



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108350066 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201680062688.3

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22)申请日 2016.10.27

代理人 凌立 黄革生

(30)优先权数据

15192195.4 2015.10.29 EP

(51)Int.Cl.

G07K 16/22(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

G07K 16/00(2006.01)

2018.04.26

G01N 33/53(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

G01N 33/68(2006.01)

PCT/EP2016/075884 2016.10.27

C07K 16/28(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/072210 EN 2017.05.04

C07K 16/42(2006.01)

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 F·科瓦莱夫斯基 M·里特尔

K·G·施图本拉赫 U·韦塞尔斯

权利要求书1页 说明书69页

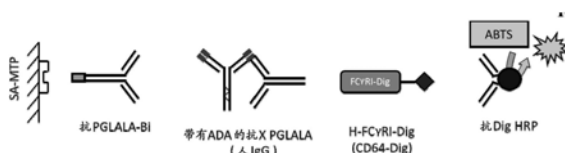
序列表11页 附图9页

(54)发明名称

抗变体Fc区抗体及使用方法

(57)摘要

本发明提供特异性结合在Fc区中具有突变P329G或突变P329G/L234A/L235A或突变I253A/H310A/H435A的抗体的抗变体Fc区抗体及其使用方法。



1. 分离的抗体,其包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:09或10的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:12、13或14的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列SEQ ID NO:16、17或18的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列SEQ ID NO:23或24的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列SEQ ID NO:26的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列SEQ ID NO:28、29或30的HVR-L3。

2. 分离的抗体,其包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:21的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列SEQ ID NO:22的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列SEQ ID NO:32的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列SEQ ID NO:34的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列SEQ ID NO:35的HVR-L3。

3. 权利要求1至2中任一项的抗体,其中抗体是单克隆抗体。

4. 权利要求1至3中任一项的抗体,其中抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

5. 权利要求1或4中任一项的抗体,其中抗体是抗体片段。

6. 分离的核酸,其编码权利要求1至5中任一项的抗体。

7. 宿主细胞,其包含权利要求6的核酸。

8. 产生抗体的方法,其包括培养权利要求7的宿主细胞,使得产生抗体。

9. 缀合物,其包含权利要求1至5中任一项的抗体和可检测标记。

10. 权利要求1至5中任一项的抗体在免疫测定中作为捕获抗体或作为示踪抗体的用途,用于测定样品中在Fc区中包含突变P329G或突变P329G/L234A/L235A或突变I253A/H310A/H435A的IgG1或IgG4亚类治疗性抗体。

11. 权利要求1和3至5中任一项的抗体在免疫测定中作为捕获抗体和作为示踪抗体的用途,用于测定样品中包含突变I253A/H310A/H435A的IgG1或IgG4亚类治疗性抗体,由此所述捕获抗体的HVR序列和所述示踪抗体的HVR序列不同。

抗变体Fc区抗体及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及特异性结合变体Fc区而不结合相应的野生型Fc区的针对变体Fc区的抗体(抗变体Fc区抗体)。本文中报道其产生方法及其用途。

背景技术

[0002] 自1974年Koehler和Milstein开发了第一个单克隆抗体以来,已作出了许多努力来开发适合用于人类中治疗的抗体。第一批可用的单克隆抗体是在小鼠和大鼠中开发的。这些抗体在用于人类的治疗时导致由抗啮齿动物抗体引起的不想要的副作用。已作出许多努力来减少或甚至消除这类不想要的副作用。

[0003] 过去几年,数目越来越多的人单克隆抗体或人源化抗体已进入市场。众所周知的实例包括例如来自Hoffmann-La Roche,Basel的**Herceptin®**和**MabThera®**。

[0004] 大量人或人源化单克隆抗体处于研究中,需要在实验动物中研究,然后可考虑为了I期试验的目的进入人体。

[0005] 必须借助实验动物来研究重要标准,仅提到它们中的两个,如生物利用率和抗体清除率。许多这些研究需要在宿主自身抗体的背景中定量治疗性抗体。在大多数情况下,用哺乳动物作为实验动物。通常首先在啮齿动物如小鼠或大鼠中评估毒理学。在药物开发的更晚期阶段,尤其是在药物进入人类之前,甚至必须在这类临床前研究中包括猴。

[0006] 哺乳动物循环中通常每毫升具有约10至约30毫克之间的免疫球蛋白。

[0007] 治疗性单克隆抗体通常必须测试约1ng/ml至约100µg/ml范围内的血清水平。因此必须针对过量约一百倍至一千万倍的宿主抗体背景检测治疗性抗体。在宿主免疫球蛋白背景中检测人或人源化治疗性抗体对药理学家而言是非常艰巨的任务。此外,应理解,不同的治疗性抗体可以需要不同的试剂和测定形式。治疗性抗体与野生型人抗体越相近,人或人源化抗体的检测越困难。

[0008] 目前,由于其高通量和灵敏度及其对不同项目的容易的适用性,酶联免疫吸附夹心测定(ELISA)桥连测定(图1A)代表用于免疫原性测试的现有技术测定型式(format)(Mikulskis,A.等,J.Immunol.Meth.365(2011)38-49)。但是,此测定的可靠性受到以下二者的挑战:寡聚靶标引起的干扰,其导致假阳性结果(Bautista,A.C.等,Bioanal.2(2010)721-731;Mire-Sluis,A.R.等,J.Immunol.Meth.289(2004)1-16(2004);Weeraratne,D.K.等,J.Immunol.Meth.396(2013)44-55;Zhong,Z.D.等,J.Immunol.Meth.355(2010)21-28);临床样品中高药物浓度的存在,其与标记药物分子竞争从而阻止ADA产生信号,从而导致假阴性结果(Mire-Sluis,A.R.等,J.Immunol.Meth.289(2004)1-16(2004);Geng,D.等,J.Pharm.Biomed.Anal.39(2005)364-375)。尤其是,结合于药物免疫复合物中的ADA的检测在传统桥连测定中显著受限(Mire-Sluis,A.R.等,J.Immunol.Meth.289(2004)1-16(2004);Geng,D.等,J.Pharm.Biomed.Anal.39(2005)364-375)。

[0009] 发明概述

[0010] 由于寡聚靶标和高药物浓度常妨碍用于检测抗药抗体(ADA)的桥连测定,需要改

进的方法。对于缺乏Fc效应子功能(例如通过在Fc区内引入Pro329Gly (PG) 取代)的治疗性抗体,本文报道耐受药物和靶标的免疫复合物测定,其利用对Fc区内的取代特异的抗体(例如抗PG抗体)和人可溶性Fc γ 受体进行检测。与常规桥连测定相比,本文报道的测定具有提高的药物寡聚靶标耐受性(Wessels,U.等,Bioanalysis 8 (2016) 2135-2145)。甚至在高药物浓度存在下,此方法也允许测定抗药抗体,因为人可溶性Fc γ 受体(例如人可溶性Fc γ RI受体)特异性结合野生型(wt) IgG,但不结合Fc区修饰的IgG。

[0011] 与桥连测定组合,临床样品的详细ADA表征现在成为可能,因为两种测定差异化识别ADA Ig亚型。对于本文报道的测定,常规桥连测定对深度表征个体对Fc区修饰的治疗性抗体的ADA反应而言是互补的。

[0012] 本文报道的一个方面是用于测定样品(包含血清)中抗药抗体的存在和/或量的测定,其包括以下步骤:

[0013] -使该样品与缺乏Fc效应子功能(例如通过在Fc区内引入一个或多个取代)的抗体特异性结合的抗体进行孵育,以从该样品(包含游离和ADA复合的抗体)捕获缺乏Fc效应子功能的抗体;

[0014] -通过使所捕获的抗体与人可溶性Fc γ RI孵育来检测所捕获的抗体;

[0015] -测定该样品中抗药抗体的存在和/或量。

[0016] 本文报道的一个方面是用于体外测定可由多特异性结合剂的第一结合特异性特异性结合的结合配偶体的存在和/或量的方法,其中排除结合于该多特异性结合剂的结合配偶体,然后通过使该样品与特异性结合该多特异性结合剂的第二结合特异性的单特异性结合剂孵育来检测该结合配偶体,其包括以下步骤:

[0017] -使包含结合配偶体和多特异性结合剂的样品与特异性结合该多特异性结合剂的第二结合特异性(其不同于该第一结合特异性)的单特异性结合剂孵育;

[0018] -从该样品排除单特异性结合剂-多特异性结合剂复合物,然后测定游离结合配偶体的存在或量;和

[0019] -用前一方面中报道的方法测定该多特异性抗原结合剂排除样品中该结合配偶体的量。

[0020] 本文报道的一个方面是特异性结合在253、310和435位各包含氨基酸残基丙氨酸(按照Kabat EU指数编号)的Fc区的分离的抗体,其包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:09或10的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:12、13或14的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列SEQ ID NO:16、17或18的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列SEQ ID NO:23或24的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列SEQ ID NO:26的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列SEQ ID NO:28、29或30的HVR-L3。

[0021] 此抗体在下文中表示为抗AAA抗体。

[0022] 本文报道的一个方面是特异性结合在329位包含氨基酸残基甘氨酸(且可选地在234和235位各包含丙氨酸氨基酸残基)(按照Kabat EU指数编号)的Fc区的分离的抗体,其包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:21的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列SEQ ID NO:22的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列SEQ ID NO:32的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列SEQ ID NO:34的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列SEQ ID NO:35的HVR-L3。

- [0023] 此抗体在下文中表示为抗PG抗体。
- [0024] 在一个实施方案中,该抗体是单克隆抗体。
- [0025] 在一个实施方案中,该抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。
- [0026] 在一个实施方案中,该抗体是特异性结合各突变Fc区的抗体片段。
- [0027] 本文报道的一个方面是编码本文报道的抗体的分离的核酸。
- [0028] 本文报道的一个方面是包含本文报道的核酸的宿主细胞。
- [0029] 在一个实施方案中,该宿主细胞是真核细胞。在一个实施方案中,该真核细胞是哺乳动物细胞。在一个优选实施方案中,该哺乳动物细胞是CHO细胞或HEK细胞。
- [0030] 一个方面是产生抗体的方法,其包括培养本文报道的宿主细胞,使得产生该抗体。
- [0031] 在一个实施方案中,该方法包括培养本文报道的包含编码本文报道的抗体的核酸的细胞和从该细胞或培养基回收该抗体的步骤。
- [0032] 本文报道的一个方面是包含与可检测标记缀合的本文报道的抗体的缀合物。
- [0033] 本文报道的一个方面是本文报道的抗体在免疫测定中作为捕获抗体或作为示踪抗体的用途,用于测定(样品中)在Fc区中包含突变P329G或突变P329G/L234A/L235A或突变I253A/H310A/H435A(按照Kabat EU指数编号)的IgG1或IgG4亚类治疗性抗体。
- [0034] 本文报道的一个方面是本文报道的两种不同抗体在免疫测定中作为捕获抗体和作为示踪抗体的用途,用于测定样品中包含突变I253A/H310A/H435A的IgG1或IgG4亚类治疗性抗体,由此该捕获抗体的HVR序列和该示踪抗体的HVR序列不同(按照Kabat EU指数编号)。
- [0035] 本文报道的一个方面是本文报道的抗体在免疫测定中作为捕获抗体或作为示踪抗体的用途,用于测定(样品中)抗IgG1或IgG4亚类治疗性抗体的抗药抗体,其中该治疗性抗体的Fc区包含突变P329G或突变P329G/L234A/L235A或突变I253A/H310A/H435A(按照Kabat EU指数编号)。
- [0036] 附图简述
- [0037] 图1用本文报道的抗体作为捕获试剂的免疫测定示意图。
- [0038] 图2用本文报道的抗体作为示踪剂的免疫测定示意图。
- [0039] 图3用本文报道的抗体作为捕获剂和作为示踪剂的免疫测定示意图。
- [0040] 图4用本文报道的抗体作为标准品的免疫测定示意图。
- [0041] 图5用本文报道的抗体作为捕获抗体和用可溶性Fc γ 受体作为示踪分子的免疫测定示意图。
- [0042] 图6用本文报道的抗体作为捕获抗体和用抗靶标抗体作为示踪抗体的免疫测定示意图。
- [0043] 图7临床试验4名患者中ADA发生的示例性时程:患者接受每两周(A,C)或每周(B)施用的治疗性抗体(每个剂量10mg),每个剂量之前和之后每天采集血样(C2、C3:第二和第三治疗周期)。所有样品都通过常规桥连(浅灰色条)和hsFc γ RI-PG测定(黑色条)二者测试抗药抗体(ADA)。提供血药浓度(ng/ml)(底部曲线),在相应的条上方显示评估为ADA阴性(-)或阳性(+)的样品。
- [0044] 发明详述
- [0045] I. 定义

[0046] 如本文所使用,重链和轻链的所有恒定区和结构域的氨基酸位置按照Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 中所述的Kabat编号系统编号,本文中称为“按照Kabat编号”。具体而言, Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 的Kabat编号系统(参见647-660页)用于 κ 和 λ 同种型的轻链恒定结构域CL, Kabat EU指数编号系统(参见661-723页)用于恒定重链结构域(CH1、铰链、CH2和CH3)。

[0047] 用于本文目的的“受体人构架”是包含源自下文定义的人免疫球蛋白构架或人共有构架的轻链可变结构域(VL)构架或重链可变结构域(VH)构架的氨基酸序列的构架。“源自”人免疫球蛋白构架或人共有构架的受体人构架可以包含其相同的氨基酸序列,或者它可以包含氨基酸序列改变。在一些实施方案中,氨基酸改变的数目为10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、或2个或更少。在一些实施方案中,VL受体人构架在序列上与VL人免疫球蛋白构架序列或人共有构架序列相同。

[0048] “亲和力”指分子(例如抗体)的单个结合部位与其结合配偶体(例如抗原)之间非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,本文所用的“结合亲和力”指内在的结合亲和力,其反映结合对(例如抗体和抗原)成员之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力一般可通过解离常数(K_d)来表示。亲和力可以通过本领域公知的方法来测量,包括本文中所述的那些。

[0049] “亲和力成熟”的抗体指在一个或多个高变区(HVR)中具有一个或多个改变的抗体,与不具有这类改变的亲本抗体相比,这类改变导致该抗体对抗原的亲和力改善。

[0050] 术语“改变”指在例如至少包含Fc区的FcRn结合部分的抗体或融合多肽的亲本氨基酸序列中突变、添加或缺失一个或多个氨基酸残基,以获得变体抗体或融合多肽。

[0051] 术语“氨基酸突变”指亲本氨基酸序列的氨基酸序列中的修饰。示例性修饰包括氨基酸取代、插入和/或缺失。在一个实施方案中,该氨基酸突变是取代。术语“…位的氨基酸突变”指取代或缺失指定的残基,或在邻近指定残基处插入至少一个氨基酸残基。术语“邻近指定残基的插入”指其1至2个残基内的插入。插入可以在指定残基的N端或C端。

[0052] 术语“氨基酸取代”指用不同的“替换”氨基酸残基替换预先确定的亲本氨基酸序列中的至少一个氨基酸残基。该一个或多个替换残基可以是“天然氨基酸残基”(即由遗传密码编码),且选自:丙氨酸(Ala);精氨酸(Arg);天冬酰胺(Asn);天冬氨酸(Asp);半胱氨酸(Cys);谷氨酰胺(Gln);谷氨酸(Glu);甘氨酸(Gly);组氨酸(His);异亮氨酸(Ile);亮氨酸(Leu);赖氨酸(Lys);甲硫氨酸(Met);苯丙氨酸(Phe);脯氨酸(Pro);丝氨酸(Ser);苏氨酸(Thr);色氨酸(Trp);酪氨酸(Tyr);和缬氨酸(Val)。在一个实施方案中,该替换残基不是半胱氨酸。一个或多个非天然氨基酸残基的取代也为本文的氨基酸取代的定义所涵盖。“非天然氨基酸残基”指除上文所列出的那些天然氨基酸残基外的残基,其能够共价结合多肽链中的一个或多个邻近氨基酸残基。非天然氨基酸残基的实例包括正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸、aib和其他氨基酸残基类似物,如Ellman等, Meth. Enzym. 202 (1991) 301-336 中所述的那些。为了产生这类非天然氨基酸残基,可以使用Noren等(Science 244 (1989) 182)和/或Ellman等(上文)的方法。简言之,这些方法涉及用非天然氨基酸残基化学活化阻

抑型tRNA,然后体外转录和翻译RNA。非天然氨基酸还可以通过化学肽合成掺入肽,然后使这些肽与重组产生的多肽(如抗体或抗体片段)融合。

[0053] 术语“氨基酸插入”指将至少一个附加氨基酸残基掺入预先确定的亲本氨基酸序列。虽然插入通常将包括一个或两个氨基酸残基的插入,但本申请考虑更大的“肽插入”,例如插入约3个至约5个或甚至至多约10个氨基酸残基。所插入的残基可以是上文定义天然残基或非天然残基。

[0054] 术语“氨基酸缺失”指在氨基酸序列中预先确定的位置去除至少一个氨基酸残基。

[0055] 在本申请内,无论何时提到氨基酸改变,它都是有意进行的氨基酸改变,不是随机的氨基酸修饰。

[0056] 术语“抗变体(人)Fc区抗体”和“特异性结合变体(人)Fc区的抗体”指这样的抗体,其能够以足够的亲和力结合变体(人)Fc区,使得该抗体可作为诊断剂用于靶向变体(人)Fc区。在一个实施方案中,抗变体(人)Fc区抗体与相应野生型(人)Fc区结合的程度小于该抗体与变体(人)Fc区的结合的约10%。这可以例如用表面等离子共振测定。在某些实施方案中,特异性结合变体(人)Fc区的抗体具有 10^{-8} M或更小(例如 10^{-8} M至 10^{-13} M,例如 10^{-9} M至 10^{-13} M)的解离常数。

[0057] 术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用并涵盖多种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们显示希望的抗原结合活性。

[0058] “抗体片段”指除完整抗体以外的包含完整抗体的部分的分子,其结合该完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);及从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0059] 术语“结合…”指第一实体与第二实体,例如抗体与其抗原的结合。此结合可以用例如**BIAcore**[®]测定(GE Healthcare,Uppsala,瑞典)来测定。

[0060] 例如,在BIAcore^(R)测定的一个可能的实施方案中,使抗原结合于表面,并通过表面等离子共振(SPR)来测量抗体的结合。通过术语ka(结合常数;结合形成复合物的速率常数)、kd(解离常数;复合物解离的速率常数)和KD(kd/ka)来定义结合的亲和力。备选地,可以就共振信号高度和解离行为将SPR传感图的结合信号与参考的响应信号直接比较。

[0061] 术语“CH2结构域”指从约EU位置231延伸至EU位置340(按照Kabat的EU编号系统)的抗体重链多肽部分。CH2结构域的独特性在于,它不与另一结构域紧密配对。相反,两个N连接的分枝糖链插在完整天然Fc区的两个CH2结构域之间。据推测,糖类可以提供结构域-结构域配对的替代,并帮助稳定CH2结构域。Burton,Mol.Immunol.22(1985)161-206。

[0062] 术语“CH3结构域”指约从EU位置341延伸至EU位置446的抗体重链多肽部分。

[0063] 术语“嵌合”抗体指这样的抗体,其中部分重链和/或轻链源自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分源自不同的来源或物种。

[0064] 抗体的“类别”指它的重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五个主要的抗体类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,这些中的几种可以进一步划分为亚类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同类别免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0065] 术语“依赖补体的细胞毒性(CDC)”指本文报道的抗体在补体存在下诱导的细胞裂

解。如果抗体在30 μ g/ml浓度下诱导20%或更多的靶细胞裂解,则可观察到CDC。与补体因子C1q的结合可在ELISA中测量。在这种测定中,一般而言,用浓度范围的抗体包被ELISA平板,向平板加入纯化的人C1q或人血清。通过抗C1q的抗体、然后通过过氧化物酶标记的缀合物来检测C1q结合。对于过氧化物酶底物**ABTS**[®](2,2'-连氮-二-[3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(6)]),将结合的检测(最大结合B_{max})测量为405nm光密度(OD₄₀₅)。

[0066] “效应子功能”指可归因于抗体Fc区且随抗体类别而变的那些生物活性。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和依赖补体的细胞毒性(CDC);Fc受体结合;依赖抗体的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;及B细胞激活。

[0067] 依赖Fc受体结合的效应子功能可由抗体Fc区与Fc受体(FcR)的相互作用介导,Fc受体是造血细胞上的专用细胞表面受体。Fc受体属于免疫球蛋白超家族,已显示其介导以下二者:通过免疫复合物的吞噬作用去除抗体包被的病原体,及通过依赖抗体的细胞毒性(ADCC)裂解相应抗体包被的红细胞和多种其他细胞靶标(例如肿瘤细胞)(参见例如Van de Winkel, J.G.和Anderson, C.L., *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524)。FcR通过其对免疫球蛋白同种型的特异性来定义:IgG抗体的Fc受体称为Fc γ R。Fc受体结合描述于例如Ravetch, J.V.和Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492; Capel, P.J., 等, *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; de Haas, M.等, *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341; Gessner, J.E., 等, *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248中。

[0068] IgG抗体的Fc区受体(Fc γ R)的交联触发多种效应子功能,包括吞噬作用、依赖抗体的细胞毒性和炎症介质释放,以及免疫复合物清除和抗体产生的调节。在人类中,已表征了三类Fc γ R,它们是:

[0069] -Fc γ RI (CD64)以高亲和力结合单体IgG,在巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞上表达。IgGFc区中至少氨基酸残基E233-G236、P238、D265、N297、A327和P329(按照Kabat的EU指数编号)之一的修饰减少了与Fc γ RI的结合。将233-236位的IgG2残基取代入IgG1和IgG4使与Fc γ RI的结合降低10³倍,并消除了人单核细胞对抗体致敏的红细胞的反应(Armour, K.L.等, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624)。

[0070] -Fc γ RII (CD32)以中至低亲和力结合复合的IgG,且广泛表达。此受体可以划分为Fc γ RIIA和Fc γ RIIB两个亚型。Fc γ RIIA见于许多涉及杀伤的细胞上(例如巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞),似乎能够激活杀伤过程。Fc γ RIIB似乎在抑制过程中发挥作用,见于B细胞、巨噬细胞上及肥大细胞和嗜酸性粒细胞上。在B细胞上,它似乎发挥作用来抑制进一步免疫球蛋白产生和同种型转换至例如IgE类。在巨噬细胞上,Fc γ RIIB发挥作用来抑制通过Fc γ RIIA介导的吞噬作用。在嗜酸性粒细胞和肥大细胞上,B形式可有助于抑制这些细胞通过IgE与其分开的受体结合而激活。例如针对包含至少在氨基酸残基E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、R292和K414(按照Kabat的EU指数编号)之一处具有突变的IgG Fc区的抗体观察到了Fc γ RIIA结合减少。

[0071] -Fc γ RIII (CD16)以中至低亲和力结合IgG,且作为两种类型存在。Fc γ RIIIA见于NK细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞及一些单核细胞和T细胞上,且介导ADCC。Fc γ RIIIB在嗜中性粒细胞上高表达。例如针对包含至少在氨基酸残基E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、S239、E269、E293、Y296、V303、A327、K338和D376(按照Kabat的EU指数编号)之一处具有突变的IgG Fc区的抗体观察到了Fc γ RIIIA结合减少。

[0072] Shields, R.L. 等 *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604 中描述了人 IgG1 上的 Fc 受体结合部位的定位、上文提到的突变位点及用于测量与 Fc γ RI 和 Fc γ RIIA 的结合的方法。

[0073] 本文所用的术语“Fc 受体”指表征为存在与受体结合的胞质 ITAM 序列的激活受体 (参见例如 Ravetch, J.V. 和 Bolland, S., *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 275-290)。这类受体有 Fc γ RI、Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIA。术语“无 Fc γ R 结合”指在 10 μ g/ml 抗体浓度下, 本文报道的抗体与 NK 细胞的结合是针对 WO 2006/029879 中报道的抗 OX40L 抗体 LC.001 观察到的结合的 10% 或更少。

[0074] 虽然 IgG4 显示减少的 FcR 结合, 但其他 IgG 亚类的抗体显示强结合。但是, Pro238、Asp265、Asp270、Asn297 (Fc 糖类丧失)、Pro329 和 234、235、236 和 237 Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434 和 His435 是在改变时也减少 FcR 结合的残基 (Shields, R.L. 等 *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604; Lund, J. 等, *FASEB J.* 9 (1995) 115-119; Morgan, A. 等, *Immunology* 86 (1995) 319-324; 及 EP 0 307 434)。在一个实施方案中, 本文报道的抗体属于 IgG1 或 IgG2 亚类, 且包含突变 PVA236、GLPSS331 和/或 L234A/L235A。在一个实施方案中, 本文报道的抗体属于 IgG4 亚类, 且包含突变 L235E。在一个实施方案中, 该抗体进一步包含突变 S228P。

[0075] 本文的术语“Fc 区”用于定义免疫球蛋白重链的 C 端区域, 其包含至少部分恒定区。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。在一个实施方案中, 人 IgG 重链 Fc 区从 Cys226 或从 Pro230 延伸至重链的羧基端。但是, Fc 区的 C 端赖氨酸 (Lys447) 可以存在或不存在。除非本文另有说明, Fc 区或恒定区中氨基酸残基的编号按照 Kabat, E.A. 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242 中所述的 EU 编号系统, 也称为 EU 指数。

[0076] 本文报道的抗体包含 Fc 区, 在一个实施方案中, 包含源自人来源的 Fc 区。在一个实施方案中, 该 Fc 区包含人恒定区的所有部分。抗体的 Fc 区直接涉及补体激活、C1q 结合、C3 激活和 Fc 受体结合。虽然抗体对补体系统的影响依赖于某些条件, 但与 C1q 的结合由 Fc 区中确定的结合部位引起。这类结合部位为现有技术已知, 并由例如 Lukas, T.J. 等, *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., 和 Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917; Burton, D.R. 等, *Nature* 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E. 等, *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E. 等, *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M. 等, *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A. 等, *Immunology* 86 (1995) 319-324; 和 EP 0 307434 描述。这类结合部位有例如 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 P329 (按照 Kabat 的 EU 指数编号; 除非文中另有说明, Fc 区或恒定区中氨基酸残基的编号是按照 Kabat, E.A. 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242 中所述的 EU 编号系统, 也称为 EU 指数)。IgG1、IgG2 和 IgG3 亚类抗体通常显示不体激活、C1q 结合和 C3 激活, 而 IgG4 不激活不体系统, 不结合 C1q, 不激活 C3。“抗体的 Fc 区”是技术人员公知的术语, 且基于抗体的木瓜蛋白酶切割来定义。在一个实施方案中, 该 Fc 区是人 Fc 区。在一个实施方案中, 该 Fc 区属于包含突变 S228P 和/或 L235E (按照 Kabat 的 EU 指数编号) 的人 IgG4 亚类。在一个实施方案中, 该 Fc 区属于包含突变 L234A 和

L235A (按照Kabat的EU指数编号) 的人IgG1亚类。

[0077] “构架”或“FR”指高变区 (HVR) 残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR一般由四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列一般按以下顺序出现在VH (或VL) 中:FR1-H1 (L1) -FR2-H2 (L2) -FR3-H3 (L3) -FR4。

[0078] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,指具有基本类似于天然抗体结构的结构或具有包含本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0079] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,指已将外源核酸引入其中的细胞,包括这类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括最初转化的细胞及其衍生的后代,而不考虑传代数。后代的核酸含量可以并非与亲本细胞完全相同,而是可以包含突变。本文包括具有与在最初转化的细胞中筛选或选择的功能或生物学活性相同的功能和生物学活性的突变体后代。

[0080] “人共有构架”是代表一系列人免疫球蛋白VL或VH构架序列中最常出现的氨基酸残基的构架。通常,该系列人免疫球蛋白VL或VH序列来自可变结构域序列亚组。通常,该序列亚组是如Kabat,E.A.等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Bethesda MD (1991),NIH Publication 91-3242,1-3卷中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,该亚组是如Kabat等,上文中的κI亚组。在一个实施方案中,对于VH,该亚组是Kabat等,上文中的III亚组。

[0081] “人源化”抗体指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含至少一个且通常为两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部HVR (例如CDR) 对应于非人抗体的那些,而全部或基本上全部FR对应于人抗体的那些。人源化抗体可以可选地包含源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体 (例如非人抗体) 的“人源化形式”指已进行了人源化的抗体。

