



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103242451 B

(45)授权公告日 2017. 11. 21

(21)申请号 201310087033.X

(22)申请日 2006.12.05

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103242451 A

(43)申请公布日 2013.08.14

(30)优先权数据

60/751,196 2005.12.16 US

60/782,332 2006.03.14 US

PCT/US2006/010762 2006.03.24 US

11/389,358 2006.03.24 US

11/391,584 2006.03.28 US

PCT/US2006/012084 2006.03.29 US

PCT/US2006/025499 2006.06.29 US

11/478,021 2006.06.29 US

60/864,530 2006.11.06 US

(62)分案原申请数据

200680052809.2 2006.12.05

(73)专利权人 IBC医药公司

地址 美国新泽西州

(72)发明人 张健行 大卫·高德宝

爱得盟·罗希

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 梁谋

(51)Int.Cl.

C07K 16/46(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

(56)对比文件

US 2003198956 A1,2003.10.23,

US 2003232420 A1,2003.12.18,

US 20040018587 A1,2004.01.29,

US 20050003403 A1,2005.01.06,

审查员 夏颖

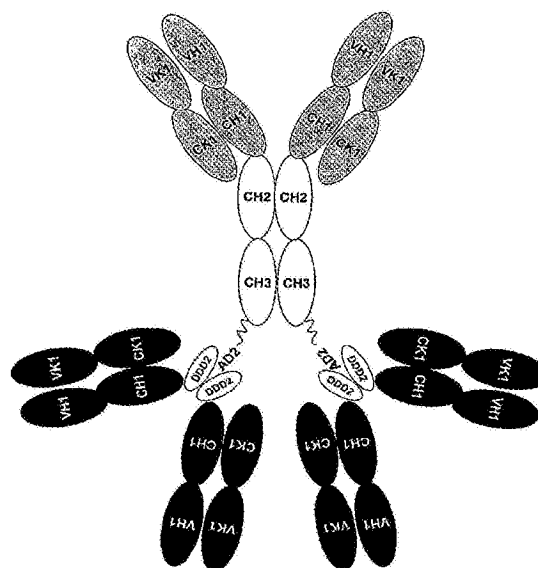
权利要求书1页 说明书81页
序列表11页 附图33页

(54)发明名称

基于免疫球蛋白的多价生物活性装配体

(57)摘要

本发明涉及确定组分的稳定拴结结构的方法和组合物,所述稳定拴结结构可能具有多种功能和/或结合特异性。优选实施方案涉及包含一个或多个IgG抗体片段的六聚稳定拴结结构,并且该结构可以是单特异性或双特异性。所公开的方法和组合物提供了容易、通用的获得具有基本上任何功能和/或结合特异性的稳定拴结结构的途径。所述稳定拴结结构可以被施用至受治疗者用于诊断和/或治疗用途,例如用于治疗癌症或自身免疫疾病。所述稳定拴结结构可以与多种已知的效应物结合和/或耦合,所述效应物如药物、酶、放射性核素、治疗剂和/或诊断剂。



1. 一种具有六聚稳定拴结结构的六聚复合体,其包含与两个SEQ ID NO: 4的AD2部分共价连接的IgG抗体和四个相同或不同IgG的抗体片段,其中每个片段均与SEQ ID NO: 2的DDD2部分共价连接;所述AD2部分与所述DDD2部分结合,其中所述复合体通过AD2部分与DDD2部分之间的二硫键被稳定,其中所述抗体片段是Fab片段并且所述AD2部分与所述IgG抗体的C末端通过编码肽间隔区的由SEQ ID NO: 29组成的序列共价连接,所述DDD2部分与所述Fab片段的C-末端通过编码肽间隔区的由SEQ ID NO: 38组成的序列共价连接,

其中所述IgG抗体和所述抗体片段是嵌合或人源化的抗体和抗体片段,

其中所述IgG抗体和抗体片段是选自以下的组合:

- (a) 结合CD20的IgG抗体和结合CD20的Fab片段,
- (b) 结合CD22的IgG抗体和结合CD20的Fab片段,或
- (c) 结合CD20的IgG抗体和结合CD22的Fab片段。

2. 如权利要求1所述的六聚复合体,其中所述Fab片段与IgG抗体结合相同的抗原表位。

3. 如权利要求1所述的六聚复合体,其中所述Fab片段与IgG抗体结合不同的抗原表位。

4. 如权利要求1所述的六聚复合体,其中所述抗体和抗体片段为hA20或hLL2和其片段。

5. 如权利要求1所述的六聚复合体,其中所述Fab片段选自由hA20和hLL2的Fab片段组成的组。

6. 如权利要求1所述的六聚复合体,其进一步包含与所述结构共价连接的一个或多个效应物或载体。

7. 如权利要求6所述的六聚复合体,其中所述效应物为诊断剂、治疗剂、放射性同位素、显像剂、抗血管生成剂、药物、酶、结合分子、免疫调节剂、寡核苷酸、激素、可光检测的标记、肽、毒素、造影剂、顺磁标记、超声标记、促凋亡剂、脂质体、纳米粒子或其组合。

8. 如权利要求6所述的六聚复合体,其中所述效应物为化疗剂、细胞因子、前体药物、细胞表面受体的配体、螯合剂或染料。

9. 如权利要求6所述的六聚复合体,其中所述效应物为趋化因子或生长因子。

10. 如权利要求3所述的六聚复合体,其中所述IgG抗体和所述抗体片段与下述抗原组合结合:CD20/CD22。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的六聚复合体在制备用于治疗或预防受治疗者的疾病或病症的药物中的用途,其中所述疾病或病症为淋巴瘤。

12. 如权利要求11所述的用途,其中所述疾病或病症为淋巴瘤,并且所述IgG抗体和/或至少一个所述抗体片段具有对选自由以下组成的组的肿瘤相关抗原的结合亲和力:CD20和CD22。

13. 如权利要求11所述的用途,其中所述结构包含选自由以下组成的组的IgG抗体和抗体片段的组合:抗CD22 X 抗CD20。

基于免疫球蛋白的多价生物活性装配体

[0001] 本申请是申请日为2006年12月5日,申请号为“200680052809.2”,发明名称为“基于免疫球蛋白的多价生物活性装配体”的申请的分案申请。

[0002] 相关的申请

[0003] 本专利申请是下列申请的部分继续申请案:2006年3月24日提交的PCT/US2006/010762;2006年3月29日提交的PCT/US2006/012084;2006年6月29日提交的PCT/US2006/025499;2006年3月24日提交的序号为11/389,358的美国专利申请;2006年3月28日提交的序号为11/391,584的美国专利申请和2006年6月29日提交的序号为11/478,021的美国专利申请;这些申请要求对下列临时专利申请的优先权:2006年3月14日提交的第60/782,332号美国临时专利申请;2005年10月19日提交的第60/728,292号美国临时专利申请;2005年12月16日提交的第60/751,196号美国临时专利申请。本申请按35U.S.C. §119(e) 要求2005年12月16日提交的第60/751,196号美国临时专利申请和2006年11月6日提交的第60/864,530号美国临时专利申请的权益。上文引用的每篇申请的内容均通过引用整体结合入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及基于免疫球蛋白的多价生物活性装配体。

背景技术

[0005] 制备具有多种功能或结合特异性的基于抗体的试剂的现有技术存在很多限制。对于通过重组工程制备的试剂而言,此类限制可包括生产成本高、表达产率低、在血清中不稳定、在溶液中不稳定(导致形成聚集体或解离的亚基)、不确定的批组成(由于存在多种产物形式)、污染性副产物、功能活性或者结合亲和性/亲和力降低(由于空间因素或者构象改变)等。对于通过各种化学交联方法产生的试剂而言,高生产成本和纯化产物的异质性是两大限制。

[0006] 近年来,对抗体或可与多于一个抗原决定簇(也称为表位)结合的其他结合部分的关注日益增加。一般而言,天然存在的抗体和单克隆抗体具有两个识别相同表位的抗原结合位点。相反,双功能或者双特异性抗体(下文将仅使用术语“双特异性抗体”)是经合成或遗传改造的可与两个不同表位结合的结构。因此,同一分子构建体具有与两个不同抗原决定簇结合的能力。

[0007] 双特异性抗体可用于许多生物医学应用。例如,具有肿瘤细胞表面抗原和T细胞表面受体两个结合位点的双特异性抗体可引导T细胞对特定的肿瘤细胞的裂解。识别神经胶质瘤和T细胞上的CD3表位的双特异性抗体已成功用于治疗人类患者的脑肿瘤(Nitta等, Lancet.1990;355:368-371)。最近,已报道称为“双特异性T细胞啮合体”(BiTE)的一类新的双特异性抗体克服了参与效应细胞募集以发挥生物活性的大多数肿瘤靶向双特异性抗体的局限(Kufer等, Trends in Biotechnol.2004;22:238-244)。BiTE是重组的双特异性单链抗体,其由导向靶细胞表面抗原和T细胞上的CD3的两个不同单链Fc片段(scFv)通过柔性多肽连接体串联连接而成(Mack等, Proc Natl Acad Sci U.S.A.1995;92:7021-7025)。BiTE

产生于哺乳动物细胞,并且与其他CD3定向双特异性抗体相反,其能够有效地再引导人外周T淋巴细胞杀伤靶细胞,而无需任何的效应T细胞的预刺激或共刺激(Mack等,J Immunol.1997;158:3965-3970;Loffler等,Blood.2000;95:2098-2103)。已表明,低至10-100pg/mL(~ 0.1 -2pM)的BiTE浓度足以在体外实现最大靶细胞裂解的一半(Dreier等,Int J Cancer.2002;100:690-697),而在小鼠模型中,亚微克量的BiTE可以阻止肿瘤生长(Dreier等,J Immunol.2003;170:4397-4404;Schlereth等,Cancer Res.2005;65:2882-2889)。

[0008] 已知有多种制备双特异性抗体的方法。例如,2004年2月11日提交的第20050002945号美国专利申请公布(其完整内容通过引用结合入本文)公开了双特异性和多特异性抗体的构建和使用的方法。双特异性抗体可通过四源杂交瘤方法制备,该方法包括两个不同杂交瘤的融合,每个杂交瘤产生识别不同抗原位点的单克隆抗体(Milstein和Cuellar,Nature,1983;305:537-540)。融合的杂交瘤能够合成两种不同的重链和两种不同的轻链,它们可以随机缔合产生10种不同抗体结构的异质群体,其中只有一个(占总抗体分子的1/8)是双特异性的,因此必须进一步将其从其他形式中纯化出来,但是即使这方法可行,其也不具备成本效益。此外,融合的杂交瘤经常在细胞遗传学上比亲本杂交瘤更不稳定,使制备细胞系的产生更加困难。

[0009] 另一种制备双特异性抗体的方法使用异双功能交联剂来化学拴结两个不同的单克隆抗体,以便所得的杂交物将与两个不同靶标结合(Staerz等,Nature,1985;314:628-631;Perez等,Nature,1985;316:354-356)。通过此方法产生的双特异性抗体基本上为两个IgG分子组成的异轭合物,其缓慢扩散入组织,并且很快被从循环中清除。双特异性抗体还可通过下述方法制备:将两个亲本单克隆抗体中的每一个均还原为相应的半分子,然后将这些半分子进行混合和再氧化以获得杂种结构(hybrid structure)(Staerz和Bevan,Proc Natl Acad Sci U S A.1986;83:1453-1457)。替代的方法包括使用适当的连接体化学交联两个或三个单独纯化的Fab'片段。例如,欧洲专利申请0453082公开了将三马来酰亚胺化合物用于制备双特异性或三特异性抗体样结构。第6,511,663号美国专利提供了通过连接结构将三个或四个Fab片段彼此共价连接,以制备三价和四价单特异性抗原结合蛋白的方法。所有这些化学方法均不适合商业化开发,原因是生产成本高、生产过程费力、纯化步骤多、产量低(<20%)和产品不纯。

[0010] 其他方法包括提高产生杂交瘤的效率,其通过逆转录病毒衍生的穿梭载体将不同的选择标志物基因转入相应的亲本杂交瘤,然后对亲本杂交瘤进行融合(DeMonte等,Proc Natl Acad Sci U S A.1990;87:2941-2945);或者,使用包含不同抗体的重链和轻链基因的表达质粒转染杂交瘤细胞系。这些方法也面临上文讨论的不可避免的纯化问题。

[0011] 第5,582,996号美国专利公开了制备由来自相同或不同抗体的Fab片段组成的重组双特异性抗体的方法,所述Fab片段通过插入抗体重链恒定区区域的互补相互作用结构域缔合在一起。所述互补相互作用结构域选自互补的亮氨酸拉链或者一对肽段,一个肽段包含一系列带正电的氨基酸残基,而另一肽段则包含一系列带负电的氨基酸残基。此方法的一个限制在于:除非同时包括两个Fab亚基,否则包含融合的互补相互作用结构域的单个Fab亚基对其靶抗原的亲和力大大下降。

[0012] 通过重组DNA技术制备的抗体离散型V_H和V_L结构域可以彼此配对形成具有结合能

力的二聚体(重组Fv片段)(第4,642,334号美国专利)。但是,此类非共价缔合分子在生理条件下不具有足以具备任何实际用途的稳定性。同源V_H和V_L结构域可用具有适当组成和长度的肽连接体(通常由超过12个的氨基酸残基组成)连接,以形成具有结合活性的单链Fv(scFv)。制备scFv的方法参见第4,946,778号美国专利和第5,132,405号美国专利。将所述肽连接体的长度减至少于12个氨基酸残基,可防止V_H和V_L结构域在同一链上配对,而迫使V_H和V_L结构域与其他链上的互补结构域配对,从而形成功能性多聚体。用具有3至12个氨基酸残基的连接体连接的V_H和V_L结构域多肽链主要形成二聚体(称为二链抗体(diabody))。使用0至2个氨基酸残基的连接体则有利于形成三聚体(称为三链抗体(triabody))和四聚体(称为四链抗体(tetrabody)),但是除了连接体长度之外,低聚的精确模式还显示依赖于V-结构域的组成和方向(V_H-连接体-V_L或V_L-连接体-V_H)。

[0013] 已经使用由5个或更少氨基酸残基组成的肽连接体获得了多价单特异性二链抗体、三链抗体和四链抗体。双特异性二链抗体也已制得,其是由两个不同scFv组成的异型二聚体,每个scFv由通过短的肽连接体与另一抗体的V_L结构域连接的一个抗体的V_H结构域组成;其制备方法是使用双顺反子表达载体,该载体在一个顺反子中包括具有V_{H1}-连接体-V_{L2}的重组基因构建体,且在另一顺反子中包括具有V_{H2}-连接体-V_{L1}的第二个重组基因构建体(Holliger等,Proc Natl Acad Sci U S A.1993;90:6444-6448;Atwell等,Mol Immunol.1996;33:1301-1302;Holliger等,Nature Biotechnol.1997;15:632-631;Helfrich等,Int.J Cancer.1998;76:232-239;Kipriyanov等,Int J Cancer.1998;77:763-772;Holliger等,Cancer Res.1999;59:2909-2916)。

[0014] 最近还报道了具有双特异性的四价串联二链抗体(称为tandab)(Cochlovius等,Cancer Res.2000;60:4336-4341)。该双特异性tandab是两个相同多肽的二聚体,每个多肽均包含两个不同抗体的四个可变区(V_{H1}、V_{L1}、V_{H2}、V_{L2}),这些可变区的连接方向有利于自缔合后形成两个各自具有两个不同特异性的潜在的结合位点。

[0015] 到目前为止,构建表达双特异性或者三特异性的三链抗体的载体尚未成功。不过,已报道包含胶原凝素颈区的多肽可三聚化(Hoppe等,FEBSLetters.1994;344:191-195)。第6,190,886号美国专利公开了从包含胶原凝素颈区的融合蛋白制备同型三聚体或异型三聚体。

[0016] 第5,844,094号美国专利、第5,837,242号美国专利和W098/44001公开了通过改变连接体长度制备多价和多特异性的基于scFv的试剂的方法。第5,989,830号美国专利和第6,239,259号美国专利公开了通过构建两个多肽链(一个包含来自至少两个抗体的V_H结构域,且另一个包含相应的V_L结构域)制备多价和多特异性的基于scFv的试剂的方法。与使用先前技术方法产生多价和多特异性的基于scFv的试剂时常相关的共同问题是表达水平低、产物形式不纯、在溶液中不稳定(导致聚集)、在血清中不稳定和亲和力降低。

[0017] 第6,809,185号美国专利公开了重组制备的双特异性或三特异性抗体,其中CH1的C-末端和Fab的C_L各自融合至来自相同或不同单克隆抗体的scFv。此“三体(Tribody)”技术的主要缺陷包括所连接的scFv的结合亲和力降低、产物形式不纯和在溶液中不稳定(导致聚集)。

[0018] 因此,本领域仍需要制备具有单特异性或多特异性或功能性的多价结构的方法,所述多价结构具有确定的组成、同质纯度和不变的亲和力,并可以高产率被制备而无需过

多的纯化步骤。此外,此类结构还必须在血清中足够稳定以适于在体内应用。需要易于构建和/或获得相对纯的形式、并具有单特异性或多特异性或功能性的稳定的多价结构。

[0019] 发明概述

[0020] 本发明公开了产生稳定拴结结构(tethered structures)的平台技术,所述结构可以是单特异性和/或单功能性的,或者可以具有多种功能或结合特异性,并且适合在体外和体内应用。在优选实施方案中,此类稳定拴结结构被制备为两种组分(本文称为A和B)通过两个不同肽序列(一个称为二聚化和停靠结构域(dimerization and docking domain, DDD),另一个则称为锚定结构域(anchoring domain, AD))之间特异的相互作用形成的复合体。在更优选实施方案中,所述DDD序列(在图1中表示为DDD1和DDD2)衍生自cAMP依赖性蛋白激酶(PKA)的调节亚基(R),且所述AD序列(在图2中表示为AD1和AD2)衍生自在各种A激酶锚定蛋白(AKAP)中发现的、介导与PKA的R亚基缔合的特定区域。但是,技术人员将了解:其他二聚化和停靠结构域以及锚定结构域是已知的,且任何此类已知结构域都可在本发明要求保护的主题的范围内使用。本发明公开的方法和组合物实现了具有DDD/AD偶联系统的任何两个复合体的定点共价或非共价缔合。发现作为DDD结构特征的X-型四螺旋束二聚化模体(Newlon等,EMBO J.2001;20:1651-1662;Newlon等,Nature Struct Biol.1999;3:222-227)也存在于其他蛋白类别,如S100蛋白(例如,S100B和钙周期蛋白),和转录因子中的肝细胞核因子(HNF)家族(例如,HNF-1 α 和HNF-1 β)。由于S100蛋白具有如肿瘤发生等生物活性,它们可能不太适用于此用途。

[0021] 参与信号转导或者转录激活的300多种蛋白质包含被称为不育 α 模体(SAM)结构域的65-70个氨基酸的模块,该模块具有存在于其二聚化界面的X-型四螺旋束的变异。对于S100B,此X-型四螺旋束使得每个二聚体能够与衍生自c-末端调节结构域(残基367-388)的两个p53肽以微摩尔亲和力结合(Rustandi等,Biochemistry,1998;37:1951-1960)。相似地,已表明HNF-1 α (HNF-p1)的N-末端二聚化结构域通过HNF-p1的二聚体与DCoH(HNF-1的二聚化辅助因子)的二聚体缔合(Rose等,Nature Struct Biol.2000;7:744-748)。在替代实施方案中,这些天然存在的系统也可用于本发明要求保护的方法和组合物,以提供具有多种功能或结合特异性的稳定的多聚结构。其他结合事件(如酶与其底物/抑制剂之间的结合,例如角质酶与磷酸酯(Hodneland等,Proc Natl Acad Sci USA.2002;99:5048-5052)),也可用于产生所述的两个缔合组分(“停靠”步骤),然后使这两个组分共价稳定(“锁定”步骤)。

[0022] 其他具有潜在用途的AD序列可参见序号为US2003/0232420A1的专利申请,其完整内容通过引用结合入本文。

[0023] 在示例性实施方案中,二元复合体的一个组分A是通过重组工程或者经由间隔区基团的化学耦合并将DDD序列连接至A的前体(称为A)而得到A/DDD结构(下文简称a)来制备的。因为a中的DDD序列影响二聚体的自发形成,所以A由a₂组成。二元复合体的另一个组分B是通过重组工程或者经由间隔区基团的化学耦合并将AD序列连接至B的前体(称为B)而得到B/AD结构(下文简称b)来制备的。a₂中包含的二聚化结构产生了用于结合b中包含的AD序列的停靠位点,该事实导致a₂与b容易缔合而形成组成为a₂b的二元复合体。在不同的实施方案中,此结合事件通过随后共价固定装配体的两个组分(例如通过二硫桥)的反应而得到进一步的稳定,其高效率地发生,因为初始的结合相互作用引导活性硫醇基团位点特异性地连

接。

[0024] 通过使半胱氨酸残基置于DDD和AD两个序列的关键位置(如DDD2和AD2中所示), a_2 和b之间可通过二硫桥发生共价结合相互作用,进而形成更有利于在体内应用的稳定拴结结构。所述稳定拴结结构同时保留了两个前体A和B的完整功能特性。本发明人不知道具有此独特的特征组合的双特异性组合物的任何先前技术。上文公开的设计性质上是模块化的本质,因为所选的两个前体中的每一个都可与DDD或AD连接,然后再进行组合。所述两个前体还可以相同($A=B$)或者不同($A\neq B$)。当 $A=B$ 时,所得的 a_2b 复合体由三个亚基的稳定拴结装配体(下文简称 a_3)组成。可作为前体的物质包括蛋白质、肽、肽模拟物、多核苷酸、RNAi、寡糖、天然或合成的多聚物、纳米粒子、量子点以及有机或无机化合物。其他具有潜在用途的前体的非限制性实例列于下面的表6-表10。

[0025] 除了使用二硫键连接防止组成性亚基解离外,也可使用增强稳定拴结结构的整体稳定性的其他方法。例如,可选择可商业途径获得的或者研究中使用的各种交联剂或方法用于此类目的。可能有用的试剂包括戊二醛,它已广泛用于通过交联组成性亚基以形成稳定的轭合物,进而探测非共价缔合的多聚蛋白的结构(Silva等,Food Technol Biotechnol.2004;42:51-56)。同样值得注意的还有两种包括蛋白质亚基的氧化交联的化学方法。一种是使用六组氨酸标签蛋白(Fancy等,Chem Biol.1996;3:551-559)或N-末端甘氨酸-甘氨酸-组氨酸标签蛋白(Brown等,Biochemistry.1998;37:4397-4406)的近位标记技术。这些标签紧密结合Ni(II),并且在用高酸氧化时生成能够介导包括蛋白质-蛋白质交联在内的多种氧化反应的Ni(III)物类。另一种技术称为PICUP(光诱导的非修饰蛋白交联),该技术使用 $[Ru(II)(bipy)_3]^{2+}$ 、过硫酸铵和可见光来诱导蛋白质-蛋白质交联(Fancy和Kodadek,Proc Natl Acad Sci USA.1999;96:6020-6024)。但是,如下文所述,许多用于化学交联肽、多肽、蛋白质或其他大分子物类的方法是本领域已知的,任何此类已知的方法均可用于共价稳定所述二元 a_2b 复合体。

[0026] 在更优选的实施方案中(更详细公开于下文实施例23-35),可以形成单特异性或双特异性的六聚复合体。例如,如图10、图11和图13所示,此类复合体可通过下列方法形成:在IgG部分的每个C-或N-末端连接一个AD2,然后所述IgG部分可与DDD2轭合的Fab片段或其他DDD2轭合的抗体或抗体片段结合,以形成六聚复合体。如实施例23-35中所述,与亲本抗体或片段相比,此类单特异性或双特异性六聚复合体表现出更高的结合亲和力和增强的效力。实施例23-35中公开了很多单特异性或双特异性的六聚稳定拴结结构。但是,技术人员应了解:这些实例是非限制性的,所公开的六聚结构中可包括多种抗原结合或者其他功能部分,表6-10对其中的一部分进行了讨论。

[0027] 技术人员应了解:上文所述的IgG或Fab片段可用其他类型的抗体、抗体片段或非抗体蛋白(在下文详细讨论)替代。所述稳定拴结结构可包含抗原结合组分和/或效应组分的不同组合。例如,与激活的血小板和组织纤溶酶原激活物(tPA)皆可反应的双特异性抗体不但通过抑制血小板聚集来防止进一步形成凝块,其还可通过将内源tPA募集到血小板表面来溶解已存在的凝块(Neblock等,Bioconjugate Chem.1991,3:126-31)。与毒素(如核糖核酸酶)连接的、包含针对内化肿瘤相关抗原(如CD74)的多价抗体结合组分的稳定拴结结构,对于选择性递送该毒素以破坏靶肿瘤细胞将非常有用。包含IL-4受体可溶组分(sIL-4R)和IL-13受体可溶组分(sIL-13R)的稳定拴结结构是治疗哮喘或变态反应的潜在治疗

剂。在防止凝块再形成方面,包含抗GPIIb/IIIa Fab片段的六聚、单特异性稳定拴结结构由于具有更高的结合亲和力而比其单价(ReoPro, Centocor)或双价类似物更加有效。在治疗类风湿性关节炎和某些其他自身免疫疾病(AID)时,包含多拷贝TNF α -R可溶组分的稳定拴结结构应该比Enbrel (Amgen)更有效地抑制TNF。

[0028] 本发明要求保护的方法和组合物还包括由连接至稳定拴结结构的一个或多个效应物或载体组成的轭合物。所述效应物或载体可非共价或者共价连接至所述稳定拴结结构,例如通过化学交联或者通过与双特异性或者多特异性稳定拴结结构结合,其中第一个特异性针对疾病相关靶标,而第二个特异性针对效应物和/或连接至所述效应物的半抗原,详见下文。根据预定用途,所述效应物可选自诊断剂、治疗剂、化疗剂、放射性同位素、显像剂、抗血管生成剂、细胞因子、趋化因子、生长因子、药物、前体药物、酶、结合分子、细胞表面受体的配体、螯合剂、免疫调节剂、寡核苷酸、激素、可光检测的标记、染料、肽、毒素、造影剂、顺磁标记、超声标记、促凋亡剂、脂质体、纳米粒子或其组合。此外,轭合物还可包含多于一个的相同或不同的效应物,或者多于一个的相同或者不同的载体。效应物和载体也可出现在同一轭合物中。当所述效应物为螯合剂时,所得的轭合物通常与放射性或非放射性的金属进行进一步络合。包含载体的轭合物还可进一步包括具有适合预定用途的诊断或治疗功能的试剂。

[0029] 在某些实施方案中,所述效应物或载体可在稳定拴结结构之后被施用至受治疗者,例如在下文讨论的预靶向策略中。可首先将所述稳定拴结结构施用至受治疗者,以允许其在病组织(如肿瘤)中定位。然后加入所述效应物或载体,以允许其与已定位的稳定拴结结构结合。当所述效应物或载体与毒性部分(如放射性核素)轭合时,此预靶向方法减少所述受治疗者与毒性的全身接触,从而允许将毒性试剂成比例更多地递送至靶组织。任选地,可在施用可靶向的构建体之前施用清除剂,以从循环中清除未定位的稳定拴结结构。这些方法在本领域是已知的,详细描述参见第4,624,846号美国专利、W092/19273和Sharkey等, Int. J. Cancer 51:266 (1992)。可靶向的构建体的示例可具有X-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Y)-NH₂的结构,其中该化合物在X或Y处包括硬酸阳离子螯合剂、和在剩余的X或Y处包括软酸阳离子螯合剂;并且其中该化合物进一步包含至少一种诊断性或治疗性阳离子,和/或一种或多种螯合的或者化学结合的治疗剂、诊断剂或酶。例如,所述诊断剂可以是:Gd (III)、Eu (III)、Dy (III)、Pr (III)、Pa (IV)、Mn (II)、Cr (III)、Co (III)、Fe (III)、Cu (II)、Ni (II)、Ti (III)、V (IV)离子或自由基。第二个构建体示例可具有式X-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Y)-NH₂,其中该化合物在X或Y处包括硬酸阳离子螯合剂或软酸螯合剂,且在剩余X或Y处不包含任何物质;并且其中该化合物进一步包含至少一种诊断性或治疗性阳离子,和/或一种或多种螯合或者化学结合的治疗剂、诊断剂或酶。在此类实施方案中,所述A亚基可例如包含肿瘤相关抗原的结合位点,而所述B亚基可包含效应物或载体、或者轭合至效应物或载体的半抗原的结合位点。

[0030] 本发明的稳定拴结结构(包括其轭合物)适合用于多种治疗和诊断用途。例如,基于抗体结合结构域的六价构建体可用于此类构建体未与其他功能剂轭合的治疗场合,其方式与使用裸抗体的治疗相同。替代地,可使用一种或多种功能剂对这些稳定拴结结构进行衍生,以用于诊断或治疗用途。所述其他试剂可使用常规轭合化学共价连接至所述稳定拴结结构。

[0031] 稳定拴结结构的使用方法可包括检测、诊断和/或治疗疾病或其他医疗病症。此类病症可包括但不限于：癌症、心血管疾病、动脉粥样硬化、中风、神经退行性疾病、阿尔茨海默病、代谢性疾病、增生症(hyperplasia)、糖尿病性视网膜病变(retinopathy)、黄斑变性、炎性肠病、克罗恩(Crohn)病、溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎、结节病(sarcoidosis)、哮喘、水肿、肺高压(pulmonary hypertension)、牛皮癣、角膜移植排斥反应、新生血管性青光眼、Osler-Webber综合征、心肌血管生成(myocardial angiogenesis)、斑块新生血管(plaque neovascularization)、再狭窄、血管损伤后新生内膜形成(neointima formation)、毛细血管扩张、血友病关节、血管纤维瘤、慢性炎症相关的纤维化、肺纤维化、淀粉样变性病、器官移植排斥反应、深静脉血栓形成或创面肉芽(wound granulation)。

[0032] 在特定实施方案中,本发明公开的方法和组合物可用于治疗自身免疫疾病,如急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜、皮炎、西德纳姆氏(Sydenham)舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺体综合征、大疱性类天疱疮、青少年糖尿病、过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura)、链球菌感染后肾炎(post-streptococcal nephritis)、结节性红斑、Takayasu氏动脉炎、艾迪生氏病(Addison's disease)、类风湿性关节炎、多发性硬化症、结节病、溃疡性结肠炎、多形红斑、IgA肾病、结节性多动脉炎、强直性脊椎炎、肺出血肾炎综合征(Goodpasture's syndrome)、thromboangitis obliterans、Sjogren氏综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多发性肌炎/皮炎、多软骨炎、寻常性天疱疮、韦格纳氏(Wegener's)肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩侧索硬化症、脊髓痨(tabs dorsalis)、巨细胞性动脉炎/多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球肾炎、牛皮癣或纤维性肺泡炎。

[0033] 不同的实施方案可包含治疗炎性和免疫失调性疾病、传染性疾病、病理性血管生成或癌症的方法。在本申请中,所述稳定拴结结构与选自以下成员组成的组的两个不同靶标结合:(A)先天性免疫系统的促炎效应物,(B)凝血因子,(C)补体因子和补体调节蛋白,以及(D)与炎性或免疫失调性疾病,或者与病理性血管生成或癌症特异性相关的靶标,其中后者的靶标不是(A)、(B)或(C)。所述靶标中至少有一个为(A)、(B)或(C)。靶标的合适组合请参见2005年12月8日提交的题为“Methods and Compositions for Immunotherapy and Detection of Inflammatory and Immune-Dysregulatory Disease, Infectious Disease, Pathologic Angiogenesis and Cancer”(免疫治疗和检测炎性和免疫失调性疾病、传染性疾病、病理性血管生成和癌症的方法和组合物)的序号为11/296,432的美国专利申请,其内容通过引用整体结合入本文。可与所述结合分子结合的先天性免疫系统的促炎效应物可以是促炎效应细胞因子、促炎效应趋化因子或促炎效应受体。适合的促炎效应细胞因子包括MIF、HMGB-1(高迁移率族盒蛋白1)、TNF- α 、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15和IL-18。促炎效应趋化因子的实例包括CCL19、CCL21、IL-8、MCP-1、RANTES、MIP-1A、MIP-1B、ENA-78、MCP-1、IP-10、GROB和嗜酸性粒细胞活化趋化因子(Eotaxin)。促炎效应受体包括IL-4R(白介素-4受体)、IL-6R(白介素-6受体)、IL-13R(白介素-13受体)、IL-15R(白介素-15受体)和IL-18R(白介素-18受体)。

[0034] 所述结合分子还可与至少一种凝血因子、特别是组织因子(TF)或凝血酶发生特异性反应。在其他实施方案中,所述结合分子与至少一种补体因子或补体调节蛋白发生特异

性反应。在优选实施方案中,所述补体因子选自由C3、C5、C3a、C3b和C5a组成的组。当所述结合分子与补体调节蛋白发生特异性反应时,所述补体调节蛋白优选地选自由CD46、CD55、CD59和mCRP组成的组。

[0035] 在某些实施方案中,所述稳定拴结结构可用于治疗癌症。预期可以靶向任何类型的肿瘤和任何类型的肿瘤抗原。可以靶向的肿瘤的示例类型包括急性淋巴母细胞性白血病、急性骨髓白血病、胆管癌、乳腺癌、宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性粒细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、头颈癌、霍奇金氏(Hodgkin's)淋巴瘤、肺癌、甲状腺髓样癌、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肾癌、卵巢癌、胰腺癌、神经胶质瘤、黑色素瘤、肝癌、前列腺癌和膀胱癌。

[0036] 可以靶向的肿瘤相关抗原包括但不限于:碳酸酐酶IX、A3、A33抗体的特异性抗原、BrE3-抗原、CD1、CD1a、CD3、CD5、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD45、CD74、CD79a、CD80、HLA-DR、NCA95、NCA90、HCG及其亚基、CEA(CEACAM-5)、CEACAM-6、CSAp、EGFR、EGP-1、EGP-2、Ep-CAM、Ba733、HER2/neu、缺氧诱导因子(HIF)、KC4-抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、巨噬细胞抑制因子(MIF)、MAGE、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、PAM-4抗原、PSA、PSMA、RS5、S100、TAG-72、p53、生腱蛋白、IL-6、IL-8、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGF、胎盘生长因子(P1GF)、17-1A抗原、血管生成标志物(如ED-B纤连蛋白)、致癌基因标志物、致癌基因产物和其他肿瘤相关抗原。有关肿瘤相关抗原的近期报告包括Mizukami等(2005,Nature Med.11:992-97);Hatfield等(2005,Curr.Cancer Drug Targets5:229-48);Vallbohmer等(2005,J.Clin.Oncol.23:3536-44);和Ren等(2005,Ann.Surg.242:55-63),其均通过引用结合入本文。特别优选的实施方案可包括具有CD20或CD22结合位点的六价单特异性构建体。其他优选的实施方案可包括具有CD20和CD22两个结合位点的六价双特异性构建体。

[0037] 其他实施方案可包含通过向受治疗者施用单个或多个剂量的稳定拴结结构,来治疗受治疗者的淋巴瘤、白血病或自身免疫疾病的方法,其中第二个前体的结合位点与淋巴细胞抗原结合,且第一个前体的结合位点与相同或不同的淋巴细胞抗原结合。所述一个或多个结合位点可结合不同的表位、或结合选自由以下组成的组的抗原的表位:CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD74、CD80、CD126、CD138、CD154、B7、MUC1、Ia、Ii、HM1.24、HLA-DR、生腱蛋白、VEGF、P1GF、ED-B纤连蛋白、致癌基因、致癌基因产物、NCA66a-d、坏死抗原、IL-2、T101、TAG、IL-6、MIF、TRAIL-R1(DR4)和TRAIL-R2(DR5)。例如,所述组分可按单位剂量20-1500毫克蛋白、单位剂量20-500毫克蛋白、单位剂量20-100毫克蛋白、或单位剂量20-1500毫克蛋白的剂量进行肠胃外施用。

[0038] 在其他实施方案中,所述稳定拴结结构可用于治疗病原生物(如细菌、病毒或真菌)感染。可治疗的真菌示例包括小孢子菌属(Microsporum)、发癣菌属(Trichophyton)、表皮癣菌属(Epidermophyton)、申克氏孢子丝菌(Sporothrix schenckii)、新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)、粗球孢子菌(Coccidioides immitis)、荚膜组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum)、皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)或白色念珠菌(Candida albicans)。病毒示例包括人类免疫缺陷病毒(HIV)、疱疹病毒、巨细胞病毒、狂犬病毒、流感病毒、人乳头瘤病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、仙台病毒(Sendai virus)、

猫白血病毒、呼肠孤病毒 (Reo virus)、脊髓灰质炎病毒、人类血清细小 (parvo-like) 病毒、猿猴病毒40、呼吸道合胞病毒、小鼠乳腺肿瘤病毒、水痘-带状疱疹病毒、登革病毒、风疹病毒 (rubella virus)、麻疹病毒、腺病毒、人T细胞白血病毒、Epstein-Barr病毒、小鼠白血病毒、腮腺炎病毒、水泡性口炎病毒、辛德毕斯 (Sindbis) 病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒或蓝舌病毒。细菌示例包括炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、淋球菌奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis*)、肺炎双球菌 (*Pneumococcus* spp.)、流感嗜血杆菌B (*Hemophilis influenzae* B)、梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*)、莱姆病螺旋体 (*Lyme disease spirochetes*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、流产布鲁氏杆菌 (*Brucella abortus*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 或支原体 (*Mycoplasma*)。

[0039] 虽然不是限制,但是在不同实施方案中,包括于所述稳定拴结结构的前体可包含一种或多种蛋白质,如细菌毒素、植物毒素、蓖麻毒素、相思豆毒素、核糖核酸酶 (RNA酶)、DNA酶I、葡萄球菌肠毒素A、美洲商陆 (pokeweed) 抗病毒蛋白、多花白树毒蛋白、白喉毒素、绿脓杆菌外毒素、绿脓杆菌内毒素、豹蛙酶 (Rap)、Rap (N69Q)、PE38、dgA、DT390、PLC、tPA、细胞因子、生长因子、可溶性受体组分、表面活性蛋白D、IL-4、sIL-4R、sIL-13R、VEGF₁₂₁、TPO、EPO (促红细胞生成素)、凝块溶解剂 (clot-dissolving agent)、酶、荧光蛋白、sTNF α -R、avimer、scFv、dsFv或纳米抗体。

[0040] 在其他实施方案中,抗血管生成剂可形成部分或全部前体,或者可连接至稳定拴结结构。使用的抗血管生成剂示例包括制管张素 (angiostatin)、baculostatin、血管能抑素 (canstatin)、乳腺丝抑蛋白、抗VEGF抗体或肽、抗胎盘生长因子抗体或肽、抗Flk-1抗体、抗Flt-1抗体或肽、层粘连蛋白肽、纤连蛋白肽、血纤维蛋白溶酶原激活物抑制剂、组织金属蛋白酶抑制剂、干扰素、白介素12、IP-10、Gro- β 、血小板反应素 (thrombospondin)、2-甲氧雌二醇、增殖蛋白相关蛋白、羧酰胺三唑 (carboxyamidotriazole)、CM101、马立马司他 (Marimastat)、戊聚糖多硫酸盐、血管生成素2、干扰素 α 、除莠霉素A、PNU145156E、16K催乳素片段、Linomide (利诺胺)、沙利度胺、己酮可可碱、染料木黄酮、TNP-470、内皮抑制素、紫杉醇、accutin、制管张素、西多福韦、长春新碱、博莱霉素、AGM-1470、血小板因子4或米诺环素。

[0041] 在其他实施方案中,一种或多种治疗剂可以被辄合至或包括于稳定拴结结构,所述治疗剂如aplidin、阿扎立平、阿那曲唑、氮杂胞苷、博莱霉素、硼替佐米、苔藓抑素-1、白消安、刺孢霉素、喜树碱、10-羟基喜树碱、卡莫司汀、塞来昔布、苯丁酸氮芥、顺铂、伊立替康 (CPT-11)、SN-38、卡铂、克拉屈滨、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯咪胺、多西紫杉醇、放线菌素、柔红霉素葡萄糖苷酸、柔红霉素、地塞米松、二乙基己烯雌酚、阿霉素、2-吡咯啉阿霉素 (2P-DOX)、氨基吗啉阿霉素、阿霉素葡萄糖苷酸、表阿霉素葡萄糖苷酸、炔雌醇、雌莫司汀、依托泊苷、依托泊苷葡萄糖苷酸、依托泊苷磷酸盐、氟尿嘧啶脱氧核苷 (FudR)、3',5'-O-二油酰基-FudR (FudR-dO)、氟达拉滨、氟他胺、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、吉西他滨、己酸羟孕酮、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、L-天冬酰胺酶、亚叶酸、洛莫司汀、氮芥、乙酸甲羟孕酮 (medroprogesterone acetate)、乙酸甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、6-巯基嘌呤、甲氨蝶呤、

米托蒽醌、光辉霉素、丝裂霉素、米托坦、苯丁酸、泼尼松、甲基苄肼、紫杉醇、喷司他丁、PSI-341、司莫司汀链脲佐菌素、他莫昔芬、紫杉烷类、紫杉酚、丙酸睾酮、沙利度胺、硫鸟嘌呤、塞替派、替尼泊苷、拓泊替康、尿嘧啶氮芥、万珂 (velcade)、长春碱、长春瑞滨、长春新碱、蓖麻毒素、相思豆毒素、核糖核酸酶、豹蛙酶 (onconase)、rapLR1、DNA酶I、葡萄球菌肠毒素A、美洲商陆抗病毒蛋白、多花白树毒蛋白、白喉毒素、绿脓杆菌外毒素、绿脓杆菌内毒素、反义寡核苷酸、干扰RNA或其组合。

[0042] 不同的实施方案可涉及稳定拴结结构和使用其用于诱导病变细胞凋亡的方法。进一步的详情可参见第20050079184号美国专利申请公布,其完整内容通过引用结合入本文。此类结构可包含对选自以下组成的组的抗原具有结合亲和性的前体:CD2、CD3、CD8、CD10、CD21、CD23、CD24、CD25、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD48、CD52、CD55、CD59、CD70、CD74、CD80、CD86、CD138、CD147、HLA-DR、CEA、CSAp、CA-125、TAG-72、EGFR、HER2、HER3、HER4、IGF-1R、c-Met、PDGFR、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、TNFR1、TNFR2、NGFR、Fas (CD95)、DR3、DR4、DR5、DR6、VEGF、PIGF、ED-B纤连蛋白、生腱蛋白、PSMA、PSA、碳酸酐酶IX和IL-6。在更加特定的实施方案中,用来诱导凋亡的稳定拴结结构可包含单克隆抗体、Fab片段、嵌合抗体、人源化抗体或者人抗体或片段。在优选的实施方案中,所述稳定拴结结构可包含下列组合:抗CD74X抗CD20、抗CD74X抗CD22、抗CD22X抗CD20、抗CD20X抗HLA-DR、抗CD19X抗CD20、抗CD20X抗CD80、抗CD2X抗CD25、抗CD8X抗CD25、抗CD2X抗CD147、抗CEACAM5X抗CD3、抗CEACAM6X抗CD3、抗EGFR X抗CD3、抗HER2/neu X抗CD3、抗CD20X抗CD3、抗CD74X抗CD3和抗CD22X抗CD3。在其他优选实施方案中,所述稳定拴结结构可以是单特异性或多特异性抗CD20、抗CD22、抗HLA-DR和/或抗CD74。技术人员应了解:多价的稳定拴结结构可包含多个抗原结合部分,例如,所述抗原结合部分与CD20或CD22抗原的不同表位结合;或者任选地可包含均结合相同的表位的单个抗原结合部分的多个拷贝。在更优选的实施方案中,所述嵌合抗体、人源化抗体或人抗体或者抗体片段可衍生自LL2 (抗CD22)、LL1 (抗CD74)、L243 (抗HLA-DR) 和A20 (抗CD20) 的可变区。

[0043] 一方面,本发明公开了一种六聚稳定拴结结构,其包含与两个AD2 (SEQ ID NO:4) 部分连接的IgG抗体和四个相同或不同IgG的抗体片段,其中每个片段均与DDD2 (SEQ ID NO:2) 部分连接;所述AD2部分与所述DDD2部分结合。

[0044] 在一些实施方案中,所述AD2部分可通过二硫键与所述DDD2部分共价连接。

[0045] 在一些实施方案中,所述结构可包含6个Fab片段和1个Fc片段。

[0046] 在一些实施方案中,每个所述Fab片段都可与相同的抗原表位结合。

[0047] 在一些实施方案中,2个所述Fab片段可与第一抗原表位结合,且4个所述Fab片段可与第二抗原表位结合。

[0048] 在一些实施方案中,所述抗体或抗体片段可为人、人源化或嵌合的抗体或抗体片段。

[0049] 在一些实施方案中,所述Fab片段可选自由hMN-14、L19、hA20、hLL2、hL243、hCC49、7E3、hLL1、hPAM4、hRS7、rH1、L49、抗CD14、抗CD111、阿达木单抗、英利昔单抗、奥马珠单抗、帕利珠单抗和hMN-15的Fab片段组成的组。

[0050] 在一些实施方案中,所述IgG抗体和/或抗体片段可与选自以下组成的组的抗原结合:碳酸酐酶IX、甲胎蛋白、A3、A33抗体特异性抗原、Ba733、BrE3抗原、CA125、CD1、CD1a、

CD3、CD5、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD38、CD45、CD74、CD79a、CD80、CD138、结肠特异性抗原p (CSAp)、CEA (CEACAM5)、CEACAM6、EGFR、EGP-1、EGP-2、Ep-CAM、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、HLA-DR、人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 及其亚基、HER2/neu、缺氧诱导因子 (HIF-1)、Ia、IL-2、IL-6、IL-8、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、KC4抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、巨噬细胞抑制因子 (MIF)、MAGE、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、NCA66、NCA95、NCA90、PAM-4抗体特异性抗原、胎盘生长因子、p53、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PSMA、RS5、S100、TAC、TAG-72、生腱蛋白、TRAIL受体、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGF、ED-B纤连蛋白、17-1A抗原、血管生成标志物、致癌基因标志物或致癌基因产物。

[0051] 在一些实施方案中,所述结构还可包含通过共价或非共价连接与所述结构耦合的一个或多个效应物或载体。

[0052] 在进一步的实施方案中,所述效应物可为诊断剂、治疗剂、化疗剂、放射性同位素、显像剂、抗血管生成剂、细胞因子、趋化因子、生长因子、药物、前体药物、酶、结合分子、细胞表面受体的配体、螯合剂、免疫调节剂、寡核苷酸、激素、可光检测的标记、染料、肽、毒素、造影剂、顺磁标记、超声标记、促凋亡剂、脂质体、纳米粒子或其组合。

[0053] 在一些实施方案中,所述IgG抗体和抗体片段具有对靶分子、复合物、聚集体、细胞、抗原或组织的结合亲和力。

[0054] 在一些实施方案中,所述IgG抗体具有对靶分子、复合物、聚集体、细胞、抗原或组织的结合亲和力,并且至少一个抗体片段具有半抗原的结合位点。

[0055] 在进一步的实施方案中,所述IgG抗体具有对以下物质的结合亲和力:细胞表面受体、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、tpA、链激酶、水蛭素、尿激酶、CA19-9、CEA、CEACAM6、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD40、CD74、ED-B纤连蛋白、EGFR、G_{D2}、G250抗原、HER2/neu、hTR、II类HLA、HMW/MAA、HN/NDV、IGF1R、IL-2R/Tac、IL-17、MUC1、PSMA、M13外壳蛋白、GpIIb/IIIa、CD74、EGP-1、CD25/Tac、Le^Y、间皮素、Erb-B2、Erb-B3、EpCAM、GP240、GPIIb/IIIa、p97、CD3、IL-4R、IL-4、IL-13、VEGFR-2、CD14、CD111/连接素-1、叶酸受体 α 、gp120、IL-6、IL-5、IL-8、CD154、IgE、LFA-1、 β -胰蛋白酶、CD105/内皮糖蛋白、TNF α 、RSV F蛋白、CEA的A1B1、CEA的N结构域、PfMSP-1、TAG-72、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、VEGFR1/Flt-1、VEGFR2/KDR或VEGFR3/Flt-4。

[0056] 在更进一步的实施方案中,其中至少一个抗体片段具有对IL-17、组胺琥珀酰甘氨酸 (HSG)、铟-DTPA、CD22、CD20、EGFR、IGF1R、VEGFR1/Flt-1、VEGFR2/KDR、VEGFR3/Flt-4、CD3、CD16、CD64、CD89、CD2、腺病毒纤突结、M13外壳蛋白、GpIIb/IIIa、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、tpA、链激酶、水蛭素或尿激酶的结合亲和力。

[0057] 在其他进一步的实施方案中,所述IgG抗体具有对选自CEA、ED-B纤连蛋白、CD20、CD22、CD19、EGFR、IGF1R、VEGFR1/Flt-1、VEGFR2/KDR、VEGFR3/Flt-4、HER2/neu、CD30、CD33、PfMSP-1、HN/NDV、EpCAM/17-1A、hTR、IL-2R/Tac、CA19-9、MUC1、II类HLA、G_{D2}、G250、TAG-72、PSMA、CEACAM6、HMWMAA、CD40、M13外壳蛋白和GPIIb/IIIa组成的组的细胞表面抗原的结合亲和力,并且其中至少一个抗体片段具有对选自组胺琥珀酰甘氨酸 (HSG) 和铟-DTPA组成的组的半抗原或者选自CD22、CD20、EGFR、IGF1R、VEGFR1/Flt-1、VEGFR2/KDR、VEGFR3/Flt-4、CD3、CD16、CD64、CD89、CD2和腺病毒纤突结组成的组的细胞表面抗原的结合亲和力。

[0058] 在一些实施方案中,所述IgG抗体具有对选自由M13外壳蛋白和GpIIb/IIIa组成的组的细胞表面抗原或者选自由碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、tpA、链激酶、水蛭素和尿激酶组成的组的生物分子的结合亲和力,并且其中至少一个抗体片段具有对选自由M13外壳蛋白和GpIIb/IIIa组成的组的细胞表面抗原或者选自由碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、tpA、链激酶、水蛭素和尿激酶组成的组的生物分子的结合亲和力。

[0059] 在一些实施方案中,所述IgG抗体和所述抗体片段可与相同抗原结合,所述抗原选自由CD14、CD111/连接素-1、叶酸受体 α 、gp120、IL-6、IL-5、IL-8、CD154、IgE、LFA-1、 β -胰蛋白酶、CD105/内皮糖蛋白、GpIIb/IIIa、TNF α 、RSV F蛋白、CEA的A1B1和CEA的N结构域组成的组。

[0060] 在其他的实施方案中,所述IgG抗体和所述抗体片段可与下述抗原组合结合: CD20/CD22; CD20/CD74; CD20/HLA-DR; CD22/CD74; CD22/HLA-DR; CD74/HLA-DR; CD74/CEA或HLA-DR/CEA。

[0061] 另一方面,本发明公开了一种方法,其包括:

[0062] a) 获得本发明的六聚稳定拴结结构;和

[0063] b) 将该结构施用至患有疾病或病症的受治疗者;

[0064] 其中所述结构对所述疾病或病症具有治疗效果。

[0065] 在一些实施方案中,所述疾病或病症可为癌症或自身免疫疾病。

[0066] 在一些实施方案中,所述疾病或病症可为癌症,并且所述IgG抗体和/或至少一个所述抗体片段具有对选自由以下组成的组的肿瘤相关抗原的结合亲和力:碳酸酐酶IX、甲胎蛋白、A3、A33抗体特异性抗原、Ba733、BrE3抗原、CA125、CD1、CD1a、CD3、CD5、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD38、CD45、CD74、CD79a、CD80、CD138、结肠特异性抗原p (CSAp)、CEA (CEACAM5)、CEACAM6、EGFR、EGP-1、EGP-2、Ep-CAM、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、HLA-DR、人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 及其亚基、HER2/neu、缺氧诱导因子 (HIF-1)、Ia、IL-2、IL-6、IL-8、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、KC4抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、巨噬细胞抑制因子 (MIF)、MAGE、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、NCA66、NCA95、NCA90、PAM-4抗体特异性抗原、胎盘生长因子、p53、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PSMA、RS5、S100、TAC、TAG-72、生腱蛋白、TRAIL受体、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGF、ED-B纤连蛋白、17-1A抗原、血管生成标志物、致癌基因标志物和致癌基因产物。

[0067] 在一些实施方案中,所述方法还可包括将一种或多种抗癌治疗与所述稳定拴结结构联合施用。

[0068] 在一些实施方案中,所述治疗可包括施用化疗剂、细胞因子、放射治疗、免疫治疗、放射免疫治疗、局部过热、激光照射、抗血管生成剂或手术切除。

[0069] 在一些实施方案中,至少一个所述抗体片段具有对半抗原的结合亲和力。

[0070] 在一些实施方案中,所述方法还可包括将所述半抗原施用至所述受治疗者。

[0071] 在进一步的实施方案中,所述半抗原可连接至选自由抗血管生成剂、化疗剂、细胞因子、药物、前体药物、毒素、酶、寡核苷酸、放射性同位素、免疫调节剂、抗生素、抗病毒剂、抗真菌剂、激素、结合分子、脂质、聚合物、胶束、脂质体、纳米粒子或其组合所组成的组的试剂。

