



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101990439 A

(43) 申请公布日 2011.03.23

(21) 申请号 200880105251.9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.07.07

A61K 39/395(2006.01)

(30) 优先权数据

60/948,397 2007.07.06 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.03.02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/069378 2008.07.07

(87) PCT申请的公布数据

W02009/023386 EN 2009.02.19

(71) 申请人 特鲁比昂药品公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 杰弗里·A·莱德伯特

威廉·布莱蒂

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

权利要求书 2 页 说明书 85 页 附图 16 页

(54) 发明名称

具有置于 C 末端的特异性结合结构域的结合肽

(57) 摘要

提供了具有如下通用格式化结构的特异性结合肽:连接到包含 CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白来源的恒定亚区的任选的 N-末端铰链区,随后是 PIMS 连接子肽和至少一个特异性结合结构域,以及提供了编码核酸、载体和宿主细胞。还提供了制备所述肽的方法,以及利用所述肽治疗或预防多种疾病、病症或病况和改善与所述疾病、病症或病况相关的至少一种症状的方法。

1. 特异性结合蛋白,其包含:
来自抗体的恒定亚区;
置于所述恒定亚区 C-末端的 PIMS 连接子;以及
包含 V_L 结构域和 V_H 结构域的至少一个的特异性结合结构域,所述特异性结合结构域置于所述 PIMS 连接子的 C-末端,其中所述特异性结合蛋白特异结合至少一种靶标并显示出抗体分子的至少一种效应器功能。
2. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,其中所述恒定亚区包含 C_{H2} 结构域和 C_{H3} 结构域,其中所述 C_{H2} 结构域和所述 C_{H3} 结构域的至少一个是完整的抗体结构域。
3. 如权利要求 2 所述的特异性结合蛋白,其中所述抗体结构域选自 IgG、IgE、IgD、IgA 和 IgM 抗体结构域。
4. 如权利要求 2 所述的特异性结合蛋白,其中所述 C_{H2} 结构域和所述 C_{H3} 结构域的至少一个包含选自 SEQ ID NO :377 和 SEQ IDNO :379 的序列。
5. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,其中所述效应器功能是抗体依赖的细胞的细胞毒作用或补体介导的细胞毒作用。
6. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,其中所述 PIMS 连接子来自 II 型 C-凝集素的茎区。
7. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,其中所述 PIMS 连接子选自抗体铰链区、CD72 茎区、NKG2a 和 NKG2a C18S。
8. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,其中所述 PIMS 连接子是选自 IgG、IgA、IgD、IgE 铰链和其变异体的抗体铰链区。
9. 如权利要求 8 所述的特异性结合蛋白,其中所述铰链是选自人 IgG1、人 gG2、人 IgG3、人 IgG4 和其人变异体的抗体铰链区。
10. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,其中所述 PIMS 连接子具有用于形成链间二硫键的单一半胱氨酸残基。
11. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,其中所述 PIMS 连接子具有用于形成链间二硫键的两个半胱氨酸残基。
12. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,其中所述 PIMS 连接子包含选自 SEQ ID NOS : 61-118 的序列。
13. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,其中所述蛋白特异结合选自 CD3、CD19、CD20、CD28、CD37 和 DR 的靶标。
14. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,其中所述蛋白选自 W0001、W0002、W0003、W0004、W0005、W0006、W0007、W0008、W0009、W0011、W0012、W0023、W0024、W0025、W0028、W0029、W0030、W0031、W0035、W0036、W0041、W0042、W0044、W0045、W0050、W0051、W0052、W0053、W0055、W0056、W0057、W0083、W0087、W0094、W0095、W0096 和 W0097。
15. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,其中所述 V_L 结构域和所述 V_H 结构域由结构域间连接子分开。
16. 如权利要求 15 所述的特异性结合蛋白,其中所述结构域间连接子的结构是 $(Gly_4Ser)_n$,其中 $n = 1-5$ 。
17. 如权利要求 15 所述的特异性结合蛋白,其中所述结构域间连接子包含选自下述的

序列:SEQ ID NO:544、SEQ ID NO:545、SEQ IDNO:184、SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ IDNO:245、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:539 和 SEQ IDNO:540。

18. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,其中所述 V_L 结构域和所述 V_H 结构域的至少一个包含选自下述的序列:SEQ ID NO:2 的残基 23-128、SEQ ID NO:2 的残基 145-265、SEQ ID NO:2 的残基 520-640、SEQ ID NO:2 的残基 661-772、SEQ ID NO:28 的残基 508-629、SEQ IDNO:28 的残基 647-754、SEQ ID NO:30 的残基 508-629、SEQ ID NO:30 的残基 652-759、SEQ ID NO:44 的残基 21-127、SEQ ID NO:44 的残基 143-264、SEQ ID NO:354 的残基 1-121 和 SEQ ID NO:354 的残基 134-239。

19. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,还包含置于所述亚区 N-末端的铰链。

20. 如权利要求 19 所述的特异性结合蛋白,其中所述铰链包含与置于所述恒定亚区和所述特异性结合结构域之间的所述 PIMS 连接子相同的序列。

21. 如权利要求 1 所述的特异性结合蛋白,还包含置于所述恒定亚区 C-末端的至少另一个特异性结合结构域。

22. 如权利要求 21 所述的特异性结合蛋白,其中所述特异性结合结构域的每个都结合相同的靶标。

23. 制备权利要求 1 所述特异性结合蛋白的方法,其包括:

将包含编码权利要求 1 所述的特异性结合蛋白的多核苷酸的细胞与培养基接触;以及在适于所述多核苷酸表达的条件下孵育所述培养基中的所述细胞。

24. 治疗选自癌症、炎症和自身免疫病症的病况的方法,包括将有效量的权利要求 1 所述的特异性结合蛋白给予有需要的生物体。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其中所述生物体是人。

26. 改善选自癌症、炎症和自身免疫病症的病况的症状的方法,包括将有效量的权利要求 1 所述的特异性结合蛋白给予有需要的生物体。

27. 如权利要求 26 所述的方法,其中所述生物体是人。

28. 权利要求 1 所述的特异性结合蛋白在制备治疗选自癌症、炎症和自身免疫病症的病况的药物中的用途。

29. 如权利要求 28 所述的用途,其中所述生物体是人。

30. 权利要求 1 所述的特异性结合蛋白在制备改善病况的症状的药物中的用途,所述病况选自癌症、炎症和自身免疫病症。

31. 如权利要求 30 所述的用途,其中所述生物体是人。

具有置于 C 末端的特异性结合结构域的结合肽

技术领域

[0001] 本发明一般地涉及特异性结合分子及其治疗应用的领域。

背景技术

[0002] 在健康的哺乳动物体内,免疫系统保护机体免受外源物质和病原体的伤害。然而,在某些情形下,免疫系统出错,导致创伤性损害和/或疾病。例如,B细胞能够产生识别自身蛋白而不识别外源蛋白的抗体,从而导致产生诸如红斑狼疮、风湿性关节炎等自身免疫性疾病特有的自身抗体。在另外的情形下,免疫系统在抵抗外源物质方面的典型有益作用是起反作用的,例如在器官移植之后。已经认识到了哺乳动物免疫系统,尤其是人类免疫系统的功能,并且已努力调控该系统以避免或改进对健康的有害影响,所述有害影响由免疫系统在异常环境中的正常机能(例如,器官移植)或由免疫系统在其他方面明显正常的环境中的异常机能(例如,自身免疫性疾病恶化)导致。另外,已经努力对免疫系统进行利用以提供建立在抗体特异性识别及特异性结合靶标的能力基础上的大量靶标特异性诊断和治疗方法学。

[0003] 免疫系统保护机体的一种途径是通过产生被称为 B 淋巴细胞或 B 细胞的特化细胞。B 细胞产生结合外源物质或病原体的抗体,在某些情形下产生介导外源物质或病原体破坏的抗体。然而,在某些情形下,人类免疫系统,特别是人类免疫系统中的 B 淋巴细胞出错,导致疾病。很多癌症都与 B 细胞的无限增殖有关。还有许多自身免疫性疾病与 B 细胞产生的抗体有关,这些抗体结合到机体某部分,而不是结合外源物质和病原体。另外,有很多自身免疫性疾病和炎症性疾病在发病机理中与 B 细胞有关。例如,通过错误地将 B 细胞呈递给 T 细胞或其他与 B 细胞相关的途径。例如,B 细胞缺陷的具有自身免疫倾向的小鼠不会发生自身免疫性肾脏疾病、血管炎或自身抗体。(Shlomchik et al., J Exp. Med. 1994, 180 : 1295-306)。有趣的是,同样这些具有自身免疫倾向的小鼠,如果具有 B 细胞但在免疫球蛋白产生方面有缺陷时,实验诱导下会发生自身免疫性疾病 (Chan et al., J Exp. Med. 1999, 189 : 1639-48)。这表明,B 细胞在自身免疫性疾病的发生中起着不可或缺的作用。

[0004] 可以通过其表面的分子鉴定 B 细胞。CD20 是第一个通过单克隆抗体鉴定的人类 B 细胞谱系特异性表面分子。它是非糖基化、疏水性、分子量为 35kDa 的 B 细胞跨膜磷蛋白,其氨基端和羟基端都位于细胞内。Einfeld et al., EMBO J. 1988, 7 : 711-17。CD20 由所有正常的成熟 B 细胞表达,但不被前体 B 细胞或浆细胞表达。CD20 的天然配基还没有被鉴定,CD20 在 B 细胞内的生物学功能尚未被完全理解。

[0005] 另一个 B 细胞谱系特异性表面分子是 CD37。CD37 是一种高度糖基化的、分子量为 40-52kDa 的蛋白,属于四次跨膜的细胞表面抗原家族。它四次跨越细胞膜,形成两个细胞外环,并将其氨基端和羟基端暴露在细胞质中。CD37 在正常的抗体生成 B 细胞 (sIg+) 上高度表达,但不在前-B 细胞或浆细胞上表达。CD37 在静止和活化的 T 细胞、单核细胞和粒细胞的表达水平低;在 NK 细胞、血小板或红细胞上没有可检测的表达。参见, Belov et al., Cancer Res., 61(11) : 4483-4489 (2001) ; Schwartz-Albiez et al., J. Immunol., 140(3) :

905-914(1988);以及 Linket al., J. Immunol., 137(9):3013-3018(1988)。除了正常的 B 细胞外,几乎所有 B 细胞来源的恶性肿瘤(malignancies)都是 CD37 表达阳性的,包括 CLL、NHL 和毛细胞白血病(Moore, et al. 1987; Merson and Brochier 1988; Faure, et al. 1990)。CD37 参与 B 细胞功能的调节,因为发现 CD37 缺失的小鼠具有低水平的免疫血清 IgG1,并且针对病毒抗原和模型抗原的体液免疫应答被削弱。它看起来是作为非经典共刺激分子或通过 MHC II 类分子形成复合物直接影响抗原呈递起作用的。参见 Knobeloch et al., MoI. Cell. Biol., 20(15):5363-5369(2000)。

[0006] B 细胞谱系特异性表面分子,如 CD37 和 CD20,自身能够成为抗体的靶标,所述抗体结合引起癌症和自身免疫性疾病的表面有 CD37 和 CD20 的 B 细胞或介导对其的破坏。已出现了建立在这一概念基础上的研究和药物开发。被称为“免疫疗法”的在非人的动物体内制备的(或基于制备的抗体)结合 CD37 或 CD20 的抗体被给予患者,使引起癌症或自身免疫性疾病的 B 细胞衰竭。

[0007] 单克隆抗体技术和遗传工程方法已经促进了利用免疫球蛋白分子诊断和治疗人类疾病的发展。免疫球蛋白的域结构顺从工程学,因为抗原结合结构域和提供了效应器功能的结构域可以在免疫球蛋白种类和亚类之间交换。免疫球蛋白的机构和功能综述于例如 Harlow et al., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual(抗体:实验室手册), Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor(1988)中。有关重组工程抗体技术各个方面的广泛介绍和详细信息能够在教科书“Recombinant Antibodies(重组抗体)”(John Wiley&Sons, NY, 1999)中找到。对详细的抗体工程实验室操作方案的全面收录能够在 R. Kontermann 和 S. Dübel (eds.), “The Antibody Engineering Lab Manual(抗体工程实验室手册)”(Springer Verlag, Heidelberg/New York, 2000)中找到。

[0008] 免疫球蛋白分子(缩写为 Ig)是一种多聚体蛋白质,通常由两个相同的轻链多肽和两个相同的重链多肽(H_2L_2)组成,所述多肽通过链间二硫键,即相邻半胱氨酸残基的巯基间的共价键连接成大分子复合体。基于其重链组成,确定了 5 种人免疫球蛋白种类,被命名为 IgG, IgM, IgA, IgE 和 IgD。IgG 类和 IgA 类抗体被进一步分为亚类,即分别为 IgG1, IgG2, IgG3 和 IgG4,以及 IgA1 和 IgA2。链内二硫键连接同一多肽链的不同区域,其形成了与邻近的氨基酸一起组成免疫球蛋白结构域的环。在氨基末端部分,每一轻链和每一重链都具有单一的可变区,其氨基酸组成在不同抗体之间显示出相当大的变异。轻链可变区 V_L 具有单一的抗原结合结构域并与重链 V_H (也含有单一的抗原结合结构域)的可变区联合以形成免疫球蛋白的抗原结合部位 Fv。

[0009] 除可变区外,每一全长抗体链都有包含一个或多个结构域的恒定区。轻链有包含单一结构域的恒定区。因此,轻链有一个可变结构域和一个恒定结构域。重链有包含几个结构域的恒定区。IgG、IgA 和 IgD 抗体中的重链有三个结构域,分别被命名为 C_{H1} , C_{H2} 和 C_{H3} ; IgM 和 IgE 抗体中的重链有四个结构域,分别被命名为 C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} 和 C_{H4} 。因此,重链有一个可变结构域以及三或四个恒定结构域。值得注意的是,这些结构域在所有已知物种中的不变的组织结构,即包含一个或多个结构域的恒定区位于或接近免疫球蛋白分子的轻链和重链的 C 末端;可变结构域位于朝向轻链和重链 N 末端一侧。免疫球蛋白的结构和功能被综述于例如 Harlow et al., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual(抗体:实验室手册), Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor(1988)中。

[0010] 免疫球蛋白的重链还能被分成三个功能区：Fd 区（包含 V_H 和 C_{H1} 的片段，即重链的两个 N 末端结构域）、铰链区和 Fc 区（“可结晶片段”区）。Fc 区包含可以和细胞上的免疫球蛋白受体以及补体级联反应中的初始成分相互作用的结构域。因此，通常认为 Fc 区或片段负责免疫球蛋白的效应器功能，诸如 ADCC（抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用）、CDC（补体依赖性细胞毒作用）和补体固定、结合 Fc 受体、与一种缺失 Fc 区的多肽相比的体内更长的半衰期、蛋白 A 结合以及甚至可能的胎盘转移。Capon et al., Nature, 337 :525-531, (1989)。此外，含有 Fc 区的多肽允许多肽的二聚体化 / 多聚体化。这些术语也可以用于其它免疫球蛋白的类似区域。

[0011] 虽然所有的人免疫球蛋白的同种型共同包含一个可识别结构，但每一同种型都展示出不同模式的效应器功能。作为非穷尽性举例，IgG 中和毒素和病毒，调理、固定补体 (CDC)，并且参与 ADCC。相比之下，IgM 中和血源性病原体，并参与调理作用。IgA 与其分泌片相连时，被分泌并提供对微生物经粘膜感染的主要防御；它也中和毒素以及支持调理作用。IgE 介导炎症反应，主要参与招募其他所需细胞以引发完整的应答。已知 IgD 提供免疫调节功能，调控 B 细胞的活化。这些同种型效应器功能的描述提供了存在于人同种型中的差异的非全面说明。

[0012] IgG、IgA、IgD 和 IgE 类抗体中存在的铰链区作为柔性间隔子起作用，使 Fab 部分在空间内自由移动。与恒定区相比，铰链结构域在结构上是多样化的，其序列和长度在免疫球蛋白种类和亚类之间均不同。例如，铰链区的长度和柔性在 IgG 亚类之间不同。IgG1 的铰链区包含氨基酸 216-231，并且因为它是自由柔韧的，Fab 片段能够绕着它们的对称轴旋转并在以两个重链间二硫键中的第一个为圆心的范围内移动。IgG2 具有比 IgG1 的铰链更短的铰链，有 12 个氨基酸残基和四个二硫键。IgG2 的铰链区缺乏甘氨酸残基、较短并包含刚性的聚脯氨酸双螺旋，其通过额外的重链间二硫键来稳定。这些特性限定了 IgG2 分子的柔性。IgG3 与其他亚类的不同之处在于其独特的延长的铰链区（约为 IgG1 铰链的 4 倍长），包含 62 个氨基酸（包括 21 个脯氨酸和 11 个半胱氨酸），并形成了柔性的聚脯氨酸双螺旋。在 IgG3 中，Fab 片段距离 Fc 片段相对较远，产生了柔性更大的分子。IgG3 中延长的铰链也解释了 IgG3 相比于其他亚类的更大分子量。IgG4 的铰链区比 IgG1 的铰链区短，且其柔性介于 IgG1 和 IgG2 的柔性之间。据报道，铰链区的柔性以 $IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2$ 的顺序降低。四种 IgG 亚类在它们效应器功能方面也彼此不同。这一差异与结构上的不同相关，所述结构上的不同包括可变区、Fab 片段和恒定 Fc 片段之间相互作用的不同。

[0013] 按照晶体学研究，免疫球蛋白铰链区还可以在功能上细分为三个区：上游铰链区、核心区和下游铰链区。Shin et al., 1992 Immunological Reviews (免疫学综述) 130 :87。上游铰链区包括从 C_{H1} 的羧基端至限制运动的铰链中的第一个残基的氨基酸，所述第一残基通常是在两条重链间形成链间二硫键的第一个半胱氨酸残基。上游铰链区的长度与抗体的区段柔性相关。核心铰链区包含重链间二硫键，下游铰链区连接 C_{H2} 结构域的氨基末端并包括 C_{H2} 中的残基。同上。人 IgG1 的核心铰链区包含序列 Cys-Pro-Pro-Cys，其通过形成二硫键二聚化时形成被认为作为支枢的环状八肽，由此提供柔性。铰链区还可以包含一个或多个糖基化位点，其包括许多结构上明显不同的位点类型用于碳水化合物连接。例如，IgA1 在铰链区 17 个氨基酸区段内包含 5 个糖基化位点，赋予了铰链区多肽对肠蛋白酶的抗性，这被视为分泌型免疫球蛋白的优势特性。

[0014] 免疫球蛋白铰链区多肽序列的结构和柔性允许的构象变化还可以影响抗体 Fc 部分的效应器功能。与 Fc 区相关的三大类效应器功能包括 (1) 经典补体级联反应的活化, (2) 与效应器细胞的相互作用, 以及 (3) 免疫球蛋白的区室化 (compartmentalization)。不同的人 IgG 亚类在固定补体或者活化和放大补体级联步骤中的相对功效不同。参见, 例如, Kirschfink, 2001 *Immunol. Rev.* 180 :177 ;Chakraborti et al, 2000 *Cell Signal* 12 :607 ;Kohl et al. , 1999 *Mol. Immunol.* 36 :893 ;Marsh et al. , 1999 *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 8 :557 ;Speth et al, 1999 *Wien Klin. Wochenschr.* 111 :378。

[0015] 常规抗体的 H₂L₂ 结构的例外情况出现在骆驼科动物 (骆驼, 单峰驼和无峰驼 (llamas) ;Hamers-Casterman et al. , 1993 *Nature* 363 :446 ;Nguyen et al. , 1998 *J. Mol. Biol.* 275 :413)、护士鲨 (Roux et al. , 1998 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95 :11804) 以及斑点兔银鲛 (Nguyen, et al. , 2002 *Immuno genetics* 54(1) :39-47) 中发现的一些同种型免疫球蛋白中。这些抗体显然能够仅利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型二聚体 (称为“重链抗体”或“HCAbs”)。尽管抗体技术在疾病诊断和治疗中有优势, 但在开发完整抗体作为诊断和 / 或治疗试剂的技术中有不利的方面。完整抗体是大蛋白结构, 例如包含两条轻链和两条重链的 IgG 同种型的异源四聚体结构。这样的大分子在一些应用中会有空间位阻影响。例如, 在治疗实体瘤时, 完整抗体不容易渗透到肿瘤内部。而且, 完整抗体相对大的体积给确保此类分子体内给药不诱导免疫反应提出了挑战。此外, 活性抗体分子的产生通常包括培养能够提供对新生抗体分子进行适当的翻译后加工的重组真核细胞, 这样的细胞难于培养并难于以提供商业有效产量的活性抗体的方式诱导。

[0016] 最近, 已经构建了较小免疫球蛋白分子以克服与完整免疫球蛋白方法学相关的问题。单链可变抗体片段 (scFv) 包含经由短肽连接到抗体轻链可变结构域的抗体重链可变结构域 (Huston et al. , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85 :5879-83)。由于 scFv 分子的体积小, 它们呈现出比完整免疫球蛋白更为有效的对组织的渗透。抗肿瘤 scFv 显示出比对应的嵌合抗体更为迅速的肿瘤渗透和在肿瘤块中更为均匀的分布 (Yokota et al. , *Cancer Res.* 1992, 52 :3402-08)。

[0017] 尽管 scFv 分子带来了血清疗法的益处, 但这种治疗方法仍存在几种缺点。scFv 从循环中被迅速清除, 这可以降低在正常细胞中的毒性效应, 但这种快速清除阻碍了向靶组织的最小有效量的递送。由于对产量有不利影响的 scFv 表达和分离的困难, 制备充足量的用于患者给药的 scFv 已经受到挑战。使用 scFv 用于治疗的另一不利情况是缺乏效应器功能。可选择地, 已提出, scFv 与诸如毒素的另一分子的融合物能够利用 scFv 的特异性抗原结合活性和小体积将毒素递送到靶组织, 但这种结合物 (conjugates) 或嵌合体的给药剂量受到该种制剂的毒素部分的过多和 / 或非特异毒性的限制。此外, 免疫毒素本身给予宿主时产生高免疫原性, 并且针对免疫毒素产生的宿主抗体限制了对个体进行重复的治疗性处理的潜在有效性。

[0018] 由于诸如体外放射和化疗的非手术癌症治疗缺乏针对癌细胞的特异性而导致的对正常组织和细胞的毒性效应, 这些治疗的功效有限。为了克服这一限制, 已经开发了靶向的治疗方法以增加对需要治疗的细胞和组织进行治疗的特异性。这种靶向方法学体内应用的实例是给予抗体偶联物, 其中抗体经设计特异地识别需要治疗的细胞或组织相关的标志物, 并且在治疗癌症的情形下将所述抗体偶联到诸如毒素的治疗剂。作为全身性药剂的抗

体循环到敏感和不良的身体区室,诸如骨髓。在急性放射损伤中,淋巴和造血区室的破坏是发生败血症及随后死亡的主要因素。而且,抗体是大的球状蛋白,在需要治疗的组织中的渗透力差。

[0019] 患有不同终末期疾病的人类患者和非人个体常常需要器官移植。然而,器官移植必须克服受体不利的免疫反应,并通过用影响造血细胞的淋巴和其他部分的细胞毒性试剂抑制受体对外源器官的细胞免疫反应来防御对移植的器官的免疫排斥。移植接受度由受体对这些细胞毒化学试剂的耐受所限制,其中许多化学试剂与抗癌(抗增殖的)剂类似。同样,当使用细胞毒性抗微生物试剂,特别是抗病毒药物,或者当使用用于自身免疫疾病治疗的细胞毒性药物,例如在治疗系统性红斑狼疮时,所述治疗剂对骨髓和机体的造血细胞的毒性效应是其严重的局限性。

[0020] 设计了诸如靶向抗体偶联物疗法的靶向疗法的应用以尽可能地将治疗剂的最大量局限在希望作用的部位,且治疗剂较高的信号-背景比揭示了这种治疗的成功。靶向抗体实例包括抗体或抗体片段、细胞或组织特异性肽以及激素和其他受体结合分子的诊断或治疗剂偶联物。例如,针对与病态的和正常细胞相关的以及与致病微生物相关的不同决定簇的抗体已经用于检测和治疗多种病理状态或病变。在这些方法中,靶向抗体直接与例如在 Hansen et al., U. S. Pat. No. 3,927,193 以及 Goldenberg, U. S. Pat. Nos. 4,331,647, 4,348,376, 4,361,544, 4,468,457, 4,444,744, 4,460,459, 4,460,561, 4,624,846 和 4,818,709 中描述的适当检测或治疗剂偶联。

[0021] 在直接靶向方法,即在其中诊断或治疗剂(“活性剂”)直接偶联到靶向部分的方法中遇到的一个难题是较小部分的偶联物实际结合到靶部位,而大部分偶联物仍留在循环中且以一种方式或另一种方式使靶向偶联物的功能受损。为了确保活性剂最大局域化,通常施用过量的靶向偶联物,确保一些偶联物会保持未结合并有助于活性剂的背景水平。

[0022] 补体依赖性细胞毒作用(CDC)被认为是清除诸如肿瘤细胞的特定靶细胞的重要机制。CDC是由以级联方式彼此激活的一系列酶组成的连续事件。补体在清除抗原中发挥重要作用,这通过补体的四个主要功能实现:(1)局部血管扩张,(2)吸引免疫细胞,特别是吞噬细胞(趋化作用),(3)标记外源生物体用于吞噬作用(调理作用)以及(4)通过膜攻击复合物破坏入侵的生物体(MAC攻击)。主要分子是C3蛋白。它是通过经典途径或替代途径中的组分裂解为两个片段的酶。经典途径由抗体诱导,特别是IgG和IgM,而替代途径由如脂多糖(LPS)的细菌产物非特异地激活。简而言之,C3裂解的产物包括小肽C3a,其对吞噬作用的免疫细胞具有趋化性,并通过导致C5a片段从C5的释放使局部血管扩张。C3的另一部分,C3b,将抗原包被在外源生物体表面,并调理生物体使其被破坏。C3b也可以与补体系统的其他组分作用以形成由C5b、C6、C7、C8和C9组成的MAC。

[0023] 因为免疫系统对任何抗原,即便是最简单的抗原的反应都是“多克隆的”,即该系统产生了在结合区以及效应器区都具有多种结构的抗体,抗体用于人类治疗中存在难题。已经使用两种方法试图降低免疫原性的抗体的问题。第一种方法是制备嵌合抗体,其中将小鼠单克隆抗体的抗原结合部分(可变区)融合到人抗体的效应器部分(恒定区)。在第二种方法中,通过称为互补决定簇(CDR)移植或“人源化(humanization)”的技术改造抗体。这种方法已被进一步改进以包括称为“整形(reshaping)”(Verhoeyen, et al, 1988Science 239:1534-1536;Riechmann, et al, 1988Nature 332:323-337;Tempest, et

al, *Bio/Technol* 1991; 9:266-271)、“高度嵌合化 (hyperchimerization)” (Queen, et al, 1989 *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10029-10033; Co, et al, 1991 *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2869-2873; Co, et al, 1992 *J Immunol* 148:1149-1154) 和“镶饰 (veneering)” (Mark, et al, In: Metcalf BW, Dalton BJ, eds. *Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential* (细胞粘附: 分子定义到治疗潜能). New York: Plenum Press, 1994:291-312) 的改变。

[0024] 在试图开发和市售更有效的治疗剂和缓解剂中, 多种抗体技术已经受到关注。不幸的是, 存在的问题影响了这些治疗的前景。例如, 用利妥昔单抗 (Rituximab) 治疗的大多数癌症患者一般在约 6-12 月内复发, 并已报道了在输注利妥昔单抗 24 小时内出现致命的输液反应。曲妥珠单抗 (Trastuzumab) 给药导致心功能不全、充血性心衰以及严重超敏反应 (包括过敏症)、输液反应和肺部事件的出现。达利珠单抗 (Daclizumab) 免疫抑制治疗使发生淋巴组织增生病症和机会性感染的风险增加。据报道, 在接受吉妥单抗 (gemtuzumab) 的患者中出现了由严重的肝中毒和静脉阻塞疾病 (VOD) 导致的肝衰引起的死亡。也在接受阿仑单抗 (Alemtuzumab) 的患者中报道了肝中毒。

[0025] 癌症包括多种多样的疾病, 影响全世界大约四分之一的人口。恶性细胞迅速和不受调节的增殖是包括血液恶性肿瘤在内的多种类型癌症的特点。尽管血液恶性疾病患者已受益于过去二十年癌症治疗的进展 (Multani et al., 1998 *J. Clin. Oncology* 16:3691-3710), 且缓解期已经延长, 但大多数患者仍会复发并死于他们所患疾病。用细胞毒性药物治疗的障碍包括, 例如肿瘤细胞抗性和化疗的高毒性, 其在许多患者中妨碍了最佳的给药。

[0026] 据报道, 使用嵌合的 CD20 单克隆抗体治疗低分级或滤泡性 B 细胞淋巴瘤患者引发患者部分或完全的应答。McLaughlin et al., 1996 *Blood* 88:90a (摘要, suppl. 1); Maloney et al., 1997 *Blood* 90:2188-95。然而, 如上所述, 肿瘤通常在 6 个月至 1 年内复发。需要在血清学治疗中作出进一步的改进以例如, 在低分级 B 细胞淋巴瘤诱导更长期的应答, 以及在高分级淋巴瘤和其他 B 细胞疾病中进行有效的治疗。

[0027] 自身免疫疾病包括自身免疫甲状腺疾病, 其包括格雷夫斯氏病 (Grave's disease) 和乔本氏甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)。另一种自身免疫疾病是类风湿性关节炎 (RA), 其是特征为导致肿胀、疼痛和功能丧失的关节炎的慢性疾病。RA 由包括最初的感染或损伤、异常免疫反应和遗传因素在内的事件组合导致的。尽管自身反应性 T 细胞和 B 细胞存在于 RA 中, 在 RA 的诊断中使用称为类风湿因子的聚集在关节中的高水平抗体的检测。RA 的目前治疗包括许多管理疼痛和减慢疾病进展的药物。系统性红斑狼疮 (SLE) 是由对包括肾脏、皮肤和关节在内的多器官中的血管反复的损害导致的自身免疫疾病。在 SLE 患者中, T 细胞和 B 细胞错误的相互作用导致攻击细胞核的自身抗体的产生。

[0028] 有几种其他公认的自身免疫疾病。干燥综合征 (Sjogren's syndrome) 是特征为机体产水分的腺体破坏的自身免疫疾病。免疫性血小板减少性紫癜 (ITP) 由与血小板结合并引起血小板破坏的自身抗体导致。多发性硬化症 (MS) 也是一种自身免疫疾病。它的特征为中枢神经系统炎症和使脑、脊髓和身体内的神经细胞纤维绝缘的髓鞘的破坏。重症肌无力 (Myasthenia Gravis, MG) 是慢性自身免疫性神经肌肉病症, 其特征为随意肌肉群无力。MG 由与表达于神经肌肉接头处的乙酰胆碱受体结合的自身抗体导致。所述自身抗体

减少或阻断乙酰胆碱受体,阻止信号从神经到肌肉的传递。银屑病侵袭大约 5 百万人口,其特征为皮肤的自身免疫炎症。硬皮病是结缔组织的慢性自身免疫疾病,也称为系统性硬化。硬皮病的特征为胶原的过量产生,从而导致皮肤的增厚。

[0029] 通过前面的讨论,显然亟需改进的组合物和方法以治疗、缓解或预防包括癌症、炎症和自身免疫疾病的多种疾病、病症和病况。

[0030] 发明概述

[0031] 本发明通过提供蛋白和编码此类蛋白的核酸以及所述蛋白和核酸的制备和诊断及治疗用途,满足了本领域前述需要的至少一种,其中所述蛋白包含经由连接子(PIMS 连接子)连接到至少一个特异性结合结构域的来自抗体分子的恒定亚区(constant sub-region),所述连接子具有来自抗体铰链区、或连接结合结构域的区域、或将结合结构域连接到细胞表面跨膜区或膜锚定的区域的氨基酸序列。本发明的蛋白在本文称为 PIMS 分子。PIMS 连接子具有来自抗体铰链区、或连接结合结构域的区域、或将结合结构域连接到细胞表面跨膜区或膜锚定的区域的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述连接子具有至少一个半胱氨酸残基,其在标准的肽条件下能够参与至少一个二硫键的形成。在一些实施方案中,PIMS 分子还包含来自抗体铰链区的 N-末端结构域,所述铰链区可以与连接恒定亚区和特异性结合结构域的 PIMS 连接子相同或不同。类比于抗体恒定区常规位于抗体链的羧基末端,通常认为将来自抗体的恒定区置于蛋白内部或其 N-末端会妨碍效应器功能。然而,将恒定亚区置于本发明所述多肽或肽链的 N-末端或内部产生的蛋白呈现出相对地不受空间位阻妨碍的效应器功能和特异性结合能力。考虑到本文公开内容,对本领域技术人员显而易见的是,这种结构的蛋白和编码这些蛋白的核酸会有多种应用,包括医学和兽医中的应用。

[0032] 一方面,本发明提供了特异性结合蛋白的优选形式,其包含恒定亚区、置于所述恒定亚区的 C-末端的 PIMS 连接子区以及至少一个特异性结合结构域,所述恒定亚区包含部分或全部的 C_{H2} 结构域和部分或全部的 C_{H3} 结构域,所述特异性结合结构域包含部分或全部的 V_L 结构域和部分或全部的 V_H 结构域,并呈现出与结合伴侣特异结合的能力,该特异性结合结构域置于 PIMS 连接子的 C-末端,其中所述特异性结合蛋白特异结合至少一个靶标并呈现出至少一种抗体分子的效应器功能。因此,在优选的 PIMS 蛋白分子中,PIMS 连接子以及因此恒定亚区置于所述分子的每一特异性结合结构域的 N-末端。在一些实施方案中,C_{H2} 结构域和 C_{H3} 结构域中的至少一个是完整的抗体结构域。本发明适合的特异性结合蛋白包括具有选自 IgG(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD, IgA(IgA1, Ig A2) 和 IgM 抗体结构域的抗体结构域的蛋白。此类分子包括其中 C_{H2} 结构域包含 SEQ ID NO:377 中列出的序列和 / 或 C_{H3} 结构域包含 SEQ ID NO:379 中列出的序列的特异性结合蛋白。恒定亚区提供的示例性效应器功能包括抗体依赖性细胞的细胞毒作用和 / 或补体介导的细胞毒作用。

[0033] 适用于本发明所述的 PIMS 分子中的 PIMS 连接子区可以选自抗体铰链区、II 型 C-凝集素(Lectin)分子的茎区(stalk region)(例如,CD72 茎区)、NKG2a 区、NKG2A C18S 区以及其变体。例如,适合的 PIMS 连接子包括选自 IgG, IgA, IgD 和 IgE 铰链和其变异体的抗体铰链区。例如,PIMS 连接子可以是选自人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 和人 IgG4 以及其变异体的抗体铰链区。在一些实施方案中,PIMS 连接子区具有用于形成链间二硫键的单个半胱氨酸残基。在其他实施方案中,PIMS 连接子具有用于形成链间二硫键的两个半胱氨酸残

基。被考虑用于 PIMS 分子的 PIMS 连接子区包括铰链区,其包含选自 SEQ ID NO :61 至 SEQ ID NO :118 的序列。

[0034] 还被考虑用作 PIMS 分子的 PIMS 连接子区的有 SEQ ID NO :2 的残基 268-281、SEQ ID NO :3 的残基 268-282、SEQ ID NO :5 的残基 268-282、SEQ ID NO :6 的残基 268-282、SEQ ID NO :8 的残基 268-282、SEQ ID NO :9 的残基 268-281、SEQ ID NO :11 的残基 268-282、SEQ ID NO :12 的残基 268-282、SEQ ID NO :14 的残基 268-281、SEQ ID NO :16 的残基 268-282、SEQ ID NO :18 的残基 268-282、SEQ ID NO :20 的残基 268-282、SEQ ID NO :22 的残基 268-282、SEQ ID NO :24 的残基 268-282、SEQ ID NO :26 的残基 268-282、SEQ ID NO :28 的残基 268-282、SEQ ID NO :30 的残基 268-282、SEQ ID NO :32 的残基 279-293、SEQ ID NO :34 的残基 274-288、SEQ ID NO :34 的残基 274-288、SEQ ID NO :36 的残基 261-275、SEQ ID NO :38 的残基 268-283、SEQ ID NO :40 的残基 268-282、SEQ ID NO :42 的残基 270-284、SEQ ID NO :44 的残基 265-279、SEQ ID NO :46 的残基 265-279、SEQ ID NO :48 的残基 265-279、SEQ ID NO :50 的残基 265-279、SEQ ID NO :52 的残基 265-279、SEQ ID NO :54 的残基 265-279、SEQ ID NO :56 的残基 265-279、SEQ ID NO :58 的残基 265-279、SEQ ID NO :60 的残基 268-282、SEQ ID NO :359 的残基 24-38、SEQ ID NO :361 的残基 24-38、SEQ ID NO :363 的残基 24-38、SEQ ID NO :365 的残基 24-38、SEQ ID NO :367 的残基 24-38、SEQ ID NO :369 的残基 24-38、SEQ ID NO :371 的残基 23-37、SEQ ID NO :373 的残基 23-37 和 SEQ ID NO :375 的残基 23-37。此外,序列表中确定的提供铰链区序列的任何氨基酸序列都可以考虑用作本发明所述的 PIMS 分子中的 PIMS 连接子。更一般地,PIMS 连接子可以是铰链样肽结构域,具有能够参与链间二硫键的至少一个自由半胱氨酸。此外,PIMS 连接子是 II 型 C-凝集素分子的茎区。

[0035] 在一些实施方案中,特异性结合蛋白或 PIMS 蛋白(或者多肽)特异地结合多种靶标的一种,所述靶标包括但不限于 CD3, CD19, CD20, CD28, CD37 和 DR。示例性的 PIMS 分子或蛋白是选自下述的特异性结合蛋白:W0001(由例如 SEQ ID NO :358 编码的 SEQ ID NO :359),W0002(由例如 SEQ ID NO :360 编码的 SEQ ID NO :361),W0003(由例如 SEQ ID NO :362 编码的 SEQ ID NO :363),W0004(由例如 SEQ ID NO :364 编码的 SEQ ID NO :365),W0005(由例如 SEQ ID NO :366 编码的 SEQ ID NO :367),W0006(由例如 SEQ ID NO :368 编码的 SEQ ID NO :369),W0007(由例如 SEQ ID NO :370 编码的 SEQ ID NO :371),W0008(由例如 SEQ ID NO :372 编码的 SEQ ID NO :373),W0009(由例如 SEQ ID NO :374 编码的 SEQ ID NO :375),W0011(由例如 SEQ ID NO :390 编码的 SEQ ID NO :391),W0012(由例如 SEQ ID NO :404 编码的 SEQ ID NO :405),W0023(由例如 SEQ ID NO :406 编码的 SEQ ID NO :407),W0024(由例如 SEQ ID NO :408 编码的 SEQ ID NO :409),W0025(由例如 SEQ ID NO :410 编码的 SEQ ID NO :411),W0028(由例如 SEQ ID NO :486 编码的 SEQ ID NO :487),W0029(由例如 SEQ ID NO :480 编码的 SEQ ID NO :481),W0030(由例如 SEQ ID NO :482 编码的 SEQ ID NO :483),W0031(由例如 SEQ ID NO :484 编码的 SEQ ID NO :485),W0035(由例如 SEQ ID NO :489 编码的 SEQ ID NO :490),W0036(由例如 SEQ ID NO :491 编码的 SEQ ID NO :492),W0041(由例如 SEQ ID NO :497 编码的 SEQ ID NO :498),W0042(由例如 SEQ ID NO :499 编码的 SEQ ID NO :500),W0044(由例如 SEQ ID NO :503 编码的 SEQ ID NO :504),W0045(由例如 SEQ ID NO :505 编码的 SEQ ID NO :506),W0050(由例如 SEQ ID NO :452 编码的 SEQ ID NO :453),

W0051(由例如 SEQ ID NO:454 编码的 SEQ ID NO:455), W0052(由例如 SEQ ID NO:456 编码的 SEQ ID NO:457), W0053(由例如 SEQ IDNO:458 编码的 SEQ ID NO:459), W0055(由例如 SEQ ID NO:510 编码的 SEQ ID NO:511), W0056(由例如 SEQ ID NO:493 编码的 SEQ IDNO:494), W0057(由例如 SEQ ID NO:507 编码的 SEQ ID NO:508), W0083(由例如 SEQ ID NO:460 编码的 SEQ ID NO:461), W0087(由例如 SEQ ID NO:495 编码的 SEQ ID NO:496), W0094(由例如 SEQ IDNO:444 编码的 SEQ ID NO:445), W0095(由例如 SEQ ID NO:446 编码的 SEQ ID NO:447), W0096(由例如 SEQ ID NO:448 编码的 SEQ IDNO:449), W0097(由例如 SEQ ID NO:450 编码的 SEQ ID NO:451), DNE090(由例如 SEQ ID NO:392 编码的 SEQ ID NO:393), DNE091(由例如 SEQ ID NO:394 编码的 SEQ ID NO:395), DNE092(由例如 SEQ IDNO:396 编码的 SEQ ID NO:397), DNE093(由例如 SEQ ID NO:398 编码的 SEQ ID NO:399), DNE094(由例如 SEQ ID NO:400 编码的 SEQ IDNO:401) 和 DNE095(由例如 SEQ ID NO:402 编码的 SEQ ID NO:403)。

[0036] 考虑用于 PIMS 分子的 PIMS 连接子包含 SEQ ID NO:148, SEQ IDNO:150, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:156, SEQ IDNO:158, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:164, SEQ IDNO:166, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:174, SEQ IDNO:176, SEQ ID NO:180, SEQ ID NO:182, SEQ ID NO:184, SEQ IDNO:186, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:190, SEQ ID NO:192, SEQ IDNO:194, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:198, SEQ ID NO:200, SEQ IDNO202, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:208, SEQ IDNO:210, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:214, SEQ ID NO:216, SEQ IDNO:222, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:240, SEQ IDNO:242, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:248, SEQ IDNO:541, SEQ ID NO:542, SEQ ID NO:543, SEQ ID NO:544, SEQ IDNO:545, SEQ ID NO:546, SEQ ID NO:547 和 SEQ ID NO:548 中任一个列出的氨基酸序列。其中 V_L 结构域和 V_H 结构域由结构域间连接子分开的特异性结合蛋白也是被考虑的。在这种实施方案中, 结构域间连接子可以显示出 $(Gly_4Ser)_n$ 的结构, 其中 n 优选为 1-5。适用于 PIMS 分子中的示例性的结构域间连接子包括, 但不限于 H11(SEQ IDNO:544)、H12(SEQ ID NO:545)、H17(SEQ ID NO:184)、H45(SEQ IDNO:240) 和 H46(SEQ ID NO:242), 以及基于 $(Gly_4Ser)_n$ 的连接子, 诸如 SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:539 和 SEQ ID NO:540 中公开的那些。此外, 序列表中确定的提供连接子序列的任何氨基酸序列都可以考虑用于本发明所述的 PIMS 分子。