[0082] 本文所用的术语“高变区”或“HVR”指抗体可变结构域的每个包含这样的氨基酸残基序列的区域,该氨基酸残基序列在序列上高变 (“互补决定区”或“CDR”) 和/或形成结构确定的环 (“高变环”) 和/或包含抗原接触残基 (“抗原接触”)。通常,抗体包含六个HVR:三个在VH中 (H1、H2、H3),三个在VL中 (L1、L2、L3)。

[0083] HVR包含:

[0084] (a) 存在于氨基酸残基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2) 和96-101 (H3) 处的高变环 (Chothia,C.和Lesk,A.M.,J.Mol.Biol.196 (1987) 901-917);

[0085] (b) 存在于氨基酸残基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2) 和95-102 (H3) 处的CDR (Kabat,E.A.等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD (1991),NIH Publication 91-3242.);

[0086] (c) 存在于氨基酸残基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2) 和93-101 (H3) 处的抗原接触 (MacCallum等J.Mol.Biol.262:732-745 (1996));和

[0087] (d) (a)、(b) 和/或 (c) 的组合,包括氨基酸残基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3) 和94-102 (H3)。

[0088] 除非另有说明,本文按照Kabat等,上文编号可变结构域中的HVR残基和其他残基 (例如FR残基)。

[0089] 术语“铰链区”指抗体重链多肽的部分,其在野生型重链中连接CH1结构域和CH2结构域,例如,按照Kabat的EU编号系统为从约216位至约230位,或按照Kabat的EU编号系统为从约226位至约230位。其他IgG亚类的铰链区可以通过与IgG1亚类序列的铰链区半胱氨酸残基比对来确定。

[0090] 铰链区通常是包含两条具有相同氨基酸序列的多肽的二聚体分子。铰链区通常包含约25个氨基酸残基且可屈,允许抗原结合区独立移动。铰链区可以细分为三个结构域:上、中和下铰链结构域(参见例如Roux等,J.Immunol.161(1998)4083)。

[0091] 在一个实施方案中,铰链区具有氨基酸序列DKTHTCPX4CP,其中X4是S或P。在一个实施方案中,铰链区具有氨基酸序列HTCPX4CP,其中X4是S或P。在一个实施方案中,铰链区具有氨基酸序列CPX4CP,其中X4是S或P。

[0092] 术语Fc区的“下铰链区”指紧靠铰链区C端的一段氨基酸残基序列,即按照Kabat的EU编号为Fc区的残基233-239。

[0093] “个体”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于饲养动物(例如牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类(例如人类和非人灵长类,如猴)、兔和啮齿类(例如小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,该个体或对象是人。

[0094] “分离的”抗体是已从其天然环境的成分分开的抗体。在一些实施方案中,将抗体纯化至通过例如电泳(例如SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或层析(例如离子交换或反相HPLC)测定的纯度大于95%或99%。用于评估抗体纯度的方法综述参见例如Flatman,S.等,J.Chromatogr.B 848(2007)79-87。

[0095] “分离的”核酸指已从其天然环境的成分分开的核酸分子。分离的核酸包括包含在通常含有该核酸分子的细胞中的核酸分子,但该核酸分子存在于染色体外或不同于其天然染色体位置的染色体位置上。

[0096] “编码抗变体(人)Fc区抗体的分离的核酸”指编码抗体重链和轻链(或其片段)的一个或多个核酸分子,包括单个载体或分开的载体中的这种(类)核酸分子,及存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的这种(类)核酸分子。

[0097] 本文所用的术语“单克隆抗体”指获自基本同质的抗体群体的抗体,即除了例如包含天然存在的突变或在产生单克隆抗体制剂期间出现的可能的变体抗体(这类变体通常以较小的量存在)外,包含该群体的单种抗体相同和/或结合相同的表位。与通常包含抗不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体抗抗原上的单个决定簇。因此,修饰词“单克隆”指抗体获自基本同质的抗体群体的特征,而不解释为需要通过任意具体方法来产生该抗体。例如,将要按照本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,其包括但不限于杂交瘤法、重组DNA法、噬菌体展示法及利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,本文描述用于制备单克隆抗体的这类方法和其他示例性方法。

[0098] “天然抗体”指天然存在的具有不同结构的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是由二硫键键合的由两条相同的轻链和两条相同的重链组成的、约150,000道尔顿的异源四聚体糖蛋白。从N端至C端,每条重链具有可变区(VH),也称为可变重链结构域或重链可变结构域,随后是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3),由此铰链区定位在第一和第二恒定结构域之间。类似地,从N端至C端,每条轻链具有可变区(VL),也称为可变轻链结构域或轻链可变

结构域,随后是恒定轻链(CL)结构域。根据其恒定结构域的氨基酸序列,可以将抗体轻链分配至称为 κ 和 λ 的两个类型之一。

[0099] 就参考多肽序列而言的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为,在比对序列并在必要时引入缺口来达到最大百分比序列同一性,而不将任意保守取代视为序列同一性的部分之后,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。可以以本领域技术之内的多种方式来达到以测定百分比氨基酸序列同一性为目的的比对,例如,使用公开可得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列全长内达到最大比对所需的任意算法。但是,为了本文的目的,用序列比较计算机程序ALIGN-2来产生%氨基酸序列同一性值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc. 编写,源代码已随用户文件提交美国版权办公室,Washington D.C., 20559,它在美国版权办公室注册在美国版权注册号TXU510087之下。ALIGN-2程序从Genentech, Inc., South San Francisco, California公开可得,或者可以从源代码编译。ALIGN-2程序应编译用在UNIX操作系统上,包括数字UNIX V4.0D。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定且不变动。

[0100] 在利用ALIGN-2来进行氨基酸序列比较的情况下,按以下计算给定氨基酸序列A与给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(备选地,其可以叙述为具有或包含与给定氨基酸序列B的某%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A):

[0101] 100乘以分数 X/Y ,

[0102] 其中X是在该程序的A和B比对中通过序列比对程序ALIGN-2评分为相同的匹配氨基酸残基的数目,且其中Y是B中氨基酸残基总数。应理解,在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A与B的%氨基酸序列同一性将不等于B与A的%氨基酸序列同一性。除非另有明确说明,本文中使用的所有%氨基酸序列同一性值都是用ALIGN-2计算机程序按前一段落中所述获得。

[0103] 除非另有说明,本文所用的术语“天然Fc区”和“野生型Fc区”指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,如灵长类(例如人类)和啮齿类(例如小鼠和大鼠))的任何天然Fc区或野生型Fc区。

[0104] 术语“变体(人)Fc区”指由于至少一个“氨基酸改变/突变”而不同于“天然”或“野生型”(人)Fc区氨基酸序列的氨基酸序列。在一个实施方案中,与天然Fc区相比,变体Fc区在天然Fc区中具有至少一个氨基酸突变,例如从约1个至约10个氨基酸突变,且在一个实施方案中为从约1个至约5个氨基酸突变。在一个实施方案中,该(变体)Fc区与野生型Fc区具有至少约80%同源性,在一个实施方案中,该变体Fc区具有至少约90%同源性,在一个实施方案中,该变体Fc区具有至少约95%同源性。

[0105] 本文报道的变体Fc区通过所包含的氨基酸改变来定义。因此,例如,术语P329G指相对于亲本(野生型)Fc区在氨基酸位置329处具有脯氨酸至甘氨酸的突变的变体Fc区。野生型氨基酸的身份可以不指定,在这种情况下前述变体称为329G。改变可以是添加、缺失或突变。术语“突变”指变为天然氨基酸以及变为非天然氨基酸(参见US 6,586,207,WO 98/48032,WO 03/073238,US 2004/0214988,WO 2005/35727,WO 2005/74524,Chin, J.W.等, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 9026-9027; Chin, J.W. 和Schultz, P.G., ChemBioChem 11 (2002) 1135-1137; Chin, J.W.等, PICAS United States of America 99 (2002) 11020-11024;

Wang, L. 和 Schultz, P. G., Chem. (2002) 1-10)。

[0106] 术语“野生型Fc区”指与见于自然界中的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。野生型Fc区包括天然人IgG1 Fc区(非A和A同种异型)、天然人IgG2 Fc区、天然人IgG3 Fc区和天然人IgG4 Fc区及其天然存在的变体。

[0107] 术语“治疗性抗体”指旨在用于人类的任何抗体制备物。优选地,这种治疗性抗体将是单克隆抗体。进一步优选的这种单克隆抗体将获自类人猿(great ape)或是人单克隆抗体。优选地,它将是人单克隆抗体。另一优选的这种治疗性单克隆抗体将是人源化单克隆抗体。

[0108] 术语“可变区”或“可变结构域”指抗体重链或轻链的涉及该抗体与抗原结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守的构架区(FR)和三个高变区(HVR)(参见例如Kindt, T. J.等Kuby Immunology, 第6版, W. H. Freeman and Co., N. Y. (2007), 91页)。单个VH或VL结构域可以足以赋予抗原结合特异性。此外,可以分别用来自结合该抗原的抗体的VH或VL结构域筛选互补VL或VH结构域的文库来分离结合特定抗原的抗体(参见例如Portolano, S.等, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T.等, Nature 352 (1991) 624-628)。

[0109] 本文所用的术语“载体”指能够扩增与它连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自主复制核酸结构的载体,以及掺入它所引入的宿主细胞基因组中的载体。某些载体能够指导与它们有效连接的核酸的表达。这类载体在本文中称为“表达载体”。

[0110] II. 组合物和方法

[0111] 在一方面,本发明部分基于这样的发现,可以提供特异性结合变体(人)Fc区而不实质性结合相应的野生型(人)Fc区的抗体。在某些实施方案中,提供特异性结合具有突变P329G或L234A、L235A、P329G或I253A、H310A、H435A的人Fc区的抗体(按照Kabat EU指数编号)。本发明的抗体用于例如测定样品中的各治疗性抗体或用于测定抗治疗性抗体的抗药抗体(ADA)。

[0112] A. 示例性抗Fc区抗体

[0113] 如之前针对食蟹猴或小鼠中的临床前研究(Stubenrauch, K.等, J. Pharm. Biomed. Anal. 52 (2010) 249-254; Moore, G. L.等, MAbs 2 (2010) 181-189; Stubenrauch, K.等, Anal. Biochem. 430 (2012) 193-199; Carrasco-Triguero, M.等, J. Immunol. Res. 2016 2618575 (2016))所述,可通过检测药物和ADA(抗药抗体)的复合物的一般或通用测定型式来改善药物耐受性。同样,通过本文报道的测定(例如hsFc γ RI-PG测定)检测药物-ADA复合物(药物=之前施用的治疗性抗体)无需标记药物抗体作为捕获或检测试剂。发现此测定设置导致药物耐受性改善。这在掺加实验中得到确认。

[0114] 药物耐受因子是可检测为阳性的阳性对照的量和样品中存在的药物的量之间的比值。对于桥连测定,确定药物耐受因子为6(在至多3 μ g/mL药物存在下可检测到500ng/mL阳性对照),而对于hsFc γ RI-PG测定,确定药物耐受因子为833(在至多25 μ g/ml药物存在下发现30ng/ml对照ADA为阳性)。

[0115] 用本文报道的测定和标准桥连测定测定了来自四名患者的临床样品中ADA发生的时程(图7)。这些数据集以示例的方式显示两种测定就药物耐受性、灵敏度和Ig同种型特异性而言的差异。

[0116] 在患者A(下表;图7A)中,两种测定都显示对桥连测定在第120小时和对hsFc γ RI-PG测定在第168小时的早期ADA阳性。两种测定在第168小时的ADA信号可比且显著,约为0.50D。样品中相应的药物水平非常低(约2ng/ml)。在下一个测量时间点(第二次给药后24小时(C2 24h)),药物水平高得多(约2430ng/mL)。这影响了桥连测定,产生低于相应分割点的大的信号下降。相反,hsFc γ RI-PG测定未受药物影响,从第168小时至C2 24小时ADA信号甚至上升。

[0117] 对于桥连测定,在其他患者样品中观察到了药物水平提高引起的相似的信号下降(参见下表)。hsFc γ RI-PG测定的信号在任何患者中都未受影响,确认了此测定的药物耐受性改善。

[0118] 表:通过常规桥连和本文报道的hsFc γ RI-PG测定评估8名患者中的ADA形成。

[0119] 每两周给药的患者

[0120]

时间点	患者 A			患者 C			患者 E			患者 F			
	hsFc γ RI-PG	桥连	药物(ng/mL)	hsFc γ RI-PG	桥连	药物(ng/mL)	hsFc γ RI-PG	桥连	药物(ng/mL)	hsFc γ RI-PG	桥连	药物(ng/mL)	
24h	-	-	6250	-	-	1620	-	-	212	-	-	2350	施用
72h	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	43	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	97	
96h	-	-	218	-	+	6	-	-	4	-	+	11	
120h	-	+	27	-	+	3	-	-	3	+	+	BLQ	
168h	+	+	2	-	+	2	-	-	2	n.d.	n.d.	n.d.	
C2 前	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	BLQ	+	+	BLQ	
C2 24h	+	-	2430	-	+	1310	-	-	545	+	+	1010	施用
C2 168h	+	+	BLQ	+	+	BLQ	+	-	BLQ	+	+	BLQ	
C3 前	+	+	BLQ	+	+	BLQ	+	-	BLQ	+	+	BLQ	

[0121] 每周给药的患者

[0122]

时间点	患者 B			患者 D			患者 G			患者 H			
	hsFc γ RI-PG	桥连	药物(ng/mL)	hsFc γ RI-PG	桥连	药物(ng/mL)	hsFc γ RI-PG	桥连	药物(ng/mL)	hsFc γ RI-PG	桥连	药物(ng/mL)	
24h	-	-	885	-	-	722	-	-	2820	-	-	1800	施用
72h	-	-	3	-	-	62	-	-	262	-	-	70	
96h	-	+	4	-	-	7	-	+	3	-	-	6	
C2 前	+	+	1	+	+	BLQ	+	+	BLQ	+	+	BLQ	
C2 24h	+	-	144	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	263	+	+	547	施用
C2 96h	+	-	BLQ	+	+	10	+	+	BLQ	+	+	BLQ	
C3 前	+	+	BLQ	-	+	1	+	+	BLQ	+	+	BLQ	
C3 24h	+	-	176	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	14	施用
C3 96h	+	-	1	-	+	8	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	BLQ	

[0123] 图7B显示患者B的时程(上表)。第96小时的初始阳性后,桥连测定在随后6个时间点显示非常低的信号,4个信号甚至低于分割点,导致这些样品的阴性归类。这可以是由于时间点C2 24h和C3 24h的药物水平升高,但甚至在药物水平低于定量限(C3前)时,样品在桥连测定中也显示低于分割点的ADA信号。

[0124] hsFc γ RI-PG测定也在C2 24h显示早期阳性。但是,此患者在整个时程中保持信号显著的阳性。这表明与桥连测定相比hsFc γ RI-PG测定灵敏度更好。患者A(上表;图7A)还显示,与桥连测定相比,hsFc γ RI-PG测定中非常晚时间点的信号高得多。一名患者在整个时程内在桥连测定中为阴性,而最后两个时间点在hsFc γ RI-PG测定中检测为阳性。

[0125] 还考虑了两种测定的不同稀释因子,在hsFc γ RI-PG测定中使用1:50稀释的样品,在桥连测定中使用1:10稀释的样品,hsFc γ RI-PG测定更灵敏,尤其是对于晚期ADA反应,甚至导致一些研究样品中ADA阳性的定性差异。

[0126] 相反,桥连测定具有比hsFc γ RI-PG测定低得多的分割点(cut point),对于早期ADA反应,桥连测定显示比hsFc γ RI-PG高的信号。对于一些患者,对于早期ADA反应,标准桥连测定显示比hsFc γ RI-PG测定早的ADA阳性和/或比hsFc γ RI-PG测定高的信号强度。这可以例如针对患者C观察到(上表;图7C)。虽然桥连测定显示所有样品从第96h起都为阳性,但hsFc γ RI-PG测定仅显示最后2个时间点为ADA阳性。由于hsFc γ RI-PG测定专一性检测IgG而不检测IgM(Fridman, W.H., FASEB J. 5 (1991) 2684-2690),通过桥连测定观察到的第一个ADA阳性峰非常可能反映IgM反应,因为IgM通常是响应最初抗原暴露而出现的的第一种抗体类别(Stewart, J.J.等, Autoimmunity 44 (2011) 294-303)。这种早期样品在桥连测定中的ADA反应更高的模式表明可以在3/8患者中观察到IgM反应。患者D(上表)尤其重要,因为它在桥连测定中显示伴随短暂进展的早期ADA反应。hsFc γ RI-PG测定仅显示具有相似的短暂进展的弱ADA阳性,显示大部分为IgM的混合IgM、IgG反应。尤其是对于具有高水平类风湿因子的患者,IgM可以是桥连ADA测定的问题,导致假阳性结果(Stubenrauch, K.等, Clin. Ther. 32 (2010) 1597-1609)。

[0127] 两种测定型式的组合允许进行关于ADA反应的解释,仅一种测定将不可能进行这种解释。

[0128] 本文报道的测定和标准桥连测定的不同在于ADA捕获和检测的原理。在桥连测定中,ADA的捕获和检测都是通过差异标记的药物分子。因此,寡聚靶标可以产生假阳性结果,且药物耐受性通常低(Bautista, A.C.等, Bioanal. 2 (2010) 721-731; Mire-Sluis, A.R.等, J. Immunol. Meth. 289 (2004) 1-16 (2004); Weeraratne, D.K.等, J. Immunol. Meth. 396 (2013) 44-55; Zhong, Z.D.等, J. Immunol. Meth. 355 (2010) 21-28)。但是,桥连测定能够检测多种Ig亚型(包括IgM)的ADA,且适用于所有类别的治疗性抗体(Mire-Sluis, A.R.等, J. Immunol. Meth. 289 (2004) 1-16 (2004); Geng, D.等, J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005) 364-375)。在hsFc γ RI-PG测定中,独立于治疗性抗体的结合区检测ADA和治疗性mAb的复合物。此测定不受寡聚靶标影响,药物耐受性比标准桥连型式中好得多。由于是基于Fc γ RI的抗体检测,该测定不识别IgG以外的Ig亚型。另外,基于Fc γ RI的测定尤其适合于在Fc区内具有PG修饰的治疗性抗体。对于此组治疗性抗体,hsFc γ RI-PG测定是通用方法,可以容易地应用。另外,对于hsFc γ RI-PG测定,无需使用标记形式的治疗性抗体(药物)。尤其是就治疗性抗体(例如多价抗体或抗体-药物缀合物)不断提高的复杂性而言,标记可以非常困难。

[0129] 总之,本文报道的测定提供了稳定和灵敏地检测抗Fc区修饰的治疗性抗体的ADA的可能性。与标准桥连测定组合,可以用它来更详细地表征免疫反应,例如通过将测定信号归类为基于IgG。

[0130] 本文报道的测定是通用方法,适用于所有治疗性抗体,例如具有Pro329Gly取代、Fc γ R结合受阻的那些。hsFc γ RI-PG测定检测药物-ADA复合物,且基于两种特异性测定试剂:(i)抗Fc区修饰(例如P329G修饰的治疗性抗体)的生物素标记抗体;和(ii)特异性检测人IgG1但不检测Fc区修饰的Ig的洋地黄毒苷(dig)标记hsFc γ RI。与常规桥连测定相比,在hsFc γ RI-PG测定中,药物耐受性和对晚期免疫反应的敏感性显著提高。由于基于hsFc γ RI的测定检测不到但常规桥连测定检测得到非IgG相关信号,两种测定的组合允许更详细和稳定地评估免疫原性,包括IgG和IgM反应的早期分化。

[0131] 本文报道的测定适用于临床和临床前测试二者。人和食蟹猴IgG的Fc区都具有高序列同源性(Jacobsen,F.W.等,J.Immunol.186(2011)341-349),基于hsFc γ RI的检测试剂已证明识别食蟹猴中抗治疗性mAb的ADA(Wessels,U.等,Bioanalysis 8(2016)2135-2145)。这一事实消除了动物和人样品分析中不同测定的需要。此外,已鉴定了除PG修饰外的另外几种修饰,这些修饰影响治疗性抗体与Fc受体和补体二者的亲和力,结果改变它们的功能特征(Moore,G.L.等,MAbs 2(2010)181-189;Richards,J.O.等,Mol.Cancer.Ther.7(2008)2517-2527;Lazar,G.A.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103(2010)4005-4010;Schlothauer,T.等,Prot.Eng.Des.Sel.29(2016)457-466)。

[0132] 本文报道的测定的原理可以转移至允许产生特异性抗体的一系列Fc区突变。

[0133] 在本文提供的实例中,在包含治疗性抗体的测定缓冲液中预孵育样品,但可在不预先掺入药物的情况下通过相同的流程同等地检测到预先存在的药物-ADA复合物。结合于药物免疫复合物中的ADA的检测似乎尤其重要,因为许多与ADA形成相关的副作用由ADA免疫复合物的形成引起(Krishna,M.和Nadler,S.G.,Front.Immunol.7(2016)21)。

[0134] 总之,常规桥连测定与本文报道的方法的组合有助于表征Fc效应子功能受抑制或改变的治疗性mAb的免疫原性特征。此方法在存在高水平可溶性寡聚靶标及临床前和临床样品中存在高药物浓度时可具有极其重要的意义。

[0135] 因此,本文报道的一个方面是用于测定(已施用药物抗体的患者的)样品中抗药抗体的存在和/或量的方法,其包括以下步骤:

[0136] -使该样品与特异性结合缺乏Fc效应子功能(通过在Fc区内引入一个或多个取代)的抗体的抗体孵育,以从该样品捕获该缺乏Fc效应子功能的抗体(包括游离和ADA复合的抗体);

[0137] -通过使所捕获的抗体与人可溶性Fc γ RI孵育来检测所捕获的抗体;

[0138] 测定该样品中抗药抗体的存在和/或量。

[0139] 在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:

[0140] -使该样品与本文报道的抗PG抗体(特异性结合在Fc区中具有P329G取代且属于人IgG1亚类的药物抗体)孵育,以从该样品捕获药物抗体(包括游离和ADA复合的药物抗体);

[0141] -通过使所捕获的抗体与人可溶性Fc γ RI孵育来检测所捕获的抗体;

[0142] 通过测定结合人可溶性Fc γ RI的存在和/或量来测定该样品中抗药抗体的存在和/或量。

[0143] 在一个实施方案中,将该抗PG抗体固定至固相。

[0144] 在一个实施方案中,该抗PG抗体包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:21的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列SEQ ID NO:22的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列SEQ ID NO:32的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列SEQ ID NO:34的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列SEQ ID NO:35的HVR-L3。

[0145] 本文报道的抗体具有以下序列:

[0146]

抗体	VH	VL	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
1.1.3	01	02	09	12	16	23	26	28
1.3.17	03	04	10	13	17	24	26	29
1.7.24	07	08	10	14	18	24	26	30
1.6.22	05	06	20	21	22	32	34	35

[0147] 在一方面,本发明提供特异性结合变体(人)Fc区的分离的抗体。

[0148] 在某些实施方案中,本文报道的抗变体(人)Fc区抗体(抗AAA抗体):

[0149] 特异性结合变体(人)Fc区上的包含氨基酸残基(A)253、(A)310和(A)435(按照Kabat EU指数编号)的表位;

[0150] 特异性结合在253、310和435位(按照Kabat EU指数编号)具有丙氨酸氨基酸残基的变体(人)Fc区;

[0151] 不(特异性)结合具有253位异亮氨酸氨基酸残基和310位组氨酸氨基酸残基和435位组氨酸氨基酸残基(按照Kabat EU指数编号)的野生型(人)Fc区;

[0152] 不(特异性)结合具有253位异亮氨酸氨基酸残基和310位组氨酸氨基酸残基和435位组氨酸氨基酸残基和329位甘氨酸氨基酸残基和234位丙氨酸氨基酸残基和235位丙氨酸氨基酸残基(按照Kabat EU指数编号)的(人)Fc区;

[0153] 不(特异性)结合具有253位异亮氨酸氨基酸残基和310位组氨酸氨基酸残基和435位组氨酸氨基酸残基和329位脯氨酸氨基酸残基和234位亮氨酸氨基酸残基和235位亮氨酸氨基酸残基(按照Kabat EU指数编号)的变体(人)Fc区。

[0154] 术语“不(特异性)结合”指在测定结合的测定中,所获得的结果没有显著不同于用不包含所讨论的抗体的样品(即空白样品或缓冲液样品)获得的结果。

[0155] 在一个具体实施方案中,该变体(人)Fc区是具有突变I253A、H310A和H435A(按照Kabat EU指数编号)的人IgG1或IgG4亚类Fc区。

[0156] 在一方面,本发明提供特异性结合在253、310和435位(按照Kabat EU指数编号)各包含氨基酸残基丙氨酸的Fc区的抗Fc区抗体,其包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:09或10的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:12、13或14的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列SEQ ID NO:16、17或18的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列SEQ ID NO:23或24的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列SEQ ID NO:26的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列SEQ ID NO:28、29或30的HVR-L3。

[0157] 在另一方面,本发明的抗体包含:(a)包含(i)含有氨基酸序列SEQ ID NO:09或10的HVR-H1、(ii)含有氨基酸序列SEQ ID NO:12、13或14的HVR-H2和(iii)含有氨基酸序列SEQ ID NO:16、17或18的HVR-H3的VH结构域;和(b)包含(i)含有氨基酸序列SEQ ID NO:23

或24的HVR-L1、(ii)含有氨基酸序列SEQ ID NO:26的HVR-L2和(iii)含有氨基酸序列SEQ ID NO:28、29或30的HVR-L3的VL结构域。

[0158] 在另一方面,本发明提供包含以下的抗体:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:09的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:12的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列SEQ ID NO:16的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列SEQ ID NO:23的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列SEQ ID NO:26的HVR-L2;和(f)含有选自SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3。

[0159] 在另一方面,本发明提供包含以下的抗体:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:10的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:13的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列SEQ ID NO:17的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列SEQ ID NO:24的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列SEQ ID NO:26的HVR-L2;和(f)含有选自SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L3。

[0160] 在另一方面,本发明提供包含以下的抗体:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:10的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:14的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列SEQ ID NO:18的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列SEQ ID NO:24的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列SEQ ID NO:26的HVR-L2;和(f)含有选自SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3。

[0161] 在某些实施方案中,在以下HVR位置取代上文提供的抗变体(人)Fc区抗体的任意一个或多个氨基酸:

[0162] -HVR-H1 (SEQ ID NO:11) 中:位置5;

[0163] -HVR-H2 (SEQ ID NO:15) 中:位置3、7、8、11、12;

[0164] -HVR-H3 (SEQ ID NO:19) 中:位置2、10;

[0165] -HVR-L1 (SEQ ID NO:25) 中:位置3、14;

[0166] -HVR-L2 (SEQ ID NO:27) 中:位置4;和

[0167] -HVR-L3 (SEQ ID NO:31) 中:位置1、6。

[0168] 在某些实施方案中,该取代是本文提供的保守取代。在某些实施方案中,任意一个或多个以下氨基酸残基(相互独立的任意一个单独或组合)可以以任意组合存在:

[0169] -HVR-H1 (SEQ ID NO:11) 中:位置5,选自氨基酸残基S、T、N和Q的中性亲水性氨基酸残基;

[0170] -HVR-H2 (SEQ ID NO:15) 中:位置3,选自氨基酸残基S、T、N、Q、D和E的中性亲水性或酸性氨基酸残基;位置7,选自氨基酸残基S、T、N、Q、H、K和R的中性亲水性或碱性氨基酸残基;位置8,选自氨基酸残基S、T、N、Q、G和P的中性亲水性氨基酸残基或影响链取向的残基;位置11,选自氨基酸残基S、T、N、Q、G、P、W、Y和F的中性亲水性或芳香族氨基酸残基或影响链取向的残基;位置12,选自氨基酸残基S、T、N、Q、G和P的中性亲水性氨基酸残基或影响链取向的残基;

[0171] -HVR-H3 (SEQ ID NO:19) 中:位置2,选自氨基酸残基M、A、V、L、I、W、Y和F的疏水性或芳香族氨基酸残基;位置10,选自氨基酸残基S、T、N、Q、W、Y和F的中性亲水性或芳香族氨基酸残基;

