



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102597771 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201080045047. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 10. 05

G01N 33/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/68 (2006. 01)

61/248, 778 2009. 10. 05 US

C12N 15/115 (2006. 01)

61/257, 351 2009. 11. 02 US

C40B 40/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/051484 2010. 10. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02011/044133 EN 2011. 04. 14

(71) 申请人 奥普索尼克治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 A·科林逊 P·瓦格纳

M·萨尔伯格 A·瓦尔内

G·舒尔曼 R·卡门

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 7 页

(54) 发明名称

用于重定向抗体特异性的高亲和力衔接分子

(57) 摘要

本发明披露了用于鉴定高亲和力衔接分子的方法,所述衔接分子结合循环抗体和目标分子并将循环抗体的特异性重定向到目标分子。本发明也提供了示例性的高亲和力衔接分子。

1. 用于鉴定能够重定向抗体特异性的高亲和力衔接分子的方法,所述方法包括:
 - (a) 提供编码候选靶向肽群体的随机化文库;
 - (b) 从展示文库中选择以高亲和力和 / 或选择性与目标分子结合的靶向肽;
 - (c) 通过连接部分连接靶向肽和配体部分以形成候选衔接分子;和
 - (d) 评价所述候选衔接分子重定向循环抗体的特异性到所述目标分子的能力;从而鉴定该衔接分子。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中,连续地进行步骤 (a)-(d)。
3. 权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,在步骤 (b) 之前进行连接步骤 (c)。
4. 上述权利要求任一项所述的方法,其中,所述文库为 mRNA 展示、核糖体展示、酵母展示、噬菌体展示或合成肽文库。
5. 上述权利要求任一项所述的方法,其中,所述靶向肽以 1nM 或更低的结合亲和力结合目标分子。
6. 上述权利要求任一项所述的方法,其中,所述配体部分包括聚糖部分。
7. 上述权利要求任一项所述的方法,其中,所述配体部分为血型抗原。
8. 上述权利要求任一项所述的方法,其中,所述配体部分为 gal 抗原或其表位。
9. 权利要求 8 所述的方法,其中,所述配体部分由一个或多个 gal- α -1-3-gal 二糖单元组成。
10. 权利要求 8 所述的方法,其中,所述配体部分为具有降低干扰分子的竞争结合的修饰的修饰 gal 抗原。
11. 权利要求 8 所述的方法,其中,所述配体部分为具有降低酶促降解或化学降解的修饰的修饰 gal 抗原。
12. 权利要求 10 或 11 所述的方法,其中,所述修饰 gal 抗原在末端半乳糖残基的 C6' 位包含保护基团。
13. 上述权利要求任一项所述的方法,其中,所述配体部分为 gal 抗原的肽模拟物。
14. 上述权利要求任一项所述的方法,其中,所述配体部分为肽配体部分。
15. 权利要求 14 所述的方法,其中,所述肽配体部分包含被循环抗体的抗原结合位点选择性结合的表位。
16. 权利要求 15 所述的方法,其中,所述肽配体部分包含抗体的独特位,其中所述独特位选择性地被循环抗独特型抗体结合。
17. 权利要求 16 所述的方法,其中,所述肽配体部分包含 Fc 结合蛋白的结合位点部分。
18. 上述权利要求任一项所述的方法,其中,所述肽配体部分通过 (i) 提供编码候选肽配体部分群体的随机化 mRNA 展示文库;和 (ii) 从步骤 (i) 的展示文库选择以高亲和力和 / 或选择性结合循环抗体的肽配体部分。
19. 权利要求 18 所述的方法,其中,在选择步骤 (ii) 之前,所述候选肽配体部分与靶向肽融合。
20. 权利要求 18 所述的方法,其中,在选择步骤 (ii) 之后,所述候选肽配体部分与靶向肽融合。
21. 上述权利要求任一项所述的方法,其中,所述目标分子为可溶性疾病相关分子。
22. 权利要求 21 所述的方法,其中,所述重定向的抗体特异性通过测量所述可溶性分

子的调理作用或中和作用进行评估。

23. 上述权利要求任一项所述的方法,其中,所述配体部分用双功能接头部分与靶向部分连接。

24. 权利要求 23 所述的方法,其中,所述双功能接头部分通过靶向部分的氨基和配体部分的硫醇部分连接靶向部分和配体部分。

25. 上述权利要求任一项所述的方法,其中,所述目标分子存在于感染的细胞或肿瘤细胞的表面上。

26. 权利要求 25 所述的方法,其中,所述重定向的特异性通过测量 ADCC 或 CDC- 依赖性细胞杀伤进行评估。

27. 根据上述权利要求任一项所述的方法鉴定的高亲和力衔接分子,所述衔接分子包含 (i) 靶向部分,所述靶向部分以高亲和力或选择性结合目标分子,(ii) 配体部分,所述配体部分特异结合循环抗体;和 (iii) 接头部分,其连接靶向部分和配体部分,其中,所述衔接分子促进抗体和目标分子之间的功能性相互作用。

28. 权利要求 27 所述的高亲和力衔接分子,其中,所述靶向部分为肽靶向部分。

29. 权利要求 27 或 28 所述的衔接分子,其中,所述靶向部分以高亲和力或选择性结合 VEGF 配体。

30. 权利要求 27-29 任一项所述的衔接分子,其中,所述靶向部分包含选自 SEQ ID NO 1、2、3 和 4 的一个或多个序列。

31. 权利要求 27-29 任一项所述的衔接分子,其中,所述靶向部分为 PEG 化的。

32. 权利要求 27-30 任一项所述的衔接分子,其中,所述配体部分包含特异性结合循环抗 Gal 抗体的 Gal 抗原。

33. 高亲和力衔接分子,选自下组:

(a) H-Gly-D-Val-D-Gln-D-Glu-D-Asp-D-Val-D-Ser-D-Ser-D-Thr-D-Leu-Gly-D-Ser-D-Trp-D-Val-D-Leu-D-Leu-D-Pro-D-Phe-D-His-D-Arg-Gly-D-Thr-D-Arg-D-Leu-D-Ser-D-Val-D-Trp-D-Val-D-Thr-PEG₂-Cys-X-Y;

(b) H-Gly-Gly-D-Phe-D-Glu-Gly-D-Leu-D-Ser-D-Gln-D-Ala-D-Arg-D-Lys-D-Asp-D-Gln-D-Leu-D-Trp-D-Leu-D-Phe-D-Leu-D-Met-D-Gln-D-His-D-Ile-D-Arg-D-Ser-D-Tyr-D-Arg-D-Thr-D-Ile-D-Thr-PEG₂-Cys-X-Y;

(c) H-Gly-D-Val-Gly-Gly-D-Ser-D-Arg-D-Leu-D-Glu-D-Ala-D-Tyr-D-Lys-D-Lys-D-Asp-D-His-D-Arg-D-Val-D-Phe-D-Gln-D-Met-D-Ala-D-Trp-D-Leu-D-Gln-D-Tyr-D-Tyr-D-Trp-D-Ser-D-Thr-D-Thr-PEG₂-Cys-X-Y; 和 (d) H-Gly-D-Ser-Gly-D-Ser-Gly-D-Asn-D-Ala-D-Leu-D-His-D-Trp-D-Val-D-Cys-D-Ala-D-Ser-D-Asn-D-Ile-D-Cys-D-Trp-D-Arg-D-Thr-D-Pro-D-Trp-D-Ala-Gly-D-Gln-D-Leu-D-Trp-Gly-D-Leu-D-Val-D-Arg-D-Leu-D-Thr-PEG₂-Cys-X-Y;

其中,

X 为具有马来酰亚胺官能团的双功能化学接头;以及

Y 为氨基修饰的 Gal-1-3-Gal 二糖。

用于重定向抗体特异性的高亲和力衔接分子

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2009 年 10 月 5 日提交的美国临时申请系列号 61/248,778 和 2009 年 11 月 2 日提交的美国临时申请系列号 61/257,351 的优先权。上述申请的全部内容在此通过引用引入。

背景技术

[0003] 重定向免疫系统以攻击新的靶标的概念作为用于靶向免疫治疗的有吸引力的策略长期以来引起科学家的兴趣。通过重定向天然的循环人抗体以攻击疾病区域如癌症、自身免疫性疾病和传染病中的所期望的靶标,人们可以避免特别免疫的需要。虽然这一策略已经显示出成功的早期迹象,但大多数研究没有超出体外验证的水平。例如,如果使用已经存在于一般人群中的抗体,这一策略将是特别有价值的并且可以制备成适于经口施用。因此,本领域需要改进的重定向抗体特异性的方法。

发明内容

[0004] 本发明提供分离的衔接分子,特别是双特异的衔接肽,其以高结合亲和力和选择性结合抗体和期望的目标分子。由于其高结合亲和力和选择性,本发明的衔接分子能够有效地将循环抗体重定向至通常不被抗体分子结合的目标分子。此外,本文中披露的衔接分子提供了与传统的抗体介导疗法相比的一种或多种下述优点:1) 使得能够同时募集多个抗体类效应子功能;2) 可以使用本发明的方法快速产生;3) 具有低商品成本;和 4) 当向使用对象施用时不引起 IgE-介导的超敏反应。

[0005] 所述衔接分子通常包含与一个或多个配体部分连接的一个或多个靶向部分。在某些实施方式中,所述配体部分包含一个或多个 Gal 抗原(例如, Gal- α -1-3-Gal)或其模拟物。在一个实施方式中,所述靶向部分包含肽,例如 VEGF 或 TNF α -结合肽。示例性的 VEGF-结合肽具有一个或多个如 SEQ ID NO. 1、2、3 和 / 或 4 所示的氨基酸序列。在另一个优选的实施方式中,所述肽(例如,如 SEQ ID NO. 1、2、3 和 / 或 4 所示的肽序列)与包含一个或多个 Gal 抗原(例如, Gal- α -1-3-Gal 二糖)的配体部分连接。

[0006] 在其它实施方式中,靶向部分包含一个或多个抗体或其抗原结合片段。合适的抗体包括但不限于阿昔单抗 (Abciximab)、阿达木单抗 (Adalimumab)、阿仑珠单抗 (Alemtuzumab)、巴利昔单抗 (Basiliximab)、贝伐单抗 (Bevacizumab)、西妥昔单抗 (Cetuximab)、聚乙二醇塞妥珠单抗 (Certolizumab pegol)、达利珠单抗 (Daclizumab)、依库珠单抗 (Eculizumab)、依法利珠单抗 (Efalizumab)、吉妥珠单抗 (Gemtuzumab)、替伊莫单抗 (Ibritumomab tiuxetan)、英夫利昔单抗 (Infliximab)、莫罗单抗 (Muromonab)-CD3、那他珠单抗 (Natalizumab)、奥马珠单抗 (Omalizumab)、帕利珠单抗 (Palivizumab)、帕尼单抗 (Panitumumab)、兰尼单抗 (Ranibizumab)、利妥昔单抗 (Rituximab)、托西莫单抗 (Tositumomab)、曲妥珠单抗 (Trastuzumab) 和 / 或戈利木单抗 (Golimumab),或其抗原结合片段。在优选的实施方式中,抗体(例如,一个或多个上面公开的抗体)或其抗原结合片