[0037] 在一些实施方案中, 特异性结合蛋白具有 V_L 结构域和 V_H 结构域中的至少一个, 其包含选自如下的序列: SEQ ID NO:2 的残基 23-128、SEQ ID NO:2 的残基 145-265、SEQ ID NO:2 的残基 520-640、SEQ IDNO:2 的残基 661-772、SEQ ID NO:28 的残基 508-629、SEQ ID NO:28 的残基 647-754、SEQ ID NO:30 的残基 508-629、SEQ ID NO:30 的残基 652-759、SEQ ID NO:44 的残基 21-127、SEQ ID NO:44 的残基 143-264、SEQ ID NO:354 的残基 1-121 和 SEQ ID NO:354 的残基 134-239。按照次序, 上述序列是抗-CD20 抗体 V_L (2H7)、抗-CD20 抗体 V_H (2H7)、抗-CD28 抗体 V_H (2E12)、抗-CD28 抗体 V_L (2E12)、抗-CD3 抗体 V_H (G19-4)、抗-CD3 抗体 V_L (G19-4)、抗-CD37 抗体 V_H (G28-1)、抗-CD37 抗体 V_L (G28-1)、抗-CD20 抗体 V_H (2Lm 20-4) 和抗-CD20 抗体 V_L (2Lm 20-4) 的氨基酸序列。本发明包括 PIMS, 其具有与骆驼科动物抗体组成类似的单一特异性结合结构域, 以及更常见的那些来自抗体的特异性结合结构

域的成对的重链和轻链。在后一组成结构中,部分或全部 V_L 结构域以及部分或全部 V_H 结构域在考虑范围内,前提是 PIMS 分子保留与结合伴侣特异结合的能力。而且, V_L 和 V_H 可以被以任一方向排列,并且利用本文公开的连接子肽或能够提供间隔子功能的任何其他氨基酸序列或者其混合, V_L 和 V_H 可以分开至少约 5-8 个氨基酸,所述间隔子功能与具有这两个结构域的 PIMS 的所述两个结构域的相互作用兼容。多特异性 PIMS 具有至少两个特异性结合结构域,与骆驼科抗体的组成结构类似,或者具有至少四个特异性结合结构域,与更常见的哺乳动物抗体成对的 V_H 和 V_L 链的组成结构类似。此外, PIMS 蛋白可以是特异性结合蛋白,如上文所述,还包含置于恒定亚区 N-末端的铰链。在一些实施方案中,铰链包含与置于恒定亚区和特异性结合结构域之间的 PIMS 连接子相同的序列。在一些实施方案中, PIMS 特异性结合蛋白还包含至少另一个置于恒定亚区 C-末端的特异性结合结构域,并且多个特异性结合结构域可以结合相同或不同的靶标。

[0038] 本发明的另一方面涉及制备本文描述的特异性结合蛋白的方法,所述方法包括将包含编码特异性结合蛋白的多核苷酸的细胞与培养基接触;并在适于所述多核苷酸表达的条件下在培养基中孵育所述细胞。

[0039] 本发明的再一方面是治疗选自癌症、炎症和自身免疫病症的病况的方法,其包括给予有所需要的生物体有效量的本文描述的特异性结合蛋白。用于治疗的优选生物体是人。本发明的相关方面是上文描述的特异性结合蛋白在制备用于治疗选自癌症、炎症和自身免疫病症的病况的药物中的用途。所述药物可以适于给予诸如例如人的哺乳动物的脊椎动物,这在本发明的考虑范围内。

[0040] 本发明的另一方面是改善选自癌症、炎症和自身免疫病症的病况的症状的方法,其包括给予有所需要的生物体有效量的本文描述的特异性结合蛋白。同样,优选的生物体是人。本发明的相关方面是上文描述的特异性结合蛋白在制备用于改善选自癌症、炎症和自身免疫病症的病况的症状的药物中的用途。所述药物可以适于给予诸如例如人的哺乳动物的脊椎动物,这在本发明的考虑范围内。

[0041] 本发明的再一方面是本文描述的特异性结合蛋白在制备用于治疗选自癌症、炎症和自身免疫病症的病况的药物中的用途。通过参考下文包括实施例在内的详细说明,本发明的其他特征和优势会被更好地理解。

附图说明

[0042] 图 1 显示了具有效应器功能的特异性结合蛋白或 PIMS 肽的结构示意图。

[0043] 图 2 显示了在 CD16 (高亲和力) 结合 ELISA 分析中 PIMS (W0001)、SMIP (结合 CD20 的 2Lm20-4) 和 Scorpion (S0129, CD20xCD20 多特异性结合蛋白) 结合的比较图,将结合的蛋白的平均荧光强度显示为蛋白浓度的函数。

[0044] 图 3 是在 CD16 (低亲和力) 结合 ELISA 分析中 PIMS (W0001)、SMIP (2Lm20-4) 和 Scorpion (S0129) 结合的比较图,将结合的蛋白的平均荧光强度显示为蛋白浓度的函数。

[0045] 图 4 显示了 PIMS (W0001) 和 SMIP (2E12) 与人外周 CD3+T- 细胞结合的比较图。

[0046] 图 5 显示了通过与 2E12SMIP、2E12PIMS 或者 PE CD3+ 和单独的 GAH 孵育的外周血单核细胞的 PE (藻红蛋白)-标记的 CD3+ 淋巴细胞的 FITC F' 2GAH (山羊抗-人二抗) 染色的平均荧光强度。将平均荧光强度作图为被测定的试剂样品 (2E12SMIP, 2E12PIMS 或对

照 (PE- 偶联的抗 -CD3 抗体 (BD Pharmingen) 和山羊抗 - 人二抗的组合物)) 浓度的函数。

[0047] 图 6 显示了 PIMS 与 WIL2-S 细胞的结合。将结合测量为几何 (geometric) 或 geo 平均荧光强度作为 PIMS(ug/ml) 浓度的函数。实心正方形 :TRU-015(抗 -CD20SMIP), 空心正方形 :2Lm20-4scc, 实心竖立三角形 (upright triangle) :2Lm20-4HL17, 2Lm20-4HL12, 空心竖立三角形 :PIMS20-17, 以及空心菱形 :PIMS20-12。

[0048] 图 7 显示了 PIMS 连接子对抗 -DR PIMS 与 Wil2-S 细胞结合的影响。将结合测量为 geo 平均荧光强度作为暴露于 500, 000 个细胞的蛋白浓度的函数。实心菱形 :M0019(一种 DR SMIP), 实心正方形 :W0035PIMS, 实心竖立三角形 :W0036PIMS, 以及“X” :W0056PIMS。

[0049] 图 8 显示了与 Ramos 细胞的最大结合的百分比 (最大结合百分比), 其作为接触细胞的抗 -CD37PIMS 分子的浓度 (nM) 的函数。实心正方形 :TRU-016, 抗 -CD37SMIP, 实心竖立三角形 :W0012(基于 H7 的 25 个氨基酸的 PIMS 连接子), 实心倒立三角形 :W0023(基于 H7 的 10 个氨基酸的 PIMS 连接子), 实心菱形 :W0024(基于 H7 的 15 个氨基酸的 PIMS 连接子), 实心圆形 :W0025(基于 H7 的 20 个氨基酸的 PIMS 连接子), 空心正方形 :W0094(基于 H65 的 25 个氨基酸的 PIMS 连接子), 空心竖立三角形 :W0095(基于 H65 的 10 个氨基酸的 PIMS 连接子), 空心倒立三角形 :W0096(基于 H65 的 15 个氨基酸的 PIMS 连接子), 以及空心圆形 :W0097(基于 H65 的 20 个氨基酸的 PIMS 连接子)。

[0050] 图 9 显示了多种 PIMS 分子和 SMIP 与 Ramos B 细胞的结合, 这通过利用酶偶联的二抗进行荧光标记后的平均荧光强度显示。空心正方形 :aHer2(抗 -Her2), 实心正方形 :TRU-016(抗 -CD37SMIP), W0028(小鼠抗 -CD37PIMS), 空心菱形 :W0029(半人源化的抗 -CD19PIMS), 实心菱形 :W0030-HD37(小鼠抗 -CD19), 以及实心圆形 :W0031-4G7(小鼠抗 -CD19)。

[0051] 图 10 显示了抗 CD28PIMS 与 Jurkat T 细胞的结合。结合通过平均荧光强度测量, 将 MFI 作图为蛋白浓度 (ug/ml) 的函数。实心菱形 :W0001(H7PIMS 连接子), 实心正方形 :W0050(H9PIMS 连接子), 实心竖立三角形 :W0051(H47PIMS 连接子), 角突起 (corner projections) 的正方形 :W0052, 角突起以及顶部中心突起的正方形 W0053(H62PIMS 连接子), 实心圆形 :W0083(H65PIMS 连接子), 以及纵刻度线 (vertical tick mark) 穿过正方形中心的实心正方形 :抗 -CD28SMIP。

[0052] 图 11 显示了 CD 16Lo 与结合到 Ramos 细胞的 CAS PIMS 的结合。显示了作为 PIMS 浓度函数的几何平均荧光强度。菱形 (1) :TRU-016(抗 -CD37SMIP), 正方形 (2) :W0012, 竖立三角形 (3) :W0023, X- 标记 (4) :W0024, 星号 (5) :W0025, 菱形 (6) :W0094, 纵刻度线 (7) :W0095, 小长方形 (8) :W0096, 以及大长方形 (9) :W0097。

[0053] 图 12 显示了抗 -CD20PIMS 介导的 BJAB B- 细胞的 ADCC。将作为 PIMS 浓度的函数的特异性 BJAB B- 细胞杀伤百分比作图。蓝色菱形 :W0008(10 个氨基酸的 PIMS 连接子), 红色圆形 :W0009(15 个氨基酸的 PIMS 连接子), 绿色竖立三角形 :2Lm20-4SMIP, 黑色圆形 :培养基。

[0054] 图 13 显示了抗 CD28PIMS 介导的 Jurkat T- 细胞的 ADCC。显示了作为 PIMS 浓度的函数的特异性 Jurkat T- 细胞杀伤百分比。菱形 :W0001(抗 -CD28PIMS), 正方形 :2E12Ig(抗 -CD28SMIP), 三角形 :2E12N297D Ig(变异的抗 -CD28SMIP), 以及圆形 :培养基。

[0055] 图 14 显示了抗 -DR PIMS- 介导的 BJAB B- 细胞的 ADCC。提供了作为 PIMS

浓度的函数的特异性 B₂20 细胞杀伤百分比。菱形 :M0019(F3. 3SMIP), 正方形 :W0035(F3. 3H7PIMS), 三角形 :W0036(F3. 3NKG2A PIMS), W0056(F3. 3NKG2A cys K/O PIMS), 带虚线的正方形 :利妥昔单抗, 以及没有连接线的正方形 :培养基。

[0056] 图 15 显示了抗-CD37PIMS- 介导的 B₂20 细胞的 ADCC。将特异性细胞杀伤百分比测量为蛋白浓度 (nM) 的函数。菱形 :W0012(H7PIMS 连接子), 正方形 :W0094(H65PIMS 连接子), 竖立三角形 :TRU-016(抗-CD37SMIP), 带虚线的圆形 :利妥昔单抗, 以及带实线的圆形 :培养基。

[0057] 图 16 显示了在人血清存在时 PIMS- 介导的 Ramos B- 细胞的 CDC。将作为 PIMS 浓度 (ug/ml) 的函数的碘化丙啶阳性细胞的百分比作图。菱形 :2Lm20-4SMIP(人源化抗-CD20SMIP), 正方形 :W0008(10 个氨基酸的 PIMS 连接子 ;HL 结合结构域取向 (orientation)), 竖立三角形 :W0009(15 个氨基酸的 PIMS 连接子 ;HL 结合结构域取向), 实心圆形 :TRU-015(抗-CD20SMIP), 以及空心圆形 :培养基。

[0058] 图 17 显示了抗-DR PIMS 抑制了 DHL-6B- 细胞中的 ATP 释放。将相对发光单位 (Relative Luminescence Unit, RLU) 测量为蛋白浓度 (ug/ml) 的函数。实心菱形 :F3. 3SMIP+GAH(山羊抗-人二抗), 空心正方形 :F3. 3H7PIMS+GAH, 空心竖立三角形 :F3. 3NKG2A PIM+GAH, 实心圆形 :TDR31. 1 单克隆抗体 +GAM(山羊抗小鼠二抗), 实心竖立三角形 :GAM(3 : 1), 实心正方形 :GAH(3 : 1), 以及空心圆形 :培养基。

[0059] 图 18 显示了抗-Her2PIMS 与 SKBR3 细胞的结合。将结合测量为平均荧光强度, 作为蛋白浓度 (ug/ml) 的函数。实心菱形 :W0042PIMS, 实心正方形 :W0044PIMS, 实心竖立三角形 :W0045PIMS, 实心大正方形 :W0041PIMS, 以及实心大正方形 :Her033SMIP。

[0060] 图 19 显示了抗-Her2PIMS 与 MDA-MB453 细胞的结合。将结合测量为平均荧光强度, 作为蛋白浓度 (ug/ml) 的函数。实心菱形 :Her033

[0061] SMIP, 实心小正方形 :W0042, 实心竖立三角形 :W0057, 实心大正方形 :对照。

[0062] 发明详述

[0063] 本发明提供了将特异性结合给定靶标诸如有害细胞 (例如, 癌细胞或与炎症或自身免疫病症有关的细胞) 上的靶标的能力与抗体效应器样活性结合的分子, 结合的方式为将恒定亚区置于朝向该分子的 N- 末端的位置, 将特异性结合结构域置于朝向该分子的 C- 末端的位置, 并带有连接所述特异性结合结构域和恒定亚区的 (通常为铰链样的) PIMS 连接子区, 所述连接子区任选地包含至少一个能够形成至少一个二硫键的半胱氨酸。效应器样功能包括 ADCC (抗体依赖性细胞的细胞毒作用) 和 CDC (补体依赖性细胞毒作用), 因此将细胞毒作用与有害的细胞 (例如, 癌细胞以及导致或加剧炎症或自身免疫病症的细胞) 联系起来。因为通过将恒定亚区置于 N- 末端, 恒定亚区的 C- 末端与分子其余部分以肽键连接 (这与恒定区位于分子的 C- 末端的天然存在的任何抗体结构不同) 而没有失去活性, 所以该分子是有效的。所述分子通常小于天然抗体和类似的多肽, 由此潜在地改善了分子的穿透性, 本文称为反转小模免疫药物 (reverse Small Modular Immunopharmaceutical) (即, SMIP) 或 PIMS 分子。值得注意的是, 小体积并没降低 PIMS 的体内持续性, 如在考虑用于生物体给药的其他小肽分子中发现的一样。不希望受任何理论约束, 恒定亚区的存在可以有助于该分子的体内持久性。

[0064] 图 1 显示了示例性 PIMS 分子的示意性结构。通常, PIMS 分子是单链多肽, 在 N- 末

端到C-末端的方向上包含来自免疫球蛋白(其包括来自相同(优选地)或不同动物种类的C_{H2}和C_{H3}结构域)、免疫球蛋白同种型和/或免疫球蛋白亚类的恒定亚区,通常为来自免疫球蛋白的铰链区的PIMS连接子肽,以及来自特异性结合对的肽成员的特异性结合结构域,其包括共同地促成功能结合结构域的来自所述肽成员的一个或多个区域。在一些实施方案中,PIMS分子还包含来自免疫球蛋白的置于N-末端的铰链区,且所述N-末端铰链区可以与在恒定亚区和结合结构域之间存在的PIMS连接子区相同或不同。PIMS分子还可以包含用于多肽制备的N-末端前导序列,且所述前导序列可以包括由存在于编码核酸中经设计的限制性内切酶切割位点所编码的氨基酸。因此,一些PIMS分子的示例性示意结构包括下述:N-恒定亚区-PIMS连接子-结合结构域-C,N-铰链-恒定亚区-PIMS连接子-结合结构域-C,N-前导区-恒定亚区-PIMS连接子-结合结构域-C,或N-前导区-铰链-恒定亚区-PIMS连接子-结合结构域-C。现在将更详细地描述PIMS分子的功能性组分。

[0065] 本发明还提供了包含编码PIMS的多核苷酸以及包含所述多核苷酸的载体和包含所述多核苷酸或载体的宿主细胞的组合物,提供了制备这种分子的方法,鉴于蛋白体积较小,优选通过重组蛋白制备方法制备,还可以通过化学合成法制备。此外,本发明提供了治疗诸如癌症、炎症和自身免疫病症的病症的方法,以及提供了改善这些病症的症状的相关方法。

[0066] 提供了这种分子以及在体内重组制备它们的方法,就已经获得了靶向诊断和治疗的新途径,其允许,例如,将免疫系统的效应器细胞(例如,细胞毒T淋巴细胞、天然杀伤细胞等)靶向召集到待破坏或收缴(sequestered)的细胞、组织、媒介(agents)和外源目标,诸如癌细胞和感染性媒介。除了将治疗性细胞定位于治疗部位外,所述肽可以用于定位诸如放射标记的蛋白的治疗性化合物。此外,该肽也可以用于清除有害的成分,例如,通过使诸如毒素的有害成分与能够破坏或消除该毒素的细胞(例如,巨噬细胞)发生联系。本发明的分子在调节诸如细胞表面受体的结合伴侣分子的活性方面是有用的。其中确定的细胞群的消除是有益的疾病和病况包括感染性和寄生性疾病、炎症性和自身免疫病况、恶性肿瘤等。通过考虑下面对本文中使用的术语的明确定义会有助于对本发明的公开的进一步描述。

[0067] “单链结合蛋白”是单一连续地排列的共价连接的氨基酸,该链作为单体和/或多聚体能够特异地与一个或多个结合伴侣结合,所述结合伴侣与待被所述单链结合蛋白可检测地结合的结合部位共享足够的决定簇。示例性结合伴侣包括蛋白、碳水化合物、脂类和小分子。

[0068] 为了便于阐述,根据与本发明所述的蛋白和/或多肽和/或肽的差异,描述了本发明所述的蛋白、多肽和肽的“衍生物(derivatives)”和“变体(variants)”,这意味着为本发明所述的蛋白/多肽/肽的所述衍生物和变体不同于本发明定义的非衍生的或非变异的蛋白、多肽或肽。本领域技术人员会理解,衍生物和变体本身为本发明所述的蛋白、多肽和肽。

[0069] “抗体”被给予与其在本领域中的意义一致的最广泛的定义,包括能够与诸如蛋白质或非蛋白质抗原的至少一种结合伴侣结合的蛋白、多肽和肽。本文使用的“抗体”包括免疫球蛋白超家族蛋白的任一种类、单链或多链组成的成员以及这些分子的变体、类似物、衍生物和片段。特别地,“抗体”包括本领域已知的任一形式的抗体,包括但不限于,单克隆

和多克隆抗体、嵌合抗体、CDR- 移植抗体、人源化抗体、人抗体、单链可变片段、双特异性抗体、双功能抗体 (diabodies)、抗体融合物等。

[0070] “结合结构域 (binding domain)”是诸如来自免疫球蛋白 (例如, 抗体) 的多肽片段的肽区域, 其特异地结合一个或多个特异性结合伴侣。如果存在多个结合伴侣, 这些伴侣共享足以可检测地与结合结构域结合的结合决定簇。优选地, 结合结构域是氨基酸的连续序列。

[0071] “表位”在本文中给予其单个抗原位点的通常含义, 即抗体与之特异地相互作用 (例如通过结合) 的物质 (例如, 蛋白) 上的抗原决定簇。除非本文特别地说明, 在免疫球蛋白 (例如抗体) 领域已经获得了确定意义的其他术语, 诸如“可变轻链区”、“可变重链区”、“恒定轻链区”、“恒定重链区”、“抗体铰链区”, “互补决定区”、“框架区”、“抗体同种型”、“F_c 区”、“恒定区”、“单链可变片段”或“scFv”、“双功能抗体 (diabody)”、“嵌合体”、“CDR- 移植的抗体”、“人源化抗体”、“整形抗体 (shaped antibody)”、“抗体融合物”等都用在在本领域已确定的含义。

[0072] 除非本文明确地说明, 本领域技术人员理解的涉及抗体技术的每一术语都用其在该领域已获得的含义。这类术语的实例有分别指来自抗体轻链和重链的可变结合区的“V_L”和“V_H”; 以及指“免疫球蛋白恒定区”的 C_L 和 C_H, 即分别来自抗体轻链或重链的恒定区, 后者被理解为还可依据恒定区来源的抗体同种型 (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) 进一步分为 C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} 和 C_{H4} 恒定区结构域。CDR 指“互补决定簇”。“铰链区”来自插入抗体单一链的 C_{H1} 和 C_{H2} 区之间且将其连接的氨基酸序列, 该序列在本领域被理解为以“铰链”的形式为整个抗体提供柔性。

[0073] “恒定亚区”是本文定义的术语, 指肽、多肽或蛋白序列, 其对应于或来自恒定亚区多肽对应的源 / 亲本抗体的一个或多个恒定区结构域的部分或全部, 而不是对应或来自全部恒定区结构域。因此, 恒定亚区可以包括任一下述结构域的部分或全部: C_{H2} 结构域、C_{H3} 结构域 (IgA, IgD, IgG, IgE 或 IgM) 和 C_{H4} 结构域 (IgE 或 IgM)。因此, 本文所定义的恒定亚区可以指对应于免疫球蛋白恒定区一部分的多肽, 只要它保留与抗体结合的至少一个效应器功能。虽然 PIMS 分子可以任选地具有连接到恒定亚区的 N- 末端铰链区, 但本发明中的多肽恒定亚区或编码核酸通常具有 C_{H2} 结构域和 C_{H3} 结构域。在一些实施方案中, 恒定亚区被置于分子的一个或多个特异性结合结构域的 N- 末端。虽然可以有一些位于恒定亚区 N- 末端的序列, 例如前面所述的 N- 末端铰链, 但在这些实施方案中没有位于恒定亚区 N- 末端的特异性结合结构域。

[0074] “效应器功能”是与抗体的恒定区相关或由抗体的恒定区提供的一种功能。示例的效应器功能包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC), 补体激活及补体依赖性细胞毒作用 (CDC), Fc 受体结合, 以及延长的血浆半衰期和胎盘转移。本发明所述组合物的效应器功能由恒定亚区提供, 并且是可检测的。优选地, 本发明所述组合物与该功能相关的特异活性近似于野生型抗体与该效应器功能相关的特异性活性。即优选地, PIMS 分子的恒定亚区相比于野生型抗体没有失去任何效应器功能。

[0075] “连接子”是与其他肽或多核苷酸结合或连接的肽或多核苷酸。通常, 肽连接子是 2-50 个氨基酸的寡肽; 因此, 编码这种肽连接子的典型的多核苷酸连接子大约是 6-150 个核苷酸长度。PIMS 连接子是一种肽连接子, 其将来自免疫球蛋白的恒定亚区结合到结合

结构域,或者,当结合结构域超过一个时,结合到离特异性结合肽的 N 末端最近的结合结构域。该 PIMS 连接子的氨基酸序列来自抗体铰链区,或来自连接结合结构域的区域,或来自将结合结构域连接到细胞膜表面跨膜区或膜锚着点的区域。在一些实施例中,该 PIMS 连接子具有至少一个在标准肽条件(例如,生理条件、常规的肽纯化条件、常规的肽维持或保藏条件等)下能够参与至少一个二硫键形成的半胱氨酸残基。优选地,由这些半胱氨酸形成的二硫键是链间二硫键。结合结构域连接子,其可以与上述的介于恒定亚区和 N-末端特异性结合结构域之间的连接子相同或相异,可以自身介于包含不少于一个结合结构域的蛋白质的所有结合结构域之间。示例的结合结构域连接子是属于 (Gly4Ser)_n 家族的肽,其中优选地, n = 1-5。

[0076] “靶标”被给予多于一种的含义,根据使用的上下文定义其在每一情形的明确含义。按其最狭义的意义来说,“靶标”是结合位点,即本发明中所述的肽组合物的结合伴侣的结合结构域。按其更广的意义来说,“靶标”或“分子靶标”指整个的结合伴侣(例如,蛋白质),其必然展现结合位点。诸如“CD20”、“CD37”等的特异性靶标都被给予其在本领域获得的通常含义。“靶标细胞”是任何的原核或真核细胞,不管是健康的还是患病的,其与本发明中所述的靶标分子有关。当然,靶标分子也被发现与任何细胞都无关联(例如,无细胞靶标),或者与诸如病毒(包括噬菌体)、有机或无机的靶标分子载体,以及外源对象的其他组合物有关。

[0077] 靶标分子可以与其结合的物质实例包括自体细胞(例如,癌细胞或其他患病细胞)、传染媒介(例如,传染性细胞和传染性病毒)等。靶标分子可以与被用于递送、运输或定位靶标分子的无核细胞、细胞膜、脂质体、海绵体、凝胶、胶囊、片剂等结合,与目的用途无关(例如,对于医学治疗,作为良性或无意的提供,或者进一步生物恐怖的威胁)。“无细胞”、“无病毒”、“无载体”、“无对象”等指靶标分子没有与指定的组合物或物质结合。

[0078] “结合亲和力”指本发明的肽组合物和它们的结合伴侣的非共价结合的强度。优选地,结合亲和力指结合对成员之间的吸引力的定量测量。

[0079] “佐剂”是一种提高或辅助与其结合的化合物的功能效应的物质,例如在包含活性剂和佐剂药物组合物的形式中。“赋形剂”是惰性物质,制备药物组合物时被用作稀释剂。“载体”是典型的惰性物质,被用于提供递送药物组合物的运送工具。

[0080] “宿主细胞”指任何细胞,原核的或真核的,在其中存在本发明所述的多核苷酸、蛋白质或肽。

[0081] 把核酸或多核苷酸“导入”宿主细胞意味着通过为本领域技术人员所熟知的任何方法使核酸或多核苷酸进入该细胞,这些方法包括但不限于体外盐介导的沉淀和其他形式的裸核酸/多核苷酸或病媒核酸/多核苷酸的转化或转染,病毒介导的感染及任意的转导、通过或不通过“辅助”分子,冲击投射(ballistic projectile)递送,共轭等。

[0082] “孵育”宿主细胞的意思是在为本领域技术人员所熟知的环境条件下维持该细胞,使其适于给定目的,例如基因表达。这些条件包括温度、离子强度、氧张力、二氧化碳浓度、营养成分等,其为本领域所熟知。

[0083] “分离”化合物,诸如本发明所述的蛋白质或肽,意味着将该化合物与被发现与其天然结合的至少一种不同的化合物分开,诸如在表达待分离的化合物的宿主细胞中,例如通过将包含该化合物的用过的培养基与生长在培养基中的宿主细胞分离。

[0084] “有需要的生物体”指有患疾病、病症或病况风险或正患疾病、病症或病况的任何生物体,所述疾病、病症或病况可以用本发明的组合物治疗或缓解其包括但不限于各种形式的癌症中的任何一种,众多自身免疫性疾病中的任何一种,由放射性标记蛋白质、肽及类似的化合物引起的放射物中毒,摄入的或内部产生的毒素等,结合全本公开,这会变得显而易见。优选地,有需要的生物体是人类患者。

[0085] “改善”疾病的症状,意思是可检测地减轻疾病的症状的严重程度,正如为本领域所熟知的那样。示例性的症状包括疼痛、发热、肿胀和关节僵硬。

[0086] 除非上下文中有明确的说明,术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”可以互相交换使用,用其中的每一个都可以指至少一个连续的氨基酸链。类似地,术语“多核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”可以互相交换使用,除非从上下文中明确地得出用于特殊的、不可互相交换的目的。

[0087] “药学上可接受的盐”指本发明中的化合物中的盐,其来自所述化合物和有机或无机酸(酸加成盐)或者有机或无机碱(碱加成盐)的组合。

[0088] 在一些实施方案中,用于 PIMS 分子重组表达的多核苷酸会编码通过编码多样化的短双肽或三肽的序列连接到 N-末端铰链区(例如,IgG1 铰链)的前导肽,所述序列包括用于所述分子的重组 DNA 工程的限制性内切核酸酶切割位点诸如 AgeI 位点(例如,在前导-编码序列的末端)和 XhoI 位点(例如,在编码诸如 IgG1 铰链的铰链的序列的起始处)的序列,随后是通过诸如 H7Scorpion 连接子(例如,具有由 SEQ ID NO:163 编码的 SEQ ID NO:164 的氨基酸序列)的(铰链-like)PIMS 连接子融合到 scFv 的铰链(例如,SCC-P)、C_{H2} 和 C_{H3} 结构域(例如,IgG1 结构域)。这样,虽然 PIMS 分子通常包含两个铰链-样的二硫键区,一个 N-末端和位于效应器结构域的末端和特异性结合结构域之间的另一个,但 PIMS 分子在天然结构水平上可以被视为类似“反向的(backwards)”SMIP。

[0089] PIMS 结合结构域

[0090] PIMS 蛋白或多肽具有不同于其他特异性结合分子的结构,所述其他特异性结合分子例如多克隆或单克隆抗体,诸如 Fab、F(ab')₂ 或 scFv 的其片段,SMIPs,双抗(diabodies),scorpion 等。PIMS 蛋白或多肽包含多肽 N-末端的效应器结构域(C_{H2}-C_{H3},任选地铰链-C_{H2}-C_{H3})和 C-末端的靶标特异性(例如,抗原-特异性)结合结构域,所述两个结构域由(铰链-样)PIMS 连接子间隔开。如果 PIMS 连接子来自 Ig 铰链,它优选地与该 PIMS 分子的 C_{H2} 和 C_{H3} 结构域中的至少一个来自相同的抗体种类、同种型或同种亚型(sub-isotype)。该靶标-特异性结合结构域可以是单一结构域,例如来自骆驼科动物抗体结合结构域的结合结构域,或者更通常地,多个区域可以联合形成至少一个结合结构域,例如 V_L-样结合结构域和 V_H-样结合结构域的链间或链内联合。PIMS 结构允许效应器功能和结合结构域的功能特性的最佳化。这些分子自身具有活性,同时还提供了评估多重特异性结合蛋白的结合结构域的平台,例如 Scorpion C-末端结合结构域(即,Scorpion 结合结构域 2(BD2)),以及提供了用于评估效应器结构域-BD2Scorpion 连接子的平台。

[0091] 特异性结合结构域可以来自特异性结合对的蛋白质或多肽成员的一个或多个区。通常地,结合结构域来自相同或不同的免疫球蛋白结构诸如抗体分子的至少一个区域。特异性结合结构域可以呈现与免疫球蛋白的区域的序列相同的序列,或者可以是该类序列的修饰物以提供例如改变的结合特性或改变的稳定性。这样的修饰为本领域所熟知,包括氨

氨基酸序列的改变,其直接促成诸如改变的结合的改变的特性,例如通过产生改变的二级或更高级的肽结构。还包括由掺入诸如非天然的常用氨基酸、非常用氨基酸和亚氨基酸的非天然氨基酸产生的修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,改变的序列产生了改变的翻译后加工,例如导致了改变的糖基化模式。

[0092] 对于其中结合结构域来自免疫球蛋白的多于一个区域(例如, Ig V_L区和 Ig V_H区)的实施方案,多个区域可以通过连接子肽连接,这将在下文描述。表 1 中提供了适用于本发明中的组合物的示例性但非限定的结合结构域的结构。

[0093] 表 1

[0094]

| 结合结构域 | 包含结构域的示例性分子 | 序列标识符(示例性编码核酸) |
|---------------------------|---|----------------|
| 抗-CD20 可变区 | 2H7 (H ₃ N-VL-VH-CO ₂ H 取向) | 120 (119) |
| 抗-CD20 (2Lm20-4) HL 12 | 2Lm20-4 (H ₃ N-VH-VL-CO ₂ H 取向) | 122 (121) |
| 抗-CD20 (2Lm20-4) HL 17 | 2Lm20-4 (H ₃ N-VH-VL-CO ₂ H 取向) | 124 (123) |
| 抗-CD28 可变区 | 2E12 (H ₃ N-VL-VH-CO ₂ H 取向) | 126 (125) |
| 抗-CD28 可变区 | 2E12 (H ₃ N-VH-VL-CO ₂ H 取向) | 128 (127) |
| 抗-CD37 可变结构域 | G28-1 (H ₃ N-VL-VH-CO ₂ H 取向) | 130 (129) |
| 抗-CD37 可变结构域 | G28-1 (H ₃ N-VH-VL-CO ₂ H 取向) | 132 (131) |
| 抗-CD3 可变结构域 | G19-4 (H ₃ N-VL-VH-CO ₂ H 取向) | 134 (133) |
| 抗-CD3 可变结构域 | G19-4 (H ₃ N-VH-VL-CO ₂ H 取向) | 136 (135) |

[0095] PIMS 恒定亚区

[0096] 恒定亚区,接近或位于多肽的 N-末端,来自免疫球蛋白的恒定区。恒定亚区通常来自免疫球蛋白的恒定重链区的部分而非全部。通常地,倘若恒定亚区保留至少一种与抗体相关的效应器功能,该恒定亚区包含免疫球蛋白 C_H 区的铰链 -C_{H2} 部分,尽管它可以来自铰链 -C_{H2}-C_{H3} 部分或者它可以来自 C_H 区的铰链 -局部 C_{H2} 部分。另外,恒定亚区的部分可以来自不同的免疫球蛋白的 C_H 区。在优选的实施方案中,铰链和 C_{H2} 区,如果相关的话也包括 C_{H3} 区,来自相同的抗体同种型。连接到恒定亚区或 N-末端铰链的 N-末端前导序列的分子也是预期的。该恒定亚区提供了与免疫球蛋白 C_H 区相关的至少一种活性,例如下述的一

种或多种效应器功能：抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)、补体依赖性细胞毒作用 (CDC)、蛋白质 A 结合、结合到至少一个 Fc 受体、与本发明所述的除了恒定亚区缺失的蛋白质有关的可重复检测的稳定性，且如本领域技术人员所公认的，或许胎盘转移（其本发明的分子代间转移 (generational transfer)）是有利的。适合用于本发明的组合物中的恒定亚区包括但不限于在表 2 中示出的结构。恒定亚区来自至少一个免疫球蛋白分子，并呈现出与至少一个免疫球蛋白的一个或多个区域相同或基本相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，从至少一个免疫球蛋白的一个或多个序列中修饰恒定亚区（通过一个或多个非天然常用的或非常用的，例如，合成的氨基酸或亚氨基酸的取代），得到一级结构，其可以产生改变的二级或更高级结构并具有与其相关的改变的性质，或者可以引起翻译后加工过程的改变，例如糖基化。

[0097] 表 2 中例举了示例性修饰的恒定亚区，其包括 hIgG1 (P238S)-C_{H2}C_{H3} (由例如 SEQ ID NO :141 编码的 SEQ ID NO :142)、hIgG1 (P331S)-C_{H2}C_{H3} (由例如 SEQ ID NO :143 编码的 SEQ ID NO :144) 及 hIgG1 (P238S/P331S)-C_{H2}C_{H3} (由例如 SEQ ID NO :145 编码的 SEQ IDNO :146)。应当注意的是，“P238S”指在使用 Kabat 编码系统的第 238 位上用 Ser 残基取代 Pro 残基。该 238 位 (Kabat) 在 SEQ ID NOS :142 和 146 的第 8 位，编码第 8 位 (Kabat 238) 残基的密码子存在于示例性编码核酸 (SEQ ID NOS :141 和 145) 的相应位置。类似地，P331S 取代是在第 331 位 (Kabat) 上，该 331 位在 SEQ ID NO :144 和 146 的第 101 位，关联密码子位于示例性编码核酸 (SEQ ID NOS :143 和 145) 的相应位置。

[0098] 对于那些呈现出与一个或多个免疫球蛋白多肽相同或基本相同的氨基酸序列的结合结构域和恒定亚区，本发明中所述分子的翻译后修饰可以产生相对于作为修饰基础的免疫球蛋白的修饰的分子。例如，使用本领域已知的技术，以相对于未被修饰的（例如，CHO）宿主细胞中的多肽产生了改变的肽糖基化模式的方式可以修饰宿主细胞，例如 CHO 细胞。

[0099] 表 2

[0100]

| 效应器结构域 | 序列标识符（示例性编码核酸） |
|---|----------------|
| hIgG1-C _{H2} C _{H3} | 140 (139) |
| hIgG1 (P238S)-C _{H2} C _{H3} | 142 (141) |
| hIgG1 (P331S)-C _{H2} C _{H3} | 144 (143) |
| hIgG1 (P238S/P331S)-C _{H2} C _{H3} | 146 (145) |

[0101] PIMS 铰链区

[0102] 表 3 中提供了典型 PIMS 分子的 PIMS 连接子区的实际结构，其中提供了氨基酸序列以及如果可适用的话，编码多核苷酸序列的非限定数目的合适区域。一般地，这些 PIMS 连接子区域来自免疫球蛋白的铰链区。同样一般地，PIMS 连接子的序列包括能够在合适的肽条件下形成二硫键，优选链间二硫键的半胱氨酸残基。包含具有至少一个半胱氨酸的铰链 - 样 PIMS 连接子的 PIMS 分子促进同源二聚作用和效应器功能。除非另有所指，表 3 中

的序列来自 IgG1 铰链区。

[0103] 通过 PIMS 修饰可能影响 ADCC 和 CDC 活性,预期所述修饰包括 N-末端铰链(例如, IgG1SCC-P 铰链 [SEQ ID NO :81])的变化或者将恒定亚区与特异性结合结构域分开的铰链-样 PIMS 连接子(例如, Scorpion 连接子 (H7),由例如 SEQ ID NO :163 编码的 SEQ ID NO :164)的变化。已经构建了变异体以最优信号序列(前导序列)周围区域以指导成熟 PIMS 肽在 COS-7 细胞中表达期间进行 N-末端的翻译后切割。可以考虑其他变异体,其会以影响表达、聚集和/或 ADCC 和/或 CDC 功能的方式改变对应 IgG1 上游铰链区的序列。此外,也可以考虑改变插入在效应器结构域和特异性结合结构域之间的 PIMS 连接子区来影响表达、聚集和/或 ADCC 和/或 CDC 功能,以及实现对 Fc_γR 的结合亲和力的改变。

[0104] 表 3 中的 PIMS 连接子(即铰链 1-26)是也在该表中提供的野生型铰链的变异体。从对不同序列的观察显而易见的是,产生的变异体延长或缩短了铰链,通过添加或删除 Cys 残基改变序列以增加或降低链间键合的可能性,以及通过引入促进柔性的残基(例如, Gly)或抑制柔性的残基(例如, Pro)改变铰链的柔性。表 3 中的野生型 IgG1 铰链与铰链 1-26(参见, Dall'Acqua et al., J. Immunol. 177 :1129-1138 (2006),其通过引用的方式并入本文)的比较表明铰链 11, 13, 14 和 17 显示了低于野生型铰链的对 Fc_γRIIIA 的结合亲和力,而铰链 1-10, 12, 15-16 和 18-26 显示了可与野生型铰链相比较的对 Fc_γRIIIA 的结合亲和力。因此,本领域的技术人员会比较表 3 中的序列以设计基于 IgG1 铰链序列的铰链样 PIMS 连接子,已知其显示对 Fc_γRIIIA 的近似野生型结合亲和力或显示对 Fc_γRIIIA 降低的结合亲和力。而且,结合亲和力与 ADCC 活性直接相关,因此本领域技术人员能够设计与近似野生型水平的 ADCC 活性相关的 PIMS 连接子区,或者与较低 ADCC 活性相关的 PIMS 连接子。在比较序列以完成 PIMS 连接子或铰链的设计中,可以选择适用于该目的的多种标准软件程序和软件包中的任何一种以促进实现合适的设计,且可以考虑将这些序列作为本发明的组合物的组分。

[0105] 具有表 3 中的一个序列的铰链-样的 PIMS 连接子区也显示了不同水平的对 C1_q 的结合亲和力,以及由此不同水平的补体介导的细胞毒作用。铰链 19、21-22 和 24-25 展示了高于野生型铰链的对 C1_q 的结合亲和力;铰链 3-6、11、13-14 和 18 展示了低于野生型铰链的对 C1_q 的结合亲和力;铰链 1-2、7-10、12、15-17、20、23 和 26 展示了与野生型铰链对 C1_q 补体蛋白的结合亲和力相当的对 C1_q 的结合亲和力。因此,相比于与野生型 IgG1 铰链有关的 CDC 活性,铰链 19、21-22 和 24-25 与较高的 CDC 活性有关;铰链 3-6、11、13-14 和 18 与较低的 CDC 活性有关;铰链 1-2、7-10、12、15-17、20、23 和 26 与和野生型铰链大致相同水平的 CDC 活性有关。在设计有助于对 Fc_γRIIIA 的相对结合和/或 ADCC 水平的 PIMS 连接子或铰链时,本领域技术人员会知道比较本文公开的 PIMS 连接子或铰链序列,并且基于对 C1_q 的不同结合亲和力和/或不同水平的 CDC,利用在容易得到的软件程序和软件包中执行的公知算法可以最优化设计以实现相对水平的对 C1_q 结合的亲和力和/或 CDC。对于前面描述的一些铰链,Dall'Acqua 等通过测定离解常数证实了结合观察结果。显示对 Fc_γRIIIA 或 C1_q 较低结合亲和力的铰链也显示了对那些分子较高的 K_Ds。

[0106] 也可以考虑特异性结合结构域区中的变化,诸如 V_H 和 V_L 结构域之间的 scFv 连接子区中的变化。这些变化可以被单独地或与上述的变异结合引入到 PIMS 分子中,以影响分子的结合亲和力、表达水平、聚集的趋势或整体功能性。

