



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113480663 A

(43) 申请公布日 2021.10.08

(21) 申请号 202110759765.3

G01N 33/68 (2006.01)

(22) 申请日 2015.05.28

A61K 38/16 (2006.01)

(30) 优先权数据

1409558.2 2014.05.29 GB

(62) 分案原申请数据

201580028405.9 2015.05.28

(71) 申请人 UCB生物制药有限责任公司

地址 比利时布鲁塞尔

(72) 发明人 H·M·芬尼 S·E·拉佩奇

M·J·赖特

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

代理人 张小勇

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书63页

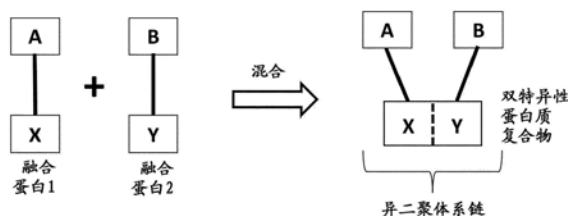
序列表21页 附图39页

(54) 发明名称

适用于高通量筛选的新的双特异性形式

(57) 摘要

本公开涉及新型双特异性蛋白质复合物和使用所述复合物筛选协同或新型生物功能的方法。双特异性形式特别适合于高通量筛选,因为其所有组分可以作为个体单元从细胞表达,并且所述单元可以简单地通过混合进行组装而无需使用缀合或偶联化学。



1. 一种具有式A-X:Y-B的双特异性蛋白质复合物,其中:  
A-X是第一融合蛋白;  
Y-B是第二融合蛋白;  
X:Y是异二聚体系链;  
:是X与Y之间的结合相互作用;  
A是选自Fab或Fab'片段的所述双特异性蛋白质复合物的第一蛋白质组分;  
B是选自Fab或Fab'片段的所述双特异性蛋白质复合物的第二蛋白质组分;  
X是独立地选自抗原或抗体或其结合片段的结合对的第一结合伴侣;和  
Y是独立地选自抗原或抗体或其结合片段的结合对的第二结合伴侣;  
条件是当X是抗原时,Y是对由X表示的抗原具有特异性的抗体或其结合片段,并且当Y是抗原时,X是对由Y表示的抗原具有特异性的抗体或其结合片段。
2. 权利要求1的双特异性蛋白质复合物,其中A是Fab片段。
3. 权利要求1或2的双特异性蛋白质复合物,其中B是Fab片段。
4. 权利要求1至3的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中X任选通过接头与Fab或Fab'片段中的重链的C末端融合。
5. 权利要求1至4的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中Y任选通过接头与Fab或Fab'片段中的重链的C末端融合。
6. 权利要求1至5的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中X独立地选自scFv、VHH和肽,条件是当X是肽时,Y是抗体或其结合片段,诸如scFv或VHH,并且当X是scFv或VHH时,则Y是抗原,诸如肽。
7. 权利要求1至6的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中Y独立地选自scFv、VHH和肽,条件是当Y是肽时,X是抗体或结合片段,诸如scFv或VHH,并且当Y是scFv或VHH时,则X是抗原,诸如肽。
8. 权利要求6或7的双特异性蛋白质复合物,其中所述肽的长度在5至25个氨基酸的范围内。
9. 权利要求1至8的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中X与Y之间的结合亲和力为5nM或更强。
10. 权利要求9的双特异性蛋白质复合物,其中X与Y之间的结合亲和力为900pM或更强,例如800pM、700pM、600pM、500pM、400pM或300pM。

## 适用于高通量筛选的新的双特异性形式

[0001] 本申请是CN 201580028405.9的分案申请。

### 发明领域

[0002] 本公开涉及检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同生物功能的方法,特别是体外/离体方法(双特异性蛋白质复合物的文库/多元体),及其试剂盒和组合物。本公开还涉及所述新型双特异性蛋白质复合物及其在治疗、研究和实验目的(特别是在寻找协同生物功能的测定中)中的用途。本公开还延伸至制备所述双特异性复合物的方法。

### [0003] 发明背景

[0004] 体内生物学机制是极复杂的信号级联,其难以去卷积(deconvolute)和理解。此类信号传导的一个实例是激活T细胞所需的信号传导,参见图1,来自www.cellsignal.com。T细胞的活化需要至少两个信号。

[0005] T细胞受体对抗原的识别被认为是第一信号,并且第二信号由共刺激产生,所述共刺激由T细胞上的其它表面分子与抗原呈递细胞上的其它分子的连接产生。

[0006] 因此,T细胞活化可用于举例说明生物功能的调节可能需要多个信号。其他生物过程同样复杂或更复杂。尽管基于细胞的体外筛选具有并且能够帮助获得对体内机制的洞察,但仍然存在如何鉴定调节生物功能的适当配体对的问题。

[0007] 双特异性抗体被广泛预期在下一代生物治疗剂中起主要作用(D.Holmes,Nature Rev Drug Disc Nov 2011:10;798)。它们具有在更大比例的患者中提供优异的,长期的,广泛的功效的潜力。这可以通过在共同疾病途径中同时共同接合不同的抗原,从而减少冗余来实现;或通过靶向来自独立途径的抗原以提供累加或协同效应来实现。

[0008] 双特异性抗体有助于获得新型生物学,诸如:

[0009] 1) 细胞上的交联受体,

[0010] 2) 诱导细胞介导的效应,

[0011] 3) 将细胞因子定位于细胞以调节信号传导或局部阻断细胞因子功能,

[0012] 4) 同时接合多个表位以产生“新活性”,增加功能或特异性,其可能不会由单一单克隆抗体或实际上未连接的抗体(“聚-单克隆”)的混合物表现。

[0013] 目前接合双重靶标的策略主要基于已知机制的合理设计,包括:交联抑制性受体、受体的共同接合/聚集(clustering)、阻断多个刺激途径、抑制性受体的选择性接合和阻断不同途径诸如共刺激和细胞因子信号传导。然而,与已知机制和靶标相关的现有技术水平是在该领域取得进展的限制因素。

[0014] 虽然双特异性抗体作为生物治疗剂具有巨大的潜力,但是与单克隆抗体相比,它们在发现和开发过程中也提出了一组增加的挑战。两个关键的困难领域是,1) 成功的双特异性抗体形式的开发,和2) 选择双特异性抗体将与其交联或共同接合的靶标对。

[0015] 现在已经开发了许多有希望的双特异性抗体形式,其可潜在地用作成功的治疗剂,包括DVD-Ig(Abbvie)、DuoBodies(Genmab)、Knobs-in-Holes(Genentech)、共同轻链

(Merus)。然而,在这些情况的每一种情况下,这些形式不理想地适合于高通量靶标-双重-抗原发现筛选,以使得能够发现用于与双特异性抗体交联的新抗原对。

[0016] 通常,对于单个双特异性抗体构建体,需要从发现载体的原始来源(例如噬菌体展示、杂交瘤或单个B细胞克隆)亚克隆至少两个可变区至合适的双特异性表达载体中,双特异性的每个臂必须被表达,并纯化所得的双特异性抗体。如果要组合大量的可变区对以尝试筛选所发现的可变区的最有效组合或发现新的抗原对,则该克隆和随后的表达努力很快变成明显的实际瓶颈。

[0017] 例如,如果针对50个细胞表面靶标的小组发现50个独特抗体,则可潜在地产生总共2500个双特异性抗体(设想为X-乘-Y网格)。使用上述双特异性抗体形式,这将需要至少100个个体克隆反应(50-X和50-Y),然后是2500个抗体表达实验。将起始单克隆抗体的数目增加至100将使克隆反应的最小数目增加至200(100-X和100-Y),并将表达数目增加至10,000。

[0018] 通常,该“表达瓶颈”的根本原因是以下事实,即上述形式需要最终双特异性构建体的两个蛋白质链“一半”在同一细胞中的单个表达实验内同时表达。因此,对于许多形式,为了产生2500个双特异性抗体,需要2500个表达实验。

[0019] 如果双特异性抗体形式是单顺反子(即克隆并表达为单链蛋白),例如单链双抗体,则“表达瓶颈”进一步恶化,因为克隆实验的数目对于上述给出的数目将分别为2500和10,000。

[0020] 此外,在表达后,可能需要充分纯化以分离期望的构建体。

[0021] 一些双特异性方法在双特异性构建体中使用共同的轻链以减少克隆的量,尽管这不减少表达实验的数目。此外,使用共同的链诸如共同的轻链,使得抗体发现的挑战更加困难,因为更加难以找到起始抗体的可变结构域,因为抗体需要单独通过一条链(诸如重链)以足够高的亲和力结合其抗原。

[0022] 因此,在大规模和高通量筛选中使用目前的双特异性形式来鉴定新的抗原对是不切实际的,并已经导致继续使用仅由假设驱动的方法来进行双特异性抗原靶向。

[0023] 我们建议,与其设计并测试有限选择的双特异性抗体(其接合两个已知靶标上的给定表位),不如说开发利用双特异性抗体获得新型生物学的真正潜力只能通过利用双特异性抗体或蛋白质配体的在的多样性组合小组进行广泛的功能筛选工作来实现。为了便于该筛选,需要能够产生大量不同的双特异性蛋白质的形式和方法,可容易地构建所述双特异性蛋白质并在多种功能筛选中筛选其功能效应。该方法允许协同对的偶然鉴定。

[0024] 因此,产生和筛选作为各种抗原特异性的组合存在的大量双特异性蛋白质复合物是有用的。特别地,能够以快速和高效的方式产生和筛选大量不同的双特异性抗体复合物将是有益的。存在一系列已如上所述的用于制造双特异性抗体的现有方法。然而,这些方法中的每一种都具有其不利方面,下面进一步详细描述替代方法亦如此。

[0025] 如何有效鉴定双特异性和多特异性构建体的靶标的问题在本领域中还没有得到充分解决。例如W02014/001326采用蛋白质与DNA片段的化学缀合,其中所述DNA片段与互补DNA序列杂交,所述互补DNA序列将两个这样的蛋白质连接在一起,以产生包含至少两个靶向实体的定制的患者特异性多特异性分子。如果要将其应用于鉴定新的双特异性组合,则存在与该方法相关的许多困难,例如蛋白质与DNA的缀合可导致对该蛋白质的活性和/或结

构的损害。特别地,蛋白质-DNA杂交物不是天然存在的,因此存在干扰的可能性。另外,连接蛋白质和DNA所需的化学缀合增加了该方法的复杂性、时间和费用。

[0026] 存在用于产生抗体药物缀合物和体内靶向技术的偶联和缀合技术。常规化学交联是劳动密集型的,因为相关种类可能需要从同二聚体和其它不期望的副产物中纯化。另外,化学修饰步骤可改变蛋白质的完整性,从而导致稳定性差或生物功能改变。因此,通过化学交联产生双特异性抗体通常是低效的,并且还可导致抗体活性的丧失。

[0027] 制备双特异性抗体的另一种方法是通过细胞融合(例如,杂交体杂交瘤),其中工程化的细胞表达随机组装的两条重链和两条轻抗体链。由于存在4种可能的变体可供选择,这导致产生10种可能的双特异性抗体组合,其中仅一些(在许多情况下,仅一种)组合将是期望的。因此,通过细胞融合产生双特异性抗体导致低产率,并且还需要额外的纯化步骤,以将所需的双特异性抗体与从所产生的其他双特异性抗体分离。这些不利方面增加了制造时间和成本。

[0028] 重组DNA技术也已用于产生双特异性抗体。例如,重组DNA技术也已用于产生“knob into hole”双特异性抗体。“knob into hole”技术包括工程化CH3结构域界面上的多聚化结构域中的空间互补突变(参见例如,Ridgway等,Protein Eng. 9:617-621 (1996); Merchant等,Nat. Biotechnol. 16 (7) :677-81 (1998);也参见美国专利号5,731,168和7,183,076)。该策略的一个约束是两个亲本抗体的轻链必须是相同的,以防止当在相同细胞中表达时错配和形成不期望的抗体和/或无活性分子。每个双特异性(其重链和轻链)必须在单个细胞中表达,并且蛋白质产物一般含有约20%的同二聚体,随后通过纯化将其除去。

[0029] 其他方法基于全长IgG4分子中的链的天然交换(Genmab Dubody)。然而,该方法也具有困难,因为其不允许在没有Fc区的情况下制备构建体。因为Fc区可促成生物活性,所以可能难以确定观察到的活性是否基于包含Fc的双特异性分子中的可变区、Fc或两者的组合。此外,交换是一个动态过程,这可能导致与实际测试的实体是什么相关的困难。

[0030] 因此,需要产生双特异性蛋白质复合物的新方法,以使得能够进行双特异性抗体的更高效和更高通量的筛选。特别地,需要一种形式和方法,其中从可获得的抗体或抗体片段库中选择任意两种抗体或抗体片段可以容易地组合以有效地产生不同双特异性抗体的多元体(multiplex),同时例如避免或最小化同二聚体的形成。当筛选抗原特异性的新组合的协同生物功能时,特别是当异二聚体对于发现该功能是必需的时候,高效地组装不同的双特异性抗体是特别重要的。

[0031] 发明概述

[0032] 在一个方面,提供了特别适合用于筛选的新的双特异性形式,因为所有组分可以作为个体单元从细胞表达,基本上没有聚集,并且所述单元可以简单地通过混合进行组装而无需使用缀合或偶联化学,并且具有最小的同二聚化。

[0033] 因此,提供了具有式A-X:Y-B的双特异性蛋白质复合物,其中:

[0034] A-X是第一融合蛋白;

[0035] Y-B是第二融合蛋白;

[0036] X:Y是异二聚体系链;

[0037] :是X与Y之间的结合相互作用;

[0038] A是选自Fab或Fab'片段的双特异性蛋白质复合物的第一蛋白质组分;

- [0039] B是选自Fab或Fab'片段的双特异性蛋白质复合物的第二蛋白质组分;
- [0040] X是独立地选自抗原或抗体或其结合片段的结合对的第一结合伴侣;以及
- [0041] Y是独立地选自抗原或抗体或其结合片段的结合对的第二结合伴侣;
- [0042] 条件是当X是抗原时,Y是对由X表示的抗原具有特异性的抗体或其结合片段,并且当Y是抗原时,X是对由Y表示的抗原具有特异性的抗体或其结合片段。
- [0043] 在一个实施方案中,变量X或Y是抗体结合片段,诸如scFv、Fv、VH、VL或VHH,并且另一个变量是肽。
- [0044] 在一个实施方案中,变量X或Y是scFv或VHH,并且另一个变量是肽。
- [0045] 因此,双特异性形式包含具有不同特异性的两个Fab臂(例如经由它们的C末端,通过抗体结合片段(诸如scFv或VHH)和肽结合相互作用连接的)。这种类型的排列对于用于筛选是理想的,因为表达单元A-X或单元B-Y没有困难。Fab/Fab'片段是非常稳定的,并且对不易进行不适当的二聚化。因此,每个单元(A-X或B-Y)表达后所需的纯化量是最小的或者事实上是没有必要的。双特异性复合物可以通过简单地混合相关单元,即无需求助于缀合和偶联化学而以1:1摩尔比形成。Fab/Fab'片段中的恒定区驱动Fab/Fab'组分的二聚化,并且结合伴侣X和Y进一步驱动平衡,有利于形成必需的异二聚体双特异性复合物。再次地,在异二聚化之后形成复合物后,需要很少的纯化或不需要纯化。因此,可以容易地制备和组合大量的A-X和B-Y。
- [0046] 复合物中的Fab/Fab'实体意味着以模拟经典抗体几何形状的生物学相关取向保持结合结构域,这可有助于将通过本文下述的筛选方法鉴定的可变区对成功地转化成保留活性的其它双特异性治疗形式。制备和筛选缺乏Fc片段CH2-CH3的双特异性复合物的能力也确保所观察到的生物活性事实上仅归因于复合物中的可变区对。本发明的双特异性复合物及其制备方法的简单性在促进可变结构域对的高通量筛选(以发现新的靶抗原组合以及优化给定的组合的可变区序列)的背景下是巨大的有利方面。
- [0047] 在一个实施方案中,A是Fab片段。在一个实施方案中,B是Fab片段。在一个实施方案中,A和B二者都是Fab片段(本文中也称为Fab-Kd-Fab)。
- [0048] 在一个实施方案中,X与Fab或Fab'片段中的重链或轻链的C末端,特别是重链的C末端融合。
- [0049] 在一个实施方案中,Y与Fab或Fab'片段中的重链或轻链的C末端,特别是重链的C末端融合。
- [0050] 在一个实施方案中,X独立地选自scFv、VHH和肽,条件是当X是肽时,Y是抗体或其结合片段,诸如scFv或VHH,并且当X是scFv或VHH时,Y是抗原,诸如肽。
- [0051] 在一个实施方案中,Y独立地选自scFv、VHH和肽,条件是Y是肽,X是抗体或结合片段,诸如scFv或VHH,当Y是scFv或VHH时,则X是抗原,诸如肽。
- [0052] 在一个实施方案中,肽(其为结合伴侣之一)的长度在5至25个氨基酸的范围内。
- [0053] 在一个实施方案中,X与Y之间的结合亲和力为5nM或更强,例如异二聚体系链的结合亲和力为900pM或更强,诸如800pM、700pM、600pM、500pM、400pM或300pM。
- [0054] 在一个实施方案中,X或Y是对肽GCN4特异性的scFv或VHH,例如scFv是52SR4(SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:3的氨基酸1-243)。
- [0055] 在一个实施方案中,X或Y是肽GCN4(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:1的氨基酸1-38)。

[0056] 在一个实施方案中,A和/或B对选自以下的抗原是特异性的:细胞表面受体诸如T细胞或B细胞信号传导受体、共刺激分子、检查点抑制剂、天然杀伤细胞受体、免疫球蛋白受体、免疫球蛋白样受体、基质金属蛋白酶和金属蛋白酶的膜类型基质金属蛋白酶组织抑制剂、TNFR家族受体、B7家族受体、粘附分子、整联蛋白、细胞因子/趋化因子受体、GPCR、生长因子受体、激酶受体、组织特异性抗原、癌抗原(肿瘤相关抗原和肽)、病原体识别受体、补体受体、激素受体、清道夫受体或可溶性分子诸如细胞因子、趋化因子、白三烯、生长因子、激素或酶或离子通道,包括其翻译后修饰形式、其包含至少一个表位的片段。

[0057] 在一个实施方案中,提供了一种组合物,例如包含一种或多种根据本公开的双特异性复合物的药物组合物。

[0058] 此外,本发明人已设计了检测式A-X:Y-B的异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法:

[0059] 其中X:Y是异二聚体系链,例如其中X和Y不适合形成同二聚体,

[0060] A和B分别是在具有X和Y的融合蛋白的形式中具有双特异性的组分,所述方法包括以下步骤:

[0061] (i) 在功能测定中测试包含至少一种异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质的多元体的部分或全部的活性;和

[0062] (ii) 分析来自功能测定的读出数据(readout),以鉴定双特异性蛋白质复合物中的协同生物功能。

[0063] 该方法使用具有下式A-X:Y-B的新型双特异性蛋白质复合物形式,其中:

[0064] A-X是第一融合蛋白;

[0065] Y-B是第二融合蛋白;

[0066] X:Y是异二聚体系链;

[0067] A是具有双特异性的第一蛋白质组分;

[0068] B是具有双特异性的第二蛋白质组分;

[0069] X是结合对的第一个结合伴侣;

[0070] Y是所述结合对的第二结合伴侣;以及

[0071] :是X与Y之间的相互作用(例如结合相互作用),特别地,所述相互作用足以形成复合物并以复合形式保持融合蛋白。

[0072] 特别地,通过在体外混合A-X与B-Y来制备异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物。因此,在一个实施方案中,该方法包括使A-X与B-Y接触的体外混合步骤。

[0073] 因此,融合蛋白A-X与B-Y一般不在同一细胞中共表达。这是有利的,因为其允许例如100种融合蛋白表达并任选地纯化,并且随后以各种排列混合100种融合蛋白可提供10,000种异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物,其中5,000种是独特的对。

[0074] 相反,某些现有技术方法需要双特异性的共表达,因此对于10,000种复合物,需要10,000个转染、表达和纯化。

[0075] 然而,如果需要,可将A-X和B-Y在同一细胞中表达。

[0076] 结合伴侣X和Y彼此具有亲和力,并且用作 **velcro®** 的生物等效物或条和磁体,并将复合物保持在一起。有利地,这意味着融合蛋白A-X和Y-B可通过将融合蛋白混合在一起而被容易地组装成双特异性蛋白质复合物。因此,本公开的双特异性蛋白质复合物具有

模块结构,其允许容易地组装两种不同的蛋白质,以便以例如网格样方式产生具有不同抗原特异性组合的双特异性蛋白质复合物的大组排列。这允许高效和系统地筛选大量双特异性蛋白质复合物,以便检测累加的、协同的或新型生物功能。

[0077] 鉴于X和Y对彼此是特异性的,这显著减弱了形成同二聚体的能力。X和Y在本文中统称为结合对或结合伴侣。在一个实施方案中,X对其它X不具有高亲和力。在一个实施方案中,Y对其它Y不具有高亲和力。有利地,当X和Y不形成同二聚体时,这防止了不期望的单特异性蛋白质复合物的形成,增加了所需双特异性蛋白质复合物的产率,并且消除了对繁重的纯化步骤以除去单特异性蛋白质复合物的需要。

[0078] 这允许双特异性蛋白质复合物以通过大多数现有技术方法(特别是现有技术的方法通常需要充分纯化步骤)不能有效获得的产率和/或纯度而快速组装。在本发明中,双特异性复合物的产率通常为75%或更高。

[0079] 更有利地,双特异性蛋白质复合物允许筛选复合物,其中所述复合物中组成蛋白(包括由组成蛋白结合的抗原)不具有已知的关系或处于不同的潜在不相关的途径中,诸如,可在双特异性蛋白质复合物中测试在两个不同的途径中起作用的并且,例如本领域技术人员通常不期望彼此接触的两种蛋白质,以鉴定累加的、协同的和/或新型功能。

[0080] 此外,可以平行研究针对给定抗原或表位的多个结合区(诸如可变区),以鉴定生物功能的细微差别。这允许针对给定的抗原对的可变区序列的组合进行研究和优化。

[0081] 本方法允许科学显示结果,并且不依赖于关于生物功能的预先构想的想法和技术偏见。该方法可能非常强大。

[0082] 有利地,X和Y组分允许包含由不同排列的融合蛋白组成的双特异性蛋白质复合物的多元体快速和容易地组装。

[0083] 在一个实施方案中,蛋白A和B是抗体或抗体片段。当抗体或抗体片段作为复合物经由X和Y保持在一起时,这形成双特异性抗体复合物。

## 附图说明

[0084] 图1是显示参与T细胞活化的主要细胞信号传导途径的示意图。

[0085] 图2是显示本公开的双特异性蛋白质复合物的结构和组装的示意图。

[0086] 图3是显示使用本发明的双特异性抗体进行功能筛选的示例性4x4网格的表格。通过使用该网格,可以组装和有效筛选16种不同的双特异性蛋白质复合物的协同功能。

[0087] 图4是显示本公开的代表性双特异性抗体复合物的示意图。该图描绘了两个不同的Fab片段如何通过附接于Fab片段的结合伴侣之间的高亲和力相互作用力在一起形成双特异性抗体复合物。

[0088] 图5是显示流式细胞术实验的结果的示图,所述实验证明对两种不同靶抗原具有特异性的两个Fab片段保留其特异性,并且当两个Fab片段组合以形成本公开的双特异性抗体复合物时能够同时共同接合它们的对应靶抗原。结果进一步证明,逆转附接于Fab片段的结合伴侣的附接不影响Fab片段特异性结合其各自的靶抗原的能力。当两种特异性都与肽(Y:Y)融合时,无复合物形成对照显示没有检测到的结合。

[0089] 填充面积=[抗抗原5Fab-肽'GCN4']:[抗抗原6Fab-肽'GCN4']:[生物素化的抗原6]:[FITC-STREP]。无复合物形成对照。



[0090] 细线=[抗抗原5Fab-scFv '52SR4']:[抗抗原6Fab-肽 'GCN4']:[生物素化的抗原6]:[FITC-STREP]

[0091] 粗线=[抗抗原5Fab-肽 'GCN4']:[抗抗原6Fab-scFv '52SR4']:[生物素化抗原6]:[FITC-STREP]

[0092] 图6是显示BIAcore迹线的图和表,其显示了结合伴侣彼此的高亲和力。检测到Fab A-scFv '52SR4' 与芯片上的肽 'GCN4' 的结合。

[0093] 图7是具有对抗原3、抗原1、抗原4和抗原2的特异性的抗体的双特异性和二价组合对磷酸化的Akt的抑制的相对效力的条形图。

[0094] 图8是具有对抗原3、抗原1、抗原4和抗原2的特异性的抗体的双特异性和二价组合对磷酸化的PLCg2的抑制的相对效力的条形图。

[0095] 图9是具有对抗原3、抗原1、抗原4和抗原2的特异性的抗体的双特异性和二价组合对CD86表达的抑制的相对效力的条形图。

[0096] 图10是具有对抗原1和抗原2的特异性的抗体的双特异性、二价或混合物以及单Fab'对照对磷酸化的Akt的抑制的相对效力的条形图。

[0097] 图11是具有对抗原3和抗原2的特异性的抗体的双特异性、二价或混合物对磷酸化的Akt的抑制的相对效力的条形图。

[0098] 图12是具有对抗原3和抗原2的特异性的抗体的双特异性、二价或混合物对磷酸化的PLCg2的抑制的相对效力的条形图。

[0099] 图13是显示抗抗原3和抗抗原2的双特异性组合对抗IgM刺激的B细胞中总I $\kappa$ B水平的效应的滴定的图。

[0100] 图14是显示抗原3和抗原2的双特异性组合对抗IgM刺激的B细胞上CD86表达的效应的滴定的图。

[0101] 图15是具有对抗原4和抗原2的特异性的抗体的双特异性、二价或混合物对磷酸化的Akt的抑制的相对效力的条形图。

[0102] 图16是具有对抗原4和抗原2的特异性的抗体的双特异性、二价或混合物对磷酸化的PLCg2的抑制的相对效力的条形图。

[0103] 图17是显示抗原4和抗原2的双特异性组合对抗IgM刺激的B细胞上CD86表达的效应的滴定的图。

[0104] 图18是显示来自实施例11的实验1的重叠尺寸排阻A280信号迹线的图。所显示的迹线是:Fab-X (VR4247) 对照、Fab-Y (VR4248) 对照以及500 $\mu$ g/ml的Fab-X (VR4247) 和Fab-Y (VR4248) 复合物的1:1摩尔比的混合物。在280nm的吸光度上检测到峰。

[0105] 图19是显示来自实施例11的实验2的重叠尺寸排阻A214信号迹线的图。所显示的迹线是:Fab-X (VR4130) 对照、Fab-Y (VR4131) 对照以及500 $\mu$ g/ml的Fab-X (VR4130) 和Fab-Y (VR4131) 复合物的1:1摩尔比的混合物。在214nm的吸光度检测到峰。

[0106] 图20是显示来自实施例11的实验2的重叠尺寸排阻A214信号迹线的图。所显示的迹线都是如所示的500 $\mu$ g/ml、50 $\mu$ g/ml和5 $\mu$ g/ml的Fab-X (VR4130) /Fab-Y (VR4131) 的1:1摩尔比混合物。在214nm的吸光度检测到峰。

[0107] 图21是显示抗原网格交叉特异性的数据的表。值为Syk的磷酸化的抑制百分数(活化的负值)以及表示所评估的多个V区组合的平均值。

[0108] 图22是显示抗原网格交叉特异性的数据的表。值是PLCg2的磷酸化的抑制百分数(活化的负值)并且表示所评估的多个V区组合的平均值。

[0109] 图23是显示抗原网格交叉特异性的数据的表。值是AKT的磷酸化的抑制百分数(活化的负值)并且表示所评估的多个V区组合的平均值。

[0110] 图24是显示与Fab-Y中的抗原3组合的Fab-X中的抗原2的每个V区组合对Syk、PLCg2和AKT的磷酸化的抑制百分数的图

[0111] 图25是显示与Fab-Y中的抗原2组合的Fab-X中的抗原3的每个V区组合对Syk、PLCg2和AKT的磷酸化的抑制百分数的图。

[0112] 图26是显示与Fab-Y中的抗原4组合的Fab-X中的抗原2的每个V区组合对Syk、PLCg2和AKT的磷酸化的抑制百分数的图。

[0113] 图27是显示与Fab-Y中的抗原2组合的Fab-X中的抗原4的每个V区组合对Syk、PLCg2和AKT的磷酸化的抑制百分数的图。

[0114] 图28是显示当组合作为纯化的Fab'或来自瞬时转染物上清液时,通过抗原3Fab'-X和抗原2-Fab'-Y对抗IgM诱导的B细胞上CD71表达的抑制百分数的数据的图。

[0115] 圆形-纯化的抗原2Fab-Y+抗原3Fab-X  $IC_{50}$  0.3224nM

[0116] 方块-瞬时转染物上清液抗原2-Y+抗原3-X  $IC_{50}$  0.2640nM

[0117] 三角-模拟转染上清液对照

[0118] 图29是显示当组合作为纯化的Fab'或来自瞬时转染物上清液时,抗原3-Fab'-X和抗原2-Fab'-Y对抗IgM诱导的B细胞中p38的磷酸化的抑制百分数的数据的图。

[0119] 圆形-纯化的抗原2Fab-Y+抗原3Fab-X  $IC_{50}$  0.1413nM

[0120] 方块-瞬时转染物上清液抗原2-Y+抗原3-X  $IC_{50}$  0.1861nM

[0121] 三角-模拟转染上清液对照

[0122] 图30至33的图例

[0123] 1. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6066) ;

[0124] 2. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6078) ;

[0125] 3. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6079) ;

[0126] 4. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6080) ;

[0127] 5. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6082) ;

[0128] 6. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6067) ;

[0129] 7. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原Fab-X (VR6068) ;

[0130] 8. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6070) ;

[0131] 9. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6071) ;

[0132] 10. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6073) ;

[0133] 11. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6075) ;

[0134] 12. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6076) ;

[0135] 13. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6077) ;

[0136] 14. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6069) ;

[0137] 15. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6072) ;

[0138] 16. 抗原2Fab-Y (VR4447) +抗原3Fab-X (VR6074) ;

- [0139] 17. 抗原2Fab-Y (VR4447) + 抗原3Fab-X (VR6081) ;
- [0140] 18. 抗原2Fab-Y (VR4447) + 抗原3Fab-X (TSUP-24117) ;
- [0141] 19. 抗原2Fab-Y (VR4447) + 抗原3Fab-X (TSUP-24432) ;
- [0142] 20. 模拟上清液1;
- [0143] 21. 模拟上清液2;
- [0144] 22. 纯化的抗原2Fab-Y (VR4447) + 抗原3Fab-X (4126)
- [0145] 图30是显示与抗原3特异性Fab-X瞬时转染物组合的纯化的抗原2-特异性Fab-Y (VR4447) 对IgM刺激的来自UCB\_Cone\_172的B细胞的磷酸读出数据的抑制的图。
- [0146] 图31是显示与抗原3特异性Fab-X瞬时转染物组合的纯化的抗原2-特异性Fab-Y (VR4447) 对IgM刺激的来自UCB\_Cone\_173的B细胞的磷酸读出数据的抑制的图。
- [0147] 图32: 与抗原3特异性Fab-X瞬时转染物组合的纯化的抗原2-特异性Fab-Y (VR4450) 对IgM刺激的来自UCB\_Cone\_172的B细胞的磷酸读出数据的抑制。
- [0148] 图33: 与抗原3特异性Fab-X瞬时转染物组合的纯化的抗原2-特异性Fab-Y (VR4450) 对IgM刺激的来自UCB\_Cone\_173的B细胞的磷酸读出数据的抑制。
- [0149] 图34显示了抗原3和抗原2特异性Fab-Kd-Fab或BYbe对B细胞中抗IgM诱导的磷酸化的PLC  $\gamma$  2的抑制百分数的数据。
- [0150] 图35显示抗原3和抗原2特异性Fab-Kd-Fab或BYbe对B细胞中抗IgM诱导的磷酸化额P38的抑制百分数的数据。
- [0151] 图36显示了通过抗原3和抗原2特异性Fab-Kd-Fab或BYbe对B细胞中抗IgM诱导的磷酸化的Akt的抑制百分数的数据。
- [0152] 图37显示抗原3和抗原2特异性Fab-Kd-Fab或BYbe对抗IgM诱导的B细胞上CD71表达的抑制百分数的数据。
- [0153] 图38显示抗原3和抗原2特异性Fab-Kd-Fab或BYbe对抗IgM诱导的B细胞上CD40表达的抑制百分数的数据。
- [0154] 图39显示抗原3和抗原2特异性Fab-Kd-Fab或BYbe对抗IgM诱导的B细胞上CD86表达的抑制百分数的数据,
- [0155] 图40显示VR4447/VR4126 BYbe和VR4447/VR4126/VR645 BYbe/白蛋白对B细胞上CD27表达的抑制。
- [0156] 图41显示VR4447/VR4126 BYbe和VR4447/VR4126/VR645 BYbe/白蛋白对B细胞上CD71表达的抑制。
- [0157] 图42显示VR4447/VR4126 BYbe和VR4447/VR4126/VR645 BYbe/白蛋白对B细胞上CD86表达的抑制。
- [0158] 图43显示VR4447/VR4130 BYbe和VR4447/VR4130/VR645 BYbe/白蛋白对B细胞上CD27表达的抑制。
- [0159] 图44显示VR4447/VR4130 BYbe和VR4447/VR4130/VR645 BYbe/白蛋白对B细胞上CD71表达的抑制。
- [0160] 图45显示VR4447/VR4130 BYbe和VR4447/VR4130/VR645 BYbe/白蛋白对B细胞上CD86表达的抑制。
- [0161] 详述

[0162] 如本文所用的“双特异性蛋白质复合物”是指包含两种蛋白质(A和B在本文中被称为双特异性组分,在本文中也被分别称为双特异性的第一蛋白质组分和第二蛋白质组分)的分子,其通过异二聚体系链保持在一起。在一个实施方案中,所述蛋白质之一或两者具有结合结构域,例如蛋白质之一或两者是抗体或其片段(特别是Fab或Fab'片段,此类复合物也称为Fab-Kd-Fab)。

[0163] 如本文所用,“融合蛋白”包含与结合伴侣X或Y(视情况而定)融合的蛋白质组分A或B。在一个实施方案中,融合蛋白是通过重组技术从遗传构建体表达(例如在宿主中从DNA构建体表达的)的翻译蛋白质。在本公开的上下文中,融合蛋白的关键特征之一是其可被表达为来自细胞的“单一蛋白质/单元”(当然在包含Fab/Fab'片段的融合蛋白的情况下将是两条链,但是为了本说明书的目的,这将被认为是具有一条链的单一蛋白,通常重链在其C末端适当地任选地经由如下文所述的接头与X或Y融合)。

[0164] 异二聚体系链X:Y的功能是保持蛋白A和B彼此接近,以使得可以例如使用本文所述的方法实现或鉴定A和B的协同功能。

[0165] 如本文所用,“异二聚体系链”是指包含形成彼此之间的相互作用(诸如结合)的两个不同的结合伴侣X和Y的系链,其具有足以将两个结合伴侣保持在一起的总亲和力。在一个实施方案中,X和/或Y不适合形成同二聚体。

[0166] 异二聚体系链束缚的和异二聚体系链在本文中可互换使用。

[0167] 在一个实施方案中,如本文所用,“不适于形成同二聚体”是指X-Y的异二聚体的形成是更优选的,一旦形成例如比同二聚体更稳定,诸如热力学稳定的。在一个实施方案中,X和Y之间的结合相互作用是单价的。

[0168] 在一个实施方案中,X-Y相互作用比X-X或Y-Y相互作用更有利。当融合蛋白A-X和B-Y混合时,这减少了同二聚体X-X或Y-Y的形成。通常在1:1摩尔比混合后形成大于75%的异二聚体。

[0169] 如果需要,可以使用纯化步骤(特别是一步纯化)(诸如柱层析)例如以纯化根据本公开的融合蛋白单元和/或双特异性蛋白质复合物。

[0170] 尽管通常聚集水平低,在一个实施方案中,在所述或每种融合蛋白表达后提供纯化步骤。因此,在一个实施方案中,在体外混合之前,以基本上纯的形式提供融合蛋白。如本文所用,基本上纯的形式是指其中融合蛋白是90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的单体。

[0171] 在一个实施方案中,不进行融合蛋白的纯化。

[0172] 在一个实施方案中,每个融合蛋白单元在不同的表达实验/运行中表达。

[0173] 在一个实施方案中,在混合之前不进行融合蛋白的纯化以产生双特异性蛋白质复合物。在一个实施方案中,在混合之前和/或之后不进行融合蛋白的纯化。

[0174] 在一个实施方案中,在双特异性蛋白质复合物形成之后不需要纯化。

[0175] 在一个实施方案中,在混合后,且一般无需进一步纯化,至少50%的组合物是所需的双特异性蛋白质复合物,例如至少60%、65%、70%、75%、80%的组合物是所需的双特异性蛋白质复合物。

[0176] 在一个实施方案中,本发明方法的体外混合步骤中使用的融合蛋白的比例为0.8:1至3:1(诸如1.5:1或2:1)的A-X:B-Y。

[0177] 在一个实施方案中,本方法的体外混合步骤中使用的融合蛋白的比例为0.8:1至3:1(诸如1.5:1或2:1)(特别是摩尔比)的B-Y:A-X。

[0178] 在一个实施方案中,在体外混合步骤中使用的A-X与B-Y的比例为1:1,特别是1:1的摩尔比。

[0179] 本公开还延伸至制备根据本公开的双特异性复合物的方法,包括例如以1:1的摩尔比混合融合蛋白A-X和B-Y。

[0180] 在一个实施方案中,混合在体外发生。

[0181] 在一个实施方案中,混合在细胞(例如宿主细胞)中发生。

[0182] 在一个实施方案中,混合发生在体内,即融合蛋白A-X和B-Y在受试者体内彼此相互作用以形成异二聚体系链,并因此形成双特异性蛋白质复合物。

[0183] 在一个实施方案中,X与Y彼此完全特异,并且不与细胞中或受试者体内的任何其它肽/蛋白质结合。这可以例如通过确保X和Y不天然存在于靶细胞或靶受试者的身体中来实现。这可以例如通过选择来自不同于受试者的物种或实体(例如酵母蛋白)并确保另一个它变量对其具有特异性的X或Y来实现。有利地,这防止融合蛋白A-X和/或B-Y与不期望的靶标结合,从而产生不希望的脱靶效应。

[0184] 在一个实施方案中,结合伴侣之一(或至少一个)不能形成同二聚体,例如,将结合伴侣的氨基酸序列突变以消除或最小化同二聚体的形成。

[0185] 在一个实施方案中,两个结合伴侣均不能形成同二聚体,例如将肽结合伴侣的氨基酸序列突变以消除或最小化同二聚体的形成,并且采用对其具有特异性的VIII。

[0186] 如本文所用的不能形成同二聚体或聚集体是指形成同二聚体或聚集体的倾向低或为0。如本文所用的低是指例如在混合或表达或纯化后5%或更少,诸如4%、3%、2%、1%、0.5%或更少的聚集体。

[0187] 异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的融合蛋白中的少量聚集体或残留通常对本公开的筛选方法具有最小的影响。因此,在一个实施方案中,在该方法中不使用融合蛋白和/或双特异性蛋白质复合物的纯化,特别是在混合步骤之后。

[0188] 在一个实施方案中:是基于吸引力(例如范德华力,诸如氢键和静电相互作用,特别是基于对抗原(诸如肽)的抗体特异性)的结合相互作用。

[0189] 在一个实施方案中:是从特定化学(诸如点击化学)相互作用形成的共价键。在一个实施方案中:不是共价键。在一个实施方案中,不使用缀合/偶联化学来制备本公开的双特异性蛋白质复合物。

[0190] 如本文所用,“形成复合物”是指当融合蛋白组分A-X和B-Y在复合物被组装并且融合蛋白被保留在一起的适当条件下接触时,充分特异且强烈的相互作用,包括结合相互作用或化学反应。

[0191] 如本文所使用,“保留在一起”是指将组分(融合蛋白)保持在彼此附近,以使得在X:Y结合后,复合物可以被处理,就如同其是一个分子一样,并且在许多情况下如单个分子一样表现和作用。在一个实施方案中,保留使得复合物适合用于本文公开的方法,即适合于至少一个功能筛选。

[0192] 如本文使用的特异性是指,其中例如,相互作用中的伴侣例如X:Y或A和抗原,或B和抗原仅相互识别,或相对于非伴侣,彼此具有比例如对无关非伴侣蛋白的结合的本底水

平显著更高的亲和力,例如高至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍的亲和力。

[0193] 如本文所用,关于X和Y的特异性是指其中相互作用中的结合伴侣X和Y仅相互识别,或相对于非伴侣,彼此具有显著更高的亲和力,例如高至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍的亲和力。

[0194] 在一个实施方案中,结合相互作用是可逆的。在一个实施方案中,结合相互作用是基本上不可逆的。

[0195] 如本文使用的基本上不可逆是指抗体或结合片段的缓慢解离速率(解离常数)。

[0196] 在一个实施方案中,X与Y之间的结合相互作用具有低解离常数。

[0197] 低解离常数的实例包括 $1-9 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 或更少,例如 $1-9 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 、 $1-9 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、 $1-9 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $1-9 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 或 $1-9 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 。特别合适的解离常数包括 $2 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更少,例如 $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 。

[0198] 尽管不希望受理论束缚,但认为低解离常数(也称为解离速率)允许分子足够稳定以使双特异性蛋白质复合物有用,特别是在功能筛选测定中。

[0199] 在一个实施方案中,X与Y彼此的亲和力为5nM或更强,诸如4nM、3nM、2nM、1nM或更强。

[0200] 在一个实施方案中,X与Y彼此的亲和力为900pM或更强,诸如800pM、700pM、600pM、500pM、400pM、300pM、200pM、100pM或50pM或更强。

[0201] 在另一个实施方案中,X与Y彼此的亲和力为10pM或更强,诸如9pM、8pM、7pM、6pM或5pM。

[0202] 亲和力是从实体的结合和解离速率计算的。如本文所使用,术语“亲和力”是指分子(例如抗体)的单个结合部位与其结合伴侣(例如肽)之间的非共价相互作用的总和的强度。分子对其结合伴侣的亲和力一般可以通过解离常数(KD)来表示。亲和力可以通过本领域已知的常用方法(包括本文所述的那些,诸如表面等离子体共振方法,特别是BIAcore)来测量。

[0203] 然而,将复合物保持在一起的能力不仅仅关乎亲和力。虽然不希望受理论束缚,我们假设事实上有三个重要的组成部分:结合率、解离率和亲和力。亲和力的计算基于结合率和解离速率。因此,如果结合速率低且解离速率快,则亲和力将是低的,并且会不足以将双特异性蛋白质复合物保持在一起。然而,缓慢的结合速率可以通过慢解离速率来补偿,以提供总体合适的亲和力的。在一些实施方案中,高结合速率可能足以将复合物保持在一起。

[0204] 如果复合物中使用的结合伴侣(X和Y)具有低的结合速率,则在混合组分后可能需要额外的时间以允许复合物形成。

[0205] 如果结合伴侣之间的亲和力足够高,则双特异性蛋白质复合物可能有可能执行其所期望的生物功能,即使双特异性蛋白质复合物的蛋白(A和B)的亲和力仅弱结合其靶标。相反,如果蛋白质(A和B)能够与其靶标强烈结合,则即使结合伴侣(X和Y)彼此的亲和力较低,也可能实现相同的生物功能。换句话说,存在“三位一体”关系,使得结合伴侣之间的更高亲和力可以补偿对靶标的较低亲和力,反之亦然。

[0206] 在一个实施方案中,蛋白质A对其配体或抗原的亲和力为约100nM或更强,例如约50nM、20nM、10nM、1nM、500pM、250pM、200pM、100pM或更强,特别是50pM或更强的结合亲和力。

