触的所述免疫球蛋白的一部分。CDR 是所述分子最可变的并且促成这些分子的多样性。在每个 V 结构域中存在三个 CDR 区即 CDR1、CDR2 和 CDR3。CDR-H 描述可变重链的 CDR 区,并且 CDR-L 与可变轻链的 CDR 区相关。H 表示可变重链而 L 表示可变轻链。可以如 Kabat(1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U. S. Department of Health and Human Services, Chothia(1987). J. Mol. Biol. 196, 901-917 以及 Chothia(1989) Nature, 342, 877-883 中所述,确定 Ig- 衍生区的 CDR 区。

[0027] “保守氨基酸取代”是指具有相似侧链的残基的可交换性。例如,具有脂肪族侧链的氨基酸组是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂肪族羟基侧链的氨基酸组是丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的氨基酸组是天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳香族侧链的氨基酸组是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的氨基酸组是赖氨酸、精氨酸和组氨酸;以及具有含硫侧链的氨基酸组是半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守氨基酸取代组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸,苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸,丙氨酸-缬氨酸,以及天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0028] 本文使用的术语“去免疫”与产生模板结合分子的变体相关,通过使得所述变体相对于原始野生型分子在人体中是非免疫原性的或者免疫原性较小,而修饰所述模板结合分子。本发明的去免疫分子与非人类来源的抗体或其部分(如框架和/或 CDR)相关。相应的实例是如 US 4361549 中所描述的抗体或其片段。术语“去免疫”也与表现出产生 T 细胞表位的倾向降低的分子相关。根据本发明,术语“产生 T 细胞表位的倾向降低”与导致特异 T- 细胞激活的 T- 细胞表位的去除相关。

[0029] 另外,产生 T 细胞表位的倾向降低,表示促成 T 细胞表位形成的氨基酸的取代,即

对于形成 T 细胞表位是必要的氨基酸的取代。换句话说,产生 T 细胞表位的倾向降低与免疫原性降低或者诱导抗原独立性 T 细胞增殖的能力降低相关。另外,产生 T 细胞表位的倾向降低与去免疫相关,其意味着诱导抗原独立性 T 细胞增殖的氨基酸序列的潜在 T 细胞表位的损失或者减少。

[0030] 本文使用的术语“T 细胞表位”指可以在细胞内的肽、多肽或者蛋白质的降解期间释放并且随后由主要组织相容性复合体 (MHC) 的分子呈递以便引发 T 细胞的激活的短肽序列;尤其是参见 WO 02/066514。对于由 II 类 MHC 呈递的肽,然后 T 细胞的这种激活可以通过 B 细胞的直接刺激诱发抗体响应,从而产生所述抗体。

[0031] DNA 的“消化”是指利用只在 DNA 中的特定序列处发挥作用的限制性内切酶催化切割 DNA。本文使用的各种限制性内切酶是可商购的,并且其反应条件、辅因子和其他需求如本领域普通技术人员所公知地使用。对于分析目的,通常 1 μ g 的质粒或者 DNA 片段与约 20 μ l 的缓冲溶液中的约 2 个单位的酶一起使用。出于分离 DNA 片段以便构建质粒的目的,通常用更大体积的 20–250 单位的酶消化 5–50 μ g 的 DNA。特定的限制性内切酶的合适的缓冲液和底物量由制造商指定。在 37°C 下通常使用约 1 小时的孵育时间,但是可以根据供应商的指示改变。在消化之后,直接在凝胶上电泳该反应物以分离期望的片段。

[0032] 如本文所使用的,术语“表位”是指与抗体的抗体结合部位结合的抗原上的抗原决定簇。抗原决定簇通常由化学活性表面分子组组成,诸如氨基酸或者糖侧链,并且可以具有特异的三维结构特性,以及特异的电荷特性。本文使用的“表位”是指抗原或者能够形成结合相互作用的其他大分子的、与抗体的可变区结合体相互作用的部分。通常,这种结合相互作用显示为与 CDR 的一个或多个氨基酸残基的分子间接触。

[0033] 如本文所使用的,术语“演化”是指定向演化或者分子演化的方法,其是为了期望的性质通过实验修饰生物分子的方法,并且可以通过诱变一个或者多个亲本分子模板和在后代分子中鉴别任何期望的分子来实现;许多演化方法(定向演化)是本领域公知和发表的,包括定点诱变、易错 PCR、位点饱和法、以及其他随机和非随机的方法。本发明的方法可以使用这些方法中的任何方法。

[0034] 当提及对照多肽时,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”包括保留至少一种与对照多肽的生物功能或者活性至少基本上相同的生物功能或者活性的多肽。另外,术语“片段”、“衍生物”或者“同源物”的实例是“原形式 (pro-form)”分子,诸如可以通过切割修饰以产生具有显著更高活性的成熟酶的低活性前蛋白 (proprotein)。

[0035] 本文提供从模板多肽产生一组后代多肽的方法,在该组后代多肽中,每个氨基酸位置处表示“全范围的单氨基酸取代”。本文所使用的“全范围的单氨基酸取代”是涉及天然编码的 20 种天然编码的形成多肽的 α 氨基酸,如本文所描述的。

[0036] 术语“基因”,表示参与产生多肽链的 DNA 片段;其包括在编码区之前和之后(前导和尾部)的区域以及位于单个编码片段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0037] 术语“异源”,表示一个单链核酸序列不能与另一单链核酸序列或其补体杂交。因此,异源区域表示多核苷酸的区域或者多核苷酸在其序列内具有不能与另一核酸或者多核苷酸杂交的区域或者区。这种区或者区域是例如突变区域。

[0038] 术语“同源”或者“部分同源”,表示一个单链核酸序列可以与互补单链核酸序列杂交。杂交的程度可以取决于许多因素,包括序列之间同一性的量和诸如温度和盐浓度的杂

交条件,如以下描述。优选同一性区大于约 5bp,更优选同一性区大于约 10bp。

[0039] 免疫球蛋白轻链可变区或者重链可变区由被三个高变区中断的“框架”区组成,也称为 CDR's。已经精确地限定框架区和 CDR's 的长度(参见,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”Kabat et al.,1987)。不同的轻链或者重链的框架区的序列在物种内相对保守。如本文所使用的,“人类框架区”是与天然存在的人类免疫球蛋白的框架区基本上(约 85 或更多,通常 90-95 或者更多)相同的框架区。抗体的框架区是组成性轻链和重链的组合框架区,其作用是定位并且对准 CDR's。CDR's 主要负责结合抗原的表位。根据本发明,框架区指免疫球蛋白的 V 结构域(VH 或者 VL 结构域)中的区域,该区域为与抗原接触的高变互补性决定区(CDR)提供蛋白支架。在每个 V 结构域中,存在命名为 FR1、FR2、FR3 和 FR4 的四个框架区。框架 1 包括从 V 结构域的 N-末端直到 CDR1 的开端的区域,框架 2 指 CDR1 和 CDR2 之间的区域,框架 3 包括 CDR2 和 CDR3 之间的区域,以及框架 4 表示从 CDR3 的末端直到 V 结构域的 C-末端的区域;尤其是参见 Janeway, Immunobiology, Garland Publishing, 2001, 5th ed(第五版)。因此,框架区包括 VH 或者 VL 结构域中的 CDR 区域之外的所有区域。

[0040] 本领域技术人员能够从给定的序列推导出框架区和 CDR;参见 Kabat(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit. (第五版), NIH Publication no. 91-3242U. S. Department of Health and Human Services, Chothia(1987). J. Mol. Biol. 196, 901-917 以及 Chothia(1989) Nature, 342, 877-883。

[0041] 术语“相同的”或者“同一性”表示两个核酸序列具有相同的序列或者互补的序列。因此,“同一性区”表示多核苷酸的区或者区域或者整个多核苷酸与另一多核苷酸的区域或者所述另一多核苷酸相同或者互补。

[0042] 术语“分离的”表示物质从其原始环境(例如,在天然存在的情况下是自然环境)移出。例如,在活的动物中存在的天然存在的多核苷酸或者酶是未分离的,但是与自然体系中的一些或者全部共存物质隔离的相同多核苷酸或者酶是分离的。这种多核苷酸可以是载体的一部分和/或这种多核苷酸或者酶可以是构成的一部分,并且仍然是分离的,因为这种载体或者构成不是其自然环境的一部分。

[0043] “分离的核酸”表示不与 5' 和 3' 侧翼序列紧邻的核酸,例如 DNA 或者 RNA,当该核酸在其衍生的天然存在的生物体基因组中存在时其通常与 5' 和 3' 侧翼序列紧邻。因此,该术语描述例如合并至载体诸如质粒或者病毒载体内的核酸;合并至异源细胞的基因组(或者同源细胞的基因组,但是处于与其通常出现的位点不同的位点处)内的核酸;以及作为单独的分子存在的核酸,例如由 PCR 扩增或者限制性内切酶切割产生的 DNA 片段,或者通过体外转录产生的 RNA 分子。该术语还描述了形成编码额外多肽序列的杂交基因的一部分的重组核酸,所述额外多肽序列可以用于例如产生融合蛋白质。

[0044] 本文使用的“配体”是指被特定受体识别的分子,诸如随机肽或者可变段序列。本领域技术人员应该认识到,分子(或者大分子复合物)可以既是受体又是配体。通常,将分子量较小的结合伴侣称为配体,而将分子量较大的结合伴侣称为受体。

[0045] “连接”是指在两个双链核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程(Maniatis et al, 1982, p. 146)。除非另有说明,可以利用公知的缓冲物和条件完成连接,条件是每 0.5 μ g

的大约等克分子量的待连接的 DNA 片段,使用 10 个单位的 T4DNA 连接酶 (“连接酶”)。

[0046] 本文使用的“连接体”或者“间隔子”是指这样的分子或者一组分子,即其例如连接两个分子,诸如 DNA 结合蛋白和随机肽,并且其作用是以优选的结构定位两个分子,例如,从而使得随机肽可以来自 DNA 结合蛋白的最小位阻结合受体。

[0047] 本文使用的“待演化的性质”包括涉及由多核苷酸序列组成的分子,由多肽序列组成的分子,以及部分由多核苷酸序列以及部分由多肽序列组成的分子。待演化的性质的尤其相关的但非限制的实例包括指定条件下的结合亲和性、特异性和活性,所述条件涉及温度;盐度;压力;pH;以及甘油、DMSO、洗涤剂的浓度,和/或在反应环境中所接触的任何其他分子种类。待演化的性质的另外尤其相关的但非限制的实例包括稳定性,例如在指定环境下暴露指定时间之后存在残留性质的量。

[0048] 术语“多特异性抗体”表示能特异性结合两个或更多个抗原的抗体;多特异性抗体包括双特异性抗体,即能结合两个抗原的抗体。

[0049] 术语“突变”表示野生型核酸序列的序列改变或者肽的序列改变。这种突变可以是点突变,诸如转换或者颠换。突变可以是缺失、插入或者复制。

[0050] 本文使用的简并“N, N, G/T”核苷酸序列代表 32 个可能的三联体,其中,“N”可以是 A、C、G 或者 T。

[0051] 本文使用的简并“N, N, N”核苷酸序列代表 64 个可能的三联体,其中“N”可以是 A、C、G 或者 T。

[0052] 对客体应用的本文使用的术语“天然存在的”是指客体可以在自然中发现。例如,在可以从自然中的来源分离出的生物体(包括病毒)中存在的并且未被人类在实验室中有意改变的多肽或者多核苷酸是天然存在的。通常,术语天然存在是指客体在非病态(未患病)的个体中存在,诸如可以是对于物种典型的。

[0053] 本文使用的“核酸分子”由至少一个碱基或者一个碱基对组成,取决于其分别是单链的或者双链的。另外,核酸分子可以唯一地或者嵌合地属于任何含核苷酸的分子组,例如但不限于下组核酸分子:RNA、DNA、基因组核酸、非基因组核酸、天然存在的和非天然存在的核酸以及合成的核酸。作为非限制的实例,这包括与任何细胞器相关的核酸,诸如线粒体、核糖体 RNA,以及嵌合地由不是天然存在的一种或多种组分以及天然存在的组分组成的核酸分子。

