

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/62

C07K 16/46 C07K 19/00

C07K 16/00 C12N 15/85

C12N 5/10 A61P 35/00

/(C07K16/28,16/30,
16/44)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01815972.9

[43] 公开日 2003 年 12 月 10 日

[11] 公开号 CN 1461344A

[22] 申请日 2001.7.25 [21] 申请号 01815972.9

[30] 优先权

[32] 2000.7.25 [33] US [31] 60/220.782

[86] 国际申请 PCT/US01/41386 2001.7.25

[87] 国际公布 WO02/08293 英 2002.1.31

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.20

[71] 申请人 免疫医疗公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 S·-O·梁

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 孟凡宏

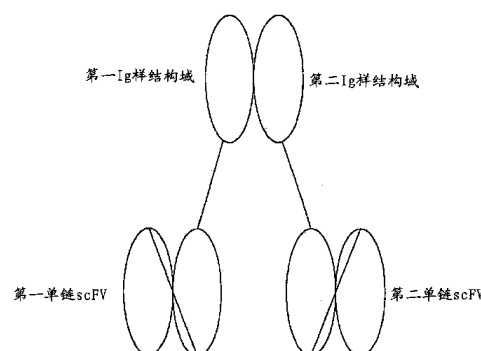
权利要求书 4 页 说明书 32 页 附图 2 页

[54] 发明名称 多价靶结合蛋白

[57] 摘要

本发明描述了一种新的多价靶结合蛋白，其包含第一和第二多肽，并具有至少三个靶结合位点。多价靶结合蛋白中的第一多肽包含第一 scFv 分子和第一免疫球蛋白样结构域，所述免疫球蛋白样结构域优选地包括免疫球蛋白轻链可变区结构域。多价靶结合蛋白中的第二多肽包含第二 scFv 分子和第二免疫球蛋白样结构域，所述免疫球蛋白样结构域优选地包含免疫球蛋白重链可变区结构域。第一 scFv 分子和第一免疫球蛋白样结构域优选地通过第一外来氨基酸序列相连，所述的外来氨基酸序列优选地包含免疫球蛋白轻链恒定区结构域。所述的第二 scFv 分子和第二免疫球蛋白样结构域优选地通过第二外来氨基酸序列相连，所述的外来氨基酸序列优选地包含免疫球蛋白重链恒定区结构域。所述的第一和第二外来氨基酸序列，优选地通过至少一个二硫键共价联合。本发明的多价靶结合蛋白

可用于治疗和检测肿瘤和感染性损伤。



知识产权出版社出版

ISSN 1008-4274

1. 一种靶结合蛋白，其包含
 - a. 含有第一单链 Fv 分子 (scFv) 和第一免疫球蛋白样结构域的第一多肽；
5 和
 - b. 含有第二单链 Fv 分子 (scFv) 和第二免疫球蛋白样结构域的第二多肽，其中，所述的第一和第二 scFv 各自独立地形成两个靶结合位点，或所述的第一 scFv 与所述的第二 scFv 联合形成两个靶结合位点；其中所述的第一免疫球蛋白样结构域与所述的第二免疫球蛋白样结构域联合形成第三
10 个靶结合位点。
2. 如权利要求 1 所述的靶结合蛋白，其中，所述的第一 scFv 和第一免疫球蛋白样结构域通过第一外来氨基酸序列相连，所述的第二 scFv 和第二
15 免疫球蛋白样结构域通过第二外来氨基酸序列相连。
3. 如权利要求 2 所述的靶结合蛋白，其中，所述的第一外来氨基酸序列与所述的第二外来氨基酸序列相联合。
- 20 4. 如权利要求 2 或 3 所述的靶结合蛋白，其中，所述的第一外来氨基酸序列与所述的第二外来氨基酸序列通过至少一个二硫键相联合。
5. 如权利要求 2 到 4 中任意一项中所述的靶结合蛋白，其中，所述的第一免疫球蛋白样结构域包含免疫球蛋白轻链可变区结构域或其衍生物，其
25 中所述的第一外来氨基酸序列包含免疫球蛋白轻链恒定区结构域或其衍生物，其中所述的第二免疫球蛋白样结构域包含免疫球蛋白重链可变区结构域或其衍生物，所述的第二外来氨基酸序列包含免疫球蛋白重链恒定区结构域或其衍生物。
- 30 6. 如权利要求 5 所述的靶结合蛋白，其中所述的第一免疫球蛋白样结构域包含免疫球蛋白轻链可变区结构域，其中，所述的第一外来氨基酸序列包含免疫球蛋白轻链恒定区结构域，其中，所述的第二免疫球蛋白样结构

域包含免疫球蛋白重链可变区结构域，其中，所述的第二外来氨基酸序列包含免疫球蛋白重链恒定区结构域。

7. 如权利要求 5 或 6 所述的靶结合蛋白，其中，所述的第一 scFv 和所述
5 的免疫球蛋白轻链恒定区结构域通过第一肽接头相连，其中的第二 scFv 和所述的免疫球蛋白重链恒定区结构域通过第二肽接头相连。

8. 如权利要求 7 所述的靶结合蛋白，其中，所述的第一肽接头包含氨基酸
10 序列 EPKSADKTHTCPPCPGGGS，所述的第二肽接头包含氨基酸序列 EPKSCDKTHTCPPCPGGGS。

9. 如权利要求 1 到 8 中任意一项中所述的靶结合蛋白，其中，三个靶结合位点中的至少两个具有不同的靶结合特异性。

15 10. 如权利要求 1 到 8 中任意一项中所述的靶结合蛋白，其中，三个靶结合位点中的至少两个具有相同的靶结合特异性。

11. 如权利要求 1 到 10 中任意一项中所述的靶结合蛋白，其中，所述的第一多肽或第二多肽在其 N-或 C-末端与一种外来氨基酸序列相连。
20

12. 如权利要求 11 中所述的靶结合蛋白，其中，所述的外来氨基酸包含选自下组的多肽，即肽标签，信号肽，酶，细胞因子，毒素，药物，细胞毒性蛋白或其他功能性蛋白。

25 13. 如权利要求 1 到 12 中任意一项中所述的靶结合蛋白，其中，所述的第一多肽或第二多肽进一步包含 N 糖基化识别序列。

14. 如权利要求 13 中所述的靶结合蛋白，其中，糖链与 N-糖基化识别序列相连。
30

15. 如权利要求 14 中所述的靶结合蛋白，其中，糖链与选自下组的试剂相连，即毒素，药物，细胞因子，螯合物，酶，放射性化合物，细胞毒性

蛋白或其他功能性试剂。

16. 如权利要求 1 到 15 中任意一项中所述的靶结合蛋白，其中，所述的
靶结合蛋白与选自下组的试剂共轭相连，即毒素，药物，细胞因子，螯合
5 物，酶，放射性化合物，细胞毒性蛋白或其他功能性试剂。

17. 如权利要求 1 到 16 中任意一项中所述的靶结合蛋白，其中，一种靶
结合位点能够与毒素，药物，细胞因子，螯合物，酶，放射性化合物，细
胞毒性蛋白或其他功能性试剂相连，其中另外两个靶结合位点能与肿瘤抗
10 原相结合。

18. 如权利要求 1 到 16 中任意一项中所述的靶结合蛋白，其中，一种靶
结合位点能与肿瘤抗原相结合，另外两种靶结合位点能与毒素，药物，细
胞因子，螯合物，酶，放射性化合物，细胞毒性蛋白或其他功能性试剂相
15 结合。

19. 如权利要求 1 到 16 中任意一项中所述的靶结合蛋白，其中，一种靶
结合位点能与肿瘤抗原相结合，另外两种靶结合位点能与 T 细胞或其他效
应细胞表面蛋白相结合。
20

20. 如权利要求 19 所述的靶结合蛋白，其中，所述的 T 细胞表面蛋白是
CD28 和 CD3。

21. 一种分离的核酸分子，其包含编码权利要求 1 中所述第一多肽的多核
25 苷酸。

22. 一种包含权利要求 21 中所述核酸的载体。

23. 一种包含权利要求 22 中所述载体的宿主细胞。
30

24. 一种分离的核酸分子，其包含编码权利要求 1 中所述第二多肽的多核
苷酸。

25. 一种包含权利要求 24 中所述核酸的载体。。
26. 一种包含权利要求 25 中所述载体的宿主细胞。
- 5 27. 一种包含权利要求 22 中所述载体和权利要求 25 中所述载体的宿主细胞。
- 10 28. 一种生产靶结合蛋白的方法，该方法包括在合适的培养基中培养如权利要求 27 中所述的宿主细胞，从所述的培养基中分离所述的靶结合蛋白。
29. 一种分离的核酸分子，其包含编码如权利要求 1 中所述第一和第二多肽的多核苷酸。
- 15 30. 一种包含权利要求 29 中所述核酸的载体。
31. 一种包含权利要求 30 中所述载体的宿主细胞。
- 20 32. 一种生产靶结合蛋白的方法，该方法包括在合适的培养基中培养如权利要求 31 中所述的宿主细胞，从所述的培养基中分离所述的靶结合蛋白。
- 25 33. 一种引发针对肿瘤的免疫应答的方法，该方法包含向受试者施用有效剂量的如权利要求 19 或 20 中所述的靶结合蛋白。
34. 一种治疗受试者中的肿瘤的药物，其包含如权利要求 1-20 中任意一项中所述的靶结合蛋白。

多价靶结合蛋白

5 发明背景

技术领域

本发明涉及多价靶结合蛋白,和利用该多价靶结合蛋白治疗和检测肿瘤及感染性损伤的方法。

10 相关技术

多价靶结合蛋白可用于治疗或检测肿瘤和其它疾病。例如多价靶结合抗原可与肿瘤抗原和细胞毒性抗原结合,并可用于向肿瘤细胞递送放射性核素,药物,毒素或其它细胞毒性试剂。

15 提高靶结合蛋白的价数是必要的。提高了的价数可提高所述靶结合蛋白对其所结合的靶的亲合力,进而可以提高治疗的特异性和安全性。价数提高了的靶结合蛋白还可用于将不同的细胞毒性物质递送到单一的靶物质,或将某种细胞毒性物质递送到不同的靶物质。多价靶结合蛋白可进一步用于将不同的免疫反应性细胞募集到单一的靶细胞,由此引发针对所述靶细胞的加强免疫反应。

20 已经有人试图生产至少针对三个不同靶结合位点的多价靶结合蛋白。例如,通过将几个 Fab-样片段通过化学接头交联起来以制造多价靶结合蛋白。参见 US Patent No. 5,262,524。也可参见 US Patent No. 5,091,542 和 Landsdorp,等,"Cyclic Tetramolecular Complexes Of Monoclonal Antibodies: A New Type Of Cross-linking Agent,"Euro. J. Immunol., 16: 679-83 (1986)。此外通过将几种单链 Fv 分子(scFv)共价连接起来形成单一的多肽来构建多价靶结合蛋白。参见 US Patent No. 5,892,020。在 US Patent Nos. 25 6,025,165 和 5,837,242. A 中描述了基本上由 scFv 分子聚集而成的多价靶结合蛋白。在 Krott 等,"Single-chain Fv Fragment of Anti-Neuraminidase Antibody NC 10 Containing Five-and Ten-Residue Linkers Form Dimers and 30 Zero-Residue Linker A Trimer" Protein Engineering, 10 (4): 423-433 (1997) 中描述了包含三个 scFv 分子的三价靶结合蛋白。但是上述的方法或是缺乏再现性、或是缺乏产生不同的,预定的靶结合特异性的能力。

本发明提供了一种新形式的,具有不同的预定结合特异性多价靶结合蛋白,及其可再现的制造方法。本发明的多价靶结合蛋白包含两条多肽,其相互联合形成至少三个靶结合位点。本发明还提供制造多价靶结合蛋白的新途径。

5

发明概述

本发明的一个目的是提供一种新的至少包含三个靶结合位点的靶结合蛋白形式。

10 本发明的另一个目的是利用本发明的多价结合蛋白治疗和检测肿瘤或感染性损伤的方法。

为达到这些目的,依照本发明的一个方面,提供了包含三个靶结合位点的靶结合蛋白,其中所述的包括与第一免疫球蛋白样结构域共价连接的第一单链 Fv 分子,和与第二免疫球蛋白样结构域共价连接的第二单链 Fv 分子,其中所述的第一单链 Fv 分子形成第一靶结合位点,所述的第二单链 Fv 分子形成第二靶结合位点,并且所述的第一免疫球蛋白样结构域与第二免疫球蛋白样结构域联合形成第三靶结合位点。另外,第一和第二单链 Fv 分子可联合在一起形成两个结合位点,第一和第二免疫球蛋白样结构域联合起来形成第三结合位点。

