



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102659940 B

(45) 授权公告日 2022. 07. 05

(21) 申请号 201210057668.0

R·W·杨森斯 D·德拉贝克

(22) 申请日 2005.07.22

(74) 专利代理机构 北京睿阳联合知识产权代理

(65) 同一申请的已公布的文献号

有限公司 11758

申请公布号 CN 102659940 A

专利代理师 张颖 景鹏

(43) 申请公布日 2012.09.12

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C07K 16/00 (2006.01)

0416392.9 2004.07.22 GB

A61K 39/395 (2006.01)

0511881.5 2005.06.10 GB

A61P 37/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

(56) 对比文件

200580031529.9 2005.07.22

WO 02/085945 A2, 2002.10.31

(73) 专利权人 伊拉兹马斯大学鹿特丹医学中心

审查员 王芳菲

地址 荷兰鹿特丹

专利权人 罗杰·金登·克雷格

(72) 发明人 罗杰·金登·克雷格

F·G·格洛斯费尔德

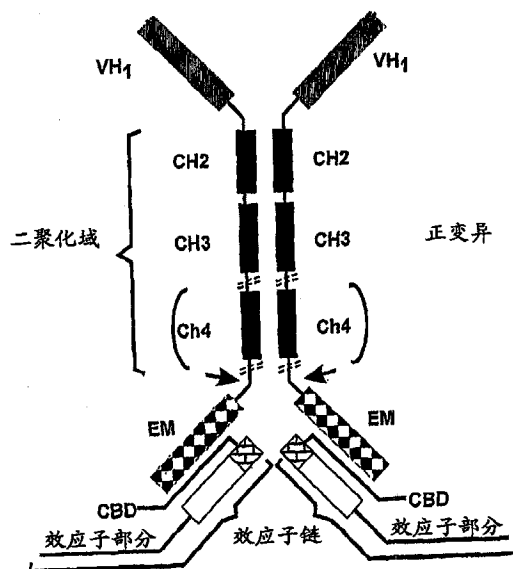
权利要求书2页 说明书30页 附图26页

(54) 发明名称

结合分子

(57) 摘要

本发明涉及经历了亲和力成熟的功能性仅有重链的抗体多样性库的制造及其用途。本发明也涉及类别特异性仅有重链的抗体多样性库的制造和用途,也涉及具有抗体重链功能性优选抗体重链结合功能性、恒定区效应子活性及任选其他效应子功能的多价多肽复合物的制造和用途。本发明还涉及在转基因小鼠中响应抗原激发产生全功能性仅有重链的抗体的方法。本发明特别涉及产生任何种类的人抗原特异性、高度亲和力、仅有重链的抗体或多种混合物的方法,以及分离及表达全功能性VH抗原结合域的方法。



1. 产生仅有 $V_H$ 重链的抗体的方法,所述方法包括:

(a) 提供表达异源 $V_H$ 重链基因座的转基因非人哺乳动物,其中:

(i) 所述 $V_H$ 重链基因座包含可变区和至少一个重链恒定区,所述可变区包含至少一个天然存在的V基因片段、至少一个D基因片段和至少一个J基因片段,其中所述V、D和J基因片段源自于人;

(ii) 每个恒定区不编码功能性 $C_H1$ 域;

(iii) V基因片段、D基因片段和J基因片段能够重组而形成VDJ 编码序列;

(iv) 每个重链恒定区来源于脊椎动物,但非来源于人类;

(v) 重组后的 $V_H$ 重链基因座在表达时,能够形成仅有重链的抗体;

(b) 用抗原免疫所述转基因非人哺乳动物,

其中所述哺乳动物是小鼠,并且该哺乳动物内源性的免疫球蛋白重链基因座缺失或被沉默。

2. 权利要求1的方法,其中所述转基因非人哺乳动物经工程改造,其产生含轻链的抗体的能力降低。

3. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述免疫包括将抗原注射进所述转基因哺乳动物中,并且其中所述方法包括下述的额外步骤:

(c) 分离表达所需抗原特异性、仅有重链的抗体的细胞或组织;

(d) 从步骤(c)的细胞或组织产生杂交瘤;

(e) 从所述杂交瘤克隆仅有重链的抗体mRNA;和

(f) 在异源表达体系中生产所述仅有重链的抗体。

4. 产生 $V_H$ 结合域的方法,其包括权利要求 1-2 中任一项的步骤,其中所述免疫包括将抗原注射进所述转基因哺乳动物中,并且其中所述方法包括下述的额外步骤:

(c) 分离表达所需抗原特异性、仅有重链的抗体的细胞或组织;

(d) 从步骤(c)的细胞或组织产生杂交瘤;

(e) 从所述杂交瘤克隆仅有重链的抗体mRNA;

(f) 从步骤(e)的克隆 mRNA 中鉴定并分离抗原特异性 $V_H$ 域;和

(g) 在异源表达体系中生产可溶性的抗原特异性  $V_H$  结合域。

5. 产生  $V_H$  结合域的方法,其包括权利要求 1-2 中任一项的步骤,其中所述免疫包括将抗原注射进所述转基因哺乳动物中,并且其中所述方法包括下述的额外步骤:

(c) 分离表达可溶性的所需抗原特异性、仅有重链的抗体的细胞或组织;

(d) 从来源于所分离细胞或组织的 mRNA 克隆 $V_H$ 基因座;

(e) 使用噬菌体或类似文库展示编码的蛋白质;

(f) 鉴定可溶性的抗原特异性 $V_H$ 域;且

(g) 表达所述可溶性的抗原特异性 $V_H$ 域,或作为融合蛋白表达所述可溶性的抗原特异性 $V_H$ 域。

6. 权利要求1或2所述的方法,其中所述  $V_H$  重链基因座包含含有超过一个V基因片段、超过一个D基因片段和超过一个J基因片段的可变区。

7. 权利要求3所述的方法,其中所述  $V_H$  重链基因座包含含有超过一个V基因片段、超过一个D基因片段和超过一个J基因片段的可变区。

8. 权利要求4或5所述的方法,其中所述  $V_H$  重链基因座包含含有超过一个V基因片段、超过一个D基因片段和超过一个J基因片段的可变区。

## 结合分子

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2005年7月22日,申请号为200580031529.9 (PCT/GB2005/002892),发明名称为“结合分子”。

### 发明领域

[0002] 本发明涉及经历了亲和力成熟的功能性仅有重链的抗体多样性库 (diverse repertoire) 的制造及其用途。本发明也涉及类别特异性仅有重链的抗体多样性库的制造和用途,也涉及具有抗体重链功能性优选抗体重链结合功能性、恒定区效应子活性及任选其他效应子功能的多价多肽复合物的制造和用途。

[0003] 本发明也涉及在转基因小鼠中响应抗原激发产生全功能性仅有重链的抗体的方法。本发明特别涉及产生任何种类的人抗原特异性、高度亲和力、仅有重链的抗体或多种混合物的方法,分离及表达全功能性VH抗原结合域的方法。

[0004] 本发明也涉及产生包含重链功能性优选重链效应子活性及其他结合和效应子功能的多价多肽复合物。

[0005] 也描述了使用本发明方法产生的仅有重链的抗体及其他多价结合复合物及其用途。

[0006] 发明背景

[0007] 在21世纪开发的新药中将存在很大比例的单克隆抗体或其变体。单克隆抗体治疗已经被公认为优选途径用于治疗类风湿性关节炎和克罗恩病且在癌症治疗中有很大的进展。用于治疗心血管疾病及感染性疾病的基于抗体产品也在开发之中。单克隆产品识别并结合靶配体(例如TNF<sub>α</sub>)上单一、明确的表位。用于治疗的人单克隆抗体的制造依然依赖于哺乳动物细胞培养。装配包括两个重链和两个轻链的复合体(H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>复合体)及接着翻译后糖基化过程排除使用的细菌体系。通过哺乳动物细胞培养制造抗体的生产成本和资金耗费高且在缺乏可接受的其它疗法时有限制基于抗体的疗法潜力的风险。许多种转基因生物能够表达全功能性抗体。包括植物、昆虫、雏鸡、山羊和牛,但是仍然没有用于制造销售的治疗性产品。

[0008] 可在大肠杆菌(E. coli)中制造功能性抗体片段但是除非在制造过程中进行聚乙二醇化否则产物在血清中稳定性通常较低。

[0009] 双特异性抗体复合物是基于工程Ig能够结合相同或不同抗原上两种不同表位的分子。双特异性结合蛋白单独或与其他结合剂联用参入抗体显示有希望的治疗模式即获得人免疫功能而具治疗效果,例如清除病原体(Van Spriël等,(1999) J. Infect. Diseases, 179,661-669; Tacken等,(2004) J. Immunol., 172,4934-4940; 美国5,487,890)、癌的治疗(Olennie和van der Winkel,(2003) Drug Discovery Today, 8,503-5100)和免疫治疗(Van Spriël等,(2000) Immunol. Today, 21,391-397; Segal等,(2001) J. Immunol. Methods, 248, 1-6; Lyden等,(2001) Nat. Med., 7,1194-1201)。

[0010] 制造方面问题的复杂性在于双特异性抗体产物以两种或多种H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>复合体为基础。例如两套或多套重链和轻链基因的共同表达可致形成高达10种不同的组合,其中仅有一种

为所需的异源二聚体(Suresh等,(1986)Methods Enzymol,121,210-228)。

[0011] 为解决这种问题,开发了许多方法生产保留重链效应子功能的哺乳动物细胞全长双特异性IgG形式(BsIgG)。BsIgGs需要工程的“杵臼结构(knob and hole)”重链以防止异源二聚体形成且利用相同L-链来避免L-链错配(Carter,(2001)J.Immunol.Methods,248,7-15)。也已经描述了可选择的化学交联方法自各自识别不同抗原的抗体片段制备复合体(Ferguson等,(1995)Arthritis and Rheumatism,38,190-209)或将其他结合蛋白例如胶原凝集素交联到抗体片段制备复合体(Tacke等,(2004)J.Immunol.,172,4934-4940)。

[0012] 开发通常缺乏重链效应子功能的双抗体或微型抗体(BsAb)也克服异源二聚体过剩。这些包含参与V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结合位点(scFv)的极微小单链抗体随后折叠(fold)并二聚化(dimerise)从而形成二价双特异性抗体,对其每个靶抗原为单价(Holliger等,(1993)PNAS,90,6444-6448;Muller等,(1998)FEBS Lett.,422,259-264)。在一个实例中,CH1和L-恒定域用作形成双特异性微型抗体的异源二聚化域(Muller等,(1998)FEBS Lett.,259-264)。已经开发了许多基于E.coli表达体系的重组方法产生BsAbs(Hudson,(1999)Curr.Opin.Immunol.,11,548-557),可是生产临床阶段多价抗体材料的花费和规模看来仍是其临床开发的首要障碍(Segal等,(2001)J.Immunol.Methods,248,1-6)。

[0013] 近来,BsAb概念已经扩展到包括双-双抗体、四价的双特异性抗体,其中在各H链和L链上的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>域已经被scFv结合域的工程对(engineered pairs)取代。虽然这类构建体的基因工程(engineer)方面的难度很大,但仍可在培养的哺乳动物细胞中装配这种构建体而不出现过剩异源二聚体(Lu等,(2003)J.Immunol.Methods,279,219-232)。

[0014] 本领域中已经熟知免疫球蛋白结构。大多数天然免疫球蛋白包含两个重链和两个轻链。重链通过大约位于每个重链中间的铰链域之间的双硫键互相结合。轻链与每个重链在铰链域N末端一侧上结合。每个轻链通过铰链域附近双硫键正常键合到其各自重链。

[0015] 当Ig分子正确折叠时,每个链折叠成许多由更线性多肽序列结合的特殊球状区域。例如轻链折叠成可变域(V<sub>L</sub>)和恒定域(C<sub>L</sub>)。重链有邻近轻链可变域的单一可变域V<sub>H</sub>、第一恒定域、铰链域和两个或三个另外的恒定域。重链(V<sub>H</sub>)和轻链(V<sub>L</sub>)可变域的相互作用导致抗原结合区(Fv)形成。通常V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>都需要抗原结合,尽管重链二聚体和氨基末端片段在没有轻链时仍显示保留有活性(Jaton等,(1968)Biochemistry,7,4185-4195)。

[0016] 随着新分子生物学技术的发展,在人B细胞增殖性疾病(重链疾病)和鼠模型系统中鉴别出仅有重链的抗体(缺乏轻链)的存在。重链疾病分子水平分析显示基因组水平的突变和缺失可导致重链C<sub>H</sub>1域不适当的表达,引起仅有重链而缺乏结合轻链活性的抗体表达(参见Hendershot等,(1987)J Cell Biol.,104,761-767;Brandt等,(1984)Mol Cell Biol.,4,1270-1277)。

[0017] 对得自噬菌体文库的分离的人V<sub>H</sub>域单独研究显示V<sub>H</sub>域的抗原特异性结合但是这些V<sub>H</sub>域证明溶解度低。而且建议选择具噬菌体阵列上展示的特异性结合性质的人V<sub>H</sub>域可形成工程抗体结构单元(Ward等,(1989)Nature,341,544-546)。

[0018] 使用其他脊椎动物物种研究显示作为天然基因突变结果的骆驼(camelids)产生功能性仅有IgG2和IgG3重链二聚体,由于缺乏C<sub>H</sub>1轻链结合区其不能结合轻链(HamersCasterman等,(1993)Nature,363,446-448)及例如鲨鱼的物种产生仅有重链样(heavy chain-only-like)结合蛋白家族,可能涉及哺乳动物T-细胞受体或免疫球蛋白轻

链(Stanfield等,(2004) Science,305,1770-1773)。

[0019] 骆驼仅有重链的抗体的一个特征是提供相对于人 $V_H$ 域提高了溶解度的骆驼 $V_H$ 域。为改善溶解性可改造人 $V_H$ 域(参见Davies和Riechmann,(1996) Protein Eng.,9(6),531-537;Lutz和Muyldermans,(1999) J.Immuno.Methods,231,25-38)或可通过体内自然选择获得溶解性(参见Tonha等,(2001) J.Biol.Chem.,276,24774-24780)。尽管应用提高亲和力策略例如亲和力热点随机化,可是得自噬菌体文库的 $V_H$ 结合域中对抗原的内在亲和力依然保持在低微摩尔-高纳摩尔范围(Yau等,(2005) J.Immunol.Methods,297,213-224)。

[0020] 骆驼 $V_H$ 抗体也具有修饰的CDR3环特征。这种CDR3环平均比非-骆驼抗体中发现的更长,且认为是影响整体抗原亲和力和特异性的主要特征,其补偿了骆驼仅有重链的抗体物种中 $V_L$ 域的缺失(Desmyter等,(1996) Nat.Struct.Biol.,3,803-811,Riechinann和Muyldermans,(1999) J.Immunol.Methods,23,25-28)。

[0021] 近来对骆驼抗体的结构研究表明依赖于V(D)J重组事件和体细胞突变的体内成熟过程大大促进了抗体多样性(De Genst等,(2005) J.Biol.Chem.,280(14),14114-14121)。

[0022] 目前已经开发出在转基因哺乳动物中产生仅有重链的抗体的方法(参见W002/085945和W002/085944)。转基因哺乳动物(优选小鼠)经抗原激发可产生任何可能种类(IgM、IgG、IgD、IgA或IgE)和得自任何哺乳动物(包括人)的功能性仅有重链的抗体。

[0023] 正常的免疫球蛋白重链基因座包含多个V基因片段、许多D基因片段和许多J基因片段。每个V基因片段编码V域中从N末端几乎直至C末端。每个V域的C末端由D基因片段和J基因片段编码。亲和力成熟前的B细胞中VDJ重排提供 $V_H$ 结合域,然后与 $V_L$ 结合域形成抗原识别位点或结合位点。重链的 $C_H1$ 区和轻链的 $\kappa$ 或 $\lambda$ 区促进了重链和轻链的相互作用。

[0024] 为产生仅有重链的抗体,种系(germ)中重链基因座包含编码部分或全部可能的恒定区的基因片段。在成熟期间,重排的 $V_H$ 结合域剪接到 $C_H2$ 恒定区编码片段从而提供编码缺乏 $C_H1$ 域的重链且因此提供不能连接于与免疫球蛋白轻链相连接的重链的重排基因。

[0025] 仅有重链单克隆抗体可通过标准克隆技术自脾的B细胞回收或通过噬菌体展示技术自B细胞mRNA回收(Ward等,(1989) Nature341,544-546)。得自骆驼或转基因动物的仅有重链的抗体具高度亲和力。正常 $H_2L_2$ 四聚体序列分析证明多样性主要源自VDJ重排和体细胞高度突变的结合(Xu和Davies,(2000) Immunity,13,37-45)。表达的在骆驼内或在转基因动物中产生的仅有重链mRNA序列分析支持这个观察结果(De Genst等,(2005) J.Biol.Chem.,280,14114-14121)。

[0026] 天然骆驼和人 $V_H$ 区的一个重要且共同的特征是每个区不依赖于与 $V_L$ 区的二聚化而作为单体(与抗原)结合以取得最佳溶解性和结合亲和力。这些特征早就被认为是特别适于产生阻滞剂和组织渗透剂。

[0027] 同-二聚体或异二聚体也可通过仅有重链的抗体的酶切或合成途径产生(Jaton等,(1968) Biochemistry,7,4185-4195和US2003/0058074 A1)。但是单体抗体结合域的优势仍有利于改造作为治疗性或诊断性试剂的多聚体蛋白质。

[0028] 通过噬菌体展示技术产生的人 $V_H$ 或骆驼 $V_{HH}$ 缺少作为体细胞突变所致改善特征的优点及通过正常抗体结合位点CDR3区中D和J区重组提供的其他多样性(Xu和Davies,(2000) Immunity,13,37-45)。同时与人 $V_H$ 相比显示溶解性优势的骆驼 $V_{HH}$ 在人体中有抗原性

且必须通过骆驼免疫或通过噬菌体展示技术产生。

[0029]  $V_H$ 结合域的参入比使用自 $V_H$ 和 $V_L$ 域改造的与特异性和亲和力可能丧失有关的scFvs具有明显的优势。为产生双特异性或多特异性结合分子,得自相关基因家族例如T-细胞受体或鲨鱼免疫球蛋白家族的 $V_H$ 结合域也可提供scFv方案的备择方案。也可使用其他天然存在的结合蛋白及其域包括例如可溶性受体片段。

[0030] 各种抗体的生理功能不同。例如IgG在成熟免疫应答中发挥决定作用。IgM涉及补体固定和凝集作用。IgA是分泌物中Ig的主要类别-眼泪、唾液、初乳、粘液中的-且因此在局部免疫中起作用。当改造多价结合复合体时包括种类特异性重链恒定区根据所需功能提供了体内效应子功能的治疗利益。工程个体效应子区也可导致功能性的添加和缺失 (Van Dijk和van der Winkel, Curr. Opin. Chem. Biol., (2001) 8月5(4), 368-374)。看来包含高度亲和力 $V_H$ 结合域(人或骆驼或其他来源)的最适合的仅有重链的抗体的产生和选择将得益于依赖于自随机化噬菌体文库选择并不促进体内重组和亲和力成熟方案的备择方案。

[0031] 因此包括IgA恒定区功能性将提高粘膜抗病原体功能 (Leher等, (1999) Exp. Eye. Res, 69, 75-84), 同时IgG1恒定区功能性的存在提高体内血清稳定性。存在的重链 $C_H2$ 和 $C_H3$ 恒定域提供了如天然抗体中所见稳定的二聚体作用基础,且为翻译后糖基化提供识别位点。如果使用双特异性和多价复合体作为试剂和诊断剂,存在的 $C_H2$ 和 $C_H3$ 也促进第二种抗体识别。

[0032] 预先在铰链区和人IgG1效应子域前克隆分离的重排前骆驼仅有重链可变区序列,插入载体并在COS细胞中表达而产生抗体。在这种体外环境中表达抗体已经经过骆驼体内类型(同种型)转换和亲和力成熟(高突变)过程且可结合于抗原 (Riechmann和Muylldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231, 25-38)。

[0033] 为在各种临床、工业和研究中应用,本领域需要使体内仅有重链的抗体多样性和B-细胞应答最大化,从而特别生产种类特异性人仅有重链的抗体和功能性仅有 $V_H$ 重链结合域的功能性库,其保留最大的抗原结合能力。

[0034] 本领域也需要产生可溶的、二价的或多价的多肽结合复合体,单独的或与效应子(轻)链组合的包含至少部分的抗体重链且为生理学上稳定的和具有效应子功能。

[0035] 发明概述

[0036] 本发明提供了一种用于在转基因哺乳动物中产生仅有 $V_H$ 重链或骆驼仅有 $V_H$  ( $V_{HH}$ )重链抗体的方法,包括哺乳动物中异源 $V_H$ 或骆驼 $V_H$  ( $V_{HH}$ )重链基因座表达步骤,其中 $V_H$ 或骆驼 $V_H$  ( $V_{HH}$ )重链基因座包含不编码 $C_H1$ 域的重链恒定区且如果表达,这种基因座能形成一种或多种确定类别的仅有重链的抗体。

[0037] 这种 $V_H$ 或骆驼 $V_H$  ( $V_{HH}$ )重链基因座可包含一种或多种骆驼或非骆驼V基因片段。优选选择或改造V基因片段从而提高溶解性。优选的V基因片段得自人。

[0038] 这种重链基因座的重链恒定区可包含 $C_{a1}$ 和/或 $C_{a2}$ 、 $C_\epsilon$ 、 $C_\delta$ 、 $C_\gamma$ 和/或 $C_\mu$ 重链恒定区基因。而且此重链基因座的重链恒定区可包含一种以上的下列重链恒定区: $C_a$ 、 $C_{a1}$ 、 $C_\epsilon$ 、 $C_\delta$ 、 $C_\gamma$ 、 $C_\mu$ 。

[0039] 优选的 $V_H$ 重链基因座包含含有至少一个人或骆驼V基因片段、至少一个D片段和至少一个J片段的可变区,其中人或骆驼V基因片段、D基因片段和J基因片段能够重组而形成VDJ编码序列。重链基因座优选包含20个或更多的D基因片段和/或5个或更多J基因片段。

优选的D和J片段为脊椎动物来源,优选人。使用得自任何脊椎动物D和J基因片段且优选人D和J基因片段可获得CDR3环。

[0040]  $V_H$ 重链基因座也可包含能够直接将J基因片段与重链恒定区基因重组的重组序列(rss)。

[0041] 异源重链基因座的重链恒定区为人源或脊椎动物来源例如骆驼来源。或者这种恒定区可以并非免疫球蛋白重链来源。

[0042] 优选的本发明方法导致基本正常B细胞成熟。本发明也提供仅有重链的抗体或其片段,或根据本发明方法得到或可以得到多种仅有重链的抗体混合物。这种仅有重链的抗体可为单克隆抗体或其片段,例如人或骆驼 $V_H$ 结合域。本发明的 $V_H$ 结合域可缺乏延伸的骆驼样CDR3环或可包含延伸的骆驼样CDR3环。

[0043] 本发明也提供包含本发明的异源重链基因座的载体且用这种载体转化宿主细胞。

[0044] 本发明也提供表达本文所述异源重链基因座的转基因哺乳动物。优选的本发明转基因哺乳动物产生包括轻链的抗体的能力降低。

[0045] 本发明也提供了仅有重链的抗体或其片段在制备免疫治疗药物中的用途。本发明的仅有重链的抗体也可作为诊断剂、试剂、抗体酶或抑制剂。也提供包含本发明仅有重链的抗体或其片段和药理学上适当载体的药用组合物。

[0046] 本发明也提供产生并选择仅有重链的抗体的方法,包括步骤:

[0047] (a) 将抗原注射进本文所述的转基因哺乳动物中;

[0048] (b) 分离表达所需抗原特异性、仅有重链的抗体的细胞或组织;

[0049] (c) 由步骤(b)的细胞或组织产生杂交瘤;

[0050] (d) 任选从所述杂交瘤克隆仅有重链的抗体mRNA,以便以后在异源表达体系例如哺乳动物、植物、昆虫、微生物、真菌或其它可行的体系中产生该抗体。

[0051] 然后从步骤(c)的克隆的mRNA中鉴别和分离抗原特异性 $V_H$ 域 产生 $V_H$ 结合域。

[0052] 本发明 $V_H$ 结合域也可产生自:

[0053] (a) 将抗原注射进本文所述的转基因哺乳动物中;

[0054] (b) 分离表达所需抗原特异性、仅有重链的抗体的细胞或组织;

