



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104335047 B

(45)授权公告日 2017.08.15

(21)申请号 201380026695.4

(22)申请日 2013.05.23

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104335047 A

(43)申请公布日 2015.02.04

(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

(73)专利权人 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 黄草生 林柏楠

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/58(2006.01)
C07K 16/08(2006.01)

审查员 陈伟潘

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,其中理想的清除速率是少于或等于12mL/kg/天的清除速率,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,和基于治疗剂与BV的结合水平计算治疗剂的BV分数,其中BV分数是从获自结合测定法的平均值计算的,实施所述结合测定法以测量治疗剂与BV的结合水平,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,其中快速清除速率是大于12mL/kg/天,并且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,其中治疗剂选自抗体或免疫粘附素。

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的方法,其中用检测试剂标记治疗剂。

4. 根据权利要求2的方法,其中用检测试剂标记治疗剂。

5. 根据权利要求1的方法,还包括将包含检测试剂的活性剂与治疗剂结合的步骤。

6. 根据权利要求2的方法,还包括将包含检测试剂的活性剂与治疗剂结合的步骤。

7. 根据权利要求3-6中任一项的方法,其中测量来自检测试剂的信号。

8. 根据权利要求1-6中任一项的方法,其中与人中大于12mL/Kg/天的清除速率相对应的BV分数被认为是快速清除速率。

9. 根据权利要求1-6中任一项的方法,其中BV分数的预先测定的阈值是5。

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. 杆状病毒颗粒和结合人抗体的抗体在制备用于测定治疗抗体在食蟹猴、人或食蟹猴和人中是否将具有理想的清除速率的试剂盒中的用途,其中理想的清除速率是少于或等于12mL/kg/天的清除速率。

12. 根据权利要求11的用途,其中试剂盒还包含微量滴定板。

13. 根据权利要求11的用途,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BV分数的归一化的数值。

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. 杆状病毒颗粒和ELISA测定法中的说明书在制备用于测定治疗抗体在食蟹猴、人或食蟹猴和人中是否将具有理想的清除速率的试剂盒中的用途,其中理想的清除速率是少于或等于12mL/kg/天的清除速率。

19. 制备治疗抗体的方法,所述方法包括选择在入中具有理想的清除速率的治疗抗体并在宿主细胞中表达治疗抗体的步骤,其中通过权利要求1的方法实现治疗抗体的选择,其中理想的清除速率是少于或等于12mL/kg/天的清除速率。

20. 根据权利要求19的方法,其中所述方法还包括回收由宿主细胞表达的治疗抗体的步骤。

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 IgGs 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 (9.2mL/kg/天) 比食蟹猴中清除 (4.3mL/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($p=0.83$, $n=16$)。

[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;酶及其片段诸如核糖核酸酶;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,即构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,其含有关于适应症、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,所述测定法是如此以下测定法所述使用目标抗体的Fab形式及其抗原进行的。通过未标记的抗原的滴定系列物的存在下用最低浓度的 $[^{125}\text{I}]$ -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 $[^{125}\text{I}]$ -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 μl /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'-(3-二甲基氨基丙基)-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 $5\mu\text{l/分钟}$ 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 $25\mu\text{l/min}$ 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(kon)和解离速率(koff)。平衡解离常数(Kd)计算为比例koff/kon。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 TM分光光度计(ThermoSpectronic))测量的增加的浓度的抗原的存在下,测量25°C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,Nature332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:10029-10033(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Osbourne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 Biology248:161-175 (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Cuellar,Nature 305:537 (1983))、WO 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(WO 2009/089004A1);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Asn 297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 2003/0157108 A1,Presta,L;和WO 2004/056312 A1,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.USA 95:652-656 (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,YO、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- 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))。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 $^{\circ}$ 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1.8x 10⁹Sf9昆虫细胞获得杆状病毒颗粒。在旋转 (200rpm) 下在27 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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2x 10⁸

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℃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℃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25μl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℃吸附于板过夜。用50μl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25μl至ELISA孔并在室温孵育1小时。用PBS洗涤板6次并将25μl的10ng/ml与辣根过氧化物酶(Jackson)缀合的山羊抗人IgG(Fcγ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25μl TMB底物添加至每个孔。通过将25μl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100μl/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℃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℃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(BDBiosciences)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(bin)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的改变的低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 $>10\text{mL/kg/天}$ 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 $<10\text{mL/kg/天}$ 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 $<10\text{mL/kg/天}$ 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人中具有 $>5\text{mL/kg/天}$ 的清除,和在食蟹猴中 $>10\text{mL/kg/天}$ 的一种抗体。剩余的10种抗体被正确分类为在人中具有缓慢清除。

[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($>10\text{mL/kg/天}$)是出乎意料的。因为52种抗体中的40种具有相同的人IgG1Fc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 5.8FcRn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。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。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] 引用文献

[0192] 1.Reichert,J.M.Marked 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- $\text{A}\beta$ 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).