20 依照本发明的另一方面,所述的第一 Fv 分子和第一免疫球蛋白样结构域通过第一外加氨基酸序列共价连接,第二单链 Fv 分子和第二免疫球蛋白样结构域通过第二外加氨基酸序列共价连接。所述的第一外加氨基酸序列与所述的第二外加氨基酸序列优选的通过共价相互作用,更优选至少通过一个二硫键联合起来。

25 在本发明的另一方面中,所述的第一免疫球蛋白样结构域包含免疫球蛋白轻链可变区结构域或其衍生物,其通过免疫球蛋白轻链恒定区结构域或其衍生物与所述第一 scFv 分子共价相连,所述的第二免疫球蛋白样结构域包含免疫球蛋白重链可变区结构域或其衍生物,其通过免疫球蛋白重链恒定区结构域或其衍生物与所述第二 scFv 分子共价相连。

30 本发明的又一方面中,所述的第一单链 Fv 分子和免疫球蛋白轻链恒定区结构域通过第一肽接头共价连接,所述的第一肽接头优选地包含氨基酸序列 EPKSADKTHTCPPCPGGGS,所述的第二单链 Fv 分子和免疫球蛋白重链恒定区结构域通过第二肽接头共价连接,所述的第二肽接头优选地

包含氨基酸序列 EPKSCDKTHTCPPCPGGGS。

依照本发明的再一方面，三个靶结合位点中的两个具有不同的靶结合特异性。

在本发明的又一方面中，三个靶结合位点中的两个具有相同的靶结合
5 特异性。

依照本发明的又一方面提供了第一或第二多肽在其 N-或 C-末端与附加的氨基酸残基共价连接。所述的附加氨基酸残基优选包括肽标签，信号肽，酶，细胞因子，毒素，药物，细胞毒性蛋白或其他功能性蛋白。

在本发明的又一方面中，糖链通过工程化连接到所述第一或第二多肽
10 链上的 N-糖基化识别序列与第一或第二多肽共价连接。所述的糖链优选地进一步与药物，放射性化合物，螯合物，酶，毒素，细胞因子，细胞毒性蛋白，或其他功能性试剂相连接。

依照本发明的再一方面，药物，放射性化合物，螯合物，酶，毒素，细胞因子，细胞毒性蛋白，或其他功能性试剂与本发明的多价结合蛋白通过
15 所述多价结合蛋白的氨基酸残基侧链共轭连接。

依照本发明的又一方面，所述多价结合蛋白的一个靶结合位点与毒素，药物，细胞因子，螯合物，酶，放射性化合物，细胞毒性蛋白或其他功能性试剂相结合，其他两个靶结合位点与肿瘤抗原相结合。

依照本发明的又一方面还提供一种多价靶结合蛋白，其中，所述多价
20 蛋白的一个靶结合位点与肿瘤抗原相结合，另外两个靶结合位点与 T 细胞或其他效应细胞表面蛋白相结合。

依照本发明的又一发明还提供一种核酸分子，其包含编码本发明的多价结合蛋白的第一多肽的第一多核苷酸和编码本发明的多价结合蛋白的第二多肽的第二多核苷酸。

25 本发明的再一方面提供两个核酸分子，一个编码本发明的多价结合蛋白的第一多肽，另一个编码本发明的多价结合蛋白的第二多肽。另外，本发明还提供包含上述核酸的载体，以及依次包含所述载体的宿主细胞。

本发明的又一方面还提供了制造本发明的多价结合蛋白的方法。

30 本发明的再一方面提供了引发针对肿瘤的增强免疫应答的方法，该方法包括向患有所述肿瘤的病人施用有效量的本发明的多价靶结合蛋白，其中该蛋白的一个靶结合位点与肿瘤结合，另两个靶结合位点与 T 细胞或其

他效应细胞的表面蛋白相结合。

本发明的再一方面提供了治疗或检测肿瘤的方法，该方法包括向患有所述肿瘤的病人施用有效量的本发明的多价靶结合蛋白，其中该蛋白的一个靶结合位点与一个靶结合位点与毒素，药物，细胞因子，螯合物，酶，
5 放射性化合物，细胞毒性蛋白或其他功能性试剂相结合，其他两个靶结合位点与肿瘤抗原相结合。

本发明的又一方面提供了一种治疗或检测肿瘤的方法，，该方法包括向患有所述肿瘤的病人施用有效量的本发明的多价靶结合蛋白，其中所述蛋白的至少一个靶结合位点，优选三个靶结合位点与肿瘤抗原相结合，同
10 时毒素，药物，细胞因子，螯合物，酶，放射性化合物，细胞毒性蛋白或其他功能性试剂与所述蛋白共轭相连。

本发明的又一方面提供利用本发明的靶结合蛋白治疗肿瘤的方法。

附图说明

15 图 1 是包含两条多肽的多价靶结合蛋白的图解说。第一多肽包含与第一免疫球蛋白样结构域(1st Ig-样结构域)共价相连的第一单链 Fv 分子 (1st scFv)。第二多肽包含与第二免疫球蛋白样结构域(2nd Ig-样结构域)共价相连的第二单链 Fv 分子 (2nd scFv)。

图 2 是包含两条多肽的多价靶结合蛋白的图解说。第一多肽包含
20 与包含恒定区 CL 和可变区 VL 的免疫球蛋白轻链片段共价相连的第一单链 Fv 分子 (1st scFv)。第二多肽包含与包含恒定区 CH1 和可变区 VH 的免疫球蛋白重链片段共价相连的第二单链 Fv 分子 (2nd scFv)。

具体实施方式

25 本发明提供了包含至少三个靶结合位点的多价靶结合蛋白。所述的三个靶结合位点可针对相同或不同的靶物质。本发明的多价结合蛋白包含第一和第二多肽。所述的第一多肽包含与第一免疫球蛋白样结构域共价相连的第一单链 Fv 分子，所述的第一免疫球蛋白样结构域优选地是免疫球蛋白轻链可变区结构域。所述的第二多肽包含与第二免疫球蛋白样结构域共
30 价相连的第二单链 Fv 分子，所述的第二免疫球蛋白样结构域优选地是免疫球蛋白重链可变区结构域。所述的第一和第二单链 Fv 分子形成两个靶结合位点，所述的第一和第二免疫球蛋白样结构域联合形成第三靶结合位

- 点。另外，第一和第二单链 Fv 还可以联合在一起形成两个结合位点，第一和第二免疫球蛋白样结构域联合形成第三靶结合位点。优选地，所述的第一 Fv 分子和第一免疫球蛋白样结构域通过第一外加氨基酸序列共价连接，其中第一外加氨基酸序列优选地包含免疫球蛋白轻链恒定区结构域，
- 5 第二单链 Fv 分子和第二免疫球蛋白样结构域通过第二外加氨基酸序列共价连接，其中，其中第二外加氨基酸序列优选地包含免疫球蛋白重链恒定区结构域。更优选地，所述的第一外加氨基酸序列与所述的第二外加氨基酸序列相互联合，优选地通过共价相互作用，如二硫键联合起来，以便于稳定第一和第二多肽之间的联合。
- 10 此处所用的术语“抗体”可与“免疫球蛋白”互换使用。所用的术语“结构域”或“片段”是指蛋白氨基酸序列的一部分。

抗体结构

- 至少存在五类人抗体，每一类都具有相同的基本结构。所述的抗体基本结构是四聚体，或其多聚体形式，其包括两个相同的异源二聚体，每个
- 15 异源二聚体包含分子量大约为 25 kDa 的轻链和分子量约为 50-77 kDa 的重链。例如，免疫球蛋白 G (IgG)由两个相同的异源二聚体，而免疫球蛋白 M (IgM)具有五个相同的异源二聚体。IgG 分子的两个异源二聚体通过二硫键共价连接。每个异源二聚体的重链和轻链也至少通过一个二硫键共
- 20 价相连。

- 每条重链和轻链都折叠成几个区域。每个区域均由约 110 个氨基酸残基组成，并具有保守的三维构象。所述的轻链包含一个可变区(VL)和一个恒定区(CL)。所述的重链包含一个可变区(VH)和三个恒定区(CH1, CH2 和 CH3)。所述的重链的 CH1 和 CH2 区域通过铰链区相连。所述的 VL 和 VH
- 25 区域相联合形成抗原结合位点。这种联合主要包括共价相互作用。"Fv"表示由 VL 和 VH 联合所形成的结构。在抗体上与所述抗原结合位点相互作用的区域称为表位。所述的表位与所述抗体的抗原结合位点的构象结构象适合，以使所述抗原抗体相结合。所述抗原和抗原结合位点之间的相互作用决定了抗体的特异性。

- 30 抗体的 CL 和 CH1 区域通过非共价相互作用联合起来。所述的 CL 区域还通过二硫键与重链的铰链区相连。例如κ型轻链的 Cys214 (Kabat 的编号)可与重链铰链区的 Cys233 (Kabat 编号)形成二硫键。有关 Kabat 编号，

参见 Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS and Foeller C.

(1991), Sequences of proteins of immunological interest (5th edition, US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Office), 该文献引入此处作为参考。所述的 CL 和 CH1 区域之间的联合, 以及 CL 和铰链区之间的二硫键与抗体三维结构的稳定性有关。

所述的可变区 (VL 和 VH) 在不同免疫球蛋白之间表现出结构上和氨基酸组成上相当的可变性。所述的恒定区 (CL, CH1, CH2 和 CH3) 几乎不表现可变性。本说明书中所用的术语“可变”是指抗体重链和轻链可变区的多变性质。在可变区域内还发现有, 在不同抗体间表现出高度可变的氨基酸序列。所述重链和轻链每个可变区发现有三个这种所谓的“高变”或“互补决定区”(CDR)。每个 CDR 的两侧是相对保守的框架区 (FR)。上述的 FR 被认为是用于保持可变区的完整性, 轻链的 CDRs 和相应重链的 CDRs 形成抗原结合位点。CDRs 的所谓“超变区”可用于解释抗体特异性的多样性。

用木瓜蛋白酶切割天然存在的抗体分子产生保留有抗原结合位点的片段。这些片段, 通常为 Fab 片段, 其包括抗体的轻链 (VL 和 CL) 和重链 (VH, CH1 和部分铰链区) 的片段。上述轻链和重链片段通过至少一个二硫键共价连接。

抗体是免疫球蛋白超家族成员。这一超家族的成员还包括, 但不限于 T 细胞受体, CD2, CD4, CD8, 和某些类型的细胞间黏附分子。参见 Molecular Biology of The Cell (2nd edition, Bruce Alberts 等, Garland Publishing, Inc., 1989), pp 1053-1054。该免疫球蛋白超家族成员中的基础构筑块称作“免疫球蛋白样结构域”。一种“免疫球蛋白样结构域”由约 100 个氨基酸组成, 折叠成由两个反向平行的 β 折叠组成的特征性的夹心样结构, 参见同上。每个天然存在的“免疫球蛋白样结构域”通常由不同的外显子编码, 参见同上。一种典型的免疫球蛋白样结构域包括抗体的可变的和恒定的区域。

单链 Fv 分子

单链 Fv 分子 (scFv) 包含 VL 结构域和 VH 结构域。所述的 VL 和 VH 结构域联合形成靶结合位点。这两个结构域通过肽接头 (L) 进一步共价连接。若 VL 结构域是 scFv 分子 N-末端的一部分则 scFv 分子表示为 VL-L-

VH, 若 VH 结构域是 scFv 分子 N-末端的一部分, 则其表示为 VH-L-VL。制备 scFv 分子的方法和设计适当的肽接头在 US Patent No. 4,704,692, US Patent No.4,946,778, R. Raag and M. Whitlow, "Single Chain Fvs." FASEB Vol 9: 73-80 (1995) 和 R. E. Bird and B. W. Walker, "Single Chain Antibody 5 可变区," TIBTECH, Vol 9: 132-137 (1991) 中有详细的描述。这些文献引入此处作为参考。