[0107] 表 3

[0108]

| 铰链区 | 核苷酸序列 | 氨基酸序列 | SEQID NOS. (示例性 编码核酸) |
|------------------|--|-----------------|-------------------------------|
| ccc- hIgG1 | | | 63 |
| sss(s)- hIgG1 | gagcccaaatcttctgacaaaact cacacatctccaccgagctca | EPKSSDKTHTSPPSS | 89(88) |
| csc(s)- hIgG1 | gagcccaaatcttctgacaaaact cacacatctccaccgtgctca | EPKSCDKTHTSPPCS | 91(90) |
| ssc(s)- hIgG1 | gagcccaaatcttctgacaaaact cacacatctccaccgtgctca | EPKSSDKTHTSPPCS | 65(64) |
| scc(s)- hIgG1 | gagcccaaatcttctgacaaaact cacacatgtccaccgtgctca | EPKSSDKTHTCPPCS | 67(66) |
| css(s)- hIgG1 | gagcccaaatcttctgacaaaact cacacatctccaccgagctca | EPKSCDKTHTSPPSS | 69(68) |
| scs(s)- hIgG1 | gagcccaaatcttctgacaaaact cacacatgtccaccgagctca | EPKSSDKTHTCPPSS | 71(70) |
| ccc(s)- hIgG1 | gagcccaaatcttctgacaaaact cacacatgtccaccgtgctca | EPKSCDKTHTSPPCS | 73(72) |
| ccc(p)- hIgG1 | gagcccaaat cttctgacaaaact cacacatgtccaccgtgccca | EPKSCDKTHTSPPCP | 75(74) |
| sss(p)- hIgG1 | gagcccaaatcttctgacaaaact cacacatctccaccgagccca | EPKSSDKTHTSPPSP | 77(76) |
| csc(p)- hIgG1 | gagcccaaatcttctgacaaaact cacacatctccaccgtgccca | EPKSCDKTHTSPPCP | 62(61) |
| ssc(p)- hIgG1 | gagcccaaatcttctgacaaaact cacacatctccaccgtgccca | EPKSSDKTHTSPPCP | 79(78) |
| scc(p)- hIgG1 | gagcccaaatcttctgacaaaact cacacatgtccaccgtgccca | EPKSSDKTHTCPPCP | 81(80) |
| css(p)- hIgG1 | gagcccaaatcttctgacaaaact cacacatctccaccgagccca | EPKSCDKTHTSPPSP | 83(82) |

| | | | |
|------------------|---|-------------------|--------|
| scs(p)- hIgG1 | gagcccaaatcttgacaaaact cacacatgtccaccgagccca | EPKS SDKTHTCPP SP | 85(84) |
| scppcp | agttgtccaccgtgccca | SCPPCP | 87(86) |
| 野生型铰链 | | EPKSCDKTHTCPPCP | 92 |
| 铰链 1 | | GGGGCDKHTCPPCP | 93 |
| 铰链 2 | | EPKSCGGGGCPCP | 94 |
| 铰链 3 | | EPKSCDKHTCGGCP | 95 |
| 铰链 4 | | EPKSCDKTHTCPPCG | 96 |
| 铰链 5 | | EPKSCDKTHTCPPSP | 97 |
| 铰链 6 | | EPKSCDKHTSPPCP | 98 |
| 铰链 7 | | EPKSCDKCHTCPPCP | 99 |
| 铰链 8 | | EPKSCDKTCCPCP | 100 |
| 铰链 9 | | EPKSCPPPPCPPCP | 101 |
| 铰链 10 | | PPPCDKTHTCPPCP | 102 |
| 铰链 11 | | EPKSCDKHTC--CP | 103 |
| 铰链 12 | | EPKSCDK--TCPCP | 104 |
| 铰链 13 | | EPKSCDK--TC--CP | 105 |
| 铰链 14 | | EPKSCDKTHTCPGGPCP | 106 |
| 铰链 15 | | EPKSCDGGGKHTCPPCP | 107 |
| 铰链 16 | | EPKSCDPPPKHTCPPCP | 108 |
| 铰链 17 | | EPKSCDKTHTCPPPPCP | 109 |
| 铰链 18 | | EPKSCDKHTCWWCP | 110 |
| 铰链 19 | | EPKSCDWWHTCPPCP | 111 |
| 铰链 20 | | EPKSCDKTHTCPPCP | 112 |
| 铰链 21 | | EPKSDCKTHTCPPCP | 113 |

| | | | |
|-------|--|-----------------|-----|
| 铰链 22 | | EPKSDCWWHTCPPCP | 114 |
| 铰链 23 | | EPKSCDFHHTCPPCP | 115 |
| 铰链 24 | | EPKSCDWWWTCPPCP | 116 |
| 铰链 25 | | EPKSCWWTHTCPPCP | 117 |
| 铰链 26 | | EPWWCDKTHTCPPCP | 118 |

[0109]

[0110] PIMS 连接子肽

[0111] PIMS 连接子肽通常是铰链区,因此,本文定义的任一铰链区结构,包括在表 3 中示例的那些铰链区结构,适合用作 PIMS 连接子肽。在本发明所述的组合物中有用的 PIMS 连接子肽优选地为大约 2-45 个氨基酸,或 2-38 个氨基酸,或 5-45 个氨基酸。例如, H1 连接子是 2 个氨基酸长度,STD2 连接子是 38 个氨基酸长度。此外,PIMS 连接子可以被用于将特异性结合结构域结合到恒定亚区,该 PIMS 连接子可以来自免疫球蛋白的铰链区。考虑到此处给出的通常合适的长度参数,本领域技术人员能够改变给定 PIMS 连接子多肽的序列和 / 或长度,以得到理想的柔性水平和 / 或恒定亚区与结合结构域之间的间隔,例如避免位阻。示例性的 PIMS 连接子肽结构包括表 3 中提供的铰链区和表 4 中提供的肽连接子。

[0112] 表 4

[0113]

| 连接子 | 核苷酸序列 | 氨基酸序列 | 序列标识符 (示例性 编码核酸) |
|------|--|--|------------------------|
| STD1 | aattatggtggcggtggctcgggc ggtggtggatctggaggaggtggg agtgggaattct | NYGGGSGGGGSGGGSGNS | 148(147) |
| STD2 | aattatggtggcggtggctcgggc ggtggtggatctggaggaggtggg agtgggaattatggtggcggtggc tcgggcggtggtggatctggagga ggtgggagtgggaattct | NYGGGSGGGGSGGGSGNYGGG SGGGSGGGGSGNS | 150(149) |
| H1 | aattct | NS | 152(151) |
| H2 | ggtggcggtggctcgggaattct | GGGGSGNS | 154(153) |
| H3 | aattatggtggcggtggctcggg aattct | NYGGGSGNS | 156(155) |

| | | | |
|-----|---|-----------------------|----------|
| H4 | ggtggcggtggctcgggcggtggt ggatctgggaattct | GGGSGGGGSGNS | 158(157) |
| H5 | aattatggtggcggtggctcgggc ggtggtggatctgggaattct | NYGGGSGGGGSGNS | 160(159) |
| H6 | ggtggcggtggctcgggcggtggt ggatctgggggaggaggcagcggg aattct | GGGSGGGGSGGGGSGNS | 162(161) |
| H7 | gggtgtccaccttgtccgaattct | GCPPCPNS | 164(163) |
| H8 | gggtctccaccttctccgaattct | GSPSPNS | 166(165) |
| H9 | tctccaccttctccgaattct | SPPSPNS | 168(167) |
| H11 | gagccacatctaccgacaaaact cacacatctccaccageccgaat tct | EPTSTDKTHTSPPSPNS | 172(171) |
| H12 | gagccacatctaccgacaaaact cacacatctccaccageccgaat tct | EPTSTDKTHTCPPCPNS | 174(173) |
| H13 | gagccacatctaccgacaaaact cacacatctccaccageccgaat tct | EPKSSDKTHTCPPCPNS | 176(175) |
| H15 | ggcggtggtggctcctgtccacct tgtccgaattct | GGGSCPPCPNS | 180(179) |
| H16 | ctgtctgtgaaagctgacttctc actccatccatcggaattct | LSVKADFLTP SIGNS | 182(181) |
| H17 | ctgtctgtgaaagctgacttctc actccatccatctcctgtccacct tgeccgaattct | LSVKADFLTP SISCPPCPNS | 184(183) |
| H18 | ctgtctgtgctcgtaacttcagt cagccagagatcggaattct | LSVLANFSQPEIGNS | 186(185) |
| H19 | ctgtctgtgctcgtaacttcagt cagccagagatctcctgtccacct tgeccgaattct | LSVLANFSQPEISCPPCPNS | 188(187) |

| | | | |
|-----|--|-----------------------|-----------|
| H20 | ctgaaaatccaggagagggt cagt aagccaaagatctcgaattct | LKIQERVSKPKISNS | 190 (189) |
| H21 | ctgaaaatccaggagagggtcagt aagccaaagatctcctgtccacct tgcccgaattct | LKIQERVSKPKISCPPCPNS | 192 (191) |
| H22 | ctggatgtgagtgagaggcctttt cctccacacatccagaattct | LDVSERPFPPHIQNS | 194 (193) |
| H23 | ctggatgtgagtgagaggcctttt cctccacacatccagtctctgtcca ccttgcccgaattct | LDVSERPFPPHIQSCPPCPNS | 196 (195) |
| H24 | cgggaacagctggcagaggctcact ttgagcttgaaagcgaattct | REQLAEVTLCLKANS | 198 (197) |
| H25 | cgggaacagctggcagaggctcact ttgagcgtgaaagcttgccaccc tgcccgaattct | REQLAEVTLCLKACPPCPNS | 200 (199) |
| H26 | cggattcaccagatgaactccgag ttgagcgtgctcgcgaattct | RIHQMNSELSVLANS | 202 (201) |
| H27 | cggattcaccagatgaactccgag ttgagcgtgctcgettgccaccc tgcccgaattct | RIHQMNSELSVLACPPCPNS | 204 (203) |
| H28 | gataccaaaggaagaacgtctctc gagaagatcttctcgaattct | DTKGKNVLEKIFSNS | 206 (205) |
| H29 | gataccaaaggaagaacgtctctc gagaagatcttctcactcctgtcca ccttgcccgaattct | DTKGKNVLEKIFDSCPPCPNS | 208 (207) |
| H30 | ctgccacctgagacacaggagagt caagaagtcacctgaattct | LPPETQESQEVTLNS | 210 (209) |
| H31 | ctgccacctgagacacaggagagt caagaagtcacctgtcctgtcca ccttgcccgaattct | LPPETQESQEVTLSCPPCPNS | 212 (211) |
| H32 | cggattcacctgaactgtccgag aggcccttctcctcgaattct | RIHLNVSERPFPPNS | 214 (213) |

| | | | |
|---------|---|----------------------|-----------|
| H33 | cggattcacctgaacgtgtccgag aggccctttcctccctgtccacc tgeccgaattct | RIHLNVSERPFPPCPPCPNS | 216 (215) |
| H36 | gggtgtccaccttgtccaggcggt ggtggatcgaattct | GCPPCPGGGGSNS | 222 (221) |
| H40 | ggatgtccaccttgtcccgcgaat tct | GCPPCPANS | 230 (229) |
| H44 | ggaggagctagttgtccaccttgt cccgggaattct | GGASCPPCPGNS | 238 (237) |
| H45 | ggaggagccagttgtccaccttgt gccgggaatt ct | GGASCPPCAGNS | 240 (239) |
| H46 | ggaggagccagttgtccaccttgt gcaattct | GGASCPPCANS | 242 (241) |
| (G4S) 3 | ggtggcggtggatccggcggaggt gggtcgggtggcggcgatct | GGGSGGSGGGS | 245 (244) |
| (G4S) 4 | ggtggcggtggctcggcggtggt ggatctggaggaggtgggagcggg ggaggtggcagt | GGGSGGSGGSGGGS | 247 (246) |

[0114]

[0115]

[0116] 能够被用作连接区的可选的铰链和连接子序列可以从连接 IgV- 样或 IgC- 样结构域的细胞表面受体的一部分制备。IgV- 样结构域之间的区（其中细胞表面受体包含多个串联的 IgV- 样结构域）和 IgC- 样结构域之间的区（其中细胞表面受体包含多个串联的 IgC- 样结构域）也可以用作连接区或连接子肽。优选的铰链和连接子序列有 5-60 个氨基酸长度；且可以主要是柔性的 (flexible)，但也可以提供更多的刚性特征；可以主要包含 α 螺旋结构，并带有最小限度的 β 片层结构。优选的序列在血浆和血清中是稳定的，并且抗蛋白水解切割。优选的序列可以包含天然存在的或添加的基序，诸如 CPPC，其提供形成一个或多个二硫键来稳定分子 C- 末端的能力。优选的序列可以包含一个或多个糖基化位点。优选的铰链和连接子序列的实例包括但不限于位于 CD2、CD4、CD22、CD33、CD48、CD58、CD66、CD80、CD86、CD96、CD150、CD166 及 CD244 的 IgV- 样和 IgC- 样结构域之间或者 IgC- 样或 IgV- 样结构域之间的结构域间区。可选择的铰链还可以从来自非 IgSF 成员，诸如 CD69、CD72 和 CD161 的 II 型受体的包含二硫化物的区域制备。

[0117] PIMS 前导肽

[0118] 设计的 PIMS 前导肽用于它们作为信号序列的已知目的，以促进表达的 PIMS 分子

的分泌。使用任一常规的前导肽（信号序列）被预期引导新生表达的 PIMS 分子进入分泌途径，并且导致前导肽在位于或靠近前导肽与 PIMS 分子的连接处从成熟的 PIMS 分子的切割。基于本领域已知的考虑选择特定的前导肽，并且可以将由给定限制核酸内切酶切割位点的多核苷酸编码的序列导入前导多肽编码序列的起始和末端以便于分子设计，前提是这种导入的序列确定的氨基酸不会不利地干扰前导肽由新生表达的蛋白质的任何期望的加工，或者不会不利地干扰 PIMS 分子的任何期望的功能，如果前导肽在 PIMS 分子成熟过程中不被切割的话。实施例中使用的示例性前导多肽包括本文公开的 2E12 或抗 -CD28 抗体前导肽，其具有氨基酸序列 $H_3N-MDFQVQIFSLILSASVIMSRG-CO_2H$ （参见，例如 SEQ ID NO :2 的残基 1-22；还可参见 SEQ ID NO :4 的残基 1-23，其是由 C-末端的单一 V 残基延伸出来的前导序列），以及人 VK3 前导肽， $H_3N-MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG-CO_2H$ （由例如 SEQ ID NO :358 的核苷酸 1-60 编码的 SEQ ID NO :250）。

[0119] PIMS 分子呈现出相对于其他抗体和抗体-样结合蛋白显著不同的结构。PIMS 分子有至少一个特异性结合结构域，例如 scFv 抗原-结合结构域，其位于免疫球蛋白效应器结构域（例如，恒定亚区），诸如 IgG1 效应器结构域的 C-末端。此外，PIMS 分子的结构是典型地独一无二的，因为它具有至少一个能够参与二硫键联接的区，被置于效应器和特异性结合结构域之间的 PIMS 连接子区是始终存在的，并且在 PIMS 分子中可以存在 N-末端铰链区。优选地，N-末端铰链区与 PIMS 分子的 C_{H2} 和 C_{H3} 结构域中的至少一个来自相同的抗体种类、同种型或同种亚型。此外，能够改变 PIMS 分子的铰链或铰链-样结构域，以影响效应器结构域或结合结构域，或两者。另外，预期 PIMS 分子更易于纯化，具有最小限度的聚集，这就稳定性和生产或制备适应性而言，将给这种分子结构以实践优势。

[0120] 设计时，PIMS 分子与天然存在的蛋白、多肽和肽之间有根本的差异，将恒定亚区置于朝向 PIMS 多肽的 N-末端。包括 PIMS 多肽以及它们的编码核酸或多核苷酸的 PIMS 分子展示了适合许多分子的模块化设计。正如此处所述，PIMS 分子包含来自免疫球蛋白的恒定亚区、可以是来自抗体的铰链区的 PIMS 连接子肽，以及包含至少一个结合区的特异性结合结构域，所述恒定亚区通常含有来自相同（优选的）或不同抗体的 C_{H2} 和 C_{H3} 结构域。经常地，成熟的 PIMS 分子还会展示来自抗体铰链区的 N-末端序列。因此，本发明中所述的 PIMS 分子包括但不限于此处公开的或为本领域已知的位于此处所提供的相对取向的模块（恒定亚区，连接子（铰链），以及特异性结合结构域）的结合。本发明明确地涉及将来自 SMIP 和在表 5 中鉴定的 Scorpion 分子的模块与表中所述的多种模块的序列终点结合。

[0121] 表 5

[0122]

| 描述 | 特征（氨基酸端点） | 序列标识符（示例性编码多核苷酸） |
|----------------------|--|------------------|
| 抗 -CD20 (2H7) LH(AA) | 前导区 :1-22 VL :23-128 连接子 :129-144 VH :145-265 | 120 (119) |

| | | |
|--|---|----------|
| 抗-CD28(2e12)LH(AA) | 前导区 :1-23 VL :24-135 连接子 :136-150 VH :151-271 | 126(125) |
| 抗-CD28(2e12)HL(AA) | 前导区 :1-23 VH :24-144 连接子 :145-164 VL :165-276 | 128(127) |
| G28-1VLVH(AA) | VL :1-107 连接子 :108-124 VH :125-239 | 130(129) |
| G28-1VHVL(AA) | VH :1-121 连接子 :122-144 VL :145-253 | 132(131) |
| G-19-4VLVH(AA) | VL :1-108 连接子 :109-125 VH :126-247 | 134(133) |
| G-19-4VHVL(AA) | VH :1-122 连接子 :123-139 VL :140-248 | 136(135) |
| 019044VHVL(AA) | | 138(137) |
| 2H7sssIgG1-STD1-2e 12HL (w/2E12 前导区)(AA) C _{H2} C _{H3} | 前导区 :1-22 VL :23-128 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-281 EFD-BD2 连接子 :500-519 | 2(1) |
| | VH2 :520-640 连接子 2 :641-660 VL2 :661-772 | |

| | | |
|--|--|------|
| <p>2H7sssIgG1 (P238S/P331S) - STD1-2e12HL (w/2e12 前导区) (AA) C_{H2}C_{H3}</p> | <p>前导区 :1-22 VL :23-128 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-519 VH2 :520-640 连接子 2 :641-660 VL2 :661-772</p> | 3 |
| <p>2H7sssIgG 1-STD 1-2e 12LH (w/2e12 前导区) (AA)</p> | <p>前导区 :1-22 VL :23-128 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-519 VL2 :520-631 连接子 2 :632-646 VH2 :647-767</p> | 5(4) |
| <p>2H7sssIgG1 (P238S/P331S) - STD1-2e12LH (w/2e12 前导区) (AA)</p> | <p>前导区 :1-22 VL :23-128 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-519 VL2 :520-631 连接子 2 :632-646 VH2 :647-767</p> | 6 |

| | | |
|---|---|--------|
| 2H7sssIgG1-STD1-2e12LH (w/2e12 前导区) (AA) | 前导区 :1-22 VL :23-129 连接子 :130-144 VH :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-537 VL2 :538-649 连接子 2 :650-664 VH2 :665-785 | 8(7) |
| 2H7sssIgG1 (P238S/P331S) - STD2-2e12LH (w/2e12 | 前导区 :1-22 VL :23-128 | 9 |
| 前导区) (AA) | 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-281 EFD-BD2 连接子 :500-537 VL2 :538-649 连接子 2 :650-664 VH2 :665-785 | |
| 2H7sssIgG 1-STD2-2e 12HL (w/2e12 前导区) (AA) | 前导区 :1-22 VL :23-128 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-537 VH2 :538-658 连接子 2 :659-678 VL2 :679-790 | 11(10) |

| | | |
|---|---|--------|
| 2H7sssIgG1 (P238S/P331S)- STD2-2e12HL (w/2e12 前导区) (AA) | 前导区 :1-22 VL :23-128 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-537 VH2 :538-658 连接子 2 :659-678 VL2 :679-790 | 12 |
| 2H7sssIgG1-H1-2e12HL (w/2e12 前导区) (AA) | 前导区 :1-22 VL :23-128 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-281 EFD-BD2 连接子 :500-501 VH2 :502-622 连接子 2 :623-642 VL2 :643-754 | 14(13) |
| 2H7sssIgG 1-H2-2e 12HL (w/2e12 前导区) (AA) | 前导区 :1-22 VL :23-127 连接子 :128-144 VH :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-507 | 16(15) |
| | VH2 :508-628 连接子 2 :629-648 VL2 :649-760 | |

| | | |
|---|--|---------------|
| <p>2H7sssIgG1-H3-2e12HL (w/2e12 前导区) (AA)</p> | <p>前导区 :1-22 VL :23-128 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-509 VH2 :510-630 连接子 2 :631-650 VL2 :651-762</p> | <p>18(17)</p> |
| <p>2H7sssIgG 1-H4-2e 12HL (AA)</p> | <p>前导区 :1-22 VL :23-128 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-512 VH2 :513-633 连接子 2 :634-653 VL2 :654-765</p> | <p>20(19)</p> |
| <p>2H7sssIgG 1-H5-2e 12HL (w/2e12 前导区) (AA)</p> | <p>前导区 :1-22 VL :23-128 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-514 VH2 :515-635 连接子 2 :636-655 VL2 :656-767</p> | <p>22(21)</p> |

| | | |
|---|---|--------|
| 2H7sssIgG 1-H6-2e 12HL (w/2e12 前导区) (AA) | 前导区 :1-22 VL :23-128 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-517 VH2 :518-638 连接子 2 :639-658 VL2 :659-770 | 24(23) |
| 2H7sscIgG 1-H7-2e 12HL (w/2e12 前导区) (AA) | 前导区 :1-22 VL :23-128 | 26(25) |
| | 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-507 VH2 :508-628 连接子 2 :629-648 VL2 :649-760 | |
| 2H7sssIgG 1-H7-G 194HL (w/2e12 前导区) (AA) | 前导区 :1-22 VL1 :23-128 连接子 :129-144 VH1 :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-507 VH2 :508-629 连接子 2 :630-646 VL2 :647-754 | 28(27) |

| | | |
|--|---|--------|
| 2H7sssIgG 1-H7-G281HL (w/2e12 前导区) (AA) | 前导区 :1-22 VL1 :23-128 连接子 :129-144 VH1 :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-507 VH2 :508-629 连接子 2 :630-651 VL2 :652-759 | 30(29) |
| 2e 12-sss-IgG 1HL SMIP (AA) | 前导区 :1-22 VH :22-144 连接子 :145-164 VL :165-276 铰链 :279-293 | 32(31) |
| 2e 12-sss-IgG 1LH SMIP (AA) | 前导区 :1-23 VL :24-135 连接子 :136-150 VH :151-271 铰链 :274-288 | 34(33) |
| G28-1LH SMIP(AA) | 前导区 :1-20 VL :21-127 连接子 :128-144 VH :145-260 铰链 :261-275 | 36(35) |
| G28-1HL SMIP(AA) | 前导区 :1-20 VH :21-136 连接子 :137-158 VL :159-266 铰链 :268-283 | 38(37) |
| G19-4LH SMIP(AA) | 前导区 :1-20 VL :21-128 连接子 :129-145 VH :146-267 铰链 :268-282 | 40(39) |

| | | |
|------------------------------------|---|--------|
| G19-4HL SMIP(AA) | 前导区 :1-20 VH :21-142 连接子 :143-159 VL :160-267 铰链 :270-284 | 42(41) |
| n2H7sssIgG 1-STD 1-2e 12HL (AA) | 前导区 :1-20 VL :21-127 连接子 :128-142 VH :143-264 铰链 :265-279 EFD-BD2 连接子 :497-516 VH2 :517-637 连接子 2 :638-657 VL2 :658-769 | 44(43) |
| n2H7sssIgG 1-STD2-2e 12LH (AA) | 前导区 :1-20 VL :21-126 连接子 :127-142 VH :143-264 铰链 :265-279 EFD-BD2 连接子 :497-516 VL2 :517-628 连接子 2 :629-643 VH2 :644-764 | 46(45) |
| n2H7sssIgG1-H1-2e12HL (AA) | 前导区 :1-20 VL :21-126 连接子 :127-142 VH :143-264 铰链 :265-279 EFD-BD2 连接子 :497-498 VH2 :499-619 | 48(47) |
| | 连接子 2 :620-639 VL2 :640-751 | |

| | | |
|---------------------------------|---|--------|
| n2H7sssIgG 1-H2-2e 12HL (AA) | 前导区 :1-20 VL :21-126 连接子 :127-142 VH :143-264 铰链 :265-279 EFD-BD2 连接子 :497-504 VH2 :505-625 连接子 2 :626-645 VL2 :646-757 | 50(49) |
| n2H7sssIgG 1-H3-2e 12HL (AA) | 前导区 :1-20 VL :21-126 连接子 :127-142 VH :143-264 铰链 :265-279 EFD-BD2 连接子 :497-506 VH2 :507-627 连接子 2 :628-647 VL2 :648-759 | 52(51) |
| n2H7sssIgG 1-H4-2e 12HL (AA) | 前导区 :1-20 VL :21-126 连接子 :127-142 VH :143-264 铰链 :265-279 EFD-BD2 连接子 :497-509 VH2 :510-630 连接子 2 :631-650 VL2 :651-762 | 54(53) |

| | | |
|--|--|---------|
| n2H7sssIgG1-H5-2e12HL (AA) | 前导区 :11-20 VL :21-126 连接子 :127-142 VH :143-264 铰链 :265-279 EFD-BD2 连接子 :497-511 VH2 :512-632 连接子 2 :633-652 VL2 :653-764 | 56 (55) |
| n2H7sssIgG 1-H6-2e 12HL (AA) | 前导区 :1-20 VL :21-126 | 58 (57) |
| | 连接子 :127-142 VH :143-264 铰链 :265-279 EFD-BD2 连接子 :497-514 VH2 :515-635 连接子 2 :636-655 VL2 :656-767 | |
| 2H7cscIgG1-STD1-2e12HL (w/2e12 前导区) (AA) | 前导区 :1-22 VL :23-128 连接子 :129-144 VH :145-265 铰链 :268-282 EFD-BD2 连接子 :500-519 VH2 :520-640 连接子 2 :641-660 VL2 :661-772 | 60 (59) |

[0123]

[0124]

[0125]

[0126]

[0127]

[0128]

[0129]

[0130] PIMS 分子的一个用途就是用于对例如多特异性结合蛋白, 诸如 scorpion 的效应

器结构域和 / 或特异性结合结构域的评价和 / 或优化。这些 PIMS 分子自身具有活性,同时还提供了更好地评价 Scorpion 结合结构域 2(BD2) 和效应器结构域 -BD2Scorpion 连接子的平台。除了作为带有效应器功能的特异性结合蛋白的用途以及评价 ScorpionBD2 和效应器结构域 -BD2 连接子活性的用途外, PIMS 分子可以被修饰,以改变例如诸如 ADCC 和 / 或 CDC 活性的效应器结构域活性,其可能包括对置于恒定亚区或效应器结构域与一个或多个特异性结合结构域之间的 N- 末端铰链 (例如, IgG1SCC-P 铰链) 或铰链 - 样 PIMS 连接子的改变。目前获得的数据表明,人源化的 CD20PIMS 的 ADCC 活性至少和它们相对的 SMIP 一样强,并且有可能成为有效的可选择的分子,用于向诸如呈现 CD20 的细胞的特异性靶标递送增强的效应器功能。

[0131] 蛋白质和多肽

[0132] 在本发明的某些实施方案中,提供了任一种本文描述的具有效应器功能的特异性结合蛋白或 PIMS,其中,具有效应器功能的特异性结合蛋白或肽包含两个或更多组成了至少一个特异性结合位点的结合结构域多肽序列 (例如, V_L 和 V_H)。结合结构域多肽序列来自抗原可变区。衍生所述结合结构域的抗体可以是多克隆的 (包括单特异性多克隆的)、单克隆的 (mAbs)、重组的、嵌合的、人源化的 (例如 CDR- 移植的)、人的、单链的、催化的和为本领域所知的任何其他形式的抗体,及其片段、变异体或衍生物。在一些实施方案中,结合结构域是结合位点 (例如,骆驼科动物结合结构域)。在一些实施方案中,本发明的蛋白的任一结合结构域都来自免疫球蛋白的完整可变区。在优选的实施方案中,每一结合结构域都基于人 Ig 可变区。在其他的实施方案中,蛋白来自 Ig 可变区的片段。在这种实施方案中,每一结合结构域多肽序列优选地与给定 Ig 可变区的每一互补决定区的序列相对应。对应于小于给定 Ig 可变区的全部 CDR 的结合结构域也包括在本发明内,只要这种结合结构域保留特异性结合到至少一个靶标的能力。

[0133] 具有效应器功能的特异性结合蛋白或 PIMS 还具有来自免疫球蛋白恒定区 (优选抗体重链恒定区) 的恒定亚区序列,其通过它的 C- 末端共价连接到 PIMS 连接子区, PIMS 连接子区又进一步通过它的 C- 末端连接到 PIMS 分子中的结合结构域。

[0134] 在一些实施方案中,插入恒定亚区和结合结构域之间的 PIMS 连接子来自免疫球蛋白的野生型铰链区,例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD 或 IgE 铰链区。在其他的实施方案中,本发明提供了带有来自改变的铰链的 PIMS 连接子的 PIMS。一类适合于包含在 PIMS 分子中的改变的铰链区是具有改变的半胱氨酸残基数目的铰链,特别是那些本领域已知在具有野生型铰链的免疫球蛋白对应分子中参与链间二硫键形成的 Cys 残基。因此,蛋白可以具有 IgG1 铰链,其中能够参与键间二硫键形成的三个铰链 Cys 残基中的一个缺失。为了表示改变的铰链的半胱氨酸亚结构,从 N- 末端到 C- 末端呈现 Cys 亚序列。使用这种鉴定体系,具有改变的 IgG 铰链的 PIMS 包括具有如下特征,即 cxc、xxc、ccx、xxc、xcx、cxc 和 xxx 的铰链结构,其中 " x " 是 " 非 c "。Cys 残基可以被删除或用导致保守取代或非保守取代的氨基酸取代。在一些实施方案中,半胱氨酸被丝氨酸取代。

[0135] 对于具有 IgG1 铰链或铰链 - 样结构的 PIMS 蛋白,在 PIMS 连接子或 N- 末端铰链区中可以有 0、1、2 或 3 个 Cys 残基,优选地有 1 或 2 个 Cys 残基。对于具有 IgG2 铰链的蛋白,可以有 0、1、2、3 或 4 个 Cys 残基,优选地有 1 或 2 个 Cys 残基。对于包含 1、2 或 3 个 Cys 残基的改变的 IgG2 铰链,Cys 残基所有可能的子集都是被考虑的。因此,对于具有 1 个 Cys

的 IgG2 铰链, PIMS 分子在铰链区中可以具有下列的 Cys 基序 :cxxx、xcxx、xxcx 或 xxxc。对于具有 2 或 3 个 Cys 残基的 IgG2 铰链变异体,保留的和取代的(或删除的)Cys 残基的所有可能的组合都是被考虑的。对于具有改变的 IgG3 或改变的 IgG4 铰链区的 PIMS, Cys 残基从 1 到铰链区中 Cys 残基全部数目的缩减是被考虑的,不管该缺失是通过删除还是通过被保守或非保守氨基酸(例如,丝氨酸)取代造成的。同样地,包括具有野生型 IgA、IgD 或 IgE 铰链的 PIMS,也包括相应的改变的铰链区,其具有减少的 Cys 残基数,从 0 扩展到在相应野生型铰链存在的全部数目的 Cys 残基。在一些具有 IgG1 铰链的实施方案中,铰链的第一个或 N-末端的 Cys 残基被保留。预期 PIMS 将能够形成同源多聚体,例如同源二聚体。此外,具有改变的铰链的蛋白在铰链区的末端可以有变化,例如,给定区或结构域,诸如本文公开的 PIMS 连接子或铰链结构域的 N-末端、C-末端或两末端的一个或多个氨基酸残基缺失或取代。

[0136] 在另一个示例性的实施方案中,恒定亚区来自包含天然的或经过改造的 IgD 铰链区的恒定区。野生型人 IgD 铰链具有一个半胱氨酸,其与天然 IgD 结构中的轻链共同形成二硫键。在一些实施方案中,这种 IgD 铰链半胱氨酸被突变(例如被删除),以产生用作介于恒定亚区和特异性结合结构域之间的 PIMS 连接子区的改变的铰链。不导致非希望的铰链刚性的其他在 IgD 铰链中的氨基酸的变化或删除或改变也在本发明的范围之内。来自其他物种的天然或经过改造的 IgD 铰链区也在本发明的范围之内,如来自非人物种的人源化的天然或经过改造的 IgD 铰链,以及来自其他人或非人抗体同种型(诸如骆驼 IgG2 铰链)的(其他非 IgD)铰链区。

[0137] 本发明还包括在 C-末端,任选地在 N-末端连接到铰链和 PIMS 连接子的恒定亚区,所述铰链和 PIMS 连接子对应于已知的铰链区,诸如上述 IgG1 铰链或 IgD 铰链。铰链可以是被修饰的或被改变的(相比于野生型)铰链区,其中至少一个已知参与了键间二硫键连接的半胱氨酸残基通过保守取代(例如用 Ser 取代 Cys)或非保守取代的方式被另一个氨基酸替代。

[0138] 可以被用作连接区的可选的铰链和 PIMS 连接子序列来自连接免疫球蛋白 V-样或免疫球蛋白 C-样结构域的细胞表面受体的部分。IgV-样结构域之间的区域(其中细胞表面受体包含多个串联的 IgV-样结构域)和 IgC-样结构域之间的区域(其中细胞表面受体包含多个串联的 IgC-样区域)也可以考虑作为连接区。铰链和 PIMS 连接子序列的长度一般为 5-60 个氨基酸,并且可以主要是柔性的(flexible),但也可以提供更多的刚性特征。另外,PIMS 连接子通常提供能够使结合结构域之间的位阻最小化的间隔。优选地,这些铰链和 PIMS 连接子多肽主要为 α 螺旋结构,并带有最小限度的 β 片层结构。优选的序列在血浆和血清中是稳定的,并且抵抗蛋白水解性切割。优选的序列可以包含天然存在的或添加的基序,诸如 CPPC 基序,其提供二硫键以稳定二聚物形成。优选的序列可以包含一个或多个糖基化位点。优选的铰链和 PIMS 连接子序列的实例包括但不限于位于 CD2、CD4、CD22、CD33、CD48、CD58、CD66、CD80、CD86、CD150、CD166 及 CD244 的 IgV-样和 IgC-样区之间的结构域间区。

[0139] 恒定亚区可以来自骆驼科动物的恒定区,诸如美洲驼(1lama)或骆驼的 IgG2 或 IgG3。特别考虑的是具有 $C_{H2}-C_{H3}$ 或铰链 $-C_{H2}-C_{H3}$ 、来自任一 Ig 类或任一 IgG 亚类诸如 IgG1(例如,人 IgG1)的区的恒定亚区。恒定亚区还可以是来自任一 Ig 类或亚类例如

IgG1 (例如,人 IgG1) 的 C_{H3} 结构域。

[0140] IgA 恒定结构域,诸如尾端突变或缺失的 IgA1 铰链、IgA2 铰链、IgA C_{H2} 及 IgA C_{H3} 结构域,也被考虑作为恒定亚区。如本领域所理解的,恒定亚区也可以对应于经改造的抗体,其中例如通过利用 IgG 框架进行选择氨基酸取代已经构建了环移植体(loop graft)以产生不是天然 FcR(CD16, CD32, CD64, Fc \in R1) 的受体的结合位点,这是本领域已知的。这种类型的示例性恒定亚区是被修饰的 IgG C_{H2}-C_{H3} 区以具有 CD89 结合位点。

[0141] 本发明的这一方面提供了具有效应器功能的特异性结合蛋白或肽,其包含、基本上仅包含或仅包含 (a) 来自免疫球蛋白恒定区的置于 N-末端的恒定亚区多肽结合结构域多肽序列,其融合到或以其他方式连接到 (b) PIMS 连接子区序列,其中 PIMS 连接子区多肽可以如本文所述的,以及可以包含、基本上仅包含或仅包含例如铰链区或可选择的铰链区多肽序列,其进一步融合到或以其他方式连接到 (c) 置于 C-末端的来自免疫球蛋白的天然或经改造的结合结构域多肽序列。

[0142] 来自免疫球蛋白恒定区的恒定亚区多肽序列能够具有选自下述的至少一种免疫活性:抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用、CDC、补体结合、Fc 受体结合,并且结合结构域多肽能够特异性结合到靶标,例如抗原。

[0143] 本发明的这一方面还包含呈现出效应器功能的变异蛋白或多肽,其与具有本文公开的特定序列的效应器功能的特异性结合蛋白有至少 80%、优选 85%,90%,95%,99% 或 99.5% 的一致性。

[0144] 多核苷酸

[0145] 本发明还提供了编码本发明所述的蛋白质或肽的多核苷酸(分离的或纯化的或纯的多核苷酸)、包含所述多核苷酸的载体(包括克隆载体和表达载体),以及用本发明的多核苷酸或载体转化或转染的细胞(例如,宿主细胞)。在编码本发明的蛋白或多肽中,所述多核苷酸编码恒定亚区(Fc 结构域)、PIMS 连接子和特异性结合结构域,这些都来自免疫球蛋白,优选来自人免疫球蛋白。结合结构域可以包含对应全长可变区序列(重链和/或轻链)或对应其部分序列的序列,只要这种结合结构域每个都保留特异性结合的能力。恒定亚区或 Fc 结构域可以具有对应全长免疫球蛋白 Fc 结构域序列或对应其部分序列的序列,只要 Fc 结构域呈现至少一种本文定义的效应器功能,且只要 Fc 结构域不是完整的抗体 Fc 结构域。另外,给定结合位点的每一个结合结构域可以通过连接子肽连接,该连接子肽通常为至少 8 个,优选地为至少 13 个氨基酸长度。优选的连接子序列是基于 Gly4Ser 基序的序列,例如 (Gly4Ser)_n,其中 n = 3-5。

[0146] 具有效应器功能的特异性结合蛋白的变异体也包括在本发明中。变异多核苷酸与本文描述的确定的多核苷酸中的一种至少 90%,优选 95%,99% 或 99.9% 相同,或者在下述严格杂交条件下与这些确定序列的多核苷酸中的一种杂交:0.015M 氯化钠、0.0015M 柠檬酸钠,在 65-68°C;或者 0.015M 氯化钠、0.0015M 柠檬酸钠以及 50% 甲酰胺,在 42°C。多核苷酸变异体保留编码具有效应器功能的特异性结合蛋白或 PIMS 的能力。

[0147] 术语“严格”用于指本领域通常理解为严格的条件。杂交严格性主要由温度、离子强度和诸如甲酰胺的变性剂的浓度确定。用于杂交和洗涤的严格条件的实例有 0.015M 氯化钠,0.0015M 柠檬酸钠,在 65-68°C;或者 0.015M 氯化钠,0.0015M 柠檬酸钠以及 50% 甲酰胺,在 42°C。参见 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分

子克隆 :实验室手册),第二版, Cold Spring Harbor Laboratory, (ColdSpring Harbor, N. Y. 1989)。

[0148] 也可以使用更严格的条件(例如更高的温度,更低的离子强度,更高的甲酰胺或其他变性剂浓度),然而杂交率将受影响。在涉及脱氧寡核苷酸杂交的实例中,额外的示范性严格杂交条件包括在 6x SSC, 0.05% 焦磷酸钠, 37°C (对 14- 碱基寡核苷酸)、48°C (对 17- 碱基寡核苷酸)、55°C (对 20- 碱基寡核苷酸) 及 60°C (对 23- 碱基寡核苷酸) 条件下洗涤。

[0149] 在本发明的相关方面,提供了制备本发明的多肽或蛋白或其他构建体,例如包括 PIMS 的方法,所述方法包括 (a) 在允许构建体表达的条件下培养本文所述或提供的宿主细胞以及 (b) 将 PIMS 表达产物从宿主细胞或宿主细胞培养物中分离的步骤。

[0150] 构建体

[0151] 本发明还涉及均包括本发明的多核苷酸或核酸的载体以及由已知的载体制备的构建体,还特别涉及包括多种已知构建体的任一种在内的重组表达构建体,包括用于基因治疗的递送构建体,其包括任一编码例如本文提供的 PIMS 的核酸;本发明还涉及用本发明的载体和 / 或其他构建体进行了基因改造的宿主细胞以及通过重组技术施用表达或其他构建体的方法,所述表达或其他构建体包含编码 PIMS 或者其片段或变体的核酸序列。

[0152] 编码 PIMS 的本发明的多种构建体在适当启动子的调控下可以在几乎任一宿主细胞中表达,包括在用于基因治疗情况下的体内宿主细胞中,这依赖构建体的性质(例如,如上所述的启动子类型),以及依赖所需的宿主细胞的性质(例如,有丝分裂后终末分化的或活跃分裂的;例如,可表达构建体保持为游离体或整合入宿主细胞基因组)。

[0153] 在例如 Sambrook, et al., *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* (分子克隆 :实验室手册),第二版, Cold Spring Harbor, NY, (1989) 中描述了用于原核和真核宿主的适当的克隆和表达载体。示例性的克隆 / 表达载体包括但不限于克隆载体、穿梭载体,以及表达构建体。其可以基于质粒、噬菌粒 (phagemids)、噬粒 (phasmids)、粘粒、病毒、人工染色体,或者本领域已知的任一适于包含其中的多核苷酸扩增、转移和 / 或表达的核酸载体。如此处所述,在本发明优选的实施方案中,在已经用本发明所述的核酸转染、转化或转导的哺乳动物细胞中进行重组表达。还可参见例如 Machida, CA., "Viral Vectors for Gene Therapy :Methods and Protocols (用于基因治疗的病毒载体 :方法和操作规程)"; Wolff, JA, "Gene Therapeutics :Methods and Applications of Direct Gene Transfer (基因治疗学 :直接基因转移的方法和应用)" (Birkhauser 1994); Stein, U and Walther, W (eds., "Gene Therapy of Cancer :Methods and Protocols (癌症的基因治疗 :方法和操作规程)" (Humana Press 2000); Robbins, PD (ed.), "Gene Therapy Protocols (基因治疗方法)" (Humana Press 1997); Morgan, JR (ed.), "Gene Therapy Protocols" (Humana Press 2002); Meager, A (ed.), "Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations : From Laboratory to Clinic (基因治疗技术、应用和规范 :从实验室到临床)" (John Wiley & Sons Inc. 1999); Machida, CA and Constant, JG, "Viral Vectors for Gene Therapy :Methods and Protocols (用于基因治疗的病毒载体 :方法和操作规程)" (Humana Press 2002); "New Methods Of Gene Therapy For Genetic Metabolic Diseases NIH Guide (用于遗传代谢疾病的基因治疗的新方法 :NIH 指南)," 第 22 卷, 第 35 号, 1993