[0055] (c) 从得自分离细胞或组织的mRNA克隆 $V_H$ 基因座;

[0056] (d) 使用噬菌体或类似文库展示编码的蛋白质;

[0057] (e) 鉴定抗原特异性 $V_H$ 域;且

[0058] (f) 在细菌、酵母或其它可行的表达体系中单独表达或作为融合蛋白表达 $V_H$ 域。

[0059] 发明详述

[0060] 发明人克服了先有技术的局限性并指出可以使转基因动物,尤其是小鼠,产生“微基因座”从而生产血浆或B细胞分泌的种类特异性,只有重链抗体,或只有重链抗体的不同种类的混合物。然后这些可用于使用已建立的杂交瘤技术产生能可靠供应的种类特异性、只有重链抗体,或者用作 $V_H$ ( $V_{HH}$ )结合域或仅有 $V_H$ 重链结合域,优选一种没有效应子功能但保留结合功能的人源可溶的仅有 $V_H$ 重链结合域。

[0061] 通常在不存在扩展的CDR3环的情况下,通过本发明的方法产生的只有重链抗体(包括骆驼抗体)显示出由于V、D和J基因片段重排和体细胞突变而产生的高亲和力。在离体血浆中可观察到基本正常的B细胞成熟有高水平的只有重链抗体出现(条件是在重组基因

座中出现的所有抗体种类中剔除了 $C_H1$ 域)。B-细胞成熟和装配的二聚体(例如IgG)或多聚体(IgM)的分泌不依赖轻链基因的存在和表达。

[0062] 编码一种从转基因小鼠得到的杂交瘤分离的抗原特异性重链的抗原特异性mRNA的核酸序列分析证明重链抗体多样性主要与VDJ重组有关。而且,本发明者指出抗体多样性产生在仅有重链的抗体的功能抗原结合域的CDR3区域,而来自 $V_H$ 域中体细胞突变的贡献相当有限。使用这里描述的方法,可以在细菌系统克隆并表达功能VH域从而产生保留有全部抗原结合、特异性和亲和力的 $V_H$ 结合域。另外,培养的杂交瘤细胞系能分泌种类特异性重链二聚体和多聚体。

[0063] 本发明也指出可按程序改造转基因小鼠从而生产响应抗原激发的仅有重链的抗体的优选种类,例如仅有IgG或者仅有IgM或例如IgA、IgG和IgM的混合物。

[0064] 发明者以前描述(参见W002/085945和W002/085944)了表达一种缺失 $C_H1$ 外显子并通过人D和J片段连接两个马驼VHH基因的最小的人IgG重链恒定区基因座的转基因小鼠的生产。当用抗原激发时,这些小鼠产生功能性、高亲和力、抗原特异性仅有IgG重链抗体。通过串联加入重链恒定区的基因构键体的使用(条件是所有恒定区基因缺乏 $C_H1$ 区并且有时会存在 $C_H4$ 区)在体内经过类转换可获得仅有重链的抗体种类的混合物(IgM和IgG)。

[0065] 这里描述的改进展示一种具有通过人D和J片段连接两种马驼 $V_{HH}$ 基因的相同IgG恒定区基因座和通过相同的人D和J片段连接两种马驼VHH基因的缺失CH1外显子的人IgM恒定区基因座结构的小鼠,也产生高分子量(多聚体)仅有IgM重链抗体和仅有IgG(二聚体)重链抗体。惊人的是基本正常B-细胞成熟和抗体产生依赖于 $C_H1$ 序列从每个存在于转基因基因座中的重链恒定区全部缺失。而且,如果CH4外显子存在不需要去除。

[0066] 因此,例如,一种转基因动物携带一种通过相同的人D和J基因片段连接两种马驼V基因片段的带有功能 $C_H1$ 外显子的人IgM重链基因座,和通过相同的人D和J基因片段连接两种马驼V基因片段的缺失 $C_H1$ 外显子的IgG恒定重链区基因座,则该转基因动物产生相当低水平的仅有重链的抗体并且不显示B-细胞成熟迹象。

[0067] 按需要可以引入或不引入包括CH4域的其它效应子域,以将效应子特征引入所得仅有重链的抗体或从中去除。

[0068] 本发明人发现抗体的产生性表达(例如B-细胞成熟)可由存在于结构中的任何V基因片段的使用引起。来源于B-细胞的抗体mRNA的分离和测序显示D和J基因片段重组产生CDR3多样性。所得的VH域的序列比较揭示体细胞突变,意味着在重组D和J基因片段中并且也在所得的表达的抗体mRNA的 $V_H$ 域发生亲和力成熟。

[0069] 优选的构建体加入选择或改造用于改善溶解度和连接用于重组的D和J链簇和CDR3产生的V基因片段。优选,VDJ序列连接于所选的串联恒定效应子域,每个缺失 $C_H1$ 外显子。

[0070] 本发明不限于人或骆驼种类特异性的仅有重链的抗体或人VH结合域(优选可溶的 $V_H$ 结合域)(单独或连接于连接于所选的效应子域)的生产和衍生化,还包括连接于D和J基因片段脊椎动物来源(任选经基因工程改造从而改善溶解性)的任何V基因片段的嵌合(chimeric)组合(combination)的生产。优选,V基因片段是人源的并且不是来自骆驼的V基因片段。所得的 $V_H$ 域可以不包含扩展的骆驼样CDR3环除非D和J片段来自骆驼。这导致展示CDR3多样性和亲和力成熟的VH域操作性连接于效应子恒定区。后者确保在所选的亲代转

基因脊椎动物中功能性分泌和任选装配,并且以后如果需要还可以提供可选择的效应子功能。

[0071] 这些观察结果对改进和简化种类特异性仅有重链的抗体和经过体细胞突变加入亲和力成熟的高亲和力可溶的 $V_H$ 域的改造有重要意义。选择的重链恒定区效应子功能(缺失 $C_H1$ )或它们的混合物的加入允许仅有重链的抗体的任何种类或没有另外抗体改造要求的仅有重链的抗体的任何混合物的产物。 $V_H$ 域可被细菌和其它微生物系统单独表达,或作为加入效应子域的功能性仅有重链的抗体由培养的杂交瘤或转染的细胞分泌。抗体和人源的 $V_H$ 结合域在健康护理领域作为药物、诊断剂和试剂有广泛应用,同时还可应用于农业、环境和工业。

[0072] 因此,第一方面,本发明提供一种用于转基因哺乳动物中仅有 $V_H$ 重链抗体的生产方法,该方法包含在那种哺乳动物中表达一种异源 $VH$ 重链基因座的步骤。优选, $V_H$ 重链基因座包含一种不编码 $C_H1$ 域并且当表达时基因座可形成完整的仅有重链的抗体的重链恒定区域的多样性库。

[0073] 本发明的第一方面也提供一种用于产生转基因哺乳动物中骆驼仅有 $V_H$ 重链抗体的方法,该方法包含在那种哺乳动物中表达一种骆驼 $V_H$ 重链基因座的步骤,其中 $VH$ 重链基因座包含一种不编码 $CH1$ 域并且当表达时基因座可形成加入VDJ重排和亲和力成熟适应抗原激发的完整的仅有重链的抗体的多样性库的重链恒定区域。

[0074] 重链效应分子可改造成无功能域,例如羧基段 $CH4$ 域,条件是改造不影响阻止细胞表面装配并因此B-细胞成熟的分泌机制。 $CH1$ 外显子单独从异源基因座删除或从基因座缺失。另外的特点可经改造加入到基因座中,例如改善糖基化,或增加功能。

[0075] 优选,当表达时,异源基因座可形成功能性IgA、IgE、IgG、IgD或IgM分子或它们的同种型。

[0076] 因此,依据需要的抗体种类以及基本正常的B-细胞成熟,设计异源重链基因座以产生仅有重链的抗体的优选种类或混合物。骆驼V、D和J基因片段和骆驼效应子区域的使用将产生带有骆驼特有特点的骆驼抗体,例如扩展的CDR3环。包含随机选择或选择或改造用于增强溶解度的V基因片段的人V、D和J基因片段的使用将产生功能性人仅有重链的抗体。

[0077] 依据本发明得到的抗体与先有技术的抗体相比其优点在于它们是基本上是单一或已知种类并优选是人源的抗体。体内VDJ重组和亲和力成熟共同使抗体具有高亲和力。用本领域技术人员已知的完备方法可分离、鉴定和制备抗体及其片段。

[0078] 异源重链基因座

[0079] 在本发明的上下文中,术语“异源的”是指如本文所述的一种核苷酸序列或一种基因座,对于其所在的哺乳动物不是内源性的。

[0080] 在本发明的上下文中,“ $VH$ 重链基因座”是指编码包含一种或多种V基因片段、一种或多种D基因片段和一种或多种J基因片段,操作性连接于一种或多种重链效应子区域(每种缺失 $CH1$ 域)的 $V_H$ 域的最少的微型基因座。优选抗体库可变性的主要来源是CDR3区,该区通过选择D和J基因片段并进行V-D和D-J连接而形成。

[0081] 本发明的优点是 $V_H$ 基因序列重排得到的抗体库和多样性通过多个D和J基因片段的使用可以最大化。使用一种不需要大量V基因片段或 $V_L$ 和 $Lc$ (轻链)免疫球蛋白基因座的最小的基因座(微基因座)的同时获得以后的体细胞突变。

- [0082] 优选,  $V_H$ 重链基因座包含来自任何脊椎动物种属的2到5个V(2、3、4或5)基因片段。
- [0083] 优选的V基因片段是人源的, 任选选择或改造以改善溶解度。
- [0084] 优选的 $V_H$ 重链基因座包含2到40个(2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、30或40)或更多D基因片段。D基因片段可以来自任何脊椎动物种属但是最优选的D基因片段是人D基因片段(正常地25个功能性D基因片段)。
- [0085] 优选的VH重链基因座包含2到20个(2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18或20)或更多J基因片段。J基因片段可选自任何脊椎动物种属但是最优选的J基因片段是人J基因片段(正常地6J基因片段)。
- [0086] 优选的 $V_H$ 重链基因座包含2个或更多V基因片段, 25个功能性人D基因片段和6个人J基因片段。
- [0087] 术语“V基因片段”包括来自一种脊椎动物包括骆驼和人天然存在的V基因片段, 该V基因片段任选经选择、突变或改造以改善特性, 例如溶解度。V基因片段也在其它种属例如鲨鱼(见Kokubu等, (1988) EMB0. J., 7, 3413-3422)中发现或进化从而提供示例性结合蛋白的不同的 $V_H$ -样家族, 例如, 免疫球蛋白轻链VL组分或T-细胞受体 $V_H$ 组分的进化中。
- [0088] 改善 $V_H$ 域的溶解度的优选方法结合了合理的(决不仅仅是随机的)手段并且在Davies和Reichmann, (1996) Protein Eng., 9(6), 531-537和Riechmann和Muyldermans, (1999) J. immunol. Methods, 231, 25-38中举例说明。通过亲和力成熟和在接着VDJ重排的 $V_H$ 基因有利突变的加入, 自然选择在体内也可发生。
- [0089] 依据本发明当表达核酸时V基因片段必须可以和D基因片段、J基因片段和重链恒定(效应子)区(它可能包含几个外显子但 $C_H1$ 外显子除外)重组从而产生仅有 $V_H$ 重链抗体。
- [0090] 依据本发明的V基因片段也包括在它的范围内任何编码同源物、衍生物或蛋白质片段基因序列, 该基因序列可以和依据本发明的D基因片段、J基因片段和重链恒定区(包含1个或多个外显子但非 $CH1$ 外显子)重组从而产生这里定义的仅有 $V_H$ 重链抗体。
- [0091] 因此VH编码序列可以来自自然发生来源或使用本领域熟练者熟悉的方法合成。
- [0092] 在本发明的上下文中“ $V_H$ 域”指的是当与上述定义的D基因片段和J基因片段重组时V基因片段的表达产物。优选, 像这里使用的VH域保持溶解并且在不需要其它任何因子维持溶解度的生理性介质中有活性。优选, 通过VDJ重组和体细胞突变改善可溶的VH域结合抗原的能力。不依赖骆驼种属特有的扩展的CDR3环的存在或缺失。VH域可以结合作为单体的抗原并且, 当结合效应子恒定区时, 依据使用的效应子分子(例如IgG、IgA、IgM等)的选择和改造或二聚化和多聚化的选择机制可以产生单特异性、双特异性、多特异性、二价或多价形式, 通过去除 $CH1$ 外显子排除了当表达可溶的仅有重链的抗体合成物的部分时结合VL域的可能性(见Sitia等, (1990) Cell, 60, 781-790)。也可单独改造VH域与不同蛋白域例如与毒素、酶和显像剂从而产生用于靶向治疗和诊断目的的融合蛋白。
- [0093] 在本发明的上下文中术语“D基因片段”和“J基因片段”包括D和J基因片段的天然存在序列。优选的D和J基因片段来自与V基因片段来源相同的脊椎动物。例如, 如果V基因片段来自人那么溶解的或改造的D和J基因片段也优选来自人。或者V基因片段来自如骆驼而D和J基因片段来自人, 反之亦然。
- [0094] 术语D基因片段和J基因片段也包括在它们范围内的衍生物、同源物和它们的片段只要所得的片段可以和像这里描述的重链抗体基因座的剩余组分重组从而产生这里描述

的仅有重链的抗体。D和J基因片段也可来自自然发生来源或使用这里描述的本领域熟练者熟悉的方法合成。V、D和J基因片段可以重组并优选经过体细胞突变。

[0095] V、D和J基因片段优选来自单个脊椎动物种属。这可以是任何脊椎动物种属但优选人。

[0096] 另外,依据本发明的异源的重链基因座包含编码重链恒定区的DNA的区域倘若在体内效应子起作用(例如IgG、IgM、IgA、IgE、IgD或它们的同种类型)。

[0097] 本发明也提供通过本发明的方法得到或可得到的抗原特异性仅有重链的抗体。

[0098] 重链恒定区

[0099] 操作上,在B细胞内可以和V基因片段、D基因片段和J基因片段重组的自然发生或改造的基因片段编码重链恒定区。优选重链恒定区来自免疫球蛋白基因座。

[0100] 依据本发明的这个方面,每个重链恒定区必需包含至少一个重链恒定区基因,该重链恒定区基因不表达功能性 $C_H1$ 域所以仅有重链的抗体的产生可以发生。每个重链恒定区也可包含一个或多个其他重链恒定区外显子,在其他重链恒定区基因也不表达功能性 $C_H1$ 域的条件下该重链恒定区外显子选自 $C\delta$ ,  $C\gamma 1-4$ ,  $C\mu$ ,  $C\epsilon$ 和 $C\alpha 1-2$ 。依据优选种类或需要的抗体种类的混合物选择重链恒定区基因片段。任选异源重链基因座为 $C\mu$ -和 $C\delta$ -缺陷。

[0101] 例如,已知M类的Ig分子对激活巨噬细胞和补体途径起重要作用。由于它的结合部位的极其近似,IgM对病原体包括病毒有高亲和力。然而也已知IgM在快速免疫测定技术中难以使用而G类的Ig在这些技术中容易使用。为了这种使用,选择优选的抗体种类是有用的,例如IgG或IgM。

[0102] 缺失CH1的异源重链 $C\gamma$ 基因座的全部或部分表达将产生任意的部分或全部IgG同种类型,依赖异源IgG基因座中存在的IgG1、IgG2、IgG3和IgG4同种类型。或者重链可包含 $C\delta$ 基因。所得的IgE分子也可用于治疗。

[0103] 或者,可以得到抗体的选择混合物。例如,当重链恒定区包含 $C\alpha$ 和 $C\mu$ 基因时可得到IgA和IgM。

[0104] 优选依据本发明的重链恒定区是人源的,尤其当重链抗体用于人治疗应用时。在重链抗体用于诊断或兽用目的时,重链恒定区优选来自实施诊断或兽医治疗的脊椎动物或哺乳动物的靶组织。

[0105] 当表达时,重链恒定区缺乏功能性 $C_H1$ 域。 $C_H1$ 外显子和任选地, $C\mu$ 和 $C\delta$ 恒定区,可突变、删除或取代。优选,删除 $C_H1$ 外显子。例如,带有功能性 $C_H1$ 域的IgM的存在抑制B-细胞成熟并因此限制产生性表达。

[0106] 哺乳动物

[0107] 本发明方法中使用的转基因哺乳动物不为人。优选的转基因哺乳动物为啮齿目动物例如兔、豚鼠、大鼠或小鼠。特别优选小鼠。也可采用可选择的其他哺乳动物例如山羊、绵羊、猫、狗或其它动物。

[0108] 优选转基因动物使用确定的卵母细胞注射技术及确定的ES细胞技术或克隆产生。

[0109] 有利的是,如果根据本发明方法表达仅有重链的抗体,哺乳动物内源性免疫球蛋白重链和任选轻链基因座缺失或被沉默。

[0110] 如上所述产生仅有重链的抗体的方法可特别用于产生人用治疗用途的抗体,通常给予与抗体源物种不同的脊椎动物物种抗体导致抗所给予抗体免疫应答发生。

[0111] 因此,在另一个方面本发明提供了表达异源重链基因座的转基因哺乳动物。

[0112] 可改造这种哺乳动物使其产生包括轻链抗体的能力降低。

[0113] 产生抗体细胞可得自本发明转基因哺乳动物且例如用来制备用于产生本文定义的仅有重链的抗体的杂交瘤。另外或可选择性可自本发明转基因哺乳动物分离核酸序列且用于产生其 $V_H$ 域仅有重链的抗体或双特异性/双功能的复合体,所用DNA重组体技术对于本领域技术人员是熟知的。

[0114] 可选择性或另外的,可通过本发明转基因动物免疫接种产生抗原特异性仅有重链的抗体。

[0115] 因此在另一个方面,本发明提供了用抗原免疫本发明转基因哺乳动物从而产生仅有重链的抗体的方法。

[0116] 在本发明这种方面的优选实施方案中,哺乳动物为小鼠。

[0117] 仅有重链的抗体及其片段

[0118] 在另一个方面中本发明提供了根据本发明方法可获得的仅有重链的抗体及其功能性片段和衍生物。包括VH结合域的片段可通过酶切或溴化氰切割本发明仅有重链即缺乏轻链的抗体获得(Jaton等,(1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195)。

[0119] 一种优选的功能性片段为抗原特异性、仅有重链结合域即 $V_H$ 结合域,其由在单V、D和J基因片段间重组然后体细胞突变所得 $V_H$ 基因座表达。根据本发明这个方面, $V_H$ 基因座可自例如分离自上述免疫的转基因动物的产生抗体细胞克隆。然后克隆序列可用噬菌体展示(Ward等,(1989) *Nature*, 341, 544-546)或用类似展示文库展示,例如使用基于酵母体系(Boder和Wittrup,(1997) *Nat. Biotechnol*, 15, 553-7)和鉴定的抗原特异性 $V_H$ 结合域。然后可单独或作为融合蛋白在能放大规模(*scalable*)的细菌、酵母或其他表达体系中制备抗原特异性重链结合域。也可从通过免疫转基因小鼠经典方法所得特征性杂交瘤克隆编码 $V_H$ 结合域的序列。然后这些可用于产生 $V_H$ 结合域及其衍生物包括具有不同效应子功能的工程的定义抗体种类(例如IgE或IgA)及其变异体。

[0120] 相应的,本发明也提供了产生 $V_H$ 结合域的方法,包括步骤:

[0121] (a) 分离表达所需抗原特异性、仅有重链的抗体的细胞或组织(优选可溶的所需抗原特异性、仅有重链的抗体);

[0122] (b) 自得分离细胞或组织的mRNA克隆编码 $V_H$ 结合域的序列;

[0123] (c) 使用噬菌体或类似文库展示编码蛋白质;

[0124] (d) 鉴定抗原特异性 $V_H$ 结合域;且

[0125] (e) 在细菌、酵母、哺乳动物或其它可行的表达体系中单独表达或作为融合蛋白表达 $V_H$ 结合域。

[0126] 或者,可使用酶切或化学切割技术及接着从其它切割产物分离含有 $V_H$ 域片段而从本发明仅有重链的抗体产生含有 $V_H$ 域的片段。

[0127] 自特征性杂交瘤分离 $V_H$ 结合域,使用噬菌体或其他展示体系可直接将得自mRNA克隆的 $V_H$ 结合域序列克隆进表达载体而不借助其它选择步骤。

[0128] 结合效应子区的仅有重链的抗体的产生体系包括适于大量培养技术的培养中哺乳动物细胞(例如CHO细胞)、植物(例如玉米)、转基因山羊、兔、牛、绵羊、小鸡和昆虫幼虫。其它产生体系包括病毒感染(例如昆虫幼虫和细胞系中杆状病毒)是细胞培养和种系方法

的备择方法。其它产生方法对于本领域技术人员也是熟知的。如果需要仅有重链IgA或IgM装配,共表达的“J链”是有利的。用于产生骆驼仅有重链的抗体或单独产生 $V_H$ 结合域的适当方法也是本领域中已知的。例如骆驼 $V_H$ 结合域在细菌体系中产生且骆驼仅有重链同二聚体在杂交瘤和转染的哺乳动物细胞中产生(参见Reichmann和Muyldermans, (1999) *J. Immunol. Methods*, 231, 25-38)。

[0129] 也适当建立了使用噬菌体展示技术获得工程人 $V_H$ 结合域的表达方法(Tanha等, (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 24774-24780及参考)。

[0130] 从转基因飞行昆虫系(fly lines)中昆虫幼虫显示产生血淋巴内功能性仅有重链的抗体片段,性质与通过哺乳动物细胞产生的相同抗体一致(PCT/GB2003/0003319)。本发明也提供了根据本发明这个方面的方法能够获得的抗原特异性单体或二聚体的 $V_H$ 结合域。

[0131] 本发明也提供包括异源重链基因座的多核苷酸序列、分离的编码本发明仅有重链的抗体的多核苷酸及包含异源重链基因座的载体,或其片段,或分离的编码本发明仅有重链的抗体多核苷酸。

[0132] 本发明也提供了用本发明的异源重链基因座或其片段或分离的编码仅有重链的抗体或抗体片段转化的宿主细胞。

[0133] 在第二个方面,本发明提供了包含本发明抗原特异性 $V_H$ 结合域、以及与其连接的提供效应子活性的效应子部分的多肽复合体。此外,这种效应子活性由重链恒定区提供且定位在分子氨基末端或羧基末端。这些多肽复合体保留有抗原特异性 $V_H$ 结合域赋予的生理学功能,也具其他靶向作用或效应子部分的效应子功能。这种多肽复合体可为功能性单体形式,或依赖于效应子部分、二聚体、四聚体、五聚体、多聚体或结合不同 $V_H$ 结合域而赋予多价和多特异性的其他复合体间的设计及相互作用。 $V_H$ 结合域可存在于结合分子的氨基末端或羧基末端(参见图1的二聚体实例)。

[0134] 如果效应子部分包含结合域,其特异性可不同于抗原特异性 $V_H$ 结合域的特异性。这种排列的优点为多肽复合体可促进不同靶标的交联。例如双特异性多肽复合体可用于促进细胞-细胞相互作用及细胞/病原体相互作用。在此实施方案中,可利用本发明多肽复合体例如用来桥接两种细胞类型例如病原体和巨噬细胞(参见Biburger等, (2005) *J. Mol. Biol.*, 346, 1299-1311)。 $V_H$ 结合域的用途优选为在这种双特异性设计中scFV结合域的用途。 $V_H$ 结合域具高度结合亲和力且可用最小载体结构将其结合进这种多肽复合体中且相对于四聚体亲代分子在设计上不需考虑维持scFVs特异性和亲和力。若要构建二聚体或多聚体多肽复合体,则加入二聚化域例如加入得自免疫球蛋白重链恒定区的 $C_H2$ 和 $C_H3$ 域(见图2)。

[0135] 本文所用术语“效应子部分”包括在细胞上介导所需生物学效应的任何部分。此效应子部分优选可溶的且可为肽、多肽或蛋白质或可为非肽结构。例如效应子部分可为酶、激素、细胞因子、药物、前体药物、毒素特别是蛋白质毒素,螯合结构中放射性核素、结合域、二聚化域或相互作用域、显像剂、白蛋白或抑制剂。

[0136] 白蛋白可用作效应子部分而改善抗原特异性 $V_H$ 结合域的稳定性和/或药物代谢动力学和/或药效学性质(Sung等, (2003) *J. Interferon Cytokine Res.*, 23(1):25-36)。或者,效应子部分可为聚乙二醇化的结构或天然糖基化的结构从而改善药效学性质。

