



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104470536 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201380023287. 3

代理人 李慧惠 彭昶

(22) 申请日 2013. 03. 04

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 38/21(2006. 01)

61/634, 565 2012. 03. 03 US

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 14/56(2006. 01)

2014. 11. 03

C07K 16/30(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/028899 2013. 03. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/134138 EN 2013. 09. 12

(71) 申请人 免疫基因公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 伊克巴尔·格雷沃

桑杰伊·D·卡雷 迈克尔·格雷瑟

拉希德·赛伊德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

权利要求书2页 说明书26页
序列表16页 附图3页

(54) 发明名称

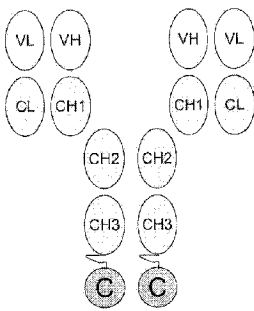
工程化的抗体-干扰素突变体融合分子

(57) 摘要

本发明领域涉及基因工程融合分子,制备所述融合分子的方法,及其在抗肿瘤免疫疗法中的用途。更具体而言,本发明涉及融合分子构建体,其中为了杀伤肿瘤细胞或抑制其生长或增殖的目的,将肿瘤相关抗原(TAA)抗体(Ab)充当靶向部分以选择性地递送细胞因子至所述肿瘤细胞。在多个实施方案中,工程化的融合分子包含融合至干扰素- α (IFN- α) 突变体分子的 TAA Ab。本发明的工程化的 Ab-IFN- α 突变体融合分子相比于 Ab-野生型 IFN- α 融合分子显示改进的治疗指数和保留的或增加的效力,和/或相比于 Ab-野生型 IFN- α 融合分子显示改进的 PK 特性。

C 细胞因子

接头



1. 基因工程融合分子,其包含连接至干扰素 α (IFN- α) 突变体分子的肿瘤相关抗原 (TAA) 抗体 (Ab),其中所述抗体直接连接至所述 IFN- α 突变体分子。

2. 权利要求 1 的融合分子,其中所述融合分子相比于 TAA Ab-野生型 IFN- α 融合分子显示改进的 PK 特性。

3. 权利要求 1 的融合分子,其中所述融合分子当接触肿瘤细胞时,导致杀伤所述肿瘤细胞或抑制其生长或增殖。

4. 权利要求 1-3 中任一项的融合分子,其中所述干扰素突变体分子包含在 SEQ ID NO: 13 中含有至少一个突变的突变的人 IFN- α 2 分子,其中所述突变选自 H57Y, E58N, Q61S,

H57S, E58S, H57A, E58A, Q61A, R149A, R162A, L30A, D35E, E165D, L26A, F27A, L135A,

A145V;及其组合。

5. 权利要求 1-4 中任一项的融合分子,其中所述 TAA 抗体为选自以下的抗体:抗-HER2/neu、抗-HER3、抗-HER4、抗-CD4、抗-CD19、抗-CD20、抗-CD22、抗-CD25、抗-CD33、抗-CD138、抗-CD200、抗-CD276、抗-CXCR3、抗-CXCR5、抗-CCR3、抗-CCR4、抗-CCR9、抗-CRTH2、抗-PMCH、和抗-内质蛋白抗体。

6. 权利要求 1-5 中任一项的融合分子,其中所述 TAA 抗体为选自以下的抗体:完全人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、抗原结合抗体片段、Fab、Fab'、Fab₂、Fab'₂、IgG、IgM、IgA、IgE、scFv、dsFv、dAb、纳米抗体、单抗体、和双价抗体。

7. 权利要求 1 的融合分子,其中所述 TAA 抗体为抗-HER2/neu 抗体,并且其中所述突变的人 IFN- α 2 分子在 SEQ ID NO: 13 中包含突变 F27A。

8. 权利要求 1 的融合分子,其中所述 TAA 抗体为抗-CD20 抗体,并且其中所述突变的人 IFN- α 2 分子在 SEQ ID NO: 13 中包含突变 F27A。

9. 权利要求 1 的融合分子,其中所述 TAA 抗体为抗-CD138 抗体,并且其中所述突变的人 IFN- α 2 分子在 SEQ ID NO: 13 中包含突变 F27A。

10. 权利要求 1 的融合分子,其中所述 TAA 抗体为抗-内质蛋白抗体,并且其中所述突变的人 IFN- α 2 分子在 SEQ ID NO: 13 中包含突变 F27A。

11. 权利要求 1 的融合分子,其中所述 TAA 抗体为抗-CD33 抗体,并且其中所述突变的人 IFN- α 2 分子在 SEQ ID NO: 13 中包含突变 F27A。

12. 权利要求 1 的融合分子,其中所述 TAA 抗体为抗-CD276 抗体,并且其中所述突变的人 IFN- α 2 分子在 SEQ ID NO: 13 中包含突变 F27A。

13. 权利要求 1 的融合分子,其中所述 TAA 抗体为抗-HER2/neu 抗体,并且其中所述突变的人 IFN- α 2 分子在 SEQ ID NO: 13 中包含两个突变 R149A 和 R162A。

14. 权利要求 1 的融合分子,其中所述 TAA 抗体为抗-CD20 抗体,并且其中所述突变的人 IFN- α 2 分子在 SEQ ID NO: 13 中包含两个突变 R149A 和 R162A。

15. 权利要求 1 的融合分子,其中所述 TAA 抗体为抗-CD138 抗体,并且其中所述突变的人 IFN- α 2 分子在 SEQ ID NO: 13 中包含两个突变 R149A 和 R162A。

16. 权利要求 1 的融合分子,其中所述 TAA 抗体为抗-内质蛋白抗体,并且其中所述突变的人 IFN- α 2 分子在 SEQ ID NO: 13 中包含两个突变 R149A 和 R162A。

17. 权利要求 1 的融合分子,其中所述 TAA 抗体为抗 -CD33 抗体,并且其中所述突变的人 IFN- α 2 分子在 SEQ ID NO: 13 中包含两个突变 R149A 和 R162A。

18. 权利要求 1 的融合分子,其中所述 TAA 抗体为抗 -CD276 抗体,并且其中所述突变的人 IFN- α 2 分子在 SEQ ID NO: 13 中包含两个突变 R149A 和 R162A。

19. 权利要求 1-18 中任一项的融合分子,其中所述抗体用肽接头直接连接至所述干扰素突变体分子。

20. 权利要求 19 的融合分子,其中所述肽接头选自 SGGGGS 和 AEAAAKEAAKAGS。

21. 药物组合物,其包含在药学上可接受的载体中的权利要求 1-20 中任一项的融合分子。

22. 权利要求 21 的药物组合物,其中配制所述组合物用于经选自以下的途径来施用:口服施用、肌内施用、静脉内施用、直接肿瘤施用、吸入、经皮施用、和皮下储存施用。

23. 治疗患者中的肿瘤或肿瘤转移的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量(作为单一疗法或作为联合治疗方案的部分)的权利要求 21 的药物组合物,其中此类施用促进肿瘤消退和 / 或肿瘤死亡。

24. 权利要求 1-20 中任一项的融合分子在制造用于杀伤癌细胞或抑制其生长或增殖的药物中的用途。

工程化的抗体 - 干扰素突变体融合分子

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求于 2012 年 3 月 3 日提交的美国临时申请号 61/634,565 的优先权和权益,其对于所有目的以其整体通过引用并入本文。

[0002] 政府支持声明

本发明用美国政府支持根据基金号 1R43CA162762-01A1,由 National Institutes of Health 资助完成。美国政府在本发明中具有某些权利。

技术领域

[0003] 本发明领域涉及基因工程融合分子,制备所述融合分子的方法,及其在抗肿瘤免疫疗法中的用途。

背景技术

[0004] 干扰素是重要的细胞因子,其对免疫应答具有多种作用(Theofilopoulos 等, Annu. Rev. Immunol., 23:307-336, 2005)。干扰素包括 1 型干扰素(例如,干扰素- α (IFN- α) 和干扰素- β (IFN- β)) 和 2 型干扰素(例如,干扰素- γ (IFN- γ))。所有 1 型 IFN 由共同的受体 (IFN- α R) 识别,所述受体由两个跨膜蛋白 IFN- α R1 和 IFN- α R2 构成。已知 IFN- α 's 抑制血管发生 (Sidky YA 和 EC Borden, Cancer Res., 47:5155, 1987),介导树突细胞的刺激和分化 (Santini 等, J Exp Med, 191:1777, 2000),并且对于抗原特异性 CD8+ T 细胞的体内增殖、扩展和长期存活是重要的 (Tough DF 等, Science, 272:1947, 1996)。尽管首先描述了它们抑制病毒复制的能力,但 IFN- α 's 具有多种特性,展示出抗增殖性作用,诱导凋亡 (Rodriguez-Villanueva J 和 TJ McDonnell, Int J Cancer, 61:110, 1995) 和诱导肿瘤细胞中的肿瘤抑制基因 P53 (Takaoka A 等, Nature, 424:516, 2003)。因此,IFN- α 's 是用于治疗多种癌症的第一重组蛋白。

[0005] 不幸的是,使用 IFN- α 治疗癌症已受其半衰期短和伴随的全身性毒性而受限 (Weiss K, Semin Oncol, 25:9, 1998; Jones GJ 和 Itri LM, Cancer, 57:1709, 2006)。由于 IFN- α 的体内半衰期短,所以需要频繁施用。药代动力学 (PK) 研究已显示仅 0.01% 的皮下注射的 IFN- α 到达靶肿瘤部位 (Suzuki K 等, Gene Ther., 10(9):765-773, 2003)。与 IFN- α 疗法相关的最常见的不利事件是流感样症状、疲劳、厌食、中枢神经系统和精神病反应,并且这些副作用中的一些可以变为剂量限制性的 (Jones GJ 和 Itri LM, Cancer, 57:1709, 2006)。由于这些限制,因此难以在恶性疾病部位实现有效的 IFN- α 浓度而不引起全身性毒性。全身性 IFN- α 疗法的限制已导致探寻安全且有效地向肿瘤附近递送 IFN- α 的替代策略。

发明内容

[0006] 在一方面,本发明提供新型基因工程肿瘤相关抗原 (TAA) 抗体 (Ab)-干扰素 α (IFN- α) 突变体分子。

[0007] 在一方面,本发明提供包含连接至 IFN- α 突变体分子的 TAA Ab 的基因工程融合分子,其中所述抗体直接连接至所述 IFN- α 突变体分子,其中所述融合分子相比于 TAA Ab-野生型 (wt) IFN- α 融合分子显示出改进的 PK 特性。

[0008] 在一方面,本发明提供包含连接至 IFN- α 突变体分子的 TAA Ab 的基因工程融合分子,其中所述抗体直接连接至所述 IFN- α 突变体分子,其中所述融合分子当与肿瘤细胞接触时导致杀伤所述肿瘤细胞或抑制其生长或增殖。

[0009] 在本发明的多个实施方案中,基因工程融合分子的干扰素 α 突变体分子包含突变的人 IFN- α 2 分子,其在 SEQ ID NO: 13 中包含至少一个突变,其中所述突变选自 **H57Y, E58N, Q61S, H57S, E58S, H57A, E58A, Q61A, R149A, R162A,**

L30A, D35E, E165D, L26A, F27A, L135A, A145V;及其组合。

[0010] 在多个实施方案中,融合分子包含 TAA 抗体,其选自抗-HER2/neu、抗-HER3、抗-HER4、抗-CD4、抗-CD19、抗-CD20、抗-CD22、抗-CD25、抗-CD33、抗-CD138、抗-CD200、抗-CD276、抗-CXCR3、抗-CXCR5、抗-CCR3、抗-CCR4、抗-CCR9、抗-CRTH2、抗-PMCH 和抗-内质蛋白抗体。

[0011] 在一个实施方案中,融合分子包含抗-HER2/neu 抗体和在 SEQ ID NO: 13 中含有突变 F27A 的突变的人 IFN- α 2 分子。

[0012] 在一个实施方案中,融合分子包含抗-CD20 抗体和在 SEQ ID NO: 13 中含有突变 F27A 的突变的人 IFN- α 2 分子。

[0013] 在一个实施方案中,融合分子包含抗-CD138 抗体和在 SEQ ID NO: 13 中含有突变 F27A 的突变的人 IFN- α 2 分子。

[0014] 在一个实施方案中,融合分子包含抗-内质蛋白抗体和在 SEQ ID NO: 13 中含有突变 F27A 的突变的人 IFN- α 2 分子。

[0015] 在一个实施方案中,融合分子包含抗-CD33 抗体和在 SEQ ID NO: 13 中含有突变 F27A 的突变的人 IFN- α 2 分子。

[0016] 在一个实施方案中,融合分子包含抗-CD276 抗体和在 SEQ ID NO: 13 中含有突变 F27A 的突变的人 IFN- α 2 分子。

[0017] 在一个实施方案中,融合分子包含抗-HER2/neu 抗体和在 SEQ ID NO: 13 中含有两个突变 R149A 和 R162A 的突变的人 IFN- α 2 分子。

[0018] 在一个实施方案中,融合分子包含抗-CD20 抗体和在 SEQ ID NO: 13 中含有两个突变 R149A 和 R162A 的突变的人 IFN- α 2 分子。

