



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104159922 B

(45)授权公告日 2018.03.02

(21)申请号 201380004989.7
 (22)申请日 2013.01.10
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 104159922 A
 (43)申请公布日 2014.11.19
 (30)优先权数据
 61/585,039 2012.01.10 US
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2014.07.08
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2013/021041 2013.01.10
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02013/106577 EN 2013.07.18
 (73)专利权人 比奥根MA公司
 地址 美国马萨诸塞州
 (72)发明人 G.K.法林顿 W.西斯克
 (74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 11105
 代理人 张文辉

(51)Int.Cl.
 C07K 16/28(2006.01)
 C07K 16/46(2006.01)
 A61K 47/68(2017.01)
 A61P 25/00(2006.01)
 (56)对比文件
 WO 2011127580 A1,2011.10.20,
 WO 2011107507 A1,2011.09.09,
 Youlet By et al.,
 .Intracerebroventricular injection of an
 agonist-like monoclonal antibody to
 adenosine A2A receptor has
 antinociceptive effects in mice.《Journal
 of Neuroimmunology》.2011,
 Abedelnasser Abulrob et al.,.Single
 domain antibodies as blood-brain barrier
 delivery vectors.《International Congress
 Series》.2005,
 审查员 靳春鹏

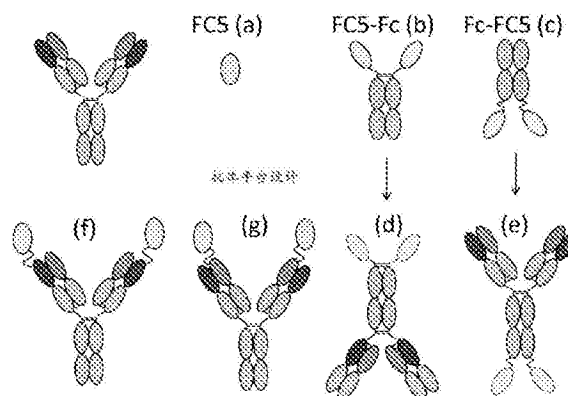
权利要求书2页 说明书38页
 序列表7页 附图11页

(54)发明名称

对转运治疗性分子穿过血脑屏障的增强

(57)摘要

本发明是至少部分地基于以下研究结果:发现二聚体形式的BBB转迁移抗体(例如,TMEM30A(CDC-50A)结合抗体FC5)与单价FC5_{V_H}相比极大地增强转运穿过BBB。本发明尤其提供增强药理学活性剂转运穿过血脑屏障的分子,增强转运穿过血脑屏障的方法,以及治疗具有神经成分的病症或疾病的方法。



1. 结合分子,其是嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含(i)至少一个药理学活性剂;和(ii)至少两个结合于TMEM30A的结合位点,其中所述至少两个结合于TMEM30A的结合位点是结合TMEM30A的单结构域抗体;和(iii)Fc区,所述Fc区包含第一Fc部分和第二Fc部分,

其中至少两个结合于TMEM30A的单结构域抗体各自分别直接或通过包含肽接头的氨基酸序列融合至所述第一Fc部分和所述第二Fc部分的N端。

2. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少两个结合位点包含FC5氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少两个结合位点由FC5氨基酸序列组成。

4. 如权利要求1所述的结合分子,其包含SEQ ID NO:1。

5. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述结合分子包含至少三个结合于TMEM30A的结合位点。

6. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述结合分子包含至少四个结合于TMEM30A的结合位点。

7. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少两个结合TMEM30A的结合位点与所述Fc部分直接基因融合。

8. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少两个结合TMEM30A的结合位点是通过包含肽接头的插入氨基酸序列与所述Fc部分基因融合。

9. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少两个结合TMEM30A的结合位点是通过由肽接头组成的插入氨基酸序列与所述Fc部分基因融合。

10. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少两个TMEM30A结合位点是通过包含肽接头的氨基酸序列与完全Fc区域的两个不同Fc部分的N端融合。

11. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少两个结合TMEM30A的结合位点之一融合至scFc分子的N端。

12. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少一个药理学活性剂融合至所述Fc区域的C端。

13. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少一个药理学活性剂为小的化学实体。

14. 如权利要求12所述的结合分子,其中所述小的化学实体是在半胱氨酸残基处融合至所述结合分子。

15. 如权利要求13所述的结合分子,其中所述半胱氨酸残基为工程改造的半胱氨酸残基。

16. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少一个药理学活性剂为多肽。

17. 如权利要求16所述的结合分子,其中所述至少一个药理学活性剂包含抗原结合位点。

18. 如权利要求17所述的结合分子,其中所述抗原结合位点是源自非TMEM30结合抗体。

19. 如权利要求18所述的结合分子,其中所述药理学活性剂选自由scFv分子、Fab分子和单结构域抗体组成的组。

20. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少一个药理学活性剂是基因融合至所述结合分子。

21. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少一个药理学活性剂是共价连接至所述结合分子。

22. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少两个结合位点是通过包含抗体分子的VH结构域的插入氨基酸序列基因融合的。

23. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少两个结合位点是通过包含抗体分子的VL结构域的插入氨基酸序列基因融合的。

24. 如权利要求22所述的结合分子,其中至少两个结合TMEM30A的结合位点与完整抗体分子的VH结构域的N端基因融合。

25. 如权利要求23所述的结合分子,其中至少两个结合TMEM30A的结合位点与完整抗体分子的VL结构域的N端基因融合。

26. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述至少两个结合位点与完整抗体分子的VH结构域和VL结构域的N端基因融合。

27. 如权利要求22或23所述的结合分子,其中所述插入氨基酸序列进一步包含肽接头。

28. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述药学活性剂选自神经活性肽、小的化学实体和结合于中枢神经系统中的靶标的抗体的可变区组成的组。

29. 权利要求1-28中任一项所述的结合分子在制备用于治疗神经病症的药物中的用途。

30. 如权利要求29所述的用途,其中所述神经病症为贮积病症。

31. 如权利要求29所述的用途,其中所述神经病症为慢性疼痛。

32. 如权利要求29所述的用途,其中所述神经病症为癫痫症。

33. 如权利要求29所述的用途,其中所述神经病症为多发性硬化症。

34. 如权利要求29所述的用途,其中所述神经病症为蛋白质病。

35. 如权利要求29所述的用途,其中所述病症为脱髓鞘病症。

对转运治疗性分子穿过血脑屏障的增强

[0001] 发明背景

[0002] 大分子在整个身体内的分布一般是由血液中的大分子介导的扩散,其穿过毛细血管脉管结构的高度窗孔内皮细胞衬里扩散至组织中。在高度血管化的大脑中不存在大分子的自由扩散。大脑毛细血管内皮细胞缺乏在循环系统其余部分中可见的窗孔并具有高度专业化的内皮细胞紧密细胞内接合。这些紧密接合用于防止大于400kDa的分子从毛细血管的管腔自由扩散至近腔侧。另外,毛细血管包含各种转运体系统,例如有机阴离子转运体(OATS)和多药耐药(MDR)系统,其积极建立可能以其他方式扩散穿过内皮细胞的分子的转运梯度。限制性屏障的组合防止了外来试剂(例如包括毒素和病毒)的进入,以及限制了治疗性实体的扩散。另外,这些限制性血脑屏障(BBB)有效阻断潜在治疗性蛋白、肽和小分子以药理学治疗剂量被动递送到脑实质中。

[0003] 一种成功实现转运治疗性分子穿过BBB内皮细胞的策略已经利用了受体介导的转胞吞作用(RMT)。这个策略使用特异性结合于BBB内皮细胞上的蛋白质的抗体或分子,其典型地涉及于分子穿过BBB内皮细胞的转运中。此类抗体在经历穿过BBB内皮细胞的转胞吞作用的同时被用作穿梭分子以递送所连接的有效负载。这种技术的应用实例包括使用转铁蛋白受体和胰岛素受体的抗体(Yu等,2011.Science Translational Medicine.第3卷)。在这两种情况下,RMT抗体在C端融合至治疗性蛋白结构域并且已显示可转运分子穿过BBB。不幸的是,常用的RMT靶标转铁蛋白和胰岛素受体在众多组织中高度且广泛地表达。这种广泛的靶标表达导致短的循环半衰期,其转而又限制了BBB内皮细胞暴露时间以及从而限制了分子在大脑中的给药。另外,这些抗体靶向代谢上关键的细胞功能,从而产生潜在的安全性风险。

[0004] 利用活性BBB转运分子来穿过BBB的改进型靶向部分,例如源自转迁移穿过BBB的抗体分子的结合位点,对于治疗剂向大脑中的递送将具有很大益处。

发明内容

[0005] 本发明是至少部分地基于以下研究结果:发现包含血脑屏障(BBB)转迁移抗体(例如TMEM30A(CDC-50A)结合抗体(例如,单结构域抗体FC5))的融合蛋白与单价 V_{HH} 相比极大地增强转运穿过BBB。初始结合和BBB内皮转运实验显示,FC5(一种美洲驼单结构域 V_{HH} 抗体(sdAb))可促进转运穿过BBB内皮细胞层(参见例如美国专利7,943,129)。已知由于低分子量和缺乏Fc结构域, V_{HH} 的循环半衰期较短(Jain,M.,Kamal,N.和Batra,S.K.(2007) Trends in biotechnology 25(7),307-316;Batra,S.K.,Jain,M.,Wittel,U.A.,Chauhan,S.C.和Colcher,D.(2002) Current opinion in biotechnology 13(6),603-608)。令人惊讶的是,通过将BBB转迁移单结构域抗体与人Fc的N端融合产生二价抗体样构建体,使这种构建体的循环半衰期得到极大增强。此种结合位点并入Fc构建体中产生二价分子,有可能产生二价结合,每个结合部分结合于在细胞表面上表达的假定靶标(例如,TMEM30A)。由于亲合力影响,二价结合可以驱动表观结合亲和力的显著变化(Reynolds,J.A.(1979) Biochemistry 18(2),264-269;Hubble,J.(1999) Molecular immunology 36(1),13-18)。如本文所示,相互作

用的亲和力增加。鉴于这种亲和力增加,未预测到如下研究结果:添加Fc以形成二价分子可显著增强转运穿过BBB。未预测到所述转运增强是由于,虽然Fc结构域的添加由于质量增加而可延长 β 相药物动力学,从而通过结合于FcRn而防止分子的肾滤过和促进体内抗体再循环,但由于在结合于高表达靶标时消除了循环结合分子,增强的表观亲和力增加还可具有相反的作用。然而,最令人惊讶的是,如本文所示,发现呈结合位点-Fc构象(从氨基至羧基端,即,结合位点融合于Fc的N端)的融合蛋白相比于呈Fc-结合位点构象(结合位点融合于Fc的C端)的融合蛋白具有更高的活性。尽管在体外进行的初始实验中显示Fc-结合位点融合蛋白(结合位点融合于Fc的C端)与内皮细胞的结合增加,但上述是事实。还提供了单价形式的结合位点-Fc构建体。

[0006] 因此,在一个方面,本发明涉及包含至少一个药理学活性剂和至少一个结合位点(例如,BBB转迁移结合位点,其结合于TMEM30A)的结合分子,其中结合于TMEM30A的所述至少一个结合位点是i)直接地或ii)通过插入氨基酸序列融合至Fc部分的N端。

[0007] 在一个实施方案中,所述结合分子包含至少两个结合位点。

[0008] 在一个实施方案中,所述至少一个结合位点包含FC5氨基酸序列。在一个实施方案中,所述结合分子包含结合于TMEM30A的至少两个或至少三个(例如,两个或三个)结合位点。在一个实施方案中,所述结合分子包含结合于TMEM30A的至少三个或至少四个(例如,三个或四个)结合位点。

[0009] 在一个实施方案中,至少一个BBB转迁移位点(例如,源自转迁移穿过BBB的抗体分子的结合位点)是直接基因融合至Fc部分。

[0010] 在一个实施方案中,至少一个BBB转迁移位点(例如,源自转迁移穿过BBB的抗体分子的结合位点)是通过包含肽接头的插入氨基酸序列基因融合至Fc部分。

[0011] 在一个实施方案中,至少一个BBB转迁移位点(例如,源自转迁移穿过BBB的抗体分子的结合位点)是通过由肽接头组成的插入氨基酸序列基因融合至Fc部分。

[0012] 在一个实施方案中,两个BBB转迁移位点(例如,源自转迁移穿过BBB的抗体分子的结合位点)是通过包含肽接头的氨基酸序列融合至完全Fc区的两个不同的Fc部分的N端。

[0013] 在一个实施方案中,至少一个BBB转迁移位点(例如,源自转迁移穿过BBB的抗体分子的结合位点)是融合至scFc分子的N端。

[0014] 在一个实施方案中,至少一个药理学活性剂是融合至Fc区的C端。

[0015] 在一个实施方案中,至少一个药理学活性剂是小的化学实体。

[0016] 在一个实施方案中,所述小的化学实体在半胱氨酸残基处融合至结合分子。在一个实施方案中,所述半胱氨酸残基是工程改造的半胱氨酸残基。

[0017] 在一个实施方案中,至少一个药理学活性剂是多肽。

[0018] 在一个实施方案中,至少一个药理学活性剂包含抗原结合位点(例如,源自非BBB转迁移抗体的抗原结合位点)。

[0019] 在一个实施方案中,所述药理学活性剂选自由scFv分子、Fab分子和单结构域抗体组成的组。

[0020] 在一个实施方案中,至少一个药理学活性剂是基因融合至结合分子。

[0021] 在一个实施方案中,至少一个药理学活性剂是共价连接至结合分子。

[0022] 在一个实施方案中,BBB转迁移位点是通过包含抗体分子的VH结构域的插入氨基

酸序列基因融合。

[0023] 在一个实施方案中, BBB转迁移位点是通过包含抗体分子的VL结构域的插入氨基酸序列基因融合。

[0024] 在一个实施方案中, 至少一个BBB转迁移位点是基因融合至完整抗体分子的VH结构域的N端。

[0025] 在一个实施方案中, 至少一个BBB转迁移位点是基因融合至完整抗体分子的VL结构域的N端。

[0026] 在一个实施方案中, 两个BBB转迁移位点是基因融合至完整抗体分子的VH结构域和VL结构域的N端。

[0027] 在一个实施方案中, 插入氨基酸序列进一步包含肽接头。

[0028] 在一个实施方案中, 药学活性剂选自自由以下组成的组: 神经活性肽、小的化学实体, 和结合于中枢神经系统中的靶标的抗体的可变区。

[0029] 在一个实施方案中, 本发明涉及一种治疗神经病症的方法, 其包括向受试者施用本发明的结合分子。

[0030] 在一个实施方案中, 所述神经病症为贮积病症。在一个实施方案中, 所述神经病症为慢性疼痛。在一个实施方案中, 所述神经病症为癫痫症。在一个实施方案中, 所述神经病症为多发性硬化症。在一个实施方案中, 所述神经病症为蛋白质病。在一个实施方案中, 所述病症为脱髓鞘病症。

[0031] 在另一个实施方案中, 本发明涉及本发明的结合分子用于制造供治疗神经病症的药物的用途。

[0032] 附图简述

[0033] 图1示出了(a)单独的FC5重链单结构域抗体、(b)与人IgG1 agly Fc结构域N端融合(FC5-Fc)或(c)与人IgG1agly Fc结构域C端融合(Fc-FC5)以及并有非BBB转迁移结构域作为药学活性部分的可能的抗体样构建体(d,e)的图解表示。分子(f)和(g)说明了FC5重链单结构域抗体向完全抗体分子的添加; 所述重链单结构域抗体可以例如融合至VL或VH结构域, 或两者。

[0034] 图2. 示出了2.5ug的每种纯化蛋白在4-12%Bis-Tris SDS PAGE上的电泳。在每种凝胶上标示10-220kD的SDS PAGE分子量标准。图2a示出了(1)非还原性泳道FC5和(2)还原性泳道FC5, 图2b示出了(1)非还原性泳道FC5-Fc和(2)还原性泳道FC5-Fc, 以及图C示出了(1)非还原性泳道Fc-FC5和(2)还原性泳道Fc-FC5。

[0035] 图3. 示出了与对照抗体12F6A(hIgG1)、CRL2434(mIgG1)和C37H(仅V_{HH})相比, FC5Fc、FcFC5和FC5穿过体外SV40大鼠BBB转化内皮细胞系的转运率增加。

[0036] 图4a-c. 图4(a)示出了FC5-Fc(○)、Fc-FC5(■)或融合至huFc agly结构域的N端的不相关对照骆驼科动物V_{HH}(V_{HH}-Fc)(Δ)与SV40大鼠BBB转化内皮细胞系的结合。图(4b)示出了FC5-Fc(○)和Fc-FC5(■)与初级大鼠BBB内皮细胞系的结合。图4c示出了FC5-Fc与在EBNA293细胞中瞬时表达的大鼠(□)或人(◇)TMEM30A以及Fc-FC5与在EBNA293细胞中瞬时表达的大鼠(▲)或人(●)TMEM30A的结合。

[0037] 图5a-c. 图5a示出了在Hargreaves动物模型中FC5与达拉根(Dalargin)共价交联(FC5-Da1)以抑制疼痛的能力。缩爪速率以基于20秒时间框架的最大可能作用的百分比(%)

MPE) 表示。阴性对照显示对侧非发炎对照爪的缩爪速率(●)并且阳性对照显示当向大鼠IV注射单独的PBS时发炎爪的快速缩爪速率(○)。在Hargreaves动物中比较单一IV剂量的21mg/Kg (mpk)的FC5-Da1 (■)与三个IV剂量的7mpk的FC5-Da1 (□)抑制缩爪速率的功效。图5b示出了每个所评价的爪的%MPE反应相对于时间的平均曲线下面积。图5c示出了在时间0、1小时和2小时向大鼠IV注射三次剂量的7mpk的不相关V_{HH}-Da1 (灰色方块)或单独的FC5 (空心方块)的其他阴性对照实验。还示出了对侧对照爪(实心圆)。在Hargreaves动物中测定关于缩爪速率的抑制的%MPE。

[0038] 图6A-D。在Hargreaves模型中评价Fc-FC5-Da1的功效。在图6A中在时间0时以2mpkat向大鼠IV给药以及在图6B中在时间0和2小时以2mpkat向大鼠IV给药。在图6C和图6D中,在时间0时以6.5mpk向每只大鼠IV给药。

[0039] 图7a-d。比较FC5-Fc-Da1与阴性对照Fc-Da1在Hargreaves模型中的功效。在时间0时以0.5、2.5或6.0mpk的单一浓度的FC5-Fc-Da1或Fc-Da1向大鼠IV给药。数据以给定时间下的最大可能作用(MPE)的百分比形式呈现于图7a和图7b中或以曲线下面积百分比形式呈现于图7c和图7d中。

[0040] 发明详述

[0041] 发现包含至少一个BBB转迁移单结构域抗体(例如,其结合于TMEM30A (CDC-50A)(例如,FC5单结构域))的融合蛋白相比于单价V_{HH}极大地增强转运穿过BBB。特别地,结合位点-Fc构象(从氨基至羧基端)显示增强的活性。至少部分地基于这种显著增加的转运,本文描述了具有增加的转运穿过血脑屏障的分子、用于增强转运穿过血脑屏障的方法,以及使用所述分子的治疗方法。

[0042] 在进一步描述本发明之前,为方便起见,某些术语描述于下:

[0043] I. 定义

[0044] 如本文所用,术语“蛋白质”或“多肽”是指两个或更多个天然氨基酸或非天然氨基酸的聚合物。

[0045] 术语“氨基酸”包括丙氨酸(Ala或A);精氨酸(Arg或R);天冬酰胺(Asn或N);天冬氨酸(Asp或D);半胱氨酸(Cys或C);谷氨酰胺(Gln或Q);谷氨酸(Glu或E);甘氨酸(Gly或G);组氨酸(His或H);异亮氨酸(Ile或I);亮氨酸(Leu或L);赖氨酸(Lys或K);甲硫氨酸(Met或M);苯丙氨酸(Phe或F);脯氨酸(Pro或P);丝氨酸(Ser或S);苏氨酸(Thr或T);色氨酸(Trp或W);酪氨酸(Tyr或Y);以及缬氨酸(Val 或V)。非传统氨基酸也在本发明的范围内并包括正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸以及例如Ellman等, *Meth. Enzym.* 202: 301-336 (1991) 中所述的其他氨基酸残基类似物。为了产生此类非天然存在的氨基酸残基,可以使用Noren等, *Science* 244: 182 (1989) 和Ellman等, 同上的程序。简要地说,这些程序涉及用非天然存在的氨基酸残基来化学活化抑制型tRNA,接着进行RNA的体外转录和翻译。还可使用本领域中已知的肽化学来实现非传统氨基酸的引入。如本文所用,术语“极性氨基酸”包括具有净电荷为零、但在其侧链的不同部分中具有非零部分电荷的氨基酸(例如M、F、W、S、Y、N、Q、C)。这些氨基酸可参与疏水性相互作用和静电相互作用。如本文所用,术语“带电荷氨基酸”包括在其侧链上可具有非零净电荷的氨基酸(例如R、K、H、E、D)。这些氨基酸可参与疏水性相互作用和静电相互作用。

[0046] 如本文所用,术语“接头肽”是指联接或连接两个多肽序列、例如连接两个多肽结

构域的氨基酸序列,所述氨基酸序列本质上并不天然联接或连接所述两个多肽结构域。在一个实施方案中,接头肽为合成的。如本文所用,术语“合成”是指并不天然存在的氨基酸序列。

[0047] 本发明的接头肽通过肽键联接两个氨基酸序列。在一个实施方案中,接头肽将BBB转迁移部分联接至第二部分,例如,Fc部分结构域或区域。在一个实施方案中,本发明的接头肽将药理学活性部分联接至线性序列中的第二部分,例如,作为BBB转迁移部分或Fc部分结构域或区域的第二部分。在另一个实施方案中,接头肽联接两个药理学活性部分。在一个实施方案中,接头肽将一个或多个Fc部分结构域或区域联接或基因融合至非Fc部分。

[0048] 在多肽的上下文中,“线性序列”或“序列”是多肽中在氨基至羧基端方向上的氨基酸顺序,其中在所述序列中彼此相邻的残基在多肽的一级结构中是连续的。

[0049] 如本文所用,术语“连接的”、“融合的”或“融合”可互换使用。这些术语是指通过包括化学缀合或重组方式在内的任何方式将两个以上元件或成分接合在一起。如本文所用,术语“共价融合”或“共价偶联”意指指定部分是彼此直接共价键合,或者通过一个或多个插入部分如连接肽或部分彼此间接共价接合。在一个优选的实施方案中,部分是共价融合的。一种共价键是肽键。本领域中已知化学缀合的方法(例如,使用异双官能交联剂)。融合部分也可为基因融合的。如本文所用,术语“基因融合的”、“基因连接的”或“基因融合”是指两个或更多个蛋白质、多肽或其片段通过编码所述蛋白质、多肽或片段的单一多核苷酸分子的基因表达经由其单独的肽主链的共线性、共价键联或连接。所述基因融合导致单一连续基因序列的表达。优选的基因融合是框内的,即,两个或更多个开放阅读框(ORF)以维持原始ORF的正确阅读框的方式融合以形成更长的连续ORF。因此,所得重组融合蛋白是包含两个或更多个对应于由原始ORF编码的多肽的蛋白质区段(所述区段本质上并不通常如此接合)的单一多肽。在这种情况下,所述单一多肽在加工期间裂解以得到包含两个多肽链的二聚分子。

[0050] 主题多肽包含至少一个药理学活性部分。药理学活性部分是指能够在生物学情形下执行作用或反应的部分。例如,术语“药理学活性部分”是指结合于生物系统的成分(例如,生物流体中或细胞表面上或细胞基质中的蛋白质)并且所述结合产生生物作用(例如,如通过活性部分和/或其所结合的成分的变化(例如,活性部分和/或其所结合的成分的裂解、信号的传输、或细胞中或受试者中的生物反应的增强或抑制)所测量)的药理学活性分子或其部分。优选的药学活性部分是治疗性部分。