[0054] 另外,“核酸分子”可以部分地含有一种或多种非核酸基组分,例如但不限于氨基酸和糖。因此,作为实例而不是限制,将部分是核苷酸基并且部分是蛋白基的核酶视为“核酸分子”。

[0055] 另外,作为实例而不是限制,将用可检测部分标记(诸如放射性或者可选地非放射性标记)的核酸分子同样视为“核酸分子”。

[0056] 术语“编码特定酶的核酸序列”或者“特定酶的 DNA 编码序列”或者“编码特定酶的核苷酸序列”以及其他同义词,指置于合适的调节序列的控制下时转录和翻译成酶的 DNA 序列。“启动子序列”是能够结合细胞中的 RNA 聚合酶并且启动下游(3' 方向)编码序列的转录的 DNA 调节区。启动子是 DNA 序列的一部分。该序列区在 3' 末端具有的起始密码子。启动子序列确实包括最小数量的碱基,启动转录所需的元件处于高于背景的可检测的水平。然而,在 RNA 聚合酶结合序列并且在起始密码子(具有启动子的 3' 末端)处启动转

录之后,转录在 3' 方向上向下游进行。在启动子序列内将发现转录起始位点(通过核酸酶 S1 作图方便地限定)以及负责 RNA 聚合酶结合的蛋白结合结构域(共有序列)。

[0057] 术语“编码酶(蛋白质)的核酸”或者“编码酶(蛋白质)的 DNA”或者“编码酶(蛋白质)的多核苷酸”以及其他同义词,涵盖只包括酶的编码序列的多核苷酸以及包括其他编码和 / 或非 -Cq3 编码序列的多核苷酸。

[0058] 在一个优选的实施方案中,“具体核酸分子种类”由其化学结构限定,例如但不限于其基本序列。在另一优选的实施方案中,具体“核酸分子种类”由核酸种类的功能或者来源于所述核酸种类的产物的功能限定。因此,作为非限制性实例,“具体核酸分子种类”可以由可归因于其的一种或者多种活性或者性质限定,包括可归因于其表达的产物的活性或者性质。

[0059] “将工作核酸样品组装到核酸文库内”的目前定义包括将核酸样品并入到载体基集合内的方法,诸如通过连接并入至载体内和转化宿主。下文提供了相关载体、宿主和其他试剂及其具体非限制性实例的说明。“将工作核酸样品组装到核酸文库内”的目前定义还包括,将核酸样品并入至非载体基集合内的方法,诸如通过连接至衔接子。优选衔接子可以与 PCR 引物退火,从而促进 PCR 扩增。

[0060] 因此,在非限制实施方案中,“核酸文库”由一种或者多种核酸分子的载体基集合组成。在另一优选的实施方案中,“核酸文库”由核酸分子的非载体基集合组成。在又一优选的实施方案中,“核酸文库”由部分是载体基以及部分是非载体基的核酸分子的组合集合组成。优选,根据单独的核酸分子种类可搜索并且可分离包括文库的分子集合。

[0061] 本发明提供了“核酸构建体”或者可选地“核苷酸构建体”或者可选地“DNA 构建体”。术语“构建体”在本文中用于描述可以任选地与一个或者多个额外的分子部分(诸如载体或者载体的部分)化学结合分子,诸如多核苷酸。在具体但非限制性方面中,通过适合转化宿主细胞的 DNA 表达构建体例示核苷酸构建体。

[0062] “寡核苷酸(oligonucleotide)”(或者同义地“寡核苷酸(oligo)”)是指可以化学合成的单链多脱氧核苷酸或者两个互补的多脱氧核苷酸链。这种合成的寡核苷酸可以具有或者不具有 5' 磷酸。不具有 5' 磷酸的合成的寡核苷酸在激酶的存在下在不随着 ATP 加入磷酸盐的情况下不会与另一寡核苷酸连接。合成的寡核苷酸会与未去磷酸的片段连接。为了实现基于聚合酶的扩增(诸如利用 PCR),提及“依次由至少第一同源序列、简并 N, N, G/T 序列以及第二同源序列组成的 32 倍简并寡核苷酸”。本文使用的“同源”是指寡核苷酸和进行基于聚合酶的扩增的亲本聚核苷酸之间的同源性。

[0063] 本文使用的术语“可操作地连接的”是指多核苷酸元件在功能关系上的连接。当将核酸置于与另一核酸序列的功能关系内时,该核酸是“可操作地连接的”。例如,如果启动子或者增强子影响编码序列的翻译,则该启动子或者增强子与编码序列可操作地连接。可操作地连接表示,连接的 DNA 序列通常是邻近的,并且在连接两个蛋白质编码区所必须之处,是邻近的并且在阅读框中。

[0064] 当 RNA 聚合酶将两个编码序列转录成单个 mRNA,然后 mRNA 被翻译成具有从两个编码序列衍生的氨基酸的单个多肽时,编码序列与另一编码序列“可操作地连接”。编码序列不需要与另一序列邻近,只要表达的序列最终被加工,以产生期望的蛋白质即可。

[0065] 本文使用的术语“生理条件”是指温度、pH、离子强度、粘度以及有生命的生物体

相容和 / 或通常以细胞内的方式存在于有生命的培养的酵母细胞或者哺乳动物细胞中的类似的生物化学参数。例如,在典型的实验室培养条件下生长的酵母细胞中的细胞内条件是生理条件。用于体外转录混合物的合适的体外反应条件通常是生理条件。通常,体外生理条件包括 50-200mM NaCl 或者 KCl, pH 6.5-8.5, 20-45°C, 以及 0.001-10mM 二价阳离子 (例如 Mg⁺⁺, Ca⁺⁺); 优选约 150mM NaCl 或者 KCl, pH7.2-7.6, 5mM 二价阳离子, 以及常常包括 0.01-1.0% 的非特异蛋白质 (例如, BSA)。非离子洗涤剂 (Tween, NP-40, Triton X-100) 可以通常以一般约 0.001-2%, 典型地 0.05-0.2% (v/v) 存在。从业人员可以根据常规方法选择具体的水条件。作为一般指南, 下列缓冲水条件可以适用: 10-250mM NaCl, 5-50mM Tris HCl, pH 5-8, 可选地加入二价阳离子和 / 或金属螯合剂和 / 或非离子洗涤剂和 / 或非离子洗涤剂和 / 或膜组分和 / 或防沫剂和 / 或闪烁体。

[0066] 本文使用的术语“群 (population)”表示诸如多核苷酸、部分或者多核苷酸或者蛋白质的组分的集合。“混合群”表示属于相同的核酸或者蛋白家族但是序列不同 (即不相同) 并因此生物活性不同的组分的集合。

[0067] 具有“原形式”的分子是指, 在途中经过一种或者多种共价和非共价化学修饰 (例如, 糖基化、蛋白水解切割、二聚化或者寡聚化、温度诱导或者 pH 诱导的构象改变、与辅因子的结合等) 的任意组合从而与对照的原形式分子相比获得具有性质差别 (例如活性增加) 的更成熟的分子形式的分子。当可以在产生成熟分子的途中区分两种或者多种化学修饰 (例如, 两种蛋白水解切割, 或者蛋白水解切割和去糖基化) 时, 可以将对照前体分子称为“原形式前 (pre-pro-form)”分子。

[0068] 本文使用的术语“伪随机”是指变异性有限的一组序列, 从而使得例如, 除了允许任何伪随机位置具有一定的残基变异程度以外, 另一位置的残基变异程度受到限制。

[0069] 本文使用的“随机肽文库”是指编码一组随机肽的一组多核苷酸序列, 并指通过这些多核苷酸序列编码的该组随机肽, 以及含有那些随机肽的融合蛋白。

[0070] 本文使用的“随机肽序列”是指由两个或者多个氨基酸单体组成并且通过任意的或者随机的过程构建的氨基酸序列。随机肽可以包括框架或者支架基元, 所述基元可以包含非变异序列。

[0071] 本文使用的“受体”是指对给定配体具有亲和性的分子。受体可以是天然存在或者合成的分子。受体可以以未改变的状态或者作为与其他种类的聚集体使用。受体可以共价地或者非共价地直接地或者通过特异性结合物质与结合成员连接。受体的实例包括但不限于抗体 (包括单克隆抗体和与特异抗原决定簇 (诸如病毒、细胞或者其他物质上) 反应的抗血清、细胞膜受体、复杂的碳水化合物和糖蛋白质、酶以及激素受体。

[0072] “重组体”酶是指通过重组 DNA 技术产生的酶, 即由编码期望的酶的外源 DNA 构建体转化的细胞产生的酶。“合成”酶是通过化学合成制备的酶。

[0073] 术语“相关的多核苷酸”表示多核苷酸的区域或者区相同以及所述多核苷酸的区域或者区异源。

[0074] 本文使用的“还原重排”是指通过重复序列介导的缺失 (和 / 或插入) 事件产生的分子多样性的增加。

[0075] 以下术语用于描述两条或者多条多核苷酸之间的序列关系: “对照序列”、“比较窗口”、“序列同一性”、“序列同一性的百分比”以及“实质同一性”。

[0076] “对照序列”是用作序列比较基础的确定序列；对照序列可以是较大序列的子集，例如，序列表中给出的全长 cDNA 或者基因序列的片段，或者可以包括完整的 cDNA 或者基因序列。通常，对照序列的长度是至少 20 个核苷酸，通常长度是至少 25 个核苷酸，并且经常长度是至少 50 个核苷酸。由于两条多核苷酸可能各自 (1) 包含在两条多核苷酸之间相似的序列（即，完整的多核苷酸序列的一部分）以及 (2) 可能还包含在两种多核苷酸之间不同的序列，通常通过在“比较窗口”上比较该两条多核苷酸的序列来实施所述两条（或者更多条）多核苷酸之间的序列比较，以识别和比较序列相似的局部区域。

[0077] 术语“序列同一性”表示在比较窗口上两条多核苷酸序列相同（即，在核苷酸-比-核苷酸的基础上）。术语“序列同一性百分比”通过以下方式计算：在比较窗口上比较两个最佳比对的序列，确定在两个序列中存在相同核酸碱基（例如，A、T、C、G、U 或者 I）的位置的数量以得出匹配位置的数量，用比较窗口中的总位置数量（即，窗口尺寸）除匹配位置的数量，以及用 100 乘以该结果从而得出序列同一性的百分比。本文使用的该“实质同一性”表示多核苷酸序列的特性，其中与至少 25-50 个核苷酸的比较窗口的对照序列相比，该多核苷酸包含具有至少 80% 序列同一性，优选至少 85% 同一性，通常 90-95% 序列同一性，以及更通常地至少 99% 序列同一性的序列，其中通过在比较窗口上比较对照序列和该多核苷酸序列来计算序列同一性百分比，该多核苷酸序列可能包括总共是对照序列的 20% 或者更少的缺失或者增加。

[0078] 本领域公知的是，两个酶之间的“相似性”通过比较一种酶的氨基酸序列及其保守氨基酸取代物与第二酶的序列来确定。相似性可以通过本领域公知的程序确定，例如，BLAST 程序（国家生物信息中心处的基本局部比对搜索工具 (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information)）。

[0079] 本文使用的术语“单链抗体”是指是多肽链连接中包含 VH 结构域和 VL 结构域的多肽，通常通过间隔子肽（例如，[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_x）连接，以及其可以在氨基-和/或羧基端包含其他氨基酸序列。例如，单链抗体可以包括用于连接编码多核苷酸的束缚片段 (tether segment)。举例来说，scFv 是单链抗体。单链抗体通常是由一个或者多个具有至少 10 个连续氨基酸的多肽片段组成的蛋白质，该多肽片段基本上通过免疫球蛋白超家族的基因编码（例如，参见 Williams and Barclay, 1989, pp. 361-368, 其通过引用并入本文），更经常地通过啮齿动物、非人灵长类、鸟类、猪、牛、绵羊、山羊或者人类重链或者轻链基因序列编码。功能性单链抗体通常含有免疫球蛋白超家族基因产物的充足部分，从而保留与特异靶分子，通常是受体或者抗原（表位）结合的特性。

