

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780010769.X

[43] 公开日 2009 年 7 月 1 日

[11] 公开号 CN 101472946A

[22] 申请日 2007.1.25

[21] 申请号 200780010769.X

[30] 优先权

[32] 2006.1.25 [33] GB [31] 0601513.5

[86] 国际申请 PCT/GB2007/000258 2007.1.25

[87] 国际公布 WO2007/085837 英 2007.8.2

[85] 进入国家阶段日期 2008.9.25

[71] 申请人 伊拉兹马斯大学鹿特丹医学中心
地址 荷兰鹿特丹

[72] 发明人 F·G·格罗斯维尔德
R·W·扬森斯 D·德拉贝克
R·K·克雷格

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘冬付磊

权利要求书 3 页 说明书 30 页 序列表 4 页
附图 4 页

[54] 发明名称
结合分子

[57] 摘要

本发明涉及单价、二价和多价多肽结合复合体以及单特异性、双特异性或多特异性多肽结合复合体的制备及其用途。本发明还涉及得自噬菌体展示文库、转基因动物或天然来源的抗原特异性 VH 结合结构域的多样性库 (diverse repertoire) 的制备和用途。优选 VH 结合结构域和二聚化结构域包含人序列。所述多肽结合复合体包含具有 4 个抗原结合 [VH] 结构域并且优选天然铰链或接头肽在二聚化结构域氨基端和羧基端融合的同二聚化结构域或异二聚化结构域。在所述多肽结合复合体缺乏 C_H2-C_H3 效应子功能的情况下, 其大小优选不超过 120kDa。制备路线见说明书。

1. 一种多肽结合复合体, 包含第一多肽链和第二多肽链的二聚体, 其中每条多肽链都包含氨基端 VH 结合结构域、羧基端 VH 结合结构域和二聚化结构域, 其中二聚化结构域缺乏 C_H2-C_H3 功能。

2. 权利要求 1 的多肽结合复合体, 其中二聚化结构域既不是工程 C_H2-C_H3 结构域也不是天然 C_H2-C_H3 结构域。

3. 权利要求 1 或 2 的多肽结合复合体, 其中第一多肽链的二聚化结构域与第二多肽链的不同, 因此所述多肽结合复合体是异二聚体。

4. 权利要求 1 或 2 的多肽结合复合体, 其中第一多肽链的二聚化结构域与第二多肽链的相同, 因此所述多肽结合复合体是同二聚体。

5. 前述权利要求中任一项的多肽结合复合体, 其中 4 个 VH 结合结构域具有相同的特异性(四价单特异性)。

6. 权利要求 1、2、3 和 4 中任一项的多肽结合复合体, 其中所述氨基端 VH 结合结构域具有相同的特异性; 所述羧基端 VH 结合结构域具有相同的特异性; 并且氨基端和羧基端 V_H 结构域的结合特异性不同(二价双特异性)。

7. 权利要求 1、2、3 和 4 中任一项的多肽结合复合体, 其中所述氨基端 VH 结合结构域具有相同的特异性; 所述羧基端 VH 结合结构域具有彼此不同的特异性并且与氨基端 V_H 结构域的也不同(三特异性)。

8. 权利要求 1、2、3 和 4 中任一项的多肽结合复合体, 其中所述羧基端 VH 结合结构域具有相同的特异性; 所述氨基端 VH 结合结构域具有彼此不同的特异性并且与羧基端 V_H 结构域的也不同(三特异性)。

9. 权利要求 1、2、3 和 4 中任一项的多肽结合复合体, 其中所述氨基端 VH 结合结构域具有彼此不同的特异性; 所述羧基端 VH 结合结构域具有彼此不同的特异性并且与氨基端 V_H 结构域的也不同(四特

异性)。

10. 前述权利要求中任一项的多肽结合复合体, 其大小不超过 120 kDA。

11. 前述权利要求中任一项的多肽结合复合体, 其中一个或多个 VH 结合结构域可以被一类替代多肽结合结构域取代。

12. 前述权利要求中任一项的多肽结合复合体, 其中第一多肽链、第二多肽链或这两条多肽链在氨基端结合结构域与二聚化结构域之间、羧基端结合结构域与二聚化之间或它们两者之间还包含柔性铰链区。

13. 权利要求 11 的多肽结合复合体, 其中所述替代结合结构域为细胞因子、生长因子、受体拮抗剂、受体激动剂或配体。

14. 前述权利要求中任一项的多肽结合复合体, 其中每条多肽链还包含一个或多个串联的和被铰链区分隔开的额外的氨基端 VH 结合结构域, 以及一个或多个串联的和被铰链区分隔开的额外的羧基端 VH 结合结构域。

15. 一种分离的多核苷酸, 其编码前述权利要求中任一项的第一多肽链、第二多肽链或这两条多肽链。

16. 一种表达载体, 其含有权利要求 15 的分离的多核苷酸。

17. 一种用权利要求 16 的表达载体转化的宿主细胞。

18. 一种制备前述权利要求中任一项的多肽结合复合体的方法, 该方法包括培养权利要求 17 的宿主细胞并分离出所述多肽复合体。

19. 一种制备前述权利要求中任一项的多肽结合复合体的方法, 该方法包括:

用一种或多种编码权利要求 1-14 中任一项的多肽结合复合体的载体转化宿主细胞;

让宿主细胞在允许所述一种或多种载体的编码序列表达的条件下生长; 和

从宿主细胞中收获所述多肽结合复合体。

20. 一种制备权利要求 1-14 中任一项的多肽结合复合体的方法，其中 VH 结合结构域、二聚化结构域或接头多肽通过合成路线例如肽化学法或缀合来制备。

21. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-14 中任一项的多肽结合复合体。

22. 权利要求 1-14 中任一项的多肽结合复合体在制备用于预防或治疗疾病的药物中的用途。

23. 一种治疗患者的方法，该方法包括给予需要治疗的患者权利要求 22 的药物组合物。

24. 权利要求 1-14 中任一项的多肽结合复合体作为诊断剂、试剂、抗体酶、抑制剂、细胞化学试剂或造影剂的用途。

25. 权利要求 1-14 中任一项的多肽结合复合体作为胞内抗体的用途。

26. 一种治疗患者的方法，该方法包括给予需要治疗的患者权利要求 16 的载体或权利要求 21 的药物组合物。

结合分子

发明领域

本发明涉及包含连接到二聚化结构域(dimerisation domain)氨基端和羧基端两端的 VH 结合结构域(如本文定义)的多肽结合复合体(polypeptide binding complex)的制备方法。用本发明方法制备的 VH 结合结构域和二聚化结构域相对于现有技术所述 scFv 衍生的多肽结合复合体,具有内在结构和功能的稳定性,因此为产品制造和产品稳定性提供了优势。本发明还描述了其用途。

发明背景

单克隆抗体或其变异体将在 21 世纪新药的投放中占较大的比例。单克隆抗体疗法已被公认是用于治疗类风湿性关节炎和克罗恩病(Crohn's disease)的优选途径,并且在癌症治疗中取得了重大进展。用于治疗心血管疾病和传染病的基于抗体的产品也在开发之中。大多数市售的单克隆抗体产品识别并结合靶配体(例如 $\text{TNF}\alpha$)上的单个定义明确的表位。装配包括两条重链和两条轻链的复合体(H_2L_2 复合体),以及随后的翻译后糖基化过程需要利用哺乳动物生产系统。通过哺乳动物细胞培养制造抗体的生产成本和资金成本高昂,而且在缺乏可接受的替代方法时,有限制基于抗体的疗法潜力的风险。多种转基因生物能够表达全功能性抗体,包括植物、昆虫、鸡、山羊和牛。可在大肠杆菌(*E. coli*)中生产功能性抗体片段,但是除非在制造过程中进行聚乙二醇化,否则产品的血清稳定性通常较低。

双特异性抗体复合体是基于工程 Ig 的能够结合相同或不同抗原上两种不同表位的分子。双特异性结合蛋白单独或与其它结合剂联用掺入抗体,从中获得的人免疫功能而产生治疗效果,显示出是有前景

的治疗模式, 例如清除病原体(Van Spriël 等, (1999) *J. Infect. Diseases*, 179, 661-669; Tacke 等, (2004) *J. Immunol.*, 172, 4934-4940; US 5,487,890)、治疗癌症(Glennie 和 van der Winkel, (2003) *Drug Discovery Today*, 8, 503-5100)和免疫疗法(Van Spriël 等, (2000) *Immunol. Today*, 21, 391-397; Segal 等, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 1-6; Lyden 等, (2001) *Nat. Med.*, 7, 1194-1201)。

制造方面问题的复杂性在于双特异性抗体产物以两种或更多种 H₂L₂ 复合体为基础。例如两套或更多套重链和轻链基因的共同表达可导致形成高达 10 种不同的组合, 其中仅有一种为所需的异二聚体 (Suresh 等, (1986) *Methods Enzymol.*, 121, 210-228)。

为解决这一问题, 开发了许多方法以用哺乳动物细胞生产保留重链效应子功能(effector function)的全长双特异性 IgG 形式(BsIgG)。BsIgG 需要工程改造的“杵臼结构(knob and hole)”重链以防止异二聚体形成, 并且利用相同 L-链来避免 L-链错配(Carter, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 7-15)。还有研究描述了备选的化学交联方法, 用以由各个识别不同抗原的抗体片段制备复合体(Ferguson 等, (1995) *Arthritis and Rheumatism*, 38, 190-209), 或者将其它结合蛋白(例如胶原凝集素)与抗体片段交联来制备复合体(Tacke 等, (2004) *J. Immunol.*, 172, 4934-4940)。

开发通常缺乏重链效应子功能的双链抗体(diabodies)或微型抗体(mini antibodies) (BsAb)也克服了异二聚体丰余性(hetero-dimer redundancy)。这些包含掺有 V_H 和 V_L 结合位点的最小单链抗体(scFv), 最小单链抗体随后折叠并二聚化从而形成对其每个靶抗原都是单价的二价双特异性抗体(Holliger 等, (1993) *PNAS*, 90, 6444-6448; Muller 等, (1998) *FEBS Lett.*, 422, 259-264)。在一个实例中, C_H1 和 L-恒定区结构域用作形成双特异性微型抗体的异二聚化结构域(heterodimerisation domain) (Muller 等, (1998) *FEBS Lett.*, 259-264)。已经开发出许多基于大肠杆菌表达系统的重组方法以生产 BsAb