年 10 月 1 日。还可参见 U. S. Pat. Nos. 6, 384, 210 ;6, 384, 203 ;6, 384, 202 ;6, 384, 018 ;6, 383, 814 ;6, 383, 811 ;6, 383, 795 ;6, 383, 794 ;6, 383, 785 ;6, 383, 753 ;6, 383, 746 ;6, 383, 743 ;6, 383, 738 ;6, 383, 737 ;6, 383, 733 ;6, 383, 522 ;6, 383, 512 ;6, 383, 481 ;6, 383, 478 ;6, 383, 138 ;6, 380, 382 ;6, 380, 371 ;6, 380, 369 ;6, 380, 362 ;6, 380, 170 ;6, 380, 169 ;6, 379, 967 ;6, 379, 966。

[0154] 通常地,表达构建体来自质粒载体。一个优选的构建体是修饰的 pNASS 载体 (Clontech, Palo Alto, CA),其具有编码氨苄青霉素抗性基因、多腺苷酸化信号及 T7 启动子位点的核酸序列。其他适合的哺乳动物表达载体是公知的(参见例如 Ausubel et al., 1995; Sambrook et al., 上述;还可参见例如 Invitrogen 的目录, San Diego, CA; Novagen, Madison, WI; Pharmacia, Piscataway, NJ)。目前优选的构建体可以被制备,其包括在适当的调节性控制下的二氢叶酸还原酶 (DHFR) - 编码序列,用于促进 PIMS 提高的生产水平,该水平是应用适当的选择剂(例如,氨甲喋呤)后的基因扩增的结果。

[0155] 一般地,如上所述,重组表达载体将包括复制起始点和允许宿主细胞转化的可选择的标志物,以及来自高表达基因的启动子,该启动子指导下游结构序列的转录。与本发明所述的多核苷酸可操作连接的载体产生克隆或表达构建体。示例性的克隆/表达构建体包含至少一个表达调控元件,例如可操作连接到本发明中的多核苷酸的启动子。其他的表达调控元件,例如增强子、因子-特异性结合位点、终止子和核糖体结合位点,也被包括在本发明所述的载体和克隆/表达构建体中。本发明所述的多核苷酸的异源结构序列在适当的阶段与翻译起始和终止序列组装。因此,例如,本文提供的 PIMS- 编码的核酸可以包括在多种表达载体构建体的任一种内作为重组表达构建体用于在宿主细胞中表达所述蛋白。在某些优选的实施方案中,构建体包含在体内给药的制剂中。这种载体和构建体包括染色体的、非染色体的和合成的 DNA 序列,例如 SV40 的衍生物,细菌质粒,噬菌体 DNA,酵母质粒,来自质粒和噬菌体 DNA 组合的载体,诸如牛痘、腺病毒、禽痘病毒和伪狂犬病病毒的病毒 DNA,或如下所述的复制缺陷性逆转录病毒。然而,任何其他的载体都可以被用于制备重组表达构建体,并且在优选的实施方案中,这样的载体可以在宿主中复制和存活。

[0156] 可以将适当的 DNA 序列例如,通过多种操作方案插入载体。一般地,通过本领域已知的操作方案将 DNA 序列插入适当的限制性核酸内切酶切割位点。可以考虑用于克隆、DNA 分离、扩增和纯化,用于包括 DNA 连接酶、DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶等的酶反应的标准技术以及多种分离技术。例如,在 Ausubel et al. (1993 Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学的通用方法), Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA); Sambrook et al. (1989 Molecular Cloning (分子克隆), 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis et al. (1982 Molecular Cloning (分子克隆), Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Glover (Ed.) (1985 DNA Cloning (DNA 克隆) Vol. I 和 II, IRL Press, Oxford, UK); Hames 和 Higgins (Eds.), (1985 Nucleic Acid Hybridization (核酸杂交), IRL Press, Oxford, UK) 以及别处描述了多种标准的技术。

[0157] 将表达载体中的 DNA 序列可操作地连接到至少一个适当的表达调控序列(例如,组成性启动子或调节的启动子)以指导 mRNA 合成。如上文所述,这种表达调控序列的代表性实例包括真核细胞或它们的病毒的启动子。使用 CAT(氯霉素酰基转移酶)载体或具有

可选择性的标志物的其他载体,启动子区可以选自任何所需的基因。真核启动子包括 CMV 即刻早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、SV40 早期和晚期启动子、来自逆转录病毒的 LTR 启动子和小鼠金属硫蛋白 -I 启动子。选择适当的载体和启动子在本领域普通技术人员的水平内,并且本文描述了某些特别优选的重组表达构建体的制备,所述构建体包含可操作地连接到编码本发明所述的蛋白或多肽的核酸的至少一个启动子或调节的启动子。

[0158] 通过在载体中插入增强子序列,可以增加编码本发明所述的蛋白和多肽的 DNA 通过高等真核生物的转录。实例包括复制起始点上游 100-270 上的 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起始点上游的多瘤病毒增强子以及腺病毒增强子。

[0159] 也可以考虑使用本发明的核酸的基因疗法,其包括替代有缺陷的基因或将新基因添加到细胞和 / 或组织的策略,所述基因疗法正在被开发用于治疗癌症、校正代谢失调以及用于免疫治疗领域。本发明的基因疗法包括本发明所述的各种构建体,有或没有单独的载体或递送载体或构建体,治疗本文提及的疾病、病症和 / 或病况的应用。这种构建体还可以用作治疗或预防本文提及的疾病、病症和 / 或病况的疫苗。例如,DNA 疫苗利用编码免疫原性蛋白的多核苷酸和核酸决定簇 (nucleic acid determinants) 刺激针对病原体或肿瘤细胞的免疫系统。这种策略能够刺激获得性或先天免疫,或者能够通过细胞因子表达参与免疫功能的修饰。通常,体内基因疗法包括将遗传物质直接注射入患者或动物以便治疗、预防或改善疾病或与疾病有关的症状。疫苗和免疫调节是全身性疗法。对于组织特异性体内疗法,诸如那些旨在治疗癌症的疗法,优选局限性基因递送和 / 或表达 / 靶向系统。靶向特异性组织的多种基因治疗载体是本领域已知的,并且已经开发了操作方法以通过物理的方式靶向特异性组织,例如,使用基于导管的技术,所有这些都都在本文的范围内。

[0160] 本文也包括基因治疗的离体方法,其涉及取出、基因修饰、扩充和重新给予例如人患者的个体的自体细胞。实例包括用于癌症治疗的骨髓移植或淋巴样祖细胞的基因修饰。离体基因治疗优选适用于治疗容易得到的细胞 (诸如血或皮肤细胞),其能够在基因转移过程的培养中存活。

[0161] 有用的基因治疗载体包括腺病毒载体、慢病毒载体、腺相关病毒 (AAV) 载体、单纯疱疹病毒 (HSV) 载体和逆转录病毒载体。也可以使用“裸 DNA”、基于脂质体的递送、基于脂质的递送 (包括连接到带正电荷脂质的 DNA)、电穿孔和冲击投射 (ballistic projection) 来实施基因疗法。

[0162] 在某些实施方案中,包括但不限于基因疗法实施方案中,载体可以是诸如例如逆转录病毒载体的病毒载体。Miller et al., 1989 BioTechniques 7:980; Coffin 和 Varmus, 1996 Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY。例如,逆转录病毒质粒载体可以来自的逆转录病毒包括但不限于莫洛尼小鼠白血病病毒,脾坏死病毒,诸如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽白血病病毒、长臂猿白血病病毒、人免疫缺陷病毒、腺病毒、骨髓瘤病毒和乳腺癌病毒的逆转录病毒

[0163] 逆转录病毒是能够复制并通过 DNA 中间物 (intermediate) 整合到宿主细胞基因组的 RNA 病毒。这一 DNA 中间物或原病毒 (provirus) 可以稳定地整合到宿主细胞 DNA 中。按照本发明的某些实施方案,表达构建体可以包含逆转录病毒,其中合并了编码外源蛋白的外源基因代替正常的逆转录病毒 RNA。当逆转录病毒 RNA 在感染同时进入宿主细胞,外源基因也被导入细胞,并可以被整合进宿主细胞 DNA 中好像它是逆转录病毒基因组的一部

分。该外源基因在宿主中的表达导致了外源蛋白的表达。

[0164] 已经开发的用于基因疗法的大多数逆转录病毒载体系统都是基于鼠逆转录病毒。这类逆转录病毒存在两种形式：称为病毒体 (virions) 的游离病毒离子或者整合入宿主细胞 DNA 的原病毒 (proviruses)。病毒的病毒体形式包含逆转录病毒的结构性和酶性蛋白 (包括逆转录酶)、病毒基因组的两种 RNA 拷贝, 以及含有病毒包被糖蛋白的源细胞质膜部分。逆转录病毒基因组被组织为 4 个主要区域: 长末端重复序列 (LTR) 以及编码 gag、pol 和 env 的三个基因, 所述长末端重复序列包含转录起始和终止必需的顺式作用元件并位于编码基因的 5' 和 3' 端。这三个基因 gag、pol 和 env 分别编码内部病毒结构、酶性蛋白 (诸如整合酶) 和提供病毒传染力和宿主范围特异性的包被糖蛋白 (命名为 gp70 和 p15e), 以及功能未明的“R”肽。

[0165] 由于关于逆转录病毒使用包括表达构建体中使用的安全考虑, 已经开发了单独的包装细胞系 (Separate packaging cell lines) 和载体产生细胞系。简而言之, 该方法应用了逆转录病毒载体和包装细胞系 (PCL) 两种组分的用途。逆转录病毒载体包含长末端重复序列 (LTRs)、待转移的外源 DNA 和包装序列 (y)。该逆转录病毒载体本身不会繁殖, 因为编码结构性和包被蛋白的基因没有包括在载体基因组中。PCL 包含编码 gag、pol 和 env 蛋白的基因, 但不包含包装信号“y”。因此, PCL 自身仅能够形成空病毒体颗粒。在这一通用方法中, 将逆转录病毒载体导入 PCL, 由此产生了载体产生细胞系 (VCL)。该 VCL 产生仅包含逆转录病毒载体的外源基因组的病毒体颗粒, 因此以前被认为是用于治疗用途的安全逆转录病毒载体。

[0166] “逆转录病毒载体构建体”指装配体, 其在本发明的优选实施方案中能够指导目的基因或序列, 诸如编码 PIMS 的核酸序列的表达。简而言之, 逆转录病毒载体构建体应当包括 5' LTR、tRNA 结合位点、包装信号、第二链 DNA 合成的起始点和 3' LTR。多种异源序列可以包括在载体构建体中, 包括但不限于编码蛋白 (例如, 细胞毒蛋白、疾病相关抗原、免疫辅助分子或替代蛋白) 或者自身作为有用分子 (例如, 作为核酶或反义序列) 的序列。

[0167] 从多种逆转录病毒可以容易地构建本发明的逆转录病毒载体构建体, 所述逆转录病毒包括例如 B、C 和 D 型逆转录病毒以及泡沫病毒 (spumaviruses) 和慢病毒 (参见, 例如, RNA Tumor Viruses (RNA 肿瘤病毒), 第二版, 冷泉港实验室, 1985)。这些逆转录病毒可以容易地从诸如美国典型培养物保藏中心 (“ATCC”; Rockville, Maryland) 的保藏或收集单位获得, 或者使用通常可利用的技术从已知来源中分离。结合本文提供的公开内容和标准的重组技术 (例如, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆: 实验室指南), 第二版, 冷泉港实验室出版社, 1989; Kunkle, 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:488), 可以容易地利用上述逆转录病毒的任一种以便组装或构建本发明所述的逆转录病毒载体构建体、包装细胞 (packaging cells) 或生产细胞 (producer cells)。

[0168] 用于病毒载体的合适的启动子一般可以包括, 但不限于逆转录病毒的 LTR、SV40 启动子、以及 Miller, et al., 1989 Biotechniques 7:980990 中描述的人巨细胞病毒 (CMV) 启动子或任何其他启动子 (例如, 诸如真核细胞启动子的细胞启动子, 包括但不限于组蛋白、pol III, 和 β -肌动蛋白启动子)。可以应用的其他的病毒启动子包括, 但不限于腺病毒启动子、胸苷激酶 (TK) 启动子和 B-19 细小病毒启动子。从包含在本文的教导中选择合适的启动子对于本领域技术人员是显而易见的, 并且合适启动子可以来自调节的启动子

(regulated promoters) 或上文描述的启动子。

[0169] 应用逆转录病毒质粒载体转导包装细胞系以形成生产细胞系。可以被转染的包装细胞的实例包括但不限于 PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+E-86, GP+envAm12 以及 Miller, human Gene Therapy (人基因疗法), 1:5-14 (1990) 描述的 DAN 细胞系。载体可以通过本领域已知的任何方式转导包装细胞。这些方式包括但不限于电穿孔、使用脂质体和 $\text{Ca} \cdot \text{PO}_4$ 沉淀。在一个可选择的方案中, 逆转录病毒质粒载体可以被装入脂质体中, 或者偶联到脂质, 然后被给予宿主。

[0170] 生产细胞系产生传染性逆转录病毒载体颗粒, 其包括编码 PIMS 的核酸序列。然后应用这种逆转录病毒载体颗粒来体外或体内转导真核细胞。转导的真核细胞会表达编码蛋白或多肽的核酸序列。可以被转导的真核细胞包括, 但不限于胚胎干细胞以及造血干细胞、肝细胞、成纤维细胞、循环外周血单核和多形核细胞包括髓单核细胞、淋巴细胞、肌细胞、组织巨噬细胞、树突细胞、枯否细胞、淋巴结和脾脏的淋巴样和网状内皮细胞、角质形成细胞、内皮细胞和支气管上皮细胞。

[0171] 宿主细胞

[0172] 本发明的另一方面提供了用本发明的多核苷酸或克隆 / 表达构建体转化或转染的宿主细胞, 或者包含本发明的多核苷酸或克隆 / 表达构建体的宿主细胞。利用本领域已知的方法, 包括转化、转染和转导, 将多核苷酸和克隆 / 表达构建体导入合适的细胞。宿主细胞包括经历离体细胞治疗, 例如包括离体基因治疗的个体的细胞。除个体自己的细胞 (例如, 人患者自己的细胞) 外, 作为本发明一方面的包含本发明的多核苷酸、载体或蛋白的真核宿主细胞包括 VERO 细胞, HeLa 细胞, 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系 (包括能够修饰表达的 PIMS 的糖基化模式的改良 CHO 细胞, 参见公布的第 2003/0115614 A1 号美国专利申请, 其通过引用的方式并入本文)、COS 细胞 (诸如 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 (*podoptera frugiperda*) 细胞 (例如, Sf9 细胞)、酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞以及本领域已知的用于表达、任选地分离本发明的蛋白或肽的其他真核细胞。本发明也包括原核细胞, 其包括但不限于大肠杆菌、枯草杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、链霉菌或者本领域已知的适于表达以及任选地分离本发明的蛋白或肽的任何原核细胞。特别地, 在从原核细胞分离蛋白或肽时, 使用本领域已知的用于从包涵体中提取蛋白的技术是被考虑的。根据本文的教导选择合适的宿主在本领域技术人员的水平所及范围内。

[0173] 可以在经改良适合激活启动子、选择转化子或扩增特定基因的常规营养培养基中培养改造的 (engineered) 的宿主细胞。用于选择的特定宿主细胞表达的培养条件, 诸如温度、pH 等对本领域普通技术人员是显而易见的。可以利用多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实例包括 Gluzman, 1981 Cell 23:175 描述的猴肾成纤维细胞的 COS-7 细胞系, 以及能够表达相容载体的其他细胞系, 例如, C127, 3T3, CHO, HeLa 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体包含复制起始点 (origin of plication)、合适的启动子, 以及任选的增强子, 还包含任何必需的核糖体结合位点、多腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点、转录终止序列以及 5' 侧翼非转录序列, 例如, 如本文描述的关于 PIMS 表达构建体制备的那样。来自 SV40 剪接的 DNA 序列以及多核苷酸化位点可以用于提供所需的非转录基因元件。将构建体导入宿主细胞可以通过本领域技术人员熟悉的多种方法实现, 这些方

法包括但不限于磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染或电穿孔 (Davis et al., 1986 Basic Methods in Molecular Biology (分子生物学基础方法))。

[0174] 在一个实施方案中,通过指导本发明的蛋白或多肽表达的重组病毒构建体转导宿主细胞。转导的宿主细胞产生包含表达的蛋白或多肽的病毒颗粒,所述蛋白质或多肽来自并入了病毒发芽期的病毒颗粒的宿主细胞膜的部分。

[0175] 药物组合物

[0176] 在一些实施方案中,本发明的组合物,诸如 PIMS 或包含编码本文描述的蛋白的多核苷酸的组合物适于在足以允许宿主细胞内编码的蛋白在体内或体外表达的条件和时间下给药,用于基因治疗等。所述组合物可以配制成用于依据已知的方法学给药的药物组合物。药物组合物通常包含一种或多种重组表达构建体,和 / 或所述构建体的表达产物,联合药学上可接受的载体、赋型剂或稀释剂。所述载体在应用的剂量和浓度下对接受者是无毒的。对于基于核酸的制剂或对于包含本发明的表达产物的制剂,给予约 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 100mg/kg 体重,例如,通过真皮内、皮下、肌肉或静脉内途径,或者通过本领域已知的在特定条件下适合的任一途径给药。例如,优选的剂量是约 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 1mg/kg,特别优选的是约 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0177] 对本领域技术人员而言,明显的是,给药的次数和频率依赖于宿主的反应。用于治疗用途的药学上可接受的载体是制药领域公知的,例如,在 Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿氏药物科学), Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985) 中已有描述。例如,可以使用生理 pH 的无菌盐水和磷酸缓冲盐。在药物组合物中可以提供防腐剂、稳定剂、染料等。例如,可以添加作为防腐剂的苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。同前引用的第 1449 页。此外,可以使用抗氧化剂和悬浮剂,同前。本发明的化合物可以以游离碱或盐形式使用,这两种形式都在本发明的考虑范围之内。

[0178] 包含本发明的一种或多种核酸构建体、或者对应由所述核酸构建体编码的产物的蛋白的药物组合物可以呈现为允许将所述组合物给予患者的任何形式。例如,组合物可以是固体、液体或气体 (气溶胶) 的形式。给药的经典途径包括,但不限于口服、表面、肠胃外、含服 (buccal)、舌下的、直肠的、阴道的和鼻内给药。用于本文的术语肠胃外的包括皮下注射、静脉内、肌肉内、胸骨内、海绵窦内、鞘内 (intrathecal)、耳道内 (intrameatal)、尿道内注射或输注技术。配制药物组合物以使其中包含的活性成分能够在将该组合物给予患者时是生物可利用的。给予患者的组合物呈现一个或多个剂量单位的形式,例如,其中片剂可以是单一剂量单位,气溶剂形式的本发明的一种或多种化合物的容器 (container) 可以包含多个剂量单位。

[0179] 对于口服给药,可以存在赋型剂和 / 或粘合剂。实例是蔗糖、高岭土、甘油、淀粉糊精类、海藻酸钠、羧甲基纤维素和乙基纤维素。着色和 / 或调味剂可以存在。可以应用包被壳。

[0180] 组合物可以是液体的形式,例如,酏剂、糖浆剂、溶液、乳剂或悬浮液。作为两个实例,液体可以用于口服或用于通过注射递送。当计划用于口服给药时,优选的组合物除包含一种或多种 PIMS 构建体或表达的产物外,还包含甜味剂、防腐剂、染料 / 着色和调味增强剂中的一种或多种。在计划通过注射给药的组合物中,可以包括表面活性剂、防腐剂、湿润剂、分散剂、悬浮剂、缓冲液、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0181] 用于本文的液体药物组合物,无论是溶液、悬浮液形式还是其他类似形式,都可以

包括下述化合物的一种或多种：无菌稀释剂，诸如注射用水、盐水溶液、优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠，诸如合成的单或双甘油酯的不挥发油，其可以作为溶剂或悬浮介质，聚乙烯二醇类、甘油、丙二醇或其他溶剂；诸如苯甲醇或尼泊金甲酯的抗菌剂；诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠的抗氧化剂；诸如乙二胺四乙酸的螯合剂；诸如乙酸盐类、柠檬酸类或磷酸盐类的缓冲液，用于调整张力的试剂诸如氯化钠或葡萄糖，以及本领域已知的任何佐剂。免疫刺激物（佐剂）的实例包括 N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸-D-异谷酰胺（MDP）、脂多糖（LPS）、葡聚糖、IL12、GM-CSF、 γ 干扰素和 IL15。肠胃外制剂可以装于由玻璃或塑料制造的安瓿瓶、一次用弃的注射器或多剂量小瓶。可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0182] 在制剂中包括其他组分，诸如递送媒介物（vehicles）也是理想的，所述媒介物包括，但不限于铝盐、油包水乳剂、生物可降解的油媒介物、水包油乳剂、生物可降解的微胶囊以及脂质体。上文已描述了用于所述媒介物的免疫刺激物（佐剂）的实例。

[0183] 尽管本领域普通技术人员已知的任一合适的载体都可以用于本发明的药物组合物中，载体的类型会依赖于给药方式以及是否需要缓释而变化。对于肠胃外给药，诸如皮下注射，载体优选包括水、盐水、乙醇、脂肪、蜡或缓冲液。对于口服给药，可以应用上述载体或固体载体的任一种，诸如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖以及碳酸镁。生物可降解的微球体（例如，polylactic galactide）也可以用作本发明的药物组合物的载体。例如，在 U.S. Patent Nos. 4,897,268 和 5,075,109（其通过引用的方式并入本文）中公开了合适的生物可降解的微球体。在这方面，优选的是，微球体大于约 25 微米。

[0184] 药物组合物还可以包含诸如缓冲液的稀释剂、诸如抗坏血酸的抗氧化剂、低分子量（少于约 10 个残基）多肽、蛋白质、氨基酸、碳水化合物（例如，葡萄糖、蔗糖或糊精类）、螯合剂（例如，EDTA）、谷胱甘肽和其他稳定剂和赋型剂。中性缓冲盐或与非特异性血清白蛋白混合的盐水是示例性的合适的稀释剂。优选地，使用合适的赋型剂溶液（例如，蔗糖）作为稀释剂，将产物配制成冷冻干产物。

[0185] 本发明所述的药物组合物还包括稳定的蛋白和依据本领域已知的技术的液体药物配方，所述技术包括公布的美国第 2006/0008415 A1 号专利申请中公开的技术，其通过引用的方式并入本文。这类技术包括蛋白的衍生化，其中所述蛋白包含与 N-乙酰-L-半胱氨酸、N-乙基马来酰亚胺或半胱氨酸偶联的巯基。

[0186] 如上所述，本发明包括能够递送编码 PIMS 分子的核酸分子的组合物。这样的组合物包括重组病毒载体，例如，反转录病毒（参见 WO90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698 和 W094/03622）、腺病毒（参见 Berkner, 1988 Biotechniques 6:616-627; Li et al., 1993 Hum. Gene Ther. 4:403-409; Vincent et al., Nat. Genet. 5:130-134; 和 Kolls et al., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219）、痘病毒（参见 U.S. Patent No. 4,769,330; U.S. Patent No. 5,017,487; 和 W089/01973）、与聚阳离子分子配合的重组表达构建体核酸分子（参见 W093/03709）、以及与脂质体结合的核酸（参见 Wang et al., 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851）。在一些实施方案中，DNA 可以与杀死的或灭活的腺病毒连接（参见 Curiel et al., 1992 Hum. Gene Ther. 3:147-154; Cotton et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6094）。其他合适的组合物包括 DNA-配体（参见 Wu et al., 1989 J. Biol. Chem. 264:16985-16987）和脂质-DNA 结合物（参见 Feigner et al.,

1989Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 :7413-7417)。

[0187] 除了直接的体内操作程序,也可以利用离体操作程序,其中将细胞从宿主(例如,诸如人患者的个体)中取出,修饰后放入相同或另一宿主动物中。显然地,本领域技术人员可以利用上述任一组合用于将本发明的构建体、蛋白质/多肽或编码它们的核酸导入离体环境中的组织细胞中。用于病毒、物理和化学摄取方法的操作方案是本领域公知的。

[0188] 抗体的制备

[0189] 通过多次皮下或腹腔内注射抗原多肽或其片段以及佐剂,通常在动物(例如,兔、仓鼠、山羊、绵羊、马、猪、大鼠、沙鼠、豚鼠、小鼠或任何其他合适哺乳动物,以及其他非哺乳动物种类)体内产生针对抗原多肽的多克隆抗体。佐剂包括,但不限于完全或不完全的弗氏佐剂、诸如氢氧化铝的矿物凝胶、诸如溶血卵磷脂的表面活性物质、复合多元醇(pluronic polyols)、聚阴离子、肽、油乳剂和二硝基苯酚。BCG(卡介苗)和短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)也是潜在地有用的佐剂。将抗原多肽与载体蛋白结合是有用的,所述载体蛋白在待免疫的物种中是致免疫的;典型的载体包括钥孔虫戚血兰素(keyholelimpet hemocyanin)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。同样,诸如明矾的聚集剂用于增强免疫反应。免疫后,给动物取血并利用常规的技术测定血清的抗-抗原多肽抗体滴度。多克隆抗体可以用于它们被检测的血清中,或者可以利用例如抗原亲和层析法从所述血清中纯化。

[0190] 通过培养连续细胞系(continuous cell lines),利用提供抗体分子制备的任何方法来制备针对抗原多肽的单克隆抗体。例如,可以通过 Kohler et al., Nature 256 :495[1975]中描述的杂交瘤方法、人B-细胞杂交瘤技术(Kosbor et al., Immunol Today 4 :72,1983 ;Cote et al., Proc Natl Acad Sci 80 :2026-2030,1983)和EBV-杂交瘤技术(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy(单克隆抗体核癌症治疗), Alan R Liss Inc, New York N. Y., pp 77-96, (1985)来制备单克隆抗体。

[0191] 当应用杂交瘤技术时,可以使用骨髓瘤细胞系。适合用于杂交瘤制备融合技术的细胞系优选不产生内源性抗体,具有高融合效率,并呈现出酶缺陷,所述缺陷使它们不能在支持仅期望的融合细胞(杂交瘤)生长的确定选择培养基中生长。例如,如果被免疫的动物是小鼠,本领域技术人员可以使用 3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8. 653, NS 1/1. Ag41, Sp210-Ag14, F0, NS0/U, MPC-11, MPC 11-X45-GTG 1.7 和 S 194/5XX0Bu1 ;如果是大鼠。可以使用 R210. RCY3, Y3-Ag 1. 2. 3, IR983F 和 4B210 ;以及 U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 和 UC729-6 都可以用于与细胞融合物的联合。

[0192] 在可选择的实施方案中,可以从噬菌体展示文库中制备人抗体(Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227 :381[1991] ;Marks et al., J. Mol. Biol. 222 :581, 还可参见 U. S. Patent No. 5, 885, 793.)。这些方法通过丝状噬菌体表面的抗体集合(repertoire)展示以及随后通过它们与选择的抗原的结合选择噬菌体来模拟免疫选择。一种这样的技术被描述于以 Adams 等的名字提交的第 PCT/US98/17364 号的 PCT 申请中,其描述了利用这样一种方法分离对于 MPL- 和 msk 受体具有高亲和力和功能拮抗的抗体。在该方法中,可以通过如前所述(Mullinax, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87 :8095-8099[1990])克隆来自外周血淋巴细胞的天然重排的人 V 基因来制备人抗体基因的完整集合。

[0193] 可选择地,可以由通过将每一人 V_H 片段与随机核苷酸的 D 片段以及人 J 片段

组装的未重排的 V 基因片段制备完全合成的人重链集合 (Hoogenboom, et al., J. Mol. Biol. 227 :381-388[1992])。同样,可以通过将每一人 V 片段与 J 片段结合来构建轻链集合 (Griffiths, et al, EMBOJ. 13 :3245-3260[1994])。将编码完整抗体 (即,重链和轻链) 的核苷酸连接为单链 Fv 片段并将该多核苷酸连接到编码丝状噬菌体较小外壳蛋白的核苷酸。当该融合蛋白表达于噬菌体表面时,可以通过利用固定的抗原的选择来鉴定编码特异性抗体的多核苷酸。

[0194] 除了制备多克隆和单克隆抗体的经典方法外,可以考虑制备任一已知抗体形式的任何方法。除了多克隆和单克隆的,抗体形式还包括嵌合的抗体、人源化抗体、CDR- 移植的抗体以及抗体片段和变异体。

[0195] 特异性结合剂的变异体和衍生物

[0196] 在一个实施例中,提供了插入变异体,其中一个或多个氨基酸残基添加到特异性结合结构域的序列。插入可以位于蛋白的任一端或两端,或者可以位于特异性结合结构域的内部区域。本发明的变异产物还包括成熟 PIMS,其中除去了前导区或信号序列,产生的蛋白具有额外的氨基末端残基。额外的氨基末端残基可以来自另一蛋白,或者可以包括不可识别为来自特定蛋白的一个或多个残基。包括具有 -1 位的额外蛋氨酸残基 (例如, Met-1-PIMS) 的多肽,具有 -2 和 -1 位的额外蛋氨酸和赖氨酸残基的本发明的多肽 (Met-2-Lys-1-PIMS) 也包括在内。放在括号里的命名强调了描述的特征 (即, N- 末端残基),并不意味着将 PIMS 限定为缺少所述 N- 末端的分子。实际上, Met-1-PIMS 和 MET-2-Lys-1-PIMS 都是 PIMS。具有额外 Met、Met-Lys 或 Lys 残基 (或者一个或多个通用的碱性残基) 的本发明的多肽的变异体特别用于提高重组蛋白在细菌宿主细胞内的产生。

[0197] 本发明还包括本发明的特异性多肽,其具有由使用特异性表达系统产生的额外的氨基酸残基。例如,将表达期望多肽的可商购的载体用作谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 融合产物的部分提供了将 GST 组份从所述期望多肽切割后在 -1 位具有额外甘氨酸残基的期望多肽。也可以考虑由在其他载体系统中表达产生的变异体,包括那些其中组氨酸标签并入氨基酸序列,通常在该序列的羧基和 / 或氨基末端并入的变异体。

[0198] 在另一方方面,本发民提供了缺失变异体,其中从本发明的多肽中去除一个或多个氨基酸残基。可以在所述多肽的一端或两端,或者通过去除氨基酸序列内的一个或多个残基实现缺失。根据本发明,缺失变异体必须包括多肽的所有片段。

[0199] 抗体片段指具有对应至少部分免疫球蛋白可变区序列的的序列的多肽。可以制备片段,例如通过酶性切割或化学切割对应全长抗体的多肽。其他结合片段包括通过合成技术或通过重组 DNA 技术制备的那些,诸如通过包含编码部分抗体可变区的核酸序列的重组质粒的表达。优选的多肽片段显示了本文描述的靶标独特的或特异的免疫学特性。具有所需免疫学特性的本发明的片段可以通过本领域公知的和常规实践的任何方法制备。

[0200] 仍在另一方面,本发明提供了 PIMS 的取代变异体。取代变异体包括那些其中氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基被去除并用可选的残基替代的多肽。在一些实施方案中,所述取代是天然保守的;然而,本发明也包括非保守的取代。可以依据物理特性和对二级和三级蛋白结构的贡献,将氨基酸分类。保守取代在本领域被公认为一个氨基酸用具有相似特性的另一氨基酸取代。示例性保守取代列于下文紧接的表 A 中 (参见,1997 年 3 月 13 日公布的 WO 97/09433,第 10 页 (PCT/GB96/02197,9/6/96 日提交))。

| | | | |
|--------|--------|-------------|-------------|
| [0201] | 表 A | | |
| [0202] | 保守取代 I | | |
| [0203] | 侧链 | 特性 | 氨基酸 |
| [0204] | 脂肪族的 | 非极性的 | G A P I L V |
| [0205] | | 极性的 - 不带电荷的 | S T M N Q |
| [0206] | | 极性的 - 带电荷的 | D E K R |
| [0207] | 芳香族的 | | H F W Y |
| [0208] | 其他 | | N Q D E |

[0209] 可选择地保守氨基酸可以如 Lehninger, [Biochemistry(生物化学), 第二版; Worth 出版社, Inc. NY :NY(1975), pp. 71-77] 中描述的分组, 如随后的表 B 中所示出的。

[0210] 表 B

| | | | |
|--------|-------------|--------------------|-------|
| [0211] | | 保守取代 II | |
| [0212] | 类型 | 侧链特性 | 氨基酸 |
| [0213] | 非极性的 (疏水的) | A. 脂肪族的 : | ALIVP |
| [0214] | | B. 芳香族的 | FW |
| [0215] | | C. 含硫的 | M |
| [0216] | | D. 边界 (Borderline) | G |
| [0217] | 不带电荷的 - 极性的 | A. 羟基 | STY |
| [0218] | | B. 酰胺 | NQ |
| [0219] | | C. 巯基 | C |
| [0220] | | D. 边界 | G |
| [0221] | 带正电荷的 (碱性) | | KRH |
| [0222] | 带负电荷的 (酸性) | | DE |
| [0223] | 保守取代 II | | |
| [0224] | 侧链特性氨基酸 | | |
| [0225] | 非极性的 (疏水的) | | |
| [0226] | | A. 脂肪族的 :ALIVP | |
| [0227] | | B. 芳香族的 :FW | |
| [0228] | | C. 含硫的 : M | |
| [0229] | | D. 边界 : G | |
| [0230] | 不带电荷的 - 极性的 | | |
| [0231] | | A. 羟基 : | STY |
| [0232] | | B. 酰胺 : | NQ |
| [0233] | | C. 巯基 : | C |
| [0234] | | D. 边界 : | G |
| [0235] | 带正电荷的 (碱性) | | K R H |
| [0236] | 带负电荷的 (酸性) | | D E |

[0237] 本发明还提供了 PIMS 多肽的衍生物。衍生物包括携带非氨基酸残基插入、缺失或取代的修饰的 PIMS 多肽。优选地, 所述修饰是天然共价的, 并且包括, 例如与聚合物、脂质、

其他有机和无机部分的化学键合。本发明的衍生物可以制备为增加特异性 PIMS 多肽的循环半衰期,并且可以设计为提高多肽对期望的细胞、组织或器官的靶向能力。

[0238] 本发明还包括共价修饰或衍生的 PIMS 以包括一个或多个水溶性聚合物连接,诸如聚乙二醇、聚氧乙烯二醇或聚丙二醇,如 U. S. Patent Nos :4, 640, 835, 4, 496, 689, 4, 301, 144, 4, 670, 417, 4, 791, 192 和 4, 179, 337 所描述的。本领域其他有用的聚合物包括单甲氧聚乙二醇、葡聚糖、纤维素以及其他基于碳水化合物的聚合物、聚-(N-乙炔吡咯酮)-聚乙二醇、丙烯二醇同聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化 (polyoxyethylated) 多元醇 (例如,甘油) 和聚乙烯醇,以及这些聚合物的混合物。特别优选的是聚乙二醇 (PEG) 衍生的蛋白。水溶性聚合物可以结合在特定位置,例如结合在本发明所述的蛋白和多肽的氨基末端或者随机连接在所述多肽的一个或多个侧链。在 Gonzales 等享有的 US Pat. No. 6, 133, 426 中描述了 PEG 提高治疗能力的用途。

[0239] 用于免疫球蛋白诱变的靶位点

[0240] 操纵抗原特异性免疫球蛋白 (例如,抗体) 的固有特性可以利用某些策略,其是非基于免疫球蛋白的结合分子不可用的。在这些选择中利于例如基于抗体的分子的策略的理想是通过亲和力成熟体内调节抗体与其靶标的亲和力,其利用免疫球蛋白基因的体细胞高度突变产生了作为免疫反应进展的亲和力增加的抗体。另外,已经开发了重组技术来改变免疫球蛋白以及免疫球蛋白区域和结构域的结构。因此,可以制备来自抗体的多肽,其显示了对给定抗原的改变的亲和力,并且许多用于鉴定和纯化或分离这些多肽的纯化方案和监测筛选 (monitoring screen) 是本领域已知的。利用这些已知的技术,可以获得包含抗体来源的结合结构域的多肽,其显示了降低的或增加的对抗原的亲和力。制备展示改变的亲和力的多肽变异体的策略包括利用编码抗体的 DNA 的位点特异性或随机诱变以改变存在于蛋白中的氨基酸,随后通过设计的筛选步骤来回收显示所期望变化的抗体变异体,例如,相对于未修饰的亲本或指示抗体增加或降低亲和力。

[0241] 在诱变策略中最通常靶向的用于改变亲和力的氨基酸残基是抗体轻链和重链可变区的互补决定区 (CDR) 或高变区中的那些残基。这些区域包含与抗原以物理化学方式相互作用的残基,以及影响这些残基空间排列的其他氨基酸。然而,CDR 区外的可变结构域的框架区中的氨基酸也显示出对抗体的抗原结合特性具有重要贡献,且能够被靶向以操纵所述特性。参见 Hudson, P.J. Curr. Opin. Biotech. , 9 :395-402 (1999) 以及其中的参考文献。

[0242] 可以通过将随机或定点诱变限定到 CDR 中的位点来制备较小和更有效的抗体变异体筛选文库,所述 CDR 对应于体细胞亲和力成熟过程中倾向于“高突变”的区域。参见 Chowdhury, et al., Nature Biotech. , 17 :568-572 (1999) 以及其中的参考文献。已知以这种方式确定高突变位点的 DNA 元件的类型包括直接的和反向重复序列、某些共有序列、二级结构和回文结构。共有 DNA 序列包括四碱基序列嘌呤 -G- 嘧啶 -A/T (即, A 或 G-G-C 或 T-A 或 T) 和丝氨酸密码子 AGY (其中 Y 可以是 C 或 T)。

[0243] 因此,本发明的另一方面是一组用于修饰抗体与其靶标亲和力的诱变策略。这些策略包括完整的重链和 / 或轻链可变区的诱变、仅 CDR 区的诱变、CDR 内共有高突变位点的诱变、框架区诱变或者这些方法的任一组合 (这里的“诱变”可以是随机的或定点的)。通过解决谈及的抗体的结构能够实现 CDR 区的确定性界定以及对包含抗体结合位点的残基的鉴定,并且通过本领域已知的技术,诸如 X-射线结晶学鉴定抗体:配体复合

物。基于所述抗体晶体结构的分析和表征的种方法是本领域技术人员已知的,并可以用于约计 CDR 区。这些通常使用的方法的实例包括 Kabat, Chothia, AbM 和接触定义 (contact definitions)。

[0244] Kabat 定义基于序列变异性,其是预测 CDR 区的最常用的定义。Johnson, et al., *Nucleic Acids Research*, 28 :214-8(2000)。Chothia 定义基于结构环区的定位 (Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196 :901-17[1986]; Chothia et al., *Nature*, 342 :877-83[1989].)。AbM 定义介于 Kabat 和 Chothia 定义之间。AbM 是由牛津分子组 (Oxford Molecular Group) 生产的用于抗体结构建模的整套程序 (Martin, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 86 : 9268-9272[1989]; Rees, et al., ABMTM, a computer program for modeling variable regions of antibodies (用于建模抗体可变区的计算机程序), Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd.)。利用知识数据库和从头开始方法的组合, AbM 套件从一级结构模拟抗体的三级结构。最近引入了称为接触定义的另一定义。参见 MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 5 :732-45(1996)。这一定义基于对可利用的复合晶体结构的分析。

[0245] 根据惯例,重链中的 CDR 结构域通常称为 H1、H2 和 H3,并从氨基末端到羧基末端依次顺序编码。轻链中的 CDR 区通常称为 L1、L2 和 L3,并从氨基末端到羧基末端依次顺序编码。

[0246] CDR-H1 大约为 10 至 12 个残基的长度,并根据 Chothia 和 AbM 定义通常从 Cys 后的 4 个残基开始,或者根据 Kabat 定义通常从 5 个残基后开始。通常, H1 后是 Trp、通常是 Trp-Val,但也可以是 Trp-Ile 或 Trp-Ala。根据 AbM 定义, H1 的长度大约为 10-12 个残基而 Chothia 定义排除了最后 4 个残基。

[0247] 根据 Kabat 和 AbM 定义, CDR-H2 通常在 H1 末端后的 15 个残基开始。H2 前的残基通常为 Leu-Glu-Trp-Ile-Gly,但有许多变异。H2 后通常为氨基酸序列 Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala。根据 Kabat 定义, H2 的长度为大约 16 至 19 个残基,其中 AbM 定义预测了该长度通常为 9 至 12 个残基。

[0248] CDR-H3 通常在 H2 末端后的 33 个残基开始,前面通常为氨基酸序列 Cys-Ala-Arg。H3 后通常是氨基酸 Gly。H3 的长度为 3 至 25 个残基。

[0249] CDR-L1 通常在约残基 24 处开始,并且通常位于 Cys 后。CDR-L1 后的残基总是 Trp,并且开始通常为下述序列中的一种: Trp-Tyr-Gln, Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln 或 Trp-Tyr-Leu。CDR-L1 的长度约为 10 至 17 个残基。

[0250] CDR-L2 在 L1 末端后的大约 16 个残基开始。它一般位于残基 Ile-Tyr, Val-Tyr, Ile-Lys 或 Ile-Phe 后。CDR-L2 的长度为大约 7 个残基

[0251] CDR-L3 通常在 L2 末端后的 33 个残基开始,并通常位于 Cys 后。L3 后面通常为氨基酸序列 Phe-Gly-XXX-Gly。L3 的长度是大约 7 至 11 个残基。

[0252] 本领域已经描述了修饰抗体的多种方法,包括,例如,制备人源化抗体的方法,其中人源化免疫球蛋白重链可变区框架序列与供体免疫球蛋白重链可变区框架 65% 至 95% 相同。除了 CDR 外,每一人源化免疫球蛋白链通常包含能够例如与 CDR 相互作用以影响结合亲和力的来自供体免疫球蛋白框架的氨基酸,诸如与供体免疫球蛋白中的 CDR 直接相邻的一个或多个氨基酸或在约 3 埃之内的那些,如由分子建模所预测的。可以通过多种位置标准的任一个或全部来设计重链和轻链。当结合成完整抗体时,人源化免疫球蛋白基本上

