



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103124743 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 29

(21) 申请号 201080064891. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 12. 29

C07K 16/28 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

61/290, 840 2009. 12. 29 US

A61P 35/00 (2006. 01)

61/365, 266 2010. 07. 16 US

A61P 37/00 (2006. 01)

61/366, 743 2010. 07. 22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 08. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/062434 2010. 12. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02011/090761 EN 2011. 07. 28

(71) 申请人 新兴产品开发西雅图有限公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 J·W·布兰肯希普 P·丹

S·K·纳塔拉加 P·A·阿尔盖特

R·A·舍诺尔特

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

权利要求书4页 说明书54页

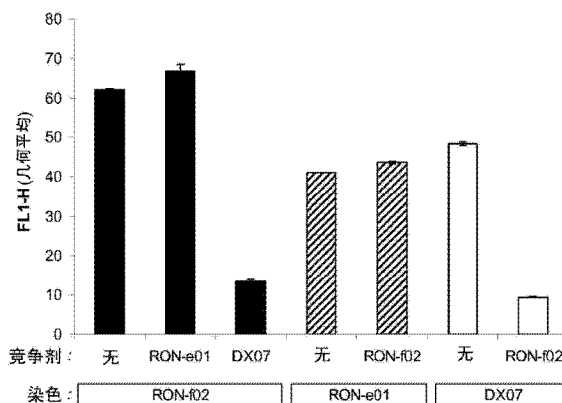
序列表(电子公布) 附图16页

(54) 发明名称

RON 结合构建物及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供特异性结合人巨噬细胞刺激受体 (MS T1R, 本发明中也称作 Recepteur d'origine Nantaise 或 RON) 的免疫球蛋白结合分子, 包括具有一个或多个其它结构域如一个或多个抗体恒定区结构域的单特异性与多特异性的单链结合蛋白和抗体。还提供了此类结合蛋白的治疗应用, 例如用于治疗癌症和炎症疾病。



1. 一种特异性结合人 RON 的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于所述免疫球蛋白结合多肽包含:

(a) 含如下组件的 VL 结构域

i. SEQ ID NO:67 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:68 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:69 所示的 CDR3 氨基酸序列;或

ii. SEQ ID NO:141 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:142 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:143 所示的 CDR3 氨基酸序列;或

(b) 含如下组件的 VH 结构域

i. SEQ ID NO:70 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:71 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:72 所示的 CDR3 氨基酸序列;或

ii. SEQ ID NO:144 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:145 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:146 所示的 CDR3 氨基酸序列;或

(c) (a) 中的 VL 和 (b) 中的 VH。

2. 如权利要求 1 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO:80 或 152 中任一项所示的氨基酸序列,而所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO:81、153 和 176 中任一项所示的氨基酸序列。

3. 如权利要求 1 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述 VL 和 VH 结构域是人源化的。

4. 如权利要求 3 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述人源化 VL 包含 SEQ ID NO:82、83 或 154 中任一项所示的氨基酸序列,而所述人源化 VH 结构域包含 SEQ ID NO:84-86、155 和 156 中任一项所示的氨基酸序列。

5. 如权利要求 1 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述免疫球蛋白结合多肽是抗体或抗体的抗原结合片段。

6. 如权利要求 5 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述抗体或所述抗体的抗原结合片段是非人的、嵌合的、人源化的或者人的。

7. 如权利要求 6 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述非人或嵌合型抗体或所述非人或嵌合型抗体的抗原结合片段具有 VL 结构域和 VH 结构域,所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO:80 和 152 中任一项所示的氨基酸序列,而所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO:81、153 和 176 中任一项所示的氨基酸序列。

8. 如权利要求 6 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述人源化抗体或者所述人源化抗体的抗原结合片段具有 VL 结构域和 VH 结构域,所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO:82、83 和 154 中任一项所示的氨基酸序列,而所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO:84-86、155 和 156 中任一项所示的氨基酸序列。

9. 如权利要求 6 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述抗体或者所述抗体的抗原结合片段具有 VL 结构域和 VH 结构域,所述 VL 结构域与 SEQ ID NO:80、82、83、152 和 154 中任一项所示的氨基酸序列的相同性至少约 90%,而所述 VH 结构域与 SEQ ID NO:81、84-86、153、155、156 和 176 中任一项所示的氨基酸序列的相同性至少约 90%。

10. 如权利要求 1 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述结合多肽选自 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、scFv、dAb 和 Fv 片段。

11. 如权利要求 10 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述 scFv 具有 VL 结构域和 VH 结构域,所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO:80 和 152 中任一项所示的氨基酸序列,而所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO:81、153 和 176 中任一项所示的氨基酸序列。

12. 如权利要求 10 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述 scFv 是人源化的且具有 VL 结构域和 VH 结构域,所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO:82、83 和 154 中任一项所示的氨基酸序列,而所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO:84-86、155 和 156 中任一项所示的氨基酸序列。

13. 如权利要求 1 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述免疫球蛋白结合多肽是小模块免疫药物 (SMIP) 蛋白。

14. 如权利要求 13 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述 SMIP 蛋白是非人的、嵌合的、人源化的或人的。

15. 如权利要求 14 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述非人或嵌合型 SMIP 蛋白具有 VL 结构域和 VH 结构域,所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO:80 和 152 中任一项所示的氨基酸序列,而所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO:81、153 和 176 中任一项所示的氨基酸序列。

16. 如权利要求 14 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述人源化 SMIP 蛋白具有 VL 结构域和 VH 结构域,所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO:82、83 和 154 中任一项所示的氨基酸序列,而所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO:84-86、155 和 156 中任一项所示的氨基酸序列。

17. 如权利要求 13-16 中任一项所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述免疫球蛋白结合多肽包括含 SEQ ID NO:349-366 和 420-475 中任一项所示氨基酸序列的铰链结构域。

18. 如权利要求 17 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述免疫球蛋白结合多肽包含免疫球蛋白恒定亚区结构域,所述恒定亚区结构域包含 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2 或 IgD 的免疫球蛋白 CH2CH3 结构域。

19. 如权利要求 18 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述免疫球蛋白结合多肽包含免疫球蛋白恒定亚区结构域,所述恒定亚区结构域包含人 IgG1 CH2CH3。

20. 如权利要求 19 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述人 IgG1 CH2 包含 SEQ ID NO:241 的氨基酸序列且所述人 IgG1 CH3 包含 SEQ ID NO:319 的氨基酸序列。

21. 如权利要求 14 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述 SMIP 蛋白包含与选自氨基酸序列 SEQ ID NO:94-114 和 160-168 的任一氨基酸序列的相同性为至少 90% 的序列。

22. 如权利要求 1-21 中任一项所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述免疫球蛋白结合多肽包含在第一单链多肽中,所述第一单链多肽包含能与第二单链多肽结合的第一异二聚化结构域,所述第二单链多肽包含不同于所述第一异二聚化结构域的第二异二聚化结构域,其中结合的第一与第二单链多肽形成多肽异二聚体。

23. 如权利要求 22 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述多肽异二聚体包含:含 SEQ ID NO:170 的氨基酸序列的第一单链多肽,和含 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列的第二单链多肽;

含 SEQ ID NO:172 的氨基酸序列的第一单链多肽,和含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列的

第二单链多肽；

含 SEQ ID NO:174 的氨基酸序列的第一单链多肽,和含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的第二单链多肽；

含 SEQ ID NO:174 的氨基酸序列的第一单链多肽,和含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的第二单链多肽；

含 SEQ ID NO:116 的氨基酸序列的第一单链多肽,和含 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列的第二单链多肽；

含 SEQ ID NO:118 的氨基酸序列的第一单链多肽,和含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列的第二单链多肽；

含 SEQ ID NO:120 的氨基酸序列的第一单链多肽,和含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的第二单链多肽；

含 SEQ ID NO:120 的氨基酸序列的第一单链多肽,和含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的第二单链多肽。

24. 如权利要求 1-21 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述免疫球蛋白结合多肽包含在单链多特异性结合蛋白中,所述多特异性结合蛋白含有置于第一结合域和第二结合域之间的恒定亚区结构域,其中所述第一结合域是如权利要求 1-21 所述的人 RON 结合域,而所述第二结构域是如权利要求 1-21 所述的人 RON 结合域或是特异性针对人 RON 以外的靶分子。

25. 如权利要求 24 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述免疫球蛋白恒定亚区是 IgG1 CH2CH3。

26. 如权利要求 24 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述免疫球蛋白恒定亚区置于第一接头肽和第二接头肽之间。

27. 如权利要求 26 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述第一和第二接头肽独立地选自 SEQ ID NO:610-777 中所提供的接头。

28. 如权利要求 26 或 27 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,所述第一接头肽包含免疫球蛋白铰链区而所述第二接头肽包含 II 型 C-凝集素茎部区。

29. 如权利要求 24 所述的免疫球蛋白结合多肽,其特征在于,具有以下结构：

N-BD1-X-L2-BD2-C,其中：

BD1 包含对人 RON 特异性的 scFv；

-X- 是 -L1-CH2CH3-,其中 L1 是免疫球蛋白 IgG1 铰链,所述 IgG1 铰链具有的氨基酸序列包含 SEQ ID NO:349-366、420-475 中的任一项,且其中 -CH2CH3- 是人 IgG1 CH2CH3 区或其缺少一个或多个效应物功能的变体；

L2 是接头肽,其具有的氨基酸序列包含 SEQ ID NO:610-777 的任一项；以及

BD2 是特异性针对人 RON 或人 RON 以外靶分子的结合域。

30. 一种组合物,所述组合物包含权利要求 1-29 中任一项所述的免疫球蛋白结合多肽和药学上可接受的赋形剂。

31. 一种能表达权利要求 1-30 中任一项所述的免疫球蛋白结合多肽的表达载体。

32. 一种包含权利要求 31 所述的表达载体的宿主细胞。

33. 一种治疗癌症的方法,其包括给予有需要的对象治疗有效量的权利要求 30 所述的

组合物。

34. 如权利要求 33 所述的方法,其特征在于,所述癌症选自胰腺癌、肺癌、结肠癌和乳腺癌。

35. 一种治疗炎性疾病的方法,其包括给予有需要的对象治疗有效量的权利要求 30 所述的组合物。

RON 结合构建物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请根据 35U. S. C. § 119(e) 要求 2009 年 12 月 29 日提交的美国临时专利申请号 61/290,840、2010 年 7 月 16 日提交的美国临时专利申请号 61/365,266、和 2010 年 7 月 22 日提交的美国临时专利申请号 61/366,743 的优先权；其全文各自通过引用纳入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 本申请的相关序列表以文本格式代替纸件副本提供，由此通过引用纳入说明书。含所述序列表的文本文件名为 910180_424PC_SEQUENCE_LISTING.txt。该文本文件为 746KB，创建于 2010 年 12 月 29 日，在提交申请的同时通过 EFS-Web 以电子方式提交。

[0005] 背景

技术领域

[0006] 本发明一般涉及结合分子及其治疗应用的领域，更具体涉及含有能结合 RON(recepteur d'origine Nantaise) 的结合域和一个或多个其它结构域如一个或多个抗体恒定区结构域，RON 在本文中也称作巨噬细胞刺激 1 受体或 MST1 R。

背景技术

[0007] RON(recepteur d'origine Nantaise, 也称作 MST1R) 是受体型蛋白酪氨酸激酶，为胚胎发育所必需，并在炎症应答中起重要作用 (Camp 等, Ann. Surg. Oncol. 12:273-281(2005))。RON 可在控制炎症期间对巨噬细胞的应答中起作用 (Correll, P. H. 等, Genes Funct. 1997 年 2 月, 1(1):69-83)。RON 大多在上皮衍生细胞类型中表达，并已提示 RON 和多种其它受体型酪氨酸激酶类似，可在恶性上皮癌的发展中起作用 (Wang 等, Carcinogenesis 23:1291-1297(2003))。

[0008] 受体型蛋白酪氨酸激酶通常由胞外结构域和胞内结构域组成，胞外结构域结合胞外配体如生长因子和激素，胞内结构域具有激酶功能域。受体型蛋白酪氨酸激酶已细分入数类，RON 是受体酪氨酸激酶的 MET 族中的一员，该族还包括 Stk、c-Met 和 c-Sea (Camp 等, Ann. Surg. Oncol. 12:273-281(2005))。RON 和 c-Met 是人体内所见的该族的仅有成员，且它们总体上有 65% 的同源性。C-Met 是肝细胞生长因子 / 分散因子 (HGF/SF) 的受体，并已相当充分地鉴定为原癌基因。

[0009] RON 是跨膜异二聚体，包括一条源自单链前体并由数个二硫键保持在一起的链。RON 的胞内部分含有激酶结构域和调控元件。胞外区域的特征为存在脑信号蛋白 (sema) 结构域 (有数个高度保守半胱氨酸残基的约 500 个氨基酸的臂 (stretch), PSI (丛蛋白、脑信号蛋白、整联蛋白) 结构域和 4 个免疫球蛋白样折叠。

[0010] 还鉴定到 RON 的配体巨噬细胞刺激蛋白 (MSP)，其与 c-Met 配体 HGF/SF 有约 40% 的同源性。MSP 和 HGF 属于以联环 (kringle) 结构域为特征的血纤维蛋白溶酶原 - 凝血酶原家族。MSP 也与癌症有关。例如，Welm 等观察到 MSP 与乳腺癌的转移和预后不良之间的关联 (PNAS 104:7507-7575(2007))。

[0011] 受体酪氨酸激酶中只有 RON 和 c-Met 具有胞外 sema 结构域,且已证明 RON 的 sema 结构域包括其配体结合位点。MSP 结合 RON 引起 RON 的激酶结构域内的磷酸化,这导致 RON 激酶活性的提高。或者, β 1 整联蛋白可通过 Src 依赖性途径磷酸化并激活 RON (Camp 等, Ann. Surg. Oncol. 12:273-281 (2005))。RON 的激活启动包括 PI3-K、Ras、src、 β - 联蛋白和 Fak 信号转导在内的多个途径的信号转导。RON 激活的很多信号转导途径与癌症相关过程如增殖和抑制细胞凋亡有关。

[0012] RON 本身也因多种原因而与癌症发展有关。例如, RON 在多种人肿瘤中表达,包括乳腺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌和胰腺癌。此外, RON 已显示在体外提高细胞增殖与活动力。而且, RON 在 RON 转基因小鼠中诱导肿瘤生长和转移。(Waltz 等, Cancer Research 66:11967-11974 (2006))。因此,需要能抑制 RON 信号转导途径的分子。

发明内容

[0013] 本发明的一方面提供特异性结合人 RON 的免疫球蛋白结合多肽,其中所述免疫球蛋白结合多肽包含:(a) VL 结构域,其含有 i. SEQ ID NO:67 的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:68 的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:69 的 CDR3 氨基酸序列;或 ii SEQ ID NO:141 的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:142 的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:143 的 CDR3 氨基酸序列;或者 (b) VH 结构域,其含有 i. SEQ ID NO:70 的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:71 的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:72 的 CDR3 氨基酸序列;或 ii SEQ ID NO:144 的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:145 的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:146 的 CDR3 氨基酸序列;或者 (c) 如 (a) 所述的 VL 和如 (b) 所述的 VH。在一种实施方式中, VL 结构域包含 SEQ ID NO:80 或 152 中任一项所示的氨基酸序列,而 VH 结构域包含 SEQ ID NO:81、153 和 176 中任一项所示的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述 VL 和 VH 结构域是人源化的。在某些实施方式中,人源化 VL 包含 SEQ ID NO:82、83 和 154 中任一项所示的氨基酸序列,而人源化 VH 包含 SEQ ID NO:84-86、155 和 156 中任一项所示的氨基酸序列。

[0014] 在某些实施方式中,所述免疫球蛋白结合多肽是抗体或抗体的抗原结合片段。就此而言,所述抗体或所述抗体的抗原结合片段是非人的、嵌合的、人源化的或者人的。

[0015] 在本发明所述免疫球蛋白结合多肽的一种实施方式中,所述非人或嵌合型抗体或所述非人或嵌合型抗体的抗原结合片段具有 VL 结构域和 VH 结构域,该 VL 结构域包含 SEQ ID NO:80 和 152 中任一项所示的氨基酸序列,该 VH 结构域包含 SEQ ID NO:81、153 和 176 中任一项所示的氨基酸序列。

[0016] 在本发明所述免疫球蛋白结合多肽的一种实施方式中,所述人源化抗体或者所述人源化抗体的抗原结合片段具有 VL 结构域和 VH 结构域,该 VL 结构域包含 SEQ ID NO:82、83 和 154 中任一项所示的氨基酸序列,该 VH 结构域包含 SEQ ID NO:84-86、155 和 156 中任一项所示的氨基酸序列。

[0017] 在本发明所述免疫球蛋白结合多肽的另一实施方式中,所述抗体或者所述抗体的抗原结合片段具有 VL 结构域和 VH 结构域,该 VL 结构域与 SEQ ID NO:80、82、83、152 和 154 中任一项所示的氨基酸序列的相同性至少约 90%,该 VH 结构域与 SEQ ID NO:81、84-86、153、155、156 和 176 中任一项所示的氨基酸序列的相同性至少约 90%。

[0018] 在本发明所述免疫球蛋白结合多肽的某些实施方式中,所述结合多肽选自 Fab 片

段、F(ab')₂ 片段、scFv、dAb 和 Fv 片段。在某些实施方式中,所述 scFv 具有 VL 结构域和 VH 结构域,该 VL 结构域包含 SEQ ID NO:80 和 152 中任一项所示的氨基酸序列,而该 VH 结构域包含 SEQ ID NO:81、153 和 176 中任一项所示的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述 scFv 是人源化的且具有 VL 结构域和 VH 结构域,该 VL 结构域包含 SEQ ID NO:82、83 和 154 中任一项所示的氨基酸序列,而该 VH 结构域包含 SEQ ID NO:84-86、155 和 156 中任一项所示的氨基酸序列。

[0019] 在本发明所述免疫球蛋白结合多肽的一种实施方式中,所述免疫球蛋白结合多肽是小模块免疫药物 (SMIP) 蛋白。在某些实施方式中,所述 SMIP 蛋白是非人的、嵌合的、人源化的或人的。在某些实施方式中,所述非人或嵌合型 SMIP 蛋白具有 VL 结构域和 VH 结构域,该 VL 结构域包含 SEQ ID NO:80 和 152 中任一项所示的氨基酸序列,而该 VH 结构域包含 SEQ ID NO:81、153 和 176 中任一项所示的氨基酸序列。在某些其它实施方式中,所述人源化 SMIP 蛋白具有 VL 结构域和 VH 结构域,该 VL 结构域包含 SEQ ID NO:82、83 和 154 中任一项所示的氨基酸序列,而该 VH 结构域包含 SEQ ID NO:84-86、155 和 156 中任一项所示的氨基酸序列。在其它实施方式中,本发明所述免疫球蛋白结合多肽包含具有 SEQ ID NO:349-366 和 420-475 中任一项所示氨基酸序列的铰链结构域。在另一实施方式中,本发明所述免疫球蛋白结合多肽包含免疫球蛋白恒定亚区结构域,该亚区结构域包含 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2 或 IgD 的免疫球蛋白 CH2CH3 结构域。在又一个的实施方式中,所示免疫球蛋白恒定亚区结构域包含人 IgG1 CH2CH3。在一种实施方式中,所述人 IgG1 CH2 包含 SEQ ID NO:241 的氨基酸序列而所述人 IgG1 CH3 包含 SEQ ID NO:319 的氨基酸序列。

[0020] 在某些实施方式中,所述 SMIP 蛋白包含与选自氨基酸序列 SEQ ID NO:94-114 和 160-168 的任一氨基酸序列的相同性为至少 90% 的序列。

[0021] 在本发明所述免疫球蛋白结合多肽的某些实施方式中,所述免疫球蛋白结合多肽包含在第一单链多肽中,该第一单链多肽包含能与第二单链多肽结合的第一异二聚化结构域,该第二单链多肽包含不同于第一异二聚化结构域的第二异二聚化结构域,其中第一与第二单链多肽的结合形成多肽异二聚体。在某些实施方式中,所述多肽异二聚体包括:包含 SEQ ID NO:170 的氨基酸序列的第一单链多肽,和包含 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列的第二单链多肽;包含 SEQ ID NO:172 的氨基酸序列的第一单链多肽,和包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列的第二单链多肽;包含 SEQ ID NO:174 的氨基酸序列的第一单链多肽,和包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的第二单链多肽;包含 SEQ ID NO:174 的氨基酸序列的第一单链多肽,和包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的第二单链多肽;包含 SEQ ID NO:116 的氨基酸序列的第一单链多肽,和包含 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列的第二单链多肽;包含 SEQ ID NO:118 的氨基酸序列的第一单链多肽,和包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列的第二单链多肽;包含 SEQ ID NO:120 的氨基酸序列的第一单链多肽,和包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的第二单链多肽;包含 SEQ ID NO:120 的氨基酸序列的第一单链多肽,和包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的第二单链多肽。

[0022] 在本发明所述免疫球蛋白结合多肽的一种实施方式中,所述免疫球蛋白结合多肽包含在单链多特异性结合蛋白中,该多特异性结合蛋白含有置于第一结合域和第二结合域之间的恒定亚区结构域,其中所述第一结合域是本文所述的人 RON 结合域,而所述第二结

构域是本文所述的人 RON 结合域或特异性针对人 RON 以外的靶分子。在某些实施方式中,所述免疫球蛋白恒定亚区是 IgG1 CH2CH3。在又一个实施方式中,所述免疫球蛋白恒定亚区置于第一接头肽和第二接头肽之间。在又一个实施方式中,所述第一和第二接头肽独立地选自 SEQ ID NO:610-777 中所提供的接头。在另一实施方式中,所述第一接头肽包含免疫球蛋白铰链区而所述第二接头肽包含 II 型 C-凝集素杆区。

[0023] 在一种实施方式中,所述免疫球蛋白结合多肽包含下述结构:N-BD1-X-L2-BD2-C,其中 BD1 包含对人 RON 特异性的 scFv, -X- 是 -L1-CH2CH3-, 其中 L1 是免疫球蛋白 IgG1 铰链,该铰链具有含 SEQ ID NO:349-366,420-475 中任一项的氨基酸序列,且其中 -CH2CH3- 是人 IgG1CH2CH3 区或其缺少一个或多个效应功能的变体;L2 是接头肽,其氨基酸序列含有 SEQ ID NO:610-777 中任一项;而 BD2 是针对人 RON 或人 RON 以外靶分子的特异性结合域。

[0024] 本发明的一方面提供包含一种或多种如本文所述的免疫球蛋白结合多肽和药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0025] 本发明的另一方面提供能表达如本文所述的免疫球蛋白结合多肽的表达载体。本发明的另一方面提供含有能表达如本文所述的免疫球蛋白结合多肽的表达载体的宿主细胞。

[0026] 本发明的另一方面提供用于治疗癌症的方法,其包括给予有需要的对象治疗有效量的组合物,该组合物包含一种或多种如本文所述的免疫球蛋白结合多肽和药学上可接受的赋形剂。就此而言,所述癌症选自胰腺癌、肺癌、结肠癌和乳腺癌,或者本文所述的其它癌症。

[0027] 本发明的另一方面提供用于治疗炎性疾病的方法,其包括给予有需要的对象治疗有效量的组合物,该组合物包含一种或多种如本文所述的免疫球蛋白结合多肽和药学上可接受的赋形剂。

附图说明

[0028] 图 1. RON-e01 和 RON-f01 鼠抗体特异性结合人 RON 并与猕猴 (*Macaca mulatta*) 的 RON 交叉反应。转染有空载体 (短划线),人 RON (点线) 或猕猴 RON (实线) 的 NIH/3T3 细胞仅用二抗 (A)、用 1mg/ml 鼠 IgG (B)、用 1mg/ml DX07 抗 -RON 抗体 (C)、RON-e01 抗 -RON 杂交瘤上清液 (D) 或 RON-f01 抗 RON 杂交瘤上清液 (E) 染色。

[0029] 图 2. RON-e02 和 RON-f02 鼠 SMIP 结合 4MBr-5 细胞表面上的天然猕猴 RON。4MBr-5 细胞仅用二抗 (短划线)、用 M0077 抗 CD79b SMIP (点线) 或抗 RON SMIP (实线) 染色。

[0030] 图 3. RON-e 和 RON-f 鼠 SMIP 与交叉介体 (Interceptor) 结合 BxPC-3 细胞表面上的天然人 RON。BxPC-3 细胞用不同浓度的 RON-e (A) 或 RON-f (B) 分子染色。对 SMIP 和交叉介体及相关 SEQ ID NO 的描述见表 3 和表 4。

[0031] 图 4. RON-e01 和 RON-f01 鼠抗体结合 RON 胞外结构域内的不同表位。来自杂交瘤克隆上清液的 RON-e01 抗体 (1-5) 不结合重组 RON Sema-PSI 蛋白,表明 RON-e01 识别的部分或所有表位位于 Sema 和 PSI 结构域外。在含可测浓度 IgG 的所有 RON-f01 杂交瘤克隆上清液 (A-M) 中观察到重组 RON Sema-PSI 蛋白结合。“仅稀释剂”样品表示各试验中仅将血清稀释剂作为样品运行时的背景结合。作为 IgG 测定和重组 RON Sema-PSI 结合的阳性对

照,在ELISA中都测试250ng/ml的抗人RON抗体(R&D系统公司(R&D Systems)#MAB691,明尼苏达州明尼阿波利斯)。

[0032] 图5. RON-e和RON-f分子在不同表位结合RON。RON-e01:鼠抗体;RON-f02:抗RON的SMIP;DX07:抗RON的 β -链抗体(加州圣克鲁兹的圣克鲁兹生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology))。

[0033] 图6A. RON-e01抗体和RON-e05 YAE交叉介体抑制MSP所诱导RON、Akt和MAPK的磷酸化。

[0034] 图6B. RON-f01抗体、RON-f02 SMIP和RON-f03二代交叉介体能抑制MSP所诱导RON、Akt和MAPK的磷酸化。

[0035] 图7. RON-e和RON-f人源化SMIP结合MDA-MB-453细胞表面上的天然人RON。MDA-MB-453细胞用不同浓度的RON-e(A)或RON-f(B)分子染色。人源化SMIP的结合活性与其鼠对应物相当。

[0036] 图8A. RON-f人源化SMIP能抑制MDA-MB-453细胞中MSP所诱导RON、Akt和MAPK的磷酸化。在封闭步骤(1小时)中应用RON-f人源化SMIP然后模拟刺激时,导致RON的最低磷酸化,但Akt或MAPK则不然。

[0037] 图8B. RON-f02鼠SMIP的人源化降低刺激步骤(20分钟)期间SMIP应用响应的受体磷酸化。RON-f02鼠SMIP刺激RON磷酸化但不刺激下游Akt或MAPK磷酸化。相比鼠SMIP,人源化的SMIP、RON-f07h24和RON-f08h25导致减弱的RON磷酸化。有意思的是,在SMIP诱导的RON受体磷酸化后未观察到对MSP所诱导RON活化的响应中观察到的高水平下游效应物蛋白磷酸化。

[0038] 图9:人源化RON-f结合域与抗CD3结合域配对的双特异性蛋白特异性指引表达RON抗原的靶细胞的细胞毒性T细胞杀死。MDA-MB-453(A)或道迪(Daudi)(B)靶细胞载有铬-51,并在纯化人T细胞对靶细胞的比例为10:1条件下与递增浓度的双特异性蛋白一起孵育。在37°C孵育4小时后,通过铬-51释放入试验上清液来评估靶细胞裂解。人转移性乳腺癌细胞系MDA-MB-453细胞表达RON但不表达CD19,而人伯基特淋巴瘤细胞系道迪细胞表达CD19但不表达RON。两种靶细胞系都仅在与T细胞和能结合该靶细胞所表达抗原的双特异性蛋白一起孵育时被杀死。当双特异性蛋白不结合靶细胞时(即,抗RON $\times$ 抗CD3双特异性用于道迪细胞),未见靶细胞细胞毒性。数据表示两个重复样本的均值 $\pm$ 均值的标准差(SEM)。

[0039] 图10A和10B显示双特异性抗RON和抗CD3构建物(多肽异二聚体S0268和蝎(Scorpion)蛋白S0266)结合MDA-MB-453细胞(A)与结合分离的T细胞(B)。

[0040] 图11A和11B显示(A)道迪(RON⁻,CD19⁺)细胞或(B)BxPC-3(RON⁺,CD19⁻)细胞的铬(⁵¹Cr)释放试验中双特异性多肽异二聚体TSC054、TSC078、TSC079和S0268所诱导T细胞指引的细胞毒性。

具体实施方式

[0041] 本文所用章节标题仅用于组织目的,而不应理解为限制所述客体。本文引用的包括但不限于专利、专利申请、文章、书本和条约在内的所有文件或文件的部分,在此通过引用将其全文明确纳入用于任何目的。当一份或多份所纳入文件或文件的部分定义的术语与

本申请中该术语的定义冲突时,以本申请中出现的定义为准。

[0042] 本发明一般涉及结合分子及其治疗应用的领域,更具体涉及由能结合巨噬细胞刺激1受体(MST1R,本文中也称作recepteur d'origine Nantaise或RON)的结合域和一个或多个其它结构域如一个或多个抗体恒定区结构域所组成的免疫球蛋白结合多肽。如本文进一步详述,结合蛋白可用是多种不同形式中的任一种,例如抗体及其抗原结合片段、SMIP™、PIMS、Xceptor、SCORPION™和交叉介体融合蛋白形式。

[0043] 在本说明书中,任何浓度范围、百分数范围、比例范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数值,适当时也包括其分数值(如整数的十分之一和百分之一),除非另有说明。另外,本文所述的有关任何物理特征,如聚合物亚基、大小或厚度的任何数值范围应理解为包括所述范围内的任何整数,除非另有说明。除非另有说明,本文所用的“约”指所述范围、数值或结构的 $\pm 20\%$ 。应理解,除非另有说明,本文所用术语“一个”和“一种”指“一个或多个”所列举的组分。另选方式的使用(如“或”)应理解为所述另选方式中的一个、两个或任何组合。本文所用术语“包括”和“包含”可作为同义词使用。此外,应理解本申请公开对衍生自本文所述组件(如结构域)和取代物的各种组合的单个融合蛋白度如同单独列出各融合蛋白的程度。因此,特定单个融合蛋白的组件的选择属于本发明范围内。

[0044] 如本文所用,若某多肽或蛋白质除数个结构域外的其它部分(例如,在氨基或羧基末段或两个结构域之间的氨基酸)组合起来最多占该多肽或蛋白长度的20%(例如,最多15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%或1%)且对不同结构域的活性(例如,结合域的靶结合亲和力,Fc区部分的活性,和异二聚化结构域在促进异二聚化中的能力)无显著影响(即,不使该活性降低超过50%,例如超过40%、30%、25%、20%、15%、10%或5%),则该多肽或蛋白质“基本组成为”该数个结构域(例如,特异性结合靶标的结合域、铰链、二聚体或异二聚化结构域,Fc区恒定结构域部分)。在某些实施方式中,多肽或蛋白(例如,融合多肽或单链融合多肽)基本组成为能特异性结合靶标的结合域,异二聚化结构域,铰链,和Fc区部分,并可包含在该蛋白的氨基-和/或羧基-末段或在两个不同结构域之间(例如,结合域与异二聚化结构域之间,异二聚化结构域与铰链之间,和/或铰链与Fc区部分之间)的接合氨基酸。

[0045] 本文所用“结合域”或“结合区”指具有特异性识别并结合靶标(如RON)的能力的蛋白质、多肽、寡肽或肽。结构域包括生物分子或另一感兴趣靶标的任何天然产生、合成、半合成或重组产生的结合伙伴。示例性结合域包括单链抗体可变区(例如,域抗体、sFv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv),受体胞外域(例如,RON)或者配体(例如,细胞因子、趋化因子)。已知鉴定特异性结合特定靶标的本发明结合域的各种实验方法,包括蛋白质印迹、ELISA或Biacore分析。

[0046] 若结合域(或含结合域的多肽)结合靶标的亲和力或 K_a (即,特定结合相互作用以1/M为单位的平衡结合常数)等于或大于 $10^5 M^{-1}$,而不显著结合测试样品中存在的其它组分,则其“特异性结合”该靶标。结合域(或含结合域的多肽)可用分类为“高亲和性”结合域和“低亲和性”结合域。“高亲和性”结合域(或含结合域的多肽)指 K_a 为至少 $10^7 M^{-1}$ 、至少 $10^8 M^{-1}$ 、至少 $10^9 M^{-1}$ 、至少 $10^{10} M^{-1}$ 、至少 $10^{11} M^{-1}$ 、至少 $10^{12} M^{-1}$ 、至少 $10^{13} M^{-1}$ 的结合域。“低亲和性”结合域(或含结合域的多肽)指 K_a 为至多 $10^7 M^{-1}$ 、至多 $10^6 M^{-1}$ 、至多 $10^5 M^{-1}$ 的结合域。或者,亲和力可定义为特定结合相互作用的平衡解离常数(K_d),单位是M(如 $10^{-5} M$ 至 $10^{-13} M$)。

本发明所述结合域多肽和融合蛋白的亲合力可采用常规技术很容易地测定(参见例如, Scatchard 等 (1949) Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660 ;和美国专利号 5, 283, 173 ;5, 468, 614 ;或等效文件)。

[0047] 本文所用“免疫球蛋白结合多肽”或“免疫球蛋白结合蛋白”指包含至少一个免疫球蛋白区如 VL、VH、CL、CH1、CH2、CH3 和 CH4 结构域的多肽。该免疫球蛋白区可以是野生型免疫球蛋白区或经改变的免疫球蛋白区。示例性免疫球蛋白结合多肽包括单链可变抗体片段(scFv)(参见例如, Huston 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83, 1988), 小模块免疫药物(SMIPTM)蛋白(参见美国专利公布号 2003/0133939、2003/0118592 和 2005/0136049), PIMS 蛋白(参见 PCT 专利申请公布号 WO 2009/023386), 和多功能结合蛋白(例如 SCORPIONTM 和 Xceptor 融合蛋白)(参见例如, PCT 专利申请公布号 WO 2007/146968, 美国专利申请公布号 2006/0051844 和美国专利号 7, 166, 707)。

[0048] 本发明的免疫球蛋白结合多肽包含至少一个 RON 结合域。本文公开了多种免疫球蛋白结合多肽构建物, 包括例如, 抗体构建物, SMIPTM 蛋白构建物, SCORPION/Xceptor 构建物和异二聚体构建物。除非另有明确说明, 术语“免疫球蛋白结合多肽”, “结合多肽”, “结合域多肽”, “融合蛋白”, “融合多肽”, “免疫球蛋白衍生的融合蛋白”, 和“RON 结合多肽”应视为可互换。