[0019] 在一个实施方案中,融合分子包含抗-CD138 抗体和在 SEQ ID NO: 13 中含有两个突变 R149A 和 R162A 的突变的人 IFN- α 2 分子。

[0020] 在一个实施方案中,融合分子包含抗-内质蛋白抗体和在 SEQ ID NO: 13 中含有两个突变 R149A 和 R162A 的突变的人 IFN- α 2 分子。

[0021] 在一个实施方案中,融合分子包含抗-CD33 抗体和在 SEQ ID NO: 13 中含有两个突变 R149A 和 R162A 的突变的人 IFN- α 2 分子。

[0022] 在一个实施方案中,融合分子包含抗-CD276 抗体和在 SEQ ID NO: 13 中含有两个突变 R149A 和 R162A 的突变的人 IFN- α 2 分子。

[0023] 在另一个实施方案中,融合分子包含抗体,其选自完全人抗体、人源化抗体、嵌

合抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、抗原结合抗体片段、Fab、Fab'、Fab₂、Fab'₂、IgG、IgM、IgA、IgE、scFv、dsFv、dAb、纳米抗体 (nanobody)、单抗体 (unibody)、和双价抗体 (diabody)。

[0024] 本发明的另一方面涉及药物组合物和制备所述药物组合物的方法,其中所述组合物在药学上可接受的载体中包含本发明的基因工程融合分子作为活性成分。

[0025] 本发明的另一方面涉及治疗患者中的肿瘤或肿瘤转移的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量(作为单一疗法或作为联合治疗方案的部分)的在药学上可接受的载体中的本发明的基因工程融合分子,其中所述施用促进肿瘤消退和/或肿瘤死亡。

[0026] 本发明的另一方面涉及本发明的基因工程融合体制备用于治疗有需要的患者中的肿瘤或肿瘤转移的药物的用途。

[0027] 本发明的其他方面涉及编码本发明的基因工程融合分子的核酸;包含编码本发明的融合分子的核酸分子,任选地,其可操作地连接至被载体转化的宿主细胞识别的控制序列上;宿主细胞,其包含含有编码本发明的融合分子的核酸分子的载体;产生本发明的融合分子的方法,其包括培养包含含有编码本发明的融合分子的核酸分子的载体的宿主细胞,使得所述核酸表达,并且任选地,从宿主细胞培养基中回收融合分子。在多个实施方案中,核酸编码包含连接至干扰素突变体分子的肿瘤相关抗原抗体的融合分子。在多个实施方案中,核酸编码将抗体连接至干扰素突变体分子的肽接头(例如,如本文所述的)。

[0028] 附图简述

图1描绘了一种提出的本发明的基因工程融合分子的设计。在图1中,标识为V_L、V_H、C_L、C_{H1}、C_{H2}和C_{H3}的椭圆形代表如本文定义的全长抗体(Ab)。标识为C的椭圆形代表细胞因子,例如IFN-α突变体。接头由扭曲的线表示。如图1中所示,C经接头在两个C_{H3}位点处连接至Ab。在一个可选的实施方案中,C经接头在两个V_L位点处连接至Ab。在仍另一个可选的实施方案中,C经接头在两个V_H位点处连接至Ab。在仍另一个可选方案中,C经接头在内部位点而非在C_{H3}、V_L或V_H位点处连接至Ab。

[0029] 图2描绘了另一种提出的本发明的基因工程融合分子的设计。在图3中,标识为V_L、V_H、C_L、C_H、C_{H1}和C_{H2}的椭圆形代表如本文定义的Fab₂。椭圆形标识C代表细胞因子。接头由扭曲的线表示。如图3中所示,C经接头在两个C_{H2}位点处连接至Fab₂。在一个可选的实施方案中,C经接头在两个V_L位点而非C_{H2}位点处连接至Fab₂。在仍另一个可选方案中,C经接头在两个V_H位点而非两个V_L或两个C_{H2}位点处连接至Fab₂。在仍另一个可选方案中,C经接头在内部位点而非在C_{H2}、V_L或V_H位点处连接至Fab₂。

[0030] 图3描绘了另一种提出的本发明的基因工程融合分子的设计。在图4中,标识为V_L、V_H、C_L和C_{H1}的椭圆形代表如本文定义的Fab。椭圆形标识C代表细胞因子。接头由扭曲的线表示。如图3中所示,C经接头在C_{H1}位点处连接至Fab。在一个可选的实施方案中,C经接头在V_L位点而非C_{H1}处连接至Fab。在仍另一个可选方案中,C经接头在V_H位点而非V_L或C_{H1}位点处连接至Fab。在仍另一个可选方案中,C经接头在内部位点而非在C_{H1}、V_L或V_H位点处连接至Fab。

[0031] 序列表

列于所附的序列表中的氨基酸序列使用氨基酸的标准三字母编码显示,如在37 C. F. R. 1.822中定义的。

[0032] SEQ ID NO:1 为抗 -Her2/neu 抗体的重链的氨基酸序列,其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽。SEQ ID NO:2 为编码抗 -Her2/neu 抗体的轻链的氨基酸序列,其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽。

[0033] SEQ ID NO:3 为抗 -CD20 抗体的重链的氨基酸序列,其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽。SEQ ID NO:3 为编码抗 -CD20 抗体的轻链的氨基酸序列,其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽。

[0034] SEQ ID NO:5 为抗 -CD138 抗体的重链的氨基酸序列,其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽。SEQ ID NO:6 为编码抗 -CD138 抗体的轻链的氨基酸序列,其中氨基酸残基 1-22 代表信号肽。

[0035] SEQ ID NO:7 为抗 -内质蛋白抗体的重链的氨基酸序列,其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽。SEQ ID NO:8 为编码抗 -内质蛋白抗体的轻链的氨基酸序列,其中氨基酸残基 1-20 代表信号肽。

[0036] SEQ ID NO:9 为抗 -CD33 抗体的重链的氨基酸序列,其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽。SEQ ID NO:10 为编码抗 -CD33 抗体的轻链的氨基酸序列,其中氨基酸残基 1-20 代表信号肽。

[0037] SEQ ID NO:11 为抗 -CD276 抗体的重链可变区的氨基酸序列,其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽。SEQ ID NO:12 为编码抗 -CD276 抗体的轻链可变区的氨基酸序列,其中氨基酸残基 1-20 代表信号肽。

[0038] SEQ ID NO:13 为人野生型 IFN- α 2 分子的氨基酸序列。

[0039] SEQ ID NO:14 为肽接头的氨基酸序列。

[0040] SEQ ID NO:15 为肽接头的氨基酸序列。

[0041] 进行本发明的方式

美国专利号 8,258,263 (Morrison 等) 证实靶向的野生型 (wt) IFN- α 可以比非靶向的 wtIFN- α 具有高得多的治疗指数,使得以有效剂量施用它成为可能。具体而言, Morrison 等证实相比于非融合的 wtIFN- α , 多种肿瘤相关抗原 Ab-wtIFN- α 嵌合构建体显示出显著改进的治疗效力(更有效~100 倍),并具有全身性毒性的明显降低。

[0042] 在本发明的多个实施方案中,制备包含经接头连接至 IFN- α 突变体分子的肿瘤相关抗原抗体的基因工程融合分子用于利用所述抗体将 IFN- α 突变体分子靶向肿瘤分子的特异性的目的。

[0043] 用于制备本发明的融合分子的 IFN- α 突变体分子对 IFN α R 复合体具有不同的亲和力。本发明人评价了 IFN α R 亲和力和体外治疗指数之间的关系,和融合蛋白体内的抗肿瘤效力,并鉴定了相比于 Ab-wtIFN- α 融合分子显示出改进的治疗指数、和保持的或改进的体内效力的 Ab-IFN- α 突变体融合分子。本发明人还鉴定了相比于 Ab-wtIFN- α 融合分子显示出改进的 PK 特性的 Ab-IFN- α 突变体融合分子。治疗指数定义为: Ab-IFN α 突变体融合分子对表达由 Ab 识别的抗原且表达 IFN α R 的细胞(“靶向的”)的 EC₅₀除以 Ab-IFN α 突变体融合分子对仅表达 IFN α R 的细胞(“非靶向的”)的 EC₅₀。效力定义为融合分子杀伤表达抗原(所述融合分子的 Ab 部分与其结合)的癌细胞的效能。

[0044] 用于鉴定此类 Ab-IFN- α 突变体融合分子的方法如下:1)制备 IFN- α 突变体;2)制备结合肿瘤相关抗原的抗体;3)经化学缀合或经接头的直接连接构建包含 IFN- α 突变

体和来自步骤 1) 和 2) 的抗体的几个 Ab-IFN- α 突变体融合分子;4) 以不同剂量在几种体外功能测定中系统地检测得到的化学缀合物或融合分子,以鉴定具有改进的治疗指数的那些;和 5) 进行使用显示出最佳治疗指数的化学缀合物或融合分子的体内研究来测定治疗体内肿瘤的效力。具体与步骤 4) 相关,使用体外功能测定来测定:a) 融合分子在非靶向细胞上结合 IFN- α R 复合体的能力;b) 融合分子结合表达 IFN- α R 复合体和由 Ab 靶向的抗原的细胞的能力;c) 融合分子结合 FcRn 受体的能力;d) 融合分子对非靶向细胞的 IFN- α 生物活性;e) 融合分子对靶向细胞的抗增殖活性;和 f) 融合分子诱导凋亡的能力。具体与步骤 5) 相关,使用体内测定来:a) 确定给定的融合体治疗肿瘤的效力;和 b) 确定给定的融合分子的改进的 PK 特性。

[0045] 定义

除非本文另有定义,否则在本发明上下文中使用的科技术语均具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另外需要,否则单数术语也应该包括复数形式并且复数术语也应该包括单数形式。通常,本文描述的与细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白和核酸化学和杂交相关使用的命名法及其技术是众所周知的且本领域中通常使用的。本发明的方法和技术通常根据本领域中众所周知的和如描述于多个一般性的和在整个本说明书中引用并讨论的更具体的参考文献中的常规方法进行,除非另有说明。参见,例如 Sambrook 等 Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 和 Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), 和 Harlow 和 Lane Antibodies:A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), 其通过引用并入本文。酶反应和纯化技术根据制造商说明书进行,如同本领域中通常进行的或如本文所描述的。本文描述的与分析化学、合成有机化学、和医学和药物化学相关使用的术语学和实验室程序及技术是众所周知的且在本领域中经常使用。标准技术可以用于化学合成、化学分析、药物制备、组合物、和递送、及患者的治疗。

[0046] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”本文中可以互换使用来指氨基酸残基的聚合物。优选的“肽”、“多肽”和“蛋白”为氨基酸的链,其 α 碳经肽键连接。因此在链的一端(氨基末端)的末端氨基酸具有游离的氨基,而在碳的另一端(羧基末端)的末端氨基酸具有游离的羧基。如本文所用,术语“氨基末端”(缩写为 N-末端)指在肽的氨基末端处的氨基酸上的游离 α -氨基或在肽内任何其他位置处的氨基酸的 α -氨基(当参与肽键时为亚氨基)。类似地,术语“羧基末端”指肽的羧基末端上的游离羧基或在肽内任何其他位置处的氨基酸的羧基。肽还包括基本上任何聚氨基酸,包括但不限于肽模拟物,诸如相对于酰胺键由醚连接的氨基酸。

[0047] 如本文所用的术语“多肽片段”指相比于对应的全长蛋白具有氨基末端和/或羧基末端缺失的多肽。例如,片段长度可以为至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、50、70、80、90、100、150 或 200 个氨基酸。例如,片段长度还可以为至多 1000、750、500、250、200、175、150、125、100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、14、13、12、11 或 10 个氨基酸。片段可以进一步在其任一端或两端包含一个或多个另外的氨基酸,例如,来自不同的天然存在蛋白(例如, Fc 或亮氨酸拉链结构域)或人工氨基酸序列(例如,人工接头序列)的氨基酸序列。

[0048] 本发明的多肽包括这样的多肽,其已经以任何方式和任何原因进行修饰例如来:(1)降低对蛋白水解的易感性,(2)降低对氧化的易感性,(3)改变对形成的蛋白复合体的结合亲和力,(4)改变结合亲和力,和(5)赋予或修饰其他物理化学或功能特性。例如,单个或多个氨基酸取代(例如,保守氨基酸取代)可以在天然存在的序列中(例如,在形成分子间接触的结构域外部的多肽的部分中)进行。“保守的氨基酸取代”是基本上不会改变亲本序列(parent sequence)的结构特性的氨基酸取代(例如,取代氨基酸应该趋于不打破在亲本序列中形成的螺旋,或不破坏为亲本序列的特征的或对其功能性是必需的其他类型的二级结构)。本领域技术公认的多肽二级和三级结构的实例描述于Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, 编辑, W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden 和 J. Tooze, 编辑, Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); 和 Thornton 等 (1991) Nature 354:105)。

[0049] 多肽的“变体”包含这样的氨基酸序列,其中相对于另一个多肽序列,一个或多个氨基酸残基被插入到氨基酸序列中,从其中缺失和/或取代入其中。本发明的变体包括融合蛋白。

