



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106349393 A

(43)申请公布日 2017.01.25

(21)申请号 201610736562.1

(22)申请日 2016.08.26

(66)本国优先权数据

201510959458.4 2015.12.21 CN

(71)申请人 合肥立方制药股份有限公司

地址 230088 安徽省合肥市长江西路669号
立方厂区

(72)发明人 张美 季俊虬 高美华 陈军

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

A61K 38/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种增强抗体药物稳定性的结构

(57)摘要

本发明属于基因工程药物领域。本发明将重组蛋白的氨基端和羧基端分别通过肽键连接到抗体的重链可变区和轻链可变区,形成抗体可变区-重组蛋白-抗体可变区的结构,使重组蛋白与抗体之间有两条肽键连接,以提高重组蛋白的稳定性和靶向性。

1. 一种蛋白质药物结构,包括抗体重链可变区、抗体轻链可变区、重组蛋白,其特征是重组蛋白在抗体的重链可变区和轻链可变区之间。
2. 根据权利要求1所述的抗体重链可变区或抗体轻链可变区,是指包含有抗体重链可变区或抗体轻链可变区的蛋白质或蛋白质结构域。
3. 根据权利要求1所述的抗体重链可变区或抗体轻链可变区,是单域抗体。
4. 根据权利要求1所述的蛋白质药物结构,是抗体重链可变区-重组蛋白-抗体轻链可变区,或者是抗体轻链可变区-重组蛋白-抗体重链可变区,或者是单域抗体-融合蛋白-单域抗体。
5. 根据权利要求1所述的重组蛋白,是任意的蛋白质,或者多肽,例如白细胞介素-2、白介素-10、白介素-4、白介素-22、肿瘤坏死因子 α 、粒细胞集落刺激生物因子GM-CSF。
6. 根据权利要求1所述的重组蛋白,其特征是氨基端和羧基端之间距离小于2纳米。
7. 根据权利要求1所述的蛋白质药物结构,其特征是各结构域之间通过肽链连接,肽链序列长度少于6个氨基酸。
8. 根据权利要求1所述的蛋白质药物结构,其特征是药物的全部结构,或作为蛋白质药物的一个亚基存在。
9. 根据权利要求1所述的蛋白质药物结构的用途,用于提高药物稳定性,或靶向性,或改变药物的体内代谢参数。

一种增强抗体药物稳定性的结构

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域。利用DNA重组技术将抗体的轻链和重链之间连接入重组蛋白,形成新的抗体融合蛋白,新的抗体融合蛋白可作为药物使用。

背景技术

[0002] 抗体具有良好的特异性和靶向性,通过抗体与药物的融合或偶联可以使药物也具有相应的特异性和靶向性,使药物更高浓度的富集于靶点组织。抗体与重组蛋白药物分子组成的抗体-重组蛋白药物融合蛋白是药物设计开发的方向之一,但此类药物结构的特点是重组蛋白药物融合在单链抗体的上游或者下游(Muller (2014).BioDrugs. 28: 123-131.),该抗体药物结构的显著特点是重组蛋白药物与抗体可变区之间仅一条肽链连接。该药物结构有如下不足:一、部分重组蛋白结构不稳定,与抗体形成融合蛋白后二者之间仅有一条肽链相连,有断裂可能,肽链断裂后则重组蛋白失去靶向性,药效降低,甚至作用于非病灶部位而产生毒性,重组蛋白药物的体内半衰期也会发生变化。二、重组蛋白药物处于游离状态的一端容易水解而失去生物活性,半衰期较短,给产业化带来困难。三、抗体药物在采用单链抗体结构时,容易出现同源二聚体结构,给分离纯化带来困难,而抗体药物二聚体或多聚体分子量会比抗体药物单体有更大的空间位阻,影响抗体药物的组织通透性,抗体药物难以抵达靶点部位。四、抗体融合蛋白中用于各结构域之间连接的非天然结构的肽链,具有一定的免疫原性,需保持最小长度,但当单链抗体两个可变区之间的肽链少于10个氨基酸或少于6个氨基酸时,同一个抗体分子的重链可变区和轻链可变区不能相互结合,而只能分子间结合形成二聚体。

[0003] 本发明解决的问题是,降低重组蛋白与抗体形成的融合蛋白药物因单一肽链水解而脱落的可能性;使融合蛋白药物结构更加稳定,融合的重组蛋白氨基端和羧基端均以肽键与其他蛋白结构域结合,而非游离;降低融合蛋白药物二聚体比例;缩短肽链的长度,甚至不额外添加氨基酸。