- [0072] 在一些实施方案中,所述疾病或病症可由真菌、病毒、细菌或寄生虫引起。
- [0073] 在一些实施方案中,所述疾病或病症可为自身免疫疾病。
- [0074] 在一些实施方案中,所述结构可包含选自以下组成的组的IgG抗体和抗体片段的组合:抗CD74X抗CD20、抗CD74X抗CD22、抗CD22X抗CD20、抗CD20X抗HLA-DR、抗CD19X抗CD20、抗CD20X抗CD80、抗CD2X抗CD25、抗CD8X抗CD25、抗CD2X抗CD147、抗CEACAM5X抗CD3、抗CEACAM6X抗CD3、抗EGFR X抗CD3、抗HER2/neu X抗CD3、抗CD20X抗CD3、抗CD74X抗CD3和抗CD22X抗CD3。
- [0075] 在一些实施方案中,所述疾病或病症可为神经退行性疾病、阿尔茨海默病、代谢性疾病、心血管疾病、动脉粥样硬化或器官移植排斥反应。
- [0076] 在一些实施方案中,所述癌症可选自由上皮癌、间充质癌、血液系统肿瘤、神经肿瘤、恶瘤、黑色素瘤、肉瘤、神经母细胞瘤、白血病、淋巴瘤、神经胶质瘤和骨髓瘤组成的组。
- [0077] 另一方面,本发明公开了一种诊断疾病或病症的方法,其包括:
- [0078] a) 获得本发明的稳定拴结结构,其中所述IgG抗体与和所述病症相关的靶分子、复合物、聚集体、细胞、抗原或组织结合,并且至少一个抗体片段与诊断性半抗原结合;
- [0079] b) 将所述结构施用于疑似患有疾病或病症的受治疗者;
- [0080] c) 向同一受治疗者施用与所述至少一个抗体片段结合的诊断性半抗原;和
- [0081] d) 检测与所述稳定拴结结构结合的所述半抗原的存在;
- [0082] 而所述半抗原至所述病症相关的组织的定位确诊所述受治疗者中所述疾病或病症的存在。
- [0083] 在一些实施方案中,所述半抗原可与诊断性放射性核素、磁共振成像(MRI)造影剂、超声成像增强剂、PET显像剂、荧光剂或发光剂轭合。

附图说明

- [0084] 图1显示两个DDD示例性序列。DDD1 (SEQ ID NO:1) 中标有下划线的序列对应于人PKA的RII α 中发现的前44个氨基末端残基。DDD2 (SEQ ID NO:2) 的两个N-末端氨基酸残基与DDD1的不同。
- [0085] 图2显示两个AD示例性序列。AD1 (SEQ ID NO:3) 标有下划线的序列对应于优化的RII选择肽AKAP-is,其K_d报道为0.4nM。同时还显示了AD2 (SEQ ID NO:4)。
- [0086] 图3显示N-DDD2-Fab-hMN-14的示意图(A),以及通过DDD2介导的二聚化作用形成的假定的 α_2 结构(B)。
- [0087] 图4显示N-DDD2-VH-hMN-14-pdHL2质粒表达载体的设计。
- [0088] 图5显示C-DDD2-Fab-hMN-14的示意图(A),以及通过DDD2介导的二聚化作用形成的假定的 α_2 结构(B)。
- [0089] 图6显示C-DDD2-VH-hMN-14-pdHL2质粒表达载体的设计。
- [0090] 图7显示下列结构的图式表征:(A)在还原条件下混合N-DDD2-Fab-hMN-14和h679-Fab-AD2而形成的非共价 $\alpha_2\beta$ 复合体;(B)通过二硫桥形成的共价TF1结构。
- [0091] 图8显示TF2的示意图。
- [0092] 图9为C-H-AD2-IgG的简图。(A)重链-AD2和轻链的cDNA/多肽序列排列。(B)C-H-AD2-IgG的图式表征。

[0093] 图10为C-H-AD2-IgG和Fab-DDD2模块结合得到的单特异性HIDS (基于IgG的六价DNL结构)的图式表征。

[0094] 图11为C-H-AD2-IgG和Fab-DDD2模块结合得到的双特异性HIDS的图式表征。

[0095] 图12为N-K-AD2-IgG的简图。(A) 重链和AD2-轻链的cDNA/多肽序列排列。(B) N-K-AD2-IgG的图式表征。

[0096] 图13为N-K-AD2-IgG和Fab-DDD2模块结合得到的双特异性HIDS的图式表征。

[0097] 图14显示下列载体的简图：(A) Fc-AD2-pdHL2穿梭载体，(B) IgG-pdHL2哺乳动物表达载体和(C) C-H-AD2-IgG-pdHL2哺乳动物表达载体。

[0098] 图15显示经蛋白A纯化的C-H-AD2-hLL2-IgG的SE-HPLC分析。指出了代表单体和二聚体形式的峰。

[0099] 图16显示经蛋白A纯化的C-H-AD2-hLL2-IgG在还原和非还原条件下的SDS-PAGE分析。指出了还原泳道中代表重链-AD2、重链和 κ 轻链的条带。指出了非还原泳道中代表C-H-AD2-hLL2-IgG和所述共价二聚体的条带。指出了分子量标志物的位置。

[0100] 图17显示经蛋白A纯化的N-K-AD2-hLL2-IgG的SE-HPLC分析。(A) 箭头指出了代表单体、二聚体和三聚体形式的峰。(B) 谷胱甘肽还原之后的分析显示二聚体和三聚体形式转化为单体形式。

[0101] 图18显示N-K-AD2-hLL2-IgG的二聚体(A) 和三聚体(B) 形式的假定结构的简图，它们通过温和还原转化为单体形式(C)。

[0102] 图19显示经蛋白A纯化的Hex-hA20的SE-HPLC分析。

[0103] 图20显示六种基于C-H-AD2-hLL2-IgG的HIDS的SDS-PAGE分析。(A) 非还原条件下的SDS-PAGE。(B) 还原条件下的SDS-PAGE。箭头指出了代表重链-AD2、Fd-DDD2和 κ 轻链的条带。指出了分子量标志物的位置。

[0104] 图21显示经蛋白A纯化的Hex-hLL2的SE-HPLC分析。

[0105] 图22显示(A) DNL1和(B) DNL1C的SE-HPLC分析。

[0106] 图23显示DNL2的SE-HPLC分析。

[0107] 图24显示DNL3和K-Hex-hA20在还原和非还原条件下的SDS-PAGE分析。代表重链、AD2- κ 链、Fd-DDD2和 κ 轻链的条带显示在还原泳道中。代表DNL3和K-Hex-hA20的条带显示在非还原泳道中。指出了分子量标志物的位置。

[0108] 图25显示DNL3的SE-HPLC分析。

[0109] 图26显示两个竞争ELISA实验的结果，比较了DNL1、DNL2Hex-hA20和Hex-hLL2与亲本IgG对hA20/hLL2的相对结合亲和力。用5 μ g/ml的hA20或hLL2IgG涂布微滴定板。HIDS的稀释系列与特异性针对hA20或hLL2IgG的抗Id (保持2nM的恒定浓度) 混合。使用过氧化物酶耦合的山羊抗大鼠IgG和OPD底物溶液检测抗Id与涂布孔之间的结合水平。结果用%抑制(与涂布孔结合的抗Id) 和HIDS浓度图表示。使用Prism软件获得EC50 (造成50%抑制的有效浓度) 值。HIDS用于竞争结合(A) hA20涂布孔中的WI2 (hA20大鼠抗Id) 或(B) hLL2涂布孔中的WN (hLL2大鼠抗Id)。

[0110] 图27显示两个竞争ELISA实验的结果，比较了DNL2和DNL3对hA20/hLL2的相对结合亲和力。实验如图26所描述的进行。使用DNL2、DNL3和亲本IgG竞争结合(A) hA20涂布孔中的WI2 (hA20大鼠抗Id) 或(B) hLL2涂布孔中的WN (hLL2大鼠抗Id)。

[0111] 图28显示用DNL1、DNL2、Hex-hA20或利妥昔单抗(rituximab)处理Daudi淋巴瘤细胞后的细胞计数分析结果。向组织培养瓶中接种 1×10^5 个Daudi细胞/ml,于补充了不同浓度HIDS或利妥昔单抗中的一种的RPMI1640培养基中。每天使用Guava PCA对活细胞进行计数。(A) 10nM浓度处理后的生长曲线比较。(B) 选定浓度下的生长曲线比较。

[0112] 图29显示用不同HIDS处理Daudi细胞的剂量响应实验结果。用细胞涂布96孔板(5,000个细胞/孔,于RPMI1640培养基中)。采用五倍系列稀释,将浓度从 2×10^{-8} 降到 6.4×10^{-12} M,三个重复。将平板孵育四天后,向其中加入MTS试剂,然后继续孵育另外四小时,然后在490nm下对平板进行读数。结果表示为未处理孔OD₄₉₀的百分比与HIDS摩尔浓度的log值。测量每个剂量响应曲线的EC₄₀(造成40%生长抑制的有效浓度)值。

[0113] 图30显示使用DNL2或Hex-hA20处理带有人伯基特淋巴瘤(Daudi)小鼠的体内治疗实验的结果。小鼠(4只/组)静脉内(i.v.)接种 1.5×10^7 个Daudi细胞(第0天)。在第1、4和7天,对小鼠腹膜内(i.p.)施用4μg或20μg的DNL2或Hex-hA20。如果小鼠出现后肢瘫痪或者体重下降>20%即予以处死。结果用%存活和时间(天)图表示。显示了中位存活期和长期存活者。

[0114] 图31显示用双特异性HID(DNL2-四个hLL2Fab片段拴结至hA20IgG)和单特异性HID(Hex-hA20)处理Daudi细胞、Raji细胞和Ramos细胞,通过MTS细胞增殖分析得到的相对剂量响应曲线(与hA20IgG对照进行比较)。在Daudi细胞(上图)中,与hA20IgG相比,DNL2显示出>100倍,Hex-hA20显示出>10,000倍的有效抗细胞增殖活性。在Raji细胞(中图)中,与hA20IgG相比,Hex-hA20显示出有效的抗细胞增殖活性,而DNL2仅显示极小活性。在Ramos细胞(底图)中,与hA20IgG相比,DNL和Hex-hA20均显示出有效的抗细胞增殖活性。

[0115] 图32显示交联对hA20IgG、DNL2和Hex-hA20抗细胞增殖活性的影响。如图中所示,交联加强了hA20IgG的抗细胞增殖活性,但对DNL2或Hex-hA20的活性则无增强作用。

[0116] 图33显示DNL1和DNL2在人血清中的稳定性,采用双特异性ELISA分析确定。10μg/ml的所述蛋白结构与新鲜采集的人血清在37℃和5%CO₂条件下孵育五天。对于第0天的样品,等分试样在用血清稀释后立即用液氮冷冻。用hA20IgG的抗Id涂布ELISA平板,然后用hLL2IgG的抗Id检测双特异性结合。DNL1和DNL2均显示了高度的血清稳定性,并保持了完全的双特异结合活性。

[0117] 图34显示DNL1、DNL2、Hex-hA20、hLL2、hA20-IgG和hA20-IgG-AD2的补体依赖性细胞毒作用(CDC)或其缺失。令人惊奇的是,虽然hA20IgG和hA20-IgG-AD2在体外实验中表现出对Daudi细胞的有效CDC活性,但是所有六价DNL结构均未在此分析中表现出CDC活性。DNL2和Hex-ha20均包含显示出与hA20IgG相似的CDC活性的hA20-IgG-AD2。

[0118] 图35比较了DNL1、hA20IgG、利妥昔单抗和hLL2IgG的抗体依赖性细胞毒作用(ADCC),分析采用新鲜分离的外周血单核细胞。利妥昔单抗和hA20IgG均表现出有效的ADCC活性,而DNL1则未表现出任何可检测的ADCC。

具体实施方式

[0119] 本申请引用的所有文档,或者其部分内容,包括但不限于专利、专利申请、论文、专著和论著,均明确地通过引用整体结合入本文。

[0120] 在某些实施方案中,提供了a₂b形式的新的稳定拴结结构以及制备这些复合体的

方法。一般而言,该二元复合体由非共价连接的同型二聚体结构(称为A或 a_2)组成,该同型二聚体结构与另一结构(称为B或b)进行位点特异性缔合。得到的 a_2b 结构可通过A和B之间的非共价或者优选地共价(例如,二硫键)相互作用进行稳定。A由两个相同的亚基形成,其中每个亚基由连接至肽序列(称为二聚化和停靠结构域,DDD)的前体组成;在优选实施方案中,所述肽序列衍生自cAMP依赖性蛋白激酶(PKA)。所述亚基中包含的DDD结构域自发缔合形成稳定的同型二聚体,而此缔合又进一步生成另一肽序列(称为锚定结构域,AD)的高亲和结合位点,AD发现于例如各种A-激酶锚定蛋白(AKAP),并包含在B中。因此,B由连接至AD的前体组成。

[0121] 所述二元复合体的组装通过AD肽与(DDD) $_2$ 结合位点的相互作用很容易发生。DDD肽可插入基本上任何多肽序列或拴结至任何前体,条件是这种衍生不干扰其二聚化和与AD肽结合的能力。相似地,AD肽可插入基本上任何多肽序列或拴结至任何前体,条件是这种衍生不干扰其与同型二聚体DDD结合位点的结合。这种模块化方法具有高度的通用性,可用于组合基本上任何A和任何B,以形成包含衍生自A的前体的两个亚基(a_2)和衍生自B的前体的一个亚基(b)的二元装配体。如果A和B的前体均包含能够与另一抗体结构域缔合而产生抗原结合位点的抗体结构域(例如,Fab或scFv),得到的 a_2b 复合体是双特异性且三价的。例如,在一些实施方案中,所述二元复合体可通过化学耦联连接至效应物(如配体或药物),连接至载体(如葡聚糖或纳米粒子),或同时连接至效应物和载体,以实现此类修饰允许的其他应用。在优选实施方案中,此主题的变化可用于制备为同型六聚体或异型六聚体的六聚复合体。

[0122] 由于二元复合体的稳定性主要依赖于A中包含的DDD对B中包含的AD的结合亲和力,且使用平衡尺寸排阻HPLC分析估测由C末端融合AD1的构建体(h679-Fab-AD1,参见实施例3)与C-或N-末端融合DDD1的构建体(C-DDD1-Fab-hMN-14或N-DDD1-Fab-hMN-14,均请参见实施例4)形成的两种原型 a_2b 结构(参见实施例5)的此亲和力不大于8nM,因此共价连接 a_2b 复合体中包含的A和B将会防止各亚基间出现不希望的解离,进而有助于在体内应用。为了稳定该二元复合体,可在DDD和AD序列的关键位置同时引入半胱氨酸残基,以使DDD和AD之间形成二硫键连接。还可应用其他方法或策略来实现经由 a_2 和b交联形成稳定的复合体。例如,使用戊二醛或PICUP方法,组成亚基彼此之间可以较低效率的低特异性方式共价连接。也可使用其他已知的共价交联方法。

[0123] 定义

[0124] 本文使用的“一个”或“一种”可指一个(种)或多于一个(种)的项目。

[0125] 如此处所用,术语“和”和“或”可用于表示合取或析取。即,除非另外指明,二者均应理解为等同于“和/或”。

[0126] “二聚化和停靠结构域(DDD)”指允许包含DDD序列的两个同型单体自发形成二聚体的肽序列。所得同型二聚体在DDD序列内包含锚定结构域的停靠位点。虽然示例性DDD序列可从cAMP依赖性蛋白激酶获得,但是也可使用其他已知的DDD序列。

[0127] “锚定结构域(AD)”是对二聚化DDD序列具有结合亲和力的肽序列。虽然示例性AD序列可衍生自任何A-激酶锚定蛋白(AKAP),但是也可使用其他已知的AD序列。

[0128] 术语“前体”使用其普通含义,即可从其形成更加稳定、确定或终产物的物质。

[0129] 如此处所用,“结合分子”、“结合部分”或“靶向分子”是任何可以特异结合靶分子、

细胞、复合体和/或组织的分子。结合分子可包括但不限于抗体或其片段、类似物或模拟物、avimer、适体或靶向肽。

[0130] 如此处所述,“抗体”指全长(即天然存在的或者通过正常的免疫球蛋白基因片段重组技术形成的)免疫球蛋白分子(如IgG抗体),或者具有免疫活性(即特异性结合)的免疫球蛋白分子的部分或类似物,像抗体片段。

[0131] “抗体片段”是抗体的一部分,如F(ab)₂、F(ab')₂、Fab、Fv、sFv等。无论结构如何,抗体片段与完整抗体识别的相同抗原结合。术语“抗体片段”还包括通过结合特异抗原以形成复合体来发挥抗体类似作用的任何合成或基因工程蛋白。例如,抗体片段包括由可变区组成的分离片段,如由重链和轻链的可变区组成的“Fv”片段,轻链和重链可变区通过肽连接体连接形成的重组单链多肽分子(“scFv蛋白”)和由氨基酸残基组成的模仿高变区的最小识别单位(CDR)。

[0132] “效应物”是产生选定结果的原子、分子或化合物。效应物可包括治疗剂和/或诊断剂。

[0133] “治疗剂”是可用于治疗疾病的原子、分子或化合物。治疗剂的实例包括抗体、抗体片段、药物、毒素、酶、核酸酶、激素、免疫调节剂、反义寡核苷酸、小干扰RNA(siRNA)、螯合剂、硼化合物、光敏剂、染料和放射性同位素。其他示例性的治疗剂和使用方法参见第20050002945、20040018557、20030148409和20050014207号美国专利公布,其均通过引用结合入本文。

[0134] “诊断剂”是可用于诊断疾病的原子、分子或化合物。有用的诊断剂包括但不限于放射性同位素、染料(如与生物素-链霉亲和素复合体一起)、造影剂、荧光化合物或分子和磁共振成像(MRI)的增强剂(如顺磁离子)。

[0135] “免疫轭合物”是结合分子(如抗体组分)与原子、分子或更高级结构(如载体、治疗剂或诊断剂)的轭合物。

[0136] “裸抗体”是未与任何其他试剂轭合的抗体。

[0137] “载体”是能够与治疗剂或诊断剂缔合以利于此试剂向靶细胞的递送的原子、分子或更高级结构。载体可包括脂质(如能够形成更高级结构的两亲性脂质)、多糖(如葡聚糖)或其他更高级结构(如胶束、脂质体或纳米粒子)。

[0138] 如此处所用,术语“抗体融合蛋白”是重组制备的抗原结合分子,其中连接了具有相同或不同特异性的两个或多个相同或不同的scFv或抗体片段。该融合蛋白的价位指示其对单个抗原或表位具有多少结合臂或位点;即单价、双价、三价或多价。抗体融合蛋白的多价位意味着它在与抗原结合时可以利用多个相互作用,因而增强与抗原结合的亲和力。特异性表示抗体融合蛋白能与多少种抗原或表位结合;即单特异性、双特异性、三特异性、多特异性。根据这些定义,天然抗体如IgG为双价的,因为它有两个结合臂,但是它是单特异性的,因为它结合一个表位。单特异性、多价融合蛋白具有多于一个的表位结合位点,但是只与一个此类表位结合,例如具有与同一抗原反应的两个结合位点的双链抗体。该融合蛋白可包含单个抗体组分、不同抗体组分的多价或多特异性组合,或者同一抗体组分的多个拷贝。该融合蛋白还可含抗体或抗体片段和治疗剂。适合用于此类融合蛋白的治疗剂实例包括免疫调节剂(“抗体-免疫调节剂融合蛋白”)和毒素(“抗体-毒素融合蛋白”)。一个优选的毒素包含核糖核酸酶(RNA酶),优选为重组RNA酶。

[0139] 如果抗体或者免疫轭合物制品,或者本文所述的组合物的施用量是生理学上显著的,即被称为施以“治疗有效量”。如果试剂的存在引起受体哺乳动物生理发生可检测的变化,即被视为生理学上显著的。在特定实施方案中,如果抗体制品的存在引起了抗肿瘤反应或者减轻了自身免疫疾病状态的征兆或者症状,即被视为生理学上显著的。生理学上显著的效应还可以是引发了受体哺乳动物的体液和/或细胞免疫反应,导致靶细胞生长受到抑制或者死亡。“治疗有效量”并不限于对受治疗者产生最优选效应的试剂量,而可以指对受治疗者、细胞、组织或器官产生所述试剂的任何可能已知的效应的量。

[0140] 制备模块化亚基的稳定拴结装配体的方法

[0141] 本发明公开的方法和组合物提供了制备由模块化亚基组成的稳定拴结装配体的平台技术。一个实施方案涉及由优选分别制备的两种确定组分A和B形成的稳定拴结的二元复合体。但是,在替代实施方案中,A和B可以一起制备,例如,通过使用既编码A又编码B的载体,或者使用分别编码A和B的两个不同载体转染单个细胞系。当A和B二者均为Fab片段时,优选为分别制备,否则共同制备时会因轻链乱序而导致异质产物。

[0142] 在某些实施方案中,由两个相同亚基(a_2)组成的A与由一个亚基(b)组成的B结合,形成 a_2b 结构的装配体。A和B的缔合是位点特异并且自发的缔合,原因在于分别构建入A和B的DDD和AD序列之间强烈的结合作用。A和B均可以为任何实体,且DDD连接的A的前体可以与AD连接的B的前体不同或者相同。在后一种情况下,所得 a_2b 复合体(称为 a_3)由三个亚基组成,每个亚基均包含相同的前体但是均同时连接至DDD和AD。

[0143] 本申请要求保护的方法和组合物的模块化本质允许任何A和任何B的组合。只要不干扰DDD的二聚化或者DDD与AD的结合,A和B所连接或包含的前体类型基本没有限制。当通过重组工程方法构建时,A和B可以独立在不同的宿主细胞中生成、被纯化和存储(或者替代地,按上述方法在相同宿主细胞中生成)。但是,在组装之前对A和B进行纯化并不是完全必需的。含有A和B的细胞提取物或培养物可以在适当条件下直接进行混合,以实现二元复合体的形成,然后通过氧化后的二硫键来稳定该复合体,之后再对该复合体进行纯化。在某些应用中,在纯化之后且在与A结合之前,B可能需要与效应物或载体轭合。或者,在纯化之后且在与B结合之前,A可能需要与效应物或载体轭合。还有可能是在结合之前,A和B均需要用效应物或载体进行修饰。此外,在某些应用中, a_2b 复合体可能需要轭合效应物或载体。当A和B在同一宿主细胞中制备时,它们可自发组装为 a_2b 复合体。

[0144] 优选的实施方案利用cAMP依赖性蛋白激酶(PKA)调节亚基和A-激酶锚定蛋白(AKAP)锚定结构域之间自然发生的特异性蛋白质/蛋白质相互作用。PKA首次报道于1968年(请参见Walsh等,J.Biol.Chem.243:3763-65(1968))。全酶结构在20世纪70年代中期得到阐明,其由两个催化亚基组成,催化亚基被调节(R)亚基二聚体置于失活状态(请参见Corbin等,J.Biol.Chem.248:1813-21(1973))。发现R亚基有两种类型(RI和RII),每种类型均有 α 和 β 亚型。R亚基只能通过分离得到稳定的二聚体,且表明二聚化结构域由前44个氨基酸末端残基组成(请参见Hausken等,J.Biol.Chem.271:29016-22(1996))。PKA是广谱丝氨酸/苏氨酸激酶,其信号转导特异性是通过全酶的区域化实现的,而全酶的区域化则是借助于称为A-激酶锚定蛋白(AKAP)的停靠蛋白(Scott等,J.Biol.Chem.265:21561-66(1990))。

[0145] 第一个AKAP,即微管相关蛋白-2,是在1984年鉴定的(Lohmann等,Proc.Natl.Acad.Sci USA.81:6723-27(1984))。截至目前为止,已在从酵母到人类等诸多

物种中鉴定了50多种结构各异的AKAP(请参见Wong等,Nat Rev Mol Cell Biol.12:959-70(2004))。AKAP的PKA锚定结构域为14-18个残基的两亲螺旋(请参见Carr等,J.Biol.Chem.266:14188-92(1991))。AKAP的PKA锚定结构域的氨基酸序列相当多样化,并且其对RII二聚体的结合亲和力为2-90nM,而对RI二聚体的结合亲和力约小100倍(请参见Alto等,Proc.Natl.Acad.Sci USA.100:4445-50(2003))。该锚定结构域与RII二聚体上由RII氨基末端的前23个残基形成的疏水表面结合(Colledge等,Trends Cell Biol.6:216-21(1999))。因此,RII二聚化结构域和AKAP结合结构域均位于相同的44氨基酸序列内。此外,AKAP仅与RII二聚体而非单体结合。图7显示了此相互作用的结构模型。

[0146] 通过DDD和AD序列之间的相互作用形成的非共价复合体可被共价稳定以实现体内应用。这可通过在DDD和AD两个序列的关键位置(如DDD2和AD2中所示)引入半胱氨酸残基,以利于形成二硫键来实现。替代地,可使用其他已知类型的共价交联方法。

[0147] 当采用重组工程方法制备时,二元复合体的两个组分(A和B)可在同一宿主细胞中合成,或者更优选地,在两个单独的宿主细胞系中合成。引导A的合成的表达载体将包含目标多肽(A)的DNA序列,该序列与编码PKA R-亚基的DDD(如DDD1或DDD2)的序列融合,DDD可由RII α 、RII β 、RII α 、RII β 或者任何天然或者合成的功能类似物的前30个或更多氨基酸组成。DDD可偶联至A的氨基末端或羧基末端,直接耦联或者优选使用包含适当长度和组成的氨基酸残基的间隔区。替代地,DDD可位于融合蛋白的内部,条件是DDD的结合活性和该多肽融合配偶体所需的活性不受影响。一旦合成以后,A/DDD融合蛋白将与DDD1全部形成稳定的同型二聚体,或者与DDD2大部分形成稳定的同型四聚体。形成稳定同型六聚体或异型六聚体的方法请参见下文的实施例。

[0148] 引导B合成的另一表达盒可位于引导A合成的同一载体中或者优选地位于独立载体中,该表达盒将包含与编码锚定结构域(AD)(如AD1或AD2)的序列融合的目标多肽(B)的DNA序列,所述锚定结构域可衍生自US2003/0232420A1(其通过引用结合入本文)公开的任何AKAP蛋白或者其天然或合成类似物。AD可偶联至B的氨基末端或羧基末端,直接偶联或者优选使用包含适当长度或组成的氨基酸残基的间隔区。在二硫化物还原剂存在下将B/AD2融合蛋白(b)和A/DDD2融合蛋白(主要是a₄)混合,形成由a₂b组成的二元复合体,然后可通过加入合适的氧化剂(如二甲基亚砷,DMSO),以利于形成二硫键,进而对该复合体进行稳定。

[0149] 这些亚基的模块化本质允许任何DDD2-多肽二聚体和任何AD2-多肽的组合。多种模块化亚基的贮存物可以作为纯化产物或未纯化的细胞培养物上清液单独保存,然后在需要时合并以得到各种a₂b结构。

[0150] 在另一实施方案中,A或B在纯化后可利用适当的耦联化学而偶联效应物(如药物或螯合剂)或者载体(如葡聚糖或纳米粒子)。替代地,此类修饰也可在该结构形成并纯化以后进行,或者在混合之前对A和B进行。

[0151] 衍生自重组抗体结合结构域的模块化亚基的稳定拴结装配体

[0152] 本发明公开的方法和组合物可用于提供基于重组抗体的、可以为单特异性或双特异性的多价结合结构。例如,DDD2序列可与单链Fv融合以获得单特异性结合结构。更为普遍的,DDD序列可与抗体可变区融合,该可变区可与互补抗体可变区缔合以形成抗原结合位点。例如,DDD1或DDD2序列可融合至包含V_H结构域和CH1结构域(Fd/DDD)的抗体序列,或者替代地,融合至V_L结构域和CL结构域(L/DDD)。然后,Fd/DDD或L/DDD可分别与互补的L或Fd

缔合以形成Fab/DDD,以及进一步形成Fab/DDD1二聚体或Fab/DDD2四聚体/二聚体。

[0153] 相似地,AD序列(如AD2)可融合至单链Fv,或者更为普遍地,融合至包含V_H结构域和CH1结构域的抗体序列(Fd/AD2),该抗体序列与同源L链配对时形成Fab/AD2。替代地,AD序列(如AD2)可融合至包含V_L结构域和CL结构域的抗体序列,该抗体序列与同源Fd链配对时形成Fab/AD2。将Fab/DDD2的四聚体/二聚体与Fab/AD2混合,然后进行还原和氧化,即得到可以是单特异性或双特异性的三价结合结构的稳定拴结装配体。

[0154] 所述结合结构的V_H和V_L区可衍生自“人源化”单克隆抗体或人抗体。替代地,V_H和/或V_L区可包含衍生自从重组免疫球蛋白文库分离的人抗体片段的序列。例如,请参见Barbas等,METHODS:A companion to Methods in Enzymology(方法:酶学方法指南)2:119(1991)和Winter等,Ann.Rev.Immunol.12:433(1994)。例如,可从STRATAGENE Cloning Systems(La Jolla,Calif.)获得用于制备人免疫球蛋白噬菌体文库的克隆和表达载体。

[0155] 人抗体V_H或V_L序列可衍生自从小鼠中制备的人单克隆抗体。此类抗体获自经过“改造”以在响应抗原刺激时产生特异人抗体的转基因小鼠。在此技术中,人重链和轻链基因座元件被引入含有被靶向破坏的内源重链和轻链基因座的胚胎干细胞系衍生而来的小鼠种系。这种转基因小鼠可合成对人抗原特异的人抗体,并且所述小鼠可用于制备分泌人抗体的杂交瘤。从转基因小鼠获得人抗体的方法请参见Green等,Nature Genet.7:13(1994),Lonberg等,Nature368:856(1994)和Taylor等,Int.Immun.6:579(1994)。

[0156] 制备包含抗体片段的重组融合蛋白的一般方法

[0157] 编码识别特定表位的抗体片段的核酸序列可通过本领域公知的技术获得。例如,分泌具有所需特异性的抗体的杂交瘤可用于获得编码抗体的DNA,所述DNA可使用已知技术制备,例如通过PCR或者传统的cDNA克隆技术。替代地,可构建Fab'表达文库或抗体噬菌体展示文库以筛选具有所需特异性的抗体片段。

[0158] 然后可以直接或者通过编码肽间隔区的序列,将编码所述抗体片段的核酸连接至编码DDD或AD的核酸。制备编码这些类型的融合蛋白的核酸序列的方法在本领域为公知,并将在实施例中进一步提供。

[0159] 在另一实施方案中,主要由A/DDD或B/AD组成的模块化亚基的N-或C-末端可添加额外的氨基酸残基,其中准确的融合位点可能取决于DDD或AD是连接至N-末端还是C-末端(或者在内部位置)。所述额外的氨基酸残基可包含肽标签、信号肽、细胞因子、酶(例如前体药物激活酶)、激素、毒素、肽药物、膜相互作用肽或其他功能蛋白质。

[0160] 在希望的宿主细胞中制备重组蛋白的方法在本领域为公知。为了便于纯化,所述稳定拴结结构可包含合适的肽标签,如FLAG序列或多聚-HIS序列,以利于使用相应的亲和柱对它们进行纯化。

[0161] 适合表达所述稳定拴结结构的组成亚基的示例性表达系统为pdHL2载体,该载体具有可扩增的鼠dhfr基因,允许通过甲氨蝶呤处理进行选择 and 扩增。请参见Gillies等,J.Immunol.Methods125:191(1989)。pdHL2载体提供由两个金属硫蛋白启动子和IgH增强子单独控制的两个基因的独立表达。

[0162] 适合表达所述稳定拴结结构的组成亚基的宿主细胞或细胞系对本领域的技术人员为已知。使用人宿主细胞会使任何表达的分子能够用人糖基化模式进行修饰。但是,并没有迹象暗示本发明公开的方法必须或者优选使用人宿主细胞。

[0163] 作为示例,可通过电穿孔方法用编码所述稳定拴结结构的组成亚基的线性化pdHL2载体转染鼠骨髓瘤细胞系(如Sp2/0)。转染48小时后,可通过将细胞与含有0.05-0.1 μ M甲氨蝶呤的培养基孵育而开始选择。然后可通过将甲氨蝶呤浓度递增至5 μ M来扩增所选克隆。

[0164] 所述稳定拴结结构的轭合物

[0165] 上述稳定拴结结构还可轭合其他部分。例如,药物、毒素、放射性化合物、酶、激素、细胞毒性蛋白、螯合剂、细胞因子和其他功能剂可轭合至所述稳定拴结结构的一个或多个亚基。例如,可通过共价连接轭合至侧链含有胺、羧基、巯基或羟基基团的氨基酸残基。有各种常规连接体可用于此用途,例如,二异氰酸酯、二异硫氰酸酯、二(羟基琥珀酰亚胺)酯、碳二亚胺、马来酰亚胺-羟基琥珀酰亚胺酯、戊二醛及类似物。试剂与所述稳定拴结结构的轭合优选不显著影响未修饰结构中包含的各个亚基的活性。可以分开对模块化亚基进行轭合,然后将亚基组装为稳定拴结构建体,或者替代地,也可使用完全形成的稳定拴结构建体或者该稳定拴结构建体形成过程中的任何中间体进行轭合。此外,可先将细胞毒性试剂或其他试剂偶联至多聚物载体,然后将该载体轭合至稳定拴结结构。有关此方法的详情,请参见Ryser等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,75:3867-3870,1978;U.S.4,699,784和U.S.4,046,722,其通过引用结合入本文。

[0166] 此处所述轭合物可通过本领域已知的各种方法制备。例如,稳定拴结结构可用¹³¹I进行放射性标记,然后与脂质轭合,以便所得轭合物可以形成脂质体。该脂质体可包括一个或多个治疗剂(如FUDR-dO等药物)或诊断剂。替代地,除了所述载体之外,稳定拴结结构可以轭合¹³¹I(如在酪氨酸残基处)和药物(如在赖氨酸残基的 ϵ 氨基),并且该载体可包括其他治疗剂或诊断剂。治疗剂和诊断剂可与所述稳定拴结结构的一个或多于一个的亚基共价缔合。

[0167] 脂质体和胶束的形成在本领域为已知。例如,请参见Wrobel和Collins,Biochimica et Biophysica Acta(1995),1235:296-304;Lundberg等,J.Pharm.Pharmacol.(1999),51:1099-1105;Lundberg等,Int.J.Pharm.(2000),205:101-108;Lundberg,J.Pharm.Sci.(1994),83:72-75;Xu等,Molec.Cancer Ther.(2002),1:337-346;Torchilin等,Proc.Nat'l.Acad.Sci.,U.S.A.(2003),100:6039-6044;U.S.5,565,215;U.S.6,379,698和U.S.2003/0082154。

[0168] 由聚合物、二氧化硅或金属形成的可用于药物递送或成像的纳米粒子或纳米胶囊也已有报道。例如,请参见West等,Applications of Nanotechnology to Biotechnology(2000),11:215-217;U.S.5,620,708;U.S.5,702,727和U.S.6,530,944。抗体或结合分子与脂质体轭合形成治疗剂或诊断剂的靶向载体已有报道。例如,请参见Bendas,Biodrugs(2001),15:215-224;Xu等,Mol.Cancer Ther(2002),1:337-346;Torchilin等,Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A(2003),100:6039-6044;Bally等,J.Liposome Res.(1998),8:299-335;Lundberg,Int.J.Pharm.(1994),109:73-81;Lundberg,J.Pharm.Pharmacol.(1997),49:16-21;Lundberg,Anti-cancer Drug Design(1998),13:453-461。另请参见U.S.6,306,393;序号为10/350,096的美国专利申请;序号为09/590,284的美国专利申请和1999年6月9日提交的序号为60/138,284的美国专利申请。所有这些参考文献均通过引用结合入本文。

[0169] 多种诊断剂和治疗剂可有利地用于形成所述稳定拴结结构的轭合物,或者可连接

至与所述稳定拴结结构上的识别位点结合的半抗原。诊断剂可包括放射性同位素、用于MRI的增强剂或用于超声成像的造影剂和荧光化合物。许多合适的显像剂,以及它们与蛋白质或肽的连接方法在本领域为已知(例如,请参见美国专利5,021,236和4,472,509,其均通过引用结合入本文)。某些连接方法包括金属螯合络合物的使用,例如,使用连接至蛋白质或肽的有机螯合剂(如DTPA)络合物(美国专利4,472,509)。

[0170] 为了向稳定拴结结构加载放射性金属离子或顺磁离子,可能需要先让该结构与连接了多个拷贝的用于结合放射性金属离子或顺磁离子的螯合基团的载体反应。此载体可为多聚赖氨酸、多糖或者具有侧基的衍生多聚物或可衍生多聚物,所述侧基可结合已知可用于此用途的螯合基团,例如乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、卟啉、多胺、冠醚、双-缩氨基硫脲、聚肟(polyoximes)等。包含螯合剂的载体可通过使用标准的化学方法来以最小化聚集和免疫活性损失的方式偶联至所述稳定拴结结构。

[0171] 可用于制备此类轭合物的其他较为不常见的方法和试剂公开于U.S. 4,824,659,其通过引用整体结合入本文。特别有用的金属-螯合剂组合包括2-苯甲基-DTPA及其单甲基类似物和环己基类似物,它们可与60-4,000keV的总能量范围内的诊断性同位素配合使用。一些有用的诊断性核素可包括 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{94}Tc 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 或 ^{111}In 。当与本发明公开的稳定拴结结构和载体一起使用时,与非放射性金属(如锰、铁和钆)络合的相同螯合剂可用于MRI。大环螯合剂,如NOTA、DOTA和TETA,可用于多种金属和射电金属,最特别的是分别用于镱、钷和铜放射性核素。通过根据目标金属调节环的大小,可使此类金属-螯合剂络合物非常稳定。可使用其他环类型的螯合剂,如用于络合 ^{223}Ra 的大环聚醚。

[0172] 例如,治疗剂包括化疗药物,如长春碱类、蒽环类、表叶毒素(epidophyllotoxin)、紫杉烷类、抗代谢物、烷化剂、抗生素、Cox-2抑制剂、抗有丝分裂剂、抗血管生成剂和促凋亡剂,特别是来自这些和其他抗癌剂类别的阿霉素、甲氨蝶呤、紫杉醇、CPT-11、喜树碱和其他物质及类似物。其他癌症化疗药物包括氮芥类、烷基磺酸盐、亚硝基脲类、三氮烯类、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物、铂配合物、激素及类似物。合适的化疗剂请参见REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(雷明顿氏药物科学),第19版(Mack Publishing Co.1995)以及GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS(GOODMAN和GILMAN的治疗学的药理学基础),第7版(MacMillan Publishing Co.1985),以及这些出版物的修订版。其他合适的化疗剂(如实验药)对本领域技术人员为已知,并可用本领域所知的方法轭合至本文所述的稳定拴结结构。

[0173] 另一类治疗剂由发射 α -粒子(如 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac)、 β -粒子(如 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Y 、 ^{111}Ag 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{166}Dy 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re)或俄歇电子(如 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{67}Ga 、 ^{191}Os 、 $^{193\text{m}}\text{Pt}$ 、 $^{195\text{m}}\text{Pt}$ 、 $^{195\text{m}}\text{Hg}$)的放射性核素组成。所述稳定拴结结构可使用上述一个或多个放射性核素进行标记,方法同诊断剂所用方法。

[0174] 包含可检测标记(如荧光分子)或细胞毒剂(如放射性碘)的合适的肽可以共价、非共价或以其他方式与所述稳定拴结结构缔合。例如,可通过将光敏剂或染料包括在稳定拴结结构上以获得可用于治疗的轭合物。荧光组合物(如荧光染料)和其他对可见光敏感的显色剂或染料(如卟啉)已经用于检测和治疗病变,方法是用合适的光照射病变部位。在治疗中,这被称为光辐射、光疗法或光动力疗法。请参见Jori等编,PHOTODYNAMIC THERAPY OF

TUMORS AND OTHER DISEASES (肿瘤和其他疾病的光动力疗法) (Libreria Progetto 1985); van den Bergh, Chem. Britain (1986), 22:430。此外,还将单克隆抗体与光活化染料偶联以实现光疗法。请参见Mew等, J. Immunol. (1983), 130:1473; idem., Cancer Res. (1985), 45:4380; Oseroff等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986), 83:8744; idem., Photochem. Photobiol. (1987), 46:83; Hasan等, Prog. Clin. Biol. Res. (1989), 288:471; Tatsuta等, Lasers Surg. Med. (1989), 9:422; Pelegrin等, Cancer (1991), 67:2529。还包括内窥镜或腹腔镜应用。内窥镜检测和治疗方案请参见U.S. 4,932,412; U.S. 5,525,338; U.S. 5,716,595; U.S. 5,736,119; U.S. 5,922,302; U.S. 6,096,289; 和U.S. 6,387,350,其均通过引用整体结合入本文。

[0175] 在某些实施方案中,本文公开的新构建体和方法可用于靶向递送RNAi进行治疗性干预。递送介质(vehicle)可以是以融合至人精蛋白(~50个氨基酸残基的肽)的内化抗体结合结构域作为前体的稳定拴结结构。使用的 α_2 构建体的实例为V_H-CH1-hP1-DDD1//V_L-CL或V_H-CH1-hP2-DDD1//V_L-CL,其中hP1和hP2分别为人精蛋白1和人精蛋白2;二者均可在体内应用中形成稳定的DNA复合体(Nat Biotechnol. 23:709-717, 2005; Gene Therapy. 13:194-195, 2006)。使用的 α_4 构建体的实例为V_H-CH1-hP1-DDD2//V_L-CL或V_H-CH1-hP2-DDD2//V_L-CL,其可提供四个活性Fab片段,每个片段均携带人精蛋白以与RNAi结合。该多价复合体将有利于与靶细胞的结合以及受体介导的内化进入靶细胞的作用,其中非共价结合的RNAi在体内中解离并释放到细胞质中。因为不涉及氧化还原化学,所以hP1或hP2中存在的3个分子内二硫键并不会产生问题。除了递送RNAi之外,这些构建体还可用于靶向递送治疗基因或DNA疫苗。此技术的另一应用领域是制备胞内抗体,胞内抗体是RNAi在功能方面的蛋白质类似物。

[0176] 治疗剂

[0177] 药物组合物

[0178] 在某些实施方案中,可向受治疗者(如有癌症的受治疗者)施用稳定拴结结构和/或一个或多个其他治疗剂。此类试剂可以药物组合物的形式施用。一般而言,这必须制备成基本不含对人或动物有害的杂质的组合物。本领域技术人员知道,药物组合物可通过各种途径施用至受治疗者,例如,所述途径包括口服或肠胃外(如静脉内)。

[0179] 在某些实施方案中,必须向受治疗者施用有效量的治疗剂。“有效量”是产生所需效应的试剂量。有效量将取决于,例如,该试剂的效力和预期的效果。例如,与癌症治疗中要减小或消灭实体肿瘤、或者阻止或减少其转移所需的量相比,治疗增生状况(如黄斑变性或子宫内膜异位症)可能需要较少量的抗血管生成剂。具体用途中特定试剂的有效量可使用本领域技术人员公知的方法来确定。

[0180] 化疗剂

[0181] 在某些实施方案中,可施用化疗剂。有用的抗癌化疗剂包括但不限于:5-氟尿嘧啶、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂(CDDP)、环磷酰胺、放线菌素D、柔红霉素、阿霉素、雌激素受体结合剂、足叶乙甙(VP16)、法尼西基蛋白转移酶抑制剂、吉西他滨、异环磷酰胺、氮芥、美法仑、甲氨蝶呤、丝裂霉素、诺维本、亚硝基脲、plicomycin、甲基苄肼、雷洛昔芬、三苯氧胺、紫杉醇、替莫唑胺(temozolomide)(DTIC的水化形式)、反铂(transplatinum)、长春碱和甲氨蝶呤、长春新碱或前述化合物的任何类似物或衍生物。有用的抗传染性生物体的化疗剂包括但不限于,阿昔洛韦、阿苯达唑、金刚烷胺、阿米卡星、阿

莫西林、两性霉素B、氨苄西林、氨曲南、阿奇霉素、杆菌肽、复方新诺明 (bactrim)、**Batrafen**[®] (巴特芬)、联苯苄唑、羧苄青霉素、卡泊芬净、头孢克洛、头孢唑啉、头孢菌素、头孢吡肟、头孢曲松、头孢噻肟、氯霉素、西多福韦、**Cipro**[®] (环丙沙星)、克拉霉素、克拉维酸、克霉唑、氯唑西林、强力霉素、益康唑、红环化素 (erythrocycline)、红霉素、灭滴灵、氟康唑、氟胞嘧啶、膦甲酸、呋喃唑酮、更昔洛韦、庆大霉素、亚胺培南、异烟肼、伊曲康唑、卡那霉素、酮康唑、林可霉素、利奈唑酮、美罗培南、咪康唑、米诺环素、萘替芬、萘啶酸、新霉素、奈替米星、呋喃妥因、制霉菌素、奥司他韦、苯唑西林、巴龙霉素、青霉素、戊烷脒、哌拉西林-他唑巴坦、利福布汀、利福平、金刚乙胺、链霉素、磺胺甲噁唑、柳氮磺胺吡啶、四环素、噻康唑、妥布霉素、托西拉酯、托萘酯、甲氧苄啶磺胺甲噁唑、万乃洛韦、万古霉素、扎那米韦 (zanamir) 和阿奇霉素。

[0182] 化疗剂和施用方法、剂量等对本领域技术人员为公知 (例如, 请参见 “Physicians Desk Reference” (医师用药参考)、古德曼和吉尔曼的 “The Pharmacological Basis of Therapeutics” (治疗学的药理学基础) 和 “Remington’s Pharmaceutical Sciences” (雷明顿氏药物科学), 其相应部分通过引用结合入本文)。必须根据治疗的受治疗者的状况对剂量进行一些调整。在任何情况下, 负责给药的人员都必须根据具体受治疗者确定合适的剂量。

[0183] 激素

[0184] 糖皮质激素可增加其他化疗剂的效力, 因此它们经常用于联合治疗。糖皮质激素的实例如泼尼松和地塞米松。孕激素, 如己酸羟孕酮、乙酸甲羟孕酮和乙酸甲地孕酮, 已用于治疗子宫内膜癌和乳腺癌。雌激素, 如二乙基己烯雌酚和炔雌醇, 已用于治疗前列腺癌等癌症。抗雌激素, 如三苯氧胺, 已用于治疗乳腺癌等癌症。雄激素, 如丙酸睾酮和氟羟甲睾酮也已用于治疗乳腺癌。

[0185] 血管生成抑制剂

[0186] 在某些实施方案中, 可使用抗血管生成剂, 如制管张素、baculostatin、血管内抑素、乳腺丝抑蛋白、抗VEGF抗体、抗PIGF肽和抗体、抗血管生长因子抗体、抗Flk-1抗体、抗Fit-1抗体和肽、层粘连蛋白肽、纤连蛋白肽、血纤维蛋白溶酶原激活物抑制剂、组织金属蛋白酶抑制剂、干扰素、白介素-12、IP-10、Gro-β、血小板反应素、2-甲氧雌二醇、增殖蛋白相关蛋白、羧酰胺三唑 (carboxiamidotriazole)、CM101、Marimastat (马立马司他)、戊聚糖多硫酸盐、血管形成素-2、干扰素α、除莠霉素A、PNU145156E、16K催乳素片段、Linomide (利诺胺)、沙利度胺、己酮可可碱、染料木黄酮、TNP-470、内皮抑制素、紫杉醇、accutin、制管张素、西多福韦、长春新碱、博莱霉素、AGM-1470、血小板因子4或米诺环素。

[0187] 免疫调节剂

[0188] 如此处所用, 术语 “免疫调节剂” 包括细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素和造血因子, 如白介素、集落刺激因子、干扰素 (例如, 干扰素-α、-β和-γ) 和命名为 “S1因子” 的干细胞生长因子。合适的免疫调节剂部分的实例包括 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、干扰素 γ、TNF-α 及类似物。

[0189] 术语 “细胞因子” 是由一个细胞群体释放的、作为细胞间介导体而作用于另一细胞的蛋白质或肽的总称。如此处广泛所用, 细胞因子的实例包括淋巴因子、单核因子、生长因子和传统的多肽激素。细胞因子包括: 生长激素, 如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和

牛生长激素;甲状旁腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素,如卵泡刺激素(FSH)、甲状腺刺激素(TSH)和黄体生成素(LH);肝细胞生长因子;前列腺素、成纤维生长因子;催乳素;胎盘催乳素、OB蛋白;肿瘤坏死因子- α 和- β ;苗勒抑制物质(mullerian inhibiting substance);小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整合素;血小板生成素(TPO);神经生长因子,如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和-II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素,如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);和粒细胞-CSF(G-CSF);白介素(IL),如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12;IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-34、IL-35、IL-36、IL-37、IL-38、IL-39、IL-40、IL-41、IL-42、IL-43、IL-44、IL-45、IL-46、IL-47、IL-48、IL-49、IL-50、IL-51、IL-52、IL-53、IL-54、IL-55、IL-56、IL-57、IL-58、IL-59、IL-60、IL-61、IL-62、IL-63、IL-64、IL-65、IL-66、IL-67、IL-68、IL-69、IL-70、IL-71、IL-72、IL-73、IL-74、IL-75、IL-76、IL-77、IL-78、IL-79、IL-80、IL-81、IL-82、IL-83、IL-84、IL-85、IL-86、IL-87、IL-88、IL-89、IL-90、IL-91、IL-92、IL-93、IL-94、IL-95、IL-96、IL-97、IL-98、IL-99、IL-100、IL-101、IL-102、IL-103、IL-104、IL-105、IL-106、IL-107、IL-108、IL-109、IL-110、IL-111、IL-112、IL-113、IL-114、IL-115、IL-116、IL-117、IL-118、IL-119、IL-120、IL-121、IL-122、IL-123、IL-124、IL-125、IL-126、IL-127、IL-128、IL-129、IL-130、IL-131、IL-132、IL-133、IL-134、IL-135、IL-136、IL-137、IL-138、IL-139、IL-140、IL-141、IL-142、IL-143、IL-144、IL-145、IL-146、IL-147、IL-148、IL-149、IL-150、IL-151、IL-152、IL-153、IL-154、IL-155、IL-156、IL-157、IL-158、IL-159、IL-160、IL-161、IL-162、IL-163、IL-164、IL-165、IL-166、IL-167、IL-168、IL-169、IL-170、IL-171、IL-172、IL-173、IL-174、IL-175、IL-176、IL-177、IL-178、IL-179、IL-180、IL-181、IL-182、IL-183、IL-184、IL-185、IL-186、IL-187、IL-188、IL-189、IL-190、IL-191、IL-192、IL-193、IL-194、IL-195、IL-196、IL-197、IL-198、IL-199、IL-200、IL-201、IL-202、IL-203、IL-204、IL-205、IL-206、IL-207、IL-208、IL-209、IL-210、IL-211、IL-212、IL-213、IL-214、IL-215、IL-216、IL-217、IL-218、IL-219、IL-220、IL-221、IL-222、IL-223、IL-224、IL-225、IL-226、IL-227、IL-228、IL-229、IL-230、IL-231、IL-232、IL-233、IL-234、IL-235、IL-236、IL-237、IL-238、IL-239、IL-240、IL-241、IL-242、IL-243、IL-244、IL-245、IL-246、IL-247、IL-248、IL-249、IL-250、IL-251、IL-252、IL-253、IL-254、IL-255、IL-256、IL-257、IL-258、IL-259、IL-260、IL-261、IL-262、IL-263、IL-264、IL-265、IL-266、IL-267、IL-268、IL-269、IL-270、IL-271、IL-272、IL-273、IL-274、IL-275、IL-276、IL-277、IL-278、IL-279、IL-280、IL-281、IL-282、IL-283、IL-284、IL-285、IL-286、IL-287、IL-288、IL-289、IL-290、IL-291、IL-292、IL-293、IL-294、IL-295、IL-296、IL-297、IL-298、IL-299、IL-300、IL-301、IL-302、IL-303、IL-304、IL-305、IL-306、IL-307、IL-308、IL-309、IL-310、IL-311、IL-312、IL-313、IL-314、IL-315、IL-316、IL-317、IL-318、IL-319、IL-320、IL-321、IL-322、IL-323、IL-324、IL-325、IL-326、IL-327、IL-328、IL-329、IL-330、IL-331、IL-332、IL-333、IL-334、IL-335、IL-336、IL-337、IL-338、IL-339、IL-340、IL-341、IL-342、IL-343、IL-344、IL-345、IL-346、IL-347、IL-348、IL-349、IL-350、IL-351、IL-352、IL-353、IL-354、IL-355、IL-356、IL-357、IL-358、IL-359、IL-360、IL-361、IL-362、IL-363、IL-364、IL-365、IL-366、IL-367、IL-368、IL-369、IL-370、IL-371、IL-372、IL-373、IL-374、IL-375、IL-376、IL-377、IL-378、IL-379、IL-380、IL-381、IL-382、IL-383、IL-384、IL-385、IL-386、IL-387、IL-388、IL-389、IL-390、IL-391、IL-392、IL-393、IL-394、IL-395、IL-396、IL-397、IL-398、IL-399、IL-400、IL-401、IL-402、IL-403、IL-404、IL-405、IL-406、IL-407、IL-408、IL-409、IL-410、IL-411、IL-412、IL-413、IL-414、IL-415、IL-416、IL-417、IL-418、IL-419、IL-420、IL-421、IL-422、IL-423、IL-424、IL-425、IL-426、IL-427、IL-428、IL-429、IL-430、IL-431、IL-432、IL-433、IL-434、IL-435、IL-436、IL-437、IL-438、IL-439、IL-440、IL-441、IL-442、IL-443、IL-444、IL-445、IL-446、IL-447、IL-448、IL-449、IL-450、IL-451、IL-452、IL-453、IL-454、IL-455、IL-456、IL-457、IL-458、IL-459、IL-460、IL-461、IL-462、IL-463、IL-464、IL-465、IL-466、IL-467、IL-468、IL-469、IL-470、IL-471、IL-472、IL-473、IL-474、IL-475、IL-476、IL-477、IL-478、IL-479、IL-480、IL-481、IL-482、IL-483、IL-484、IL-485、IL-486、IL-487、IL-488、IL-489、IL-490、IL-491、IL-492、IL-493、IL-494、IL-495、IL-496、IL-497、IL-498、IL-499、IL-500、IL-501、IL-502、IL-503、IL-504、IL-505、IL-506、IL-507、IL-508、IL-509、IL-510、IL-511、IL-512、IL-513、IL-514、IL-515、IL-516、IL-517、IL-518、IL-519、IL-520、IL-521、IL-522、IL-523、IL-524、IL-525、IL-526、IL-527、IL-528、IL-529、IL-530、IL-531、IL-532、IL-533、IL-534、IL-535、IL-536、IL-537、IL-538、IL-539、IL-540、IL-541、IL-542、IL-543、IL-544、IL-545、IL-546、IL-547、IL-548、IL-549、IL-550、IL-551、IL-552、IL-553、IL-554、IL-555、IL-556、IL-557、IL-558、IL-559、IL-560、IL-561、IL-562、IL-563、IL-564、IL-565、IL-566、IL-567、IL-568、IL-569、IL-570、IL-571、IL-572、IL-573、IL-574、IL-575、IL-576、IL-577、IL-578、IL-579、IL-580、IL-581、IL-582、IL-583、IL-584、IL-585、IL-586、IL-587、IL-588、IL-589、IL-590、IL-591、IL-592、IL-593、IL-594、IL-595、IL-596、IL-597、IL-598、IL-599、IL-600、IL-601、IL-602、IL-603、IL-604、IL-605、IL-606、IL-607、IL-608、IL-609、IL-610、IL-611、IL-612、IL-613、IL-614、IL-615、IL-616、IL-617、IL-618、IL-619、IL-620、IL-621、IL-622、IL-623、IL-624、IL-625、IL-626、IL-627、IL-628、IL-629、IL-630、IL-631、IL-632、IL-633、IL-634、IL-635、IL-636、IL-637、IL-638、IL-639、IL-640、IL-641、IL-642、IL-643、IL-644、IL-645、IL-646、IL-647、IL-648、IL-649、IL-650、IL-651、IL-652、IL-653、IL-654、IL-