[0051] 示例性药理学活性部分可包含例如药物、抗体分子或其部分(例如,F(ab)、scFv、VH结构域或VL结构域)的抗原结合片段(例如,为赋予、诱导或阻断生物反应)、受体的配体结合部分或配体的受体结合部分、酶等。在一个实施方案中,药理学活性部分包含成熟形式的蛋白质。在另一个实施方案中,药理学活性部分包含保留生物活性的全长蛋白的一部分。其他示例性药理学活性部分包括治疗上有用的氨基酸、肽、蛋白质、核酸(包括但不限于多核苷酸、寡核苷酸)、碳水化合物以及脂质。本发明的示例性药理学活性部分包括神经营养因子、生长因子、酶、抗体、神经递质、神经调节剂、抗生素、抗病毒剂、抗真菌剂、成像或可检测剂、同位素以及化学治疗剂等。本发明的药理学活性部分还包括当治疗剂被递送至靶组织时可以被活化的药物、前药和前体。术语“药理学活性部分”不欲包括BBB转迁移部分。药理学活性剂为非BBB转迁移部分。

[0052] 本发明的结合分子为“嵌合”或“融合”蛋白。所述蛋白包含连接至其本质上并不天然连接的第二氨基酸序列的第一氨基酸序列。所述氨基酸序列可正常存在于集合在融合多肽中的单独的蛋白质中,或者它们可正常存在于相同蛋白质中但以新的排列置于融合多肽中。可使用本领域中众所周知的方法产生嵌合蛋白,例如,通过化学合成,或通过产生和翻译以所需关系编码肽区域的多核苷酸。

[0053] 本发明的多肽为结合分子,即,其包含源自BBB转迁移抗体的结合域或结合位点。BBB转迁移抗体促进与其连接的部分转迁移穿过BBB。示范性BBB转迁移抗体结合位点描述于美国专利7,943,129中。在一个实施方案中,BBB转迁移抗体结合于TMEM30A。如本文所用的术语“结合结构域”或“结合位点”是指介导与靶标分子的特异性结合的多肽的部分、区域或位点(例如TMEM30A结合位点或促进BBB转迁移的其他位点)。示范性结合结构域包括抗原结合位点(例如,VH和/或VL结构域)或包含这种结合位点的分子(例如,抗体或单结构域抗体)。

[0054] 本发明的多肽关于BBB转迁移部分是单价或多价的,例如,包含至少1个、2个、3个、4个、5个或更多个BBB转迁移部分。

[0055] 如本文所述的药理学活性部分还可包括例如源自抗体分子的结合结构域或结合位点(例如,来自不会转迁移穿过BBB的抗体的VH和/或VL结构域)、包含这种结合位点的分子(例如,抗体或单结构域抗体)、配体的受体结合结构域、受体的配体结合结构域或催化结构域。如本文所用的术语“配体结合结构域”是指天然受体(例如,细胞表面受体)或至少保留定性配体结合能力并且优选相应的天然受体的生物活性的其区域或衍生物。如本文所用的术语“受体结合结构域”是指天然配体或至少保留定性受体结合能力并且优选相应的天然配体的生物活性的其区域或衍生物。

[0056] 在一个实施方案中,本发明的多肽是修饰抗体。如本文所用,术语“修饰抗体”包括合成形式的抗体,其被改变以使得其并非天然存在的,例如,包含至少两个重链部分但非两个完全重链的抗体(例如,结构域缺失抗体或微型抗体(minibody));多特异性形式的抗体(例如,双特异性、三特异性等),其被改变以结合于两种或更多种不同的抗原,例如,结合于TMEM30A和接合于Fc部分、结构域、区域或scFc区域的治疗上相关的靶结合位点。

[0057] 如本文所用,术语“Fc区域”应定义为对应于天然免疫球蛋白的Fc区域的多肽部分,即,如通过其两个重链的各自Fc结构域(或Fc部分)的二聚缔合而形成。天然Fc区域为同型二聚的并包含两个多肽链。相比之下,如本文所用,术语“基因融合的Fc区域”或“单链Fc区域”(scFc区域)是指如例如美国申请20110243966中所述的在单一多肽链内基因连接(即,编码于单一连续基因序列中)的由Fc结构域(或Fc部分)构成的合成二聚Fc区域。在一个实施方案中,当使用scFc区域时,结合分子关于BBB转迁移部分为单价的。

[0058] 如本文所用,术语“Fc结构域”是指开始于铰链区中木瓜蛋白酶裂解位点正上游(即IgG中的残基216,将重链恒定区的第一个残基定为114)并且结束于抗体的C端的单一免疫球蛋白重链部分。因此,完全Fc结构域包含至少铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。如本文所用,术语“Fc区域”是指类似于天然抗体的Fc区域的二聚Fc结构域(例如,无论是形成传统的两个多肽链形式或呈单链Fc区域形式)。

[0059] 如本文所用,术语“Fc结构域部分”或“Fc部分”包括Fc结构域或源自Fc结构域的氨基酸序列。在某些实施方案中,Fc部分包含以下至少一者:铰链(例如,上部、中部和/或下部

铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域、CH4结构域、或其变体、部分或片段。在其他实施方案中,Fc部分包含完全Fc结构域(即,铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域)。在一个实施方案中,Fc部分包含与CH3结构域(或其部分)融合的铰链结构域(或其部分)。在另一个实施方案中,Fc部分包含与CH3结构域(或其部分)融合的CH2结构域(或其部分)。在另一个实施方案中,Fc部分由CH3结构域或其部分组成。在另一个实施方案中,Fc部分由铰链结构域(或其部分)和CH3结构域(或其部分)组成。在另一个实施方案中,Fc部分由CH2结构域(或其部分)和CH3结构域组成。在另一个实施方案中,Fc部分由铰链结构域(或其部分)和CH2结构域(或其部分)组成。在一个实施方案中,Fc部分缺乏CH2结构域的至少一部分(例如,CH2结构域的全部或一部分)。

[0060] 在一个实施方案中,本发明的结合分子包含完全Fc区域,无论是以一条多肽链(scFc分子)形式存在或在野生型形式中以两条多肽链存在。

[0061] 特异性结合是指两个分子形成在生理条件下相对稳定的复合物。特异性结合的特征在于高亲和力和低至中等能力,与通常具有低亲和力与中等至高能力的非特异性结合相区别。典型地,当亲和常数 K_A 高于 $10^6 M^{-1}$ 或更优选高于 $10^8 M^{-1}$ 时,结合被视为具特异性。必要时,可通过改变结合条件在基本上不影响特异性结合的情况下减少非特异性结合。本领域技术人员可使用常规技术对适当结合条件进行优化,例如分子的浓度、溶液的离子强度、温度、允许结合的时间、阻断剂(例如血清白蛋白、乳酪蛋白)的浓度等。

[0062] 在一个实施方案中,本发明的Fc部分包含本领域中已知为FcRn结合所需的Fc分子的至少部分,本文称为新生儿受体(FcRn)结合伴侣。FcRn结合伴侣为可被FcRn受体特异性结合的分子或其部分,随后FcRn受体活性转运所述FcRn结合伴侣。

[0063] 本发明的FcRn结合伴侣涵盖可被FcRn受体特异性结合的分子,包括全IgG、IgG的Fc片段和包括FcRn受体的完全结合区域的其他片段。在另一个实施方案中,本发明的结合分子的Fc部分结构域或区域被修饰以使得其展现与FcRn的结合减少、最小或无结合。已经基于X射线结晶学描述了结合于FcRn受体的IgG的Fc部分的区域(Burmeister等,1994,Nature372:379)。Fc与FcRn的主要接触区域接近CH2结构域和CH3结构域的交界。Fc-FcRn接触点都在单一Ig重链内。FcRn结合伴侣包括全IgG、IgG的Fc片段和包括FcRn的完全结合区域的其他IgG片段。主要的接触位点包括CH2结构域的氨基酸残基248、250-257、272、285、288、290-291、308-311和314以及CH3结构域的氨基酸残基385-387、428和433-436。对于免疫球蛋白或免疫球蛋白片段或区域的氨基酸编号的提及都是基于Kabat等,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Public Health,Bethesda,Md。

[0064] 可以根据诸如定点诱变等公认程序来修饰IgG的Fc区域以得到将被FcRn结合的修饰IgG或Fc片段或其部分。所述修饰包括与FcRn接触位点相距较远的修饰以及保持或甚至增强与FcRn结合的接触位点内的修饰。例如,人IgG1Fc(Fc γ 1)中的下列单个氨基酸残基可以在Fc对于FcRn的结合亲和力无显著损失的情况下被取代:P238A、S239A、K246A、K248A、D249A、M252A、T256A、E258A、T260A、D265A、S267A、H268A、E269A、D270A、E272A、L274A、N276A、Y278A、D280A、V282A、E283A、H285A、N286A、T289A、K290A、R292A、E293A、E294A、Q295A、Y296F、N297A、S298A、Y300F、R301A、V303A、V305A、T307A、L309A、Q311A、D312A、N315A、K317A、E318A、K320A、K322A、S324A、K326A、A327Q、P329A、A330Q、P331A、E333A、

K334A、T335A、S337A、K338A、K340A、Q342A、R344A、E345A、Q347A、R355A、E356A、M358A、T359A、K360A、N361A、Q362A、Y373A、S375A、D376A、A378Q、E380A、E382A、S383A、N384A、Q386A、E388A、N389A、N390A、Y391F、K392A、L398A、S400A、D401A、D413A、K414A、R416A、Q418A、Q419A、N421A、V422A、S424A、E430A、N434A、T437A、Q438A、K439A、S440A、S444A和K447A,其中例如P238A表示在位置编号238处野生型脯氨酸被丙氨酸取代。

[0065] 某些上述突变可在Fc部分上赋予新的功能性。例如,一个实施方案包括N297A,从而除去高度保守的N-糖基化位点。这种突变的作用在于减少糖基化,从而降低效应子功能和/或免疫原性。作为由上述突变产生的新功能性的另一个实例,在一些情况下对于FcRn的亲合力可能增加超过野生型。这种增加的亲合力可反映为增加的“开通”速率、降低的“关闭”速率或增加的“开通”速率与降低的“关闭”速率。认为赋予FcRn增加的亲和力的突变包括T256A、T307A、E380A和N434A (Shields等,2001,J.Biol.Chem.276:6591)。

[0066] 在一个实施方案中,FcRn结合伴侣为包括序列PKNSSMISNTP (SEQ ID NO:)并且任选地进一步包括选自HQSLGTQ (SEQ ID NO:)、HQNLSDGK (SEQ ID NO:)、HQNISDGK (SEQ ID NO:)或VISSHLGQ (SEQ ID NO:)的序列的多肽(美国专利No.5,739,277)。

[0067] 本领域技术人员应熟知展现改变的效应子功能和/或FcRn结合的许多其他Fc突变体或其类似物。另外,对免疫球蛋白恒定区(例如聚乙二醇化)或其片段进行化学修饰的方法(参见例如Aslam和Dent1998,Bioconjugation:Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences Macmillan Reference,London)是本领域中众所周知的,例如在美国申请20120003210中。

[0068] 在一个实施方案中,使用本领域中已知的方法,例如通过使通常糖基化的残基突变或通过改变多肽的表达以便不发生糖基化,将BBB转迁移部分所连接的Fc部分、结构域或区域无糖基化。作为实例,一个具体实施方案包括N297A突变,从而除去高度保守的N-糖基化位点。在另一个实施方案中,Fc部分包括在位置299处的突变,例如,T299突变为另一种氨基酸,如美国专利7,863,419中所述。除了丙氨酸之外,可在上文指定或本领域中已知的位置用其他氨基酸取代野生型氨基酸以降低Fc功能。

[0069] 在另一个实施方案中,可将Armour,K.L.,Clark,M.R.,Hadley,A.G.和Williamson L.M. (1999),Eur J Immunol29:2613-2624中所公开的突变引入主题结合分子中。

[0070] 可将突变单独引入Fc中,产生一百种以上不同于天然Fc的Fc部分。另外,可一起引入两种、三种或三种以上的这些单独的突变的组合,产生数百种以上潜在的Fc区域。此外,本发明构建体的一个Fc部分可进行突变,而另一个Fc部分完全未进行突变,或者它们都可进行突变但具有不同的突变。

[0071] 本发明嵌合蛋白中还涵盖使用免疫球蛋白恒定区的至少一部分的肽模拟物,例如,Fc片段的肽模拟物或FcRn结合伴侣的肽模拟物。在一个实施方案中,使用噬菌体展示或通过化学文库筛选来鉴定肽模拟物(参见例如McCafferty等,1990,Nature348:552;Kang等,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA88:4363;EP0 589 877B1)。

[0072] 在另一个实施方案中,本发明的Fc区域(例如,scFc区域)包含本领域中已知为Fc γ R结合所需的Fc分子的至少部分。

[0073] 在一个实施方案中,本发明的Fc区域(例如,scFc区域)包含本领域中已知为蛋白质A结合所需的Fc分子的至少部分。在一个实施方案中,本发明的Fc区域(例如,scFc区域)

包含本领域中已知为蛋白质G结合所需的Fc分子的至少部分。在一个实施方案中,此种分子不结合于FcRn。

[0074] 如本文所述,本领域普通技术人员应了解,还可通过包括一个或多个氨基酸变化(取代、添加或缺失)来修饰Fc结构域以使得其氨基酸序列相比于野生型Fc部分有所改变。本领域中已知许多此类变化或改变。在某些示例性实施方案中,Fc部分保留效应子功能(例如,Fc γ R结合),并且在某些实施方案中,Fc部分缺乏效应子功能或具有降低的效应子功能。

[0075] 本发明的多肽的Fc结构域或部分可来自任何同种型(A、E、G或M)并且可源自不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的Fc结构域或部分可包含源自IgG1分子的CH2和/或CH3结构域和源自IgG3分子的铰链区。在另一个实例中,Fc结构域或部分可包含部分源自IgG1分子并且部分源自IgG3分子的嵌合铰链区。在另一个实例中,Fc结构域或部分可包含部分源自IgG1分子并且部分源自IgG4分子的嵌合铰链区。

[0076] 可使用本领域中已知的技术制备包含本发明的接头肽的多肽。在一个实施方案中,本发明的多肽为“重组产生的”,即使用重组DNA技术产生。用于制备本发明的多肽的示例性技术更详细阐述于本文中。

[0077] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”意指可与活性成分组合并且在组合后可用于向受试者施用所述活性成分的化学组合物或化合物。如本文所用,术语“生理学上可接受的”酯或盐意指可与药物组合物的任何其他成分相容的酯或盐形式的活性成分,其对待施用组合物的受试者无害。如本文所用,“药学上可接受的载体”还包括但不限于下列一种或多种:赋形剂;表面活性剂;分散剂;惰性稀释剂;造粒和崩解剂;粘合剂;润滑剂;甜味剂;调味剂;着色剂;防腐剂;生理学上可降解的组合物如明胶;水性媒介物和溶剂;油性媒介物和溶剂;悬浮剂;分散或润湿剂;乳化剂、缓和剂;缓冲剂;盐;增稠剂;填充剂;乳化剂;抗氧化剂;稳定剂;以及药学上可接受的聚合物或疏水性材料。可包括于本发明的药物组合物中的其他“额外成分”是本领域中已知的并例如描述于Genaro编,1985,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.中,其以引用的方式并入本文中。

[0078] 如本文所用,“有效量”为足以产生治疗反应的量。

[0079] 如本文所用,术语“蛋白质病”是指特征为错误折叠的蛋白质或聚集的蛋白质的病症,所述病症具有遗传成分。

[0080] II. BBB转迁移抗体

[0081] 在一个实施方案中,BBB转迁移部分如美国专利7,943,129中所述。例如,在一个实施方案中,BBB转迁移部分包含以选自由以下组成的组的序列所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:58 (FC5)、SEQ ID NO:86 (FC44) 和SEQ ID NO:87 (FC7),如美国专利7,943,129中所述。在一个实施方案中,BBB转迁移部分为FC5部分。FC5为源自骆驼科动物的重链抗体(HCA,也称为双链、双链重链抗体、V_H或单结构域抗体)。与也由骆驼科动物产生的常规IgG型四链免疫球蛋白相比,这些抗体缺乏常规免疫球蛋白的轻链和CH1结构域。这些天然存在的重链抗体的一个显著特征是Glu、Arg和Gly分别在其可变结构域(称为V_H)的VL界面位置44、45和47(Kabat编号)的主要存在。常规四链抗体的重链的可变结构域(称为V_H)中的相同位置几乎无一例外地被Gly、Leu和Trp占据。与常规四链抗体的V_H结构域的相对不溶性相比,这些差

异被认为是造成了骆驼科动物HCA可变结构域(V_H)的高溶解性和稳定性。骆驼科动物V_H结构域的两个更关键特征是其相对较长的CDR3和半胱氨酸对在CDR中的高发生率。似乎半胱氨酸对介导二硫桥的形成并因此涉及调节抗体组合位点的表面拓扑结构。在骆驼sdAb-溶菌酶复合物的晶体结构中,从sdAb突出并被CDR二硫键部分稳定的刚性环延伸超出组合位点并深深地渗透入溶菌酶活性位点(Desmyter等,Nature Struct.Biol.,3,803-811(1996))。

[0082] 在一个实施方案中,BBB转迁移抗体结合于TMEM30A(C6orf67、CDC50A)。结合于TMEM30A的示例性部分是已知的或者可使用本领域中众所周知的方法制备。例如,包含TMEM30A或其部分的氨基酸序列的氨基酸序列可用于制备特异性识别TMEM30A氨基酸序列的抗体或者从结合位点文库中筛选特异性结合于TMEM30A的结合部分。来自所述抗体或源自文库的结合位点可用于本发明的结合分子中。TMEM30A的氨基酸序列示于下:

```

10      20      30      40      50      60
NAMNPNARDE VDGGSPCARG GTAKIRRPDU TAFEQQRLEA WQFILKSTV LPYFFLGLI

70      80      90      100     110     120
FIPIGIGIFV YGNNIPREI DYTGTEPSP CNECLSPQVT PCPTINFTL ERKFBGNVFM

130     140     150     160     170     180
YTGLSNFTQ HRRYVKSRD SQLGGQDAL LNPKECEFY PRNEDKPIA CEALANRNFN

190     200     210     220     230     240
DTLELFLIG DSYPIFIALK KEGIANWIK NYFRNPPFG ENLBEREKY TKPVNWLEFV

250     260     270     280     290     300
YMLDQDFEM GFINEEPIW MPTAALPTF KLYRLERKQ DLNPTLRAG YSLNVTINYP

310     320     330     340     350     360
NHYEDGRFEM ELSTISWQGG ENFFLGIAVI AVGSISFLLG VVLLVINRKY RRSQNIADIT
    
```

[0083]

[0084] 本发明的多肽可包含源自使用本领域公认方案结合于TMEM30A的抗体的可变区或其部分(例如VL和/或VH结构域)。例如,可变结构域可源自通过用抗原或其片段使哺乳动物免疫而在所述非人哺乳动物(例如,鼠、豚鼠、灵长类动物、兔或大鼠)中产生的抗体。参见Harlow和Lane,同上,其出于所有目的以引用的方式并入。可通过多次皮下或腹膜内注射相关抗原(例如,纯化肿瘤相关抗原或包含所述抗原的细胞或细胞提取物)和佐剂来产生免疫球蛋白。这种免疫作用典型地引起免疫反应,其包含从活化的脾细胞或淋巴细胞产生抗原反应性抗体。

[0085] 虽然可变区可源自从免疫的哺乳动物的血清收获的多克隆抗体,但通常希望从脾脏、淋巴结或外周血分离单独的淋巴细胞以提供可得到所需可变区的单克隆抗体(MAb)的均质制剂。兔或豚鼠典型地用于制备多克隆抗体。小鼠典型地用于制备单克隆抗体。可通过将抗原片段注射入小鼠中,制备“杂交瘤”以及针对特异性结合于抗原的抗体筛选杂交瘤来制备针对片段的单克隆抗体。在这种众所周知的方法(Kohler等,(1975),Nature,256:495)中,将来自已经被注射了抗原的小鼠的相对短命或会死的淋巴细胞与永生的肿瘤细胞系

(例如骨髓瘤细胞系)融合,因此,产生都是永生的并能够产生由B细胞基因编码的抗体的杂交细胞或“杂交瘤”。通过选择、稀释以及与包含特定基因的各个单独的菌株一起再生长以形成单一抗体而将所得杂交物分离成单一基因菌株。它们针对所需抗原产生均质的抗体并且关于其纯基因血统被称为“单克隆的”。

[0086] 由此制备的杂交瘤细胞可以接种并生长在优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞的生长或存活的一种或多种物质的合适培养基中。本领域技术人员应了解,用于形成、选择和培养杂交瘤的试剂、细胞系和培养基可购自多个来源并且标准化方案已经非常成熟。一般来说,对于使杂交瘤细胞生长的培养基测定针对所需抗原的单克隆抗体的产生。优选通过免疫沉淀或通过体外测定法如放射性免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)来测定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。在鉴定了产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞之后,可通过有限稀释程序对所述克隆进行亚克隆并通过标准方法培养(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第59-103页(Academic Press, 1986))。应进一步了解,可通过常规纯化程序如例如亲和色谱法(例如,蛋白质-A、蛋白质-G或蛋白质-L亲和色谱法)、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳或透析将亚克隆所分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清分离。

[0087] 任选地,可针对与抗原的特定区域或所需片段结合而不结合于抗原的其他非重叠片段来筛选抗体。可通过测定抗体与抗原的缺失突变体集合的结合并且测定哪些缺失突变体结合于抗体来实现后一种筛选。可以例如通过免疫印迹法或ELISA来评估结合。显示与抗体特异性结合的最小片段定义抗体的表位。可选地,可通过测试抗体与参考抗体竞争结合于抗原的竞争测定法来测定表位特异性。如果测试抗体和参考抗体竞争,则它们结合于充分接近的相同的一个或多个表位以使得一种抗体的结合干扰另一种抗体的结合。

[0088] 可使用上文关于恒定区结构域序列的分离所述的任何常规程序(例如,通过使用能够特异性结合于编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地对编码所需单克隆抗体的DNA进行分离和测序。经过分离并亚克隆的杂交瘤细胞充当所述DNA的优选来源。更具体地,所分离的DNA(其可如本文所述合成)可用于克隆所需可变区序列以并入本发明的多肽中。

[0089] 在其他实施方案中,结合位点是源自完全人抗体。可在不能内源性产生免疫球蛋白的转基因动物(例如,小鼠)中产生人或基本上人抗体(参见例如美国专利No.6,075,181、5,939,598、5,591,669和5,589,369,其各自以引用的方式并入本文中)。例如,已经描述了在嵌合和生殖系突变小鼠中抗体重链接合区域的纯合缺失导致内源性抗体产生的完全抑制。将人免疫球蛋白基因阵列转移至所述生殖系突变小鼠将导致在抗原攻击时产生人抗体。使用SCID小鼠产生人抗体的另一种优选方法公开于美国专利No.5,811,524中,其以引用的方式并入本文中。应了解,与这些人抗体相关的遗传物质也可如本文所述分离和操作。

[0090] 用于产生重组抗体的另一种高效方法由Newman, *Biotechnology*, 10:1455-1460 (1992) 公开。具体地,这种技术导致产生包含猴可变结构域和人恒定序列的灵长化抗体。所述参考文献以全文引用的方式并入本文中。此外,这种技术还描述于共同受让的美国专利No.5,658,570、5,693,780和5,756,096中,其各自以引用的方式并入本文中。

[0091] 在另一个实施方案中,可通过显微操作和所分离的可变基因来选择淋巴细胞。例如,可从免疫的哺乳动物中分离外周血单核细胞并体外培养约7天。可从培养物中筛选满足

筛选标准的特定抗体。可以分离来自阳性孔的细胞。可通过FACS或通过补体介导的溶血空斑测定法中进行鉴定来分离单独的产生Ig的B细胞。可将产生Ig的B细胞显微操作至管中并且可使用例如RT-PCR来扩增VH和VL基因。可将VH和VL基因克隆到抗体表达载体中并转染到细胞(例如,真核细胞或原核细胞)中供表达。