[0137] 这种效应子部分可为键合到抗原特异性 $V_H$ 结合域的肽,或者其可化学性键合到抗

原特异性重 $V_H$ 域,例如通过使用化学连接结构例如马来酰亚胺交联剂。可选择的本发明的多肽复合体可为表达的融合蛋白。如此本发明也包括包括异源重链基因座多核苷酸序列,或者本发明的编码仅有重链的抗体的分离的多核苷酸,其中多核苷酸进一步包含在阅读框内编码效应子部分的一个或多个外显子。这种外显子可为多核苷酸的5'或3'末端。例如多核苷酸可以下述次序(following order)并在阅读框内包含: $V_H$ 和结合域\效应子部分基因片段。

[0138] 关于基因融合,可用编码融合蛋白氨基酸序列的重组DNA构建体与编码位于相同阅读框各个域的DNA达到各个域的连接。这种构建体具有诊断和治疗价值。对于诊断,这种效应子域可为荧光蛋白质(例如GFP)或酶(例如 $\beta$ -gal)。或者,这种效应子域可为增强结合于底物的tag(例如多组氨酸或生物素),可为提供二抗结合位点或亮氨酸拉链或可利于结合荧光标记的类似结合基序的抗原。

[0139] 多肽复合体

[0140] 本发明人也清楚可能产生包含单独或与包含互补装配域且具其他效应子活性的分离效应子(轻)链组合的至少部分抗体重链的二价或多价多肽复合体。本发明的多肽复合体保留重链恒定区赋予的生理功能及与效应子链相关的另外的效应子部分功能(图3)。

[0141] 因此在第三个方面,这种多肽复合体包含与一种或多种效应子链(轻链)组合的重链。本发明的第二个方面提供了一种包含一对重链和一对效应子链的多肽复合体,其中:

[0142] 一对重链相互连接;

[0143] 一条效应子链与一条重链相连,而另一条效应子链与另一条重链相连;

[0144] 每个重链包含结合域、优选包含至少 $C_H2$ 、 $C_H3$ 和任选 $C_H4$ 恒定区域的二聚化域和能够结合于效应子链互补装配域的效应子部分;

[0145] 效应子链包含连接于效应子部分的互补装配域,

[0146] 其中装配域和互补装配域通过非共价相互作用互相连接。

[0147] 优选的重链中的效应子部分不同于效应子链中的效应子部分。

[0148] 任选的多肽复合体包括柔软的铰链样域,该域位于 $C_H3$ 域(或 $C_H4$ 域,如果存在)的羧基末端并通过它与装配域相连。优选的多肽复合体包括天然铰链域或柔软的位于结合域和 $C_H2$ 域之间工程铰链样域。存在的铰链区促进所得多肽复合体中结合域和效应子部分独立发挥功能。

[0149] 在第一条多肽重链中效应子部分任选特异性不同于第二条多肽重链中效应子部分的特异性。根据本发明,多肽复合体的效应子部分可被结合域取代。优选的结合域包含 $V_H$ 域(如本发明第一个方面所定义)或细胞受体结合域。所得四价二聚体结合蛋白(多肽复合体)可包含多达4个不同效应子部分。优选的在重链氨基末端的效应子部分相同,且在羧基末端的也相同(但是识别不同抗原或表位到氨基末端),促进单个同二聚体的装配。这种分子可确证捕获病原体,通过包括适当的重链域(例如IgG或IgM)提供的效应子功能的优势。

[0150] 根据本发明第三个方面,示例性多肽复合体有利于细胞化学标记、靶向作用或治疗。例如效应子分子包含定向于癌细胞表面标记的抗原特异性 $V_H$ 结合域及包含结合域特定的前体药物转化酶(效应子链)的效应子部分。抗原特异性 $V_H$ 结合域结合于靶标且使效应子部分几乎进入靶标从而在结合效应子链上其在前体药物(例如带有CB1954的硝基还原酶)中可在靶标上发挥生物功能。作为二聚化域的包括的免疫球蛋白重链效应子功能也可利于

消除靶细胞。

[0151] 效应子链

[0152] 效应子链包含互补结合域和效应子部分,其通过重链效应子部分与重链连接从而形成装配的多肽结合复合体。效应子链互补装配域可为效应子部分或蛋白质或融合或化学性连接于效应子部分的可选择配体的整体部分。装配多肽结合复合体的重链结合于靶标且使效应子(轻)链部分几乎进入靶标从而发挥靶标的生物功能。

[0153] 效应子部分

[0154] 本文所用术语“效应子部分”包括在细胞上介导所需生物效应的任何部分。效应子域可为细胞例如T-细胞、肽、多肽或蛋白质或可为非肽结构。例如效应子域可为酶、药物、前体药物、毒素特别是蛋白质毒素、螯合结构中放射性核素或结合域。根据所需效应,与互补装配域相关效应子部分可为细胞、蛋白质、有机物或天然的无机物。

[0155] 关于本发明所有上述方面中所用术语“结合域”包括任何生理性介质中有活性的多肽域。在生理条件下这种结合域也必须具有结合于靶标的活性。

[0156] 这种结合域包括可介导结合或附着到细胞表面的域。本发明的多肽复合体中可使用的适当的域为哺乳动物、原核细胞或病毒细胞粘附分子、细胞因子、生长因子、受体拮抗剂或激动剂、配体、细胞表面受体、调节因子、结构蛋白质和肽、血清蛋白、分泌性蛋白、质膜相关蛋白质、病毒抗原、细菌性抗原、原生动物抗原、寄生性抗原、脂蛋白、糖蛋白、激素、神经递质、凝固因子、工程单链Fvs 等。优选的结合域为脊椎动物 $V_H$ 域,更优选哺乳动物 $V_H$ 域例如人 $V_H$ 域。

[0157] 结合域可包含骆驼 $V_H$ ( $V_{HH}$ )域或可包含得自非-骆驼的 $V_H$ 域。优选的结合域为人 $V_H$ 域。由于为适应体内抗原激发经VDJ重排和体细胞突变产生而具有更高亲和力,与得自合成噬菌体文库的 $V_H$ 结合域相比, $V_H$ 结合域优选得自转基因动物或骆驼(如前面所述)的B-细胞来源。

[0158] 如果效应子部分包含结合域,优选其具有与重链结合域不同的特异性。重排的优点是多肽复合体可促进不同靶标交联或结合靶细胞上的不同抗原(例如病原体)。

[0159] 第一条重链中结合域可具有与第二条重链中结合域不同的特异性。以这种方式,多肽复合体至少为二价且能够交联不同靶标,且效应子域能够在两个靶标均起作用。可通过结合四价重链和包含带有不同特异性和功能性的效应子域的效应子链产生多价多肽复合体。同样,第一条重链中效应子部分可具有与第二条重链中效应子部分不同的特异性,其允许捕获超过一条具不同功能性的效应子链。

[0160] 结合于效应子部分的互补装配域

[0161] 当重链与轻链相连时,本文所用术语“效应子部分”和“互补装配域”包括相互间可形成至少非共价连接的任何部分。例如效应子部分和互补装配域可为蛋白质、肽片段或能够形成蛋白质-蛋白质相互作用的共有序列,蛋白质-蛋白质相互作用例如可见于:免疫球蛋白重链 $C_H1$ 域和免疫球蛋白轻链恒定区、亮氨酸拉链、VCAM和VLA-4、整联蛋白和细胞外基质蛋白、整联蛋白和细胞表面分子例如CD54或CD102、ALCAMs和SRCR域、scFv和抗原或 $V_H$ 结合域和抗原之间。

[0162] 重链

[0163] 重链的二聚化域包含免疫球蛋白重链恒定区,此恒定区( $C_H$ 外显子)可赋予此多肽

结合复合体其它生理功能。特别的是,根据抗体恒定域类别或亚类,免疫球蛋白重链恒定域除其它以外还可提供如补体结合作用、巨噬细胞活化和与Fc受体的结合。

[0164] 如上述讨论,已经很好证明了表达的这种重链在体内效应子功能中具有重要作用。建立的细胞系可产生多肽复合体,具有有利的靶向和生物活性但是重链恒定区可为不需要的诊断性或治疗性类别,或者其可能不分泌适当的数量。相应的,本发明多肽复合体的重链恒定域可特异性改变或者局部或完全不产生或清除免疫球蛋白重链。

[0165] 例如,已知M类的Ig分子在巨噬细胞活化和补体途径中起重要作用。由于几乎进入其结合位点,IgM具有高度病原体亲和力,包括病毒。但是亦知IgM难以使用于快速免疫测定技术,而G类的Ig可容易的使用于这些技术中。为这种用途,转换重链类别自 $\mu$ 至 $\gamma$ 域是有利的。

[0166] 重链 $C_{\gamma}$ 基因座的单独表达可产生IgG,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4同种型,部分也可活化补体。IgG抗体结合及活化巨噬细胞和粒性白细胞,且可穿过胎盘。

[0167] 多种抗体类别的其它应用如前所述。

[0168] 本发明多肽复合体的重链恒定区可为如上文定义的人、兔、大鼠或小鼠来源。优选的其为人源。

[0169] 也可单独用本发明的多肽复合体通过使用没有效应子功能的二聚化域来封闭配体与受体的结合。可通过多特异性多肽复合体封闭多重受体(Multiple receptors)。

[0170] 在本发明第四方面中,效应子分子可包含二聚化域,从而使效应子分子可与分离的效应子分子结合。二聚化域可包含一种或多种 $C_{H2}$ 、 $C_{H3}$ 或 $C_{H4}$ 抗体恒定区域和/或J链。在本发明这种实施方案中,两种或多种效应子分子可结合产生效应子分子二聚体或多聚体。这些效应子分子可相同(使产生效应子分子同二聚体或同多聚体)或不同(使产生效应子分子异源二聚体或异源多聚体)。优选的效应子分子二聚体或多聚体为二价或多价。优选的两种或多种效应子分子恒定区(即二聚化域)相同,因此降低产生不均一性的可能性。

[0171] 根据本发明第四个方面,提供了包含包括第一条多肽重链和第二条多肽重链的二聚体的多肽复合体,其中:

[0172] 每个多肽重链包含结合域和任选包含至少 $C_{H2}$ 、 $C_{H3}$ 和任选 $C_{H4}$ 抗体恒定域的二聚化域,和任选的效应子部分,其中优选:

[0173] 在第一条多肽重链中结合域具有与第二条多肽重链中结合域相同的特异性,及

[0174] 这两种多肽重链的恒定区(二聚化域)相同。

[0175] 优选第一条和第二条链具有相同的效应子部分。

[0176] 优选的二聚化域包含至少 $C_{H2}$ 、 $C_{H3}$ 和任选的 $C_{H4}$ 抗体恒定域。

[0177] 本发明的第四个方面也提供包含多个多肽重链二聚体和J链的多肽复合体,其中:

[0178] 多个多肽重链二聚体通过J链装配;

[0179] 每个多肽重链包含结合域和相同的 $\mu$ 、 $\epsilon$ 、 $\alpha$ 或 $\gamma$   $C_{H2}$ 、 $C_{H3}$ 和任选的 $C_{H4}$ 域;及

[0180] 在多肽复合体中至少有两种具有不同特异性的结合域(参见图4和5)。

[0181] 如上述本发明第四方面所定义,每个重链恒定区优选包含至少一个重链恒定区基因,其表达产物没有功能性 $C_{H1}$ 域从而产生仅有重链的抗体。每个重链恒定区也可包含一种或多种附加的选自包括 $C_{\delta}$ 、 $C_{\gamma 1-4}$ 、 $C_{\mu}$ 、 $C_{\epsilon}$ 和 $C_{\alpha 1-2}$ 的基团的重链恒定区基因,条件是附加的重链恒定区基因也不表达功能性 $C_{H1}$ 域。根据优选的所需抗体种类的类别或混合物选择重链

恒定区基因。

[0182] 优选在表达的IgA和IgM中仅有两种不同特异性的结合域。

[0183] 在一个实施方案中,每个重链包括 $C_H4$ 域,恒定域为 $\alpha$ 域且多肽复合体包括J链。

[0184] 在另一个实施方案中,每个重链包括 $C_H4$ 域,恒定域为 $\mu$ 域且 抗体包括J链。

[0185] 多肽复合体的装配

[0186] 本发明多肽复合体的调节域排列使其以很多可能变化的排列次序构建。在多肽复合体的域结构和氨基酸序列中的这种转变可通过适当突变或相应DNA编码序列的适当区域的半合成和置换获得。置换或附加域可得自相容的重组DNA序列。例如重链可包括天然铰链或工程的柔性多肽域,其位于结合域和 $C_H2$ 域的氨基末端之间,也位于效应子域和重链( $C_H3$ 或 $C_H4$ )的C-末端之间。

[0187] 本发明多肽复合体中重链表达为融合蛋白。本发明这个方面的多肽复合体中效应子链可表达为融合蛋白或可通过化学方法装配,或者如果细胞可自血液或组织中分离则或可进行体内捕获(例如白蛋白)。

[0188] 在基因融合下,可使用编码融合蛋白的氨基酸序列与编码位于相同阅读框内多种域的DNA达到各种域的连接。

[0189] 如果以融合蛋白部分存在,效应子部分可位于互补装配域氨基末端或羧基末端。

[0190] 或者,可通过如本领域中已知的正常肽化学方法而不通过合成融合蛋白的方法装配效应子链中的域。

[0191] 可通过肽键或通过化学键连接。例如效应子部分可为键合到互补装配域的肽,或者其可化学性键合到互补装配域例如通过使用化学连接结构例如马来酰亚胺交联剂。

[0192] 效应子部分可位于重链中任何区域。例如效应子部分可位于重链C末端或在结合域与多肽复合体的 $C_H2$ 域或铰链域之间。由于可能干扰效应子功能和二聚化域,优选装配域不位于 $C_H2$ 和 $C_H3$ 之间。优选效应子部分经肽的柔性接头或铰链样区连接于重链的氨基末端或羧基末端从而促进效应子部分的独立结合/发挥功能。

[0193] 多核苷酸、载体和宿主细胞

[0194] 本发明也提供了编码任何一种本发明多肽复合体的重链的多核 苷酸序列,也提供了包含一种或多种上述多核苷酸的载体和用编码本发明多肽复合体重链转化的宿主细胞。多核苷酸优选包括使表达的重链以同二聚体分泌进入宿主细胞生长培养基中的序列。宿主细胞可为任何来源,包括细菌和酵母细胞,但是优选脊椎动物宿主细胞,更优选哺乳动物宿主细胞。

[0195] 用编码包含对不同靶向特异的结合域的重链的第二种载体转染相同宿主细胞导致两种构建体共表达及同二聚体和异二聚体混合物的装配。同二聚体将显示对同族抗原的特异性且异二聚体将结合两个抗原。

[0196] 本发明也提供了用至少一条本发明多肽复合体的效应子链编码的载体转化的宿主细胞。这种宿主细胞可为任何来源,包括细菌和酵母细胞,但是优选脊椎动物宿主细胞,更优选哺乳动物宿主细胞。可选择的效应子链可使用本领域已知方法合成。

[0197] 本发明也提供用编码至少一条本发明多肽复合体重链的载体转化的宿主细胞。这种宿主细胞可为任何来源,包括细菌和酵母细胞,但是优选脊椎动物宿主细胞,更优选哺乳动物宿主细胞。可选择的重链可使用本领域已知方法合成。

[0198] 本发明也提供了用编码本发明多肽复合体的至少一条重链和至少一条效应子链的载体转化的宿主细胞。这种宿主细胞可为任何来源,包括细菌和酵母细胞,但是优选脊椎动物宿主细胞,更优选哺乳动物宿主细胞。可选择的这些链可使用本领域已知方法独立或装配合成。

[0199] 另外本发明提供了表达本发明的至少一种重链同二聚体或异二聚体多肽复合体的转基因生物体。这种转基因生物体可为非人脊椎动物或哺乳动物,植物或昆虫。

[0200] 本发明也提供了产生种类特异性仅有重链的抗体及其V<sub>H</sub>域的方法,根据本发明第一个方面通过用抗原免疫本发明的转基因生物体而制得。

[0201] 在本发明这个方面的优选实施方案中,生物体为小鼠。

[0202] 用于健康护理应用产生的抗体和多肽复合体需要大规模的制造体系,上述详细讨论了其实例。这种体系包括适于大规模培养技术的植物(例如玉米)、转基因牛和绵羊、雏鸡和昆虫幼虫。其他产生体系包括病毒感染(例如昆虫幼虫和细胞系中杆状病毒)细胞培养和种系方法也为本领域技术人员所熟知。

[0203] 这些方法和本领域已知的其他适当方法可用于产生本发明的多肽结合复合体。可使用这些方法产生同二聚体和/或异二聚体。

[0204] 本发明的仅有重链的抗体和多肽复合体的用途

[0205] 本发明的仅有重链的抗体和多肽结合复合体有许多用途。

[0206] 例如,本发明的仅有重链的抗体和多肽复合体包含双特异性和多特异性多肽复合体。这些复合体特别有利于例如治疗性用于治疗 and 预防感染性疾病。

[0207] 本发明的仅有重链的抗体和多肽结合复合体有利于细胞化学标记、靶向作用、治疗和诊断。

[0208] 在单抗体治疗中,病原体逃避(pathogen escape),例如由于突变导致失去单一结合位点将丧失抗体的治疗效应。产生的异二聚体多肽复合体识别相同病原体上不同抗原可克服这种问题。在本发明多肽复合体中具有不同特异性的至少两种结合域的用途也可用于提高细胞-细胞相互作用和细胞/病原体相互作用。

[0209] 在这种实施方案中,本发明多肽复合体可用作例如在两种细胞类型例如病原体和巨噬细胞,或肿瘤细胞和T-细胞之间的桥接(bridge)多肽复合体。可选择的该多肽复合体可识别相同病原体上两种或多种表位,通过由重链恒定区单独提供的效应子功能。

[0210] 或者,双特异性多肽结合复合体可使用在体内的靶细胞和组织,接着可使用于捕获循环的效应子分子或显像剂。例如双特异性肿瘤靶向剂可使用到捕获前途前体药物转化复合物(pro-drug converting complexes)从而局限性转化前体药物为活性剂。依赖于选择的结合域,与效应子剂结合的双特异性或多特异性结合复合体也可用于结合并破坏一种或多种病原体。可选择的识别相同病原体上不同抗原的两种或多种结合域的存在提供临床利益且降低了病原体逃避和病原体内突变导致药物过量的可能性。

[0211] 本发明根据本发明第一个方面提供了仅有重链的抗体或其片段,根据本发明第二个方面提供了多肽链和复合体,且根据本发明第三个方面提供了效应子链和多肽复合体。所有均适于人的药物用途,且如此本发明提供了包含本发明的仅有重链的抗体、多肽链、效应子链或多肽复合体的药用组合物。本发明也提供了本发明的仅有重链的抗体、多肽链、效应子链或多肽复合体在制备用于预防和/或治疗疾病药物中的用途。依赖于给药方法和药

物效应,可共同或单独制备重链和效应子链。

[0212] 在给予患者前典型制备药用组合物和药物。

[0213] 例如特别如果其为冻干,仅有重链的抗体或多肽复合体可与稳定剂混合。加入糖(例如甘露醇、蔗糖或海藻糖)典型的赋予冷冻干燥期间稳定性,且优选的稳定剂为甘露醇。人血清白蛋白(优选重组体)也可作为稳定剂加入。也可使用糖类混合物例如蔗糖和甘露醇、海藻糖和甘露醇等。

[0214] 可向组合物中加入缓冲液例如Tris缓冲液、组氨酸缓冲液、甘氨酸缓冲液或优选的磷酸盐缓冲液(例如含有磷酸二氢钠和磷酸氢二钠)。加入缓冲液使pH优选为7.2-7.8,且特别的pH约为7.5。

[0215] 为冷冻干燥后重组,可使用无菌注射用水。也可能用包含人血清白蛋白(优选重组体)的含水组合物重建冻干块(lyophilised cake)。

[0216] 通常使用纯化形式的仅有重链的抗体和多肽复合体连同药理学适当的载体。

[0217] 由此本发明提供了用于治疗患者的方法,包括给予患者本发明的药用组合物。优选患者为人,可为儿童(例如幼儿或婴儿)、青少年或成人但通常为成人。

[0218] 本发明也提供了本发明仅有重链的抗体、多肽链、效应子链或多肽复合体作为药物的用途。

[0219] 本发明也提供了本发明仅有重链的抗体、多肽链、效应子链或多肽复合体在制造治疗患者药物中的用途。

[0220] 这些用途、方法和药物优选用来治疗一种下列疾病或紊乱:伤口愈合,细胞增殖性疾病包括肿瘤、黑素瘤、肺、结肠直肠、骨肉瘤、直肠、卵巢肉瘤、颈部、食管、乳房、胰腺、膀胱、头部和颈部及其他实体肿瘤,骨髓组织增殖性疾病例如非白血性白血病、非霍奇金淋巴瘤、白细胞减少、血小板减少症、血管发生疾病、卡波西肉瘤,自身免疫性/炎性疾病包括变态反应症、炎性肠病、关节炎、银屑病和呼吸道炎症、哮喘、免疫疾病和器官移植排异反应,心血管和脉管病包括高血压、水肿、心绞痛、动脉粥样硬化、血栓形成、败血症、休克、再灌注损害和局部缺血,神经疾病包括中枢神经系统疾病、阿尔茨海默病、脑损害、肌萎缩的侧生硬化症和疼痛,发育障碍,代谢疾病包括糖尿病、骨质疏松症和肥胖症,AIDS和肾脏病,感染包括病毒感染、细菌感染、真菌感染和寄生虫感染,与胎盘相关的病症及其他症并用于免疫疗法。

[0221] 在另外的方面,本发明提供本发明仅有重链的抗体或多肽结合复合体作为诊断剂、预后剂或治疗性显像剂的用途。另外本发明提供单独或与一种或多种本发明效应子(轻)链结合的本发明重链同二聚体或异二聚体作为治疗性显像剂、细胞化学试剂或诊断剂的用途。

[0222] 本发明提供本文所述仅有重链的抗体或其片段作为细胞内结合剂或抗体酶的用途。优选的仅有重链的抗体片段为可溶性抗原特异性 $V_H$ 结合域。

[0223] 本发明也提供本发明抗原特异性单链抗体或 $V_H$ 结合域作为酶抑制剂或受体阻滞剂的用途。优选的仅有重链的抗体片段为可溶的抗原特异性 $V_H$ 结合域。

[0224] 本发明也提供融合到效应子分子的 $V_H$ 域作为治疗性显像剂、诊断剂、抗体酶或试剂的用途。

[0225] 附图简述

[0226] 图1A和1B:显示包含结合域( $V_H$ )二聚化域(任选 $C_H2$ 、 $C_H3$ 和 $C_H4$ )及效应子部分(EM)。结合域和效应子部分可定位在二聚化域的氨基末端或羧基末端。

[0227] 标示了柔性接头( $\leftarrow$ )和铰链( $J$ )区

[0228] 图2A和2B:显示结合域的不同构型及通过其他结合域置换效应子部分。A. 优选选项,因为产生同二聚体。不需要分离产物。B. 产生同二聚体和异二聚体的混合物。需要分离产物。

[0229] 图3:显示与效应子链结合的重链多肽复合体。效应子链包含互补结合域(CBD)和效应子部分(EM)。CBD由重链的EM识别。CBD与效应子融合或是效应子的一部分,例如酶、毒素、螯合剂、显影剂。效应子链可独立于重链合成。

[0230] 图4显示与J链结合的二价分泌型IgA。

[0231] 图5显示经J链装配的多价仅有重链IgM样多肽复合体。

[0232] 图6:显示产生表达IgG基因座的转基因小鼠并用抗原激发后产生功能性仅有重链的抗体和 $V_H$ 域的策略。

[0233] 图7:显示产生表达IgM基因座的转基因小鼠并用抗原激发后产生功能性仅有重链的抗体和 $V_H$ 域的策略。

[0234] 图8:显示产生表达IgA基因座的转基因小鼠并用抗原激发后产生功能性仅有重链的抗体和 $V_H$ 域的策略。

[0235] 图9:使用 $V_{HH1}$ 和 $V_{HH2}$ 引物以及人 $C_{\gamma 2}$ 引物对其基因座中自带的恒定区中具骆驼剪接突变的小鼠的骨髓cDNA进行PCR而去除CH1,并对PCR产物进行序列对比。结果显示CH1未被清除。

