



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104995517 B

(45)授权公告日 2018.07.17

(21)申请号 201380043777.X

(22)申请日 2013.08.08

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104995517 A

(43)申请公布日 2015.10.21

(30)优先权数据  
12180835.6 2012.08.17 EP  
61/684,836 2012.08.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.02.16

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2013/066625 2013.08.08

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/026905 EN 2014.02.20

(73)专利权人 莫佛塞斯公司

地址 德国马丁斯瑞德普兰奈格  
专利权人 S·哈特勒 C·弗里施  
A·克纳皮克

(72)发明人 S·哈特勒 C·弗里施  
A·克纳皮克

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 顾小曼

(51)Int.Cl.  
C07K 16/00(2006.01)  
G01N 33/564(2006.01)  
G01N 33/53(2006.01)  
C07K 16/24(2006.01)

审查员 薛艳华

权利要求书1页 说明书23页 附图6页

(54)发明名称

复合物特异性抗体和抗体片段及其用途

(57)摘要

本发明提供了特异性地检测特异性关联抗原结合部分(特别是抗体)与其抗原的复合物的抗体及其片段。本公开的抗体并不单独与所述关联抗原结合部分或所述抗原结合,并因此可用于,例如直接检测结合抗原的抗原结合部分。进一步公开的是使用所述抗体和抗体片段的方法。

1. 一种分离的单克隆抗体,其特异性地结合至单一特异性关联抗体与其抗原的复合物,且不与所述特异性关联抗体或所述抗原单独结合,并且其结合至靶抗体CDR区的至少某些部分,其中所述分离的单克隆抗体的表位位于可变区,且包括来自所述特异性关联抗体和所述特异性关联抗体的抗原二者的序列段以及所述特异性关联抗体的可变区的一个或多个氨基酸和所述特异性关联抗体的抗原的一个或多个氨基酸,其中所述单一特异性关联抗体选自但不限于以下列表:阿达木单抗、MOR103、利妥昔单抗、曲妥珠单抗、阿仑单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、吉妥珠单抗、英夫利昔单抗、兰尼单抗、优特克单抗、戈利木单抗、那他珠单抗、奥法木单抗、奥马珠单抗、帕尼单抗。

2. 根据前述权利要求1所述的分离的单克隆抗体,其中所述分离的单克隆抗体是人源化的或人单克隆抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的分离的单克隆抗体,其中所述抗原是细胞因子或受体。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体用于检测样品中的特异性关联抗体与其抗原的复合物的用途。

5. 一种检测样品中的特异性关联抗体与其抗原的复合物的方法,所述方法包括下列步骤:

- a) 将所述样品与根据权利要求1-3中任一项所述的分离的单克隆抗体接触,和
- b) 检测与所述复合物结合的所述分离的单克隆抗体。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中使用EIA、ELISA、RIA、间接竞争性免疫测定、直接竞争性免疫测定、非竞争性免疫测定、夹心免疫测定、凝集测定或MSD来检测所述复合物。

7. 根据权利要求5或6所述的方法,其中所述特异性关联抗体与其抗原的复合物选自,但不限于:阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 、MOR103/GM-CSF、曲妥珠单抗/Her2/c-neu、阿仑单抗/CD52、贝伐单抗/VEGF-A、西妥昔单抗/EGF-R、吉妥珠单抗/CD33、英夫利昔单抗/TNF- $\alpha$ 、兰尼单抗/VEGF-A、优特克单抗/IL-12、优特克单抗/IL-23、戈利木单抗/TNF- $\alpha$ 、那他珠单抗/ $\alpha$ 4-整联蛋白、奥法木单抗/CD20、利妥昔单抗/CD20、奥马珠单抗/IgE、帕尼单抗/EGFR。

8. 一种鉴定根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体的方法,所述方法包括:

- a) 在未结合的抗原和与特异性关联抗体具有相同同种型的抗体的存在下,筛选针对所述特异性关联抗体与其抗原的复合物的抗体的文库,
- b) 分离所述特异性关联抗体与其抗原的复合物和其结合的抗体,以及
- c) 鉴定并分离所述特异性关联抗体与其抗原的复合物结合的抗体。

9. 一种分离的单克隆抗体,其能够根据权利要求8所述的方法获得。

10. 一种试剂盒,其包含一种或多种根据权利要求1-3中任一项所述的分离的单克隆抗体以及至少一种对于检测特异性关联抗体与其抗原的复合物所必需的试剂或装置。

11. 根据权利要求10所述的试剂盒,其中所述一种或多种抗体选自与一种以下复合物结合的抗体,所述复合物选自但不限于:阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 、MOR103/GM-CSF、曲妥珠单抗/Her2/c-neu、阿仑单抗/CD52、贝伐单抗/VEGF-A、西妥昔单抗/EGF-R、吉妥珠单抗/CD33、英夫利昔单抗/TNF- $\alpha$ 、兰尼单抗/VEGF-A、优特克单抗/IL-12、优特克单抗/IL-23、戈利木单抗/TNF- $\alpha$ 、那他珠单抗/ $\alpha$ 4-整联蛋白、奥法木单抗/CD20、利妥昔单抗/CD20、奥马珠单抗/IgE、帕尼单抗/EGFR。

## 复合物特异性抗体和抗体片段及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2012年8月20日提交的美国临时申请序列号61/684,836号的权益,其全部内容并入本文以供参考。

### 背景技术

[0003] 制药产业对免疫球蛋白例如抗体有着持续并增长的兴趣。自2000年以来,单克隆抗体的治疗市场已呈指数增长,在2007年,在美国最畅销的20种生物技术药物中有8种为治疗性单克隆抗体,每一种在全世界都有超过50亿美元的年销售额。

[0004] 目前,显著数量的抗体以及免疫球蛋白的衍生物和片段正处于临床前和临床研究阶段中。在进入人体之前,所研究的药物必须在广泛的探究和临床前试验中进行分析 and 表征。需要研究例如毒理学、药代动力学和药效动力学特征等重要指标,以建立安全且有效的药物信息(drug profile)。为了量化和监测治疗性抗体的水平,许多这类的研究需要使用药物特异性试剂,以在样品基质(sample matrix)例如病人或实验动物的血清或任意液体中特异地检测治疗性抗体。

[0005] 药物特异性试剂包括,例如,仅检测人免疫球蛋白或人源化免疫球蛋白且因此其可用于对源自非人实验宿主的样品中的人治疗性抗体或人源化治疗性抗体进行定量的抗体(见例如W02006066912;US序列号11/792,910,其全部内容并入本文以供参考)。进一步的是使用抗独特型抗体(anti-idiotypic antibodies)或抗体片段,其特异于治疗性抗体中的独特结构。因此,抗独特型抗体可用于检测样品基质中特定的治疗性抗体或抗体片段,而与样品所分离自的宿主无关(见,例如W02009032128)。然而,因为绝大部分的抗独特型抗体结合至治疗性抗体的独特CDR的一个或多个,且所述的CDR定义了特异地与治疗性抗体的抗原相互作用的互补位(paratope),所以只有对游离的、非与抗原结合的治疗性抗体的检测和监测是可能的。

[0006] US 2012/0157663描述了所谓的“domino抗体”,其具有仅当在抗体结合到各自的抗原上时才与所述抗体相结合的能力。US2012/0157663的抗体通过一种特定的基于杂交瘤的筛选技术产生。所有domino抗体的共同点是,靶抗体上的domino抗体的表位通过靶抗体与其各自的抗原相结合时所引起的构象变化形成。所述表位位于靶抗体的恒定区(例如轻链的恒定区),且既不包括抗原的任何部分,也不包括所述靶抗体的CDR区。相比之下,本发明的复合物特异性抗体和抗体片段结合至靶抗体CDR区的至少某些部分。因此,尽管domino抗体仅在靶抗体结合其各自的抗原时识别靶抗体,domino抗体也与具有相同的抗原特异性的其它靶抗体相结合,即它们在这个方面是泛特异性的。相比之下,本发明的抗体和抗体片段特异于一种单一的靶抗体,且其仅在靶抗体结合其抗原时与此靶抗体结合。

[0007] 因为应用到患者的治疗性抗体总是在宿主身体周围中的不同状态之间平衡,因此对于这些不同状态的监控和均衡化(proportion)为治疗性抗体的安全性提供了必须的信息。这些不同的状态根据质量作用定律平衡,包括总抗体、未结合抗体和结合抗体,且所述的平衡取决于,例如治疗性抗体的亲和性以及体内抗原的浓度。此外,由于治疗性抗体相对

较慢的体内清除率,与其抗原相结合的治疗性抗体在长期的施用中通常导抗原水平的增加(Charles P. (1999) *Journal of Immunology* 163;1521-1528)。在治疗性抗体的存在下,结合的抗原被中和,且其大多数不具生物活性。然而,必须监测这种现象,并且例如评估突然停药的风险很重要。

[0008] 对于治疗性抗体的剖析(profiling)和稍后的批准来说,综合总抗体、未结合抗体和结合抗体的特异性检测是尤受关注和重要的(Kuang B. (2010) *Bioanalysis*, 2(6):1125-40)。仅例示出一些抗独特型抗体有能力结合未结合的治疗性抗体并且还能结合复合物(治疗性抗体结合至其抗原),并因此可用以检测总抗体负载(total antibody load)。这种非互补位(non-paratopic)抗独特型抗体在W02009032128中公开。

[0009] 相比之下,几乎所有的抗独特型抗体都针对靶抗体的CDR,且因此仅检测未结合的抗体(见例如Tornetta M. (2007) *Journal of Immunological Methods* 328,34-44)。

[0010] 然而,无论是使用CDR特异性抗独特型抗体,还是使用非互补位抗独特型抗体,都无法仅为药物-抗原复合物提供直接检测和定量。为了量化结合的抗体,建立了多种基于ELISA的测定法,但往往需要使用二级抗体,例如抗人Fc,以进行间接检测。使用Fc特异性检测抗体需要额外的步骤以及充分的洗涤,以由血清免疫球蛋白中捕获和分离复合物,因此这些测定法容易受到背景噪音和信号变化的影响。

[0011] 因此,需要更为灵敏和稳健的替代方法来检测和定量抗体-抗原复合物。

## 发明内容

[0012] 本发明公开了这样的抗体及抗体片段,其特异性地检测和结合关联抗体(cognate antibody)与其抗原的复合物。本公开的抗体并不与所述的关联抗原结合部分或所述的抗原单独结合,并因此可用于直接检测结合的治疗性抗体,而不需要使用二级Fc特异性抗体。

[0013] 本发明还公开了这样的抗体及抗体片段,其特异性地检测和结合特异性关联抗体与其抗原的复合物。具体地,本发明的抗体和抗体片段不与具有相同抗原特异性的其它关联抗体的复合物结合。

[0014] 这些复合物特异抗体提供了优越的对从人类患者或实验动物中分离的样品中的抗体-抗原复合物以及游离或未结合的药物进行定量的方法。在本文中公开了更灵敏且更稳健的测定法,例如ELISA体系(set-up),为药代动力学提供替代的和改进的测定法。此外,可使用本文公开的定量测定法开发护理点测试(point of care tests),使用例如横向流动技术(lateral flow techniques)以监测药物水平。

[0015] 本公开进一步公开了所述抗体在用于检测所述复合物的测定中的用途。此外,本公开内容公开了鉴定特异性地检测特异性关联抗体与其抗原的复合物的抗体的方法。

## 附图说明

[0016] 图1示出了在ELISA中针对一系列不相关和相关的抗原以及阿达木单抗(Adalimumab)/TNF- $\alpha$ 复合物测试7个抗体的特异性结合的结果。每种抗原以5 $\mu$ g/mL涂覆在微量滴定板上过夜。在使用5%BSA洗涤和封闭后,加入Fab-FH形式(format)(来自2 $\mu$ g/mL溶液中的20 $\mu$ L)的抗阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 抗体。使用HPR标记的抗His抗体和QuantaBlu荧光过氧化酶底物进行检测。

[0017] 图2示出了在ELISA中AdaTNF#5对于不同的固定化抗原的滴定结果。在测试的浓度范围(0.03-2000ng/mL)内,AdaTNF#5只与阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 复合物结合,但并不与其单一组分和其它抗原结合。

[0018] 图3示出了在ELISA中转换为全长人IgG1的纯化AdaTNF#5针对不同抗原的测试结果。结合HRP的纯化AdaTNF#5-hIgG1特异性地与阿达木单抗和TNF- $\alpha$ 的复合物结合。