[0207] 在一个实施方案中,蛋白质B对其配体或抗原的亲合力为约100nM或更强,例如约50nM、20nM、10nM、1nM、500pM、250pM、200pM、100pM或更强,特别是50pM或更强的结合亲合力。

[0208] 在一个实施方案中,重链中的恒定结构域(诸如CH1)和轻链中的恒定结构域(诸如C<sub>κ</sub>)之间的相互作用有助于根据本公开的双特异性复合物的形成和/或稳定性。因此,在本公开的双特异性复合物中使用Fab或Fab'片段是有益的。

[0209] 在一个实施方案中,本公开的双特异性复合物不包含具有效应子功能的组分,例如所述复合物不包含除CH1和C<sub>κ</sub>或C<sub>λ</sub>外的恒定结构域,特别是不包含独立地选自包括CH2、CH3、CH4及其组合的恒定结构域。在一个实施方案中,本公开的双特异性复合物缺少Fc区。

[0210] 在一个实施方案中,本文的方法用于通过从文库制备本公开的融合蛋白来筛选初始噬菌体文库。

[0211] 本发明的双特异性蛋白质复合物可用于任何合适的应用,包括功能筛选。该新型形式在多重功能筛选中特别有用,以基于功能鉴定蛋白质靶标,以及可被双特异性疗法靶向的那些靶蛋白上的最佳表位。此外,当蛋白质A和B是抗体或其结合片段时,双特异性蛋白质复合物也可用于多重功能筛选以鉴定用于双特异性抗体治疗剂的最佳可变区对。

[0212] 如本文所使用的“多元体”是用于测试的实体群体,其包括:

[0213] 被组合以产生至少一种异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物的至少两种组分融合蛋白(A-X和Y-B),和至少一种呈相同或不同形式的相关生物学比较剂,或

[0214] 至少两种异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物与任选的至少一种呈相同或不同形式的相关生物学比较剂。

[0215] 显然有用的是,用作比较剂的不同形式必须适合于在本公开中使用的功能性体外测定中进行测试。在一个实例中,多元体中的比较剂是A-X和B-X的单价混合物或A-X-Y-A的二价单特异性复合物。

[0216] 在一个实施方案中,多元体包含1至数十万个异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物,例如2至500,000个所述复合体,诸如2至100,000个或2至10,000个所述复合体(特别是通过在网格中混合第一和第二融合蛋白(A-X和B-Y)中的2至100个产生的)。在一个实施方案中,所述多元体包含例如2至1,000个,诸如2至900个、2至800个、2至700个、2至600个、2至500个、2至400个、2至300个、2至200个、2至100个、2至90个、3至80个、4至70个、5至60个、6至50个、7至40个、8至30个、9至25个、10至20个或15个双特异性蛋白质复合物。关于此类网格的实例,参见图3。

[0217] 在一个实施方案中,该多元体中的异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质的数目为 $n^2$ ,其中 $n$ 为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多。

[0218] 多元体可以呈阵列形式,例如微量滴定板,其中微孔板的每个孔可含有不同的双特异性蛋白质复合物。双特异性蛋白质复合物可被系连至固体基质表面,例如附接至珠,或可将其悬浮在液体(例如溶液或介质)形式中,例如在孔内或在液滴内。

[0219] 在一个实施方案中,多元体中的每个“A”是不同的蛋白质,优选为结合靶抗原的抗体或其结合片段,并且每个“B”是不同的蛋白质,优选为结合靶抗原的抗体或其结合片段。

[0220] 在一个实施例中,以如下所讨论的网格中提供多元体:例如 $8 \times 8$ 、 $16 \times 16$ 或 $16 \times 20$ ,其分别等于64个、256个或320个样品。

[0221] 本文使用的“网格”是指二维图或阵列,其中一个变量,诸如蛋白质A(在A-X中)沿着一个轴(诸如X轴(水平轴))变化并且另一个变量诸如蛋白质B(在B-Y中)沿着另一轴线(诸如Y轴(垂直轴))变化。该排列有助于系统地评估变量的各种组合(排列)。

[0222] 在一个实施方案中,在96孔板上提供多元体,并且分析的样品可以是其倍数,即96个、192个、384个等。

[0223] 有利地,网格排列对于高效地筛选根据本公开的双特异性蛋白质复合物的生物功能是特别有利的。图3显示了这样的网格的实例,其中4种第一融合蛋白可以容易地与4种第二融合蛋白组合以产生16种双特异性蛋白质复合物。

[0224] 筛选网格的其它变型对于技术人员将是显而易见的,例如可将第一融合蛋白(A-X)中的第一蛋白质(A)保持恒定,而使第二融合蛋白(B-X)中的第二蛋白质(B)变化。这可用于快速筛选大量不同的第二蛋白质的与预先选择的第一蛋白质的协同功能。

[0225] 在另一个实施方案中,通过改变蛋白质A的抗体可变区(以使得每个抗体变体对相同抗原具有特异性,但是具有不同的可变区组合)来使蛋白质A沿着一个轴变化。蛋白质B可以保持恒定,或者也可以以相同方式变化或可这样变化,以使得对于B蛋白质的抗原特异性改变(跨网格或沿着网格向下)。

[0226] 有利地,当双特异性蛋白质复合物对相同抗原是特异性的但是具有不同的可变区组合时,这样的筛选网格可潜在地允许检测协同功能的小差异。

[0227] 在一个实施方案中,根据本公开的“共同的”第一融合蛋白(A-X)可以存在于每个孔中。然后可根据本公开的一系列不同的第二融合蛋白(B-Y)分配到每个孔中。随后,两种结合伴侣(X和Y)的特异性结合相互作用在物理上将两种融合蛋白结合在一起,形成双特异性蛋白质复合物。这导致包含双特异性蛋白质复合物的多元体,所述复合物全部结合共同的第一靶抗原(由A结合),但也能够结合针对每一种双特异性蛋白质复合物可以是不同的第二靶抗原(由B结合)。

[0228] 在一个实施方案中,B-Y融合蛋白包含与相同靶抗原不同的可变区,以允许优化当与A-X中的可变区组合时由B结合的给定靶抗原的可变区和/或表位。

[0229] 本文所用的“共同的”第一融合蛋白是指这样的融合蛋白,其中其A或B组分结合相同的蛋白质或表位,特别是其中A或B组分在共同的融合蛋白中有完全同一性,即共同的第一融合蛋白总是包含相同的可变区序列。

[0230] 本领域技术人员还知道上述的不同变化,使得可以容易地控制多元体中每个位置处的双特异性蛋白质复合物的期望特异性。当在功能测定中使用此类多元体时,这允许高效地筛选双特异性蛋白质复合物的不同组合。在一个实施方案中,使用因子设计来定义网格中采用的变量。

[0231] 在一个实施方案中,本公开的方法有助于高通量分析。

[0232] 在一个实施方案中,并行或基本上同时测试多个双特异性蛋白质复合物。

[0233] 如本文所用,同时是指在相同的分析中,例如在相同的“运行”中分析样品/分子/复合物的情况。这可能是有利的,因为通常用于给定样品运行的试剂将是相同的批次、浓度、细胞来源等,因此具有相同的性质。此外,进行分析的环境条件(诸如温度和湿度)可能是相似的。

[0234] 在一个实施方案中,同时是指伴随分析,其中信号输出在基本上相同的时间由仪



器分析。该信号可能需要去卷积以解释所获得的结果。

[0235] 有利地,测试多个双特异性蛋白质复合物允许更高效地筛选大量的双特异性蛋白质复合物和鉴定新的和有趣的关系。

[0236] 在一个实施方案中,通过使用如上定义的多元体测试多个双特异性蛋白质复合物,并对其进行一种或多种功能测定。因此,本发明提供了用于检测式A-X:Y-B的异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同生物功能的方法

[0237] 其中X:Y是异二聚体系链

[0238] :是X与Y之间的结合相互作用,

[0239] A和B分别是与X和Y的融合蛋白形式中的双特异性的蛋白质组分,所述方法包括以下步骤:

[0240] (i) 在功能测定中测试包含至少一种异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物的多元体的部分或全部的活性;和

[0241] (i i) 分析来自功能测定的读出数据,以鉴定或检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同生物功能;以及

[0242] 其中Y是抗原,并且X是对Y具有特异性的抗体或其结合片段,或X是抗原,并且Y是对X具有特异性的抗体或其结合片段。

[0243] 如本文所用,术语“生物功能”是指被测试的生物实体的天然活性或目的,例如细胞、蛋白质或类似物的天然活性。理想情况下,可以使用体外功能测定(包括离体使用哺乳动物细胞,诸如活细胞,诸如B或T细胞或组织的测定)来测试生物功能的存在。如本文所用的天然功能还包括异常功能,诸如与疾病(诸如癌症)相关的功能。

[0244] 本文使用的相关“生物学比较剂”是指用于在与用于双特异性蛋白质复合物的测定相同的测定中评估活性以确定是否存在任何变化或新型活性或功能的合适实体。A-X:Y-B的合适比较剂可包括呈天然形式的纯化蛋白质(包括重组蛋白)或以与双特异性相同的形式存在,例如其中A和B是相同的实体,诸如A-X:Y-A或B-X:Y-B即二价单特异性复合物。或者,呈未复合的形式的融合蛋白A-X或B-Y可单独用作比较剂或作为未复合的混合物诸如A-X与B-X一起或A-Y与B-Y一起来使用。或者,可采用不同形式(特别是如本文所述的)的多个比较剂。本领域技术人员能够基于文献中发现的公知常识或信息来鉴定和包括合适的对照制/比较剂。

[0245] 如本文所用,术语“协同功能”或“协同生物功能”是指具有如下情况的生物活性或生物活性水平或对生物功能或活性的作用:

[0246] ●对于个体融合蛋白组分直至使用双特异性才观察到的(并且可包括对于针对所述抗原的抗体的组合观察到的活性,其不以双特异性形式存在,而是特别地指当两个结合结构域以双特异性形式连接时才观察到的活性)或

[0247] ●与当单独使用本公开的双特异性蛋白质复合物的第一和第二蛋白质时观察到的活性相比,更高或更低的活性,例如仅在双特异性形式中观察到的活性。

[0248] 因此,“协同”包括新型生物功能或新型活性。如本文使用的协同功能一般不包括简单的靶向,即仅基于结合,而是一一般在结合后涉及一定的抑制、活化、信号传导等。

[0249] 如本文使用的新型生物功能或新型活性是指在两个或更多个协同实体(蛋白质A和蛋白质B)被聚在一起(作为双特异性的或以其他方式)之前不明显或不存在的生物功能

或活性,或先前未鉴定的功能。

[0250] 如本文所用的更高是指活性的增加,包括例如双特异性中的一些活性从零的增加,其中个体未复合的双特异性组分在相关功能测定中不具有活性,本文也称为新活性或新型生物功能。与个体未复合的双特异性组分(单独测试或与其连接组合测试)相比,本文所用的更高的还包括在相关功能测定中双特异性中的大于累加的功能例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%或更高的相关活性的增加。

[0251] 在一个实施方案中,未复合的蛋白质一起具有与双特异性相同的活性,并且该活性或功能是以以前未知的。这在本说明书的上下文中也是新型协同功能。

[0252] 在一个实施方案中,协同功能是更高的功能。

[0253] 在一个实施方案中,协同作用是更低的功能。

[0254] 如本文所用的更低功能是指其中相关功能测定中的双特异性相比于在相关功能测定中具有活性(作为个体蛋白质分析的或在相同条件下作为蛋白质的混合物分析的)的个体未复合的双特异性组分,具有较少活性或没有活性,在本文中也称为新活性,或新型生物功能(诸如天然蛋白质,即不存在于融合蛋白中也不存在于除在体内发生的外的任何其它复合物的一部分的重组分离蛋白质-包括所述蛋白质的活性结构域或片段),例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%或更大的相关活性的降低。活性降低大于100%是指在不同方向上的阳性活性的增加,例如,如果当实体是激动剂时,则活性降低超过100%可使实体为拮抗剂,反之亦然。

[0255] 在一个实施方案中,双特异性复合物的活性低于蛋白质A和蛋白质B的已知功能的总和。

[0256] 在一些实施方案中,本公开的双特异性蛋白质复合物具有简单累加的生物功能。本文所用的累加生物功能是指当在相同条件下测试时,与单独的组分A和B的每一个的总和相同的功能。如果活性或功能先前未知或未被鉴定,则累加功能可以是新型功能。

[0257] 使用本领域已知的任何合适的测定法进行筛选,这取决于期望的待鉴定的功能。

[0258] 在一个实施方案中,在本公开的方法中使用的功能测定是体外或离体测定。

[0259] 如本文所用的“功能测定”是可用于测定经受测试条件的双特异性蛋白质复合物、抗体复合物或抗体混合物的一个或多个所需性质或活性的测定。合适的功能测定可以是结合测定、细胞凋亡测定、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定、补体依赖性细胞毒性(CDC)测定、细胞生长或增殖抑制(细胞生长抑制作用)测定、细胞杀伤(细胞毒性效应)测定、细胞信号传导测定、细胞因子产生测定、抗体产生和同种型转换、细胞分化测定、集落形成测定、趋化性测定、细胞粘附测定、细胞迁移测定、细胞周期测定、代谢测定(全细胞和细胞器功能)、用于测量对病原体对靶细胞的结合的抑制的测定、测量血管内皮生长因子(VEGF)或其它分泌的分子的分泌的测定、抑菌作用、杀菌活性、病毒中和的测定、测量免疫系统的组分至其中抗体所结合的部位吸引力的测定,包括原位杂交方法、标记方法等。

[0260] 在一个实施方案中,可以使用体内测定法,诸如动物模型,包括小鼠肿瘤模型、自身免疫疾病模型、病毒感染或细菌感染的啮齿动物或灵长类动物模型等。

[0261] 本领域技术人员完全能够基于所研究的靶标/蛋白质选择合适的功能测定。然而,可将复合物进行一小组“标准”测定,而不预先选择被认为与尝试鉴定新功能相关的测定。

[0262] 在双特异性抗体复合物的上下文中,可通过本领域普通技术人员一般已知的方法

将根据本公开的双特异性抗体复合物的功效在此类模型中与个体抗体或抗体(或片段)的混合物进行比较。

[0263] 例如,可以测试双特异性抗体复合物抑制细胞增殖、影响细胞活力或细胞代谢活性(例如使用染色诸如阿拉玛蓝或通过监测由细胞表达的萤光素酶引起的发光)或引起癌细胞的细胞凋亡的能力,这些是包括除与抗原结合之外的性质的生物功能。

[0264] 通过选择与特定目标疾病密切相关的功能测定,本公开的方法使得有可能鉴定结合已知或未知的靶分子的潜在治疗性抗体。因此,有可能使用本公开的方法鉴定新的靶分子和/或直接鉴定潜在的治疗性抗体。有利地,本发明的方法不限于任何特定的测定,并且为用户提供了根据需要进行选择最合适的功能测定的完全灵活性。

[0265] 当针对所需的生物功能筛选双特异性抗体复合物时,可使用各种策略。例如,可以针对生物活性直接筛选含有抗体的介质。或者,可在针对生物活性筛选之前将抗体结合至包被的珠或微量滴定板。或者,可在镍捕获纯化步骤中经由His标签纯化融合蛋白。此类策略可增加抗体的局部浓度,从而导致来自功能测定的更清楚的结果。

[0266] 功能测定可以根据需要重复多次,利用或不利用特定双特异性抗体复合物的不同样品,以增强结果的可靠性。可以采用本领域技术人员已知的各种统计学检验来鉴定统计上显著的结果,从而鉴定具有生物功能的双特异性抗体复合物。

[0267] 当建立用于筛选的功能测定时,本领域技术人员可以设定合适的阈值,超过该阈值所鉴定的活性则被认为是“命中”。在使用不止一种功能测定的情况下,可将每种测定的阈值设定在合适的水平以建立可控的命中率。在一个实例中,命中率可以是3-5%。在一个实例中,当搜索抑制B细胞功能的抗原对时设定的标准可以是在B细胞活化测定中至少两个磷酸读出数据(phospho-readouts)的至少30%的抑制。

[0268] 在本发明的双特异性蛋白质复合物中,可使用以下蛋白质和肽组分。

[0269] 在一个实施方案中,结合对的第一结合伴侣X和第二结合伴侣Y中的至少一个独立地选自肽和蛋白质;例如第一结合伴侣或第二结合伴侣是肽。

[0270] 合适的肽包括包含GCN4、Fos/Jun(人和鼠Fos分别具有Uniprot编号P01100和P01101,人和鼠Jun分别具有Uniprot编号05412和05627)、对应于人流感血凝素的氨基酸98-106的HA-标签、多组氨酸(His)、c-myc和FLAG的组。其它肽也被设想为适用于本公开,并且特别合适的肽是用于蛋白质纯化的亲和标签,因为此类肽具有以高亲和力结合其各自的结合伴侣的趋势。

[0271] 在一个实施方案中,所述肽不是E5B9。

[0272] 如本文所用,术语“肽”是指通过肽键连接的氨基酸的短聚合物,其中所述肽含有2至100个氨基酸,例如5至99个,诸如6至98个、7至97个、8至96个或5至25个。在一个实施方案中,本公开中使用的肽是50个氨基酸残基或更少,例如40个、30个、20个、10个或更少的氨基酸残基的氨基酸序列。本公开中使用的肽具有足够长度以适合目的,例如如果肽是接头,则其需要适当长以允许其连接的片段发挥其生物功能;或者如果肽是结合伴侣,则其必须能够特异性结合另一个实体,诸如抗体。

[0273] 在一个实施方案中,结合对的另一个结合伴侣(可选择的第一或第二结合伴侣)是蛋白质。

[0274] 本文所用的蛋白质是指100个氨基酸或更多个氨基酸的氨基酸序列。在一个实施

方案中,如本文所用的“蛋白质”是指具有二级或三级结构的氨基酸序列。

[0275] 多肽和蛋白质在本文中可互换使用。然而,多肽将一般是具有简单结构例如很少的二级和/或三级结构的蛋白质。

[0276] 在一个实施方案中,肽与蛋白质之间的区别基于二级结构和/或三级结构的存在或不存在,其中肽没有二级结构,并且具有二级结构和/或三级结构的多个氨基酸被认为是蛋白质。

[0277] 在一个实施方案中,蛋白质是抗体或抗体片段。

[0278] 如本文所用,术语“抗体”是指能够经由至少一个位于免疫球蛋白分子可变区中的抗原识别位点(也称为在本文中也称为结合位点),特异性结合靶抗原诸如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽、肽等的免疫球蛋白分子。

[0279] 如本文所用的“抗体分子”包括抗体及其结合片段。

[0280] 如本文所用的“抗体片段”是指抗体结合片段,包括但不限于Fab、经修饰的Fab、Fab'、经修饰的Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、单结构域抗体、scFv、二价、三价或四价抗体、Bis-scFv、双抗体、三抗体、四抗体和上述任何抗体的表位结合片段(参见,例如,Holliger和Hudson,2005,Nature Biotech.23(9):1126-1136;Adair和Lawson,2005,Drug Design Reviews-Online 2(3),209-217)。用于产生和制备这些抗体片段的方法是本领域熟知的(参见例如Verma等,1998,Journal of Immunological Methods,216:165-181)。用于本公开的其它抗体片段包括描述于国际专利申请W005/003169、W005/003170和W005/003171中的Fab和Fab'片段。多价抗体可以包含多种特异性例如双特异性或可以是单特异性的(参见例如W092/22853、W005/113605、W02009/040562和W02010/035012)。

[0281] 如本文所用的“结合片段”是指能够以足够的亲和力结合靶肽或抗原的片段,以将所述片段表征为对于肽或抗原具有特异性的片段。

[0282] 如本文所用,术语“Fab片段”是指包含轻链片段(包含轻链(CL)的VL(可变轻链)结构域和恒定结构域)以及重链的VH(可变重链)结构域和第一恒定结构域(CH1)的抗体片段。在一个实例中,Fab片段的重链序列在CH1的链间半胱氨酸处“终止”。在一个实施方案中,本公开的融合蛋白(诸如A-X和/或B-Y)中使用的Fab片段是单价的。

[0283] 如本文所用的Fab'片段是指还包含全部或部分铰链区的Fab片段。在一个实施方案中,本公开的融合蛋白(诸如A-X和/或B-Y)中使用的Fab'片段是单价的。

[0284] 如本文所用,术语“单链Fv”或缩写为“scFv”是指包含经连接(例如通过肽接头)以形成单个多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。在该形式中省略重链和轻链的恒定区。本文使用的单链Fv包括其二硫键稳定的形式,其中除了肽接头以外,在可变区之间还存在二硫键。

[0285] 二硫键稳定的scFv可以消除一些可变区动态呼吸的倾向,这涉及可变区分开并再次聚集在一起。

[0286] 如本文所用,术语“单结构域抗体”是指由单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段。单结构域抗体的实例包括VH或VL或VHH。

[0287] 在一个实施方案中,抗体结合片段和/或双特异性抗体复合物不包含Fc区。如本文所用的“不包含Fc区”是指不存在较低的恒定结构域,诸如CH2、CH3和CH4。然而,可以存在恒定结构域,诸如CH1、Cκ/Cλ。

[0288] 在一个实施方案中,抗体重链包含CH1结构域,并且抗体轻链包含CL结构域( $\kappa$ 或 $\lambda$ )。

[0289] 在一个实施方案中,抗体重链包含CH1结构域、CH2结构域和CH<sub>3</sub>结构域,并且抗体轻链包含CL结构域( $\kappa$ 或 $\lambda$ )。

[0290] 在一个实施方案中,双特异性蛋白质复合物的第一蛋白质A和/或第二蛋白质B是抗体或抗体片段。此类双特异性蛋白质复合物可被称为双特异性抗体复合物。

[0291] 如本文使用的“双特异性抗体复合物”是指包含至少两个抗体结合部位的双特异性蛋白质复合物,其中组分抗体、片段或两者通过异二聚体系链复合在一起。

[0292] 双特异性抗体复合物通常是指包含至少两个抗原结合部位的分子,其中所述结合部位具有不相同的特异性。

[0293] 在一个实施方案中,两种蛋白质(例如抗体、片段或抗体与片段的组合)靶向相同抗原,例如结合相同靶抗原上的两个不同表位,在本文也称为双互补位双特异性。

[0294] 在另一个实施方案中,两种蛋白质(例如抗体、片段或抗体与片段的组合)可具有不同的抗原特异性,例如结合两种不同的靶抗原。

[0295] 在另一个实施方案中,两种蛋白质是相同的,即结合相同靶抗原上的相同表位,因此所述复合物是单特异性的。

[0296] 在一个实施方案中,本公开的双特异性抗体复合物中使用的每个抗体或片段包含一个结合部位,即每个结合部位对于每个靶抗原是单价的。

[0297] 用于融合蛋白(A-X或B-Y)的全长抗体或抗体片段可以是单特异性的,单价的,多价的或双特异性的。

[0298] 有利地,两个双特异性抗体或抗体片段的使用允许本公开的双特异性抗体复合物潜在地对至多4种不同抗原具有特异性(即复合物可以是四特异性的)。这允许研究亲合力类型效应。

[0299] 在一个实施方案中,第一融合蛋白(A-X)中使用的抗体或抗体片段是单特异性抗体或抗体片段,特别是单价Fab、Fab'、scFv、Fv、VHH或类似物。

[0300] 在一个实施方案中,第二融合蛋白(B-Y)中使用的抗体或抗体片段是单特异性抗体或抗体片段,特别是单价Fab、Fab'、scFv或类似物。

[0301] 如本文所用的“单特异性”是指仅结合一种靶抗原的能力。

[0302] 如本文所用的“单价”是指具有单个结合部位并因此仅结合靶抗原仅一次的抗体或抗体片段。

[0303] 在一个实施方案中,第一融合蛋白(A-X)中使用的抗体或抗体片段是多价的,即具有两个或更多个结合结构域。

[0304] 在一个实施方案中,在第二融合蛋白(B-Y)中使用的抗体或抗体片段是多价的,即具有两个或更多个结合结构域。

[0305] 在一个实施方案中,第一融合蛋白(A-X)中使用的抗体或抗体片段是单价的,并且在第二融合蛋白(B-X)中使用的抗体或抗体片段是单价的。

[0306] 在一个实施方案中,第一融合蛋白(A-X)中使用的抗体或抗体片段是单价的,并且第二融合蛋白(B-Y)中使用的抗体或抗体片段是多价的。

[0307] 在一个实施方案中,在第一融合蛋白(A-X)中使用的抗体或抗体片段是多价的,并

且在第二融合蛋白(B-Y)中使用的抗体或抗体片段是单价的。

[0308] 在一个实施方案中,第一融合蛋白(A-X)中使用的抗体或抗体片段是多价的,并且第二融合蛋白(B-Y)中使用的抗体或抗体片段是多价的。

[0309] 在一个实施方案中,A-X或B-Y不是包含两个scFv(一个对抗原CD33具有特异性并且一个对抗原CD3具有特异性)的融合蛋白,或不是可选择地对这两种抗原具有特异性的双特异性复合物形式。

[0310] 在一个实施方案中,A-X或B-Y不是包含对与肽E5B9连接的CD3具有特异性的scFv(或备选地另一种抗体形式)的融合蛋白。

[0311] 如本文所用的“结合结构域或部位”是抗体的与抗原/表位接触并参与与其的结合相互作用的部分。在一个实施方案中,结合结构域含有至少一个可变结构域或其衍生物,例如一对可变结构域或其衍生物,诸如可变结构域或其衍生物的同源对。

[0312] 在一个实施方案中,结合结构域包含3个CDR,特别地其中结合结构域是结构域抗体,诸如VH、VL或VHH。在一个实施方案中,结合结构域包含两个可变结构域以及6个CDR和框架,并且这些元件一起促成抗体或结合片段与抗原/表位的结合相互作用的特异性。

[0313] 如本文使用的“同源对”是指作为预先形成的偶对从宿主分离的重链和轻链对。该定义不包括从文库中分离的可变结构域,其中不保留来自宿主的原始配对。同源对可能是有利的,因为它们通常在宿主中亲和力成熟,因此可能对它们对其具有特异性的抗原具有高亲和力。

[0314] 如本文所用的“天然存在结构域的衍生物”意指天然存在的序列中的1、2、3、4或5个氨基酸已经被替换或缺失,例如以诸如通过消除不期望的性质优化结构域的性质,但其中保留了结构域的特征。修饰的实例是去除糖基化位点、GPI锚或溶剂暴露的赖氨酸的那些修饰。这些修饰可通过用保守氨基酸取代替换相关的氨基酸残基来实现。

[0315] 在一个实施方案中,加工本公开的双特异性抗体复合物或其抗体/片段组分以提供改善的对靶抗原的亲和力。此类变体可通过许多亲和力成熟操作方案获得,包括突变CDR(Yang等,J.Mol.Biol.,254,392-403,1995)、链改组(Marks等,Bio/Technology,10,779-783,1992),大肠杆菌(E.coli)的增变株的使用(Low等,J.Mol.Biol.,250,359-368,1996)、DNA改组(Patten等,Curr.Opin.Biotechnol.,8,724-733,1997)、噬菌体展示(Thompson等,J.Mol.Biol.,256,77-88,1996)和有性PCR(Cramer等,Nature,391,288-291,1998)。Vaughan等(同上)讨论了这些亲和力成熟的方法。

[0316] 在一个实施方案中,第一抗体或抗体片段(A)对第一抗原具有特异性,第二抗体或抗体片段(B)对第二抗原具有特异性,其中第一和第二抗原是不同的。有利地,双特异性抗体复合物可对两种不同的抗原具有特异性。这提供了抗体复合物结合两种不同抗原的可能性,每种抗原位于不同的实体上,从而使两个实体彼此紧密物理接近。

[0317] 或者,第一抗体或抗体片段(A)可对第一表位具有特异性,第二抗体或抗体片段(B)可对第二表位具有特异性,其中第一和第二表位都在相同抗原上。由于抗原和双特异性抗体复合物之间的多个相互作用,这可以极大地增强双特异性抗体复合物对抗原的亲合力。

[0318] 在一个实施方案中,本公开的双特异性抗体复合物的第一抗体(A)或第二抗体(B)或第一和第二抗体两者都可以是IgG,任选地具有无活性或有活性的Fc区。

[0319] 在一个实施方案中,第一(A)或第二(B)抗体片段选自:片段抗原结合(Fab)、Fab'、单链可变片段(scFv)和单结构域抗体(sdAb)(诸如VHH)。

[0320] 在一个实施方案中,本公开的双特异性抗体复合物的第一抗体/片段(A)、第二抗体/片段(B)或第一和第二抗体/片段两者都可以是Fab。

[0321] 在一个实施方案中,本公开的双特异性抗体复合物的第一抗体/片段(A)、第二抗体/片段(B)或第一和第二抗体/片段两者都可以是Fab'。

[0322] 在一个实施方案中,本公开的双特异性抗体复合物的第一抗体/片段(A)、第二抗体/片段(B)或第一和第二抗体/片段两者都可以是scFv。

[0323] 在一个实施方案中,本公开的双特异性抗体复合物的第一(A)或第二(B)抗体/片段或第一和第二抗体/片段两者是VHH。

[0324] 为了方便起见,本公开的双特异性蛋白质复合物在本文中称为A-X:Y-B。然而,该命名法并不旨在限制如何设计融合蛋白A-X和B-Y,因为我们的实验表明,结合伴侣X和Y可以颠倒(即A-Y和B-X)而不会不利地影响该方法。因此,A和B以及X和Y是被提及用于辅助本技术的解释的标称标签。

[0325] 如本文所用的“附接”是指经由接头(诸如肽接头,其实例在下文讨论)直接或间接连接。直接连接包括融合在一起(例如肽键)或化学缀合。

[0326] 如本文所用的“结合伴侣”是指结合对的一个组成部分。

[0327] 在一个实施方案中,结合伴侣的亲合力是高的,5nM或更强,例如900pM、800pM、700pM、600pM、500pM、400pM、300pM或更强。

[0328] 如本文所用的“结合对”是指彼此特异性结合的两个结合伴侣。结合对的实例包括肽和对其具有特异性的抗体或结合片段,或酶和配体,或酶和该酶的抑制剂。

[0329] 在一个实施方案中,第一结合伴侣(X)选自:全长抗体、Fab、Fab'、Fv、dsFv、scFv和sdAb,其中sdAb的实例包括VH或VL或V<sub>H</sub>H。

[0330] 当X是抗体或其结合片段时,则Y是蛋白质或肽,特别是肽。

[0331] 在一个实施方案中,第二个伴侣(Y)选自:全长抗体、Fab、Fab'、Fv、dsFv、scFv和sdAb,其中sdAb的实例包括VH或VL或V<sub>H</sub>H。

[0332] 当Y是抗体或其结合片段时,则X是蛋白质或肽,特别是肽。

[0333] 在一个实施方案中,其中A是抗体或其片段,第一结合伴侣(X)附接至第一抗体或抗体片段的重链或轻链的C末端,例如第一结合伴侣(X)附接至第一抗体或抗体片段(A)的重链的C末端。

[0334] 在另一个实施方案中,其中B是抗体或其片段,第二结合伴侣(Y)附接至第二抗体或抗体片段的重链或轻链的C末端,例如第二结合伴侣(Y)附接至第二抗体或抗体片段(B)的重链的C末端。

[0335] 在一个实施方案中,X附接至抗体或片段(蛋白质A)的重链的C末端,Y附接至抗体或片段(蛋白质B)的重链的C末端。

[0336] 在一个实施方案中,X经由接头(诸如ASGGGG SEQ ID NO:71或ASGGGGSG SEQ ID NO:72)或本领域已知的或本文以下描述的任何其它合适的接头附接至抗体或片段(蛋白质A)的重链的C末端,并且Y经由接头(诸如ASGGGG SEQ ID NO:71或ASGGGGSG SEQ ID NO:72)附接至抗体或片段(蛋白质B)的重链的C-末端。

[0337] 合适的结合对(X或Y)的实例可以包括GCN4(SEQ ID NO:1或缺少HIS标签的SEQ ID NO:1的氨基酸1-38)或其变体和52SR4(SEQ ID NO:3或缺少HIS标签的SEQ ID NO:3的氨基酸1至243)或其变体,其是对GCN4具有特异性的scFv。

[0338] 在一个实施方案中,第一结合伴侣(标称X)是GCN4(例如如SEQ ID NO:1所示)或其片段或变体(例如无His标签)和第二结合伴侣(标称Y)是对GCN4具有特异性的scFv或VHH(例如如SEQ ID NO:3所示)或其变体。

[0339] 在一个实施方案中,第一结合伴侣(标称X)是对GCN4具有特异性的sFv或VHH(例如如SEQ ID NO:3所示)或其变体,并且第二结合伴侣(标称Y)是GCN4(例如如SEQ ID NO:1所示)或其片段或变体。

[0340] GCN4变体包括与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%、或99%同一性的氨基酸序列。GCN4变体还包括具有由核苷酸序列SEQ ID NO:2编码的序列或由在严格条件下与SEQ ID NO:2杂交的核苷酸序列编码的序列的至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸。

[0341] 对GCN4具有特异性的合适的scFv是52SR4(SEQ ID NO:3)或其变体。52SR4的变体包括与SEQ ID NO:3具有至少80%、或85%、或90%、或95%、或98%或99%同一性的氨基酸序列。52SR4变体还包括具有由核苷酸序列SEQ ID NO:4编码的序列或由在严格条件下与SEQ ID NO:4杂交的核苷酸序列编码的序列的至少80%、或85%、或90%、或95%、或98%、或99%的氨基酸序列。

[0342] 本发明人已经发现单链抗体52SR4和肽GCN4是适用于本公开的双特异性蛋白质复合物的结合对。

[0343] 或者,可使用任何合适的抗体/片段和抗原(诸如肽)作为X和Y。当A-X和Y-B以1:1的摩尔比组合时,优选这样的X和Y对得到大于75%的异二聚体。

[0344] 在一个实施方案中,第一结合伴侣(X)和第二结合伴侣(Y)是蛋白质。

[0345] 在一个实施方案中,第一结合伴侣(X)是酶或其活性片段,并且第二结合伴侣(Y)是配体,或反之亦然。

[0346] 在一个实施方案中,第一结合伴侣(X)是酶或其活性片段,并且第二结合伴侣(Y)是该酶的抑制剂,或反之亦然。

[0347] 如本文使用的“活性片段”是指氨基酸片段,其小于实体的整个氨基酸序列,并保持基本上相同的生物活性或相关的生物活性,例如大于50%的活性,诸如60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的活性。

[0348] 在另一个实施方案中,第一结合伴侣X是谷胱甘肽(GSH),并且第二结合伴侣Y是谷胱甘肽-S-转移酶(GST),或反之亦然。

[0349] 在另一个实施方案中,X是Fos,并且Y是Jun,或反之亦然。

[0350] 在另一个实施方案中,X是His,并且Y是抗His,或反之亦然。

[0351] 在另一个实施方案中,结合对是钙调蛋白(calmodulin)结合肽,并且Y是钙调蛋白,或反之亦然。

[0352] 在另一个实施方案中,X是麦芽糖结合蛋白,并且Y是抗麦芽糖结合蛋白或其片段,或反之亦然。

[0353] 还设想了其它酶-配体组合用于结合伴侣。还合适的是本领域已知的用于蛋白质



纯化的亲和标签,因为这些标签具有以高亲和力结合其各自的结合伴侣的趋势。

[0354] 如本文所用的“同一性”表示在比对序列中的任何特定位置,氨基酸残基在序列之间是相同的。如本文所用的“相似性”表示在比对序列中的任何特定位置,氨基酸残基在序列之间具有相似类型。例如,亮氨酸可以取代异亮氨酸或缬氨酸。通常可以彼此取代的其他氨基酸包括但不限于:

[0355] -苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸(具有芳香族侧链的氨基酸);

[0356] -赖氨酸、精氨酸和组氨酸(具有碱性侧链的氨基酸);

[0357] -天冬氨酸和谷氨酸(具有酸性侧链的氨基酸);

[0358] -天冬酰胺和谷氨酰胺(具有酰胺侧链的氨基酸);以及

[0359] -半胱氨酸和甲硫氨酸(具有含硫侧链的氨基酸)。

[0360] 可以容易地计算同一性和相似性的程度(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., 编辑, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., 编辑, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G., 编辑, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J., 编辑, M Stockton Press, New York, 1991)。BLASTTM软件可从NCBI获得(Altschul, S.F.等, 1990, J.Mol.Biol.215:403-410; Gish, W.& States, D.J. 1993, Nature Genet.3:266-272. Madden, T.L.等, 1996, Meth.Enzymol.266:131-141; Altschul, S.F.等, 1997, Nucleic Acids Res.25:3389-3402; Zhang, J.& Madden, T.L. 1997, Genome Res.7:649-656)。

[0361] 在一个实施方案中,第一或第二结合伴侣(X或Y)是蛋白质或肽。

[0362] 在一个实施方案中,第一和第二融合蛋白包含一个或多个肽接头。接头可以并入融合蛋白中的不同位置。例如,可在结合伴侣和与其附接的蛋白质之间引入接头。

[0363] 在一个实施方案中,接头是肽接头。

[0364] 如本文所用,术语“肽接头”是指具有氨基酸序列的肽。一系列合适的肽接头将是本领域技术人员已知的。

[0365] 在一个实施方案中,双特异性蛋白质复合物的结合伴侣经由肽接头与其各自的蛋白质连接。

[0366] 在一个实施方案中,融合蛋白是翻译融合物,其是在包含从其表达融合蛋白的遗传构建体的宿主细胞中表达的融合蛋白。

[0367] 在一个实施方案中,融合蛋白通过任选地经由肽接头将A的重链与X融合和/或将B的重链与Y融合来制备。

[0368] 在一个实施方案中,肽接头的长度为50个氨基酸或更少,例如20个氨基酸或更少。

[0369] 一般重组表达融合蛋白将更高效,因此可由宿主细胞表达的直接肽键或肽接头可能是有利的。

[0370] 在一个实施方案中,接头选自序列5至72所示的序列或PPP。

[0371] 表1. 铰链接头序列

[0372]

SEQ ID NO:	序列
5	DKTHTCAA

6	DKTHTCPPCPA
7	DKTHTCPPCPATCPPCPA
8	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
9	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
10	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
11	DKTHTCCVECPCPA
12	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
13	DKTHTCPSCPA

[0373] 表2. 柔性接头序列

SEQ ID NO:	序列
14	SGGGGSE
15	DKTHTS
16	(S) GGGGS

[0374]

[0375]

17	(S) GGGSGGGGS
18	(S) GGGSGGGSGGGGS
19	(S) GGGSGGGSGGGSGGGGS
20	(S) GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
21	AAAGSG-GASAS
22	AAAGSG-XGGGS-GASAS
23	AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS
24	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS
25	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
26	AAAGSG-XS-GASAS
27	PGNRRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
28	ATTTGSSPGPT
29	ATTTGS
30	GS
31	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
32	GTVAAPSVFIFPPSD
33	GGGGIAPSMVGGGS
34	GGGGKVEGAGGGGS
35	GGGSMKSHDGGGS
36	GGGGLITIVGGGS
37	GGGGVVPSLPGGGGS
38	GGEKSIPGGGS
39	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
40	YPRSIYIRRRHPSPLTT
41	TPSHLSHILPSFGLPTFN
42	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
43	SPAAHFPRSIPRPGPIRT
44	APGPSAPSHRSLPSRAFG
45	PRNSIHFLHPLLVAPLGA

[0376]	46	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
	47	SPQYPSPLTLTLPPHPSL
	48	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
	49	LPWRTSLLPSLPLRRRP
	50	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
	51	VPPAPVVSLRSAHARPPY
	52	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
	53	PNVAHVLP LLTVPWDNLR
	54	CNPLLPLCARSPAVRTFP

[0377] (S) 在序列17至20中是任选的。

[0378] 刚性接头的实例包括肽序列GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO:69)、PPPP (SEQ ID NO:70) 和PPP。

[0379] 其他接头示于表3中：

SEQ ID NO:	序列
[0380] 55	DLCLR DWGCLW
56	DICLPRWGCLW
57	MEDICLPRWGCLWGD
58	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
59	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
60	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
61	EDICLPRWGCLWEDD
62	RLMEDICLPRWGCLWEDD
63	MEDICLPRWGCLWEDD
64	MEDICLPRWGCLWED
65	RLMEDICLARWGCLWEDD
66	EVRSFCTR WPAEK SCKPLRG
67	RAPESFVCYWETICFERSEQ
68	EMCYFPGICWM

[0381] 在一个方面,提供了产生本公开的双特异性蛋白质复合物的方法,包括以下步骤:

[0382] (a) 产生第一融合蛋白(A-X),其包含衔接至结合对的第一结合伴侣(X)的第一蛋白质(A);

[0383] (b) 产生第二融合蛋白(B-Y),其包含衔接至结合对的第二结合伴侣(Y)的第二蛋白质(B);和

[0384] (c) 将步骤a)和b)中制备的第一融合蛋白(A-X)和第二融合蛋白(B-Y)混合在一起。

[0385] 通常,步骤(c)中A-X和B-Y的混合是以1:1的摩尔比混合。

[0386] 在一个实施方案中,本公开的复合物中使用的每种融合蛋白通过在表达实验中在宿主细胞中表达产生。

[0387] 一方面,提供了制备本公开的双特异性蛋白质复合物的方法,其包括以下步骤:

[0388] (a) 表达第一融合蛋白(A-X),其包含附接于结合对的第一结合伴侣(X)的第一蛋白质(A);

[0389] (b) 表达第二融合蛋白(B-Y),其包含附接于结合对的第二结合伴侣(Y)的第二蛋白质(B);

[0390] 其中融合蛋白A-X和B-Y从相同的宿主细胞或不同的宿主细胞表达。

[0391] 如本文使用的不同的宿主细胞是指个体细胞,其包括相同类型的细胞(甚至相同的克隆类型)。

[0392] 在一个实施方案中,表达是瞬时表达。当与无需求助纯化而产生双特异性复合物的能力组合时,使用瞬时表达是高度有利的。这导致产生双特异性蛋白质复合物的快速方法,因为瞬时转染比稳定转染简单得多并且资源密集程度更低。

[0393] 在一个实施方案中,表达是稳定表达,即其中编码讨论中的融合蛋白的DNA稳定整合至宿主细胞基因组中。

[0394] 在一个实施方案中,将编码A-X的多核苷酸和编码相同或不同多核苷酸序列上的B-Y的多核苷酸转染至细胞中作为功能测定的一部分,其中所述蛋白质在细胞中表达和/或从细胞中释放。特别地,将多核苷酸在相同或不同的质粒上瞬时转染。

[0395] A-X和B-Y的混合一般在X和Y可以相互作用的条件下进行。在一个实施方案中,将融合蛋白在细胞培养条件下于细胞培养基中孵育,例如将融合蛋白在37°C/5%CO<sub>2</sub>环境中孵育90分钟。

[0396] 在一个实施方案中,将本公开的融合蛋白在水性环境中混合,例如可将一种融合蛋白结合至固体表面诸如珠或板,并且可在水溶液/悬浮液中向其引入其它融合蛋白。固相允许容易地洗掉多余的组分和试剂。在一个实施方案中,两种融合都不附接固相,并且简单地在液体/溶液/介质中混合。因此在一个实施方案中,将A-X和B-Y作为游离蛋白质在水性介质中混合。

[0397] 有利地,本公开的方法可用于制备异源对之间(即在第一融合蛋白[A-X]与第二融合蛋白[B-Y]之间)形成的复合物,其中使同源对之间(即两个第一融合蛋白[A-X]或两个第二融合蛋白[B-Y]之间)的相互作用最小化。因此,本发明的方法允许制备大量的双特异性蛋白质复合物,同时具有最小或没有同二聚体复合物的污染。本公开的构建体和方法的有利方面是A-X与B-Y的比率由A-X和B-Y的性质控制,并且特别地可以实现1:1的摩尔比。这种控制原理是对某些现有技术方法的显著改进。

