



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102971342 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 13

(21) 申请号 201180017079. 3

C12N 15/13(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 01. 28

C12P 21/08(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/53(2006. 01)

61/299, 162 2010. 01. 28 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 09. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/022998 2011. 01. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02011/094593 EN 2011. 08. 04

(71) 申请人 AB 生物科学公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 张秀青

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 孔青 林森

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

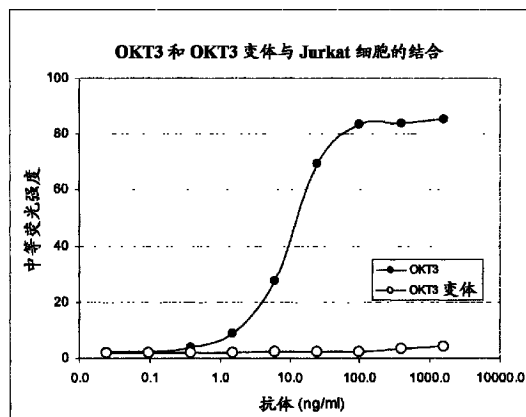
权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 10 页

(54) 发明名称

亲和力降低的新抗体和制备所述抗体的方法

(57) 摘要

本发明提供用于制备合理设计的亲和力降低的新抗体的方法。本发明的方法制备这样的抗体，其具有设计成在不改变总体三维抗体结构的情况下降低或消除亲代抗体的抗原结合活性的可变结构域。使用在不同测定法中采用本发明方法制备的抗体允许研究人员将特异性抗原-抗体相互作用产生的作用与其它非特异性抗体作用区分。



1. 一种用于产生具有降低的结合能力的抗体或抗体片段的方法,所述方法包括以下步骤:

- a) 获得靶抗原的信息;
- b) 合理鉴定抗体或抗体片段内能够与靶抗原相互作用的一个或多个结合氨基酸;
- c) 改变抗体或抗体片段内一个或多个结合氨基酸序列使得所得抗体或抗体片段具有降低的结合抗原的能力;和
- d) 测试经改变的抗体或抗体片段与靶抗原的结合亲和力,使得经改变的抗体或抗体片段具有降低的与抗原结合的能力。

2. 一种用于产生具有降低的特异性结合能力的互补决定区(CDR)的方法,所述方法包括以下步骤:

- a) 从重链或轻链可变区、CDR多肽序列内鉴定CDR多肽序列中能够与抗原相互作用的至少一个氨基酸;和
- b) 改变CDR多肽的氨基酸序列,以降低或消除与抗原的相互作用。

3. 权利要求2的方法,其中CDR多肽序列中的氨基酸改变通过用非相互作用的氨基酸替换至少一个氨基酸来进行。

4. 权利要求2的方法,其中一个氨基酸与抗原之间的相互作用是选自以下的分子吸引力:氢键、弱的共价相互作用、极性力、非极性力、盐桥和范德华力。

5. 权利要求2的方法,其中所述CDR多肽序列中的氨基酸选自:天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、组氨酸和谷氨酰胺。

6. 权利要求2的方法,其中所述CDR多肽序列中的氨基酸选自:酪氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、色氨酸、精氨酸、苯丙氨酸和甘氨酸。

7. 权利要求3的方法,其中所述非相互作用的氨基酸选自:丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸和甲硫氨酸。

8. 权利要求6的方法,其中所述非相互作用的氨基酸是丙氨酸。

9. 权利要求2的方法,其中鉴定相互作用的氨基酸的步骤通过分析描述CDR多肽序列和抗原之间的复合物的晶体结构来进行。

10. 权利要求2的方法,其中所述CDR多肽序列位于抗体或抗体片段内。

11. 权利要求10的方法,其中所述抗体或抗体片段选自:

- (a) 完整的免疫球蛋白分子;
- (b) scFv;
- (c) Fab片段;
- (d) Fab'片段;
- (e) F(ab')₂;
- (f) Fv;
- (g) Fd片段;和
- (h) 二硫键连接的Fv。

12. 权利要求10的方法,所述方法还包括验证抗原结合丧失的步骤。

13. 权利要求12的方法,其中所述验证步骤通过FACS、ELISA或放射免疫测定法实现。

14. 权利要求10的方法,其中所述抗体具有大于或等于约 10^{-7} 的近似解离常数(K_D)。

15. 权利要求 10 的结合能力降低的抗体。
16. 一种用于产生具有降低的结合能力的抗体或抗体片段的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a) 从抗体或抗体片段内鉴定能够与抗原相互作用的至少一个氨基酸;和
 - b) 改变抗体或抗体片段的氨基酸序列,以降低或消除与抗原的相互作用。
17. 权利要求 16 的方法,其中抗体或抗体片段中的氨基酸改变通过用非相互作用的氨基酸替换至少一个氨基酸来进行。
18. 权利要求 16 的方法,其中一个氨基酸与抗原之间的相互作用是选自以下的分子吸引力:氢键、弱的共价相互作用、极性力、非极性力、盐桥和范德华力。
19. 权利要求 16 的方法,其中所述抗体或抗体片段中的氨基酸选自:天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、组氨酸和谷氨酰胺。
20. 权利要求 16 的方法,其中所述抗体或抗体片段中的氨基酸选自:酪氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、色氨酸、精氨酸、苯丙氨酸和甘氨酸。
21. 权利要求 17 的方法,其中所述非相互作用的氨基酸选自:丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸和甲硫氨酸。
22. 权利要求 21 的方法,其中所述非相互作用的氨基酸是丙氨酸。
23. 权利要求 16 的方法,其中所述鉴定相互作用氨基酸的步骤通过分析描述抗体或抗体片段与抗原之间的复合物的晶体结构来进行。
24. 权利要求 16 的方法,所述方法还包括验证抗原结合丧失的步骤。
25. 权利要求 24 的方法,其中所述验证步骤通过 FACS、ELISA 或放射免疫测定法实现。
26. 权利要求 16 的方法,其中所述抗体或抗体片段具有大于或等于约 10^{-7} 的近似解离常数 (K_D)。
27. 权利要求 16 的方法,其中所述抗体或抗体片段选自:
 - (a) 完整的免疫球蛋白分子;
 - (b) scFv;
 - (c) Fab 片段;
 - (d) Fab' 片段;
 - (e) F(ab')₂;
 - (f) Fv;
 - (g) Fd 片段;和
 - (h) 二硫键连接的 Fv。
28. 权利要求 16 的结合能力降低的抗体或抗体片段。

亲和力降低的新抗体和制备所述抗体的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求 2010 年 1 月 28 日提交的美国临时申请 61/299,162 的权益的优先权,其整个内容通过引用结合到本文中。

[0002] 发明背景

单克隆抗体因其以高度特异性结合抗原的能力而被广泛用作研究、诊断和治疗试剂。除其与抗原特异性结合外,单克隆抗体还可以通过其 Fc 区活化补体系统和效应细胞。为了正确地说明抗体的生物学性质,合适的对照是必需的。在没有合适对照的情况下,难以确定抗体的特异性结合活性与抗体的生物化学和生物学作用之间的因果关系。

[0003] 目前使用的对照单克隆抗体包括:1. 由天然存在的浆细胞瘤分泌的无已知靶抗原的抗体;2. 针对来自进化远缘物种例如 KLH (匙孔戚血蓝蛋白) 的抗原产生的抗体;3. 与不同于目的抗原的已知靶抗原起反应的抗体。

[0004] 在这些情况的每一种中,所用对照抗体具有限定不清的可变结构域和不确定的抗原特异性。而在第三种情况下,仍存在交叉反应性的问题。因此,当使用目前可获得的对照抗体时,常常会遇到例如交叉反应性或非特异性结合等问题。此外,由于缺乏理想的对照抗体,因此常常使用制剂溶媒(例如生理盐水)作为对照进行研究。在这种情况下,如果不是不可能的话,也难以区别所观察到的生物化学和/或生物学作用是特异性抗原/抗体相互作用的直接结果,还是非特异性作用的结果,非特异性作用例如抗体分子的其它部分或存在于抗体制备物中的污染物(例如宿主细胞蛋白质)的相互作用和生物学作用。鉴于至少这些原因,目前极其需要改进的合理设计的对照抗体。

[0005] 发明概述

一方面,本发明提供用于产生结合能力降低的互补决定区(CDR)的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 从 CDR 多肽内鉴定出能够与抗原相互作用的至少一个结合氨基酸;和(b) 改变 CDR 多肽内的所述至少一个结合氨基酸,使得所得 CDR 在结合抗原方面的能力降低。在一些实施方案中,所述 CDR 位于抗体或抗体片段内。在一些实施方案中,所述方法还包括验证抗原结合丧失的步骤。可通过 FACS 分析实现验证步骤。

[0006] 另一方面,本发明提供用于产生结合能力降低的抗体或抗体片段的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 自抗体或抗体片段内鉴定出能够与抗原相互作用的至少一个结合氨基酸;和(b) 改变抗体或抗体片段内的所述至少一个结合氨基酸,使得所得抗体在结合抗原方面的能力降低。在一些实施方案中,所述方法还包括验证抗原结合丧失的步骤。可通过 FACS 分析实现验证步骤。

[0007] 在一些实施方案中,所述相互作用是氢键、盐桥和/或范德华力。在某些实施方案中,所述结合氨基酸是天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、组氨酸或谷氨酰胺。在其它实施方案中,所述结合氨基酸是酪氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、色氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或甘氨酸。在一些实施方案中,所述结合氨基酸被非结合氨基酸替换。在一些实施方案中,所述非结合氨基酸是丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸或甲硫氨酸。

[0008] 在本发明的某些实施方案中,通过分析描述 CDR 和抗原间的复合物的晶体结构来进行鉴定结合氨基酸的步骤。

[0009] 另一方面,本发明包括采用本发明的方法产生的抗体或抗体片段。在一些实施方案中,本发明的抗体或抗体片段具有大于或等于约 10^{-7} 的解离常数 (K_D)。在一些实施方案中,本发明的抗体或抗体片段是完整的免疫球蛋白分子、scFv、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂、Fd 片段、Fv 或二硫键连接的 Fv。

[0010] 附图简述

图 1 表示描述制备本发明的对照抗体的流程图。

[0011] 图 2 表示参与抗体-抗原相互作用的特定 CDR 氨基酸的频率。

[0012] 图 3 表示包括 Fv 结构域、Fab 结构域和 Fc 结构域的抗体结构的示例性示意图。

[0013] 图 4 表示重组抗体生产的示例性方法的图示。

[0014] 图 5 表示 OKT3 的抗体产生和本发明的一些示例性对照抗体。

[0015] 图 6 表示表明本发明的一些示例性对照抗体与人 Jurkat 细胞结合的 FACS 图。

[0016] 图 7 表示表明本发明的一些示例性对照抗体与人 PBMC 结合的 FACS 图。

[0017] 图 8 表示编码 OKT3 重链的 pME-wtOKT3 HC 载体的图谱。

[0018] 图 9 表示编码 OKT3 轻链的 pME-wtOKT3 LC 载体的图谱。

[0019] 图 10 表示 OKT3 和 OKT3 变体与 Jurkat 细胞的结合。

[0020] 图 11 表示变体抗体的药代动力学。

[0021] 发明详述

本发明提供亲和力降低的新抗体,其具有在基本不改变抗体的三维结构的情况下降低或消除抗原结合的充分表征的可变结构域。为了更容易地理解本发明,下文以及整个说明书对某些术语和短语作出定义。

[0022] 术语“抗体”在生物学和生物医学领域中被充分理解,通常是指完整抗体及任何抗体片段或其单链。抗体是由称为浆细胞的特化 B 淋巴细胞分泌的糖蛋白。其亦被称为免疫球蛋白 (Ig),因为其含有存在于许多蛋白质中的共有结构域。抗体最可能包含通常由二硫键连接的 2 条重 (H) 链和 2 条轻 (L) 链或其抗原结合部分。每条重链由重链可变区 (V_H) 和重链恒定区组成。每条轻链同样由可变区 (V_L) 和恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。 V_H 和 V_L 区可进一步再分成超变区,称为互补决定区 (CDR),其散布有称为构架区 (FR) 的更保守的区域。每个 V_H 和 V_L 由按以下顺序自氨基端到羧基端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。

[0023] 本发明还包括抗体片段。抗体片段的实例包括 (i) Fab 片段,一种由 V_H 、 V_L 、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂ 片段,一种包含在铰链区通过二硫键连接的 2 个 Fab 片段的二价片段;(iii) Fd 片段,其由 V_H 和 CH1 结构域组成;(iv) Fv 片段,其由抗体单臂的 V_H 和 V_L 结构域组成,(v) dAb 片段 (Ward 等, (1989) Nature 341:544-546),其由 V_H 结构域组成;和 (vi) 分离的互补决定区 (CDR) 或 (vii) 两个或更多个分离 CDR 的组合,其可任选通过合成接头连接。此外,虽然 Fv 片段的 2 个结构域 V_H 和 V_L 由不同的基因编码,但是可采用重组方法,通过合成接头将它们连接,所述合成接头使它们成为其中 V_H 和 V_L 区配对形成单价分子(称为单链 Fv (scFv) 的一条蛋白质链;参见例如 Bird 等 (1988) Science

242:423 426 ;以及 Huston 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:5879 5883)。这类单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。本文所用“抗体”和“抗体片段”可互换使用以描述本发明,除非另有明确说明。

[0024] 术语“超变区”、“HVR”或“HV”是指序列是超变的并形成结构上确定的环的抗体可变结构域的区域。抗体一般包含 6 个 HVR ;3 个在 VH (H1、H2、H3) 中,3 个在 VL (L1、L2、L3) 中。在抗体分子中,VH 结构域的 3 个 HVR 和 VL 结构域的 3 个 HVR 在三维结构中被连接在一起形成抗原结合表面。因为这些序列形成与靶抗原的三维结构互补的表面,因此 HVR 亦被称为互补决定区 (CDR)。