[0019] 图4示出了药代动力学ELISA分析的结果。将人TNF- $\alpha$ 涂覆在微量滴定板上,将增加浓度的阿达木单抗掺入10%人类血清,并将其涂覆到预涂覆板。在洗涤后,以2 $\mu$ g/ml添加抗阿达木单抗/TNF- $\alpha$ -hIgG1抗体AdaTNF#5(结合至HRP)。通过添加QuantaBlu<sup>®</sup>荧光过氧化酶底物进行检测。在人类血清的存在下,AdaTNF#5以剂量依赖的方式结合阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 复合物。

[0020] 图5示出了在ELISA中IFX-TNF#1、IFX-TNF#2和IFX-TNF#3针对多种抗原的测试结果。因此,将5 $\mu$ g/mL每种抗原涂覆在微量滴定板上,加入Fab-FH形式(来自2 $\mu$ g/mL溶液中的20 $\mu$ L)的抗英夫利昔单抗(Infliximab)/TNF- $\alpha$ 抗体。已证明IFX-TNF#1特异性地检测抗英夫利昔单抗/TNF- $\alpha$ 复合物(图5)。

[0021] 图6示出了筛选ELISA以检测抗MOR103/GM-CSF复合物抗体的结果。将5 $\mu$ g/mL的每种抗体(BSA、GST、MOR03207和MOR103)涂覆在微量滴定板上。此外,MOR103/GM-CSF复合物还固定化在该板上。M103GmCSF#1、M103GmCSF#2和M103GmCSF#3特异性地检测MOR103/GM-CSF复合物,但不单独检测GM-CSF或MOR103。

[0022] 图7示出了测试M103GmCSF#1的靶标选择性的ELISA测试结果。将单独的MOR103、生物素化GM-CSF或结合MOR103的生物素化GM-CSF涂覆到抗生物素蛋白涂覆板上。以增加的浓度加入His标记的M103GmCSF#1Fab并进行检测。M103GmCSF#1显示出结合药物-靶复合物而不结合单独蛋白质(药物和靶)的高选择性。

[0023] 图8示出了基于MSD<sup>®</sup>(Meso Scale Discovery)配体结合测定法以定量人类血清中的MOR103/GM-CSF复合物的结果。MOR103/GM-CSF复合物补充有人血清,并在Multi-array<sup>®</sup>96孔板标准板上进行滴定。使用ECL标记的M103GmCSF#1IgG检测MOR103/GM-CSF复合物。在整个滴定曲线中,MOR103/GM-CSF复合物在50%人类血清的存在下以剂量依赖的方式被特异性地检测。

### 具体实施方式

[0024] 因此,在一个方面,本公开涉及分离的单克隆抗体或其片段,其特异性地结合至特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物。在一个实施方式中,分离的单克隆抗体或其片段特异性地结合至特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物,且不单独与所述关联抗原结合部分或所述抗原结合。

[0025] 分离的单克隆抗体或其片段

[0026] 在另一方面,本公开涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其中所述分离的单克隆抗体或其片段特异性地结合至特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物,且EC<sub>50</sub>浓度为小于100nM、90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM或1nM。

[0027] 在另一方面,本公开涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其中所述分离的单克隆抗体或其片段特异性地结合至特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物,且解离常数( $K_d$ )为小于 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、 $10^{12} M^{-1}$ 或 $10^{13} M^{-1}$ 。

[0028] 在一个方面,本公开涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其中所述分离的单克隆抗体或其片段是单克隆抗体或多克隆抗体。在一个实施方式中,所述分离的抗体或其片段是人抗体或人源化抗体。在一个实施方式中,所述分离的抗体或其片段是嵌合抗体。在一个实施方式中,所述分离的抗体或其片段包括人重链恒定区和人轻链恒定区。在一个实施方式中,所述分离的抗体为IgG同种型。在另一个实施方式中,抗体可为任意同种型(例如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)、类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或其衍生物(例如IgG1f LALA)。在一个实施方式中,所述抗体为IgG1f LALA同种型。在一个实施方式中,所述分离的抗体或其片段选自Fab、F(ab2)'、F(ab)2'或scFV。在一个实施方式中,所述分离的抗体选自单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和合成抗体。在一个实施方式中,所述的抗体或其片段为人抗体或人源化抗体。

[0029] 关联抗原结合部分

[0030] 在一方面,本公开涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原的复合物。在另一方面,本公开涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其特异性地结合至特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物。在一个实施方式中,所述关联抗原结合部分或所述特异性关联抗原结合部分为关联抗体或其片段。在一个实施方式中,所述关联抗体或其片段、或所述特异性关联抗体或其片段为治疗性抗体或治疗性抗体片段。在另一个实施方式中,所述关联抗体或其片段、或所述特异性关联抗体或其片段为诊断性抗体或诊断性抗体片段。

[0031] 在一个优选的实施方式中,所述关联抗体或其片段为特异性关联单克隆抗体或其片段。“特异性关联单克隆抗体”意指一种,且仅有一种与其抗原特异性地结合的单克隆抗体。所谓的“domino抗体”(见US 2012/0157663)的靶抗体在此定义下并非特异性关联抗体,因为domino抗体与其靶抗体的恒定区结合,因此不是特异于一种单一抗体,而是对所有的、或至少众多的具有一定的靶特异性的抗体具有特异性。

[0032] 在一个优选的实施方式中,关联抗体或其片段为关联单克隆抗体或其片段。

[0033] 在一个实施方式中,所述关联单克隆抗体或其片段是人抗体或人源化抗体。在一个实施方式中,所述关联单克隆抗体或其片段是嵌合抗体。在一个实施方式中,所述关联单克隆抗体或其片段包括人重链恒定区和人轻链恒定区。在一个实施方式中,所述关联单克隆抗体为IgG同种型。在另一个实施方式中,关联抗体可为任意同种型(例如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)、类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或其衍生物(例如IgG1f LALA)。在一个实施方式中,所述抗体为IgG1f LALA同种型。

[0034] 在一个实施方式中,所述关联单克隆抗体或其片段选自Fab、F(ab2)'、F(ab)2'或scFV。在一个实施方式中,所述关联单克隆抗体或其片段选自单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和合成抗体。在一个实施方式中,关联抗体或其片段为人抗体或人源化抗体。

[0035] 在一个方面,本公开涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物,其中关联抗原

结合部分为抗体衍生的支架。在一个实施方式中,抗体衍生的支架选自scFv、四价抗体、交联的Fab或IgG。在一个实施方式中,关联抗体或其片段为单链抗体。

[0036] 在一个方面,本公开涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原的复合物、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物,其中关联抗原结合部分选自单域抗体(single domain antibodies)、巨型抗体(maxibodies)、微型抗体(minibodies)、胞内抗体、双抗体、三链抗体(triabodies)、四链抗体(tetrabodies)、v-NAR、骆驼抗体(camelid antibodies)、锚蛋白、结构域抗体(domain antibodies)、脂质运载蛋白、小模块免疫药物(small modular immunopharmaceuticals)、maxybodies、蛋白质A和affilins。

[0037] 在一个方面,本公开涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原的复合物、或关联抗原结合部分与其抗原的复合物,其中关联抗原结合部分选自由以下组成的列表,但不限于其:阿达木单抗(Adalimumab)、MOR103、利妥昔单抗(Rituximab)、曲妥珠单抗(Trastuzumab)、阿仑单抗(Alemtuzumab)、贝伐单抗(Bevacizumab)、西妥昔单抗(Cetuximab)、吉妥珠单抗(Gemtuzumab)、英夫利昔单抗(Infliximab)、兰尼单抗(Ranibizumab)、优特克单抗(Ustekinumab)、戈利木单抗(Golimumba)、那他珠单抗(Natalizumab)、奥法木单抗(Ofatumumab)、奥马珠单抗(Omalizumab)、帕尼单抗(Panitumumab)。

[0038] 抗原

[0039] 在一个方面,本公开涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其特异性地结合至特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物,其中抗原为蛋白质。在优选的实施方式中,所述蛋白质为人蛋白质。

[0040] 本发明的分离的单克隆抗体或片段的表位包括特异性关联抗体的可变区的一个或多个氨基酸。因此,在某些方面,本公开涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其中所述分离的单克隆抗体或其片段的表位包括特异性关联抗体的可变区的一个或多个氨基酸。在其它方面,本公开涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其中所述分离的单克隆抗体或其片段的表位包括特异性关联抗体的可变区的一个或多个氨基酸,以及所述特异性关联抗体的抗原的一个或多个氨基酸。

[0041] 在其它方面,本公开涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其中所述分离的单克隆抗体或其片段的表位包括来自特异性关联抗体和所述特异性关联抗体的抗原二者的序列段(stretches)。

[0042] 在一个实施方式中,所述蛋白质与特定病症相关。在一个实施方式中,蛋白质是特定病症中的特定生物疗法的有用靶标。在一个实施方式中,蛋白质是特定药物的有用靶标。在一个实施方式中,蛋白质是治疗性抗体或其片段的有用靶标。在一个实施方式中,蛋白质是诊断性抗体或其片段的有用靶标。在一个实施方式中,蛋白质是细胞因子。在一个实施方式中,蛋白质为受体。

[0043] 在一个实施方式中,蛋白质与炎性疾病、自身免疫性疾病、病毒、细菌和寄身虫感染、恶性肿瘤、神经变性疾病或任何肿瘤相关的疾病相关联。在一个实施方式中,蛋白质与癌症相关。

[0044] 在一个实施方式中,蛋白质选自由以下组成的列表,但不限于其:TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、

VEGF-A、 $\alpha 4$ -整联蛋白、CD20、IgE (Fc区)、EGFR、GM-CSF、CD19、M-CSF、CD38、MIF、DDT、IL-17A、IL-17C、IL-1 $\alpha$ 、IL1- $\beta$ 、IL-6、IL-12、IL-23、Her2/c-neu、CD52、CD33。

[0045] 在一个方面,本公开涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原的复合物,其中所述复合物选自,但不限于阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 、MOR103/GM-CSF、曲妥珠单抗/Her2/c-neu、阿仑单抗/CD52、贝伐单抗/VEGF-A、西妥昔单抗/EGF-R、吉妥珠单抗/CD33、英夫利昔单抗/TNF- $\alpha$ 、兰尼单抗/VEGF-A、优特克单抗/IL-12、优特克单抗/IL-23、戈利木单抗/TNF- $\alpha$ 、那他珠单抗/ $\alpha 4$ -整联蛋白、奥法木单抗/CD20、利妥昔单抗/CD20、奥马珠单抗/IgE (Fc区)、帕尼单抗/EGFR。

[0046] 分离的单克隆抗体或其片段的用途

[0047] 在一个方面,本公开涉及分离的抗体或其片段用于检测样品中的关联抗原结合部分与其抗原的复合物、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物的用途,其中所述分离的抗体或其片段特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原的复合物、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物,且不单独结合所述关联抗原结合部分或所述抗原。

[0048] 在另一方面,本公开涉及使用分离的抗体或其片段检测样品中的关联抗原结合部分与其抗原的复合物、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物的方法,所述分离的抗体或其片段特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原的复合物、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物,且不单独结合所述关联抗原结合部分或所述抗原。

[0049] 在一个方面,本公开涉及检测样品中的关联抗原结合部分与其抗原的复合物、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0050] a) 将所述样品与分离的抗体或其片段接触,其中所述分离的抗体或其片段特异地与所述复合物结合,且不单独与所述关联抗原结合部分或所述抗原结合,

[0051] b) 检测与所述复合物结合的所述分离的抗体或片段。

[0052] 在另一方面,本公开涉及检测样品中的关联抗原结合部分与其抗原的复合物、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0053] a) 将所述样品与分离的抗体或其片段接触,其中所述分离的抗体或其片段特异地与所述复合物结合,且不单独与所述关联抗原结合部分或所述抗原结合,

[0054] b) 检测与所述复合物结合的所述分离的抗体或片段,和

[0055] c) 将与所述复合物结合的所述分离的抗体或片段与结合抗原的关联抗原结合部分的浓度相关联。

[0056] 在另一方面,本公开涉及检测样品中的关联抗体与其抗原的复合物、或特异性关联抗体与其抗原的复合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0057] a) 提供待分析样品,

[0058] b) 将所述样品与分离的抗体或其片段接触,其中所述分离的抗体或其片段特异地与所述复合物结合,且不单独与所述关联抗体或所述抗原结合,

[0059] c) 检测与所述复合物结合的所述分离的抗体或片段,和

[0060] d) 将与所述复合物结合的所述分离的抗体或片段与结合抗原的关联抗体的浓度相关联。

[0061] 在一个实施方式中,所述关联抗原结合部分为关联抗体或其片段。在一个优选的实施方式中,所述关联抗体或其片段为关联单克隆抗体或其片段。在一个实施方式中,所述