[0398] 在一个实施方案中,本公开的方法包括将被鉴定为具有协同活性的成对可变区(特别是两对可变区)转换成替代双特异性形式中的另外步骤,任选地如果必要则预先对所述可变区进行人源化,所述替代双特异性形式是替代治疗性形式和/或具有适合于在具有更长持续时间(例如其运行一周或更长)的测定中测试的延长的半寿期的形式。

[0399] 多价形式包括本领域已知的那些形式和本文所述的那些形式,诸如DVD-Ig、FabFv(例如如W02009/040562和W02010/035012中公开的)、双抗体、三抗体、四抗体等。

[0400] 双特异性和多特异性形式(包括治疗性形式)的其它实例包括双抗体、三抗体、四抗体、串联scFv、串联scFv-Fc、FabFv、Fab' Fv、FabdsFv、Fab-scFv、Fab'-scFv、diFab、diFab'、sc双抗体、sc双抗体-Fc、ScFv-Fc-scFv、sc双抗体-CH3、IgG-scFv、scFv-IgG、V-IgG、IgG-V、DVD-Ig和DuoBody。

[0401] 本文使用的双抗体是指两个Fv对:VH/VL和具有两个Fv间接头(使得第一Fv的VH连接至第二Fv的VL以及第一Fv的VL连接至第二Fv的VH)的另外的VH/VL对。

[0402] 如本文使用的三抗体指与包含三个Fv对和三个Fv间接头的类似于双抗体的形式。

[0403] 如本文使用的四抗体是指与包含四个Fv对和四个Fv间接头的类似于双抗体的形式。

[0404] 如本文所用的串联scFv是指经由单个接头彼此连接以使得存在单个Fv间接头的两个scFv(各自包含接头是通常的方式)。

[0405] 如本文所用的串联scFv-Fc是指两个串联scFv,其中每个scFv例如经由铰链附加至恒定区片段-CH2CH3的CH2结构域的N末端。

[0406] 如本文所用的FabFv是指具有附加至以下每一个的C末端的可变区的Fab片段:重链的CH1和轻链的CL。该形式可以以其PEG化形式提供。

[0407] 如本文所用的Fab' Fv类似于FabFv,其中Fab部分被Fab'替代。所述形式可以以其PEG化形式提供。

[0408] 如本文使用的FabdsFv是指FabFv,其中Fv内二硫键稳定附加的C-末端可变区。所述形式可以以其PEG化形式提供。

[0409] 如本文所使用的Fab-scFv是具有附加在轻链或重链的C末端上的scFv的Fab分子。

[0410] 如本文使用的Fab'-scFv是具有附加在轻链或重链的C末端上的scFv的Fab'分子。

[0411] 如本文使用的DiFab是指经由其重链的C末端连接的两个Fab分子。

[0412] DiFab'是指经由其铰链区中的一个或多个二硫键连接的两个Fab'分子。

[0413] 如本文所使用的,sc双抗体是包含Fv内接头的双抗体,以使得该分子包含三个接头并形成正常scFv,其VH和VL末端各自连接至另一Fv对的可变区之一。

[0414] 如本文所用的sc双抗体-Fc是两个sc双抗体,其中每个例如经由铰链附加至恒定区片段-CH2CH3的CH2结构域的N末端。

[0415] 如本文使用的ScFv-Fc-scFv是指4个scFv,其中每一个各自附加至-CH2CH3片段的重链和轻链二者的N末端和C末端。

[0416] 如本文所用的sc双抗体-CH3是指两个各自例如通过铰链连接至CH3结构域的sc双抗体分子。

[0417] 如本文使用的IgG-scFv是在每条重链或每条轻链的C末端具有scFv的全长抗体。

[0418] 如本文使用的scFv-IgG是在每条重链或每条轻链的N末端具有scFv的全长抗体。

[0419] 如本文使用的V-IgG是在每条重链或每条轻链的N末端具有可变结构域的全长抗体。

[0420] 如本文使用的IgG-V是在每条重链或每条轻链的C末端具有可变结构域的全长抗体。

[0421] DVD-Ig(也称为双V结构域IgG)是具有4个另外的可变结构域(每条重链和每条轻链的N末端上一个)的全长抗体。

[0422] 本文使用的Duobody或“Fab臂交换”是双特异性IgG抗体形式,其中两种不同单克隆抗体的恒定结构域(通常为CH3)中的匹配和互补工程化的氨基酸改变在混合时导致异二聚体的形成。来自第一抗体的重/轻链对将作为残基工程化的结果,优选与第二抗体的重链:轻链对缔合。

[0423] 如果存在本发明的双特异性抗体复合物或抗体分子的恒定区结构域,则可考虑所提出的复合物或抗体分子的功能,特别是可能需要的效应子功能来选择。例如,恒定区结构域可以是人IgA、IgD、IgE、IgG或IgM的结构域。特别地,当抗体分子意欲用于治疗用途并且需要抗体效应子功能时,可以使用人IgG恒定区结构域,特别是IgG1和IgG3同种型的恒定区结构域。或者,当抗体分子意欲用于治疗目的并且不需要抗体效应子功能时,可使用IgG2和IgG4同种型。应当理解,也可以使用这些恒定区结构域的序列变体。例如,可使用如Angal等,1993, *Molecular Immunology*, 1993, 30:105-108中所述的其中241位的丝氨酸已经改变为脯氨酸的IgG4分子。因此,在其中抗体是IgG4抗体的实施方案中,抗体可包括突变S241P。

[0424] 本领域技术人员还将理解,抗体可经历多种翻译后修饰。这些修饰的类型和程度常常取决于用于表达抗体的宿主细胞系以及培养条件。此类修饰可以包括糖基化、甲硫氨酸氧化、二酮哌嗪形成、天冬氨酸异构化和天冬酰胺脱酰胺的变化。频繁的修饰是由于羧肽酶的作用(如Harris,RJ, *Journal of Chromatography* 705:129-134,1995所述的)而导致的羧基末端碱性残基(诸如赖氨酸或精氨酸)的丢失。因此,抗体重链的C末端赖氨酸可以不存在。

[0425] 本公开还提供了包含如上所述的一种或多种双特异性蛋白质复合物的组合物,其中所述组合物主要包含根据本公开的异二聚体双特异性复合物,例如具有最少或无同二聚体复合物的污染。

[0426] 在一个实施方案中,组合物中至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%的融合蛋白是双特异性蛋白质复合物形式。

[0427] 在一个实施方案中,组合物中至少60%的融合蛋白是双特异性蛋白质复合物形式。

[0428] 在一个实施方案中,形成的复合物不需要进一步的纯化步骤,因此组合物包含未纯化的双特异性复合物。

[0429] 在一个实施方案中,形成的复合物需要一个纯化步骤,例如柱层析。

[0430] 在一个实施方案中,所述方法还包括至少一个纯化步骤,例如在根据本公开表达融合蛋白之后且在混合融合蛋白之前。

[0431] 一方面,本公开涉及如本文所定义的融合蛋白、异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物、包含融合蛋白或所述双特异性蛋白质复合物的组合物、多元体(multiple)、阵列、文库。

[0432] 在一个实施方案中,双特异性蛋白质复合物在溶液或悬浮液中。

[0433] 在一个实施方案中,将双特异性蛋白质复合物固定在固体基质表面上。

[0434] 在一个实施方案中,多元体是阵列形式,例如在微量滴定板诸如96或384孔板中。此类阵列可容易地在筛选测定中实施,以鉴定具有所需功能的双特异性蛋白质复合物。

[0435] 在另一个实施方案中,将双特异性蛋白质复合物缀合至珠。

[0436] 如上定义的融合蛋白是根据本公开的双特异性蛋白质复合物的组分。在一个方

面,本公开涉及本文所述的融合蛋白。

[0437] 在另一方面,提供了包含两个或更多个如上定义的融合蛋白的文库。

[0438] 如本文使用,术语“文库”是指本公开的两种或更多种双特异性抗体复合物或本公开的多种融合蛋白,其可以组合以形成根据本公开的至少两种不同的双特异性抗体复合物。如在整个说明书中所描述的,术语“文库”以其最广泛的含义使用,并且还可包括子文库。

[0439] 有利地,文库可以包含一系列不同的融合蛋白,其具有与其附接的特定结合对的第一结合伴侣(X)或第二结合伴侣(Y)。在一个实施方案中,文库的部分包含各自连接至结合伴侣X的蛋白质/抗体/片段,并且文库的其余部分包含各自连接至结合伴侣Y的相同蛋白质/抗体/片段。因此,只要一个融合蛋白具有附接的结合对的第一结合伴侣并且另一融合蛋白具有附接的结合对的第二结合伴侣,这允许任何两种融合蛋白易于组合以形成本公开的双特异性蛋白质复合物。

[0440] 在一个实施方案中,本发明的双特异性蛋白质复合物适合于治疗应用,并且可提供用于治疗疾病的新型治疗。因此,在另一方面,提供了如上所述的用于治疗的双特异性蛋白质复合物。双特异性蛋白质复合物适合于治疗一系列疾病,诸如自身免疫疾病和癌症。

[0441] 相反,本公开的双特异性蛋白质复合物可以用对T淋巴细胞具有特异性的一种抗体或抗体片段和对癌症特异性抗原具有特异性的另一种抗体或抗体片段进行工程改造。因此,与普通单克隆抗体相比,本公开的双特异性抗体复合物可有利地具有更高的细胞毒性潜力。

[0442] 本公开的双特异性蛋白质复合物也特别适合于抑制B细胞功能,以控制各种自身免疫疾病中的免疫和自身免疫反应。

[0443] 因此,本公开延伸至治疗患者中疾病的方法,包括施用本公开的双特异性蛋白质复合物。

[0444] 在一个方面,提供了包含本公开的一种或多种双特异性蛋白质复合物的药物组合物。

[0445] 在一个实施方案中,提供了对于本公开的方法获得或可获得的融合蛋白。

[0446] 在一个实施方案中,提供了从本公开的方法获得或可获得的双特异性抗体复合物。

[0447] 在一个实施方案中,提供了包含通过根据本公开的方法鉴定的可变区组合的双特异性或多特异性抗体分子。

[0448] 在一个实施方案中,提供了一种组合物,诸如包含从本公开的方法获得的融合蛋白、双特异性抗体复合物或双特异性/多特异性抗体分子的药物组合物。

[0449] 组合物中可包括各种不同的组分,包括药学上可接受的载体、赋形剂和/或稀释剂。任选地,所述组合物可包含能够改变本发明抗体群的特征从而例如降低、稳定、延迟、调节和/或激活抗体功能的其它分子。组合物可以是固体或液体形式,并且尤其可以是粉末、片剂、溶液或气溶胶的形式。

[0450] 本公开还提供了药物或诊断组合物,其包含本发明的双特异性蛋白质复合物与一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体的组合。因此,提供了本发明的双特异性蛋白质复合物用于治疗 and 制造用于治疗病理性病况或病症的药物的用途。



[0451] 病理性病况或病症可以例如选自感染(病毒、细菌、真菌和寄生虫感染)、与感染相关的内毒素性休克、关节炎诸如类风湿性关节炎、哮喘诸如重症哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、骨盆炎性疾病、阿尔茨海默病、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、阴茎纤维性海绵体炎(Peyronie's Disease)、腹腔疾病、胆囊疾病、藏毛病、腹膜炎、银屑病、血管炎、手术粘连、中风、I型糖尿病、莱姆病、脑膜脑炎、自身免疫性葡萄膜炎、中枢和周围神经系统的免疫介导的炎性病况诸例如多发性硬化、狼疮(诸如系统性红斑狼疮)和吉兰-巴雷综合征、特应性皮炎、自身免疫性肝炎、纤维性肺泡炎、格雷夫斯病、IgA肾病、特发性血小板减少性紫癜、梅尼埃尔氏病、天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、结节病、硬皮病、韦格纳肉芽肿病、其它自身免疫性疾病、胰腺炎、创伤(手术)、移植物抗宿主病、移植排斥、心脏病,包括缺血性疾病诸如心肌梗塞以及动脉粥样硬化、血管内凝血、骨吸收、骨质疏松、骨关节炎、牙周炎、胃酸过少(hypochlorhydria)和癌症,包括乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头颈癌、肾癌,特别是肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、黑素瘤、肉瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌和甲状腺癌及其转移形式。

[0452] 本公开还提供了药物或诊断组合物,其包含本发明的双特异性蛋白质复合物与药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体的一种或多种的组合。因此,提供本发明的双特异性蛋白质复合物用于治疗 and 用于制造药物的用途。

[0453] 组合物通常会作为正常包括药学上可接受的载体的无菌药物组合物的一部分提供。本发明的药物组合物可另外包含药学上可接受的佐剂。

[0454] 本发明还提供了制备药物或诊断组合物的方法,其包括将本发明的抗体分子或双特异性抗体复合物与药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体的一种或多种一起加入和混合。

[0455] 如本文所用,术语“药学上可接受的赋形剂”是指药学上可接受的制剂载体、溶液或添加剂,以增强本发明组合物的所需特征。赋形剂是本领域众所周知的,包括缓冲液(例如柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液和碳酸氢盐缓冲液)、氨基酸、尿素、醇、抗坏血酸、磷脂、蛋白质(例如,血清白蛋白)、EDTA、氯化钠、脂质体、甘露醇、山梨醇和甘油。溶液或悬浮液可被包封在脂质体或可生物降解的微球中。一般使用无菌制造方法以基本上无菌的形式提供制剂。

[0456] 这可包括通过过滤用于制剂的缓冲溶剂溶液,抗体在无菌缓冲溶剂溶液中的无菌悬浮液的产生和灭菌,以及通过本领域普通技术人员熟悉的方法将制剂分配到无菌容器中。

[0457] 药学上可接受的载体本身不应诱导对接受组合物的个体有害的抗体的产生,并且不应是有毒的。合适的载体可以是大的,缓慢代谢的大分子,诸如蛋白质、多肽、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物和无活性病毒颗粒。

[0458] 可使用药学上可接受的盐,例如无机酸盐,诸如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和硫酸盐,或有机酸的盐,诸如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐和苯甲酸盐。

[0459] 治疗组合物中的药学上可接受的载体可另外含有液体,诸如水、盐水、甘油和乙醇。此类载体使得药物组合物能够配制为片剂、丸剂、糖锭、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液和悬浮液,以供患者摄取。

[0460] 可将本发明的双特异性蛋白质复合物分散在溶剂中例如以溶液或悬浮液的形式

递送。可将其悬浮在适当的生理溶液例如生理盐水、药理学上可接受的溶剂或缓冲溶液中。本领域已知的缓冲溶液可以每1ml水含有0.05mg至0.15mg乙二胺四乙酸二钠、8.0mg至9.0mg NaCl、0.15mg至0.25mg聚山梨酯、0.25mg至0.30mg无水柠檬酸和0.45mg至0.55mg柠檬酸钠,以达到约4.0至5.0的pH。如上所述,悬浮液可以例如由冻干抗体制备。

[0461] 药理学上可接受的载体的详尽讨论可在Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991) 中获得。

[0462] 双特异性抗体复合物(或本公开的双特异性/多特异性抗体分子)可以是药物或诊断组合物中的唯一活性成分,或者可以伴随其他活性成分,包括其他抗体成分,例如抗TNF、抗IL-1 $\beta$ 、抗T细胞,抗IFN $\gamma$ 或抗LPS抗体,或非抗体成分诸如黄嘌呤。其它合适的活性成分包括能够诱导耐受性的抗体,例如抗CD3或抗CD4抗体。

[0463] 在另一个实施方案中,将根据本公开的抗体、片段或组合物与另外的药物活性剂例如皮质类固醇(诸如丙酸氟替卡松)和/或 $\beta$ -2-激动剂(诸如沙丁胺醇、沙美特罗或福莫特罗)或细胞生长和增殖的抑制剂(诸如雷帕霉素、环磷酰胺、氮甲蝶呤)或CD28和/或CD40抑制剂组合使用。在一个实施方案中,抑制剂是小分子。在另一个实施方案中,抑制剂是对靶具有特异性的抗体。

[0464] 药物组合物合适地包含治疗有效量的本发明的双特异性抗体复合物(或本公开的双特异性/多特异性抗体分子)。

[0465] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指治疗、改善或预防靶向疾病或病况或表现出可检测的治疗或预防效果所需的治疗剂的量。对于任何抗体,最初可在细胞培养测定或动物模型中,通常在啮齿动物、兔、狗、猪或灵长类动物中估计治疗有效量。动物模型也可用于确定适当的浓度范围和施用途径。这样的信息然后可以用于确定用于在人中施用的有用剂量和途径。

[0466] 对于人受试者的精确治疗有效量将取决于疾病状态的严重度、,受试者的一般健康状况、受试者的年龄、体重和性别、饮食、施用的时间和频率、药物组合、对治疗的反应敏感性和耐受性/应答。该量可通过常规实验确定并且在临床医生的判断范围内。通常,治疗有效量会是0.01mg/kg至50mg/kg,例如0.1mg/kg至20mg/kg。或者,剂量可以是每天1至500mg,诸如每天10mg至100mg、200mg、300mg或400mg。药物组合物可方便地以含有预定量的本发明活性剂的单位剂量形式提供。

[0467] 组合物可被单独地施予患者,或者可以与其他试剂、药物或激素组合(例如同时、顺序或分开地)施用。

[0468] 施用本发明的抗体分子的剂量取决于待治疗的病症的性质、存在的炎症的程度以及抗体分子是被预防性使用还是用于治疗现有病症。

[0469] 剂量的频率将取决于抗体分子的半寿期和其效应的持续时间。如果抗体分子具有短的半寿期(例如2至10小时),则可能有必要每天给予一个或多个剂量。或者,如果抗体分子具有长的半寿期(例如2至15天),则可能仅需要每天给予一次,每周一次或甚至每月一次剂量。

[0470] 在本公开中,最终制剂的pH不类似于抗体或片段的等电点的值,因为如果制剂的pH为7,则8-9或更高的pI可能是适当的。尽管不希望受理论束缚,但据认为这可能最终提供具有改善的稳定性的最终制剂,例如抗体或片段保留在溶液中。

[0471] 本发明的药物组合物可以通过许多途径施用,包括但不限于口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、鞘内、室内(intraventricular)、透皮、经皮(例如,参见W098/20734)、皮下、腹膜内、鼻内、肠内、局部、舌下、阴道内或直肠途径。无针注射器也可以用于施用本发明的药物组合物。

[0472] 组合物的直接递送一般通过皮下、腹膜内、静脉内或肌肉内注射,或递送至组织的间隙空间来完成。还可将组合物施用至特定目标组织中。剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。

[0473] 当产品用于注射或输注时,其可采取在油性或水性媒介中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并且其可以含有配制剂,诸如悬浮剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。或者,双特异性蛋白质复合物(或本公开的双特异性/多特异性抗体分子)可以是干燥形式,用于在使用前用合适的无菌液体重构。如果组合物通过使用胃肠道的途径来施用,则组合物将需要含有保护抗体免于降解但是一旦其从胃肠道被吸收就释放双特异性蛋白质复合物的试剂。

[0474] 根据本公开的可雾化制剂可以例如作为包装在箔包封中的单剂量单位(例如,密封塑料容器或小瓶)提供。每个小瓶含有一定体积(例如2ml)的溶剂/溶液缓冲液的单位剂量。

[0475] 如本文所用,术语“变体”是指与相应的野生型肽或蛋白质的氨基酸或核苷酸序列相比,含有至少一个氨基酸序列或核苷酸序列改变的肽或蛋白质。变体可包含与相应的野生型肽或蛋白质至少80%、或85%、或90%、或95%、或98%或99%的序列同一性。然而,变体可以包含小于80%的序列同一性,只要变体表现出与其相应的野生型肽或蛋白质基本相似的功能。

[0476] 抗原包括细胞表面受体诸如T细胞或B细胞信号传导受体、共刺激分子、检查点抑制剂、天然杀伤细胞受体、免疫球蛋白受体、TNFR家族受体、B7家族受体、粘附分子、整联蛋白、细胞因子/趋化因子受体、GPCR、生长因子受体、激酶受体、组织特异性抗原、癌抗原、病原体识别受体、补体受体、激素受体或可溶性分子诸如细胞因子、趋化因子、白三烯、生长因子、激素或酶或离子通道、其表位、片段和翻译后修饰形式。

[0477] 在一个实施方案中,双特异性蛋白质复合物包含一种或两种细胞表面受体特异性。

[0478] 在一个实施方案中,双特异性蛋白质复合物包含一种或两种细胞因子或趋化因子特异性。

[0479] 可将通过根据本公开的方法鉴定的一对靶的抗体或片段掺入适于用作实验室试剂、测定试剂或治疗剂的任何形式。

[0480] 因此,在一个方面,本公开延伸至以任何形式作为对的抗体片段或其组合的用途,其实例在上文给出。

[0481] 本公开还延伸至组合物,诸如包含具有特定抗原特异性的所述新型形式的药物组合物。

[0482] 在另一方面,本公开包括所述形式和组合物在治疗中的用途。

[0483] 在一个实施方案中,本公开的双特异性蛋白质复合物可用于功能改变目的抗原的活性。例如,双特异性蛋白质复合物可以直接或间接中和、拮抗或激动所述抗原的活性。

[0484] 本公开还延伸至试剂盒,其例如包括:

[0485] a) 一种或多种融合蛋白 (A-X), 其包含衔接至结合对的第一结合伴侣 (X) 的第一抗体或抗体片段 (A); 和

[0486] b) 一种或多种融合蛋白 (B-Y), 其包含衔接至结合对的第二结合伴侣 (Y) 的第二抗体或抗体片段 (B), 其中后者对第一结合伴侣具有特异性;

[0487] 例如其中第一结合伴侣 (X) 是肽或多肽, 并且第二结合伴侣 (Y) 是对其具有特异性的抗体或抗体片段;

[0488] 其中所述第二结合伴侣 Y 对所述第一结合伴侣 X 具有特异性, 并且所述第二结合伴侣是例如对其具有特异性的抗体或抗体片段; 并且两个结合伴侣的特异性相互作用 (诸如结合相互作用) 形成异二聚体系链, 其将来自 a) 和 b) 的两种融合蛋白物理地结合在一起以形成双特异性蛋白质复合物; 以及

[0489] 其中所述融合蛋白呈复合的或非复合的形式。

[0490] 有利地, 试剂盒可包含本公开的双特异性蛋白质复合物, 或可包含复合或非复合形式的融合蛋白。在前一种情况下, 双特异性蛋白质复合物准备好“开箱即用”, 这提供了方便且易于使用, 而在后一种情况下, 可根据用户的要求通过组合不同的融合蛋白来组装双特异性蛋白质复合物。

[0491] 在另一个实施方案中, 试剂盒还包含使用说明书。

[0492] 在另一个实施方案中, 试剂盒还包含用于进行一种或多种功能测定的一种或多种试剂。

[0493] 在一个实施方案中, 如本文所述的融合蛋白、双特异性蛋白质复合物、多元体、网格、文库、组合物等用作实验室试剂。

[0494] 在另一方面, 提供了核苷酸序列, 例如编码如上定义的融合蛋白和/或双特异性蛋白质复合物的 DNA 序列。

[0495] 在一个实施方案中, 提供了核苷酸序列, 例如编码根据本公开的双特异性蛋白质复合物的 DNA 序列。

[0496] 在一个实施方案中, 提供了核苷酸序列, 例如编码根据本公开的双特异性或多特异性抗体分子的 DNA 序列。

[0497] 本文的公开内容还延伸至包含如上定义的核苷酸序列的载体。

[0498] 如本文所用, 术语“载体”是指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。载体的实例是“质粒”, 其是可将另外的 DNA 区段连接至其中的环状双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体, 其中可将另外的 DNA 区段连接至病毒基因组中。某些载体能够在其中导入了它们的宿主细胞中自主复制 (例如, 具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。可将其他载体 (例如, 非附加型哺乳动物载体) 整合至宿主细胞的基因组中, 其中它们随后与宿主基因组一起被复制。在本说明书中, 术语“质粒”和“载体”可以互换使用, 因为质粒是载体最常用的形式。

[0499] 可以构建载体的一般方法、转染方法和培养方法是本领域技术人员众所周知的。在这方面, 参考“Current Protocols in Molecular Biology”, 1999, F.M. Ausubel (编辑), Wiley Interscience, New York 和由 Cold Spring Harbor Publishing 生产的 Maniatis Manual。

[0500] 如本文所用, 术语“选择性标志物”是指其表达允许鉴定已经用含有标志物基因的

载体转化或转染的细胞的蛋白质。多种选择性标志物是本领域已知的。例如,通常选择性标志物基因赋予已将载体导入其中的宿主细胞对药物诸如G418、潮霉素或氨甲蝶呤的抗性。选择性标志物还可以是视觉上可鉴定的标志物,诸如荧光标志物。荧光标志物的实例包括罗丹明、FITC、TRITC、Alexa Fluors及其各种缀合物。

[0501] 还提供了包含一个或多个克隆或表达载体的宿主细胞,所述载体包含编码本公开的抗体的一个或多个DNA序列。任何合适的宿主细胞/载体系统可用于表达编码本公开的抗体分子的DNA序列。可使用细菌(例如大肠杆菌)和其他微生物系统,或者也可以使用真核生物(例如哺乳动物)的宿主细胞表达系统。合适的哺乳动物宿主细胞包括CHO、骨髓瘤或杂交瘤细胞。

[0502] 本公开还提供了用于生产根据本公开的融合蛋白的方法,其包括在适于导致从编码本公开的分子的DNA表达蛋白质的条件下培养含有本公开的载体的宿主细胞,并分离该分子。

[0503] 本公开的双特异性蛋白质复合物可用于诊断/检测试剂盒,其中使用具有抗原特异性的特定组合的双特异性蛋白质复合物。例如,试剂盒可包含对两种抗原具有特异性的双特异性抗体复合物,所述两种抗原都存在于相同的细胞类型上,并且其中只有在成功检测到两种抗原时才可进行阳性诊断。通过使用本公开的双特异性抗体复合物而不是呈非复合形式的两种分开的抗体或抗体片段,可以极大地增强检测的特异性。

[0504] 在一个实施方案中,将双特异性抗体复合物固定在固体表面上。固体表面可以例如是芯片或ELISA板。

[0505] 还提供了本公开的双特异性蛋白质复合物用于在样品中检测第一和第二肽的存在用途,其中所述双特异性复合物用作检测剂。

[0506] 可以例如将本公开的双特异性抗体复合物缀合至荧光标志物,所述荧光标志物促进结合的抗体-抗原复合物的检测。此类双特异性抗体复合物可用于免疫荧光显微镜术。或者,双特异性抗体复合物也可用于蛋白质印迹或ELISA。

[0507] 在一个实施方案中,提供了纯化抗体(特别是根据本发明的抗体或片段)的方法。

[0508] 在一个实施方案中,提供了用于纯化根据本公开的融合蛋白或双特异性蛋白质复合物的方法,其包括以下步骤:以非结合模式进行阴离子交换层析,以使得杂质保留在柱子上,并且抗体保留在未结合级分中。该步骤可以例如在约6-8的pH下进行。

[0509] 该方法还可包括例如在约4至5的pH下进行的使用阳离子交换层析的初始捕获步骤。

[0510] 该方法还可包括另外的层析步骤,以确保产物和方法相关的杂质从产物流中适当地分离(resolved)。

[0511] 纯化方法还可包括一个或多个超滤步骤,诸如浓缩和渗滤步骤。

[0512] 如上所用的“纯化形式”意指至少90%的纯度,诸如91%w/w、92%w/w、93%w/w、94%w/w、95%w/w、96%w/w、97%w/w、98%w/w、99%w/w或更纯。

[0513] 在本说明书的上下文中,“包含(comprising)”被解释为“包括(including)”。

[0514] 包含某些元素的本公开的方面也旨在延伸至“由相关元素组成”或“基本上由相关元素组成”的替代实施方案。

[0515] 本文使用的积极实施方案可以为排除本公开的某些方面提供基础。

[0516] 在涉及双特异性复合物的方法的上下文中的公开同样适用于复合物本身,并且反之亦然。

[0517] 段落:

[0518] 1. 一种用于检测式A-X:Y-B的异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法

[0519] 其中X:Y是异二聚体系链,

[0520] A和B分别是与X和Y的融合蛋白形式中的双特异性的组分,所述方法包括以下步骤:

[0521] (i) 在功能测定中测试包含至少一种异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质的多元体的部分或全部的活性;和

[0522] (ii) 分析来自功能测定的读出数据,以鉴定双特异性蛋白质复合物中的协同生物功能。

[0523] 2. 根据段落1的用于检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法,其中所述方法还包括形成异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物的多元体的第一步骤。

[0524] 3. 根据段落1或2的用于检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法,其中X是肽或蛋白质,并且Y是对X具有特异性的肽或蛋白质结合伴侣。

[0525] 4. 根据段落3的用于检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法,其中所述异二聚体系链的结合亲和力为5nM或更强。

[0526] 5. 根据段落4的用于检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法,其中所述异二聚体系链的结合亲和力为900pM或更强,诸如800pM、700pM、600pM、500pM、400pM或300pM。

[0527] 6. 根据段落3的用于检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法,其中X是抗体或其结合片段。

[0528] 7. 根据段落6的用于检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法,其中所述X是选自Fab、Fab'、单链Fv和单结构域抗体诸如VHH的抗体片段。

[0529] 8. 根据段落7的用于检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法,其中所述X是单链Fv。

[0530] 9. 根据段落8的用于检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法,其中所述单链Fv对肽GCN4具有特异性。

[0531] 10. 根据段落9的用于检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法,其中所述单链Fv是52SR4。

[0532] 11. 根据段落3至10的任一项的用于检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法,其中Y是肽。

[0533] 12. 根据段落11的用于检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法,其中所述肽的长度为5至25个氨基酸。

[0534] 13. 根据段落1至12的任一项的用于检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同功能的方法,其中A是抗体或其结合片段。

[0535] 14. 根据段落1至13中任一项的用于检测异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复

合物中的协同功能的方法,其中B是抗体或其结合片段。

[0536] 15.根据前述段落中任一项的方法,其中所述多元体包含至少一种用于所述至少一种异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质的生物比较剂。

[0537] 16.根据段落1至15的任一项的方法,其中同时测试多种双特异性蛋白质复合物。

[0538] 17.一种具有式A-X:Y-B的双特异性蛋白质复合物,其中:

[0539] A-X是第一融合蛋白;

[0540] Y-B是第二融合蛋白;

[0541] X:Y是异二聚体系链;

[0542] A是双特异性的第一蛋白质组分;

[0543] B是双特异性的第二蛋白质组分;

[0544] X是结合对的第一个结合伴侣;

[0545] Y是结合对的第二结合伴侣;以及

[0546] :是X与Y之间的相互作用(诸如结合相互作用)。

[0547] 18.根据段落17的双特异性蛋白质复合物,其中所述X与Y之间的结合相互作用具有低解离常数。

[0548] 19.根据段落18的双特异性蛋白质复合物,其中所述解离常数在 $1-9 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 或更小的范围内,例如 $1-9 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 、 $1-9 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、 $1-9 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $1-9 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 或 $1-9 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 。

[0549] 20.根据段落19的双特异性蛋白质复合物,其中所述解离常数为 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更小,例如 $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 。

[0550] 21.根据段落17至20的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中X和Y彼此的亲和力为5nM或更强,例如900pM或更强,诸如800pM、700pM、600pM、500pM、400pM或300pM。

[0551] 22.段落17至21中的一项的双特异性蛋白质复合物,其中Y是肽或蛋白质。

[0552] 23.根据段落22的双特异性蛋白质复合物,其中所述肽是GCN4。

[0553] 24.根据段落16至23的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中X是抗体或抗体片段。

[0554] 25.根据段落24的双特异性蛋白质复合物,其中所述抗体片段选自:Fab、Fab'、单链可变片段(scFv)和单结构域抗体(sdAb),诸如VHH。

[0555] 26.根据段落25的双特异性蛋白质复合物,其中所述抗体片段是scFv。

[0556] 27.根据段落26的双特异性蛋白质复合物,其中所述scFv是52SR4。

[0557] 28.根据段落17至27的任一项的双特异性复合物,其中X或Y是肽,并且所述肽不是称为E5B9的肽表位。

[0558] 29.根据段落17的双特异性蛋白质复合物,其中所述结合伴侣对选自其中:

[0559] (i) X是谷胱甘肽(GSH),并且Y是谷胱甘肽S-转移酶(GST)

[0560] (ii) X是Fos,并且Y是Jun,

[0561] (iii) X是FLAG,并且Y是抗FLAG抗体或其片段,

[0562] (iv) X是His,并且Y是抗His,以及

[0563] (v) X是麦芽糖结合蛋白,并且Y是抗麦芽糖结合蛋白或其片段。

[0564] 30.根据段落17至29的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中A选自抗体、抗体片段、配体、受体、抑制剂和酶,诸如抗体或抗体片段。

- [0565] 31. 根据段落17至30的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中B选自抗体、抗体片段、配体、受体、抑制剂和酶,诸如抗体或抗体片段。
- [0566] 32. 根据段落30或31的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中A和/或B是对细胞表面受体具有特异性的抗体或抗体片段。
- [0567] 33. 根据段落29至30的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中A和/或B是对细胞因子或趋化因子具有特异性的抗体或抗体片段。
- [0568] 34. 根据段落30至34的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中X附接至第一抗体或抗体片段的重链或轻链的C末端,例如其中X附接至第一抗体或抗体结合片段的重链的C末端。
- [0569] 35. 根据段落31至35的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中Y附接至第二抗体或抗体结合片段的重链或轻链的C端,例如其中Y附接至第二抗体或抗体片段的重链的C末端。
- [0570] 36. 根据段落17至36的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中A是对第一抗原具有特异性的抗体或抗体结合片段,并且B是对第二抗原具有特异性的抗体或抗体片段,其中所述第一和第二抗原是不同的。
- [0571] 37. 一种组合物,其包含根据段落17至37的任一项的一种或多种双特异性蛋白质复合物。
- [0572] 38. 根据段落38的组合物,其中至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的融合蛋白呈双特异性蛋白质复合物形式。
- [0573] 39. 根据段落39的组合物,其中至少60%的融合蛋白呈双特异性蛋白质复合物形式。
- [0574] 40. 一种双特异性蛋白质复合物的多元体,其包括:
- [0575] 至少两种根据段落19至37的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中所述双特异性蛋白质复合物具有不同的特异性。
- [0576] 41. 根据段落41的多元体,其中所述双特异性蛋白质复合物在溶液或固定在固体基质表面上。
- [0577] 42. 根据段落42的多元体,其中所述多元体呈阵列或网格的形式,例如在微量滴定板诸如96孔板或384孔板中。
- [0578] 43. 根据段落41至43的任一项的多元体,其中所述双特异性蛋白质复合物缀合至珠。
- [0579] 44. 如段落1至37的任一项所定义的融合蛋白A-X或B-Y。
- [0580] 45. 一种包含两种或更多种如在段落1至37的一项所定义的融合蛋白的文库。
- [0581] 46. 一种编码如段落1-37的任一项所定义的融合蛋白的核苷酸序列。
- [0582] 47. 一种载体,其包含根据段落47的核苷酸序列。
- [0583] 48. 根据段落17至37中的任一项的双特异性蛋白质复合物或根据段落38至40的任一项的组合物,其用于治疗。
- [0584] 49. 一种治疗患者的方法,其包括施用根据段落7至36的任一项的双特异性蛋白质复合物或根据段落37至39的任一项的组合物。
- [0585] 50. 一种试剂盒,其包括:
- [0586] a) 一种或多种融合蛋白A-X;和



- [0587] b) 一种或多种融合蛋白B-Y;
- [0588] X:Y是异二聚体系链;
- [0589] A是双特异性的第一蛋白质组分;
- [0590] B是双特异性的第二蛋白;
- [0591] X是结合对的第一个结合伴侣,诸如肽或蛋白质;
- [0592] Y是结合对的第二结合伴侣,例如对X具有特异性的肽或蛋白质;和
- [0593] 其中X和Y不能形成同二聚体,以使得X与Y之间的特异性结合相互作用形成异二聚体系链并且物理上将两个融合物结合在一起以形成双特异性蛋白质复合物;以及
- [0594] 其中所述试剂盒中的融合蛋白呈复合的或非复合的形式。
- [0595] 51. 根据段落51的试剂盒,其还包括使用说明书。
- [0596] 52. 根据段落50或51的试剂盒,其还包含用于进行一种或多种功能测定的一种或多种试剂。
- [0597] 本文引用的所有参考文献明确地通过引用并入。
- [0598] 参考文献
- [0599] 1. Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. Hanes J, Jermutus L, Weber-Bornhauser S, Bosshard HR, Plückthun A. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 14130-14135
- [0600] 2. Directed in Vitro Evolution and Crystallographic Analysis of a Peptide-binding Single Chain Antibody Fragment (scFv) with Low Picomolar Affinity. Zhand C, Spinelli S, Luginbuhl B, Amstutz P, Cambillau C, Pluckthun A. (2004) J. Biol. Chem. 279, 18870-18877
- [0601] 3. Antigen recognition by conformational selection. Berger C, Weber-Bornhauser S, Eggenberger Y, Hanes J, Pluckthun A, Bosshard H.R. (1999) F.E.B.S. Letters 450, 149-153

## 实施例

- [0602] 在一些实施例中使用的一般方法
- [0603] 一般方法1: 将源自单采血液成分术的血小板锥的人PBMC作为冷冻的等分试样储备入库。在进行测定之前,将细胞解冻,在DMEM (Life Technologies) 中洗涤,使其适应37°C和5%CO<sub>2</sub>环境。
- [0604] 一般方法2: 将Fab'A-X和Fab'B-Y一起孵育90分钟(在37°C/5%CO<sub>2</sub>环境中),然后与2.5x10<sup>5</sup>个PBMC在V型底96孔板中混合。然后将PBMC加双特异性(Fab'A-X和Fab'B-Y)或二价(例如,Fab'A-X FabA'-Y)组合一起孵育另外90分钟。此后,通过在37°C下加入200nM山羊F(ab')<sub>2</sub>抗人IgM(Southern Biotechnology)进行8分钟来活化B细胞。然后通过加入等体积的Cytotfix缓冲液(BD Biosciences)来停止信号传导反应。然后将板在室温下放置15分钟,然后以500g离心5分钟。从细胞沉淀中弃去过量的上清液,将其重悬在流式缓冲液中并再次洗涤。然后将细胞在冰冷的Perm缓冲液III(BD Biosciences)中重悬30分钟,然后在流式缓冲液中洗涤两次。
- [0605] 一般方法3: 如一般方法2中所述活化细胞,并用荧光标记的抗CD20抗体(BD

Biosciences)、识别位置473处的经修饰的丝氨酸残基的抗磷酸Akt抗体、识别位置759的经修饰的酪氨酸残基的抗磷酸PLC $\gamma$ 2抗体和识别总I $\kappa$ B的抗I $\kappa$ B抗体进行荧光标记。然后将板重悬并在室温下于黑暗中孵育1小时。此后,将板再洗涤两次并重悬于25 $\mu$ l流式缓冲液中。使用Intellicyt HTFC<sup>TM</sup>流式细胞仪测量CD20、Akt和PLC $\gamma$ 2的细胞表达。

[0606] 实施例1.本公开的双特异性抗体复合物FabB-GCN4 (7P14P) :52SR4-FabA的构建

[0607] 图2和4显示了本公开的代表性双特异性抗体复合物。双特异性抗体复合物由第一和第二融合蛋白组成。

[0608] 第一融合蛋白(A-X)包括对抗原6具有特异性的Fab片段(Fab A(也称为Fab#1),其通过肽接头ASGGGG SEQ ID NO:71附接至X scFv(克隆52SR4 SEQ ID NO:3),所述接头连接到Fab片段的CH<sub>1</sub>结构域的c-末端和scFv的V<sub>L</sub>结构域。scFv本身也含有位于其V<sub>L</sub>与V<sub>H</sub>结构域之间的肽接头。

[0609] 第二融合蛋白(B-Y)包括对抗原5具有特异性的Fab片段(Fab B[也称为Fab#2])。然而,与第一蛋白相比,该Fab片段经由肽接头ASGGGG SEQ ID NO:71连接至Y(肽GCN4)(克隆7P14P SEQ ID NO:1),所述肽接头与Fab片段的CH<sub>1</sub>结构域连接。

[0610] scFv(X)是对于结合伴侣Y(GCN4)特异性的并与其互补。因此,当使两种融合蛋白相互接触时,发生scFv与GCN4肽之间的非共价结合相互作用,从而以双特异性抗体复合物的形式物理地保留了两种融合蛋白。

[0611] 通过从用GCN4(7P14P)免疫的小鼠的脾脏构建和淘选核糖体展示VL-接头-VH scFv文库,衍生得到单链抗体(scFv)52SR4(参考文献1)。另一份2004年的出版物再次描述了使用随机文库的核糖体展示再次将52SR4亲和力成熟为报道的5pM(参考文献2)。

[0612] 通过在7位和14位包含脯氨酸残基而从酵母转录因子GCN4衍生得到GCN4肽,因此GCN4(7P14P)保持在如Berger等的1999年的出版物(参考文献3)中所述scFv结合的单体状态。

[0613] 将编码GCN4肽和52SR4 scFv的核苷酸序列在含有CH<sub>1</sub>并且已经设计来接收抗体VH区的内部重链Fab表达载体下游克隆入两个分开的载体中。

[0614] 然后将来自抗抗原6抗体和抗抗原5抗体的VH区分开克隆入这两个重链载体中。

[0615] 将编码GCN4肽和52SR4 scFv的核苷酸序列分开克隆入分别在含有CK并且被设计来接收抗体VL区的内部轻链Fab表达载体下游的第一和第二载体中。

[0616] 将来自抗抗原6抗体和抗抗原5抗体的VL区与内部轻链表达载体中的CK分开框内克隆在一起,用于与合适的重链载体共表达以表达Fab-scFv和Fab-肽蛋白。

[0617] 然后对载体进行测序以确认克隆已经成功,并且细胞随后分开表达具有分别来自抗抗原6抗体和抗抗原5抗体的V区的Fab-scFv和Fab-肽蛋白。实施例1中的抗原5和6不是在大网格形式的后续实施例中的抗原标记的抗原5和抗原6。

[0618] 实施例2.形成可同时共同接合两种靶抗原的非共价双特异性抗体的scFv:肽相互作用的流式细胞术证明

[0619] 图5显示了流式细胞术实验的结果,其证明了使用scFv:肽结合相互作用形成的两种不同双特异性抗体复合物的抗原特异性。

[0620] 使用以下两种融合蛋白构建第一双特异性抗体复合物:

[0621] 1.抗抗原5Fab-scFv(52SR4);和

[0622] 2. 抗抗原6Fab-肽 (GCN4)

[0623] 使用以下两种融合蛋白构建第二双特异性抗体复合物:

[0624] 1. 抗抗原5Fab-肽 (GCN4); 和

[0625] 2. 抗抗原6Fab-scFv (52SR4)

[0626] 因此, 两种双特异性抗体复合物具有相同的Fab片段和相同的结合伴侣 (即52SR4和GCN4)。两种双特异性抗体复合物之间的差异是其中Fab片段附接至哪个结合伴侣。

[0627] 不形成复合物的对照混合物由以下融合蛋白制备:

[0628] 1. 抗抗原5Fab:GCN4; 和

[0629] 2. 抗抗原6Fab:GCN4

[0630] 为了证明双特异性抗体复合物结合抗原5的能力, 将复合物与表达抗原5的Jurkat细胞一起孵育。为了证明双特异性抗体复合物结合抗原6的能力, 随后将曾经与Jurkat细胞上的抗原5结合的复合物与生物素化的抗原6接触。然后使用荧光标记的链霉抗生物素蛋白检测生物素化的抗原6。

[0631] 然后使Jurkat细胞运行通过FacsCalibur流式细胞仪, 其中荧光标记的Jurkat细胞 (其仅当与双特异性抗体复合物结合时才能被标记, 所述双特异性抗体复合物进而与抗原6结合, 从而表明双特异性抗体复合物能够结合抗原5和抗原6), 可与用能够结合抗原5和抗原6的两种融合蛋白 (二者都与不能形成复合物的肽融合) 孵育的Jurkat细胞分离。