[0050] 多肽的“衍生物”为已经化学修饰的例如缀合至另一化学部分诸如例如聚乙二醇、白蛋白(例如人血清白蛋白)、磷酸化和糖基化的多肽。

[0051] 术语“分离的分子”(其中所述分子例如为多肽、多核苷酸、或抗体)为这样的分子,由于其起源或衍生的来源,所述分子(1)不和在其天然状态中伴随它的天然相关组分在一起,(2)基本上不含来自相同物种的其他分子(3)由来自不同物种的细胞表达,或(4)天然中不存在。因此,化学合成的分子、或在与从中它天然产生的细胞不同的细胞系统中表达的分子,将是从其天然相关组分中“分离的”。分子还可以使用本领域中熟知的纯化技术通过分离使得基本上不含天然相关组分。分子纯度或同质性可以通过多种本领域中熟知的方法测定。例如,多肽样品的纯度可以使用本领域中熟知的技术用聚丙烯酰胺凝胶电泳和凝胶染色以显色多肽来测定。对于某些目的,更高的分辨率可以通过使用 HPLC 或本领域中熟知的用于纯化的其他方法来提供。

[0052] 如本文所用,“抗体”指包含一种或多种多肽的蛋白,所述多肽基本上或部分地由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段所编码并具有对肿瘤抗原的特异性或对在病理状态中过表达的分子的特异性。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 、和 μ 恒定区基因,以及这些基因的亚型和众多的免疫球蛋白可变区基因。将轻链分为 κ 或 λ 。将重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其继而分别确定免疫球蛋白类别 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。典型的免疫球蛋白(例如抗体)结构单元包含四聚体。每一四聚体由相同的两对多肽链构成,每一对具有一条“轻”链(约 25 kD)和一条“重”链(约 50-70 kD)。每一链的 N-末端确定主要负责抗原识别的约 100-110 或更多个氨基酸的可变区。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别指这些轻链和重链。

[0053] 在全长抗体中,每一重链由重链可变区(本文缩写为 HCVR 或 V_H)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} (并在某些情况下为 C_{H4})构成。每一轻链由轻链可变区(本文缩写为 V_L)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 构成。 V_H 和 V_L 区可以进一步细分为称为互补性决定区域(CDR)的高变的区域,其散布于由称为框架区(FR)

的更保守的区域。每一 V_H 和 V_L 由三个 CDR 和四个 FR 构成,从氨基端向羧基端按以下顺序排列:FR₁、CDR₁、FR₂、CDR₂、FR₃、CDR₃、FR₄。框架区和 CDR 的范围已经确定(参见, Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991,其通过参考并入本文)。Kabat 数据库目前在线维护,并且 CDR 序列可以被确定,例如,参见 IMGT/V-QUEST 程序版本:3.2.18., 2011 年 3 月 29 日,在互联网上可得和 Brochet, X. 等, *Nucl. Acids Res.*, 36:503-508, 2008)。不同轻链和重链的框架区的序列在物种内例如人中是相对保守的。抗体的框架区(其为组成的轻链和重链的组合的框架区)在三维空间中提供位置并排列 CDR。免疫球蛋白分子可以为任何类型(例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、类别(例如, IgG1、IgG2、IgG 3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类。

[0054] CDR 主要负责结合至抗原的表位上。每一链的 CDR 通常称为 CDR₁、CDR₂、CDR₃,从 N-末端顺序编号,并且还通常由具体的 CDR 位于其中的链所确定。因此, V_H CDR₃ 位于其中发现它的抗体的重链的可变域中,而 V_L CDR₁ 为来自其中发现它的抗体的轻链的可变域中的 CDR₁。具有不同特异性(即对不同的抗原的不同的组合位点)的抗体具有不同的 CDR。尽管是 CDR 使得抗体与抗体有所不同,但在 CDR 中仅为有限数目的氨基酸位置直接参与抗原结合。CDR 内的这些位置被称为特异性决定残基(SDR)。

[0055] 术语“Fc 区”用于定义免疫球蛋白重链的 C-末端区域,其可以通过完整抗体的木瓜蛋白酶消化来产生。Fc 区可以是天然序列 Fc 区或变体 Fc 区。免疫球蛋白的 Fc 区通常包含两个恒定区, C_{H2} 结构域和 C_{H3} 结构域,并任选包含 C_{H4} 结构域。抗体的 Fc 部分介导几种重要的效应子功能,例如细胞因子诱导、ADCC 吞噬作用、补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体和抗原-抗体复合体的半衰期/清除速率(例如,新生 FcR (FcRn) 在酸性 pH 下在内体中结合 IgG 的 Fc 区,并保护 IgG 免于降解,由此促成 IgG 的长的血清半衰期)。在 Fc 部分中替换氨基酸残基以改变抗体的效应子功能是本领域中已知的(例如参见 Winter 等,美国专利号 5,648,260 和 5,624,821)。

[0056] 抗体作为完整的免疫球蛋白或作为许多良好表征的片段而存在。此类片段包括 Fab 片段, Fab' 片段、Fab₂、F(ab)'₂ 片段、单链 Fv 蛋白(“scFv”)和二硫化物稳定的 Fv 蛋白(“dsFv”),其结合靶抗原。scFv 蛋白为这样的融合蛋白,其中免疫球蛋白的轻链可变区和免疫球蛋白的重链可变区通过接头连接,而在 dsFv 中,将链突变以引入二硫键来稳定链的结合。尽管多种抗体片段以消化完整片段的方式确定,但技术人员将理解此类片段可以化学地或利用重组 DNA 方法重新合成。因此,术语抗体如本文所用还包括通过修饰完整抗体产生的或使用重组 DNA 方法重新合成的抗体片段,包括但不限于 Fab、Fab'、Fab₂、Fab'₂、IgG、IgM、IgA、IgE、scFv、dsFv、dAb、纳米抗体、单抗体、和双价抗体。在多种实施方案中,抗体包括但不限于 Fab₂、IgG、IgM、IgA、IgE 和单链 Fv (scFv) 抗体,其中可变重链和可变轻链连接在一起(直接或经过肽接头)以形成连续多肽。

[0057] 双价抗体为二价抗体,其包含两条多肽链,其中每一多肽链包含由接头连接的 V_H 和 V_L 区,所述接头非常短使得在同一链上的两个区域之间无法配对,因此允许每一区与另一多肽链上的互补区配对(例如,参见 Holliger 等, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48 (1993), 和 Poljak 等, *Structure* 2:1121-23 (1994))。如果双价抗体的两条多肽链是相同的,则由它们的配对产生的双价抗体将具有两个相同的抗原结合位点。具

有不同序列的多肽链可以用于产生具有两个不同抗原结合位点的双价抗体。类似地,三价抗体 (tribodies) 和四价抗体 (tetra-bodies) 是分别包含三条和四条多肽链的抗体,并且分别形成三个和四个抗原结合位点,其可以是相同的或不同的。

[0058] 在某些实施方案中,在本发明的构建体中使用的抗体和抗体片段可以是双特异性的。双特异性抗体或片段可以具有几种构型。例如,双特异性抗体可以类似单一抗体(或抗体片段)但具有两个不同的抗原结合位点(可变区)。在多个实施方案中,双特性抗体可以通过化学技术 (Kranz 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78:5807, 1981)、通过“多瘤 (polydome)”技术 (例如,参见美国专利号 4,474,893)、或通过重组 DNA 技术产生。在某些实施方案中,本发明的双特异性抗体可以具有对至少两种不同表位(其中至少一种为肿瘤相关抗原)具有结合特异性。在多个实施方案中,抗体和片段还可以为异种抗体。异种抗体是连接在一起的两种或多种抗体、或抗体结合片段(例如 Fab),每一抗体或片段具有不同的特异性。

[0059] 如本文所用的术语“单克隆抗体”指获自基本上同质性抗体的群(即包含群的各个抗体除了可能的可以以少量存在的天然发生突变外均是相同的)的抗体。单克隆抗体是高度特异的,针对单一抗原。此外,与多克隆抗体制剂(其一般包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体)不同,每一单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”不应解释为需要通过任何特定的方法产生抗体。

[0060] 如本文所用的术语“嵌合抗体”指这样的抗体,其具有来自一种物种诸如人的框架残基,和来自另一物种诸如特异性结合靶标的抗原的鼠抗体的 CDR(其通常赋予抗原结合)。

[0061] 如本文所用,术语“人抗体”旨在包括具有源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括例如在 CDRs 中并具体在 CDR₃中不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点定向诱变或通过体内体细胞突变引入突变)。然而,如本文所用,术语“人抗体”并不旨在包括这样的抗体,其中来源于另一哺乳动物物种诸如小鼠的种系的 CDR 序列已经连接至人框架序列上。

[0062] 如本文所用的术语“人源化抗体”指包含人源化轻链和人源化重链免疫球蛋白的抗体。人源化抗体结合与提供 CDR 的供体抗体结合的相同抗原。人源化免疫球蛋白或抗体的受体框架可以具有由取自供体框架的氨基酸的有限数目的取代。人源化或其他单克隆抗体可以具有另外的保守的氨基酸取代,其对抗原结合或其他免疫球蛋白功能基本上无影响。人源化的免疫球蛋白可以通过基因工程来构建(例如参见美国专利号 5,585,089)。

[0063] 如本文所用,术语“重组人抗体”旨在包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有的人抗体,诸如使用转染入宿主细胞内的重组表达载体表达的抗体;从重组、组合的人抗体文库分离的抗体;从其为人免疫球蛋白基因转基因的动物分离的抗体;或通过涉及人免疫球蛋白基因序列剪切为其他 DNA 序列的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。在某些实施方案中,然而,将此类重组人抗体进行体外诱变(或者,当使用对人 Ig 序列转基因的动物时,为体内体细胞诱变),并因此该重组抗体的 V_H和 V_L区域的氨基酸序列是这样的序列,尽管来源于人种系 V_H和 V_L序列或与其相关,但其并不天然存在于在体内人抗体种系所有组成成分中。所有此类重组方法对于本领域普通技术人员是熟知的。

[0064] 如果包括抗体的抗原结合蛋白以高结合亲和力如测定为至少 1×10^{-6} M、或至少 1

$\times 10^{-7}$ M、或至少 1×10^{-8} M、或至少 1×10^{-9} M、或至少 1×10^{-10} M、或至少 1×10^{-11} M 的离解常数(Kd, 或对应的 Kb, 如下文定义的) 值结合抗原, 则它“特异性地结合”抗原。特异性结合目的人抗原的抗原结合蛋白还可以能够以相同或不同的亲和力结合来自其他物种的相同的目的抗原。

[0065] “表位”是由抗原结合蛋白(例如由抗体)结合的分子的部分。表位可以包含分子的非连续的部分(例如, 在多肽中, 在多肽的一级序列中不连续的但在所述多肽的三级或四级结构的情况下彼此足够靠近使得被抗原结合蛋白所结合的氨基酸残基)。

[0066] 术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”可以在全文中互换使用并且包括 DNA 分子(例如, cDNA 或基因组 DNA)、RNA 分子(例如, mRNA)、使用核苷酸类似物(例如, 肽核酸和非天然存在的核苷酸类似物)产生的 DNA 或 RNA 的类似物、及其杂化物。核酸分子可以为单链的或双链的。在一个实施方案中, 本发明的核酸分子包含编码本发明的抗体、或片段、衍生物、突变蛋白、或其变体的连续的可读框。

[0067] 如果两条单链多核苷酸的序列可以以反平行方向排列从而使得一条多核苷酸中的每一核苷酸与另一多核苷酸中的其互补核苷酸相对而不引入缺口并且在任一序列的 5' 或 3' 端无未配对的核苷酸, 则它们是“互补的”。如果两条多核苷酸可以在中等严格条件下彼此杂交, 则多核苷酸与另一条多核苷酸是“互补的”。因此, 多核苷酸可以与另一多核苷酸是互补的, 而不是其补体。

[0068] “载体”是可以用于将与其连接的另一核酸引入细胞中的核酸。一种类型的载体是“质粒”, 其指另外的核酸区段可以连入其中的线性或环状双链的 DNA 分子。另一类型的载体是病毒载体(例如, 复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒), 其中另外的 DNA 区段可以引入病毒基因组中。某些载体可以在它们导入其中的宿主细胞(例如包含细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)中自主复制。其他载体(例如, 非附加型哺乳动物载体)在引入宿主细胞中时整合入宿主细胞的基因组中, 并由此随宿主基因组进行复制。“表达载体”是可以指导所选的多核苷酸表达的一类载体。

[0069] 如果调节序列影响核苷酸序列的表达(例如, 表达的水平、时机或位置), 则所述和核苷酸为“可操作地连接”至该调节序列。“调节序列”为影响与其可操作地连接的核酸的表达(例如, 表达的水平、时机或位置)的核酸。调节序列例如可以对被调节的核酸直接或经过一种或多种其他分子的作用(例如, 结合调节序列和 / 或该核酸的多肽)施加其作用。调节序列的实例包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如, 多腺苷酸化信号)。调节序列的进一步的实例描述于例如 Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. 和 Baron 等, 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06。

[0070] “宿主细胞”是可以用于表达核酸例如本发明的核酸的细胞。宿主细胞可以是原核生物, 例如大肠杆菌, 或者它可以是真核生物, 例如, 单细胞的真核生物(例如酵母或其他真菌)、植物细胞(例如, 烟草或番茄植物细胞)、动物细胞(例如, 人细胞、猴细胞、仓鼠细胞、大鼠细胞、小鼠细胞、或昆虫细胞)或杂交瘤。通常, 宿主细胞为培养的细胞, 其可以用编码多肽的核酸转化或转染, 其可以随后在宿主细胞中表达。可以使用短语“重组宿主细胞”来表示已用待表达的核酸转化或转染的宿主细胞。宿主细胞还可以是这样的细胞, 其包含核酸, 但不在期望的水平上表达它, 除非向宿主细胞中引入调节序列使得它变为与该核酸是可操

