



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104335047 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 04

(21) 申请号 201380026695. 4

G01N 33/58 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 05. 23

C07K 16/08 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/650, 964 2012. 05. 23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 11. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/042535 2013. 05. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/177470 EN 2013. 11. 28

(71) 申请人 弗·哈夫曼 - 拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 R·F·凯利 F·泰尔 L·伯恩斯坦

I·霍特策尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书25页 附图11页

(54) 发明名称

治疗剂的选择方法

(57) 摘要

本发明涉及检测治疗性候选物的脱靶结合的方法。此测定法尤其可以在抗体先导物生成或优化期间使用以增加获得合适的药物的概率。

1. 预测治疗剂在食蟹猴、人或食蟹猴和人中是否将具有理想的清除速率的方法,所述方法包括步骤为将治疗剂与杆状病毒颗粒 (BV) 接触,测量治疗剂与 BV 的结合水平和基于结合水平计算治疗剂的 BV 分数,其中在预先测定的阈值之上的 BV 分数提示快速清除速率的增加的可能性,其中在预先测定的阈值之下的 BV 分数提示理想的清除速率的增加的可能性。
2. 根据权利要求 1 的方法,其中在结合治疗剂之前 BV 与微量滴定板结合。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项的方法,其中用检测剂标记治疗剂。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法,还包括将包含检测剂的第二种活性剂与治疗剂结合的步骤。
5. 根据权利要求 3 或 4 中任一项的方法,其中测量来自检测试剂的信号。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项的方法,其中与人中大于 10mL/Kg/ 天的清除速率相关联的 BV 分数被认为是快速清除速率。
7. 根据权利要求 6 中任一项的方法,其中 BV 分数的预先测定的阈值是 5。
8. 根据权利要求 1 的方法,其中治疗剂包含多肽。
9. 根据权利要求 1 的方法,其中治疗剂包含抗体或免疫粘附素。
10. 根据权利要求 1 的方法,其中前两个步骤并入 ELISA 测定法中。
11. 用于测定治疗剂是否将具有理想的清除速率的试剂盒,其中试剂盒包含杆状病毒颗粒和结合人抗体的抗体。
12. 根据权利要求 11 的试剂盒,其中试剂盒还包含微量滴定板。
13. 根据权利要求 11 的试剂盒,其中结合人抗体的抗体结合人抗体的 Fc 区。
14. 根据权利要求 1 的方法,其中 BV 结合于固体支持物上。
15. 根据权利要求 14 的方法,其中固体支持物是微量滴定板。
16. 根据权利要求 15 的方法,其中测量不存在杆状病毒颗粒时治疗剂的结合以得到用于归一化的数值。
17. 根据权利要求 1 的方法,其中任何步骤中不存在洗涤剂。
18. 用于测定治疗剂是否将具有理想的清除速率的试剂盒,其中试剂盒包含杆状病毒颗粒和 ELISA 测定法中的说明。
19. 制备治疗剂的方法,所述方法包括选择在人中具有理想的清除速率的治疗剂并在宿主细胞中表达治疗剂的步骤。
20. 方法还包括回收由宿主细胞表达的治疗剂的步骤。
21. 权利要求 19 或权利要求 20 的方法,其中通过权利要求 1 的方法实现治疗剂的选择。

治疗剂的选择方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2012 年 5 月 23 日提交的美国临时申请号 61/650,964 的权益,所述临时申请以其整体并入本文作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于鉴定治疗剂的选择方法,所述治疗剂具有在人或人和食蟹猴中具有快速清除的增加了的风险,和降低此类治疗剂的清除的方法。

[0004] 背景

[0005] 人或人源化单克隆抗体已经广泛地成功用作人类疾病的治疗剂。多于 30 种抗体已经收到了 FDA 许可用于治疗多种病症,同时上百种更多的抗体目前处于临床开发中¹。除了使用抗体治疗剂能够达到的精确的选择性和高效价之外,抗体作为药物的成功很大地得益于其通常长的循环半寿期。从血液中缓慢清除使得能够以不频繁的给药实现期望的药物浓度。抗体药物通常经由静脉内输注或皮下注射施用,并且较不频繁的施用提高了患者依从和因此临床益处。

[0006] 抗体可以通过若干种机制从全身循环中消除 – 液相内吞作用后的细胞内分解代谢(非特异性清除),抗原介导的清除⁴,和在一些情况下由于形成抗治疗抗体(ATA)。抗原介导的清除通常在抗体结合与细胞结合的抗原时观察到,并且在低浓度抗体时最为明显,并且通常可以通过增加抗体剂量饱和。已经观察到 ATA 在给药后 4-7 天出现,涉及形成免疫复合物,所述免疫复合物可以被快速清除,并且有些时候可以从抗体的血浆浓度 – 时间谱的非典型形状容易地检测到。

[0007] 通过 FcRn 依赖性回收机制减缓抗体消除。当抗体穿过内吞作用途径时,其可以在 pH<6 时结合 FcRn。与 FcRn 结合保护 IgG 免受分解代谢并且促进回到顶端细胞表面,在此其可以在血液的 pH(>7) 快速释放。这些特征导致人或人源化抗体在人中半寿期为 6-32 天(Keizer, R. J., Huitema, A. D. R., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H. Clinical Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies. Clinical Pharmacokinetics 49, 493-507(2010))。在 12 种 IgG1 抗体的药物代谢动力学数据的基础上,测定了人中清除的平均值为 3.9 ± 1.2 (S. D.) mL/kg/天,范围为 ~ 2-6 mL/kg/天(Deng, R. 等人. Projecting human pharmacokinetics of therapeutic antibodies from nonclinical data: What have we learned? mAbs 3, 61-66(2011))。相似地,这些抗体在食蟹猴中的研究得到了 6.5 ± 2.9 (S. D.) mL/kg/天的平均清除。增加 pH 6.0 时与 FcRn 结合的抗体 Fc 区的改造能够增加潜在治疗抗体在食蟹猴和小鼠中的半寿期(Dall'Acqua, W. F., Kiener, P. A. & Wu, H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). The Journal of biological chemistry 281, 23514-23524(2006); Hinton, P. R. 等人 An Engineered Human IgG1 Antibody with Longer Serum half life. J Immunol 176, 346-356(2006); Yeung, Y. A. 等人 Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement

on pharmacokinetics in primates. *J Immunol* 182, 7663–7671 (2009); Zalevsky, J. 等人 Enhanced antibody half life improves in vivo activity. *Nature biotechnology* 28, 157–159 (2010)。

[0008] 潜在治疗抗体在相关的非人物种中的临床前测试对于获得对人对预期的给药治疗方案的理解,以及评价潜在毒性是必须的。考虑到人和非人灵长动物 (NHP) 之间的高靶抗原序列同源性,和对于回收 FcRn 受体的相似的结合亲和力 (Dall'Acqua, Kiener&Wu, 见上文),食蟹猴是临床前药物代谢动力学 (PK) 和毒理学研究的优选的物种。先前我们已经显示在人对测定的治疗 IgG1 抗体的非特异性清除通常是在食蟹猴中测量的约一半 (Deng, R. 等人, 见上文)⁸。

[0009] 快于预期的清除的一个潜在机制是脱靶 (off-target) 结合¹³⁻¹⁶。尽管有时可以鉴定并消除高特异性的脱靶结合,¹⁴ 通常脱靶结合的来源是未知的并且难以用增加剂量来饱和。尚未建立评价和预测抗体的体内吸收、分布、代谢,和消除机制或体内药物代谢动力学行为的体外系统。我们寻求开发非特异性结合的体外测定法,所述测定法可用于鉴定可能表现出快速体内清除的抗体。

[0010] 附图简述

[0011] 图 1 是显示了在人和食蟹猴中测量的抗体清除值的关联的图 ($\rho = 0.74, n = 16$)。对于我们的分析,选择的抗体剂量被认为是饱和和任何靶依赖性清除。实线是人清除的对数对于食蟹猴清除的对数的线性回归拟合。对于显示的大多数抗体,人清除比对应的食蟹猴清除慢大约 2 倍。相比之下,对于抗 NRP1,人中清除 (9.2 mL/kg/天) 比食蟹猴中清除 (4.3 mL/kg/天) 快 ~ 2 倍。

[0012] 图 2 是显示食蟹猴中抗体 ($n = 52$) 的清除值的图。显示了来自给药组的几何平均值,其中假定任何特异性清除对报道的清除的贡献是可忽略的。除了 4 个研究之外,平均值来自 3 或更多只动物。显示了人源化的 (圆圈)、人 (方形)、合成的人噬菌体衍生的 (三角),和嵌合的 (菱形) 抗体。实心标志提示抗体具有 λ 轻链,全部其他具有 κ 轻链。具有铰链稳定突变体 S228P 的 IgG4 同种型抗体用“x”标记,全部其他为 IgG 1 同种型。几何形状内的水平线提示 afucosylated 抗体。通过几何形状内的点提示经由用 Ala 替换 Asn297 得到的 aglycosylated 抗体。通过几何形状内的垂直线提示具有调节 Fc γ R 结合的 Fc 氨基酸替换的抗体。

[0013] 图 3 是显示人源化的和衍生自噬菌体展示文库的合成的人抗体在食蟹猴中的清除值的比较的盒形图。未显示嵌合抗体 ($n = 1$) 和来自非噬菌体来源的人抗体 ($n = 3$) 因为非常小量的数据集。图显示被盒形图覆盖的单个数据值。盒形图矩形显示第一四分位数 (第 25 百分位) 和第三四分位数 (第 75 百分位) 之间的四分位数间距 (IQR); 盒形图矩形内较粗的水平线处于中位数 (第 50 百分位)。下盒形图线延伸至仍在下四分位数的 1.5IQR 之内的最低的数据值,而上线延伸至上四分位数的 1.5IQR 之内的最高数据值。

[0014] 图 4 说明了食蟹猴中抗体清除和对于食蟹猴 FcRn 的结合亲和力 ($K_D, pH 5.8$) 之间的关系。使用如图 2 中定义的标志。如 Yeung 等人, 2010 所述从 SPR 数据的稳态分析测定了 nM 的解离常数 (K_D)。使用的标志与图 2 相同。

[0015] 图 5 说明了 A) 食蟹猴和 B) 人中抗体清除值与归一化的 BV ELISA 分数的关联。BV ELISA 分数 >5 与食蟹猴中增加的快速清除的风险有关 ($\rho = 0.53, n = 45$)。从 6 次测定

的平均计算 BV 分数 ;通过除以相同测定板上的非包被的孔观察到的信号归一化每次测定。BV 分数 <5 的抗体中的 12% 在食蟹猴中清除 >10mL/kg/ 天, 而 BV 分数 >5 的抗体中的 75% 清除超过 10mL/kg/ 天。比值比的最大似然估计为 19.5 (费希尔精确检验, 95% 置信区间 (3.3, 165.7))。置信区间提示对于 BV>5 更快清除的几率增加 3.3 至 166 倍 ;区间不含有 1 提示了统计显著性。B) BV ELISA 分数 >5 与人中增加的快速清除的风险相关 ($\rho = 0.83, n = 16$)。

[0016] 图 6-8 显示食蟹猴中的抗体清除和抗体之间分别关于 A) pI, B) 如 HIC 测定的疏水性, 和 C) Fv 结构域计算的电荷的关系。

[0017] 图 9 显示食蟹猴清除和 BV ELISA 分数是相关联的。

[0018] 图 10 显示食蟹猴清除和归一化的 BV 分数之间的关联在测试为具有 HIII 和 $\kappa 1$ 框架和不同 CDR 和游标位置的 IgG1 抗体之间仍然存在。

[0019] 图 11 显示人清除和 BV ELISA 分数之间的关联甚至对于抗 NRP-1 抗体依然存在。

[0020] 图 12 显示了降低快速清除风险的可能的筛选级联。

[0021] 详细描述

[0022] 在此我们描述了基于检测与杆状病毒 (BV) 颗粒结合的测定法, 其可用于评价治疗剂的脱靶结合。此测定法尤其可以在抗体先导物生成或优化过程中使用以增加获得合适的药物的概率。

[0023] 通过在本发明的测定法中测试一大组抗体并使用食蟹猴和, 如果可获得的, 人中的相同抗体的药物代谢动力学数据分析测试结果, 我们测定了与回收 FcRn 受体相互作用的改变并不导致这些抗体观察到的比预期更快的清除。我们未发现如其他人所报道的清除与完整抗体的等电点 (pI) 或疏水性相关。我们认为脱靶结合导致许多抗体的快速清除, 尽管在大多数情况下并未鉴定此类脱靶。在非人灵长动物和人中进行药物代谢动力学研究是耗时且昂贵的。在本发明之前, 在进行此类体内药物代谢动力学研究之前, 难以预测潜在的脱靶结合对药物代谢动力学谱的贡献。我们开发了便宜的、更高通量的体外测定法, 其易于使用并且可用于帮助选择具有更高的具有适当的药物代谢动力学性质的可能性的治疗候选物并且不选择具有更高的在非人灵长动物和人中具有不适当的药物代谢动力学性质的可能性的治疗候选物。

[0024] 现在将通过使用以下定义和实例仅作为参考的方式详细描述本发明。本文参考的全部专利和出版物, 包括此类专利和出版物中公开的全部序列明确并入作为参考。

[0025] “治疗剂”指可用于治疗疾病的活性剂。在一个实施方案中, 治疗剂包含一个或多个多肽序列。在另一个实施方案中, 治疗剂包含抗体的序列。在另一个实施方案中, 治疗剂是免疫缀合物。

[0026] 如本文所用的“BV”指杆状病毒颗粒。

[0027] 如本文所用的“BV 分数”指从来自多个 (2 个或更多个) 结合测定法的平均值计算的值, 所述结合测定法测量治疗剂与杆状病毒颗粒的结合水平。

[0028] “归一化的 BV 分数”指这样的 BV 分数, 其中来自每个结合测定法的值在计算平均值之前已经被归一化。在一个实施方案中, 通过用来自每个结合测定法的值除以在非治疗的 (即, 没有 BV) 的测定法中观察到的值实现归一化。在一个实例中, 用来自具有 BV 的每个结合测定法的 OD 值除以对于非包被的孔观察到的 OD 值的平均值。

[0029] “增加的风险”或“增加的可能性”指事件将发生的更大的概率。

[0030] “快速清除”指活性剂在人或食蟹猴中的清除速率。在一个实施方案中，快速清除速率是高于 10mL/kg/ 天的任何速率。在另一个实施方案中，快速清除速率是高于 12mL/kg/ 天的任何速率。

[0031] “理想的清除”指活性剂在人或食蟹猴中的理想的清除速率。在一个实施方案中，理想的清除速率是 8.5mL/kg/ 天或更低的速率。在另一个实施方案中，理想的清除速率是 12mL/kg/ 天或更低的速率。

[0032] 如本文所用，术语“免疫粘附素”指抗体样分子，其组合了异源蛋白质（“粘附素”）的结合特异性与免疫球蛋白恒定结构域的效应子功能。结构上，免疫粘附素包含具有期望的结合特异性的氨基酸序列和免疫球蛋白恒定结构域序列的融合物，所述氨基酸序列不是抗体的抗原识别和结合位点（即，是“异源的”）。免疫粘附素分子的粘附素部分通常是连续的氨基酸序列，至少包含受体或配体的结合位点。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定结构域序列可以从任何免疫球蛋白获得，诸如 IgG-1、IgG-2、IgG-3，或 IgG-4 亚型、IgA（包括 IgA-1 和 IgA-2）、IgE、IgD 或 IgM。