[0080] 如果一对分子的成员（例如，抗体-抗原对或者核酸对）互相结合的亲和性比其他非特异分子大，则认为该对分子的成员彼此“特异性结合”。例如，与非特异蛋白相比与抗原更有效地结合的针对该抗原产生的抗体可以描述成与该抗原特异性结合。（类似地，如果核酸探针通过碱基配对相互作用（参见上文）与核酸靶标形成特异双螺旋，则可以将该核酸探针描述为特异性结合所述靶标）。

[0081] 本文将“特异杂交”定义为在第一多核苷酸和第二多核苷酸（例如，具有与第一多核苷酸有区别的但是基本上相同的序列的多核苷酸）之间形成的杂交体，其中基本上不相关的多核苷酸序列在混合物中不形成杂交体。

[0082] 术语“特异性多核苷酸”表示具有确定的端点和具有特定的核酸序列的多核苷酸。

两条多核苷酸,其中一种多核苷酸具有与第二多核苷酸的一部分相同的序列但是端点不同,包含两条不同的特异性多核苷酸。

[0083] “严格杂交条件”表示只有在序列之间的同一性为至少 90%,优选至少 95%和最优选至少 97%的情况下,才会发生杂交。参见 Sambrook et al, 1989,其全部内容通过引用并于本文。

[0084] “基本上相同的”氨基酸序列是与对照序列的序列的不同仅仅为保守氨基酸取代的序列,例如,用一个氨基酸取代成同类的另一个氨基酸(例如,用一个疏水氨基酸诸如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、或者蛋氨酸取代另一氨基酸,或者用一个极性氨基酸取代另一极性氨基酸,,诸如用精氨酸取代赖氨酸,用谷氨酸取代天门冬氨酸,或者用谷氨酰胺取代天门冬素)。

[0085] 另外,“基本上相同的”氨基酸序列是与对照序列的不同为一个或者多个非保守取代、缺失或者插入的序列,尤其是当该取代发生在不是分子的活性位点的位点处时,并且条件是该多肽实质上保留其行为特性。例如,一个或者多个氨基酸可以从多肽中缺失,从而导致多肽的结构改变,而不会显著地改变其生物活性。例如,可以去除生物活性不需要的氨基或者羧基端氨基酸。这种改变可以导致更小的活性多肽的开发。

[0086] 本文使用的“基本上纯”表示目标物是存在的主导物(即,以摩尔计在组合物中该种类比任何其他单独的大分子种类更大量),并且优选地,基本上纯的部分是其中目标物包含至少约 50%(以摩尔计)的存在的所有大分子物种的组合物。通常,基本上纯的组合物包含约 80 至 90%的在组合物中存在的所有大分子物种。最优选地,将目标物纯化为本质上同质(通过常规检测方法不能检测出组合物中的污染物),其中该组合物本质上由单个大分子种类组成。溶剂类、小分子(<500 道尔顿)以及元素离子种类不视为大分子种类。

[0087] 本文使用的“同系的”表示基因相同或者充分相同并且免疫上兼容。

[0088] 本文使用的“模板”、“模板抗体”或者“亲本抗体”,表示产生本发明的多功能抗体的蛋白。本领域的技术人员应该理解,本发明可以使用任何数量的模板。“蛋白”或者“寡肽”的定义内尤其包括已知蛋白的片段和结构域,包括功能结构域,诸如酶结构域、结合结构域等,以及更小的片段,诸如转角(turn)、环(loop)等。换句话说,也可以使用蛋白的一部分。另外,本文使用的“蛋白质”包括蛋白质、寡肽和肽。另外,可以使用蛋白变体,即非天然存在的蛋白的类似结构。

[0089] 合适的蛋白包括但不限于药用蛋白,包括配体、细胞表面受体、抗原、抗体、细胞因子、激素、转录因子、信号组件(signaling module)、细胞骨架蛋白和酶。合适的蛋白骨架包括但不限于结构生物信息学研究实验室(RCSB,原来是 Brookhaven 国家实验室)汇编和服务的蛋白质数据库中发现的所有那些。

[0090] 本文使用的术语“变异片段”是指包含随机的、伪随机的或者定义的核心序列的新生肽的一部分。“变异片段”是指包含随机的、伪随机的或者定义的核心序列的新生肽的一部分。变异片段可以包含变异和非变异的残基部分,并可以限制变异残基位置处残基变异的程度;根据从业人员的判断选择这两个选项。通常,变异片段的长度是约 5-20 个氨基酸残基(例如,8-10),但是变异片段可以更长并且可以包含抗体部分或者受体蛋白,诸如抗体片段、核酸结合蛋白、受体蛋白等。

[0091] 术语“野生型”表示该多核苷酸不包含任何突变。“野生型”蛋白表示该蛋白在自

然中发现的活性水平上会是有活性的,并且会包含在自然中发现的氨基酸序列。

[0092] 发明描述

[0093] 本发明的多功能抗体的产生

[0094] 利用分子生物学技术,诸如克隆、噬菌体展示、转基因鼠和诱变,已经在实验室中构建了具有不同的特性(例如改进的亲合性、亲合力和药代动力学)和结构的抗体,包括全人类抗体、具有人类和非人类元件的嵌合抗体、Fab 抗体和其他抗体结构。本发明的多功能抗体可以从用作起始分子或者模板的抗体产生。亲本抗体可以是全人类抗体、啮齿动物抗体、兔抗体、犬抗体、牛抗体、偶蹄目抗体、鱼抗体、软骨鱼抗体、嵌合抗体、人源化抗体、部分人类抗体或者其他抗体。产生这种抗体的方法是本领域公知的。已经公布了并且已知有关单克隆抗体及其在研究、诊断和多种疾病(包括癌症)治疗中的用途的相当多的信息。例如,超过几十种的单克隆抗体获得政府监管机构的批准用于患者中的治疗用途。

[0095] 人类基因组的解读已打开建立可以用于治疗剂的全人类抗体的新机遇。人类免疫系统能够由少数的种系抗体基因产生针对所有的免疫分子的抗体。通过 V、D 和 J 片段(重链)以及用于轻链的 V 和 J 片段的随意(灵活)重组产生多样性。得到的可变抗体结构域由三个互补性决定区(CDR)和四个框架区组成。框架提供支架以给予 CDR 环用于抗原的最佳结合的正确空间定位。在本发明的一个方面中,根据本领域公知的方法可以产生和筛选新的全人类抗体文库,从而鉴别本发明的模板。

[0096] 通过用靶抗原免疫啮齿目动物或者其他宿主动物,以及随后利用本领域公知的方法产生杂交瘤细胞系,也能够产生可以用作本发明的分子的亲本抗体的单克隆抗体。

[0097] 在本发明的方法中,也可以预见,可以使结合一个或者多个靶标(已知或者未知)上的表位的任何抗体演化以结合所述一个或者多个靶标上的第二或者第三或者多个表位。因此,亲本抗体可以是一种或者多种抗体。

[0098] 利用各种已知方法,诸如本文描述的那些,也可以筛选抗体文库以产生一种或者多种亲本抗体。

[0099] 通过位点诱变以及最近以来的分子演化的蛋白质工程已经成功地用于改善抗体的治疗特性。已经改变了诸如热稳定性、特异性、结合亲和性以及其它特性等全部特性从而使抗体更好地适应特定目的。

[0100] 从一开始,已经描述许多用于分子演化的不同方法,并应用其改善靶蛋白的特性。通常为高表达突变体产生和筛选单点突变体组。然后可以重组和筛选有利的单氨基酸取代以进一步优化靶分子的期望特性。

[0101] 在本发明中,使用演化方法鉴别形成自并且基于最初鉴别的双结合、多特异性抗体(或者单功能抗体,视情况而定)的模板多肽的突变多肽。

[0102] 例如,本文将演化这些多肽的一种方法称为综合位置演化(Comprehensive Positional Evolution, CPE),随后可选地进行组合蛋白合成(Combinatorial Protein Synthesis, CPS)。其他方法包括综合位置插入演化(comprehensive positional insertion evolution, CPI)、综合位置缺失演化(comprehensive positional deletion evolution, CPD);由组合蛋白合成(CPS)跟随的综合位置缺失演化(CPD);或者由组合蛋白合成(CPS)跟随的综合位置缺失演化(CPD)。这些方法在名称为 Methods of Protein Evolution(蛋白演化方法)的专利公开文本 W02012/009026 中有详细的描述(其全部内容

通过引用并于本文)。

[0103] 可以对本发明的多特异性抗体使用演化,以降低蛋白-蛋白聚集、提高蛋白的稳定性、通过糖基化文库 (glycosylation libraries) 优化药代动力学、优化蛋白的二级和三级结构以及直接通过突变设置 (mutation set) 或者间接通过糖基化掩蔽使抗原位点去免疫。

[0104] 演化还可以用于去免疫以消除免疫原性同时保持功能。演化去免疫可以通过以下方式实施:用糖基化掩蔽免疫原性、鉴别可能消除免疫原性同时保持功能的人类有体细胞高度突变氨基酸取代谱、降低剂量以规避免疫原性可能性、以及非表面氨基酸残基变化的最小化演化。另外,免疫原性数据库和算法可以用于鉴别和替换潜在的 MHC 结合表位。

[0105] 可以通过本领域公知的技术测量产生 T-细胞表位的倾向的降低和/或去免疫。优选地,可以通过 T 细胞增殖试验在体外测试蛋白质的去免疫。在该试验中,针对响应野生型或去免疫肽而增殖,筛选来自代表世界 >80% 的 HLA-DR 等位基因的供体的 PBMC。理想的是,细胞增殖只在用野生型肽装载抗原呈递细胞时才检测到。用于去免疫的其他试验包括人类体外 PBMC 再刺激试验 (例如 γ -干扰素 (Th1) 或 IL-4 (Th2) ELISA。另外,可以通过表达代表所有单倍型的 HLA-DR 四聚体测试去免疫。为了测试去免疫肽是否呈递在 HLA-DR 单倍型上,可以测量例如 PBMC 上的荧光标记的肽的结合。测量 HLA I 类和 II 类转基因小鼠对靶抗原 (例如干扰素 γ 和 IL-4) 的反应。可选地,用来自 PBMC 的经过训练 T 细胞 (MHC I 9 个单元单体 (9mer); MHC II 20 个单元单体) 筛选的表位文库和/或进行转基因小鼠试验。此外,可以通过确定针对去免疫分子的抗体是否已在患者给药后产生来证明去免疫。

[0106] 演化技术也可以用于表达优化。在一个方面中,本发明公开了利用蛋白质工程的方法开发在哺乳动物细胞中具有改善的表达的沉默突变密码子优化的 Fc 变体。一个沉默突变是其中 DNA 序列的变异不导致蛋白质的氨基酸序列变化的突变。在一个方面中,在恒定区中实施密码子诱变以便优化哺乳动物细胞表达。具有改善的表达特性同时保持介导效应子功能能力的密码子优化的 Fc 变体提高治疗性抗体的产生。在这方面,例如,可以演化抗体分子的恒定区以在不同的表达宿主中筛选,例如,哺乳动物细胞系表达筛选利用 CHO、HEK293 和 COS-7。

[0107] 术语模板可以指基础多肽或编码该多肽的多核苷酸。本领域技术人员应该理解,任何模板可用于本发明的方法和组合物中。如本发明所述,可以突变从而演化的模板可用于指导另一多肽或多肽文库的合成。如本文更详细描述,可演化的模板编码多肽的合成,并且以后可以用来解码多肽的合成史,间接地扩增所述多肽,和/或演化 (即,多样化、选择和扩增) 所述多肽。在某些实施方案中,可演化的模板是核酸。在本发明的某一实施方案中,模板基于核酸。在其它实施方案中,模板是多肽。

[0108] 本发明使用的核酸模板由 DNA、RNA、DNA 和 RNA 的杂交体,或者 DNA 和 RNA 的衍生物构成,并且可以是单链或双链。模板的序列用于编码多肽的合成,优选不是或不类似于核酸或者核酸类似物的化合物 (例如,非天然多聚体或者小分子)。在某些非天然多聚体的情况下,核酸模板用于对齐序列中的将出现在多聚体中的单体单元以及使它们沿模板与相邻的单体单元紧密相邻,从而使它们反应并通过共价键连接。在另一些实施方案中,模板可以用于通过由核苷酸的随机区组成的合成 DNA 模板文库的 PCR 扩增来产生非天然多聚体。

