(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117980330 A
(43)申请公布日 2024.05.03

(21)申请号 202280062021.9

(22)申请日 2022.07.13

(30)优先权数据
63/221,686 2021.07.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.03.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2022/051093 2022.07.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/283736 EN 2023.01.19

(71)申请人 帕克斯拉迪亚MAB 科技公司
地址 加拿大大不列颠哥伦比亚省

(72)发明人 A·C·摩根

(74)专利代理机构 上海光伟律师事务所 31525
专利代理师 马飞 王枞

(51)Int.Cl.
C07K 16/18(2006.01)
A61K 47/64(2006.01)
A61P 9/00(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
C40B 40/10(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)

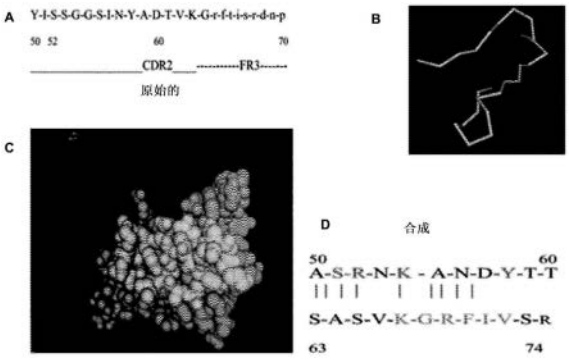
权利要求书3页 说明书29页
序列表（电子公布） 附图11页
按照条约第19条修改的权利要求书2页

(54)发明名称

同源二聚化肽和包含其的抗体

(57)摘要

描述了具有改进的自结合的同源二聚化(HD)肽。HD肽可以包含与相应的天然存在的HD肽相比具有反向构型的氨基酸序列,或包含具有一个或多个亲水性取代的天然存在的HD肽的氨基酸序列。此外,还描述了HD肽的二聚体。还公开了包含所述HD肽或HD二聚体的抗体,以及所述抗体的制造方法和用途。



CN 117980330 A

1.一种同源二聚化(HD)肽,包含与相应的天然存在的HD肽相比呈反向构型的氨基酸序列或其保守变体。

2.根据权利要求1所述的HD肽,其中,所述相应的天然存在的HD肽是T15 HD肽或R24 HD肽。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的HD肽,其中,所述HD肽包含与SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6或SEQ ID NO.18具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的HD肽,具有一个或多于一个氨基酸取代,其中,所述一个或多于一个取代增加了所述HD肽的亲水性。

5.一种同源二聚化(HD)肽,包含一个或多于一个氨基酸取代,其中,所述一个或多于一个取代增加了所述HD肽的亲水性。

6.根据权利要求5所述的HD肽,其中,所述HD肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,在位置4、7和18具有一个或多于一个氨基酸取代。

7.根据权利要求6所述的HD肽,其中,位置4处的所述一个或多于一个氨基酸取代是K或K的保守取代,位置7处的所述一个或多于一个氨基酸取代是R或R的保守取代,以及位置18处的所述一个或多于一个氨基酸取代是H或H的保守取代。

8.根据权利要求6或7所述的HD肽,其中,所述HD肽包含与SEQ ID NO:8、9或10具有80%-100%序列同一性的氨基酸序列。

9.一种包含第一HD肽和第二HD肽的同源二聚化(HD)肽二聚体,其中,所述第一HD肽和第二HD肽源自天然存在的HD肽,或其中,所述第一HD肽和第二HD肽源自天然存在的HD肽的反向序列。

10.根据权利要求9所述的同源二聚化(HD)肽二聚体,其中,所述第一HD和/或第二HD包含权利要求1-8中任一项所述的HD肽。

11.根据权利要求9或10中任一项所述的HD肽二聚体,其中,所述二聚体的所述第一HD肽和第二HD肽通过接头连接。

12.根据权利要求11所述的HD肽二聚体,其中,所述接头是gly-gly。

13.根据权利要求9所述的同源二聚化(HD)肽二聚体,其中,所述HD肽二聚体包含与SEQ ID NO:5、7、11、12、13、14、15、17或19具有80-100%序列同一性的氨基酸序列。

14.一种抗体或抗原结合片段,包含权利要求1至8中任一项所述的HD肽或权利要求9至13中任一项所述的HD肽二聚体。

15.根据权利要求14所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述抗体或抗原结合片段是人源化IgG。

16.根据权利要求16所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述抗体或抗原结合片段是人源化IgG1、人源化IgG4或人源化IgG3。

17.根据权利要求14至16中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述HD肽或HD肽二聚体与所述抗体或抗原结合片段的核苷酸亲和位点融合。

18.根据权利要求17所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述HD肽或HD肽二聚体是通过赖氨酸、半胱氨酸或碳水化合物融合的。

19.根据权利要求14至18中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述HD肽或HD肽二聚体直接位于所述抗体的重链或轻链的CDR3之后。

20.根据权利要求14至18中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述HD肽或HD肽二聚体直接位于所述抗体的重链或轻链恒定区的C端之后。

21.根据权利要求14至18中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述HD肽或HD肽二聚体直接位于所述抗体的重链可变区之后。

22.根据权利要求14至18中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述HD肽或HD肽二聚体直接位于所述抗体的Fc区的C端之后。

23.根据权利要求14至22中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述HD肽或HD肽二聚体偶联至所述抗体。

24.根据权利要求14至23中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述抗体是嵌合重组抗体。

25.根据权利要求14至24中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述HD肽或HD肽二聚体前面是间隔子。

26.根据权利要求25所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述间隔子是gly-gly。

27.根据权利要求14至26中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述抗体是单链抗体(scFv)、双特异性抗体(BsAb)或抗体样肽。

28.根据权利要求14至27中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述抗体是人源化单克隆抗体。

29.根据权利要求14至28中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述抗体是Her-2neu抗体(诸如Herceptin)、CD-20抗体(诸如Rituxin)、血管内皮生长因子抗体(诸如Avastin)或是检查点抑制剂抗体(诸如PD-L1)。

30.一种组合物,包含权利要求14至29中任一项所述的一种或多种抗体或抗原结合片段和药学上可接受的载体。

31.一种表达载体,包含编码权利要求1至8中任一项所述的HD肽或权利要求9-13中任一项所述的HD肽二聚体的第一核酸序列。

32.根据权利要求31所述的表达载体,进一步包含编码抗体或抗原结合片段的第二核酸序列,使得当所述第一核酸序列和第二核酸序列表达时,所述HD肽和所述抗体或抗原结合片段作为融合蛋白表达。

33.一种产生同源二聚化(HD)抗体的方法,包括在宿主细胞中表达权利要求32所述的表达载体。

34.一种用权利要求31或32所述的表达载体转化的分离的宿主细胞。

35.一种增强抗体的结合和/或效力的方法,包括:

将权利要求1至8中任一项所述的HD肽或权利要求9至13中任一项所述的HD二聚体偶联至所述抗体;或

重组表达包含所述HD肽的嵌合抗体。

36.一种治疗患有疾病或病症的患者的方法,包括给予根据权利要求14至29中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

37.根据权利要求36所述的方法,其中,所述疾病或病症是选自由以下各项组成的列表的一种:癌症、自身免疫障碍、炎性障碍、神经退行性疾病、心血管疾病、移植物或移植排斥。

38.一种检测样品中的分析物的方法,包括:

使所述分析物与针对所述分析物的抗体或抗原结合片段接触,其中,所述抗体或抗原结合片段融合至权利要求1至8中任一项所述的HD肽或权利要求9至13中任一项所述的HD肽二聚体;以及

检测由所述分析物和与所述HD肽融合的抗体形成的复合物。

39.一种用于检测样品中的分析物的试剂盒,包括:

针对所述分析物的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段融合至权利要求1至8中任一项所述的HD肽或权利要求9至13中任一项所述的HD肽二聚体;和

用于检测所述分析物的说明书。

40.一种噬菌体展示文库,包含连接至权利要求1至8中任一项所述的HD肽或权利要求9至13中任一项所述的HD肽二聚体的抗体或抗原结合片段。

41.根据权利要求14至29中任一项所述的抗体在治疗中的应用。

42.根据权利要求14至29中任一项所述的抗体用于治疗。

43.根据权利要求14至29中任一项所述的抗体在诊断测试中的应用。

44.根据权利要求14至29中任一项所述的抗体用于诊断测试。

同源二聚化肽和包含其的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及同源二聚化肽、包含所述同源二聚化肽的抗体及其方法和应用。

背景技术

[0002] 抗体被誉为对抗疾病的“魔术子弹”,已经用作用于治疗慢性疾病诸如癌症和自身免疫障碍的主要治疗工具。值得注意的成功案列包括治疗乳腺癌的Herceptin®和治疗非霍奇金淋巴瘤的Rituxan®。抗体在疾病治疗中的关键优势在于它们靶向致病细胞或分子的能力,同时保留身体的健康组织和正常产物。

[0003] 目前,存在十六种FDA批准的单克隆抗体,年销售额620亿美元。预计到2025年,将增加到70种批准的产品,产生年销售额1200亿美元。此外,最近十年中的最新且最成功的癌症疗法,针对癌细胞表面上的抑制分子(诸如PD-L1)的单克隆抗体(mAb)已经证明能够释放癌症患者的免疫系统上的刹车(brake),从而产生在癌症患者中通过传统化学疗法治疗不好的高治疗活性。预期到2025年,仅此靶标产生350亿美元的年销售额。

[0004] 然而,由于低效靶向、低生物活性、低治疗功效和/或不可接受的副作用,在实验室研究中表现出所希望的特异性的抗体经常在临床前和临床评估中失败。这部分地是由于以下事实:抗体仅代表免疫防御的一个分支,其中T细胞在免疫防御中提供另一种策略。

[0005] 抗体是用于靶向和递送装置的理想平台。抗体已经用作用于若干生物活性分子(诸如毒素、药物和细胞因子(ADC))的递送装置。在一些情况下,由于更好的组织渗透,优选抗体片段、抗原结合片段(Fab)或单链可变片段(scFv)。尽管现在有几种批准的ADC,它们的开发非常昂贵,需要长的批准时间。

[0006] 优选的治疗性mAb形式是人(或人源化)IgG1,其中,mAb治疗活性由其结合(激动剂、拮抗性)或效应子功能[补体介导的细胞毒性(C’MC)、抗体依赖性细胞介导的毒性(ADCC)或触发凋亡]赋予。mAb已经适于在血液中长期存活,具有帮助血管和组织穿透的位点,并且在功能上与先天免疫的许多防御机制相关。

[0007] 已知治疗性抗体对其靶细胞有效的主要机制是诱导细胞死亡,即抗体诱导的细胞凋亡。这种诱导的细胞凋亡通常由交联受体触发,这些受体是细胞的细胞凋亡信号通路的一部分。例如,通过抗体交联B细胞抗原受体诱导B细胞肿瘤中的细胞凋亡(Ghetie M.等人,1997)。细胞受体的交联还增加抗体对其靶抗原的结合亲合力,因此可能增加所有细胞表面依赖性治疗机制,诸如补体介导的杀死和补体依赖性调理作用和吞噬作用、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)以及当使用靶向细胞受体的抗体时通过增加与细胞受体的结合和阻断增强细胞生长的抑制或细胞内代谢途径的改变。

[0008] 通过使用针对“进化”天然抗体的Fab文库,相对于其靶抗原的亲和力,抗体的治疗性能可以被增强。这可能导致亲和力增加有时多达100至1000倍。然而,这不能克服单克隆抗体结合的基本性质。关于蛋白质表位,单克隆抗体通常以一条臂结合至单个表位-当mAb从其靶标解离时,下一靶标通常太远以致mAb不能再结合。这种缺陷可以通过使用靶系统来克服,在该靶系统中,mAb可以跨越表位之间的距离;这通常需要聚集在膜上的非常高的抗

原密度。实例是B细胞上的细胞表面免疫球蛋白。不幸的是,这种性质的治疗靶标非常少。

[0009] 可以通过增加mAb交联其靶标的机会来增强抗原结合,从而在相邻靶标抗原上同时接合表位。对于许多靶标,这种交联是触发细胞凋亡的有效手段。交联的可能性可以通过增加抗体的化合价(诸如用五聚体IgM抗体)来增强。这还可以通过由IgG产生多聚体免疫球蛋白分子的重组手段来完成(Xiao-Yun Liu,Laurentu M.Pop,Lydia Tsai,Iliodora V.Pop and Ellen S.Vitetta,Int.J.Cancer 129,497-506(2011))。然而,对于大多数治疗靶标,即使免疫球蛋白分子的化合价和大小增加,也不能实现交联。

[0010] 在已经在自然(Nature)中鉴定的罕见类别的自结合或亲同种抗原的抗体(不同地称为“自体(autophilic)抗体”或“自抗体(autobodies)”)中,化合价和亲合力增加(Kang,C.Y.,Cheng,H.L.,Rudikoff,S.and Kohler,H.J.Exp.Med.165:1332,(1987);Xiyun,A.N.,Evans,S.V.,Kaminki,M.J.,Fillies,S.F.D.,Reisfeld,R.A.,Noughton,A.N.and Chapman,P.B.J.Immun0l.157:1582-1588(1996))。这起因于次级(对抗原结合)相互作用,并且可以并入多个IgG并且跨越靶标之间的细胞表面上的任何距离。它们能够通过与自身非共价相互作用形成二聚体和/或聚合物。自体抗体的实例是TEPC-15(T15),其靶向凋亡细胞和动脉粥样硬化病变上的磷酰胆碱的正常隐蔽决定因子(Binder,J.等人,2003;Kang,C-Y等人,1988)。仅在修饰的抗体附接至其细胞表面靶标(即“差异寡聚化”)之后,可以诱导二聚化或多聚化。在溶液中,自体抗体可以在它的单体与二聚体形式之间处于平衡(Kaveri S.等人,1990)。不幸的是,自然创造了非常少的这些类型的抗体,并且它们针对有限数目的靶标。

[0011] TEPC-15(T15)抗体的重链区中的肽被鉴定为自结合并且赋予抗体更高的治疗活性(Kang,C.Y.Brunck,T.K.,Kieber-Emmons,T.,Blalock,J.E.and Kohler,H.,Science,240:1034-1036,1988)。此类肽被称为“自体肽”或“同源二聚化(HD)肽”。对该肽序列和具有相似诱导抗体自缔合能力的其他序列的阐明提供了赋予靶向不同抗原的其他抗体相同的自缔合性能的机会。最近,探索了自结合的性质,并且推导出肽偏向于形成二级和三级特征的合成形式(Bost KL,Blalock JE.Viral Immunol.2(4),229-238(1989);Kohler,H,Immunotherapy(2013)5(3),235-246)。

[0012] 在增强已知抗体的抗原检测和/或治疗功效的努力中,提出了包含两个不同的共价连接结构域的杂交分子。例如,美国专利公开号2003/0103984(Kohler)和美国专利公开号2004/0185039(Kohler)公开了包含抗体和肽结构域的融合蛋白,其中肽结构域可以具有自体活性。WO2009/002939公开了具有对与自体肽融合的CD-20抗原的结合亲和力的免疫球蛋白组分。WO2009/108803公开了使用偶联至自体肽的抗体来检测样品中的分析物的方法和试剂盒。

[0013] 然而,仍然需要改进抗体用于检测、预防和/或治疗疾病的敏感性和功效。

发明内容

[0014] 本发明涉及具有自缔合或同源二聚化的改进的生物活性的同源二聚化(HD)肽。本发明还涉及包含所述HD肽的融合蛋白(例如化学偶联或重组抗体)。包含免疫球蛋白组分或抗体和HD肽的融合蛋白可以是重组的,或HD肽可以以不破坏抗原结合并允许HD肽序列中的优选构型变化从而赋予二聚化活性的方式与其结合。本文公开的HD肽可以用于增强治疗性

抗体的效力或用于增加针对其他应用(诸如诊断)的结合敏感性和/或亲合力。

[0015] 在一个方面,提供了同源二聚化(HD)肽,其包含与相应的天然存在的HD肽相比呈反向构型的氨基酸序列或其保守变体。在一些实施方式中,相应的天然存在的HD肽可以是T15HD肽或R24HD肽。

[0016] 在一些实施方式中,HD肽可以包含与RSVIFRGKVSASYETTYDNAKNRSA(SEQ ID NO:4)或AYNISSGGSSIYAY(SEQ ID NO:6)具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,即T15和R24 HD肽的反向氨基酸序列。

[0017] 在另一个方面,提供了同源二聚化(HD)肽,其包含赋予改进的自结合性能的一个或多于一个取代或其保守变体。一个或多于一个取代可以是亲水性取代。因此,本文描述的HD肽可以包含一个或多于一个氨基酸取代,其中一个或多于一个取代增加了HD肽的亲水性。

[0018] 在一些实施方式中,同源二聚化(HD)肽可以包含在核苷酸位置4、7和18处具有一个或多个取代的氨基酸序列ASRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSR(SEQ ID NO:1)。位置4处的一个或多于一个氨基酸取代可以是K或K的保守取代,位置7处的一个或多于一个氨基酸取代可以是R或R的保守取代,以及位置18处的一个或多于一个氨基酸取代可以是H或H的保守取代。