[0033] “融合蛋白”和“融合多肽”指具有至少两个共价连接在一起的部分的多肽，其中每个部分是具有不同性质的多肽。性质可以是生物学性质，诸如体外或体内活性。性质也可以是简单的化学或物理性质，诸如结合靶分子、催化反应等。所述部分可以通过单肽键或通过含有一个或多个氨基酸残基的肽接头直接连接。一般而言，所述部分和接头彼此符合读框。

[0034] 术语“抗体”在本文以最广泛的含义使用并且涵盖多种抗体结构，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），和抗体片段只要其展示出期望的抗原结合活性。

[0035] “抗体片段”指不是完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述部分结合完整抗体结合的抗原。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）；和从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0036] 与参照抗体“结合相同表位的抗体”指在竞争测定法中阻断参照抗体与其抗原的结合的 50% 或更多的抗体，并且相反地，参照抗体在竞争测定法中阻断所述抗体与其抗原的结合的 50% 或更多。本文提供了示例性的竞争测定法。

[0037] 术语“嵌合的”抗体指这样的抗体，其中重链和 / 或轻链的一部分源自特别的来源或物种，而重链和 / 或轻链的剩余部分源自不同的来源或物种。

[0038] 抗体的“类别”指其重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。有五种主要的抗体类别：IgA、IgD、IgE、IgG，和 IgM，并且这些中的若干可进一步分为亚类（同种型），例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1，和 IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ ，和 μ 。

[0039] 如本文所用的术语“细胞毒性剂”指抑制或阻止细胞功能和 / 或导致细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括，但不限于，放射性同位素（例如，At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、Pb212 和 Lu 的放射性同位素）；化疗剂或药物（例如，甲氨蝶呤、阿霉素、长春花生物碱类（长春新碱、长春花碱、依托泊苷）、多柔比星、美法仑、丝裂霉素 C、瘤可宁、道诺霉素或其他嵌入剂）；生长抑制剂；酶及其片段诸如核酶；抗生素；

毒素诸如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素,包括其片段和 / 或变体 ;和下文公开的多种抗肿瘤或抗癌剂。

[0040] “效应子功能”指可以归因于抗体的 Fc 区的那些生物学活性,其可以随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括 :C1q 结合和补体依赖性细胞毒性 (CDC) ;Fc 受体结合 ;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) ;吞噬作用 ;细胞表面受体 (例如 B 细胞受体) 的下调 ;和 B 细胞激活。

[0041] 活性剂,例如药物制剂的“有效量”指必要的剂量和时间段的,有效达到期望的治疗或预防结果的量。

[0042] 本文的术语“Fc 区”用于定义至少含有恒定区的一部分的免疫球蛋白重链的 C 末端区。此术语包括天然序列 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 延伸至重链的羧基末端。然而,Fc 区的 C 末端赖氨酸 (Lys447) 可或可不存在。除非本文另外说明,Fc 区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据 EU 编号系统,也称为 EU 索引,如 Kabat 等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述。

[0043] “框架区”或“FR”指非超变区 (HVR) 残基的可变结构域残基。可变结构域的 FR 通常由 4 个 FR 结构域组成 :FR1、FR2、FR3, 和 FR4。因此,HVR 和 FR 序列通常在 VH (或 VL) 中的下列序列中出现 :FR1-H1 (L1) -FR2-H2 (L2) -FR3-H3 (L3) -FR4。

[0044] 术语“全长抗体”、“完整抗体”,和“整个抗体”在本文可互换地使用以指具有与天然抗体结构基本相同的结构或具有含有如本文定义的 Fc 区的重链的抗体。

[0045] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”,和“宿主细胞培养物”可互换使用并指其中已经导入了外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,其包括原代转化的细胞和源自其的后代而不论传代次数。后代与亲本细胞在核酸内容上可以不是完全相同的,但可以含有突变。本文包括具有与初始转化的细胞中所筛选的或选择的相同的功能或生物学活性的突变体后代。

[0046] “免疫缀合物”是与一个或多个异源分子缀合的抗体,包括但不限于细胞毒性剂或检测剂。

[0047] 术语“检测”旨在包括测定物质的存在或不存在或对物质的量进行定量。此术语因此指本发明的材料、组合物和方法用于定性和定量测定的用途。

[0048] “个体”或“对象”是哺乳动物。哺乳动物包括,但不限于驯养动物 (例如牛、绵羊、猫、狗和马),灵长动物 (例如人和非人灵长动物诸如猴),兔,和啮齿动物 (例如小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,个体或对象是人。

[0049] “分离的”抗体是已经从其天然环境的组分中分离出的抗体。在一些实施方案中,将抗体纯化至大于 95% 或 99% 的纯度,这是如通过,例如,电泳 (例如, SDS-PAGE、等电点聚焦 (IEF)、毛细电泳) 或色谱 (例如,离子交换或反相 HPLC) 所测定的。对于评估抗体纯度的方法的综述,参见,例如, Flatman 等人, J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)。

[0050] “分离的”核酸指已经从其天然环境的组分中分离出的核酸分子。分离的核酸分子包括通常含有核酸分子的细胞中含有的核酸分子,但核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置处。

[0051] “编码抗体的分离的核酸”指编码抗体重链和轻链 (或其片段) 的一种或多种核酸

分子,包括在单个载体或不同的载体中的(一种或多种)此类核酸分子,和存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的(一种或多种)此类核酸分子。

[0052] 如本文所用的术语“单克隆抗体”指从基本均质的抗体的群体中获得的抗体,即成群体的单个抗体相同和/或结合相同表位,除了可能的变体抗体,例如,含有天然存在的突变或在生产单克隆抗体制剂的过程中出现,此类变体通常以少量存在。与通常包括针对不同决定簇(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个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。因此,修饰语“单克隆”提示抗体的特征为从基本均质的抗体群体中获得,并且不被理解为需要通过任何特别的方法生产抗体。例如,待根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括但不限于杂交瘤方法、重组 DNA 方法,噬菌体展示方法,和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此类方法和其他示例性方法。

[0053] “裸露的抗体”指未与异源部分(例如,细胞毒性部分)或放射标签缀合的抗体。裸露的抗体可以存在于药物制剂中。

[0054] “天然的抗体”指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然 IgG 抗体是约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白,由二硫键结合的两条相同的轻链和两条相同的重链组成。从 N 至 C 端,每条重链具有重链可变区(VH),也称为可变重链结构域或重链可变结构域,其后为三个恒定结构域(CH1、CH2,和 CH3)。相似地,从 N 至 C 末端,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,其后为恒定轻链(CL)结构域。抗体的轻链可以指定为两种类型中的一种,称为 κ 和 λ ,基于其恒定结构域的氨基酸序列。

[0055] 术语“包装说明书”用于指习惯上包括在治疗产品的商业包装中的说明,其含有有关适应症、用法、剂量、施用、组合疗法、禁忌症和/或关于此类治疗产品的使用的警告的信息。

[0056] 术语“药物制剂”指这样的制剂,其处于允许其中含有的活性成分的生物学活性有效的形式,并且不含有对制剂将施用的对象具有不可接受的毒性的额外组分。

[0057] “可药用的载体”指药物制剂中的成分,其非活性成分,对于对象无毒。可药用的载体包括,但不限于,缓冲液、赋形剂、稳定剂,或防腐剂。

[0058] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变化诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)指尝试改变受治疗的个体的自然过程的临床干预,并且可以用于预防或在临床病理性的过程中进行。治疗的理想的效果包括但不限于,防止疾病的发生或复发,减轻症状,减少疾病的任何直接的或间接的病理学结果,防止转移,降低疾病进展速度,缓和或减轻疾病状态,和缓解或改善的预后。在一些实施方案中,本发明的抗体用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进程。

[0059] 术语“可变区”或“可变结构域”指涉及抗体与抗原的结合的抗体重链或轻链结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为 VH 和 VL)大体上具有相似的结构,每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个超变区(HVR)(参见,例如,Kindt 等人 *Kuby Immunology*, 第 6 版,W.H.Freeman and Co., 第 91 页(2007))。单个 VH 或 VL 结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特别抗原的抗体可以使用来自结合该抗原的抗体的 VH 或 VL 结构域分离以分别筛选互补 VL 或 VH 结构域的文库。参见,例如,Portolano 等人, *J. Immunol.* 150:880-887(1993);Clarkson 等人, *Nature* 352:624-628(1991)。

[0060] 如本文所用的术语“载体”指能够增殖与其连接的另一核酸的核酸分子。此术语包括作为自我复制性的核酸结构的载体以及并入其导入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其有效连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0061] 在其他方面,根据以上实施方案中的任一种的抗体可以单独或组合地包括如以下章节 1-7 中所述的任何特征。

[0062] 1. 抗体亲和力

[0063] 在某些实施方案中,本文提供的抗体具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 、或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更低,例如从 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如,从 10^{-9}M 至 10^{-13}M) 的解离常数 (Kd)。

[0064] 在一个实施方案中,通过放射标记的抗原结合测定法 (RIA) 测量 Kd,所述测定法是如以下测定法所述使用目标抗体的 Fab 形式及其抗原进行的。通过在未标记的抗原的滴定系列物的存在下用最低浓度的 (^{125}I)-标记的抗原平衡 Fab,然后用抗 Fab 抗体包被的平板捕获结合的抗原,测量 Fab 对抗原的溶液结合亲和力 (参见,例如,Chen 等人, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999))。为了建立此测定法的条件,用在 50mM 碳酸钠 (pH9.6) 中的 $5 \mu\text{g/ml}$ 的捕获抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) 过夜包被 **MICROTITER®** 多孔板 (Thermo Scientific),并随后用 PBS 中的 2% (w/v) 牛血清白蛋白在室温 (约 23°C) 封闭 2 至 5 小时。在非吸收性板 (Nunc#269620) 中,将 100pM 或 26pM [^{125}I]-抗原与目标 Fab 的系列稀释液混合 (例如,与 Presta 等人, Cancer Res. 57:4593-4599(1997) 中的抗 VEGF 抗体、Fab-12 的评估一致)。然后过夜孵育目标 Fab;然而,孵育可以继续更长的时间 (例如,约 65 小时) 以确保达到平衡。此后,将混合物转移到捕获板上用于在室温孵育 (例如,1 小时)。然后移除溶液并用 PBS 中的 0.1% 聚山梨醇酯 20 (**TWEEN-20®**) 洗板 8 次。当板已经干燥时,添加 $150 \mu\text{l}$ /孔的闪烁剂 (MICROSCINT-20TM;Packard),并在 TOPCOUNT TM γ 计数器 (Packard) 上对板计数 10 分钟。选择给出少于或等于 20% 的最大结合的每个 Fab 浓度用于竞争性结合测定法中。

[0065] 根据另一个实施方案,使用表面等离子共振测定法测量 Kd,所述表面等离子共振测定法在 25°C 使用具有 ~ 10 响应单元 (RU) 的固定化的抗原 CM5 芯片的 **BIACORE®-2000** 或 **BIACORE®-3000** (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)。简而言之,根据供应商的说明使用 N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 激活羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片 (CM5, BIACORE, Inc.)。用 10mM 醋酸钠, pH 4.8 将抗原稀释至 $5 \mu\text{g/ml}$ ($\sim 0.2 \mu\text{M}$),然后以 $5 \mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速注射以达到约 10 响应单元 (RU) 的偶联的蛋白质。在注射抗原后,注射 1M 乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量,在 25°C 以约 $25 \mu\text{l}/\text{min}$ 的流速在具有 0.05% 聚山梨醇酯 20 (TWEEN-20TM) 表面活性剂的 PBS (PBST) 中注射 Fab 的 2 倍系列稀释物 (0.78nM 至 500nM)。使用简单一对一 Langmuir 结合模型 (simple one-to-one Langmuir binding model) (**BIACORE®** 评价软件版本 3.2) 通过同时拟合缔合和解离传感图计算缔合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (Kd) 计算为比例 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。参见,例如,Chen 等人, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)。如果通过以上的表面等离子共振测定法缔合速率超过 $106\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,则可以通过使用荧光淬灭技术测定缔合速率,所述荧光淬灭技术在如分光

光度计（诸如配有停留的分光光度计 (Aviv Instruments) 或具有搅拌的比色杯的 8000 系列 SLM-AMINCO™ 分光光度计 (ThermoSpectronic)）测量的增加的浓度的抗原的存在下，测量 25℃ 时 PBS, pH 7.2 中的 20nM 抗 - 抗原抗体 (Fab 形式) 的荧光发射强度（激发 = 295nm；发射 = 340nm, 16nm 带通）的增加或降低。

[0066] 2. 抗体片段

[0067] 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，和下文描述的其他片段。某些抗体片段的综述参见 Hudson 等人 *Nat. Med.* 9:129-134(2003)。scFv 片段的综述参见例如 Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg 和 Moore 编, (Springer-Verlag, New York), 第 269-315 页 (1994)；也参见 WO 93/16185；和美国专利号 5,571,894 和 5,587,458。关于包含补救受体结合表位残基和具有增加的体内半寿期的 Fab 和 F(ab')₂ 片段的讨论，参见美国专利号 5,869,046。

[0068] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段，其可为二价的或双特异性的。参见，例如，EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson 等人, *Nat. Med.* 9:129-134(2003)；和 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448(1993)。三链抗体和四链抗体也在 Hudson 等人, *Nat. Med.* 9:129-134(2003) 中描述。

[0069] 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，美国专利号 6,248,516B1)。

[0070] 可以通过多种技术制备抗体片段，包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞（例如大肠杆菌或噬菌体）生产，如本文所述。

[0071] 3. 嵌合和人源化的抗体

[0072] 在某些实施方案中，本文提供的抗体是嵌合抗体。例如，在美国专利号 4,816,567；和 Morrison 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855(1984) 中描述了某些嵌合抗体。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、或非人灵长动物，诸如猴的可变区）和人恒定区。在另外的实例中，嵌合抗体是“类别交换的”抗体，其中类别或亚类已经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。

[0073] 在某些实施方案中，嵌合抗体是人源化的抗体。通常，非人抗体经人源化以降低对人的免疫原性，同时保持亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般地，人源化的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，并且 FR（或其部分）源自人抗体序列。人源化的抗体任选地也包含至少一部分人恒定区。在一些实施方案中，人源化的抗体中的一些 FR 残基被来自非人抗体（例如，HVR 残基源自的抗体）的对应的残基替换，例如，以恢复或提高抗体特异性或亲和力。

[0074] 人源化的抗体和制备其的方法在例如，Almagro 和 Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633(2008) 中综述，并在例如，Riechmann 等人, *Nature* 332:323-329(1988)；Queen 等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033(1989)；美国专利号 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, 和 7,087,409；Kashmiri 等人, *Methods* 36:25-34(2005)（描述了 SDR(a-CDR) 移植）；Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498(1991)（描述了“表面重修”）；Dall'Acqua 等人, *Methods*