[0109] 应该理解,模板的碱基数量的变化可以很大。例如,在某些实施方案中,模板的长

度可以是 10-10000 个碱基,优选是 10-1500 个碱基,更优选 10-1000 个碱基。当然,模板的长度取决于密码子的长度、文库的复杂性、将要合成的非天然多聚合体的长度、将要合成的小分子的复杂性、空间序列的使用等。核酸序列可利用本领域已知的制备核酸序列的任何方法制备。这些方法包括体内和体外方法,包括 PCR、质粒制备、核酸内切酶消化、固相合成、体外转录、链分离等。核酸模板也可以使用自动 DNA 合成仪合成。

[0110] 由于可以在单个残基处产生 19 个氨基酸取代的高效率,可以单独地或与蛋白内的其他突变组合,对感兴趣的众多的残基实施饱和诱变。本文所用的“完全饱和”诱变定义为用其他 19 个天然存在的氨基酸取代蛋白质内的给定氨基酸。在 Kretz et al., *Methods in Enzymology*, 2004, 388:3-11, 短美国专利第 6, 171, 820 号和短美国专利第 6, 562, 594 号(其通过引用结合于本文中)中公开了基因位点饱和诱变,其系统地探讨了沿蛋白质序列的最低限度的所有可能的单个氨基酸取代。

[0111] 密码子引物(含简并 N, N, G/T 序列)可以用于将点突变引入多核苷酸内,从而产生一组后代多肽,在该组后代多肽中,在每个氨基酸的位置处代表了全范围的单一氨基酸取代(参见美国专利第 6171820 号;还参见,美国专利第 5677149 号,每篇专利均通过引用并于本文中)。使用的寡核苷酸连续地由第一同源序列、简并的 N, N, G/T 序列以及优选但不一定是第二同源序列组成。来自这种寡核苷酸的使用的下游后代翻译产物包括在沿着多肽的每个氨基酸位点处的所有可能的氨基酸变化,因为 N, N, G/T 序列的简并性包括所有 20 个氨基酸的密码子。

[0112] 密码子使用是哺乳动物基因表达的重要因素之一。不同密码子的使用频率在不同的宿主之间、以及在同一生物体中以高或低的水平表达的蛋白质之间变化显著。这种变化的最可能的原因是优选的密码子与细胞内可用的同源 tRNA 的丰度关联。密码子使用和 tRNA 受体浓度可以共同演化,而且,高表达基因与低水平表达的基因相比,共同演化的选择压力更明显。

[0113] 一个这种简并寡核苷酸(由一个简并 N, N, G/T 盒组成)可用于使亲本多核苷酸模板中的每个原始密码子进行全范围的密码子取代。此外,至少两个简并 N, N, G/T 盒可用于(无论是否在相同的寡核苷酸中)使亲本多核苷酸模板中的至少两个原始密码子进行全范围的密码子取代。因此,一个以上的 N, N, G/T 序列可以包含在一个寡核苷酸中,以在一个以上的位点处引入氨基酸突变。该多个 N, N, G/T 序列可以是直接邻近的,或者被一个或多个另外的核苷酸序列分离。可用于引入添加和缺失的寡核苷酸也可以单独使用或与含有 N, N, G/T 序列的密码子组合使用,以引入氨基酸添加、缺失和/或取代的任何组合或者排列。

[0114] 模板多肽可以是任何蛋白,但是优选具有方便的对活性(如催化活性或配体结合)的测定法的蛋白质。如本文所用,配体是特异性地结合不同分子的任何分子,例如结合蛋白的小分子。靶相互作用的代表性实例包括催化/酶-底物的相互作用/蛋白-核酸相互作用/受体-配体相互作用、蛋白-金属相互作用以及抗体-抗原相互作用。代表性的靶蛋白包括酶、抗体、细胞因子、受体、DNA 结合蛋白、螯合剂和激素。

[0115] 可以通过产生和筛选抗体文库发现模板。如所指示的,各种用于产生和筛选抗体文库的方法是本领域已知的。例如,可以利用全人类抗体展示文库。在这种情况下,“文库”是一个或多个宿主细胞表面上展示的抗体群。优选地,该抗体文库代表了人类的抗体谱,因为它们具有结合广泛抗原的宽泛能力。此外,该文库优选展示数千个二价抗体。因

为该抗体展示于细胞表面,在文库中的每种抗体的有效亲和性(由于亲合力)增加。不像其他流行的文库类型,如噬菌体展示文库,其中用于筛选和鉴别目的的该抗体的亲合力是不理想的,在本发明中由细胞表面展示所提供的超级亲合力是理想的。细胞表面展示文库能够鉴别低、中和高结合亲和性抗体,以及在筛选或选择步骤中鉴别非免疫原性和弱表位。任何化学合成或重组诱变方法可以用于产生突变多肽群。除非另有说明,本发明的实践可以使用常规的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学技术,它们在本领域的技术范围内。这些技术在文献中有充分的解释。参见,例如, *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (分子克隆:实验室手册), 2nd Ed. (第二版), ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 著) (Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989); *DNA Cloning, Volumes I and II* (DNA 克隆, 卷 1 和卷 2) (D. N. Glover 著, 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (寡核苷酸合成) (M. J. Gait 著, 1984); *Mullis et al. U. S. Patent No:4,683,195* (Mullis 等美国专利第 4,683,195 号); *Nucleic Acid Hybridization* (核酸杂交) (B. D. Hames & S. J. Higgins 著, 1984); *Transcription And Translation* (转录和翻译) (B. D. Hames & S. J. Higgins 著, 1984); *Culture Of Animal Cells* (动物细胞培养) (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (固定化细胞和酶) (IRL Press, 1986); *B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning* (分子克隆实用手册) (1984); 专著: *Methods In Enzymology* (酶学方法) (Academic Press, Inc., N. Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (哺乳动物细胞的基因转移载体) (J. H. Miller 和 M. P. Cabs 著, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155* (酶学方法, 卷 154 和卷 155) (Wu et al. eds. (Wu 等著)), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (细胞生物学和分子生物学免疫化学方法) (Mayer 和 Walker 著, Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV* (实验免疫学手册, 第 1-4 卷) (D. M. Weir 和 C. C. Blackwell 著, 1986); *Manipulating the Mouse Embryo* (操作小鼠胚胎), (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986)。

[0116] 在优选实施方案中,模板多肽是抗体。对抗体进行本文中所描述的方法,从而例如,定位和理解 CDR 内的哪个位置影响结合亲和性。用于制备和使用各种基于抗体的构建体及其片段的技术是本领域公知的。本发明的一个重要方面是鉴别在所关注的相互作用(例如,抗原-抗体相互作用、金属螯合、受体结合、底物结合等)中发挥或者可能发挥作用的残基。根据本发明可使用任何抗体或抗体片段。抗体的特异性由轻链可变区 (VL) 和重链可变区 (VH) 内的互补性决定区 (CDR) 决定。抗体的 Fab 片段是完整抗体的约三分之一大小,包含重链和轻链可变区、完整的轻链恒定区和重链恒定区的一部分。由于该恒定区序列的贡献, Fab 分子稳定并且很好地连接。然而,在细菌系统中表达的功能性 Fab 的产率低于仅含有重链和轻链的可变区的较小 Fv 片段的产率。Fv 片段是抗体的仍保留了功能性抗原结合位点的最小部分。Fv 片段与 Fab 具有相同的结合特性,但是没有恒定区所赋予的稳定性,该 Fv 的两条链可以相对容易地在稀释条件中解离。

[0117] 为了克服这个问题,可以将 VH 和 VL 区经由多肽连接体融合 (Huston et al., 1991) 以稳定该抗原结合位点。此单个多肽 Fv 片段被称为单链抗体 (scFv)。VH 和 VL 可以首先

与两者之中任何一个结构域一起排列。连接体将第一链的羧基末端与第二链的氨基末端连接。

[0118] 本领域技术人员应该认识到,重链或轻链 Fv 或 Fab 片段也可以与该系统一起使用。可以诱变重链或轻链,然后向溶液中加入互补链。然后使两链结合并形成功能性抗体片段。随机非特异性轻或重链序列的添加允许产生生成不同成员的文库的组合系统。

[0119] 通常,产生单链表达多核苷酸。该表达多核苷酸含有:(1)单链抗体盒,由 VH 结构域、间隔肽以及可操作地连接以编码单链抗体的 VL 结构域组成,(2)可操作地连接以确保单链抗体盒的体外转录的适合体外转录的启动子(例如,T7 启动子,SP6 启动子,等等),该单链抗体盒形成编码单链抗体的 mRNA,以及(3)适于在体外转录反应中起作用的转录终止序列。任选地,表达多核苷酸还可以包含复制起点和/或可选择的标记。合适的表达多核苷酸的实例是 pLM166。

[0120] 从利用 V 基因家族特异性引物或 V 基因特异性引物的 PCR 扩增产生的 V_H 和 V_L 序列文库,可以方便地得到 V_H 和 V_L 序列(Nicholls et al. (1993) J. Immunol. Meth. 165:81; W093/12227),或者根据基于可用的序列信息,根据本领域已知的标准方法设计。通常,小鼠或人类 V_H 和 V_L 序列是分离的。然后,通常用插入间隔序列(例如,编码框内柔性肽间隔子)连接 V_H 和 V_L 序列,从而形成编码单链抗体的试剂盒。通常,使用包括多个 V_H 和 V_L 序列的文库(有时也使用所示的多个间隔肽),其中,用一个或者多个经诱变而尤其是增加 CDR 残基处(有时在框架残基处)的序列多样性的 V_H 和 V_L 序列构建文库。可以方便地将 V 区序列克隆成 cDNA 或者 PCR 扩增产物,以用于免疫球蛋白表达细胞。例如,来自人杂交瘤或淋巴瘤的细胞,或合成细胞表面或分泌的免疫球蛋白的其他细胞系,可以用于分离聚 A+RNA。然后使用酶逆转录酶将 RNA 用于寡聚 dT 引发的 cDNA 的合成(对于通用方法参见,Goodspeed et al. (1989) Gene 76:1;Dunn et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:13057)。一旦 V 区 cDNA 或 PCR 产物得以分离,则将其克隆到载体中以形成单链抗体盒。

[0121] 为了实现抗体和抗体片段的构建,分离和鉴别编码基因。可以修饰基因以允许克隆到表达载体中,或体外转录/翻译。虽然可以使用探测诸如为来自杂交瘤 cDNA 的 VH 和 VL 的 DNA(Maniatis et al., 1982) 或为 VH 和 VL 构建合成基因(Barbas et al., 1992) 的方法,但是方便的方式是使用模板指导的方法扩增抗体序列。通过将引物设计为称为框架的可变区的 3' 和 5' 端处的保守序列或设计为抗体的恒定区,可以从模板样品扩增不同的抗体基因群(Iverson et al., 1989)。可以在引物内放置限制性位点,以促进克隆到表达载体中。通过将该引物引导至这些保守区域,维持该抗体群的多样性,以允许不同的文库的构建。抗体的具体种类和类别可以通过引物序列的选择限定,如 Kabat et al., 1987 中给出的所有类型的抗体的大量序列所说明的,该文献通过引用并于本文。

[0122] 从动物的脾脏或外周血中分离出的信使 RNA 也可以用作扩增抗体文库的模板。在某些情况下,如果期望在细胞表面上展示抗体片段的均质群(homogeneous population),可以从单克隆抗体群中分离 mRNA。来自任一来源的信使 RNA 可通过标准方法制备,并直接使用或用于制备 cDNA 模板。按照制备和表征抗体的公知工序(参见,例如,Antibodies: A Laboratory Manual(抗体:实验室手册),1988;通过引用并于本文)容易地完成用于克隆抗体目的的 mRNA 的产生。

[0123] 单克隆抗体(MAb)的产生通常遵循与制备多克隆抗体的工序相同的工序。简要地

说,用一致的免疫原性组合物免疫动物并从该免疫的动物收集抗血清来制备多克隆抗体。范围广泛的动物物种可用于生产抗血清。通常用于生产抗血清的动物是兔、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠或山羊。因为兔的相对较大血液体积,通常优选兔用于产生多克隆抗体。