在人体内无免疫原性,并基本上保留与供体免疫球蛋白相同的对抗原的亲合力,所述抗原诸如蛋白或包含相关表位的其他化合物。

[0253] 在一个实施例中,描述了制备抗体以及抗体片段的方法,所述抗体和抗体片段具有与亲本抗体相似的结合特异性,但它具有增加的人的特性。人源化抗体可以通过链改组(chain shuffling)获得,例如,利用噬菌体展示技术和包含对感兴趣抗原特异的非人抗体的重链或轻链可变区的多肽,其随后与人互补(轻链或重链)链可变区的集合结合。鉴定了对感兴趣抗原特异的杂交配对物(Hybrid pairings),并将来自选择的配对物的人链与人互补可变结构域(重链或轻链)的集合结合。在另一实施方案中,将来自非人抗体的CDR的组份与来自人抗体的CDR的组份部分的集合结合。从得到的抗体多肽二聚体文库中,选择杂交物并可以用于第二次人源化改组步骤中;可选择地,如果杂交物已经具有足够的人特性从而具备治疗价值,去除第二步骤。增加人特性的修饰方法是本领域已知的。

[0254] 另一个实施例是制备人源化抗体的方法,其通过用CDR氨基酸序列取代相应的人CDR氨基酸序列和/或用FR氨基酸序列取代相应的人FR氨基酸序列。

[0255] 另一个实施例提供了识别抗体可变结构域的氨基酸残基的方法,该可变结构域可以被修饰而不降低抗原结合结构域的天然亲合力,同时降低其与异源物种相关的免疫原性;还提供了制备这些修饰的抗体可变区用于给予异源物种的方法。

[0256] 设计通过本领域已知的任何方法对诸如抗体的免疫球蛋白进行修饰来实现对抗原增加的或降低的结合亲和力和/或降低抗体在受者(recipient)中的免疫原性和/或调节效应器活性水平。在一种方法中,可以修饰人源化抗体以去除糖基化位点以便增加抗体对其同类抗原的亲合力(Co, et al., *Mol. Immunol.* 30:1361-1367[1993])。诸如“整形(reshaping)”、“高度嵌合化(hyperchimerization)”和“镶饰(veneering)/重塑(resurfacing)”的技术已经产生了具有更大治疗潜力的人源化抗体。Vaswami, et al., *Annals of Allergy, Asthma, & Immunol.* 81:105(1998); Roguska, et al., *Prot. Engineer.* 9:895-904(1996)。还可参见US Pat. No. 6,072,035,其描述了用于整形抗体的方法。尽管这些技术通过降低外源残基的数目减弱了抗体的免疫原性,但它们没有防止多次抗体给药后的抗独特型和抗异型反应。用于降低免疫原性的这些方法的替代方法在Gilliland et al., *J. Immunol.* 62(6):3663-71(1999)中被描述。

[0257] 在许多实例中,使抗体人源化导致抗原结合能力的丧失。因此优选“回复突变(back mutate)”人源化抗体以包括一个或多个在初始(最经常为啮齿类动物)抗体存在的氨基酸残基以试图恢复抗体的结合亲合力。参见,例如,Saldanha et al., *Mol. Immunol.* 36:709-19(1999)。

[0258] 免疫球蛋白的糖基化已被表明影响效应器功能、结构稳定性和从抗体产生细胞中的分泌速率(参见Leatherbarrow et al., *Mol. Immunol.* 22:407(1985),其通过引用的方式并入本文)。负责这些特性的碳水化合物基团通常与抗体的恒定区连接。例如,IgG在C_{H2}结构域中的Asn297的糖基化有助于IgG全力激活补体依赖的细胞溶解作用(Tao et al., *J. Immunol.* 143:2595(1989))。例如,IgM C_{H3}结构域中的Asn 402的糖基化有助于抗体合适的组装和细胞溶解活性(Muraoka et al., *J. Immunol.* 142:695(1989))。去除IgA抗体的C_{H1}和C_{H3}结构域中的162和419位的糖基化位点导致细胞内降解以及至少90%的分泌抑制(Taylor et al., *Wall, Mol. Cell. Biol.* 8:4197(1988))。因此,本发明的分子包括包

括突变性改变的免疫球蛋白,其通过突变例如恒定亚区中的特定残基显示了改变的糖基化模式以改变效应器功能。参见,Co et al.,*Mol. Immunol.* 30 :1361-1367(1993), Jacquemon et al., *J. Thromb. Haemost.* 4 :1047-1055(2006), Schuster et al., *Cancer Res.* 65 :7934-7941(2005),和 Warnock et al., *Biotechnol Bioeng.* 92 :831-842(2005),其每一篇通过引用的方式并入本文。

[0259] 本发明还包括具有至少一个结合结构域的 PIMS,其在序列上与已知的免疫球蛋白可变区序列至少 80%、优选 90%或 95%或 99%相同,并且其具有至少一个不同于所述免疫球蛋白可变区的残基,其中所述变化的残基相对于免疫球蛋白可变区增加了糖基化位点,改变了一个或多个糖基化位点的定位,或者优选地去除了与糖基化位点。在一些实施方案中,所述变化去除了免疫球蛋白可变区框架中的 N-连接的糖基化位点,或者去除了出现在免疫球蛋白重链可变区框架(在跨越约氨基酸残基 65 至约氨基酸残基 85 的区域,利用 Co et al., *J. Immunol.* 148 :1149, (1992) 的编号惯例)的 N-连接的糖基化位点。

[0260] 可以考虑本领域已知的任何方法用于制备 PIMS,其相对于免疫球蛋白指示序列显示了改变的糖基化模式。例如,可以利用多种遗传学技术来改变一个或多个特定的残基。可选择地,用于进行制备的宿主细胞可以被改造为产生所述改变的糖基化模式。例如,本领域已知的一种方法提供了增加了 ADCC 的对分(bisected)、非果糖化变异体形式的改变的糖基化。变异体产生自包含寡糖修饰酶的宿主细胞中的表达。可选择地,考虑 BioWa/Kyowa Hakko 的 Potelligent 技术来降低本发明所述的糖基化分子的岩藻糖含量。在一个已知的方法中,提供了用于重组免疫球蛋白产生的 CHO 宿主细胞,其通过产生 GDP-岩藻糖,修饰了免疫球蛋白 F_c 区的糖基化模式。可以利用该技术来修饰本发明的 PIMS 的恒定亚区的糖基化模式。

[0261] 除了修饰诸如免疫球蛋白的结合结构域的结合特性外,以及除了诸如人源化的修饰外,本发明包括通过改变或突变促进效应器功能的残基来调节效应器功能,诸如免疫球蛋白恒定亚区的效应器功能。利用本领域已知的任何技术,诸如 Presta et al., *Biochem. Soc. Trans.* 30 :487-490(2001) 中公开的方法(其通过引用的方式并入本文)能够实现这些修饰。示例性的方法包括利用 Presta et al. 中公开的方案来修饰已知影响一个或多个恒定亚区与 FC γ RI, FC γ RII, FC γ RIII, FC α R 和 / 或 FC ϵ R 结合的特定残基。

[0262] 在另一方法中,可以利用 Xencor XmAb 技术改造对应于 Fc 结构域的恒定亚区以增强细胞杀伤效应器功能。参见 Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 103(11) :4005-4010(2006),其通过引用的方式并入本文。例如,利用这一方法,本领域技术人员可以产生对 FC γ R 特异性和结合最优化的恒定亚区,从而增强细胞杀伤效应器功能。

[0263] PIMS 的制备

[0264] 可以使用多种表达载体 / 宿主系统以包含和表达本发明的 PIMS。这些系统包括,但不限于诸如用重组的噬菌体转化的细菌的微生物、质粒、粘粒或其他表达载体;用酵母表达或穿梭载体转化的酵母;用病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用病毒表达载体转染(例如,花椰菜花叶病毒, CaMV;烟草花叶病毒, TMV)或用细菌表达载体转化(例如, Ti 或 pBR322 质粒)的植物细胞系统;或者动物细胞系统。用于重组 PIMS 产生的哺乳动物细胞包括但不限于 VERO 细胞、HeLa 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、COS 细胞(诸如 COS-7)、W138、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562 和 HEK293 细胞。下文描

述了用于重组表达 PIMS 的示例性操作方案。

[0265] 表达载体可以包含转录单位,其包含如下的装配:(1) 一个或多个在基因表达中具有调节作用的遗传元件,例如,启动子、增强子或因子特异性结合位点,(2) 被转录成 mRNA 和翻译成蛋白质的编码 PIMS 的结构序列和 (3) 适当的转录和翻译起始和终止序列。希望用于酵母或真核表达系统的结构单位优选包括前导序列,其能够使翻译的蛋白通过宿主细胞细胞外分泌。可选择地,如果表达的重组 PIMS 没有前导或转运序列,它可以包括氨基末端甲硫氨酸残基。随后该残基可以或可以不被从表达的重组蛋白中切割以提供最终的 PIMS。

[0266] 例如,利用可商购的表达系统,例如, Pichia 表达系统 (Invitrogen, San Diego, CA),按照生产商的说明,可以将 PIMS 在酵母中重组表达。这一系统还依赖于 pre-pro- α 序列以引导分泌,但插入片段的转录在甲醇诱导时受醇氧化酶 (AOX1) 启动子的驱动。分泌的 PIMS 肽可以从酵母生长培养基中纯化,例如,通过用于从细菌和哺乳动物细胞上清中纯化肽的方法。

[0267] 可选择地,可以将编码 PIMS 肽的 cDNA 克隆入杆状病毒表达载体 pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA)。可以根据生产商的说明书 (PharMingen) 使用该载体来感染无 SF9 蛋白的培养基中的草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞并产生重组蛋白。利用肝素琼脂糖柱 (Pharmacia, Piscataway, NJ) 可以从培养基中纯化和浓缩 PIMS 蛋白。诸如 SF9 系统的用于蛋白表达的昆虫系统是本领域技术人员公知的。在这样一个系统中,可以将苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, AcNPV) 用作载体以表达草地贪夜蛾细胞或粉纹夜蛾幼虫 (*Trichoplusia larvae*) 中的外源基因。可以将 PIMS 肽编码序列克隆入病毒的非必需区,诸如多角体蛋白基因,并置于多角体蛋白启动子的调控下。PIMS 肽的成功插入会使多角体蛋白基因失活并产生缺少外壳蛋白的重组病毒。重组病毒可以用于感染其中肽被表达的草地贪夜蛾 (*S. frugiperda*) 细胞或粉纹夜蛾幼虫 (Smith et al., *J Virol* 46 :584, 1983 ;Engelhard et al., *Proc Nat Acad Sci (USA)* 91 :3224-7, 1994)。

[0268] 在另一个实例中,编码 PIMS 肽的 DNA 序列可以通过 PCR 扩增,并被克隆到适当的载体,例如 pGEX-3X (Pharmacia, Piscataway, NJ)。pGEX 载体经设计产生融合蛋白,其包含由载体编码的谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 和由插入到载体的克隆位点中的 DNA 片段编码的 PIMS 蛋白。用于 PCR 的引物可以被制备为包括,例如,适当的切割位点以促进合适的克隆。如果 PIMS 蛋白融合部分被单独利用以促进表达或者在其他方面不希望作为目的肽的连接部分,那么可以将重组的 PIMS 蛋白融合物从所述融合蛋白的 GST 部分切割下来。将 pGEX-3X/PIMS 构建体转化到大肠杆菌 XL-1 Blue 细胞 (Stratagene, La Jolla CA),并分离和培养个别的转化子。纯化来自个别转化子的质粒 DNA,并可以利用自动测序仪进行部分测序以验证所期望的编码 PIMS 蛋白的核酸插入片段在正确方向的存在。

[0269] 可以如下文所述纯化融合的 PIMS 蛋白,所述 PIMS 蛋白可以被制备为细菌内的不溶性包涵体。通过离心收集宿主细胞;在 0.15M NaCl, 10mM Tris, pH 8, 1mM EDTA 中洗涤并在室温下用 0.1mg/ml 的溶菌酶 (lysozyme) (Sigma Chemical Co.) 处理 15 分钟。通过超声使裂解产物清澈,通过在 12,000g 离心 10 分钟沉淀细胞碎片。将包含融合 PIMS 蛋白的沉淀物重悬在 50mM Tris, pH 8 和 10mM EDTA 中,在 50% 甘油上方分层,并在 6000g 离心 30

分钟。将沉淀物重悬在无 Mg^{++} 和 Ca^{++} 的标准磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中。还可以通过将重悬的沉淀物在变性 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (Sambrook et al.) 中分离来进一步纯化 PIMS 蛋白融合物。将凝胶浸泡在 0.4M KCl 中以使所述蛋白显现,切下所述蛋白并在不含 SDS 的凝胶电泳缓冲液中进行电洗脱。如果在细菌中产生的 GST/PIMS 肽融合蛋白为可溶性蛋白,可以利用 GST 纯化模块 (GST Purification Module) (Pharmacia Biotech) 将其纯化。

[0270] 优选地,消化所述 PIMS 蛋白融合物以将 GST 从本发明的 PIMS 肽中切下。可以在室温下孵育消化反应 (0.5ml PBS 中的 20-40 μ g 融合蛋白、20-30 单位的人凝血酶 (4000U/mg (Sigma)) 16 至 48 小时,然后加载于变性 SDS-PAGE 凝胶以分离反应产物。将凝胶浸泡在 0.4M KCl 中以使蛋白条带显现。可以通过利用自动测序仪的氨基酸序列分析证实对应于 PIMS 肽的预期分子量的蛋白条带的身份 (Applied Biosystems Model 473A, Foster City, CA)。可选择地,可以通过进行该肽的 HPLC 和 / 或质谱来证实身份。

[0271] 可选择地,可以将编码 PIMS 肽的 DNA 序列克隆入包含所需启动子以及任选的前导序列的所需启动子 (参见,例如, Better et al., Science, 240 :1041-43, 1988)。可以通过自动测序来证实该构建体的序列。然后利用应用 $CaCl_2$ 孵育和细菌的热休克处理的标准方案 (Sambrook et al.), 可以将质粒转化到合适的大肠杆菌株中, 诸如 MC 1061 株。转化的细菌可以生长在添加有羧苄青霉素或本领域已知的另一种合适形式的选择的 LB 培养基中, 通过在合适培养基中的生长可以诱导表达的蛋白的产生。如果存在, 前导序列可以引起 PIMS 肽的分泌并在分泌过程中被切割。通过下文描述的方法从细菌培养基中纯化分泌的重组蛋白。

[0272] 用于表达重组蛋白的哺乳动物宿主系统为本领域技术人员所熟知, 并且这些系统是优选的系统。宿主细胞株的选择可以基于加工表达的蛋白或产生某些翻译后修饰的特定能力, 其在提供蛋白活性方面是有用的。多肽的这种修饰包括, 但不限于, 乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂质化和酰化。诸如 CHO, HeLa, MDCK, 293, WD38 等的不同的宿主细胞具有相对于所述翻译后活性的特定细胞机构和特有机理, 可以被选择以确保对外源蛋白的正确修饰和加工。

[0273] 转化的细胞用于长期、高产量蛋白的产生是优选的, 同样, 稳定的表达是理想的。一旦所述细胞用载体转化, 细胞在富集培养基中生长 1-2 天, 而后转移到选择性培养基, 所述载体优选包含至少一个可选择的标志物以及所需的表达盒。可选择的标志物被设计为提供选择抗性, 其存在允许成功表达了外源蛋白的细胞的生长和回收。利用适合细胞的组织培养技术, 可以使稳定转化的细胞的抵抗群 (Resistant clumps) 繁殖。

[0274] 可以利用许多选择系统来回收已被转化用于重组蛋白产生的细胞。这种选择系统包括, 但不限于分别在 tk-, hgp^rt- 或 ap^rt- 细胞中的 HSV 胸苷激酶次黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶基因。同样, 抗代谢物抗性可以用作基于 dhfr-, gpt-, neo 和 hyg^r 筛选的基础, 其中 dhfr 提供甲氨喋呤抗性; gpt 提供霉酚酸抗性; neo 提供氨基葡萄糖苷 G418 (aminoglycoside G418) 抗性和提供氯磺隆抗性; 以及 hyg^r 提供潮霉素抗性。其他可以使用的可选择的基因包括使细胞利用吡啶代替色氨酸的 trpB, 以及使细胞利用 histinol 代替组氨酸的 hisD。用于鉴定转化子的产生可见信号的标志物包括花色素苷类 (anthocyanins)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶和其底物 GUS 以及荧光素酶和其底物荧光素。

[0275] 蛋白的纯化

[0276] 蛋白纯化技术为本领域技术人员所熟知。从某种程度上来说,这些技术包括多肽和非多肽成分的粗分离。已经将 PIMS 多肽与至少一种其他蛋白质分开,PIMS 多肽被纯化,但利用层析、电泳和 / 或其他已知的技术进行进一步的纯化以实现部分或完全纯化是通常期望的。特别适合于制备纯 PIMS 肽的分析方法是离子交换层析法、排阻层析法、聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电点聚焦。特别高效的纯化肽的方法是快速蛋白质液相层析和 HPLC。

[0277] 本发明的某些方面涉及编码的 PIMS 蛋白或肽的纯化,在具体的实施方案中,涉及编码的 PIMS 蛋白或肽的基本纯化。本文使用的术语“纯化的 PIMS 蛋白或肽”意指可从其他组分中分离的成分,其中所述 PIMS 蛋白或肽被纯化到相当于其天然可获得的状态的任何程度。因此纯化的 PIMS 蛋白或肽还指从其天然存在的环境中分离出的 PIMS 蛋白或肽。

[0278] 通常,“纯化的”指已经进行部分分离以去除多种其他组分的 PIMS 蛋白组合物,该组合物基本上保留其表达的生物活性。如果使用“基本上纯化的”的术语,这一指定指其中 PIMS 蛋白或肽构成了组合物的主要组分的 PIMS 蛋白组合物,诸如 PIMS 蛋白或肽在组合物中占有约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 99% 的蛋白重量。

[0279] 量化 PIMS 蛋白纯化程度的多种方法是本领域技术人员已知的。这些包括,例如,确定活性部分的特异性结合活性或者通过 SDS/PAGE 分析评估部分内 PIMS 多肽的量。用于评估 PIMS 蛋白部分纯度的优选方法是计算该部分的结合活性,将其与初始提取物的结合活性比较,由此计算纯化的程度,在本文中通过“- 倍纯化数 (-fold purification number)”评估。当然,用于表示结合活性量的实际单位依赖于被选择进行纯化的特定分析技术,以及被表达的 PIMS 蛋白或肽是否显示了可检测的结合活性。

[0280] 适用于 PIMS 蛋白纯化的多种技术为本领域技术人员所熟知。这些包括,例如,用硫酸铵、PEG、抗体等的沉淀,或者通过热变性,随后离心;诸如离子交换、凝胶过滤、反相、羟基磷灰石和亲和层析的层析步骤;等电点聚焦;凝胶电泳和这些的组合以及其他已知的技术。如本领域公知的,认为进行不同纯化步骤的顺序可以改变,或者可以省去某些步骤,这仍可得到制备基本纯化的 PIMS 蛋白的合适方法。

[0281] 对总是以其最纯化的状态提供 PIMS 蛋白没有普遍的需求。实际上,在某些实施方案中,可以考虑利用基本上较不纯化的 PIMS 蛋白。通过利用较少的纯化步骤组合,或者通过利用同一总体纯化方案的不同形式来实现部分纯化。例如,可以理解,与利用低压力层析系统的相同技术比较,利用 HPLC 仪器进行的阳离子交换柱层析通常会得到更高的纯化。显示较低程度的相对纯化的方法在 PIMS 蛋白产物的总体回收率或者在维持被表达的 PIMS 蛋白的结合活性方面有优势。

[0282] 已知多肽的迁移可以随着 SDS/PAGE 的不同条件而变化,有时是显著的变化 (Capaldi et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 76 :425, 1977)。因此可以理解,在不同的电泳条件下,纯化的或部分纯化的 PIMS 蛋白表达产物的表观分子量可以变化。

[0283] 效应器细胞

[0284] 用于诱导,例如针对靶细胞的 ADCC 的效应器细胞包括人白细胞、巨噬细胞、单核细胞、活化的嗜中性粒细胞、活化的天然杀伤 (NK) 细胞和嗜酸性粒细胞。效应器细胞表达 Fc γ R (CD89), Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII 和 / 或 FC ϵ R, 且所述效应器细胞包括,例如,单核细胞和活化的嗜中性粒细胞。例如,已经发现 Fc γ RI 的表达被干扰素 γ (IFN- γ) 上调。这种增强的表达增加了单核细胞和嗜中性粒细胞针对靶细胞的细胞毒活性。因此,在与本

发明的 PIMS 蛋白接触前,效应器细胞可以被 (IFN- γ) 或其他细胞因子 (例如, TNF- α 或 β 、集落刺激因子、IL-2) 激活以增加 Fc γ RI 在细胞表面的存在。

[0285] 本发明的 PIMS 蛋白提供了用于针对靶细胞的抗体效应器功能,诸如抗体依赖的效应器细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)。如本文教导的,单独给予具有效应器功能的 PIMS 蛋白,或者在与效应器细胞偶联后给予,由此形成了“活化的效应器细胞”。“活化的效应器细胞”是如本文定义的效应器细胞,其连接到本文定义的 PIMS 蛋白,这样,效应器细胞在给药之前被有效地提供了靶向功能。

[0286] 以生理学上可接受的溶液中的细胞悬浮液体内给予活化的效应器细胞。给予的细胞的数目为 10^8 - 10^9 数量级,但可以根据治疗目的而变化。通常,所述给予量足以获得效应器细胞在靶细胞处的定位,并在那一部位提供期望水平的效应器细胞功能。诸如通过 ADCC 和 / 或吞噬作用的细胞杀伤。本文使用的术语“生理学上可接受的溶液”意在包括稳定用于体内给药的靶向的效应器细胞的任何载体溶液,其包括,例如,盐水和水性缓冲溶液、溶剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂等。

[0287] 因此,本发明的另一方面提供了诱导针对个体中针对细胞的特异性抗体效应器功能诸如 ADCC 的方法,其包括给予个体 PIMS 蛋白 (或编码核酸) 或在生理学上可接受的介质中的活化的效应器细胞。如本领域已知的,给药途径可以变化,合适的给药途径可以由本领域技术人员根据病例特异性变量和常规操作程序的考虑来确定。

[0288] 疾病、病症和病况

[0289] 本发明提供了结合到一个或多个结合伴侣的 PIMS 蛋白以及其变异体和衍生物,并且那些结合事件可以用于治疗、预防或改善与疾病、病症或病理病况 (优选侵袭人的那些) 有关的症状。在这些方法的优选实施方案中,PIMS 蛋白使携带诸如肿瘤特异性细胞表面标志物的靶标的细胞与诸如免疫系统中展示细胞毒活性的细胞的效应器细胞产生联系。在另外的实施方案中,具有多于一个的特异性结合位点的 PIMS 蛋白与两种不同的疾病 -、病症 - 或病况 - 特异的细胞表面标志物特异结合以确保正确的靶标与诸如免疫系统的细胞毒细胞的效应器细胞发生联系。此外, PIMS 蛋白可以用于诱导或增加抗原活性,或者抑制抗原活性。PIMS 蛋白也适用于联合治疗和姑息性方案 (palliative regimes)。

[0290] 一方面,本发明提供了用于治疗或预防疾病和病况的组合物和方法,所述疾病和病况的特征在于与细胞相关的异常水平的抗原活性。这些疾病包括癌症和其他过度增生病况,诸如增生、银屑病、接触性皮炎、免疫性病症和不育。包括实体瘤和白血病在内的多种癌症可以用本文公开的组合物和方法治疗。可以治疗的癌症类型包括,但不限于:乳房、前列腺和结肠的腺癌;所有形式的肺的支气管原癌;骨髓瘤;黑色素瘤;肝细胞瘤 (hepatoma); 神经母细胞瘤;乳头状瘤;前体摄取与脱羧细胞瘤 (apudoma); 迷芽瘤 (choristoma); 鳃原瘤;恶性类癌综合征;类癌性心脏病和癌 (例如, Walker 癌、基底细胞癌、基底鳞状癌、布朗 - 皮西二氏癌、导管癌、Ehrlich 肿瘤、Krebs 2、merkel 细胞癌、粘液癌、非小细胞肺癌、燕麦细胞癌、乳头状癌、硬癌、细支气管肺泡癌、支气管癌、鳞状细胞和移行细胞癌)。适于治疗的其他类型的癌症包括:组织细胞病症;白血病;恶性组织细胞增生症;霍奇金病;免疫增生性小肠病;非霍奇金淋巴瘤;浆细胞瘤;网状内皮组织增殖症;黑素瘤;软骨母细胞瘤;软骨瘤;软骨肉瘤;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;间质瘤;

中肾瘤；肌肉瘤；造釉细胞瘤；牙骨质瘤；牙瘤；畸胎瘤；胸腺瘤和滋养细胞肿瘤。另外，下述类型的癌症也可以考虑为顺从于治疗：腺瘤；胆管瘤；珠光瘤；圆柱瘤 (cyclindroma)；囊腺癌；囊腺瘤；颗粒细胞瘤；两性母细胞瘤；肝细胞瘤；汗腺腺瘤；胰岛细胞瘤；睾丸间质细胞瘤；乳头状瘤；支持细胞瘤；卵泡膜细胞瘤；平滑肌瘤；子宫肌肉瘤；肌母细胞瘤；肌瘤；肌肉瘤；横纹肌瘤；横纹肌肉瘤；室管膜瘤；神经节细胞瘤；胶质瘤；髓母细胞瘤；脑膜瘤；神经鞘瘤；神经母细胞瘤；神经上皮瘤；纤维神经瘤；神经瘤；副神经节瘤；非嗜铬性副神经节瘤。可以治疗的癌症的类型还包括，但不限于血管角质瘤；血管淋巴样增生伴嗜酸性白细胞增多症；硬化性血管瘤；血管瘤病 (angiomatosis)；血管球瘤；血管内皮瘤；血管瘤 (hemangioma)；血管外皮瘤；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；乳腺叶状囊肉瘤；纤维肉瘤；血管肉瘤；平滑肌肉瘤；白色肉瘤；脂肪肉瘤；淋巴管肉瘤 (lymphangiosarcoma)；肌肉瘤 (myosarcoma)；粘液肉瘤；卵巢癌；横纹肌肉瘤；肉瘤；赘生物；神经纤维瘤和子宫颈非典型增生。本发明还提供了用于治疗其他病况的组合物和方法，其中由于异常高表达的抗原，细胞已变为永生的或过度增殖的。

[0291] 可受本发明的组合物和方法作用的示例性多种过度增生性病况是 B- 细胞癌症，包括 B- 细胞淋巴瘤（诸如多种形式的霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 或者中枢神经系统淋巴瘤）、白血病（诸如急性淋巴母细胞性白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、毛细胞白血病和慢性髓性白血病）和骨髓瘤（诸如多发性骨髓瘤）。另外的 B 细胞癌包括小淋巴细胞淋巴瘤、B- 细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤、脾边缘区 B 细胞淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关淋巴组织 (MALT) 结外边缘区 B 细胞淋巴瘤、结边缘区 B 细胞淋巴瘤、滤泡淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、纵隔（胸腺）大 B 细胞淋巴瘤、血管内大型 B 细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、Burkitt 淋巴瘤 / 白血病、不确定的恶变潜能的 B- 细胞增殖、淋巴瘤样肉芽肿和移植后淋巴组织增生病症。

[0292] 特征在于自身抗体产生的病症通常被认为是自身免疫性疾病。可以用本发明的组合物和方法治疗或改善症状的自身免疫疾病包括，但不限于，关节炎、类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、骨关节炎、多软骨炎、银屑病关节炎、银屑病、皮炎、多肌炎 / 皮肌炎、包涵体肌炎、炎症性肌炎、中毒性表皮坏死松解症、系统性硬皮病和硬化症、CREST 综合征、与炎症肠病有关的反应、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、成人呼吸窘迫综合征 (ARDS)、脑脊膜炎、脑炎、葡萄膜炎、结肠炎、肾小球性肾炎、过敏性病况、湿疹、哮喘、涉及 T 细胞浸润和慢性炎症反应的病况、动脉粥样硬化、自身免疫心肌炎、白细胞粘附缺陷病、系统性红斑狼疮 (SLE)、亚急性皮肤型红斑狼疮、盘状狼疮、狼疮脊髓炎、狼疮脑炎、幼稚发作型糖尿病、多发性硬化症、过敏性脑脊髓炎、视神经脊髓炎、风湿热、舞蹈病、由细胞因子和 T 淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫反应、结核病、结节病、包括韦格纳肉芽肿病和 Churg-Strauss 病的肉芽肿病、粒细胞缺乏症、血管炎（包括超敏性血管炎 / 脉管炎，ANCA 和类风湿性血管炎）、再生障碍性贫血、Diamond-Blackfan 贫血、免疫性溶血性贫血（包括自身免疫性溶血性贫血 (AIHA)、恶性贫血、纯红细胞再生障碍性贫血 (PRCA)、因子 VIII 缺陷病、A 型血友病、自身免疫性中性粒细胞减少症、全血细胞减少症、白血球减少症、与淋巴细胞渗出有关的疾病、中枢神经系统 (CNS) 炎症性病况、多器官损伤综合征、重症肌无力、抗原 - 抗体复合物介导的疾病、抗肾

小球基膜疾病、抗 - 磷脂抗体综合征、过敏性神经炎、白塞病、Castleman' s 综合征、肺出血肾炎综合征、Lambert-Eaton 肌无力综合征、雷诺综合征、干燥综合征、Stevens-Johnson 综合征、实质器官移植排斥、移植物抗宿主的病 (GVHD)、大疱性类天疱疮、天疱疮、自身免疫性多内分泌腺疾病、血清反应阴性的脊柱关节病、瑞特病 (Reiter' s disease)、僵人综合征 (stiff-man syndrome)、巨细胞血管炎、免疫复合物性肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病或 IgM 介导的神经病、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、Henoch-Schonlein 紫癜、自身免疫性血小板减少症、包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎的睾丸和卵巢自身免疫病、原发性甲状腺机能减退、自身免疫性内分泌疾病 (包括自身免疫性甲状腺炎、慢性甲状腺炎 (桥本甲状腺炎)、亚急性甲状腺炎、特发性甲状腺功能减退、阿狄森氏病、格雷夫斯氏病 (Grave' s disease)、自身免疫性多腺体综合征 (或多腺内分泌病综合征)、也称为胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM) 的 I 型糖尿病和席汉氏综合征 (Sheehan' s syndrome))、自身免疫性肝炎、淋巴细胞性间质性肺炎 (HIV)、闭塞性细支气管炎 (非 - 移植) 对 NSIP、格林 - 巴利综合征、大血管性血管炎 (包括风湿性多肌痛症和巨细胞 (Takayasu' s) 动脉炎)、中间血管血管炎 (包括川崎病和结节性多动脉炎)、结节性多动脉炎 (PAN) 强直性脊柱炎、伯格氏病 (IgA 肾病)、急进性肾小球肾炎、原发性胆汁性肝硬化、乳糜泻 (麦胶性肠病)、冷球蛋白血症、肝炎相关性冷球蛋白血症、肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、冠状动脉疾病、家族性地中海热、显微镜下多血管炎、Cogan 综合征、Whiskott-Aldrich 综合征和血栓闭塞性脉管炎。

[0293] 类风湿性关节炎 (RA) 是慢性疾病,其特征为导致肿胀、疼痛和功能丧失的关节炎症。患有长期 RA 的患者通常表现出进行性关节破坏、变形、残疾以及甚至过早死亡 (premature death)。除了 RA 外,炎症性疾病、病症和病况通常顺从治疗、预防或改善与炎症过程相关的症状 (例如,发热、疼痛、肿胀、发红),且本发明的组合物和方法在治疗、预防或改善包括 RA 在内的异常或反常炎症过程是有益的。

[0294] 克罗恩氏病和相关的疾病即溃疡性结肠炎是属于称为炎性肠病 (IBD) 的一组疾病的两种主要的疾病类型。克罗恩氏病是导致消化或胃肠 (GI) 道炎症的慢性病症。尽管它能够累及包括从口到肛门的 GI 道的任何区域,但它最通常侵袭的是小肠和 / 或结肠。在溃疡性结肠炎中,累及的 GI 局限于结肠。克罗恩氏病的特征可以为针对嗜中性粒细胞抗原的抗体,即“核周抗嗜中性粒细胞抗体” (pANCA) 和针对酿酒酵母菌的抗体,即“抗 - 酿酒酵母菌抗体” (ASCA)。许多溃疡性结肠炎患者在他们的血液中具有 pANCA,但没有 ASCA 抗体,而许多克罗恩氏病患者显示出 ASCA 抗体,而没有显示出 pANCA 抗体。评价克罗恩氏病的一种方法是利用克罗恩氏病活指数 (CAI),基于医生收集的 18 个预测变量评分。150 及以下的 CDAI 值与静止性疾病有关,高于 150 的值指示活动性疾病,以及观察到的高于 450 的值与极严重的疾病有关 [Best et al., " Development of a Crohn' s disease activity index (克罗恩氏病活动指数的发展). " Gastroenterology 70 :439-444(1976)]。然而,自从最初研究以来,一些研究者使用 200 至 250 的“主观值 (subjective value)”作为健康分数。

[0295] 系统性红斑狼疮 (SLE) 是由包括肾、皮肤和关节在内的多器官中血管的反复损伤导致的自身免疫疾病。在 SLE 患者中,T 细胞和 B 细胞之间错误的相互作用导致攻击细胞核的自身抗体的产生。对于自身抗体是 SLE 的病因这一点已达成共识,所以使免疫系统复位

到从前体产生新 B 细胞的消减 B 细胞谱系的新疗法为 SLE 患者中的长效益处提供了希望。

[0296] 多发性硬化症 (MS) 也是一种自身免疫性疾病。它的特征在于中枢神经系统的炎症以及髓鞘 (myelin) 的破坏,所述髓鞘隔离了脑、脊髓和身体中的神经细胞纤维。尽管 MS 的病因是未知的,但广泛认为自身免疫 T 细胞是该疾病发病机制的首要因素。然而,高水平的抗体存在于 MS 患者的脑脊髓液中,并且一些理论预测导致抗体产生的 B 细胞应答对于该病的进展是重要的。

[0297] 自身免疫性甲状腺病由产生的自身抗体引起,所述自身抗体刺激甲状腺导致甲状腺功能亢进症 (格雷夫斯病 (Graves' disease)) 或者破坏甲状腺导致甲状腺功能减退症 (桥本甲状腺炎 (Hashimoto' s thyroiditis))。甲状腺的刺激由结合并活化促甲状腺激素 (TSH) 受体的自身抗体导致。甲状腺的破坏由与其他甲状腺抗原反应的自身抗体导致。

[0298] 受本发明的组合物和方法提供的益处作用的其他疾病、病症和病况包括前述的干燥综合征,其是特征在于身体产湿腺体 (body' s moisture-producing glands) 的破坏的自身免疫疾病。此外,免疫性血小板减少性紫癜 (ITP) 由结合血小板并导致其破坏的自身抗体导致,该病况适于应用本发明的物质和方法。重症肌无力 (MG) 是一种慢性自身免疫性神经肌肉病症,其特征是结合表达在神经肌肉接头的乙酰胆碱受体、导致随意肌群无力的自身抗体。重症肌无力 (MG) 是具有可以使用本发明的组合物和方法治疗的症状的疾病,因此预期本发明在治疗和 / 或预防 MG 中是有益的。另外,预期 Rous 肉瘤病毒感染可以用本发明的组合物和方法治疗或改善至少一种症状。

[0299] 本发明的另一方面是使用本发明中的物质和方法预防和 / 或治疗任何皮肤的过度增生病况,包括银屑病、接触性皮炎或其他过度增生疾病。银屑病的特征是皮肤的自身免疫性炎症,其在 30% 的病例中也和关节炎有关,还与硬皮病及炎性肠病 (包括克罗恩氏病和溃疡性结肠炎) 有关。已经证实,患有银屑病和接触性皮炎的患者在这些病变内具有增加的抗原活性 (Ogoshi et al., J. Inv. Dermatol., 110 :818-23[1998])。

[0300] PIMS 蛋白能够递送免疫系统的细胞毒细胞例如直接递送到表达高水平抗原的病变内的细胞。PIMS 蛋白能够在病变周围的皮下给药,或者通过使用本文描述的多种给药途径的任一种以及本领域技术人员公知的其他途径给药。

[0301] 特发性炎性肌病 (IIM) 的治疗也在本发明范围之内,所述特发性炎性肌病包括皮肌炎 (dermatomyositis, DM) 和多肌炎 (polymyositis, PM)。利用多种分类方案已经对炎性肌病进行了分类。Miller' s 分类方案 (Miller, Rheum Dis Clin North Am. 20 :811-826, 1994) 鉴定了 2 种特发性炎性肌病 (IIM): 多肌炎 (PM) 和皮肌炎 (DM)。

[0302] 多肌炎和皮肌炎是慢性的使人虚弱的炎症疾病,其累及肌肉,在 DM 的情形下还累及皮肤。这些病症少见,在美国报道的年发病率为每百万成年人约 5 至 10 例病例,每百万儿童每年有 0.6 至 3.2 例病例 Targoff, Curr Probl Dermatol. 1991, 3 :131-180)。特发性炎性肌病与显著的病态和死亡率有关,受累成年人中高达一半被发现患有明显的病损 (Gottdiener et al., Am J Cardiol. 1978, 41 :1141-49)。Miller (Rheum Dis Clin North Am. 1994, 20 :811-826 以及 Arthritis and Allied Conditions (关节炎及其有关病况), Ch. 75, Eds. Koopman 和 Moreland, Lippincott Williams 和 Wilkins, 2005) 描述了用于诊断 IIM 的 5 组标准,即特发性炎性肌病标准 (IIMC) 评估,包括肌肉无力、肌肉活检的变性证据、肌肉相关酶的血清水平升高、肌病的电磁三联体 (electromagnetic triad of myopathy)、

皮炎中疹的证据并且自身抗体的证据作为次级标准。

[0303] 包括肌肉相关酶和自身抗体在内的 IIM- 相关因子包括,但不限于,肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶、醛缩酶、C 反应蛋白、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT),以及抗核自身抗体 (ANA)、肌炎特异性抗体 (MSA) 和可提取的核抗原的抗体。

[0304] 受本发明的方法作用的优选自身免疫疾病包括克罗恩氏病、格林 - 巴利综合征 (GBS ;也称为急性炎性脱髓鞘性多发性神经病、急性特发性多发性神经根炎、急性特发性多神经炎和兰德里上行性麻痹)、红斑狼疮、多发性硬化症、重症肌无力、视神经炎、银屑病、类风湿性关节炎、甲状腺机能亢进 (例如,格雷夫斯氏病)、甲状腺功能减退 (例如,桥本氏病)、Ord' s 甲状腺炎 (与桥本氏病类似的甲状腺炎)、糖尿病 (1 型)、再生障碍性贫血、赖特综合征、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、抗磷脂抗体综合征 (APS)、眼阵挛 - 肌阵挛综合征 (OMS)、颞动脉炎 (也称为 " 巨细胞动脉炎 ")、急性播散性脑脊髓炎 (ADEM)、肺出血肾炎综合征、韦格纳肉芽肿病、乳糜泻 (coeliac disease)、天疱疮、犬多发性关节炎和温抗体自身免疫性溶血性贫血。此外,本发明包括用于治疗或改善与下述疾病相关的症状的方法:子宫内膜异位症、间质性膀胱炎、神经性肌强直、硬皮病、白癜风、外阴症 (vulvodynia)、导致查加斯心脏病 (心脏扩大症) 的查加斯病、肉样瘤病、慢性疲劳综合征和家族性自主神经机能异常。

[0305] 认为补体系统在携带免疫组分的许多疾病中都起作用,所述疾病诸如阿兹海默症、哮喘、红斑狼疮、多种形式的关节炎、自身免疫性心脏病和多发性硬化症,所有这些疾病都是被考虑为利用本发明的方法可以治疗或改善症状的疾病、病症或病况。

[0306] 依赖多特异性单链结合分子显示的特定效应器功能,优选某些恒定亚区。例如, IgG (IgG1、2 或 3) 和 IgM 优选用于补体激活,任一亚型的 IgG 优选用于调理作用和毒素中和; IgA 优选用于病原体结合;以及 IgE 优选用于结合诸如蠕虫的寄生虫。

[0307] 举例来说,已经发现识别 IgG 抗体的恒定区的 Fc γ R 以三种不同类型的 Fc γ 受体存在于人白细胞上,所述 Fc γ 受体可以通过结构和功能特性以及通过由抗 -CD 单克隆抗体识别的抗原结构来区分。它们被称为 Fc γ RI, Fc γ RII 和 Fc γ RIII,并在 (重叠) 亚群白细胞上差异表达。

[0308] Fc γ RI (CD64) 为表达在单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、骨髓样前体细胞和树突状细胞上的高亲和力受体,其包含 Ia 和 Ib 亚型。Fc γ RI 具有对单体人 IgG1 和 IgG3 的高亲和力。它对于 IgG4 的亲和力约低 10 倍,而它不结合 IgG2。Fc γ RI 没有显示出基因多态性。

[0309] 包含亚型 IIa、IIb1、IIb2、IIb3 和 IIc 的 Fc γ RII (CD32) 是分布最广泛的人 Fc γ R 类型,表达在大多数血白细胞上,以及朗格汉斯细胞、树突状细胞和血小板上。Fc γ RII 是仅结合聚集的 IgG 的低亲和力受体。它是唯一能够结合 IgG2 的 Fc γ R 类型。Fc γ RIIa 显示出基因多态性,产生两个不同的同种异型 (allotype) Fc γ RIIa-H131 和 Fc γ RIIa-R131。这种功能多态性归因于单个氨基酸差异:在第 131 位分别为组氨酸 (H) 或精氨酸 (R),这对 IgG 结合是至关重要的。Fc γ RIIa 更容易结合除 IgG4 外的人 IgG 亚同种型。Fc γ RIIa-H131 比 Fc γ RIIa-R131 同种异型具有对复合的 IgG2 更高的亲和力。

[0310] Fc γ RIII (CD16) 有两个亚型,两者都能结合 IgG1 和 IgG3。对 IgG 具有中间亲和力的 Fc γ RIIIa 表达在巨噬细胞、单核细胞、天然杀伤 (NK) 细胞以及 T 细胞亚群上。