[0049] 抗体技术领域技术人员理解的术语各自具有所述领域获得的含义, 除非本文作明确的不同定义。已知抗体具有可变区、铰链区和恒定区。有关免疫球蛋白结构和功能的综述参见例如 Harlow 等编, Antibodies: A Laboratory Manual(《抗体: 实验室手册》), 第 14 章(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory), 冷泉港, 1988)。

[0050] 例如, 术语“VL”和“VH”分别指来自抗体轻链和重链的可变结合区。可变结合区由离散的已明确定义的亚区域构成, 这些区域称作“互补决定区”(CDR) 和“框架区”(FR)。术语“CL”指“免疫球蛋白轻链恒定区”或“轻链恒定区”, 即来自抗体轻链的恒定区。术语“CH”指“免疫球蛋白重链恒定区”或“重链恒定区”, 其可进一步根据抗体同种型细分入 CH1、CH2 和 CH3(IgA、IgD、IgG) 或 CH1、CH2、CH3 和 CH4 结构域(IgE、IgM)。“Fab”(片段抗原结合)是抗体能结合抗原的部分, 包括可变区和经链间二硫键与轻链连接的重链 CH1。

[0051] 本文所用“Fc 区恒定结构域部分”或“Fc 区部分”指抗体 Fc 片段(“可结晶片段”区或 Fc 区)的重链恒定区区段, 其可包括一个或多个恒定区, 例如 CH2、CH3、CH4, 或其任意组合。在某些实施方式中, Fc 区部分包括 IgG、IgA 或 IgD 抗体的 CH2 和 CH3 结构域, 及其任意组合, 或者 IgM 或 IgE 抗体的 CH3 和 CH4 结构域, 及其任意组合。在一种实施方式中, CH2CH3 或 CH3CH4 结构来自同一抗体同种型, 例如 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM。作为背景, Fc 区负责免疫球蛋白的效应功能如 ADCC(抗体依赖的细胞介导的细胞毒性)、ADCP(抗体依赖的细胞吞噬作用)、CDC(补体依赖性细胞毒性)和补体结合、结合 Fc 受体(例如, CD16、CD32、FcRn)、体内半衰期比缺少 Fc 区的多肽更长、蛋白 A 结合、可能甚至负责胎盘转移(参见 Capon 等 Nature, 337:525(1989))。在某些实施方式中, 本发明所述多肽异二聚体中所见 Fc 区部分将能介导这些效应功能中的一种或多种。

[0052] 此外, 抗体具有铰链序列, 其通常位于 Fab 和 Fc 区之间(但该铰链的下部可包括 Fc 区的氨基末端部分)。作为背景, 免疫球蛋白铰链作为柔性间隔物, 允许 Fab 部分在空间内自由移动。与恒定区相反, 铰链在结构上不同, 其序列和长度在免疫球蛋白类别甚至在亚

类之间都有变化。例如,人 IgG1 铰链区为自由柔性,允许 Fab 片段绕其对称轴转动并在以两个重链间二硫桥中第一个为中心的球内移动。作为对比,人 IgG2 铰链相对短且含有由四个重链间二硫桥稳定的刚性多脯氨酸双螺旋,二硫桥限制柔性。人 IgG3 的铰链与其它亚类的区别在于其独特的延展铰链区(约 IgG1 铰链的四倍长),含 62 个氨基酸(包括 21 个脯氨酸和 11 个半胱氨酸),形成非柔性多脯氨酸双螺旋并提供更大的柔性,因为 Fab 片段相对远离 Fc 片段。人 IgG4 的铰链短于 IgG1,但与 IgG2 长度相同,且其柔性介于 IgG1 和 IgG2。

[0053] 根据结晶图象研究,可按照功能和结构将 IgG 铰链结构域再分成以下三个区域:上部、核心或中部和下部铰链区(Shin 等,Immunological Reviews 130:87(1992))。示例性上部铰链区包括 IgG1 中发现的 EPKSCDKTHT(SEQ ID NO:194)、IgG2 中发现的 ERKCCVE(SEQ ID NO:195)、IgG3 中发现的 ELKTPLGDTT HT(SEQ ID NO:196)或 EPKSCDTPPP(SEQ ID NO:197)、以及 IgG4 中发现的 ESKYGPP(SEQ ID NO:198)。示例性中部或核心铰链区包括如 IgG1 和 IgG2 中所见 CPPCP(SEQ ID NO:199)、如 IgG3 中所见 CPRCP(SEQ ID NO:200)和如 IgG4 中所见 CPSCP(SEQ ID NO:201)。尽管 IgG1、IgG2 和 IgG4 抗体各显示具有单个上部和中部铰链,IgG3 具有串联的 4 个铰链——1 个 ELKTPLGDTTHTCPRCP(SEQ ID NO:202)和 3 个 EPKSCDTPPP CPRCP(SEQ ID NO:203)。

[0054] IgA 和 IgD 抗体看来缺少 IgG-样核心区,IgD 看来具有两个串联的上部铰链区(参见 SEQ ID NO:204 和 205)。SEQ ID NO:206 和 207 中列出了 IgA1 和 IgA2 抗体中发现的示例性野生型上部铰链区。

[0055] 相反,IgE 和 IgM 抗体包含具有铰链样性质的 CH2 区而非典型铰链区。SEQ ID NO:208(VCSRDFTPPTVKILQSSSDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQ SELTSLQKHWSLDRITYTCQVITYQGHTFEDSTKKCA)和 SEQ ID NO:209(VIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRK SKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTF QQNASSMCVP)分别列出 IgE 和 IgM 的示例性野生型 CH2 上部铰链样序列。

[0056] 本文所用“铰链区”或“铰链”指(a)免疫球蛋白铰链区(例如,由上部和核心区构成)或其功能变体,包括野生型和经改变的免疫球蛋白铰链,(b)凝集素结构域间区域或其功能变体,(c)分化群(CD)分子茎部区或其功能变体,或(d)连接免疫球蛋白 V-样或免疫球蛋白 C-样结构域的细胞表面受体(结构域间区域)的部分。

[0057] 本文所用“野生型免疫球蛋白铰链区”指在抗体重链中发现的位于 CH1 和 CH2 结构域之间并连接这两个域(就 IgG、IgA 和 IgD 而言)或位于 CH1 和 CH3 结构域之间并连接这两个域(就 IgE 和 IgM 而言)的天然产生的上部和中部铰链氨基酸序列。在某些实施方式中,野生型免疫球蛋白铰链区序列是人序列,且在某些具体实施方式中,包含人 IgG 铰链区。SEQ ID NO:206(IgA1 铰链)、207(IgA2 铰链)、210(IgD 铰链)、211(IgG1 铰链)、212(IgG2 铰链)、213(IgG3 铰链)和 214(IgG4 铰链)给出了示例性人野生型免疫球蛋白铰链区。

[0058] “经改变的野生型免疫球蛋白铰链区”或“经改变的免疫球蛋白铰链区”指(a)有至多 30%氨基酸改变(例如,至多 25%、20%、15%、10%或 5%氨基酸取代或缺失)的野生型免疫球蛋白铰链区,或(b)长度约 5 个氨基酸(例如,约 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个氨基酸)直至约 120 个氨基酸(例如,长度为约 10-40 个氨基酸或约 15-30 个氨基酸或约 15-20 个氨基酸或约 20-25 个氨基酸)并有至多约 30%氨基酸改变(例如,至

多约 25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、或 1% 氨基酸取代或缺失或其组合) 的野生型免疫球蛋白铰链区的部分, 且具有 SEQ ID NO:199-201 中所示 IgG 核心铰链区。在某些实施方式中, 野生型或经改变免疫球蛋白铰链区中的一个或多个半胱氨酸残基可被一个或多个其它氨基酸残基(例如, 丝氨酸、丙氨酸) 所取代。在进一步实施方式中, 经改变的免疫球蛋白铰链区可用替代或补充性将脯氨酸残基用另一氨基酸残基(例如, 丝氨酸、丙氨酸) 取代。示例性的经改变野生型免疫球蛋白铰链区包括 SEQ ID NO:215-227 中所示。

[0059] 在某些实施方式中, 可由于融合多肽的构建物设计而在铰链和 Fc 区部分之间具有一个或多个(例如, 约 2-8 个) 氨基酸残基(例如, 因为在构建编码融合多肽的核酸分子时使用限制性酶位点造成的氨基酸残基)。如本文所述, 此类氨基酸残基可称作“接合氨基酸”或“接合氨基酸残基”。SEQ ID NO:14-17 中提供的铰链变体序列中显示了示例性接合氨基酸(例如, SEQ ID NO:14 中 C- 末端 SG 残基视为接合氨基酸; SEQ ID NO:15 中 N- 末端 SS 残基视为接合残基; SEQ ID NO:16 中 N- 末端 SS 和 C- 末端 SG 残基视为接合氨基酸; SEQ ID NO:17 中 N- 末端 RT 和 C- 末端 SG 为接合氨基酸)。

[0060] 在某些实施方式中, 接合氨基酸存在于含 CH2 和 CH3 的 Fc 区部分和异二聚化结构域(CH1 或 CL) 之间。若存在于 CH3 的 C- 末端与 CH1 或 CL 的 N- 末端之间时, 这些接合氨基酸也称作“CH3 与 CH1 或 CL 间的接头”。此类接头可以是, 例如长约 2-1012 个氨基酸。在某些实施方式中, Fc 区部分包含人 IgG1 CH2 和 CH3 结构域, 其中缺失人 IgG1 CH3 的 C- 末端赖氨酸残基。CH3 和 CH1 间的示例性接头包括 SEQ ID NO:799-801 中所示。CH3 和 C κ 的示例性接头包括 SEQ ID NO:802-804 中所示(其中接头内羧基末端精氨酸或者可视为 C κ 的第一位精氨酸)。在某些实施方式中, 此类接头或接头对的存在(例如, SEQ ID NO:799 在异二聚体的一条单链多肽中作为 CH3-CH1 接头而 SEQ ID NO:802 在该异二聚体的另一单链多肽中作为 CH3-C κ 接头; SEQ ID NO:800 作为 CH3-CH1 接头而 SEQ ID NO:803 作为 CH3-C κ 接头; 和 SEQ ID NO:801 作为 CH3-CH1 接头而 SEQ ID NO:804 作为 CH3-C κ 接头) 相对异二聚体两条单链多肽中参比接头如 SEQ ID NO:798 所示 KSR 序列的存在能改善异二聚体的生成。

[0061] “肽接头”或“可变结构域接头”指连接重链可变区与轻链可变区并提供与两个亚接合结构域间相互作用相容的间隔物功能, 从而所得多肽保留含同一轻链和重链可变区的抗体对同一靶分子的特异性结合亲和性。在某些实施方式中, 可变结构域接头包括约 5-35 个氨基酸, 而在某些实施方式中, 则包括约 15-25 个氨基酸。

[0062] “野生型免疫球蛋白区”或“野生型免疫球蛋白结构域”指来自各种免疫球蛋白类别或亚类(包括例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE 和 IgM) 和来自各种物种(包括例如人、绵羊、小鼠、大鼠和其它哺乳动物) 的天然产生的免疫球蛋白区或结构域(例如, 天然产生的 VL、VH、铰链、CL、CH1、CH2、CH3 或 CH4)。SEQ ID NO:20, 228-235 列出示例性野生型人 CH1 区, SEQ ID NO:236 列出野生型人 C κ 区, SEQ ID NO:237-240 中列出野生型人 C λ 区, SEQ ID NO:241-249 中列出野生型人 CH2 结构域, SEQ ID NO:250-258 中列出野生型人 CH3 结构域, 而 SEQ ID NO:259-260 中列出野生型人 CH4 结构域。

[0063] “经改变的免疫球蛋白区”或“经改变的免疫球蛋白结构域”指与野生型免疫球蛋白区或结构域(例如, 野生型 VL、VH、铰链、CL、CH1、CH2、CH3 或 CH4) 的序列相同性为至少约 75%(例如, 约 80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或

99.5%) 的免疫球蛋白区域。例如,“经改变的免疫球蛋白 CH1 区”或“经改变的 CH1 区”指与野生型免疫球蛋白 CH1 区(例如,人 CH1) 的序列相同性为至少约 75%(例如,约 80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99 或 99.5%) 的 CH1 区。类似地,“经改变的免疫球蛋白 CH2 结构域”或“经改变的 CH2 结构域”指与野生型免疫球蛋白 CH1 区(例如,人 CH2) 的序列相同性为至少约 75%(例如,约 80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99 或 99.5%) 的 CH2 结构域。

[0064] 本文所用“序列相同性”指对准并在必要时引入缺口以实现最大百分序列相同性后,一个序列中氨基酸残基与与另一参比多肽内氨基酸残基相同的百分数,且任何保守取代均不视为序列相同性的部分。百分数序列相同性数值是由 NCBI BLAST2.0 软件产生,如 Altschul 等,(1997)“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs(缺口 BLAST 和 PSI-BLAST:新一代蛋白数据库检索程序)”, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 中所定义,参数设定为默认值。

[0065] 在某些实施方式中,经改变的免疫球蛋白结构域仅含有野生型免疫球蛋白结构域的保守氨基酸取代。在某些其它实施方式中,经改变的免疫球蛋白结构域仅含有野生型免疫球蛋白结构域的非保守氨基酸取代。在另一些实施方式中,经改变的免疫球蛋白结构域含有保守和非保守的氨基酸取代。

[0066] 本领域将“保守取代”认定为将某氨基酸用具有类似性质的另一氨基酸取代。本领域熟知示例性保守取代(参见例如 WO 97/09433,第 10 页,1997 年 3 月 13 日公开;Lehninger,Biochemistry(《生物化学》),第 2 版,沃斯出版公司(Worth Publishers, Inc.),纽约州纽约市(1975),第 71-77 页;Lewin,Genes IV(《基因 IV》),纽约的牛津大学出版社和马萨诸塞州剑桥的细胞出版社(Cell Press)(1990),第 8 页)。在某些实施方式中,保守取代包括亮氨酸取代为丝氨酸。

[0067] 本文所用术语“衍生(物)”指将肽的一个或多个氨基酸残基通过化学或生物手段用或不用酶来修饰,例如通过糖基化、烷基化、酰基化、酯形成或酰胺形成。通常,“衍生物”不同于“类似物”,母体多肽可以是产生“衍生物”的起始材料,但母体多肽不一定用作产生“类似物”的起始材料。衍生物可具有与母体多肽不同的化学、生物或物理特性。例如,与母体多肽相比,衍生物可能亲水性更高或反应性改变(例如具有改变其靶点亲和力的氨基酸变化的 CDR)。

[0068] 如本文所用,除非另有提出,免疫球蛋白分子的可变区中氨基酸残基位置的编号按 Kabat 编号惯例(Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest(《具免疫学重要性的蛋白质序列》),第 5 版,马里兰州贝塞斯达:公共健康服务部(Public Health Services),国立卫生研究院(National Institutes of Health)(1991)),且免疫球蛋白分子恒定区中氨基酸残基位置的编号按照 EU 命名法(Ward 等,1995 Therap. Immunol. 2:77-94)。

[0069] “受体”是存在于细胞的质膜或细胞质中的蛋白质分子,信号分子(即配体,如激素、神经递质、毒素、细胞因子)可与其结合。单个分子与受体的结合导致受体的构象改变,这通常启动细胞应答。但是,一些配体只是阻断受体而不引起任何应答(例如拮抗剂)。一些受体蛋白是外周膜蛋白,很多激素和神经递质受体为嵌入细胞膜磷脂双层中的跨膜蛋白,而另一类主要受体是胞内蛋白例如甾体和胞内分泌肽激素受体。

[0070] 术语“生物学样品”包括来自对象或生物来源的血样、活检样品、组织外植体、器官培养物、生物流体（例如，血清、尿液、CSF）或任何其它组织或细胞或其它制备物。对象或生物来源可以是例如，人或非人动物、原代细胞培养物或适合培养的细胞系，包括可含有染色体整合的或附加体形式的重组核酸序列的遗传工程改造细胞系、体细胞杂交细胞系、永生化或可永生化细胞系、分化或可分化细胞系、转化的细胞系或类似细胞系。在本发明的其它实施方式中，对象或生物来源可疑似患有疾病、失调或病症，或处于患上疾病、失调或病症的风险中，所述疾病、失调或病症包括恶性疾病、失调或病症或 B 细胞疾病。在某些实施方式中，对象或生物来源可疑似患有过度增殖、炎症或自身免疫疾病或者处于发生这些疾病的风险中，在本发明某些其它实施方式中，对象或生物来源可以是已知不具患这样的疾病、失调或病症的风险，或不存在这样的疾病、失调或病症。

[0071] “治疗”，“处理”或“缓解”指治疗性处理或防范性 / 预防性处理。若接受处理的个体中疾病的至少一种症状有改善或者处理可延迟个体中进行性疾病的恶化或防止额外相关疾病的发生，则处理为治疗性。

[0072] 特定结合分子或化合物的“治疗有效量（或剂量）”或“有效量（或剂量）”指该化合物的量足以导致所治疗疾病的一种或多种症状以统计学显著性方式得以缓解。在涉及单独给予单个活性组分时，治疗有效剂量仅涉及该组分。涉及组合物时，治疗有效剂量指依序或同时（在同一制剂中或是在不同制剂中同时）给予的活性组分能导致治疗效果的总量。

[0073] 术语“药学上可接受的”指用本领域熟知途径给予时不产生过敏性或其它严重不良反应的分子实体和组合物。

[0074] “有需要的患者”指有风险罹患或正患有某个能用本文所述免疫球蛋白结合多肽或其组合物治疗或缓解的疾病、失调或病症的患者。

[0075] 本文所用“免疫球蛋白衍生的融合蛋白”指包含至少一个免疫球蛋白区如 VL、VH、CL、CH1、CH2、CH3 和 CH4 结构域的融合蛋白。该免疫球蛋白区可以是野生型免疫球蛋白区或经改变的免疫球蛋白区。

[0076] 其它定义在本说明书全文中列出。

[0077] 含结合域的构建物

[0078] 本发明提供含有结合域，特别是含有能特异性结合 RON 的结合域的多肽。含本发明的结合域的多肽可以是含本文所述结合域并还包含任意其它组件 / 结构域如 Fc 区结构域、接头、铰链、二聚化 / 异二聚化结构域、接合氨基酸、标签等的融合蛋白。下文进一步详述免疫球蛋白多肽的这些组件。

[0079] 此外，本文公开的免疫球蛋白结合多肽可以是抗体或任意不同形式的融合蛋白（例如，该融合蛋白可以是 SMIP™、PIMS、Scorpion™/Xceptor 蛋白或交叉介体蛋白的形式）。

[0080] 结合域

[0081] 如上所述，本发明的免疫球蛋白结合多肽包含特异性接合靶标（例如 RON）的结合域。由结合域接合靶标可阻断靶标（例如，受体如 RON 或配体）与另一分子间的相互作用，并从而干扰、减弱或消除该靶标的某些功能（例如，信号转导）。

[0082] 应注意，本发明所述免疫球蛋白结合多肽的主要靶标是 RON 蛋白。但在某些实施方式中，所述免疫球蛋白结合多肽可包含能结合 RON 或除 RON 以外的其它靶标（例如，异种靶标）的一个或多个额外结合域。例如，这些异种靶分子可包括特定的细胞因子或靶向特

定细胞类型的结合域多肽的分子,毒素,额外的细胞受体,抗体等。

[0083] 在某些实施方式中,结合域,例如作为交叉介体的部分,可包含 TCR 结合域用以募集 T 细胞来靶向表达 RON 的靶细胞(参见例如,实施例 8)。在某些实施方式中,本文所述的多肽异二聚体可包含特异性结合 TCR 复合物或其组分(例如,TCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ 和 CD3 ϵ)的结合域和特异性结合 RON 的另一结合域。

[0084] 因此,结合域可以是特异性结合感兴趣靶标(例如,RON)的任意肽。结合域的来源包括来自人、啮齿类、禽类和羊类在内的不同物种的抗体可变区(其形式可为抗体、sFv、scFv、Fab、或可溶 V_H 结构域或域抗体)。域抗体(dAb)包含免疫球蛋白重链或轻链的可变区(分别为 V_H 和 V_L) (Holt 等, (2003) Trends Biotechnol. 21:484-490)。结合域的其他来源包括来自其它物种的抗体可变区,这些物种如羊驼(来自骆驼、单峰骆驼或美洲驼;Ghahroudi 等 (1997) FEBS Letters 414(3):521-526; Vincke 等 (2009) Journal of Biological Chemistry (2009) 284:3273-3284; Hamers-Casterman 等 (1993) Nature, 363:446 和 Nguyen 等 (1998) J. Mol. Biol., 275:413), 铰口鲨 (Roux 等 (1998) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 95:11804)、科氏兔银鲛 (spotted ratfish) (Nguyen 等 (2002) Immunogenetics, 54:39), 或七鳃鳗 (Herrin 等, (2008) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 105:2040-2045 和 Alder 等, (2008) Nature Immunology 9:319-327)。这些抗体显然可以仅用重链可变区形成抗原结合区,即这些功能抗体是仅有重链的同二聚体(称作“重链抗体”) (Jespersen 等 (2004) Nature Biotechnology 22:1161-1165; Cortez-Retamozo 等, (2004) Cancer Research 64:2853-2857; Baral 等 (2006) Nature Medicine 12:580-584 和 Barthelemy 等 (2008) Journal of Biological Chemistry 283:3639-3654)。

[0085] 本发明所述结合域的替代来源包括编码随机肽文库的序列或编码其它非抗体支架的环区域中工程改造的多种氨基酸的序列,例如血纤蛋白原结构域(参见例如,Weisel 等 (1985) Science 230:1388)、Kunitz 结构域(参见例如,美国专利 6,423,498)、锚蛋白重复结构域 (Binz 等 (2003) Journal of Molecular Biology 332:489-503 和 Binz 等 (2004) Nature Biotechnology 22(5):575-582), 纤连蛋白结合域 (Richards 等 (2003) Journal of Molecular Biology 326:1475-1488; Parker 等 (2005) Protein Engineering Design and Selection 18(9):435-444 和 Hackel 等 (2008) Journal of Molecular Biology 381:1238-1252), 胱氨酸结小蛋白 (Vita 等 (1995) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 92:6404-6408; Martin 等 (2002) Nature Biotechnology 21:71-76 和 Huang 等 (2005) Structure 13:755-768), 三角形四肽重复结构域 (Main 等 (2003) Structure 11:497-508 和 Cortajarena 等 (2008) ACS Chemical Biology 3:161-166), 富亮氨酸重复结构域 (Stumpp 等 (2003) Journal of Molecular Biology 332:471-487), 脂质运载蛋白结构域(参见例如,WO 2006/095164, Beste 等 (1999) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 96:1898-1903 和 **Schönfeld** 等 (2009) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 106:8198-8203), V 样结构域(参见例如,美国专利申请公布号 2007/0065431), C-型凝集素结构域 (Zelensky 和 Gready (2005) FEBS J. 272:6179; Bevil 等 (1992) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 89:753-757 和 Sato 等 (2003) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 100:7779-7784), mAb² 或 FcabTM (参见例如, PCT 专利申请公布号 WO 2007/098934; WO 2006/072620), 等等 (Nord 等 (1995) Protein Engineering 8(6):601-608; Nord 等 (1997)

Nature Biotechnology 15:772-777 ;Nord 等 (2001)European Journal of Biochemistry 268(15):4269-4277 和 Binz 等 (2005)Nature Biotechnology 23:1257-1268)。

[0086] 可根据本文所述方法或本领域已知的各种方法产生本发明结合域 (参见例如, 美国专利 6, 291, 161 和 6, 291, 158)。例如, 可通过从 Fab 噬菌体文库筛选能特异性结合感兴趣靶标的 Fab 片段 (参见 Hoet 等 (2005)Nature Biotechnol. 23:344) 鉴定出本发明的结合域。此外, 可采用在适宜系统 (例如, 小鼠、HuMAb 小鼠®、TC 小鼠™、KM- 小鼠®、美洲驼、鸡、大鼠、仓鼠、家兔等) 中以感兴趣靶标作为免疫原的传统杂交瘤开发策略来开发本发明的结合域。

[0087] 在一些实施方式中, 结合域是单链 Fv 片段 (scFv), 其含有对感兴趣靶标特异性的 V_H 和 V_L 区。在某些实施方式中, 所述 V_H 和 V_L 结构域是人的结构域。示例性 V_L 和 V_H 区包括来自本文所述 4C04 和 11H09 抗体的 V_L 和 V_H 区。SEQ ID NO:152 中列出 4C04 的轻链氨基酸序列, SEQ ID NO:141-143 中分别列出其 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。SEQ ID NO:153 中列出 4C04 的重链氨基酸序列, SEQ ID NO:144-146 中分别列出其 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。SEQ ID NO:80 中列出 11H09 scFv 的轻链氨基酸序列, SEQ ID NO:67-69 中分别列出其 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。SEQ ID NO:81 中列出 11H09scFv 的重链氨基酸序列, SEQ ID NO:70-72 中分别列出其 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。

[0088] 在某些实施方式中, 结合域是与轻链可变区 (V_L) (例如 SEQ ID NO:80 和 152) 或与重链可变区 (V_H) (例如 SEQ ID NO:81 和 153) 或两者的氨基酸序列至少约 90%, 至少约 91%, 至少约 92%, 至少约 93%, 至少约 94%, 至少约 95%, 至少约 96%, 至少约 97%, 至少约 98%, 至少约 99%, 至少约 99.5% 或 100% 相同的序列或者包括这样的序列。在某些实施方式中, 与来自特异性结合感兴趣靶标 (例如, RON) 的单克隆抗体或其片段或衍生物的 CDR 相比, 各 CDR 包含不超过 1、2 或 3 个取代、插入或缺失。在另一些实施方式中, 结合域包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 (例如, 来自本文所述 4C04 和 11H09 抗体的 CDR1、CDR2 和 CDR3), 其中所述 CDR 其中 1、2 或 3 个包含本文所述 CDR 的片段, 例如具有本文所述 CDR 的 3、4、5、6、7、8 或 9 个氨基酸的 CDR 片段。

[0089] 在某些实施方式中, 结合域是轻链可变区 (V_L) (例如, SEQ ID NO:80 和 152) 或重链可变区 (V_H) (例如, SEQ ID NO:81 和 153) 或两者的人源化形式的序列或包含该序列。SEQ ID NO:82、83 和 154 中提供示例性人源化轻链可变区 (V_L)。SEQ ID NO:84-86 和 155-156 中提供示例性人源化重链可变区 (V_H)。

[0090] 在某些实施方式中, 本发明所述结合域 V_H 可衍生自己知单克隆抗体 (例如, DX07 抗 RON 抗体) 的 V_H 或基于此, 并在与已知单克隆抗体的 V_H 比较时, 含有约 1 个或多个 (例如, 约 2、3、4、5、6、7、8、9、10 个) 插入, 约 1 个或多个 (例如, 约 2、3、4、5、6、7、8、9、10 个) 缺失, 约 1 个或多个 (例如, 约 2、3、4、5、6、7、8、9、10 个) 氨基酸取代 (例如, 保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代), 或上述改变的组合。所述插入、缺失或取代可以在 V_H 区的任意位置, 包括在该区的氨基或羧基末端或两端, 前提是各 CDR 不含或包含至多 1、2 或 3 个变化且提供含经修饰 V_H 区的结合域仍能以与野生型结合域相似的亲和力特异性结合其靶标。

[0091] 在另一些实施方式中, 本发明所述结合域中的 V_L 区可衍生自己知单克隆抗体的 V_L 或基于此, 并在与已知单克隆抗体的 V_L 比较时, 含有 1 个或多个 (例如, 2、3、4、5、6、7、8、9、10 个) 插入, 1 个或多个 (例如, 2、3、4、5、6、7、8、9、10 个) 缺失, 1 个或多个 (例如, 2、

3、4、5、6、7、8、9、10 个) 氨基酸取代(例如, 保守氨基酸取代), 或上述改变的组合。所述插入、缺失或取代可以在 VL 区的任意位置, 包括在该区的氨基或羧基末端或两端, 前提是各 CDR 不含或包含至多 1、2 或 3 个变化且提供含经修饰 V_L 区的结合域仍能以与野生型结合域相似的亲和力特异性结合其靶标。

[0092] 所述 VH 和 VL 结构域可以任意取向安置(即, 从氨基末端到羧基末端, VH-VL 或 VL-VH), 并可任选由可变区接头连接, 例如, 能提供间隔物功能使得两个亚结合域能相互作用形成功能性结合域的氨基酸序列(如长度为约 5-35 个氨基酸)。在某些实施方式中, 连接 VH 和 VL 结构域的氨基酸序列(本文中也可称作“可变区接头”)包括属于 (Gly_nSer) 家族的那些, 例如 $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_1$ 、 $(Gly_3Ser)_1(Gly_4Ser)_n$ 、 $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_n$ 或 $(Gly_4Ser)_n$, 其中 n 是 1-5 的整数。在某些实施方式中, 该接头是 GGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO:179) 或 GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:180)。在某些实施方式中, 这些 (Gly_nSer) 基接头用来连接结合域中的 VH 和 VL 结构域, 但不用来连接结合域与其它结构域如异二聚化结构域或 Fc 区部分。

[0093] 对 RON 特异性的示例性结合域包括 SEQ ID NO:157 中所示 4C04scFv 或 SEQ ID NO:158 和 159 中所示其人源化形式, 和 SEQ ID NO:87 中所示 11H09scFv 或 SEQ ID NO:88-93 中所示其人源化形式。

[0094] SEQ ID NO:152 中列出 4C04 scFv 的轻链氨基酸序列, SEQ ID NO:141-143 中分别列出其 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。SEQ ID NO:153 中列出 4C04scFv 的重链氨基酸序列, SEQ ID NO:144-146 中分别列出其 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。

[0095] SEQ ID NO:80 中列出 11H09 scFv 的轻链氨基酸序列, SEQ ID NO:67-69 中分别列出其 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。SEQ ID NO:81 中列出 11H09 scFv 的重链氨基酸序列, SEQ ID NO:70-72 中分别列出其 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。

[0096] 在某些实施方式中, RON 结合域包含 RON 配体巨噬细胞刺激蛋白 (MSP) 或其 RON 结合部分。MSP 蛋白的序列为本领域已知且可获自公共数据库如 GENBANK。MSP 的说明性氨基酸序列可见于 GENBANK 登录号 AAA59872 gi398038 (SEQ ID NO:785) 和 SEQ ID NO:809 中所示 NCBI 参比序列 (Reference Sequence) NP_066278。(另见 J. Biol. Chem. 268(21), 15461-15468 (1993))。

[0097] 本发明所述包含在结合多肽或其多肽异二聚体中的结合域所特异性结合的靶分子可发现于感兴趣细胞(“靶细胞”)上或结合于感兴趣细胞。示例性靶细胞包括癌细胞, 与自体免疫疾病或病症相关或者与炎性疾病或病症相关的细胞, 和感染性细胞(例如, 感染性细菌)。感染性生物如哺乳动物寄生虫的细胞也考虑为靶细胞。靶分子也可不与细胞结合。不与细胞结合的示例性靶分子包括可溶蛋白、分泌蛋白、沉积蛋白和胞外结构(基质)蛋白。

[0098] 在某些实施方式中, 本发明所述免疫球蛋白结合蛋白的结合域识别的靶标选自肿瘤细胞、单核细胞/巨噬细胞靶标和上皮细胞。在进一步实施方式中, 本发明所述结合多肽的结合域结合受体蛋白, 例如外周膜受体蛋白或跨膜受体蛋白。

[0099] 在某些实施方式中, 本发明所述免疫球蛋白结合蛋白特异性结合 RON。

[0100] 含二聚化/异二聚化结构域的免疫球蛋白结合多肽

[0101] 在某些实施方式中, 本发明的免疫球蛋白结合多肽可包含二聚化或异二聚化结构

域。本文所用“多肽异二聚体”或“异二聚体”指由两条不同的单链多肽形成的二聚体。

[0102] 二聚化/异二聚化结构域可用于需要由两条单链多肽形成同二聚体或异二聚体的情形,所述单链多肽其一或两者含有结合域。应注意,在某些实施方式中,本文所述某些异二聚体的一条单链成员可不含有结合域。表4中总结的参见例如 RON-f03-f06 交叉介体分子。这些缺乏结合域的单链多肽成员可含有本文所述免疫球蛋白结合多肽的任意组件(例如,Fc 区、铰链、接头、二聚化/异二聚化结构域、接合氨基酸等)。

[0103] 在某些实施方式中,所述结合多肽包含“二聚化结构域”,其指通过非共价或共价相互作用,例如通过形成氢键、静电相互作用、盐桥、范德华力、二硫键、疏水相互作用等或其任意组合,能够促进至少两种单链多肽或蛋白质结合的氨基酸序列。示例性二聚化结构域包括免疫球蛋白重链恒定区或亚区。应理解,二聚化结构域可促进二聚体或更高阶多聚体复合物(如三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体等)的形成。

[0104] 需要异二聚化时,多肽异二聚体的异二聚化结构域彼此不同,因此可以被差异修饰以促进两条链的异二聚化并使各链的同二聚化降至最小。本文提供的异二聚化结构域允许不同多肽间的有效异二聚化并促进所得多肽异二聚体的纯化。

[0105] 如本文所提供,能用于促进本发明所述两种不同单链多肽(例如,一短一长)异二聚化的异二聚化结构域包括免疫球蛋白 CH1 和 CL 结构域,例如,人 CH1 和 CL 结构域。在某些实施方式中,免疫球蛋白异二聚化结构域是野生型 CH1 区,例如野生型 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2IgD、IgE 或 IgM CH1 区。在进一步的实施方式中,免疫球蛋白异二聚化结构域是 SEQ ID NO:181-189 中分别列出的野生型人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE 或 IgM CH1 区。在某些实施方式中,免疫球蛋白异二聚化结构域是 SEQ ID NO:20 中所示野生型人 IgG1CH1 区,在某些实施方式中,其可用于本文的构建物中而无末端“RT”残基。

[0106] 在进一步实施方式中,免疫球蛋白异二聚化结构域是经改变的免疫球蛋白 CH1 区,例如经改变的 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2IgD、IgE 或 IgM CH1 区。在某些实施方式中,免疫球蛋白异二聚化结构域是经改变的人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE 或 IgM CH1 区。在更进一步实施方式中,所述经改变的免疫球蛋白 CH1 区中,野生型 CH1 区(例如,人 CH1)中参与和野生型免疫球蛋白 CL 结构域(例如,人 CL)形成二硫键的半胱氨酸残基缺失或被取代,使得所述经改变 CH1 区和野生型 CL 结构域间不形成二硫键。

[0107] 在某些实施方式中,免疫球蛋白异二聚化结构域是野生型 CL 结构域,例如野生型 C κ 结构域或野生型 C λ 结构域。在特定实施方式中,免疫球蛋白异二聚化结构域是 SEQ ID NO:190 和 191 中分别列出的野生型人 C κ 或人 C λ 结构域。在进一步实施方式中,免疫球蛋白异二聚化结构域是经改变的免疫球蛋白 CL 结构域,例如经改变的 C κ 或 C λ 结构域,例如经改变的人 C κ 或人 C λ 结构域。