[0190] 趋化因子一般充当化学引诱物,以将免疫效应细胞募集到趋化因子表达位点。趋化因子包括但不限于,RANTES、MCAF、MIP1- α 、MIP1- β 和IP-10。熟练的技术人员了解,某些细胞因子已知同样具有化学引诱效应,并可归于术语趋化因子下。相似地,术语免疫调节剂和细胞因子各自的成员也有重叠。

[0191] 放射性同位素治疗和放射免疫治疗

[0192] 在某些实施方案中,所述肽和/或蛋白质可用于放射性核素治疗或放射免疫治疗方法(例如,请参见Govindan等,2005,Technology in Cancer Research&Treatment,4:375-91;Sharkey和Goldenberg,2005,J.Nucl.Med.46:115S-127S;Goldenberg等(J Clin Oncol2006;24:823-834),“Antibody Pre-targeting Advances Cancer Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy”(抗体预靶向改善了癌症的放射免疫检测和放射免疫治疗),其均通过引用结合入本文)。在特定实施方案中,稳定拴结结构可直接用放射性同位素进行标记并施用至受治疗者。在替代实施方案中,一种或多种放射性同位素可用上述预靶向方法施用,使用了半抗原肽或配体,所述半抗原肽或配体是放射性标记的并在施用定位于病组织中表达升高的部位的双特异性稳定拴结结构之后注射。

[0193] 可用于治疗病组织的放射性同位素包括但不限于： ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 和 ^{211}Pb 。治疗性放射性核素的衰变能优选在20-6,000keV范围内，俄歇辐射源的衰变能优选为60-200keV范围内， β 辐射源的衰变能优选为100-2,500keV， α 辐射源的衰变能优选为4,000-6,000keV。有用的 β 粒子辐射核素的最大衰变能优选为20-5,000keV，更优选地为100-4,000keV，最优选地为500-2,500keV。基本上通过辐射俄歇粒子进行衰变的放射性核素也是优选的。例如，Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m和Ir-192。有用的 β 粒子辐射核素的衰变能优选为<1,000keV，更优选地为<100keV，最优选地为<70keV。基本上通过产生 α -粒子进行衰变的放射性核素也是优选的。此类放射性核素包括但不限于：Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213和Fm-255。有用的 α -粒子辐射的放射性核素的衰变能优选为2,000-10,000keV，更优选地为3,000-8,000keV，最优选地为4,000-7,000keV。

[0194] 例如,由于具有61.5小时的半衰期并供应大量 β 粒子和 γ 射线, ^{67}Gu 被视为放射免疫治疗的一种更有前景的放射性同位素,其可通过使用螯合剂p-溴乙酰氨基-苄基-四乙胺四乙酸(TETA)螯合至蛋白质或肽。替代地,放射含能 β 粒子的 ^{90}Y ,可通过使用二乙烯三胺五乙酸(DTPA)偶联至肽、抗体、融合蛋白或其片段。

[0195] 其他可用的放射性同位素包括 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{75}Br 、 ^{198}Au 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{77}Br 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Tm 、 ^{197}Pt 、 ^{109}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{199}Au 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{201}Tl 、 ^{225}Ac 、 ^{76}Br 、 ^{169}Yb 及类似同位素。

[0196] 在另一实施方案中,可使用放射增敏剂。添加放射增敏剂可导致效力增强。放射增敏剂描述于D.M.Goldenberg编,CANCER THERAPY WITH RADIOLABELED ANTIBODIES(使用放射标记抗体治疗癌症),CRC Press(1995),其通过引用整体结合入本文。

[0197] 具有用于热中子活化治疗的硼附加物(boron addend)负载载体的稳定拴结结构通常有几种起效方式。但是,在执行中子辐照之前,最好等待非定位免疫复合物清除完毕。可使用与所述配体结合的抗体来加速清除。有关此基本原理的描述,请参见第4,624,846号美国专利。例如,可在抗体上连接硼附加物(如碳硼烷)。如本领域公知的,可以制备在侧链具有羧基官能的碳硼烷。碳硼烷与载体(如氨基葡聚糖)的连接可通过激活碳硼烷的羧基并与载体上的胺缩合来实现。然后将此中间复合物螯合至所述抗体。施用所述复合物之后,硼附加物被热中子辐照激活并转化为放射性原子,后者通过 α 辐射进行衰变,产生高毒性的短程作用。

[0198] 试剂盒

[0199] 不同实施方案可包括含有适合用于治疗或诊断受治疗者病组织的组分的试剂盒。示例性试剂盒可包含至少一种稳定拴结结构。如果包含施用成分的组合物未制成通过消化道(如通过口服)递送,则试剂盒还可包括能够通过其他途径递送试剂盒组分的设备。一种用于肠胃外递送等的设备类型为注射器,其用于将所述组合物注射到受治疗者体内。也可使用吸入设备。

[0200] 所述试剂盒组分可包装在一起或者分开包装在两个或更多独立的容器中。在某些实施方案中,所述容器可以是包含适合重建(reconstitution)的复合物的无菌、冻干制剂的管形瓶。试剂盒还可包含适用于重建和/或稀释其他试剂的一种或多种缓冲液。其他可使用的容器包括但不限于:袋、盘、盒、管或类似容器。试剂盒组分可无菌包装并保存在所述容器中。可包括的另一组成部分为给使用试剂盒的人员的使用说明。

[0201] 配制和施用

[0202] 所述稳定拴结结构(包括其复合物)可进一步进行配制以获得组合物,该组合物包含一种或多种药学适宜赋形剂、一种或多种其他成分、或者这些赋形剂和成分的某些组合。这些可通过制备药学有用剂型的已知方法实现,其中有效成分(即所述稳定拴结结构或复合物)与一种或多种药学适宜赋形剂组合成混合物。无菌的磷酸盐缓冲液即为药学适宜赋形剂的一个实例。其他合适的赋形剂对本领域技术人员为公知。例如,请参见Ansel等,PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS(药物剂型和药物递送系统),第5版(Lea&Febiger1990),和Gennaro编,REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(雷明顿氏药物科学),第18版(Mack Publishing Company1990),及其修订版本。

[0203] 本文所述组合物的优选施用途为肠胃外注射。在肠胃外注射中,所述组合物将与药学可接受赋形剂一起制成单位剂量可注射形式,如溶液、悬浮液或乳剂。此类赋形剂本身无毒,并且无治疗作用。此类赋形剂的实例有生理盐水、林格氏液、葡萄糖溶液和Hank's溶液。也可使用非水相赋形剂,如脂肪油和油酸乙酯。优选的赋形剂为5%葡萄糖生理盐水溶液。赋形剂可包含少量添加剂,如增强等渗性和化学稳定性的物质,包括缓冲液和防腐剂。还考虑其他给药方法,包括口服给药。

[0204] 包含稳定拴结结构的配制组合物可用于静脉内施用,例如通过推注或连续输注。用于注射的组合物可与添加的防腐剂以单位剂量形式提供在例如安瓿或多剂量容器中。组合物还可采取诸如油相或水相介质的悬浮液、溶液或乳剂的形式,并可包含制剂用剂,如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。替代地,所述组合物可以是粉末形式,以便在使用前用合适介质(例如,无菌无热原水)构成制剂。

[0205] 所述组合物可以溶液形式施用。该溶液的pH应在pH5-9.5范围内,优选为pH6.5-7.5。其制剂应为具有合适的药学可接受缓冲液的溶液,所述药学可接受缓冲液如磷酸、三羟甲基氨基甲烷-盐酸或柠檬酸盐等。缓冲液浓度应在1-100mM范围内。配制的溶液还可包含盐类,如浓度为50-150mM的氯化钠或氯化钾。还可包括有效量的稳定剂,如甘油、白蛋白、球蛋白、去污剂、明胶、精蛋白或精蛋白盐。如果所述稳定拴结结构使用抗体的人源化形式作为模板,则配制的组合物的全身用药通常为每两天或三天进行或者一周一次。替代地,可以每天施用。通常的施用方式为肌肉注射或血管内输注。

[0206] 所述组合物可通过皮下或其他肠胃外途径施用至哺乳动物。此外,可通过连续输注或者单次或多次推注施用。对抗体或免疫轭合物有用的方法可用于本文所述组合物。一般而言,人的免疫轭合物、融合蛋白或裸抗体施用剂量取决于诸如受治疗者年龄、体重、身高、性别、总体健康状况和先前的治疗历史等因素。通常情况下,需要向受体提供约1mg/kg至20mg/kg范围内的有效成分剂量作为单次静脉内输注,但是也可根据情况需要施用更低或更高的剂量。可按需要重复此剂量,例如,每周一次,持续4-10周;优选为每周一次,持续8周;更优选地,每周一次,持续4周。给药频率也可降低,如每两周一次,持续若干个月。可通过不同的肠胃外途径给药,并相应调整剂量和用药时间。在不同示例性实施方案中,对于抗体、抗体片段或融合蛋白施用,可用的剂量范围为100-500mg, 200-1000mg, 500-2000mg, 100-250mg, 250-500mg, 500-1000mg, 或已知的其他范围。

[0207] 可对本文所述的配制组合物应用用于控制免疫轭合物或抗体作用持续时间的药学方法。控释制剂可通过使用生物相容性聚合物络合或者吸附所述免疫轭合物或裸抗体来实现,例如乙烯-醋酸乙烯酯共聚物基质和硬脂酸二聚体和癸二酸的聚酸酐共聚物基质。请参见Sherwood等, *Bio/Technology* (1992), 10:1446。免疫轭合物或抗体从此基质上释放的速率取决于该免疫轭合物或抗体的分子量、基质内的免疫轭合物或抗体量和分散粒子的大小。请参见Saltzman等, *Biophys. J* (1989), 55:163; Sherwood等, 同上。其他固体剂型描述于Ansel等, *PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS* (药物剂型和药物递送系统), 第5版 (Lea&Febiger1990), 和Gennaro编, *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES* (雷明顿氏药物科学), 第18版 (Mack Publishing Company1990), 及其修订版本。

[0208] 用于治疗目的时,所述组合物以治疗有效量施用至哺乳动物。本文公开的治疗和诊断方法的合适受治疗者通常为人,但也包括非人动物受治疗者,如哺乳动物、猫、狗、马、

猪、山羊、牛、羊驼、骆驼或绵羊。

[0209] 本文公开的稳定拴结结构在序号为09/590,284的美国专利申请(待通过)公开的治疗自身免疫疾病方法中特别有用,该专利申请于2000年6月9日提交,题为“Immunotherapy of Autoimmune Disorders using Antibodies that Target B-Cells”(使用靶向B细胞的抗体治疗自身免疫疾病的免疫疗法),其通过引用整体结合入本文。包含此类结合结构的组合物优选采用静脉内或肌肉内施用方式,剂量为20-5000mg。还可使用鼻内或其他非肠胃外施用途径。组合物还可通过微球、脂质体或置于某些组织(包括血液)内的其他微粒化递送系统施用。

[0210] 所述组合物可通过气溶胶施用,以实现定位递送到肺部。可使用水相气溶胶或非水相(如氟碳推进剂)悬浮液。制备气溶胶时优选使用声波喷雾器,以最大限度减少组合物中的稳定拴结结构暴露于剪切力,那样会导致其降解和活性的损失。

[0211] 一般而言,施用剂量取决于诸如受治疗者年龄、体重、身高、性别、总体健康状况和先前的治疗历史等因素。优选向患者施用饱和剂量的稳定拴结结构。

[0212] 通常情况下,需要向受体提供剂量约50-500毫克范围内的稳定拴结结构,但是也可根据情况需要而施用更低或更高的剂量。剂量实例包括单位剂量20-1500毫克蛋白、单位剂量20-500毫克蛋白、单位剂量20-100毫克蛋白、单位剂量20-1000毫克蛋白、单位剂量100-1500毫克蛋白。在所述组合物包含放射性核素的实施方案中,剂量可以毫居里测量。对于 ^{90}Y ,剂量可为15-40mCi、10-30mCi、20-30mCi或10-20mCi。

[0213] 连接放射性核素的稳定拴结结构对于微生物治疗特别有效。确定所述稳定拴结结构定位于受治疗者体内的一个或多个感染部位之后,注射较高剂量的所述标记组合物,一般为单位剂量20mCi至150mCi (^{131}I),单位剂量5mCi至30mCi (^{90}Y),或者单位剂量5mCi至20mCi (^{186}Re),均基于患者体重为70kg。可采取静脉内、动脉内、淋巴管内、鞘内、或腔内(即肠胃外)注射,并可重复注射。对于某些治疗,可有利地采取多次、分剂量的施用方式,以提供较高的微生物毒性剂量,而不会引起通常情况下发生的正常组织的辐射相应增加的情况。

[0214] 未化学连接至所述稳定拴结结构的化疗剂、抗菌剂、细胞因子、粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)、促红细胞生成素、血小板生成素及类似物,可在所述组合物之前、之后或者与所述组合物同时施用。替代地,此类试剂可连接至所述稳定拴结结构。

[0215] a_2b 形式的稳定拴结结构特别适合用作预靶向剂。示例性结构将由与靶组织或细胞双价结合的两个scFv或Fab亚基(作为 a_2),以及与半抗原结合的一个scFv或Fab亚基(作为b)组成。可先将此双特异性三价结构施用至受治疗者,任选地可接着施用清除剂,然后施用其中半抗原与功能剂结合的试剂,所述功能剂如诊断用的可检测标记,或治疗方法所用的治疗剂。熟练的技术人员了解,已知的使用双特异性抗体的其他方法也可使用所述稳定拴结结构来实施。这些诊断和治疗方法基本上可用于其中已使用基于抗体的试剂进行诊断或治疗的任何场合。如下文所述,双特异性六价稳定拴结结构也可用于和双特异性三价结构相同的目的。

[0216] 治疗和诊断用途:不涉及预靶向的应用

[0217] 所述稳定拴结结构(包括其轭合物)适合用于多种使用抗体或免疫轭合物并且不

需要预靶向的治疗和诊断应用。例如,所述三价结构可作为“裸”构建体、以与裸抗体的治疗相同的方式用于治疗,即此结构未吻合其他功能剂的实施方案。替代地,所述稳定拴结结构被一种或多种功能剂衍生化,以实现诊断或治疗应用。如上所述,其他试剂可共价连接至稳定拴结结构。

[0218] 还包括连接至所述稳定拴结结构的放射性和非放射性诊断剂的用途。合适的非放射性诊断剂是那些用于磁共振成像(MRI)、计算机断层扫描(CT)或超声的诊断剂。例如,MRI剂包括与合适的螯合剂(如2-苄基-DTPA及其单甲基类似物和环己基类似物)络合的非放射性金属,如锰、铁和钆。请参见2001年10月10日提交的序号为09/921,290的美国专利申请,其通过引用整体结合入本文。

[0219] 可使用有助于进行诊断成像的放射性同位素标记所述稳定拴结结构。合适的放射性同位素可包括处于60-4,000KeV能量范围内的同位素,或者更具体地, ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{45}Ti 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{32}P 、 ^{188}Re 及类似的同位素或其组合。例如,请参见题为“Labeling Targeting Agents with Gallium-68”(使用镓-68标记定位剂)的美国专利申请(发明人:G.L.Griffiths和W.J.McBride),和第60/342,104号美国临时专利申请,其公开了用于成像目的的正电子辐射源,如 ^{18}F 、 ^{68}Ga 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 及类似物;二者均通过引用整体结合入本文。例如,可通过单光子发射计算机断层显像(SPECT)或正电子发射断层显像(PET)进行检测。也可应用于外科手术期间的诊断,以鉴定隐蔽的赘生性肿瘤。

[0220] 在另一实施方案中,可使用一种或多种有效杀伤赘生性或其他快速分裂细胞的放射性同位素标记所述稳定拴结结构,所述放射性同位素包括 β -辐射源(如 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Y 、 ^{111}Ag 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{166}Dy 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re)、俄歇电子辐射源(如 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{67}Ga 、 ^{191}Os 、 $^{193\text{m}}\text{Pt}$ 、 $^{195\text{m}}\text{Pt}$ 、 $^{195\text{m}}\text{Hg}$)、 α -辐射源(如 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac)、或其组合。

[0221] 所述稳定拴结结构可通过连接一种或多种成像增强剂而用于MRI,所述成像增强剂可包括选自由铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、铷(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、铽(III)、镨(III)、钽(III)和铟(III)组成的组的金属的络合物。相似地,所述稳定拴结结构可通过连接一种或多种市售的成像增强剂而用于超声成像。第6,331,175号美国专利介绍了MRI技术和吻合MRI增强剂的抗体的制备,其通过引用整体结合入本文。

[0222] 功能蛋白(如毒素)可以多种方式存在于所述稳定拴结结构中。例如,通过与DDD2或AD2融合,功能蛋白可充当所述二元复合体的任一组分的前体,然后DDD2或AD2与靶向实体复合,分别构成例如Fab/AD2或Fab/DDD2。替代地,功能蛋白可融合至靶向结构以充当A的前体,所得A可任选地与合适的B配对。可用于此用途的毒素包括蓖麻毒素、相思豆毒素、核糖核酸酶(RNA酶)、DNA酶I、金葡菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、多花白树毒蛋白、白喉毒素、绿脓杆菌外毒素和绿脓杆菌内毒素。例如,请参见Pastan.等,Cell(1986),47:641和Goldenberg,CA-A Cancer Journal for Clinicians(1994),44:43。适合用于本发明的其他毒素对本领域技术人员为已知并描述于U.S.6,077,499,其通过引用整体结合入本文。其他值得关注的功能蛋白包括各种细胞因子、溶栓剂(clot-dissolving agent)、酶和荧光蛋白。

[0223] 本发明还提供了通过按上文所述方法向受治疗者施用“裸”稳定拴结结合结构,以治疗该受治疗者的肿瘤性疾病的方法,所述稳定拴结结合结构中至少有一个抗原结合位点与选自以下组成的组的抗原结合:碳酸酐酶IX、甲胎蛋白、A3、A33抗体特异性抗原、Ba733、BrE3抗原、CA125、癌胚抗原(CEACAM5)、CEACAM6、CD1、CD1a、CD3、CD5、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD38、CD45、CD74、CD79a、CD80、CD138、结肠特异性抗原p(CSAp)、EGFR、EGP-1、EGP-2、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、HER2/neu、HLA-DR、人绒毛膜促性腺激素、Ia、IL-2、IL-6、IL-8、胰岛素样生长因子、KC4抗原、KS-1、KS1-4、Le(y)、巨噬细胞抑制因子(MIF)、MAGE、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、NCA66、NCA95、NCA90、坏死抗原、p53、PAM-4抗体结合抗原、胎盘生长因子、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PSMA、RS5、S100、T101、TAC、TAG-72、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、生腱蛋白、TRAIL受体、ED-B纤连蛋白、VEGF、17-1A抗原、血管生成标志物、致癌基因标志物或致癌基因产物。抗TRAIL受体(如TRAIL-R1和TRAIL-R2)的抗体在本领域为公知(例如,请参见Georgakis等, Br. J. Haematol. 2005, 130:501-510; Mori等, FEBS Lett. 2005, 579:5379-84)。此类抗体或片段可单独或者与抗TAA抗体组合用于治疗癌症。

[0224] 所述肿瘤性疾病可选自由癌组织、肉瘤、神经胶质瘤、淋巴瘤、白血病和黑色素瘤组成的组。可靶向的肿瘤的示例类型包括急性成淋巴细胞白血病、急性骨髓白血病、胆管癌、乳腺癌、宫颈癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、头颈癌、霍奇金氏淋巴瘤、肺癌、甲状腺髓样癌、非霍奇金氏淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、神经胶质瘤、黑色素瘤、肝癌、前列腺癌和膀胱癌。

[0225] 还提供了通过向受治疗者施用一个或多个剂量的治疗性组合物来治疗受治疗者的B细胞恶性肿瘤、或B细胞免疫或自身免疫疾病的方法,所述组合物包含上文所述的稳定拴结结合结构和药学可接受载体,其中每个抗原结合位点结合CD19、CD20、CD22或IL-17的不同表位。所述治疗组合物可按单位剂量20-1500毫克蛋白、或单位剂量20-500毫克蛋白、或单位剂量20-100毫克蛋白的剂量进行肠胃外施用。受治疗者可接受单位剂量20-100毫克蛋白的重复肠胃外用,或者单位剂量20-1500毫克蛋白的重复肠胃外用。在这些方法中,所述结合结构的亚组分可用放射性同位素进行标记,如 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{90}Y 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{223}Ra 和 ^{225}Ac ,或其组合。

[0226] 还提供了通过为受治疗者施用诊断性组合物来检测或诊断受治疗者的B细胞恶性肿瘤、或B细胞免疫或自身免疫疾病的方法,所述诊断性组合物包含稳定拴结结合结构(其中每个抗原结合位点结合CD19、CD20、CD22或IL-17的不同表位),药学可接受载体,和选自 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{32}P 、 ^{45}Ti 和 ^{188}Re ,或其组合组成的组的放射性核素。可按上文所述通过SPECT或PET进行检测。还可应用于外科手术期间的诊断,以鉴定隐蔽的赘生性肿瘤。

[0227] 本发明还提供了通过向受治疗者施用诊断性组合物来检测或诊断受治疗者的B细胞恶性肿瘤、或B细胞免疫或自身免疫疾病的方法,所述诊断性组合物包含稳定拴结结合结构(其中每个抗原结合位点结合CD19、CD20、CD22或IL-17的不同表位),药学可接受载体和用于磁共振成像(MRI)的一种或多种成像增强剂。所述成像增强剂可选自上文所述增强剂。

[0228] 本发明还提供了通过向患有非肿瘤性疾病或病症的受治疗者施用稳定拴结结合

结构来诊断和/或治疗所述疾病或病症的方法,所述稳定拴结结合结构上连接了可检测标记或治疗剂,并且有特定于该疾病或病症标志物的一个或多个抗原结合位点。所述疾病或病症可由真菌或病毒引起,所述真菌如小孢子菌属、发癣菌属、表皮癣菌属、申克氏孢子丝菌、新型隐球菌、粗球孢子菌、荚膜组织胞浆菌、皮炎芽生菌和白色念球菌;所述病毒如人类免疫缺陷病毒(HIV)、疱疹病毒、巨细胞病毒、狂犬病毒、流感病毒、人乳头瘤病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、仙台病毒、猫白血病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、人类血清细小病毒、猿猴病毒40、呼吸道合胞病毒、小鼠乳腺肿瘤病毒、水痘-带状疱疹病毒、登革病毒、风疹病毒、麻疹病毒、腺病毒、人T细胞白血病毒、Epstein-Barr病毒、小鼠白血病毒、腮腺炎病毒、水泡性口炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒和蓝舌病毒。

[0229] 所述疾病或病症可由细菌引起,如炭疽杆菌、无乳链球菌、嗜肺军团菌、化脓性链球菌、大肠杆菌、淋球菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎双球菌、流感嗜血杆菌B、梅毒螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌和结核分枝杆菌,或支原体。所述疾病或病症可由寄生虫引起,如疟疾。

[0230] 所述疾病或病症可为自身免疫疾病,如急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜、皮炎、西德纳姆氏舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺体综合征、大疱性类天疱疮、糖尿病、过敏性紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、Takayasu's动脉炎、艾迪生氏病、类风湿性关节炎、多发性硬化症、结节病、溃疡性结肠炎、多形红斑、IgA肾病、结节性多动脉炎、强直性脊柱炎、肺出血肾炎综合征、thromboangitis obliterans、Sjogren氏综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、甲状腺功能亢进、硬皮病、慢性活动性肝炎、多发性肌炎/皮肌炎、多软骨炎、寻常性天疱疮、韦格纳肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩侧索硬化、脊髓痨、巨细胞性动脉炎/多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球肾炎、牛皮癣和纤维性肺泡炎。

[0231] 所述疾病或病症可为心肌梗死、缺血性心脏病、或动脉粥样硬化斑块、或移植排斥反应、或阿尔茨海默氏病、或由特应性组织引起的疾病。所述疾病或病症可为活化的粒细胞、单核细胞、淋巴样细胞或巨噬细胞在炎症部位合生而引起的炎症,并且该炎症由传染剂引起。

[0232] 此外,也可使用稳定拴结结构靶向表达特定受体或者过表达受体的细胞,其中A或B组分包含该受体的配体,此配体可指导所述结构与携带所述受体的细胞结合。所述结构的一个或多个亚基可融合或者融合至治疗剂或诊断剂,以允许诊断和治疗方法。

[0233] 治疗和诊断用途:涉及预靶向的应用

[0234] 预靶向是最初为了解决直接靶向抗体血液清除慢而开发的多步骤过程,直接靶向抗体对正常组织(特别是骨髓)有不良毒性。在预靶向中,放射性核素或其他治疗剂连接至可在几分钟内从血液中清除的小化合物。先施用能够识别放射标记的小化合物和靶抗原的预靶向剂;当所述预靶向剂稍后从血液中充分清除时再施用所述放射标记化合物。

[0235] 预靶向方法的开发目的是增加检测或治疗剂的靶标:本底比率。预靶向和生物素/亲和素方法的实例请参见,例如,Goodwin等,第4,863,713号美国专利;Goodwin等, J.Nucl.Med.29:226,1988;Hnatowich等, J.Nucl.Med.28:1294,1987;Oehr等, J.Nucl.Med.29:728,1988;Klibanov等, J.Nucl.Med.29:1951,1988;Sinitzyn等, J.Nucl.Med.30:66,1989;Kalofonos等, J.Nucl.Med.31:1791,1990;Schechter等,

Int.J.Cancer48:167,1991;Paganeli等,Cancer Res.51:5960,1991;Paganeli等,Nucl.Med.Comm.12:211,1991;第5,256,395号美国专利;Stickney等,Cancer Res.51:6650,1991;Yuan等,Cancer Res.51:3119,1991;第6,077,499号美国专利;美国序号09/597,580;美国序号10/361,026;美国序号09/337,756;美国序号09/823,746;美国序号10/116,116;美国序号09/382,186;美国序号10/150,654;第6,090,381号美国专利;第6,472,511号美国专利;美国序号10/114,315;第60/386,411号美国临时专利申请;第60/345,641号美国临时专利申请;第60/3328,835号美国临时专利申请;第60/426,379号美国临时专利申请;美国序号09/823,746;美国序号09/337,756;第60/342,103号美国临时专利申请;和第6,962,702号美国专利,其均通过引用结合入本文。

[0236] 在特定的、非限制性实例中,基于所述稳定拴结结构的预靶向剂包含特定于CEA的两个相同的肿瘤抗原结合位点和特定于组胺-琥珀酰-甘氨酸(HSG)半抗原的第三个结合位点。在替代实施方案中,可靶向不同的肿瘤相关抗原以及相同或不同的半抗原。

[0237] 在预靶向应用中,所述可靶向剂可为脂质体,该脂质体脂膜的外表面共价连接了双价HSG-肽。所述脂质体可充气作为对照,或者可填充治疗剂或诊断剂。

[0238] 治疗或诊断受治疗者的疾病或病症的预靶向方法提供如下:(1)向该受治疗者施用上述双特异性三价或六价结合结构,其中第一个抗原结合位点针对特定于所述病症的一种或多种标志物,且第二个抗原结合位点针对包含双价半抗原的可靶向构建体;(2)任选地向该受治疗者施用清除组合物,并允许该组合物将所述结合结构从循环中清除;和(3)向该受治疗者施用所述包含双价半抗原的可靶向构建体,其中所述可靶向构建体进一步包含一个或多个螯合或者化学结合的治疗剂或诊断剂。所述疾病或病症可为上文所述疾病或病症。

[0239] 本发明还提供了抗体依赖性酶前体药物疗法(ADEPT),具体为:(1)按上文所述方法向患有肿瘤性疾病的患者施用结合结构,其中该结构包含共价连接的、能够激活前体药物的酶,(2)任选地向该受治疗者施用清除组合物,并允许该组合物将所述结合结构从循环中清除,和(3)向该患者施用所述前体药物。

[0240] 其他用途

[0241] 一般而言,所述稳定拴结结构可替换为表现出治疗癌症或非癌疾病效力的基于抗体的试剂。众所周知,放射性同位素、药物和毒素可耦合至特异性结合癌细胞产生的或与癌细胞相关的标志物的抗体或抗体片段,并且此类抗体耦合物可用于将放射性同位素、药物或毒素靶向至肿瘤部位,以增强其治疗效力并最大限度减少副作用。Wawrzynczak和Thorpe(Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer(癌症的细胞和分子生物学介绍),L.M.Franks和N.M.Teich编,第18章,第378-410页,Oxford University Press.Oxford,1986),Immunoconjugates(免疫耦合物)(选自“Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer”(癌症放射显像和治疗中的抗体耦合物),C.W.Vogel编,3-300,Oxford University Press,N.Y.,1987),和Dillman,R.O.(CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology1:357,CRC Press,Inc.,1984)对这些试剂和方法进行了综述。另请参见Pastan等,Cell(1986),47:641;Vitetta等,Science(1987),238:1098-1104;和Brady等,Int.J.Rad.Oncol.Biol.Phys.(1987),13:1535-1544。

[0242] 在某些实施方案中,可使用多价稳定拴结结构对正常或病组织和器官进行治疗

和/或成像,例如,使用下列专利中介绍的方法:第6,126,916;6,077,499;6,010,680;5,776,095;5,776,094;5,776,093;5,772,981;5,753,206;5,746,996;5,697,902;5,328,679;5,128,119;5,101,827;和4,735,210号美国专利,其均通过引用结合入本文。其他方法请参见1999年6月22日提交的序号为09/337,756的美国专利申请和2001年4月3日提交的序号为09/823,746的美国专利申请。此成像可通过直接标记所述稳定拴结结构或者通过预靶向成像方法执行,请参见Goldenberg等,“Antibody Pretargeting Advances Cancer Radioimmunodetection and Radiotherapy”(抗体预靶向改善了癌症的放射免疫检测和放射治疗),(发行中,J.Clin.Oncol.),另请参见第20050002945,20040018557,20030148409和20050014207号美国专利公布,其均通过引用结合入本文。

[0243] 已公开了使用免疫轭合物治疗癌症的其他实例和其他治疗形式,尤其是在下列美国专利中:4,331,647、4,348,376、4,361,544、4,468,457、4,444,744、4,460,459、4,460,5614,624,846、4,818,709、4,046,722、4,671,958、4,046,784、5,332,567、5,443,953、5,541,297、5,601,825、5,635,603、5,637,288、5,677,427、5,686,578、5,698,178、5,789,554、5,922,302、6,187,287和6,319,500。这些方法还可通过用本发明的稳定拴结结构代替工程抗体和前述方法的抗体,而用于本文所公开的方法。

[0244] 在某些实施方案中,本发明公开和要求保护的稳定拴结结构可用于放射性核素治疗或放射免疫治疗方法(例如,请参见Govindan等,2005,Technology in Cancer Research&Treatment,4:375-91;Sharkey和Goldenberg,2005,J.Nucl.Med.46:115S-127S;Goldenberg等(发行中,J.Clin.Oncol.),“Antibody Pretargeting Advances Cancer Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy”(抗体预靶向改善了癌症的放射免疫检测和放射免疫治疗),其均通过引用结合入本文)。

[0245] 在另一实施方案中,放射增敏剂可与裸露或轭合的稳定拴结结构、抗体或抗体片段组合使用。例如,所述放射增敏剂可与放射标记的稳定拴结结构组合使用。与单独使用放射标记的稳定拴结结构进行治疗相比,加入放射增敏剂可增强效力。放射增敏剂请参见D.M.Goldenberg编,CANCER THERAPY WITH RADIOLABELED ANTIBODIES(使用放射标记抗体治疗癌症),CRC Press(1995),其通过引用整体结合入本文。

[0246] 用于要求保护的任何方法的稳定拴结结构均可连接抗菌剂或者与其一起施用。

[0247] 用于要求保护的任何方法的稳定拴结结构均可缔合细胞因子和免疫调节剂或者与其一起施用。这些细胞因子和免疫调节剂至少包括 α 、 β 和 γ 干扰素以及集落刺激因子。

[0248] 本发明公开的方法还可使用稳定拴结结构以刺激患者的免疫反应。在一个实施方案中,所述稳定拴结结构可包含抗独特型抗体的抗原结合位点(ABS)。此类稳定拴结结构可模拟肿瘤相关抗原的表位,以增强机体的免疫反应。

[0249] 所述稳定拴结结构可用于许多目前使用抗体的免疫程序。这些程序包括使用抗独特型抗体和表位轭合抗体,以激发免疫系统。请参见第5,798,100;6,090,381和6,132,718号美国专利。抗独特型抗体还用作抗癌症和传染性疾病的疫苗。请参见第6,440,416和6,472,511号美国专利。此外,多特异性三聚或六聚结合结构可结合多药运输蛋白并克服细胞和病原体的多药抗性表型。这些方法中的抗体可替换为本发明公开的稳定拴结结构。

[0250] 不同的实施方案涉及治疗自身免疫疾病症状的方法。在所述方法中,稳定拴结结构施用至患有自身免疫疾病的患者,其在施用前可与药学可接受载体混合。此方法中的稳

定拴结结构应包含至少一个能特异性结合B细胞或T细胞抗原表位的ABS。所述B细胞抗原可为CD22,且所述表位可为CD22和其他抗原的A表位、B表位、C表位、D表位和E表位。所述B细胞相关抗原也可能是另一细胞抗原,如CD19、CD20、HLA-DR和CD74。所述T细胞抗原可包括CD25。在某些实施方案中,可选择用于治疗自身免疫疾病的稳定拴结结构与IL-17结合。

[0251] 所述ABS可包含类人灵长类动物、鼠单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人来源的序列。例如,所述ABS可来源于人源化LL2 (抗CD22)、人源化LL1 (抗CD74) 或人源化A20 (抗CD20) 单克隆抗体。

[0252] 所述施用方式可为肠胃外,剂量为单位剂量20-2000mg。可重复施用,直至症状得到一定程度的减轻。

[0253] 本发明要求保护的方法可用于治疗包括人在内的任何动物。优选地,所述动物为哺乳动物,如人类、灵长类、马科、犬科和猫科。

[0254] 所述稳定拴结结构可用于治疗抵抗或耐受全身化疗的疾病。这些疾病包括各种病毒、真菌、细菌和原生动物感染,以及特定的寄生虫感染。病毒感染包括由流感病毒、疱疹病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒和巨细胞病毒、狂犬病毒 (Rhabdoviridae)、乳头瘤病毒和乳多空病毒引起的感染,所有这些感染均难以通过全身施用抗生素/细胞毒剂进行治疗。使用多价结合结构可提供更高的靶病毒亲和力,进而显著提高治疗指数。使用放射性同位素 (并包括可用热中子激活的硼附加物) 标记的稳定拴结结构的轭合物进行靶向放射免疫治疗,提供了抗病毒治疗的新方法。

[0255] 可用本发明所述方法进行治疗的原生动物包括,例如疟原虫 (特别是疟疾寄生物恶性疟原虫)、刚地弓形虫 (弓形体病的传染剂)、利什曼原虫 (利什曼病的传染剂) 和溶组织内大肠杆菌 (*Escherichia histolytica*)。使用所述稳定拴结结构可显著增强对各个阶段的疟疾的检测和治疗。与子孢子抗原结合的单克隆抗体 (mAb) 为已知。但是,由于血液期的寄生虫不具有子孢子抗原,因此使用此类针对子孢子抗原的mAb进行定位只能局限于刚刚注射完毕并且在宿主肝细胞中发展之前,所述子孢子自由存在于循环中的相对较短的时间。因此,优选使用可以靶向原生动物 (如*P. falciparum*) 多于一个的寄生时期的mAb,这可通过使用具有多特异性的一个或多个的稳定拴结结构实现。使用轭合物可提供进一步的好处,如使用^{99m}Tc进行成像,或者如使用²¹¹At或抗疟药 (如乙胺嘧啶) 进行治疗。

[0256] 弓形体病也不能使用全身化疗。尚不清楚特异性结合*T. gondii*的mAb或天然的宿主抗体能否在对弓形体病的免疫反应中发挥作用,但是对于疟原虫而言,合适定位的稳定拴结结构可成为递送治疗剂的有效介质。

[0257] 广泛流行的蠕虫感染病血吸虫病是由一些淡水螺类携带的自由游动的尾蚴 (cercariae) 引起的。对于疟疾而言,其传染过程涉及不同阶段的尾蚴。能结合多个阶段的尾蚴、任选地结合一个或多个阶段的尾蚴上的多个表位、并且优选为多特异性组合物形式的稳定拴结结构,可轭合至显像剂或治疗剂,以进行有效的定位和增强治疗效力。

[0258] 可制备结合克氏锥虫 (即查格斯病的病原体) 的一个或多个形式的稳定拴结结构,并将其用于此微生物传染病的检测和治疗。与此锥体虫不同分化阶段的细胞表面糖蛋白或其他表面抗原反应的稳定拴结结构适合用于将显像剂和治疗剂定位至机体内的寄生渗透部位。

[0259] 现有药物非常难以治疗的另一传染性生物体为麻风杆菌 (*Mycobacterium*

leprae)。可制备特异性结合M. leprae表面的多个表位的稳定拴结结构,并且其可单独或组合用于将显像剂和/或抗生素/细胞毒剂靶向至该细菌。

[0260] 蠕虫寄生传染病(如类圆线虫病(Strongyloidosis)和旋毛虫病(Trichinosis))本身难以用化疗剂控制,是稳定拴结结构的合适靶标。可使用特异性结合所述寄生虫的一个或优选地多个表位的合适的稳定拴结结构或轭合物对其进行诊断和治疗。

[0261] 特异性结合引起人类大多数传染病的大多数微生物和寄生虫的抗体已有市售,或可容易地制得。其中有许多抗体之前已用于体外诊断目的,并可作为抗体轭合物的组分包含在稳定拴结结构内,以将诊断剂和治疗剂靶向至传染部位。人和哺乳动物的微生物病原体和无脊椎寄生虫是具有复杂生命周期的生物,其不同阶段表达多种抗原。因此,当制备识别不同形式生物体的抗原决定簇的稳定拴结结构并将其作为混合物或多特异性轭合物(与合适的治疗剂连接)组合使用时,靶向治疗可能最为有效。同样的原理也适用于通过连接显像剂(例如放射性核素和/或MRI增强剂),使用包含稳定拴结结构的试剂检测感染部位的情况。

[0262] 其他实施方案涉及通过施用有效量的稳定拴结结构和可靶向构建体来手术定位病组织的方法,其中所述稳定拴结结构包含至少一个特异性结合靶组织的抗原结合位点,并且另外至少有一个抗原结合位点特异性结合所述可靶向构建体;并且,其中所述至少一个抗原结合位点能够与靶细胞、组织或病原体上的互补结合部分,或者其产生或与其相关的分子上的互补结合部分特异性结合。

[0263] 其他实施方案涉及通过施用有效量的稳定拴结结构和施用可靶向构建体,来使用内窥镜确定受治疗者的病组织的方法。所述稳定拴结结构包含至少一个特异性结合靶组织的抗原结合位点和至少一个特异性结合所述可靶向构建体的抗原结合位点;并且其中所述至少一个抗原结合位点显示与靶细胞、组织或病原体上的互补结合部分,或者其产生或与其相关的分子上的互补结合部分特异性结合。

[0264] 可用的替代检测方法为无线胶囊内镜,该方法使用食入性胶囊摄像机/检测器类型,例如可购自Given Imaging(Norcross GA)。某些实施方案包括通过施用有效量的稳定拴结结构和施用可靶向构建体,来使用内窥镜确定受治疗者的病组织的方法。在此实施方案中,所述稳定拴结结构包含至少一个特异性结合靶组织的抗原结合位点和至少一个特异性结合所述可靶向构建体的抗原结合位点;并且其中所述至少一个抗原结合位点显示与靶细胞、组织或病原体上的互补结合部分,或者其产生或与其相关的分子上的互补结合部分特异性结合。

[0265] 替代实施方案涉及通过施用有效量的稳定拴结结构和可靶向构建体,来确定受治疗者血管内的病组织的方法。所述稳定拴结结构包含至少一个特异性结合靶细胞、组织或病原体上的互补结合部分,或者其产生或与其相关的分子上的互补结合部分的抗原结合位点(ABS),和至少一个特异性结合可靶向构建体的ABS。所述靶组织可为正常组织,如甲状腺、肝脏、心脏、卵巢、胸腺、甲状旁腺、子宫内膜、骨髓、淋巴结或脾。

[0266] 一些实施方案涉及可实施本发明要求保护的方法的试剂盒。该试剂盒可包括可靶向构建体。所述可靶向构建体可使用试剂标记,所述试剂可为适合于上文所述可靶向构建体的任何试剂。此外,所述可靶向构建体可不进行标记,但是所述试剂盒可包含标记该可靶向构建体的标记试剂。所述标记试剂(如果包括)可包含该标记和交联剂。所述试剂盒还可

包含稳定拴结结构,该稳定拴结结构包含至少一个特异性结合所述可靶向构建体的ABS和至少一个特异性结合可靶向组织的ABS。所述试剂盒可任选包含清除组合物,以从循环中清除稳定拴结结构。

[0267] 稳定拴结结构的靶标

[0268] 有关稳定拴结结构靶标的其他公开内容,请参见2004年12月9日提交的序号为60/634,076的美国临时专利申请,“Methods and Compositions for Immunotherapy and Detection of Inflammatory and Immune-dysregulatory Disease, Infectious Disease, Pathologic Angiogenesis and Cancer”(用于对炎症和免疫失调疾病、传染性疾病、病理性血管生成和癌症进行免疫治疗和检测的方法和组合物)(Goldenberg等),其完整内容通过引用结合入本文。

[0269] 在一些实施方案中,本发明要求保护的稳定拴结结构与两个不同靶标发生特异性反应。所述不同靶标可包括但不限于,先天免疫系统的促炎效应物,凝血因子,补体因子和补体调节蛋白,与炎症和免疫失调疾病、与传染原、或与病理性血管生成和癌症特异性相关的靶标;其中此后一类靶标不是免疫系统的促炎效应物或凝血因子。因此,在某些实施方案中,所述稳定拴结结构包含至少一种与疾病细胞、病理性血管生成或癌症,或者传染性疾病相关的结合特异性,和至少一种对免疫系统组分的特异性,所述免疫系统组分如B细胞、T细胞、嗜中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞和树突状细胞的受体或抗原,凝血调节剂(如凝血酶或组织因子),或者促炎细胞因子(如IL-1、IL-6、IL-10、HMGB-1和MIF)。

[0270] 所述稳定拴结结构可为裸的,但也可辄合至诊断显像剂(例如,同位素、放射造影剂)或辄合至治疗剂,所述治疗剂包括放射性核素、硼化合物、免疫调节剂、肽、激素、激素拮抗剂、酶、寡核苷酸、酶抑制剂、光敏治疗剂、细胞毒剂、血管生成抑制剂和其组合。所述稳定拴结结构与靶标的结合可下调或以其他方式影响免疫细胞的功能,但是所述稳定拴结结构也可与不直接影响免疫细胞功能的其他靶标结合。例如,抗粒细胞(如抗CD66或CEACAM6)抗体(例如NCA90或NCA95)不但可用于靶向感染组织中的粒细胞,而且还可用于靶向表达CEACAM6的癌症。

[0271] 在一个实施方案中,所述治疗剂为寡核苷酸。例如,所述寡核苷酸可为反义寡核苷酸或双链干扰RNA(RNAi)分子。所述寡核苷酸可针对致癌基因,如bcl-2或p53。第5,734,033号美国专利中描述了抑制bcl-2表达的反义分子。它可辄合至稳定拴结结构的治疗剂部分,或形成该治疗剂部分。替代地,所述寡核苷酸可与所述稳定拴结结构同时或在其后施用。

[0272] 在另一实施方案中,所述治疗剂为硼附加物,并且在定位所述治疗剂之后,必须通过热或超热中子照射进行治疗。所述治疗剂还可为光敏治疗剂,尤其是显色剂或染料。

[0273] 在优选实施方案中,所述治疗剂为细胞毒剂,如药物或毒素。还优选的是,所述药物选自由以下组成的组:氮芥类、乙撑亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲类、吉西他滨、三氮烯类、叶酸类似物、蒽环类、紫杉烷类、COX-2抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗生素、酶、酶抑制剂、表鬼臼毒素、铂配合物、长春碱类、取代脲、甲基胍衍生物、肾上腺抑制剂、激素拮抗剂、内皮抑制素、紫杉醇、SN38、喜树碱、阿霉素及其类似物、抗代谢物、烷化剂、抗有丝分裂剂、抗血管生成剂、凋亡剂、甲氨蝶呤、CPT-11及其组合。

[0274] 在另一优选实施方案中,所述治疗剂为从选自包含动物、植物和微生物的组的来源获得的毒素。优选毒素包括蓖麻毒素、相思豆毒素、 α 毒素、肥皂草蛋白、核糖核酸酶(RNA

酶)、DNA酶I、金葡菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、多花白树毒蛋白、白喉毒素、绿脓杆菌外毒素和绿脓杆菌内毒素。

[0275] 所述治疗剂可为免疫调节剂,如细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、造血因子、集落刺激因子(CSF)、干扰素(IFN)、干细胞生长因子、促红细胞生成素、血小板生成素和其组合,所述淋巴毒素为肿瘤坏死因子(TNF)。所述造血因子可为白介素(IL),所述集落刺激因子可为粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF),所述干扰素可为干扰素- α 、 β 或 γ ,所述干细胞生长因子可为S1因子。替代地,所述免疫调节剂可包含IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-17、IL-18、IL-21、干扰素- γ 、TNF- α ,或其组合。

[0276] 优选的治疗放射性核素包括keV范围为80-500keV的 β 、 α 和俄歇辐射源。治疗放射性同位素的示例包括 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{111}In 、 ^{111}Ag 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{198}Au 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 和 ^{225}Ac 和其组合。光敏治疗剂示例选自包含显色剂和染料的组。

[0277] 还优选地,所述治疗剂为选自包含苹果酸脱氢酶、金黄色葡萄球菌核酸酶、 δ -V-甾体异构酶、酵母乙醇脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、糖化酶和乙酰胆碱酯酶的组的酶。

[0278] 治疗剂肽的各种实例在本领域为已知,并且任何此类已知试剂均可使用。示例性治疗肽包括但不限于,激素、生长因子、细胞因子、趋化因子、结合肽、封闭肽、毒素、血管生成因子、抗血管生成因子、抗生素、抗癌肽、抗病毒肽、药物肽、酶、激动剂、拮抗剂、造血剂(如促红细胞生成素)和许多其他临床有用化合物。

[0279] 所述稳定拴结结构可与至少一个促炎效应细胞因子、促炎效应趋化因子或促炎效应受体特异性结合。可与所述稳定拴结结构结合的促炎效应细胞因子包括但不限于,MIF、HMGB-1、TNF- α (中瘤坏死因子 α)、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17和IL-18。促炎效应趋化因子包括但不限于,CCL19、CCL21、IL-8、MCP-1(单核细胞趋化蛋白1)、RANTES、MIP-1A(巨噬细胞炎性蛋白1A)、MIP-1B(巨噬细胞炎性蛋白1B)、ENA-78(上皮中性粒细胞激活肽78)、IP-10、GROB(GRO β)和Eotaxin(嗜酸粒细胞趋化因子)。促炎效应受体包括但不限于,IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R和IL-18R。所述稳定拴结结构还可与至少一个凝血因子(如组织因子或凝血酶)特异反应。所述淋巴因子/细胞因子与其在免疫细胞上的受体反应,以实现激活,而抗体可通过中和该淋巴因子/细胞因子来阻止激活。替代地,抗体可与所述淋巴因子/细胞因子受体反应以阻止激活。

[0280] 与所述稳定拴结结构特异性结合的不同靶标可来自相同或不同类别的效应物和凝血因子。例如,与所述稳定拴结结构特异性结合的两个或多个不同靶标可选自相同类别的效应物或凝血因子,如两个或多个不同的促炎效应细胞因子、两个或多个不同的促炎效应趋化因子、两个或多个不同的促炎效应受体或者两个或多个不同的凝血因子。替代地,所述两个或多个不同靶标可选自不同类别的效应物和凝血因子。例如,一个靶标可为先天免疫系统的促炎效应物,而另一个靶标可为凝血因子。或者所述稳定拴结结构可与两个不同类别的促炎效应物特异反应,如至少一个促炎效应细胞因子和至少一个促炎效应趋化因子,至少一个促炎效应细胞因子和至少一个促炎效应受体或者至少一个促炎效应趋化因子

和至少一个促炎效应受体。还可以是如下情况：与所述稳定拴结结构特异反应的两个不同靶标为先天免疫系统中同一促炎效应物的多于一个的表位，或者同一凝血因子的多于一个的表位。

[0281] 因此，“两个不同靶标”可指两个不同的抗原或同一抗原的两个不同表位。可对同一抗原使用多个抗体，进而增加价位。例如，当靶向MIF或HMGB-1，尤其是用于治疗脓毒症、某些癌症和动脉粥样硬化斑块时，稳定拴结结构可包含两个结合靶标上两个相同表位的抗体和具有一个或多个对不同抗原的结合臂的另一抗体，所述不同抗原如II类HLA恒定链抗原，如CD74。所述抗体可选择为与两个不同抗原结合，如MIF和CD74的抗体；HMGB-1和CD74的抗体。

[0282] 当靶向促炎效应受体时，在优选实施方案中，实际的靶标可为该促炎效应受体的胞外结构域。在替代实施方案中，所述稳定拴结结构可包含至少一个可与促炎效应受体反应的分子。该分子可为所述促炎效应受体的天然拮抗剂，或者与所述受体特异性相互作用的此拮抗剂的片段或突变体。在优选实施方案中，所述天然拮抗剂为天然的IL-1受体拮抗剂，或者此拮抗剂的片段或突变体。