发明内容

[0004] 本文所述的重组蛋白是指能通过DNA重组技术实现与抗体可变区相融合的蛋白或蛋白结构域。而抗体与重组蛋白融合后产生的新蛋白称为抗体融合蛋白。获得的抗体融合蛋白用于治疗用途时可称为抗体融合蛋白药物,或简称为抗体药物。将不同来源的编码蛋白质的基因序列通过DNA重组技术连接到一起生成一个新的蛋白的过程称为蛋白融合,获得的新的蛋白叫融合蛋白。

[0005] 本发明一种蛋白质药物结构,包括抗体重链可变区、抗体轻链可变区、融合的重组蛋白,其结构是融合的重组蛋白在抗体的重链可变区和轻链可变区之间。重组蛋白的氨基端和羧基端的抗体可变区可以来自同一个抗体,可以靶向同一个抗原,可以靶向不同的抗原,可以有一个抗体可变区,也可以有多个抗体可变区。

[0006] 本发明所述的抗体重链可变区或抗体轻链可变区,是指包含有抗体重链可变区或

抗体轻链可变区的蛋白质或蛋白质结构域,也包括抗体可变区通过基因工程改造后的新结构域或多肽或蛋白,也可以是单域抗体。单域抗体也称纳米抗体。优选的,本发明所述的抗体重链可变区和抗体轻链可变区来自同一个抗体。更优选的,本发明所述的蛋白质药物结构,仅包括一个抗体重链可变区和一个抗体轻链可变区。

[0007] 本发明所述的蛋白质药物结构所包含的抗体重链可变区和抗体轻链可变区之间含有重组蛋白,所述的重组蛋白不是来自所述的抗体。

[0008] 本发明所述的蛋白质药物结构,是抗体可变区-重组蛋白-抗体可变区,具体的,例如可以是抗体重链可变区-重组蛋白-抗体轻链可变区,也可以是抗体轻链可变区-重组蛋白-抗体重链可变区。

[0009] 本发明所述的蛋白质药物结构,各结构域之间通过多肽连接,此时多肽也称肽链。肽链可以是富含甘氨酸的肽链、富含甘氨酸和丝氨酸的肽链、含GGGGS肽链。也可以不添加肽链。肽链主要起到连接各结构域作用,或调节各结构域的相对位置,长度和氨基酸组成可根据实际需要决定。

[0010] 所述的重组蛋白可以是任意的蛋白质或者多肽,重组蛋白具有一定的生物活性或药用价值或可以起到提高抗体融合蛋白稳定性的作用。

[0011] 一些成熟的哺乳动物内源性蛋白的氨基端和羧基端空间距离较近,比如白细胞介素-2(IL2)、白介素-4(IL4)、白介素-10(IL10)、白介素-22(IL22)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、粒细胞集落刺激生物因子GM-CSF等。部分蛋白的氨基端和羧基端之间距离小于2纳米,可以直接在其氨基端和羧基端融合抗体的重链和轻链,或者通过少于6个氨基酸的肽链连接各结构域,即可形成本发明所述的蛋白质药物结构。所采用的技术手段为本领域技术人员熟知。

[0012] 重组蛋白与抗体有两条肽链连接,即其中一条肽链或肽链相邻位置被水解、断裂,重组蛋白仍通过另一条肽链与抗体相连。

[0013] 重组蛋白的氨基端和羧基端均与抗体连接,不容易被水解,提高重组蛋白稳定性,保护重组蛋白的活性。

[0014] 通过抗体轻链可变区和重链可变区之间融合另一个重组蛋白,可以使抗体的轻链可变区和重链可变区分子内结合,形成单体抗体药物,也可以是分子间结合,形成同源二聚体药物。优选的,抗体的轻链可变区和重链可变区是分子内结合,比同源二聚体结构具有更好的组织通透性,容易进入固形组织中,如肌肉、肿瘤等。更优选的,抗体可变区与重组蛋白之间的肽链少于6个氨基酸,或者在不额外添加肽链情况下抗体的重链可变区与轻链可变区也可形成分子内结合。

[0015] 本发明所述蛋白质药物结构,可以是药物的全部结构,或部分结构,或作为药物的一个亚基存在。本发明所述蛋白质药物结构,也可用于药物以外的用途,如分析检测类蛋白分子的设计。

[0016] 另外,本发明所述药物结构中所用的方位词,如中间,一般指的是蛋白质的一级结构,为本领域技术人员熟知。

[0017] 概括的说,本发明所述的蛋白质药物结构,即将抗体的两个可变区置于重组蛋白两端而形成的新的抗体融合蛋白结构。本发明所述的蛋白质药物结构可以提高重组蛋白的稳定性,可以使重组蛋白具有靶向性,可以缩短抗体融合蛋白的肽链长度,也可以带来重组

蛋白药物的代谢动力学改变。

附图说明

[0018] 图1 本发明所述的抗体融合蛋白结构,VH为抗体重链可变区,VL为抗体轻链可变区,FP为重组蛋白。上图为蛋白质三级结构示意图,下图为蛋白质一级结构示意图。