36:43-60(2005) (描述了“FR改组”) ;和 Osbourn 等人, Methods 36:61-68(2005) 和 Klimka 等人, Br. J. Cancer, 83:252-260(2000) (描述了 FR 改组的“导向选择”方法) 中进一步描述。

[0075] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最适”方法选择的框架区(参见,例如, Sims 等人 J. Immunol. 151:2296(1993));源自特别亚组的轻链或重链可变区的人抗体的共有序列的框架区(参见,例如, Carter 等人 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992); 和 Presta 等人 J. Immunol., 151:2623(1993));人成熟(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(参见,例如, Almagro 和 Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008));和源自筛选 FR 文库的框架区(参见,例如, Baca 等人, J. Biol. Chem. 272:10678-10684(1997) 和 Rosok 等人, J. Biol. Chem. 271:22611-22618(1996))。

[0076] 4. 人抗体

[0077] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的多种技术生产人抗体。在 van Dijk 和 van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74(2001) 和 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459(2008) 中大体地描述了人抗体。

[0078] 可以通过对转基因动物施用免疫原制备人抗体,所述转基因动物已被修饰以应答抗原攻击而生产完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有人免疫球蛋白基因座的全部或一部分,其取代了内源性免疫球蛋白基因座,或存在于染色体外或随机整合到动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被失活。获取来自转基因动物的人抗体的方法的综述参见 Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125(2005)。也参见,例如,描述了 XENOMOUSE™ 技术的美国专利号 6,075,181 和 6,150,584;描述了 **HUMAB®** 技术的美国专利号 5,770,429;描述了 K-M **MOUSE®** 技术的美国专利号 7,041,870,和描述了 **VELOCIMOUSE®** 技术的美国专利申请公开号 US 2007/0061900)。来自此类动物生成的完整抗体的人可变区可例如,通过与不同的人恒定区组合进一步修饰。

[0079] 也可以通过基于杂交瘤的技术生产人抗体。已经描述了用于生产人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤细胞系(参见,例如, Kozbor J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeur 等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 和 Boerner 等人, J. Immunol., 147:86(1991))。经由人 B 细胞杂交瘤技术生成的人抗体也在 Li 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562(2006) 中描述。额外的方法包括,例如,在美国专利号 7,189,826 (描述了从杂交瘤细胞系生产单克隆人 IgM 抗体) 和 Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268(2006) (描述了人-人杂交瘤) 中描述的那些。人杂交瘤技术 (Trioma 技术) 也在 Vollmers 和 Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937(2005) 以及 Vollmers 和 Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91(2005) 中描述。

[0080] 也可以通过分离选自源自人的噬菌体展示文库的 Fv 克隆可变结构域序列生成抗体。此类可变结构域序列然后可以与期望的人恒定结构域组合。下文描述了从抗体文库选择人抗体的技术。

[0081] 5. 源自文库的抗体

[0082] 可通过筛选组合文库的具有期望的一种或多种活性的抗体分离本发明的抗体。例如,本领域已知用于生成噬菌体展示文库和筛选此类文库的具有期望的结合特征的抗体的多种方法。此类方法在例如 Hoogenboom 等人 *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien 等人, 编辑, Human Press, Totowa, NJ, 2001) 中综述并在, 例如, McCafferty 等人, *Nature* 348:552-554; Clackson 等人, *Nature* 352:624-628 (1991); Marks 等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Marks 和 Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, 编辑, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu 等人, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee 等人, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); 和 Lee 等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004) 中进一步描述。

[0083] 在某些噬菌体展示方法在, VH 和 VL 基因的库通过聚合酶链式反应 (PCR) 分别克隆并在噬菌体文库中随机重组, 其然后可以筛选抗原结合噬菌体如 Winter 等人, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994) 中所述。噬菌体通常展示抗体片段, 作为单链抗体 Fv (scFv) 片段或作为 Fab 片段。来自经免疫的来源的文库提供了对免疫原高亲和力的抗体而不需要构建杂交瘤。备选地, 可以克隆幼稚库 (例如, 从人) 以对广泛范围的非自身以及自身抗原提供单个来源的抗体而没有任何免疫如 Griffiths 等人, *EMBO J.*, 12:725-734 (1993) 所述。最后, 也可以通过克隆来自干细胞的未重排的 V 基因区段, 并使用含有随机序列的 PCR 引物以编码高度可变的 CDR3 区并且实现体外重排, 合成地制备幼稚文库, 如 Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992) 所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括, 例如: 美国专利号 5, 750, 373, 和美国专利公开号 2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936, 和 2009/0002360。

[0084] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段在本文被认为是人抗体或人抗体片段。

[0085] 6. 多特异性抗体

[0086] 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。多特异性抗体是具有对于至少两个不同位点的结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中, 结合特异性之一是对于 [[PRO]] 而另一种是对于任何其他抗原。在某些实施方案中, 双特异性抗体可结合 [[PRO]] 的两种不同表位。双特异性抗体也可用于将细胞毒性剂定位至表达 [[PRO]] 的细胞。双特异性抗体可以作为全长抗体或抗体片段制备。

[0087] 用于制备多特异性抗体的技术包括, 但不限于, 重组共表达具有不同特异性的两条免疫球蛋白重链-轻链对 (参见, Milstein 和 Cuello, *Nature* 305:537 (1983))、W0 93/08829, 和 Traunecker 等人, *EMBO J.* 10:3655 (1991)), 和“节入孔 (knob-in-hole)”改造 (参见, 例如, 美国专利号 5, 731, 168)。也可以通过改造静电转向效应以制备抗体 Fc 异二聚体分子 (W02009/089004A1); 交联两个或多个抗体或片段 (参见, 例如, 美国专利号 4, 676, 980, 和 Brennan 等人, *Science*, 229:81 (1985)); 使用亮氨酸拉链生产双特异性抗体 (参见, 例如, Kostelny 等人, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); 使用用于制备双特异性抗体片段的“双抗体”技术 (参见, 例如, Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); 和使用单链 Fv (sFv) 二聚体 (参见, 例如 Gruber 等人, *J.*

Immunol., 152:5368(1994));和例如,如 Tutt 等人 J. Immunol. 147:60(1991) 中所述制备三特异性抗体,来制备多特异性抗体。

[0088] 本文也包括具有三种或更多种功能性抗原结合位点的经改造的抗体,包括“章鱼抗体”(参见,例如 US 2006/0025576A1)。

[0089] 本文的抗体或片段也包括“双作用 Fab”或“DAF”,其包含结合 [[PRO]] 以及另一个,不同抗原的抗原结合位点(参见,US 2008/0069820, 例如)。

[0090] 7. 抗体变体

[0091] 在某些实施方案中,设想本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,提高抗体的结合亲和力和/或其他生物学性质可以是理想的。可以通过将适当的修饰引入编码抗体的核苷酸序列,或者通过肽合成制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括,例如,在抗体的氨基酸序列内缺失,和/或插入和/或替换残基。可以使得缺失、插入,和替换的任意组合达到最终的构建体中,前提是最终构建体拥有期望的特征,例如,抗原结合。

[0092] a) 替换、插入,和缺失变体

[0093] 在某些实施方案中,提供了具有一个或多个氨基酸替换的抗体变体。替换诱变的目标位点包括 HVR 和 FR。在表 1 中标题“保守替换”下显示保守替换。在表 1 中标题“示例性替换”下提供更实质的改变,并如参考氨基酸侧链类别在下文进一步描述的。可以将氨基酸替换引入到目标抗体中并筛选产物的期望的活性,例如,保留的/提高的抗体结合,降低的免疫原性,或提高的 ADCC 或 CDC。

[0094] 表 1

[0095]

原始残基	示例性替换	优选的替换
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

[0096]

原始残基	示例性替换	优选的替换
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

[0097] 可以根据共同的侧链性质将氨基酸分组：

[0098] (1) 疏水的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0099] (2) 中性亲水的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0100] (3) 酸性的：Asp、Glu；

[0101] (4) 碱性的：His、Lys、Arg；

[0102] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0103] (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

[0104] 非保守替换将使得这些类别中之一的成员与另一类别交换。

[0105] 一类替换变体涉及替换亲本抗体（例如人源化的或人抗体）的一个或多个超变区残基。一般而言，选择用于进一步研究的（一种或多种）获得的变体将在某些生物学性质（例如增加的亲和力、降低的免疫原性）中相对于亲本抗体具有修饰（例如提高）和/或具有基本保留的亲本抗体的某些生物学性质。示例性的替换变体是亲和力成熟的抗体，其可以方便地生成，例如，使用诸如那些本文描述的基于噬菌体展示的亲和力成熟技术。简而言之，突变一个或多个 HVR 残基并且在噬菌体上展示变体抗体并就特别的生物学活性（例如结合亲和力）进行筛选。

[0106] 可以在 HVR 中制造变异（例如，替换），例如，以提高抗体亲和力。此类变异可以在 HVR“热点”，即由在体细胞成熟过程中以高频率经历突变的密码子所编码的残基（参见，例如，Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196(2008)），和/或 SDR (a-CDR) 中制造，测试获得的变体 VH 或 VL 的结合亲和力。通过构建并从第二文库重新选择的亲和力成熟已经在，例如 Hoogenboom 等人 Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien 等人，编辑，Human Press, Totowa, NJ, (2001).) 中描述。在亲和力成熟的一些实施方案中，通过多

种方法中的任何一种（例如，易错PCR、链改组、或寡核苷酸定向诱变）将多样性引入到选择用于成熟的可变基因中。然后制造第二文库。然后筛选文库以鉴定具有期望的亲力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向方法，其中随机化若干HVR残基（例如，一次4-6个残基）。可以特异性地鉴定抗原结合中涉及的HVR残基，例如使用丙氨酸扫描诱变或建模。特别地通常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0107] 在某些实施方案中，替换、插入、或缺失可以在一个或多个HVR内发生，只要此类变异不实质性地降低抗体结合抗原的能力。例如，可以在HVR中制备不实质性地降低结合亲和力的保守的变异（例如，如本文提供的保守替换）。此类替换可以在HVR“热点”或SDR之外。在以上提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中，每个HVR或未改变，或含有不多于一个、两个或三个氨基酸替换。

[0108] 鉴定可被靶向用于诱变的抗体的残基或区域的可用的方法称为“丙氨酸扫描诱变”，如Cunningham和Wells(1989)Science, 244:1081-1085所述。在此方法中，鉴定残基或靶残基的组（例如，带电的残基诸如arg、asp、his、lys、和glu）并使用中性或带负电的氨基酸（例如丙氨酸或多聚丙氨酸）将其取代以测定是否影响抗体与抗原的相互作用。可以在表现出对于初始替换功能性敏感的氨基酸位置处引入其他替换。备选地，或额外地，抗原抗体复合物的晶体结构鉴定抗体和抗原之间的接触点。可以作为替换候选对象靶向或消除此类接触残基和相邻残基。可以筛选变体以测定其是否含有期望的性质。

[0109] 氨基酸序列插入片段包括长度范围从一个残基至含有100个或更多残基的多肽的氨基或羧基末端融合物，以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入片段。末端插入片段的实例包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N或C末端与酶（例如ADEPT）或增加抗体的血清半寿期的多肽的融合。

[0110] b) 糖基化变体

[0111] 在某些实施方案中，本文提供的抗体被改变以增加或降低抗体被糖基化的程度。对抗体添加或删除糖基化位点可以通过改变氨基酸序列从而使得创造或移除一个或多个糖基化位点而方便地实现。

[0112] 当抗体包含Fc区时，可以改变附着于其的糖。由哺乳动物细胞生产的天然抗体通常包含分支的、二天线的寡糖，所述寡糖一般通过N连接附着于Fc区的CH2结构域的Asn297。参见，例如，Wright等人TIBTECH15:26-32(1997)。寡糖可包括多种糖，例如甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖，和唾液酸，以及附着于二天线寡糖结构的“干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中，可以制造本发明的抗体中寡糖的修饰以创造具有某些提高的性质的抗体变体。

[0113] 在一个实施方案中，提供的抗体变体具有缺少（直接或间接）附着于Fc区的岩藻糖的糖结构。例如，此类抗体中岩藻糖的量可以为从1%至80%，从1%至65%，从5%至65%或从20%至40%。通过计算糖链内Asn297处的平均岩藻糖的量相对于如通过MALDI-TOF质谱法测量的附着于Asn297的全部糖基结构的总和（例如，复合，杂合和高甘露糖结构）测定岩藻糖的量，如WO 2008/077546中所述，例如。Asn297指位于Fc区中约297位（Fc区残基的Eu编号）的天冬酰胺残基；然而，Asn297也可位于297位的约±3个氨基酸上游或下游，即位置294和300之间，由于抗体中微小的序列变异。此类岩藻糖化变体可具有提高的ADCC功能。参见，例如，美国专利公开号

US 2003/0157108 (Presta, L.) ;US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。涉及“去岩藻糖化的”或“岩藻糖缺陷的”抗体变体的公开的实例包括 :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 ;WO2005/053742 ;WO2002/031140 ;Okazaki 等人 J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004) ;Yamane-Ohnuki 等人 Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)。能够生产去岩藻糖化的抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖化缺陷的 Lec13 CHO 细胞 (Ripka 等人 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986) ;US 专利申请号 US 2003/0157108A1, Presta, L ;和 WO 2004/056312A1, Adams 等人, 特别在实施例 11 中), 和敲除细胞系, 诸如 α -1, 6-岩藻糖转移酶基因, FUT8, 敲除 CHO 细胞 (参见, 例如, Yamane-Ohnuki 等人 Biotech. Bioeng. 87:614 (2004) ;Kanda, Y. 等人, Biotechnol. Bioeng., 94(4) :680-688 (2006) ;和 WO2003/085107)。

[0114] 提供的抗体变体还具有二分的寡糖, 例如, 其中附着于抗体 Fc 区的二天线寡糖被 GlcNAc 二分。此类抗体变体可具有降低的岩藻糖化和 / 或提高的 ADCC 功能。此类抗体变体的实例描述于例如 WO 2003/011878 (Jean-Mairet 等人) ;美国专利号 6, 602, 684 (Umana 等人) ;和 US 2005/0123546 (Umana 等人) 中。也提供了在附着于 Fc 区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可具有提高的 CDC 功能。此类抗体变体描述于例如 WO 1997/30087 (Patel 等人) ;WO 1998/58964 (Raju, S.) ;和 WO 1999/22764 (Raju, S.) 中。

[0115] c) Fc 区变体

[0116] 在某些实施方案中, 可以将一个或多个氨基酸修饰引入到本文提供的抗体的 Fc 区中, 从而生成 Fc 区变体。Fc 区变体可以包含人 Fc 区序列 (例如, 人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区), 所述序列在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰 (例如替换)。

