

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：

A6102902

C07K16/00 (2006.01)

※ 申請日期：

06.1.15

※IPC 分類：

C12N15/63 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

結合分子3

BINDING MOLECULES 3

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

荷蘭鹿特丹ERASMUS大學醫學中心

ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER ROTTERDAM

代表人：(中文/英文)

F.G.A. 凡 德 馬歇

VAN DER MECHE, F.G.A.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

荷蘭鹿特丹市摩爾瓦特普蘭大道50號

DR. MOLEWATERPLEIN 50 3015 GE ROTTERDAM NETHERLANDS

國 籍：(中文/英文)

荷蘭 THE NETHERLANDS

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 富蘭克林 傑拉杜斯 葛洛斯佛

GROSVELD, FRANKLIN GERARDUS

2. 李察 威爾罕 詹森

JANSSENS, RICHARD WILHELM

3. 杜布夫卡 卓別克

DRABEK, DUBRAVKA

4. 羅傑 金頓 克伊格

CRAIG, ROGER KINGDOM

國 籍：(中文/英文)

1. 荷蘭 THE NETHERLANDS

2. 荷蘭 THE NETHERLANDS

3. 荷蘭 THE NETHERLANDS

4. 英國 U.K.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 英國；2006年01月25日；0601513.5

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於產生包含連接至二聚作用域的胺基及羧基末端之VH結合域(如本文所定義)的多肽結合錯合物。使用本發明方法產生的VH結合域及二聚作用域相對於先前技術中所描述的scFv衍生之多肽結合錯合物，顯示固有結構及功能穩定性，因此為產品製造及產品穩定性提供優勢。本發明亦描述其用途。

【先前技術】

單株抗體或其變異體將代表高比例之21世紀推出的新藥。單株抗體療法已經接受為治療類風濕性關節炎及克隆氏病(Crohn's disease)之較佳途徑，且在癌症治療中存在令人印象深刻的進展。對於治療心血管及感染性疾病而言，以抗體為主的產品亦在發展中。大部分上市的單株抗體產品識別及結合靶配位子(例如TNF α)上單一的、良好界定的抗原決定基。由兩條重鏈及兩條輕鏈組成之錯合物(H₂L₂錯合物)的組裝及隨後之轉譯後糖基化過程需要使用哺乳動物生產系統。由哺乳動物細胞培養製造抗體之生產成本及資本費用高，且有在缺乏可接受的替代療法狀況中限制以抗體為主的療法之潛力的危險。各種轉殖基因生物能表現完整功能的抗體。此等生物包括植物、昆蟲、雞、山羊及牛。可在大腸桿菌(*E. coli*)中製造功能抗體片段，但除非在製造過程期間聚乙二醇化，否則產物通常具有低血清穩定性。

雙特異性抗體錯合物為以經工程處理之Ig為主的分子，其能結合相同或不同抗原上之兩種不同的抗原決定基。單獨或與其他結合劑組合之併入抗體之雙特異性結合蛋白，顯示出對於其中被捕獲的人類免疫功能有治療作用之治療模態之希望(例如消除病原體(Van Spriël等人，(1999) *J. Infect. Diseases*, 179, 661-669；Tacken等人，(2004) *J. Immunol.*, 172, 4934-4940；US 5,487,890)、治療癌症(Glennie及 van der Winkel, (2003) *Drug Discovery Today*, 8, 503-5100)及免疫療法(Van Spriël等人，(2000) *Immunol. Today*, 21, 391-397；Segal等人，(2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 1-6；Lyden等人，(2001) *Nat. Med.*, 7, 1194-1201))。

其中雙特異性抗體產物係基於兩種或兩種以上H₂L₂錯合物時，製造問題為複雜的。舉例而言，共表現兩組或兩組以上重鏈及輕鏈基因可導致形成高達10種不同組合，其中僅一種為所要的異二聚體(Suresh等人，(1986) *Methods Enzymol.*, 121, 210-228)。

為處理此問題，已開發數種策略用於在哺乳動物細胞中產生保持重鏈效應功能之全長雙特異性IgG格式(BsIgG)。BsIgG需要經工程處理之"凸節及凹洞(knob and hole)"重鏈以預防異二聚體形成且利用相同L-鏈以避免L-鏈錯配(Carter, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 7-15)。已描述自各識別不同抗原之抗體片段產生錯合物(Ferguson等人，(1995) *Arthritis and Rheumatism*, 38, 190-200)，或(例如)

膠凝素 (collectin) 之其他結合蛋白交聯至抗體片段 (Tacke 等人, (2004) *J. Immunol.*, 172, 4934-4940) 的替代化學交聯策略。

通常缺乏重鏈效應功能之雙功能抗體或微小抗體 (BsAb) 之開發亦克服異二聚體冗餘。此等抗體包含併入 V_H 及 V_L 結合位點 (scFv) 之最小單鏈抗體, 其隨後折疊且二聚化以形成對其各靶抗原為單價之二價雙特異性抗體 (Holliger 等人, (1993) *PNAS*, 90, 6444-6448; Muller 等人, (1998) *FEBS Lett.*, 422, 259-264)。在一實例中, C_H1 及 L-恆定域已用作雙特異性微小抗體形成之雜二聚作用域 (Muller 等人, (1998) *FEBS Lett.*, 259-264)。已開發基於大腸桿菌表現系統之各種重組方法用於產生 BsAb (Hudson, (1999) *Curr. Opin. Immunol.*, 11, 548-557), 雖然臨床級多價抗體材料之生產成本及規模仍為臨床開發之主要障礙 (Segal 等人, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 1-6)。

最近, 已擴展 BsAb 概念以包括二雙功能抗體, 亦即其中各 H 及 L 鏈上之 V_H 及 V_L 域已由經工程處理之 scFv 結合域對替代的四價雙特異性抗體。雖然對於工程處理而言為複雜的, 但該等構造可在缺乏異二聚體冗餘之狀況下, 在培養基中哺乳動物細胞中組裝 (Lu 等人, (2003) *J. Immunol. Methods*, 279, 219-232)。

免疫球蛋白之結構為此項技術中已知的。大多數天然免疫球蛋白包含兩條重鏈及兩條輕鏈。重鏈在位於沿各重鏈約一半長度的鉸鏈域之間經由二硫鍵彼此接合。輕鏈在鉸

鏈域N-末端側與各重鏈締合。各輕鏈通常由接近鉸鏈域之二硫鍵結合至其各重鏈。

當Ig分子正確折疊時，各鏈折疊為數個由多個線性多肽序列接合之截然不同的球狀域。舉例而言，輕鏈折疊為一可變 V_L 及一恆定(C_L)域。重鏈具有與輕鏈可變域相鄰的單一可變域 V_H 、第一恆定域、鉸鏈域及兩個或三個其他恆定域。重(V_H)及輕(V_L)鏈可變域之交互作用導致形成抗原結合域(Fv)。一般而言，最佳抗原結合需要 V_H 及 V_L 兩者，但在缺乏輕鏈狀況下，重鏈二聚體及胺基末端片段已顯示為保持活性(Jaton等人，(1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195)。

隨著分子生物學技術的到來，在人類B細胞增生性病征中及在鼠類模型系統中識別僅含重鏈抗體(缺乏輕鏈)之存在(重鏈疾病)。於在分子水平上分析重鏈疾病顯示，在基因組水平上變異及刪除可導致不適當表現重鏈 C_H1 域，引起表現缺乏結合輕鏈能力之僅含重鏈抗體(參見Hendershot等人，(1987) *J. Cell Biol.*, 104, 761-767；Brandt等人，(1984) *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1270-1277)。

對來源於噬菌體庫之經分離人類 V_H 域的個別研究(Ward等人，(1989) *Nature*, 341, 544-546)證明 V_H 域之抗原特異性結合，但此等 V_H 域通常，但不總是證明為相對低溶解度的(參見Jespers等人(2004) *J. Mol. Biol.* 337, 893-903)。

使用其他脊椎動物種類之研究已顯示，由於天然基因突變，駱駝(camelid)產生功能IgG2及IgG3單一重鏈二聚體，

由於缺乏 C_{H1} 輕鏈 - 結合域，其不能結合輕鏈 (Hamers-Casterman 等人，(1993) *Nature*, 363, 446-448)，且諸如鯊魚之種類產生單一重鏈樣結合蛋白家族，其可能與哺乳動物 T 細胞受體或免疫球蛋白輕鏈相關 (Stanfield 等人，(2004) *Science*, 305, 1770-1773)。

駱駝僅含重鏈抗體之表徵性特徵為駱駝 V_H 域，其提供相對於天然人類 V_H 域之改良的溶解度及穩定性。人類 V_H 域可經工程處理，從而獲得改良的溶解度特徵 (參見 Davies 及 Riechmann, (1996) *Protein Eng.*, 9 (6), 531-537; Lutz 及 Muyldermans, (1999) *J. Immuno. Methods*, 231, 25-38) 或可藉由活體內自然選擇獲得溶解度 (參見 Tanha 等人，(2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 24774-24780; Jespers L, Schon O, James LC, Veprintsev D, Winter G., *J. Mol. Biol.* 2004 Apr 2; 337(4):893-903)。然而，其中 V_H 結合域來源於噬菌體庫時，雖然施加涉及 (例如) 親和力熱點隨機化 (affinity hot spot randomisation) 之親和力改良策略，但在低微莫耳至高奈莫耳範圍內保持對抗原之固有親和力 (Yau 等人，(2005) *J. Immunol. Methods*, 297, 213-224)。