[0283] 在一个实施方案中，靶标可为获得性免疫系统的抗原或受体。在其他实施方案中，所述稳定拴结结构的靶标可位于先天性免疫系统的细胞，如粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞和NK细胞。其他靶标包括血小板和内皮细胞。另一组靶标为由C5a、LPS、IFN γ 和B7组成的组。另一组合适靶标包括CD2、CD3、CD4、CD14、CD18、CD11a、CD20、CD22、CD23、CD25、CD29、CD38、CD40L、CD52、CD64、CD83、CD147和CD154。这些CD是免疫细胞上的靶标，可封闭它们以阻止免疫细胞反应。CD83作为活化树突状细胞的标记特别有效(Cao等, *Biochem J.*, 2004年8月23日(印刷前的电子出版物); Zinser等, *J. Exp. Med.* 200 (3): 345-51 (2004))。

[0284] 某些靶标非常值得关注，如MIF、HMGB-1、TNF- α 、补体因子和补体调节蛋白以及凝血因子。MIF是先天性免疫系统的关键细胞因子，并且在控制炎症反应中发挥重要作用。巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)蛋白最初被描述为抑制巨噬细胞随机迁移的、由T淋巴细胞产生的因子，其在近30年的时间内被视为神秘的细胞因子。近年来，MIF为垂体前叶产物的发现以及生物活性重组MIF蛋白的克隆和表达使人们清楚了其在体内的重要生物作用。MIF具有从糖皮质激素刺激的巨噬细胞和T淋巴细胞释放的独特特性。释放之后，MIF在体外抵消糖皮质激素对TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和IL-8(由LPS刺激的单核细胞产生)的抑制作用，并且在体内抑制甾体对致死内毒素血症的保护作用。通过恢复IL-2和IFN- γ 的产生，MIF还在体外拮抗糖皮质激素对T细胞增殖的抑制作用。MIF是确定可反向调节糖皮质激素的抑制作用的第一个调节体，因而在炎症和免疫的宿主控制中发挥关键作用。MIF在治疗癌症、病理性血管生成和脓毒症或感染性休克方面特别有效。

[0285] HMGB-1(DNA结合的核和胞质蛋白)是由IL-1 β 、TNF或LPS激活的单核细胞和巨噬细胞释放的促炎细胞因子。其通过其B盒结构域诱导DC的表型成熟。它还造成促炎细胞因子IL-1 α 、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- α 和RANTES分泌增加。坏死细胞释放的HMGB-1可能是组织或细胞受损的信号，当此信号被DC感知时，其诱发和/或增强免疫反应。Palumbo等报道了HMBG1诱导中间成血管细胞(Mesoangioblast)迁移和增殖(*J. Cell Biol.* 164:441-449 (2004))。

[0286] HMGB-1是内毒素诱导的致死的晚期调节体，与TNF和IL-1 β 相比，其表现出显著延

迟的动力学。靶向特异性早期炎症调节体(如TNF和IL-1 β)的实验性治疗剂(Experimental therapeutics)单独未能证明临床有效性,但是同时靶向早期和晚期炎症调节体的稳定拴结结构可改善响应。

[0287] 靶向HMBG-1的稳定拴结结构在治疗关节炎,尤其是胶原诱导的关节炎方面特别有效。包含HMBG-1的稳定拴结结构还可用于治疗脓毒症和/或感染性休克。Yang等,PNAS USA101:296-301(2004);Kokkola等,Arthritis Rheum,48:2052-8(2003);Czura等,J Infect Dis,187Suppl2:S391-6(2003);Treutiger等,J Intern Med,254:375-85(2003)。

[0288] TNF- α 是参与全身炎症反应和急性期反应的重要细胞因子。TNF- α 由受激的单核细胞、成纤维细胞和内皮细胞释放。巨噬细胞、T细胞和B淋巴细胞、粒细胞、平滑肌细胞、嗜酸性粒细胞、软骨细胞、成骨细胞、肥大细胞、胶质细胞和角质形成细胞也可在受激后产生TNF- α 。其释放是由几种其他调节体(如白介素-1和细菌内毒素)在损伤过程(如感染造成的损伤)中刺激的。其对各种器官系统具有多种作用,通常为与白介素-1和-6一起。TNF- α 的一个作用是抑制食欲;因此,治疗恶病质的稳定拴结结构优选靶向TNF- α 。TNF- α 还刺激肝脏的急性期反应,导致C反应蛋白和多种其他调节体的增加。它还是治疗脓毒症或感染性休克的有效靶标。

[0289] 补体系统是包括血浆糖蛋白的蛋白酶切(通常由细胞受体激活)的复杂级联。“补体级联”是组成型且非特异性的,但是它必须被激活以发挥功能。补体激活造成单向序列的酶和生物化学反应。在此级联中,特异的补体蛋白C5形成两个具有高度活性的炎性副产物C5a和C5b,C5a和C5b可联合激活白细胞。这进而激发许多其他炎性副产物,包括有害细胞因子、炎性酶和细胞粘附分子。这些副产物一起可导致许多炎症性疾病中见到的组织的破坏。此级联最终导致诱发炎症反应、巨噬细胞趋化作用和调理作用,以及细胞裂解。

[0290] 补体系统可通过两个不同途径激活,即经典途径和替代途径。大多数补体组分都进行了编号(例如,C1、C2、C3等),但是一些则称为“因子”。一些组分必须经过酶切才能激活它们的功能;其他组分则只需组合形成活性复合体。经典途径的活性组分包括C1q、C1r、C1s、C2a、C2b、C3a、C3b、C4a和C4b。替代途径的活性组分包括C3a、C3b、因子B、因子Ba、因子Bb、因子D和Properdin(备解素)。每条途径的最后一步是相同的,并包括组分组装为膜攻击复合体。所述膜攻击复合体的活性组分包括C5a、C5b、C6、C7、C8和C9n。

[0291] 虽然稳定拴结结构可靶向补体系统的任何组分,但是其中某些补体组分为优选。C3a、C4a和C5a导致肥大细胞释放吸引巨噬细胞、抗体和补体等的趋化因子(如组胺和5-羟色胺)。这些补体组分构成一组优选靶标。另一组优选靶标包括C3b、C4b和C5b,它们增强外源细胞的吞噬作用。另一组优选靶标为前两组的前驱物组分,即C3、C4和C5。C5b、C6、C7、C8和C9诱导外源细胞的裂解(膜攻击复合体),并构成另一组优选靶标。

[0292] 像C3a一样,补体C5a为过敏毒素。它介导炎症反应,并且是诱导嗜中性粒细胞释放抗菌蛋白酶和氧自由基的趋化引诱剂。因此,C5a和其前驱物C5是特别优选的靶标。靶向C5不仅影响C5a,还影响启动膜攻击复合体组装的C5b。因此,C5是另一优选靶标。C3b及其前驱物C3也是优选靶标,原因在于经典和替代补体途径均依赖于C3b。三个蛋白(C1抑制剂、蛋白H和因子I)影响此因子的水平,因此它们也是本发明的优选靶标。补体调节蛋白(如CD46、CD55和CD59)可为所述稳定拴结结构的结合靶标。

[0293] 凝血因子,特别是组织因子(TF)和凝血酶,也是优选靶标。TF还称作组织凝血活

酶、CD142、凝血因子III或因子III。TF是膜内在受体糖蛋白和细胞因子受体超家族的成员。TF的配体结合胞外结构域由两个结构化模块组成,依据这些模块的特征,TF归为2型细胞因子受体成员。TF参与凝血蛋白酶级联,并通过在TF的胞外结构域和循环血凝血因子、丝氨酸蛋白酶因子VII或因子VIIa之间形成高亲和力复合体,启动外部和内部凝血级联。然后这些具有酶活性的复合体激活因子IX和因子X,导致产生凝血酶,并进而形成凝血。

[0294] TF表达于各种细胞类型,包括单核细胞、巨噬细胞和血管内皮细胞,并受IL-1、TNF- α 或细菌脂多糖的诱导。蛋白激酶C参与内皮细胞TF表达的细胞因子激活过程。内毒素和细胞因子诱导的TF表达是革兰氏阴性脓毒症患者中引发播散性血管内凝血的重要机制。TF还参与多种非止血功能,包括炎症、癌症、脑功能、免疫反应和肿瘤相关性血管生成。因此,依据本发明,靶向TF的稳定拴结结构不仅可有效治疗凝血病,而且可有效治疗脓毒症、癌症、病理性血管生成,以及其他免疫和炎症失调疾病。多种细胞因子影响TF在多种细胞中的表达的能力,以及配体与所述受体结合的作用表明,凝血途径和细胞因子网络之间存在复杂的相互作用。已报道配体结合(因子VIIa)产生胞内钙信号,进而表明TF是真正的受体。

[0295] 凝血酶是凝血因子II(凝血酶原)的活性形式;它将纤维蛋白原转化为纤维蛋白。凝血酶是巨噬细胞的有效趋化物,并可改变其细胞因子和花生四烯酸代谢物的产生。它在脓毒症伴生的凝血病中具有重要作用。已有多项研究证实,脓毒症患者体内或施用LPS的动物模型内激活了凝血系统。虽然已研究了30多年,但是人们对LPS诱导肝脏毒性的机制仍知之甚少。现在人们清楚它们包括细胞和体液调节体之间一系列复杂的顺序性相互作用。在同一时段内,革兰氏阴性全身性脓毒症和其后遗症(sequelae)成为主要的健康问题,使用针对LPS或各种炎症调节体的单克隆抗体的尝试治疗未能成功。同时靶向凝血酶和至少一个其他靶标的稳定拴结结构解决了脓毒症临床治疗失败的问题。

[0296] 在其他实施方案中,所述稳定拴结结构与I类MHC、II类MHC或辅助分子(如CD40、CD54、CD80或CD86)结合。所述稳定拴结结构还可与T细胞激活细胞因子或细胞因子调节体(如INF- κ B)结合。

[0297] 在某些实施方案中,所述两个不同靶标之一可为癌症细胞受体或癌症相关抗原,尤其是选自由以下组成的组的抗原:B细胞系抗原(CD19、CD20、CD21、CD22、CD23等)、VEGFR、EGFR、癌胚抗原(CEA)、胎盘生长因子(P1GF)、生腱蛋白、HER-2/neu、EGP-1、EGP-2、CD25、CD30、CD33、CD38、CD40、CD45、CD52、CD74、CD80、CD138、NCA66、CEACAM6(癌胚抗原相关的细胞粘附分子6)、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC16、IL-6、甲胎蛋白(AFP)、A3、CA125、结肠特异性抗原-p(CSAp)、叶酸受体、HLA-DR、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、Ia、EL-2、胰岛素样生长因子(ILGF)和ILGF受体、KS-1、Le(y)、MAGE、坏死抗原、PAM-4、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、Pr1、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、S100、T101、TAC、TAG72、TRAIL受体和碳酸酐酶IX。

[0298] 与脓毒症和免疫失调以及其他免疫疾病相关的靶标包括MIF、IL-1、IL-6、IL-8、CD74、CD83和C5aR。已发现针对C5aR的抗体和抑制剂改善了患脓毒症的啮齿动物(Huber-Lang等,FASEB J2002;16:1567-1574;Riedemann等,J Clin Invest2002;110:101-108)以及患感染性休克和成人呼吸窘迫综合征的猴(Hangen等,JSurgRes1989;46:195-199;Stevens等,J Clin Invest1986;77:1812-1816)的存活率。因此,对于脓毒症而言,所述两个不同靶标之一优选为感染相关靶标,如LPS/C5a。其他优选靶标包括HMGB-1、TF、CD14、

VEGF和IL-6,其均与败血病或感染性休克相关。优选的稳定拴结结构靶向HMGB-1、TF和MIF中的两个或多个靶标,如MIF/TF和HMGB-1/TF。

[0299] 在其他实施方案中,所述两个不同靶标之一可为与移植物抗宿主病或移植排斥反应相关的靶标,如MIF(Lo等,Bone Marrow Transplant,30(6):375-80(2002))。所述两个不同靶标之一还可为与急性呼吸窘迫综合征相关的抗原,如IL-8(Bouros等,PMC Pulm Med,4(1):6(2004),与动脉粥样硬化或再狭窄相关的抗原,如MIF(Chen等,Arterioscler Thromb Vasc Biol,24(4):709-14(2004);与哮喘相关的抗原,如IL-18(Hata等,Int Immunol,2004年10月11日,出版前的电子出版物);与肉芽肿病相关的抗原,如TNF- α (Ulbricht等,Arthritis Rheum,50(8):2717-8(2004);与神经病变相关的抗原,如氨甲酰EPO(促红细胞生成素)(Leist等,Science305(5681):164-5(2004);或与恶病质相关的抗原,如IL-6和TNF- α 。

[0300] 其他靶标包括C5a、LPS、IFN- γ 、B7;CD2、CD4、CD11a、CD11b、CD11c、CD14、CD18、CD27、CD29、CD38、CD40L、CD52、CD64、CD83、CD147、CD154。CD18、CD11b或CD11c的抗体可在一定程度上抑制某些微生物抗原(包括LPS)对单核细胞的活化,从而牵涉 β_2 -整合素(Cuzzola等,J Immunol2000;164:5871-5876;Medvedev等,J Immunol1998;160:4535-4542)。已发现CD83在巨细胞动脉炎(GCA)中起作用,该病为影响中型和大型动脉(主要是主动脉弓的颅外分枝和主动脉本身的颅外分枝)的系统性血管炎,该病造成血管狭窄和并发的组织缺血以及严重的失明、脑卒中和主动脉弓综合征并发症(Weyand和Goronzy,N Engl J Med2003;349:160-169;Hunder和Valente,来源:Inflammatory Diseases of Blood Vessels(血管炎症疾病),G.S.Hoffman和C.M.Weyand编,Marcel Dekker,New York,2002:255-265)。还发现CD83的抗体可消除人GCA的SCID小鼠模型的血管炎(Ma-Krupa等,J Exp Med2004;199:173-183),这暗示研究人员,在激活时表达CD83的树突状细胞是GCA中重要的抗原加工细胞。在这些研究中,他们使用了小鼠抗CD83Mab(来自Research Diagnostics的IgG1克隆HB15e)。TNF家族成员CD154表达于CD4阳性T淋巴细胞的表面,并且已报道CD154的人源化单克隆抗体对活动期系统性红斑狼疮(SLE)患者有显著的临床受益(Grammar等,J Clin Invest2003;112:1506-1520)。此外,还有报道表明此抗体可用于其他自身免疫疾病(Kelsoe,J Clin Invest2003;112:1480-1482)。事实上,还报道此抗体对难治性特发性血小板减少性紫癜患者有效(Kuwana等,Blood2004;103:1229-1236)。

[0301] 已表明重组白介素-1受体拮抗剂、IL-1Ra或阿那白滞素(Kineret®)对类风湿性关节炎有效果(Cohen等,Ann Rheum Dis2004;63:1062-8;Cohen,Rheum Dis Clin North Am2004;30:365-80)。对这些受治疗者(迄今尚需要进行甲氨蝶呤联合治疗)的治疗改进是将阿那白滞素与一个或多个所述抗促炎效应细胞因子或抗促炎效应趋化因子(如上所举)组合使用。实际上,在对类风湿性关节炎的抗体治疗的综述中,Taylor(Curr Opin Pharmacol2003;3:323-328)提出,除了TNF之外,也可使用针对此类细胞因子(如IL-1、IL-6、IL-8、IL-15、IL-17和IL-18)的其他抗体。

[0302] 一些更优选的靶标组合如下所示。此表列出了优选组合的实例,但并非旨在是穷尽性的。

[0303]

第一靶标	第二靶标
------	------

MIF	另一促炎效应细胞因子,尤其是HMGB-1、TNF- α 、IL-1或IL-6
MIF	促炎效应趋化因子,尤其是MCP-1、RANTES、MIP-1A或MIP-1B
MIF	促炎效应受体,尤其是IL-6R、IL-13R和IL-15R
MIF	凝血因子,尤其是TF或凝血酶
MIF	补体因子,尤其是C3、C5、C3a或C5a
MIF	补体调节蛋白,尤其是CD46、CD55、CD59和mCRP
MIF	癌症相关抗原或受体
HMGB-1	另一促炎效应细胞因子,尤其是MIF、TNF- α 、IL-1或IL-6
HMGB-1	促炎效应趋化因子,尤其是MCP-1、RANTES、MIP-1A或MIP-1B
HMGB-1	促炎效应受体,尤其是IL-6R、IL-13R和IL-15R
HMGB-1	凝血因子,尤其是TF或凝血酶
HMGB-1	补体因子,尤其是C3、C5、C3a或C5a

[0304]

HMGB-1	补体调节蛋白,尤其是CD46、CD55、CD59和mCRP
HMGB-1	癌症相关抗原或受体
TNF- α	另一促炎效应细胞因子,尤其是MIF、HMGB-1、IL-1或IL-6
TNF- α	促炎效应趋化因子,尤其是MCP-1、RANTES、MIP-1A或MIP-1B
TNF- α	促炎效应受体,尤其是IL-6R、IL-13R和IL-15R
TNF- α	凝血因子,尤其是TF或凝血酶
TNF- α	补体因子,尤其是C3、C5、C3a或C5a
TNF- α	补体调节蛋白,尤其是CD46、CD55、CD59和mCRP
TNF- α	癌症相关抗原或受体
LPS	促炎效应细胞因子,尤其是MIF、HMGB-1、TNF- α 、IL-1或IL-6
LPS	促炎效应趋化因子,尤其是MCP-1、RANTES、MIP-1A或MIP-1B
LPS	促炎效应受体,尤其是IL-6R、IL-13R和IL-15R
LPS	凝血因子,尤其是TF或凝血酶
LPS	补体因子,尤其是C3、C5、C3a或C5a
LPS	补体调节蛋白,尤其是CD46、CD55、CD59和mCRP
TF或凝血酶	促炎效应细胞因子,尤其是MIF、HMGB-1、TNF- α 、IL-1或IL-6
TF或凝血酶	促炎效应趋化因子,尤其是MCP-1、RANTES、MIP-1A或MIP-1B
TF或凝血酶	促炎效应受体,尤其是IL-6R、IL-13R和IL-15R
TF或凝血酶	补体因子,尤其是C3、C5、C3a或C5a
TF或凝血酶	补体调节蛋白,尤其是CD46、CD55、CD59和mCRP
TF或凝血酶	癌症相关抗原或受体

[0305] 所述稳定拴结结构可为包含至少两个单独的抗体和/或受体或者与所述不同靶标结合的它们的配体的混合物。在一个优选实施方案中,所述靶标选自由先天性免疫系统的促炎效应物、凝血因子、补体因子和补体调节蛋白,以及与炎症或免疫失调疾病、与病理性血管生成或癌症、或者与传染性疾病特异性相关的靶标组成的组。

[0306] 所述稳定拴结结构可与,如LPS、IL-1、IL-10、IL-6、MIF、HMGB1、TNF、IFN、组织因

子、凝血酶、CD14、CD27和CD134的受体或其靶分子结合。其中许多既作为受体也作为在血液中的可溶形式存在。与所述稳定拴结结构的结合造成其被从血液中快速清除,然后由所述稳定拴结结构的第二个组分将其靶向至另一细胞(如巨噬细胞),以进行运输并由该细胞(尤其是溶酶体)进行降解。这在所述第二个靶向组分针对巨噬细胞和树突状细胞表达的内化抗原(如CD74)时特别有效。这与Hansen,第6,458,933号美国专利公开的内容一致,但是集中在用于免疫失调疾病的炎性细胞因子和其他免疫调节分子以及受体,和用于免疫治疗这些癌症的癌症抗原。

[0307] 治疗癌症的优选稳定拴结结构包括针对CD55和上述任何癌症抗原的抗体、针对CD46和上述任何癌症抗原的抗体、针对CD59和上述任何癌症抗原的抗体、针对MIF和上述任何癌症抗原的抗体、针对NF- κ B和上述任何癌症抗原的抗体,以及针对IL-6和除IL-6外的上述任何癌症抗原的抗体。

[0308] 所述稳定拴结结构可与一个或多个第二治疗剂联合使用。所述第二治疗剂可为影响先天性免疫系统组分的治疗剂。替代地,其可影响获得性免疫系统的组分。所述第二治疗剂还可为影响凝血、癌症或自身免疫疾病的组分,如细胞毒药物。

[0309] 具有诊断剂或治疗剂的稳定拴结结构可作为用于人或哺乳动物治疗和诊断的试剂盒而提供于药学可接受注射介质、优选为生理pH和浓度的磷酸盐缓冲液(PBS)中。所述制品优选为无菌的,尤其是当其预定为人用时。此类试剂盒的任选组分包括稳定剂、缓冲液、标记试剂、放射性同位素、顺磁化合物、增强清除的另一抗体和常规的注射器、柱、管形瓶等。

[0310] 噬菌体展示

[0311] 在一些替代实施方案中,构建DDD和/或AD结构域的结合肽可通过本领域公知的噬菌体展示方法确定。例如,与DDD结构域结合并因而可用天然存在的AD序列取代的肽可通过针对DDD二聚体的噬菌体展示淘选,并选择具有高结合亲和力的噬菌体来确定。选择性或特异性结合特定靶标分子的其他类型的结合肽可通过针对所选靶标的噬菌体展示淘选来检测。

[0312] 各种噬菌体展示方法和制备多样化肽群体的技术在本领域为公知。例如,第5,223,409;5,622,699和6,068,829号美国专利(其均通过引用结合入本文)公开了制备噬菌体文库的方法。噬菌体展示技术包括对噬菌体进行遗传操作,以使小分子肽可在其表面表达(Smith和Scott,1985,Science228:1315-1317;Smith和Scott,1993,Meth.Enzymol.21:228-257)。

[0313] 过去十年见证了噬菌体展示肽文库构建和开发使用所述文库分离肽配体的筛选方法的长足进步。例如,肽文库的使用,使得鉴定许多蛋白的相互作用位点和受体-配体结合模体成为可能,所述蛋白质如参与炎性反应的抗体或介导细胞粘附的整合素。此方法还用于确定可充当开发肽模拟药物或显像剂的前导物的新的肽配体(Arap等,1998a,Science279:377-380)。除了肽之外,更大的蛋白结构域(如单链抗体)也可在噬菌粒表面展示(Arap等,1998a)。

[0314] 选择性靶向给定靶标分子的靶向氨基酸序列可通过淘选分离(Pasqualini和Ruoslahti,1996,Nature380:364-366;Pasqualini,1999,The Quart.J.Nucl.Med.43:159-162)。简单而言,即将包含假定靶向肽的噬菌体文库施用至靶分子,然后收集包含结合噬菌

体的样品。例如,靶分子可连接至96孔板的微滴定孔底部。与靶标结合的噬菌体可洗脱下来,然后可通过在宿主细菌中培养进行扩增。

[0315] 在某些实施方案中,可在两轮淘选之间在宿主细菌中繁殖所述噬菌体。所述细菌不是被该噬菌体裂解,而是分泌展示特定插入的多拷贝噬菌体。如果需要,可再次让扩增的噬菌体接触所述靶分子,并收集噬菌体进行附加轮次的淘选。可执行多轮淘选,直至获得选择性或特异性结合的群体。所述肽的氨基酸序列可通过对噬菌体基因组中该靶向肽的插入部分的DNA进行测序来确定。所鉴定的靶向肽然后可通过标准的蛋白质化学技术生成为合成肽(Arap等,1998a;Smith等,1985)。

[0316] 适体

[0317] 在某些实施方案中,用于形成构建体的前体可包含适体。构建适体和确定其结合特性的方法在本领域为公知。例如,此类技术可参见第5,582,981、5,595,877和5,637,459号美国专利,其均通过引用结合入本文。

[0318] 适体可通过任何已知的方法(包括合成、重组和纯化方法)制备,并可单独使用或者与同一靶标的其他特异性配体组合使用。一般而言,最少约3个核苷酸,优选地至少5个核苷酸是实现特异性结合所必需的。虽然序列短于10个碱基的适体是可行的,但是优选10、20、30或40个核苷酸的适体。

[0319] 适体需要包含赋予结合特异性的序列,但是可通过侧翼区域进行延长或者通过其他方式进行衍生。在优选实施方案中,适体结合序列的侧翼可带有引物结合序列,以便通过PCR或其他扩增技术扩增所述适体。在进一步实施方案中,所述侧翼序列可包含特异序列,该特异序列优先识别或结合能够增强所述适体对底物的固定作用的部分。

[0320] 适体可像常规DNA或RNA分子一样进行分离、测序和/或扩增或合成。替代地,感兴趣的适体可包含经过修饰的低聚物。适体内通常包含的任何羟基都可替换为磷酸酯基、磷酸基团,用标准保护基保护,或者被激活以生成与其他核苷酸的连接,或者耦联至固体支持物。一个或多个磷酸二酯连接可替换为替代连接基团,如P(O)O替换为P(O)S、P(O)NR₂、P(O)R、P(O)OR'、CO或CNR₂,其中R为H或烷基(1-20C),且R'为烷基(1-20C);此外,此基团可通过O或S连接至相邻核苷酸。低聚物中的所有连接不必全部相同。

[0321] 制备和筛选与感兴趣的特定靶标结合的适体的方法为公知,例如请参见第5,475,096号美国专利和第5,270,163号美国专利,其均通过引用结合入本文。该方法一般包括从候选适体混合物中进行选择和逐步重复结合、分离结合适体与未结合适体以及扩增。由于所述混合物中仅有少量序列(也许仅有一个适体分子)具有最高的亲和力,因此通常需要设定分离标准,以便分离过程中混合物中能够保留大量适体(约5-50%)。每个循环都富集对靶标具有高亲和力的适体。可重复3-6个选择和扩增循环以制备高亲和力和特异性结合所述靶标的适体。

[0322] Avimer

[0323] 在某些实施方案中,本文所述前体、组分和/或复合体可包含一个或多个avimer序列。Avimer是其针对不同靶分子的亲和力和特异性有些类似于抗体的一类结合蛋白。它们是通过体外外显子改组和噬菌体展示从人胞外受体结构域生成的(Silverman等,2005,Nat.Biotechnol.23:1493-94;Silverman等,2006,Nat.Biotechnol.24:220)。得到的多结构域蛋白可包含多个独立的结合结构域,与单表位结合蛋白相比,此蛋白可表现出更高的

亲和力(某些情况下为次纳摩)和特异性。(Id.)例如,在不同实施方案中,avimer可连接至例如AD和/或DDD序列,以用于本发明要求保护的方法和组合物。有关构建和使用avimer的方法的其他详情,请参见,例如,第20040175756、20050048512、20050053973、20050089932和20050221384号美国专利申请公布,其实施例部分均通过引用结合入本文。

[0324] 蛋白质和肽

[0325] 多种多肽或蛋白质可用于本发明要求保护的方法和组合物范围内。在某些实施方案中,所述蛋白质可包含抗体或包含抗原结合位点的抗体片段。在其他实施方案中,所述蛋白质或肽可为效应分子,如酶、激素、细胞因子、结合蛋白或毒素。

[0326] 如此处所用,蛋白质、多肽或肽泛指但不限于:大于约200个氨基酸、最大为从基因翻译的全长序列的蛋白质;大于约100个氨基酸的多肽;和/或大约3个到大约100个氨基酸的肽。方便起见,术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文可交替使用。因此,术语“蛋白质”或“肽”包括包含至少一种天然存在蛋白中发现的20种常见氨基酸或者至少一种修饰或罕见氨基酸的氨基酸序列。

[0327] 如此处所用,“氨基酸残基”指本领域已知的任何天然存在的氨基酸、任何氨基酸衍生物或任何氨基酸模拟物。在某些实施方案中,所述蛋白质或肽的残基是连续的,没有中断所述氨基酸残基序列的任何非氨基酸。在其他实施方案中,所述序列可包含一个或多个非氨基酸部分。在特定实施方案中,所述蛋白质或肽的残基序列可被一个或多个非氨基酸部分中断。

[0328] 因此,术语“蛋白质”或“肽”包括包含至少一种天然存在蛋白中发现的20种常见氨基酸或者至少一种修饰或罕见氨基酸的氨基酸序列,所述氨基酸包括但不限于:2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、 β -丙氨酸、 β -氨基-丙酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基庚二酸、2,4-二氨基丁酸、锁链素、2,2'-二氨基庚二酸、2,3-二氨基丙酸、N-乙基天冬酰胺、羟赖氨酸、别-羟赖氨酸、3-羟脯氨酸、4-羟脯氨酸、异锁链素、别-异亮氨酸、N-甲基甘氨酸、肌氨酸、N-甲基异亮氨酸、6-N-甲基赖氨酸、N-甲基缬氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸和鸟氨酸。替代地,蛋白质或肽可在天然存在的L-氨基酸之外包含一个或多个D-氨基酸,或用多个D-氨基酸取代天然L-氨基酸。包含D-氨基酸的肽的制备方法公开于例如第20050025709号美国专利申请公布(McBride等,2004年6月14日提交)。

[0329] 蛋白质或肽可采用本领域技术人员已知的任何技术制备,所述技术包括通过标准的分子生物学技术表达蛋白质、多肽或肽,从天然来源中分离蛋白质或肽,或化学合成蛋白质或肽。不同基因相应的核苷酸和蛋白质、多肽、肽序列已公开,并可在本领域技术人员已知的计算机数据库中找到。其中一类数据库为美国国家生物技术信息中心的Genbank数据库和GenPept数据库。已知基因的编码区可使用本文公开的,或者本领域普通技术人员已知的技术进行扩增和/或表达。替代地,蛋白质、多肽和肽的各种市售制品对本领域技术人员为已知。

[0330] 肽模拟物

[0331] 制备多肽的另一实施方案为使用肽模拟物。肽模拟物是模拟蛋白质二级结构元件的含肽分子。例如,请参见Johnson等,“Peptide Turn Mimetics”(肽转角模拟物),选自BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY, Pezzuto等编, Chapman and Hall, New York (1993), 其通过

引用结合入本文。使用肽模拟物的原理在于,蛋白质肽骨架的存在主要是为了定位氨基酸侧链以促进分子间相互作用,如抗体和抗原的相互作用。肽模拟物预期允许类似于天然分子的分子间相互作用。这些原理可用于改造具有本发明公开的结合肽的许多天然特性、但是某些特征发生改变或者得到改进(如胃或肠的吸收增加,和/或体内稳定性或活性增加)的二代分子。

[0332] 融合蛋白

[0333] 不同实施方案可包含融合蛋白。这些分子通常是将肽的整体或其实质部分通过N-或C-末端连接至另一多肽或蛋白质的整体或部分。例如,融合可使用其他物种的前导序列,以实现蛋白在异源宿主中的重组表达。另一有用的融合包括添加免疫活性结构域,如抗体表位。另一有用的融合形式可包括连接可用于纯化的部分,如FLAG表位(Prickett等,1989, *Biotechniques* 7:580-589;Castrucci等,1992, *J Virol* 66:4647-4653)。融合蛋白的另一用途包括构建本发明要求保护的拴结复合体的组分,例如提供与第一个单体连接的DDD序列和与第二个单体连接的AD序列。

[0334] 制备融合蛋白的方法对本领域技术人员为公知。例如,此类蛋白可通过以下方法制备:使用双功能交联剂进行化学连接,从头合成完整的融合蛋白,或者将编码第一个蛋白或肽的DNA序列连接至编码第二个蛋白或肽的DNA序列,然后表达完整的融合蛋白,如下文的实施例所示。

[0335] 合成肽

[0336] 可根据常规技术在溶液中或在固体支持物上完整或者部分合成蛋白质或肽。各种自动合成仪已经上市,并可按已知的实验方案使用。例如,请参见Stewart和Young (1984, *Solid Phase Peptide Synthesis* (固相肽合成),第2版,Pierce Chemical Co.);Tam等 (1983, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442);Merrifield (1986, *Science*, 232:341-347);以及Barany和Merrifield (1979, *The Peptides* (肽),Gross和Meienhofer编,Academic Press, New York,第1-284页)。此类方法可很容易地合成较短的肽序列,通常从约6个氨基酸,直到约35-50个氨基酸。替代地,可使用重组DNA技术,即将编码感兴趣的肽的核苷酸序列插入表达载体,转化或转染合适的宿主细胞,然后在适合表达的条件下培养。

[0337] 肽施用

[0338] 本发明要求保护的方法和/或组合物的不同实施方案可涉及施用至受治疗者的一种或多种基于肽的稳定拴结结构。施用可采取本领域已知的任何途径,包括但不限于口服、经鼻、经口、吸入、直肠、阴道、局部、原位、皮内、皮下、肌肉内、腹腔内、动脉内、鞘内或静脉内注射。

[0339] 未修饰的肽口服施用至受治疗者时可在消化道内被降解,并且,根据其序列和结构,可表现出差的肠道上皮吸收。但是,对肽进行化学修饰以使它们不易被内源蛋白酶降解或更易被消化道吸收的方法为公知(例如,请参见Blondelle等,1995, *Biophys. J.* 69:604-11;Ecker和Crooke,1995, *Biotechnology* 13:351-69;Goodman和Ro,1995, *BURGER'S MEDICINAL CHEMISTRY AND DRUG DISCOVERY*,第I卷,Wolff编,John Wiley&Sons;Goodman和Shao,1996, *Pure&Appl. Chem.* 68:1303-08)。制备肽类似物,如包含D氨基酸的肽;由模拟肽结构的有机分子组成的肽模拟物;或类肽(如乙烯类肽)的文库的方法也已有报道,并可用于构建基于肽的适合受治疗者口服施用的稳定拴结结构。

[0340] 在某些实施方案中,标准肽键连接可被一个或多个替代连接基团(如 $\text{CH}_2\text{-NH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S}$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 、 CH=CH 、 CO-CH_2 、 CHOH-CH_2 及类似基团)所取代。制备肽模拟物的方法为公知(例如,Hruby,1982,Life Sci31:189-99;Holladay等,1983,Tetrahedron Lett.24:4401-04;Jennings-White等,1982,Tetrahedron Lett.23:2533;Almquist等,1980,J.Med.Chem.23:1392-98;Hudson等,1979,Int.J.Pept.Res.14:177-185;Spatola等,1986,Life Sci.38:1243-49;第5,169,862;5,539,085;5,576,423;5,051,448;5,559,103号美国专利,其均通过引用结合入本文)。与其肽类似物相比,肽模拟物可表现出增强的体内稳定性和/或吸收。

[0341] 替代地,肽口服递送施用时可利用N-末端和/或C-末端加帽,以避免外肽酶活性。例如,C-末端可使用酰胺肽进行加帽,而N-末端可通过肽的乙酰化进行加帽。肽还可进行环化,例如通过形成环状酰胺、二硫键、醚、硫化物等,以封闭外肽酶。

[0342] 肽稳定性还可通过用D-氨基酸取代天然存在的L-氨基酸(尤其是在已知的内肽酶作用位点)来实现。内肽酶结合和切割序列在本领域为已知,并且制备和使用包含D-氨基酸的肽的方法也已有报道(例如,第20050025709号美国专利申请公布,McBride等,2004年6月14日提交,其通过引用结合入本文)。在某些实施方案中,肽和/或蛋白质可通过与蛋白酶和/或肽酶抑制剂制成复合制剂进行口服施用。

[0343] 治疗肽口服递送的其他方法请参见Mehta(“Oral delivery and recombinant production of peptide hormones”(肽类激素的口服递送和重组制备),2004年6月,BioPharm International)。所述肽以与赋形剂制成的肠溶固体剂型施用,所述赋形剂调节肠的蛋白水解活性,并增强肽的跨肠壁运输。使用此技术的完整肽的相对生物利用度为所施剂量的1%-10%。胰岛素已通过胆酸钠和蛋白酶抑制剂制成肠溶微胶囊成功施用至狗(Ziv等,1994,J.Bone Miner.Res.18(Suppl.2):792-94)。已通过使用酰基肉碱作为渗透增强剂和肠溶衣对肽进行口服施用(Eudragit L30D-55,Rohm Pharma Polymers,请参见Mehta,2004)。用于口服施用肽的赋形剂一般可包括肠蛋白酶/肽酶的一种或多种抑制剂,以及增强肽的溶解性或吸收性的去污剂或其他试剂,所述赋形剂可包括在肠溶胶囊或片剂内(Mehta,2004)。所述胶囊内可包括有机酸,当所述胶囊在肠内溶解后,所述有机酸可对肠进行酸化,并抑制肠蛋白酶活性(Mehta,2004)。肽口服递送的另一替代实施方案可包括与基于聚乙二醇(PEG)的两性低聚物轭合,以增强吸收和对酶解的抗性(Soltero和Ekwuribe,2001,Pharm.Technol.6:110)。

[0344] 在其他实施方案中,肽可通过轭合至某些蛋白如IgG1的Fc区(请参见实施例3-7)进行修饰,以便用于口服或吸入施用。例如,制备和使用肽-Fc轭合物的方法请参见Low等(2005,Hum.Reprod.20:1805-13)和Dumont等(2005,J.Aerosol.Med.18:294-303),其均通过引用结合入本文。Low等(2005)公开了通过在CHO细胞中使用重组表达,将FSH的 α 和 β 亚基以单链或异型二聚体形式轭合至IgG1的Fc区。所述轭合Fc的肽通过肺或肠的表皮细胞被介导运输系统的新生Fc受体吸附。与原来的肽相比,所述轭合Fc的肽表现出增强的体内稳定性和吸收性。同时还观察到异型二聚体轭合物的活性要高于单链形式。

[0345] 交联剂

[0346] 在某些实施方案中,蛋白质、肽或其他大分子可使用本领域已知的各种交联试剂(如同型双功能、异型双功能和/或光敏交联试剂)共价交联在一起。此类试剂的非限制性实

例包括：双酰亚胺酯(bisimides)；1,5-二氟-2,4-(二硝基苯)；辛二酸的N-羟基琥珀酰亚胺酯；酒石酸二琥珀酰亚胺酯；二甲基-3,3'-二硫-双丙酰亚胺酯(dimethyl-3,3'-dithio-bispropionimide)；N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫)丙酸酯(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate)；4-(溴代氨基乙基)-2-硝基苯基叠氮化物；和4-叠氮基乙二醛。在示例性实施方案中，碳二亚胺交联剂，如DCCD或EDC可用于将酸性残基交联至氨基或其他基团。此类试剂可进行修饰，以连接至不同类型的标记，如荧光标记。

[0347] 双功能交联试剂已广泛用于各种用途。携带两个相同官能团的同型双功能剂已证明在诱导相同和不同大分子或大分子的亚基之间的交联，以及将多肽配体连接至其特异性结合位点方面非常有效。异型双功能剂包含两个不同的官能团。通过利用所述两个不同官能团的不同反应活性，可以同时选择性且顺序性地控制交联。所述双功能交联试剂可根据其官能团的特异性进行划分，所述官能团例如氨基、巯基、胍基、吡啶、羧基特异性基团。其中，针对自由氨基的试剂由于其已实现商业化、易于合成和反应条件温和而特别受欢迎。大部分异型双功能交联试剂包含伯胺反应基团和巯基反应基团。

[0348] 另一实例描述了异型双功能交联试剂和使用这些交联试剂的方法(第5,889,155号美国专利)。所述交联试剂同时具有亲核腈残基和亲电马来酰亚胺残基，允许在一个实例中将醛偶联至自由巯基。所述交联试剂可进行修饰以交联不同的官能团。

[0349] 抗体

[0350] 不同实施方案可涉及靶标的抗体。术语“抗体”在此指任何具有抗原结合区的抗体样分子，并包括抗体片段，如Fab'、Fab、F(ab')₂、单结构域抗体(DAB)、Fv、scFv(单链Fv)及类似片段。制备和使用各种基于抗体的构建体和片段的方法在本领域为公知。制备和鉴定抗体的方法在本领域同样为公知(例如，请参见Harlowe和Lane,1988,Antibodies:A Laboratory Manual(抗体实验室手册),Cold Spring Harbor Laboratory)。所用抗体还可从多种已知来源购买获得。例如，许多分泌抗体的杂交瘤系可购自American Type Culture Collection(ATCC,Manassas,VA)。

[0351] 抗体片段的制备

[0352] 本发明要求保护的方法和/或组合物的某些实施方案可涉及抗体片段。此类抗体片段可通过使用常规方法对全长抗体进行胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化获得。例如，可用胃蛋白酶对抗体进行酶切来制备抗体片段，以提供F(ab')₂片段。此片段可进一步使用巯基还原剂裂解，并任选地使用针对二硫键断裂产生的巯基的封闭基团，以制备Fab'单价片段。替代地，使用木瓜蛋白酶进行酶解产生两个单价Fab片段和一个Fc片段。制备抗体片段的方法示例请参见第4,036,945号美国专利；第4,331,647号美国专利；Nisonoff等,1960,Arch.Biochem.Biophys.,89:230；Porter,1959,Biochem.J.,73:119；Edelman等,1967,METHODS IN ENZYMOLOGY(酶学方法)，第422页(Academic Press)，和Coligan等编,1991,CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY(免疫学当前方案)，(John Wiley&Sons)。

[0353] 也可使用裂解抗体的其他方法，如分离重链以形成单价轻-重链片段、进一步裂解片段或其他酶学、化学或遗传技术，只要所述片段能与完整抗体识别的抗原结合。例如，Fv片段包含V_H和V_L链的缔合。此缔合可为非共价的，如Inbar等,1972,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,69:2659所述。替代地，所述可变的链(variable chain)可通过分子间二硫键连接，或通过化学剂(如戊二醛)交联。请参见Sandhu,1992,Crit.Rev.Biotech.,12:

437。

[0354] 优选地,所述Fv片段包含用肽连接体连接的V_H和V_L链。这些单链抗原结合蛋白(sFv)通过构建包含编码V_H和V_L结构域的DNA序列的结构基因制备,其中,V_H和V_L结构域用寡核苷酸连接体序列连接。所述结构基因插入表达载体,该载体随后导入宿主细胞,如大肠杆菌。所述重组宿主细胞合成单个多肽链,其中两个V结构域由连接体肽桥接。制备sFv的方法在本领域为公知。请参见Whitlow等,1991,Methods:A Companion to Methods in Enzymology (方法:酶学方法指南) 2:97;Bird等,1988,Science,242:423;第4,946,778号美国专利;Pack等,1993,Bio/Technology,11:1271,和Sandhu,1992,Crit.Rev.Biotech.,12:437。

[0355] 抗体片段的另一形式为编码单个互补决定区(CDR)的肽。CDR肽(“最小识别单元”)可通过构建编码目标抗体的CDR的基因获得。例如,此类基因通过使用聚合酶链式反应从产生抗体的细胞的RNA合成所述可变区来制备。请参见Larrick等,1991,Methods:A Companion to Methods in Enzymology (方法:酶学方法指南) 2:106;Ritter等编,1995,MONOCLONAL ANTIBODIES:PRODUCTION,ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION (单克隆抗体:制备、改造和临床应用),第166-179页(Cambridge University Press);Birch等编,1995,MONOCLONAL ANTIBODIES:PRINCIPLES AND APPLICATIONS (单克隆抗体:原理和应用),第137-185页(Wiley-Liss,Inc.)。

[0356] 嵌合和人源化抗体

[0357] 例如,嵌合抗体是人抗体的可变区被小鼠抗体的可变区(包括该小鼠抗体的互补决定区(CDR))取代的重组蛋白。嵌合抗体在施用至受治疗者时表现出免疫原性下降,且稳定性增加。构建嵌合抗体的方法在本领域为公知(例如,Leung等,1994,Hybridoma.13:469)。

[0358] 嵌合单克隆抗体可通过将该小鼠免疫球蛋白重链和轻链可变区的小鼠CDR转移到人抗体的相应可变区而进行人源化。该嵌合单克隆抗体中的小鼠框架区(FR)也替换为人FR序列。为了保留所述人源化单克隆抗体的稳定性和抗原特异性,一个或多个FR残基可替换为相应的小鼠残基。人源化单克隆抗体可用于治疗受治疗者。人源化抗体对靶标的亲和力也可通过选定的CDR序列修饰得以提高(W00029584A1)。制备人源化单克隆抗体的技术在本领域为公知(例如,请参见Jones等,1986,Nature,321:522;Riechmann等,Nature,1988,332:323;Verhoeyen等,1988,Science,239:1534;Carter等,1992,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,89:4285;Sandhu,Crit.Rev.Biotech.,1992,12:437;Tempest等,1991,Biotechnology9:266;Singer等,J.Immunol.,1993,150:2844)。

[0359] 其他实施方案可包含非人灵长类抗体。例如,培养在狒狒中有效的治疗抗体的一般技术可参见Goldenberg等,W091/11465(1991)和Losman等,Int.J.Cancer.46:310(1990)。

[0360] 人抗体

[0361] 使用组合方法或转有人免疫球蛋白基因座的转基因动物制备完全人抗体的方法在本领域为已知(例如,Mancini等,2004,New Microbiol.27:315-28;Conrad和Scheller,2005,Comb.Chem.High Throughput Screen.8:117-26;Brekke和Loiset,2003,Curr.Opin.Pharmacol.3:544-50;其均通过引用结合入本文)。此类完全人抗体与嵌合或人

源化抗体相比表现出的副作用更少,并基本上可作为内源人抗体在体内行使功能。在某些实施方案中,本发明要求保护的方法和程序可使用通过此类技术制备的人抗体。

[0362] 在一个替代实施方案中,噬菌体展示技术可用于制备人抗体(例如,Dantas-Barbosa等,2005,Genet.Mol.Res.4:126-40,其通过引用结合入本文)。人抗体可从正常人或表现出特定疾病状态如癌症(Dantas-Barbosa等,2005)的人中制备。从患病个体中构建人抗体的好处在于循环抗体库(repertoire)可能对疾病相关抗原抗体具有偏好性。

[0363] 在此方法的一个非限制性实例中,Dantas-Barbosa等(2005)构建了骨肉瘤患者的人Fab抗体片段的噬菌体展示文库。一般而言,总RNA获自循环血淋巴细胞(Id.)。从 μ 、 γ 和 κ 链抗体库中克隆重组Fab,并将其插入噬菌体展示文库(Id.)。RNA可通过使用对重链和轻链免疫球蛋白序列特异的引物转化为cDNA,并用于制备Fab cDNA文库(Marks等,1991,J.Mol.Biol.222:581-97,其通过引用结合入本文)。文库构建按Andris-Widhopf等(2000,选自Phage Display Laboratory Manual,Barbas等编,第1版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY第9.1-9.22页,其通过引用结合入本文)进行。最终的Fab片段用限制性核酸内切酶消化,然后插入噬菌体基因组以制备所述噬菌体展示文库。此类文库可使用本领域已知的标准噬菌体展示方法进行筛选。熟练的技术人员将了解,此技术仅为示例,并且可利用任何已知的通过噬菌体展示制备和筛选人抗体或抗体片段的方法。

[0364] 在另一替代实施方案中,使用标准的免疫实验方案,经过基因工程改造以制备人抗体的转基因动物可用于制备针对基本上任何免疫靶标的抗体。此系统的非限制性示例为Abgenix(Fremont,CA)的Xeno小鼠®(例如,Green等,1999,J.Immunol.Methods.231:11-23,其通过引用结合入本文)。在Xeno小鼠®和相似动物中,小鼠抗体基因已被失活,并替换为功能性人抗体基因,但是小鼠免疫系统的剩余部分仍保持完整。

[0365] Xeno小鼠®已转化了种系配置的YAC(酵母人工染色体),该YAC包含部分人IgH和Ig κ 基因座,包括可变区序列的大部分区域,以及辅助基因和调控序列。人可变区库可用于制备产生抗体的B细胞,而B细胞可通过已知技术融合至杂交瘤。用靶抗原免疫的Xeno小鼠®将通过正常的免疫反应产生人抗体,所述人抗体可通过上述标准技术进行收获和/或制备。有多个种系的Xeno小鼠®可用,每个种系均能产生不同类别的抗体。此类人抗体可通过化学交联或其他已知方法偶联至其他分子。使用转基因方法制备的人抗体已显示出治疗潜力,并保留了普通人抗体的药物动力学特性(Green等,1999)。熟练的技术人员将了解,本发明要求保护的组合物和方法并不限于使用Xeno小鼠®系统,而是可以使用已经过基因工程改造来制备人抗体的任何转基因动物。

[0366] 病组织检测、诊断和显像方法

[0367] 基于蛋白质的体外诊断

[0368] 本发明包括稳定拴结结构在体外和/或体内筛选生物样品中存在的疾病相关抗原的用途。在示例性免疫分析中,包含抗体、融合蛋白或其片段的稳定拴结结构可使用液相或者结合于固相载体,如下文所述。在优选实施方案,特别是包括体内施用的实施方案中,所述抗体或其片段为人源化的。同样优选地,所述抗体或其片段为完全人抗体。更优选地,所述融合蛋白包含人源化抗体或完全人抗体。熟练的技术人员将了解,已知有多种技术用于确定特定基因的表达水平,并且任何此类已知方法,如免疫分析、RT-PCR、mRNA纯化和/或制

备cDNA后与基因表达分析芯片杂交,均可用于确定个体受治疗者和/或组织中的表达水平。使用体外分析的示例包括RIA、ELISA、夹心ELISA、Western杂交、狭缝杂交、斑点杂交及类似分析。虽然此类技术是使用完整抗体开发的,但是也可使用包含抗体、抗体片段或其他结合部分的稳定拴结结构。

[0369] 包含抗体、融合蛋白、抗体片段和/或其他结合部分的稳定拴结结构也可用于检测从组织标本制备的组织切片中是否存在靶抗原。此原位检测可用于确定是否存在所述抗原,以及确定该抗原在所检查的组织中的分布。原位检测可通过对冷冻或石蜡包埋的组织切片使用可检测标记结构实现。原位检测的一般技术对普通技术人员为公知。例如,请参见Ponder,“Cell Marking Techniques and Their Application”(细胞标记技术及其应用),选自MAMMALIAN DEVELOPMENT:A PRACTICAL APPROACH(哺乳动物发育:实验方法)113-38Monk编(IREL Press1987),和Coligan,第5.8.1-5.8.8页。

[0370] 稳定拴结结构可用任何合适的标志物部分进行可检测标记,例如,放射性同位素、酶、荧光标记、染料、显色剂、化学发光标记、生物发光标记或顺磁标记。

[0371] 所述标志物部分可为放射性同位素,其可通过使用 γ 计数器或 β -闪烁计数器等手段,或通过放射自显影技术进行检测。在优选实施方案中,所述诊断轭合物为 γ -、 β -或正电子辐射同位素。标志物部分指会在预定条件下产生信号的分子。标志物部分的实例包括放射性同位素、酶、荧光标记、化学发光标记、生物发光标记和顺磁标记。标志物部分与稳定拴结结构的结合可通过本领域已知的标准技术实现。此方面的经典方法请参见Kennedy等,Clin.Chim.Acta70:1(1976);Schurs等,Clin.Chim.Acta81:1(1977);Shih等,Int'l J.Cancer46:1101(1990)。

[0372] 基于核酸的体外诊断

[0373] 在某些实施方案中,稳定拴结结构可包括核酸部分。在特定实施方案中,可通过分析核酸,尤其是使用核酸扩增方法,来确定结合水平。各种形式的扩增方法在本领域为公知,并且任何此类方法均可使用。一般而言,扩增包括使用与要扩增的靶核酸序列选择性或特异性杂交的一个或多个引物。

[0374] 如此处所定义,术语“引物”意在包括能够在模板依赖性过程中引导新生核酸合成的任何核酸。用于选择和设计扩增引物的计算机程序可从熟练的技术人员公知的商业和/或公共来源获得。有多个模板依赖性过程可用于扩增给定样品中存在的标志物序列。最著名的扩增方法之一就是聚合酶链式反应(简称PCR),其详情请参见第4,683,195、4,683,202和4,800,159号美国专利。但是,也可使用已知的其他扩增方法。

[0375] 体内诊断

[0376] 使用标记的肽或MAb进行诊断显像已是众所周知。例如,在免疫显像技术中,配体或抗体使用 γ 辐射放射性同位素标记,然后导入患者体内。 γ 摄像机用于检测 γ 辐射放射性同位素的定位和分布。例如,请参见Srivastava编,RADIOLABELED MONOCLONAL ANTIBODIES FOR IMAGING AND THERAPY(用于显像和治疗的放射性标记单克隆抗体)(Plenum Press1988);Chase,“Medical Applications of Radioisotopes”(放射性同位素的医学应用),REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(雷明顿氏药物科学),第18版,Gennaro等编,第624-652页(Mack Publishing Co.,1990);和Brown,“Clinical Use of Monoclonal Antibodies”(单克隆抗体的临床应用),选自BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY

(生物技术与制药) 227-49, Pezzuto等编 (Chapman&Hall 1993)。同样优选的还有正电子辐射放射性核素 (PET同位素), 如能量为511keV的放射性核素, 如 ^{18}F 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 和 ^{124}I 。此类显像可通过直接标记所述稳定拴结结构或使用预靶向显像方法执行, 所述预靶向显像方法请参见Goldenberg等, “Antibody Pre-targeting Advances Cancer Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy” (抗体预靶向改善了癌症的放射免疫检测和放射免疫治疗), (J Clin Oncol 2006; 24: 823-834), 另请参见第20050002945、20040018557、20030148409和20050014207号美国专利公布, 其均通过引用结合入本文。

[0377] 向患者施用的同位素剂量保持在尽可能低的水平, 这通过选择半衰期最短, 在体内停留时间最短, 以及进行检测和精确测量所需的同位素量最小的最佳组合同位素实现。适合进行诊断显像的放射性同位素的实例包括 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和 ^{111}In 。