关联单克隆抗体或其片段为人抗体或人源化抗体。在一个实施方式中,所述关联单克隆抗体或其片段是嵌合抗体。在一个实施方式中,所述关联单克隆抗体或其片段含有人重链恒定区和人轻链恒定区。在一个实施方式中,所述关联单克隆抗体为IgG同种型。在另一个实施方式中,关联抗体可为任意同种型(例如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)、类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或其衍生物(例如IgG1f LALA)。在一个实施方式中,关联抗体为IgG1f LALA同种型。

[0062] 在一个实施方式中,所述关联单克隆抗体或其片段选自Fab、F(ab2)'、F(ab)2'或scFV。在一个实施方式中,所述关联单克隆抗体或其片段选自单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和合成抗体。在一个实施方式中,关联抗体或其片段为人抗体或人源化抗体。

[0063] 在一个实施方式中,所述特异性关联抗体与其抗原的复合物选自,但不限于阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 、MOR103/GM-CSF、曲妥珠单抗/Her2/c-neu、阿仑单抗/CD52、贝伐单抗/VEGF-A、西妥昔单抗/EGF-R、吉妥珠单抗/CD33、英夫利昔单抗/TNF- $\alpha$ 、兰尼单抗/VEGF-A,优特克单抗/IL-12、优特克单抗/IL-23、戈利木单抗/TNF- $\alpha$ 、那他珠单抗/ $\alpha$ 4-整联蛋白、奥法木单抗/CD20、利妥昔单抗/CD20、奥马珠单抗/IgE(Fc区)、帕尼单抗/EGFR。

[0064] 在一个方面,本公开涉及检测样品中的抗原结合部分的方法,所述方法包括以下步骤:

[0065] a) 将关联抗原结合部分的抗原固定化,

[0066] b) 将所述样品与所述固定化的抗原接触,

[0067] c) 使用分离的抗体或其片段来检测所述关联抗原结合部分与其抗原之间所形成的复合物,所述分离的抗体或其片段特异性地与所述复合物结合,且不单独与所述关联抗原结合部分或所述抗原结合。

[0068] 在另一方面,本公开涉及检测样品中的未结合的关联抗原结合部分的方法,所述方法包括以下步骤:

[0069] a) 将关联抗原结合部分的抗原固定化,

[0070] b) 将所述样品与所述固定化的抗原接触,

[0071] c) 使用分离的抗体或其片段来检测所述关联抗原结合部分与其抗原之间所形成的复合物,所述分离的抗体或其片段特异性地与所述复合物结合,且不单独与所述关联抗原结合部分或所述抗原结合。

[0072] 在另一方面,本公开涉及检测样品中的未结合的关联抗原结合部分的方法,所述方法包括以下步骤:

[0073] a) 将关联抗原结合部分的抗原固定化,

[0074] b) 将所述样品与所述固定化的抗原接触,

[0075] c) 使用分离的抗体或其片段来检测所述关联抗原结合部分与其抗原之间所形成的复合物,所述分离的抗体或其片段特异性地与所述复合物结合,且不单独与所述关联抗原结合部分或所述抗原结合,

[0076] d) 将b)中形成的复合物与样品中未结合的关联抗原结合部分的浓度相关联。

[0077] 在本方法的一个实施方式中,所述检测通过选自EIA、ELISA、RIA、间接竞争性免疫测定、直接竞争性免疫测定、非竞争性免疫测定、夹心免疫测定(sandwich immunoassay)、

凝集分析法 (agglutination assay) 和MSD (Meso Scale Discovery) 的方法而实现。在优选的实施方式中,所述检测通过夹心ELISA (sandwich ELISA) 实现。在另一优选的实施方式中,所述检测通过MSD (Meso Scale Discovery) 分析法而实现。

[0078] 在一个实施方式中,样品为组织或液体样品。在另一实施方式中,液体样品是唾液、尿液、全血、血浆或血清。在优选的实施方式中,由实验动物或人中获得样品。在更优选的实施方式中,样品是取自人的全血、血浆或血清。

[0079] 在一个方面,本公开涉及一种鉴定分离的单克隆抗体或其片段的方法,所述分离的单克隆抗体或其片段特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原的复合物,且不单独结合所述关联抗原结合部分或所述抗原,所述方法包括:

[0080] (a) 在未结合的抗原和与所述关联抗体具有相同同种型的抗体的存在下,筛选针对关联抗体与其抗原的复合物或特异性关联抗体与其抗原的复合物的抗体或抗体片段的文库,

[0081] (b) 分离所述关联抗体与其抗原的复合物或所述特异性关联抗体与其抗原的复合物以及结合的抗原结合部分,以及

[0082] (c) 鉴定并分离所述抗原结合部分。

[0083] 在另一方面,本公开涉及一种鉴定分离的单克隆抗体或其片段的方法,所述分离的单克隆抗体或其片段特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原的复合物,且不单独结合所述关联抗原结合部分或所述抗原,所述方法包括:

[0084] (a) 在未结合的抗原和与所述关联抗体具有相同同种型和相同框架 (framework) 的抗体的存在下,筛选针对关联抗体与其抗原的复合物或特异性关联抗体与其抗原的复合物的抗体或抗体片段的文库,

[0085] (b) 分离所述关联抗体与其抗原的复合物或所述特异性关联抗体与其抗原的复合物以及结合的抗原结合部分,以及

[0086] (c) 鉴定并分离所述抗原结合部分。

[0087] 在一方面,本公开涉及一种试剂盒,该试剂盒包括一种或多种特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原的复合物、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物的抗体或其片段,以及至少一种为检测这样的复合物所必需的试剂或装置,所述抗体或其片段不单独结合所述关联抗原结合部分或所述抗原。

[0088] 在另一方面,本公开涉及一种试剂盒,该试剂盒包括一种或多种特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原的复合物、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物的抗体或其片段,以及至少一种为检测关联抗原结合部分与其抗原、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的一种或多种不同的复合物所必需的试剂或装置。在另一方面,本公开涉及一种试剂盒,所述试剂盒包括特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原的复合物、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物的抗体或其片段,以及至少一种为检测所述复合物所必需的试剂或装置。在一个实施方式中,所述装置为横向流动装置。

[0089] 在另一方面,本公开涉及包含一种或多种抗体或其片段的横向流动装置,所述抗体或其片段特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原的复合物、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物。在一个实施方式中,所述一种或多种抗体或其片段特异性地结合至关联抗原结合部分与其抗原的复合物、或特异性关联抗原结合部分与其抗原的复合物,

且不单独与所述关联抗原结合部分或所述抗原结合。在另一实施方式中,所述一种或多种抗体选自与以下一种复合物结合的抗体或其片段,所述复合物选自,但不限于阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 、MOR103/GM-CSF、曲妥珠单抗/Her2/c-neu、阿仑单抗/CD52、贝伐单抗/VEGF-A、西妥昔单抗/EGF-R、吉妥珠单抗/CD33、英夫利昔单抗/TNF- $\alpha$ 、兰尼单抗/VEGF-A,优特克单抗/IL-12、优特克单抗/IL-23、戈利木单抗/TNF- $\alpha$ 、那他珠单抗/ $\alpha$ 4-整联蛋白、奥法木单抗/CD20、利妥昔单抗/CD20、奥马珠单抗/IgE (Fc区)、帕尼单抗/EGFR。

[0090] 在另一方面,本公开涉及编码单克隆抗体或其片段的分离核酸,所述单克隆抗体或其片段特异性地结合关联抗原结合部分与其抗原的复合物。

[0091] 在另一方面,本公开涉及包含编码单克隆抗体或其片段的分离核酸的载体,所述单克隆抗体或其片段特异性地结合关联抗原结合部分与其抗原的复合物。

[0092] 在另一方面,本公开涉及一种包含载体的宿主细胞,所述载体包含编码单克隆抗体或其片段的分离核酸,所述单克隆抗体或其片段特异性地结合关联抗原结合部分与其抗原的复合物。在一个实施方式中,宿主细胞为原核或真核宿主细胞。在优选的实施方式中,宿主细胞为哺乳动物宿主细胞。

[0093] 在另一方面,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其片段,其与表1中记载的抗体交叉竞争。在某些实施方式中,在基于ELISA的交叉竞争中,分离的单克隆抗体或其片段与表1中记载的抗体交叉竞争,并使表1所记载的抗体之一的特异性结合降低至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0094] 在另一方面,本公开涉及同表1中记载的抗体那样与相同的表位相互作用(例如通过结合、稳定化、空间分布)的分离的单克隆抗体或其片段。

[0095] 在一个方面,本公开涉及包含表1中任意抗体的6个CDR(由Kabat定义)的分离的单克隆抗体或其片段。在另一方面,本公开涉及包含表1中各抗体的6个CDR(由Kabat定义)的分离的单克隆抗体或其片段。

[0096] 在一个方面,本公开涉及包含表1中任意抗体的VH和VL的分离的单克隆抗体或其片段。

[0097] 在另一方面,本公开涉及编码分离的单克隆抗体或其片段的核酸,其中所述核酸包含表1中任意抗体的VH和VL。

[0098] 在另一方面,本公开涉及编码分离的单克隆抗体或其片段的核酸,其与表1中记载的核酸具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%的序列同一性。

[0099] 定义

[0100] 本文中使用的术语“抗原结合部分”意指含有如下多肽的部分,该多肽赋予其特异性结合给定抗原的能力。例如,抗体、抗体片段、抗体衍生物、抗体样支架(antibody-like scaffolds)和备选支架包含至少一个抗原结合部分。抗原结合部分也可并入单域抗体、巨型抗体、微型抗体、胞内抗体、双抗体、三链抗体、四链抗体、v-NAR和scFV(见,例如 Hollinger and Hudson,2005,Nature Biotechnology,23,9,1126-1136)。含有抗原结合部分的分子的其它实例在下文给出,包括纤连蛋白(Adnexus,由Bristol-Myers Squibb, Waltham,MA完全所有)、骆驼抗体、锚蛋白(Molecular Partners AG,Zurich, Switzerland)、结构域抗体(Domantis,Ltd.,Cambridge,MA,and Ablynx nv,Zwijnaarde, Belgium)、脂质运载蛋白(Pieris Proteolab AG,Freising,Germany)、小模块免疫药物

(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、maxybodies (Avidia, Inc., Mountain View, CA)、蛋白质A (Affibody AG, Sweden) 和affilins ( $\gamma$ -晶体蛋白或泛素) (Sci1 Proteins GmbH, Halle, Germany)。

[0101] 本文中使用的术语“抗原结合区”意指抗原结合部分的如下结构域,其负责抗原结合部分与抗原之间的特异性结合。例如,抗体或其片段的抗原结合区由重链(本文中缩写为VH)和轻链(本文中缩写为VL)的N端可变区的氨基酸残基组成。VH和VL的可变区各含有三个高变区(hypervariable region),称为互补决定区(CDR)。VH的3个CDR和VL的3个3DR相对彼此呈三维布置,形成抗原结合表面。

[0102] 本文中使用的术语“抗体”包括整个抗体以及其任何片段或单链。天然存在的“抗体”是包含通过二硫键相互连接的至少两个重链(H)和两个轻链(L)的蛋白。每个重链包括重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包括三个结构域CH1、CH2和CH3。每个轻链包括轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域,CL。VH和VL区可被进一步细分成称作互补决定区(CDR)的高变区,散布有称作骨架区(FR)的更保守的区域。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基端至羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一成分(C1q))的结合。抗体可为任意同种型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)、亚类或其修饰型(例如IgG1f LALA)。

[0103] 术语抗体的“片段”是指保留有与抗原特异性地结合的能力的抗体的一个或多个片段。涵盖在术语“片段”中的结合片段的实例包括:Fab片段——由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)<sub>2</sub>片段——包括在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;单域抗体(dAb)片段(Ward等,(1989) Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;以及分离的互补决定区(CDR)和其中VL和VH区匹配以形成单价分子的单链片段(scFv)(称为单链Fv(scFv));参见,例如,Bird等(1988) Science 242:423-426;和Huston等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883)。尽管VL和VH这两个结构域由单独的基因编码,但可以利用重组方法通过使其得以成为单一蛋白链的人工肽接头将其接合。这些单链抗体包括一个或多个抗原结合部分。这些抗体片段利用本领域技术人员已知的常规技术获得,并对片段进行筛选以与完整抗体相同的方式应用。

[0104] “抗原”被定义为由抗原结合部分特异性地结合的任何分子或任何分子的复合物。

[0105] 术语“复合物”意指至少两个彼此具有亲和力的部分(例如化学的或生化的)之间的结合物。“蛋白质复合物”或“多肽复合物”意指包含至少一个或多个多肽的复合物。如本文中使用的,复合物包含关联抗原结合部分和其抗原。在一个实施方式中,复合物为抗体-抗原复合物。在优选的实施方式中,复合物为包含治疗性抗体和其抗原的抗体-抗原复合物。