(Hudson, (1999) *Curr. Opin. Immunol.*, 11, 548-557), 尽管生产临床级多价抗体材料的费用和规模似乎仍然是其临床开发的主要障碍(Segal 等, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 1-6)。

近来, BsAb 概念已经延伸到包括双-双链抗体(di-diabodies)、四价双特异性抗体(tetravalent bi-specific antibodies), 其中在各 H 链和 L 链上的 V_H 结构域和 V_L 结构域已经被 scFv 结合结构域的工程对(engineered pairs)置换。虽然这类构建体的工程改造十分复杂, 但是仍可在哺乳动物的培养细胞中进行装配而不出现异二聚体丰余性(Lu 等, (2003) *J. Immunol. Methods*, 279, 219-232)。

免疫球蛋白的结构是本领域众所周知的。大多数天然免疫球蛋白包含两条重链和两条轻链。重链通过大约位于每条重链中部的铰链区之间的二硫键互相结合。轻链在铰链区的 N 端一侧上与每条重链结合。每条轻链通过铰链区附近的二硫键正常结合到其各自的重链上。

当 Ig 分子正确折叠时, 每条链折叠成多个由更线性多肽序列结合的特殊球状区。例如轻链折叠成可变区(V_L)和恒定区(C_L)。重链有邻近轻链可变区的单个可变区 V_H 、第一恒定区、铰链区和两个或三个另外的恒定区。重链(V_H)和轻链(V_L)可变区的相互作用导致抗原结合区(Fv)形成。通常 V_H 和 V_L 都需要最佳的抗原结合, 尽管重链二聚体和氨基端片段在没有轻链时仍显示保持活性(Jaton 等, (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195)。

随着新的分子生物学技术的出现, 在人 B 细胞增殖性疾病(重链疾病)和鼠模型系统中鉴定出存在仅有重链的抗体(缺乏轻链)。重链疾病的分子水平分析显示, 基因组水平上的突变和缺失可导致重链 C_H1 结构域不当表达, 引起缺乏结合轻链能力的仅有重链的抗体进行表达(参见 Hendershot 等, (1987) *J. Cell Biol.*, 104, 761-767; Brandt 等, (1984) *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1270-1277)。

对得自噬菌体文库的分离的人 V_H 结构域进行的独立研究(Ward 等, (1989) *Nature*, 341, 544-546)证实了 V_H 结构域的抗原特异性结合,

但是这些 V_H 结构域一般但不总是被证明具有相对低的溶解度(参见 Jespers 等, (2004) *J. Mol. Biol.* 337, 893-903)。

使用其它脊椎动物物种的研究显示, 作为天然基因突变的结果, 骆驼(camelid)产生功能性仅有 IgG2 和 IgG3 重链的二聚体, 由于缺乏 C_H1 轻链结合区而无法结合轻链(Hamers-Casterman 等, (1993) *Nature*, 363, 446-448), 鲨鱼等物种产生可能与哺乳动物 T 细胞受体或免疫球蛋白轻链有关的仅有重链样(heavy chain-only-like)结合蛋白家族(Stanfield 等, (2004) *Science*, 305, 1770-1773)。

仅有骆驼重链的抗体的一个特征是骆驼 V_H 结构域, 相对于天然人 V_H 结构域, 其溶解度和稳定性提高。可以对人 V_H 结构域进行工程改造以改进溶解特性(参见 Davies 和 Riechmann, (1996) *Protein Eng.*, 9(6), 531-537; Lutz 和 Muyldermans, (1999) *J. Immuno. Methods*, 231, 25-38), 或者可通过体内自然选择获得溶解性(参见 Tanha 等, (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 24774-24780; Jespers L., Schon O., James L.C., Veprintsev D., Winter G., *J. Mol. Biol.* 2004 年 4 月 2 日; 337(4):893-903)。然而, 尽管应用亲和力提高策略, 包括例如亲和力热点随机化(affinity hot spot randomisation), 但是得自噬菌体文库的 V_H 结合结构域对抗原的内在亲和力仍保持在低的微摩尔至高的纳摩尔浓度范围内(Yau 等, (2005) *J. Immunol. Methods*, 297, 213-224)。

scFv 当从宿主细胞中产生并回收, 或者当在还原的细胞内环境中作为胞内抗体产生时, 由于其内在不稳定性和无效折叠而存在局限性(参见 der Maur 等, (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 45075-45085)。与 V_H 结构域相比, 作为骆驼 V_{HH} 的典型例子, 相对于常规抗体片段显示较高热力学稳定性(Dumoulin 等, (2002) *Protein Science*, 11, 500-515), 即使在非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂存在下, 以及在尿素等非常苛刻的变性条件下, 也能保持功能稳定性(Dolk 等, (2005) *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 442-450), 保持从非常苛刻的制备环境中以高产量回收功能性抗体复合体的重要特性, 保持在体内和体

外维持产品结构和功能的完整性。 V_{HH} 和骆驼源化 V_H 抗体结构域 (camelised V_H antibody domains) 或工程 V_H 抗体结构域显示, 比起较大的常规抗体片段, 感染因子 (infectious agent) 的靶标穿透潜力较大 (Stijlemans 等, (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 1256-1261), 当用作 PK15 培养细胞的“胞内抗体”时, 可保持细胞内的结构和功能稳定性, 阻断猪反转录病毒的产生 (Dekker 等, (2003) *J. Virol.* 77, 12132-12139)。

骆驼 V_H 抗体的特征还在于修饰的 CDR3 环。这种 CDR3 环平均比非骆驼抗体中存在的长, 被认为是主要影响整体抗原亲和力和特异性的特征, 这似乎补偿了仅有骆驼重链的抗体物种中 V_L 结构域的缺失 (Desmyter 等, (1996) *Nat. Struct. Biol.*, 3, 803-811, Riechmann 和 Muyldermans, (1999) *J. Immunol. Methods*, 23, 25-28)。

最近, 已经开发出在转基因哺乳动物中生产仅有重链抗体的方法 (参见 WO02/085945 和 WO02/085944)。可以通过抗原攻击从转基因哺乳动物 (优选小鼠) 产生任何可能类别 (IgM、IgG、IgD、IgA 或 IgE) 的以及得自任何哺乳动物 (包括人) 的功能性仅有重链的抗体。

仅有重链的单克隆抗体可通过标准克隆技术从脾脏 B 细胞回收, 或者通过噬菌体展示技术从 B 细胞 mRNA 回收 (Ward 等, (1989) *Nature* 341, 544-546)。得自骆驼或转基因动物的仅有重链的抗体具备高度亲和力。根据转基因小鼠中通过抗原攻击所产生的抗体的结构研究表明, 骆驼源化的人 V_H 抗体多样性主要是由体内成熟过程驱动的, 取决于 VDJ 重组事件和体细胞突变。然而, 与骆驼 V_{HH} 不同, 当 CDR3 区得自人 D 区和 J 区时, 骆驼源化的人 V_H 缺乏 CDR3 环 (参见 Janssen 等, (2006) *PNAS* 103 (41):15130-5, Epub 2006 年 10 月 2 日* 和 PCT/GB2005/002892)。

在仅有重链的抗体 (例如仅有骆驼 V_{HH} 重链的抗体和仅有骆驼源化的人 V_H 重链的抗体) 中所发现的 V_H 结构域的一个重要的共同特征是, 每个区都结合成为单体, 而不依赖于与 V_L 区二聚化以达最佳溶解度和结合亲和力。这些特征似乎特别适于生产阻滞剂和组织渗透剂

(有关综述参见 Holliger, P.和 Hudson, P.J. (2005) *Nature Biotechnology* 23, 1126-1136)。

然而, 在仅有重链的抗体中所发现的 V_H 结构域的益处早已被用于多聚体蛋白作为试剂、治疗药和诊断用药的辅助设计, 尽管通过天然抗体铰链区结合的两个 V_H 结构域已被证实保留了双特异性构建体或二价构建体内的结合特征(Conrath 等, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 7346-7352)。

结合二聚化结构域掺入多个结合结构域比使用 scFv 的类似方法有着明显的优势, scFv 必须由 V_H 结构域和 V_L 结构域改造, 伴随着相关特异性和亲合力丧失的可能, 由于接头肽存在所致的抗原性风险增加, 且相对于 V_H 结合结构域缺乏内在稳定性。得自抗体相关基因家族(如 T 细胞受体)或鲨鱼免疫球蛋白家族的 V_H 结合结构域也为产生双特异性或多特异性结合分子提供了 scFv 的替代品。

重链 C_{H2} 和 C_{H3} 恒定区结构域的存在为天然抗体中所观察到的稳定的二聚化提供了基础, 并且除重链效应子功能以外, 还提供翻译后糖基化的识别位点。 C_{H2} - C_{H3} 二聚化结构域已用于设计在其氨基端和羧基端携带 scFv 结合结构域的四聚体单特异性同二聚体(tetrameric monospecific homodimer)或二价双特异性同二聚体(参见 Jendreyko 等, (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 47812-47819)或 scFv 结合结构域和受体结合蛋白的组合(Biburger 等, (2005) *J. Mol. Biol.* 346, 1299-1311)。 C_{H2} - C_{H3} 结构域还一直用来利用见于仅有重链抗体的骆驼源化 V_H 结构域和美洲驼 V_{HH} 结构域来构建二价双特异性同二聚体(PCT/GB2005/002892)。

本领域仍需要改进现有 scFv 结合技术, 提供可溶且结构上稳定的、抗原特异性的一价、二价或多价多肽结合复合体。二聚化结构域可包含缺乏重链效应子功能的天然或工程免疫球蛋白 C_{H2} - C_{H3} 二聚化结构域, 例如得自 IgG4 的 C_{H2} - C_{H3} (参见 Bruggemann, M.等, *J. Ex. Med.* (1987) 166, 1351-1361)。优选掺入不是 C_{H2} - C_{H3} 的二聚化结构域。优选所得多肽结合复合体的分子量不超过 120kDa, 以便当体内给予时使

组织穿透性最大。

发明简述

本发明提供 VH 结合结构域(如本文定义)单用或与其它结合结构域(但不包括 scFV)联用以产生多肽结合复合体的方法。

本发明提供包含第一重链和第二重链的二聚体的多肽结合复合体, 其中每条重链都包含氨基端 VH 结合结构域(如本文定义)、羧基端 VH 结合结构域(如本文定义)和优选缺乏 C_H2-C_H3 二聚化功能的二聚化结构域。