[0108] 在某些实施方式中,所述经改变的免疫球蛋白 CL 结构域中,野生型 CL 结构域(例如,人 CL)中参与和野生型免疫球蛋白 CH1 区(例如人 CH1)形成二硫键的半胱氨酸残基缺失或被取代。此类经改变的 CL 结构域可进一步包含其氨基末端的氨基酸缺失。SEQ ID NO:21 中给出示例性 C κ 结构域,其中缺失野生型人 C κ 结构域的首个精氨酸和最后一个半胱氨酸。SEQ ID NO:192 中给出示例性 C λ 结构域,其中缺失野生型人 C λ 结构域的首个精氨酸且参与和 CH1 区中半胱氨酸形成二硫键的半胱氨酸被丝氨酸取代。

[0109] 在进一步实施方式中,免疫球蛋白异二聚化结构域是经改变的 C κ 结构域,和野

生型 C κ 结构域相比,其在可能参与形成 C κ -C κ 界面处链间氢键网络的位置处含有一个或多个氨基酸取代。例如,在某些实施方式中,免疫球蛋白异二聚化结构域是在 N29、N30、Q52、V55、T56、S68 或 T70 处有一个或多个氨基酸被不同的氨基酸取代的经改变的人 C κ 结构域。氨基酸的编号是基于其在 SEQ ID NO:21 中所列经改变的人 C κ 序列中的位置。在某些实施方式中,免疫球蛋白异二聚化结构域是在 N29、N30、V55 或 T70 处有 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的经改变的人 C κ 结构域。用于在上述位置取代的氨基酸可以是丙氨酸,或是具有大侧链部分的氨基酸残基例如精氨酸、色氨酸、酪氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺或赖氨酸。SEQ ID NO:261-297 中给出示例性的经改变的人 C κ 结构域。SEQ ID NO:22 和 23 中提供经改变人 C κ 结构域的示例,其中氨基酸残基 30、55 和 70 已改变。这两种 C κ 变体分别称作 C κ (YAE) 和 C κ (EAE),指出其三处替代残基。某些经改变的人 C κ 结构域可促进与 CH1 区的异二聚化,但使与另一 C κ 结构域的同二聚化降至最低。代表性的经改变人 C κ 结构域见序列:SEQ ID NO:298(N29W V55A T70A)、299(N29Y V55A T70A)、300(T70E N29A N30A V55A)、301(N30R V55A T70A)、302(N30K V55A T70A)、303(N30E V55A T70A)、304(V55R N29A N30A)、305(N29W N30Y V55A T70E)、306(N29Y N30Y V55A T70E)、23(N30E V55A T70E) 和 22(N30Y V55A T70E)。

[0110] 在进一步实施方式中,其它经改变的人 C κ 结构域包括 N30D V55A T70E(DAE); N30M V55A T70E(MAE); N30S V55A T70E(SAE) 和 N30FV55A T70E(FAE)。

[0111] 在进一步实施方式中,特定的经改变 CH1 结构域可与特定的经改变的人 C κ 结构域适当配对以使同二聚化不稳定。就此而言,说明性的经改变结构域对包括 C κ L29E+CH1 V68K 和 C κ L29K+CH1 V68E。

[0112] 在某些实施方式中,补充或替代本文上述 C κ 结构域的突变,多肽异二聚体的免疫球蛋白异二聚化结构域(即,免疫球蛋白 CH1 和 CL 结构域)具有突变从而所得免疫球蛋白异二聚化结构域在突变位点处的氨基酸残基之间形成盐桥(即,离子相互作用)。例如,多肽异二聚体的异二聚化结构域可以是经突变的 CH1 结构域结合经突变的 C κ 结构域。在上述经突变的 CH1 结构域中,野生型人 CH1 结构域的 68 位缬氨酸(V68)被带负电的氨基酸残基(例如,天冬氨酸或谷氨酸)取代,而缺失首个精氨酸和最后一个半胱氨酸的经突变人 C κ 结构域中 29 位的亮氨酸(L29)被带正电氨基酸残基(例如,赖氨酸、精氨酸或组氨酸)取代。所得经突变 CH1 结构域的带负电氨基酸残基与所得经突变 C κ 结构域的带正电氨基酸残基之间的电荷-电荷相互作用形成盐桥,稳定经突变 CH1 和 C κ 结构域间的异二聚体界面。或者,野生型 CH1 的 V68 可被带正电的氨基酸残基取代,而缺失首个精氨酸和最后一个半胱氨酸的经突变人 C κ 结构域的 L29 可被带负电的氨基酸残基取代。V68 被带负电或正电的氨基酸取代的示例性经突变 CH1 结构域包括 V68K 和 V68E 取代的 CH1 结构域。L29 被带负电或正电的氨基酸取代的示例性经突变 C κ 结构域包括 L29E 和 L29K 取代的 C κ 结构域。在某些实施方式中,存在于野生型 C κ 中的末端半胱氨酸残基缺失。

[0113] 可用带相反电荷的氨基酸取代人 CH1 结构域的 V68 和人 C κ 结构域的 L29 以外的位置来产生氨基酸之间的离子相互作用以补充或替代 CH1 结构域的 V68 和 C κ 结构域的 L29 处的突变。此类位置可由任何适当方法鉴定,包括随机诱变,用以鉴定 CH1-C κ 界面处氨基酸残基的 CH1-C κ 对晶体结构分析,并用某组标准(例如,参与离子相互作用的倾向性,离潜在伙伴残基的接近度,等等)进一步鉴定 CH1-C κ 界面处氨基酸残基之间的合适位置。

[0114] 在需要多肽异二聚体的某些实施方式中,所用单链多肽可仅含一对异二聚化结构域。例如,多肽异二聚体的第一链可包含 CH1 区作为异二聚化结构域,而第二链可包含 CL 结构域(例如,C κ 或 C λ)作为异二聚化结构域。或者,第一链可包含 CL 结构域(例如,C κ 或 C λ)作为异二聚化结构域,而第二链可包含 CH1 区作为异二聚化结构域。如本文所述,所述第一链和第二链的异二聚化结构域能结合形成本发明的多肽异二聚体。

[0115] 在某些其他实施方式中,免疫球蛋白结合多肽可具有两对异二聚化结构域。例如,多肽异二聚体的第一链可包含两个 CH1 区,而第二链可具有与所述第一链中的两个 CH1 区结合的两个 CL 结构域。或者,第一链可包含两个 CL 结构域,而第二链可具有与所述第一链中的两个 CL 结构域结合的两个 CH1 区。在某些实施方式中,第一链多肽包含 CH1 区和 CL 结构域,而第二链多肽包含分别结合所述第一链多肽的 CH1 区和 CL 结构域的 CL 结构域和 CH1 区。

[0116] 在多肽异二聚体仅包含一个异二聚体对(即,各链中一个异二聚化结构域)的实施方式中,各链的异二聚化结构域可以位于该链 Fc 区部分的氨基末端。或者,各链中的异二聚化结构域可位于该链 Fc 区部分的羧基末端。

[0117] 在多肽异二聚体包含两个异二聚体对(即,每条链中各有两个异二聚化结构域)的实施方式中,各链的两个异二聚化结构域可以都位于该链 Fc 区部分的氨基末端。或者,各链中的两个异二聚化结构域可都位于该链 Fc 区部分的羧基末端。在进一步实施方式中,各链中的一个异二聚化结构域可位于该链 Fc 区部分的氨基末端,而各链的另一异二聚化结构域可位于该链 Fc 区部分的羧基末端。换言之,在这些实施方式中,Fc 区部分介于各链的两个异二聚化结构域之间。

[0118] Fc 区部分

[0119] 如本文所述,本发明的结合构建物,无论是否包含结合域,可包含 Fc 区恒定结构域部分(也称作 Fc 区部分)。包含 Fc 区部分减缓所述结合蛋白在给予对象后循环中的清除。如本领域所知和本文所述,通过突变或其它改变,Fc 区部分还使得能相对简单的调整所述结合多肽或其二聚体或异二聚体的效应功能(例如,ADCC、ADCP、CDC、补体固定并结合 Fc 受体),这些功能可取决于所治疗的疾病而被提高或降低。在某些实施方式中,本发明所述结合多肽的 Fc 区部分将能介导这些效应功能中的一种或多种。

[0120] 单链多肽中的 Fc 区部分可包含 CH2 结构域、CH3 结构域、CH4 结构域或其任意组合。例如,Fc 区部分可包含 CH2 结构域、CH3 结构域、CH2 和 CH3 结构域,CH3 和 CH4 结构域,两个 CH3 结构域,CH4 结构域,或两个 CH4 结构域。

[0121] 能形成本发明所述单链多肽的 Fc 区部分的 CH2 结构域可以是来自某些免疫球蛋白分类或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2 或 IgD)和来自不同物种(包括人、小鼠、大鼠和其它哺乳动物)的野生型免疫球蛋白 CH2 结构域或其经改变的免疫球蛋白 CH2 结构域。

[0122] 在某些实施方式中,CH2 结构域是野生型人免疫球蛋白 CH2 结构域,例如 SEQ ID NO:241、246-248 和 242-244 中分别列出的人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2 或 IgD 的野生型 CH2 结构域。在某些实施方式中,CH2 结构域是 SEQ ID NO:241 中所示野生型人 IgG1 CH2 结构域。

[0123] 在某些实施方式中,CH2 结构域是包含 297 位天冬酰胺处的氨基酸取代(例如,天

冬酰胺取代为丙氨酸)的经改变免疫球蛋白 CH2 区(例如,经改变的人 IgG1 CH2 结构域)。这样的氨基酸取代降低或消除该位点的糖基化并取消 Fc 对 Fc γ R 和 C1q 的有效结合。含 297 位 Asn 至 Ala 取代的经改变的人 IgG1 CH2 结构域的序列见 SEQ ID NO:307。

[0124] 在某些实施方式中,CH2 结构域是在 234-238 位包含至少一个取代或缺失的经改变免疫球蛋白 CH2 区(例如,经改变的人 IgG1 CH2 结构域)。例如,免疫球蛋白 CH2 区可包含 234、235、236、237 或 238 位某位置,234 和 235 位,234 和 236 位,234 和 237 位,234 和 238 位,234-236 位,234、235 和 237 位,234、236 和 238 位,234、235、237 和 238 位,236-238 位,或 234-238 位的 2、3、4 或 5 个氨基酸的任意其它组合的取代。补充或替代地,经改变的 CH2 区可包含 234-238 位的一个或多个(例如,2、3、4 或 5 个)氨基酸缺失,例如在 236 位或 237 位其一为缺失而另一位置为取代。上述突变降低或消除含所述经改变 CH2 结构域的多肽异二聚体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性或 Fc 受体结合能力。在某些实施方式中,234-238 位中一个或多个位置处的氨基酸残基被一个或多个丙氨酸残基替换。在进一步实施方式中,在 234-238 位置仅有一个氨基酸残基缺失,而另有 234-238 位的一个或多个其余氨基酸被另一氨基酸取代(例如,丙氨酸或丝氨酸)。

[0125] 在某些其它实施方式中,CH2 结构域是在 253、310、318、320、322 和 331 位包含一个或多个氨基酸取代的经改变免疫球蛋白 CH2 区(例如,经改变的人 IgG1 CH2 结构域)。例如,免疫球蛋白 CH2 区可包含在 253、310、318、320、322 或 331 某位置、318 和 320 位,318 和 322 位,318、320 和 322 位,或 253、310、318、320、322 和 331 位的 2、3、4、5 或 6 个氨基酸位置处的取代。上述突变降低或消除含所述经改变 CH2 结构域的多肽异二聚体的补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0126] 在某些其它实施方式中,除 297 位的氨基酸取代外,经改变的 CH2 区(例如,经改变的人 IgG1 CH2 结构域)还可在 234-238 位包含一个或多个(例如,2、3、4 或 5 个)额外的取代。例如,免疫球蛋白 CH2 区可在 234 和 297 位,234、235 和 297 位,234、236 和 297 位,234-236 和 297 位,234、235、237 和 297 位,234、236、238 和 297 位,234、235、237、238 和 297 位,236-238 和 297 位,或者在 234-238 位的 2、3、4 或 5 个氨基酸的任意组合附加 297 位处包含取代。补充或替代地,经改变的 CH2 区可包含 234-238 位的一个或多个(例如,2、3、4 或 5 个)氨基酸缺失,例如在 236 位或 237 位。额外的突变降低或消除含所述经改变 CH2 结构域的多肽异二聚体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性或 Fc 受体结合能力。在某些实施方式中,234-238 位中一个或多个位置处的氨基酸残基被一个或多个丙氨酸残基替换。在进一步实施方式中,在 234-238 位置仅有一个氨基酸残基缺失,而另有 234-238 位的一个或多个其余氨基酸被另一氨基酸(例如,丙氨酸或丝氨酸)取代。

[0127] 在某些实施方式中,除 234-238 位的一个或多个(例如,2、3、4 或 5 个)氨基酸取代以外,本发明所述融合蛋白中经突变的 CH2 区(例如,经改变的人 IgG1 CH2 结构域)可在参与补体结合的一处或多处位置(例如,在 I253、H310、E318、K320、K322 或 P331 位)包含一个或多个(例如,2、3、4、5 或 6 个)额外的氨基酸取代。经突变免疫球蛋白 CH2 区的示例包括在 234、235、237(若有)、318、320 和 322 位有丙氨酸取代的人 IgG1、IgG2、IgG4 和小鼠 IgG2a CH2 区。一种示例性经突变免疫球蛋白 CH2 区是在 L234、L235、G237、E318、K320 和 K322 处有丙氨酸取代的小鼠 IGHG2c CH2 区(SEQ ID NO:308)。

[0128] 在其它实施方式中,除 297 位的氨基酸取代和 234-238 位的额外单个或多个缺失

或取代外,经改变的 CH2 区(例如,经改变的人 IgG1 CH2 结构域)还可在 253、310、318、320、322 和 331 位包含一个或多个(例如,2、3、4、5 或 6 个)额外的取代。例如,免疫球蛋白 CH2 区可包含 (1) 297 位的取代,(2) 234-238 位的一处或多处取代或缺失或其组合,以及 I253、H310、E318、K320、K322 和 P331 位的一处或多处(例如,2、3、4、5 或 6 处)氨基酸取代,例如在 E318、K320 和 K322 处的 1、2、3 处取代。在一种实施方式中,上述位置的氨基酸被丙氨酸或丝氨酸取代。

[0129] 在某些实施方式中,免疫球蛋白 CH2 区多肽包含:(i) 在 297 位天冬酰胺的氨基酸取代和 234、235、236 或 237 位的一个氨基酸取代;(ii) 在 297 位天冬酰胺的氨基酸取代和 234-237 位的 2 个氨基酸取代;(iii) 在 297 位天冬酰胺的氨基酸取代和 234-237 位的 3 个氨基酸取代;(iv) 在 297 位天冬酰胺的氨基酸取代和 234、235 和 237 位的氨基酸取代,和 236 位的氨基酸缺失;(v) 在 234-237 位的 3 处氨基酸取代和在 318、320 和 322 位的氨基酸取代;或(vi) 在 234-237 位的 3 处氨基酸取代,在 236 位的氨基酸缺失,和在 318、320 和 322 位的氨基酸取代。

[0130] 在 297 位天冬酰胺处有氨基酸取代的示例性的经改变免疫球蛋白 CH2 区包括:在 L234、L235、G237 与 N297 处有丙氨酸取代并缺失 G236 的人 IgG1CH2 区 (SEQ ID NO:309),在 V234、G236 与 N297 处有丙氨酸取代的人 IgG2CH2 区 (SEQ ID NO:310),在 F234、L235、G237 与 N297 处有丙氨酸取代并缺失 G236 的人 IgG4CH2 区 (SEQ ID NO:311),在 F234 与 N297 处有丙氨酸取代的人 IgG4CH2 区 (SEQ ID NO:312),在 L235 与 N297 处有丙氨酸取代的人 IgG4CH2 区 (SEQ ID NO:313),在 G236 与 N297 处有丙氨酸取代的人 IgG4CH2 区 (SEQ ID NO:314),和在 G237 与 N297 处有丙氨酸取代的人 IgG4CH2 区 (SEQ ID NO:315)。

[0131] 在某些实施方式中,除上述氨基酸取代以外,经改变的 CH2 区(例如,经改变的人 IgG1 CH2 结构域)可含有上述位置以外一处或多处位置的一个或多个额外的氨基酸取代。此类氨基酸取代可以是保守或非保守的氨基酸取代。例如,在某些实施方式中,经改变的 IgG2 CH2 区(例如,SEQ ID NO:310)中 P233 可变为 E233。补充或替代地,在某些实施方式中,所述经改变的 CH2 区可含有一个或多个氨基酸插入、缺失或两者兼有。所述一个或多个插入、缺失或取代可在免疫球蛋白 CH2 区的任意位置,例如在野生型免疫球蛋白 CH2 区的 N- 或 C- 末端,导致所述 CH2 区经铰链连接另一区(例如,结构域或异二聚化结构域)。

[0132] 在某些实施方式中,本发明所述多肽异二聚体中的经改变 CH2 区是与野生型免疫球蛋白 CH2 区,例如野生型的人 IgG1、IgG2 或 IgG4 或者小鼠 IgG2a(如 IGHG2c) 的 CH2 区的序列至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 相同的序列,或包含这样的序列。

[0133] 本发明所述多肽异二聚体的经改变免疫球蛋白 CH2 区可衍生自不同物种(包括人、小鼠、大鼠和其它哺乳动物)的不同免疫球蛋白同种型的 CH2 区,所述同种型如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2 和 IgD。在某些实施方式中,本发明所述融合蛋白的免疫球蛋白 CH2 区可衍生自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 或者小鼠 IgG2a(如 IGHG2c) 的 CH2 区,其序列如 SEQ ID NO:241、246、248 和 316 所示。

[0134] 在某些实施方式中,经改变的 CH2 结构域是在 235、318、320 与 322 位有丙氨酸取代的人 IgG1CH2 结构域(即,带有 L235A、E318A、K320A 和 K322A 取代的人 IgG1 CH2 结构域)(SEQ ID NO:317),并可选有 N297 突变(例如,变为丙氨酸)。在某些其它实施方式中,

经改变的 CH2 结构域是在 234、235、237、318、320 与 322 位有丙氨酸取代的人 IgG1 CH2 结构域（即，带有 L234A、L235A、G237A、E318A、K320A 和 K322A 取代的人 IgG1 CH2 结构域）（SEQ ID NO:318），并可选有 N297 突变（例如，变为丙氨酸）。

[0135] 在某些实施方式中，经改变的 CH2 结构域是带有本领域已知能改善免疫活性如 ADCC、ADCP、CDC、补体结合、Fc 受体结合或其任意组合的突变的经改变人 IgG1 CH2 结构域。

[0136] 能形成本发明所述结合多肽的 Fc 区部分的 CH3 结构域可以是来自不同物种（包括人、小鼠、大鼠和其它哺乳动物）的某些免疫球蛋白分类或亚类（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgM）的野生型免疫球蛋白 CH3 结构域或其经改变的免疫球蛋白 CH3 结构域。在某些实施方式中，CH3 结构域是野生型人免疫球蛋白 CH3 结构域，例如 SEQ ID NO:319-328 中分别列出的人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE 或 IgM 的野生型 CH3 结构域。在某些实施方式中，CH3 结构域是 SEQ ID NO:319 中所示的野生型人 IgG1 CH3 结构域。在某些实施方式中，CH3 结构域是经改变的人免疫球蛋白 CH3 结构域，例如基于或衍生自人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE 或 IgM 抗体的野生型 CH3 结构域的经改变 CH3 结构域。例如，经改变的 CH3 结构域可以是在 H433 与 N434 处（位置按 EU 编号法编号）有一个或两个突变的人 IgG1 CH3 结构域。这些位置处的突变可参与补体结合。在某些其它实施方式中，经改变的 CH3 结构域可以是人 IgG1 CH3 结构域，但带有 F405 或 Y407 位的 1 或 2 个氨基酸取代。在这些位置处的氨基酸参与和另一 CH3 结构域的相互作用。在某些实施方式中，经改变的 CH3 结构域可以是缺失末位赖氨酸的经改变人 IgG1 CH3 结构域。这一经改变 CH3 结构域的序列如 SEQ ID NO:329 所示。

[0137] 在某些实施方式中，特别是需要多肽异二聚体的实施方式中，异二聚体的多肽包含含有称作“旋钮入孔 (knobs-into-holes)”突变的 CH3 对（参见 Marvin 和 Zhu, *Acta Pharmacologica Sinica* 26:649-58, 200; Ridgway 等, *Protein Engineering* 9:617-21, 1966）。更具体地，可在两个 CH3 结构域中各自引入突变使得 CH3/CH3 结合所需的互补性迫使这两个 CH3 结构域彼此结对。例如，多肽异二聚体中一条单链多肽的 CH3 结构域可含有 T366W 突变（“钮”突变，用较大氨基酸取代小氨基酸），而该多肽异二聚体中另一单链多肽的 CH3 结构域可含有 Y407A 突变（“孔”突变，用较小氨基酸取代大的氨基酸）。其它示例性旋钮入孔的突变包括（1）一个 CH3 结构域中的 T366Y 突变和另一 CH3 结构域中的 Y407T，和（2）一个 CH3 结构域中的 T366W 突变和另一 CH3 结构域中的 T366S、L368A 和 Y407V 突变。

[0138] 可形成含或不含结合域的单链多肽 Fc 区部分的 CH4 结构域可以是来自 IgE 或 IgM 分子的野生型免疫球蛋白 CH4 结构域或其经改变的免疫球蛋白 CH4 结构域。在某些实施方式中，CH4 结构域是野生型人免疫球蛋白 CH4 结构域，例如 SEQ ID NO:330 和 331 分别列出的人 IgE 和 IgM 分子的野生型 CH4 结构域。在某些实施方式中，CH4 结构域是经改变的人免疫球蛋白 CH4 结构域，例如基于或衍生自人 IgE 或 IgM 分子的 CH4 结构域的经改变 CH4 结构域，其具有提高或降低已知与 IgE 或 IgM Fc 区相关的免疫活性的突变。

[0139] 在某些实施方式中，Fc 区恒定结构域部分包含 CH2、CH3 或 CH4 结构域的组合（即选自 CH2、CH3 和 CH4 的超过 1 个恒定亚结构域）。例如，Fc 区部分可包含 CH2 与 CH3 结构域或 CH3 与 CH4 结构域。在某些其它实施方式中，Fc 区部分可包含 2 个 CH3 结构域而无 CH2 或 CH4 结构域（即，仅 2 个或更多个 CH3）。形成 Fc 区部分的多个恒定亚结构域可以基

于或衍生自同一免疫球蛋白分子,或者同一类别或亚类的免疫球蛋白分子。在某些实施方式中,Fc 区部分是 IgG CH₂CH₃(例如,IgG1CH₂CH₃、IgG2 CH₂CH₃和 IgG4 CH₂CH₃)且在某些实施方式中是人的(例如,人 IgG1、IgG2 和 IgG4)CH₂CH₃。例如,在某些实施方式中,Fc 区部分包含 (1) 野生型人 IgG1 CH₂与 CH₃ 结构域,(2) 含 N297A 取代的人 IgG1 CH₂(即,CH₂(N297A)) 和野生型人 IgG1 CH₃,或 (3) 人 IgG1CH₂(N297A) 和缺失末位赖氨酸的经改变人 IgG1 CH₃。

[0140] 或者,多个恒定亚结构域可以基于或衍生自不同的免疫球蛋白分子,或者不同类别或亚类的免疫球蛋白分子。例如,在某些实施方式中,Fc 区部分同时包含人 IgM CH₃ 结构域和人 IgG1 CH₃ 结构域。形成 Fc 区部分的多个恒定亚结构域可以直接相连或可通过一个或多个(例如,2-8 个)氨基酸相连。

[0141] 示例性 Fc 区部分如 SEQ ID NO:18-19,332-341 所示。

[0142] 对于本文所述的异二聚体,某些实施方式中多肽异二聚体中两个单链多肽的 Fc 区部分彼此相同。在某些其它实施方式中,多肽异二聚体中一条单链多肽的 Fc 区部分不同于该异二聚体中另一单链多肽的 Fc 区部分。例如,一个 Fc 区部分可含有带“钮”突变的 CH₃ 结构域,而另一 Fc 区部分可含有带“孔”突变的 CH₃ 结构域。

[0143] 铰链

[0144] 根据本发明的披露,本文所述的含或不含结构域的任意免疫球蛋白结合多肽如单链多肽中所含的铰链区可位于 (a) 紧邻 Fc 区部分的氨基末端(例如,根据具体的同种型,当 Fc 区部分是 CH₂CH₃ 时位于 CH₂ 结构域的氨基末端,或当 Fc 区部分是 CH₃CH₄ 时位于 CH₃ 结构域的氨基末端), (b) 间插在结合域(例如,scFv) 和异二聚化结构域之间并连接这两个结构域, (c) 间插在异二聚化结构域和 Fc 区部分(例如,根据具体的同种型或多种同种型,所述 Fc 区部分是 CH₂CH₃ 或 CH₃CH₄) 之间并连接这两个结构域, (d) 间插在 Fc 区部分和结合域之间并连接这两个结构域, (e) 所述单链多肽的氨基末端,或 (f) 所述单链多肽的羧基末端。

[0145] 在某些实施方式中,铰链是野生型人免疫球蛋白铰链区(例如,SEQ ID NO:342-348 中所示的人免疫球蛋白铰链区)。在某些其它实施方式中,可在野生型免疫球蛋白铰链区的氨基或羧基末端添加一个或多个氨基酸残基作为融合蛋白构建物设计的一部分。例如,额外的接合氨基酸残基在铰链氨基末端时可以是“RT”、“RSS”、“SS”、“TG”或“T”,或在铰链羧基末端时可以是“SG”,或者铰链的缺失可结合添加,例如 ΔP 与羧基末端的“SG”添加。SEQ ID NO:14-17 中提供说明性的变体铰链。

[0146] 在某些实施方式中,铰链是经改变的免疫球蛋白铰链,其中野生型免疫球蛋白铰链区的一个或多个半胱氨酸残基取代为一种或多种其它氨基酸残基(例如,丝氨酸或丙氨酸)。例如,铰链可以是基于或衍生自 SEQ ID NO:349 所示野生型人 IgG1 铰链的经改变免疫球蛋白铰链,其自氨基末端至羧基末端含有上部铰链区(EPKSCDKTHT,SEQ ID NO:194) 和核心铰链区(CPPCP,SEQ ID NO:199)。示例性的经改变免疫球蛋白铰链包括将野生型人 IgG1 铰链中所见的 1、2 或 3 个半胱氨酸残基取代以 1、2 或 3 个另外的氨基酸残基(例如丝氨酸或丙氨酸)的免疫球蛋白人 IgG1 铰链区。经改变的免疫球蛋白铰链可额外将脯氨酸取代为另一氨基酸(例如,丝氨酸或丙氨酸)。例如,上述经改变的人 IgG1 铰链可额外将位于野生型人 IgG1 铰链区 3 个半胱氨酸的羧基末端的脯氨酸取代以另一氨基酸残基(例如,丝氨

酸、丙氨酸)。在一种实施方式中,核心铰链区的脯氨酸未被取代。SEQ ID NO:350-377 中给出示例性的经改变的免疫球蛋白铰链。在一种实施方式中,经改变的 IgG1 铰链是经改变的人 IgG1 铰链,其中首个半胱氨酸被丝氨酸取代。该示例性的经改变 IgG1 铰链的序列见 SEQ ID NO:354 所示,并称作“人 IgG1 SCC-P 铰链”或“SCC-P 铰链”。在某些实施方式中,可在突变的免疫球蛋白铰链区的氨基或羧基末端添加一个或多个氨基酸残基(例如,“RT”、“RSS”或“T”)作为融合蛋白构建物设计的一部分。

[0147] 在某些实施方式中,铰链多肽是与野生型免疫球蛋白铰链区,例如野生型人 IgG1 铰链,野生型人 IgG2 铰链或野生型人 IgG4 铰链至少约 80%、至少约 81%、至少约 82%、至少约 83%、至少约 84%、至少约 85%、至少约 86%、至少约 87%、至少约 88%、至少约 89%、至少约 90%、至少约 91%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99% 相同的序列或包含这样的序列。

[0148] 在进一步实施方式中,铰链可以不基于或衍生自免疫球蛋白铰链(即,非野生型免疫球蛋白铰链或经改变免疫球蛋白铰链)的铰链。在一种实施方式中,这些类型的非免疫球蛋白基铰链用于或靠近本文所述多肽的羧基末端(例如,位于 Fc 区部分的羧基末端方向)。此类铰链的示例包括来自 II 型 C 凝集素或 CD 分子的结构域间或茎部区域的肽,例如 SEQ ID NO:378-383 所示的 CD69、CD72、CD94、NKG2A 和 NKG2D 的茎部区域。额外的示例性铰链包括 SEQ ID NO:384-419 中所示的那些。

[0149] 可用于本文的替代铰链是来自细胞表面受体的部分(结构域间区域),其连接免疫球蛋白 V-样或免疫球蛋白 C-样结构域。当细胞表面受体含有多个串联的 Ig V-样结构域时在 Ig V-样结构域之间的区域,以及当细胞表面受体含有多个串联的 Ig C-样区域时在 Ig C-样结构域之间的区域也考虑为可用作多肽异二聚体的单链多肽中的铰链。在某些实施方式中,含有细胞表面受体结构域间区域的铰链序列还可含有天然存在或添加的基序,例如能提供一个或多个二硫键以稳定所示多肽异二聚体形成的 IgG 核心铰链序列。铰链的示例包括 CD2、CD4、CD22、CD33、CD48、CD58、CD66、CD80、CD86、CD150、CD166 和 CD244 的 IgV 样和 IgC 样区之间的结构域间区域。

[0150] 在某些实施方式中,铰链序列具有约 5-150 个氨基酸,约 5-10 个氨基酸,约 10-20 个氨基酸,约 20-30 个氨基酸,约 30-40 个氨基酸,约 40-50 个氨基酸,约 50-60 个氨基酸,约 5-60 个氨基酸,约 5-40 个氨基酸,例如,约 8-20 个氨基酸或约 12-15 个氨基酸。铰链可以主要是柔性的,但也可提供更为刚性的特性或可主要含 α -螺旋结构而 β -片层结构尽可能少。铰链的长度或序列可影响该铰链直接或间接(经另一区域或结构域,例如异二聚化结构域)所连接的结合域的结合亲和性,以及该铰链直接或间接连接的 Fc 区部分的一种或多种活性。

[0151] 在某些实施方式中,铰链序列在血浆和血清中具有稳定性,并能耐受蛋白水解切割。IgG1 上部铰链区的首个赖氨酸可被突变以使蛋白水解切割最小。例如,所述赖氨酸可取代为甲硫氨酸、苏氨酸、丙氨酸或甘氨酸,或缺失该赖氨酸(参见例如 SEQ ID NO:420-475,其可在氨基末端包括接合氨基酸,例如 RT)。

[0152] 在一些实施方式中,铰链序列可含有能形成一个或多个二硫键以稳定分子羧基末端的天然产生的或添加的基序,如免疫球蛋白铰链核心结构 CPPC(SEQ ID NO:476)。在其它实施方式中,铰链序列可含有一个或多个糖基化位点。

[0153] 示例性的铰链,包括经改变的免疫球蛋白铰链,见 SEQ ID NO:389-475 和 477-606 中所示。其它示例性的铰链,包括经变体铰链,见 SEQ ID NO:790-797 和 805-506 中所示。

[0154] 在某些实施方式中,免疫球蛋白结合多肽包含超过一个铰链。例如,具有两个结合域的单链多肽可有两个铰链,这两个结合域一个在氨基末端另一个在羧基末端。一个铰链可直接或间接(例如,经异二聚化结构域)连接在氨基末端或该端附近的结合域,而另一铰链可连接(例如,直接连接)羧基末端或该端附近的另一结合域。在某些实施方式中,即使是仅有一个结合域的单链多肽仍可在其氨基或羧基末端具有超过一个铰链。在例如需要异二聚化的某些实施方式中,此类铰链可与异二聚体中另一链的相应铰链相互作用,例如形成一个或多个链间二硫键,以促进或增强这两条链的异二聚化。当多肽异二聚体 aSCP-I 的铰链(H-I)和异二聚体 SCP-II 的铰链(H-II)位于其相应的单链多肽 Fc 区部分的相同末端时,H-I“对应于”H-II。例如,多肽异二聚体可含有下列两条单链多肽:第一链多肽从氨基到羧基末端包含第一结合域、CH1、铰链、CH2 和 CH3,而第二链多肽从氨基到羧基末端包含 CK、第一铰链、CH2、CH3、第二铰链和第二结合域。第一链的铰链可视为“对应于”第二链的第一铰链,因为两者都在所连 Fc 区部分的氨基末端。

[0155] 在某些实施方式中,特别是免疫球蛋白结合多肽包含羧基末端或该端附近的结合域时,可存在铰链以连接所述结合域与该多肽的另一部分(例如,Fc 区部分或异二聚化结构域)。在某些实施方式中,此类铰链是非免疫球蛋白铰链(即,铰链并非基于或衍生自野生型免疫球蛋白铰链)且可以是 CD 分子或 II 型 C-凝集素的茎部区,连接细胞表面受体的 IgV-样或 IgC-样结构域的结构域间区域,或其衍生物或功能性变体。示例性羧基末端铰链有时称作“后端”铰链,包括 SEQ ID NO:384、389-419、593-596 中所示的那些。

[0156] 其它组件或修饰

[0157] 在某些实施方式中,本发明的免疫球蛋白结合多肽可含有一个或多个额外的结构域或区域。此类额外区域可以是在氨基末端用于分泌所表达多肽的前导序列(也称作“信号肽”)。本发明的示例性前导肽包括天然的前导序列或其它,例如 SEQ ID NO:193 和 13 所示序列。在一种实施方式中,本发明的多肽利用不含前导肽(信号肽)的成熟蛋白质。因此,尽管本文就结合域蛋白(如 RON)提供的某些序列包括前导肽,技术人员很容易理解如何从包含信号肽的序列确定成熟蛋白质序列。在某些实施方式中,包含前导肽可能具有实用性。