[0106] 术语“关联”意指共同起作用或在某方面彼此具有特异性的组分,例如正交tRNA和正交氨酰基-tRNA合成酶,或抗体和抗原。这些组分也可称为“互补的”。如本文所用,关联抗原结合部分是特异性地结合其抗原的抗原结合部分。

[0107] 术语“重链可变区CDR1”和“H-CDR1”可互换使用,亦如术语“重链可变区CDR2”和

“H-CDR2”、术语“重链可变区CDR3”和“H-CDR3”、术语“轻链可变区CDR1”和“L-CDR1”；术语“轻链可变区CDR2”和“L-CDR2”以及术语“轻链可变区CDR3”和“L-CDR3”。

[0108] 本文中使用的术语“人抗体”旨在包括这样的抗体，其中可变区的骨架区和CDR区域均来自人来源的序列。如本文中使用的，人抗体包含重链可变区或轻链可变区，或全长重链或全长轻链。在某些情况下，人抗体的氨基酸序列可与种系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列具有至少60%、70%、80%、90%，或至少95%，或甚至至少96%、97%、98%或99%的同一性。因而，所述人抗体可由如下技术平台获得，其包含由分离自B细胞的VH/VL谱系(repertoire)经PCR扩增而生成的、或合成法生成的衍生自人种系基因的抗体。技术平台包括基于文库的途径，包括在噬菌体、核糖体或酵母上展示的人类免疫球蛋白基因。各展示技术在科学界是标准的。此外，对携带人类免疫球蛋白谱系的转基因小鼠进行免疫是产生针对所感兴趣的抗原的人抗体的另一种方法。选自基于MorphoSys HuCAL®概念(Knappik等., (2000) *J Mol Biol* 296:57-86)的抗体文库的抗体或其片段被认为是完全人类的。

[0109] 本文中使用的术语“单克隆抗体”意指单分子组成的抗体分子制备物。单克隆抗体组成呈现出具有独特结合特异性的独特结合位点和对特定表位的亲和性。

[0110] “人源化”抗体是一种保留非人抗体反应性却对人有较少免疫原性的抗体。这可通过例如保留非人CDR区并用人对对应部分(即恒定区和可变区的骨架部分)替换抗体的剩余部分而获得。参见，例如Morrison等(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855; Morrison和Oi(1988) *Adv. Immunol.*, 44:65-92; Verhoeyen等(1988) *Science*, 239:1534-1536; Padlan, Molec(1991) *Immun.*, 28:489-498; 和Padlan, Molec(1994) *Immun.*, 31:169-217。人工程化技术的其它实例包括，但不限于US5,766,886中公开的Xoma技术。

[0111] 术语“嵌合抗体”为如下的抗体分子，其中(a)恒定区或其部分被改变、替换或交换，从而使抗原结合位点(可变区)连接至类型、效应物功能和/或种类不同或者改变的恒定区，或连接至对嵌合抗体赋予新性质的完全不同的分子(例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等)；或者(b)可变区或其部分被改变、经具有不同的或改变了抗原特异性的可变区替换或交换。例如，小鼠抗体可通过使用人免疫球蛋白的恒定区替代其恒定区而进行修饰。由于使用人恒定区替代，嵌合抗体可在保留其识别抗原的特异性的同时，相比原小鼠抗体对人具有降低的抗原性(antigenicity)。

[0112] 术语“分离的”意指一种化合物，其可以是例如抗体或抗原结合部分，所述抗体或抗原结合部分基本上不含其它具有不同的抗原特异性的抗体或抗原结合部分。此外，分离的抗体或抗原结合部分可基本上不含有其它细胞物质和/或化学品。

[0113] 术语“多肽”以及“蛋白”在本文中可以互换使用，指氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物，也适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另外说明，特定的多肽系列也隐含地涵盖其保守修饰的变体。

[0114] 术语“细胞因子”是由一个细胞群释放的蛋白的总称，其作为细胞间介质作用于另一细胞。这样的细胞因子的例子是淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子中包括生长激素，如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素；甲状旁腺素；甲状腺素；胰岛素；胰岛素原；松弛素；松弛素原(prorelaxin)；糖蛋白激素如促滤泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体激素(LH)；肝脏生长因子；成纤维细胞生长因子；催乳素；胎盘催乳

素;肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和- $\beta$ ;苗勒管抑制物质(mullerian-inhibiting substance);小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子A-F(如VEGF-A);整联蛋白(如 $\alpha 4$ -整联蛋白);血栓形成素(TPO);神经生长因子如NGF- $\beta$ ;血小板生长因子;转化生长因子(TGFs)如TGF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ ;胰岛素样生长因子-I和-II;红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素如干扰素- $\alpha$ 、- $\beta$ 和- $\gamma$ ;集落刺激因子(CSFs)如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);和粒细胞-CSF(G-CSF);白介素(ILs)如IL-1、IL-1 $\alpha$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL17-家族成员(如IL-17C);肿瘤坏死因子如TNF- $\alpha$ 或TNF- $\beta$ ;和包括LIF、kit配体(KL)、MIF、D-DT在内的其它多肽因子。如本文所述,术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白,以及天然序列细胞因子的生物学上活性的等同物。

[0115] 术语“受体”为一个通用术语,表示由于与特异性配体或结合配偶体的相互作用而具有影响生物学活性(在例如细胞中)的能力的蛋白质。细胞膜结合受体以胞外配体结合结构域、一个或多个跨膜或穿膜结构域和通常参与信号转导的胞内效应结构域为特征。配体结合到细胞膜受体造成胞外结构域的变化,该变化跨细胞膜通讯,直接或间接地与一种或多种胞内蛋白质相互作用,改变细胞特性如酶活性、细胞形状或基因表达谱。受体也可不连在细胞表面上,可以是胞质受体、核内受体或者完全从细胞中释放出来。一般来说,受体可以是膜结合的、胞质的、细胞核的;单体的(monomeric)(例如:甲状腺刺激激素受体、 $\beta$ -肾上腺素受体)或多体的(multimeric)(例如:PDGF受体、生长激素受体、IL-3受体、GM-CSF受体、G-CSF I受体、红细胞生成素受体和IL-6受体)。受体的更多具体实例包括,但不限于进一步的分化簇(例如CD20、CD19、CD38、CD52、CD33)、免疫球蛋白(例如IgE(Fc区))、表皮生长因子受体(例如EGFR)或受体酪氨酸激酶(RTK)(例如Her2/c-neu、Her3、Her4)。

[0116] 术语“同种型”意指由重链恒定区基因提供的抗体类别(例如IgM、IgE、IgG(诸如IgG1或IgG4))。同种型还包括这些类别中的一类的修饰版本,其中已作出修饰以改变Fc功能,例如,以增强或降低效应子功能或与Fc受体的结合。例如,IgG1f LALA为IgG同种型的一个修饰版本,其具有显著降低的效应子功能。与未修饰的抗体相比,氨基酸的特定取代降低了对Fc gamma RI受体的结合亲和性。IgG1f LALA在美国序列号08/479,752(SCOTGEN BIOPHARMACEUTICALS INC.)中描述,其全部内容通过引用并入本文。在本公开的某些实施方式中,抗原结合部分为抗体,且为IgG、IgM、IgA、IGE或IgD型。在具体的实施方式中,抗体为IgG型。在本公开的某些实施方式中,抗体为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型。在特定的实施方式中,抗体为IgG1或IgG4亚型。在其它特定的实施方式中,抗体为IgG1或IgG1f LALA亚型。

[0117] 短语“特异性结合”至抗原是指一种结合反应,其可在异质群体的蛋白质和其它生物制剂中在抗原的存在下被测定。因此短语“识别抗原”和“特异于抗原”在本文中“特异性地结合抗原”可互换使用。抗原结合部分(例如单克隆抗体)与抗原的特异性结合可通过本领域公知的多种已建立的方法来测定,并包括ELISA、FACS、Western印迹、免疫印迹、MSD、BIAcore和SET。在本公开中,当抗原结合部分被证明能够高于背景至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍地结合至特定的抗原时,认为该抗原结合部分是特异于抗原的。此处,背景通过已知非特异于所选抗原的抗原结合部分而确定,或通过比较与不相关的抗

原的结合而确定。

[0118] “交叉竞争”是指在标准竞争性结合测定中,抗体或其它抗原结合部分干扰其它抗体或抗原结合部分结合至特定抗原的能力。可使用标准竞争结合测定来测定抗体或其它抗原结合部分干扰另一抗体或抗原结合部分结合至特定抗原的能力或程度,且由此可确定其是否为本发明下的交叉竞争。一种合适的测定法包括使用Biacore技术(例如使用BIAcore 3000仪器(Biacore,Uppsala,Sweden),其可采用表面等离子共振技术测定相互作用的程度。另一种测定交叉竞争的测定法使用基于ELISA的方法。在国际专利申请号W02003/48731中描述了基于交叉竞争的用于“表位框并”(epitope binning)抗体的高通量方法。

[0119] 术语“表位”包括任何能够与抗体特异性结合或与分子以其他方式相互作用的蛋白决定子(determinant)。表位决定子通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物类或糖侧链组成,其可以具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。表位可以是“线性的”或“构象的”。术语“线性表位”是指蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用点沿蛋白质的一级氨基酸序列(连续的)线性出现的表位。术语“构象表位”是指其中不连续的氨基酸在三维构象中集合在一起的表位。在构象表位中,相互作用点跨过蛋白质上彼此隔开的氨基酸残基出现。

[0120] “结合相同的表位”意指抗体或其它抗原结合部分结合特定的抗原、并与例示的抗体具有相同表位的能力。例示的抗体及其它抗体的表位可通过表位作图(epitope mapping)技术测定。表位作图技术在本领域是公知的。例如,构象表位可通过测定氨基酸的空间构象,例如通过氢/氘交换、X射线晶体学和二维核磁共振而容易地识别。

[0121] 本文中使用的术语“亲和性”是指在单一抗原位点上,抗原结合部分(例如单克隆抗体)与抗原之间相互作用的强度。在每个抗原位点内,抗体“臂”的可变区在许多位点通过弱的非共价力与抗原相互作用;相互作用越多,亲和性越强。

[0122] 如本文中使用的术语“KD”是指解离常数,其由Kd与Ka的比值(即Kd/Ka)所得,并表示为摩尔浓度(M)。可通过本领域确立的方法来确定抗原结合部分(例如单克隆抗体)的KD值。测定抗原结合部分(例如单克隆抗体)的KD的方法为SET(可溶平衡滴定)或使用生物传感器系统(例如Biacore®系统)的表面等离子体共振。在本公开中,抗原结合部分通常具有的解离速率常数(KD)(Koff/Kon)为小于 $5 \times 10^{-2}M$ 、小于 $10^{-2}M$ 、小于 $5 \times 10^{-3}M$ 、小于 $10^{-3}M$ 、小于 $5 \times 10^{-4}M$ 、小于 $10^{-4}M$ 、小于 $5 \times 10^{-5}M$ 、小于 $10^{-5}M$ 、小于 $5 \times 10^{-6}M$ 、小于 $10^{-6}M$ 、小于 $5 \times 10^{-7}M$ 、小于 $10^{-7}M$ 、小于 $5 \times 10^{-8}M$ 、小于 $10^{-8}M$ 、小于 $5 \times 10^{-9}M$ 、小于 $10^{-9}M$ 、小于 $5 \times 10^{-10}M$ 、小于 $10^{-10}M$ 、小于 $5 \times 10^{-11}M$ 、小于 $10^{-11}M$ 、小于 $5 \times 10^{-12}M$ 、小于 $10^{-12}M$ 、小于 $5 \times 10^{-13}M$ 、小于 $10^{-13}M$ 、小于 $5 \times 10^{-14}M$ 、小于 $10^{-14}M$ 、小于 $5 \times 10^{-15}M$ 或小于 $10^{-15}M$ 或更小。

[0123] “病症”是任何会受益于使用例如治疗性抗体或其它抗原结合部分的医学治疗的病症。病症的非限制性实例包括自身免疫性疾病、炎症、细胞增殖性疾病;B细胞淋巴瘤、非白血病和淋巴系统恶性肿瘤;神经元、神经胶质、星形胶质细胞、下丘脑和其它腺体、巨噬细胞、上皮、基质和囊胚腔病症;及炎性、免疫性或感染性疾病。术语“细胞增殖性疾病”和“增殖性病症”意指与一定程度的异常细胞增殖有关的病症。在一个实施方式中,所述病症是癌症。

[0124] 本文中使用的术语“自身免疫性疾病”通常指的是特征为具有自识别的成分的疾病。自身免疫性疾病的实例包括,但不限于自身免疫性肝炎、多发硬化症、系统性红斑狼疮、