[0019] 在一些实施方式中,一个或多于一个取代可以是N4K、N7R和/或K18H。

[0020] 在一些实施方式中,HD肽可以包含与SEQ ID NO:8、9或10具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0021] 在又一个方面,提供了包含如上描述的HD肽的同源二聚化(HD)肽二聚体。二聚体的HD肽可以通过接头连接。在一些实施方式中,接头可以是gly-gly。

[0022] 进一步提供了包含第一HD肽和第二HD肽的同源二聚化(HD)肽二聚体,其中,第一HD肽和第二HD肽源自天然存在的HD肽,或其中,第一HD肽和第二HD肽源自天然存在的HD肽的反向序列。

[0023] 在一些实施方式中,HD肽二聚体可以包含与SEQ ID NO.5或7具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,即通过gly-gly接头连接的T15或R24 HD肽的二聚体。

[0024] 在另一个实施方式中,HD肽二聚体可以包含与SEQ ID NO.11、12、13、14或15具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,HD肽二聚体包含与SEQ ID NO:5、7、11、12、13、14、15、17或19具有80-100%序列同一性的氨基酸序列。

[0025] 本发明进一步提供了抗体或抗原结合片段,其包含与其融合的本文描述的HD肽或HD肽二聚体。发现具有本文描述的HD肽或HD肽二聚体的抗体赋予改进的结合和治疗性能。

[0026] 在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段是人源化IgG。例如,抗体或抗原结合片段可以是人源化IgG1、人源化IgG4或人源化IgG3。

[0027] HD肽或HD肽二聚体可以位于抗体的适当位点。在一些实施方式中,HD肽或HD肽二聚体可以融合到抗体或抗原结合片段的核苷酸亲和位点上。例如,HD肽或HD肽二聚体可以通过赖氨酸、半胱氨酸或碳水化合物融合。

[0028] 在一些实施方式中,HD肽或HD肽二聚体直接位于抗体的重链或轻链的CDR3之后。在替代实施方式中,HD肽或HD肽二聚体直接位于抗体的重链或轻链恒定区的C端之后。在替代实施方式中,HD肽或HD肽二聚体直接位于抗体的重链可变区之后。在替代实施方式中,HD

肽或HD肽二聚体直接位于抗体的Fc区的C端。

[0029] 本文描述的抗体可以通过将HD肽或HD肽二聚体偶联至其上来产生。可替代地,抗体可以通过重组方法来产生。本发明还涉及用于产生重组抗体和肽的方法,该重组抗体和肽具有自缔合形成晶格和交联它们的靶抗原的能力。这种交联然后可以导致细胞信号传导增强、受体阻断增强、抗原/抗体复合物内化以及甚至诱导凋亡。

[0030] 在一些实施方式中,HD肽或HD肽二聚体与抗体的附接位置之前可以是间隔子,诸如gly-gly。

[0031] 抗体或抗原结合片段(Fab)可以是单链抗体(scFv)、双特异性抗体(BsAb)或抗体样肽。

[0032] 在一些实施方式中,抗体是人源化单克隆抗体。抗体可以是Her-2neu抗体,诸如赫赛汀(Herceptin)。抗体可以是CD-20抗体,诸如利妥昔单抗。抗体可以是血管内皮生长因子抗体,诸如安维汀。抗体可以是检查点抑制剂抗体,诸如PD-L1。

[0033] 进一步提供了组合物,该组合物包含本文描述的一种或多种抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

[0034] 进一步提供了表达载体,其包含编码本文描述的HD肽或HD肽二聚体的第一核酸序列。在一些实施方式中,表达载体进一步包含编码抗体或抗原结合片段的第二核酸序列,使得当第一核酸序列和第二核酸序列表达时,HD肽或HD肽二聚体和抗体或抗原结合片段作为融合蛋白表达。

[0035] 提供了产生同源二聚化(HD)抗体的方法,包括在宿主细胞中表达本文描述的表达载体。例如,宿主细胞可以是动物细胞、酵母细胞或植物细胞。

[0036] 提供了用本文描述的表达载体转化的分离的宿主细胞。

[0037] 提供了增强抗体的结合和/或效力的方法,包括:将本文描述的HD肽或HD肽二聚体与抗体偶联;或用HD肽或HD肽二聚体重组表达抗体。

[0038] 提供了治疗患有疾病或病症的患者的方法,包括给予本文描述的抗体或抗原结合片段。疾病或病症可以是选自由以下各项组成的列表中的一种:癌症、自身免疫障碍、炎性障碍、神经退行性疾病、心血管疾病、移植物或移植排斥。

[0039] 提供了检测样品中的分析物的方法,包括:使分析物与针对分析物的抗体或抗原结合片段接触,其中,抗体或抗原结合片段与本文描述的HD肽或HD肽二聚体融合;以及检测由分析物和与HD肽或HD肽二聚体融合的抗体形成的复合物。

[0040] 提供了用于检测样品中的分析物的试剂盒,包括:针对分析物的抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段与本文描述的HD肽或HD肽二聚体融合;以及用于检测分析物的说明书。

[0041] 提供了噬菌体展示文库,其包括连接至本文描述的HD肽或HD肽二聚体的抗体或抗原结合片段。

[0042] 本文描述的抗体可以用于疗法,例如疾病的预防和/或治疗。本文描述的抗体还可以用于诊断,例如体外诊断测定。

[0043] 本发明内容不必需描述本发明的所有特征。

附图说明

[0044] 根据参考了附图的以下描述,本发明的这些及其他特征将变得更加显而易见,其中:

[0045] 图1示出(从左至右):(A)T15抗体中的亲同种抗原结构域的氨基酸序列(aa 50-70),指示CDR2和框架3;(B)MPC 603Fab结构的折叠体中T15序列aa 50-70的碳背景跟踪;(C)T15 aa 50-70MPC603结构的球表示;(D)示出亲水性相互作用的T15肽的比对;

[0046] 图2示出使用具有7个残基的窗口的Kyte-Doolittle算法的T15HD肽(T15)及其反向序列(rs-T15)的亲水性谱;

[0047] 图3示出如图2中描绘的T15肽及其反向序列(rs-T15)的亲水性比对;

[0048] 图4示出了亲水性分析,3个种系序列中T15肽的逐个氨基酸,所述种系序列从具有无、几乎没有或高HD活性的Mopc抗体的重链CDR2/框架3提取。顶部肽:以灰度显示的具有促成自结合的氨基酸的T15肽。以上或以下示出单个氨基酸的亲水性得分。中间肽:低HD结合,以灰度显示的来自T15的氨基酸取代。底部肽:无HD结合(Mpc 167),以灰度显示来自T15的氨基酸取代;

[0049] 图5示出G11、S107和G9抗体在4℃和37℃在非生理条件下的温度依赖性自缔合(参见Bryan,J.A.and Kohler,H.Physical and Biological Properties of Homophilic therapeutic Antibodies,Cancer Immunology Immunotherapy,60:507,2010)。测量自上而下至水平移动后弯月面达到平衡所需的时间。误差条表示两次运行的百分比变化;

[0050] 图6示出了通过流式细胞术检测的结合利妥昔单抗和HD-利妥昔单抗的人淋巴瘤细胞。利妥昔单抗鉴定了2种癌细胞的原代群体,一种具有低抗原密度(第二箭头),第二种具有更高的密度(第三箭头);

[0051] 图7示出了利妥昔单抗和HD-利妥昔单抗的补体依赖性细胞毒性。利妥昔单抗可以介导针对3种具有不同抗原密度(光条)的不同细胞系(Raji、Ramos以及JOK1)的C'MC。HD-利妥昔单抗的C'MC显著增强,表明在较低抗体浓度下杀伤水平较高(暗条)。抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)也用HD抗体增强(HD-赫赛汀获得类似结果,数据未显示)。

[0052] 图8示出注射肿瘤后7天,赫赛汀和HD-赫赛汀在表达低抗原的乳腺癌(MCF-7)的裸鼠模型中的功效;

[0053] 图9示出来自抗体R24的HD肽序列。还示出了发夹环内的氨基酸导致自结合的相互作用;

[0054] 图10示出使用Kyte-Doolittle算法的R24 HD肽(R24)的亲水性谱;

[0055] 图11示出使用电化学发光(例如用于诊断)检测PSA抗体。该图示出用通过HD技术修饰的抗PSA抗体对比未修饰的抗体产生的信号。

具体实施方式

[0056] 以下描述是优选的实施方式。

[0057] 本公开涉及同源二聚化(HD)肽。更具体地,本公开涉及人工或合成的同源二聚化(HD)肽。本公开的HD肽具有改进的自缔合或同源二聚化的生物活性。

[0058] 在一个方面,HD肽可以是源自天然存在的HD肽或其保守变体的人工或合成HD肽。例如,与相应的天然存在的HD肽或其保守变体相比,HD肽可以包含反向构型的氨基酸序列。

在一个实施方式中,人工或合成HD肽可以包含与T15HD肽或R24 HD肽的序列相反的氨基酸序列。

[0059] 在另一个方面,提供了同源二聚化(HD)肽,其包含赋予改进的自结合性能的一个或多于一个取代或其保守变体。一个或多于一个取代可以是亲水性取代。同源二聚化(HD)肽可以包含一个或多于一个氨基酸取代,其中一个或多于一个取代增加了HD肽的亲水性。

[0060] 在一些实施方式中,同源二聚化(HD)肽可包含在核苷酸位置4、7和18处具有一个或多个取代的氨基酸序列ASRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSR(SEQ ID NO:1)。位置4处的一个或多于一个氨基酸取代可以是K或K的保守取代,位置7处的一个或多于一个氨基酸取代可以是R或R的保守取代,以及位置18处的一个或多于一个氨基酸取代可以是H或H的保守取代。HD肽可以包含与SEQ ID NO:8、9或10具有80%-100%序列同一性的氨基酸序列。

[0061] 还提供了人工或合成的HD肽二聚体,其可以包括天然存在的HD肽的二聚体、天然存在的HD肽的反向序列的二聚体或其保守变体。同源二聚化(HD)肽二聚体可以包含第一HD肽和第二HD肽,其中,第一HD肽和第二HD肽源自天然存在的HD肽,或其中,第一HD肽和第二HD肽源自天然存在的HD肽的反向序列。二聚体的第一HD肽和第二HD肽可以通过接头连接。二聚体中的HD肽可以进一步包含一个或多于一个本文描述的取代。同源二聚化(HD)肽二聚体可以包含与SEQ ID NO:5、7、11、12、13、14、15、17或19具有80-100%序列同一性的氨基酸序列。

[0062] 因此,人工或合成HD二聚体可以包含第一HD肽和第二HD肽,其中,第一HD肽、第二HD肽或第一HD肽和第二HD肽源自天然存在的HD肽或其保守变体。此外,人工或合成HD可以是HD二聚体并且包含第一HD肽和第二HD肽,其中,第一HD肽、第二HD肽或第一HD肽和第二HD肽源自天然存在的HD肽的反向序列或其保守变体。例如,第一HD肽和第二HD肽可以源自T15HD肽、R24HD肽、反向T15HD肽、反向R24HD肽或其保守变体。例如,二聚体的第一HD肽和第二HD肽可以包含与SEQ ID No.5、7、11、12或13具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0063] 二聚体内的HD肽可以通过接头连接。在一些实施方式中,接头可以是gly-gly。

[0064] 本公开进一步提供了包含本文描述的HD肽和/或HD二聚体的融合蛋白(例如化学偶联或重组抗体)。融合蛋白可以包含免疫球蛋白组分或抗体,HD肽或HD肽二聚体可以是重组的,或HD肽或HD肽二聚体可以以不破坏抗原结合并且允许HD肽序列中的优选构型变化从而赋予二聚化活性的方式与其结合。本文公开的HD肽和HD肽二聚体可以用于增强治疗性抗体的效力或用于增加针对其他应用(例如诊断)的结合敏感性和/或亲合力。

[0065] 术语“同源二聚化”,也称为“自体的”,描述了自缔合的实体。例如,“同源二聚化抗体”或“自体抗体”是自结合的抗体。术语“同源二聚化(HD)肽”或“自体肽”是能够实现抗体或其他免疫球蛋白的例如自缔合或自结合的肽。

[0066] 术语“天然存在的HD肽”或“天然HD肽”是指在自然界中发现的HD肽。例如,“T15”是指抗磷酰胆碱抗体,以及T15HD肽是指在T15抗体中发现的具有氨基酸序列SRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSR(SEQ ID No.1)的HD肽。“R24”是指识别双唾液酸神经节苷脂GD3(J)的抗体(J.Biol.Chem 374:5597-55604,1999),以及R24 HD肽是指在R24抗体中发现的具有氨基酸序列VAYISSGGSSINYA(SEQ ID NO.3)的HD肽。

[0067] 与HD肽序列相关的术语“反向构型”或“反向序列”是指天然存在的HD肽的氨基酸序列呈反向顺序,即N端变成C端并且C端变成N端。反向序列可以通过反向读取肽或蛋白质

序列来获得。回读序列(向后序列)是新的肽(向后肽)或蛋白质序列(向后蛋白质)。

[0068] 术语“抗体”通常是指含有抗原结合位点的重链或轻链免疫球蛋白分子或其任何功能组合或片段,例如抗原结合片段(Fab)。抗体优选在膜结构诸如蛋白质、糖蛋白、多糖或碳水化合物上和在正常细胞或肿瘤细胞上对细胞受体具有特异性。抗体可以是全长免疫球蛋白分子或抗体的可变结构域片段。术语“抗体”涵盖纳米抗体、双特异性抗体和双抗体、Fv和Fab、$F(ab)_2$、骆驼和其他抗原结合支架。

[0069] 术语“嵌合”是指来自不同遗传来源或物种的组分的组合。例如,根据本公开的嵌合抗体可以包含来自一种抗体的免疫球蛋白部分和本文描述的HD肽。嵌合抗体还可以包含源自两种或多种来源或物种的免疫球蛋白部分和HD肽。

[0070] 关于氨基酸序列的“保守变体”是指具有一个或多个保守取代的氨基酸序列的变体。

[0071] 本文所用的术语“保守取代(conserved substitution)”或“保守取代(conservative substitution)”及其语法变体是指HD肽的序列中存在与氨基酸不同但属于同一类描述的取代或描述的残基的氨基酸(即,非极性残基代替非极性残基、芳香族残基代替芳香族残基、极性不带电残基代替极性不带电残基、带电残基代替带电残基)。此外,保守取代可涵盖具有与取代野生型残基的残基相同符号且通常具有相似量值的界面亲水值的残基。

[0072] 本文所用的术语“非极性残基”是指甘氨酸(G,Gly)、丙氨酸(A,Ala)、缬氨酸(V,Val)、亮氨酸(L,Leu)、异亮氨酸(I,Ile)和脯氨酸(P、Pro);术语“芳香族残基”是指苯丙氨酸(F,Phe)、酪氨酸(Y,Tyr)和色氨酸(W,Trp);术语“极性不带电残基”是指丝氨酸(S,Ser)、苏氨酸(T,Thr)、半胱氨酸(C,Cys)、甲硫氨酸(M,Met)、天冬酰胺(N,Asn)和谷氨酰胺(Q,Gln);术语“带电残基”是指带负电的氨基酸天冬氨酸(D,Asp)和谷氨酸(E,Glu)以及带正电的氨基酸赖氨酸(K,Lys),精氨酸(R,Arg)和组氨酸(H,His)。氨基酸的其他分类可以如下:

[0073] 具有疏水侧链的氨基酸(脂肪族):丙氨酸(A,Ala)、异亮氨酸(I,Ile)、亮氨酸(L,Leu)、甲硫氨酸(M,Met)和缬氨酸(V,Val);

[0074] 具有疏水侧链的氨基酸(芳香族):苯丙氨酸(F,Phe)、色氨酸(W,Trp)、酪氨酸(Y,Tyr);

[0075] 具有极性中性侧链的氨基酸:天冬酰胺(N,Asn)、半胱氨酸(C,Cys)、谷氨酰胺(Q,Gln)、丝氨酸(S,Ser)和苏氨酸(T,Thr);

[0076] 带电侧链的氨基酸(酸性):天冬氨酸(D、Asp)、谷氨酸(E、Glu);

[0077] 带有带电侧链的氨基酸(碱性):精氨酸(R,Arg);组氨酸(H,His);赖氨酸(K,Lys)、甘氨酸(G,Gly)和脯氨酸(P,Pro)。

[0078] 保守氨基酸取代可能对所得HA蛋白变体或修饰的HA蛋白的活性具有与原始取代或修饰类似的影响。关于保守取代的进一步信息可以在例如Ben Bassat(J.Bacteriol,169:751-757,1987)等人、O′Regan等人(基因,77:237-251,1989)、Sahin-Toth等人(蛋白质科学3:240-247,1994)、Hochuli等人(生物技术,6:1321-1325,1988)和广泛使用的遗传学和分子生物学教科书中找到。