[0025] 术语“CDR”及其复数“CDRs”是指互补决定区 (CDR),其中 3 个构成轻链可变区 (CDRL1、CDRL2 和 CDRL3) 的结合特性,3 个构成重链可变区 (CDRH1、CDRH2 和 CDRH3) 的结合特性。CDR 有助于抗体分子的功能活性,并且被包括支架区或构架区的氨基酸序列分开。确切界定的 CDR 边界和长度取决于不同的分类和编号系统。因此 CDR 可参考 Kabat、Chothia、接触或任何其它边界定义。尽管有不同的边界,这些系统的每一个在构成可变序列内的所谓“超变区”中有某种程度的重叠。因此,就相邻构架区而言,按照这些系统的 CDR 定义的长度和边界区域可不同。参见例如 Kabat、Chothia 和 / 或 MacCallum 等 (Kabat 等,载于“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第 5 版,美国卫生与公众服务部 (U.S. Department of Health and Human Services), 1992; Chothia 等, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901 ;和 MacCallum 等, J. Mol. Biol., 1996, 262: 732,各自均通过引用以其整体结合)。

[0026] “构架区”或“FR”残基是那些可变结构域残基而非本文定义的 HVR 残基。示例性的构架区由 SEQ ID NOs. 15-22 提供。

[0027] 本文术语“Fc 区”用来定义免疫球蛋白重链的 C 端区,包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。虽然免疫球蛋白重链的 Fc 区的边界可不同,但人 IgG 重链 Fc 区通常被定义为从 Cys226 位或 Pro230 位的氨基酸残基延伸至其羧基端。例如,可在抗体产生或纯化期间,或者通过重组工程改造编码抗体重链的核酸,除去 Fc 区的 C 端赖氨酸 (EU 编号系统的残基 447)。因此,完整抗体的组成可包含所有 K447 残基均被除去的抗体群、无 K447 残基被除去的抗体群和具有含或不含 K447 残基的抗体的混合物的抗体群。用于本发明抗体的合适的天然序列 Fc 区包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

[0028] “Fc 受体”或“FcR”描述了与抗体 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。此外,优选的 FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR (γ 受体),并且包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式,Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA (“活化受体”)和 Fc γ RIIB (“抑制受体”),其具有主要在其胞质结构域上不同的相似氨基酸序列。活化受体 Fc γ RIIA 在其胞质结构域含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 在其胞质结构域含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM)。(参见 M. Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997))。FcR 的综述见 Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991);Capel 等, Immunomethods 4: 25-34 (1994);以及 de Haas 等, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)。其它 FcR,包括与其它同种型结合的 FcR 以及将来鉴定的 FcR,均包括在本文术语“FcR”中。

[0029] 抗体可以是异种的、同种异体的或同基因的或其修饰形式(例如人源化的、嵌合

的等)。抗体还可是完全人抗体。本文所用术语“单克隆抗体”是指针对特定表位显示单一结合特异性和亲和力的抗体。因此,术语“人单克隆抗体”是指这样的抗体,其显示单一结合特异性并且具有来源于人种系或非种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。在一个实施方案中,人单克隆抗体由包括 B 细胞的杂交瘤产生,所述 B 细胞获自转基因非人动物(例如转基因小鼠),其具有包含与永生化细胞融合的人重链和轻链转基因的基因组。

[0030] 在本发明的一些实施方案中,对抗体或其片段进行修饰以降低或消除潜在的糖基化位点。这类修饰抗体常被称为“去糖基化 (*aglycosylated*)”抗体。为了改进抗体或其抗原结合片段的结合亲和力,可通过例如诱变(例如定点诱变)来改变抗体的糖基化位点。“糖基化位点”是指被真核细胞识别作为糖残基连接位置的氨基酸残基。糖(例如寡糖)所连接的氨基酸通常是天冬酰胺(N-联)、丝氨酸(O-联)和苏氨酸(O-联)残基。为了鉴定抗体或抗原-结合片段内的潜在糖基化位点,通过例如利用可公开获取的数据库例如生物学序列分析中心(Center for Biological Sequence Analysis)提供的网站(对于预测 N-联糖基化位点,参见 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>,对于预测 O-联糖基化位点,参见 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>),对抗体的序列进行检查。用于改变抗体的糖基化位点的其它方法描述于美国专利号 6,350,861 和 5,714,350。此外,抗体糖基化可受其中产生抗体糖基化的细胞、抗体的构象和细胞培养条件影响。本发明优选的细胞表达系统是人细胞表达系统。

[0031] 术语“人源化抗体”是指由来源于哺乳动物而非人的抗体 CDR 以及人抗体的 FR 区和恒定区组成的抗体。人源化抗体可用作治疗剂的有效组分,因为在人体中人源化抗体的抗原性降低。在治疗应用的情况下,本发明的目的是设计人源化抗体的亲和力降低的抗体。

[0032] 术语“重组抗体”包括所有通过重组方法制备、表达、产生或分离的抗体,例如(a)自动物(例如小鼠)(其免疫球蛋白基因为转基因或转染色体的)或者由其制备的杂交瘤(在下文第 I 部分作进一步描述)分离的抗体,(b)自经转化以表达抗体的宿主细胞(例如转染瘤)分离的抗体,(c)自重组的组合抗体文库分离的抗体,和(d)通过任何其它方法(涉及将免疫球蛋白基因序列剪接成其它 DNA 序列)制备、表达、产生或分离的抗体。这类重组抗体具有来源于种系和/或非种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,可对这类重组抗体进行体外诱变(或当使用动物(其对于 Ig 序列为转基因的)时为体内体细胞诱变),因此重组抗体 V_H 和 V_L 区的氨基酸序列是这样的序列,虽然来源于人种系 V_H 和 V_L 序列以及与人种系 V_H 和 V_L 序列有关,但可能并非天然存在于体内种系库(repertoire)内。

[0033] 术语“双特异性单克隆抗体”是指其结合臂与两种不同类型的抗原具有双重特异性的单克隆抗体。双特异性单克隆抗体不是天然存在的;其必须用重组 DNA 或细胞融合技术制备。用该方法,对于这类抗体可能同时与细胞毒性细胞(使用受体诸如 CD3)和癌症靶细胞(诸如 CD19)结合,导致更有效地杀死靶癌细胞。本发明的目的是设计双特异性单克隆抗体的亲和力降低的抗体使得双特异性抗体的一个或两个臂可对抗原具有降低或消除的亲和力。

[0034] 术语“ K_D ”意欲指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。抗体对于单价表位的结合强度的量度称为亲和力。在某些情况下,抗体可与抗原形成多价相互作用。在这种情况下,抗体/抗原相互作用的表现解离平衡常数可不同于单价解离常数。

[0035] 亲和力随存在于抗体上的抗原结合部位和特异性抗原的抗原决定簇或表位之间的非共价键而变化。在典型情况下,抗体用于其特异性结合性质,而且当使用重组蛋白作为分析物,抗体作为配体,例如在 BIACORE 仪器中通过表面等离子共振 (SPR) 技术测定时,抗体以约小于 10^{-7} M、例如约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或甚至更低的亲和力 (K_D) 结合,且与预定抗原结合的亲和力是与非特异性抗原(例如 BSA、酪蛋白)而非预定抗原或密切相关抗原结合的亲和力的至少 1.1 倍、1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、1.6 倍、1.7 倍、1.8 倍、1.9 倍、2.0 倍、2.5 倍、3.0 倍、3.5 倍、4.0 倍、4.5 倍、5.0 倍、6.0 倍、7.0 倍、8.0 倍、9.0 倍或 10.0 倍或更多倍。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原有特异性的抗体”在本文中术语“与抗原特异性结合的抗体”互换使用。具有“降低的亲和力”的抗体是指 K_D 约大于 10^{-7} M,例如是 10^{-7} M 的约 10 倍、或 100 倍、或 1000 倍。本发明的目的是设计几乎不与或不与抗原特异性结合的抗体。在一些实施方案中,本发明的抗体具有大于或等于约 10^{-7} 的解离常数 (K_D)。更优选本发明的抗体具有大于或等于约 10^{-6} 的解离常数 (K_D)。最优选本发明的抗体对限定的抗原无可检测的特异性结合。

[0036] 根据 Ig 类别,可以结合多达 5 个结构分子以形成任一种抗体。在哺乳动物中,有 5 种 Ig 类别 (IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE);在鸟类中,有 3 种类别 (IgY、IgM 和 IgE)。在选定的哺乳动物中,因重链保守区中的多态性所致, IgG 和 IgA 被进一步细分成亚类,称为同种型。

[0037] 术语“核酸分子”或“多核苷酸”意欲包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链的或双链的,但优选为双链 DNA。

[0038] 本发明还包括附图中所示序列的“保守序列修饰”,包括核苷酸和氨基酸序列修饰,其不显著影响或改变由所述核苷酸序列编码的抗体或含有所述氨基酸序列的抗体的结合特性。这类保守序列修饰包括核苷酸和氨基酸取代、添加和缺失。可通过本领域已知的标准技术,例如定点诱变和 PCR 介导的诱变,将修饰引入附图所示的序列中。保守氨基酸取代包括其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替换的取代。本领域已界定了具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有以下侧链的氨基酸:碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -分支的侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0039] 因此,由本文公开的重链和轻链可变区核苷酸序列编码的抗体和/或含有本文公开的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体包括由经保守修饰的类似序列编码的基本类似抗体或含有经保守修饰的类似序列的基本类似抗体。下面提供如何根据本文公开的序列(即重链和轻链可变区)产生所述基本类似抗体的进一步论述。

[0040] 可按照标准技术使本发明的核酸组成突变,以得到基因序列。对于编码序列,这些突变可按需要影响氨基酸序列。具体地说,预期基本同源于或来源于天然 V、D、J、恒定、转换区的 DNA 序列和本文所述的其它这类序列(其中“来源”表明序列与另一序列相同或自另一序列修饰)。

[0041] 以下分部更详细地描述了本发明的各个方面。

[0042] I. 亲和力降低的抗体

本发明亲和力降低的抗体是经合理设计以消除或降低与抗原结合的抗体。现有优选亲和力降低的抗体是除 CDR 区以外在各方面都类似于野生型（天然）抗体的抗体，并且相对于野生型抗体几乎没有可辨别的三维结构变化。示例性抗体是显示与抗原的结合亲和力降低 10 倍的抗体。优选亲和力降低的抗体与抗原结合，且与抗原的结合亲和力降低 100 倍。更优选亲和力降低的抗体与抗原结合，且与抗原的结合亲和力降低 1000 倍。最优选亲和力降低的抗体与抗原无显著结合，并且相对于背景结合水平，检测不到与抗原的特异性结合。可通过常用实验方法包括表面等离子共振，或放射性配体结合测定法，或流式细胞术，来测量亲和力。在涉及使用抗体的许多体内和体外应用中，本发明亲和力降低的抗体可用作其野生型（天然）对应物（其保持与抗原的特异性结合）的对照试剂。

[0043] 可采用各种已知技术，例如重组 DNA 技术和其它标准分子和细胞生物学技术，来产生本发明亲和力降低的抗体。

[0044] 可采用本领域众所周知的重组 DNA 技术和基因转染方法，来制备重组的亲和力降低的抗体 (Morrison, S. (1985) Science 229:1202)。例如编码序列、具有已知抗原特异性的抗体编码多核苷酸可通过标准分子生物学技术（例如聚合酶链式反应）扩增，并连接至表达载体（例如 pME）中。可采用标准定点诱变技术将突变引入表达载体，以破坏所编码抗体的抗原结合。可采用本领域已知技术（例如磷酸钙沉淀、电穿孔、脂转染），将编码经突变的抗体重链和轻链基因的表达载体转染至宿主细胞（例如 293T 细胞、CHO- 细胞）。

[0045] 在将表达载体导入宿主细胞后，细胞将开始产生突变抗体并将突变抗体分泌至培养基中。可通过例如鉴定和选择表达突变抗体的细胞，来实现长期的大规模抗体生产。可采用本领域已知技术从这些培养上清液和 / 或细胞中分离和纯化重组抗体。或者，突变抗体可在其它表达系统或完整生物体中产生，或者可合成产生。

[0046] 在另一个实施方案中，亲和力降低的抗体可作为嵌合抗体产生，其中将抗体重链和 / 或轻链的可变区与来自各种物种的恒定结构域融合。

[0047] 另外，可按照标准方案例如公开于美国专利 5,565,332 的方案，制备人源化的亲和力降低的抗体。在另一个实施方案中，可采用本领域已知技术，例如如美国专利 5,565,332、5,871,907 或 5,733,743 中所述，将包含核酸分子的载体（其编码特异性抗体链的多肽链与可复制基因展示包 (replicable generic display package) 组分的融合物）与含有编码单一结合对成员的第二多肽链的核酸分子的载体之间的重组来产生抗体链。

[0048] 可采用本领域已知的重组 DNA 技术，例如采用描述于以下文献的方法，来产生亲和力降低的抗体：Robinson 等，国际专利公布号 PCT/US86/02269；Akira 等，欧洲专利申请 184,187；Taniguchi, M.，欧洲专利申请 171,496；Morrison 等，欧洲专利申请 173,494；Neuberger 等，PCT 申请 WO 86/01533；Cabilly 等，美国专利号 4,816,567；Cabilly 等，欧洲专利申请 125,023；Better 等 (1988) Science 240:1041-1043；Liu 等 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA84:3439-3443；Liu 等 (1987) J. Immunol. 139:3521-3526；Sun 等 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:214-218；Nishimura 等 (1987) Cancer Res. 47:999-1005；Wood 等 (1985) Nature 314:446-449；和 Shaw 等 (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559；Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207；Oi 等 (1986) Biotechniques 4:214；Winter 美国专利 5,225,539；Jones 等 (1986) Nature 321:552-525；Verhoeyan 等 (1988) Science 239:1534；以及 Beidler 等 (1988) J.