具有 VL-L-VH 构象的单链 Fv 分子可与所述的具有 VH-L-VL 构象的 Fv 分子联合以形成二价的二聚体。在这种情况下, 第一 scFv 分子的 VL 结构域和第二 scFv 分子的 VH 结构域相联合形成一个靶结合位点, 同时 10 第一 scFv 分子的 VH 结构域与第二 scFv 分子的 VL 结构域联合形成另一个靶结合位点。

多价靶结合蛋白

在一个实施方案中, 通过第一和第二肽的联合构建多价靶结合蛋白。 15 参见图 1。所述的第一多肽包含与第一免疫球蛋白样结构域共价连接的第一单链 Fv 分子, 所述的免疫球蛋白样结构域优选地是免疫球蛋白轻链可变区结构域。所述的第二多肽包含与第二免疫球蛋白样结构域共价连接的第二单链 Fv 分子, 所述的免疫球蛋白样结构域优选地是免疫球蛋白重链可变区结构域。每一个第一和第二单链 Fv 分子形成一种靶结合位点, 第 20 一和第二免疫球蛋白样结构域联合形成第三靶结合位点。

在优选的实施方案中, 所述的第一免疫球蛋白样结构域包含抗体轻链可变区结构域(VL 结构域)或其衍生物, 第二免疫球蛋白样结构域包含抗体重链可变区结构域(VH 结构域)或其衍生物。所述的 VL 和 VH 结构域 25 域。所述的 VL 结构域或其衍生物与 VH 结构域或其衍生物联合形成功能性的靶结合位点。如果两结构域之间的氨基酸序列同一性高于 50%, 优选高于 70%, 更优选高于 90%, 则上述的一个结构域是由另一结构域衍生而来。所谓“氨基酸序列同一性”具有本领域所公认的意义, 并可通过已公开的技术计算出来。参见 COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, 30 Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA,

PART I, Griffin, A. M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, Von Heinje, G., Academic Press, 1987; and SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991。这些文献引入此
5 处作为参考。由于存在许多的方法测定两氨基酸序列之间的同一性,因此
术语“同一性”是本领域技术人员所公知的。参见 Carillo, H., and Lipton, D.,
SIAM J Applied Math (1988) 48 : 1073,该文献引入此处作为参考。通常用
于确定两氨基酸之间的同一性或相似性的方法包括,但不限于那些在如
Guide to Hugs. Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego,
10 1994, and Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J Applied Math (1988) 48 : 1073
中所描述的方法。确定同一性和相似性的方法已编写成计算机程序。优选
地确定两氨基酸之间的同一性或相似性的计算机程序方法包括,但不限于
GCG 程序包 (Devereux, J.,等, Nucleic Acids Research (1984) 12 (1) : 387),
BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F.等, J. Mol. Biol. (1990) 215: 403),
15 和 FASTDB (Brutlag 等, Comp. App. Biosci. (1990) 6: 237-245)。

更优选的确定待查询序列 (query sequence) (例如, 本发明的序列)
和被比较序列 (subject sequence) 之间的最佳总体匹配, 也称作全序列对
比的方法, 可以是基于 Brutlag 等 (Comp. App. Biosci. (1990) 6: 237-245)
算法的 FASTDB 程序。在序列对比中待查询序列 (query sequence) 和被
20 比较序列 (subject sequence) 可均为氨基酸序列, 也可以均为核苷酸序列。
所述的全序列对比结果以百分同一性的形式表示。在 FASTDB 氨基酸对
比中优选使用的参数是: Matrix=PAM 0, k- tuple=2, Mismatch Penalty =1,
Joining Penalty=20, Randomization Group Length = zero, Cutoff Score= 1,
Window Size=sequence length, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty=0.
25 05, Window Size=500 或被比较氨基酸序列的长度, 其中较短的一个。如果
由于 N-或 C-末端缺失, 而不是由于内部的缺失造成被比较序列 (subject
sequence) 比被比较序列 (subject sequence) 短, 则需要进行人工校正以
获得所述结果。这是由于 FASTDB 程序在计算全序列百分同一性时不解
释被比较序列 (subject sequence) N-和 C-末端截短。相对于待查询序列
30 (query sequence), 在 N-和 C-末端截短的被比较序列 (subject sequence)
所述百分同一性的校正是通过下述方式进行的, 计算被比较序列 (subject
sequence) N-和 C-末端的残基, 即不与相应的被比较残基相匹配/对比的

残基的数量，作为占待查询序列（query sequence）总碱基数的百分数。一个残基是否匹配/对比是通过 FASTDB 序列对比结果确定的。然后利用特定的参数通过上述 FASTDB 程序的计算将这一百分比从上述百分同一性中扣除，从而获得最终的百分同一性值。这一最终百分同一性值就是用于本发明目的中的。对于人工调整百分同一性值，仅需要考虑被比较序列（subject sequence）N-和 C-末端的残基不与被比较序列（subject sequence）匹配/对比。这就是说，仅需考虑超出被比较序列（subject sequence）最远端的 N-和 C 末端残基位置的待查询残基位置。例如，90 个氨基酸残基的被比较序列（subject sequence）与 100 个残基的待查询序列（query sequence）相比确定百分同一性。缺失出现在被比较序列（subject sequence）的 N-末端，因此 FASTDB 对比不表示出在其 N-末端前 10 个残基的匹配/对比性。所述的 10 个非配对残基代表所述序列的 10%（在 N-和 C-末端不匹配的残基数/待查询序列的残基总数）。因此从由 FASTDB 程序计算出的百分同一性值中扣除 10%。如果剩余的 90 个残基完全匹配，则最终的百分同一性值为 90%。另一个例子是，90 个氨基酸残基的被比较序列（subject sequence）与 100 个残基的待查询序列（query sequence）相比。这一次是内部缺失，所以在被比较序列（subject sequence）的 N-或 C 末端没有与待查询序列（query sequence）不匹配/对比的残基。在这种情况下由 FASTDB 计算出的百分同一性不经人工校正。再一次说明，只有在 FASTDB 对比中显示出不与待查询序列（query sequence）相匹配/对比的，在被比较序列（subject sequence）的 N-或 C 末端外的残基序列才进行人工校正。

VL 结构域或其衍生物是否能与 VH 结构域或其衍生物联合形成功能性的靶结合位点可以利用 M13 噬菌体显示进行检测。例如，编码 VL 结构域或其衍生物的 cDNA 可与编码 VH 结构域或其衍生物的 DNA 相连接形成 scFv 序列。由此形成的所述的 scFv 可亚克隆到 M13 噬菌体显示载体中。所表达的 scFv 分子对所需靶物质的亲和性可通过常规的噬菌体显示技术确定。有关噬菌体显示技术参见 Phage display of peptides and proteins :A laboratory Manual (1996) (Eds. Kay, B.,等, Academic Press, San Diego); Dunn IS, Curr. Opin. Biotechnol., 7: 547-553 (1996); Smith GD and Scott JK, Methods Enzymol. 217: 228-257 (1993); O'Neil KT and Hoess RH, Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 443-449 (1995)。这些文献和本说明书中所引述

的任何其他文献均可引入此处作为参考。所述的 VL 结构域或其衍生物或 VH 结构域或其衍生物是否能形成功能性的靶结合位点，可通过本领域所公知的标准试验评估，例如竞争试验，酶联免疫吸附测定(ELISA)，放射性免疫试验(RIA)。类似的，由两免疫球蛋白样结构域联合形成的靶结合位点的活性也可以用上述方法进行确定。如此处所用到的，如果所述的结合位点与有用的靶物质以至少 10^3 M^{-1} ，优选 10^4 M^{-1} ，更优选 10^5 M^{-1} ，最优选 10^6 M^{-1} 的亲和力相结合，则所述的结合位点是功能性的。

在另一个优选的实施方案中，第一单链 Fv 分子和第一免疫球蛋白样结构域通过第一外部氨基酸序列共价相连，第二单链 Fv 分子和第二免疫球蛋白样结构域通过第二外部氨基酸序列共价相连。优选的，第一和第二外部氨基酸序列相互连接，以稳定多价靶结合蛋白中第一和第二多肽之间的联合。例如，第一和第二氨基酸序列之间可以富含亮氨酸，以形成亮氨酸拉练结构的方式。更优选地，所述的第一和第二外来氨基酸序列之间共价相连。例如，所述第一和第二外来氨基酸序列可富含半胱氨酸残基，由此，在它们之间形成二硫键。

在一个优选的实施方案中，所述的第一外来氨基酸序列包含轻链恒定区结构域(CL 结构域)或其衍生物，所述的第二外来氨基酸序列包含重链恒定区结构域(CH 结构域)或其衍生物。优选地，所述 CL 结构域或其衍生物和 CH 结构域或其衍生物彼此联合，以稳定多价靶结合蛋白中的第一和第二多肽之间的联合。所述的 CL 结构域或其衍生物可与 CH 结构域或其衍生物可通过非共价相互作用的方式，如疏水相互作用相联合。

在优选的实施方案中，第一外来氨基酸序列包含 κ 型轻链 CL 结构域，其具有相应于依照 Kabat 编号中的 Cys214 的半胱氨酸残基，第二外来氨基酸序列包含重链较链区或其衍生物，其具有相应于依照 Kabat 编号中的 Cys233 的半胱氨酸残基。所述的第一和第二外来氨基酸序列可以通过上述两个半胱氨酸之间形成的二硫键共价连接。

在又一优选的实施方案中，多价靶结合蛋白中的第一多肽包含与包含可变区 VL 和恒定区 CL 的免疫球蛋白轻链片段共价相连的第一 scFv 分子，多价靶结合蛋白中的第二多肽包含与包含可变区 VH 和恒定区 CH1 的免疫球蛋白重链片段共价相连的第二 scFv 分子共价相连，参见图 2。所述的 VL 区域和 VH 区域相连接以形成靶结合位点。所述的 CL 区域和 CH1 区域彼此联合以稳定多价靶结合蛋白。优选地，第一 scFv 分

子 和 CL 区域通过第一肽接头共价相连,所述的第一肽接头优选地由约 4 到 15 个氨基酸残基组成。所述的第二 scFv 分子和 CH1 区域也优选地通过第二肽接头共价相连,所述的第二肽接头优选地由约 4 到 15 个氨基酸残基组成。优选地,所述的第一肽接头可包含氨基酸序列 GGGS 或
5 EPKSADKTHTCPPCPGGGS,第二肽接头具有氨基酸序列 EPKSCGGGS 或 EPKSCDKTHTCPPCPGGGS。更优选地,第二肽接头中的半胱氨酸残基可与 CL 区域以抗体轻链和重链之间形成的二硫键相似的方式形成二硫键。本实施方式中的多价靶结合蛋白的分子量可约为 100 kDa。

在一个实施方案中,所述的第一和第二免疫球蛋白样结构域可以包含
10 人源化的可变区结构域。例如,可将鼠抗体的互补决定区移植到人抗体的框架结构区域。参见 Sahagen 等, J. Immunol., 137: 1066-1074 (1986); Sun 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 214-218 (1987); Nishimura 等, Cancer Res., 47: 999-1005 (1987); Lie 等, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987); and US Patent No. 5,874,540。这些文献在此引入作为参考。另外,
15 也可以使用人抗体可变区。分离人抗体的方法是本领域所公知的,例如通过经遗传修饰产生人抗体的转基因动物,或通过人抗体噬菌体显示文库。参见 US Patent Nos 6,075,181 and 5,969,108,该文献在此引入作为参考。人可变区结构域是否能与另一可变区结构域相联合以形成功能性的靶结合位点,可以利用 M13 噬菌体显示或其他标准的试验,如例如竞争试
20 验,酶联免疫吸附测定(ELISA),放射性免疫试验(RIA)进行测定。第一和第二 scFv 分子的可变区结构域也可进行类似的人源化。人抗体恒定区结构域也可用于将多价靶结合蛋白的第一和第二 scFv 分子分别与第一和第二免疫球蛋白样结构域共价相连。