[0158] 额外的区域还可以是在羧基末端用于鉴定或纯化单链多肽(例如,用于检测或纯化的表位标签,例如组氨酸标签、生物素、FLAG®表位,或其任意组合)。

[0159] 进一步可选的区域可以是长约 1-8 个氨基酸(例如,约 2-5 个氨基酸)的额外氨基酸残基(称作“接合氨基酸”或“接合氨基酸残基”),其可由就本发明所述多肽的特定表达系统或构建物设计的应用而产生。此类额外氨基酸残基(例如,约 1、2、3、4 或 5 个额外氨基酸)可存在于氨基或羧基末端或者在不同区域或结构域之间,例如在结合域与异二聚化结构域之间,在异二聚化结构域与铰链之间,在铰链与 Fc 区部分之间,在 Fc 区部分的结构域之间(例如,在 CH2 与 CH3 结构域或在 2 个 CH3 结构域之间),在结合域与铰链之间,或在可变区和接头之间。在铰链氨基末端的示例性接合氨基酸包括 RDQ(SEQ ID NO:607)、RT、SS、SASS(SEQ ID NO:608)和 SSS(SEQ ID NO:609)。铰链羧基末端的示例性接合氨基酸包括氨基酸 SG。其它示例性接合氨基酸包括 SR。

[0160] 本发明的多肽还可在本文所述不同结构域之间包含接头。示例性接头可包括 SEQ ID NO:610-777 中提供的任意接头。798-805 中提供了可用于连接 CH3 结构域的羧基末端与 CH1 或 C κ 结构域的氨基末端的说明性接头。

[0161] 在某些实施方式中,免疫球蛋白 Fc 区(例如,CH2、CH3 和 / 或 CH4 区)可能相对于免疫球蛋白参比序列具有改变的糖基化模式。例如,可采用各种遗传技术来改变构成糖基化位点的一个或多个特定氨基酸残基(参见 Co 等 (1993) *Mol. Immunol.* 30:1361; Jacquemon 等 (2006) *J. Thromb. Haemost.* 4:1047; Schuster 等 (2005) *Cancer Res.* 65:7934; Warnock 等 (2005) *Biotechnol. Bioeng.* 92:831),如 CH2 结构域的 N297 (EU 编号)。或者,生成所述免疫球蛋白结合多肽的宿主细胞可以工程改造为产生经改变的糖基化模式。例如,本领域已知的一种方法以增加 ADCC 的平分的非岩藻糖基化变体形式提供改变的糖基化模式。在含有寡糖修饰酶的宿主细胞中表达产生所述变体。或者,考虑用 BioWa/Kyowa Hakko 的 Potelligent 技术降低本发明糖基化分子的岩藻糖含量。在一种已知方法中,提供用于重组免疫球蛋白生产的 CHO 宿主细胞,其通过产生 GDP-岩藻糖而改变免疫球蛋白 Fc 区的糖基化模式。

[0162] 或者,用化学技术改变本发明的融合多肽的糖基化模式。例如,多种糖苷酶和 / 或甘露糖苷酶抑制剂提供一种或多种所需效果:提高 ADCC 活性、提高 Fc 受体结合和改变糖基化模式。在某些实施方式中,在含有糖修饰物的培养基中培养表达本发明融合蛋白的细胞,其中所述糖修饰物的浓度能提高所述宿主细胞产生的免疫糖蛋白分子的 ADCC,并且低于 800 μ M。在一种实施方式中,表达这些多肽的细胞生长于含有澳粟精胺或几夫碱,例如浓度为 100-800 μ M,如 100 μ M、200 μ M、300 μ M、400 μ M、500 μ M、600 μ M、700 μ M 或 800 μ M 的澳粟精胺的培养基中。美国专利号 7846434 或 PCT 公布号 WO 2008/052030 中提供了用糖修饰物如澳粟精胺改变糖基化的方法。

[0163] 免疫球蛋白结合多肽结构排列 / 形式:

[0164] 免疫球蛋白结合多肽:抗体

[0165] 本发明提供抗体或其抗原结合片段形式如 F(ab)、F(ab')₂、Fv、sFv 和 scFv 形式的结合域蛋白。可制备对 RON 或其它感兴趣靶标特异性的单克隆抗体,例如,用本领域熟知技术,如 Kohler 和 Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976 中所述技术及其改进;Wayner EA, Hoffstrom BG. 2007. *Methods Enzymol* 426:117-153;以及 Lane RD. 1985. *J Immunol Methods* 81:223-228。

[0166] 这些方法包括制备能产生具有所需特异性(即,对感兴趣多肽的反应性)的抗体的永生细胞系。例如,此类细胞系可制备自上述经免疫动物的脾细胞。然后,将所述脾细胞永生,例如,通过与骨髓瘤细胞融合伙伴的融合,所述融合伙伴优选与所述经免疫动物为同系基因型。可采用多种融合技术。例如,可将脾细胞和骨髓瘤与非离子型去污剂混合数分钟,然后以低密度接种至选择性培养基,该培养基支持杂交细胞的生长但不支持骨髓瘤细胞。一种选择技术采用 HAT(次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶核苷)选择。充分时间(通常约 1-2 周)后,观察到杂交子的集落。选择单集落并就针对所述多肽的结合活性来测试其培养上清液。优选具有高反应性和特异性的杂交瘤。

[0167] 单克隆抗体可分离自生长中杂交瘤集落的上清液。此外,可采用各种技术来提高得率,例如将杂交瘤细胞系注射入合适脊椎动物宿主如小鼠的腹膜腔。然后,可从腹水或血

液收集单克隆抗体。可用常规技术如色谱法、凝胶过滤法、沉淀法和萃取法从抗体中去除污染物。

[0168] 免疫球蛋白结合多肽:SMIP/PIMS 分子

[0169] 在某些实施方式中,免疫球蛋白结合多肽可包含“小模块免疫药物”(SMIPTM)。就此而言,术语 SMIPTM 指具有比单克隆和重组抗体增强的药物性质的高度模块化的化合物类别。SMIP 包含具有靶点特异性结合域的单个多肽链,其基于例如抗体可变结构域,结合有允许特异性募集所需类别效应物细胞(如巨噬细胞和天然杀伤(NK)细胞)和/或募集补体介导的杀伤作用的可变FC区。根据选择的靶点和铰链区,SMIP 可通过细胞表面受体进行信号传导或阻断信号传导。因此,SMIP 蛋白一般结合结构域-免疫球蛋白融合蛋白,该融合蛋白通常从氨基末端到羧基末端含:衍生自免疫球蛋白(例如,scFv)的结合域,铰链区和效应物结构域(例如,IgG CH2 和 CH3 区)。本文所用的称为“小模块免疫药物”或“SMIPTM产物”的如美国专利公布号 2003/133939、2003/0118592 和 2005/0136049,以及国际专利公布 W002/056910、W02005/037989 和 W02005/017148 中所述。两个相同 SMIP 可彼此形成同二聚体。

[0170] 在一些实施方式中,本发明所述包含 RON 结合域的融合蛋白可包含反向的 SMIPTM,也称作 PIMSTM 分子,如美国专利公布号 2009/0148447 和国际专利公布号 W02009/023386 中所述的那些。

[0171] 免疫球蛋白结合多肽:Scorpion/Xceptor 分子

[0172] 在某些实施方式中,本发明的结合域可存在于免疫球蛋白结合多肽中,例如 PCT 申请号 W02007/146968 和 US2009/059446 中所述的那些。在该实施方式中,免疫球蛋白结合多肽在本文也称为 Scorpion/Xceptor 多肽和多特异性融合蛋白,可含有 RON 结合域和结合 RON 以外分子的结构域(“异种结合域”)。在某些实施方式中,所述异种结合域特异性结合靶分子,其靶分子包括但不限于 Her1、Her2、Her3、CD3、表皮生长因子受体(EGFR)、c-Met、富组氨酸糖蛋白(HRG)、IGF-1、IGF-2、IGF-R1、IGF-R2、CD72、EGF、ERBB3、HGF、CD44、CD151、CEACAM6、TROP2、DR5、cKIT、CD27、IL6、CD40、VEGF-R、PDGF-R、TGFB、CD44v6、CD151、Wnt 和生长激素释放激素(GHRH)。

[0173] 考虑到 RON 结合域可位于多特异性融合蛋白的氨基末端而所述异种结合域可位于该融合蛋白的羧基末端。还考虑到异种结合域可位于氨基末端而 RON 结合域可位于羧基末端。如本文所述,本发明的结合域可融合于间插结构域(例如免疫球蛋白恒定区或其亚区)的任一端。此外,两个或多个结合域可各自通过接头(如本文所述)连接间插结构域。

[0174] 本文所用的“间插结构域”指一种氨基酸序列,其简单地用作一个或多个结合域的支架以使融合蛋白主要(例如,约 50% 或更多融合蛋白)或基本(例如,约 90% 或更多融合蛋白)以单链多肽形式存在于组合物中。例如,某些间插结构域可具有结构功能(如间隔、柔韧性、刚性)或生物学功能(如血浆中如人血中的半衰期延长)。可延长本发明融合蛋白的血浆半衰期的示例性间插结构域包括白蛋白、转铁蛋白、结合血清蛋白的支架结构域等,或其片段。

[0175] 在某些实施方式中,包含在本发明所述多特异性融合蛋白中的间插结构域是如本文另述的二聚化结构域。在某些实施方式中,两个相同的多特异性融合蛋白可彼此形成同型二聚体。

[0176] 包含 RON 结合域的多肽（本文称作 Xceptor 分子）的示例性结构包括 N-BD1-X-BD2-C、N-BD2-X-BD1-C，其中 N 和 C 分别代表氨基末端和羧基末端；BD1 是 RON 结合域，例如免疫球蛋白样或免疫球蛋白可变区结合域，或者是胞外域；X 是间插结构域，而结合域 BD2 是异种结合域，即，结合例如但不限于 Her1、Her2、Her3、CD3、表皮生长因子受体（EGFR）、c-Met、富组氨酸糖蛋白（HRG）、IGF-1、IGF-2、IGF-R1、IGF-R2、CD72、EGF、ERBB3、HGF、CD44、CD151、CEACAM6、TROP2、DR5、cKIT、CD27、IL6、IL6-R、超级 IL6、CD40、VEGF-R、PDGF-R、TGFB、CD44v6、CD151、Wnt 和生长激素释放激素（GHRH）等 RON 以外蛋白的结合域。在某些实施方式中，BD1 和 BD2 都是免疫球蛋白样或免疫球蛋白可变区结合域，且所述多肽还可称作“Scorpion”蛋白。在一些构建物中，X 可包含位于第一和第二结合域之间的免疫球蛋白恒定区或亚区域。在一些实施方式中，免疫球蛋白结合多肽具有的间插结构域（X）从氨基末端到羧基末端包含如下结构：-L1-X-L2-，其中 L1 和 L2 各自独立地是含有 2 到约 150 个氨基酸的接头；X 是免疫球蛋白恒定区或亚区。在进一步实施方式中，所述免疫球蛋白结合多肽具有的间插结构域将是白蛋白、转铁蛋白或其它血清蛋白结合蛋白，其中所述融合蛋白在组合物中主要或基本保持单链多肽的形式。

[0177] 在其它实施方式中，本发明的免疫球蛋白结合多肽具有以下结构：N-BD1-X-L2-BD2-C，其中 BD1 是 RON 结合域，例如与 RON 结合域至少约 90% 相同的结合域，例如 SEQ ID NO:87-93 和 157-159 中所示的那些；-X- 是 -L1-CH₂CH₃-，L1 是第一 IgG1 铰链，可选经取代第一或第二半胱氨酸而突变，且其中 -CH₂CH₃- 是 IgG1Fc 结构域的 CH₂CH₃ 区；L2 是选自 SEQ ID NO:610-777 的接头；而 BD2 是结合 RON 以外分子的异种结合域。

[0178] 在某些实施方式中，本发明提供包含多个 RON 结合域的 Scorpion/Xceptor。在一种实施方式中，多个 RON 结合域可串联连接并如上文结构中所述用作的 BD1 或 BD2。在另一实施方式中，Scorpion 或 Xceptor 分子的结合域可以都是 RON 结合域（例如 BD1 和 BD2 都是 RON 结合域）。

[0179] 免疫球蛋白结合多肽：异二聚分子

[0180] 本发明的免疫球蛋白结合多肽还包括两种不同单链多肽间通过免疫球蛋白 CH1 区和免疫球蛋白轻链恒定区（CL）之间的天然异二聚化形成的多肽异二聚体，例如本文实施例中以及美国临时申请 61/290,840、61/365,266 和 61/366,743；发明人 J·W·布兰肯希普和 P·谭名下 2010 年 12 月 29 日所提交的题为“HETERODIMER BINDING PROTEINS AND USES THEREOF（异二聚体结合蛋白及其用途）”的国际申请；以及发明人 J·W·布兰肯希普和 P·谭名下 2010 年 12 月 29 日所提交的题为“POLYPEPTIDE HETERODIMERS AND USES THEREOF（多肽异二聚体及其用途）”的国际申请中进一步描述的那些。

[0181] 本文所用“多肽异二聚体”、“异二聚体”或“交叉介体（Interceptor）”指由两条不同的单链融合多肽形成的二聚体。在某些实施方式中，多肽异二聚体包含的至少一条链（长链）长于另一链（短链）。所述术语不包括从四个单链多肽（即两轻链和两重链）形成的抗体。“二聚体”指由彼此相连的两个亚基所构成的生物实体，所述亚基通过一种或多种分子内力，包括共价键（如二硫键）和其他互相作用（如静电相互作用、盐桥、氢键和疏水相互作用）相连，且其在合适条件下（例如在生理条件下，在适合表达、纯化和 / 或存储重组蛋白的合适水溶液中，或用于非变性和 / 或非还原电泳的条件下）稳定。

[0182] “单链多肽”或“单链融合多肽”是单个、线性且连续排列的共价连接的氨基酸。它

不包括以非线性方式如通过链间二硫键（如半免疫球蛋白分子中，轻链和重链通过二硫键连接）相连的两个多肽链。某些实施方式中，单链多肽可以有或形成一个或多个链内二硫键。单链多肽可以有或没有上述结合域。例如，在某些实施方式中，两条单链多肽构建为使得它们形成的异二聚体中，异二聚体对的一条单链多肽成员含有结合域而该对的另一成员不含结合域。因此，该实施方式中，所形成的异二聚体通过异二聚体成员多肽链其中一结合域的功能来用作结合分子。

[0183] 本文所用“免疫球蛋白异二聚化结构域”，指免疫球蛋白结构域（“第一免疫球蛋白异二聚化结构域”），其能优选与另一不同的免疫球蛋白结构域（“第二免疫球蛋白异二聚化结构域”）相互作用或结合，其中不同异二聚化结构域的相互作用基本造成或有效促进异二聚化（即，在两条不同多肽之间形成二聚体，也称为“异二聚体”）。本发明的代表性免疫球蛋白异二聚化结构域包括免疫球蛋白 CH1 区，免疫球蛋白 CL 区（例如，C κ 或 C λ 同种型），或其衍生物，如本文所提供。

[0184] 在某些实施方式中，本文所述多肽异二聚体包括 (i) 含第一免疫球蛋白异二聚化结构域的单链多肽（“第一单链多肽”）和 (ii) 含不同于第一异二聚化结构域的第二异二聚化结构域的另一单链多肽（“第二单链多肽”），其中所述第一和第二异二聚化结构域基本造成或有效促进所述多肽异二聚体的形成。若所述第一与第二单链多肽间的二聚化在没有所述第一异二聚化结构域和 / 或第二异二聚化结构域时有统计学显著性降低，则所述第一与第二异二聚化结构域间的相互作用基本造成或有效促进第一与第二单链多肽的异二聚化。在某些实施方式中，当第一和第二单链多肽共表达时，至少约 60%、至少约 60%–约 70%、至少约 70%–约 80%、至少约 80%–约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%，和至少约 90%–约 92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的第一和第二单链多肽彼此形成异二聚体。

[0185] 本文所述异二聚化技术有一个或多个以下优点：(1) 多肽异二聚体的极低免疫原性，因为二聚体是由免疫球蛋白 CH1 区和免疫球蛋白 CL 区的自然异二聚化形成；(2) 可通过两个不同单链多肽的共表达来有效生产和纯化本发明的多肽异二聚体，如实施例显示；(3) 能调节 Fc 效应功能（如 CDC, ADCC, ADCCP），能通过突变上调或下调这些功能，且血清半衰期更长，因为本发明所述多肽异二聚体的各链有 Fc 区部分（如免疫球蛋白 CH2 和 CH3 结构域）；和 (4) 本发明的多肽异二聚体的大小通常小于抗体分子，这能允许更好的组织穿透，例如进入实体恶性肿瘤。

[0186] 在一方面，本发明提供仅包含单个结合域即 RON 结合域的异二聚体。所述异二聚体含较长单链多肽（其具有 RON 结合域）和较短单链多肽（其不含任何结合域）。另外，异二聚体的两个链还各自包括 Fc 区部分（例如，免疫球蛋白 CH2 和 / 或 CH3 结构域）。

[0187] 更具体地，本发明提供单链多肽及其多肽异二聚体，它们含单个 RON 结合域并具有 C κ -CH1 或 C λ -CH1 异二聚化结构域对或这些对的组合。在最简单的形式中，多肽异二聚体（也称作交叉介体）通过共表达两条不等的链而制得，一条链具有 C κ 或 C λ 结构域，而另一链具有 CH1 区。例如，表示长链的第一链多肽具有 scFv 形式的 RON 结合域和 CH1 异二聚化结构域，而表示短链的另一链没有结合域但具有 C κ 异二聚化结构域。多肽异二聚体（交叉介体）通常会单价结合 RON 靶蛋白，并理想的用于阻断受体 / 配体或受体 / 受体相互作用并避免通过受体交叉结合的细胞活化。相对例如 Fab 的其它不同优势包括较长血清

半衰期和易于纯化,因为存在 Fc 结构域。交叉介体可在氨基或羧基末端具有 RON 结合域。

[0188] 另一方面,本发明提供两个不同单链多肽结合所形成的多肽异二聚体(“多特异性异二聚体”),其有超过一个结合域,具体是至少一个 RON 结合域和至少一个结合域来结合 RON 以外的靶标。在某些实施方式中,异二聚体可以是双特异性或可以是多特异性的。在此方面,本发明提供多肽异二聚体,其中第一单链多肽(SCP-I)包含:特异结合 1-4 个靶标的 1-4 结合域、铰链(H-I)、免疫球蛋白异二聚化结构域(HD-I)和 Fc 区部分(FRP-I),或者由这些部分组成或基本由这些部分组成;而第二单链多肽(SCP-II)包含:特异结合从 0-4 个靶标的 0-4 个结合域、铰链(H-II)、免疫球蛋白异二聚化结构域(HD-II)和 Fc 区部分(FRP-II),或者由这些部分组成或基本由这些部分组成;前提是所述多肽异二聚体包括至少两个结合域来特异结合至少 2 个不同靶标。H-I 和 H-II 可以有相同序列,但可以不同。FRP-I 和 FRP-II 可以有相同序列,但可以不同。本文详细描述本发明所述多肽异二聚体的个体组件。

[0189] 若多特异性异二聚体的单链多肽包括单个结合域,所述结合域可位于所述单链多肽的 Fc 区部分的氨基或羧基末端。例如,含两个结合域的单链多肽可有一个结合域位于所述单链多肽的 Fc 区部分的氨基末端而另一个位于羧基末端,或两个结合域可以都位于所述 Fc 区部分的氨基末端或羧基末端。另一个实施例中,单链多肽可包含 3 个结合域,其中 (a) 2 个结合域在不同单链蛋白的氨基末端,而第三个结合域在 SCP-I 或 SCP-II 的 Fc 区部分的羧基末端, (b) 2 个结合域在不同单链蛋白的羧基末端,而第三个结合域在 SCP-I 或 SCP-II 的 Fc 区部分的氨基末端。在另一实施例中,多肽异二聚体可包含 4 个结合域,其中 2 个结合域位于不同单链蛋白 Fc 区部分的氨基末端,而另 2 个结合域位于不同链的 Fc 区部分的羧基末端。或者,任何所述实施方式中,根据所存在结合域的数量,2 个结合域可彼此串联连接并位于 SCP-I 或 SCP-II 或两者上,当 SCP-I 和 SCP-II 中共有 5-8 个结合域时使用串联堆积。

[0190] 因此,在某些实施方式中,异二聚体包含至少一个 RON 结合域并可包含结合异种靶蛋白的一个或多个额外的结合域,所述靶蛋白例如但不限于 TCR、CD3、Her1、Her2、Her3、、表皮生长因子受体(EGFR)、c-Met、富组氨酸糖蛋白(HRG)、IGF-1、IGF-2、IGF-R1、IGF-R2、CD72、EGF、ERBB3、HGF、CD44、CD151、CEACAM6、TROP2、DR5、cKIT、CD27、IL6、IL6-R、超级 IL6、CD40、VEGF-R、PDGF-R、TGFB、CD44v6、CD151、Wnt 和生长激素释放激素(GHRH)。在一种具体实施方式中,所述第一单链多肽包含抗 RON 结合域而所述第二单链多肽包含 TCR 结合域,例如 CD3 结合域。在另一实施方式中,所述第一单链多肽包含抗 RON 结合域而所述第二单链多肽包含抗 c-Met 结合域。在另一实施方式中,所述第一单链多肽包含抗 RON 结合域而所述第二单链多肽包含抗 CD19 结合域。

[0191] 通过结合域结合靶标调节所述靶标(如抗原、受体或配体)与另一分子之间的相互作用。某些实施方式中,通过结合域结合靶标(如受体)刺激所述靶标的某些功能(如信号转导)或就某生物效果而言使不同靶标更接近(如引导 T 细胞到肿瘤进而激活所述 T 细胞)。某些其他实施方式中,通过结合域结合靶标阻断靶标和另一分子间的相互作用并从而干扰、减弱或消除所述靶标的某些功能。

[0192] 在相关方面,本发明提供 2 种不同单链多肽结合所形成的多肽异二聚体,所述多肽含 2 个或多个结合域,各自结合 RON。此类多肽异二聚体可类似于本文所述的多特异性异

二聚体,但其结合域只结合 RON 而非能结合至少 2 种不同靶标的多特异性异二聚体的结合域。

[0193] 制备免疫球蛋白结合多肽

[0194] 为有效生产本文所述的任意结合多肽,可用前导肽促进所表达多肽的分泌。预期使用任何常规前导肽(信号序列)来引导初始表达的多肽进入分泌通路并在所述前导肽与所述多肽之间的连接处或其附近将所述前导肽从成熟多肽上切割。特定的前导肽根据本领域已知因素来选择,例如使用易于在前导肽的编码序列起始处或末端插入限制性内切核酸酶切割位点以便于分子工程操作的多核苷酸编码的序列,条件是这类引入序列确定的氨基酸不会不可接受地干扰由初始表达的蛋白质进行任何所需前导肽处理;或如果所述前导肽在该多肽或融合蛋白成熟过程中不被切割,则其不会不可接受地干扰所述多肽的任何所需功能。本发明的示例性前导肽包括天然前导序列(即,随天然蛋白质一起表达的那些序列)或使用异源前导序列,如 $\text{H}_3\text{N-MDFQVQIFSFLISASVIMSRG}(\text{X})_n\text{-CO}_2\text{H}$, 其中 X 是任何氨基酸而 n 是 0-3 (SEQ ID NO:778-781) 或 $\text{H}_3\text{N-MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG-CO}_2\text{H}$ (SEQ ID NO:782)。

[0195] 如本文所述,考虑到本文所述的结合域,如胞外域、轻链和重链可变区以及 CDR 的变体和衍生物。在一个实施例中,提供用一个或多个氨基酸残基补充特定结合剂氨基酸序列的插入变体。插入可位于蛋白质的任一端或两端,或可位于特定结合剂氨基酸序列的内部区域内。本发明的变体产物也包含成熟的特异性结合剂产物,即去除前导或信号序列且所得蛋白质具有额外的氨基末端残基的特异性结合剂产物。所述的额外氨基末端残基可来自另一蛋白质,或可包含无法鉴定为来自某特定蛋白质的一个或多个残基。考虑在 -1 位上有额外甲硫氨酸残基的多肽,以及在 -2 和 -1 位上有额外甲硫氨酸和赖氨酸残基的本发明多肽。具有额外的 Met、Met-Lys 或 Lys 残基(或总体具有一个或多个碱性残基)的变体特别有助于提高细菌宿主细胞中的重组蛋白生成。

[0196] 本文所用的“氨基酸”指天然(天然产生)的氨基酸、取代的天然氨基酸、非天然氨基酸、取代的非天然氨基酸或其任何组合。天然氨基酸的名称在本文中表示为标准的单字母或三字母代码。天然极性氨基酸包括天冬酰胺(Asp 或 N)和谷氨酰胺(Gln 或 Q);以及碱性氨基酸如精氨酸(Arg 或 R)、赖氨酸(Lys 或 K)、组氨酸(His 或 H)及其衍生物;以及酸性氨基酸如天冬氨酸(Asp 或 D)和谷氨酸(Glu 或 E)及其衍生物。天然疏水性氨基酸包括色氨酸(Trp 或 W)、苯丙氨酸(Phe 或 F)、异亮氨酸(Ile 或 I)、亮氨酸(Leu 或 L)、甲硫氨酸(Met 或 M)、缬氨酸(Val 或 V)及其衍生物;以及其它非极性氨基酸如甘氨酸(Gly 或 G)、丙氨酸(Ala 或 A)、脯氨酸(Pro 或 P)及其衍生物。中等极性的天然氨基酸包括丝氨酸(Ser 或 S)、苏氨酸(Thr 或 T)、酪氨酸(Tyr 或 Y)、半胱氨酸(Cys 或 C)及其衍生物。除非另有说明,本文所述的任何氨基酸可以是 D- 或 L- 构型。

[0197] 取代变体包括氨基酸序列中一个或多个氨基酸残基被去除或用替代性残基取代的那些多肽。在一些实施方式中,取代具有保守性质;然而,本发明也包括非保守性取代。可根据物理性质以及在蛋白质二级和三级结构中的贡献对氨基酸进行分类。本领域将保守取代认定为用具有类似性质的另一个氨基酸取代氨基酸。示例性保守取代见如下表 1 所示(参见 WO 97/09433, 第 10 页, 1997 年 3 月 13 日公开)。

[0198] 表 1. 保守取代 I

[0199]

侧链	特征	氨基酸
脂族	非极性	G, A, P, I, L, V
	极性-不带电	S, T, M, N, Q
	极性-带电	D, E, K, R
芳族		H, F, W, Y
其它		N, Q, D, E

[0200] 或者,保守氨基酸可如下表 2 所示按 Lehninger(Biochemistry(《生物化学》),第二版;纽约州沃斯出版公司(Worth Publishers, Inc. NY:NY)(1975),第 71-77 页)所述分组。

[0201] 表 2. 保守取代 II

侧链	特征	氨基酸
非极性(疏水性)	脂族:	A, L, I, V, P
	芳族	F, W
	含硫	M
	边界性	G
不带电-极性	羟基	S, T, Y
	酰胺	N, Q
	巯基	C
	边界性	G
带正电(碱性)		K, R, H
带负电(酸性)		D, E

[0203] 变体或衍生物也可能因使用特定表达系统而具有额外的氨基酸残基。例如,使用将所需多肽表达为谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合产物一部分的市售载体能提供在切割所需多肽的 GST 组分后在 -1 位上具有额外甘氨酸残基的所需多肽。也考虑到在其它载体系统中表达产生的变体,包括将组氨酸标签引入氨基酸序列,通常位于序列的羧基和/或氨基末端的变体。

[0204] 也考虑了本发明结合域中一个或多个氨基酸残基被去除的缺失变体。缺失可以在融合蛋白的一端或两端实现,或通过去除氨基酸序列内的一个或多个残基进行。

[0205] 在某些示例性实施方式中,本发明的免疫球蛋白结合多肽为糖基化,糖基化的模式取决于各种因素,包括表达蛋白质的宿主细胞(如果在重组宿主细胞中制备)和培养条件。

[0206] 本发明也提供免疫球蛋白结合多肽的衍生物。在某些实施方式中,修饰是共价修饰,包括例如与聚合物、脂质以及其它有机和无机部分发生化学键合。可制备本发明的衍生物以延长特异性结合域多肽的循环半衰期,或者可设计该衍生物以提高所述多肽对目的细胞、组织或器官的靶向能力。

[0207] 本发明还包括经共价修饰或衍生化而包含一个或多个水溶性聚合物连接体如聚乙二醇、聚氧乙烯二醇或聚丙二醇的结合多肽,如美国专利号 4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192 和 4,179,337 中所述。本领域已知的其它有用聚合物包括单甲氧基-聚乙二醇、右旋糖苷、纤维素和其它基于糖的聚合物、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)-聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化的多元醇(如甘油)和聚乙烯醇、以及这些聚合物的混合物。特别优选聚乙二醇(PEG)衍生的蛋白质。水溶性聚合物可在特定位置键合,例如在本发明蛋白质或多肽的氨基末端,或与所述多肽的一个或多个侧链随机连接。使用 PEG 提高治疗能力见美国专利号 6,133,426 所述。

[0208] 在一种实施方式中,免疫球蛋白结合多肽是包含免疫球蛋白的融合蛋白或 Fc 融合蛋白。这类融合蛋白可具有较长的半衰期,例如,数小时、一天或更久,或甚至一周或更久,特别是在 Fc 结构域能够与 FcRn,即新生 Fc 受体相互作用时。Fc 结构域中与 FcRn 的结合位点也是细菌蛋白 A 和 G 结合的位点。这些蛋白质之间的紧密结合可用作纯化本发明抗体或融合蛋白的手段,例如,在蛋白质纯化过程中使用蛋白 A 或蛋白 G 亲和色谱。在某些实施方式中,融合蛋白的 Fc 结构域可选突变以消除与 Fc γ RI-III 的相互作用但保留 FcRn 相互作用。

[0209] 蛋白质纯化技术是本领域技术人员众所周知的。这些技术包括在某一水平上对多肽和非多肽组分进行粗分级。常常需要使用色谱和电泳技术进行进一步纯化,以实现部分或完全纯化(或纯化至均一)。特别适合制备纯多肽的分析方法是离子交换色谱、排阻色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦。特别有效的肽纯化方法是快速蛋白质液相色谱和 HPLC。

[0210] 本发明的某些方面涉及多肽的纯化,且在具体实施方式中,涉及其充分纯化。本文中术语“纯化的多肽”和“纯化的融合蛋白”互换使用,并指可与其它组分分离的组分,且相对其天然可获得状态纯化至任何程度。因此,纯化的多肽也指与其天然产生环境相分离的多肽。

[0211] 通常,“纯化”指经过分级去除了各种其它组分的多肽组分,该组分基本保持了表达的生物学活性。用到术语“基本纯化”时,这一指明表示多肽组合物中,所述多肽构成该组合物的主要成分,例如占组合物中多肽重量的约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 99% 或更多。

[0212] 本领域技术人员能够从本发明中获知定量分析纯化程度的各种方法。它们包括例如,测定活性组分的特异性结合活性,或通过 SDS/PAGE 分析评估组分中多肽的含量。评价蛋白质组分纯度的优选方法是计算该组分的结合活性,将其与初始提取物的结合活性作比较,从而计算纯化程度,在本文中通过“纯化倍数”评价。当然,用于代表结合活性水平的实际单位取决于选择用于跟踪纯化的具体测定技术和表达的融合蛋白是否显示可检测的结合活性。

[0213] 适用于蛋白质纯化的各种技术是本领域技术人员众所周知的。这些技术包括例如,用硫酸铵、PEG、抗体等沉淀,或通过先热变性再离心进行沉淀;色谱步骤如离子交换、凝胶过滤、反相、羟基磷灰石和亲和色谱;等电聚焦;凝胶电泳;以及这些技术和其它技术的组合。正如本领域众所周知的那样,认为可改变进行各种纯化步骤的顺序,或可省略某些步骤,并仍产生适合制备基本纯化的蛋白质的方法。

[0214] 通常并不要求总是以最纯化状态提供结合多肽。实际上,考虑纯化水平较低的蛋白质可用于某些实施方式中。可结合使用较少的纯化步骤,或利用同一总纯化方案的不同形式达到部分纯化。例如,应理解利用 HPLC 设备进行的阳离子交换柱色谱的纯化水平通常高于利用低压色谱系统的相同技术的纯化水平。显示较低相对纯化程度的方法可能在蛋白质产物总回收率方面,或在维持所表达蛋白质的结合活性方面具有优点。

[0215] 已知多肽迁移可随不同的 SDS/PAGE 条件发生改变,有时是显著改变 (Capaldi 等 (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 76:425)。因此,应理解在不同的电泳条件下,纯化或部分纯化的融合蛋白表达产物的表观分子量可能不同。

[0216] 多核苷酸、表达载体和宿主细胞

[0217] 本发明提供编码本发明免疫球蛋白结合多肽的多核苷酸(分离或纯化或纯的多核苷酸)、包含这类多核苷酸的载体(包括克隆载体和表达载体)以及用本发明所述多核苷酸或载体转化或转染的细胞(如宿主细胞)。

[0218] 在某些实施方式中,考虑编码本发明的结合域,或含有一个或多个这类结合域的多肽的多核苷酸(DNA 或 RNA)。本文实施例及所附序列表中提供编码融合蛋白构建物的表达盒。

[0219] 本发明还涉及包含本发明多核苷酸的载体,具体为重组表达构建体。在一种实施方式中,本发明考虑含编码 RON 结合域或其它结合域的多核苷酸及其多肽,以及能引起或促进此类蛋白质的编码序列的转录、翻译和加工的其它多核苷酸序列。

[0220] 适合用于原核和真核宿主的克隆和表达载体可参见例如,Sambrook 等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》),第二版,纽约州冷泉港,(1989)。示例性的克隆/表达载体包括可基于质粒、噬菌粒、噬粒、粘粒、病毒、人工染色体或本领域已知适用于扩增、转移和/或表达所含多核苷酸的任何核酸载体的克隆载体、穿梭载体和表达构建体。

[0221] 如本文所用,“载体”表示能够运输所连接的另一核酸的核酸分子。示例性载体包括质粒、酵母人工染色体和病毒基因组。某些载体可在宿主细胞中自主复制,而另一些载体可整合到宿主细胞基因组中从而随宿主基因组一起复制。此外,某些载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称“表达载体”),其含有操作性连接于表达控制序列并因此能够指导这些序列表达的核酸序列。

[0222] 在某些实施方式中,表达构建体衍生自质粒载体。说明性构建体包括修饰的 pNASS 载体(加利福尼亚州帕洛阿尔托的克隆泰克公司(Clontech, Palo Alto, CA)),其具有编码氨苄青霉素抗性基因、多腺苷酸化信号和 T7 启动子位点的核酸序列;pDEF38 和 pNEF38(CMC ICOS 生物技术公司(CMC ICOS Biologics, Inc.)),其具有 CHEF1 启动子;和 pD18(龙沙公司(Lonza)),其具有 CMV 启动子。熟知其它合适的哺乳动物表达载体(参见例如,Ausubel 等,1995;Sambrook 等,同上;也参见,例如,加州圣地亚哥的英杰公司(Invitrogen, San Diego, CA)、威斯康星州麦迪逊的诺华基公司(Novagen, Madison, WI)、新泽西州皮斯卡塔韦的法玛西亚公司(Pharmacia, Piscataway, NJ))的产品目录。可制备包含在合适调控下的二氢叶酸还原酶(DHFR)-编码序列的有用构建体,用于提供融合蛋白的生成水平,所述水平取决于应用合适选择剂(如甲氨蝶呤)后的基因扩增。