[0236] 图10-13: $V_H$ /骆驼 $V_H(V_{HH})$ 构建体的结构。1-n代表任何数量的VH基因,或D或J片段。人基因座的正常补体为51个V基因,25个功能性D片段(附加2个没有功能的片段)及6个J片段。在 $C_{\mu}$ (IgM)或 $C_{\epsilon}$ (IgE)区的情况下,没有H区且在CH3和M1之间有另外的外显子。VH基因突变而提供如共有域(public domain)中溶解性。

[0237] VH基因、D和J片段及C外显子优选人,但是可源自任何其他物种包括骆驼。后者情况下骆驼VH(VHH)由于天然可溶而不突变。

[0238] 图14:用于产生对E.coli HSP70的仅有重链IgG的小鼠免疫接种方案和抗体测定。

[0239] 图15:得自转基因小鼠脾细胞流动细胞计数分析和免疫组化结果。

[0240] 图16:DKTP免疫的转基因小鼠的ELISA分析结果和抗体文库的序列分析结果。

[0241] 图17:在免疫的转基因小鼠中体细胞突变和VDJ重排的实例。

[0242] 图18:用含有A5抗体应激质粒转染的Tet-on细胞系上免疫染色测定结果。

[0243] 图19:转基因小鼠系血清的蛋白质印迹分析结果。

[0244] 图20:人IgM混合通过IgM附加IgG基因座小鼠产生的人单链IgM的大小分级分离。

[0245] 图21:单链IgM和抗人TNF $\alpha$ 产生的IgG抗体的ELISA分析结果。

[0246] 图22:显示具有对HSP70和 $\alpha$ GAG结合亲和力的同二聚体质粒的产生策略。

[0247] 图23:CHO细胞中同二聚体多肽复合体的功能性表达。

[0248] 图24:证明同二聚体多肽复合体同时功能性结合于 $\alpha$ GAG和HSP70。图式代表二价、双特异性抗体。第二种可变区(直接抗gag的VHH2)克隆到含有其他特异性的仅有重链的抗体(直接抗HSP70的VHH1)的羧基末端。CH3和VHH2之间的铰链区被联结子置换,其中所有半

胱氨酸被脯氨酸置换(箭头)。用Gag包被ELISA板,用1%牛奶/1%BSA的PBS溶液封闭,首先用双抗体培养基(1:2稀释)然后用BI21细胞裂解物(含有HSP70)(1:2稀释)孵育。Elute结合蛋白和样品缓冲液=2-巯基乙醇且在8%凝胶上跑电泳。用抗Gag的多克隆/单克隆抗体、双抗体和HSP70染色。 $\alpha$ Gag:兔多克隆 $\alpha$ 兔-AP(蓝色)。 $\alpha$ HSP70:单克隆/山羊 $\alpha$ 人IgG-HRP(棕色)。 $\alpha$ 双抗体:山羊 $\alpha$ 人IgG-HRP(棕色)。泳道1:Gag/双抗体/BI21细胞裂解物。泳道2:Gag/培养基(为双抗体阴性对照)/BI21。泳道3:-牛奶-BSA/双抗体/BI21。泳道4:-牛奶-BSA/培养基/BI21。泳道5:Gag/双抗体/-牛奶-BSA。泳道6:Gag/培养基/-牛奶-BSA。

[0249] 图25:显示产生同二聚体多肽复合体,任选与具有IgG效应子功能的效应子链结合的策略。

[0250] 图26:显示产生同二聚体多肽复合体,任选与具有IgG效应子功能的效应子链结合的策略。

#### [0251] 通用技术

[0252] 除非另有定义,本文所用所有技术或科学方法具有与本领域普通技术人员的(例如在细胞培养、分子遗传学、核酸化学、杂交技术和生物化学中)通常理解相同的意义。标准技术用为分子、遗传、生物化学方法(普遍参见Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子克隆:实验指南),第二版.(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.和Ausubel等,Short Protocols in Molecular Biology(精编分子生物学实验指南)(1999)第四版,John Wiley & Sons,Inc.)和化学方法。另外优选Harlow & Lane,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,N.Y.,为标准免疫技术。

[0253] 在产生本发明二价和多价多肽复合体、单一重链抗体及其片段中可使用任何适当的重组DNA技术。构建包含编码每个多肽复合体链或抗体链的DNA序列的典型表达载体例如质粒。为免疫球蛋白酶和化学片段并分离所得片段可使用任何适当建立的技术。

[0254] 本发明也提供包括用于表达转基因小鼠中仅有重链的抗体的构建体的载体,及本发明多肽复合体的构建和表达的载体。

[0255] 应理解可构建含有编码超过多肽链的DNA序列的单个载体。例如编码两种不同重链的DNA序列可插入在相同质粒上不同位置。

[0256] 可选择编码每个多肽链的DNA序列可独自插入质粒,从而产生许多构建的质粒,每个编码一种特定的多肽链。优选质粒与插入的序列相容。

[0257] 然后使用每个质粒转化宿主细胞从而每个宿主细胞含有编码多肽复合体中每条多肽链的DNA序列。

[0258] 在细菌体系中可用于克隆的适当的表达载体包括质粒例如ColE1、pcR1、pBR322、pACYC 184和RP4,噬菌体DNA或这些的任何衍生物。

[0259] 在酵母体系中克隆使用的适当的表达载体包括基于2微米来源的质粒。

[0260] 含有适当哺乳动物基因启动子序列的任何质粒可使用在哺乳动物体系克隆。昆虫或杆状病毒(baculoviral)启动子序列可用于昆虫细胞基因表达。这种载体包括得自例如pBR322、牛绒毛状瘤病毒、逆转录病毒、DNA病毒及牛痘病毒的质粒。

[0261] 为表达多肽复合体或抗体可使用适当的宿主细胞,包括细菌、酵母和真核细胞例如昆虫或哺乳动物细胞系,转基因植物、昆虫、哺乳动物和其他无脊椎动物或脊椎动物表达

体系。

[0262] 本发明的多肽复合体和单一重链抗体

[0263] 应理解本发明术语“多肽复合体”、“单一重链抗体”及“异源重链基因座”也包括得自任何来源的同源多肽和核酸序列,例如相关细胞同源物、其他物种的同源物及其变异体或衍生物。

[0264] 因此本发明包括变异体、多肽复合体和本文所述抗体的同源物或衍生物。

[0265] 在本发明上下文中,同源序列其中至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%相同,优选至少98%或99%相同,包括氨基酸序列,在氨基酸水平至少30,优选50、70、90或100个氨基酸。虽然同源性也可依据类似性考量(即具有类似化学性质/功能的氨基酸残基),但是在本发明上下文中优选依据序列鉴定表达同源性。

[0266] 本发明也包括为产生本发明多肽复合体和抗体中使用而构建的表达载体和转化的宿主细胞。

[0267] 在相同宿主细胞中表达各个链后,其可恢复而提供活化形式的全部多肽复合体或仅有重链的抗体。

[0268] 考虑在本发明优选形式中,各个重链经宿主细胞处理从而形成利于自其分泌的全部多肽复合体或抗体。优选的效应子链分别通过宿主细胞或合成方法产生。

[0269] 用于制备重组抗体多肽复合体的技术在上述参考文献中描述,且也参见于例如EP-A-0623679、EP-A-0368684和EP-A-0436597。

[0270] 转基因生物体的免疫接种

[0271] 在另一个方面,本发明提供用于制备产生本发明抗体的方法,包括给予本发明的转基因生物体抗原。

[0272] 本发明的转基因动物产生的抗体和多肽复合体包括多克隆和单克隆抗体及其片段。如果需要多克隆抗体,可通过已知技术用抗原和免疫动物血清免疫转基因动物(例如小鼠、兔、山羊、马等),收集和处理。如果含有多克隆抗体血清含有其他抗原的抗体,可通过本领域技术人员熟知的免疫亲和色谱等技术纯化感兴趣的多克隆抗体。本领域也已知产生和处理多克隆抗血清的技术。

[0273] 本发明多肽结合复合体和抗体的用途

[0274] 本发明的多肽复合体和抗体包括其片段的可应用于:体内治疗性和预防性应用、体外和体内诊断应用、体外测定和试剂应用等。

[0275] 本发明多肽复合体和抗体的治疗及预防用途涉及给予上述受试哺乳动物例如人。

[0276] 给予哺乳动物的基本纯化的多肽复合体和抗体包括其片段的优选至少90%-95%的同源性,作为药物用途特别是哺乳动物为人时最优选98%-99%或更高的同源性。一旦部分纯化局部或所需同源性,本文所述多肽复合体和仅有重链的抗体可用于诊断或治疗(或体外使用)或显像或使用本领域技术人员已知方法进行测定。

[0277] 通常本发明的多肽复合体和抗体以纯化形式连同药理学上适当载体使用。典型的,这些载体包括水溶液或醇/水溶液、乳状液或混悬液,其可包括盐和/或缓冲介质。胃肠道载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠和乳酸盐林格氏液。

[0278] 如果需要保持多肽复合体为混悬液,可选择作为增稠剂的适当生理学可接受赋形

剂,例如羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、明胶和海藻酸盐。

[0279] 静脉内载体包括例如基于林格氏葡萄糖的液体和营养补充剂和电解质补充剂。也可存在防腐剂及其他添加剂例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体 (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版)。

[0280] 本发明的多肽复合体和抗体包括其片段的可单独作为药用组合物使用或与其他药物联用。包括各种免疫治疗药物例如环孢霉素、氨甲喋呤、阿霉素、顺铂或免疫毒素。可选择的多肽复合体可与在效应位点转化前体药物的酶结合使用。

[0281] 药物组合物可包括多种细胞毒素或其他药物“鸡尾酒”结合本发明选择的抗体或甚至结合本发明选择抗体的组合。

[0282] 给予本发明药用组合物的途径可为本领域技术人员已知的任何常规途径。为了治疗包括但不局限于免疫治疗,本发明的多肽复合体或抗体可根据标准方法给予任何患者。给药可通过任何适当模式包括胃肠外、静脉内、肌内、腹膜内、经皮肤、经肺途径给药,也或者适当的通过导管直接输注。给药剂量和频率根据患者年龄、性别和病情、联用的其他药物、禁忌症及其他参数由临床医生考虑。

[0283] 本发明多肽复合体和抗体可冻干保存且用前在适当载体中重建。可采用已知的冻干和重建技术。本领域技术人员应理解冷冻干燥和重建可导致不同程度的功能丧失且使用水平应由于补偿而调整。

[0284] 另外本发明多肽复合体和抗体可用作诊断目的。例如本文所述抗体可对抗抗原产生或增加,在疾病状态特定表达或自疾病状态其水平变化。

[0285] 为某些目的例如诊断或追踪目的,可加入标记。适当的标记包括但不限于任何下列的:放射性标记、NMR自旋标记及荧光标记。标记检测方法为本领域技术人员所熟知。

[0286] 可给予含有本发明多肽复合体和抗体的组合物或其混合剂用于预防和/或治疗。

[0287] 含有本发明多肽复合体和抗体的组合物可用在预防和治疗设备中以帮助转化、灭活、杀灭或清除哺乳动物中选择的靶向细胞群。另外本文所述多肽复合体和抗体的选定组分可体外使用或体外选择性杀灭、耗尽或其他有效清除来自细胞的异源收集物的靶向细胞群。

[0288] 实施例1

[0289] 在预实验中,制备转基因小鼠以表达重链基因座,其中两个马驼 (llama) VHH外显子连接于人重链多变 (D) 和连接 (J) 片段,接着是C $\mu$ 、C $\delta$ 、C $\gamma$  2、C $\gamma$  3人恒定区基因和人重链免疫球蛋白3'LCR。人C $\gamma$  2和C $\gamma$  3基因包括G $\rightarrow$ A剪接突变 (splice mutation)。存在的Fr $t$ 位点使单拷贝转基因小鼠通过Flp介导的重组由多拷贝转基因阵列产生。但是具有G $\rightarrow$ A剪接突变的转基因基因座序列显示异常剪接但是未完全清除CH1 (图9)。

[0290] 构建体

[0291] 为克服这种问题,使用标准方法筛选基因组黏粒文库得到含有VH基因的克隆。基于其序列随机选择一种(或多种)不同种系VHs(在人VH's中有5属类)。根据IMGT编号在42、49、50和52位引入亲水性氨基酸密码子 (Lefranc等, (1999))。通过标准程序例如使用做的接头或同源重组直接克隆将VH基因结合进BAC载体中。

[0292] 从人基因组Pac文库RPC1-11 (BACPAC Resource Center, 美国) 中选择两种克隆: 含有人重链D和J片段、C $\mu$  (IgM) 和C $\delta$  (IgD) 的克隆1065N8及含有C $\gamma$  3 (IgG3) 基因的克隆1115

N15。使用来自不同人基因组文库 (Incyte Genomics, CA, 美国) 的Bac克隆11771作为C $\gamma$ 2 (IgG2) 基因和免疫球蛋白重链LCR的来源 (Mills等, (1997) J. Exp. Med., 15;186 (6) :845-58)。

[0293] 使用标准技术将C $\gamma$ 3和C $\gamma$ 2分别亚克隆入pFastBac载体 (Invitrogen)。同样, 可从这些BACs (IgA、IgE) 克隆任何其它的Ig恒定区。使用每个恒定区CH1外显子侧翼序列通过同源重组取得CH1外显子的完全缺失 (Imam等, (2001))。任选可在C $\mu$ 转换区前引入frt位点从而通过用标准方法例如与rosa-flp小鼠杂交在体内用flp重组酶处理而从多拷贝基因座产生单拷贝基因座 (图10)。

[0294] 通过常规限制消化和连接或通过同源重组 (或二者混用) 或其它任何克隆技术将分离的VH基因、D和J片段及C和LCR外显子克隆进一个BAC中。

[0295] 然后可构造进一步的构建体。

[0296] 仅有IgM的基因座

[0297] 为获得IgM构建体 (图11), 一种或多种VHs基因 (优选工程人VH基因从而提供可溶性或骆驼VHH基因), 接着将人D和J重链片段及C $\mu$ 克隆进BAC。方法学参见上述。这样仅有C $\mu$ 区克隆进终BAC。

[0298] IgM附加IgG基因座, (C $\delta$ 任选)

[0299] 为获得IgM附加IgG构建体 (图12), 一种或多种VH基因 (优选工程人VH片段从而提供可溶性或骆驼VHH基因), 接着将人D和J重链片段、C $\mu$  (没有CH1但有CH4外显子), (任选C $\delta$ ) 及修饰的人C $\gamma$ 2和C $\gamma$ 3基因和3' LCR克隆进BAC。为产生仅有IgG基因座, 在标准克隆步骤 (如上述) 期间引入loxP位, 且BAC在294 Cre E. coli菌株中生长 (Buscholz等), cre介导的重组生成产生仅有IgG的基因座的细菌。进一步构造细节参见上述。

[0300] IgM附加IgG基因座, (C $\delta$ 任选)

[0301] 为获得IgM附加IgG构建体 (图13), 一种或多种VHs基因 (优选工程人VH片段从而提供可溶性或骆驼VHH基因), 接着将人D和J重链片段、C $\mu$  (带有CH1和CH4), (任选C $\delta$ ) 及修饰的人C $\gamma$ 2和C $\gamma$ 3基因和3' LCR克隆进BAC。为产生仅有IgG基因座, 在标准克隆步骤 (如上述) 期间引入loxP位, 且BAC在294 Cre E. coli菌株中生长 (Buscholz等), cre介导的重组生成产生仅有IgG的基因座的细菌。

[0302] 转基因小鼠, 繁殖和基因分型

[0303] 通过标准受精卵显微注射或经胚胎干细胞转染技术将终BAC引入到转基因小鼠中。

[0304] 用5'和3'末端基因座探针通过尾部DNA的DNA印迹分析 (Southern 1975) 检查转基因基因座完整性和拷贝数。创始鼠 (founder) 作为在 $\mu$ MT<sup>-/-</sup>背景中的品系繁殖。通过标准PCR分析使用基因座不同区域各自的引物完成基因分型。得自转基因小鼠的BM cDNA的RT-PCR产物序列分析, 其中C $\gamma$ 2和C $\gamma$ 3的整个CH1外显子缺失 (其中一种具有 (HLL品系) 而另一种没有C $\mu$ 和C $\delta$ 基因), 显示这种转基因座不仅能够VDJ重组, 而且IgG转录物类似于在马驼和骆驼HCAbs中所见。

[0305] 免疫组化

[0306] 在OCT化合物中镶嵌脾。在丙酮中固定冷冻的5 $\mu$ m冷冻切片且如前面所述单或双标记 (Leenen等, 1998)。采用单克隆抗体抗B220/RA3-6B2、抗-CD11c/N418 (Steimnan等,

1997),作为杂交瘤培养上清液。过氧化物酶偶联山羊抗人-IgG和抗-人IgM得自Sigma。第二步试剂为过氧化物酶标记的山羊抗-大鼠Ig(DAKO,Glostrup,丹麦)或抗-仓鼠Ig(Jackson ImmunoResearch Laboratories,West Grove,PA)和山羊抗-大鼠Ig碱性磷酸酶(Southern Biotechnology,Birmingham,AL,美国)。

[0307] 图15显示在 $\mu\text{MT}^{-/-}$ 背景中来自 $\mu\text{MT}^{-/-}$ 、WT和HLL及HLL-MD转基因小鼠中5 $\mu\text{m}$ 冷冻脾切片的免疫组化分析。切片用B细胞的抗B220(蓝色)和树状突细胞的抗-CD 11 c/N418(棕色)染色。箭头显示小簇B细胞的定位。

[0308] 流式细胞计数分析

[0309] 在PBS中自淋巴器官制备单细胞悬液,如前所述(Slieker等,1993)。4 $^{\circ}\text{C}$ 下在96孔板中约 $1 \times 10^6$ 个细胞与抗体在PBS/0.5%牛血清白蛋白(BSA)中孵育30分钟。在PBS/0.5% BSA中洗涤细胞两次。对于每个样品,每 $3 \times 10^4$ 数使用FACSscan分析仪评分(Becton Dickinson,Sunnyvale,加拿大)。使用CellQuest 1.0版计算机软件分析FACS数据。在Becton Dickinson FACS Calibur上进行四色分析。下列mAbs得自BD Pharmingen(San Diego,加拿大):FITC偶联的抗B220-RA3-6B2、PE偶联的抗CD19。在图15的底格中展示了用抗-CD 19和抗-B 220染色的脾细胞FACS扫描数据。

[0310] 图的左侧为通过将HLL品系与FlpeR转基因品系杂交的体内FLP重组的图像,以及提供支持的重组体脾细胞的FACS扫描数据,显示在直接产生的原始HLL-MD品系中可见B细胞获救。右侧为与Cag Cre转基因品系杂交的体内Cre重组图像,以及单拷贝重组体的脾细胞的FACS数据。

[0311] 免疫接种和杂交瘤产生(图14)

[0312] 制造含有包括两个马驼VHH域、人D和J区及IgG2和3恒定区(没有CH1域)的仅有重链的抗体基因座的转基因小鼠。

[0313] 8周龄小鼠用大肠杆菌热休克蛋白70(hsp 70)免疫。分别在第0、14、28、42天皮下注射及在第50天腹腔注射20 $\mu\text{g}$ 或5 $\mu\text{g}$ 的抗原和Specol佐剂(IDDL0,Lelystadt,NL)。在第0、14和45天取血。三次加强免疫后,3分之1的用Hsp70免疫的HLL-MD1小鼠中检测到低滴度抗原特异性抗体(图14)。

[0314] 进行标准的脾细胞与骨髓瘤细胞株系融合从而生成在单克隆杂交瘤细胞系中产生的抗hsp70蛋白的单克隆抗体。这种抗-HSP70HCAb包括马驼VHH片段,其最接近与人IgHD3-10片段(检索号X13972)和人IgHJ4-02片段(检索号X86355)重组的D区(VHH2)。与种系构建(germ line configuration)相比虽然没有高频率,但是VHHs几乎没有引起氨基酸改变的突变,参见图9。RT-PCR分析也显示,在杂交瘤中仅有一种产生性的IgH转录物,表明没有其他转录物产生。 $\alpha\text{HSP70IgG2}$ 抗体作为仅有重链二聚体分泌(变性凝胶下蛋白质印迹(二聚体)和非变性凝胶下蛋白质印迹(单体)环境,图14)。使用G1onal细胞TM-HY试剂盒(StemCell Technologies, UK)根据厂家说明书在第56天融合脾细胞与Sp2-0-Ag14骨髓瘤细胞(R. Haperen馈赠)。

[0315] 用TNF $\alpha$ 免疫含有仅有重链的抗体基因座的转基因小鼠,其包括两个马驼VHH域、人D和J区、人IgM和IgG及3恒定区(均无CH1域,图12),从而获得HC-IgM抗体。在标准ELISA测定中三分之一小鼠显示出阳性血清。标准骨髓瘤融合产生阳性IgM杂交瘤(图16)。琼脂糖凝胶6B凝胶过滤后在非还原条件下层析柱每级流分在还原条件下装柱且用 $\alpha$ 人IgM-HRP检测(图

20)。非还原条件下分级分离显示HC-IgM作为多聚体抗体分泌且与人对照IgM(HC-IgM中减去轻链和CH1分子量后)大小相同。还原条件下每个柱流分的凝胶过滤显示预期的(图20)的单体。

#### [0316] 血清Ig ELISA

[0317] 在涂铺EDTA的试管中收集15-25周龄小鼠血液,室温(RT)下离心15'且用PBS1:5稀释上清液。用5mg/ml山羊抗人IgG(YES Biotechnology)或山羊抗人IgM(Sigma)包被96孔板2小时,用PBS洗涤,室温下用封闭溶液(1.5%BSA/1.5%奶粉/0.1%Tween 20/PBS)封闭1小时且用PBS洗涤3次。装入梯度稀释的血清样品和标准品(人IgG2或人IgM(Sigma, Zwijndrecht, NL))且孵育2-4小时,在加入第二种抗体(1:2000稀释的偶联到HRP的山羊抗人IgG或山羊抗人(Sigma, Zwijndrecht, NL))前用PBS洗涤板6次。所有稀释均用封闭液完成。室温下孵育1-2小时后且用PBS洗涤,加入POD底物(Roche)。

[0318] 图16显示了检测自IgG2噬菌体文库的抗原特异性可溶sdAbs的ELISA。可溶sdAbs在包被抗原的板上用作一抗,然后是小鼠 $\alpha$ -myc抗体和HRP偶联的山羊 $\alpha$ -小鼠抗体。使用POD作为底物。底部图示用限制性内切酶Hinf I的克隆酶解图谱,显示编码抗B.Pertusts的sdAb的5个不同插入片段。

#### [0319] 抗体文库构建和筛选

[0320] 使用Ultraspec RNA分离体系(Biotecx Laboratories Inc, Houston, Texas, 美国)自DKTP免疫的单拷贝仅有IgG小鼠的脾(图12, cre处理后)分离总RNA。使用寡dT制备cDNA。使用特异性引物:vh1后Sfi I引物(Dekker等, 2003)联用hIgG2hingrev引物(5'-AATCTGGGCAGCGGCCCGCCTCGACACAACATTTGCGCTC-3')通过PCR扩增编码VHHDJ的DNA片段。这种扩增的VHHDJs(~400bp)用Sfi I/Not I消化、凝胶纯化且克隆进Sfi I/Not I消化的噬菌粒载体pHEN-1。

[0321] 转化进TG1电感受态细胞,产生人单域抗体文库。使用吸附在塑料(用未稀释疫苗包被的免疫试管)上的疫苗抗原淘选两轮。进行标准的限制性分析和序列测定。

#### [0322] 仅有重链基因座的RT-PCR

[0323] 然后用IgG2和IgG3特异性引物从淋巴集结得到cDNA形式的RT-PCR产物,并通过测定产物序列来研究HLL-MD基因座是否作为正常基因座在产生多样抗体库中发挥作用。图17显示自非免疫小鼠(左边部分)和免疫小鼠(右边部分)克隆体细胞突变的部分实例。这些小鼠仅有IgG基因座,并用大肠杆菌hsp70、百日咳溶菌产物、破伤风类毒素免疫。灰色阴影为自ERKCCV起始的IgG2铰链区。

[0324] 虽然对淋巴集结的RT-PCR分析显示使用两个V<sub>H</sub>,所有已测序抗体都重排了V<sub>H</sub>2。通过选择D和J片段并进行V-D和D-J连接形成的CDR3区是抗体库可变性的来源。人J片段的使用与人重排中所见的类似,最常用的是JH4和JH6片段。