在一个实施方案中,多价结合蛋白的三个靶结合位点中至少两个具有
25 不同的靶结合特异性。例如,所述的第一和第二 scFv 分子可具有不同的氨基酸序列,从而具有不同的结合特异性。三个靶结合位点中的每一个均可具有与其他结合位点不同的结合特异性。如此处所述,两结合位点具有不同的靶结合特异性,条件是它们不具有相同的靶结合特异性。两结合位点具有“相同的”靶结合特异性,条件是它们可以相同的亲和力与相同的
30 靶物质结合。两靶结合位点具有相同的结合亲和力,条件是它们对给定的抗原或靶物质的亲和常数在约 0.2 到约 5 之间。若两结合位点对相同的靶物质具有相同的结合特异性则它们是同一的。

在另一个实施方案中,多价结合蛋白中的三个靶结合位点中的至少两个具有相同的靶结合特异性。例如,所述的第一和第二 scFv 分子可具有相同的氨基酸序列从而具有相同的结合特异性。所述的三个靶结合位点可以具有相同的结合特异性。这可以通过当第一免疫球蛋白样结构域,第一
5 scFv 分子的 VL 结构域和第二 scFv 分子的 VL 结构域具有相同的氨基酸序列,所述的第二免疫球蛋白样结构域,第一 scFv 分子的 VH 结构域和第二 scFv 分子的 VH 结构域具有相同的氨基酸序列时才能实现。具有至少两个相同结合位点的靶结合蛋白对其靶物质可表现出增强的亲和力。

在又一实施方案中,所述的多价结合蛋白包含至少两个异源二聚体,
10 每个异源二聚体包含第一和第二多肽。第一多肽包含第一单链 Fv 分子和通过第一外来氨基酸序列共价相连的第一免疫球蛋白样结构域。所述的第二多肽包含第二单链 Fv 分子和通过第二外来氨基酸序列共价相连的第二免疫球蛋白样结构域。第一异源二聚体的第一和第二外来氨基酸序列可与第二异源二聚体的第一和第二外来氨基酸序列共价相连,优选地通过共价
15 相互作用,例如二硫键。

此处所用到的,一种分子与另一中分子相联合,条件是所述的两分子具有结合在一起的倾向。两分子间的联合可包括共价相互作用或非共价相互作用,或者共价相互作用及非共价相互作用。若两分子彼此联合,则它们之间相互连接或共轭配合。此处所用的术语“连接”和“共轭配合”可
20 相互替换。

多价靶结合蛋白的肽接头

用于多价靶结合蛋白 scFv 分子的肽接头优选地主要由 Gly 和 Ser 残基组成。优选的肽接头是[GGGGS]₃。也可以包括 Glu 和 Lys 残基。用
25 于 scFv 分子的合适的肽接头可依照 US Patent No.4,946,778 中描述的方法进行设计,该文献在此引入作为参考。

用于多价靶结合蛋白 scFv 分子的肽接头优选地包含至少 12 个氨基酸残基。更优选地,所述肽接头具有至少 15 个氨基酸残基。最优选地,所述肽接头具有约 15 到约 30 个氨基酸残基。少于 12 个氨基酸的肽接头可能
30 会降低 scFv 分子 VL 和 VH 结构域之间的灵活性。

本发明的多价结合蛋白的第一和第二 scFv 分子可以是 VL-L-VH 构象,也可以是 VH-L-VL 构象。同一多价结合蛋白中的两个 scFv 分子可

以是相同或相反的构象。

在一个实施方案中，本发明的多价结合蛋白的两个 scFv 分子的肽接头包含至少 12 个氨基酸残基，且两 scFv 分子具有相反的构象。例如，第一 scFv 分子具有 VL-L-VH 构象，而第二 scFv 分子具有 VH-L-VL 构象。

- 5 所述的两个 scFv 分子相联合形成两个靶结合位点。在上述的实施例中，一个靶结合位点通过第一 scFv 分子的 VL 结构域和第二 scFv 分子的 VH 结构域之间相结合形成，另一靶结合位点通过第一 scFv 分子的 VH 结构域和第二 scFv 分子的 VL 结构域之间联合形成。如此形成的两结合位点的结合亲和特异性可通过本领域已知的标准试验，例如竞争试验，酶联免疫吸附测定(ELISA)，放射性免疫试验(RIA)进行评估。

- 在另一实施方案中，多价靶结合蛋白中的第一多肽包含通过第一多肽接头与免疫球蛋白轻链片段共价相连的第一 scFv 分子，所述多价靶结合蛋白中的第二多肽 包含通过第二多肽接头与免疫球蛋白重链共价相连的第二 scFv 分子。所述的第一和第二肽接头可以提高 scFv 分子相对于所述
- 15 多价结合蛋白其他部分的灵活性。这种灵活性在由于，例如靶物质大而导致的一个靶结合事件阻碍另一个靶结合事件时显得突出。在优选的实施方案中，由于免疫球蛋白轻链片段包含 VL 和 CL 区域，所述的免疫球蛋白重链片段包含 VH 和 CH1 区域。所述的第一和第二 肽接头优选地包含至少 4 个氨基酸残基，更优选地包含至少 10 个氨基酸残基，最优选地 包含
- 20 至少 15 个氨基酸残基。优选地，所述第二肽接头包含半胱氨酸残基，其能与免疫球蛋白轻链片段 CL 区域的 Cys 214 (Kabat's numbering) 形成二硫键。例如，所述的第二肽接头具有 EPKSCGGGS 序列，所述的第一肽接头具有 GGGS 氨基酸序列。在另一个实施例中，所述的第二肽接头可具有氨基酸序列 EPKSCDKTHTCPPCPGGGS，第一肽接头可具有氨基酸序
- 25 列 EPKSADKTHTCPPCPGGGS。

多价靶结合蛋白与某种试剂的共轭连接

- 附加的氨基酸残基可以添加到第一或第二多肽的 N-或 C-末端。所述的附加氨基酸残基可以包含肽标签，信号肽，细胞因子，酶 (例如，原药
- 30 激活酶)，肽毒素，如假单胞菌外毒素，肽药物，细胞毒素蛋白或其他功能性蛋白。此处所用的功能性蛋白是指具有生物活性的蛋白。优选的功能性蛋白是细胞毒性蛋白。在蛋白的 N-或 C-末端附加额外氨基酸残基是本领

域已知的。例如，其可通过将编码所述附加氨基酸的 DNA 序列框内连接到编码第一或第二多肽的 DNA 序列中。连接位点可在编码第一或第二多肽的 DNA 序列的 5'或 3'端。附加的氨基酸序列优选地并不显著地影响所述多价结合蛋白的结合和亲和特异性。如果经修饰的蛋白以小于 10^3 M^{-1} 的亲合力与命中的靶物质结合，则靶结合蛋白的结合特异性受到显著地影响。如果经修饰的蛋白比未经修饰的蛋白的结合亲和性第 10 倍以上，则靶结合蛋白的结合亲和性受到显著地影响。

在一个实施方案中，药物，毒素，放射性化合物，酶，细胞毒性蛋白，螯合物，细胞因子，或其他功能性试剂与所述多价靶结合蛋白共轭连接，优选地共价连接到多价靶结合蛋白的氨基酸侧链，例如，胺，羧基，苯基，硫醇或羟基基团。多种常规的接头均可用于这一目的，例如，二异氰酸盐，二异硫氰酸盐，bis (羟基琥珀酰亚胺)酯，碳化二亚胺，马来酰亚胺-羟基琥珀酰亚胺酯，戊二醛等等。用于多价蛋白的共轭试剂优选地不显著影响所述蛋白对其靶物质的结合和亲和特异性。此处所用到的功能性试剂是具有生物活性的试剂。优选的功能性试剂是细胞毒性试剂。

在另一实施方案中，细胞毒性试剂可与多聚体载体共轭相连，且所述的多聚体载体接下来可与多价靶结合蛋白共轭相连。有关这一方法参见 Ryser 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 3867-3870, 1978, US Patent No. 4,699,784 和 US Patent No. 4,046,722，这些文献引入此处作为参考。共轭连接优选地不显著地影响多价结合蛋白的结合和亲和特异性。

已知许多药物和毒素对肿瘤细胞或微生物具有细胞毒性作用。这些药物和毒素可在药物和毒素简述，如 Merck 索引等中查到。

在一个实施方案中，至少一个将一个 N-糖基化序列引入到多价靶结合蛋白的第一或第二多肽中。参见 Hansen 等, U. S. Patent No. 5,443,953, 和 Leung 等, U. S. Provisional Patent Application 60/013,709, 其中，N-糖基化序列引入到抗体的 VL (HCN1 位点)或 CH1 (HCN5 位点)区域。这些文献在此引入作为参考。优选地，将所述糖基化序列插入到远离靶结合位点的位点，以便所述序列的糖基化不显著地影响所述多价靶结合蛋白的结合特异性和亲和性。而且，优选地将所述糖基化序列插入到距靶结合位点至少 4.1! 处。最优选地，将所述的 N-糖基化位点引入到第一和第二免疫球蛋白样结构域和第一和第二 scFv 分子外。在一个优选的实施方案中，使 N-糖基化位点引入到第一和第二外来氨基酸序列中，如分别将第一与第二免

疫球蛋白样结构域与第一或第二 scFv 分子共价相连的免疫球蛋白恒定区结构域。应用计算机模型可以辅助将 N-糖基化位点引入到合适的位点。

利用定点突变可将 N-糖基化识别序列引入第一或第二多肽。在任何可能的情况下,所述的突变在自然条件下是保守的,以便于保持所述蛋白的最终的四级结构。保守的突变一般包括用相似大小,临床性质相似的氨基酸之间的取代。例如,优选的 N-糖基化识别序列是 NXT 或 NXS,其中的 N 代表精氨酸, T 代表苏氨酸, S 代表丝氨酸, X 代表任意氨基酸。用精氨酸(N)残基替代谷氨酰胺(Q)被认为是保守取代。可以通过小心地选择在 5 其中仅有一个氨基酸发生取代并足以提供潜在的糖基化位点的序列而使对最终四级结构的干扰最小化。

所述 N-糖基化序列的插入,仅作为一个例子。其所包含的原理也适用于 O-糖基化。已知 O-糖基化可出现在苏氨酸或丝氨酸处。O-联结糖基化受体的序列没有很好的定义,参见 Wilson 等, *Biochem. J.*, 275: 526 (1991)。在这些区域偏向于富含脯氨酸,丝氨酸和苏氨酸,但仅通过可及性,而非确切的一级结构确定是否某个特定的丝氨酸或苏氨酸残基可成为 15 O-糖基化位点。但潜在的 O-糖基化序列,如在其他已知具有 O-糖基化位点的抗体中鉴定出的那些,可作为标准序列移植到有用靶结合蛋白的不同位点。参见 Chandrashekaran 等, *J. Biol. Chem.*, 259: 1549 (1981), Smyth and Utsumi, *Nature*, 216: 322 (1967), Kim 等, *J. Biol. Chem.*, 269: 12345 (1994)。糖基化识别序列的插入,被引入序列的糖基化,或任何其他的修饰 20 优选地不显著影响所述多价靶结合蛋白的结合特异性和亲和特异性。

在另一实施方案中,糖链可与工程化的糖基化序列共价相连。可将包含所述糖基化识别序列的多价结合蛋白在真核细胞中表达已实现共价附着。优选地,将单一的肽序列引入多价结合蛋白的第一或第二多肽的 N- 25 末端。在真核细胞中表达时,带有信号肽序列的第一或第二多肽可从胞液质易位到内质网(ER),在那里所述的多肽可被工程化的糖基化识别序列糖基化。

在另一个实施方案中,可将酶,毒素,细胞因子,药物,螯合物,细胞毒性蛋白,放射性化合物或其他毒性试剂通过工程化的糖基化识别序列 30 整合到多价结合蛋白中。为将某种试剂与糖链共轭相连,所述糖链中的半羧醛环可通过化学氧化以产生反应性的醛基。这样形成的醛基可与蛋白或试剂中的氨基通过西弗氏碱共价键合。有关将蛋白或试剂附着于糖链的一

般方法, 参见 Hansen 等, U. S. Patent No. 5,443,953, 和 Leung 等, U. S. Provisional Patent Application 60/013,709, 上述的全部内容引入此处作为参考。

5 多价靶结合蛋白表达载体的构建

可通过下述方法获得所述多价靶结合蛋白第一或第二多肽的表达载体可利用本领域技术人员已知的连接技术将编码免疫球蛋白样结构域的 DNA 分子, scFv 分子或外来氨基酸序列通过框内连接获得。参见 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Ed. (1989)。将所述 scFv 分子共价连接到多价结合蛋白其他部分的肽接头可通过 PCR 技术引入, 例如利用整合了编码所述肽接头的 DNA 序列的引物。