作地连接的。应理解术语宿主细胞不仅指具体的本发明的细胞还指此类细胞的后代或潜在后代。因为由于例如突变或环境影响,某些修饰可以在继代中发生,所以此类后代实际上可能与母细胞不相同,但仍包括在如本文所用的术语的范围内。

[0071] 肿瘤相关抗原和抗体

如本文所用的术语“抗原”指化合物、组合物、或物质,其可以刺激动物中抗体产生或 T 细胞应答,包括注射入或吸收入动物中的组合物。抗原与特异性体液或细胞免疫的产物(包括由异源免疫原诱导的那些)反应。术语“抗原”包括所有相关的抗原表位。表位可以由连续的氨基酸或由于蛋白的三级折叠而紧靠的非连续氨基酸形成。由连续的氨基酸形成的表位通常对变性溶剂保持暴露,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丧失。表位通常包括至少三个、至少五个、或至少八至十个处于独特的空间构象的氨基酸。测定表位的空间构型的方法包括例如 x 射线晶体学和二维核磁共振。

[0072] 至于“靶向的抗原”,事实上任何抗原可以被本发明的分子靶向。某些靶向的抗原包括与特征在于细胞的过度增殖的病理学(即,过度增生性病症)相关的那些。示例性的过度增生性病症包括但不限于银屑病、中性白细胞增多症、红细胞增多症、血小板增多和癌症。表征为癌症的过度增生性病症包括但不限于实体瘤、乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、消化道癌、尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌及它们的远端转移。这些病症还包括淋巴瘤、肉瘤、多发性骨髓瘤和白血病。乳腺癌的实例包括但不限于浸润性导管癌、浸润性小叶癌、原位导管癌和原位小叶癌。呼吸道癌的实例包括但不限于小细胞和非小细胞肺癌、以及支气管腺瘤和胸膜肺母细胞瘤。脑癌的实例包括但不限于脑干和下丘脑(hypophthalmic)胶质瘤、小脑和大脑星形细胞瘤、髓母细胞瘤、室管膜瘤以及神经外胚层和松果体瘤。男性生殖器官肿瘤包括但不限于前列腺和睾丸癌。女性生殖器官肿瘤包括但不限于子宫内膜癌、宫颈癌、卵巢癌、阴道癌、和外阴癌、以及子宫肉瘤。消化道肿瘤包括但不限于肛门癌、结肠癌、结肠直肠癌、食管癌、胆囊癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌、小肠癌、和唾液腺癌。尿道肿瘤包括但不限于膀胱癌、阴茎癌、肾癌、肾盂癌、输尿管癌、和尿道癌。眼癌包括但不限于眼内黑素瘤和视网膜母细胞瘤。肝癌的实例包括但不限于肝细胞癌(具有或不具有纤维板层变体的肝细胞癌)、胆管癌(肝内胆管癌)、和混合型肝细胞胆管癌。皮肤癌包括但不限于鳞状细胞癌、卡波济氏肉瘤、恶性黑素瘤、Merkel 细胞皮肤癌和非黑素瘤皮肤癌。淋巴瘤包括但不限于 AIDS 相关淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、霍奇金病、和中枢神经系统的淋巴瘤。肉瘤包括但不限于软组织肉瘤、骨肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、淋巴瘤肉瘤、和横纹肌肉瘤。白血病包括但不限于急性髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病和毛细胞白血病。

[0073] 在本发明的多个实施方案中,靶向部分是结合癌症标志物例如肿瘤相关抗原(TAA)的部分。许多种癌症标志物是本领域技术人员已知的。癌症标志物对于癌细胞需要不仅是独特的,而且还是有效的,其中癌症标志物的表达在癌细胞中(相比于正常健康细胞)升高或者其中癌症标志物不以相当的水平存在于周围组织中(尤其是其中融合分子局部递送)。在多种实施方案中,癌症标志物包括:Her2/neu (Lewis 等, Semin. Cancer Biol., 6(6):321-327, 1995)、Her3、EGF、Her4、B7 家族成员(Collins 等, Genome Biol., 6:223.1-223.7, 2005)、TNF 超家族成员(参见例如“Therapeutic Targets of the TNF Superfamily”, 由 Iqbal S. Grewal 编辑, Landes Bioscience/

Springer Science+Business Media, LLC dual imprint / Springer series:Advances in Experimental Medicine and Biology, 2009)、CD1、CD2、CD3、CD5、CD7、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20 (Cragg 等, Curr. Dir. Autoimmun., 8:140-174, 2005)、CD21、CD23、CD25、CD33 (Nakase 等, Am J Clin Pathol., 105(6):761-768, 1996)、CD34、CD38、CD46、CD55、CD59、CD123、CD138 (O'Connell, 等, Am. J. Clin. Pathol., 121(2):254-263, 2004)、CD200、CD276 (Hofmeyer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 105(30):10277-10278, 2008)、5E10、CEA、内质蛋白 (美国专利申请号 US20120009194 (Ferrone 等))、HLA-DR、HM 1.24、HMB 45、Ia、Leu-M1、MUC1、PMSA、EGFR、鞘糖脂 GD2、SLAM 家族成员、gp100、酪氨酸酶、MAGE、TAG-72、SE10、磷脂酰丝氨酸抗原等。本发明的基因工程融合分子可以结合一种抗原或多种癌症标志物。

[0074] 针对这些和其他癌症标志物的抗体是本领域技术人员已知的并且可以商购获得或容易地产生。例如,抗体可以通过用靶抗原或其免疫原性片段免疫动物并在该动物中产生抗体来产生,并且单链抗体可以根据本领域技术人员熟知的方法使用噬菌体展示技术来产生。考虑用作本发明的融合分子中的靶向部分的抗体包括针对特定肿瘤相关抗原的消耗性抗体 (depleting antibodies),包括但不限于抗 -HER2/neu、抗 -HER3、抗 -HER4、抗 -CD20、抗 -CD19、抗 -CD22、抗 -CD33、抗 -CXCR3、抗 -CXCR5、抗 -CCR3、抗 -CCR4、抗 -CCR9、抗 -CRTH2、抗 -PMCH、抗 -CD4、抗 -CD25、抗 -CD200、抗 -CD138、抗 -CD276 和抗 -内质蛋白抗体。所述此类肿瘤和炎症细胞特异性的、消耗性抗体已充分描述于文献中。

[0075] 在多个实施方案中,抗体是抗 -Her2/neu 抗体,其包含具有如 SEQ ID NO: 1 中描述的氨基酸序列的重链:

```
MECSWVMLFLLSVTAGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNID
TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL
QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)
```

其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽;并且轻链具有如 SEQ ID NO: 2 中描述的氨基酸序列:

```
MEWSCVMLFLLSVTAGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNT
AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPE
DFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFEPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)
```

其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽。

[0076] 在多个实施方案中,抗体是抗 -CD20 抗体,其包含具有如 SEQ ID NO: 3 中描述的氨基酸序列的重链:

MYLGLNCVIIIFLLKGVQSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTS
YNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYM
QLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽；并且轻链具有如 SEQ ID NO: 4 中描述的氨基酸序列：

MKLPVRLLVLMFWIPASSSQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSY
IHWFQQKPGSSPKPWYATSNLASGVVPRFSGSGSGTSYSLTISRVEAED
AATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 4)

其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽。

[0077] 在多个实施方案中，抗体是抗-CD138 抗体，其包含具有如 SEQ ID NO: 5 中描述的氨基酸序列的重链：

MGWSYIILFLVATATDVHSQVQLQQSGSELMMPGASVKISCKATGYTFSN
YWIEWVKQRPBGHGLEWIGEILPGTGRTIYNEKFKGKATFTADISSNTVQM
QLSSLTSEDSAVYYCARRDYGNFYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5)

其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽；并且轻链具有如 SEQ ID NO: 6 中描述的氨基酸序列：

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCSASQG
INNYLNWYQQKPDGTVELLIYYTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNL
EPEDIGTYCQQYSKLPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVYCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 6)

其中氨基酸残基 1-22 代表信号肽。

[0078] 在多个实施方案中，抗体是抗-内质蛋白抗体，其包含具有如 SEQ ID NO: 7 中描述的氨基酸序列的重链：

MYLGLNCVIVFLLKGVQSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS
YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQGRVTITRDTSASTAYM
ELSSLRSEDNAVYYCARAHFDYWGGTLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 7)

其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽 ;并且轻链具有如 SEQ ID NO: 8 中描述的氨基酸序列 :

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIELTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSIS
SYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
EDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 8)

其中氨基酸残基 1-20 代表信号肽。

[0079] 在多个实施方案中,抗体是抗 -CD33 抗体,其包含具有如 SEQ ID NO: 9 中描述的氨基酸序列的重链 :

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITD
SNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYM
ELSSLRSEDNAFYVCVNGNPWLAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)

其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽 ;并且轻链具有如 SEQ ID NO: 10 中描述的氨基酸序列 :

MSVPTQVLGLLLLWLTDARCDIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESLD
NYGIRFLTWFQQKPGKAPKLLMYAASNQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
SLQPDDFATYYCQQTKVEPWSFGQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 10)

其中氨基酸残基 1-20 代表信号肽。

[0080] 在多个实施方案中,抗体是抗 -CD276 抗体,其包含具有如 SEQ ID NO: 11 中描述的氨基酸序列的重链可变区 :

MNFGFRLIFLALILKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCEASRFTFS
YAMSWVRQTPEKRLEWVAAISGGGRYTYYPDSMKGRFTISRDNANKFLYL
QMSSLRSEDTAMYYCARHYDGYLDYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPG
SL (SEQ ID NO: 11)

其中氨基酸残基 1-19 代表信号肽；并且轻链具有如 SEQ ID NO: 12 中描述的氨基酸序列：

MKSQSQVFVFLWLSGVDGDIVMTQFAGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDR
VSITCKASQDVSTTVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSG
TDFITFISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPPTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIF
PPSSKLG (SEQ ID NO: 12)

其中氨基酸残基 1-20 代表信号肽。

[0081] 干扰素和干扰素突变体

术语“干扰素”指全长干扰素或干扰素片段(截短的干扰素)或干扰素突变体(截短的干扰素和干扰素突变体在本文中共同称为‘修饰的干扰素’),其基本上保留全长野生型干扰素的生物活性(例如,保留至少 50%)。干扰素包括 I 型干扰素(例如干扰素- α 和干扰素- β)以及 II 型干扰素(例如干扰素- γ)。干扰素可以来自基本上任何哺乳动物物种。美国专利号 6,610,830 (Goeddel 等)描述了多种用于治疗病毒和肿瘤学疾病的成熟人白细胞干扰素,例如干扰素- α 。

[0082] 在本发明的多个实施方案中,干扰素突变体包含一个或多个氨基酸取代、插入、和/或缺失。鉴定此类修饰的干扰素分子的方法对于本领域技术人员是常规的。在一种示例性方法中,产生截短的和/或突变的 IFN- α 的文库并筛选 IFN- α 活性。产生多肽变体文库的方法是本领域技术人员熟知的。因此,例如,易错 PCR 可以用于产生突变体和/或截短的 IFN- α 的文库(例如参见美国专利号 6,365,408)。产生的文库成员可以随后根据本领域技术人员已知的标准方法进行筛选。因此,例如,可以通过测量针对特定测试病毒的抗病毒活性来测定 IFN- α 活性。用于测定 IFN- α 活性的试剂盒是可商购的(参见例如 Neutekbio, Ireland 的 ILITE™ α β 试剂盒)。

[0083] 还考虑使用化学修饰的干扰素。例如,在某些实施方案中,化学修饰干扰素来增加血清半衰期。因此,例如,(2-硫代-9-苄基甲氧基羰基) $_7$ -干扰素- α 2 经历时间依赖性自发水解,产生活性干扰素 (Shechter 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 98(3):1212-1217, 2001)。其他修饰包括例如 N-末端修饰,包括但不限于添加 PEG、保护基团等(参见例如美国专利号 5,824,784)。

[0084] 在多个实施方案中,还考虑使用截短的干扰素。例如,具有前 15 个氨基末端氨基酸残基和/或最后 10-13 个羧基末端氨基酸残基缺失的人 INF α 已显示出展示与亲本分子实际上相同的活性(参见例如 Ackerman (1984) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:1045-1047)。因此,考虑使用缺失了 1、2、3、高至 13 个羧基末端氨基酸残基和/或缺失了 1、2、3、高至 15 个氨基末端氨基酸残基的 IFN- α 。还证实活性存在于 huIFN- α 片段 HuIFN- α (1-110) 中(同样 (*Id.*))。因此,考虑具有残基 110 后的缺失和/或具有 1、2、3、高至 15 个氨基末端氨基酸残基缺失的羧基截短的 IFN。