[0325] 这种分析显示所用的两种VHs、不同人D及所有人J片段构成了多样性抗体库(repertoire)。也通过将每个重排基因与其种系负体即转基因构建体中原始V<sub>H</sub>做比较,显示存在IgG3转换的B细胞和发生了体细胞突变(参见图17)。因此人仅有重链IgG抗原受体可提供B细胞成熟必需信号。

#### [0326] 免疫染色

[0327] 图18显示另外用含有A5抗体的应答质粒转染细胞系上Tet-之一的免疫染色结果

(Dekker等, 2003)。上面显示在细胞质中多西环素诱导的A5抗体的产生(红色)及用DAPI染色的细胞核(蓝色)。下面显示核中表达rtTA的细胞为经诱导产生A5的细胞(上面)。用一种带有下列显示序列的抗rtTA的人HCAb(绿色)完成染色。使用这种FITC偶联的山羊抗人IgG作为第二个步骤。通过Dekker等, 2003先前所述检测A5.rTTA抗体为带有下列序列的IgG3:

[0328] 241 AGACTCT

[0329] 80 R L

[0330] 301 CCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTC

[0331] 100 S C A A S G S I F S I N A M G W Y R Q A

[0332] 361 CAGGAAGCAGCGCGAGTTGGTTCGAGCTATTACTAGTGGTGGTAGCACAAGGTATGCAG

[0333] 120 P G K Q R E L V A A I T S G G S T R Y A

[0334] 421 ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGC

[0335] 140 D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y L

[0336] 481 AAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTTTGATCTCTATGGTTC

[0337] 160 Q M N S L K P E D T A V Y Y C L I S M V

[0338] 541 GGGGAGCCCGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGAGCTCA

[0339] 180 R G A R F D Y W G Q G T L V T V S S E L

[0340] 601 AAACCCCACTT

[0341] 200 K T P L

[0342] IgG3铰链起始于氨基酸198ELKTP L。比较参看图17中IgG2铰链区。

[0343] 蛋白质印迹分析

[0344] 图19显示cre处理(即IgM缺失, 仅余留IgG)后含有IgM附加IgG基因座(图10)的不同转基因小鼠系的血清蛋白质印迹。在还原(图19右面)和非还原(图19左面)条件下通过prot G和凝胶分级分离纯化血清。对照为背景KO小鼠和正常人血清样品。注意在两种凝胶间大小差别显示人仅有重链IgG为二聚体。

[0345] 图19中显示信号用抗人IgG抗体通过标准方法检测。

[0346] 通过IgM附加IgG基因座小鼠产生人IgM的大小分级

[0347] 与作为对照的人血清样品混合后, 在非还原条件下通过凝胶过滤将IgM附加IgG小鼠的血清(图13)分级分离。结果显示于图20。柱上复合体分子量从左至右每个泳道(代表每种流分)逐级下降。通过凝胶电泳在还原条件下分析流分(每个泳道)。

[0348] 在许多由用人TNF $\alpha$ 免疫的含有IgM附加IgG(图13)基因座小鼠制备的杂交瘤上进行ELISA分析。结果显示于图21。图21中顶部两行用抗人IgG分析, 接下来的两行用抗人IgM分析。血清样品(行)显示小鼠产生IgG和IgM抗-TNF $\alpha$ 抗体。单行显示阳性IgM杂交瘤。各孔用可商业购得的人TNF $\alpha$ 包被。所有均为标准方法。

[0349] 实施例2

[0350] 通过将两种仅有重链单特异性抗体相结合产生双特异性双价抗体。第一种抗体形成骨架而产生第一种特异性和效应子功能(分别为可变区和恒定区)。经新型改造的铰链结合具有第二种特异性的第二种抗体。这种铰链类似于现存IgG2铰链序列但是用脯氨酸代替半胱氨酸从而阻止抗体二聚体中半胱氨酸交联, 且提供由脯氨酸带来的额外柔性而预防第二种抗体受到可能抑制其功能的空间位阻。

[0351] 起始的骨架抗体为抗E.coli HSP70蛋白质而产生的抗体。此HSP70抗原注射进含有(参见前文图14)中所述的仅有重链的抗体基因座转基因小鼠。通过标准杂交瘤融合技术(参见上文)从这些小鼠产生单克隆抗体。然后通过标准RT-PCR重组DNA方法克隆编码 $\alpha$ HSP-抗体的cDNA产生含有全长cDNA的质粒,其从5'末端至3'末端(在蛋白质中从N末端至COOH末端)包括起始密码子ATG、信号肽序列、可变域VHH1(参见Janssens等)、重组D和J区及C $\gamma$ 2的恒定区(缺少CH1区),但是包括终止密码子和polyA位点(图22左边上部)。为克隆使用正向引物和反向引物通过PCR扩增编码 $\alpha$ HSP70抗体的cDNA。

[0352] 正向引物为:

[0353] CTGGAATTC**TCAACC**ATGGAGCTGGGGCTGAGC,提供用于克隆目的(加下划线的)的EcoRI位点,有效翻译起始序列(粗体)和正常起始密码子(灰色底纹)。

[0354] 反向引物为:GACAAGCTTTACCCGAGACAGGGAGAGGC,提供HindIII克隆位点(加下划线的)并保留了正常终止密码子。

[0355] 这种扩增因而导致形成EcoRI/HindIII片段,其包括EcoRI位点(加下划线的)、有效翻译起始序列(粗体)和正常 $\alpha$ HSP70抗体基因的起始密码子(灰色底纹,也见于图22)。

[0356] 反向3'末端引物为:

[0357] GACAAGCTTTACCCGAGACAGGGAGAGGC,提供HindIII克隆位点(加下划线的)并清除了正常终止密码子。如此产生的片段带有EcoRI位点和HindIII位点(图22左边从上数第2),其中EcoRI位点克隆在启动子序列上,HindIII位点用于将5'末端克隆在表达质粒上并将3'末端克隆在新型铰链序列上(参见下述)。最后,用EcoRI和HindIII切割该片段从而提供用于克隆的适当的单链末端。

[0358] 产生第二种特异性的第二种克隆的抗体包含抗猪逆转录病毒(PERV) gag抗原的马驼抗体VHH域(Dekker等,(2003) J.Virol.,77(22):12132-9,图22上右)。使用下列引物经标准PCR扩增法扩增 $\alpha$ gag:

[0359] 正向:GTC **CTCGAG**GCCCAGGTCCAAGTGCAGGAGTCTG和反向引物:

[0360] GTCGAATTCTCATTCCGAGGAGACGGTGACCTGGGTC。其提供的扩增片段(图22右从上数第2)带有XhoI位点(灰色底纹)和EcoRI位点(加下划线的),其中XhoI位点克隆框架内5'末端与新型铰链(参见下列),EcoRI位点用于将3'末端克隆进表达质粒(图22,右中)。最后用EcoRI和XhoI切割该片段从而产生用于克隆的单链末端。

[0361] 这两种抗体序列经新型铰链结合成一种双抗体序列。新型铰链由两种寡核苷酸在一起形成带有以克隆为目的的5'和3'突出端(分别与HindIII和XhoI相容)的双链寡核苷酸而产生相容。结构中改造进 $\alpha$ HSP70序列末端和 $\alpha$ gag序列的起始端。形成的二硫键(sulphide bridges)通常存在于人IgG2铰链中,通过用脯氨酸(加下划线的)代替半胱氨酸(灰色底纹)防止其形成。脯氨酸向铰链中加入额外柔性从而使经铰链连接于第一种抗体COOH末端的第二种抗体域起适当功能。

[0362] 正常IgG铰链序列(半胱氨酸密码子为灰色底纹,脯氨酸密码子为加下划线的)。

[0363] GAGCGCAAATG**TTGTGT**CGAG **TGC**CCACCG **TGC**CCA及其互补序列被下述序列:

[0364] **AGCT**TCTGAGCGCAAACCACCAGTCGAGCCACCACCGCCACCAC,及其互补序列

[0365] **TCGAG**TGGTGGCGGTGGTGGCTCGACTGGTGGTTTTCGCTCAGA)替代。这也提供了带有两

种单链末端与用于克隆目的的HindIII (粗体) 和XhoI (斜体) 位点相容的片段(白框铰链,图22,中部)。

[0366] 这三种片段( $\alpha$ HSP70IgG2、铰链和 $\alpha$ gag)然后通过标准重组DNA技术连接进含有小鸡肌动蛋白启动子和CMV增强序列(图22,表达质粒)的bluescript (Pbluescript11 sk+)表达质粒中。当这种质粒表达时(参见下列)则产生图22底部所示的双抗体。

[0367] 通过标准方法(superfect)培养双抗体表达质粒并将其与质粒pGKhygro共转染(从而使得能够选择转染的细胞)进CHO细胞(图23)。通过使用 $\alpha$ 人IgG-HRP检测含有由CHO细胞分泌的双链抗体的生长培养基的标准 $\alpha$ gag ELISA法(Dekker等,J.Virol.2003)在含有均霉素的培养基中选择阳性克隆并将其鉴定为表达双链抗体的阳性克隆。 $\alpha$ -gag活性阳性试验使其最可能使某一给定的克隆表达完整双抗体,因为gag特异性在于双抗体后端(COOH末端)。然后HSP70的ELISA试验也为阳性。为与55KD的单体(非还原及还原条件及蛋白质印迹,图23右部)比较而显示质粒中表达的蛋白质为110KD的二聚体(如图23底部显示),进行非还原条件和还原条件下这些ELISA选定的克隆的蛋白质印迹。因此ELISA和蛋白质印迹共同显示转染的CHO细胞产生的双抗体以二聚体表达并分泌进入培养基中(以 $>70\text{ng/ml}$ ),并且抗体可结合HSP70和gag抗原。但是其未显示相同二聚体抗体分子可同时结合两种抗原。

[0368] 因此进行了后续实验。首先将gag抗原(图24中部第一个孔)固定到塑料孔底部。然后在应用克隆1的CHO细胞上清液(图24中部第2个孔)后通过第一种抗原(gag)捕获双抗体(图24上部)。接着充分洗涤且然后应用第二种抗原(HSP 70,图24中部第3孔),然后再充分洗涤。如果双抗体分子可同时结合两种抗原,其应通过结合第一种抗原(gag)而被捕获在孔底部并接着捕获第二种抗原(HSP70)。当随后从该孔(图24中部,右孔)洗脱整个复合体时,在蛋白质印迹上双抗体和抗原都可见到(图24底部)。

[0369] 为收集分泌的双抗体,CHO克隆在相同标准条件和用于收集杂交瘤产生抗体的培养基(SIGMA杂交瘤培养基,没有血浆)中生长。

[0370] 方法:用纯化的重组gag蛋白质( $12.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的PBS溶液)0/N 4C包被Nunc-免疫板(Maxisorp)的孔。用1%牛奶/1%BSA的PBS溶液封闭2小时。CHO-DB克隆-1培养基在PBS-牛奶-BSA(或对照)中稀释一倍,室温(RT)下孵育3小时。细菌B121细胞裂解物(含有HSP70蛋白质)在PBS-牛奶-BSA中稀释一倍,在室温下孵育3小时并洗涤。用含有2-巯基乙醇的Laemmli样品缓冲液稀释结合蛋白。通过蛋白质印迹分析样品且因此进行10%SDS-PAGE且印迹在硝酸纤维素膜上。印迹用PBS-牛奶-BSA封闭2小时且用初级抗体孵育。产物使用偶联到可目测染色的酶的二抗通过标准方法显影。使用的试剂为:

[0371]  $\alpha$ Gag:兔多克隆(1:2000)2小时室温

[0372]  $\alpha$ 双抗体:山羊 $\alpha$ 人IgG-HRP(1:2500)2小时室温

[0373]  $\alpha$ HSP70:单克隆G20-380培养基(1:2)2小时室温

[0374] 二抗为:山羊 $\alpha$ 兔-AP(1:2000)2小时室温及山羊抗HSP70单克隆的 $\alpha$ 人IgG-HRP(1:2500)2小时室温

[0375] 为显影蛋白质条带,首先使用与碱性磷酸酶(AP)反应的NBT/BCIP底物(紫色),然后用与辣根过氧化物酶反应的DAB底物(棕色)。

[0376] 用PBS-0.05%Tween-20完成所有洗涤步骤。

[0377] 通过去掉一种组分或添加不产生双抗体(图24)的CHO细胞的培养基进行对照,即;

缺乏没有双抗体应用(培养基来自非转染的C0细胞)因此仅有gag(泳道2);孔底部缺乏gag(用牛奶蛋白代替)因而没有产物(泳道3);缺乏gag和双抗体因而没有产物(泳道4);缺乏HSP70抗原(被牛奶抗原代替)因而仅有双抗体和gag(泳道5);缺乏HSP70和双抗体因而仅有gag(泳道6)。

[0378] 所有3种组分(双抗体附加两种抗原)仅存在于泳道1的孔,其接受所有3种组分(也见于图24底部插图的说明)这一事实显示单一双抗体同时结合两种抗原。

[0379] 双特异性IgA或多特异性IgM的产生

[0380] 双特异性IgA的产生基本类似于所述的IgG(上述),但是除另外使用Vhsol、D和J外,还使用导致产生IgA的恒定区C $\alpha$ (图25)。

[0381] IgM的产生大同小异,但是因为IgM分子可形成大的多聚体(有或没有J链)而提供了其他可能性。因此除类似于前面所述分子(图26右底部,除去多聚化的序列后)外,也可简单通过共表达具有不同特异性的IgM' s产生多聚体。

[0382] 实施例3

[0383] 如Sambrook等((1989)Molecular Cloning A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press)中所述分子生物学技术构建了一种编码多肽复合体的表达载体,该复合体包含:重链和轻链,其中重链包括结合于PSCA(前列腺干细胞抗原)的结合域、含Jun亮氨酸拉链基序和抗体铰链的装配域、CH2和CH3域,而轻链包括含Fos亮氨酸拉链基序的互补装配域。

[0384] 然后通过常规技术将表达载体转移到适当的宿主细胞从而产生最适合载体表达的转染宿主细胞。然后使用本领域技术人员已知的任何适当技术培养转染或转化的宿主细胞从而产生本发明的多肽复合体。

[0385] 一旦产生就通过标准技术步骤包括交叉流过滤、硫酸铵沉淀法和亲和层析(例如蛋白A)纯化多肽复合体。

[0386] 然后使用本领域技术人员已知技术将包括3,3'-二吡啶基甲烷(DIM)的可溶效应子域融合到互补装配域。

[0387] 实施例4

[0388] 如Sambrook等所述分子生物学技术构建了编码本发明多肽复合体重链的表达载体,该复合体包含:结合于AFP( $\alpha$ 胎儿蛋白)的可溶性VHH结合域和包括Jun亮氨酸拉链基序和抗体铰链的装配域、CH2和CH3。

[0389] 也构建了编码本发明多肽复合体轻链的第二种表达载体。其包含包括Fos亮氨酸拉链基序的互补装配域。

[0390] 然后通过常规技术将表达载体转移到适当宿主细胞从而产生最适合载体表达的共转染宿主细胞。然后使用本领域技术人员已知的任何适当技术培养转染或转化的宿主细胞从而产生本发明的多肽复合体。

[0391] 一旦产生就通过标准技术步骤包括交叉流过滤、硫酸铵沉淀法和亲和层析(例如蛋白A)纯化多肽复合体。

[0392] 然后使用本领域技术人员已知技术将包括3,3'-二吡啶基甲烷(DIM)的可溶效应子域融合到互补装配域。

[0393] 实施例5

[0394] VCAM和VLA-4

[0395] 使用如Sambrook等所述分子生物学技术构建了编码多肽复合体的表达载体,该复合体包含:重链和轻链,其中重链包括结合于PSCA(前列腺干细胞抗原)的结合域、包括VCAM和抗体铰链的装配域、CH2和CH3域,而轻链包括含融合到蓖麻毒蛋白A毒素的VLA-4的互补装配域。

[0396] 然后通过常规技术将表达载体转移到适当的宿主细胞从而产生最适合载体表达的转染宿主细胞。然后使用本领域技术人员已知的任何适当技术培养转染或转化的宿主细胞从而产生本发明的多肽复合体。

[0397] 一旦产生就通过标准技术步骤包括交叉流过滤、硫酸铵沉淀法和亲和层析(例如蛋白A)纯化多肽复合体。

[0398] 实施例6

[0399] 使用如Sambrook等所述分子生物学技术构建了编码多肽复合体的表达载体,该复合体包含:重链和轻链,其中重链包括结合于PSCA(前列腺干细胞抗原)的结合域、包括Jun亮氨酸拉链基序和抗体铰链的装配域、CH2和CH3域,轻链包括含Fos亮氨酸拉链基序的互补装配域和编码嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)的可溶性效应子域。

[0400] 然后通过常规技术将表达载体转移到适当的宿主细胞从而产生最适合载体表达的转染宿主细胞。然后使用本领域技术人员已知的任何适当技术培养转染或转化的宿主细胞从而产生本发明的多肽复合体。

[0401] 一旦产生就通过标准技术步骤包括交叉流过滤、硫酸铵沉淀法和亲和层析(例如蛋白A)纯化多肽复合体。

[0402] PNP将氟达拉滨转化为毒性代谢产物2-氟腺嘌呤,其杀灭包含PNP酶细胞并进一步扩散而杀灭周围未感染细胞而形成局部旁观者效应。

[0403] 实施例7

[0404] 使用如Sambrook等所述分子生物学技术构建了编码本发明多肽复合体第一条重链的表达载体,该复合体包含:结合于糖蛋白抗原gp120的V3-PND区的可溶性VHH结合域和包括Jun亮氨酸拉链基序和抗体铰链的装配域、CH2和CH3域。

[0405] 也构建了编码本发明多肽复合体第二条重链的第二种表达载体,该复合体包含:结合于GP-41的可溶性VHH结合域、包括Jun亮氨酸拉链基序和抗体铰链的装配域、CH2和CH3域。

[0406] 还构建了编码本发明多肽复合体轻链的第三种表达载体。其包括含Fos亮氨酸拉链基序的互补装配域。

[0407] 然后通过常规技术将这些表达载体转移到适当的宿主细胞从而产生最适合载体表达的共转染宿主细胞。然后使用本领域技术人员已知的任何适当技术培养转染或转化的宿主细胞从而产生本发明的多肽复合体。

[0408] 一旦产生就通过标准技术步骤包括交叉流过滤、硫酸铵沉淀法和亲和层析(例如蛋白A)纯化多肽复合体。

[0409] 然后使用本领域技术人员已知技术将包括HIV-1 MN V3(PND)肽免疫原的可溶性效应子域融合到互补装配域。

[0410] 实施例8

[0411] 使用Sambrook等((1989)Molecular Cloning-A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press)所述分子生物学技术构建了编码本发明多肽复合体第一条重链的表达载体,该复合体包含:可溶性VHH结合域,其结合于糖蛋白抗原的V3-PND区。

[0412] 也构建了编码本发明多肽复合体第二条重链的第二种表达载体,包含:结合于GP-41的可溶性VHH结合域。

[0413] 这两种重链的特征在于两重链恒定区包含相同的 $\mu$ 、CH2、CH3和CH4域。

[0414] 然后通过常规方法将这些表达载体转移到组成型表达J链的宿主细胞从而产生最适合载体表达的共转染宿主细胞。然后使用本领域技术人员已知的任何适当技术培养转染或转化的宿主细胞从而产生本发明的多肽复合体。

[0415] 一旦产生就通过标准技术步骤包括交叉流过滤、硫酸铵沉淀法和亲和层析(例如蛋白A)纯化多肽复合体。

[0416] 然后使用本领域技术人员已知技术将包括HIV-1 MN V3 (PND) 肽免疫原的可溶性效应子域融合到互补装配域。

[0417] 在前面说明书中提及的所有公开通过引用结合到本文中。

[0418] 未偏离本发明范围和精神的本发明所述的方法及体系的各种修改和变化对于本领域技术人员是显而易见的。虽然已结合特定实施方案描述了本发明,但是应理解本发明不应局限于这些特定的实施方案。事实上,对于生物化学、分子生物学和生物技术或相关领域中技术人员来说显而易见的实践本发明所述方法的各种修改均在下列权利要求书的范围内。