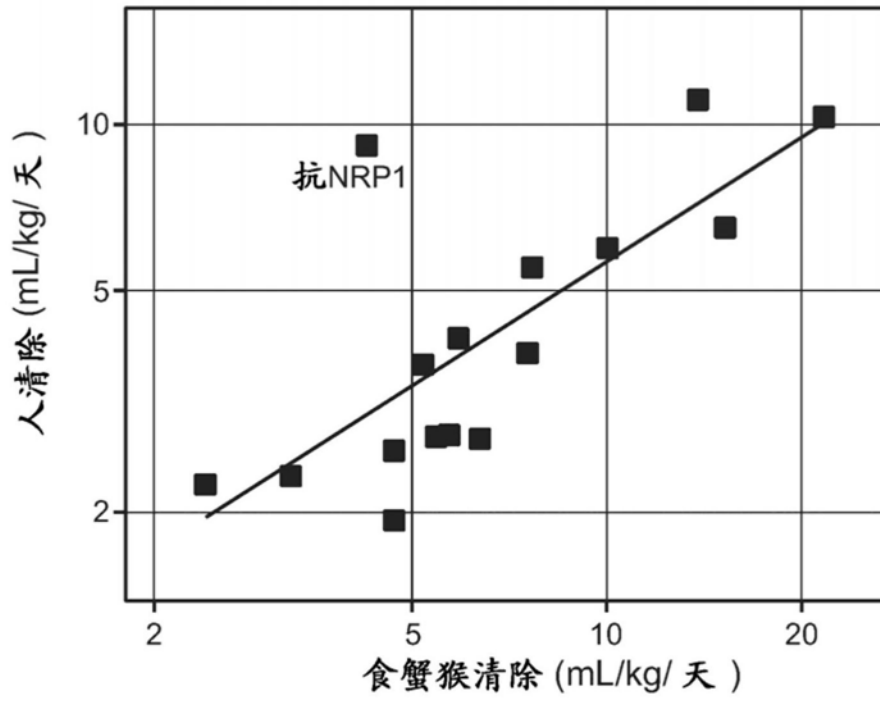


图1

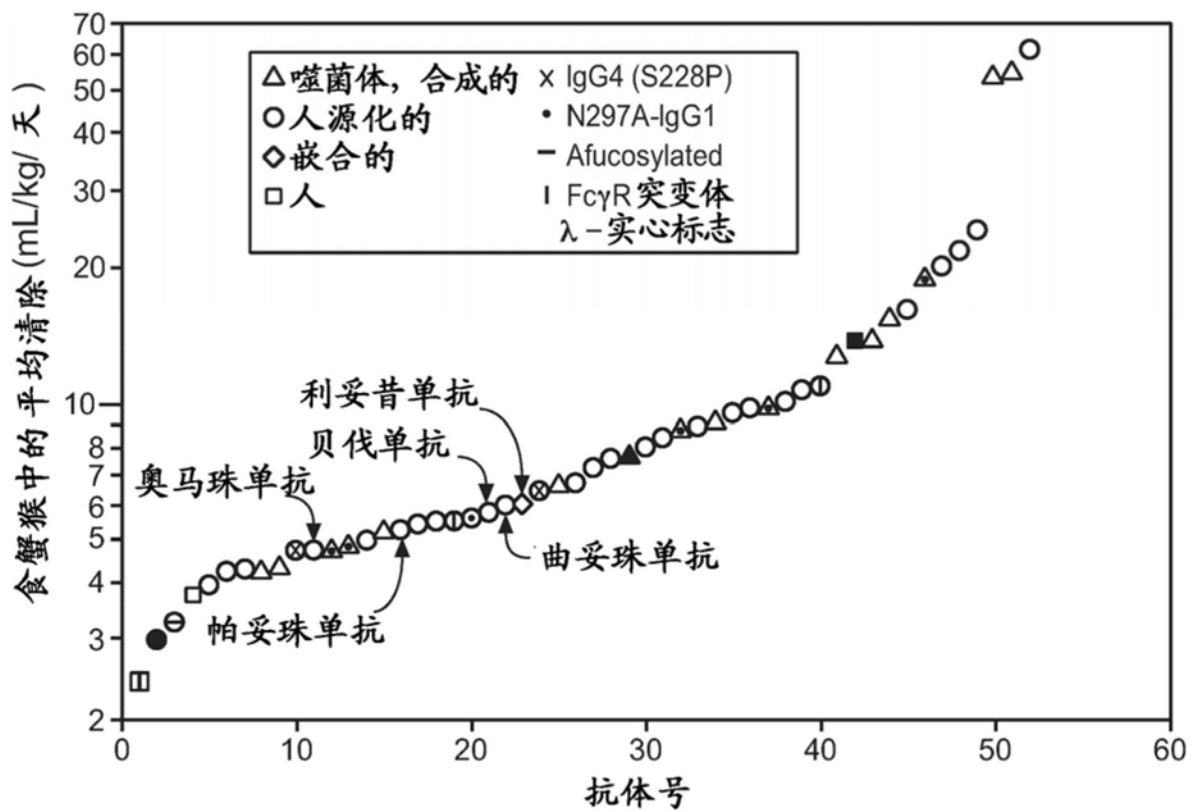


图2