[0172] -HVR-L1 (SEQ ID NO:25) 中:位置3,选自氨基酸残基S、T、N和Q的中性亲水性氨基酸残基;位置14,选自氨基酸残基S、T、N、Q、D和E的中性亲水性或酸性氨基酸残基;

[0173] -HVR-L2 (SEQ ID NO:27) 中:位置4,选自氨基酸残基E、D、H、K和R的酸性或碱性氨基酸残基;和

[0174] -HVR-L3 (SEQ ID NO:31) 中:位置1,选自氨基酸残基M、A、V、L和I的疏水氨基酸残基;位置6,选自氨基酸残基S、T、N、Q、D和E的中性亲水性或酸性氨基酸残基。

[0175] SEQ ID NO:11、15、19、25、27和31的共有序列涵盖了以上取代的所有可能的组合。

[0176] 在任意以上实施方案中,抗变体(人)Fc区抗体是人源化的。在一个实施方案中,抗变体(人)Fc区抗体包含如以上实施方案的任一个中的HVR,且进一步包含受体人构架,例如人免疫球蛋白构架或人共有构架。

[0177] 在另一实施方案中,该人源化抗体包含源自SEQ ID NO:01的重链可变结构域氨基酸序列和源自SEQ ID NO:02的轻链可变结构域氨基酸序列,且该人源化抗体具有与包含氨基酸序列SEQ ID NO:01作为重链可变结构域且包含氨基酸序列SEQ ID NO:02作为轻链可变结构域的嵌合抗体或鼠抗体相同的结合特异性。

[0178] 在另一实施方案中,该人源化抗体包含源自SEQ ID NO:03的重链可变结构域氨基酸序列和源自SEQ ID NO:04的轻链可变结构域氨基酸序列,且该人源化抗体具有与包含氨基酸序列SEQ ID NO:03作为重链可变结构域且包含氨基酸序列SEQ ID NO:04作为轻链可变结构域的嵌合抗体或鼠抗体相同的结合特异性。

[0179] 在另一实施方案中,该人源化抗体包含源自SEQ ID NO:07的重链可变结构域氨基酸序列和源自SEQ ID NO:08的轻链可变结构域氨基酸序列,且该人源化抗体具有与包含氨基酸序列SEQ ID NO:07作为重链可变结构域且包含氨基酸序列SEQ ID NO:08作为轻链可变结构域的嵌合抗体或鼠抗体相同的结合特异性。

[0180] 在另一方面,抗变体(人)Fc区抗体包含与SEQ ID NO:01、03和07中任一个的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变结构域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列相对于参考序列包含取代(例如保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗变体(人)Fc区抗体保留结合变体(人)Fc区的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:01、03和07的任一个中取代、插入和/或缺失了总计1至10个氨基酸。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR的外侧区域中(即FR中)。可选地,抗变体(人)Fc区抗体包含如SEQ ID NO:01、03和07的任一个中的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0181] 在另一方面,提供抗变体(人)Fc区抗体,其中该抗体包含与SEQ ID NO:02、04和08中任一个的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列相对于参考序列包含取代(例如保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗变体(人)Fc区抗体保留结合变体(人)Fc区的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:02、04或08中取代、插入和/或缺失了总计1至10个氨基酸。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR的外侧区域中(即FR中)。可选地,抗变体(人)Fc区抗体包含SEQ ID NO:02、04或08的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0182] 在另一方面,提供抗变体(人)Fc区抗体,其中该抗体包含如上文提供的实施方案的任一个中的VH和如上文提供的实施方案的任一个中的VL。在一个实施方案中,该抗体包含:(i)分别在SEQ ID NO:01和SEQ ID NO:02中的VH和VL序列、或(ii)分别在SEQ ID NO:03和SEQ ID NO:04中的VH和VL序列、或(iii)分别在SEQ ID NO:07和SEQ ID NO:08中的VH和

VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。

[0183] 在某些实施方案中,本文报道的抗变体(人)Fc区抗体(抗PG抗体):

[0184] 特异性结合变体(人)Fc区上的包含氨基酸残基(A) 234、(A) 235和(G) 329(按照Kabat EU指数编号)的表位;

[0185] 特异性结合在234和235位具有丙氨酸氨基酸残基且在329位具有甘氨酸氨基酸残基(按照Kabat EU指数编号)的变体(人)Fc区;

[0186] 特异性结合具有234和235位丙氨酸氨基酸残基、329位甘氨酸氨基酸残基和253位异亮氨酸氨基酸残基和310位组氨酸氨基酸残基和435位组氨酸氨基酸残基(按照Kabat EU指数编号)的变体(人)Fc区;

[0187] 特异性结合具有234、235、253、310和435位丙氨酸氨基酸残基及329位甘氨酸氨基酸残基(按照Kabat EU指数编号)的变体(人)Fc区;

[0188] 不(特异性)结合具有234和235位亮氨酸氨基酸残基及329位脯氨酸氨基酸残基(按照Kabat EU指数编号)的野生型(人)Fc区;

[0189] 不(特异性)结合具有具有234和235位亮氨酸氨基酸残基、329位脯氨酸氨基酸残基和253位异亮氨酸氨基酸残基和310位组氨酸氨基酸残基和435位组氨酸氨基酸残基(按照Kabat EU指数编号)的野生型(人)Fc区;和

[0190] 不(特异性)结合具有具有234和235位亮氨酸氨基酸残基、329位脯氨酸氨基酸残基和253位丙氨酸氨基酸残基和310位丙氨酸氨基酸残基和435位丙氨酸氨基酸残基(按照Kabat EU指数编号)的变体(人)Fc区。

[0191] 由于为产生抗PG抗体而进行的免疫是用具有P329G、L234A和L235A Fc区取代的IgG1进行的,预期获得特异性结合这些氨基酸残基的抗体。令人惊奇地,独立于L234A和L235A突变的存在或缺乏,所获得的抗体特异性结合仅具有P239G突变的人IgG1和Fc区片段,而人wt-IgG1和具有突变L234A和L235A的人IgG1不结合。因此,本文报道的抗PG抗体对人IgG1 Fc区中的单个P329G突变特异。

[0192] 在一个具体实施方案中,该变体(人)Fc区是具有突变P329G(按照Kabat EU指数编号)的人IgG1或IgG4亚类Fc区。

[0193] 在一方面,本发明提供特异性结合在329位包含氨基酸残基甘氨酸(可选地在234和235位包含氨基酸残基丙氨酸)(按照Kabat EU指数编号)的Fc区的抗Fc区抗体,其包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:21的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列SEQ ID NO:22的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列SEQ ID NO:32的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列SEQ ID NO:34的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列SEQ ID NO:35的HVR-L3。

[0194] 在另一方面,本发明的抗体包含:(a)包含(i)含有氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H1、(ii)含有氨基酸序列SEQ ID NO:21的HVR-H2和(iii)含有氨基酸序列SEQ ID NO:22的HVR-H3的VH结构域;和(b)包含(i)含有氨基酸序列SEQ ID NO:32的HVR-L1、(ii)含有氨基酸序列SEQ ID NO:34的HVR-L2和(iii)含有氨基酸序列SEQ ID NO:35的HVR-L3的VL结构域。

[0195] 在另一方面,本发明提供包含以下的抗体:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:21的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列SEQ ID NO:22的

HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列SEQ ID NO:32的HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列SEQ ID NO:34的HVR-L2; 和(f) 含有氨基酸序列SEQ ID NO:35的HVR-L3。

[0196] 在某些实施方案中,在以下HVR位置取代上文提供的抗变体(人)Fc区抗体的任意一个或多个氨基酸:

[0197] -HVR-L1 (SEQ ID NO:33) 中:位置9。

[0198] 在某些实施方案中,该取代是本文提供的保守取代。在某些实施方案中,任意一个或多个以下氨基酸残基(相互独立的任意一个单独或组合)可以以任意组合存在:

[0199] -HVR-L1 (SEQ ID NO:33):位置9,选自氨基酸残基S、T、N、Q、G和P的中性亲水性氨基酸残基或影响链取向的残基。

[0200] SEQ ID NO:33的共有序列涵盖了以上取代的所有可能的组合。

[0201] 在任意以上实施方案中,抗变体(人)Fc区抗体是人源化的。在一个实施方案中,抗变体(人)Fc区抗体包含如以上实施方案的任一个中的HVR,且进一步包含受体人构架,例如人免疫球蛋白构架或人共有构架。

[0202] 在另一实施方案中,该人源化抗体包含源自SEQ ID NO:05的重链可变结构域氨基酸序列和源自SEQ ID NO:06的轻链可变结构域氨基酸序列,且该人源化抗体具有与包含氨基酸序列SEQ ID NO:05作为重链可变结构域且包含氨基酸序列SEQ ID NO:06作为轻链可变结构域的嵌合抗体或鼠抗体相同的结合特异性。

[0203] 在另一方面,抗变体(人)Fc区抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:05具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变结构域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列相对于参考序列包含取代(例如保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗变体(人)Fc区抗体保留结合变体(人)Fc区的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:05中取代、插入和/或缺失了总计1至10个氨基酸。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR的外侧区域中(即FR中)。可选地,抗变体(人)Fc区抗体包含如SEQ ID NO:05中的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0204] 在另一方面,提供抗变体(人)Fc区抗体,其中该抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:06具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列相对于参考序列包含取代(例如保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗变体(人)Fc区抗体保留结合变体(人)Fc区的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:06中取代、插入和/或缺失了总计1至10个氨基酸。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR的外侧区域中(即FR中)。可选地,抗变体(人)Fc区抗体包含SEQ ID NO:06的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0205] 在另一方面,提供抗变体(人)Fc区抗体,其中该抗体包含如上文提供的实施方案的任一个中的VH和如上文提供的实施方案的任一个中的VL。在一个实施方案中,该抗体包含SEQ ID NO:05和SEQ ID NO:06中的VH和VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。

[0206] 在本发明的另一方面,以上实施方案中任一个的抗变体(人)Fc区抗体是单克隆抗体,包括嵌合、人源化或人抗体。在一个实施方案中,抗变体(人)Fc区抗体是抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或F(ab')₂片段。在另一实施方案中,该抗体是全长抗体,例如本

文定义的人IgG1亚类或其他类别或同种型的完整抗体。

[0207] 在另一方面,以上实施方案中任一个的抗变体(人)Fc区抗体可以单个或组合并入以下章节1-4中所述的任意特征;

[0208] 1. 抗体片段

[0209] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段,及下文所述的其他片段。某些抗体片段的综述参见Hudson,P.J.等,Nat.Med.9(2003)129-134。scFv片段的综述参见例如Plueckthun,A.,In; The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,113卷,Rosenburg和Moore(编辑),Springer-Verlag,New York(1994),269-315页;还参见WO 93/16185、US5,571,894和US 5,587,458。包含补救受体结合表位残基且具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论参见US 5,869,046。

[0210] 双抗体是具有两个抗原结合部位的抗体片段,其可以是二价的或双特异性的。参见例如EP 0 404 097;WO 1993/01161;Hudson,P.J.等,Nat.Med.9(2003)129-134;及Holliger,P.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90(1993)6444-6448。三抗体和四抗体还描述于Hudson,P.J.等,Nat.Med.9(2003)129-134)中。

[0211] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis,Inc.,Waltham,MA;参见例如US 6,248,516)。

[0212] 可以通过包括但不限于本文所述的完整抗体蛋白酶解消化以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生的多种技术来制备抗体片段。

[0213] 2. 嵌合抗体和人源化抗体

[0214] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如US 4,816,567;和Morrison,S.L.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81(1984)6851-6855中。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔、或非人灵长类(如猴)的可变区)和人恒定区。在另一实例中,嵌合抗体是“类别转换”抗体,其中类别或亚类已从亲本抗体的类别或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0215] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,人源化非人抗体来降低对人类的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR,例如CDR(或其部分)源自非人抗体,FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体还将可选地包含至少部分人恒定区。在一些实施方案中,用来自非人抗体(例如从其衍生HVR残基的抗体)的相应残基取代人源化抗体中的一些FR残基,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0216] 人源化抗体和制备它们的方法综述于例如Almagro,J.C.和Fransson,J.,Front.Biosci.13(2008)1619-1633中,并进一步描述于例如Riechmann,I.等,Nature 332(1988)323-329;Queen,C.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA86(1989)10029-10033;US 5,821,337,US 7,527,791,US 6,982,321和US 7,087,409;Kashmiri,S.V.等,Methods 36(2005)25-34(描述特异性决定区(SDR)移植);Padlan,E.A.,Mol.Immunol.28(1991)489-498(描述“表面重建”);Dall'Acqua,W.F.等,Methods 36(2005)43-60(描述“FR改组”);Osbourn,J.等,Methods 36(2005)61-68;及Klimka,A.等,Br.J.Cancer 83(2000)252-260(描述FR改组

的“指导选择”方法)中。

[0217] 可以用于人源化的人构架区包括但不限于:用“最适”法选择的构架区(参见例如Sims,M.J.等,J.Immunol.151(1993)2296-2308);源自具体亚组的轻链或重链可变区的人抗体的共有序列的构架区(参见例如Carter,P.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89(1992)4285-4289;和Presta,L.G.等,J.Immunol.151(1993)2623-2632);人成熟(体细胞突变)构架区或人种系构架区(参见例如Almagro,J.C.和Fransson,J.,Front.Biosci.13(2008)1619-1633);和源自筛选FR文库的构架区(参见例如Baca,M.等,J.Biol.Chem.272(1997)10678-10684和Rosok,M.J.等,J.Biol.Chem.271(1996)922611-22618)。

[0218] 3. 多特异性抗体

[0219] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同部位具有结合特异性的单克隆抗体。在一些实施方案中,结合特异性之一是针对变体(人)Fc区,另一结合特异性是针对任意其他抗原。在某些实施方案中,双特异性抗体可以结合变体(人)Fc区的两个不同表位。双特异性抗体可以制备为全长抗体或抗体片段。

[0220] 用于制备多特异性抗体的技术包括但不限于重组共表达两个具有不同特异性的免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein,C.和Cuellar,A.C.,Nature305(1983)537-540,WO 93/08829,及Traunecker,A.等,EMBO J.10(1991)3655-3659)和“杵入臼”改造(参见例如US 5,731,168)。还可以通过以下来制备多特异性抗体:用于制备抗体Fc-异二聚体分子的工程静电引导作用(WO 2009/089004);交联两种或多种抗体或片段(参见例如US 4,676,980和Brennan,M.等,Science 229(1985)81-83);用亮氨酸拉链来产生双特异性抗体(参见例如Kostelny,S.A.等,J.Immunol.148(1992)1547-1553);使用用于制备双特异性抗体片段的“双抗体”技术(参见例如Holliger,P.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90(1993)6444-6448);使用单链Fv(sFv)二聚体(参见例如Gruber,M等,J.Immunol.152(1994)5368-5374);按例如Tutt,A.等,J.Immunol.147(1991)60-69中所述制备三特异性抗体。

[0221] 本文还包括具有三个或多个功能性抗原结合部位的改造抗体,包括“章鱼抗体”(参见例如US 2006/0025576)。

[0222] 抗体或其抗体片段还可以包括含有与变体Fc区以及另一不同抗原结合的抗原结合部位的“双重作用Fab”或“DAF”(参见例如US 2008/0069820)。

[0223] 本文的抗体或片段还包括WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792和WO 2010/145793所述的多特异性抗体。

[0224] 例如WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954、WO 2013/096291中描述了进行CH3修饰来支持异二聚化的几种方法,其在此引入作为参考。通常,在本领域已知的方法中,以互补方式改造第一重链CH3结构域和第二重链CH3结构域二者,使得包含一种改造的CH3结构域的重链不再能与另一具有相同结构的重链同二聚化(例如,CH3改造的第一重链不再能与另一CH3改造的第一重链同二聚化;CH3改造的第二重链不再能与另一CH3改造的第二重链同二聚化)。从而迫使包含一种改造的CH3结构域的重链与另一包含以互补方式改造的CH3结构域的重链异二聚化。对于此

实施方案,通过氨基酸取代以互补方式改造第一重链的CH3结构域和第二重链的CH3结构域,使得迫使第一重链和第二重链异二聚化,而第一重链和第二重链不再能够同二聚化(例如由于空间原因)。

[0225] 考虑将上文引用和包括的本领域已知用于支持重链异二聚化的不同方法作为不同选择,与上文所述的具体氨基酸取代组合,用于提供本文报道的多特异性抗体,该多特异性抗体包含特异性结合第一抗原的源自第一抗体的“非交叉Fab区”和特异性结合第二抗原的源自第二抗体的“交叉Fab区”。

[0226] 可以通过“杵入臼”技术来改变本文报道的多特异性抗体的CH3结构域,该技术以几个实例详细描述于例如WO 96/027011,Ridgway,J.B.等,Protein Eng.9(1996)617-621;及Merchant,A.M.等,Nat.Biotechnol.16(1998)677-681中。在此方法中,改变两个CH3结构域的相互作用表面来增加包含这两个CH3结构域的两条重链的异二聚化。(两条重链的)的两个CH3结构域中的每一个可以是“杵”,而另一个是“臼”。二硫键的引入进一步稳定该异二聚体(Merchant,A.M.等,Nature Biotech.16(1998)677-681;Atwell,S.等,J.Mol.Biol.270(1997)26-35),并提高产率。

[0227] 在一个优选实施方案中,本文报道的多特异性抗体在“杵链”的CH3结构域中包含T366W突变,在“臼链”的CH3结构域中包含T366S、L368A、Y407V突变(按照Kabat EU指数编号)。还可以例如通过在“杵链”CH3结构域中引入Y349C突变和在“臼链”CH3结构域中引入E356C突变来在CH3结构域间使用附加的链间二硫键(Merchant,A.M.等,Nature Biotech.16(1998)677-681)。因此,在另一优选实施方案中,本文报道的多特异性抗体在两个CH3结构域之一中包含Y349C和T366W突变,在两个CH3结构域的另一一个中包含E356C、T366S、L368A和Y407V突变,或本文报道的多特异性抗体在两个CH3结构域之一中包含Y349C和T366W突变,在两个CH3结构域的另一一个中包含S354C、T366S、L368A和Y407V突变(一个CH3结构域中的附加Y349C突变和另一个CH3结构域中的附加E356C或S354C突变形成链间二硫键)(按照Kabat EU指数编号)。

[0228] 在本文报道的所有方面和实施方案的一个实施方案中,该多特异性抗体是双特异性抗体或三特异性抗体。在一个优选实施方案中,该多特异性抗体是双特异性抗体。

[0229] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,该抗体是二价或三价抗体。在一个实施方案中,该抗体是二价抗体。

[0230] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,该多特异性抗体具有IgG类型抗体的恒定结构域结构。在本文报道的所有方面的另一实施方案中,该多特异性抗体的特征在于,该多特异性抗体属于人IgG1亚类,或具有突变L234A和L235A的人IgG1亚类。在本文报道的所有方面的另一实施方案中,该多特异性抗体的特征在于,该多特异性抗体属于人IgG2亚类。在本文报道的所有方面的另一实施方案中,该多特异性抗体的特征在于,该多特异性抗体属于人IgG3亚类。在本文报道的所有方面的另一实施方案中,该多特异性抗体的特征在于,该多特异性抗体属于人IgG4亚类,或具有附加突变S228P的人IgG4亚类。在本文报道的所有方面的另一实施方案中,该多特异性抗体的特征在于,该多特异性抗体属于人IgG1亚类或人IgG4亚类。在本文报道的所有方面的另一实施方案中,该多特异性抗体的特征在于,该多特异性抗体属于具有突变L234A和L235A的人IgG1亚类(按照Kabat EU指数编号)。在本文报道的所有方面的另一实施方案中,该多特异性抗体的特征在于,该多特异性抗体属于

具有突变L234A、L235A和P329G的人IgG1亚类(按照Kabat EU指数编号)。在本文报道的所有方面的另一实施方案中,该多特异性抗体的特征在于,该多特异性抗体属于具有突变S228P和L235E的人IgG4亚类(按照Kabat EU指数编号)。在本文报道的所有方面的另一实施方案中,该多特异性抗体的特征在于,该多特异性抗体属于具有突变S228P、L235E和P329G的人IgG4亚类(按照Kabat EU指数编号)。

[0231] 4. 抗体变体

[0232] 在某些实施方案中,考虑本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可以希望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。可以通过在编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。这类修饰包括例如从抗体的氨基酸序列缺失残基和/或在抗体的氨基酸序列内插入残基和/或取代抗体的氨基酸序列内的残基。可以进行缺失、插入和取代的任意组合来达到最终构建体,只要最终构建体具有希望得到的特征,例如抗原结合。

[0233] a) 取代、插入和缺失变体

[0234] 在某些实施方案中,提供具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。进行取代诱变的目的位点包括HVR和FR。表1中在“优选取代”的表头下显示保守取代。表1中在“示例性取代”的表头下显示更实质性的改变,如下文参考氨基酸侧链类别进一步描述。可以在目的抗体中引入氨基酸取代,并针对希望得到的活性(例如保留/改善抗原结合、降低免疫原性或改善ADCC或CDC)筛选产物。

[0235] 表1

[0236]

原残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu;Asn	Glu
Cys (C)	Ser;Ala	Ser
Gln (Q)	Asn;Glu	Asn
Glu (E)	Asp;Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val;Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr

Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;正亮氨酸	Leu

[0237] 氨基酸可以按照共同的侧链性质分组：

[0238] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0239] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0240] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0241] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0242] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0243] (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

[0244] 非保守取代将需要将这些类别之一的成员换为另一类别。

[0245] 一类取代变体涉及取代亲本抗体(例如人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,所得到的选择用于进一步研究的一种或多种变体将相对于亲本抗体具有某些生物学特性(例如提高的亲合力、降低的免疫原性)的修饰(例如改善),和/或将具有基本上保留的亲本抗体的某些生物学特性。示例性取代变体是亲合力成熟的抗体,其可以例如用基于噬菌体展示的亲合力成熟技术(如本文所述的那些)方便地产生。简言之,突变一个或多个HVR残基,将变体抗体展示在噬菌体上,并针对具体生物学活性(例如结合亲合力)进行筛选。

[0246] 可以在HVR中进行改变(例如取代),例如以改善抗体亲合力。可以在HVR“热点”(即由在体细胞成熟过程中以高频率发生突变的密码子编码的残基)(参见例如Chowdhury, P.S., Methods Mol. Biol. 207 (2008) 179-196)和/或接触抗原的残基中进行这类改变,针对结合亲合力测试所得到的变体VH或VL。通过构建二级文库并从二级文库重新选择的亲合力成熟已描述于例如Hoogenboom, H.R.等in Methods in Molecular Biology 178 (2002) 1-37中。在亲合力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如易错PCR、链改组或寡核苷酸定点诱变)中的任一种来在选择用于成熟的可变基因中引入多样性。然后产生二级文库。然后筛选该文库来鉴定具有希望得到的亲和力的任意抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定点途径,其中随机化几个HVR残基(例如每次4-6个残基)。可以例如用丙氨酸扫描诱变或模拟来明确地鉴定出涉及抗原结合的HVR残基。尤其是通常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0247] 在某些实施方案中,取代、插入或缺失可以发生在一个或多个HVR内,只要这类改变不实质性降低抗体结合抗原的能力。例如,可以在HVR中进行不实质性降低结合亲和力的保守改变(例如本文提供的保守取代)。这类改变可以例如在HVR中的抗原接触残基之外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,各HVR未改变,或包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0248] 如Cunningham, B.C.和Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085所述,用于鉴定可以靶向进行诱变的抗体残基或区域的方法称为“丙氨酸扫描诱变”。在此方法中,鉴定残基或靶残基组(例如带电荷残基,如arg、asp、his、lys和glu),并用中性或带负电荷氨基酸(例如丙氨酸或多聚丙氨酸)取代,以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在证明对最初取代的功能敏感性的氨基酸位置引入其他取代。备选地或此外,用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体和抗原之间的接触点。这类接触残基和邻近残基可以作为取代的候选残基来靶向或消除。可以筛选变体来确定它们是否包含希望得到的特性。

[0249] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基至含有一百或更多个残基的多肽的范围内的氨基端和/或羧基端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N端蛋氨酸残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N或C端与酶(例如,对于ADEPT)或增加抗体血清半衰期的多肽融合。

[0250] b) 糖基化变体

[0251] 在某些实施方案中,可以改变本文提供的抗体以提高或降低该抗体的糖基化程度。通过改变氨基酸序列,使得产生或去除一个或多个糖基化位点,可以方便地实现抗体的糖基化位点的添加或缺失。

[0252] 在抗体包含Fc区时,可以改变附着于其上的糖类。哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分枝的双触角寡糖,其一般通过N连接附着于Fc区CH2结构域的Asn297。参见例如Wright,A.和Morrison,S.L.,TIBTECH 15(1997)26-32。寡糖可以包括多种糖类,例如甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及在双触角寡糖结构的“茎”中附着于GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可以进行本发明的抗体中的寡糖的修饰来产生具有某些改善的特性的抗体变体。

[0253] 在一个实施方案中,提供在附着于(直接或间接)Fc区的糖类结构中缺乏岩藻糖的抗体变体。例如,这种抗体中岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。相对于通过例如WO 2008/077546中所述的MALDI-TOF质谱法测量的附着于Asn 297的所有糖结构(例如复合、杂合和高甘露糖结构)的总和,通过计算Asn297处的糖链内岩藻糖的平均量来测定岩藻糖的量。Asn297是指定位在Fc区中的约297位(Fc区残基的EU编号)的天冬酰胺残基;但是,由于抗体中小的序列变异,Asn297也可以定位在297位上游或下游约±3个氨基酸,即在294位和300位之间。这类岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见例如US 2003/0157108;US 2004/0093621。涉及“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺乏”的抗体变体的出版物的实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO 2005/053742;WO 2002/031140;Okazaki,A.等,J.Mol.Biol.336(2004)1239-1249;Yamane-Ohnuki,N.等,Biotech.Bioeng.87(2004)614-622。能够产生去岩藻糖基化的抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13CHO细胞(Ripka,J.等,Arch.Biochem.Biophys.249(1986)533-545;US 2003/0157108;及WO 2004/056312,尤其是在实施例11处)和敲除细胞系,如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除的CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki,N.等,Biotech.Bioeng.87(2004)614-622;Kanda,Y.等,Biotechnol.Bioeng.94(2006)680-688;WO 2003/085107)。

[0254] 还提供具有二等分寡糖的抗体变体,例如,其中附着于抗体Fc区的双触角寡糖被GlcNAc二等分。这类抗体变体可以具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。这类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878、US 6,602,684和US 2005/0123546中。还提供在附着于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。这类抗体变体可以具有改善的CDC功能。这类抗体变体描述于例如WO 1997/30087、WO 1998/58964和WO 1999/22764中。

[0255] c) Fc区变体

[0256] 在某些实施方案中,可以向本文提供的抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸修

饰,从而产生Fc区变体。Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置处含有氨基酸修饰(例如取代)的人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0257] 在某些实施方案中,本发明考虑具有一些但不是全部效应子功能的抗体变体,这使得它成为其中抗体的体内半衰期很重要但某些效应子功能(如补体和ADCC)不必要或有害的应用所希望的候选者。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定来确认CDC和/或ADCC活性的降低/减损。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定来确保抗体缺乏Fc γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch, J.V. 和 Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492 的第464页的表3中。评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例描述于US 5,500,362(参见例如Hellstrom, I.等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 7059-7063; 和Hellstrom, I.等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1499-1502); US 5,821,337(参见Bruggemann, M.等, *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361)中。备选地,可以利用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA); 和 CytoTox96®非放射性细胞毒性测定(Promega, Madison, WI))。用于这类测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地或此外,可以在体内,例如在诸如公开于Clynes, R.等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 652-656中的动物模型的动物模型中评估目的分子的ADCC活性。还可以进行C1q结合测定来确认抗体不能结合C1q,并因此缺乏CDC活性。(参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA)。为了评估补体活化,可以进行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro, H.等, *J. Immunol. Methods* 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S.等, *Blood* 101 (2003) 1045-1052; 及Cragg, M.S. 和 M.J. Glennie, *Blood* 103 (2004) 2738-2743)。还可以用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定(参见例如Petkova, S.B.等, *Int. Immunol.* 18 (2006: 1759-1769)。