[0079] Blosum矩阵通常用于确定多肽序列的相关性。Blosum矩阵是使用可信比对的大数据库(BLOCKS数据库)创建的,其中对通过小于某一阈值百分比同一性相关的成对序列比对

进行计数(Henikoff等人,美国科学学院学报,美国89:10915-10919,1992)。对于BLOSUM90矩阵的高度保守的靶标频率,使用了90%同一性阈值。对于BLOSUM65矩阵,使用了65%同一性阈值。Blosum矩阵中零分及以上的分数被视为所选百分比同一性的"保守取代"。下表示出了示例性的保守氨基酸取代:表1。

[0080] 表1示例性保守氨基酸取代

[0081]

原始残基	高度保守的取代	高度保守的取代(来自Blosum90矩阵)	保守取代(来自Blosum65矩阵)
Ala	Ser	Gly, Ser, Thr	Cys, Gly, Ser, Thr, Val
Arg	Lys	Gln, His, Lys	Asn, Gln, Glu, His, Lys
Asn	Gln; His	Asp, Gln, His, Lys, Ser, Thr	Arg, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr
Asp	Glu	Asn, Glu	Asn, Gln, Glu, Ser

[0082]

Cys	Ser	无	Ala
Gln	Asn	Arg, Asn, Glu, His, Lys, Met	Arg, Asn, Asp, Glu, His, Lys, Met, Ser
Glu	Asp	Asp, Gln, Lys	Arg, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Ser
Gly	Pro	Ala	Ala, Ser
His	Asn; Gln	Arg, Asn, Gln, Tyr	Arg, Asn, Gln, Glu, Tyr
Ile	Leu; Val	Leu, Met, Val	Leu, Met, Phe, Val
Leu	Ile; Val	Ile, Met, Phe, Val	Ile, Met, Phe, Val
Lys	Arg; Gln; Glu	Arg, Asn, Gln, Glu	Arg, Asn, Gln, Glu, Ser,
Met	Leu;Ile	Gln, Ile, Leu, Val	Gln, Ile, Leu, Phe, Val
Phe	Met; Leu; Tyr	Leu, Trp, Tyr	Ile, Leu, Met, Trp, Tyr
Ser	Thr	Ala, Asn, Thr	Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Lys, Thr
Thr	Ser	Ala, Asn, Ser	Ala, Asn, Ser, Val
Trp	Tyr	Phe, Tyr	Phe, Tyr
Tyr	Trp; Phe	His, Phe, Trp	His, Phe, Trp
Val	Ile; Leu	Ile, Leu, Met	Ala, Ile, Leu, Met, Thr

[0083] 不希望受理论束缚,据信通过增加亲水性(通过使用单个氨基酸的亲水性指数),结合水平可能增加,而亲水性的减少可能降低自结合。

[0084] 在一些实施方式中,可以修饰HD肽序列以增强本文描述的HD抗体的交联潜力。在一个实施方式中,此类功能增强的肽是通过产生一系列在模板序列内的每个氨基酸位置处具有取代的合成肽,然后测试这种肽文库针对自体结合或针对结合至原始肽序列来确定。然后将那些与原始序列具有优异结合的肽偶联到免疫球蛋白上,测试所得偶联物的效力、特异性和不希望的诱导聚集的能力。在一个具体实施方式中,改变T15肽序列,并选择修饰的序列用于增强的功能。在本发明的另一个实施方式中,肽的自结合潜力可以通过增加序列的互补性来增强,诸如美国专利号4,863,857(授予Blalock等人)中描述的。肽的自结合潜力和/或耐受也可以通过人源化源自非人动物的自结合肽序列来增强。将肽序列人源化涉及针对在人类中的表达或功能性优化该序列。在别处已经描述了人源化肽和蛋白的实例和方法(Roque-Navarro等人,2003;Caldas等人,2003;Leger等人,1997;Isaacs和Waldmann,1994;Miles等人,1989;Veeraraghavan等人,2004;Dean等人,2004;Hakenberg等人,2003;Gonzales等人,2004和H.Schellekens,2002)。

[0085] 术语“表达构建体”是指包括编码待表达的肽或蛋白质的核酸序列的重组核酸序列。编码待表达的肽或蛋白质的核酸可操作地连接至促进待表达的肽或蛋白质的表达的一个或多个调节核酸序列。当核酸序列处于功能关系时,它们可操作地连接。调节核酸序列说明性地是启动子、增强子、DNA和/或RNA聚合酶结合位点、核糖体结合位点、聚腺苷酸化信号、转录起始位点、转录终止位点或内部核糖体进入位点(IRES)。可以将表达构建体掺入载体中,诸如表达载体和/或克隆载体。术语“载体”是指用于转移核酸的重组核酸载体。示例性的载体是质粒、粘粒、病毒和噬菌体。具体的载体是本领域已知的,并且本领域技术人员将认识到用于特定目的的合适载体。

[0086] 同源二聚化(HD)肽

[0087] 本申请描述了具有改进的自结合的同源二聚化(HD)肽并且用T15和R24 HD肽举例说明(参见实施例1)。T15肽和其他HD肽的自结合和亲水性特征的分析产生了基序,该基序可用于预测可以导致改进的自结合的氨基酸取代。

[0088] 本文描述的示例性同源二聚化肽总结在以下表2中。

[0089]

表 2-自体/同源二聚化（HD）序列

SEQ ID NO.	HD 肽名称	衍生	序列
1	T15	T15 抗磷酰胆碱	ASRNKANDY**TTEY**SASVKGRFIVSR*
2	抗-病毒肽	CR3014 抗-SARS	RIRNQAYSYTTEYAASVKGRFTISR**
3	R24（短）	R24 抗双唾液酸神经节苷脂	VAYISSGGSSINYA
4	rs-T15	T15 抗磷酰胆碱	RSVIFRGKVSASYETTYDNAKNRSA
5	rs-T15 二聚体（rs-GG-rs）	T15 抗磷酰胆碱	RSVIFRGKVSASYETTYDNAKNRS**AGG**RSVIFRGKVSASYETTYDNAKNRSA
6	rs-R24	R24 抗双唾液酸神经节苷脂	AYNISSGGSSIYAY
7	rs-R24 二聚体（rs-GG-rs）	R24 抗双唾液酸神经节苷脂	AYNISSGGSSIYAY**GG**AYNISSGGSSIYAY
8	T15-var1	T15 抗磷酰胆碱	ASR**KK**ANDYTTEYSASVKGRFIVSR
9	T15-var2	T15 抗磷酰胆碱	ASRNKA**R**DYTTEYSASVKGRFIVSR
10	T15-var3	T15 抗磷酰胆碱	ASRNKANDYTTEYSASV**H**GRFIVSR
11	T15-var1 二聚体	T15 抗磷酰胆碱	ASR**KK**ANDYTTEYSASVKGRFIVSRGGASR**KK**ANDYTTEYSASVKGRFIVSR
12	T15-var2 二聚体	T15 抗磷酰胆碱	ASRNKA**R**DYTTEYSASVKGRFIVSRGGASRNKA**R**DYTTEYSASVKGRFIVSR
13	T15-var3 二聚体	T15 抗磷酰胆碱	ASRNKANDYTTEYSASV**H**GRFIVSRGGASRNKANDYTTEYSASV**H**GRFIVSR
14	T15 二聚体		ASRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSRGGASRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSR
15	R24 二聚体（短）		VAYISSGGSSINY**AGG**VAYISSGGSSINYA
16	R24（长）		GAAVAYISSGGSSINYA
17	R24 二聚体（长）		GAAVAYISSGGSSINYA**GG**AAVAYISSGGSSINYA
18	rs-R24（长）		AYNISSGGSSIYAVAAG
19	Rs-R24 二聚体（长）		AYNISSGGSSIYAVAAGGAYNISSGGSSIYAVAAG

*YTTEY（在 SEQ ID NO：1 中为粗体）表示可能的铰链区

** SEQ ID 2 是假定的天然的自结合抗体。序列可以通过如在本公开中所公开的亲水性基序来增强

[0090] 免疫球蛋白组分的基本上相同的氨基酸序列具有与在本发明的具体实施方式中在本文公开的氨基酸序列至少70％、80％、85％、90％以及更优选地95％、96％、97％、98％、

99％或更大％同一性的氨基酸序列,其中基本上相同的蛋白保留了与其基本上相同的参考蛋白相比基本上相似或更好的功能。如本领域技术人员将理解的,遗传密码的简并性使得超过一个核酸将编码具体的免疫球蛋白组分,并且这些替代序列被认为在本发明的范围内。

[0091] 与SEQ ID NO.4和8-10的25聚体基本上一致的氨基酸序列具有至少20个连续氨基酸,更优选至少22个连续氨基酸,具有与所鉴定的自体氨基酸序列的20或更多个连续氨基酸至少70％、80％、85％、90％并且更优选95％、96％、97％、98％、99％或100％一致的氨基酸序列。与SEQ ID NO.3和6的14聚体基本上一致的氨基酸序列具有至少10个连续的氨基酸,更优选至少8个连续的氨基酸,具有与鉴定的自体氨基酸序列的10个或更多个连续的氨基酸至少70％、80％、85％、90％并且更优选95％、96％、97％、98％、99％或100％一致的氨基酸序列。这同样适用于HD二聚体,例如SEQ ID NO.5、7、11、12和13,中的每个氨基酸序列。接头不一定需要是gly-gly,并且可以是任何其他合适的接头。

[0092] 一种氨基酸序列,具有与SEQ ID NO 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19的序列具有至少70％、80％、85％、90％并且更优选95％、96％、97％、98％、99％或100％或它们之间的任何量的同一性或相似性的氨基酸序列。

[0093] 基本上相同的氨基酸序列可以包含一个或多个保守取代并且可以被称为保守变体。与本文描述的HD肽基本上相同的肽保留了与其基本上相同的参照自体肽相比基本上相似或更好的自体功能。

[0094] 回源二聚化抗体(也称为自体、自结合抗体或HD抗体)

[0095] 本公开描述了抗体-肽融合蛋白的产生,该抗体-肽融合蛋白增强抗体的生物学和免疫学活性,而不改变针对相应抗原的抗体特异性。具体地,本公开提供了抗体融合蛋白的产生,抗体融合蛋白包含源自T15的完全或部分自体24聚体肽或源自R24的17聚体肽。HD肽可以以反向构型提供,作为二聚体或具有亲水性取代。

[0096] 来自任何抗体的CDR可以用于本文描述的肽/抗体复合物中。优选的抗体是结合免疫调节或检查点抑制剂的抗体。例如,CDR序列可以编码对PD-1/PD-1L或CTLA-4特异性并且针对T细胞活化表达活性的抗体。对肽长度的任何限制是与肽合成相关的那些实际限制,而不是与本公开的方法的实践相关的限制。其他优选的CDR序列源自FDA批准的抗体,诸如利妥昔单抗、赫赛汀和/或安维汀。

[0097] 已经产生了重组单克隆抗体,其中将非人物种(典型地小鼠)的CDR(抗原结合序列)的基因插入到人抗体框架中用于主要降低免疫原性。尽管这些重组抗体具有与效应细胞和人类补体相互作用的能力,但治疗活性(如果有的话)通常由于抗原/抗体相互作用的性质而由原始CDR序列赋予。

[0098] 附接至抗体的HD肽允许在细胞表面形成晶格,其掺入结合至靶标的抗体以及仅通过与其他结合靶标的抗体的自结合相互作用结合的抗体两者。这不仅允许晶格形成和细胞表面抗原的交联,而且允许高于与抗原表位结合的抗体的典型1:1比值。基于流式细胞术分析,该比值,至少在一些抗原-抗体系统中,可以高达50-100倍。事实上,HD修饰的抗体的结合大大增加是HD抗体的标志,并且用作评估重组和化学偶联抗体的初始测定。

[0099] 允许抗体自缔合、形成晶格并交联靶抗原的同源二聚化序列(HD)的发现提供了赋予重组单克隆抗体治疗活性的机会,该重组单克隆抗体独立于抗原结合CDR序列并且因此

适用于许多抗原/抗体系统。此类肽序列先前已经通过核苷酸结合位点化学偶联至抗体并且插入在融合蛋白的Fc区的C端上。前一种方法允许HD肽以位点特异性方式插入抗体中,但不是可规模化的制造工艺。相反,后一种方法是可规模化的,但是不允许最佳活性。为了抗体中的最佳HD活性,肽需要在多个氨基酸位置处与相邻抗体上的HD肽相互作用。这种自结合可以通过肽在HD肽的c端附近形成发夹结构的倾向而降低。出乎意料地,发现HD肽序列可以插入到重组抗体中,通过位点特异性偶联而不损失抗原结合,或通过仔细选择例如肽位置来降低效应子功能,例如通过反转HD肽中氨基酸的顺序。通过将不允许HD肽的C端形成其优选发夹结构的正常序列顺序(N端至C端)逆转,克服了以前的重组抗体方法在插入Fc区的C端时HD活性丧失的问题。通过在正向或反向构型中二聚化HD肽,并用接头如gly-gly连接两个HD肽,也可以实现类似的结果。

[0100] 将HD技术掺入到除了原型人类或人源化IgG1抗体形式之外的其他抗体形式中,由于大大增强的结合,将改进它们的治疗或诊断活性。此类抗体形式包括但不限于纳米抗体、双特异性抗体和双抗体、Fv和Fab、$F(ab)_2$、骆驼和其他抗原结合支架(综述于:Hoglan Yu,Abhiskek Saxena,Sachdev S.Sidhu,Donghui Wu,Frontiers of Immunology 8:Article 38,2017)。

[0101] 在Fc区内被修饰以增加或减少血清半衰期、抗体依赖性细胞毒性、补体结合或补体介导的杀伤的一组重组抗体形式还代表通过HD技术增加的抗原结合可以增强治疗或诊断活性的抗体形式(综述于:Abhishek Saxena&Donghu Wu,Frontiers in 1 mmunology,7:Article 580,2016中)。本发明的重组抗体形式不受这些参考形式的限制。

[0102] 根据本发明的抗体只有在首次结合至它们的靶抗原之后才可以自发地结合至自身。本发明的同源二聚体化抗体在结合其靶抗原(通常是细胞表面跨膜受体)时优选与其他这类偶联的抗体非共价结合。

[0103] 本发明的同源二聚化抗体通常包含与具有HD肽序列的一种或多种肽偶联的抗体。本发明的同源二聚化抗体可以包含几乎任何免疫球蛋白。在一些实施方式中,抗体结合至涉及疾病或障碍的靶标,其中靶标的结合对该疾病或障碍具有治疗效果。靶抗原可包括细胞表面抗原,包括跨膜受体。在具体的实施方式中,抗体的Ig组分可以包括单克隆抗体。

[0104] 本发明提供了具有自结合性能的抗体,该自结合性能模拟罕见的、天然存在的、自体抗体的那些性能。本发明因此提供了针对增强抗体的治疗潜力的共价二聚化和其他工程化方法的简单且有吸引力的替代方案。

[0105] 表达系统

[0106] 本发明提供了用表达载体转化的分离的宿主细胞,表达载体编码具有抗原结合结构域和HD肽的免疫球蛋白重链。在具体的实施方式中,分离的宿主细胞还用编码具有抗原结合结构域的免疫球蛋白轻链的表达载体转化,并且免疫球蛋白重链的抗原结合结构域和免疫球蛋白轻链的抗原结合结构域一起形成抗原结合位点。用于产生本发明的重组自体抗体的分离的宿主细胞可以是体外的。用于HD抗体表达的表达系统说明性地包括:真核细胞诸如哺乳动物细胞、植物细胞、昆虫细胞、酵母和两栖动物细胞;以及原核表达系统诸如细菌。本领域技术人员能够选择用于生产重组HD抗体的具体表达系统。

[0107] HD肽的位置

[0108] 如在美国专利公开号20030103984中所见,先前仅认为将HD肽序列插入在Fc区的c

端上是实用的。这是由于在mAb的其他区域中插入HD肽可以降低或破坏抗原结合或潜在的治疗活性诸如ADCC或补体结合的担忧。事实上,公布的数据表明当合成和测定时,源自T15抗体的24聚体HD序列表达三维构型;将其编码成抗体可能不仅使肽的3D结构无效,而且可能削弱附近CDR的抗原结合。尽管与核苷酸亲和位点化学偶联物相比描述了Fc末端构建体中的自缔合活性(Kohler,H,Rector,K&Amick J.,Hydridoma 2012(6):395-402),但该活性降低(数据未示出)。

[0109] 在本发明的优选实施方式中,HD肽定位于抗体内的三个位置之一,例如IgG。

[0110] 第一个直接在重链或轻链的CDR3之后。在这种形式中,该Ig分子可以表达为单链Fv,其中HD肽在本文描述的任何优化构型中在最c端部分上被gly-gly或类似间隔子编码。尽管与抗体的抗原结合部分邻近,但该位置可以赋予最大自缔合而不降低抗原结合。抗原结合在该位置的保留是完全出人意料的,因为我们,原始技术的诸位发明人,认为这是不可能的,以致于我们实际上先前将序列连接到整个IgG的Fc区的c端上-我们能够将抗原结合与自缔合分离的最远的。

