



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102659941 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 12

(21) 申请号 201210057684. X

C12N 15/63 (2006. 01)

(22) 申请日 2005. 07. 22

C12N 1/15 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 1/19 (2006. 01)

0416392. 9 2004. 07. 22 GB

C12N 1/21 (2006. 01)

0511881. 5 2005. 06. 10 GB

C12N 5/10 (2006. 01)*C12P 21/00* (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

A61K 39/395 (2006. 01)

200580031529. 9 2005. 07. 22

A61P 37/02 (2006. 01)*G01N 33/53* (2006. 01)

(71) 申请人 伊拉兹马斯大学鹿特丹医学中心

地址 荷兰鹿特丹

申请人 罗杰·金登·克雷格

(72) 发明人 罗杰·金登·克雷格

F·G·格洛斯费尔德 R·W·杨森斯

D·德拉贝克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 孔青 郭文洁

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006. 01)*C12N 15/13* (2006. 01)

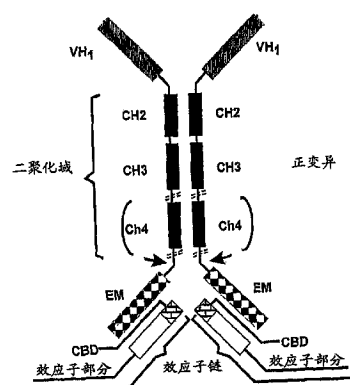
权利要求书 1 页 说明书 31 页 附图 25 页

(54) 发明名称

结合分子

(57) 摘要

一种结合分子。本发明涉及经历了亲和力成熟的功能性仅有重链的抗体多样性库的制造及其用途。本发明也涉及类别特异性仅有重链的抗体多样性库的制造和用途,也涉及具有抗体重链功能性优选抗体重链结合功能性、恒定区效应子活性及任选其他效应子功能的多价多肽复合物的制造和用途。本发明还涉及在转基因小鼠中响应抗原激发产生全功能性仅有重链的抗体的方法。本发明特别涉及产生任何种类的人抗原特异性、高度亲和力、仅有重链的抗体或多种混合物的方法,以及分离及表达全功能性 VH 抗原结合域的方法。



1. 结合多肽复合物,其由第一重链和第二重链的二聚体组成,其中:
每条重链包含由二聚化域连接的两个 V_H 结合域;并且
每个二聚化域包含得自任何类别的免疫球蛋白重链基因的至少 C_H2 、 C_H3 和任选的 C_H4 抗体恒定域。
2. 权利要求 1 的结合多肽复合物,其中存在于第一重链和第二重链的氨基末端的 V_H 结合域是相同的,并且存在于第一重链和第二重链的羧基末端的 V_H 结合域是相同的。
3. 权利要求 1 或 2 的结合多肽复合物,其中所述 V_H 结合域可以得自包括骆驼 V_H 结合域的天然 V_H 结合域,或得自来源于任何脊椎动物的经修饰的 V_H 结合域。
4. 任一前述权利要求的结合多肽复合物,其中所述二聚化域的恒定域被改变或部分缺失。
5. 任一前述权利要求的结合多肽复合物,其中所述 V_H 域是人 V_H 域。
6. 分离的多核苷酸,其编码权利要求 1-5 中任一项的结合多肽复合物的两条重链。
7. 克隆载体或表达载体,其包含权利要求 6 所述的编码第一重链和第二重链的分离的多核苷酸。
8. 经权利要求 7 的表达载体转化的宿主细胞。
9. 产生权利要求 1-5 中任一项的结合多肽复合物的方法。
10. 组合物,其包含权利要求 1-5 中任一项的结合多肽复合物和药理学适当的载体。
11. 权利要求 1-5 中任一项的结合多肽复合物或权利要求 10 的组合物,其用于治疗。
12. 权利要求 1-5 中任一项的结合多肽复合物,其用于诊断疾病。

结合分子

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2005年7月22日,申请号为200580031529.9(PCT/GB2005/002892),发明名称为“结合分子”。

发明领域

[0002] 本发明涉及经历了亲和力成熟的功能性仅有重链的抗体多样性库 (diverse repertoire) 的制造及其用途。本发明也涉及类别特异性仅有重链的抗体多样性库的制造和用途,也涉及具有抗体重链功能性优选抗体重链结合功能性、恒定区效应子活性及任选其他效应子功能的多价多肽复合物的制造和用途。

[0003] 本发明也涉及在转基因小鼠中响应抗原激发产生全功能性仅有重链的抗体的方法。本发明特别涉及产生任何种类的人抗原特异性、高度亲和力、仅有重链的抗体或多种混合物的方法,分离及表达全功能性 VH 抗原结合域的方法。

[0004] 本发明也涉及产生包含重链功能性优选重链效应子活性及其他结合和效应子功能的多价多肽复合物。

[0005] 也描述了使用本发明方法产生的仅有重链的抗体及其他多价结合复合物及其用途。

[0006] 发明背景

[0007] 在21世纪开发的新药中将存在很大比例的单克隆抗体或其变异体。单克隆抗体治疗已经被公认为优选途径用于治疗类风湿性关节炎和克罗恩病且在癌症治疗中有很大的进展。用于治疗心血管疾病及感染性疾病的基于抗体产品也在开发之中。单克隆产品识别并结合靶配体(例如TNF α)上单一、明确的表位。用于治疗的人单克隆抗体的制造依然依赖于哺乳动物细胞培养。装配包括两个重链和两个轻链的复合体(H₂L₂复合体)及接着翻译后糖基化过程排除使用的细菌体系。通过哺乳动物细胞培养制造抗体的生产成本和资金耗费高且在缺乏可接受的其它疗法时有限制基于抗体的疗法潜力的风险。许多种转基因生物能够表达全功能性抗体。包括植物、昆虫、雏鸡、山羊和牛,但是仍然没有用于制造销售的治疗性产品。

[0008] 可在大肠杆菌(E. coli)中制造功能性抗体片段但是除非在制造过程中进行聚乙二醇化否则产物在血清中稳定性通常较低。

[0009] 双特异性抗体复合物是基于工程Ig能够结合相同或不同抗原上两种不同表位的分子。双特异性结合蛋白单独或与其他结合剂联用参入抗体显示有希望的治疗模式即获得人免疫功能而具治疗效果,例如清除病原体(Van Spriël等,(1999)J. Infect. Diseases, 179,661-669;Tacken等,(2004)J. Immunol., 172,4934-4940;美国5,487,890)、癌的治疗(Olennie和van der Winkel,(2003)Drug Discovery Today,8,503-5100)和免疫治疗(Van Spriël等,(2000)Immunol. Today,21,391-397;Segal等,(2001)J. Immunol. Methods,248, 1-6;Lyden等,(2001)Nat. Med.,7,1194-1201)。

[0010] 制造方面问题的复杂性在于双特异性抗体产物以两种或多种H₂L₂复合体为基础。例如两套或多套重链和轻链基因的共同表达可致形成高达10种不同的组合,其中仅有一

种为所需的异源二聚体 (Suresh 等, (1986) *Methods Enzymol.*, 121, 210-228)。

[0011] 为解决这种问题,开发了许多方法生产保留重链效应子功能的哺乳动物细胞全长双特异性 IgG 形式 (BsIgG)。BsIgGs 需要工程的“杵臼结构 (knob and hole)”重链以防止异源二聚体形成且利用相同 L-链来避免 L-链错配 (Carter, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 7-15)。也已经描述了可选择的化学交联方法自各自识别不同抗原的抗体片段制备复合体 (Ferguson 等, (1995) *Arthritis and Rheumatism*, 38, 190-209) 或将其他结合蛋白例如胶原凝集素交联到抗体片段制备复合体 (Tacke 等, (2004) *J. Immunol.*, 172, 4934-4940)。

[0012] 开发通常缺乏重链效应子功能的双抗体或微型抗体 (BsAb) 也克服异源二聚体过剩。这些包含参入 VH 和 VL 结合位点 (scFv) 的极微小单链抗体随后折叠 (fold) 并二聚化 (dimerise) 从而形成二价双特异性抗体,对其每个靶抗原为单价 (Holliger 等, (1993) *PNAS*, 90, 6444-6448; Muller 等, (1998) *FEBS Lett.*, 422, 259-264)。在一个实例中, CH1 和 L-恒定域用作形成双特异性微型抗体的异源二聚化域 (Muller 等, (1998) *FEBS Lett.*, 259-264)。已经开发了许多基于 *E. coli* 表达体系的重组方法产生 BsAbs (Hudson, (1999) *Curr. Opin. Immunol.*, 11, 548-557), 可是生产临床阶段多价抗体材料的花费和规模看来仍是其临床开发的首要障碍 (Segal 等, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 1-6)。

[0013] 近来, BsAb 概念已经扩展到包括双-双抗体、四价的双特异性抗体,其中在各 H 链和 L 链上的 VH 和 VL 域已经被 scFv 结合域的工程对 (engineered pairs) 取代。虽然这类构建体的基因工程 (engineer) 方面的难度很大,但仍可在培养的哺乳动物细胞中装配这种构建体而不出现过剩异源二聚体 (Lu 等, (2003) *J. Immunol. Methods*, 279, 219-232)。

[0014] 本领域中已经熟知免疫球蛋白结构。大多数天然免疫球蛋白包含两个重链和两个轻链。重链通过大约位于每个重链中间的铰链域之间的双硫键互相结合。轻链与每个重链在铰链域 N 末端一侧上结合。每个轻链通过铰链域附近双硫键正常键合到其各自重链。

[0015] 当 Ig 分子正确折叠时,每个链折叠成许多由更线性多肽序列结合的特殊球状区域。例如轻链折叠成可变域 (VL) 和恒定域 (CL)。重链有邻近轻链可变域的单一可变域 VH、第一恒定域、铰链域和两个或三个另外的恒定域。重链 (VH) 和轻链 (VL) 可变域的相互作用导致抗原结合区 (Fv) 形成。通常 VH 和 VL 都需要抗原结合,尽管重链二聚体和氨基末端片段在没有轻链时仍显示保留有活性 (Jaton 等, (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195)。

[0016] 随着新分子生物学技术的发展,在人 B 细胞增殖性疾病 (重链疾病) 和鼠模型系统中鉴别出仅有重链的抗体 (缺乏轻链) 的存在。重链疾病分子水平分析显示基因组水平的突变和缺失可导致重链 CH1 域不适当的表达,引起仅有重链而缺乏结合轻链活性的抗体表达 (参见 Hendershot 等, (1987) *J. Cell Biol.*, 104, 761-767; Brandt 等, (1984) *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1270-1277)。

[0017] 对得自噬菌体文库的分离的人 VH 域单独研究显示 VH 域的抗原特异性结合但是这些 VH 域证明溶解度低。而且建议选择具噬菌体阵列上展示的特异性结合性质的人 VH 域可形成工程抗体结构单元 (Ward 等, (1989) *Nature*, 341, 544-546)。

[0018] 使用其他脊椎动物物种研究显示作为天然基因突变结果的骆驼 (camelids) 产生功能性仅有 IgG2 和 IgG3 重链二聚体,由于缺乏 CH1 轻链结合区其不能结合轻链 (HamersCasterman 等, (1993) *Nature*, 363, 446-448) 及例如鲨鱼的物种产生仅有重链样

(heavy chain-only-like) 结合蛋白家族,可能涉及哺乳动物 T- 细胞受体或免疫球蛋白轻链 (Stanfield 等, (2004) *Science*, 305, 1770-1773)。

[0019] 骆驼仅有重链的抗体的一个特征是提供相对于人 V_H 域提高了溶解度的骆驼 V_H 域。为改善溶解性可改造人 V_H 域 (参见 Davies 和 Riechmann, (1996) *Protein Eng.*, 9(6), 531-537; Lutz 和 Muyldermans, (1999) *J. Immunol. Methods*, 231, 25-38) 或可通过体内自然选择获得溶解性 (参见 Tonha 等, (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 24774-24780)。尽管应用提高亲和力策略例如亲和力热点随机化,可是得自噬菌体文库的 V_H 结合域中对抗原的内在亲和力依然保持在低微摩尔 - 高纳摩尔范围 (Yau 等, (2005) *J. Immunol. Methods*, 297, 213-224)。

[0020] 骆驼 V_H 抗体也具有修饰的 CDR3 环特征。这种 CDR3 环平均比非 - 骆驼抗体中发现的更长,且认为是影响整体抗原亲和力和特异性的主要特征,其补偿了骆驼仅有重链的抗体物种中 V_L 域的缺失 (Desmyter 等, (1996) *Nat. Struct. Biol.*, 3, 803-811, Riechinann 和 Muyldermans, (1999) *J. Immunol. Methods*, 23, 25-28)。

[0021] 近来对骆驼抗体的结构研究表明依赖于 V(D)J 重组事件和体细胞突变的体内成熟过程大大促进了抗体多样性 (De Genst 等, (2005) *J. Biol. Chem.*, 280(14), 14114-14121)。

[0022] 目前已经开发出在转基因哺乳动物中产生仅有重链的抗体的方法 (参见 W002/085945 和 W002/085944)。转基因哺乳动物 (优选小鼠) 经抗原激发可产生任何可能种类 (IgM、IgG、IgD、IgA 或 IgE) 和得自任何哺乳动物 (包括人) 的功能性仅有重链的抗体。

[0023] 正常的免疫球蛋白重链基因座包含多个 V 基因片段、许多 D 基因片段和许多 J 基因片段。每个 V 基因片段编码 V 域中从 N 末端几乎直至 C 末端。每个 V 域的 C 末端由 D 基因片段和 J 基因片段编码。亲和力成熟前的 B 细胞中 VDJ 重排提供 V_H 结合域,然后与 V_L 结合域形成抗原识别位点或结合位点。重链的 C_H1 区和轻链的 κ 或 λ 区促进了重链和轻链的相互作用。

[0024] 为产生仅有重链的抗体,种系 (germ) 中重链基因座包含编码部分或全部可能的恒定区的基因片段。在成熟期间,重排的 V_H 结合域剪接到 C_H2 恒定区编码片段从而提供编码缺乏 C_H1 域的重链且因此提供不能连接于与免疫球蛋白轻链相连接的重链的重排基因。

[0025] 仅有重链单克隆抗体可通过标准克隆技术自脾的 B 细胞回收或通过噬菌体展示技术自 B 细胞 mRNA 回收 (Ward 等, (1989) *Nature* 341, 544-546)。得自骆驼或转基因动物的仅有重链的抗体具高度亲和力。正常 H_2L_2 四聚体序列分析证明多样性主要源自 VDJ 重排和体细胞高度突变的结合 (Xu 和 Davies, (2000) *Immunity*, 13, 37-45)。表达的在骆驼内或在转基因动物中产生的仅有重链 mRNA 序列分析支持这个观察结果 (De Genst 等, (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 14114-14121)。

[0026] 天然骆驼和人 V_H 区的一个重要且共同的特征是每个区不依赖于与 V_L 区的二聚化而作为单体 (与抗原) 结合以取得最佳溶解性和结合亲和力。这些特征早就被认为是特别适于产生阻滞剂和组织渗透剂。

[0027] 同 - 二聚体或异二聚体也可通过仅有重链的抗体的酶切或合成途径产生 (Jaton 等, (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195 和 US2003/0058074A1)。但是单体抗体结合域的优