[0258] 具有减少的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个的取代的那些(US 6,737,056)。这类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或多个处具有取代的Fc突变体,包括具有残基265和297至丙氨酸的取代的所谓“DANA”Fc突变体(US 7,332,581)。

[0259] 描述了某些具有改善或减少的FcR结合的抗体变体(参见例如US 6,737,056; WO 2004/056312; 及Shields, R.L.等, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604)。

[0260] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有一个或多个改善ADCC的氨基酸取代(例如Fc区298、333和/或334位(残基的EU编号)的取代)的Fc区。

[0261] 在一些实施方案中,例如,如US 6,194,551、WO 99/51642和Idusogie, E.E.等, *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184中所述,在Fc区中进行改变,该改变导致改变(即改善或减少)的C1q结合和/或依赖补体的细胞毒性(CDC)。

[0262] 具有增加的半衰期和改善的新生儿Fc受体(FcRn)结合的抗体描述于US 2005/0014934中,新生儿Fc受体负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer, R.L.等, *J. Immunol.* 117 (1976) 587-593和Kim, J.K.等, *J. Immunol.* 24 (1994) 2429-2434)。那些抗体包含其中具有一个或多个取代的Fc区,该取代改善Fc区与FcRn的结合。这类Fc变体包括在Fc区残基238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、

424或434中的一个或多个处具有取代的那些,例如,Fc区残基434的取代(US 7,371,826)。

[0263] 关于Fc区变体的其他实例,还参见Duncan,A.R.和Winter,G.,Nature322(1988) 738-740;US 5,648,260;US 5,624,821;及WO 94/29351。

[0264] 在所有方面的一个实施方案中,该抗体包含(所有位置按照Kabat的EU指数)以下,前提是该抗体不结合/不能结合自身:

[0265] i) 可选地具有突变P329G、L234A和L235A的人IgG1亚类的同二聚体Fc区;或

[0266] ii) 可选地具有突变P329G、S228P和L235E的人IgG4亚类的同二聚体Fc区;或

[0267] iii) 可选地具有突变P329G、L234A、L235A、I253A、H310A和H435A或可选地具有突变P329G、L234A、L235A、H310A、H433A和Y436A的人IgG1亚类的同二聚体Fc区;或

[0268] iv) 异二聚体Fc区,其中

[0269] a) 一条Fc区多肽包含突变T366W,另一条Fc区多肽包含突变T366S、L368A和Y407V;或

[0270] b) 一条Fc区多肽包含突变T366W和Y349C,另一条Fc区多肽包含突变T366S、L368A、Y407V和S354C;或

[0271] c) 一条Fc区多肽包含突变T366W和S354C,另一条Fc区多肽包含突变T366S、L368A、Y407V和Y349C;

[0272] 或

[0273] v) 人IgG1亚类的异二聚体Fc区,其中两条Fc区多肽都包含突变P329G、L234A和L235A,且

[0274] a) 一条Fc区多肽包含突变T366W,另一条Fc区多肽包含突变T366S、L368A和Y407V;或

[0275] b) 一条Fc区多肽包含突变T366W和Y349C,另一条Fc区多肽包含突变T366S、L368A、Y407V和S354C;或

[0276] c) 一条Fc区多肽包含突变T366W和S354C,另一条Fc区多肽包含突变T366S、L368A、Y407V和Y349C;

[0277] 或

[0278] vi) 人IgG4亚类的异二聚体Fc区,其中两条Fc区多肽都包含突变P329G、S228P和L235E,且

[0279] a) 一条Fc区多肽包含突变T366W,另一条Fc区多肽包含突变T366S、L368A和Y407V;或

[0280] b) 一条Fc区多肽包含突变T366W和Y349C,另一条Fc区多肽包含突变T366S、L368A、Y407V和S354C;或

[0281] c) 一条Fc区多肽包含突变T366W和S354C,另一条Fc区多肽包含突变T366S、L368A、Y407V和Y349C;

[0282] 或

[0283] vii) i)、ii)和iii)之一与vi)、v)和vi)之一的组合。

[0284] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,包含含有本文指定的CH3结构域的重链的抗体包含附加的C端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,按照Kabat EU指数编号)。在本文报道的所有方面的一个实施方案中,包含含有本文指定的CH3结构域的重链的抗体包含

附加的C端甘氨酸残基(G446,按照Kabat EU指数编号)。

[0285] 在一个实施方案中,本文报道的抗体的特征在于属于具有突变PVA236、L234A/L235A和/或GLPSS331(按照Kabat EU指数编号)的人IgG1亚类,或属于IgG4亚类。在另一实施方案中,该抗体的特征在于属于在E233、L234、L235、G236、D270、N297、E318、K320、K322、A327、A330、P331和/或P329(按照Kabat EU指数编号)中包含至少一个突变的任意IgG类别,在一个实施方案中为IgG1或IgG4。在另一实施方案中,IgG4亚类抗体包含突变S228P或突变S228P和L235E(Angal, S.等, Mol. Immunol. 30 (1993) 105-108)(按照Kabat EU指数编号)。

[0286] 本文报道的抗体的重链C端可以是以氨基酸残基PGK结束的完整C端。重链C端可以是缩短的C端,其中去除了一个或两个C端氨基酸残基。在一个优选实施方案中,重链C端是以PG结束的缩短的C端。

[0287] d) 半胱氨酸改造的抗体变体

[0288] 在某些实施方案中,可以希望产生半胱氨酸改造的抗体,例如“thioMAb”,其中用半胱氨酸残基取代抗体的一个或多个残基。在具体实施方案中,取代的残基存在于抗体的可接近部位。通过用半胱氨酸取代那些残基,从而将反应性巯基放置在抗体的可接近部位,并可以用于将抗体缀合至其他部分,如药物部分或接头-药物部分,以产生本文进一步描述的免疫缀合物。在某些实施方案中,可以用半胱氨酸取代以下残基中的任意一个或多个:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);及重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸改造的抗体可以按例如US 7,521,541中所述产生。

[0289] e) 抗体衍生物

[0290] 在某些实施方案中,可以进一步修饰本文提供的抗体以包含本领域已知且易于得到的附加非蛋白质部分。适合用于衍生化抗体的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(同聚物或随机共聚物)、葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、propylene glycol同聚物、polypropylene oxide/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛可以在制备中具有优势。聚合物可以具有任意分子量,且可以分枝或不分枝。附着于抗体的聚合物的数目可以不同,且如果附着超过一个聚合物,则它们可以是相同或不同的分子。一般而言,可以根据包括但不限于抗体要改善的具体特性或功能、抗体衍生物是否将在确定的条件下用于治疗等的考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型。

[0291] 在另一实施方案中,提供抗体和可通过暴露于照射来选择性加热的非蛋白质部分的缀合物。在一个实施方案中,该非蛋白质部分是碳纳米管(Kam, N.W.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605)。照射可以具有任意波长,且包括但不限于这样的波长,该波长不损害普通细胞,但加热非蛋白质部分至杀死靠近抗体-非蛋白质部分的细胞的温度。

[0292] B. 重组方法和组合物

[0293] 抗体可以用例如US 4,816,567中所述的重组方法和组合物产生。在一个实施方案中,提供编码本文所述抗变体(人)Fc区抗体的分离的核酸。这种核酸可以编码含有抗体VL的氨基酸序列和/或含有抗体VH的氨基酸序列(例如抗体轻链和/或重链)。在另一实施方案

中,提供一个或多个包含这种核酸的载体(例如表达载体)。在另一实施方案中,提供包含这种核酸的宿主细胞。在一个这种实施方案中,宿主细胞包含以下(例如已用以下转化):(1)包含编码含有抗体VL的氨基酸序列和含有抗体VH的氨基酸序列的核酸的载体;或(2)包含编码含有抗体VL的氨基酸序列的核酸的第一载体,和包含编码含有抗体VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,该宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供制备抗变体(人)Fc区抗体的方法,其中该方法包括在适于表达抗体的条件下培养上文提供的含有编码抗体的核酸的宿主细胞,并可选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0294] 为了重组产生抗变体(人)Fc区抗体,分离例如上文所述的编码抗体的核酸,并插入一个或多个载体用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。这种核酸可以用常规方法(例如通过使用能够特异性结合编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序。

[0295] 适合用于克隆或表达编码抗体的载体的宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,尤其是在不需要糖基化和Fc效应子功能时,可以在细菌中产生抗体。抗体片段和多肽在细菌中的表达参见例如US 5,648,237、US 5,789,199和US 5,840,523。(还参见Charlton,K.A.,In:Methods in Molecular Biology,248卷,Lo,B.K.C.(编辑),Humana Press,Totowa,NJ(2003),245-254页,其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达)。表达后,可以从可溶性级分中的细菌细胞糊分离抗体,并可以进一步纯化。

[0296] 除原核生物外,诸如丝状真菌或酵母的真核微生物也是编码抗体的载体的适宜的克隆或表达宿主,包括糖基化途径已“人源化”,导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体的真菌和酵母菌株。参见Gerngross,T.U.,Nat.Biotech.22(2004)1409-1414;和Li,H.等,Nat.Biotech.24(2006)210-215。

[0297] 适合用于表达糖基化抗体的宿主细胞还源自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已鉴定了许多可以与昆虫细胞结合使用,尤其是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞的杆状病毒毒株。

[0298] 植物细胞培养物也可以用作宿主。参见例如US 5,959,177、US6,040,498、US 6,420,548、US 7,125,978和US 6,417,429(描述用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0299] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如,可以使用适应悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7);人胚肾细胞系(描述于例如Graham,F.L.等,J.Gen Virol.36(1977)59-74中的293或293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(描述于例如Mather,J.P.,Biol.Reprod.23(1980)243-252中的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);buffalo大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);描述于例如Mather,J.P.等,Annals N.Y.Acad.Sci.383(1982)44-68中的TRI细胞;MRC 5细胞;及FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub,G.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77(1980)4216-4220);及骨髓瘤细胞系,如Y0、NS0和Sp2/0。适合用于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述参见例如Yazaki,P.和Wu,A.M.,Methods in Molecular Biology,248卷,Lo,B.K.C.(编

辑), Humana Press, Totowa, NJ (2004), 255-268页。

[0300] C. 测定

[0301] 本文提供的抗变体(人)F区抗体可以用于本领域已知的多种测定。

[0302] 如果治疗性抗体在Fc区中包含该突变或必须检测例如样品中抗这类治疗性抗体的抗药抗体,则本文报道的抗体尤其有用。

[0303] 在一个实施方案中,该治疗性抗体包含:

[0304] i) 突变P329G或P329G、L234A和L235A;和/或

[0305] ii) 突变I253A、H310A和H435A。

[0306] 在一个实施方案中,包含该突变的抗体是包含以下的抗体:

[0307] i) 突变P329G或P329G、L234A和L235A;和/或

[0308] ii) 突变I253A、H310A和H435A。

[0309] 本文报道的一个方面是本文报道的抗体在(抗原桥连)免疫测定中作为捕获抗体或作为示踪抗体的用途,用于测定(样品中)在Fc区中包含该突变的治疗性抗体(即在Fc区中包含该突变的抗体)。检测或捕获所需的该其他试剂分别可以是该治疗性抗体的任意抗原、特异性结合该治疗性抗体或与之缀合但不干扰所使用的抗体结合(即两种抗体可以同时结合该治疗性抗体)的部分的第二抗体、该治疗性抗体的抗特应型抗体、或人Fc γ 受体I或其Fc区结合片段,其已相应地衍生化、固定化或标记。

[0310] 如果将本文报道的抗体用作示踪抗体,则此测定适用于任何非人血清。在一个实施方案中,该用途是用于测定非人实验动物的血清样品。

[0311] 如果将本文报道的抗体用作捕获抗体,则此测定适用于任何血清(包括人血清)。

[0312] 这种测定在10%食蟹猴血清(测定浓度)中具有低于100pg/ml例如40-80pg/ml的定量下限。

[0313] 本文报道的一个方面是本文报道的一种或多种抗体在抗原桥连免疫测定中作为捕获抗体和作为示踪抗体的用途,用于测定(样品中)在Fc区中包含该突变的治疗性抗体。

[0314] 此测定适用于任何血清(包括人血清)。在一个优选实施方案中,用本文报道的两种不同抗体作为捕获抗体和示踪抗体。

[0315] 本文报道的一个方面是本文报道的抗体在抗原桥连免疫测定中作为校准标准品的用途。

[0316] 本文报道的一个方面是本文报道的抗体在免疫测定中的用途,用于测定(样品中)抗治疗性抗体的抗药抗体,由此该治疗性抗体在Fc区中包含该突变。

[0317] 如果将本文报道的抗体用作捕获抗体,则此测定适用于任何血清(包括人血清)。

[0318] 本文报道的一个方面是用于检测(样品中)在Fc区包含该突变的人IgG1或IgG4亚类的治疗性抗体,其包括以下步骤:

[0319] a) 可选地提供待分析样品;

[0320] b) 使该样品与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;

[0321] c) 可选地使该样品与用于选择性检测该治疗性抗体的试剂孵育;和

[0322] d) 使(b)或(c)中形成的复合物与该治疗性抗体的存在相关,从而检测该治疗性抗体。

[0323] 在一个实施方案中,将本文报道的抗体用作捕获抗体。在一个实施方案中,将该捕

获抗体固定至固体表面。在一个实施方案中,此固体表面是多孔板的孔(的壁或底)。因此,在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:

[0324] a) 使该样品与固定在固体表面上的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育,以形成包含该治疗性抗体的固定化复合物;

[0325] b) 可选地洗涤该固体表面(以去除未结合的物质);

[0326] c) 使该固定化复合物与选择性结合该治疗性抗体的检测试剂孵育;

[0327] 从而检测样品中的该治疗性抗体。

[0328] 在一个实施方案中,将本文报道的抗体用作示踪抗体。为了捕获,在一个实施方案中,将适宜的捕获试剂固定至固体表面。在一个实施方案中,此固体表面是多孔板的孔(的壁或底)。因此,在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:

[0329] a) 使该样品与固定在固体表面的捕获试剂孵育,以形成包含该治疗性抗体的固定化复合物;

[0330] b) 可选地洗涤该固体表面(以去除未结合的物质);

[0331] c) 使该固定化复合物与缀合可检测标记的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育,以形成进一步的复合物;

[0332] d) 使c)中形成的复合物与选择性结合该可检测标记的检测试剂孵育;

[0333] 从而检测样品中的该治疗性抗体。

[0334] 本文报道的一个方面是用于用包含捕获抗体和示踪抗体的抗原桥连免疫测定测定样品中在Fc区含有该突变的人IgG1或IgG4亚类治疗性抗体的方法,其特征在于,该捕获抗体和该示踪抗体二者都独立地选自本文报道的抗体或其Fc区结合片段。

[0335] 在一个实施方案中,该样品获自选自狨猴和绢毛猴、旧大陆猴、侏儒狐猴和鼠狐猴、长臂猿和小猿猴、美狐猴科成员及其杂交种的实验动物或获自人。在一个实施方案中,该样品获自猕猴、或狨猴、或狒狒猴、或食蟹猴、或人。在一个实施方案中,该实验动物是猕猴。在一个实施方案中,该样品获自食蟹猴或猕猴或人。

[0336] 本文报道的一个方面是特异性结合在Fc区中包含该突变的人IgG1或IgG4亚类治疗性抗体的本文报道的抗体或其Fc区结合片段在测定(样品中)的总、活性、ADA结合或抗原结合治疗性抗体浓度中的用途。

[0337] 本文报道的一个方面是包含本文报道的抗体和/或其Fc区结合片段的混合物的抗体组合物。

[0338] 本文报道的一个方面是本文报道的抗体组合物在本文报道的方法中的用途。

[0339] 在一个实施方案中,该免疫测定是夹心免疫测定。在另一实施方案中,通过经抗体氨基酸主链的N端和/或 ϵ 氨基(赖氨酸)、不同赖氨酸的 ϵ 氨基、羧基、巯基、羟基和/或酚官能团和/或抗体糖结构的糖醇基团的化学结合来进行抗体与其缀合配偶体的缀合。在一个实施方案中,该捕获抗体通过特异性结合对固定。在一个实施方案中,该捕获抗体与生物素缀合,并通过固定化的亲和素或链霉抗生物素蛋白固定。在一个实施方案中,该示踪抗体通过特异性结合对与可检测标记缀合。在一个实施方案中,该示踪抗体与洋地黄毒苷缀合,并通过抗洋地黄毒苷的抗体进行与可检测标记的连接。在一个实施方案中,该治疗性抗体是人抗体或人源化抗体。在一个实施方案中,该人抗体或人源化抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中,检测总治疗性抗体,在另一实施方案中,检测活性治疗性抗体,在另一实施方案中,

检测与其抗原结合的治疗性抗体。

[0340] 本文报道的一个方面是检测(样品中)治疗性抗体的方法,其包括步骤:

[0341] a) 使样品与固定在固体表面的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育,以形成复合物;

[0342] b) 使该样品与适合用于选择性检测总、活性或抗原结合治疗性抗体的试剂孵育;和

[0343] c) 使(b)中形成的复合物与(样品中)该治疗性抗体的浓度相关;

[0344] 从而检测该治疗性抗体。

[0345] 本文报道的一个方面是用于测定(样品中)抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体(即在Fc区中包含该突变的抗体)的抗药抗体的存在的抗药抗体免疫测定,其包括以下顺序的以下步骤:

[0346] a) 使包含哺乳动物血清的样品与固定在固体表面的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育,以形成复合物;

[0347] b) 使a)的复合物与全长人Fc γ 受体I或其Fc区结合片段孵育,使得该样品中存在的抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体的抗药抗体和人Fc γ 受体I或其Fc区结合片段间形成复合物,由此该全长人Fc γ 受体I或其Fc区结合片段与可检测标记缀合;和

[0348] c) 通过该可检测标记测定前一步骤中形成的复合物。

[0349] 本文报道的一个方面是用于测定(样品中)抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体(即在Fc区中包含该突变的抗体)的抗药抗体的存在的抗药抗体免疫测定,其包括以下顺序的以下步骤:

[0350] a) 使包含哺乳动物血清的样品与固定在固体表面的全长人Fc γ 受体I或其Fc区结合片段孵育,以形成复合物;

[0351] b) 使a)的复合物与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育,使得该样品中存在的抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体的抗药抗体和本文报道的抗体间形成复合物,由此本文报道的抗体与可检测标记缀合;和

[0352] c) 通过该可检测标记测定前一步骤中形成的复合物。

[0353] 本文报道的一个方面是用于测定(样品中)抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体(即在Fc区中包含该突变的抗体)的抗药抗体的存在的抗药抗体免疫测定,其包括以下顺序的以下步骤:

[0354] a) 使固定了Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体的固相与包含哺乳动物血清的样品孵育(使得形成固相结合的药物抗体-抗药抗体复合物);

[0355] b) 使该固相(步骤a)中形成的药物抗体-抗药抗体复合物与之结合)与缀合可检测标记的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;和

[0356] c) 通过测定该可检测标记的存在来测定步骤b)中的固相结合复合物的形成,由此测定样品中抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体的抗药抗体的存在。

[0357] 本文报道的一个方面是用于测定样品中抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体的抗药抗体的存在的抗药抗体免疫测定,其包括以下顺序的以下步骤:

[0358] a) 使固定了Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体的FAB的固相与包含哺乳动物血清的样品孵育(使得形成固相结合FAB-抗药抗体复合物);

[0359] b) 使该固相(步骤a)中形成的FAB-抗药抗体复合物与之结合)与缀合可检测标记的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;和

[0360] c) 通过测定该可检测标记的存在来测定步骤b)中的固相结合复合物的形成,从而测定样品中抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体的抗药抗体的存在。

[0361] 本文报道的一个方面是用于测定(样品中)抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体(即在Fc区中包含该突变的抗体)的抗药抗体的存在的抗药抗体免疫测定,其包括以下顺序的以下步骤:

[0362] a) 向该样品加入(过量)药物抗体(以将存在于该样品中的(任何)抗药抗体转移在药物抗体-抗药物抗体复合物中),其中样品包含哺乳动物血清;

[0363] b) 使固定了Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体特异性结合的抗原的固相与步骤a)中获得的样品孵育(使得形成固相结合的抗原-药物抗体-抗药抗体复合物);

[0364] c) 使该固相(结合了步骤b)中形成的抗原-药物抗体-抗药抗体复合物)与缀合可检测标记的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;和

[0365] d) 通过测定该可检测标记的存在来测定步骤c)中的固相结合复合物的形成,从而测定样品中抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体的抗药抗体的存在。

[0366] 本文报道的一个方面是用于测定(样品中)抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体(即在Fc区中包含该突变的抗体)的抗药抗体的存在的抗药抗体免疫测定,其包括以下顺序的以下步骤:

[0367] a) 向该样品加入(过量)药物抗体(以将存在于该样品中的(任何)抗药抗体转移在药物抗体-抗药物抗体复合物中),其中样品包含哺乳动物血清;

[0368] b) 使固定了本文报道的抗体或其Fc区结合片段的固相与步骤a)中获得的样品孵育(使得形成固相结合的Fc区抗体-药物抗体-抗药抗体复合物);

[0369] c) 使该固相(结合了步骤b)中形成的Fc区抗体-药物抗体-抗药抗体复合物)与该药物抗体的抗原孵育,由此该抗原与可检测标记缀合;和

[0370] d) 通过测定该可检测标记的存在来测定步骤c)中的固相结合复合物的形成,从而测定样品中抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体的抗药抗体的存在。

[0371] 本文报道的一个方面是用于测定(样品中)抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体(即在Fc区中包含该突变的抗体)的抗药抗体的存在的抗药抗体免疫测定,其包括以下顺序的以下步骤:

[0372] a) 向该样品加入(过量)药物抗体(以将存在于该样品中的(任何)抗药抗体转移在药物抗体-抗药物抗体复合物中),其中样品包含哺乳动物血清;

[0373] b) 使固定了抗该药物抗体的抗药抗体的固相与步骤a)中获得的样品孵育(使得形成固相结合的抗药抗体-药物抗体-抗药抗体复合物);

[0374] c) 使该固相(结合了步骤b)中形成的抗药抗体-药物抗体-抗药抗体复合物)与缀合可检测标记的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;和

[0375] d) 通过测定该可检测标记的存在来测定步骤c)中的固相结合复合物的形成,从而测定样品中抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体的抗药抗体的存在。

[0376] 本文报道的一个方面是用于测定(样品中)抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体(即在Fc区中包含该突变的抗体)的抗药抗体的存在的方法,其包括以下顺序的以下

步骤:

[0377] -使包含哺乳动物血清的样品与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育,使得该样品中存在的抗Fc区结合受抑制的人或人源化药物抗体的抗药抗体和本文报道的抗体或其Fc区结合片段间形成复合物,由此本文报道的抗体或其Fc区结合片段与可检测标记缀合;和

[0378] -通过该可检测标记测定前一步骤中形成的复合物。

[0379] 本文报道的一个方面是本文报道的抗体在(抗原桥连)免疫测定中作为捕获抗体的用途,用于测定(样品中)与抗药抗体复合的在Fc区中包含该突变的的治疗性抗体(即在Fc区中包含该突变的抗体)。检测该复合物所需的该其他试剂分别可以是人Fc γ 受体I或其Fc区结合片段,其已相应地衍生化、固定化或标记。

[0380] 如果将本文报道的抗体用作捕获抗体,则此测定适用于任何人和非人血清。在一个实施方案中,该用途是用于非人实验动物的血清样品中的测定。

[0381] 这种测定在10%食蟹猴血清(测定浓度)中具有低于100pg/ml例如40-80pg/ml的定量下限。

[0382] 本文报道的一个方面是本文报道的抗体或其Fc区结合片段的用途,用于测定包含哺乳动物血清的样品中抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体(即在Fc区中包含该突变的抗体)的抗药抗体的存在或量。

[0383] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,每个孵育步骤后进行以下步骤:

[0384] -洗涤该固相,以去除未结合的化合物。

[0385] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,该测定用于测定(样品中)抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体(即在Fc区中包含该突变的抗体)的抗药抗体的存在或量,且包含以下作为最终步骤:

[0386] -通过测定该可检测标记的存在来测定前一步骤中的固相结合复合物的形成,通过用标准曲线使所测定的标记的量与抗药抗体的量相关来测定样品中抗Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体的抗药抗体的量。

[0387] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,该Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体属于人IgG1或IgG4亚类。

[0388] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,该Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体属于人IgG1亚类,且在两条Fc区多肽中都具有突变L234A、L235A和P329G,或者该Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体属于人IgG4亚类,且在两条Fc区多肽中都具有突变S228P、L235E和P329G,或者该Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体属于人IgG1亚类,且在两条Fc区多肽中都具有突变I253A、H310A、H435A和P329G,或者该Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体属于人IgG4亚类,且在两条Fc区多肽中都具有突变I253A、H310A、H435A和P329G(按照Kabat的EU编号系统编号)。

[0389] 在所有方面的一个实施方案中,该Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体是双特异性抗体、或三特异性抗体、或四特异性抗体、或五特异性抗体、或六特异性抗体。在一个实施方案中,该Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体是双特异性抗体。

[0390] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,该哺乳动物血清是人血清或食蟹猴血清或小鼠血清。

[0391] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,该哺乳动物血清获自己施用该Fc受体结合受抑制的人或人源化药物抗体的哺乳动物。在一个实施方案中,该样品在第一次对该哺乳动物施用该抗体后至少2天获得。

[0392] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,抗效应子功能受抑制的人或人源化药物抗体的抗药抗体属于IgG类别。

[0393] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,用酶联颜色反应、表面等离子共振、电化学发光或放射免疫测定来测定该标记的存在和/或量。

[0394] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,该免疫测定和/或该方法和/或该用途是体外免疫测定和/或体外方法和/或体外用途。

[0395] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,该固相与结合对的第一成员缀合,待固定在该固相上的化合物与结合对的第二成员缀合。

[0396] 在一个实施方案中,这种结合对(第一成员/第二成员)选自链霉抗生物素蛋白或亲和素/生物素、抗体/抗原(参见例如Hermanson,G.T等,Bioconjugate Techniques, Academic Press (1996))、凝集素/多糖、类固醇/类固醇结合蛋白、激素/激素受体、酶/底物、IgG/蛋白A和/或G等。

[0397] 在一个实施方案中,该第二结合配偶体通过特异性结合对结合(固定)。在一个实施方案中,这种结合对(第一成分/第二成分)选自链霉抗生物素蛋白或亲和素/生物素、抗体/抗原(参见例如Hermanson,G.T等,Bioconjugate Techniques, Academic Press (1996))、凝集素/多糖、类固醇/类固醇结合蛋白、激素/激素受体、酶/底物、IgG/蛋白A和/或G等。在一个实施方案中,该第二结合配偶体与生物素缀合,通过固定化亲和素或链霉抗生物素蛋白进行固定化。

[0398] 在一个优选实施方案中,结合对的第一成员是链霉抗生物素蛋白,结合对的第二成员是生物素。

[0399] 在一个实施方案中,该固相与链霉抗生物素蛋白缀合,待固定在该固相上的化合物是生物素化的。

[0400] 在一个实施方案中,该固相是链霉抗生物素蛋白包被的顺磁小球或链霉抗生物素蛋白包被的琼脂糖小球或链霉抗生物素蛋白包被的多孔板的孔。

[0401] 在一个实施方案中,待缀合至该固相的化合物是包含与生物素缀合的位点不同从而随后固定在该固相表面的至少两种化合物的混合物。

[0402] 在一个实施方案中,待固定在该固相表面的化合物通过经多肽氨基酸主链的N端和/或 ϵ 氨基(赖氨酸)、不同赖氨酸的 ϵ 氨基、羧基、巯基、羟基和/或酚官能团和/或多肽糖结构的糖醇基团的化学结合与该结合对的第二成员缀合。

[0403] 这种经不同氨基的缀合可以通过在第一个步骤中用化学保护剂酰化(例如通过柠康酰化)一部分 ϵ 氨基来进行。在第二个步骤中,通过剩余氨基进行缀合。随后,去除柠康酰化,通过剩余游离氨基将结合配偶体固定在该固相上,即所获得的结合配偶体是通过未得到柠康酰化保护的氨基固定在该固相上。适宜的化学保护剂在未得到保护的侧链胺处形成键,与N端处的那些键相比较不稳定和不同。许多这类化学保护剂是已知的(参见例如EP 0 651 761)。在一个实施方案中,该化学保护剂包括环二羧酸酐,如马来酸或柠康酸酐。