[0085] 本文考虑使用的单点突变包括但不限于一系列主要的单点突变体(参见下文表

1),其特别地设计以增加 IFN- α 和 IFN- α R 之间的亲和力和其他预期通过基于发表的噬菌体展示研究和 NMR 结构特定地建模改变来降低 IFN- α 和 IFN- α R 之间的亲和力 (Kalie E 等, J. Biol.Chem., 282:11602, 2007; Gomez D 和 Reich NC, J. Immunol., 170:5373, 2003; Quadts-Akabayov SR 等, Protein Science, 15:2656, 2006; Akabayov SR 等, Biochemistry, 49:687, 2010)。策略基于单点突变可以改变结合亲和力但将不会完全敲掉 IFN- α 的活性这一信念,因此仍保留抗增殖性特性,尽管以更高的浓度,即目标为相比于包含野生型干扰素 - α 的融合分子改进包含干扰素 - α 突变体的融合分子的治疗指数。如本文描述且如描述于表 1 中,单突变将通过在全长野生型干扰素序列内的特定氨基酸位置处的具体氨基酸取代来鉴定。例如,包含取代在氨基酸 57 处的全长野生型组氨酸的酪氨酸的突变鉴定为 H57Y。表 1 中描述的突变体从中衍生的野生型 IFN- α 2 氨基酸序列在下文提供为 SEQ ID NO: 13:

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKA
ETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQQLNDLEACVI
QGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRS
FSLSTNLQESLRSKE (SEQ ID NO: 13)

[0086] 表 1

某些提出的 IFN- α 突变体分子的列表。

	IFN- α 序列突变	选择标准
M1	H57Y, E58N, Q61S	选择的 IFN- α 残基的噬菌体展示优化以增加位点 1 的 IFN- α -IFN- α R1 结合亲和力
M2	H57S, E58S, Q61S	基于预测产生 IFN- α 和 IFN- α R1 之间的结合接触丧失的三联体突变,降低在位点 1 的 IFN- α -IFN- α R1 结合亲和力
M3	H57A	类似于 M2 但仅为单点,降低在位点 1 的 IFN- α -IFN- α R1 结合亲和力
M4	E58A	类似于 M2 但仅为单点,降低在位点 1 的 IFN- α -IFN- α R1 结合亲和力
M5	Q61A	类似于 M2 但仅为单点,降低在位点 1 的 IFN- α -IFN- α R1 结合亲和力
M6	R149A	基于结合接触的丧失,降低在位点 2 的 IFN- α -IFN- α R1 结合亲和力
M7	R162A	基于结合接触的丧失,降低在位点 2 的 IFN- α -IFN- α R1 结合亲和力
M8	R149A, R162A	基于结合接触的丧失,降低在位点 2 的 IFN- α -IFN- α R1 结合亲和力
M9	L30A	基于结合接触的丧失,降低在位点 2 的 IFN- α -IFN- α R1 结合亲和力
M10	D35E	基于结构中最小改变,改变在位点 2 的 IFN- α -IFN- α R1 结合
M11	E165D	基于结构中最小改变,改变在位点 2 的 IFN- α -IFN- α R1 结合
M12	L26A	基于结构中最小改变,改变在位点 2 的 IFN- α -IFN- α R1 结合
M13	F27A	基于结构中最小改变,改变在位点 2 的 IFN- α -IFN- α R1 结合
M14	L153A	基于结构中最小改变,改变在位点 2 的 IFN- α -IFN- α R1 结合
M15	A145V	基于结构中最小改变,改变在位点 2 的 IFN- α -IFN- α R1 结合

[0087] 在本发明的多个实施方案中,抗体重链或轻链的 N- 或 C- 末端将用几种考虑的干扰素 α 突变体之一进行遗传构建。融合分子可以具有如描述于例如图 1-3 中的任何的一般构建体。

[0088] 一般说来,本发明的基因工程融合分子的抗体和干扰素突变体分子可以以任何顺序连接在一起。因此,例如,干扰素突变体分子可以连接到抗体的氨基或羧基末端;或相反地,干扰素突变体分子可以连接至抗体的内部位置,只要连接位点不影响抗体与靶抗原的结合。可选地,抗体可以连接至干扰素突变体分子的氨基或羧基末端;或者连接至干扰素突变体分子的内部区域。

[0089] 本发明涉及基因工程融合分子,其包含经基因融合或化学偶联形成的连接至至少一种干扰素突变体的至少一种抗体。“连接的”意指第一序列和第二序列连接使得第二序

列能够通过第一序列转运至靶细胞中,即融合分子(其中抗体通过基因表达编码这些蛋白的 DNA 分子经它们的多肽骨架连接至干扰素突变体)、直接合成的蛋白、和其中预先形成的序列通过交联剂连接的偶联的蛋白。许多用于连接多种化合物(包括放射性核素金属螯合物、毒素和药物)至蛋白诸如抗体的程序和接头分子是已知的。例如,参见美国专利号 4,671,958;4,659,839;4,414,148;4,699,784;4,680,338;4,569,789;和 4,589,071。

[0090] 在某些实施方案中,抗体和干扰素突变体直接彼此连接并使用重组 DNA 方法合成,例如产生编码抗体-干扰素突变体融合蛋白的 DNA 序列,将该 DNA 置于表达盒中在特定启动子的控制下,在宿主中表达融合蛋白,并分离表达的融合蛋白。在本发明的一个实施方案中,将编码合适的抗体框架的核酸序列任选克隆并连接入合适的载体(例如,用于例如原核生物或真核生物的表达载体)中。此外,将编码合适的干扰素突变体的核酸序列任选以合适的方向和位置克隆入同一载体中,使得从该载体的表达产生抗体-干扰素突变体融合分子。一些任选的实施方案还需要表达后修饰,例如抗体亚基的装配等。上述(和类似的)操作的技术和领域是本领域技术人员熟知的。相关介绍例如见于 Sambrook 等, *Molecular Cloning—A Laboratory Manual* (第2版), 第1-3卷, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 和 *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel 等, 编辑, Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. 和 John Wiley & Sons, Inc. 之间的合资企业(在 1999 年增刊)。

[0091] 在某些实施方案中,两个分子可以通过由一个或多个氨基酸组成的肽间隔序列(“接头”)所分隔。通常,肽接头除了连接蛋白或保持它们之间的一些最小距离或其他空间关系外,将不具有特定的生物活性。在某些实施方案中,然而,可以选择间隔序列的构成的氨基酸以影响分子的一些特性诸如折叠、净电荷、或疏水性。合适的接头是本领域技术人员熟知的且包括但不限于直链或支链碳接头、杂环碳接头、或肽接头。在某些实施方案中,接头可以经它们的侧基(例如,经二硫键或半胱氨酸)连接至抗体的构成氨基酸和/或干扰素。在某些实施方案中,接头连接至抗体和/或干扰素的末端氨基酸的 α 碳氨基和/或羧基。在某些实施方案中,接头是抗蛋白水解的接头,诸如描述于美国专利申请公开号 20100172868 (Morrison 等)中的那些。在某些实施方案中,抗蛋白水解的接头是 **SGGGGS (SEQ ID NO: 14)**或 **AEEAAKEAAAKAGS (SEQ ID NO: 15)**。

[0092] 在某些可选的实施方案中,抗体化学缀合至干扰素突变体分子。化学缀合分子的方法是技术人员熟知的。缀合两个分子的程序根据试剂的化学结构而不同。多肽通常含有多种官能团;例如羧酸(COOH)或游离胺($-NH_2$)基,其可用于与在另一肽上的、或将分子与其连接的接头上合适官能团的反应。可选地,抗体和/或干扰素突变体可以衍生以暴露或连接另外的反应性官能团。衍生可以涉及连接许多接头分子的任何种,诸如可获自 Pierce Chemical Company, Rockford Ill 的那些。

[0093] 适合于复制并支持融合蛋白的重组表达的细胞是本领域中熟知的。此类细胞可以合适地转染或转导有特定的表达载体,并且含有大量载体的细胞可以生长用于接种大规模发酵罐,来获得用于临床应用的足量蛋白。此类细胞可以包括原核微生物,诸如大肠杆菌;多种真核细胞,诸如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、NS0、293;HEK 酵母;昆虫细胞;杂交瘤;人细胞系;和转基因动物和转基因植物等。在这些系统中表达外源基因的标准技术是本领域中已知的。重组蛋白基因通常可操作地连接至每一宿主的合适的表达控制序列上。对于大肠

杆菌,这包括启动子,诸如 T7、trp、或 λ 启动子、核糖体结合位点和优选的转录终止信号。对于真核细胞,控制序列将包括来源于免疫球蛋白基因、SV40、巨细胞病毒等的启动子和优选增强子,和多腺苷酸化序列,并可以包括剪接供体和受体序列。

[0094] 一旦表达,则重组融合蛋白可以根据本领域标准程序进行纯化,包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、凝胶电泳等。对于药物用途,优选至少约 90-95% 同质性的基本上纯的组合物,并且 98-99% 或更高同质性是最优选的。一旦纯化(部分地或至期望的同质性的),则多肽可以随后治疗性使用。

[0095] 在某些实施方案中,表达的融合蛋白可以具有基本上不同于构成多肽的天然构象的构象,并且可能因此必须变性并还原多肽并随后引起多肽重折叠为构象。还原并变性蛋白和诱导重折叠的方法是本领域技术人员熟知的(参见例如,Debinski 等, J. Biol. Chem., 268:14065-14070, 1993)。

[0096] 本发明的药物组合物包含本发明的基因工程融合分子和药学上可接受的载体。如本文所用,“药学上可接受的载体”意指任何和所有的溶剂、分散介质、涂料、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等,其是生理学上相容的。药学上可接受的载体的一些实例是水、盐水、磷酸缓冲盐溶液、葡萄糖、甘油、乙醇等,以及其组合。在许多情况下,将优选在组合物中包括等渗剂,例如蔗糖、多元醇诸如甘露醇、山梨醇、或氯化钠。药学上可接受的物质的另外的实例为湿润剂或少量的辅助物质诸如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其提高抗体的储存期或有效性。除了与本发明的基因工程融合分子不相容的任何常规赋形剂、载体或媒介物的范围,考虑它在本发明的药物制剂中的用途。

[0097] 如本文所用,术语“施用”指向生理系统(例如,个体或体内、体外、或先体外后体内的细胞、组织和器官)给予药物、前药或其他药剂、或治疗性处理(例如放射疗法)的行为。本发明的组合可以以多种形式,例如,液体、半固体和固体剂型,诸如液体溶液(例如,可注射的和可输注(infusible)的溶液)、分散剂或悬浮剂、片剂、丸剂、粉剂、脂质体和栓剂。将本发明的药物组合物配制为与其旨在的施用途径和治疗应用相容。施用本发明的药物组合物的方法为经能够向肿瘤细胞递送所述组合物的任何途径,并且包括但不限于口服、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、肿瘤内、吸入、皮下等。如本领域技术人员将理解的,施用途径和/或模式将根据期望的结果而不同。典型的药物组合物以可注射的或可输注的溶液的形式,诸如与用于人的被动免疫的那些类似的组合物。在一个实施方案中,组合物通过静脉内输注或注射来施用。在另一个实施方案中,组合物通过肌肉内或皮下注射来施用。

[0098] 本发明的融合分子和包含它们的药物组合物可以与一种或多种其他的治疗药剂、诊断药剂或预防药剂组合施用。另外的治疗药剂包括烷化剂、抗代谢物、免疫调节剂、和其他抗肿瘤剂(anti-neoplastic)、抗癌剂(anti-tumor)、抗血管生成剂或化疗剂。此类另外的药剂可以包括在同一组合物中或单独地施用。

[0099] 治疗药物组合物通常必须是无菌的且在制造和储存的条件下是稳定的。无菌的可注射溶液可以通过将融合分子以需要的量掺入具有一种上文列举的成分或其组合的合适的溶剂中(如需要,随后为过滤灭菌)来制备。通常,分散剂通过将活性化合物掺入含有基础分散介质的无菌媒介物中来制备,并需要上文列出的那些中的其他成分。在用于制备无菌的可注射溶液的无菌粉剂的情况下,制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其从其之前无菌过滤的溶液中产生活性成分加上任何另外的期望的成分的粉末。例如,可以通过使用涂料诸

如卵磷脂,通过在分散剂的情况下维持期望的颗粒大小和通过使用表面活性剂,维持溶液的适当的流动性。可注射的组合物延长的吸收可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂诸如单硬脂酸盐和明胶来达到。

[0100] 在某些实施方案中,药物组合物活性化合物可以与载体来制备,所述载体将保护组合物免于快速释放,诸如受控释放的组合物,包括植入物、透皮贴剂和微囊化的递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,诸如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、和聚乳酸。许多用于此类组合物的制备的方法是获专利的或本领域技术人员通常已知的。参见例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, 编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0101] 在某些实施方案中,本发明的融合分子可以口服施用,例如,连同惰性稀释剂或可同化的可食用载体。化合物(如需要,及其他成分)还可以包封在硬壳或软壳明胶胶囊中,压缩入片剂中,或直接掺入个体的饮食中。对于口服治疗施用,融合分子可以掺有赋形剂并以可吸收的片剂、口含片(buccal tablet)、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮剂、糖浆剂、干胶片(wafer)的形式使用。为了通过除肠胃外施用的方式施用本发明的化合物,可能需要用防止它失活的材料包被所述化合物或将所述化合物与其共同施用。