段与包含一个或多个 Gal 抗原（例如，Gal- α -1-3-Gal）的配体部分连接。在另一个优选的实施方式中，抗体（例如，一个或多个上面公开的抗体）或其抗原结合片段与包含一个 Gal- α -1-3-Gal 二糖的配体部分连接。在另一个优选的实施方式中，包含一个或多个 Gal 抗原（例如，Gal- α -1-3-Gal）的配体部分与抗体的一个或多个可变区连接。

[0007] 在其它实施方式中，靶向部分包含抗体样分子。合适的抗体样分子包括但不限于 Adnectins、亲和体 (Affibodies)、DARPinS、Anticalins、Avimers 和 Versabodies，或其抗原结合片段。在优选的实施方式中，抗体样分子与包含一个或多个 Gal 抗原（例如，Gal- α -1-3-Gal）的配体部分连接。

[0008] 在其它实施方式中，本发明的靶向部分包含细胞表面受体或其片段的细胞外部分。合适的细胞表面受体包括但不限于 TNF 家族受体（例如，TNF α 受体，例如，人 TNF α 受体）和酪氨酸激酶家族的生长因子受体（例如，p185HER2）。在优选的实施方式中，细胞表面受体分子的细胞外部分与包含一个或多个 Gal 抗原（例如，Gal- α -1-3-Gal）的配体部分连接。在另一个优选的实施方式中，细胞表面受体分子的细胞外部分与包含一个 Gal- α -1-3-Gal 二糖的配体部分连接。

[0009] 在其它实施方式中，靶向部分包含用于细胞表面受体的配体。在优选的实施方式中，配体与包含一个或多个 Gal 抗原（例如，Gal- α -1-3-Gal）的配体部分连接。在另一个优选的实施方式中，配体与包含一个 Gal- α -1-3-Gal 二糖的配体部分连接。

[0010] 另一方面，本发明也提供了用于鉴定分离的衔接分子的方法，这类方法包括：提供编码候选靶向部分的群体的随机化文库；从展示文库中选择以高亲和力和 / 或选择性与目标分子结合的靶向部分；通过连接部分连接靶向部分和配体部分以形成候选衔接分子；以及评价候选衔接分子将循环抗体的特异性重定向至目标分子的能力。用于本发明的方法中的合适的筛选方法包括 mRNA 展示、核糖体展示、酵母展示、噬菌体展示或合成肽文库的筛选。在一个优选的实施方式中，mRNA 展示文库用于选择靶向肽。在另一个优选的实施方式中，噬菌体展示文库用于选择靶向肽。

[0011] 本发明的进一步方面提供了治疗受试者的疾病（例如，癌症、传染病或自身免疫疾病）的方法，包括向受试者施用有效量的本发明的分离的衔接分子，从而治疗所述疾病。在特定的实施方式中，所述疾病为黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、牛皮癣、糖尿病、心血管缺血、牛皮癣、类风湿性关节炎和骨关节炎中的至少一种。

附图说明

[0012] 图 1 为本发明的示例性衔接分子的示意图。所述衔接分子为双特异性肽，包含针对目的靶标的高亲和力肽靶向部分和包含抗 gal 抗体的糖肽表位的配体部分。通过结合目标分子和天然存在的抗 gal 抗体，衔接分子能够重定向抗体的效应子功能以作用于目标分子。

[0013] 图 2 提供了在 mRNA 展示期间进行的各种个方法步骤的概述。

[0014] 图 3 描述了可以用于 mRNA 展示中用于选择高亲和力衔接肽的示例性肽文库。

[0015] 图 4 描述了本发明的四个示例性高亲和力 VEGF 靶向肽。

[0016] 图 5 描述了用于偶联目标部分（例如，本发明的 VEGF 靶向部分）到配体部分上的示例性方法和接头。

[0017] 图 6 描述了目标部分 / 配体部分偶联反应的 HPLC 和质谱分析。

[0018] 图 7 描述了优化的目标部分 / 配体部分偶联反应的 HPLC 和质谱分析。

[0019] 图 8 描述了证明本发明的 VEGF- 结合衔接体重定向天然存在的抗 gal 抗体以结合 VEGF 的效力的体外分析的结果。

具体实施方式

[0020] 本说明书特别地描述了以高结合亲和力和选择性结合抗体和目标分子的新的衔接分子的鉴定和制备。如本文中使用的,术语“衔接体”指的是肽促进抗体与该抗体通常不结合的目标分子之间的功能性相互作用的能力。例如,本发明的衔接分子能够结合抗体和目标分子,以使得抗体和靶标彼此紧密接近。在一些实施方式中,所述抗体能够促进对目标分子的抗体反应。示例性的抗体反应可以包括目标分子(例如,可溶性因子,如细胞因子或生长因子)的中和作用或调理作用。可选择地,当目标分子存在于病毒表面上时,所述抗体可以促进病毒的中和作用或调理作用。在其它实施方式中,目标分子可以存在于细胞(例如,感染的细胞或肿瘤细胞)的表面上并且通过衔接肽将抗体募集到细胞上促进抗体介导的效应子反应的诱导(例如,诱导补体级联或抗体依赖性细胞毒性(ADCC))。由于本文中公开的衔接分子不明显活化嗜碱性粒细胞而是特别有利的,且因此在向受试者施用时不引起 IgE 超敏反应。

[0021] 本发明的衔接分子包含至少三个部分:(a) 靶向部分、(b) 配体部分和 (c) 接头部分。靶向部分 (a) 是以高亲和力和 / 或选择性结合目标分子的部分。配体部分 (b) 是循环抗体以高亲和力和 / 或选择性结合的部分。靶向部分和配体部分通过介于其间的接头部分 (c) 可操作地连接。所述接头部分可以是共价键、化学接头或肽氨基酸序列,或能够连接衔接肽的靶向部分和配体部分的任何其它部分。

[0022] (a) 靶向部分

[0023] 针对其与目标分子以高亲和力和 / 或选择性结合的能力选择对本发明的靶向部分。在特定实施方式中,靶向部分以 100 纳摩尔或更低(例如,10nM 或更低、1nM 或更低、100pM 或更低、10pM 或更低或 1pM 或更低)的解离常数(KD)与目标分子特异性结合。在其它实施方式中,靶向分子表现出高选择性。“特异性结合”指的是所述部分识别目标分子并与目标分子相互作用,但是基本不识别和与样品如生物样品中的其它分子相互作用。在特定实施方式中,对于目标分子的靶向部分的结合亲和力比对于非目标分子的结合亲和力高至少 1000 倍(例如,高 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍或 10^7 倍)。

[0024] 可以针对其以高选择性和 / 或亲和力结合实际上任何目标分子的能力选择靶向部分。在特定实施方式中,靶向部分结合病原体相关的目标分子,包括但不限于来自病毒(例如, HAV、HBV 或 HCV、HIV、流感病毒)、细菌、酵母、寄生虫或真菌的表面蛋白质或抗原。在其它实施方式中,目标分子为细胞表面蛋白,包括但不限于来自感染的宿主细胞或肿瘤细胞的细胞表面抗原或受体。示例性的肿瘤相关抗原包括酪氨酸激酶家族的生长因子受体, p185HER2。在其它实施方式中,目标分子为激素或生长因子。示例性的激素或生长因子包括肿瘤坏死因子 α (TNF α) 或血管内皮生长因子 (VEGF)。在其它实施方式中,目标分子为抗体(例如,自身抗体)。

[0025] 在一个优选的实施方式中,本发明的靶向部分包含肽部分。肽靶向部分的长度理

想地为至少 3-200 个氨基酸,优选至少 3-100 个氨基酸,更优选 3-50 个氨基酸,再更优选 3-30 个氨基酸(例如,3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个氨基酸)。用作靶向部分的示例性的肽在 WO/2010014830 中描述,其全部内容在此通过引用引入。在优选的实施方式中,肽为包含任一个或多个下述氨基酸序列或由任一个或多个下述氨基酸序列组成的 VEGF- 结合肽或其 VEGF 结合部分:

[0026] SEQ ID NO. 1

[0027] H-Gly-Val-Gln-Glu-Asp-Val-Ser-Ser-Thr-Leu-Gly-Ser-Trp-Val-Leu-Leu-Pro-Phe-His-Arg-Gly-Thr-Arg-Leu-Ser-Val-Trp-Val-Thr

[0028] SEQ ID NO. 2

[0029] H-Gly-Gly-Phe-Glu-Gly-Leu-Ser-Gln-Ala-Arg-Lys-Asp-Gln-Leu-Trp-Leu-Phe-Leu-Met-Gln-His-Ile-Arg-Ser-Tyr-Arg-Thr-Ile-Thr

[0030] SEQ ID NO. 3

[0031] H-Gly-Val-Gly-Gly-Ser-Arg-Leu-Glu-Ala-Tyr-Lys-Lys-Asp-His-Arg-Val-Phe-Gln-Met-Ala-Trp-Leu-Gln-Tyr-Tyr-Trp-Ser-Thr-Thr;和/或

[0032] SEQ ID NO. 4

[0033] H-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Asn-Ala-Leu-His-Trp-Val-Cys-Ala-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-Arg-Thr-Pro-Trp-Ala-Gly-Gln-Leu-Trp-Gly-Leu-Val-Arg-Leu-Thr

[0034] 在其它实施方式中,本发明的靶向部分包含抗体,或其结合片段(例如,CDR(例如,CDRH3)、可变域(VH 或 VL)或 Fab 片段)。来自任何动物物种的任何抗体或其片段预期用于本文中描述的方法和组合物中。合适的抗体和抗体片段包括但不限于单链抗体(参见,例如,Bird 等(1988)Science 242:423-426;和Huston 等(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 85:5879-5883,其各全部内容在此引入作为参考)、域抗体(参见,例如,美国专利 6,291,158;6,582,915;6,593,081;6,172,197;6,696,245,其各全部内容在此引入作为参考)、纳米抗体(Nanobodies)(参见,例如,U. S. 6,765,087,其全部内容在此引入作为参考)和 UniBodies(参见,例如,WO2007/059782,其全部内容在此引入作为参考)。在一些实施方式中,抗体为阿昔单抗、阿达木单抗、阿仑珠单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、聚乙二醇塞妥珠单抗、达利珠单抗、依库珠单抗、依法利珠单抗、吉妥珠单抗、替伊莫单抗、英夫利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕尼单抗、兰尼单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗和/或戈利木单抗或其抗原结合片段。