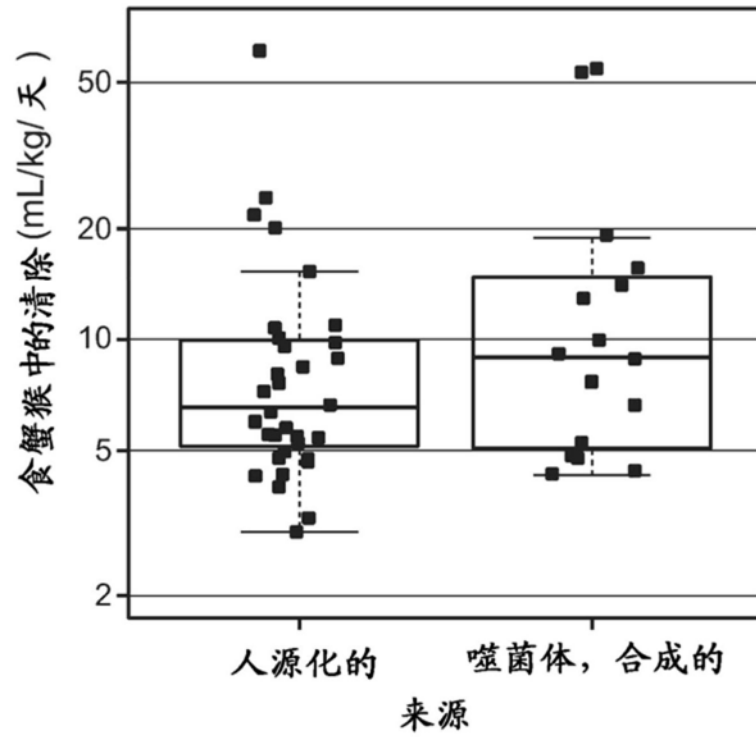


图3

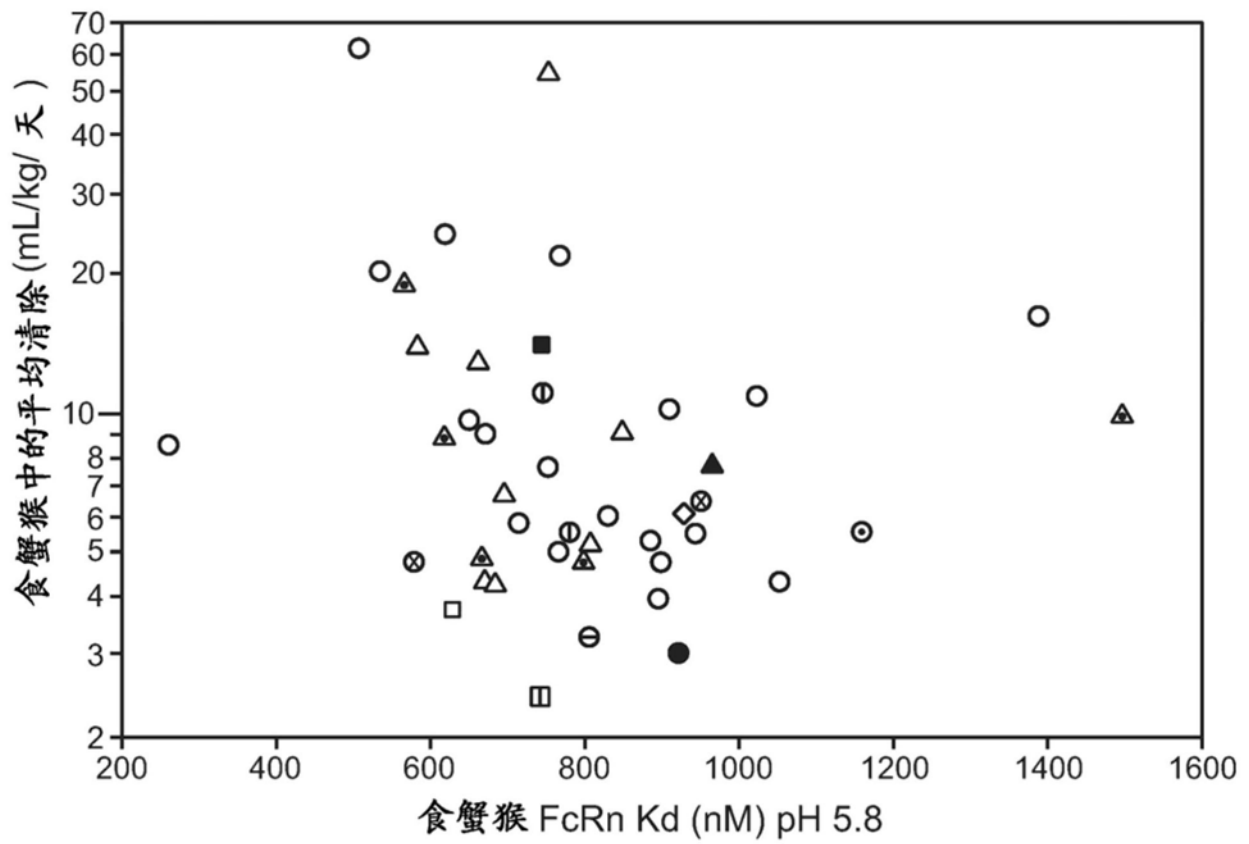