當自宿主細胞產生及回收時，或當作為內抗體在還原性細胞內環境中產生時，scFv 由於其固有不穩定性及折疊無效率，受到限制 (參見 der Maur 等人，(2002) *J. Biol. Chem.* 277, 45075-45085)。與 V_H 域相反，以駱駝 V_{HH} 為代表，相對於習知抗體片段顯示高熱力學穩定性 (Dumoulin 等人，(2002) *Protein Science*, 11, 500-515) 且甚至在非離子及陰

離子界面活性劑存在下及諸如脲之苛刻的變性條件中保持功能穩定性(Dolk等人, (2005) *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 442-450), (其為自苛刻製造環境中以高產量回收功能抗體錯合物之重要特徵)且在活體內及活體外維持產物結構及功能完整性。 V_{HH} 及駱駝化或經工程處理之 V_H 抗體域亦顯示與較大習知抗體片段相比, 感染劑之較大靶穿透的能力(Stijlemans等人, (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 1256-1261), 且當用作"內抗體"時, 保持細胞內結構及功能穩定性, 阻斷培養基中之PK15細胞產生豬反轉錄病毒(Dekker等人, (2003) *J. Virol.* 77, 12132-12139)。

駱駝 V_H 抗體亦可由經改質CDR3環表徵。此CDR3環平均比非駱駝抗體中發現的彼等環長, 且據認為其為對總體抗原親和力及特異性產生主要影響之特徵, 其表現為補償駱駝僅含重鏈抗體種類中 V_L 域之缺失(Desmyter等人, (1996) *Nat. Struct. Biol.*, 3, 803-811, Riechmann及Muyldermans, (1999) *J. Immunol. Methods*, 23, 25-28)。

最近, 已發展在轉殖基因哺乳動物中產生僅含重鏈抗體之方法(參見WO 02/085945及WO 02/085944)。作為抗原挑釁之結果, 可自轉殖基因哺乳動物(較佳地小鼠)產生可能之任何類別(IgM、IgG、IgD、IgA或IgE)且來源於任何哺乳動物(包括人類)之功能性僅含重鏈抗體。

可由標準選殖技術自脾之B細胞回收單一重鏈單株抗體, 或由噬菌體展示技術自B細胞mRNA回收(Ward等人, (1989) *Nature*, 341, 544-546)。來源於駱駝或轉基因動物

之僅含重鏈抗體為高親和力的。基於作為抗原挑釁結果之轉殖基因小鼠中產生的抗體的結構研究顯示，駱駝化人類 V_H 抗體多樣性很大程度上由活體內成熟過程驅動，其取決於VDJ重組事件及體細胞突變。然而，與駱駝 V_{HH} 不同，其中CDR3區來源於人類D及J區之駱駝化人類 V_H 中，CDR3環缺失（參見Janssen等人，(2006) PNAS 103 (41):15130-5. Epub 2006 Oct 2*及PCT/GB2005/002892）。

在諸如駱駝 V_{HH} 僅含重鏈抗體及駱駝化人類 V_H 僅含重鏈抗體之僅含重鏈抗體中發現的 V_H 域之重要及常見特徵為，各區作為單體不依靠二聚作用而與 V_L 區結合，從而獲得最佳溶解度及結合親和力。此等特徵表現為尤其適於產生阻斷劑及組織穿透劑（關於綜述參見Holliger, P. & Hudson, P.J. (2005) Nature Biotechnology 23, 1126-1136）。

然而，在僅含重鏈抗體中發現之 V_H 域的優勢尚未在多聚體蛋白作為試劑、治療劑及診斷劑之設計中加以利用，但由天然抗體鉸鏈區繫栓的兩個 V_H 域已顯示為在雙特異性或二價構造中保持結合特徵（Conrath等人，(2001) J. Biol. Chem. 276, 7346-7352）。

與二聚作用域組合的多個結合域之併入與使用必須自 V_H 及 V_L 域經工程處理之scFv、具有損失特異性及結合性之相關可能的平行方法相比，在由於存在連接肽導致的抗原性之增加的風險及相對於 V_H 結合域固有缺乏穩定性方面，具有顯著優勢。來源於諸如T細胞受體或鯊魚免疫球蛋白家族之抗體相關基因家族的 V_H 結合域亦提供對用於產生二或

多特異性結合分子之 scFv 的選擇。

重鏈 C_{H2} 及 C_{H3} 恆定域之存在除重鏈效應功能外，為天然抗體中所見的穩定二聚作用提供基礎，且提供轉譯後糖基化的識別位點。 C_{H2} - C_{H3} 二聚作用域已用於在胺基及羧基端載運 scFv 結合域(參見 Jendreyko 等人(2003) *J. Biol. Chem.* 278, 47812-47819)或 scFv 結合域與受體結合蛋白之組合(Biburger 等人(2005) *J. Mol. Biol.* 346, 1299-1311)之四聚單特異性同二聚體或二價雙特異性同二聚體的設計中。 C_{H2} - C_{H3} 域亦已用於使用在單體重鏈抗體中發現的駱駝化 V_H 及駱駝 (llama) V_{HH} 域構造二價雙特異性同二聚體(PCT/GB 2005/002892)。

在此項技術中存在對改良可變 scFv 結合技術及提供抗原特異性可溶及結構穩定單價、二價或多價多肽結合錯合物之需要。二聚作用域可包含缺乏重鏈效應功能之天然或經工程處理之免疫球蛋白 C_{H2} - C_{H3} 二聚作用域，例如來源於 IgG4 之 C_{H2} - C_{H3} (參見 Bruggemann, M. 等人 *J. Ex. Med.* (1987) 166, 1351-1361)。較佳地併入除 C_{H2} - C_{H3} 外之其他二聚作用域。所得多肽結合錯合物較佳小於 120 kDa 分子量，以便當活體內投藥時使組織穿透最大化。

【發明內容】

本發明提供一種單獨或與其他結合域(但 scFv 除外)組合使用 V_H 結合域(如本文所定義)以產生多肽結合錯合物之方法。

根據本發明，提供一種包含第一重鏈與第二重鏈之二聚

體的多肽結合錯合物，其中各重鏈包含胺基末端VH結合域(如本文所定義)；羧基末端VH結合域(如本文所定義)；及較佳缺乏C_H2-C_H3二聚作用功能之二聚作用域。

如本文所用之術語"VH結合域"包括天然VH結合域，例如由僅作為單一V、D及J基因片段之間重組接著隨後體細胞突變的結果的重鏈基因座所表述。術語"VH結合域"包括來源於包括鯊魚、駱駝及人類之脊椎動物之任何天然產生的抗原結合域。自駱駝或其他天然僅含重鏈抗體取得之VH結合域稱為V_{HH}域。自除僅含重鏈抗體外的抗體取得之VH結合域或來源於除僅含重鏈抗體外的抗體之VH結合域稱為V_H域。"VH結合域"包括已經由選擇或工程處理改變以改變特徵之V_H或V_{HH}域。舉例而言，可改變在某些條件下的穩定性或溶解度。亦可經由選擇或工程處理來改變VH域以更加類似於來自另一種類之V_H或V_{HH}域。舉例而言，人類V_H域之V區可經改變以更加類似於駱駝V_{HH}域中發現的V區。術語"VH結合域"亦包括能起VH域之作用(例如VL結合域)的同系物、衍生物或蛋白片段。所有該等實施例包括於本發明中。

或者，該多肽結合錯合物可包含第一重鏈及第二重鏈的二聚體，其中各重鏈包含串連之一或多個額外的胺基末端VH結合域且由鉸鏈域分離；及串連之一或多個額外的羧基末端VH結合域且由鉸鏈域分離。

對於治療應用而言，二聚作用域較佳為人類來源的，且可視應用而定，包含天然或經工程處理之醣基化位點以加

強血漿穩定性或者可缺乏所有轉譯後修飾位點以加強血漿清除或減少掩蔽以加強靶識別及結合。當需要諸如組織穿透或血漿清除之活體內效能準則時，總體多肽結合錯合物之尺寸應較佳地不超過120 kDa。

當將包含VH結合域之多肽結合錯合物用作內抗體時(參見Dekker等人(2003) J. Virol. 77, 12132-12139)，可併入額外的、細胞內訊號特徵以測定(例如)核內或膜定位(參見(例如)Jendreyo等人，(2003) J. Biol. Chem. 278, 47812-47819)。對於製造目的而言，亦可於多肽結合錯合物之胺基末端將訊號肽併入載體中以促進自所選擇之生產細胞(例如酵母、昆蟲或哺乳動物細胞)合成及分泌經組裝多肽錯合物。二聚作用域可包含同二聚體或異二聚體。

在一實施例中，第一重鏈之二聚作用域不同於第二重鏈之二聚作用域，使得該多肽結合錯合物為包含不同多肽之異二聚體(或複數個異二聚體)。

在一替代實施例中，第一重鏈之二聚作用域與第二重鏈之二聚作用域相同，使得多肽結合錯合物為包含兩個相同多肽之同二聚體(或複數個同二聚體)。

本發明VH域可顯示相同特異性或其可顯示不同特異性。當該多肽結合錯合物包含四個VH域時，此等錯合物可為四價單特異性、二價雙特異性、三特異性或四特異性的。當存在超過四個VH域時，則預計顯示符合額外VH域數目的較大特異性程度增加的多肽結合錯合物。舉例而言，具有八個VH域之多肽錯合物可顯示八特異性。