[0378] 所述稳定拴结结构, 或者与其结合的半抗原或载体, 也可用顺磁离子和各种放射性造影剂进行标记, 以用于体内诊断。对磁共振成像特别有用的造影剂包括钆、锰、镓、钬或铁离子。其他试剂包括铬、铜、钴、镍、铈、铈、铈、铈、铈或钆。配体、抗体及其片段也可耦合至超声造影剂/增强剂。例如, 一个超声造影剂为包含人源化IgG或其片段的脂质体。同样优选地, 所述超声造影剂为充气的脂质体。

[0379] 显像剂和放射性同位素

[0380] 许多合适的显像剂以及将它们连接至蛋白质或肽的方法在本领域为已知 (例如, 请参见第5,021,236和4,472,509号美国专利, 其均通过引用结合入本文)。某些连接方法包括使用金属螯合复合体, 例如, 所述复合体使用连接至蛋白质或肽的有机螯合剂 (如DTPA) (第4,472,509号美国专利)。蛋白质或肽也可在存在偶联剂 (如戊二醛或高碘酸) 的条件下与酶反应。具有荧光标志物的耦合物在存在这些偶联剂的条件下制备, 或者通过与异硫氰酸酯反应来制备。

[0381] 可用作显像剂的顺磁离子的非限制性实例包括铬 (III)、锰 (II)、铁 (III)、铁 (II)、钴 (II)、镍 (II)、铜 (II)、铈 (III)、钐 (III)、镱 (III)、钆 (III)、钐 (II)、铈 (III)、镓 (III)、铈 (III) 和铈 (III), 其中特别优选的为钆。可用于其他方法 (如X射线成像) 的离子包括但不限于钬 (III)、金 (III)、铅 (II), 尤其是铈 (III)。

[0382] 可用作显像剂或治疗剂的放射性同位素包括砷 211 、碳 14 、铬 51 、氯 36 、钴 57 、钴 58 、铜 62 、铜 64 、铜 67 、Eu 152 、氟 18 、镓 67 、镓 68 、氢 3 、碘 123 、碘 124 、碘 125 、碘 131 、铟 111 、铁 52 、铁 59 、镓 177 、磷 32 、磷 33 、铈 186 、铈 188 、Sc 47 、硒 75 、银 111 、硫 35 、铈 $^{94\text{m}}$ 、铈 $^{99\text{m}}$ 、铈 86 、铈 90 和铈 89 。某些实施方案经常优选使用I 125 , 而铈 $^{99\text{m}}$ 和铈 111 也由于其低能量和适合远程探测而经常获得优选使用。

[0383] 放射性标记的蛋白质或肽可根据本领域公知的方法制备。例如, 它们可以通过与碘化钠或碘化钾, 和化学氧化剂 (如次氯酸钠) 或酶氧化剂 (如乳过氧化物酶) 反应进行碘标记。蛋白质或肽可通过配体交换过程或直接标记技术进行铈 $^{99\text{m}}$ 标记, 所述配体交换过程例如, 使用亚锡溶液还原高铈酸盐, 将还原的铈螯合至Sephadex (交联葡聚糖) 柱, 然后将所述肽加至此柱; 所述直接标记技术例如, 将高铈酸盐、还原剂 (如 SnCl_2)、缓冲液 (如邻苯二甲酸钠钾溶液) 和所述肽一起孵育。经常用于将金属离子形式的放射性同位素结合至肽的中间官能团包括二乙烯三胺五乙酸 (DTPA)、DOTA、NOTA、卟啉螯合剂和乙二胺四乙酸 (EDTA)。同样可用的还有荧光标记, 包括若丹明、荧光素异硫氰酸酯和肾造影剂。

[0384] 在某些实施方案中, 所述蛋白质或肽可连接至二级结合配体或与显色底物反应生

成有色产物的酶(酶标签)。合适酶的实例包括脲酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶和葡萄糖氧化酶。优选的二级结合配体为生物素和亲和素或链霉亲和素化合物。此类标记的用途对本领域的技术人员为公知,并可参见,例如,第3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149和4,366,241号美国专利;其均通过引用结合入本文。这些荧光标记优选用于体外用途,但也可用于体内用途,特别是内窥镜或血管内检测程序。

[0385] 在替代实施方案中,配体、抗体或其他蛋白质或肽可用荧光标志物进行标记。可光检测的标记的非限制性实例包括Alexa350、Alexa430、AMCA、氨基吡啶、BODIPY630/650、BODIPY650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、5-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素、5-羧基-2',4',5',7'-四氯荧光素、5-羧基荧光素、5-羧基若丹明、6-羧基若丹明、6-羧基四甲基胺、Cascade Blue、Cy2、Cy3、Cy5、6-FAM、丹磺酰氯、荧光素、HEX、6-JOE、NBD (7-硝基苯并-2-氧-1,3-二唑)、俄勒冈绿488 (Oregon Green488)、俄勒冈绿500、俄勒冈绿514、太平洋蓝、邻苯二甲酸、对苯二甲酸、间苯二甲酸、甲酚固紫、甲酚蓝紫、亮甲酚蓝、对氨基苯甲酸、赤藓红、酞菁、甲亚胺、菁、黄嘌呤、琥珀酰荧光素、稀土金属穴位化合物、三联吡啶二胺铈(europium trisbipyridine diamine)、铈穴位化合物或螯合物、二胺、二花青苷、La Jolla蓝色染料(La Jolla blue dye)、别藻青素(allophycocyanin)、allococyanin B、藻青素C、藻青素R、硫胺素、藻红蓝蛋白、藻红蛋白R、REG、若丹明绿、若丹明异硫氰酸酯、若丹明红、ROX、TAMRA、TET、TRIT(四甲基若丹明异硫醇)、四甲基若丹明、Edans和得克萨斯红。这些和其他荧光标记可获自商业来源,如Molecular Probes (Eugene, OR) 和EMD Biosciences (San Diego, CA)。

[0386] 有用的化学发光标记化合物可包括鲁米诺、异鲁米诺、芳基吡啶酯、咪唑、吡啶盐和草酸酯或生物发光化合物,如荧光素、荧光素酶和水母素。例如,诊断轭合物可用于外科手术、内窥镜或血管内肿瘤或疾病诊断。

[0387] 在不同实施方案中,有用的标记可包含金属纳米粒子。制备纳米粒子的方法为已知(例如,请参见第6,054,495;6,127,120;6,149,868号美国专利;Lee和Meisel, J. Phys. Chem. 86:3391-3395, 1982)。纳米粒子也可获自商业来源(例如, Nanoprobe Inc., Yaphank, NY; Polysciences, Inc., Warrington, PA)。经过修饰的纳米粒子已实现商业化,如 Nanoprobe, Inc. (Yaphank, NY) 的 Nanogold® 纳米粒子。用于轭合蛋白质或肽的功能化纳米粒子也可通过商业途径购得。

[0388] 实施例

[0389] 下列实施例用以说明,而不是限制本文要求保护的发明。

[0390] 制备由三个Fab亚基组成的非共价a₂b复合体的方法

[0391] 实施例1. 制备模块化Fab亚基的一般策略

[0392] Fab模块可制备成包含DDD或AD序列的融合蛋白。为每个Fab融合蛋白设计独立的转基因细胞系。当制备时,如果需要,模块可进行纯化或保存在细胞培养物的上清液中。制备之后, (Fab-DDD)₂模块和Fab-AD模块之间可任意组合,以生成双特异性三价Fab (bsTF)。

[0393] 质粒载体pdHL2已用于制备多种抗体和基于抗体的构建体。请参见Gillies等, J Immunol Methods (1989), 125:191-202; Losman等, Cancer (Phila) (1997), 80:2660-6。双顺反子哺乳动物表达载体介导IgG重链和轻链的合成。许多不同IgG-pdHL2构建体的载体序列绝大部分都是相同的,仅在可变区(V_H和V_L)序列存在差异。使用本领域技术人员已知的分子

生物学工具,可将这些IgG表达载体转化为Fab-DDD或Fab-AD表达载体。为了制备产生Fab-DDD表达载体,重链的铰链区、CH2和CH3结构域的编码序列替换为编码所述铰链的前4个残基、14个残基的Gly-Ser连接体和人RII α 的前44个残基的序列(称为DDD1,图1)。为了制备Fab-AD表达载体,IgG的铰链区、CH2和CH3结构域的序列替换为编码所述铰链的前4个残基、15个残基的Gly-Ser连接体和名为AKAP-IS的17个残基的合成AD的序列(称为AD1,图2),该序列系使用生物信息学和肽阵列技术制备,并显示出非常高的与RII α 二聚体结合的亲和力(0.4nM)。请参见Alto等,Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A (2003),100:4445-50。

[0394] 设计了两个穿梭载体,以利于将IgG-pdHL2载体转化为Fab-DDD1或Fab-AD1表达载体,如下所述。

[0395] CH1的制备

[0396] CH1结构域系使用pdHL2质粒载体作为模板,通过PCR扩增获得。左侧PCR引物由CH1结构域的上游(5')和SacII限制性核酸内切酶位点(即CH1编码序列的5'端)组成。右侧引物由编码铰链的前4个残基(PKSC)后接GGGGS(最后两个密码子(GS),包含Bam HI限制性酶切位点)的序列组成。

[0397] CH1左侧引物的5'端

[0398] 5'GAACCTCGCGGACAGTTAAG-3'(SEQ ID NO:5)

[0399] CH1-G4S-Bam右侧

[0400] 5'GGATCCTCCGCCGCCGAGCTCTTAGGTTTCTGTCCACCTTGGTGTGCTGG-3'(SEQ ID NO:6)

[0401] 将410 bp PCR扩增片段克隆至pGemT PCR克隆载体(Promega, Inc.),然后筛选克隆以获得T7(5')方向的插入物。

[0402] (G4S)₂DDD1的构建

[0403] 使用Sigma Genosys(Haverhill,UK)合成双链寡核苷酸(命名为(G4S)₂DDD1),以编码DDD1的氨基酸序列,所述DDD1前面有连接体肽的11个残基,其中前两个密码子包含BamHI限制性酶切位点。终止密码子和EagI限制性酶切位点位于3'端。编码的多肽序列如下所示。

[0404] GSGGGSGGGGSHIQIPPGITEIIQGYTVEVIRQQPPDIVEFAVEYFTRIAREAR (SEQ ID NO:7)

[0405] 合成两个寡核苷酸(命名为RIIA1-44上和RIIA1-44下,它们的3'端有30个碱基对的重叠)(Sigma Genosys),并将它们组合在一起以包含174bp DDD1序列的154个居中碱基对。对所述寡核苷酸进行退火,然后使用Taq聚合酶进行引物延伸反应。

[0406] RIIA1-44上

[0407] 5'GTGGCGGGTCTGGCGGAGGTGGCAGCCACATCCAGATCCCGCCGGGGCTCACGGAGCTGCTGCAGGGCTACACGGTGGAGGTGCTGCGACAG-3'(SEQ ID NO:8)

[0408] RIIA1-44下

[0409] 5'GCGCGAGCTTCTCTCAGGCGGGTGAAGTACTCCACTGCGAATTCGACGAGGTCAGGCGGCTGCTGTCGCAGCACCTCCACCGTGTAGCCCTG-3'(SEQ ID NO:9)

[0410] 引物延伸之后,使用以下引物对所述双链进行扩增:

[0411] G4S Bam-左

[0412] 5'-GGATCCGGAGGTGGCGGGTCTGGCGGAGGT-3'(SEQ ID NO:10)

[0413] 1-44终止Eag右

- [0414] 5'-CGGCCGTCAAGCGCGAGCTTCTCTCAGGCG-3' (SEQ ID NO:11)
- [0415] 将此扩增片段克隆至pGemT,然后筛选T7 (5') 方向的插入物。
- [0416] (G₄S)₂-AD1的构建
- [0417] 合成双链寡核苷酸(命名为(G₄S)₂-AD1) (Sigma Genosys),以编码AD1的氨基酸序列,所述AD1前面有连接体肽的11个残基,其中前两个密码子包含BamHI限制性酶切位点。终止密码子和EagI限制性酶切位点位于3'端。编码的多肽序列如下所示。
- [0418] GSGGGSGGGGSQIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:12)
- [0419] 合成两个互补并有重叠的寡核苷酸(命名为AKAP-IS上和AKAP-IS下)。
- [0420] AKAP-IS上
- [0421] 5'GGATCCGGAGGTGGCGGGTCTGGCGGAGGTGGCAGCCAGATCGAGTACCTGGCCAAGCAGATCGTGGACAACGCCATCCAGCAGGCCTGACGGCCG-3' (SEQ ID NO:13)
- [0422] AKAP-IS下
- [0423] 5'CGGCCGTCAAGCCTGCTGGATGGCGTTGTCCACGATCTGCTTGGCCAGGTACTCGATCTGGCTGCCACCTCGCCAGACCCGCCACCTCCGGATCC-3' (SEQ ID NO:14)
- [0424] 使用下列引物对所述双链体(duplex)进行PCR扩增:
- [0425] G4S Bam-左
- [0426] 5'-GGATCCGGAGGTGGCGGGTCTGGCGGAGGT-3' (SEQ ID NO:15)
- [0427] AKAP-IS终止Eag右
- [0428] 5'-CGGCCGTCAAGCCTGCTGGATG-3' (SEQ ID NO:16)
- [0429] 将此扩增片段克隆至pGemT载体,然后筛选T7 (5') 方向的插入物。
- [0430] 连接DDD1和CH1
- [0431] 使用BamHI和NotI限制性内切酶将编码DDD1序列的190bp片段从pGemT上切下,然后将该片段连接至CH1-pGemT的相同位点,以生成穿梭载体CH1-DDD1-pGemT。
- [0432] 连接AD1和CH1
- [0433] 使用BamHI和NotI将含有AD1序列的110bp片段从pGemT上切下,然后将该片段连接至CH1-pGemT的相同位点,以生成穿梭载体CH1-AD1-pGemT。
- [0434] 将CH1-DDD1或CH1-AD1克隆至基于pdHL2的载体
- [0435] 使用此模块化设计,CH1-DDD1或CH1-AD1均可包含于pdHL2载体中的任何IgG构建体。通过去除pdHL2的SacII/EagI限制性片段(CH1-CH3),并将其替换为从相应pGemT穿梭载体上切下的CH1-DDD1或CH1-AD1的SacII/EagI片段,整个重链恒定区即替换为上述构建体之一。
- [0436] N-末端DDD结构域
- [0437] DDD或AD的位置并不限于CH1的羧基末端。已改造了DDD1序列连接至V_H结构域氨基末端的构建体。
- [0438] 实施例2:表达载体
- [0439] h679-Fd-AD1-pdHL2的构建
- [0440] h679-Fd-AD1-pdHL2是用于制备h679Fab的表达载体,其中AD1通过由14个氨基酸残基组成的柔性Gly/Ser肽间隔区耦合至Fd的CH1结构域的羧基末端。将包含h679的可变区的基于pdHL2的载体的SacII/EagI片段替换为CH1-AD1片段(由SacII和EagI从CH1-AD1-SV3

穿梭载体上切下),该载体即转化为h679-Fd-AD1-pdHL2。

[0441] C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2的构建

[0442] C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2是用于制备包含两个拷贝的融合蛋白C-DDD1-Fab-hMN-14的稳定二聚体的表达载体,在所述融合蛋白中,DDD1通过柔性肽间隔区连接至hMN-14Fab的CH1羧基末端。质粒载体hMN14(I)-pdHL2(已用于制备hMN-14IgG)通过用SacII和EagI限制性核酸内切酶消化以去除CH1-CH3结构域,然后插入CH1-DDD1片段(由SacII和EagI从CH1-DDD1-SV3穿梭载体上切下),即转化为C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2。

[0443] N-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2的构建

[0444] N-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2是用于制备包含两个拷贝的融合蛋白N-DDD1-Fab-hMN-14的稳定二聚体的表达载体,在所述融合蛋白中,DDD1通过柔性肽间隔区连接至hMN-14Fab的V_H的氨基末端。

[0445] 按如下方式对所述表达载体进行改造。使用下面所示的两个引物对DDD1结构域进行PCR扩增。

[0446] DDD1Nco左

[0447] 5'CCATGGGCAGCCACATCCAGATCCCGCC-3'(SEQ ID NO:17)

[0448] DDD1-G4S Bam右

[0449] 5'GGATCCGCCACCTCCAGATCCTCCGCCGCCAGCGGAGCTTCTCTCAGGCGGG TG-3'(SEQ ID NO:18)

[0450] PCR之后,NcoI限制性酶切位点和连接体(G₄S)₂中包含BamHI限制性酶切位点的部分的编码序列即分别连接到5'和3'末端。将170bp PCR扩增片段克隆至pGemT载体,然后筛选克隆以获得T7(5')方向的插入物。194bp插入物由NcoI和SalI限制性内切酶从所述pGemT载体上切下,并克隆至所述SV3穿梭载体(使用相同的酶消化制备而成),以生成中间载体DDD1-SV3。

[0451] 使用下面所示的寡核苷酸引物对hMN-14Fd序列进行PCR扩增。

[0452] hMN-14V_H左G4S Bam

[0453] 5'-GGATCCGGCGGAGGTGGCTCTGAGGTCCAAGTGGTGAGAGCGG-3'(SEQ ID NO:19)

[0454] CH1-C终止Eag

[0455] 5'-CGGCCGTCAGCAGCTCTTAGGTTTCTTGTC-3'(SEQ ID NO:20)

[0456] PCR之后,BamHI限制性酶切位点和部分连接体(G₄S)的编码序列即连接到扩增片段的5'端。终止密码子和EagI限制性酶切位点则连接至3'端。将该1043bp扩增片段克隆至pGemT。使用BamHI和EagI限制性内切酶将hMN-14-Fd插入物从pGemT上切下,然后将该插入物连接至DDD1-SV3载体(使用相同的酶消化制备而成),以生成构建体N-DDD1-hMN-14Fd-SV3。

[0457] 使用XhoI和EagI限制性内切酶将N-DDD1-hMN-14Fd序列切下,然后将该1.28kb插入片段连接至经相同酶消化C-hMN-14-pdHL2制备的载体片段。最终的表达载体即为N-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2。

[0458] 实施例3.h679-Fab-AD1的制备和纯化

[0459] h679-Fd-AD1-pdHL2载体用SalI限制性核酸内切酶消化而被线性化,然后通过电穿孔方法转染Sp/EEE骨髓瘤细胞。该双顺反子表达载体介导h679κ轻链和h679Fd-AD1两者

的合成和分泌,它们结合形成h679Fab-AD1。电穿孔之后,用所述细胞涂布96孔组织培养板,并用0.05 μ M甲氨蝶呤(MTX)选择转化克隆。使用涂布BSA-IMP-260(HSG) 鞭合物的微滴定板通过ELISA筛选克隆的蛋白质表达,并使用鞭合HR的山羊抗人Fab进行检测。BIAcore分析使用HSG(IMP-239) 传感器芯片,通过测量注射的稀释培养基样品的初始斜率来确定生产率。产量最高的克隆的初始生产率约为30mg/L。使用单步IMP-291亲和层析,从4.5升转瓶培养物中纯化出总计230mg h679-Fab-AD1。在加至IMP-291-affigel柱之前,培养基用超滤方法浓缩了约10倍。使用PBS将该柱洗脱至基线,然后使用1M咪唑、1mM EDTA、0.1M NaAc、pH4.5洗脱h679-Fab-AD1。对洗脱液的SE-HPLC分析表明存在保留时间(9.63分钟)对应于50kDa蛋白的单一锐峰(未显示)。在还原SDS-PAGE分析中,仅有代表h679-AD1的多肽组分的两个条带可见(未显示)。

[0460] 实施例4.N-DDD1-Fab-hMN-14和C-DDD1-Fab-hMN-14的制备和纯化

[0461] C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2载体和N-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2载体通过电穿孔转入Sp2/0衍生的骨髓瘤细胞。C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2为双顺反子表达载体,其介导hMN-14 κ 轻链和hMN-14Fd-DDD1两者的合成和分泌,它们结合形成C-DDD1-hMN-14Fab。N-DDD1-hMN-14-pdHL2为双顺反子表达载体,其介导hMN-14 κ 轻链和N-DDD1-Fd-hMN-14两者的合成和分泌,它们结合形成N-DDD1-Fab-hMN-14。每个融合蛋白均通过DDD1结构域的相互作用形成稳定的同型二聚体。

[0462] 电穿孔之后,用所述细胞涂布96孔组织培养板,并用0.05 μ M甲氨蝶呤(MTX)选择转化克隆。使用涂布WI2(hMN-14的大鼠抗id单克隆抗体)的微滴定板通过ELISA筛选克隆的蛋白质表达,并使用鞭合HRP的山羊抗人Fab进行检测。C-DDD1-Fab-hMN14Fab和N-DDD1-Fab-hMN14Fab产量最高的克隆的初始生产率分别为60mg/L和6mg/L。

[0463] 使用AD1-Affigel亲和纯化N-DDD1-hMN-14和C-DDD1-hMN-14

[0464] 使用DDD/AD相互作用对包含DDD1的构建体进行亲和纯化。AD1-C是通过合成制备的由AD1序列和羧基末端半胱氨酸残基组成的肽(请参见实施例6),所述半胱氨酸残基用于将该肽鞭合至Affigel(根据巯基与氯乙酸酐的反应)。包含DDD的 α_2 结构在中性pH下特异性结合AD1-C-Affigel树脂,并可在低pH(例如,pH2.5)下洗脱。

[0465] 使用单步AD1-C亲和层析,从1.2升转瓶培养物中纯化出总计81mgC-DDD1-Fab-hMN-14。在加至AD1-C-affigel柱之前,培养基用超滤方法浓缩了约10倍。使用PBS将该柱洗脱至基线,然后使用0.1M甘氨酸、pH2.5洗脱C-DDD1-Fab-hMN-14。对洗脱液的SE-HPLC分析表明存在保留时间(8.7分钟)对应于107kDa蛋白的单一蛋白峰(未显示)。纯度还经还原SDS-PAGE分析确认,仅显示代表C-DDD1-Fab-hMN-14的两个多肽组分的两个条带(未显示)。

[0466] 如上所述,使用单步AD1-C亲和层析,从1.2升转瓶培养物中纯化出总计10mg N-DDD1-hMN-14。对洗脱液的SE-HPLC分析表明存在保留时间(8.77分钟)类似于C-DDD1-Fab-hMN-14并对应于107kDa蛋白的单一蛋白峰(未显示)。还原SDS-PAGE分析仅显示对应于N-DDD1-Fab-hMN-14的多肽组分的两个条带(未显示)。

[0467] C-DDD1-Fab-hMN-14的结合活性通过样品的SE-HPLC分析确定,在所述样品中,该测试品与不同量的WI2混合。WI2Fab和C-DDD1-Fab-hMN-14按0.75:1的摩尔比混合制成的样品显示三个峰,对应于未结合的C-DDD1-Fab-hMN14(8.71分钟)、结合一个WI2Fab的C-DDD1-Fab-hMN-14(7.95分钟)和结合两个WI2Fab的C-DDD1-Fab-hMN14(7.37分钟)(未显示)。当分

析的样品包含的WI2Fab和C-DDD1-Fab-hMN-14的摩尔比为4时,仅观察到一个7.36分钟的峰(未显示)。这些结果证明,hMN14-Fab-DDD1为二聚体,并且有两个活性结合位点。使用N-DDD1-Fab-hMN-14重复此实验,得到的结果非常相似。

[0468] 竞争ELISA证明,C-DDD1-Fab-hMN-14和N-DDD1-Fab-hMN-14均以和hMN-14IgG类似的亲和力与CEA结合,并且亲和力显著强于单价hMN-14Fab(未显示)。使用包含hMN-14特异的CEA表位(A3B3)的融合蛋白涂布ELISA平板。

[0469] 实施例5.a₂b复合体的形成

[0470] a₂b复合体形成的证据是由包含等摩尔量的C-DDD1-Fab-hMN-14(即a₂)和h679-Fab-AD1(即b)的混合物的SE-HPLC分析首先提供的。对此样品进行分析时,观察到保留时间为8.40分钟的单一峰,这与形成了大于任何单独的h679-Fab-AD1(9.55分钟)或C-DDD1-Fab-hMN-14(8.73分钟)的新蛋白一致(未显示)。当hMN-14F(ab')₂与h679-Fab-AD1混合,或者C-DDD1-Fab-hMN-14与679-Fab-NEM混合时,均未观察到此高磁场位移(upfield shift),证明此相互作用是通过DDD1和AD1结构域特异介导的。使用h679-Fab-AD1和N-DDD1-Fab-hMN-14时得到了非常类似的结果(未显示)。

[0471] 使用BIAcore进一步证明和鉴定了DDD1和AD1融合蛋白之间的特异性相互作用。此实验过程如下:首先让h679-Fab-AD1或679-Fab-NEM结合到高密度的HSG偶联的(IMP239)传感器芯片的表面,然后注射C-DDD1-Fab-hMN-14或hMN-14F(ab')₂。不出所料,当注射后者时,仅有h679-Fab-AD1和C-DDD1-Fab-hMN-14组合造成响应单元的进一步增加(未显示)。使用N-DDD1-Fab-hMN-14和h679-Fab-AD1得到了类似的结果(未显示)。

[0472] 执行了平衡SE-HPLC实验,以确定相应融合蛋白的AD1和DDD1之间的特异性相互作用的结合亲和力。h679-Fab-AD1与C-DDD1-Fab-hMN-14、N-DDD1-hMN-14和重组人RIIα的商业化样品结合的解离常数(K_d)分别为15nM、8nM和30nM。

[0473] 其他相关方法

[0474] 实施例6.双-AD1的制备

[0475] 在此实施例中,通过合成制备了具有如下所示的氨基酸序列的小多肽(AD1-C)。

[0476] NH₂-KQIEYLAKQIVD^{NAI}QQAKGC-CQQH(SEQ ID NO:37)

[0477] 在AD1-C中,AD1氨基酸序列(标有下划线)的N-末端侧翼为赖氨酸残基,且羧基末端侧翼为KGC三肽。引入了两个赖氨酸(K)残基以增加溶解性,并在C-末端半胱氨酸之前插入甘氨酸(G)残基以提供更多的柔性。用DMSO处理之后,AD1-C氧化形成二聚体,命名为双-AD1,双-AD1通过RP-HPLC纯化。双-AD1的结构示意图如下所示(=指示二硫桥)。

[0478] NH₂-KQIEYLAKQIVD^{NAI}QQAKGC=CGKAQQIANDVIQKALYEIQK-NH₂(SEQ ID NO:21)

[0479] 双-AD1或AD1-C中有许多官能团可用于进行进一步修饰。例如,双-AD1和AD1-C中分别包含的8个和4个伯胺基团可用于耦联药物、毒素、蛋白质或其他效应物。此外,双-AD1和AD1-C还分别有2个和1个酪氨酸残基,它们可用于进行放射碘标记。最后,AD1-C包含自由的半胱氨酸残基,其也可用于耦联效应物或形成包含效应物的双-AD1类似物。

[0480] 实施例7.新的预靶向方法

[0481] 本发明的方法提供了新的预靶向方法。下面提供了无需半抗原结合抗体的预靶向系统的实例,该系统使用亲和力增强系统(Le Doussal等,JNucl Med(1989),30:1358-66)。C-DDD1-Fab-hMN-14或N-Fab-DDD2-hMN-14的二聚体(按实施例4所述方法制备)可用于预靶

向肿瘤。该107kDa蛋白首先静脉内施用至受治疗者,然后其将从血液和正常组织中清除,而与肿瘤上的CEA结合。稍后,静脉内施用携带治疗性(例如, ^{90}Y)或诊断性放射性同位素(例如, ^{111}In)的双价肽,如双-AD1的DOTA轭合物。此小肽($\sim 5000\text{Da}$)很快从血液和正常组织中清除,但由于其包含两个AD序列而定位于肿瘤,AD序列可与已被所述肿瘤截留的C-DDD1-Fab-hMN-14发生特异性相互作用。

[0482] C-DDD1-Fab-hMN-14与双-AD1的体外交联已被SE-HPLC证实。当C-DDD1-Fab-hMN-14与双-AD1混合时,蛋白峰从8.67分钟迁移到7.95分钟,表明形成了交联结构(未显示)。当hMN-14F(ab')₂与双-AD1混合时,未观察到此类迁移,证明所述交联是由DDD1和AD1之间的相互作用介导的。为了证明所述峰迁移确实由C-DDD1-Fab-hMN-14的特异性交联引起,使用DTT还原该复合体以断裂双-AD1的二硫键连接,结果该峰又迁回8.67分钟(未显示)。

[0483] 实施例8.DDD或AD融合蛋白的亲纯化

[0484] 可通过制备具有较低亲和力停靠的DDD或AD蛋白来开发通用的亲和纯化系统。与RII α 相比,RI α 二聚体形成的DDD与AKAP-IS(AD1)结合的亲和力要弱500倍(225nM)。因此,可制备由前44个氨基酸残基形成的RI α 二聚体,并将其轭合至树脂制成有吸引亲和力的基质,以纯化任何包含AD1的融合蛋白。

[0485] 自然界存在许多较低亲和力(0.1 μM) AKAP锚定结构域。如果需要,可引入高度可预测的氨基酸取代以进一步降低所述结合亲和力。低亲和力AD可通过合成或生物学方法制备,并可轭合至树脂以用于任何DDD1融合蛋白的亲纯化。

[0486] 与制备稳定拴结结构相关的方法

[0487] 实施例9.用于制备由三个Fab片段组成的二硫键稳定结构的载体

[0488] N-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2

[0489] N-DDD2-hMN-14-pdHL2是用于制备N-DDD2-Fab-hMN-14的表达载体,该结构拥有与Fd的氨基末端连接的DDD2的二聚化和停靠结构域序列(图4)。DDD2通过15个氨基酸残基的Gly/Ser肽连接体轭合至V_H结构域。DDD2具有与DDD1的序列相同的二聚化序列和停靠序列,但是在它们之前具有半胱氨酸残基。分泌的融合蛋白由两个相同拷贝的hMN-14Fab组成,它们通过DDD2结构域的非共价相互作用连接(图3B)。

[0490] 按如下方式对所述表达载体进行改造。通过合成制备两个包含DDD2的1-13位残基的重叠的互补寡核苷酸(DDD2上和DDD2下)。所述寡核苷酸进行退火,并用T4多核苷酸激酶(PNK)磷酸化,以在5'和3'端形成适合与分别用限制性核酸内切酶NcoI和PstI消化的DNA连接的外伸。

[0491] DDD2上

[0492] 5'CATGTGCGGCCACATCCAGATCCCGCCGGGGCTCACGGAGCTGCTGCA-3'(SEQ ID NO:22)

[0493] DDD2下

[0494] 5'GCAGCTCCGTGAGCCCCGGCGGGATCTGGATGTGGCCGCA-3'(SEQ ID NO:23)

[0495] 所述双链DNA与载体片段DDD1-hMN14Fd-SV3(通过用NcoI和PstI消化制备)连接,以生成中间构建体DDD2-hMN14Fd-SV3。使用XhoI和EagI限制性核酸内切酶,将包含DDD2-hMN14Fd编码序列的1.28kb插入片段从所述中间构建体上切下,然后将该片段连接至使用相同酶消化制备的hMN14-pdHL2载体DNA。所得表达载体即为N-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2(图4)。

[0496] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2

[0497] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2是用于制备C-DDD2-Fab-hMN-14的表达载体,在该结构中,DDD2的二聚化和停靠结构域序列通过14个氨基酸残基的Gly/Ser肽连接体连接至Fd的羧基末端(图5A)。分泌的融合蛋白由两个相同拷贝的hMN-14Fab组成,它们通过DDD2结构域的非共价相互作用连接(图5B)。

[0498] 按如下方式对所述表达载体进行改造。通过合成制备两个包含连接体肽的部分(GGGGSGGGCG,SEQ ID NO:38)和DDD2的1-13位残基的编码序列的重叠的互补寡核苷酸。所述寡核苷酸进行退火,并用T4PNK磷酸化,以在5'和3'端形成适合与分别用限制性核酸内切酶BamHI和PstI消化的DNA连接的外伸。

[0499] G4S-DDD2上

[0500] 5'GATCCGGAGGTGGCGGGTCTGGCGGAGGTTGCGGCCACATCCAGATCCCGCCGGGGCTCACGGAGCTGCTGCA-3'(SEQ ID NO:24)

[0501] G4S-DDD2下

[0502] 5'GCAGCTCCGTGAGCCCCGGCGGGATCTGGATGTGGCCGCAACCTCCGCCAGA CCCGCCACCTCCG-3'(SEQ ID NO:25)

[0503] 所述双链DNA与穿梭载体CH1-DDD1-pGemT(通过用BamHI和PstI消化制备)连接,以生成穿梭载体CH1-DDD2-pGemT。使用SacII和EagI将507bp片段从CH1-DDD2-pGemT上切下,然后将该片段连接至使用SacII和EagI消化制备的IgG表达载体hMN14(I)-pdHL2。所得表达构建体即为C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2(图6)。

[0504] h679-Fd-AD2-pdHL2

[0505] h679-Fab-AD2设计作为B,与N-DDD2-Fab-hMN-14或C-DDD2-Fab-hMN-14配对。h679-Fd-AD2-pdHL2是用于制备h679-Fab-AD2的表达载体,在该结构中,AD2的锚定结构域序列通过14个氨基酸残基的Gly/Ser肽连接体连接至CH1的羧基末端。AD2在AD1锚定结构域序列的前后各有一个半胱氨酸残基。

[0506] 按如下方式对所述表达载体进行改造。通过合成制备两个包含AD2的编码序列和部分连接体序列的重叠的互补寡核苷酸。所述寡核苷酸进行退火,并用T4PNK磷酸化,以在5'和3'端形成适合与分别用限制性核酸内切酶BamHI和SpeI消化的DNA连接的外伸。

[0507] AD2上

[0508] 5'GATCCGGAGGTGGCGGGTCTGGCGGATGTGGCCAGATCGAGTACCTGGCCAAGCAGATCGTGGACAA CGCCATCCAGCAGGCCGGCTGCTGAA-3'(SEQ ID NO:26)

[0509] AD2下

[0510] 5'TTCAGCAGCCGGCCTGCTGGATGGCGTTGTCCACGATCTGCTTGGCCAGGTACTCGATCTGGCCACA TCCGCCAGACCCGCCACCTCCG-3'(SEQ ID NO:27)

[0511] 所述双链DNA与穿梭载体CH1-AD1-pGemT(通过用BamHI和SpeI消化制备)连接,以生成穿梭载体CH1-AD2-pGemT。使用SacII和EagI限制性内切酶将包含CH1和AD2编码序列的429碱基对片段从所述穿梭载体上切下,然后将该片段连接至使用相同酶消化制备的h679-pdHL2载体。最终的表达载体即为h679-Fd-AD2-pdHL2。

[0512] 实施例10.h679-Fab-AD2的制备

[0513] h679-Fd-AD2-pdHL2载体通过电穿孔转入Sp/EEE骨髓瘤细胞。此双顺反子表达载

体介导h679 κ 轻链和h679Fd-AD2两者的合成和分泌,它们结合形成h679-Fab-AD2。AD任一末端的半胱氨酸残基提供了两个潜在的活性巯基。电穿孔之后,用所述细胞涂布96孔组织培养板,并用0.05 μ M甲氨蝶呤(MTX)选择转化克隆。使用涂布B SA-IMP-260(HSG) 靶合物的微滴定板通过ELISA筛选克隆的蛋白质表达,并使用山羊抗人Fab-HRP进行检测。BIAcore分析使用HSG(IMP-239) 传感器芯片,通过测量注射的稀释培养基样品的初始斜率来确定生产率。产量最高的克隆的初始生产率约为50mg/L。使用单步IMP-291亲和层析,从2.9升转瓶培养物中纯化出总计160mg h679-Fab-AD2。在加至IMP-291-affigel柱之前,培养基用超滤方法浓缩了约10倍。使用PBS将该柱洗脱至基线,然后使用1M咪唑、1mM EDTA、0.1M NaAc、pH4.5洗脱h679-AD2。SE-HPLC分析表明存在保留时间($\sim$ 10分钟)对应于50kDa蛋白的单一锐峰(未显示)。当此材料与hMN14-Fab-DDD1混合时,SE-HPLC迹线上观察到对应于所述二元复合体的新峰,表明仅1/3发生了反应(未显示)。但是使用TCEP还原h679-Fab-AD2得到100%的活性(未显示)。这表明:(1) AD2的两个半胱氨酸残基可形成分子内二硫键,阻止了与DDD的结合,但是也防止了所述巯基与其他物质反应;和(2) 所述分子内二硫桥可通过还原断裂,得到具有两个自由巯基的DDD反应性锚定结构域。

[0514] 实施例11.a₂结构形式的N-DDD2-Fab-hMN-14的制备

[0515] N-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2载体通过电穿孔转入Sp/EEE骨髓瘤细胞。此双顺反子表达载体介导hMN-14 κ 轻链和N-DDD2-hMN-14Fd两者的合成和分泌,它们结合形成N-DDD2-hMN14Fab。通过DDD2的二聚化可形成A₂结构,得到两个由每个DDD2的半胱氨酸残基提供的潜在反应性巯基。电穿孔之后,用所述细胞涂布96孔组织培养板,并用0.05 μ M甲氨蝶呤(MTX)选择转化克隆。

[0516] 使用涂布WI2(hMN-14抗Id)的微滴定板通过ELISA筛选克隆的蛋白质表达,并使用山羊抗人Fab-HRP进行检测。产量最高的克隆的初始生产率约为10mg/L。使用蛋白L亲和层析,从1.8升转瓶培养物中纯化出总计16mg N-DDD2-hMN-14。在加至蛋白L亲和层析柱之前,培养基用超滤方法浓缩了约10倍。使用PBS将该柱洗脱至基线,然后使用1mMEDTA、0.1M NaAc(pH2.5)洗脱N-DDD2-hMN14,并立即用Tris-HCl中和。SE-HPLC分析显示存在四个蛋白峰(未显示),其中两个稍后被鉴定为N-DDD2-Fab-hMN-14的a₄(7.9分钟)和a₂(8.8分钟)形式,剩下两个为所述 κ 链的二聚体和单体。此混合物几乎没有显示出对h679-Fab-AD1的结合活性,直至加入巯基还原剂(如TCEP)将大部分a₄形式转化为a₂形式(未显示)。这些数据表明:(1) 两个a₂结构通过DDD2中的半胱氨酸连接形成了a₄,进而阻止了与AD的结合,但同时也阻止了所述巯基与其他物质反应;和(2) 所述分子内二硫桥可通过还原断裂,得到a₂结构,该结构具有包含两个自由巯基的AD反应性DDD二聚体。请注意,此副产物(a₄)由四个活性Fab亚基组成。即使用高的TCEP浓度和长的反应时间,总N-DDD2-Fab-hMN-14中仍有约15%在还原之后保持A₄形式(未显示)。这表明,除了二硫桥之外,其他机制(如结构域交换)可能参与了a₄形式的形成。

[0517] 实施例12.C-DDD2-Fab-hMN-14的制备

[0518] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2载体通过电穿孔转入Sp/EEE骨髓瘤细胞。此双顺反子表达载体介导hMN-14 κ 轻链和C-DDD2-Fd-hMN-14两者的合成和分泌,它们结合形成C-DDD2-Fab-hMN14。像N-DDD2-Fab-hMN-14一样,通过DDD2的二聚化可形成a₂结构,得到两个由每个DDD2的半胱氨酸残基提供的潜在反应性巯基。电穿孔之后,用所述细胞涂布96孔组织培养

板,并用0.05 μ M甲氨蝶呤(MTX)选择转化克隆。

[0519] 使用涂布WI2(hMN-14抗Id)的微滴定板通过ELISA筛选克隆的蛋白质表达,并使用山羊抗人Fab-HRP进行检测。产量最高的克隆的初始生产率约为100mg/L,比N-DDD2-Fab-hMN-14的产量高10倍。使用蛋白L亲和层析,从1.8升转瓶培养物中纯化出总计200mg C-DDD2-hMN-14,如实施例3所述。蛋白L纯化C-DDD2-Fab-hMN-14的SE-HPLC图谱(未显示)与N-DDD2-Fab-hMN-14的图谱相似。四个蛋白峰中有两个被鉴定为C-DDD2-Fab-hMN-14的 α_4 (8.40分钟)和 α_2 (9.26分钟)形式,剩下两个代表所述 κ 链的二聚体和单体。此混合物几乎没有显示出对h679-AD1的结合活性,直至加入巯基还原剂(如TCEP)将大部分 α_4 形式转化为 α_2 形式,然后 α_2 与h679-AD1亲和性结合。这些数据表明C-DDD2-Fab-hMN-14是N-DDD2-hMN-14的功能等同物。

[0520] 实施例13.TF1的制备

[0521] h679-Fab-AD2设计作为B组分,以与 α_2 组分(如N-DDD2-hMN-Fab-14或C-DDD2-hMN-14)配对,当混合在一起时,它们很容易结合形成 $\alpha_2\beta$ 结构(图7A),该结构可经进一步诱导通过二硫键进行共价结合(图7B)。由于对N-DDD2-和AD2-构建体的鉴定证实其均需进行还原以实现完全的DDD/AD相互作用,因此,此过程包括还原步骤。最初使用固定的TCEP作为还原剂,以节省去除还原剂所需的时间。在室温还原1小时之后,离心去除TCEP-琼脂糖,然后向反应溶液中加入DMSO至终浓度为10%。存在共价连接的 $\alpha_2\beta$ 复合体(自此命名为TF1)的第一个证据是通过BIAcore分析证实的。

[0522] 通过使用固定TCEP的小规模反应建立可行性之后,TF1的大规模制备按下述方法执行。N-DDD2-Fab-hMN-14(经蛋白L纯化)和h679-Fab-AD2(经IMP-291纯化)首先按大致化学计量浓度在1mM EDTA、PBS、pH7.4中混合。加入TCEP之前,SE-HPLC未显示 $\alpha_2\beta$ 形成的任何证据(未显示)。相反,存在代表 α_4 (7.97分钟;200kDa)、 α_2 (8.91分钟;100kDa)和B(10.01分钟;50kDa)的峰。加入5mM TCEP很快就有 $\alpha_2\beta$ 复合体形成,表现为8.43分钟处出现新峰,对应于150kDa蛋白(未显示)。显然,此实验中B过剩,因为存在对应于h679-Fab-AD2(9.72分钟)的明显的峰,而未观察到对应于 α_2 或 α_4 的明显峰(未显示)。还原一个小时之后,TCEP通过过夜透析(多次更换PBS)除去。所得溶液加入DMSO至终浓度为10%,并在室温下放置过夜。

[0523] 使用SE-HPLC进行分析时,代表 $\alpha_2\beta$ 的峰更加锐利,并且保留时间略有下降,下降了0.1分钟至8.31分钟(未显示),根据我们以前的发现,这表明结合亲和力的增加。该复合体进一步使用IMP-291亲和层析纯化,以除去 κ 链污染物。不出所料,过量的h679-AD2也一起纯化出来,并通过稍后的制备性SE-HPLC加以去除(未显示)。

[0524] TF1为高度稳定的复合体。测试TF1与HSG(IMP-239)传感器芯片的结合时,样品注射末尾观测的反应未出现明显下降。相比之下,在相似条件下测试包含C-DDD1-Fab-hMN-14和h679-Fab-AD1的等摩尔混合物溶液时,观测的响应单元数的增加伴有样品注射过程中和刚注射完毕时的可检测下降,表明最初形成的 $\alpha_2\beta$ 结构不稳定。此外,随后注射WI2造成TF1的响应单元数显著增加,而C-DDD1/AD1混合物的则无明显增加。

[0525] 响应单元数的额外增加(由WI2与固定在传感器芯片上的TF1的结合造成)对应于两个完全的功能性结合位点,每个位点均由N-DDD2-Fab-hMN-14的一个亚基提供。这已为TF1能够结合WI2的两个Fab片段所证实(未显示)。使用BIAcore分析包含h679-AD2和N-DDD1-hMN14(已按照与TF1完全相同的方式进行还原和氧化)的混合物时,几乎没有额外的

WI2结合(未显示),表明二硫键稳定的a₂b复合体(如TF1)只能通过DDD2和AD2的相互作用形成。

[0526] 对此过程进行了两项改进,以减少此过程的时间和降低效力。第一,使用a₄/a₂结构的混合物与h679-Fab-AD2反应时,使N-DDD2-Fab-hMN-14的摩尔数稍微过量,以便不会剩下自由的h679-Fab-AD2,并且任何未与h679-Fab-AD2拴结的a₄/a₂结构,以及轻链均可通过IMP-291亲和层析去除。第二,使用疏水相互作用层析(HIC)替代透析或渗滤作为还原之后去除TCEP的手段,这不仅缩短了过程时间,而且增加了潜在的病毒去除步骤。N-DDD2-Fab-hMN-14和679-Fab-AD2混合,并使用5mM TCEP在室温下还原1小时。向该溶液中加入终浓度0.75M的硫酸铵,然后加至Butyl FF HIC柱。使用0.75M硫酸铵、5mM EDTA、PBS洗涤该柱以去除TCEP。还原的蛋白使用PBS从HIC柱洗脱,然后加入终浓度10%的DMSO。在室温孵育过夜之后,通过IMP-291亲和层析分离得到高度纯化的TF1(未显示)。无需其他纯化步骤,如凝胶过滤。

[0527] 实施例14. TF2的制备

[0528] 成功制备TF1之后,命名为TF2的类似物(图8)也通过使C-DDD2-Fab-hMN-14与h679-Fab-AD2反应获得。TF2有两个潜在的优势超过了TF1。第一,C-DDD2-Fab-hMN-14的制备水平比N-DDD2-Fab-hMN-14高10倍。第二,具有C-末端DDD结构域的融合蛋白的CEA-结合亲和力和显著高于具有N-末端DDD结构域的融合蛋白。这很可能归因于结构域的排列方式,其中N-DDD变体的结合可能由于位阻干扰而受到影响。

[0529] TF2试验批次的制备产量>90%,方法如下。蛋白L纯化的C-DDD2-Fab-hMN-14(200mg)与h679-Fab-AD2(60mg)按1.4:1的摩尔比混合。总蛋白浓度为1.5mg/ml(用含1mM EDTA的PBS配制)。随后的步骤,包括TCEP还原、HIC层析、DMSO氧化和IMP-291亲和层析,与TF1的步骤相同。加入TCEP之前,SE-HPLC未显示a₂b形成的任何证据(未显示)。相反,存在对应于a₄(8.40分钟;215kDa)、a₂(9.32分钟;107kDa)和b(10.33分钟;50kDa)的峰。加入5mM TCEP很快就有a₂b复合体形成,表现为8.77分钟处出现新峰,对应于所述二元结构预期的150kDa蛋白(未显示)。TF2经IMP-291亲和层析纯化至接近同质(未显示)。对未结合IMP-291的组分的SE-HPLC分析证明已从该产物中去除a₄、a₂和游离κ链(未显示)。

[0530] 非还原性SDS-PAGE分析表明,绝大部分TF2以大的共价结构存在,其相对迁移率接近IgG的迁移率(未显示)。其他条带暗示实验条件下二硫键的形成不够充分。还原性SDS-PAGE表明,在非还原性凝胶中显著的任何其他条带都是产物相关的(未显示),因为在还原性SDS-PAGE中,仅有代表TF2组成性多肽的条带可见。但是,这四个多肽的相对迁移率均非常接近,以至于难以分离。MALDI-TOF质谱(未显示)得到156,434Da的单峰,该分子量在TF2的计算质量(157,319Da)的99.5%范围内。

[0531] TF2的功能通过BIAcore确定,方法与TF1的相同。TF2、C-DDD1-hMN-14+h679-AD1(用作非共价a₂b复合体的对照样品),或C-DDD2-hMN-14+h679-AD2(用作未还原的a₂和b组分的对照样品)稀释至1μg/ml(总蛋白),然后经过用HSG固定的传感器芯片。TF2的反应约为两个对照样品反应的两倍,表明对照样品中仅有h679-Fab-AD组分结合并保留在传感器芯片上。随后的WI2IgG注射表明,仅有TF2具有与h679-Fab-AD紧密结合的DDD-Fab-hMN-14组分,这可从增加的信号反应判断出。响应单元数的额外增加(由WI2与固定在传感器芯片上的TF2的结合造成)还对应于两个完全的功能性结合位点,每个位点均由C-DDD2-Fab-hMN-14

的一个亚基提供。这已为TF2能够结合WI2的两个Fab片段所证实(未显示)。

[0532] TF2的相对CEA结合亲和力通过竞争ELISA确定。使用包含CEA的A3B3结构域(可为hMN-14识别)的融合蛋白涂布平板(0.5 μ g/孔)。制备TF1、TF2和hMN-14IgG的四份系列稀释液,然后在包含靶合HR的hMN-14IgG(1nM)孔中孵育。数据表明,TF2与CEA的结合亲和力至少等于IgG的亲和力,并比TF1高出两倍(未显示)。这并不奇怪,因为之前在相似的分析中发现,C-DDD1-Fab-hMN-14的CEA结合亲和力强于hMN-14IgG,而其结合亲和力又强于N-DDD1-Fab-hMN-14。C-DDD-Fab-hMN-14的亲和力相对亲本IgG有显著的提高,可能的解释是前者的Gly/Ser连接体提供了一个比IgG更加柔软的分子。虽然N-DDD变体也拥有柔性肽连接体,但是其CEA结合位点彼此靠近,并且邻近DDD二聚体,导致亲和力下降。

[0533] 实施例15. TF1和TF2的血清稳定性

[0534] TF1和TF2设计成为可用于体内血液和组织被严重稀释的场合的稳定拴结结构。使用BIAcore评估了TF2在人血清中的稳定性。TF2用人新鲜血清(采集自四名捐血者)稀释至0.1mg/ml,然后在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂条件下孵育7天。每天的样品按1:25稀释,然后使用IMP-239HSG传感器芯片进行BIAcore分析。注射WI2IgG以确定完整并且具有完全活性的TF2的量。血清样品与直接从贮液稀释而来的对照样品进行比较。TF2在血清中高度稳定,7天后保留98%的双特异性结合活性(未显示)。TF1在人或小鼠血清中均获得了相似的结果(未显示)。

[0535] 实施例16. TF2在荷瘤小鼠中的生物分布

[0536] TF2的生物分布研究在皮下荷有人大肠腺癌异种移植物(LS174T)的雌性无胸腺裸小鼠中进行。细胞在组织培养基中扩增,直至获得足够皮下注射50只小鼠(每只小鼠 1×10^7 个细胞)的细胞。一周之后,对肿瘤进行测量,并将小鼠按每个时间点5只小鼠进行分组。研究开始时平均肿瘤大小为 $0.141 \pm 0.044 \text{ cm}^3$ 。所有小鼠均注射40 μ g¹²⁵I-TF2(250皮摩, 2 μ Ci)。然后在注射后0.5、2、4、16、24、48和72小时对它们进行处死并尸体剖检。本研究共使用了35只小鼠。摘除肿瘤以及各种组织,并将其置于 γ -计数器中,以确定组织在各时间点的每克注射剂量百分比(%ID/g)。

[0537] ¹²⁵I-TF2的放射碘标记得到2.7%的未结合同位素,比活为1.48mCi/mg。然后将标记的样品单独和在与20倍摩尔过量的CEA混合之后进行SE-HPLC。约有83%的TF2洗脱下来的保留时间为10.1分钟。标记的TF2中存在9%的聚物质(RT=9.03分钟)和8%低分子量物质(RT=14.37分钟)。与CEA混合时,95%的标记TF2迁移至高分子量物类(RT=7.25分钟)。这些结果表明,所述标记的制品可有效施用至所述荷瘤小鼠。

[0538] 表1提供了肿瘤和各组织中的计算%ID/g值。肿瘤吸收峰值出现于注射后4h($10.3 \pm 2.1\%$ ID/g)。注射后16和24h,肿瘤中的TF2量差异不显著($5.3 \pm 1.1\%$ ID/g和 $5.37 \pm 0.7\%$ ID/g),表明:取决于血液值,肽可在这两个时间点之间的任意时间施用,而不影响肿瘤定位。TF2在正常组织中的吸收和清除与之前TF1的观察非常相似。TF1和TF2看来均便于通过RES系统(脾和肝)清除。

[0539] 同时还评估了荷瘤小鼠中TF2的血液PK,并发现该值表现出两阶段清除。这些数据的分析使用WinNonlin非线性预测程序(4.1版)中提供的双房室分析,确定的参数显示于表2。

[0540] 实施例17. 荷瘤小鼠中TF2的预靶向

[0541] TF2的预靶向研究在皮下荷有人大肠腺癌异种移植瘤(LS174T)的雌性无胸腺裸小鼠中进行。细胞在组织培养基中扩增,直至获得足够皮下注射55只小鼠(每只小鼠 1×10^7 个细胞)的细胞。一周之后,对肿瘤进行测量,并将小鼠按每个时间点5只小鼠进行分组。研究开始时平均肿瘤大小为 $0.105 \pm 0.068 \text{ cm}^3$ 。20只小鼠注射 $80 \mu\text{g}^{125}\text{I}$ -TF2(500皮摩,2 μCi),并在16h后施用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IMP-245(40 μCi ,92ng,50皮摩)。在注射后0.5、1、4和24小时将小鼠处死并进行尸体剖检。此外,24h时间点组的3只小鼠在注射1、4和24h后用 γ -摄像机显像。作为对照,3只其他小鼠仅接受 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IMP-245(无预靶向),并在注射1、4和24h后进行显像,24h显像期之后进行验尸。摘除肿瘤以及各种组织,并将其置于 γ -计数器中,以确定组织在各时间点的%ID/g。