[0124] 免疫原性组合物的免疫原性经常变化。因此,经常有必要强化宿主免疫系统,这可以通过将肽或多肽免疫原与载体偶联来实现。示例性的和优选的载体是匙孔血蓝蛋白(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)。其他白蛋白如卵白蛋白、小鼠血清白蛋白或兔血清白蛋白也可以用作载体。用于将多肽缀合至载体蛋白的公认方法是公知的,并包括戊二醛、间马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯、碳二亚胺和双-重氮化联苯胺。

[0125] 特定的免疫原组合物的免疫原性可通过被称为佐剂的免疫应答的非特异性刺激剂来增强。示例性和优选的佐剂包括完全弗氏佐剂(包含灭活的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的免疫应答的非特异性刺激剂),不完全的弗氏佐剂和氢氧化铝佐剂。

[0126] 在产生多克隆抗体中使用的免疫原组合物的量基于免疫原的性质以及用于免疫的动物而变化。各种途径可以用于施用免疫原(皮下、肌内、皮内、静脉内和腹膜内)。多克隆抗体的生产可以通过免疫之后在不同点处采样免疫动物的血液进行监控。也可以给予二次加强注射。重复加强和滴定过程,直到达到合适的滴度。当获得免疫原性的期望水平时,可以对免疫的动物放血,并且分离、储存血清,以及收集的脾脏用于由多克隆应答分离 mRNA,或者可以使用所述动物生成 MAb,用于从均质抗体群分离 mRNA。

[0127] 可以通过使用众所周知的技术容易地制备 MAb,如美国专利第 4196265 号示例的技术,该专利通过引用并入本文。通常,该技术涉及用选定的免疫原组合物免疫合适的动物,例如与载体缀合的小分子半抗原、纯化的或部分纯化的蛋白质、多肽或肽。该免疫组合物以有效地刺激抗体生成细胞的方式施用。啮齿类动物,如小鼠和大鼠,是常用的动物;然而,也可以使用兔细胞、绵羊细胞、蛙细胞。使用大鼠可提供某些优点(Goding, pp. 60-61, 1986),但小鼠是优选的,特别是 BALB/c 小鼠,因为这是最常使用的并且通常提供较高百分比的稳定融合物。

[0128] 免疫后,选择具有产生抗体的潜力的体细胞,尤其是 B 淋巴细胞(B 细胞),用于 MAb 产生方案。这些细胞可得自活检脾脏、扁桃体或淋巴结或血液样品。脾细胞和血细胞是优选的,前者是因为它们是处于分裂的浆母细胞阶段的抗体产生细胞的丰富来源,而后者是因为血液是很容易获得的。经常,免疫一组动物并且移出具有最高抗体滴度的动物脾,并通过用注射器使脾均质化得到脾淋巴细胞。通常,来自免疫小鼠的脾含有约 5×10^7 至 2×10^8 个淋巴细胞。

[0129] 然后用永生的骨髓瘤细胞的细胞,通常是与被免疫的动物同种的细胞与来自免疫的动物的抗体产生 B 淋巴细胞融合。适合用于产生杂交瘤的融合工序的骨髓瘤细胞系优选是非抗体产生、具有高融合效率和酶缺陷,该酶缺陷使其不能在仅支持期望的融合细胞(杂交瘤)生长的某些选择性培养基中生长。

[0130] 可以使用许多骨髓瘤细胞中的任一种,如本领域的那些技术人员公知的(Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, 1984)。例如,如果免疫的动物是小鼠,则可使用 P3-X63/AG8、X63-AG8.653、NS1/1.Ag41、SP210-AG14、F0、NS0/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG1.7 和 S194/5XX0BUL;对于大鼠,可以使用 R210、RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F 和 4B210;且

U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2 和 UC729-6 都可以用于与人类细胞融合物一起使用。

[0131] 一种优选的鼠骨髓瘤细胞是 NS-1 骨髓瘤细胞系（也称为 P3-NS-1-Ag4-1），其可容易地通过请求细胞系文库号 GM3573 从 NIGMS 人类基因突变细胞库获得。可使用的另一小鼠骨髓瘤细胞系是 8- 氮杂鸟嘌呤抗性小鼠的鼠骨髓瘤 SP2/0 非生产者细胞系。

[0132] 用于生成产生抗体的脾或淋巴结细胞与骨髓瘤细胞的杂交体的方法通常包括，在促进细胞膜融合的试剂或者多种试剂（化学的或者电学的）的存在下，以 2 : 1 的比例混合体细胞与骨髓瘤细胞，但是所述比例可以各自地从约 20 : 1 变化至约 1 : 1。使用仙台病毒（Sendai virus）的融合方法已由 Kohler & Milstein (1975 ; 1976) 描述，以及使用聚乙二醇（PEG）（如 37% (V/V) 的 PEG）的那些（Gefter et al., 1977）。使用电诱导的融合方法也是合适的（Goding pp. 71-74, 1986）。

[0133] 融合方法通常以低频率即约 1×10^{-6} 至 1×10^{-8} 产生活杂交体。然而，这并不构成问题，因为活、融合杂合体通过在选择性培养基中培养从亲本、未融合的细胞（特别是通常会继续无限分裂的未融合的骨髓瘤细胞）分化。选择性培养基通常是含有阻断核苷酸在组织培养基中从头合成的试剂的培养基。示例性且优选的试剂是氨基喋呤、氨甲喋呤和重氮丝氨酸。氨基喋呤和氨甲喋呤阻断嘌呤和嘧啶的从头合成，而重氮丝氨酸仅阻断嘌呤合成。在使用氨基喋呤或氨甲喋呤时，培养基补充有次黄嘌呤和胸苷作为核苷酸的来源（HAT 培养基）。在使用重氮丝氨酸时，培养基补充有次黄嘌呤。

[0134] 优选的选择培养基是 HAT。只有能够操作核苷酸补救途径的细胞能够在 HAT 培养基中存活。骨髓瘤细胞缺少补救途径的关键酶，例如，次黄嘌呤磷酸核糖转移酶（HPRT），因此它们不能存活。B 细胞可以操作该途径，但它们在培养基时具有有限的寿命，并且一般在约两周内死亡。因此，能在选择性培养基中存活的唯一细胞是由骨髓瘤和 B 细胞形成的那些杂交体。

[0135] 这种培养提供了杂交瘤群，从中选择特定的杂交瘤。通常，通过利用在微量滴定板中进行单克隆稀释培养细胞，随后检测各克隆上清（约两到三周后）的期望的反应性而实施杂交瘤的选择。简单并快速的测定法包括放射性免疫测定、酶免疫测定、细胞毒性测定法、噬菌斑测定法、斑点免疫结合测定法等。

[0136] 连续地稀释选定的杂交瘤并克隆成各个产生抗体的细胞系，然后可以由此细胞系无限地繁殖克隆以提供 MAbs。可以以两种基本方式利用该细胞系用于产生 MAbs。可以将杂交瘤样品注射（通常注射到腹腔腔）至用于为原始融合提供体细胞和骨髓瘤细胞的类型的组织相容性动物内。注射的动物发展肿瘤，该肿瘤分泌由融合的细胞杂交体产生的特异性单克隆抗体。然后可抽出动物的体液，如血清或腹水，以提供高浓度的 MAbs。单个细胞系也可以在体外培养，在这种情况下 MAbs 自然分泌到培养基内，从该培养基可以容易地获得高浓度的 MAbs。如果需要的话，用过滤、离心和各种层析方法，如 HPLC 或亲和层析，可以进一步纯化通过任一方法产生的 MAbs。

[0137] 在期望的单克隆抗体的分离和表征之后，可以利用本领域公知的技术分离 mRNA，并用作扩增靶序列的模板。

[0138] 在诱变前后，可以使用许多模板依赖性方法扩增靶序列。例如，最好的已知的扩增方法之一是在美国专利第 4,683,195、4,683,202 和 4,800,159 号以及 Innis et al. (1990) 中详细描述聚合酶链式反应（称为 PCR），每篇的全部内容均通过引用并于本文。简要地

说,在 PCR 中,制备与靶序列的相反互补链上的区域互补的两条引物序列。将过量的脱氧核苷三磷酸与 DNA 聚合酶(例如 Taq 聚合酶)一起加入反应混合物中。如果样品中存在靶序列,引物会结合靶标并且聚合酶会使引物通过添加到核苷酸上而沿着靶序列延伸。通过提高和降低反应混合物的温度,延伸的引物会从靶标解离以形成反应产物,过量的引物会结合靶标和反应产物,并重复该过程。优选地,为了量化扩增的靶标的量,可以实施逆转录酶 PCR 扩增程序。聚合酶链式反应的方法是本领域公知的技术。使用诸如 PCR 的酶促扩增技术,可将所需的控制元件设计至引物内,因此该所需的控制元件会并入 DNA 产物内。

[0139] 许多其他的扩增方法是本领域已知的。

[0140] 基因合成的固相方法的一个优点是,有机会利用组合合成技术诱变。组合合成技术被定义成通过顺序连接不同的构建单元同时生产大的化合物集合或者文库的那些技术。可以利用溶液中游离的化合物构建文库,但优选将化合物连接至固体支持物,如珠、固体颗粒,或甚至将其展示于微生物的表面上。

[0141] 存在用于组合合成的几种方法(Holmes et al.,1995;Burbaum et al.,1995;Martin et al.,1995;Freier et al.,1995;Pei et al.,1991;Bruce et al.,1995;Ohlmeyer et al.,1993),包括分裂合成或平行合成。可替代地,可以在固相或溶液中进行公知为平行合成的技术。使用组合方法,可以合成大量突变基因模板。

[0142] 也可以通过本领域中已知的半合成方法来产生突变基因(Barbas et al.,1992)。使用抗体片段的保守区作为框架,一次可以以随机的组合插入一个或者多个可变区以改变该抗体片段的特异性并产生新的结合位点,尤其是在产生对免疫无益的抗原的抗体时,诸如有毒或不稳定的化合物。同样,通过随机地或者非随机地引入突变可以变化已知的抗体序列。

[0143] 用于蛋白生产的原核生物体外技术是最先使用的(Zubay et al.,1970)。随后采用小麦胚芽(Roberts,1973)和兔网织红细胞(Pelham,1976)开发了真核系统。若干新的发展已经增加了这些技术的效率。实例包括发展大肠杆菌的核酸酶缺陷菌株以改进使用线性 DNA 模板(Yang,1980)的结果和用微球菌核酸酶处理网织红细胞裂解物以降低来自系统的任何背景表达。

[0144] 为体外转录/翻译开发的最新系统是基于通过包括 SP6 和 SP7 在内的噬菌体 RNA 聚合酶进行的转录(Krieg,1987,Studier,1990)。在 T7 启动子元件控制下的 DNA 可以用作通过 T7RNA 聚合酶进行的体外转录的模板或用作完全体外转录/翻译的模板,该完全体外转录/翻译利用添加到原核或真核蛋白质合成系统中的聚合酶。虽然本发明的方法可以与任何的体外转录/翻译系统一起使用,但是 T7 系统优选用于转录,并且优选使用原核翻译系统,因为不需要 RNA 加帽。

[0145] 利用体外方法进行翻译,通过将衍生的氨基酸加入蛋白合成系统混合物,可以将氨基酸衍生物并入蛋白。相对于正常的氨基酸,改变衍生物的浓度允许创建混合群并测量相对影响。G. 表征。

[0146] 可以用多种技术表征由本发明产生的突变多肽。通常,可以使用 SDS-PAGE 分析蛋白产物的正确表观分子量。这提供了实际上合成了多肽的初始指示。当相比天然分子时,它也表示正常折叠或加工是否与突变体一起发生。因此,它可用于证明标记多肽是有用的。可选地,多肽可以通过凝胶染色来鉴别。

[0147] 除了仅仅合成以外,还可根据各种特性和范围广泛的功能表征蛋白。特性包括等电点、热稳定性、沉积速率和折叠。检查折叠的一种方式是可被同源结合伴侣识别的能力。该功能的主要实例是抗体-抗原相互作用。各种各样的不同免疫测定形式可用于该目的,并且在本领域中是公知的。主要地,当将使蛋白与特异性配体或相关配体组接触时,可以确定亲和性或特异性的变化。