[0404] 本文报道的一个方面是用于(免疫)测定(样品中)多特异性结合剂的量的方法,其

包括以下步骤：

[0405] -通过使以下二者间形成的复合物与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育来测定该复合物的量：

[0406] i) 特异性结合该多特异性结合剂的第一结合特异性的抗特应型抗体；和

[0407] ii) 该多特异性结合剂；

[0408] 从而测定样品中该多特异性结合剂的量。

[0409] 在一个实施方案中，特异性结合该多特异性结合剂的第一结合特异性的抗特应型抗体与固相缀合。

[0410] 在一个实施方案中，本文报道的抗体或其Fc区结合片段与可检测标记缀合。

[0411] 在一个实施方案中，该样品包含(人)血清或(人)血浆、和/或是细胞裂解物、和/或包含该多特异性结合剂的一种或多种抗原。在一个实施方案中，该样品是(人)血清或(人)血浆。

[0412] 在一个实施方案中，该多特异性结合剂选自抗体、包含抗体或抗体片段和非抗体多肽的融合多肽、包含抗体或抗体片段和可溶性受体的融合多肽、或包含抗体或抗体片段和肽结合分子的融合多肽。

[0413] 在一个实施方案中，该多特异性结合剂是抗体。在一个实施方案中，该抗体是双特异性抗体、或三特异性抗体、或四特异性抗体、或五特异性抗体、或六特异性抗体。在一个实施方案中，该抗体是双特异性抗体。

[0414] 在一个实施方案中，该结合特异性是结合部位或一对抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域。

[0415] 在一个实施方案中，特异性结合该多特异性结合剂的第一结合特异性的抗特应型抗体生物素化，该固相用链霉抗生物素蛋白包被。在一个实施方案中，该固相是链霉抗生物素蛋白包被的顺磁小球或链霉抗生物素蛋白包被的琼脂糖小球。

[0416] 在一个实施方案中，本文报道的抗体或其Fc区结合片段是洋地黄毒苷化的。

[0417] 在一个实施方案中，该方法包括步骤：

[0418] -通过测定所形成的复合物中的可检测标记来测定以下三者间形成的复合物的量：

[0419] i) 本文报道的抗体或其Fc区结合片段；

[0420] ii) 该多特异性结合剂；和

[0421] iii) 特异性结合该多特异性结合剂的结合特异性且包含可检测标记的抗特应型抗体。

[0422] 在一个实施方案中，通过经该药物抗体氨基酸主链的N端和/或 ϵ 氨基(赖氨酸)、不同赖氨酸的 ϵ 氨基、羧基、巯基、羟基和/或酚官能团和/或药物抗体糖结构的糖醇基团的化学结合进行该抗特应型抗体与其缀合配偶体的缀合。

[0423] 在一个实施方案中，该抗特应型抗体是包含通过至少两个不同氨基与固相缀合的抗特应型抗体的混合物。这种经不同氨基的偶联可以通过在第一个步骤中用化学保护剂酰化(例如通过柠康酰化)一部分 ϵ 氨基来进行。在第二个步骤中，通过剩余氨基进行缀合。随后，去除柠康酰化，通过剩余游离氨基将抗体缀合至该固相，即所获得的抗体是通过未得到柠康酰化保护的氨基缀合至该固相。适宜的化学保护剂在未得到保护的侧链胺处形成键，

与N端处的那些键相比较不稳定和不同。许多这类化学保护剂是已知的(参见例如EP 0 651 761)。在一个实施方案中,该化学保护剂包括环二羧酸酐,如马来酸或柠康酸酐。

[0424] 在一个实施方案中,本文报道的抗体或其Fc区结合片段通过特异性结合对缀合(固定)。在一个实施方案中,这种结合对(第一成分/第二成分)选自链霉抗生物素蛋白或亲和素/生物素、抗体/抗原(参见例如Hermanson,G.T等,Bioconjugate Techniques, Academic Press (1996))、凝集素/多糖、类固醇/类固醇结合蛋白、激素/激素受体、酶/底物、IgG/蛋白A和/或G等。在一个实施方案中,该抗特应型抗体与生物素缀合,通过固定化亲和素或链霉抗生物素蛋白进行固定化。

[0425] 本文报道的一个方面是用于测定(样品中)双特异性抗体的(第一)抗原的存在和/或量的体外方法,由此该双特异性抗体的第一结合特异性可以特异性结合待测检测的抗原,由此该抗原与该双特异性抗体复合(抗原-双特异性抗体复合物),其包括步骤:

[0426] -使包含该抗原和该双特异性抗体的样品与缀合至固相的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育。

[0427] 在一个实施方案中,该方法包括步骤:

[0428] -使包含该抗原和该双特异性抗体的样品与缀合至固相的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;和

[0429] -检测抗原-双特异性抗体-抗Fc区抗体的复合物,从而测定双特异性抗体的抗原的存在和/或量。

[0430] 在一个实施方案中,该方法包括步骤:

[0431] -使包含该抗原和该双特异性抗体的样品与缀合至固相的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;和

[0432] -使第一个步骤中形成的复合物与在不同于该双特异性抗体所结合的表位的表位处特异性结合该抗原的抗体孵育,从而测定样品中双特异性抗体的抗原的存在和/或量。

[0433] 在一个实施方案中,该方法用于测定与双特异性抗体复合的该双特异性抗体的抗原的存在和/或量。

[0434] 在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:

[0435] -提供包含该抗原和该双特异性抗体的样品,其中该双特异性抗体复合至少90%的该抗原;

[0436] -使包含该抗原和该双特异性抗体的样品与缀合至固相的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;和

[0437] -使第一个步骤中形成的复合物与在不同于该双特异性抗体所结合的表位的表位处特异性结合该抗原的抗体孵育,从而测定样品中双特异性抗体的抗原的存在和/或量。

[0438] 在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:

[0439] -使包含该抗原和该双特异性抗体的样品与一定量的该双特异性抗体孵育以提供样品,其中该双特异性抗体复合至少90%的该抗原;

[0440] -使包含该双特异性抗体复合的抗原的样品与缀合至固相的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;和

[0441] -使前一个步骤中形成的复合物与在不同于该双特异性抗体所结合的表位的表位处特异性结合该抗原的抗体孵育,从而测定样品中双特异性抗体的抗原的存在和/或量。

[0442] 在一个实施方案中,该双特异性抗体复合至少95%的该抗原。在一个实施方案中,该双特异性抗体复合至少98%的该抗原。

[0443] 本文报道的一个方面是用于测定(样品中)双特异性抗体的抗体结合(第一)抗原的量的方法,由此该双特异性抗体的第一结合特异性可以特异性结合该抗原,其包括步骤:

[0444] -使包含该抗原和该双特异性抗体的样品的第一试样与一定量的该双特异性抗体孵育以提供样品,其中该双特异性抗体复合至少90%的该抗原;

[0445] -使包含该双特异性抗体复合的抗原的样品与缀合至固相的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;和

[0446] -使前一个步骤中形成的复合物与在不同于该双特异性抗体所结合的表位的表位处特异性结合该抗原的抗体孵育,从而测定样品中双特异性抗体的抗原的存在和/或量,从而测定样品中存在的抗原的总量;

[0447] -使包含该抗原和该双特异性抗体的样品的第二试样与缀合至固相的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;和

[0448] -使所形成的复合物与在不同于该双特异性抗体所结合的表位的表位处特异性结合该抗原的抗体孵育,从而测定样品中存在的双特异性抗体的游离抗原的量;和

[0449] -通过样品中存在的抗原总量和样品中存在的游离抗原量的差值来确定双特异性抗体的抗体结合抗原的量。

[0450] 本文报道的一个方面是用于体外测定多特异性结合剂的第一结合特异性可以特异性结合的结合配偶体(抗原、靶标、分析物)的存在和/或量的方法,其中在检测该结合配偶体之前通过使该样品与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育来排除结合于样品中存在的多特异性结合剂的结合配偶体部分。

[0451] 在一个实施方案中,待检测的结合配偶体是非复合结合配偶体或游离结合配偶体。

[0452] 本文报道的一个方面是用测定多特异性结合剂的(第一)结合配偶体的存在和/或量的体外方法,由此该多特异性结合剂的第一结合特异性可以特异性结合该结合配偶体,其包括步骤:

[0453] -使包含(第一)结合配偶体和多特异性结合剂的样品与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育。

[0454] 在一个实施方案中,该方法包括步骤:

[0455] -使包含(第一)结合配偶体和多特异性结合剂的样品与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;和

[0456] -测定该多特异性结合剂排除的样品中该(游离的第一)结合配偶体的量。

[0457] 在一个实施方案中,该方法包括步骤:

[0458] -使包含(第一)结合配偶体和多特异性结合剂的样品与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;

[0459] -在测定游离结合配偶体的存在或量之前从该样品排除Fc区抗体-多特异性结合剂复合物;和

[0460] -测定该多特异性结合剂排除的样品中该(第一)结合配偶体的量。

[0461] 通过与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育,从该样品去除/排除了该多特异

性结合剂。同时,还从该样品去除了(第一)结合配偶体-多特异性结合剂复合物。

[0462] 在一个实施方案中,该多特异性结合剂选自抗体、包含抗体或抗体片段和非抗体多肽的融合多肽、包含抗体或抗体片段和可溶性受体的融合多肽、或包含抗体或抗体片段和肽结合分子的融合多肽。

[0463] 在一个实施方案中,该多特异性结合剂是抗体。在一个实施方案中,该抗体是双特异性抗体、或三特异性抗体、或四特异性抗体、或五特异性抗体、或六特异性抗体。在一个实施方案中,该抗体是双特异性抗体。

[0464] 在一个实施方案中,该结合特异性是结合部位或一对抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域。

[0465] 在一个实施方案中,将本文报道的抗体或其Fc区结合片段缀合至固相。

[0466] 在一个实施方案中,该第二结合配偶体生物素化,该固相用链霉抗生物素蛋白包被。在一个实施方案中,该固相是链霉抗生物素蛋白包被的顺磁小球或链霉抗生物素蛋白包被的琼脂糖小球。

[0467] 本文报道的一个方面是用免疫测定免疫学测定样品中多特异性结合剂的结合配偶体的存在和/或量的方法,其中在测定该结合配偶体之前通过与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育并去除所形成的复合物来从该样品排除该多特异性结合剂。

[0468] 在本文报道的所有各方面的一个实施方案中,该结合配偶体是游离结合配偶体,即该多特异性结合剂未结合或复合的结合配偶体。

[0469] 在一个实施方案中,本文报道的抗体或其Fc区结合片段是生物素化的第二结合配偶体,且通过链霉抗生物素蛋白缀合至固相。

[0470] 在本文报道的方法的一个实施方案中,本文报道的抗体或其Fc区结合片段是包含与固相缀合的位点不同的至少两种本文报道的抗体或其Fc区结合片段的混合物。在一个实施方案中,该位点是本文报道的抗体或其Fc区结合片段的氨基酸序列的氨基酸位置。

[0471] 在一个实施方案中,该第一结合配偶体是多肽。

[0472] 在一个实施方案中,该第二结合配偶体是多肽。

[0473] 在一个实施方案中,通过经该多肽氨基酸主链的N端和/或 ϵ 氨基(赖氨酸)、不同赖氨酸的 ϵ 氨基、羧基、巯基、羟基和/或酚官能团和/或该多肽糖结构的糖醇基团的化学结合进行该缀合。

[0474] 经不同氨基的偶联可以通过在第一个步骤中用化学保护剂酰化(例如通过柠康酰化)一部分 ϵ 氨基来进行。在第二个步骤中,通过剩余氨基进行缀合。随后,去除柠康酰化,通过剩余游离氨基将结合配偶体缀合至固相,即所获得的结合配偶体是通过未得到柠康酰化保护的氨基缀合至固相。适宜的化学保护剂在未得到保护的侧链胺处形成键,与N端处的那些键相比较不稳定和不同。许多这类化学保护剂是已知的(参见例如EP 0 651 761)。在一个实施方案中,该化学保护剂包括环二羧酸酐,如马来酸或柠康酸酐。

[0475] 在一个实施方案中,本文报道的抗体或其Fc区结合片段通过被动吸附缀合至固相。例如Butler, J.E., in "Solid Phases in Immunoassay" (1996) 205-225和Diamandis, E.P.和Christopoulos, T.K. (编辑), in "Immunoassay" (1996) Academic Press (San Diego) 描述了被动吸附。

[0476] 在一个实施方案中,本文报道的抗体或其Fc区结合片段通过特异性结合对缀合

(固定)。在一个实施方案中,这种结合对(第一成分/第二成分)选自链霉抗生物素蛋白或亲和素/生物素、抗体/抗原(参见例如Hermanson,G.T等,Bioconjugate Techniques, Academic Press (1996))、凝集素/多糖、类固醇/类固醇结合蛋白、激素/激素受体、酶/底物、IgG/蛋白A和/或G等。在一个实施方案中,该第二结合配偶体与生物素缀合,通过固定化亲和素或链霉抗生物素蛋白进行固定化。

[0477] 在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:

[0478] -使多特异性抗体排除的样品与特异性结合(第一)抗原的捕获抗体孵育,以形成捕获抗体-(第一)抗原复合物;和

[0479] -使所形成的捕获抗体-(第一)抗原复合物与样品中(第一)抗原的量相关。

[0480] 在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:

[0481] -使多特异性抗体排除的样品与特异性结合(第一)抗原的捕获抗体孵育,以形成捕获抗体-(第一)抗原复合物;

[0482] -使捕获抗体-(第一)抗原复合物与示踪抗体孵育,由此该捕获抗体和该示踪抗体结合(第一)抗原上的非重叠表位;和

[0483] -使所形成的捕获抗体-(第一)抗原-示踪抗体复合物与样品中抗原的量相关。

[0484] 在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:

[0485] -使多特异性抗体排除的样品与特异性结合(第一)抗原的捕获抗体孵育,以形成捕获抗体-(第一)抗原复合物;

[0486] -使捕获抗体-(第一)抗原复合物与示踪抗体孵育,由此该捕获抗体和该示踪抗体结合(第一)抗原上的非重叠表位;

[0487] -使捕获抗体-(第一)抗原-示踪抗体复合物与包含可检测标记的检测抗体孵育,由此该检测抗体在示踪抗体可变结构域外侧的表位处特异性结合示踪抗体;和

[0488] -使所形成的捕获抗体-(第一)抗原-示踪抗体复合物与样品中(第一)抗原的量相关。

[0489] 在一个实施方案中,该多特异性抗体是具有特异性结合第一抗原或抗原上的第一表位的第一结合特异性和特异性结合第二抗原或抗原上的第二表位的第二结合特异性的双特异性抗体。

[0490] 在一个实施方案中,该第一抗原和该第二抗原是同一抗原,该第一结合特异性结合抗原上的第一表位,该第二结合特异性结合抗原上的第二表位,由此该第二表位和该第一表位是非重叠表位,该第一结合特异性不干扰该第二结合特异性的结合。

[0491] 在一个实施方案中,该方法包括步骤:

[0492] -在测定(第一)抗原的存在或量之前从样品排除所形成的复合物。

[0493] 本文报道的一个方面是用于测定(样品中)多特异性抗体的(第一)抗原的存在和/或量的体外方法,由此该多特异性抗体的第一结合特异性可以特异性结合待检测的抗原,其包括步骤:

[0494] -使包含该(第一)抗原的样品与双特异性抗体和本文报道的抗体或其Fc区结合片段的复合物孵育。

[0495] 在一个实施方案中,该第二抗原是标记的第二抗原。在一个实施方案中,本文报道的抗体或其Fc区结合片段通过特异性结合对固定至固相。在一个实施方案中,该特异性结

合对是生物素和链霉抗生物素蛋白。

[0496] 在一个实施方案中,该方法包括以下作为第二步骤:

[0497] -使第一个步骤中形成的复合物与在不同于该双特异性抗体所结合的表位的表位处特异性结合该第一抗原的抗体孵育。

[0498] 本文报道的一个方面是用于测定(样品中)与双特异性抗体复合的双特异性抗体的(第一)抗原(第一抗原-双特异性抗体复合物)的存在和/或量的体外方法,由此该双特异性抗体的第一结合特异性可以特异性结合待检测的抗原,其包括步骤:

[0499] -使包含该(第一)抗原和该双特异性抗体的样品与缀合至固相的本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育。

[0500] 在一个实施方案中,该方法包括以下作为第二步骤:

[0501] -使第一个步骤中形成的复合物与在不同于该双特异性抗体所结合的表位的表位处特异性结合该第一抗原的抗体孵育,从而测定样品中与双特异性抗体复合的双特异性抗体的(第一)抗原(第一抗原-双特异性抗体复合物)的量。

[0502] 在一个实施方案中,该方法包括步骤:

[0503] -在测定该(第一)抗原的存在或量之前从该样品排除所形成的复合物。

[0504] 本文报道的一个方面是用于测定(样品中)多特异性抗体的抗原的存在和/或量的体外方法,由此该多特异性抗体的第一结合特异性可以特异性结合待检测的抗原,其包括步骤:

[0505] -使包含该多特异性抗体、多特异性抗体结合抗原和游离抗原的样品与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育。

[0506] 在一个实施方案中,该方法包括步骤:

[0507] -使包含抗原和多特异性抗体的样品与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;
和

[0508] -测定多特异性抗体排除的样品中该抗原的量。

[0509] 在一个实施方案中,该方法包括步骤:

[0510] -使包含抗原和多特异性抗体的样品与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;

[0511] -在测定游离抗原的存在或量之前从该样品排除抗Fc区抗体-多特异性抗体复合物;和

[0512] -测定多特异性抗体排除的样品中该抗原的量。

[0513] 在一个实施方案中,该样品包含多特异性抗体、游离抗原和多特异性抗体-抗原复合物,该检测是检测该多特异性抗体的游离抗原。

[0514] 在一个实施方案中,将本文报道的抗体或其Fc区结合片段缀合至顺磁小球。

[0515] 在一个实施方案中,将本文报道的抗体或其Fc区结合片段缀合至固相。

[0516] 在一个实施方案中,本文报道的抗体或其Fc区结合片段生物素化,固相用链霉抗生物素蛋白包被。在一个实施方案中,该固相是链霉抗生物素蛋白包被的顺磁小球或链霉抗生物素蛋白包被的琼脂糖小球。

[0517] 在一个实施方案中,该结合特异性是结合部位。在一个实施方案中,该结合部位是一对抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域。

[0518] 在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:

- [0519] -使包含该多特异性抗体、多特异性抗体结合抗原和游离抗原的样品与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育;和
- [0520] -从该样品去除抗Fc区抗体-多特异性抗体复合物。
- [0521] 在一个实施方案中,该抗Fc区抗体-多特异性抗体复合物是抗Fc区抗体-多特异性抗体复合物和抗Fc区抗体-多特异性抗体-抗原复合物的混合物。
- [0522] 在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:
- [0523] -使包含抗原和多特异性抗体的样品与本文报道的抗体或其Fc区结合片段孵育,以形成抗Fc区抗体-多特异性抗体复合物;
- [0524] -从该样品去除抗Fc区抗体-多特异性抗体复合物;和
- [0525] -测定该多特异性抗体排除的样品中该抗原的量。
- [0526] 在一个实施方案中,该抗原的量的测定包括以下步骤:
- [0527] -使多特异性抗体排除的样品与特异性结合该抗原的捕获抗体孵育,以形成捕获抗体-抗原复合物;和
- [0528] -使所形成的抗体-抗原复合物与样品中抗原的量相关。
- [0529] 在一个实施方案中,该抗原的量的测定包括以下步骤:
- [0530] -使多特异性抗体排除的样品与特异性结合该抗原的捕获抗体孵育,以形成捕获抗体-抗原复合物;
- [0531] -使该捕获抗体-抗原复合物与示踪抗体孵育,由此该捕获抗体和该示踪抗体结合该抗原上的非重叠表位;和
- [0532] -使所形成的捕获抗体-抗原-示踪抗体复合物与样品中抗原的量相关。
- [0533] 在一个实施方案中,该抗原的量的测定包括以下步骤:
- [0534] -使多特异性抗体排除的样品与特异性结合该抗原的捕获抗体孵育,以形成捕获抗体-抗原复合物;
- [0535] -使该捕获抗体-抗原复合物与示踪抗体孵育,由此该捕获抗体和该示踪抗体结合该抗原上的非重叠表位;
- [0536] -使该捕获抗体-抗原-示踪抗体复合物与包含可检测标记的检测抗体孵育,由此该检测抗体在该示踪抗体的可变结构域外侧的表位处特异性结合该示踪抗体;和
- [0537] -使所形成的捕获抗体-抗原-示踪抗体复合物与样品中抗原的量相关。
- [0538] 在一个实施方案中,该多特异性抗体是具有特异性结合第一抗原或抗原上的第一表位的第一结合特异性和特异性结合第二抗原或抗原上的第二表位的第二结合特异性的双特异性抗体。
- [0539] 本文报道的一个方面是本文报道的抗体或其Fc区结合片段在从样品排除结合于多特异性抗体的第二结合特异性的抗原中的用途。
- [0540] 术语“治疗性抗体”指为获批作为人治疗剂而在临床研究中测试或测试过且可以为了治疗疾病而对个体施用的抗体。在一个实施方案中,该治疗性抗体是单克隆抗体。在另一实施方案中,该治疗性抗体获自大猿或用人抗体基因座转化的动物,或是人单克隆抗体,或是人源化单克隆抗体。在一个实施方案中,该治疗性抗体是人单克隆抗体。在一个实施方案中,该治疗性抗体是人源化单克隆抗体。治疗性抗体广泛用于治疗多种疾病,如肿瘤学疾病(例如血液和实体恶性肿瘤,包括非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌和结直肠癌)、免疫学疾病、中

枢神经疾病、血管疾病或感染性疾病。这类抗体有例如抗CD19、CD20、CD22、HLA-DR、CD33、CD52、EGFR、G250、GD3、HER2、PSMA、CD56、VEGF、VEGF2、CEA、Levis Y抗原、IL-6受体(IL6R)或IGF-1受体(IGF1R)的抗体。

[0541] 术语“表位”指能够特异性结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常包含分子的化学活性表面分组,如氨基酸或糖侧链,表位通常具有特异的三维结构特征,以及特异的电荷特征。构象和非构象表位的不同在于,与前者而不是后者的结合在变性溶剂存在下丧失。

[0542] 例如Hage,D.S. (Anal.Chem.71 (1999) 294R-304R) 描述了不同免疫测定的原理。Lu,B.等 (Analyst 121 (1996) 29R-32R) 报道了用于免疫测定的抗体定向固定化。例如Wilchek,M.和Bayer,E.A., in Methods Enzymol.184 (1990) 467-469报道了亲和素-生物素介导的免疫测定。

[0543] 多肽和单克隆抗体及其恒定结构域包含许多用于与结合对成员(如多肽/蛋白质、聚合物(例如PEG、纤维素或聚苯乙烯)、或酶)缀合的反应性氨基酸侧链。氨基酸的化学反应性基团有例如氨基(赖氨酸、 α -氨基)、巯基(胱氨酸、半胱氨酸和甲硫氨酸)、羧基(天冬氨酸、谷氨酸)和糖醇基团。例如Aslam M.和Dent,A., in “Bioconjugation”, MacMillan Ref.Ltd.1999, 50-100页描述了这类方法。

[0544] 多肽和抗体最常见的反应性基团之一是氨基酸赖氨酸的脂肪族 ϵ -胺。通常,几乎所有多肽和抗体都包含丰富的赖氨酸。赖氨酸胺在pH 8.0以上是非常好的亲核试剂($pK_a=9.18$),因此容易和干净地与多种试剂反应形成稳定键。胺反应性试剂主要与蛋白质的赖氨酸和 α -氨基反应。反应性酯尤其是N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯是最常用于修饰胺基的试剂。在水性环境中反应的最适pH为pH 8.0至9.0。异硫氰酸酯是胺修饰试剂,与蛋白质形成硫脲键。它们在水溶液(最好在pH 9.0至9.5)中与蛋白质胺反应。醛在温和水性条件下与脂肪族和芳香族胺、肼和酰肼反应形成亚胺中间体(希夫碱)。希夫碱可以用温和或强还原剂(如硼氢化钠或氰基硼氢化钠)还原来衍生稳定的烷基胺键。用于修饰胺的其他试剂有酸酐。例如,二亚乙基三胺五乙酸酐(DTPA)是包含两个胺反应性酐基团的双功能螯合剂。它可以与氨基酸的N端和 ϵ -胺基反应形成酰胺连接。酐环打开产生能够在配位络合物中与金属紧密结合的多价、金属螯合臂。

[0545] 多肽和抗体中另一种常见的反应性基团是来自含硫氨基酸胱氨酸及其还原产物半胱氨酸(或半个胱氨酸)的巯基。半胱氨酸包含游离巯基,其比胺更亲核,通常是蛋白质中反应性最强的官能团。巯基通常在中性pH具有反应性,因此可在胺存在下与选择性地与其他分子偶联。由于游离巯基相对更具反应性,含有这些基团的蛋白质常以它们作为二巯基或二硫键的氧化形式随之存在。在这类蛋白质中,需要用诸如二硫苏糖醇(DTT)的试剂还原二硫键来产生反应性游离巯基。巯基反应性试剂是将与多肽上的巯基偶联形成硫醚偶联产物的那些。这些试剂在弱酸至中性pH下快速反应,因此可在胺基存在下选择性反应。文献报道了用几种硫醇化交联试剂(如Traut's试剂(2-亚胺基硫烷)、乙酸琥珀酰亚胺酯(乙酰硫)(SATA)和6-[3-(2-吡啶基二硫)丙酰胺基]己酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-LC-SPDP))来提供通过反应性氨基引入多个巯基的有效方式。卤乙酰衍生物例如碘乙酰胺形成硫醚键,也是用于巯基修饰的试剂。其他有用的试剂有马来酰亚胺。马来酰亚胺与巯基反应性试剂的反应与碘乙酰胺基本相同。马来酰亚胺在弱酸性至中性pH快速反应。

[0546] 多肽和抗体中另一种常见的反应性基团是羧酸。多肽和抗体在C端位置处及天冬

氨酸和谷氨酸的侧链内包含羧酸基团。羧酸在水中相对低的反应性使得难以用这些基团来选择性修饰多肽和抗体。在进行这种修饰时,通常通过使用水溶性碳二亚胺来将羧酸基团转化为反应性酯,并与亲核试剂如胺、酰肼或肼反应。含胺试剂应为弱碱性,以在碱性更高的赖氨酸 ϵ -胺存在下与活化羧酸选择性反应形成稳定的酰胺键。在pH提高至8.0以上时可发生蛋白质交联。

[0547] 可以用高碘酸钠来将附着于抗体的糖部分内的糖的醇部分氧化为醛。每个醛基可以按针对羧酸所述与胺、酰肼或肼反应。由于糖部分主要见于抗体的可结晶片段(Fc)区,可以通过远离抗原结合部位的糖的位点定向修饰来达到缀合。形成希夫碱中间体,其可以通过用氰基硼氢化钠(温和和选择性)或硼氢化钠(强)水溶性还原剂还原中间体来还原为烷基胺。

[0548] 术语“样品”包括但不限于来自活物或以前的活物的任意量的物质。这类活物包括但不限于人类、小鼠、猴、大鼠、兔和其他动物。在一个实施方案中,该样品获自猴,尤其是食蟹猴、或兔、或小鼠、或大鼠、或人。在一个实施方案中,这类物质包括但不限于来自个体的全血或血清,其是临床常规最广泛使用的样品来源。

[0549] 术语“固相”指非流体物质,包括从诸如聚合物、金属(顺磁、铁磁颗粒)、玻璃和陶瓷的材料制成的颗粒(包括微粒和小球);凝胶物质,如硅石、矾土和聚合物凝胶;可由聚合物、金属、玻璃和/或陶瓷制成的毛细管;沸石和其他多孔物质;电极;微量滴定板;固体条;及杯、管或其他分光计样品容器。固相成分与惰性固体表面的不同在于,“固相”在其表面包含至少一个旨在与样品中的物质相互作用的部分。固相可以是固定成分,如管、条、杯或微量滴定板,或者可以是非固定成分,如小球和微粒。可以使用允许非共价或共价附着蛋白质和其他物质的多种微粒。这种颗粒包括聚合物颗粒,如聚苯乙烯和聚(甲基丙烯酸甲酯);金颗粒,如金纳米颗粒和金胶体;陶瓷颗粒,如硅石、玻璃;及金属氧化物颗粒。参见例如Martin,C.R.等,*Analytical Chemistry-News&Features*,70(1998)322A-327A或Butler,J.E.,*Methods* 22(2000)4-23。