[0102] 另外的活性化合物也可以掺入到本发明的药物组合物中。在某些实施方案中,本发明的融合分子与一种或多种另外的治疗药剂共同配制和/或与其共同施用。这些药剂包括但不限于结合其他靶标的抗体、抗肿瘤剂、抗癌剂、化疗剂、和/或本领域中已知的可以增强针对肿瘤细胞的免疫应答的其他药剂,例如 IFN- β 1、IL-2、IL-8、IL-12、IL-15、IL-18、IL-23、IFN- γ 和 GM-CSF。此类组合疗法可能需要更低剂量的融合分子以及共同施用的药剂,因而避免可能的毒性或与多种单一疗法相关的并发症。

[0103] 本发明的药物组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的融合分子。如本文所用,短语“有效量”指足以提供足够高的浓度以对其受体赋予有益作用的剂量。对任何特定个体的具体的治疗有效剂量水平将依赖于多种因素,包括待治疗的病症、病症的严重程度、具体化合物的活性、施用途径、化合物的清除速率、治疗的持续时间、与所述化合物组合使用的或同时存在的药物、个体的年龄、体重、性别、饮食、和一般健康、以及医疗领域和科学中众所周知的类似因素。测定“治疗有效量”中考虑的多种一般性考量是本领域技术人员已知的并且例如描述于 Gilman 等, 编辑, Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 第 8 版, Pergamon Press, 1990; 和 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990。“预防有效量”指在剂量上和对于需要的时间周期而言,有效地实现期望的预防结果的量。通常,由于预防剂量在疾病之前或在疾病的早期阶段中用于个体,因此预防有效量会少于治疗有效量。

[0104] 治疗有效剂量可以通过测定 IC_{50} 最初从细胞培养测定中估计。可以随后在动物模型中制定剂量来实现包括在细胞培养物中测定的 IC_{50} 的循环血浆浓度范围。此类信息可以用于更准确地测定人中的可用剂量。血浆中的水平例如可以通过 HPLC 测定。精确的组合物、施用途径和剂量可以由各个医师考虑患者病况来选择。

[0105] 给药方案可以进行调整以提供最佳的期望应答(例如,治疗性或预防性应答)。例如,单次大剂量(bolus)可以施用,几次分开的剂量(多次或重复或维持)可以随时间施

用,并且剂量可以随治疗情形的紧急情况所示而按比例降低或增加。为了容易施用和剂量的一致性,尤其有利的是以剂量单位形式配制肠胃外组合物。如本文所用的剂量单位形式指适合作为用于待治疗的哺乳动物个体的单一剂量的物质上分离的单位 (physically discrete units);每一单位含有经计算产生期望的治疗效果的预定量的活性化合物和必需的药物载体。本发明的剂量单位形式的规格将主要受抗体的独特特征和待实现的具体治疗性或预防性作用的控制。

[0106] 本发明的抗体或抗体部分的治疗或预防有效量的示例性、非限制性范围为 0.025–50 mg/kg、更优选 0.1–50 mg/kg、更优选 0.1–25、0.1–10 或 0.1–3 mg/kg。应该注意剂量值可以随待减轻的病况的类型和严重程度而不同。进一步应理解对于任何特定个体,具体的给药方案应随时间根据个体需要和施用组合物或指导组合物的施用的人的专业判断而有所调整,并且本文中描述的剂量范围仅为示例性的且并不旨在限制要求保护的组合物的范围或实践。

[0107] 本发明的另一方面涉及治疗患者中的癌细胞的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量(作为单一疗法或在联合治疗方案中)的在药学上可接受的载体中的本发明的基因工程融合分子,其中此类施用促进癌细胞的生长抑制和/或增殖。特别地,本发明的基因工程融合分子用于治疗表征为癌症的病症。此类病症包括但不限于实体瘤,诸如乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、消化道癌、尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌及它们的远端转移、淋巴瘤、肉瘤、多发性骨髓瘤和白血病。乳腺癌的实例包括但不限于浸润性导管癌、浸润性小叶癌、原位导管癌和原位小叶癌。呼吸道癌的实例包括但不限于小细胞和非小细胞肺癌、以及支气管腺瘤和胸膜肺母细胞瘤。脑癌的实例包括但不限于脑干和下丘脑 (hypophthalmic) 胶质瘤、小脑和大脑星形细胞瘤、髓母细胞瘤、室管膜瘤以及神经外胚层和松果体瘤。男性生殖器官肿瘤包括但不限于前列腺和睾丸癌。女性生殖器官肿瘤包括但不限于子宫内膜癌、宫颈癌、卵巢癌、阴道癌、和外阴癌、以及子宫肉瘤。消化道肿瘤包括但不限于肛门癌、结肠癌、结肠直肠癌、食管癌、胆囊癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌、小肠癌、和唾液腺癌。尿道肿瘤包括但不限于膀胱癌、阴茎癌、肾癌、肾盂癌、输尿管癌、和尿道癌。眼癌包括但不限于眼内黑素瘤和视网膜母细胞瘤。肝癌的实例包括但不限于肝细胞癌(具有或不具有纤维板层变体的肝细胞癌)、胆管癌(肝内胆管癌)、和混合型肝细胞胆管癌。皮肤癌包括但不限于鳞状细胞癌、卡波济氏肉瘤、恶性黑素瘤、Merkel 细胞皮肤癌和非黑素瘤皮肤癌。头颈癌包括但不限于鼻咽癌、和唇及口腔癌。淋巴瘤包括但不限于 AIDS 相关淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、霍奇金病、和中枢神经系统的淋巴瘤。肉瘤包括但不限于软组织肉瘤、骨肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、淋巴肉瘤、和横纹肌肉瘤。白血病包括但不限于急性髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病和毛细胞白血病。

[0108] 本发明还涉及包含一定量的本发明的融合分子并组合有一定量的化疗剂的用于抑制哺乳动物中异常细胞生长的药物组合物,其中融合分子的量和化疗剂的量一同对抑制异常细胞生长是有效的。许多化疗剂在本领域目前是已知的。化疗剂可以是蛋白或非蛋白剂,诸如小分子药物、抗体、肽、蛋白和免疫调节剂。在一些实施方案中,化疗剂选自有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢物、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物应答调节剂、抗激素例如抗雄激素、和抗血管发生剂。本领域

域技术人员可以容易地鉴定化疗剂(例如,参见 Slapak 和 Kufe, Principles of Cancer Therapy, Harrison's Principles of Internal Medicine 中 第 86 章, 第 14 版; Perry 等, Chemotherapy, Ch. 17 in Abeloff, Clinical Oncology 2. sup.nd 编辑, .COPYRGT. 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer L, Berkery R (编辑):Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 第2版 St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer D S, Knobf M F, Durivage H J (编辑):The Cancer Chemotherapy Handbook, 第4版 St. Louis, Mosby-Year Book, 1993)。

[0109] 提供以下实施例以进一步详细描述本发明。

[0110] 实施例 1

本实施例描述包含肿瘤相关抗原抗体和 IFN- α 突变体分子(或野生型 IFN- α 分子)的基因工程融合分子的制备。

[0111] 本发明的融合分子使用本领域普通技术人员熟知且理解的方法和技术制备并通常可如下描述:抗体的重链使用肽接头用 IFN- α 分子在羧基末端重组工程化,例如, **SGGGGS (SEQ ID NO: 14)**或 **AEEAAKEAAAKAGS (SEQ ID NO: 15)**。在验证融合蛋白载体具有正确的核苷酸序列后,将它连同抗体轻链载体一起转染入 CHO 细胞中。转染子通过 ELISA 来筛选完整融合分子的产生。将产生最高信号的克隆扩大并且随后的亚克隆生长于滚瓶中。收集条件培养基,浓缩,并使用单蛋白 A 亲和层析步骤或合适的可选层析方法纯化目的蛋白。将终产物配制于期望的缓冲液中并为期望的浓度(通过 UV 吸收确定蛋白浓度)。终产物的纯度通过 SDS-PAGE 在还原和非还原条件下测定。使用蛋白质印迹分析来确定分子的预期大小。

[0112] 在本实施例中,使用包含具有如 SEQ ID NO: 3 中描述的氨基酸序列的重链和具有如 SEQ ID NO: 4 中描述的氨基酸序列的轻链的抗-CD20 抗体来制备包含野生型 IFN- α (SEQ ID NO: 13)或在表 1 中鉴定为 M1-M15 的 15 种 IFN- α 突变体分子之一的 Ab-IFN- α 融合分子。分子最初如图 1 中所示构建,具有经肽接头 **SGGGGS (SEQ ID NO: 14)**连接至抗体的重链的 IFN- α 突变体分子(或野生型 IFN- α)。

[0113] 实施例 2

本实施例描述了在多个体外功能测定中以不同剂量测试实施例 1 的抗-CD20Ab-IFN- α 突变体融合分子,来鉴定具有最佳治疗指数的抗-CD20Ab-IFN- α 突变体融合分子。下文描述的测定用于分析抗-CD20Ab-IFN- α 突变体融合分子。

[0114] A. 融合分子结合 IFN- α R 复合体的能力的评价

将使用本领域中之前描述的多种细胞系和方法来测定用于评估融合分子与 IFN- α R 复合体的结合的最佳方法。此类方法可以包括 Alexa fluor 555 (Invitrogen)、Qdot 565 (Invitrogen)、或一级/二级 Ab FACS 方法 (Invitrogen)。待使用的细胞系可以包括 Daudi 细胞、U266 细胞、和 He1 92.1.7 细胞。

[0115] Daudi 细胞是 B 淋巴母细胞并且对 IFN- α 对细胞增殖的抑制作用非常敏感。该细胞系中 CD20 表达非常高,其使得该细胞系非常适合示踪 CD20 阳性 B 细胞淋巴瘤。用于 Daudi 的基础培养基为具有 2mM L- 谷氨酰胺、50mM b- 巯基乙醇和 10%胎牛血清的 RPMI, 在 37 度和 5%的二氧化碳 (CO₂) 下保持在培养箱中。每 2-3 天需要替换培养基。

[0116] U266 为人骨髓瘤细胞系(B 淋巴细胞细胞类型)并且对于 IFN- α 对细胞增殖的

抑制作用非常敏感。在该细胞系中不存在 CD20 表达,这使得该细胞系非常适合作为负对照。用于 U266 的基础培养基为具有 2mM L- 谷氨酰胺、50mM b- 巯基乙醇和 10% 胎牛血清的 RPMI, 在 37 度和 5% 的二氧化碳 (CO₂) 下保持在培养箱中。每 2-3 天需要替换培养基。

[0117] He1 92.1.7 是人红白血病细胞系,其也具有阴性 CD20 表达。用于 He1 92.1.7 的基础培养基为具有 2mM L- 谷氨酰胺、50mM b- 巯基乙醇和 10% 胎牛血清的 RPMI, 在 37 度和 5% 的二氧化碳 (CO₂) 下保持在培养箱中。每 2-3 天需要替换培养基。

[0118] B. 融合分子结合表达 CD20 的细胞的能力的评价

流式细胞术分析

为了测定结合 CD20 的融合蛋白,将 38C13-huCD20 细胞 (1×10^6) 与相应的抗 -CD20Ab-IFN- α 突变体融合蛋白或对照试剂孵育。确定融合蛋白的结合并与非融合的抗 -CD20Ab (RITUXAN® (Genentech)) 比较。细胞与生物素化的大鼠抗 - 人 IgG (BD Biosciences) 反应,随后与 PE 标记的链霉抗生物素蛋白 (BD Biosciences) 反应,并随后通过流式细胞术使用 FACScan (Becton Dickinson) 分析并使用 FlowJo 软件 (TreeStar Inc) 分析。

[0119] C. 融合分子结合 FCRN 受体的能力的评价

HuFCRN/B2MG 生物素化

将纯化的重组 HuFCRN/B2MG 以 1mg/ml 的终浓度溶于 PBS 中。以 4mg/ml 的终浓度在 DMSO 中制备 NHS-LC- 生物素。对于 1mg/mL 蛋白溶液的 ≥ 20 倍的摩尔过量的生物素,将 4 μ l 的生物素 /DMSO 加入到 1mg/ml HuFCRN/B2MG 蛋白溶液中 (完整说明书参见 <http://piercenet.com/instructions/2160237.pdf>)。生物素化在室温下进行 2 小时并随后在 PBS 中透析过夜。将生物素化的试剂以 0.1mg/ml 的浓度在 4°C 下储存。

[0120] HuFCRN/B2MG - Ig: IFN 动力学分析

将 SA 生物传感器在黑色 96 孔板中在 200 μ l 的 1X 动力学缓冲液中预水合 10 分钟。在 1X 动力学缓冲液中以 5 μ g/ml 的终浓度制备一毫升生物素化的 HuFCRN/B2MG。将 Ig: IFN 在 2 倍步骤中滴定三个额外的稀释度,以 100 μ g/ml 开始,并且每一终体积为 200 μ l。样品板设定如下:在动力学测定方案中,ForteBio Octet 仪器测量每一孔中的结合,每 1.6 秒进行读数,持续 2 分钟。在移至下一列前,实时平行读取完整的一列四个孔 (行 A-D)。