势仍有利于改造作为治疗性或诊断性试剂的多聚体蛋白质。

[0028] 通过噬菌体展示技术产生的人 V_H 或骆驼 V_H 缺少作为体细胞突变所致改善特征的优点及通过正常抗体结合位点 CDR3 区中 D 和 J 区重组提供的其他多样性 (Xu 和 Davies, (2000) *Immunity*, 13, 37-45)。同时与人 V_H 相比显示溶解性优势的骆驼 V_H 在人体中有抗原性且必须通过骆驼免疫或通过噬菌体展示技术产生。

[0029] V_H 结合域的参入比使用自 V_H 和 V_L 域改造的与特异性和亲和力可能丧失有关的 scFvs 具有明显的优势。为产生双特异性或多特异性结合分子,得自相关基因家族例如 T- 细胞受体或鲨鱼免疫球蛋白家族的 V_H 结合域也可提供 scFv 方案的备择方案。也可使用其他天然存在的结合蛋白及其域包括例如可溶性受体片段。

[0030] 各种抗体的生理功能不同。例如 IgG 在成熟免疫应答中发挥决定作用。IgM 涉及补体固定和凝集作用。IgA 是分泌物中 Ig 的主要类别 - 眼泪、唾液、初乳、粘液中的 - 且因此在局部免疫中起作用。当改造多价结合复合体时包括种类特异性重链恒定区根据所需功能提供了体内效应子功能的治疗利益。工程个体效应子区也可导致功能性的添加和缺失 (Van Dijk 和 van der Winkel, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, (2001) 8 月 5 (4), 368-374)。看来包含高度亲和力 V_H 结合域 (人或骆驼或其他来源) 的最适合的仅有重链的抗体的产生和选择将得益于依赖于自随机化噬菌体文库选择并不促进体内重组和亲和力成熟方案的备择方案。

[0031] 因此包括 IgA 恒定区功能性将提高粘膜抗病原体功能 (Leher 等, (1999) *Exp. Eye. Res.*, 69, 75-84), 同时 IgG1 恒定区功能性的存在提高体内血清稳定性。存在的重链 C_H2 和 C_H3 恒定域提供了如天然抗体中所见稳定的二聚体作用基础, 且为翻译后糖基化提供识别位点。如果使用双特异性和多价复合体作为试剂和诊断剂, 存在的 C_H2 和 C_H3 也促进第二种抗体识别。

[0032] 预先在铰链区和人 IgG1 效应子域前克隆分离的重排前骆驼仅有重链可变区序列, 插入载体并在 COS 细胞中表达而产生抗体。在这种体外环境中表达抗体已经经过骆驼体内类型 (同种型) 转换和亲和力成熟 (高突变) 过程且可结合于抗原 (Riechmann 和 Muyldermans, (1999) *J. Immunol. Methods*, 231, 25-38)。

[0033] 为在各种临床、工业和研究中应用, 本领域需要使体内仅有重链的抗体多样性和 B- 细胞应答最大化, 从而特别生产种类特异性人仅有重链的抗体和功能性仅有 V_H 重链结合域的功能性库, 其保留最大的抗原结合能力。

[0034] 本领域也需要产生可溶的、二价的或多价的多肽结合复合体, 单独的或与效应子 (轻) 链组合的包含至少部分的抗体重链且为生理学上稳定的和具有效应子功能。

[0035] 发明概述

[0036] 本发明提供了一种用于在转基因哺乳动物中产生仅有 V_H 重链域骆驼仅有 $V_H(V_{HH})$ 重链抗体的方法, 包括哺乳动物中异源 V_H 或骆驼 $V_H(V_{HH})$ 重链基因座表达步骤, 其中 V_H 或骆驼 $V_H(V_{HH})$ 重链基因座包含不编码 C_H1 域的重链恒定区且如果表达, 这种基因座能形成一种或多种确定类别的仅有重链的抗体。

[0037] 这种 V_H 或骆驼 $V_H(V_{HH})$ 重链基因座可包含一种或多种骆驼或非骆驼 V 基因片段。优选选择或改造 V 基因片段从而提高溶解性。优选的 V 基因片段得自人。

[0038] 这种重链基因座的重链恒定区可包含 $C_{\alpha 1}$ 和 / 或 $C_{\alpha 2}$ 、 C_{ϵ} 、 C_{δ} 、 C_{γ} 和 / 或 C_{μ} 重链恒定区基因。而且此重链基因座的重链恒定区可包含一种以上的下列重链恒定区: C_{α} 、 $C_{\alpha 1}$ 、

C_{ϵ} 、 C_{δ} 、 C_{γ} 、 C_{μ} 。

[0039] 优选的 V_H 重链基因座包含含有至少一个人或骆驼 V 基因片段、至少一个 D 片段和至少一个 J 片段的可变区,其中人或骆驼 V 基因片段、D 基因片段和 J 基因片段能够重组而形成 VDJ 编码序列。重链基因座优选包含 20 个或更多的 D 基因片段和 / 或 5 个或更多 J 基因片段。优选的 D 和 J 片段为脊椎动物来源,优选人。使用得自任何脊椎动物 D 和 J 基因片段且优选人 D 和 J 基因片段可获得 CDR3 环。

[0040] V_H 重链基因座也可包含能够直接将 J 基因片段与重链恒定区基因重组的重组序列 (rss)。

[0041] 异源重链基因座的重链恒定区为人源或脊椎动物来源例如骆驼来源。或者这种恒定区可以并非免疫球蛋白重链来源。

[0042] 优选的本发明方法导致基本正常 B 细胞成熟。本发明也提供仅有重链的抗体或其片段,或根据本发明方法得到或可以得到多种仅有重链的抗体混合物。这种仅有重链的抗体可为单克隆抗体或其片段,例如人或骆驼 V_H 结合域。本发明的 V_H 结合域可缺乏延伸的骆驼样 CDR3 环或可包含延伸的骆驼样 CDR3 环。

[0043] 本发明也提供包含本发明的异源重链基因座的载体且用这种载体转化宿主细胞。

[0044] 本发明也提供表达本文所述异源重链基因座的转基因哺乳动物。优选的本发明转基因哺乳动物产生包括轻链的抗体的能力降低。

[0045] 本发明也提供了仅有重链的抗体或其片段在制备免疫治疗药物中的用途。本发明的仅有重链的抗体也可作为诊断剂、试剂、抗体酶或抑制剂。也提供包含本发明仅有重链的抗体或其片段和药理学上适当载体的药用组合物。

[0046] 本发明也提供产生并选择仅有重链的抗体的方法,包括步骤:

[0047] (a) 将抗原注射进本文所述的转基因哺乳动物中;

[0048] (b) 分离表达所需抗原特异性、仅有重链的抗体的细胞或组织;

[0049] (c) 由步骤 (b) 的细胞或组织产生杂交瘤;

[0050] (d) 任选从所述杂交瘤克隆仅有重链的抗体 mRNA,以便以后在异源表达体系例如哺乳动物、植物、昆虫、微生物、真菌或其它可行的体系中产生该抗体。

[0051] 然后从步骤 (C) 的克隆的 mRNA 中鉴别和分离抗原特异性 V_H 域产生 V_H 结合域。

[0052] 本发明 V_H 结合域也可产生自:

[0053] (a) 将抗原注射进本文所述的转基因哺乳动物中;

[0054] (b) 分离表达所需抗原特异性、仅有重链的抗体的细胞或组织;

[0055] (c) 从得自分离细胞或组织的 mRNA 克隆 V_H 基因座;

[0056] d) 使用噬菌体或类似文库展示编码的蛋白质;

[0057] (e) 鉴定抗原特异性 V_H 域;且

[0058] (f) 在细菌、酵母或其它可行的表达体系中单独表达或作为融合蛋白表达 V_H 域。

[0059] 发明详述

[0060] 发明人克服了先有技术的局限性并指出可以使转基因动物,尤其是小鼠,产生“微基因座”从而生产血浆或 B 细胞分泌的种类特异性,只有重链抗体,或只有重链抗体的不同种类的混合物。然后这些可用于使用已建立的杂交瘤技术产生能可靠供应的种类特异性、只有重链抗体,或者用作 $V_H(V_{HH})$ 结合域或仅有 V_H 重链结合域,优选一种没有效应子功能但

保留结合功能的人源可溶的仅有 V_H 重链结合域。

[0061] 通常在不存在扩展的 CDR3 环的情况下,通过本发明的方法产生的只有重链抗体(包括骆驼抗体)显示出由于 V、D 和 J 基因片段重排和体细胞突变而产生的高亲和力。在离体血浆中可观察到基本正常的 B 细胞成熟有高水平的只有重链抗体出现(条件是在重组基因座中出现的所有抗体种类中剔除了 C_H1 域)。B- 细胞成熟和装配的二聚体(例如 IgG)或多聚体(IgM)的分泌不依赖轻链基因的存在和表达。

[0062] 编码一种从转基因小鼠得到的杂交瘤分离的抗原特异性重链的抗原特异性 mRNA 的核酸序列分析证明重链抗体多样性主要与 VDJ 重组有关。而且,本发明者指出抗体多样性产生在仅有重链的抗体的功能抗原结合域的 CDR3 区域,而来自 V_H 域中体细胞突变的贡献相当有限。使用这里描述的方法,可以在细菌系统克隆并表达功能 V_H 域从而产生保留有全部抗原结合、特异性和亲和力的 V_H 结合域。另外,培养的杂交瘤细胞系能分泌种类特异性重链二聚体和多聚体。

[0063] 本发明也指出可按程序改造转基因小鼠从而生产响应抗原激发的仅有重链的抗体的优选种类,例如仅有 IgG 或者仅有 IgM 或例如 IgA、IgG 和 IgM 的混合物。

[0064] 发明者以前描述(参见 W002/085945 和 W002/085944)了表达一种缺失 C_H1 外显子并通过人 D 和 J 片段连接两个马驼 V_{HH} 基因的最小的人 IgG 重链恒定区基因座的转基因小鼠的生产。当用抗原激发时,这些小鼠产生功能性、高亲和力、抗原特异性仅有 IgG 重链抗体。通过串联加入重链恒定区的基因构建体的使用(条件是所有恒定区基因缺乏 C_H1 区并且有时会存在 C_H4 区)在体内经过类转换可获得仅有重链的抗体种类的混合物(IgM 和 IgG)。

[0065] 这里描述的改进展示一种具有通过人 D 和 J 片段连接两种马驼 V_{HH} 基因的相同 IgG 恒定区基因座和通过相同的人 D 和 J 片段连接两种马驼 V_{HH} 基因的缺失 $CH1$ 外显子的人 IgM 恒定区基因座结构的小鼠,也产生高分子量(多聚体)仅有 IgM 重链抗体和仅有 IgG(二聚体)重链抗体。惊人的是基本正常 B- 细胞成熟和抗体产生依赖于 C_H1 序列从每个存在于转基因基因座中的重链恒定区全部缺失。而且,如果 $CH4$ 外显子存在不需要去除。

[0066] 因此,例如,一种转基因动物携带一种通过相同的人 D 和 J 基因片段连接两种马驼 V 基因片段的带有功能 C_H1 外显子的人 IgM 重链基因座,和通过相同的人 D 和 J 基因片段连接两种马驼 V 基因片段的缺失 C_H1 外显子的 IgG 恒定重链区基因座,则该转基因动物产生相当低水平的仅有重链的抗体并且不显示 B- 细胞成熟迹象。

[0067] 按需要可以引入或不引入包括 $CH4$ 域的其他效应子域,以将效应子特征引入所得仅有重链的抗体或从中去除。

[0068] 本发明人发现抗体的产生性表达(例如 B- 细胞成熟)可由存在于结构中的任何 V 基因片段的使用引起。来源于 B- 细胞的抗体 mRNA 的分离和测序显示 D 和 J 基因片段重组产生 CDR3 多样性。所得的 V_H 域的序列比较揭示体细胞突变,意味着在重组 D 和 J 基因片段中并且也在所得的表达的抗体 mRNA 的 V_H 域发生亲和力成熟。

[0069] 优选的构建体加入选择或改造用于改善溶解度和连接用于重组的 D 和 J 链簇和 CDR3 产生的 V 基因片段。优选,VDJ 序列连接于所选的串联恒定效应子域,每个缺失 C_H1 外显子。

[0070] 本发明不限于人或骆驼种类特异性的仅有重链的抗体或人 V_H 结合域(优选可溶

的 V_H 结合域) (单独或连接于连接于所选的效应子域) 的生产和衍生化, 还包括连接于 D 和 J 基因片段脊椎动物来源 (任选经基因工程改造从而改善溶解性) 的任何 V 基因片段的嵌合 (chaemic) 组合 (combination) 的生产。优选, V 基因片段是人源的并且不是来自骆驼的 V 基因片段。所得的 V_H 域可以不包含扩展的骆驼样 CDR3 环除非 D 和 J 片段来自骆驼。这导致展示 CDR3 多样性和亲和力成熟的 VH 域操作性连接于效应子恒定区。后者确保在所选的亲代转基因脊椎动物中功能性分泌和任选装配, 并且以后如果需要还可以提供可选择的效应子功能。

[0071] 这些观察结果对改进和简化种类特异性仅有重链的抗体和经过体细胞突变加入亲和力成熟的高亲和力可溶的 V_H 域的改造有重要意义。选择的重链恒定区效应子功能 (缺失 C_H1) 或它们的混合物的加入允许仅有重链的抗体的任何种类或没有另外抗体改造要求的仅有重链的抗体的任何混合物的产物。 V_H 域可被细菌和其它微生物系统单独表达, 或作为加入效应子域的功能性仅有重链的抗体由培养的杂交瘤或转染的细胞分泌。抗体和人源的 V_H 结合域在健康护理领域作为药物、诊断剂和试剂有广泛应用, 同时还可应用于农业、环境和工业。

[0072] 因此, 第一方面, 本发明提供一种用于转基因哺乳动物中仅有 V_H 重链抗体的生产方法, 该方法包含在那种哺乳动物中表达一种异源 VH 重链基因座的步骤。优选, V_H 重链基因座包含一种不编码 C_H1 域并且当表达时基因座可形成完整的仅有重链的抗体的重链恒定区域的多样性库。

[0073] 本发明的第一方面也提供一种用于产生转基因哺乳动物中骆驼仅有 V_H 重链抗体的方法, 该方法包含在那种哺乳动物中表达一种骆驼 V_H 重链基因座的步骤, 其中 VH 重链基因座包含一种不编码 $CH1$ 域并且当表达时基因座可形成加入 VDJ 重排和亲和力成熟适应抗原激发的完整的仅有重链的抗体的多样性库的重链恒定区域。

[0074] 重链效应分子可改造成无功能域, 例如羧基段 $CH4$ 域, 条件是改造不影响阻止细胞表面装配并因此 B- 细胞成熟的分泌机制。 $CH1$ 外显子单独从异源基因座删除或从基因座缺失。另外的特点可经改造加入到基因座中, 例如改善糖基化, 或增加功能。

[0075] 优选, 当表达时, 异源基因座可形成功能性 IgA、IgE、IgG、IgD 或 IgM 分子或它们的同种型。

[0076] 因此, 依据需要的抗体种类以及基本正常的 B- 细胞成熟, 设计异源重链基因座以产生仅有重链的抗体的优选种类或混合物。骆驼 V、D 和 J 基因片段和骆驼效应子区域的使用将产生带有骆驼特有特点的骆驼抗体, 例如扩展的 CDR3 环。包含随机选择或选择或改造用于增强溶解度的 V 基因片段的人 V、D 和 J 基因片段的使用将产生功能性人仅有重链的抗体。