[0035] 在其它实施方式中,本发明的靶向部分包含抗体样分子。合适的抗体样分子包括但不限于 Adnectins(参见,例如,WO 2009/083804,其全部内容在此引入作为参考)、亲和体(参见,例如,美国专利号 5,831,012,其全部内容在此引入作为参考)、DARpins(参见,例如,美国专利申请公开号 2004/0132028,其全部内容在此引入作为参考)、Anticalins(参见,例如,美国专利号 7,250,297,其全部内容在此引入作为参考)、Avimers(参见,例如,美国专利申请公开号 200610286603,其全部内容在此引入作为参考)和 Versabodies(参见,例如,美国专利申请公开号 2007/0191272,其全部内容在此引入作为参考)。

[0036] 在其它实施方式中,本发明的靶向部分包含用于细胞表面受体的配体,其中,所述配体能够将衔接分子募集到表达所述细胞表面受体的细胞。

[0037] 在其它实施方式中,本发明的靶向部分包含细胞表面受体或其片段的胞外部分,

其中,所述细胞表面受体或其片段能将衔接分子募集到所述细胞表面受体的同源配体。合适的细胞表面受体包括但不限于 TNF 家族受体(例如, TNF α 受体,例如,人 TNF α 受体)和酪氨酸激酶家族的生长因子受体(例如, p185HER2)。

[0038] 在一些示例性实施方式中,本发明的靶向部分包含 Fc 融合蛋白或免疫粘附素(immunoadhesin)(例如, TNF 受体 -Fc 融合体,如依那西普(Etanercept))。

[0039] (b) 配体部分

[0040] 本发明的配体部分包含通过受试者中存在的免疫粘附素(Fc 融合蛋白)结合的抗原域。在一些实施方式中,配体部分被循环抗体结合。循环抗体可由于天然获得性免疫力而在受试者中存在。可选择地,循环抗体作为受试者的在先免疫的结果而存在。例如,循环抗体可作为童年期对天花、麻疹、风疹、疱疹、肝炎和脊髓灰质炎疫苗接种的结果而存在。因此,配体部分可包含被这些循环抗体识别的一个或多个表位。

[0041] 然而,一些实施方式中,配体部分与已经施用于受试者的抗体相互作用。例如,与本发明的衔接分子的配体部分相互作用的抗体可以与衔接分子共施用。另外,与配体部分相互作用的抗体可能通常在受试者中不存在,但是所述受试者通过引入生物材料或抗原(例如,血清、血液或组织)从而在受试者中产生高滴度的抗体而已经获得该抗体。例如,经历输血的受试者获得多种抗体,其中一些抗体可与衔接肽的配体部分相互作用。

[0042] 配体部分可包含任何能结合抗体的化合物,包括但不限于肽、碳水化合物、脂质、抗体或抗体样分子。在一些实施方式中,配体部分(例如,肽、抗体或抗体样分子)可包含一个或多个非天然氨基酸。优选地,配体部分包含结合“高滴度抗体”的表位。本文中使用的术语“高滴度表位”指的是对于抗原(例如,抗原域上的表位)具有高亲和力的抗体。例如,在固相酶联免疫吸附分析(ELISA)中,高滴度抗体对应于血清样品中存在的抗体,所述抗体在将血清在适当的稀释缓冲液中稀释到约 1 : 100-1 : 1000 的范围后在该分析中保持阳性。其它的稀释范围包括 1 : 200-1 : 1000、1 : 200-1 : 900、1 : 300-1 : 900、1 : 300-1 : 800、1 : 400-1 : 800、1 : 400-1 : 700、1 : 400-1 : 600 等。在某些实施方式中,血清和稀释缓冲液之间的比例为大约 : 1 : 100、1 : 150、1 : 200、1 : 250、1 : 300、1 : 350、1 : 400、1 : 450、1 : 500、1 : 550、1 : 600、1 : 650、1 : 700、1 : 750、1 : 800、1 : 850、1 : 900、1 : 950、1 : 1000。

[0043] 在某些实施方式中,配体部分为从抗体的已知目标分子(例如,来自病原体、肿瘤细胞或感染的宿主细胞的表面蛋白)获得的抗原肽。肽配体部分的长度理想地在至少 3-200 个氨基酸之间,优选 3-100 个氨基酸之间,更优选 3-50 个氨基酸之间,再更优选 10-25 个氨基酸之间(例如,3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个氨基酸)。在一些实施方式中,肽由天然氨基酸组成。在其它实施方式中,肽包括一个或多个非天然氨基酸(例如,D-氨基酸)。

[0044] 在某些实施方式中,配体部分为糖基化配体部分。糖基化配体部分可包含由受试者中的抗体识别的抗原性糖或聚糖部分,或由受试者中的抗体识别的抗原性糖或聚糖部分组成。在一些实施方式中,糖基化配体部分与衔接分子的靶向部分直接或间接(即,通过接头部分)连接。这种配体部分缺少抗原性肽部分。在其它实施方式中,糖基化配体部分为包含额外抗原性肽元件(例如,包含病原体的肽或表位的抗原域)的糖肽。

[0045] 示例性的糖基化配体部分源自血型抗原。这些抗原通常为位于红细胞细胞膜外侧

的表面标志物。这些表面标志物大多数为蛋白质,然而,一些是与脂质或蛋白质结合的碳水化合物。结构上,可以用于本文中描述的实施方案的血型决定簇分为两个基本类别,称为 I 型和 II 型。I 型包含由与 N-乙酰葡萄糖胺连接的半乳糖 1-3 β 组成的主链,而 II 型包含在相同的构件块之间的 1-4 β 连接。这些主链结构的岩藻糖基化位置和程度产生路易斯型 (Lewis-type) 和 H-型特异性。例如,仅在主链中的半乳糖部分中的 C2-羟基处存在 α -单岩藻糖基支链构成 H-型特异性 (I 和 II 型),而通过 α -连接的半乳糖或 α -连接的 N-乙酰半乳糖胺的取代的进一步排列提供了为人熟知的血清学血型分类 A、B 和 O 的分子基础。通过首先确定患者特定血型抗原集,人们可以选择包含患者全部类型以外的一个或多个血型抗原的配体部分,以产生对包含这个配体部分的衔接分子的强效反应且因而将患者中存在的抗体重定向至由所述衔接分子的靶向部分结合的目标分子。示例性的血型抗原在美国专利号 7,318,926 的表 2 中详细描述,其全部内容在此通过引用引入。

[0046] 在某些优选的实施方案中,糖基化配体部分包含 gal 抗原的一个或多个 gal- α -1-3gal 二糖糖单元。gal 抗原通过糖基化酶半乳糖基转移酶 (α (1,3)GT) 在猪、小鼠和新世界猴的细胞表面上大量产生。由于人和旧世界灵长类缺乏 gal 抗原,他们对 gal 抗原没有免疫耐受且在整个生命过程中响应于胃肠道细菌的抗原刺激产生抗 gal 抗原抗体 (抗 Gal)。已经估计抗 gal 抗体代表人体中超过 2% 的循环 IgG 和 1-8% 的循环 IgM。抗 Gal 与供体器官的内皮细胞表面的糖脂和糖蛋白上表达的 gal 抗原的结合导致补体级联的活化和超急性排斥,并且在补体依赖的迟发性异种移植物排斥的发生中起重要作用。因此,gal 抗原具有产生强效免疫反应的能力。

[0047] 在某些优选的实施方案中,待结合或并入衔接分子中的糖基化配体部分基本上由一个或多个 Gal- α (1-3)-Gal 二糖糖单元组成,并且缺少 Gal 抗原的任何剩余部分 (例如, GlcNac 或 Glc)。例如,一个或多个 Gal- α (1-3)-Gal 二糖可以通过在二糖单元的还原端的游离羟基 (例如,不参与糖苷键的 C1 碳的羟基) 连接衔接分子的靶向部分。在某些实施方案中, Gal 二糖在游离羟基处通过间隔体部分 (例如, C1-C6 烷基间隔体) 与靶向部分连接。不限于任何特定理论,据认为 Gal 抗原的 Gal- α (1-3)-Gal 二糖部分优先与抗 -Gal 抗体连接,但是对凝集素 (例如,半乳糖凝集素 -3 (Galectin-3)) 或与 Gal 抗原的其它部分 (例如, Gal- β (1-4)-GlcNAc 部分) 结合的其它分子显示出有限的结合。在其它实施方案中,待结合或并入衔接分子的糖基化配体部分包含 Gal 抗原的额外糖残基。例如,可以并入 gal 抗原的一个或多个三糖 (Gal- α (1-3)-Gal- β (1-4)-GlcNAc 或 Gal- α (1-3)-Gal- β (1-4)-Glc)、四糖 (Gal- α (1-3)-Gal- β (1-4)-GlcNAc- β (1-3)-Gal) 或五糖 (Gal- α (1-3)-Gal- β (1-4)-GlcNAc- β (1-3)-Gal- β (1-4)-Glc) 单元。

[0048] 在某些实施方案中,待结合或并入到衔接分子的 gal 抗原选自 gal- α -(1,3)gal 系列的新糖蛋白并可包括 Gal α 1-3Gal-BSA(3-原子间隔体)、Gal α 1-3Gal-BSA(14-原子间隔体)、Gal α 1-3Gal-HSA(3-原子间隔体)、Gal α 1-3Gal-HSA(14-原子间隔体)、Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-BSA(3-原子间隔体)、Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-BSA(14-原子间隔体)、Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-HSA(3-原子间隔体)、Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-HSA(14-原子间隔体)、Gal α 1-3Gal-五糖-BSA(3-原子间隔体) 等。在其它实施方案中,gal 抗原可以选自 gal α (1,3)gal 类似物新糖蛋白,包括 Gal α 1-3Gal β 1-4Glc-BSA(3-原子间隔体)、Gal α 1-3Gal β 1-4Glc-HSA(3-原子间隔

体)、Gal α 1-3Gal β 1-3GlcNAc-BSA(3-原子间隔体)、Gal α 1-3Gal β 1-3GlcNAc-HSA(3-原子间隔体)、Gal α 1-3Gal β 1-4(3-脱氧GlcNAc)-HSA(3-原子间隔体)、Gal α 1-3Gal β 1-4(6-脱氧GlcNAc)-HAS等。

[0049] 在再其它实施方式中, Gal 抗原的肽模拟物可以并入本发明的衔接分子中。示例性的肽模拟物包括 α Gal-连接的糖肽 Gal- α -YWRV、Gal- α -TWRV 和 Gal- α -RWRV。其它肽模拟物可使用 Xian 等(参见 J. Comb. Chem., 6:126-134(2004), 此处引入作为参考)的方法通过筛选 α Gal 糖肽的随机化文库的抗-Gal 抗体结合活性来进行鉴定。