编码抗体可变区和恒定区结构域的 DNA 序列可从已公开的来源中获得也可以通过本领域技术人员已知的方法获得。例如, Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th ed (1991), 发表在 U. S. Department of Health and Human Services, 公开了在其出版日前本领域中已有描述的大部分抗体的可变区序列。

合成抗体可变区或恒定区的常用技术在下述文献中有描述, 例如 Orlandi 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86: 3833 (1989) 和 Larrick 等, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2: 106 (1991)。还可以参见 Ward 等, 发表在 MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, 137-185 页 (Wiley-Liss, Inc. 1995) 中的 "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," 和 Courtenay-Luck, "Genetic Mahr.'pulationox of Monoclohal Actibodies," 在 MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter 等 (编), 166-179 页 (Cambridge University Press 1995)。

抗体可变区和恒定区的 DNA 序列还可通过编码所述抗体的 mRNA 反转录获得。抗体 mRNA 的可来自多种杂交瘤。参见例如 ATCC 细胞系和杂交瘤目录, American Type Culture Collection, 20309 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1990)。那里列出了杂交瘤分泌的, 能与多种抗原反应的单克隆抗体, 并可以从他们那里获得上述的单克隆抗体。这些细胞系或其它类似的来源可作为编码抗体可变区和恒定区的 mRNA 的来源。

抗体的可变区和恒定区也可通过免疫合适的脊椎动物，一般是家畜，最常用的是小鼠。免疫原可以是有用的抗原，或有用的半抗原时，将半抗原的抗原性偶联物连接到抗原上，如匙孔血蓝蛋白(KLH)。所述的免疫可常规地通过一次或多次将所述的免疫原重复注射到宿主哺乳动物中而进行，通常间隔两到三周。通常在最后一次攻击的三天后，去除脾细胞，分离单细胞以用于细胞融合制备杂交瘤，再通过本领域已知的标准技术制备 mRNA。通过 mRNA 反转录获得 DNA 序列。上述的过程可以产生对任意选择的免疫性抗原，例如，细胞表面蛋白，T 细胞标记，如 CD 28 和 CD3，Fc 受体，药物，毒素，细胞因子，酶，细胞毒性蛋白，螯合物，肿瘤抗原，放射性化学物质具有特异性的抗体。所述的编码抗体可变区和恒定区的 DNA 可用于构建本发明的多价靶结合蛋白。

抗体的可变区和恒定区也可以利用 M13 噬菌体显示获得。参见 Burton et al, Adv. Immuno. 57: 191-280 (1994)。本质上，由大量抗体产生细胞，如 B-淋巴细胞获得的 mRNA 制备抗体 cDNA 文库。将扩增的 cDNA 克隆到 M13 噬菌体显示载体中制备在噬菌体表面表达所述抗体片段的噬菌体文库。利用与所述抗体的亲和筛选显示所述有用抗体片段的噬菌体。扩增所筛选出的噬菌体以产生有用的抗体。

用于 scFv 分子的 DNA 序列的构建已在例如 European Patent Application No. 239400 和 U. S. Patent No. 4,946,778 中有描述。这些文献在此引入作为参考。ScFv 序列的构建也在 R. E. Bird 和 B. W. Walker, "Single Chain Antibody variable Regions," TIBTECH, Vol 9: 132137 (1991) 中有描述，该文引入此处作为参考。另外，编码 scFv 分子 VL 和 VH 区域的 DNA 可从上述制备的抗体中获得。

信号肽，优选具有抗体基因来源的，可通过常规的 DNA 克隆技术，例如，利用含有信号肽的 5'端引物进行 PCR，添加到靶结合蛋白的 N-末端。另外，信号肽也可以通过抗体 mRNA 的反转录整合。编码天然存在的抗体的 mRNA 通常包含信号肽序列。MRNA 的反转录技术将产生编码抗体可变区和信号肽的 DNA 序列。由此获得的 DNA 序列可用于构建多价靶结合蛋白的第一和第二免疫球蛋白样结构域。

DNA 序列可通过 Sanger 等, Proc.Natl. Acad. Sci., USA, 74: 5463 (1977) 中所述的方法进行测定，上述文献引入此处作为参考。

多价靶结合蛋白的表达

将 DNA 载体引入到宿主细胞的方法是本领域已知的。这些方法包括,但不限于,电穿孔,磷酸钙,阳离子脂类,基因枪和 Biolistic (Bio-Rad)的方法。

5 为表达多价靶结合蛋白的第一和第二多肽,所述的编码两个多肽的 DNA 序列需要可操作地连接到调节在宿主细胞中转录和翻译的调节序列上。控制转录的调节序列包括启动子和增强子。所述的宿主细胞可以是原核细胞也可以是真核细胞。表达载体也可以包括标记基因以便筛选带有所述表达载体的宿主细胞。

10 适用于在原核宿主细胞中表达的启动子可以是阻遏型的,组成型的,或诱导型的。这些启动子是本领域已知的。这些启动子包括,但不限于能识别 T4, T3, Sp6 和 T7 聚合酶的启动子噬菌体 λ PR 和 PL 启动子, *E. coli* trp, recA, 热激, 和 lacZ 启动子, 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) α -淀粉酶启动子和 σ 28-特异性启动子, 芽孢杆菌噬菌体的启动子, 链霉菌启动子, 噬菌体 λ int
15 启动子, pBR322 的 β -内酰胺酶 bla 启动子, 和氯霉素乙酰转移酶基因 CAT 启动子。原核生物启动子参见 Glick, J. Ind. Microbiol., 1: 277 (1987)的综述和 Watson 等, MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, 4th Ed., Benjamin Cumins (1987)。

优选的原核宿主是大肠杆菌。优选的大肠杆菌菌株包括 Y1089,
20 CSH18, ER1451, 和 ER1647。参见, 例如 Brown (Ed.), MOLECULAR BIOLOGY LABPAX, Academic Press (1991)。另外优选的宿主是枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*), 其中的菌株例如, BR151, YB886, MI119, MI120, 和 B170。参见, 例如 Hardy, "Bacillus Cloning Methods," in DNA CLONING: A PRACTICAL APPROACH, Glover (Ed.), IRL Press (1985)。

25 在原核宿主中表达抗体的方法上本领域技术人员已知的。参见例如 Ward 等, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, pages 137-185 (WileyLiss, Inc. 1995)。而且, 在原核生物中克隆抗体的表达系统是可商购的。例如 IMMUNO ZAP Cloning and Expression System
30 (Stratagene Cloning Systems; La Jolla, CA)提供在大肠杆菌中表达抗体重链和轻链的表达载体。本领域的技术人员应当知道在无需过多不必要的劳动的前提下即可应用在原核细胞中表达可克隆抗体重链和轻链的技术表达

和克隆本发明的多价结合蛋白。

另外,本发明的多价结合蛋白的第一和第二多肽也可以在真核细胞中宿主表达。真核宿主细胞包括哺乳动物,昆虫和酵母细胞。优选地,所述真核宿主细胞是哺乳动物细胞。

- 5 哺乳动物细胞可以对所表达的多肽提供合适的翻译后修饰。合适的哺乳动物细胞包括 COS-7 细胞 (ATCC CRL 1651),非分泌的骨髓瘤细胞 (SP2/0-AG14; ATCC CRL 1581), 鼠脑垂体细胞 (GHI ; ATCC CCL 82), 和鼠肝细胞瘤细胞 (H-4-II-E ; ATCC CRL 1548)。

- 10 对于哺乳动物细胞,所述的转录和翻译调节信号可来源于病毒,如腺病毒,牛乳头瘤病毒,类人猿病毒。另外,可以利用来自哺乳动物表达产物,如肌动蛋白,胶原,肌球蛋白的启动子。优选地是利用金属硫蛋白启动子。另外也可以用原核启动子,如噬菌体 T3 RNA 聚合酶启动子,其中,所述的原核启动子受真核启动子的调节,参见 Zhou 等, Mol. Cell. Biol., 10: 4529 (1990), 和 Kaufman 等, Nucl. Acids Res., 19: 4485 (1991)。可选择
15 转录起始调节信号以便于调节所述基因的表达,例如使其易于抑制或激活。

- 一般真核调节区包括足以指导 RNA 合成起始的启动子区域。这种真核启动子包括小鼠金属硫蛋白 I 基因启动子 (Hamer 等, J. Mol. Appl. Gen. 1 : 273 (1982)); 疱疹病毒 TK 启动子(McKnight, Cell 31 : 355 (1982)); SV40
20 早期启动子 (Benoist 等, Nature (London) 290: 304 (1981)); 鲁斯氏肉瘤病毒启动子;巨细胞病毒启动子 (Foehcking 等, Gene 45 : 101 (1980)); 酵母 gal4 基因启动子(Johnston,等, Proc.Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 6971 (1982); Silver,等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81 : 5951 (1984)); IgG 启动子 (Orlandi 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 3833 (1989))。

- 25 对本发明的调节序列而言,强调节序列是优选的。这种优选的强调节序列的例子包括 SV40 启动子增强子 (Gorman,"High Efficiency Gene Transfer into Mammalian cells,"in DNA CLONING: A PRACTICAL APPROACH, Volume II, Glover (Ed.), IRL Press pp. 143-190 (1985)), hCMV-MIE 启动子-增强子(Bebbington 等, Bio/Technology 10 : 169 (1992)),
30 和抗体重链启动子 (Orlandi 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 3833 (1989))。还优选的是用于表达轻链的 κ 链增强子, 和 IgH 增强子 (Gillies,"Design of Expression Vectors and Mammalian Cell Systems Suitable

for Engineered Antibodies,"in ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL GUIDE, C.Borrebaeck (Ed.), W. H. Freeman and Company, pp. 139-157 (1992)).

5 编码第一或第二多肽的 DNA 序列可操作地与启动子相连, 然后作为非复制的 DNA 分子引入真核宿主细胞中。这些 DNA 序列可以是线状的, 但更优选地是共价闭合环状的。由于这些 DNA 分子不能自主复制, 其所编码的蛋白的表达可能是通过所引入的 DNA 序列的瞬间表达出现的。优选地是使用永久性表达, 这是当所引入的 DNA 序列整合到宿主的染色体上时出现的。

10 优选地, 将所引入的 DNA 序列整合到能在受体宿主中自我复制的质粒或病毒载体中。已存在几种可能用于这一目的的载体系统。一类载体使用可使染色体外质粒自我复制的 DNA 元件, 所述的 DNA 元件可来源于动物病毒, 如牛乳头瘤病毒, polyoma 病毒, 腺病毒或 SV40 病毒。第二类载体依赖将有用的基因组或 cDNA 序列整合到宿主染色体上。优化 mRNA 的合成还可能需要其他的附加元件。这些元件可能包括间隔信号, 15 及转录启动子, 增强子, 和终止信号。包含这些序列的 cDNA 表达载体包括在下述文献中所描述的那些如 Okayama, Mol. Cell. Biol. 3: 280 (1983), Sambrook 等, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2nd Ed. (1989), and Fouser 等, BiolTechnology 20 10 : 1121 (1992)。也可以使用包含内含子序列的基因组 DNA 表达载体, 参见, Lerner 等 (Eds.), NEW TECHNIQUES IN ANTIBODY GENERATION, Methods 2 (2) (1991)。

另外, 优选地所述表达载体包含选择标记, 如药物抗性标记或其他可是宿主细胞表达选择性特征的标记。“宿主细胞”是指可被用重组 DNA 25 技术构建的载体重组转化或转染的细胞。抗药性标记或其他标记利于在经转化或转染的宿主细胞中的筛选。例如, G418 可用于筛选用带有氨基糖苷磷酸转移酶基因的表达式载体转染的细胞, 参见 Southern 等, J.Mol. Appl. Getz., 1: 327 (1982)。另外, 潮霉素-B 可用于筛选带有潮霉素-B-磷酸转移酶基因的经转染宿主细胞。参见 Palmer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 30 1055 (1987)。另外, 氨基蝶呤霉酚酸可用于筛选带有黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖核苷转移酶基因基因的经转染宿主细胞。参见 Mulligan 等, Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 78: 2072 (1981)。优选地, 用甲氨蝶呤筛选经转染的细胞,