[0092] 可选地,可变(V)结构域可获自来自所选动物的可变基因序列文库。可用所需抗原筛选表达结构域(例如,V_H和/或V_L结构域)的随机组合的文库来鉴定具有所需结合特性的元件。所述筛选方法是本领域中众所周知的。例如,可将抗体基因谱克隆到λ噬菌体表达载体中(Huse,WD等,(1989).*Science*,2476:1275)。另外,可以筛选在表面上表达抗体的细胞(Francisco等,(1994),*PNAS*,90:10444;Georgiou等,(1997),*Nat.Biotech.*,15:29;Boder和Wittrup(1997)*Nat.Biotechnol.*15:553;Boder等(2000),*PNAS*,97:10701;Daugherty,P.等,(2000)*J.Immunol.Methods*.243:211)或病毒(例如,Hoogenboom,HR.(1998),*Immunotechnology*4:1;Winter等,(1994).*Annu.Rev.Immunol.*12:433;Griffiths,AD.(1998).*Curr.Opin.Biotechnol.*9:102)。

[0093] 本领域技术人员还应了解,编码抗体可变结构域的DNA还可源自使用本领域中已知的方法在噬菌体、酵母或细菌中表达的抗体文库。示例性方法阐述于例如EP368684B1;美国专利No.5,969,108;Hoogenboom等,(2000)*Immunol.Today*21:371;Nagy等,(2002)*Nat.Med.*8:801;Huie等,(2001),*PNAS*,98:2682;Lui等,(2002),*J.Mol.Biol.*315:1063中,其各自以引用的方式并入本文中。若干出版物(例如,Marks等,(1992),*Bio/Technology*10:779-783)已经描述了通过链改组以及组合感染和体内重组作为构建大的噬菌体文库的策略来产生高亲和力人抗体。在另一个实施方案中,可使用核糖体展示来代替噬菌体作为展示平台(参见例如Hanes等,(1998),*PNAS*95:14130;Hanes和Pluckthun.(1999),*Curr.Top.Microbiol.Immunol.*243:107;He和Taussig.(1997),*Nuc.Acids Res.*,25:5132;Hanes等,(2000),*Nat.Biotechnol.*18:1287;Wilson等,(2001),*PNAS*,98:3750;或Irving等,(2001)*J.Immunol.Methods*248:31)。

[0094] 用于筛选的示例性文库为人可变基因文库。还可使用来自非人来源的V_L和V_H结构域。文库可以是天然的,来自免疫的受试者,或半合成的(Hoogenboom和Winter.(1992).*J.Mol.Biol.*227:381;Griffiths等,(1995)*EMBO J.*13:3245;de Kruif等,(1995).*J.Mol.Biol.*248:97;Barbas等,(1992),*PNAS*,89:4457)。在一个实施方案中,可对免疫球蛋白结构域进行突变以产生具有更大的异质性的核酸分子的文库(Thompson等,(1996),*J.Mol.Biol.*256:77;Lamminmaki等,(1999),*J.Mol.Biol.*291:589;Caldwell和Joyce.(1992),*PCR Methods Appl.*2:28;Caldwell和Joyce.(1994),*PCR Methods Appl.*3:S136)。可使用标准的筛选程序来选择高亲和力变体。在另一个实施方案中,可例如使用利用本领域中已知的技术从晶体结构获得的信息对V_H和V_L序列作出改变来增加抗体亲和力。

[0095] 另一个示例性文库为包含单结构域抗体的骆驼科动物文库。示例性单结构域分子包括抗体的分离重链可变结构域(V_H),即重链可变结构域,不具有轻链可变结构域,以及抗体的分离轻链可变结构域(V_L),即轻链可变结构域,不具有重链可变结构域。用于本发明的结合分子中的示例性单结构域抗体包括例如骆驼科动物重链可变结构域(约118至136个氨基酸残基),如Hamers-Casterman等,*Nature*363:446-448(1993);和Dumoulin等,*Protein Science*11:500-515(2002)中所述。其他示例性单结构域抗体包括单一V_H或V_L结构域,也称

为Dabs® (Domantis Ltd., Cambridge, UK)。其他单结构域抗体包括鲨鱼抗体(例如,鲨鱼Ig-NAR)。鲨鱼Ig-NAR包含一个可变结构域(V-NAR)和五个C类恒定结构域(C-NAR)的同型二聚体,其中多样性集中在长度从5个到23个残基的细长CDR3区域中。在骆驼科动物物种(例如,美洲驼)中,重链可变区(称为V_{HH})形成整个抗原结合结构域。骆驼科动物V_{HH}可变区与源自常规抗体的那些(VH)之间的主要差异包括:(a)与V_{HH}中的相应区域相比,VH的轻链接触表面中的氨基酸疏水性更大,(b)V_{HH}中的CDR3更长,以及(c)V_{HH}中的CDR1与CDR3之间频繁出现二硫键。制备单结构域结合分子的方法描述于美国专利No.6,005,079和6,765,087中,其都以引用的方式并入本文中。包含V_{HH}结构域的示例性单结构域抗体包括Nanobodies® (Ablynx NV, Ghent, Belgium)。

[0096] 此外,可用于制备本发明的多肽的可变区序列可获自多种不同来源。例如,如上文所讨论,多种人基因序列可以公开可得的保藏物形式获得。已公布了许多抗体和抗体编码基因(例如,已知具有临床有益性质的抗体)的序列并且可使用本领域公认技术从这些序列合成合适的可变区序列(例如VL和VH序列)。

[0097] 在另一个实施方案中,本发明的多肽的结合结构域由例如源自骆驼科动物的V_H结构域组成,其在不存在VL链的情况下稳定(Hamers-Casterman等,(1993).Nature,363:446; Desmyter等,(1996).Nat.Struct.Biol.3:803;Decanniere等,(1999).Structure,7:361; Davies等,(1996).Protein Eng.,9:531;Kortt等,(1995).J.Protein Chem.,14:167)。

[0098] 本发明的多肽可包含源自完全鼠、完全人、嵌合、人源化、非人灵长类或灵长化抗体的可变结构域或CDR。可使用本领域公认的技术改变非人抗体或其片段或结构域以降低其免疫原性。人源化抗体是源自非人抗体的抗体,其已经被修饰以保留或基本上保留亲本抗体的结合性质,但其在人中的免疫原性相比于亲本非人抗体较小。在人源化靶抗体的情况下,这可通过多种方法来实现,包括:(a)将整个非人可变结构域移植到人恒定区上以产生嵌合靶抗体;(b)在保留或不保留关键的框架残基的情况下将一个或多个非人互补决定区(CDR)的至少一部分移植到人框架和恒定区;(c)移植整个非人可变结构域,但通过表面残基的置换用人样部分将其“覆盖”。所述方法公开于Morrison等,(1984),PNAS.81:6851-5;Morrison等,(1988),Adv.Immunol.44:65-92;Verhoeyen等,(1988),Science239:1534-1536;Padlan,(1991),Molec.Immun.28:489-498;Padlan,(1994),Molec.Immun.31:169-217;以及美国专利No.5,585,089、5,693,761和5,693,762中,其全部特此以全文引用的方式并入本文中。

[0099] 还可使用脱免疫作用来降低本发明的多肽的免疫原性。如本文所用,术语“脱免疫作用”包括T细胞表位的修饰(参见例如W09852976A1、W00034317A2)。例如,分析VH和VL序列并且产生各V区域的人T细胞表位“图”,其显示表位相对于序列内的互补决定区(CDR)和其他关键残基的位置。对来自T细胞表位图的单独的T细胞表位进行分析以鉴定改变最终抗体的活性的风险较低的可选氨基酸取代。设计了多种包含氨基酸取代的组的可选VH和VL序列并且随后将这些序列并入进行功能测试的多种本发明多肽中。典型地,产生12至24种变异抗体并进行测试。然后将包含修饰的V和人C区域的完全重链和轻链基因克隆到表达载体中并且随后将质粒引入细胞系中以产生全抗体。然后在适当的生物化学和生物测定法中比较所述抗体,并且鉴定最佳变体。

[0100] 在一个实施方案中,通过至少部分置换一个或多个CDR来改变本发明多肽中使用

的可变结构域。在另一个实施方案中,可例如通过部分框架区域置换和序列改变来任选改变可变结构域。在制造人源化可变区时,CDR可源自与获得框架区的抗体相同种类或甚至子类的抗体,然而,可以设想CDR源自不同种类的抗体并且优选源自来自不同物种的抗体。可能没有必要用来自供体可变区的完全CDR置换所有CDR以将一个可变结构域的抗原结合能力转移至另一个可变结构域。相反,可能只需要转移为维持结合结构域的活性所需的那些残基。鉴于美国专利No.5,585,089、5,693,761和5,693,762中所述的解释,通过进行常规实验或通过试错试验以获得具有降低的免疫原性的功能性抗原结合位点,其将完全在本领域技术人员的技能范围内。

[0101] FC5是可并入本发明多肽中的示例性TMEM30A结合部分。FC5的氨基酸序列阐述于下:

[0102]

```

E V Q L Q A S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G F K I T H Y I M
G W F E Q A F G K E R E F V C R I T N G G D N T F Y C N S V K G R F
T I S R D N A E N T V Y L Q N N S L K P E D T A D Y Y C A A G S I S
T A T P L R V - - - D Y N G K G T Q V I V S S

```

[0103] III. 任选的接头肽

[0104] 本发明的多肽任选包含至少一个接头肽。在一个实施方案中,两个或更多个接头肽存在于本发明多肽的多肽中。在另一个实施方案中,本发明的多肽包含3、4、5、6、7、8、9或10个接头肽。

[0105] 本发明的接头肽可在重组多肽中的给定位置出现一次,或可在重组多肽中的给定位置出现多次(即,接头肽的序列可在序列中重复x次)。例如,在一个实施方案中,本发明的接头肽在多肽中的给定位置重复1次至10次(包括1次和10次)。在另一个实施方案中,接头肽在多肽中的给定位置出现2、3、4、5、6、7、8、9或10次。

[0106] 本发明的接头肽可具有各种长度。在一个实施方案中,本发明的接头肽的长度为约5至约75个氨基酸。在另一个实施方案中,本发明的接头肽的长度为约5至约50个氨基酸。在另一个实施方案中,本发明的接头肽的长度为约10至约40个氨基酸。在另一个实施方案中,本发明的接头肽的长度为约15至约35个氨基酸。在另一个实施方案中,本发明的接头肽的长度为约15至约20个氨基酸。在另一个实施方案中,本发明的接头肽的长度为约15个氨基酸。

[0107] 接头肽如此频繁地用于蛋白质工程改造中以致于其已经变成合成生物学中的标准组装部分(参见例如Anderson, J.C.等, Journal of Biological Engineering 2010.4:1 和partsregistry网址,其列出了基因构建体中所用的标准生物学部分)。

[0108] 接头肽的目前本领域公认用途的一些实例包括用于以下:scFv 分子(Freund等, FEBS1993.320:97);单链免疫球蛋白分子(Shu等,1993.PNAS.USA90:7995);微型抗体(Hu等,1996Cancer Res.56:3055);CH2结构域缺失抗体(Mueller, B.M.等,1990PNAS USA.87:5702);单链双特异性抗体(Schlereth等,2005Cancer Res.65:2882);全长IgG样双特异性抗体(Marvin, J.S.等,2005Acta Pharmacol Sin26:649和其中引用的参考文献以及Michaelson, J.S.等,2009MAbs.1:128和Orcutt K.D.等,2010Protein Eng Des Sel.23:221);scFv融合蛋白(deGraaf等,2002British Journal of Cancer86:811);开发蛋白质-

片段互补测定法 (Remy, I. 等, 2007 BioTechniques 42:137)。

[0109] 其他示例性接头肽包括可用于本发明结合分子中的降低木糖的那些 (例如, 如 PCT/US11/66947 中所公开)。

[0110] 接头肽可连接至其所连接的多肽的N端或C端 (或两者)。

[0111] IV. 示例性药理学活性部分

[0112] 根据所靶向的疾病或病症或病状, 可使用例如靶向 TMEM30A 的本发明结合分子, 例如包含根据本发明的 BBB 转移位点的结合分子, 在体内成功地递送多种药物载体, 例如, 药理学活性剂或等效地药理学活性部分。如本文所用, 术语“药理学活性部分”和“药理学化合物”应是指可用于治疗或改善疾病或病症的作用的任何部分或化合物。例如, 可以靶向包括神经退化疾病如阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease)、帕金森氏病 (Parkinson's disease)、亨廷顿氏病 (Huntington's disease)、肌肉萎缩性侧索硬化 (ALS、路格里格病 (Lou Gehrig's disease))、疼痛癫痫症、贮积病和多发性硬化症在内的疾病或病症。

[0113] 示例性药理学活性分子包括: 神经生长因子 (NGF)、脑源性神经营养因子 (BDNF)、睫状神经营养因子 (CNTF)、神经胶质细胞系神经营养因子 (GDNF) 和胰岛素样生长因子 (IGF)。另外, 已经显示具有治疗潜力并且可由本发明的抗体递送的其他化合物为神经肽, 包括但不限于物质 P、神经肽 Y、达拉根、 α 突触核蛋白、血管活性肠肽 (VIP)、 γ -氨基丁酸 (GABA)、多巴胺、缩胆囊素 (CCK)、内啡肽、脑啡肽和促甲状腺激素释放激素 (TRH)。其他示例性治疗剂可包括细胞因子、抗焦虑剂、抗惊厥药、多核苷酸和转基因, 包括例如可用于以下神经元病症的小干扰 RNA, 所述病症包括但不限于精神疾病例如焦虑症、抑郁症、精神分裂症和睡眠障碍, 以及癫痫症、癫痫发作病症、中风和脑血管障碍、脑炎和脑膜炎、记忆和认知障碍、急性或慢性疼痛 (例如, 难治性) 和身体创伤。

[0114] 在一个实施方案中, 药理学活性部分包含不结合于 TMEM30A 的抗原结合位点。在某些实施方案中, 本发明的多肽具有至少一个对介导生物作用的非 TMEM30A 靶标分子具特异性的结合位点。在一个实施方案中, 所述结合位点调节细胞活化或抑制 (例如, 通过结合于细胞表面受体和导致活化或抑制信号的传输)。在一个实施方案中, 所述结合位点能够引起信号转导, 其导致细胞死亡 (例如, 通过细胞信号诱导途径、通过补体固定或暴露于结合分子上存在的有效负载 (例如, 有毒的有效负载)), 或其调节受试者的疾病或病症 (例如, 通过介导或促进细胞杀灭、通过促进纤维蛋白凝块的溶解或促进凝块形成, 或通过调节生物可利用的物质的量。在另一个实施方案中, 本发明的多肽具有至少一个对靶向减少或消除的抗原 (例如, 细胞表面抗原或可溶性抗原) 具特异性的结合位点)。

[0115] 在其他实施方案中, 本发明的多肽结合于可用于治疗神经疾病或病症的分子。例如, 多肽可结合于神经细胞 (例如, 神经元、神经胶质细胞或 a) 上存在的抗原。在某些实施方案中, 抗原相关神经病症可为上述自身免疫或炎性病症。如本文所用, 术语“神经疾病或病症”包括受试者中神经系统退化的病症或病状 (例如, 神经退化性病症, 以及神经系统不能正常发育或在损伤后不能再生的病症, 例如, 脊髓损伤)。可通过本发明的方法和组合物诊断、预防或治疗的神经病症的实例包括但不限于多发性硬化症、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、神经性疼痛、创伤性脑损伤、格林-巴利综合征 (Guillain-Barré syndrome) 和 慢性炎性脱髓鞘多发性神经病 (CIDP)。

[0116] 其他示例性药理学活性部分进一步讨论于下:

[0117] i. 抗原结合部分

[0118] 在某些实施方案中, 药学活性部分包含例如抗体或单结构域抗体的至少一个抗原结合部分(结合位点)。在一个实施方案中, 抗原结合部分将组合物靶向特定细胞类型或组织。

[0119] 在其他实施方案中, 本发明的药学活性部分的结合位点可包含抗原结合部分或片段。术语“抗原结合部分”是指结合抗原或与完整抗体(即, 与其所源自的完整抗体)竞争结合抗原(即, 特异性结合)的免疫球蛋白、抗体或抗体变体的多肽片段。例如, 抗原结合片段可源自上述抗体或抗体变体。可通过本领域中众所周知的重组或生物化学方法产生抗原结合部分。示例性抗原结合片段包括V_H和/或V_L(如果任一种单独的可变区足以结合抗原的话)、Fv、Fab、Fab'和(Fab')₂。

[0120] 在其他实施方案中, 本发明的药学活性部分可包含来自单链结合分子(例如, 单链可变区或scFv)的结合位点。关于制备单链抗体所述的技术(美国专利No. 4,694,778; Bird, Science242:423-442(1988); Huston等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:5879-5883(1988); 以及Ward等, Nature334:544-554(1989))可被改适以产生单链结合分子。通过经由氨基酸桥连接Fv区域的重链与轻链片段以产生单链抗体来形成单链抗体。还可使用用于在大肠杆菌中组装功能性Fv片段的技术(Skerra等, Science242:1038-1041(1988))。

[0121] 在某些实施方案中, 本发明的药学活性部分包含一个或多个包含单链可变区序列或由单链可变区序列(scFv)组成的结合位点或区域。单链可变区序列包含具有一个或多个抗原结合位点的单一多肽, 例如, 通过接头肽连接至V_H结构域的V_L结构域。所述V_L和/或V_H结构域可源自本领域中已知的抗体或其变体。可以V_H-接头-V_L定向或V_L-接头-V_H定向构建ScFv分子。

[0122] 在某些实施方案中, 在本发明的药学活性部分中使用的scFv分子是稳定化scFv分子。在一个实施方案中, 所述稳定化scFv分子可包含插入V_H结构域与V_L结构域之间的接头肽, 其中所述V_H结构域和V_L结构域是通过V_H结构域中的氨基酸与V_L结构域中的氨基酸之间的二硫键连接的。在其他实施方案中, 稳定化scFv分子可包含具有最佳长度或组成的scFv接头。在其他实施方案中, 稳定化scFv分子可包含具有至少一个稳定化氨基酸取代的V_H或V_L结构域。在另一个实施方案中, 稳定化scFv分子可具有至少两个上文列出的稳定化特征。

[0123] 稳定化scFv分子具有改善的蛋白质稳定性或者向其可操作性连接的多肽赋予改善的蛋白质稳定性。可存在于本发明的多肽中的示例性稳定化scFv分子描述于2007年3月19日提交的美国专利申请No. 11/725,970中, 其各自以全文引用的方式并入本文中。

[0124] 在某些示例性实施方案中, 本发明的药学活性部分包含通过接头肽可操作性连接至Fc区域的C端和/或N端的至少一个scFv分子。

[0125] 在一个实施方案中, 本发明的药学活性部分包含至少一个来自识别所需靶标的抗体的CDR。在另一个实施方案中, 本发明的药学活性部分包含至少两个来自识别所需靶标的抗体的CDR。在另一个实施方案中, 本发明的药学活性部分包含至少三个来自识别所需靶标的抗体的CDR。在另一个实施方案中, 本发明的药学活性部分包含至少四个来自识别所需靶标的抗体的CDR。在另一个实施方案中, 本发明的药学活性部分包含至少五个来自识别所需靶标的抗体的CDR。在另一个实施方案中, 本发明的药学活性部分包含全部六个来自识别所需靶标的抗体的CDR。在一个实施方案中, 本发明的药学活性部分包含识别所需靶标的抗体

分子的完全氨基酸序列(例如,在双特异性、四价抗体分子的情况下)。

[0126] 本领域中已知用于本发明的药学活性部分中的可获得结合位点的示例性抗体。例如,目前被FDA批准用于治疗抗体可用于获得结合位点。在一个实施方案中,示例性结合位点是源自抗Lingo抗体(参见例如PCT/US2008/000316)。

[0127] 在其他方面,本发明的药学活性部分可包含修饰的抗体分子或源自修饰形式的抗体的抗原结合位点(或其部分)。示例性此类形式包括例如微型抗体、双链抗体、三链抗体、纳米抗体、骆驼科动物抗体、Dabs、四价抗体、胞内双链抗体(例如,Jendreyko等,2003.J.Biol.Chem.278:47813)、融合蛋白(例如,抗体细胞因子融合蛋白、与Fc受体的至少一部分融合的蛋白质)以及双特异性抗体。其他修饰抗体描述于例如美国专利No.4,745,055;EP256,654;Faulkner等,Nature298:286(1982);EP120,694;EP125,023;Morrison,J.Immun.123:793(1979);Kohler等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA77:2197(1980);Raso等,Cancer Res.41:2073(1981);Morrison等,Ann.Rev.Immunol.2:239(1984);Morrison,Science229:1202(1985);Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA81:6851(1984);EP255,694;EP266,663;以及W088/03559中。重配免疫球蛋白链也是已知的。参见例如美国专利No.4,444,878;W088/03565;以及EP68,763和其中引用的参考文献。

[0128] 在另一个实施方案中,本发明的药学活性部分包含作为双链抗体或源自其的抗原结合位点的抗原结合位点或区域。双链抗体是二聚的四价分子,各自具有与scFv分子类似的多肽,但通常具有联接两个可变结构域的短的(例如,少于10个并且优选1-5个)氨基酸残基接头,以使得同一多肽链上的V_L和V_H结构域不能相互作用。实际上,一条多肽链的V_L和V_H结构域与第二多肽链上的V_H和V_L结构域(分别地)相互作用(参见例如W002/02781)。在一个实施方案中,本发明的药学活性部分包含可操作性连接到至少一个基因融合Fc区域(即scFc区域)的N端和/或C端的双链抗体。

[0129] 在某些实施方案中,本发明的药学活性部分包含非BBB转迁移抗体结合位点(例如,非TEME30A结合单结构域结合分子,例如单结构域抗体)。

[0130] ii. 非免疫球蛋白结合分子

[0131] 在某些其他实施方案中,本发明的药学活性部分包含一个或多个源自非免疫球蛋白结合分子的结合位点。如本文所用,术语“非免疫球蛋白结合分子”是结合位点包含源自除免疫球蛋白以外的多肽的氨基酸序列的结合分子。包含并非源自抗体分子的结合位点的结合分子的实例包括下文更详细讨论的受体结合位点和配体结合位点。

[0132] 非免疫球蛋白药学活性部分可包含源自并非免疫球蛋白的免疫球蛋白超家族成员(例如T细胞受体或细胞粘附蛋白(例如,CTLA-4、N-CAM、端蛋白(telokin)))的氨基酸序列。在其他实施方案中,氨基酸序列可包含并非基于免疫球蛋白折叠(例如锚蛋白重复蛋白或纤连蛋白)但仍然能够特异性结合于靶标的蛋白质拓扑结构。

[0133] 可通过从具有人工多样化结合位点的结合分子文库选择或分离靶标结合变体来鉴定基于非免疫球蛋白的药学活性部分。可使用完全随机方法(例如,易错PCR、外显子改组或定向进化)产生或通过本领域公认的设计策略辅助多样化文库。例如,可通过在编码结合位点的核酸内的相应位置插入简并密码子、三核苷酸、随机肽或整个环来随机化当所述结合位点与其同源靶标分子相互作用时通常涉及的氨基酸位置(参见例如美国公开No.20040132028)。可通过研究与靶标分子复合的结合位点的晶体结构来鉴定氨基酸位置

的定位。供随机化的候选位置包括环、平坦表面、螺旋以及结合位点的结合腔。在某些实施方案中,结合位点内可能为多样化的候选物的氨基酸可通过其与免疫球蛋白折叠的同源性来鉴定。例如,纤连蛋白的CDR样环内的残基可经随机化以产生纤连蛋白结合分子的文库(参见例如Koide等,J.Mol.Biol.,284:1141-1151(1998))。可被随机化的结合位点的其他部分包括平坦表面。可通过本领域公认方法如噬菌体展示、酵母展示或核糖体展示来实现选择。

[0134] 在一个实施方案中,本发明的药学活性部分包含来自纤连蛋白结合分子的结合位点。纤连蛋白结合分子(例如,包含纤连蛋白I型、II型或III型结构域)展示CDR样环,其与免疫球蛋白相比,不依赖于链内二硫键。用于制备纤连蛋白多肽的方法描述于例如W001/64942以及美国专利No.6,673,901、6,703,199、7,078,490和7,119,171中,其以引用的方式并入本文中。在一个示例性实施方案中,纤连蛋白多肽为AdNectin®(Adnexus Therapeutics,Waltham,MA)。