[0050] Gal 抗原, 或其肽模拟物, 可以使用任何本领域公认的方式与靶向部分(共价和/或非共价地)连接。本领域公认的非共价连接包括生物素-亲和素或生物素-抗生物素连接和其它高亲和力结合伴侣(例如, 亮氨酸拉链等)。共价连接的合适方式包括但不限于图 4 中和在此处通过引用全部引入的美国专利申请号 20100183635 中所述的那些。例如, gal 抗原(或肽模拟物)可以通过合成化学接头与多肽靶向部分的多肽骨架直接连接。示例性的合成化学接头包括双功能接头部分, 例如具有马来酰亚胺官能性的接头。例如, 双功能接头部分可以通过靶向部分中的氨基和配体部分中的硫醇部分连接靶向部分和配体部分, 反之亦然。在一个示例性实施方式中, 马来酰亚胺接头(例如, 硫代-SMCC)用于将多肽靶向部分的半胱氨酸残基连接到氨基修饰的 Gal 抗原(例如, 图 5 的 B_{di}-(CH₂)₃-NH₂)的氨基上。额外地或可选择地, gal 抗原可与糖蛋白靶向部分的 N-连接的寡糖连接。在一些实施方式中, 一个或多个 Gal 抗原(例如, gal- α -(1,3)gal)或其肽模拟物连接到目标部分上的单一位点。在其它实施方式中, 一个或多个 Gal 抗原(例如, gal- α -(1,3)gal)或其肽模拟物连接到目标部分上的多个位点。在某些实施方式中, 对接头部分进行化学修饰以降低酶促降解或化学降解。

[0051] 如本文中披露的包含 Gal 抗原的衔接分子是特别有利的, 因为其不明显活化嗜碱性粒细胞, 且因此在向受试者施用时不引起 IgE 介导的超敏反应。尽管如此, 在一些实施方式中, 对本发明的衔接分子活化嗜碱性粒细胞的能力进行测定。用于测定嗜碱性粒细胞活化的合适分析方法是本领域已知的(参见, 例如, J. Allergy Clin Immunol (2002) 110102-9, 此处全部引入作为参考)。

[0052] 在某些实施方式中, 配体部分包含聚合的结合分子, 其中单体不是氨基酸。

[0053] 在某些示例性实施方式中, 高亲和力衔接分子选自由下组:

[0054] (a)H-Gly-D-Val-D-Gln-D-Glu-D-Asp-D-Val-D-Ser-D-Ser-D-Thr-D-Leu-Gly-D-Ser-D-Trp-D-Val-D-Leu-D-Leu-D-Pro-D-Phe-D-His-D-Arg-Gly-D-Thr-D-Arg-D-Leu-D-Ser-D-Val-D-Trp-D-Val-D-Thr-PEG₂-Cys-X-Y;

[0055] (b)H-Gly-Gly-D-Phe-D-Glu-Gly-D-Leu-D-Ser-D-Gln-D-Ala-D-Arg-D-Lys-D-Asp-D-Gln-D-Leu-D-Trp-D-Leu-D-Phe-D-Leu-D-Met-D-Gln-D-His-D-Ile-D-Arg-D-Ser-D-Tyr-D-Arg-D-Thr-D-Ile-D-Thr-PEG₂-Cys-X-Y;

[0056] (c)H-Gly-D-Val-Gly-Gly-D-Ser-D-Arg-D-Leu-D-Glu-D-Ala-D-Tyr-D-Lys-D-Lys-D-Asp-D-His-D-Arg-D-Val-D-Phe-D-Gln-D-Met-D-Ala-D-Trp-D-Leu-D-Gln-D-Tyr-D-Tyr-D-Trp-D-Ser-D-Thr-D-Thr-PEG₂-Cys-X-Y;和

[0057] (d)H-Gly-D-Ser-Gly-D-Ser-Gly-D-Asn-D-Ala-D-Leu-D-His-D-Trp-D-Val-D-Cys-D-Ala-D-Ser-D-Asn-D-Ile-D-Cys-D-Trp-D-Arg-D-Thr-D-Pro-D-Trp-D-Ala-Gly-D-Gln

-D-Leu-D-Trp-Gly-D-Leu-D-Val-D-Arg-D-Leu-D-Thr-PEG2-Cys-X-Y ;

[0058] 其中, X 为具有马来酰亚胺官能性的双功能化学接头;以及 Y 为氨基修饰的 Gal-1-3-Gal 二糖。

[0059] (c) 修饰的衔接分子

[0060] 可以对本发明的衔接分子的一个或多个部分进行修饰。在某些实施方式中,对衔接分子的肽部分进行修饰。例如,衔接分子的肽部分可以进行修饰以包括非天然氨基酸,如在此处引入作为参考的美国专利号 6,559,126 中描述的那些。例如本发明的肽可以由一个或多个,或最优选地所有,为 D- 型光学异构体的氨基酸组成。这些 D- 肽相对于抗体和其它蛋白质治疗剂有几种好处。D- 肽的较小尺寸和较高稳定性使其更容易配制成用于经肺、局部和经口递送。D- 肽也已知为弱免疫原 (Dintzis 等, (1993) PROTEINS :Structure, Function, and Genetics 16,306-308)。此外,与其它肽类药物相比,D- 肽对酶降解的抗性以及其与聚合物结合的能力导致了增强的药代动力学。而且, D- 肽具有降低的生长成本,这一优势可以传导到消费者。

[0061] 也可以通过多种标准化学方法对衔接分子的肽成分进行修饰(例如,可以用保护基对氨基酸进行修饰;可以将羧基末端氨基酸形成为末端酰胺基团;可以用基团修饰氨基末端残基以,例如增强亲脂性;或可以将多肽化学糖基化或以其它方式进行修饰以增加稳定性或体内半衰期)。可以将本发明的衔接分子设计为包括促进溶解性的化学修饰或特定的氨基酸序列。例如,在一些实施方式中,可以将肽部分合成为在 N- 末端或 C- 末端区域包括氨基酸 DDD 或 KKK。额外地或可选择地,可以将肽或其它靶向部分合成为例如在 N- 末端和 / 或 C- 末端区域包括 PEG 化部分。示例性 PEG 化部分包括 PEG₂-NH₂ 和 PEG₂-Cys-NH₂ 部分。

[0062] 本发明也包含本文中描述的序列的“保守序列修饰”或“保守氨基酸修饰”,即不显著影响或改变由核苷酸序列编码的或包含该氨基酸序列的肽的结合性质的氨基酸序列修饰。这种保守序列修饰包括核苷酸和氨基酸置换、添加和缺失。也可以通过本领域已知的标准技术,如定点诱变和 PCR- 介导的诱变将修饰引入到序列中。在一些实施方式中,通过合理设计选择修饰,并且通过如本文中描述的化学合成产生设计的肽。“保守氨基酸修饰”包括作为其中氨基酸残基被具有相似侧链(例如,相似的尺寸、形状、电荷、化学性质包括形成共价键或氢键的能力等)的氨基酸残基替代的置换的保守氨基酸置换。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、β- 分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。

[0063] 本发明的肽或其模拟物可以通过一个或多个置换进行修饰,特别是在预期不与目标蛋白相互作用的蛋白质部分中。预期肽中多至 5%、10%、20%、30%、40%、50% 或甚至 50% 以上的氨基酸可以通过保守置换改变而基本上不改变蛋白质对目标蛋白的亲合力。可能的是这种变化改变多肽的体内免疫原性,且在免疫原性降低的情况中,这种变化是希望的。可以在本发明的肽分子结构中进行的类似置换的另外的非限制性实例包括用 D- 酪氨酸、D- 吡啶基丙氨酸或 D- 高苯丙氨酸置换 D- 苯丙氨酸、用 D- 缬氨酸或其它具有脂族侧链

的天然或非天然氨基酸置换 D-亮氨酸和 / 或用 D-亮氨酸或其它具有脂族侧链的天然或非天然氨基酸置换 D-缬氨酸。在一些实施方式中,保守氨基酸置换单独,即没有氨基酸缺失或添加,是氨基酸修饰的优选类型。本领域技术人员将理解这种修饰或置换可以在 DNA 水平进行,因此编码改变的或取代的肽,或他们可以在蛋白质水平进行,例如通过直接化学合成。

[0064] 在一些实施方式中,可以将衔接分子的肽或肽部分制成环状。这种“环肽”具有连接两个氨基酸的分子内连接。环肽常常对蛋白水解降解具有抗性,且因此是用于经口施用的良好候选物。分子内连接可以包含中间连接基团或可以涉及氨基酸残基之间的直接共价键合。在一些实施方式中,N-末端和 C-末端氨基酸连接。在其它实施方式中,一个或多个内部氨基酸参与环化。其它本领域已知的方法可用于环化本发明的肽。例如,可以通过侧链叠氮-炔 1,3-偶极环化加成反应形成环肽 (Cantel 等, *J. Org. Chem.*, 73(15), 5663-5674, 2008, 此处引入作为参考)。例如,也可以通过此处引入作为参考的美国专利号 5596078 ;4033940 ;4216141 ;4271068 ;5726287 ;5922680 ;5990273 ;6242565 ;以及 Scott 等, *PNAS*. 1999. vol. 96 no. 24 第 13638-13643 页公开的方法实现肽的环化。在一些实施方式中,分子内连接可以是二硫键模拟或保持另外通过二硫键产生的结构的二硫键模拟物。

[0065] 在一些特别优选的实施方式中,肽的环化通过分子内二硫键发生。在一些优选的实施方式中,分子内二硫键的形成增加了肽的亲合力。因此,可以在选择之前或选择期间在允许二硫键形成的条件下(例如,氧化条件)进行用于选择和 / 或亲和纯化本发明的肽或其模拟物的方法。在一些特别优选的实施方式中,二硫键可以在天然存在于文库或肽中的半胱氨酸残基之间形成,或在一轮或多轮选择过程中通过突变方法将二硫键引入。在其它实施方式中,可以将肽设计为在特定位置包含半胱氨酸残基,以使得可以知道哪个残基参与二硫键。可以通过本领域已知的方法(例如,美国专利号 4572798 ;6083715 ;6027888, 和 WIPO 公开 WO/2002/103024, 此处引入作为参考)诱导半胱氨酸残基之间的分子内二硫键键合。

[0066] 在一些实施方式中,二硫键的形成(或通常环化的或分子内连接的结构形成)赋予肽对目标结合重要的特定结构。因此,优选二硫键和 / 或环化在肽选择之前形成,以使得可以选择由键形成产生的潜在有利的结构。在一些实施方式中,本发明的肽或其模拟物可以具有多于一个、两个、三个或更多的二硫键。可以使用本领域已知的产生和选择具有分子内二硫键、分子内二硫键替代物或其它分子内连接的肽的其它方法。例如,此处引入作为参考的 W003040168 中描述的方法描述了产生和选择肽适体、conotides 和其它环化肽的方法,在一些实施方式中,这些适体、conotides 和其它环化肽可以用于本发明的方法中。