图4

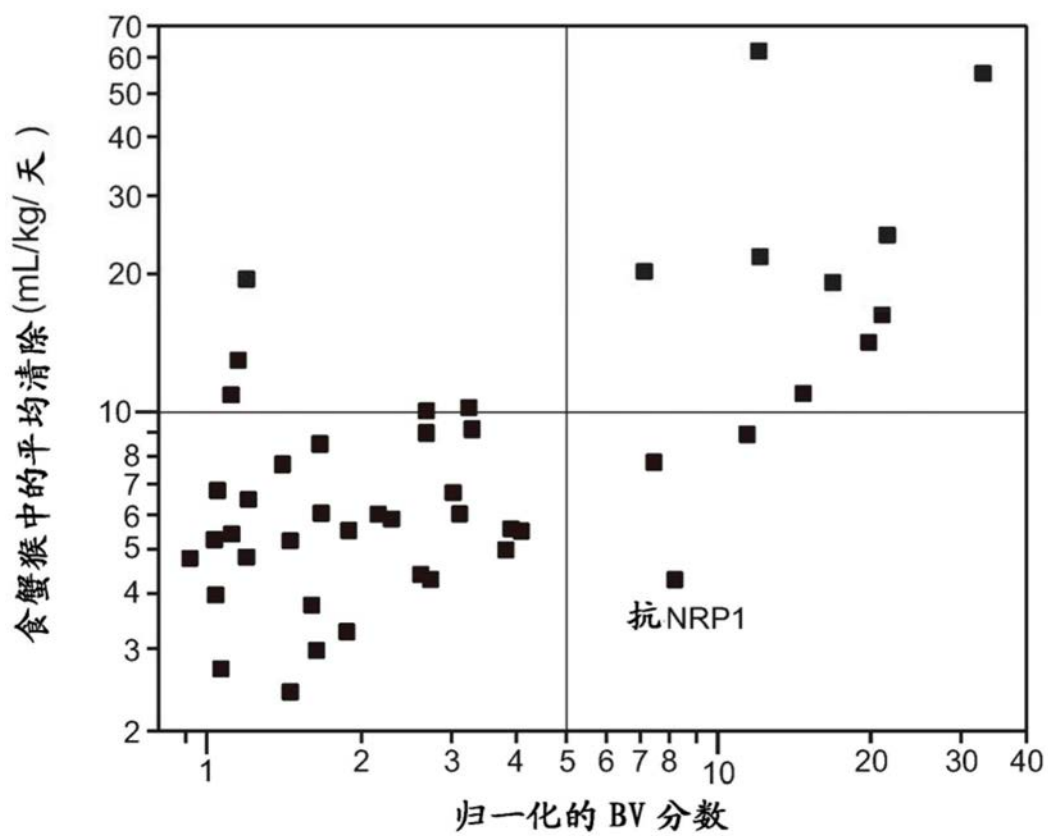


图5A

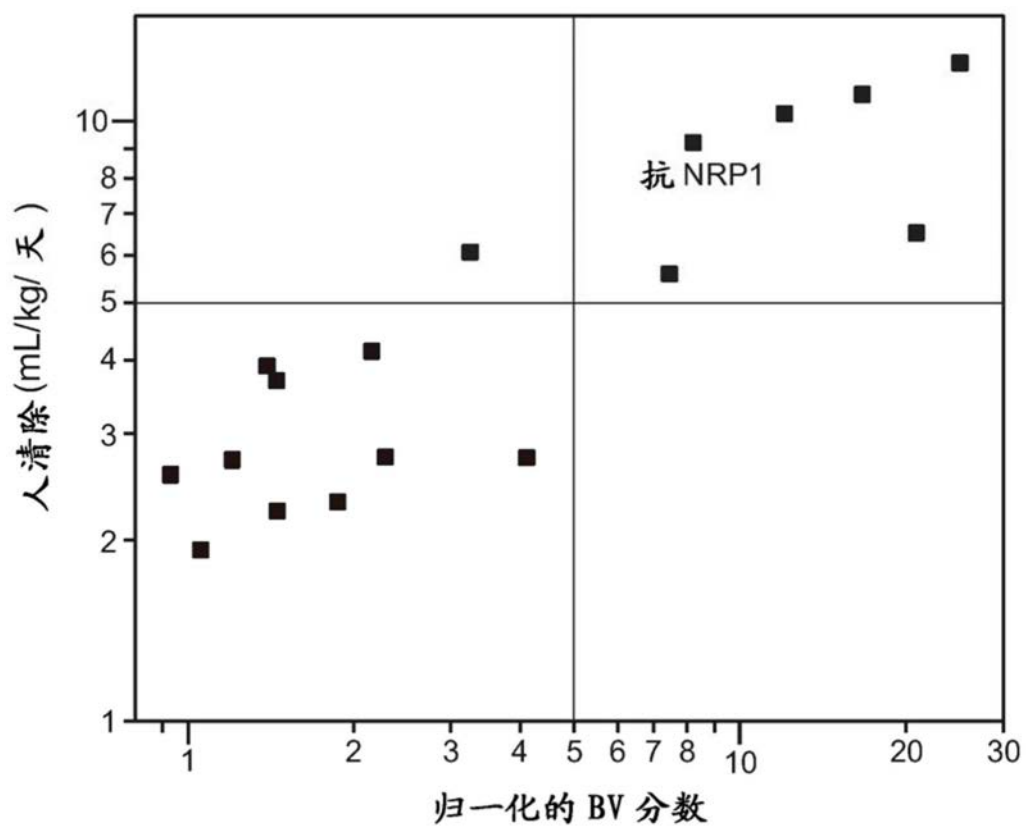