具体实施例

[0019] 实施例一 抗体融合蛋白结构设计

本发明所述的抗体融合蛋白结构见图1。VH和VL分别为抗体的重链可变区和轻链可变区,FP代表重组蛋白。三个部分之间由两条肽链连接。抗体融合蛋白可通过DNA重组技术,利用宿主细胞表达。

[0020] 实施例二 抗体融合蛋白药物

B5抗体与人白介素2 (hIL2)的融合,形成B5H-hIL2-B5L蛋白。其中B5H-hIL2-B5L结构为蛋白B5抗体的重链可变区在前,白介素2在中间,B5抗体的轻链可变区在后,三个结构域之间均用富含甘氨酸肽链连接。氨基酸序列如SEQ ID No. 1所示。

[0021] 经CHO(中华仓鼠卵巢细胞)细胞分泌表达蛋白,经阳离子层析纯化,获得B5H-hIL2-B5L蛋白。

[0022] 通过SDS-PAGE变性电泳和非变性电泳分析纯化的B5H-hIL2-B5L蛋白,两种条件下电泳条带分子量均约为50kD。提示B5H-hIL2-B5L为单体。

[0023] 实施例三 抗体融合蛋白生物活性分析

(1)B5H-hIL2-B5L的IL2生物学活性

B5H-IL2-B5L按100 ng/ml添加至含10%胎牛血清的RPM1640培养基中,用于培养CTLL2细胞(小鼠细胞毒T淋巴细胞),可维持CTLL2细胞正常生长并持续传代。B5H-hIL2-B5L融合蛋白中融合的hIL2具有重组人IL2的生物活性。

[0024] (2)B5H-hIL2-B5L在血浆中的稳定性试验

将B5-IL2(专利公开号104395342A)、B5H-hIL2-B5L用Ba1 b/c小鼠血浆分别稀释至1 ng/u1,并分装到5个EP管中,每管100u1。于37℃分别水浴0、24、48、72、96小时,水浴后立即用于IL2的生物学活性检测。

[0025] 将正常培养的CTLL2细胞离心去除原含IL2的培养基,用含10%胎牛血清的RPM1640培养基稀释至10万细胞/ml,并按100 u1/孔接种于96孔细胞培养板中。在每孔细胞中加入10 u1上述待测的含B5-IL2小鼠血浆、B5H-hIL2-B5L小鼠血浆并持续培养24小时,每个血浆样本各做5个平行孔。用MTT法检测细胞活性。

[0026] 结果显示:B5-IL2、B5H-hIL2-B5L经37℃孵育0,24,48,72,96 小时后,二者的IL2生物学活性在0 h时没有明显差异,在孵育24小试后出现差异且差异有统计意义,在孵育72小时后B5-IL2的生物活性均值仅为B5H-hIL2-B5L的47.2%,在孵育96 小时后二者均不能维持CTLL2细胞存活24小时。

[0027] B5H-hIL2-B5L在Ba1 b/c小鼠血浆中可更稳定的维持IL2活性。

[0028] (3)B5H-hIL2-B5L的抗体亲和力

用含ED-B结构域的FN(7B89)蛋白作为抗原包被酶标板,以辣根过氧化物酶标记的B5H-

hIL2-B5L蛋白为一抗,进行ELISA检测试验。结果显示B5H-hIL2-B5L对FN(7B89)蛋白显阳性。提示B5H-hIL2-B5L可识别ED-B。

<110> 合肥立方制药股份有限公司
 <120> 一种增强抗体药物稳定性的结构
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> recombinant protein
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Ser Pro Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Thr Ala Pro Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro Thr Ser Ser Ser
 115 120 125
 Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln
 130 135 140
 Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
 145 150 155 160
 Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
 165 170 175
 His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
 180 185 190
 Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile
 195 200 205
 Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr

210	215	220
Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu		
225	230	235
Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ala		
	245	250
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu		
	260	265
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln		
	275	280
Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
290	295	300
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Ala Thr Gly Ile		
305	310	315
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
	325	330
Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln		
	340	345
Gly Arg His Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile		
	355	360
Lys		365

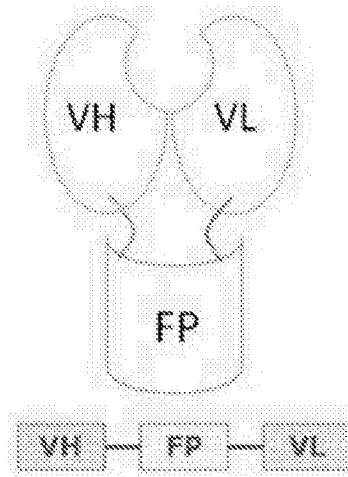


图1