[0067] 在相关的实施方式中,可以通过化学交联或其它肽稳定的方法保持或模仿对结合有益的肽构象或结构(例如,增加结合亲和力)。例如,可以通过化学处理或反应稳定由二硫键形成的有益的肽构象或结构,从而使得在没有二硫键的情况下保持所述结构。确实,无论二硫键是否原始存在,都可以采用肽稳定技术稳定本发明的肽。例如,此处引入作为参考的 Jackson 等, *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 9391-9392 ;Phelan 等, *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 455-460 ;Bracken 等, *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 6431-6432 中描述的技术可以用于稳定本发明的肽或肽部分。

[0068] 可以使用其它稳定肽和肽结构的方法,例如,通过邻烯丙基丝氨酸残基的螺旋的

烯属交联 (Blackwell, H. E. ;Grubbs, R. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* 1998, 37, 3281-3284, 此处引入作为参考)、所有烃交联 (Schafmeister 和 Verdine *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122(24), 5891-5892, 此处引入作为参考) 和美国专利号 7183059 (此处引入作为参考) 中公开的方法。Blackwell 等和 Schafmeister 等中公开的方法可以被描述为产生“装订 (stapled)”肽, 即共价锁定在特定构象状态或二级结构中的肽, 或具有将肽具有形成特定构象或结构的倾向的特定分子内共价连接的肽。如果如此处理的肽倾向于例如, 形成对目标结合重要的 α -螺旋, 那么用于结合的能量阈值将降低。这种“装订”肽已经显示对蛋白酶具有抗性, 并且也可以被设计为更有效地跨过细胞膜 (也参见 Walensky 等, *Science* 2004 :Vol. 305. no. 5689, 第 1466-1470 页 ;Bernal 等, *J Am Chem Soc.* 2007, 129(9) :2456-7, 此处引入作为参考)。因此, 本发明的肽或肽部分可以被装订或以其它方式修饰以将它们锁定在特定构象形状中或者它们可以被修饰为倾向于有利于结合的特定构象或二级结构。预计这种肽修饰可以在肽选择之前发生, 以使得也可以对任何构象限制的益处进行选择。可选择地, 在一些实施方式中, 可以在选择之后进行修饰以保留已知有益于结合的构象或进一步增强肽候选物。

[0069] 在其它实施方式中, 可以对衔接分子的配体部分进行修饰。可以进行所述修饰, 例如以通过干扰分子最小化竞争结合或降低配体部分的酶促降解或化学降解 (例如, 在生理条件下)。如文中使用的, 术语“干扰分子”指的是与循环抗体竞争结合衔接分子并 (例如, 通过从循环中快速清除衔接分子) 阻止发挥其预期的治疗效应的结合分子 (例如, 循环或细胞表面受体)。例如, 糖基化配体可以包含已经被化学修饰以通过抗 -Gal 抗体增强优先的结合而同时通过凝集素 (例如, 半乳糖凝集素 -3) 或其它干扰分子最小化不期望的结合的 gal 抗原或模拟物。额外地或可选择地, 糖基化配体部分可包含已经被化学修饰, 例如以降低酶促降解或化学降解或促进共价连接的 gal 抗原或模拟物。示例性的修饰包括例如, 通过脱水偶联、还原胺化或例如用半乳糖氧化酶的酶促氧化, 在 gal 抗原的糖残基上的反应性羟基上添加生物学惰性保护基团。可以将保护性基团加入到 Gal 表位的末端 Gal 残基的 C-6' OH 上 (参见, 例如 Andreana 等, *Glycoconjugate J.*, 20 :107-118(2004))。示例性的保护基团包括胺 (例如, 氨基吡啶) 和胍取代基 (例如, O-Me-胍、O-Et-胍、O-tBu-胍、O-Bn-胍和 O-烯丙基-胍)。可选择地, 极性 C-6' OH 基团可以被非极性氢替代以形成 6-脱氧- α -Gal 衍生物 (参见 Janczuk 等, *Carbohydrate Research*, 337 :1247-1259(2002), 此处引入作为参考)。在某些示例性实施方式中, Gal 表位可以用氨基修饰物 (例如, 烷基-NH₂取代基) 进行修饰 (例如, 在 C-10H) 以促进与靶向部分的连接。然后可以使用本领域公认的方法 (例如, ELISA) 评价抗 -Gal 抗体与修饰的 gal 抗原的结合。

[0070] (d) 多价衔接分子

[0071] 预期可以将文中公开的种类的多种肽或肽部分连接以产生具有增加的亲合力或结合价的复合衔接分子。同样, 衔接分子的肽或肽部分可以与多种其它多肽连接, 例如荧光多肽、靶向多肽和具有明显不同治疗效果的多肽。

[0072] II. 用于鉴定高亲和力衔接分子的方法

[0073] 在某些方面, 本发明提供了用于鉴定具有高结合亲和力或选择性的衔接分子的方法。本发明的方法包含 (i) 至少一个选择步骤以鉴定高亲和力靶向部分 (例如, 靶向肽部分和/或配体肽部分), 和 (ii) 连接步骤, 其中衔接分子的靶向部分和配体部分连接以形成

衔接分子。

[0074] 在某些实施方式中,本发明的方法利用核糖体展示或 mRNA 展示作为选择步骤以鉴定衔接分子的一个或多个靶向部分。核糖体展示和 mRNA 展示方法的一般综述由此处全部引入作为参考的 Lipovsek 和 Pluckthun (*J. Immunological Methods*, 290 :51-67 (2004)) 提供。在优选的实施方式中,使用 mRNA 展示鉴定衔接分子的靶向部分(例如,肽靶向部分)。示例性 mRNA 展示方法在图 2 中描述。简要地,通过例如直接 DNA 合成或通过体外或体内诱变获得起始文库。然后将双链 DNA 文库体外转录(例如,使用 T7 聚合酶)并连接到嘌呤霉素样接头上。进行体外翻译,其中嘌呤霉素样接头与新生的翻译产物反应。在纯化后,得到高度多样化($\sim 10^{13}$)的肽-mRNA 融合分子文库。反转录产生与转录的肽共价连接的 cDNA/RNA 杂交体。然后通过使用目标分子(在靶向肽部分的情况下)或抗体(在配体肽部分的情况下)对这个复合物进行选择。对结合目标或抗体分子的肽(例如,在严格洗涤条件下)进行选择,以及方便地将 cDNA 洗脱以鉴定选择的肽。所述选择可以进行多次以鉴定高亲和力的结合物。应当注意,在选择过程中,可以在使得在肽中存在分子内二硫键的条件下进行所述选择方法。在其它实施方式中,如果需要,可以阻止二硫键的形成。

[0075] 在额外的或替代的实施方式中,本发明的方法利用噬菌体展示和/或酵母展示技术作为选择步骤以鉴定衔接分子的一个或多个靶向(例如,肽)部分。这种文库筛选方法的非限制性实例在例如,各在此处全文引入作为参考的美国专利号 7,195,880 ;6,951,725 ;7,078,197 ;7,022,479 ;5,922,545 ;5,830,721 ;5,605,793 ;5,830,650 ;6,194,550 ;6,699,658 中描述。

[0076] 在其它实施方式中,本发明的方法利用合成肽文库。这类合成肽可以化学合成或酶学产生(例如,通过 RNA 的体外翻译或通过预先存在的蛋白质的酶促消化)。在一些实施方式中,合成肽文库在固相基质(例如,载玻片)上排列。

[0077] 在某些实施方式中,本发明的方法利用编码与已知与特定目标或抗体分子相互作用的较大多肽的部分对应的随机化肽的 mRNA 文库(例如, mRNA 展示文库)。示例性 mRNA 展示文库在图 3 中描述。例如,肽文库可以包含线性肽分子的群体,其中肽的氨基酸序列在分子内的一个或多个氨基酸位置(优选至少 10 个或多个氨基酸位置)是随机化的。这种肽序列的随机化部分的侧翼可以为来自母体多肽的一个或多个恒定区域。

[0078] 在某些实施方式中,本发明的方法包括提供编码候选靶向部分(例如,或肽或多肽)的随机化群体的 mRNA 展示文库。以举例的形式,靶向肽可以为源自可溶性配体,例如 VEGF,的随机化肽。可以通过从文库中筛选肽-mRNA-cDNA 融合体选择高亲合力靶向肽。优选进行多个选择循环以富集结合目标分子(例如,VEGF 受体)的分子群体。通过降低各个选择步骤中目标分子的浓度,可以在群体中进一步富集以最高亲合力结合目标分子的肽。各个选择步骤中可以利用的额外的选择过程包括:(1)反选择以消除非特异性肽;(2)竞争洗脱以鉴定点特异性肽;(3)以及在特定溶液条件(例如,高严格洗涤条件)下选择以鉴定稳定肽。

[0079] 在某些实施方式中,在选择之前对文库成员进行修饰以包括能与接头(例如,双功能接头)反应以形成连接部分的偶联部分。在其它实施方式中,在选择步骤后用偶联部分修饰文库成员以促进与连接部分的连接。示例性的偶联部分包括能与马来酰亚胺官能性的双功能接头反应的末端氨基酸(例如,C-或 N-末端半胱氨酸或半胱氨酸类似物)或氨

氨基酸侧链（例如，半胱氨酸或半胱氨酸类似物侧链）。

[0080] 一旦已经鉴定了高亲合力靶向部分，肽就可以通过连接部分与预选择的配体部分连接，从而产生转接分子。在某些实施方式中，已经使用 mRNA 展示方法对配体部分进行预选择。可选择地，可以将靶向部分作为恒定区域插入编码候选配体的随机化群体的第二 mRNA 展示文库中。然后可以对这个第二 mRNA 展示文库进行进一步选择步骤，其中相对抗体对文库成员进行筛选以鉴定衔接分子。因此，候选配体优选对应于抗体配体的部分（例如，表位）。在一个实施方式中，抗体配体部分可以为抗体结合的抗原表位。在另一个实施方式中，抗体配体部分可以为第二抗独特型抗体所结合的第一抗体的独特位 (idiotope)。在又一个实施方式中，抗体配体部分可以为 Fc 结合蛋白（例如，Fc 受体）的 Fc 结合部分。

[0081] 选择了以高亲合力和 / 或选择性结合目标分子和抗体分子的衔接分子后，可以评价衔接分子重定向抗体特异性至目标分子的能力。例如，其中目标分子为细胞表面分子，可以使用本领域公认的技术评价衔接分子诱导效应子功能（例如，抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)）和细胞杀伤的能力。