[0542] 使用 ^{125}I -TF2预靶向确定的 ^{125}I -TF2和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IMP-245的%ID/g值分别总结于表3和表4。TF2水平在肽注射后的前4个小时(或TF2施用后20h)内保持相对不变,从肽注射后0.5h(TF2施用后16.5h)的 $6.7 \pm 1.6\%$ ID/g到4h时间点(TF2注射后20h)的 $6.5 \pm 1.5\%$ ID/g。使用TF2预靶向时,肽注射后0.5、1、4和24h后IMP-245的肿瘤吸收值(%ID/g)分别为 $22 \pm 3\%$ 、 $30 \pm 14\%$ 、 $25 \pm 4\%$ 和 $16 \pm 3\%$ 。

[0543] 对于正常组织,在检查的各个时间点,使用TF2进行预靶向的小鼠的肝、肺和血液中的肽显著少于使用目前已开发的其他预靶向剂获得的结果(Rossi等,Clin Cancer Res.2005;11(19Suppl):7122s-7129s)。这些数据表明,TF2得以从正常器官中有效清除,没有留下可与随后施用的肽结合的任何残留片段。

[0544] 高肿瘤吸收伴以正常组织中的低水平,产生了极好的肿瘤:非肿瘤(T/NT)比(表5),进而确认了TF2是将基于双-HSG的效应物定位至产生CEA的肿瘤的合适预靶向剂。

[0545] 实施例18.使用谷胱甘肽氧化还原系统制备TF2

[0546] 作为上述实施例13和14中公开的方法的替代实施方案,可使用谷胱甘肽氧化还原系统来制备稳定拴结结构(如TF1或TF2),以形成特异性二硫键将所述稳定拴结结构连接在一起。

[0547] 制备TF2的简单而有效的方法如下所示。整个过程在室温下进行。C-DDD2-Fab-hMN-14(经蛋白L纯化)和h679-Fab-AD2(经IMP-291纯化)首先按大致化学计量浓度在1mM EDTA、PBS、pH7.4中混合。加入还原型谷胱甘肽至终浓度为1mM。30分钟之后,加入氧化型谷胱甘肽至终浓度为2mM。BIACORE分析表明,加入氧化型谷胱甘肽后2分钟,TF2形成已达50%,4小时内达100%。TF2经IMP-291亲和层析纯化至接近同质,如上文实施例14所述。

[0548] 实施例19.粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的位点特异性聚乙二醇化

[0549] 重组人GM-CSF(14kDa)在临床上用于治疗多种血液病。当前GM-CSF产品的局限在于循环半衰期短,因此其必须通过每天注射施用至受治疗者以达到最佳效果。用于延长蛋白治疗剂的循环半衰期的一个方法是对该蛋白质进行聚乙二醇(PEG)修饰,以增加其有效大小。但是,所有目前已知的将PEG耦合至蛋白(聚乙二醇化)的方法均不理想,并且通常需要对目标蛋白进行修饰,以实现位点特异性偶联(Doherty等,Bioconjugate Chem.2005、16:1291-1298)。而且,即使经过此类修饰,耦合产率仍然有所差异,并且所得产物可能达不到均质。

[0550] 高产率GM-CSF位点特异性聚乙二醇化可通过本发明实现(以下命名为停靠和锁定(DNL)方法或技术),如下所述。DDD2序列通过间隔区融合至GM-CSF的C-末端,以生成GM-CSF

的二聚体,进而生成AD2的停靠位点,而AD2与PEG耦合成形成PEG-AD2。在与所述TF2方法相似的条件混合GM-CSF-DDD2和PEG-AD2,即可形成聚乙二醇化的GM-CSF。值得注意的是,除了延长循环半衰期之外,聚乙二醇化产物中的GM-CSF二聚体结构要比目前单体形式的GM-CSF更加有效。此策略可用于其他细胞因子(如重组人IL-2)、酶(如重组人精氨酸酶)或生物活性肽(如血小板生成素受体的肽激动剂,请参见Cwirta等,Science1997,276:1696-1699)或需要增加循环半衰期以改善治疗效果的肽模拟物。

[0551] 实施例20.DNL技术促成的新免疫药物

[0552] 可制备作为允许耦合并目标细胞毒性药物的B组分的融合蛋白,并使用该融合蛋白耦合作为A组分制备的靶向蛋白,从而得到如下所示的新类型的免疫药物。第一,选择表达良好的免疫球蛋白人轻链作为支架(scaffold)或载体蛋白,此支架或载体蛋白的C-末端融合至AD2序列。为防止形成轻链二聚体,将末端的半胱氨酸(与Fd链形成二硫键连接)替换为丝氨酸。此外,该轻链内设计了至少一个N-糖基化位点(三肽序列N-X-T)以便添加寡糖,其可通过重组以高产率制备,纯化至均质和可用作通过合适化学耦合并药物的底物(例如,请参见Shih等将蒽环类抗生素(anthracyclin)耦合并至氨基葡聚糖(Cancer Res.1991;51:4192-4198)。此包含药物的B组分可与多种包含DDD2的A组分结合,其中所述DDD2连接至具有定位和内化功能的结合结构。替代地,使用AD2衍生的包含药物的氨基葡聚糖与合适的A组分结合,以实现靶标特异性的药物治疗。其他表达良好的重组分子也可用作耦合并药物的支架或载体蛋白。

[0553] 实施例21.将病原体靶向至嗜中性粒细胞杀死

[0554] 最近已报道包含重组人表面活性蛋白片段D(rfhSP-D)和抗CD89抗体的Fab的化学耦合物为广谱抗感染剂,可用于治疗由多种病原体(包括甲型流感病毒、白色念珠菌和大肠杆菌)引起的疾病(Tacke等,J. Immunol.2004,172:4934-4940)。DNL技术可用于制备可将病原体靶向至嗜中性粒细胞杀死的稳定拴结复合体,如下所示。包含 α -螺旋卷曲螺旋颈部结构域和C-末端糖基识别结构域(CRD)的hSP-D截短片段的N-末端与DDD2融合,以生成通过CRD与病原体多价结合的A结构。为了在嗜中性粒细胞上给FcR提供定位,所述A结构连接至由抗CD89Fab和AD2的融合蛋白组成的B组分,得到由hSP-D的两个CRD和抗CD89的一个Fab组成的稳定复合体。通过将人表面活性蛋白A(hSP-A)替换为hSP-D和其他抗体(如针对CD3和CD64的抗体),可制备类似的抗感染剂。

[0555] 实施例22.使用非PKA和AKAP衍生的蛋白-蛋白相互作用结构域制备多价、多特异性结构

[0556] 预想了两种基本策略。第一种策略依赖于搜索和评估适合取代DDD和AD的作用的其他天然蛋白-蛋白相互作用结构域。例如,HNF-1 α 的N-末端二聚化结构域可取代DDD,而HFN-1二聚化辅助因子(DcoH)可取代AD。第二种策略如下所示。

[0557] 人p53是由离散的功能结构域组成的模块化蛋白。人p53的C-末端残基325-355(图1I)(称为四聚化结构域(p53tet)在溶液状态下自发形成四聚体,该四聚体事实上是二聚体的二聚体,两个二聚体之间具有微弱的亲和力($K_d \sim 2\mu M$)。但是,每个二聚体中的两个单体为强力结合,报道其 K_d 低于 $10^{-15} M$ (Brokx等,J. Biol. Chem.2003;278:2327-2332)。因此,包含p53tet的融合蛋白预期可形成非常紧密结合的二聚体,就像包含PKA类型的人RII α 的DDD序列的融合蛋白一样。为了将第二个结构连接至p53tet的二聚体,使用酵母双杂交系统

或合适的噬菌体展示文库选择与p53tet结合的Kd为1 μ M或更小,并包含15-50个残基的肽。亲和力和最高(即Kd值最小)的肽使用半胱氨酸衍生(如果需要),并融合至目标蛋白,该蛋白可稳定拴结至p53tet的二聚体。

[0558] 图示I

[0559] GEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQA (SEQ ID NO:28)

[0560] 基于IgG的六价DNL结构(HIDS)的制备和用途

[0561] 实施例23.六聚体构建体

[0562] 使用上述制备a2b复合体的DNL技术制备基于IgG的六价DNL结构(HIDS)。制为重组融合蛋白的两种类型的模块结合以制备多种HIDS。按所述,Fab-DDD2模块用于制备三-Fab结构(Rossi等,Proc Natl Acad Sci USA.2006;103(18):6841-6,请参见上文的实施例)。Fab-DDD2模块形成与包含AD2的模块结合的稳定的同型二聚体。为了制备HIDS,设计两种类型的IgG-AD2模块以与Fab-DDD2模块配对:C-H-AD2-IgG和N-L-AD2-IgG。

[0563] C-H-AD2-IgG模块包含通过9个氨基酸残基的肽连接体融合至IgG重链(H)的羧基末端(C)的AD2肽(图9A)。所述连接体肽(GSGGGSGG,SEQ ID NO:29)的DNA编码序列(后接AD2肽(CGQIEYLAKQIVDN AIQQ AGC,SEQ ID NO:4))通过标准DNA重组技术偶联至CH3(重链恒定区3)编码序列的3'端,得到一个毗邻的开放阅读框。当重链-AD2多肽与轻链多肽一起表达时,即形成包含两个AD2序列的IgG分子(图9B),该分子进而与两个Fab-DDD2二聚体结合。C-H-AD2-IgG模块可与任何Fab-DDD2模块结合,以生成包含Fc片段和6个Fab片段的多种六价结构。如果C-H-AD2-IgG模块和Fab-DDD2模块衍生自同一亲本单克隆抗体(MAb),所得HIDS为单特异性,并具有同一抗原的六个结合臂(图10)。如果所述模块衍生自两个不同MAb,则所得HIDS为双特异性,并具有两个C-H-AD2-IgG模块特异性结合臂和4个Fab-DDD2模块特异性结合臂(图11)。

[0564] N-L-AD2-IgG是IgG-AD2模块的替代类型,其中,AD2肽通过13个氨基酸残基的肽连接体融合至IgG轻链(L)的氨基末端(N)(图12A)。所述L链可任选为 κ (K)或Lambda(λ),且在本文或图中用具有相同意义的K表示。AD2肽(CGQIEYLAKQIVDN AIQQAGC,SEQ ID NO:4)的DNA编码序列(后接连接体肽(GGGGSGGGSGG,SEQ ID NO:30))融合至L链可变区(VL)编码序列的5'端,得到一个毗邻的开放阅读框。当AD2- κ 多肽与重链多肽一起表达时,即形成包含两个AD2肽的IgG分子(图12B),该分子进而与两个Fab-DDD2二聚体结合。N-L-AD2-IgG模块可与任何Fab-DDD2模块结合,以生成包含Fc片段和6个Fab片段的多种六价结构,其排列方式如图13所示。

[0565] 实施例24.C-H-AD2-IgG-pdHL2表达载体的产生

[0566] pdHL2哺乳动物表达载体已用于介导许多重组IgG的表达。制备质粒穿梭载体以便将任何IgG-pdHL2载体转化为C-H-AD2-IgG-pdHL2载体。以pdHL2载体为模板,并以寡核苷酸Fc BglIII左和Fc Bam-EcoRI右作为引物,扩增Fc(CH2和CH3结构域)的基因。

[0567] Fc BglIII左

[0568] 5'-AGATCTGGCGCACCTGAACTCCTG-3'(SEQ ID NO:31)

[0569] Fc Bam-EcoRI右

[0570] 5'-GAATTCGATCCTTTACCCGAGACAGGGAGAG-3'(SEQ ID NO:32)

[0571] 将此扩增片段克隆至pGemT PCR克隆载体。使用XbaI和BamHI限制性内切酶将Fc插

入片段从pGemT上切下,并将其连接至AD2-pdHL2载体(使用XbaI和BamHI消化h679-Fab-AD2-pdHL2制备而成),以生成穿梭载体Fc-AD2-pdHL2(图14A)。

[0572] 为了将任何IgG-pdHL2表达载体(图14B)转化为C-H-AD2-IgG-pdHL2表达载体(图14C),将861bp BsrGI/NdeI限制性片段从前一个载体上切下,并替换为从Fc-AD2-pdHL2载体上切下的952bp BsrGI/NdeI限制性片段。BsrGI切割CH3结构域,且NdeI切割所述表达盒的下游(3')。

[0573] 实施例25.C-H-AD2-hLL2IgG的制备

[0574] 依帕珠单抗(Epratuzumab)或hLL2IgG为人源化抗人CD22MAb。按实施例24所述方法,使用hLL2IgG-pdHL2制备C-H-AD2-hLL2IgG的表达载体,然后将该载体用于通过电穿孔转染Sp2/0骨髓瘤细胞。转染之后,用所述细胞涂布96孔板,并在包含甲氨蝶呤的培养基上筛选转基因克隆。使用涂布hLL2特异性抗独特型MAb的96孔微滴定板通过夹心ELISA筛选克隆的C-H-AD2-hLL2IgG生产率,并使用耦联过氧化物酶的抗人IgG进行检测。使用转瓶扩增克隆以制备蛋白质,并使用单步蛋白-A亲和层析从耗尽的培养基中纯化C-H-AD2-hLL2IgG。SE-HPLC分析显示两个蛋白峰(图15)。慢洗脱峰的保留时间(8.63分钟)与hLL2IgG类似。快洗脱峰的保留时间(7.75分钟)对应于~300kDa蛋白。后来确定此峰代表C-H-AD2-hLL2-IgG的二硫键连接二聚体。此二聚体在DNL反应中还原为单体形式。SDS-PAGE分析表明,纯化的C-H-AD2-hLL2-IgG由模块的单体和二硫键连接的二聚体两种形式组成(图16)。代表这两种形式的蛋白条带在非还原性条件下的SDS-PAGE中清晰可见,但是在还原条件下,所有形式均被还原为代表组成性多肽(重链-AD2和κ链)的两个条带。未检测到其他污染条带。

[0575] 实施例26.C-H-AD2-hA20IgG的制备

[0576] hA20IgG为人源化抗人CD20MAb。按实施例24所述方法,使用hA20IgG-pdHL2制备C-H-AD2-hA20IgG的表达载体,然后将该载体通过电穿孔转染Sp2/0骨髓瘤细胞。转染之后,用所述细胞涂布96孔板,并在包含甲氨蝶呤的培养基上筛选转基因克隆。使用涂布hA20特异性抗独特型MAb的96孔微滴定板通过夹心ELISA筛选克隆的C-H-AD2-hA20IgG生产率,并使用耦联过氧化物酶的抗人IgG进行检测。使用转瓶扩增克隆以制备蛋白质,并使用单步蛋白-A亲和层析从耗尽的培养基中纯化C-H-AD2-hA20IgG。SE-HPLC和SDS-PAGE分析得到的结果与实施例25中C-H-AD2-hLL2IgG的结果类似。

[0577] 实施例27.N-L-AD2-hA20IgG的制备

[0578] 制备了包含轻链前导肽、AD2、13个残基的肽连接体和hA20Vk的前4个残基(均在一个框内)的编码序列的197bp DNA双链,如下所示。使用Taq聚合酶通过引物延伸将两个100-mer合成寡核苷酸(有35bp的重叠)制备为完全双链。

[0579] LP-AD2-L13上

[0580]

CATCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGACGGCTGTGGCCAGATCGAGTACCTGGCCAAGCAGATC (SEQ ID NO:33)

[0581] LP-AD2-L13下

[0582]

CCGCCAGACCCGCCACCTCCGGACCCTCCGCCCGCAGCCGGCCTGCTGGATGGCGTTGTCCACGATCTGCTTGGCCAGGTACTCGATCTGGCCACAGC (SEQ ID NO:34)

[0583] 通过PCR扩增所述序列,分别向5'和3'端添加了XbaI和PvuII限制性酶切位点。将所述扩增片段克隆至pGemT。

[0584] LP-左XbaI

[0585] TCTAGACACAGGACCTCATCATGGGATGGAGCTGTA (SEQ ID NO:35)

[0586] L13-VK右PvuII

[0587] CAGCTGGATGTCACCTCCGCCAGACCCGCCACCTCC (SEQ ID NO:36)

[0588] 将197bp XbaI/PvuII片段从pGemT上切下,然后将其连接至hA20VK穿梭载体h2B8-Vk-pBR2 (使用XbaI和PvuII消化制成)。得到新的穿梭载体AD2-K-hA20-pBR2。将536bp XbaI/Bam HI限制性片段从AD2-K-hA20-pBR上切下,然后将其连接至hA20-IgG-pDHL2载体 (使用XbaI和Bam HI消化制成)以制备表达载体N-L-AD2-hA20-IgG-pdHL2。

[0589] 使用N-L-AD2-hA20-IgG-pdHL2通过电穿孔转染Sp2/0骨髓瘤细胞。转染之后,用所述细胞涂布96孔板,并在包含甲氨蝶呤的培养基上筛选转基因克隆。使用涂布hA20特异性抗独特型MAb的96孔微滴定板通过夹心ELISA筛选克隆的C-H-AD2-hLL2IgG生产率,并使用耦联过氧化物酶的抗人IgG进行检测。使用转瓶扩增克隆以制备蛋白质,并使用单步蛋白-A亲和层析从耗尽的培养基中纯化N-L-AD2-hA20IgG。

[0590] 尺寸排阻HPLC表明,制品中绝大部分的N-L-AD2-hA20IgG为单体形式,其保留时间类似于IgG。还观察到两个其他峰,它们很可能代表二硫键连接的二聚体和三聚体形式,并且每种形式占总蛋白的大约15% (图17A)。温和还原制品 (如DNL反应中所用) 使二聚体和三聚体形式转化为单体形式 (图17B)。三种形式的预测结构略图如图18所示。

[0591] 实施例28.Hex-hA20的制备

[0592] 使用DNL方法将C-H-AD2-hA20IgG (请参见实施例26) 和hA20-Fab-DDD2组合,以制备单特异性抗CD20HIDS,即Hex-hA20.Hex-hA20结构包含六个抗CD20Fab片段和一个Fc片段 (图10)。

[0593] Hex-hA20的制备包括四步。

[0594] 步骤1,化合:210%摩尔等量的(hA20-Fab-DDD2)₂与C-H-AD2-hA20IgG混合。使用此摩尔比是因为两个Fab-DDD2二聚体偶联至各个C-H-AD2-hA20IgG分子,前者附加10%过量以确保偶联反应完成。C-H-AD2-hA20IgG和(hA20-Fab-DDD2)₂的分子量分别为168kDa和107kDa。作为实例,134mg hA20-Fab-DDD2与100mg C-H-AD2-hA20IgG混合,以达到前者的210%摩尔等量。此混合物通常使用含1mM EDTA的pH7.4磷酸盐缓冲液(PBS)制备。

[0595] 步骤2,温和还原:加入终浓度1mM的还原型谷胱甘肽(GSH),然后将溶液在室温(16-25℃)放置1-24小时。

[0596] 步骤3,温和氧化:还原之后,向反应混合物中直接加入终浓度2mM的氧化型谷胱甘肽(GSSH),然后将溶液在室温放置1-24小时。

[0597] 步骤4,分离DNL产物:氧化之后,将反应混合物直接加至蛋白-A亲和层析柱。使用PBS洗涤该柱,并使用0.1M甘氨酸、pH2.5洗脱Hex-hA20。因为反应中使用了过量的hA20-Fab-DDD2,所以不存在未耦联的C-H-AD2-hA20IgG或仅包含一个(hA20-Fab-DDD2)₂部分的不完整DNL结构。未耦联的过量hA20-Fab-DDD2不与亲和树脂结合;因此,经蛋白A纯化的物质仅包含所需产物。

[0598] 根据组成性多肽的推测氨基酸序列计算的分子量为386kDa。尺寸排阻HPLC分析显

示保留时间对应于375-400kDa的蛋白结构的单一蛋白峰(图19)。非还原条件下的SDS-PAGE分析显示一簇高分子量条带,表明形成了大的共价结构(图20A,泳道3)。还原条件下的SDS-PAGE(图20B,泳道3)显示仅存在三个预期的多肽链:融合AD2的重链(HC-AD2)、融合DDD2的Fd链(Fd-DDD2)和 κ 链。

[0599] 实施例29.Hex-hLL2的制备

[0600] 使用DNL方法将C-H-AD2-hLL2IgG(请参见实施例25)和hLL2-Fab-DDD2组合,以制备单特异性抗CD22HIDS(Hex-hLL2)。DNL反应按实施例28中描述的制备Hex-hA20的方法进行。

[0601] 根据组成性多肽的推测氨基酸序列计算的分子量为386kDa。尺寸排阻HPLC分析显示保留时间对应于375-400kDa的蛋白结构的单一蛋白峰(图21)。非还原条件下的SDS-PAGE分析显示一簇高分子量条带,表明形成了大的共价结构(图20A,泳道4)。还原条件下的SDS-PAGE(图20B,泳道4)显示仅存在三个预期的多肽链:HC-AD2、Fd-DDD2和 κ 链。

[0602] 实施例30.DNL1和DNL1C的制备

[0603] 使用DNL方法制备双特异性HIDS,将C-H-AD2-hLL2IgG(请参见实施例25)和hLL2-Fab-DDD2组合以获得DNL1,或者与hMN-14-DDD2组合以获得DNL1C。DNL1具有四个CD20结合臂和两个CD22结合臂。因为hMN-14为癌胚抗原(CEA)的人源化MAb,所以DNL1C具有四个CEA结合臂和两个CD22结合臂。DNL反应按实施例28中描述的制备Hex-hA20的方法进行。

[0604] 对于DNL1和DNL1C而言,根据组成性多肽的推测氨基酸序列计算的分子量均为~386kDa。尺寸排阻HPLC分析显示每个结构均存在保留时间对应于375-400kDa的蛋白结构的单一蛋白峰(DNL1,图22A;DNL1C,图22B)。非还原条件下的SDS-PAGE分析显示一簇高分子量条带,表明形成了大的共价结构(图20A,泳道1&5)。还原条件下的SDS-PAGE(图20B,泳道1&5)显示所述大的共价结构仅由三个预期的多肽组成:HC-AD2、Fd-DDD2和 κ 链。

[0605] 实施例31.DNL2和DNL2C的制备

[0606] 使用DNL方法制备双特异性HIDS,将C-H-AD2-hA20IgG(请参见实施例26)和hLL2-Fab-DDD2组合以获得DNL2,或者与hMN-14-DDD2组合以获得DNL2C。DNL2具有四个CD22结合臂和两个CD20结合臂。DNL2C具有四个CEA结合臂和两个CD20结合臂。DNL反应按实施例28中描述的制备Hex-hA20的方法进行。

[0607] 对于DNL2和DNL2C而言,根据组成性多肽的推测氨基酸序列计算的分子量均为~386kDa。尺寸排阻HPLC分析显示每个结构均存在保留时间对应于375-400kDa的蛋白结构的单一蛋白峰(图23)。非还原条件下的SDS-PAGE分析显示一簇高分子量条带,表明形成了大的共价结构(图20A,泳道2&6)。还原条件下的SDS-PAGE(图20B,泳道2&6)显示所述大的共价结构仅由三个预期的多肽组成:HC-AD2、Fd-DDD2和 κ 链。

[0608] 实施例32.K-Hex-hA20的制备

[0609] 使用DNL方法将N-L-AD2-hA20IgG(请参见实施例27)和hA20-Fab-DDD2组合,以制备单特异性抗CD20HIDS(K-Hex-hA20)。DNL反应按实施例28中描述的制备Hex-hA20的方法进行。

[0610] 根据组成性多肽的推测氨基酸序列计算的分子量为386kDa。非还原条件下的SDS-PAGE分析显示一簇高分子量条带,表明形成了大的共价结构(图24,泳道2&3)。还原条件下的SDS-PAGE(图24,泳道2R&3R)显示所述大的共价结构仅由四个预期的多肽组成:Fd-DDD2、

H链、κ链和AD2-κ。

[0611] 实施例33.DNL3的制备

[0612] 通过组合N-L-AD2-hA20IgG(请参见实施例27)和hLL2-Fab-DDD2制备了双特异性HIDS.DNL反应按实施例28中描述的制备Hex-hA20的方法进行。

[0613] 根据组成性多肽的推测氨基酸序列计算的分子量为386kDa。尺寸排阻HPLC分析显示保留时间对应于375-400kDa的蛋白结构的单一蛋白峰(图25)。非还原条件下的SDS-PAGE分析显示一簇高分子量条带,表明形成了大的共价结构(图24,泳道1)。还原条件下的SDS-PAGE(图24,泳道1R)显示所述大的共价结构仅由四个预期的多肽组成:Fd-DDD2、H链、κ链和AD2-κ。

[0614] 实施例34.HIDS的体外鉴定

[0615] 如图26和27所示,按实施例28-33所述方法制备的HIDS保留了其亲本Fab/IgG的结合特性。使用竞争ELISA研究不同HIDS的结合亲和力,使用hA20的大鼠抗独特型MAb(WR2)以评估hA20组分的结合活性,或者使用hLL2的大鼠抗独特型MAb(WN)以评估hLL2组分的结合活性。为了评估hA20结合,使用hA20IgG涂布ELISA板,然后让所述HIDS与固定的IgG竞争WR2结合。为了评估hLL2结合,使用hLL2IgG涂布平板,然后让所述HIDS与固定的IgG竞争WN结合。与固定的IgG结合的抗Id的相对量使用耦联过氧化物酶的抗大鼠IgG进行检测。

[0616] 相对CD20结合亲和力显示于图26A.DNL2(具有两个CD20结合基团)显示出与hA20IgG(也具有两个CD20结合臂)相似的结合亲和力。DNL1(具有四个CD20结合基团)的相对亲和力强于(~4倍)DNL2或hA20IgG.Hex-hA20(具有六个CD20结合基团)的相对亲和力更强于(~10倍)hA20IgG。

[0617] CD22结合有类似发现,如图26B所示。DNL1(具有两个CD22结合基团)显示出与hLL2IgG(也具有两个CD22结合臂)相似的结合亲和力。DNL2(具有四个CD22结合基团)的相对亲和力强于(>5倍)DNL1或hLL2IgG.Hex-hLL2(具有六个CD22结合基团)的相对亲和力更强于(>10倍)hLL2IgG。

[0618] 因为DNL2和DNL3均包含两个hA20Fab和四个hLL2Fab,所以它们对同一抗id抗体显示出相似的结合强度(图27)。

[0619] 其中某些HIDS显示出对淋巴瘤细胞系的有效抗增殖活性。DNL1、DNL2和Hex-hA20在体外抑制Daudi伯基特淋巴瘤细胞的生长(图28)。使用10nM浓度处理所述细胞时,所述HIDS确实比利妥昔单抗更加有效(图28A)。使用细胞计数分析,预计DNL1和DNL2的效力要比利妥昔单抗的效力大出100多倍,而Hex-hA20表现出更强的效力(图28B)。这已为MTS增殖分析证实,该分析生成了使用不同浓度的HIDS处理Daudi细胞的剂量-反应曲线(图29)。与利妥昔单抗相比,双特异性HIDS(DNL1和DNL2)和Hex-hA20分别表现出>100倍和>10000倍的效力。

[0620] 实施例35.HIDS的体内抗肿瘤活性

[0621] 在使用人伯基特淋巴瘤模型的小鼠中,HIDS表现出体内治疗效力(图30)。低剂量(12μg)的DNL2和Hex-hA20使荷瘤小鼠的存活时间增加两倍以上。使用高剂量(60μg)治疗得到长期存活者。

[0622] 实施例36.HIDS和亲本IgG对淋巴瘤细胞系的效应比较

[0623] 使用MTS增殖分析,比较了三种不同的淋巴瘤细胞系中HIDS(DNL1、DNL2、Hex-

hA20) 与亲本IgG (hA20IgG) 的剂量-反应曲线(图31)。在Daudi淋巴瘤细胞中(图31, 上组), 与亲本hA20IgG相比, 双特异性结构DNL1 (未显示) 和DNL2表现出>100倍的有效抗增殖活性, 且Hex-hA20显示出>10,000倍的有效活性。Hex-hLL2和对照结构(DNL1-C和DNL2-C) 在此分析中几乎未表现出抗增殖活性(未显示)。

[0624] 在Raji淋巴瘤细胞中(图31, 中组), 与hA20IgG相比, Hex-hA20显示出有效的抗增殖活性, 但DNL2仅显示出极小的活性。在Ramos淋巴瘤细胞中(图31, 下组), 与hA20IgG相比, DNL2和Hex-hA20均显示出有效的抗增殖活性。这些结果表明, HIDS的效力高于亲本IgG并不限于特定细胞系, 而是具有合适靶标的细胞的普遍现象。

[0625] 实施例37. 交联对HIDS和亲本IgG的效力的影响

[0626] 已表明, 抗CD20单克隆抗体的交联可增强它们在体外的效力。图32使用MTS分析, 显示了交联对HIDS相对亲本IgG的效力的影响。如图32所示, 与非交联hA20IgG相比, 使用通过山羊抗人IgG Fc特异性交联剂交联的hA20IgG治疗Daudi淋巴瘤细胞时同样存在此影响。但是, 未观察到存在交联剂条件下DNL2或Hex-hA20抗增殖活性的增加。如下所述, 这可能是当其他四个Fab基团拴结至HIDS的羧基末端时, 其Fc部分变得无法接近。

[0627] 实施例38. 血清中的稳定性

[0628] 图33显示DNL1和DNL2在人血清中的稳定性, 采用双特异性ELISA分析确定。10 μ g/ml的所述蛋白结构与新鲜采集的人血清在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂条件下孵育五天。对于第0天的样品, 小份试样在用血清稀释后立即用液氮冷冻。用hA20IgG的抗Id涂布ELISA平板, 然后用hLL2IgG的抗Id检测双特异性结合。DNL1和DNL2均显示了高度的血清稳定性, 并保持了完全的双特异结合活性。

[0629] 实施例39. CDC和ADCC活性

[0630] 在体内, 抗CD20单克隆抗体(如利妥昔单抗和hA20)可利用补体依赖性细胞毒作用(CDC)、抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)和信号转导诱导的生长抑制/凋亡来杀伤肿瘤细胞。在体外分析中, 使用Daudi细胞测试了所述六价DNL结构(DNL1、DNL2、Hex-hA20)的CDC活性。令人惊奇的是, 所有与CD20结合的六价结构均未表现出CDC活性(图34)。亲本hA20IgG表现出有效的CDC活性(图34), 而同所预料的一样, 针对CD22的hLL2抗体未显示活性。DNL2和Hex-hA20没有影响是值得关注的, 因为它们包含hA20-IgG-Ad2, 而该结构显示出与hA20IgG类似的阳性CDC活性(图34)。

[0631] 使用新鲜分离的外周血单核细胞评估了DNL1的ADCC活性(图35)。利妥昔单抗和hA20IgG均显示出对Daudi细胞的有效活性(图35), 而DNL1则未显示出任何可检测的ADCC活性。

[0632] 这些数据表明, 当其他四个Fab基团拴结至其羧基末端时, 所述Fc部分可变得无法发挥效应功能(CDC和ADCC)。因此, 所述六价DNL结构的体内抗肿瘤活性仅依赖于信号转导诱导的生长抑制/凋亡。

[0633] 表1. LS174T荷瘤裸小鼠中¹²⁵I-TF2的肿瘤吸收和组织清除

[0634]

	% ID/g $\pm$ SD						
组织	0.5h	2h	4h	16h	24h	48h	72h
LS 174T	4.43 $\pm$ 1.13	9.19 $\pm$ 1.18	10.33 $\pm$ 2.05	5.32 $\pm$ 1.09	5.37 $\pm$ 0.72	1.69 $\pm$ 0.60	1.00 $\pm$ 0.13
肝	11.71 $\pm$ 2.22	8.39 $\pm$ 0.86	4.24 $\pm$ 0.11	0.32 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01
脾	22.04 $\pm$ 6.02	24.87 $\pm$ 8.22	15.39 $\pm$ 1.35	0.73 $\pm$ 0.14	0.45 $\pm$ 0.06	0.25 $\pm$ 0.08	0.21 $\pm$ 0.03
肾	13.45 $\pm$ 0.64	6.31 $\pm$ 0.48	3.88 $\pm$ 0.24	0.31 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01
肺	9.02 $\pm$ 1.38	4.99 $\pm$ 0.62	3.91 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.06	0.23 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.01

[0635]

血液	36.17 $\pm$ 3.49	15.51 $\pm$ 2.43	9.06 $\pm$ 0.93	0.68 $\pm$ 0.07	0.43 $\pm$ 0.05	0.16 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.03
胃	3.03 $\pm$ 0.45	26.00 $\pm$ 5.55	50.79 $\pm$ 10.83	0.85 $\pm$ 0.10	1.08 $\pm$ 0.38	0.23 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.03
小肠	2.21 $\pm$ 0.17	3.09 $\pm$ 0.50	2.08 $\pm$ 0.11	0.19 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01
大肠	0.83 $\pm$ 0.03	1.38 $\pm$ 0.12	1.62 $\pm$ 0.07	0.21 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.03
尾部	3.83 $\pm$ 0.16	3.64 $\pm$ 0.95	2.79 $\pm$ 0.38	0.19 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01
肿瘤重量(g)	0.154 $\pm$ 0.040	0.098 $\pm$ 0.055	0.114 $\pm$ 0.061	0.175 $\pm$ 0.061	0.159 $\pm$ 0.014	0.240 $\pm$ 0.150	0.468 $\pm$ 0.220

[0636] 表2.LS174T荷瘤小鼠中TF2的血液药物动力学

[0637]

$t_{1/2\alpha}$	$t_{1/2\beta}$	Cmax	CL
(h)	(h)	(ng)	(ng/h*ng)
0.58 $\pm$ 0.08	3.47 $\pm$ 0.36	31,186 $\pm$ 995	0.51 $\pm$ 0.02

[0638] 表3.LS174T荷瘤裸小鼠中TF2的肿瘤吸收和组织清除

[0639]

	% ID/g $\pm$ SD			
TF2 施用后时间	16.5h	17h	20h	40h
IMP245 施用后时间	0.5h	1h	4h	24h
LS 174T	6.7 $\pm$ 1.6	9.0 $\pm$ 4.9	6.5 $\pm$ 1.5	3.5 $\pm$ 0.8
肝	0.29 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.05	0.27 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.02
脾	0.49 $\pm$ 0.12	0.53 $\pm$ 0.10	0.46 $\pm$ 0.08	0.22 $\pm$ 0.06

[0640]

肾	0.48±0.11	0.45±0.14	0.29±0.06	0.14±0.01
肺	0.31±0.04	0.37±0.09	0.24±0.06	0.12±0.03
血液	0.53±0.05	0.61±0.16	0.44±0.11	0.20±0.04
胃	1.05±0.13	1.78±0.64	0.88±0.47	0.50±0.40
小肠	0.20±0.02	0.27±0.09	0.13±0.03	0.08±0.03
大肠	0.30±0.10	0.47±0.17	0.20±0.06	0.10±0.05
尾部	0.41±0.13	0.26±0.06	0.22±0.15	0.09±0.01
肿瘤重量(g)	0.279±0.142	0.222±0.113	0.362±0.232	0.356±0.152

[0641] 表4.LS174T荷瘤裸小鼠中TF2预靶向的^{99m}Tc-IMP-245的肿瘤吸收和组织清除

[0642]

	% ID/g±SD			
TF2 施用后时间	16.5h	17h	20h	40h
IMP245 施用后时间	0.5h	1h	4h	24h
LS 174T	21.8±3.0	30.1±13.7	25.0±3.7	16.3±2.9
肝	0.64±0.07	0.41±0.06	0.23±0.06	0.14±0.02
脾	0.59±0.07	0.30±0.06	0.16±0.08	0.09±0.02
肾	8.7±1.4	5.0±0.4	2.4±0.4	1.2±0.2
肺	1.6±0.2	0.69±0.16	0.24±0.05	0.10±0.03
血液	1.7±0.2	0.50±0.12	0.11±0.02	0.04±0.01
胃	0.37±0.09	0.87±1.28	0.09±0.08	0.16±0.09
小肠	0.79±0.04	1.08±0.22	0.25±0.12	0.15±0.06

[0643]

大肠	0.30±0.09	0.13±0.03	1.9±2.0	0.40±0.28
尾部	2.1±0.4	0.94±0.45	0.45±0.49	0.06±0.02
肿瘤重量(g)	0.279±0.142	0.222±0.113	0.362±0.232	0.356±0.152

[0644] 表5. 使用TF2预靶向^{99m}Tc-肽 (IMP-245) 时的T/NT比率

[0645]

IMP245施用后时间	0.5h	1h	4h	24h
肝	34±4	83±10	116±32	115±21
脾	37±4	109±21	170±54	177±30
肾	3±0.4	7±2	11±2	14±3
肺	14±2	47±4	106±26	162±24
血液	13±2	66±5	237±36	395±26
胃	63±25	169±116	456±271	135±91
小肠	28±3	35±5	114±47	125±46
大肠	75±17	241±31	22±14	57±34
尾部	11±3	37±8	164±135	293±80

[0646] 表6. 包含两种类型抗原结合亚基的复合体的实例

[0647]

A 的靶标	B 的靶标	A	B	应用
CEA	HSG	hMN-14	h679	pRAIT; 癌症显像/治疗
CEA	In-DPTA	hMN-14	h734	pRAIT/癌症显像/治疗

[0648]

ED-B 纤连蛋白	HSG	L19	h679	pRAIT/癌症显像/治疗
ED-B 纤连蛋白	In-DPTA	L19	h734	pRAIT/癌症显像/治疗
CD20	CD22	hA20	hLL2	淋巴瘤和自身免疫疾病 (AID)治疗
CD22	CD20	hLL2	hA20	淋巴瘤/AID 治疗
CD19	CD20			淋巴瘤/AID 治疗
EGFR	IGFR1			实体瘤治疗
VEGFR1/Flt-1	VEGFR2/KDR			阻止 VEGF/PlGF 结合; 实 体瘤和血管生成治疗
VEGFR3/Flt-4	VEGFR2/KDR			阻止血管生成和实体瘤治 疗
CD19	CD3/TCR			淋巴瘤/AID 治疗
CD19	CD16/FcγRIIIa			淋巴瘤/AID 治疗
CD19	CD64/FcγRI			淋巴瘤/AID 治疗
HER2/neu	CD89/FcαRI			乳腺癌治疗
HER2/neu	CD16			乳腺癌治疗
HER2/neu	CD64			乳腺癌治疗
HER2/neu	CD3			乳腺癌治疗
CD30	CD64			淋巴瘤治疗
CD33	CD64			急性髓系白血病(AML)治 疗
EGFR	CD2			实体瘤治疗

[0649]

EGFR	CD64			实体瘤治疗
EGFR	CD16			实体瘤治疗
EGFR	CD89			实体瘤治疗
PfMSP-1	CD3			疟疾治疗
HN	CD3	HN1,4c	OKT3	肿瘤疫苗增强剂
HN	CD28	HN1,4c	15E8	肿瘤疫苗增强剂
EpCAM/17-1A	CD3			实体瘤治疗
IL-2R/Tac	CD3			淋巴瘤/AIDS 治疗
CA19-9	CD16			实体瘤治疗
MUC1	CD64			实体瘤治疗
II 类 HLA	CD64	L243		癌症治疗
G _{D2}	CD64			神经母细胞瘤治疗
G250	CD89			肾细胞癌组织治疗
TAG-72	CD89	hCC49		实体瘤治疗
EpCAM	腺病毒纤突结			重新靶向病毒载体; 实体瘤治疗
PSMA	腺病毒纤突结			前列腺癌治疗
CEA	腺病毒纤突结		S11	CEA 阳性癌治疗
HMWMAA	腺病毒纤突结			黑色素瘤治疗
G250	腺病毒纤突结			肾细胞癌组织治疗

[0650]

CD40	腺病毒纤突结		S11	免疫疾病和癌症治疗
M13 外壳蛋白	碱性磷酸酶			病毒检测
Gp II b/IIIa	tPA	7E3	P4B6	增强血栓溶解

[0651] 表7. 包含一种抗原结合亚基和一种效应物亚基的复合体的实例

[0652]

A 的靶标	A	B	应用
CD74	hLL1	Rap(N69Q)	CD74+癌症/AID 治疗
CD22	hLL2	Rap(N69Q)	淋巴瘤和自身免疫疾病 (AID)治疗
MUC1	hPAM4	Rap(N69Q)	前列腺癌治疗
EGP-1	hRS7	Rap(N69Q)	实体瘤治疗
IGF1R	hR1	Rap(N69Q)	实体瘤治疗
CD22	HLL2/RFB4	PE38	淋巴瘤治疗
CD30		PE38	淋巴瘤治疗
CD25/Tac		PE38	淋巴瘤治疗
Le ^y		PE38	实体瘤治疗
间皮素		PE38	实体瘤治疗
Erb-B2		PE38	乳腺癌
EpCAM		PE38	实体瘤治疗
CD25		dgA	淋巴瘤治疗
CD30		dgA	淋巴瘤治疗
CD19		dgA	淋巴瘤治疗

[0653]

CD22		dgA	淋巴瘤治疗
CD3		DT390	移植物抗宿主疾病
CD25		PLC	淋巴瘤治疗
Gp240		多花白树毒蛋白 (gelonin)	黑色素瘤治疗
X	抗 X	链霉亲和素 (straptavidin)	ELISA
X	抗 X	HRP	ELISA
X	抗 X	AP	ELISA
X	抗 X	GFP	报告蛋白
Gp II b/IIIa	7E3	tPA	增强血栓溶解
X	抗 X	细胞因子	重新靶向细胞因子
X	抗 X	生长因子	重新靶向生长因子
X	抗 X	可溶受体组分	重新靶向受体
X	抗 X	羧肽酶 G2(CPG2)	前体药物治疗
X	抗 X	青霉素酰胺酶	前体药物治疗
X	抗 X	β -内酰胺酶	前体药物治疗
X	抗 X	胞嘧啶脱氨酶	前体药物治疗
X	抗 X	硝基还原酶	前体药物治疗
p97	L49	大肠杆菌 β -半乳糖苷酶	前体药物治疗
X	抗 X	人羧酸酯酶 2	实体瘤治疗

[0654] 表8.具有两种不同类型效应物亚基的复合体的实例

[0655]

A 的靶标	B 的靶标	A	B	应用
IL-4R	-	IL-4	PE38	实体瘤治疗
-	IL-4R	PE38	IL-4	实体瘤治疗
IL-4	IL-13	sIL-4R	sIL-13R	哮喘、过敏治疗
IL-13	IL-4	sIL-13R	sIL-4R	哮喘、过敏治疗
VEGFR-2	-	VEGF ₁₂₁	志贺样毒素	癌症治疗
VEGFR-2		VEGF ₁₂₁	白喉毒素	癌症治疗
ED-B 纤连蛋白			ILGF-1	癌症治疗

[0656] 表9.具有一种抗原结合亚基的复合体的实例

[0657]

A 的靶标	A	应用
X	抗 X	治疗或检测携带 X 标志物的疾病
CD14	抗 CD14	治疗感染性休克
CD111/连接素 (nectin) -1	抗 CD111	治疗疱疹病毒感染
叶酸受体 α		治疗线状病毒感染 (例如埃博拉 (Ebola) 病毒和马堡 (Marburg) 病毒)
Gp120		治疗 HIV-1/AIDS
IL-6		治疗骨髓瘤、关节炎和其他自身免疫疾病
IL-5		治疗哮喘
IL-8		治疗一般感染
CD154		治疗狼疮、移植排斥反应、AID

[0658]

IgE		治疗哮喘
LFA-1		治疗移植排斥反应
β -胰蛋白酶		治疗过敏、炎症
CD105/内皮糖蛋白 (endoglin)		抗血管生成
Gp II b/IIIa	7E3	血栓溶解
TNF α	(Humira)	AID 治疗
TNF α	(remicade(英利昔 单抗))	AID 治疗
IgE	(Xolair)	哮喘治疗
RSV F 蛋白	(Synagis)	RSV 治疗
CEA 的 A1B1	hMN-15	抑制实体瘤的黏附/侵入/转移
CEA 的 N 结构域	hMN-15	抑制实体瘤的黏附/侵入/转移

[0659] 表10. 具有一种效应物亚基的复合体的实例

[0660]

A的靶标	A	应用
细胞因子受体	细胞因子	增强细胞因子功能
生长因子受体	生长因子	增强生长因子功能
膜结合受体	可溶受体组分	增强可溶受体组分的能力和亲和力
血凝块	tPA	增强tPA的效力
TPO受体	TPO	增强血小板生成素的效力
EPO受体	EPO	增强rHuEPO的效力
TNF α	sTNF α -R	增强Enbrel的效力

序列表

<110> IBC 医药公司
张健行
大卫·高德青
罗希·A·爱得盟

<120> 基于多价免疫球蛋白的生物活性装配体

<130> 345588

<150> PCT/US2006/01076
<151> 2006-03-24

<150> PCT/US2006/012084
<151> 2006-03-29

<150> PCT/US2006/025499
<151> 2006-06-29

[0001] <150> 11/389,358
<151> 2006-03-24

<150> 11/391,584
<151> 2006-03-28

<150> 11/478,021
<151> 2006-06-29

<150> 60/782,332
<151> 2006-03-14

<150> 60/728,292
<151> 2005-10-19

<150> 60/751,196
<151> 2005-12-16

<150> 60/864,530
<151> 2006-11-06

<160> 38

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 44
<212> PRT
<213> 氨基酸，人

<400> 1

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

[0002]

<210> 2
<211> 45
<212> PRT
<213> 氨基酸，人工，合成肽

<400> 2

Cys Gly His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe
20 25 30

Ala Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40 45

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> 氨基酸，人工，合成肽

<400> 3

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> 氨基酸, 人工, 合成肽

<400> 4

Cys Gly Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile
1 5 10 15

[0003]

Gln Gln Ala Gly Cys
20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸

<400> 5

gaacctcgcg gacagttaag

20

<210> 6

<211> 53

<212> DNA

<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸

<400> 6

ggatcctcgc cgcgcgcgcg tcttaggttt cttgtccacc ttgggtgtgc tgg

53

<210> 7

<211> 55

<212> PRT

<213> 氨基酸, 人工, 合成肽

<400> 7

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Ile Gln Ile
1 5 10 15

Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr Thr Val Glu Val Leu
20 25 30

Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala Val Glu Tyr Phe Thr
35 40 45

Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
50 55

[0004]

<210> 8

<211> 92

<212> DNA

<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸

<400> 8

gtggcggggc tggeggaggt ggcagccaca tccagatccc gccggggctc acggagctgc 60

tgcagggeta cacggtggag gtgetgcgac ag 92

<210> 9

<211> 92

<212> DNA

<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸

<400> 9

gcgcgagctt ctctcaggcg ggtgaagtae tccactgega attcgacgag gtcaggcggc 60

tgetgtgeca geacctccac cgtgtagecc tg 92

[0005]	<210>	10	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400>	10	
		ggatcgggag gtggcgggtc tggcggaggt	30
	<210>	11	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400>	11	
		cggccgtcaa gcgcgagctt ctctcaggcg	30
[0005]	<210>	12	
	<211>	29	
	<212>	PRT	
	<213>	氨基酸, 人工, 合成肽	
	<400>	12	
		Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Glu Tyr	
		1 5 10 15	
		Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln Ala	
		20 25	
	<210>	13	
	<211>	96	
	<212>	DNA	
	<213>	核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400>	13	
		ggatcgggag gtggcgggtc tggcggaggt ggcagcaga tcgagtacct ggccaagcag	60
		atcgtggaca acgccatcca gcaggcctga cggccg	96

	<210> 14	
	<211> 96	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 14	
	cggcgcgcag gcctgctgga tggcgttgte cagcatetgc ttggccaggt acfcgatetg	60
	gctgccacct cggccagacc cgccacctcc ggatcc	96
	<210> 15	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 15	
	ggatccggag gtggcgggtc tggcggaggt	30
[0006]	<210> 16	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 16	
	cggcgcgcag gcctgctgga tg	22
	<210> 17	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 17	
	ccatgggcag ccacatccag atcccgcc	28
	<210> 18	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 18	

ggatccgccca cctccagatc ctccgccgcc agegegagct tctctcagge ggggtg 55

<210> 19

<211> 44

<212> DNA

<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸

<400> 19

ggatccggcg gaggtggetc tgaggtccaa ctggtggaga gcgg 44

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸

<400> 20

cggcgcgcag cagctcttag gtttcttgtc 30

[0007]

<210> 21

<211> 42

<212> PRT

<213> 氨基酸, 人工, 合成肽

<400> 21

Lys Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln
1 5 10 15

Gln Ala Lys Gly Cys Cys Gly Lys Ala Gln Gln Ile Ala Asn Asp Val
20 25 30

Ile Gln Lys Ala Leu Tyr Glu Ile Gln Lys
35 40

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸

	<400> 22	
	catgtgcggc cacatccaga tcccgccggg gctcacggag ctgctgca	48
	<210> 23	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 23	
	gcagctccgt gagecccggc gggatctgga tgtggccgca	40
	<210> 24	
	<211> 73	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 24	
	gatecggagg tggcgggtct ggccgaggtt gcggccacat ccagatcccg ccggggctca	60
[0008]	cgagctgct gea	73
	<210> 25	
	<211> 65	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 25	
	gcagctccgt gagecccggc gggatctgga tgtggccgca acctccgcca gacccgccac	60
	ctccg	65
	<210> 26	
	<211> 93	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 26	
	gatecggagg tggcgggtct ggccgatgtg gccagatcga gtacctggcc aagcagatcg	60

tggacaacgc catccagcag gccggctget gaa 93

<210> 27

<211> 89

<212> DNA

<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸

<400> 27

ttcagcagcc ggcttctgg atggcgttgt ccacgatctg cttggccagg tactcgatct 60

ggccacatcc gccagaccgc ccacctcgc 89

<210> 28

<211> 31

<212> PRT

<213> 氨基酸, 人工, 合成肽

<400> 28

[0009]

Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu Arg Phe Glu Met
1 5 10 15

Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala Gln Ala
20 25 30

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> 氨基酸, 人工, 合成肽

<400> 29

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> 氨基酸, 人工, 合成肽

	<400> 30	
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
	1 5 10	
	<210> 31	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 31	
	agatctggeg cacctgaact cctg	24
	<210> 32	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
[0010]	<400> 32	
	gaattcggat cctttaccgg gagacaggga gag	33
	<210> 33	
	<211> 100	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 33	
	catcatggga tggagctgta tcatcctett ctiggtagea acagctacag gtgtccactc	60
	cgacggctgt ggccagatcg agtacctggc caagcagate	100
	<210> 34	
	<211> 100	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 34	
	cgcgcagacc cgcacctcc ggacctccg ccgcgcagc cggcctgctg gatggcgttg	60

	tccaagatct gcttggccag gtactcgatc tggccacagc	100
	<210> 35	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 35	
	tctagacaca ggacctcacc atgggatgga gctgta	36
	<210> 36	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 核酸, 人工, 合成寡核苷酸	
	<400> 36	
	cagctggatg tcacctcacc cagacctcacc acctcc	36
[0011]	<210> 37	
	<211> 21	
	<212> PRT	
	<213> 氨基酸, 人工, 合成肽	
	<400> 37	
	Lys Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln	
	1 5 10 15	
	Gln Ala Lys Gly Cys	
	20	
	<210> 38	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> 氨基酸, 人工, 合成肽	
	<400> 38	
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Cys Gly	
	1 5 10	

DDD1:

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRRQQPPDL
VEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

DDD2:

CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRRQQPPDLVEFA
VEYFTRLREARA (SEQ ID NO:2)

图1

AD1:QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

AD2: CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID
NO:4)