特发性血小板减少性紫癜、重症肌无力、I型糖尿病、类风湿性关节炎、银屑病、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯氏病(Grave's disease)、强直性脊柱炎、Sjogrens病(Sjogrens Disease)、CREST综合症、硬皮病、IgA肾病(Nephropathy)、大疱性类天疱疮、寻常型天疱疮(Pemphigous Vulgaris)、ANCA相关性血管炎、抗磷脂综合症及更多。大多数自身免疫性疾病也是慢性炎症性疾病。其被定义为与炎症细胞(白细胞)长期(>6个月)激活相关的疾病过程。慢性炎症导致患者器官或组织的损伤。许多疾病是慢性炎症病症,但已知并不具有自身免疫基础。例如动脉粥样硬化、充血性心力衰竭、克罗恩病(Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、结节性多动脉炎、惠普耳氏病(Whipple's Disease)、原发性硬化性胆管炎和更多。

[0125] 术语“癌症”指哺乳动物中的生理病症,其通常的特征为不受调控的细胞生长/增殖。癌症的实例包括,但不限于:癌(carcinoma)、淋巴瘤、胚细胞瘤和白血病。癌症更具体的实例包括,但不限于:结肠直肠癌、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、包括非小细胞肺癌(NSCLC)的肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肠类癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、肝癌(肝细胞癌)、肝母细胞癌、食道癌、肺腺癌、间皮瘤、滑膜肉瘤、骨肉瘤、头颈鳞状细胞癌、青少年鼻咽纤维血管瘤、脂肪肉瘤、甲状腺癌、黑色素瘤、基底细胞癌(BCC)、髓母细胞瘤和硬纤维瘤。尤其感兴趣的使用本发明的方法治疗的癌症包括神经胶质瘤、髓母细胞瘤、结肠癌、结肠直肠癌、黑素瘤、乳腺癌、肺癌、肝癌和胃癌。

[0126] 术语“治疗性抗体”涉及任何意欲在人类中使用的抗体制剂。优选地,这样的治疗性抗体将为单克隆抗体。进一步优选的此种单克隆抗体将得自类人猿或者是人单克隆抗体。优选地,其将为人单克隆抗体。还优选这种治疗性单克隆抗体为人源化单克隆抗体。治疗性抗体广泛用于各种病症的治疗,如肿瘤疾病(如血液学和实体恶性肿瘤,包括非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌和结肠直肠癌)、免疫性疾病、中枢神经疾病、血管疾病或感染性疾病的治疗。在一个实施方式中,这样的抗体是针对TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、VEGF-A、 $\alpha$ 4-整联蛋白、CD20、IgE(Fc $\gamma$ 2)、EGFR、GM-CSF、CD19、M-CSF、CD38、MIF、DDT、IL-17C、IL-12、Her2/c-neu、CD52、CD33的抗体。这样的抗体为,例如阿达木单抗、MOR103、利妥昔单抗、曲妥珠单抗、阿仑单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、吉妥珠单抗、英夫利昔单抗、兰尼单抗、优特克单抗、戈利木单抗、那他珠单抗、奥法木单抗、奥马珠单抗和帕尼单抗。

[0127] 在本申请中使用的术语“样品”表示但不限于,来自活物或原为活物中的任意量的物质。此类活物包括,但不限于人、小鼠、猴、大鼠、兔和其它动物。此类物质包括,但不限于来自个体的唾液、尿、全血、血清或血浆。在临床常规中最广泛使用的样品来源为全血、血浆或血清。在优选的实施方式中,样品分离自患者。在更优选的实施方式中,样品分离自人。

[0128] 本文中使用的术语“患者”表示哺乳动物。优选地,根据本发明的患者为人。

[0129] 本文中使用的术语“结合”意指可为共价(例如通过化学耦联)或非共价(例如离子相互作用、疏水相互作用、氢键等)的结合或连接。在优选的实施方式中,所述的结合或连接为非共价相互作用。在一个实例中,术语结合意指关联抗原结合部分与其抗原的连接。

[0130] 术语“结合抗原的”抗原结合部分用于指示存在于实验动物或患者的循环中的结合其抗原的抗原结合部分。在进一步的实施方式中,结合抗原的抗原结合部分为抗体。在进一步的实施方式中,结合抗原的抗原结合部分为治疗性抗体。

[0131] 术语“未结合的”抗原结合部分用于指示存在于实验动物或患者的循环中的未结合其抗原的抗原结合部分。在进一步的实施方式中,抗原结合部分为抗体或其片段。在进一

步的实施方式中,抗原结合部分为治疗性抗体。

[0132] 术语“集合”或“文库”意指至少两个成员。术语“成员”包括但不限于,编码抗体或其片段的核酸,或抗体或其片段本身。

[0133] 术语“文库”意指一组实体,其包含两个或多个具有如本文所描述的多样性的实体。例如,“抗体或抗体片段的文库”意指一组多核苷酸,其包含两个或多个编码抗体或抗体片段、并具有本文所描述的多样性的多核苷酸。例如可使用市售的噬菌体展示文库,例如 MorphoSys HuCAL PLATINUM® 文库。

[0134] 本文使用的术语“多样性”意指多种多样或明显的异质性。

[0135] 术语“骨架”意指由Kabat等(1991)定义为作为可变结构域的一部分用作该可变结构域的抗原结合环(antigen binding loop)的支架的抗体可变结构域。骨架区的例子包括可变重链或可变轻链的FR1、FR2、FR3或FR4。

[0136] 术语“同种型”意指由重链恒定区基因提供的抗体类别(例如IgM、IgE、IgG(如IgG1或IgG4))。同种型也包括这些类别中的一类的修饰版本,其中作出修饰以改变Fc功能,例如,以增强或降低效应子功能或与Fc受体的结合。

[0137] “抗独特型抗体”是指特异性地结合另一抗体的抗原结合区并因此特异性地被所述另一抗体结合的一种抗体。抗独特型抗体可模拟另一抗体通常所识别的表位。独特型是在免疫球蛋白可变区中由基因决定的结构变化。独特型变异的确切遗传学基础只得到部分解释。然而,独特型变异涉及,尤其是在抗原结合区的区域中的氨基酸序列和蛋白质结构(所谓的决定子),也称为独特位(idiotope)。术语“独特型”指定抗体分子的可变区的全套决定子。

[0138] 术语“氨基酸”意指天然存在的氨基酸以及合成氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码所编码的氨基酸,以及后来经过修饰的那些氨基酸,例如羟基脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸以及O-磷酸丝氨酸(O-phosphoserine)。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即一个 $\alpha$ 碳,该 $\alpha$ 碳结合至氢、羧基、氨基以及R基,例如高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、蛋氨酸甲基硫。这些类似物具有经修饰的R基(例如正亮氨酸)或经修饰的肽主链,但仍然保持有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物意指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构、但以类似于天然氨基酸的方式发挥功能的化合物。

[0139] 术语“核酸”在本文中与术语“多核苷酸”可互换使用,并意指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸以及其呈单链或双链形式的聚合物。该术语涵盖含有已知的核苷酸类似物或经修饰的主链残基或键合的核酸,这些核酸是合成的、天然存在的以及非天然存在的,具有类似于参考核酸的结合特性,并且以类似于参考核苷酸的方式代谢。这些类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯类(phosphorothioates)、氨基磷酸酯类(phosphoramidates)、甲基磷酸酯类、手性-甲基磷酸酯类、2-O-甲基核糖核苷酸类、肽-核酸(PNA)。除非另外指出,否则特定的核酸序列也隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如简并密码子替换)和互补序列,以及明确表明序列。确切地,具体如下,简并密码子替换可通过产生如下序列来达成,在该序列中一个或多个选定的(或全部)密码子的第三位置使用混合碱基和/或脱氧肌苷残基进行替换(Batzer等(1991)Nucleic Acid Res.19:5081;Ohtsuka等(1985)J.Biol.Chem.260:

2605-2608和Rossolini等(1994)Mol.Cell.Probes 8:91-98)。

[0140] 术语“重组宿主细胞”(或只是“宿主细胞”)是指已引入重组表达载体的细胞。应当理解,这样的术语不仅意指特定对象细胞,且亦指这种细胞的后代。由于某些修饰由于突变或环境影响可出现在后代中,使这种后代事实上可能与亲代细胞不相同,但仍被包括在如本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0141] 本文所用的术语“载体”是指用于将外源遗传材料导入另一个细胞的分子载体。载体本身通常是DNA序列,其由插入物(目标序列)和起载体“骨架”作用的较长序列组成。将遗传信息转入另一个细胞的载体的目的通常是在靶细胞中分离、倍增或表达插入物。

[0142] 如本文中使用的术语“横向流动”是指沿着基底或载体平面(例如横向流动膜)的液体流动。一般而言,横向流动装置包含条带(或流体连通的多个条带),条带的材料使其可通过毛细作用(即芯吸或层析作用)输送溶液,其中条带中不同的区域或地带包含测定试剂,其扩散或不扩散地结合底物,并当溶液输送至或迁移通过这样的区域时,产生可检测的信号。通常,此类测定包含适于接受液体样品的施加区域、与施加区域横向间隔并与其流体连通的试剂区域以及与试剂区域横向间隔并与其流体连通的检测区域。试剂区域可包含化合物(例如抗体),其可在液体中移动,并可与样品中的分析物相互作用(例如形成分析物-试剂复合物)和/或与结合于检测区域的分子相互作用。检测区域可包含结合分子(如抗体),其固定在条带上,并能与分析物和/或试剂和/或分析物-试剂复合物相互作用,以产生可检测的信号。可使用此类测定法通过直接的(夹心测定)或竞争性结合来检测样品中的分析物。横向流动装置的实例在US 6,194,220、US 5,998,221和US5,798,273中提供。

[0143] 表1:序列

[0144]

抗体-ID/ SEQ-ID 号	区域	序列
AdaTNF#1		VH1A VLκ3
SEQ ID NO:1 (Kabat)	HCDR1	GGTFSTYAIS
SEQ ID NO:2 (Kabat)	HCDR2	WMGGIPIFGTANYAQKFQG
SEQ ID NO:3 (Kabat)	HCDR3	DYFSSIGWVVYYGPMDY
SEQ ID NO:4 (Kabat)	LCDR1	RASQSVSSPYLA
SEQ ID NO:5 (Kabat)	LCDR2	LLIYDVSSRAT
SEQ ID NO:6	LCDR3	QQYTSTPP

[0145]

(Kabat)		
SEQ ID NO:7	VL	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSPYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDVSSRATGIPARFSGSGSDFTLTISSL EPEDFAVYYCQYQTSTPPTFGQGTKVEIKRT
SEQ ID NO:8	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYAISWVR QAPGGGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARDYFSSIGWVWVYGPMDY WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:9	DNA VL	gatatcgtgctgaccagagcccggcgaccctgagcctgagcccgggtgaac gtgccaccctgagctgcagagcgagccagctctgttctctccgtacctggcttg taccagcagaaaccgggcccaggccccgctctattaatctacgacgttctctc gtgcgaccggcattccggcgcttttagcggcagcggatccggcaccgattca ccctgaccattagcagcctggaaccggaagacttgcgggtattattgccagc agtacactctactccgccaccttggccagggcacgaaagtgaalttaaac gtacg
SEQ ID NO:10	DNA VH	caggtgcaaltggtgcagagcgggtgccgaagtgaaaaaacgggcagcag cgtgaaagttagctgcaaagcatccggaggacgttttctactacgctatctct gggtgcgccaggccccgggcccaggcctcgagtgatggcggtatcatccc gatcttcgacactgcgaactacgccagaaattcagggccgggtgaccattac cgccgatgaaagcaccagcaccgcctatatggaactgagcagcctgcgag cgaagatacggccgtgtattattgcgcgctgactactctctctatcggttgggt gttactacgggccgatggattactggggccaaggcaccctggtgactgttagct ca
<b>AdaTNF#5</b>		VH1A VLk1
SEQ ID NO:11 (Kabat)	HCDR1	GGTFSTNAIS
SEQ ID NO:12 (Kabat)	HCDR2	WMGGINPHLGHADYAQKFQG
SEQ ID NO:13 (Kabat)	HCDR3	GWYYIGSNPSMYPNYFDP
SEQ ID NO:14 (Kabat)	LCDR1	RASQTISSYLN
SEQ ID NO:15 (Kabat)	LCDR2	LLIYTASNLQS
SEQ ID NO:16 (Kabat)	LCDR3	QQVLHLP

[0146]