當需要快速清除或加強組織穿透時，則該多肽結合錯合物尺寸較佳小於120 kDA。

在一替代實施例中，一或多個、但非所有該等VH域可經替代類別之多肽結合域取代。該替代結合域較佳為細胞因子、生長因子、受體拮抗劑或促效劑或配位子。

重鏈之一或兩者之二聚作用域及/或胺基或羧基末端結合域較佳由彈性鉸鏈域分隔。

本發明亦提供一種編碼本發明第一重鏈、第二重鏈或兩者重鏈之經分離核酸。本發明亦提供一種包含該經分離核酸之載體。本發明另外提供一種以該載體轉形(transform)的細胞。

在另一實施例中，本發明提供一種用於產生本發明多肽結合錯合物之方法，包含培養以包含編碼該第一重鏈、該第二重鏈或該兩者重鏈的核酸之載體轉形的宿主細胞。

可由諸如肽化學或化學接合之合成途徑產生本發明VH結合域、二聚作用域或連接多肽。

該多肽結合錯合物可經聚乙二醇化以加強活體內穩定性。

本發明亦提供一種包含本發明之多肽結合錯合物之醫藥組合物。本發明亦提供一種藉由向患者投與本發明醫藥組合物或載體治療患者之方法。

本發明亦提供在製備用於預防或治療疾病之藥品中本發明之多肽結合錯合物之用途。

本發明亦提供將本發明之多肽結合錯合物用作診斷劑、

試劑、抗體酶、抑制劑、細胞化學試劑、成像劑或內抗體。

多肽結合錯合物包含於該分子之胺基及羧基末端與VH結合域組態的二聚作用域。該二聚作用域及該VH結合域視情況由彈性多肽連接分隔。較佳組態包含四價單特異性多肽VH結合錯合物及二價雙特異性多肽VH結合錯合物(參見圖1至5)。

VH結合域可來源於任何脊椎動物，但較佳為人類來源的。該等VH結合域可來源於諸如駱駝、轉基因動物或鯊魚之天然來源，或選自諸如噬菌體或酵母VH展示庫之合成庫陣列。VH結合域可經工程處理以改良諸如溶解度及穩定性之物理特徵，或經人化以避免或降低抗原性。VH之定義包括來源於免疫球蛋白重鏈、免疫球蛋白輕鏈、T細胞受體或類似分子，但除結合位點自四聚體抗體(H_2L_2)之 V_H 及 V_L 域工程處理的經工程處理之scFv分子之外之任何天然多肽結合域。

該二聚作用域包含衍生自天然來源(較佳人類)之同二聚體或異二聚體，其在生理條件下穩定。該二聚作用域可天然地併入額外之效應功能或可經工程處理以併入額外的效應功能。此等效應功能包括(但不限於)轉譯後修飾(磷酸化及糖基化)位點、聚乙二醇化、酶、細胞毒性及成像位點、免疫刺激及受體結合功能。

本發明亦提供一種包含編碼本發明VH多肽結合錯合物及二聚作用域之核苷酸序列的載體及一種以該(等)載體轉

形的宿主細胞。

本發明亦提供一種本發明之多肽結合錯合物在藥品製備中之用途。本發明之多肽結合錯合物亦可作為成像劑、診斷劑、試劑、抗體酶或抑制劑。本發明亦提供一種包含本發明之多肽結合錯合物及藥理學上適當的載劑之醫藥組合物。本發明之多肽結合錯合物亦可作為內抗體，以能指導靶細胞內該多肽結合錯合物之細胞內合成的載體而遞送至靶細胞，或是以用於進行細胞吸收及隨後於靶細胞內之細胞內作用之含蛋白錯合物而遞送。

【實施方式】

本發明之發明者已先前顯示(參見 WO 02/085945、WO 02/085944及 PCT/GB 2005/002892)可使用"微基因座"產生轉基因動物(尤其小鼠)，以產生類別特異性之VH僅含重鏈抗體或不同類別VH僅含重鏈抗體之混合物，其係由血漿或B細胞回應抗原挑釁而分泌。此等動物可接著用於使用已確立的融合瘤技術而產生類別特異性僅含重鏈抗體之可靠供應，或作為功能性駱駝V_{HH}結合域或VH僅含重鏈結合域(較佳為人類來源之可溶性V_H僅含重鏈結合域)的來源。類似地，具有所需特異性之VH結合域可來源於噬菌體、酵母或經類似建構的展示庫。

可在細菌系統中選殖及表現功能性之VH域以產生保留抗原結合、特異性及親和力之VH結合域。此外，VH結合域無論存在於二聚作用域之胺基末端或羧基末端均保持功能性。此等特徵已用於建構二價雙特異性同二聚體VH結

合分子，其係將免疫球蛋白重鏈 C_{H2} - C_{H3} 二聚作用區作為同二聚作用域(參見PCT/GB 2005/002892)。

總之，對於經由使用功能上穩定的、可溶性VH域之改良及簡化性抗體工程處理而言，此等觀察具有重要的含義。可使用同或異二聚作用域組裝四價單特異性VH結合錯合物或二價雙特異性VH結合錯合物，且其可經使用培養中細胞(例如細菌、酵母、昆蟲、植物或哺乳動物細胞)或由轉殖基因生物(例如哺乳動物、昆蟲、植物等)表現及組裝，而不需要結合域(scFv)之廣泛先前工程處理、不需要化學交聯或不需要自錯配結合域之異種混合物分離產物。

VH域相對於scFv(28 kDa)或Fab(55 kDa)結合域而言為小的(約15 kDa)。尺寸差異及重鏈效應功能之存在或不存在對活體內蛋白錯合物之藥物動力學及生物分佈具有顯著影響。因此顯示快速組織穿透及高靶保持、缺乏一些或所有效應功能及自血流中快速清除之小可溶性多肽結合錯合物，在一些臨床環境中優於具有不良組織穿透、相關效應功能及長血清半衰期之大IgG分子(詳盡綜述參見Holliger, P.及Hudson, P. J. (2005) Nature Biotechnology, 23, 1126-1136)。大部分天然 C_{H2} - C_{H3} 二聚作用域之使用向VH多肽結合錯合物添加重鏈效應功能。來源於IgG4或交替同或異二聚作用域之 C_{H2} - C_{H3} 域之使用允許在缺乏重鏈效應功能狀況下，以受控方式進行工程處理之尺寸限制，但如所需要併入額外所要的功能特徵。

蛋白經由需要非共價相互作用之截然不同類型的蛋白-蛋白界面自我締合以形成二聚體及更高級寡聚物，促進許多生物學功能 (Ofra, Y.及 Rost, B. (2003) J. Mol. Biol. 325, 377-387)。特異性蛋白二聚作用之生物學功能、結構及控制為整體性的 (參見 Marianayagam 等人 (2004) TIBS, 29, 618-625)。白胺酸拉鏈表示一種良好表徵的結構基元，其能形成同及異二聚體 (Landschulz 等人, (1988) Science, 240, 1759-1764)。C_H1重鏈域及輕鏈恆定域形成穩定異二聚體。諸如 TATA 結合蛋白之某些真核轉錄蛋白羧基末端，形成穩定同二聚體 (Coleman 等人, (1995) J. Biol. Chem. 270, 13842-13860)。已經識別及表徵數種其他二聚作用域 (參見 Brown, J.H. (2006) Protein Science 15, 1-13)。其中一些 (但非所有) 適於發展多肽結合錯合物。較佳二聚作用域為人類來源的，較佳地在特化組織中產生，因此在生產期間在各種蛋白生產系統中其不可能作為同源污染物存在。或者，當存在於天然蛋白中時，該二聚作用域應具有核或細胞質定位，因此可自目的為使用天然細胞內膜結合方法經由分泌途徑分泌之二聚化多肽結合蛋白產物分隔內因性蛋白。多肽二聚體之締合/解離較佳並非取決於磷酸化作用。

VH 多肽結合錯合物、尤其彼等人類來源的 VH 多肽結合錯合物在保健領域作為藥品、成像劑、診斷劑、抗體酶及試劑具有廣泛的應用，且具有相應農業、環境及工業應用。

僅含重鏈抗體及其片段

可自(例如)分離自如上所述之經免疫轉基因動物之產生抗體細胞的mRNA選殖本發明之抗原特異性VH結合域。亦可自噬菌體陣列(Ward等人, (1989) *Nature*, 341, 544-546)或類似陣列庫中, (例如)使用基於酵母的系統(Boder及Wittrup, (1997) *Nat. Biotechnol.*, 15, 553-7), 分離經選殖之VH結合域序列。接著可在可擴展的細菌、酵母或另外之表現系統中, 單獨或作為融合蛋白製造抗原特異性VH結合域。亦可藉由典型程序自來源於經免疫轉殖基因小鼠之經表徵融合瘤選殖編碼VH結合域之序列。接著此等序列可用於產生抗原特異性VH結合域及其衍生物。

或者, 可使用酶或化學分解技術自來源於轉基因動物或天然來源(鯊魚及駱駝)的經分離免疫球蛋白重鏈、僅含重鏈抗體產生含有VH域之片段, 且隨後自其他分解產物分離含有VH域的片段(Jaton等人, (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195)。

當自經表徵融合瘤分離該VH結合域時, 可將來源於mRNA之VH結合域序列直接選殖入表現載體中, 而無需求助於必需使用表徵及最佳化所選VH結合域的親和力之噬菌體及其他展示系統的額外選擇步驟。

併入重鏈二聚作用及效應子區之VH結合域之生產系統包括培養中的哺乳動物細胞(例如B細胞融合瘤、CHO細胞)、植物(例如玉蜀黍)、轉殖基因山羊、兔、牛、綿羊及雞及適於大量飼養技術之昆蟲幼蟲。包括病毒感染(例如