Immunol. 141:4053-4060。

[0049] 在本发明的又一个方面,部分或已知的抗体序列可用来产生和/或表达亲和力和降低的抗体。抗体主要通过位于6个重链和轻链互补决定区(CDR)的氨基酸残基与靶抗原相互作用。为此,各个抗体间的CDR内的氨基酸序列比CDR外的序列更加多样化。因为CDR序列负责大部分抗体-抗原相互作用,所以可能通过构建表达载体来表达模拟特异性抗体的性质的重组抗体,所述载体包括植入来自具有不同性质的不同抗体的构架序列中的特异性抗体的CDR序列(参见例如Riechmann,L.等,1998,Nature 332:323-327;Jones,P.等,1986,Nature 321:522-525;以及Queen,C.等,1989,Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:10029-10033)。所述构架序列可获自包括种系或非种系抗体基因序列的公共DNA数据库。这些种系序列将不同于成熟的抗体基因序列,因为它们将不包括完全装配的可变基因,其在B细胞成熟期间通过V(D)J连接而形成。种系基因序列也可在均匀跨可变区的各处不同于高亲和力二级库抗体的序列。例如,体细胞突变在构架区的氨基端部分相对稀少。例如,体细胞突变在构架区1的氨基端部分和在构架区4的羧基端部分相对稀少。此外,许多体细胞突变不显著改变抗体的结合性质。为此,不必要获得特定抗体的完整DNA序列以产生具有类似于原始抗体的结合性质的完整重组抗体(参见1999年3月12日提交的PCT/US99/05535)。对于此目的,跨越CDR区的部分重链和轻链序列通常就足够。使用部分序列以确定哪个种系和/或非种系可变和连接基因区段对重组的抗体可变基因产生影响。然后使用种系和/或非种系序列填补可变区的缺失部分。重链和轻链前导序列在蛋白质成熟期间被切割,且不会对最终抗体的性质产生影响。为了加入缺失序列,通过连接或PCR扩增将克隆的cDNA序列与合成寡核苷酸联合。或者,整个可变区可合成为一组短的重叠寡核苷酸,并通过PCR扩增联合以产生全部合成的可变区克隆。该方法具有某些优势,例如消除或包括特定的限制位点,或使特定的密码子最优化。该方法还可用来筛选一种物种(例如人)中特定免疫球蛋白编码序列的文库,以设计来自另一种物种(例如小鼠)中的已知抗体序列的同族(cognate)免疫球蛋白编码序列。

[0050] 来自杂交瘤的重链和轻链转录物的核苷酸序列用来设计一组重叠的合成寡核苷酸,以产生具有与天然序列相同的氨基酸编码能力的合成V序列。合成重链和 κ 链序列可在三个方面不同于天然序列:重复核苷酸碱基的串(string)被间断以利于寡核苷酸合成和PCR扩增;按照Kozak规则掺入最适翻译起始位点(Kozak,1991, J. Biol. Chem.);及在翻译起始位点上游对限制位点进行改造。

[0051] 对于重链和轻链可变区两者,最优化编码链序列和相应的非编码链序列大致在相应的非编码寡核苷酸的中点分解成30-50个核苷酸。因此,对于每条链,寡核苷酸可装配成为跨越150-400个核苷酸区段的重叠双链组。该库(pool)然后用作模板以产生150-400个核苷酸的PCR扩增产物。通常,单一可变区寡核苷酸组可被分解成2个库,将其单独扩增以产生两个重叠的PCR产物。然后,通过PCR扩增使这些重叠产物联合以形成完整的可变区。亦可期需的是,在PCR扩增中包括重链或轻链恒定区的重叠片段以产生可容易地克隆至表达载体构建体的片段。

[0052] 然后,将重新构建的重链和轻链可变区与克隆启动子、前导序列、翻译起始序列、前导序列、恒定区、3'未翻译序列、聚腺苷酸化序列和转录终止序列联合以形成表达载体构建体。可将重链和轻链表达构建体并入单一载体中,共转染、依次转染或单独转染至宿主细

胞,然后使其融合形成表达两条链的宿主细胞。

[0053] 用于该用途的质粒是本领域已知的,包括下面的实施例部分提供的质粒。可以构建类似的质粒用于表达其它重链同种型,或用于表达包含 λ 轻链的抗体。本发明的抗体因此还包括来自不同物种的抗体的各种同种型 (IgG、IgE、IgA、IgM 和 IgD)。

[0054] 在本发明的又一个方面,可采用噬菌体和 / 或酵母展示技术,产生亲和力降低的抗体。例如,具有已知抗原特异性的抗体重链 (VH) 和轻链 (VL) 的可变区可融合为单链 Fv 片段,并在噬菌体和 / 或酵母表面上展示。展示这类 scFv 可对其靶抗原显示强的结合活性。可在 Fv 片段的一个或多个 CDR 上进行随机诱变,从而构建噬菌体文库。可针对不再显示抗原结合的克隆对文库进行选择,从而鉴定消除或降低抗原结合的 CDR 突变。

[0055] 亲和力降低的抗体的抗原特异性的降低和 / 或消除的验证可采用本领域已知方法进行。可用于验证抗原结合降低的技术包括例如 FAC 分析、免疫印迹法、竞争结合测定法、免疫组织化学和表面等离子共振技术。可通过例如分析抗原表面上的氨基酸与抗体 CDR 区中的氨基酸之间的相互作用,来鉴定负责抗原和抗体之间相互作用的氨基酸 (结合氨基酸)。这些相互作用的性质可分为 3 大类,范德华力、氢键和盐桥。在抗原决定簇和 CDR 氨基酸侧链之间最常形成相互作用,但氢键也可能受抗原决定簇和 CDR 氨基酸侧链之间的水分子介导。最频繁参与范德华力相互作用的 CDR 氨基酸包括 Ala、Phe、Ile、Leu、Asn、Pro、Gln、Val、Trp 和 Tyr。最常形成盐桥的 CDR 氨基酸包括 Asp、Glu、Arg 和 Lys。最常参与氢键相互作用的 CDR 氨基酸包括 Asp、Glu、His、Lys、Arg、Ser 和 Tyr。

[0056] 参与抗原相互作用的 CDR 氨基酸的分析显示这样的模式,其中某些氨基酸比其它氨基酸更可能参与抗体 / 抗原相互作用。通过 CDR 区内特定氨基酸的定点诱变 (突变),或者通过分析抗原 - 抗体复合物的晶体结构 (x-tal),来测定结合氨基酸 / 抗原相互作用。用于该分析的抗体列于表 1 中。

[0057] 表 1. 用于抗体 / 抗原相互作用分析的抗体

抗体	抗原	方法
OKT3 ¹	CD3	X-tal
23C3 ²	骨桥蛋白	X-tal
5c8 ³	CD154	X-tal
7G10 ⁴	白介素 -23	X-tal
B13I2 ⁵	蚯蚓肌红蛋白 C-螺旋肽	突变
Fab4-4-20 ⁵	单链 DNA	突变
FabD1.3 ⁵	鸡卵溶菌酶	突变
H57 ⁶	CD8	X-tal
HyHEL-10 ⁵	鸡卵溶菌酶	突变
HyHEL-5 ⁵	鸡卵溶菌酶	突变
K411B ⁷	阿特拉津	突变
McPC603 ⁵	磷酸胆碱	突变
Rituxan ⁸	CD20	X-tal
YTS156 ⁹	CD8	X-tal

1. Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3 (与治疗性 mAb OKT3 复合的人 T 细胞受体 CD3 ϵ γ 异二聚体的晶体结构). Kjer-Nielsen L, Dunstone MA, Kostenko L, Ely LK, Beddoe T, Mifsud NA, Purcell AW, Brooks AG, McCluskey J, Rossjohn J. (2004) Proc Natl Acad Sci U S A. 101:7675-7680.

[0058] 2. Molecular basis of recognition of human osteopontin by 23C3, a potential therapeutic antibody for treatment of rheumatoid arthritis (一种潜在用于治疗类风湿性关节炎的治疗性抗体 23C3 识别人骨桥蛋白的分子基础)。Du J, Hou S, Zhong C, Lai Z, Yang H, Dai J, Zhang D, Wang H, Guo Y, Ding J. (2008) *J Mol Biol.* 382:835-842。

[0059] 3. Structure of CD40 ligand in complex with the Fab fragment of a neutralizing humanized antibody (与中和人源化抗体的 Fab 片段复合的 CD40 配体的结构)。Karpusas M, Lucci J, Ferrant J, Benjamin C, Taylor FR, Strauch K, Garber E, Hsu YM. (2001) *Structure.* 4;9:321-329。

[0060] 4. Crystal structures of the pro-inflammatory cytokine interleukin-23 and its complex with a high-affinity neutralizing antibody (促炎细胞因子白介素-23 及其与高亲和力中和抗体的复合物的晶体结构)。Beyer BM, Ingram R, Ramanathan L, Reichert P, Le HV, Madison V, Orth P. (2008) *J Mol Biol.* 382:942-955。

[0061] 5. Structure, function and properties of antibody binding sites (抗体结合部位的结构、功能和性质)。Mian IS, Bradwell AR, Olson AJ. (1991) *J Mol Biol.* 217:133-151。

[0062] 6. Atomic structure of an alphabeta T cell receptor (TCR) heterodimer in complex with an anti-TCR fab fragment derived from a mitogenic antibody (与来源于促有丝分裂抗体的抗 TCR fab 片段的复合的 $\alpha\beta$ T 细胞受体 (TCR) 异二聚体的原子结构)。Wang J, Lim K, Smolyar A, Teng M, Liu J, Tse AG, Liu J, Hussey RE, Chishti Y, Thomson CT, Sweet RM, Nathenson SG, Chang HC, Sacchettini JC, Reinherz EL. (1998) *EMBO J.* 17:10-26。

[0063] 7. Mapping of a hapten-binding site: molecular modeling and site-directed mutagenesis study of an anti-atrazine antibody (半抗原-结合部位的作图:抗阿特拉津抗体的分子建模和定点诱变研究)。Kusharyoto W, Pleiss J, Bachmann TT, Schmid RD. *Protein Eng.* (2002) 15:233-41。

[0064] 8. Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab (治疗性抗体利妥昔单抗识别 CD20 的结构基础)。Du J, Wang H, Zhong C, Peng B, Zhang M, Li B, Huo S, Guo Y, Ding J. (2007) *J Biol Chem.* 282:15073-80。

[0065] 9. The Crystal Structure of CD8 in Complex with YTS156.7.7 Fab and Interaction with Other CD8 Antibodies Define the Binding Mode of CD8 alphabeta to MHC Class I (与 YTS156.7.7 Fab 复合的 CD8 晶体结构和与其它 CD8 抗体的相互作用限定 CD8 $\alpha\beta$ 与 MHC I 类的结合方式)。Shore DA, Issafras H, Landais E, Teyton L, Wilson IA. (2008) *J Mol. Biol.* 待发表。

[0066] 抗体/抗原相互作用的分析显示, Tyr 更频繁地与抗原决定簇相互作用, 占全部相互作用的约四分之一, 接着是 Ser, 其负责相互作用的约 14% (表 2, 图 2)。与 Asn 和 Glu 一起, 这些 4 种氨基酸占全部接触的一半以上 (56%)。抗原接触性 CDR 氨基酸的这类偏倚允许产生用于鉴定最可能与抗原决定簇相互作用的 CDR 氨基酸的算法。简单地说, 根据本领域

已知的和上文描述的方法来鉴定 CDR 区。对于具有已知晶体结构的抗体,可对结构进行分析以确定接触抗原决定簇的 CDR 残基。对于其结构未知或无法获得的抗体,可根据表 2 和图 3 所示频率,确定可能参与抗原相互作用的 CDR 残基。

[0067] 可通过改变在能够结合抗原的抗体中参与抗体 / 抗原接触的一个或多个氨基酸 (结合氨基酸),来产生本发明亲和力降低的抗体。可采用本领域已知的或本文描述的任何技术,包括但不限于晶体结构分析和氨基酸接触频率统计数据应用 (表 2 和图 3),来鉴定结合氨基酸。在一些实施方案中,至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个结合氨基酸被改变。在一些实施方案中,至少 10%、25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95% 或 100% 的结合氨基酸被改变。可采用破坏结合氨基酸与抗原形成接触的能力的任何方法,包括但不限于用非结合氨基酸替换结合氨基酸和 / 或使结合氨基酸缺失,来进行结合氨基酸的改变。可通过结合氨基酸 (其破坏结合氨基酸接触抗原的能力) 上游或下游氨基酸序列的缺失、替换或插入,来改变结合氨基酸。

[0068] 表 2. CDR 氨基酸接触性抗原决定簇的频率。

AA	CDRL1	CDRL2	CDRL3	CDRH1	CDRH2	CDRH3	总计	%
Y	11	3	3	6	8	8	39	23%
S	3		6	2	11	1	23	14%
N	4		3	1	7	2	17	10%
D	2	3	2	2	3	3	15	9%
W			5	4	2	3	14	8%
R	1		1	1	5	4	12	7%
F	2		4		1	2	9	5%
G	1		2	1	1	3	6	3%
H	2		1	1		1	5	3%
E				2	2		4	2%
T			1	1	2		4	2%
A	1			1	1	1	4	2%
P	1		1			1	3	2%
K	1	1			1		3	2%
Q		1				1	2	1%
L	1		1				2	1%
M		1				1	2	1%
I					1		1	1%
V			1				1	1%
C							0	0%
总计	30	9	31	22	45	31	168	100%