图2

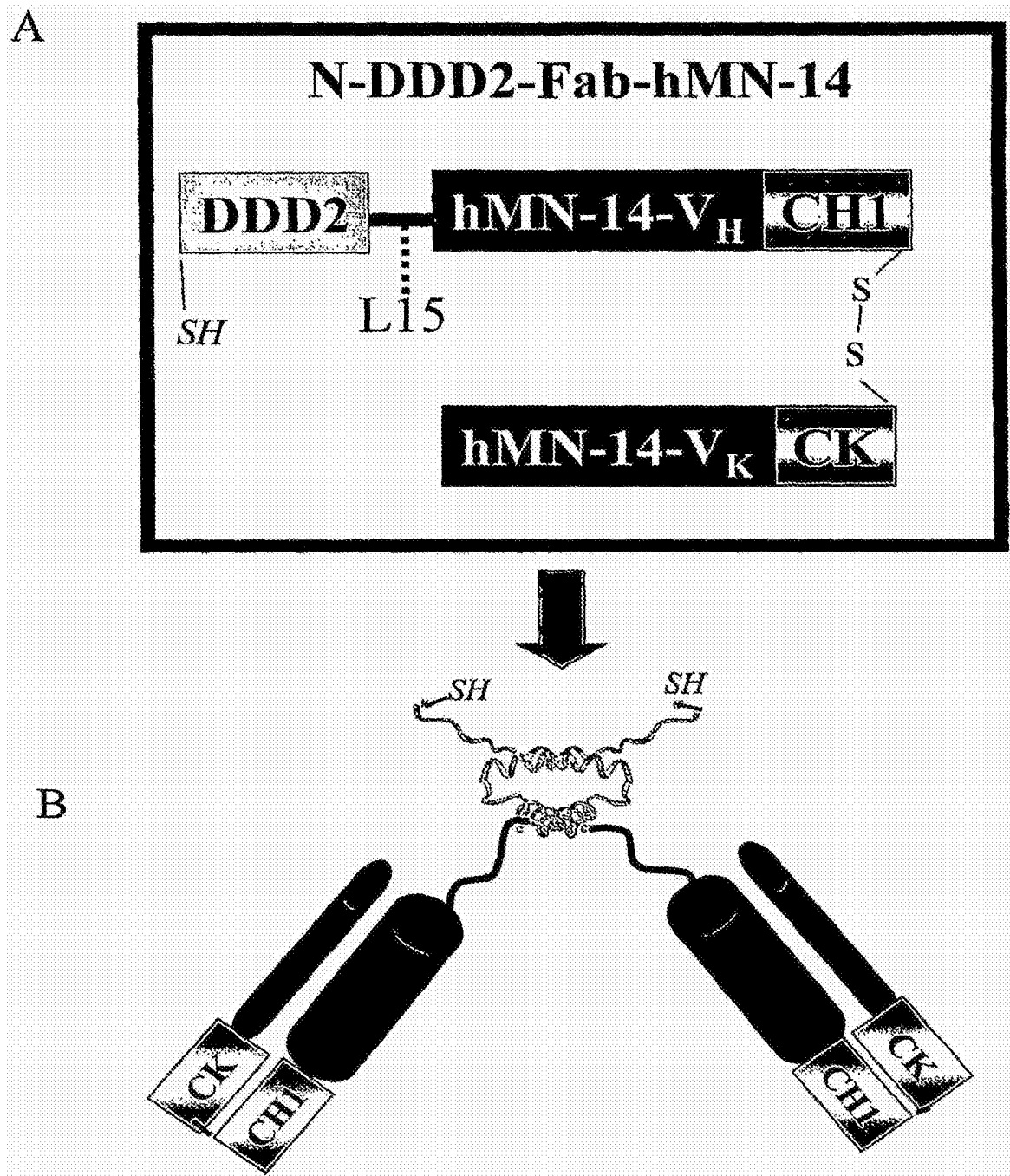


图3

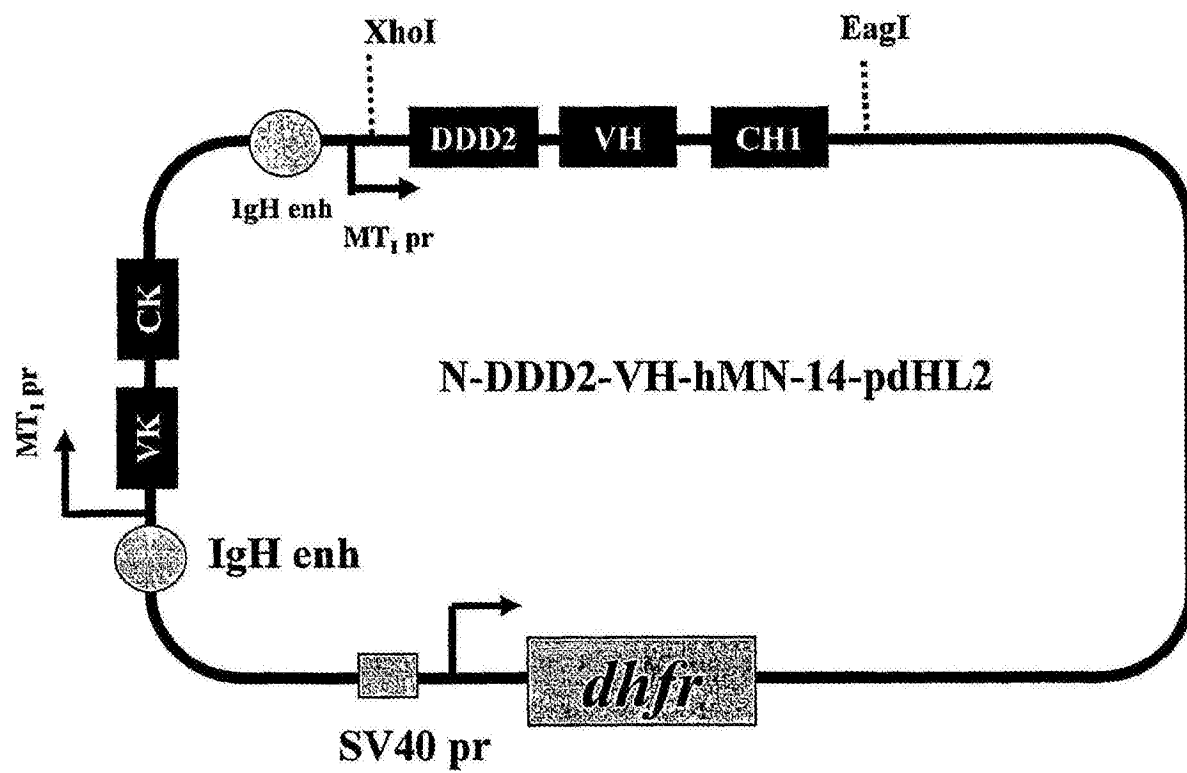


图4

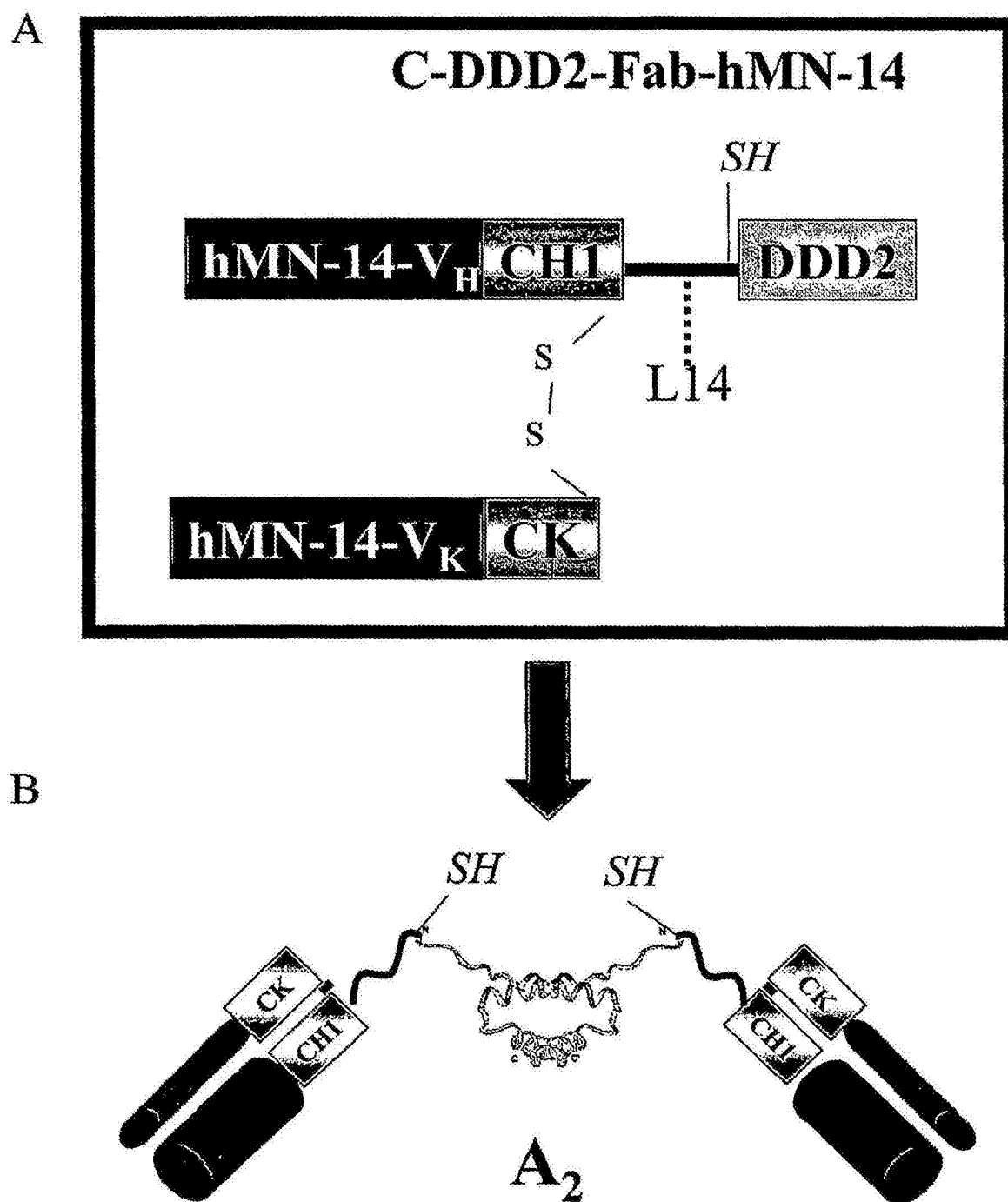


图5

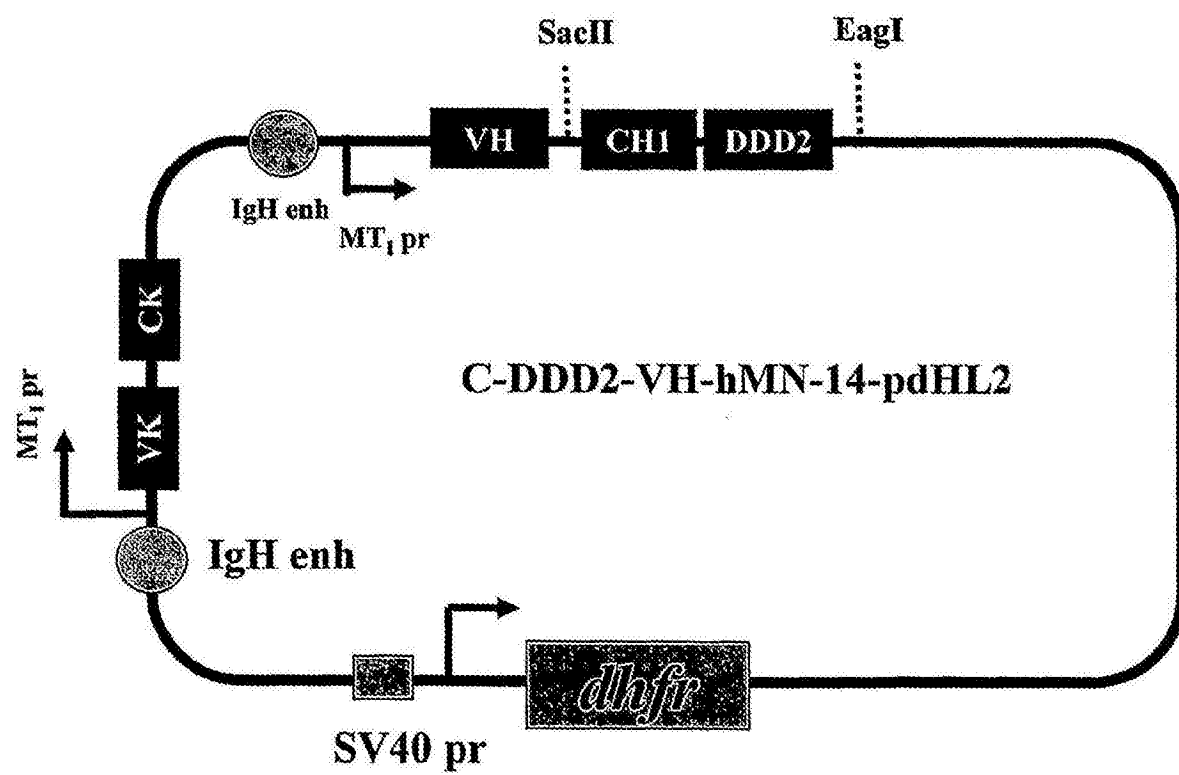


图6

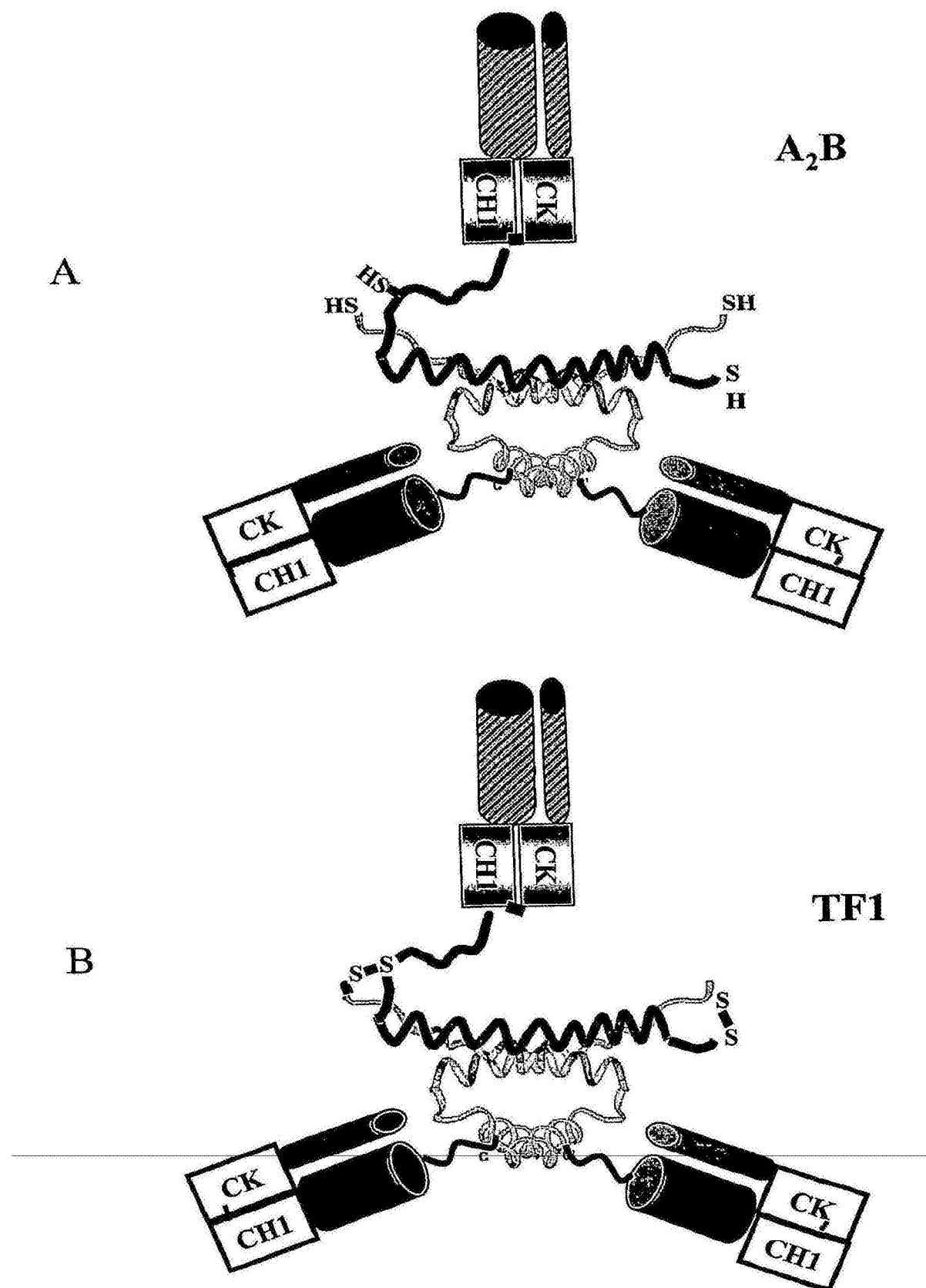


图7

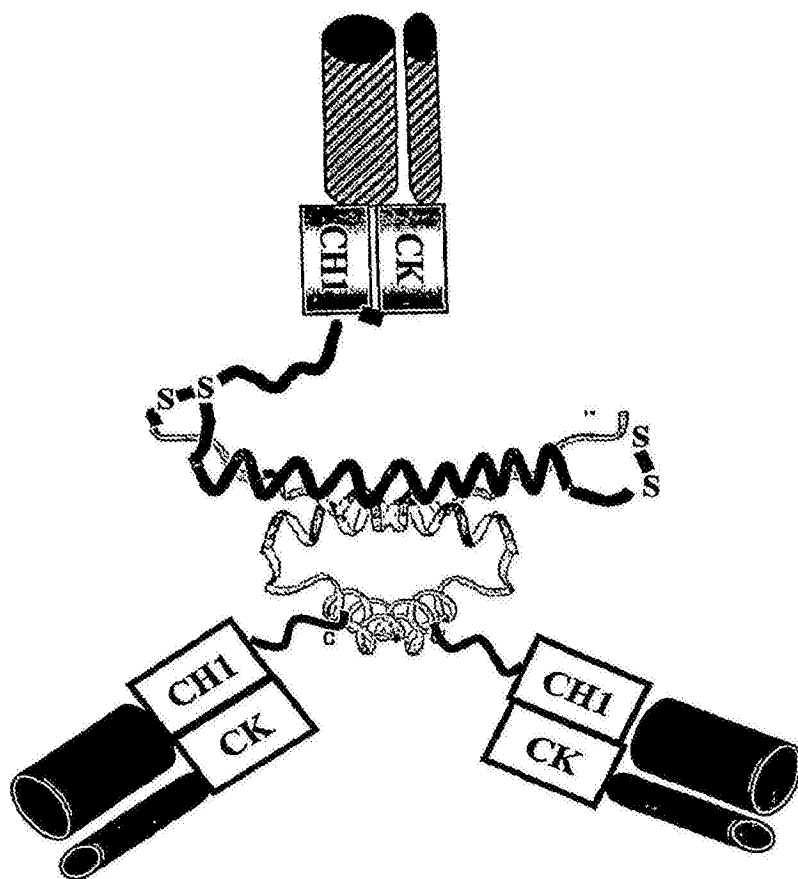
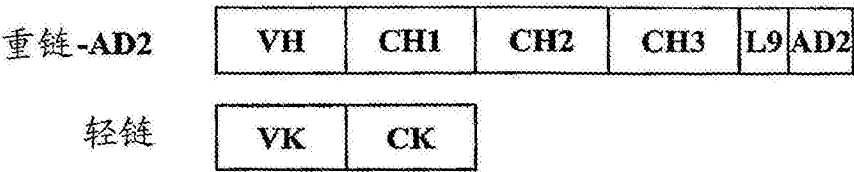
TF2

图8

A



B

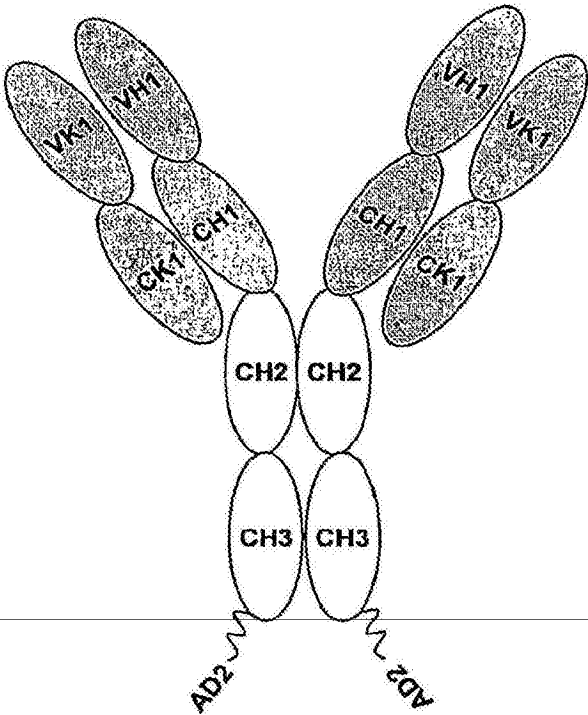


图9

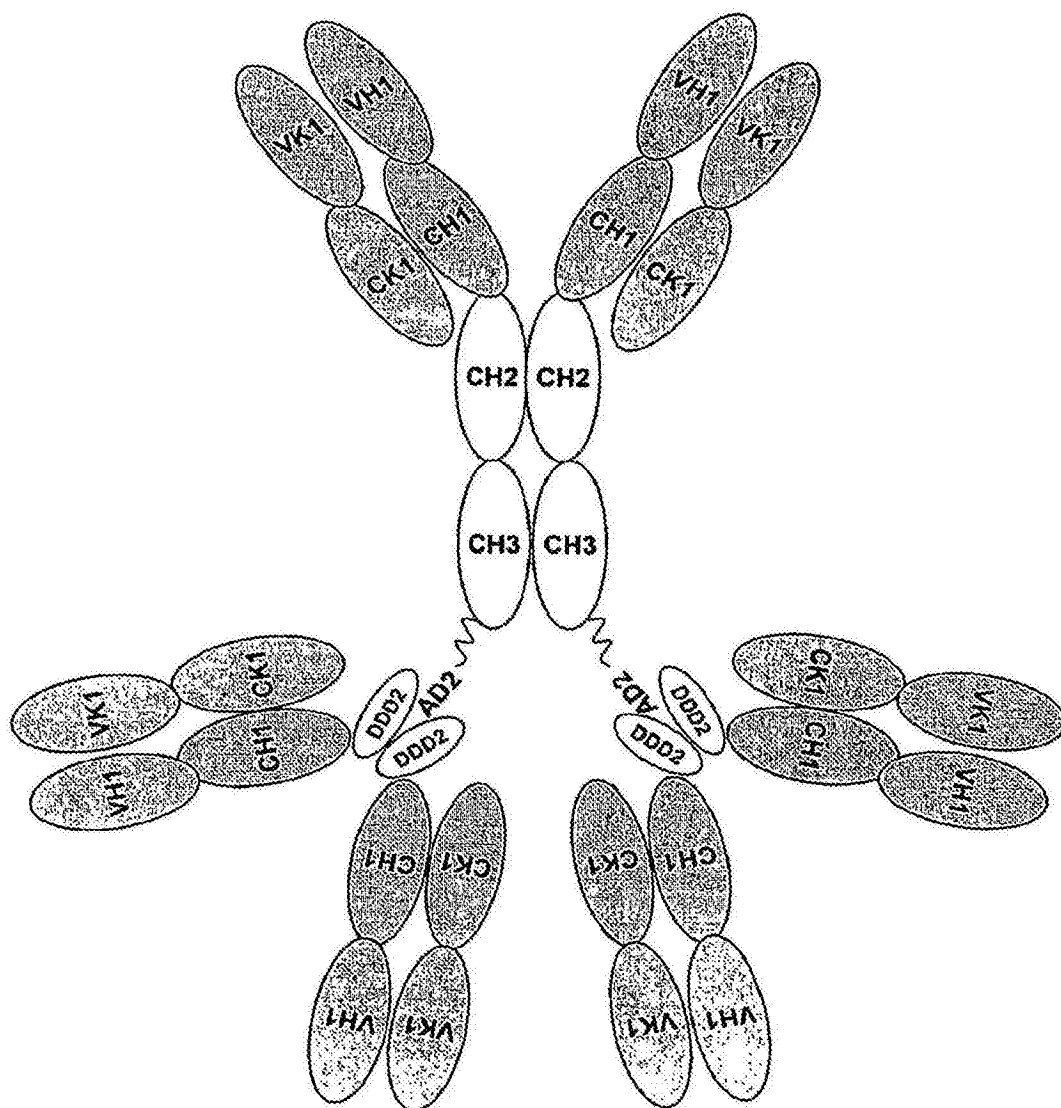


图 10

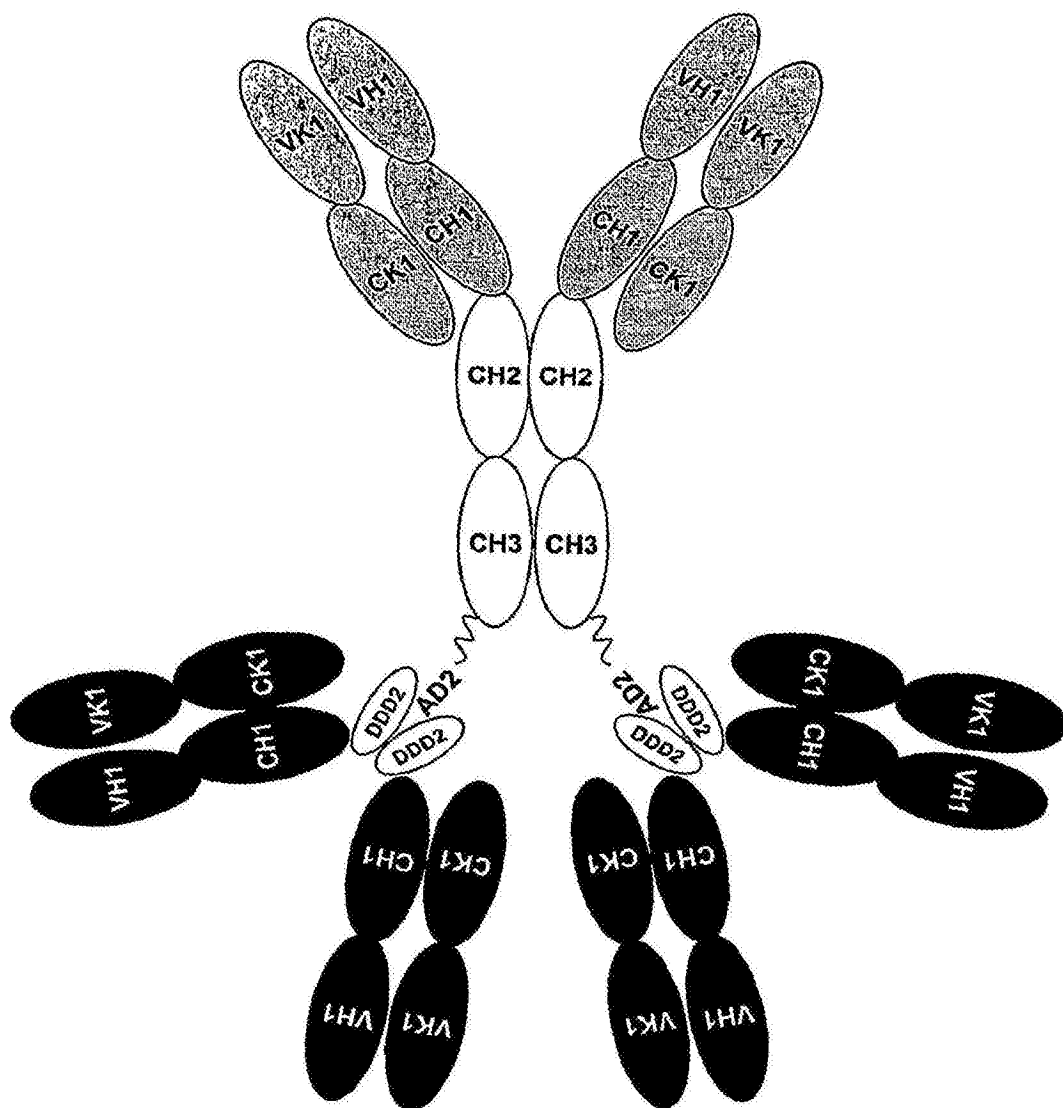
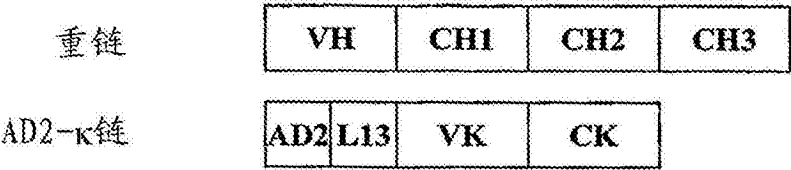