[0135] 在另一个实施方案中,本发明的药学活性部分包含来自 Affibody®(Abcam,Cambridge,MA)的结合位点。亲和体(Affibody)是源自金黄色葡萄球菌蛋白A(staphylococcal Protein A,SPA)的免疫球蛋白结合结构域(参见例如Nord等,Nat.Biotechnol.,15:772-777(1997))。用于制备亲和体结合位点的方法描述于美国专利6,740,734和6,602,977以及W000/63243中,其各自以引用的方式并入本文中。

[0136] 在另一个实施方案中,本发明的药学活性部分包含来自 Anticalin®(Pieris AG,Friesing,Germany)的结合位点。抗运载蛋白(也称为脂质运载蛋白)是多样化 β -桶状蛋白家族的成员,所述蛋白家族的功能在于在其桶/环区域中结合靶标分子。脂质运载蛋白结合位点可通过对联接桶的链的环序列进行随机化来工程改造(参见例如Schlehuber等,Drug Discov.Today,10:23-33(2005);Beste等,PNAS,96:1898-1903(1999))。本发明的结合分子中所用的抗运载蛋白结合位点可从脂质运载蛋白家族的多肽起始获得,所述多肽在四个对应于包含菜粉蝶(Pieris brassica)的胆色素结合蛋白(BBP)的氨基酸位置28至45、58至69、86至99和114至129的线性多肽序列的序列位置的区段中突变。用于制备抗运载蛋白结合位点的其他方法描述于W099/16873和W005/019254中,其各自以引用的方式并入本文中。

[0137] 在另一个实施方案中,本发明的药学活性部分包含来自富含半胱氨酸的多肽的结合位点。本发明的实践中所用的富含半胱氨酸的结构域典型地不形成 α -螺旋、 β 折叠或 β -桶结构。典型地,二硫键促进结构域折叠成三维结构。通常,富含半胱氨酸的结构域具有至少两个二硫键,更典型地至少三个二硫键。示例性富含半胱氨酸的多肽为A结构域蛋白。A结构域(有时称为“补体型重复单元”)含有约30-50个或30-65个氨基酸。在一些实施方案中,所述结构域包含约35-45个氨基酸并且在一些情况下包含约40个氨基酸。在30-50个氨基酸内,存在约6个半胱氨酸残基。在六个半胱氨酸中,在下列半胱氨酸之间典型地存在二硫键:C1与C3、C2与C5、C4与C6。A结构域构成配体结合部分。所述结构域的半胱氨酸残基经二硫键连接形成紧凑、稳定、功能独立的部分。这些重复单元的集簇构成配体结合结构域,并且有差别的集簇可以赋予关于配体结合的特异性。包含A结构域的示例性蛋白包括例如补体成分(例如,C6、C7、C8、C9和因子I)、丝氨酸蛋白酶(例如,肠肽酶、蛋白裂解酶和丝氨酸肽酶(corin))、跨膜蛋白(例如,ST7、LRP3、LRP5和LRP6)以及内吞受体(例如,分拣蛋白相关受

体、LDL-受体、VLDLR、LRP1、LRP2和ApoER2)。用于制备具有所需结合特异性的A结构域蛋白的方法公开于例如W002/088171和W004/044011中,其各自以引用的方式并入本文中。

[0138] 在其他实施方案中,本发明的药学活性部分包含来自重复蛋白的结合位点。重复蛋白是包含堆叠在一起的小的(例如,约20至约40个氨基酸残基)结构单元或重复单元的连续拷贝以形成连续结构域的蛋白质。可通过调节蛋白质中重复单元的数目来修饰重复蛋白以适应特定靶标结合位点。示例性重复蛋白包括经过设计的锚蛋白重复蛋白(即,**DARPin**[®],Molecular Partners,Zurich,Switzerland)(参见例如Binz等,Nat.Biotechnol.,22:575-582(2004))或富含亮氨酸的重复蛋白(即LRRP)(参见例如Pancer等,Nature,430:174-180(2004))。所有目前为止测定的锚蛋白重复单元的三级结构共有以下特征:由 β -发夹构成,接着为两个反向平行的 α -螺旋并且由联接重复单元与下一个重复单元的环终止。通过将重复单元堆叠成延伸和弯曲的结构来形成由锚蛋白重复单元构成的结构域。LRRP结合位点来自海洋七鳃鳗和其他无鳔鱼的适应性免疫系统的一部分并且与抗体的类似之处在于其是通过在淋巴细胞成熟期间的一套富含亮氨酸的重复基因的重组形成的。用于制备DARPin或LRRP结合位点的方法描述于W002/20565和W006/083275中,其各自以引用的方式并入本文中。

[0139] 可用于本发明的结合分子中的其他非免疫球蛋白结合位点包括源自Src同源结构域(例如SH2或SH3结构域)、PDZ结构域、 β -内酰胺酶、高亲和力蛋白酶抑制剂、或小的二硫键结合蛋白骨架如蝎毒素的结合位点。用于制备源自这些分子的结合位点的方法已经在本领域中公开,参见例如Silverman等,Nat.Biotechnol.,23(12):1493-4(2005);Panni等,J.Biol.Chem.,277:21666-21674(2002);Schneider等,Nat.Biotechnol.,17:170-175(1999);Legendre等,Protein Sci.,11:1506-1518(2002);Stoop等,Nat.Biotechnol.,21:1063-1068(2003);以及Vita等,PNAS,92:6404-6408(1995)。其他结合位点可源自选自由以下组成的组的结合结构域:EGF样结构域、Kringle结构域、PAN结构域、Gla结构域、SRCR结构域、Kunitz/牛胰蛋白酶抑制剂结构域、Kazal型丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域、Trefoil(P型)结构域、vonWillebrand因子C型结构域、过敏毒素样结构域、CUB结构域、甲状腺球蛋白I型重复单元、LDL受体A类结构域、Sushi结构域、Link结构域、凝血酶敏感蛋白I型结构域、免疫球蛋白样结构域、C型凝集素结构域、MAM结构域、vonWillebrand因子A型结构域、生长调节素B结构域、WAP型四二硫化物核心结构域、F5/8C型结构域、血红素结合蛋白结构域、层粘连蛋白型EGF样结构域、C2结构域、CTLA-4结构域,和本领域普通技术人员已知的其他此类结构域,以及其衍生物和/或变体。其他非免疫球蛋白多肽包括**Avimers**[®](Avidia,Inc.,Mountain View,CA,参见国际PCT公开No.W006/055689和美国专利公开2006/0234299)、**Telobodies**[®](Biotech Studio,Cambridge,MA)、**Evibodies**[®](Evogenix,Sydney,Australia,参见美国专利No.7,166,697)和**Microbodies**[®](Nascacell Technologies,Munich,Germany)。

[0140] iii.受体或配体的结合部分

[0141] 在其他方面,本发明的药学活性部分为受体的配体结合部分和/或配体的受体结合部分。

[0142] 在其他示例性实施方案中,本发明的药学活性部分可包含源自一种或多种下列蛋白质的一个或多个配体结合结构域或受体结合结构域:

[0143] a. 细胞因子和细胞因子受体

[0144] 细胞因子对于淋巴细胞的增殖、分化和功能活化具有多效性作用。各种细胞因子或其受体结合部分可应用于本发明的融合蛋白中。示例性细胞因子包括白介素(例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13和IL-18)、集落刺激因子(CSF)(例如粒细胞CSF(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞CSF(GM-CSF)和单核细胞巨噬细胞CSF(M-CSF))、肿瘤坏死因子(TNF) α 和 β 、细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4),以及干扰素如干扰素- α 、 β 或 γ (美国专利No.4,925,793和4,929,554)。

[0145] 细胞因子受体典型地由配体特异性 α 链和普通 β 链组成。示例性细胞因子受体包括如下:GM-CSF、IL-3(美国专利No.5,639,605)、IL-4(美国专利No.5,599,905)、IL-5(美国专利No.5,453,491)、IL10受体、IFN γ (EP0240975),和TNF家族的受体(例如,TNF α (例如TNFR-1(EP417,563)、TNFR-2(EP417,014)淋巴毒素 β 受体)。

[0146] b. 粘附蛋白

[0147] 粘附分子是允许细胞彼此相互作用的膜结合蛋白。各种粘附蛋白,包括白细胞归巢受体和细胞粘附分子或其受体结合部分,可并入本发明的融合蛋白中。白细胞归巢受体表达于发炎期间的白细胞表面上,并且包括 β -1整合素(例如VLA-1、2、3、4、5和6),其介导与细胞外基质成分的结合;和 β 2-整合素(例如LFA-1、LPAM-1、CR3和CR4),其结合血管内皮细胞上的细胞粘附分子(CAM)。示例性CAM包括ICAM-1、ICAM-2、VCAM-1和MAdCAM-1。其他CAM包括选择素家族的那些,包括E-选择素、L-选择素和P-选择素。

[0148] c. 趋化因子

[0149] 趋化因子是刺激白细胞向感染部位迁移的趋化蛋白,其也可并入本发明的融合蛋白中。示例性趋化因子包括巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α 和MIP-1- β)、嗜中性粒细胞趋化因子,和RANTES(调节激活正常T细胞表达和分泌)。

[0150] d. 激素

[0151] 用作本发明的融合蛋白中的药理学活性部分的示例性生长激素包括肾素、人生长激素(HGH;美国专利No.5,834,598)、N-甲硫氨酰基人生长激素;牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素(PTH);促甲状腺激素(TSH);甲状腺素;胰岛素原和胰岛素(美国专利No.5,157,021和6,576,608);促卵泡激素(FSH);降钙素、促黄体生成激素(LH)、瘦素、胰高血糖素;蛙皮素;促生长激素;苗勒氏抑制物质;松弛素和松弛素原;促性腺激素相关肽;催乳素;胎盘生乳素;OB蛋白;或苗勒氏抑制物质。

[0152] e. 受体和配体

[0153] 在一个实施方案中,本发明的药理学活性部分将配体或受体的结合位点(例如受体的细胞外结构域(ECD))与至少一个基因融合Fc区域(即,scFc区域)组合。在某些实施方案中,受体的配体-结合部分的结合位点或结构域可源自被抗体或抗体变体结合的受体。在其他实施方案中,受体的配体结合部分是源自选自以下组成的组的受体:免疫球蛋白(Ig)超家族的受体(例如,可溶性T细胞受体,例如,mTCR®(Medigene AG,Munich,Germany))、上述TNF受体超家族的受体(例如,免疫粘附素的 α 可溶性TNF α 受体)、神经胶质细胞源神经营养因子(GDNF)受体家族的受体(例如,GFR α 3)、G蛋白偶联受体(GPCR)超家族的受体、酪氨酸激酶(TK)受体超家族的受体、配体门控(LG)超家族的受体、趋化因子受体超家族的受体、IL-1/To11样受体(TLR)超家族和细胞因子受体超家族。

[0154] 在其他实施方案中,配体的受体结合部分的结合位点或结构域可源自被抗体或抗体变体结合的配体。例如,所述配体可结合选自以下组成的组的受体:免疫球蛋白(Ig)超家族的受体、TNF受体超家族的受体、G蛋白偶联受体(GPCR)超家族的受体、酪氨酸激酶(TK)受体超家族的受体、配体门控(LG)超家族的受体、趋化因子受体超家族的受体、IL-1/To11样受体(TLR)超家族和细胞因子受体超家族。在一个示例性实施方案中,配体的受体结合部分的结合位点是源自属于TNF配体超家族的配体(例如,CD40L)。

[0155] 生长因子或其受体(或其受体结合或配体结合部分)可并入本发明的融合蛋白中。示例性生长因子包括血管内皮生长因子(VEGF)和其同种型(美国专利No.5,194,596);成纤维细胞生长因子(FGF),包括aFGF和bFGF;心房利钠因子(ANF);肝生长因子(HGF;美国专利No.5,227,158和6,099,841)、神经营养因子如骨源性神经营养因子(BDNF)、神经胶质细胞源神经营养因子配体(例如,GDNF、neurturin、artemin和persephin)、神经营养素-3、-4、-5或-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6)、或神经生长因子如NGF- β 血小板源生长因子(PDGF)(美国专利No.4,889,919、4,845,075、5,910,574和5,877,016);转化生长因子(TGF)如TGF- α 和TGF- β (W090/14359)、骨诱导因子(包括骨形态发生蛋白(BMP));胰岛素样生长因子-I和胰岛素样生长因子-II(IGF-I和IGF-II;美国专利No.6,403,764和6,506,874);促红细胞生成素(EPO);血小板生成素(TPO);干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO,c-Mpl配体),和Wnt多肽(美国专利No.6,159,462)。

[0156] 可用作本发明的药理学活性部分的示例性生长因子受体包括EGF受体;VEGF受体(例如Flt1或Flk1/KDR)、PDGF受体(W090/14425);HGF受体(美国专利No.5,648,273和5,686,292),和神经营养受体,包括低亲和力受体(LNGFR),也称为p75^{NTR}或p75,其结合NGF、BDNF和NT-3,和高亲和力受体,其为受体酪氨酸激酶的trk家族的成员(例如trkA、trkB(EP455,460)、trkC(EP522,530))。

[0157] f. 药物

[0158] 在另一个实施方案中,药理学活性剂是用于治疗、治愈、预防或诊断疾病或用于以其他方式增强身体或精神健康状况的药物物质。此类药物可以是化学实体并且示例性此类实体更详细描述于本文中。

[0159] 本发明可应用于递送用于治疗影响神经系统的病症的其他剂并且其可出于诊断目的应用。优选种类的用于治疗CNS病症的剂包括:

[0160] 作用于突触和神经效应器接合位点的药物;全身性和局部性镇痛剂和麻醉剂如阿片类镇痛剂和拮抗剂;安眠药和镇静剂;用于治疗精神障碍如抑郁症、精神分裂症的药物;抗癫痫药和抗惊厥药;亨廷顿氏病、老化和阿尔茨海默氏病;神经保护剂(例如兴奋性氨基酸拮抗剂和神经营养因子)和神经再生剂;营养因子如脑源性神经营养因子、睫状神经营养因子或神经生长因子;旨在治疗CNS创伤或中风的药物;和用于治疗成瘾和药物滥用的药物;自体有效物质和抗炎药物;用于寄生虫感染和微生物疾病的化学治疗剂;免疫抑制剂和抗癌药物;激素和激素拮抗剂;重金属和重金属拮抗剂;非金属毒性剂的拮抗剂;用于治疗癌症的细胞生长抑制剂;用于核医学中的诊断物质,和放射疗法免疫活性和免疫反应性剂;以及多种其他剂如传递素及其各自的受体激动剂和拮抗剂、其各自的前体或代谢物;抗生素、抗痉挛药、抗组胺剂、止吐剂、松弛剂、兴奋剂、“有义”和“反义”寡核苷酸、脑扩张剂、精神药物、抗躁狂药、血管扩张剂和收缩剂、抗高血压药、偏头痛治疗剂、催眠药、高血糖剂或

低血糖剂、矿物或营养剂、抗肥胖药物、蛋白同化制剂和抗哮喘药。

[0161] 典型的活性成分(例如,药物)可为影响神经系统或用于神经系统的诊断测试的任何物质。这些由Gilman等,(1990),“Goodman and Gilman’s--The Pharmacological Basis of Therapeutics”,Pergamon Press,New York描述,并且包括以下剂:

[0162] 乙酰胆碱和合成胆碱酯、天然存在的拟胆碱生物碱及其合成同源物、抗胆碱酯酶剂、神经节兴奋剂、阿托品、东莨菪碱和相关的抗毒蕈碱药物、儿茶酚胺和拟交感神经药物如肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺、肾上腺素能激动剂、肾上腺素能受体拮抗剂、传递素如GABA、甘氨酸、谷氨酸、乙酰胆碱、多巴胺、5-羟色胺和组胺、神经活性肽;

[0163] 镇痛剂和麻醉剂如阿片类镇痛剂和拮抗剂;麻醉前和麻醉药物如苯并二氮杂卓类、巴比妥类、抗组胺剂、吩噻嗪和丁苯酮;阿片类;止吐剂;抗胆碱能药物如阿托品、东莨菪碱或格隆溴铵;可卡因;氯醛衍生物;乙氯维诺;格鲁米特;甲乙哌酮;氮甲丙二酯;三聚乙醛;双硫仑;吗啡、芬太尼和纳洛酮;

[0164] 中枢活性镇咳剂;

[0165] 精神药物如吩噻嗪类、噻吨和其他杂环化合物(例如,氟哌啶醇);三环抗抑郁剂如去甲丙咪嗪和丙咪嗪;非典型抗抑郁剂(例如,氟西汀和曲唑酮)、单胺氧化酶抑制剂如异卡波肼;锂盐;抗焦虑药如氯氮卓和地西洋;

[0166] 抗癫痫药,包括乙内酰脲、抗惊厥巴比妥类、亚氨基(例如卡马西平)、琥珀酰亚胺、丙戊酸、噁唑烷二酮和苯并二氮杂卓类;

[0167] 抗帕金森病药物如左旋多巴/卡比多巴、阿扑吗啡、金刚烷胺、麦角灵、司来吉兰、罗匹尼罗、甲磺酸溴隐亭和抗胆碱能剂;

[0168] 抗痉挛剂,例如巴氯芬、地西洋和丹曲林;

[0169] 神经保护剂,例如兴奋性氨基酸拮抗剂、神经营养因子和脑源性神经营养因子、睫状神经营养因子或神经生长因子;神经营养素(NT)3(NT3);NT4和NT5;神经节苷脂;神经再生剂;

[0170] 用于治疗成瘾和药物滥用的药物包括阿片类拮抗剂和抗抑郁剂;

[0171] 自体有效物质和抗炎药物如组胺、缓激肽、胰激肽和其各自的激动剂和拮抗剂;

[0172] 用于寄生虫感染和微生物疾病的化学治疗剂;

[0173] 抗癌药物,包括烷化剂(例如,亚硝基脲)和抗代谢物;氮芥、乙二胺和甲基三聚氰胺;烷基磺酸酯;叶酸类似物;嘧啶类似物、嘌呤类似物、长春花生物碱;以及抗生素。

[0174] 本发明还可用于递送抗恶心药、松弛药、兴奋剂、“有义”和“反义”寡核苷酸、脑扩张剂、精神药物、血管扩张剂和收缩剂、抗高血压药、偏头痛治疗剂、高血糖剂或低血糖剂、矿物或营养剂、抗肥胖药物、蛋白同化制剂和抗哮喘药、抗炎药物如保泰松、吲哚美辛、萘普生、布洛芬、氟比洛芬、双氯芬酸、地塞米松、泼尼松和泼尼松龙;脑血管扩张剂如舒洛地尔(soloctidilum)、长春胺、草酸萘呋胺酯、甲磺酸双氢麦角毒碱、环扁桃酯、罂粟碱、烟碱酸、抗感染剂如硬脂酸红霉素、和头孢氨苄。

[0175] 促肾上腺皮质激素、腺苷脱氨酶核糖核酸酶、碱性磷酸酯酶、血管紧张素、抗体、精氨酸酶、精氨酸脱氨酶、天冬酰胺酶、蛙皮素、降钙素、胰凝乳蛋白酶、胆囊收缩素、凝血因子、强啡肽、内啡肽、内啡肽、脑啡肽、脑啡肽、促红细胞生成素、胃泌素释放肽、胰高血糖素、血红蛋白、下丘脑释放因子、干扰素、钙抑肽、胃动素、神经肽Y、神经降压素、非天然存在的

阿片类、催产素、木瓜蛋白酶、甲状旁腺激素、肽催乳素、可溶性CD-4、生长调节素、生长抑素、生长抑素、促生长激素、超氧化物歧化酶、促甲状腺激素、组织纤维蛋白溶酶原激活剂、胰蛋白酶、血管加压素,和这些肽的类似物,以及其他合适的酶、激素、蛋白质、多肽、酶-蛋白质缀合物、抗体-半抗原缀合物、病毒表位等。

[0176] V. 多肽的示例性形式

[0177] 本发明的结合分子的示例性形式阐述于附图中。例如,图1包括其中未说明药理学活性部分的实施方案(例如,可添加药理学活性部分的Fc5Fc和FcFC5骨架)以及其中药理学活性部分为抗体结合位点的实施方案。例如,在一个实施方案中,本发明的结合分子(即,可添加药理学活性部分的构建体)的骨架包含共价连接(例如,基因融合)至Fc区域、结构域或部分的两个BBB转迁移部分。所述BBB转迁移部分可直接或经由接头肽连接。在一个优选的实施方案中,BBB转迁移部分可连接至Fc区域、结构域或部分的N端。在一个实施方案中,其他结合部分(例如,呈scFv分子形式的非TMEM30A药理学活性部分)还可连接至Fc区域、结构域或部分的C端。

[0178] 在另一个实施方案中,其他BBB转迁移部分可连接至Fc区域、结构域或部分的C端。所述BBB转迁移部分可直接或经由接头肽连接。

[0179] 在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含与完整抗体分子的VH结构域N端融合的BBB转迁移部分。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含与完整抗体分子的VL结构域N端融合的BBB转迁移部分。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含与完整抗体分子C端融合的两个BBB转迁移部分。所述BBB转迁移部分可直接或经由接头肽连接。

[0180] 应了解,可使用本领域中已知的方法将药理学活性部分(或其他药理学活性部分)连接至任何这些构建体。

[0181] 在一个实施方案中,本发明的多肽仅包含一个药理学活性部分(产生关于药理学活性部分为单体的,但其关于BBB转迁移部分为多聚的(例如,二聚的)分子)。在另一个实施方案中,本发明的多肽包含一个以上药理学活性部分,例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个药理学活性部分。所述药理学活性部分可能相同或不同。

[0182] 在本发明的一个实施方案中,药理学活性部分通过接头肽可操作性连接至Fc结构域、区域或部分的N端。在另一个实施方案中,药理学活性部分通过接头肽可操作性连接至Fc结构域、区域或部分的C端。

[0183] 在其他实施方案中,两个或更多个药理学活性部分彼此串联连接(例如,通过接头肽)。在一个实施方案中,药理学活性部分的串联阵列通过接头肽可操作性连接至Fc区域、结构域或部分的C端或N端。

[0184] 将蛋白质缀合、连接和偶联至药理学活性化合物的其他方法是本领域中众所周知的。例如,参见Wu A M, Senter P D, Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates, *Nat. Biotechnol.* 2005年9月; 23(9): 1137-46; 和Trail P A, King H D, Dubowchik G M, Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer, *Cancer Immunol Immunother.* 2003年5月; 52(5): 328-37; Saito G, Swanson J A, Lee K D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities, *Adv Drug Deliv Rev.* 2003年2月10日; 55(2): 199-215。同样,本发明抗体可与负载药理学活

性化合物的脂质体、纳米粒子或其他类似载体组合提供。制备此类组合物的方法是本领域中已知的(参见例如Sugano等, *Antibody Targeting of Doxorubicin-loaded Liposomes Suppresses the Growth and Metastatic Spread of Established Human Lung Tumor Xenografts in Severe Combined Immunodeficient Mice Cancer Research* 60,6942-6949, 2000年12月15日;和Martin等, *Nanomaterials in Analytical Chemistry, Analytical Chemistry News & Features*, 1998年5月1日;第322A-327A页)。

[0185] 许多效应分子缺乏可连接结合多肽的合适的官能团。在一个实施方案中,效应分子(例如,药物或前药)通过连接分子连接至多肽。在一个实施方案中,连接分子在特定位点包含允许细胞毒性活化的化学键。合适的化学键是本领域中众所周知的并且包括二硫键、酸不稳定键、光不稳定键、肽酶不稳定键、形成于巯基与马来酰亚胺基团之间的硫醚键以及酯酶不稳定键。连接分子最优选包含二硫键或硫醚键。根据本发明,连接分子p优选包含反应性化学基团。特别优选的反应性化学基团是N-琥珀酰亚胺基酯和N-磺基琥珀酰亚胺基酯。在一个优选的实施方案中,反应性化学基团可通过硫醇基团之间的二硫键共价结合至效应子。在一个实施方案中,效应分子被修饰以包含硫醇基团。本领域普通技术人员应了解,硫醇基团含有键合至氢原子的硫原子并且在本领域中还典型地称为巯基,其可表示为“-SH”或“RSH”。