[0117] 在某些实施方案中, 本发明设想具有一些但并非全部效应子功能的抗体变体, 这使得其是这样的应用的理想的候选者, 所述应用中抗体的体内半寿期是重要的然而某些效应子功能 (诸如补体和 ADCC) 是不必要的或有害的。可以进行体外和 / 或体内细胞毒性测定法以确认 CDC 和 / 或 ADCC 活性的降低 / 耗尽。例如, 可以进行 Fc 受体 (FcR) 结合测定法以确保抗体缺少 Fc R 结合 (因此可能缺少 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 RIII, 然而单核细胞表达 Fc RI、Fc RII 和 Fc RIII。造血细胞上的 FcR 表达在 Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991) 的 464 页上的表 3 中总结。用于评估目标分子的 ADCC 活性的体外测定法的非限制性实例描述于美国专利号 5, 500, 362 (参见, 例如 Hellstrom, I. 等人 Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) 和 Hellstrom, I 等人, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985) ;5, 821, 337 (参见 Bruggemann, M. 等人, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)) 中。备选地, 可以采用非放射性测定法 (参见, 例如, 流式细胞术的 ACTI™ 非放射性细胞毒性测定法 (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA ;和 **CytoTox 96®** 非放射性细胞毒性测定法 (Promega, Madison, WI))。用于此类测定法的有用的效应子细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。备选地, 或额外地, 目标分子的 ADCC 活性可以在体内评估, 例如在动物模型中, 诸如 Clynes 等人 Proc. Nat' l

Acad. Sci. USA95:652-656(1998) 中公开的。也可以进行 C1q 结合测定法以确认抗体不能结合 C1q 并因此缺少 CDC 活性。参见,例如,WO 2006/029879 和 WO 2005/100402 中的 C1q 和 C3c 结合 ELISA。为了评估补体激活,可以进行 CDC 测定法(参见,例如,Gazzano-Santoro 等人, J. Immunol. Methods202:163(1996);Cragg, M. S. 等人, Blood 101:1045-1052(2003); 和 Cragg, M. S. 和 M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743(2004))。FcRn 结合和体内清除 / 半寿期测定也可以使用本领域已知的方法进行(参见,例如, Petkova, S. B. 等人, Int' l. Immunol. 18(12):1759-1769(2006))。

[0118] 具有降低的效应子功能的抗体包括在 Fc 区残基 238、265、269、270、297、327 和 329 中的一个或多个具有替换的那些抗体(美国专利号 6, 737, 056)。此类 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替换的 Fc 突变体,包括具有残基 265 和 297 替换为丙氨酸的所谓的“DANA”Fc 突变体(美国专利号 7, 332, 581)。

[0119] 描述了具有提高的或减弱的与 FcR 结合的某些抗体变体。(参见,例如,美国专利号 6, 737, 056;WO 2004/056312, 和 Shields 等人, J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)。)

[0120] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有提高 ADCC 的一个或多个氨基酸替换的 Fc 区,例如 Fc 区的位置 298、333,和 / 或 334 处(残基的 EU 编号)的替换。

[0121] 在一些实施方案中,在 Fc 区制造改变,其导致改变的(即提高的或减弱的)C1q 结合和 / 或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如,如美国专利号 6, 194, 551, WO 99/51642, 和 Idusogie 等人 J. Immunol. 164:4178-4184(2000) 中所述。

[0122] 具有增加的半寿期和提高的与新生儿 Fc 受体(FcRn)的结合的抗体在 US2005/0014934A1(Hinton 等人)中描述,所述新生儿 Fc 受体负责母体 IgG 转移至胎儿(Guyer 等人, J. Immunol. 117:587(1976) 和 Kim 等人, J. Immunol. 24:249(1994))。那些抗体包含其中具有提高 Fc 区与 FcRn 的结合的一个或多个替换的 Fc 区。此类 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替换的那些,例如 Fc 区残基 434 的替换(美国专利号 7, 371, 826)。

[0123] 关于 Fc 区变体的其他实例也参见 Duncan&Winter, Nature322:738-40(1988);美国专利号 5, 648, 260;美国专利号 5, 624, 821;和 WO 94/29351。

[0124] d) 半胱氨酸改造的抗体变体

[0125] 在某些实施方案中,创造半胱氨酸改造的抗体是理想的,例如,“thioMAb”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基替换。在特别的实施方案中,被替换的残基存在于抗体的易接近的位点处。通过用半胱氨酸替换那些残基,从而将反应性硫醇基团放置于抗体的可接近位点处并可用于缀合抗体与其他部分,诸如药物部分或接头药物部分,以创造免疫缀合物,如本文另外所述。在某些实施方案中,以下残基中的任何一个或多个可被半胱氨酸替换:轻链的 V205(Kabat 编号);重链的 A118(EU 编号);和重链 Fc 区的 S400(EU 编号)。可以如,例如美国专利号 7, 521, 541 中所述地生成半胱氨酸改造的抗体。

[0126] e) 抗体衍生物

[0127] 在某些实施方案中,还可进一步修饰本文提供的抗体以含有本领域已知的并且容易获得的非蛋白质部分。适合于抗体的衍生化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-1,3,6-三恶烷、乙烯/顺丁烯二酸酐共聚物、聚氨基酸（同聚物或随机共聚物），和葡聚糖或聚（n-乙烯基吡咯烷酮）聚乙二醇、聚丙二醇同聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烷化多元醇（例如丙三醇）、聚乙烯醇，及其混合物。聚乙二醇丙醛可在生产中具有优势由于其在水中的稳定性。多聚物可具有任意分子量，并且可为分支的或无分支的。附着于抗体的多聚物的数目可不同，并且如果附着多于一个多聚物，它们可以是相同或不同的分子。一般而言，用于衍生化的多聚物的数量和/或类型可以基于如下考虑确定，包括，但不限于，待改善的抗体的特别的性质或功能，抗体衍生物是否将在定义的条件用于疗法中，等。

[0128] 在另一个实施方案中，提供了抗体和可以通过暴露于辐射选择性地加热的非蛋白质部分的缀合物。在一个实施方案中，非蛋白质部分是碳纳米管（Kam 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:11600-11605 (2005)）。辐射可以具有任何波长，并且包括，但不限于，这样的波长，所述波长不伤害普通细胞，但将非蛋白质部分加热至杀死抗体-非蛋白质部分临近的细胞的温度。

[0129] 重组方法和组合物

[0130] 可以使用重组方法和组合物生产抗体，例如，如美国专利号 4,816,567 中所述。在一个实施方案中，提供了编码本文描述的抗体的分离的核酸。此类核酸可编码包含 VL 的氨基酸序列和/或包含抗体的 VH 的氨基酸序列（例如，抗体的轻链和/或重链）。在另外的实施方案中，提供了包含此类核酸的一个或多个载体（例如，表达载体）。在另外的实施方案中，提供了包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施方案中，宿主细胞包含（例如已经转化有）：(1) 包含核酸的载体，所述核酸编码包含抗体的 VL 的氨基酸序列和包含抗体的 VH 的氨基酸序列，或 (2) 包含编码包含抗体的 VL 的氨基酸序列的核酸的第一载体和包含编码包含抗体的 VH 的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中，宿主细胞是真核生物，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，提供了制备抗体的方法，其中所述方法包括在适于表达抗体的条件下培养如上文提供的包含编码抗体的核酸的宿主细胞，和任选地从宿主细胞（或宿主细胞培养基）回收抗体。

[0131] 为了重组生产抗体，例如，如上文描述的编码抗体的核酸被分离并插入到一个或多个载体中用于进一步克隆和/或在宿主细胞中表达。使用常规流程可容易地分离和测序此类核酸（例如，通过使用寡核苷酸探针，所述探针能够特异性地结合编码抗体的重链和轻链的基因）。

[0132] 用于编码抗体的载体的克隆或表达的合适的宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如，可以在细菌中生产抗体，特别是当不需要糖基化和 Fc 效应子功能时。对于在细菌中表达抗体片段和多肽，参见，例如，美国专利号 5,648,237, 5,789,199, 和 5,840,523（也参见 Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, 编辑, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第 245-254 页，描述了在大肠杆菌中表达抗体）。在表达后，抗体可以从可溶级分的细菌细胞糊中分离并可进一步纯化。

[0133] 除了原核微生物，真核微生物诸如丝状真菌或酵母是编码抗体的载体的合适的克隆或表达宿主，包括其糖基化途径已经被“人源化”，导致生产具有部分或全部人糖基化模式的抗体的真菌和酵母菌株。参见 Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), 和 Li

等人, Nat. Biotech. 24:210-215(2006)。

[0134] 适于表达糖基化的抗体的宿主细胞也源自多细胞生物(无脊椎生物和脊椎生物)。无脊椎生物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了多种杆状病毒株,其可以与昆虫细胞共同使用,特别地用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。

[0135] 也可以使用植物细胞培养物作为宿主。参见,例如,美国专利号 5,959,177,6,040,498,6,420,548,7,125,978,和 6,417,429(描述了用于在转基因植物中生产抗体的 PLANTIBODIESTM 技术)。

[0136] 也可以使用脊椎生物细胞作为宿主。例如,可以使用调整适合于悬浮生长的哺乳动物细胞系。可用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是被 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7);人胚胎肾系(293 或 293 细胞,如例如 Graham 等人, J. Gen. Virol. 36:59(1977)中描述的);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(TM4 细胞,如例如, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980)中描述的);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);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI 细胞,如例如, Mather 等人, Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982)中所述;MRC 5 细胞;和 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 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980));和骨髓瘤细胞系诸如 Y0、NS0 和 Sp2/0。适于抗体生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述参见,例如, Yazaki 和 Wu, Methods in Molecular Biology, 第 248 卷(B. K. C. Lo, 编辑, Humana Press, Totowa, NJ), 第 255-268 页(2003)。

[0137] 在以下实验公开内容中,使用以下缩写:eq(当量);M(摩尔); μ M(微摩尔);N(正常);mol(摩尔);mmol(毫摩尔); μ mol(微摩尔);nmol(纳摩尔);g(克);mg(毫克);kg(千克); μ g(微克);L(升);ml(毫升); μ l(微升);cm(厘米);mm(毫米); μ m(微米);nm(纳米); $^{\circ}$ C.(摄氏度);h(小时);min(分钟);sec(秒);msec(毫秒);Ci(居里)mCi(毫居里); μ Ci(微居里);TLC(薄层层析);Ts(甲苯磺酰基);Bn(苄基);Ph(苯基);Ms(甲磺酰基);Et(乙基),Me(甲基)。

实施例

[0138] 本发明在以下实施例中进一步详细描述,所述实施例不以任何方式旨在限制所要求保护的本发明的范围。所附的附图意在被认为是本发明的说明书和描述的整体部分。本文引用的全部参考具体地作为引用全部并入本文。提供以下实施例以说明,但并非限制所要求保护的发明。

[0139] 本申请通过引用以整体并入本文所引述的专利申请和专利和出版物,特别地包括 Hotzel 等人,(2012),“A Strategy for Risk Mitigation of Antibodies with Fast Clearance”, mAbs 4:6, 1-8。

[0140] 实施例 1

[0141] 测定食蟹猴中的清除

[0142] 此实施例说明用于测定非人灵长动物中抗体清除的标准方法。

[0143] 在食蟹猴中静脉内施用单次剂量或多次剂量的治疗抗体后,测定抗体药物代谢动力学。从在多个时间点收集的血液制备血清样品并通过 ELISA 测定抗体浓度。在大多数

情况下 ELISA 由用经包被的抗原捕获随后用抗人 Fc 抗体检测组成。抗体 26 的 ELISA 测定法采用抗个体型抗体用于捕获。抗体 14、17、24、33 和 44 使用抗人 Fc 夹心 ELISA 用于测定血清浓度。使用非隔室分析对血清浓度对时间谱进行分析以计算总清除 (Deng, R. 等人 Pharmacokinetics of humanized monoclonal anti-tumor necrosis factor- $\{\alpha\}$ antibody and its neonatal Fc receptor variants in mice and cynomolgus monkeys. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals 38, 600-605 (2010))。每种抗体测试的最高剂量时的清除报道为非特异性清除, 并假定特异性清除对总清除的贡献是可以忽略的。

[0144] 使用稍大于先前可用的数据集 (Deng, R. 等人 Projecting human pharmacokinetics of therapeutic antibodies from nonclinical data: What have we learned? mAbs 3, 61-66 (2011)), 我们确认了在食蟹猴和人中测量的清除数值之间的强烈关联。(图 1, Spearman 关联系数 (ρ) = 0.74)。获得简单的缩放准则, 其在于人中测量的清除比在食蟹猴中测量的清除慢约 2 倍, 抗 NRP1 抗体作为异常值。

[0145] 实施例 2

[0146] 测定 FcRn 亲和力

[0147] 以下实施例详述了可如何测定平衡解离常数 (K_D)。

[0148] 通过在 **Biacore® 4000** 仪器 (GE Healthcare) 上的表面等离子共振 (SPR) 测量测定食蟹猴 FcRn 与固定的抗体的结合的平衡解离常数 (K_D)。如先前所述制备食蟹猴 FcRn (Yeung, Y. A. 等人 Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates. J Immunol 182, 7663-7671 (2009))。使用由生产商提供的方案, 安装、归一化、并制备一系列 S 传感器芯片用于进行水动力学研究。通过暴露于 EDC/NHS 溶液 (0.2M N-乙基-N'-(3-二乙基氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 和 0.05M N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)) 10 分钟激活 4 个流动池中每一个的全部五个点用于胺偶联。通过暴露于含有 2 μ g/mL 抗体和 10mM NaOAc, pH 5 的溶液 7 分钟将抗体偶联至点 1、2、4 和 5。然后通过将全部 5 个点暴露于 1M 乙醇胺 7 分钟封闭未反应的位点。在此形式中点 3 是参照池, 每个流动池偶联 4 种不同抗体, 每个传感器芯片共 16 种。偶联密度在 200-1000RU 抗体的范围。单独的实验提示计算的 K_D 在此范围内不随偶联密度变化 (数据未显示)。在含有 25mM MES、25mM HEPES、150mM NaCl、0.05% 聚山梨醇酯-20, pH 5.8 的运行缓冲液中制备浓度从 10 μ M 至 0.04 μ M 以 2 倍增加变化的食蟹猴 FcRn 的一系列溶液。收集以 30 μ L/min 的流速在传感器芯片上注射 60 μ L 这些溶液, 和仅对照缓冲液的传感图。测量温度是 25°C, 监控解离 180 秒并然后通过注射 30 μ L 含有 50mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.05% 聚山梨醇酯-20, pH 8 的溶液洗脱保持结合的任何 FcRn。使用 Biacore 4000 评价软件 1.0 从稳态亲和力分析计算解离常数。

[0149] 实施例 3

[0150] 生产用于 ELISA 的抗原

[0151] 此实施例描述了生产用于包被本文描述的测定法中使用的微量滴定板的底物。

[0152] 通过在 600ml 的无血清 ESF921 培养基 (Expression systems, Davis, CA) 中用表达绿色荧光蛋白的重组苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (Bac-to-Bac, Invitrogen) 以约 1 的感染复数感染 1.8×10^9 Sf9 昆虫细胞获得杆状病毒颗粒。在旋转 (200rpm) 下在 27°C 孵育

感染的培养物 40 小时,收获并通过在 5,000x g 离心 10 分钟移除细胞。上清中的病毒通过在 4°C 在 25,000x g 离心 4 小时沉淀,在 PBS 缓冲液 (150mM NaCl, 10mM 磷酸钠, pH 7.4) 中重悬、在 4ml PBS 中的 35% (w/v) 蔗糖垫上铺层、并在 SW40Ti 离心机 (Beckman) 中在 4°C 以 30,000rpm 离心 1 小时。丢弃带有碎片的上清,用 PBS 轻轻清洗病毒沉淀一次,在具有蛋白酶抑制剂混合物 (Roche) 的 1.2ml PBS 中重悬并在 4°C 贮藏多至 4 个月。