[0082] 在再其它实施方式中，文库成员在选择步骤之前与配体部分连接。例如，待筛选的文库的各成员可以用 Gal 抗原衍生化，然后进行筛选步骤以鉴定高亲和力衔接分子。所述 Gal 抗原可以与各肽的末端氨基酸或氨基酸侧链连接。

[0083] 在再其它实施方式中，可以利用反复选择方法，其中在第一选择步骤中（或第一系列的选择步骤中）选择靶向部分，以及将靶向部分的序列并入到 mRNA-肽融合体的恒定区域中，以利于第二选择步骤（或第二系列的选择步骤）中配体部分的选择。例如，在连续轮的选择中交替进行第一和第二选择步骤（或系列选择步骤）以鉴定高亲和力衔接分子。

[0084] III. 用于合成高亲和力衔接分子的方法

[0085] 一旦使用本文中描述的方法鉴定了高亲和力衔接分子的成分，它们就可以使用本领域已知的标准方法制备。例如，可以通过重组 DNA 方法，将编码多肽的核酸序列（例如，cDNA）插入重组表达载体中并在促进表达的条件下表达所述 DNA 序列制备所述肽。用于核酸操作的一般技术在例如，此处引入作为参考的 Sambrook 等，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ed., 1989, 或 F. Ausubel 等，*Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing and Wiley-Interscience; New York, 1987) 和定期更新中有描述。用于细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主的合适的克隆和表达载体可以在 *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, (Elsevier, New York, 1985) 中找到，其相关公开内容在此处引入作为参考。其它重组 DNA 方法在此处引入作为参考的美国专利号 4356270、4399216、4506013、4503142、4952682、5618676、5854018、5856123、5919651 和 6455275 中描述。

[0086] 也可以使用本领域公知的技术，通过化学合成制备衔接分子及其成分。例如，可以在涉及使用合适的保护基的固相合成方法中使用逐步添加 D-氨基酸来合成 D-肽。通常用于 L-肽的固相肽合成技术在其全部在此处引入作为参考的 Meinhofer, *Hormonal Proteins and Peptides*, vol. 2, (New York 1983); Kent 等, *Ann. Rev. Biochem.*, 57:957 (1988); Bodanszky 等, *Peptide Synthesis*, (2d ed. 1976); Atherton 等, (1989) Oxford, England: IRL Press. ISBN 0199630674; Stewart 等, (1984) 第二版, Rockford: Pierce Chemical Company, 91. ISBN 0935940030 和 Merrifield (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 中描

述。用于固相合成 D-肽的 D-氨基酸可以从多种商业来源获得。D-肽和包含混合的 L-和 D-氨基酸的肽是本领域中已知的。同样,已经合成了专门包含 D-氨基酸的肽(D-肽)。参见 Zawadzke 等, J. Am. Chem. Soc., 114:4002-4003(1992); Milton 等, Science 256:1445-1448(1992)。本领域已经描述了制备 D-肽的其它方法,并且可以至少在此处引入作为参考的 WIPO 公开号 WO/1997/013522 和美国申请号 60/005,508 中找到。

[0087] 可以通过蛋白质化学领域中一般已知的蛋白质分离/纯化方法纯化本发明的肽。非限制性实例包括萃取、重结晶、盐析(例如,用硫酸铵或硫酸钠)、离心、透析、超滤、吸附色谱、离子交换层析、疏水层析、正相色谱、反相色谱、凝胶过滤、凝胶渗透色谱、亲和层析、电泳、逆流分布或其任何组合。纯化后,可以通过本领域已知的多种方法中任一种将所述肽交换到不同的缓冲液中中和/或浓缩,所述方法包括但不限于过滤和透析。纯化的多肽是优选至少 85%或 90%纯的,更优选至少 93%或 95%纯的,以及最优选至少 97%、98%,或 99%纯的。不管纯度的确切数值,肽足够纯以用作药用产品。

[0088] 实施例

[0089] 本公开进一步通过附图和下述实施例(其不应解释为进一步限制)进行说明。本申请中引用的所有附图和所有参考文献、专利和公开专利申请的内容在此全部通过引用引入。

[0090] 实施例 1. 选择高亲和力抗-VEGF 肽作为靶向部分以及与 α Gal 配体部分结合

[0091] 使用附图 2 中描述的 mRNA 展示方法,对随机化肽序列的文库进行与 VEGF 的高亲和力结合的筛选。选择了四个高亲和力抗-VEGF 肽序列(SEQ ID NO 1-4)。各肽在 C-末端以 PEG₂-NH₂ 或 PEG₂-Cys-NH₂ 部分 PEG 化(参见附图 4)以促进与 Gal 抗原(Bdi-(CH₂)-NH₂, 二糖)的化学偶联。

[0092] 为促进各肽与 Gal 二糖的化学结合,采用了具有马来酰亚胺和硫代-NHS 官能性的双功能接头(硫代-SMCC, PIERCE)。所述接头与二糖中存在的氨基和肽的 C-末端半胱氨酸残基的巯基(sulf hydroxy)中的马来酰亚胺官能性反应。为了获得期望的化合物和避免任何进一步的反应和副产物的形成,将反应物在温育后立即进行 RP-HPLC 纯化。对反应物的量的比率进行优化以避免副产物的形成。在示例性合成中,将 6mg 二糖化合物 B_{di}-(CH₂)-NH₂(~ 15 μ mol) 溶解于 100 μ l 含 20% MeCN 的 0.1M HEPES 缓冲液中, pH 6.0; 将 1.3mg 硫代-SMCC 接头(~ 3 μ mol) 溶解于 100 μ l 含 20% MeCN 的 0.1M HEPES 缓冲液中, pH 6.0; 并将两种溶液混合和在反应管连续转动条件下在室温下温育 30 分钟。将 1mg 肽 07-090(07-090; 冻干粉, TFA 加合物, M. W. 3474g/mol; ~ 320nmol) 溶解于 1ml H₂O/MeCN 80:20% 中。制备后澄清肽溶液立即加入到接头-二糖溶液中,并在室温下在反应管连续转动条件下额外温育 90 分钟。将反应混合物置于冰上并将等分试样在 RP-HPLC-C18 柱上分析。通过在在 0~50%; 缓冲液 A:H₂O/5% MeCN, 0.1% TFA, 缓冲液 B:H₂O/5% MeCN, 0.1% TFA 的 HPLC 梯度下运行对期望的化合物(B_{di}-(CH₂)-NH-接头-S-07-090-肽)进行纯化。HPLC 级分在用 65% 甲醇、0.5% 甲酸稀释后通过 ESI-TOF-MS 进行分析,并对产物级分进行鉴定。相关的产物峰级分在 -80°C 冷冻,并随后冻干至完全干燥以包含期望的化合物。

[0093] 实施例 2. 抗-VEGF-特异衔接分子可以重定位天然抗- α Gal 抗体至 VEGF

[0094] 设计了分析方法以测试 α Gal-连接的抗-VEGF 肽重定向特异于 α Gal 的天然抗体以结合 VEGF 的能力。该分析方法用固相上的重组 VEGF 设计。然后将系列稀释的

α Gal- 连接的抗 -VEGF 肽与 rVEGF 一起温育,接着与含高水平抗 α Gal 的来自小鼠的血清一起温育。然后用酶联抗小鼠抗体指示结合的抗 α Gal 的量。通过加入显色底物指示酶的存在以及通过测定 490nm 处的光密度测量颜色的增加。图 8 中显示的数据清楚表明,由于肽量或抗血清量的降低导致光密度的降低, α Gal- 连接的抗 -VEGF 肽可以重定向天然抗 - α Gal 抗体至 VEGF。