[0111] 第二位点直接在重链或轻链恒定区的c端,其后是gly-gly间隔子。这可以表示为Fab。在这种形式中,Fab还可以是针对与靶抗原的结合测定的天然噬菌体表达文库或免疫噬菌体表达文库的一部分。使用HD肽将允许结合增强以及和甚至鉴定低亲和力抗体。

[0112] 第三个位点是其中将HD序列克隆到Fc区的c端上的位点,位点之前是gly-gly或其他间隔子。在HD肽是HD肽的二聚体的实施方式中,在正常或反向构型中,通过gly-gly或替代间隔子将两个HD肽分离尤其与抗体c端构建体相关以克服空间抑制。在初始测试中,这种形式的HD肽具有较高的相互作用亲合力。

[0113] 生产同源二聚化(自体)抗体的方法

[0114] 通过各种位点特异性化学偶联方法产生的HD肽修饰的抗体也可用于产生完全活性的自结合抗体。用于将HD肽附接至抗体分子的许多方法是本领域技术人员已知的。一种方法是使用化学交联,诸如在美国专利公开号20040185039中描述的亲和交联方法。最初采用这种方法是因为它能够将肽连接到定位于Fab重链末端的抗体的核苷酸结合位点。该亲和位点允许插入肽而不降低结合的亲和力,并保持肽的自缔合活性。当与HD-肽与碳水化合物的偶联相比时,在抗原结合区附近的这样的位点特异性偶联物更具活性,即使通过碳水化合物的偶联导致更多的肽结合至抗体(J.Immunol Methods:(2005)304:100-106,Photo-activated affinity-site cross-linking of antibodies using tryptophan containing peptides,Mike Russ,Dingyuan Lou,Heinz Kohler)。然而,由于该方法的要素,即光活化步骤,用于结合这种方法的制造过程不可规模化并且仅可用于产生少量偶联物。

[0115] 已经开发了用于与抗体-药物偶联物(ADC)一起使用的位点特异性偶联的第二种方法,即Smartag技术(Wu,P.,et al.,Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using for genetically encoded aldehyde tag.Proc Natl Acad Sci U S A,2009.106(9):p.3000-5.)。用HD肽使用此类技术或类似位点特异性技术可以克服规模性的问题。

[0116] 可替代地,可以使用重组方法。例如,可以制备包含编码抗体的核酸序列和编码肽的核酸序列的融合基因,其中编码肽的核酸序列位于编码抗体的核酸序列内部的位点处,

其中,当表达该融合体时,由此产生的融合蛋白包含该抗体加上该肽,并且该肽在不干扰该抗体的抗原结合的位点处连接到该抗体上,并且表达该融合基因以产生该融合蛋白。具体地,该融合蛋白可以通过提供编码抗体的基因来产生,其中,基因被突变以包含限制性位点,其中,限制性位点直接位于抗体的CDR3的C端,或直接位于重链可变区的c端,或位于抗体的c端上。通过小鼠或其他人或非人来源的CDR交换产生的人源化抗体连同编码HD肽的人IgG框架可以由融合基因表达。

[0117] 产生融合蛋白的方法描述于例如以下美国专利:Mascarenhas等人的美国专利号5,563,046;Fell,Jr等人的美国专利号5,645,835;Murphy等人的美国专利号5,668,225;Nemazee等人的美国专利号5,698,679;Whitlow等人的美国专利号5,763,733;Quertermus等人的美国专利号5,811,265;Chang等人的美国专利号5,908,626;Bona等人的美国专利号5,969,109;Epstein等人的美国专利号6,008,319;Seed等人的美国专利号6,117,656;Whitlow等人的美国专利号6,121,424;Ledbetter等人的美国专利号6,132,992;Huston等人的美国专利号6,207,804;以及Segal等人的美国专利号6,224,870。产生Ig融合蛋白的方法描述于例如抗体工程(Antibody EnGlneering),第2版,Carl A.K.Borrebaeck,牛津大学出版社,1995以及“分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第2版,冷泉港出版社,1989)中。

[0118] 在具体实施方式中,将编码本文描述的HD肽或基本上相同的HD肽的DNA序列与编码免疫球蛋白重链和/或免疫球蛋白轻链的DNA序列框内插入。由DNA序列表达的融合蛋白(或HD抗体)包含具有所述HD肽的免疫球蛋白重链和/或免疫球蛋白轻链。

[0119] 编码免疫球蛋白重链或免疫球蛋白轻链的核酸是众所周知的,并且可以使用编码免疫球蛋白重链或免疫球蛋白轻链的各种核酸中的任一种来产生本发明的重组嵌合HD抗体。本文描述了编码人恒定重链和/或人恒定轻链,具体是人γ恒定重链和人κ恒定轻链的特异性核酸。编码人γ恒定重链和/或人κ恒定轻链的核酸可以从商业来源获得,诸如从Progen Biotechnik GmbH可获得的载体pAc-k-CH3。可以使用重组技术(诸如通过克隆或合成)产生编码本文描述的蛋白质和/或肽(包括人γ恒定重链和/或人κ恒定轻链)的核酸。具体的免疫球蛋白恒定重链和/或免疫球蛋白κ恒定轻链描述于例如美国专利号5,736,137和6,194,551。

[0120] IgG融合蛋且

[0121] Ig融合蛋白具有将抗体组合特异性和/或抗体效应子功能与贡献独特性能的分子结合的优点。当c-myc取代抗体分子的Fc(Neuberger M S,Williams G T和Fox R O,自然125:604,1984)时,首先证明了产生这种蛋白家族的能力,但现在存在许多实例。Ab融合蛋白可以按若干不同方式实现。在一种方法中,非Ig序列取代可变区;替换V区的分子提供用贡献性能诸如效应子功能和改进的药代动力学的抗体靶向的特异性。实例包括IL-2和CD4。可替代地,非Ig序列可以取代恒定区或附接至恒定区。所得分子保留了原始抗体的结合特异性,但从附接的蛋白质获得特征。取决于取代的位置,将保留不同的抗体相关的效应子功能和生物性能。

[0122] 用于构建IgG融合蛋白的载体

[0123] 已经产生一系列载体,其允许在抗体分子内不同位置处融合蛋白,由此促进具有不同性能的融合蛋白的构建。使用这些载体,有可能产生具有不同分子量、化合价的分子并

且具有抗体分子的功能性能的不同子集的融合蛋白家族。

[0124] 作为如何促进融合基因的构建的具体实例,使用定点诱变在人IgG3重链基因中产生独特的限制酶位点。在该具体实例中,在CH1外显子的3′端、直接在CH2外显子的5′端的铰链之后以及在CH3外显子的3′端产生限制性位点。如此产生的限制性位点是在CH1末端通过用TacGTa替换TtgGTg的SnaB I、在CH2开始通过用CAgCTG替换CAcCTG的Pvu 11和在CH3末端用AATatt替换AATgag的Ssp I。这些操作在这些位置提供了独特的平端克隆位点。在所有情况下,定位限制性位点使得在切割后Ig将贡献密码子的第一个碱基。选择具有62个氨基酸的延伸铰链区的人IgG3用作免疫球蛋白;当存在时,该铰链应提供间隔和柔性,从而促进同时的抗原和受体结合。还在IgG3基因的31处引入EcoR I位点以提供3′克隆位点和polyA添加信号。尽管最初设计用于与生长因子一起使用,但是这些限制位点可以用于将任何新序列定位在抗体中的限定位置。而且,使用这些克隆盒,可以容易地改变可变区。可以使用类似的技术来在其他抗体基因中产生适合的限制性位点。

[0125] 融合基因的产生

[0126] 作为产生融合蛋白的第一步,必须在期望的位置将平端限制性位点引入待融合的基因的5′端。为了维持正确的阅读框,必须对该位点进行定位,这样使得在切割之后,它将对密码子贡献两个碱基。如果目的是用完整分子制备融合蛋白,则通常将限制性位点引入任何翻译后加工的位置,诸如引入到前导序列之后。可替代地,如果目的是仅使用蛋白质的一部分,那么可以在基因内的任何位置引入平端位点,但是必须始终注意维持正确的阅读框。此外,如果存在融合蛋白的羧基端翻译后加工,经常希望的是在该加工位点引入终止密码子。

[0127] 当产生融合蛋白时,主要关注点是维持所有组分的生物活性。通过抗体的结构域结构促进用抗体产生融合蛋白,并且所有克隆位点直接位于完整结构域之后。在这种构型中,应该确保免疫球蛋白的正确折叠。附着的蛋白质的折叠取决于其结构和它在哪里融合。每当结构信息可用时,希望在将维持附接蛋白的结构完整性的位置处产生融合。

[0128] 为了产生足以用于功能分析的蛋白质的量,希望使蛋白质分泌到培养基中。虽然在迄今为止报道的实例中,组装的融合蛋白已经被组装并分泌,但是当设计另外的融合蛋白时,这仍然是个顾虑。

[0129] 设计含有生物活性肽作为重链或轻链基因的一部分的融合基因的方法可以使用已建立的抗体工程方案(抗体工程(Antibody EnGlneering),第二版:Carl A.K.Borrebaeck,牛津大学出版社,1995,第9章,第267-293页)。该肽可以融合至H或L链的N端残基或C端残基。此类融合基因的表达通常在哺乳动物细胞系中进行,尽管可以使用其他表达系统,例如像细菌或酵母表达系统。

[0130] 药物组合物

[0131] 本发明还涉及包含本发明的同源二聚化抗体和药学上可接受的载体的组合物。

[0132] 本发明的抗体可用于以单位剂型、无菌溶液或悬浮液、无菌非胃肠外溶液或悬浮液、口服溶液或悬浮液、水包油或油包水乳液等全身施用于人和动物的药物组合物,其包含合适量的活性成分。局部应用可以是软膏剂、乳膏剂、洗剂、胶冻剂、喷雾剂、灌洗剂等的形式。组合物可以约1%至20%、以及优选约5%至15%的组成用于活性成分与载体或运载体的药物组合物(wt%)中。

[0133] 以上肠胃外溶液或悬浮液可以经皮给予,如果希望的话,可以给予更浓缩的缓释形式。本发明的融合蛋白可以静脉内、肌内、腹膜内或局部给予。因此,可以将活性化合物掺入缓释基质中以用于经皮给药。为了本发明的目的,可接受的药物载体是本领域已知的载体,它们不会不利地影响药物、宿主或包括药物递送装置的材料。载体还可以含有防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂等以及本发明的渗透促进剂。哺乳动物的有效剂量可能由于以下因素而变化,如年龄、体重活动水平或正在治疗的受试者的状况。通常,当每天至少一次以溶液给予时,根据本发明的化合物的有效剂量是约10mg至500mg。可以以合适的间隔重复给予。

[0134] 当结合其靶抗原时,偶联物自体抗体可以与其他自体抗体非共价结合。然而,抗体的二聚体或多聚体的过早形成可以导致制造中的困难,诸如在纯化和浓缩期间,以及给药中的缺点,这可能导致副作用。因此,将含有本发明的自体抗体-肽偶联物的组合物进行配制以降低这种二聚化可能并且使单体性能最大化,同时以溶液并且在给予之前。例如,已经发现通过使用高渗组合物可以减少或减轻溶液二聚化。在一些实施方式中,可以将0.5M或更高的盐浓度,低水平的SDS或其他各种洗涤剂,诸如阴离子性质的那些(参见美国专利号5,151,266,其通过引用并入本文),或例如通过使用琥珀酰酐降低其等电点的抗体修饰(参见美国专利号5,322,678,其通过引用并入本文)用于配制组合物。

[0135] 免疫测定

[0136] 根据本发明提供了免疫测定,免疫测定包括使生物或环境样品中的分析物与偶联至自体肽的抗体接触。然后检测由分析物和与自体肽偶联的抗体形成的复合物。

[0137] 在具体实施方式中,本发明的测定的特征在于检测低水平表达的抗原,诸如在细胞表面上,使用含有天然自体肽的抗体,或通过将自体肽与抗体偶联。

[0138] 高度特异性抗体的使用在许多诊断应用中是常见的。所述抗体的结合可以通过许多手段直接检测,或可替代地,需要第二抗体用于信号增强和检测。以前,信号检测与结合的抗体(单价或二价结合至靶标)的量直接相关。在本发明中,增强的信号强度起因于结合到目标分析物上的自体肽偶联抗体的多价结合相互作用。

[0139] 不论是直接检测还是间接检测,由于晶格形成以及靶标周围更多的抗体,自体肽偶联抗体大大增强了信号检测。因此,可以将天然存在的自体抗体和非天然存在的自体肽偶联的抗体用可检测的标记直接标记,标记在免疫测定中提供增强的信号。类似地,间接标记(诸如次级抗体的标记)在免疫测定中产生增加的信号,因为该次级抗体将以增加的数目结合到一级自体肽偶联的抗体上。

[0140] 在本发明的测定的实施方式中,天然发生的自体抗体或偶联至同源二聚化(HD)肽的抗体用于在测定(诸如ELISA)中增强固定在基板(诸如塑料)上的抗原的信号检测。

[0141] 在本发明的测定的实施方式中,天然发生的自体抗体或偶联至同源二聚化(HD)肽的抗体用于增强“解离速率(off-rate)”或被包被或结合至聚合物芯片并且通过表面等离子体共振检测的抗原的亲合力的增加。

[0142] 在本发明的测定的实施方式中,天然发生的自体抗体或偶联至同源二聚化(HD)肽的抗体用于通过荧光或其他信号检测方法增强在体内(诸如在异种移植肿瘤动物模型中)结合到靶标上的抗体的结合和定位检测。

[0143] 根据本发明的实施方式的测定可包括与一种或多种同源二聚化(HD)肽偶联以增

强分析物检测的几乎任何免疫球蛋白。

[0144] 术语“分析物”是指由偶联至自体肽的抗体特异性识别的任何分子或化合物,说明性地包括蛋白质、肽、半抗原、碳水化合物、脂质、神经节苷脂以及这些的组合。在具体实施方式中,分析物可以是哺乳动物分析物,说明性地包括例如由哺乳动物的正常或异常细胞生成的蛋白质、肽、半抗原、碳水化合物、脂质、神经节苷脂或其组合。

[0145] 在另外的具体实施方式中,分析物可以是由微生物(诸如细菌或病毒)产生的非哺乳动物分析物,诸如蛋白质、肽、半抗原、碳水化合物、脂质、神经节苷脂或其组合。因此,提供本发明的具体测定用于检测微生物和/或微生物的产物。例如,用于检测微生物和/或微生物的产物的测定用于测定从人或非人动物获得的样品以检测感染。在进一步的实施方式中,用于检测微生物和/或微生物的产物的测定用于测定获自待测试的环境或物体的样品被微生物和/或微生物的产物污染。

[0146] 在本发明的测定的实施方式中,目标分析物是B细胞受体、CD20、Her2、神经节苷脂GM2、乙醇酸神经节苷脂GM3、GD3神经节苷脂、半胱天冬酶、氧化的低密度脂蛋白、磷酰胆碱、EGFR、CD32B、HLADR1、CD19、EpCAM、PSA以及细菌抗原诸如葡萄球菌抗原。

[0147] 在本发明的一些实施方式中,提供了诊断和预后免疫测定。术语“诊断免疫测定”是指允许确定指示动物或人受试者中的疾病或病理状况的分析物的存在或量的免疫测定。术语“预后免疫测定”是指允许确定指示疾病或病理状况在动物或人类受试者中的进展的分析物的存在或量的免疫测定。

[0148] 试剂盒

[0149] 在本发明的实施方式中,提供了用于使用抗体-同源二聚化(HD)肽偶联物进行测定的试剂盒。在具体实施方式中,试剂盒包括抗体-同源二聚化(HD)肽偶联物和用于检测样品中的分析物的说明书。

[0150] 治疗方法

[0151] 还考虑了增强细胞凋亡、补体固定、效应细胞介导的靶标杀死或预防疾病状态的发展或增强的疾病状态的方法,其使用本发明的同源二聚化(HD)-抗体或包含同源二聚化(HD)-抗体的组合物。在一个实施方式中,向受试者给予本发明的自体偶联物、或包含本发明的自体偶联物的组合物。一旦给予,抗体结合至靶细胞并且增强细胞凋亡、补体固定、效应细胞介导的靶标杀死或预防靶标抗原或细胞刺激疾病状态的发展或进一步增强疾病状态。在进一步的实施方式中,允许自体偶联物与靶细胞结合并且增强细胞凋亡、补体固定、效应细胞介导的靶标杀死或预防靶标抗原或细胞进一步增强疾病状态的时间,以及为了使自体偶联物从正常组织中清除,可以给予第二抗自体肽抗体。