[0223] 通常,重组表达载体包含允许转化宿主细胞的复制起点和选择性标记,以及衍生

自高表达基因的指导下游结构序列转录的启动子,如上所述。与本发明多核苷酸操作性连接的载体产生克隆或表达构建体。示例性的克隆/表达构建体含有至少一个操作性连接于本发明多核苷酸的表达控制元件,如启动子。也考虑在载体和本发明克隆/表达构建体中采用其它表达控制元件,如增强子、因子特异性结合位点、终止子和核糖体结合位点。本发明所述多核苷酸的异源结构序列以合适状态与翻译起始和终止序列装配在一起。因此,例如,本文提供的蛋白编码核酸可包含在任何表达载体构建体中,形成用于在宿主细胞中表达这类蛋白质的重组表达构建体。

[0224] 例如,可通过各种方法将合适的 DNA 序列插入载体中。通常,通过本领域已知方法将 DNA 序列插入合适的限制性核酸内切酶切割位点。考虑用于克隆、DNA 分离、扩增和纯化的标准技术,用于涉及 DNA 连接酶、DNA 聚合酶、限制性内切核酸酶等的酶促反应的标准技术以及各种分离技术。许多标准技术可参见例如, Ausubel 等 (Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学实验指南》),马萨诸塞州波士顿的格林出版联合公司和约翰韦利父子公司 (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA), 1993); Sambrook 等 (Molecular Cloning (《分子克隆》), 第二版, 纽约州普莱恩维尤的冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY), 1989); Maniatis 等 (《分子克隆》, 纽约州普莱恩维尤的冷泉港实验室出版社, 1982); Glover 编 (DNA Cloning(《DNA 克隆》) 第 I 卷和第 II 卷, 英国牛津的 IRL 出版社 (IRL Press, Oxford, UK), 1985); Hames 和 Higgins 编 (Nucleic Acid Hybridization(《核酸杂交》), 英国牛津的 IRL 出版社, 1985); 等等。

[0225] 表达载体中的 DNA 序列操作性连接于至少一个合适的表达控制序列(如组成型启动子或调节性启动子),以指导 mRNA 合成。这类表达控制序列的代表性例子包括真核细胞或其病毒的启动子,如上所述。可利用 CAT(氯霉素转移酶)载体或具有选择性标记的其它载体从任何所需基因中选择启动子区域。真核启动子包括 CMV 立即早期、HSV 胸苷激酶、早期和晚期 SV40、逆转录病毒的 LTR 和小鼠金属硫蛋白 -I。本领域普通技术人员熟知如何选择合适的载体和启动子,本文描述了某些特别优选的包含与编码本发明蛋白质或多肽的核酸操作性连接的至少一个启动子或调节性启动子的重组表达构建体的制备。

[0226] 也考虑本发明多核苷酸的变体。变体多核苷酸与本文所述的确定序列的多核苷酸之一至少约 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 99.9% 相同,或者能够在严紧杂交条件(0.015M 氯化钠、0.0015M 柠檬酸钠,约 65-68°C;或者 0.015M 氯化钠、0.0015M 柠檬酸钠和 50% 甲酰胺,约 42°C)下与确定序列的那些多核苷酸之一杂交。多核苷酸变体保持编码具有本文所述功能的结合域或其融合蛋白的能力。

[0227] 术语“严紧”用于指本领域通常理解为严紧的条件。杂交严紧性通常取决于温度、离子强度和变性剂如甲酰胺的浓度。用于杂交和洗涤的严紧条件的例子是 0.015M 氯化钠、0.0015M 柠檬酸钠,约 65-68°C;或者 0.015M 氯化钠、0.0015M 柠檬酸钠和 50% 甲酰胺,约 42°C(参见 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》),第 2 版,纽约州冷泉港的冷泉港实验室出版社,1989)。

[0228] 也可采用更严紧的条件(如更高的温度、更低的离子强度、更多的甲酰胺或其它变性剂);然而,杂交速率会受影响。在涉及脱氧寡核苷酸杂交的情况中,其它示例性严紧杂交条件包括在 37°C(用于 14 个碱基的寡核苷酸)、48°C(用于 17 个碱基的寡核苷酸)、

55° C(用于 20 个碱基的寡核苷酸)和 60° C(用于 23 个碱基的寡核苷酸)下,用 6x SSC、0.05% 焦磷酸钠洗涤。

[0229] 本发明的另一方面提供用本发明的任何多核苷酸或载体 / 表达构建体转化或转染的或含有本发明的任何多核苷酸或载体 / 表达构建物的宿主细胞。利用本领域已知的任何方法,包括转化、转染和转导,将本发明的多核苷酸或克隆 / 表达构建体引入合适的细胞。宿主细胞包括接受离体细胞治疗,包括例如,离体基因治疗的对象细胞。携带本发明多核苷酸、载体或蛋白质时,考虑作为本发明某一方面的真核宿主细胞除对象自身细胞(如人患者的自身细胞)外还包括 VERO 细胞、HeLa 细胞、中华仓鼠卵巢(CHO)细胞系(包括能够修饰所表达多价结合分子的糖基化模式的修饰的 CHO 细胞,参见美国专利申请公开号 2003/0115614)、COS 细胞(如 COS-7)、W138、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562、HEK293 细胞、HepG2 细胞、N 细胞、3T3 细胞、草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞(如 Sf9 细胞)、酿酒酵母细胞以及本领域已知可用于表达和任选地分离本发明蛋白质或肽的任何其它真核细胞。还考虑原核细胞,包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)、链霉菌、或者本领域已知适用于表达和任选地分离本发明蛋白质或肽的任何原核细胞。具体而言,在从原核细胞分离蛋白质或肽时,考虑可采用本领域已知的用于从内含体提取蛋白质的技术。本领域技术人员根据本文教导能够选择合适的宿主。考虑能糖基化本发明所述融合蛋白的宿主细胞。

[0230] 术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)指含有重组表达载体的细胞。应理解,这类术语不仅指特定对象细胞,还指该细胞的后代。由于在连续传代过程中可能因突变或环境影响而发生某些改变,因此这类后代实际上可能不与亲代细胞完全相同,但仍落入本文所用术语“宿主细胞”的范围内。

[0231] 可在经修饰适合激活启动子、选择转化体或扩增特定基因的常规营养培养基中培养重组宿主细胞。本领域普通技术人员不难了解选择用于表达的特定宿主细胞的培养条件,如温度、pH 等。也可利用各种哺乳动物细胞培养系统来表达重组蛋白。哺乳动物表达系统的例子包括如 Gluzman(1981)Cell 23:175 所述的猴肾成纤维细胞的 COS-7 细胞系,以及能够表达相容性载体的其它细胞系,例如 C127、3T3、CHO、HeLa 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体包含复制起点、合适启动子和任选的增强子,还包含任何必需的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点、转录终止序列和 5' - 侧接的非转录序列,例如,本文中关于多价结合蛋白表达构建物的制备中所述。衍生自 SV40 剪接的 DNA 序列和多腺苷酸化位点可用于提供所需的非转录遗传元件。可通过本领域技术人员熟悉的各种方法包括磷酸钙转染、DEAE- 右旋糖苷介导的转染或电穿孔将所述构建物引入宿主细胞(Davis 等,(1986)Basic Methods in Molecular Biology(《分子生物学基本方法》))。

[0232] 在一种实施方式中,以指导本发明所述蛋白质或多肽表达的重组病毒构建体转导宿主细胞。转导的宿主细胞能产生含有所表达的蛋白质或多肽的病毒颗粒,所表达的蛋白质或多肽来自病毒出芽期间引入病毒颗粒的宿主细胞膜的部分。

[0233] 利用免疫球蛋白结合多肽的组合物与方法

[0234] 本发明还提供含本文所述的任意免疫球蛋白结合多肽的组合物。本发明的免疫球蛋白结合多肽是 RON 结合多肽。除非另有明示,本文中术语“免疫球蛋白结合多肽”、“结合

多肽”、“RON 结合多肽”、“融合蛋白”和“融合多肽”可互换使用。

[0235] 本发明还提供包含任意形式免疫球蛋白结合多肽（例如，抗 RON 抗体、SMIPTM、PIMS、XceptorTM、同二聚体和异二聚体交叉介体）的药物组合物和单位剂型以及含任意形式本文所述 RON 结合多肽的组合物的使用方法。

[0236] 本发明的免疫球蛋白结合多肽的组合物通常包含本文所述任意形式的结合多肽（例如，抗 RON 抗体、SMIPTM、PIMSTM、XceptorTM、同二聚体和异二聚体交叉介体）联合药学上可接受的赋形剂包括药学上可接受的载体和稀释剂。药学上可接受的赋形剂在所用剂量和浓度下应对接受者无毒。它们为药学领域所熟知，并描述于如 Rowe 等, Handbook of Pharmaceutical Excipients: A Comprehensive Guide to Uses, Properties, and Safety (《药物赋形剂手册：应用、性质和安全性指导大全》), 第 5 版, 2006。

[0237] 用于治疗应用的药学上可接受的载体也是药学领域所熟知的，并描述于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences (《雷明顿药物科学》), 麦克出版公司 (Mack Publishing Co.), (A. R. Gennaro 编, 1985)。示例性的药学上可接受的载体包括无菌盐水和生理 pH 下的磷酸盐缓冲盐水。药物组合物中可提供防腐剂、稳定剂、染料等。此外，也可采用抗氧化剂和悬浮剂。

[0238] 药物组合物还可含有稀释剂如缓冲液，抗氧化剂如抗坏血酸，低分子量（小于约 10 个残基）的多肽，蛋白质，氨基酸，糖（如葡萄糖、蔗糖、糊精），螯合剂（如 EDTA），谷胱甘肽，以及其它稳定剂和赋形剂。示例性的稀释剂有混有非特异性血清白蛋白的盐水或中性缓冲盐水。在一种实施方式中，用合适赋形剂溶液（如蔗糖）为稀释剂将产物配制成冻干物。

[0239] 本发明还提供疾病与病症的治疗方法，所述疾病与病症例如与过度的受体介导信号转导相关，所述方法包括给予有需要的患者以治疗有效量的本发明所述任意 RON 结合蛋白。

[0240] 与过度受体介导信号转导相关的示例性疾病或病症包括癌症（例如，实体恶性肿瘤和血液恶性肿瘤）以及各种炎性病症。

[0241] 在一种实施方式中，本发明提供用以预防炎症或炎性疾病或者治疗、减轻其严重度的方法（参见例如 Camp 等, Ann. Surg. Oncol. 12:273-281 (2005); Correll, P. H. 等, Genes Funct. 1997 Feb; 1(1):69-83)。例如，本发明的一种实施方式提供治疗炎症或炎性疾病的方法，所述炎症或炎性疾病包括但不限于：克罗恩氏病、结肠炎、皮炎、牛皮癣、憩室炎、肝炎、肠易激综合征 (IBS)、类风湿性关节炎、哮喘、红斑狼疮、肾炎、帕金森病、溃疡性结肠炎、多发性硬化症 (MS)、阿尔茨海默病、关节炎和各种心血管疾病如粥样硬化和脉管炎。在某些实施方式中，所述炎性疾病选自类风湿性关节炎、糖尿病、痛风、冷吡啉 (cryopyrin) 相关周期性综合征和慢性阻塞性肺病，包括将治疗有效量的本发明所述免疫球蛋白结合多肽或本发明所述组合物给予患者。就此而言，一种实施方式提供通过给予有需要的患者以治疗有效量的本文所述 RON 结合蛋白来预防炎症或炎性疾病或治疗、减轻其严重度的方法。

[0242] 一些研究已表明 RON 在先天免疫和 TNF- α 相关病理学中的作用 (Nikolaidis 等, 2010 年 11 月 18 日, Innate Immun. (在线提前发表); Wilson 等, 2008, J Immunol. 181:2303)。其它研究表明 RON 抑制单核细胞/巨噬细胞中的 HIV-1 转录 (Lee 等, 2004, J. Immunol. 173:6864)。因此，在某些实施方式中，本发明所述 RON 结合蛋白可用于治

疗脓毒症、腹膜炎、溃疡性结肠炎、AIDS、类风湿性关节炎和其它 TNF- α 相关病理。

[0243] 在一方面,本发明提供抑制恶性肿瘤(例如,实体恶性肿瘤或血液恶性肿瘤)的生长、转移或转移生长的方法,包括给予有需要的患者以有效量的本文所述任意形式的 RON 结合多肽或其组合物。

[0244] 包括实体恶性肿瘤和血液恶性肿瘤在内的多种癌症可用本文所述组合物与方法治疗。可治疗的癌症包括但不限于:乳腺、前列腺、胰腺、结肠和直肠的腺癌;所有形式的肺部支气管癌(包括鳞状细胞癌,腺癌、小细胞肺癌和非小细胞肺癌);骨髓的;黑色素瘤;肝细胞瘤;神经母细胞瘤;乳头状瘤;胺前体摄取脱羧细胞瘤;迷芽瘤;鳃源性瘤;恶性类癌综合征;类癌心脏症;和癌症(例如, Walker 氏癌、基底细胞癌、鳞状基底细胞癌、布-皮二氏(Brown-Pearce)癌、导管癌、艾氏(Ehrlich)肿瘤、Krebs 2 癌、merkel 细胞癌、粘蛋白癌、非小细胞肺癌、燕麦细胞癌、乳头癌、硬癌、细支气管癌、支气管原癌、鳞状细胞癌和移行细胞癌)。可治疗的其它类型癌症包括:组织细胞疾病;白血病;恶性组织细胞增多病;霍奇金病;免疫增生性小瘤;非霍奇金氏淋巴瘤;浆细胞瘤;网状内皮组织增殖;黑色素瘤;成软骨细胞瘤;软骨瘤;软骨骨瘤;纤维瘤;纤维肉瘤;巨细胞瘤;组织细胞瘤;脂肪瘤;脂肪肉瘤;间皮瘤;粘液瘤;粘液肉瘤;骨瘤;骨肉瘤;脊索瘤;颅咽管瘤;无性细胞瘤;错构瘤;间叶瘤;中肾瘤;肌肉瘤;成釉细胞瘤;牙骨质瘤;牙瘤;畸胎瘤;胸腺瘤;滋养层肿瘤。此外,还考虑下列类型癌症可进行治疗:腺瘤;胆管瘤;圆柱瘤;囊腺癌;囊腺瘤;粒层细胞肿瘤;两性母细胞瘤;肝细胞瘤;汗腺腺癌;胰岛细胞瘤;Leydig 细胞瘤;乳头状瘤;Sertoli 细胞瘤;膜细胞瘤;平滑肌瘤;平滑肌肉瘤;成肌细胞瘤;肌瘤;肌肉瘤;横纹肌瘤;横纹肌肉瘤;室管膜瘤;神经节瘤;胶质瘤;成神经管细胞瘤;脑脊膜瘤;神经鞘瘤;神经母细胞瘤;神经上皮瘤;神经纤维瘤;神经瘤;副神经节瘤;非嗜铬性副神经节瘤;和多形性成胶质细胞瘤。可治疗的癌症类型还包括但不限于:血管角质瘤;有嗜曙红细胞增多的血管淋巴样增生;致硬化的血管瘤;血管瘤病;血管球瘤;血管内皮瘤;血管瘤;血管外皮细胞瘤;血管肉瘤;淋巴管瘤;淋巴管肌瘤;淋巴管肉瘤;松果体瘤;癌肉瘤;软骨肉瘤;叶状柄囊性肉瘤;纤维肉瘤;血管肉瘤;平滑肌肉瘤;白血病性肉瘤;脂肪肉瘤;淋巴管肉瘤;肌肉瘤;粘液肉瘤;卵巢癌;横纹肌肉瘤;肉瘤;瘤;神经纤维瘤病;和宫颈发育异常。

[0245] 也可用本文所述组合物与方法治疗的其它示例性癌症有 B 细胞癌,包括 B 细胞淋巴瘤[例如,各种形式的霍奇金氏病,非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)或中枢神经系统淋巴瘤],白血病[例如,急性成淋巴细胞性白血病(ALL),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),毛细胞白血病和慢性成肌细胞白血病]和骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤)。其它 B 细胞癌包括小淋巴细胞性淋巴瘤,B 细胞前淋巴细胞性白血病,淋巴浆细胞淋巴瘤,脾缘区淋巴瘤,浆细胞性骨髓瘤,孤立性骨浆细胞瘤,骨外浆细胞瘤,粘膜相关淋巴组织结外边缘区 B 细胞淋巴瘤,结边缘区 B 细胞淋巴瘤,滤泡性淋巴瘤,套膜细胞淋巴瘤,弥漫性大 B 细胞淋巴瘤,纵隔(胸腺)大 B 细胞淋巴瘤,血管内大 B 细胞淋巴瘤,原发性渗出性淋巴瘤,伯奇氏淋巴瘤/白血病,不确定恶性潜能的 B 细胞增殖,淋巴瘤样肉芽肿病和移植后的淋巴增殖性疾病。

[0246] 任意形式的本发明所述免疫球蛋白结合多肽或其组合物可以经口、局部、透皮、肠胃外、通过吸入喷雾、经阴道、经直肠、通过颅内注射或其任意组合来给予。在一种实施方式中,肠胃外给予所述 RON 结合蛋白或其组合物。本文所用术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉内、肌肉内、脑池内注射或输注技术。还考虑通过静脉内、皮内、肌肉内、乳房内、腹膜内、鞘内、

眼球后、肺内注射和 / 或外科植入特定定位点来给药。例如, 本发明包括治疗患者的方法, 包括将本发明免疫球蛋白结合多肽或本发明组合物的治疗有效量通过静脉内注射给予患者。

[0247] 治疗有效剂量取决于疾病类型、所用组合物、给药途径、所治疗对象的类型、考虑治疗的特定对象的身体特征、平行用药和医学领域技术人员应认识到的其它因素。例如, 可根据本发明的免疫球蛋白结合多肽的效能, 给予 0.01mg/kg 至 1000mg/kg (例如, 约 0.1-1mg/kg、约 1-10mg/kg、约 10-50mg/kg、约 50-100mg/kg、约 100-500mg/kg 或约 500-1000mg/kg) 体重的活性成分 (可作为一次剂量给予, 或每天、每周、每月给予一次, 或以任何合适间隔给予)。

[0248] 还考虑联合给予免疫球蛋白结合多肽或其组合物和第二药剂。第二药剂可以是本领域接受为针对特定疾病状态或病症, 如癌症或炎症性疾病的标准治疗的药剂。考虑到的示例性第二药剂包括多克隆抗体、单克隆抗体、免疫球蛋白衍生的融合蛋白、化疗、离子辐射、类固醇、NSAID、抗感染剂或其它活性和辅助性药剂, 或其任何组合。

[0249] 多种其它治疗剂可用于和本文所述免疫球蛋白结合多肽一起给予。在一种实施方式中, 所述免疫球蛋白结合多肽与抗炎剂一起给予。抗炎剂或药物包括但不限于: 类固醇和糖皮质激素 (包括倍他米松、丁地去炎松、地塞米松、醋酸氢化可的松、氢化可的松、氢化可的松、甲泼尼龙、强的松龙、氯泼尼松、氟羟强的松龙)、非类固醇抗炎药 (NSAID) 包括阿司匹林、布洛芬、甲氧萘丙烯酸、免疫选择性消炎衍生物 (imSAID)、甲氨蝶呤、柳氮磺胺吡啶、来氟米德、抗 TNF 药物、环磷酰胺和麦考酚酯。

[0250] 可与本文所述免疫球蛋白结合蛋白或组合物联合使用的第二药剂包括抗感染药例如抗生素、抗病毒与抗真菌剂。例如, 示例性抗生素包括青霉素类、先锋霉素类、氨基糖苷类、大环内酯类、喹诺酮类和四环素类。例如, 示例性的抗病毒剂包括逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、抗体和干扰素。例如, 示例性的抗真菌剂包括多烯抗真菌剂 (例如, 纳他霉素和龟裂杀菌素), 咪唑, 三唑, 或噻唑抗真菌剂 (例如, 咪康唑、酮康唑、氟康唑、伊曲康唑和阿巴芬净), 丙烯胺类 (例如, 特比萘芬、萘替芬) 和棘白菌素类 (例如, 阿尼芬净和卡泊芬净)。

[0251] 在某些实施方式中, 免疫球蛋白结合多肽和第二药剂协同作用。换言之, 这两种化合物相互作用使得化合物的组合效果优于各化合物单独给予时的个体效果之和 (参见例如, Berenbaum, Pharmacol. Rev. 41:93, 1989)。

[0252] 在某些其它实施方式中, 免疫球蛋白结合多肽和第二药剂叠加作用。换言之, 这两种化合物相互作用使得化合物的组合效果与各化合物单独给予时的个体效果之和相同。

[0253] 可与本文所述免疫球蛋白结合蛋白或其组合物联合使用的第二药剂可以是类固醇, NSAID, mTOR 抑制剂 (例如, 雷帕霉素 (西罗莫司)、坦罗莫司、得夫罗莫司、依维莫司、唑他莫司、姜黄素、法尼基硫代水杨酸), 神经钙蛋白抑制剂 (例如, 环孢菌素、他克莫司), 抗代谢物 (例如, 霉酚酸、麦考酚酸吗乙酯), 多克隆抗体 (例如, 抗胸腺细胞球蛋白), 单克隆抗体 (例如, 达克珠单抗、巴利昔单抗、HERCEPTIN® (曲妥珠单抗)、ERBITUX® (西妥昔单抗)) 和 CTLA4-Ig 融合蛋白 (例如, 阿巴西普或贝拉西普)。

[0254] 第二药剂可用于抑制实体恶性肿瘤的生长, 抑制实体恶性肿瘤的转移或转移性生长, 或者治疗或缓解血液恶性肿瘤, 包括化疗剂、离子辐射和其它抗癌药物。考虑为进一步治疗剂的示例性化疗剂包括烷化剂, 如氮芥类 (例如, 双氯乙基甲胺、环磷酰胺、异环磷

酰胺、苯丙氨酸氮芥和苯丁酸氮芥);双功能化疗剂(例如苯达莫司汀);亚硝基脲类(例如,卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)和司莫司汀(甲基-CCNU));蛋白酶体抑制剂(如VELCADE®(保特佐米));酪氨酸激酶抑制剂(例如,TARCEVA®(埃罗替尼)和TYKERB®(拉帕替尼));亚乙基氨基类和甲基蜜胺类(例如,曲他胺(TEM)、三亚乙基硫代磷酰胺(噻替派)和六甲三聚氰胺(HMM、六甲蜜胺));烷基磺酸盐类(例如,白消安);和三嗪类(例如,达卡巴嗪(DTIC));抗代谢物,例如叶酸类似物(例如,甲氨蝶呤、三甲曲沙、培美曲塞(多靶抗叶酸剂));嘧啶类似物(例如,5-氟尿嘧啶(5-FU)、氟尿嘧啶脱氧核苷、吉西他滨、阿糖胞苷(AraC、阿糖胞嘧啶)、5-氮杂胞苷和2,2'-双氟脱氧胞苷);和嘌呤类似物(例如,6-巯基嘌呤、6-巯基鸟嘌呤、硫唑嘌呤、2'-脱氧柯福霉素(喷司他汀),红羟基壬基腺嘌呤(EHNA),磷酸氟达拉滨,2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨、2-CdA));I型拓扑异构酶抑制剂如喜树碱(CPT)、拓扑替康和伊立替康;天然产物,例如表鬼臼毒素类(例如,依托泊苷和替尼泊苷);和长春花生物碱(例如,长春碱、长春新碱和长春瑞滨);抗肿瘤抗生素如放线菌素D、多柔比星和博来霉素;放射增敏剂如5-溴脱氧尿苷、5-碘脱氧尿苷和溴脱氧胞苷;铂配位络合物如顺铂、卡铂和奥沙利铂;取代脲类如羟基脲;和甲基胍衍生物如N-甲基胍(MIH)和丙卡巴胍。

[0255] 在某些实施方式中,可用于抑制恶性肿瘤生长转移或转移性生长的第二药剂包括本发明所述的能结合RON以外的癌细胞靶标的多特异性结合多肽或结合多肽异二聚体。在某些其它实施方式中,可用于此类治疗的第二药剂包括能结合癌细胞靶标的多克隆抗体、单克隆抗体和免疫球蛋白衍生的融合蛋白。

[0256] 本发明考虑的其它治疗剂被称作免疫抑制剂,其用于抑制或掩蔽被治疗个体的免疫系统。例如,免疫抑制剂包括非甾体抗炎药(NSAID),止痛药,糖皮质激素,用于治疗关节炎的疾病改善性抗风湿性药物(DMARD),或生物学反应修饰剂。DMARD描述中的组分也用于治疗类风湿性关节炎以外的很多其它自身免疫性疾病。

[0257] 示例性NSAID选自布洛芬、甲氧萘丙酸、甲氧萘丙酸钠、Cox-2抑制剂如VIOXX®(罗非昔布)和CELEBREX®(塞利考西)和唾液酸化剂。示例性止痛药选自扑热息痛、羟考酮、曲马多或盐酸丙氧芬。示例性糖皮质激素选自可的松、地塞米松、氢化可的松、甲泼尼龙、强的松龙或氯泼尼松。示例性生物学反应修饰剂包括针对细胞表面标记物的分子(例如,CD4、CD5等),细胞因子抑制剂如TNF拮抗物(例如依那西普(ENBREL®)、阿达木单抗(HUMIRA®)和英利昔单抗(REMICADE®)),趋化因子抑制剂和粘着分子抑制剂。生物学反应修饰剂包括单克隆抗体以及分子的重组形式。示例性DMARD包括硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素、甲氨蝶呤、青霉胺、来氟洛米、柳氮磺胺吡啶、羟氯喹、金(口服(金诺芬)和肌肉内的)和米诺环素。

[0258] 考虑结合分子组合物和所述第二活性药剂可以在同一制剂中同时给予。或者,所述第二药剂可以在单独制剂中但同时给予(即,彼此的给予相隔小于1小时)。

[0259] 在某些实施方式中,可以给予所述第二活性药剂,然后给予RON结合多肽或其组合物。在先给予指所述第二活性药剂的给予比用所述RON结合蛋白或其组合物进行治疗早至少1小时。还考虑可以在给予所述结合分子组合物以后给予所述活性药剂。在后给予是指在给予所述结合分子或其组合物至少1小时后给予。

[0260] 本发明考虑到包含本发明药物组合物的剂量单位。这样的剂量单位包括例如,单

剂量或多剂量小瓶或注射器,包括两室小瓶或注射器,一室包含冻干形式的本发明药物组合,另一室包含用于重建的稀释剂。多剂量的剂量单位也可以是,例如,用于连接于静脉内输注装置的(输液)袋或管。

[0261] 另一方面,本发明包括药盒,其中包含可用于本发明所述方法的一种或多种化合物或组合,包装方式有助于其应用于实施本发明的方法。在最简单的实施方式中,此类药盒包括本文所述可用于实施本发明方法的某化合物或组合,其包装在容器如密闭的瓶或管中,容器附有标签或包装内包括标签,所述标签描述所述化合物或组合在实施本发明所述方法中的用途。所述化合物或组合优选以单位剂型包装。所述药盒还可包括用于将所述组合按优选给药路径来给予或用于实施筛选试验的合适装置。实施药盒可包括标签来描述所述结合分子组合在本发明所述某方法中的用途。

[0262] 实施例

[0263] 实施例 1

[0264] 生成 RON 结合分子

[0265] 如下所述产生抗 RON 抗体并从这些抗体构建含抗 RON 结合域的多种重组分子。

[0266] 用全长 RON/MST1R 产生 RON 表达型细胞系,前者获自 OG 技术公司 (OriGene Technologies, #SC309913, 马里兰州罗克维尔; GENBANK™ 登录号 NM_002447gi:153946392; SEQ ID NO:783, 其编码的氨基酸序列见 SEQ ID NO:784。由 BHB 公司 (Blue Heron Biotechnology, 华盛顿州玻塞尔) 根据 Ensembl 序列 ENSMUT00000004738 合成全长的猕猴 (*Macaca mulatta*) RON。人和猕猴 RON 的开放读码框序列均亚克隆入 pcDNA™3.1/Hygro(+) (英杰公司 (Invitrogen), 加利福尼亚州卡尔斯巴德)。以含 Bcg I-(人) 或 Bgl II-(猕猴) 线性化全长 RON 的 pcDNA™3.1/Hygro(+) 采用聚乙烯亚胺技术 (Boussif 等, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA92:7297-7301) 转染 NIH/3T3 细胞 (ATCC, 弗吉尼亚州马纳萨斯)。从瞬时转染池克隆出过量表达人或猕猴全长 RON 的稳定细胞系。作为 RON 阴性细胞系对照, NIH/3T3 细胞转染以超螺旋的 pcDNA™3.1/Hygro/lacZ (英杰公司) 或 pcDNA™3.1/Hygro(+) 并如上所述克隆产生稳定细胞系。

[0267] 用此前确立的方案 (Wayner 和 Hoffstrom 2007) 并以上述 RON 表达型细胞系为免疫原产生针对 RON 的新抗体。对于 RON-e01 抗体, 在细胞系激发后, 小鼠接受 50 μ g 重组 RON Sema-PSI 蛋白 (R&D 系统公司 (R&D Systems), #1947-MS, 明尼苏达州明尼阿波利斯) 的激发。该蛋白包括偶联有羧基末端组氨酸标签的人 RON 的 Sema 和 PSI 结构域 (Glu 25-Leu571), 并在 NS0 小鼠骨髓瘤细胞系中表达。对于 RON-f01 抗体, 在细胞系激发后, 小鼠接受 20 μ g 重组 RON 蛋白的激发。用稳定表达猕猴 RON 的 NIH/3T3 细胞的 50 μ l 压紧细胞进行一次额外的激发和融合前激发。

[0268] 采用标准方法 (Lane 1985) 由来自经免疫动物脾的 B 细胞与小鼠骨髓瘤细胞系 P3-X63-Ag8.653 (Kearney 等, 1979) 的克隆 (命名为 P3-X63-Ag8.653.3.12.11) 融合产生杂交瘤。

[0269] 在 MDA-MB-453 细胞中就杂交瘤培养上清液对巨噬细胞刺激蛋白 (MSP, R&D 系统公司, 明尼苏达州明尼阿波利斯) 所诱发 RON 磷酸化的抑制能力进行筛选。将 MDA-MB-453 细胞以 5×10^4 个细胞/孔接种在 96 孔组织培养涂层板内于 DMEM+10%FBS 中过夜。次日, 移除培养基并换为无血清 DMEM 来进行 3 小时 37° C 血清饥饿然后与杂交瘤上清液一起孵育, 或

者直接换为杂交瘤上清液用以在 37° C 进行 1 小时的封闭步骤。移除封闭处理,并将细胞于室温下在含 100 μ M Na_3VO_4 的无血清 DMEM 中用 3nM MSP 刺激 10 分钟。MSP 刺激后,立即将细胞于冰上在加有 HALT™ 蛋白酶抑制剂混合物(赛默飞世尔科学有限公司(Thermo Fisher Scientific),伊利诺伊州洛克福德)、HALT™ 磷酸酶抑制剂混合物(Thermo Fisher)与 1mM Na_3VO_4 的 1X 样品稀释浓缩液 2(R&D 系统公司,明尼苏达州明尼阿波利斯)中裂解。在 DuoSet IC 人磷酸 -MSP R/Ron ELISA(R&D 系统公司,明尼苏达州明尼阿波利斯)上分析细胞裂解物。

[0270] 随后,通过流式细胞术用 RON 阴性 NIH/3T3 细胞相比过量表达人或猕猴 RON 的 NIH/3T3 细胞来检测 RON 磷酸化试验中所鉴定的来自杂交瘤池的上清液中抗 RON 抗体的存在。

[0271] 池中通过这两项筛选的感兴趣杂交瘤从 HAT 选择转成次黄嘌呤 - 胸苷 (HT),并由 BM Condimed H1(罗氏应用科学公司(Roche Applied Science),印第安纳州印第安纳波利斯)存在下的有限稀释来克隆。对克隆再次测试结合与功能活性。这一阶段选出 RON-e01(11H09 杂交瘤)和 RON-f01(4C04 杂交瘤)用于进一步测试。两种抗体的 VL 和 VH 区都用 5' -RACE(cDNA 末端快速扩增)鉴定并转化成 SMIP 和交叉介体形式。

[0272] RON 特异性的结合域包括 SEQ ID NO:43(多核苷酸)和 87(氨基酸)所示的 11H09scFv 以及 SEQ ID NO:127(多核苷酸)和 157(氨基酸)所示的 4C04scFv。人源化形式的 4C04scFv RON 结合域见 SEQ ID NO:128-129(多核苷酸)和 158-159(氨基酸),而人源化形式的 11H09scFv RON 结合域见 SEQ ID NO:44-49(多核苷酸)和 88-93(氨基酸)。

[0273] SEQ ID NO:152 中列出 4C04scFv 的轻链氨基酸序列,SEQ ID NO:141-143 中分别列出其 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。SEQ ID NO:153 中列出 4C04scFv 的重链氨基酸序列,SEQ ID NO:144-146 中分别列出其 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。4C04scFv 重链氨基酸序列的变体见 SEQ ID NO:176,其中末端亮氨酸改变为丝氨酸残基。该变体重链序列用于本文所述的多个结合域构建物,例如 SEQ ID NO:160-175 中公开的构建物。

[0274] SEQ ID NO:80 中列出 11H09scFv 的轻链氨基酸序列,SEQ ID NO:67-69 中分别列出其 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。SEQ ID NO:81 中列出 11H09scFv 的重链氨基酸序列,SEQ ID NO:70-72 中分别列出其 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。

[0275] SEQ ID NO:130-132(多核苷酸)和 160-168(氨基酸)中提供含 4C04 衍生 RON 结合域的 SMIP 分子。SEQ ID NO:160、163 和 166 包括 20 个氨基酸的 Vk3 前导序列;SEQ ID NO:161、162、164、165、167 和 168 不包括前导序列;SEQ ID NO:162、165 和 168 中已除去末端赖氨酸残基。SEQ ID NO:131、132 和 163-168 是人源化的。Vk3 前导序列见 SEQ ID NO:13,其由多核苷酸序列 SEQ ID NO:1 所编码。