本文所用术语“VH 结合结构域”包括天然 VH 结合结构域, 例如通过单个 V、D 和 J 基因区段之间重组紧接着经体细胞突变所产生的仅重链基因座所表达的 VH 结合结构域。术语“VH 结合结构域”包括得自脊椎动物(包括鲨鱼、骆驼和人)的任何天然存在的抗原结合结构域。如果 VH 结合结构域得自骆驼或其它天然的仅有重链的抗体, 则被称为 V_{HH} 结构域。如果 V_H 结构域得自或衍生自抗体而非仅有重链的抗体, 则被称为 V_H 结构域。“VH 结合结构域”包括 V_H 结构域或 V_{HH} 结构域, 通过筛选或改变其特征的工程改造而被改变。例如, 在某些条件下的稳定性或溶解度可被改变。V_H 结构域也可通过筛选或工程改造变成更类似于其它物种的 V_H 结构域或 V_{HH} 结构域。例如, 人 V_H 结构域的 V 区可变得更类似于骆驼 V_{HH} 结构域中所见的 V 区。术语“VH 结合结构域”还包括能够起 V_H 结构域作用的同源物、衍生物或蛋白片段, 例如 VL 结合结构域。本发明包括所有这些实施方案。

或者, 多肽结合复合体可包含第一重链和第二重链的二聚体, 其中每条重链都包含一个或多个串联的并被铰链区分隔开的额外的氨基端 VH 结合结构域; 以及一个或多个串联的及被铰链区分隔开的额外的羧基端 VH 结合结构域。

对于治疗方面的应用, 二聚化结构域优选为人源的, 并可根据应用而包含天然或工程糖基化位点以提高血浆稳定性, 或者可缺乏所有

的翻译后修饰位点以提高血浆清除率或减少掩蔽,从而提高靶识别和靶结合。而体内性能标准(例如组织穿透性或血浆清除率)是必需的,完整多肽结合复合体的大小应优选不超过 120kDa。

如果包含 V_H 结合结构域的多肽结合复合体被用作胞内抗体(参见 Dekker 等, (2003) *J. Virol.* 77, 12132-12139), 则可掺入额外的胞内信号转导特性以测定例如核内定位或膜定位(参见例如 Jendreyo 等, (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 47812-47819)。对于制造目的, 还可将信号肽在多肽结合复合体的氨基端掺入载体中, 以促进从所选的生产细胞(例如酵母、昆虫或哺乳动物细胞)中合成和分泌组装的多肽复合体。二聚化结构域可包含同二聚体或异二聚体。

在一个实施方案中, 第一重链的二聚化结构域不同于第二重链的二聚化结构域, 因此多肽结合复合体是包含不同多肽的异二聚体(异二聚体)。

在一个替代实施方案中, 第一重链的二聚化结构域与第二重链的二聚化结构域相同, 因此多肽结合复合体是包含两种相同多肽的同二聚体(同二聚体)。

本发明的 V_H 结构域可具有相同的特异性, 或者它们可具有不同的特异性。如果多肽结合复合体包含 4 个 V_H 结构域, 则这些结构域可为四价单特异性、二价双特异性、三特异性或四特异性的。如果有 4 个以上的 V_H 结构域, 则可预期多肽结合复合体具有符合额外 V_H 结构域的更高水平的特异性。例如, 具有 8 个 V_H 结构域的多肽复合体可具有八特异性。

如果需要快速清除或提高组织穿透性, 则优选多肽结合复合体的大小不超过 120kDa。

在一个替代实施方案中, 一个或多个但并非所有的 V_H 结构域可被一类替代多肽结合结构域取代。优选替代结合结构域为细胞因子、生长因子、受体拮抗剂、受体激动剂或配体。

优选二聚化结构域和/或一条或两条重链的氨基端结合结构域或

羧基端结合结构域被柔性铰链区分隔开。

本发明还提供编码本发明第一重链、第二重链或两条重链的分离的核酸。本发明还提供包含分离的核酸的载体。本发明还提供用载体转化的细胞。

在另一个实施方案中，本发明提供本发明的多肽结合复合体的生产方法，该方法包括培养用包含编码第一重链、第二重链或两条重链的核酸的载体转化的宿主细胞。

本发明的 VH 结合结构域、二聚化结构域或接头多肽可通过合成路线(例如肽化学法或化学缀合)制备。

多肽结合复合体可进行聚乙二醇化以提高体内稳定性。

本发明还提供包含本发明的多肽结合复合体的药物组合物。本发明还提供通过给予患者本发明的药物组合物或载体来治疗患者的方法。

本发明还提供本发明的多肽结合复合体在制备用于预防或治疗疾病的药物中的用途。

本发明还提供将本发明的多肽结合复合体用作诊断剂、试剂、抗体酶、抑制剂、细胞化学试剂、造影剂或胞内抗体。

多肽结合复合体包含与分子氨基端和羧基端两端的 VH 结合结构域排列在一起的二聚化结构域。任选二聚化结构域和 VH 结合结构域被柔性多肽接头分隔开。优选的构型包含四价单特异性多肽 VH 结合复合体和二价双特异性多肽 VH 结合复合体(参见图 1-5)。

VH 结合结构域可得自任何脊椎动物，尽管优选为人源的。这类 VH 结合结构域可得自天然来源(例如骆驼、转基因动物或鲨鱼)或选自合成文库阵列(例如噬菌体或酵母 VH 展示文库)。可以对 VH 结合结构域进行工程改造以改进物理特性(例如溶解度和稳定性)，或使之人源化以避免或降低抗原性。VH 的定义包括得自免疫球蛋白重链、免疫球蛋白轻链、T 细胞受体或类似分子的任何天然多肽结合结构域，但是不包括其中结合位点是由四聚体抗体(H_2L_2)的 V_H 结构域和 V_L 结

构域进行工程改造而得到的工程 scFv 分子。

二聚化结构域包含得自天然来源(优选人)的同二聚体或异二聚体,它在生理条件下是稳定的。二聚化结构域可不经工程改造加入附加的效应子功能,或者可经工程改造加入附加的效应子功能。这些可包括但不限于翻译后修饰(磷酸化和糖基化)的位点、聚乙二醇化、酶、细胞毒性和造影、免疫刺激和受体结合功能的位点。

本发明还提供包含编码本发明 VH 多肽结合复合体和二聚化结构域的核苷酸序列的载体以及用这种载体转化的宿主细胞。

本发明还提供本发明的多肽结合复合体在制备药物中的用途。本发明的多肽结合复合体还可用作造影剂、诊断剂、试剂、抗体酶或抑制剂。还提供的有包含本发明多肽结合复合体和药理学上合适的载体的药物组合物。本发明的多肽结合复合体还可用作胞内抗体,不论是作为能够指导多肽结合复合体在靶细胞进行胞内合成的载体递送到靶细胞,还是作为蛋白质复合体用于胞内摄取且随后在靶细胞内起胞内功能而递送。

发明详述

本发明的发明人之前曾表明(参见 WO02/085945、WO02/085944 和 PCT/GB2005/002892),可以用“微基因座(micro loci)”产生转基因动物,特别是小鼠,微基因座产生仅有类别特异性(class-specific) VH 重链的抗体或不同类别的仅有 VH 重链的抗体的混合物,这些抗体是由浆细胞或 B 细胞响应抗原攻击而分泌的。然后这些转基因动物可被用来利用已建立的杂交瘤技术产生可靠供应的类别特异性仅有重链的抗体,或者作为功能性骆驼 V_{HH} 结合结构域或仅有 V_H 重链的结合结构域,优选可溶性人源仅有 V_H 重链的结合结构域的来源。同样地,所需特异性的 VH 结合结构域可源自噬菌体、酵母或类似构建的展示文库。

功能性 VH 结构域可以在细菌系统中克隆并表达,产生保留抗原结合、特异性和亲和力的 V_H 结合结构域。此外,不论是存在于二聚

化结构域的氨基端还是羧基端, VH 结合结构域均保留了功能性。这些特征已被用来利用免疫球蛋白重链 C_H2-C_H3 二聚化区作为同源二聚化结构域构建二价双特异性同二聚体 VH 结合分子(参见 PCT/GB2005/002892)。

总之, 这些观察结果对于通过利用功能上稳定的可溶性 V_H 结构域对抗体工程改造进行改进和简化都具有重要的意义。四价单特异性 VH 结合复合体或二价双特异性 VH 结合复合体可用同二聚化结构域或异二聚化结构域来装配, 并可用培养细胞(例如细菌、酵母、昆虫、植物或哺乳动物细胞)或者通过转基因生物(例如哺乳动物、昆虫、植物等)表达和装配, 而不需要结合结构域(scFv)大量前期的工程改造, 不需要化学交联或者不需要从错配结合结构域的异源混合物中分离出产物。

相对于 scFv (28kDa)或 Fab (55kDa)结合结构域, V_H 结构域较小(大约 15kDa)。大小差异以及重链效应子功能存在与否对体内蛋白复合物的药代动力学特征和生物分布都有显著作用。因此, 具有快速组织穿透性和较高靶标保持力, 缺乏某些或所有效应子功能并且从血流快速清除的小的可溶性多肽结合复合体, 在某些临床情况下优于组织穿透性差、结合了效应子功能和血清半衰期长的大 IgG 分子(参见 Holliger, P.和 Hudson, P. J. (2005) *Nature Biotechnology*, 23, 1126-1136 有关详细综述)。利用大多数天然 C_H2-C_H3 二聚化结构域将重链效应子功能加到 VH 多肽结合复合体上。利用得自 IgG4 或替代的同二聚化结构域或异二聚化结构域的 C_H2-C_H3 结构域允许在不存在重链效应子功能、但按需要掺入另外所需功能特征的情况下, 以受控制的方式进行工程改造以限制大小。

通过需要非共价相互作用的独特类型的蛋白质间的界面, 蛋白质自我缔合形成二聚体和更高级的寡聚体, 有利于许多生物学功能(Ofran, Y.和 Rost, B. (2003) *J. Mol. Biol.* 325, 377-387)。特异性蛋白质二聚化是构成生物学功能、结构和控制所必需的(参见 Marianayagam