[0550] 在一个实施方案中,可检测标记选自色原(荧光或发光基团和染料)、酶、NMR活性基团、金属颗粒或半抗原,如洋地黄毒苷。可检测标记也可以是光活化交联基团,例如叠氮基或氮杂环丙烯(azirine)基团。在一个实施方案中,可通过电化学发光检测的金属螯合物也是信号发射基团,尤其优选钆螯合物,例如钆(联吡啶) 3^{2+} 螯合物。例如EP 0 580 979、WO 90/05301、WO 90/11511和WO 92/14138中描述了适宜的钆标记基团。

[0551] 一些用于本文报道的免疫测定和方法的化合物与许多结合对缀合。在一个实施方案中,通过经化合物氨基酸主链的N端和/或 ϵ 氨基(赖氨酸)、不同赖氨酸的 ϵ 氨基、羧基、巯基、羟基和/或酚官能团和/或化合物糖结构的糖醇基团的化学结合进行缀合。在一个实施方案中,所缀合的化合物是与结合对成员缀合的至少两种化合物的混合物,其中混合物中的该至少两种化合物与结合对成员缀合的位点不同。例如,该混合物可以包含经氨基酸主链的氨基酸的缀合和经糖的糖醇基团的缀合。另外,例如,该混合物可以包含经氨基酸主链的不同氨基酸残基与结合对成员缀合的化合物。表述“不同氨基酸残基”指两种不同类别的氨基酸,例如赖氨酸和天冬氨酸,或酪氨酸和谷氨酸,或因其化合物氨基酸序列中的位置而不同的氨基酸主链的两个氨基酸残基。在后一种情况下,该氨基酸可以属于相同类别或不同类别。表述“位点不同”指位点类型的不同,例如氨基酸或糖醇基团,或例如化合物与结

合对成员缀合的氨基酸主链氨基酸数目的不同。

[0552] 术语“抗特应型抗体”指这样的抗体，其特异性结合诸如亲本抗体的结合部位的结合特异性，尤其是针对例如抗亲本抗体的抗原结合部位。在一个实施方案中，抗特应型抗体特异性结合亲本抗体的一个或多个CDR。在一个实施方案中，亲本抗体是治疗性抗体。在一个实施方案中，亲本抗体是多特异性抗体。在一个实施方案中，亲本抗体是双特异性抗体。

[0553] 术语“总”治疗性抗体指检测到的任何抗体，无论该抗体是活性的（即仍与其抗原反应）、无活性的、和/或抗原结合的。

[0554] 术语“活性”治疗性抗体指存在于实验动物中的仍能够结合其抗原的治疗性抗体。这类抗体例如尚未在其抗原结合部位结合其抗原或任何其他分子。

[0555] 术语“抗原结合的”治疗性抗体用来指存在于实验动物循环中的结合于其抗原的治疗性抗体。

[0556] 上文定义的总、活性或抗原结合治疗性抗体可以在本发明的方法中直接检测。

[0557] 此外，还可能间接评估任何“无活性”治疗性抗体。这类无活性治疗性抗体可以是例如结合于其抗原的治疗性抗体、结合于交叉反应性抗原的治疗性抗体、或抗治疗性抗体的自身抗体阻断的治疗性抗体。如技术人员将理解，可能借助本公开来评估无活性抗体部分。在总抗体量超过活性抗体和抗原结合抗体的总和的情况下，将存在另一包含未结合于其相应抗原的无活性抗体的抗体部分。

[0558] 在一个优选实施方案中，在夹心型免疫测定中检测总治疗性抗体，其中在这种夹心测定的两侧都使用本文报道的抗体或其Fc区结合片段。在这种夹心一侧使用的抗体结合于或能够结合固相（常称为捕获抗体），而在这种夹心另一侧使用的抗体以这种方式标记，使得便于直接或间接检测（所谓的检测抗体）。这种夹心测定方法中结合的检测抗体的量与所研究的样品中治疗性抗体的量直接相关。

[0559] 在本领域中（例如US 2003/0068664），已知允许检测活性治疗性抗体的测定系统。这类系统需要抗原与固相结合，治疗性抗体与此结合抗原结合，通过与固相结合的抗原来检测所结合的治疗性抗体。

[0560] 样品中活性治疗性抗体的检测可以通过方便的现有技术方法来达到。但是，总治疗性抗体或结合于其抗原的治疗性抗体部分的检测非常复杂，需要非常不同的测定设置，尤其需要为每种不同测定定制试剂。使用本文报道的抗体，可能在相互类似的测试系统中评估活性治疗性抗体、总治疗性抗体、或抗原结合治疗性抗体部分。就其本质而言，在治疗性抗体的这些多种部分间进行定量比较时，这种总、活性或抗原结合治疗性抗体的比较评估应具有巨大优势。

[0561] （也）可以设置夹心型测定型式来检测活性治疗性抗体。在一个优选实施方案中，用本文报道的抗体或其Fc区结合片段作为捕获抗体，这种夹心测定的检测一侧利用标记形式的抗原或在抗原结合后利用不与治疗性抗体识别的表位结合或竞争的第二抗体，其中该第二抗体可特异性检测和/或以这样的方式标记，使得便于直接或间接检测。

[0562] 抗原结合治疗性抗体也优选以夹心型测定型式检测，优选本文报道的抗体或其Fc区结合片段作为捕获试剂。在该检测中，优选使用在不与治疗性抗体的表位竞争的表位处结合该抗原的第二抗体。该第二抗体优选以这样的方式标记，使得便于直接或间接检测。

[0563] 对于直接检测，标记基团可以选自任何已知的可检测标记基团，如染料，发光标记

基团,如化学发光基团,例如吡啶酯或二氧杂环丁烷,或荧光染料,例如荧光素、香豆素、罗丹明、噁嗪、试卤灵、花青及其衍生物。标记基团的其他实例有发光金属络合物,如钆或铈络合物,例如用于ELISA或用于CEDIA(克隆酶供体免疫测定,例如EP-A-0 061 888)的酶,及放射性同位素。

[0564] 间接检测系统包括例如检测试剂,例如用bioaffine结合对的第一配偶体标记检测抗体。适宜的结合对的实例有半抗原或抗原/抗体,生物素或生物素类似物如氨基生物素、亚氨基生物素或脱硫生物素/亲和素或链霉抗生物素蛋白,糖/凝集素,核酸或核酸类似物/互补核酸,及受体/配体,例如类固醇激素受体/类固醇激素。优选的第一结合对成员包括半抗原、抗原和激素。尤其优选的是半抗原,如地高辛和生物素及其类似物。通常例如通过上文提到的标记来标记这种结合对的第二配偶体(例如抗体、链霉抗生物素蛋白等),以允许直接检测。

[0565] 免疫测定为技术人员公知。相关教科书中总结了用于进行这类测定的方法以及实际应用和流程。相关教科书的实例有Tijssen,P.,Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates(in:"Practice and theory of enzyme immunoassays"(1990),221-278页,Eds.R.H.Burdon和v.P.H.Knippenberg,Elsevier,Amsterdam)及"Methods in Enzymology"(Eds.S.P.Colowick,N.O.Caplan,Academic Press)关于免疫学检测方法的多个卷,尤其是卷70、73、74、84、92和121。

[0566] 在所有以上免疫学检测方法中,选择允许所利用的试剂结合,例如允许抗体与其相应抗原结合的试剂条件。技术人员通过使用术语复合物来引用这种结合事件的结果。通过现有技术方法使本发明的测定方法中形成的复合物与该治疗性抗体的相应浓度相关。取决于所利用的检测试剂,此相关步骤将得到总、活性或抗原结合治疗性抗体的浓度。

[0567] 如技术人员将理解,本发明的方法不仅将揭示总、抗原结合、活性或甚至无活性治疗性抗体的浓度。由于优选在不同测定中使用一种且相同的试剂(本文报道的抗体或其Fc区结合片段),所获得的值可以容易地相互比较,甚至评估其比值。在另一优选实施方案中,本发明涉及活性治疗性抗体与总治疗性抗体的比值。此比值可以很好地作为治疗性抗体的功效指针。

[0568] D. 用于诊断和检测的方法和组合物

[0569] 在某些实施方案中,本文提供的任意抗变体(人)Fc区抗体都可用于检测生物样品中包含具有突变P329G(/L234A/L235A)或突变I253A/H310A/H435A的变体Fc区的治疗性抗体的存在。本文所用的术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些实施方案中,生物样品包含生物流体,如血清。

[0570] 在一个实施方案中,提供用于诊断或检测方法的抗变体(人)Fc区抗体。在另一方面,提供检测生物样品中包含具有突变P329G或突变I253A/H310A/H435A的变体Fc区的治疗性抗体的存在的方法。在某些实施方案中,该方法包括使该生物样品与本文所述抗变体(人)Fc区抗体在允许该抗变体(人)Fc区抗体与包含具有突变P329G或突变I253A/H310A/H435A的变体Fc区的治疗性抗体结合的条件下接触,并检测该抗变体(人)Fc区抗体和包含具有突变P329G或突变I253A/H310A/H435A的变体Fc区的治疗性抗体之间是否形成复合物。这种方法可以是体外或体内方法。

[0571] 在某些实施方案中,提供标记的抗变体(人)Fc区抗体。标记包括但不限于标记包

括但不限于直接检测的标记或部分(如荧光标记、生色标记、电子密度标记、化学发光标记和放射性标记),以及例如通过酶促反应或分子相互作用间接检测的部分,如酶或配体。示例性标记包括但不限于放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I ,荧光团如稀土螯合物或荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹磺酰、伞形酮、萤光素酶(例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利号4,737,456))、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮,辣根过氧化物酶(HRP),碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶,葡糖淀粉酶,溶菌酶,糖氧化酶(例如葡糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡糖-6-磷酸脱氢酶),杂环氧化酶(如尿酸氧化酶和黄嘌呤氧化酶),与利用过氧化氢来氧化染料前体的酶(如HRP、乳过氧化物酶或微过氧化物酶)偶联,生物素/抗生物素蛋白,自旋标记,噬菌体标记,稳定自由基等。

III. 实施例

[0572] 以下是本发明的方法和组合物的实例。应理解,由于上文提供的一般描述,可以实施多种其他实施方案。

[0573] 实施例1

[0574] 材料和方法

[0575] Kabat,E.A.等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中给出了关于人免疫球蛋白轻链和重链核苷酸序列的一般信息。抗体链的氨基酸按照Kabat(Kabat,E.A.等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991))的编号来编号和引用。

[0576] 重组DNA技术

[0577] 可以用Sambrook,J.等,Molecular Cloning:A laboratory manual;Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989中所述的标准方法来操作DNA。分子生物学试剂按照厂家说明书使用。

[0578] 基因合成

[0579] 希望得到的基因区段可以从通过化学合成产生的寡核苷酸制备。长基因区段(侧翼可以有单限制性内切酶切割位点)可以通过退火和连接寡核苷酸(包括PCR扩增)来组装,随后通过所示限制位点克隆。亚克隆的基因片段的DNA序列可以通过DNA测序确认。

[0580] DNA序列测定

[0581] DNA序列可以通过双链测序来测定。

[0582] DNA和蛋白质序列分析及序列数据管理

[0583] 可以用GCG(Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin)软件包10.2版和Infomax's Vector NT1Advance suite 8.0版进行序列创建、作图、分析、注释和图解。

[0584] 表达载体

[0585] 为了表达抗体,可以应用基于含或不含CMV-内含子A启动子的cDNA组织或基于含CMV启动子的基因组组织的用于瞬时表达(例如在HEK293细胞中)的表达质粒。

[0586] 除抗体表盒外,该载体可以包含:

[0587] -允许此质粒在大肠杆菌中复制的复制起点;和

[0588] -在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性的 β -内酰胺酶基因。

[0589] 抗体基因的转录单位可以由以下元件组成：

[0590] -5' 端的独特限制位点；

[0591] -来自人巨细胞病毒的立即早期增强子和启动子；

[0592] -cDNA组织情况下的内含子A序列；

[0593] -源自人抗体基因的5' 非翻译区；

[0594] -免疫球蛋白重链信号序列；

[0595] -作为cDNA或具有基因组外显子-内含子组织的各抗体链编码核酸；

[0596] -含聚腺苷酸化信号序列的3' 非翻译区；和

[0597] -3' 端的独特限制位点。

[0598] 编码抗体链的融合基因可以通过PCR和/或基因合成产生,并通过已知的重组方法和技术,通过例如用各载体中的独特限制位点连接相应的核酸区段来组装。亚克隆的核酸序列可以通过DNA测序验证。对于瞬时转染,可以通过从转化的大肠杆菌培养物制备质粒来制备更大量的质粒。

[0599] 细胞培养技术

[0600] 可以使用Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. 和 Yamada, K.M. (编辑), John Wiley & Sons, Inc. 中所述的标准细胞培养技术。

[0601] HEK293系统中的瞬时转染

[0602] 可以通过瞬时转染制备抗体。因此,可以按照厂家说明书用HEK293系统 (Invitrogen) 进行各质粒的转染。简言之,可以用各表达质粒和293fectin™或fectin (Invitrogen) 的混合物转染在摇瓶中或在搅拌式发酵罐中,于无血清FreeStyle™293表达培养基 (Invitrogen) 中悬浮生长的HEK293细胞 (Invitrogen)。对于2L摇瓶 (Corning), HEK293细胞可以按 1.0×10^6 细胞/mL的密度接种在600mL中,并120转/分钟、8%CO₂孵育。第二天,可以用约42mL A) 含600μg总质粒DNA (1μg/mL) 的20mL Opti-MEM培养基 (Invitrogen) 和 B) 补充1.2mL 293fectin或fectin (2μl/mL) 的20ml Opti-MEM培养基的混合物按约 1.5×10^6 细胞/mL的细胞密度转染细胞。根据葡萄糖消耗,可以在发酵过程中加入葡萄糖溶液。通常在5-10天后收集含有分泌抗体的上清,可以直接从上清纯化抗体或将上清冻存。

[0603] 蛋白质测定

[0604] 可以使用按照Pace等, Protein Science 4 (1995) 2411-1423根据氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过测定280nm光密度 (OD) 来测定纯化的抗体和衍生物的蛋白质浓度。

[0605] 上清中的蛋白质浓度测定

[0606] 可以通过蛋白A琼脂糖小球 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国) 免疫沉淀来估计细胞培养物上清中抗体和衍生物的浓度。因此,可以在TBS-NP40 (50mM Tris缓冲液 pH 7.5, 补充150mM NaCl和1%Nonidet-P40) 中洗涤60μL蛋白A琼脂糖小球三次。随后,可以向在TBS-NP40中预平衡的蛋白A琼脂糖小球加入1-15mL细胞培养物上清。室温孵育1小时后,用0.5mL TBS-NP40在Ultrafree-MC-filter柱 (Amicon) 上洗涤小球一次,用0.5mL 2x磷酸缓冲盐溶液 (2xPBS, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国) 洗涤两次,用0.5mL 100mM柠檬酸钠缓冲液 (pH 5.0) 短暂洗涤四次。可以通过加入35μl **NuPAGE®**LDS样品缓冲液 (Invitrogen) 来洗脱结合的抗体。可以分别将一半的样品与**NuPAGE®**样品还原

剂组合或保持不还原,70℃加热10分钟。然后,可以将5-30 μ l加至4-12% **NuPAGE®** Bis-Tris SDS-PAGE凝胶 (Invitrogen) (MOPS缓冲液用于非还原SDS-PAGE,含**NuPAGE®**抗氧化剂运行缓冲液添加剂 (Invitrogen) 的MES缓冲液用于还原SDS-PAGE),并用考马斯兰染色。

[0607] 细胞培养物上清中抗体的浓度可以通过亲和HPLC层析定量。简言之,可以在Agilent HPLC 1100系统上将含有与蛋白A结合的抗体的细胞培养物上清在200mM KH_2PO_4 、100mM柠檬酸钠、pH 7.4中加至Applied Biosystems Poros A/20柱,并用200mM NaCl、100mM柠檬酸、pH 2.5洗脱。洗脱的抗体可以通过UV吸光度和峰面积积分来定量。用纯化的标准IgG1抗体作为标准品。

[0608] 备选地,可以通过夹心IgGELISA测量细胞培养物上清中抗体和衍生物的浓度。简言之,可以按0.1 μ g/mL用100 μ L/孔生物素化抗人IgG捕获分子F(ab')₂-抗人Fc γ 抗体-BI (Dianova) 室温包被StreptaWell High Bind Streptavidin A-96孔微量滴定板 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国) 1小时,或备选地4℃过夜包被,随后用200 μ L/孔PBS、0.05% Tween (PBST, Sigma) 洗涤三次。然后,可以向孔中加入100 μ L/孔的各含抗体的细胞培养物上清在PBS (Sigma) 中的系列稀释,并在震荡器上室温孵育1-2小时。用200 μ L/孔PBST洗涤孔三次,按0.1 μ g/mL用100 μ l F(ab')₂抗人Fc γ 抗体-POD (Dianova) 作为检测抗体,通过在震荡器上室温孵育1-2小时来检测结合的抗体。未结合的检测抗体可以通过用200 μ L/孔PBST洗涤三次来去除。结合的检测抗体可以通过加入100 μ L ABTS/孔后孵育来检测。在Tecan Fluor Spectrometer上在405nm测量波长 (参考波长492nm) 进行吸光度测定。

[0609] 制备型抗体纯化

[0610] 可以参考标准流程从经过滤的细胞培养物上清纯化抗体。简言之,可将抗体加至蛋白A琼脂糖柱 (GE Healthcare),并用PBS洗涤。可在pH 2.8达到抗体的洗脱,然后立即中和。聚集的蛋白质可以通过PBS中或含150mM NaCl (pH 6.0) 的20mM组氨酸缓冲液中的大小排阻层析 (Superdex200, GE Healthcare) 从单体抗体分开。单体抗体级分可以合并,用例如MILLIPORE Amicon Ultra (30MWC0) 离心浓缩器浓缩 (如果需要),冻存于-20℃或-80℃。可以提供部分样品用于随后的蛋白质分析,例如通过SDS-PAGE、大小排阻层析 (SEC) 或质谱分析法进行分析表征。

[0611] SDS-PAGE

[0612] **NuPAGE®** Pre-Cast凝胶系统 (Invitrogen) 可以按厂家说明书使用。具体而言,可以使用10%或4-12% **NuPAGE® Novex®** Bis-TRIS Pre-Cast凝胶 (pH 6.4) 和**NuPAGE®** MES (还原胶,含**NuPAGE®**抗氧化剂运行缓冲液添加剂) 或MOPS (非还原胶) 运行缓冲液。

[0613] CE-SDS

[0614] 可以用微流Labchip技术 (PerkinElmer, USA) 通过CE-SDS来分析纯度和抗体完整性。因此,可以按厂家说明书用HT Protein Express Reagent Kit制备5 μ l抗体溶液用于CE-SDS分析,并用HT Protein Express Chip在LabChip GXII系统上分析。数据可以用LabChip GX软件分析。

[0615] 分析型大小排阻层析

[0616] 可以通过HPLC层析来进行用于测定抗体的聚集和寡聚状态的大小排阻层析

(SEC)。简言之,可将蛋白A纯化的抗体在Dionex **Ultimate®** 系统(Thermo Fischer Scientific)上在300mM NaCl、50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液(pH 7.5)中加至Tosoh TSKgel G3000SW柱,或在Dionex HPLC系统上在2x PBS中加至Superdex 200柱(GE Healthcare)。洗脱的蛋白质可以通过UV吸光度和峰面积积分来定量。用BioRad Gel Filtration Standard151-1901作为标准品。

[0617] 质谱分析法

[0618] 抗体可以按1mg/ml蛋白质浓度用N-糖苷酶F在磷酸盐或Tris缓冲液中37℃脱糖基化至多17小时。可以用100µg脱糖基化抗体在Tris缓冲液(pH 8)中室温进行有限LysC(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国)消化120小时,或37℃进行40分钟。质谱分析之前,样品可以通过Sephadex G25柱(GE Healthcare)上的HPLC脱盐。通过配有TriVersa NanoMate源(Advion)的maXis 4G UHR-QTOF MS系统(Bruker Daltonik)上的ESI-MS来测定总质量。

[0619] 免疫球蛋白的产生

[0620] 将杂交瘤细胞系按 1.0×10^5 和 2.2×10^5 细胞/ml之间的初始细胞密度(活细胞)接种在补充了10%FCS和常用补充剂的RPMI 1640中,在方瓶(Celline, IBS)中扩增约三周时间。按标准蛋白质化学方法(例如Bruck, C.等, Methods Enzymol. 121 (1986) 587-596中报道的那些方法)进行从培养物上清纯化抗体。

[0621] 桥连ADA测定

[0622] 此一步法ELISA桥连测定的所有步骤都在室温(RT)进行,在10%HPS(合并人血清)存在下分析样品和质控。将样品1:10稀释在含生物素化捕获抗体和洋地黄毒苷化检测抗体(=治疗性抗体)(各1.0µg/ml)的low cross **buffer®**中,RT、450转/分钟震荡孵育过夜。然后将样品(100µl)转移至SA包被的MTP。RT(450转/分钟)孵育1小时后,洗涤孔三次(每次300µl洗涤缓冲液)。加入100µl多克隆抗Dig-S-Fab-HRP缀合物(25mU/ml)并孵育1小时后,再次洗涤平板(三次,每次300µl洗涤缓冲液)。最后,每孔加入100µl ABTS底物,光度法405nm(参考波长490nm)评估颜色反应。样品一式两份地测量并取平均值。如果重复的精密度为变异系数(CV) ≤ 20%,则接受测量结果为有效。按照Shankar等(Shankar, G.等, J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 1267-1281)通过分析34个个体空白血清样品来确定筛查分割点。筛查期间评估为ADA阳性的样品通过未标记检测抗体(治疗性抗体)(333ng/ml)存在下重新测试来确认特异性,该未标记检测抗体在过夜孵育之前加至稀释的样品。

[0623] hsFc γ RI-PG测定

[0624] 该方法的所有步骤都在RT进行。样品按1:50最终稀释度测试,所有样品和质控都在2%HPS和1µg/mL治疗性抗体存在下分析。首先,使100µl/孔生物素标记的抗PG抗体(2µg/ml)结合至SA包被的MTP。孵育(450转/分钟)1小时后,在300µl洗涤缓冲液中洗涤三次(所有随后的孵育和洗涤步骤都同样地进行)。然后,按100µl/孔体积加入已在含1µg/ml治疗性抗体的low cross **buffer®**中预孵育过的质量标准品和样品。孵育和洗涤后,按100µl/孔加入洋地黄毒苷标记的hsFc γ RI(可溶性人Fc γ RI)(0.5µg/ml),再次孵育和洗涤后,加入100µl/孔多克隆抗Dig-S-Fab-HRP缀合物(50mU/ml)。按上文所述孵育和洗涤后,加入100µl/孔ABTS底物。在405nm波长(参考波长490nm)测量吸光度。样品一式两份地分析并取平均值。通过一式两份地分析任一性别的25个个体空白血清样品来评价此测定的分割点。分割点的计

算用Shankar等 (Shankar, G. 等, J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 1267-1281) 的非参数法进行。

[0625] 实施例2

[0626] 本文报道的抗体作为捕获抗体

[0627] 分别使生物素化抗PGLALAFc区抗体或生物素化抗AAAFc区抗体结合至链霉抗生物素蛋白包被的多孔板 (SA-MTP) 的孔以产生捕获平板。通过洗涤去除过量的未结合抗体。将掺入人和食蟹猴血清 (10%终浓度) 的样品/标准抗体加至捕获抗体包被的SA-MTP多孔板的孔, 室温孵育1小时。洗涤后, 用洋地黄毒苷化抗人 κ 抗体M1.7.10 (参见例如, WO 2011/048043, 在此引入作为参考) 孵育孔。洗涤后, 使结合的洋地黄毒苷化抗人 κ 抗体复合物与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗洋地黄毒苷抗体孵育。再一洗涤步骤后, 向孔中加入ABTS溶液并孵育。通过Elisa酶标仪在405nm波长 (参考波长490nm) 测量颜色反应产物。一式三份地测定每个样品或标准品的吸光度值。

[0628] 下表显示用本文报道的抗变体 (人) Fc区抗体M1.3.17 (SEQ ID NO:03和04) 作为捕获抗体测定的血清中具有突变P329G、L234A、L235A、I253A、H310A和H435A的抗VEGF/ANG2抗体的消光值。

[0629]

抗VEGF/ANG2抗体 [ng/mL]	信号 [OD405nm]
10	2.2255
5	1.6010
2.5	0.9865
1.25	0.5730
0.625	0.3140
0.3125	0.1815
0.15625	0.1075
0	0.0740

[0630] 下表显示用本文报道的不同抗体作为捕获抗体和检测抗体测定的在Fc区中具有不同突变的不同特异性的抗体的消光值。

[0631] 测定B: 捕获抗体: M1.6.22-Bi/M1.7.24-Bi/M1.3.17-Bi

[0632] 示踪抗体: 1.7.10-Dig

[0633] 测定C: 捕获抗体: M1.6.22-Bi/M1.7.24-Bi/M1.3.17-Bi

[0634] 示踪抗体: Fc γ RI-Dig

[0635] M1.6.22=抗AAA变体Fc区抗体

[0636] M1.7.10=抗IgG1 κ 抗体

[0637] M1.7.24=抗PGLALA变体Fc区抗体

[0638] M1.3.17=抗PGLALA变体Fc区抗体

[0639] 样品:

[0640] 1) 抗VEGF/ANG2抗体 (具有突变P329G/L234A/L235A/I253A/H310A/H435A的IgG1亚类)

[0641] 2) 抗VEGF/ANG2抗体 (具有突变P329G/L234A/L235A的IgG1亚类)

- [0642] 3) 抗IGF-1R抗体 (具有突变I253A/H310A/H435A的IgG1亚类)
 [0643] 4) 抗P-选择蛋白抗体 (具有突变S228P/L235E的IgG4亚类)
 [0644] 5) 抗VEGF/ANG2抗体 (野生型IgG1亚类)

测定	捕获	示踪	抗体	浓度 [ng/mL]	信号 [OD405nm]	
[0645]	B	M1.6.22-Bi	M1.7.10-Dig	1	100	0.052
					50	0.050
					25	0.044
					13	0.041
					6	0.039

[0646]

测定	捕获	示踪	抗体	浓度 [ng/mL]	信号 [OD405nm]
				3	0.039
				2	0.041
				0	0.047
B	M1.6.22-Bi	M1.7.10-Dig	2	100	0.210
				50	0.127
				25	0.092
				13	0.066
				6	0.053
				3	0.044
				2	0.041
				0	0.038
B	M1.6.22-Bi	M1.7.10-Dig	3	100	2.898
				50	2.900
				25	2.894
				13	2.849
				6	2.734
				3	2.259
				2	1.482
				0	0.037
B	M1.6.22-Bi	M1.7.10-Dig	4	100	0.051
				50	0.047
				25	0.048
				13	0.042
				6	0.040
				3	0.039
				2	0.032
				0	0.038
B	M1.6.22-Bi	M1.7.10-Dig	5	100	0.061
				50	0.049
				25	0.047
				13	0.046
				6	0.039
				3	0.037
				2	0.036
				0	0.037
B	M1.7.24-Bi	M1.7.10-Dig	1	100	0.057
				50	0.060
				25	0.047
				13	0.053
				6	0.053
				3	0.040
				2	0.049
				0	0.049
B	M1.7.24-Bi	M1.7.10-Dig	2	100	3.235
				50	3.167
				25	3.159
				13	3.148