图5B

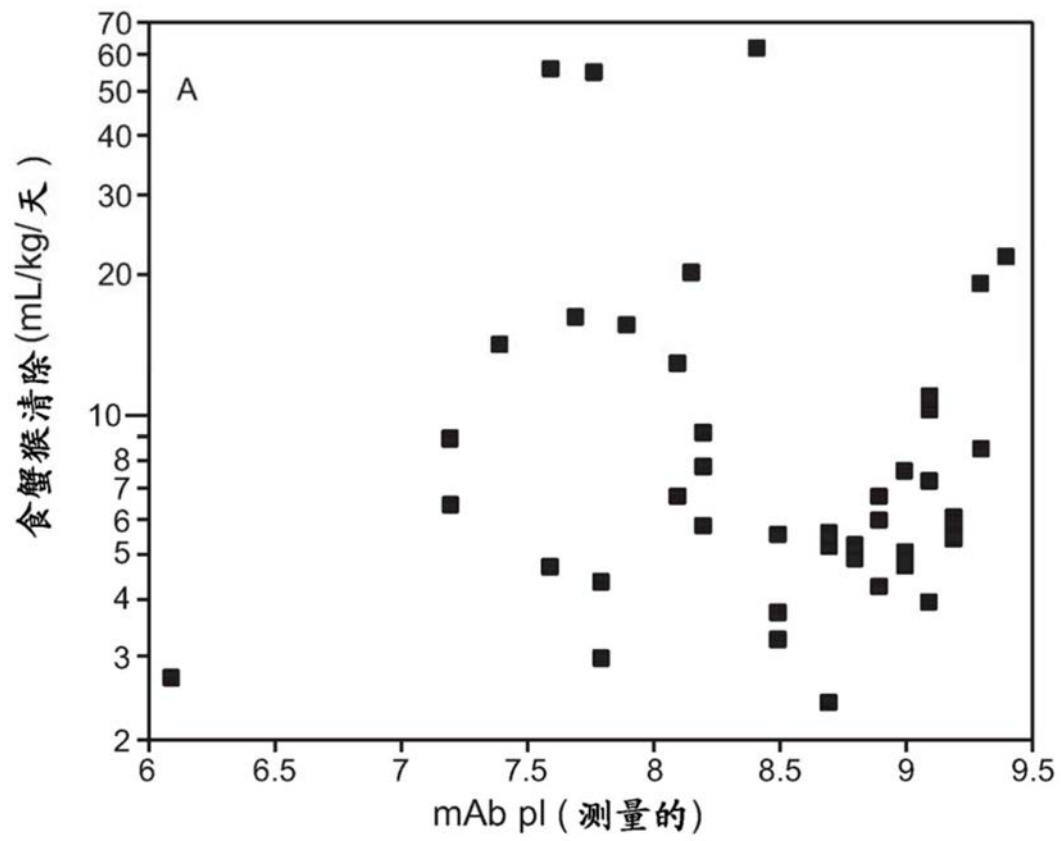


图6

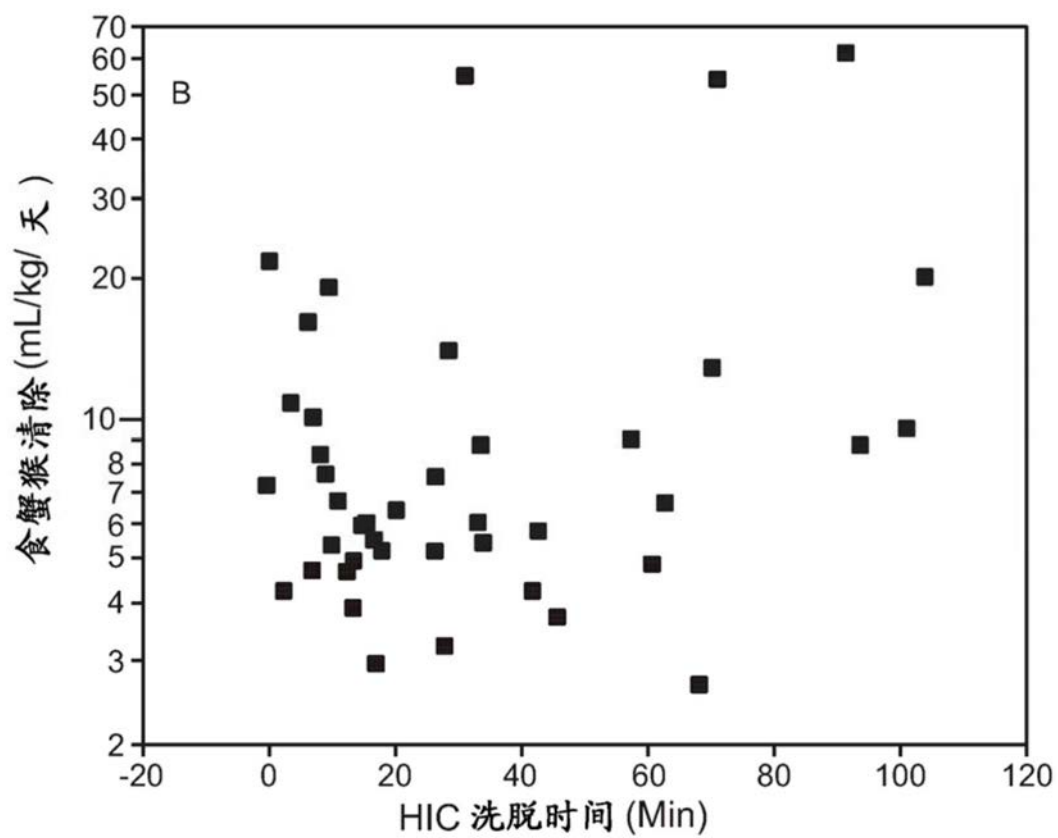