[0632] 图5中的FACS曲线显示两种双特异性抗体复合物 (超过和高于填充的背景的细线和粗线) 的显著偏移, 因此证明双特异性抗体复合物可以成功地结合两种靶抗原, 并且结合两种靶标的能力抗原被保留, 而不论给定的Fab片段是否连接至scFv或肽。

[0633] 随后捕获分别被C末端融合至抗抗原6Fab的肽或scFv允许进一步捕获生物素化抗原6, 所述抗原在具有荧光标记的链霉抗生物素蛋白的最终层中被检测到。因此, FACS曲线图中描述的结果显示本公开的双特异性抗体复合物能够成功地同时结合两种不同的靶抗原。

[0634] 实施例2中的抗原5和6不是在以下利用大网格形式的后续实施例中的抗原标记的抗原5和抗原6。

[0635] 实施例3. scFv: 肽相互作用的Biacore证明

[0636] 图6显示了证明scFv: 肽 (即52SR4:GCN4) 相互作用的亲和力的表面等离子体共振迹线。使用Biacore 3000 (GE Healthcare) 进行表面等离子体共振。在25°C下进行所有实验。链霉抗生物素蛋白 (内部产生的) 通过胺偶联化学固定在CM5传感器芯片 (GE Healthcare) 上, 最终水平为约1750个应答单位。使用HBS-N缓冲液 (10mM HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl; GE Healthcare) 作为用于固定和肽捕获的运行缓冲液。使用在HBS-N (10nM, M.W. 4360) 中的5 $\mu$ l注射的生物素-GCN4肽来在固定的链霉抗生物素蛋白上实现约6RU的捕获。将运行缓冲液转换为HBS-EP+缓冲液 (10mM HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% (v/v) 表面活性剂P20; GE Healthcare), 用于测量抗GCN4 (52SR4) scFv结合动力学。将来自30nM或HBS-EP+缓冲液对照的Fab-scFv (内部产生的) 的三倍系列稀释液以30 $\mu$ l/min的流速注射到固定的GCN4肽 (3分钟缔合, 15分钟解离) 上。每次注射后, 以10 $\mu$ l/min的流速通过两次连续60秒的2M胍-HCl注射来再生表面。按照标准程序, 使用3000BIAEval软件 (4.1版) 分析扣除双参照背景的结合曲线。从拟合1:1结合模型算法确定动力学参数。数据证明

scFv具有516pM的对肽的亲合力。

[0637] 实施例4. 用于功能测定的Fab-A (Fab-scFv[A-X]) 和Fab-B (Fab-肽[B-Y]) 的产生

[0638] 克隆策略:通过PCR或基因合成侧接限制性酶切位点DNA序列产生抗体可变区DNA。这些位点是可变重链的HindIII和XhoI,可变轻链的HindIII和BsiWI。这使得重链可变区适于连接至两个重链载体(具有FabB-Y的pNAFH和具有FabA-X的pNAFH)中,因为它们具有互补的限制性位点。这将可变区上游(或5')与鼠恒定区和肽Y(GCN4)或scFv X(52SR4)连接,产生整个阅读框。将轻链克隆入标准的内部鼠恒定κ载体(pMmCK或pMmCK S171C),其再次使用相同的互补限制性位点。如果从兔分离可变区,则使用pMmCK S171C载体。通过使用侧接整个开放阅读框架的引物进行测序来确认克隆事件。

[0639] 培养CHOSXE:将CHOSXE悬浮细胞预先适应于补充有2mM(100x) glutamx的CDCHO培养基(Invitrogen)。在振荡培养箱(Kuner AG,Birsfelden,Switzerland)上将细胞维持在对数生长期,以140rpm摇动,并在补充有8%CO<sub>2</sub>的37°C下培养。

[0640] 电穿孔转染:在转染前,使用CEDEX细胞计数器(Innovatis AG,Bielefeld,Germany)测定细胞数和活力,将所需量的细胞( $2 \times 10^8$ 个细胞/ml)转移到离心锥形管中,并以1400rpm离心10分钟。将沉淀的细胞重悬于无菌Earls平衡盐溶液中,并以1400rpm再离心10分钟。弃去上清液,将沉淀重悬至所需的细胞密度。

[0641] 将800μl用于 $2 \times 10^8$ 个细胞/ml混合物的终浓度为400μg的载体DNA移液至比色杯(Biorad)中,并使用内部电穿孔系统进行电穿孔。

[0642] 分开转染Fab-A (Fab-scFv[A-X]) 和Fab-B (Fab-肽[B-Y])。

[0643] 将转染的细胞直接转移至含有富含2mM glutamx和抗生素抗有丝分裂(100X)溶液(1/500)的ProCHO 5培养基的1x3L锥形瓶中,并将细胞在设定为37°C,5%CO<sub>2</sub>和140rpm摇动的Kuhner振荡培养箱中培养。在转染后24小时添加补料2g/L ASF(AJINOMOTO),温度降至32°C,再培养13天。在第4天,向培养物中添加3mM的丙酮酸钠(正丁酸钠盐,Sigma B-5887)。

[0644] 在第14天,将培养物转移到管中,并在4000rpm离心30分钟后将细胞与上清液分离。将保留的上清液通过0.22μm SARTOBRAN®P Millipore,然后0.22μm Gamma金过滤器进一步过滤。通过蛋白G-HPLC测定最终表达水平。

[0645] 大规模(1.0L)纯化:使用AKTA Xpress系统和HisTrap Excel预包装镍柱(GE Healthcare)通过亲和捕获纯化Fab-A和Fab-B。将培养物上清液0.22μm无菌过滤,并且如果需要,在上样到柱子上之前用弱酸或碱将pH调节至中性。使用含有15-25mM咪唑的第二洗涤步骤来置换来自镍树脂的任何弱结合的宿主细胞蛋白/非特异性His结合物。用10mM磷酸钠、pH7.4+1M NaCl+250mM咪唑进行洗脱,收集2ml级分。将一个柱体积分添加至洗脱液中,将系统暂停10分钟以收紧洗脱峰,并因此减小总洗脱体积。合并最干净的级分并将缓冲液交换至PBS(Sigma),pH 7.4中以及进行0.22μm过滤。通过A280扫描、SE-HPLC(G3000方法)、SDS-PAGE(还原和非还原)测定最终汇集物,对于内毒素,使用PTS Endosafe系统。

[0646] 实施例5. 在异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物形式中使用Fab-A (Fab-scFv[AX]) 和Fab-B (Fab-肽[BY]) 以基于Akt信号传导的抑制(作为B细胞活化的量度)选择功能性二价和双特异性抗原靶组合

[0647] 根据一般方法1制备人PBMC。在此期间,通过在含有10%小牛血清和2mM谷氨酰胺的DMEM中稀释等摩尔(200nM)量的具有对细胞表面蛋白抗原3、抗原1、抗原4和抗原2的不同

抗原特异性的Fab'-A (Fab-scFv) 和Fab'-B (Fab-肽) 来制备双特异性或二价抗体的网格。该网格如表4所示。

[0648] 表4:对抗原3、抗原1、抗原4和2具有特异性的抗体的双特异性和二价组合的可能网格

(A-X) Fab A	(B-Y) Fab B			
	抗原 3-Y	抗原 1-Y	抗原 4-Y	抗原 2-Y
抗原 3-X	3-X: Y-3	3-X: Y-1	3-X: Y-4	3-X: Y-2
抗原 1-X	1-X: Y-3	1-X: Y-1	1-X: Y-4	1-X: Y-2
抗原 4-X	4-X: Y-3	4-X: Y-1	4-X: Y4	4-X: Y-2
抗原 2-X	2-X: Y-3	2-X: Y-1	2-X: Y-4	2-X: Y-2

[0651] 其中X是scFv (52SR4), Y是肽 (GCN4)

[0652] 在如实施例4中所述纯化后,根据一般方法2将Fab'A-X和Fab'B-Y与PMBC一起孵育。

[0653] 然后用荧光标记的抗CD20抗体 (BD Biosciences) 和荧光标记的抗磷酸Akt抗体对细胞进行染色,所述荧光标记的抗磷酸Akt抗体识别蛋白质上473位的经修饰的丝氨酸残基。然后将板重悬并在室温下于黑暗中孵育1小时。此后,将板再洗涤两次并重悬于25μl流式缓冲液中。使用Intellicyt HTFC™流式细胞仪测量CD20和Akt的细胞表达。

[0654] 使用数据分析软件包Forecyt™ (Intellicyt) 将B细胞鉴定为不同于其他细胞群体,并且计算每个孔的Akt水平的几何平均值。然后将所有数据表示为相对于最大应答 (仅抗IgM) 减去背景 (仅细胞) 的抑制百分数。针对抗原3的抗体 (VR0982)、针对抗原1的抗体 (VR4247)、针对抗原4的抗体 (VR4248) 和针对抗原2的抗体 (VR4246) 的组合的相对效应示于表5中 (↓=抑制,↑=刺激和↔=无总体效应)。箭头的数量指示活性的强度。

[0655] 表5:具有对抗原3、1、4和2的特异性的抗体的双特异性和二价组合对磷酸化Akt的抑制的相对效力的表

(A-X) Fab A 特异于	(B-Y) Fab B			
	抗原 3-Y	抗原 1-Y	抗原 4-Y	抗原 2-Y
抗原 3-X	↑ ↑	未测试到	↑ ↑	↓ ↓ ↓
抗原 1-X	↔	↔	↔	↓ ↓ ↓ ↓
抗原 4-X	未测试到	未测试到	未测试到	未测试到
抗原 2-X	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓	↔

[0657] 其中X是scFv (52SR4), Y是肽 (GCN4)

[0658] 该数据也以直方图的形式显示 (图7):平均值和误差条显示95%的置信区间。数据显示,针对抗原3的Fab (VR0982) 与针对抗原2的Fab (VR4246)、针对抗原1的Fab (VR4247) 与针对抗原2的Fab (VR4246) 和针对抗原4的Fab (VR4248) 与针对抗原2的Fab (VR4246) 的组合

都能抑制用抗IgM刺激的B细胞中的磷酸-Akt表达。相反,针对抗原3的Fab (VR0982) 与针对抗原3的Fab (VR0982) 和针对抗原3的Fab (VR0982) 与针对抗原4的Fab (VR4248) 的组合表现出升高的磷酸-Akt表达水平。所有其他测试的组合没有显示效果。

[0659] 实施例6. 使用异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物形式, 基于PLCg2信号传导的抑制(作为B细胞活化的量度) 选择功能性、二价和双特异性抗原靶组合

[0660] 根据一般方法1制备人PBMC。在此期间, 通过在含有10%小牛血清和2mM谷氨酰胺的DMEM中稀释等摩尔(200nM) 量的具有对细胞表面蛋白抗原3、抗原1、抗原4和抗原2的抗原特异性的Fab'-A (Fab-scFv[A-X]) 和Fab'-B (Fab-肽[B-Y]) 产生双特异性或二价抗体的网格。该网格示于表6中。

[0661] 根据一般方法2孵育Fab'A-X和Fab'B-Y。

[0662] 然后用荧光标记的抗CD20抗体(BD Biosciences) 和荧光标记的抗磷酸PLCg2抗体对细胞进行染色, 所述荧光标记的抗磷酸PLCg2抗体识别蛋白质上759位的经修饰的酪氨酸残基。然后将板重悬并在室温下于黑暗中孵育1小时。此后, 将板洗涤两次并重悬于25μl流式缓冲液中。使用Intellicyt HTFC™流式细胞仪测量CD20和PLCg2的细胞表达。

[0663] 使用数据分析软件包Forecyt™(Intellicyt) 将B细胞鉴定为不同于其他细胞群体, 并且计算每个孔的PLCg2水平的几何平均值。然后将所有数据表示为相对于最大应答(仅抗IgM) 减去背景(仅细胞) 的抑制百分数。针对抗原3、抗原1、抗原4和抗原2的“抗体”组合的相对效应显示于表6中(↓=抑制, ↑=刺激, ↔=无总体效应)。箭头的数量指示活性的强度。

[0664] 表6: 具有对抗原3、1、4和2的特异性的抗体的双特异性和二价组合对磷酸化PLCg2的抑制的相对效力的表

(A-X) Fab A 特异于	(B-Y) Fab B			
	抗原 3-Y	抗原 1-Y	抗原 4-Y	抗原 2-Y
抗原 3-X	↑	未测试到	↑↑	↓↓↓
1-X	↔	↔	↔	↓↓
4-X	未测试到	未测试到	未测试到	未测试到
2-X	↓↓↓	↓↓	↓↓↓	↔

[0666] 其中X是scFv, Y是肽

[0667] 该数据也表示为直方图(图8), 显示平均值和误差条为95%的置信区间。数据显示, 针对抗原3的Fab (VR0982) 与针对抗原2的Fab (VR4246)、针对抗原1的Fab (VR4247) 与针对抗原2的Fab (VR4246)、针对抗原4的Fab (VR4248) 与针对抗原2的Fab (VR4246) 的组合全都能够抑制用抗IgM刺激的B细胞中的磷酸-PLCg2表达。相反, 针对抗原3的Fab (VR0982) 与针对抗原3的Fab (VR0982) 和针对抗原3的Fab (VR0982) 与针对抗原4的Fab (VR4248) 的组合显示出升高的磷酸-PLCg2表达水平。针对抗原1的Fab与针对抗原1的Fab的组合没有显示效果。

[0668] 实施例7. 使用异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物形式, 基于对CD86表达的抑制(作为B细胞活化的量度) 选择功能性、二价和双特异性抗原靶组合

[0669] 根据一般方法1制备人PBMC。在此期间,通过在含有10%小牛血清和2mM谷氨酰胺的DMEM中稀释等摩尔(200nM)量的具有对细胞表面蛋白抗原3、抗原1、抗原4和抗原2的抗原特异性的Fab'-X (Fab-scFv) 和Fab'-Y (Fab-肽) 来产生双特异性或二价抗体的网格。该网格示于表7中。

[0670] 将Fab'A-X和Fab'B-Y一起孵育90分钟(在37°C和5%CO<sub>2</sub>环境中),然后与2.5x10<sup>5</sup>个PBMC在V型底96孔板中混合。然后将PBMC加双特异性或二价的组合一起孵育另外90分钟。此后,通过在37°C下加入200nM山羊F(ab')<sub>2</sub>抗人IgM(Southern Biotechnology)进行24小时来活化B细胞。此后,将板置于冰上,并在冰冷的流式缓冲液(PBS+1%BSA+0.01%NaN<sub>3</sub>)中洗涤一次。然后用荧光标记的抗CD19抗体(BD Biosciences)和荧光标记的抗CD86抗体对细胞进行染色,并在冰上在黑暗中孵育1小时。此后,将板再洗涤两次并重悬于25μl流式缓冲液中。使用Intellicyt HTFC™流式细胞仪测量CD19和CD86的细胞表达。

[0671] 使用数据分析软件包Forecyt™(Intellicyt)将B细胞鉴定为不同于其他细胞群体,并且计算每个孔的CD86水平的几何平均值。然后将所有数据表示为相对于最大应答(仅抗IgM)减去背景(仅细胞)的抑制百分数。针对抗原3的Fab (VR0982)、针对抗原1的Fab (VR4247)、针对抗原4的Fab (VR4248) 和针对抗原2的Fab (VR4246) 的组合的相对效示于表7中(↓=抑制,↑=刺激和↔=没有总体效应)。箭头数量指示活性的强度。

[0672] 表7:具有对抗原1、3、4和2的特异性的抗体的双特异性和二价组合对B细胞CD86表达的抑制的相对效力的表

(A-X) 特异于...的 Fab A	(B-Y) Fab B			
	抗原 3-Y	抗原 1-Y	抗原 4-Y	抗原 2-Y
[0673] 抗原 3-X	↑	未测试到	↔	↓↓↓
抗原 1-X	↔	↔	↑↑	↔
抗原 4-X	未测试到	未测试到	未测试到	未测试到
抗原 2-X	↓↓↓	↓	↓↓↓↓	↓↓

[0674] 其中X是scFv (52SR4), Y是肽(GCN4)

[0675] 该数据也显示为直方图(图9),平均值和误差条是95%的置信区间。数据显示,针对抗原3的Fab (VR0982) 与针对抗原2的Fab (VR4246)、针对抗原1的Fab (VR4247) 与针对抗原2的Fab (VR4246)、针对抗原4的Fab (VR4248) 与针对抗原2的Fab (VR4246) 和针对抗原2的Fab (VR4246) 与针对抗原2的Fab (VR4246) 的组合都能抑制用抗IgM刺激的B细胞上的CD86表达。相反,针对抗原3的Fab (VR0982) 与针对抗原3的Fab (VR0982) 的组合和针对抗原1的Fab (VR4247) 与针对抗原4的Fab (VR4248) 的组合显示出升高的CD86表达水平。所有其他测试的组合没有显示效应。

[0676] 实施例8只有当将抗体以双特异性取向排列时,才能再现针对抗原1的Fab (VR4247) 和针对抗原2的Fab (VR4246) 的抑制作用

[0677] 根据一般方法1制备人PBMC。在此期间,通过在含有10%小牛血清和2mM谷氨酰胺

的DMEM中稀释等摩尔(200nM)量的具有对细胞表面蛋白抗原1和抗原2的抗原特异性的Fab' A-X (Fab-scFv) 和/或Fab' B-Y (Fab-肽) 产生抗体的双特异性、二价或混合物的组合。另外还添加单Fab对照 (Fab'-X和Fab'-Y)。这些组合示于表8中。

[0678] 表8:具有对抗原1和抗原2的特异性的双特异性、二价、混合物或单Fab' 的网格

(A-X) Fab A 特异于	(B-Y) Fab B			
	-	抗原 1-Y	抗原 2-Y	抗原 2-X
抗原 1-X	1-X	1-X: Y-1	1-X: Y-2	1-X X-2
抗原 2-X	2-X	2-X: Y-1	2-X: Y-2	-
抗原 1-Y	1-Y	-	1-Y Y-2	-
抗原 2-Y	2-Y	-	-	-

[0680] 其中X是scFv (52SR4), Y是肽 (GCN4)

[0681] 根据一般方法2孵育Fab' A-X和/或Fab' B-Y。

[0682] 然后用荧光标记的抗CD20抗体 (BD Biosciences) 和荧光标记的抗磷酸Akt抗体对细胞进行染色, 所述荧光标记的抗磷酸Akt抗体识别蛋白质上473位的经修饰的丝氨酸残基。然后将板重悬并在室温下于黑暗中孵育1小时。此后, 将板再洗涤两次并重悬于25μl流式缓冲液中。使用Intellicyt HTFC™流式细胞仪测量CD20和Akt的细胞表达。

[0683] 使用数据分析软件包Forecyt™ (Intellicyt) 将B细胞鉴定为不同于其他细胞群体, 并且计算每个孔的Akt水平的几何平均值。然后将所有数据表示为相对于最大应答 (仅抗IgM) 减去背景 (仅细胞) 的抑制百分数。图10显示, 只有针对抗原1的Fab (VR4247) 和针对抗原2的Fab (VR4246) 的双特异性组合而非任何其它组合可以调节B细胞磷酸-Akt水平 (数据表示平均值, 误差条为95%的置信区间)。

[0684] 实施例9. 只有当抗体以双特异性取向排列时, 才能再现抗抗原3 (VR0982) 和抗抗原2 (VR4246) 的抑制效应

[0685] 根据一般方法1制备人PBMC。在此期间, 通过在含有10%小牛血清和2mM谷氨酰胺的DMEM中稀释等摩尔(200nM)量的具有对细胞表面蛋白抗原1和抗原2的抗原特异性的Fab'-X (Fab-scFv) 和/或Fab'-Y (Fab-肽) 产生抗体的双特异性、二价或混合物的组合。这些组合示于表9中。

[0686] 表9:具有对抗原3和2的特异性的双特异性、二价或混合物的网格

(A-X) Fab A 特异于	(B-Y) Fab B		
	抗原 3-Y	抗原 2-Y	抗原 2-X
抗原 3-X	3-X: Y-3	3-X: Y-2	3-X X-2
抗原 2-X	2-X: Y-3	2-X: Y-2	-
抗原 3-Y	-	3-Y Y-2	-

[0688] 其中X是scFv (52SR4), Y是肽 (GCN4)

[0689] 根据一般方法2孵育Fab' A-X和/或Fab' B-Y。



[0690] 然后根据一般方法3将细胞染色。

[0691] 使用数据分析软件包Forecyt™ (Intellicyt) 将B细胞鉴定为不同于其他细胞群体,并且计算每个孔的Akt和PLCg2水平的几何平均值。然后将所有数据表示为相对于最大应答(仅抗IgM)减去背景(仅细胞)的抑制百分数。图11和12显示,只有对抗原3和抗原2的双特异性组合而非抗抗原3 (VR0982) 和抗抗原2 (VR4246) 抗体的混合物抑制磷酸化的Akt和PLCg2表达(数据表示平均值,误差条是95%的置信区间)。

[0692] 为了验证用对抗原3和抗原2的双特异性组合所观察到的抑制,滴定该组合连同抗抗原3 (VR0982) 和抗抗原2 (VR4246) 抗体的混合物,并在B细胞中测量总细胞内IκB(信号传导出数据)和CD86(24小时后的活化标志物)的抑制。

[0693] 如从图13中可以看出的,抗原-3-X/抗原-2-Y的组合而非抗原-3-X/抗原-2-X的组合(即,作为简单的未连接的混合物)能够在抗IgM刺激后抑制NF-κB信号活化,如通过总IκB蛋白的水平测量的。如使用Graphpad Prism 6利用4参数对数曲线拟合外推的IC<sub>50</sub>为7.5nM(数据表示平均值,误差条是标准偏差)。另外,抗原-3-X/抗原-2-Y的组合而非抗原-3-X/抗原-2-X的组合的滴定能够在24小时后抑制抗IgM诱导的B细胞上CD86表达(参见图14)。如使用Graphpad Prism 6利用4参数对数曲线拟合外推的IC<sub>50</sub>为10.3nM(数据表示平均值,误差条为标准偏差)。

[0694] 实施例10. 只有当抗体以双特异性取向排列时,才能再现抗抗原4和抗抗原2的抑制效应

[0695] 根据一般方法1制备人PBMC。在此期间,通过在含有10%小牛血清和2mM谷氨酰胺的DMEM中稀释等摩尔(200nM)量的具有对细胞表面蛋白抗原4和抗原2的抗原特异性的Fab' A-X (Fab-scFv) 和/或Fab' B-Y (Fab-肽) 产生抗体的双特异性、二价或混合物的组合。这些组合示于表10中。

[0696] 表10:具有对抗原4和2的特异性的双特异性、二价或混合物的网格

(A-X) Fab A	(B-Y) Fab B	
	抗原 2-X	抗原 2-Y
抗原 4-Y	2-X: Y-4	4-Y Y-2
抗原 2-X	-	2-X: Y-2

[0698] 其中X是scFv (52SR4), Y是肽 (GCN4)

[0699] 根据一般方法2孵育Fab' A-X和/或Fab' B-Y。然后根据一般方法3将细胞染色。

[0700] 使用数据分析软件包Forecyt™ (Intellicyt) 将B细胞鉴定为不同于其他细胞群体,并且计算每个孔的Akt和PLCg2水平的几何平均值。然后将所有数据表示为相对于最大应答(仅抗IgM)减去背景(仅细胞)的抑制百分数。

[0701] 图15和16显示只有抗抗原4 (VR4248) 和抗抗原2 (VR4246) 的双特异性组合而非抗抗原4 (VR4248) 和抗抗原2 (VR4246) 抗体的混合物抑制磷酸化的Akt和PLCg2表达(数据表示平均值,误差条为95%的置信区间)。

[0702] 为了验证用抗抗原4 (VR4248) 和抗抗原2 (VR4246) 的双特异性组合所观察到的抑制,在测量抗IgM诱导的B细胞上的CD86表达的测定系统中滴定该组合。

[0703] 如从图17可看出的,24小时后,抗原4-X/抗原2-Y的组合的滴定能够抑制抗IgM诱导的B细胞上的CD86表达。如使用Graphpad Prism 6利用4参数对数曲线拟合外推的 $IC_{50}$ 为4.7nM(数据表示平均值,误差条是标准偏差)。

[0704] 实施例11. 双特异性复合物的表征

[0705] 功能筛选试剂的纯化:在标准CHO表达后,如下纯化功能筛选形式Fab-X (Fab-scFv-His) 和Fab-Y (Fab-肽-His)。使用1L stericup将澄清的细胞培养物上清液进行0.22 $\mu$ l 1无菌过滤。测量pH,并且必要时调节至pH 7.4。将制备的上清液以5ml/min上样到在10mM磷酸钠,0.5M NaCl,pH 7.4中平衡的5ml HisTrap Nickel Excel (GE Healthcare) 柱上。柱子用15mM咪唑、10mM磷酸钠、0.5M NaCl、pH 7.4洗涤,然后用250mM咪唑、10mM磷酸钠、0.5M NaCl、pH 7.4洗脱。洗脱后通过在280nm处的吸光度进行检测,收集洗脱峰。通过在TSKgel G3000SWXL上进行尺寸排阻层析法来分析峰洗脱;5 $\mu$ m、7.8x300 mm柱,用等度梯度的0.2M磷酸盐、pH7.0以1ml/min展开 (develop),通过在280nm处的吸光度进行检测。将足够纯度的样品浓缩至>1m/ml,并使用具有10kDa截留分子量膜的Amicon Ultra-15浓缩器和在水平转头中以4000xg离心的方式渗滤入PBS pH7.4 (Sigma Aldrich Chemicals) 中。当产物质量不足时,将镍柱洗脱液浓缩并施加至在PBS、pH 7.4 (Sigma Aldrich Chemicals) 中平衡的XK16/60或XK16/60Superdex200 (GE Healthcare) 柱。用等度梯度的PBS、pH 7.4 (Sigma Aldrich Chemicals) 分别以1ml/min或2.6ml/min展开。收集级分并通过在TSKgel G3000SWXL上的尺寸排阻层析法进行分析;5 $\mu$ m、7.8x300 mm柱子,用等度梯度的0.2M磷酸盐、pH7.0以1ml/min展开,通过在280nm处的吸光度进行检测。合并所选择的级分,使用具有10kDa截留分子量膜的Amicon Ultra-15浓缩器并在水平转头中以4000xg离心浓缩至>1mg/ml。

[0706] 在溶液中分析双特异性形成

[0707] 实验1

[0708] 将纯化的Fab-X (VR4247) 和纯化的Fab-Y (VR4248) 以1:1的摩尔比混合,总蛋白浓度为500 $\mu$ g/ml,并在环境温度下孵育过夜。对照由混合物的个体部分组成,其浓度与它们在混合物中的浓度相同。将100 $\mu$ l样品和每个对照物注射至TSKgel G3000SWXL上;5 $\mu$ m、7.8x300 mm柱,用等度梯度的0.2M磷酸盐、pH 7.0以1ml/min展开。通过在280nm处的吸光度进行检测(参见图18)。

[0709] 图18的尺寸排阻层析图显示,Fab-X (VR4247) 对照具有92%的总峰面积的主峰,保留时间为8.610公制分钟。Fab-Y (VR4248) 对照具有94%的总峰面积的主峰,保留时间为10.767公制分钟。通过使用由在相同条件下运行的BioRad凝胶过滤标准品(151-1901)的保留时间产生的标准曲线,分别将针对Fab-X和Fab-Y对照测量的保留时间转化为95kDa和35kDa的表观分子量。这些表观分子量与Fab-scFv和Fab-肽分子的预期表观分子量一致。Fab-X (VR4247) /Fab-Y (VR4248) 混合物的主峰具有9.289公制分钟的保留时间。如上将其转化为187kDa的表观分子量。该表观分子量与一个Fab-X (VR4247) 与一个Fab-Y (VR4248) 的配对所预期的一致。主峰也是总峰面积的84%,表明大多数Fab-X (VR4247) 和Fab-Y (VR4248) 已经形成了1:1的双特异性蛋白质复合物。在主峰之后洗脱的小的另外的肩和峰与Fab-X (VR4247) 和Fab-Y (VR4248) 起始材料一致。

[0710] 实验2

[0711] 将纯化的Fab-X (VR4130) 和Fab-Y (VR4131) 以1:1的摩尔比混合,总蛋白浓度为500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。然后将该混合物的等分试样用PBS pH 7.4稀释至50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度。还建立了由与它们在500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 混合物中的浓度相同浓度的混合物的个体部分组成的对照。将所有混合物和对照在环境温度下孵育过夜。将100 $\mu\text{l}$ 的所有样品和对照物注射至TSKgel G3000SWXL上;5 $\mu\text{m}$ 、7.8 $\times$ 300mm柱,用等度梯度的0.2M磷酸盐、pH7.0以1ml/min展开。通过在214nm的吸光度进行检测(参见图19、图20和表11)。

[0712] 图19中的尺寸排阻层析图显示Fab-X (VR4130) 对照具有91%的总峰面积的主峰,保留时间为8.634公制分钟。Fab-Y (VR4131) 对照具有97%的总峰面积的主峰,保留时间为9.361公制分钟。通过使用从在相同条件下运行的BioRad凝胶过滤标准品(151-1901)的保留时间产生的标准曲线,分别将对于Fab-X和Fab-Y对照测量的保留时间转化为109kDa和55kDa的表观分子量。这些表观分子量与Fab-scFv和Fab-肽分子的预期表观分子量一致。Fab-X (VR4130) /Fab-Y (VR4131) 混合物的主峰具有8.016公制分钟的保留时间。将其如上转化为198kDa的表观分子量。该表观分子量与一个Fab-X (VR4130) 与一个Fab-Y (VR4131) 的配对所预期的一致。主峰也是82%的总峰面积,这表明大多数Fab-X (VR4130) 和Fab-Y (VR4131) 已经形成1:1复合物。在主峰之后洗脱的两个小峰与Fab-X (VR4130) 和Fab-Y (VR4131) 起始材料一致。

[0713] 图20中的尺寸排阻层析图是针对500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的Fab-X (VR4130) /Fab-Y (VR4131) 的1:1混合物的。所有迹线与具有相似保留时间和相似相对峰高度和面积的样品之间的对应峰类似。在表11中比较了峰面积百分数,其中每个峰的百分数在混合物稀释时保持相当恒定。这表明Fab-X/Fab-Y 1:1复合物在所有测试浓度下保持为复合物。即使当将混合物稀释至5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时(这相当于40nM的复合物的浓度),75%的Fab-X和Fab-Y作为1:1的复合物存在。

[0714] 表11:500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的Fab-X (VR 4130) /Fab-Y (VR4131) 1:1摩尔比混合物的尺寸排阻峰面积数据。在214nm处检测峰的吸光度

浓度		峰面积%		
$\mu\text{g}/\text{ml}$	nM	Fab-X (VR4130) /Fab-Y (VR4131) 1:1 复合物	Fab-X (VR4130)	Fab-Y (VR4131)
500	4000	82%	4%	5%
50	400	81%	11%	3%
5	40	75%	21%	3%

[0717] 因此,这些实验的结果表明,高比例的Fab-X和Fab-Y融合蛋白形成所需的双特异性复合物,留下最少比例的单体,并且没有同二聚体形成的证据。

[0718] 实施例12:网格筛选异二聚体系链束缚的蛋白质复合物的大组以鉴定新型双特异性抗体靶。

[0719] 引言:在较早实施例中在双特异性形式和筛选方法的成功验证之后,将筛选扩展到更大数量的抗原对。产生针对B细胞上表达的23种不同抗原的一小组抗体可变(V)区对。

使用Fab-Kd-Fab[即A-X:Y-B,其中A和B是Fab片段]形式,形成异二聚体系链束缚的蛋白质复合物的网格,其代表315种不同抗原对组合中的每一种的多种V区组合。在高通量流式细胞术测定中筛选这些组合的调节BCR(B细胞受体)信号传导的能力,以选择用于利用双特异性抗体干预的新型靶对。

[0720] **免疫:**通过基因合成或商业来源获得编码所选抗原的DNA,并克隆入具有强组成型启动子的表达载体中。然后使用内部电穿孔系统将质粒DNA转染入Rab-9兔成纤维细胞(ATCC®CRL-1414™)中。24小时后,通过流式细胞术检查细胞的抗原表达,并在液氮中以等分试样冷冻直至使用。通过在相同细胞上共表达或制备单一或多个转染细胞的混合物,每只兔免疫至多6种抗原。用3剂量的细胞免疫兔。

[0721] **抗体发现:**使用与Zubler等(1985)描述的方法类似的方法制备B细胞培养物。简言之,将来自免疫兔的脾或PBMC衍生的B细胞以约2000-5000个细胞/孔的密度在具有200 $\mu$ l/孔RPMI 1640培养基(Gibco BRL)的条形码编码的96孔组织培养板中于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>气氛中培养7天,所述RPMI 1640培养基补充有10%FCS(PAA laboratories l td),2%HEPES(Sigma Aldrich),1%L-谷氨酰胺(Gibco BRL),1%青霉素/链霉素溶液(Gibco BRL),0.1% $\beta$ -巯基乙醇(Gibco BRL),3%活化的脾细胞培养物上清液和 $\gamma$ 辐照的突变型EL4鼠胸腺瘤细胞(5x10<sup>4</sup>/孔)。

[0722] 使用基于均匀荧光的结合测定、使用与用于免疫兔的抗原共转染的HEK293细胞来测定B细胞培养物上清液中的抗原特异性抗体的存在。筛选涉及使用Matrix Platemate液体处理器将10 $\mu$ l来自条形码编码的96孔组织培养板的上清液转移至含有靶抗原转染的HEK293细胞(约3000个细胞/孔)的条形码编码的384孔黑壁测定板中。用山羊抗兔IgG Fc $\gamma$ 特异性Cy-5缀合物(Jackson)显示结合。在Applied Biosystems 8200细胞检测系统上读板。

[0723] 初次筛选后,使用Aviso Onyx随机样品挑选(hit-picking)机器人将阳性上清液固定在96孔条形码编码的母板上,并将细胞培养板中的B细胞在-80 $^{\circ}$ C冷冻。然后在基于均匀荧光的结合测定中,在分开用抗原转染的HEK293细胞和用重组蛋白作为抗原来源的Superavidin™珠(Bangs Laboratories)上筛选母板。这样做是为了测定每个孔的抗原特异性。

[0724] 为了允许从目标孔的选择中回收抗体可变区基因,进行去卷积步骤以使得能够鉴定含有异质B细胞群的给定孔中的抗原特异性B细胞。这使用荧光焦点法(Clargo等,2014.Mabs 2014Jan 1:6(1)143-159;EP1570267B1)来实现。简言之,将来自阳性孔的分泌免疫球蛋白的B细胞与用靶抗原转染的HEK293细胞或用生物素化的靶抗原包被的链霉抗生物素蛋白珠(New England Biolabs)和山羊抗兔Fc $\gamma$ 片段特异性FITC缀合物(Jackson)的1:1200最终稀释液混合。在37 $^{\circ}$ C下静态孵育1小时后,由于围绕B细胞的荧光晕的存在,可鉴定抗原特异性B细胞。然后用Eppendorf微操作器挑取使用奥林巴斯显微镜鉴定的多个这些个体B细胞克隆并沉积至PCR管中。荧光焦点法也用于从直接来自免疫兔的骨髓的B细胞的异质群体中鉴定抗原特异性B细胞。

[0725] 使用重链和轻链可变区特异性引物通过逆转录(RT)-PCR从单个细胞中回收抗体可变区基因。进行两轮PCR,巢式二级PCR在3'和5'末端引入限制性位点,从而允许将可变区克隆入小鼠Fab-X和Fab-Y(VH)或小鼠 $\kappa$ (VL)哺乳动物表达载体中。使用Fectin 293(Life

Technologies) 或Expi293细胞,使用Expifectamine (Life Technologies) 将Fab-X和Fab-Y表达载体的重链和轻链构建体共转染入HEK-293细胞中,并在6孔组织培养板中在5ml的体积中表达重组抗体。在表达5-7天后,收获上清液。在对用抗原转染的HEK293细胞和包被有重组蛋白或抗原转染的HEK细胞的Superavidin™珠 (Bangs Laboratories) 的基于均匀荧光的结合测定中测试上清液。这样做是为了确认克隆的抗体的特异性。

[0726] 小规模生产Fab A-X和Fab B-Y(小规模(50mL) Expi293转染)

[0727] 将Expi293细胞在Expi293™表达培养基中常规地继代培养至终浓度为 $0.5 \times 10^6$ 个活细胞/mL,并在回转式摇动培养箱 (Multitron, Infors HT) 中在120rpm, 8%CO<sub>2</sub>和37°C下进行孵育。

[0728] 在转染当天,使用自动细胞计数器 (Vi-CELL, Beckman Coulter) 测量细胞活力和浓度。为了达到 $2.5 \times 10^6$ 个活细胞/mL的最终细胞浓度,将适当体积的细胞悬浮液添加至无菌的250mL锥形摇瓶中,对于每个50ml转染,通过添加新鲜的预温热的Expi293™表达培养基来达到42.5mL的体积。

[0729] 为了为每次转染制备脂质-DNA复合物,将总共50μg的重链和轻链质粒DNA在**Opti-MEM®** I培养基 (LifeTechnologies) 中稀释至总体积为2.5mL,并将135μl的ExpiFectamine™ 293试剂 (Life Technologies) 在**Opti-MEM®** I培养基中稀释至总体积为2.5mL。将所有稀释液轻轻混合并在室温下孵育不超过5分钟,然后将每种DNA溶液加入各稀释的ExpiFectamine™ 293试剂中,以获得5mL的总体积。轻轻混合DNA-ExpiFectamine™ 293试剂混合物,并在室温下孵育20-30分钟,以形成DNA-ExpiFectamine™ 293试剂复合物。

[0730] 在DNA-ExpiFectamine™ 293试剂复合物孵育完成后,将5mL DNA-ExpiFectamine™ 293试剂复合物添加至每个摇瓶中。将摇瓶在回转式摇动培养箱 (Multitron, Infors HT) 中以120rpm, 8%CO<sub>2</sub>和37°C进行孵育。

[0731] 转染后约16-18小时,向每个摇瓶中添加250μl的ExpiFectamine™ 293转染增强剂1 (LifeTechnologies) 和2.5mL的ExpiFectamine™ 293转染增强剂2 (LifeTechnologies)。

[0732] 转染后7天收获细胞培养物。将细胞转移到50mL旋转管 (Falcon) 中并以4000rpm离心30分钟,然后通过0.22μm Stericup (Merck Millipore) 无菌过滤。将澄清和无菌过滤的上清液在4°C下储存。通过蛋白G-HPLC测定最终表达水平。

[0733] 小规模(50ml)纯化:使用基于真空的小规模纯化系统通过亲和捕获分别纯化Fab-X和Fab-Y二者。简言之,将50ml培养物上清液进行0.22μm无菌过滤,然后添加500μl Ni Sepharose珠 (GE Healthcare)。然后将上清液珠混合物翻滚约1小时,然后通过施加真空除去上清液。然后用洗涤液1 (50mM磷酸钠、1M NaCl、pH 6.2) 和洗涤液2 (0.5M NaCl) 洗涤珠子。用50mM醋酸钠、pH 4.0+1M NaCl进行洗脱。将洗脱的级分缓冲液交换至PBS (Sigma)、pH 7.4,并进行0.22μm过滤。通过A280扫描、SE-UPLC (BEH200方法)、SDS-PAGE (还原和非还原) 测定最终汇集物,对于内毒素,使用PTS Endosafe系统。

[0734] 筛选测定

[0735] 使用设定为37°C的水浴将供体PBMC快速解冻,并小心地转移至50ml Falcon管中。然后将它们在测定培养基中逐滴稀释至5ml,以使渗透性休克最小化。然后将细胞仔细稀释至20ml,然后添加最终的培养基稀释剂以使体积为50ml。然后将细胞以500g离心5分钟,然

后除去上清液并将细胞重悬于1ml培养基中。然后计数细胞并稀释至 $1.66 \times 10^6$ 个细胞/ml，然后以每孔30 $\mu$ l分配至V-底TC板中，最终测定浓度为 $5.0 \times 10^4$ 个细胞/孔。然后将细胞板存储被覆盖在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中，直到需要它们，给予它们至少1小时休息。

[0736] 以测定培养基中5x的最终测定浓度将Fab-X和Fab-Y试剂以等摩尔比混合，并在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下孵育90分钟。在96孔U形底聚丙烯板中制备样品，并在孵育期间覆盖。

[0737] 将10 $\mu$ l 5x Fab-KD-Fab混合物添加到含有细胞的合适的测试孔中，并通过以1000rpm摇动混合30秒，然后在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下孵育90分钟。

[0738] 然后用10 $\mu$ l抗人IgM刺激细胞。刺激物的最终测定浓度根据测定小组读出数据而变化，三种抗体混合物A、B和C(在下文中详述的)以50 $\mu$ g/ml(混合物A和C)或25 $\mu$ g/ml(混合物B)的最终测定浓度进行刺激。然后在于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育5分钟(抗体混合物A和C)或2分钟(抗体混合物B)之前，将测定板以1000rpm温和混合30秒。通过向所有孔中添加150 $\mu$ l冰冷的BD CytoFix来终止测定，并在室温下孵育15分钟。然后将固定的细胞以500g离心5分钟以沉淀细胞，并使用BioTek ELx405板洗涤器除去上清液。通过以2400rpm涡旋平板30秒来重悬沉淀物。然后通过添加100 $\mu$ l冰冷的BD细胞透化缓冲液III在4 $^{\circ}$ C下使细胞透化30分钟。然后将细胞在100 $\mu$ l FACS缓冲液中洗涤，并在500g离心5分钟。再次通过ELx405除去上清液，然后使用ELx405快速分配200 $\mu$ l FACS缓冲液以洗去任何残留的透化缓冲液。将细胞再次以500g离心，通过倒置除去上清液。在前述离心步骤过程中，在FACS缓冲液中制备抗体混合物并保持避光。然后通过涡旋(2400RPM, 30秒)将细胞重悬，然后向所有孔中添加20 $\mu$ l抗体混合物，并将板在1000rpm下摇动30秒。然后将细胞在室温下于黑暗中孵育60分钟。

[0739] 然后将细胞在200 $\mu$ l FACS缓冲液中通过500g离心洗涤两次，并在每个步骤后除去上清液。最后，通过以2400rpm涡旋30秒来重悬细胞，然后添加最终的20 $\mu$ l FACS缓冲液。然后在Intellicyt HTFC/iQue仪上读板。

[0740] FACS缓冲液= PBS+1%BSA+0.05%NaN<sub>3</sub>+2mM EDTA

[0741] 抗体混合物A=1:2CD20 PerCp-Cy5.5(BD Biosciences)+1:5PLC  $\gamma$  2AF88+1:10Akt AF647+1:50ERK1/2PE(稀释于FACS缓冲液中)。

[0742] 抗体混合物B=1:2CD20 PerCp-Cy5.5(BD Biosciences)+1:5Syk PE+1:5BLNK AF647(在FACS缓冲液中稀释)

[0743] 抗体混合物C=1:5CD20 PerCp-Cy5.5(Biolegend)+1:5PLC  $\gamma$  2AF488+1:10Akt AF647+1:5Syk PE(在FACS缓冲液中稀释)

试剂	供应商	目录号
抗人 IgM	Southern Biotech	2022-14
[0744] CytoFix	BD Biosciences	554655
Perm 缓冲液 III	BD Biosciences	558050
抗 Akt (pS473) AF647	BD Biosciences	561670