测定	捕获	示踪	抗体	浓度 [ng/mL]	信号 [OD405nm]
				6	2.981
				3	2.513
				2	1.730
				0	0.046
B	M1.7.24-Bi	M1.7.10-Dig	3	100	0.098
				50	0.064
				25	0.048
				13	0.043
				6	0.039
				3	0.046
				2	0.047
				0	0.040
B	M1.7.24-Bi	M1.7.10-Dig	4	100	0.050
				50	0.043
				25	0.040
				13	0.037
				6	0.037
				3	0.031
				2	0.033
				0	0.035
B	M1.7.24-Bi	M1.7.10-Dig	5	100	0.047
				50	0.040
				25	0.041
				13	0.040
				6	0.038
				3	0.033
				2	0.034
				0	0.039
B	M1.3.17-Bi	M1.7.10-Dig	1	100	0.035
				50	0.035
				25	0.035
				13	0.034
				6	0.035
				3	0.036
				2	0.036
				0	0.035
B	M1.3.17-Bi	M1.7.10-Dig	2	100	0.216
				50	0.215
				25	0.213
				13	0.217
				6	0.196
				3	0.165
				2	0.125
				0	0.038
B	M1.3.17-Bi	M1.7.10-Dig	3	100	0.050
				50	0.048
				25	0.046

[0647]

[0648]

测定	捕获	示踪	抗体	浓度 [ng/mL]	信号 [OD405nm]
				13	0.044
				6	0.045
				3	0.047
				2	0.047
				0	0.045
B	M1.3.17-Bi	M1.7.10-Dig	4	100	0.048
				50	0.049
				25	0.047
				13	0.047
				6	0.048
				3	0.050
				2	0.049
				0	0.049
B	M1.3.17-Bi	M1.7.10-Dig	5	100	0.043
				50	0.042
				25	0.043
				13	0.042
				6	0.046
				3	0.044
				2	0.043
				0	0.043
C	M1.6.22-Bi	FcγRI-Dig	1	100	0.079
				50	0.077
				25	0.081
				13	0.064
				6	0.060
				3	0.066
				2	0.077
				0	0.077
C	M1.6.22-Bi	FcγRI-Dig	2	100	0.076
				50	0.057
				25	0.063
				13	0.061
				6	0.060
				3	0.068
				2	0.072
				0	0.064
C	M1.6.22-Bi	FcγRI-Dig	3	100	2.096
				50	1.059
				25	0.401
				13	0.175
				6	0.104
				3	0.083
				2	0.082
				0	0.069
C	M1.6.22-Bi	FcγRI-Dig	4	100	0.069
				50	0.054

[0649]

测定	捕获	示踪	抗体	浓度 [ng/mL]	信号 [OD405nm]
				25	0.060
				13	0.052
				6	0.051
				3	0.050
				2	0.067
				0	0.077
C	M1.6.22-Bi	FcγRI-Dig	5	100	0.076
				50	0.067
				25	0.066
				13	0.070
				6	0.064
				3	0.069
				2	0.077
				0	0.069
C	M1.7.24-Bi	FcγRI-Dig	1	100	0.050
				50	0.084
				25	0.082
				13	0.085
				6	0.079
				3	0.094
				2	0.085
				0	0.076
C	M1.7.24-Bi	FcγRI-Dig	2	100	0.082
				50	0.094
				25	0.083
				13	0.060
				6	0.060
				3	0.057
				2	0.093
				0	0.092
C	M1.7.24-Bi	FcγRI-Dig	3	100	0.110
				50	0.095
				25	0.073
				13	0.058
				6	0.069
				3	0.077
				2	0.074
				0	0.086
C	M1.7.24-Bi	FcγRI-Dig	4	100	0.080
				50	0.066
				25	0.070
				13	0.066
				6	0.053
				3	0.053
				2	0.056
				0	0.076
C	M1.7.24-Bi	FcγRI-Dig	5	100	0.073

测定	捕获	示踪	抗体	浓度 [ng/mL]	信号 [OD405nm]
				50	0.066
				25	0.063
				13	0.057
				6	0.057
				3	0.053
				2	0.058
				0	0.073
C	M1.3.17-Bi	FcγRI-Dig	1	100	1.194
				50	1.167
				25	1.074
				13	1.137
				6	1.171
				3	1.161
				2	1.171
				0	1.176
C	M1.3.17-Bi	FcγRI-Dig	2	100	1.222
				50	1.211
				25	1.214
				13	1.226
				6	1.215
				3	1.222
				2	1.221
				0	1.233
C	M1.3.17-Bi	FcγRI-Dig	3	100	1.204
				50	1.214
				25	1.203
				13	1.213
				6	1.212
				3	1.210
				2	1.260
				0	1.217
C	M1.3.17-Bi	FcγRI-Dig	4	100	1.170
				50	1.153
				25	1.166
				13	1.161
				6	1.175
				3	1.188
				2	1.191
				0	1.189
C	M1.3.17-Bi	FcγRI-Dig	5	100	1.183
				50	1.161
				25	1.163
				13	1.166
				6	1.173
				3	1.187
				2	1.190
				0	1.197

[0650]

[0651] 测定D:捕获抗体:M1.7.24-Bi/M1.3.17-Bi

[0652] 示踪抗体:1.7.10-Dig/M1.19.31-Dig

- [0653] M1.7.10=抗IgG1κ抗体
- [0654] M1.19.31=抗IgG1κ抗体
- [0655] M1.7.24=抗PGLALA变体Fc区抗体
- [0656] M1.3.17=抗PGLALA变体Fc区抗体
- [0657] 样品:
- [0658] 6) 抗Dig抗体 (具有突变P329G/L234A/L235A的IgG1亚类)

测定	捕获	示踪	信号 缓冲液 [OD405nm]	信号 10% 食蟹猴 血清 [OD405nm]	信号 10%人血清 [OD405nm]
D	M1.3.17-Bi	M1.7.10-Dig	0.053	2.116	2.656
			0.038	1.177	2.550
			0.037	0.485	2.508
			0.032	0.194	2.482
			0.031	0.096	2.489
			0.032	0.065	2.529
			0.029	0.052	2.533
			0.031	0.044	2.514
D	M1.3.17-Bi	M1.19.31-Dig	0.050	1.874	2.583
			0.041	0.872	2.137
			0.040	0.357	1.843
			0.037	0.162	1.728
			0.036	0.105	1.706
			0.033	0.082	1.671
			0.033	0.075	1.706
			0.036	0.077	1.802
D	M1.7.24-Bi	M1.7.10-Dig	0.062	2.367	2.738
			0.046	1.413	2.609
			0.039	0.575	2.484
			0.034	0.223	2.457
			0.031	0.094	2.407
			0.031	0.050	2.396
			0.034	0.041	2.438
			0.033	0.031	2.452
D	M1.7.24-Bi	M1.19.31-Dig	0.054	2.254	2.505
			0.051	1.168	2.044
			0.045	0.438	1.605
			0.037	0.173	1.427
			0.033	0.078	1.335
			0.033	0.049	1.362
			0.033	0.039	1.386

[0659]

测定	捕获	示踪	信号 缓冲液 [OD405nm]	信号 10% 食蟹猴 血清 [OD405nm]	信号 10%人血清 [OD405nm]
			0.033	0.035	1.423

[0660]

[0661] 实施例3

[0662] 本文报道的抗体作为示踪抗体

[0663] 使生物素化抗人 κ 抗体M1.7.10(参见例如WO 2011/048043)结合至链霉抗生物素蛋白包被的多孔板(SA-MTP)的孔以产生捕获平板。通过洗涤去除过量的未结合抗体。将掺入人和食蟹猴血清(10%终浓度)的样品/标准抗体加至捕获抗体包被的SA-MTP多孔板的孔,室温孵育1小时。洗涤后,分别用洋地黄毒苷化抗PGLALA Fc区抗体或抗AAAFc区抗体孵育孔。洗涤后,使结合的洋地黄毒苷化抗人 κ 抗体复合物与辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗洋地黄毒苷抗体孵育。再一洗涤步骤后,向孔中加入ABTS溶液。通过Elisa酶标仪在405nm波长(参考波长490nm)测量颜色反应产物。一式三份地测定每个样品或标准品的吸光度值。

[0664] 下表显示用本文报道的抗变体(人)Fc区抗体M1.7.24(SEQ ID NO:07和08)作为示踪抗体测定的血清中具有突变P329G、L234A、L235A、I253A、H310A和H435A的抗VEGF/ANG2抗体的消光值。

[0665]

抗VEGF/ANG2抗体 [ng/mL]	信号 [OD405nm]
10	2.7565
5	2.1725
2.5	1.437
1.25	0.8465
0.625	0.468
0.3125	0.261
0.15625	0.1475
0.078125	0.096
0.0390625	0.072
0.01953125	0.057

[0666] 下表显示用本文报道的不同抗体作为捕获抗体和检测抗体测定的在Fc区中具有不同突变的特异性的抗体的消光值。

[0667] 测定A:捕获抗体:M1.7.10-Bi

[0668] 示踪抗体:M1.6.22-Dig/M1.7.24-Dig/M1.3.17-Dig

[0669] M1.6.22=抗AAA变体Fc区抗体

[0670] M1.7.10=抗IgG1 κ 抗体

[0671] M1.7.24=抗PGLALA变体Fc区抗体

[0672] M1.3.17=抗PGLALA变体Fc区抗体

[0673] 样品:

[0674] 1) 抗VEGF/ANG2抗体(具有突变P329G/L234A/L235A/I253A/H310A/H435A的IgG1亚类)

[0675] 2) 抗VEGF/ANG2抗体(具有突变P329G/L234A/L235A的IgG1亚类)

[0676] 3) 抗IGF-1R抗体(具有突变I253A/H310A/H435A的IgG1亚类)

[0677] 4) 抗P-选择蛋白抗体(具有突变S228P/L235E的IgG4亚类)

[0678] 5) 抗VEGF/ANG2抗体(野生型IgG1亚类)

[0679]

测定	捕获	示踪	抗体	浓度 [ng/mL]	信号 [OD405nm]
A	M1.7.10-Bi	M1.6.22-Dig	1	100	0.059
				50	0.060
				25	0.061
				13	0.061
				6	0.057
				3	0.057
				2	0.055
				0	0.058
A	M1.7.10-Bi	M1.6.22-Dig	2	100	0.076
				50	0.065
				25	0.060
				13	0.051
				6	0.044
				3	0.039
				2	0.047
				0	0.048
A	M1.7.10-Bi	M1.6.22-Dig	3	100	2.889
				50	2.740
				25	2.509
				13	1.738
				6	0.858
				3	0.414
				2	0.199
				0	0.046
A	M1.7.10-Bi	M1.6.22-Dig	4	100	0.057
				50	0.052
				25	0.057
				13	0.050
				6	0.041

[0680]

测定	捕获	示踪	抗体	浓度 [ng/mL]	信号 [OD405nm]
				3	0.037
				2	0.040
				0	0.043
A	M1.7.10-Bi	M1.6.22-Dig	5	100	0.056
				50	0.045
				25	0.053
				13	0.045
				6	0.046
				3	0.039
				2	0.047
				0	0.042
A	M1.7.10-Bi	M1.7.24-Dig	1	100	0.053
				50	0.051
				25	0.047
				13	0.047
				6	0.045
				3	0.046
				2	0.042
				0	0.050
A	M1.7.10-Bi	M1.7.24-Dig	2	100	2.652
				50	2.604
				25	2.606
				13	2.516
				6	2.239
				3	1.730
				2	1.134
				0	0.043
A	M1.7.10-Bi	M1.7.24-Dig	3	100	0.060
				50	0.048
				25	0.047
				13	0.044
				6	0.042
				3	0.045
				2	0.048
				0	0.049
A	M1.7.10-Bi	M1.7.24-Dig	4	100	0.046
				50	0.049
				25	0.048
				13	0.046
				6	0.045
				3	0.040
				2	0.036
				0	0.045
A	M1.7.10-Bi	M1.7.24-Dig	5	100	0.042
				50	0.048
				25	0.039
				13	0.042

[0681]

测定	捕获	示踪	抗体	浓度 [ng/mL]	信号 [OD405nm]
				6	0.042
				3	0.038
				2	0.038
				0	0.041
A	M1.7.10-Bi	M1.3.17-Dig	1	100	0.043
				50	0.043
				25	0.040
				13	0.040
				6	0.042
				3	0.038
				2	0.043
				0	0.044
A	M1.7.10-Bi	M1.3.17-Dig	2	100	3.044
				50	2.955
				25	2.932
				13	2.698
				6	1.985
				3	1.215
				2	0.669
				0	0.042
A	M1.7.10-Bi	M1.3.17-Dig	3	100	0.047
				50	0.044
				25	0.043
				13	0.040
				6	0.038
				3	0.036
				2	0.042
				0	0.040
A	M1.7.10-Bi	M1.3.17-Dig	4	100	0.040
				50	0.037
				25	0.037
				13	0.038
				6	0.036
				3	0.033
				2	0.034
				0	0.036
A	M1.7.10-Bi	M1.3.17-Dig	5	100	0.042
				50	0.041
				25	0.037
				13	0.038
				6	0.036
				3	0.033
				2	0.034
				0	0.036

[0682] 下表显示用抗IL2抗体作为捕获抗体和本文报道的抗变体(人)Fc区抗体M1.7.24 (SEQ ID NO:07和08)作为示踪抗体测定的血清中具有突变P329G、L234A、L235A、I253A、H310A和H435A的细胞因子(IL-2)抗体的消光值。

[0683]

细胞因子抗体缀合物[ng/mL]	信号[OD405nm]
2500	2.346
1250	1.459
625	0.811
312.5	0.4505
156.25	0.253
78.125	0.1525
39.0625	0.1005
0	0.0475

[0684] 实施例4

[0685] 本文报道的抗体作为捕获抗体以及作为示踪抗体

[0686] 分别使生物素化抗PGLALA Fc区抗体或抗AAAFc区抗体结合至链霉抗生物素蛋白包被的多孔板(SA-MTP)的孔以产生捕获平板。通过洗涤去除过量的未结合抗体。将掺入人和食蟹猴血清(10%终浓度)的样品/标准抗体加至捕获抗体包被的SA-MTP多孔板的孔,室温孵育1小时。洗涤后,分别用洋地黄毒苷化抗PG Fc区抗体或抗AAA Fc区抗体孵育孔。洗涤后,使结合的洋地黄毒苷化抗人κ抗体复合物与辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗洋地黄毒苷抗体孵育。再一洗涤步骤后,向孔中加入ABTS溶液。通过Elisa酶标仪在405nm波长(参考波长490nm)测量颜色反应产物。一式三份地测定每个样品或标准品的吸光度值。

[0687] 下表显示用本文报道的抗变体(人)Fc区抗体M1.3.17(SEQ ID NO:03和04)作为捕获抗体和本文报道的抗变体(人)Fc区抗体M1.7.24(SEQ ID NO:07和08)作为示踪抗体测定的血清中具有突变P329G、L234A、L235A、I253A、H310A和H435A的抗VEGF/ANG2抗体的消光值。

[0688]

抗VEGF/ANG2抗体[ng/mL]	信号[OD405nm]
2500	2.7700
1250	1.8810
625	1.1345
312.5	0.6580
156.25	0.4185
78.125	0.3015
39.0625	0.2325
0	0.1755

[0689] 实施例5

[0690] 本文报道的抗体在抗药抗体测定中作为校准标准品

[0691] 分别配制抗PG Fc区抗体或抗AAA Fc区抗体的稀释系列作为标准曲线。

[0692] 使具有突变P329G、L234A、L235A、I253A、H310A和H435A的生物素化抗VEGF/ANG2抗体及具有突变P329G、L234A、L235A、I253A、H310A和H435A的洋地黄毒苷化抗VEGF/ANG2抗体与稀释样品或标准品室温过夜预孵育。预孵育后,将样品转移至链霉抗生物素蛋白包被的多孔板,室温孵育1小时。通过洗涤去除过量的未结合抗体。洗涤步骤后,用辣根过氧化物酶

(HRP) 标记的抗洋地黄毒苷抗体检测分别包含具有突变P329G、L234A、L235A、I253A、H310A和H435A的生物素化和洋地黄毒苷化抗VEGF/ANG2抗体以及抗PG Fc区抗体M1.3.17 (SEQ ID NO:03和04) 或抗药抗体的结合洋地黄毒苷化复合物。洗涤步骤和与各自底物孵育之后,存在于所形成的复合物中的HRP催化ABTS转化为有色产物。通过Elisa酶标仪在405nm波长(参考波长490nm) 测量信号。一式三份地测定每个血清样品的吸光度值。

[0693] 下表显示用本文报道的抗变体(人)Fc区抗体M1.3.17 (SEQ ID NO:03和04) 作为标准抗体,血清中的具有突变P329G、L234A、L235A、I253A、H310A和H435A的抗VEGF/ANG2抗体作为捕获抗体(生物素化) 以及作为示踪抗体(洋地黄毒苷化) 测定的消光值。

抗 PGLALA 抗体 M1.3.17 [ng/mL]	信号 [OD405nm]
250	0.150
125	0.085
62.5	0.063
31.25	0.054
15.625	0.050
7.8125	0.047
3.90625	0.045
0	0.046

[0695] 实施例6

[0696] 用本文报道的抗体从样品排除靶抗体

排除剂	排除前浓度 [μg/mL]	排除后浓度 [μg/mL]	回收率 [%]
抗 PGLALA 抗体 M1.3.17-Bi	1000.00	0.0169	0.002%
	30.00	0.0080	0.027%
	100.00	0.0173	0.017%
	3.00	0.0023	0.078%
	10.00	0.0017	0.017%
	0.30	0.0002	0.065%
	1.00	0.0007	0.067%

排除剂	排除前浓度 [μg/mL]	排除后浓度 [μg/mL]	回收率 [%]
抗 AAA 抗体 M1.6.22-Bi	1000.00	0.0163	0.002%
	30.00	0.0054	0.018%
	100.00	0.0143	0.014%
	3.00	0.0023	0.008%
	10.00	0.0005	0.005%
	0.30	0.0001	0.039%
	1.00	0.0003	0.031%

[0699] 实施例7

[0700] 本文报道的抗体用于检测PGLALAAAA抗体

[0701] 使生物素化抗PGLALAFc区抗体结合至链霉抗生物素蛋白包被的多孔板(SA-MTP)的孔以产生捕获平板。通过洗涤去除过量的未结合抗体。将掺入人和食蟹猴血清(10%终浓度)的样品/标准抗体加至捕获抗体包被的SA-MTP多孔板的孔,室温孵育1小时。洗涤后,用

洋地黄毒苷化抗人κ抗体M1.7.10 (参见例如,WO 2011/048043,在此引入作为参考) 孵育孔。洗涤后,使结合的洋地黄毒苷化抗人κ抗体复合物与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗洋地黄毒苷抗体孵育。另一洗涤步骤后,向孔中加入ABTS溶液并孵育。通过Elisa酶标仪在405nm波长 (参考波长490nm) 测量颜色反应产物。一式三份地测定每个样品或标准品的吸光度值。

[0702] 测定E:捕获抗体:M1.7.24-Bi/M1.3.17-Bi

[0703] 示踪抗体:1.7.10-Dig

[0704] M1.7.10=抗IgG1κ抗体

[0705] M1.7.24=抗PGLALA变体Fc区抗体

[0706] M1.3.17=抗PGLALA变体Fc区抗体

[0707] 样品:

[0708] 1) 抗VEGF/ANG2抗体 (具有突变P329G/L234A/L235A/I253A/H310A/H435A的IgG1亚类)

[0709] 2) 抗VEGF/ANG2抗体 (具有突变P329G/L234A/L235A的IgG1亚类)

[0710]

测定	捕获	示踪	分析物	浓度 [ng/mL]	信号 [OD405nm]
E	M1.7.24-Bi	M1.7.10-Dig	1)	100	2.312
				50	1.942
				25	1.553
				12.5	1.057
				6.25	0.640
				3.124	0.363
				1.5625	0.208
				0	0.025
				100	2.217
				50	1.796
	25	1.390			
	12.5	0.884			
	6.25	0.528			
	3.124	0.298			
	1.5625	0.172			
	0	0.028			
E	M1.3.17-Bi	M1.7.10-Dig	1)	100	2.287
				50	1.951
				25	1.602
				12.5	1.093
				6.25	0.677
				3.124	0.383
				1.5625	0.224
				0	0.027
				100	2.269
				50	1.890
	25	1.476			
	12.5	0.960			
	6.25	0.577			
	3.124	0.316			
	1.5625	0.187			
	0	0.027			

[0711] 实施例8

[0712] 食蟹猴研究样品测量-本发明的抗药抗体测定和常规桥连抗药抗体测定的比较

[0713] 桥连型式抗药抗体测定

[0714] 在第一个步骤中,使生物素化效应子功能沉默治疗性抗体、来自使用效应子功能沉默治疗性抗体的人研究的样品、以及洋地黄毒苷化效应子功能沉默治疗性抗体在微量滴定板(MTP)震荡器上室温(RT)过夜预孵育(500转/分钟,捕获抗体和示踪抗体终浓度1 μ g/ml;样品浓度0-100ng/ml)。在第二个步骤中,将预孵育的样品转移至链霉抗生物素蛋白包被的MTP(SA-MTP)。通过每次用300 μ L缓冲液洗涤三次去除过量的未结合复合物。洗涤后,用辣根过氧化物酶缀合的抗洋地黄毒苷抗体检测复合物结合的洋地黄毒苷化效应子功能沉默治疗性抗体(室温孵育1小时,500转/分钟震荡)。另一洗涤步骤(三次,300 μ L缓冲液)后,加入ABTS底物。通过Elisa酶标仪在405nm波长(参考波长490nm)测量信号。一式三份地测定每个血清样品的吸光度值。

样品稀释 **1:10**

分割点 **约 0.06**

[0715]

药物耐受性 **低**

IgM 检测 **是**

[0716] 免疫复合物测定型式

[0717] 在第一个步骤中,使生物素化抗PGLALA抗体结合至链霉抗生物素蛋白包被的微量滴定板(SA-MTP)。通过洗涤去除过量的未结合抗体。向孔中加入人血清中的包含来自研究的效应子功能沉默治疗性抗体和抗药抗体的复合物的样品,孵育1小时。洗涤后,用洋地黄毒苷化人Fc γ RI孵育孔。洗涤后,用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗洋地黄毒苷抗体检测结合的洋地黄毒苷化人Fc γ RI。再一洗涤步骤后,加入ABTS底物。通过Elisa酶标仪在405nm波长(参考波长490nm)测量信号。一式三份地测定每个血清样品的吸光度值。

[0718] **样品稀释** **1:50**

分割点 **约 0.18**

[0719] **药物耐受性** **高**

IgM 检测 **否**

[0720] 研究样品分析结果:

个体	时间点 周期/小时	药物水平 [ng/ml]	桥连测定	免疫复合 物测定
1	C1 24 h	1620	-	-
	C1 72 h	42.6	-	-
	C1 96 h	6.09	+	-
	C1 120 h	2.5	+	-
	C1 168 h	2.11	+	-
	C2 24h	1310	+	-
	C2 168 h	b.l.q.	+	+
	C3 pre	b.l.q.	+	+
	2	C1 24 h	2350	-
C1 72 h		94.4	-	-
C1 96 h		11.1	+	-
C1 120 h		b.l.q.	+	+
C1 168 h		b.l.q.	+	+
C2 24h		1010	+	+
C2 168 h		b.l.q.	+	+
C3 pre		b.l.q.	+	+
3		C1 24 h	1130	-
	C1 72 h	11.6	-	-
	C1 96 h	5.46	-	-
	C1 120 h	1.79	+	-
	C1 168 h	b.l.q.	+	+
	C2 24h	1870	-	-
	C2 168 h	b.l.q.	+	+
	C3 pre	455	+	+
	4	C1 24 h	6250	-
C1 96 h		218	-	-
C1 120 h		26.5	+	-
C1 168 h		2.01	+	+
C2 24h		2430	-	+
C2 168 h		b.l.q.	+	+
C3 pre		b.l.q.	+	+
5	C1 24 h	1800	-	-
	C1 72 h	69.6	-	-
	C1 96 h	5.83	-	-
	C2 pre	b.l.q.	+	+
	C2 24 h	547	+	+
	C2 96 h	b.l.q.	+	+
	C3 pre	b.l.q.	+	+
	C324 h	13.6	+	+
	C3 96 h	b.l.q.	+	+

[0721]

个体	时间点 周期/小时	药物水平 [ng/ml]	桥连测定	免疫复合物测定
6	C1 24 h	2820	-	-
	C1 72 h	262	-	-
	C1 96 h	2.62	+	-
	C2 pre	b.l.q.	+	+
	C2 24 h	263	-	+
	C2 96 h	b.l.q.	+	+
	C3 pre	b.l.q.	+	+
7	C1 24 h	885	-	-
	C1 72 h	3.41	-	-
	C1 96 h	4.22	+	-
	C2 pre	1.25	+	+
	C2 24 h	144	-	+
	C2 96 h	b.l.q.	-	+
	C3 pre	b.l.q.	+	+
8	C1 24 h	176	-	+
	C1 96 h	0.764	-	+
	C1 120 h	212	-	-
	C1 168 h	3.5	-	-
	C2 pre	2.57	-	-
	C2 24h	1.99	-	-
	C2 168 h	b.l.q.	-	+
9	C3 pre	b.l.q.	-	+
	C1 24 h	722	-	-
	C1 72 h	61.5	-	-
	C1 96 h	6.73	-	-
	C2 pre	b.l.q.	+	+
	C2 96h	9.61	+	+
	C3 pre	1.44	+	-
10	C3 96 h	8.13	+	-
	C1 24 h	1210	-	+
	C1 96 h	5.82	-	+
	C1 120 h	b.l.q.	+	+
	C1 168 h	b.l.q.	+	+
	C2 pre	73.8	+	+
	C2 168 h	b.l.q.	+	+
	C3 pre	b.l.q.	+	+

[0722]

[0723] 实施例9

[0724] 本文报道的抗体作为捕获试剂用于药物-靶标复合物检测,以允许区分靶标结合的药物和总药物

[0725] 使0.5 μ g/mL生物素化抗PG抗体结合至链霉抗生物素蛋白包被的多孔板(SA-MTP)的孔以产生捕获平板。通过洗涤(3次,300 μ L/孔)去除过量的未结合抗体。向捕获抗体包被的SA-MTP多孔板的孔中加入100 μ L/孔样品/标准抗体,室温孵育1小时。

[0726] 样品包含游离和结合的具有PG (LALA) 修饰的抗靶标X抗体 (I) 和靶标X。抗靶标X抗体 (I) 将结合于该平板。

[0727] 洗涤 (3次, 300 μ L/孔) 后, 用100 μ L/孔的0.5 μ g/mL洋地黄毒苷化抗靶标抗体 (II) 孵育孔。

[0728] 抗靶标抗体 (I) 和 (II) 能够同时结合靶标X。

[0729] 洗涤 (3次, 300 μ L/孔) 后, 使结合的洋地黄毒苷化抗靶标抗体 (II) 与100 μ L/孔的50mU/mL辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗洋地黄毒苷抗体孵育。再一洗涤步骤后, 向孔中加入100 μ L/孔的ABTS溶液。通过Elisa酶标仪在405nm波长 (参考波长490nm) 测量颜色反应产物。一式三份地测定每个样品或标准品的吸光度值。

[0730] 此测定中只有药物和靶标的复合物将产生信号 (结合药物)。

[0731] 还可能在测定中测量之前使样品与过量靶标预孵育, 来将所有可用药物分子转化为结合药物, 以获得总药物。

[0732] 此测定的示意图参见图6。

[0733] 虽然已为了理解的清晰性的目的以说明和实施例的方式较为详细地描述了前述发明, 但该描述和实施例不应解释为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容在此明确以其整体引入作为参考。

序 列 表

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> 抗变体 Fc 区抗体及使用方法
 <130> P33184-W0
 <150> EP15192195.4
 <151> 2015-10-29
 <160> 35
 <170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <400> 1

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
 1 5 10 15
 Leu Cys Glu Val Arg Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30
 Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
 35 40 45
 Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60
 [0001] Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Arg Pro Ile Asn Ser Ser Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr
 85 90 95
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Glu Leu Gly Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Pro Leu Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Asn Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ala
 130 135

<210> 2
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 2

Met Ala Trp Thr Ser Leu Phe Leu Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ser Gly
 1 5 10 15
 Ala Ile Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
 20 25 30
 Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val
 35 40 45

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

<210> 3

<211> 137

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 3

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
 1 5 10 15
 Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30
 Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Phe Arg
 35 40 45
 [0002] Arg Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60
 Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 85 90 95
 Met Tyr Leu Gln Met Arg Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135