图11

A



B

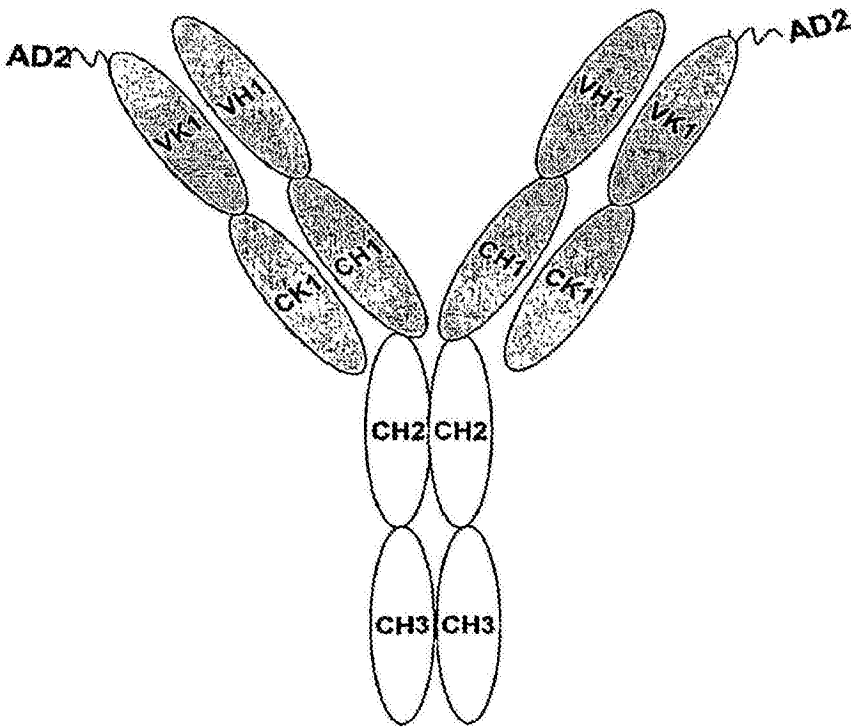


图12

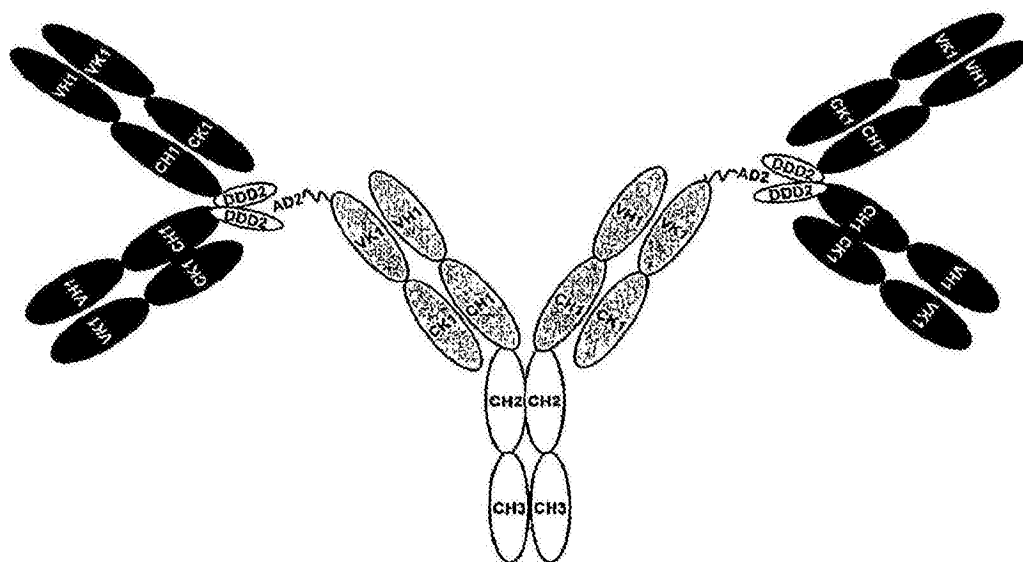


图13

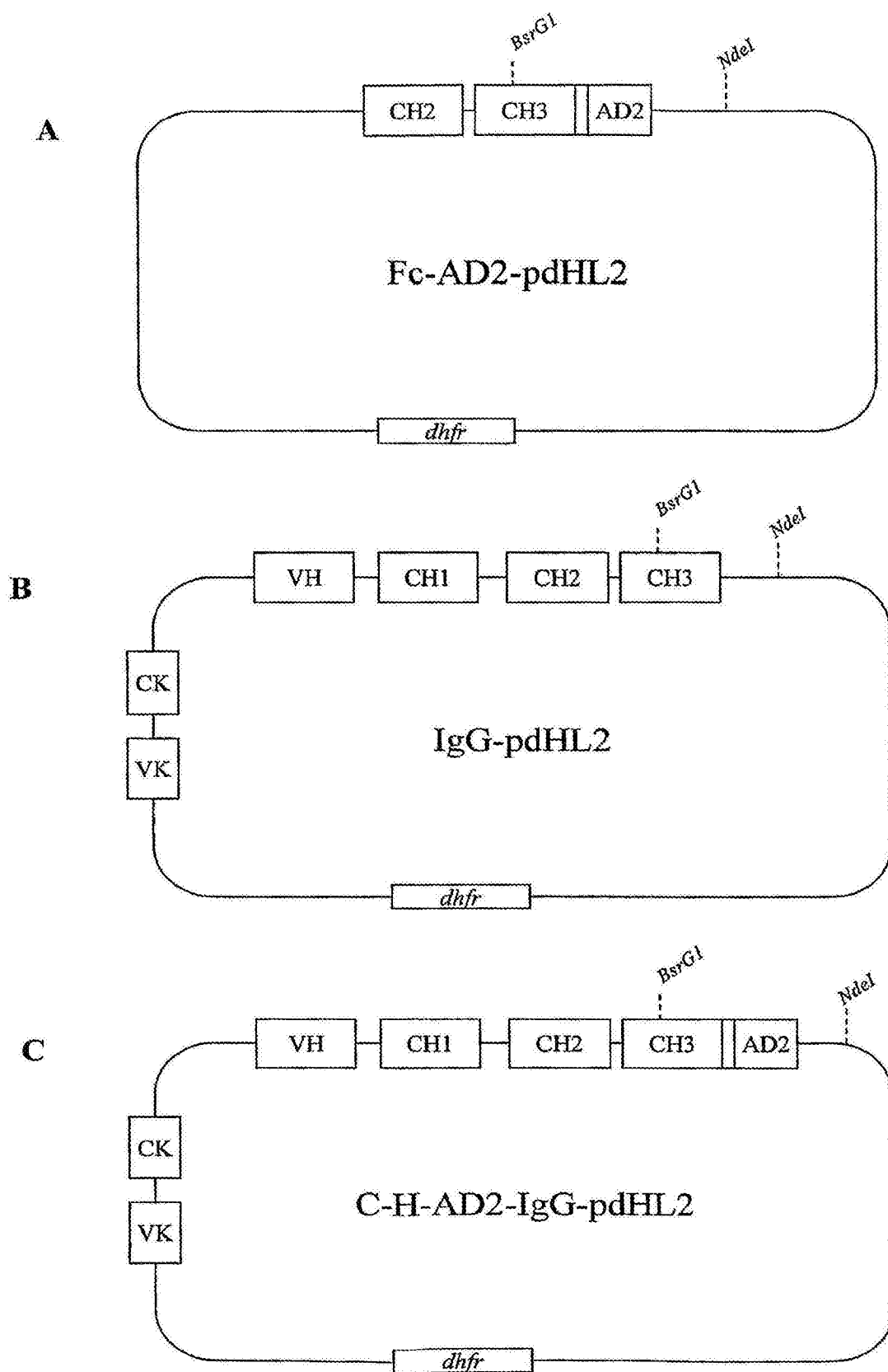


图14

C-H-AD2-hLL2-IgG的SE-HPLC分析

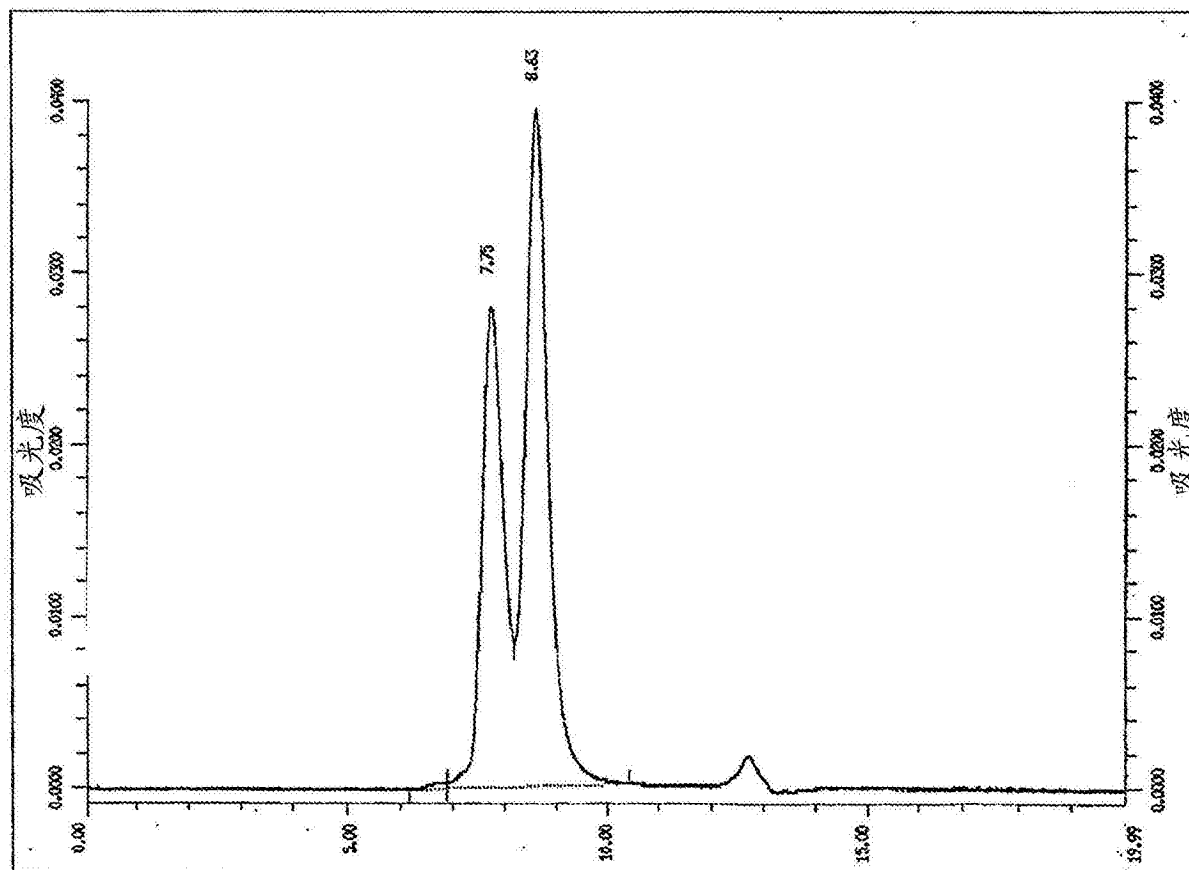


图15

C-H-AD2-hLL2的SDS-PAGE分析

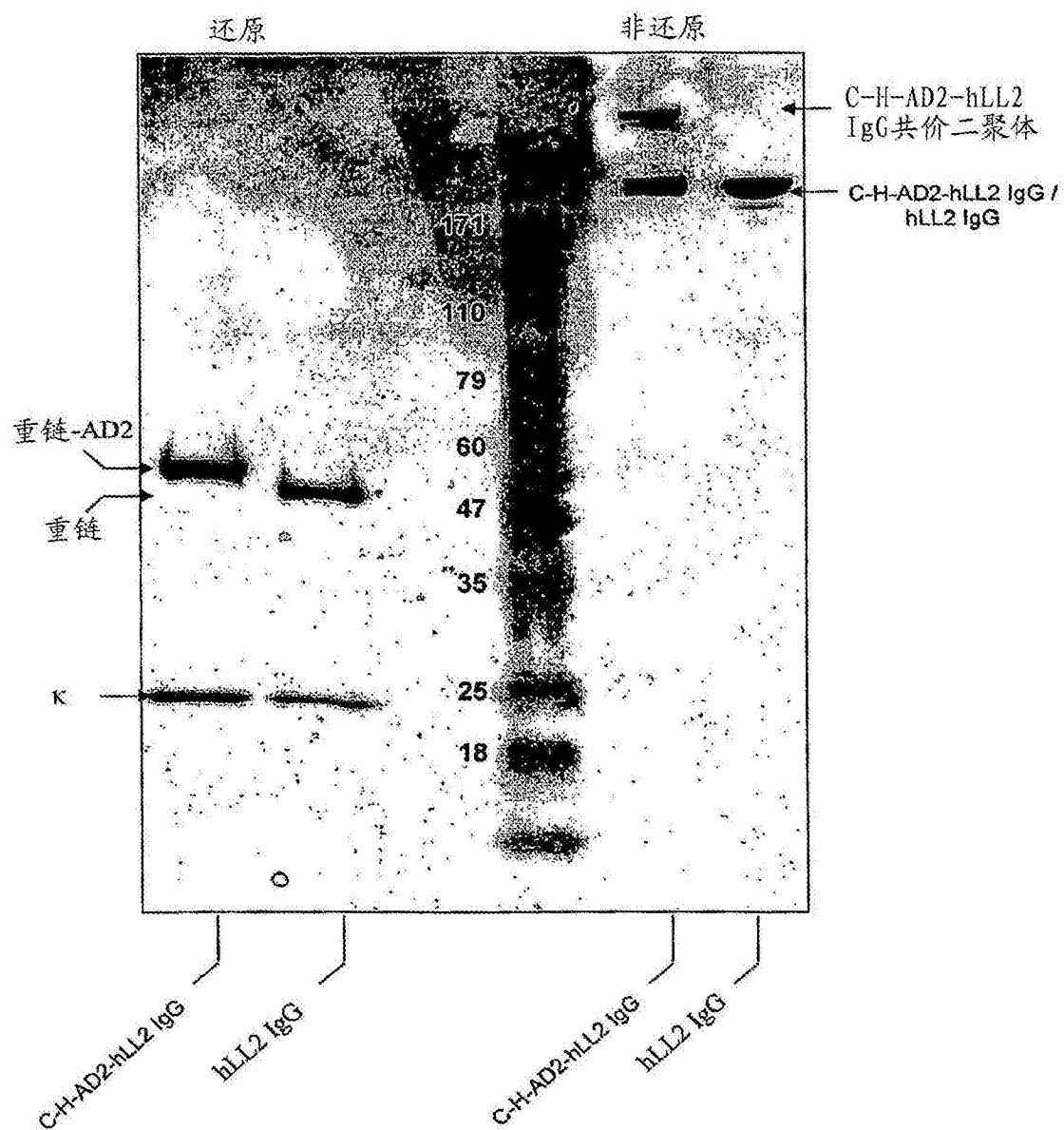


图16

N-K-AD2-hA20 IgG的SE-HPLC分析

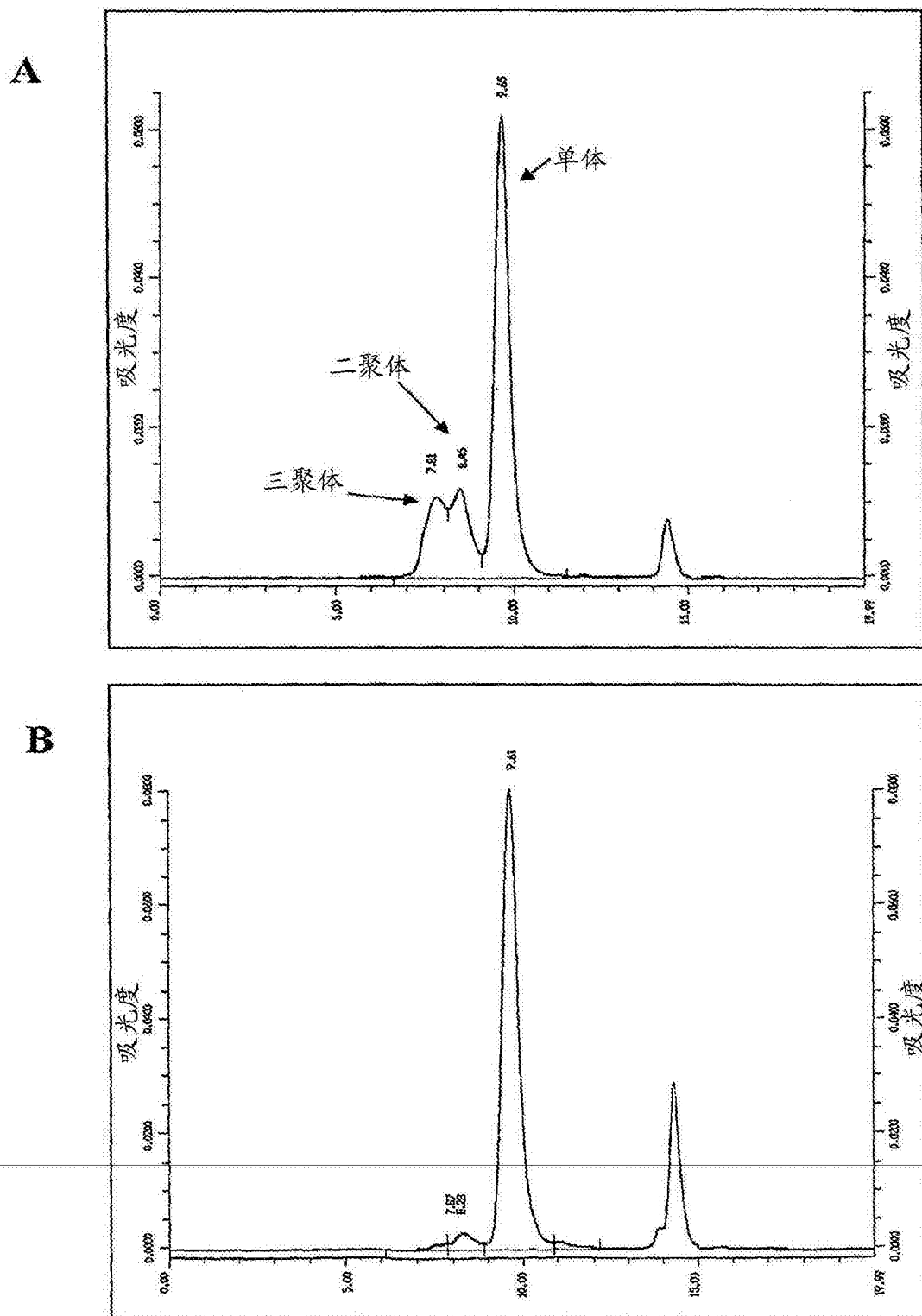


图17

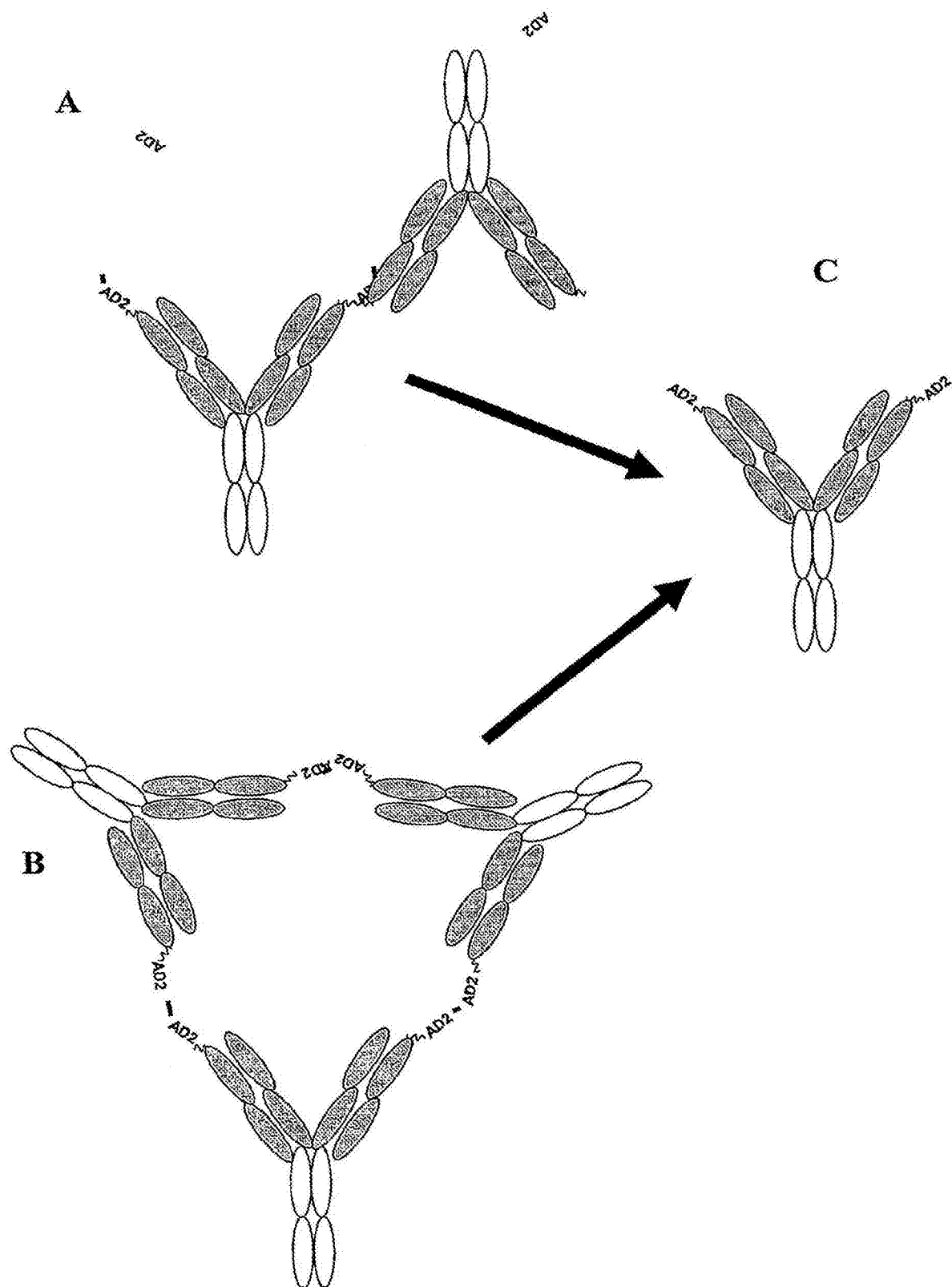


图18

Hex-hA20的SE-HPLC分析

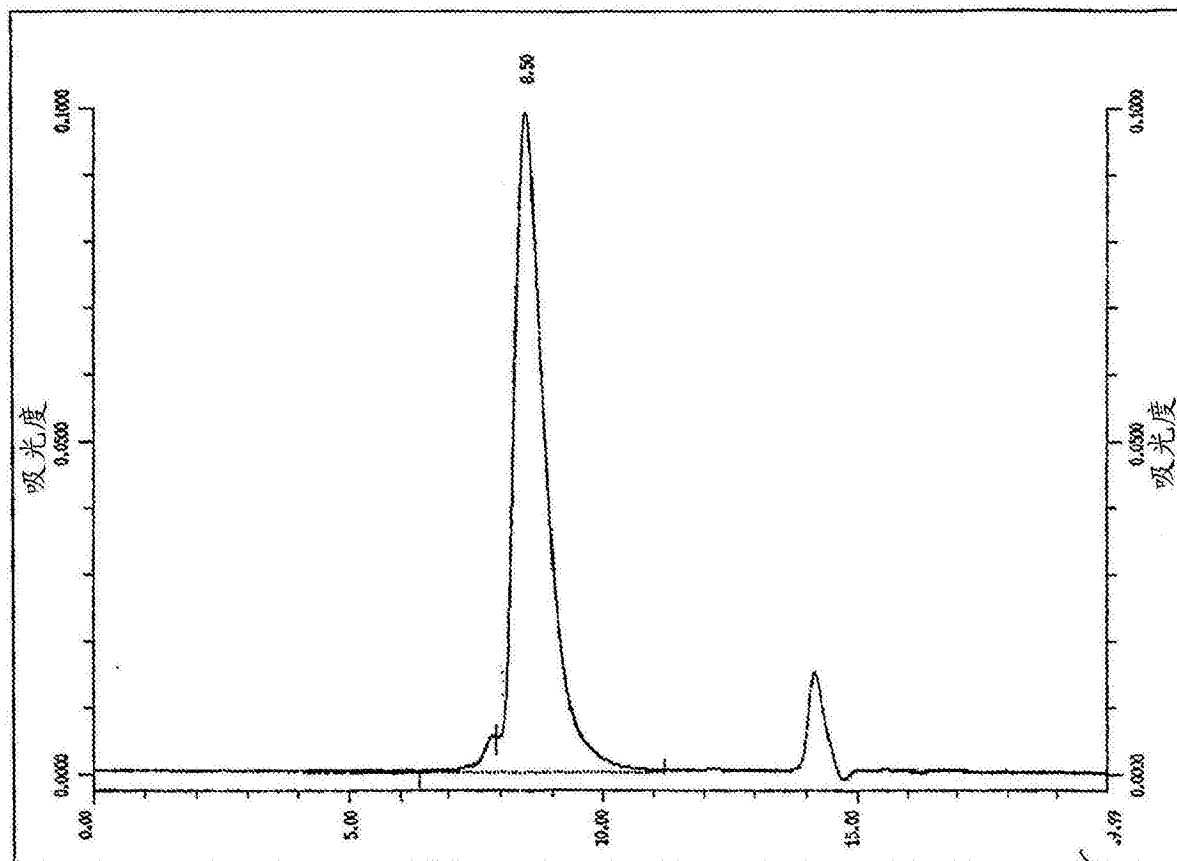


图19

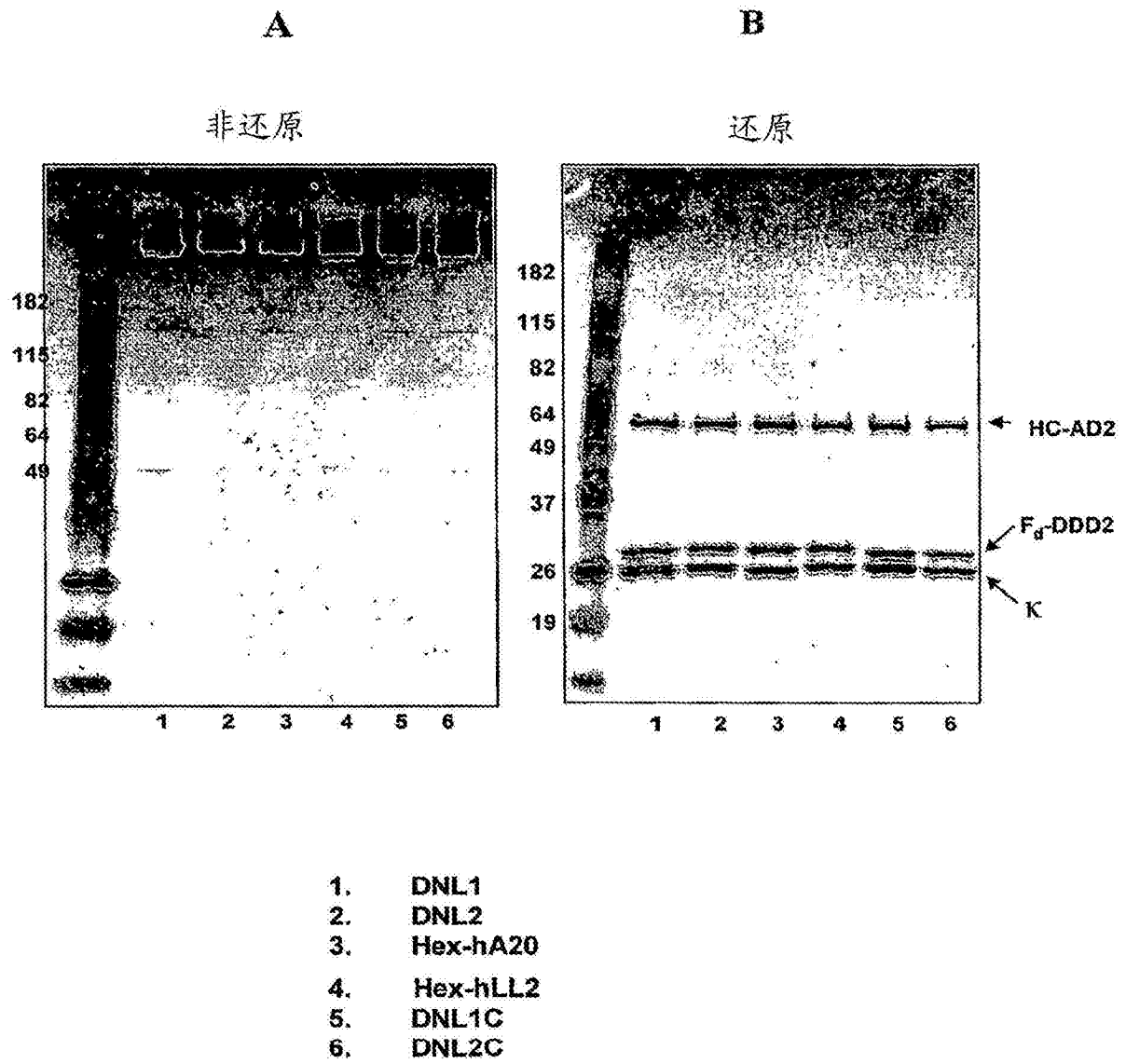


图20

Hex-hLL2的SE-HPLC分析

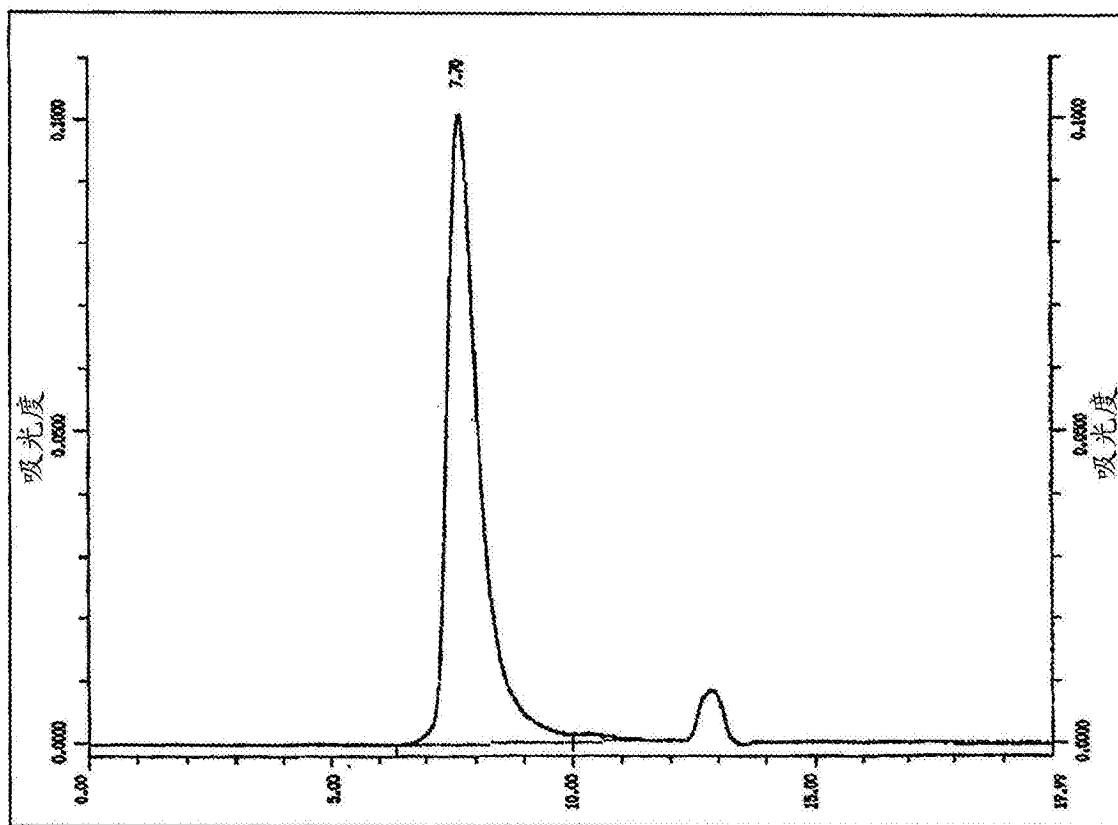


图21

DNL1和DNL1C的SE-HPLC分析

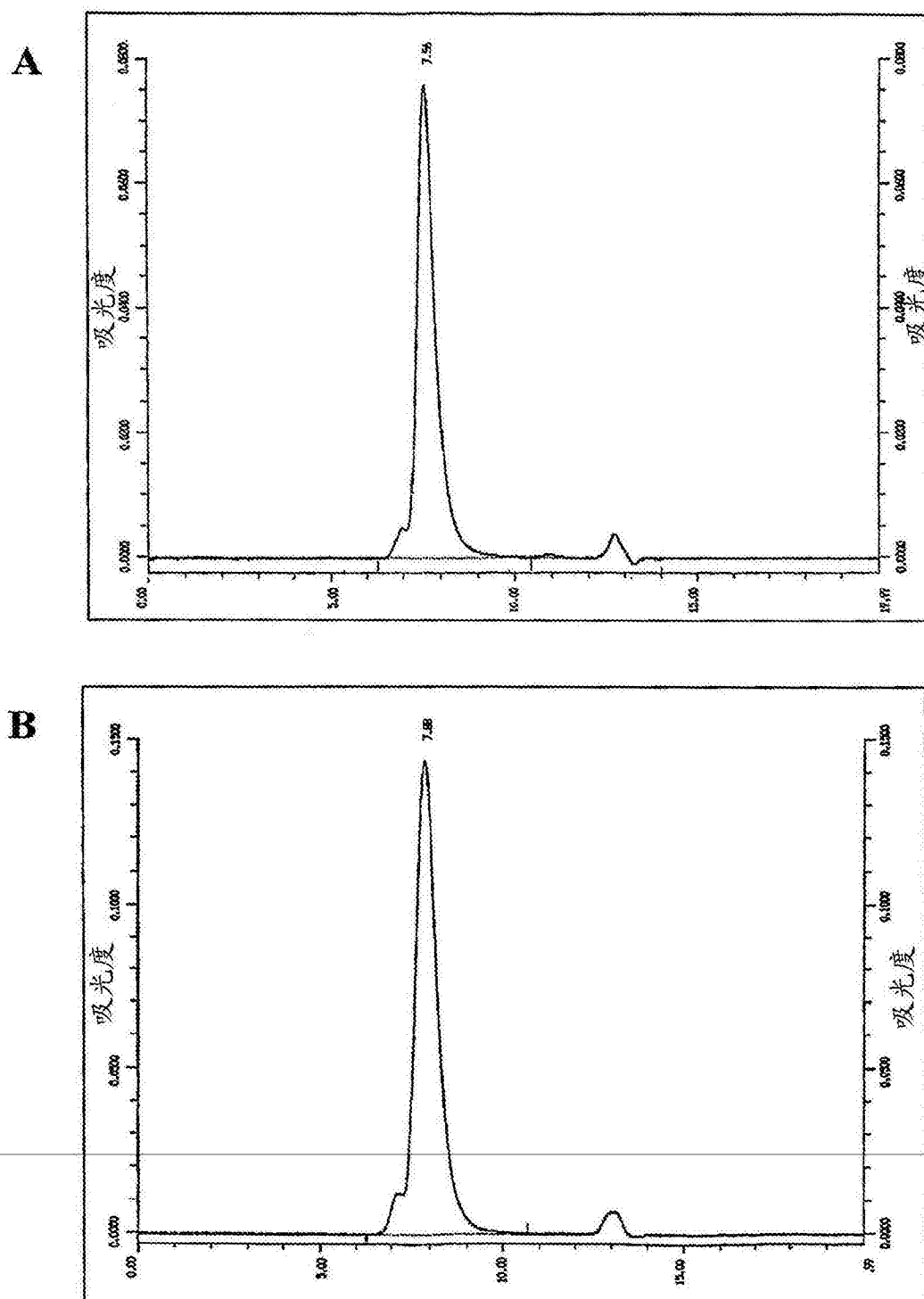


图22

DNL2的SE-HPLC分析

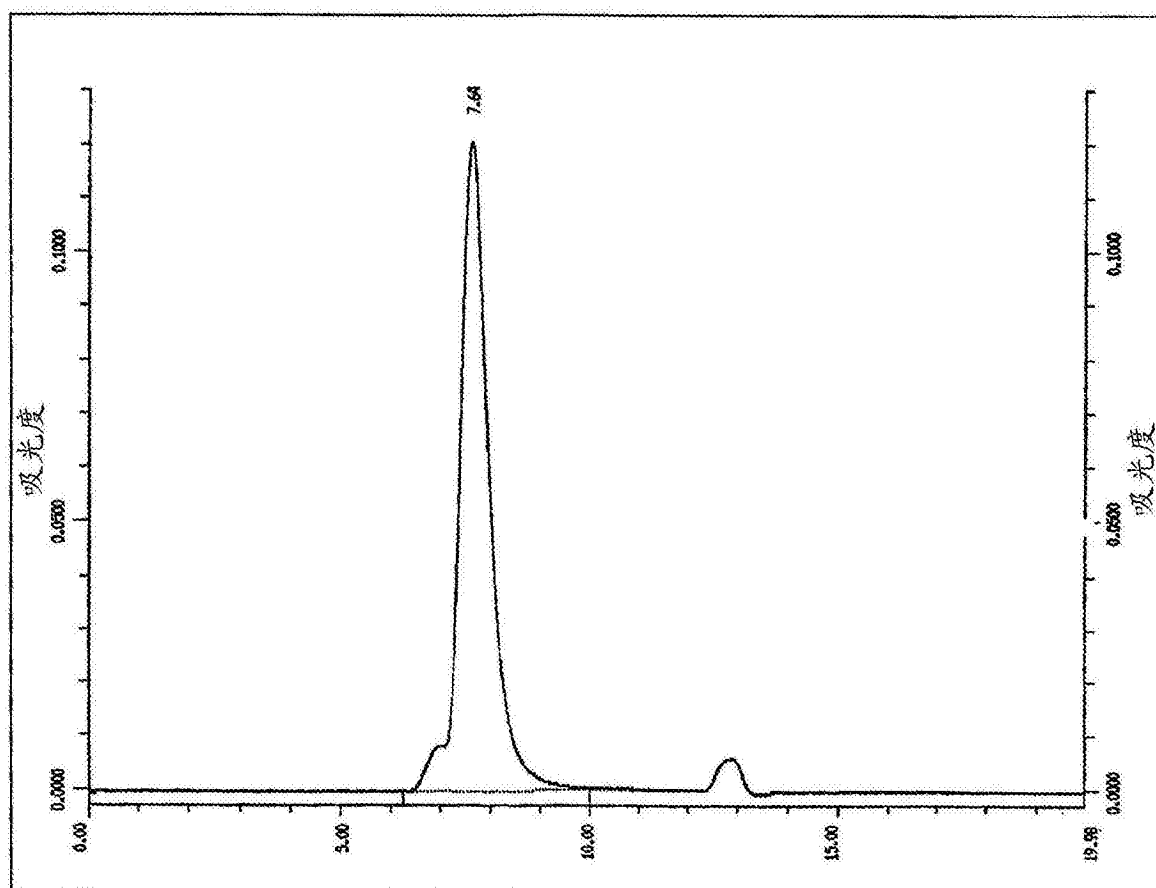
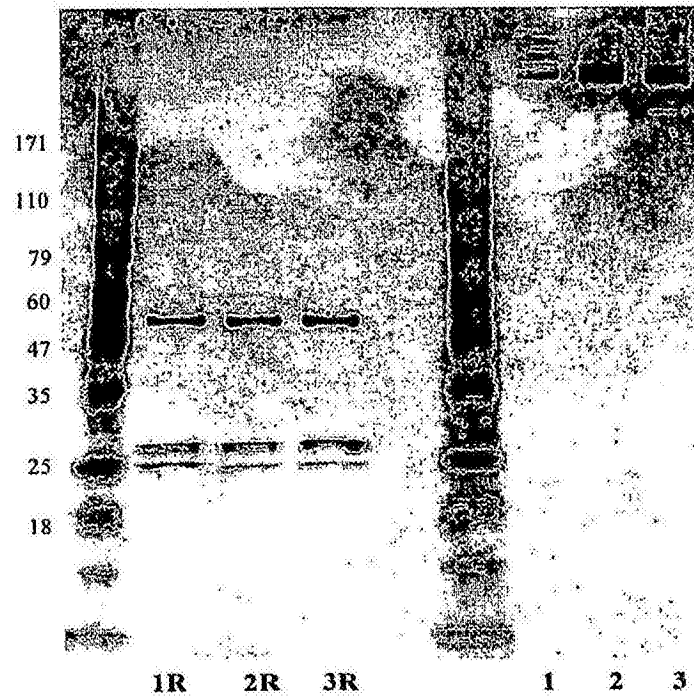


图23



- 1. DNL3
- 2. K-Hex-hA20, 产物1
- 3. K-Hex-hA20, 产物2
- 1R. 还原型DNL3
- 2R. 还原型Khex-hA20
- 3R. 还原型K-Hex-hA20

图24

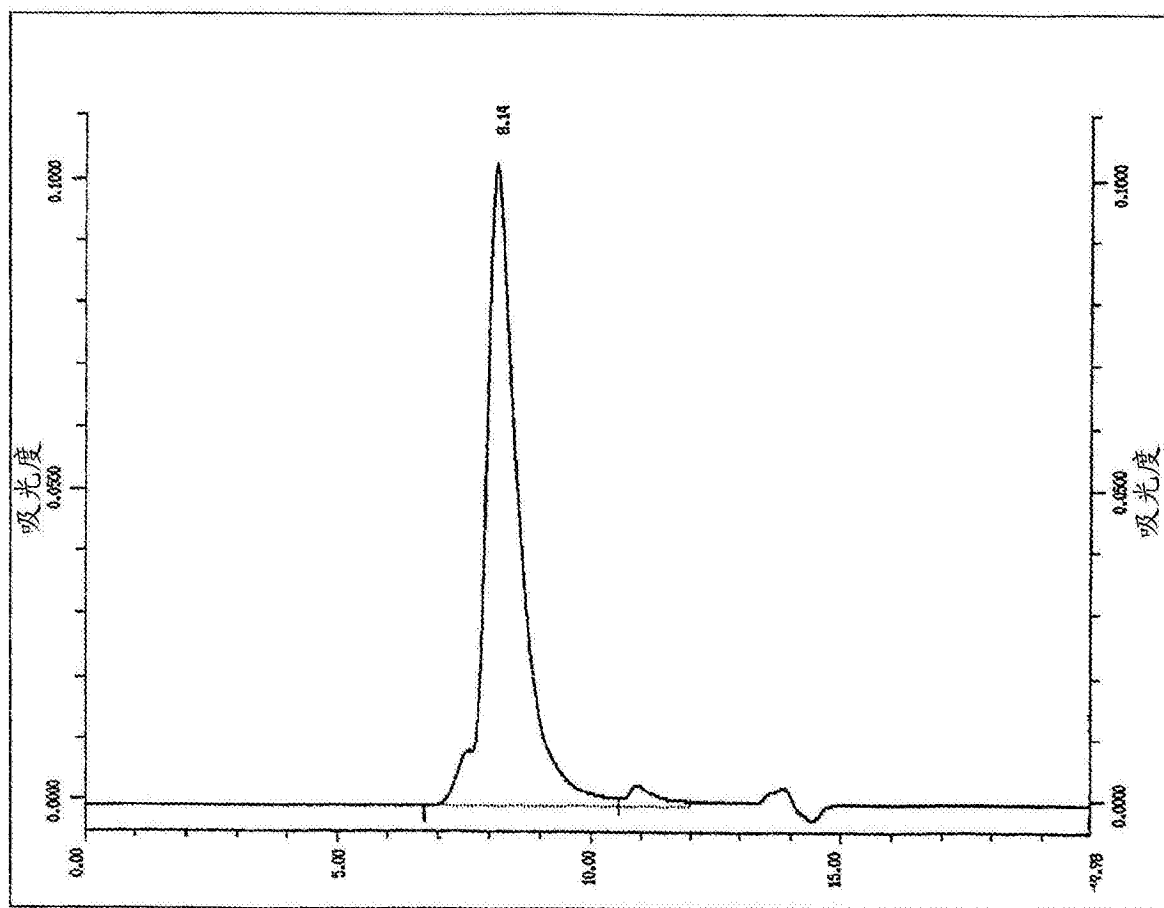


图25

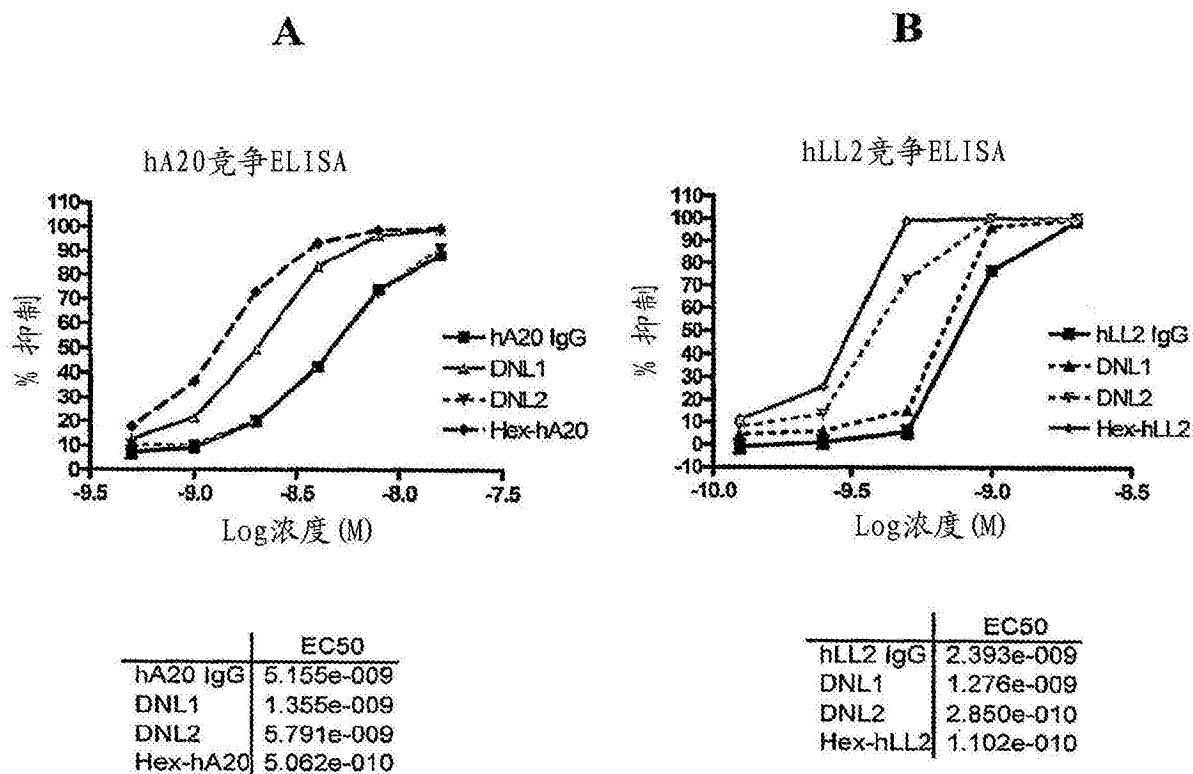


图26

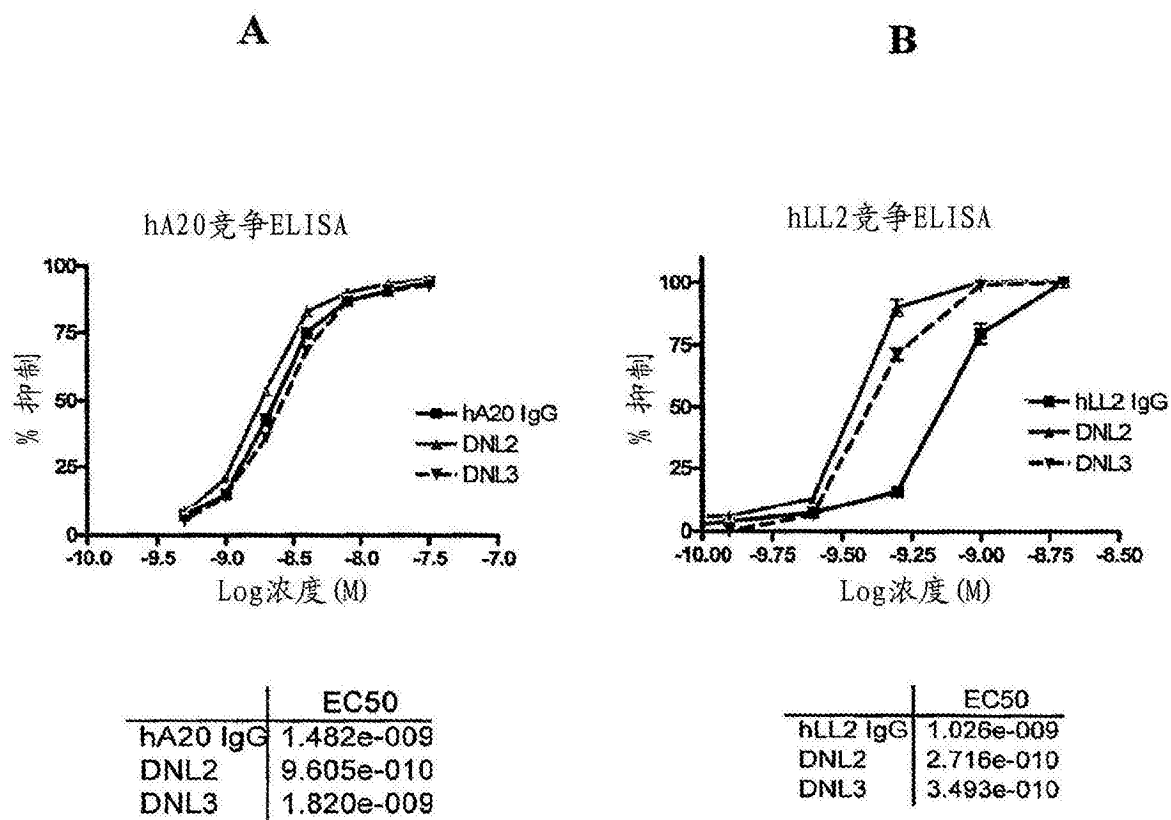


图27

10nM下MAb的比较

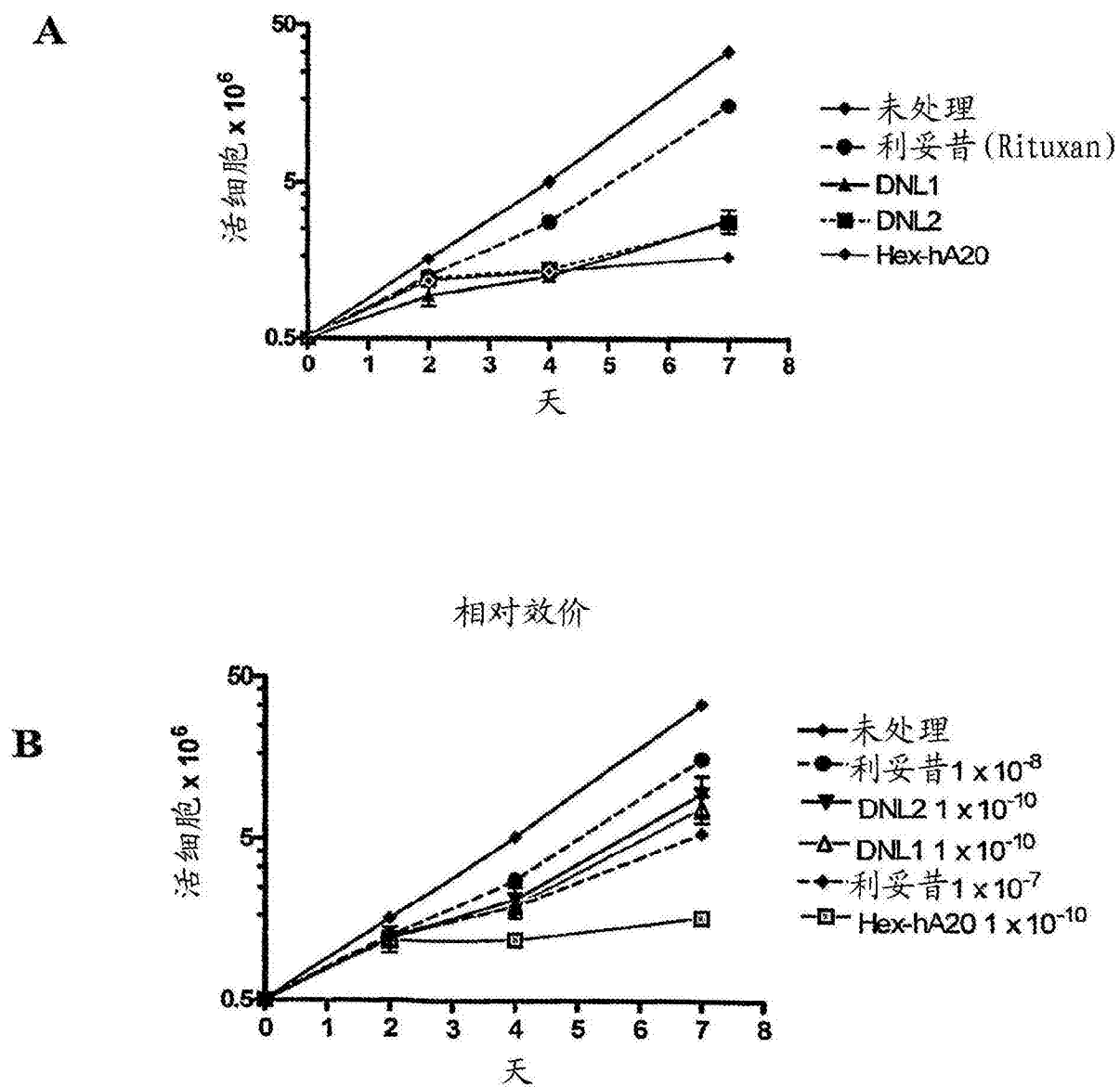
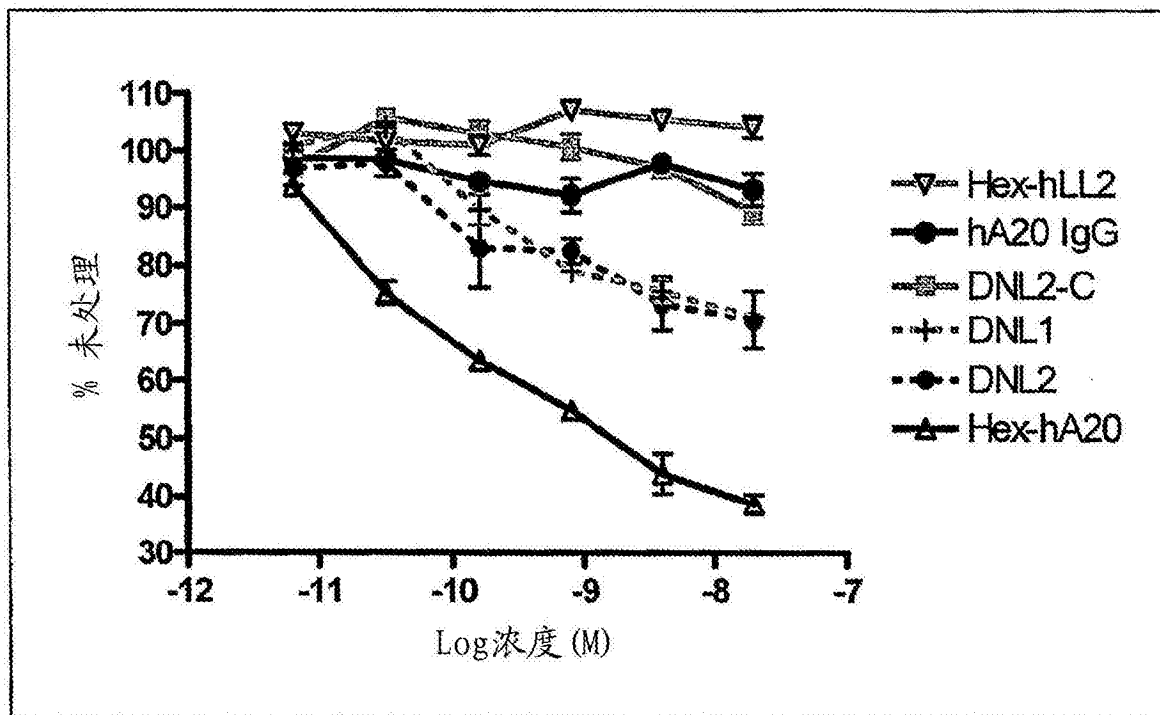


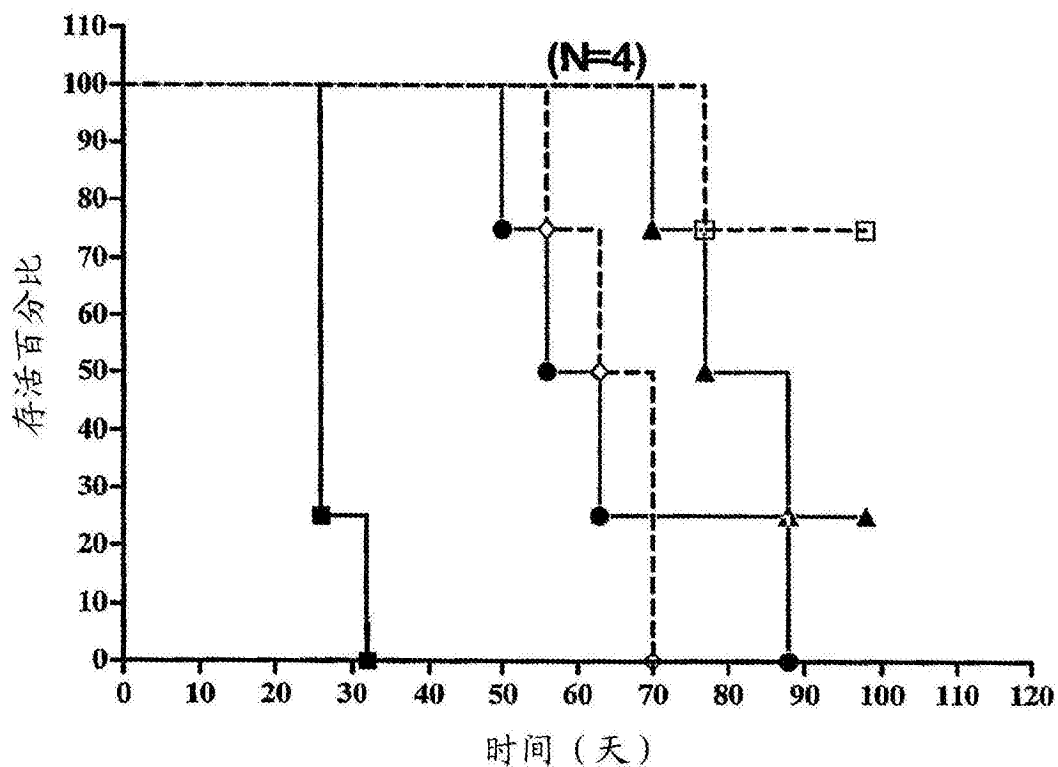
图28



	EC ₄₀	相对利妥昔的效价
利妥昔	$> 2 \times 10^{-7} \text{ M}$	-----
DNL1 & DNL2	$2 \times 10^{-9} \text{ M}$	$>100 \text{ X}$
Hex-hA20	$2 \times 10^{-11} \text{ M}$	$>10,000 \text{ X}$

图29

DNL2和Hex-hA20在Daudi接种的SCID小鼠中的治疗效力
(治疗q3d × 3)



	中位存活期	存活者/总计
—▲— DNL-2 (20 µg i.p., q3dx3)	82.5 天	1/4
—●— DNL-2 (4 µg i.p., q3dx3)	59.5 天	0/4
—□— hA20-hex (20 µg i.p., q3dx3)	>98 天	3/4
—◇— hA20-hex (4 µg i.p., q3dx3)	66.5 天	0/4
—■— 生理盐水 (100 µL i.p., q3dx3)	26 天	0/4

对于所有治疗与生理盐水对照, $P=0.0058$

图30

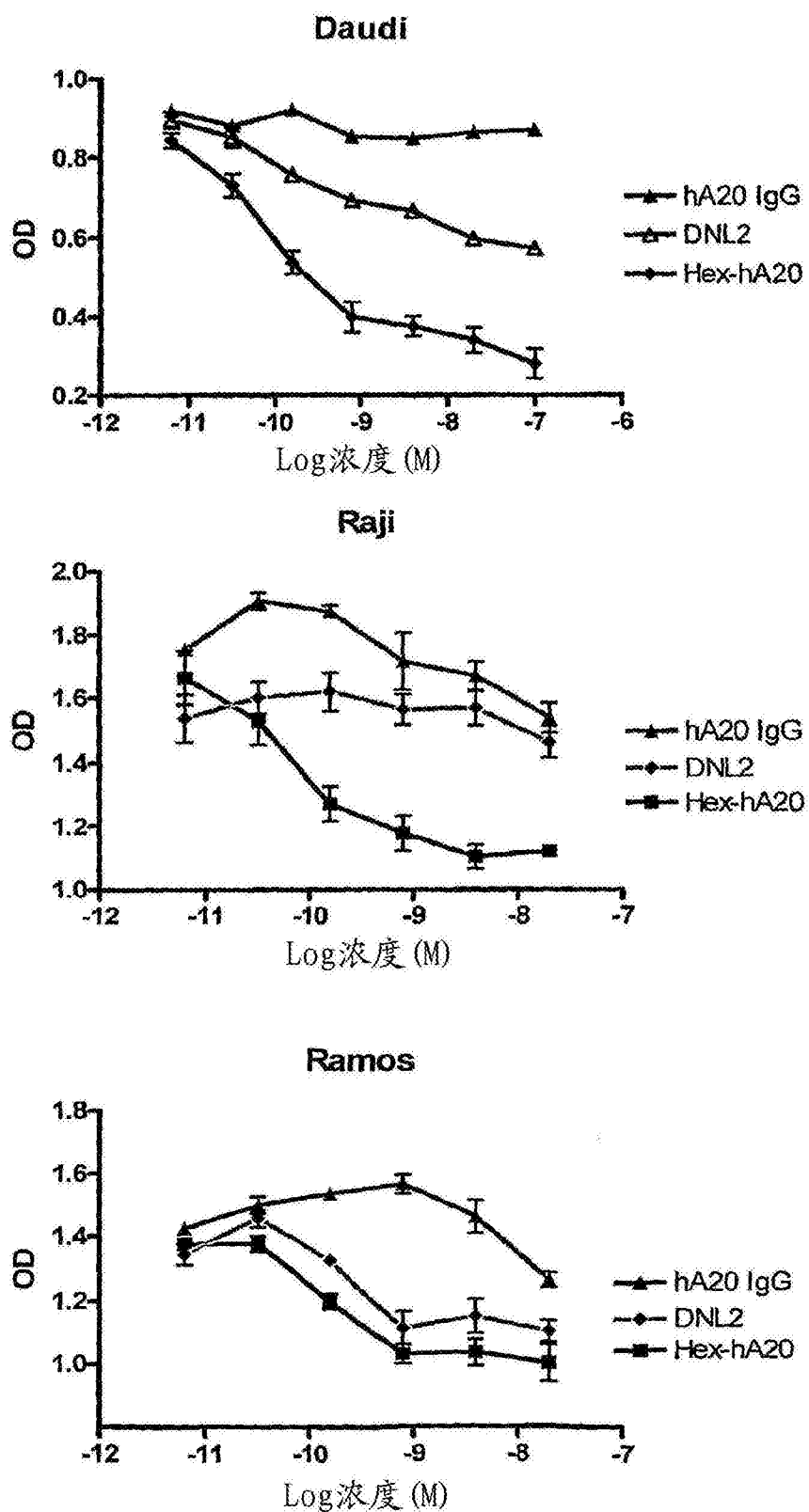


图31

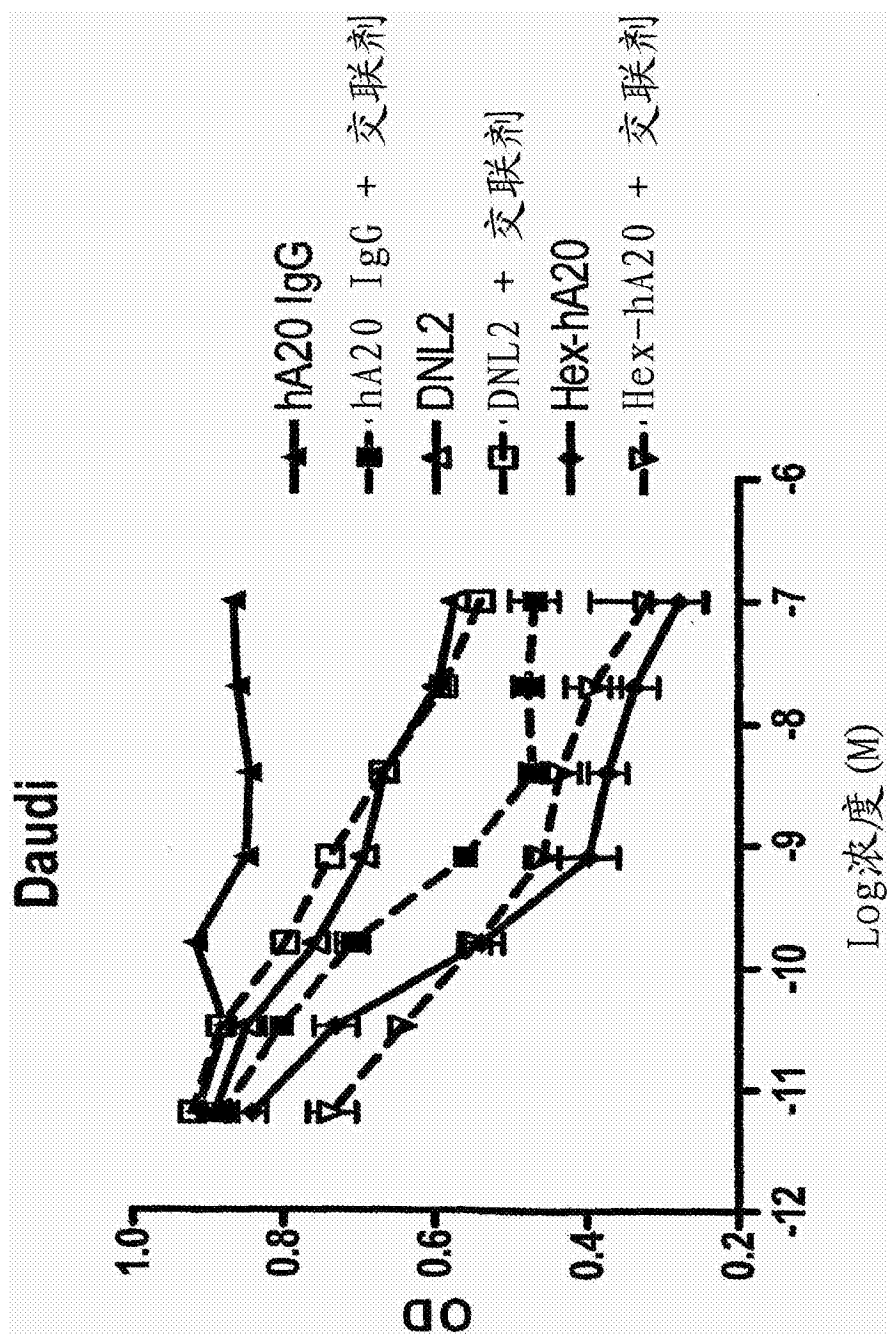


图32

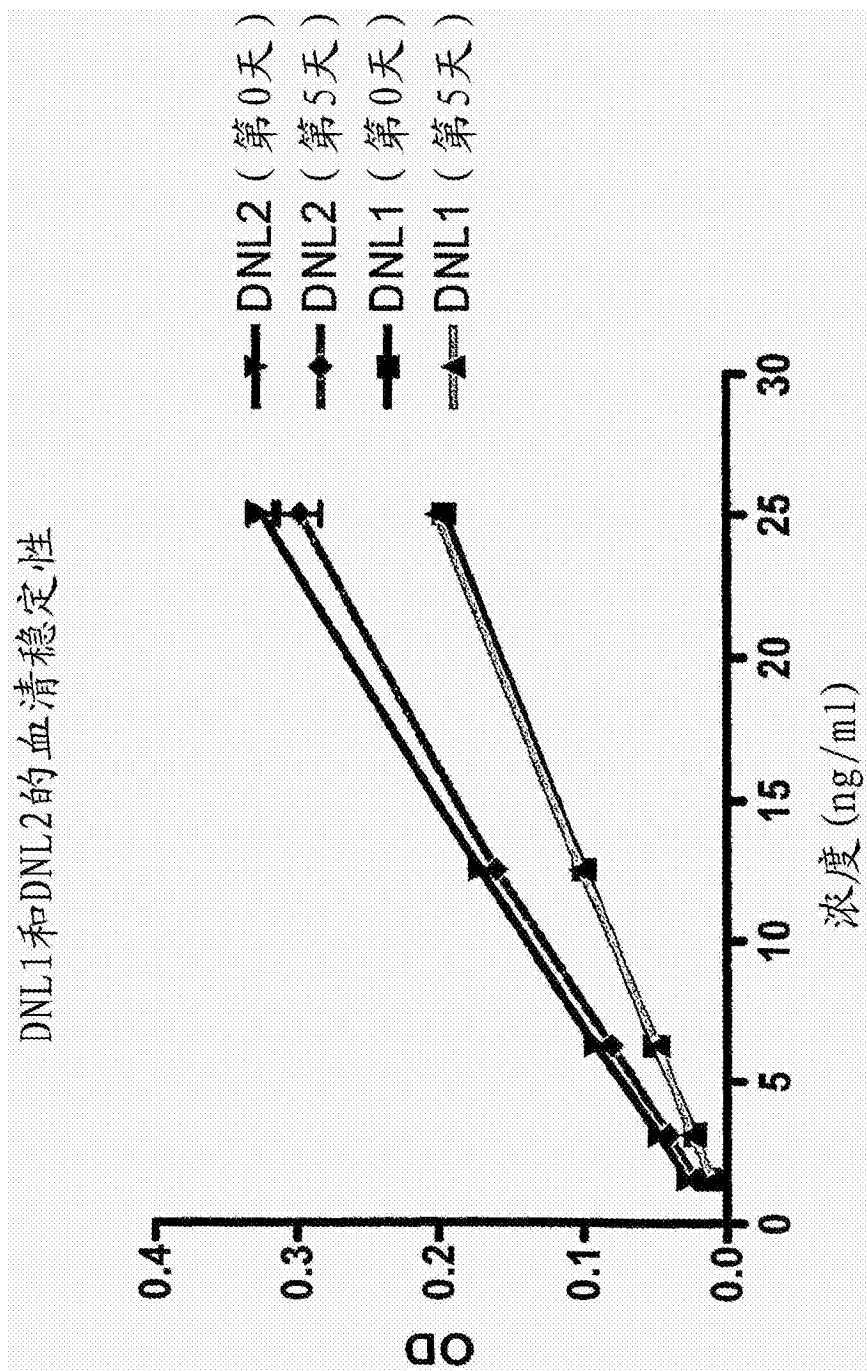


图33

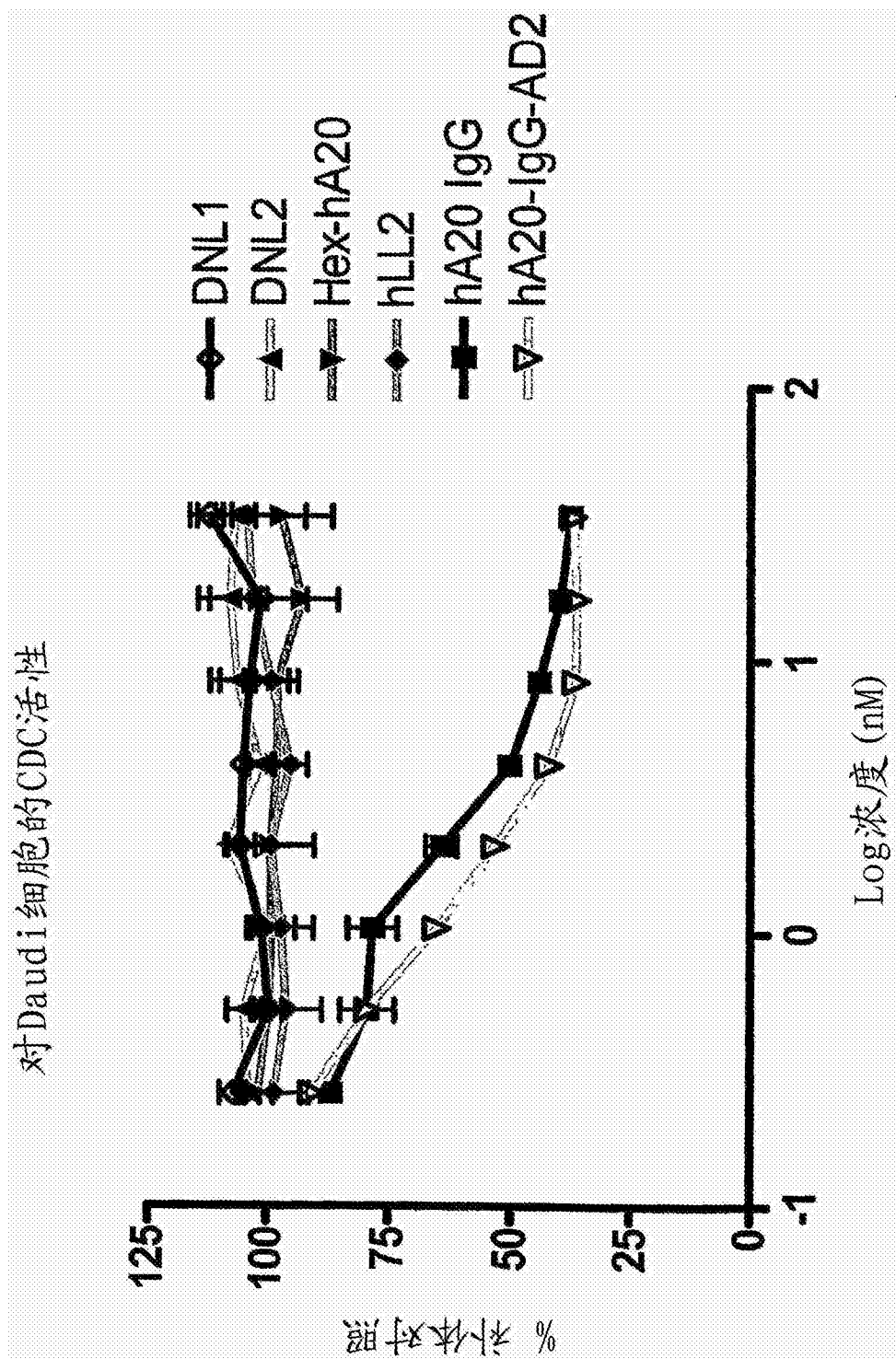


图34

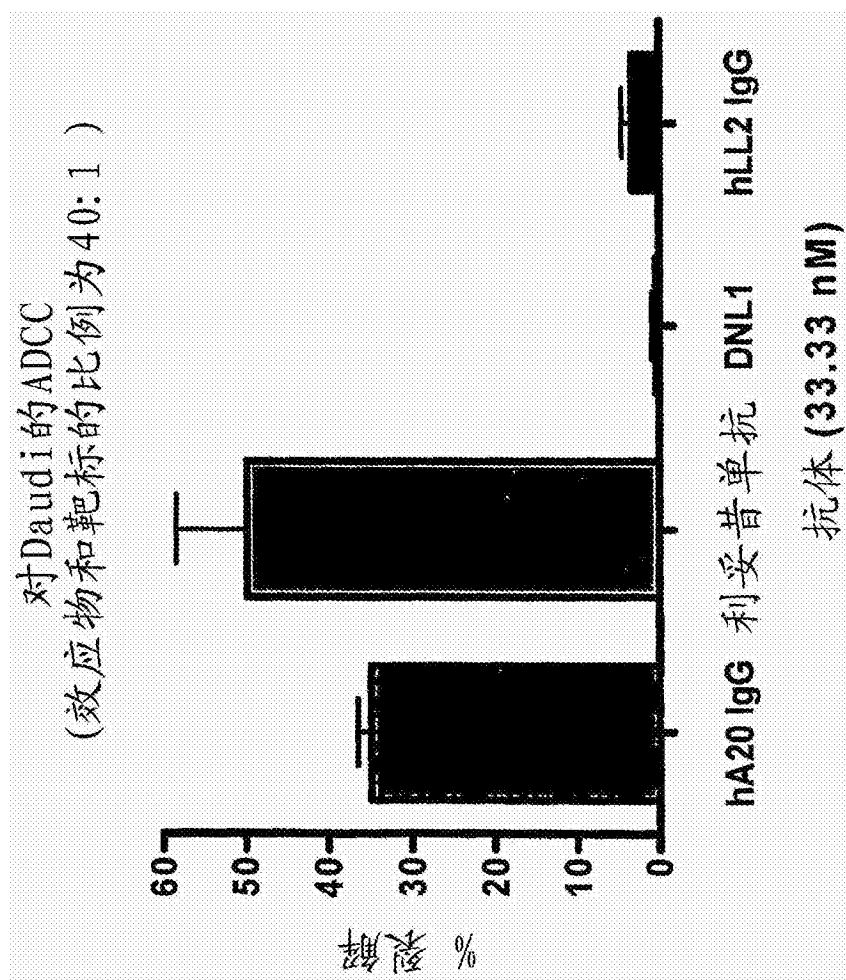


图35