[0077] 依据本发明得到的抗体与先有技术的抗体相比其优点在于它们是基本上是单一或已知种类并优选是人源的抗体。体内 VDJ 重组和亲和力成熟共同使抗体具有高亲和力。用本领域技术人员已知的完备方法可分离、鉴定和制备抗体及其片段。

[0078] 异源重链基因座

[0079] 在本发明的上下文中, 术语“异源的”是指如本文所述的一种核苷酸序列或一种基因座, 对于其所在的哺乳动物不是内源性的。

[0080] 在本发明的上下文中, “ VH 重链基因座”是指编码包含一种或多种 V 基因片段、一

种或多种 D 基因片段和一种或多种 J 基因片段,操作性连接于一种或多种重链效应子区域(每种缺失 CH1 域)的 V_H 域的最少的微型基因座。优选抗体库可变性的主要来源是 CDR3 区,该区通过选择 D 和 J 基因片段并进行 V-D 和 D-J 连接而形成。

[0081] 本发明的优点是 V_H 基因序列重排得到的抗体库和多样性通过多个 D 和 J 基因片段的使用可以最大化。使用一种不需要大量 V 基因片段或 V_L 和 L_c (轻链)免疫球蛋白基因座的最小的基因座(微基因座)的同时获得以后的体细胞突变。

[0082] 优选, V_H 重链基因座包含来自任何脊椎动物种属的 2 到 5 个 V(2、3、4 或 5) 基因片段。

[0083] 优选的 V 基因片段是人源的,任选选择或改造以改善溶解度。

[0084] 优选的 V_H 重链基因座包含 2 到 40 个(2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、30 或 40) 或更多 D 基因片段。D 基因片段可以来自任何脊椎动物种属但是最优选的 D 基因片段是人 D 基因片段(正常地 25 个功能性 D 基因片段)。

[0085] 优选的 V_H 重链基因座包含 2 到 20 个(2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18 或 20) 或更多 J 基因片段。J 基因片段可选自任何脊椎动物种属但是最优选的 J 基因片段是人 J 基因片段(正常地 6J 基因片段)。

[0086] 优选的 V_H 重链基因座包含 2 个或更多 V 基因片段,25 个功能性人 D 基因片段和 6 个人 J 基因片段。

[0087] 术语“V 基因片段”包括来自一种脊椎动物包括骆驼和人天然存在的 V 基因片段,该 V 基因片段任选经选择、突变或改造以改善特性,例如溶解度。V 基因片段也在其它种属例如鲨鱼(见 Kokubu 等,(1988)EMBO. J., 7,3413-3422)中发现或进化从而提供示例性结合蛋白的不同的 V_H -样家族,例如,免疫球蛋白轻链 V_L 组分或 T-细胞受体 V_H 组分的进化中。

[0088] 改善 V_H 域的溶解度的优选方法结合了合理的(决不仅仅是随机的)手段并且在 Davies 和 Reichmann,(1996)Protein Eng., 9(6),531-537 和 Riechmann 和 Muyldermans,(1999)J. immunol. Methods, 231,25-38 中举例说明。通过亲和力成熟和在接着 VDJ 重排的 V_H 基因有利突变的加入,自然选择在体内也可发生。

[0089] 依据本发明当表达核酸时 V 基因片段必须可以和 D 基因片段、J 基因片段和重链恒定(效应子)区(它可能包含几个外显子但 C_H1 外显子除外)重组从而产生仅有 V_H 重链抗体。

[0090] 依据本发明的 V 基因片段也包括在它的范围内任何编码同源物、衍生物或蛋白质片段基因序列,该基因序列可以和依据本发明的 D 基因片段、J 基因片段和重链恒定区(包含 1 个或多个外显子但非 $CH1$ 外显子)重组从而产生这里定义的仅有 V_H 重链抗体。

[0091] 因此 V_H 编码序列可以来自自然发生来源或使用本领域熟练者熟悉的方法合成。

[0092] 在本发明的上下文中“ V_H 域”指的是当与上述定义的 D 基因片段和 J 基因片段重组时 V 基因片段的表达产物。优选,像这里使用的 V_H 域保持溶解并且在不需其它任何因子维持溶解度的生理性介质中有活性。优选,通过 VDJ 重组和体细胞突变改善可溶的 V_H 域结合抗原的能力。不依赖骆驼种属特有的扩展的 CDR3 环的存在或缺失。 V_H 域可以结合作为单体的抗原并且,当结合效应子恒定区时,依据使用的效应子分子(例如 IgG、IgA、IgM 等)的选择和改造或二聚化和多聚化的选择机制可以产生单特异性、双特异性、多特异性、二价或多价形式,通过去除 $CH1$ 外显子排除了当表达可溶的仅有重链的抗体合成物的部分时结

合 VL 域的可能性 (见 Sitia 等, (1990) Cell, 60, 781-790)。也可单独改造 VH 域与不同蛋白域例如与毒素、酶和显像剂从而产生用于靶向治疗和诊断目的的融合蛋白。

[0093] 在本发明的上下文中术语“D 基因片段”和“J 基因片段”包括 D 和 J 基因片段的天然存在序列。优选的 D 和 J 基因片段来自与 V 基因片段来源相同的脊椎动物。例如, 如果 V 基因片段来自人那么溶解的或改造的 D 和 J 基因片段也优选来自人。或者 V 基因片段来自如骆驼而 D 和 J 基因片段来自人, 反之亦然。

[0094] 术语 D 基因片段和 J 基因片段也包括在它们范围内的衍生物、同源物和它们的片段只要所得的片段可以和像这里描述的重链抗体基因座的剩余组分重组从而产生这里描述的仅有重链的抗体。D 和 J 基因片段也可来自自然发生来源或使用这里描述的本领域熟练者熟悉的方法合成。V、D 和 J 基因片段可以重组并优选经过体细胞突变。

[0095] V、D 和 J 基因片段优选来自单个脊椎动物种属。这可以是任何脊椎动物种属但优选人。

[0096] 另外, 依据本发明的异源的重链基因座包含编码重链恒定区的 DNA 的区域倘若在体内效应子起作用 (例如 IgG、IgM、IgA、IgE、IgD 或它们的同种类型)。

[0097] 本发明也提供通过本发明的方法得到或可得到的抗原特异性仅有重链的抗体。

[0098] 重链恒定区

[0099] 操作上, 在 B 细胞内可以和 V 基因片段、D 基因片段和 J 基因片段重组的自然发生或改造的基因片段编码重链恒定区。优选重链恒定区来自免疫球蛋白基因座。

[0100] 依据本发明的这个方面, 每个重链恒定区必需包含至少一个重链恒定区基因, 该重链恒定区基因不表达功能性 C_H1 域所以仅有重链的抗体的产生可以发生。每个重链恒定区也可包含一个或多个其他重链恒定区外显子, 在其他重链恒定区基因也不表达功能性 C_H1 域的条件下该重链恒定区外显子选自 $C\delta$, $C\gamma 1-4$, $C\mu$, $C\epsilon$ 和 $C\alpha 1-2$ 。依据优选种类或需要的抗体种类的混合物选择重链恒定区基因片段。任选异源重链基因座为 $C\mu$ - 和 $C\delta$ - 缺陷。

[0101] 例如, 已知 M 类的 Ig 分子对激活巨噬细胞和补体途径起重要作用。由于它的结合部位的极其近似, IgM 对病原体包括病毒有高亲和力。然而也已知 IgM 在快速免疫测定技术中难以使用而 G 类的 Ig 在这些技术中容易使用。为了这种使用, 选择优选的抗体种类是有用的, 例如 IgG 或 IgM。

[0102] 缺失 CH1 的异源重链 $C\gamma$ 基因座的全部或部分表达将产生任选的部分或全部 IgG 同种类型, 依赖异源 IgG 基因座中存在的 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 同种类型。或者重链可包含 $C\delta$ 基因。所得的 IgE 分子也可用于治疗。

[0103] 或者, 可以得到抗体的选择混合物。例如, 当重链恒定区包含 $C\alpha$ 和 $C\mu$ 基因时可得到 IgA 和 IgM。

[0104] 优选依据本发明的重链恒定区是人源的, 尤其当重链抗体用于人治疗应用时。在重链抗体用于诊断或兽用目的时, 重链恒定区优选来自实施诊断或兽医治疗的脊椎动物或哺乳动物的靶组织。

[0105] 当表达时, 重链恒定区缺乏功能性 C_H1 域。 C_H1 外显子和任选地, $C\mu$ 和 $C\delta$ 恒定区, 可突变、删除或取代。优选, 删除 C_H1 外显子。例如, 带有功能性 C_H1 域的 IgM 的存在抑制 B- 细胞成熟并因此限制产生性表达。

[0106] 哺乳动物

[0107] 本发明方法中使用的转基因哺乳动物不為人。优选的转基因哺乳动物为啮齿目动物例如兔、豚鼠、大鼠或小鼠。特别优选小鼠。也可采用可选择的其他哺乳动物例如山羊、绵羊、猫、狗或其它动物。

[0108] 优选转基因动物使用确定的卵母细胞注射技术及确定的 ES 细胞技术或克隆产生。

[0109] 有利的是,如果根据本发明方法表达仅有重链的抗体,哺乳动物内源性免疫球蛋白重链和任选轻链基因座缺失或被沉默。

[0110] 如上所述产生仅有重链的抗体的方法可特别用于产生人用治疗用途的抗体,通常给予与抗体源物种不同的脊椎动物物种抗体导致抗所给予抗体免疫应答发生。

[0111] 因此,在另一个方面本发明提供了表达异源重链基因座的转基因哺乳动物。

[0112] 可改造这种哺乳动物使其产生包括轻链抗体的能力降低。

[0113] 产生抗体细胞可得自本发明转基因哺乳动物且例如用来制备用于产生本文定义的仅有重链的抗体的杂交瘤。另外或可选择性可自本发明转基因哺乳动物分离核酸序列且用于产生其 V_H 域仅有重链的抗体或双特异性 / 双功能的复合体,所用 DNA 重组体技术对于本领域技术人员是熟知的。

[0114] 可选择性或另外的,可通过本发明转基因动物免疫接种产生抗原特异性仅有重链的抗体。

[0115] 因此在另一个方面,本发明提供了用抗原免疫本发明转基因哺乳动物从而产生仅有重链的抗体的方法。

[0116] 在本发明这种方面的优选实施方案中,哺乳动物为小鼠。

[0117] 仅有重链的抗体及其片段

[0118] 在另一个方面中本发明提供了根据本发明方法可获得的仅有重链的抗体及其功能性片段和衍生物。包括 V_H 结合域的片段可通过酶切或溴化氰切割本发明仅有重链即缺乏轻链的抗体获得 (Jaton 等, (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195)。

[0119] 一种优选的功能性片段为抗原特异性、仅有重链结合域即 V_H 结合域,其由在单 V 、 D 和 J 基因片段间重组然后体细胞突变所得 V_H 基因座表达。根据本发明这个方面, V_H 基因座可自例如分离自上述免疫的转基因动物的产生抗体细胞克隆。然后克隆序列可用噬菌体展示 (Ward 等, (1989) *Nature*, 341, 544-546) 或用类似展示文库展示,例如使用基于酵母体系 (Boder 和 Wittrup, (1997) *Nat. Biotechnol.*, 15, 553-7) 和鉴定的抗原特异性 V_H 结合域。然后可单独或作为融合蛋白在能放大规模 (scalable) 的细菌、酵母或其他表达体系中制备抗原特异性重链结合域。也可从通过免疫转基因小鼠经典方法所得特征性杂交瘤克隆编码 V_H 结合域的序列。然后这些可用于产生 V_H 结合域及其衍生物包括具有不同效应子功能的工程的定义抗体种类 (例如 IgE 或 IgA) 及其变异体。

[0120] 相应的,本发明也提供了产生 V_H 结合域的方法,包括步骤:

[0121] (a) 分离表达所需抗原特异性、仅有重链的抗体的细胞或组织 (优选可溶的所需抗原特异性、仅有重链的抗体);

[0122] (b) 自得分离细胞或组织的 mRNA 克隆编码 V_H 结合域的序列;

[0123] (c) 使用噬菌体或类似文库展示编码蛋白质;

[0124] (d) 鉴定抗原特异性 V_H 结合域 ; 且

[0125] (e) 在细菌、酵母、哺乳动物或其它可行的表达体系中单独表达或作为融合蛋白表达 V_H 结合域。

[0126] 或者, 可使用酶切或化学切割技术及接着从其它切割产物分离含有 V_H 域片段而从本发明仅有重链的抗体产生含有 V_H 域的片段。

[0127] 自特征性杂交瘤分离 V_H 结合域, 使用噬菌体或其他展示体系可直接将得自 mRNA 克隆的 V_H 结合域序列克隆进表达载体而不借助其它选择步骤。

[0128] 结合效应子区的仅有重链的抗体的产生体系包括适于大量培养技术的培养中哺乳动物细胞 (例如 CHO 细胞)、植物 (例如玉米)、转基因山羊、兔、牛、绵羊、小鸡和昆虫幼虫。其它产生体系包括病毒感染 (例如昆虫幼虫和细胞系中杆状病毒) 是细胞培养和种系方法的备择方法。其它产生方法对于本领域技术人员也是熟知的。如果需要仅有重链 IgA 或 IgM 装配, 共表达的“J 链”是有利的。用于产生骆驼仅有重链的抗体或单独产生 V_H 结合域的适当方法也是本领域中已知的。例如骆驼 V_H 结合域在细菌体系中产生且骆驼仅有重链同二聚体在杂交瘤和转染的哺乳动物细胞中产生 (参见 Reichmann 和 Muylldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231, 25-38)。

[0129] 也适当建立了使用噬菌体展示技术获得工程人 V_H 结合域的表达方法 (Tanha 等, (2001) J. Biol. Chem., 276, 24774-24780 及参考)。

[0130] 从转基因飞行昆虫系 (fly lines) 中昆虫幼虫显示产生血淋巴内功能性仅有重链的抗体片段, 性质与通过哺乳动物细胞产生的相同抗体一致 (PCT/GB2003/0003319)。本发明也提供了根据本发明这个方面的方法能够获得的抗原特异性单体或二聚体的 V_H 结合域。

[0131] 本发明也提供包括异源重链基因座的多核苷酸序列、分离的编码本发明仅有重链的抗体的多核苷酸及包含异源重链基因座的载体, 或其片段, 或分离的编码本发明仅有重链的抗体多核苷酸。

[0132] 本发明也提供了用本发明的异源重链基因座或其片段或分离的编码仅有重链的抗体或抗体片段转化的宿主细胞。

[0133] 在第二个方面, 本发明提供了包含本发明抗原特异性 V_H 结合域、以及与其连接的提供效应子活性的效应子部分的多肽复合体。此外, 这种效应子活性由重链恒定区提供且定位在分子氨基末端或羧基末端。这些多肽复合体保留有抗原特异性 V_H 结合域赋予的生理学功能, 也具其他靶向作用或效应子部分的效应子功能。这种多肽复合体可为功能性单体形式, 或依赖于效应子部分、二聚体、四聚体、五聚体、多聚体或结合不同 V_H 结合域而赋予多价和多特异性的其他复合体间的设计及相互作用。 V_H 结合域可存在于结合分子的氨基末端或羧基末端 (参见图 1 的二聚体实例)。