<210> 4

<211> 128

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 4

Met Ala Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ser Gly
 1 5 10 15
 Ala Ile Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Thr Thr Gly Ala Val
 35 40 45
 Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu
 50 55 60
 Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile
 85 90 95
 Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp
 100 105 110
 Tyr Ser Asp His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 115 120 125

<210> 5

<211> 140

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 5

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Val Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30
 [0003] Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Met Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 6

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 20 25 30
 Thr Gly His Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 7

<211> 137

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 7

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
 1 5 10 15
 Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30
 [0004] Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
 35 40 45
 Arg Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60
 Trp Ile Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 85 90 95
 Leu Tyr Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 8

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 9
 Arg Tyr Trp Met Ser
 1 5

[0005]

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 10
 Arg Tyr Trp Met Asn
 1 5

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HVR-H1 共有序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X表示中性亲水性氨基酸残基
 <400> 11
 Arg Tyr Trp Met Xaa
 1 5

<210> 12
 <211> 17

<212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 12
 Glu Ile Asn Pro Asp Ser Arg Pro Ile Asn Ser Ser Pro Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Asp

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 13
 Glu Ile Asp Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Asp

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 14
 [0006] Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Asp

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HVR-H2 共有序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = 中性亲水性或酸性氨基酸残基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X = 中性亲水性或碱性氨基酸残基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X = 中性亲水性或链影响氨基酸残基
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> X = 中性亲水性或芳香族氨基酸残基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> X = 中性亲水性氨基酸残基
 <400> 15
 Glu Ile Xaa Pro Asp Ser Xaa Xaa Ile Asn Xaa Xaa Pro Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Asp

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 16
 Pro Leu Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Asn
 1 5 10

[0007]

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 17
 Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 18
 Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser
 1 5 10

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HVR-H3 共有序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)

<223> X=疏水性或芳香族氨基酸残基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X=中性亲水性或芳香族氨基酸残基

<400> 19

Pro Xaa Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Xaa

1 5 10

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 20

Ser Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 21

[0008] Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 22

Leu Gly Met Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 23

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 24

<211> 14

<212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 24
 Arg Ser Thr Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 1 5 10

<210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HVR-L1 共有序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X=中性亲水性氨基酸残基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> X=中性亲水性或酸性氨基酸残基
 <400> 25
 Arg Ser Xaa Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Xaa
 [0009] 1 5 10

<210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 26
 Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
 1 5

<210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HVR-L2 共有序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X=酸性或碱性氨基酸残基
 <400> 27
 Gly Thr Asn Xaa Arg Ala Pro
 1 5

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 28
 Val Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val
 1 5

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 29
 Ala Leu Trp Tyr Ser Asp His Trp Val
 1 5

[0010]

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 30
 Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val
 1 5

<210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HVR-L3 共有序列
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 可以是任意天然氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 可以是任意天然氨基酸
 <400> 31
 Xaa Leu Trp Tyr Ser Xaa His Trp Val
 1 5

<210> 32
 <211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 32

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Thr Gly His Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HVR-L1 共有序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> X=中性或链取向影响氨基酸残基

<400> 33

[0011] Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Xaa Thr Gly His Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 34

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 35

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr

1 5

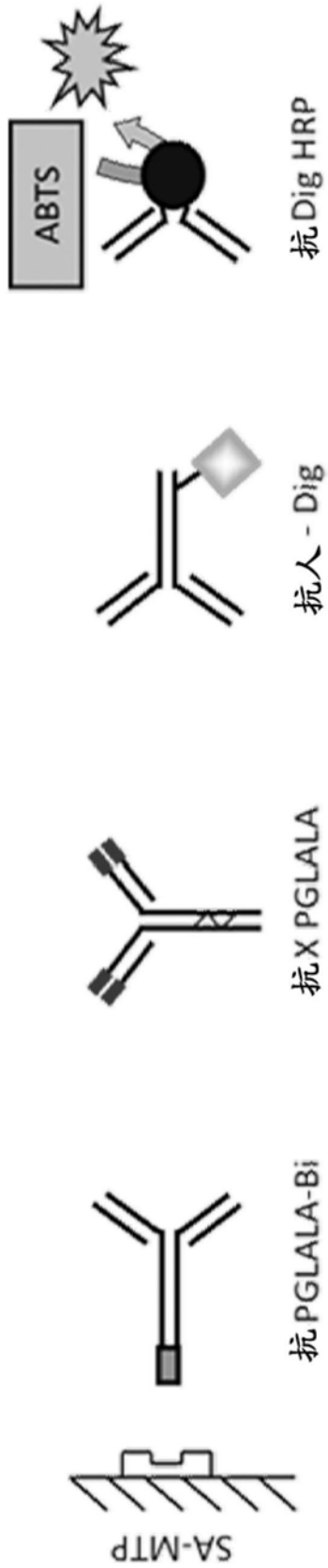


图1

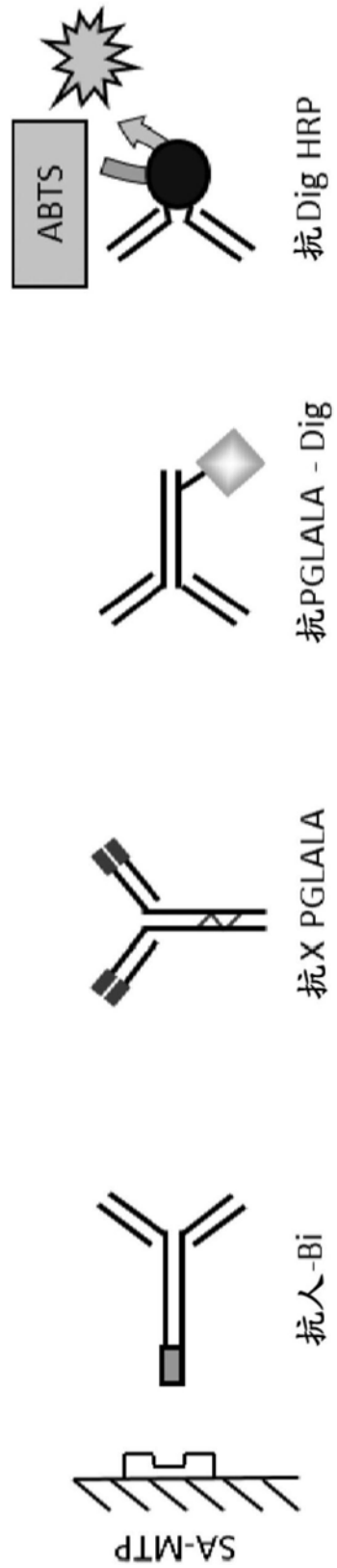


图2

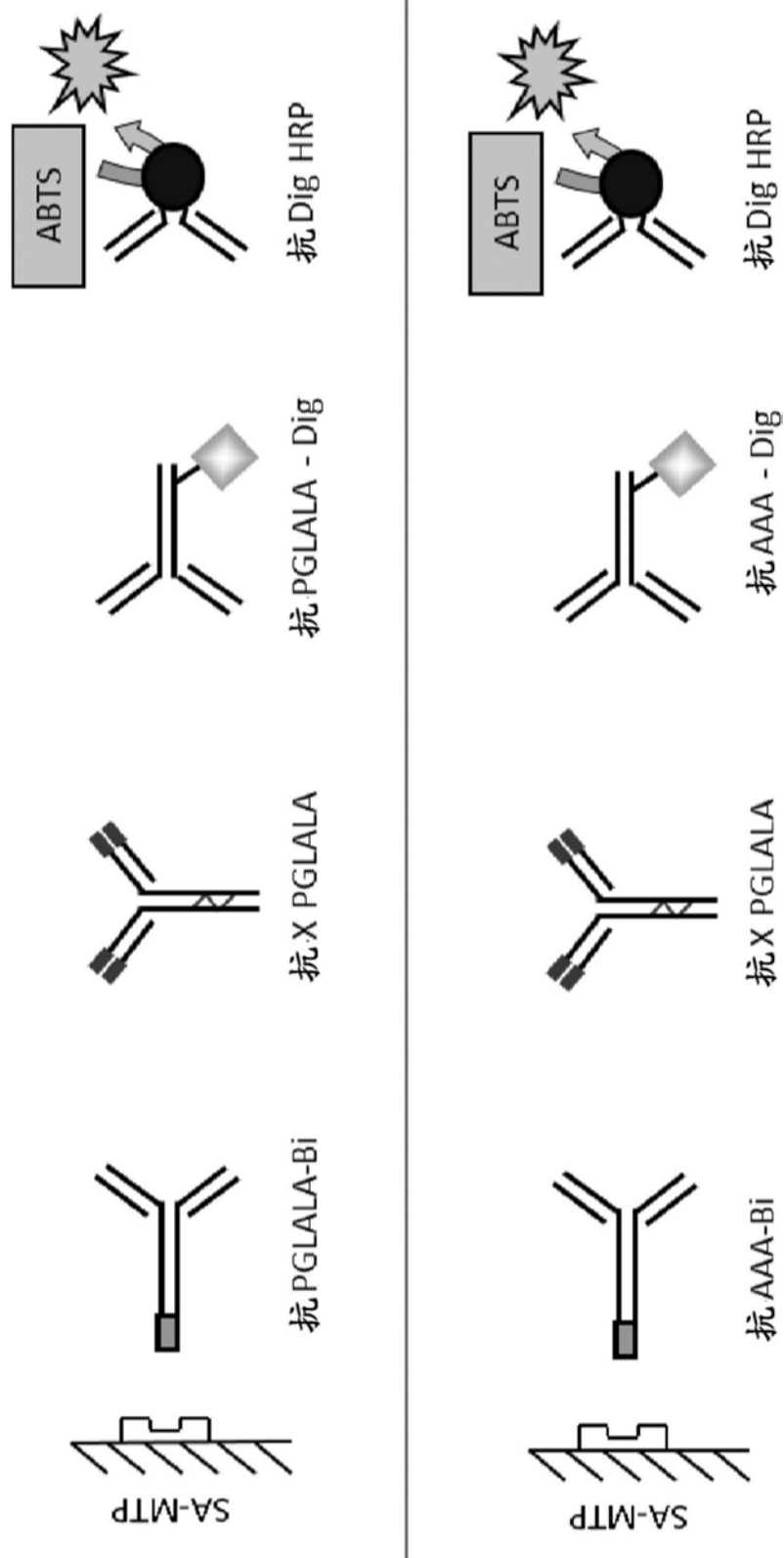


图3

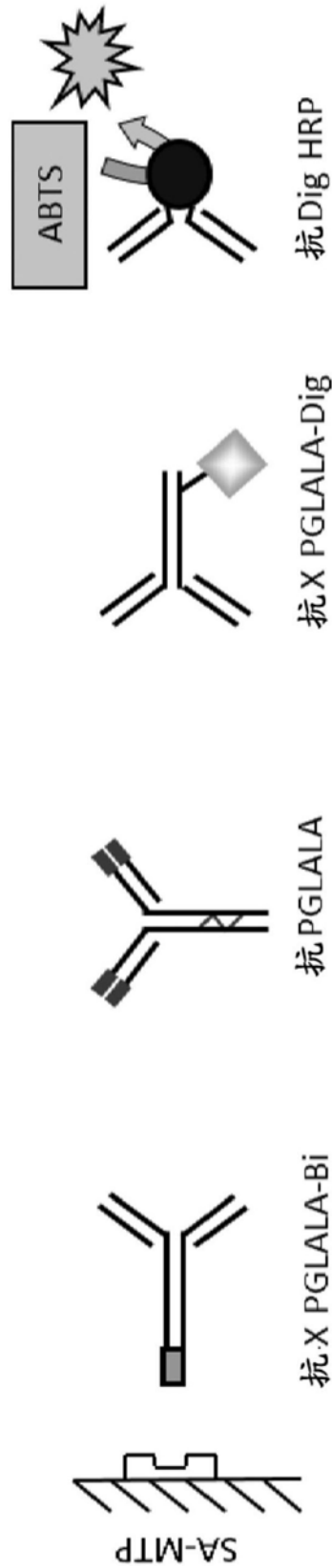


图4

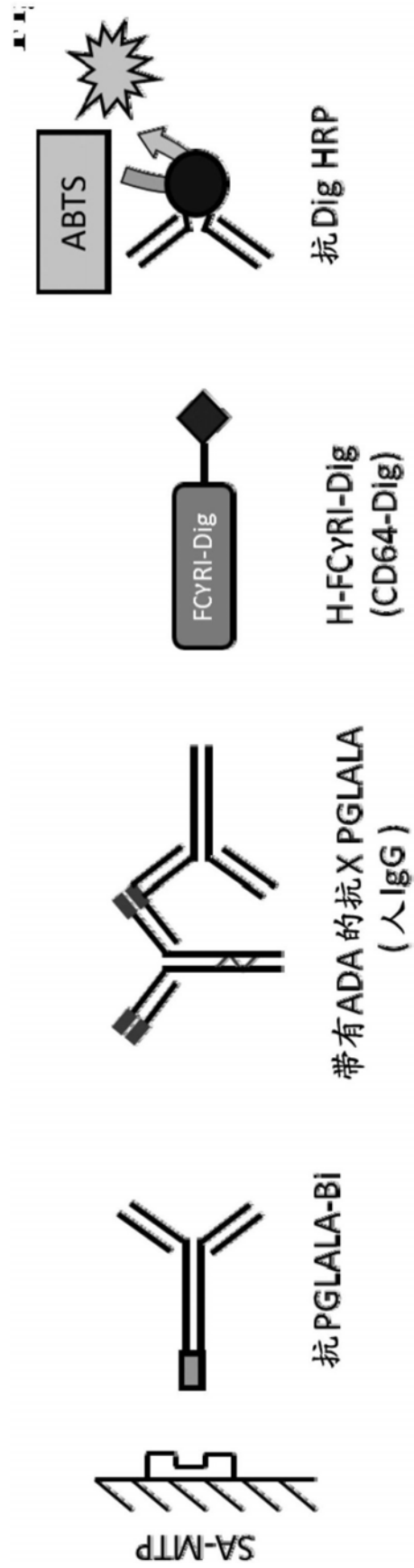


图5

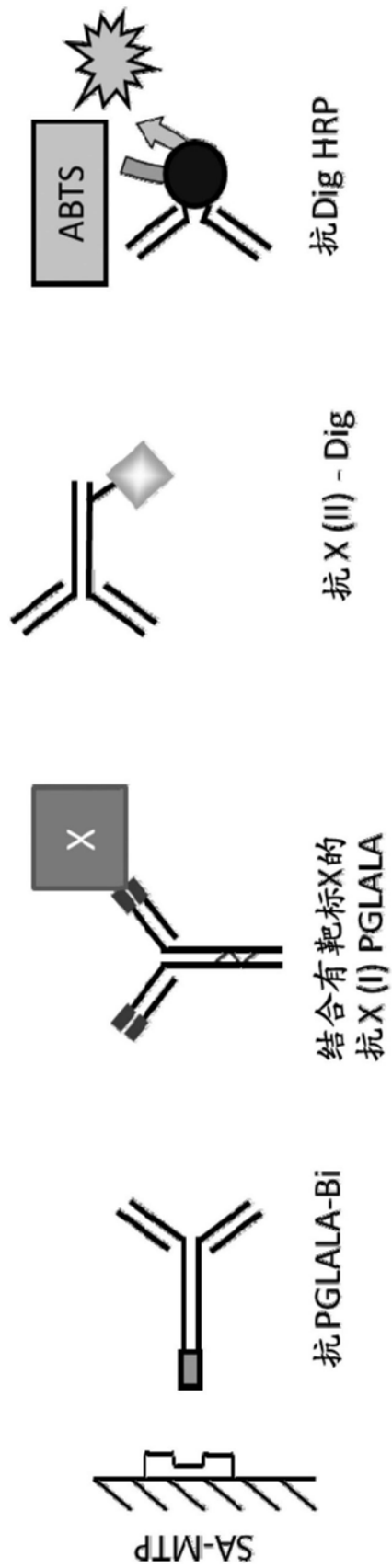
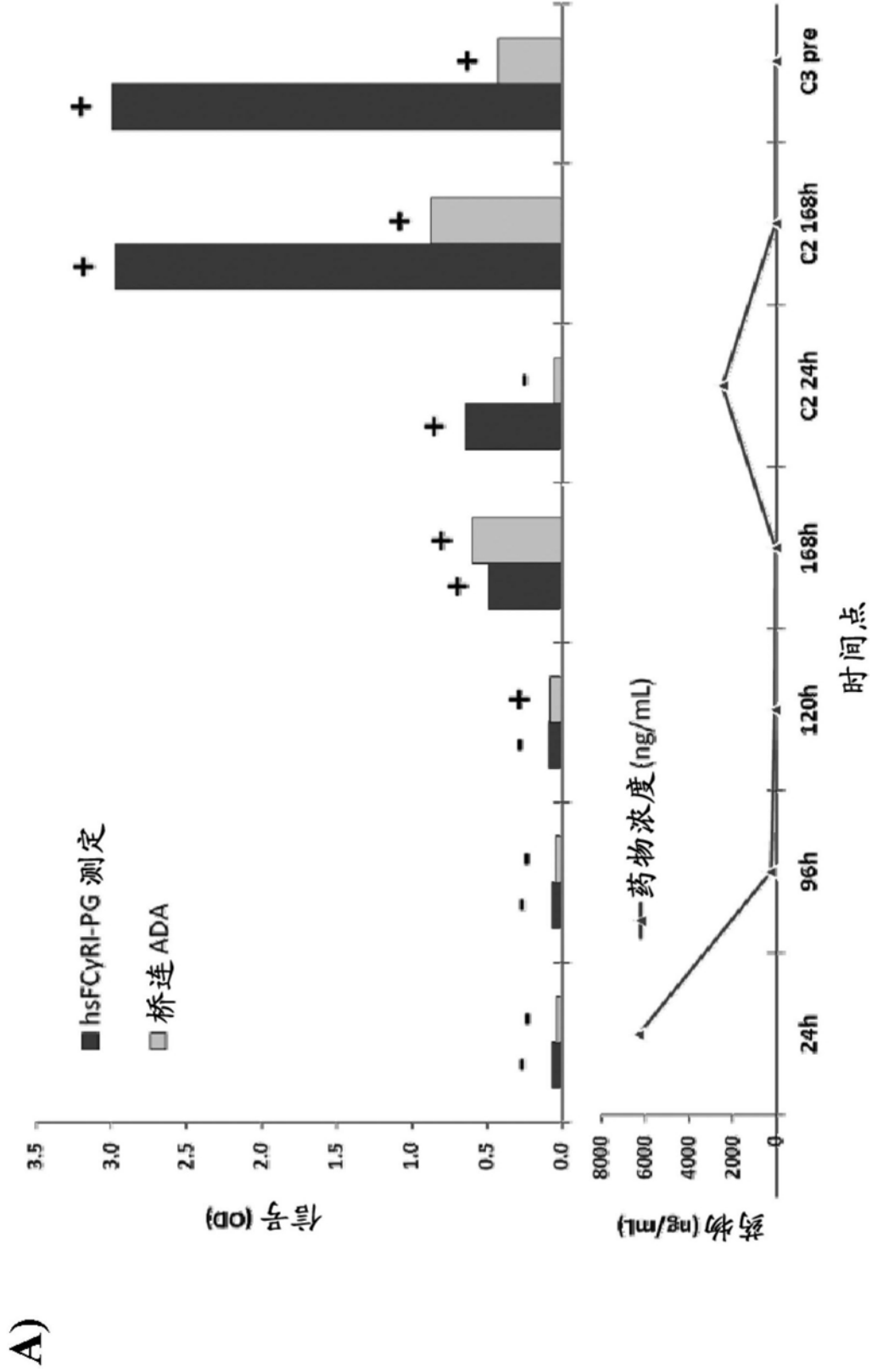
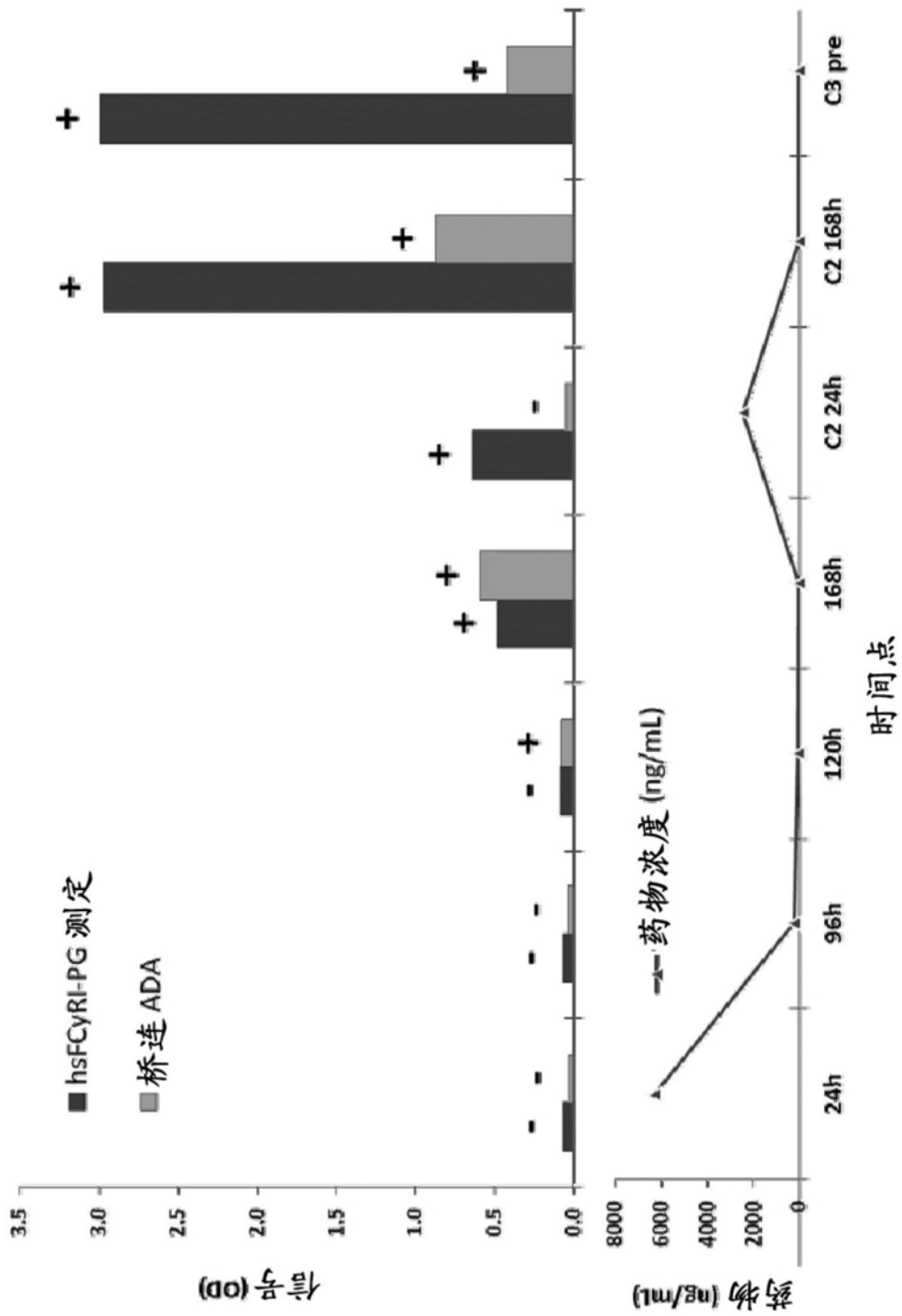


图6



B)



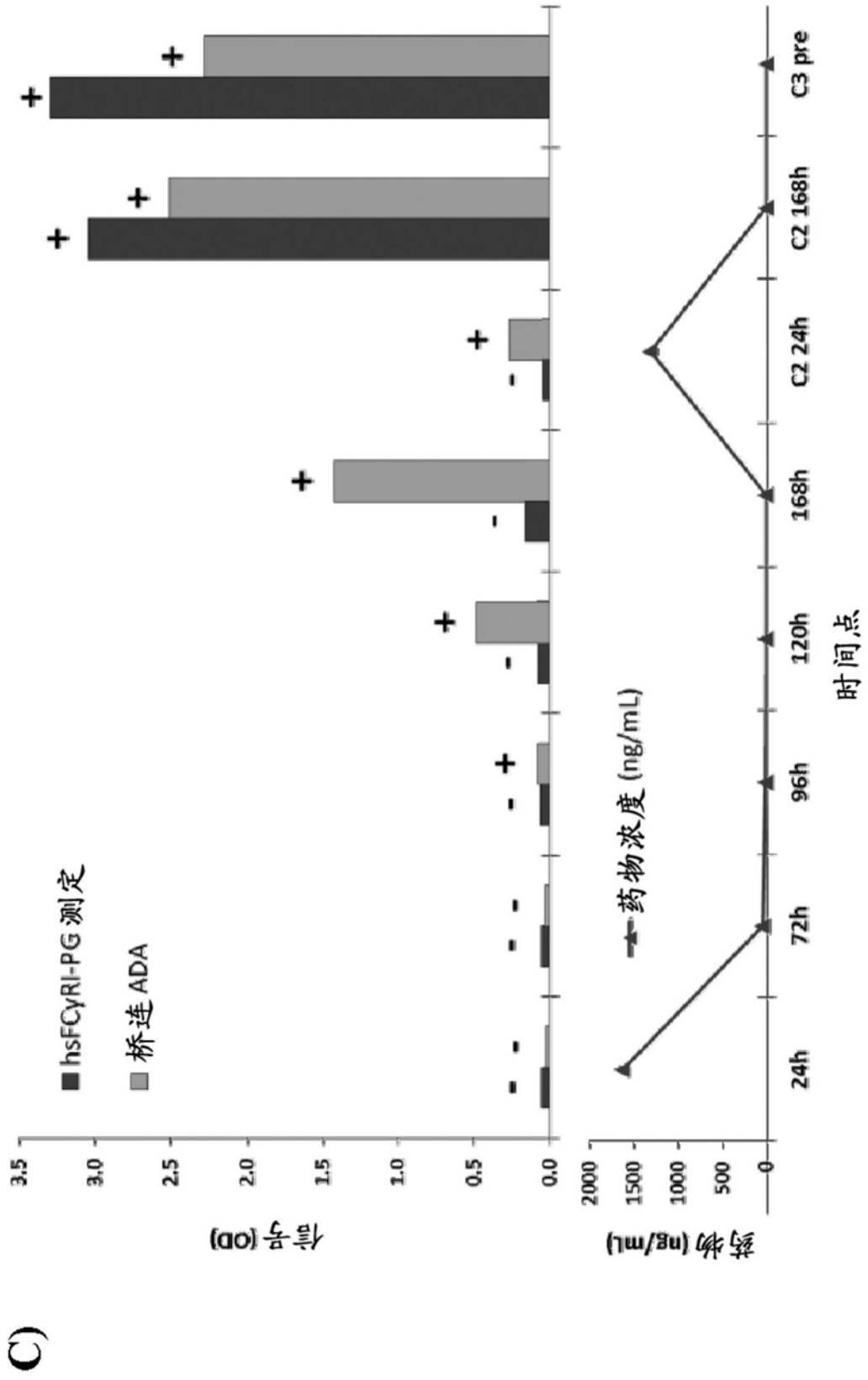


图7

专利名称(译)	抗变体Fc区抗体及使用方法		
公开(公告)号	CN108350066A	公开(公告)日	2018-07-31
申请号	CN201680062688.3	申请日	2016-10-27
申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
[标]发明人	F科瓦莱夫斯基 M里特尔 K G施图本拉赫 U韦塞尔斯		
发明人	F·科瓦莱夫斯基 M·里特尔 K-G·施图本拉赫 U·韦塞尔斯		
IPC分类号	C07K16/22 C07K16/00 G01N33/53 G01N33/68 C07K16/28 C07K16/42		
CPC分类号	C07K16/462 C07K16/00 C07K16/22 C07K16/283 C07K16/2854 C07K16/2863 C07K16/42 C07K2317/24 C07K2317/52 C07K2317/524 C07K2317/526 C07K2317/565 G01N33/5306		
代理人(译)	凌立		
优先权	2015192195 2015-10-29 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供特异性结合在Fc区中具有突变P329G或突变P329G/L234A/L235A或突变I253A/H310A/H435A的抗体的抗变体Fc区抗体及其使用方法。