[0276] SEQ ID NO:50-56(多核苷酸)和 94-114 中提供含 11H09 衍生 RON 结合域的 SMIP 分子。SEQ ID NO:94、97、100、103、106、109 和 112 含有 20 个氨基酸的 SEQ ID NO:13 所示 Vk3 前导序列;SEQ ID NO:95-96、98-99、101-102、104-105、107-108、110-111 和 113-114 不含前导序列;SEQ ID NO:96、99、102、105、108、111、114 已去除末端赖氨酸残基。SEQ ID NO:99-114 是人源化的。

[0277] 下表 3 小结了所产生的 4C04 和 11H09RON 结合抗体与 SMIP 分子并列出其相应的 SEQ ID NO。

[0278] 表 3 :4C04 和 11H09 RON 结合分子的小结

[0279]

专利蛋白质名称	形式描述	多核苷酸 SEQ ID NO	氨基酸 SEQ ID NO
RON-e01	11H09 鼠 VL	36	80
	11H09 鼠 VL CDR1		67
	11H09 鼠 VL CDR2		68
	11H09 鼠 VL CDR3		69
RON-e01	11H09 鼠 VH	37	81
	11H09 鼠 VH CDR1		70
	11H09 鼠 VH CDR2		71
	11H09 鼠 VH CDR3		72
RON-e01h6	采用 K02098 人种系构架区的人源化 11H09 鼠 VL	38	82
RON-e01h7	采用 Y14865 人种系构架区的人源化 11H09 鼠 VL	39	83
RON-e01h8	采用 X62106 人种系构架区的人源化 11H09 鼠 VH	40	84
RON-e01h9	采用 M99637 人种系构架区的人源化 11H09 鼠 VH	41	85
RON-e01h0	采用 X92343 人种系构架区的人源化 11H09 鼠 VH	42	86
RON-e02	VLVH ScFv	43	87
RON-e07h68	人源化 VLVH scFV	44	88
RON-e08h78	人源化 VLVH scFV	45	89
RON-e09h69	人源化 VLVH scFV	46	90
RON-e10h79	人源化 VLVH scFV	47	91
RON-e11h60	人源化 VLVH scFV	48	92
RON-e12h70	人源化 VLVH scFV	49	93
RON-e02	11H09 鼠 SMIP	50	94 (含前导), 95 (不含前导), 96 (不含前导, 无末端赖氨酸)
RON-e07h68	人源化 11H09 SMIP: e01h6 VL/e01h8 VH	51	97 (含前导), 98 (不含前导), 99 (不含前导, 无末端赖氨酸)

[0280]

专利蛋白质名称	形式描述	多核苷酸 SEQ ID NO	氨基酸 SEQ ID NO
RON-e08h78	人源化 11H09 SMIP: e01h7 VL/e01h8 VH	52	100 (含前导), 101 (不含前导), 102 (不 含前导, 无末端赖氨 酸)
RON-e09h69	人源化 11H09 SMIP: e01h6 VL/e01h9 VH	53	103 (含前导), 104 (不含前导), 105 (不 含前导, 无末端赖氨 酸)
RON-e10h79	人源化 11H09 SMIP: e01h7 VL/e01h9 VH	54	106 (含前导), 107 (不含前导), 108 (不 含前导, 无末端赖氨 酸)
RON-e11h60	人源化 11H09 SMIP: e01h6 VL/e01h0 VH	55	109 (含前导), 110 (不含前导), 111 (不 含前导, 无末端赖氨 酸)
RON-e12h70	人源化 11H09 SMIP: e01h7 VL/e01h0 VH	56	112 (含前导), 113 (不含前导), 114 (不 含前导, 无末端赖氨 酸)
RON-f01	4C04 鼠 VL	122	152
	4C04 鼠 VL CDR1		141
	4C04 鼠 VL CDR2		142
	4C04 鼠 VL CDR3		143
RON-f01	4C04 鼠 VH	123	153
	4C04 鼠 VH 变体(末端 L->S)		176
	4C04 鼠 VH CDR1		144
	4C04 鼠 VH CDR2		145
	4C04 鼠 VH CDR3		146
RON-f01h2	采用 X59315 人种系构架区 的人源化 4C04 鼠 VL	124	154
RON-f01h4	采用 Z12305 人种系构架区 的人源化 4C04 鼠 VH	125	155

[0281]

专利蛋白质名称	形式描述	多核苷酸 SEQ ID NO	氨基酸 SEQ ID NO
RON-f01h5	采用 Z14309 人种系构架区的人源化 4C04 鼠 VH	126	156
Ron-f02	4C04 鼠 VLVH scFV	127	157
RON-f07h24	4C04 人源化 VLVH scFV	128	158
RON-f08h25	4C04 人源化 VLVH scFV	129	159
RON-f02	4C04 鼠 SMIP:	130	160 (含前导), 161 (不含前导), 162 (不含前导, 无末端赖氨酸)
RON-f07h24	人源化 4C04 SMIP: f01h2 VL/f01h4 VH	131	163 (含前导), 164 (不含前导), 165 (不含前导, 无末端赖氨酸)
RON-f08h25	人源化 4C04 SMIP: f01h2 VL/f01H5 VH	132	166 (含前导), 167 (不含前导), 168 (不含前导, 无末端赖氨酸)

[0282] 下表 4 小结了用 4C04- 和 11H09- 衍生的 RON 结合域产生的交叉介体对。

[0283] 表 4. 示例性 RON 交叉介体

交叉介体特征	交叉介体 ID	链 1 ID 和形式(含结合域的长链)	链 2 ID (除注明外不含结合域的短链)
链 1-4C04 scFv BD 链 2-交叉介体对 2	RON-f03	VLVH-CH1-H-CH2-CH3-Ck PNSEQ ID NO:133 AA SEQ ID NO:169 (含前导), 170 (不含前导)	Ck-H-CH2-CH3-CH1 PN SEQ ID NO:11, 12 (分别含与不含前导) AA SEQ ID NO: 34, 35 (分别含与不含前导)
链 1-4C04 scFv BD 链 2-交叉介体对 1C-1	RON-f04	VLVH-H-CH2-CH3-CH1 PN SEQ ID NO:134 AA SEQ ID NO:171 (含前导), 172 (不含前导)	H-CH2-CH3-Ck(YAE) PN SEQ ID NO:8 AA SEQ ID NO:26, 27 (分别含与不含前导)
链 1-4C04 scFv BD 链 2-交叉介体对 1N-1	RON-f05	VLVH-CH1-H-CH2-CH3 PN SEQ ID NO:135 AA SEQ ID NO:173 (含前导), 174 (不含前导), 175 (不含前导/无末端赖氨酸)	Ck(YAE)-H-CH2-CH3 PN SEQ ID NO:9 AA SEQ ID NO:28, 29, 30 (分别为含前导、不含前导、和不含前导不含末端赖氨酸)
链 1-4C04 scFv BD 链 2-交叉介体对 1N-2	RON-f06	VLVH-CH1-H-CH2-CH3 PN SEQ ID NO:135 AA SEQ ID NO: 173 (含前导), 174 (不含前导), 175 (不含前导/无末端赖氨酸)	Ck(EAE)-H-CH2-CH3 PN SEQ ID NO:10 AA SEQ ID NO: 31, 32,33 (分别为含前导、不含前导、和不含前导不含末端赖氨酸)
链 1-1IH09 scFv BD 链 2-交叉介体对 2	RON-e03	VLVH-CH1-H-CH2-CH3-Ck PN SEQ ID NO:57 AA SEQ ID NO:115 (含前导), 116 (不含前导)	Ck-H-CH2-CH3-CH1 PN SEQ ID NO:11, 12 (分别为含与不含前导) AA SEQ ID NO: 34, 35 (分别为含与不含前导)

[0284]

交叉介体特征	交叉介体 ID	链 1 ID 和形式(含结合域的长链)	链 2 ID (除注明外不含结合域的短链)
链 1-1IH09 scFv BD 链 2-交叉介体对 1C-1	RON-e04	VLVH-H-CH2-CH3-CH1 PN SEQ ID NO:58 AA SEQ ID NO:117 (含前导), 118 (不含前导)	H-CH2-CH3-CK(YAE) PN SEQ ID NO:8 AA SEQ ID NO:26, 27 (分别为含与不含前导)
链 1-1IH09 scFv BD 链 2-交叉介体对 1N-1	RON-e05	VLVH-CH1-H-CH2-CH3 PN SEQ ID NO:59 AA SEQ ID NO:119 (含前导), 120 (不含前导) 121 (不含前导/无末端赖氨酸)	CK(YAE)-H-CH2-CH3 PN SEQ ID NO:9 AA SEQ ID NO:28, 29, 30 (分别为含前导、不含前导、和不含前导不含末端赖氨酸)
链 1-1IH09 scFv BD 链 2-交叉介体对 1N-2	RON-e06	VLVH-CH1-H-CH2-CH3 PN SEQ ID NO:59 AA SEQ ID NO: 119 (含前导), 120 (不含前导) 121 (不含前导/无末端赖氨酸)	CK(EAE)-H-CH2-CH3 PN SEQ ID NO:10 AA SEQ ID NO: 31, 32, 33 (分别为含前导、不含前导、和不含前导不含末端赖氨酸)
链 1-hu4C04 scFv BD 链 2-huCris7 scFv BD*	RON-f10h24	VLVH-H-CH2/CH3 无 CH1 PN SEQ ID NO:787 AA SEQ ID NO:789 (序列包含前导)	VLVH-H-CH2/CH3 无 CKYAE PN SEQ ID NO:807 AA SEQ ID NO:808

[0285]

[0286] * 抗 CD3 结合域 ;Cris7 单克隆抗体及其所衍生结合域的详述另见已公开申请 W02010/042904。

[0287] 实施例 2

[0288] RON-e01 和 RON-f01 鼠抗体及所衍生的结合分子特异性结合人 RON 并与猕猴 (*Macaca mulatta*) 的 RON 交叉反应。

[0289] 如实施例 1 所述生成的抗体、SMIP 和交叉介体结合分子显示能结合人 RON 并与猕猴 (*Macaca mulatta*, Mamu) RON 交叉反应。

[0290] 将转染有人或猕猴 RON 或空载体的 NIH/3T3 细胞用胰蛋白酶解离并以 1.6×10^5 个细胞 / 样品在冰上和稀释于染色缓冲液 (含 2% FBS 的 Dulbecco PBS) 的纯化抗体或杂交瘤上清液一起孵育来染色。未标记的鼠 IgG (南方生物技术公司 (SouthernBiotech), 阿拉巴马州伯明翰) 和 DX07 抗 RON β -链抗体 (圣克鲁斯生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology), 加利福尼亚州圣克鲁斯) 分别用作阴性和阳性对照。用 R-PE-偶联的羊抗小鼠 IgG (南方生物技术公司) 检测鼠抗体。在装有 HTS 的 BD FACSCalibur 流式细胞仪上用 PlateManager 和 CellQuest Pro 软件 (BD 生物科学公司 (BD Biosciences), 加利福尼亚州圣何塞) 分析样品。用 FlowJo 软件 (树星公司 (Tree Star), 俄勒冈州艾士兰) 绘制数据。

[0291] 用 PBS 基无酶细胞解离缓冲液 (Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free PBS-based, 英杰公司) 解离猕猴肺 4MBr-5 细胞 (ATCC), 并以 1.1×10^5 个细胞 / 样品用稀释于染色缓冲液的纯化分子染色。用 Alexa Fluor 488-偶联的羊抗人 IgG (英杰公司) 检测 SMIP, 且在二抗染色时用 $20 \mu\text{g/ml}$ 碘化丙锭标记死细胞。在 BD FACSCalibur 流式细胞仪上用 CellQuest Pro 软件 (BD 生物科学公司, 加利福尼亚州圣何塞) 分析样品。在 FlowJo 中绘制数据 (排除死细胞)。

[0292] 用胰蛋白酶解离人胰腺癌 BxPC-3 细胞 (ATCC), 并用橡胶细胞刮手动收集人乳腺转移癌 MDA-MB-453 细胞 (ATCC)。细胞以 3×10^5 个细胞 / 样品在冰上用稀释于染色缓冲液的纯化分子染色。用 Alexa Fluor 488-偶联的羊抗人 IgG (英杰公司) 检测 SMIP 和交叉介体。在装有 HTS 的 BDFACSCalibur 流式细胞仪上用 PlateManager 和 CellQuest Pro 软件分析样品。

[0293] 如图 1 所示, RON-e01 和 -f01 鼠抗体特异性结合人 RON 并与猕猴 (Mamu) 的 RON 交叉反应。转染有空载体 (虚线), 人 RON (点线) 或猕猴 RON (实线) 的 NIH/3T3 细胞仅用二抗 (图 1A)、用 1mg/ml 鼠 IgG (图 1B)、用 1mg/ml DX07 抗 -RON 抗体 (图 1C), RON-e01 抗 -RON 杂交瘤上清液 (图 1D) 或 RON-f01 抗 RON 杂交瘤上清液 (图 1E) 染色。

[0294] 如图 2 所示, RON-e02 和 -f02 SMIP 结合 4MBr-5 细胞表面上天然的猕猴 RON。4MBr-5 细胞仅用二抗 (虚线)、用 M0077 抗 CD79b SMIP (点线) 或抗 RON SMIP (实线) 染色。

[0295] 此外, 图 3 显示 RON-e 和 RON-f 鼠 SMIP 与交叉介体 (Interceptor) 结合分子结合 BxPC-3 细胞表面上天然的人 RON。BxPC-3 细胞用不同浓度的 RON-e (图 3A) 或 RON-f (图 3B) 分子染色。对 SMIP 和交叉介体构建物及相关 SEQ ID NO 的描述见表 3 和表 4。RON 交叉介体结合的饱和水平高于其 SMIP 对应物。饱和水平的这种差异可能反映了 RON 受体占用度的差异。每个交叉介体含有一个结合域并结合单个 RON 分子 (结合比 1:1), 而各 SMIP 含有 2 个结合域并可同时占用多至 2 个 RON 分子 (结合比 1:2)。

[0296] 此外, RON-e (图 7a) 和 RON-f (图 7B) 人源化 SMIP 结合 MDA-MB-453 细胞表面上

天然的人 RON。将 MDA-MB 453 细胞和不同浓度的人源化 RON-e SMIP 构建物 RON-e07h68、RON-e08h78、RON-e09h69、RON-e 10h79、RON-e 11h60、RON-e 12h70 及 RON-f SMIP 的 SMIP 构建物 RON-f07h24 与 RON-f08h25 一起孵育并分别与鼠 RON-e02 及 RON-f02 对照作比较。人源化 RON SMIP 的结合活性与其鼠对应物相当。

[0297] 这些实验表明基于 RON-e01 和 RON-f01 的结合分子特异性结合天然构型的人和猕猴的 RON 分子。

[0298] 实施例 3

[0299] RON-e01 和 RON-f01 鼠抗体结合 RON 胞外结构域内的不同表位。

[0300] 用 ELISA 测试抗 RON 鼠抗体与 RON 的 Sema-PSI 结构域的结合

[0301] 为测定杂交上清液克隆中的相对抗体浓度,将 96 孔 EIA/RIA 微孔板(康宁生命科学公司(Corning Life Sciences),马萨诸塞州洛厄尔)用羊 F(ab')₂ 抗小鼠 IgG(南方生物技术公司)包被并用含 10% FBS 的 DPBS 封闭,然后添加 1 → 100 稀释于血清稀释剂(DPBS/0.1% 吐温 20/0.1% BSA)中的杂交瘤上清液。包被抗体所捕获的鼠抗体采用 HRP 偶联的羊抗鼠 IgM+IgG+IgA(南方生物技术公司)检测,用 TMB 底物(赛默飞世尔科学有限公司)显色,并用 1N 硫酸终止。在 VersaMax 酶标仪上(分子装置公司(Molecular Devices),加利福尼亚州萨尼维尔)以 450nm 读取平板。

[0302] 为测定鼠抗体与 RON Sema-PSI 结构域的结合,将 96 孔 EIA/RIA 微孔板用 1 μg/ml 重组 RON Sema-PSI (R&D 系统公司,#1947-MS,明尼苏达州明尼阿波利斯)包被。该蛋白包括偶联有羧基末端组氨酸标签的人 RON 的 Sema 和 PSI 结构域(Glu 25-Leu 571;见 SEQ ID NO:784),并在 NS0 小鼠骨髓瘤细胞系中表达。平板用含 10% FBS 的 DPBS 封闭,然后添加 1 → 5 稀释于血清稀释剂中的杂交瘤上清液。如上所述检测结合有重组 RON Sema-PSI 的鼠抗体。

[0303] 如图 4 所示,来自杂交瘤克隆上清液的 RON-e01 抗体(1-5)含有可测浓度的 IgG,不结合重组 RON Sema-PSI 蛋白,表明 RON-e01 识别的部分或所有表位位于 Sema 和 PSI 结构域外。但是,在含可测浓度 IgG 的所有 RON-f01 杂交瘤克隆上清液(A-M)中都观察到重组 RON Sema-PSI 蛋白,说明 RON-f01 识别的部分或所有表位包含在 RON Sema 和 PSI 结构域中。“仅稀释剂”样品表示各试验中仅将血清稀释剂作为样品运行时的背景结合。作为 IgG 测定和重组 RON Sema-PSI 结合的阳性对照,在 ELISA 中测试 250ng/ml 的抗人 RON 抗体(R&D 系统公司,#MAB691,明尼苏达州明尼阿波利斯)。

[0304] 实施例 4

[0305] RON-e 和 RON-f 结合分子不彼此竞争细胞表面结合

[0306] 用胰蛋白酶解离的 BxPC-3 细胞在冰上用稀释于染色缓冲液(含 2%FBS 的 DPBS)的分子染色。将 3x 10⁵ 个细胞在冰上与 500nM 竞争剂分子孵育 1 小时,清洗,并用 100nM 鼠一抗或 SMIP 染色,然后分别用 Alexa Fluor 488 偶联的抗小鼠或抗人 IgG 二抗(RON-e01:鼠抗体;RON-f02:抗 RON SMIP;DX07:抗 RON β 链抗体(圣克鲁兹生物技术公司,加州圣克鲁兹)检测。在 BD FACSCalibur 流式细胞仪上用 CellQuest Pro 软件分析样品。

[0307] 如图 5 所示,RON-e 和 RON-f 分子不彼此竞争细胞表面结合,证实实施例 3 中表明 RON-e 和 RON-f 分子在不同表位结合 RON 的结果。DX07 和 RON-f 分子干扰彼此的细胞表面结合,提示它们可结合 RON 的相似区域或通过位阻而妨碍结合。

[0308] 实施例 5

[0309] RON-e 和 RON-f 结合分子可抑制 MSP 诱导的 RON、Akt 和 MAPK 磷酸化

[0310] 采用磷蛋白的蛋白质印迹分析测定 RON 结合分子是否能抑制 MSP 诱导的 RON、Akt 和 MAPK 磷酸化。

[0311] 将 MDA-MB-453 细胞以 2.5×10^6 个细胞 / 孔接种在 6 孔板内于 DMEM+10%FBS 中过夜。次日, 移除培养基并替换为制备于无血清 RPMI 的 10 或 200nM 的封闭剂中 37°C 处理 1 小时。移除封闭处理剂并将细胞用 MSP (R&D 系统公司, 明尼苏达州明尼阿波利斯) 在 37°C 下刺激 30 分钟。在含 $100 \mu\text{M}$ Na_3VO_4 的无血清 RPMI 培养基中制备无配体和 3nM MSP 处理液。细胞用冰冷的 TBS (50mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl) 清洗一次并在 150 μL RIPA 裂解缓冲液 (赛默飞世尔科学有限公司) 中于冰上裂解, 裂解缓冲液中加入 HALT™ 蛋白酶抑制剂混合物, HALT™ 磷酸酶抑制剂混合物, 5mM EDTA, 1mM Na_3VO_4 和 0.9mM 苯甲基磺酰氟。裂解物经 4°C 离心澄清并处理用于变性电泳。17.5 μL RIPA 裂解物上样至各泳道并在 6% (RON) 或 4-20% (Akt 和 MAPK) 的 Tris- 甘氨酸凝胶上分离。凝胶印迹到硝酸纤维素膜上。抗 RON 抗体均获自圣克鲁斯生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology, 加利福尼亚州圣克鲁斯), 而抗 Akt 和 MAPK 抗体均获自细胞信号传导技术公司 (Cell Signaling Technology, 马萨诸塞州丹弗斯市)。二抗购自 LI-COR 生物科学公司 (LI-COR Biosciences, 内布拉斯加州林肯)。

[0312] 酪氨酸磷酸化的 RON 在双份印迹上检测, 分别采用针对磷酸化酪氨酸 1238/1239 或 1353 的抗磷酸化 RON 抗体和 IRDye 800CW 驴抗兔或抗羊二抗。抗磷酸化酪氨酸 1238/1239 和 / 或 1353 的印迹用 RON β C-20 抗体和 IRDye 680 (图 6) 或 800CW (图 8) 驴抗兔二抗就总 RON 再次检测。分别用 IRDye 680 驴抗兔或 IRDye 800CW 驴抗小鼠二抗在同一印迹上测得磷酸-Akt (Ser473) 和磷酸-p44/42 MAPK。双份印迹 (图 6) 或抗磷酸-Akt/MAPK 印迹 (图 8) 的总 Akt 与 MAPK 探测采用泛 Akt 40D4 和 p44/42MAPK 抗体, 分别用 IRDye 680 驴抗小鼠或 IRDye 800CW 驴抗兔二抗检测。印迹采用 ODYSSEY® 红外成像系统 (LI-COR 公司, 内布拉斯加州林肯)。

[0313] 如图 6A 所示, RON-e01 抗体和 RON-e05 YAE 交叉介体能抑制 MSP 诱导的 RON、Akt 和 MAPK 磷酸化, 而 RON-e02 SMIP 显示不显著的封闭活性。此外, RON-f01 抗体、RON-f02 SMIP 和 RON-f03 交叉介体能抑制 MSP 所诱导 RON、Akt 和 MAPK 的磷酸化 (图 6B)。

[0314] 如图 8A 所示, RON-f 人源化 SMIP (RON-f07h24 和 RON-f08h25) 能抑制 MDA-MB-453 细胞中 MSP 所诱导 RON、Akt 和 MAPK 的磷酸化。RON-f 人源化 SMIP 应用于封闭步骤中然后模拟刺激时, 导致 RON 的最低磷酸化, 但 Akt 或 MAPK 则不然。图 8B 显示 RON-f02 鼠 SMIP 的人源化降低刺激步骤期间响应 SMIP 应用的受体磷酸化。RON-f02 鼠 SMIP 刺激 RON 磷酸化但不刺激下游 Akt 或 MAPK 磷酸化。相比鼠 SMIPRON-f02, 人源化的 SMIP (RON-f07h24 和 RON-f08h25) 导致减弱的 RON 磷酸化。有意思的是, 在 SMIP 诱导的 RON 受体磷酸化后未观察到对 MSP 所诱导 RON 活化的响应中观察到的高水平下游效应物蛋白磷酸化。

[0315] 因此, 本文所述 RON 结合分子可用于抑制 MSP 诱导的信号转导途径, 并因此有助于多种治疗情况, 包括用于治疗各种癌症, 例如但不限于胰腺癌。

[0316] 实施例 6

[0317] RON-e 和 RON-f 结合分子的结合动力学

[0318] 用 Biacore 分析测定 RON-e 和 RON-f 结合分子的结合动力学。

[0319] 在 CHO K1SV 细胞 (龙沙公司 (Lonza), 新泽西州艾伦代尔) 中生成 RON Sema-PSI-AFH 蛋白, 所述细胞稳定转染有包含融合了 c 末端标签的 RON 的 Sema-PSI 区 (氨基酸 25-568), 所述标签包括亲和素、3X FLAG[®] 和 6X 组氨酸标签。可溶 RON 蛋白包括在 305-309 位氨基酸用凝血酶切割位点 (LVPRG; SEQ ID NO:177) 取代天然切割位点 (KRRRR; SEQ ID NO:178)。该蛋白采用抗 - FLAG[®] M2 亲和琼脂糖凝胶 (西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich), 密苏里州圣路易斯) 从上清液纯化, 用 3X FLAG[®] 肽 (西格玛奥德里奇公司) 洗脱, 并用尺寸排阻层析 (SEC) 进一步纯化。

[0320] RON-f 鼠抗体、SMIP 和交叉介体对可溶性 RON Sema-PSI-AFH 的结合动力学采用 Biacore T100 (GE 医疗保健公司 (GE Healthcare), 新泽西州皮斯卡特维) 测定。抗 RON 鼠抗体用固定化的抗小鼠 Fc 多克隆抗体捕获, 而 SMIP 和交叉介体用抗人 Fc 单克隆抗体捕获。所用捕获抗体均来自 GE 医疗保健公司, 所述抗体用 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐和 N-羟基琥珀酰亚胺通过胺共价偶联于羧甲基葡聚糖糖表面 (CM4)。用乙醇胺封闭活化表面的未占据位点。在试验期间, 所述捕获抗体未显示与所捕获的抗 RON 分子有可检测的解离。在各轮循环中, 注射单个浓度的可溶性 RON Sema-PSI-AFH, 然后允许其解离。在各循环结束时, 用 3M MgCl₂ 温和地再生该表面, 这种试剂能使捕获抗体所结合的蛋白质解离。利用与参比细胞结合相关的信号消减折射变化, 利用空白 (仅缓冲液) 注射校正漂移和系统噪声。

[0321] 用 BIA 评估软件确定动力学参数和亲和力。用相互作用的 k_a (M⁻¹s⁻¹) 和 k_d (s⁻¹) 速率来计算抗体 / 受体相互作用的亲和常数 K_D (M)。 K_D 定义为 k_d 和 k_a 常数的比值 (k_d/k_a)。RON-f01 鼠抗体在单个实验中测试, 而 RON-f02 SMIP 和 RON-f03 交叉介体分子各自在 3 个独立实验中测试。表 5 显示代表性实验所得的速率和亲和常数。RON-f 分子捕获在含固定化抗 Fc 的传感器芯片上, 而可溶性 RON Sema-PSI-AFH 蛋白以不同浓度流经该表面。

[0322] 表 5.

[0323] Biocore 分析对 RON-f 分子确定的速率与亲和常数

[0324]

样品	k_a (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (pM)
RON-f01	6.32×10^5	9.49×10^{-5}	150
RON-f02	8.66×10^5	1.00×10^{-4}	115
RON-f03	4.34×10^5	6.78×10^{-5}	156

[0325] 实施例 7

[0326] RON-e 和 RON-f 结合分子防止完全的 MSP 所诱导 BxPC-3 细胞的愈伤用体外功能试验测试 RON 结合分子防止 MSP 诱导愈伤的能力。

[0327] BxPC-3 细胞以 5×10^5 个细胞 / 孔接种入胶原蛋白包被的 24 孔板 (BD 生物科学公司, 加利福尼亚州圣何塞) 的 1ml RPMI+10%FBS 中, 37° C 孵育 18 小时。次日, 将培养基从细胞抽出, 并替换为 1ml 无菌 DPBS。用 1-ml 移液器尖头从各孔中心竖直刮下细胞单层。进行刮取后, 从孔中小心抽出 DPBS 和所有刮下的细胞。各孔加入 500 μ l 无血清 RPMI 或在无血清 RPMI 中稀释至 100 μ M 的封闭试剂。细胞在 37° C 孵育 1 小时。在封闭步骤中, 用

IN 细胞分析仪 1000 (GE 医疗保健公司, 新泽西州皮斯卡特维) 对平板进行 0 小时点的成像, 采用亮场设定和 4X 物镜。MSP 配体 (R&D 系统公司, 明尼苏达州明尼阿波利斯) 在无血清 RPMI 中稀释至 5 μ g/ml。封闭孵育后, 各孔加入 10 μ l 无血清 RPMI (无配体对照) 或加入稀释 MSP 至终浓度 100ng/ml MSP/孔。该平板在 37 $^{\circ}$ C 孵育 18 小时, 并在 IN 细胞分析仪上用 0 小时点的同样设定再次成像。对伤口就完全愈合 (如在无封闭处理的 MSP 刺激下所观察) 或不完全愈合 (如在无 MSP 刺激下所观察) 进行评分。各处理均采用复孔进行。结果小结见表 6 和表 7。

[0328] 表 6.

[0329] RON-e 和 RON-f 蛋白防止 MSP 诱导的 BxPC-3 细胞愈合

[0330] 对照和无关蛋白 RON-e 蛋白 RON-f 蛋白

[0331]	MSP	封闭处理	愈合	封闭处理	愈合	封闭处理	愈合
	-	-	不完全	----	----	----	----
	+	-	完全	----	----	----	----
	+	抗 CD28 抗体	完全	RON-e01 抗体	不完全	RON-f01 抗体	不完全
	+	抗 CD28 SMIP	完全	RON-e02 SMIP	不完全	RON-f02 SMIP	不完全
	+	抗 CD28 交叉介体	完全	RON-e03 交叉介体	不完全	RON-f03 交叉介体	不完全

[0332] 表 7.

[0333] 人源化 RON-e 和 RON-f SMIP 防止 MSP 诱导的 BxPC-3 细胞愈合

[0334] 对照和无关 SMIP RON-e SMIP RON-f SMIP

[0335]

MSP	封闭处理	愈合	MSP	封闭处理	愈合	MSP	封闭处理	愈合
-	-	不完全	+	RON-e02	不完全	+	RON-f02	不完全
+	-	完全	+	RON-e07 h68	不完全	+	RON-f07 h24	不完全
+	抗 CD37 SMIP	完全	+	RON-e08 h78	不完全	+	RON-f08 h25	不完全
			+	RON-e09 h69	不完全			
			+	RON-e10 h79	不完全			
			+	RON-e11 h60	不完全			
			+	RON-e12 h70	不完全			

[0336] 如表 6 和 7 所小结, 包括抗 RON-e01、抗 RON-f01 抗体, RON-e02 和 RON-f02 SMIP, 以及 RON-e03 和 RON-f03 交叉介体分子, 还有人源化 RON-e 和 RON-f SMIP 在内的 RON 结合域分子都阻断 MSP 所诱导的 BxPC-3 细胞愈合。

[0337] 实施例 8

[0338] 双特异性人源化 RON-f 结合域 / 抗 CD3 结合域分子特异性引导细胞毒性 T

[0339] 细胞杀伤表达 RON 抗原的靶细胞

[0340] 本实施例中, 用定向的 T 细胞细胞毒性试验来证明含 RON 结合域与抗 CD3 结合域的双特异性分子能引导细胞毒性 T 细胞介导杀伤表达 RON 的靶细胞。用了两种不同的抗

RON 结合域分子形式。具体来说,构建了 RON 结合型 SCORPION 分子和 RON 结合型交叉介体分子。f10h24RON 结合型交叉介体分子的描述见表 4,该构建物的多核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:787 和 789 所示。单链抗 CD3 交叉介体对多肽从其氨基到羧基末端含有:CRIS7(抗 CD3 单克隆抗体)scFv,人 IgG1SCC-P 铰链,人 IgG1 CH2(无 ADCC/CDC),人 IgG1 CH3,和人 Ck(YAE)。该构建物的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:807 和 808 所示。SCORPION 构建物包含人源化 4C04ScFv 和人源化 Cris7ScFv 并含有 Fc 结构域,后者具有消除 ADCC 和 CDC 活性的突变。该 SCORPION 构建物的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:786 和 788 所示。

[0341] MDA-MB-453(ATCC) 和 Daudi(ATCC) 靶细胞载有每百万细胞 0.05mCi 的铬 -51。靶细胞清洗并以 2×10^5 个细胞 / 毫升重悬于试验培养基 [RPMI 1640, 10%FBS, 1mM 丙酮酸钠, 1X MEM 非必需氨基酸 (英杰公司), $55 \mu\text{M}$ 2- 巯基乙醇]。用泛 T 细胞分离试剂盒 II(美天旎生物技术公司 (Miltenyi Biotec), 加利福尼亚州奥本) 从外周血单核细胞分离出健康供体的 T 细胞。未刺激的 T 细胞清洗并以 1×10^6 个细胞 / 毫升重悬于试验培养基中。在 96 孔 U 底板中,将 $50 \mu\text{L}$ 靶细胞 (10,000 个细胞 / 孔) 与 $50 \mu\text{L}$ L4X 处理液 (仅试验培养基, NP-40 去污剂, 或双特异性蛋白) 混合并室温孵育 15 分钟。孔中适当加入 $100 \mu\text{L}$ 试验培养基或 T 细胞 (100,000 个细胞 / 孔) 并将板在 37°C 、5% CO_2 下孵育 4 小时。孵育后,将细胞轻柔离心并将 $25 \mu\text{L}$ 无细胞上清液转移至包被有闪烁剂的 LUMAPLATE™-96 孔板 (帕金埃尔默公司 (PerkinElmer), 马萨诸塞州沃尔瑟姆)。将闪烁平板干燥过夜,并在 TopCount NXT (帕金埃尔默公司) 上记录各样品的每分钟计数 (cpm)。测定含靶细胞、T 细胞和无处理的各孔内的自发释放。测定含靶细胞和 0.2%NP-40 去污剂的孔内的总裂解。数据绘制为 % 总裂解,按下式确定:

[0342]

$$\% \text{总裂解} = \frac{(\text{cpm}^{\text{样品}} - \text{cpm}^{\text{自发释放}})}{(\text{cpm}^{\text{总裂解}} - \text{cpm}^{\text{自发释放}})}$$

[0343] 如图 9A 和 9B 所示,两种靶细胞系都仅在与 T 细胞和能结合该靶细胞所表达抗原的双特异性蛋白一起孵育时被 T 细胞杀死。当双特异性蛋白不结合靶细胞时 (即,抗 RON x 抗 CD3 双特异性蛋白用于 Daudi 细胞或抗 CD19 用于 MDA-MB-453 细胞),未见靶细胞细胞毒性。因此,人源化 RON-f 结合域与抗 CD3 结合域配对的双特异性蛋白特异性指引细胞毒性 T 细胞杀死表达 RON 抗原的靶细胞。这些实验证明本文所示与抗 CD3 结合域分子配对的 RON 结合分子可用于治疗性设定以募集细胞毒性 T 细胞以杀死表达 RON 的靶细胞。

[0344] 实施例 9

[0345] 含抗 RON 和抗 c-Met 结合域的多肽异二聚体

[0346] 制得含抗 RON 结合域 (ORN151) 的二价多肽异二聚体和含抗 RON 和抗 c-Met 结合域的两个双特异性多肽异二聚体 (ORN152 和 ORN153)。

[0347] 二价多肽异二聚体 ORN151 含有单链多肽 ORN145(4C04 CH2 CH3 CH1) 和 ORN148(11H09 CH2 CH3 Ck(YAE))。单链多肽 ORN145 从其氨基到羧基末端含有:4C04(抗 RON)scFv,人 IgG1 SCC-P 铰链,人 IgG1CH2,人 IgG1 CH3 和人 IgG1 CH1。ORN145 的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:810 和 811 所示。单链多肽 ORN148 从其氨基到羧基末端含有:11H09(抗 RON)scFv,人 IgG1SCC-P 铰链,人 CH2,人 CH3 和人 Ck(YAE)。ORN148 的核

苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:812 和 813 所示。

[0348] 二价双特异性 (c-Met, RON) 多肽异二聚体 ORN152 含有单链多肽 ORN116 (MET021 CH2 CH3 CH1) 和 ORN146 (4C04 CH2 CH3 Ck(YAE))。单链多肽 ORN116 从其氨基到羧基末端含有 :MET021 (抗 c-Met) scFv, 人 IgG1 SCC-P 铰链, 人 IgG1 CH2, 人 IgG1 CH3 和人 IgG1CH1。ORN116 的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:814 和 815 所示。单链多肽 ORN146 从其氨基到羧基末端含有 :4C04 (抗 RON) scFv, 人 IgG1 SCC-P 铰链, 人 CH2, 人 CH3 和人 Ck (YAE)。ORN146 的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:816 和 817 所示。

[0349] 双特异性 (c-Met, RON) 多肽异二聚体 ORN153 含单链多肽 ORN116 (MET021 CH2 CH3 CH1) 和 ORN148 (11H09 CH2 CH3 Ck(YAE))。

[0350] 多肽异二聚体 ORN151、ORN152 和 ORN153 按以下方法表达。获得如下表达水平 : ORN151 培养物 :1.9 μ g 蛋白质 /mL, ORN152 为 3.1 μ g/mL, 而 ORN153 为 4.9 μ g/mL。

[0351] 表达

[0352] 转染前一日, 将 HEK293 细胞以 0.5×10^6 个细胞 / 毫升的细胞浓度悬浮于在 Freestyle 293 表达培养基 (吉布可公司 (Gibco))。大型转染使用 250ml 细胞, 但小型转染使用 60ml 细胞。转染当天, 将 320ul 293fectin 试剂 (英杰公司) 和 8ml 培养基混合。同时, 也将对应两条链的各 250ug DNA 与 8ml 培养基混合并孵育 5 分钟。孵育 15 分钟后, 将 DNA-293fectin 混合液加入 250ml 的 293 细胞中, 并返回摇床在 37° C 下以 120RPM 速度振荡。对使用 60ml 细胞的较小转染, 用四分之一的 DNA、293fectin 和培养基。

[0353] 实施例 10

[0354] 双特异性抗 RON/ 抗 CD3 多肽异二聚体的细胞结合

[0355] 构建含抗 RON 和抗 CD3 结合域的多肽异二聚体 S0268。S0268 含有单链多肽 ORN145 (4C04 CH2 CH3 CH1) 和 TSC019 (G19-4CH2 CH3 Ck(YAE))。单链多肽 TSC019 从其氨基到羧基末端含有 :G19-4 (抗 CD3) scFv, 人 IgG1SCC-P 铰链, 人 CH2, 人 CH3 和人 Ck (YAE)。TSC019 的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:818 和 819 所示。单链多肽 ORN145 的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:810 和 811 所示。

[0356] 为比较双特异性多肽异二聚体分子靶向肿瘤细胞抗原和 T 细胞的效力, 比较了 S0268 和含同样结合域的另一双特异性支架 (SCORPION™ 蛋白) S0266 的细胞上结合特性。SCORPION 蛋白 S0266 的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:820 和 821 所示。人 293 细胞中的瞬时转染对 S0266 培养物产生 6.9 μ g 蛋白质 /mL ; S0268 培养物产生 2.3 μ g/mL ; TSC020 培养物产生 3.0 μ g/mL ; 而 TSC021 培养物产生 3.2 μ g/mL。

[0357] MDA-MB-453 (RON+) 乳腺癌细胞获自 ATCC (弗吉尼亚州马纳萨斯), 并按所提供的方案培养。用来自美天旎生物技术公司 (德国贝尔吉施格拉德巴赫) 的泛 T 细胞分离试剂盒 II 从供体 PBMC 分离出 T 细胞。通过用生物素偶联的单克隆抗体和抗生物素磁性微珠间接磁性标记从 PBMC 分离出非 T 细胞。然后通过将这些细胞保持在有磁场环绕的柱中来消除这些细胞。T 细胞不保持在该柱中, 并在流出液中收集得到。

[0358] 通过将 5×10^5 个 T 细胞或靶 (MDA-MB-453) 细胞与序列稀释至浓度从 100nM 到 0.1nM 的双特异性分子 S0266 (α RON $\times$ α CD3 SCORPION™ 蛋白) 或 S0268 (α RON $\times$ α CD3 多肽异二聚体) (对 MDA-MB-453 细胞和分离的 T 细胞而言) 一起在 4° C 孵育 30 分钟来评估结合。将细胞清洗 3 次, 然后与羊抗人 IgG-FITC (1:200 稀释) 一起在 4° C 再孵育 30 分钟。

然后,细胞再次清洗 3 次,固定于 1% 多聚甲醛并在 FACS-Calibur 仪器上读取。

[0359] 在 FlowJo 7.5 版(树星公司,俄勒冈州艾士兰)中对高 FSC、高 SSC 子集的分析显示双特异性分子 S0266 和 S0268 剂量依赖性结合 MDA-MB-453 与分离的 T 细胞(图 10A 和 10B)。出人意料地,尽管缺少亲合力(avidity)的潜力,S0268 多肽异二聚体结合 MDA-MB-453 与 T 细胞的亲和性(affinity)与相应的 SCORPION™ 分子(S0266)相当。还观察到多肽异二聚体在两种靶细胞类型上的更高饱和度,这可以是多肽异二聚体比相应的 SCORPION™(二价 Scorpion 与表面抗原潜在的 1:2 结合)以更高计量学(多肽异二聚体 1:1 结合表面抗原)时的情形。

[0360] 实施例 11

[0361] 由多肽异二聚体重定向 T 细胞细胞毒性

[0362] 为比较不同双特异性多肽异二聚体分子在诱导靶标依赖性 T 细胞细胞毒性中的效力,在铬(⁵¹Cr)释放试验中比较了四种不同的双特异性分子。一同测试含共同抗 CD19 结合域(HD37)和 3 种不同抗 CD3 结合域(TSC054 为 G19-4,TSC078 为 OKT3,TSC079 为 HuM291)的 3 种不同的双特异性分子(TSC054,TSC078,TSC079),以及含抗 RON 结合域(4C04)与抗 CD3 结合域(G19-4)的第四种双特异性分子(S0268,见实施例 10)。二价多肽异二聚体 TSC054 含有单链多肽 TSC049(HD37 CH2(无 ADCC/CDC)CH3 CH1)和 TSC053(G19-4 CH2(无 ADCC/CDC)CH3 Ck(YAE))。单链多肽 TSC049 从其氨基到羧基末端含有:HD37(抗 CD19) scFv,人 IgG1 SCC-P 铰链,人 IgG1 CH2(无 ADCC/CDC)(即,含 L234A、L235A、G237A、E318A、K320A 和 K322A 取代的人 IgG1 CH2),人 IgG1 CH3 和人 IgG1 CH1。TSC049 的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:822 和 823 所示。单链多肽 TSC053 从其氨基到羧基末端含有:G19-4(抗 CD3) scFv,人 IgG1 SCC-P 铰链,人 IgG1 CH2(无 ADCC/CDC)(即,含 L234A、L235A、G237A、E318A、K320A 和 K322A 取代的人 IgG1 CH2),人 IgG1 CH3 和人 Ck(YAE)。TSC053 的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:824 和 825 所示。

[0363] 二价多肽异二聚体 TSC078 含有单链多肽 TSC049(HD37 CH2(无 ADCC/CDC)CH3 CH1)和 TSC076(OKT3 CH2(无 ADCC/CDC)CH3 Ck(YAE))。单链多肽 TSC076 从其氨基到羧基末端含有:OKT3(抗 CD3) scFv,人 IgG1 SCC-P 铰链,人 IgG1 CH2(无 ADCC/CDC),人 IgG1 CH3 和人 Ck(YAE)。TSC076 的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:826 和 827 所示。

[0364] 二价多肽异二聚体 TSC079 含有单链多肽 TSC049(HD37 CH2(无 ADCC/CDC)CH3 CH1)和 TSC077(Nuvion CH2(无 ADCC/CDC)CH3 Ck(YAE))。单链多肽 TSC077 从其氨基到羧基末端含有:Nuvion(抗 CD3) scFv,人 IgG1 SCC-P 铰链,人 IgG1 CH2(无 ADCC/CDC),人 IgG1 CH3 和人 Ck(YAE)。TSC077 的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:828 和 829 所示。

[0365] 人 293 细胞中的瞬时转染生成的蛋白质就 TSC054 而言为约 2.33 μg/mL, TSC078 为约 0.67 μg/mL, TSC079 为约 3.5 μg/mL。

[0366] Daudi 伯基特淋巴瘤细胞(CD19+, RON-)和 BxPC-3 细胞(CD19-, RON+)获自 ATCC(弗吉尼亚州马纳萨斯),并按所提供的方案培养。用标准菲可(ficoll)梯度从人血中分离外周血单核细胞(PBMC)。所分离的细胞用盐水缓冲液清洗。用来自美天旎生物技术公司(德国贝尔吉施格拉德巴赫)的泛 T 细胞分离试剂盒 II 按生产商的方案(更多信息还可参见实施例 5)额外分离出 T 细胞。

[0367] 通过 ⁵¹Cr 释放试验评估细胞毒性。将约 5×10⁶ 个 Daudi 或 BxPC-3 细胞用 0.3mCi

的 ^{51}Cr 处理并在在 37°C 孵育 75 分钟。75 分钟后,将细胞用培养基 (RPMI+10% FBS) 清洗 3 次并重悬于 11.5mL 培养基。将该悬液以每孔 $50\mu\text{L}$ 分入 96 孔 U 底板 (约 20,000 个细胞/孔)。将浓度范围在 10nM-0.1pM 的双特异性分子添加至靶 (Daudi, BxPC-3) 细胞,总体积为 $100\mu\text{L}$ /孔。靶细胞在室温下培育 15 分钟。然后添加 $100\mu\text{L}$ 分离的 T 细胞 (约 200,000 个) 使 T 细胞与靶细胞的比例为 10:1。含靶细胞的对照孔中添加 $50\mu\text{L}$ 0.8%NP-40,留置 15 分钟,然后添加 $100\mu\text{L}$ 培养基以提供总体裂解对照。

[0368] 平板孵育 4 小时,1500rpm 离心 3 分钟,从各孔将 $25\mu\text{L}$ 上清液转移至 96 孔 Luma 样品板的对应孔中。使样品板在化学通风橱中空气干燥 18 小时,然后在 Topcount 闪烁计数器上用标准方案读取放射性。

[0369] 细胞毒性数据的分析表明,抗 RON 定向的双特异性分子 S0268 在 Daudi (RON-) 细胞上没有脱靶细胞毒性 (图 11A)。类似地,没有 T 细胞时用 TSC054 处理 Daudi 细胞未见直接细胞毒性 (图 11A)。但是存在 T 细胞和抗 CD19 定向的双特异性分子 (TSC054) 时,用 Daudi 细胞观察到强烈的 T 细胞定向的细胞毒性,该毒性在浓度为 10 到 100pM 之间时达到最大裂解 (图 11A)。类似地,用第二 T 细胞供体 (图 11B),从 CD19 定向的双特异性 TSC054、TSC078 或 TSC079,获自 CD19 定向的 BiTE bsc19x3 未见 BxPC-3 (CD19-) 细胞的脱靶细胞毒性。抗 RON 定向的 S0268 双特异性分子在 BxPC-3 (RON+) 细胞中诱导细胞毒性,在浓度为 10 到 100pM 之间时达到最大 (图 11B)。

[0370] 实施例 12

[0371] 双特异性抗 RON/ 抗 CD19 多肽异二聚体

[0372] 构建了二价抗 RON/ 抗 CD19 多肽异二聚体 TSC099。TSC099 含有单链多肽 TSC049 (抗 CD19) (HD37 CH2 (无 ADCC/CDC) CH3 CH1) 和 TSC097 (4C04 CH2 (无 ADCC/CDC) CH3 Ck (YAE))。单链多肽 TSC097 从其氨基到羧基末端含有:4C04 (抗 RON) scFv,人 IgG1SCC-P 铰链,人 IgG1 CH2 (无 ADCC/CDC),人 IgG1 CH3 和人 Ck (YAE)。TSC097 的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:830 和 831 所示。单链多肽 TSC049 从其氨基到羧基末端含有:HD37 (抗 CD19) scFv,人 IgG1 SCC-P 铰链,人 IgG1 CH2 (无 ADCC/CDC) (即,含 L234A、L235A、G237A、E318A、K320A 和 K322A 取代的人 IgG1 CH2),人 IgG1 CH3 和人 IgG1CH1。TSC049 的核苷酸和氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:822 和 823 所示。

[0373] 可以组合上述各种实施方式以提供进一步的实施方式。本说明书引用的和/或申请数据单中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过引用全文纳入本文。所述实施方式的各方面可被修改,必要时可应用各种专利、申请和出版物的概念,以提供更多的实施方式。

[0374] 对所述实施方式的这些和其它变化可以根据以上详述的提示作出。通常,在下列权利要求中,所用术语不应视为将所述权利要求限制于本说明书中和权利要求所公开的具体实施方式,而应视为包括所有可能的实施方式以及权利要求所确定等同方案的全部范围。因此,权利要求书不局限于具体公开。