[0134] 如果效应子部分包含结合域, 其特异性可不同于抗原特异性 V_H 结合域的特异性。这种排列的优点为多肽复合体可促进不同靶标的交联。例如双特异性多肽复合体可用于促进细胞-细胞相互作用及细胞/病原体相互作用。在此实施方案中, 可利用本发明多肽复合体例如用来桥接两种细胞类型例如病原体和巨噬细胞 (参见 Biburger 等, (2005) J Mol. Biol., 346, 1299-1311)。 V_H 结合域的用途优选为在这种双特异性设计中 scFV 结合域的用途。 V_H 结合域具高度结合亲和力且可用最小载体结构将其结合进这种多肽复合体中且相对于四聚体亲代分子在设计上不需考虑维持 scFVs 特异性和亲和力。若要构建二聚体或多聚

体多肽复合体,则加入二聚化域例如加入得自免疫球蛋白重链恒定区的 C_H2 和 C_H3 域(见图 2)。

[0135] 本文所用术语“效应子部分”包括在细胞上介导所需生物学效应的任何部分。此效应子部分优选可溶的且可为肽、多肽或蛋白质或可为非肽结构。例如效应子部分可为酶、激素、细胞因子、药物、前体药物、毒素特别是蛋白质毒素,整合结构中放射性核素、结合域、二聚化域或相互作用域、显像剂、白蛋白或抑制剂。

[0136] 白蛋白可用作效应子部分而改善抗原特异性 V_H 结合域的稳定性或药物代谢动力学和/或药效学性质(Sung 等,(2003)J. interferon Cytokine Res.,23(1):25-36)。或者,效应子部分可为聚乙二醇化的结构或天然糖基化的结构从而改善药效学性质。

[0137] 这种效应子部分可为键合到抗原特异性 V_H 结合域的肽,或者其可化学性键合到抗原特异性重 V_H 域,例如通过使用化学连接结构例如马来酰亚胺交联剂。可选择的本发明的多肽复合体可为表达的融合蛋白。如此本发明也包括包括异源重链基因座多核苷酸序列,或者本发明的编码仅有重链的抗体的分离的多核苷酸,其中多核苷酸进一步包含在阅读框内编码效应子部分的一个或多个外显子。这种外显子可为多核苷酸的 5' 或 3' 末端。例如多核苷酸可以下述次序(following order)并在阅读框内包含:V_H 和结合域\效应子部分基因片段。

[0138] 关于基因融合,可用编码融合蛋白氨基酸序列的重组 DNA 构建体与编码位于相同阅读框各个域的 DNA 达到各个域的连接。这种构建体具有诊断和治疗价值。对于诊断,这种效应子域可为荧光蛋白质(例如 GFP)或酶(例如 β-gal)。或者,这种效应子域可为增强结合于底物的 tag(例如多组氨酸或生物素),可为提供二抗结合位点或亮氨酸拉链或可利于结合荧光标记的类似结合基序的抗原。

[0139] 多肽复合体

[0140] 本发明人也清楚可能产生包含单独或与包含互补装配域且具其他效应子活性的分离效应子(轻)链组合的至少部分抗体重链的二价或多价多肽复合体。本发明的多肽复合体保留重链恒定区赋予的生理功能及与效应子链相关的另外的效应子部分功能(图 3)。

[0141] 因此在第三个方面,这种多肽复合体包含与一种或多种效应子链(轻链)组合的重链。本发明的第二个方面提供了一种包含一对重链和一对效应子链的多肽复合体,其中:

[0142] 一对重链相互连接;

[0143] 一条效应子链与一条重链相连,而另一条效应子链与另一条重链相连;

[0144] 每个重链包含结合域、优选包含至少 C_H2、C_H3 和任选 C_H4 恒定区域的二聚化域和能够结合于效应子链互补装配域的效应子部分;

[0145] 效应子链包含连接于效应子部分的互补装配域,

[0146] 其中装配域和互补装配域通过非共价相互作用互相连接。

[0147] 优选的重链中的效应子部分不同于效应子链中的效应子部分。

[0148] 任选的多肽复合体包括柔软的铰链样域,该域位于 C_H3 域(或 C_H4 域,如果存在)的羧基末端并通过它与装配域相连。优选的多肽复合体包括天然铰链域或柔软的位于结合域和 C_H2 域之间工程铰链样域。存在的铰链区促进所得多肽复合体中结合域和效应子部分独立发挥功能。

[0149] 在第一条多肽重链中效应子部分任选特异性不同于第二条多肽重链中效应子部分的特异性。根据本发明,多肽复合体的效应子部分可被结合域取代。优选的结合域包含 V_H 域(如本发明第一个方面所定义)或细胞受体结合域。所得四价二聚体结合蛋白(多肽复合体)可包含多达 4 个不同效应子部分。优选的在重链氨基末端的效应子部分相同,且在羧基末端的也相同(但是识别不同抗原或表位到氨基末端),促进单个同二聚体的装配。这种分子可确证捕获病原体,通过包括适当的重链域(例如 IgG 或 IgM)提供的效应子功能的优势。

[0150] 根据本发明第三个方面,示例性多肽复合体有利于细胞化学标记、靶向作用或治疗。例如效应子分子包含定向于癌细胞表面标记的抗原特异性 V_H 结合域及包含结合域特定的前体药物转化酶(效应子链)的效应子部分。抗原特异性 V_H 结合域结合于靶标且使效应子部分几乎进入靶标从而在结合效应子链上其在前体药物(例如带有 CB1954 的硝基还原酶)中可在靶标上发挥生物功能。作为二聚化域的包括的免疫球蛋白重链效应子功能也可利于消除靶细胞。

[0151] 效应子链

[0152] 效应子链包含互补结合域和效应子部分,其通过重链效应子部分与重链连接从而形成装配的多肽结合复合体。效应子链互补装配域可为效应子部分或蛋白质或融合或化学性连接于效应子部分的可选择配体的整体部分。装配多肽结合复合体的重链结合于靶标且使效应子(轻)链部分几乎进入靶标从而发挥靶标的生物功能。

[0153] 效应子部分

[0154] 本文所用术语“效应子部分”包括在细胞上介导所需生物效应的任何部分。效应子域可为细胞例如 T-细胞、肽、多肽或蛋白质或可为非肽结构。例如效应子域可为酶、药物、前体药物、毒素特别是蛋白质毒素、螯合结构中放射性核素或结合域。根据所需效应,与互补装配域相关效应子部分可为细胞、蛋白质、有机物或天然的无机物。

[0155] 关于本发明所有上述方面中所用术语“结合域”包括任何生理性介质中有活性的多肽域。在生理条件下这种结合域也必须具有结合于靶标的活性。

[0156] 这种结合域包括可介导结合或附着到细胞表面的域。本发明的多肽复合体中可使用的适当的域为哺乳动物、原核细胞或病毒细胞粘附分子、细胞因子、生长因子、受体拮抗剂或激动剂、配体、细胞表面受体、调节因子、结构蛋白质和肽、血清蛋白、分泌性蛋白、质膜相关蛋白质、病毒抗原、细菌性抗原、原生动物的抗原、寄生性抗原、脂蛋白、糖蛋白、激素、神经递质、凝固因子、工程单链 Fvs 等。优选的结合域为脊椎动物 V_H 域,更优选哺乳动物 V_H 域例如人 V_H 域。

[0157] 结合域可包含骆驼 $V_H(V_{Hm})$ 域或可包含得自非-骆驼的 V_H 域。优选的结合域为人 V_H 域。由于为适应体内抗原激发经 VDJ 重排和体细胞突变产生而具有更高亲和力,与得自合成噬菌体文库的 V_H 结合域相比, V_H 结合域优选得自转基因动物或骆驼(如前面所述)的 B-细胞来源。

[0158] 如果效应子部分包含结合域,优选其具有与重链结合域不同的特异性。重排的优点是多肽复合体可促进不同靶标交联或结合靶细胞上的不同抗原(例如病原体)。

[0159] 第一条重链中结合域可具有与第二条重链中结合域不同的特异性。以这种方式,多肽复合体至少为二价且能够交联不同靶标,且效应子域能够在两个靶标均起作用。可通

过结合四价重链和包含带有不同特异性和功能性的效应子域的效应子链产生多价多肽复合体。同样,第一条重链中效应子部分可具有与第二条重链中效应子部分不同的特异性,其允许捕获超过一条具不同功能性的效应子链。

[0160] 结合于效应子部分的互补装配域

[0161] 当重链与轻链相连时,本文所用术语“效应子部分”和“互补装配域”包括相互间可形成至少非共价连接的任何部分。例如效应子部分和互补装配域可为蛋白质、肽片段或能够形成蛋白质-蛋白质相互作用的共有序列,蛋白质-蛋白质相互作用例如可见于:免疫球蛋白重链 C_H1 域和免疫球蛋白轻链恒定区、亮氨酸拉链、VCAM 和 VLA-4、整联蛋白和细胞外基质蛋白、整联蛋白和细胞表面分子例如 CD54 或 CD102、ALCAMs 和 SRCR 域、scFv 和抗原或 V_H 结合域和抗原之间。

[0162] 重链

[0163] 重链的二聚化域包含免疫球蛋白重链恒定区,此恒定区(C_H 外显子)可赋予此多肽结合复合体其它生理功能。特别的是,根据抗体恒定域类别或亚类,免疫球蛋白重链恒定域除其它以外还可提供如补体结合作用、巨噬细胞活化和与 Fc 受体的结合。

[0164] 如上述讨论,已经很好证明了表达的这种重链在体内效应子功能中具有重要作用。建立的细胞系可产生多肽复合体,具有有利的靶向和生物活性但是重链恒定区可为不需要的诊断性或治疗性类别,或者其可能不分泌适当的数量。相应的,本发明多肽复合体的重链恒定域可特异性改变或者局部或完全不产生或清除免疫球蛋白重链。

[0165] 例如,已知 M 类的 Ig 分子在巨噬细胞活化和补体途径中起重要作用。由于几乎进入其结合位点,IgM 具有高度病原体亲和力,包括病毒。但是亦知 IgM 难以使用于快速免疫测定技术,而 G 类的 Ig 可容易的使用于这些技术中。为这种用途,转换重链类别自 μ 至 γ 域是有利的。

[0166] 重链 C _{γ} 基因座的单独表达可产生 IgG,包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 同种型,部分也可活化补体。IgG 抗体结合及活化巨噬细胞和粒性白细胞,且可穿过胎盘。

[0167] 多种抗体类别的其它应用如前所述。

[0168] 本发明多肽复合体的重链恒定区可为如上文定义的人、兔、大鼠或小鼠来源。优选的其为人源。

[0169] 也可单独用本发明的多肽复合体通过使用没有效应子功能的二聚化域来封闭配体与受体的结合。可通过多特异性多肽复合体封闭多重受体(Multiple receptors)。

[0170] 在本发明第四方面中,效应子分子可包含二聚化域,从而使效应子分子可与分离的效应子分子结合。二聚化域可包含一种或多种 C_H2、C_H3 或 C_H4 抗体恒定区域和 / 或 J 链。在本发明这种实施方案中,两种或多种效应子分子可结合产生效应子分子二聚体或多聚体。这些效应子分子可相同(使产生效应子分子同二聚体或同多聚体)或不同(使产生效应子分子异源二聚体或异源多聚体)。优选的效应子分子二聚体或多聚体为二价或多价。优选的两种或多种效应子分子恒定区(即二聚化域)相同,因此降低产生不均一性的可能性。

[0171] 根据本发明第四个方面,提供了包含包括第一条多肽重链和第二条多肽重链的二聚体的多肽复合体,其中:

[0172] 每个多肽重链包含结合域和任选包含至少 C_H2、C_H3 和任选 C_H4 抗体恒定域的二聚

化域,和任选的效应子部分,其中优选:

[0173] 在第一条多肽重链中结合域具有与第二条多肽重链中结合域相同的特异性,及

[0174] 这两种多肽重链的恒定区(二聚化域)相同。

[0175] 优选第一条和第二条链具有相同的效应子部分。

[0176] 优选的二聚化域包含至少 C_H2 、 C_H3 和任选的 C_H4 抗体恒定域。

[0177] 本发明的第四方面也提供包含多个多肽重链二聚体和 J 链的多肽复合体,其中:

[0178] 多个多肽重链二聚体通过 J 链装配;

[0179] 每个多肽重链包含结合域和相同的 μ 、 ϵ 、 α 或 γ C_H2 、 C_H3 和任选的 C_H4 域;及

[0180] 在多肽复合体中至少有两种具有不同特异性的结合域(参见图 4 和 5)。

[0181] 如上述本发明第四方面所定义,每个重链恒定区优选包含至少一个重链恒定区基因,其表达产物没有功能性 C_H1 域从而产生仅有重链的抗体。每个重链恒定区也可包含一种或多种附加的选自包括 $C\delta$ 、 $C\gamma_{1-4}$ 、 $C\mu$ 、 $C\epsilon$ 和 $C\alpha_{1-2}$ 的基团的重链恒定区基因,条件是附加的重链恒定区基因也不表达功能性 C_H1 域。根据优选的所需抗体种类的类别或混合物选择重链恒定区基因。

[0182] 优选在表达的 IgA 和 IgM 中仅有两种不同特异性的结合域。

[0183] 在一个实施方案中,每个重链包括 C_H4 域,恒定域为 α 域且多肽复合体包括 J 链。

[0184] 在另一个实施方案中,每个重链包括 C_H4 域,恒定域为 μ 域且抗体包括 J 链。

[0185] 多肽复合体的装配

[0186] 本发明多肽复合体的调节域排列使其以很多可能变化的排列次序构建。在多肽复合体的域结构和氨基酸序列中的这种转变可通过适当突变或相应 DNA 编码序列的适当区域的半合成和置换获得。置换或附加域可得自相容的重组 DNA 序列。例如重链可包括天然铰链或工程的柔性多肽域,其位于结合域和 C_H2 域的氨基末端之间,也位于效应子域和重链(C_H3 或 C_H4) 的 C-末端之间。

[0187] 本发明多肽复合体中重链表达为融合蛋白。本发明这个方面的多肽复合体中效应子链可表达为融合蛋白或可通过化学方法装配,或者如果细胞可自血液或组织中分离则或可进行体内捕获(例如白蛋白)。

[0188] 在基因融合下,可使用编码融合蛋白的氨基酸序列与编码位于相同阅读框内多种域的 DNA 达到各种域的连接。

[0189] 如果以融合蛋白部分存在,效应子部分可位于互补装配域氨基末端或羧基末端。

[0190] 或者,可通过如本领域中已知的正常肽化学方法而不通过合成融合蛋白的方法装配效应子链中的域。

[0191] 可通过肽键或通过化学键连接。例如效应子部分可为键合到互补装配域的肽,或者其可化学性键合到互补装配域例如通过使用化学连接结构例如马来酰亚胺交联剂。

[0192] 效应子部分可位于重链中任何区域。例如效应子部分可位于重链 C 末端或在结合域与多肽复合体的 C_H2 域或铰链域之间。由于可能干扰效应子功能和二聚化域,优选装配域不位于 C_H2 和 C_H3 之间。优选效应子部分经肽的柔性接头或铰链样区连接于重链的氨基末端或羧基末端从而促进效应子部分的独立结合/发挥功能。