[0153] 从未感染的细胞获得粗 Sf9 细胞膜级分。将在无血清 ESF 培养基中生长的共 2×10^8 个未感染的 Sf9 细胞在 PBS 中洗涤一次并在 4ml 冰冷裂解缓冲液 (1mM EDTA, 50mM HEPES 缓冲液, pH 7.4, 完全蛋白酶抑制剂混合物) 中重悬。将细胞转移至 Dounce 均质器中并以宽大的杵击打 8 次破碎细胞。对裂解的细胞添加含有 0.5M 蔗糖的额外 4ml 裂解缓冲液并以紧贴的杵击打 8 次进一步破碎细胞。在 4°C 以 500x g 离心裂解液 10 分钟以移除线粒体、细胞核和粗糙碎片。沉淀用裂解缓冲液润洗一次并使用具有紧贴的杵的 Dounce 均质器在 5ml 相同的缓冲液中重悬。通过在 4°C 以 500x g 离心移除大碎片。

[0154] 实施例 4

[0155] ELISA 测定法

[0156] 通过对每个孔添加 25 μ l 的 50mM 碳酸钠缓冲液 pH 9.6 中的 1% 杆状病毒悬液,将抗原 (例如,杆状病毒颗粒) 固定在 384 孔 ELISA 板 (Nunc Maxisorp) 上,允许颗粒在 4°C 吸附于板过夜。用 50 μ l 封闭缓冲液 (含有 0.5% BSA 的 PBS) 在室温封闭孔 1 小时。在用 PBS 润洗板三次后,在封闭缓冲液中系列稀释纯化的抗体,一式两份地添加 25 μ l 至 ELISA 孔并在室温孵育 1 小时。用 PBS 洗涤板 6 次并将 25 μ l 的 10ng/ml 与辣根过氧化物酶 (Jackson) 缀合的山羊抗人 IgG (Fc γ 片段特异性的) 添加至每个孔。在室温孵育板 1 小时,在 PBS 中洗 6 次并将 25 μ l TMB 底物添加至每个孔。通过将 25 μ l 的 1M 磷酸添加至每个孔在 15 分钟后终止反应并在 450nm 处阅读吸光度,参照在 620nm 处。从 6 次光密度测定的平均值计算 BV 分数,其中每次已经通过除以非包被的孔观察到的平均信号归一化。对于使用 Sf9 细胞膜的测定法,使用 2% 粗膜悬液代替杆状病毒颗粒包被 ELISA 板。不在任何步骤中向缓冲液添加洗涤剂。

[0157] 实施例 5

[0158] FACS 分析

[0159] HEK293 细胞在 DMEM-10% 胎牛血清中以 5×10^6 细胞/ml 重悬并在 U 形底 96 孔板中以 100 μ l/孔分配。将在 PBS (150mM NaCl, 10mM 磷酸钠, pH 7.4) 中稀释的等体积的 IgG (30 至 50nM 终浓度) 添加至细胞并在 4°C 孵育 1h。细胞然后用冰冷的 PBS 洗涤 3 次,用抗人 IgG Fc-R-藻红蛋白缀合物 (Jackson Immunoresearch) 或抗人 IgG-Alexa488 (Molecular Probes) 缀合物在 4°C 孵育 30 分钟,在冰冷的 PBS 中洗涤两次并在具有 0.1% 多聚甲醛的 PBS 中固定。在具有高通量取样器的 FACSCalibur 流式细胞仪 (BD Biosciences) 中分析细胞。

[0160] 实施例 6

[0161] 统计分析

[0162] 使用 R (R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 于 R-project[dot]org 在线可获得) 进行全部统计分析。使用如图 5

的图例中描述的比值比, BV 分数在正确鉴定快速和缓慢清除的抗体中的表现的评估是乐观的因为其是使用用于测定 $BV = 5$ 的装箱 (binning) 阈值的相同的数据集进行的。使用 5 倍交叉验证和回归建模以测定 BV 分数阈值获得了 10mL/kg/ 天的清除阈值的体外测定法用途的更保守的评估; 此方法给出了更适度的比值比估计 14.1 (95% 置信区间 (2.4, 113.3))。

[0163] 实施例 7

[0164] 从猴中清除预测性缩放人清除

[0165] 使用稍大于先前可用的数据集⁸, 我们确认了在食蟹猴和人中测量的清除值之间的强烈关联 (图 1, Spearman 关联系数 (ρ) = 0.74)。获得简单的缩放准则, 在于人中测量的清除比食蟹猴中测量的清除慢约 2 倍, 抗 NRP1 抗体作为异常值。

[0166] 实施例 8

[0167] 治疗抗体组的结构变体的表征和食蟹猴中的清除

[0168] 在正常的临床前开发过程中, 已经收集了 52 种人源化的和人抗体在食蟹猴中的药物代谢动力学数据。这些抗体的主要的同种型是 IgG1, κ ($n = 46$)。此抗体组也包括 4 种 IgG1, λ , 和 2 种 IgG4, κ 抗体。IgG4 抗体并入 S228P 铰链稳定性替换 17。对 52 种抗体中的 5 种 aglycosylate 以降低效应子功能, 1 种 afucosylate 以增加 ADCC 活性, 并且 3 种具有 Fc 氨基酸替换以消除或增加 Fc γ R 结合。这些抗体的可变结构域是人源化的 ($n = 32$), 源自合成的人抗体噬菌体文库 18 ($n = 16$), 人的 ($n = 3$), 或小鼠的 ($n = 1$; 利妥昔单抗)。这些抗体显示广泛的清除数值 (图 2), 15 种 (29%) 抗体具有快于 10mL/kg/ 天的清除。

[0169] 研究了快速清除与合成的文库抗体相关联的假设。选择源自合成的人抗体噬菌体文库的抗体并通过体外选择 18 优化。这些中的大多数需要通过在其互补决定区 (CDR) 中的氨基酸改变的亲和力成熟以达到需要的亲和力和效价。尽管许多人源化的抗体相对于啮齿类序列也具有 CDR 替换以提高亲和力或化学稳定性, 一般而言已经对人源化的抗体进行更少的体外优化。体外选择需要关注的是其可能无意地导致脱靶相互作用因为可以在体外进行的阴性选择比可以在体内进行的更少 13。然而, 人源化的和合成的文库来源的抗体的比较提示清除数值的重叠范围 (图 3)。人源化的抗体的中位清除数值是 6.5mL/kg/ 天而来自合成的噬菌体文库的人抗体是 9.0mL/kg/ 天。这些数据不提供合成的文库抗体和快速清除之间的关联的证据 ($P = 0.28$, Wilcoxon 测试)。

[0170] 实施例 9

[0171] 对食蟹猴的结合亲和力

[0172] 为了测试 FcRn 结合的变异是否能导致观察到的清除数值的范围, 我们使用表面等离子共振 (SPR) 方法以测定 pH 5.8 时这些抗体与纯化的食蟹猴 FcRn 的结合的 KD 值。因为 IgG-FcRn 结合是相对弱的相互作用, 我们使用先前描述的稳态方法 11 以测定结合常数。通过固定分析可用的每种抗体 ($n = 44$) 避免来自 2:1FcRn:IgG 相互作用的抗体亲抗原性作用。在此方式中测定的 KD 值范围从约 250nM 至 1,500nM。因为使用随机偶联经由氨基基团单独固定每种抗体, 以及在传感器芯片表面上的定向中相伴的不确定性, KD 值的范围不是意外的。帕妥珠单抗的 KD 的多次 ($n = 7$) 测定提示 940 ± 140 (S. D.) nM 的平均值。测量方法可以检测 FcRn 亲和力的改变因为我们能够再现 Fc 突变体的结合作用 (数据未显示), 所述 Fc 突变体已知增加对于 FcRn 的亲和力 19。一些抗体观察到的较快的清除不是

由于对于食蟹猴 FcRn 的变化的低 pH 结合亲和力 (Fig. 4)。事实上,具有大约相同 FcRn 结合亲和力的若干种抗体的比较给出了清除数值中近 30 倍的范围。单独的实验 (数据未显示) 提示 pH 7.4 时食蟹猴 FcRn 从这些抗体解离的速率是快速的并且在测试的组中是等同的。尽管这些实验不足以排除一些抗体的回收途径的改变作为观察到的快速清除的解释, pH 5.8 时的结合亲和力或中性 pH 时的释放动力学中的显著改变看起来似乎不太可能在快速清除中起主要作用。

[0173] 实施例 10

[0174] 开发用于快速清除风险降低的体外测定法

[0175] 已经将一些抗体观察到的快速清除与特异性 14, 15 或非特异性 13, 16 脱靶结合相关联。在抗体生成和优化过程中,就缺少与紧密相关的抗原同源物的结合筛选我们的组中的大多数抗体。此外,在存在添加剂的情况下选择经由噬菌体展示获得的许多抗体以防止富集非特异性结合²⁰。如 Wu 等人注意到的¹³,通过使用有限种的抗原的 ELISA 筛选可能无法检测可影响体内行为的特异性或非特异性脱靶结合的种类。因此,我们寻找开发可用于鉴定可能显示快速清除的候选抗体的体外测定法。在使用具有特异性膜结合的靶的完整 BV 颗粒作为 ELISA 测定法中的抗原²¹ 的实验的过程中,我们注意到一些抗体结合并未表达靶的杆状病毒颗粒。通过 FACS 也显示这些抗体中的许多非特异性地结合非表达人 293 细胞 (数据未显示)。然而,一些同族抗原在 293 细胞上的表达使得区分特异性和非特异性结合是困难的。

[0176] 针对选自图 2 的组的 15 种抗体的测试组的初始筛选提示在杆状病毒 (BV) ELISA 中快速清除的抗体非特异性地结合。随后,在测定法中测试 45 种抗体的更大的组。尽管有相当多的可变性,体外测定法中较高的分数与食蟹猴中的较快清除相关联 (图 5)。“快速”清除的 >10mL/kg/ 天的阈值和归一化的 BV 分数的 >5 的阈值可用于定量这些数据。10mL/kg/ 天的清除数值比猴中 12 种人 IgG1 抗体测定的平均值标准差 (6.5 ± 2.9) 高 1。使用这些阈值,正确地鉴定了 9 种抗体 (“真阳性”) 为在猴中具有快速清除,只有仅 3 个“假阳性” - 具有 <10mL/kg/ 天的清除数值的显示归一化的 BV 分数 >5 的抗体。四种抗体是“假阴性”,具有大于 10mL/kg/ 天的清除和 <5 的 BV 分数。剩余的 29 种抗体正确鉴定为“真阴性”。

[0177] 尽管数据集 ($n = 16$) 较小,人中增加的快速清除的风险也与高 BV 分数相关 (图 5B ; Spearman $\rho = 0.83$)。在测定法中正确地鉴定了在人中具有快于 5mL/kg/ 天的清除的五种抗体。值得注意的是,在食蟹猴中具有 <10mL/kg/ 天的清除的抗 NRP1 抗体在 BV ELISA 中被检测为是人清除的真阳性。在测定法中未鉴定在中具有 >5mL/kg/ 天的清除,和在食蟹猴中 >10mL/kg/ 天的一种抗体。剩余的 10 种抗体被正确分类为在中具有缓慢清除。

[0178] 通过进一步改造抗体 47 我们测试了 BV ELISA 是否能够预期性地用于帮助候选物选择。这是人源化的抗体,在 CDR 中具有氨基酸改变,用于亲和力提高和移除潜在的序列缺陷。食蟹猴是抗体 47 的非靶结合物种。使用抗体 47 未在猴中观察到可再组织的染色,但是测定了此抗体在食蟹猴中清除为 20.2mL/kg/ 天。抗体 47 的变体 (抗体 47b) 在 BV ELISA 中显示降低的结合 (表 2),所述变体保留了亲和力成熟改变中的 2 个,和移除在重链 CDR 中之一中的潜在 N-连接的糖基化位点的氨基酸改变。抗体 47c 仅保留了移除潜在的 N-连接的糖基化位点的氨基酸改变并也具有降低的 BV 结合。单独的实验提示移除潜在 Asp-Gly

异构化位点的 VL-D27cS 改变对抗体 47 的 BV 结合有大贡献。抗体 47b 和 47c 在食蟹猴中具有相对抗体 47 更慢的清除（表 2）。

[0179] 实施例 11

[0180] 对此组抗体测量的食蟹猴中的清除数值的广泛分布,和 15 种抗体观察到的较快清除 (>10mL/kg/天) 是出乎意料的。因为 52 种抗体中的 40 种具有相同的人 IgG1 Fc 序列,预期较快的清除不与 FcRn 相互作用的改变相关联。事实上,尽管在 pH 5.8 测量的 FcRn 结合的 KD 在 7 倍范围中变化,这不与清除数值中的趋势相关联。考虑到 pH 5.8 FcRn 亲和力的相对大的增加导致清除的适度提高¹⁹,此处测定的 FcRn 亲和力中的小差别对清除没有影响不是令人惊讶的。测试的全部抗体在中性 pH 时显示等同的并且快速的从 FcRn 释放。与由 Wang 等人²² 报告的结果相反,我们并未检测到清除和中性 pH 时抗体的 Fab 部分对 FcRn 释放动力学的影响之间的关联。我们的研究使用较大组抗体和不同取向的 SPR 实验以最小化抗体亲抗原性对结合的影响。

[0181] 考虑到我们的组中的抗体之间最大的差异在可变结构域中,并且特别地在 CDR 中,可能这些结构域的组成的差异对清除行为中的变异性有贡献。其他组已经观察到了与 CDR 序列中的改变相关联的对清除的影响,所述改变不与对靶抗原 13、16 的结合亲和力的差异相关。我们并未发现清除与等电点 (pI) 或完整抗体的疏水性相关 (补充附图 1A, B)。Igawa 等人²³ 先前已经显示食蟹猴中的人 IgG1 抗体的清除可以通过导致较低的 pI 的可变结构域中的改变降低。此作用在这样的剂量下观察到,在所述剂量下进行显著的抗原依赖性清除。假定机制为非 FcRn 依赖性的。对于大组抗体的比较,使用在半寿期是 FcRn 依赖性的剂量时收集到的药物代谢动力学数据,清除率不依赖于 pI。对于此结论的提醒是此分析中多数抗体聚簇在相对狭窄的 pI 值范围 (7.5-9.5) 因此也许将观察到趋势如果测试更宽的 pI 范围。此外,我们发现清除不与抗体 Fv 计算的总电荷相关联 (补充附图 1C)。因此,导致快速清除的抗体物理化学性质不能从单独的序列比较简单地识别并且可能需要更多细节的结构功能分析。