[0069] II. 分离的核酸分子

本发明的一个方面涉及编码本发明多肽的分离核酸分子、以及足以用作杂交探针以鉴定编码这些多肽的核酸分子的核酸片段、以及用作 PCR 引物用于所述核酸分子扩增或突变的片段。本文所用术语“核酸分子”或“多核苷酸”意欲包括 DNA 分子 (例如 cDNA 或基因组 DNA) 和 RNA 分子 (例如 mRNA) 和使用核苷酸类似物所产生的 DNA 或 RNA 的类似物。核酸分子可以是单链的或双链的,但优选是双链 DNA。

[0070] 可采用标准分子生物学技术和本文提供的序列信息分离本发明的核酸分子。例如,可采用根据本发明的序列设计的合成寡核苷酸引物,通过聚合酶链式反应 (PCR),来分离本发明的核酸分子。

[0071] 可按照标准 PCR 扩增技术,采用 cDNA、mRNA 或基因组 DNA 作为模板和合适的寡核苷酸引物来扩增本发明的核酸分子。可将如此扩增的核酸分子克隆至合适的载体中,并通

过 DNA 序列分析表征。此外,可通过标准合成技术,例如采用自动 DNA 合成仪,来制备与本发明的核酸序列相应的寡核苷酸。

[0072] 在另一个实施方案中,本发明的分离核酸分子包含与所描述的核酸分子互补的核酸分子。与所描述的核酸分子互补的核酸分子是这样的核酸分子,其与所描述的核苷酸序列充分互补,使得其可与本发明相应的核苷酸序列杂交从而形成稳定双链体。

[0073] 在又一个实施方案中,本发明的分离核酸分子包含与本发明的全长核苷酸序列有至少约 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的核苷酸序列,或任何这些核苷酸序列的一部分。

[0074] 本发明还包括由遗传密码简并所致而不同于编码本发明多肽的核苷酸序列的核酸分子,因此编码与由相应核苷酸序列编码的相同的多肽。在另一个实施方案中,本发明的分离核酸分子具有编码本发明多肽的核苷酸序列。

[0075] 可按照标准杂交技术,在严格杂交条件下,采用本文公开的 cDNA 或其部分作为杂交探针,根据其与本站公开的核酸的同源性来分离相当于本发明核酸分子的同源物的核酸分子。

[0076] 因此,在另一个实施方案中,本发明的分离核酸分子长度至少为 15、20、25、30 个或更多个核苷酸,并在严格条件下与包含本发明的核酸分子的核酸分子杂交。

[0077] 本文所用术语“在严格条件下杂交”意欲描述用于杂交和洗涤的条件,在此条件下,彼此显著同一或同源的核苷酸序列保持彼此杂交。优选地,条件是这样的,使得彼此有至少约 70%、更优选至少约 80%、甚至更优选至少约 85% 或 90% 同一性的序列彼此保持杂交。所述严格条件为本领域技术人员所知,可参见 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel 等主编, John Wiley & Sons, Inc. (1995), 第 2, 4 和 6 节。另外的严格条件可参见 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook 等, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), 第 7, 9 和 11 章。严格杂交条件的非限制性实例包括在 4x 或 6x 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中于约 65-70°C 杂交 (或在 4x SSC 加 50% 甲酰胺中于约 42-50°C 杂交),接着在 1x SSC 于约 65-70°C 洗涤一次或多次。严格杂交条件的另一个非限制性实例包括在 6x SSC 中于 45°C 杂交,接着在 0.2x SSC、0.1% SDS 中于 65°C 洗涤一次或多次。高严格杂交条件的非限制性实例包括在 1x SSC 中于约 65-70°C 杂交 (或在 1x SSC 加 50% 甲酰胺于约 42-50°C 杂交),接着在 0.3x SSC 于约 65-70°C 洗涤一次或多次。严格性降低的杂交条件的非限制性实例包括在 4x 或 6x SSC 中于约 50-60°C 杂交 (或在 6x SSC 加 50% 甲酰胺中于约 40-45°C 杂交),接着在 2x 中于约 50-60°C 洗涤一次或多次。本发明还意欲包括介于上述值例如 65-70°C 或 42-50°C 之间的范围。在杂交和洗涤缓冲液中,SSPE (1x SSPE 为 0.15M NaCl、10mM NaH₂PO₄ 和 1.25 mM EDTA, pH 7.4) 可用来替换 SSC (1x SSC 为 0.15M NaCl 和 15mM 柠檬酸钠);在杂交完成后,进行洗涤各 15 分钟。预期长度小于 50 个碱基对的杂合体的杂交温度应小于杂合体解链温度 (T_m) 的 5-10°C,其中按照下列等式求出 T_m。对于长度小于 18 个碱基对的杂合体, T_m (°C) = 2(A + T 碱基的数目) + 4(G + C 碱基的数目)。对于长度介于 18 和 49 个碱基对之间的杂合体, T_m (°C) = 81.5 + 16.6(log₁₀[Na⁺]) + 0.41(%G+C) - (600/N), 其中 N 为杂合体中的碱基数, [Na⁺] 为杂交缓冲液中钠离子的浓度 (1x SSC 的 [Na⁺] = 0.165 M)。本领域技术人员还应认识到,可将其它试剂加入杂交和 / 或洗涤缓冲液中以降低核酸分子与膜 (例如硝酸纤维素或尼龙膜)

的非特异性杂交,包括但不限于封闭剂(例如 BSA 或鲑精或鲑精载体 DNA)、去污剂(例如 SDS)、螯合剂(例如 EDTA)、菲可(Ficoll)、PVP 等。具体地说,当使用尼龙膜时,严格杂交条件的其它非限制实例是在 0.25-0.5M NaH₂PO₄、7% SDS 中于约 65°C 杂交,接着在 0.02M NaH₂PO₄、1% SDS 中于 65°C 洗涤一次或多次,参见例如 Church 和 Gilbert (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA81:1991-1995 (或 0.2x SSC,1% SDS)。

[0078] 技术人员还应了解的是,可通过突变将改变引入本发明的核酸分子,从而在不改变所编码的本发明多肽的功能性能力(的情况下,导致所述多肽的氨基酸序列改变。例如,可在本发明的核酸分子中,进行导致在“非必需”氨基酸残基处氨基酸取代的核苷酸取代。“非必需”氨基酸残基是可在不改变生物学性质的情况下,自本发明的核酸分子中被改变的残基,而“必需”氨基酸残基是生物学性质所必需的。例如,预期对于抗体分子的结构完整性重要的氨基酸残基特别不适于被改变。

[0079] 因此,本发明的另一个方面涉及编码本发明多肽的核酸分子,其包含对活性不是必需的氨基酸残基中的改变。所述多肽的氨基酸序列不同于图 2-7 中的氨基酸序列,但仍保持生物活性。在一个实施方案中,分离核酸分子包含编码多肽的核苷酸序列,其中所述多肽包含与本发明的多肽有至少约 71%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的氨基酸序列。

[0080] 可通过将一个或多个核苷酸取代、添加或缺失引入本发明的核苷酸序列,使得将一个或多个氨基酸取代、添加或缺失引入所编码的多肽,来产生编码与本发明多肽相同的多肽的分离核酸分子。可通过标准技术,例如定点诱变和 PCR 介导的诱变,将突变引入本发明的核酸分子。在一个实施方案中,在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处进行保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸取代。本领域中已定义了具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有以下侧链的氨基酸:碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β-分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,在本发明的多肽(例如图 2-7 中的多肽)中预测的非必需氨基酸残基可被来自同一侧链家族的另一个氨基酸残基替换。或者,在另一个实施方案中,可通过例如饱和诱变,将突变随机引入全部或部分的本发明核酸分子中,并且可针对生物活性筛选所得突变型,以鉴定保留活性的突变型。在本发明的核酸分子诱变后,可重组表达所编码的多肽,并可测定所述多肽的活性。

[0081] 可通过将异源 DNA 调节元件插入稳定细胞系或克隆微生物的基因组,使得所插入的调节元件与本发明的核酸分子可操作地连接,来改进本发明的核酸分子在细胞系或微生物内的表达特性。例如,将异源调节元件插入稳定细胞系或克隆微生物中,使得其与本发明的核酸分子可操作地连接,这可采用例如靶向同源重组等技术,其为本领域技术人员众所周知的,并描述于例如 Chappel,美国专利号 5,272,071;1991 年 5 月 6 日公布的 PCT 公布号 WO 91/06667。

[0082] III. 分离的多肽分子

本发明的一个方面涉及分离的多肽。在一个实施方案中,可采用标准蛋白质纯化技术,

通过合适的纯化方案,由细胞或组织来源分离本发明的多肽。在另一个实施方案中,本发明的多肽通过重组 DNA 技术产生。或者,本发明的多肽可采用标准肽合成技术化学合成。

[0083] “分离的”或“纯化的”多肽基本不含来自细胞或组织来源(本发明的多肽来源于该细胞或组织来源)的细胞物质或其它污染性蛋白质,或者当化学合成时基本不含化学前体或其它化学物质。表述“基本不含细胞物质”包括本发明多肽的制备物,其中将多肽与多肽从中分离或重组产生的细胞的细胞组分分离。在一个实施方案中,表述“基本不含细胞物质”包括这样的本发明多肽的制备物,即所述制备物具有小于约 30% (以干重计)的非本发明的蛋白质(本文亦称为“污染性蛋白质”)、更优选小于约 20% 的非本发明的蛋白质、还更优选小于约 10% 的非本发明的蛋白质、最优选小于约 5% 的非本发明的蛋白质。如果本发明的多肽是重组产生的,则其还优选基本不含培养基,即培养基占蛋白质制备物体积的小于约 20%、更优选小于约 10%、最优选小于约 5%。

[0084] 表述“基本不含化学前体或其它化学物质”包括本发明多肽的制备物,其中将所述多肽与参与多肽合成的化学前体或其它化学物质分离。在一个实施方案中,表述“基本不含化学前体或其它化学物质”包括这样的本发明多肽的制备物,其具有小于约 30% (以干重计)的化学前体或非本发明的蛋白质、更优选小于约 20% 的化学前体或非本发明的蛋白质、还更优选小于约 10% 的化学前体或非本发明的蛋白质、最优选小于约 5% 的化学前体或非本发明的蛋白质。

[0085] 在另一个实施方案中,本发明的多肽(例如编码本发明亲和力降低的抗体的多肽)具有包括 SEQ ID NO: 1-14 中的一个或多个的氨基酸序列。

[0086] 为了测定 2 个氨基酸序列或 2 个核酸序列的百分比同一性,针对最佳比较目的对序列进行比对(例如可在第一氨基酸或核酸序列和第二氨基酸或核酸序列的一个或两个中引入空位用于最佳比对,且出于比较目的,可忽略非同一性序列)。在一个实施方案中,用于比较目的所比对的参比序列的长度为参比序列长度的至少 30%、优选至少 40%、更优选至少 50%、甚至更优选至少 60%、甚至更优选至少 70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 或 99.9%。然后,比较相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。如果第一序列的某一位置被第二序列上相应位置的相同氨基酸残基或核苷酸占据,则该分子在该位置上是相同的(本文所用的氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。2 个序列的百分比同一性是序列共有的相同位置数的函数,考虑了需要引入以进行两个序列的最佳比对的空位的数目和各个空位的长度。

[0087] 所描述的多肽的氨基酸序列将使本领域技术人员能够产生相应的多肽。可通过表达编码本发明多肽的多核苷酸,而在原核或真核宿主细胞中产生这类多肽。或者,这类多肽可通过化学方法合成。用于在重组宿主中表达异源多肽、化学合成多肽和体外翻译的方法是本领域众所周知的,并进一步描述于 Maniatis 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), 第 2 版, Cold Spring Harbor, N. Y.; Berger 和 Kimmel, *Methods in Enzymology*, 第 152 卷, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Merrifield, J. (1969) *J. Am. Chem. Soc.* 91:501; Chaiken I. M. (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 11:255; Kaiser 等 (1989) *Science* 243:187; Merrifield, B. (1986) *Science* 232:342; Kent, S. B. H. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57:957; 以及 Offord, R. E. (1980) *Semisynthetic Proteins*, Wiley

Publishing, 这些均通过引用结合到本文中。

[0088] IV. 重组表达载体和宿主细胞

本发明的另一个方面涉及含有编码本发明多肽的核酸分子（或其部分）的载体、优选表达载体。本文所用术语“载体”是指能够转运其所连接的另一个核酸的核酸分子。一种载体类型是“质粒”，其是指另外的 DNA 区段可连接到其中的环状双链 DNA 环。另一种载体类型是病毒载体，其中另外的 DNA 区段可连接至病毒基因组。某些载体能够在其所引入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）。其它载体（例如非附加型哺乳动物载体）在引入宿主细胞中时被整合至宿主细胞的基因组，从而与宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导与之可操作地连接的基因的表达。这类载体在本文称为“表达载体”。一般而言，用于重组 DNA 技术的表达载体常常呈质粒的形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可互换使用，因为质粒是最常使用的载体形式。然而，本发明意欲包括提供等效功能的这类表达载体的其它形式，例如病毒载体（例如复制缺陷型反转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒）。