[0186] 在一个实施方案中,连接分子可用于接合效应分子与本发明的多肽。连接分子可为可裂解或不可裂解的。在一个实施方案中,可裂解的连接分子为可氧化还原裂解的连接分子,因此所述连接分子可在具有较低氧化还原电位的环境中裂解,例如具有较高浓度的含游离巯基的分子的细胞质和其他区域。可由于氧化还原电位的变化而裂解的连接分子的实例包括含有二硫键的那些。在细胞内摄取本发明的结合蛋白时可提供裂解刺激,其中细胞质的较低氧化还原电位促进连接分子的裂解。在另一个实施方案中,pH的降低触发美登素类载物释放至靶细胞中。许多生理学和病理学过程中都涉及pH的降低,例如内体运输、肿瘤生长、发炎和心肌缺血。pH从生理值7.4降至内体中的5-6或者溶酶体中的4-5。可用于靶向癌细胞的溶酶体或内体的酸敏感性连接分子的实例包括具有酸可裂解键的那些,例如缩醛、缩酮、原酸酯、脲、三苯甲基、顺式乌头基(cis-aconityl)或硫代氨基甲酰基中存在的那些(参见例如Willner等, (1993), *Bioconj. Chem.*, 4:521-7;美国专利No. 4,569,789、4,631,190、5,306,809和5,665,358)。其他示例性酸敏感性连接分子包含二肽序列Phe-Lys和Val-Lys (King等, (2002), *J. Med. Chem.*, 45:4336-43)。在细胞内摄取运输时可提供裂解刺激以降低pH内体隔室(例如溶酶体)。其他示例性酸可裂解连接分子为包含两个或更多个酸可裂解键以连接两个或更多个美登素类的分子(King等, (1999), *Bioconj. Chem.*, 10:279-88; W098/19705)。

[0187] 可裂解连接分子可能对与特定靶细胞(例如,溶酶体或肿瘤相关酶)相关的生物上供应的裂解剂敏感。可酶促裂解的连接分子的实例包括但不限于肽和酯。示例性酶可裂解连接分子包括对肿瘤相关蛋白酶如组织蛋白酶B或血纤维蛋白溶酶敏感的那些(Dubowchik等, (1999), *Pharm. Ther.*, 83:67-123;Dubowchik等, (1998), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8:3341-52;de Groot等, (2000), *J. Med. Chem.*, 43:3093-102;de Groot等, (1999) m42:5277-83)。组织蛋白酶B可裂解位点包括二肽序列缬氨酸-瓜氨酸和苯丙氨酸-赖氨酸(Doronina等, (2003), *Nat. Biotech.*, 21 (7):778-84);Dubowchik等, (2002), *Bioconjug. Chem.*, 13:

855-69)。其他示例性酶可裂解位点包括由具有4至16个氨基酸的寡肽序列(例如,Suc- β -Ala-Leu-Ala-Leu)形成的那些,其被trypsin蛋白酶如Thimet寡肽酶(TOP)、由嗜中性粒细胞、巨噬细胞和其他粒细胞优先释放的酶识别。

[0188] 在某些特定方面,本发明的结合多肽是多特异性的,例如,具有至少一个结合于第一分子或分子表位的结合位点和至少一个结合于第二分子或第一分子的第二表位的第二结合位点。本发明的多特异性结合分子可包含至少两个结合位点。在某些实施方案中,本发明的多特异性结合分子的至少两个结合位点为BBB转迁移位点。

[0189] VI. 结合分子的合成

[0190] 在选择了本发明多肽的形式之后,多种方法可用于产生多肽。此类方法包括但不限于化学合成技术和重组DNA表达技术。

[0191] 在一个实施方案中,本发明涉及包含编码本发明的多肽分子的核酸序列的核酸构建体。应了解,由于密码的简并性,多种核酸序列将编码多肽的氨基酸序列。可使用本领域中已知的方法产生所需多核苷酸(例如,通过重新固相DNA合成或通过较早制备的编码靶多肽的多核苷酸的PCR诱变)。

[0192] 寡核苷酸介导的诱变是一种用于制备取代、框内插入或改变(例如,改变的密码子)以引入编码氨基酸取代的密码子(例如,至Fc变体部分中)的方法。例如,通过将编码所需突变的寡核苷酸与单链DNA模板杂交来改变起始多肽DNA。在杂交后,使用DNA聚合酶来合成并有寡核苷酸引物的模板的整个第二互补链。在一个实施方案中,基因工程改造(例如,基于引物的PCR诱变)足以并有如本文所定义的改变,以产生编码本发明的多肽的多核苷酸。

[0193] 对于重组产生,将编码多肽的多核苷酸序列插入适当的表达媒介物中,即,含有关于所插入的编码序列的转录和翻译所必需的元件的载体,或者在RNA病毒载体的情况下,关于复制和翻译所必需的元件。

[0194] 在适当的阅读框中将编码多肽的核酸插入载体中。然后将表达载体转染至将表达多肽的合适靶细胞中。本领域中已知的转染技术包括但不限于磷酸钙沉淀(Wigler等,1978,Cell114:725)和电穿孔(Neumann等,1982,EMBO,J.1:841)。多种宿主-表达载体系统可用于在真核细胞中表达本文所述的多肽。在一个实施方案中,真核细胞为动物细胞,包括哺乳动物细胞(例如CHO、BHK、Cos、HeLa细胞)。当在真核细胞中表达多肽时,编码所述多肽的DNA也可编码将允许多肽被分泌的信号序列。本领域技术人员应了解,当蛋白质被翻译时,信号序列被细胞裂解以形成成熟多肽。在一个实施方案中,本发明涉及包含本发明的接头肽的成熟多肽。可选地,在不包括信号序列时,可通过溶解细胞来回收多肽。

[0195] 还可以在转基因动物如啮齿动物、山羊、绵羊、猪或奶牛中合成本发明的多肽。术语“转基因动物”是指已经将外来基因并入其基因组中的非人动物。因为这种基因存在于生殖系组织中,所以其从亲代传递至后代。将外源基因引入单细胞胚胎中(Brinster等,1985,Proc.Natl.Acad.Sci.USA82:4438)。产生转基因动物的方法是本领域中已知的,包括产生免疫球蛋白分子的转基因学(Wagner等,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA78:6376;McKnight等,1983,Cell34:335;Brinster等,1983,Nature306:332;Ritchie等,1984,Nature312:517;Baldassarre等,2003,Theriogenology59:831;Robl等,2003,Theriogenology59:107;Malassagne等,2003,Xenotransplantation10(3):267)。

[0196] 表达载体可编码允许容易纯化或鉴定重组产生的多肽的标签。实例包括但不限于载体pUR278 (Ruther等, 1983, EMBO J. 2:1791), 其中可将编码本文所述的多肽的序列与lac z编码区域框内连接至载体中以便产生杂交蛋白; pGEX载体可用于表达具有谷胱甘肽S-转移酶(GST) 标签的蛋白质。这些蛋白质通常是可溶性的并且可通过吸附于谷胱甘肽-琼脂糖珠粒、接着在游离谷胱甘肽存在下洗脱而容易地从细胞中纯化。所述载体包括用于在纯化后容易除去标签的裂解位点(例如PreCission蛋白酶(Pharmacia, Peapack, N.J.))。

[0197] 对于本发明的目的, 可使用众多不同的本领域公认的表达载体系统。

[0198] 这些表达载体典型地可以游离体形式或宿主染色体DNA的整体部分形式在宿主生物体中复制。表达载体可包括表达控制序列(包括但不限于启动子(例如, 天然缔合启动子或异源启动子)、增强子、信号序列、剪接信号、增强子元件和转录终止序列。所述表达控制序列优选为能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统。表达载体也可利用源自动物病毒如牛乳头状瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录病毒(RSV、MMTV或MOMLV)、巨细胞病毒(CMV) 或SV40病毒的DNA元件。其他涉及使用具有内部核糖体结合位点的多顺反子系统。

[0199] 通常, 表达载体含有选择标记(例如, 氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性 or 新霉素抗性) 以允许检测用所需DNA序列转化的那些细胞(参见例如Itakura等, 美国专利4, 704, 362)。可通过引入一个或多个允许选择转染的宿主细胞的标记来选择已经将DNA整合到其染色体中的细胞。该标记可向营养缺陷型宿主提供原营养, 提供杀生物剂抗性(例如, 抗生素) 或对重金属如铜的抗性。选择性标记基因可直接连接至待表达的DNA序列, 或通过共转化引入同一细胞中。

[0200] 在其他优选实施方案中, 可使用多顺反子构建体表达本发明的多肽。在这些表达系统中, 所感兴趣的多种基因产物如多聚体结合蛋白的多种多肽可由单一多顺反子构建体产生。这些系统有利地使用内部核糖体进入位点(IRES) 以在真核宿主细胞中提供相对高水平的本发明的多肽。相容性IRES序列公开于美国专利No. 6, 193, 980中, 其也并入本文中。本领域技术人员应了解, 此类表达系统可用于有效产生在本申请中公开的全范围的多肽。

[0201] 更一般地, 一旦已经制备了编码多肽的载体或DNA序列, 就可将表达载体引入适当的宿主细胞中。也就是说, 宿主细胞可被转化。可通过本领域技术人员众所周知的各种技术来将质粒引入宿主细胞中。这些技术包括但不限于转染(包括电泳和电穿孔)、原生质体融合、磷酸钙沉淀、与包膜DNA进行细胞融合、显微注射和感染完整病毒。参见Ridgway, A.A.G. "Mammalian Expression Vectors" 第24.2章, 第470-472页, Vectors, Rodriguez和Denhardt编(Butterworths, Boston, Mass. 1988)。最优选通过电穿孔将质粒引入宿主中。使转化细胞在适于产生轻链和重链的条件下生长, 并测定重链和/或轻链蛋白合成。示例性测定技术包括酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、或荧光活化细胞分选仪分析(FACS)、免疫组织化学等。

[0202] 如本文所用, 术语“转化”应以宽泛意义使用以指代将DNA引入接受体宿主细胞中, 其改变基因型并因此导致接受体细胞的变化。

[0203] 沿着相同路线, “宿主细胞”是指已经用使用重组DNA技术构建并且编码至少一个异源基因的载体转化的细胞。在从重组宿主中分离多肽的过程的描述中, 除非另外明确说明, 否则术语“细胞”和“细胞培养物”可互换使用以表示多肽来源。换句话说, 从“细胞”中回

收多肽可意指来自离心沉降的全细胞,或来自含有培养基和悬浮细胞的细胞培养物。

[0204] 用于蛋白质表达的宿主细胞系最优选为哺乳动物源;本领域技术人员具有优先确定最适于有待于其中表达的所需基因产物的特定宿主细胞系的能力。示范性宿主细胞系包括但不限于DG44和DUXB11(中国仓鼠卵巢细胞系,DHFR⁻)、HELA(人子宫颈癌)、CVI(猴肾细胞系)、COS(具有SV40T抗原的CVI的衍生物)、R1610(中国仓鼠成纤维细胞)、BALBC/3T3(小鼠成纤维细胞)、HAK(仓鼠肾细胞系)、SP2/0(小鼠骨髓瘤)、P3x63-Ag3.653(小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT(牛内皮细胞)、RAJI(人淋巴细胞)和293(人肾细胞)。CHO细胞是特别优选的。宿主细胞系典型地从商业服务、美国组织培养物保藏中心(American Tissue Culture Collection)或已发表的文献获得。

[0205] 编码本发明的多肽的基因还可表达于非哺乳动物细胞如细菌或酵母或植物细胞中。在这方面,应了解各种单细胞非哺乳动物微生物如细菌也可以被转化;即,能够在培养物或发酵中生长的那些。易于转化的细菌包括以下成员:肠杆菌科,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)或沙门氏菌(*Salmonella*)的菌株;芽孢杆菌科(*Bacillaceae*),例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);肺炎球菌(*Pneumococcus*);链球菌(*Streptococcus*),和流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)。应进一步了解,当在细菌中表达时,多肽典型地变成包涵体的一部分。多肽应该被分离、纯化并且然后组装成功能分子。

[0206] 除了原核生物之外,还可使用真核微生物。在真核微生物中,尽管通常可获得多种其他菌株,但酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常见面包酵母是最常用的。为了在酵母属中表达,通常使用例如质粒YRp7(Stinchcomb等,*Nature*,282:39(1979);Kingsman等,*Gene*,7:141(1979);Tschemper等,*Gene*,10:157(1980))。这种质粒已经包含TRP1基因,其为缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变菌株(例如ATCC No.44076或PEP4-1)提供了一个选择标记(Jones,*Genetics*,85:12(1977))。trp1损伤作为酵母宿主细胞基因组的特征的存在则通过在色氨酸不存在下的生长提供了用于检测转化的有效环境。还可使用其他酵母宿主如毕赤酵母(*Pichia*)。需要具有表达控制序列(例如,启动子)、复制起点、终止序列等的酵母表达载体。典型的启动子包括3-磷酸甘油酯激酶和其他糖酵解酶。诱导型酵母启动子尤其包括来自醇脱氢酶、异细胞色素C和负责甲醇、麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0207] 可选地,编码多肽的核苷酸序列可并入转基因中以引入转基因动物的基因组中并且随后表达于转基因动物的乳汁中(参见例如Deboer等,US5,741,957;Rosen,US5,304,489;和Meade等,US5,849,992)。合适的转基因包括与来自乳腺特异性基因如酪蛋白或 β 球蛋白的启动子和增强子可操作性连接的多肽的编码序列。

[0208] 体外产生允许扩大规模以得到大量的所需多肽。用于在组织培养条件下进行哺乳动物大规模细胞培养的技术是本领域中已知的并且包括均质悬浮培养,例如在气升式反应器或连续搅拌反应器中,或者固定或包埋细胞培养,例如在中空纤维、微囊中、琼脂糖微珠粒或陶瓷滤筒上。如果必要和/或需要的话,可例如在合成铰链区多肽的优先生物合成之后或者在本文所述的HIC色谱步骤之前或之后,通过惯用色谱法例如凝胶过滤、离子交换色谱法、于DEAE-纤维素上的色谱法或(免疫-)亲和色谱法来纯化多肽的溶液。亲和力标签序列(例如His(6)标签)可任选地连接或包括于多肽序列内以促进下游纯化。

[0209] 本领域技术人员可以容易地合成结合本发明使用的较小的肽。用于制备合成肽的标准程序是本领域中众所周知的。可使用Merrifield的固相肽合成(SPPS)方法

(J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1964), 其以引用的方式并入本文中) 或使用本领域中众所周知的标准溶液方法(参见例如Bodanzsky, M., Principles of Peptide Synthesis, 第2修订版(Springer-Verlag, 1988和1993), 其以引用的方式并入本文中) 来合成肽。可选地, 可以使用本领域中众所周知的同时多个肽合成(SMPS) 技术。可使用自动化肽合成器如Applied Biosystems 431A-01肽合成器(Mountain View, Calif.) 或使用由Houghten, Proc. Nat. Acad. Sci., USA82:5131 (1985) (其以引用的方式并入本文中) 所述的手动肽合成技术来合成通过Merrifield方法制备的肽。

[0210] 可使用氨基酸或氨基酸类似物来合成肽, 所述氨基酸或氨基酸类似物的活性基团在必要时使用例如叔丁基二碳酸酯基(t-BOC) 或芴基甲氧基羰基(FMOC) 进行保护。氨基酸和氨基酸类似物可商购获得(Sigma Chemical Co.; Advanced Chemtec) 或使用本领域中已知的方法合成。使用固相方法合成的肽可连接至包括4-甲基二苯甲胺(MBHA)、4-(氧基甲基)-苯基乙酰胺基甲基和4-(羟基甲基) 苯氧基甲基-共聚(苯乙烯-1% 二乙烯基苯)(Wang树脂)(其都可购得) 在内的树脂, 或连接至对硝基二苯甲酮脲聚合物(脲树脂), 其可如以引用的方式并入本文的De Grado和Kaiser, J. Org. Chem. 47:3258 (1982) 所述合成。

[0211] VII. 结合分子的纯化

[0212] 一旦被表达, 本发明的多肽就可根据本领域中的标准程序来纯化, 所述程序包括例如硫酸铵沉淀、亲和柱色谱法、HPLC纯化、凝胶电泳等(一般参见Scopes, Protein Purification(Springer-Verlag, N.Y., (1982))。还可使用诸如反相高效液相色谱法(RP-HPLC) 等方法或基于肽的尺寸或电荷的其他分离方法来纯化新合成的肽。此外, 可使用这些和其他众所周知的方法如氨基酸分析和质谱法来表征纯化的肽。

[0213] 对于药物用途来说, 具有至少约90%至95%均质性的基本上纯的蛋白质是优选的, 并且98%至99%或更高均质性是最优选的。

[0214] VIII. 施用方法

[0215] 制备本发明的多肽以及向受试者施用本发明的多肽的方法是本领域技术人员众所周知的或者可容易地由本领域技术人员确定。

[0216] 用于向受试者施用的组合物包括包含编码本发明的结合分子的核苷酸序列的核酸分子(用于基因疗法应用) 以及多肽分子。

[0217] 引入方法包括但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。可通过任何适宜途径, 例如通过输注或推注、通过经上皮或皮肤粘膜内层(例如, 口腔粘膜、直肠和肠粘膜等) 吸收来施用缀合物, 并且其可与其他药理学活性剂一起施用。施用可以是全身或局部的。

[0218] 在某些情况下, 可能希望通过任何合适的途径(包括脑室内和鞘内注射) 将本发明的药物组合物直接引入中枢神经系统中; 可通过例如连接至储集器如Ommaya储集器的脑室内导管来帮助脑室内注射。

[0219] 还可使用肺部或经鼻施用, 例如, 通过使用吸入器或喷雾器, 和具有雾化剂的制剂。

[0220] 在另一个实施方案中, 可以控制释放系统递送缀合物。在一个实施方案中, 可使用泵(参见Langer, 同上; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald等, Surgery 88:507 (1980); Saudek等, N. Engl. J. Med. 321:574 (1989))。在另一个实施方案中,

可将控制释放系统置于治疗靶标(即大脑)附近,从而仅需要全身剂量的一部分(参见例如, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, 同上, 第2卷, 第115-138页(1984))。

[0221] 其他控制释放系统讨论于Langer的评述(*Science*249:1527-1533 (1990))中。

[0222] 受试者优选为动物,包括但不限于诸如奶牛、猪、马、鸡、猫、狗等动物,并且优选为哺乳动物,并且最优选为人。

[0223] 通常,适于注射的药物组合物可包含缓冲剂(例如乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂)、表面活性剂(例如聚山梨醇酯)、任选的稳定剂(例如人白蛋白)等。然而,在与本文的教导相容的其他方法中,多肽可直接递送至不良细胞群体部位,从而增加病变组织对于治疗剂的暴露。

[0224] 用于肠胃外施用的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油,以及可注射的有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、醇性/水性溶液、乳液或悬浮液,其包括盐水和缓冲介质。在本发明中,药学上可接受的载体包括但不限于0.01-0.1M且优选0.05M磷酸盐缓冲液或0.8%盐水。其他常见的肠胃外媒介物包括磷酸钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸化林格氏液或不挥发油。静脉内媒介物包括流体和营养补充剂、电解质补充剂,例如基于林格氏右旋糖的那些等。也可存在防腐剂和添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0225] 更具体地,适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(在具水溶性时)或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。在这些情况下,组合物必须是无菌的,并且应该在存在易注射性的程度下流动。其应该在制造和储存条件下稳定,并且将优选对抗诸如细菌和真菌等微生物的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,包含例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等),以及其合适的混合物。可例如通过使用包衣如卵磷脂、通过在分散液的情况下维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0226] 可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等,来防止微生物的作用。在许多情况下,组合物中应优选包括等渗剂,例如糖、多元醇如甘露糖醇、山梨糖醇,或氯化钠。可通过在组合物中包括延迟吸收的剂(例如单硬脂酸铝和明胶)产生可注射组合物的延长吸收。

[0227] 在任何情况下,可通过将所需量的活性化合物(例如,多肽本身或与其他活性剂组合)与本文所列举的成分之一或组合(按需要)并入适当的溶剂中,接着过滤灭菌,来制备无菌可注射溶液。一般来说,通过将活性化合物并入无菌媒介物中来制备分散液,所述媒介物包含基本分散介质和上文所列举的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,从其先前无菌过滤溶液得到活性成分与任何额外的所需成分的粉末。根据本领域中已知的方法将注射制剂加工,填充到诸如安瓿、袋、瓶、注射器或小瓶等容器中,并且在无菌条件下密封。此外,所述制剂可以试剂盒形式包装并销售,所述试剂盒将优选具有标签或包装插页,指示相关组合物可用于治疗罹患或易患自身免疫或肿瘤性病症的受试者。

[0228] 用于治疗病状的本发明组合物的有效剂量根据许多不同因素而改变,包括施用方式、靶位点、患者的生理状态、患者是人还是动物、所施用的其他药物,以及治疗是预防性还

是治疗性的。通常，患者是人，但也可治疗非人哺乳动物，包括转基因哺乳动物。

[0229] 可使用本领域技术人员已知的常规方法来滴定治疗剂量以优化安全性和功效。在一个实施方案中，本发明的多肽为先前已经施用至患者、但其已经被修饰以包含本发明的接头肽来代替传统的接头肽的多肽。在这些情况下，所施用的多肽的剂量将与先前认为是安全和有效的剂量(即护理标准)一致。

[0230] 本发明的多肽可以多次施用。单次剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。间隔也可以是不规则的，如通过测量患者血液中的多肽、多肽靶标或抗原水平所指示。在一些方法中，调节剂量以达到特定的体内浓度。可选地，可以持续释放制剂形式施用多肽，在所述情况下需要较小的施用频率。剂量和频率根据患者中多肽的半衰期而改变。

[0231] 施用的剂量和频率可根据治疗是预防性还是治疗性而改变。在预防性应用中，将包含本发明的多肽或其混合液的组合物施用至尚未处于疾病状态中的患者以增强患者的抵抗力。此种量被定义为“预防有效剂量”。可在较长一段时间内以相对不频繁的间隔施用相对低的剂量。一些患者在其余生中持续接受治疗。

[0232] 在治疗性应用中，有时可能需要以相对短的间隔施用相对高的剂量直至疾病进展降低或终止，并且优选直至患者显示疾病症状的部分或完全改善。

[0233] 应进一步了解，本发明的分子可与一种或多种剂结合或组合使用(例如以提供组合治疗方案)。可与本发明的分子组合的示例性剂包括代表着所治疗的特定病症的目前护理标准的剂。所述剂本质上可为化学制剂或生物制剂。术语“生物制剂”或“生物剂”是指打算用作治疗剂的由活有机体和/或其产品制得的任何药理学活性剂。

[0234] 本发明的多肽可任选地与可有效治疗需要治疗(例如，预防性或治疗性)的病症或病状的其他剂组合施用。如本文所用，本发明的多肽与辅助疗法结合或组合施用意指所述疗法与所公开多肽的连续、同时、同延、并行、伴随或同期施用或应用。本领域技术人员应了解，组合治疗方案的各种成分的施用或应用可以被定时以增强整体治疗效用。例如，可结合主题结合分子在标准的众所周知的治疗过程中施用化学治疗剂或生物剂。本领域技术人员(例如医师)应能够基于所选择的辅助疗法和本说明书的教导在无过度实验的情况下容易地辨别有效的组合治疗方案。

[0235] 在一个实施方案中，可通过以核酸分子形式施用而在患者中产生多肽。可使用本领域中已知的技术施用核酸分子，所述技术包括通过载体、质粒、脂质体、DNA注射、电穿孔、基因枪、静脉内注射或肝动脉输注。用于基因疗法实施方案中的载体是本领域中已知的。

[0236] 与本发明的多肽组合使用的剂的量可根据受试者而改变或者可根据本领域中已知进行施用。参见例如Bruce A Chabner等, *Antineoplastic Agents*, 于GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287 (Joel G. Hardman等编, 第9版, 1996)。在另一个实施方案中，施用与护理标准一致的此种剂的量。

[0237] 如先前所讨论，本发明的多肽可以药理学上有效量施用以供体内治疗哺乳动物病症。在这方面，应了解，本发明的分子可以经过配制以便于施用并促进活性剂的稳定性。根据本发明的药物组合物优选包含药理学上可接受的、无毒、无菌载体，例如生理盐水、无毒缓冲剂、防腐剂等。就本申请来说，与治疗剂缀合或未缀合的本发明多肽的药理学上有效量应意指足以实现与抗原的有效结合并实现益处、例如改善疾病或病症的症状或检测物质或细胞的量。在肿瘤细胞的情况下，多肽应优选能够与肿瘤或免疫反应性细胞上的选定的免疫反