如经转染的 SP2/0 细胞, 所述细胞带有具 DHFR 基因的表达载体, 所筛选出的经转化细胞接下来经逐步提高甲氨蝶呤的浓度, 以便提高所需蛋白的产量。对于同时带有两个表达载体的宿主细胞, 每一载体包含编码不同多价结合蛋白的, 优选地设计为每一载体带有不同的筛选标记, 以便于将

5 两种药物结合对宿主细胞进行筛选。

另外, 筛选标记, 如抗药性标记的存在也可用于防止污染微生物在培养基中的增殖。在这一实施方案中, 可在需具有与选择标记相关的表型才能存活条件下培养所述细胞以获得经转化或转染的宿主细胞的纯培养。优选的, 所述表达载体和编码本发明的多价结合蛋白的第一或第二多肽的插入物带有相容的位于插入接点处的限制性酶切位点, 而且这些位点

10 对于插入区域而言是独一无二的。载体和插入物均用限制性内切酶处理, 然后通过在下述文献中描述的任意一种方法进行连接, Sambrook 等, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2nd Ed. (1989)。

在一个实施方案中, 所述的包含编码多价靶结合蛋白中的第一多肽的 DNA 序列的表达载体还包括编码所述蛋白第二多肽的 DNA 序列。每一种这样的 DNA 均可操作地与独立的一套调节序列相连, 所述的调节序列控制转录和翻译的表达。还可将上述表达载体引入原核或真核宿主细胞, 并在其中表达。优选地, 所述的多价靶结合蛋白在宿主细胞中进行组装, 并由下文所描述的方法分离。另外可将所表达的多肽分离, 然后在体外组装成多价靶结合蛋白。

15 20

在一个实施方案中, 所述的编码靶结合蛋白第一和第二多肽的 DNA 序列可克隆到不同的表达载体中。每一 DNA 序列均可操作地与控制转录和翻译表达的调节序列相连。将每一载体引入到原核或真核宿主细胞中, 并在其中进行表达。可分离出所产生的第一和第二多肽或依照下文描述的方法进行浓缩。然后将经分离和浓缩的第一和第二多肽混合在一起联合形成所述的多价结合蛋白。所述多价结合蛋白的最终产物可用下文中描述的方法进行分离。另外, 也可将编码第一和第二多肽的两个载体引入同一宿主细胞中共表达。所表达的第一和第二在宿主细胞中进行组装, 然后分

25 30 离。

多价靶结合蛋白的分离

选择并培养经转化或转染的宿主细胞,然后用去污剂或渗透压扰动裂解细胞。对于具有使所表达蛋白分泌的信号肽的表达构建体,需保留带有细胞裂解物的细胞培养物悬液以分离所表达的蛋白。可用本领域已知的技术分离、浓缩所表达的蛋白,所述技术如亲和层析, G 蛋白亲和层析, 凝胶过滤层析, 离子交换层析。详细技术的描述参见 Coligan 等 (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, John Wiley & Sons (1991)。所述的亲和层析柱可用至少与三种靶结合位点中的一种结合的靶物质偶联。

在原核宿主细胞中表达的多肽可能是折射体或包含体的形式。通过溶解细胞纯化包含体,重复离心经溶解的细胞并清洗所得的颗粒状物。最终的颗粒状物包含经分离的包含体。经分离的包含体用盐酸胍溶解,然后经凝胶过滤层析分离所表达的蛋白。盐酸胍的处理特别适合于本发明的多价靶结合蛋白,该蛋白具有通过至少一个二硫键共价相连的第一和第二多肽。

亲和层析是本领域已知的。简要地说,是将多价靶结合蛋白的目的性靶物质偶联到层析柱的基质上,如琼脂糖小珠。所表达的多价靶结合蛋白或两多肽之一可留在与靶物质偶联的亲和柱上,条件是它们具有特异于靶物质的功能性结合位点。然后洗脱留在柱上的蛋白。如本领域技术人员所了解的那样, G 蛋白亲和柱也可以用于纯化多价靶结合蛋白。

离子交换层析也是本领域技术人员所熟知的。大部分的蛋白带有正或负电。这样,带有相反类型电荷的层析柱可以留住所述的蛋白。

凝胶过滤层析基于蛋白的分子量不同用凝胶样物质分离蛋白。“凝胶”通常是水和多聚物的基质,如琼脂糖或聚丙烯酰胺。如本领域技术人员所知,本发明包括使用 HPLC (高效液相色谱) 凝胶过滤。

标准的回收和收集程序是本领域已知的。回收所表达的多肽或多价靶结合蛋白优选地包含收集由亲和柱、离子交换柱或凝胶过滤柱中有用的峰中所包含的分离物组分。人工的和自动的组分收集均是本领域已知的。接下来的过程包括将所收集的洗脱物冷冻干燥以产生稳定的固体或进一步地纯化。

所述的活性包括所分离的多肽或多价靶结合蛋白结合和亲和活性,可通过本领域已知的实验进行评估,例如竞争试验,酶联免疫吸附测定 (ELISA), 放射性免疫试验 (RIA)。

多价靶结合蛋白的稳定化

在一个实施方案中，多价靶结合蛋白的第一和第二多肽可通过共价相互作用，如二硫键稳定化。例如每一第一和第二可包含富含半胱氨酸的外来氨基酸序列。这些外来氨基酸序列彼此之间可以形成二硫键，由此稳定第一和第二多肽之间的联合。在优选的实施方案中，所述的第一多肽可包含 CL 区域，其将第一 scFv 分子共价连接到第一免疫球蛋白样结构域，所述的第二多肽可以包含完整的或部分的重链铰链区。所述的 CL 区域可以通过二硫键与铰链区共价相连。

二硫键的形成可以出现在多价靶结合蛋白在宿主细胞中合成的过程中。合适的宿主细胞可以包含原核细胞（如大肠杆菌）酵母或昆虫细胞。优选的宿主细胞包括培养的哺乳动物细胞。二硫键也可以在体外通过 Kostelny 等, *J. Immunol.*, 148: 1547-1553 (1992) 所描述的利用氧化的方法形成。在这一方法中，混合所述的多价结合蛋白的第一和第二多肽，经氧化还原缓冲液透析。最终的产物可通过凝胶过滤层析或亲和层析纯化，亲和层析柱与靶物质偶联，所述的靶物质与第一和第二免疫球蛋白样结构域联合形成的靶结合位点结合。

为阻止不需要的二硫键形成，可用非半胱氨酸残基替换不需要的半胱氨酸残基，例如通过定点诱变。尽可能使所引入在自然条件下保守的突变以便保持所得蛋白结构域的最终四级结构。例如，在一定条件下用丝氨酸替换半胱氨酸可认为是保守取代。半胱氨酸残基的取代，优选地不显著地影响多价靶结合蛋白的结合特异性和稳定性。

当第一多肽包含含有 VL 和 CL 区域的轻链片段，第二多肽包含含有 VL 和 CL 区域的重链片段，参见图 2，在轻链片段和重链片段相互作用中所包含的氨基酸残基易于引起突变以增强两片段之间的联合。用于诱变的合适氨基酸残基是基于抗体的晶体结构确定的。所述的抗体的晶体结构是本领域已知的。被选的诱变可直接引入离子键或二硫键，或提高疏水相互作用或氢键的数量。这些残基的突变优选地不显著影响多价结合蛋白的结合和亲和特异性。最终的诱变产物可利用已与靶物质相偶联的亲和层析分离。如果所述的诱变不显著地影响多价结合蛋白的结合活性，所述的蛋白将留在亲和柱上并通过常规的收集技术回收。

多价靶结合蛋白的应用

本发明的多价靶结合蛋白有多种用途。基本上单克隆或多克隆抗体或其片段的已知用途均可由本发明的多价靶结合蛋白体现。多价靶结合蛋白可进行标记检测。标记的类型对本领域的技术人员是已知的。它们包括放射性标记，化学发光标记，荧光标记和发色团标记。其他的应用包括通过施用有效剂量的标记形式的多价结合蛋白，测定与所述动物相关的可检测的辐射动物(包括人)对所述动物进行内部结构成相。还包括经改进的免疫测定，包括夹心免疫测定，竞争免疫测定，和用经标记的本发明的多价靶结合蛋白替换经标记的抗体的其他免疫测定方式。

多价靶结合蛋白也可用于募集特异于细胞靶物质，如肿瘤细胞或被感染的细胞的细胞毒素细胞，如天然杀伤细胞(NK)或细胞毒性T细胞，参见 Staerz 等, *Nature*, 314: 628 (1985), 和 Songilvilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 315 (1990)。多价靶结合蛋白也可用于递送针对肿瘤细胞或感染细胞的毒素，药物，螯合物，细胞因子，酶，如原药激活的酶，放射性化合物，细胞毒性蛋白，或其他细胞毒性试剂。多价靶结合蛋白共价或非共价地与放射性化合物或其他细胞毒性试剂相偶联的应用使将这些试剂直接递送到肿瘤或损害位点，减少使正常的组织暴露于这些试剂的可能性。参见 Goldenberg, *Semin. Nucl. Med.*, 19: 332 (1989)。近年来，基于治疗的多价靶结合蛋白(包括抗体)及其定位于肿瘤相关抗原的准确度在实验室和临床中都有表现。参见，例如 Thorpe, *TIBTECH*, 11: 42 (1993); Goldenberg, *Scientific American, Science & Medicine*, 1: 64 (1994); US Patent Nos. 4,925,922 and 4,916,213; US Patent No. 4,918,163; US Patent No. 5,204,095; US Patent No. 5,196,337; 和 US Patent Nos. 5,134,075 和 5,171,665。此外，多价靶结合蛋白在体外条件下靶定肿瘤细胞或感染细胞也是有用的，例如在分离的体外样品中治疗和检测肿瘤细胞或感染细胞。多价靶结合蛋白对来自体内的由骨髓催泻白血病细胞也是有用的。参见 Kaneko 等, *Blood*, 81: 1333-1341 (1993)。

在一个实施方案中，所述的多价结合蛋白具有至少一个能与细胞毒性试剂或细胞毒性细胞相结合的靶结合位点，和至少一个其他的结合位点，优选两个能与肿瘤细胞或感染细胞上的抗原相结合的其他的结合位点。

在另一个实施方案中，所述的多价结合蛋白具有至少一个结合位点，优选三个能与肿瘤细胞或感染细胞上的抗原相结合的结合位点。

细胞毒性试剂与多价结合蛋白相偶联, 优选地 通过共价地附加方式, 如通过所述蛋白的氨基酸残基的侧链, 或通过工程化到所述蛋白的糖链。

多价靶结合蛋白也可用于检测或治疗肿瘤细胞, 感染细胞, 肿瘤或感染细胞。优选地, 多价靶结合蛋白可直接应用于人或非人动物以治疗特定的肿瘤或感染损伤或确定受试者是否具有所述肿瘤或感染损伤。参见 Doussal 等, *Int. J. Cancer, Supplement 7*: 58-62 (1992); Peltier 等, *J. Nucl. Med.*, 34: 1267-1273 (1993); Somasundaram 等, *Cancer Immunol. Immunother.*, 36: 337-345 (1993); Bruynck 等, *Br. J. Cancer*, 67: 436-440 (1993)。例如多价结合蛋白可具有肿瘤抗原结合位点和半抗原结合位点。这一蛋白可通过注射引入到病人中, 注射蛋白在体内与于肿瘤位点与肿瘤抗原相结合。放射性标记的半抗原, 如金属螯合物通过注射引入病人体内, 定位于肿瘤位点经半抗原结合位点与所述蛋白相结合, 由此对肿瘤进行检测或治疗。在上述的实施例中, 放射性标记的半抗原也可以与多价靶结合蛋白相偶联, 例如, 通过工程化到多价靶结合蛋白上的糖链。

在另一实施方案中, 多价靶结合蛋白可具有一个特异于靶细胞的靶结合位点, 和两个特异于效应细胞表面抗原的靶结合位点。优选的靶细胞包括肿瘤细胞, 感染细胞, 或任何其他类型的非需要的细胞。效应细胞是那些能产生或参与产生生理应答, 如针对抗原或靶细胞的免疫应答的细胞。优选的效应细胞包括, 但不限于 T 细胞, NK 细胞和巨噬细胞。特异于效应细胞的两个靶结合位点可与效应细胞表面的相同或不同的表面抗原相结合。例如, 所述的两个靶结合位点可与细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞的表面抗原相结合。这种多价靶结合蛋白能够将细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞募集于单一的靶细胞, 由此产生针对靶细胞的增强的免疫应答。