[0148] 通常免疫测定法可分为两种类型:需要多个分离步骤的异质测定法,以及直接实施的均质测定法。异质测定法通常涉及在固体基质上固定的配体或抗体。使含有配体的样品与固定的抗体接触,并且由直接或间接地附着于固定的复合物的标签确定基质支撑物上形成的复合物的量。如本发明的上下文所使用的,配体被定义为与不相同的分子相互作用以形成紧密结合的、稳定的复合物的种类。为了实用的目的,该结合亲和性通常大于约 10^6M^{-1} 以及优选在 10^9 - 10^{15}M^{-1} 的范围内。该配体可以是若干类型的有机分子中的任何分子,包括脂环烃、多环芳烃、卤代化合物、苯型化合物、多环烃、氮杂环、硫杂环、氧杂环和烷烃、烯烃炔烃等。生物分子特别有利,包括氨基酸、肽、蛋白、脂质、糖、核酸和它们的组合。当然应当理解,这些仅仅是实例,并且设想的免疫测定方法适用于检测非常宽泛的化合物,只要能够得到与目的配体结合的抗体即可。

[0149] 异质免疫测定可以如夹心测定法实施,其中使目的分子与固定的抗体反应,该固定的抗体以高亲和性与该分子特异性结合。在第二步骤中,使由相同或不同的抗原抗体与标记分子形成的缀合物与固定基质上的抗原-抗体复合物反应。除去过量的游离标记缀合物后,测量与样品中的配体的量成比例的结合的标记缀合物。

[0150] 免疫复合物形成的检测是本领域公知的,并且可以通过应用多种方法来实现。这些方法通常是基于标签或标记的检测,如本领域公知的任何放射性、荧光、化学发光、电化学发光、生物或酶标签或标记。关于这些标签的使用的美国专利包括美国专利第 3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4275149 和 4366241 号,每篇均通过引用并入本文。当然,通过使用次级结合配体的另外的优点,如第二抗体或生物素/抗生物素蛋白配体结合结构,如本领域公知的。

[0151] 用于检测的优选方法包括:放射性免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA),由于通常增加灵敏度,ELISA 是最优选的。ELISA 广泛用于生物技术应用,特别是作为用于大范围的抗原物质的免疫测定。ELISA 的灵敏度基于信号的酶促扩增。

[0152] 根据本发明考虑使用的其他优选的蛋白是具有方便的活性测定法的蛋白。靶相互作用的代表性实例包括催化、酶-底物相互作用、蛋白-核酸相互作用、受体-配体相互作用和蛋白-金属相互作用。在这些测定中,对于执行前述任一功能的能力的变化,可以将突变蛋白质与野生型蛋白质进行比较。

[0153] 如本文所用,术语“接触”的定义是,使反应组分彼此足够接近以允许所期望的相互作用发生。接触可以通过例如在溶液中混合组分或通过异质相互作用完成,例如利用通过结合其中一种组分的柱或固定基质的流式接触。

[0154] 对于具有催化活性的突变蛋白,可以监控适当反应的催化速率变化或特异性改变。

[0155] DNA 表达构建体通常包括与编码序列可操作地连接的表达控制 DNA 序列,包括天然相关或异源启动子区域。优选地,表达控制序列将是载体中能转化或转染真核宿主细胞

的真核启动子系统。一旦载体已被并入合适的宿主内,则将上述宿主保持在适合核苷酸序列高水平表达以及突变的“工程化”抗体的收集和纯化的条件下。

[0156] 在序列已经可操作地连接于表达控制序列(即,定位成确保结构基因的转录和翻译)之后,在宿主中表达 DNA 序列。这些表达载体在宿主生物体中通常作为游离基因或者作为宿主染色体 DNA 的整合部分而复制。通常,表达载体含有选择标记,例如四环素或新霉素,以允许检测用期望的 DNA 序列转化的那些细胞(参见,例如美国专利第 4704362 号,其通过引用并入本文)。

[0157] 除了真核微生物(如酵母)之外,也可用哺乳动物组织细胞培养物于产生本发明的多肽(参见,Winnacker,Winnacker,“From Genes to Clones,”VCH Publishers,N. Y., N. Y. (1987),其通过引用并于本文中)。因为本领域已经开发许多能够分泌完整的免疫球蛋白的适当的宿主细胞系,因此真核细胞是优选的,并包括 CHO 细胞系,各种 COS 细胞系,HeLa 细胞,骨髓瘤细胞系等,但优选转化的 B- 细胞或杂交瘤。这些细胞的表达载体可包括表达控制序列,如复制起点、启动子、增强子(Queen et al. (1986) Immunol. Rev. 89:49),以及必需的加工信息位点,如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止序列。优选的表达控制序列是衍生自免疫球蛋白基因、巨细胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳头状瘤病毒等的启动子。

[0158] 通过将增强子序列插入载体中可以增大真核生物 DNA 转录。增强子是增加启动子转录的介于 10-30obp 之间的顺式作用序列。增强子能够有效地提高转录,无论 5' 或 3' 至转录单位。如果位于内含子内或编码序列本身内它们也是有效的。通常,使用病毒增强子,包括 SV40 增强子、巨细胞病毒增强子、多瘤细胞增强子和腺病毒增强子。也常用来自哺乳动物系统的增强子序列,如小鼠免疫球蛋白重链增强子。

[0159] 哺乳动物表达载体系统通常还包括可选择的标志物基因。合适的志物的实例包括二氢叶酸还原酶基因(DHFR)、胸苷激酶基因(TK)或赋予药物抗性的原核基因。前两个标记基因优选使用在不向生长培养基添加胸苷的情况下缺乏生长能力的突变细胞系。然后转化的细胞可以通过其在非补充培养基上生长的能力来鉴别。作为标志物有用的原核药物抗性基因的实例包括赋予 G418、霉酚酸和潮霉素抗性的基因。

[0160] 根据细胞宿主的类型,通过公知的方法可以将包含目的 DNA 片段的载体转移入宿主细胞内。例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理、脂质体转染或电穿孔可用于其它细胞宿主。用于转化哺乳动物细胞的其他方法包括使用聚凝胺、原生质体融合、脂质体、电穿孔和显微注射(通常参见 Sambrook et al., 同上)。

[0161] 一旦表达,可以根据本领域的标准程序,包括硫酸铵沉淀、馏分柱层析、凝胶电泳等,纯化本发明的抗体、个别突变的免疫球蛋白链、突变的抗体片段以及其它免疫球蛋白多肽(通常参见 Scopes,R.,Protein Purification(蛋白纯化),Springer-Verlag,N. Y. (1982))。一旦部分地纯化或纯化至所需的同质性,然后可以在治疗上使用多肽或在开发和实施测定程序,免疫荧光染色等中使用多肽(通常参见 Immunological Methods,Vols. I and II(免疫学方法),Eds.Lefkovits and Pernis(Lefkovitsj 和 Pernis 著),Academic Press,N. Y. N. Y. (1979 和 1981))。

[0162] 一旦已经定位模板肽,各种技术可用于使模板或肽文库的成员多样化以构建性能改善的配体。可以基于这些肽序列在每一步使用设计成产生主寡核苷酸序列的微小变化的

浓度下的所有碱基,合成寡核苷酸。如本文所述,然后将(轻微)简并寡核苷酸的这种混合物克隆到随机肽文库表达载体内。这种方法产生起始肽序列的系统的、受控的变化,但需要在突变前对各个正载体测序。该方法用于扩展少量回收载体的多样性。

[0163] 用于使选定的随机肽载体多样化的另一种方法涉及回收载体的集合或子集的诱变。汇集并分离用从淘选(paning)回收的载体转化的重组宿主细胞。通过用例如亚硝酸、甲酸、胍处理细胞,或通过使用如下所述的增变菌株处理细胞,诱变载体 DNA。这些处理在载体 DNA 中产生多种突变。含有编码可变肽的序列的片段可任选地通过用对可变区侧翼的位点具有特异性的一种或多种限制性核酸内切酶切断而分离,然后再克隆到未损坏的载体 DNA 内。可选地,可以在不进行诱变的随机肽编码序列的再克隆的情况下,使用诱变的载体。

[0164] 在使一组肽配体多样化的第二通用方法中,即添加额外的氨基酸至肽或发现有活性的肽内,各种方法都可用。在一种方法中,单独地确定在早期的淘选中选择的肽序列,并且合成合并了所有或部分的所确定的序列以及邻近的简并序列的邻近寡核苷酸。然后克隆这些以产生次级文库。

[0165] 除非在合成期间或之后由翻译机制修饰,重组肽文库由 20 个正常 L-氨基酸的序列组成。尽管可用于这种文库的结构多样性是大的,额外的多样性可以通过各种手段,例如氨基酸的化学修饰引入。例如,作为增加多样性的一个来源,本发明的肽文库可以进行羧基末端酰胺化。羧基末端酰胺化对于许多天然存在的生物活性肽的活性是必要的。在由酶肽酰甘氨酸 α -酰胺化单加氧酶(PAM)和羟基甘氨酸转氨酶(HGAT)催化的两步反应中通过切割羧基末端 Gly 残基的 N-C 键,在体内发生这种修饰。参见 Eipper et al., J. Biol. Chem. 266, 7827-7833(1991); Mizuno et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 137(3), 984-991(1986); Murthy et al., J. Biol. Chem. 261(4), 1815-1822(1986); Katopodis et al., Biochemistry 29, 6115-6120(1990); 以及 Young and Tamburini, J. Am. Chem. Soc. 111, 1933-1934(1989), 每篇文献通过引用并于本文中。

[0166] 可以通过用酶如 PAM 和 HGAT 在体内或体外处理并且在有利于保持融合蛋白/载体复合物的结构完整性的条件下来实施酰胺化。在本发明的随机肽文库中,酰胺化会发生在文库子集上,即,具有羧基末端 Gly 的那些肽。可以通过在文库的可变区结构域的末端处引入 Gly 密码子构建针对酰胺化而设计的肽文库。酰胺化后,富集的文库用作优先结合酰胺化肽的受体的特别有效的配体来源。

[0167] 可以将天然存在的肽和蛋白质中找到的其它修饰引入到文库内,以提供额外的多样性并促进所期望的生物活性。例如,可以为可变区文库提供编码参与磷酸化、糖基化、硫酸化、异戊二烯化(或添加其它脂质)的氨基酸残基的密码子。不被天然存在的酶催化的修饰可以通过化学手段(在相对温和的条件下)或者通过例如催化抗体和类似物的作用引入。在大多数情况下,用于文库构建的有效策略包括指定文库的可变核苷酸区内的或者邻近所述文库的可变核苷酸区的酶(或化学)底物识别位点,从而修饰文库的大多数成员。根据需要,加入的底物识别位点可以仅仅是单个残基(例如,用于磷酸化的丝氨酸)或复杂的共有序列。

[0168] 使用传统技术生成、产生或制造双特异性抗体的一个缺点是,通常,单个细胞中的 2 个抗体的表达导致 10 个可能的 LC/HC 抗体组合的形成(每个抗体具有 2 条重链和 2 条轻链),仅其中之一是所期望的双特异性产物;因此,所期望的双特异性产物仅是混合物的一

小部分而双特异性抗体的纯化在商业规模上非常困难。例如,如果第一抗体(抗体 1)具有左 LC(1-LC1)和左 HC(1-HC1)以及右 LC(r-LC1)和右 HC(r-HC1),且第二抗体(抗体 2)具有左 LC(1-LC2)和左 HC(1-HC2)以及右 LC(r-LC2)和右 HC(r-HC2),则单个细胞中的抗体 1 和抗体 2 的表达导致形成以下可能的 LC/HC 组合:(1)1-LC1/1-HC1 与 r-LC1/r-HC1;(2)1-LC1/1-HC1 与 r-LC2/r-HC1;(3)1-LC1/1-HC1 与 r-LC1/r-HC2;(4)1-LC2/1-HC1 与 r-LC2/r-HC1;(5)1-LC2/1-HC2 与 r-LC2/r-HC2;(6)1-LC2/1-HC2 与 r-HC2/r-LC1;(7)1-LC2/1-HC1 与 r-HC2/r-LC2;(8)1-LC1/1-HC2 与 r-HC2/r-LC1;(9)1-LC2/1-HC1 与 r-LC2/r-HC2;(10)1-LC1/1-HC1 与 r-LC2/r-HC2。只有组合之一结合两种抗原(1-LC1/1-HC1 与 r-LC2/r-HC2)。另外,不需要的 LC/HC 配对的结合亲和性和特异性是未知的。对重链 CH3 结构域(如杵臼设计)的修饰可以消除重链同源二聚体的形成,并产生的可能的 LC/HC 抗体组合的数量减少低至 4 个不同的产物(2 条不同的轻链与一个重链对的共表达)。例如,在杵臼设计中,4 种不同的产物将是:(1)1-LC1/1-HC1 与 r-LC2/r-HC2;(2)1-LC1/1-HC1 与 r-LC1/r-HC2;(3)1-LC2/1-HC1 与 r-LC1/r-HC2;(4)1-LC2/1-HC1 与 r-LC2/r-HC2。