	抗 SYK (pY348) PE	BD Biosciences	558529
	抗 PLC $\gamma$ 2 (pY759) AF488	BD Biosciences	558507
	抗 BLNK (pY84) AF647	BD Biosciences	558443
	抗 ERK1/2 (pT202/pY204) PE	BD Biosciences	561991
	抗人 CD20 PerCp-Cy5.5	BD Biosciences	558021
	抗人 CD20 AF488	BD Biosciences	558056
	抗人 CD20 PerCp-Cy5.5	Biolegend	340508
[0745]	磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS)	Fisher Scientific	10562765
	RPMI 1640	Life Technologies	31870
	胎牛血清 (FCS)	Life Technologies	16140
	Glutamax	Life Technologies	35050
	青霉素/金霉素 (P/S)	Life Technologies	15070
	EDTA	Sigma	03690
	叠氮化钠 (NaN <sub>3</sub> )	Sigma	S2002
	牛血清白蛋白 (BSA)	Sigma	A1470

[0746] 用抗体混合物A和B或单独的C筛选Fab-X+Fab-Y组合。所有筛选在来自2个不同供血者的锥细胞上进行。使用商购可得软件工具捕获和评价数据。针对315种不同抗原组合筛选总共2500个Fab-X+Fab-Y组合。

[0747] 结果

[0748] 计算每个Fab-Kd-Fab[即,A-X:Y-B,其中A和B是Fab片段]组合对BCR信号传导级联蛋白的磷酸化的诱导的抑制百分数,在本实施例中寻找抑制B细胞功能的抗原的新组合,阳性组合的标准被设定为至少一个V区组合对至少两个磷酸读出数据的至少30%的抑制。根据该阈值,在315个检查中有11个新抗原对组合满足所要求的标准。这代表3.5%的命中率,证明了筛选大量组合以找到所需活性的重要性。

[0749] 图21-23显示了抗原网络的交叉特异性的数据。值分别为Syk、PLC $\gamma$ 2和AKT的磷酸化的抑制百分数(活化的负值),并且表示所评估的多个V区组合的平均值。测试了315种不同的抗原组合,并且可以看出,不同抗体组合对BCR信号传导的影响从强抑制(例如,Fab-X上的抗原2与Fab-Y上的抗原3和4的组合(69.66%和70.4%的对磷酸Syk的抑制,图21))至活化(例如X上的抗原6和Y上的抗原11(负的118.10%磷酸Syk,图21))显著变化。

[0750] 对于Fab-X上的抗原2和Fab-Y上的抗原3,在图24中显示了代表图21-23中所示的平均%值的每个数据点。在该情况下,评价了不同抗体V区的23种不同组合。相同但为替代取向的抗原组合,即Fab-Y上的抗原2和Fab-X上的抗原3示于图25中。在该情况下,评价了不同抗体V区的9种不同组合。所有V区显示抑制,但有利地该方法也可用于选择最佳V区组合。

[0751] 类似地,对于Fab-X上的抗原2和Fab-Y上的抗原4的组合,在图26中显示了代表图21-23中所示的平均%值的每个数据点。在该情况下,评价了不同抗体V区的10种不同组合。

相同但为替代取向的抗原组合,即Fab-Y上的抗原2和Fab-X上的抗原4显示于图27中。在该情况下,评估了不同抗体V区的6种不同组合。再次,所有V区显示抑制,但是可使用该方法鉴定和选择最佳V区组合。

[0752] 实施例13.评价瞬时表达的异二聚体系链束缚的蛋白质复合物以评价FabA-X:Y-FabB网格筛选是否可以鉴定新型双特异性抗体靶而不求助于蛋白纯化

[0753] 引言:将使用Fab-Kd-Fab[FabA-X:Y-FabB]形式和异二聚体系链束缚的蛋白质复合物的网格筛选所鉴定的作为双特异性抗体抑制B细胞信号传导的2种不同抗原2和3的V区,瞬时表达为FabA-X和FabB-Y。比较瞬时表达(无后续纯化)与纯化的FabA-X和FabB-Y组合的活性,以评估是否可用瞬时表达的直接产物代替纯化的组分来进行网格筛选。

[0754] 免疫:以与实施例12中所述相同的方式进行抗原表达细胞的制备和兔的免疫。

[0755] 抗体发现

[0756] 以与实施例12中所述相同的方式制备B细胞培养物。

[0757] 以与实施例12中所述相同的方式确定在B细胞培养物上清液中的抗原特异性抗体的筛选和用于鉴定抗原特异性B细胞的去卷积步骤。

[0758] 通过使用重链和轻链可变区特异性引物的逆转录(RT)-PCR从单个细胞中回收抗体可变区基因。进行两轮PCR,巢式2°PCR在3'和5'末端引入限制性位点,从而允许将可变区克隆入小鼠Fab-X和Fab-Y(VH)或小鼠κ(VL)哺乳动物表达载体中。然后进行3°PCR,以使得扩增的可变区、人CMV启动子片段和兔γ1重链恒定或兔κ恒定片段的组合能够产生分开的重链和轻链转录活性PCR(TAP)片段。这些DNA片段直接用于在HEK-293细胞(使用293Fectin(Life Technologies))中或在Expi293细胞中(使用Expifectamine(Life Technologies))重组表达兔全长IgG抗体。

[0759] 然后使用基于均匀荧光的结合测定法对用抗原和用重组蛋白包被的Superavidin™珠(Bangs Laboratories)转染的HEK-293细胞筛选所得重组抗体的抗原结合。一旦用TAP瞬时转染物证实了特异性,就将抗体基因克隆入Fab-X和Fab-Y表达载体中。将重链和轻链构建体共转染入HEK-293细胞(使用Fectin 293(Life Technologies))或Expi293细胞(使用Expifectamine(Life Technologies))中,并且在6孔组织培养板中以5ml的体积表达重组抗体。在表达5-7天后,收获上清液。在基于均匀荧光的结合测定中,在对用抗原和用重组蛋白包被的Superavidin™珠(Bangs Laboratories)转染的HEK293细胞中或抗原转染的HEK细胞上测试上清液。这样做是为了确认克隆的抗体的特异性。

[0760] 含有Fab-X和Fab-Y的瞬时转染物上清液的产生

[0761] 使用实施例12中描述的相同的Expi293转染方法产生含有Fab-X和Fab-Y的瞬时转染物上清液。

[0762] 纯化的Fab-X和Fab-Y的生产

[0763] 使悬浮CHOSXE细胞预先适应于补充有2mM(100x) glutamx的CDCHO培养基(Invitrogen)。在振荡培养箱(Kuner AG,Birsfelden,Switzerland)上在以140rpm摇动的情况下将细胞维持在对数生长期,并在补充有8%CO<sub>2</sub>的37°C下培养。

[0764] 在转染前,使用CEDEX细胞计数器(Innovatis AG,Bielefeld,Germany)测定细胞数和活力,将所需量的细胞( $2 \times 10^8$ 个细胞/ml)转移至离心锥形管中,并以1400rpm离心10分钟。将沉淀的细胞重悬于无菌Earls平衡盐溶液中,并以1400rpm再离心10分钟。弃去上清



液,将沉淀重悬至所需的细胞密度。

[0765] 将800 $\mu$ l用于 $2 \times 10^8$ 细胞/ml混合物的400 $\mu$ g的终浓度的载体DNA移液至比色杯(Biorad)中,并使用内部电穿孔系统进行电穿孔。

[0766] 将转染的细胞直接转移至含有富含2mM glutamx和抗生素抗有丝分裂(100x)溶液(1/500)的ProCHO 5培养基的1X 3L锥形瓶中。将细胞在设定为37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>和140rpm摇动的Kuhner振荡培养箱中培养。在转染后24小时添加补料2g/L ASF(AJINOMOTO),并将温度降至37 $^{\circ}$ C以进一步培养13天。在第4天,将3mM丙酮酸钠(正丁酸钠盐,Sigma B-5887)添加至培养物中。

[0767] 在第14天,将培养物转移至管中,并在4000rpm离心30分钟后将上清液与细胞分离。将保留的上清液通过0.22 $\mu$ m SARTOBRAN<sup>®</sup>P Millipore,然后0.22 $\mu$ m Gamma金过滤器进一步过滤。通过蛋白G-HPLC测定最终表达水平。

[0768] 使用AKTA Xpress系统和HisTrap Excel预包装镍柱(GE Healthcare)通过亲和捕获来纯化Fab-X和Fab-Y。将培养物上清液进行0.22 $\mu$ m无菌过滤,并且如果需要,在上样到柱子上之前用弱酸或碱将pH调节至中性。使用含有15-25mM咪唑的第二洗涤步骤从镍树脂中置换任何弱结合的宿主细胞蛋白质/非特异性His结合物。用10mM磷酸钠,pH 7.4+1M NaCl+250mM咪唑进行洗脱,并收集2ml级分。将一个柱体积添加至洗脱液中,将系统暂停10分钟以收紧洗脱峰,并因此减小总洗脱体积。合并最干净的级分并将缓冲液交换至PBS(Sigma)、pH 7.4中以及进行0.22 $\mu$ m过滤。通过A280扫描、SE-HPLC(G3000方法)、SDS-PAGE(还原和未还原)测定最终汇集物,对于内毒素,使用PTS Endosafe系统。

[0769] 功能测定

[0770] 活化标志物测定:将纯化的或在瞬时转染物上清液中的抗原2-特异性Fab'-Y和抗原3-特异性Fab'-X一起在等摩尔浓度下孵育60分钟(在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>环境中)。从185nM的起始摩尔浓度,以1:4连续稀释度滴定组合。还包括模拟上清液,从纯净滴定。在V形底96孔板中,将 $1.5 \times 10^5$ 个PBMC添加至向其中添加了滴定的Fab'-X和Fab'-Y组合或模拟上清液的孔中。随后将组合和细胞一起孵育另外的90分钟。此后,通过在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下添加12.5 $\mu$ g/mL山羊F(ab')<sub>2</sub>抗人IgM(Southern Biotechnology)进行24小时来活化B细胞。

[0771] 向孔中添加100 $\mu$ l冰冷的FACS缓冲液(PBS+1%BSA+0.1%NaN<sub>3</sub>+2mM EDTA),将板密封并用湿冰覆盖约15分钟,然后在4 $^{\circ}$ C下以500 $\times$ g离心5分钟。从细胞沉淀中弃去过量的上清液,并将板在2000rpm下摇动30秒。

[0772] 然后用荧光标记的抗CD19、抗CD20和抗CD71抗体(BD Biosciences)的混合物对细胞进行染色。稍稍摇动平板并在黑暗中于湿冰上孵育1小时。此后,将板洗涤两次并重悬于20 $\mu$ l FACS缓冲液中。使用Intellicyt **iQUE**<sup>®</sup> Screener流式细胞仪测量CD19、CD20和CD71的细胞表达。

[0773] 使用数据分析软件包Forecyt<sup>™</sup>(Intellicyt)将B细胞鉴定为不同于其他细胞群体,并且计算每个孔的CD71水平的几何平均值。然后将所有数据表示为相对于最大应答(仅抗IgM)减去背景(仅细胞)的抑制百分数。

[0774] PhosFlow测定:将纯化的或在瞬时转染物上清液中的抗原2-特异性Fab'-Y和抗原3-特异性Fab'-X以等摩尔浓度一起孵育60分钟(在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>环境中)。从185nM的起始

摩尔浓度,以1:4连续稀释度滴定组合。还包括模拟上清液,从纯净滴定。在V形底96孔板中,将 $5.0 \times 10^4$ 个PBMC添加至向其中添加了滴定的Fab'-X和Fab'-Y组合或模拟上清液的孔中。然后将组合和细胞一起孵育另外90分钟。此后,通过在37°C和5%CO<sub>2</sub>下添加25μg/ml山羊F(ab')<sub>2</sub>抗人IgM(Southern Biotechnology)持续15分钟来活化B细胞。然后通过添加等体积的Cytotfix缓冲液(BD Biosciences)停止信号传导反应。然后将板在室温下放置15分钟,然后以500×g离心5分钟。从细胞沉淀中弃去过量上清液,将其重悬于FACS缓冲液(PBS+1%BSA+0.01%NaN<sub>3</sub>+2mM EDTA)中并再次洗涤。然后将细胞在冰冷的Perm缓冲液III(BD Biosciences)中重悬30分钟,然后在流式缓冲液中洗涤两次。

[0775] 然后用荧光标记的抗CD20抗体(BD Biosciences)和识别保守的双磷酸化位点pT180/pY182的抗磷酸化p38抗体对细胞进行染色。然后将板重悬并在室温下于黑暗中孵育1小时。此后,将板再洗涤两次并重悬于20μl FACS缓冲液中。使用Intellicyt iQUE<sup>®</sup>流式细胞仪测量CD20和磷酸-p38的细胞表达。

[0776] 使用数据分析软件包Forecyt<sup>™</sup>(Intellicyt)将B细胞鉴定为不同于其他细胞群体,并且计算每个孔的p38水平的几何平均值。然后将所有数据表示为相对于最大应答(仅抗IgM)减去背景(仅细胞)的抑制百分数。

[0777] 结果

[0778] 活化标志物测定:从图28可以看出,数据显示抗原3与抗原2的组合(无论是纯化的还是来自瞬时转染物上清液)可以抑制用抗IgM刺激的B细胞上CD71的表达。

[0779] PhosFlow测定:图29中的数据显示抗原3与抗原2的组合(无论是纯化的还是来自瞬时转染物上清液)可以抑制用抗IgM刺激的B细胞中磷酸化的p38。

[0780] 能够直接从瞬时表达的培养物构建本发明的双特异性复合物而无需求助于纯化的令人惊奇的能力,允许实现比使用纯化的组分时更高通量的双特异性复合物的筛选。

[0781] 实施例14.用纯化的抗抗原2Fab-Y在异二聚体系链束缚的蛋白质复合物中筛选作为Fab-X的针对抗原3的瞬时表达的V区,以选择最佳的抗原3抗体V区

[0782] 引言:使用异二聚体系链束缚的蛋白质复合物的网格筛选来鉴定作为与抗原2特异性V区组合的双特异性抗体抑制B细胞信号的新的针对抗原3的V区。将抗原3V区瞬时表达为Fab-X,并使其与纯化的抗抗原2Fab-Y组合。测量B细胞信号传导的活化的抑制,以选择最有效力的抗原3和抗原2V区。

[0783] 以与实施例12中所述相同的方式进行抗原表达细胞的制备和兔的免疫。

[0784] 抗体发现:以与实施例12中所述相同的方式制备B细胞培养物。

[0785] 以与实施例12相同的方式确定在B细胞培养上清液中的抗原特异性抗体的筛选和用于鉴定抗原特异性B细胞的去卷积步骤。

[0786] 通过直接焦点法直接从免疫小鼠的脾脏和骨髓衍生的B细胞发现另外的可变区。简言之,将终浓度在 $4 \times 10^5$ 至 $8 \times 10^5$ 个细胞/ml之间的细胞与用生物素化抗原包被的链霉抗生物素蛋白珠(New England Biolabs)和山羊抗小鼠Fcγ片段特异性FITC缀合物(Jackson)的1:1200最终稀释液混合。在37°C静态孵育1小时后,可鉴定出抗原特异性B细胞,因为B细胞周围存在荧光晕。然后用Eppendorf微操作器挑取使用奥林巴斯显微镜鉴定的多个这些个体B细胞克隆,并将其沉积至PCR管中。

[0787] 通过使用重链和轻链可变区特异性引物的逆转录(RT)-PCR从单个细胞中回收抗

体可变区基因。进行两轮PCR,巢式2°PCR在3'和5'末端掺入限制性位点,从而允许将可变区克隆到小鼠Fab-X和小鼠κ(VL)哺乳动物表达载体中。然后将这些载体共转染进HEK-293细胞(使用293Fectin(Life Technologies))或Expi293细胞(使用Expifectamine(Life Technologies)中,并使其表达6天。在对用抗原和包被有重组蛋白的Superavidin™珠(Bangs Laboratories)转染的HEK293细胞或抗原转染的HEK细胞上,在基于均匀荧光的结合测定中测试上清液。这样做是为了确认克隆的抗体的特异性。

[0788] 除了Fab-X瞬时转染物上清液之外,使用不相关的对照DNA以相同的方式制备阴性对照模拟上清液。

[0789] 通过蛋白G-HPLC测定Fab-X的表达水平。

[0790] 纯化的Fab-Y的产生:使用与实施例13中所述相同的方法制备纯化的Fab-Y。

[0791] 功能测定

[0792] 使用与实施例12中所述相同的功能测定,除了不使用3种不同的抗体混合物,只使用一种混合物(测定浓度和孵育条件与实施例12中针对抗体混合物A所述的相同)外。

[0793] 抗体混合物=1:3CD20 PerCp-Cy5.5+1:5PLCγ 2AF88+1:10Akt AF647+1:5p38 MAPK PE(在FACS缓冲液中稀释)。

[0794] 结果

[0795] 从图30-33可以看出,数据显示Fab-X中的不同瞬时表达的抗原3小鼠V区与Fab-Y中的2个不同的纯化的抗原2V区(VR447和VR4450)的组合可抑制B细胞活化至不同水平,因此筛选有助于选择最佳V区。将与瞬时转染的Fab-X的组合与具有纯化的Fab-X(VR4126)的参照组合进行比较。

[0796] 实施例15.将Fab-Kd-Fab筛选形式中抗原2加抗原3共靶向的活性与分子连接的双特异性BYbe形式相比较。

[0797] 引言:为了检查在Fab-Kd-Fab异二聚体系链束缚的筛选复合物中鉴定的靶标对的活性是否可以转化成替代性治疗性分子连接的形式类似的所需活性,以BYbe形式产生抗原2特异性(VR4447)和抗原3特异性(VR4130)。该BYbe形式由作为与抗抗原2Fab(VR4447)的重链融合的二硫键稳定的(ds)单链(sc)-Fv的抗抗原3V区(VR4130)组成。

[0798] 方法:

[0799] 除用于功能筛选的BYbe的纯化外,如实施例13所述,如下进行该方法:

[0800] 如下纯化功能筛选BYbe(Fab-dsscFv[Fab重链的C末端解离的scFv])形式。将来自标准expiHEK或CHO表达的澄清的细胞培养上清液进行0.22μm无菌过滤。将过滤的上清液以2ml/min上样至在PBS pH 7.4(Sigma Aldrich Chemicals)中平衡的50ml GammabindPlus Sepharose XK26柱(GE Healthcare)上。上样后,用PBS pH 7.4洗涤柱,然后用0.1M甘氨酸/HCl pH 2.7进行洗脱。洗脱后在280nm处进行吸光度检测,收集洗脱峰,然后用1/25体积的2M Tris/HCl pH 8.5中和。使用具有10kDa(BYbes)截留分子量膜的Amicon Ultra-15浓缩器并在水平转头中以4000xg离心,浓缩中和的样品。将浓缩的样品施加至于PBS、pH 7.4中平衡的XK16/60或XK26/60Superdex200柱(GE Healthcare)。用等度梯度的PBS、pH 7.4分别以1ml/min或2.6ml/min展开。收集级分并通过在TSK凝胶G3000SWXL上的尺寸排阻层析法分析;5μm、7.8x300 mm柱子,用等度梯度的0.2M磷酸盐、pH7.0以1ml/min展开,通过在280nm处进行吸光度检测。合并选择的单体级分,使用具有10kDa截留分子量膜的Amicon Ultra-15

浓缩器并在水平转头中以4000xg离心将其浓缩至>1mg/ml。测定最终样品；使用A280扫描紫外-可见分光光度计(Cary 50Bio)测量浓度；通过在TSK凝胶G3000SWXL上利用尺寸排阻层析测量单体%；5 $\mu$ m、7.8x300mm柱子，用等度梯度的0.2M磷酸盐、pH7.0以1ml/min展开，通过在280nm处进行吸光度检测；通过在4-20%Tris-甘氨酸1.5mm凝胶(Novex)上以50mA(每凝胶)进行还原和非还原SDS-PAGE 53分钟；以及利用Charles River's **EndoSafe®**便携式测试系统(利用Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 测试盒)测定内毒素。

[0801] 功能测定

[0802] 活化标志物测定：将抗原2-特异性Fab'-Y和抗原3-特异性Fab'-X以等摩尔浓度一起孵育60分钟(在37°C和5%CO<sub>2</sub>环境中)。从100nM的起始摩尔浓度，以1:4连续稀释度滴定组合。抗原2和3-特异性BYbe也从100nM的起始摩尔浓度以1:4连续稀释度滴定。在V形底96孔板中，将1.5x10<sup>5</sup>个PBMC添加至向其中添加了滴定的Fab'-X和Fab'-Y组合或滴定的BYbe的孔中。将Fab'-X和Fab'-Y组合或BYbe与细胞一起孵育另外的90分钟。此后，通过在37°C和5%CO<sub>2</sub>下添加25 $\mu$ g/ml的山羊F(ab')<sub>2</sub>抗人IgM(Southern Biotechnology)进行24小时来活化B细胞。

[0803] 向孔中添加100 $\mu$ l冰冷的FACS缓冲液(PBS+1%BSA+0.1%NaN<sub>3</sub>+2mM EDTA)，将板密封并用湿冰覆盖约15分钟，然后在4°C下以500 $\times$ g离心5分钟。从细胞沉淀中弃去过量的上清液，并将板在2000rpm下摇动30秒。

[0804] 然后用荧光标记的抗CD19、抗CD20和抗CD71、抗CD40和抗CD86抗体(BD Biosciences)的混合物将细胞染色。稍稍摇动平板并在黑暗中于湿冰上孵育1小时。此后，将板洗涤两次并重悬于20 $\mu$ l FACS缓冲液中。使用Intellicyt **iQUE®** Screener流式细胞仪测量CD19、CD20和CD71、CD40和CD86的细胞表达。

[0805] 使用数据分析软件包Forecyt<sup>TM</sup>(Intellicyt)将B细胞鉴定为不同于其他细胞群，并且计算每个孔的CD71、CD40和CD86水平的几何平均值。然后将所有数据表示为相对于最大应答(仅抗IgM)减去背景(仅细胞)的抑制百分数。

[0806] PhosFlow测定：将抗原2-特异性Fab'-Y和抗原3-特异性Fab'-X在等摩尔浓度下一起孵育60分钟(在37°C和5%CO<sub>2</sub>环境中)。从100nM的起始摩尔浓度以1:4连续稀释度滴定组合。抗原2和抗原3-特异性BYbe也从100nM的起始摩尔浓度以1:4连续稀释度滴定。在V形底96孔板中，将5.0 $\times$ 10<sup>4</sup>个PBMC添加至向其中添加了滴定的Fab'-X和Fab'-Y组合或滴定的BYbe的孔中。将Fab'-X和Fab'-Y组合或BYbe与细胞一起孵育另外的90分钟。此后，通过在37°C和5%CO<sub>2</sub>下添加25 $\mu$ g/ml山羊F(ab')<sub>2</sub>抗人IgM(Southern Biotechnology)持续15分钟来活化B细胞。然后通过添加等体积的Cytifix缓冲液(BD Biosciences)来停止信号传导反应。然后将板在室温下放置15分钟，然后以500 $\times$ g离心5分钟。从细胞沉淀中弃去过量上清液，将其重悬于FACS缓冲液(PBS+1%BSA+0.01%NaN<sub>3</sub>+2mM EDTA)中并再次洗涤。然后将细胞在冰冷的Perm缓冲液III(BD Biosciences)中重悬30分钟，然后在流式缓冲液中洗涤两次。

[0807] 然后用荧光标记的抗CD20抗体(BD Biosciences)和抗磷酸化的PLC $\gamma$ 2、抗磷酸化的Akt和抗磷酸化的p38抗体(BD Biosciences)将细胞染色。然后将板重悬并在室温下于黑暗中孵育1小时。此后，将板再洗涤两次并重悬于20 $\mu$ l FACS缓冲液中。使用Intellicyt

**iQUE®** 流式细胞仪测量CD20和磷酸-PLC  $\gamma$  2、磷酸-Akt和磷酸-p38的细胞表达。

[0808] 使用数据分析软件包Forecyt™ (Intellicyt) 将B细胞鉴定为不同于其他细胞群体,并且计算每个孔的PLC  $\gamma$  2、Akt和p38水平的几何平均值。然后将所有数据表示为相对于最大应答(仅抗IgM)减去背景(仅细胞)的抑制百分数。

[0809] 结果

[0810] PhosFlow测定:图34中的数据显示,以Fab-Kd-Fab或BYbe形式靶向抗原3和抗原2可以抑制用抗IgM刺激的B细胞中磷酸化的PLC  $\gamma$  2。图35中的数据显示,以Fab-Kd-Fab或BYbe形式靶向抗原3和抗原2可以抑制用抗IgM刺激的B细胞中磷酸化的P38。图36中的数据显示,以Fab-Kd-Fab或BYbe形式的靶向抗原3和抗原2可以抑制用抗IgM刺激的B细胞中磷酸化的Akt。

[0811] 活化标志物测定:如可从图37看到的,数据显示,以Fab-Kd-Fab或BYbe形式靶向抗原3和抗原2可以抑制用抗IgM刺激的B细胞上CD71的表达。图38中的数据显示,以Fab-Kd-Fab或BYbe形式靶向抗原3和抗原2可以抑制用抗IgM刺激的B细胞上CD40的表达。图39中的数据显示,以Fab-Kd-Fab或BYbe形式靶向抗原3和抗原2可以抑制用抗IgM刺激的B细胞上CD86的表达。

[0812] 实施例16. 在分子连接的双特异性Bybe形式中抗原2加上抗原3共靶向的活性与进一步添加抗白蛋白结合结构域以延长体内半寿期的比较

[0813] 引言:为了检查在Fab-Kd-Fab异二聚体系链束缚的筛选复合物中鉴定的靶标对的活性是否可以转化成具有抗清蛋白靶向的体内半寿期延长的潜在治疗性分子连接的形式,将抗体片段与实施例15中所述的BYbe形式的抗原3Fab的轻链融合。在添加和不添加抗白蛋白片段(VR0645)的情况下以Bybe形式产生抗原2特异性(VR4447)和抗原3特异性(VR4130和VR4126)。

[0814] 在本实验中使用的构建体的描述。

构建体名称	Fab 特异性	重链	轻链
[0815] VR4447/VR4126 BYbe	抗原 2	抗原 3	无
VR4447/VR4126/VR645)	抗原 2	抗原 3	白蛋白

BYbe/白蛋白			
[0816] VR4447/VR4130 BYbe	抗原 2	抗原 3	无
VR4447/VR4130/VR645)	抗原 2	抗原 3	白蛋白
BYbe/白蛋白			

[0817] 方法

[0818] 用于功能筛选的BYbe的纯化:

[0819] 如下纯化功能筛选BYbe (Fab-dsscFv [Fab重链的C末端解离的scFv]) 形式。将来自标准exp iHEK或CHO表达的澄清的细胞培养上清液进行0.22 $\mu$ m无菌过滤。以2ml/min将过滤的上清液上样至于PBS pH 7.4 (Sigma Aldrich Chemicals) 中平衡的50ml GammabindPlus Sepharose XK26柱(GE Healthcare)上。上样后,用PBS pH 7.4洗涤柱,然后用0.1M甘氨酸/

HCl、pH2.7洗脱。洗脱后在280nm处进行吸光度检测,收集洗脱峰,然后用1/25体积的2M Tris/HCl、pH8.5中和。使用具有10kDa或30kDa截留分子量膜的Amicon Ultra-15浓缩器并在水平转头中以4000xg离心来浓缩中和的样品。将浓缩的样品施加于在PBS、pH 7.4中平衡的XK16/60或XK26/60Superdex200柱(GE Healthcare)上。用等度梯度的PBS、pH 7.4分别以1ml/min或2.6ml/min展开柱子。收集级分并在TSKgel G3000SWXL上通过尺寸排阻层析法进行分析;5 $\mu$ m、7.8x300mm柱子,用等度梯度的0.2M磷酸盐、pH 7.0以1ml/min展开,通过在280nm处进行吸光度检测。合并选择的单体级分,使用具有10kDa或30kDa截留分子量膜的Amicon Ultra-15浓缩器并在水平转头中以4000xg离心来浓缩至>1mg/ml。测定最终样品;通过A280扫描紫外-可见分光光度计(Cary 50Bio)测定浓度;通过在TSKgel G3000SWXL上的尺寸排阻层析测定单体%;5 $\mu$ m、7.8x300mm柱子,用等度梯度的0.2M磷酸盐、pH7.0以1ml/min展开,通过在280nm处进行吸光度检测;通过在4-20%Tris-甘氨酸1.5mm凝胶(Novex)上以50mA(每凝胶)进行还原和非还原SDS-PAGE 53分钟;以及通过Charles River's **EndoSafe®**便携式测试系统(利用Limulus Amebocyte Lysate (LAL)测试盒)测定内毒素。

[0820] 将100nM的每种构建体纯化的蛋白质与来自5个单独的供体的人PBMC在37°C/5% CO<sub>2</sub>下于RMP1 1640培养基(加上10%胎牛血清和2mM Glutamax (R10培养基))中预孵育60分钟。60分钟后,用25ug/ml被设计来仅刺激B细胞的山羊抗IgM抗体刺激细胞。24小时后,将板置于冰上以停止任何进一步的细胞活化,然后用冰冷的流式细胞术缓冲液(PBS+1%BSA+0.01%NaN<sub>3</sub>)洗涤一次。除去所有上清液,并重悬细胞沉淀。将细胞置于冰上,添加抗CD19、抗CD20、抗CD27、抗CD71和抗CD86抗体的混合物。将细胞孵育60分钟,然后在流式细胞术缓冲液中洗涤两次。使用iQUE高通量流式细胞仪产生抗CD27、-CD71和CD86与CD19/CD20阳性B细胞的结合的数据。使用Forecyt软件产生直方图并得到抗CD27、-CD71和-CD86抗体与B细胞的结合的几何平均强度读数。将该数据输入至Excel中并为每个组合产生抑制百分数的值。然后将数据输入至Graphpad Prism中,并为每个组合产生盒和须图表,其中平均值由“+”表示。

[0821] 图40显示由VR4447/VR4126 BYbe和VR4447/VR4126/VR645 BYbe/白蛋白诱导的对B细胞上CD27表达的抑制。在所测试的5个供体中,两者均显示出始终相似的抗IgM诱导的CD27的抑制水平。图41显示由VR4447/VR4126 BYbe和VR4447/VR4126/VR645 BYbe/白蛋白诱导的B细胞上CD71表达的抑制。在所有5个供体当中,两者显示出始终相似的抗IgM诱导的CD71的抑制水平。图42显示由VR4447/VR4126 BYbe和VR4447/VR4126/VR645 BYbe/白蛋白诱导的B细胞上CD86表达的抑制。在5个供体当中,两者显示出始终相似的抗IgM诱导的CD86的抑制水平。

[0822] GCN4 (7P14P) 序列

[0823] ASGGGRMKQLEPKVEELLPKNYHLENEVARLKKLVGERHHHHH SEQ ID NO:1其中以粗体标示的氨基酸是任选的,以斜体标示的氨基酸是连接序列

[0824] GCTAGCGGAGGCGGAAGAATGAAACAACCTGAACCCAAGGTTGAAGAATTGCTTCCGAAAATTATCACTTGAAAATGAGGTTGCCAGATTAAAGAAATTAGTTGGCGAACGCCATCACCATCACCATCAC SEQ ID NO:2

[0825] 52SR4 ds scFv序列

[0826] DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSL

IGDKAALTITGAQTEDEAIYFCVLWYSDHWVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSDVQLQQSGPGLVAP  
 SQSL SITCTVSGFLLTDYGVNWRVQSPGKCLEWLGVWGDGITDYN SALKSRLSVTKDNSKSQVFLKMNSLQSGDS  
 ARYYCVTGLFDYWQGTTLTVSSAAAHHHHHHEQKLI SEEDL—SEQ ID NO:3

[0827] GATGCGGTGGTGACCCAGGAAAGCGCGCTGACCAGCAGCCCGGGCGAAACCGTGACCCTGACCTGCCGC  
 AGCAGCACCGGCGCGGTGACCACCAGCAACTATGCGAGCTGGGTGCAGGAAAACCGGATCATCTGTTTACCGGCCT  
 GATTGGCGGCACCAACAACCGCGCGCCGGGCGTGCCGGCGCGCTTTAGCGGCAGCCTGATTGGCGATAAAGCGGCGC  
 TGACCATTACCGGCGCGCAGACCGAAGATGAAGCGATTTATTTTTGCGTGCTGTGGTATAGCGACCATTGGGTGTTT  
 GGCTGCGGCACCAAACCTGACCGTGCTGGGTGGAGGCGGTGGCTCAGGCGGAGGTGGCTCAGGCGGTGGCGGGTCTGG  
 CGGCGGCGGCAGCGATGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGGCGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACCT  
 GCACCGTGAGCGGCTTTCTCCTGACCGATTATGGCGTGAACGGGTGCGCCAGAGCCCGGGCAAATGCCTGGAATGG  
 CTGGGCGTGATTTGGGGCGATGGCATTACCGATTATAACAGCGCGCTGAAAAGCCGCTGAGCGTGACCAAAGATAA  
 CAGCAAAGCCAGGTGTTTCTGAAAATGAACAGCCTGCAGAGCGGCGATAGCGCGCGCTATTATTGCGTGACCGGCC  
 TGTTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACCCTGACCGTGAGCAGCGCGGCCGCCATCACCATCACCATCACGAACAG  
 AACTGATTAGCGAAGAAGATCTGTAATAG

[0828] SEQ ID NO:4

[0829] 本发明涉及以下实施方案：

[0830] 1. 一种具有式A-X:Y-B的双特异性蛋白质复合物，其中：

[0831] A-X是第一融合蛋白；

[0832] Y-B是第二融合蛋白；

[0833] X:Y是异二聚体系链；

[0834] :是X与Y之间的结合相互作用；

[0835] A是选自Fab或Fab'片段的所述双特异性蛋白质复合物的第一蛋白质组分；

[0836] B是选自Fab或Fab'片段的所述双特异性蛋白质复合物的第二蛋白质组分；

[0837] X是独立地选自抗原或抗体或其结合片段的结合对的第一结合伴侣；和

[0838] Y是独立地选自抗原或抗体或其结合片段的结合对的第二结合伴侣；

[0839] 条件是当X是抗原时，Y是对由X表示的抗原具有特异性的抗体或其结合片段，并且当Y是抗原时，X是对由Y表示的抗原具有特异性的抗体或其结合片段。

[0840] 2. 项目1的双特异性蛋白质复合物，其中A是Fab片段。

[0841] 3. 项目1或2的双特异性蛋白质复合物，其中B是Fab片段。

[0842] 4. 项目1至3的任一项的双特异性蛋白质复合物，其中X任选通过接头与Fab或Fab'片段中的重链的C末端融合。

[0843] 5. 项目1至4的任一项的双特异性蛋白质复合物，其中Y任选通过接头与Fab或Fab'片段中的重链的C末端融合。

[0844] 6. 项目1至5的任一项的双特异性蛋白质复合物，其中X独立地选自scFv、VHH和肽，条件是当X是肽时，Y是抗体或其结合片段，诸如scFv或VHH，并且当X是scFv或VHH时，则Y是抗原，诸如肽。

[0845] 7. 项目1至6的任一项的双特异性蛋白质复合物，其中Y独立地选自scFv、VHH和肽，条件是当Y是肽时，X是抗体或结合片段，诸如scFv或VHH，并且当Y是scFv或VHH时，则X是抗原，诸如肽。

- [0846] 8. 项目6或7的双特异性蛋白质复合物,其中所述肽的长度在5至25个氨基酸的范围内。
- [0847] 9. 项目1至8的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中X与Y之间的结合亲和力为5nM或更强。
- [0848] 10. 项目9的双特异性蛋白质复合物,其中X与Y之间的结合亲和力为900pM或更强,例如800pM、700pM、600pM、500pM、400pM或300pM。
- [0849] 11. 项目1至10的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中X或Y是对肽GCN4 (SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:1的氨基酸1至38)具有特异性的scFv或VHH。
- [0850] 12. 项目11所述的双特异性蛋白质复合物,其中所述scFv是52SR4 (SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:3的氨基酸1至243)。
- [0851] 13. 项目1至12的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中X或Y是肽GCN4 (SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:1的氨基酸1至38)。
- [0852] 14. 项目1至13的任一项的双特异性蛋白质复合物,其中A和/或B对选自以下的抗原是特异性的:细胞表面受体诸如T细胞或B细胞信号传导受体、共刺激分子、检查点抑制剂、天然杀伤细胞受体、免疫球蛋白受体、TNFR家族受体、B7家族受体、粘附分子、整联蛋白、细胞因子/趋化因子受体、GPCR、生长因子受体、激酶受体、组织特异性抗原、癌抗原、病原体识别受体、补体受体、激素受体或可溶性分子例如细胞因子、趋化因子、白三烯、生长因子、激素、酶和离子通道。
- [0853] 15. 一种组合物,其包含项目1至14中任一项中定义的一种或多种双特异性蛋白质复合物。
- [0854] 16. 项目1至15的任一项的双特异性蛋白质复合物或项目15的组合物,其用于治疗。
- [0855] 17. 一种方法,所述方法检测根据项目1至15的任一项的双特异性蛋白质复合物中的协同生物功能,包括在一种或多种功能测定中测试所述双特异性蛋白质复合物。
- [0856] 18. 一种用于检测式A-X:Y-B的异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同生物功能的方法
- [0857] 其中X:Y是异二聚体系链
- [0858] :是X与Y之间的结合相互作用,
- [0859] A和B是分别与X和Y形成融合蛋白形式的双特异性的蛋白质组分,所述方法包括以下步骤:
- [0860] (i) 在功能测定中测试包含至少一种异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物的多元体的部分或全部的活性;和
- [0861] (ii) 分析来自功能测定的读出数据以检测所述异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物中的协同生物功能;和
- [0862] 其中Y是抗原,并且X是对Y具有特异性的抗体或其结合片段,或X是抗原,并且Y是对X具有特异性的抗体或其结合片段。
- [0863] 19. 项目18的方法,其中所述多元体呈网格形式。
- [0864] 20. 项目18或项目19的方法,其中所述多元体包含至少两种异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物。



- [0865] 21. 项目18至20的任一项的方法,其中所述异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物不含有Fc区。
- [0866] 22. 项目18或21的任一项的方法,其中A独立地选自Fab片段、Fab'片段、VHH、VH、VL和scFv。
- [0867] 23. 项目22所述的方法,其中A是Fab或Fab'片段,诸如Fab。
- [0868] 24. 项目18至23的任一项的方法,其中B独立地选自抗体、Fab片段、Fab'片段、VHH、VH、VL和scFv。
- [0869] 25. 项目24所述的方法,其中B是Fab或Fab'片段,诸如Fab片段。
- [0870] 26. 项目18至25的任一项的方法,其中X任选通过接头与抗体、Fab或Fab'片段中的重链的C末端融合。
- [0871] 27. 项目18至26的任一项的方法,其中Y任选通过接头与抗体、Fab或Fab'片段中的重链的C末端融合。
- [0872] 28. 项目18至27的任一项的方法,其中X独立地选自scFv、VHH和肽,条件是当X是肽时,Y是抗体或其结合片段,诸如scFv或VHH,并且当X是scFv或VHH时,则Y是抗原,诸如肽。
- [0873] 29. 项目18至28的任一项的方法,其中Y独立地选自scFv、VHH和肽,条件是Y是肽,X是抗体或结合片段,诸如scFv或VHH,并且当Y是scFv或VHH时,则X是抗原,诸如肽。
- [0874] 30. 项目28或29所述的方法,其中所述肽的长度在5至25个氨基酸的范围内。
- [0875] 31. 项目18至30的任一项的方法,其中X与Y之间的结合亲和力为5nM或更强。
- [0876] 32. 项目31所述的方法,其中X与Y之间的结合亲和力为900pM或更强,例如800pM、700pM、600pM、500pM、400pM或300pM。
- [0877] 33. 项目18至32的任一项的方法,其中X或Y是对肽GCN4 (SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:1的氨基酸1-38)具有特异性的scFv或VHH。
- [0878] 34. 项目33所述的方法,其中所述scFv是52SR4 (SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:3的氨基酸1-243)。
- [0879] 35. 项目18至34的任一项的方法,其中X或Y是肽GCN4 (SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:1的氨基酸1-38)。
- [0880] 36. 项目18至35的任一项的方法,其中A和/或B对选自以下的抗原是特异性的:细胞表面受体诸如T细胞或B细胞信号传导受体、共刺激分子、检测点抑制剂、天然杀伤细胞受体、免疫球蛋白受体、TNFR家族受体、B7家族受体、粘附分子、整联蛋白、细胞因子/趋化因子受体、GPCR、生长因子受体、激酶受体、组织特异性抗原、癌抗原、病原体识别受体、补体受体、激素受体或可溶性分子诸如细胞因子、趋化因子、白三烯、生长因子、激素或酶或离子通道。
- [0881] 37. 项目18至36的任一项的方法,其中所述异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物在测试之前不纯化。
- [0882] 38. 项目37所述的方法,其中在以1:1摩尔比混合以产生每个异二聚体系链束缚的双特异性蛋白质复合物之前,瞬时表达所述A-X和Y-B融合蛋白,但不进行纯化。

## 序列表

<110> UCB Pharma

<120> 适用于高通量筛选的新的双特异性形式

<130> G0221\_W001

<160> 72

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GCN4 (7P14P) 序列

<400> 1

```
Ala Ser Gly Gly Gly Arg Met Lys Gln Leu Glu Pro Lys Val Glu Glu
1           5           10           15
Leu Leu Pro Lys Asn Tyr His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys
           20           25           30
Lys Leu Val Gly Glu Arg His His His His His His
           35           40
```

<210> 2

<211> 132

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA编码SEQ ID NO: 1

<400> 2

```
gctagcggag gcggaagaat gaaacaactt gaaccaagg ttgaagaatt gcttccgaaa      60
aattatcact tggaaaatga ggttgccaga ttaaagaaat tagttggcga acgccatcac    120
catcaccatc ac                                                           132
```

<210> 3

<211> 262

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 52SR4 ds scFv序列

<400> 3

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Asn Tyr Ala Ser Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asp  
 85 90 95  
 His Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly  
 100 105 110  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Asp Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro  
 130 135 140  
 Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Leu Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Asp Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Cys Leu Glu  
 165 170 175  
 Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ser Ala  
 180 185 190  
 Leu Lys Ser Arg Leu Ser Val Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val  
 195 200 205  
 Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gly Asp Ser Ala Arg Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Cys Val Thr Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr  
 225 230 235 240  
 Val Ser Ser Ala Ala Ala His His His His His His Glu Gln Lys Leu  
 245 250 255  
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
 260

<210> 4

<211> 792

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA编码SEQ ID NO: 3

<400> 4

gatgcggtgg tgaccagga aagcgcgctg accagcagcc cgggcgaaac cgtgaccctg	60
acctgccgca gcagcaccgg cgcggtgacc accagcaact atgcgagctg ggtgcaggaa	120
aaaccggatc atctgtttac cggcctgatt ggcggcacca acaaccgcgc gccgggctg	180
ccggcgcgct ttagcggcag cctgattggc gataaagcgg cgctgacat taccggcgcg	240
cagaccgaag atgaagcgat ttatTTTTgc gtgctgtggt atagcgacca ttgggtgttt	300
ggctgcggca ccaaactgac cgtgctgggt ggaggcgggt gctcaggcgg aggtggctca	360
ggcggtgccg ggtctggcgg cggcggcagc gatgtgcagc tgcagcagag cggcccgggc	420
ctgggtggcg cgagccagag cctgagcatt acctgcaccg tgagcggctt tctcctgacc	480
gattatggcg tgaactgggt gcgccagagc ccgggcaaat gcctggaatg gctgggctg	540
atTTggggcg atggcattac cgattataac agcgcgctga aaagccgcct gagcgtgacc	600
aaagataaca gcaaaaagcca ggtgtttctg aaaatgaaca gcctgcagag cggcgatagc	660
gcgcgctatt attgcgtgac cggcctgttt gattattggg gccagggcac caccctgacc	720
gtgagcagcg cggccgcca tcaccatcac catcacgaac agaaactgat tagcgaagaa	780
gatctgtaat ag	792
<210> 5	
<211> 8	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 柔性肽接头	
<400> 5	
Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala	
1 5	
<210> 6	
<211> 11	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 柔性肽接头	
<400> 6	
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10	
<210> 7	
<211> 18	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 柔性肽接头	
<400> 7	