SEQ ID NO:17	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQTISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYTASNLSQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQVLHLPHTFGQGTKVEIKRT
SEQ ID NO:18	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTNAISWVR QAPGGGLEWMGGINPHLGHADYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARGWYYIGSNPSMYPNYF DPWGQGLVTVSS
SEQ ID NO:19	DNA VL	gatatccagatgaccagagcccagcagcctgagcgcagcgtggcgat cgcgtagaccattacctgcagagccagcagactatttcttctacctaactgta ccagcagaaccgggcaaagcgcgaaactattaatctactgcttcaacc tgcaaagcggcgtgccgagccgcttagcggcagcggatccggcaccgattc accctgaccattagctctctgcaaccggaagactttgcgacctattgcccagc aggtctgcatctgccgatacctttggccagggcacgaaagttaaataaac gtacg
SEQ ID NO:20	DNA VH	Caggtgcaattggtgcagagcggtgccgaagtgaaaaaacgggcagcag cgtgaaagttagctgcaaagcatccggaggacggttttactaacgctatctct gggtgcccaggccccggccagggcctcagtgatggcggtatcaacc cgcatctggccatgaggactacgccagaaattcagggccgggtgaccatt accgcccgatgaaagcaccagcaccgctatatggaactgagcagcctgccc agcgaagatacggcgtgtattattgcgcgctgggtggtactacatcggtcta accgctctatgaccgaaactactcgatccgtggggccaaggcaccctgggta ctgttagctca
<b>IFX-TNF#1</b>		VH3-23 VLk3
SEQ ID NO:21 (Kabat)	HCDR1	GFTFSSYGMH
SEQ ID NO:22 (Kabat)	HCDR2	WWSYIYYGSDTYADSVKG
SEQ ID NO:23 (Kabat)	HCDR3	GMYLYDQPAFDY
SEQ ID NO:24 (Kabat)	LCDR1	SGDNIRSDYVH
SEQ ID NO:25 (Kabat)	LCDR2	LVIYDKSERPS
SEQ ID NO:26 (Kabat)	LCDR3	QAADTWSTIV
SEQ ID NO:27	VL	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLGDYYVHWYQQK

[0147]

		PGQAPVLVIYADNNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAEDEADYYCQTYDDRSSPVFGGGTKLTVLGQ
SEQ ID NO:28	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWV RQAPGKGLEWVSGIGSYTYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARLSQTGVMDYWGQGLT VSS
SEQ ID NO:29	DNA VL	gatatcgaactgaccagccgcttcagtgagcgtgcaccaggtcagaccgc gcgtatctcgtgtagcggcattctctggtgattattaigtccattggtaccagcag aaaccgggcaggcggcagttctgtgattatgctgataataatcgtccctcag gcatcccggaacgcttttagcggatccaacagcggcaacaccgcgaccctga ccattagcggcactcaggcgaagacgaagcgggattattgaccagactatg atgatcgttctctcgtgtgttgccggcggcacgaagtaaccgtcctaggtcag
SEQ ID NO:30	DNA VH	cagggtgcaattggtgaaagcggcggcggcctggtgcaaccggcggcagc ctgctgtagctgcggcctccgattaccttaattcttatgctatgcttgggt gcgccaagcccctggaagggtctcagtgagggtgagcggatcgtgtagctata cctattatcggtatagcgtgaaaggccgtttaccatttcacgtgataattcga aacaccctgatctgcaaatgaacagcctgctgcggaagatcggcctgta ttattgcgctcttctcagactggtgattgattgggccaaggcacccct ggtgacggtagctca

[0148] 实施例

[0149] 生成特异于抗体/抗原复合物的Fab片段和抗体

[0150] 使用市售的噬菌体展示文库——MorphoSys HuCAL PLATINUM® 文库,进行特异性识别抗体/抗原复合物的抗体的选择。所述抗体文库基于HuCAL®概念 (Knappik等, (2000) J Mol Biol 296:57-86), 并采用CysDisplay® 技术以将Fab展示在噬菌体表面上 (W02001/05950, Lohning)。然而,任何其它可用的抗体库也将适用于鉴定复合物特异性的抗体。

[0151] 为鉴定抗体/抗原复合物特异性抗体,已开发淘选策略 (panning strategy) 以靶向抗体/抗原复合物。由此,使用纯化的重组抗原及其各自的重组治疗性抗体进行淘选。根据下文所描述的实施例,对于3种不同的抗体/抗原复合物,鉴定仅结合特定复合体的抗体。所有描述的淘选策略和抗原用于抗体选择过程。每种淘选策略包含至少3轮单独的淘选,且包含独特的抗原、抗体浓度和洗涤严谨度 (washing stringency)。

[0152] 实施例1:特异于阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 复合物的Fab片段和抗体的生成和表征

[0153] 为鉴定特异性地结合阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 复合物的抗体,使用与磁珠 (magnetic beads) 结合的重组TNF- $\alpha$  (BioLegend 570108,批号B137143) 和阿达木单抗,作为溶液淘选方法的抗原。

[0154] a) 淘选

[0155] 对于溶液淘选,将TNF- $\alpha$ 共价结合到Epoxy M-450磁珠 (Dynabeads M-450, Dynal), 对噬菌体展示抗体文库 (phage display antibody library) 的噬菌体制备物进行洗涤,使用Chemiblocker (Chemicon) 进行封闭。

[0156] 为提供阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 复合物,将结合到磁珠的重组TNF- $\alpha$ 与阿达木单抗一起预孵育。对于第一轮淘选,在Chemiblocker (Chemicon) 和Tween/PBS的存在下,在纯化人IgG1kappa (50 $\mu$ g/mL)、10%人血清、50 $\mu$ g/mL利妥昔单抗 (IgG1kappa) 以及1 $\mu$ g/mL TNF- $\alpha$ 的存在下将噬菌体抗体加至阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 复合物,以吸附所有特异于IgG1kappa和游离

TNF- $\alpha$ 、或与人血清中的任何组分交叉反应的噬菌体抗体。当在旋转器上于2至8 $^{\circ}$ C孵育过夜后,将噬菌体-抗原混合物转移至试管,并使用磁性分离器捕获磁珠。从磁珠小心地移除上清液,并使用PBST洗涤剩余的磁珠。

[0157] 以类似的方式进行随后的第2和第3轮淘选,并以递增浓度的游离TNF- $\alpha$  (第2轮淘选中5 $\mu$ g/ml;第3轮淘选中25 $\mu$ g/ml) 增加严谨度,弃掉与游离TNF- $\alpha$ 交叉反应的抗体。

[0158] 在每一轮的淘选中,余下的噬菌体被洗脱,且将洗脱的噬菌体立刻用于E. Coli TG1细菌的感染。在使用辅助噬菌体救援(rescue)噬菌体后,对多克隆扩增的噬菌体产出再次滴定,并在连续的选择步骤中使用。在第3轮的淘选后,将从感染的细菌中分离出洗脱的抗原特异性噬菌体DNA,且将Fab编码的DNA通过PCR亚克隆到特异的Fab表达载体中。在TG1-F细菌转化后,使用Fab编码载体,进行包含HuCAL Fab片段的周质提取物(periplasmic extract)的单克隆表达和制备。使用含Fab周质提取物进行初步筛选和表征。

[0159] 使用纯化的Fab进行进一步的表征。在摇瓶培养中使用补充有1mM氯霉素和0.1%葡萄糖的500ml的2 $\times$ YT培养基进行TG-1细胞中Fab片段的表达。通过添加0.75mM IPTG,在30 $^{\circ}$ C下20小时诱导表达。使用含有溶菌酶、Bugbuster、核酸酶(Benzonase)和由Ni-NTA层析(Bio-Rad,德国)分离的Fab片段的裂解缓冲液来破坏细胞。使用UV分光光度法测定蛋白质浓度。在变性、还原的状态中使用SDS-PAGE,以及在自然状态(native state)中使用HP-SEC,分析Fab片段的纯度。

[0160] 为了表达全长IgG,从Fab表达载体亚克隆重链(VH)和轻链(VL)的可变域片段到人IgG2、人IgG4、人IgG4\_Pro和人IgG1f LALA的合适的pMORPH<sup>®</sup>\_hIg载体中。

[0161] b) 筛查

[0162] 使用ELISA进行初次筛查。在上文所描述的淘选步骤的产出中随机挑选368个克隆,并使其在384孔ELISA板中生长。在诱导抗体表达(0.75mM IPTG,30 $^{\circ}$ C下20小时)和使用溶菌酶进行细胞裂解后,将含有抗体的细胞裂解物在ELISA中进行测试。

[0163] 因此,将下文中的抗原在ELISA板上进行涂覆:阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 复合物、来自骨髓瘤细胞系的纯化人IgG1/kappa、利妥昔单抗及游离的重组TNF- $\alpha$ 。

[0164] 总共识别出12个对复合物显示阳性(信号为背景的至少5倍以上)、但不结合其它抗原的克隆。因此,将这12个克隆进行测序,以鉴定独特抗体。可鉴定出七个独特的序列。对这7个克隆进行表达和纯化,并随后表征。

[0165] c) 表征

[0166] 首先,在ELISA中,将这7个抗体针对一系列不相关和相关的抗原和阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 复合物进行特异性结合测试,其中阿达木单抗涂覆在板上并用TNF- $\alpha$ 来形成复合物,或反过来。由此,在微量滴定板上涂覆5 $\mu$ g/mL的各抗原,过夜。在使用5%BSA洗涤和封闭后,加入Fab-FH(来自2 $\mu$ g/mL溶液的20 $\mu$ L)形式的抗阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 抗体。使用HRP标记的抗His抗体和QuantaBlu荧光过氧化酶底物进行检测。已证明AdaTNF#1和AdaTNF#5高度特异于复合物(图1)。

[0167] 在下一步骤中,通过在不同的固定化抗原上滴定抗体,更具体地测试AdaTNF#5。在测试的浓度范围内(0.03至2000ng/mL),所述的抗体仅与阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 复合物结合,而不与英夫利昔单抗/TNF- $\alpha$ 复合物、未结合的阿达木单抗、游离的TNF- $\alpha$ 或其它抗原结合(图2)。

[0168] 将AdaTNF#5转化为全长人IgG1形式,在人细胞系中表达,并通过蛋白质A层析纯化,以进行进一步的分析。首先,对所述抗体在(二价的)IgG1形式中是否仍显示相同的特异性进行测试。以5 $\mu$ g/mL在微量滴定板上涂覆抗原过夜。在使用5%BSA洗涤和封闭后,加入HRP结合的AdaTNF#5-hIgG1(HiSpec缓冲液中,来自2 $\mu$ g/mL溶液的20 $\mu$ L)。使用QuantaBlu<sup>®</sup>荧光过氧化酶底物进行检测。HRP结合的纯化的AdaTNF#5-hIgG1特异性地结合阿达木单抗和TNF- $\alpha$ 的组合物(图3)。

[0169] 为了进一步的表征,使用Attana A200仪器在固定化的阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 复合物上进行实时、无标记分子相互作用分析,以测量 $k_D=67$ nM时AdaTNF#5的单价固有亲和性(monovalent intrinsic affinity)。然后测试复合物特异的抗体AdaTNF#5是否可用于测定人类血清中掺入的阿达木单抗。以5 $\mu$ g/mL在微量滴定板上涂覆人TNF- $\alpha$ ,并孵育过夜。在使用PBST中的5%BSA洗涤和封闭后,将增加浓度的阿达木单抗掺入10%人类血清,并涂覆到预涂覆板上。在洗涤后,以2 $\mu$ g/mL加入阿达木单抗/TNF- $\alpha$ hIgG1抗体AdaTNF#5(结合HRP)。加入QuantaBlu<sup>®</sup>荧光过氧化酶底物进行检测。AdaTNF#5以剂量依赖的方式结合阿达木单抗/TNF- $\alpha$ 复合物(图4)。因此,可将这种新型的特异性用于开发高灵敏度的定量测定法,其不依赖最常用的桥接形式(bridging format)。

[0170] 实施例2:特异于英夫利昔单抗/TNF- $\alpha$ 复合物的Fab片段和抗体的生成和表征

[0171] 为鉴定特异性结合英夫利昔单抗/TNF- $\alpha$ 复合物的抗体,使用与磁珠结合的重组TNF- $\alpha$ (BioLegend 570108,批号B137143)以及英夫利昔单抗作为溶液淘选方法的抗原。

[0172] 如实施例1所述进行淘选和筛选。经过初步筛选,鉴定出3个与英夫利昔单抗/TNF- $\alpha$ 复合物结合的独特的抗体,并将其表达,纯化,进行进一步的表征研究。