在优选的实施方案中, 多价靶结合蛋白可具有一个特异于靶细胞 (如, 肿瘤细胞) 的靶结合位点, 特异于单一效应细胞 (如 T 细胞) 上两个不同的表面抗原的靶结合位点。由此, 多价靶结合蛋白可通过两个不同的表面抗原结合于单一的效应细胞, 其可在效应细胞中引发不同的信号转导途径。在单一的效应细胞中两个信号途径的激活可产生来自效应细胞的增强的生理应答。

在优选的实施方案中, 多价靶结合蛋白具有一个能与肿瘤抗原或感染细胞抗原结合的靶结合位点, 和两个分别能与 T 细胞表面蛋白 CD3 和

CD28 结合的靶结合位点。这一多价靶结合蛋白能在 T 细胞中引发两个不同的信号转导途径，一个通过 CD3 另一个通过 CD28，以产生针对靶肿瘤或感染细胞的增强的免疫应答。参见 Holliger 等, *Cancer Research*, 59: 2099 (1999)。

5 在又一个实施方案中，多价靶结合蛋白三个靶结合位点中的一个与细胞毒性试剂或效应细胞(如 T 细胞的 CD8 或 CD4)表面抗原相结合。另外两个靶结合位点与肿瘤抗原，如 CEA (抗-癌胚抗原)或 CSAp (结肠-特异抗原 p)相结合。CEA 和 CSAp 均在结肠癌细胞表面表达。带有与同一肿瘤抗原相结合的两个靶结合位点的多价靶结合蛋白可具有对靶肿瘤细胞更
10 高的亲合力，从而减少将正常的组织暴露于与细胞毒性试剂或效应细胞相关的细胞毒性效应物的可能。在又一实施方案中，所述的两个肿瘤抗原结合位点具有不同的结合特异性，例如，一个与 CEA 结合，另一个与 CSAp 结合。具有两个不同的肿瘤-靶结合特异性可提高对肿瘤靶定的机会，从而降低由于抗原修饰造成的肿瘤逃避的机会。

15 在又一实施方案中，多价靶结合蛋白的第一或第二多肽在 N-或 C 末端与附加的氨基酸残基共价相连。这些附加的氨基酸残基可以包含肽标签，信号肽，酶，如原药激活酶，细胞因子，肽毒素，肽药物，细胞毒性蛋白或其他功能性蛋白。这种多价靶结合蛋白可用于治疗和诊断肿瘤。例如，肽毒素，如假单胞菌外毒素，或细胞因子，如 IL-1, IL-2, IFN- γ , TNF- α . 和 GM-SF,可添加到多价靶结合蛋白的 N-或 C-末端，其优选地具有三个肿瘤抗原结合位点。由于具有三个肿瘤抗原结合位点，所述的多价结合蛋白可具有对肿瘤更高的偏嗜性，从而更有效地将附加的毒素或细胞因子递送到靶肿瘤位点。在另一个实施例，具有三个肿瘤抗原结合位点的多
20 价靶结合蛋白可带有肽标签，其能被另一种放射性抗体识别。这一多价结合蛋白可用于在体内检测和治疗肿瘤。由于带有三个肿瘤结合位点，这一
25 多价结合蛋白可提供检测和治疗肿瘤的更多敏感途径。

 在一个优选的实施方案中，多价靶结合蛋白可以“亲和增强系统”用于预靶定。例如具有三个靶结合位点的多价靶结合蛋白，两个针对肿瘤抗原，一个针对如 In-DTPA 半抗原的半抗原。两个肿瘤抗原结合位点优选
30 地与同一抗原相结合，或与同一肿瘤细胞相关的不同抗原相结合。一个受试者可以是，例如人或非人动物，可用靶结合蛋白预处理。此处所用的术语受试者和患者可相互替换。在预定的时间可将非结合的靶结合蛋白从受

试者清除。

对所述的受试者施用带有半抗原的肽载体。优选地所述肽载体带有至少两个半抗原。所述的肽载体可以是放射性标记的，或与药物，毒素，或其他毒性试剂相偶联，由此对靶肿瘤细胞的生长起抑制作用。

- 5 本发明的多价靶结合蛋白可依照已知的方法配制以制备药学上有用的组合物或药剂，由此，所述的蛋白可与药学上可接受的载体结合形成混合物。无菌的磷酸盐缓冲液是药学上可接受的载体的例子。其他合适的载体是本领域已知的，参见例如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), and GILMAN'S THE
10 PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)。

- 可通过静脉内的，动脉内的，腹膜内的，肌内的，皮下的，胸膜内的，鞘内的，通过局部导管灌注或直接的损害部位内注射向患者或非人动物施用多价靶结合蛋白。当通过注射施用多价靶结合蛋白时，所述的施用可通
15 过连续的浸泡或单一或多重大丸剂施用。

- 为治疗或检测感染损伤，或引发针对肿瘤或感染细胞的免疫应答可将有效剂量的多价靶结合蛋白或其他试剂施用于非人动物。为治疗肿瘤或感染损伤的目的，可以有效极量施用多价靶结合蛋白，条件是所谓“有效剂量”是生理上显著的。在生理上显著的有效剂量是在受体患者或非人动
20 物的至少一个靶细胞引起生理上可检测的改变，优选地 在受体患者或非人动物的靶肿瘤或感染损伤部位引起生理上可检测的改变。具体说来，治疗肿瘤或损伤部位显著的生理剂量是导致至少一个靶肿瘤或感染细胞生长受到抑制，优选地是对靶肿瘤或感染损伤产生抑制效果。为检测肿瘤或感染损伤可以“有效剂量”施用靶结合蛋白或另一种试剂，条件是其可引
25 起非背景检测信号。为引起针对肿瘤或感染损伤可以“有效剂量”施用靶结合蛋白或另一种试剂，条件是所施用的剂量在至少一个靶肿瘤或感染细胞引起增强的可检测的免疫应答，优选地与未施用所述靶结合蛋白或试剂相比，可引起针对靶肿瘤或感染细胞的增强的可检测的免疫应答。

所引用的所有文献均引入此处作为参考。

- 30 参照下述实施例可更容易地理解本发明，下述的实施例仅是示例性的，并非要对本发明作任何形式的限制。

实施例 1: 编码包含带有两个 ScFv For 734 的 hMN14 Fab 分子的多价结合蛋白的 DNA 序列的构建, 所述的两个 ScFv For 734 中的一个与 κ 链融合, 另一个与 Fd 序列的 C-末端融合

5 此处所用的, DTPA 表示二乙烯三胺五乙酸 (diethylenetriaminepentaacetic acid)。hMN-14 表示人源化的单克隆抗体 MN-14。hMN-14 在 US Patent No. 5,874,540 中有描述, 该文献引入此处作为参考。抗体的 Fd 是经胃蛋白酶消化后的抗体重链部分。抗体的 Fd 部分包含 VH, CH1 和部分铰链区。"734"表示针对 DTPA 的单克隆抗体。 κ 链
10 是一种类型的免疫球蛋白轻链。

scFv for 734 表示 734scFv, 框内插入 hMN14 Fd 的 C-末端, 如下:框内连接 hMN14 重链 Fd 到 734scFv 所必需的合适接头, 利用特异的引物通过 PCR 反应导入到 734 的 VL 和 VK 结构域, 分别表示为 734VL 和 734VK。PCR 扩增 734VL 是利用引物对 734VL scFv5' (Cys)和 734VLscFv3'
15 进行的。

引物 734VLscFv5' (Cys)的序列为:

5' TCTCTGCAGAGCCCAAATCTTGTGGTGGCGGTTTCACAGCTGGTTGTGACTCAG 3'
P K S C G G G S Q L V V T Q

其代表编码人 IgG1 铰链区前四个氨基酸序列 (PKSC) 的有义链序列, 其通过一个短可变接头 GGGG 与 734 VL 的前六个残基 (QLVVTQ) 框内相连。人铰链的一个 Cys 也包含在内, 这是因为其需要 hMN14 重链
20 Fd-734scFv 和 hMN14 轻链融合体间的链间二硫键。还包含一个 *Pst*I 位点 (下划线)以便于在连接 CH1 结构域和铰链区的内含子序列处的连接。

引物 734VLscFv3'的序列:

5' AGCCTCCGCCTCCTGATCCGCACCTCCTAAGATCTTCAGTTTGGTTCC 3'
G G G G S G G G G L I K L K T G

其代表编码 734 VL 结构域最后六个氨基酸残基(TKLIKIL)的反义序列和部分可变接头序列(GGGGSGGGG), 其框内融合到 VL 结构域的下游。

25 先用 T4 DNA 聚合酶处理 PCR 扩增产物, 以去除在 PCR 过程中添加到末端的多余的 A 残基, 接下来用 *Pst*I 消化。所得的产物是带有 *Pst*I 突出端和平末端的双链 DNA。

734VH 的 PCR 扩增是利用引物对 734VHscFv5'和 734VHscFv3' (*Sac*I)

进行的。

引物 734VHscFv5'的序列:

5' CCGAGGCGGTGGGAGTGAGGTGAACTGCAGGAGT 3'
S G G G G S E V K L Q E

其代表编码与 VL 和 VH 序列相连的可变接头序列 (SGGGGS) 剩余部分的有义链序列, 和 734 VH 结构域的前六个氨基酸(EVKLQE) 残基。

5 引物 734VHscFv3'(Sacl)的序列:

5' AACCTTGAGCTCGGCCGTCGCACTCATGAGGAGACGGTGACCGT 3'
* S S V T V T

其代表编码 734 VH 最后六个残基 (TVTVSS) 的有义链序列。还包括翻译终止密码子 (*)。在终止密码子下游位点引入了限制性酶切位点 *EagI* (粗体)和 *SacI* (下划线) 以便于亚克隆。

类似地, 先用 T4 DNA 聚合酶处理 PCR 扩增产物, 以去除在 PCR 过程中添加到末端的多余的 A 残基, 接下来用 *SacI* 消化, 得到带有平端-粘端构象的 VH DNA 片段。

构建包含人 IgG1 基因组序列 *SacII* 片段的基于 pBlueScript (Stratagene, La Jolla) 的阶段载体(HClkbpSK)。所述的基因组 *SacII* 片段包含部分 5'内含子, 人 IgG1 CH1 结构域, 将 CH1 连接到铰链区的内含子序列, 铰链区序列, 将铰链区连接到 CH2 结构域的内含子序列, 和部分 CH2 结构域。在 HClkbpSK 中的所述的节段包含铰链区和部分 CH2 结构域通过 *PstI/SacI* 消化去除, 所产生的克隆位点用于连接上述的 VL (*PstI*/平端)和 VH (平端/*SacI*) PCR 产物。所得构建体(CH1-734pSK)的 CH1 结构域通过内含子与 734scFv 基因序列相连。

20 由于 IgG1 的基因组 *SacII* 片段仅包含部分 CH1 结构域侧翼的 5'内含子序列, 全部的内含子序列需将剩余的内含子序列作为 *BamHI/SacII* 节段插入到相应的 CH1-734pSK 中的位点得以恢复。然后分离含有全长 5'内含子, CH1 结构域, 连接内含子, 5 铰链残基, 短 GGGGS 接头和 734scFv 序列的 *BamHI/EagI* 片段, 用于替换在 hMN14pdHL2 载体中含人基因组 IgG1
25 恒定区序列的 *HindIII/EagI* 节段。所述的 hMN14pdHL2 载体在 Leung SO, Losman MJ, Qu Z, Goldenberg DM and Hansen HJ, Enhanced Production of a Humanized Anticarcinoembryonic Antigen Antibody, Tumor Targeting 2: 184 (#95) (1996) 中有描述。对于 pdHL2 载体, 请参阅 Losman MJ, Qu Z,

Krishnan IS, Wang J, Hansen HJ, Goldenberg DM and Leung SO, Generation and Monitoring of cell lines producing humanized antibodies, Clin. Cancer Res., 5: 3101s-3105s (1999), and Losman MJ, Hansen HJ, Dworak H, Krishna IS, Qu Z, Shih LB, Zeng L, Goldenberg DM and Leung SO, Generation of a high-producing clone of a humanized anti-B-cell lymphoma monoclonal antibody (hLL2), Cancer (suppl), 80 : 2660-2666 (1997)。这些文献和本说明书中的其他文献一样引入此处作为参考。