[0089] 本发明的重组表达载体包含呈适于在宿主细胞中表达核酸的形式本发明核酸，这意味着重组表达载体包括根据待用于表达的宿主细胞而选择的一个或多个调节序列，其与待表达的核酸序列可操作地连接。在重组表达载体内，“可操作地连接”意欲指以允许核苷酸序列表达的方式（例如在体外转录 / 翻译系统中或在载体被导入宿主细胞时的宿主细胞中），使目的核苷酸序列与调节序列连接。术语“调节序列”意欲包括启动子、增强子和其它表达调控元件（例如聚腺苷酸化信号）。这类调节序列描述于例如 Goeddel (1990) *Methods Enzymol.* 185:3-7。调节序列包括在许多类型的宿主细胞中指导核苷酸序列组成型表达的调节序列和只在某些宿主细胞中指导核苷酸序列表达的调节序列（例如组织特异性调节序列）。本领域技术人员应理解的是，表达载体的设计可取决于例如待转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达水平等因素。可将本发明的表达载体导入宿主细胞，从而产生由本文所述核酸编码的蛋白质或肽，包括融合蛋白或融合肽。

[0090] 可以设计本发明的重组表达载体用于在原核或真核细胞中表达本发明的多肽。例如，可在细菌细胞例如大肠杆菌 (*E. coli*)、昆虫细胞（使用杆状病毒表达载体）、酵母细胞或哺乳动物细胞中表达多肽。合适的宿主细胞进一步论述于 Goeddel (1990)，同上。或者，例如可使用 T7 启动子调节序列和 T7 聚合酶，体外转录和翻译重组表达载体。

[0091] 最常在具有载体的大肠杆菌中进行原核生物多肽的表达，所述载体含有指导融合或非融合蛋白表达的组成型或诱导型启动子。融合载体将许多氨基酸加入其中所编码的多肽中，通常加至重组多肽的氨基端。这类融合载体通常用于 3 个目的：1) 增加重组多肽的表达；2) 提高重组多肽的溶解度；和 3) 通过在亲和纯化中用作配体而有助于重组多肽的纯化。常常在融合表达载体中，将蛋白水解切割位点引入融合部分与重组多肽的连接处，使得在融合蛋白纯化后，能够将重组多肽与融合部分分离。这类酶及其同族识别序列包括因子 Xa、凝血酶和肠激酶。典型的融合表达载体包括 pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. 和 Johnson, K. S. (1988) *Gene* 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) 和 pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ)，其分别将谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST)、麦芽糖 E 结合蛋白或蛋白 A 与靶重组多肽融合。

[0092] 合适的诱导型非融合大肠杆菌表达载体的实例包括 pTrc (Amann 等 (1988) *Gene*

69:301-315) 和 pET 1 Id (Studier 等 (1990) *Methods Enzymol.* 185:60-89)。pTrc 载体的靶基因表达依赖于宿主 RNA 聚合酶自杂合体 trp-lac 融合启动子的转录。pET 11 d 载体的靶基因表达依赖于自 T7 gn10-lac 融合启动子的转录,所述启动子由共同表达的病毒 RNA 聚合酶 (T7 gn1) 介导。通过带有 T7 gn1 基因的定居原噬菌体的宿主株 BL21 (DE3) 或 HMS174 (DE3) 在 lacUV 5 启动子的转录调控下供应该病毒聚合酶。

[0093] 使重组多肽在大肠杆菌中表达最大化的一种策略是在蛋白酶水解切割重组多肽的能力受损的宿主细菌中表达该多肽 (Gottesman, S. (1990) *Methods Enzymol.* 185:119-128)。另一种策略是改变待插入表达载体的核酸的核酸序列,使得每个氨基酸的各个密码子是优先用于大肠杆菌的密码子 (Wada 等 (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118)。本发明核酸序列的这类改变可通过标准 DNA 合成技术进行。

[0094] 在另一个实施方案中,表达载体是酵母表达载体。用于在酵母酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中表达的载体的实例包括 pYepSec1 (Baldari 等 (1987) *EMBO J.* 6:229-234)、pMFa (Kurjan 和 Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943)、pJRY88 (Schultz 等 (1987) *Gene* 54:113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) 和 picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.)。

[0095] 或者,可利用杆状病毒表达载体使本发明的多肽 (例如图 2-7) 在昆虫细胞中表达。可用于在培养的昆虫细胞 (例如 Sf 9 细胞) 中表达多肽的杆状病毒载体包括 pAc 系列 (Smith 等 (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) 和 pVL 系列 (Lucklow 和 Summers (1989) *Virology* 170:31-39)。

[0096] 在又一个实施方案中,使用哺乳动物表达载体使本发明的核酸 (例如图 2-7) 在哺乳动物细胞中表达。哺乳动物表达载体的实例包括 pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) 和 pMT2PC (Kaufman 等 (1987) *EMBO J.* 6:187-195)。当用于哺乳动物细胞时,表达载体的调控功能常常由病毒调节元件提供。例如,常用的启动子来源于多瘤病毒、腺病毒 2、巨细胞病毒和猿猴病毒 40。对于用于原核和真核细胞的其它合适的表达系统参见 Sambrook, J. 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 第 2 版, 第 16 和 17 章, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989。

[0097] 在另一个实施方案中,重组哺乳动物表达载体能够指导核酸优先在特定细胞类型中表达 (例如组织特异性调节元件用来表达核酸)。组织特异性调节元件是本领域已知的。合适的组织特异性启动子的非限制性实例包括白蛋白启动子 (肝特异性; Pinkert 等 (1987) *Genes Dev.* 1:268-277)、淋巴特异性启动子 (Calame 和 Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275)、T 细胞受体的特定启动子 (Winoto 和 Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) 和免疫球蛋白的特定启动子 (Banerji 等 (1983) *Cell* 33:729-740; Queen 和 Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748)、神经元特异性启动子 (例如神经丝启动子; Byrne 和 Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477)、胰特异性启动子 (Edlund 等 (1985) *Science* 230:912-916) 和乳腺特异性启动子 (例如乳清启动子; 美国专利号 4,873,316 和欧洲申请公布号 264,166)。还包括发育调节启动子,例如鼠 *hox* 启动子 (Kessel 和 Gruss (1990) *Science* 249:374-379) 和甲胎蛋白启动子 (Campes 和 Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546)。

[0098] 本发明的另一个方面涉及宿主细胞,在重组表达载体内或含有允许其同源重组进入宿主细胞基因组特定位置的序列的核酸分子内的本发明核酸分子被导入其中。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文中互换使用。要理解的是,这类术语不仅是指特定的主题细胞,而且还指这类细胞的子代或潜在子代。因为由突变或环境影响所致某些修饰可发生在后代中,实际上,这类子代可能与母细胞不同,但仍包括在本文所用该术语的范围内。

[0099] 宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如,可在细菌细胞(例如大肠杆菌)、昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或COS细胞)中表达本发明的多肽。其它合适的宿主细胞为本领域技术人员所知。

[0100] 可通过常规转化或转染技术,将载体DNA导入原核或真核细胞。本文所用术语“转化”和“转染”欲指用于将外源核酸(例如DNA)导入宿主细胞的各种本领域公知的技术,包括磷酸钙或氯化钙共同沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂转染或电穿孔。用于转化或转染宿主细胞的合适方法可参见Sambrook等(Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989)和其它实验室指南。

[0101] 对于哺乳动物细胞的稳定转染,已知取决于所用的表达载体和转染技术,仅小部分细胞可将外源DNA整合至其基因组。为了鉴定和选择这些整合子(integrand),通常将编码选择标记(例如抗生素抗性)的基因与目的基因一起导入宿主细胞。优选的选择标记包括赋予药物例如G418、潮霉素和甲氨蝶呤抗性的选择标记。可将编码选择标记的核酸在与本发明的多核苷酸相同的载体中导入宿主细胞,或者可在单独载体中导入。用导入的核酸稳定转染的细胞可通过药物选择来鉴定(例如已掺入选择标记基因的细胞可存活,而其它细胞则死亡)。

[0102] 本发明的宿主细胞,例如培养中的原核或真核宿主细胞,可用来产生(即表达)本发明的多肽。因此,本发明还提供使用本发明的宿主细胞产生本发明多肽的方法。在一个实施方案中,所述方法包括将本发明的宿主细胞(编码本发明的多肽的重组表达载体已导入其中)培养在合适的培养基中,使得产生本发明的多肽。在另一个实施方案中,所述方法还包括将本发明的多肽从培养基或宿主细胞中分离。

[0103] 还可如下所述使用本发明的宿主细胞产生非人转基因动物。

[0104] V. 使用方法

可将亲和力降低的抗体用于指定为诊断或预后监测组织中的多肽水平作为临床检验法的组成部分的测定法中,以例如测定给定治疗方案的功效。可通过使抗体与可检测物质偶联(即物理连接)促进检测。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质和放射性物质。合适酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、P-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适辅基复合物的实例包括链霉抗生物素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适荧光物质的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹酰氯或藻红蛋白;发光物质的实例包括鲁米诺(luminol);生物发光物质的实例包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白;合适放射性物质的实例包括¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S或³H。

[0105] 实施例1 亲和力降低的新抗体的产生和表征

对OKT3互补决定区的氨基酸序列进行修饰以在不影响抗体结构或表达的情况下降低或消除抗原结合。本发明对照抗体的示例性CDR序列列于表3中。所得亲和力降低的抗体

正常表达 (图 3), 与人 Jurkat 细胞 (图 4) 或人外周血单核细胞 (PBMC, 图 5) 的结合能力最小或无结合能力。

[0106] 表 3. 示例性的亲和力降低的抗体 CDR 序列。

CDR	取代	序列	SEQ ID NO.
OKT3 CDRH1	NA	GYTFTRYTMH	SEQ ID NO: 1
CDRH1m	T33A	GYTFTRYAMH	SEQ ID NO: 2
OKT3 CDRH2	NA	YINPSRQYTNYNQKFKD	SEQ ID NO: 3
CDRH2m1	Y50A/N52A/R55A/Y57A	ALAPSAGATNYNQKFKD	SEQ ID NO: 4
CDRH2m2	R55A	YINPSAGYTNYNQKFKD	SEQ ID NO: 5
OKT3 CDRH3	NA	YYDDHYCLDY	SEQ ID NO: 6
CDRH3m1	Y99A/D101A/Y104A	AYADHACL DY	SEQ ID NO: 7
CDRH3m2	D101A	YYADHYCLDY	SEQ ID NO: 8
OKT3 CDRL1	NA	SASSSVSY	SEQ ID NO: 9
CDRL1m	S30A/Y31A	SASSSVAA	SEQ ID NO: 10
OKT3 CDRL2	NA	IYDTSKL	SEQ ID NO: 11
CDRL2m	D49A	IYATSKL	SEQ ID NO: 12
OKT3 CDRL3	NA	QQWSSNPFT	SEQ ID NO: 13
CDRL3m	W90A/S91A	QQAASNPF T	SEQ ID NO: 14

[0107] 细胞系和培养基

将人 293T 细胞保持在 Dulbecco 改进的 Eagles 培养基 (DMEM) 中, 该培养基补充了 10% 胎牛血清 (FBS) (Invitrogen, Gibco, Carlsbad, CA)、2 mM L- 谷氨酰胺和 40 ug/ml 庆大霉素。使小鼠 OKT3 (一种产生抗人 CD3 抗体的杂交瘤细胞系) 在 Iscove 改进的 Dulbecco 培养基 (IMDM) 中生长, 该培养基含有 10% FBS、1mM 丙酮酸钠、2 mM L- 谷氨酰胺和 40 ug/ml 庆大霉素。使 Jurkat E6.1 (一种人白血病 T 细胞系) 在补充了 10% FBS、2 mM L- 谷氨酰胺和 40 ug/ml 庆大霉素的 RPMI 培养基中生长。除 FBS 以外, 所有培养基和补充物购自 Lonza, Walkville, MD。

[0108] OKT3 重链和轻链表达质粒的构建

使用得自 Invitrogen 的 TRIzol 试剂, 将总 RNA 从 OKT3 杂交瘤细胞系中分离。使用 SuperScript™ III 反转录酶 (Invitrogen) 和寡 (dT) 12-18 引物 (Invitrogen) 合成 cDNA。根据小鼠 OKT3 重链 (登记号 A22261) 和轻链 (登记号 A22259) 核苷酸序列的 Genbank 记录, 以 OKT3 杂交瘤的寡 dT- 引发的 cDNA 作为模板, 通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增重链和轻链的完整编码序列, 并克隆至由 CMV 即时早期基因启动子驱动的哺乳动物表达质粒 (称为 pME) 中。SEQ ID NO: 23 表示质粒 pME-wtOKT3 HC 的完整核苷酸序列 (图 6), SEQ ID NO: 24 表示质粒 pME-wtOKT3LC 的完整核苷酸序列 (图 7)。

[0109] 编码 OKT3 重链和轻链变体的表达质粒的构建

采用标准 PCR 技术进行定点诱变, 以产生 OKT3 重链和轻链变体, CDR 内的各种抗原接触性氨基酸用丙氨酸替换。将带有突变的 PCR 片段克隆至相同的表达质粒 pME 中。所得质粒通过测序反应验证。

[0110] 转染

采用标准磷酸钙方法, 通过瞬时转染产生 OKT3 和变体抗体。简单地说, 在转染前 20-24 小时, 将 293T 细胞以 6×10^5 个细胞 / 3 ml 293T 培养基 / 孔接种至 6 孔板中。在转染前 3 小时, 更换培养基为补充有 10% FBS、25mM HEPES 缓冲液和 40 ug/ml 庆大霉素的 IMDM。通过先将 8 μ g 各 OKT3 重链和轻链质粒 DNA 与 31 μ l 2M CaCl₂ 和无菌蒸馏水混合至 250

μl 的最终体积,来进行转染程序。然后将 DNA/ 钙混合物慢慢加入 250 μl 2x HBS 缓冲液 (281 mM NaCl、100 mM HEPES、1.5mM Na_2HPO_4 , pH 7.12) 中。使转染混合物在室温下孵育 20 分钟,然后慢慢加入 293T 培养物中。转染后 12-16 小时,再次更换培养基为完全 293T 培养基。转染后 40-48 小时,收获含有 OKT3 变体抗体的培养上清液,用于后续分析。