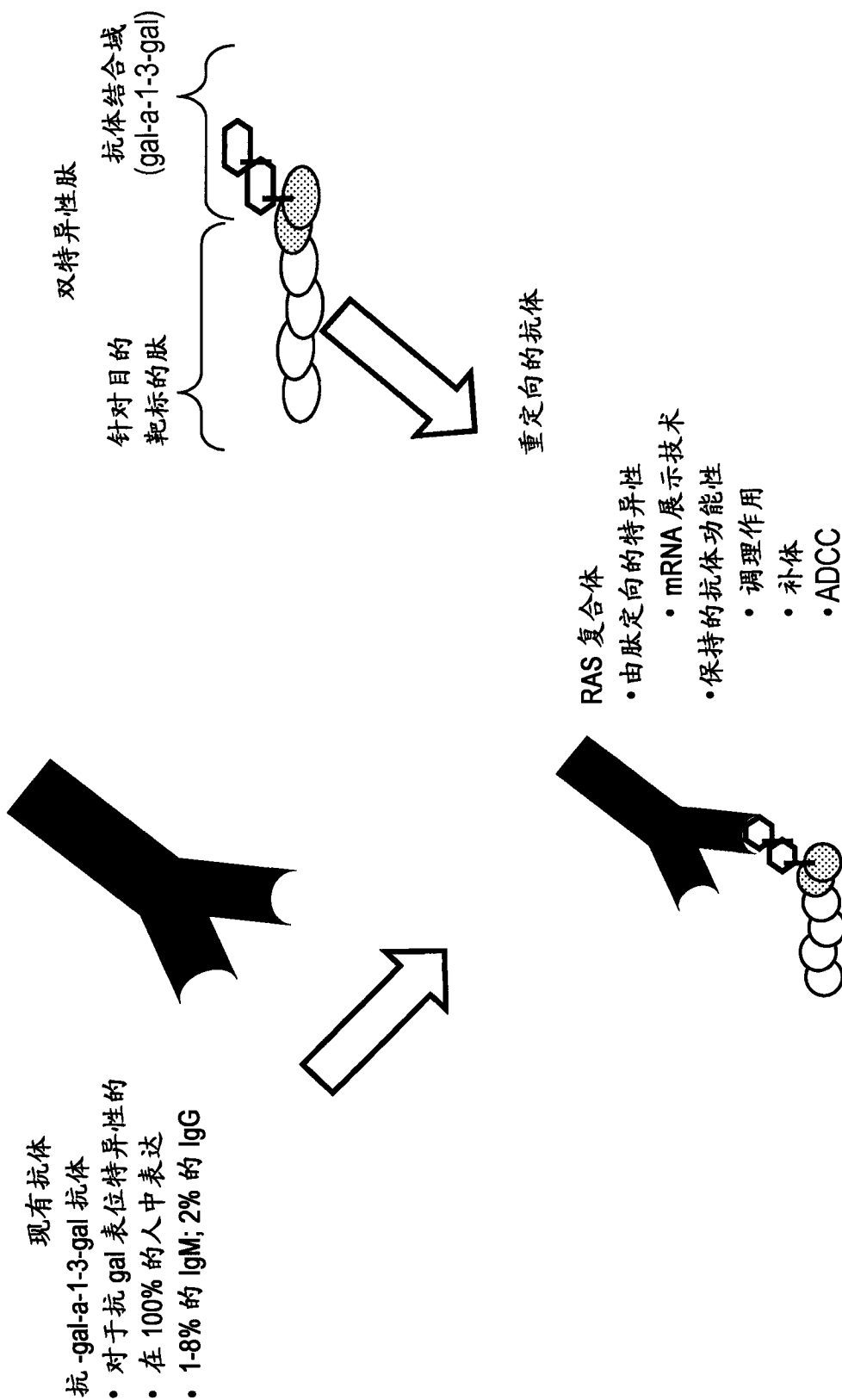


图 1

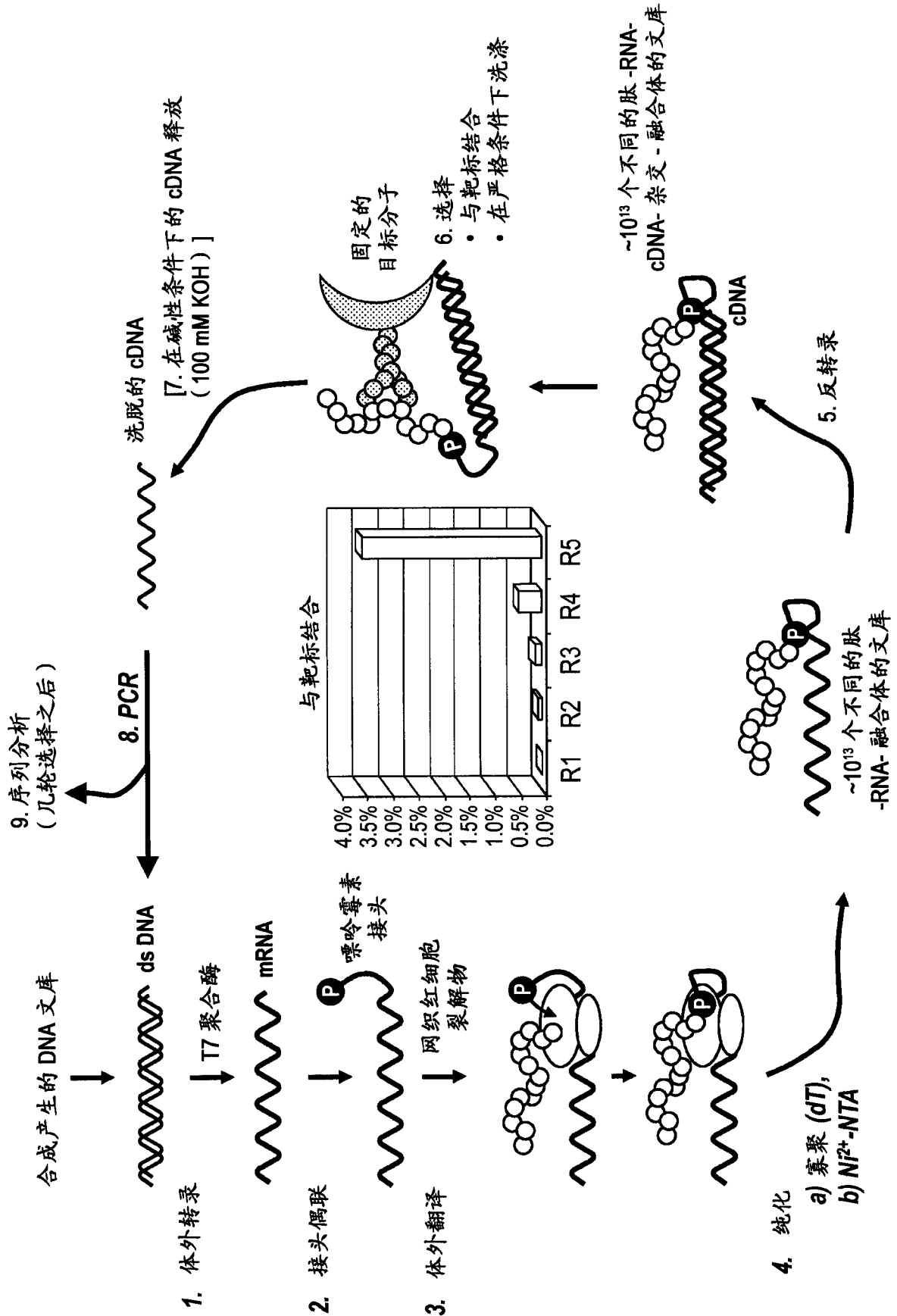
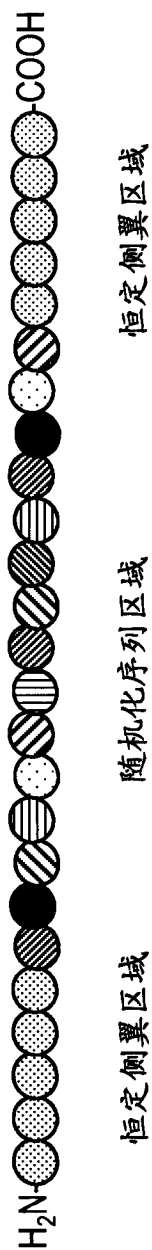


图 2

1. 线性肽文库，具有 10、15 或最多 27 个随机化位置



2. 限制的肽文库：恒定的 Cys- 残基允许形成二硫桥

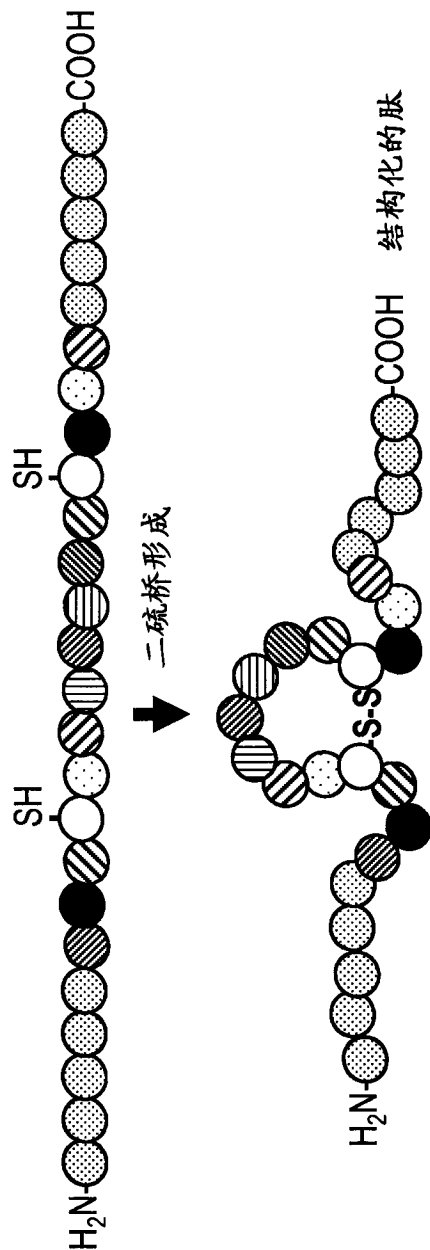


图 3

CS4541 07-090	H-Gly-D-Val-D-Gln-D-Glu-D-Asp-D-Val-D-Ser-D-Ser-D-Thr-D-Leu-Gly-D-Ser-D-Trp-D-Val-D-Leu-D-Leu-D-Pro-D-Phe-D-His-D-Arg-Gly-D-Thr-D-Arg-D-Leu-D-Ser-D-Val-D-Trp-D-Val-D-Thr-PEG2-Cys-NH2
CS4542 07-091	H-Gly-Gly-D-Phe-D-Glu-Gly-D-Leu-D-Ser-D-Gln-D-Ala-D-Arg-D-Lys-D-Asp-D-Gln-D-Leu-D-Trp-D-Leu-D-Phe-D-Leu-D-Met-D-Gln-D-His-D-Ile-D-Arg-D-Ser-D-Tyr-D-Arg-D-Thr-D-Ile-D-Thr-PEG2-Cys-NH2
CS4543 07-092	H-Gly-D-Val-Gly-Gly-D-Ser-D-Arg-D-Leu-D-Glu-D-Ala-D-Tyr-D-Lys-D-Lys-D-Asp-D-His-D-Arg-D-Val-D-Phe-D-Gln-D-Met-D-Ala-D-Trp-D-Leu-D-Gln-D-Tyr-D-Trp-D-Ser-D-Thr-D-Thr-PEG2-Cys-NH2
CS3726 07-81-1	H-Gly-D-Ser-Gly-D-Ser-Gly-D-Asn-D-Ala-D-Leu-D-His-D-Trp-D-Val-D-Cys-D-Ala-D-Ser-D-Asn-D-Ile-D-Cys-D-Trp-D-Arg-D-Thr-D-Pro-D-Trp-D-Ala-Gly-D-Gln-D-Leu-D-Trp-Gly-D-Leu-D-Val-D-Arg-D-Leu-D-Thr-PEG2-NH2