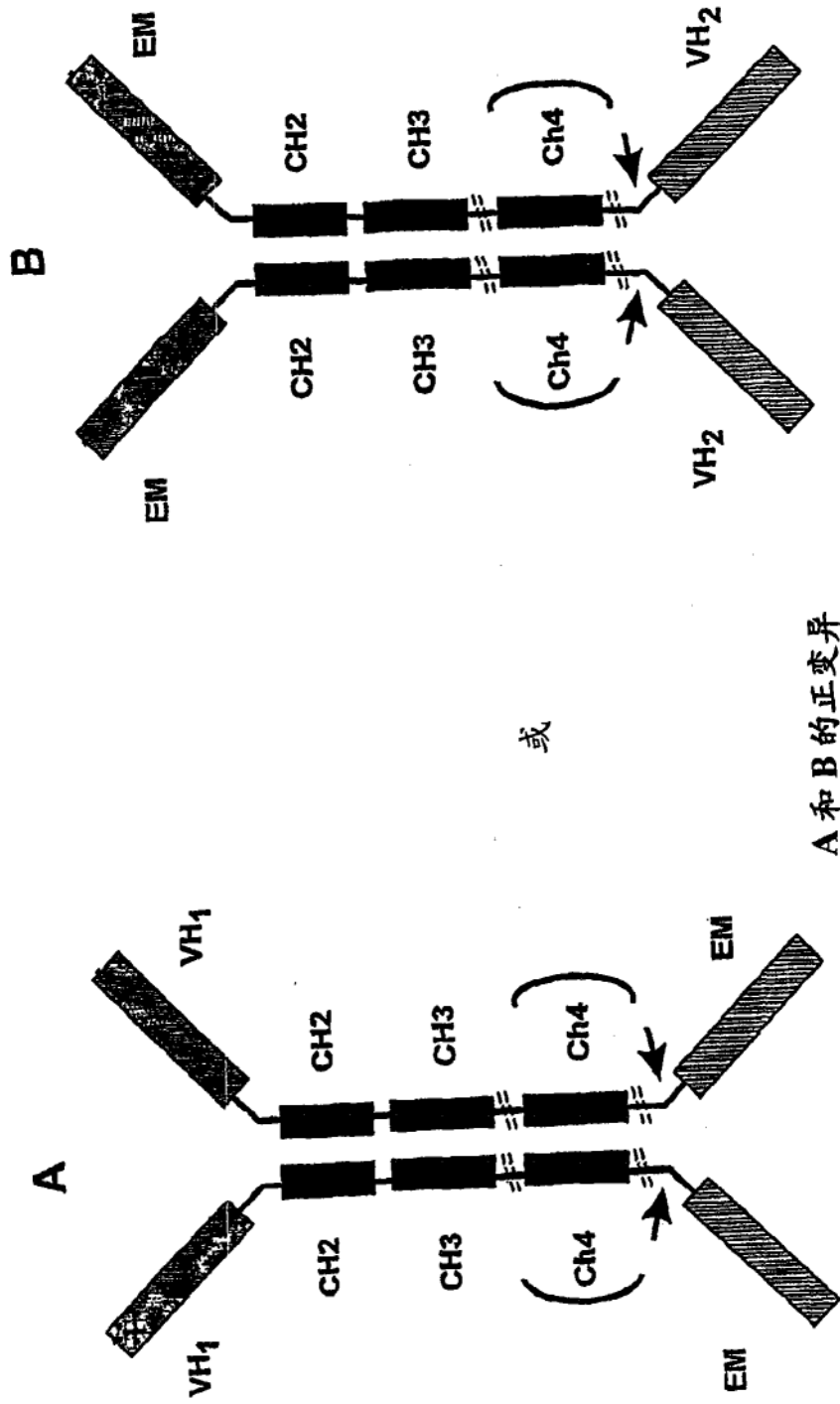


图1

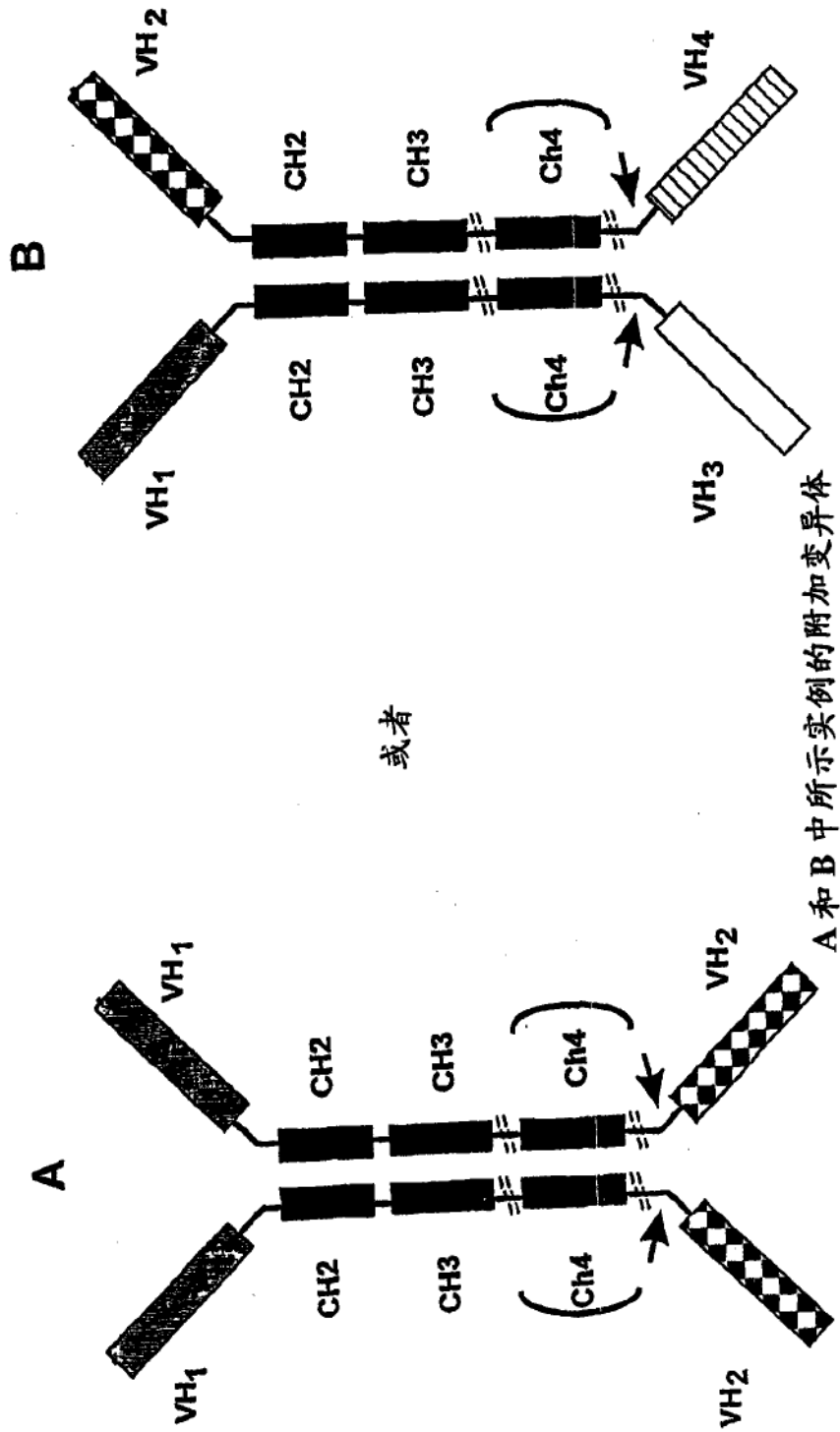


图2

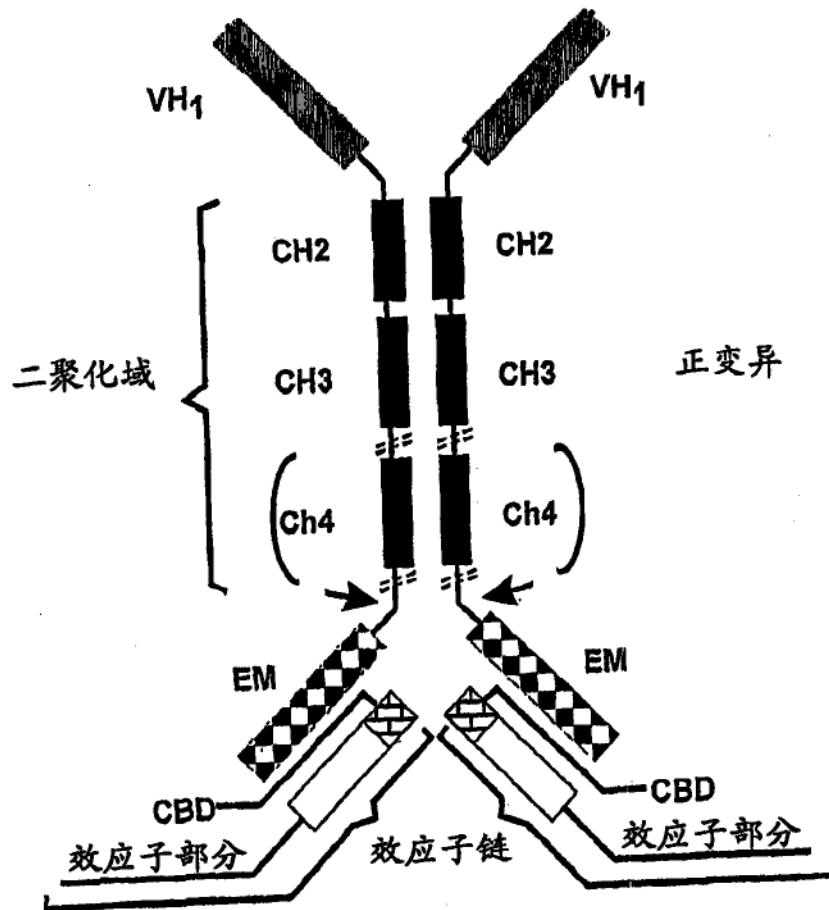


图3

二价分泌 IgA

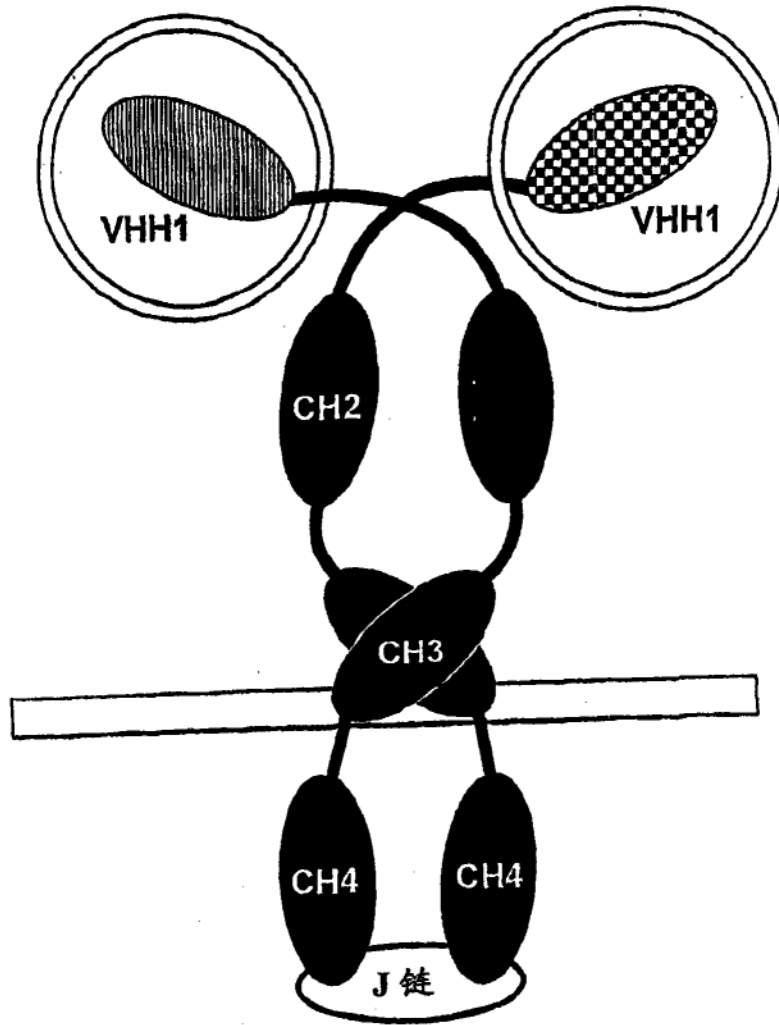


图4

多价 IgM 样

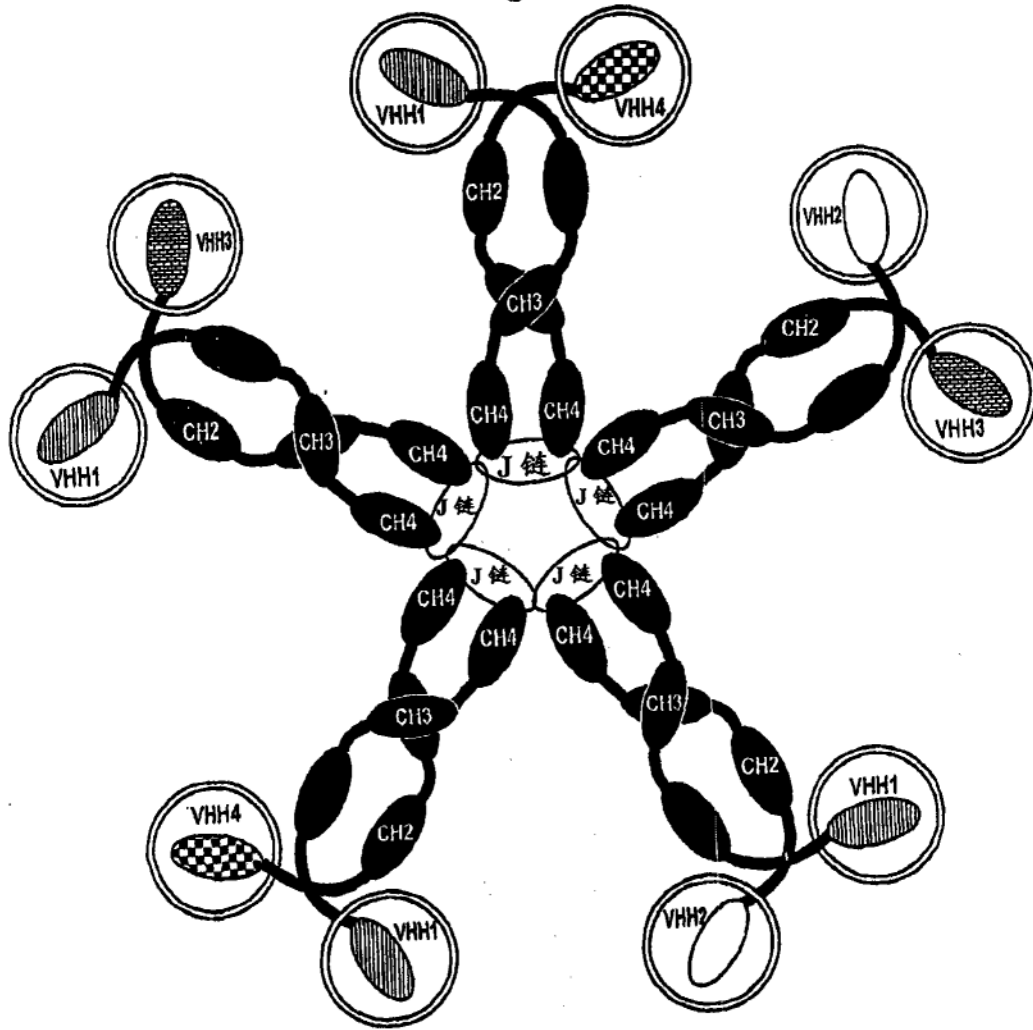


图5

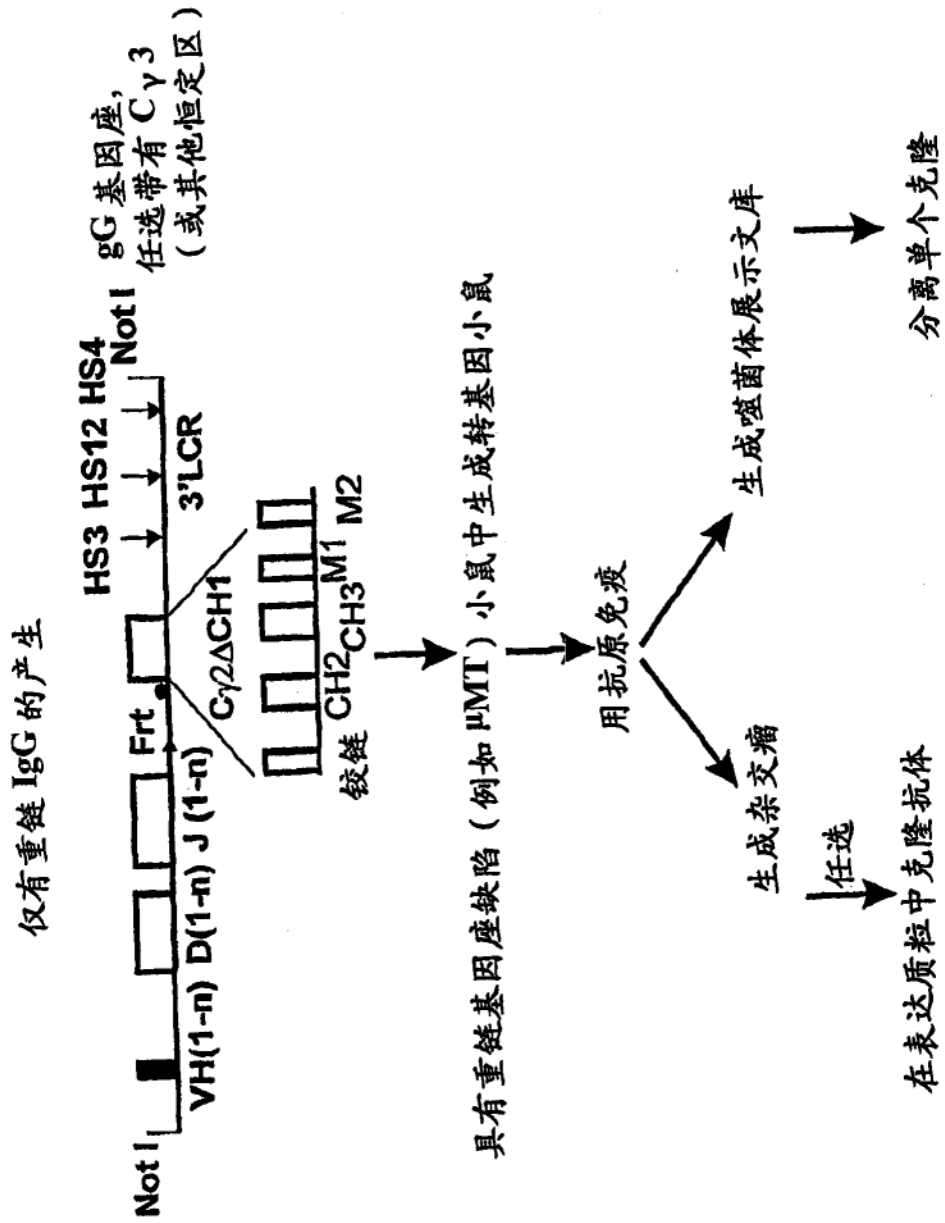


图6

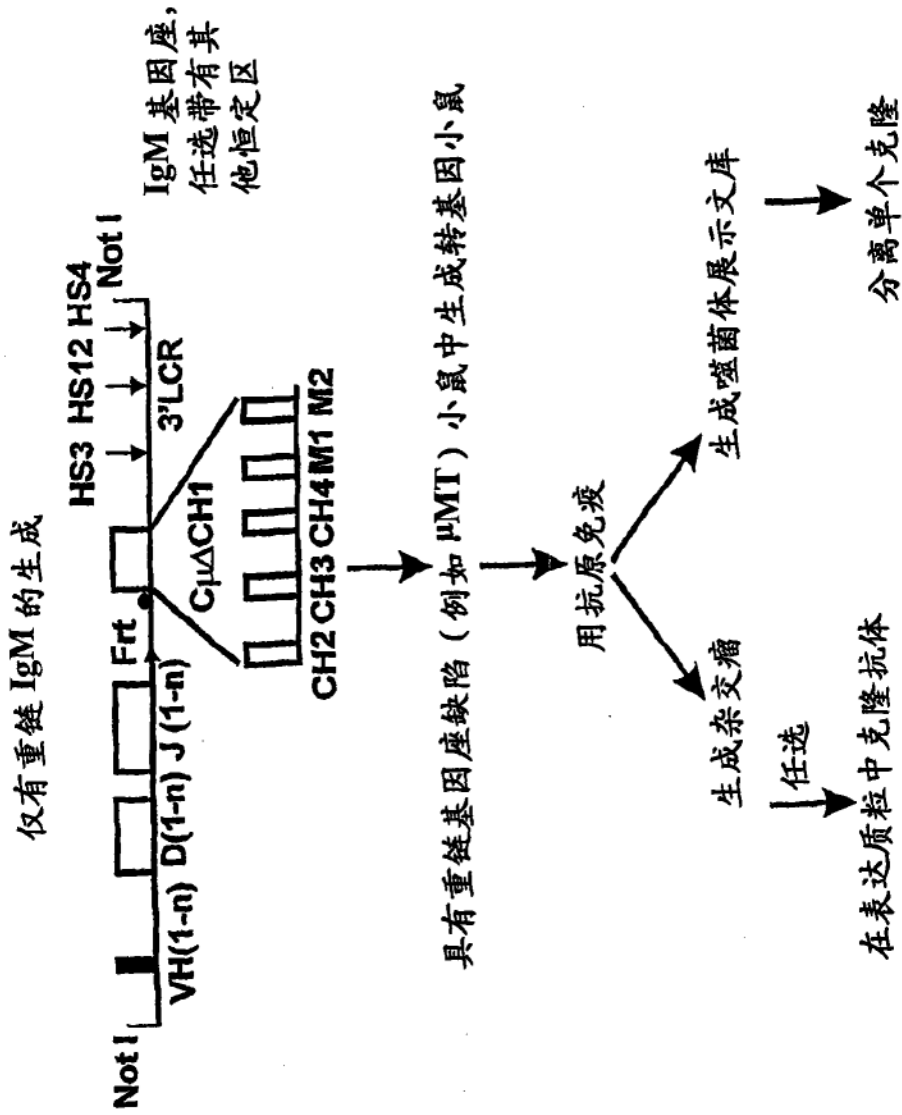


图7

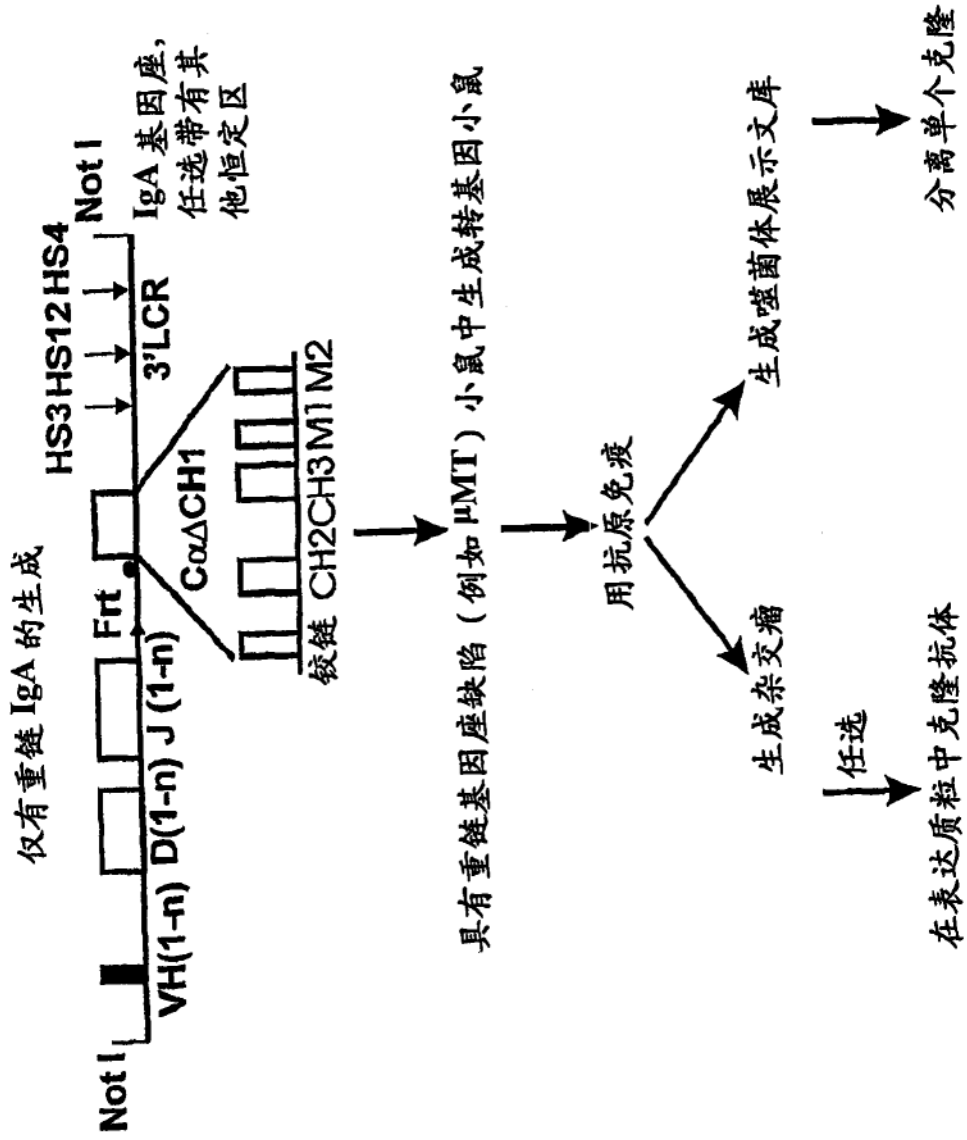


图8



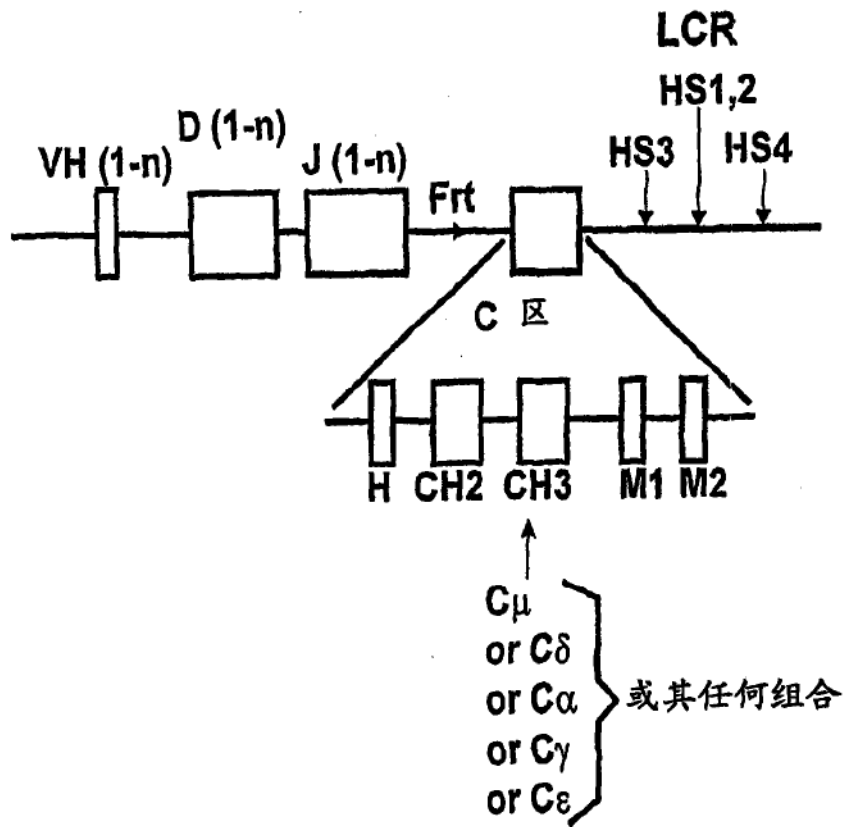


图10

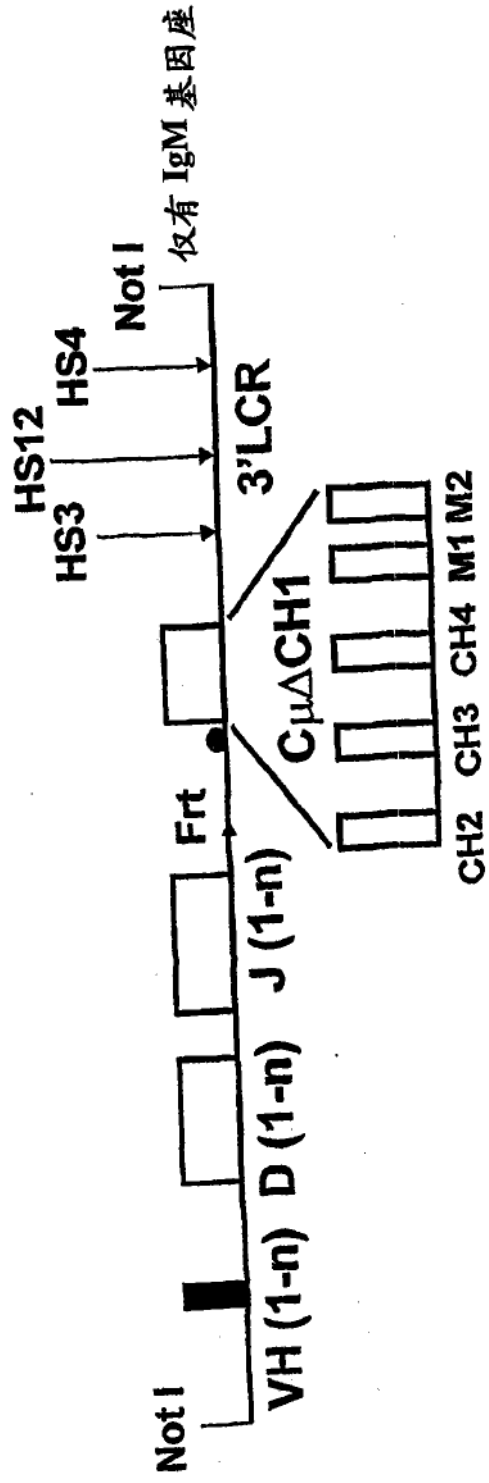


图11