[0111] 抗体定量

按照生产商的方案,通过 Guava RapidQuant 小鼠 IgG 试剂盒 (Guava Technologies, Hayward, CA) 测定由瞬时转染产生的 OKT3 和变体抗体的量。简单来说,将来自各转染的 10 μl 上清液与 IgG 俘获珠在振荡的同时孵育 40 分钟。随后,将 FITC 缀合的山羊抗小鼠 IgG 加入各样品中,振荡的同时孵育 60 分钟。使样品体积达到 200 μl ,并在 Guava EasyCyte 系统 (Guava) 中运行。通过将样品的平均荧光通道 (mean fluorescence channel, MFI) 与标准物的平均荧光通道进行比较,来计算各样品中的抗体浓度。

[0112] 人外周单核细胞 (hPBMC) 的分离

采用菲科帕克 (Ficoll-paque) 梯度方法分离人外周单核细胞 (hPBMC)。简单来说,人全血用 1x 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 1:1 稀释,并小心地在菲科帕克 (血样体积的 0.4 体积) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 顶部分层。在 900 g 下离心 30 分钟后,小心地在血液与菲科帕克的界面提取 hPBMC。细胞悬液用 1x PBS 1:3 稀释,在 400 g 下于 8-20°C 离心 10 分钟。细胞沉淀再用 1x PBS 在 400 g 下于 8-20°C 洗涤一次,持续 10 分钟,用 FACS 缓冲液 (具有 2% FCS、0.1% NaN_3 的 PBS) 稀释用于流式细胞术分析。

[0113] 流式细胞术

将人 Jurkat 细胞 (1×10^5 个细胞 / 孔, 96 孔板中) 或 hPBMC (3×10^5 个细胞 / 孔, 96 孔板中) 与 100 μl OKT3 和变体的转染上清液一起在 4°C 下孵育 60 分钟,用 200 μl FACS 缓冲液洗涤两次。细胞用 100 μl 藻红蛋白 (PE) 缀合的山羊-抗小鼠免疫球蛋白 G (Invitrogen-Caltag, Carlsbad, CA) 在 4°C 下染色 60 分钟,用 200 μl FACS 缓冲液洗涤两次。然后将细胞用 1% 低聚甲醛在 4°C 下固定 15 分钟,并用 FACS 缓冲液洗涤一次。然后将细胞重新悬浮于 200 μl 的 FACS 缓冲液中用于在 Guava EasyCyte Plus 系统 (Guava Technologies, Inc., Hayward, CA) 中进行分析。

[0114] OKT3 和 OKT3 变体与 Jurkat 细胞的结合。

[0115] 将共 1×10^5 个 Jurkat 细胞与系列稀释的 OKT3 或 OKT3 变体抗体一起孵育,接着与 PE 缀合的山羊抗小鼠 IgGg 一起孵育,并通过 FACS 分析。在 1600 ng/ml 下,OKT3 变体的结合与 0.4 ng/ml 下的 OKT3 抗体的结合相当。因此,OKT3 变体的结合亲和力是亲代 OKT3 抗体的约 $1/4000 \times$ (图 8)。

[0116] 变体抗体的药代动力学。

[0117] 变体 IgG2a 抗体的药代动力学分析。通过 CDR 突变重链 (Seq No. 26) 和 CDR 突变轻链 (Seq No. 47) 的共表达而产生 IgG2a 抗体。虽然清楚该变体抗体不再与 CD3 (其是亲代抗体 OKT3 的抗原) 结合,但是不知道该抗体是否意外发现仍可与另外的抗原结合。检测这一点的一种方法是确定变体抗体是否具有类似于内源循环的 IgG2a 抗体的体内半衰期。将变体抗体给予 B6 小鼠,收集血清样品直至 21 天。通过同种异型特异性抗小鼠抗体测量重组 IgG2a 抗体的浓度。通过拟合药代动力学分布 (profile) 的 β 期,计算抗体的半衰期,测定为 13.75 天 (图 9)。该半衰期与报告的鼠 IgG2a 抗体的 10-15 天半衰期极为一致

(Talbot, P. J. and Buchmeier M. J. Catabolism of homologous murine monoclonal hybridoma IgG antibodies in mice (小鼠中同源鼠单克隆杂交瘤 IgG 抗体的分解代谢). *Immunology* 60:485-489, 1987)。长的血清半衰期表明,该抗体很可能不与预料不到的抗原相互作用,并且体内系统不能够将变体抗体与相同同种型的内源免疫球蛋白区分。

[0118] 通过引用结合

本文提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用以其整体结合到本文中,就如每个单独的出版物、专利和专利申请明确且单独说明通过引用而结合。如果有抵触,则以本申请(包括本文的任何定义)为准。

[0119] 也通过引用以其整体结合的是引用与公共数据库条目相关的登录号的任何多核苷酸和多肽序列,所述公共数据库例如由万维网上基因组研究所 (Institute for Genomic Research, TIGR) 和 / 或万维网上的国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechniques Information, NCBI) 维护的公共数据库。

[0120] 等价实施方案

本领域技术人员应了解或者仅采用常规实验就能够确定本文所述本发明的具体实施方案的许多等价实施方案。以下权利要求书意欲包括所述等价实施方案。

具有沉默 CDR 的 Ab 变体的产生

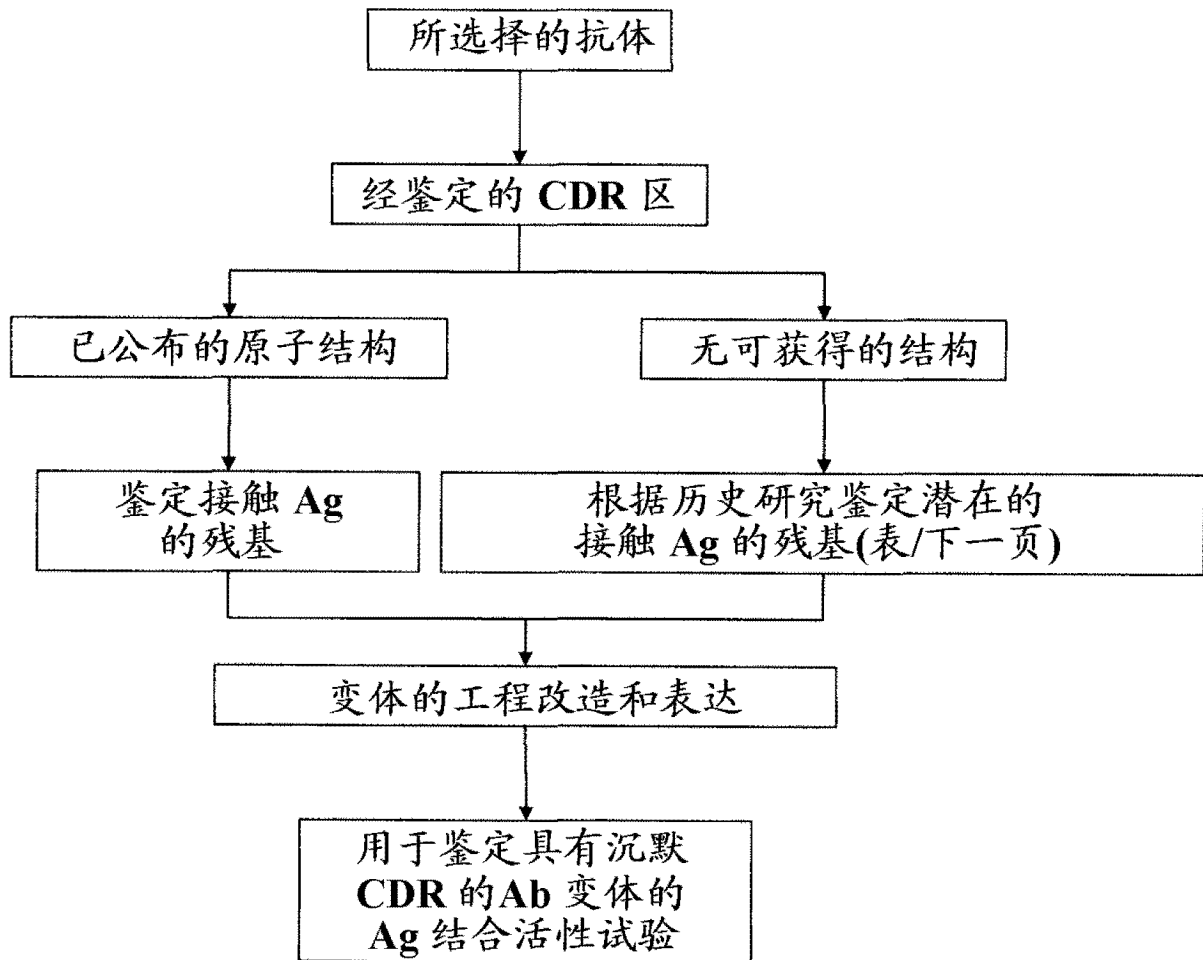
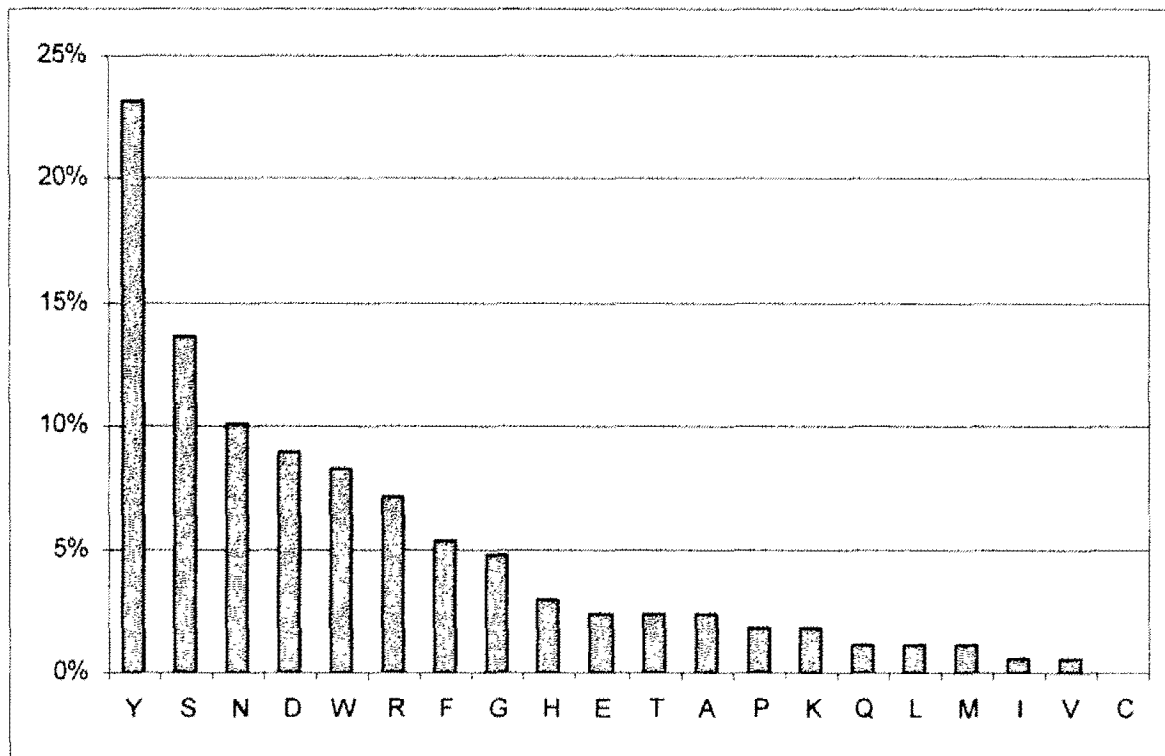


图 1

接触抗原的各个氨基酸的频率(II)