形式。VH結合域存在於結合分子之胺基及羧基末端(例如參見圖1)。取決於最終功能多肽結合錯合物之所需設計，二聚作用域可為同二聚體或異二聚體。

此排列之優勢為數倍的。以合作方式起作用的兩個或兩個以上相同VH域之存在，相對於僅單一VH而言對結合分子提供更大親和力(affinity)及結合性(avidity)。不僅四聚體VH產物(例如藥品)將具有較單聚或二聚體VH形式更大的可能效能，而且可自單一選殖的基因序列中，作為無錯配污染結合序列之單一產物，產生作為蛋白同二聚體組裝的四價單特異性多肽結合錯合物。二價雙特異性多肽結合錯合物可促進不同靶標的交聯，同時保持兩個VH結合域對於各抗原之有利的合作效應。舉例而言，可利用雙特異性多肽錯合物以加強細胞-細胞相互作用或細胞/病原體相互作用。在此實施例中，可利用本發明之多肽錯合物以在諸如紅血球及病原體之兩種細胞類型之間橋接(參見Taylor等人，(1991) PNAS 88, 3305-3309)。可使用雙官能度以同時抑制酶途徑之兩種組份(Jendreyko等人(2003) J. Biol. Chem. 278, 47812-47819)。

雙官能度可用於使效應子部分緊密接近靶細胞。各域之胺基末端之VH結合域較佳為相同的，且於羧基末端之彼等VH結合域為相同的(但於胺基末端識別不同抗原或抗原決定基)，促進VH結合域對之合作結合。

如本文所用之術語'效應子部分'包括介導細胞上所要的生物學效應之任何部分。效應子部分較佳為可溶性的且可

昆蟲幼蟲及細胞株中之桿狀病毒)之其他生產系統，為細胞培養及生殖系方法之替代選擇。其他產生方法對於熟悉此項技術者亦將為熟悉的。產生駱駝僅含重鏈抗體或單獨VH結合域之適當方法為此項技術中已知的。舉例而言，已在細菌系統中產生駱駝VH結合域且已在融合瘤及經轉染之哺乳動物細胞中產生駱駝單一重鏈同二聚體(參見Reichmann及Muyldermans, (1999) *J. Immunol. Methods*, 231, 25-38)。

對於表現使用噬菌體展示技術獲得的經工程處理人類V_H結合域而言，亦充分建立方法(Tanha等人，(2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 24774-24780及其中參考案)。

來自轉殖基因蒼蠅株的昆蟲幼蟲已顯示產生具有與由哺乳動物細胞產生的相同抗體不可區分的特徵之功能性僅含重鏈抗體片段(PCT/GB 2003/0003319)。

本發明亦提供一種包含編碼本發明之VH結合域及二聚作用域之多肽結合蛋白或其片斷的載體。

本發明亦提供一種以本發明之載體轉形的宿主細胞。

在第一態樣中，本發明提供一種多肽結合錯合物，其包含融合於缺乏C_H2-C_H3重鏈效應功能之二聚作用域羧基及胺基末端的抗原特異性VH結合域。此等多肽結合錯合物保持由與天然存在或經工程處理成為二聚作用域之額外靶向或效應功能組合之抗原特異性VH結合域賦予的生理學功能。該等多肽結合錯合物可為功能單特異性四聚結合錯合物、二價雙特異性結合錯合物或四特異性結合錯合物之

為肽、多肽或蛋白或可為非肽結構。舉例而言，效應子部分可為酶、激素、細胞因子、藥物、前藥、毒素(尤其蛋白毒素)、螯合結構中之放射性核種、成像劑、白蛋白或抑制劑。效應子部分可為細胞，例如T細胞、肽、多肽或蛋白或可為非肽結構。取決於所要的效應，與VH結合域相關的效應子部分性質上可為細胞、蛋白、有機或無機的。

白蛋白、免疫球蛋白或其他血清蛋白可用作效應子部分以增加抗原特異性VH結合域之穩定性或藥物動力學及/或藥效學性質(Sung等人，(2003) *J. Interferon Cytokine Res.*, 23 (1): 25-36; Harmsen等人(2005) *Vaccine*, 23 (41) 4926-4934)。或者，該效應子部分可為聚乙二醇化結構或天然醮基化的結構以改良藥效學性質。

多肽二聚作用域

本發明之發明者亦已認識到任何多肽結合錯合物之性質不僅取決於併入最終多肽結合錯合物之VH結合域。總體錯合物之尺寸對錯合物之活體內藥物動力學及製造容易度具有顯著影響。此外，視多肽結合錯合物之設計而定，該二聚作用域可包含額外的效應子活性。因此，在本發明第二態樣中，該多肽錯合物包含二聚作用域，其在尺寸上受限以有利於組織穿透。本發明之第二態樣提供一種二聚作用域，其中該二聚作用域可包含同二聚體或異二聚體。該二聚作用較佳係經由非共價相互作用。

二聚作用域於該二聚作用域之胺基及羧基末端經共價鍵

連接至 VH 結合域。

該多肽結合錯合物視情況包括連接 VH 結合域與二聚作用域之天然或經工程處理之彈性鉸鏈樣域。鉸鏈區之存在促進所得多肽結合錯合物中 VH 結合域之獨立功能。

該二聚作用域視情況可包含其他有用的功能，或可經工程處理以併入諸如糖基化、聚乙二醇化、細胞表面受體結合之識別序列或抗體或結合蛋白識別之標籤的額外特徵。二聚作用域可經工程處理以經由引入或消除(例如)額外半胱氨酸殘基來最佳化締合。

諸如白胺酸拉鏈之小二聚作用域可作為單體或串聯對存在以加強穩定性。額外 VH 域可用於連接串聯二聚作用域。

該二聚作用域之尺寸較佳不超過 60 kDa 且多肽結合錯合物之尺寸為約 120 kDa，以便加強組織穿透。

較佳的二聚作用域包含來自天然(人類)蛋白之小域。此等小域包括存在於許多基因調節蛋白中之 30 個胺基酸的小白胺酸拉鏈基元 (Landschulz 等人 (1988) *Science*, 240, 1759-1764)。先前已使用此方法產生雙特異性 $F(ab')_2$ 異二聚體 (Kostelny 等人, (1992) *J. Immunology* 148, 1547-1553)。拉鏈可經工程處理以增加給定異二聚作用事件的特異性 (Loriaux 等人 (1993) *PNAS* 90, 9046-9050)。

根據本發明第一及第二態樣之二聚作用域可為任何能形成同或異二聚體蛋白-蛋白相互作用之蛋白、肽片段或一致序列，例如在以下物質之間可看到的：免疫球蛋白重鏈

恆定區之 C_H2-C_H3 區、免疫球蛋白重鏈之 C_H1 域及免疫球蛋白輕鏈恆定區，或TATA結合蛋白之180個胺基酸羧基端域的同二聚作用(Colemen等人，(1995) J. Biol. Chem. 270, 13842-13849)；VCAM及VLA-4；整合素及細胞外基質蛋白；整合素及諸如CD54或CD102之細胞表面分子；ALCAM；白胺酸拉鏈雜二聚作用域；麩胱甘肽轉移酶；及SRCR域提供替代實例。

根據本發明第一及第二態樣之例示性多肽結合錯合物可用於細胞化學標記、靶向方法或療法。例如：

1. 若胺基末端抗原特異性VH結合域靶向癌細胞表面標記，則該羧基末端VH可結合包含前藥轉化酶之效應子部分。該胺基末端抗原特異性VH結合域結合至靶標且該羧基末端VH使效應子部分緊密接近該靶標，使得效應子部分可在前藥存在下對靶標發揮生物學作用(例如硝基還原酶或DT黃遞酶對CB1954)；
2. 若胺基及羧基末端VH結合域靶向細胞因子(例如 $TNF\alpha$)，則合作起作用之所有四個結合域將以比單獨VH單體或二聚體大的結合性及親和力起作用。或者，胺基末端VH結合域可結合細胞因子及羧基域血清白蛋白以加強活性錯合物之血清半衰期。

如本文關於所有以上本發明態樣所使用之術語'結合域'包括在生理介質中具有效應子活性之任何多肽結合域。該多肽結合域必需亦具有在生理條件下結合至靶標之能力。

VH結合域可包含駱駝VH域或可包含自非駱駝獲得的VH域。該VH結合域較佳為人類VH結合域。VH結合域較佳地為B-細胞來源的、來源於轉基因動物或駱駝(如上所述)，而與來自合成噬菌體庫之VH域相反，因為前者由於其回應活體內抗原挑釁經由VDJ重排及體細胞突變而產生將具有較高親和力。

根據本發明第三態樣，一些或所有該等VH結合域可由替代蛋白結合域取代。較佳於胺基或羧基末端但非兩者處發生取代。

該等結合域包括可介導結合或黏著至細胞表面之域。可用於本發明之多肽錯合物之適當域為哺乳動物、原核及病毒細胞黏著分子、細胞因子、生長因子、受體拮抗劑或促效劑、配位子、細胞表面受體、調節因子、結構蛋白及肽、血清蛋白、分泌蛋白、質膜相關蛋白、病毒抗原、細菌抗原、原蟲抗原、寄生抗原、脂蛋白、糖蛋白、激素、神經傳遞素、凝血因子及其類似物，但經工程處理之單鏈Fv除外。

聚核苷酸序列、載體及宿主細胞

本發明亦提供一種編碼本發明之任一多肽結合錯合物之聚核苷酸序列、一種包含一或多種如上提及之聚核苷酸的載體及一種以編碼本發明之多肽結合錯合物之載體轉形的宿主細胞。該等聚核苷酸較佳地包括允許所表現多肽結合錯合物作為同或異二聚體分泌進入宿主細胞所生長之培養基的序列。宿主細胞可包括(但不限於)細菌及酵母、昆