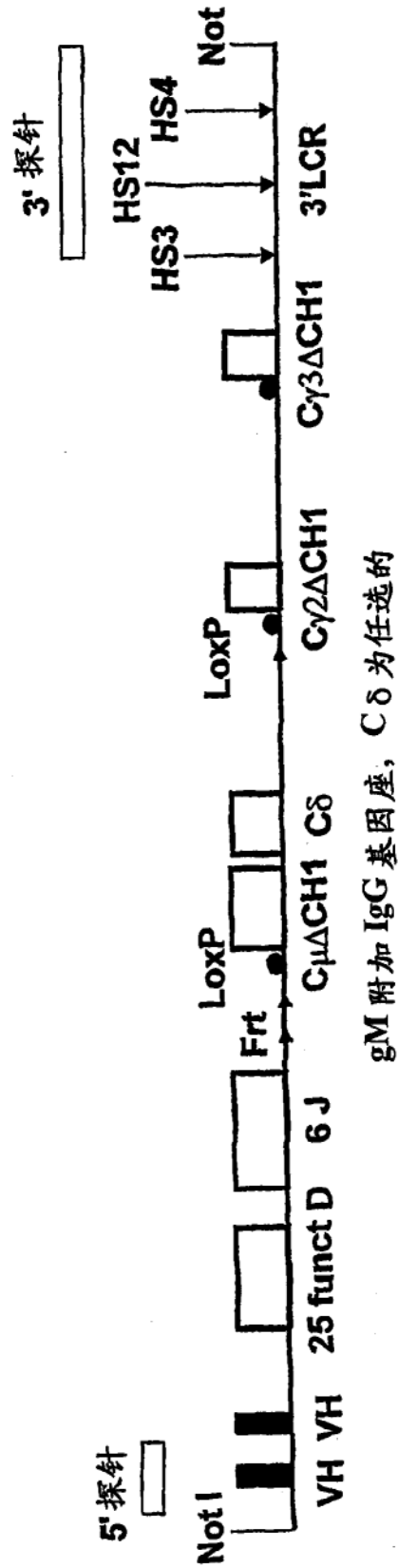


图12

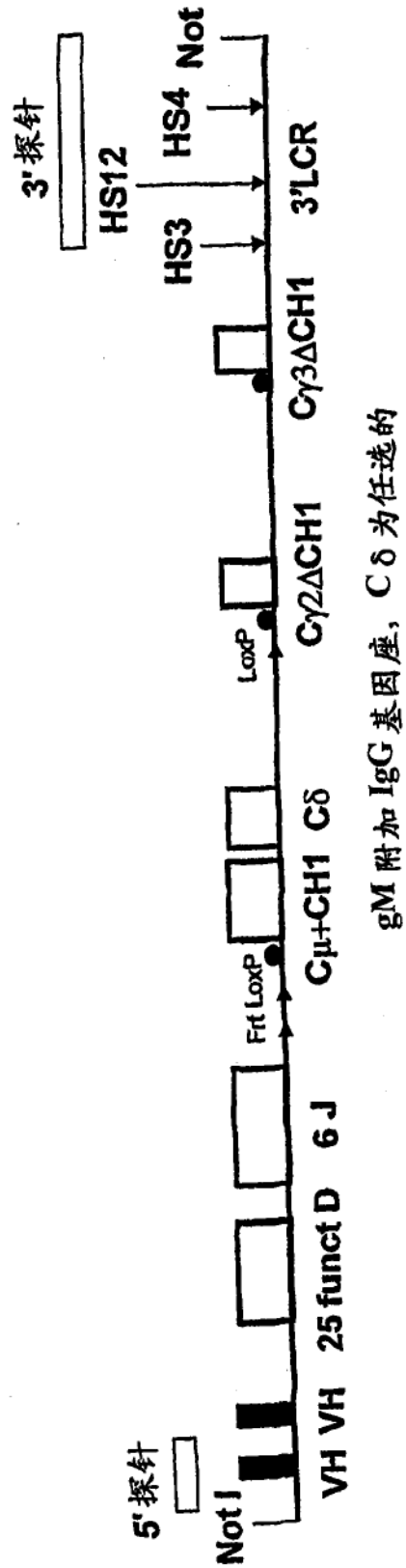


图13

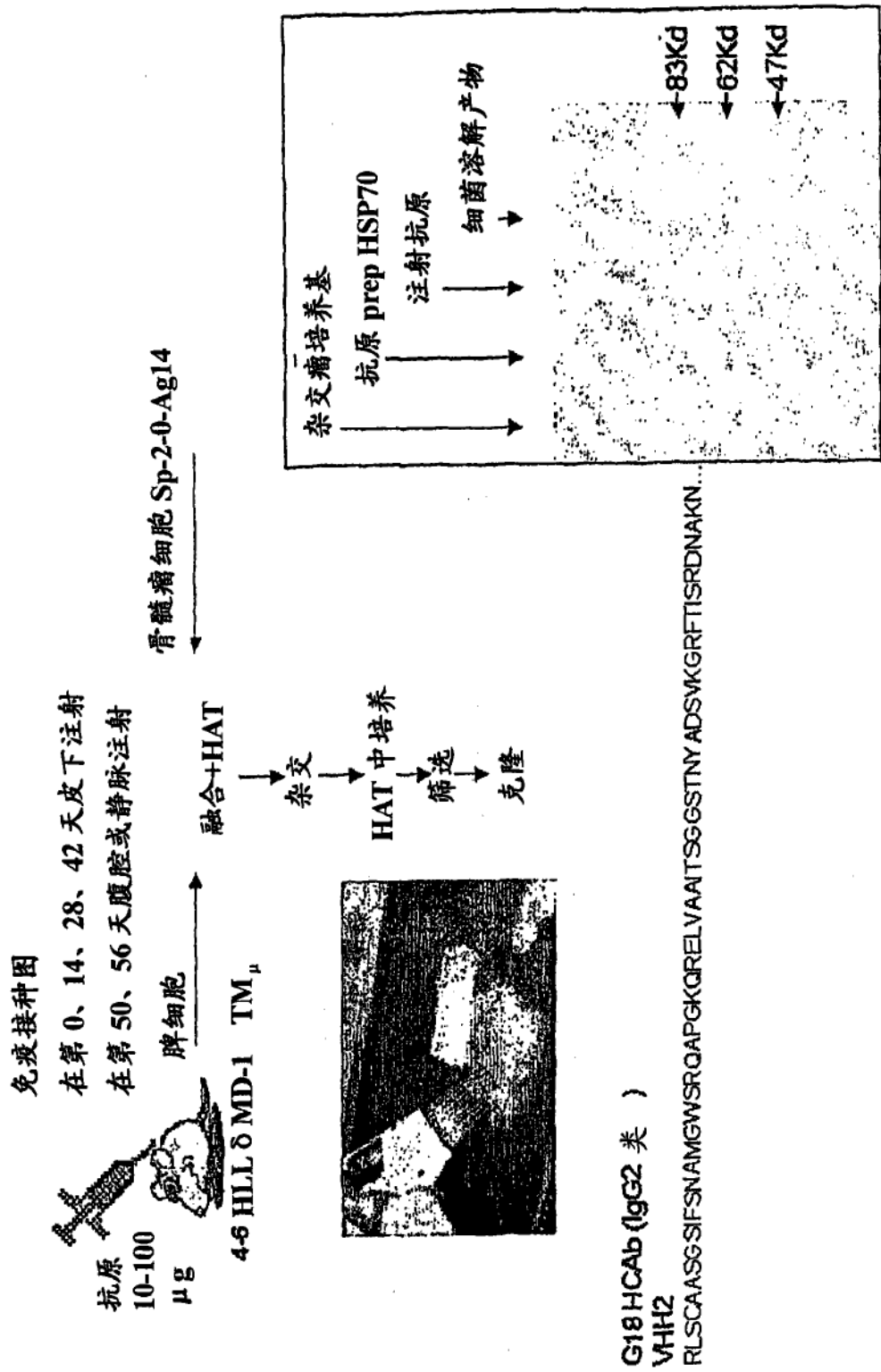


图14

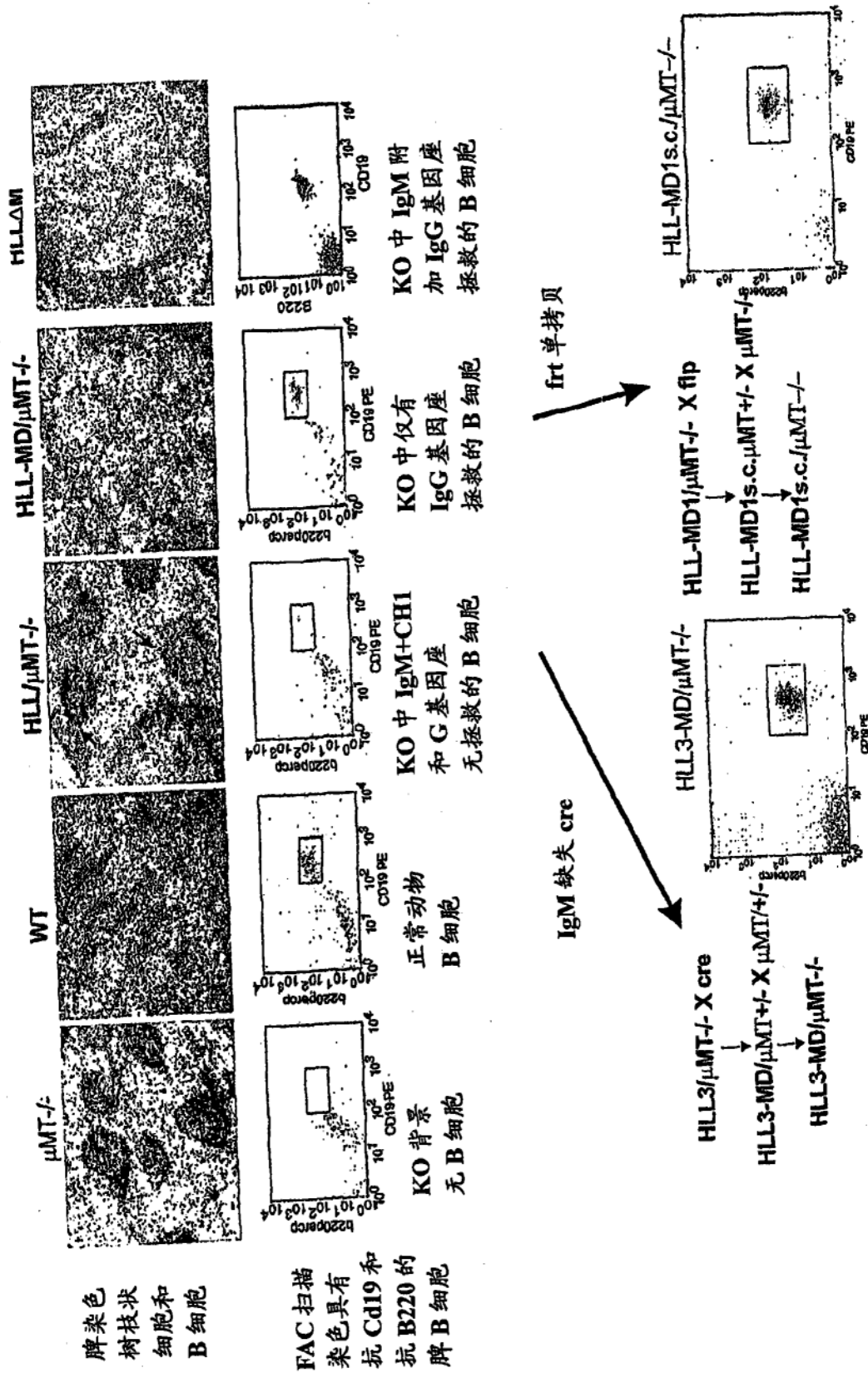


图15

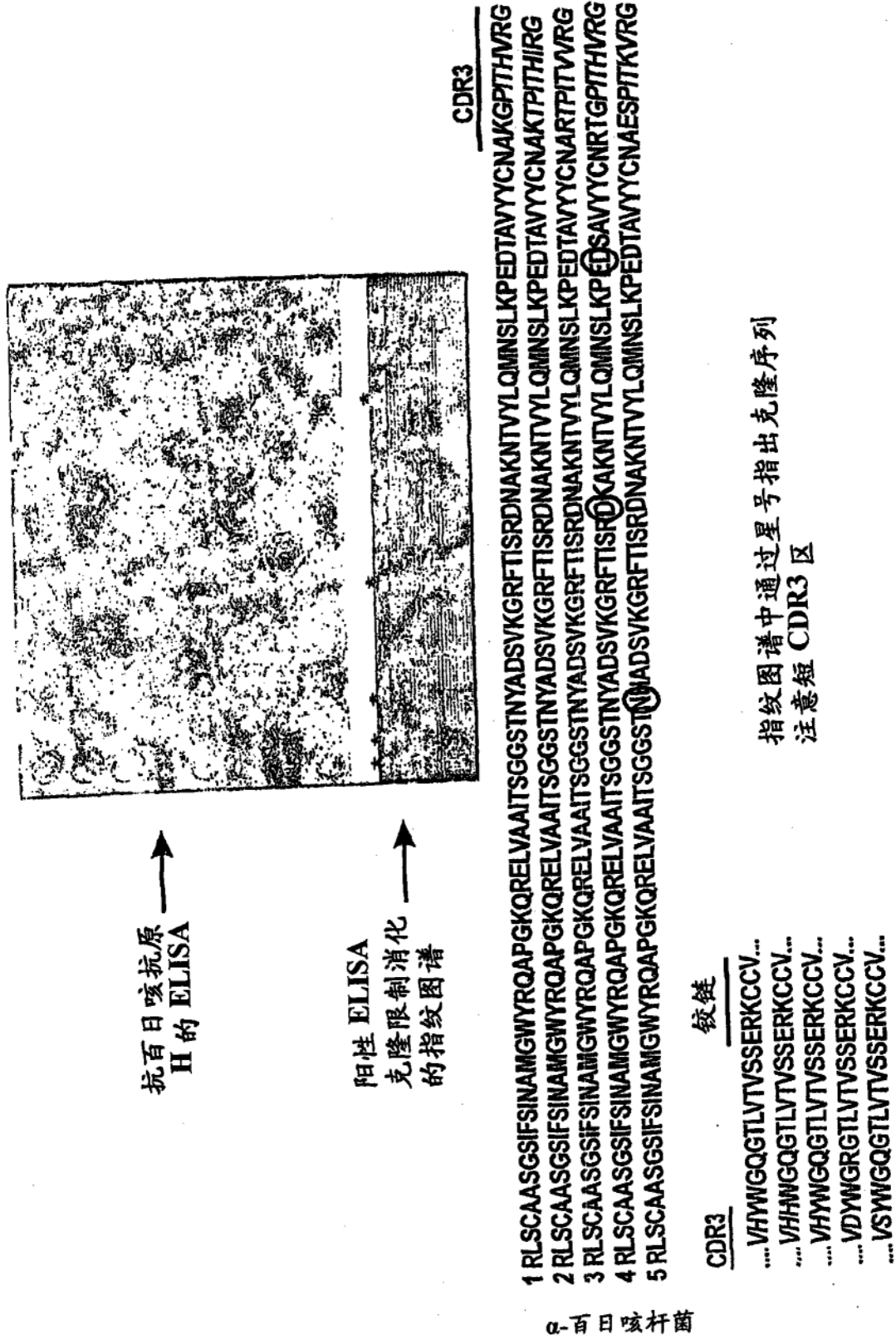


图16



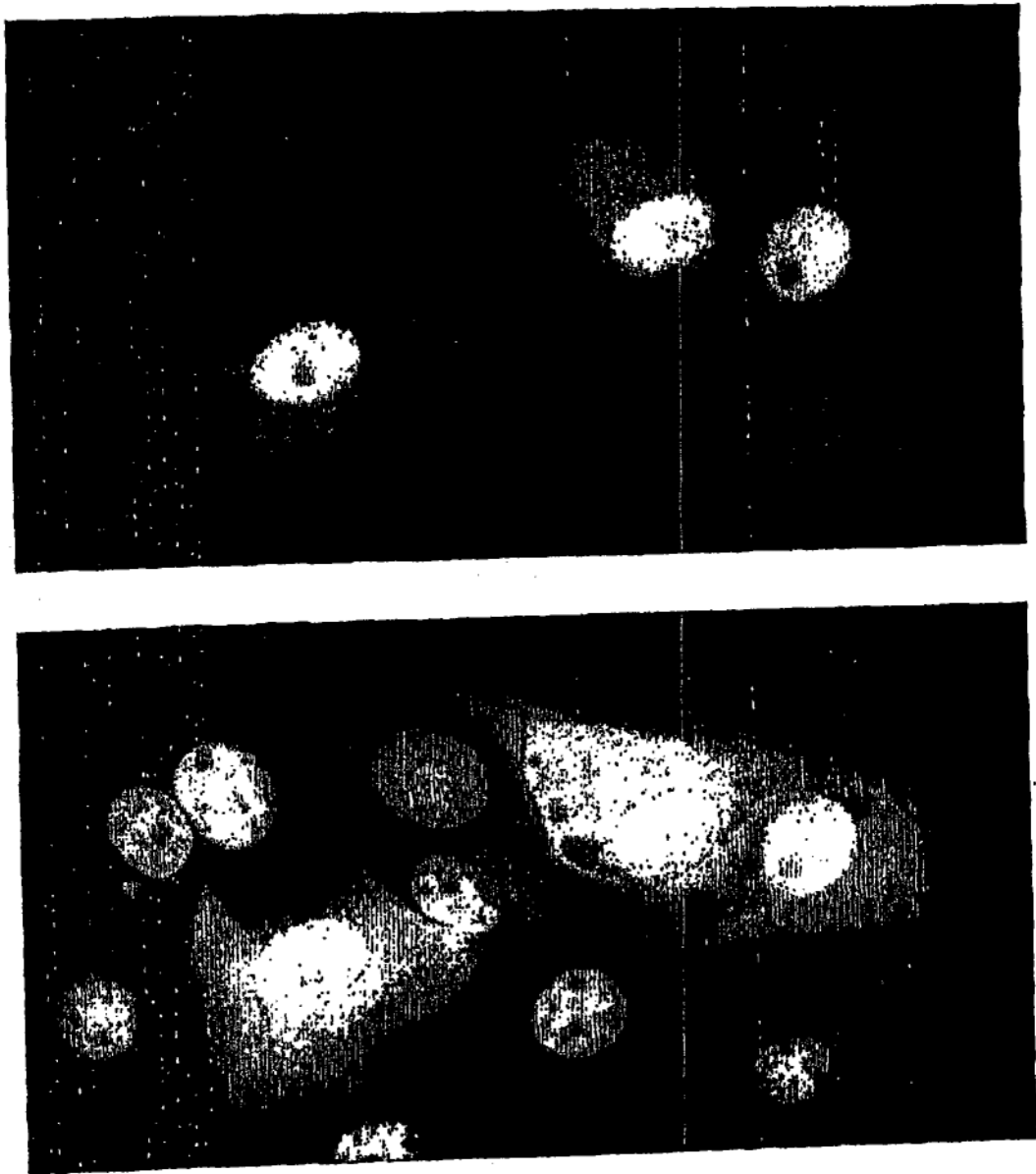


图18

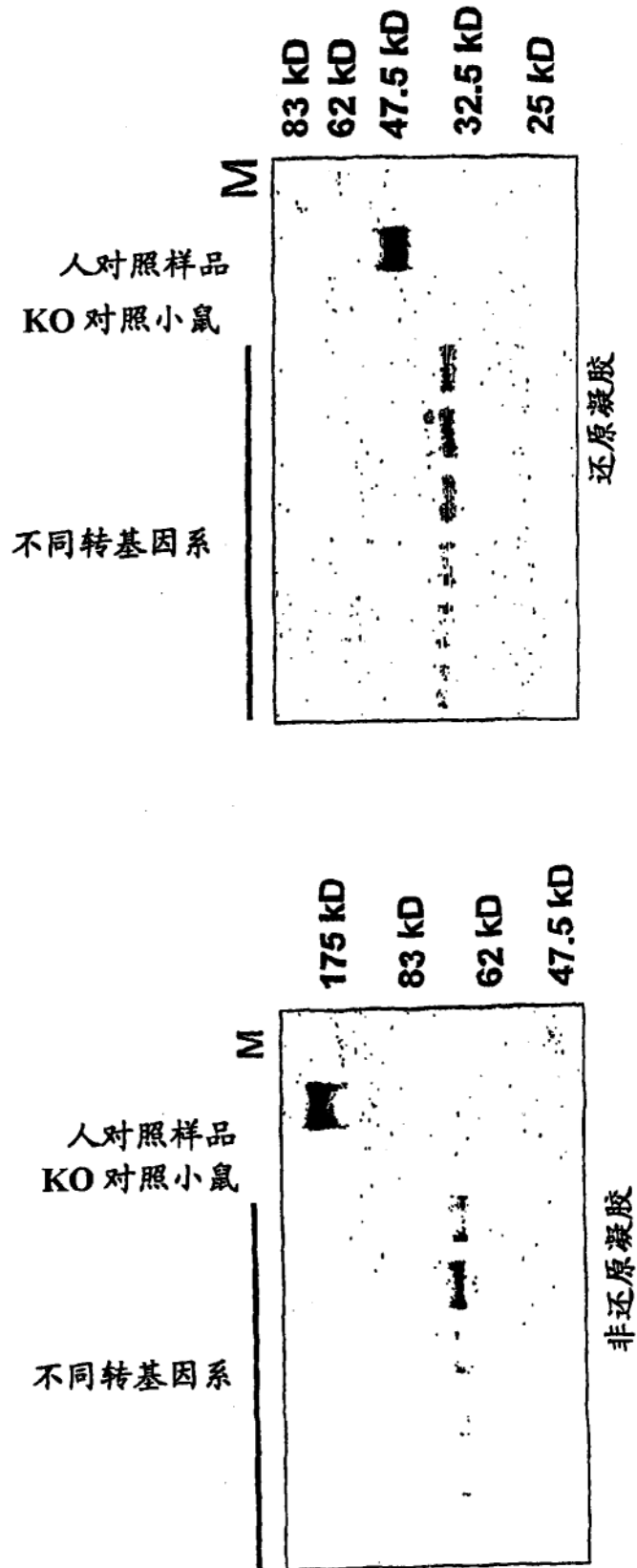


图19

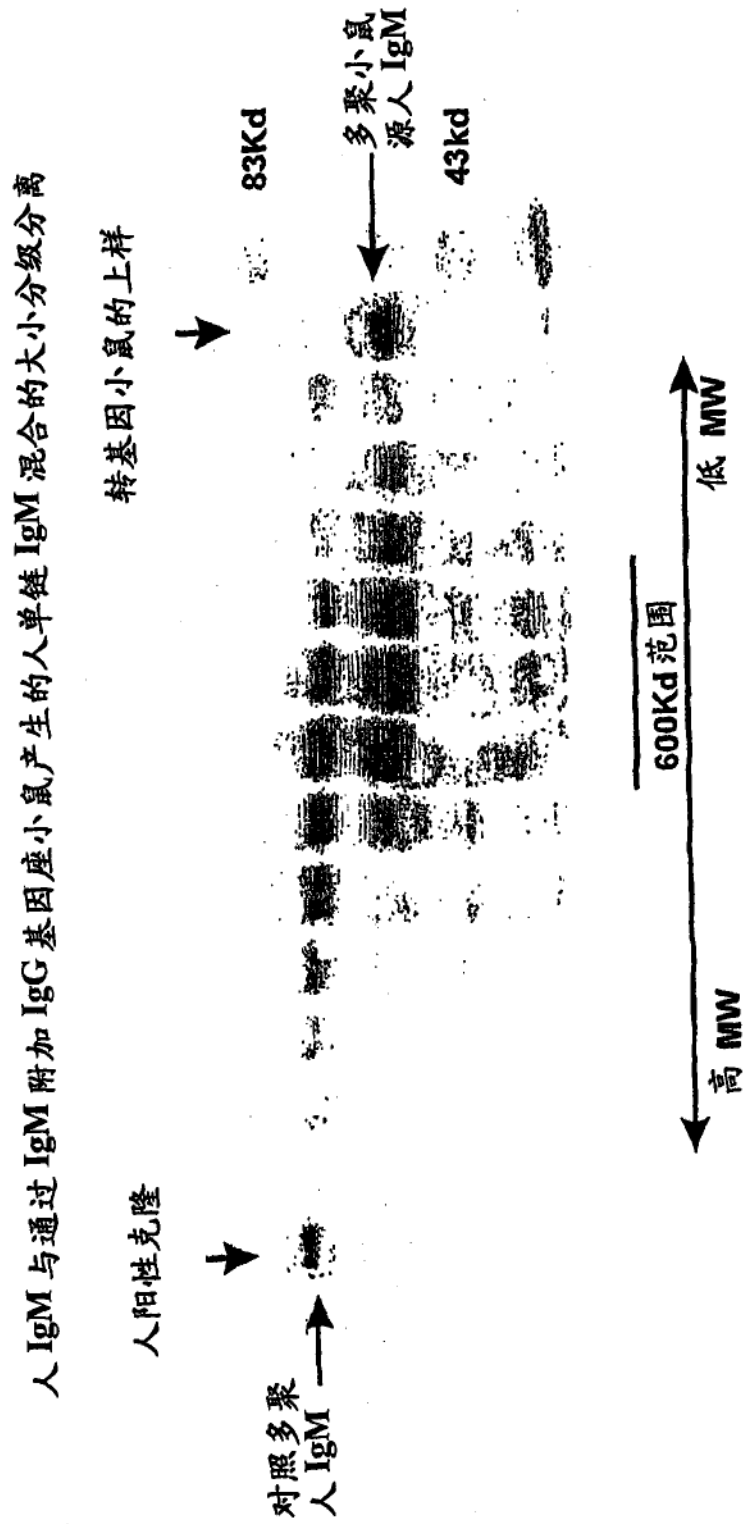


图20

抗人 TNF  $\alpha$  的单链 IgM 和 IgG 抗体的 ELISA

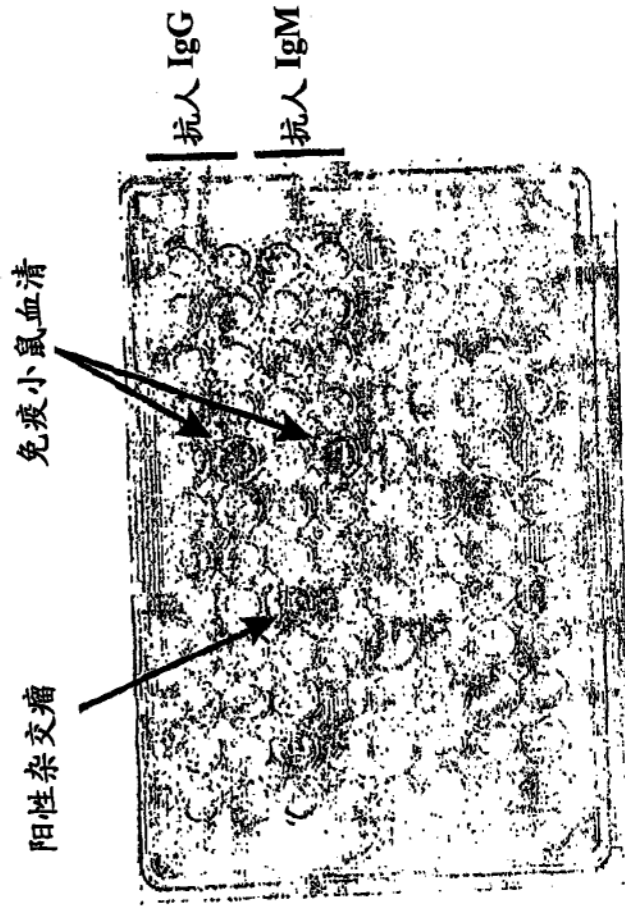


图21