研究：
14 种抗体
168 个 CDR 氨基酸

图 2

抗体结构

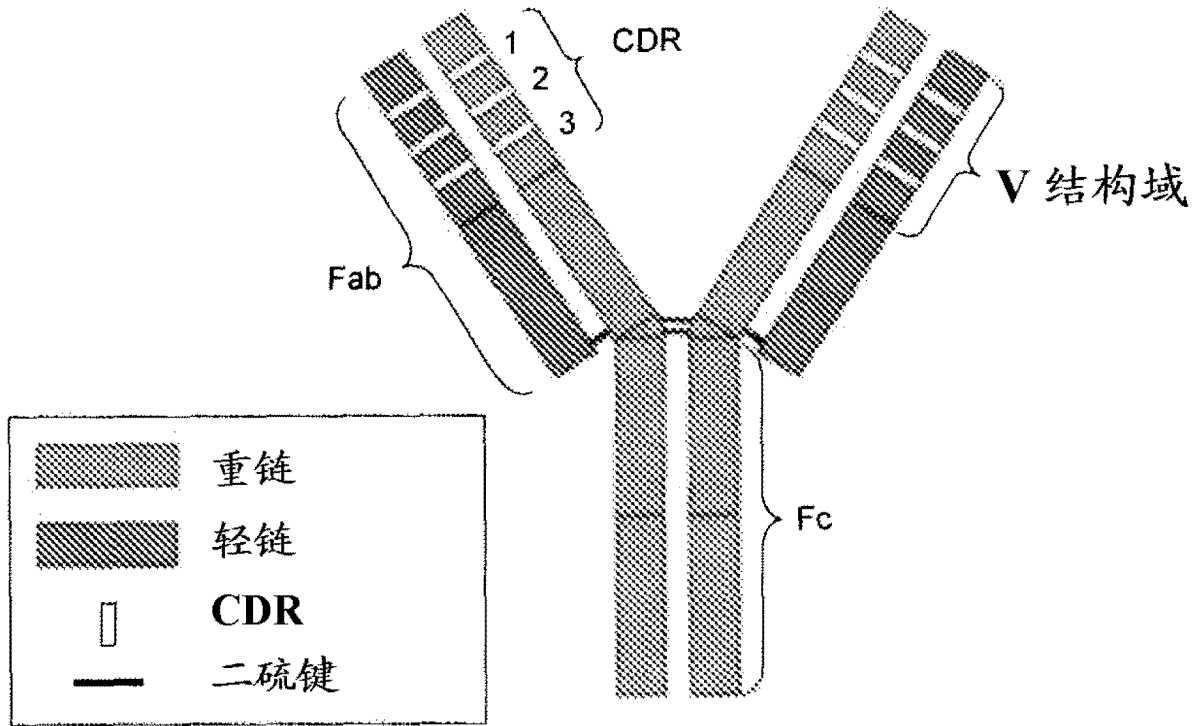


图 3

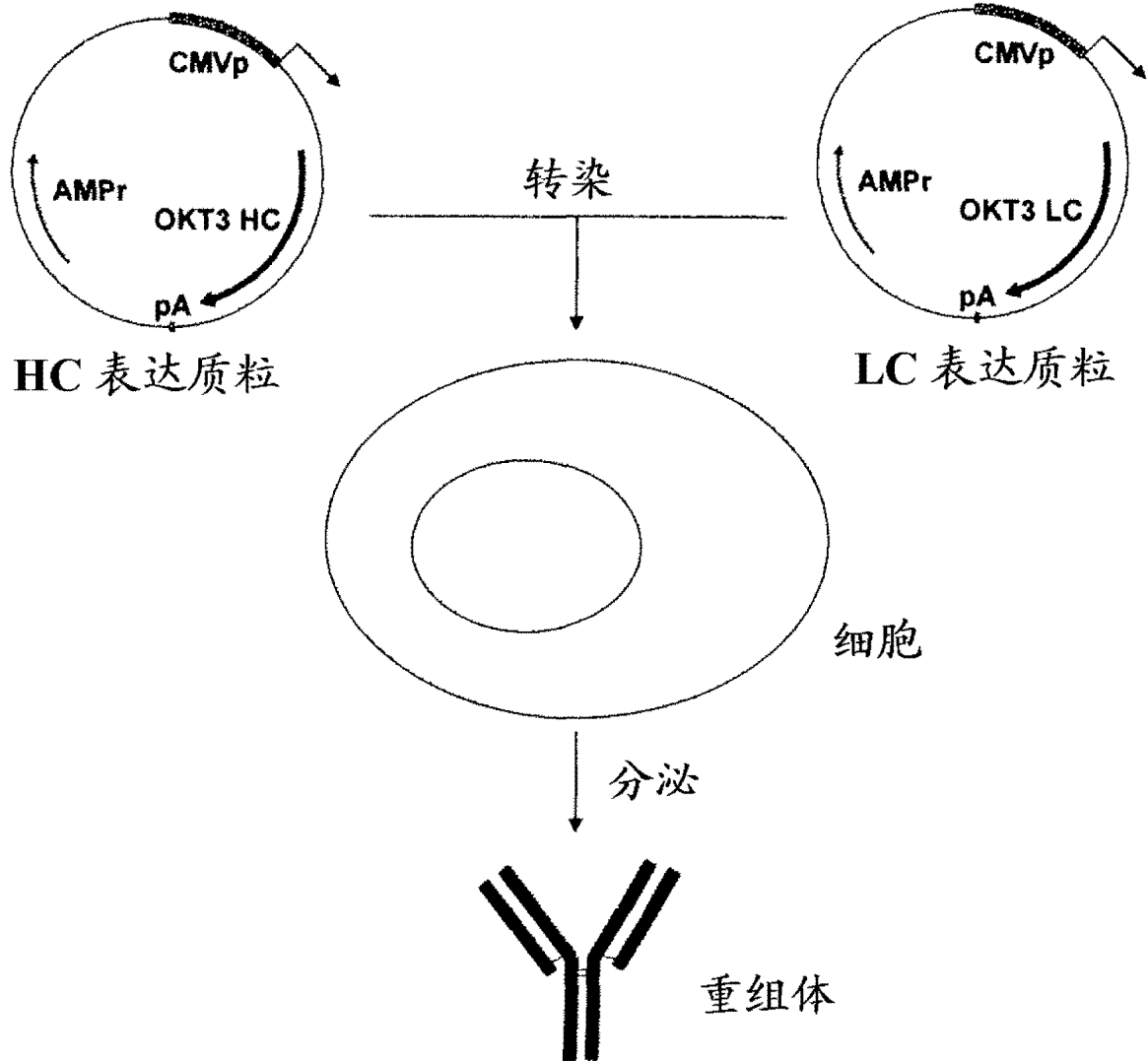


图 4

293 T 转染中 OKT3 和变体的抗体产生(μg/ml)

链		野生型	CDRH1m	CDRH2m1	CDRH2m2	CDRH3m1	CDRH3m2
		NA	T33A	Y50A/N52A/ R55A/Y57A	R55A	Y99A/D101A / Y104A	D101A
野生型	NA	5.8	6.7	2.8	3.4	2.5	1.4
CDRL1m	S30A/Y31A	4.7	7.7	2.9	4.1	3.0	2.9
CDRL2m	D49A	2.8	2.3	2.1	1.2	1.3	1.0
CDRL3m	W90A/S91A	4.3	2.9	3.5	2.5	3.3	1.9