图7

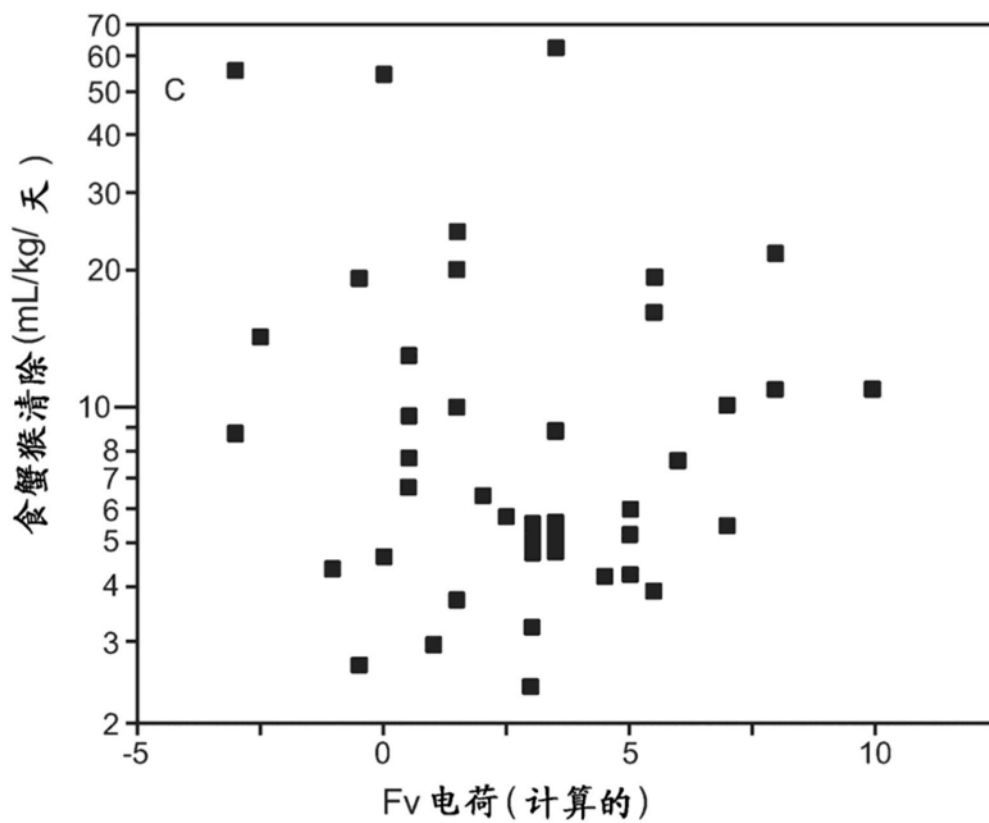
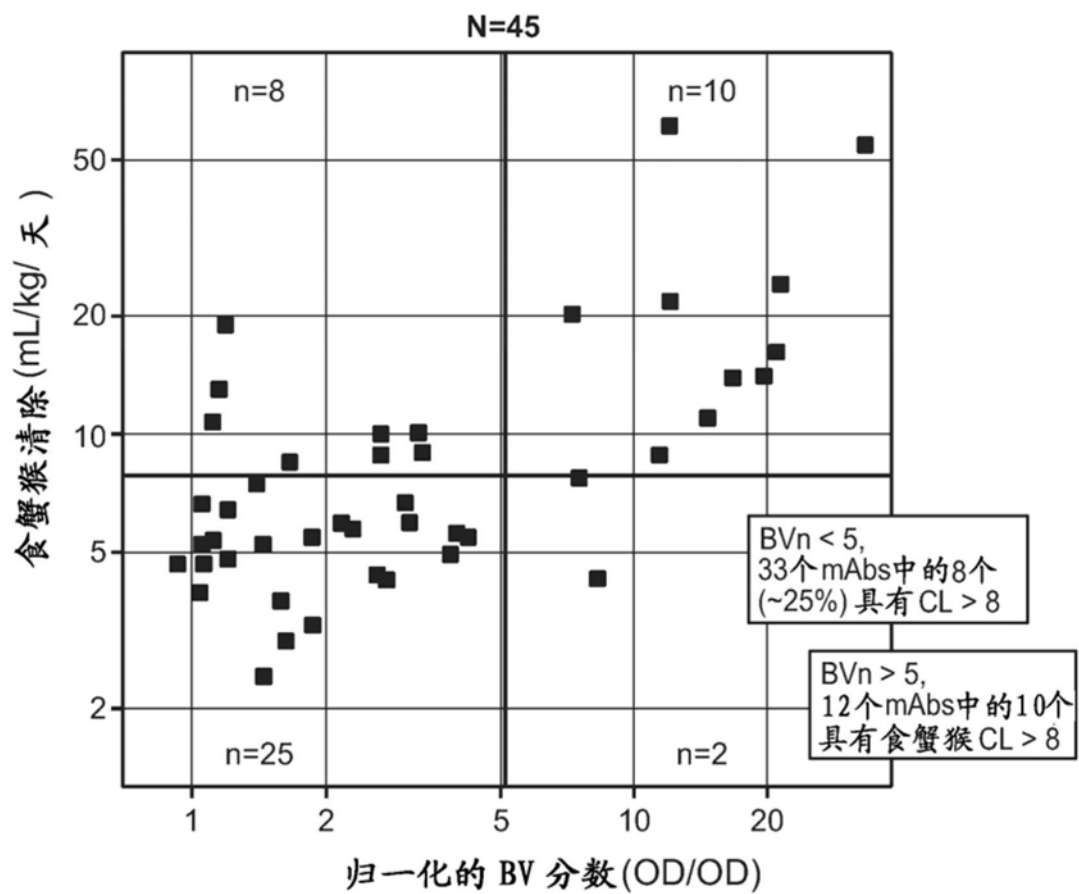