[0182] 我们在这里显示了可以用于鉴定在人和食蟹猴中具有增加的快速清除的风险的抗体的简单非特异性结合测定法。该测定法,基于抗体与从杆状病毒感染的昆虫细胞制备的病毒颗粒的结合,采用简单的 ELISA 形式并且可以以高通量形式应用。因为在哺乳动物物种中测定药物代谢动力学数据,基于与哺乳动物细胞非特异性结合的测定法可能预期显示与快速清除的更强的关联。初步结果提示快速清除和由 FACS 检测到的与人 293 细胞非特异性结合之间的关联,但排除了此测定法广泛的应用因为此抗体集合的许多同族抗原在 293 细胞上表达。我们开发的 BL ELISA 测定法不受此靶表达限制。对于使用两种测定法都能够评估的抗体,观察到了非特异性结合中的相似的趋势 (数据未显示)。芽殖杆状病毒病毒体是模拟被感染的细胞表面的稳定的纳米颗粒,呈现磷脂、糖、糖蛋白、胞外基质和核酸以及病毒衣壳的混合物^{24,25}。假定抗原也含有包括蛋白质、膜和核酸的一些昆虫细胞碎片。缺乏治疗抗体的特异性靶同时保留与人细胞和组织相同的整体生物化学复杂性的此类混合物在非特异性结合测定法中有优势,因为其可检测不同抗体中的不同种类的相互作用,例如静电对疏水相互作用。

[0183] 对于食蟹猴中的抗体清除和与 BV 颗粒结合的关联的重要提醒是,除了对于抗体 47 外,其是基于通过正常临床前发展,而非其中 BV 颗粒结合系统性变化的设计的实验收集

到的数据的观察。从具有广泛不同的剂量水平并且使用不同的 PK 测定法类型的单独的研究中获得清除数值。然而,当可获得充足数据用于进行评价时,发现食蟹猴中的快速清除和 BV 结合之间的关联跨越剂量水平、测定法类型和抗体来源和靶类型存在。

[0184] 可以通过使用测定法以最小化在抗体的改造过程中非特异性结合的引入降低快速清除的风险。在抗体 47 中,电荷减少和增加的疏水性与增加的与 BV 颗粒的非特异性结合相关。具有降低的非特异性结合的变体具有较慢的清除。不预期 BV ELISA 是特异性脱靶作用的可靠的测定法。例如,先前显示由于与补体蛋白非计划的特异性结合而在小鼠中具有快速清除的人源化的抗体¹⁴与 BV 颗粒不具有可检测的结合(未显示)。以我们的经验,特异性脱靶作用不如具有更广泛的脱靶结合的抗体普遍。此外,特异性脱靶作用通常可以通过快速清除的机制研究鉴定。

[0185] BV 颗粒 ELISA 检测大多数但并不是全部的在食蟹猴中快速清除的抗体,有少数假阳性。因此,测定法应当被认为是降低需要在 NHP PK 实验中测试的治疗抗体数目的筛选工具而不是一致地预测食蟹猴中的清除的测定法。当可以获得具有相似的针对靶的效价的多种候选者时,使得少数但非零的假阳性率是可以接受的,此测定法是最小化快速清除风险的有成本效益的工具。能够增强 BV ELISA 测定法如果能够鉴定假阴性结果的基础。相对于来自哺乳动物细胞的膜,昆虫细胞膜的磷脂组成富含磷脂酰肌醇、磷脂酰胆碱,和磷脂酰乙醇胺,具有较低水平的酸性磷脂磷脂酰丝氨酸、胆固醇、鞘糖脂和鞘脂²⁴。较高量的中性磷脂可导致测定法中的假阴性如果这些抗体的较快的清除与结合哺乳动物膜上的酸性磷脂相关。4 个假阴性抗体中的两个的 Fv 结构域计算具有高净负电荷。探索 BV 颗粒的磷脂组成是否能够通过生长条件或细胞系差异操纵同时提高非特异性结合测定法的精确性是感兴趣的。这些研究能够进一步阐明应在抗体改造过程中避免的特征以保持可接受的药物代谢动力学行为。

[0186] 实施例 12

[0187] 抗体清除优化

[0188] 在该实施例中我们测试了 BV ELISA 是否能够通过进一步改造预测性地用于帮助候选物选择。

[0189] 抗体 47 是人源化的抗体,在 CDR 中具有氨基酸改变,用于亲和力提高和移除潜在的序列缺陷。食蟹猴是抗体 47 的非靶结合物种。使用抗体 47 在猴中没有观察到可再现的组织染色,但测定了此抗体在食蟹猴中的清除为 20.2mL/kg/天。保留了亲和力成熟改变中的 2 个,和移除在重链 CDR 中之一中的潜在 N-连接的糖基化位点的氨基酸改变的抗体 47 的变体(抗体 47b)在 BV ELISA 中显示降低的结合(表 1)。抗体 47c 仅保留了移除潜在的 N-连接的糖基化位点的氨基酸改变并也具有降低的 BV 结合。单独的实验提示移除潜在 Asp-Gly 异构化位点的改变对抗体 47 的 BV 结合有大贡献。抗体 47b 和 47c 在食蟹猴中具有相对抗体 47 更慢的清除(表 1)。

[0190] 因此,此测定法可以用作清除的快速评估并帮助开发相对于亲本抗体具有更低的清除的临床相关的抗体。

[0191] 参考文献

[0192] 1. Reichert, J. M. Marketed therapeutic antibodies compendium. mAbs4 (2012).

[0193] 2. Wang, W., Wang, E. Q. & Balthasar, J. P. Monoclonal antibody pharmacokinetics

- and pharmacodynamics. *Clinical pharmacology and therapeutics* 84, 548–558 (2008).
- [0194] 3. Tabrizi, M. A., Tseng, C. M. & Roskos, L. K. Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug discovery today* 11, 81–88 (2006).
- [0195] 4. Mager, D. E. Target-mediated drug disposition and dynamics. *Biochemical pharmacology* 72, 1–10 (2006).
- [0196] 5. Mould, D. R. & Green, B. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies: Concepts and Lessons for Drug Development. *Biodrugs* 24, 23–39 (2010).
- [0197] 6. Kuo, T. T. & Aveson, V. G. Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics. *mAbs* 3, 422–430 (2011).
- [0198] 7. Keizer, R. J., Huitema, A. D. R., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H. Clinical Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Clinical Pharmacokinetics* 49, 493–507 (2010).
- [0199] 8. Deng, R. 等人. Projecting human pharmacokinetics of therapeutic antibodies from nonclinical data: What have we learned? *mAbs* 3, 61–66 (2011).
- [0200] 9. Dall'Acqua, W. F., Kiener, P. A. & Wu, H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *The Journal of biological chemistry* 281, 23514–23524 (2006).
- [0201] 10. Hinton, P. R. 等人. An Engineered Human IgG1 Antibody with Longer Serum Half-Life. *J Immunol* 176, 346–356 (2006).
- [0202] 11. Yeung, Y. A. 等人. Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates. *J Immunol* 182, 7663–7671 (2009).
- [0203] 12. Zalevsky, J. 等人. Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nature biotechnology* 28, 157–159 (2010).
- [0204] 13. Wu, H. 等人. Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. *Journal of molecular biology* 368, 652–665 (2007).
- [0205] 14. Bumbaca, D. 等人. Highly specific off-target binding identified and eliminated during the humanization of an antibody against FGF receptor 4. *mAbs* 3, 376–386 (2011).
- [0206] 15. Vugmeyster, Y. 等人. Complex pharmacokinetics of a humanized antibody against human amyloid beta peptide, anti- β Ab2, in nonclinical species. *Pharmaceutical research* 28, 1696–1706 (2011).
- [0207] 16. Vugmeyster, Y. 等人. In vitro potency, pharmacokinetic profiles and pharmacological activity of optimized anti-IL-21R antibodies in a mouse model of lupus. *mAbs* 2, 335–346 (2010).
- [0208] 17. Angal, S. 等人. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. *Molecular immunology*

30, 105-108(1993).

[0209] 18. Lee, C. V. 等人. High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *Journal of molecular biology* 340, 1073-1093(2004).

[0210] 19. Yeung, Y. A. 等人. A therapeutic anti-VEGF antibody with increased potency independent of pharmacokinetic half-life. *Cancer research* 70, 3269-3277(2010).

[0211] 20. Dennis, M. S. & Lowman, H. B. in *Phage Display*, Vol. 266. (eds. T. Clackson & H. B. Lowman) 61-94 (Oxford University Press, Oxford, UK ;2004).

[0212] 21. Hotzel, I. 等人. Efficient production of antibodies against a mammalian integral membrane protein by phage display. *Protein engineering, design & selection: PEDS* 24, 679-689(2011).

[0213] 22. Wang, W. 等人. Monoclonal antibodies with identical Fc sequences can bind to FcRn differentially with pharmacokinetic consequences. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 39, 1469-1477(2011).

[0214] 23. Igawa, T. 等人. Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. *Protein engineering, design & selection: PEDS* 23, 385-392(2010).

[0215] 24. Marheineke, K. Lipid Composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS Letters* 441, 4(1998).

[0216] 25. Wang, R. 等人. Proteomics of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus budded virions. *Journal of virology* 84, 7233-7242(2010).

[0217] 26. Deng, R. 等人. Pharmacokinetics of humanized monoclonal anti-tumor necrosis factor- α antibody and its neonatal Fc receptor variants in mice and cynomolgus monkeys. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 38, 600-605(2010).

[0218] 27. Stone, M. Cross-validatory choice and assessment of statistical predictions. *Journal of the Royal Statistical Society Ser. B* 36, 111-147(1974).

[0219] 28. Geisser, S. The predictive sample reuse method with applications I. *Amer. Stat. Assoc.* 70, 320-328(1975).