图 5

CDR 内的突变破坏与人 Jurkat 细胞结合的 OKT3

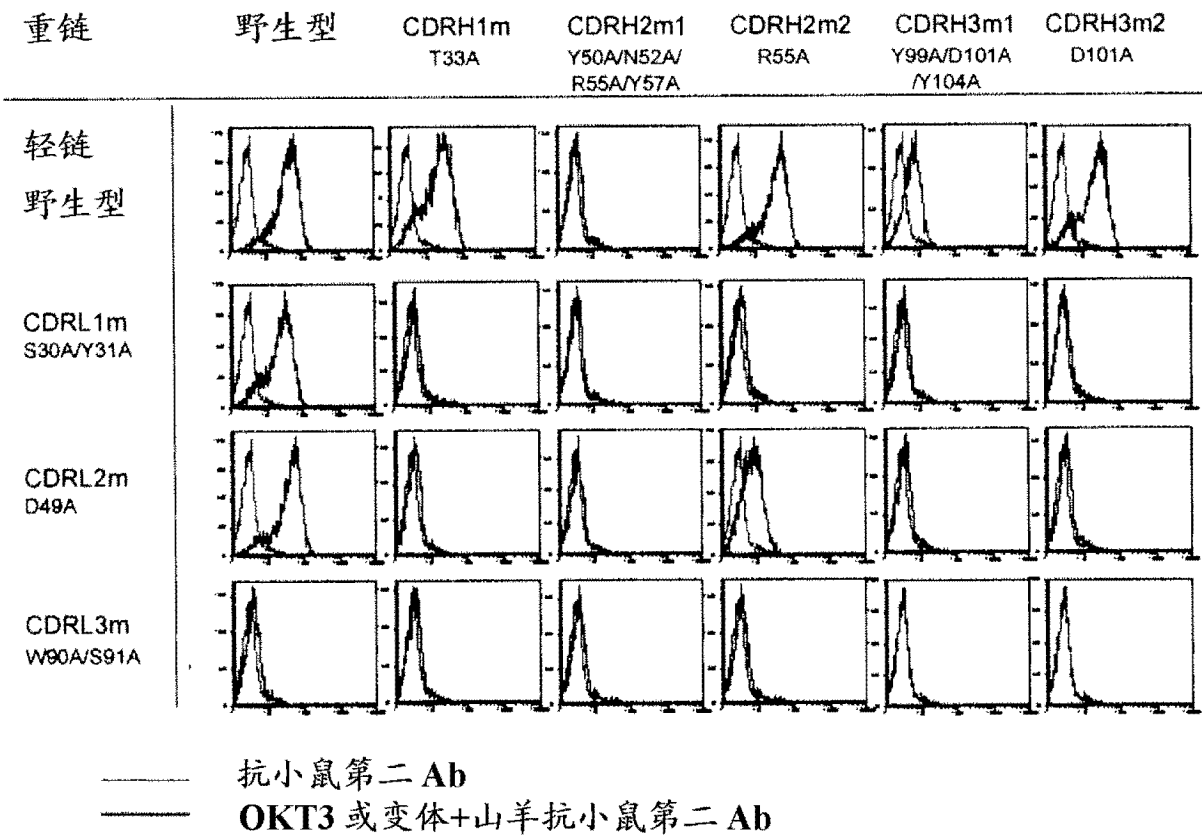


图 6

CDR 内的突变破坏与人 PBMC 结合的 OKT3

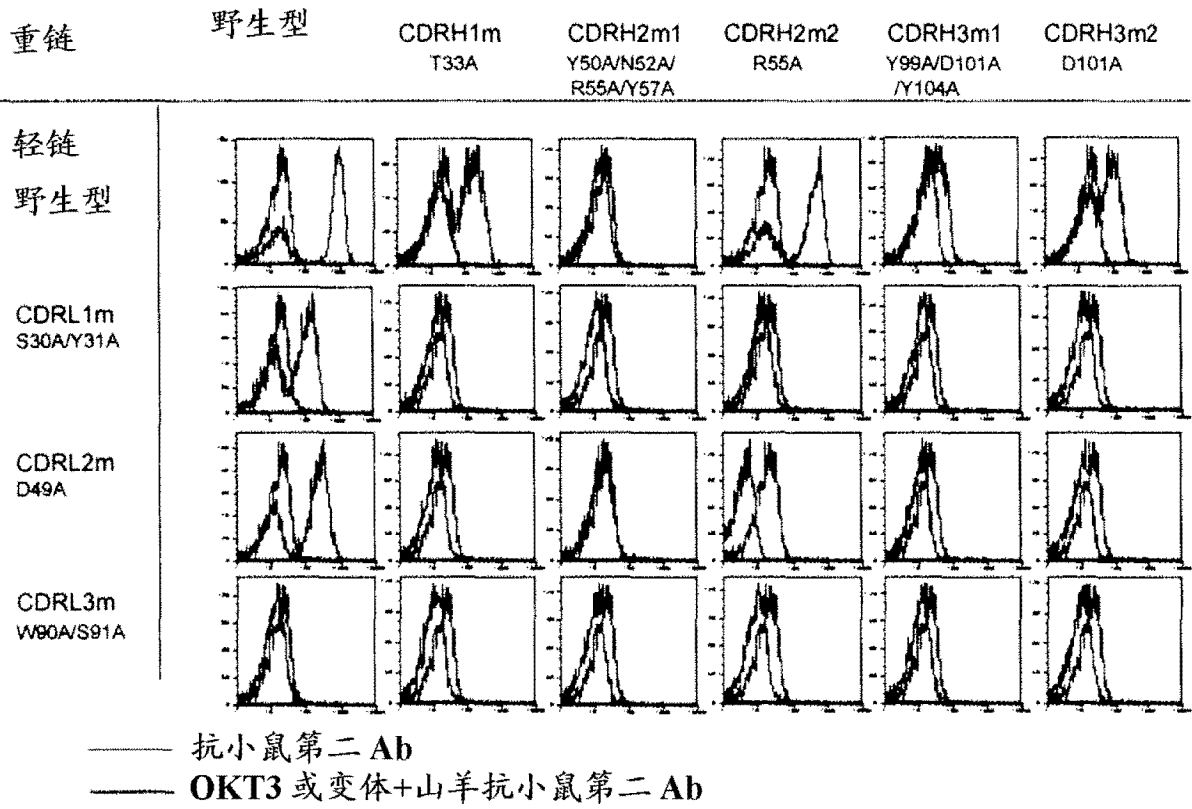


图 7

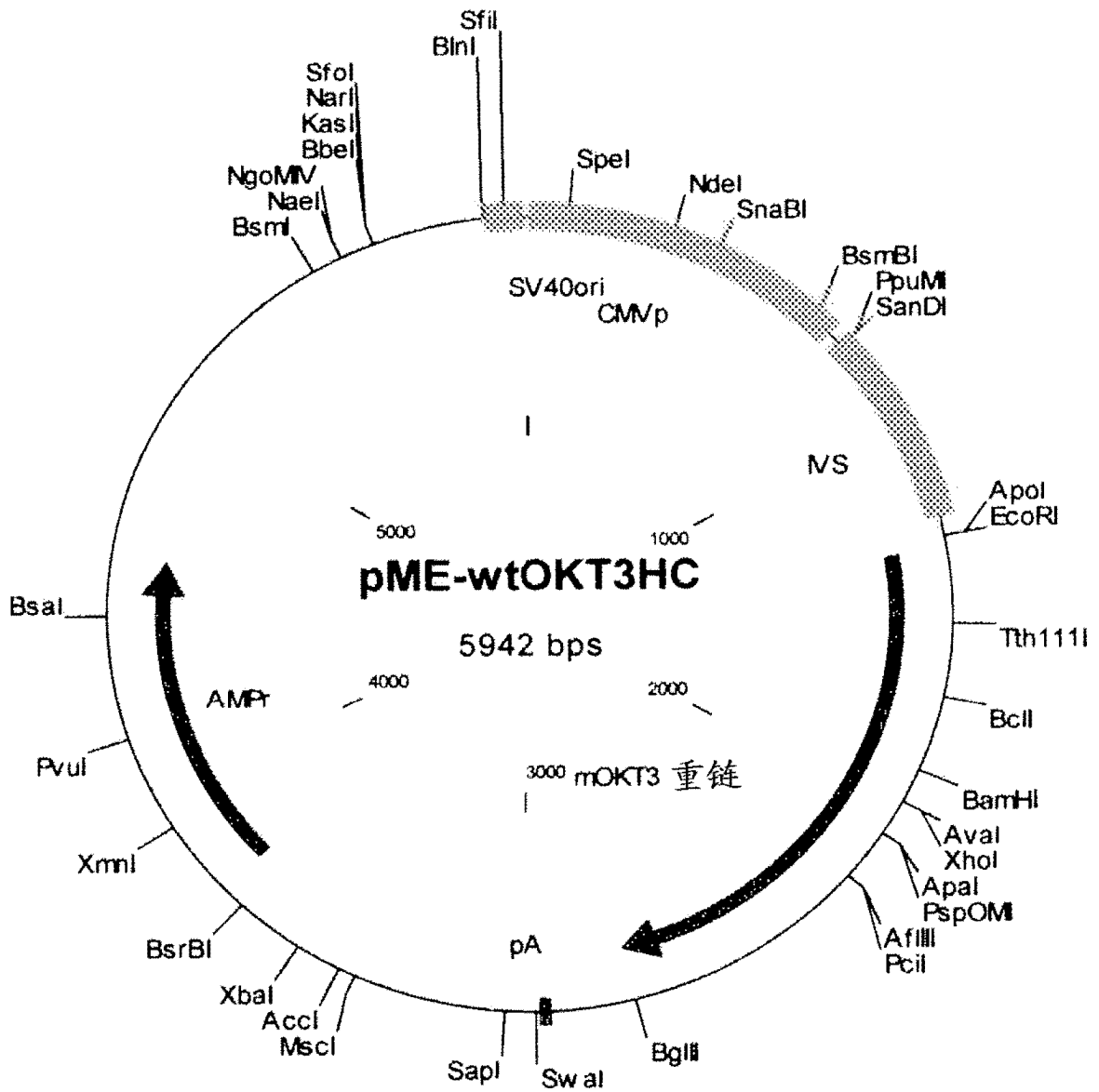


图 8

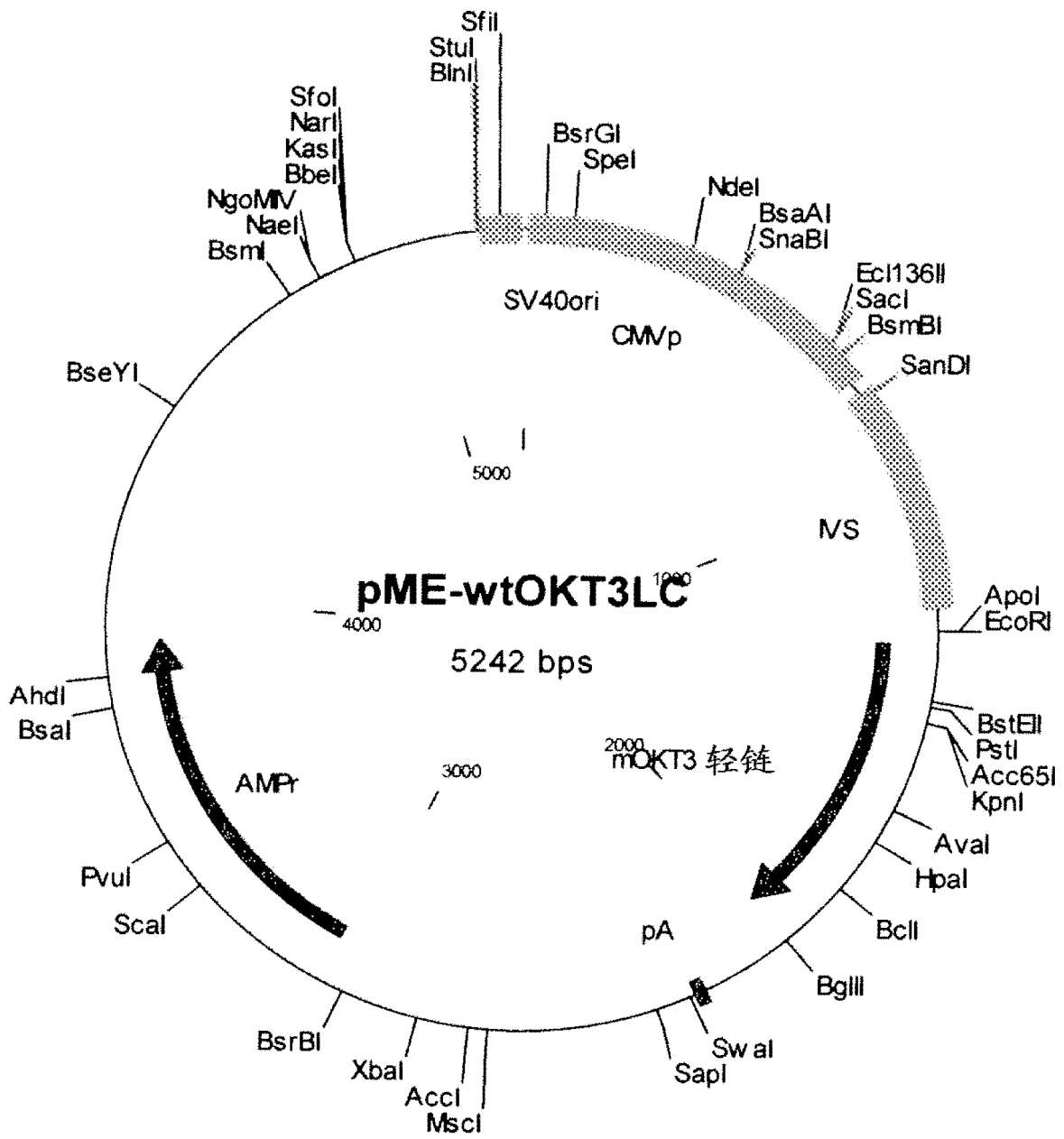


图 9

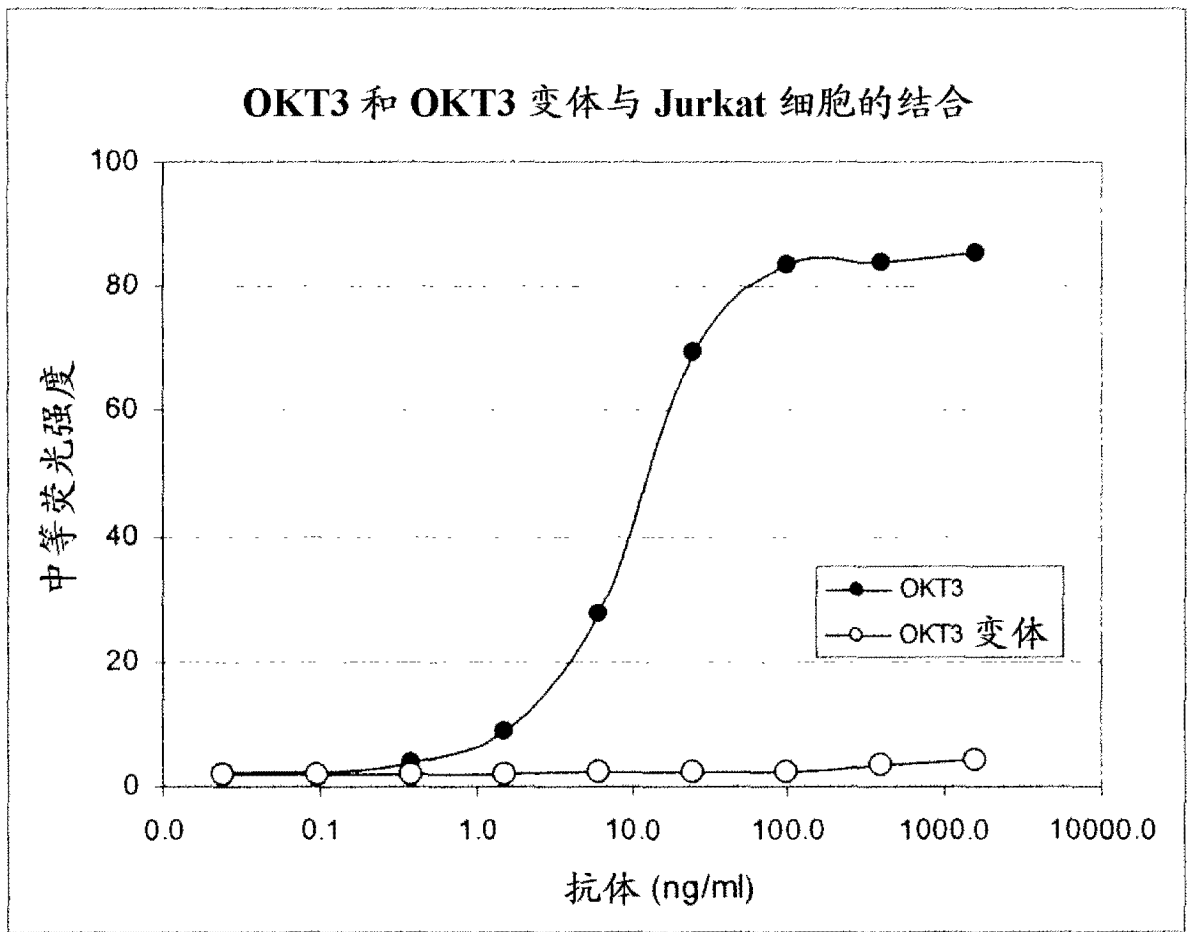
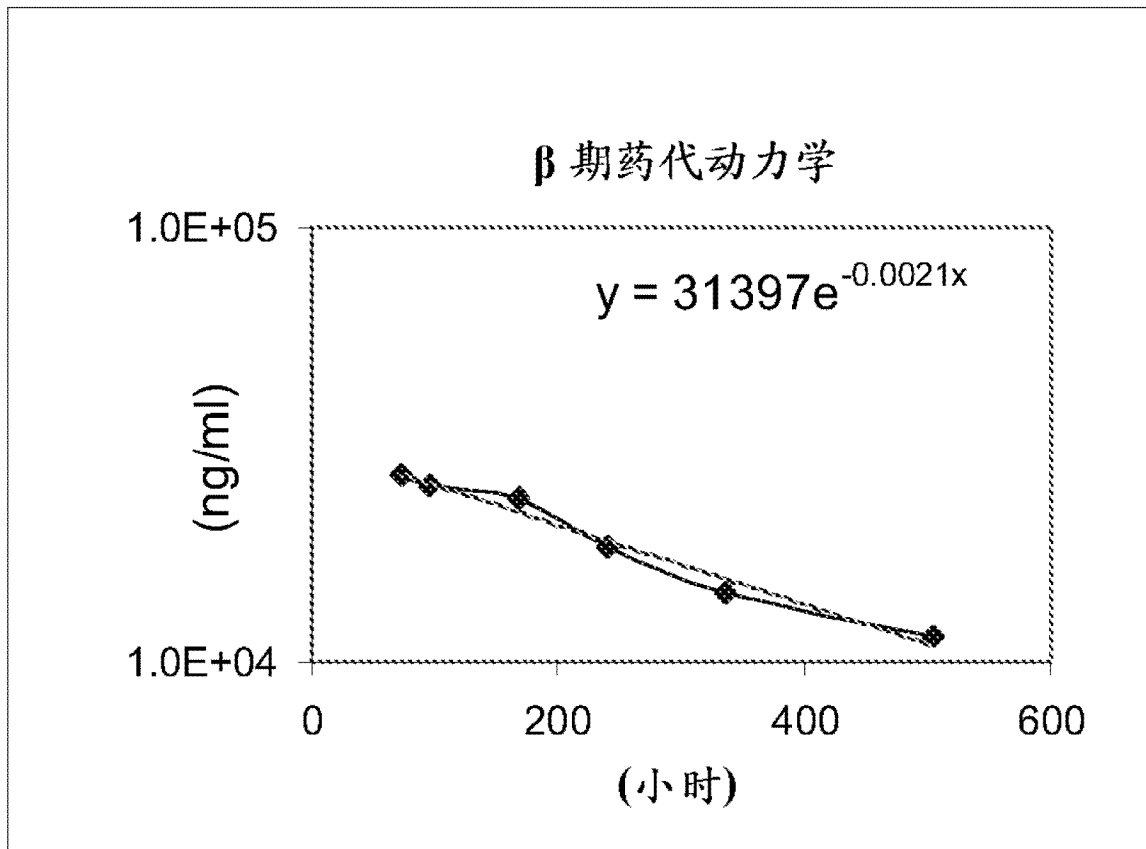


图 10

C57B6 小鼠中 OKT3-NC [seq 26x47] 的药代动力学



$T_{1/2} = 13.75$ 天

Y (ng/ml)	X (小时)
20,000	214.75
10,000	544.82

图 11

专利名称(译)	亲和力降低的新抗体和制备所述抗体的方法		
公开(公告)号	CN102971342A	公开(公告)日	2013-03-13
申请号	CN201180017079.3	申请日	2011-01-28
[标]发明人	张秀青		
发明人	张秀青		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/13 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	C07K2317/565 C07K2317/92 C07K2317/94 C07K16/00 C07K16/2809		
代理人(译)	孔青 林森		
优先权	61/299162 2010-01-28 US		
其他公开文献	CN102971342B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供用于制备合理设计的亲和力降低的新抗体的方法。本发明的方法制备这样的抗体，其具有设计成在不改变总体三维抗体结构的情况下降低或消除亲代抗体的抗原结合活性的可变结构域。使用在不同测定法中采用本发明方法制备的抗体允许研究人员将特异性抗原-抗体相互作用产生的作用与其它非特异性抗体作用区分。