[0173] 在ELISA中,针对一系列不相关和相关的抗原以及英夫利昔单抗/TNF- $\alpha$ 复合物,对IFX-TNF#1、IFX-TNF#2和IFX-TNF#3进行特异性结合测试。由此,将5 $\mu$ g/mL的各抗原涂覆在微量滴定板上过夜。在使用5%BSA进行洗涤和封闭后,加入Fab-FH形式(来自2 $\mu$ g/mL溶液中的20 $\mu$ L)的抗英夫利昔单抗/TNF- $\alpha$ 抗体。使用HRP标记的抗His抗体和QuantaBlu荧光过氧化酶底物进行检测。已证明IFX-TNF#1高度特异于所述复合物(图5)。

[0174] 实施例3:特异于MOR103/GM-CSF复合物的Fab片段和抗体的生成和表征

[0175] 为鉴定特异性地结合MOR103/GM-CSF复合物的抗体,使用重组的生物素化的人GM-CSF和MOR103作为固相淘选方法(solid phase panning approach)的抗原。

[0176] a) 淘选

[0177] 根据实施例1中描述的淘选步骤,制备噬菌体制备物。

[0178] 为提供MOR103/GM-CSF复合物,将重组GM-CSF固定在链霉亲和素涂覆板上,并加入MOR103以形成复合物。

[0179] 在100 $\mu$ g/ml的MOR3207(溶菌酶特异的人IgG1)和5 $\mu$ g/ml的游离GM-CSF的存在下进行全部的3轮淘选。如实施例1所述,将分离噬菌体的DNA亚克隆到Fab表达载体中,对各克隆进行初步筛查。

[0180] b) 筛查

[0181] 通过ELISA进行初步筛查。随机从上文所述的淘选步骤的产出中选取368个克隆,使其在284孔ELISA板中生长。在诱导抗体表达(0.75mM IPTG,30 $^{\circ}$ C下20小时)和使用溶菌酶

进行细胞裂解后,在ELISA中测试含有抗体的细胞裂解物。

[0182] 因此,将以下抗原在ELISA板上进行涂覆:MOR103/GM-CSF复合物、纯化的人MOR3207 (IgG1/kappa);MOR103以及游离的重组人GM-CSF。

[0183] 总共鉴定出3个对复合物显示阳性(信号为背景的至少5倍以上)、但不结合其它抗原的独特的克隆。随即对选定的克隆进行表达和纯化,且在ELISA中针对一系列不相关和相关的抗原以及MOR103/GM-CSF复合物进行特异性结合测试。

[0184] 将5 $\mu$ g/mL的各抗原(BSA、GST、MOR03207和MOR103)在微量滴定板上涂覆过夜。对于生物素化的GM-CSF (GM-CSF-bio)的固定化,将中和亲和素(neutravidin)以5 $\mu$ g/mL涂覆过夜,在用5%BSA进行封闭后,加入GM-CSF-bio。将5 $\mu$ g/mL的MOR103加至固定化的GM-CSF-bio,形成各MOR103/GM-CSF-bio复合物。在用5%BSA洗涤和封闭后,加入包含C-端6-His标记的Fab形式(来自2 $\mu$ g/mL溶液中的20 $\mu$ L)的抗MOR103/GM-CSF抗体,随后使用抗His检测抗体进行检测,并在QuantaBlu荧光过氧化酶底物洗涤后进行量化。

[0185] 结果,所有的3种抗体(M103GmCSF#1、M103GmCSF#2和M103GmCSF#3)可特异性地检测MOR103/GM-CSF复合物,但并不单独检测GM-CSF或MOR103(图6)。观察到一些M103GmCSF#1结合至MOR103,但无法在随后的ELISA滴定中确认。

[0186] c) 表征

[0187] 对M103GmCSF#1进行进一步的表征。将单独的MOR103、生物素化的GM-CSF或结合MOR103的生物素化的GM-CSF涂覆在抗生物素蛋白涂覆板上。以增加的浓度加入His标记的M103GmCSF#1Fab,使用His特异的POD结合二抗进行检测,并使用QuantaBlu荧光过氧化酶底物进行定量。M103GmCSF#1显示出与药物-靶复合物结合且不与单独的蛋白质(药物和靶)结合的高选择性(图7)。M103GmCSF#1Fab与药物-靶复合物的单价亲和性: $kD=4.9nM$ 。

[0188] 实施例4:使用特异于关联抗体与其抗原的复合物的抗体来检测人类血清中的抗体/抗原复合物的测定

[0189] 为监测和量化人类血清或血浆中的特定抗体/抗原复合物,建立了基于MSD® (Meso Scale Discovery)技术的稳健的药代动力学检测测定。

[0190] 简而言之,将溶解于PBS的2 $\mu$ g/ml的大鼠抗人GM-CSF涂覆至Multi-array®96孔板标准板的各孔上(Meso Scale Discovery;目录:L11XA-3)。

[0191] 第二天,将MOR103(hIgG1 $\lambda$ ;DSM:P19292;CMC2;浓度:2.0mg/mL)和GM-CSF(Bayer;NDC50419-002-33批号:B16891;浓度:0.25mg/mL)在LCB缓冲液(LowCross-缓冲液,Candor Bioscience GmbH目录号100500,批号100C434c)中稀释。为形成MOR103/GM-CSF复合物,将MOR103和GM-CSF以5:1的比例进行混合,并补充100%人血清(混合,男性;Sigma,目录:H4522;批号:11M0605)。在1小时的孵育后,使用LCB缓冲液将MOR103和GM-CSF混合物稀释2倍,使最终血清浓度为50%,并由预孵育板转移至预涂覆的Multi-array®96孔板,再在室温下孵育1h。使用PBST洗涤检定板(assay plate),并添加400ng/ml的ECL标记的M103GmCSF#1IgG(批号:110801\_11STE11\*1;ECT标记:批号:110831\_5AUN51;浓度:PBS中1.7mg/mL)1小时,以检测MOR103/GM-CSF复合物,随后使用MSD读取缓冲液T(目录:R92TC-1)以进行定量,在MSD Sector Imager6000(Meso Scale Discovery,Gaithersburg,MD,USA)中测量。

[0192] 在整个滴定曲线中, MOR103/GM-CSF复合物在人类血清的存在下以剂量依赖的方式被特异性地检测, 各浓度下的拟合曲线回归精度 (back accuracy) 为至少96-104% (见下文, 图8)。

[0193]

校准样品	标称浓度 [pM]	重复精度 (precision duplicate)分析 [%]	精度 [%]
St01	500	2.3	100.3
St02	250	0.5	99.5
St03	125	0.4	99.5
St04	62.5	3.1	100.2
St05	31.25	3.3	100.4
St06	15.63	2.2	99.7
St07	7.81	2.8	103.7
St08	3.91	2.6	96.5
St09	1.95	4.1	97.3
St10	0.98	0	104.8
St11	0.49	20	99.8

[0194] 已经充分描述本公开, 其通过以下意在说明而并非进一步限定的实施例和权利要求进一步说明。

[0195] 前面的书面说明书被认为足以使本领域技术人员能够实施本发明。但是应认识到, 前述内容无论在文本上可能显得如何详尽, 本发明都还可用多种方式进行实施, 本公开应按照所附权利要求或其任何等同物进行解释。