[0169] 本发明的 H2L 多特异性抗体克服这些生产/制造困难。本发明的 H2L 抗体具有优化的可变结构域,其允许相同的轻链与 2 条重链中的每一条组装而不改变对特定抗原的结合特异性。轻链与重链 1 组装形成结合抗原 1 的 Fab-臂。轻链还可以与重链 2 组装形成结合抗原 2 的 Fab 臂。以使 HC1-HC2 二聚体仅在体内形成的方式修饰重链的 Fc 部分(例如通过“杵臼”设计促进)。仅形成杂二聚体的 2 条重链和单个轻链的表达导致只有单个产物即本发明的 H2L 多特异性抗体的形成。所产生的每个分子具有一个结合抗原 1 的 Fab 臂和结合抗原 2 的另一 Fab 臂。H2L mAbs。单个轻链已按照本发明的方法进行了优化,以便能够与两条重链组装和形成结合抗原 1 或抗原 2 的功能性 Fab 臂。可以利用本领域公知的方法,类似于普通的 IgG 制造和纯化本发明的 H2L 抗体。

[0170] H2L mAb 的构建

[0171] 起始亲本抗体可以是针对不同抗原(例如,抗体 1 结合抗原 1 以及抗体 2 结合抗原 2)的已知结合子(例如,包含抗体 1 的 LC1/HC1 对,和包含抗体 2 的 LC2/HC2 对),并且可以是非人类的、人源化的或全人抗体。

[0172] 在第一步骤中,两个抗体(LC1 和 LC2)的 2 条不同的轻链被单个轻链(新-LC)取代。这个过程可以以轻链文库开始。可以以几种方式来产生本发明的潜在的新轻链(新-LC)文库。例如,所有的功能性人种系 κ 轻链(VK)可变区已经公开,并且可以从公共数据库获得。可选择可变基因用于文库构建。轻链可变基因可从人基因组 DNA 采用基因特异性引物扩增。如公开的,在以碎片扩增基因的情况下,部分基因可以通过重叠 PCR 进行组合。也可以使用对轻链分泌信号的 5' 末端具有特异性的正向引物和对 κ 或 λ 恒定结构域的 3' 末端具有特异性的反向引物,从人 cDNA(例如,从非免疫化供体集合的 PBMC 衍生)扩增重排的 κ 和 λ 轻链。还可以通过从每个已知的亲本抗体(LC1 和 LC2)获取 LC 并根据本文描述的演化方法或其它方法演化一个(或两者)抗体以产生 LC 群或文库(LC1 文库和 LC2 文库)来产生 LC 文库。

[0173] 在本发明的一种方法中,抗体 1(HC1)的 HC 与人类 LC1 文库共表达,例如如本文描述而产生的 LC1 文库,并且为抗原 1 的结合子或者标的(hit)筛选该 HC1-LC1 文库,然后分离该结合子或者标的的轻链。共表达抗体 2(HC2)的 HC2 与人类 LC2 文库,例如如本文描述

而产生的 LC1 文库,并且为抗原 2 的结合子或者标的筛选该 HC2-LC2 文库,然后分离该结合子或者标的的轻链。筛选可以通过 FACS(例如,如果 LC/HC 组合被表达在细胞表面上)或通过 ELISA(使用分泌或细胞表面结合的文库)进行。

[0174] 在 HC1-LC1 文库中鉴别的标的的分离的轻链与来自抗体 2(HC2)的重链共表达,并且为抗原 2 的结合子或者标的筛选 HC2-LC1 文库。也分离 HC2-LC2 文库中鉴别的标的的分离的轻链,与来自抗体 1(HC1)的重链共表达,并且为抗原 1 的结合子或者标的筛选。这种方法鉴别包含可以在功能上补充 HC1 和 HC2 两者的轻链的克隆群。进一步表征(例如,通过野生型抗原 1 或抗原 2 的竞争性 ELISA)含有可以在功能上补充 HC1 和 HC2 两者的轻链的这些克隆,以验证对各克隆与抗原 1 和 / 或抗原 2 的结合特异性和作为各自亲本分子(抗体 1 和 / 或抗体 2)的抗原 1 和 / 或抗原 2 上的相同表位的保护。这些克隆的轻链也可以用 HC1 和 HC2 重新测试,以确认它们保留了在功能性上补充 HC1 和 HC2 两者的能力。

[0175] 可以进一步演化(例如,通过本文所述的演化方法)鉴别的新的一条或多条轻链演化演化以提高亲和性,以便匹配或超过亲本分子的结合亲和性,或修饰其他特征,如热稳定性、特异性、结合亲和性和 / 或其它特征。

[0176] 用经修饰的 IgG 恒定结构域在框架内克隆 HC1 可变结构域,例如用本文描述的杵臼技术,使得其可以不再与自身组装形成 HC1 同源二聚体。并行地,用经修饰的 IgG 恒定结构域在框架内克隆 HC2 可变结构域,例如用本文描述的杵臼技术,使得其可以不再与自身组装形成 HC2 同源二聚体。HC1 和 HC2 中的修饰消除了同源二聚体的形成,但被设计为允许 HC1-HC2 异源二聚体的形成。在 Ridgway JB, Presta LG, Carter P(1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng* 9:617 - 621 中详细描述了杵臼技术。在杵臼技术中,将大的氨基酸侧链引入重链的 CH3 结构域内,所述氨基酸侧链匹配另一重链的 CH3 结构域中适当设计的空腔内。

[0177] 在本发明中,优化的轻链(其功能地补充两条重链)以及同一细胞中的 HC1 和 HC2 的表达导致双特异性抗体的直接组装。

[0178] 如果起始亲本抗体是单个抗体,演化亲本抗体 HC 可变结构域演化(通过任何演化方法,如本文描述的那些),以结合第二(或更多)靶标。然后可将其中一新的、演化的 HC 与来自亲本抗体的一个原始 HC 以及来自亲本抗体的原始 LC 结合以形成本发明的 H2L 抗体。

[0179] 对于高组织穿透和 / 或较短的半衰期是重要的某些应用而言,也可以将全长 IgG 转化成更小的片段(例如,跳过 CH 2 或制备 F(ab')₂)

[0180] 在另一个方面,本发明涉及本文中所述的多功能抗体和抗原结合片段,其通过有机部分的共价连接修饰。这种修饰可以产生药代动力学性质改善(例如,体内血清半衰期增加)的抗体或抗原结合片段。该有机部分可为直链或支链亲水性聚合基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。在具体实施方案中,亲水性聚合基团的分子量可以为约 800 至约 120,000 道尔顿并且可以是聚链烷二醇(例如,聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG))、碳水化合物多聚体、氨基酸多聚体或聚乙烯基吡咯烷酮,以及脂肪酸或脂肪酸酯基团可包括约 8 至约 40 个碳原子。

[0181] 本发明的经修饰的多功能抗体和抗原结合片段可以包含与所述抗体直接或间接地共价键合的一个或多个有机部分。与本发明的抗体或抗原结合片段键合的每个有机部分

可以独立地是亲水性聚合基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。如本文所用的术语“脂肪酸”包括单羧酸和二羧酸。在本文中使用的术语“亲水性聚合基团”指的是在水中比在辛烷中更可溶的有机多聚体。例如，聚赖氨酸在水中比在辛烷中更可溶。因此，本发明涵盖通过多聚赖氨酸的共价附着而修饰的抗体。适于修饰本发明的抗体的亲水性多聚体可以是直链或支链的并包括，例如，聚链烷二醇（例如，PEG、单甲氧基聚乙二醇（MPEG）、PPG 等）、碳水化合物（例如，葡聚糖、纤维素、寡糖、多糖等）、亲水性氨基酸的多聚体（例如，聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等）、聚链烷氧化物（例如，聚环氧乙烷、聚环氧丙烷等）和聚乙烯吡咯烷酮。优选地，修饰本发明的抗体的亲水性多聚体作为单独的分子实体分子量为约 800 至约 150,000 道尔顿。例如可以使用 PEG₅₀₀₀ 和 PEG_{20,000}，其中下标是以道尔顿计的多聚体的平均分子量。可以用一个至约六个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代亲水性多聚体基团。可以通过采用合适的方法制备被脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水性多聚体。例如，包含胺基的多聚体可以与脂肪酸或脂肪酸酯的羧酸盐偶联，以及脂肪酸或脂肪酸酯上的活化的羧酸盐（例如，用 N,N-羰基二咪唑活化）可以与多聚体上的羟基偶联。

[0182] 适于修饰本发明的多功能抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或可以含有一个或多个不饱和单元。适合于修饰本发明的抗体的脂肪酸包括，例如，正十二烷酸盐（C₁₂，月桂酸盐）、正十四烷酸盐（C₁₄，肉豆蔻酸盐）、正十八烷酸盐（C₁₈，硬脂酸盐）、正二十烷酸盐（C₂₀，花生酸盐）、正二十二烷酸盐（C₂₂，山嵛酸盐）、正三十烷酸盐（C₃₀）、正四十烷酸盐（C₄₀）、顺式 δ -9-十八烷酸盐（C₁₈，油酸盐），所有的顺式 δ 5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸盐（C₂₀，花生四烯酸盐）、辛二酸、十四烷二酸、十八烷二酸、二十二烷酸和类似物。合适的脂肪酸酯包括包含直链或支链低级烷基的二羧酸的单酯。该低级烷基可以包括 1 个至约 12 个、优选 1 至约 6 个的碳原子。

[0183] 可以使用合适的方法制备修饰的多功能抗体和抗原结合片段，如通过与一种或多种改性剂反应。在本文中使用的术语“改性剂”是指包含活化基团的合适的有机基团（例如，亲水性多聚体、脂肪酸、脂肪酸酯）。“活化基团”是在适当的条件下能够与第二化学基团反应从而形成改性剂与第二化学基团之间的共价键的化学部分或官能团。例如，胺反应性活化基团包括亲电基团，如甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、卤素（氯、溴、氟、碘）、N-羟基琥珀酰亚胺酯（NHS）等。可以与硫醇反应的活化基团包括，例如，马来酰亚胺、碘乙酰基、丙烯酰基、吡啶基二硫化物、5-硫醇-2-硝基苯甲酸硫醇（TNB 硫醇）和类似物。醛官能团可与含胺或含酰肼的分子偶联，以及叠氮基可与三价磷基团反应而形成氨基磷酸酯或磷酰亚胺键。向分子内引入活化基团的合适方法是本领域已知的（参见例如，Hernanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)）。活化基团可以与有机基团（例如，亲水性多聚体、脂肪酸、脂肪酸酯）直接键合，或通过连接体部分键合，例如其中一个或多个碳原子可以被杂原子（如氧、氮或硫）取代的二价 C₁-C₁₂ 基团。合适的连接体部分包括，例如，四甘醇、-(CH₂)₃-、-NH-(CH₂)₆-NH-、-(CH₂)₂-NH- 和 -CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-NH-。可以制备包含连接体部分的改性剂，例如，通过在 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺（EDC）的存在下，使单-Boc-烷基二胺（例如，单-Boc-乙二胺、单-Boc-二氨基己烷）与脂肪酸反应以形成游离胺和脂肪酸羧酸酯之间的酰胺键。通过用三氟乙酸（TFA）处理以暴露可以与另一所描述的羧酸偶联的伯胺，可以从产物去除 Boc 保护基，或者可以使 Boc 保护基与马来酸酐反应并且环化所得产物，以产生脂肪酸的活化的马来酰亚胺