[0121] 数据处理

处理对 FCRN/B2MG 和 Ig: IFN 融合分子之间的相互作用获得的原始数据,并拟合至曲线以获得 k_{on} 、 k_{diss} 和 K_D 的准确值。处理开始于参考校正以补偿固定生物传感器用测定缓冲液的信号漂移。应用 Y 轴排列、步骤间校正 (inter-step correction) 和 savitzky-Golay 过滤。注意多种数据拟合模型可以根据数据集的特征使用。具体的处理设定可以由于实验设置和所研究的分析物 - 配体系统而不同。FCRN/B2MG 结合数据的结果如下:

表 2

	K _{on}	K _{off}	kD	nM
Rituxan	7.15E+05	4.98E-02	6.97E-08	69.70
wtIFN	3.55E+05	2.01E-02	5.67E-08	56.70
M1	1.38E+05	3.11E-03	3.96E-08	39.60
M2	4.10E+04	1.64E-03	3.99E-08	39.90
M3	5.23E+04	9.63E-04	1.84E-08	18.40
M4	7.10E+04	7.90E-04	1.11E-08	11.10
M5	3.21E+05	1.51E-02	4.71E-08	47.10
M6	2.46E+04	4.92E-04	2.00E-08	20.00
M7	8.72E+03	3.24E-04	3.72E-08	37.20
M8	1.19E+04	1.69E-04	1.42E-08	14.20
M9	2.59E+04	5.92E-04	2.29E-08	22.90
M10	3.89E+05	2.08E-02	5.35E-08	53.50
M11	4.05E+05	1.93E-02	4.76E-08	47.60
M12	3.04E+05	2.78E-02	9.14E-08	91.40
M13	8.09E+03	2.20E-04	2.72E-08	27.20
M14	3.78E+05	2.08E-02	5.51E-08	55.10
M15	3.73E+05	1.74E-02	4.66E-08	46.60

[0122] 新生 FcR (FcRn) 在内体中在酸性 pH 下结合 IgG 的 Fc 结构域,并保护 IgG 免于降解,由此促成 IgG 的长血清半衰期。为了理解突变体融合蛋白的药代动力学行为,我们测定了所有 15 种突变体融合蛋白体外对重组 FcRn 的结合。计算每一突变体融合蛋白对 FcRn/B2MG 的以 K_{on} 、 K_{off} 和 KD 值的结合亲和力,并呈现在上表中。IFN- α 突变对于这些突变体融合蛋白对 FcRn 的亲合力的显著作用是清楚明确的,这显示为相比于野生型 IFN- α 融合蛋白在结合亲和力中改进或降低,说明多种突变影响融合蛋白对 FcRn 结合的能力的所起的重要作用。在抗体的重链的 C-末端连接的 IFN- α 有效载荷 (payload) 中在远离结合 Fc 结构域的 FcRn 的位点处,简单突变对 FcRn 结合的这种显著作用完全是出人意料的且是令人惊奇的发现。由于 FcRn 对抗体的 Fc 部分的结合亲和力已显示与血清半衰期有关 (Yeung 等, J. Immunol., 182:7663-7671, 2009),因此在 IFN- α 有效载荷中突变的这种作用可以调节融合蛋白的血清半衰期。因此,IFN- α 突变在改变 FcRn 结合亲和力中的强烈影响的这种新发现教导我们优化我们的融合蛋白的 PK 特性的全新的方式,并且具有改进的 PK 特性的分子在本文提供。

[0123] D. 融合分子的 IFN 生物活性的评价

为了评价抗 -CD20Ab-IFN- α 突变体融合蛋白的抗病毒活性,以 2×10^5 细胞 /ml 接种 WISH 细胞(转化的上皮样形态 (epitheloid morphology) 的人细胞系)并用融合蛋白或 Roferon® (重组人干扰素 α -2a) 的两倍连续稀释处理 24 小时。随后将细胞用 VSV (水泡性口膜炎病毒) 以 4000 pfu/100 μ l 的浓度感染。72 小时后,将细胞用 0.1% 的结晶紫染

色。通过用 0.1% 结晶紫染色并使用点光密度计通过计数蚀斑 (plaque) 的数目测定每孔中染料定量存活于感染的细胞, 来测定针对病毒感染的保护。

[0124] E. 融合分子的抗增殖活性的评价

将测定如下文描述的那些用于抗 -CD20Ab-IFN- α 突变体融合分子的抗增殖活性分析。

[0125] 融合蛋白的抗增殖活性的 MTS 测定

将肿瘤细胞铺板于 96 孔组织培养板上, 密度为 1.25×10^4 细胞 / 孔, 并且加入连续稀释的不同融合蛋白。在 37°C 下在 5% CO₂ 气氛中 48 小时后, 通过加入 20 μ l 的 MTS 溶液 (Promega, Madison, WI) 将板显色并在 490 nm 处在 ELISA 读数器上测量。计算增殖的百分比抑制。

[0126] ³H-胸苷掺入来测量抗增殖作用

将肿瘤细胞铺板于 96 孔组织培养板上, 密度为 1.25×10^4 细胞 / 孔, 并且加入连续稀释的不同融合蛋白。24 小时后, 加入 [甲基 -³H]- 胸苷 (ICN Biomedicals, Inc., Irvine, CA) 至 4 μ Ci/ml 的终浓度。将细胞再培养 24 小时并随后使用 11050 Micro Cell Harvester, (Skatron, Norway) 收集至玻璃纤维滤器中, 并在 1205 Betaplate Liquid Scintillation Counter (WALLAC Inc., Gaithersburg, MD) 上计数, 并且计算增殖的百分比抑制。

[0127] CFSE 标记的肿瘤细胞的增殖抑制

肿瘤细胞 (1×10^6) 与 2.5 μ M CFSE (Molecular Probes) 在 37°C 下孵育 10 分钟。随后将细胞用 1 nM 不同的融合蛋白处理 48 小时, 并通过流式细胞术分析, 按照由制造商建议的程序, 使用 CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Molecular Probes)。

[0128] F. 融合分子诱导凋亡的能力的评价

将测定诸如下文描述的测定将用于分析抗 -CD20Ab-IFN- α 突变体融合分子诱导凋亡的能力。

[0129] 凋亡的测定

将肿瘤细胞 (1×10^6) 用不同的融合蛋白处理 72 小时。随后用冰冷的 PBS 洗涤细胞。Annexin V/ 碘化丙啶 (PI) 测定使用 Vybrant Apoptosis Assay Kit #2 按照制造商建议的程序 (Molecular Probe) 进行。凋亡细胞的百分比计算为早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞百分比的和。

[0130] 实施例 3

本实施例描述了使用 Ab-IFN- α 突变体融合分子的体内研究 (其表明在体外测定中对 FcRn 受体增加的结合亲和力) 以确定是否此类 Ab-IFN- α 突变体融合分子证实改进的 PK 特性。下文描述的测定用于分析 Ab-IFN- α 突变体融合分子。

[0131] 鼠 rIFN- α (PBL Biomedical Laboratories)、IgG3-IFN- α 和抗 -CD20Ab-IFN- α 突变体融合蛋白使用 Iodo-Beads (Pierce) 根据制造商方案用 ¹²⁵I 碘化至 10 μ Ci/ μ g。将小鼠用 66 μ Ci 的 ¹²⁵I- 标记的蛋白腹膜内 (i. p.) 注射。在注射 ¹²⁵I- 标记的 rIFN- α 、IgG3-IFN- α 或抗 -CD20Ab-IFN- α 突变体融合蛋白后的不同时间间隔, 使用小鼠全身计数器 (Wm. B. Johnson and Associates) 测量剩余的放射性。

[0132] 实施例 4

本实施例描述了使用 Ab-IFN- α 突变体融合分子的体内研究(其表明在体外测定中改进的治疗指数(实施例 2)) 来确定治疗体内肿瘤中的效力。测定如下文描述的那些用于抗-CD20Ab-IFN- α 突变体融合分子的分析。

[0133] 用 5000 38C13-CD20 细胞在第 0 日皮下注射小鼠(4 只的组)。在第 1、2 和 3 天,将它们用 hepes 缓冲盐水溶液(HBSS)或 0.4 μ g、2 μ g、或 10 μ g 的抗-CD20Ab-IFN- α 突变体融合分子静脉内处理,并监测肿瘤生长。

[0134] 用 5000 38C13-CD20 细胞在第 0 日接种 C3H/HeJ 小鼠。在第 5、6 和 7 日,将它们用 HBSS 或 10 μ g 的抗-CD20Ab-IFN- α 突变体融合分子处理。检测它们的肿瘤生长和存活。

[0135] 用 5000 38C13-CD20 细胞在第 0 日接种 C3H/H3J 小鼠并在第 5、6 和 7 天用 10 μ g 的抗-CD20-IgG3 或 10 μ g 的抗-CD20Ab-IFN- α 突变体融合分子处理,随后监测肿瘤生长和存活。

[0136] 实施例 5

在本实施例中,融合分子包含:1) 抗-CD33 抗体和野生型 IFN- α 分子;2) 抗-CD33 抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M1;3) 抗-CD33 抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M8;和 4) 抗-CD33 抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M13 如图 1 中所示和如实施例 1 中所述进行构建。在本实施方案的融合分子构建体中,野生型 IFN- α 分子包含 SEQ ID NO:13 中描述的氨基酸序列。构建体使用肽接头 **SGGGGS (SEQ ID NO: 14)** 制备,和构建体使用肽接头 **AEAAAKEAAAKAGS (SEQ ID NO: 15)** 制备。抗-CD33 抗体包含分别描述于 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 中的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列。

[0137] 多种融合分子在多种体外功能测定中测试,以鉴定相比于抗-CD33Ab-wtIFN- α 融合分子的具有最佳治疗指数和保留的或改进的体内效力的抗-CD33Ab-IFN- α 突变体融合分子,和证实最佳 PK 特性的融合分子。

[0138] 实施例 6

在本实施例中,融合分子包含:1) 抗-CD138 抗体和野生型 IFN- α 分子;2) 抗-CD138 抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M1;3) 抗-CD138 抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M8;和 4) 抗-CD138 抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M13 如图 1 中所示和如实施例 1 中所述进行构建。在本实施方案的融合分子构建体中,野生型 IFN- α 分子包含 SEQ ID NO:13 中描述的氨基酸序列。构建体使用肽接头 **SGGGGS (SEQ ID NO: 14)** 制备,和构建体使用肽接头 **AEAAAKEAAAKAGS (SEQ ID NO: 15)** 制备。抗-CD138 抗体包含分别描述于 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 中的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列。

[0139] 多种融合分子在多种体外功能测定中测试,以鉴定相比于抗-CD138Ab-wtIFN- α 融合分子的具有最佳治疗指数和保留的或改进的体内效力的抗-CD138 Ab-IFN- α 突变体融合分子,和证实最佳 PK 特性的融合分子。

[0140] 实施例 7

在本实施例中,融合分子包含:1) 抗-HER2/neu 抗体和野生型 IFN- α 分子;2) 抗-HER2/neu 抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M1;3) 抗-HER2/neu 抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M8;和 4) 抗-HER2/neu 抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M13 如图 1 中所示和如实施例 1 中所述进行构建。在本实施方案的融合分子构建体中,野生型 IFN- α 分子包含

SEQ ID NO:13 中描述的氨基酸序列。构建体使用肽接头 **SGGGGS (SEQ ID NO: 14)** 制备, 和构建体使用肽接头 **AEAAAKEAAAKAGS (SEQ ID NO: 15)** 制备。抗-HER2/neu 抗体包含分别描述于 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 中的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列。

[0141] 多种融合分子在多种体外功能测定中测试, 以鉴定相比于抗-HER2/neu Ab-wtIFN- α 融合分子的具有最佳治疗指数和保留的或改进的体内效力的抗-HER2/neu Ab-IFN- α 突变体融合分子, 和证实最佳 PK 特性的融合分子。

[0142] 实施例 8

在本实施例中, 融合分子包含: 1) 抗-内质蛋白抗体和野生型 IFN- α 分子; 2) 抗-内质蛋白抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M1; 3) 抗-内质蛋白抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M8; 和 4) 抗-内质蛋白抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M13 如图 1 中所示和如实施例 1 中所述进行构建。在本实施方案的融合分子构建体中, 野生型 IFN- α 分子包含 SEQ ID NO:13 中描述的氨基酸序列。构建体使用肽接头 **SGGGGS (SEQ ID NO: 14)** 制备, 和构建体使用肽接头 **AEAAAKEAAAKAGS (SEQ ID NO: 15)** 制备。抗-内质蛋白抗体包含分别描述于 SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 中的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列。

[0143] 多种融合分子在多种体外功能测定中测试, 以鉴定相比于抗-内质蛋白 Ab-wtIFN- α 融合分子的具有最佳治疗指数和保留的或改进的体内效力的抗-内质蛋白 Ab-IFN- α 突变体融合分子, 和证实最佳 PK 特性的融合分子。

[0144] 实施例 9

在本实施例中, 融合分子包含: 1) 抗-CD276 抗体和野生型 IFN- α 分子; 2) 抗-CD276 抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M1; 3) 抗-CD276 抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M8; 和 4) 抗-CD276 抗体和表 1 的 IFN- α 突变体分子 M13 如图 1 中所示和如实施例 1 中所述进行构建。在本实施方案的融合分子构建体中, 野生型 IFN- α 分子包含 SEQ ID NO:13 中描述的氨基酸序列。构建体使用肽接头 **SGGGGS (SEQ ID NO: 14)** 制备, 和构建体使用肽接头 **AEAAAKEAAAKAGS (SEQ ID NO: 15)** 制备。抗-CD276 抗体包含分别描述于 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 12 中的重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列。