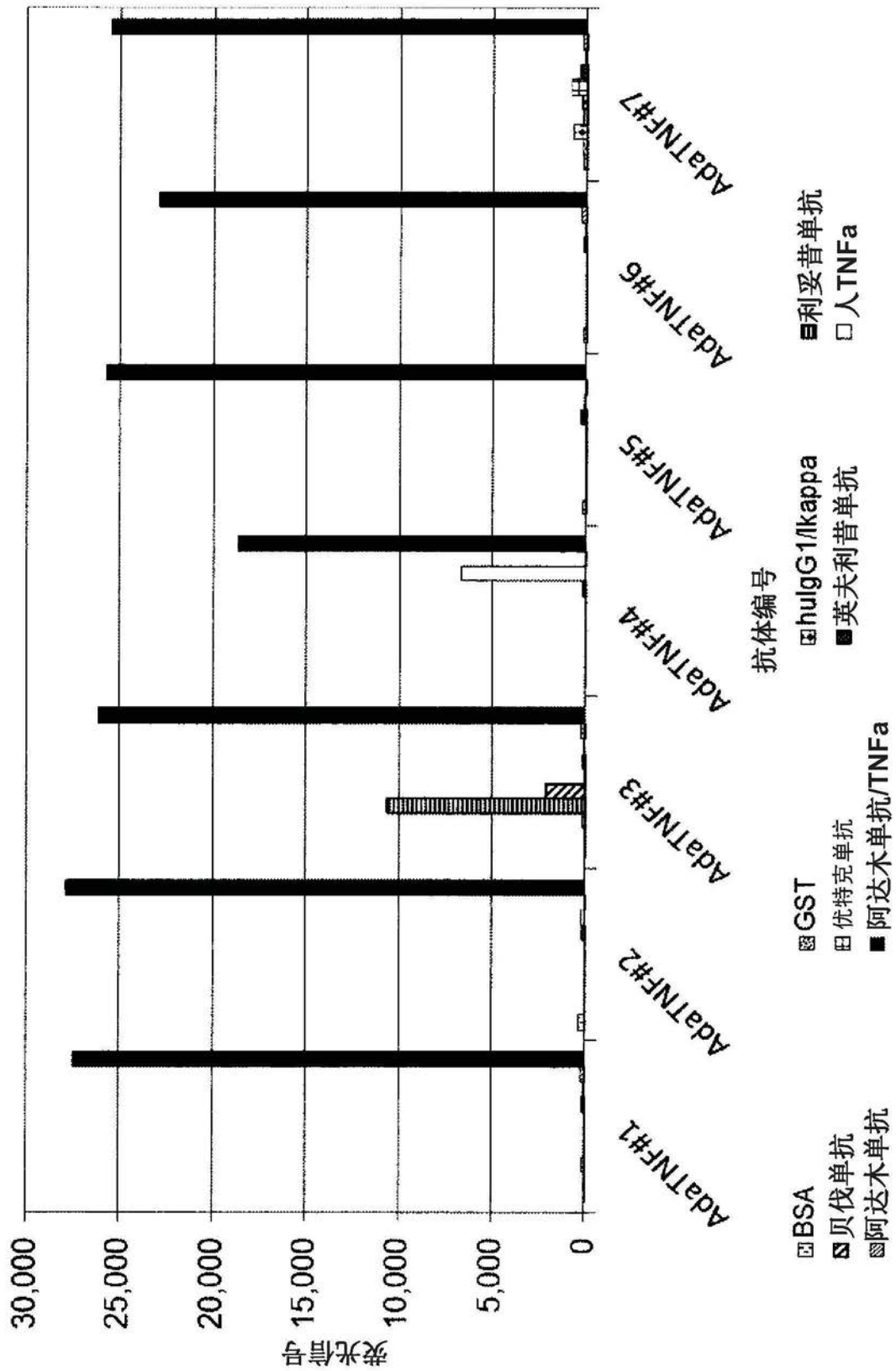


图1

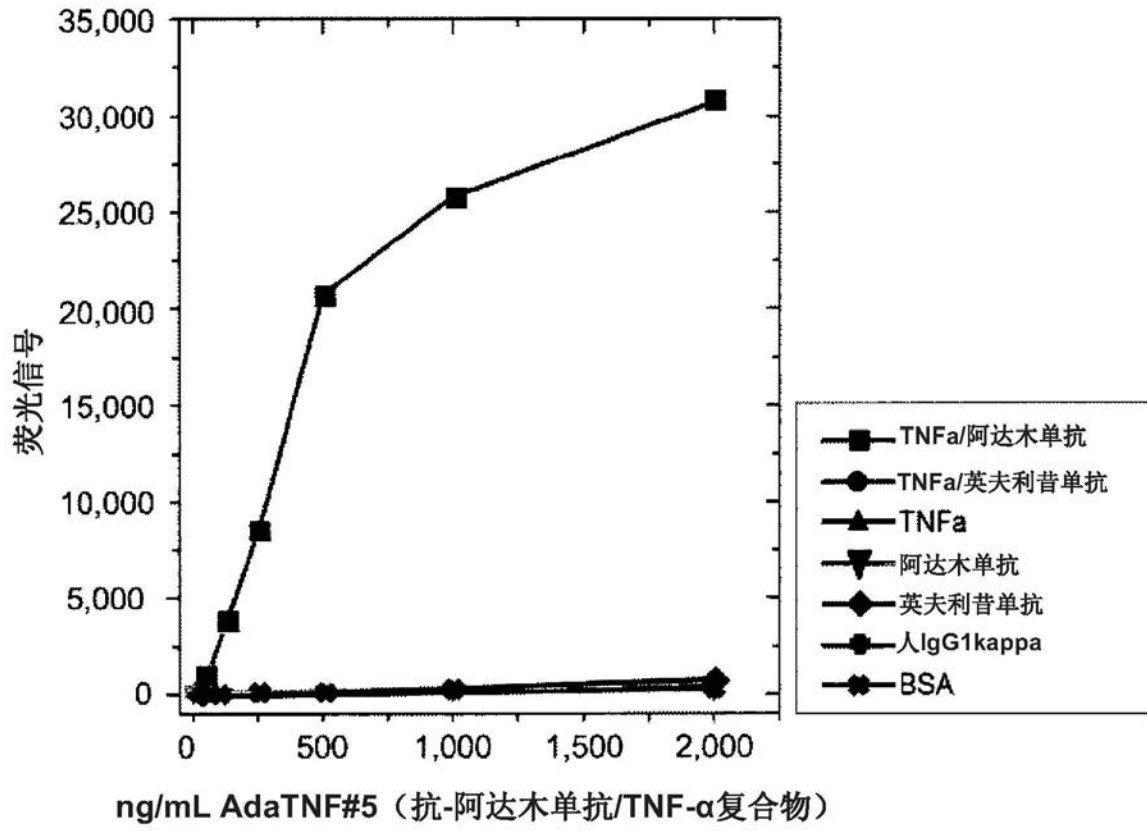


图2



图3

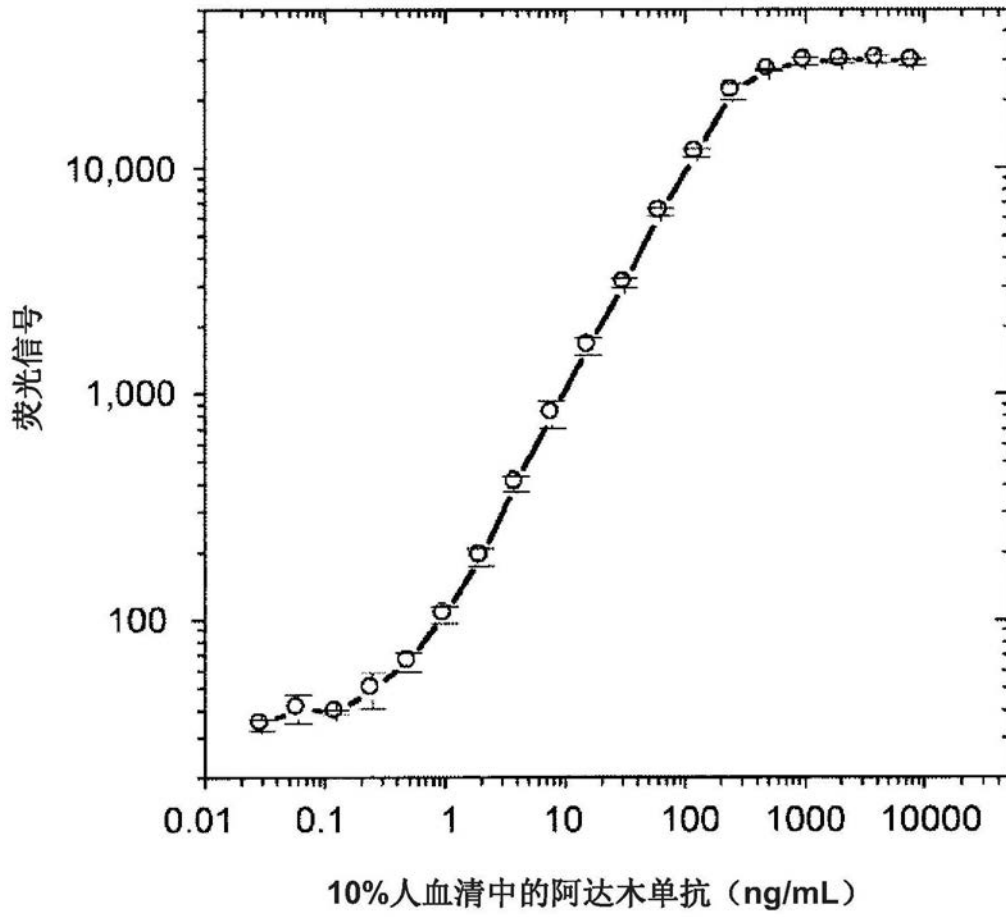


图4

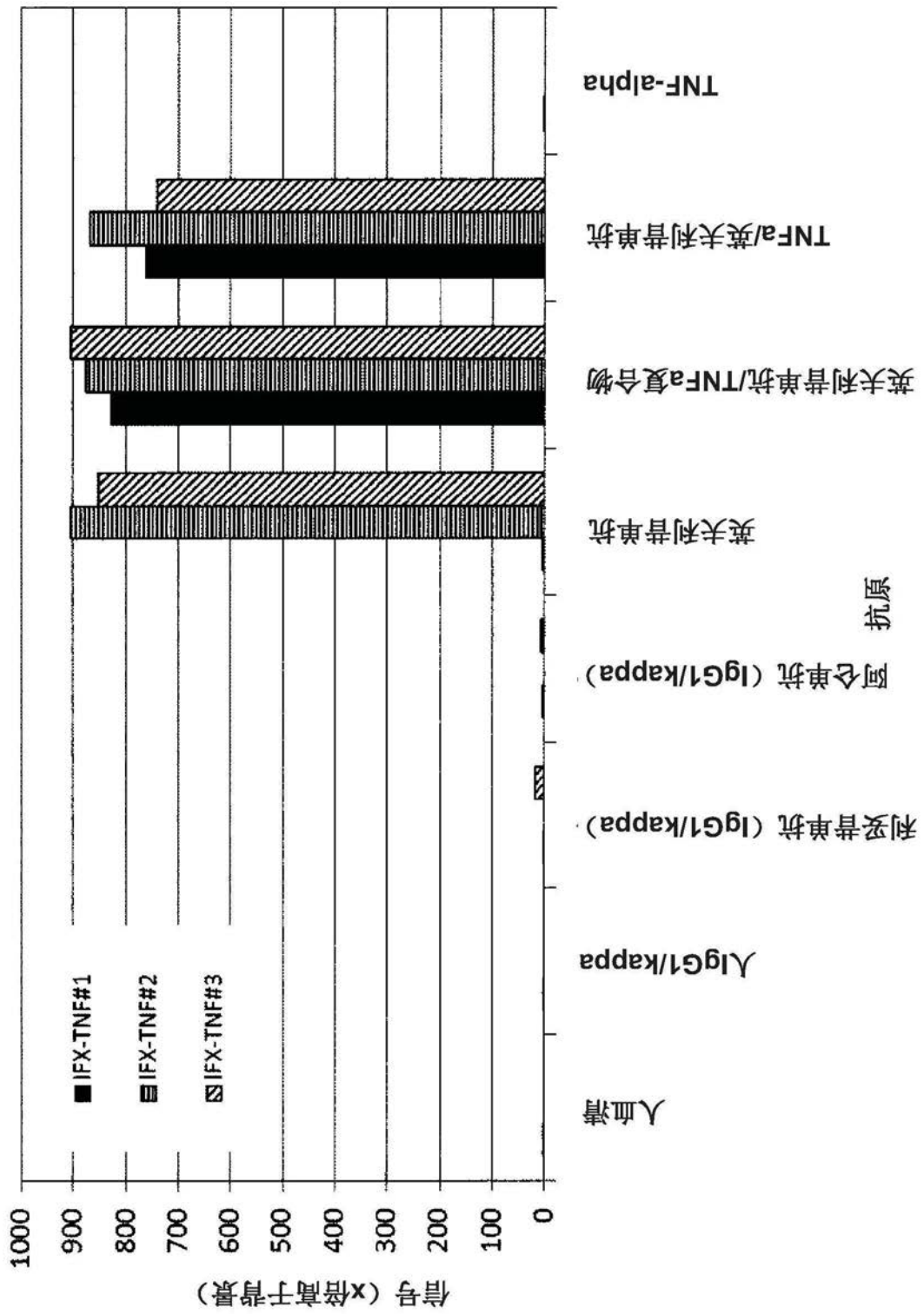


图5

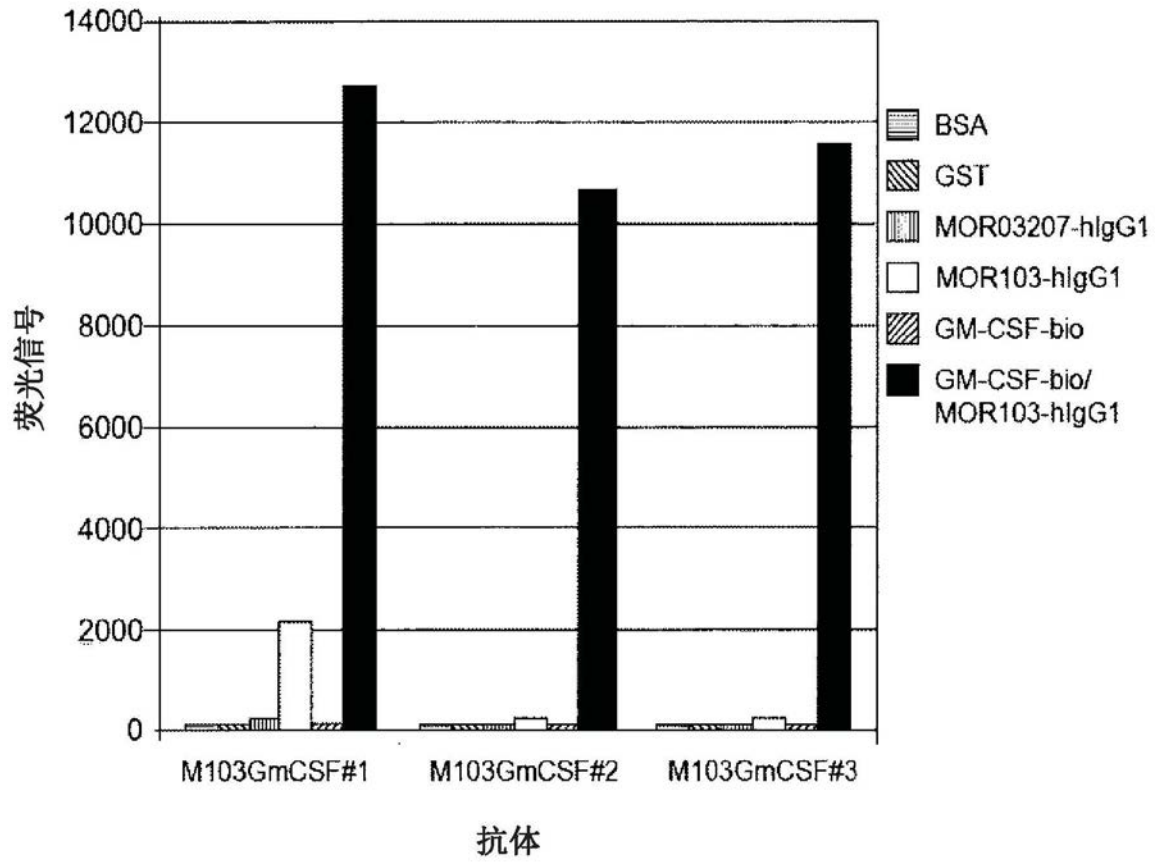


图6

专利名称(译)	复合物特异性抗体和抗体片段及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN104995517B</a>	公开(公告)日	2018-07-17
申请号	CN201380043777.X	申请日	2013-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	莫佛塞斯公司		
申请(专利权)人(译)	莫佛塞斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	莫佛塞斯公司		
[标]发明人	S·哈特勒 C·弗里施 A·克纳皮克		
发明人	S·哈特勒 C·弗里施 A·克纳皮克		
IPC分类号	C07K16/00 G01N33/564 G01N33/53 C07K16/24		
优先权	2012180835 2012-08-17 EP 61/684836 2012-08-20 US		
其他公开文献	CN104995517A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了特异地检测特异性关联抗原结合部分(特别是抗体)与其抗原的复合物的抗体及其片段。本公开的抗体并不单独与所述关联抗原结合部分或所述抗原结合, 并因此可用于, 例如直接检测结合抗原的抗原结合部分。进一步公开的是使用所述抗体和抗体片段的方法。

抗体-ID/ SEQ-ID 号	区域	序列
AdaTNF#1		VH1A VLκ3
SEQ ID NO:1 (Kabat)	HCDR1	GGTFSTYAIS
SEQ ID NO:2 (Kabat)	HCDR2	WMGGIPIFGTANYAQKFQG
SEQ ID NO:3 (Kabat)	HCDR3	DYFSSIGWVYYGPM DY
SEQ ID NO:4 (Kabat)	LCDR1	RASQSVSSPYLA
SEQ ID NO:5 (Kabat)	LCDR2	LLIYDVSSRAT
SEQ ID NO:6	LCDR3	QQYTSTPP