图8



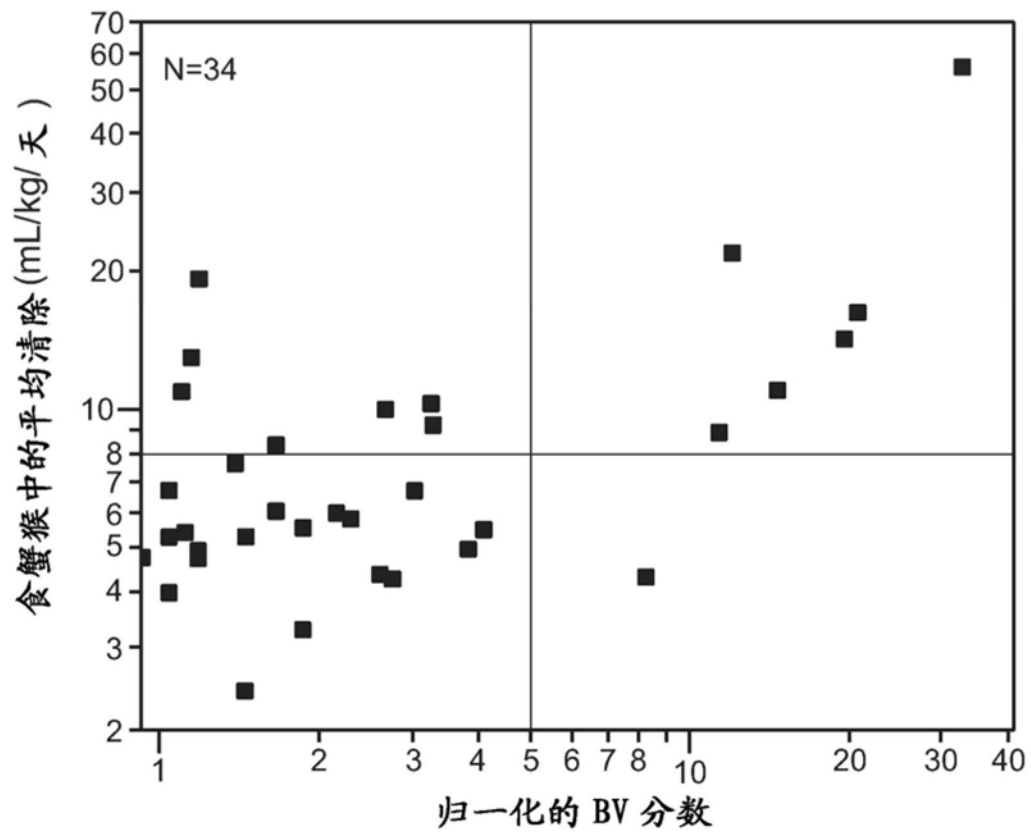


图10

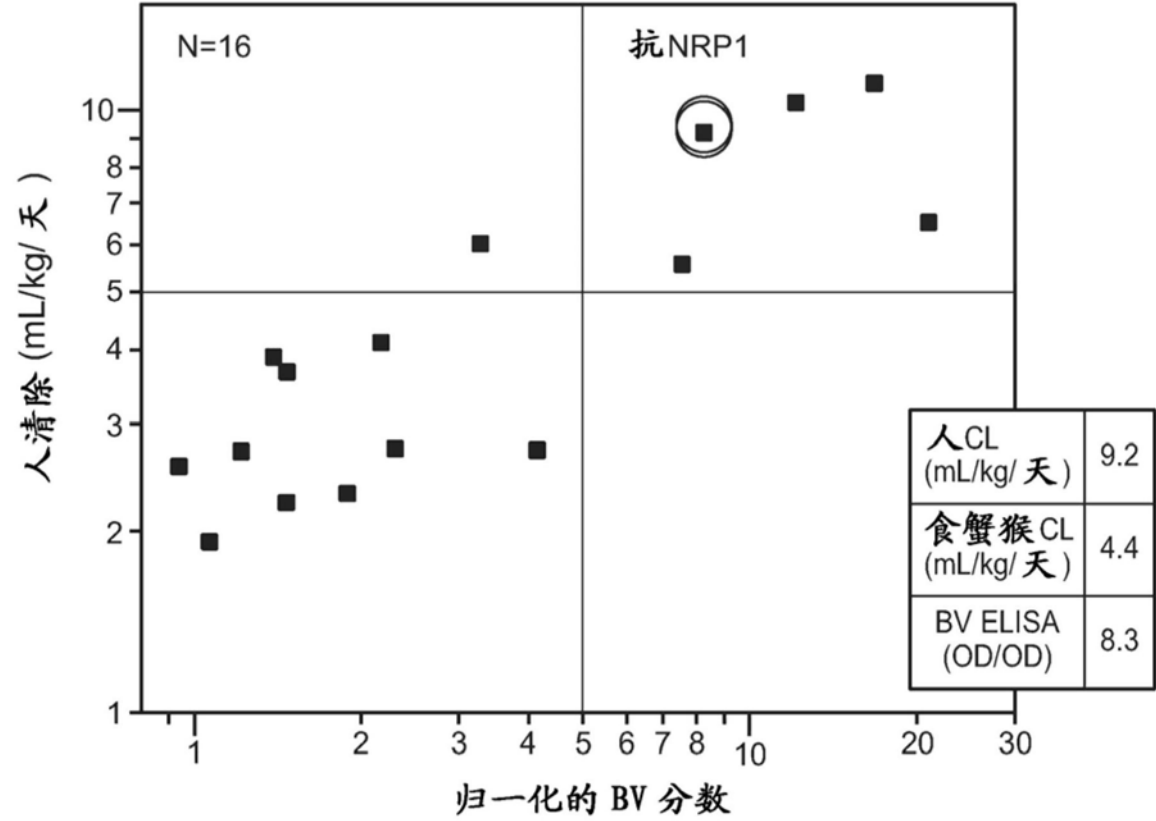


图11

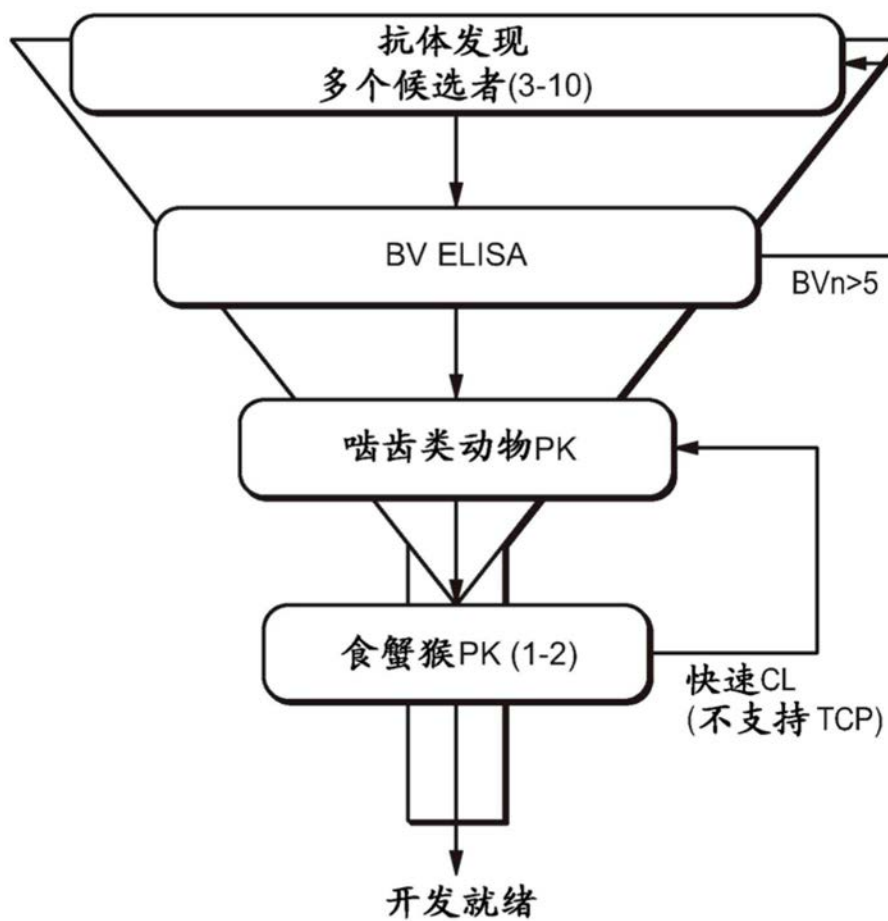


图12

专利名称(译)	治疗剂的选择方法		
公开(公告)号	CN104335047B	公开(公告)日	2017-08-15
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	C07K16/00 C07K2317/94 G01N33/586 G01N2333/01 G01N2500/04 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	CN104335047A		
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