用一头带有 *Bam*HI 突出端，一头带有 *Hind*III 突出端的 HNB 接头，以便于 *Bam*HI/*Eag*I 片段连接到 hMN14pdHL2 载体中的 *Hind*III/*Eag*I 位点。它的序列：

5' AGCTTGC GGCCGC 3'
3' ACGCCGGCGCTAG 5'

所得的载体称为 hMN14-734pdHL2。

为将 734 scFv 插入到 hMN-14 Fab κ 链的 C-末端，可以利用相似的策略，如下：

含有人 CK 结构域侧翼区部分 5' 内含子的 *Sac*I 片段和大部分的 CK 区域序列共连接到存在接头 CKSB 的 pBlueScript 载体的 *Sac*I/*Bam*HI 克隆位点。所述的 CKSB 接头包含两个合成的 DNA 核苷酸，其在退火时将产生编码人 CK 区域最末 13 个氨基酸的 DNA，其与人 IgG1 铰链的头 4 个氨基酸残基框内连接，在其 C-末端包含一个短的可变接头(GGGS)。所述的 CKSB 具有双链序列：

5' CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGAGCCCAAATCTGGTGGCG 3'
3' TCGAGCGGGCAGTGTCTCGAAGTTGTCCCTCTCAGCTCGGGTTTAGACCACCGCCTAG 5'
S P V T K S F N R G E C E P K S G G G S

所述的 CKSB 接头的 *Sac*I 3' 突出端与 CK 片段 C-末端的 *Sac*I 相连，*Bam*HI 末端与相应的 pBlueScript 的 *Bam*HI 位点相连。所得的阶段载体称作 CK (B) pSK。

所述的 734 的 VL 区域利用引物对 734VLscFv5'(BglII) 和 734VLscFv3' 进行 PCR 扩增。734VLscFv5' (BglII) 的序列：

5' TCTAGATCTCAGCTGGTTGTGACTCAG 3'
S Q L V V T Q

其代表编码 734 VL 前 6 个氨基酸残基 (QLVVTTQ) 的有义链序列。掺入 5'BglII 位点(下划线) 以便于接下来将可变接头连接到 CK 结构域。

734VLscFv3'的序列已在上述列出。

用 T4 DNA 聚合酶和 *Bgl*III 处理 734 VL 的 PCR-扩增产物，产生平末端/*Bgl*III 粘末端片段。

734 VH 的 PCR-的扩增利用引物对 734VHscFv5' 和 734VHscFv3' (*Sall*) 进行。

734VLscFv5'的序列已在上述列出。

734VHscFv3'(*Sall*) 的序列基本上与 734VHscFv3' (*Sac*I) 的序列相同，除了用 *Sall* (下划线)位点代替 *Sac*I 位点。

5' AACCCCTTGTCGACGGCCGTCGCACTCATGAGGAGACGGTGACCGT 3'

* S S V T V T

类似地，先用 T4 DNA 聚合酶处理 PCR-扩增的 VH 产物以产生平末端，再用 *Sall* 消化以产生粘末端。

阶段载体 CK (B) pSK 用 *Bam*HI 和 *Sall*，然后，所暴露的克隆位点处插入 VL 和 VH PCR 产物。所述的 VL 的 *Bgl*III 突出端与 *Bam*HI 突出端与在消化载体的 CK-片段的 C-末端互补，而 *Sall* 末端与所述载体下游末端的相应位点连接。所得的载体，称作 CK-734scFvpSK，带有通过短肽序列与 734scFv 序列融合的基因组 CK 序列。

所述的 CK-734scFvpSK 载体先用 *Hind*I 酶线性化，其在 *Sall* 位点切开以产生平末端，CK-734scFv 片段用 *Sac*I 部分消化。分离包含大小约为 1.3 Kb 的 CK-734scFv 基因序列的片段，连接到 hMN14pdHL2 载体的 *Sac*I/*Pfl*MI 位点，替代原有的 CK 序列。*Pfl*MI 位点位于 CK 终止密码子下游约 50 bp 的 3'非编码区，在 CK-734scFv 片段连接到 hMN14- 734pdHL2 载体之前，经 *Pfl*MI 消化产生的 3' 端经 Klenow 酶补平。最终的表达载体称作 hMN14-Di-734pdHL2，编码带有两个 scFv for 734 的 hMN14 Fab 分子，其中的一个与κ 链的 C-末端融合，另一个与 Fd 序列的 C-末端融合。

实施例 2: 含由抗体 734 衍生的两个抗-DTPA ScFv 连接的 CEA 特异的 Fab 的三价双特异性抗体的表达和纯化

为构建含由抗体 734 衍生的两个抗-DTPA ScFv 连接的 CEA 特异的 Fab 的三价双特异性抗体，734 scFv 与 hMN-14 Fd 序列的 C-末端融合以

- 形成 Fd-scFv 基因序列；相同的 734 scFv 添加到 hMN-14 κ 链序列 C-末端，形成 κ scFv 基因序列。Fd-scFv 和 κ -scFv 序列在表达载体 pdHL2 中组装，所得的表达载体称作 hMN14-discFv734pdHL2，其将利用标准的技术通过电穿孔转染 SP2/0 细胞。所述的表达载体包含 DHFR 基因，其可用
- 5 作用 0.1, μ M 甲氨蝶呤 (MTX) 筛选转染细胞的选择标记。可利用 ELISA 试验检测抗体分泌克隆，所述的克隆接下来通过逐步扩增，提高在 MTX 中的浓度。所分泌的抗体可通过 G 蛋白亲和柱纯化，并可通过离子交换层析进行进一步的纯化。

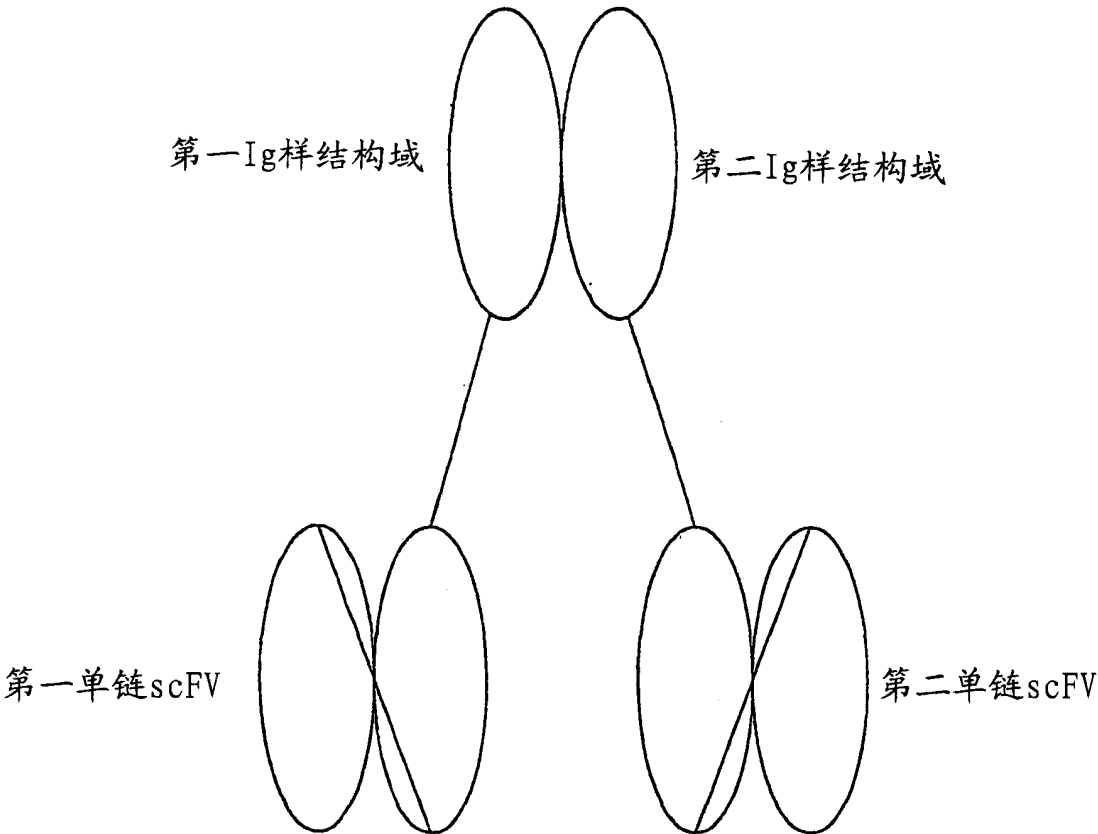


图 1

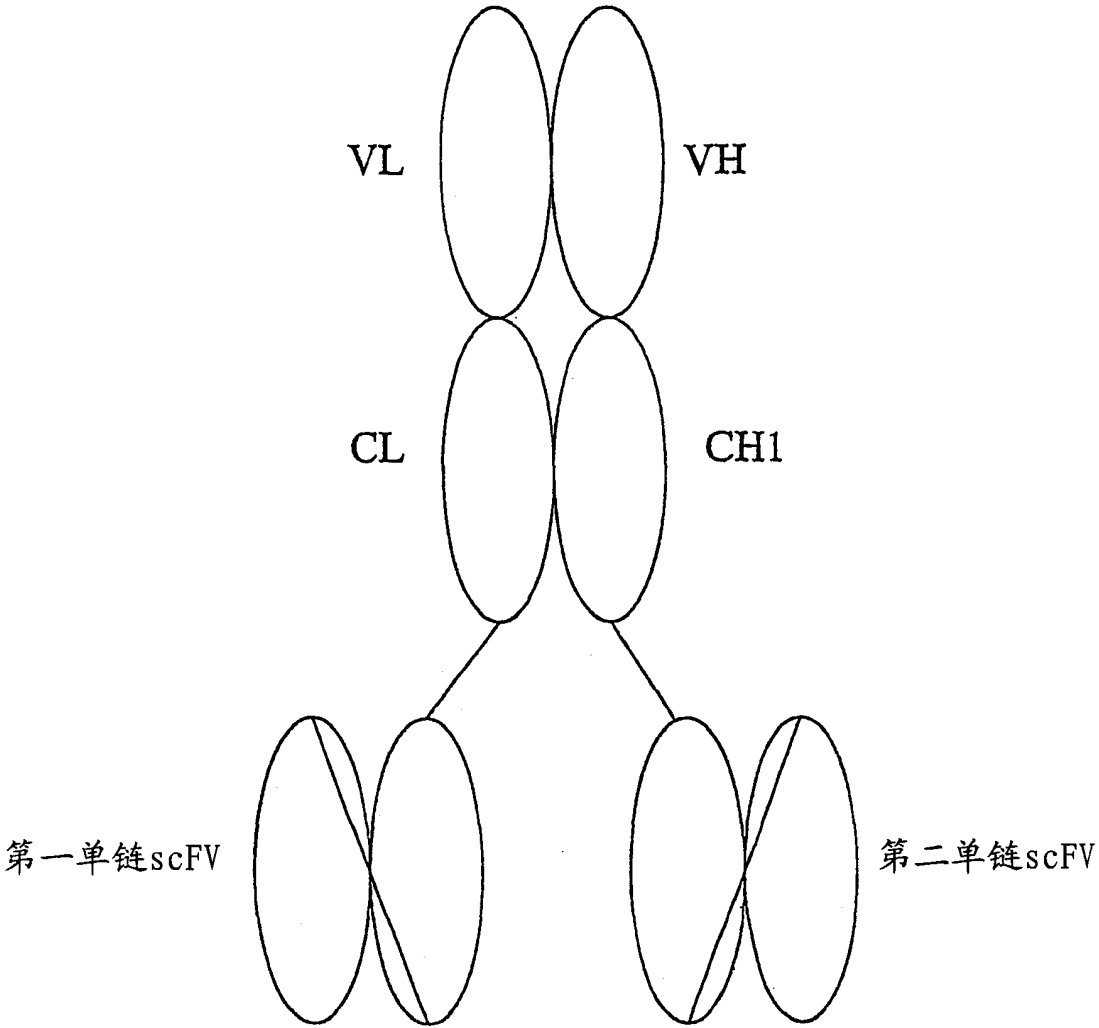


图 2