Fc γ RIIIb 是 IgG 的低亲和力受体,选择性表达在嗜中性粒细胞上。它是高移动性受体,与其他膜受体有效协作。对骨髓瘤 IgG 二聚体的研究已显示出只有 IgG1 和 IgG3 结合 Fc γ RIIIb(低亲和力),而没有发现 IgG2 和 IgG4 的结合。Fc γ RIIIb 携带共显性、二等位基因多态性,同种异型被指定为 NA1(嗜中性粒细胞抗原)和 NA2。

[0311] 本发明的另一方面是利用本发明的物质和方法通过治疗、预防或减轻对抗由多种传染性媒介的任一种引起的感染的影响。设计本发明的 PIMS 分子以有效地和有力地募集宿主生物体的免疫系统以抵抗由外源生物体、外源细胞、外源病毒或外源无生命物导致的感染。

[0312] 本发明包括的传染性细胞包括任何已知的传染性细胞,包括,但不限于多种细菌(例如,致病性大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、绿脓杆菌、炭疽杆菌、肉毒梭菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌,幽门螺旋杆菌、霍乱弧菌等)、分支杆菌、支原体、真菌(包括酵母和霉菌)以及寄生虫(包括原生动物、吸虫、绦虫和线虫的任何已知的寄生成员)的任一种。传染性病毒包括,但不限于真核病毒(例如,腺病毒、布尼亚病毒、疱疹病毒、乳多泡病毒、副粘液病毒、微小核糖核酸病毒、痘病毒、呼吸道肠道病毒、反转录病毒等)以及噬菌体。外源物包括进入生物体,优选人的物体,不管进入的方式和是否伤害是有意的。考虑到多重耐药性感染因子(例如,细菌)逐渐增加的流行,特别是作为医院内感染的致病因子,预期本发明的物质和方法为可以用来对抗这些病况的医疗和兽医贮备提供了受欢迎的补充,所述物质和方法提供了一种避免由逐渐增加的抗生素抗性带来的困难的治疗途径。

[0313] 与传染性因子有关并可以用本文公开的物质和方法治疗的疾病、病况或病症包括,但不限于炭疽热、曲霉病、细菌性脑膜炎、细菌性肺炎(例如,衣原体肺炎)、芽生菌病、肉毒中毒、普鲁氏菌病、念珠菌病、霍乱、球孢子菌病、隐球菌病、致腹泻性、肠出血性或产肠毒素大肠杆菌、白喉症、鼻疽病、组织胞浆菌病、军团病、麻风病、李氏杆菌病、诺卡氏菌病、百日咳、沙门菌病、猩红热、孢子丝菌病、链球菌性咽炎、中毒性休克综合征、旅行者腹泻和伤寒热。

[0314] 通过下面的实施例,本发明的其他方面和细节会显而易见,这些实施例意在示例而不是限制本发明。

[0315] 实施例 1

[0316] PIMS 构建

[0317] 如图 1 所示, PIMS 肽具有下述结构域:置于 N-末端的恒定亚区和至少一个置于 C-末端的特异性结合部位,这两个结构域的每个通过可以来自免疫球蛋白铰链的 PIMS 连接器连接。在一些实施方案中,来自免疫球蛋白的铰链区位于所述恒定亚区的 N-末端,尽管该恒定亚区仍位于特异性结合部位的 N-末端。在一些实施方案中,如本领域技术人员已知的,初生表达的 PIMS 分子的 N-末端可以是前导肽用于编码的肽的表达和分泌。而且,该前导肽可以共价连接到来自免疫球蛋白铰链的区域,或者直接连接到恒定亚区(缺少来自铰链区的 N-末端结构域的 PIMS 分子)。

[0318] 预期编码 PIMS 的多核苷酸的载体的重组工程促进这些不同 PIMS 分子的构建,例如通过合适的限制性内切酶切割位点的定向布置。除了通过重组工程生成 PIMS 多核苷酸和编码的 PIMS 肽的集合外,可以考虑使用不同的诱变技术,包括定点诱变来生成多种 PIMS 和其变体。例如,定点诱变适用于改变指定半胱氨酸残基的密码子,所述半胱氨酸残基能

够参与链间二硫键形成。通常,这种 Cys 残基位于连接恒定亚区和至少一个特异性结合部位的连接子区域中,和 / 或位于 N- 末端铰链区中。示例性铰链包括来自 IgG1 铰链的区域,其中所述衍生的铰链区具有单个 Cys 残基或具有两个 Cys 残基。

[0319] 从图 1 还可以显而易见的是参与给定结合部位的结合结构域的布置。例如,本发明包含具有任一取向的给定结合部位的两个结合结构域的 PIMS 分子。例如,一个 PIMS 分子具有如下取向 :N-[任选的前导肽]-[任选的铰链区]- 恒定亚区 -PIMS 连接子 -V_L-V_H-C, 以及另一 PIMS 分子具有如下取向 :N-[任选的前导肽]-[任选的铰链区]- 恒定亚区 -PIMS 连接子 -V_H-V_L-C。其他示例性 PIMS 是如下分子 :其中 C- 末端结合结构域由单一可变结构域 (V_H 或 V_L) 组成,以及由可能具有相同、相似或不同结合特性的两个可变结构域 (V_H-V_H 或 V_L-V_L) 组成,诸如一个结合 CD3 胞外结构域的 V_H,或两个结合 CD3 胞外结构域上相同或分别的表位的 V_H 结构域,或者其中一个结构域结合 CD3 胞外结构域且另一个结合例如 CD28 胞外结构域的两个 V_H 结构域。PIMS 分子包括多肽 (以及编码多核苷酸), 其包含来自免疫球蛋白的恒定亚区、可以来自免疫球蛋白的 PIMS 连接子以及至少一个特异性结合结构域,其中所述恒定亚区相对于该分子的每一特异性结合结构域置于 N- 末端。

[0320] 利用允许包含在 SMIP、Scorpion 或 PIMS 中的不同组份交换的已存在的表达载体盒策略构建 PIMS 分子。该策略和分子结构在美国第 60/813, 261 号专利申请中 (特别是在其实施例 3 中) 被描述, USSN60/813, 261 通过引用的方式并入本文。使用 SMIP 盒, 通过利用限制酶 AgeI 和 BsrGI (New England Biolabs) 对载体盒 DNA 的完全消化切下包含“结合结构域 1” (BD1) 和效应器结构域的前 400 个核苷酸的 scFv, 在该例中为人 IgG1 的铰链 -C_{H2}-C_{H3}。产生的包含完整 pD18 载体、人 VK3 前导片段和人 IgG1 的 C- 末端 300 个核苷酸的最大 DNA 片段通过凝胶纯化并贮存于 -20°C 备用。

[0321] 为了通过 PIMS W0007 制备 PIMS W0001, 设计寡核苷酸引物 (W0001F-W0007F) 使得它们编码 VK3 前导片段的最后 2 个氨基酸, 所述 VK3 前导片段对应于 AgeI 切割位点 (编码 Thr-Gly 的 ACCGGT), 一连串插入氨基酸确保信号肽切割不会发生在 IgG1 效应器结构域的铰链区内, 然后包含限制酶 XhoI 识别序列的核苷酸在正确的读码框内。这确保开放读码框从前导序列开始, 通过间隔子氨基酸持续到整个效应器结构域。这些引物与反向引物 IgBsrG1R 一起用于 PCR 扩增反应中以制备 PCR 产物, 然后将 PCR 产物用 AgeI 和 BsrGI 消化完全, 通过凝胶纯化并连接到如上述的先前消化的载体中。

[0322] 该设计产生了 7 个 PIMS 分子, 其仅在前导序列和效应器结构域起始之间编码的氨基酸处不同 (参见序列表中 PIMS W0001-W0007 的氨基酸序列)。这些分子中所有其他序列都是相同的。这些“间隔子”氨基酸不但限制了翻译时前导肽的切割, 而且作为模板指导蛋白设计工程研究以影响效应器结构域功能, 蛋白在不同生物系统中的表达以及作为对于其他生物相关肽的插入点。

[0323] 更具体来说通过最初将部分 Scorpion 分子 S0033 稀释到 5 μ g/mL 的浓度, 构建抗 -CD28PIMS 分子。1 μ L 用作 PCR 中的模板, 所述 PCR 包含在 Platinum PCR Supermix 高保真性 PCR 混合 (Invitrogen) 中 50 μ L 的总反应体积中 20 pmol 的每种引物, 其来自引物 W0001F 和 12HL-XbaR (表 6 中提供了用作, 例如, 引物的寡核苷酸) 的 100 μ M 储存液。然后将 PCR 混合物置于 ABI 9700 热循环仪, 最初在 95°C 孵育 3 分钟后, 以 94°C 30 秒、60°C 15 秒和 68°C 2 分钟的条件循环 30 次, 随后在 68°C 进行最后 3 分钟的延伸。然后使反应回到

室温并按照生产商的操作方案在 Qiagen MinElute 柱上纯化以去除盐类、多余的引物和酶。然后将该纯化的 PCR 产物从柱洗脱到总体积 20 μ L, 溶于 10mM Tris (pH 8)。随后将 4 μ L PCR 产物与 1 μ L 1M 氯化钠溶液混合, 当加入 1 μ L pCR2.1-TOPO 载体混合物 (Invitrogen) 时, 小心地混合, 并将反应混合物在台上孵育和 20 分钟。将 2 μ L 的该反应物与 20 μ L 化学感受态菌株 TOP 10 混合, 并在冰上孵育 15 分钟, 在 42 $^{\circ}$ C 热休克 30 秒, 在 SOC 肉汤中稀释到 200 μ L, 并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 所有操作都按照生产商的说明 (Invitrogen) 进行。然后将细菌接种于 LB 琼脂 +50 μ g/mL 卡那霉素 +X-gal/IPTG 板 (Teknova) 上。将所述板在 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 并在第二天, 将菌落接种在深孔、96 孔板中, 每孔 1mL T- 肉汤 + 卡那霉素 50 μ g/mL (Teknova), 并在 37 $^{\circ}$ C 摇动过夜。第二天, 从每孔中取出 20 μ L, 并与 20 μ L 50% 的甘油溶液在 96- 孔板中混合, 然后使其在 -20 $^{\circ}$ C 贮存过夜。然后将深孔板中的其他细菌在 BeckmanAvanti 离心机中以 4K rpm 沉淀 10 分钟, 然后取除清澈的肉汤, 只留下细菌沉淀物。将上述板置于 QiaRobot 8000 上, 利用生产商提供的用于 QiaRobot 8000 的 QiaPrep Turbo 试剂盒纯化质粒 DNA。所有挑取的菌落都以该方式制备纯化的 DNA 用于分析。

[0324] 对于 PCR 测序反应, 从 96 孔板的每孔中取出 5 μ L 纯化的 DNA 并移入 2 个完全相同的 96 孔板中。将 4 皮摩尔 DNA 测序引物 M13R (板 1) 或 M13F (板 2) 以及 4 μ L BigDye 终止子测序组合 (3.1 版) (BigDye Terminator Sequencing Mix version 3.1) (ABI) 的混合物添加到每孔中, 总体积为 10 μ L。然后将这些 PCR 测序反应物放置于 ABI 9700 热循环仪中, 并以 96 $^{\circ}$ C 10 秒、50 $^{\circ}$ C 5 秒和 60 $^{\circ}$ C 6 分钟的条件循环 25 次。此后, 将测序反应物在无菌水稀释到 20 μ L, 并加载到预转 (pre-spun) Centri-Sep G-25 柱上 (Princeton Separations) 以从反应物中去除未掺入的标记的核苷酸。然后将得到的 PCR 产物加载并在 ABI 3130-XL DNA 测序仪上泳动, 使用 Vector NTI 10.0 的 ConTig Express 模块 (Invitrogen) 分析 DNA 序列。然后将来自包含所需的 DNA 序列的一个克隆的 DNA 在 60 μ L 反应中用限制酶 AgeI 和 XbaI (两者均购自 New England BioLabs) 消化。在 37 $^{\circ}$ C 孵育消化 6 小时, 然后加载于 1% 琼脂糖 TAE 凝胶上并在 110V 下泳动 40 分钟。此时, 可以将 1.5Kbp W0001DNA (SEQ ID NO:358) 条带与 4Kbp 载体 DNA 条带容易地分开。利用生产商对于从琼脂糖凝胶中进行 DNA 提取的说明书 (Qiagen), 将 W0001DNA 从琼脂糖凝胶切下并在 Qiagen MinElute 柱上纯化。将得到的消化的和纯化的 DNA 在 10 μ L 体积中洗脱。将 2 μ L 所述 DNA 用于连接反应中, 所述连接反应包括在 15 μ L 反应中的 10ng 用 AgeI 和 XbaI 消化的 pD18+VK3 前导 DNA、1.5 μ L 10X 连接缓冲液 (Roche) 和 1 μ L T4DNA 连接酶 (Roche), 将反应在室温下孵育过夜。连接后, 将 5 μ L 转化入化学感受态 TOP 10 中, 如上所述一样, 除了将细胞铺于 2xYT+ 羧苄青霉素 (100 μ g/mL) 板上并在 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。如上所述培养菌落, 基于 1.5Kbp AgeI-XbaI DNA 片段的存在筛选菌落, 并再次测序以证实 DNA 具有所需的核苷酸序列。接着将鉴定为 W0001 的单克隆在 100mL T- 肉汤 + 羧苄青霉素过夜培养中扩增。按照生产商的操作方案, 利用 Qiagen Maxi Prep 试剂盒从这一细菌培养物中制备 DNA。利用 Nanodrop 分光光度计通过 260nm 处吸光度定量得到的 DNA 制剂。

[0325] 表 6

[0326]

| | |
|----|-------|
| 命名 | 序列标识符 |
|----|-------|

| | |
|-----------------------|-----|
| 重链 GSP1 引物 | 251 |
| 嵌套重链 GSP2 引物 | 252 |
| 轻链 GSP1 引物 | 253 |
| 嵌套轻链 GSP2 引物 | 254 |
| 5' RACE 桥式锚定引物 | 255 |
| T7 测序引物 | 256 |
| M13 反向引物 | 257 |
| PCR 引物 hVK3L-F3H3 | 258 |
| PCR 引物 hVK3L-F2 | 259 |
| PCR 引物 hVK3L-F1-2H7VL | 260 |
| PCR 引物 2H7VH-NheF | 261 |
| PCR 引物 G4S-NheR | 262 |
| PCR 引物 015VH-XhoR | 263 |
| PCR 引物 G1H-S-XHO | 265 |
| PCR 引物 CH3R-EcoR1 | 266 |
| PCR 引物 G1-XBA-R | 267 |
| PCR 引物 G4SLinkR1-S | 268 |
| PCR 引物 G4SLinkR1-AS | 269 |
| PCR 引物 2E12VLXbaR | 270 |
| PCR 引物 2E12VLR1F | 271 |
| PCR 引物 2E12VHR1F | 272 |

| | |
|---------------------|-----|
| PCR 引物 2E12VHXbaR | 273 |
| PCR 引物 2e12VHdXbaF1 | 274 |
| PCR 引物 2e12VHdXbaR1 | 275 |
| PCR 引物 IgBsrG1F | 276 |
| PCR 引物 IgBsrG1R | 277 |
| PCR 引物 M13R | 278 |
| PCR 引物 M13F | 279 |
| PCR 引物 T7 | 280 |
| PCR 引物 pD18F-17 | 281 |
| PCR 引物 pD18F-20 | 282 |
| PCR 引物 pD18F-1 | 283 |
| PCR 引物 pD18R-s | 284 |
| PCR 引物 CH3seqF1 | 285 |
| PCR 引物 CH3seqF2 | 286 |
| PCR 引物 CH3seqR1 | 287 |
| PCR 引物 CH3seqR2 | 288 |
| PCR 引物 L1-11R | 289 |
| PCR 引物 L1-6R | 290 |
| PCR 引物 L3R | 291 |
| PCR 引物 L4R | 292 |
| PCR 引物 L5R | 293 |

| | |
|-------------------------------------|-----|
| PCR 引物 IgBsrG1F | 294 |
| PCR 引物 L-CPPCPR | 295 |
| CD37 结合结构域引物 G281LH-NheR | 309 |
| CD37 结合结构域引物 G281LH-NheF | 310 |
| CD37 结合结构域引物 G281-LH-LPInF | 311 |
| CD37 结合结构域引物 G281-LH-HXhoR | 312 |
| CD37 结合结构域引物 G281-LH-LEcoF | 313 |
| CD37 结合结构域引物 G281-LH-HXbaR | 314 |
| CD37 结合结构域引物 G281-HL-HF | 315 |
| CD37 结合结构域引物 G281-HL-HR3 | 316 |
| CD37 结合结构域引物 G281-HL-HR2 | 317 |
| CD37 结合结构域引物 G281-HL-HNheR | 318 |
| CD37 结合结构域引物 G281-HL-LNheF | 319 |
| CD37 结合结构域引物 G281-HL-LXhoR | 320 |
| CD37 结合结构域引物 G281-HL-LXbaR | 321 |
| CD37 结合结构域引物 G281-HL-EcoF | 322 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LH-LF1 | 323 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LF2 | 324 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LF3 | 325 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LF4 | 326 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LF5 | 327 |

| | |
|-------------------------------------|-----|
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LF6 | 328 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LF7 | 329 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LR7 | 330 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LR6 | 331 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LR5 | 332 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LR4 | 333 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LR3 | 334 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LR2 | 335 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LH-LR1 | 336 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LH-HF1 | 337 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HF2 | 338 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HF3 | 339 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HF4 | 340 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HF5 | 341 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HF6 | 342 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HR6 | 343 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HR5 | 344 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HR4 | 345 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HR3 | 346 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HR2 | 347 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LH-HR1 | 348 |

| | |
|--|-----|
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HL-HF1 | 349 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HL-HR1 | 350 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HL-HR0 | 351 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HL-LF1 | 352 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HL-LR3Xho | 353 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HL-LR3Xba | 354 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-HL-HF1R1 | 355 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LH-LF1R1 | 356 |
| CD3 结合结构域引物 (G19-4temp.) 194-LH-HR1Xba | 357 |
| W0001F PCR 引物 | 296 |
| W0002F PCR 引物 | 297 |
| W0003F PCR 引物 | 298 |
| W0004F PCR 引物 | 299 |
| W0005F PCR 引物 | 300 |
| W0006F PCR 引物 | 301 |
| W0007F PCR 引物 | 302 |
| W0008F PCR 引物 | 303 |
| W0009F PCR 引物 | 304 |
| W0010F PCR 引物 | 305 |
| W0011F PCR 引物 | 306 |
| W0012F PCR 引物 | 307 |

| | |
|------------------|-----|
| 12HL-XbaR PCR 引物 | 308 |
|------------------|-----|

[0327]

[0328]

[0329]

[0330] 已经构建了其他的PIMS分子,其与在W0001PIMS中发现的结构域的总体组织结构一致,即N-末端铰链区连接到包含C_{H2}区和C_{H3}区的恒定亚区Fc效应器结构域,随后为PIMS连接子和置于C-末端的结合结构域。这些PIMS分子被命名为W0002至W0009,且这些序列在SEQ ID NOS:360-375呈现。W0002-W0007的每一个都包含2E12结合结构域并特异结合CD28;W0008包含2Lm20-4V_HV_L 12结合结构域,W0009包含2Lm20-4V_HV_L 17,每个都特异结合CD20。这些PIMS的氨基酸序列的特征以及示例性编码核酸序列显示在表7中。因此,显而易见的是,多种特异性结合结构域可以用于PIMS中以靶向所述的分子。

[0331] 表7

[0332]

| PIMS 分子 | 特征 |
|---------------------------|--|
| W0001 核酸 (SEQ ID NO :358) | 人 VK3 前导区 :核苷酸 1-60 前导区 - 铰链接头 :61-69 |
| | 铰链区 :70-114 CH2CH3 区 :115-765 连接子肽 :766-789 结合结构域 :790-1551 结合区连接子 :1153-1212 |
| W0001 多肽 (SEQ ID NO :359) | 人 VK3 前导区 :氨基酸 1-20 前导区 - 铰链接头 :21-23 铰链区 :24-38 CH2CH3 区 :39-255 连接子肽 :256-263 结合结构域 :264-516 结合区连接子 :385-404 |

| | |
|---------------------------|---|
| W0002 核酸 (SEQ ID NO :360) | 人 VK3 前导区 :核苷酸 1-60 前导区 - 铰链接头 :61-69 铰链区 :70-114 CH2CH3 区 :115-765 连接子肽 :766-789 结合结构域 :790-1551 结合区连接子 :1153-1212 |
| W0002 多肽 (SEQ ID NO :361) | 人 VK3 前导区 :氨基酸 1-20 前导区 - 铰链接头 :21-23 铰链区 :24-38 CH2CH3 区 :39-255 连接子肽 :256-262 结合结构域 :263-516 结合区连接子 :385-404 |
| W0003 核酸 (SEQ ID NO :362) | 人 VK3 前导区 :核苷酸 1-60 前导区 - 铰链接头 :61-69 铰链区 :70-114 CH2CH3 区 :115-765 连接子肽 :766-789 结合结构域 :790-1551 结合区连接子 :1153-1212 |
| W0003 多肽 (SEQ ID NO :363) | 人 VK3 前导区 :氨基酸 1-20 前导区 - 铰链接头 :21-23 |

| | |
|---------------------------|---|
| | 铰链区 :24-38 CH2CH3 区 :39-255 连接子肽 :256-263 结合结构域 :264-516 结合区连接子 :385-404 |
| W0004 核酸 (SEQ ID NO :364) | 人 VK3 前导区 :核苷酸 1-60 前导区 - 铰链接头 :61-69 铰链区 :70-114 CH2CH3 区 :115-765 连接子肽 :766-789 结合结构域 :790-1551 结合区连接子 :1153-1212 |
| W0004 多肽 (SEQ ID NO :365) | 人 VK3 前导区 :氨基酸 1-20 前导区 - 铰链接头 :21-23 铰链区 :24-38 CH2CH3 区 :39-255 连接子肽 :256-263 结合结构域 :264-516 结合区连接子 :385-404 |
| W0005 核酸 (SEQ ID NO :366) | 人 VK3 前导区 :核苷酸 1-60 前导区 - 铰链接头 :61-69 铰链区 :70-114 CH2CH3 区 :115-765 连接子肽 :766-789 结合结构域 :790-1551 结合区连接子 :1153-1212 |

| | |
|---------------------------|--|
| W0005 多肽 (SEQ ID NO :367) | 人 VK3 前导区 :氨基酸 1-20 前导区 - 铰链接头 :21-23 铰链区 :24-38 CH2CH3 区 :39-255 连接子肽 :256-263 结合结构域 :264-516 结合区连接子 :385-404 |
| W0006 核酸 (SEQ ID NO :368) | 人 VK3 前导区 :核苷酸 1-60 前导区 - 铰链接头 :61-69 |
| | 铰链区 :70-114 CH2CH3 区 :115-765 连接子肽 :766-789 结合结构域 :790-1551 结合区连接子 :1153-1212 |
| W0006 多肽 (SEQ ID NO :369) | 人 VK3 前导区 :氨基酸 1-20 前导区 - 铰链接头 :21-23 铰链区 :24-38 CH2CH3 区 :39-255 连接子肽 :256-263 结合结构域 :264-516 结合区连接子 :385-404 |

| | |
|---------------------------|---|
| W0007 核酸 (SEQ ID NO :370) | 人 VK3 前导区 :核苷酸 1-60 前导区 - 铰链接头 :61-66 铰链区 :67-111 CH2CH3 区 :112-762 连接子肽 :763-786 结合结构域 :787-1548 结合区连接子 :1150-1209 |
| W0007 多肽 (SEQ ID NO :371) | 人 VK3 前导区 :氨基酸 1-20 前导区 - 铰链接头 :21-22 铰链区 :23-37 CH2CH3 区 :38-254 连接子肽 :255-262 结合结构域 :263-515 结合区连接子 :384-403 |
| W0008 核酸 (SEQ ID NO :372) | 人 VK3 前导区 :核苷酸 1-60 前导区 - 铰链接头 :61-66 铰链区 :67-111 CH2CH3 区 :112-762 连接子肽 :763-786 结合结构域 :787-1503 结合区连接子 :1150-1185 |
| W0008 多肽 (SEQ ID NO :373) | 人 VK3 前导区 :氨基酸 1-20 前导区 - 铰链接头 :21-22 |

| | |
|---------------------------|---|
| | 铰链区 :23-37 CH2CH3 区 :38-254 连接子肽 :255-262 结合结构域 :263-501 结合区连接子 :384-395 |
| W0009 核酸 (SEQ ID NO :374) | 人 VK3 前导区 :核苷酸 1-60 前导区 - 铰链接头 :61-66 铰链区 :67-111 CH2CH3 区 :112-762 连接子肽 :763-786 结合结构域 :787-1518 结合区连接子 :1150-1200 |
| W0009 多肽 (SEQ ID NO :375) | 人 VK3 前导区 :氨基酸 1-20 前导区 - 铰链接头 :21-22 铰链区 :23-37 CH2CH3 区 :38-254 连接子肽 :255-262 结合结构域 :263-506 结合区连接子 :384-400 |

[0333]

[0334]

[0335]

[0336]

[0337] 还构建了其他的 PIMS 分子,其应用了不同的结合结构域、PIMS 连接子长度、PIMS 连接子来源等。这些另外 PIMS 分子的结构,包括鉴定的表 7 中一些 PIMS 分子的特征,提供在序列表中。这些 PIMS 分子中的一些显示了表 8 中示例的组织结构。

[0338] 表 8

[0339]

| 命名 | 结合结构域 | PIMS 连接子 |
|----|-------|----------|
|----|-------|----------|

| | | |
|-------|----|-----|
| W0035 | DR | H7 |
| W0036 | DR | H62 |
| W0056 | DR | H65 |
| W0087 | DR | H64 |

[0340] 通过重叠寡核苷酸 PCR 构建抗 -DR V_k(V_L) 和 V_h(V_H) 结合区。简而言之,将 10pmol 的每一种寡核苷酸 (1 μ l 10 μ M 储备液) 添加到 PCR 反应中,用 PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen cat#10790-020) 将体积扩至 50 μ l。按照下述操作方案进行 PCR 反应:94°C 进行 2 分钟,然后进行 94°C 30 秒、接着 50°C 20 秒、随后 68°C 3 分钟的 30 个循环,完成第三十个循环时,在 68°C 孵育 5 分钟,随后在 4°C 孵育。将 PCR 产物克隆入 pCR 4-TOPO (Invitrogen cat#45-0030) 并验证序列。将抗 -DR V_k(AgeI/BamHI) 和抗 -DR V_h(BamHI/BclI) 片段连接到 pD18scc-p AgeI/BclI 消化的载体中以制备 pD18 抗 -DR SMIP 构建体 (M0019)。

[0341] 在 PCR 扩增中,通过将 EcoRI 位点添加到 5' 端和将 XbaI 位点添加到 3' 端制备 PIMS。将具有用于在每一末端克隆的限制位点的 PCR 扩增片段克隆到 W0011 构建体中,通过 EcoRI/XbaI 消化已经删除了 TRU-015 (CD20) 结合结构域。更具体地, W0011EcoRI/XbaI 用于构建具有 H7PIMS 连接子的 PIMS (W0035), W0011H62EcoRI/XbaI 用于构建具有 H62PIMS 连接子的 PIMS (W0036), 以及 W0011H64 用于构建具有作为 PIMS 连接子的 H64 的 PIMS (W0087)。通过利用 W0036DNA 构建体作为模板,用 5' 寡核苷酸的测序引物 pD18For 和下述的 3' 寡核苷酸 5' -ttcagaatttcggagaatgacgtgctttctg-3' (SEQ ID NO:549) 进行寡核苷酸定点诱变,制备 W0056。随后,利用 HindIII/BsrGI 限制位点,将片段克隆回 W0036 中。

[0342] 实施例 2

[0343] 将 PIMS- 编码多核苷酸转染入 CHO-S 细胞

[0344] 在进行合适的转染实验前一天,两个无菌长颈瓶中的每一个接种 5×10^5 细胞/ml, 在 250ml 添加有 8Mm L- 谷氨酰胺的 Freestyle™ CHO 表达培养基中。将长颈瓶在 37°C 用 8% CO₂ 孵育并以 70rpm 转动。在转染当天,计数每一长颈瓶中的细胞,并加入 Freestyle™ 培养基以提供 10^6 细胞/ml。在分别的 15ml 无菌管中,将 313 μ g Freestyle™ Max 转染试剂 (1.0 μ g/ml) 加到 4,687 μ l OptiPro™ SFM, 以及将 313 μ g W0001DNA 质粒 (1.0 μ g/ml) 加到 4,687 μ l OptiPro™ SFM 中。将稀释的 Freestyle™ Max 转染试剂加到稀释的 W0001 质粒中并在室温下孵育 10 分钟。然后将 DNA-Freestyle™ Max 试剂复合物缓慢加入到含有细胞的长颈瓶中并将细胞于 37°C、8% CO₂ 下孵育,在轨道摇床上以 70rpm 转动。7 天后,回收每一长颈瓶中的上清并调配到 500ml 的总体积,然后将其通过 2 μ m 过滤器过滤。通过 ELISA 测定的 W0001 蛋白浓度为 7.38 μ g/ml。

[0345] 实施例 3

[0346] 表达研究

[0347] 对上述编码具有效应器功能的特异性结合蛋白或 PIMS 分子的核酸进行表达研究。将编码 PIMS 蛋白的核酸瞬时转染入 COS 细胞,并将转染的细胞维持在熟知的条件下,

所述条件允许异源基因在这些细胞中表达。利用以前描述的 PEI 或 DEAE-右旋糖苷（对于 PEI, 参见 Boussif O. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 92 :7297-7301, (1995), 其通过引用的方式并入本文 ;Pollard H. et al., J. Biol. Chem. 273 :7507-7511, (1998), 其通过引用的方式并入本文）将 DNA 瞬时转染入 COS 细胞中。进行每一新分子的多次独立转染以便确定每一新形式的平均表达水平。对于通过 PEI 的转染, 将 COS 细胞在 DMEM/10% FBS 培养基中铺于 60mm 的组织培养板上, 并孵育过夜使它们可以在转染的当天为大约 90% 汇合。将培养基换为不含抗生素的无血清 DMEM, 然后孵育 4 小时。转染培养基 (4ml/板) 含有无血清 DMEM 和 50 μ g PEI 和 10-20 μ g 感兴趣的 DNA 质粒, 诸如 W0001 质粒。通过涡旋混合转染培养基, 并在室温孵育 15 分钟, 然后吸去现存培养基后将其添加到板中。将培育物孵育 3-7 天, 然后收集上清。通过 SDS-PAGE 和 Western 印迹测定细胞上清中的蛋白表达。

[0348] 对于 SDS-PAGE, 从粗培养物上清 (通常为 30 μ l/孔) 或纯化的蛋白部分中制备样品, 每孔包含 8 μ g 蛋白, 加入 2X Tris-甘氨酸 SDS 缓冲液 (Invitrogen) 直到 1X 终浓度。十 (10) μ l SeeBlue 标志物 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 进行电泳以提供 MW 大小标准。将 PIMS 蛋白在 4-20% Novex Tris-甘氨酸凝胶 (Invitrogen, San Diego, CA) 上进行 SDS-PAGE 分析。利用 Novex Tris-甘氨酸 SDS 上样缓冲液 (2X) 在还原或非还原条件下于 95 $^{\circ}$ C 加热 3 分钟后上样, 随后在 175V 电泳 60 分钟。使用 IXNovex Tris-甘氨酸 SDS 电泳缓冲液 (Invitrogen) 进行电泳。

[0349] COS 细胞中的表达研究结果显示 PIMS 表达的水平介于 scorpion 分子和 SMIP 分子之间。具体地 PIMS 分子以 5-6 μ g/ml 表达, scorpion 以 1-2 μ g/ml 表达, 以及 SMIP 分子以 10 μ g/ml 表达。

[0350] 实施例 4

[0351] ELISA 结合分析

[0352] 对 PIMS 分子、SMIP 分子和 Scorpion 分子进行比较 ELISA 结合测定。使用两种捕获抗体, 即高亲和力和低亲和力抗-CD16 抗体。为了进行分析, 每一 MaxiSorb 板 (Costar MaxiSorb 黑塑料 96-孔板) 最初包被 100 μ l 2 μ g/ml 抗-CD16 低或高亲和力抗体 (CD16mIgG 高亲和力 (870 μ g/ml) : 7.8 μ l/3.4ml PBS ; CD16mIgG 低亲和力 (560 μ g/ml) : 23.6 μ l/6.6ml PBS)。覆盖板并在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第二天早上, 用 200 μ l NFDM (提前一天制备的 PBS/3% 脱脂奶粉, 3g/100ml) 洗涤每板两次。然后通过向每孔中添加 200 μ l NFDM 封闭板并在室温孵育 1 小时。通过向孔中加入 120 μ l NFDM 制备低于最高浓度 (C-H 为列 1-7) 的稀释板 (96-孔塑料板)。随后, 加入 120 μ l 8 μ g/ml 的目的蛋白。对于 CD 16 高和低测定的目的蛋白 (POIs) : S0129 (抗-CD20x 抗-CD20 多特异性结合蛋白或 scorpion ; 1.2mg/ml) 3.32 μ l 加到 500 μ l PBS 中 ; 2Lm20-4 (抗-CD20SMIP ; 1.0mg/ml-稀释自 54mg/ml 母液), 4 μ l 加到 500 μ l PBS 中 ; W0001 (抗-CD28PIMS ; 348 μ g/ml) 11.5 μ l, 然后添加 PBS 到 500 μ l 的终体积。

[0353] 从每孔的混合物中, 转移 120 μ l 到下一孔, 一孔接着一孔地继续该模式进行两倍连续稀释。然后将 NFDM 从 MaxiSorb 板中机械地移出 (即通过轻拍)。从稀释板的每孔中, 转移 100 μ l 到 ELISA 板的对应的孔中。转移后, 将 ELISA 板在室温孵育 1 小时。在该孵育期间, 将山羊抗-人 IgG (FcSp) 和 (H+L)-HRPO 结合物 (Caltech 代 : :H10307, 批号 : 14010107, 有效期为 2007 年 1 月) 以 1 : 1000 稀释于 NFDM (即, 10 μ l 溶于 10ml NFDM 的

终体积中)。然后将 ELISA 板用 PBST (PBS+0.2%吐温 20 = 400 μ l 吐温 20 加到 200ml PBS 中) 洗涤三次,将 100 μ l 辣根过氧化物酶 (HRP) 试剂加到合适的孔中。然后将 ELISA 板在室温下孵育 1 小时。在该孵育期间,通过将 1.1ml 过氧化物酶添加到 8.9ml 底物 (1 : 9) 中制备 Pierce Quanta 蓝色试剂 (Pierce Chemicals 目录号 :15169)。用 PBST 洗涤 ELISA 板三次,将 100 μ l Pierce QuantaBlue 混合物加到每孔中,避免产生气泡。随后将孔在室温下避光孵育 30 分钟。然后将 SpectraMAX GeminiXS 用于测量孔板中的比色反应产物,并将计数以平均荧光强度 (MFI) 作图作为蛋白浓度的函数。对于高亲和力结合的结果显示在图 2 中,对于低亲和力结合的结果显示在图 3 中。样本来源最高蛋白浓度处 MFI 的差异以及信号如何随蛋白样本的进一步稀释迅速降低的差异反映了 CD16 结合的差异。也将磷酸缓冲盐 (PBS) 阴性对照作图以提供测定中背景信号的水平。

[0354] 实施例 5

[0355] Jurkat 细胞结合测定

[0356] 进行结合研究以评估 PIMS 分子诸如 W0001PIMS 的特异结合性质。最初,利用常规技术将 Jurkat 细胞铺板。利用整板中从 20 μ g/ml 低至 0.16 μ g/ml 的两倍滴定法,将 CD28 纯化的蛋白添加到接种的多孔板中。。不含蛋白的一孔作为背景对照。

[0357] 将包含蛋白的接种板在冰上孵育 1 小时。随后,用 200 μ l 溶于 PBS 的 1% FBS 洗涤板一次。然后将 1 : 100 的标记有 FITC 的山羊抗 - 人抗体 (Fc Sp) 添加到每孔中,并将所述板再次在冰上孵育 1 小时。然后将板用 200 μ l 溶于 PBS 的 1% FBS 洗涤一次,随后将细胞重悬在 200 μ l 1% FBS 中,通过 FACS 进行分析。

[0358] 为了评估 W0001 抗 -CD28 肽的结合特性,通过在培养板的个别孔中接种将表达 CD28 的 Jurkat 细胞铺板。然后利用从 20 μ g/ml 扩展低至 0.16 μ g/ml 的两倍稀释方案,将 CD28 纯化的蛋白添加到个别孔中。再利用两倍稀释方案,即从 20 μ g/ml 低至 0.16 μ g/ml,将 W0001PIMS 纯化的蛋白添加到个别接种的孔中。没有蛋白的一孔作为背景对照。然后将所述板在冰上孵育 1 小时,用 200 μ l 溶于 PBS 的 1% FBS 洗涤一次,随后将 1 : 100 的标记有 FITC 的山羊抗 - 人抗体 (Fc Sp) 添加到每孔中。再将板在冰上孵育 1 小时并随后用 200 μ l 溶于 PBS 的 1% FBS 洗涤一次。将细胞在 200 μ l 1% FBS 重悬后,进行 FACS 分析。通过流式细胞术显示表达的蛋白与 Jurkat 细胞上表达的 CD28 结合,由此证实 W0001 肽能够结合特异性靶抗原。此外,没有发现使用的连接子 (H1-H6) 明显影响对靶抗原的结合亲和力。

[0359] 另外,使用外周血单核细胞 (PBMC。简而言之 37°C 下,将 1×10^7 /ml Jurkat T- 细胞在添加 10% FBS (#16140-071, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) 的 Iscoves 培养基 (#12440-053, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) 中标记 500 μ Ci/ml [51 Cr] 铬酸钠 (#CJS1, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 90 分钟),检测了抗 -CD28PIMS 和 SMIP 分子介导 ADCC 诱导的 Jurkat 细胞的细胞死亡的能力。将负载 51 Cr 的 Jurkat 细胞在添加有 10% FBS 的 RPMI (#11875-093, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) 培养基中洗涤 3 次,并以 4×10^5 /ml 重悬在 RPMI 中。通过淋巴细胞分离液 (#50494, MP Biomedicals, Aurora, OH) 上方离心,将来自内部供体的 PBMC 从肝素化全血中分离,用 RPMI 培养基洗涤 2 次,并以 5×10^6 /ml 重悬在添加有 10% FBS 的 RPMI 中。将为终浓度 4 倍的试剂样品加入到添加有 10% FBS 的 RPMI 培养基中,每一试剂制备三份 10 倍连续稀释液。将这些试剂以每孔

50 μ l 加入到 96-孔 U-底板达到标示的终浓度。然后将 ^{51}Cr 标记的 Jurkat 细胞以 50 μ l/孔 (2×10^4 /孔) 加到板中。接着将 PBMC 以 100 μ l/孔 (5×10^5 /孔) 加到板中, 最终效应器 (PBMC): 靶标 (Jurkat 细胞) 的比例为 25 : 1。将效应器和靶标加入到单独的培养基中以测量背景杀伤作用。将 ^{51}Cr 标记的 Jurkat 细胞加入到单独的培养基中以测量 ^{51}Cr 的自发释放, 以及将其加入到添加有 5% NP40 (#28324, Pierce, Rockford, Ill) 的培养基中以测量 ^{51}Cr 的最大释放。将板在 37°C 下于 5% CO_2 中孵育 5 小时。然后将每孔中的 50 μ l 上清转移到 LumaPlate-96 (#6006633, Perkin Elmer, Boston, Mass) 中并在室温干燥过夜。早上, 用 Packard TopCount-NXT 测量放射性发射 (cpm)。特异性杀伤百分比如下计算: $((\text{样品} - \text{cpm 自发释放}) / (\text{cpm 最大释放} - \text{cpm 自发释放})) \times 100$ 。所有的单位都是 cpm; 样品是一式四份样品的平均。呈现在图 4 中的结果显示 PIMS 分子 (W0001) 诱导或介导 Jurkat 细胞死亡。

[0360] 实施例 6

[0361] CD3+ 淋巴细胞结合测定

[0362] 也进行了结合研究以评价诸如 W0001PIMS 的 PIMS 分子对 CD3+ 淋巴细胞的特异结合特性。研究的设计包括用藻红蛋白-结合的鼠抗-CD3+ 抗体标记淋巴细胞制备物的 CD3+ 部分, 并通过利用 FITC-标记的山羊抗人二抗检测 PIMS、SMIP 对这些细胞的结合或者背景结合, 所述二抗能够结合 PIMS 和 SMIP 的恒定亚区。

[0363] 在进行该实验时, 从人供体获得外周血单核细胞 (PBMCs)。通过在淋巴细胞分离液 (MP Biomedicals) 上方离心, 将 PBMC 从肝素化的全血中分离, 用 RPMI 培养基 (Gibco) 洗涤两次, 随后以 8×10^6 细胞/ml 重悬在染色液 (PBS w/2.5% 小鼠血清 /2.5% 山羊血清) 中。将试剂样品 (2E12SMIP, W0001 (2E12PIMS)) 以两倍于测定终浓度的浓度加入到染色液中, 进行四倍连续稀释。将如此处理的试剂样品以每孔 60 微升加到 96-孔 V-底板 (Falcon) 中, 并将单独的培养基加到对照孔中。留出 PBMC 的合适体积, 将 PE-结合的抗-CD3 (BD Pharmingen) 加到这些细胞中, 每孔加等同的 10 μ l 的该试剂。随后将用 PE (藻红蛋白) 抗-CD3 抗体染色的细胞以 60 μ l/孔加入到含有试剂样品 (SMIP, PIMS) 或培养基的孔中。细胞在冰上避光孵育 45 分钟。然后通过离心将板用冷 PBS 洗 2.5 次。(如本领域所理解的, 提到的 2.5 次洗涤实际上包括 3 次洗涤, 即一次洗涤包括在第一次离心前, 将全体积 PBS 的一半加到样品中, 随后的两次每次都在全体积的 PBS 中洗涤)。将 1 : 100 稀释的 FITC (异硫氰酸荧光素)-F' 2 山羊抗人 IgG (Caltag) 在 50 μ l 染色液中加入到孔中。细胞在冰上避光孵育 45 分钟。将所述细胞在冷 PBS 中洗涤 2.5 次, 用 1% 的多聚甲醛 (USB Corp) 固定, 在 4°C 贮存过夜, 然后第二天在 FACsCalibur 流式细胞计数器上读数, 并用 Cell Quest 软件 (Becton Dickinson) 进行分析。图 5 中提供的结果证实了与 CD3+ 淋巴细胞有关的平均荧光强度随着逐渐增加浓度的 W0001 (2E12PIMS) 或 2E12SMIP 而增加。因此, 荧光强度不是人造读数, 而是反映了 2E12PIMS 与 CD3+ 淋巴细胞的结合, 还证实了 PIMS 蛋白结构的功能效用。