<212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 柔性接头  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12) .. (12)  
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸  
 <400> 23  
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Gly Ala Ser Ala Ser  
                   20  
 <210> 24  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 柔性接头  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12) .. (12)  
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17) .. (17)  
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸  
 <400> 24  
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser



Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Ser Gly Ala Ser Ala Ser  
1 5 10

<210> 27

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 柔性接头

<400> 27

Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr  
20 25

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 柔性接头

<400> 28

Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr  
1 5 10

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 柔性接头

<400> 29

Ala Thr Thr Thr Gly Ser  
1 5

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 柔性接头

<400> 30

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1	5	10
<210>	31	
<211>	21	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	柔性接头	
<400>	31	
Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Ser Pro Pro Ser Lys Glu		
1	5	10
Ser His Lys Ser Pro		
	20	
<210>	32	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	柔性接头	
<400>	32	
Gly Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
1	5	10
<210>	33	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	柔性接头	
<400>	33	
Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Ser Met Val Gly Gly Gly Gly Ser		
1	5	10
<210>	34	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	柔性接头	
<400>	34	
Gly Gly Gly Gly Lys Val Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser		
1	5	10

<210> 35  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 柔性接头  
 <400> 35  
 Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Ser His Asp Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 <210> 36  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 柔性接头  
 <400> 36  
 Gly Gly Gly Gly Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 <210> 37  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 柔性接头  
 <400> 37  
 Gly Gly Gly Gly Val Val Pro Ser Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 <210> 38  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 柔性接头  
 <400> 38  
 Gly Gly Glu Lys Ser Ile Pro Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10  
 <210> 39  
 <211> 18  
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 柔性接头

<400> 39

Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Pro Pro Phe Pro Phe Gly Phe Pro Ser Val

1                    5                                    10                                    15

Arg Pro

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 柔性接头

<400> 40

Tyr Pro Arg Ser Ile Tyr Ile Arg Arg Arg His Pro Ser Pro Ser Leu

1                    5                                    10                                    15

Thr Thr

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 柔性接头

<400> 41

Thr Pro Ser His Leu Ser His Ile Leu Pro Ser Phe Gly Leu Pro Thr

1                    5                                    10                                    15

Phe Asn

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 柔性接头

<400> 42

Arg Pro Val Ser Pro Phe Thr Phe Pro Arg Leu Ser Asn Ser Trp Leu

1                    5                                    10                                    15

Pro Ala

<210> 43

<211> 18

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 柔性接头  
 <400> 43  
 Ser Pro Ala Ala His Phe Pro Arg Ser Ile Pro Arg Pro Gly Pro Ile  
 1                   5                   10                   15  
 Arg Thr  
 <210> 44  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 柔性接头  
 <400> 44  
 Ala Pro Gly Pro Ser Ala Pro Ser His Arg Ser Leu Pro Ser Arg Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Phe Gly  
 <210> 45  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 柔性接头  
 <400> 45  
 Pro Arg Asn Ser Ile His Phe Leu His Pro Leu Leu Val Ala Pro Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Gly Ala  
 <210> 46  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 柔性接头  
 <400> 46  
 Met Pro Ser Leu Ser Gly Val Leu Gln Val Arg Tyr Leu Ser Pro Pro  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Leu  
 <210> 47









<210> 59

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 59

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1                    5                    10                    15

Gly Arg Ser Val

20

<210> 60

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 60

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1                    5                    10                    15

Gly Arg Ser Val Lys

20

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 61

Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp

1                    5                    10                    15

<210> 62

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 62

Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu

1	5	10	15
Asp Asp			
<210> 63			
<211> 16			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 63			
Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp			
1	5	10	15
<210> 64			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 64			
Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp			
1	5	10	15
<210> 65			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 65			
Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Ala Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu			
1	5	10	15
Asp Asp			
<210> 66			
<211> 20			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 66			
Glu Val Arg Ser Phe Cys Thr Arg Trp Pro Ala Glu Lys Ser Cys Lys			
1	5	10	15

Pro Leu Arg Gly

20

<210> 67

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 67

Arg Ala Pro Glu Ser Phe Val Cys Tyr Trp Glu Thr Ile Cys Phe Glu

1

5

10

15

Arg Ser Glu Gln

20

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 68

Glu Met Cys Tyr Phe Pro Gly Ile Cys Trp Met

1

5

10

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽序列

<400> 69

Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala

1

5

10

<210> 70

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽序列

<400> 70

Pro Pro Pro Pro

1

<210> 71

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 71

Ala Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 72

Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

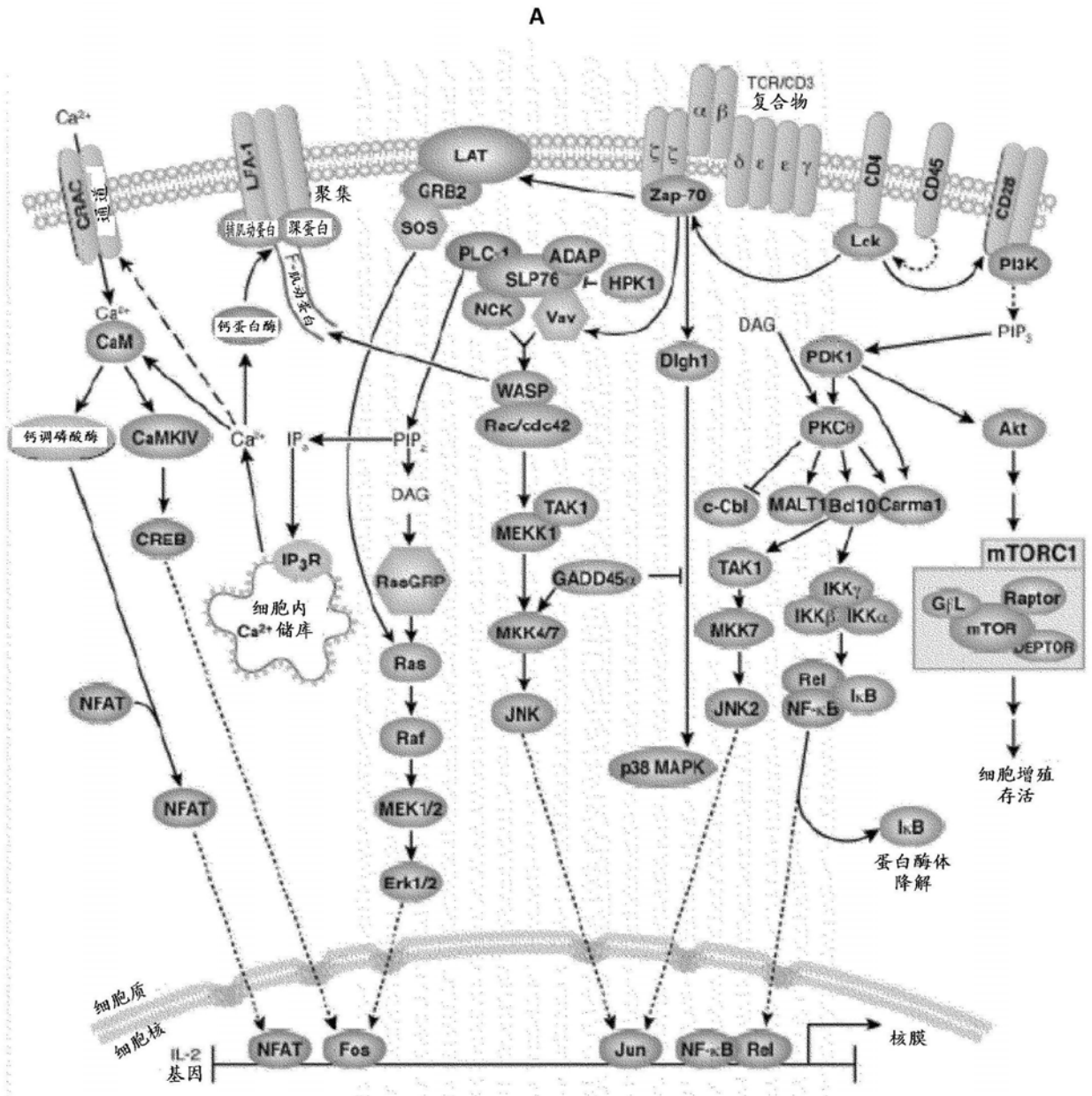


图1

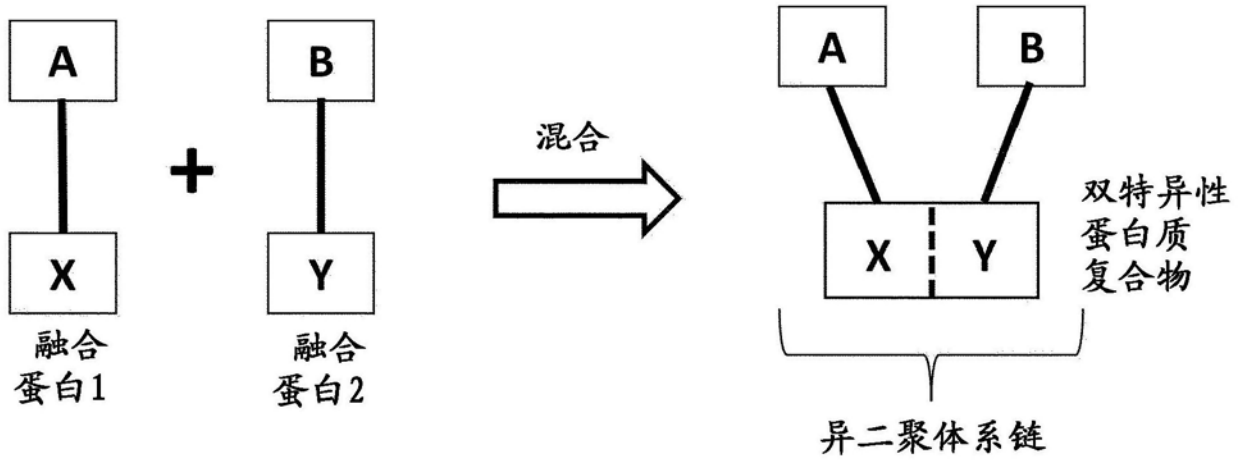


图2

	A <sub>1</sub> X	A <sub>2</sub> X	A <sub>3</sub> X	A <sub>4</sub> X
B <sub>1</sub> Y	A <sub>1</sub> X B <sub>1</sub> Y	A <sub>2</sub> X B <sub>1</sub> Y	A <sub>3</sub> X B <sub>1</sub> Y	A <sub>4</sub> X B <sub>1</sub> Y
B <sub>2</sub> Y	A <sub>1</sub> X B <sub>2</sub> Y	A <sub>2</sub> X B <sub>2</sub> Y	A <sub>3</sub> X B <sub>2</sub> Y	A <sub>4</sub> X B <sub>2</sub> Y
B <sub>3</sub> Y	A <sub>1</sub> X B <sub>3</sub> Y	A <sub>2</sub> X B <sub>3</sub> Y	A <sub>3</sub> X B <sub>3</sub> Y	A <sub>4</sub> X B <sub>3</sub> Y
B <sub>4</sub> Y	A <sub>1</sub> X B <sub>4</sub> Y	A <sub>2</sub> X B <sub>4</sub> Y	A <sub>3</sub> X B <sub>4</sub> Y	A <sub>4</sub> X B <sub>4</sub> Y

图3

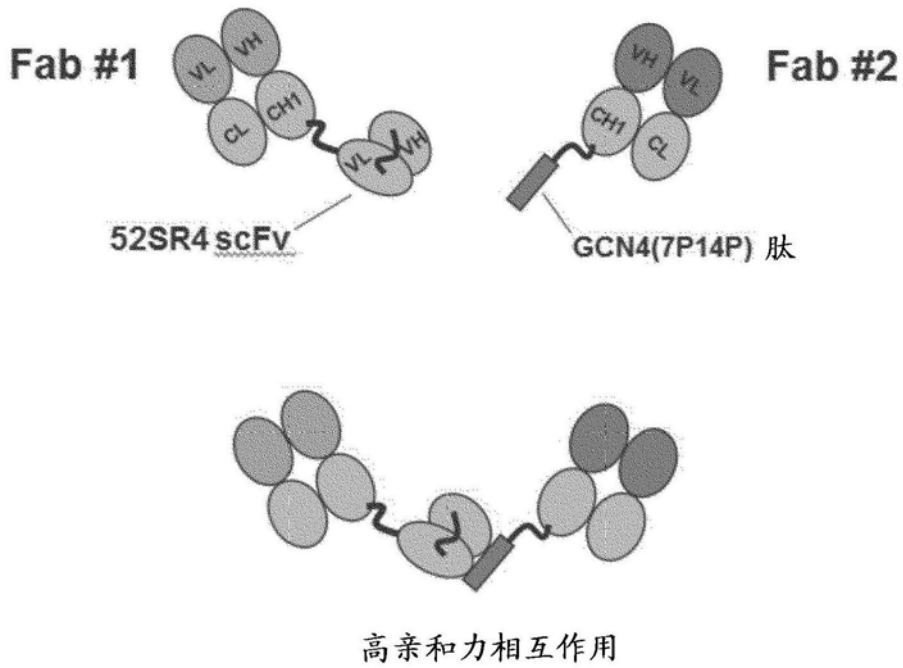


图4



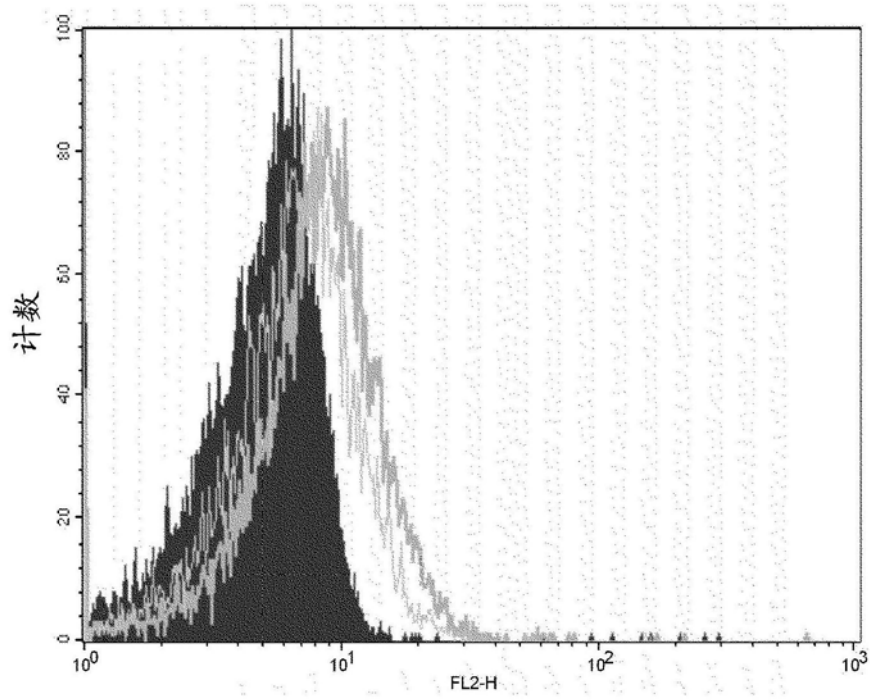


图5

表面等离子体分析抗原5Fab-scFv (52RS4) 与GNC4肽的结合

样品	生物素-GCN4肽			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	亲和力 (pM)	免疫反应性%
抗原 5Fab52RS4scFv	5.10E+05	2.70E-04	516	105