等, (2004) TIBS, 29, 618-625)。亮氨酸拉链是一种被充分表征的能够形成同二聚体和异二聚体的结构基序(Landschulz 等, (1988) Science, 240, 1759-1764)。C_{H1} 重链区和轻链恒定区形成稳定的异二聚体。某些真核转录蛋白(例如 TATA 结合蛋白)的羧基端, 形成稳定的同二聚体(Coleman 等, (1995) J. Biol. Chem. 270, 13842-13860)。已经鉴定和表征了若干其它的二聚化结构域(参见 Brown, J. H. (2006) Protein Science 15, 1-13)。一些但并非所有适于多肽结合复合体的开发。优选的二聚化结构域是人源的, 优选在特化组织中产生, 因此在不同蛋白质生产系统中制备时, 它们不可能作为同源污染物而存在。或者, 二聚化结构域当存在于天然蛋白质中时, 应为核定位或胞质定位的, 从而利用天然胞内膜结合过程, 使内源蛋白质与注定通过分泌途径分泌的二聚化多肽结合蛋白产物分离开。优选多肽二聚体的缔合/解离不依赖于磷酸化。

VH 多肽结合复合体, 尤其是人源的 VH 多肽结合复合体, 在医疗保健领域, 在作为药物、造影剂、诊断剂、抗体酶和试剂方面有着广泛应用, 同样还用于农业、环境和工业用途。

仅有重链的抗体及其片段

可以从例如上述经免疫的转基因动物的抗体生成细胞分离的 mRNA, 来克隆本发明的抗原特异性 VH 结合结构域。还可从噬菌体阵列(Ward 等, (1989) *Nature*, 341, 544-546)或类似阵列文库例如使用基于酵母的系统(Boder 和 Wittrup, (1997) *Nat. Biotechnol.*, 15, 553-7)中分离出克隆的 VH 结合结构域序列。然后可以在规模扩大的细菌、酵母或替代表达系统中单独或作为融合蛋白制备抗原特异性 VH 结合结构域。也可从通过免疫转基因小鼠经典方法所得到的特征性杂交瘤, 克隆编码 V_H 结合结构域的序列。然后, 可用这些序列产生抗原特异性 VH 结合结构域及其衍生物。

或者, 可以用酶裂解或化学裂解技术, 从分离的免疫球蛋白重链、

得自转基因动物或天然来源(鲨鱼和骆驼)的仅有重链的抗体产生含有 V_H 结构域的片段, 随后从其它裂解产物中分离出含有 V_H 结构域的片段(Jaton 等, (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195)。

如果 V_H 结合结构域是从特征性杂交瘤分离的, 则从 mRNA 得到的 V_H 结合结构域序列无需借助用噬菌体和其它展示系统所必需的额外筛选步骤, 便可以直接克隆到表达载体中, 以表征和优化选定 V_H 结合结构域的亲和力。

掺入重链二聚化和效应子区的 V_H 结合结构域的生产系统包括哺乳动物培养细胞(例如 B 细胞杂交瘤、CHO 细胞)、植物(例如玉米)、转基因山羊、兔、牛、绵羊和鸡及适于大量饲养技术的昆虫幼虫。其它生产系统, 包括病毒感染(例如昆虫幼虫和细胞系中的杆状病毒), 是细胞培养和种系方法的替代方法。其它生产方法也为本领域技术人员所熟知。生产仅有骆驼重链的抗体或仅有 V_H 结合结构域合适方法为本领域所知。例如, 已在细菌系统中生产出骆驼 V_H 结合结构域, 并已在杂交瘤和转染的哺乳动物细胞中生产出仅有骆驼重链的同二聚体(参见 Reichmann 和 Muylldermans, (1999) *J. Immunol. Methods*, 231, 25-38)。

也适当建立了使用噬菌体展示技术所得到的工程人 V_H 结合结构域的表达方法(Tanha 等, (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 24774-24780 及其中的参考文献)。

得自转基因蝇系(fly line)的幼虫显示, 产生的功能性仅有重链的抗体片段的特征与哺乳动物细胞所产生的同一抗体没有区别(PCT/GB2003/0003319)。

本发明还提供包含多肽结合蛋白或其片段、编码本发明的 V_H 结合结构域和二聚化结构域的载体。

本发明还提供用本发明的载体转化的宿主细胞。

第一方面, 本发明提供多肽结合复合体, 该多肽结合复合体包含在缺乏 C_H2-C_H3 重链效应子功能的二聚化结构域的羧基端和氨基端融

合的抗原特异性 VH 结合结构域。这些多肽结合复合体保留了抗原特异性 VH 结合结构域所赋予的生理学功能，以及天然存在或工程改造至二聚化结构域的其它寻靶功能或效应子功能。这类多肽结合复合体可以是功能性单特异性四聚体结合复合体、二价双特异性结合复合体或四特异性结合复合体的形式。VH 结合结构域存在于结合分子的氨基端和羧基端(例如参见图 1)。二聚化结构域可以为同二聚体或异二聚体，这取决于所需要的最终功能性多肽结合复合体的设计。

这种排列的优势是多方面的。存在的两个或更多个相同的 V_H 结构域以协同方式发挥作用，为结合分子提供比仅有单个 VH 更大的亲和力和亲合力。不仅仅四聚体 VH 产物(例如药物)比单体或二聚体的 VH 形式具有更大的潜在功效，而且还可以由作为不含错配污染结合序列的单一产物的单个克隆基因序列，产生作为蛋白质同二聚体装配的四价单特异性多肽结合复合体。二价双特异性多肽结合复合体可促进不同靶标的交联，同时还保持两个 VH 结合结构域对各自抗原的有益的协同效应。例如，可以利用双特异性多肽复合体来提高细胞间的相互作用或细胞/病原体间的相互作用。在该实施方案中，例如，可以利用本发明的多肽复合体来桥接两种细胞类型，例如红细胞和病原体(参见 Taylor 等，(1991) PNAS 88, 3305-3309)。可以用双功能性以便同时抑制酶途径的两个组分(Jendreyko 等，(2003) J. Biol. Chem. 278, 47812-47819)。

可以用双功能性使效应子部分非常接近于靶细胞。优选各结构域的氨基端的 VH 结合结构域是相同的，并且羧基端的也是相同的(只是识别不同于氨基端的抗原或表位)，这有利于 VH 结合结构域对的协同性结合。

本文所用术语“效应子部分”包括介导细胞中所需生物学效应的任何部分。优选效应子部分为可溶的，并且可为肽、多肽或蛋白质，或者可为非肽结构。例如，效应子部分可为酶、激素、细胞因子、药物、前药、毒素(特别是蛋白质毒素)、螯合结构中的放射性核素、造

影剂、白蛋白或抑制剂。效应子部分可为细胞(例如 T 细胞)、肽、多肽或蛋白质,或者可为非肽结构。与 VH 结合结构域缔合的效应子部分的性质可为细胞性质、蛋白质性质、有机性质或无机性质,这取决于所需效应。

白蛋白、免疫球蛋白或其它血清蛋白可用作效应子部分以提高抗原特异性 VH 结合结构域的稳定性或药代动力学和/或药效动力学性质(Sung 等, (2003) *J. Interferon Cytokine Res.*, 23 (1): 25-36; Harmsen 等, (2005) *Vaccine*, 23 (41) 4926-4934)。或者,效应子部分可为聚乙二醇化结构或天然糖基化结构,以改善药效动力学性质。

多肽二聚化结构域

本发明的发明人已经认识到,任何多肽结合复合体的性质不仅仅只取决于最终多肽结合复合体中所掺入的 VH 结合结构域。整个复合体的大小对体内复合体的药代动力学特征和制造是否容易都具有重大影响。而且,根据多肽结合复合体设计的二聚化结构域,可包含另外的效应子活性。因此,在本发明的第二方面,多肽复合体包含大小受到限制以利于组织穿透的二聚化结构域。本发明第二方面提供二聚化结构域,其中二聚化结构域可包含同二聚体或异二聚体。优选二聚化是通过非共价相互作用。

二聚化结构域在二聚化结构域的氨基端和羧基端与 VH 结合结构域共价连接。

任选多肽结合复合体包括连接 VH 结合结构域和二聚化结构域的天然或工程柔性铰链样结构域。铰链区的存在有利于所得多肽结合复合体上 VH 结合结构域的独立功能。

任选二聚化结构域可包含其它有用的功能,或者可经工程改造以掺入额外的特征,例如糖基化、聚乙二醇化、细胞表面受体结合或抗体标记或结合蛋白识别的识别序列。可对二聚化结构域进行工程改造,通过引入或剔除例如额外的半胱氨酸残基而使缔合最优化。

小型二聚化结构域(例如亮氨酸拉链)可作为单体或串联对(tandem pairs)存在以提高稳定性。额外的 V_H 结构域可用来连接串联二聚化结构域。

优选二聚化结构域的大小不超过 60kDa, 多肽结合复合体的大小约为 120kDa 以提高组织穿透性。

优选的二聚化结构域包含得自天然(人)蛋白质的小结构域。这些包括在许多基因调节蛋白中存在的 30 个氨基酸的亮氨酸小拉链基序(Landschulz 等, (1988) Science, 240, 1759-1764)。这种方法之前曾被用来产生双特异性 $F(ab')_2$ 异二聚体(Kostelny 等, (1992) J. Immunology 148, 1547-1553)。可对拉链进行工程改造以增加给定异二聚化复合体的特异性(Loriaux 等(1993), PNAS 90, 9046-9050)。

本发明第一方面和第二方面的二聚化结构域可以是能够形成同二聚体或异二聚体蛋白质间相互作用的任何蛋白质、肽片段或共有序列, 例如见于以下组分之间的蛋白质、肽片段或共有序列: 免疫球蛋白重链恒定区的 C_{H2} - C_{H3} 区、免疫球蛋白重链的 C_{H1} 结构域与免疫球蛋白轻链的恒定区或 TATA 结合蛋白 180 个氨基酸羧基端结构域的同源二聚化(Colemen 等, (1995) J. Biol. Chem. 270, 13842-13849); VCAM 与 VLA-4; 整联蛋白与胞外基质蛋白; 整联蛋白与细胞表面分子, 例如 CD54 或 CD102; ALCAM; 亮氨酸拉链异源二聚化结构域; 谷胱甘肽转移酶; SRCR 结构域提供了备选实例。

本发明第一方面和第二方面的示例性的多肽结合复合体可用于细胞化学标记、导向方法或导向疗法。例如:

1. 如果氨基端抗原特异性 VH 结合结构域靶向癌细胞表面标记, 则羧基端 VH 可以结合包含前药转化酶的效应子部分。氨基端抗原特异性 VH 结合结构域结合到靶标上, 羧基端 VH 使效应子部分非常接近于该靶标, 从而使效应子部分可以在前药存在下对该靶标发挥生物学效应(例如硝基还原酶或 DT 心肌黄酶与 CB1954)。