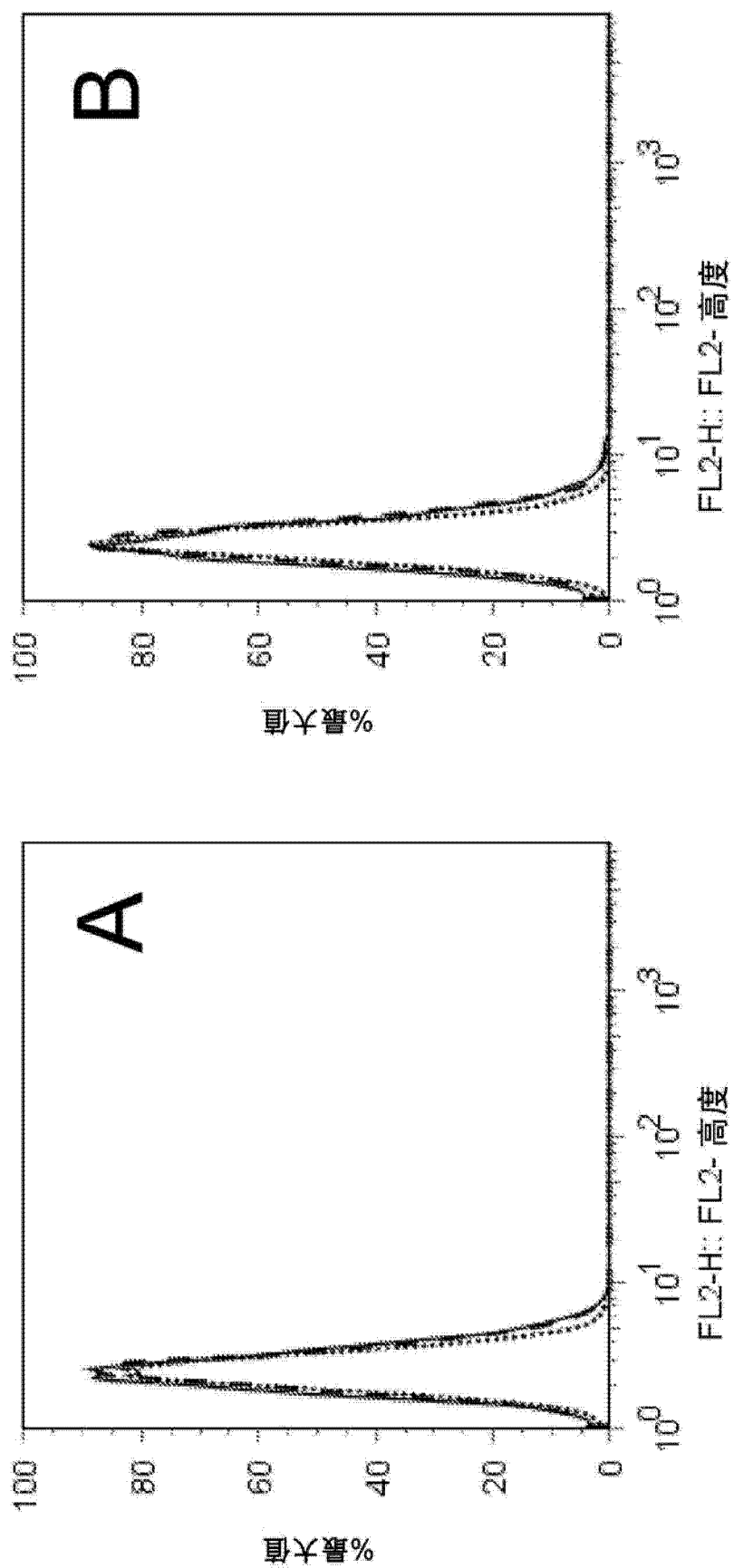


图 1

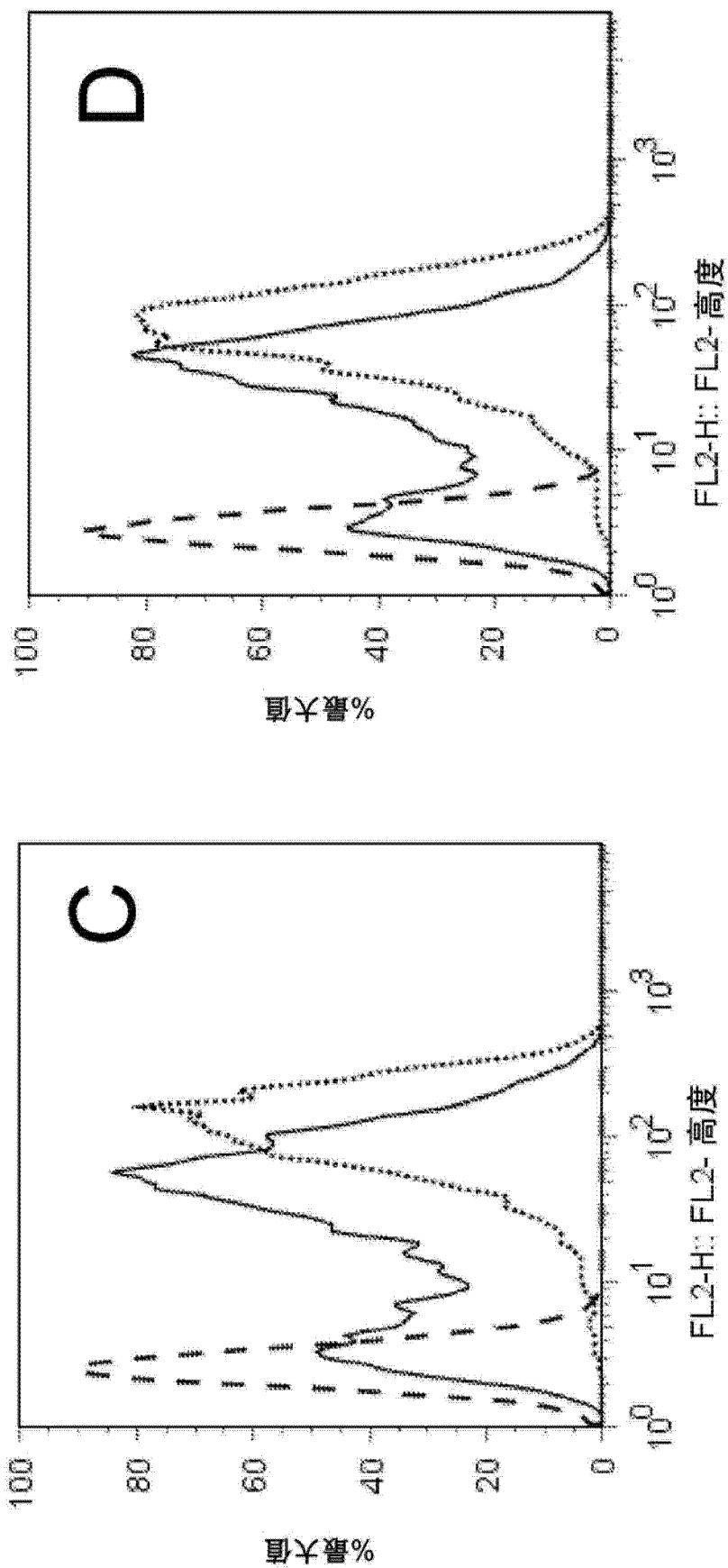


图 1

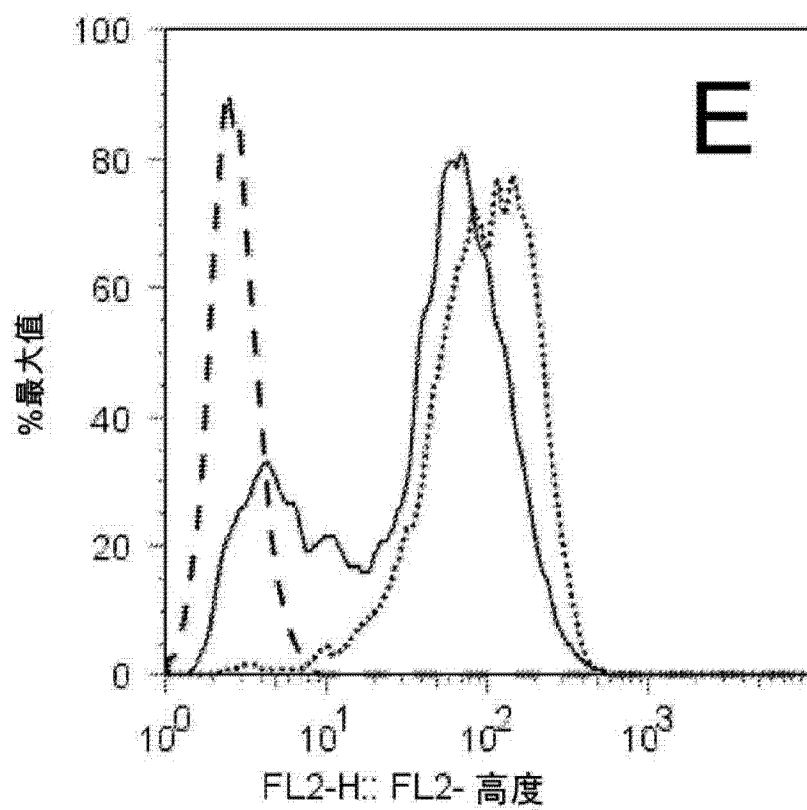


图 1

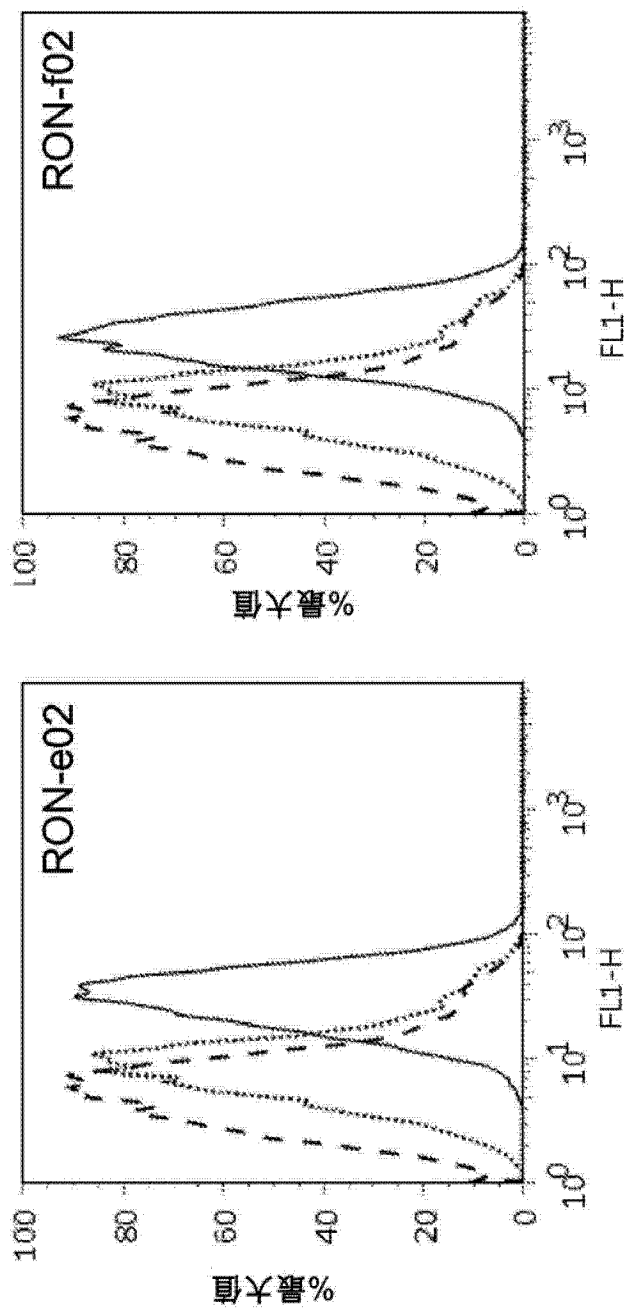


图 2

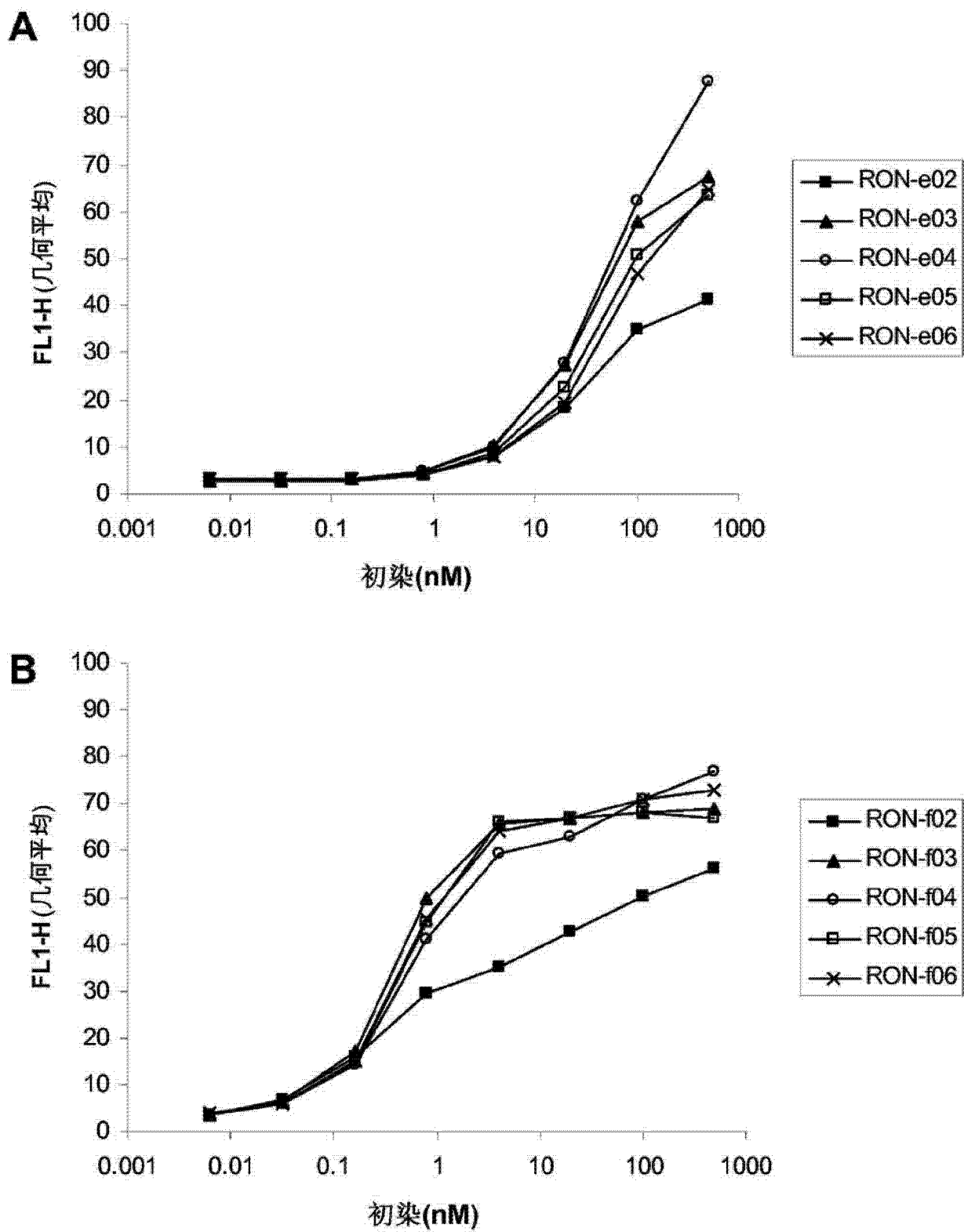


图 3

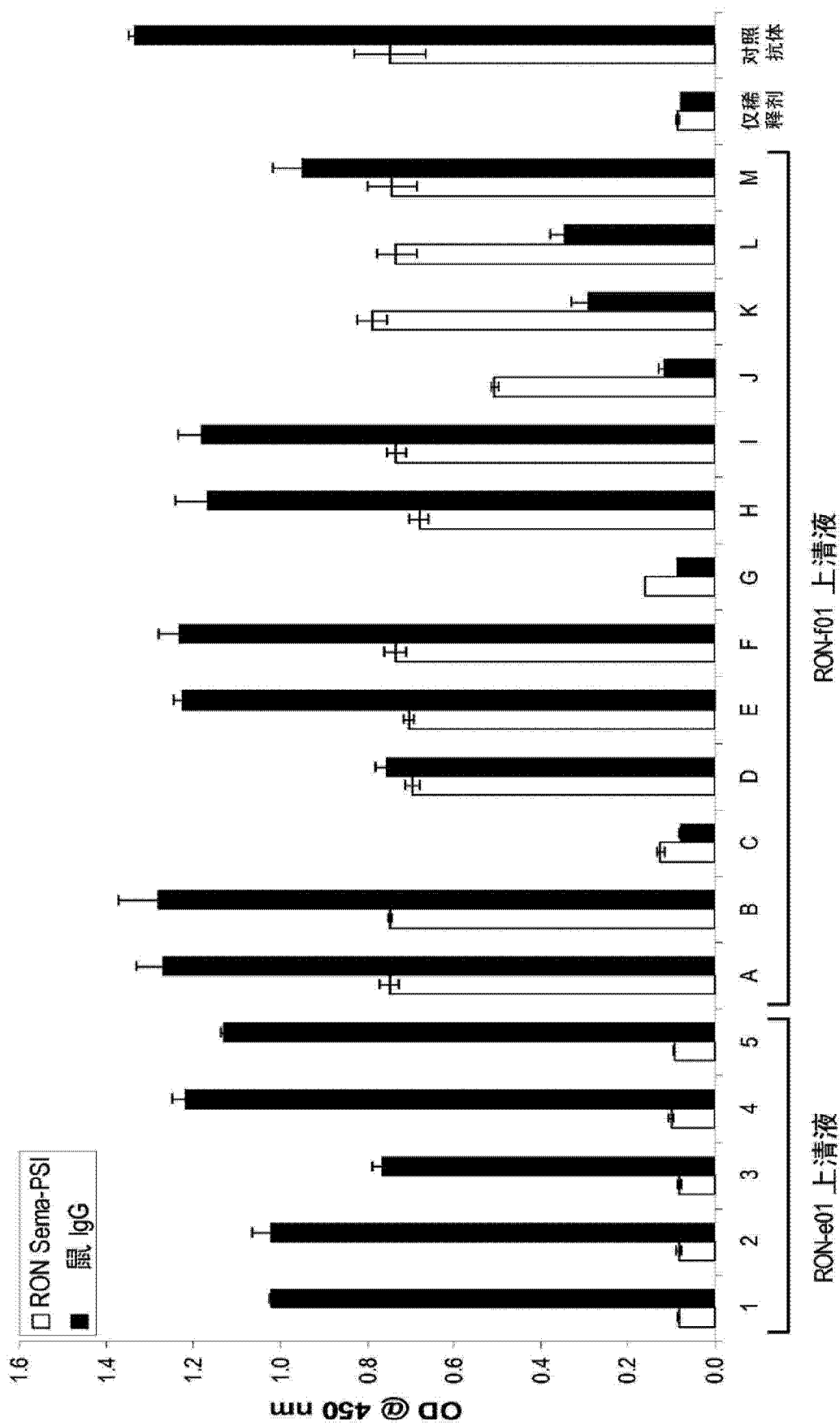


图 4

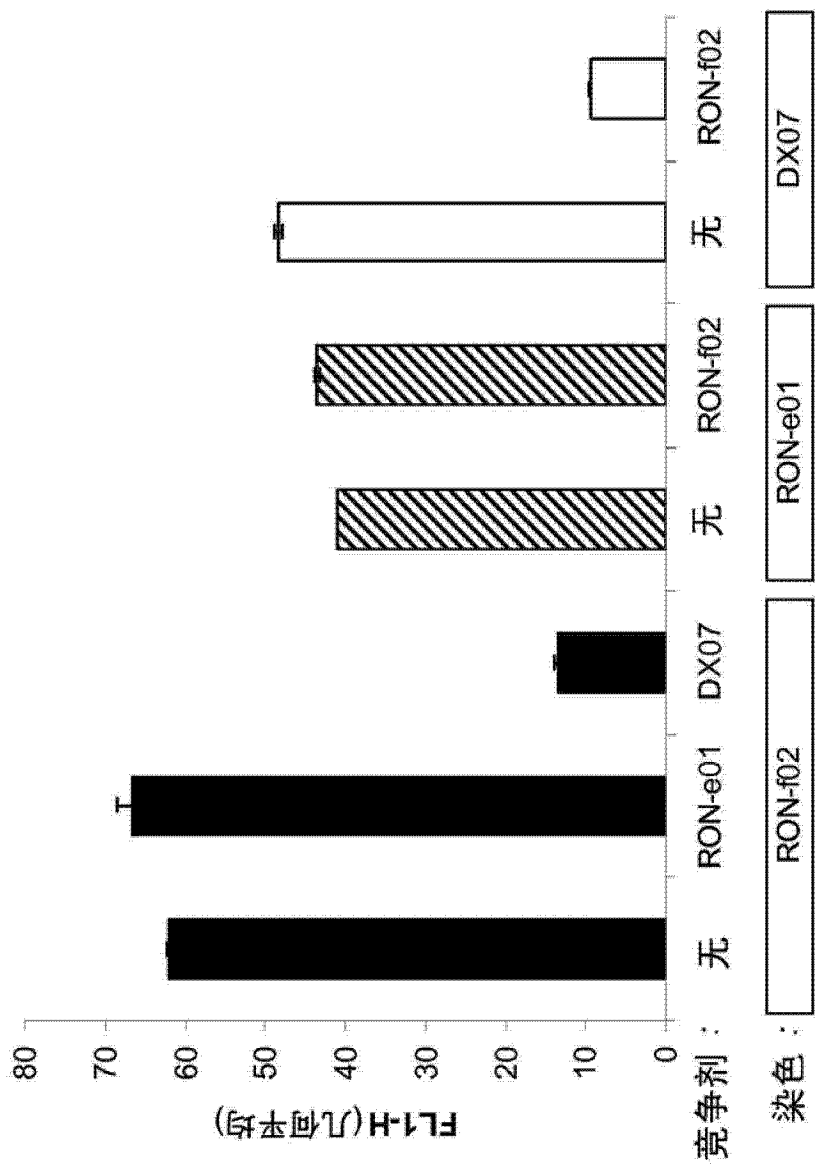


图 5

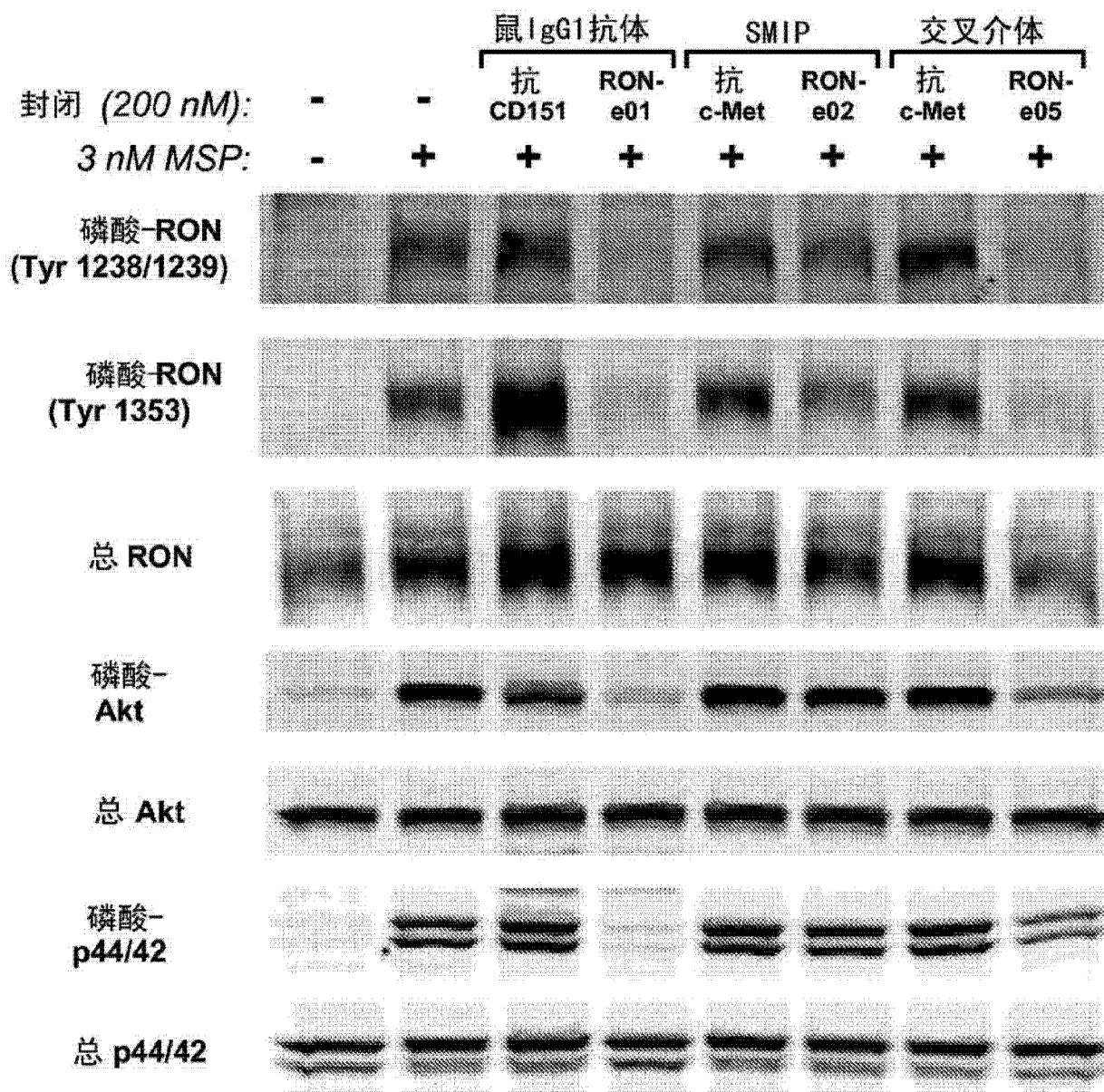


图 6A

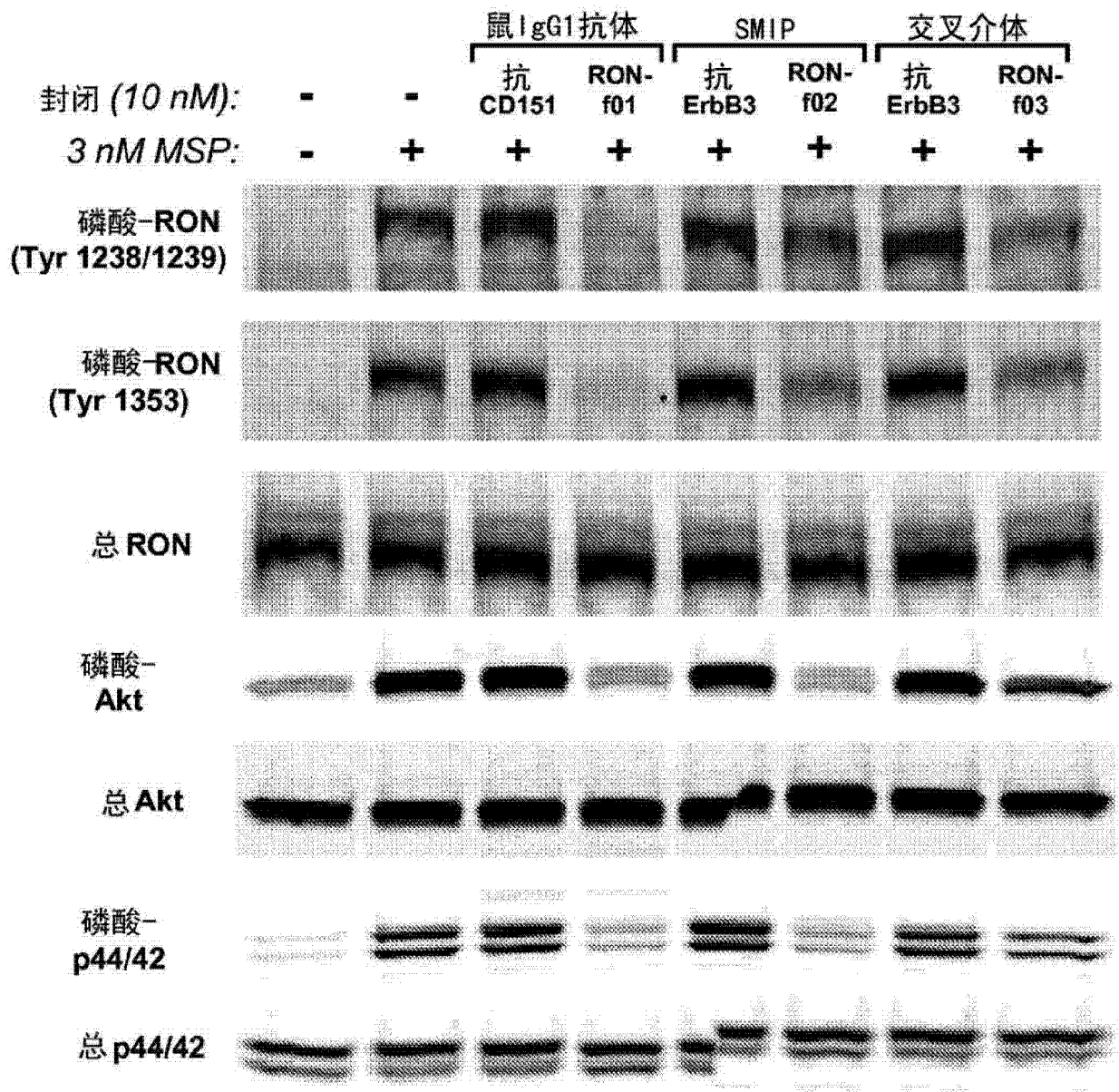


图 6B

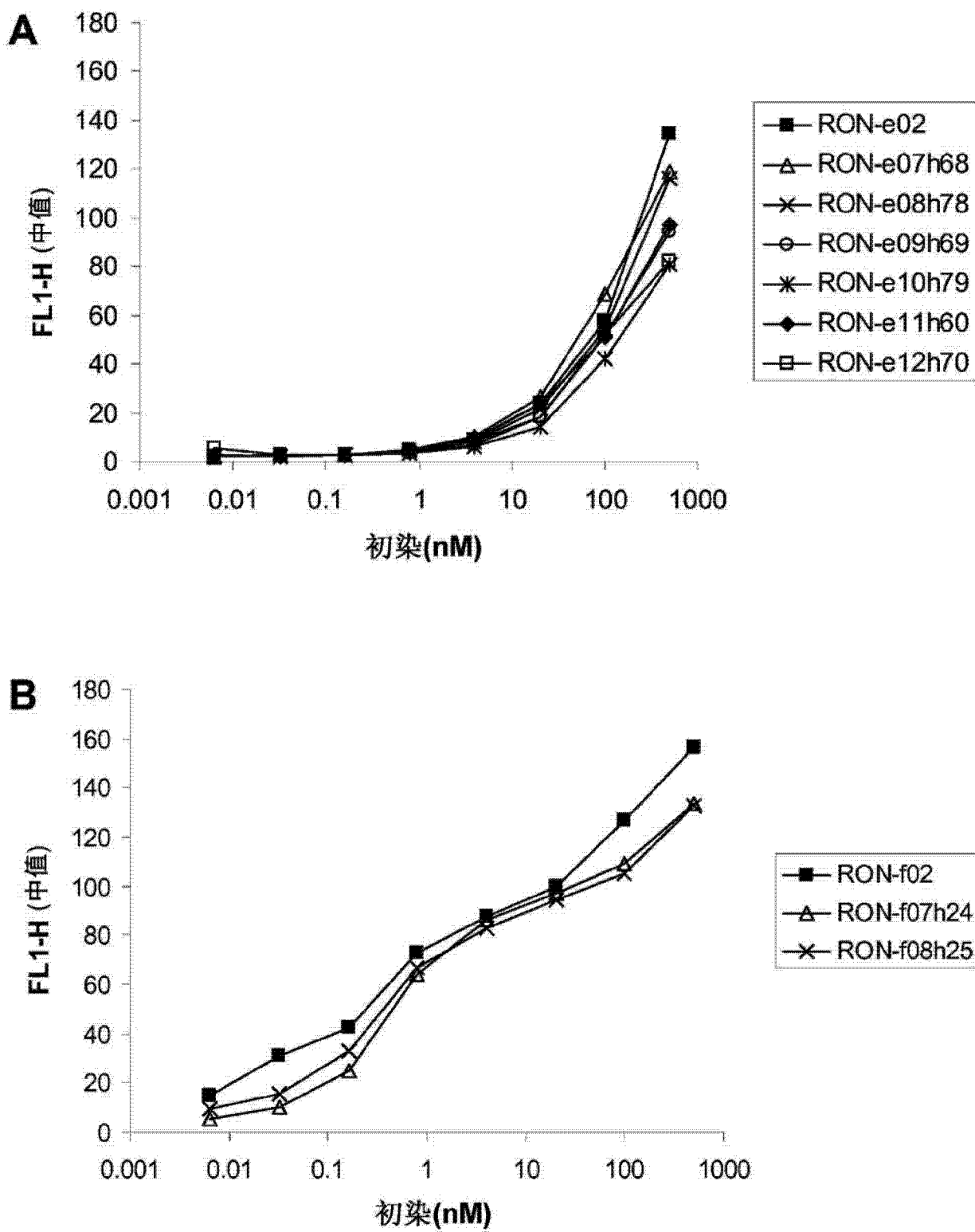


图 7

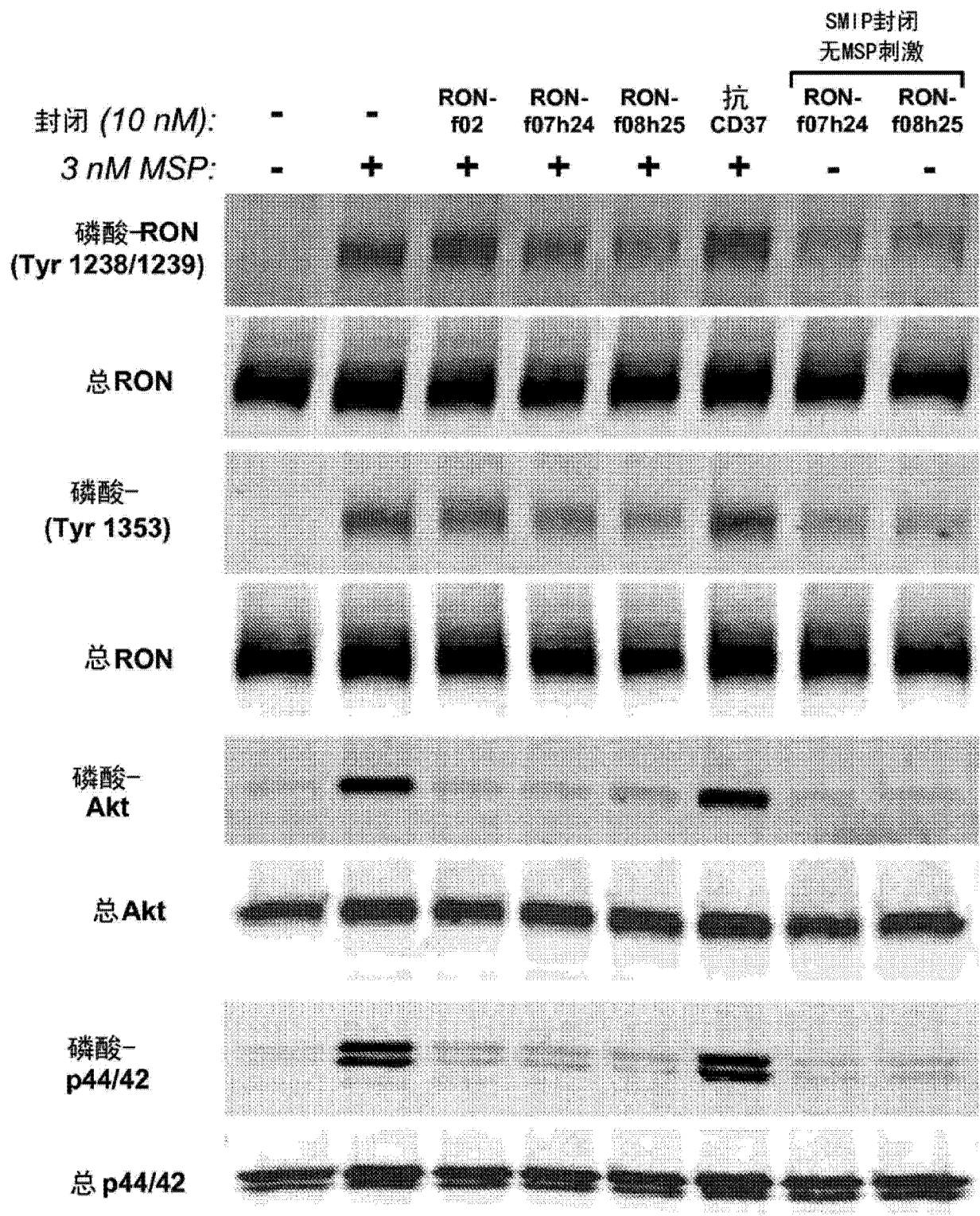


图 8A

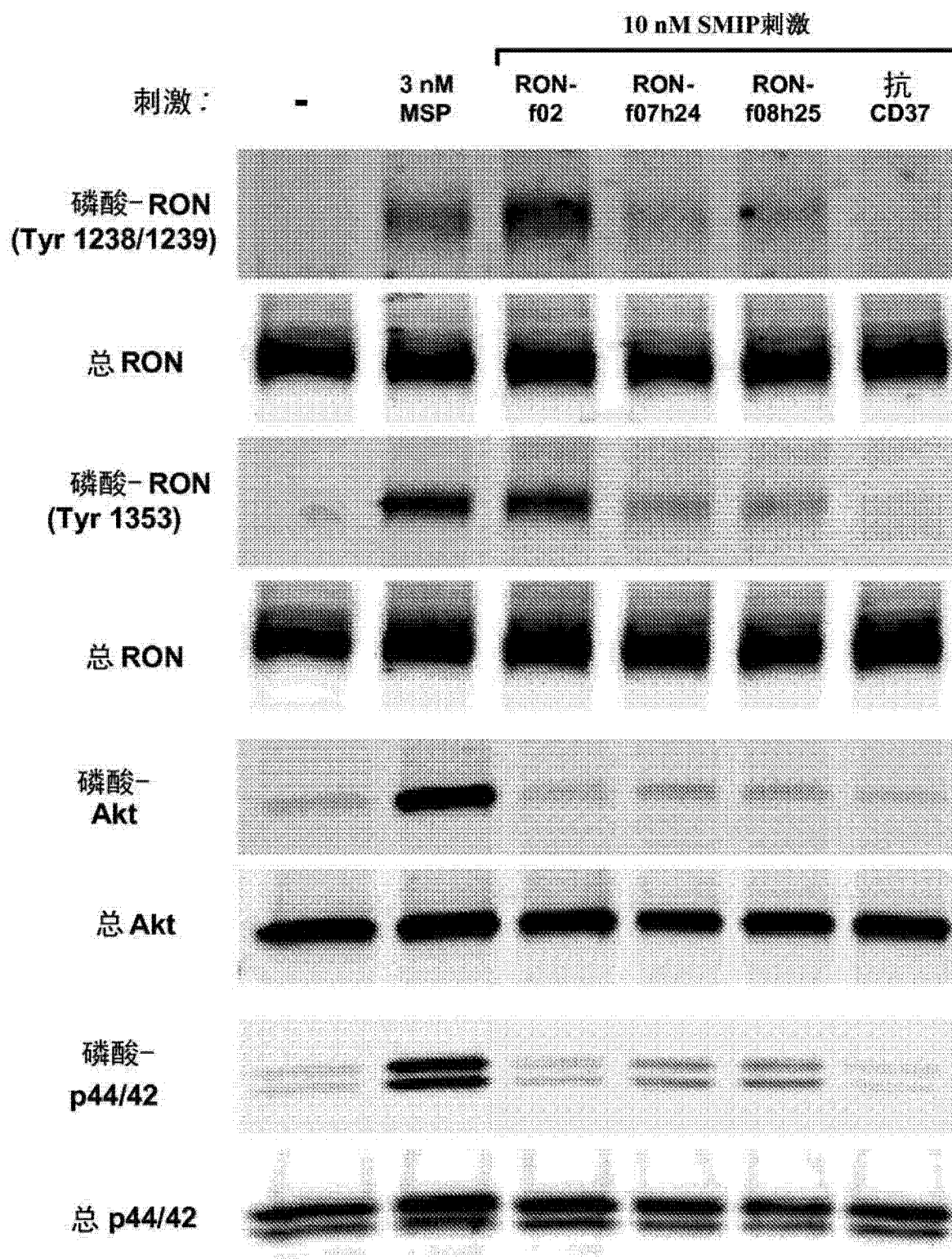


图 8B

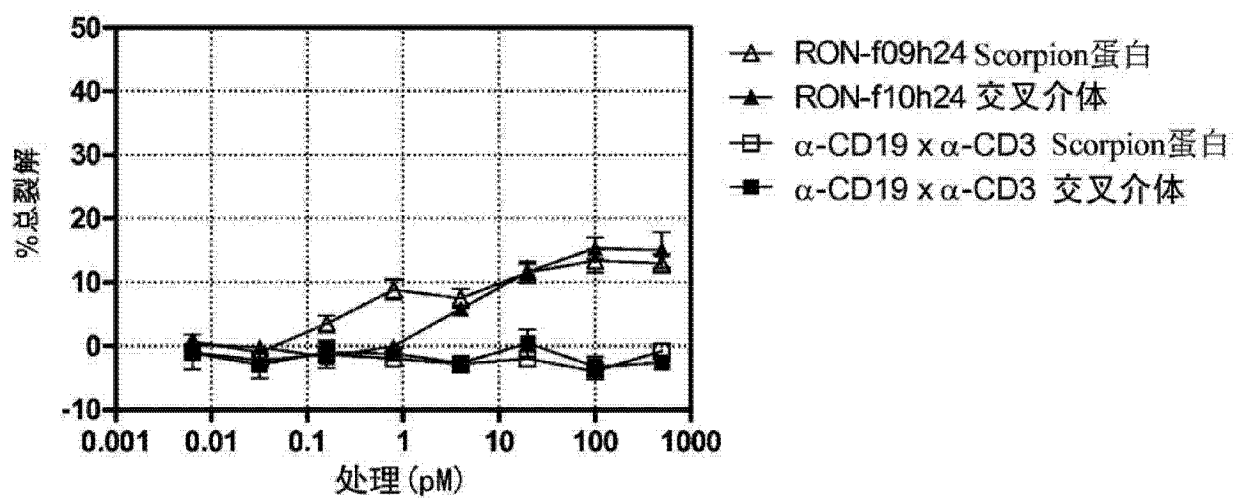
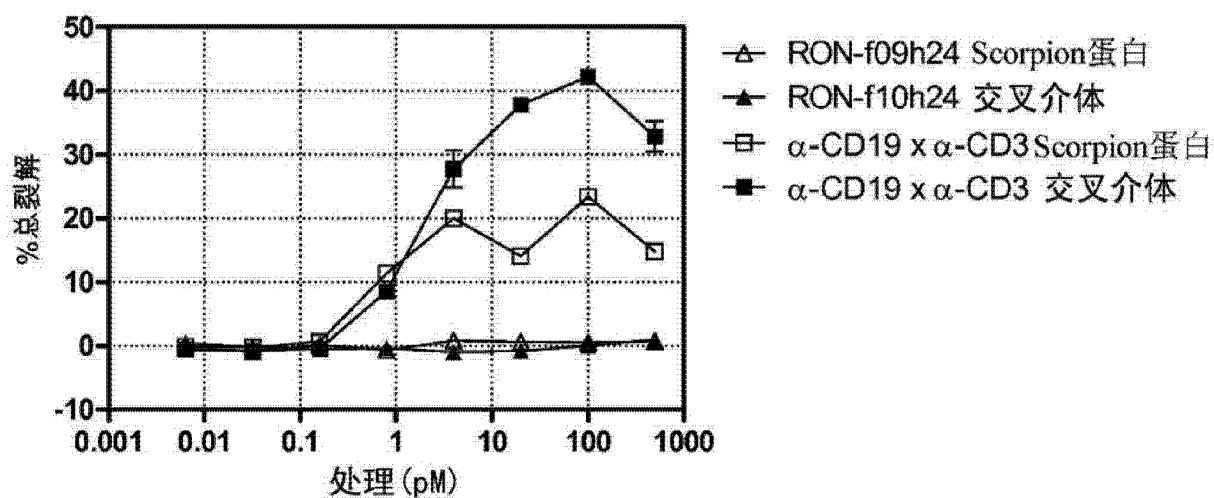
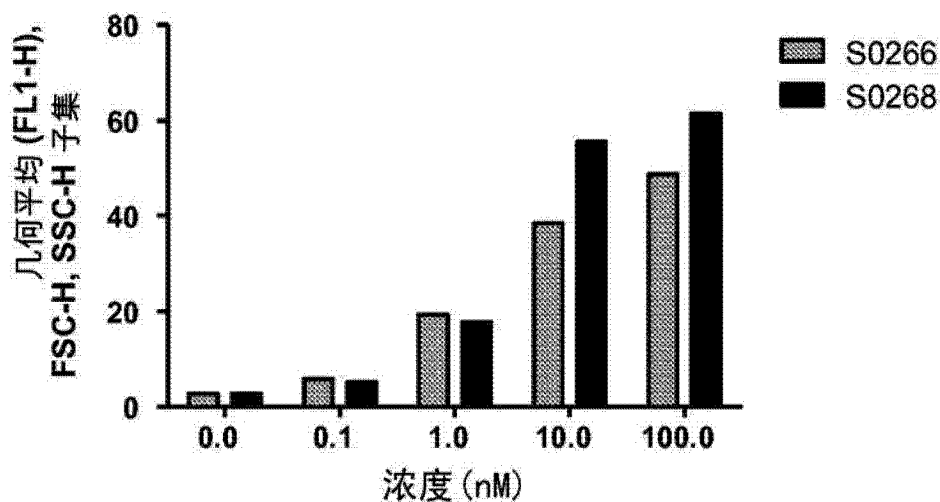
A**B**

图 9

双特异性 α RON $\times$ α CD3 构建物
与MDA-MB-453细胞的结合

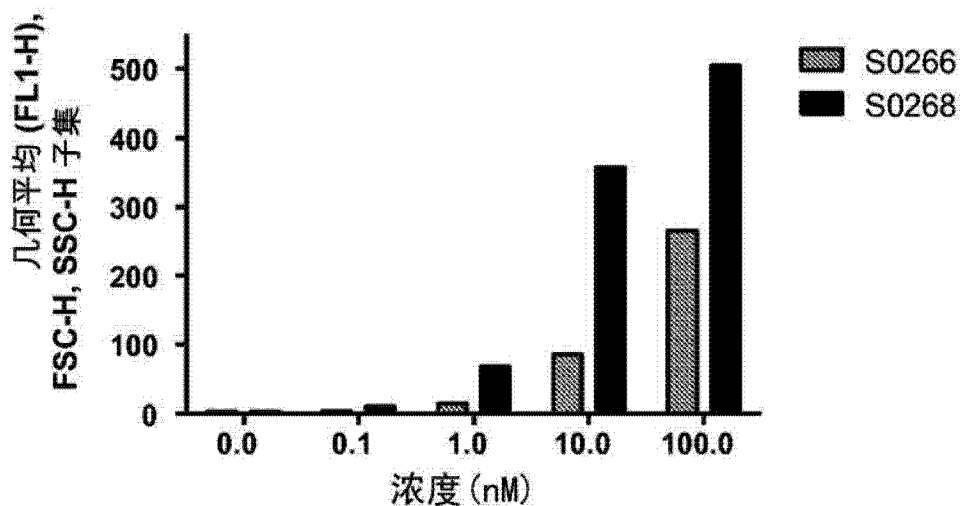


S0266 = α RON $\times$ α CD3 Scorpion蛋白

S0268 = α RON $\times$ α CD3 交叉介体

图 10A

双特异性 α RON $\times$ α CD3 构建物
与分离T细胞的结合



S0266 = α RON $\times$ α CD3 Scorpion蛋白

S0268 = α RON $\times$ α CD3 交叉介体

图 10B

Daudi细胞的T细胞引导细胞毒性(4小时)

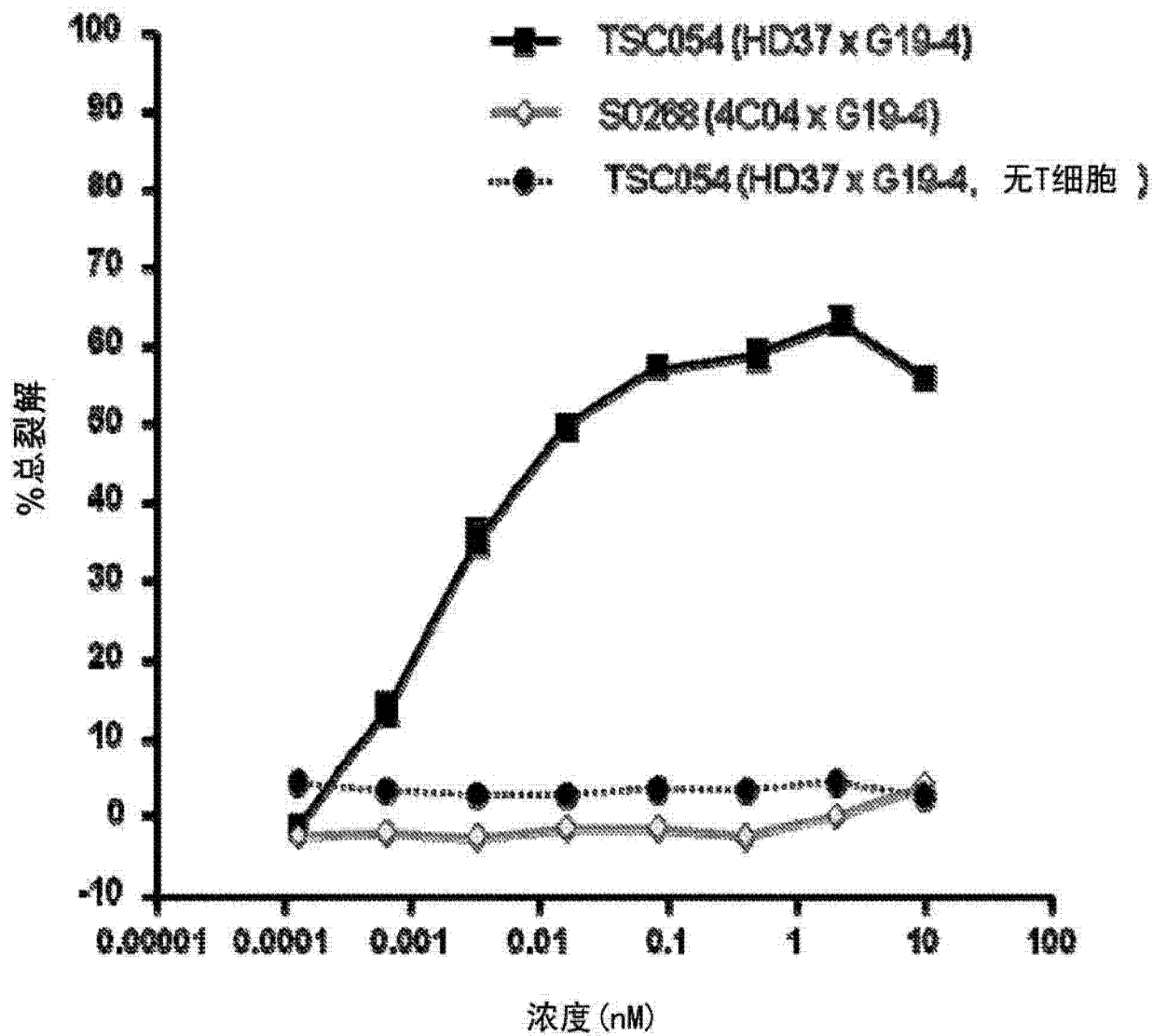


图 11A

BxPC-3细胞的T细胞引导细胞毒性(4小时)

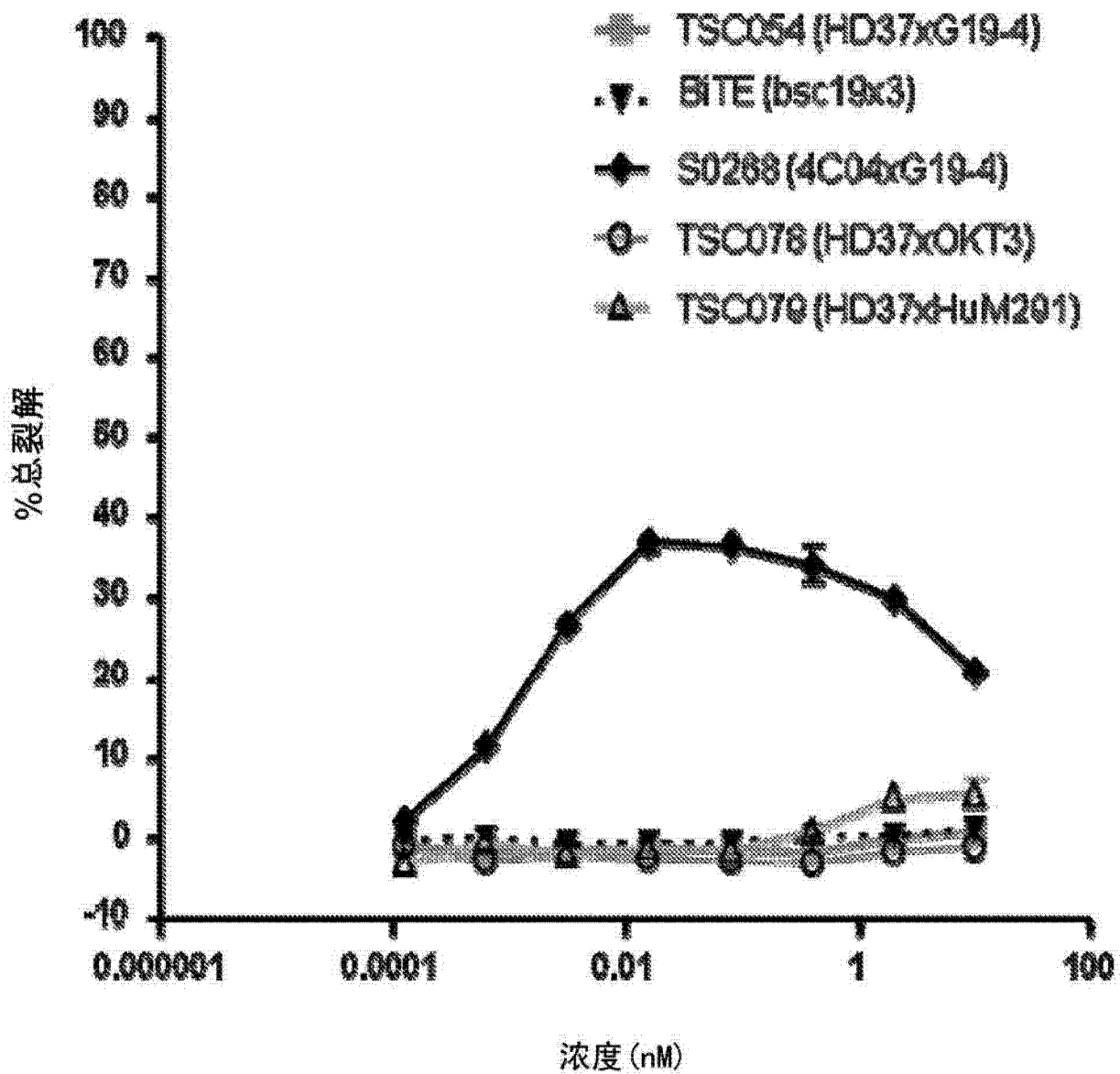


图 11B