[0364] 实施例 7

[0365] 结合竞争

[0366] 进行了结合研究以测量抗-CD37PIMS 与 TRU-016, 一种抗-CD37SMIP 竞争结合 B-细胞的能力。将 10mL RAMOS 细胞重悬在 TSA/FBS (IX TSA-50mM Tris HCl pH 7.8, 添加有 0.5% FBS 的 0.9% NaCl) 中以达到 2×10^6 细胞/mL 的浓度。将 100 μ l 该细胞悬液加

到 96-孔 U-底板的个别孔中,得到 200,000 细胞 / 孔。将板离心以沉淀细胞并移除 TSA/FBS。事先在稀释板中稀释竞争剂蛋白。竞争剂蛋白的起始浓度是 1.0 μ M,将所述蛋白进行三倍连续稀释。将 100 μ l 稀释的竞争剂蛋白加到 U-底板的孔中。将 100 μ L 12nM TRU-016-Eu(Europium-labeled TRU-016) 加到每孔中的 100 μ L 竞争剂蛋白和细胞中,得到每孔 6nM TRU-016-Eu 的终浓度。将蛋白和细胞在 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。用 200 μ L TSA/FBS 将处理的细胞洗涤三次。将细胞重悬在 200 μ L 增强溶液 (Enhancement solution) 中,转移到黄色 96-孔板中,摇动 5 分钟,然后在 EnVisionTM 板阅读器 (PerkinElmer, Waltham, MA) 上读数。结果显示在图 9 中。结果表明,随着多种 PIMS 分子的任一种的浓度增加, TRU-016-Eu 的置换增加,不管 PIMS 连接子长度 (检测了 10 至 25 个氨基酸长度) 和 PIMS 连接子的类型 (H7 或 H65)。这些数据证实多种 PIMS 连接子是功能性的,如由以下证明的:多种 PIMS 结合 CD37,包含基于 H65 结构的 PIMS 连接子的 PIMS 比包含基于来自免疫球蛋白铰链区的 H7 连接子的 PIMS 连接子的 PIMS 具有更好的结合。

[0367] 实施例 8

[0368] PIMS 的另外结合研究

[0369] A. 抗 -CD20 PIMS 与 Wi12-S 细胞的结合

[0370] 对于 Wi12-S B-细胞结合研究,使用 100 μ g/ml PIMS。简而言之,将每孔 5×10^5 Wi12-S B 细胞与如图 6 所示的分子的每一种 (例如, PIMS 或 SMIP) 在 FACS 缓冲液 (1xPBS, 1% 胎牛血清, 0.02% 叠氮化钠) 中于冰上孵育。使用 1 : 100 稀释于 FACS 缓冲液中的结合到藻红蛋白 (PE) 的山羊抗人 IgG(γ 特异性) (Jackson Immunoresearch #109-116-098) 检测结合。通过 FACsCalibur 上单色流式细胞术,利用 CellQuest 软件分析结果。除了评价抗 CD20 PIMS 与 WIL2-S 细胞的结合外,也评价了抗 CD20 SMIP 与在其表面表达 CD20 的 Wi12-S 细胞的结合。如上所述的,通过荧光标记的二抗实现结合的检测,所述二抗识别 SMIP 或 PIMS 分子的 Fc 部分,并产生荧光信号 (表示为几何平均值 (geoMean)), 如图 6 所示。在该图中, 2Lm20-4scc 是也称为 DNE076 的 LH SMIP, 2Lm20-4HL17 是具有 17-氨基酸 gly4ser 连接子的 HLSMIP 并还称为 DNE079, 2Lm20-4HL 12 是具有 12-氨基酸 gly4ser 连接子的 HL SMIP 并还称为 DNE078, PIMS20-17 还被称为 W0009, 以及 PIMS20-12 还被称为 W0008。

[0371] 显示在图 6 中的结果表明,较高浓度的蛋白显示了增加的信号,表示能够达到饱和和结合 (信号平台) 的更高的结合。作为蛋白浓度的函数的达到的信号的水平 and 信号曲线图的斜率都指示结合强度和亲和力。这些数据表明,在较低浓度时,与大多数 CD20 指向的 SMIP 相比,CD20 指向的 PIMS 结合较差;然而,在较高浓度时,来自 PIMS 的信号超过了来自 SMIP 的信号。与具有相同 CD20 结合结构域 (2Lm20-4) 和构型 (VHVL) 的 SMIP 相比, PIMS 分子的饱和可以高出 2 倍多。此外,尽管 gly4ser 连接子长度 (12 或 17) 影响 HL SMIP 的结合 (黑色圆形 / 三角形)。PIMS 的两种连接子形式显示了相似的结合模式 (空心三角形 / 菱形)。

[0372] B. 抗 -DR PIMS 与 Wi12-S 细胞的结合

[0373] 也进行了结合研究以评价抗 -DR PIMS 分子结合 Wi12-S B-细胞的能力。使用上文描述的结合分析,将目的蛋白进行了适当取代。简而言之,将 500,000 个 Wi12-S 细胞铺于多孔板的每孔中,并在冰上与在 FACS 缓冲液 (1x PBS, 1% FBS, 0.02% 叠氮化钠) 中的受

研究的 PIMS 或 SMIP 的一种进行孵育。将细胞与在 FACS 缓冲液中 1 : 100 稀释的 PE- 结合的山羊抗人 IgG(γ 特异性)二抗 (Jackson Immunoresearch#109-116-098) 接触后, 实现藻红蛋白的检测。呈现在图 7 中的结果表明, 抗 -DR PIMS 分子的结合强烈依赖于 PIMS 连接子。W0035, 带有 H7 连接子的抗 -DR PIMS, 具有最低的结合活性。W0036 为带有 H62 连接子的另一种抗 -DR PIMS, 其结合活性高于 W0035。含有 H65 连接子的 W0056 显示了最好的结合活性, 可以与亲本抗 -DR SMIP(M0019) 相比。

[0374] C. 抗 -CD37PIMS 和抗 -CD19PIMS 与 Ramos 细胞的结合

[0375] 另外的结合研究评价了小鼠抗 -CD37PIMS 和抗 -CD19PIMS 结合 Ramos B- 细胞的能力。如上文和实施例 5 中所述的那样进行分析, 结果显示在图 9 中。在该实验中研究的蛋白是 aHer2(抗 -Her2, 参见实施例 12 中 Her2 相关的公开内容)、TRU-016(一种抗 -CD37SMIP)、W0028(小鼠抗 -CD37PIMS)、W0029(半-人源化的抗 -CD 19SMIP)、W0030(小鼠抗 -CD 19PIMS) 和 W0031(一种不同的小鼠抗 -CD19PIMS)。对每一蛋白, 制备 3 : 1 连续稀释液, 范围从 16.7 μ g 至 0.01 μ g。图 9 中的结果表明, 当蛋白浓度从 0.01 μ g/ml 增加时, TRU-016SMIP 和 W0028 比其他 PIMS 或 aHer2 以显著增加的量结合, 但图 9 也证实了测试的不同 PIMS 蛋白与它们的靶标结合。

[0376] D. 抗 -CD28PIMS 与 Jurkat T- 细胞的结合

[0377] 也研究了抗 -CD28PIMS 与 Jurkat T- 细胞的结合。分析了多种抗 CD28PIMS 蛋白, 即 W0001(具有 H7PIMS 连接子的抗 -CD28PIMS)、W0050(带有 H9PIMS 连接子的抗 -CD28PIMS)、W0051(带有 H47PIMS 连接子的抗 -CD28PIMS)、W0052(带有 H56PIMS 连接子的抗 -CD28PIMS)、W0053(带有 H62PIMS 连接子的抗 -CD28PIMS)、W0083(带有 H65PIMS 连接子的抗 -CD28PIMS) 和抗 -CD28SMIP。为了进行这一结合研究, 对于上述蛋白的每一种, 将 50 μ l 蛋白溶液以 10 μ g/ml 至 5ng/ml 的不同浓度分别添加到 V- 形 96 孔板的孔中。接着, 将 50 μ l 中的 2.5×10^5 个 Jurkat 细胞添加到每孔中。然后将样品在冰上孵育 30 分钟, 用溶于 PBS 的 1% BSA 洗涤 2 次, 并添加在溶于 PBS 的 1% BSA 中 1 : 200 稀释的抗人 IgG-PE。将板在冰上再孵育 30 分钟, 用溶于 PBS 的 1% BSA 洗涤 1 次。将细胞重悬在溶于 PBS 中的 2% 甲醛中。使用 Faecscan 测量每孔中结合的平均荧光强度。

[0378] 涉及抗 -CD28PIMS 和 Jurkat T- 细胞的结合研究的结果显示于图 10 中。不管具体的 PIMS 连接子, 所有抗 -CD28PIMS 都显示出相当的结合活性。看起来 PIMS 连接子并不影响抗 -CD28PIMS 与 Jurkat 细胞的结合。这与结合受到使用的 scorpion 连接子的类型强烈影响的抗 -DR PIMS 结合的情况不同。

[0379] E. PIMS 恒定亚区与 CD 16 的结合

[0380] 使用被鉴定为 Fc 受体 Fc γ RIIIa 和 Fc γ RIIIb 的 CD16, 也进行了 PIMS 分子恒定亚区的结合研究。CD16 结合 IgG 抗体的 Fc 区。为了评估 PIMS 与 CD16 的结合特性, 应用了低亲和力的 CD16。为了进行分析, 将 Ramos 细胞以 350,000 细胞 / 孔添加到细胞培养孔中。以 0.011 μ g / 孔至 1.2 μ g / 孔的浓度添加包括 TRU-016(抗 -CD37SMIP) 和抗 -CD37PIMS 分子的目的蛋白的溶液, CD16 添加到 1 μ g / 孔。然后用 200 μ l FACS 缓冲液 (1xPBS, 1% FBS, 0.02% 叠氮化钠) 洗涤反应混合物 2.5x。然后添加以 1 : 100 稀释的与藻红蛋白 (PE) 结合的山羊抗 - 小鼠 (Jackson Immunoresearch#115-116-071), 将混合物在冰上孵育 45 分钟。随后, 用 FACS 缓冲液将反应混合物洗涤 1.5x, 然后进行分析。CD161o(低亲和力 CD16)

结合数据显示在表 9 中。

[0381] 表 9

[0382]

| <u>样品</u> <u>conc (ug/ml)</u> | <u>Geo</u> <u>MFI</u> | | | | | | | | |
|----------------------------------|--------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | <u>TRU016</u> | <u>W0012</u> | <u>W0023</u> | <u>W0024</u> | <u>W0025</u> | <u>W0094</u> | <u>W0095</u> | <u>W0096</u> | <u>W0097</u> |
| 24 | 157.72 | 119.99 | 75.33 | 145.82 | 124.11 | 77.19 | 85.82 | 65.36 | 64.89 |
| 8 | 227.94 | 69.76 | 41.97 | 102.88 | 81.76 | 105.02 | 89.6 | 99.77 | 96.44 |
| 2.67 | 228.76 | 30.74 | 17.71 | 44.38 | 32.29 | 98.89 | 59.99 | 93.57 | 97.8 |
| 0.89 | 214.19 | 11.73 | 6.67 | 16.38 | 10.27 | 52.42 | 24.32 | 43.65 | 54.55 |
| 0.3 | 143.31 | 4.25 | 2.86 | 5.17 | 3 | 16.69 | 5.1 | 11.53 | 20.39 |
| 0.1 | 57.46 | 2.25 | 1.7 | 2.03 | 1.61 | 3.88 | 1.64 | 2.71 | 6.12 |
| 0.033 | 21.75 | 1.59 | 1.45 | 1.49 | 1.31 | 1.57 | 1.36 | 1.46 | 2.02 |
| 0.011 | 7.41 | 1.34 | 1.38 | 1.33 | 1.42 | 1.28 | 1.19 | 1.25 | 1.61 |

[0383] 图 11 中显示了涉及 CD161 α 结合抗 CD37PIMS 分子和对照的结合研究的结果的图解。

[0384] 包括具有多种 PIMS 连接子的 PIMS 在内的所有进行分析的抗 -CD37PIMS 与 TRU-016 (抗 -CD37SMIP) 相比显示了较低的 CD16 结合。这些发现与下文实施例 9 中描述的 ADCC 分析结果是一致的。

[0385] 实施例 9

[0386] PIMS 的 ADCC 活性

[0387] 为了评估可由 PIMS 诱导的或介导的抗体依赖的细胞的细胞毒作用 (ADCC), 进行了 ADCC 分析。简而言之, 在添加有 10% FBS (#16140-071, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) 的 Iscoves 培养基 (#12440-053, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) 中, 将 1×10^7 细胞/ml BJBAB B- 细胞用 500uCi/ml 的 ^{51}Cr 铬酸钠 (#CJS 1, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 在 37°C 下标记 2 小时。然后将 ^{51}Cr - 负载的 BJBAB B- 细胞在添加有 10% FBS 的 RPMI (#11875-093, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) 培养基中洗涤 3 次, 以 4×10^5 细胞/ml 重悬在 RPMI 中。将来自内部供体的外周血单核细胞 (PBMC) 通过在淋巴细胞分离液 (#50494, MP Biomedicals, Aurora, OH) 上方的离心从肝素化的全血中分离出, 用 RPMI 培养基洗 2 次, 然后以 5×10^6 细胞/ml 重悬在添加有 10% FBS 的 RPMI 中。将试剂样品以 4 倍于终浓度的浓度加入到添加有 10% FBS 的 RPMI 培养基中, 每一试剂制备 3 份 10 倍连续稀释液。然后将这些试剂以 50 μ l/ 孔加入到 96- 孔 U- 底板中以达到标示的终浓度。然后将 ^{51}Cr - 标记的 BJBAB 细胞以 50 μ l/ 孔 (2×10^4 细胞/ 孔) 加到板中。

[0388] 然后将 PBMC 以 100 μ l/ 孔 (5×10^5 细胞/ 孔) 加到板中, 使效应器 (PBMC): 靶标 (BJBAB) 的终比例为 25 : 1。将效应器和靶标加到单独的培养基中测量背景杀伤作用。将 ^{51}Cr 标记的 BJBAB B- 细胞加到单独的培养基以测量 ^{51}Cr 的自发释放以及加到含有 5% NP40 (#28324, Pierce, Rockford, Ill) 的培养基中以测量 ^{51}Cr 的最大释放。将板于 37°C 在 5% CO_2 中孵育 6 小时。然后将每孔中的 50 μ l 上清转移到 LumaPlate-96 (#6006633, Perkin Elmer, Boston, Mass) 并在室温干燥过夜。早上, 在 Packard TopCount-NXT 上读取 cpm。根据下面的方程式计算特异性杀伤百分比: ((样品 (一式四份样品的平均) 的 cpm - cpm 自发释放) / (cpm 最大释放 - cpm 自发释放)) \times 100。结果显示在图 12 中, 其表明,

对于每一测试的蛋白,即 2Lm20-4(人源化抗-CD20SMIP)、W0008(具有 10-氨基酸 PIMS 连接子的抗-CD20PIMS)和 W0009(具有 15-氨基酸 PIMS 连接子的抗-CD20PIMS),随着蛋白浓度从 0.01 μ g/ml 增加到 10 μ g/ml,特异性杀伤的 BJAB B- 细胞的百分比普遍从约 40% 增加至约 58%。如所预期的,培养基对照几乎没有显示细胞杀伤作用。

[0389] 如上所述,在 ADCC 分析中评估了抗-CD28PIMS 分子诱导 ADCC- 介导的 Jurkat T- 细胞的杀伤的能力。显示在图 13 的结果表明,随着蛋白浓度的增加,W001,抗-CD28PIMS 相比两种抗-CD28SMIP 分子的任一种(2E12Ig 或其为 2E12N297D Ig 形式的变体)或单独的培养基诱导了更大百分比的对 Jurkat T- 细胞的特异性杀伤。

[0390] 进行了相似的 ADCC 分析以确定抗-DR PIMS 诱导 BJAB B- 细胞的 ADCC 的能力。如上所述再次进行分析,结果显示在图 14 中。利妥昔单抗在测试的所有浓度都显示了最高百分比的特异性细胞杀伤,且特异性杀伤的细胞的百分比随着增加的蛋白浓度增加。类似地,W0019,抗-DR SMIP(具有 H7 连接子区)显示了高水平的特异性细胞杀伤,且杀伤的细胞的百分比随着蛋白浓度的每一增加而增加。抗-DRPIMS 也显示了特异性细胞杀伤作用,杀伤的细胞的百分比随着 PIMS 蛋白的百分比从 0.2nM 增加至 20nM 而增加。W0056,抗-DR PIMS(含有 H65PIMS 连接子),在测试的所有浓度显示了任一抗-DR PIMS 的最高水平的特异细胞杀伤作用。与 W0056 相似,W0036(具有 H62PIMS 连接子的抗-DR PIMS)显示了随着相关 PIMS 浓度从 20 增加至 200nM,特异细胞杀伤百分比的降低。相比之下,随着 PIMS 浓度从 0.2 增加至 20nM,W0035(具有 H7PIMS 连接子的抗-DR PIMS)显示了显著增加的特异杀伤的细胞百分比,然后随着浓度增加超出 20nM 至 200nM,杀伤的细胞百分比大致达到平台期。结果表明抗-DR PIMS 在 PIMS 浓度为 20nM 时能够诱导 42-58% 的 ADCC- 介导的 BJAB B- 细胞的细胞死亡,该范围的较高端点归因于含 H65PIMS 连接子的 PIMS,该范围的较低端点归因于含 H7PIMS 连接子的 PIMS。

[0391] 也进行上述的 ADCC 分析来评估抗-CD37PIMS 诱导 ADCC- 介导的 BJAB B- 细胞的细胞死亡的能力。在该分析中,将两种 PIMS(W0012 和 W0094)与 TRU-016(抗-CD37SMIP)比较。W0012 是具有 H7PIMS 连接子的抗-CD37PIMS。W0094 是具有 H65PIMS 连接子的抗-CD37PIMS。在该分析中也评估了作为阳性对照的利妥昔单抗和作为阴性对照的单独的培养基。结果表明,两种 PIMS 比 SMIP 具有较低的 ADCC 活性,如图 15 所示。尽管本文公开的结合研究表明,W0094 比 W0012 具有更高的结合活性,但 W0094 没有比 W0012 表现出更强的 ADCC 诱导能力,不像上文所述的抗-DR PIMS 的结果那样,其中具有 H65PIMS 连接子的抗-DR PIMS 表现出一致的比具有 H7PIMS 连接子的抗-DR PIMS 更强的 ADCC 活性。

[0392] 实施例 10

[0393] PIMS 的 CDC 活性

[0394] 补体依赖性细胞毒作用(CDC)提供了另一机制,通过该机制诸如 B 细胞的真核(例如,哺乳动物)细胞被杀死。探究 PIMS 的 CDC 活性以确定这些展示特异性靶标结合的单链分子是否还能够诱导或介导诸如在其表面表达 PIMS 结合伴侣的 B 细胞的靶标细胞的 CDC。为了评价 CDC 活性,将在 50 μ l Iscoves(#12440-053, Gibco/Invitrogen, GrandIsland, NY)培养基(无 FBS)中的 5-2.5x 10⁵ 个 Ramos B- 细胞加到 96- 孔 V- 底板的每孔中。被分析的蛋白是 2Lm20-4(人源化抗-CD20SMIP)、TRU-015(抗-CD20SMIP)、W0008(含 10-氨基酸 PIMS 连接子、具有 HL 取向的结合结构域的 PIMS)、W0009(含 15-氨

基酸 PIMS 连接子、具有 HL 取向的结合结构域的 PIMS) 以及作为阴性对照的单独的培养基。将 50ul 的 Iscoves 中的这些蛋白的每一种 (或单独的 Iscoves) 以 2 倍于所示终浓度的浓度分别加到孔中。将细胞和试剂在 37°C 孵育 45 分钟。将细胞在不含 FBS 的 Iscoves 培养基中洗 2¹/₂ 次, 然后在 96 孔板中以所示浓度重悬于含人血清 (#A113, Quidel, San Diego, CA) 的 Iscoves 中。然后将细胞在 37°C 孵育 90 分钟。通过离心洗细胞, 随后重悬在 125ul 冷 PBS 中。将细胞转移到 FACs 聚类管 (FACs cluster tubes) (#4410, CoStar, Corning, NY) 中并以 5ug/ml 加入 125ul 含碘化丙啶 (#P-16063, Molecular Probes, Eugene, OR) 的 PBS。将细胞与碘化丙啶在室温避光孵育 15 分钟, 然后置于冰上, 在带有 CellQuest 软件的 FACsCalibur (Becton Dickinson) 上读数并进行分析。

[0395] 结果显示在图 16 中。从图中可以明显看出, 随着蛋白浓度的增加, 两种 SMIP 的每一种的 CDC 活性从 0.2ug/ml 蛋白时的约 5% Pi- 阳性细胞增加到 20ug/ml 蛋白时的约 88% Pi- 阳性细胞。在 0.2ug/ml 蛋白时, 两种 PIMS 分子也都显示约 5% Pi- 阳性细胞, 但在 20ug/ml 蛋白时, 增加到约 69% Pi- 阳性细胞。为诱导的 CDC 活性水平的量度的 Pi- 阳性细胞百分比对于在所有测试的浓度下的两种 PIMS 分子而言都几乎相同, 这表明 10-15 个氨基酸的 PIMS 连接子在 CDC 诱导方面功能相似。

[0396] 实施例 11

[0397] 通过 PIMS 的细胞生长抑制

[0398] 前面的实施例证实了 PIMS 分子可以通过 ADCC 和 / 或 CDC 用于诱导细胞死亡。此外, PIMS 分子可以用于抑制真核细胞的生长。为了证实 PIMS 分子的这种特性, 在含有 10% FCS (Gibco/Invitrogen#01-40200J, Grand Island, NY) 的 RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen#11875, Grand Island, NY) 中制备多种 PIMS 蛋白、SMIP 蛋白和其他对照的四倍稀释液以得到四倍于图 17 中显示的终浓度的浓度。将 SU-DHL-6B- 细胞 (DMSZ#ACC 572, Braunschweig, Germany) 悬浮于含 10% FCS 的 RPMI 中, 浓度为 2x10⁵ 细胞 /ml。使用黑色的 96- 孔平底板进行分析, 如果需要将培养基加到孔中以得到 200 微升的终孔体积。然后将细胞以 50 微升 / 孔 (10⁴ 细胞 / 孔) 加入。随后将目的蛋白以 50 微升 / 孔分别加到孔中。在培养基中制备 Fab' 2 山羊抗 - 小鼠 IgG (GAM ; Jackson ImmunoResearch Labs#115-006-062, West Grove, PA) 或 Fab' 2 山羊抗 - 人 IgG (GAH ; Jackson ImmunoResearch Labs#109-006-008, West Grove, PA) 的交联溶液。制备四倍稀释液以得到终浓度为目的蛋白的浓度三倍的交联剂。然后将这些蛋白分别加到孔中, 山羊抗人二抗加到含 PIMs 和 SMIP 的孔中, 且山羊抗 - 小鼠二抗加到含单克隆抗体的孔中 (参见图 17)。将板于 37°C 在 5% CO₂ 中孵育 72 小时。

[0399] 通过 ATPlite (Perkin Elmer#6016943, Waltham, MA) 测量多种目的蛋白对 ATP 释放的影响。按照生产商的推荐, 利用底物溶液进行这些细胞毒性作用研究, 所述底物溶液以与每一样品中存在的 ATP 成比例的方式发光。简而言之, 加入哺乳动物细胞裂解缓冲液裂解细胞, 随后加入底物溶液。每孔中产生的光量在 TopCountR 微板闪烁发光计数仪 (Perkin Elmer, Waltham, MA) 中测量。显示在图 17 中的结果表示为一式四份样品的平均值和标准差。这些结果表明, 相对于在相同蛋白浓度的测试的单克隆抗体观察到的较适度的生长抑制, 随着 PIMS (或 SMIP) 浓度从 0.03ug/ml 增加到 0.5ug/ml, DHL-6B 细胞的生长抑制显著增加。因此, PIMS 显示了抑制细胞生长的能力。

[0400] 实施例 12**[0401] 抗 -Her2PIMS**

[0402] Her2(也称为 neu、ErbB-2 和 ERBB2)是与攻击性的乳腺癌有关的蛋白。该蛋白为 ErbB 蛋白家族或表皮生长因子受体家族的成员。它是细胞膜表面结合的受体酪氨酸激酶,通常与导致细胞生长和分化的信号转导途径有关,并且它已经被鉴定为抗癌治疗的靶标,诸如乳腺癌、卵巢癌、胃癌以及其他癌治疗的靶标。预期特异识别 Her2 的 PIMS 分子将 PIMS 的 ADCC、CDC 和生长抑制特性靶向高水平表达 Her2 的细胞,即靶向癌细胞。

[0403] 为了评估 PIMS 识别 Her2 的能力,使用实施例 5 和 6 中描述的方案进行结合分析,适当地代替为抗 -Her2PIMS 和表达 Her2 的 SKBR3 乳腺癌细胞。结果显示在图 18 中,该图表明,随着蛋白浓度从 0.0046ug/ml 增加至 10.0000ug/ml,Her033smip(即,抗 -Her2SMIP)展示了急剧增加的平均荧光强度。随着蛋白浓度的增加,也观察到 W042、W044 和 W045 三种抗 -Her2PIMS 分子的较不急剧但仍明显的平均荧光强度的增加。W041PIMS 看起来不结合 SKBR3 细胞上的 Her2。这些数据证实了抗 -Her2PIMS 分子确实结合 SKBR3 细胞表面上的 Her2。

[0404] 当 Her2PIMS 与另一乳腺癌细胞系 MDA-MB453 细胞系接触时,也发现了用 SKBR3 细胞获得的结果。对目的蛋白和细胞适当取代后,进行上文和实施例 5 和 6 中所述的操作方案。显示在图 19 中的结果表明,Her033,抗 -Her2SMIP 的平均荧光强度随着增加的蛋白浓度迅速增加,然后在 2.222 至 20.000ug/ml 之间达到平台期。W0042 和 W0057PIMS 分子也显示了与 MDA-MB453 细胞结合的明显增加,正如随着蛋白浓度的增加显著增加的平均荧光强度所显示的。对于 PIMS 结合没有观察到平台期。正如预期的,对照显示出可以忽略的结合,如所有测试的浓度中观察到的最小平均荧光强度所表明的。

[0405] 在多种乳腺癌细胞系上显示的 Her2 被 PIMS 分子的结合提示,PIMS 可以用于癌症诊断、预后和治疗,包括但不限于与 Her2 表达或过表达有关的癌症,诸如乳腺、卵巢和胃癌。更一般地,预期靶向癌症标志物的 PIMS 是有用的诊断、预后和诊断试剂。

[0406] 结合本文公开的内容,具有效应器功能的特异性结合蛋白的结构主题的变形对本领域技术人员来说是显而易见的,且这些变异的结构都在本发明的范围内。

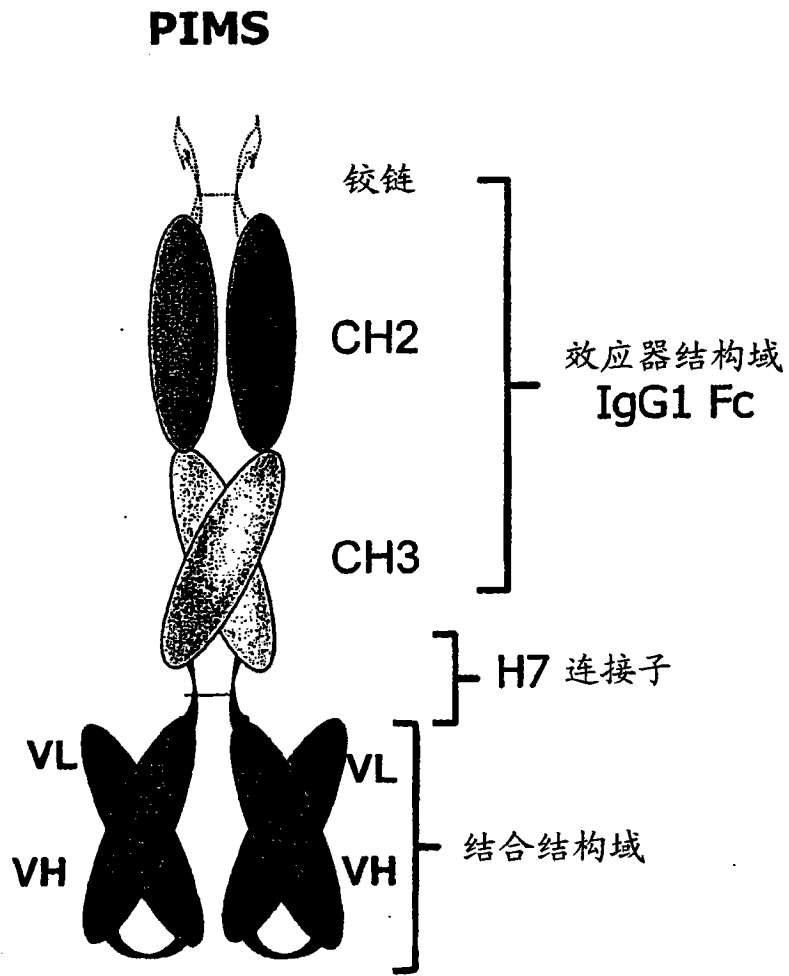


图 1

CD16 高亲和力数据(30分钟读数)

| | S0129 | 2Lm20-4 | W0001 | PBS |
|-------|-----------|----------|----------|---------|
| 0.125 | 4332.091 | 3900.822 | 6200.239 | 3159.28 |
| 0.25 | 4680.122 | 4827.506 | 8801.978 | |
| 0.5 | 5899.813 | 5509.538 | 11231.53 | |
| 1 | 7471.331 | 6845.705 | 13753.33 | |
| 2 | 9314.948 | 8722.129 | 15724.54 | |
| 4 | 11747.45 | 10542.34 | 16995.84 | |
| 8 | 12628.235 | 14571.1 | 17739.22 | |

PBS 阴性对照 - 三孔的平均值

| | | |
|----------|----------|----------|
| 2948.251 | 3015.527 | 3514.062 |
|----------|----------|----------|

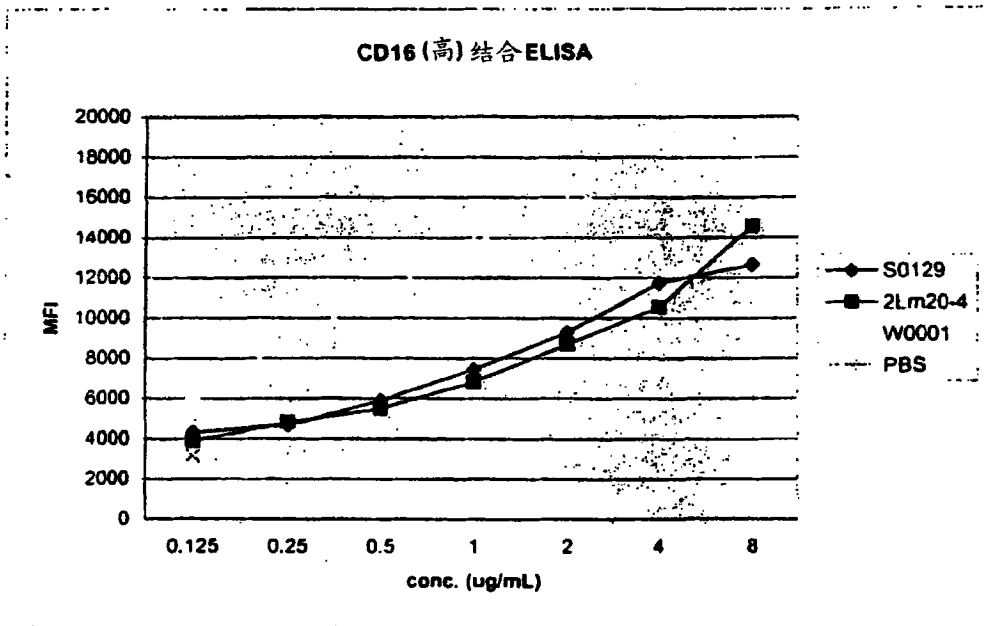


图 2

CD16 低亲和力数据 (30分钟读数)

| | S0129 | 2Lm20-4 | W0001 | PBS |
|-------|----------|----------|----------|---------|
| 0.125 | 844.192 | 870.616 | 4336.849 | 615.245 |
| 0.25 | 1349.737 | 737.392 | 6775.06 | |
| 0.5 | 1734.488 | 927.225 | 9742.545 | |
| 1 | 2387.618 | 870.672 | 12956.27 | |
| 2 | 3818.847 | 1526.304 | 15397.14 | |
| 4 | 6051.314 | 2248.092 | 17132.39 | |
| 8 | 8610.13 | 3552.533 | 18054.67 | |

PBS 阴性对照 - 三孔平均值

| | | |
|---------|---------|---------|
| 562.574 | 610.928 | 672.233 |
|---------|---------|---------|