2. 如果氨基端和羧基端 VH 结合结构域靶向细胞因子(例如

TNF α), 则协同起作用的所有 4 个结合结构域在发挥作用时的亲合力和亲和力大于仅有 V_H 单体或二聚体的亲合力和亲和力。或者, 氨基端 V_H 结合结构域可以结合细胞因子, 羧基结构域可结合血清白蛋白, 从而提高活性复合体的血清半寿期。

关于本发明上述所有方面所用的术语“结合结构域”, 包括在生理介质中具有效应子活性的任何多肽结合结构域。这类多肽结合结构域还必须具有在生理条件下结合靶标的能力。

V_H 结合结构域可包含骆驼 V_H 结构域, 或者可包含从非骆驼物种中所获得的 V_H 结构域。优选 V_H 结合结构域为人 V_H 结合结构域。V_H 结合结构域优选为 B 细胞来源, 得自转基因动物或骆驼(如上所述), 与得自合成噬菌体文库的 V_H 结构域不同, 因为前者由于其在响应体内抗原攻击时通过 VDJ 重排和体细胞突变而产生, 将有较高的亲和力。

本发明第三方面, 某些或所有 V_H 结合结构域可以被替代蛋白结合结构域取代。优选取代发生在氨基端或者发生在羧基端, 但不同时发生在两端。

这类结合结构域包括可以介导结合或粘附在细胞表面的结构域。可用于本发明多肽复合体的合适结构域为哺乳动物、原核细胞和病毒细胞黏着分子、细胞因子、生长因子、受体拮抗剂或激动剂、配体、细胞表面受体、调节因子、结构蛋白和肽、血清蛋白质、分泌性蛋白、质膜相关蛋白、病毒抗原、细菌抗原、原生动物抗原、寄生虫抗原、脂蛋白、糖蛋白、激素、神经递质、凝血因子等等, 但不包括工程单链 Fv。

多核苷酸序列、载体和宿主细胞

本发明还提供编码本发明任一多肽结合复合体的多核苷酸序列、包含一个或多个上述多核苷酸序列的载体和用编码本发明多肽结合复合体的一种或多种载体转化的宿主细胞。多核苷酸优选包括允许表

达的多肽结合复合体作为同二聚体或异二聚体分泌到宿主细胞生长培养基中的序列。该宿主细胞可包括但不限于细菌和酵母、昆虫、植物和哺乳动物宿主细胞。

此外，本发明提供表达至少一种本发明的同二聚体或异二聚体多肽结合复合体的转基因生物。该转基因生物可以是非人脊椎动物或哺乳动物、植物或昆虫。

生产用于医疗保健应用的多肽结合复合体需要大规模的制造系统，上面详细论述了该系统的实例。这类系统包括植物(例如玉米)、转基因牛、绵羊和鸡，还包括适于大量饲养技术的昆虫幼虫。其它生产系统，包括病毒感染(例如昆虫幼虫和细胞系中的杆状病毒)作为细胞培养和种系方法的替代方法也为本领域技术人员所熟知。

可以采用这些方法和本领域已知的其它合适方法来生产本发明的多肽结合复合体。可用这些方法进行同二聚体和/或异二聚体的生产。

本发明的多肽结合复合体的用途

本发明的多肽结合复合体有多种用途。例如，本发明的多肽结合复合体包括单特异性、双特异性和多特异性多肽复合体。这些复合物是特别有利的，例如作为治疗药用于治疗、预防和诊断疾病。本发明的多肽结合复合体可用于细胞化学标记、导向方法、治疗和诊断用药。

在单一抗体疗法中，病原体逃逸(pathogen escape)，例如由于突变而导致丧失单一结合位点，将丧失抗体的治疗作用。在识别同一病原体上不同抗原的二价双特异性多肽结合复合体的产生能够克服这一问题。本发明多肽结合复合体上具有不同特异性的两个 VH 结合结构域的应用还可用来提高细胞间的相互作用和细胞/病原体间的相互作用。

在本实施方案中，本发明的多肽复合体可用来例如桥接两种细胞类型(例如病原体与巨噬细胞，或肿瘤细胞与 T 细胞)之间的多肽复合

体。或者，多肽复合体可以识别具有效应子功能的同一病原体上的两种或更多种表位，该效应子功能由二聚化结构域内和铰链序列内的受体识别结构域或者插入二聚化结构域与铰链序列之间的受体识别结构域提供。

或者，双特异性多肽结合复合体可在体内用来靶向细胞和组织，继而俘获循环的效应子分子或造影剂。例如双特异性肿瘤靶向药(targeting agent)可用来俘获前药转化复合物，用于随后前药定位转化成反应剂。双特异性和多特异性结合复合体与效应子成分组合，还可根据结合结构域的选择来结合并消灭一种或多种病原体。或者，识别同一病原体上不同抗原的两个或更多个结合结构域的存在，提供了临床优势，并减少了病原体逃逸的可能性以及因病原体内的突变而出现药物过剩。

本发明第一方面提供 VH 结合结构域或其片段以及包括缺乏某些或所有重链效应子功能的天然或工程 C_H2-C_H3 二聚化结构域的二聚化结构域。根据本发明的第二方面，多肽结合复合体的大小不超过 120kDa，从而提高多肽结合复合体的组织穿透性。根据本发明第三方面，氨基端或羧基端 VH 结合结构域可用替代的结合结构域置换，scFv 除外。主要包含人序列的多肽结合复合体适于人用药物，因此本发明提供多肽结合复合体的药物组合物，所述多肽结合复合体包含 VH 结合结构域和二聚化结构域，其中 VH 结合结构域通过任选在氨基端和羧基端的铰链区连接到二聚化结构域。本发明还提供本发明的多肽结合复合体在制备用于预防和/或治疗疾病的药物中的用途。如果适当的话，多肽结合复合体和效应子部分可单独或共同配制。

药物组合物和药物通常在给予患者之前配制。

例如，多肽结合复合体可与稳定剂相混合，特别是如果要将其冻干的话。通常在冻干过程中添加糖(例如甘露醇、蔗糖或海藻糖)以提供稳定性，优选的稳定剂为甘露醇。人血清白蛋白(优选重组人血清白蛋白)还可作为稳定剂加入。也可使用糖的混合物，例如蔗糖与甘露醇、

海藻糖与甘露醇，等等。

可向组合物中加入缓冲液，例如 Tris 缓冲液、组氨酸缓冲液、甘氨酸缓冲液或优选磷酸缓冲液(例如含有磷酸二氢钠和磷酸氢二钠)。优选加入缓冲液以提供介于 7.2 和 7.8 之间的 pH, 特别是 pH 约为 7.5。

对于冻干后的重配，可使用注射用无菌水。用包含人血清白蛋白(优选重组人血清白蛋白)的含水组合物来重配冻干块也是可行的。

一般而言，多肽结合复合体可以纯的形式连同药理学上适当的载体一起使用。

因此，本发明提供治疗患者的方法，该方法包括给予患者本发明的药物组合物。患者优选为人，可以是儿童(例如初学步幼儿或婴幼儿)、青少年或成人，但一般为成人。

本发明还提供用作药物的本发明的多肽结合复合体。

本发明还提供本发明的多肽结合复合体在制备用于治疗患者的药物中的用途。

这些用途、方法和药物优选用于治疗以下一种疾病或病症并用于免疫疗法：伤口愈合、细胞增殖性疾病，包括赘生物、黑素瘤、肺肿瘤、结肠直肠肿瘤、骨肉瘤、直肠肿瘤、卵巢肿瘤、肉瘤、宫颈肿瘤、食管肿瘤、乳腺肿瘤、胰腺肿瘤、膀胱肿瘤、头颈部肿瘤和其它实体瘤；骨髓增殖性疾病，例如白血病、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、白细胞减少症、血小板减少症、血管生成疾病、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)；自身免疫性/炎性疾病，包括变态反应、炎性肠病、关节炎、银屑病和呼吸道炎症、哮喘、免疫疾病和器官移植排斥；心血管疾病和血管性疾病，包括高血压、水肿、心绞痛、动脉粥样硬化、血栓形成、脓毒症、休克、再灌注损伤和局部缺血；神经疾病，包括中枢神经系统疾病、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、脑损伤、肌萎缩性侧索硬化和疼痛；发育障碍；代谢疾病，包括糖尿病、骨质疏松症和肥胖症、AIDS 和肾病；感染，包括病毒感染、细菌感染、真菌感染和寄生虫感染、与胎盘相关的病理病症和其它病理病症。

在又一方面，本发明提供本发明的多肽结合复合体用作诊断性、预后性或治疗性造影剂的用途。

本发明提供本文所述仅有重链的抗体或其片段作为胞内结合试剂或抗体酶的用途。优选的仅有重链的抗体片段为可溶性抗原特异性VH结合结构域。

本发明还提供本发明的VH多肽结合复合体作为酶抑制剂或受体阻断剂的用途。

本发明还提供VH多肽结合复合体用作治疗药、造影剂、诊断剂、抗体酶或试剂的用途。

本发明还提供用作胞内结合剂(胞内抗体)的VH多肽结合复合体，并提供在靶细胞中起作用的胞内表达胞内抗体、包含VH多肽结合复合体的载体。

附图简述

图1：表示包含VH多肽结合结构域、通过铰链或接头序列连接的同源二聚化结构域的多肽结合复合体。VH多肽结构域位于二聚化结构域的氨基端和羧基端。

A. 表示四价单特异性多肽结合结构域

B. 表示二价双特异性多肽结合结构域

C. 表示一价四特异性多肽结合结构域

图2：表示异二聚化结合结构域的不同构型。

图3：表示四价单特异性多肽结合复合体的制备方案。

图4：表示具有GAG和HSP结合亲和力的双特异性二价多肽结合复合体的制备方案。

图5：表示包含一个以上氨基端和羧基端V_H结构域的双特异性四价抗体的实例。

图6：表示用*fos*和*jun*拉链结构域产生异二聚化双特异性二价结合分子流程。

图 7: PCR 结果。

通用技术

除非另有定义, 否则本文所用的所有科技术语均具有本领域普通技术人员通常所理解的含义(例如细胞培养、分子遗传学、核酸化学、杂交技术和生物化学)。标准技术用于分子、遗传和生化方法(一般参见 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 和 Ausubel 等, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 第 4 版, John Wiley & Sons, Inc.)以及化学方法。另外, Harlow 和 Lane, *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N. Y 被认是标准免疫学技术。