蟲、植物及哺乳動物宿主細胞。

此外，本發明提供一種表現至少一種本發明之同或異二聚體多肽結合錯合物的轉殖基因生物。該轉殖基因生物可為非人類脊椎動物或哺乳動物、植物或昆蟲。

保健應用之多肽結合錯合物的生產需要大規模製造系統，其之實例已在以上詳細討論。該等系統包括植物(例如玉蜀黍)、轉殖基因牛及綿羊，及雞，以及適於大量飼養技術之昆蟲幼蟲。作為細胞培養及生殖系方法之替代的其他生產系統，包括病毒感染(例如昆蟲幼蟲及細胞株中之桿狀病毒)亦為彼等熟習此項技術者所熟悉。

此等方法及此項技術中已知的其他適當方法，可用於生產本發明之多肽結合錯合物。可使用此等方法達成同二聚體及/或異二聚體之生產。

本發明多肽結合錯合物之用途

本發明之多肽結合錯合物具有大量應用。舉例而言，本發明之多肽結合錯合物包含單、雙及多特異性多肽錯合物。此等錯合物為尤其宜(例如)作為治療、預防及診斷疾病的治療劑。本發明之多肽結合錯合物可用於細胞化學標記、靶向方法、療法及診斷。

在單抗體療法中，(例如)由於變異導致損失單結合位點，病原體逃脫，將破壞該抗體的治療效應。識別相同病原體上不同抗原之二價雙特異性多肽結合錯合物的生產可克服此問題。將兩個具有不同特異性的VH結合域用於本發明之多肽結合錯合物亦可用於加強細胞-細胞相互作用

及細胞/病原體相互作用。

在此實施例中，本發明之多肽錯合物可用於(例如)橋接介於兩種不同細胞類型(諸如病原體與巨噬細胞，或腫瘤細胞與T細胞)之間的多肽錯合物。或者，該多肽錯合物可識別相同病原體上兩種或兩種以上抗原決定基，其中由介於二聚作用域與鉸鏈序列之間或插入其間的受體識別域提供效應功能。

或者，雙特異性多肽結合錯合物可用於在活體內靶向細胞及組織，接著隨後捕獲循環效應分子或成像劑。舉例而言，雙特異性腫瘤靶向劑可用於捕獲前藥轉化錯合物用於隨後前藥定位轉化為反應劑。與效應劑組合之二及多特異性結合錯合物亦可視所選結合域而定，用於結合及破壞一或多種病原體。或者，識別相同病原體上不同抗原之兩種或兩種以上結合域之存在提供臨床優勢且降低由於病原體內突變導致的病原體逃脫及藥物冗餘的可能性。

本發明之第一態樣提供VH結合域或其片段及二聚作用域，其包括缺乏一些或所有重鏈效應功能之天然或經工程處理之 C_H2-C_H3 二聚作用域。根據本發明第二態樣，多肽結合錯合物尺寸不大於120 kDa，以加強多肽結合錯合物之組織穿透。根據本發明第三態樣，可以除scFv之外的替代結合域替換胺基或羧基末端VH結合域。主要包含人類序列之多肽結合錯合物適於人類中之醫藥用途，且因此本發明提供一種包含經由胺基及羧基末端之可選鉸鏈區連接至二聚作用域之VH結合域的多肽結合錯合物的醫藥組合

物。本發明亦提供在製備用於預防及/或治療疾病之藥品中本發明之多肽結合錯合物之用途。其中可分別或共同調配適當多肽結合錯合物及效應子部分。

該等醫藥組合物及藥品通常將係在向患者投藥前調配。

舉例而言，多肽結合錯合物可與穩定劑混合，尤其若欲將其凍乾。添加糖(例如甘露糖醇、蔗糖或海藻糖)通常可在凍乾期間給予穩定性，且較佳之穩定劑為甘露糖醇。亦可添加人類血清白蛋白(較佳為重組子)而作為穩定劑。亦可使用糖之混合物，例如蔗糖與甘露糖醇、海藻糖與甘露糖醇等。

可在組合物中添加緩衝劑，例如Tris緩衝劑、組胺酸緩衝劑、甘胺酸緩衝劑或較佳地，磷酸鹽緩衝劑(例如含磷酸二氫鈉及磷酸氫二鈉)。添加緩衝劑以產生介於7.2與7.8之間的pH為較佳的，尤其為約7.5的pH。

對於凍乾後之復水而言，可使用注射用無菌水。亦可能以包含人類血清白蛋白(較佳為重組子)之含水組合物而使凍乾餅復水。

一般而言，該多肽結合錯合物將係以純化形式與藥理學上適當的載劑一起使用。

因此本發明提供一種治療患者之方法，其包含向患者投與本發明之醫藥組合物。該患者較佳地為人類，且可為兒童(例如幼童或嬰兒)、少年或成人，但通常為成人。

本發明亦提供一種作為藥品之本發明多肽結合錯合物。

本發明亦提供本發明之多肽結合錯合物在用於治療患者

的藥品之生產中的用途。

此等用途、方法及藥品較佳用於治療以下疾病或病症之一：傷口癒合；細胞增生性病症，包括贅瘤、黑素瘤、肺、結腸直腸、骨肉瘤、直腸、卵巢、肉瘤、子宮頸、食道、乳腺、胰腺、膀胱、頭及頸部及其他實體腫瘤；骨髓增生性病症，諸如白血病、非霍奇金氏(Hodgkin)淋巴瘤、白血球減少症、血小板減少症、血管生成病症、卡堡氏(Kaposi's)肉瘤；自體免疫/發炎性病症，包括過敏症、發炎性腸疾病、關節炎、牛皮癬及呼吸道炎症、哮喘、免疫病症及器官移植排斥反應；心血管及血管病症，包括高血壓、水腫、絞痛症、動脈粥樣硬化、栓塞、敗血症、休克、再灌注損傷及局部缺血；神經病症，包括中樞神經系統疾病、阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)、腦損傷、肌萎縮性側索硬化及疼痛；發育病症；代謝病症，包括糖尿病、骨質疏鬆症及肥胖症、AIDS及腎病；感染，包括病毒感染、細菌感染、真菌感染及寄生蟲感染、與胎盤相關的病理病症及其他病理病症，及用於免疫療法。

在另一態樣中，本發明提供一種本發明多肽結合錯合物用作診斷、預測或治療成像劑的用途。

本發明提供一種本文所描述僅含重鏈抗體或其片段作為細胞內結合試劑或抗體酶之用途。較佳之僅含重鏈抗體片段為可溶性抗原特異性VH結合域。

本發明亦提供根據本發明之VH多肽結合錯合物作為酶抑制劑或受體阻斷劑之用途。

本發明亦提供VH多肽結合錯合物用作治療劑、成像劑、診斷劑、抗體酶或試劑之用途。

本發明亦提供用作細胞內結合劑(內抗體)之VH多肽結合錯合物，且提供在靶細胞中起作用以細胞內表現包含VH多肽結合錯合物之內抗體的載體。

一般技術

除非另外定義，否則本文所使用之所有技術及科學術語具有與一般熟悉此項技術(例如，細胞培養、分子遺傳學、核酸化學、雜交技術及生物化學)者所通常理解相同的含義。對於分子、基因及生物化學方法(通常參見 Sambrook 等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.及 Ausubel 等人，Short Protocols in Molecular Biology (1999)第4版，John Wiley & Sons, Inc.)及化學方法使用標準技術。另外關於標準免疫技術參考 Harlow & Lane, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N. Y.。

任何適當重組DNA技術可用於產生本發明二及多價多肽錯合物、單重鏈抗體及其片段。構造諸如質體之典型表現載體，使之包含編碼多肽錯合物鏈或抗體鏈之各者的DNA序列。可使用用於免疫球蛋白之酶及化學斷裂及分離所得片段之任何適當的已建立的技術。來自噬菌體展示庫及來源於駱駝及轉殖基因小鼠之融合瘤的抗原特異性VH多肽結合域之識別、分離及表徵使用良好建立的方法。

本發明亦提供包括用於構造及表現本發明多肽結合錯合物之構造的載體。

應瞭解可構造含有編碼不僅多肽鏈之DNA序列的單一載體。舉例而言，可於相同質體上不同位置插入編碼與VH結合域締合的異二聚體之兩個不同多肽鏈的DNA序列。

或者，可將編碼各多肽鏈之DNA序列個別插入質體中，因此產生數個經構造質體，各編碼特定的多肽鏈。該等序列所插入的質體較佳為相容的。

接著各質體用於轉形宿主細胞，使得各宿主細胞含有編碼多肽結合錯合物中各多肽鏈之DNA序列。

可用於在細菌系統中選殖的適當表現載體包括諸如Col E1、pcR1、pBR322、pACYC 184及RP4之質體、噬菌體DNA或任何此等物質之衍生物。

對於用於在酵母系統中之選殖而言，適當表現之載體包括基於2微米起點之質體。

可將含適當哺乳動物基因啟動子序列之任何質體用於在哺乳動物系統中選殖。昆蟲或桿狀病毒啟動子序列可用於昆蟲細胞基因表現。該等載體包括來源於(例如)pBR322、牛乳頭狀瘤病毒、反轉錄病毒、DNA病毒及牛痘病毒之質體。