[0152] 在一些方面,以有效减轻疾病或病症的症状的量向患有衰弱性或潜在威胁生命的疾病或病症的患者给予至少一种受试者同源二聚化(HD)抗体。设想由本发明的抗体治疗的疾病或病症可以是恶性肿瘤、肿瘤、癌症、自身免疫障碍、阿尔茨海默病或其他神经退行性病症、或移植物或移植排斥。

[0153] 在一些方面,增强患者的靶细胞的细胞凋亡的方法包括给予第一同源二聚化(HD)抗体-肽偶联物和识别该偶联物的肽结构域的第二抗体。在该实施方式中,抗体-肽偶联物识别靶细胞的跨膜受体的胞外区。由于其同源二聚化性能,抗体-肽偶联物可以比缺乏自结合肽结构域的相应抗体更密切地结合至靶标。此外,每当自体抗体结合到两种或更多种受

体上时,其中这些受体由于抗体的自结合性能而紧密接近,就可以触发细胞内的细胞凋亡信号。在那些情况下,当偶联物的肽结构域呈现暴露的表位时,可以给予对自体肽特异性的第二抗体,该第二抗体结合至修饰的抗体,并且增强交联过程,甚至引起靶抗原的暂时清除。如果靶抗原是受体,则从细胞表面的清除、胞吞作用和降解将随后需要合成新的受体蛋白,意味着将比使用简单的阻断抗体或小分子抑制剂更有效地抑制受体的生物功能更长的时间。可替代地,第二抗体可以携带放射性标记或其他潜在治疗性物质,使得当给予时,它可以攻击靶向的细胞。使用第二抗体的关键是抗体的特异性。同源二聚化(HD)肽虽然是天然存在的,但仅存在于少量的鼠免疫球蛋白上。因此,对该肽具有特异性的抗体将具有在体内使用的必需选择性。

[0154] 疾病

[0155] 考虑由本发明的抗体治疗的疾病或病症可以是恶性肿瘤、肿瘤、癌症、动脉粥样硬化、自身免疫障碍、阿尔茨海默病或其他神经变性病症、移植物或移植排斥、或对抗体疗法有反应的任何其他疾病或病症。

[0156] 剂量

[0157] 本文描述的同源二聚化(HD)抗体可以按一个或多个剂量给予,这些剂量基本上等同于或小于对于未修饰抗体可实行的那些。

[0158] 表3.序列的SEQ ID NO:和描述

[0159]

SEQ ID NO:	序列描述
1	T15
2	CR3014 抗 SARS
3	R24（短）
4	rs-T15
5	rs-T15 二聚体
6	rs-R24
7	rs-R24 二聚体
8	T15-var1
9	T15-var2
10	T15-var3
11	T15-var1 二聚体
12	T15-var2 二聚体
13	T15-var3 二聚体
14	T15 二聚体
15	R24 二聚体（短）
16	R24（长）
17	R24 二聚体（长）
18	Rs-R24（长）
19	Rs-R24 二聚体（长）
20	利妥昔单抗重链
21	利妥昔单抗轻链
22	赫赛汀轻链（1 和 2）
23	赫赛汀重链（1 和 2）
24	贝伐单抗轻链

[0160]

25	贝伐单抗重链
26	阿替利珠单抗（抗 PD-L1 mAb）重链
27	阿替利珠单抗（抗 PD-L1 mAb）轻链

[0161] 提供以下实施例来说明本发明的某些方面,并且不旨在限制本发明的范围。

[0162] 将在以下实施例中进一步说明本发明。

[0163] 实施例

[0164] 实施例1-具有优化的自结合的潜力的HD肽

[0165] 使用单独氨基酸的亲水得分和总肽亲水图(Kyte-Doolittle)分析源自T15的24聚体肽序列,并将其与具有有限的HD活性或无HD活性的相同种系构型的其他抗磷酰胆碱抗体比较,这是非免疫球蛋白通常采用的蛋白质分析方法。

[0166] 如图1所示,T15肽优选在C端形成发夹结构,这可能削弱其自结合的能力(图1B)。在原始HD抗体(T15)中,将HD序列插入CDR3的后部分和CH1的第一部分(不允许二级构型的位置)中。我们假设在具有插入抗体c端的HD肽的抗体的重组形式中,HD肽自由形成发夹结构,降低自结合及其通过晶格形成增强抗体的治疗活性的能力。类似地,化学偶联至抗体的T15肽,在正常的N至C端构型中,也将具有形成具有降低的自结合的二级构型的能力。此外,在大抗体蛋白的情况下,小HD肽序列可能对自结合存在空间限制。

[0167] 第一个比较是正常或反向顺序的已知T15肽构型(参见图2和3)。原始T15序列的检查(图2的左小图)表明自结合与肽的序列亲水性图相关。肽的第一半源自抗体的CDR2,而第二半源自CDR之间的框架。第一半然后将含有赋予自结合并且从种系序列改变的氨基酸;重要的是用于结合的第二半的亲水性残基越多,第一半中引发自结合过程的亲水性残基越少。出乎意料地,当我们检查反向序列中的24聚体肽(图2的右小图)时,尽管c端处存在发夹结构,它还能够呈现所需的自结合构型。这然后允许肽通过前c端(现在是n端)栓系至抗体,其中肽的更重要的第一半(其决定自结合)进一步栓系于抗体并且更能找出其他肽/抗体结合物中的相应自结合序列。

[0168] 通过比较从没有HD活性、几乎没有HD活性或高HD活性的Mopc抗体的重链CDR2/框架3提取的3个种系序列中的氨基酸差异来鉴定单个氨基酸对自结合的亲水贡献以便构建可优化的基序。将氨基酸的单个氨基酸亲水评分(可获得于:http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/aminoacidscores.htm)绘制至自结合涉及的氨基酸的已知位置(参见图4)。如所示,T15肽(高HD活性)中使能自结合的氨基酸变化与取代的氨基酸的亲水得分的显著变化相关,即,通常更亲水的取代使得能够自结合至更疏水的构架区。这允许人们预测到T15肽的前CDR2区中其他氨基酸的取代需要保存单个氨基酸的亲水性特征。还变得清楚的是,在T15肽的前CDR2区内的另外的亲水性取代可以增加与该肽的更疏水的前框架部分的潜在结合,反之亦然;将更疏水的氨基酸取代到框架3部分中将允许与T15肽的更亲水的部分的更多自结合。这种亲水-亲水相互作用用于引发自结合过程,然后该过程产生自结合涉及的具体氨基酸,从而形成其他非共价相互作用。整个过程赋予自结合过程的相对亲和力。一些说明性的单个氨基酸、保守取代在表2中给出(例如T15-var1、T15-var2和T15-var3)。

[0169] 不希望受理论束缚,据信通过增加HD肽的亲水性(例如通过氨基酸的取代),可以调节HD肽的结合特征,例如HD肽的结合特征可以增加。进一步认为,可以优化对自结合的亲和力以避免在抗体与靶标结合之前形成抗体二聚体。因此,与天然存在的HD肽相比,HD肽的亲和力可以增加,但仍低于抗体对其靶标的结合亲和力。例如,该HD肽的结合亲和力可以是10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}或10^{-8}。

[0170] 可以通过单个氨基酸变体的合成肽合成,用氚标记氢原子,然后测量与固定的T15

肽的结合,容易地测量自结合的潜在增加。然后可以将单个氨基酸取代的肽的阳性变化作为双氨基酸变化或三个氨基酸变化掺入。必须指出,最终结果是具有较高自结合亲和力但不太引起抗体聚集的自结合肽。

[0171] T15不是唯一的天然存在的HD抗体和HD肽的来源。研究较好的实例是针对双唾液酸神经节苷脂GD3的R24的实例。与T15一样,在原始鼠抗体中增加的效力与允许在细胞表面形成晶格而增加治疗效力的自结合肽的存在有关。如图9所示,负责晶格形成的R24序列将以抗平行方式自结合。与T15一样,R24肽虽然比T15短,但展示了相应的亲水图,其中该肽的一端比另一端更加亲水(参见图10)。该图基本上是T15的逆转,其中亲水性从低变高,而不是从高变为低。因此,通过反转序列、形成二聚体和进行具有改变的亲水性特征的单个保守氨基酸取代促进自结合的相同原理用于增加自结合。

[0172] 实施例2-鉴定具有自体/同源二聚化(HD)活性的抗体

[0173] 以下方法使用掺入HD肽的抗体的特定生物物理性能来测试抗体制剂中或scFv或Fab的噬菌体文库中的HD活性。该方法还可以用作HD抗体的质量保证(QA)释放测定。

[0174] 抗体粘度

[0175] 将微稀释管(USA Scientific,奥卡拉,佛罗里达州,在PBS中包含1mg/ml的HPC G9或HPC G11)安装在标准显微镜载玻片上。将它们在4℃、20℃和37℃下平衡,密封,然后竖直定位,然后水平定位,然后在每个温度拍照。

[0176] 粘度平衡的时间延时测量

[0177] 将含有在PBS中的1mg/ml抗体的微稀释管在4℃或37℃下平衡。将管竖直放置3s,然后水平放置并成膜。使用秒表测量弯月面停止移动所需的时间。

[0178] 结果

[0179] 同源二聚体的温度依赖性平衡:HPC G9/HPC G11是IgG抗磷酰胆碱抗体的同种型,由此HPC G11与TEPC-15中的CDR2/FR3共享独特型和序列。因此,HPC G11是亲同种抗原的,HPC G9不是。因为已知温度影响蛋白(包括抗体)的物理性能,使用尺寸排阻色谱法在4℃、20℃和37℃比较HPC G9和HPC G11的行为。将在排阻体积内洗脱的抗体的量与包含体积的抗体量进行比较。

[0180] 在不同温度下排除的/包含的HPC G11的比值。在4℃、20℃和37℃下,排除的蛋白质与HPC G9的比值没有显著改变(数据未显示),但是HPC G11的比值随温度增加。这些发现支持以下观点:亲同种抗原G11在溶液中的二聚化程度在生理温度下比在非生理温度下高。

[0181] 粘度差

[0182] 还在不同温度下比较HPC G9和HPC G11的粘度。将500ml体积的每种抗体置于架子上的管中,并在水平位置在4℃、20℃和37℃下平衡30分钟。然后将管移动到自上而下的竖直位置持续1s,然后返回到水平位置并且拍照。测量弯月面的位置,并且用HPC G9或HPC G11计算这些测量的比值。在4℃下的比值是1.45,在20℃下是0.92,并且在37℃下是0.54。平衡后颠倒管的倾斜(即,将管的底部竖直升高1s,然后返回至水平位置并拍照)。在4℃下,HPC G9与HPC G11的比值是1.5,在20℃下是1.41,以及在37℃下是2.06。

[0183] 为了排除G11的粘度是独特的可能性,测试S107,已知血友病的鼠单克隆IgA抗体。为了比较,将另一个鼠抗体G9包括在粘度分析中。首先将管自下而上放置3s,然后返回到水平位置。测量每个抗体的弯月面停止移动所需的时间。在图5中,我们示出了针对这些抗体

在4℃和37℃下停止移动的弯月面记录的秒。移动停止所需的时间越多,溶液的粘度越高。在图5所示的两个温度下记录的时间差对于G11和S107比对于G9小。G11、S107和1F7的4℃时间除以37℃时间的比值是相同的,而对于G9的比值大2倍。G11和S107是兼性亲同种抗原的聚合物,而1F7 IgM是共价五聚体。令人感兴趣的是,注意到亲同种抗原的聚合物和共价IgM聚合物具有与单体G9二价抗体相似的粘度但不同的粘度。亲同种抗原的抗体的这种独特粘度独立于Ig类别并且可以是它们独特的二聚化潜力的一部分,该二聚化潜力负责它们的优异靶向。

[0184] 实施例3-具有反向构型的重组治疗性HD抗体(利妥昔单抗)的产生和表征

[0185] 以下实施例说明了反向序列HD抗体的产生和重组HD形式的抗体与天然抗体相比治疗特征的变化。为了测试HD肽的能力,使用分子生物技术产生嵌合形式的利妥昔单抗抗体(chRituximab)以及与chRituximab相同的嵌合HD抗体,除了将HD肽(rs-T15)添加至重链的每个可变区的C端。

[0186] 材料和方法

[0187] 细胞系

[0188] JOK-1细胞是Affimed Inc.赠送的。JOK-1细胞在补充有10%FBS-Premium-HI(Aleken Biologicals)和1%青霉素/链霉素(Gibco)的具有谷氨酰胺(Gibco)的RPMI-1640中生长。Raji和Ramos细胞分别从美国典型培养物保藏中心(ATCC),以编号HB-9645、CCL-86、CRL-1596以及TIB-152获得。将Raji和Ramos细胞维持在具有HEPES(ATCC)、补充有10%FBS-Premium-HI(Aleken Biologicals)和1%青霉素/链霉素(Gibco)的RPMI-1640培养基中。将利妥昔单抗细胞维持在具有HEPES(ATCC)、补充有10%FBS-低-IgG(Gibco)、1%青霉素/链霉素(Gibco)和0.5%谷氨酰胺(Gibco)的RPMI-1640培养基中。CHO-S细胞购自Invitrogen,并且在补充有1%HT补充剂(Gibco)、2%谷氨酰胺(Gibco)和100U/ml青霉素/链霉素(Gibco)的CD CHO培养基中生长。在引入载体DNA之后,CHO-S细胞在添加1.2mg/ml 418(英杰公司)用于选择的情况下如上生长。在37℃和5%CO2下维持所有细胞。

[0189] 嵌合抗体基因的构建

[0190] 重链和轻链可变区由公开的利妥昔单抗序列合成:

[0191] 利妥昔单抗重链:

[0192] QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE
WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY
YCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH

[0193] EALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：20）

[0194] 利妥昔单抗轻链：

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYAT

SNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGG

[0195] GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK

VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT

HQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO：21）

[0196] 使用引物modVLRituximabfwd和modVLRituximabbev利妥昔单抗brev通过PCR从cDNA库中扩增利妥昔单抗重链可变区。所有寡核苷酸购自Operon。使用引物modVLRituximabfwd和modVLRituximabbev通过PCR从cDNA库中扩增利妥昔单抗轻链可变区。将重链和轻链PCR产物对应地克隆到载体pAc-k-CH3(Progen Biotechnik GmbH)的XhoI-NheI和SacI-Hind11I位点中,以形成pAc-k-利妥昔单抗H和利妥昔单抗K。通过在两个方向进行测序来验证克隆。所有限制酶购自Takara或New England Biolabs。Taq聚合酶(Promega)用于所有PCR。使用制造商的方案进行所有酶促反应。

[0197] 抗体表达载体的构建

[0198] 将寡聚物LongT15fwd、LongT15rev和PrimerB用于巢式PCR以构建编码T15肽的反向序列的DNA序列。将所得PCR产物克隆至pIRES(Clontech)的MCSB中的SalI-NotI位点中以形成pHD。分别使用引物modVHXfwd和modVHXrev或VKXfwd和VKXrev,PCR扩增pAc-k-RituximabH和pAc-k-RituximabK的完整重链和轻链。将轻链克隆到载体pHD的MCSA的NheI-XhoI位点中,并且将重链克隆到所得载体的SalI-NotI位点中以形成pchRituximab-HD。通过在两个方向进行测序来验证克隆。为了产生pchRituximab(不含T15肽的抗CD20),用NotI和ClaI消化pchRituximab-HD和pIRES。使用Qiaquick试剂盒(Qiagen)将来自pchRituximab-HD的约6Kb和来自pIRES的约2.2Kb的所得DNA片段各自从1％琼脂糖凝胶中凝胶纯化,并且连接在一起以形成利妥昔单抗。通过在两个方向进行测序来验证克隆。使用所提供的热休克方案,将所有载体构建体引入大肠杆菌(XL-10细胞,来自Stratagene)中。使用Qiagen小量制备试剂盒从3ml过夜细菌培养物中纯化质粒。使用设置为580V和40μs的Eppendorf Multiporator中的4mm间隙小杯,将载体pchRituximab和pchRituximab-HD电穿孔至CHO-S细胞中。在开始选择之前允许两天的恢复。

[0199] 重组抗体的纯化

[0200] 根据细胞密度,每3-5天收获细胞培养物上清液。在低速(480-740x g)下离心细胞悬浮液7至10分钟,并在另外的处理之前将上清液保持在-20℃。在37℃下快速融化后,通过真空过滤将上清液通过0.2μm过滤器(Corning)以除去细胞碎片,然后将过滤的上清液通过HiTrap蛋白G HP柱(GE Healthcare)。将结合的抗体用0.1M甘氨酸缓冲液(pH 2.7)洗脱,以1mL级分收集,并且将pH用50μL 1M Tris(pH 9)中和。通过在280处读取UV吸光度来确定洗脱曲线(数据未示出)。然后将具有显著蛋白质含量的级分合并,并且根据制造商的说明书使用Amicon超离心过滤装置50,000MW截留(Millipore)进行浓缩。