任何合适的重组 DNA 技术都可用于产生本发明的二价和多价多肽复合体、单一重链抗体及其片段。构建出包含编码多肽复合体或抗体每条链的 DNA 序列的典型表达载体(例如质粒)。可以采用使免疫球蛋白经酶促裂解和化学裂解并分离所得片段的任何适当建立的技术。采用适当建立的方法鉴定、分离和表征来自噬菌体展示文库和得自骆驼和转基因小鼠的杂交瘤的抗原特异性 VH 多肽结合结构域。

本发明还提供包括用于本发明多肽结合复合体构建和表达的构建体的载体。

应当理解的是, 可以构建含有编码不止一种多肽链的 DNA 序列的单一载体。例如, 可将编码带有相关 VH 结合结构域的异二聚体的两条不同多肽链的 DNA 序列, 插入到同一质粒的不同位置上。

或者, 可将编码每条多肽链的 DNA 序列, 各自插入质粒中, 从而产生多个构建质粒, 各自编码特定的多肽链。优选插入序列的质粒是相容的。

然后, 用各个质粒转化宿主细胞, 从而使每个宿主细胞都含有编码多肽结合复合体中每条多肽链的 DNA 序列。

可用于在细菌系统中克隆的合适表达载体包括质粒, 例如 Col E1、pcR1、pBR322、pACYC 184 和 RP4、噬菌体 DNA 或上述任一

种的衍生物。

用于在酵母系统中克隆的合适表达载体包括基于 2μ 来源的质粒。

含有合适的哺乳动物基因启动子序列的任何质粒都可用于哺乳动物系统中的克隆。昆虫或杆状病毒(baculoviral)启动子序列可用于昆虫细胞基因表达。这类载体包括得自例如 pBR322、牛乳头瘤病毒、反转录病毒、DNA 病毒和痘苗病毒的质粒。

可用于多肽复合体或抗体表达的合适宿主细胞包括细菌、酵母和真核细胞，例如昆虫或哺乳动物细胞系、转基因植物、昆虫、哺乳动物和其它无脊椎动物或脊椎动物表达系统。

本发明的多肽结合复合体

应当理解的是，术语“多肽结合复合体”包括从任何来源获得的同源多肽序列以及核酸序列，例如有关细胞的同源物，其它物种的同源物及其变异体或衍生物。

因此，本发明包括本文所述多肽结合复合体、VH 结合结构域和二聚化结构域的变异体、同源物或衍生物。

在本发明的内容中，同源序列被认为包括在至少 30 个以上的氨基酸水平，优选 50、70、90 或 100 个氨基酸水平上，具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9% 同一性的氨基酸序列，优选至少 98% 或 99% 同一性。尽管同源性也能用相似性(即具有相似化学性质/功能的氨基酸残基)来表示，但是在本发明的内容中，优选序列同一性来表示同源性。

本发明还包括用于制备本发明的多肽结合复合体、二聚化结构域和 VH 结合结构域而构建的表达载体和转化的宿主细胞。

各条链在同一宿主细胞中表达后，可被回收以提供完整的活性形式的多肽结合复合体或 VH。

可以想像在本发明优选的形式中，各个多肽结合复合体将由宿主细胞加工以形成二聚化多肽结合复合体，这最好由细胞中分泌出来。

用于制备重组抗体多肽结合复合体的技术参见上述参考文献，另可参见例如 EP-A-0 623 679、EP-A-0 368 684 和 EP-A-0 436 597。

本发明多肽结合复合体的用途

本发明的多肽结合复合体(包括其片段)可用于体内治疗性和预防性用途、体外和体内诊断用途、体外实验和试剂用途等。

本发明的多肽结合复合体的治疗性和预防性用途包括给予接受治疗的哺乳动物(例如人)上述成分。

优选给予哺乳动物至少 90-95%同质性的基本纯的多肽结合复合体(包括其片段)，对于药物用途，尤其当哺乳动物为人时，最优选 98-99%以上同质性。一旦部分纯化或达到所需同质性，就可用本领域技术人员已知方法，将本文所述多肽结合复合体用于诊断或治疗(包括用于体外)，或者可用于开发及实施测定方法。

本发明的多肽结合复合体一般以纯的形式连同药理学上适当的载体一起使用。这些载体通常包括水溶液或醇/水溶液、乳液或混悬液，可包括盐水和/或缓冲介质。胃肠外溶媒包括氯化钠溶液，林格氏葡萄糖(Ringer's dextrose)、右旋糖和氯化钠和乳酸盐林格氏液(lactated Ringer's)。

如果需要将多肽复合体保持在混悬液中，则合适的生理上可接受的辅料可选自增稠剂，例如羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、明胶和藻酸盐。

静脉内容媒包括例如基于林格氏葡萄糖的液体和营养补充剂和电解质补充剂。还可存在防腐剂和其它添加剂，例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体(Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版)。

本发明的多肽复合体和抗体(包括其片段)可用作单独给予的组合物或者与其它药物联用。这些可包括各种免疫治疗药物，例如环孢菌素、甲氨蝶呤、阿霉素、顺铂或免疫毒素。或者，多肽结合复合体可

与用于在其起效部位转化前药的酶联用。

药物组合物可包括各种细胞毒剂或其它药物与精选的本发明多肽结合复合体联用或甚至与精选的本发明多肽结合复合体混合的“鸡尾酒合剂(cocktail)”。

本发明药物组合物的给药途径可以是本领域普通技术人员通常已知的任何途径。对于疗法，包括但不限于免疫疗法，可以按照标准技术给予任何患者本发明的多肽结合复合体。可通过任何适当的方式给药，包括胃肠外、静脉内、肌内、腹膜内、经皮、经肺途径，或者也可适当地通过导管直接输注。给药剂量和频率根据患者年龄、性别和病情、联用的其他药物、禁忌症和其它参数由临床医生综合考虑后做出决定。

本发明的多肽结合复合体和抗体可冻干保存，可在临用前用合适的载体重配。可采用已知的冻干和重配技术。本领域技术人员要理解的是，冻干和重配可能导致不同程度功能活性的丧失，可以向上调整使用水平予以补偿。

当用作胞内抗体时，可用非病毒型或病毒型载体递送多肽结合复合体，或者可作为脂质体剂型或其它剂型递送，以便在所需靶细胞中摄取。

另外，本发明的多肽结合复合体可用于诊断目的。例如，本文所述 V_H 结合结构域可针对这样的抗原产生，即针对在疾病过程中特异性表达或者在特定疾病过程中水平发生变化的抗原产生。对于诊断或试剂目的，多肽结合复合体可包含结合同一抗原上的一个或多个表位的 V_H 结构域，或者一个或多个结合结构域可起捕获结构域(capture domain)的作用，捕获结构域或使多肽复合体与规定的底物结合，或与用于分析读数所需的定性或定量分析成分结合。

对于某些目的，例如诊断或跟踪目的，可以使用标记。合适的标记包括但不限于下列任何标记：放射性标记、NMR 自旋标记和荧光标记。本领域技术人员熟悉检测标记的方法。

可以给予含有本发明多肽结合复合体或其鸡尾酒合剂的组合物用于预防性和/或治疗性治疗。

含有一种或多种本发明多肽结合复合体的组合物可用于预防和治疗装置以有助于改变、灭活、杀死或清除哺乳动物体内所选择的靶细胞群体。另外，本文所述多肽结合复合体的精选成分可体外使用，或者体外在异源细胞集合体中选择性杀死、耗尽或另外有效清除靶细胞群体。

实施例

实施例 1

四价单特异性抗 α TNF 多肽结合蛋白

从 α TNF 攻击的转基因小鼠产生的先前已表征的仅有重链的 IgM 的单克隆抗体中获得构建体。V_H 结构域包含骆驼 V 区段和人 DJ 区和恒定区。

剔除了抗体的 C_H2C_H3 骨架后，用 C_H1 免疫球蛋白重链结构域和免疫球蛋白轻链恒定区替换。然后用修饰的铰链区，在每个构建体的羧基端复制和克隆 V_H 结构域。该铰链区类似于已有的 IgG2 铰链序列，有所改变是用脯氨酸置换半胱氨酸，以防止抗体二聚体中半胱氨酸交联，并且通过脯氨酸提供额外的柔性以防止第二抗体在空间上受到限制，否则这可能抑制其功能。

因此，用脯氨酸(下划线)置换半胱氨酸(灰色阴影)抑制了人 IgG2 铰链区中通常存在的二硫桥的形成。脯氨酸给铰链区增加了额外柔性，使得通过铰链区连接到二聚化结构域的 COOH 端的第二抗体结构域适当发挥功能。

正常 IgG 铰链序列(灰色阴影中的半胱氨酸密码子，加下划线的脯氨酸密码子)

GAGCGCAAATG**ITGIGT**CGAG**TGC**CCACCG**TGCC**CA (SEQ ID NO:1) 及其互补序列被

AGCTTCTGAGCGCAAACCACCAGTCGAG**CCAC**CG**CCAC**CA

C (SEQ ID NO:2) 及其互补序列
TCGAGTGGTGGCGGTGGTGGCTCGACTGGTGGTTTGCGCTCAGA
(SEQ ID NO:3)置换。这还为片段(白色框较链, 图 2, 中心)提供了与
具有用于克隆目的 HindIII (粗体字)和 XhoI (斜体字)位点相容的两条
单链末端。

用标准重组 DNA 技术, 将最终的构建体连接至含有鸡肌动蛋白
启动子和 CMV 增强子序列的 bluescript (pbluescript11 sk+)表达质粒
(图 22, 表达质粒)中。

让双链抗体表达质粒增殖, 并通过标准方法(Superfect)与质粒
pGK-hygro (允许筛选转染细胞)一起共转染到 CHO 细胞。在含有潮霉
素的培养基中筛选出阳性克隆, 通过对含有由 CHO 细胞分泌的双链
抗体的生长培养基进行标准 aTNF ELISA, 被明确鉴定为可表达双链
抗体。为了证实由质粒表达的蛋白质是相对于单体的二聚体, 在非还
原和还原条件下, 进行这些 ELISA 精选克隆的蛋白质印迹法。因此,
ELISA 和蛋白质印迹法同时表明, 双链抗体通过转染的 CHO 细胞表
达并作为二聚体分泌到培养基中, 且该抗体可与 aTNF 结合。aTNF VH
单体、二聚体与四聚体的结合亲和力的比较显示, 四聚体的结合亲和
力最大。