可用於表現多肽錯合物或抗體之適當宿主細胞包括細菌、酵母及真核細胞，諸如昆蟲或哺乳動物細胞株、轉殖基因植物、昆蟲、哺乳動物及其他非脊椎動物或脊椎動物表現系統。

本發明之多肽結合錯合物

應瞭解術語'多肽結合錯合物'包括自任何來源(例如相關細胞同系物、來自其他種類的同系物及變異體或其衍生物)獲得的同源多肽及核酸序列。

因此，本發明包括如本文所描述之多肽結合錯合物、VH結合域及二聚作用域的變異體、同系物或衍生物。

在本發明內容中，採用於超過至少30、較佳50、70、90或100個胺基酸含量之包括至少80、85、90、95、96、97、98、99、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9%相似、較佳至少98或99%相似之胺基酸序列的同源序列。雖然亦可關於相似度(亦即具有類似化學性質/功能之胺基酸殘基)考慮同源性，但在本發明內容中，較佳關於序列一致性表現同源性。

本發明亦包括用於產生本發明之多肽結合錯合物、二聚作用域及VH結合域的經構造表現載體及經轉形宿主細胞。

在相同宿主細胞中表現各鏈後，其可經回收從而以活性形式提供完整多肽結合錯合物或VH。

吾人預期在本發明較佳形式中，可由宿主細胞加工各多肽結合錯合物以形成二聚化多肽結合錯合物，其宜自其分泌。

用於製備重組抗體多肽結合錯合物之技術描述於以上參考案中且亦描述於(例如)EP-A-0 623 679；EP-A-0 368 684及EP-A-0 436 597中。

本發明之多肽結合錯合物之用途

本發明之多肽結合錯合物(包括其片段)可用於：活體內治療及預防應用、活體外及活體內診斷應用、活體外檢定及試劑應用及其類似應用。

本發明之多肽結合錯合物之治療及預防用途涉及將以上物質投與接受哺乳動物，諸如人類。

對於向哺乳動物投藥而言，至少90至95%同質性之實質上純的多肽結合錯合物(包括其片段)為較佳的，且對於醫藥學用途而言98至99%或以上之同質性為最佳的(尤其當該哺乳動物為人類時)。經純化後，部分或對於如所需要的同質性而言，如本文所描述之多肽結合錯合物可在診斷學或治療學上使用(包括離體使用)或用於發展及執行使用彼等熟習此項技術者已知的檢定程序。

一般而言，可以純化形式與藥理學上適當的載劑一起使用本發明之多肽結合錯合物。通常，此等載劑包括水性或醇性/水性溶液、乳液或懸浮液，其可包括鹽水及/或緩衝介質。非經腸媒劑包括氯化鈉溶液、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖及氯化鈉及乳酸化林格氏。

若需要保持多肽錯合物處於懸浮液狀態，則可自諸如羧甲基纖維素、聚乙烯吡咯啉酮、明膠及海藻酸鹽之增稠劑選擇適當生理學上可接受佐劑。

靜脈內媒劑包括流體及營養補充液及電解質補充液，例如以林格氏右旋糖為主之彼等媒劑。亦可存在諸如抗菌劑、抗氧化劑、螯合劑及惰性氣體之防腐劑及其他添加劑

(Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版)。

可作為分別投與的組合物或與其他藥劑結合使用本發明多肽錯合物及抗體(包括其片段)。此等藥劑可包括各種免疫治療藥物，諸如環孢黴素(cyclosporine)、甲胺喋呤、阿德里黴素(adriamycin)、順鉑或免疫毒素。或者，可與在其作用位點轉化前藥之酶組合使用多肽結合錯合物。

醫藥組合物可包括與所選本發明之多肽結合錯合物組合之各種細胞毒性或其他藥劑之"混合液"，或甚至所選本發明之多肽結合錯合物之組合。

投與本發明醫藥組合物之途徑可為任何熟習此項技術者通常已知的途徑。對於包括(但不限於)免疫療法之療法而言，可根據標準技術向任何患者投與本發明之多肽結合錯合物。投藥可藉由任何適當的模式，包括非經腸、靜脈內、肌肉內、腹膜內、經皮、經由肺途徑或同樣適當的，藉由以導管直接灌輸。投藥之劑量及頻率將視患者年齡、性別及病症、其他藥物之同時投藥、副適應症及臨床家將考慮的其他參數而定。

本發明多肽結合錯合物及抗體可經凍乾用於儲存且在使用前在適當載劑中復水。可使用已知凍乾及復水技術。熟習此項技術者應瞭解：凍乾及復水可導致各種程度之功能活性損失且可必須上調使用含量以補償。

當用作內抗體時，可使用基於非病毒或病毒的載體遞送該多肽結合錯合物，或可作為導致在所靶細胞中吸收的

脂質體或替代調配物遞送。

另外，本發明之多肽結合錯合物可用於診斷目的。舉例而言，可相對於在疾病狀態期間特異表現或在給定疾病狀態期間含量改變的抗原產生或出現如本文所描述之VH結合域。對於診斷或試劑目的而言，多肽結合錯合物可包含結合相同抗原上一或多種抗原決定基的VH域，或者一或多種結合域可用作將該多肽錯合物結合至界定的基質或結合對於檢定讀出之定量或定性態樣而言所需的檢定組份之捕獲域。

對於諸如診斷或示蹤目的之某些目的而言，可添加標記。適當標記包括(但不限於)任何以下標記：放射性標記、NMR自旋標記及螢光標記。偵測標記之方式為彼等熟悉此項技術者所熟悉的。

可投與含有本發明之多肽結合錯合物或其混合液之組合物用於預防性及/或治療性治療。

可將含有一或多種本發明之多肽結合錯合物之組合物用於預防及治療設定以協助哺乳動物中所選靶細胞集之改變、失活、殺傷或移除。另外，可離體或在活體外選擇性使用本文所選目錄所描述之多肽結合錯合物以殺傷、耗盡靶細胞集或另外有效地自細胞之異質集合中移除靶細胞集。

實例

實例 1

四價單特異性抗 α TNF多肽結合蛋白

該構造來源於先前表徵之單株抗體，其在經 aTNF 挑釁的轉殖基因小鼠中產生單一重鏈 IgM。該 VH 域包含駱駝 V 片段及人類 DJ 及恆定區。

刪除抗體之 CH2CH3 主鏈且以 CH1 免疫球蛋白重鏈域及以免疫球蛋白輕鏈恆定區替代。接著複製 VH 域且使用經改質鉸鏈區於各構造的羧基末端選殖。此鉸鏈類似於已存在之 IgG2 鉸鏈序列，但藉由以脯胺酸替代半胱胺酸改變以預防抗體二聚體中半胱胺酸之交聯且經由脯胺酸提供額外的彈性以預防二級抗體在空間上受限制，其另外可抑制其功能。

因此藉由以脯胺酸(有下劃線)替代半胱胺酸(灰色陰影)，預防通常在人類 IgG2 鉸鏈中存在之硫橋的形成。脯胺酸向鉸鏈添加額外的彈性以允許變得經由鉸鏈連接至二聚作用域 COOH 末端之二級抗體域適當起作用。

正常 IgG 鉸鏈序列(半胱胺酸密碼子處於灰色陰影中，脯胺酸密碼子有下劃線)GAGCGCAAATG TTGTGTCGAG TGCCCACCG TGCCCA(SEQ ID NO:1) 及其互補序列由 AGCTTCTGAGCGCAAACCACCGAGTCGAGCCACCGC CACCAC(SEQ ID NO:2) 及其互補序列 TCGAGTGGTGGC GGTGGTGGCTCGACTGGTGGTTTGCGCTCAGA(SEQ ID NO:3) 替代。此亦提供具有與用於選殖目的的 HindIII(粗體)及 XhoI(斜體)位點相容之兩條單一股末端的片段(白盒鉸鏈(white box hinge)，圖 2，中間)。

藉由標準重組 DNA 技術將最終構造接合至含有雞肌動蛋

白啟動子及CMV強化子序列之bluescript(Pbluescript11sk+)表現質體中(圖22, 表現質體)。

培養雙功能抗體表現質體且藉由標準方法(Superfect)將其與質體pGK-hygro(以允許選擇經轉染細胞)共轉染入CHO細胞中。在含濕黴素(hygromycin)培養基中選擇陽性純系, 且藉由對含有經CHO細胞分泌的雙功能抗體之生長培養基執行標準aTNF ELISA經陽性識別為表現雙功能抗體。在非還原及還原條件下執行此等經ELISA選擇的純系之西方墨點法, 以顯示與單體相比較自該質體表現的蛋白為二聚體。因此ELISA及西方墨點法共同顯示該雙功能抗體作為二聚體由經轉染CHO細胞表現及分泌進入培養基中, 且該抗體可結合aTNF。aTNF VH單體、二聚體及四聚體之結合親和力的比較顯示四聚體具有最大結合親和力。

實例2

包含來源於IgG4的VH結合域及缺乏重鏈效應功能之CH2CH3二聚作用域的雙特異性二價多肽結合錯合物

使用於二聚作用域之胺基末端相對於E. coli HSP70蛋白產生的駱駝化人類VH域及於羧基末端相對於PERV gag抗原產生的駱駝(llama)VHH域(Dekker等人, (2003) J. Virol. 77, (22) 12132-9)進行實驗。實驗細節描述於PCT/GB 2005/002892之實例2, 圖22、23及24中, 差別在於IgG2 CH2-CH3二聚作用域由人類IgG4 CH2-CH3二聚作用域替代(Bruggemann, M.等人(1987) J. Ex. Med., 166, 1351-1361)。

將包含多肽結合錯合物之載體表現於CHO細胞中且西方墨點法顯示所分泌之多肽結合錯合物結合HSP70及gag抗原兩者。

實例 3-5

可使用其他二聚作用域(例如*jun*及*fos*基因之白胺酸拉鏈域)代替使用免疫球蛋白恆定區，與不同(人類)VH域結合，來產生多價多特異性結合分子。*jun*拉鏈域可與*fos*拉鏈域異二聚化，但其亦可同二聚化。以下兩個實例描述使用此等拉鏈域之異及同二聚作用。最後實例描述使用其他域。