衍生物。(参见,例如,Thompson, et al., WO 92/16221,其全部教导通过引用并于本文)。

[0184] 通过使多功能抗体或抗原结合片段与改性剂反应,可产生本发明的修饰的多功能抗体。例如,有机部分可以通过使用胺反应性改性剂,例如,PEG的NHS酯,以非位点特异性方式与抗体键合。修饰的多功能抗体或抗原结合片段也可通过还原抗体或抗原结合片段的二硫键(例如,链内二硫键)来制备。然后可以使该还原的抗体或抗原结合片段与硫醇反应性改性剂反应,以产生本发明的修饰的多功能性抗体。可以使用合适的方法,如反向蛋白水解,制备修饰的多功能抗体和抗原结合片段,该修饰的多功能抗体和抗原结合片段包含与本发明的多功能抗体的特定位置键合的有机部分(Fisch et al., *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153(1992); Werlen et al., *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417(1994); Kumaran et al., *Protein Sci.* 6(10):2233-2241(1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24(1):59-68(1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463(1997)),并且该方法描述于 Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, Calif. (1996) 中。

[0185] 本发明的多功能抗体可用于诊断和治疗。通过说明而非限制的方式,多功能抗体可用于治疗癌症、自身免疫性疾病或病毒感染。对于治疗癌症,该多功能的抗体通常会结合在癌症细胞上优先表达的抗原,如 erbB-2、CEA、CD33 和本领域技术人员公知的许多其它抗原。对于治疗自身免疫性疾病,该抗体通常会结合在 T 细胞上表达的抗原,如 CD4、IL-2 受体、各种 T 细胞抗原受体和本领域技术人员公知的许多其它抗原(例如,参见 *Fundamental Immunology*, 2nd ed. (基础免疫学), W. E. Paul, ed. (W. E. Paul 著), Raven Press: New York, N. Y., 其通过引用并于本文)。对于治疗病毒感染,该抗体通常会结合在由特定病毒(单纯疱疹病毒和巨细胞病毒的各种糖蛋白(例如, gB、gD、gE)) 感染了细胞上表达的抗原和本领域的技术人员公知的许多其他抗原(例如,参见 *Virology*, 2nd ed., B. N. Fields et al., eds., (1990), Raven Press: New York, N. Y.)。

[0186] 本发明的多功能抗体可用于治疗中枢神经系统疾病。已经描述了跨越血脑屏障和结合大脑蛋白而潜在地用于治疗的双特异性抗体 (Yu YJ, et al, "Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target", *Sci Transl Med* 2011 May 25 ;3(84):84ra44, 其通过引用并于本文)。本发明的方法尤其可用于制备这种抗体。

[0187] 本发明的方法可以用于产生在名称为 "Mirac Proteins" 并且通过引用并入本文的未决专利申请 PCT/US10/26611 中描述的条件活性蛋白。该有条件活性蛋白是生物蛋白,特别是治疗性蛋白质,并且在野生型、正常的生理条件下可逆或不可逆地失活。例如,条件活性蛋白在体温下几乎无活性,但在较低温度下有活性。如所述的,条件活性蛋白可潜在地用于治疗多种疾病。在本发明的方法中,鉴别是条件活性蛋白的多特异性抗体有。可以用有机部分进一步修饰这些是条件活性的多特异性抗体,从而产生共轭的、条件活性多特异性抗体。

[0188] 包含本发明的抗体的药物组合物可用于胃肠外给药,即,皮下、肌肉或静脉注射。用于胃肠外给药的组合物通常会包含该抗体的溶液或在可接受载体中溶解的其混合物,优选水性载体。可使用多种水性载体,例如,水、缓冲水、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸等。这些溶液是无菌的并通常不含颗粒物质。这些组合物可以通过常规的公知灭菌技术进行灭菌。该

组合物可以含有所需的药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,如 pH 调节剂和缓冲剂,毒性调节剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。根据所选的特定给药模式,这些制剂中的突变抗体的浓度可以广泛地变化,即从不到约 0.01%,通常至少约 0.1% 到高达 5% (重量),并且主要基于流体体积、粘度等选择。

[0189] 因此,用于肌肉内注射的典型药物组合物可被配制成含 1ml 无菌缓冲水和约 1mg 的突变抗体。用于静脉内输注的典型组合物可制成含有 250ml 无菌林格氏溶液和 10mg 的突变抗体。制备肠胃外给药的组合物实际的方法将是本领域技术人员已知的或显而易见的,并且更详细地描述于例如 Remington's Pharmaceutical Science, 20th Ed. (雷明顿药理学,第 20 版), Mack Publishing Company, Easton, Pa. (2000) 中,其通过引用并入本文。

[0190] 本发明的益处延伸到“工业应用”(或工业工艺),该术语用来包括在使得商业行业 (commercial industry) (或仅仅是工业) 中的应用以及非商业工业应用 (例如,非盈利机构的生物医学研究)。相关应用包括在诊断、医药、农业、制造业和学术界领域中的那些。

[0191] 本文引用的所有文献,包括但不限于出版物、专利和专利申请,均在此通过引用并入本文,包括美国专利第 6171820 号和美国专利第 5677149 号。

[0192] 无需进一步详尽说明,据信本领域的技术人员可以使用前述的说明,将本发明利用至最大限度。下面的实施例被认为是说明性的,因此不以任何方式限制本发明的其余部分。

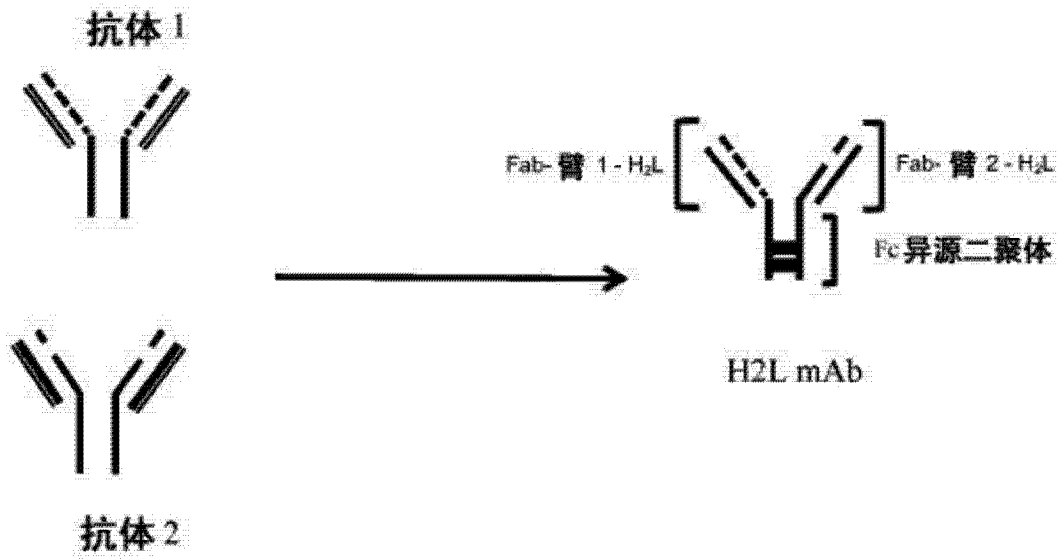


图 1

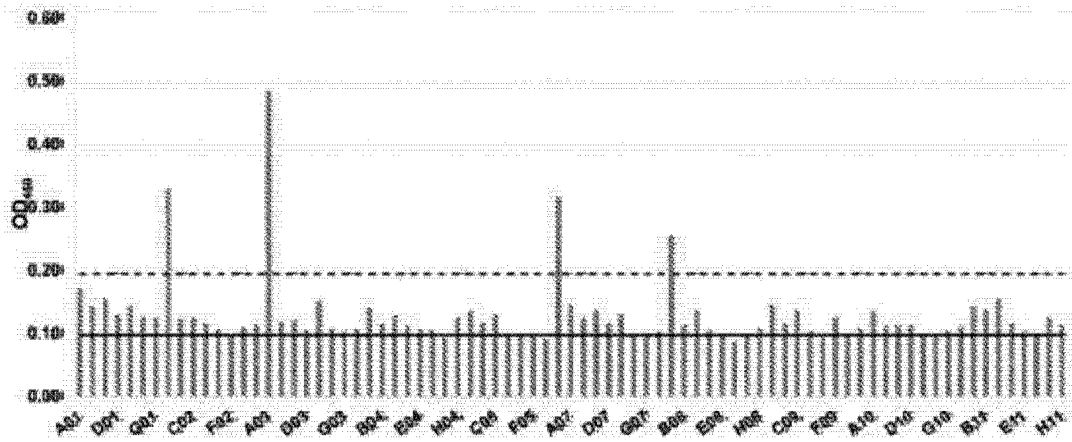


图 2

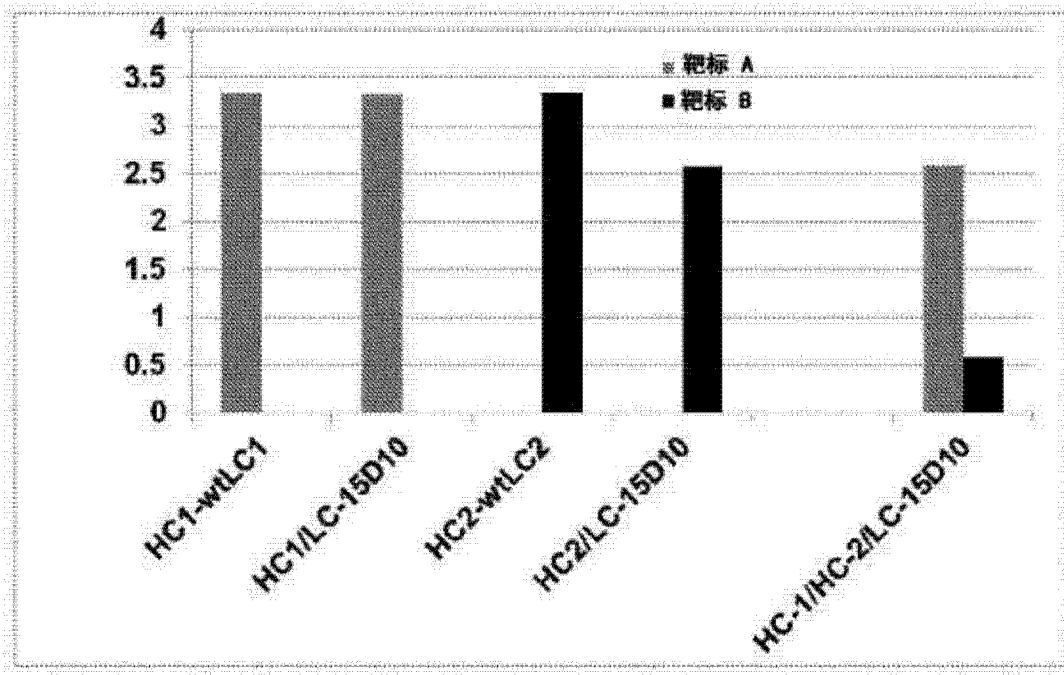


图 3

专利名称(译)	多特异单克隆抗体		
公开(公告)号	CN104583239A	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201380035170.7	申请日	2013-05-10
[标]申请(专利权)人(译)	生物蛋白有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物蛋白有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物蛋白有限公司		
[标]发明人	格那德弗雷 华文昌 杰M少特		
发明人	格那德·弗雷 华文昌 杰·M·少特		
IPC分类号	C07K16/46 C07K16/18 G01N33/53 C12N15/13		
CPC分类号	A01K2267/03 A61P35/00 C07K16/005 C07K16/468 C07K2317/21 C07K2317/622 C12N15/1034 G01N33/6854 C07K16/18 C07K16/46 C07K16/461 G01N33/53 C07K2317/14 C07K2317/31 C07K2317/92 C07K2317/94		
代理人(译)	王朋飞		
优先权	61/645302 2012-05-10 US		
其他公开文献	CN104583239B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及多特异性抗体的产生，该抗体的特征在于其以特异性和亲和性与多个抗原结合的能力。尤其是，本发明涉及双特异性抗体。