实施例 2

包含 VH 结合结构域和得自 IgG4 缺乏重链效应子功能的 C_H2C_H3 二
聚化结构域的双特异性二价多肽结合复合体

在针对大肠杆菌 HSP70 蛋白所产生的骆驼源化人 V_H 结构域的二
聚化结构域氨基端, 以及在针对 PERV gag 抗原(Dekker 等, (2003) J.
Virol. 77, (22) 12132-9)所产生的美洲驼 V_{HH} 结构域的羧基端进行了实
验。实验详情见 PCT/GB2005/002892)的实施例 2, 图 22、23 和 24,
只是 IgG2 C_H2-C_H3 二聚化结构域用人 IgG4 C_H2-C_H3 二聚化结构域置
换(Bruggemann, M.等, (1987) J. Ex. Med., 166, 1351-1361)。

包含多肽结合复合体的载体在 CHO 细胞中表达, 通过蛋白质印迹法显示, 分泌的多肽结合复合体与 HSP70 抗原和 gag 抗原两者结合。

实施例 3-5

可以使用其它二聚化结构域而不是用免疫球蛋白恒定区来产生多价多特异性结合分子, 例如 *jun* 和 *fos* 基因的亮氨酸拉链结构域与不同的(人) V_H 结构域组合。*jun* 拉链结构域可与 *fos* 拉链结构域异二聚化, 但它也可同二聚化。下面的两个实施例描述了使用这些拉链结构域的异二聚化和同二聚化。最后一个实施例描述了其它结构域的用途。

实施例 3. 使用 *fos* 和 *jun* 拉链结构域的异二聚化双特异性二价结合分子

产生这类分子的基本流程见图 6, 包括下列步骤:

1. 将针对 rTTA (Janssens 等, 2006) 所产生的 V_H 用引物进行 PCR 扩增, 该引物在 5' 一侧具有 EcoRI 位点(引物 1)并与前导序列同源, 在 3' 一侧与铰链区同源加上与 *fos* 和 *jun* 序列的 5' 端同源的序列(分别为引物 2 和引物 3)。标准 PCR 扩增产生 600 碱基对的 *fos* (图 6 实线) 或 *fos* (图 7 虚线) 的片段 A。

引物 1: CTGGAATTCTCACCATGGAGCTGGGGCTGAGC (SEQ ID NO:4)

引物 2: CGCTTGGAGTGTATCAGTCAGTGGGCACCTTGGGCACGGGGG
(SEQ ID NO:5)

引物 3: CAGCCGGGCGATTCTCTCCAGTGGGCACCTTGGGCACGGGGG
(SEQ ID NO:6)

2. 由编码 *fos* 或 *jun* 的人 cDNA 扩增 *fos* 和 *jun* 亮氨酸拉链区。引物的 5' 端含有与 rTT V_H 铰链区 3' 端同源的序列(分别为引物 4 和引物 5)。引物的 3' 端与拉链区的 3' 端同源(引物 6 和引物 7), 在 3' 端含有与存在于 A5 V_H (Janssens 等, 2006) 5' 端的铰链区 (PCT/GB2005/002892) 的 5' 端同源的序列。*fos* 和 *jun* 序列的扩增分别

产生各 200bp 的片段 B (图 6 实线)和片段 C (图 6 虚线)。

引物 4: CCCCCGTGCCCAAGGTGCCCACTGACTGATACACTCCAAGCG
(SEQ ID NO:7)

引物 5: CCCCCGTGCCCAAGGTGCCCACTGGAGAGAATCGCCCGGCTG
(SEQ ID NO:8)

引物 6: TGGTGGTTTGCGCTCAGAAGCCAGGATGAACTCTAGTTTTTC
(SEQ ID NO:9)

引物 7: TGGTGGTTTGCGCTCAGAAGCAACGTGGTTCATGACTTTCTG
(SEQ ID NO:10)

3. 不含任何半胱氨酸的铰链序列最先克隆 (如 PCT/GB2005/002892 中规定, ERKPPVEPPPPP)到 A5 VH 区(Dekker 等, 2003; Janssens 等, 2006)。铰链区和 A5 VH 随后用引物扩增, 其中一个引物与铰链区 5'端同源, 一个引物与包括终止密码子的 A5 VH 区的 3'端同源, 产生 400 碱基对的 fos 片段 D (图 6 实线)或 jun 片段 D (图 6 虚线)。

引物 8: GAAAACTAGAGTTCATCCTGGCTTCTGAGCGCAAACCACCA
(SEQ ID NO:11)

引物 9: CAGAAAGTCATGAACCACGTTGCTTCTGAGCGCAAACCACCA
(SEQ ID NO:12)

引物 10: GTCGAATTCTCATTCGAGGAGACGGTGACCTGGGTC (SEQ
ID NO:13)

4. 将片段 A (图 6 实线)、片段 B 和片段 D (图 6 实线)按等摩尔量混合, 将片段 A (图 6 虚线)、片段 C 和片段 D (图 6 虚线)按等摩尔量混合, 变性, 用引物 1 和引物 10 进行 PCR 扩增, 产生 1200 碱基对的片段(参见图 7, rTTA-fos-A5 下, 在 A5 序列 5'端含有特征性 XhoI 位点)。

5. 通过标准方法将 rTTA-foszip-A5 和 rTTA-junzip-A5 克隆到酵母(毕赤酵母(*Pichia*), Invitrogen)或标准 CHO (介于 CAG 启动子与 polyA 位点之间)表达载体中。将这些构建体分别导入酵母和 CHO 细胞。

6. 收集培养基和细胞, 用 ELISA 分析表明, 它们仍然结合 rTTA

和 A5，天然蛋白质印迹显示它们是二聚化的。

实施例 4

通过与实施例 3 所述方法相同的方法，但只进行了 jun 拉链部分的实验，本实施例也显示出同二聚化。用实施例 2 的相同方法使 rTTA-junzip-A5 在毕赤酵母或 CHO 细胞中表达，表明形成 rTTA 与 A5 的结合同二聚体。

实施例 5

实施例 3 和实施例 4 所述的类似方法还可用于其它同二聚体或异二聚体形成结构域。对于这些实例，用于实施例 2 步骤 2 的引物可能与这类其它的二聚化结构域同源，用于步骤 1 和步骤 3 的寡核苷酸可能具有与能够进行步骤 4 的这些结构域重叠的末端。

在所有实施例中，可以使用其它 VH 结构域或 VL 结构域或其它结合结构域，例如转录因子 DNA 结合结构域或配体结合结构域。

在以上说明书中提及的所有出版物都通过引用结合到本文中。

对于本领域技术人员来说，在不偏离本发明范围和精神的情况下，对本发明所述方法及系统的各种修改和变化是显而易见的。虽然已结合具体优选的实施方案描述了本发明，但是应理解本发明不得不得当地局限于这些具体实施方案。事实上，对于生物化学、分子生物学和生物技术或相关领域的技术人员来说显而易见的是，为实现本发明所述方法所作的各种修改均落入所附权利要求书的范围内。

<110> 伊拉兹马斯大学鹿特丹医学中心(ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER ROTTERDAM)

<120> 结合分子

<130> P042858W0

<150> GB0601513.5

<151> 2006-01-25

<160> 13

<170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG 铰链区编码序列

<400> 1

gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgccca

36

<210> 2

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG 铰链区编码序列的置换序列

<400> 2

agcttctgag cgcaaaccac cagtcgagcc accaccgcca ccac

44

<210> 3

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG 铰链区编码序列的置换互补序列

<400> 3

tcgagtgggtg gcggtggtgg ctcgactggt ggtttgcgct caga

44

<210>	4	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	4	
	ctggaattct caccatggag ctggggctga gc	32
<210>	5	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	5	
	cgcttggagt gtatcagtca gtgggcacct tgggcacggg gg	42
<210>	6	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	6	
	cagccgggcg attctctcca gtgggcacct tgggcacggg gg	42
<210>	7	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	7	
	ccccgtgcc caaggtgcc actgactgat acactccaag cg	42
<210>	8	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	8	
cccccggtgcc	caaggtgccc	actggagaga atcgcccggc tg 42
<210>	9	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	9	
tggtggtttg	cgctcagaag	ccaggatgaa ctctagtttt tc 42
<210>	10	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	10	
tggtggtttg	cgctcagaag	caacgtgggt catgactttc tg 42
<210>	11	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	11	
gaaaaactag	agttcatcct	ggcttctgag cgcaaaccac ca 42
<210>	12	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	12	
cagaaagtca	tgaaccacgt	tgcttctgag cgcaaaccac ca 42