[0201] 细胞表面结合

[0202] 将每孔$3x10^5$个Raji、Ramos或JOK-1细胞接种在24孔板中并且在37℃和5％CO_2下孵育过夜。然后收获细胞并用PBS洗涤两次。将细胞重悬于1mL PBS中,与增加浓度(1μg、5μg、

10μg、20μg/mL)的chRituximab或HD chRituximab一起孵育,并且在4℃下孵育30分钟。通过用PBS洗涤细胞两次来去除过量的抗体,然后将细胞再悬浮于1mL的FITC偶联的山羊抗人(Sigma,1:1000)溶液中,并在4℃下孵育30分钟。洗涤两次后,将细胞重悬于200μL PBS中,并通过流式细胞术(BD FACSCalibur仪器,BD Bioscience)进行分析。通过使用下式确定特异性平均荧光强度:特异性MFI=MFI(第一Ab+山羊抗人FITC)-MFI(山羊抗人FITC)。

[0203] 细胞凋亡测定

[0204] 将每孔2x10^{5}个Raji、Ramos或JOK-1细胞接种在24孔板中并且在37℃和5%CO_2下孵育过夜。然后在37℃下,用增加浓度的Ab处理细胞20小时。收获细胞,用PBS洗涤一次,并且用100μL 1X膜联蛋白结合缓冲液再悬浮,该结合缓冲液含有最终浓度为4μg/mL的3μL膜联蛋白VAlexa Fluor 488偶联物(Invitrogen)和碘化丙啶(Sigma),以分别检测细胞凋亡和细胞死亡。在37℃孵育20分钟后,将细胞用150μL的1X膜联蛋白结合缓冲液稀释并通过流式细胞术(BD FACSCalibur仪器,BD Bioscience)进行分析。凋亡细胞百分比是通过门控未处理对照样品中的健康群体并且使用以下公式确定的:凋亡细胞百分比=(1-(活处理靶细胞/活未处理靶细胞))*100。

[0205] CDC溅定

[0206] 将2×10^{5}个细胞接种到24孔板中,并在37℃和5%CO_2下孵育过夜。然后在5%兔HLA-ABC补体富集血清(Sigma)的存在下,将细胞用增加浓度的Ab在37℃下处理2小时。收获细胞并用PBS洗涤一次,再悬浮于包含50nM钙黄绿素-AM(Biochemica)和4μg/mL碘化丙啶(Sigma)的200μL PBS中。在37℃下孵育20分钟后,通过流式细胞术(BDFACSCalibur仪器,BD Bioscience)分析细胞活力。通过下式确定杀伤百分比:死细胞百分比=(1-(活处理的靶细胞/活的未处理的靶细胞))*100。

[0207] PBMC分离

[0208] 通过Ficoll-Hypaque密度梯度离心从健康供体的血沉棕黄层(肯塔基血液中心(Kentucky Blood Center),莱克星顿KY)制备外周血单核细胞(PBMC)。将PBMC在hRPMI(10%FBS,低IgG)培养基中稀释至6x10^{6}个细胞/mL,并维持最多三天。在实验之前,通过流式细胞术(BDFACSCalibur仪器,BD Bioscience)分析PBMC活力和日常细胞群体变异。

[0209] ADCC测定

[0210] 从T75烧瓶收获靶细胞(Raji、Ramos或JOK-1),再悬浮于1mL培养基中,该培养基含有400nM钙黄绿素-AM(Biochemica)和8μL TFL2染料(Onco 1 mmunin),根据制造商的说明书使用。将靶细胞在37℃标记45分钟,在培养基中洗涤两次,再悬浮到6x10^{5}个细胞/mL的密度。然后从T75烧瓶收获效应细胞(PBMC),并重悬至1.2X10^{7}个细胞/mL的密度。将靶细胞和效应细胞以20:1的E:T比值混合,然后将250μL的细胞混合物等分到单独的5mL圆底管中,并且与增加浓度的Ab在37℃下孵育2小时。孵育后,通过流式细胞术(BD FACSCalibur仪器,BD Bioscience)分析靶细胞活力。通过下式确定杀伤百分比:死细胞百分比=(1-(活处理的靶细胞/活的未处理的靶细胞))*100。

[0211] 结果

[0212] 荧光激活细胞分选(FACS)

[0213] 为了验证重组的chRituximab和chRituximab-HD抗体是功能性的,使用荧光激活细胞分选(FACS)测试它们结合至来自人B细胞JOK-1系的细胞的能力。在图6中,下小图示出

用chRituximab-HD抗体染色的平均荧光强度(MFI),而上小图表示用chRituximab,非-HD抗体染色。chRituximab-HD抗体的结合比chRituximab的结合高约4倍。

[0214] 细胞凋亡的诱导依赖于受体交联

[0215] HD抗体的建议机制之一是细胞凋亡的受体交联诱导。在三种细胞系Raji、Ramos和JOK-1中比较了chRituximab和HD抗体的细胞凋亡的诱导。在一些细胞系中,chRituximab的添加诱导约30%的细胞凋亡,尤其是在最高剂量下。与未修饰的嵌合体相比,HD抗体诱导显著更多的细胞凋亡。类似地,HD抗体是Ramos细胞和其他B淋巴瘤细胞中的细胞凋亡的更有力的诱导物。表4示出了在一定浓度范围内两种形式的利妥昔单抗的细胞凋亡作用。令人感兴趣的是,注意到在较低浓度的Ab下,增强作用更显著得多。例如,在用5μg/mL的任一抗体治疗Raji细胞之后,凋亡细胞的百分比在HD治疗之后高2.5倍,但是在用20μg/mL治疗之后略高不到2倍。

[0216] 表4-细胞凋亡诱导的比较

[0217]

细胞系	抗体剂量[1]	chRituximab[2]	HD-CH-利妥昔单抗
Raji	1	0.83 (2.18)	5.06 (2.16)
	5	14.90 (1.81)	36.91 (8.73)
	10	26.73 (4.28)	47.40 (2.89)
	20	30.05 (3.13)	58.37 (4.67)
Ramos	1	4.00 (0.11)	19.36 (2.06)
	5	20.11 (2.30)	33.06 (7.1)

[0218]

	10	24.61 (0.40)	42.53 (4.28)
	20	31.74 (1.70)	40.79 (1.41)
Jok-1	1	7.85 (0.99)	4.39 (0.99)
	5	23.77 (5.48)	27.19 (12.14)
	10	59.43 (13.89)	52.13 (18.97)
	29	49.44 (7.50)	56.87 (4.60)

[0219] [1]将不同量的抗体添加到每个细胞系中持续20小时(μg/ml)

[0220] [2]由chRituximab诱导的凋亡细胞百分比(括号中的数字=加/减)

[0221] [3]由HD-chRituximab诱导的凋亡细胞百分比(括号中的数字=加/减)

[0222] 补体依赖性细胞毒性(CDC)的比较

[0223] 比较chRituximab和chRituximab-HD的CDC活性(参见图7A-C)。CDC在补体组分与抗体的Fc区结合之后被诱导,并且在IgG1同种型中是有效的,该IgG1同种型是HD构建体的同种型。在所有细胞系中观察到增强作用。如在图7A中所见,例如,在5μg/mL下,在具有嵌合体的Raji细胞中几乎没有CDC活性,然而,35%的细胞被HD mAb杀死。这与细胞凋亡的有效性的最高改进相关。令人感兴趣的是,注意到在Ramos细胞中,HD抗体的效力在5μg/ml下达到平台(图7B)。chRituximab似乎在10μg/ml下稳定,但它在所测试的任何水平下未达到HD Ab的效力,表明甚至更高的剂量将不会达到5μg/ml HD Ab的杀伤能力。

[0224] ADCC的比较

[0225] 测试嵌合抗体诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力。在1μg/ml和3μg/ml的Raji和Ramos细胞中,HD抗体诱导比chRituximab显著更多的ADCC。

[0226] 体外淋巴瘤生长的抑制

[0227] 为了近似这些抗CD20抗体对肿瘤细胞的体内杀死潜力,在Raji和Ramos细胞系中测试chRituximab和chRituximab-HD的抗增殖作用。该测定测量与核酸结合的荧光染料的水平(参见方法和材料)。在所有测试浓度下,HD抗体更大程度地抑制两种细胞系中的增殖。

[0228] 实施例4-具有反向构型的HD抗Her-2抗体(曲妥珠单抗)的体内表征

[0229] 如实施例3中所述产生赫赛汀(曲妥珠单抗)的HD形式。CDR序列取自重链和轻链可变区:

[0230] 赫赛汀轻链(1和2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI

[0231] YSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFG

QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW

KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV

THQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO：22）

[0232] 赫赛汀重链(1和2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV

ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC

SRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA

LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS

SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP

[0233] SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN

AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK

TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES

NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA

LHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：23）

[0234] 为了评估HD抗体在相关人肿瘤模型中的功效,注射肿瘤后7天,在低抗原表达乳腺癌(MCF-7)的裸鼠模型中开始治疗。

[0235] 如图8所示,赫赛汀没有显示出治疗效果,肿瘤测量与对照相同(顶线)。相反,HD-赫赛汀显著地抑制肿瘤生长(底线)。预期在该模型中赫赛汀缺乏活性,因为它不识别低抗原表达的乳腺癌。在用HD-赫赛汀治疗的肿瘤的组织学检查后,发现很少有活癌细胞,而炎性细胞是丰富的。

[0236] 当外推至人类剂量时,发现HD-赫赛汀的最大活性剂量是10μg,而赫赛汀在高达100μg/剂量下没有作用(基于75kg人类受试者的假设)。

[0237] 实施例5-具有反向构型的HD抗Vegf(安维汀)抗体的表征

[0238] 利用从可变重链和轻链序列提取的CDR将生物类似的贝伐单抗抗体转化为如实施例3所述的重组HD形式：

[0239] 贝伐单抗轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIY

FTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFG

[0240] QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW

KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV

THQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO：24）

[0241] 贝伐单抗重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEW

VGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYY

CAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG

GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL

[0242] LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV

EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV

MHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：25）

[0243] VEGF由健康和肿瘤细胞产生。它的活性是由两种受体酪氨酸激酶介导的。VEGF信号通常是生理学和病理性血管生成中的限速步骤。贝伐单抗作为抗血管生成癌症治疗剂作为单一药剂以及与化疗组合在III和IV期结肠癌患者中已经被研究。

[0244] HD贝伐单抗的体内肿瘤模型评估的总结：

[0245] a)抑制肿瘤生长(在肾细胞癌和前列腺癌中)；

[0246] b)缓解肿瘤(在结肠癌中)；

[0247] c)预防肿瘤复发)；

[0248] d)减少/预防转移(在肾和结肠转移两者中)；

[0249] e)减少A498人肾癌细胞的生长。

[0250] 体内评估表明,可以用HD抗Vegf治疗其他类型的癌症,并且其不仅抑制增殖而且使癌症消退。

[0251] 实施例6-具有T15二聚体构型的HD抗PD-L1抗体的表征

[0252] 使用来自阿替利珠单抗(抗PD-L1mAb)的下面的可变重链和轻链序列的CDR来构建人源化IgG1(如实施例3中所描述),该人源化IgG1将T15二聚体的反向构型(参见表2)结合到该抗体的Fc端上。

[0253] 重链：

[0254] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWV
AWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：26）

[0255] 轻链：

[0256] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY
SASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFG
QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO：27）

[0257] 相对于针对携带PD-L1抗原的黑素瘤细胞的亲本抗体测试HD-阿替利珠单抗。通过流式细胞术评估人PD-L1的表达。简言之,制备黑色素瘤细胞悬浮液,并且在由包含2%的胎牛血清的磷酸盐缓冲盐水(PBS;pH 7.2)组成的荧光激活细胞分选仪中洗涤。将细胞用抗PD-L1抗体(2μg/mL)或小鼠IgG1同种型对照(2μg/mL)在4℃下孵育60分钟,洗涤三次,并且用FITC标记的第二抗体(BD PharMingen,圣何塞,加利福尼亚州)在4℃下孵育30分钟。然后将细胞在PBS中再洗涤三次,固定在2%福尔马林中,并且评估荧光(FACScalibur流式细胞仪;BD Bioscience,圣地亚哥,加利福尼亚州)。

[0258] 将结果表示为平均荧光指数(MFI)或结合的倍数增加(扣除背景)-参见下表5。

[0259] 表5

[0260]

FITC（背景）	阿替利珠单抗	HD-阿替利珠单抗	倍数增加
5	27	2498	113

[0261] 结果表明用HD形式的抗体与细胞表面PD-L1的结合超过100倍的增加。这将必然导致阻断肿瘤细胞介导的T细胞抑制的能力增加。

[0262] 实施例例7-用于体外诊断应用的HD技术

[0263] 通过重组技术对PSA的单克隆抗体进行HD修饰,然后标记用于电化学发光检测,并用于抗原检测试验(分析科学,2009,5月25(5):587-97)。将未修饰的抗体与HD修饰的抗体进行比较,其中将T15肽连接至抗体的轻链的末端。

[0264] HD修饰的抗体提供比未修饰的抗体高得多的信噪比,使得测定尤其在较低抗原浓

度下更敏感(参见图11)。

[0265] 结果表明HD修饰的抗体可以用于任何构型(直接或间接检测),并且用于任何检测方法,包括更标准的ELISA。HD修饰的抗体可以用于增强信号,以及由于更高的信号产生而减少读出测定的时间。

[0266] 当本文与术语“包含(comprising)”结合使用时,词语“一个(a)”或“一个(an)”的使用可以表示“一个”,但它也与“一个或多个”、“至少一个”和“一个或多于一个”的含义一致。以单数形式表达的任何要素也涵盖其复数形式。以复数形式表达的任何要素也涵盖其单数形式。本文所用的术语“多个”是指多于一个,例如两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个等。

[0267] 如本文所使用的,术语“包含(comprising)”、“具有(having)”、“包括(including)”和“包含(containing)”及其语法变体是包容性的或开放式的,并且不排除附加的、未列举的要素和/或方法步骤。当本文与组合物、用途或方法结合使用时,术语“基本上由……组成”表示可以存在另外的要素、方法步骤或者另外的要素和方法步骤两者,但是这些添加不会实质上影响所列举的组合物、方法或用途作用的方式。当在此结合组合物、用途或方法使用时,术语“由……组成”排除了另外的要素和/或方法步骤的存在。如本文所使用的,术语“约”,当用于描述所列举值时,是指所列举值的10%以内。

[0268] 所有引用均通过引证并入本文。

[0269] 已经关于一个或多个实施方式描述了本发明。然而,对于本领域技术人员显而易见的是,在不背离如权利要求所限定的本发明的范围的情况下,可以做出许多变化和修改。权利要求的范围不应受到实施例中阐述的优选实施例的限制,而应给予与整个说明书一致的最广泛的解释。

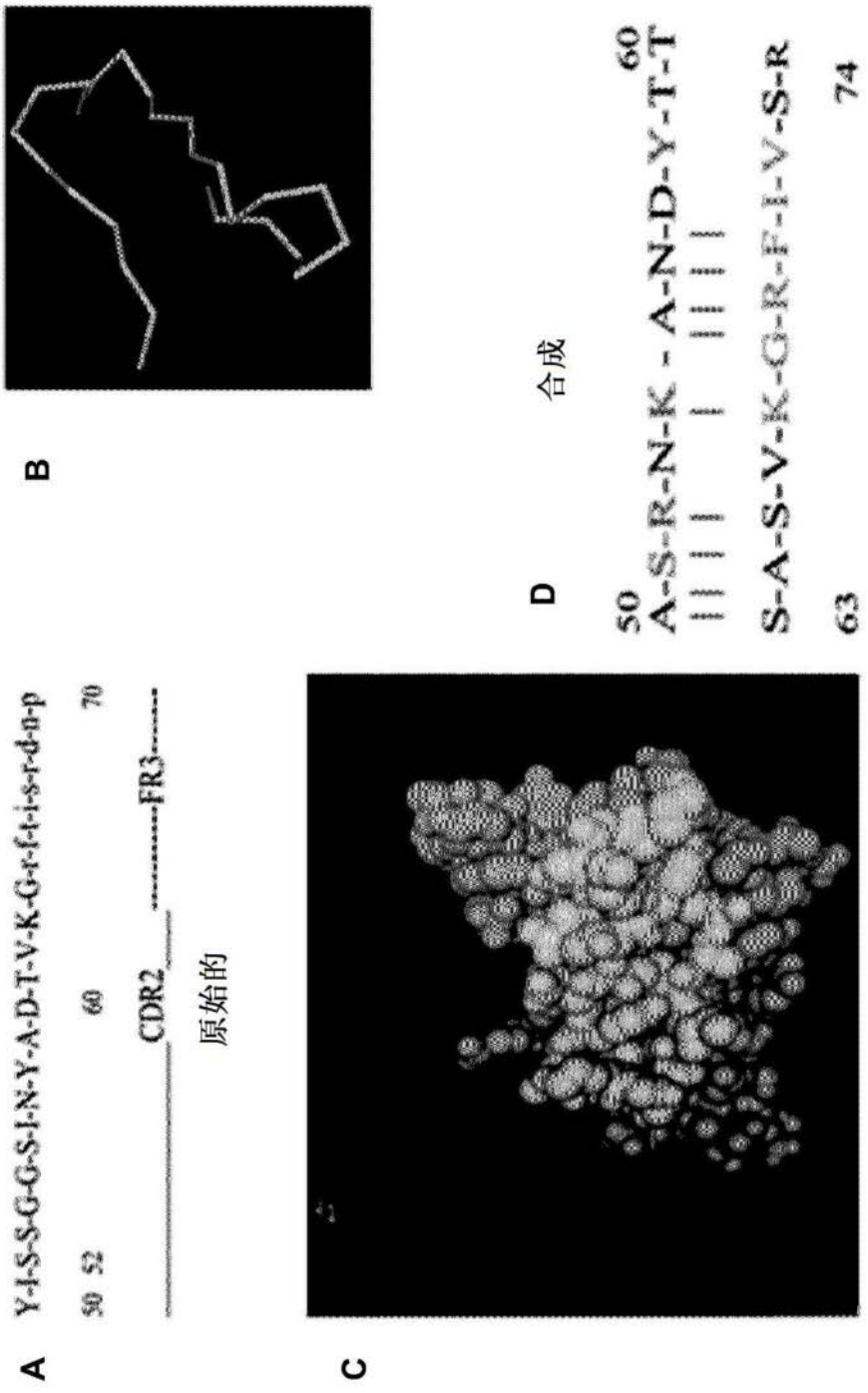

A
Y-I-S-S-G-G-S-I-N-Y-A-D-T-V-K-G-r-f-t-i-s-r-d-n-p
50 52 60 70
CDR2 FR3
原始的
B
C
D
合成
50 60
A-S-R-N-N-K - A-N-D-Y-T-T
S-A-S-V-K-G-R-F-I-V-S-R
63 74