免疫反应性% = Rmax / 估算的 Rmax x 100

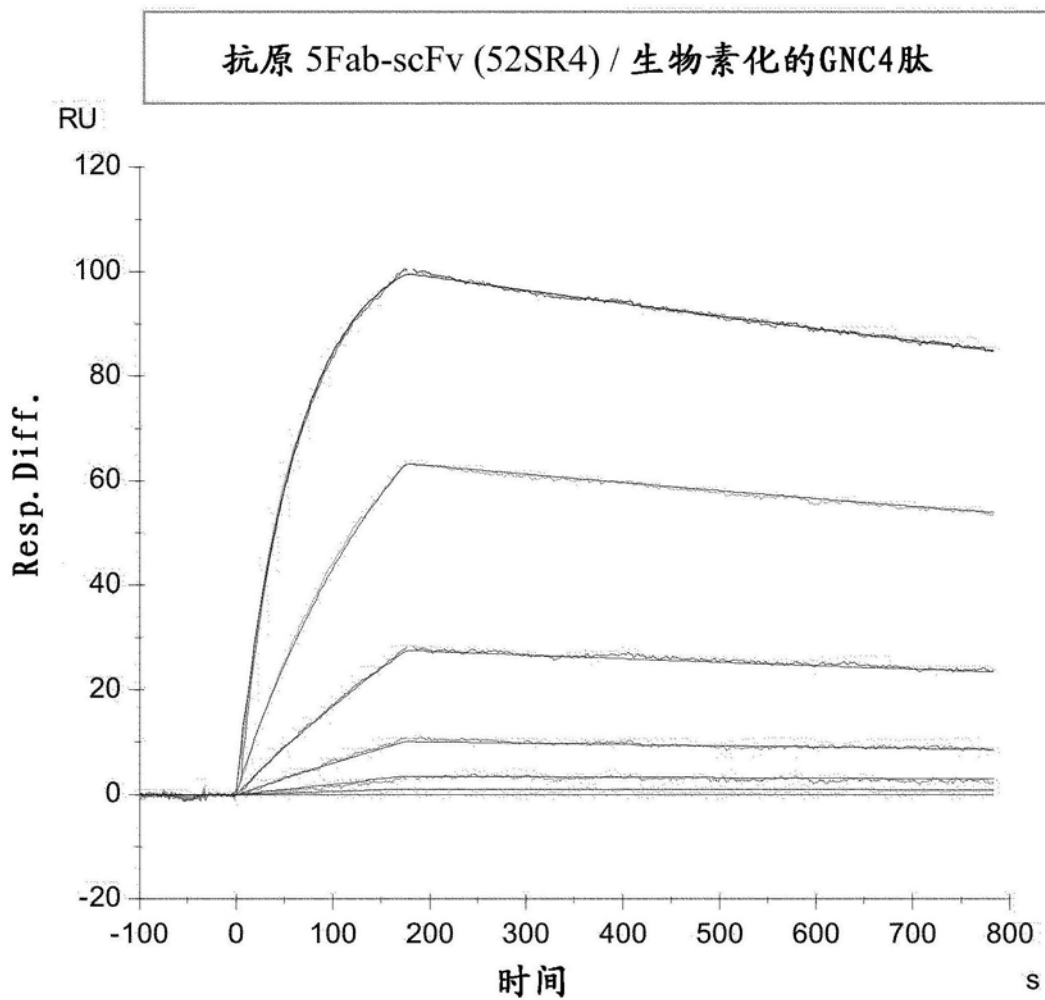


图6

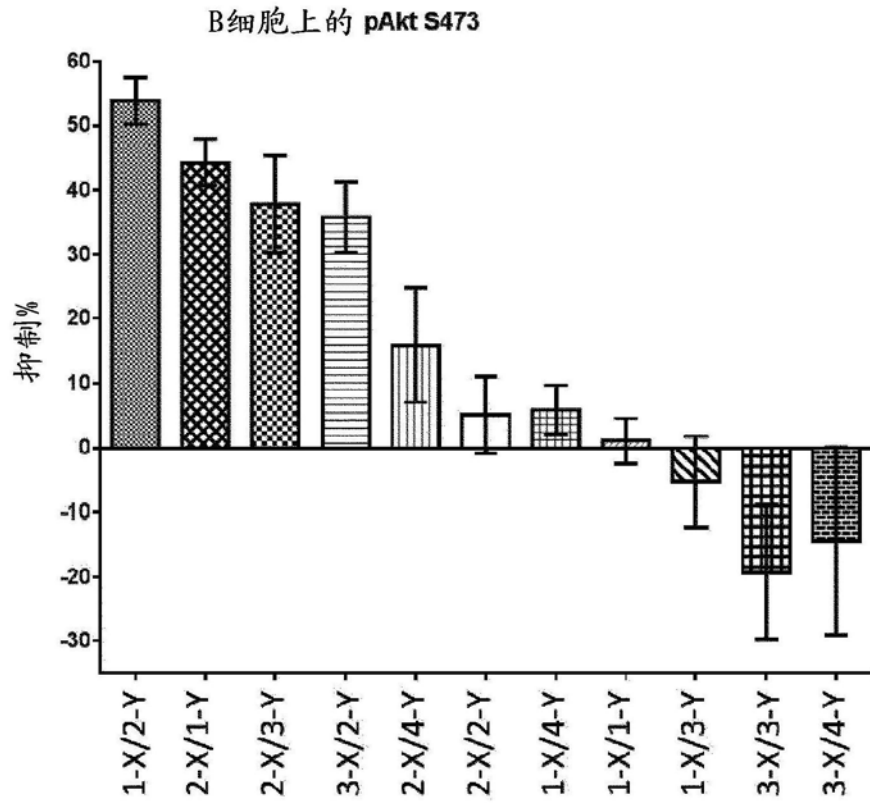


图7

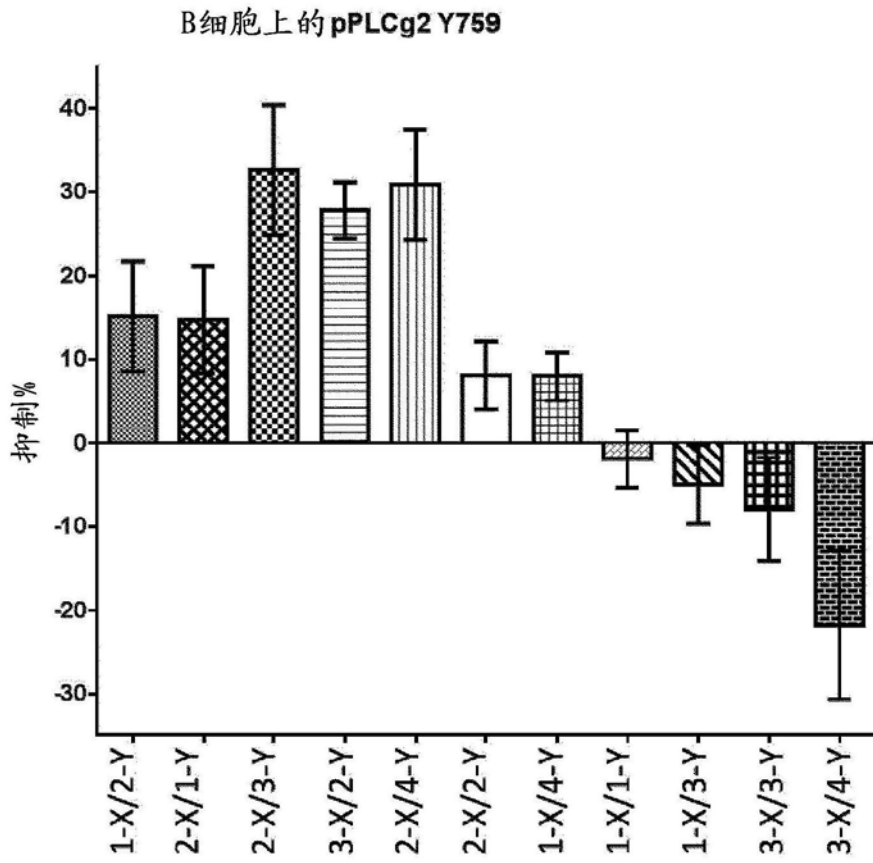


图8

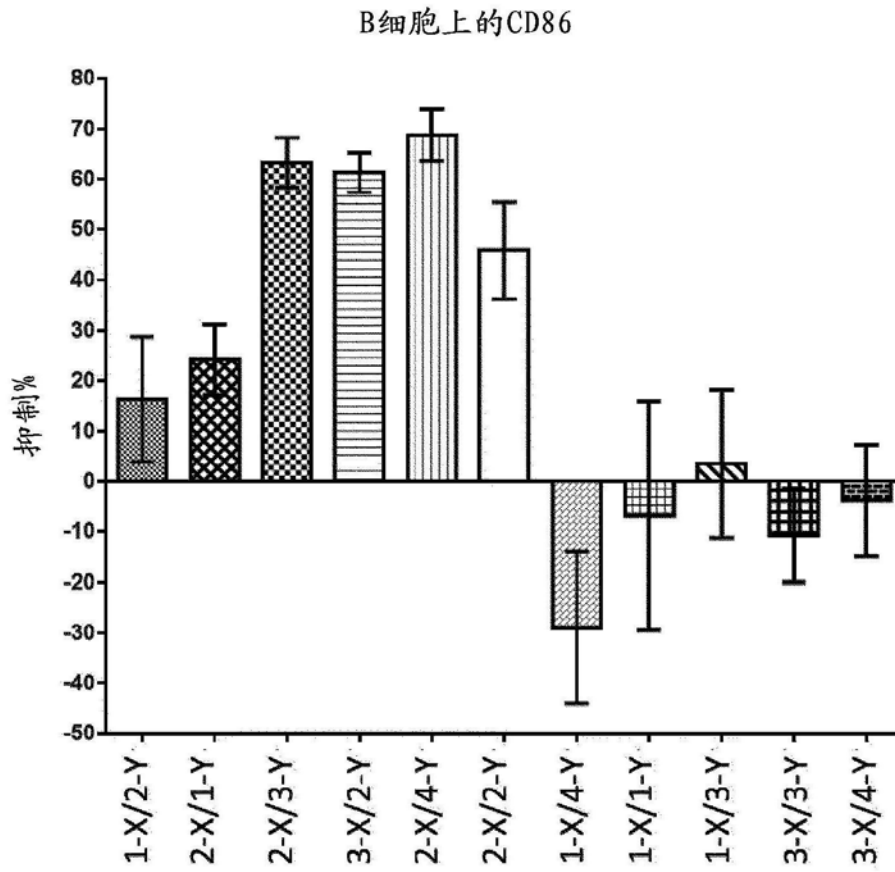


图9

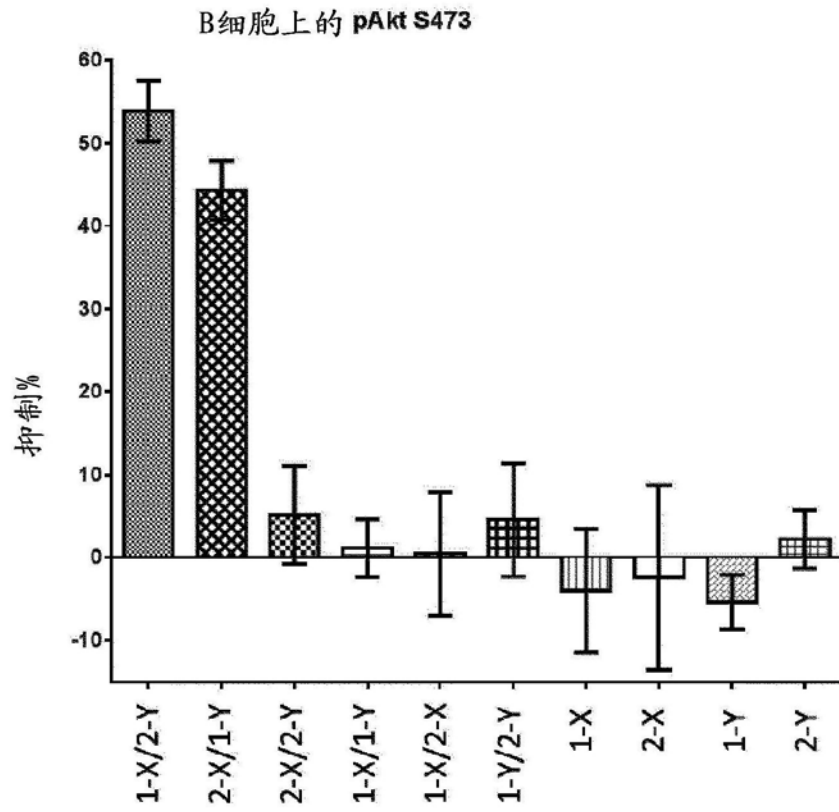


图10

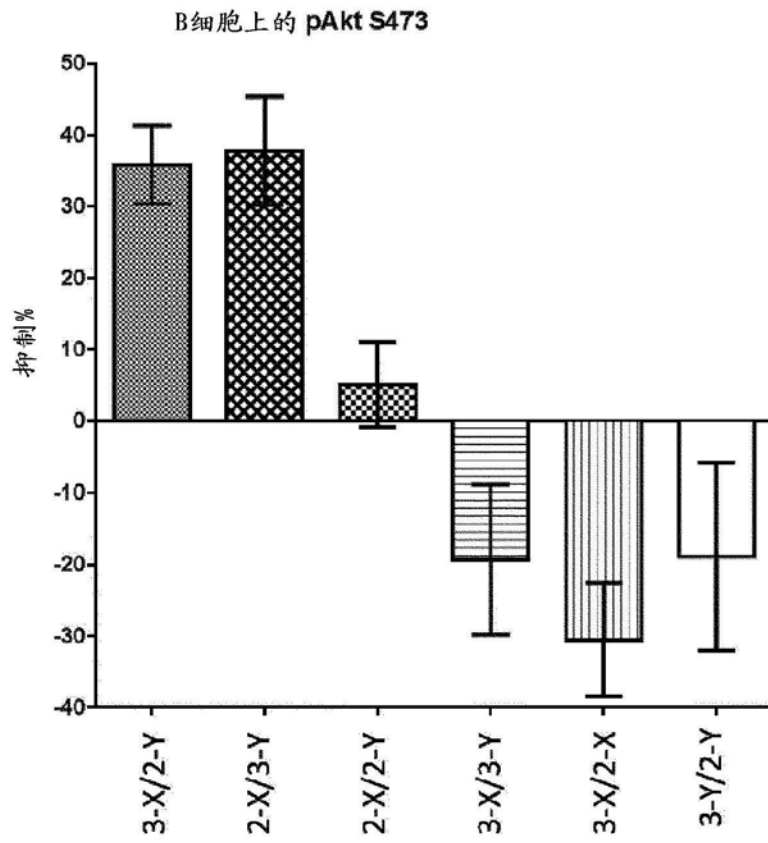


图11

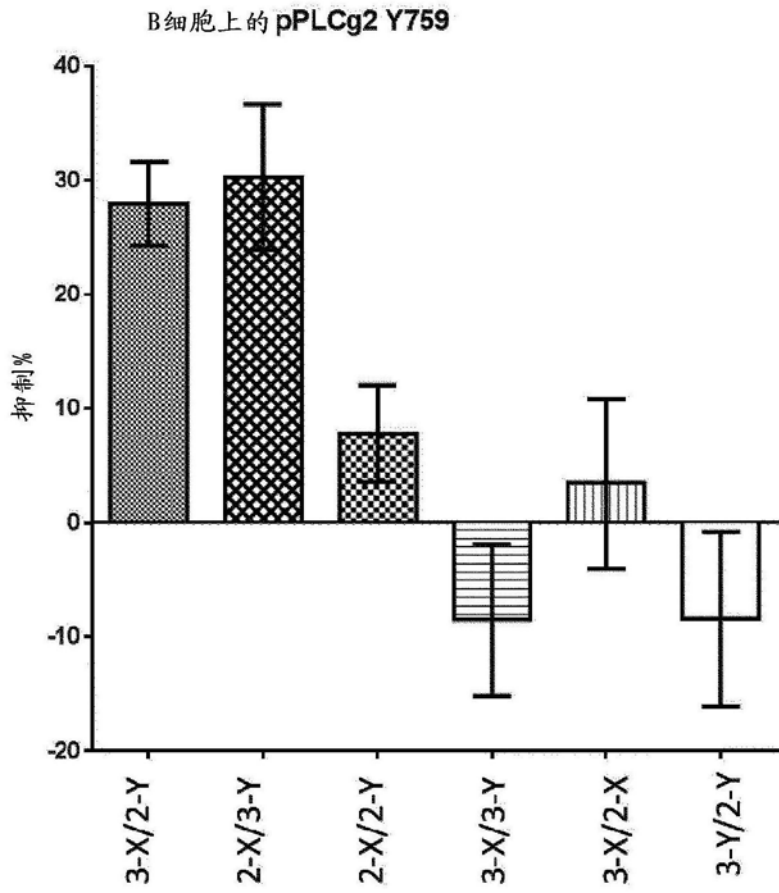


图12



IκB滴定-抗原2/抗原3

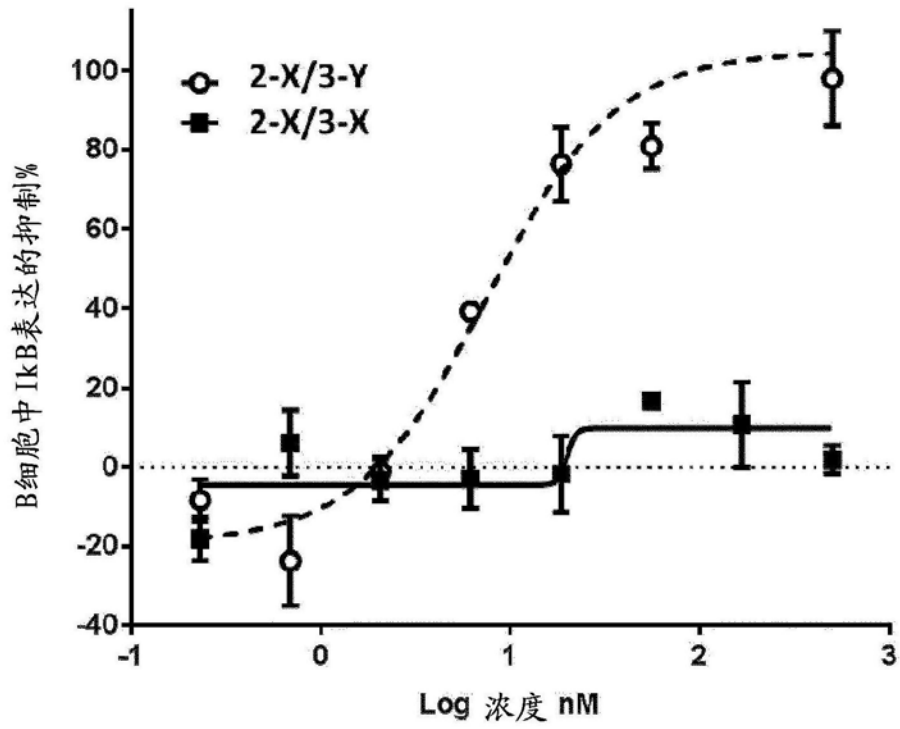


图13

CD86滴定 抗原2/抗原3

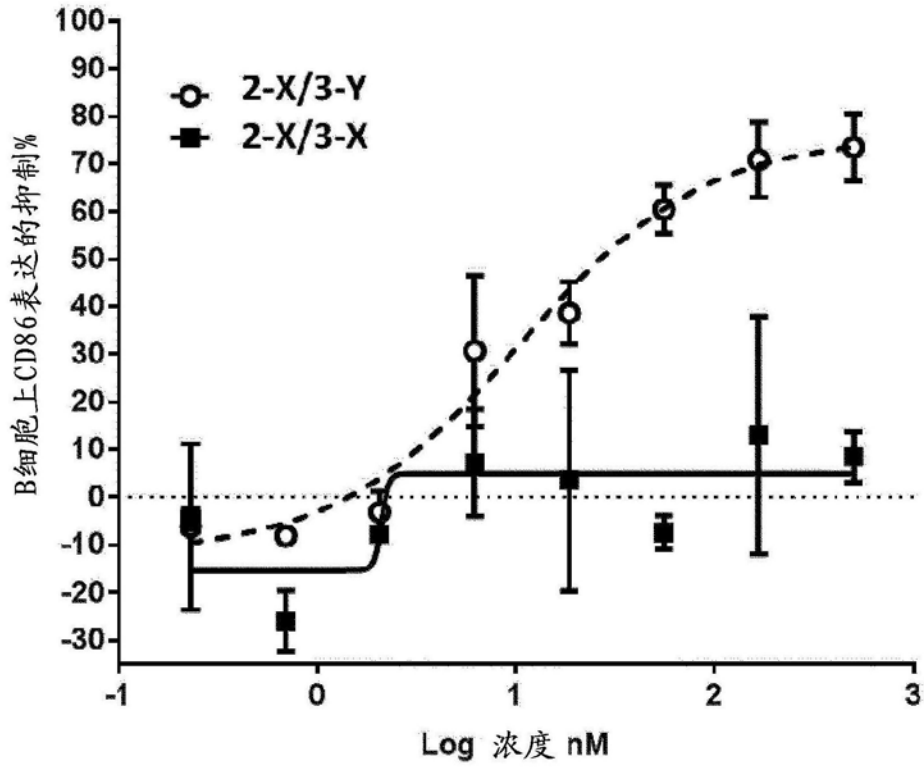


图14

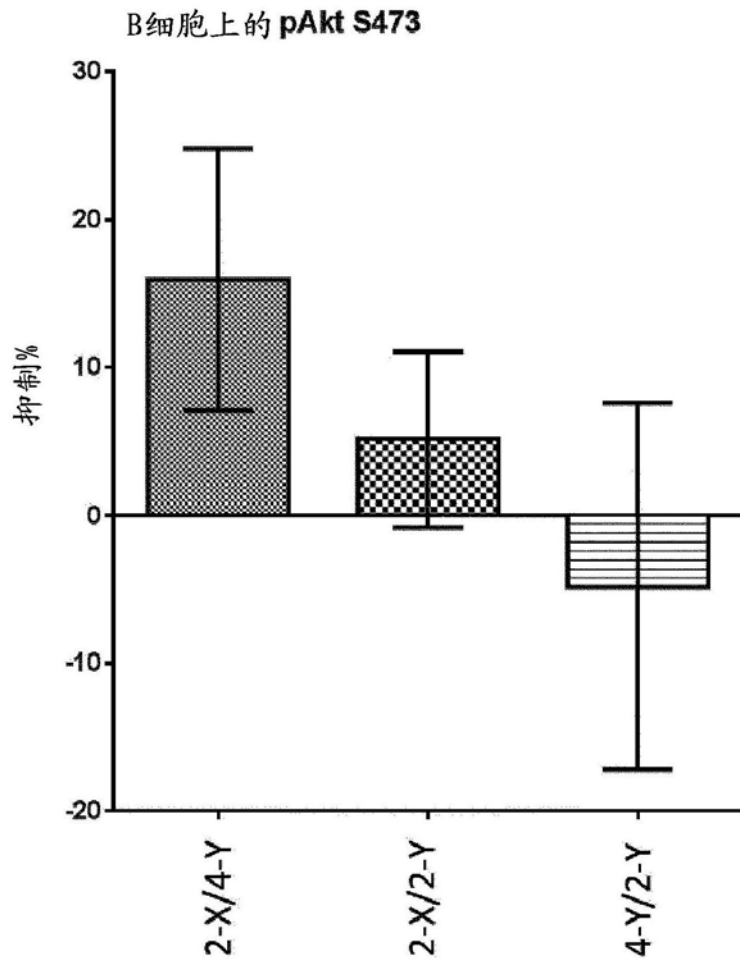


图15

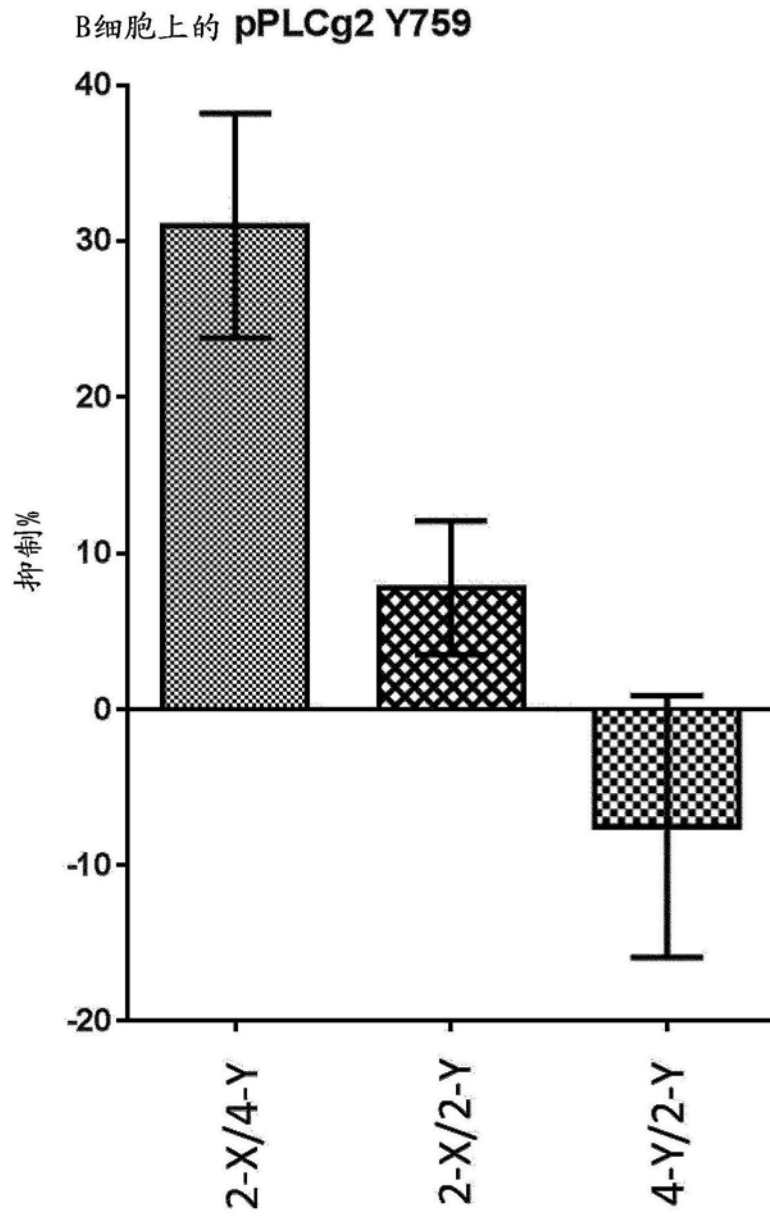


图16

CD86滴定 抗原4/抗原2

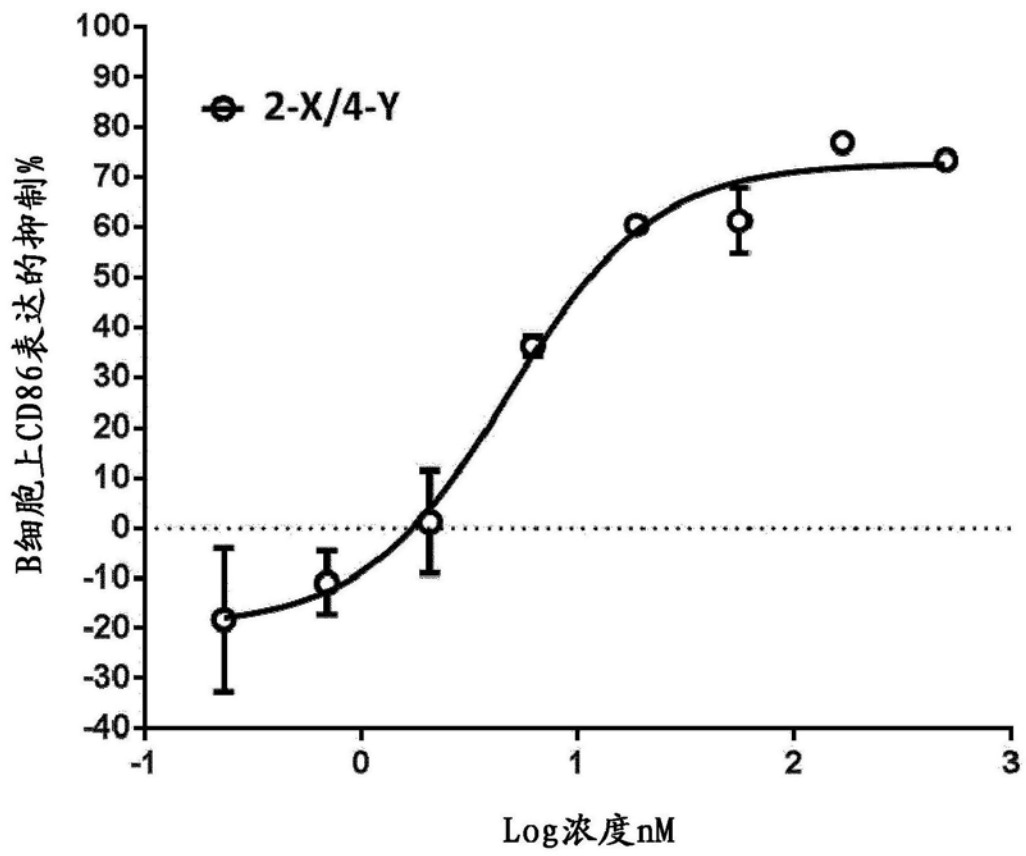


图17

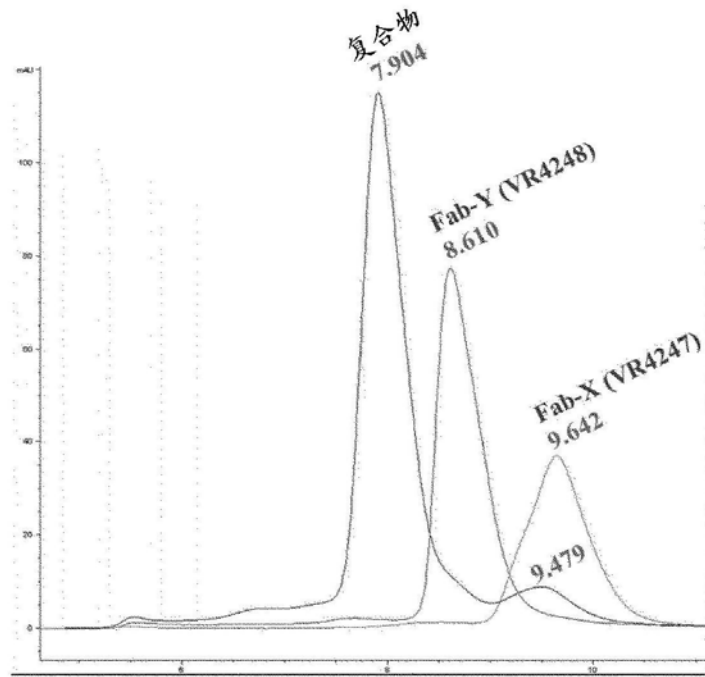


图18

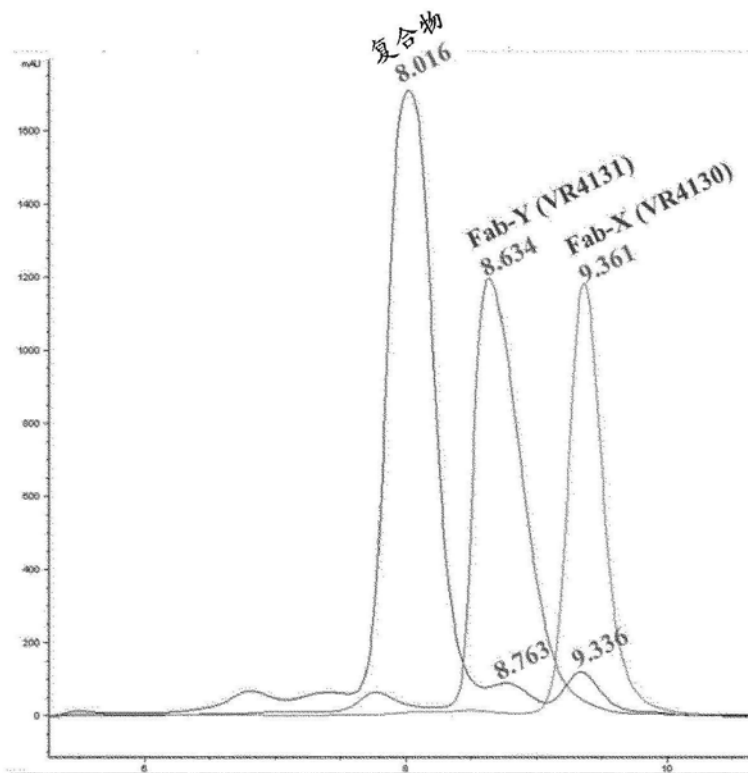


图19

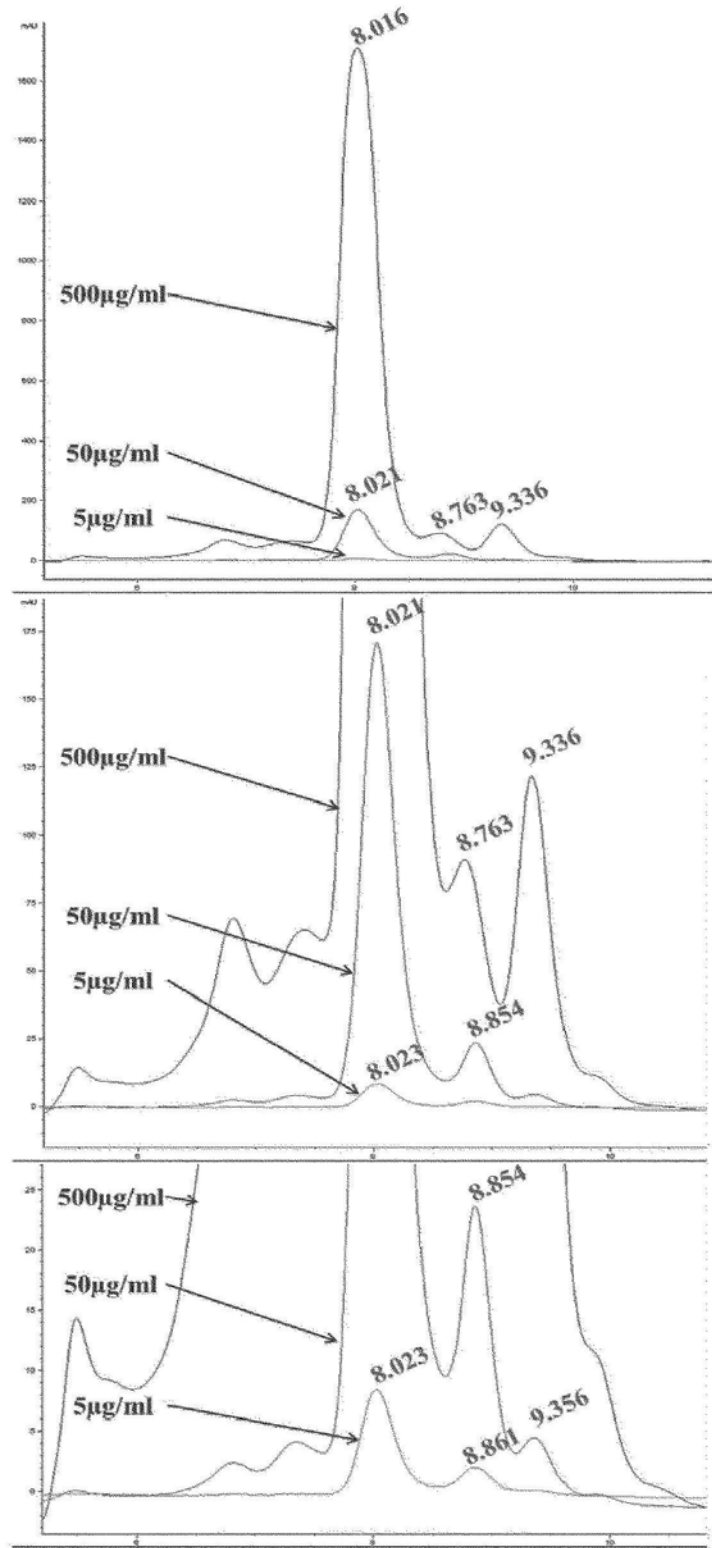


图20

Fab-X特异性抗原1-15

SP_Y...	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-4.37	33.57	10.45	13.99	3.81	4.26	8.34	21.07	4.10	13.98	6.07	16.03	7.39	9.00	23.01
2	27.22	25.26	52.32	63.81	30.98	19.94	26.90	29.48	20.58	30.61	9.05	4.18	14.73	36.56	33.04
3	17.62	69.66	3.88	16.35	7.81	-5.45	6.94	12.43	6.90	7.41	15.55	18.23	8.31	7.13	15.98
4	13.81	70.47	-9.21	11.98	2.91	-0.27	7.92	9.85	0.93	4.02	8.95	40.06	10.33	6.02	15.96
5	5.05	36.09	-1.78	-0.25	10.55	-14.55	11.88	6.91	-0.32	-2.82	9.14	12.00	3.48	7.99	9.03
6	...	21.62	7.24	15.78	16.88	2.69	2.50	14.67	9.48	4.44	11.14	20.93	12.37	...	...
7	10.54	35.72	2.40	16.16	14.92	1.39	2.23	14.14	5.64	10.62	8.02	17.58	9.49	10.65	10.80
8	6.03	26.05	-7.89	3.46	7.85	-18.33	0.26	-5.98	-2.08	0.09	7.83	5.13	2.60	9.59	9.47
9	13.56	32.14	-4.74	2.87	9.63	-7.13	5.17	10.72	0.79	1.69	9.22	13.53	2.49	15.70	10.52
10	15.35	54.98	13.21	17.70	-2.07	6.11	21.65	23.25	9.94	10.33	16.30	41.50	13.23	6.52	16.72
11	...	-0.28	-50.76	-5.43	-0.23	-118.10	-4.78	-9.59	0.08	-4.95	6.09	2.91	-9.06	...	...
12	5.85	8.47	19.70	42.01	20.13	13.12	15.14	26.89	20.69	24.69	18.86	36.32	18.07	20.28	38.97
13	...	31.56	22.19	28.34	15.50	13.12	14.23	27.59	22.46	14.25	16.00	26.84	16.21	...	...
14	9.13	40.70	10.80	14.56	5.88	8.89	7.52	22.68	6.27	9.04	7.34	33.39	11.20	7.01	14.84
15	9.38	33.18	7.13	11.20	15.92	11.35	9.90	19.61	9.90	10.62	13.98	28.99	15.26	13.77	25.64
16	...	26.46	-7.59	19.38	15.65	-24.93	12.05	14.00	15.27	11.98	13.29	20.57	11.99	...	...
17	...	22.79	-4.70	19.07	17.98	-37.56	10.99	11.71	15.83	8.61	10.98	21.28	9.71	...	...
18	...	28.91	29.09	33.25	23.16	10.61	13.85	26.28	21.37	18.39	18.45	32.78	18.27	...	...
19	...	33.63	-15.93	2.00	15.54	-24.55	11.73	10.55	7.32	4.45	15.19	20.98	10.61	...	...
20	...	24.94	-13.88	20.88	10.53	-21.56	8.43	6.69	8.81	7.57	10.73	17.52	13.55	...	...
21	...	23.94	6.69	22.70	22.45	-3.18	13.33	21.28	15.88	10.81	15.92	25.96	17.22	...	...
22	13.93	20.55	-18.75	-4.96	6.90	-17.32	4.12	-3.15	-4.19	-6.48	11.71	2.48	-0.84	9.14	11.68
23	...	24.25	-9.45	22.83	24.63	-26.70	9.65	13.79	10.74	7.96	13.02	24.43	18.33	...	...

Syk抑制%

Fab-Y特异性抗原1-23

图21



Fab-X特异性抗原1-15

SP_Y...	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.81	22.29	11.45	10.78	5.39	1.80	7.43	5.90	2.24	3.29	-2.71	10.80	0.99	6.90	-4.08
2	19.70	18.61	44.00	50.83	23.17	19.01	24.57	21.47	25.89	39.80	12.35	0.52	18.91	28.55	25.89
3	17.93	61.18	3.00	15.38	5.38	-0.12	4.05	3.77	6.84	12.78	11.01	16.71	2.97	9.17	4.69
4	13.34	55.83	-3.82	7.24	1.41	-1.39	6.75	0.89	3.12	3.12	4.16	40.49	1.71	5.13	1.10
5	0.34	25.16	0.51	-0.63	7.36	-1.41	11.49	4.08	5.59	2.99	5.76	11.67	2.84	5.90	-2.06
6	---	20.71	-0.85	6.04	0.40	3.49	-2.60	-0.87	3.41	0.22	1.34	12.34	3.36	---	---
7	10.95	27.95	1.38	15.86	11.27	2.40	2.48	4.45	6.13	16.07	3.18	12.77	3.92	5.85	0.37
8	7.73	24.86	4.02	5.23	3.56	0.49	2.68	-1.16	2.39	1.45	4.10	8.50	-0.64	3.01	0.97
9	7.37	28.27	-0.02	3.22	6.39	1.35	4.75	4.06	4.92	4.09	3.10	10.50	0.62	5.82	1.50
10	17.08	47.69	7.72	5.65	-5.55	1.40	21.89	6.66	5.90	5.11	7.61	35.77	1.50	4.32	-0.06
11	---	11.76	-10.93	1.38	-0.56	-24.94	-1.36	0.83	3.58	3.88	5.92	11.18	-4.57	---	---
12	6.05	-3.88	9.02	29.48	4.92	1.15	1.89	5.75	7.23	20.95	5.44	17.92	3.37	16.34	8.67
13	---	23.78	-0.99	7.30	0.43	-1.40	1.83	6.41	8.91	3.25	2.76	11.64	5.41	---	---
14	4.40	28.11	1.77	5.61	4.01	1.73	5.95	2.45	4.05	6.85	-0.60	20.60	5.45	4.11	0.05
15	4.96	25.60	0.87	3.43	5.41	1.77	1.89	1.80	3.72	1.96	2.29	14.57	5.26	2.36	0.11
16	---	22.39	-5.77	4.50	2.41	-6.86	4.89	2.52	5.19	3.07	3.38	9.47	1.17	---	---
17	---	19.53	-6.98	6.73	2.99	-10.27	2.35	2.13	6.02	2.08	3.10	10.86	2.03	---	---
18	---	19.90	2.43	12.38	2.08	-1.05	1.09	4.25	6.70	4.90	4.40	12.49	4.34	---	---
19	---	35.50	-12.22	-2.38	-1.61	-9.05	5.97	1.78	5.27	4.63	5.92	15.60	3.16	---	---
20	---	21.53	-9.67	2.95	-0.16	-6.71	-3.46	-4.81	4.13	2.31	6.52	10.96	4.25	---	---
21	---	19.03	-6.66	2.36	1.10	-6.49	-0.95	5.09	4.96	3.55	3.97	10.89	3.63	---	---
22	14.73	28.47	-5.00	0.58	3.97	-0.08	3.70	-1.25	1.72	0.99	11.40	7.99	2.80	8.39	4.58
23	---	19.72	-16.22	0.75	-1.16	-11.03	-3.57	3.30	3.57	1.23	4.90	8.22	4.20	---	---

Fab-Y特异性抗原1-23

抑制%

图22

Fab-x特异性抗原1-15

SP_Y...	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-11.06	53.06	-1.56	6.02	-8.08	-12.41	3.84	-12.93	-8.22	-8.88	-11.49	-3.34	-17.29	-4.43	-6.28
2	40.41	37.15	48.29	48.35	39.50	30.66	40.36	25.61	42.23	42.64	32.59	37.11	26.58	35.70	38.11
3	13.19	70.81	2.37	15.53	8.68	7.93	12.32	3.78	10.56	14.18	8.76	-1.58	6.61	10.75	10.83
4	8.35	55.50	-6.07	17.80	7.97	7.14	8.49	6.54	6.98	9.67	12.96	41.04	5.99	9.28	7.89
5	-3.80	40.21	-0.85	13.54	2.05	-2.13	3.01	-6.86	0.91	2.02	0.76	4.43	-3.42	4.06	0.15
6	...	40.39	6.67	19.26	-4.86	12.95	3.52	2.59	6.73	5.65	5.28	4.77	-1.03	...	...
7	0.53	45.36	4.87	18.76	4.08	0.72	-1.43	5.07	4.69	11.48	6.48	5.72	4.78	0.73	-3.71
8	6.81	37.54	5.72	16.25	-1.45	2.38	0.64	0.17	1.10	2.08	6.50	7.58	2.18	-4.37	-4.53
9	0.51	42.34	0.95	9.41	-0.30	1.07	2.86	-2.56	0.51	-0.55	2.07	2.49	-2.84	4.54	0.16
10	11.13	52.32	3.75	12.67	-4.41	3.82	15.78	-3.15	5.70	4.26	1.77	22.73	-4.68	7.65	8.05
11	...	33.40	-3.95	18.04	7.48	6.00	3.13	4.24	5.66	13.11	9.85	11.24	2.04	...	...
12	0.89	29.50	-7.93	38.94	2.68	4.95	-0.13	-2.33	2.52	15.03	-0.82	3.63	-5.61	25.99	12.57
13	...	35.33	-4.80	10.35	-4.98	-7.45	-7.91	-6.47	3.78	-0.83	-4.68	-3.84	-9.54	...	...
14	1.62	44.02	0.91	16.05	1.80	-2.56	1.09	-4.49	3.94	5.30	-0.19	8.15	-5.85	5.21	0.86
15	2.25	36.02	-2.44	10.00	-0.22	0.37	-2.20	-2.11	2.41	1.84	3.23	2.78	2.51	-2.19	-4.62
16	...	33.56	-3.12	15.33	0.19	-5.46	-0.71	-5.67	1.83	1.35	-0.24	-1.99	-8.53	...	...
17	...	35.02	-4.92	16.87	1.78	-2.20	0.34	-2.12	3.07	1.17	0.98	0.80	-2.14	...	...
18	...	31.31	-1.77	19.71	-6.19	-4.39	-3.72	-3.91	2.70	3.44	-0.42	-1.65	-5.72	...	...
19	...	50.00	-2.93	9.82	2.01	9.54	10.18	2.60	11.44	9.84	7.96	9.17	3.37	...	...
20	...	38.56	-1.83	18.96	1.40	5.57	0.37	1.23	4.23	6.85	10.48	6.54	2.60	...	...
21	...	36.74	1.67	11.59	-5.60	6.23	0.59	6.00	6.99	5.11	3.12	3.73	3.44	...	...
22	-2.71	40.50	-2.45	12.91	-1.39	6.77	1.56	4.97	1.68	2.93	18.10	8.41	8.06	-2.35	-4.93
23	...	33.54	-1.68	5.45	-2.46	7.13	0.05	-3.14	2.99	3.34	6.02	4.97	-4.12	...	...

AKT抑制%

Fab-y特异性抗原1-23

图23

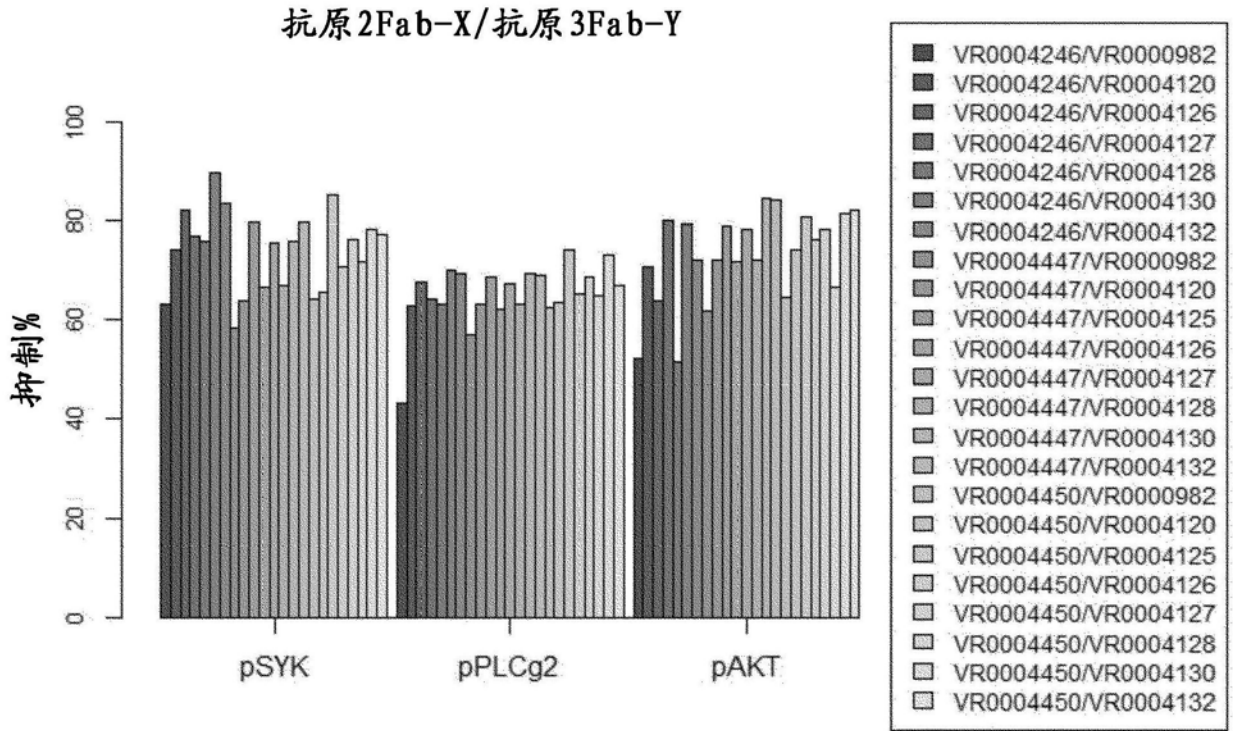


图24

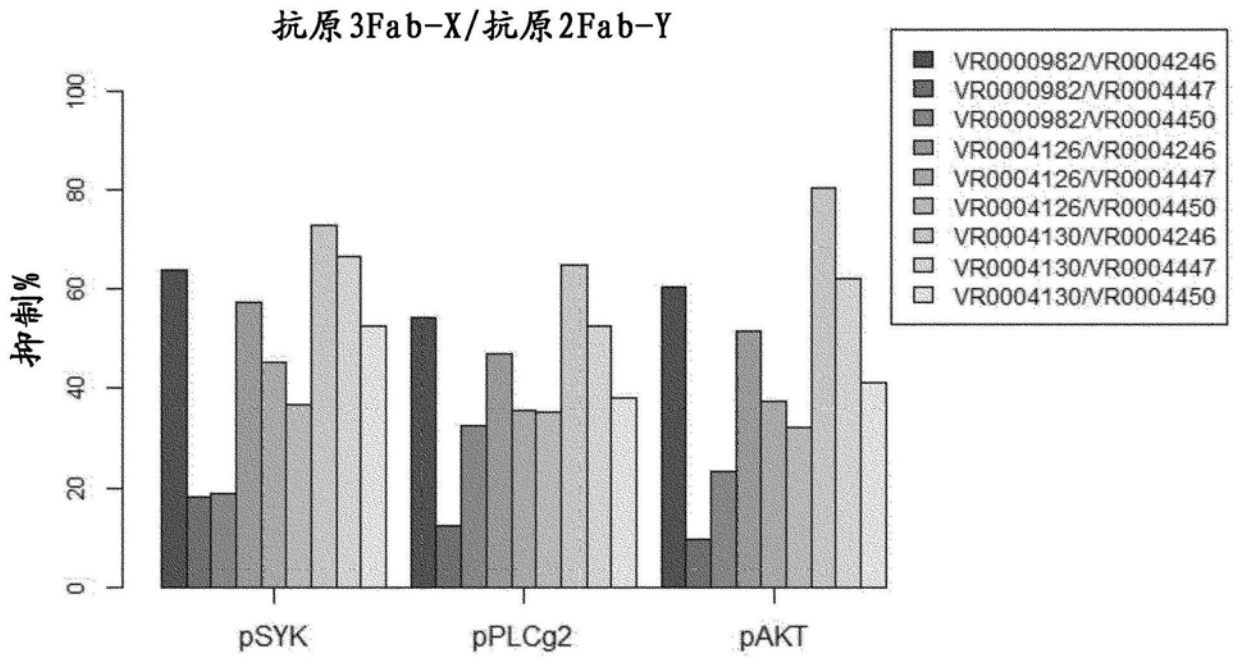


图25

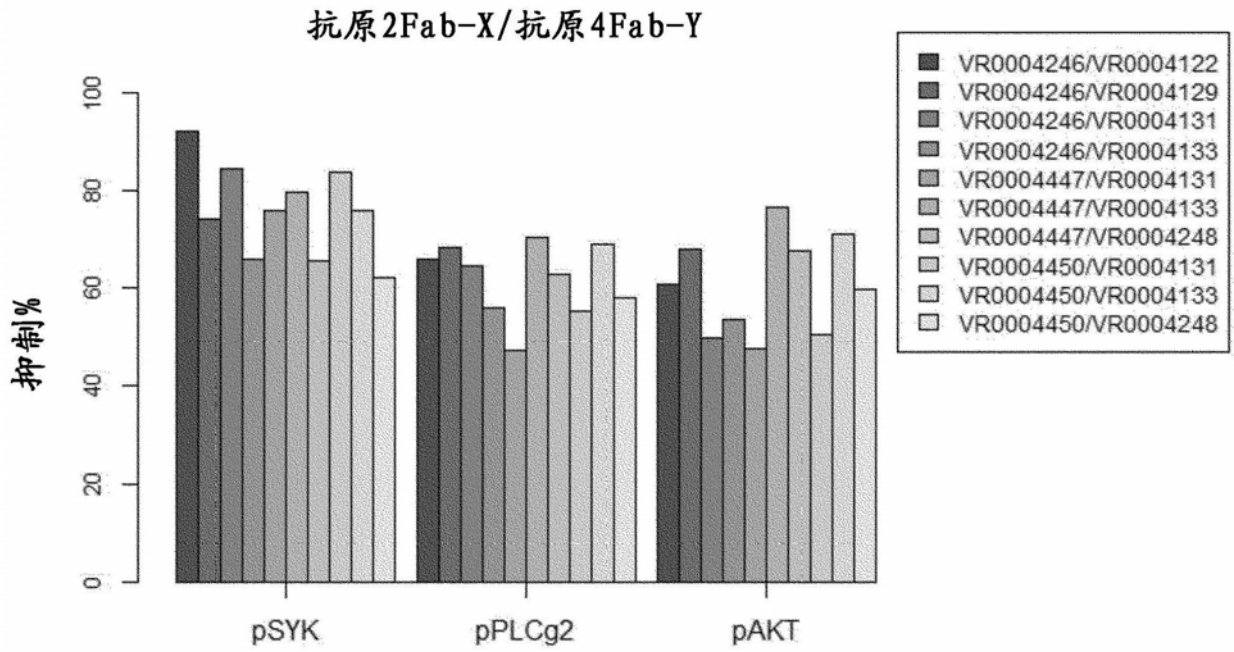


图26

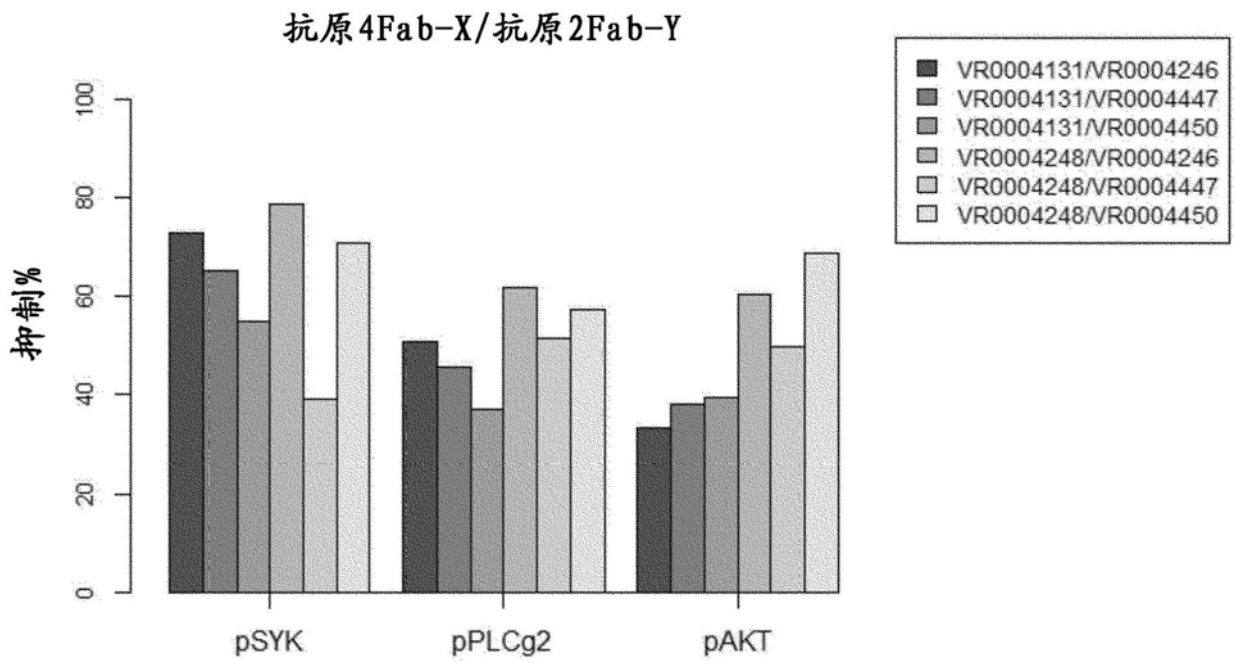


图27

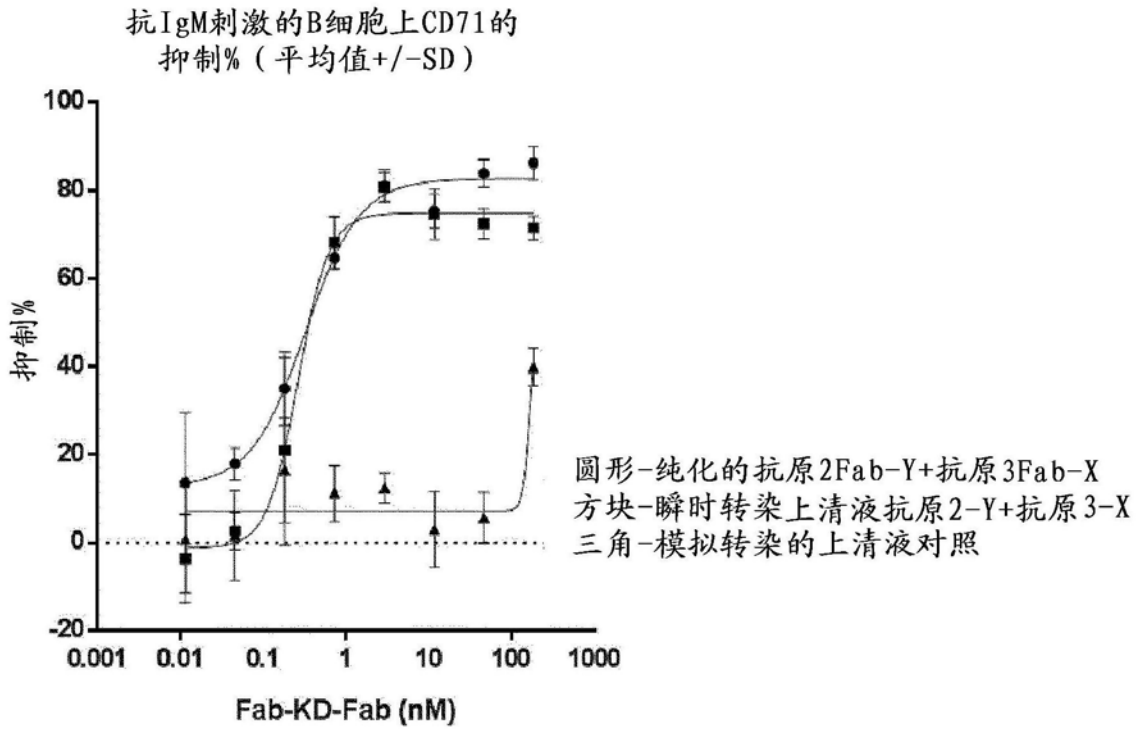


图28

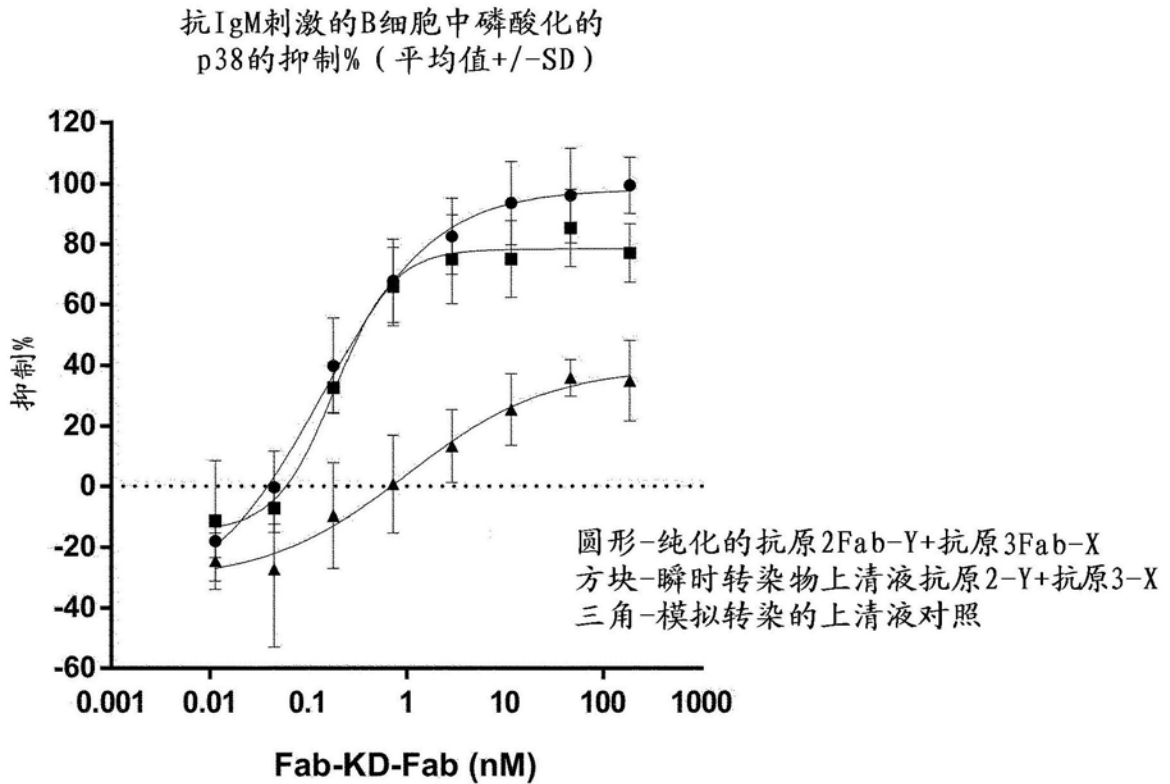


图29

与抗原3-特异性Fab-X瞬时转染物组合的纯化的  
抗原2-特异性Fab-Y (VR4447) 对来自UCB-Cone-172  
的B细胞的磷酸读出数据的抑制

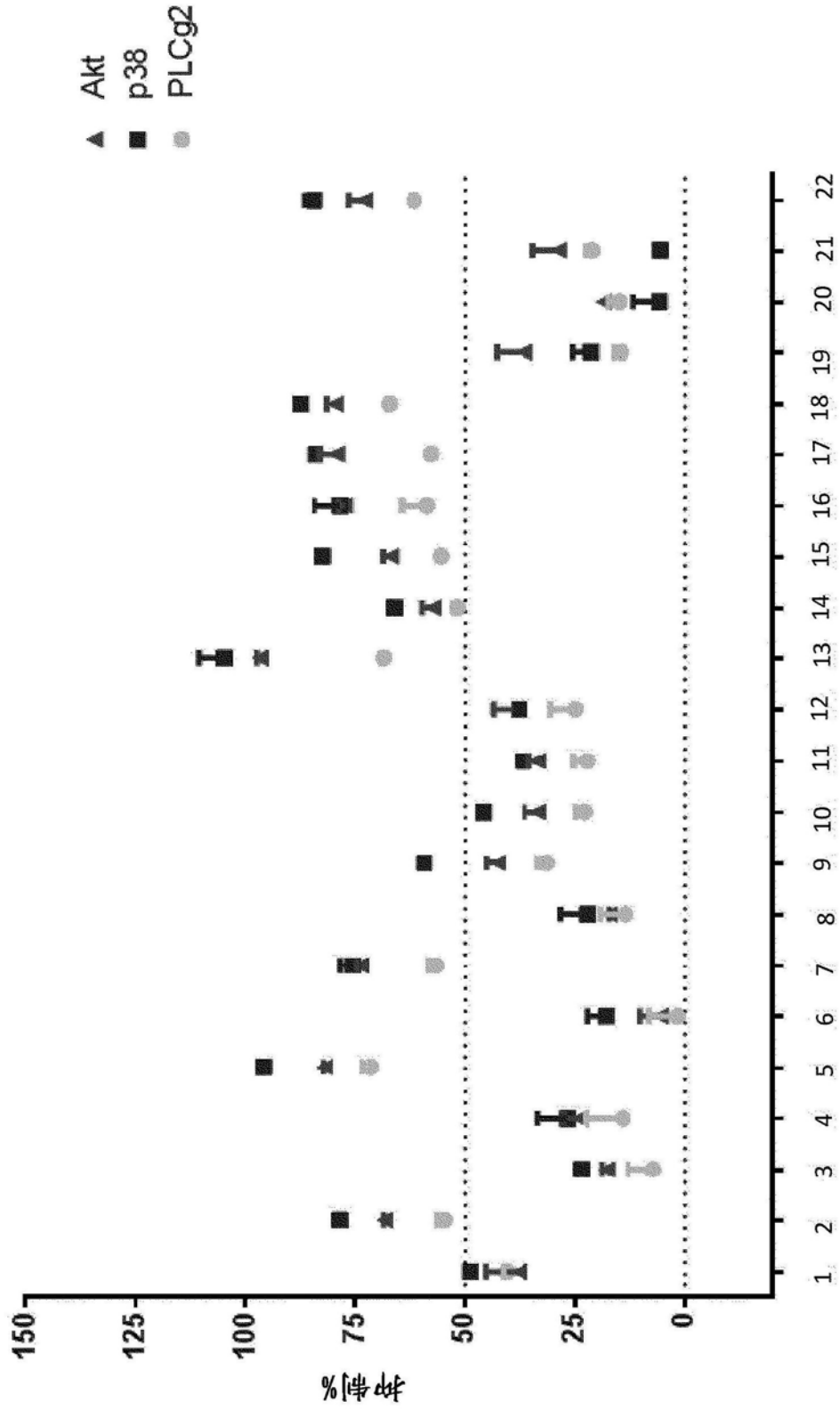


图30

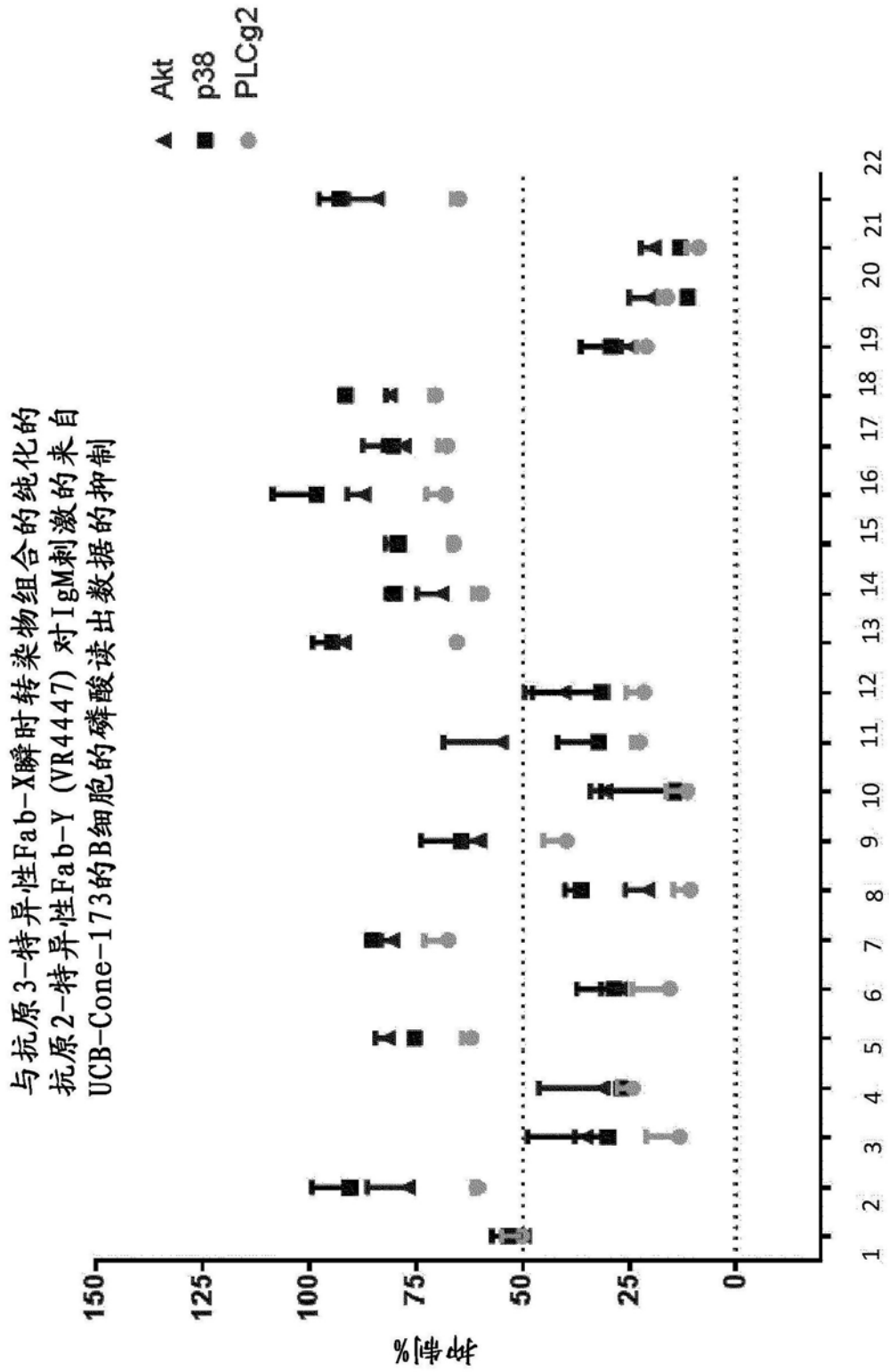


图31

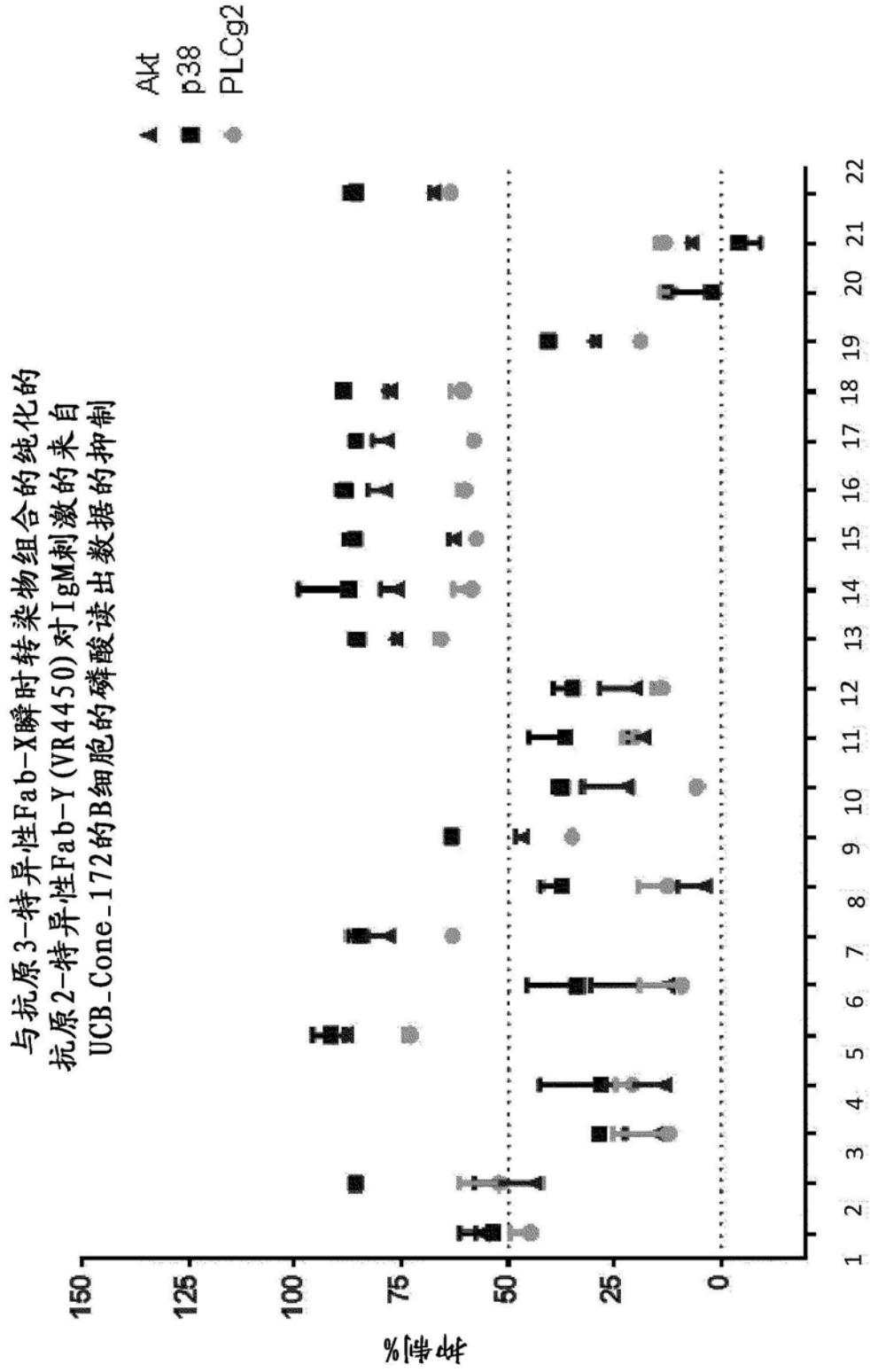


图32



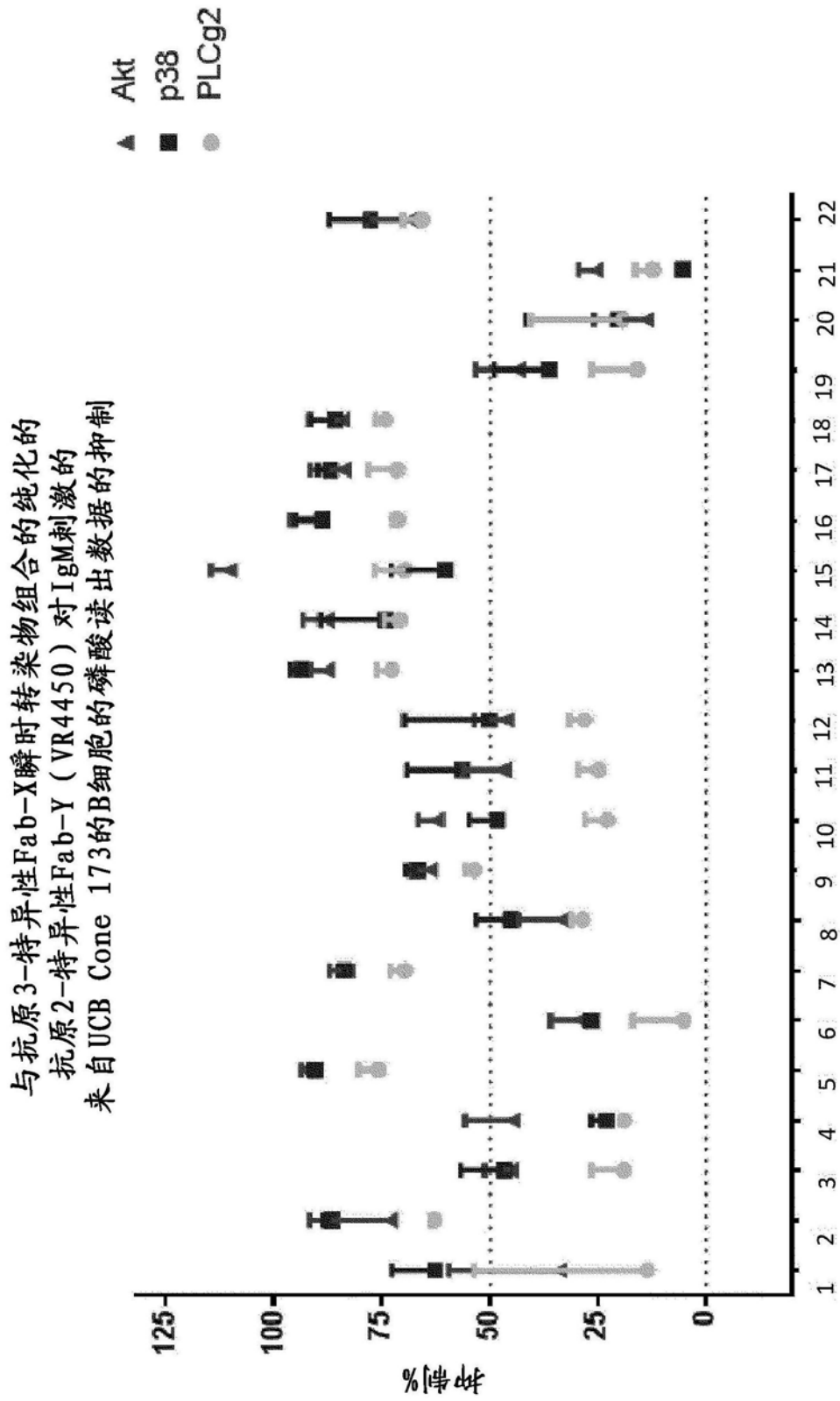


图33

抗原3和抗原2特异性Fab-Kd-Fab和BYbe对抗  
IgM刺激的B细胞中磷酸化的PLC  $\gamma$  2的抑制% (+/-SD)