应性抗原相互作用并且使那些细胞的死亡增加。当然,本发明的药物组合物可以单次或多次剂量施用以提供药理学上有效量的多肽。

[0238] 在符合本公开的范围的情况下,可根据前述治疗方法向人或其他动物施用足以产生治疗性或预防性作用的量的本发明的分子。

[0239] 施用模式和剂型当然会影响对于给定治疗应用来说所希望和有效的化合物的治疗量。治疗有效量是预防、延迟或降低疾病发作的严重程度所需的量,或抑制或降低正在进行的疾病的严重程度所需的量。本领域技术人员将显而易见的是,这个量将根据诸如接受者的体重和健康状况、所转化的细胞的类型、本发明组合物的施用模式和所治疗的医学病症的类型等因素而改变。

[0240] 本发明还提供了包含一个或多个填充有一种或多种本发明药物组合物的成分的容器的药物包装或试剂盒。与所述容器任选地相伴的可能是由规定药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构所指定形式的通知,所述通知反映出被所述机构批准制造、使用或销售供人施用。

[0241] 本发明由下列实施例进一步说明,所述实施例不应理解为限制性。本申请中所引用的所有参考文献、专利和公开专利申请的内容以引用的方式并入本文中。

实施例

[0242] FC5分子的表达、纯化和表征:FC5表达于大肠杆菌中并使用渗透冲击纯化以从周质空间中释放出可溶性蛋白。然后从镍柱上的溶胞产物,通过在fractogel SE上进行阳离子交换,接着在superdex200上凝胶过滤来捕获可溶性His标记FC5。通过SDS PAGE表征骆驼科动物Vhh(图2a-c)。根据先前所述的方法使FC5-Fc、Fc-FC5和FC5-scram-Fc表达于DG44CHO细胞系中。通过调节pH至7.0并且在先前平衡的5ml HiTrap rProteinA FF柱(GE healthcare)上捕获蛋白质而从CHO细胞发酵培养基(1L)中纯化含有所需hFc的蛋白质。在注射之前对所有纯化的蛋白质表征内毒素水平以确保不会发生一般化内毒素依赖性BBB开放。结果示于表I中。使用Uto等,1991中所述的方法(Uto, I., Ishimatsu, T., Hirayama, H., Ueda, S., Tsuruta, J. 和 Kambara, T. (1991) *Journal of immunological methods* 138(1), 87-94), 利用琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(SMCC)作为双官能化学接头来连接神经活性肽、达拉根、甘丙肽(Galanin)或NPY与所需分子(FC5、FC5-Fc)。在C端用半胱胺类似物合成待连接的每种肽,这允许使用SMCC双官能交联化学通过游离半胱氨酸将肽与蛋白质上的赖氨酸侧链进行C端交联。在交联之后,通过S-200制备型凝胶过滤纯化每个标记分子以消除在交联反应期间形成的任何聚集体。通过质谱法测定连接至每个FC5结构域或FC5-Fc结构域的肽达拉根、NPY或甘丙肽的平均数目。表I示出了每个FC5、FC5-Fc或Fc-FC5结构域所连接的肽的平均数目。

[0243] 含FC5的分子的循环药物动力学:为了理解BBB内皮对于每种含FC5的抗体的暴露,在大鼠中测定分子的药物动力学。向动物腹膜内给药3mpk的与人Fc结构域N端融合(FC5-Fc)或C端融合(Fc-FC5)的FC5Vhh。通过ELISA在多个时间点测定FC5-Fc或Fc-FC5在血浆中的浓度。分析结果以测定每种构建体的 β 相半衰期(表II)。结果表明当与人Fc融合时相比于单独的FC5Vhh,FC5-Fc和Fc-FC5的半衰期显著更长,因为众所周知Fc可赋予再循环并且较大的质量可防止肾滤过(Holt, L.J., Herring, C., Jespers, L.S., Woolven, B.P. 和

Tomlinson, I.M. (2003) Trends in biotechnology 21 (11), 484-490。

[0244] 含FC5分子的体外转运率:我们使用体外BBB内皮细胞层来模拟每种含FC5蛋白的体内跨BBB通量率。所述体外模型在用小分子验证紧密度的单层测定系统中使用永生化成人大鼠脑内皮细胞(SV-ARBE)的单层(Garberg, P., Ball, M., Borg, N., Cecchelli, R., Fenart, L., Hurst, R.D., Lindmark, T., Mabondzo, A., Nilsson, J.E., Raub, T.J., Stanimirovic, D., Terasaki, T., Oberg, J.O. 和 Osterberg, T. (2005) Toxicol In Vitro 19 (3), 299-334)。用于体外通量率测定的方法与(Caram-Salas, N., Boileau, E., Farrington, G.K., Garber, E., Brunette, E., Abulrob, A. 和 Stanimirovic, D. Methods in molecular biology 763, 2010版, 383-401)中所述几乎相同。测定FC5、FC5-Fc和Fc-FC5穿过SV-ARBE细胞层的通量率并且结果如图3中所示。

[0245] FC5分子对于TMEM30A的结合亲和力:在单独的荧光流式细胞仪测定法中使用新鲜分离的大鼠BBB内皮细胞、SV40转化大鼠BBB内皮细胞(Caram-Salas, N., Boileau, E., Farrington, G.K., Garber, E., Brunette, E., Abulrob, A. 和 Stanimirovic, D. Methods in molecular biology 763, 2010版, 383-401)以及用先前鉴定的靶标TMEM30A瞬时转染的Hek293细胞评价每种分子的结合亲和力。每种细胞系的结合曲线示于图4a-c中,并且所计算的亲和力值示于表III中。结果显示FC5Fc与初级大鼠BBB内皮细胞的结合具有11nM的亲和力,而与SV40转化细胞系的结合产生75nM的EC50值,约7倍弱的结合。而与用大鼠TMEM30A瞬时转染的Hek293细胞系的结合产生约1700 nM的亲和力,相比于与初级BBB内皮细胞系的结合几乎弱170倍。这些数据表明,当用流式细胞仪测量时,FC5-Fc相比于单独的FC5Vhh具有表观亲和力的大幅增加,这表明FC5-Fc以双配位亲和力与表达TMEM-30A的细胞结合。

[0246] 在动物模型中的功效评价:为了评估FC5Vhh结构域二聚化对于分子充当转运体以经由RMT递送分子有效负载穿过BBB的能力将具有什么影响,在动物模型中评价这些分子的活性。已知众多因素可影响转运的效率,例如已经报道了甚至将抗转铁蛋白受体抗体的亲和力降低数倍,对于分子有效进行BBB转迁移的能力也具有正面的影响(Yu, Y. J., Zhang, Y., Kenrick, M., Hoyte, K., Luk, W., Lu, Y., Atwal, J., Elliott, J.M., Prabhu, S., Watts, R.J. 和 Dennis, M.S. Science translational medicine 3 (84), 84ra44)。根据这个概念,在FC5Vhh的Fc二聚化时显著的亲和力增强将被预计可负面影响FC5Vhh充当有效的BBB转运分子的能力。因此,对于具有不同的FC5价态的各分子,在体内模型中评价了已经连接神经活性肽的分子的效能。

[0247] Hargreaves模型测量了通过在爪中注射弗氏佐剂(Freud's adjuvant)而诱导的对热疼痛的敏感性增加。热疼痛可以在六个氨基酸肽达拉根与表达于脑导管周围部分中的 μ 疼痛受体结合时得到抑制。静脉内注射的达拉根不能穿过BBB并且不会产生疼痛抑制,但ICV注射使得达拉根扩散至 μ 受体并阻断 μ 受体,从而阻断疼痛。因此静脉内注射的达拉根必须连接至受体介导的转运体以允许穿过BBB转运并抑制疼痛。为了评价由含FC5分子介导的达拉根穿过BBB的转运,使用Hargreaves动物模型来比较各种分子形式的连接至达拉根的FC5Vhh的效能。FC5-达拉根的阴性对照分子为EG2-达拉根,FC5-Fc-达拉根的阴性对照分子为Fc-FC5-达拉根。

[0248] 为了确保阳性和阴性测试物的可比性,通过质谱法表征FC5-Da1和EG2-Da1,显示连接至各Vhh的达拉根肽的比率是类似的(表I)。

[0249] 在静脉内 (IV) 注射之前,最初通过脑室内 (ICV) 注射测试各分子作为阳性对照以确保所有连接分子都具功能活性并能够诱导疼痛抑制。阴性对照与阳性测试分子在ICV注射时都被预计可抑制疼痛,因为所述分子被直接注射至脑脊髓液中并能够扩散并阻断脑导管周围 μ 疼痛受体。在所有情况下,当通过ICV注射评价时,基于所递送的达拉根的量,FC5-Da1、EG2-Da1、FC5-Fc-Da1、Fc-FC5-Da1或单独的达拉根得到类似的效能。接着评价每个达拉根标记分子和相应的达拉根标记对照蛋白在IV施用时的功效。最初,比较FC5-Da1相对于对照(EG2-Da1)的功效。结果显示达到与单独利用吗啡可观察到的抑制水平类似的完全疼痛抑制(图5a和图5b)。有趣的是,注意到在观察到初始疼痛抑制之前,需要三次剂量的FC5-Da1,每次剂量为7.5mg/kg (mpk)。另外,即使在动物被以7.5mg/kg (mpk)类似地给药三次后,对照组也未显示疼痛抑制。这些数据表明并证实,FC5能够充当受体介导的转运体,转运达拉根穿过BBB进入脑实质并使得达拉根结合并阻断 μ 疼痛受体,而对照EG2-达拉根未显示疼痛抑制。这些数据概述于表IV中。

[0250] 二聚化FC5形式FC5-Fc和Fc-FC5显示对于BBB内皮细胞上的TMEM30A非常不同的结合亲和力(表III)。为了测定增强的亲和力是否与Hargreaves疼痛模型中改善的效能相关,评价FC5-Fc-dal与Fc-FC5-dal的疼痛抑制。在IV注射之后,Fc-FC5-dal显示无功效(图6A-D),而FC5-Fc-dal(图7a和图7c)对疼痛抑制非常有效。另外,阴性对照Fc-Da1显示无体内功效(图7b和图7d)。FC5-Fc即使在最初0.5mpk的单一剂量下也在第一小时内显示出减少疼痛的功效,在前0.5小时后具有50%MPE的平均值。比较FC5-dal与FC5-Fc-dal的效能,结果显示单一剂量的21mpk的FC5-dal得到与0.5mpk的FC5-Fc-Da1大约相同水平的疼痛抑制。基于所注射的达拉根的摩尔比率,在Hargreaves模型中抑制疼痛的能力方面,FC5Fc-Da1显示比FC5-Da1的效能高约80倍。第二剂量的2.5mpk的FC5-Fc-Da1在一个动物中足以得到最大的可能的疼痛抑制。在Hargreaves疼痛模型中观察到的FC5-Fc-Da1、Fc-FC5-Da1和FC5-Da1的生物活性观测值增强与FC5-Fc的较高亲和力和较高功效相关,如表II中所概述。

[0251] 此外,可使用其他神经活性肽实现类似的疼痛抑制功效。例如,具有与上述相同化学性质的连接至FC5或FC5-Fc的甘丙肽(29个氨基酸的3.2kD肽)在Hargreaves模型中抑制慢性疼痛。相比之下,连接至单独的Fc的甘丙肽不能提供有效的疼痛减轻。ICV阳性对照与IV注射的结果概述于表VI中。为了验证所连接的甘丙肽结合其同源受体GalR1和GalR2并且在阴性对照和测试分子中抑制疼痛的活性,在ICV注射后对所有分子进行测试并显示抑制疼痛(表VI)。当IV注射时,仅连接至含FC5分子(FC5或FC5-Fc)的甘丙肽能够在体内抑制疼痛。在Hargreaves动物模型中减少疼痛所需的连接至FC5的甘丙肽相对于连接至FC5-Fc的甘丙肽的给药存在显著差异。单一剂量的6mpk的甘丙肽-FC5(表VI)产生8%MPE,而单一剂量的FC5-Fc-Gal产生45%MPE。

[0252] 在大鼠中腹膜内施用戊四氮(pentylentetrazol,PTZ)诱发癫痫发作并且已经被用作癫痫发作的模型(Chen,J.W.;Naylor,D.E.;Wasterlain,C.G.Advances in the pathophysiology of status epilepticus.Acta Neurol.Scand.增刊,2007,186,7-15.; Werner,F.M.; **Coveñas**,R.Neuropeptides involved in schizophrenia, Curr.Top.Neurochem.,2005,4,35-49.; Werner,F.M.; **Coveñas**,R.于Focus on Neuropeptide Research, **Coveñas**,Mangas和Narváez编;Transworld Reasearch

Network:Trivandrum,2007;第299-339页;Werner,F.M.;Coveñas,R.Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in major depression.Int.J.Neurosci.,2010,120,455-70)。已知神经活性肽如甘丙肽和神经肽Y赋予针对PTZ诱发的癫痫发作的保护(Mazarati1998a;Mazarati,A M.,Hohmann,J.G.,Bacon,A,Liu,H.,Sankar,R.,Steiner,R.A,Wynick,D.等,Modulation of hippocampal excitability and seizures by galanin.The Journal of neuroscience:the official journal of the Society for Neuroscience,2000,20(16),6276-81)。Mazarati等(Mazarati A,Liu H, Soomets U,Sankar R,Shin D,Katsumori H,Langel U,Wasterlain CG Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus.J Neurosci1998,18:10070-10077)。这些研究显示大鼠海马中甘丙肽的耗竭与自持性癫痫持续状态(self-sustaining status epilepticus)的发展相关。另外,将甘丙肽注射至大脑海马区域中可抑制癫痫发作(Mazarati A,Liu H,Soomets U,Sankar R,Shin D,Katsumori H,Langel U,Wasterlain CG Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus.J Neurosci1998,18:10070-10077.;Mazarati AM,Halaszi E,Telegdy G Anticonvulsive effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxin kindled seizure syndrome in rats.Brain Res1992,589:164-166)。然而,经静脉内给与的神经活性肽不能穿过BBB并且由于其小尺寸而具有短暂的半衰期(Jain,Kamal和Batra.Trends Biotechnol.第25卷.2007:307-16;Batra,Jain,Wittel,Chauhan和Colcher.Curr Opin Biotechnol.第13卷.2002版:603-8)。通过测试连接至FC5、单结构域抗体以及FC5-Fc的甘丙肽来评价甘丙肽在PTZ模型中的功效。虽然两种构建体都预计增强BBB转运,但FC5-Fc构建体由于其与其假定靶标TMEM30A的亲合结合而在本文显示具有增大的实际亲和力并且由于增大的尺寸和Fc依赖性再循环而具有远远更长的半衰期。

[0253] 在PTZ诱发的癫痫发作模型中,经IV或通过直接海马注射来注射所感兴趣的剂。海马注射将剂直接递送至作用部位,这使得甘丙肽与其同源受体结合并阻断癫痫发作。另外,直接海马注射每种分子充当阳性对照,显示连接至每种分子Fc、FC5或FC5-Fc的甘丙肽保持癫痫发作抑制活性。改变所施用的每种分子的剂量以得到几乎摩尔当量的甘丙肽剂量。对于阳性对照研究,使雄性Wistar大鼠(4-6周龄)接受下列之一的海马内注射:丙戊酸、Gal-Cya或FC5-Gal,最终体积为5uL,随后15分钟后IP注射50mpk PTZ以诱发癫痫发作。

[0254] 为了评价连接至FC5、FC5-Fc或Fc的甘丙肽穿过BBB的效力,全身注射这些分子中的每一种,如图7a和图7b中所详述。对于全身性研究,大鼠接受1、2或3次Gal-Cya或FC5-Gal的静脉内注射(通过尾静脉),或单一剂量的FC5-Fc-Gal或Fc-Gal。在每种情况下,在IP之后,经腹膜内施用50mpk剂量的PTZ注射并且记录大鼠的运动持续30分钟。

[0255] 然后复查所有记录的运动并且由不带偏见的研究人员针对三种特征性行为变化各自测量癫痫发作起始时间和癫痫发作持续时间:第一次肌抽跃(FMJ;其特征为耳朵、头部和肩部抽动)、第一次阵挛性发作(FCJ;其特征为最小程度的癫痫发作、头部肌肉和前肢的阵挛、全身不自主运动和跳跃运动与翻正反射)和第一次紧张性全身延伸(TGE;其特征为翻正能力丧失、前肢和后肢的屈曲或伸展以及全身的阵挛)。

[0256] 表VIIa显示每种分子的海马内注射的结果。IP注射50mpk PTZ导致以下每一种类型的快速起始：癫痫发作、肌阵挛、阵挛和全身性强直，其中非常快速地从严重程度最小的FMJ进展到最严重的癫痫发作形式全身性强直。已知部分抑制PTZ诱发的癫痫发作的小分子丙戊酸(Pollack G.M., Shen D.D. J Pharmacol Methods. (1985) 4月; 13 (2) :135-46) 显著延迟所有三种类型的癫痫发作，但并不能完全预防癫痫发作起始，其中观察到肌阵挛性发作和阵挛性发作的起始延迟约100秒。海马内注射单独的甘丙肽或连接至FC5的甘丙肽导致肌阵挛性发作的显著延迟和更严重的阵挛性和全身性强直发作的完全预防。

[0257] 静脉内给药每种分子所获得的结果示于表VIIb中。PTZ导致每种癫痫发作类型的快速起始并且11.2mpk丙戊酸的IV给药抑制肌阵挛性发作和阵挛性发作的起始。静脉内甘丙肽和甘丙肽-Fc(神经活性肽的短半衰期形式和长半衰期形式)分别导致癫痫发作起始无延迟或非常轻微延迟。在PTZ给药之前1小时以6mpk给药的FC5-甘丙肽导致肌阵挛性发作的显著延迟以及阵挛性和全身阵挛性发作的完全抑制。在PTZ给药之前两小时给与的单一剂量的FC5-Fc-甘丙肽也导致肌阵挛性发作的显著延迟以及阵挛性和全身阵挛性发作的完全抑制。

[0258] 从这些结果可得出若干结论。如所示当在Hargreaves模型中ICV给药时，连接至FC5、Fc或FC5-Fc的甘丙肽保持同等活性(表IV和表V)，另外表VIIa示出FC5-甘丙肽当注射至PTZ癫痫发作模型中的大鼠海马中时显示与单独的甘丙肽等效的活性(以摩尔计)。相比之下，单独的甘丙肽或呈连接至hFc分子的长寿命分子形式的甘丙肽不能有效穿过血脑屏障并抑制PTZ诱发的癫痫发作。只要当连接至FC5时，呈FC5-甘丙肽或FC5-Fc-甘丙肽形式的甘丙肽能够穿过BBB并有效延迟和抑制PTZ诱发的癫痫发作。在减少癫痫发作方面，以摩尔给药比较计，连接至FC5-Fc的甘丙肽比连接至单独的FC5的甘丙肽远远更有效；具体地，其有效性高至少十六倍。另外，FC5-Fc甘丙肽与FC5-甘丙肽相比显示第一次肌阵挛性癫痫发作起始时间的更大延迟。这些结果指示FC5-Fc对其靶标的改善的半衰期和实际亲和力增加改善了甘丙肽穿过BBB的递送并且相比于FC5甘丙肽导致PTZ癫痫发作模型中的癫痫发作更有效减少。

[0259] 表I. 表达和纯化分子的表征。

分子质粒	FC5 ⁽¹⁾ (EAG2333)	FC5-Fc ⁽²⁾ (EAG2345)	Fc-FC5 ⁽²⁾ (EAG2304)	Fc
分子量计算值 (道尔顿)	15,375	78,725	78,924	51,896
[0260] 内毒素(EU/mg)	<1	<1	<1	<1
LS分子量(道尔顿)	16,860	77,530	78,950	57,800
纯度, 分析型SEC中的峰面积%	99.7	98.9	95.0	99.7
平均连接的达拉根肽 ⁽³⁾	1.5	1.5	1.5	1.0

[0261] (1) 包含myc标签EQKLISEEDL、C端(1202mwt)、C端His标签5H

[0262] (2) Fc结构域是人IgG1和ag1y(所有Fc结构域在hIgG序列中都包含T299A点突变以消除Fc N-糖基化)

[0263] (3) 通过MS评价,以测定与FC5-Fc结构域共价连接的达拉根的平均数目。

[0264] 表II.融合至hFc的FC5结构域的药物动力学半衰期测定。

	FC5-Fc		Fc-FC5	hIgG1	
[0265] 测定法形式	荧光	ELISA	荧光	荧光	ELISA
β 相半衰期(小时)	39.4	35.7	38.6	43.5	48

[0266] 通过ELISA检测测定来自大鼠血清的人Fc的半衰期或者利用AL680标记分子并从血清测定荧光。在通过荧光测定半衰期的分子与通过ELISA测定半衰期的分子之间未观察到差异。以3mpk腹膜内注射分子。

[0267] 表III.在Hargreaves模型中FC5-Dal、FC5-Fc-Dal和Fc-FC5-Dal的结合亲和力和相对功效的概述,显示对于BBB内皮细胞的功效和亲和力的相关性。

分子	亲和力(nM)		
	FC5	FC5-Fc	Fc-FC5
[0268] 初级大鼠BBB EC	>2000	11	1700
SV-ARBEC		75	ND
大鼠主动脉内皮		1700	
相比于Hargreaves模型中的FC5-Dal的效能倍数	1	80	<0.1

[0269] 表IV.在Hargreaves模型中单独的达拉根或连接至FC5的达拉根对于慢性疼痛的抑制的概述。

分子	ICV		IV	
	剂量(ug)	% MPE	剂量(mg/kg)	% MPE
[0270] PBS	5	0 \pm 0.8	800 (μ L)	0 \pm 0.6
达拉根	2	35 \pm 1	0.34 \times 3次注射	0.3 \pm 0.3
FC5	69.75	0 \pm 2	7 \times 3次注射	1.9 \pm 0.3
EG2	69.75	0 \pm 2	7 \times 3次注射	0 \pm 1.3
A20.1			7.84 \times 3次注射	2.2 \pm 0.3
FC5-达拉根	74.4	47 \pm 2	7 \times 3次注射	41 \pm 0.5
[0271] EG2-达拉根	74.4	31 \pm 1	7 \times 3次注射	2.0 \pm 0
A20.1-达拉根			2.49 \times 3次注射	3.1 \pm 0
FC5+达拉根			(0.65 ug + 7 mg/Kg) \times 3次注射	0 \pm 1.6

[0272] 慢性疼痛抑制以最大可能作用的百分比(%MPE)形式表示。所述值是基于疼痛抑制动物中相对于对侧对照爪在测量时间框架内的曲线下面积。ICV或IV注射的分子的功效以Hargreaves模型中的最大可能作用的百分比(%MPE)形式表示。A20.1和EG2是与FC5无关的单结构域抗体,其对于BBB内皮细胞无表观亲和力。对于静脉内(IV)给药的剂量(mpk)值以每次注射量乘以注射次数表示。

[0273] 表V.Hargreaves模型中连接至Fc的达拉根或连接至FC5-Fc的达拉根对慢性疼痛的抑制的概述。

分子	ICV		IV	
	剂量(ug)	% MPE	剂量(mg/kg)	% MPE
[0274] FC5-Fc-Dal	11.5	43 \pm 3	6	46 \pm 2
Fc Dal	9.3	55 \pm 2	6	5 \pm 2
FC5-Fc + FC5-Fc-Dal			2.5 + 6	32 \pm 7

[0275] 在第二实验中,在以所示浓度添加FC5-Fc-Da1之前,IV注射IV剂量的未连接的FC5-Fc。

[0276] 表VI.Hargreaves模型中连接至Fc、FC5-Fc或FC5的甘丙肽对于慢性疼痛的抑制。

	分子	ICV		IV	
		剂量(ug)	% MPE	(mg/kg)	% MPE
[0277]	甘丙肽	2	54 ± 1	1	0 ± 1
	Fc-Gal	11.2	49 ± 1	6	2 ± 1
	FC5-Gal	10.87	49 ± 2	6	8 ± 1
	FC5-Fc-Gal	11.4	49 ± 2	6	45 ± 2