图 4

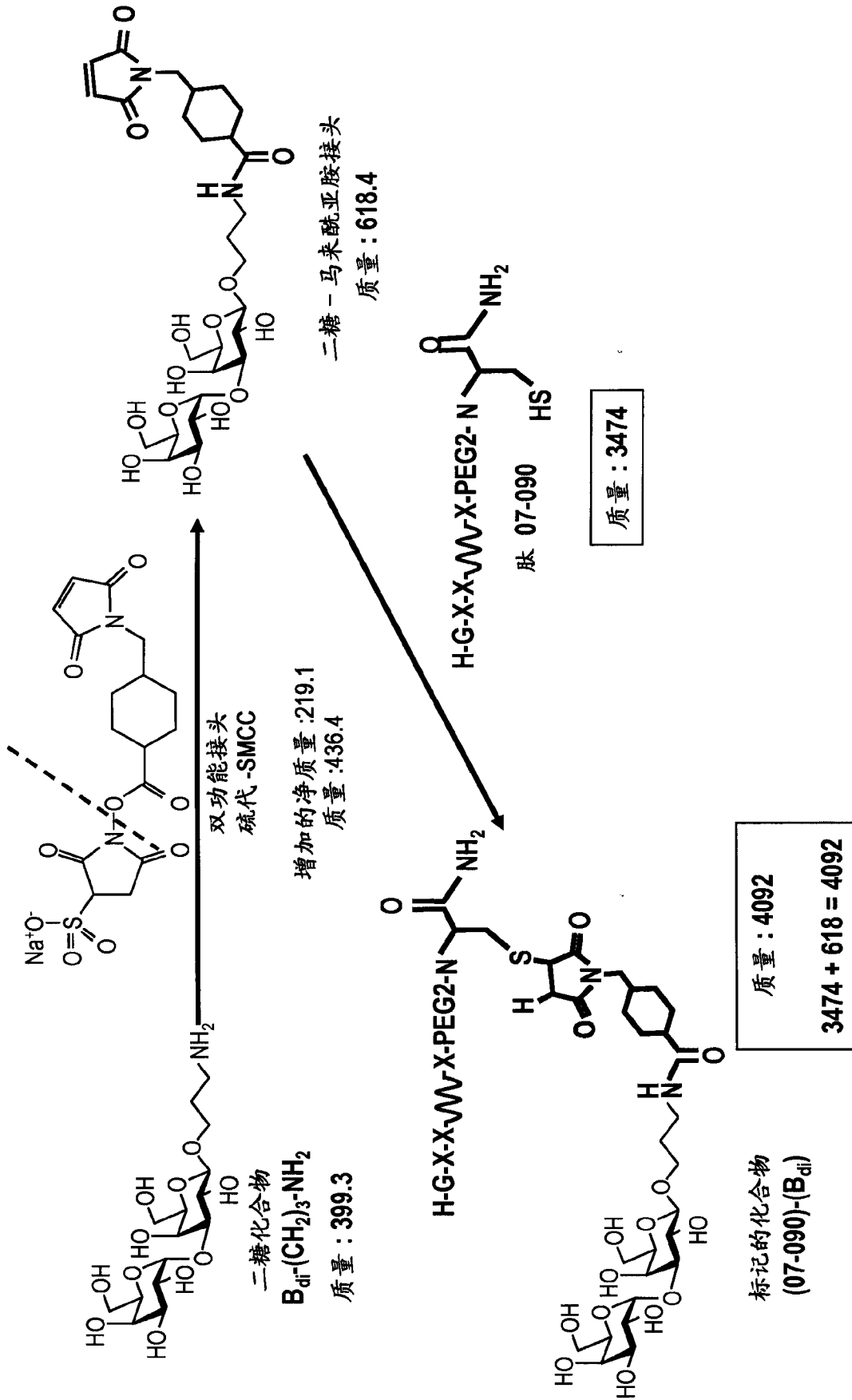
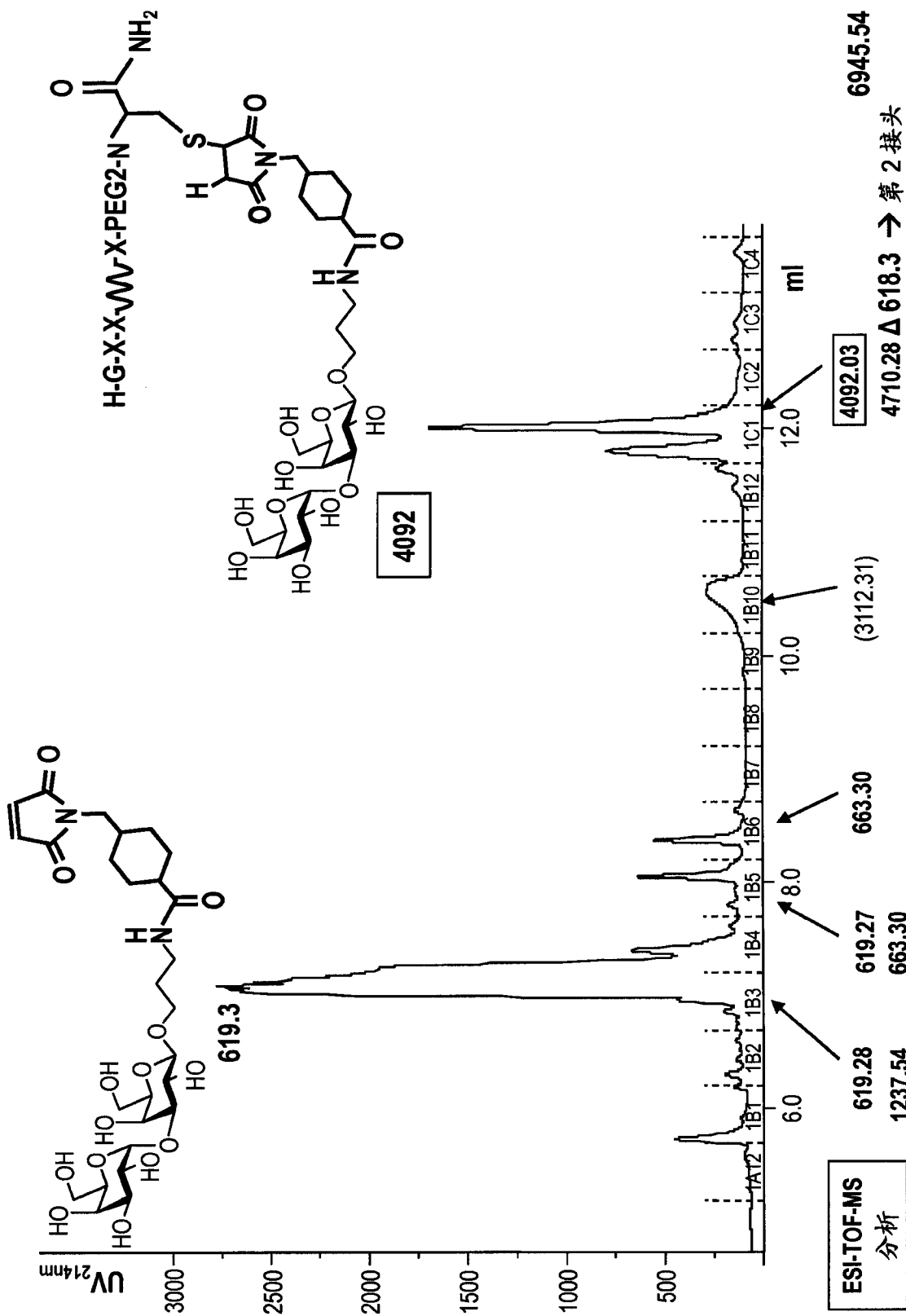


图 5



(在指定的级分中通过质谱检测的物质)

图 6

标记反应的反应化合物的改变比例

- 相对肽量的较低量的接头和二糖
- 反应产物的 HPLC 分析

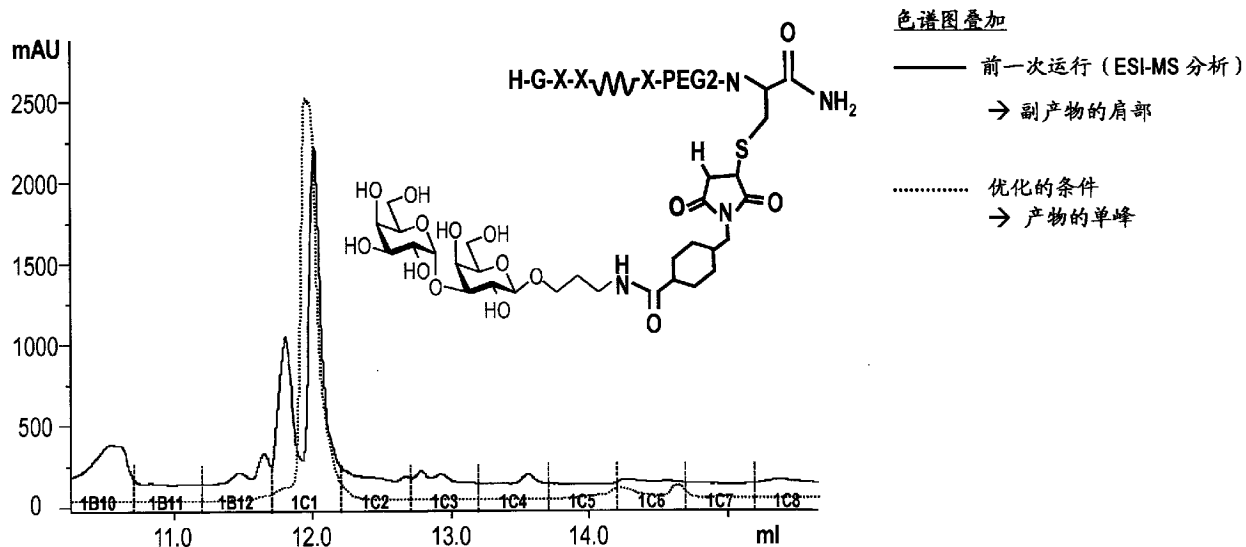


图 7

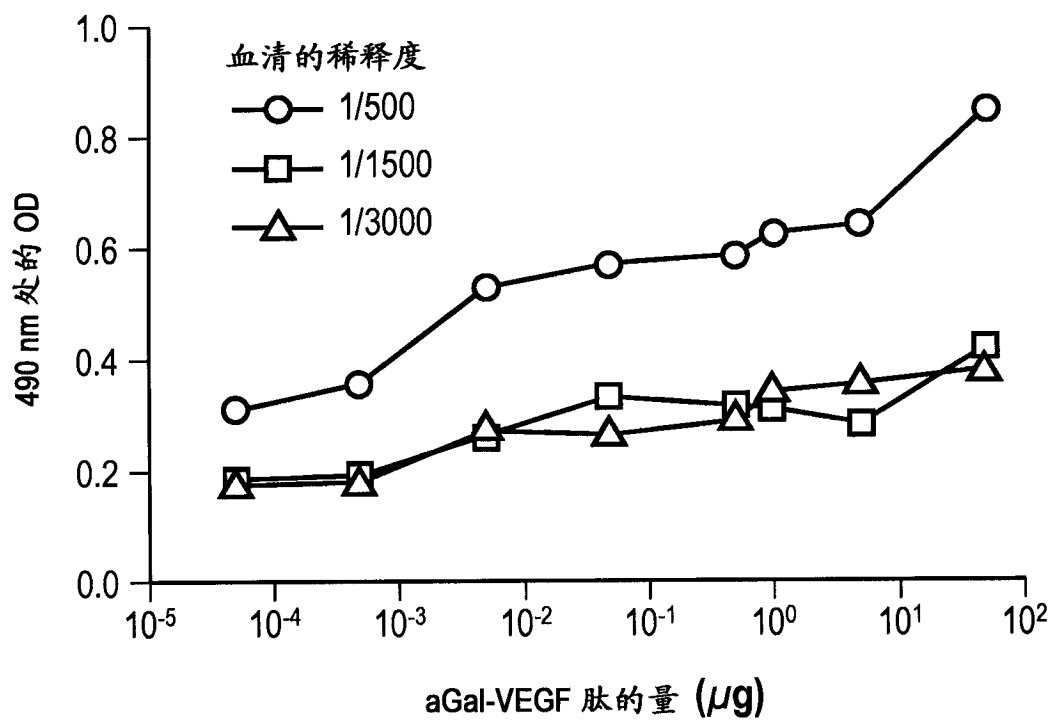


图 8