[0193] 多核苷酸、载体和宿主细胞

[0194] 本发明也提供了编码任何一种本发明多肽复合体的重链的多核苷酸序列,也提供了包含一种或多种上述多核苷酸的载体和用编码本发明多肽复合体重链转化的宿主细胞。多核苷酸优选包括使表达的重链以同二聚体分泌进入宿主细胞生长培养基中的序列。宿主细胞可为任何来源,包括细菌和酵母细胞,但是优选脊椎动物宿主细胞,更优选哺乳动物宿主细胞。

[0195] 用编码包含对不同靶向特异的结合域的重链的第二种载体转染相同宿主细胞导致两种构建体共表达及同二聚体和异二聚体混合物的装配。同二聚体将显示对同族抗原的特异性且异二聚体将结合两个抗原。

[0196] 本发明也提供了用至少一条本发明多肽复合体的效应子链编码的载体转化的宿主细胞。这种宿主细胞可为任何来源,包括细菌和酵母细胞,但是优选脊椎动物宿主细胞,更优选哺乳动物宿主细胞。可选择的效应子链可使用本领域已知方法合成。

[0197] 本发明也提供用编码至少一条本发明多肽复合体重链的载体转化的宿主细胞。这种宿主细胞可为任何来源,包括细菌和酵母细胞,但是优选脊椎动物宿主细胞,更优选哺乳动物宿主细胞。可选择的重链可使用本领域已知方法合成。

[0198] 本发明也提供了用编码本发明多肽复合体的至少一条重链和至少一条效应子链的载体转化的宿主细胞。这种宿主细胞可为任何来源,包括细菌和酵母细胞,但是优选脊椎动物宿主细胞,更优选哺乳动物宿主细胞。可选择的这些链可使用本领域已知方法独立或装配合成。

[0199] 另外本发明提供了表达本发明的至少一种重链同二聚体或异二聚体多肽复合体的转基因生物体。这种转基因生物体可为非人脊椎动物或哺乳动物,植物或昆虫。

[0200] 本发明也提供了产生种类特异性仅有重链的抗体及其 V_H 域的方法,根据本发明第一个方面通过用抗原免疫本发明的转基因生物体而制得。

[0201] 在本发明这个方面的优选实施方案中,生物体为小鼠。

[0202] 用于健康护理应用产生的抗体和多肽复合体需要大规模的制造体系,上述详细讨论了其实例。这种体系包括适于大规模培养技术的植物(例如玉米)、转基因牛和绵羊、雏鸡和昆虫幼虫。其他产生体系包括病毒感染(例如昆虫幼虫和细胞系中杆状病毒)细胞培养和种系方法也为本领域技术人员所熟知。

[0203] 这些方法和本领域已知的其他适当方法可用于产生本发明的多肽结合复合体。可使用这些方法产生同二聚体和/或异二聚体。

[0204] 本发明的仅有重链的抗体和多肽复合体的用途

[0205] 本发明的仅有重链的抗体和多肽结合复合体有许多用途。

[0206] 例如,本发明的仅有重链的抗体和多肽复合体包含双特异性和多特异性多肽复合体。这些复合体特别有利于例如治疗性用于治疗和预防感染性疾病。

[0207] 本发明的仅有重链的抗体和多肽结合复合体有利于细胞化学标记、靶向作用、治疗和诊断。

[0208] 在单抗体治疗中,病原体逃避(pathogen escape),例如由于突变导致失去单一结合位点将丧失抗体的治疗效应。产生的异二聚体多肽复合体识别相同病原体上不同抗原可克服这种问题。在本发明多肽复合体中具有不同特异性的至少两种结合域的用途也可用于提高细胞-细胞相互作用和细胞/病原体相互作用。

[0209] 在这种实施方案中,本发明多肽复合体可用作例如在两种细胞类型例如病原体和巨噬细胞,或肿瘤细胞和 T- 细胞之间的桥接 (bridge) 多肽复合体。可选择的该多肽复合体可识别相同病原体上两种或多种表位,通过由重链恒定区单独提供的效应子功能。

[0210] 或者,双特异性多肽结合复合体可使用在体内的靶细胞和组织,接着可使用于捕获循环的效应子分子或显像剂。例如双特异性肿瘤靶向剂可使用到捕获前途前体药物转化复合物 (pro-drug converting complexes) 从而局限性转化前体药物为活性剂。依赖于选择的结合域,与效应子剂结合的双特异性或多特异性结合复合体也可用于结合并破坏一种或多种病原体。可选择的识别相同病原体上不同抗原的两种或多种结合域的存在提供临床利益且降低了病原体逃避和病原体内突变导致药物过量的可能性。

[0211] 本发明根据本发明第一个方面提供了仅有重链的抗体或其片段,根据本发明第二个方面提供了多肽链和复合体,且根据本发明第三个方面提供了效应子链和多肽复合体。所有均适于人的药物用途,且如此本发明提供了包含本发明的仅有重链的抗体、多肽链、效应子链或多肽复合体的药用组合物。本发明也提供了本发明的仅有重链的抗体、多肽链、效应子链或多肽复合体在制备用于预防和 / 或治疗疾病药物中的用途。依赖于给药方法和药物效应,可共同或单独制备重链和效应子链。

[0212] 在给予患者前典型制备药用组合物和药物。

[0213] 例如特别如果其为冻干,仅有重链的抗体或多肽复合体可与稳定剂混合。加入糖 (例如甘露醇、蔗糖或海藻糖) 典型的赋予冷冻干燥期间稳定性,且优选的稳定剂为甘露醇。人血清白蛋白 (优选重组体) 也可作为稳定剂加入。也可使用糖类混合物例如蔗糖和甘露醇、海藻糖和甘露醇等。

[0214] 可向组合物中加入缓冲液例如 Tris 缓冲液、组氨酸缓冲液、甘氨酸缓冲液或优选的磷酸盐缓冲液 (例如含有磷酸二氢钠和磷酸氢二钠)。加入缓冲液使 pH 优选为 7.2-7.8, 且特别的 pH 约为 7.5。

[0215] 为冷冻干燥后重组,可使用无菌注射用水。也可能用包含人血清白蛋白 (优选重组体) 的含水组合物重建冻干块 (lyophilised cake)。

[0216] 通常使用纯化形式的仅有重链的抗体和多肽复合体连同药理学适当的载体。

[0217] 由此本发明提供了用于治疗患者的方法,包括给予患者本发明的药用组合物。优选患者为人,可为儿童 (例如幼儿或婴儿)、青少年或成人但通常为成人。

[0218] 本发明也提供了本发明仅有重链的抗体、多肽链、效应子链或多肽复合体作为药物的用途。

[0219] 本发明也提供了本发明仅有重链的抗体、多肽链、效应子链或多肽复合体在制造治疗患者药物中的用途。

[0220] 这些用途、方法和药物优选用来治疗一种下列疾病或紊乱:伤口愈合,细胞增殖性疾病包括肿瘤、黑素瘤、肺、结肠直肠、骨肉瘤、直肠、卵巢肉瘤、颈部、食管、乳房、胰腺、膀胱、头部和颈部及其他实体肿瘤,骨髓组织增殖性疾病例如非白血性白血病、非霍奇金淋巴瘤、白细胞减少、血小板减少症、血管发生疾病、卡波西肉瘤,自身免疫性 / 炎性疾病包括变态反应症、炎性肠病、关节炎、银屑病和呼吸道炎症、哮喘、免疫疾病和器官移植排异反应,心血管和脉管病包括高血压、水肿、心绞痛、动脉粥样硬化、血栓形成、败血病、休克、再灌注损害和局部缺血,神经疾病包括中枢神经系统疾病、阿尔茨海默病、脑损害、肌萎缩的侧生

硬化症和疼痛,发育障碍,代谢疾病包括糖尿病、骨质疏松症和肥胖症,AIDS 和肾脏病,感染包括病毒感染、细菌感染、真菌感染和寄生虫感染,与胎盘相关的病症及其他症并用于免疫疗法。

[0221] 在另外的方面,本发明提供本发明仅有重链的抗体或多肽结合复合体作为诊断剂、预后剂或治疗性显像剂的用途。另外本发明提供单独或与一种或多种本发明效应子(轻)链结合的本发明重链同二聚体或异二聚体作为治疗性显像剂、细胞化学试剂或诊断剂的用途。

[0222] 本发明提供本文所述仅有重链的抗体或其片段作为细胞内结合剂或抗体酶的用途。优选的仅有重链的抗体片段为可溶性抗原特异性 V_H 结合域。

[0223] 本发明也提供本发明抗原特异性单链抗体或 V_H 结合域作为酶抑制剂或受体阻滞剂的用途。优选的仅有重链的抗体片段为可溶的抗原特异性 V_H 结合域。

[0224] 本发明也提供融合到效应子分子的 V_H 域作为治疗性显像剂、诊断剂、抗体酶或试剂的用途。

[0225] 附图简述

[0226] 图 1A 和 1B :显示包含结合域 (V_H) 二聚化域(任选 C_H2 、 C_H3 和 C_H4) 及效应子部分(EM)。结合域和效应子部分可定位在二聚化域的氨基末端或羧基末端。

[0227] 标示了柔性接头(\leftarrow)和铰链(\int)区

[0228] 图 2A 和 2B :显示结合域的不同构型及通过其他结合域置换效应子部分。A. 优选选项,因为产生同二聚体。不需要分离产物。B. 产生同二聚体和异二聚体的混合物。需要分离产物。

[0229] 图 3 :显示与效应子链结合的重链多肽复合体。效应子链包含互补结合域(CBD)和效应子部分(EM)。CBD 由重链的 EM 识别。CBD 与效应子融合或是效应子的一部分,例如酶、毒素、螯合剂、显影剂。效应子链可独立于重链合成。

[0230] 图 4 显示与 J 链结合的二价分泌型 IgA。

[0231] 图 5 显示经 J 链装配的多价仅有重链 IgM 样多肽复合体。

[0232] 图 6 :显示产生表达 IgG 基因座的转基因小鼠并用抗原激发后产生功能性仅有重链的抗体和 V_H 域的策略。

[0233] 图 7 :显示产生表达 IgM 基因座的转基因小鼠并用抗原激发后产生功能性仅有重链的抗体和 V_H 域的策略。

[0234] 图 8 :显示产生表达 IgA 基因座的转基因小鼠并用抗原激发后产生功能性仅有重链的抗体和 V_H 域的策略。

[0235] 图 9 :使用 V_{H1} 和 V_{H2} 引物以及人 C_H2 引物对其基因座中带有恒定区中具骆驼剪接突变的小鼠的骨髓 cDNA 进行 PCR 而去除 CH1,并对 PCR 产物进行序列对比。结果显示 CH1 未被清除。

[0236] 图 10-13 : V_H /骆驼 $V_H(V_{Hm})$ 构建体的结构。1-n 代表任何数量的 V_H 基因,或 D 或 J 片段。人基因座的正常补体为 51 个 V 基因,25 个功能性 D 片段(附加 2 个没有功能的片段)及 6 个 J 片段。在 C_H2 (IgM) 或 C_H3 (IgE) 区的情况下,没有 H 区且在 CH3 和 M1 之间有另外的外显子。 V_H 基因突变而提供如共有域(public domain)中溶解性。

[0237] V_H 基因、D 和 J 片段及 C 外显子优选人,但是可源自任何其他物种包括骆驼。后者

情况下骆驼 VH(VHH) 由于天然可溶而不突变。

[0238] 图 14 :用于产生对 *E. coli* HSP70 的仅有重链 IgG 的小鼠免疫接种方案和抗体测定。

[0239] 图 15 :得自转基因小鼠脾细胞流动细胞计数分析和免疫组化结果。

[0240] 图 16 :DKTP 免疫的转基因小鼠的 ELISA 分析结果和抗体文库的序列分析结果。

[0241] 图 17 :在免疫的转基因小鼠中体细胞突变和 VDJ 重排的实例。

[0242] 图 18 :用含有 A5 抗体应激质粒转染的 Tet-on 细胞系上免疫染色测定结果。

[0243] 图 19 :转基因小鼠系血清的蛋白质印迹分析结果。

[0244] 图 20 :人 IgM 混合通过 IgM 附加 IgG 基因座小鼠产生的人单链 IgM 的大小分级分离。

[0245] 图 21 :单链 IgM 和抗人 TNF α 产生的 IgG 抗体的 ELISA 分析结果。

[0246] 图 22 :显示具有对 HSP70 和 α GAG 结合亲和力的同二聚体质粒的产生策略。

[0247] 图 23 :CHO 细胞中同二聚体多肽复合体的功能性表达。

[0248] 图 24 :证明同二聚体多肽复合体同时功能性结合于 α GAG 和 HSP70。图式代表二价、双特异性抗体。第二种可变区 (直接抗 gag 的 VHH2) 克隆到含有其他特异性的仅有重链的抗体 (直接抗 HSP70 的 VHH1) 的羧基末端。CH3 和 VHH2 之间的铰链区被联结子置换, 其中所有半胱氨酸被脯氨酸置换 (箭头)。用 Gag 包被 ELISA 板, 用 1% 牛奶 /1% BSA 的 PBS 溶液封闭, 首先用双抗体培养基 (1 : 2 稀释) 然后用 BI21 细胞裂解物 (含有 HSP70) (1 : 2 稀释) 孵育。Elute 结合蛋白和样品缓冲液 = 2- 巯基乙醇且在 8% 凝胶上跑电泳。用抗 Gag 的多克隆 / 单克隆抗体、双抗体和 HSP70 染色。 α Gag :兔多克隆 / 猪 α 兔 -AP (蓝色)。 α HSP70 :单克隆 / 山羊 α 人 IgG-HRP (棕色)。 α 双抗体 :山羊 α 人 IgG-HRP (棕色)。泳道 1 :Gag/ 双抗体 /BI21 细胞裂解物。泳道 2 :Gag/ 培养基 (为双抗体阴性对照) /BI21。泳道 3 :- 牛奶 -BSA/ 双抗体 /BI21。泳道 4 :- 牛奶 -BSA/ 培养基 /BI21。泳道 5 :Gag/ 双抗体 /- 牛奶 -BSA。泳道 6 :Gag/ 培养基 /- 牛奶 -BSA。

[0249] 图 25 :显示产生同二聚体多肽复合体, 任选与具有 IgG 效应子功能的效应子链结合的策略。

[0250] 图 26 :显示产生同二聚体多肽复合体, 任选与具有 IgG 效应子功能的效应子链结合的策略。

[0251] 通用技术

[0252] 除非另有定义, 本文所用所有技术或科学方法具有与本领域普通技术人员的 (例如在细胞培养、分子遗传学、核酸化学、杂交技术和生物化学中) 通常理解相同的意义。标准技术用为分子、遗传、生物化学方法 (普遍参见 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆: 实验指南), 第二版. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 和 Ausubel 等, Short Protocols in Molecular Biology (精编分子生物学实验指南) (1999) 第四版, John Wiley & Sons, Inc.) 和化学方法。另外优选 Harlow & Lane, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N. Y., 为标准免疫技术。

[0253] 在产生本发明二价和多价多肽复合体、单一重链抗体及其片段中可使用任何适当的重组 DNA 技术。构建包含编码每个多肽复合体链或抗体链的 DNA 序列的典型表达载体例