[0278] 在关于FC5-Gal1的多次剂量的情况下,每次剂量间隔1小时。在第三次实验中,在以所示浓度添加FC5-Fc-Da1之前,IV注射IV剂量的未连接的FC5-Fc。

[0279] 表VII:在大鼠PTZ模型中使用海马注射(a)或IV注射(b)的癫痫发作起始时间的比较

[0280] a) 海马注射

	分子	剂量(ug)	癫痫发作起始时间(秒)		
			肌阵挛性(秒)	阵挛性	全身性强直
[0281]	仅PTZ	50 mg/kg	0 ± 2	0 ± 6	0 ± 0.5
	丙戊酸	11.2	100 ± 6	100 ± 9	2 ± 1
	甘丙肽	1.82	104 ± 0	得到预防	得到预防
	FC5-甘丙肽	11.9	82 ± 4	得到预防	得到预防

[0282] b) 静脉内注射

	分子	剂量(mg/kg)	癫痫发作起始时间(秒)		
			肌阵挛性(秒)	阵挛性	全身性强直
[0283]	仅PTZ	50 mg/kg	0 ± 1	0 ± 3	0 ± 0.5
	丙戊酸	11.2	100 ± 3	100 ± 3	100 ± 0
	甘丙肽	1×2次注射	0.5 ± 5	0 ± 2	2 ± 4
	Fc-Gal	6	2 ± 1	18 ± 2	17 ± 2
	FC5-甘丙肽	6×3次注射	47 ± 3	得到预防	得到预防
	FC5-Fc-甘丙肽	6	101 ± 28	得到预防	得到预防

[0284] 在向大鼠IP给与PTZ之后,每种类型的癫痫发作的起始时间示于下文;测试FMJ、FCJ和TGE。癫痫发作类型更详细描述于上文。(a) 经IP施用的PTZ确定每种癫痫发作类型的对照时间。在IP注射PTZ之前丙戊酸、甘丙肽或FC5-甘丙肽的海马注射确定这些分子各自可能对每种癫痫发作类型的时间的最大作用。(b) 在PTZ的IP注射之前2小时给与丙戊酸(阳性对照)、甘丙肽(1×3次注射剂量,每次剂量间隔1小时,在PTZ给药之前45分钟完成)或FC5-甘丙肽(1×3次剂量,每次剂量间隔1小时,在PTZ给药之前45分钟完成)、FC5-Fc-Gal或Fc-Gal1的IV给药,测定这些分子各自可能对IV给药的影响。Fc-Gal1充当阴性对照,因为所述分子缺乏FC5F(ab)片段,但具有与FC5-Fc类似的体内PK。

[0285] 序列1:FC5-agly (T299A) hFc的序列。(pEAG2345)

[0286] DVQLQASGGGLVQAGSLRLSCAASGFKITHTYMGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYNSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTADYYCAAGSTSTATPLRVDYWGKGTQVTVSSAEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP SVFLFPPKPKDITLMSIRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0287] 序列2: ag1y (T299A) hFc-FC5的序列。(pEAG2403)

[0288] EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQ
KLSLSLSPGGGGSDVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKI THYTMGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYNSV
KGRFTISRDNANKNTVYLMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTATPLRVDYWGKGTQVTVSS

[0289] 序列3: 拼凑的FC5-ag1y (T299A) hFc的序列 (pYL605)

[0290] EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQ
KLSLSLSPGGGGSDVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKI THYTMGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYNSV
KGRFTISRDNANKNTVYLMNSLKPEDTADYYCAADAGSTGSGYGSFDYWGKGTQVTVSS

[0291] 等效物

[0292] 本领域技术人员应认识到或能够仅使用常规实验来确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等效物。所述等效物欲由以下权利要求涵盖。

[0001]

序列表

<110> 比奥根艾迪克 MA 公司
(BIOGEN IDEC MA INC.
FARRINGTON, Graham K.
SISK, William)

<120> 对转运治疗性分子穿过血脑屏障的增强 (ENHANCEMENT OF TRANSPORT OF THERAPEUTIC MOLECULES ACROSS THE BLOOD BRAIN BARRIER)

<130> BGG-952PC

<140> PCT/US2013/021041
<141> 2013-01-10

<150> US 61/585,039
<151> 2012-01-10

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 355
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Synthetic construct: FC5-agly (T299A)hFc. (pEAG2345)

<400> 1

Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Ile Thr His Tyr
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gly Ser Thr Ser Thr Ala Thr Pro Leu Arg Val Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys
115 120 125

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
130 135 140

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

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
165 170 175

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
180 185 190

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Ala Tyr
 195 200 205
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 210 215 220
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 225 230 235 240
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 245 250 255
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 260 265 270
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 275 280 285
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 290 295 300
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 325 330 335
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 340 345 350

[0002]

Pro Gly Lys
355

<210> 2

<211> 358

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Synthetic amino acid: agly (T299A) hbc-PC5. (pEAG2403)

<400> 2

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Ala Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Leu
 225 230 235 240

Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 245 250 255

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Ile Thr His Tyr Thr Met Gly Trp
 260 265 270

Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ser Arg Ile Thr
 275 280 285

Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe
 290 295 300

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
 305 310 315 320

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Ser
 325 330 335

Thr Ser Thr Ala Thr Pro Leu Arg Val Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr
 340 345 350

Gln Val Thr Val Ser Ser
 355

[0003]

<210> 3
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Synthetic amino acid: scrambled PC5-agly (T299A)hFc (pYL605)

<400> 3

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Ala Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Leu
 225 230 235 240
 Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 245 250 255
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Ile Thr His Tyr Thr Met Gly Trp
 260 265 270
 Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ser Arg Ile Thr
 275 280 285
 Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe
 290 295 300
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
 305 310 315 320
 Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Ala
 325 330 335

[0004]

Gly Ser Thr Gly Ser Tyr Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr
340 345 350

Gln Val Thr Val Ser Ser
355

- <210> 4
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成肽

<400> 4

Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro
1 5 10

- <210> 5
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成肽

<400> 5

His Gln Ser Leu Gly Thr Gln
1 5

- <210> 6
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> 人工序列

[0005]

- <220>
- <223> 合成肽

<400> 6

His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys
1 5

- <210> 7
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成肽

<400> 7

His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys
1 5

- <210> 8
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成肽

<400> 8

Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln
1 5

- <210> 9
- <211> 300

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的 TMEM30A 的氨基酸序列
 <400> 9
 Met Ala Met Asn Tyr Asn Ala Lys Asp Glu Val Asp Gly Gly Pro Pro
 1 5 10 15
 Cys Ala Pro Gly Gly Thr Ala Lys Thr Arg Arg Pro Asp Asn Thr Ala
 20 25 30
 Phe Lys Gln Gln Arg Leu Pro Ala Trp Gln Pro Ile Leu Thr Ala Gly
 35 40 45
 Thr Val Leu Pro Ile Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Phe Ile Pro Ile
 50 55 60
 Gly Ile Gly Ile Phe Val Thr Ser Asn Asn Ile Arg Glu Ile Glu Ile
 65 70 75 80
 Asp Tyr Thr Gly Thr Glu Pro Ser Ser Pro Cys Asn Lys Cys Leu Ser
 85 90 95
 Pro Asp Val Thr Pro Cys Phe Cys Thr Ile Asn Phe Thr Leu Glu Lys
 100 105 110
 Ser Phe Glu Gly Asn Val Phe Met Tyr Tyr Gly Leu Ser Asn Phe Tyr
 115 120 125
 Gln Asn His Arg Arg Tyr Val Lys Ser Arg Asp Asp Ser Gln Leu Asn
 130 135 140
 Gly Asp Ser Ser Ala Leu Leu Asn Pro Ser Lys Glu Cys Glu Pro Tyr
 145 150 155 160
 Arg Arg Asn Glu Asp Lys Pro Ile Ala Pro Cys Gly Ala Ile Ala Asn
 165 170 175
 Ser Met Phe Asn Tyr Met Leu Asp Ser Asp Pro Asp Asn Asn Gly Phe
 180 185 190
 Ile Asn Glu Asp Phe Ile Val Trp Met Arg Thr Ala Ala Leu Pro Thr
 195 200 205
 Phe Arg Lys Leu Tyr Arg Leu Ile Glu Arg Lys Ser Asp Leu His Pro
 210 215 220
 Thr Leu Pro Ala Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Val Thr Tyr Asn Tyr Pro
 225 230 235 240
 Val His Tyr Phe Asp Gly Arg Lys Arg Met Ile Leu Ser Thr Ile Ser
 245 250 255
 Trp Met Gly Gly Lys Asn Pro Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Ile Ala Val
 260 265 270
 Gly Ser Ile Ser Phe Leu Leu Gly Val Val Leu Leu Val Ile Asn His
 275 280 285

[0006]

Lys Tyr Arg Asn Ser Ser Asn Thr Ala Asp Ile Thr
 290 295 300

<210> 10
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Synthetic amino acid sequence of FC5

<400> 10

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Ile Thr His Tyr
 20 25 30

[0007]

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Gly Ser Thr Ser Thr Ala Thr Pro Leu Arg Val Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