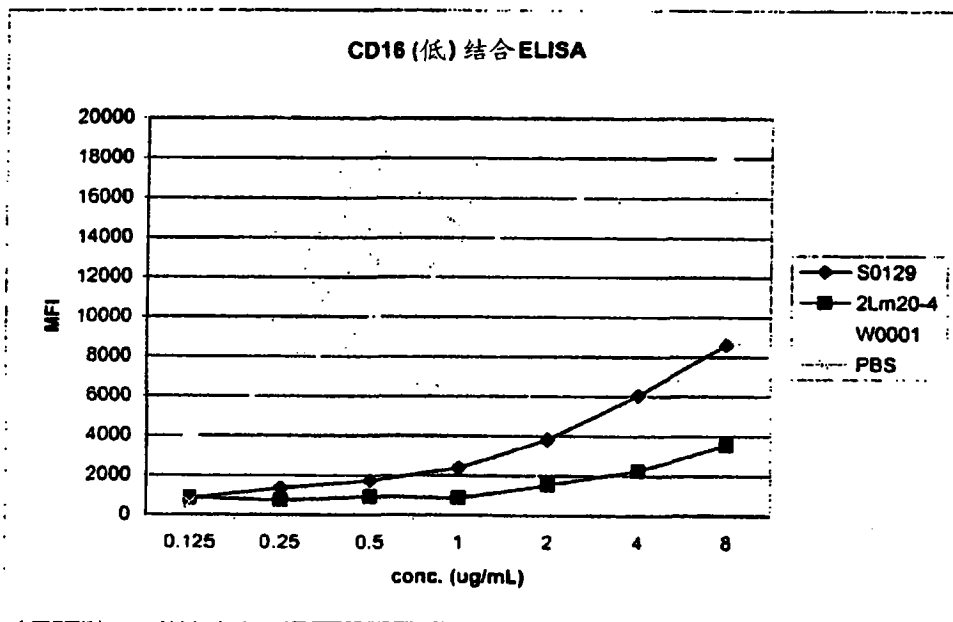


图 3

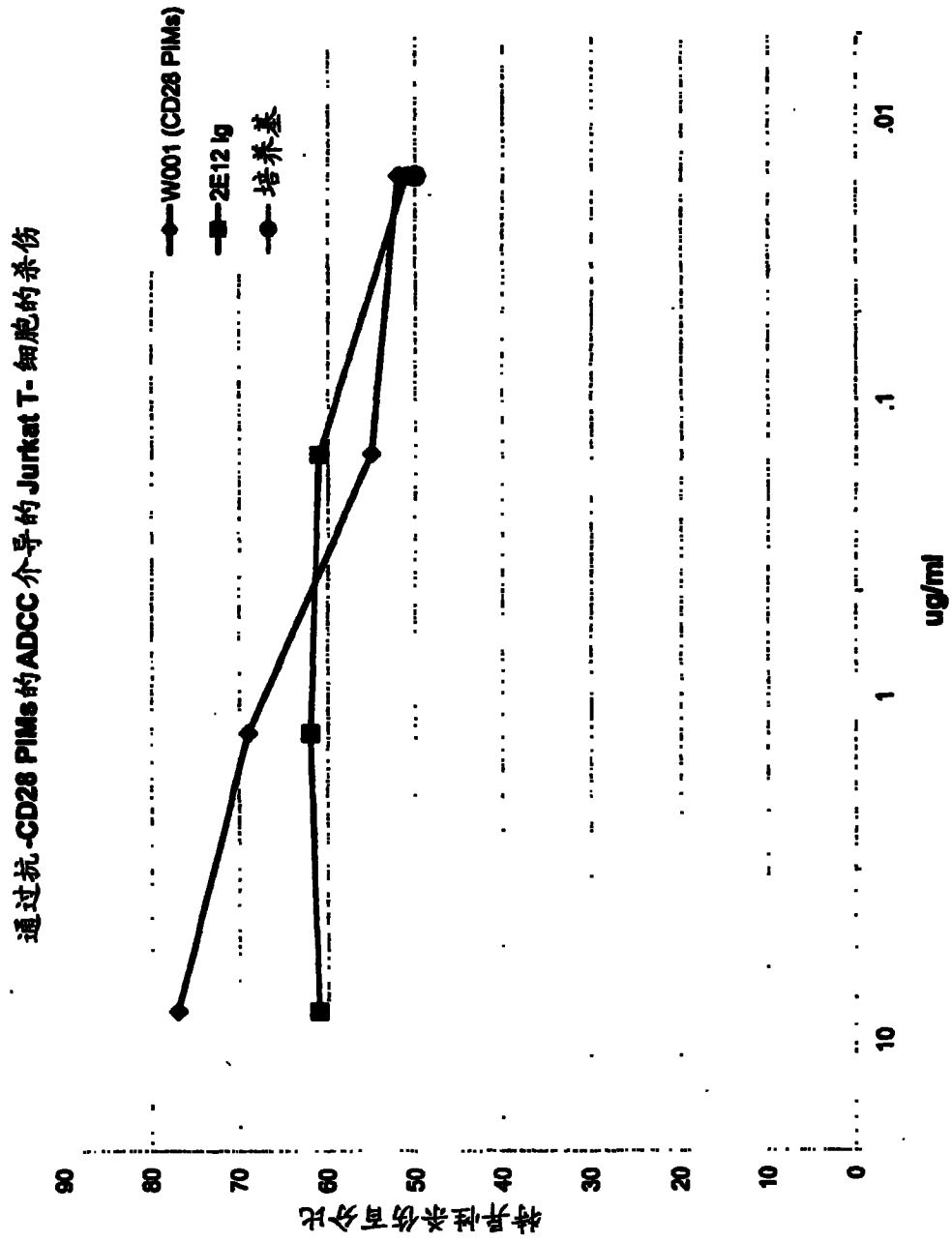


图 4

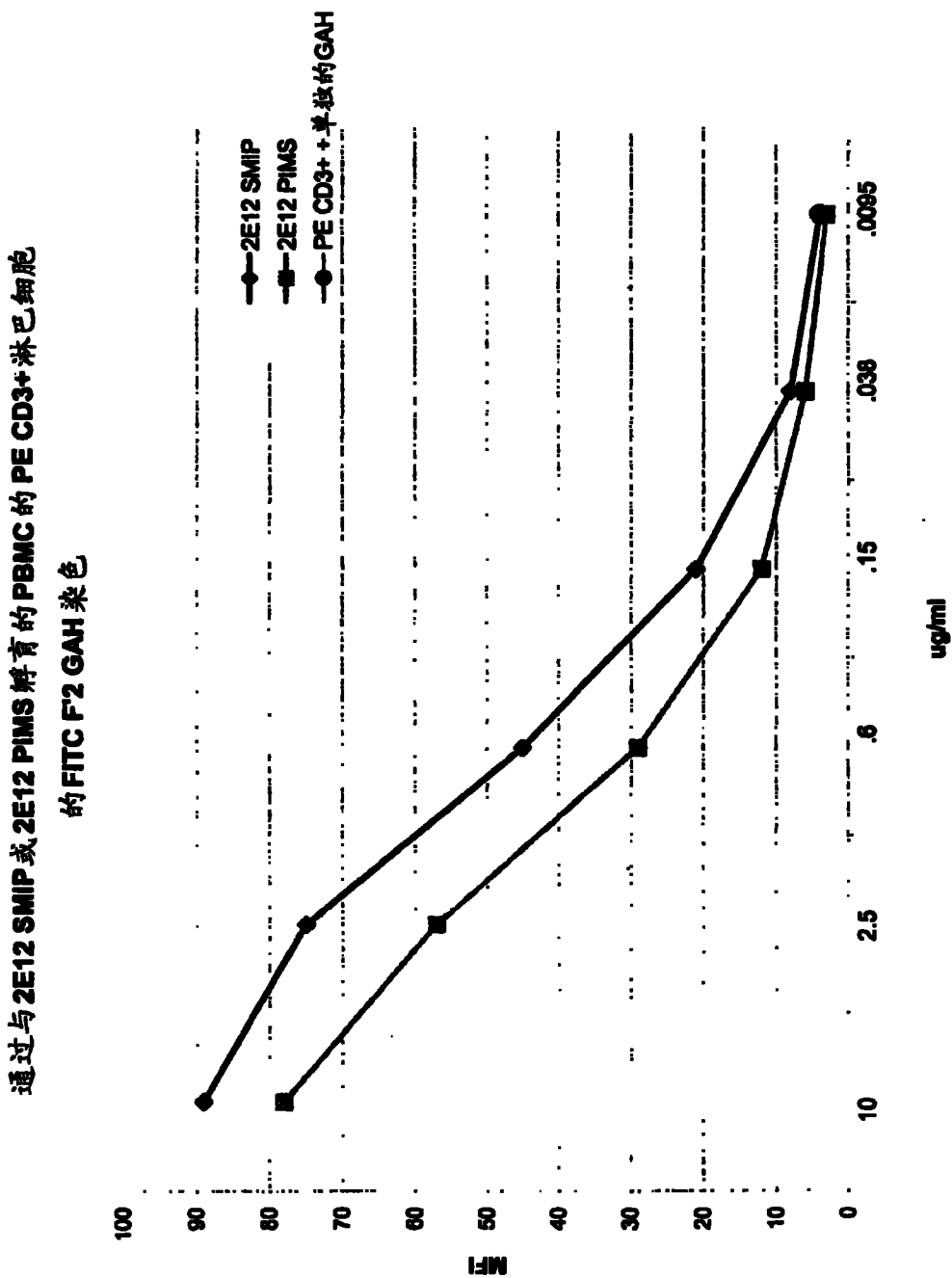


图 5

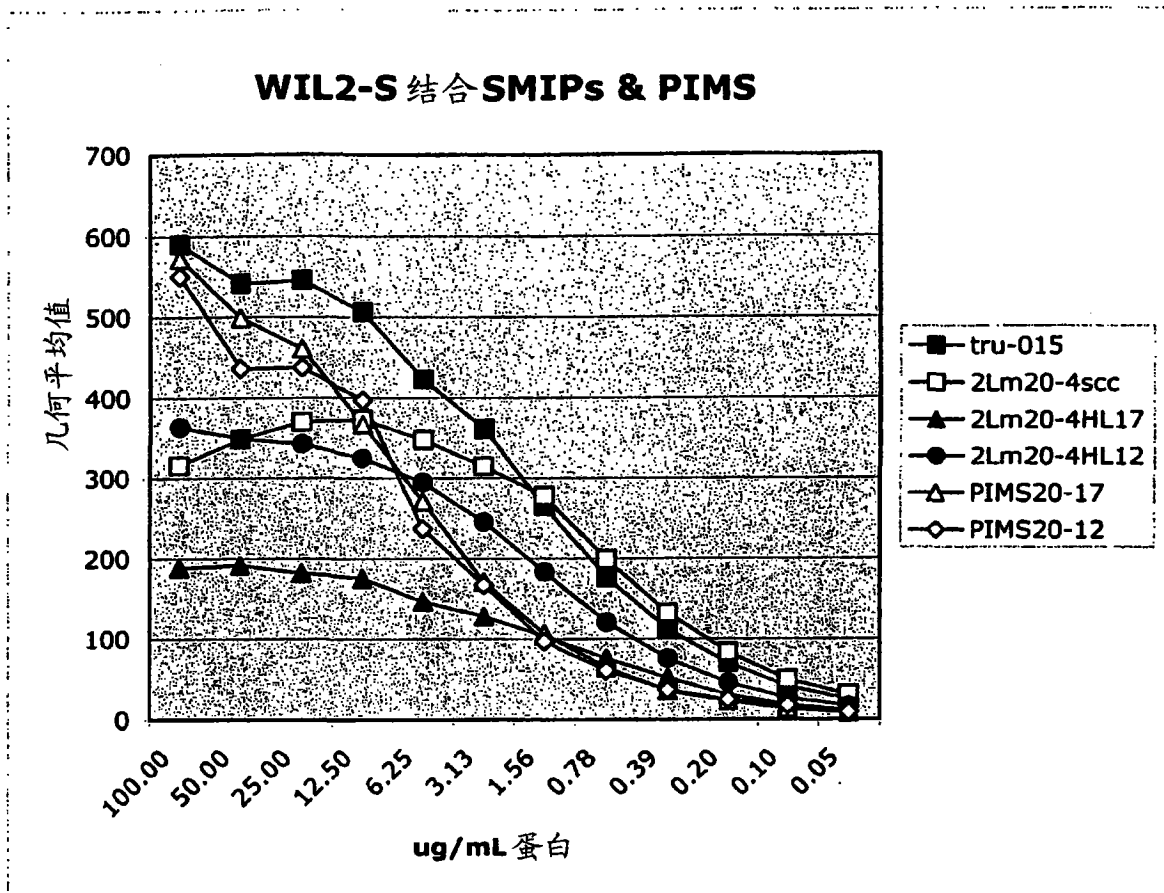


图 6

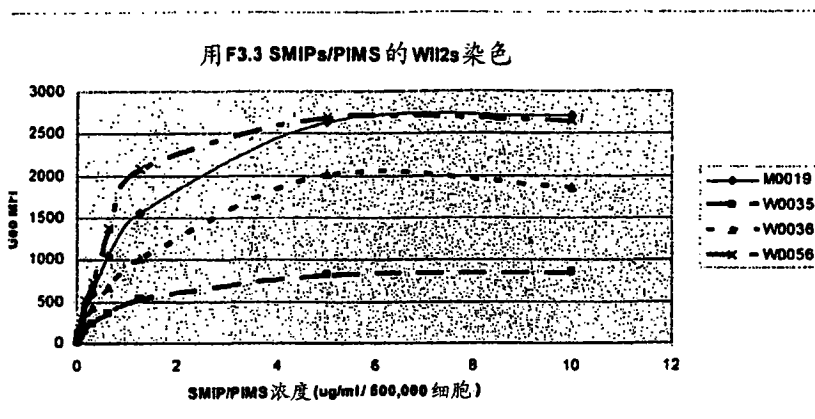


图 7

抗-CD37 PIMS 与 Ramos 细胞的竞争性结合

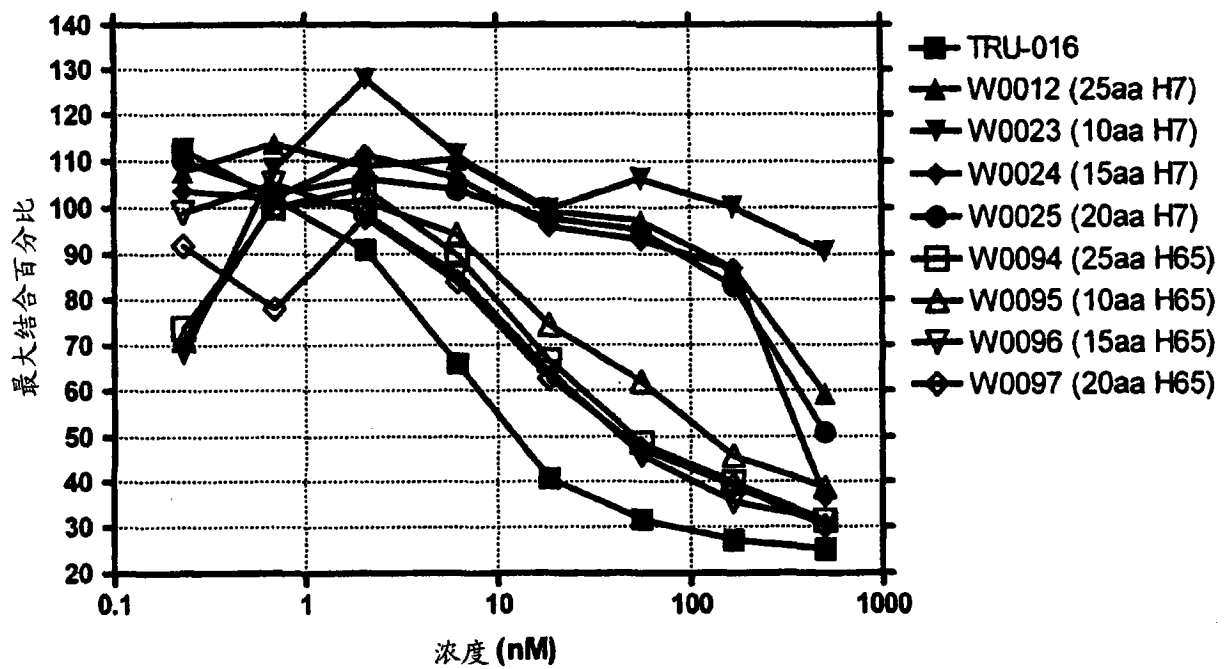


图 8

结合 RAMOS 的 CD19 和小鼠-CD37 PIMS

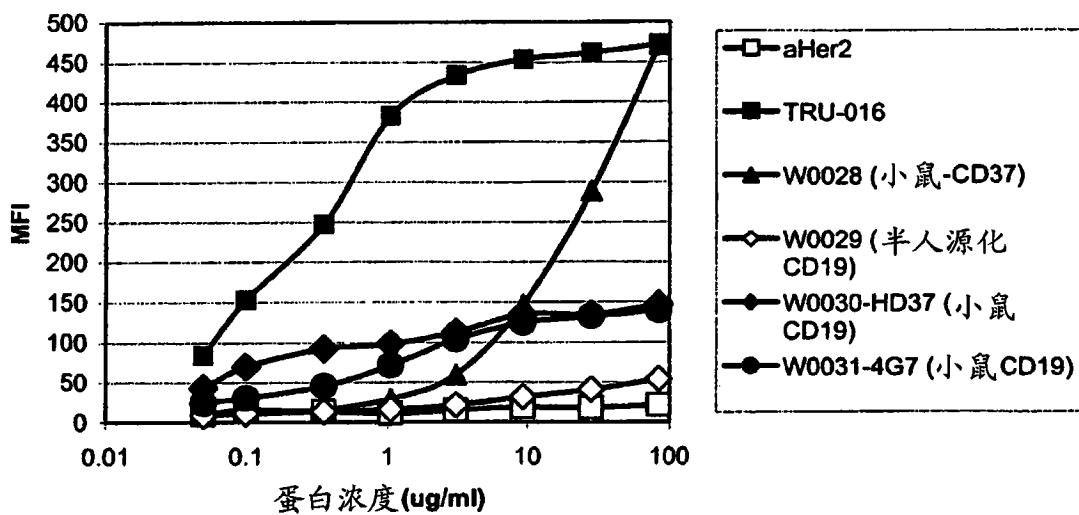


图 9

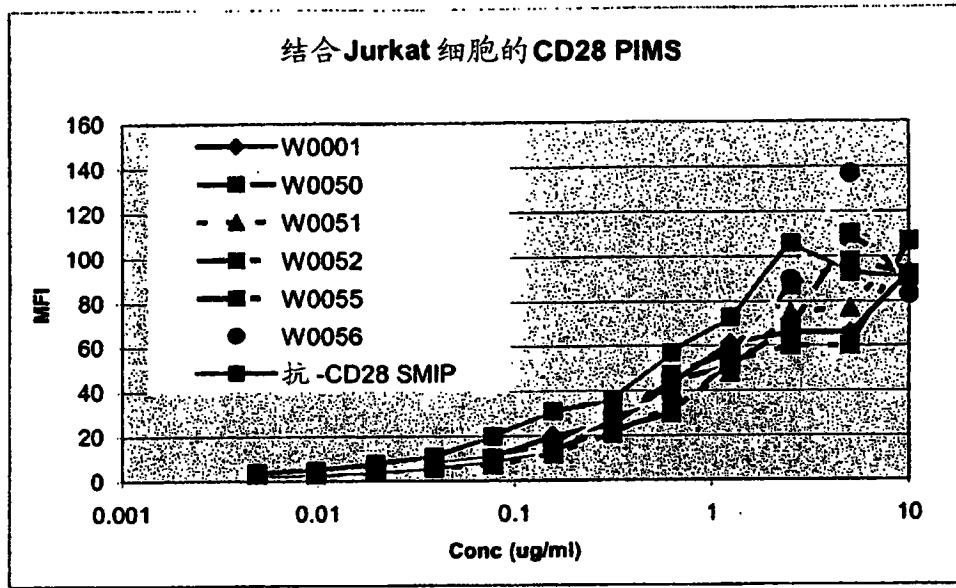


图 10

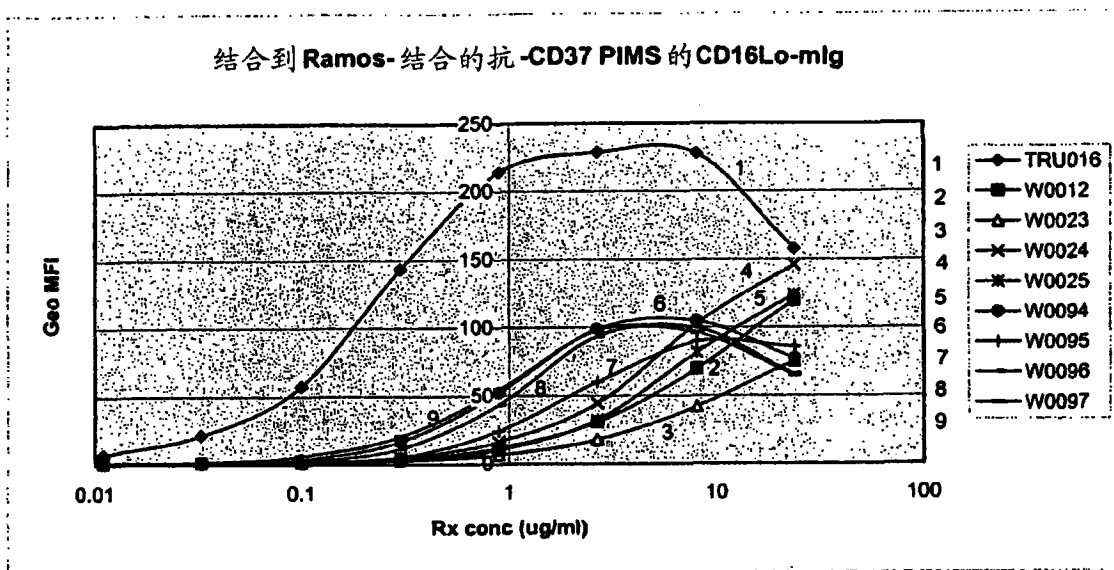


图 11

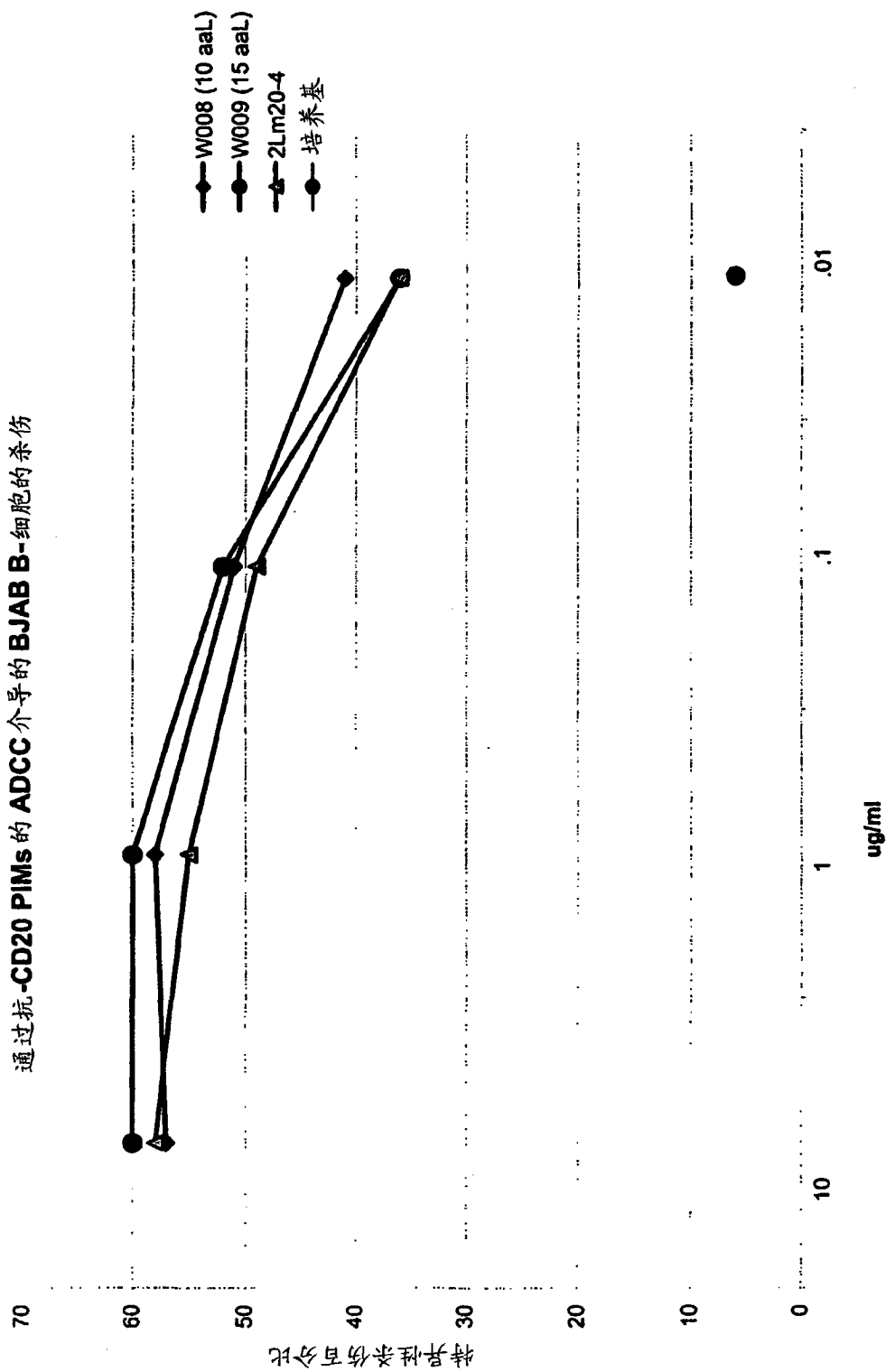


图 12

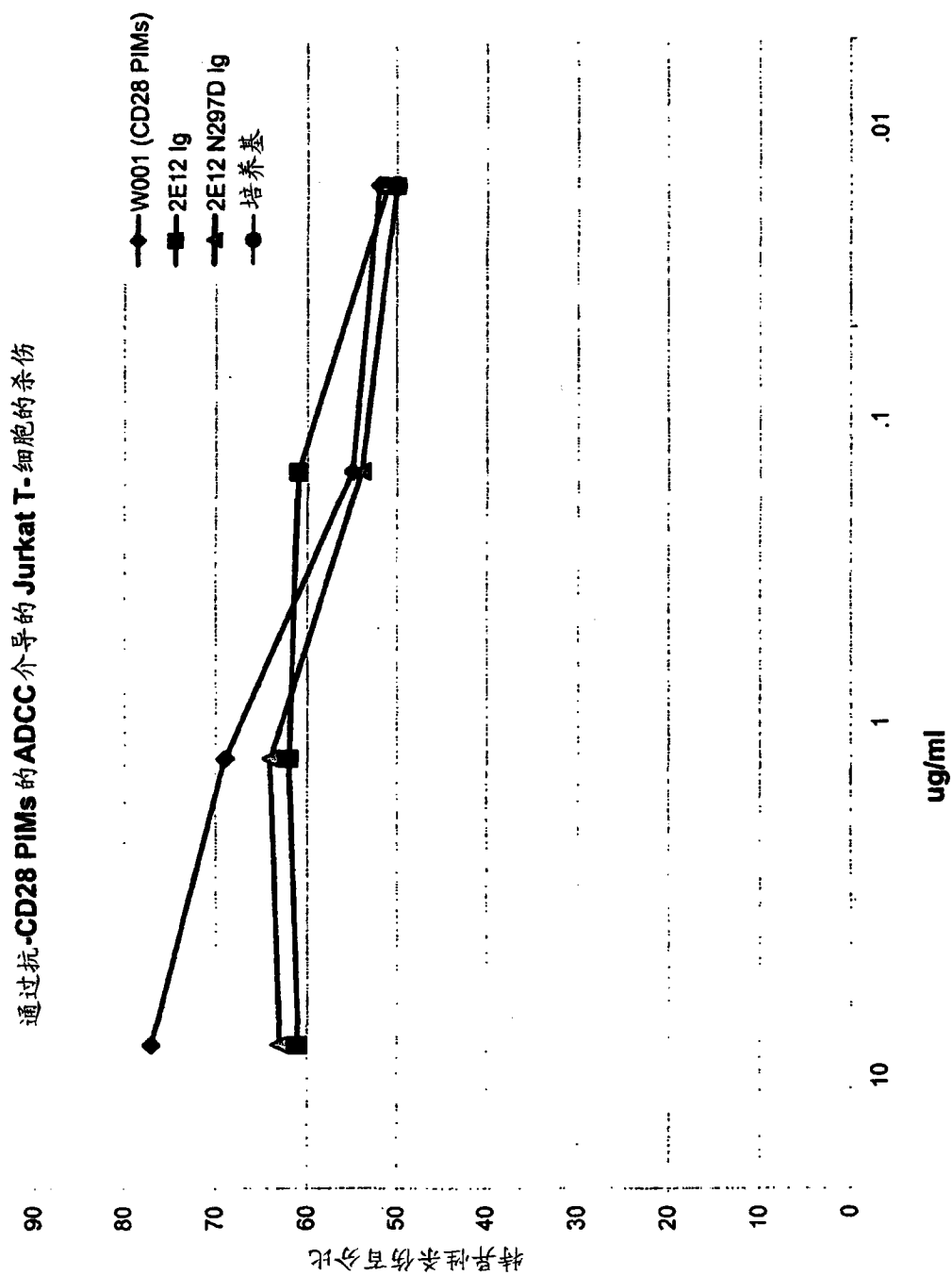


图 13

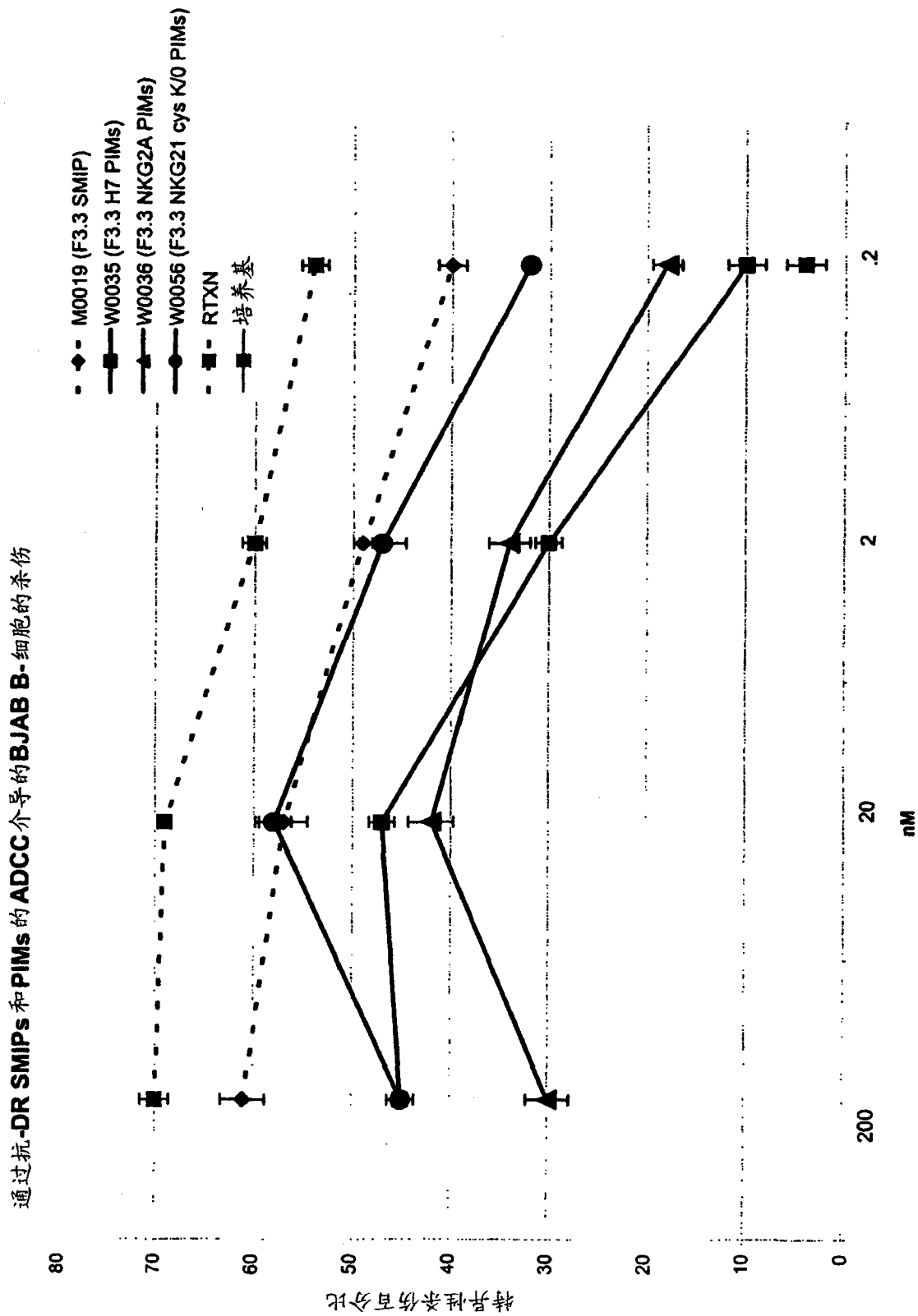


图 14

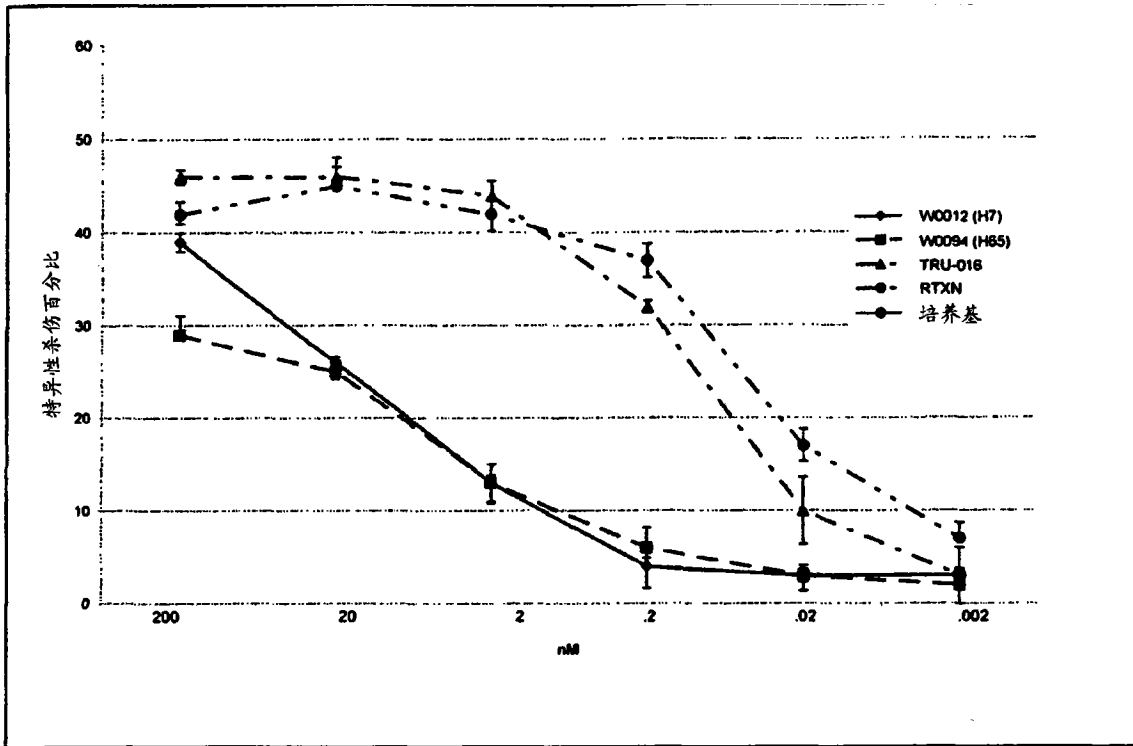


图 15

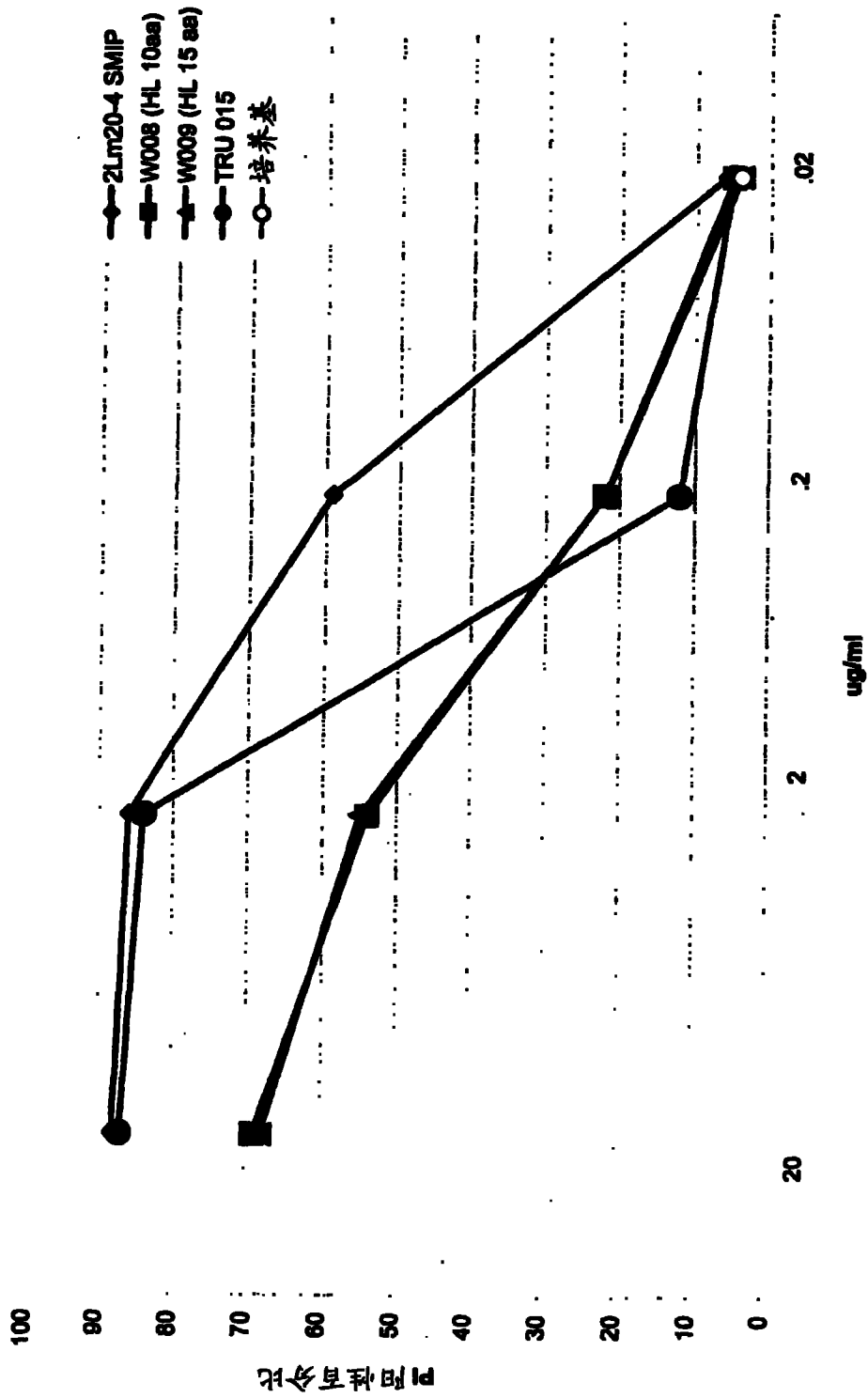


图 16

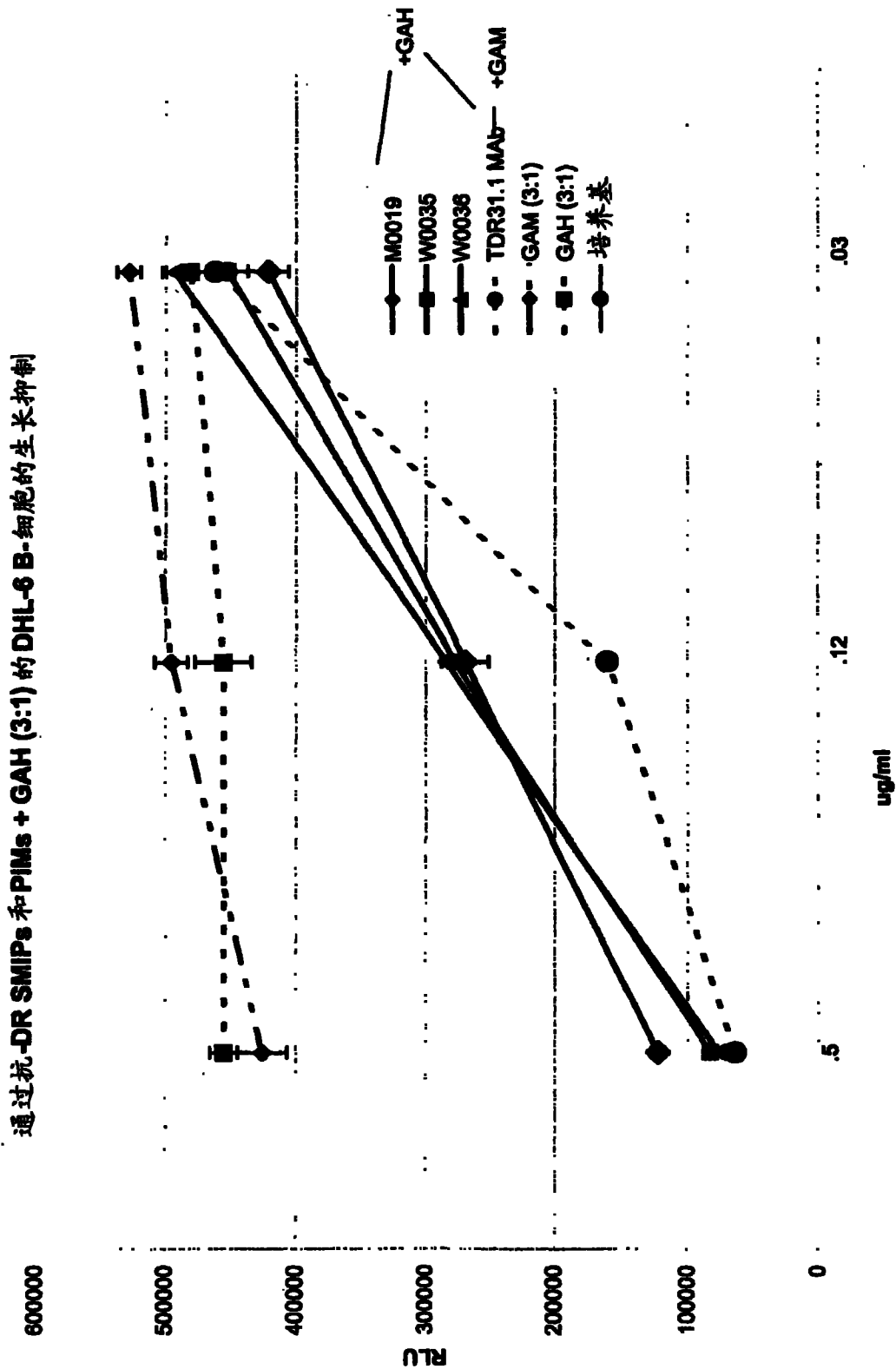


图 17

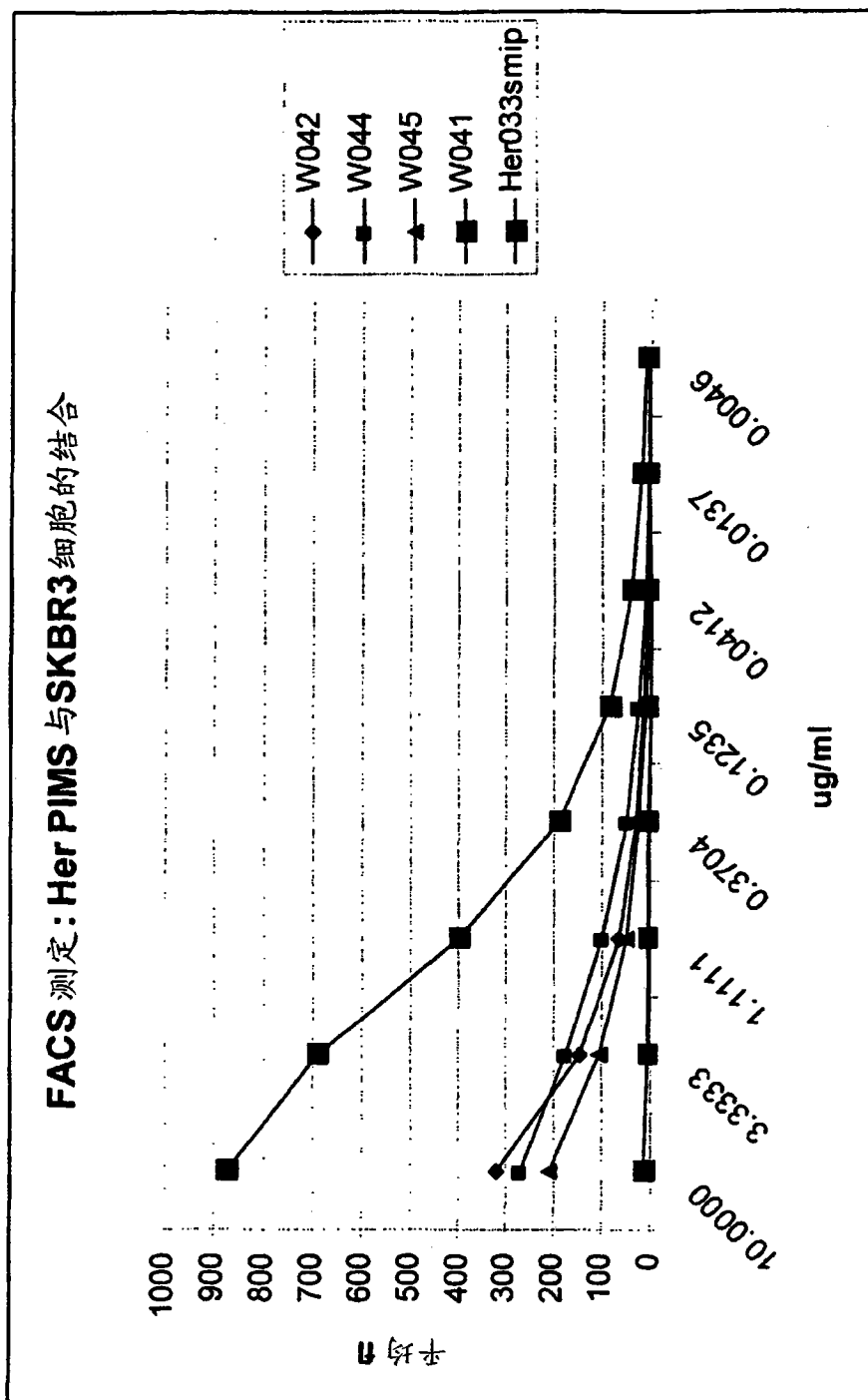


图 18

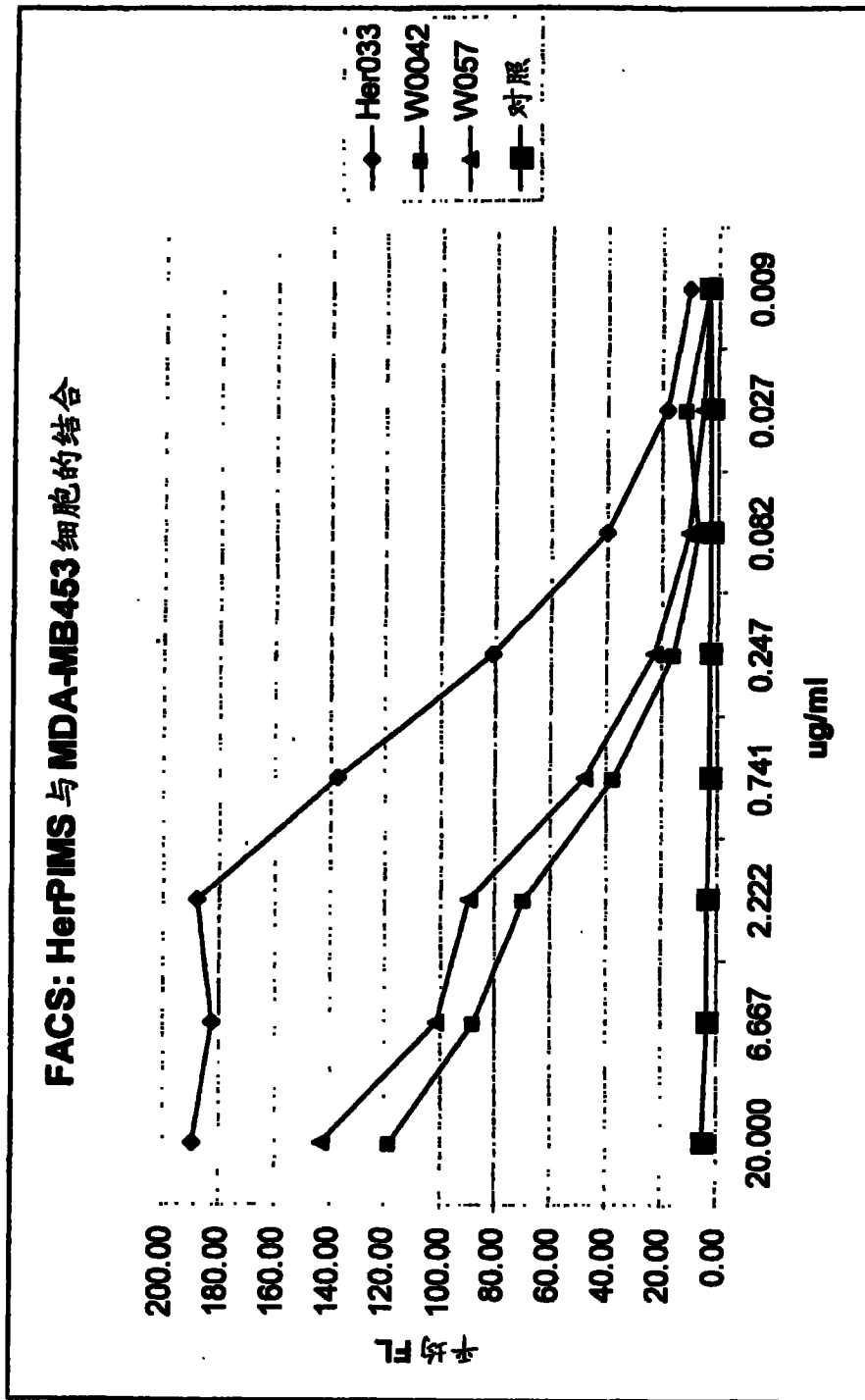


图 19