[0145] 多种融合分子在多种体外功能测定中测试, 以鉴定相比于抗-CD276 Ab-wtIFN- α 融合分子的具有最佳治疗指数和保留的或改进的体内效力的抗-CD276 Ab-IFN- α 突变体融合分子, 和证实最佳 PK 特性的融合分子。

[0146] 在本公开内容的教导下, 本文公开并要求保护的所有物品和方法可以被生产或实行, 而不需要过度的实验。尽管本发明的物品和方法已经以多种实施方案的形式进行了描述, 但对于本领域技术人员显而易见的是可以对物品和方法应用变化而不背离本发明的精神和范围。对于本领域技术人员显而易见的所有此类变化和等同方案(无论是目前存在或是以后开发的)均认为处于由所附的权利要求所确定的发明的精神和范围之内。本说明书中提及的所有专利、专利申请和出版物表示本发明所属的本领域普通技术人员的技术水平。所有专利、专利申请、和出版物为了所有目的以其整体通过引用并入本文并且至相同程度, 如同每一单独的出版物被明确地且单独地说明以为了任何和所有目的以其整体通过引用并入。本文示例性描述的本发明可以合适地在缺少任何本文未明确公开的要素的情况下实施。因此, 例如, 在本文每一情况下任何术语“包含”、“基本上由……组成”和“由……组

成”可以由其他两个术语中任一个所替换。已使用的术语和表达作为描述性而非限制性的术语使用,并且不旨在在使用此类术语和表达中排除显示和描述的特征或其部分的任何等同物,但认可多种改变均可以在要求保护的本发明的范围内。因此,应该理解尽管本发明通过某些实施方案和任选的特征已进行明确地公开,但本领域技术人员可以诉诸本文公开的概念的改变和变化,并且认为此类改变和变化均在由所附的权利要求确定的本发明的范围内。

[0001]

序列表

<110> ImmunGene Inc

<120> 工程化的抗体-干扰素突变体融合分子

<130> IG003PCT

<160> 15

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 469

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-her2/neu抗体重链-氨基酸残基1-19代表信号肽

<400> 1

Met Glu Cys Ser Trp Val Met Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35 40 45

Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
210 215 220

[0002]

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Ser Pro Gly Lys
 465
 <210> 2
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗-Her2/neu抗体轻链-氨基酸残基1-19代表信号肽
 <400> 2

[0003]

Met Glu Trp Ser Cys Val Met Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val
 35 40 45
 Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 50 55 60
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 85 90 95
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr
 100 105 110
 Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Glu Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 3
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗-CD20抗体重链-氨基酸残基1-19代表信号肽

<400> 3

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Cys Val Ile Ile Val Phe Leu Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

[0004]

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
 115 120 125
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

[0005]

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 4

<211> 232

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD20抗体轻链—氨基酸残基1-19代表信号肽

<400> 4

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val
35 40 45

Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro
50 55 60

Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val
85 90 95

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn
100 105 110

[0006]

```

Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
    115                      120                      125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
    130                      135                      140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    145                      150                      155                      160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
                      165                      170                      175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                      180                      185                      190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
                      195                      200                      205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
    210                      215                      220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    225                      230

<210> 5
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-CD138抗体重链一氨基酸残基1-19代表信号肽

<400> 5

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp
1                      5                      10                      15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Met Met
                      20                      25                      30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
                      35                      40                      45

Ser Asn Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
    50                      55                      60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Arg Thr Ile Tyr Asn
    65                      70                      75                      80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn
                      85                      90                      95

Thr Val Gln Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
    100                      105                      110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Tyr Gly Asn Phe Tyr Tyr Ala Met
    115                      120                      125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
    130                      135                      140

```

[0007]

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

[0008]

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 6
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-CD138抗体轻链—氨基酸残基1-22代表信号肽

<400> 6

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60

Thr Val Glu Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Tyr Ser Lys Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

[0009]

```

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                230                235

<210> 7
<211> 463
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-内质蛋白抗体重链-氨基酸残基1-19代表信号肽

<400> 7

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Cys Val Ile Ile Val Phe Leu Leu Lys Gly
1                5                10                15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
                20                25                30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
                35                40                45

Thr Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
50                55                60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser
65                70                75                80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser
85                90                95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100               105               110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
115               120               125

Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
130               135               140

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
145               150               155               160

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
165               170               175

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
180               185               190

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
195               200               205

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
210               215               220

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
225               230               235               240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245               250               255

```

[0010]

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460
 <210> 8
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗-内质蛋白抗体轻链-氨基酸残基1-20代表信号肽
 <400> 8
 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

[0011]

Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
 100 105 110
 Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 9

<211> 465

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD33抗体重链—氨基酸残基1-19代表信号肽

<400> 9

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile
 35 40 45

Thr Asp Ser Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn
 65 70 75 80

[0012]

Gln Lys Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Pro Thr Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 210 215 220
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 225 230 235 240
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 275 280 285
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380

[0013]

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 10
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 CD33抗体轻链-氨基酸残基1-20代表信号肽

<400> 10

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

Leu Asp Asn Tyr Gly Ile Arg Phe Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Trp Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
115 120 125

Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

[0014]

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 11

<211> 152

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD276抗体重链可变区—氨基酸残基1-19代表信号肽

<400> 11

Met Asn Phe Gly Phe Arg Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Arg Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Phe Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Tyr Asp Gly Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val
130 135 140

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Leu
145 150

<210> 12

<211> 157

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0015]

<223> 抗-CD276抗体轻链可变区一氨基酸残基1-20代表信号肽

<400> 12

Met Lys Ser Gln Ser Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Phe Ala Gly Val Asp Gly
20 25 30

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
35 40 45

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Thr
50 55 60

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
65 70 75 80

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
85 90 95

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
100 105 110

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro
115 120 125

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
130 135 140

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Lys Leu Gly
145 150 155

<210> 13

<211> 165

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人干扰素 α 2野生型蛋白

<400> 13

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

[0016]

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽接头

<400> 14

Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 15
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽接头

<400> 15

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Gly Ser
1 5 10

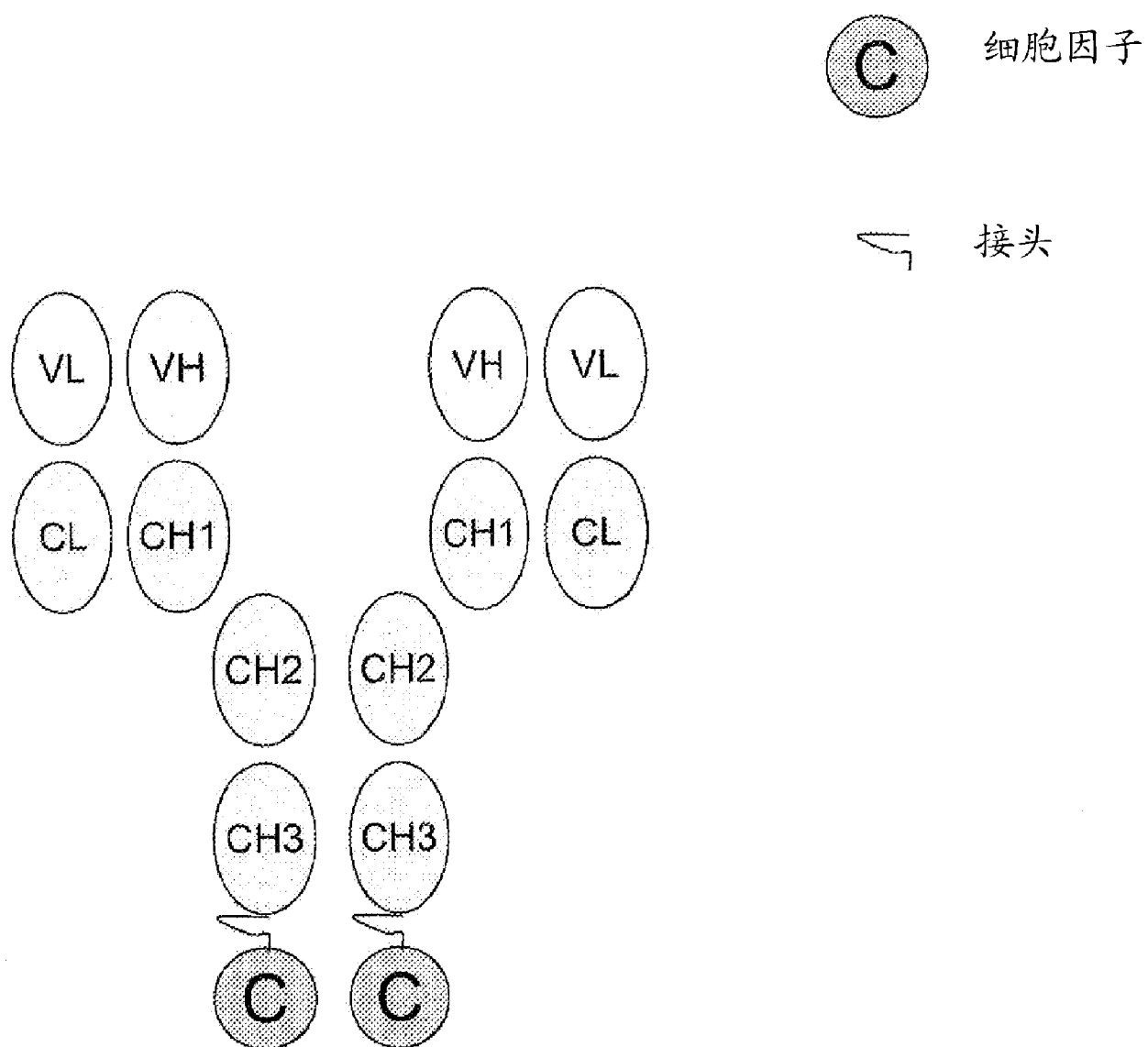


图 1

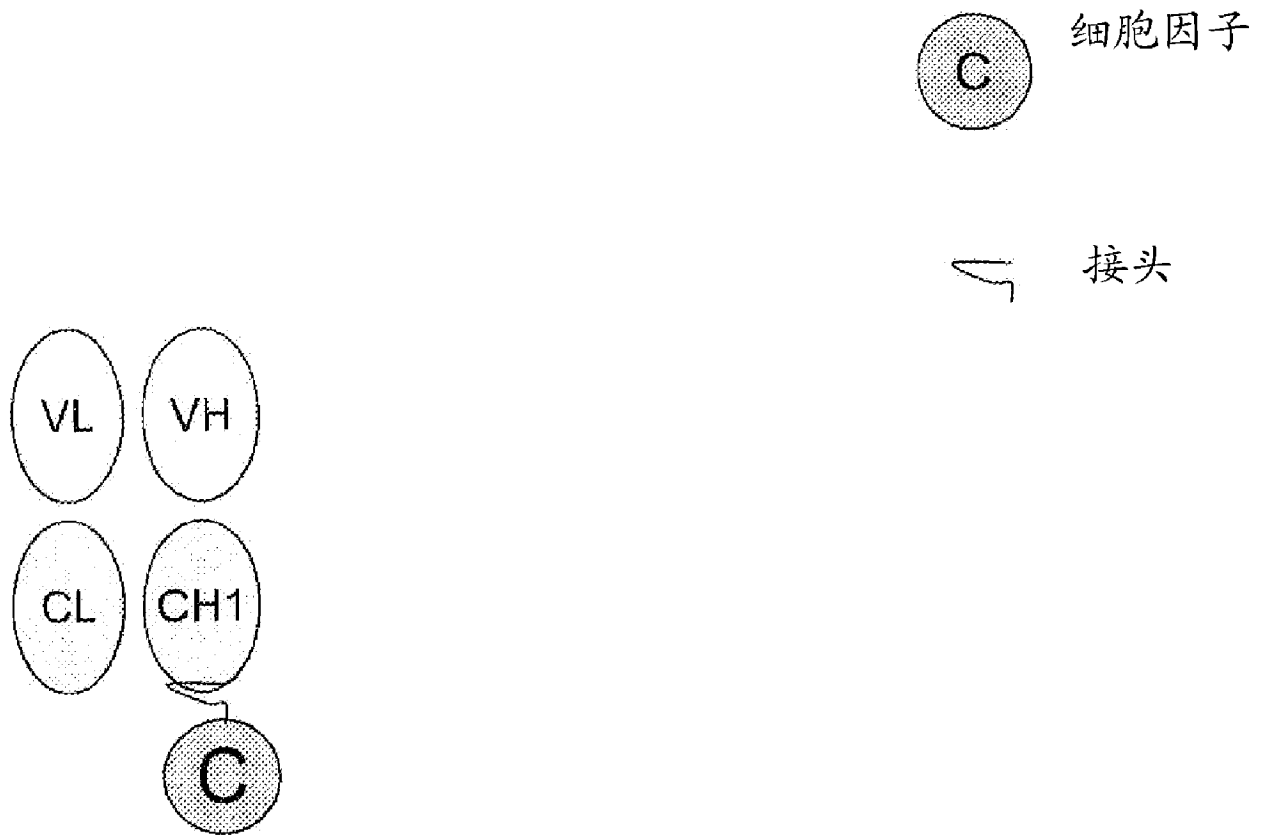


图 3