實例 3.使用*fos*及*jun*拉鏈域異二聚化的雙特異性二價結合分子。

產生該等分子之基本流程說明於圖 6 中，且由以下步驟組成：

1. 藉由 PCR 以於 5'側具有 EcoRI 位點之引子(引子 1)及與引導序列同源且在 3'側與鉸鏈區同源的引子加上與 *fos* 及 *jun* 序列之 5'端同源的序列(分別為引子 2 及 3)，擴增相對於 rTTA 發展的 VH(Janssens 等人，2006)。標準 PCR 擴增產生 600 鹼基對之關於 *fos*(圖 6 實線)或 *fos*(圖 7 虛線)的片段 A。

引子 1：CTGGAATTCTCACCATGGAGCTGGGGCTGAGC(SEQ ID NO:4)

引子 2：CGCTTGGAGTGTATCAGTCAGTGGGCACCTTGGGCACGGGGG(SEQ ID NO:5)

引子 3 : CAGCCGGGCGATTCTCTCCAGTGGGCACC
TTGGGCACGGGGG(SEQ ID NO:6)

2. 自編碼 fos 或 jun 之人類 cDNA 擴增 fos 及 jun 白胺酸拉鏈區。於 5' 端之該等引子含有與 rTTA VH 之鉸鏈區的 3' 端同源的序列(分別為引子 4 及 5)。於 3' 端之引子與拉鏈區之 3' 端同源(引子 6 及 7)且於 3' 端含有與存在於 A5 VH 之 5' 端的鉸鏈區 5' 端(PCT/GB 2005/002892)同源之序列(Janssens 等人, 2006)。fos 及 jun 序列之擴增產生分別各為 200 bp 之片段 B(圖 6 實線)及 C(圖 6 虛線)。

引子 4 : CCCCCGTGCCCAAGGTGCCCACTGACTGA
TACACTCCAAGCG(SEQ ID NO:7)

引子 5 : CCCCCGTGCCCAAGGTGCCCACTGGAGAGA
ATCGCCCGGCTG(SEQ ID NO:8)

引子 6 : TGGTGGTTTTCGCTCAGAAGCCAGGATGA
ACTCTAGTTTTTC(SEQ ID NO:9)

引子 7 : TGGTGGTTTTCGCTCAGAAGCAACGTGG
TTCATGACTTTCTG(SEQ ID NO:10)

3. 首先將不含任何半胱胺酸之鉸鏈序列選殖(如 PCT/GB 2005/002892 中所指定, ERKPPVEPPPPP)於 A5 VH 區上(Dekker 等人, 2003; Janssens 等人, 2006)。隨後使用與鉸鏈區之 5' 端同源的引子及與 A5 VH 區之 3' 端同源的引子(包括終止密碼子(引子))擴增鉸鏈及 A5 VH, 產生 400 鹼基對之 fos(圖 6 實線)或 jun(圖 6 虛線)之片段 D。

引子 8 : GAAAACTAGAGTTCATCCTGGCTTCTGA
GCGCAAACCAACCA(SEQ ID NO:11)

引子 9 : CAGAAAGTCATGAACCACGTTGCTTCTGAG
CGCAAACCAACCA(SEQ ID NO:12)

引子 10 : GTCGAATTCTCATTCCGAGGAGACGGTGA
CCTGGGTC(SEQ ID NO:13)

4. 以等莫耳量混合片段 A(圖 6 實線)、B 及 D(圖 6 實線)且以等莫耳量混合片段 A(圖 6 虛線)、C 及 D(圖 6 虛線)，使之變性且使用引子 1 及 10 進行 PCR 擴增，產生 1200 鹼基對之片段(參見圖 7，以下 rTTA-fos-A5，於 A5 序列之 5' 含有特徵性 XhoI 位點)。
5. 藉由標準方法將 rTTA-foszip-A5 及 rTTA-junzip-A5 選殖進入酵母(*Pichia*, Invitrogen)或標準 CHO(介於 CAG 啟動子及 polyA 位點之間)表現載體中。分別將此等構造引入酵母及 CHO 細胞中。
6. 收集培養基及細胞且由 ELISA 分析顯示其仍結合 rTTA 及 A5 且天然西方墨點法顯示其為二聚化的。

實例 4

此將藉由與實例 3 中所示相同方法顯示同二聚作用，其中不同之處在於僅執行實驗之 jun 拉鏈部分。在 *Pichia* 或 CHO 細胞中表現 rTTA-junzip-A5 且由實例 2 中相同方法顯示為形成 rTTA 及 A5 結合同二聚體。

實例 5

與實例 3 及 4 中類似的方法可應用於其他同或異二聚體形

成域。對於該等狀況而言，用於實例2步驟2中的引子將與該等其他二聚化域同源且在步驟1及3中所使用的寡核苷酸將與此等域具有末端重複以能進行步驟4。

在所有實例中，可使用其他VH或VL域或其他結合域(諸如轉錄因子DNA結合域或配位子結合域)。

在以上說明書中所提及之所有公開案以引用方式併入本文中。

對於彼等熟習此項技術者而言，在不脫離本發明範疇及精神狀況下，各種修改及變化為顯而易見的。雖然已關於特定較佳實施例描述本發明，應理解如所主張之本發明不應不適當地限制於該等特定實施例。實際上，對於彼等熟悉生物化學、分子生物學及生物技術或相關領域者而言熟習的、用於執行本發明之所述模式的各種修改旨在處於以下申請專利範疇內。

【圖式簡單說明】

圖1：顯示包含VH多肽結合域、由鉸鏈或連接序列連接之同二聚作用域的多肽結合錯合物。VH多肽域位於二聚作用域之胺基及羧基末端。

- A. 顯示四價單特異性多肽結合域
- B. 顯示二價雙特異性多肽結合域
- C. 顯示單價四特異性多肽結合域

圖2：顯示異二聚作用結合域之不同組態。

圖3：顯示產生四價單特異性多肽結合錯合物之策略。

圖4：顯示產生具有對GAG及HSP之結合親和力之雙特

異性二價多肽結合錯合物的策略。

圖5：顯示包含多於一個胺基及羧基末端VH域之雙特異性四價抗體的實例。

圖6：顯示使用*fos*及*jun*拉鏈域產生異二聚化雙特異性二價結合分子之流程。

圖7：PCR結果。

序列表

<110>	荷蘭鹿特丹 ERASMUS 大學	
<120>	結合分子3	
<130>	P042858WO	
<140>	096102902	
<141>	2007-01-25	
<150>	GB0601513.5	
<151>	2006-01-25	
<160>	13	
<170>	SeqWin99, version 1.02	
<210>	1	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	IgG鉸鏈編碼序列	
<400>	1	
	gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgccca	36
<210>	2	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	IgG鉸鏈編碼序列置換	
<400>	2	
	agcttctgag cgcaaaccac cagtcgagcc accaccgcca ccac	44
<210>	3	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	IgG鉸鏈編碼序列置換互補序列	
<400>	3	
	tcgagtgggtg gcggtgggtgg ctcgactggt ggtttgcgct caga	44
<210>	4	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	4	
	ctggaattct caccatggag ctggggctga gc	32
<210>	5	
<211>	42	

<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	5	
	cgcttggagt gtatcagtca gtgggcacct tgggcacggg gg	42
<210>	6	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	6	
	cagccgggcg attctctcca gtgggcacct tgggcacggg gg	42
<210>	7	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	7	
	cccccgtgcc caaggtgccc actgactgat acactccaag cg	42
<210>	8	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	8	
	cccccgtgcc caaggtgccc actggagaga atcgcccggc tg	42
<210>	9	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	9	
	tggtgggtttg cgctcagaag ccaggatgaa ctctagtttt tc	42
<210>	10	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	PCR引子	

<400>	10	
tggtgggttg cgctcagaag caacgtgggt catgactttc tg		42
<210>	11	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	11	
gaaaaactag agttcatcct ggcttctgag cgcaaaccac ca		42
<210>	12	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	12	
cagaaagtca tgaaccacgt tgcttctgag cgcaaaccac ca		42
<210>	13	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	13	
gtcgaattct cattccgagg agacggtgac ctgggtc		37

五、中文發明摘要：

本發明係關於製造單、二及多價多肽結合錯合物，以及單、二或多特異性多肽結合錯合物及其用途。本發明亦係關於衍生自噬菌體展示庫、轉基因動物或天然來源的抗原特異性VH結合域之多樣性彙集的製造及用途。該等VH結合域及該等二聚作用域較佳地包含人類序列。該等多肽結合錯合物包含具有較佳使用天然鉸鏈或連接肽融合於二聚作用域胺基及羧基末端之四個抗原結合[VH]域的同或異二聚作用域。其中該等多肽結合錯合物缺乏CH₂-CH₃效應功能時，其尺寸較佳小於120 kDa。本文描述製造途徑。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