如质粒。为免疫球蛋白酶和化学片段并分离所得片段可使用任何适当建立的技术。

[0254] 本发明也提供包括用于表达转基因小鼠中仅有重链的抗体的构建体的载体,及本发明多肽复合体的构建和表达的载体。

[0255] 应理解可构建含有编码超过多肽链的 DNA 序列的单个载体。例如编码两种不同重链的 DNA 序列可插入在相同质粒上不同位置。

[0256] 可选择的编码每个多肽链的 DNA 序列可独自插入质粒,从而产生许多构建的质粒,每个编码一种特定的多肽链。优选质粒与插入的序列相容。

[0257] 然后使用每个质粒转化宿主细胞从而每个宿主细胞含有编码多肽复合体中每条多肽链的 DNA 序列。

[0258] 在细菌体系中可用于克隆的适当的表达载体包括质粒例如 ColE1、pcR1、pBR322、pACYC 184 和 RP4,噬菌体 DNA 或这些的任何衍生物。

[0259] 在酵母体系中克隆使用的适当的表达载体包括基于 2 微米来源的质粒。

[0260] 含有适当哺乳动物基因启动子序列的任何质粒可使用在哺乳动物体系克隆。昆虫或杆状病毒 (bacculoviral) 启动子序列可用于昆虫细胞基因表达。这种载体包括得自例如 pBR322、牛绒毛状瘤病毒、逆转录病毒、DNA 病毒及牛痘病毒的质粒。

[0261] 为表达多肽复合体或抗体可使用适当的宿主细胞,包括细菌、酵母和真核细胞例如昆虫或哺乳动物细胞系,转基因植物、昆虫、哺乳动物和其他无脊椎动物或脊椎动物表达体系。

[0262] 本发明的多肽复合体和单一重链抗体

[0263] 应理解本发明术语“多肽复合体”、“单一重链抗体”及“异源重链基因座”也包括得自任何来源的同源多肽和核酸序列,例如相关细胞同源物、其他物种的同源物及其变异体或衍生物。

[0264] 因此本发明包括变异体、多肽复合体和本文所述抗体的同源物或衍生物。

[0265] 在本发明上下文中,同源序列其中至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9% 相同,优选至少 98% 或 99% 相同,包括氨基酸序列,在氨基酸水平至少 30,优选 50、70、90 或 100 个氨基酸。虽然源性也可依据类似性考量(即具有类似化学性质/功能的氨基酸残基),但是在本发明上下文中优选依据序列鉴定表达源性。

[0266] 本发明也包括为产生本发明多肽复合体和抗体中使用而构建的表达载体和转化的宿主细胞。

[0267] 在相同宿主细胞中表达各个链后,其可恢复而提供活化形式的全部多肽复合体或仅有重链的抗体。

[0268] 考虑在本发明优选形式中,各个重链经宿主细胞处理从而形成利于自其分泌的全部多肽复合体或抗体。优选的效应子链分别通过宿主细胞或合成方法产生。

[0269] 用于制备重组抗体多肽复合体的技术在上述参考文献中描述,且也参见于例如 EP-A-0623679、EP-A-0368684 和 EP-A-0436597。

[0270] 转基因生物体的免疫接种

[0271] 在另一个方面,本发明提供用于制备产生本发明抗体的方法,包括给予本发明的转基因生物体抗原。

[0272] 本发明的转基因动物产生的抗体和多肽复合体包括多克隆和单克隆抗体及其片段。如果需要多克隆抗体,可通过已知技术用抗原和免疫动物血清免疫转基因动物(例如小鼠、兔、山羊、马等),收集和处理。如果含有多克隆抗体血清含有其他抗原的抗体,可通过本领域技术人员熟知的免疫亲和色谱等技术纯化感兴趣的多克隆抗体。本领域也已知产生和处理多克隆抗血清的技术。

[0273] 本发明多肽结合复合体和抗体的用途

[0274] 本发明的多肽复合体和抗体包括其片段的可应用于:体内治疗性和预防性应用、体外和体内诊断应用、体外测定和试剂应用等。

[0275] 本发明多肽复合体和抗体的治疗及预防用途涉及给予上述受试哺乳动物例如人。

[0276] 给予哺乳动物的基本纯化的多肽复合体和抗体包括其片段的优选至少 90% -95% 的同源性,作为药物用途特别是哺乳动物为人时最优选 98% -99% 或更高的同源性。一旦部分纯化局部或所需同源性,本文所述多肽复合体和仅有重链的抗体可用于诊断或治疗(或体外使用)或显像或使用本领域技术人员已知方法进行测定。

[0277] 通常本发明的多肽复合体和抗体以纯化形式连同药理学上适当载体使用。典型的,这些载体包括水溶液或醇/水溶液、乳状液或混悬液,其可包括盐和/或缓冲介质。胃肠道外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠和乳酸盐林格氏液。

[0278] 如果需保持多肽复合体为混悬液,可选择作为增稠剂的适当生理学可接受赋形剂,例如羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、明胶和海藻酸盐。

[0279] 静脉内载体包括例如基于林格氏葡萄糖的液体和营养补充剂和电解质补充剂。也可存在防腐剂及其他添加剂例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体(Mack(1982) Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版)。

[0280] 本发明的多肽复合体和抗体包括其片段的可单独作为药用组合物使用或与其他药物联用。包括各种免疫治疗药物例如环孢霉素、氨甲喋呤、阿霉素、顺铂或免疫毒素。可选择的多肽复合体可与在效应位点转化前体药物的酶结合使用。

[0281] 药物组合物可包括多种细胞毒素或其他药物“鸡尾酒”结合本发明选择的抗体或甚至结合本发明选择抗体的组合。

[0282] 给予本发明药用组合物的途径可为本领域技术人员已知的任何常规途径。为了治疗包括但不限于免疫治疗,本发明的多肽复合体或抗体可根据标准方法给予任何患者。给药可通过任何适当模式包括胃肠外、静脉内、肌内、腹膜内、经皮肤、经肺途径给药,也或者适当的通过导管直接输注。给药剂量和频率根据患者年龄、性别和病情、联用的其他药物、禁忌症及其他参数由临床医生考虑。

[0283] 本发明多肽复合体和抗体可冻干保存且用前在适当载体中重建。可采用已知的冻干和重建技术。本领域技术人员应理解冷冻干燥和重建可导致不同程度的功能丧失且使用水平应由于补偿而调整。

[0284] 另外本发明多肽复合体和抗体可用作诊断目的。例如本文所述抗体可对抗抗原产生或增加,在疾病状态特定表达或自疾病状态其水平变化。

[0285] 为某些目的例如诊断或追踪目的,可加入标记。适当的标记包括但不限于任何下列的:放射性标记、NMR 自旋标记及荧光标记。标记检测方法为本领域技术人员所熟知。

[0286] 可给予含有本发明多肽复合体和抗体的组合物或其混合剂用于预防和/或治疗。

[0287] 含有本发明多肽复合体和抗体的组合物可用在预防和治疗设备中以帮助转化、灭活、杀灭或清除哺乳动物中选择的靶向细胞群。另外本文所述多肽复合体和抗体的选定组分可体外使用或体外选择性杀灭、耗尽或其他有效清除来自细胞的异源收集物的靶向细胞群。

[0288] 实施例 1

[0289] 在预实验中,制备转基因小鼠以表达重链基因座,其中两个马驼 (llama)VHH 外显子连接于人重链多变 (D) 和连接 (J) 片段,接着是 C μ 、C δ 、C γ 2、C γ 3 人恒定区基因和人重链免疫球蛋白 3' LCR。人 C γ 2 和 C γ 3 基因包括 G \rightarrow A 剪接突变 (splice mutation)。存在的 Frt 位点使单拷贝转基因小鼠通过 Flp 介导的重组由多拷贝转基因阵列产生。但是具有 G \rightarrow A 剪接突变的转基因基因座序列显示异常剪接但是未完全清除 CH1 (图 9)。

[0290] 构建体

[0291] 为克服这种问题,使用标准方法筛选基因组黏粒文库得到含有 VH 基因的克隆。基于其序列随机选择一种 (或多种) 不同种系 VHs (在人 VH' s 中有 5 属类)。根据 IMGT 编号在 42、49、50 和 52 位引入亲水性氨基酸密码子 (Lefranc 等, (1999))。通过标准程序例如使用定做的接头或同源重组直接克隆将 VH 基因结合进 BAC 载体中。

[0292] 从人基因组 Pac 文库 RPCI-11 (BACPAC Resource Center, 美国) 中选择两种克隆: 含有人重链 D 和 J 片段、C μ (IgM) 和 C δ (IgD) 的克隆 1065N8 及含有 C γ 3 (IgG3) 基因的克隆 1115N15。使用来自不同人基因组文库 (Incyte Genomics, CA, 美国) 的 Bac 克隆 11771 作为 C γ 2 (IgG2) 基因和免疫球蛋白重链 LCR 的来源 (Mills 等, (1997) J. Exp. Med., 15;186 (6):845-58)。

[0293] 使用标准技术将 C γ 3 和 C γ 2 分别亚克隆入 pFastBac 载体 (Invitrogen)。同样, 可从这些 BACs (IgA、IgE) 克隆任何其它的 Ig 恒定区。使用每个恒定区 CH1 外显子侧翼序列通过同源重组取得 CH1 外显子的完全缺失 (Imam 等, (2001))。任选可在 C μ 转换区前引入 frt 位点从而通过用标准方法例如与 rosa-flp 小鼠杂交在体内用 flp 重组酶处理而从多拷贝基因座产生单拷贝基因座 (图 10)。

[0294] 通过常规限制消化和连接或通过同源重组 (或二者混用) 或其它任何克隆技术将分离的 VH 基因、D 和 J 片段及 C 和 LCR 外显子克隆进一个 BAC 中。

[0295] 然后可构造进一步的构建体。

[0296] 仅有 IgM 的基因座

[0297] 为获得 IgM 构建体 (图 11), 一种或多种 VHs 基因 (优选工程人 VH 基因从而提供可溶性或骆驼 VHH 基因), 接着将人 D 和 J 重链片段及 C μ 克隆进 BAC。方法学参见上述。这样仅有 C μ 区克隆进 BAC。

[0298] IgM 附加 IgG 基因座, (C δ 任选)

[0299] 为获得 IgM 附加 IgG 构建体 (图 12), 一种或多种 VH 基因 (优选工程人 VH 片段从而提供可溶性或骆驼 VHH 基因), 接着将人 D 和 J 重链片段、C μ (没有 CH1 但有 CH4 外显子), (任选 C δ) 及修饰的人 C γ 2 和 C γ 3 基因和 3' LCR 克隆进 BAC。为产生仅有 IgG 基因座, 在标准克隆步骤 (如上述) 期间引入 loxP 位, 且 BAC 在 294Cre E. coli 菌株中生长 (Buscholz 等), cre 介导的重组生成产生仅有 IgG 的基因座的细菌。进一步构造细节参见上述。

[0300] IgM 附加 IgG 基因座, (C₈ 任选)

[0301] 为获得 IgM 附加 IgG 构建体 (图 13), 一种或多种 VHs 基因 (优选工程人 VH 片段从而提供可溶性或骆驼 VHH 基因), 接着将人 D 和 J 重链片段、C_μ (带有 CH1 和 CH4), (任选 C₈) 及修饰的人 C_γ2 和 C_γ3 基因和 3' LCR 克隆进 BAC。为产生仅有 IgG 基因座, 在标准克隆步骤 (如上述) 期间引入 loxP 位, 且 BAC 在 294Cre E. coli 菌株中生长 (Buscholz 等), cre 介导的重组生成产生仅有 IgG 的基因座的细菌。

[0302] 转基因小鼠, 繁殖和基因分型

[0303] 通过标准受精卵显微注射或经胚胎干细胞转染技术将终 BAC 引入到转基因小鼠中。

[0304] 用 5' 和 3' 末端基因座探针通过尾部 DNA 的 DNA 印迹分析 (Southern 1975) 检查转基因基因座完整性和拷贝数。创始鼠 (founder) 作为在 μ MT^{-/-} 背景中的品系繁殖。通过标准 PCR 分析使用基因座不同区域各自的引物完成基因分型。得自转基因小鼠的 BM cDNA 的 RT-PCR 产物序列分析, 其中 C_γ2 和 C_γ3 的整个 CH1 外显子缺失 (其中一种具有 (HLL 品系) 而另一种没有 C_μ 和 C_δ 基因), 显示这种转基因座不仅能够 VDJ 重组, 而且 IgG 转录物类似于在马驼和骆驼 HCAbs 中所见。

[0305] 免疫组化

[0306] 在 OCT 化合物中镶嵌脾。在丙酮中固定冷冻的 5 μ m 冷冻切片且如前面所述单或双标记 (Leenen 等, 1998)。采用单克隆抗体抗 B220/RA3-6B2、抗 -CD11c/N418 (Steimnan 等, 1997), 作为杂交瘤培养上清液。过氧化物酶偶联山羊抗人 -IgG 和抗 -人 IgM 得自 Sigma。第二步骤试剂为过氧化物酶标记的山羊抗 -大鼠 Ig (DAKO, Glostrup, 丹麦) 或抗 -仓鼠 Ig (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 和山羊抗 -大鼠 Ig 碱性磷酸酶 (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, 美国)。

[0307] 图 15 显示在 μ MT^{-/-} 背景中来自 μ MT^{-/-}、WT 和 HLL 及 HLL-MD 转基因小鼠中 5 μ m 冷冻脾切片的免疫组化分析。切片用 B 细胞的抗 B220 (蓝色) 和树状突细胞的抗 -CD11c/N418 (棕色) 染色。箭头显示小簇 B 细胞的定位。

[0308] 流式细胞计数分析

[0309] 在 PBS 中自淋巴器官制备单细胞悬液, 如前所述 (Slieker 等, 1993)。4°C 下在 96 孔板中约 1×10^6 个细胞与抗体在 PBS/0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 中孵育 30 分钟。在 PBS/0.5% BSA 中洗涤细胞两次。对于每个样品, 每 3×10^4 数使用 FACSscan 分析仪评分 (Becton Dickinson, Sunnyvale, 加拿大)。使用 CellQuest 1.0 版计算机软件分析 FACS 数据。在 Becton Dickinson FACS Calibur 上进行四色分析。下列 mAbs 得自 BD Pharmingen (San Diego, 加拿大): FITC 偶联的抗 B220-RA3-6B2、PE 偶联的抗 CD19。在图 15 的底格中展示了用抗 -CD 19 和抗 -B 220 染色的脾细胞 FACS 扫描数据。

[0310] 图的左侧为通过将 HLL 品系与 FlpeR 转基因品系杂交的体内 FLP 重组的图像, 以及提供支持的重组体脾细胞的 FACS 扫描数据, 显示在直接产生的原始 HLL-MD 品系中可见 B 细胞获救。右侧为与 CagCre 转基因品系杂交的体内 Cre 重组图像, 以及单拷贝重组体的脾细胞的 FACS 数据。

[0311] 免疫接种和杂交瘤产生 (图 14)

[0312] 制造含有包括两个马驼 VHH 域、人 D 和 J 区及 IgG2 和 3 恒定区 (没有 CH1 域) 的

仅有重链的抗体基因座的转基因小鼠。

[0313] 8 周龄小鼠用大肠杆菌热休克蛋白 70 (hsp 70) 免疫。分别在第 0、14、28、42 天皮下注射及在第 50 天腹腔注射 20 μ g 或 5 μ g 的抗原和 Specol 佐剂 (IDDL0, Lelystadt, NL)。在第 0、14 和 45 天取血。三次加强免疫后, 3 分之 1 的用 Hsp70 免疫的 HLL-MD1 小鼠中检测到低滴度抗原特异性抗体 (图 14)。