图1

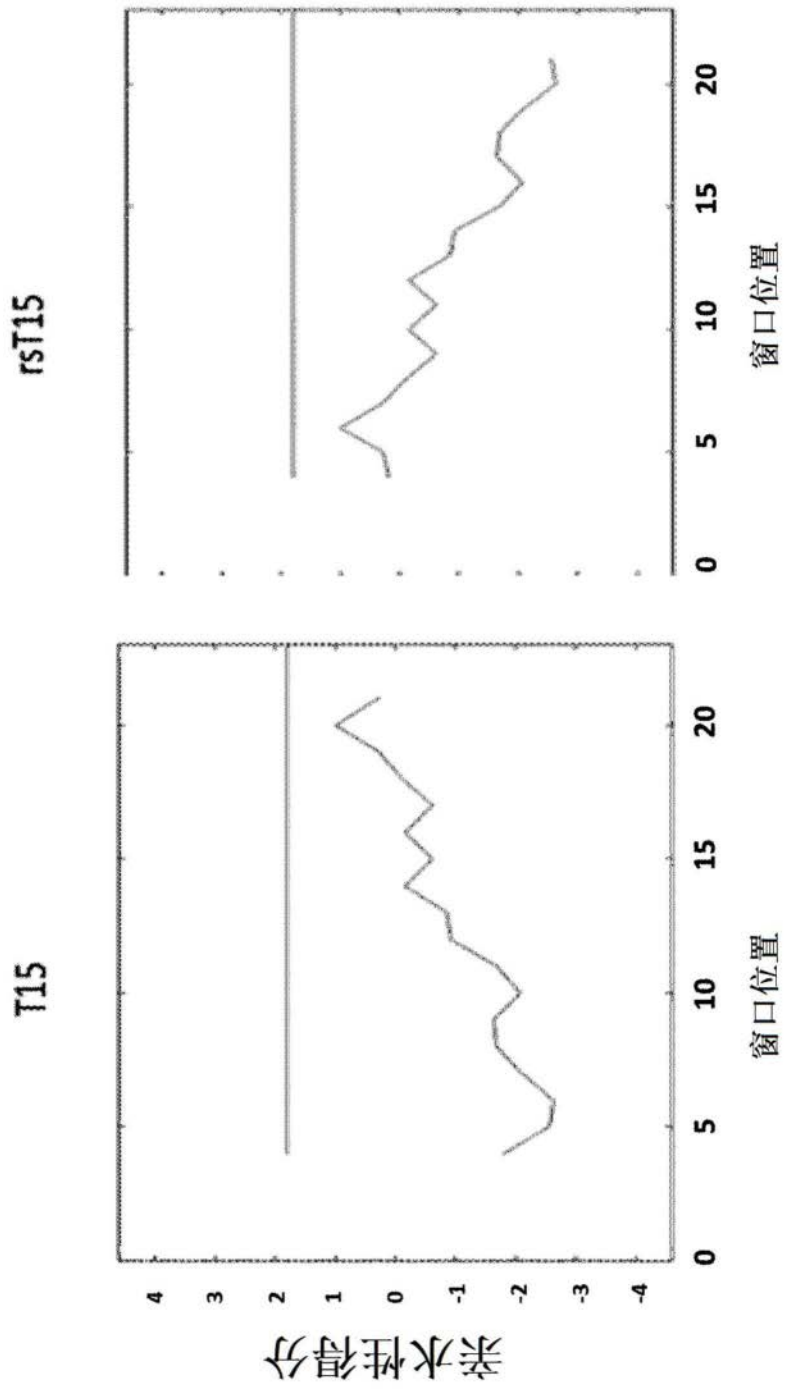


图2

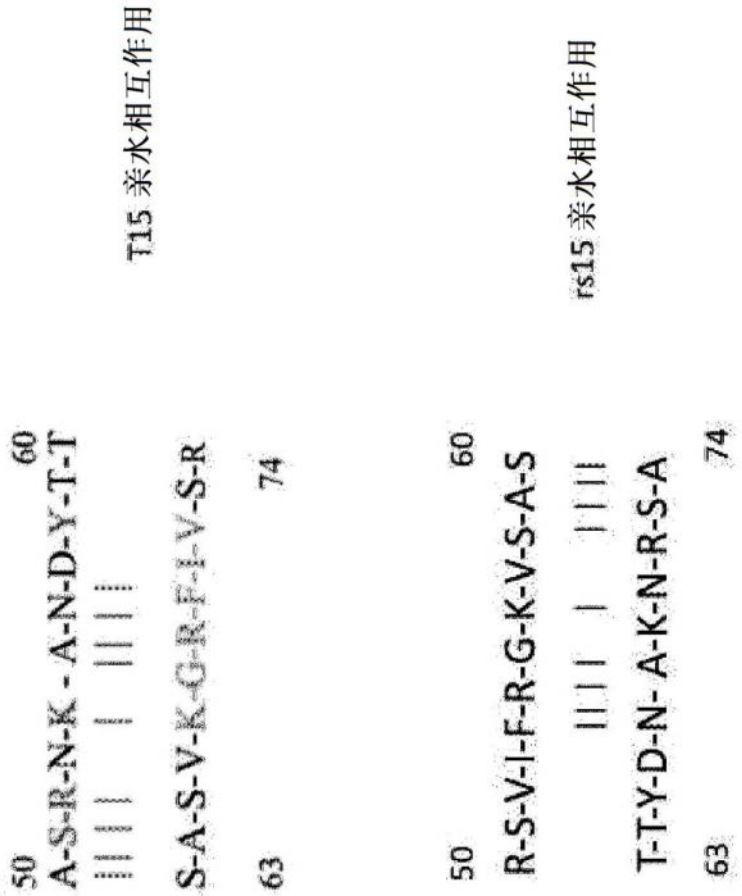

T15 亲水相互作用
50
60
A-S-R-N-N-K - A-N-D-Y-T-T
S-A-S-V-K-G-R-F-I-V-S-R
63
74
rs15 亲水相互作用
50
60
R-S-V-I-F-R-G-K-V-S-A-S
T-T-Y-D-N- A-K-N-R-S-A
63
74

图3


-3.5 -3.5 -0.7 (氨基酸的亲水性得分)
ASRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSR (高HD)
1.8 -3.5
ASRNKGNK YTTEYSASVKGRFIVSR (低HD)
-0.4 -3.9
ASRSKAHDYR TEYSASVKGRFIVSR (无HD)
-0.8 -3.2 -4.5