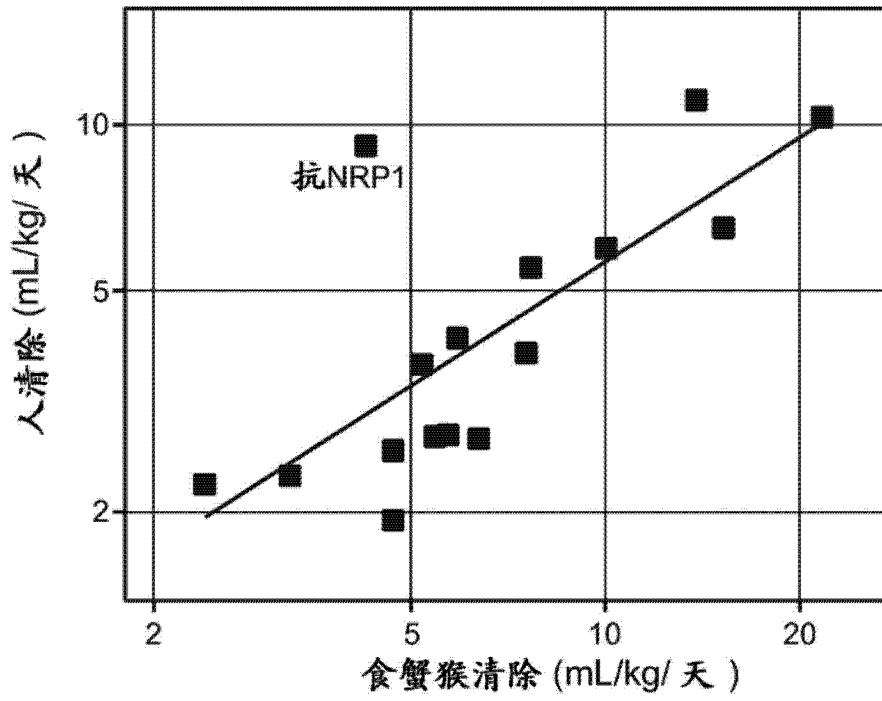


图 1

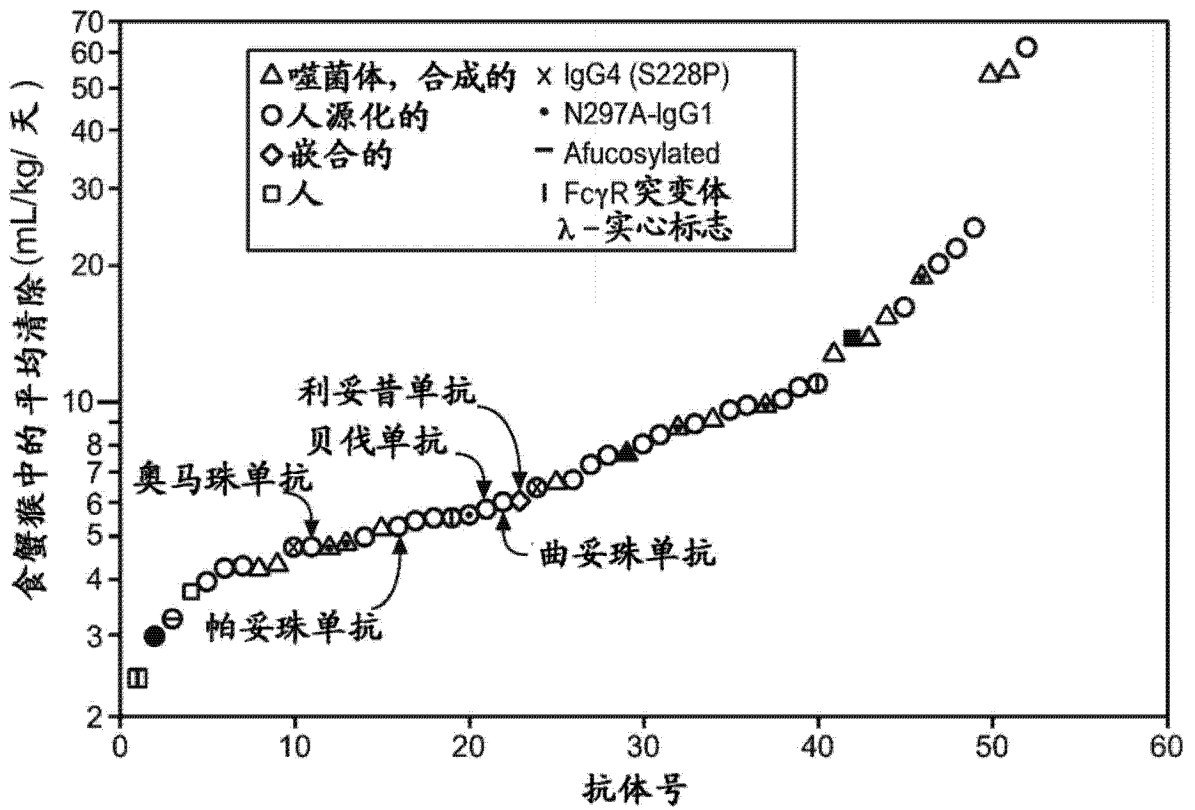


图 2

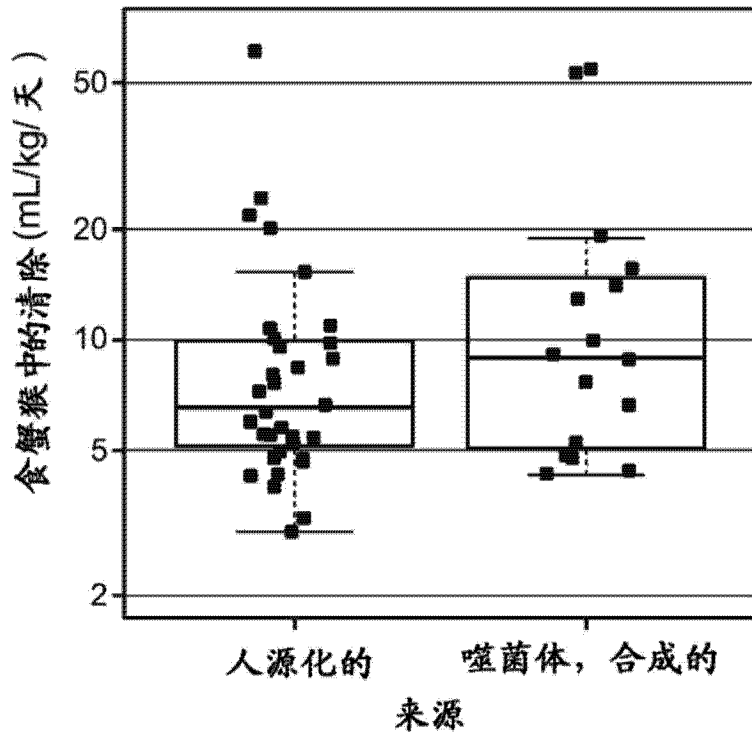


图 3

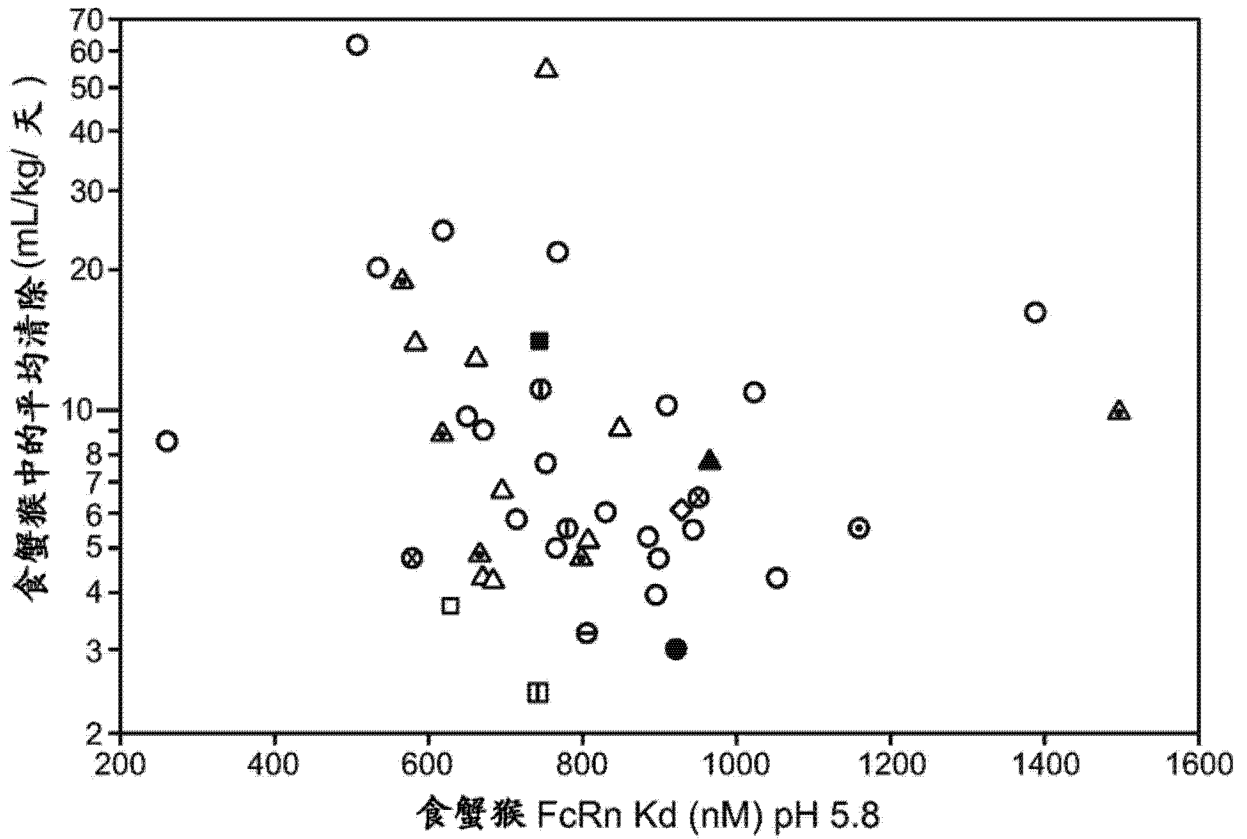


图 4

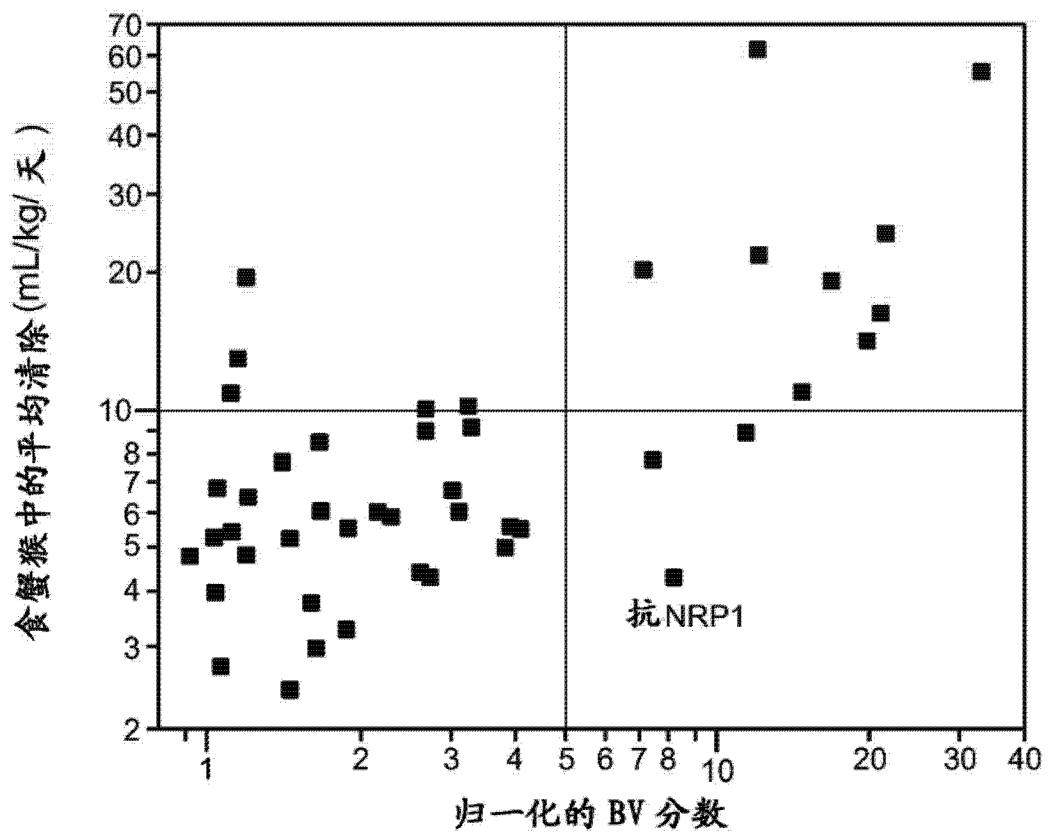


图 5A

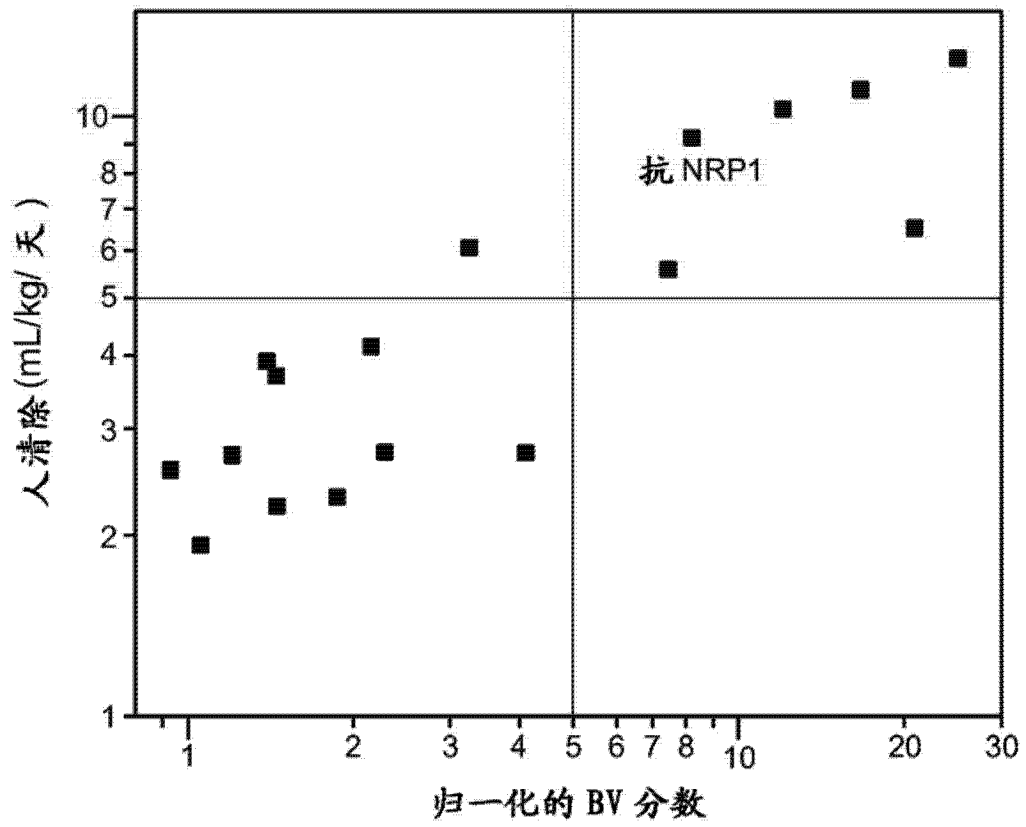


图 5B

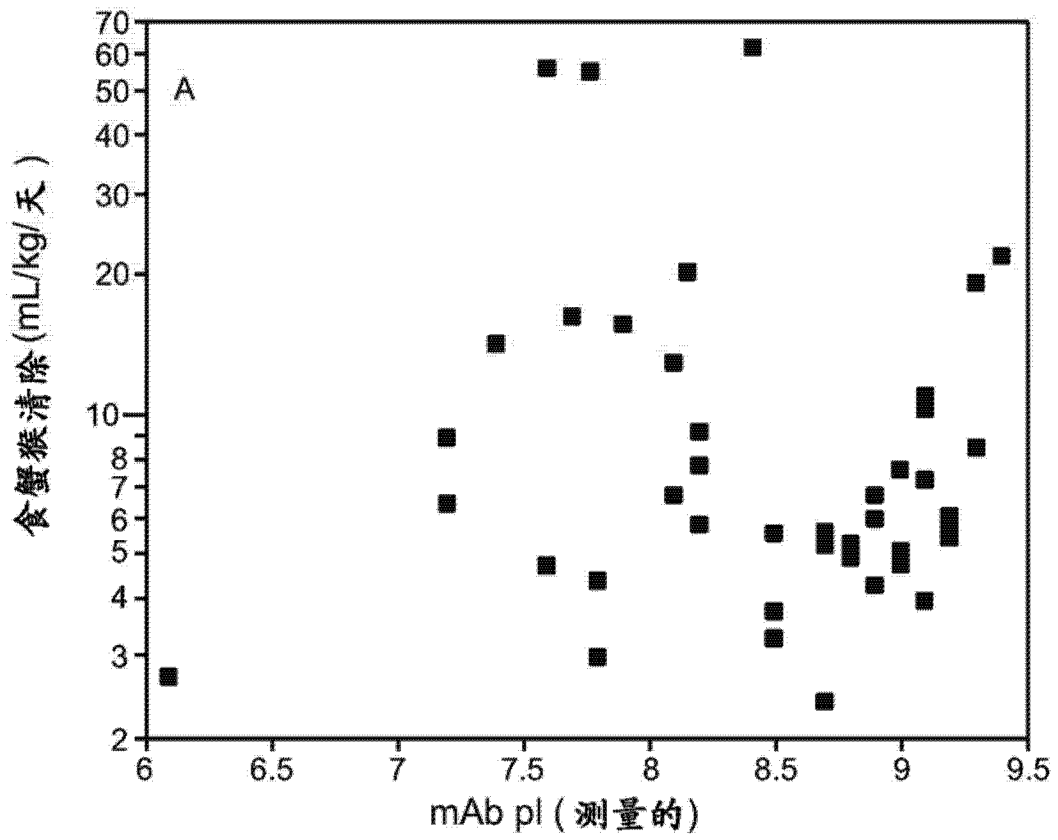


图 6

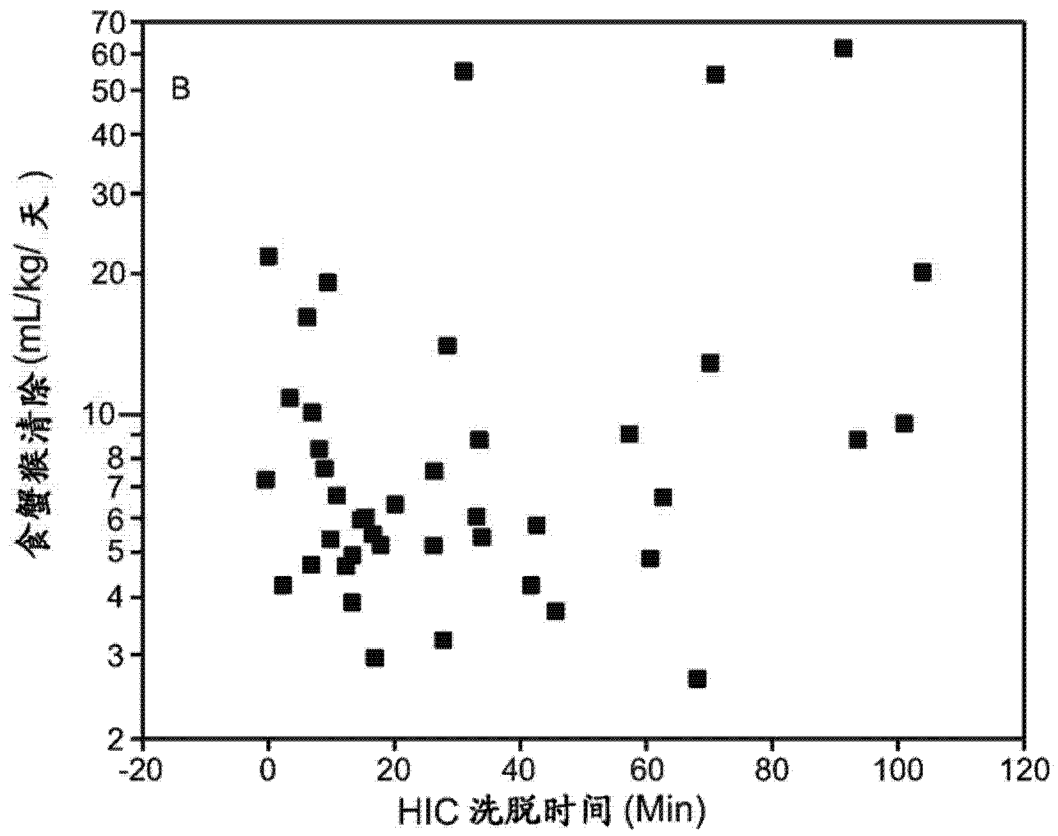


图 7

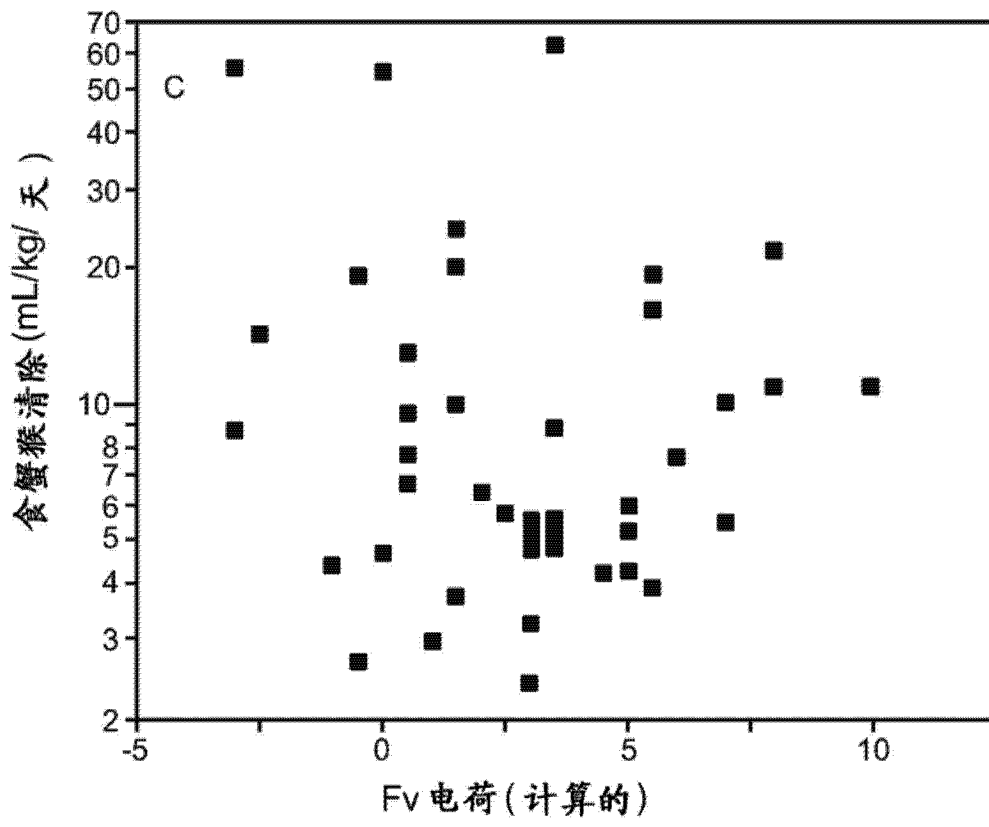


图 8

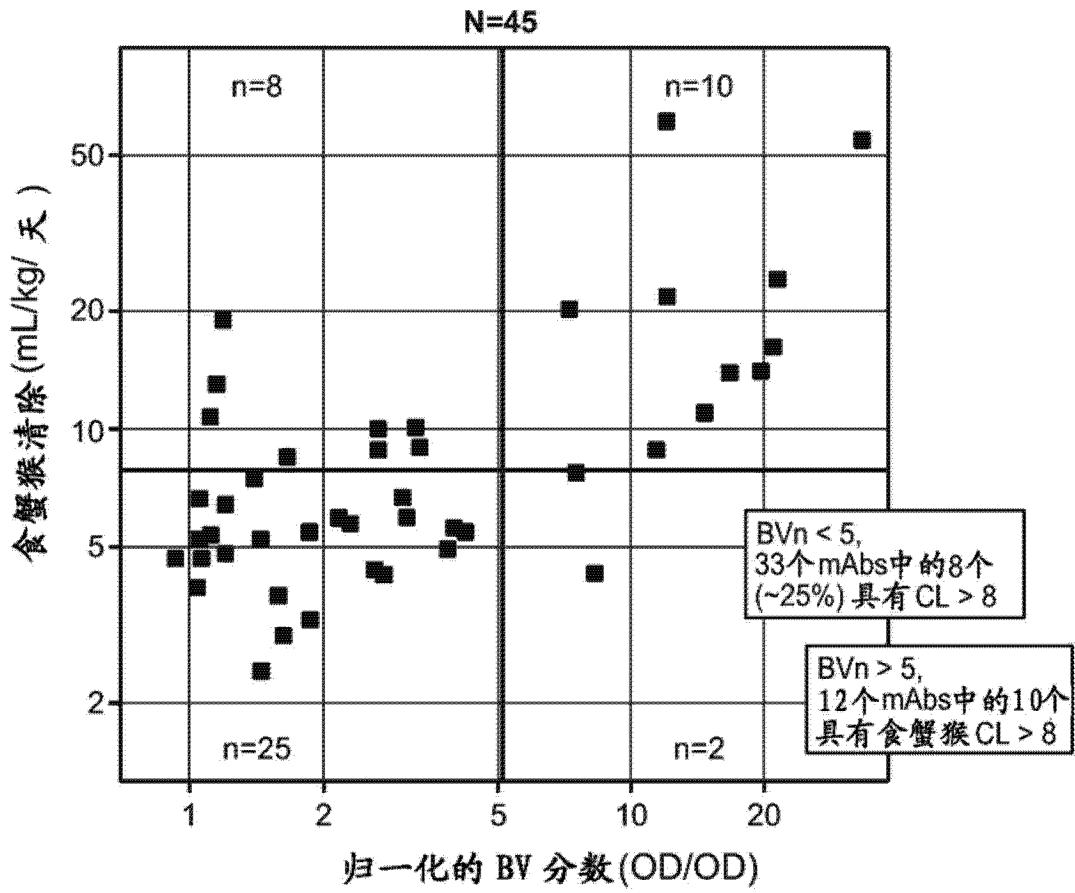


图 9

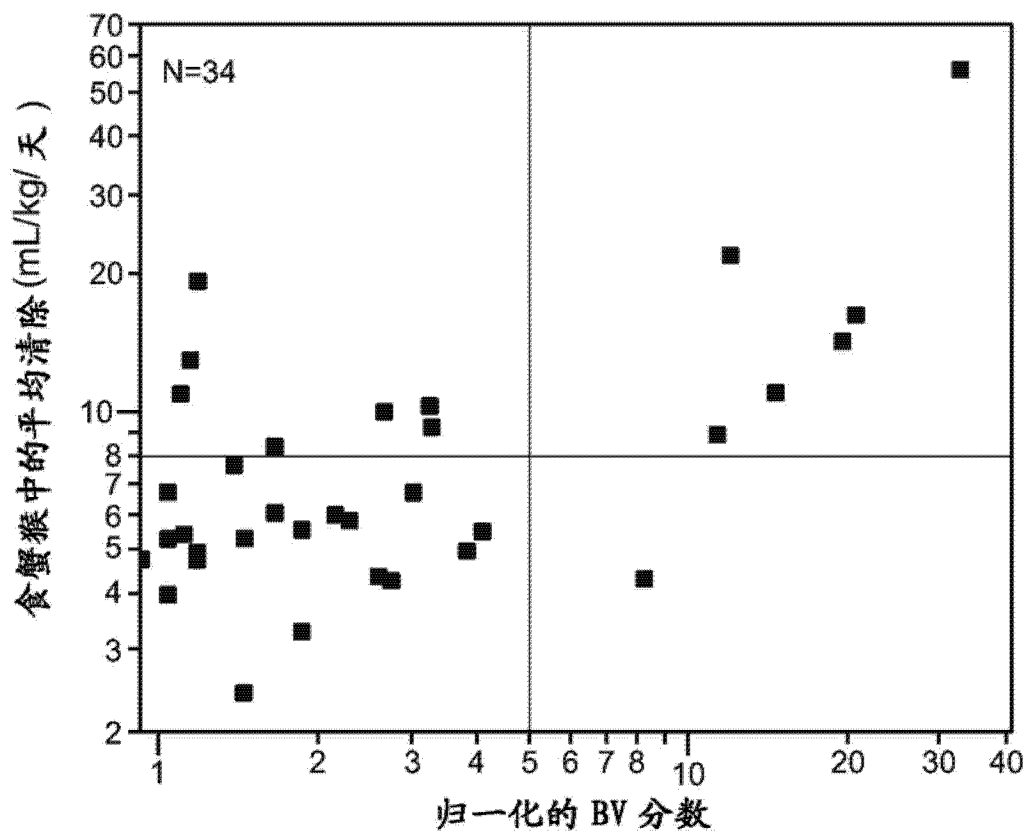


图 10

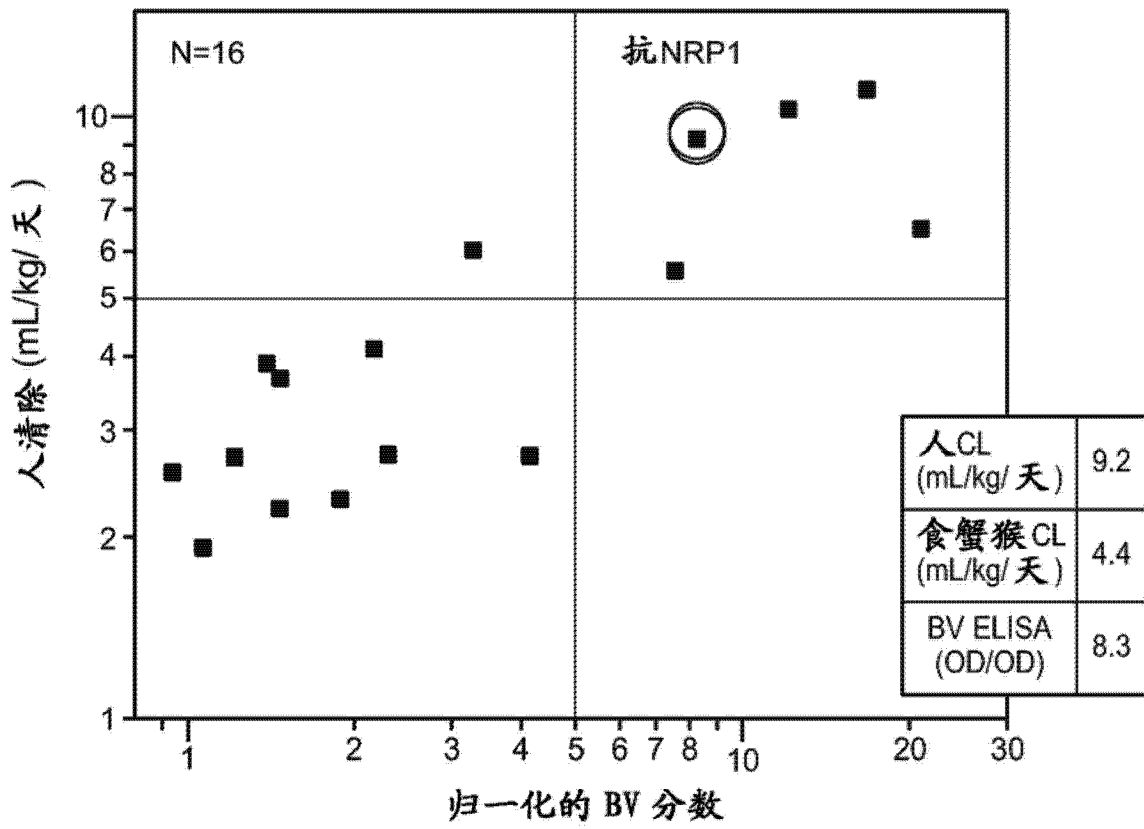


图 11

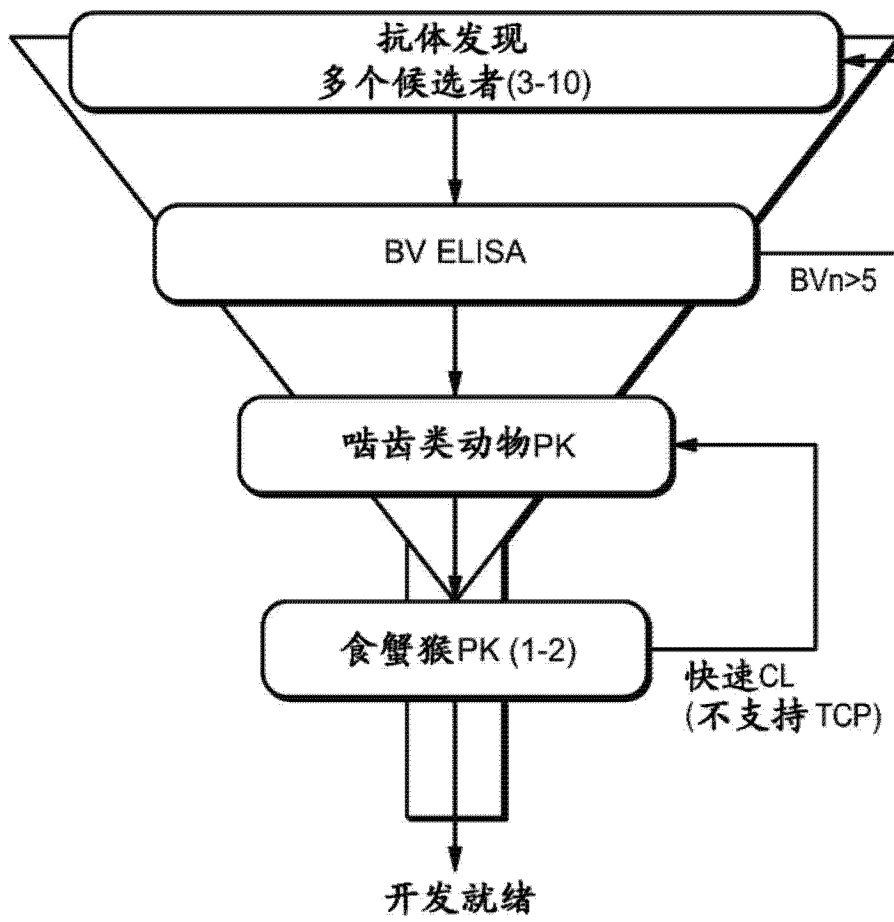


图 12

专利名称(译)	治疗剂的选择方法		
公开(公告)号	CN104335047A	公开(公告)日	2015-02-04
申请号	CN201380026695.4	申请日	2013-05-23
申请(专利权)人(译)	弗·哈夫曼-拉罗切有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	弗·哈夫曼-拉罗切有限公司		
[标]发明人	RF凯利 F泰尔 L伯恩斯坦 I霍特策尔		
发明人	R·F·凯利 F·泰尔 L·伯恩斯坦 I·霍特策尔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/58 C07K16/08		
CPC分类号	G01N33/586 G01N2500/04 C07K16/00 C07K2317/94 G01N2333/01 A61K47/50 C07K16/08 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/58		
优先权	61/650964 2012-05-23 US		
其他公开文献	CN104335047B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测治疗性候选物的脱靶结合的方法。此测定法尤其可以在抗体先导物生成或优化期间使用以增加获得合适的药物的概率。

原始残基	示例性替换	优选的替换
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