<210> 13
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引物

<400> 13
gtcgaattct cattccgagg agacggtgac ctgggtc

37

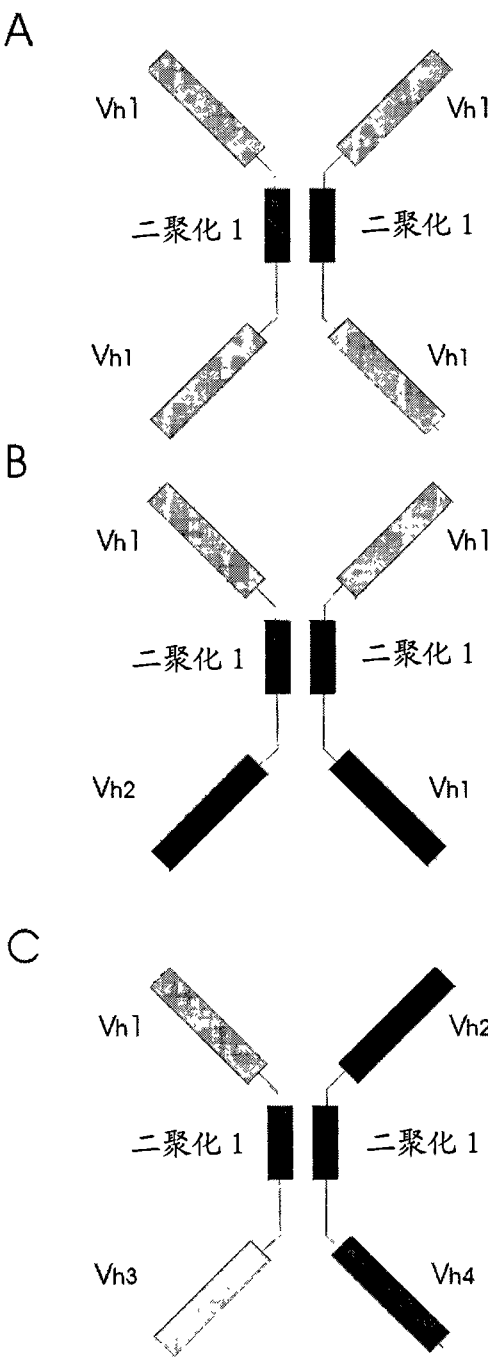


图 1

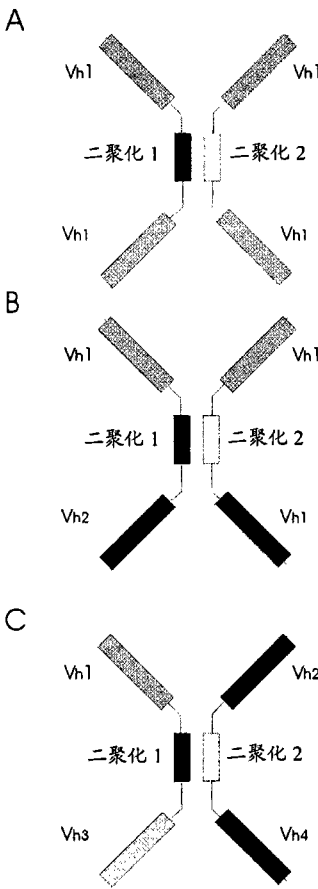


图 2

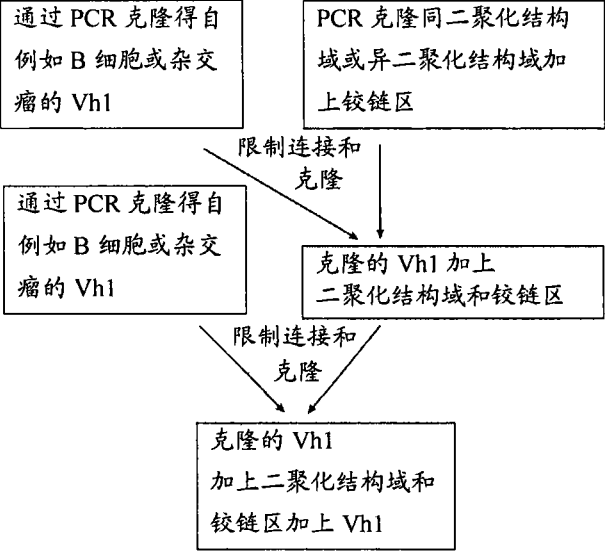


图 3

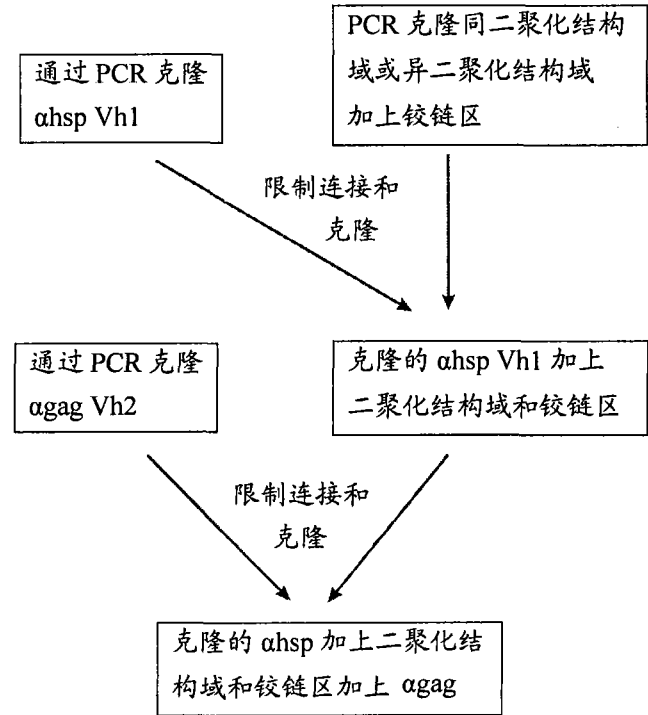


图 4

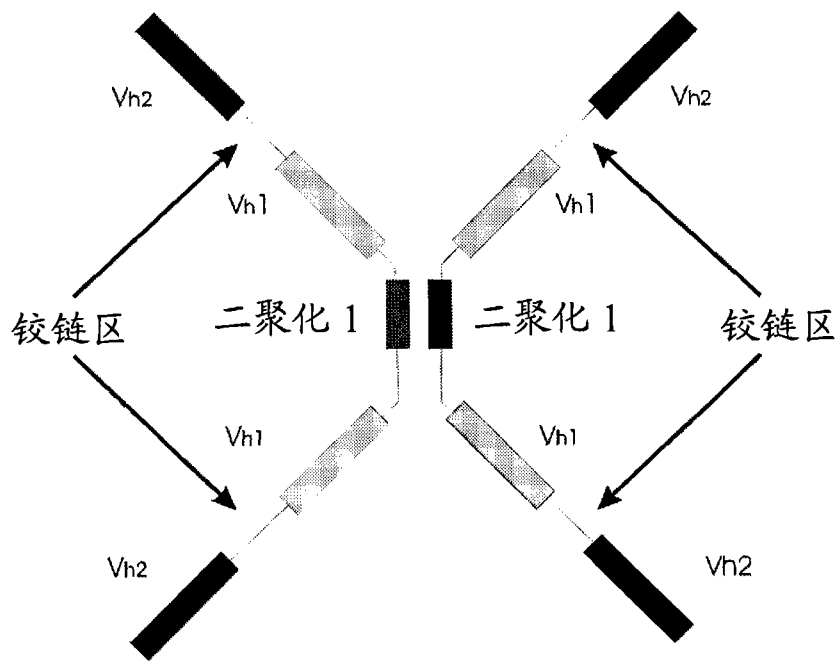


图 5

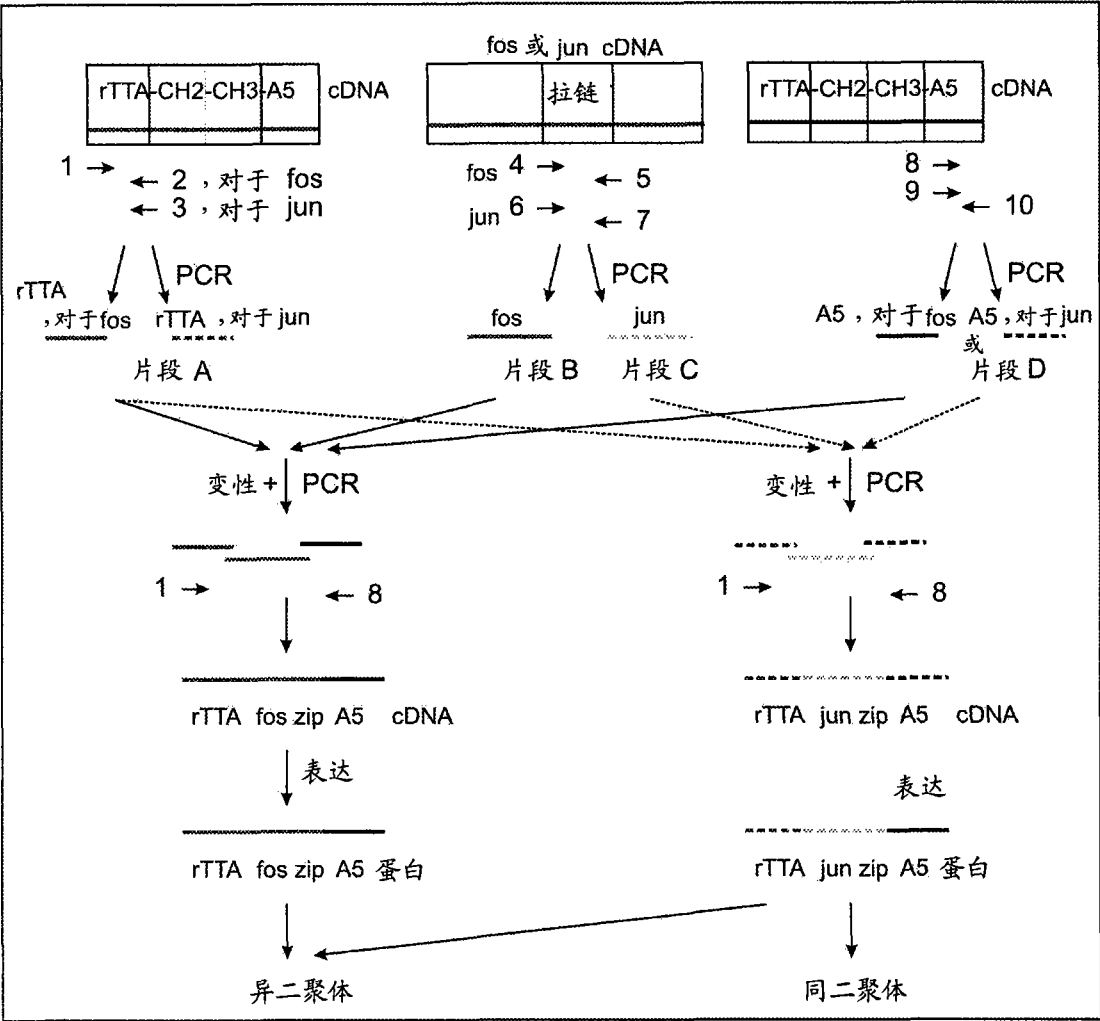


图 6

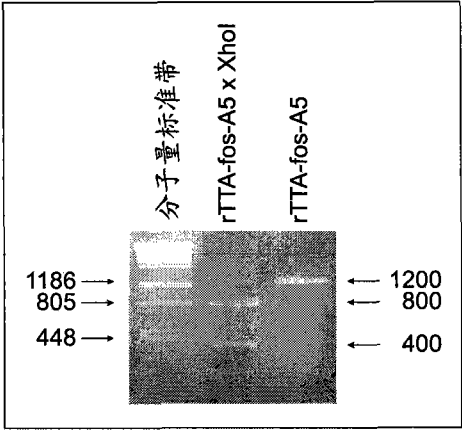


图 7