图4

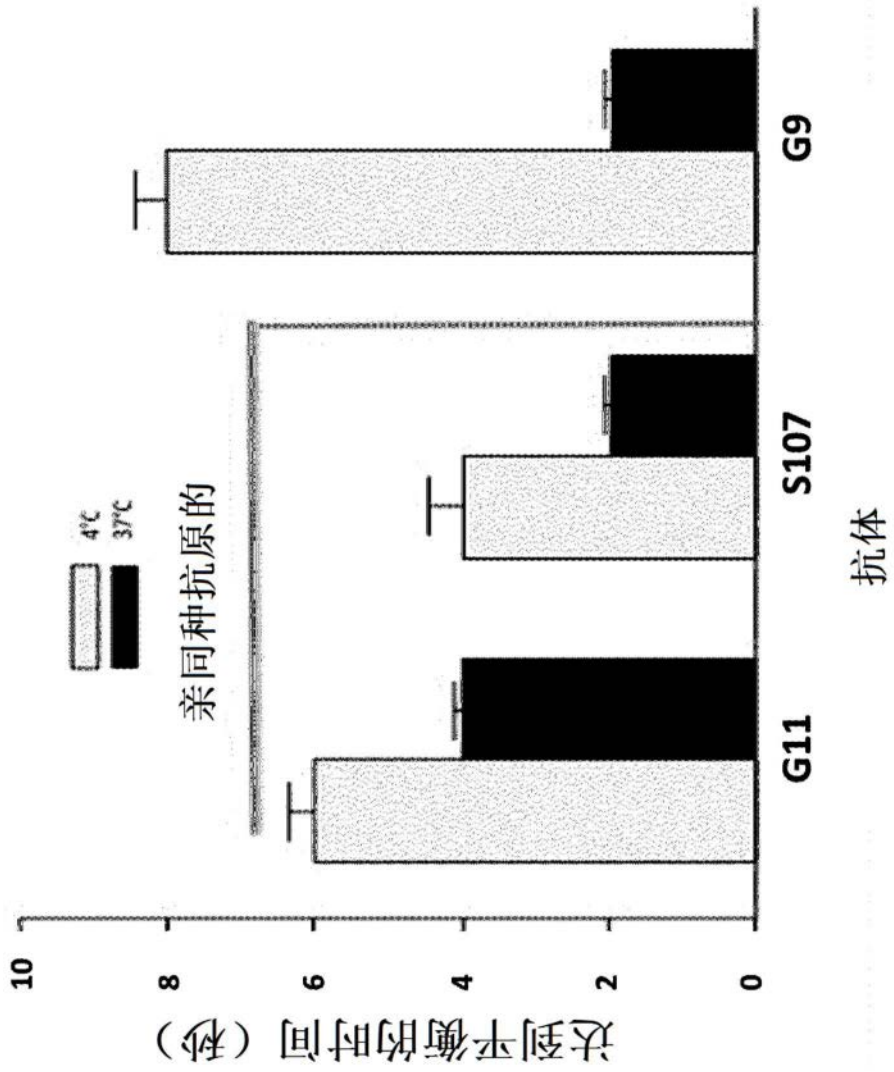


图5

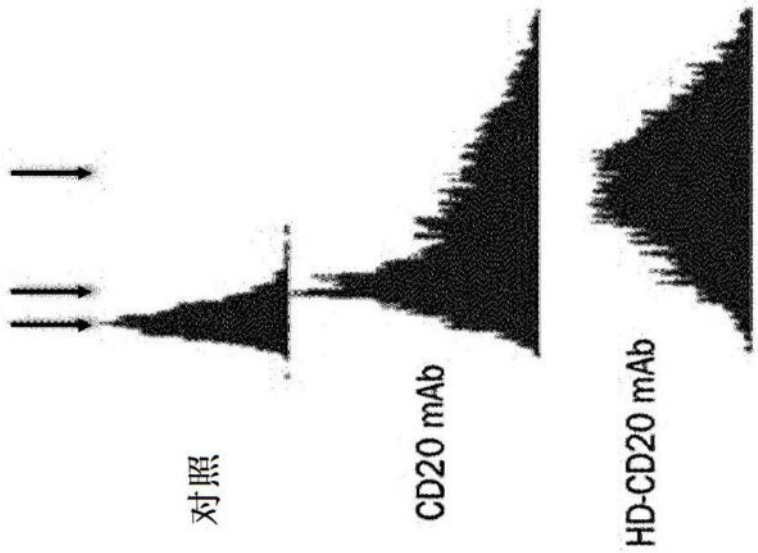


图6

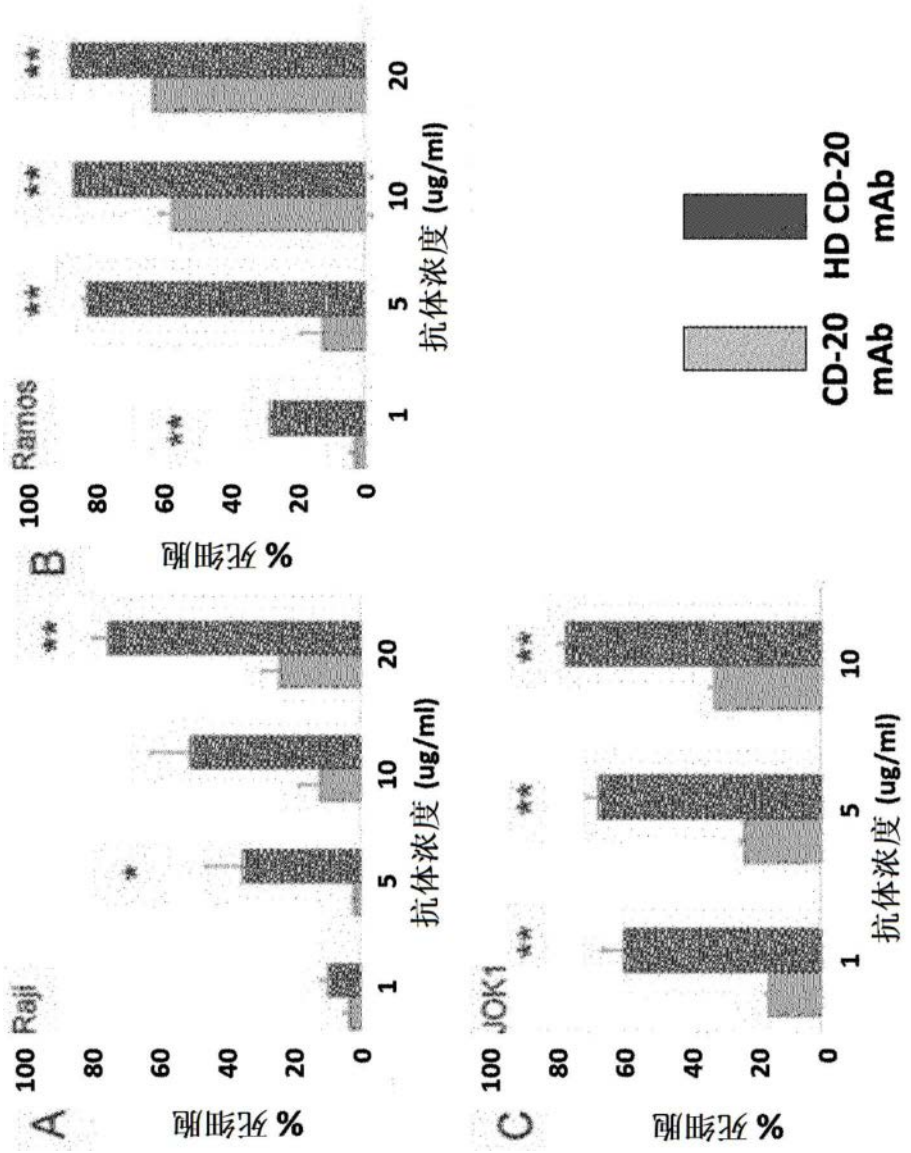


图7

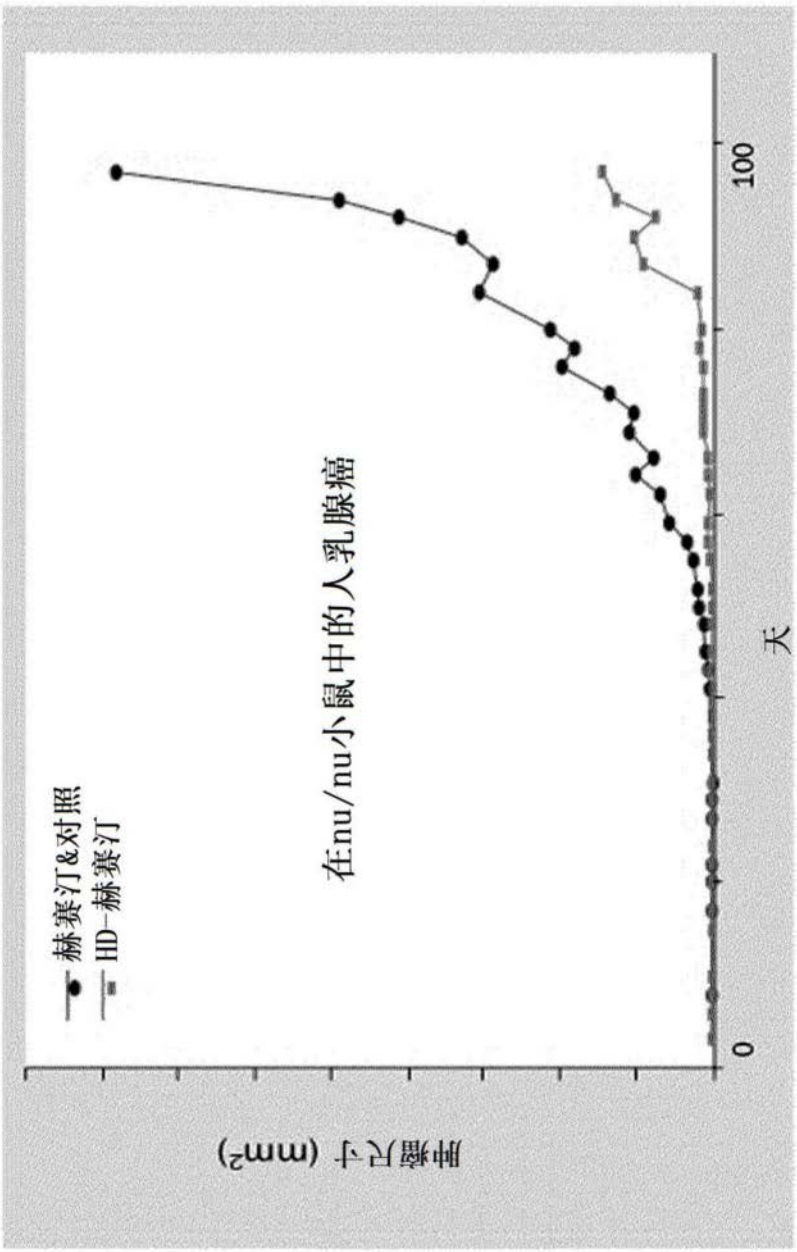


图8

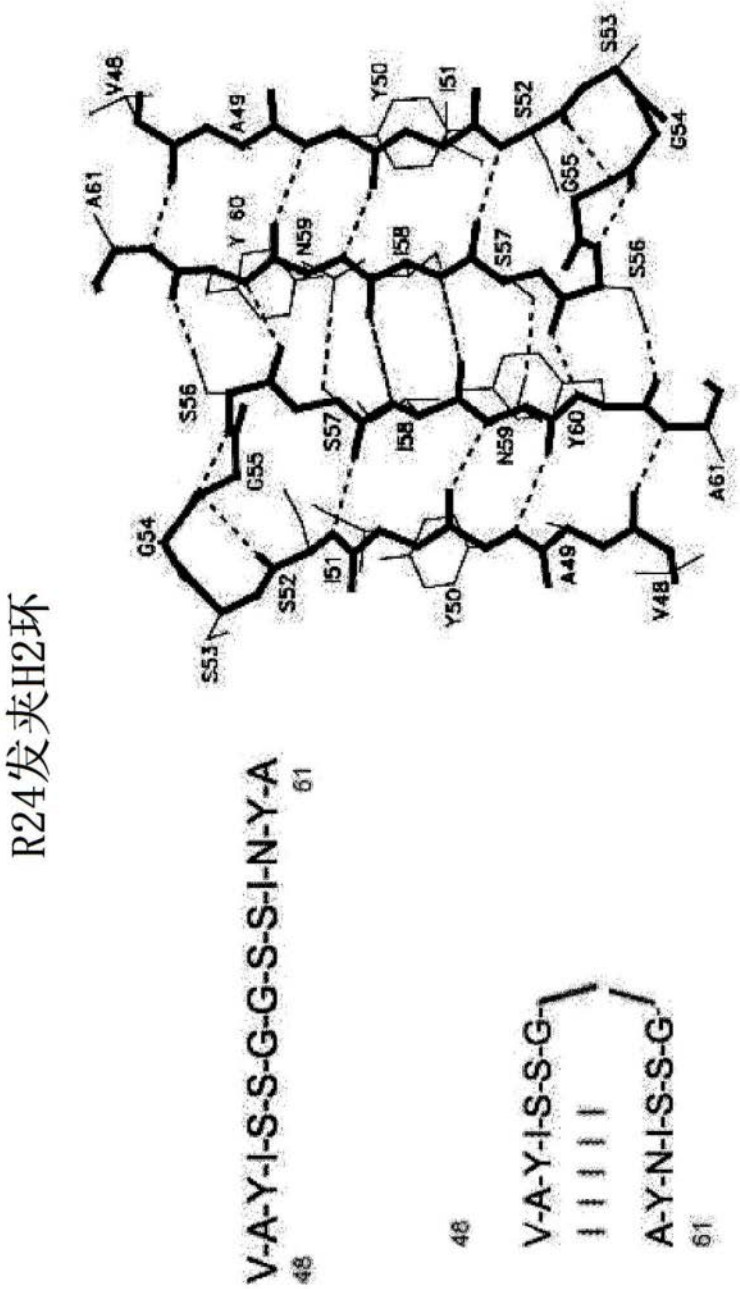


图9

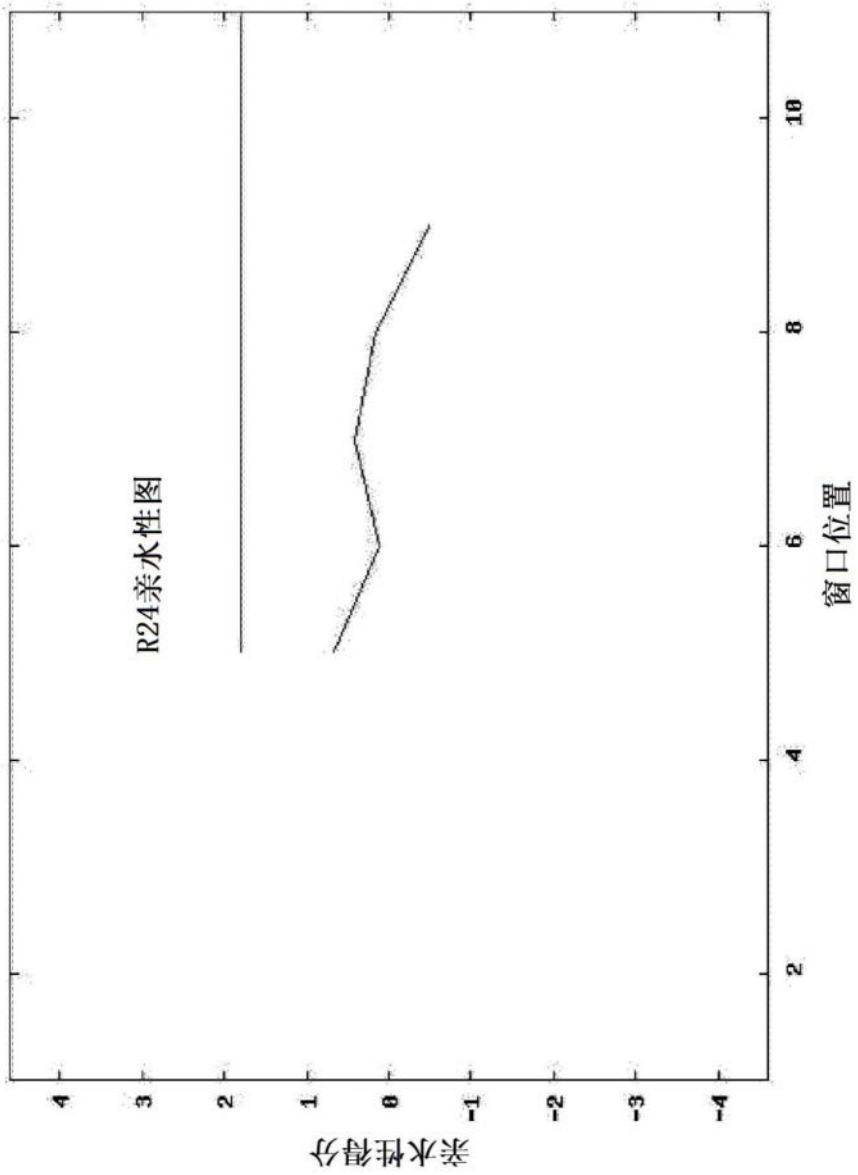


图10

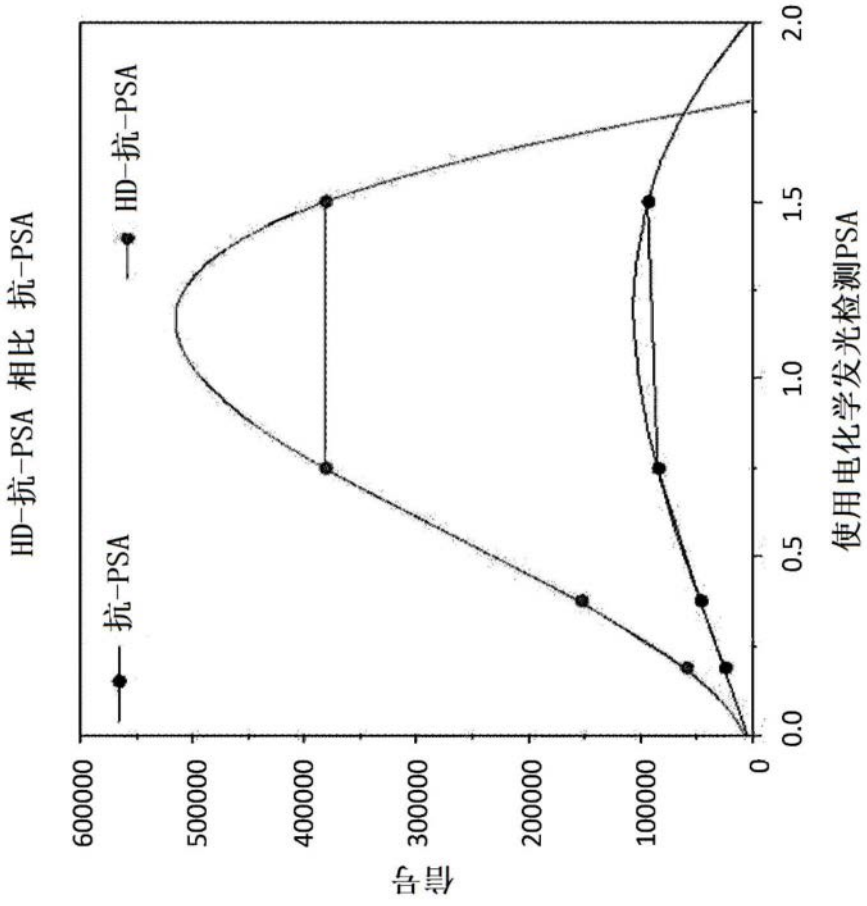

HD-抗-PSA 相比 抗-PSA
抗-PSA
HD-抗-PSA
信号
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
使用电化学发光检测PSA

图11

1.一种同源二聚化(HD)肽,包含与相应的天然存在的HD肽相比呈反向构型的氨基酸序列或与其具有至少90%序列同一性的保守变体。

2.根据权利要求1所述的HD肽,其中所述相应的天然存在的HD肽是T15 HD肽或R24 HD肽,任选地,其中所述HD肽包含与SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6或SEQ ID NO.18具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的HD肽,具有一个或多于一个氨基酸取代,其中所述一个或多于一个取代增加所述HD肽的亲水性。

4.一种由天然存在的HD肽的氨基酸序列组成的同源二聚化(HD)肽,所述氨基酸序列包含一个或多于一个氨基酸取代,其中所述一个或多于一个取代增加了所述HD肽的亲水性。

5.根据权利要求4所述的HD肽,其中所述HD肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述氨基酸序列在位置4、7和18处具有一个或多于一个氨基酸取代,任选地,其中在位置4处的所述一个或多于一个氨基酸取代是K或K的保守取代,在位置7处的所述一个或多于一个氨基酸取代是R或R的保守取代,并且在位置18处的所述一个或多于一个氨基酸取代是H或H的保守取代,任选地,其中所述HD肽包含与SEQ ID NO:8、9或10具有80%-100%序列同一性的氨基酸序列。

6.一种包含第一HD肽和第二HD肽的同源二聚化(HD)肽二聚体,其中所述第一HD肽和/或第二HD肽包含权利要求1-5中任一项所述的HD肽。

7.根据权利要求6所述的HD肽二聚体,其中所述二聚体的所述第一HD肽和第二HD肽通过接头连接,所述接头诸如gly-gly接头。

8.根据权利要求6所述的同源二聚化(HD)肽二聚体,其中所述HD肽二聚体包含与SEQ ID NO:5、7、11、12、13、14、15、17或19具有80-100%序列同一性的氨基酸序列。

9.一种抗体或抗原结合片段,包含权利要求1至5中任一项所述的HD肽或权利要求6-8中任一项所述的HD肽二聚体,任选地,其中所述抗体或抗原结合片段是人源化IgG,诸如人源化IgG1、人源化IgG4或人源化IgG3。

10.根据权利要求9所述的抗体或抗原结合片段,其中所述HD肽或HD肽二聚体与所述抗体或抗原结合片段的核苷酸亲和位点融合,任选地,其中所述HD肽或HD肽二聚体是通过赖氨酸、半胱氨酸或碳水化合物融合的。

11.根据权利要求9或权利要求10所述的抗体或抗原结合片段,其中所述HD肽或HD肽二聚体:

直接位于所述抗体的重链或轻链的CDR3之后;

直接位于所述抗体的重链或轻链恒定区的C端之后;

直接位于所述抗体的重链可变区之后;或

直接位于所述抗体的Fc区的C端之后。

12.根据权利要求9至11中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述HD肽或HD肽二聚体偶联至所述抗体,其中所述抗体可以是嵌合重组抗体。

13.根据权利要求9至12中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述HD肽或HD肽二聚体前面是间隔子,诸如gly-gly间隔子。

14.根据权利要求9至13中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述抗体是单链抗体(scFv)、双特异性抗体(BsAb)或抗体样肽,任选地其中,所述抗体是人源化单克隆抗

体,任选地其中,所述抗体是Her-2neu抗体(诸如Herceptin)、CD-20抗体(诸如Rituxin)、血管内皮生长因子抗体(诸如Avastin)或检查点抑制剂抗体(诸如PD-L1)。

15.一种组合物,包含权利要求9至14中任一项所述的一种或多种抗体或抗原结合片段和药学上可接受的载体。

16.一种表达载体,包含编码权利要求1至5中任一项所述的HD肽或权利要求6至8中任一项所述的HD肽二聚体的第一核酸序列,任选地,进一步包含编码抗体或抗原结合片段的第二核酸序列,使得当所述第一核酸序列和第二核酸序列表达时,所述HD肽和所述抗体或抗原结合片段作为融合蛋白表达。

17.一种产生同源二聚化(HD)抗体的方法,包括在宿主细胞中表达权利要求16所述的表达载体。

18.一种用权利要求16所述的表达载体转化的分离的宿主细胞。

19.一种增强抗体的结合和/或效力的方法,所述方法包括:

将权利要求1至5中任一项所述的HD肽或权利要求6-8中任一项所述的HD二聚体偶联至所述抗体;或

重组表达包含所述HD肽的嵌合抗体。

20.一种治疗患有疾病或病症的患者的方法,包括给予根据权利要求9至14中任一项所述的抗体或抗原结合片段,任选地,其中所述疾病或病症是选自由以下各项组成的列表中的一种:癌症、自身免疫障碍、炎性障碍、神经退行性疾病、心血管疾病、移植物或移植排斥。

21.一种检测样品中的分析物的方法,包括:

使所述分析物与针对所述分析物的抗体或抗原结合片段接触,其中所述抗体或抗原结合片段融合至权利要求1至5中任一项所述的HD肽或权利要求6至8中任一项所述的HD肽二聚体;以及

检测由所述分析物和与所述HD肽融合的所述抗体形成的复合物。

22.一种用于检测样品中的分析物的试剂盒,包括:

针对所述分析物的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段融合至权利要求1至5中任一项所述的HD肽或权利要求6至8中任一项所述的HD肽二聚体;和

用于检测所述分析物的说明书。

23.一种噬菌体展示文库,包含与权利要求1至5中任一项所述的HD肽或权利要求6至8中任一项所述的HD肽二聚体连接的抗体或抗原结合片段。

24.根据权利要求9至14中任一项所述的抗体,用于治疗或用于诊断测试。