[0314] 进行标准的脾细胞与骨髓瘤细胞株系融合从而生成在单克隆杂交瘤细胞系中产生的抗 hsp70 蛋白的单克隆抗体。这种抗 -HSP 70HCab 包括马驼 VHH 片段, 其最接近与人 IgHD3-10 片段 (检索号 X13972) 和人 IgHJ4-02 片段 (检索号 X86355) 重组的 D 区 (VHH 2)。与种系构建 (germ line configuration) 相比虽然没有高频率, 但是 VHHs 几乎没有引起氨基酸改变的突变, 参见图 9A。RT-PCR 分析也显示, 在杂交瘤中仅有一种产生性的 IgH 转录物, 表明没有其他转录物产生。α HSP70 IgG2 抗体作为仅有重链二聚体分泌 (变性凝胶下蛋白质印迹 (二聚体) 和非变性凝胶下蛋白质印迹 (单体) 环境, 图 14)。使用 G1onal 细胞 TM-HY 试剂盒 (StemCell Technologies, UK) 根据厂家说明书在第 56 天融合脾细胞与 Sp2-0-Ag14 骨髓瘤细胞 (R. Haperen 馈赠)。

[0315] 用 TNF α 免疫含有仅有重链的抗体基因座的转基因小鼠, 其包括两个马驼 VHH 域、人 D 和 J 区、人 IgM 和 IgG 及 3 恒定区 (均无 CH1 域, 图 12), 从而获得 HC-IgM 抗体。在标准 ELISA 测定中三分之一小鼠显示出阳性血清。标准骨髓瘤融合产生阳性 IgM 杂交瘤 (图 16)。琼脂糖凝胶 6B 凝胶过滤后在非还原条件下层析柱每级流分在还原条件下装柱且用 α 人 IgM-HRP 检测 (图 20)。非还原条件下分级分离显示 HC-IgM 作为多聚体抗体分泌且与人对照 IgM (HC-IgM 中减去轻链和 CH1 分子量后) 大小相同。还原条件下每个柱流分的凝胶过滤显示预期的 (图 20) 的单体。

[0316] 血清 Ig ELISA

[0317] 在涂铺 EDTA 的试管中收集 15-25 周龄小鼠血液, 室温 (RT) 下离心 15' 且用 PBS1 : 5 稀释上清液。用 5mg/ml 山羊抗人 IgG (YES Biotechnology) 或山羊抗人 IgM (Sigma) 包被 96 孔板 2 小时, 用 PBS 洗涤, 室温下用封闭溶液 (1.5% BSA/1.5% 奶粉/0.1% tween 20/PBS) 封闭 1 小时且用 PBS 洗涤 3 次。装入梯度稀释的血清样品和标准品 (人 IgG2 或人 IgM (Sigma, Zwijndrecht, NL)) 且孵育 2-4 小时, 在加入第二种抗体 (1 : 2000 稀释的偶联到 HRP 的山羊抗人 IgG 或山羊抗人 (Sigma, Zwijndrecht, NL)) 前用 PBS 洗涤板 6 次。所有稀释均用封闭液完成。室温下孵育 1-2 小时后且用 PBS 洗涤, 加入 POD 底物 (Roche)。

[0318] 图 16 显示了检测自 IgG2 噬菌体文库的抗原特异性可溶 sdAbs 的 ELISA。可溶 sdAbs 在包被抗原的板上用作一抗, 然后是小鼠 α -myc 抗体和 HRP 偶联的山羊 α -小鼠抗体。使用 POD 作为底物。底部图示用限制性内切酶 Hinf I 的克隆酶解图谱, 显示编码抗 B. Pertustis 的 sdAb 的 5 个不同插入片段。

[0319] 抗体文库构建和筛选

[0320] 使用 Ultraspec RNA 分离体系 (Biotechx Laboratories Inc, Houston, Texas, 美国) 自 DKTP 免疫的单拷贝仅有 IgG 小鼠的脾 (图 12, cre 处理后) 分离总 RNA。使用寡 dT 制备 cDNA。使用特异性引物 :vh1 后 Sfi I 引物 (Dekker 等, 2003) 联用 hIgG2hingrev 引物 (5' -AATCTGGGCAGCGGCCGCTCGACACAACATTTGCGCTC-3') 通过 PCR 扩增编码 VHHDJ 的

DNA 片段。这种扩增的 VHHDJs (~ 400bp) 用 Sfi I/Not I 消化、凝胶纯化且克隆进 Sfi I/Not I 消化的噬菌粒载体 pHEN-1。

[0321] 转化进 TG1 电感受态细胞,产生人单域抗体文库。使用吸附在塑料(用未稀释疫苗包被的免疫试管)上的疫苗抗原淘选两轮。进行标准的限制性分析和序列测定。

[0322] 仅有重链基因座的 RT-PCR

[0323] 然后用 IgG2 和 IgG3 特异性引物从淋巴集结得到 cDNA 形式的 RT PCR 产物,并通过测定产物序列来研究 HLL-MD 基因座是否作为正常基因座在产生多样抗体库中发挥作用。图 17 显示自非免疫小鼠(左边部分)和免疫小鼠(右边部分)克隆体细胞突变的部分实例。这些小鼠仅有 IgG 基因座,并用大肠杆菌 hsp70、百日咳溶菌产物、破伤风类毒素免疫。灰色阴影为自 ERKCCV 起始的 IgG2 铰链区。

[0324] 虽然对淋巴集结的 RT-PCR 分析显示使用两个 V_H , 所有已测序抗体都重排了 V_H2 。通过选择 D 和 J 片段并进行 V-D 和 D-J 连接形成的 CDR3 区是抗体库可变性的来源。人 J 片段的使用与人重排中所见的类似,最常用的是 JH4 和 JH6 片段。

[0325] 这种分析显示所用的两种 VHs、不同人 D 及所有人 J 片段构成了多样性抗体库(repertoire)。也通过将每个重排基因与其种系负体即转基因构建体中原始 V_H 做比较,显示存在 IgG3 转换的 B 细胞和发生了体细胞突变(参见图 17)。因此人仅有重链 IgG 抗原受体可提供 B 细胞成熟必需信号。

[0326] 免疫染色

[0327] 图 18 显示另外用含有 A5 抗体的应答质粒转染细胞系上 Tet- 之一的免疫染色结果(Dekker 等, 2003)。上面显示在细胞质中多西环素诱导的 A5 抗体的产生(红色)及用 DAPI 染色的细胞核(蓝色)。下面显示核中表达 rtTA 的细胞为经诱导产生 A5 的细胞(上面)。用一种带有下列显示序列的抗 rtTA 的人 HCAb(绿色)完成染色。使用这种 FITC 偶联的山羊抗人 IgG 作为第二个步骤。通过 Dekker 等, 2003 先前所述检测 A5。rtTA 抗体为带有下列序列的 IgG3:

[0328] 241 AGACTCT

[0329] 80 R L

[0330] 301 CCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTC

[0331] 100 S C A A S G S I F S I N A M G W Y R Q A

[0332] 361 CAGGGAAGCAGCGGAGTTGGTCGAGCTATTACTAGTGGTGGTAGCACAAGGTATGCAG

[0333] 120 P G K Q R E L V A A I T S G G S T R Y A

[0334] 421 ACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGC

[0335] 140 D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y L

[0336] 481 AAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTTTGATCTCTATGGTTC

[0337] 160 Q M N S L K P E D T A V Y Y C L I S M V

[0338] 541 GGGGAGCCCGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGAGCTCA

[0339] 180 R G A R F D Y W G Q G T L V T V S S E L

[0340] 601 AAACCCCACTT

[0341] 200 K T P L

[0342] IgG3 铰链起始于氨基酸 198ELKTPL。比较参看图 17 中 IgG2 铰链区。

[0343] 蛋白质印迹分析

[0344] 图 19 显示 cre 处理（即 IgM 缺失，仅余留 IgG）后含有 IgM 附加 IgG 基因座（图 10）的不同转基因小鼠系的血清蛋白质印迹。在还原（图 19 右面）和非还原（图 19 左面）条件下通过 prot G 和凝胶分级分离纯化血清。对照为背景 KO 小鼠和正常人血清样品。注意在两种凝胶间大小差别显示人仅有重链 IgG 为二聚体。

[0345] 图 19 中显示信号用抗人 IgG 抗体通过标准方法检测。

[0346] 通过 IgM 附加 IgG 基因座小鼠产生人 IgM 的大小分级

[0347] 与作为对照的人血清样品混合后，在非还原条件下通过凝胶过滤将 IgM 附加 IgG 小鼠的血清（图 13）分级分离。结果显示于图 20。柱上复合体分子量从左至右每个泳道（代表每种流分）逐级下降。通过凝胶电泳在还原条件下分析流分（每个泳道）。


[0348] 在许多由用人 TNF α 免疫的含有 IgM 附加 IgG（图 13）基因座小鼠制备的杂交瘤上进行 ELISA 分析。结果显示于图 21。图 21 中顶部两行用抗人 IgG 分析，接下来的两行用抗人 IgM 分析。血清样品（行）显示小鼠产生 IgG 和 IgM 抗 -TNF α 抗体。单行显示阳性 IgM 杂交瘤。各孔用可商业购得的人 TNF α 包被。所有均为标准方法。

[0349] 实施例 2

[0350] 通过将两种仅有重链单特异性抗体相结合产生双特异性双价抗体。第一种抗体形成骨架而产生第一种特异性和效应子功能（分别为可变区和恒定区）。经新型改造的铰链结合具有第二种特异性的第二种抗体。这种铰链类似于现存 IgG2 铰链序列但是用脯氨酸代替半胱氨酸从而阻止抗体二聚体中半胱氨酸交联，且提供由脯氨酸带来的额外柔性而预防第二种抗体受到可能抑制其功能的空间位阻。

[0351] 起始的骨架抗体为抗 E. coli HSP70 蛋白质而产生的抗体。此 HSP70 抗原注射进含有（参见前文图 14）中所述的仅有重链的抗体基因座转基因小鼠。通过标准杂交瘤融合技术（参见上文）从这些小鼠产生单克隆抗体。然后通过标准 RT-PCR 重组 DNA 方法克隆编码 α HSP- 抗体的 cDNA 产生含有全长 cDNA 的质粒，其从 5' 末端至 3' 末端（在蛋白质中从 N 末端至 COOH 末端）包括起始密码子 ATG、信号肽序列、可变域 VHH1（参见 Janssens 等）、重组 D 和 J 区及 C γ 2 的恒定区（缺少 CH1 区），但是包括终止密码子和 polyA 位点（图 22 左边上部）。为克隆使用正向引物和反向引物通过 PCR 扩增编码 α HSP70 抗体的 cDNA。

[0352] 正向引物为：

[0353] CTGGAATTC **TCAACC**  GAGCTGGGGCTGAGC，提供用于克隆目的（加下划线的）的 EcoRI 位点，有效翻译起始序列（粗体）和正常起始密码子（灰色底纹）。

[0354] 反向引物为：GACAAGCTTTACCCGAGACAGGGAGAGGC，提供 HindIII 克隆位点（加下划线的）并保留了正常终止密码子。

[0355] 这种扩增因而导致形成 EcoRI/HindIII 片段，其包括 EcoRI 位点（加下划线的）、有效翻译起始序列（粗体）和正常 α HSP70 抗体基因的起始密码子（灰色底纹，也见于图 22）。

[0356] 反向 3' 末端引物为：

[0357] GACAAGCTTTACCCGAGACAGGGAGAGGC，提供 HindIII 克隆位点（加下划线的）并清除了正常终止密码子。如此产生的片段带有 EcoRI 位点和 HindIII 位点（图 22 左边从上数第 2），其中 EcoRI 位点克隆在启动子序列上，HindIII 位点用于将 5' 末端克隆在表达质

粒上并将 3' 末端克隆在新型铰链序列上 (参见下述)。最后,用 EcoRI 和 HindIII 切割该片段从而提供用于克隆的适当的单链末端。

[0358] 产生第二种特异性的第二种克隆的抗体包含抗猪逆转录病毒 (PERV) gag 抗原的马驼抗体 VHH 域 (Dekker 等, (2003) J. Virol., 77 (22) :12132-9, 图 22 上右)。使用下列引物经标准 PCR 扩增法扩增 α gag:

[0359] 正向:GTC  GCCCAGGTCCAAGTGCAGGAGTCTG 和反向引物:

[0360] GTCGAATTCATTCATTCCGAGGAGACGGTGACCTGGGTC。其提供的扩增片段 (图 22 右从上数第 2) 带有 XhoI 位点 (灰色底纹) 和 EcoRI 位点 (加下划线的), 其中 XhoI 位点克隆框架内 5' 末端与新型铰链 (参见下列), EcoRI 位点用于将 3' 末端克隆进表达质粒 (图 22, 右中)。最后用 EcoRI 和 XhoI 切割该片段从而产生用于克隆的单链末端。

[0361] 这两种抗体序列经新型铰链结合成一种双抗体序列。新型铰链由两种寡核苷酸在一起形成带有以克隆为目的的 5' 和 3' 突出端 (分别与 HindIII 和 XhoI 相容) 的双链寡核苷酸而产生相容。结构中改造进 α HSP70 序列末端和 α gag 序列的起始端。形成的二硫键 (sulphide bridges) 通常存在于人 IgG2 铰链中, 通过用脯氨酸 (加下划线的) 代替半胱氨酸 (灰色底纹) 防止其形成。脯氨酸向铰链中加入额外柔性从而使经铰链连接于第一种抗体 COOH 末端的第二种抗体域起适当功能。

[0362] 正常 IgG 铰链序列 (半胱氨酸密码子为灰色底纹, 脯氨酸密码子为加下划线的)。

[0363] GAGCGCAAATG  CGAG  CCACCG  CCA 及其互补序列被下述序列:

[0364] **AGCT** TCTGAGCGCAAACACCACCAGTCGAGCCACCACCGCCACCAC, 及其互补序列

[0365] **TCCGAG** TGGTGGCGGTGGTGGCTCGACTGGTGGTTTGCCTCAGA) 替代。这也提供了带有两种单链末端与用于克隆目的的 HindIII (粗体) 和 XhoI (斜体) 位点相容的片段 (白框铰链, 图 22, 中部)。

[0366] 这 3 种片段 (α HSP70 IgG2、铰链和 α gag) 然后通过标准重组 DNA 技术连接进含有小鸡肌动蛋白启动子和 CMV 增强序列 (图 22, 表达质粒) 的 bluescript (Pbluescript11 sk+) 表达质粒中。当这种质粒表达时 (参见下列) 则产生图 22 底部所示的双抗体。

[0367] 通过标准方法 (superfect) 培养双抗体表达质粒并将其与质粒 pGK hygro 共转染 (从而使得能够选择转染的细胞) 进 CHO 细胞 (图 23)。通过使用 α 人 IgG-HRP 检测含有由 CHO 细胞分泌的双链抗体的生长培养基的标准 α gag ELISA 法 (Dekker 等, J. Virol. 2003) 在含有均霉素的培养基中选择阳性克隆并将其鉴定为表达双链抗体的阳性克隆。 α -gag 活性阳性试验使其最可能使某一给定的克隆表达完整双抗体, 因为 gag 特异性在于双抗体后端 (COOH 末端)。然后 HSP70 的 ELISA 试验也为阳性。为与 55KD 的单体 (非还原及还原条件及蛋白质印迹, 图 23 右部) 比较而显示质粒中表达的蛋白质为 110KD 的二聚体 (如图 23 底部显示), 进行非还原条件和还原条件下这些 ELISA 选定的克隆的蛋白质印迹。因此 ELISA 和蛋白质印迹共同显示转染的 CHO 细胞产生的双抗体以二聚体表达并分泌进入培养基中 (以 $> 70\text{ng/ml}$), 并且抗体可结合 HSP70 和 gag 抗原。但是其未显示相同二聚体抗体分子可同时结合两种抗原。