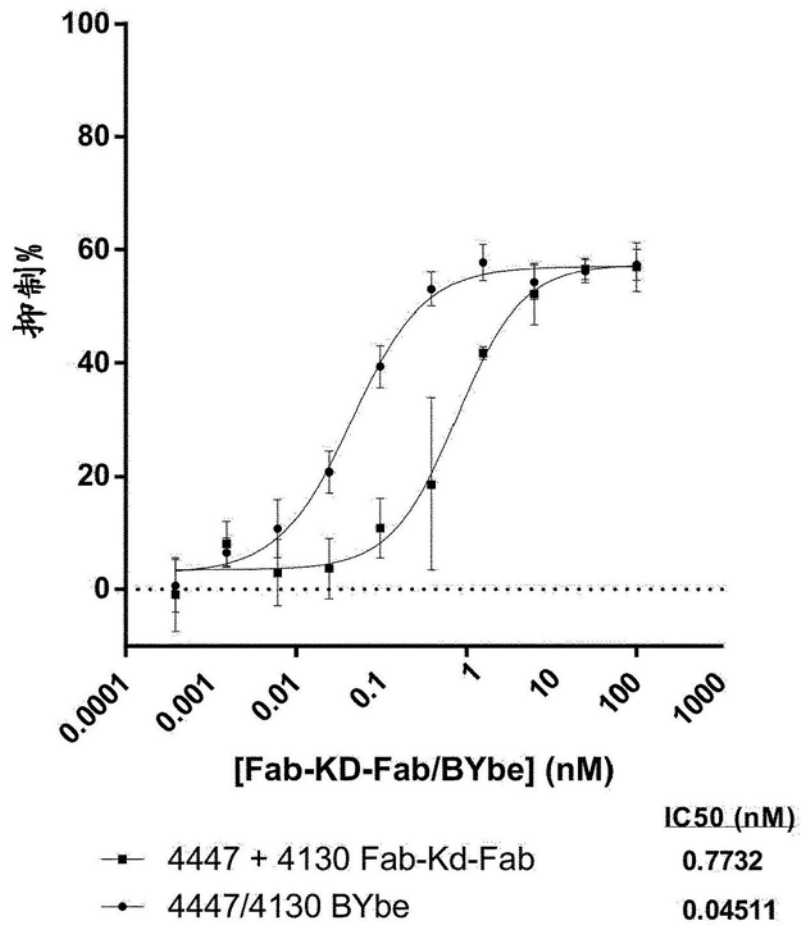


图34

抗原3和抗原2特异性Fab-Kd-Fab和BYbe对抗IgM刺激的B细胞中磷酸化的p38的抑制% (+/-SD)

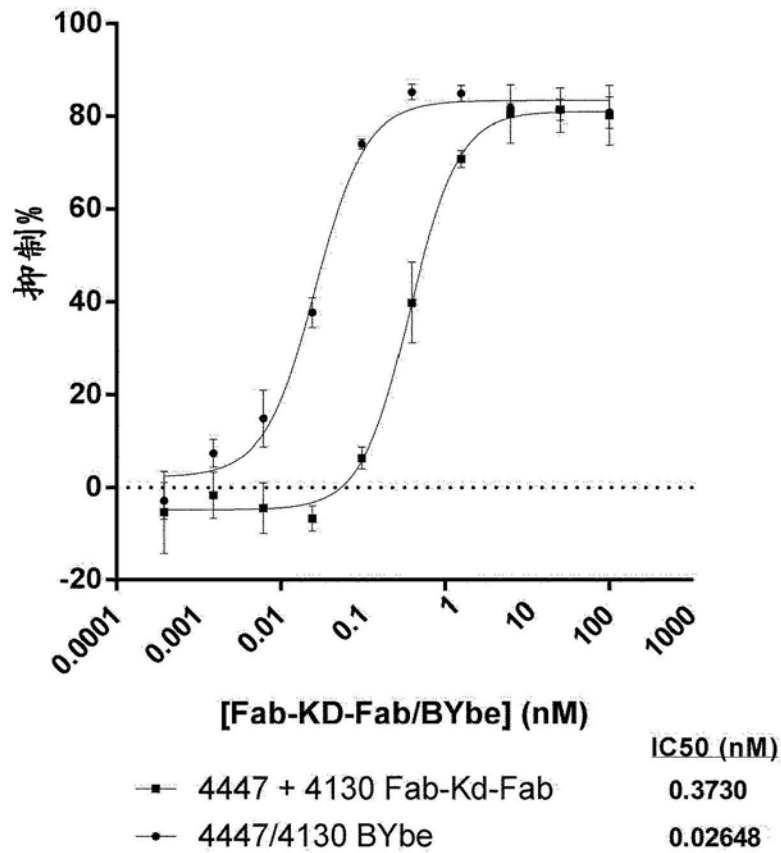


图35

抗原3和抗原2特异性Fab-Kd-Fab和BYbe对抗IgM刺激的B细胞中磷酸化的Akt的抑制% (+/-SD)

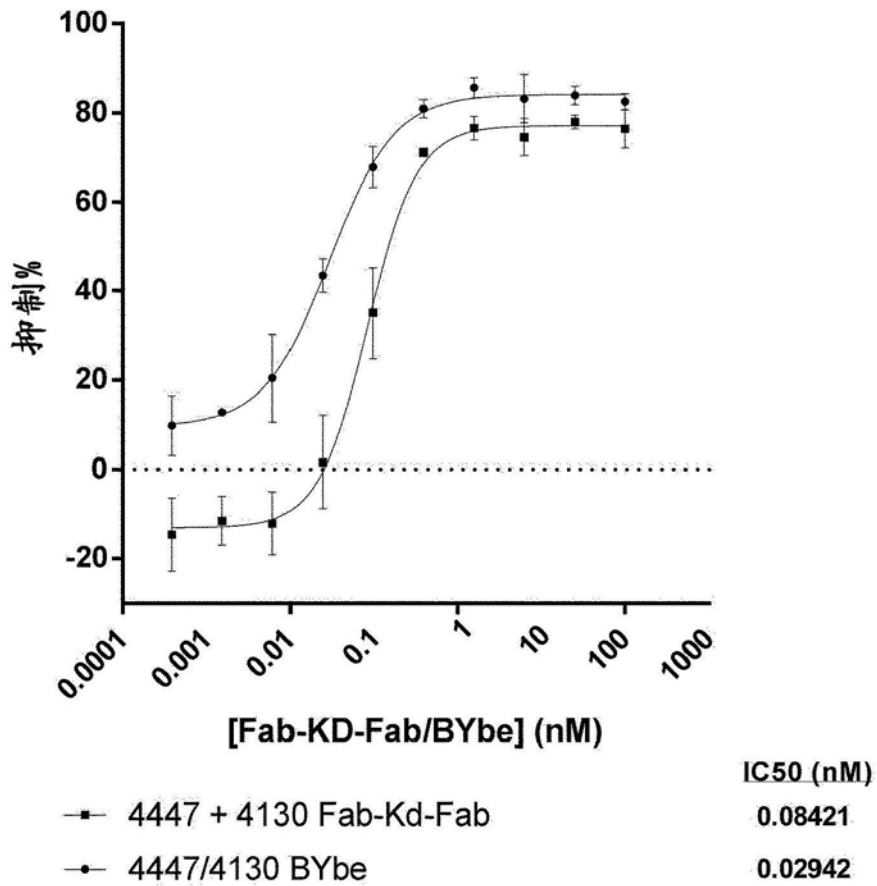


图36

抗原3和抗原2特异性Fab-Kd-Fab和BYbe  
对抗IgM诱导的B细胞上CD71的抑制%

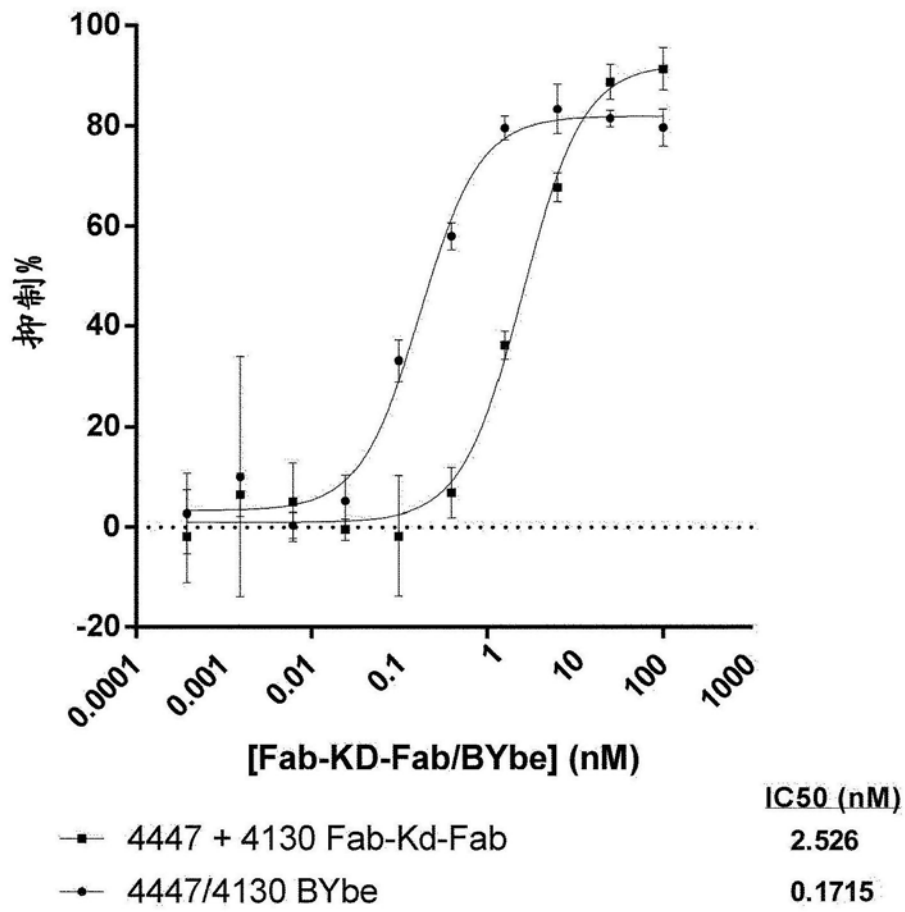


图37

抗原3和抗原2特异性Fab-Kd-Fab和BYbe对抗IgM  
诱导的B细胞上CD40的抑制%

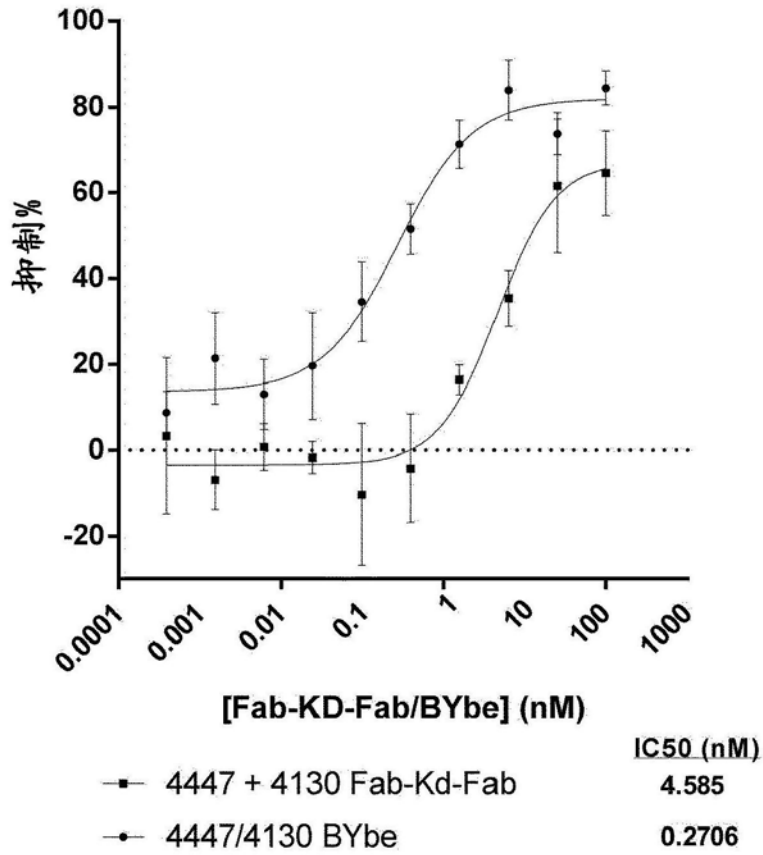


图38

抗原3和抗原2特异性BYbe和Fab-Kd-Fab对抗IgM  
诱导的B细胞上CD86的抑制%

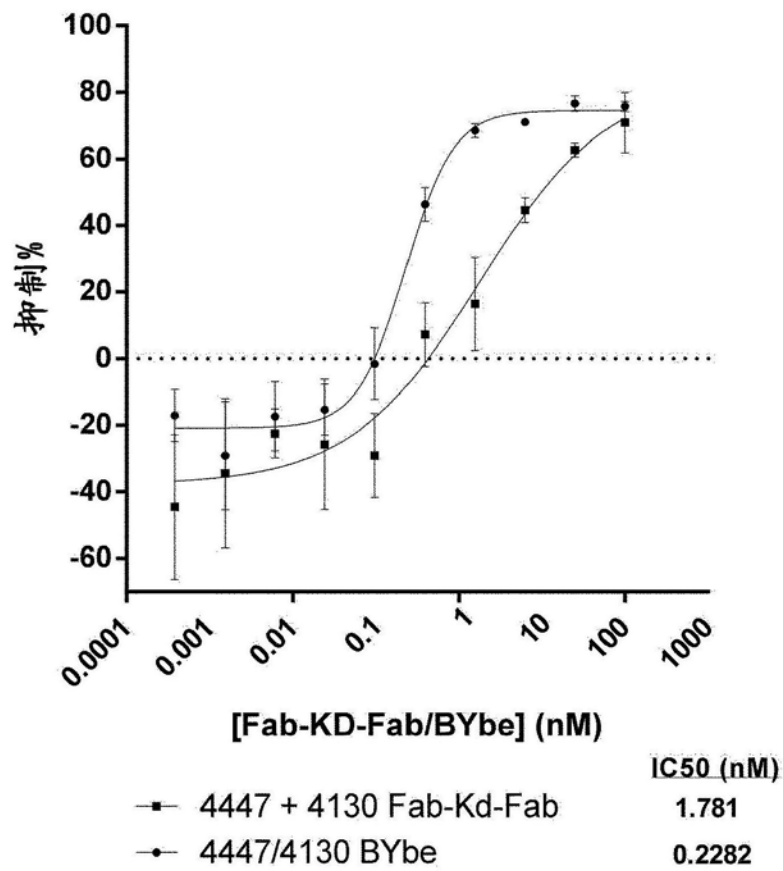


图39

用山羊抗人抗IgM抗体刺激的总B细胞上CD27表达的抑制百分数

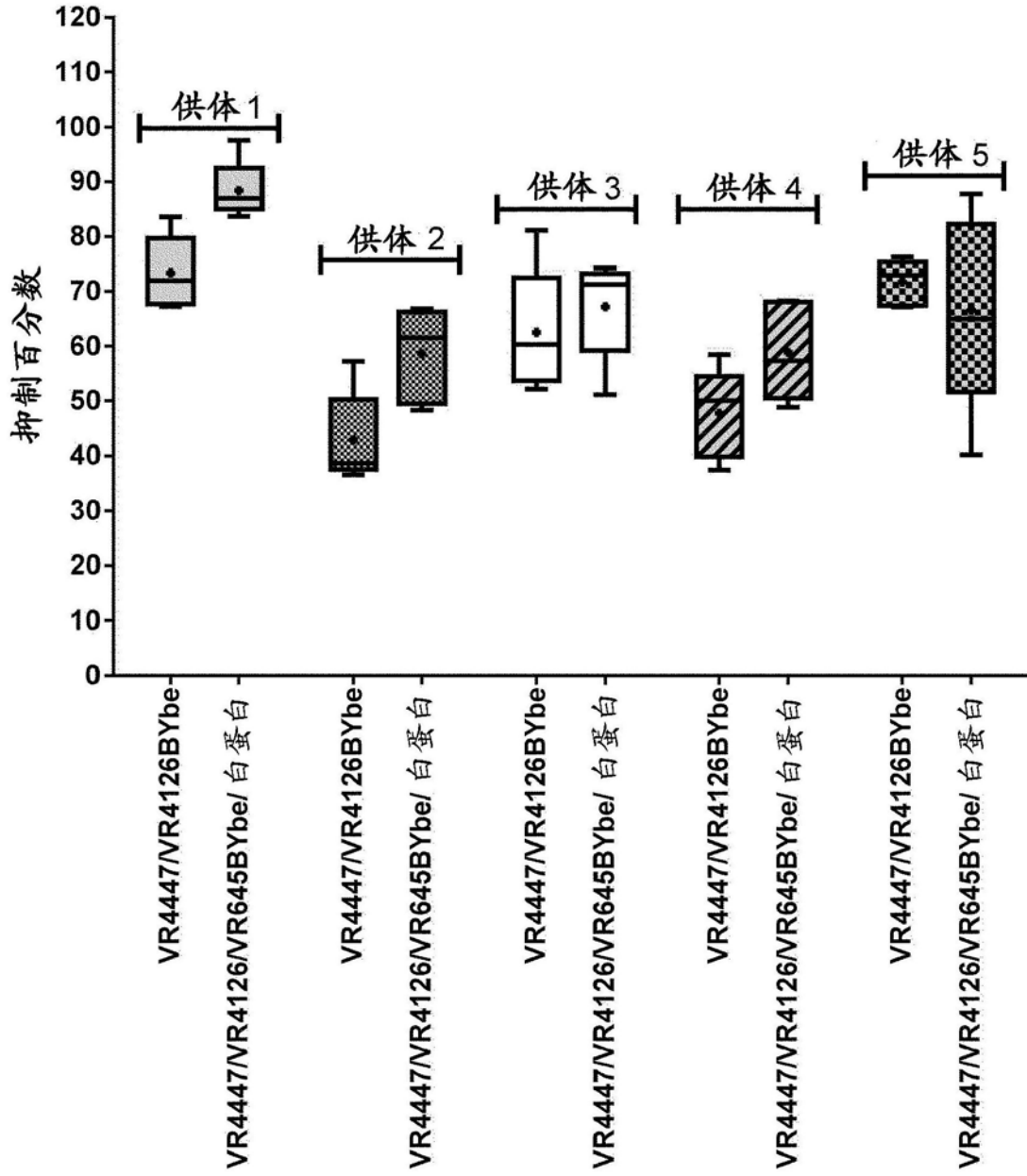


图40



用山羊抗人抗IgM抗体刺激的总B细胞上  
CD71表达的抑制百分数

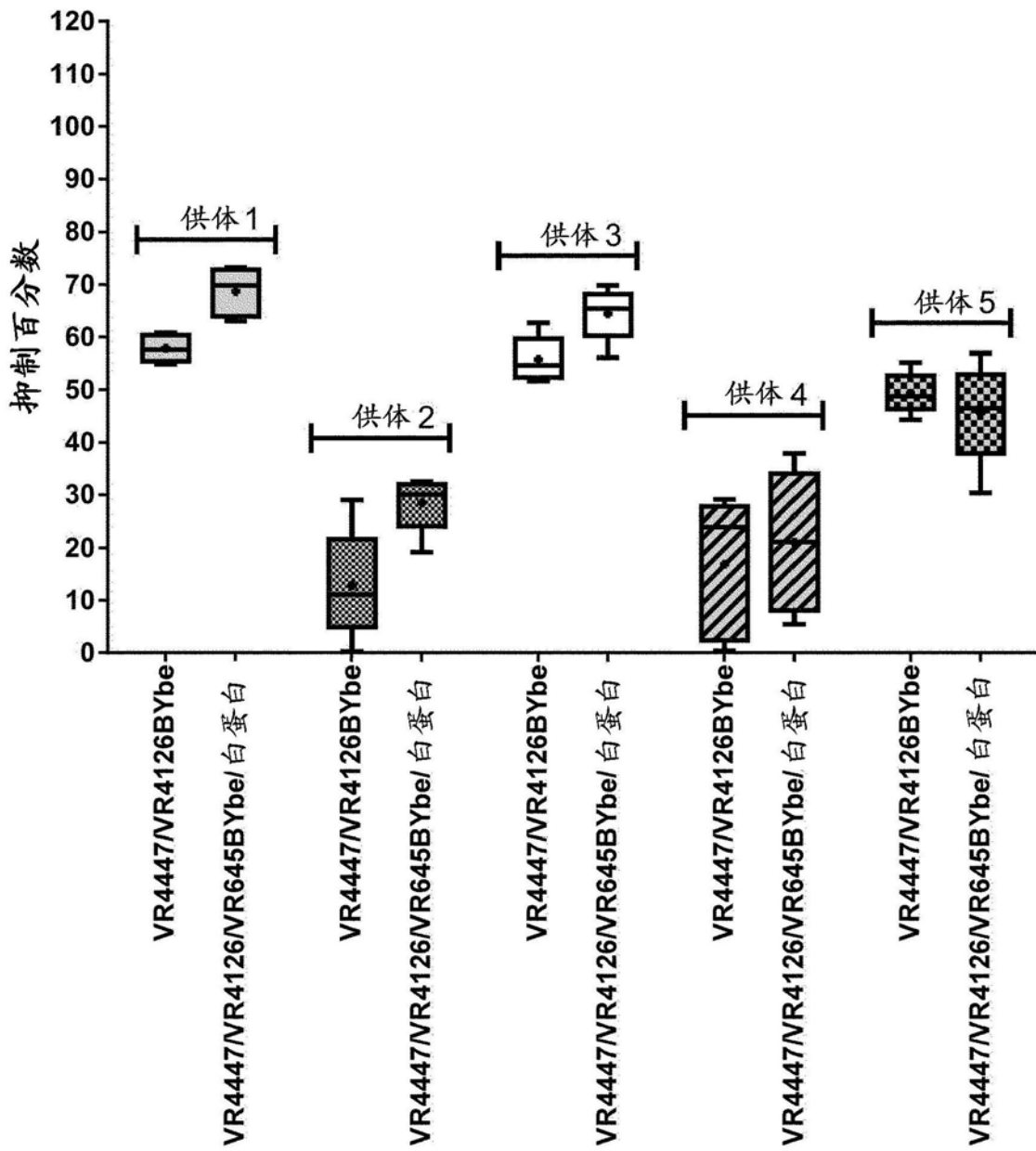


图41

用山羊抗人抗IgM抗体刺激的总B细胞上CD86表达的抑制百分数

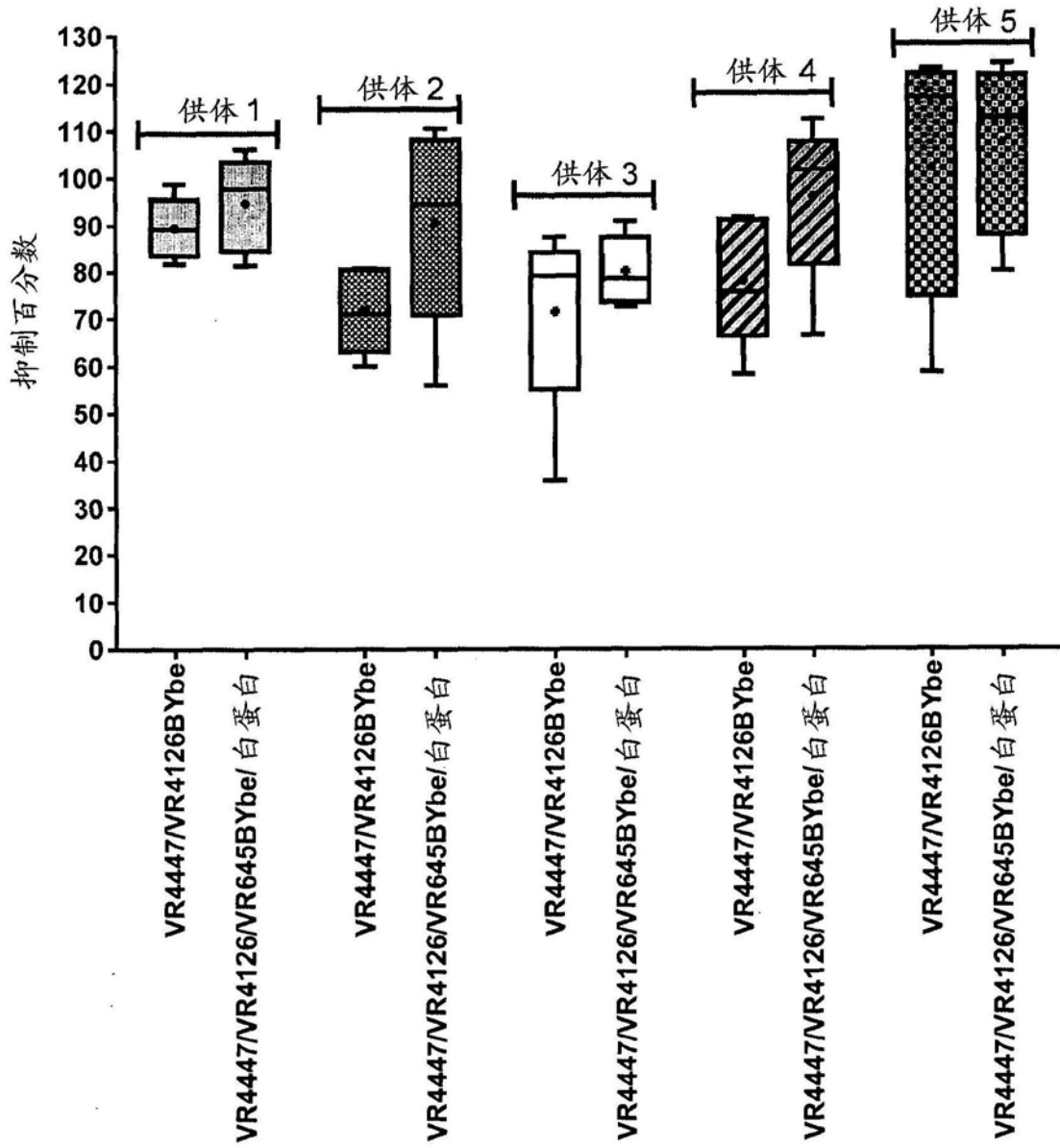


图42

用山羊抗人抗IgM抗体刺激的总B细胞上  
CD27表达的抑制百分数

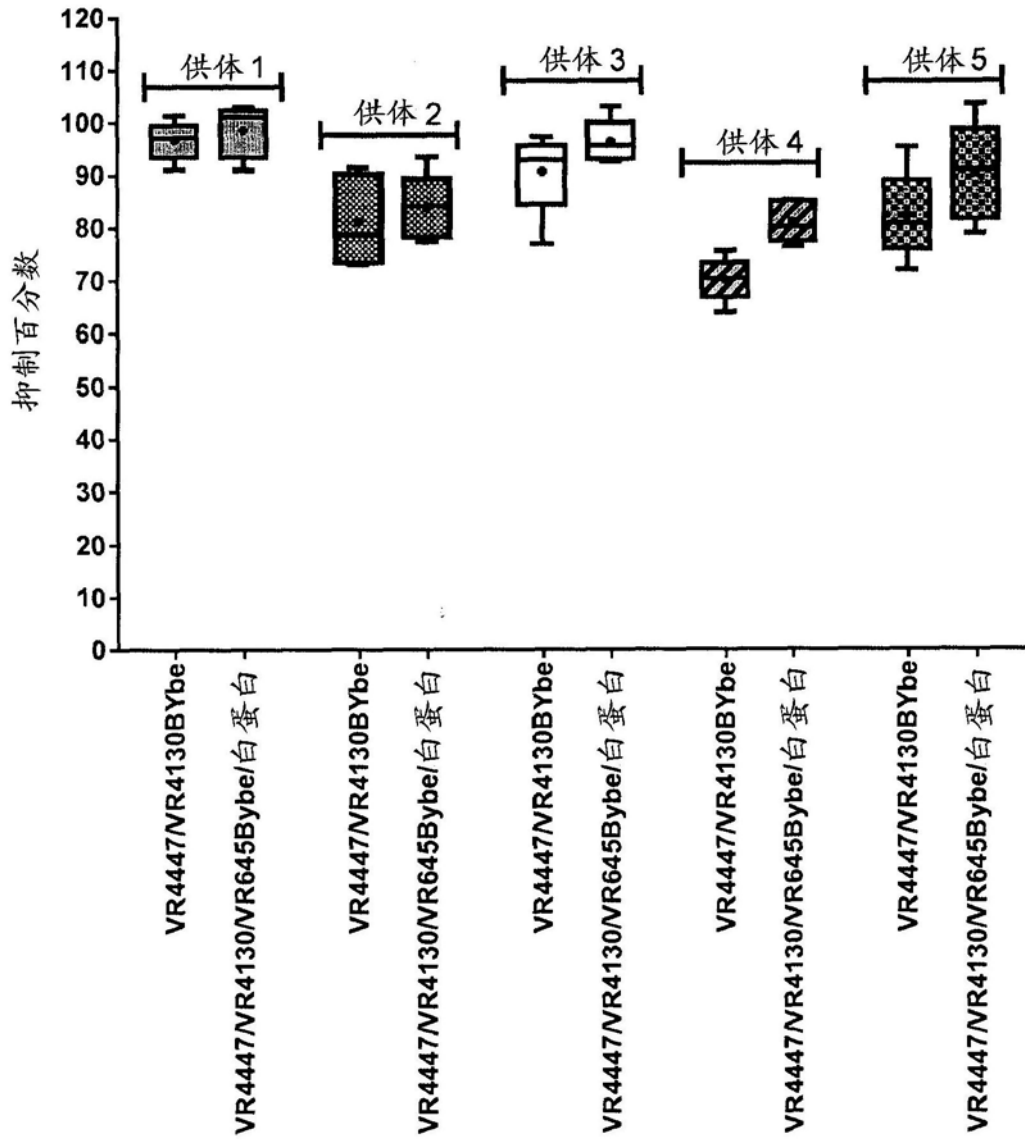


图43

用山羊抗人抗IgM抗体刺激的总B细胞上  
CD71表达的抑制百分数

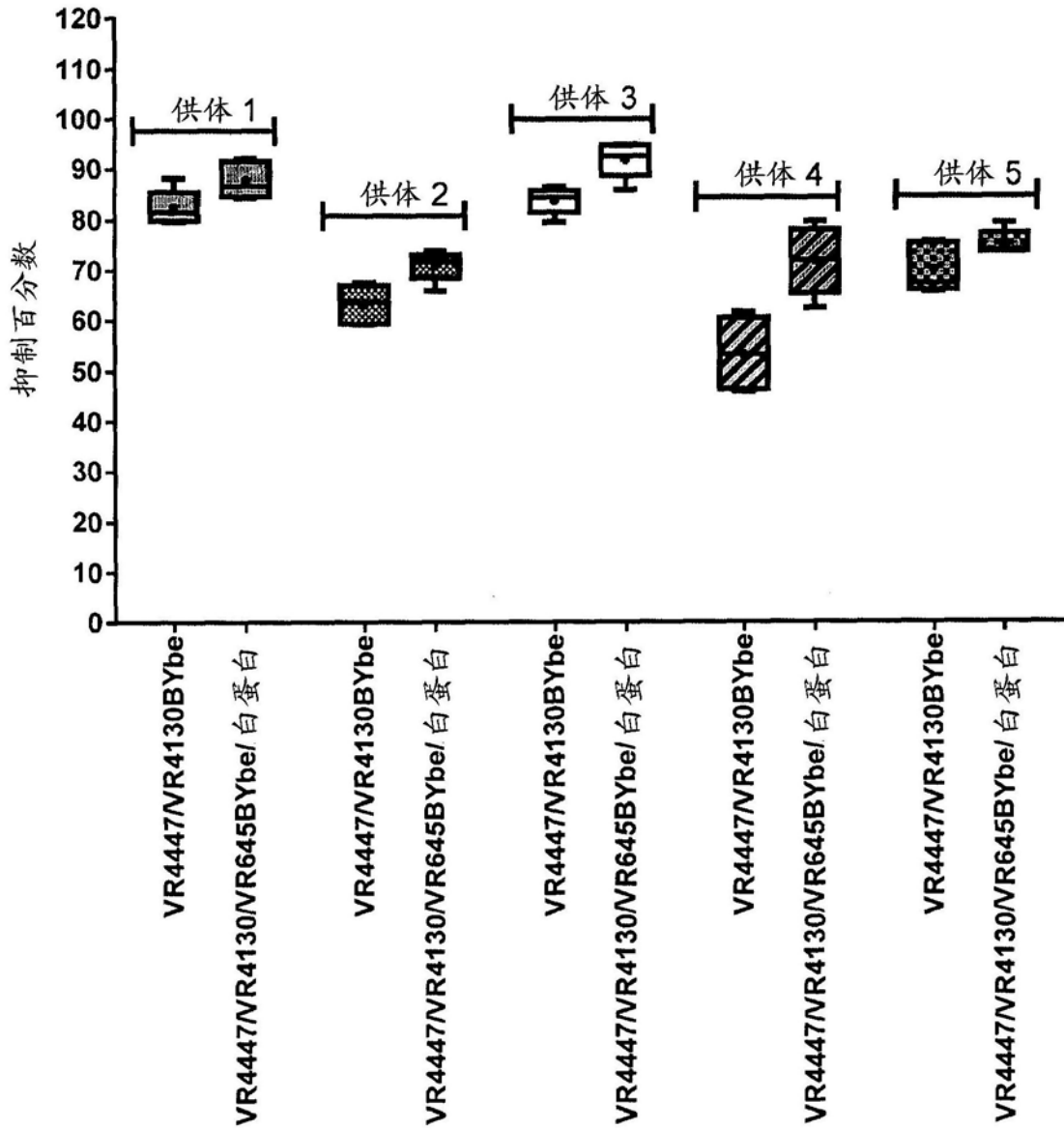


图44

用山羊抗人抗IgM抗体刺激的总B细胞上  
CD86表达的抑制百分数

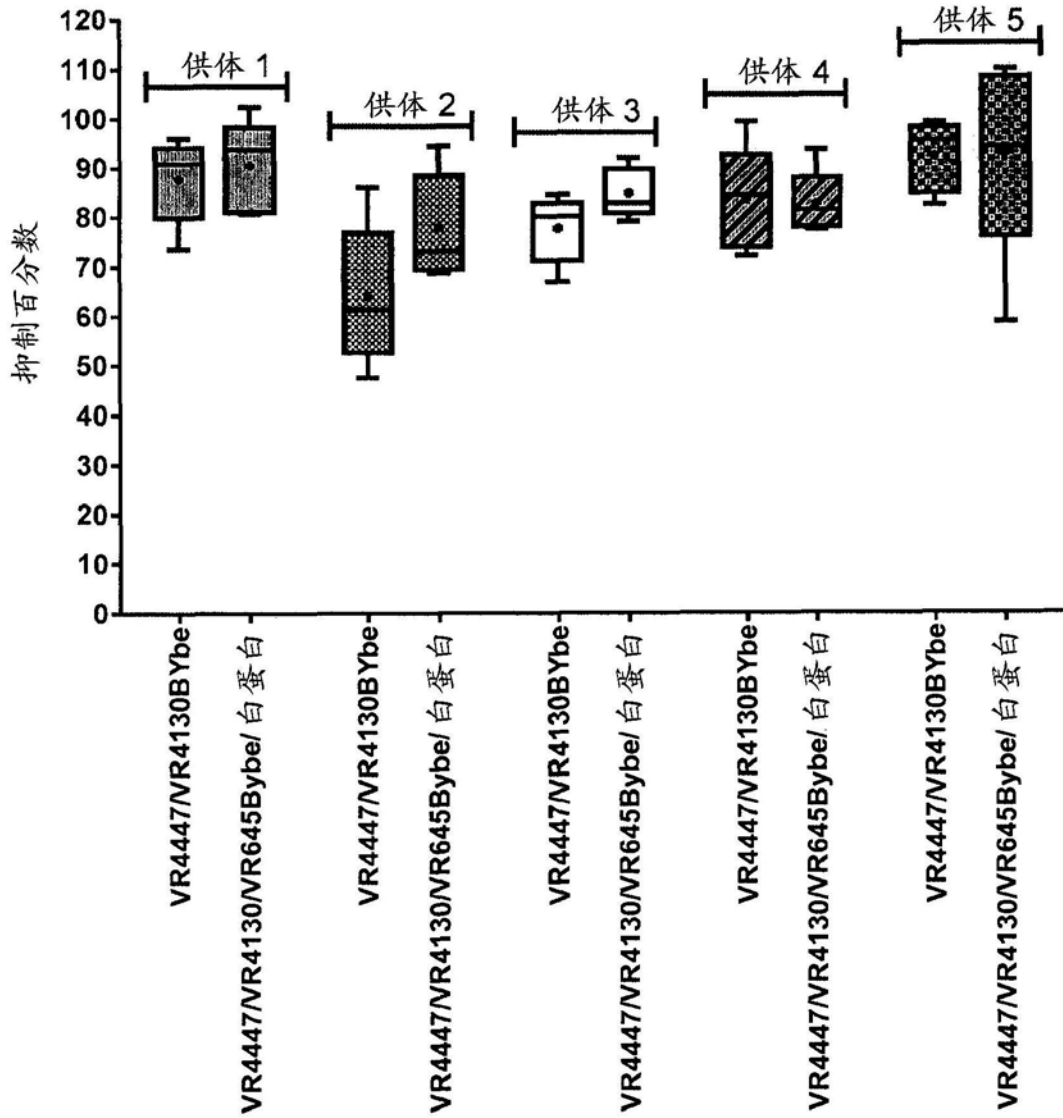


图45