1. 一種多肽結合錯合物，其包含第一多肽鏈與第二多肽鏈之二聚體，其中各多肽鏈包含胺基末端VH結合域；羧基末端VH結合域；及二聚作用域，其中該二聚作用域缺乏 $C_{H2}-C_{H3}$ 功能。
2. 如請求項1之多肽結合錯合物，其中該二聚作用域為經工程處理的或天然的 CH_2-CH_3 域。
3. 如請求項1或請求項2之多肽結合錯合物，其中該第一多肽鏈之二聚作用域不同於該第二多肽鏈之二聚作用域，以致該多肽結合錯合物為異二聚體。
4. 如請求項1及2之多肽結合錯合物，其中該第一多肽鏈之二聚作用域與該第二多肽鏈之二聚作用域相同，以致該多肽結合錯合物為同二聚體。
5. 如前述請求項中任一項之多肽結合錯合物，其中該等四個VH結合域顯示相同的特異性(四價單特異性)。
6. 如請求項1、2、3及4中任一項之多肽結合錯合物，其中該等胺基末端VH結合域顯示相同的特異性；該等羧基末端VH結合域顯示相同的特異性；且該等胺基末端及該等羧基末端VH域之結合特異性不同(二價雙特異性)。
7. 如請求項1、2、3及4中任一項之多肽結合錯合物，其中該等胺基末端VH結合域顯示相同的特異性；且該等羧基末端VH結合域顯示彼此不同且與該等胺基末端VH域不同的特異性(三特異性)。
8. 如請求項1、2、3及4中任一項之多肽結合錯合物，其中

該等羧基末端VH結合域顯示相同的特異性；且該等胺基末端VH結合域顯示彼此不同且與該等羧基末端VH域不同的特異性(三特異性)。

9. 如請求項1、2、3及4中任一項之多肽結合錯合物，其中該等胺基末端VH結合域顯示彼此不同的特異性；且該等羧基末端VH結合域顯示彼此不同且與該等胺基末端VH域不同的特異性(四特異性)。
10. 如前述請求項中任一項之多肽結合錯合物，其尺寸不超過120 kDA。
11. 如前述請求項中任一項之多肽結合錯合物，其中一或多個該等VH結合域可由另一類別之多肽結合域取代。
12. 如前述請求項中任一項之多肽結合錯合物，其中該第一多肽鏈、該第二多肽鏈或兩者多肽鏈在該胺基末端結合域與該二聚作用域之間；或該羧基末端結合域與該二聚作用域之間；或兩者另外包含彈性鉸鏈域。
13. 如請求項11之多肽結合錯合物，其中該另一結合域為細胞因子、生長因子、受體拮抗劑或促效劑或配位子。
14. 如前述請求項中任一項之多肽結合錯合物，其中各多肽鏈另外包含一或多個串聯的且由鉸鏈域分隔的額外胺基末端VH結合域；及一或多個串聯的且由鉸鏈域分隔的額外羧基末端VH結合域。
15. 一種經分離聚核苷酸，其編碼如前述請求項中任一項之該第一多肽鏈、該第二多肽鏈或兩者多肽鏈。
16. 一種表現載體，其含有如請求項15之經分離聚核苷酸。

17. 一種宿主細胞，其經如請求項16之表現載體轉形。
18. 一種產生如前述請求項中任一項之多肽結合錯合物的方法，其包含培養如請求項17之宿主細胞及分離該多肽錯合物。
19. 一種產生如前述請求項中任一項之多肽結合錯合物的方法，其包含：
以編碼如請求項1至14中任一項之多肽結合錯合物之一或多個載體轉形宿主細胞；
在允許表現該(該等)載體之編碼序列之條件下培養該宿主細胞；及
自該宿主細胞收穫該多肽結合錯合物。
20. 一種產生如請求項1至14中任一項之多肽結合錯合物的方法，其中該VH結合域、二聚作用域或連接多肽係由諸如肽化學或接合之合成途徑產生。
21. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至14中任一項而產生之多肽結合錯合物。
22. 一種如請求項1至14中任一項之多肽結合錯合物在製備用於預防或治療疾病之藥品製備中的用途。
23. 一種治療患者之方法，其包含向需要治療之患者投與如請求項22之醫藥組合物。
24. 一種如請求項1至14中任一項之多肽結合錯合物的用途，其係作為診斷劑、試劑、抗體酶、抑制劑、細胞化學試劑或成像劑。
25. 一種如請求項1至14中任一項之多肽結合錯合物之用

途，其係作為內抗體。

26. 一種治療患者之方法，其包含向需要治療之患者投與如請求項16之載體或如請求項21之醫藥組合物。

十一、圖式：

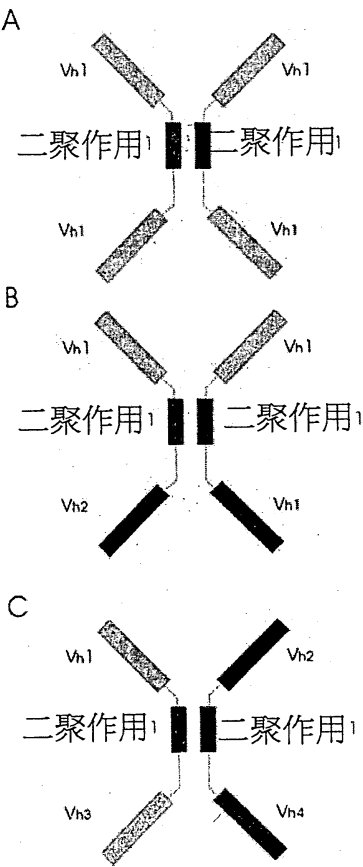
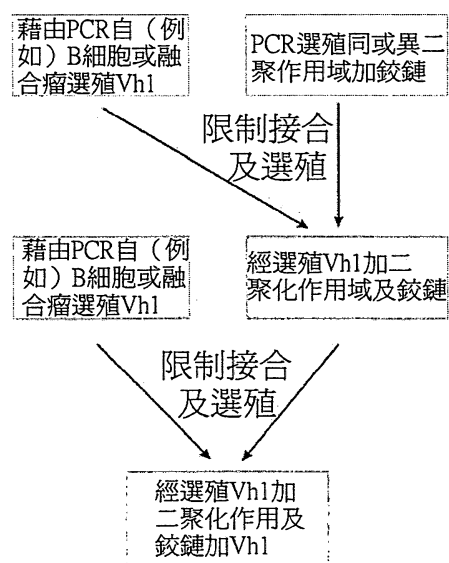
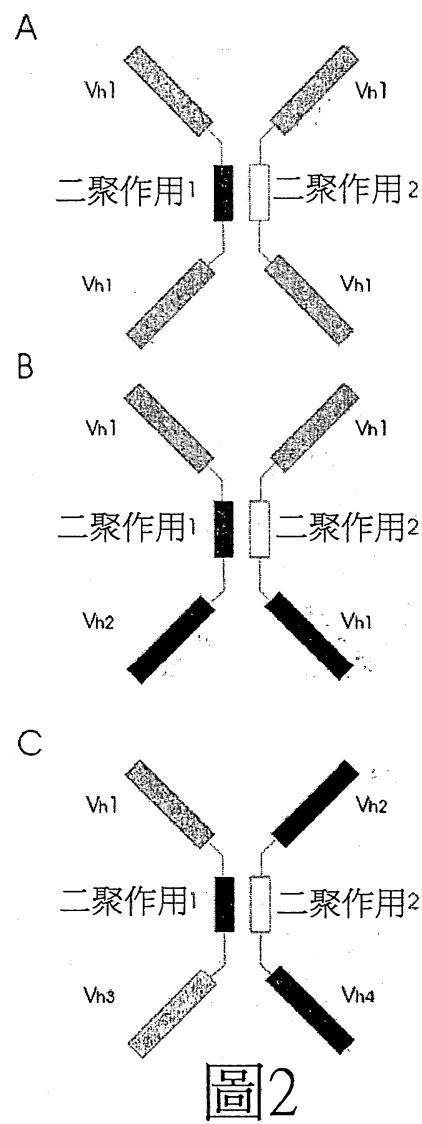


圖1



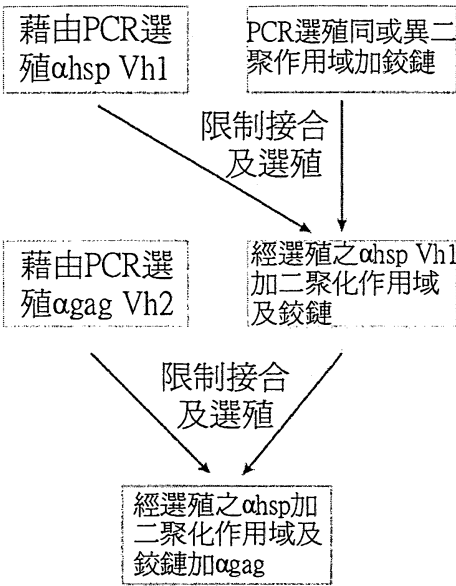


圖4

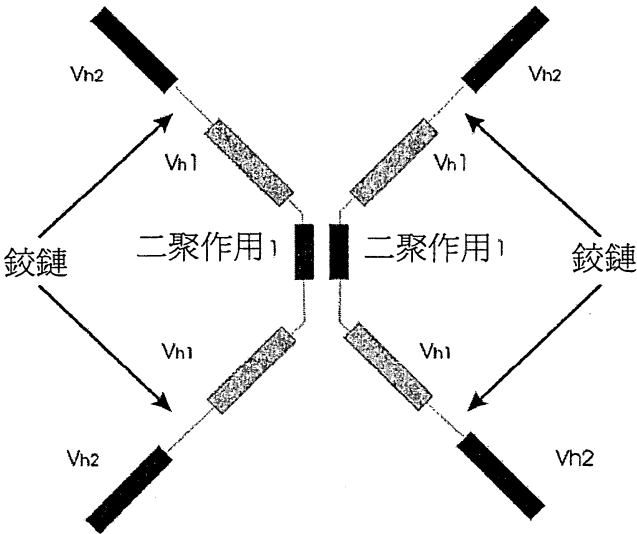


圖5

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)