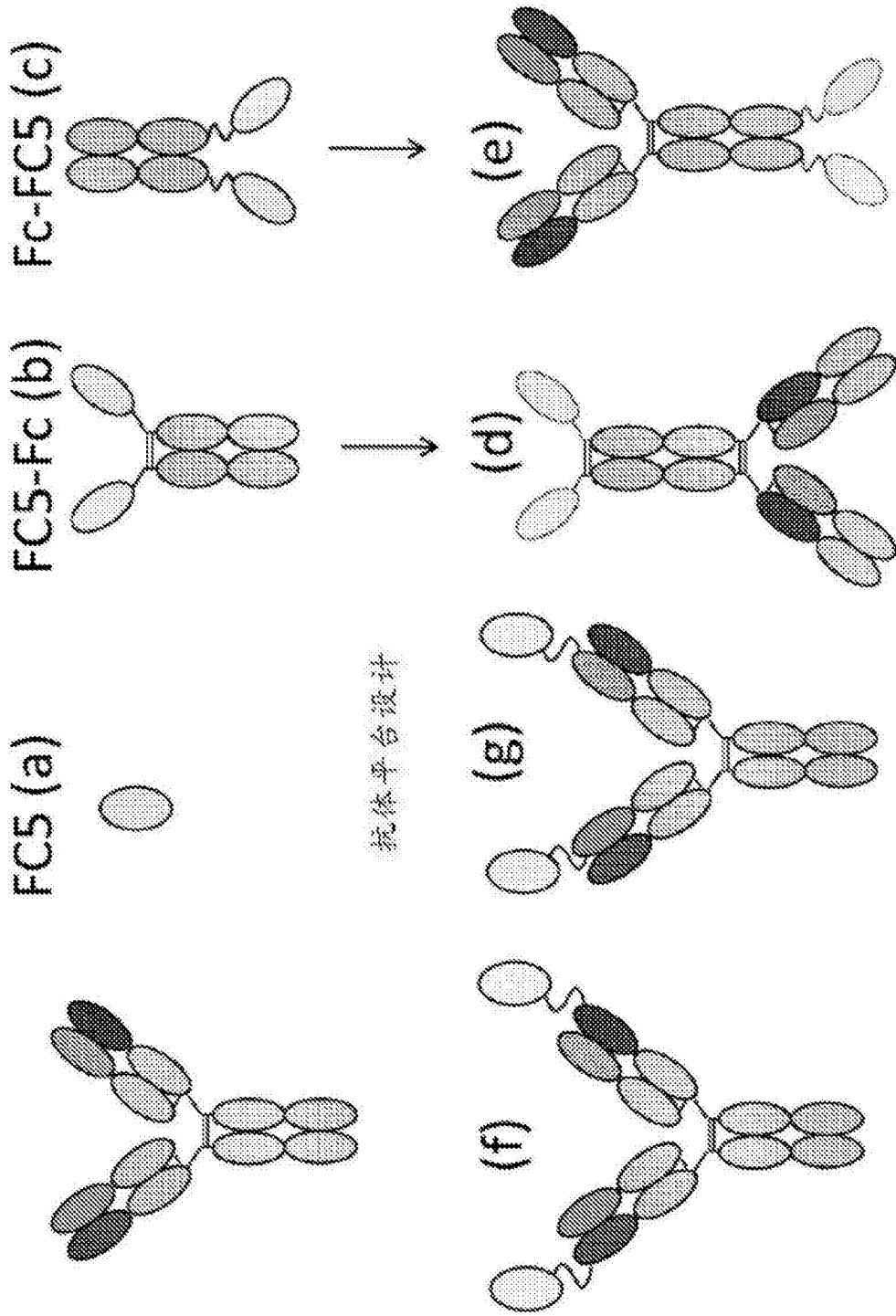


图1

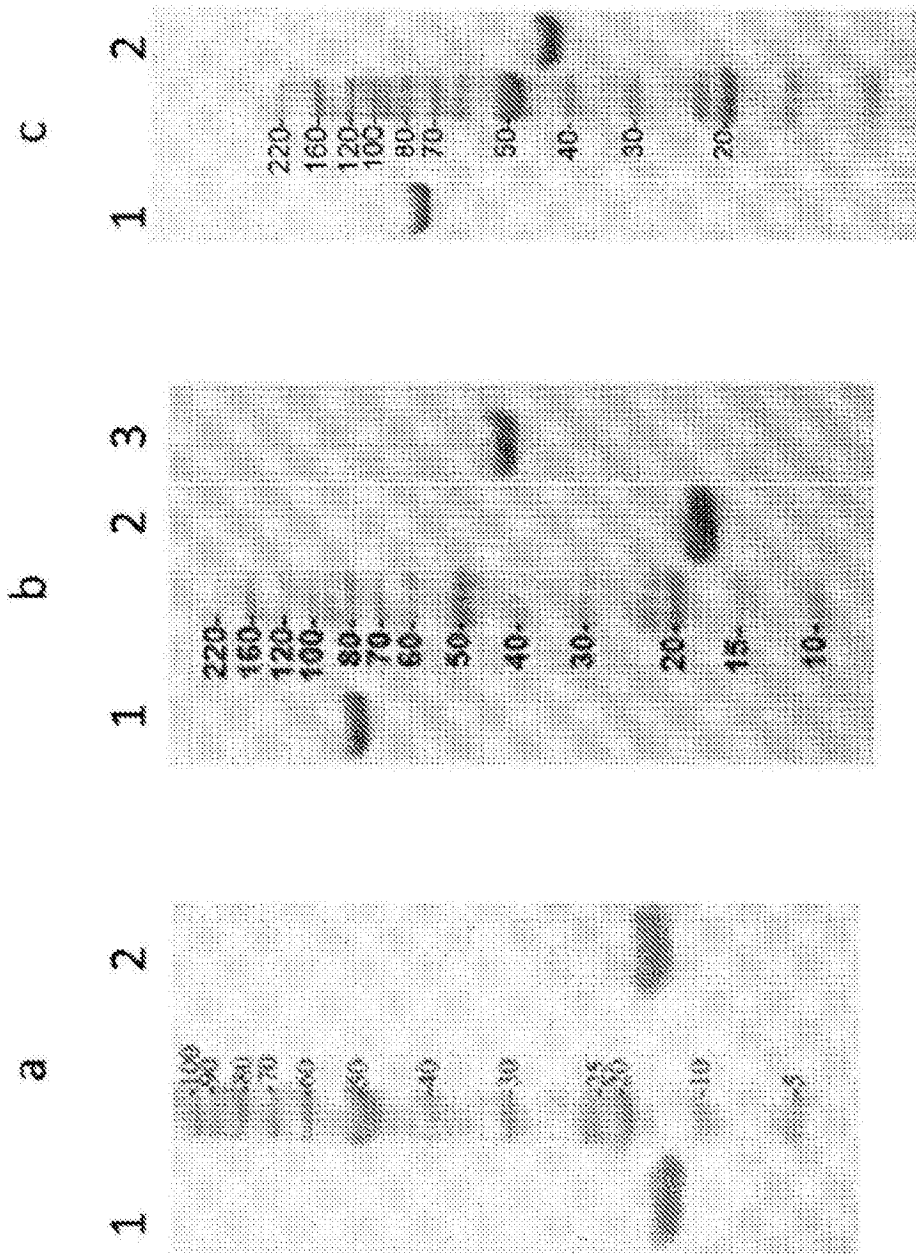


图2

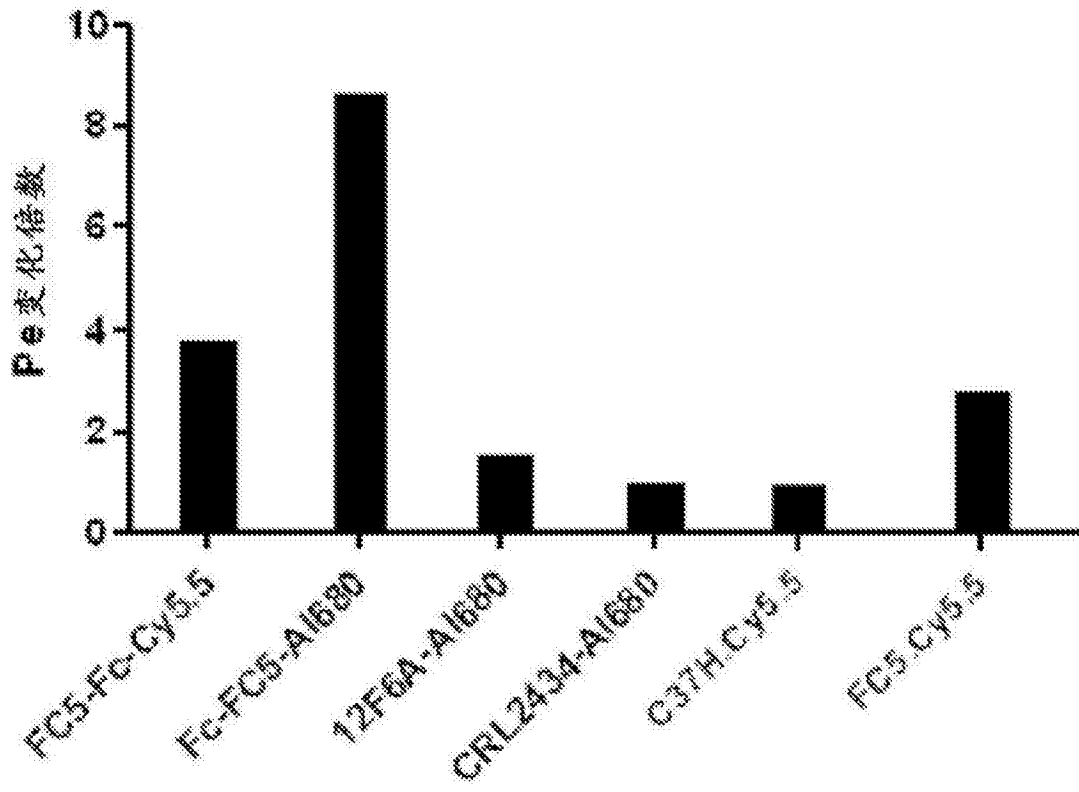


图3

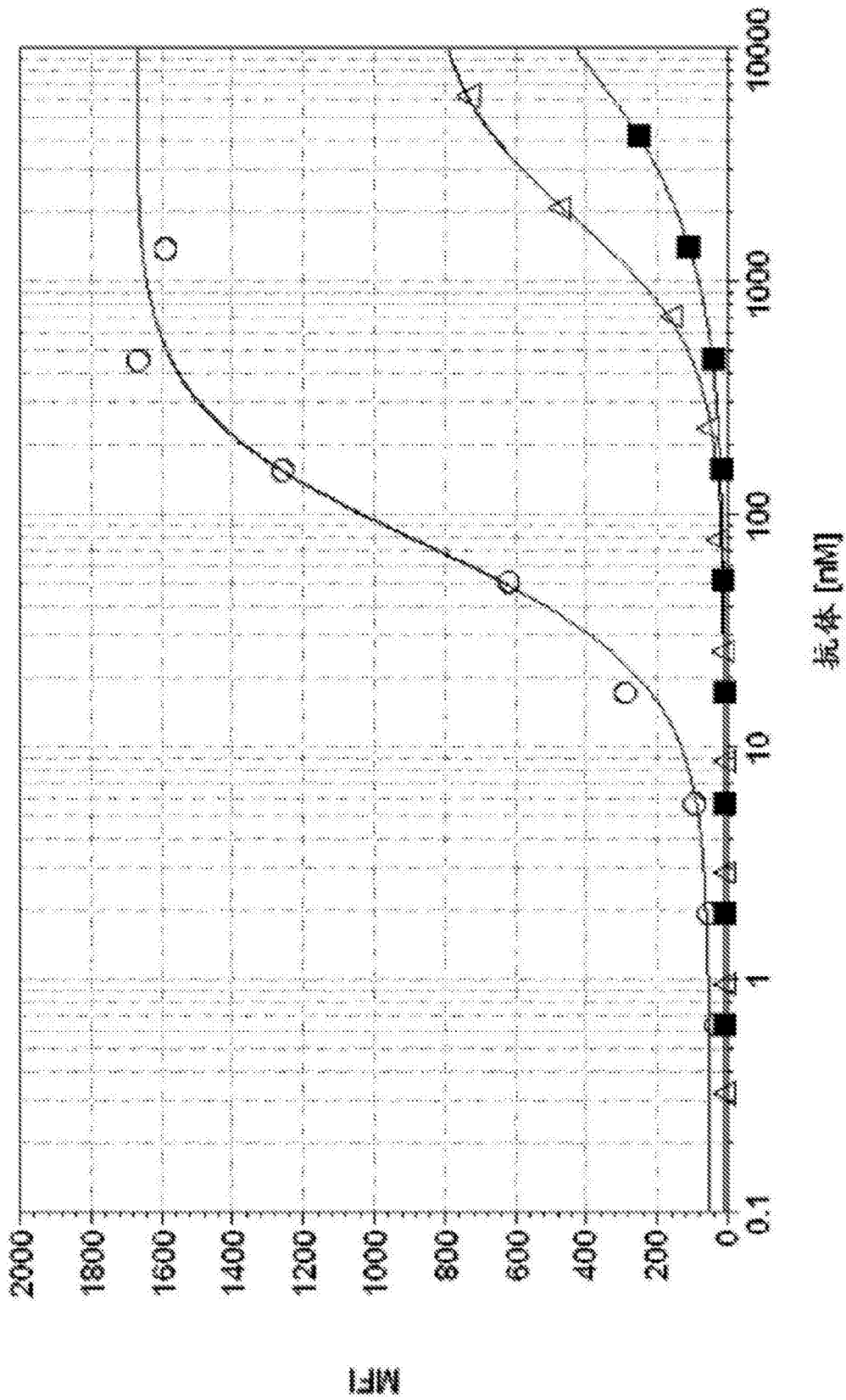


图4a

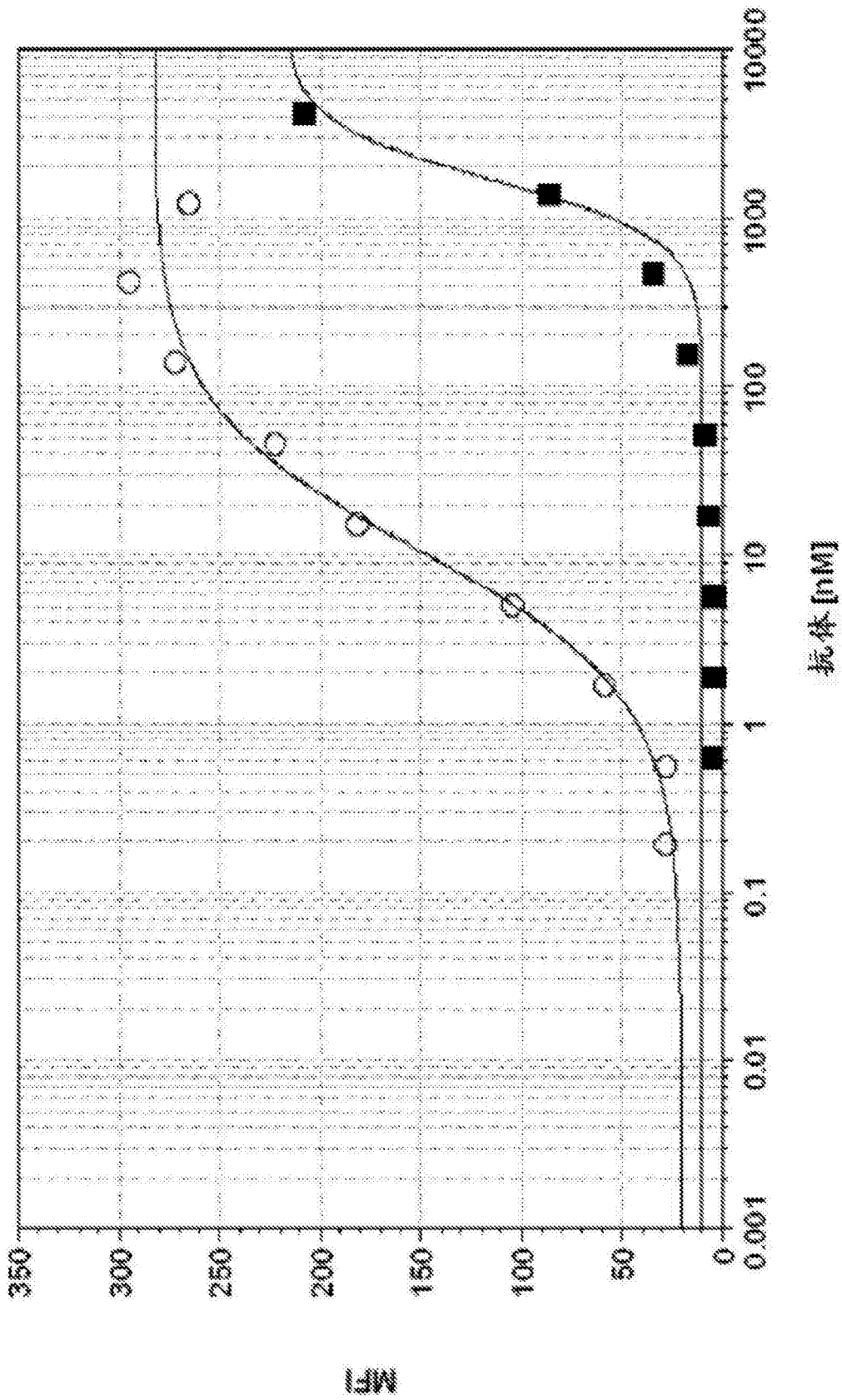


图4b

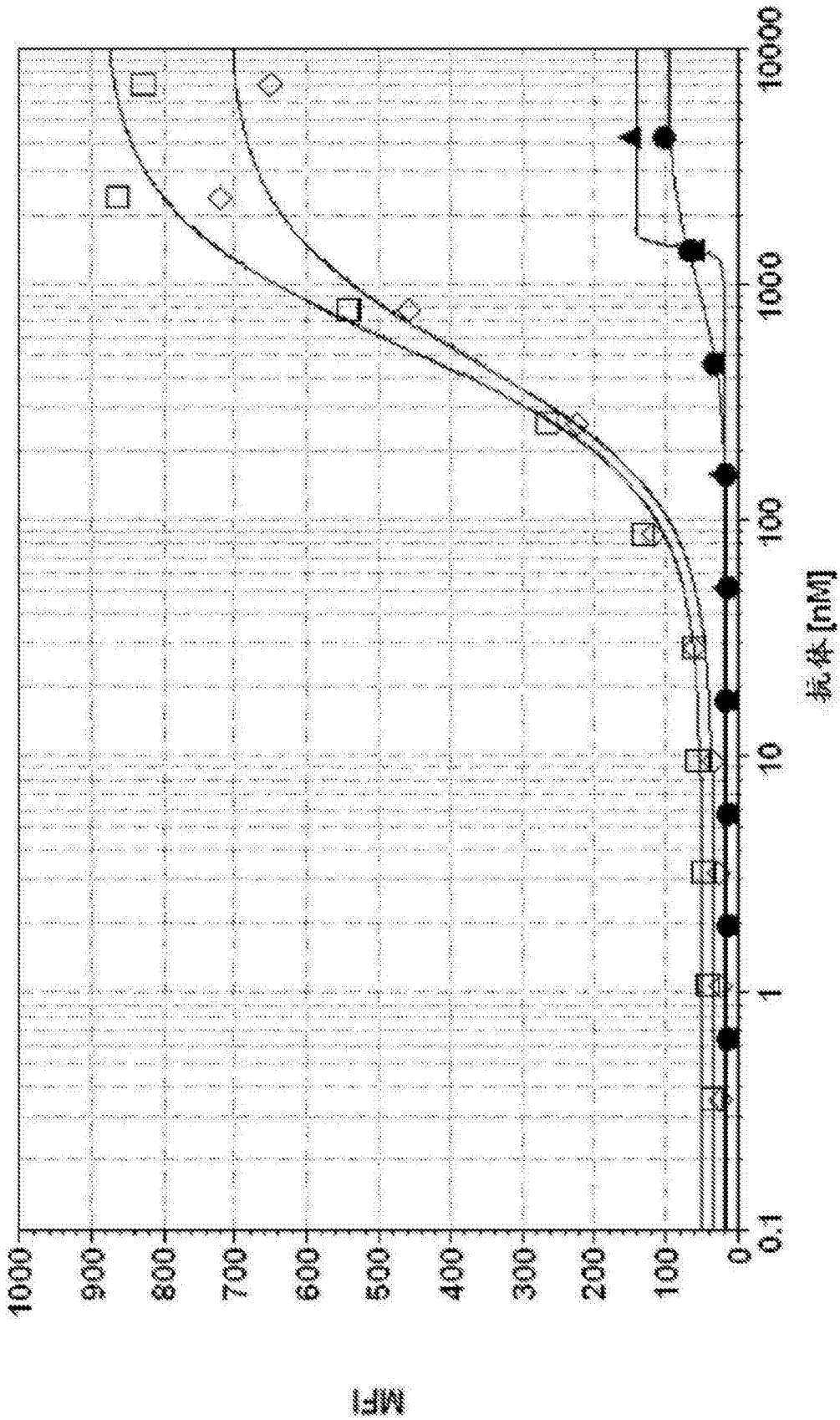


图4c

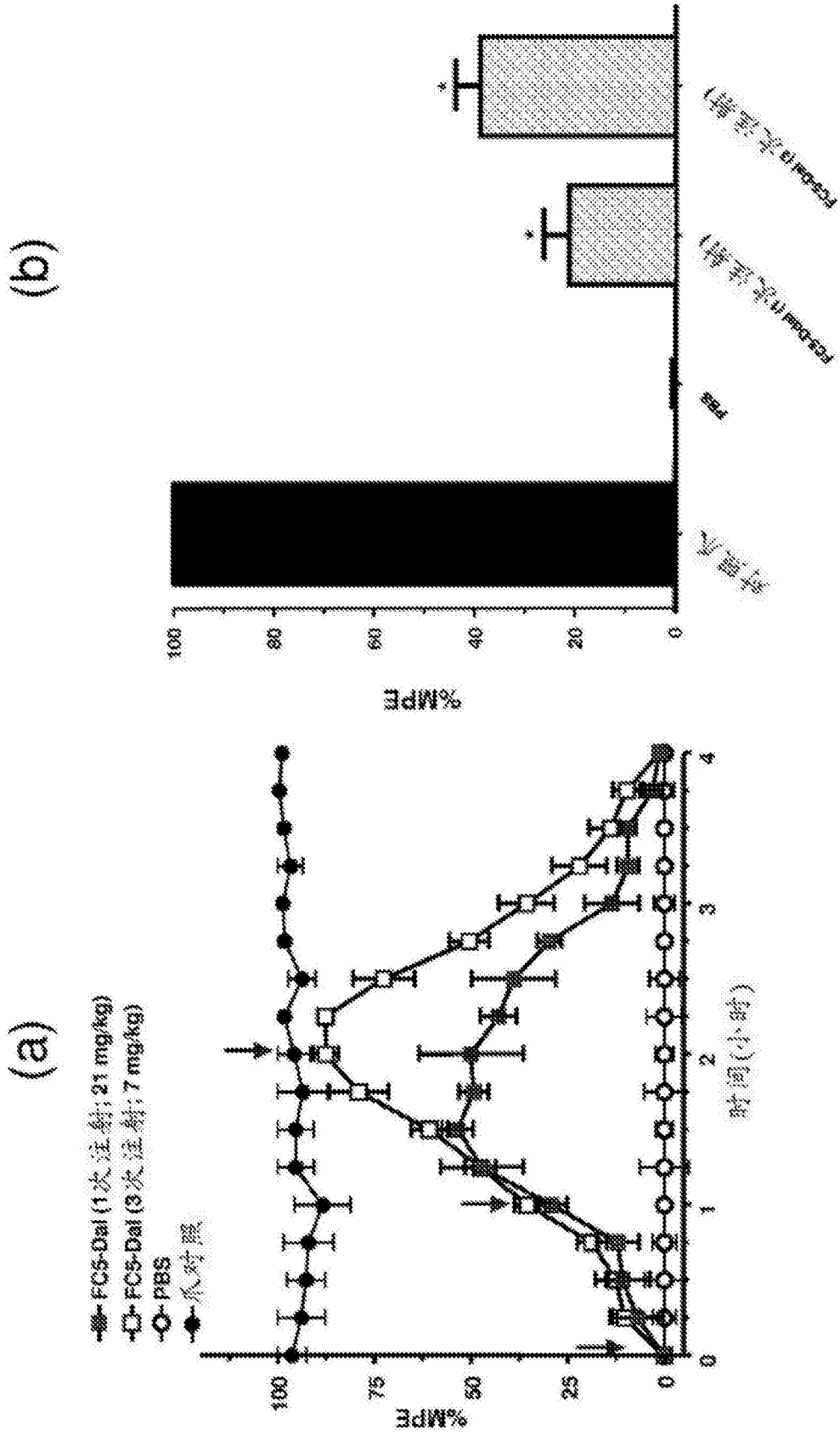


图5

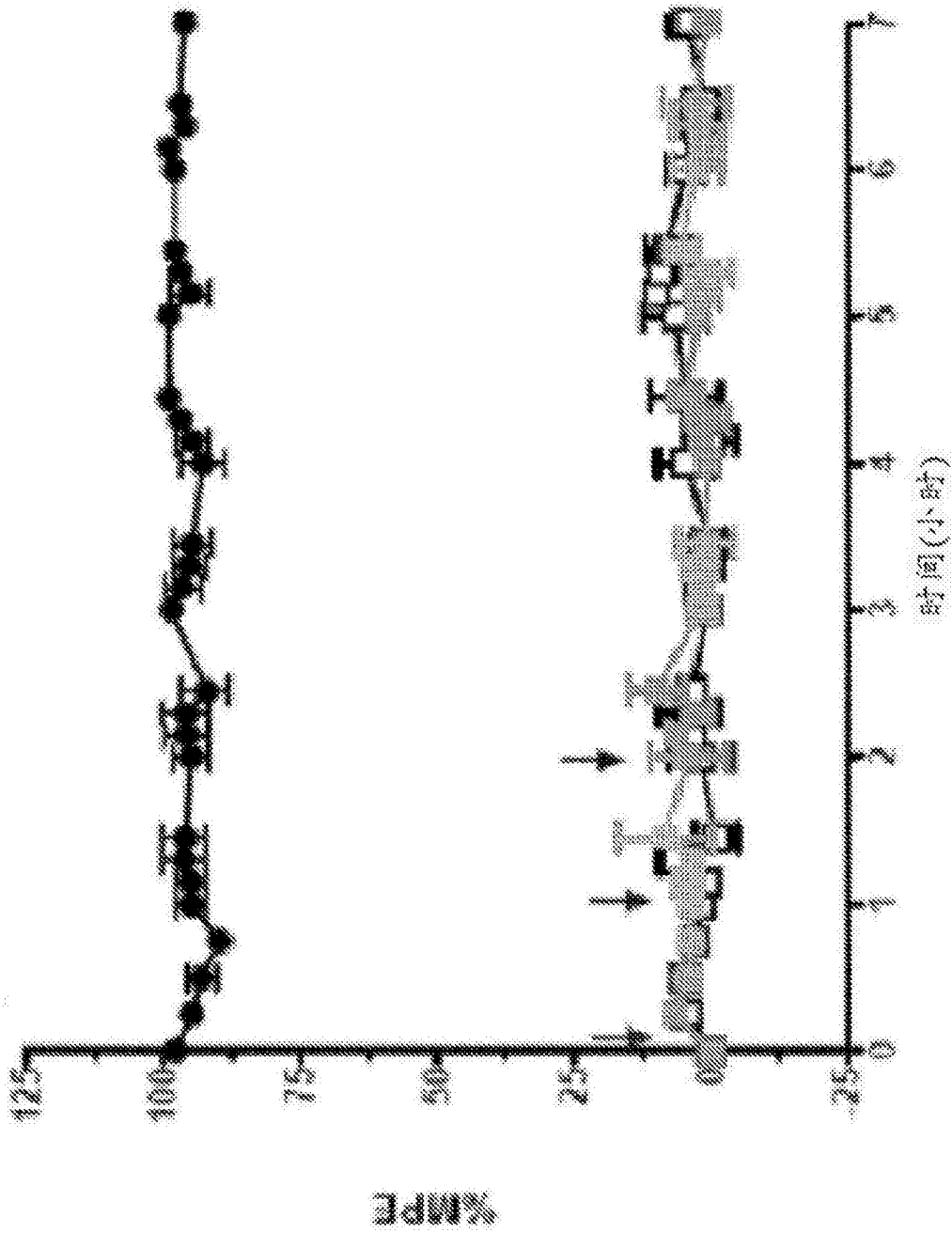


图5c

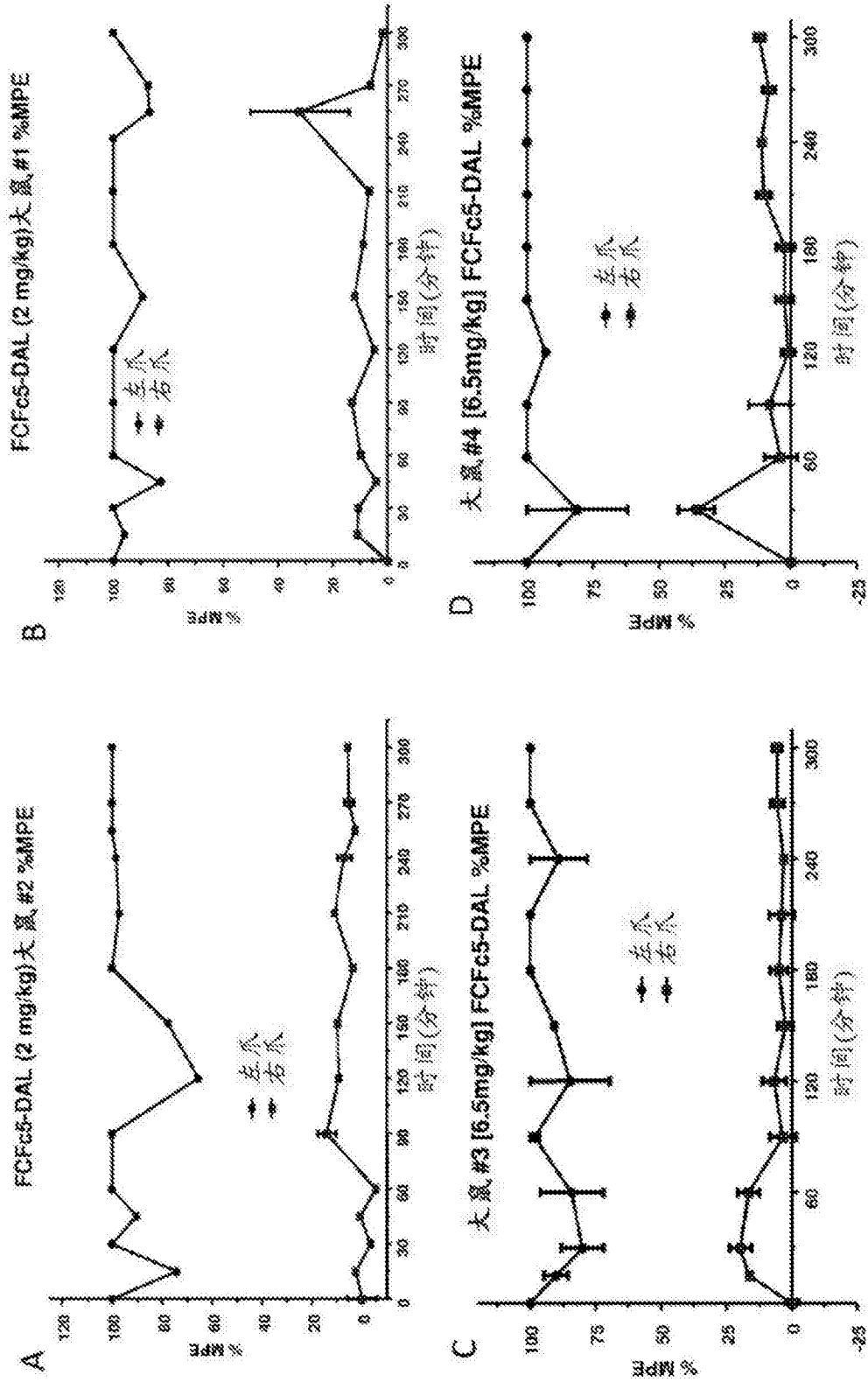


图6

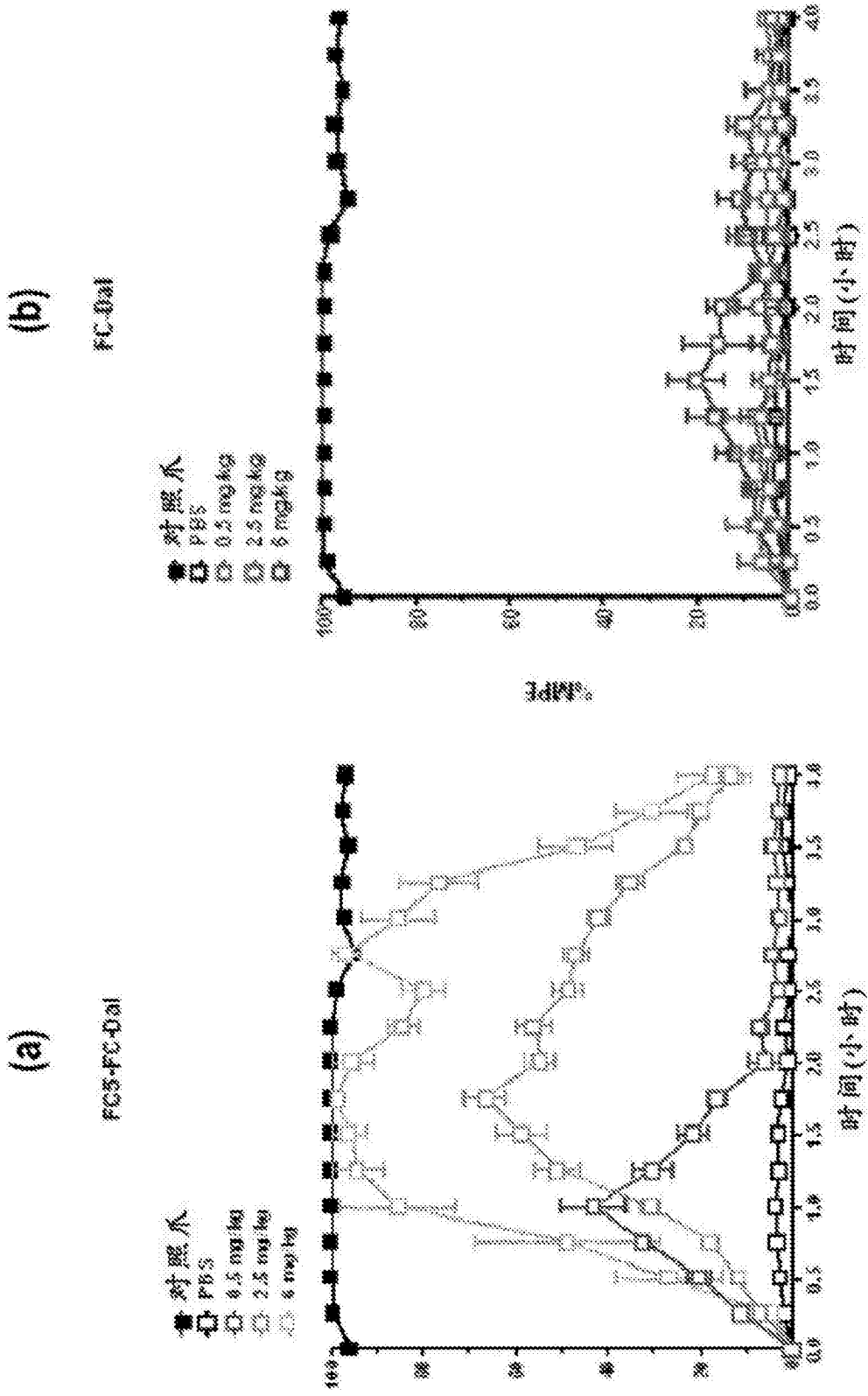
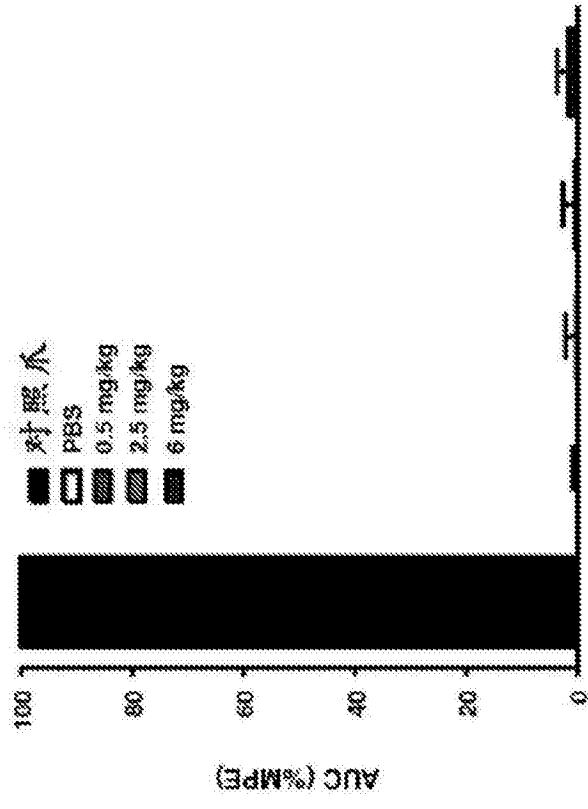


图7

(d)

FC-Dal



(c)

FC5-FC-Dal

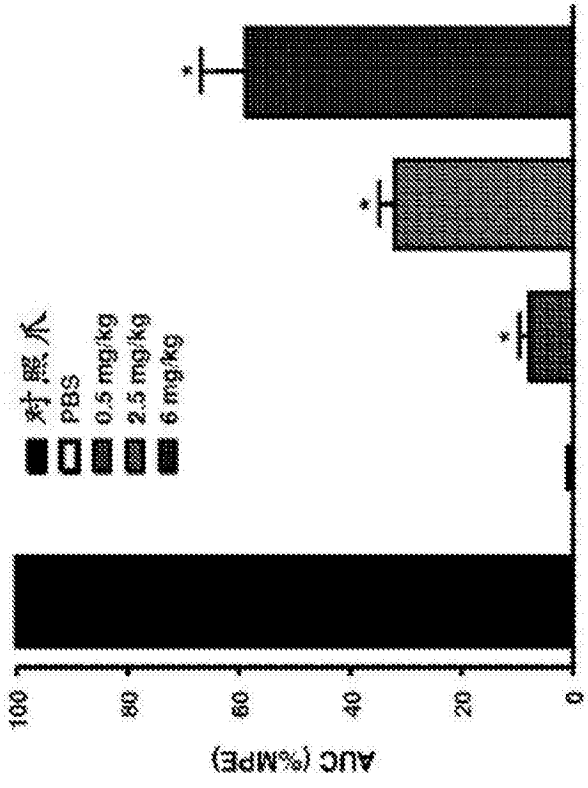


图7