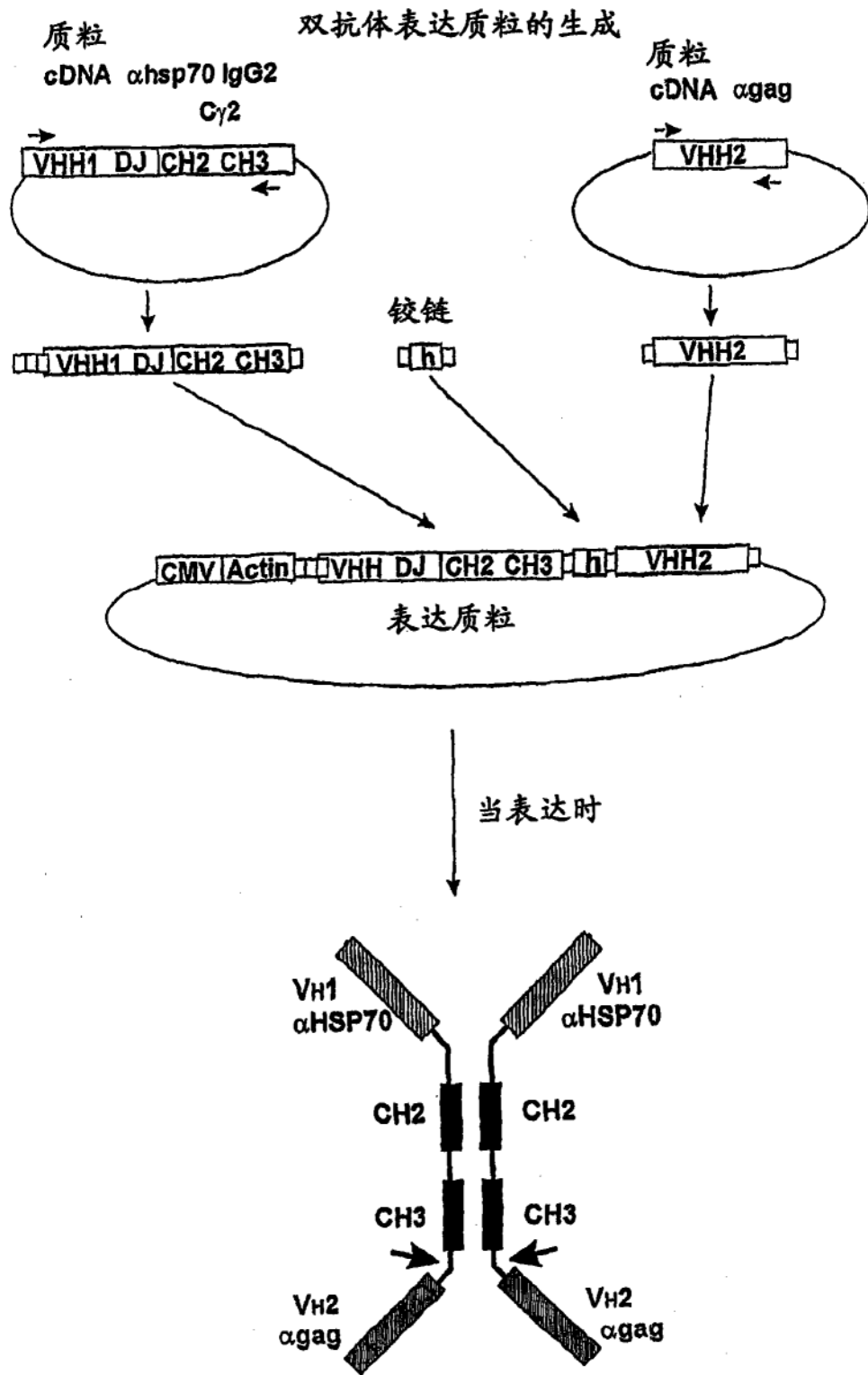


图22

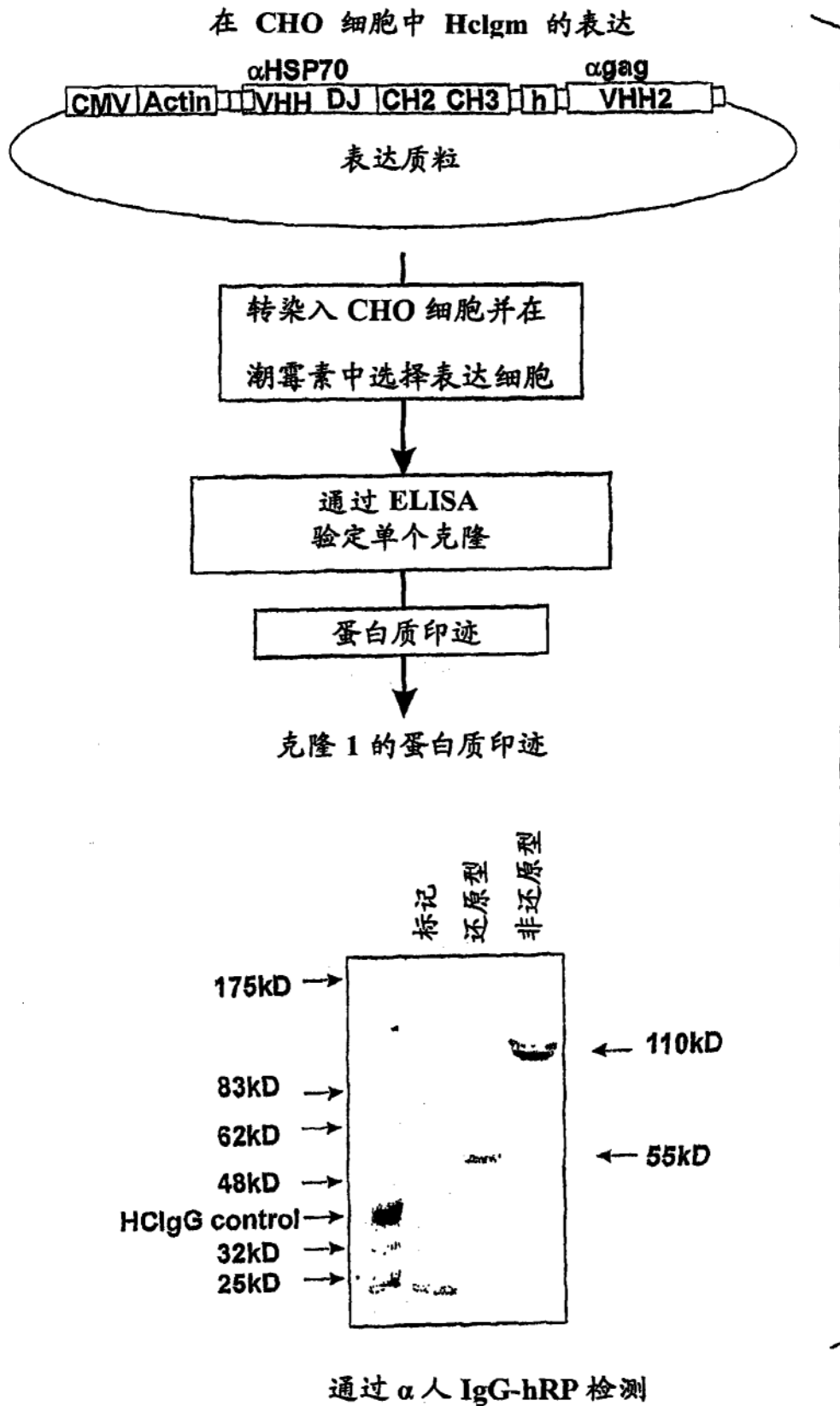


图23

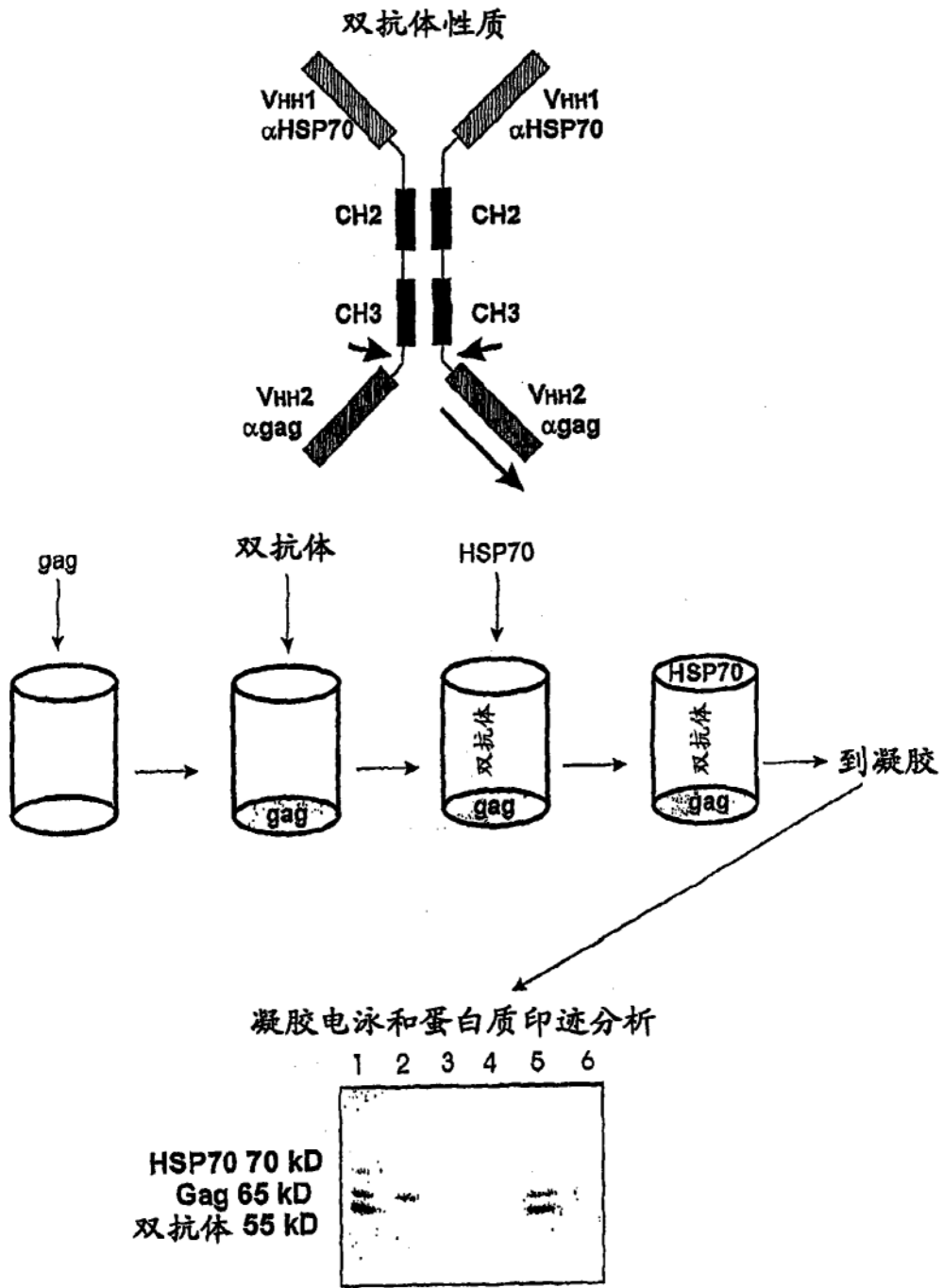


图24

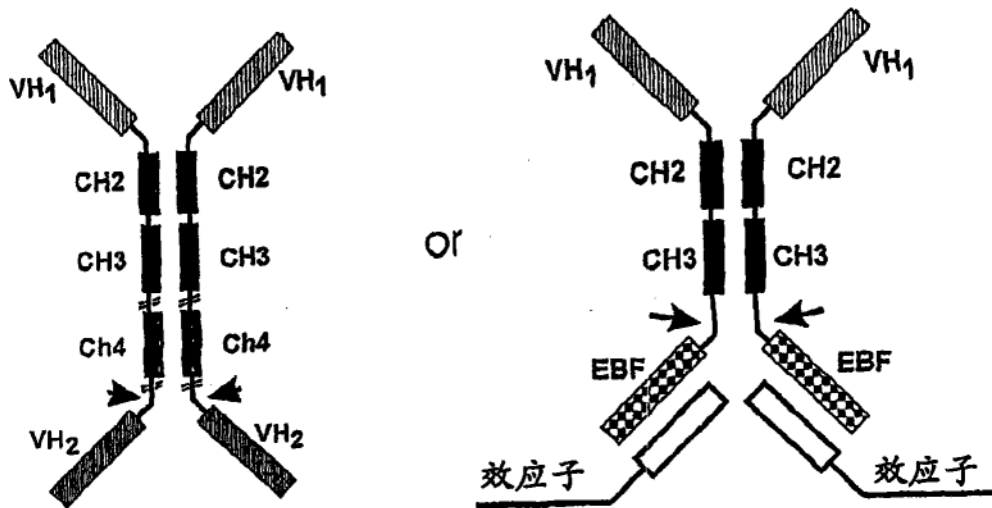
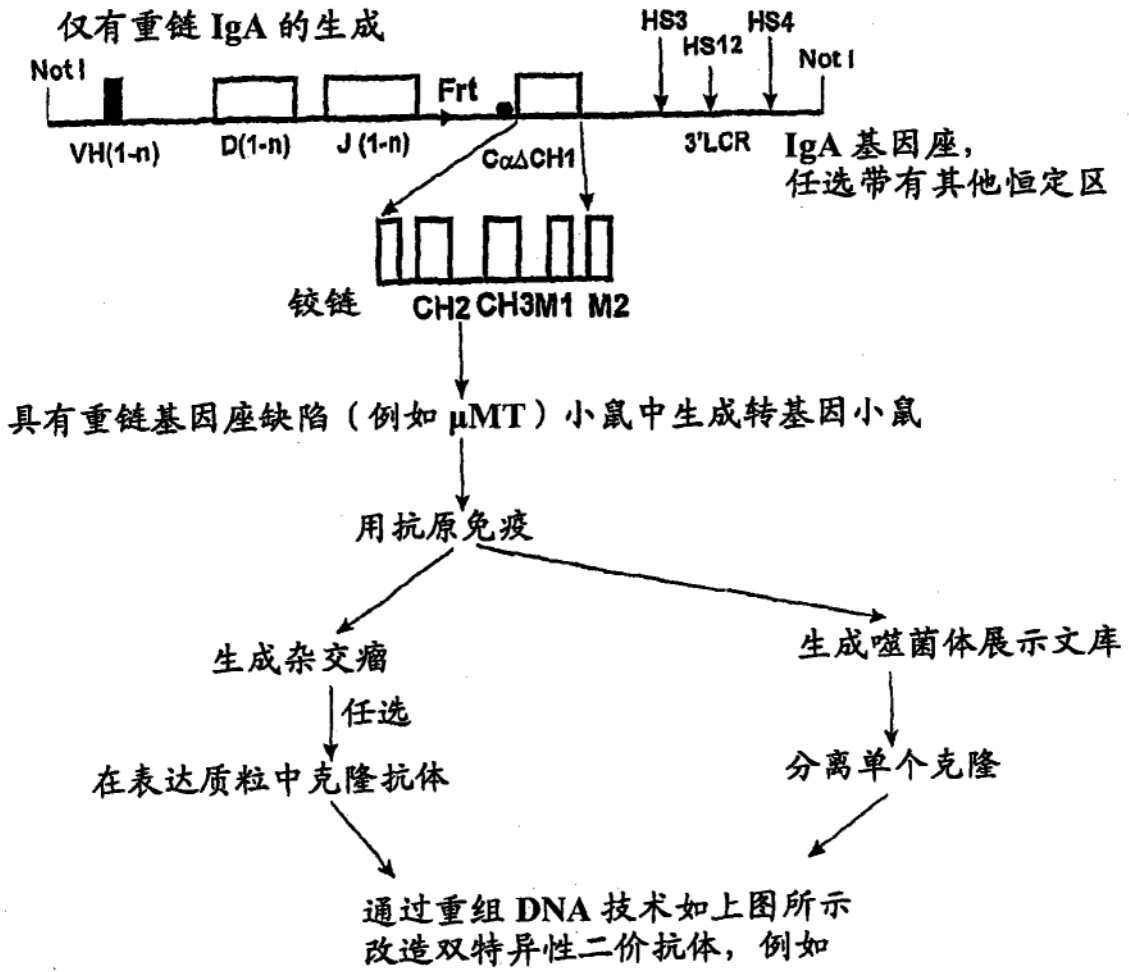
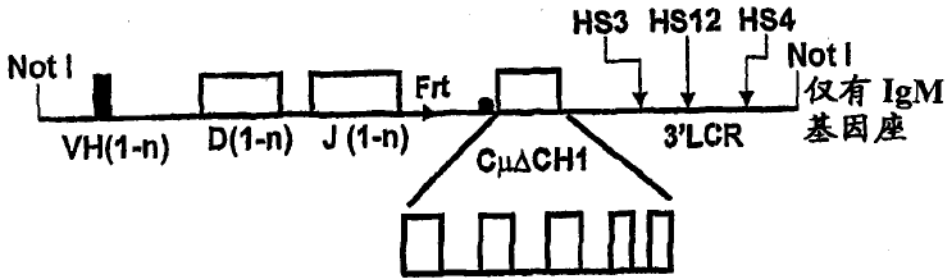


图25

多价仅有 IgM 抗体的生成



具有重链基因座缺陷 (例如 μMT) 小鼠中生成转基因小鼠

用抗原免疫

生成杂交瘤

生成噬菌体展示文库

在质粒中克隆抗体

分离单个克隆

不同特异性 IgM 如不同 VH sol 的共表达

通过重组 DNA 技术 如上图所示改造双 特异性二价抗体, 例如

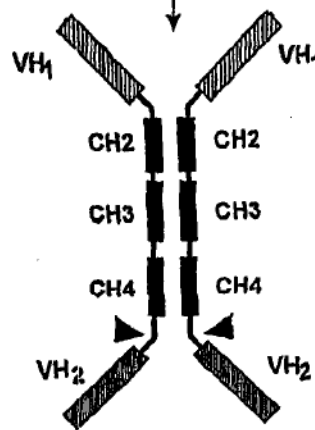
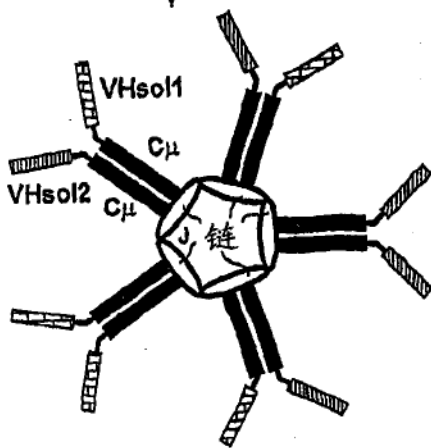


图26