[0368] 因此进行了后续实验。首先将 gag 抗原 (图 24 中部第一个孔) 固定到塑料孔底部。然后在应用克隆 1 的 CHO 细胞上清液 (图 24 中部第 2 个孔) 后通过第一种抗原 (gag)

捕获双抗体（图 24 上部）。接着充分洗涤且然后应用第二种抗原（HSP 70, 图 24 中部第 3 孔），然后再充分洗涤。如果双抗体分子可同时结合两种抗原，其应通过结合第一种抗原（gag）而被捕获在孔底部并接着捕获第二种抗原（HSP70）。当随后从该孔（图 24 中部，右孔）洗脱整个复合体时，在蛋白质印迹上双抗体和抗原都可见到（图 24 底部）。

[0369] 为收集分泌的双抗体，CHO 克隆在相同标准条件和用于收集杂交瘤产生抗体的培养基（SIGMA 杂交瘤培养基，没有血浆）中生长。

[0370] 方法：用纯化的重组 gag 蛋白质（12.5 μ g/ μ l 的 PBS 溶液）0/N 4C 包被 Nunc- 免疫板（Maxisorp）的孔。用 1% 牛奶 / 1% BSA 的 PBS 溶液封闭 2 小时。CHO-DB 克隆 -1 培养基在 PBS- 牛奶 -BSA（或对照）中稀释一倍，室温（RT）下孵育 3 小时。细菌 B121 细胞裂解物（含有 HSP70 蛋白质）在 PBS- 牛奶 -BSA 中稀释一倍，在室温下孵育 3 小时并洗涤。用含有 2- 巯基乙醇的 Laemmli 样品缓冲液稀释结合蛋白。通过蛋白质印迹分析样品且因此进行 10% SDS-PAGE 且印迹在硝酸纤维素膜上。印迹用 PBS- 牛奶 -BSA 封闭 2 小时且用初级抗体孵育。产物使用偶联到可目测染色的酶的二抗通过标准方法显影。使用的试剂为：

[0371] α Gag : 兔多克隆 (1 : 2000) 2 小时 室温

[0372] α 双抗体 : 山羊 α 人 IgG-HRP (1 : 2500) 2 小时 室温

[0373] α HSP70 : 单克隆 G20-380 培养基 (1 : 2) 2 小时 室温

[0374] 二抗为 : 山羊 α 兔 -AP (1 : 2000) 2 小时 室温 及山羊抗 HSP70 单克隆的 α 人 IgG-HRP (1 : 2500) 2 小时 室温

[0375] 为显影蛋白质条带，首先使用与碱性磷酸酶（AP）反应的 NBT/BCIP 底物（紫色），然后用与辣根过氧化物酶反应的 DAB 底物（棕色）。

[0376] 用 PBS-0.05% Tween-20 完成所有洗涤步骤。

[0377] 通过去掉一种组分或添加不产生双抗体（图 24）的 CHO 细胞的培养基进行对照，即：缺乏没有双抗体应用（培养基来自非转染的 C0 细胞）因此仅有 gag（泳道 2）；孔底部缺乏 gag（用牛奶蛋白代替）因而没有产物（泳道 3）；缺乏 gag 和双抗体因而没有产物（泳道 4）；缺乏 HSP70 抗原（被牛奶抗原代替）因而仅有双抗体和 gag（泳道 5）；缺乏 HSP70 和双抗体因而仅有 gag（泳道 6）。

[0378] 所有 3 种组分（双抗体附加两种抗原）仅存在于泳道 1 的孔，其接受所有 3 种组分（也见于图 24 底部插图的说明）这一事实显示单一双抗体同时结合两种抗原。

[0379] 双特异性 IgA 或多特异性 IgM 的产生

[0380] 双特异性 IgA 的产生基本类似于所述的 IgG（上述），但是除另外使用 Vhso1、D 和 J 外，还使用导致产生 IgA 的恒定区 C α （图 25）。

[0381] IgM 的产生大同小异，但是因为 IgM 分子可形成大的多聚体（有或没有 J 链）而提供了其他可能性。因此除类似于前面所述分子（图 26 右底部，除去多聚化的序列后）外，也可简单通过共表达具有不同特异性的 IgM' s 产生多聚体。

[0382] 实施例 3

[0383] 如 Sambrook 等 ((1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press) 中所述分子生物学技术构建了一种编码多肽复合体的表达载体，该复合体包含：重链和轻链，其中重链包括结合于 PSCA（前列腺干细胞抗原）的结合域、含 Jun 亮氨酸拉链基序和抗体铰链的装配域、CH2 和 CH3 域，而轻链包括含 Fos 亮氨酸拉链

基序的互补装配域。

[0384] 然后通过常规技术将表达载体转移到适当的宿主细胞从而产生最适合载体表达的转染宿主细胞。然后使用本领域技术人员已知的任何适当技术培养转染或转化的宿主细胞从而产生本发明的多肽复合体。

[0385] 一旦产生就通过标准技术步骤包括交叉流过滤、硫酸铵沉淀法和亲和层析（例如蛋白 A）纯化多肽复合体。

[0386] 然后使用本领域技术人员已知技术将包括 3,3' - 二吡啶基甲烷 (DIM) 的可溶效应子域融合到互补装配域。

[0387] 实施例 4

[0388] 如 Sambrook 等所述分子生物学技术构建了编码本发明多肽复合体重链的表达载体,该复合体包含:结合于 AFP(α 胎儿蛋白)的可溶性 VHH 结合域和包括 Jun 亮氨酸拉链基序和抗体铰链的装配域、CH2 和 CH3。

[0389] 也构建了编码本发明多肽复合体轻链的第二种表达载体。其包含包括 Fos 亮氨酸拉链基序的互补装配域。

[0390] 然后通过常规技术将表达载体转移到适当宿主细胞从而产生最适合载体表达的共转染宿主细胞。然后使用本领域技术人员已知的任何适当技术培养转染或转化的宿主细胞从而产生本发明的多肽复合体。

[0391] 一旦产生就通过标准技术步骤包括交叉流过滤、硫酸铵沉淀法和亲和层析（例如蛋白 A）纯化多肽复合体。

[0392] 然后使用本领域技术人员已知技术将包括 3,3' - 二吡啶基甲烷 (DIM) 的可溶效应子域融合到互补装配域。

[0393] 实施例 5

[0394] VCAM 和 VLA-4

[0395] 使用如 Sambrook 等所述分子生物学技术构建了编码多肽复合体的表达载体,该复合体包含:重链和轻链,其中重链包括结合于 PSMA(前列腺干细胞抗原)的结合域、包括 VCAM 和抗体铰链的装配域、CH2 和 CH3 域,而轻链包括含融合到蓖麻毒蛋白 A 毒素的 VLA-4 的互补装配域。

[0396] 然后通过常规技术将表达载体转移到适当的宿主细胞从而产生最适合载体表达的转染宿主细胞。然后使用本领域技术人员已知的任何适当技术培养转染或转化的宿主细胞从而产生本发明的多肽复合体。

[0397] 一旦产生就通过标准技术步骤包括交叉流过滤、硫酸铵沉淀法和亲和层析（例如蛋白 A）纯化多肽复合体。

[0398] 实施例 6

[0399] 使用如 Sambrook 等所述分子生物学技术构建了编码多肽复合体的表达载体,该复合体包含:重链和轻链,其中重链包括结合于 PSMA(前列腺干细胞抗原)的结合域、包括 Jun 亮氨酸拉链基序和抗体铰链的装配域、CH2 和 CH3 域,轻链包括含 Fos 亮氨酸拉链基序的互补装配域和编码嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP) 的可溶性效应子域。

[0400] 然后通过常规技术将表达载体转移到适当的宿主细胞从而产生最适合载体表达的转染宿主细胞。然后使用本领域技术人员已知的任何适当技术培养转染或转化的宿主细

胞从而产生本发明的多肽复合体。

[0401] 一旦产生就通过标准技术步骤包括交叉流过滤、硫酸铵沉淀法和亲和层析（例如蛋白 A）纯化多肽复合体。

[0402] PNP 将氟达拉滨转化为毒性代谢产物 2- 氟腺嘌呤，其杀灭包含 PNP 酶细胞并进一步扩散而杀灭周围未感染细胞而形成局部旁观者效应。

[0403] 实施例 7

[0404] 使用如 Sambrook 等所述分子生物学技术构建了编码本发明多肽复合体第一条重链的表达载体，该复合体包含：结合于糖蛋白抗原 gp120 的 V3-PND 区的可溶性 VHH 结合域和包括 Jun 亮氨酸拉链基序和抗体铰链的装配域、CH2 和 CH3 域。

[0405] 也构建了编码本发明多肽复合体第二条重链的第二种表达载体，该复合体包含：结合于 GP-41 的可溶性 VHH 结合域、包括 Jun 亮氨酸拉链基序和抗体铰链的装配域、CH2 和 CH3 域。

[0406] 还构建了编码本发明多肽复合体轻链的第三种表达载体。其包括含 Fos 亮氨酸拉链基序的互补装配域。

[0407] 然后通过常规技术将这些表达载体转移到适当的宿主细胞从而产生最适合载体表达的共转染宿主细胞。然后使用本领域技术人员已知的任何适当技术培养转染或转化的宿主细胞从而产生本发明的多肽复合体。

[0408] 一旦产生就通过标准技术步骤包括交叉流过滤、硫酸铵沉淀法和亲和层析（例如蛋白 A）纯化多肽复合体。

[0409] 然后使用本领域技术人员已知技术将包括 HIV-1MN V3 (PND) 肽免疫原的可溶性效应子域融合到互补装配域。

[0410] 实施例 8

[0411] 使用 Sambrook 等 ((1989)Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press) 所述分子生物学技术构建了编码本发明多肽复合体第一条重链的表达载体，该复合体包含：可溶性 VHH 结合域，其结合于糖蛋白抗原的 V3-PND 区。

[0412] 也构建了编码本发明多肽复合体第二条重链的第二种表达载体，包含：结合于 GP-41 的可溶性 VHH 结合域。

[0413] 这两种重链的特征在于两重链恒定区包含相同的 μ 、CH2、CH3 和 CH4 域。

[0414] 然后通过常规方法将这些表达载体转移到组成型表达 J 链的宿主细胞从而产生最适合载体表达的共转染宿主细胞。然后使用本领域技术人员已知的任何适当技术培养转染或转化的宿主细胞从而产生本发明的多肽复合体。

[0415] 一旦产生就通过标准技术步骤包括交叉流过滤、硫酸铵沉淀法和亲和层析（例如蛋白 A）纯化多肽复合体。

[0416] 然后使用本领域技术人员已知技术将包括 HIV-1MN V3 (PND) 肽免疫原的可溶性效应子域融合到互补装配域。

[0417] 在前面说明书中提及的所有公开通过引用结合到本文中。

[0418] 未偏离本发明范围和精神的本发明所述的方法及体系的各种修改和变化对于本领域技术人员是显而易见的。虽然已结合特定实施方案描述了本发明，但是应理解本发明

不应局限于这些特定的实施方案。事实上,对于生物化学、分子生物学和生物技术或相关领域中技术人员来说显而易见的实践本发明所述方法的各种修改均在下列权利要求书的范围内。

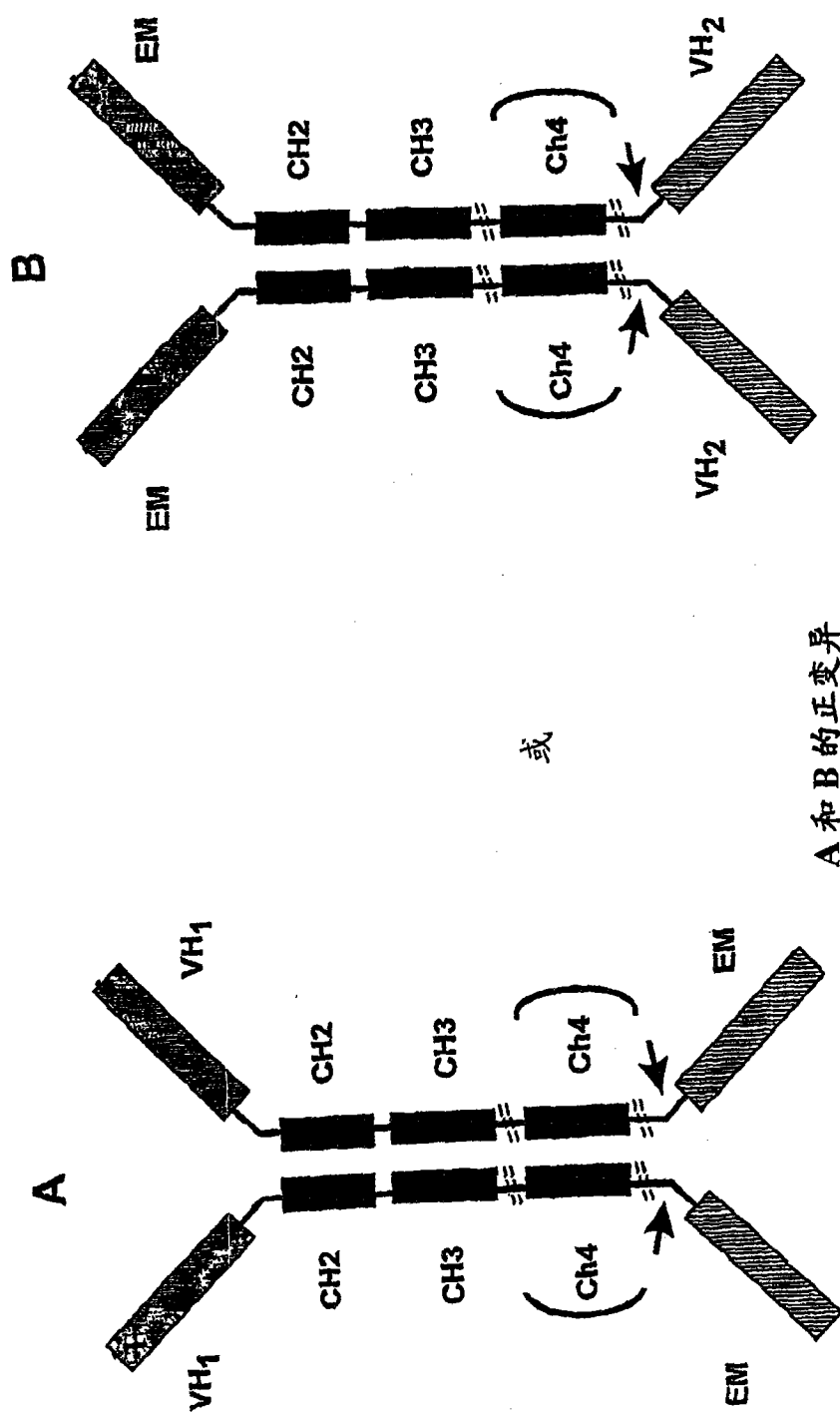


图 1

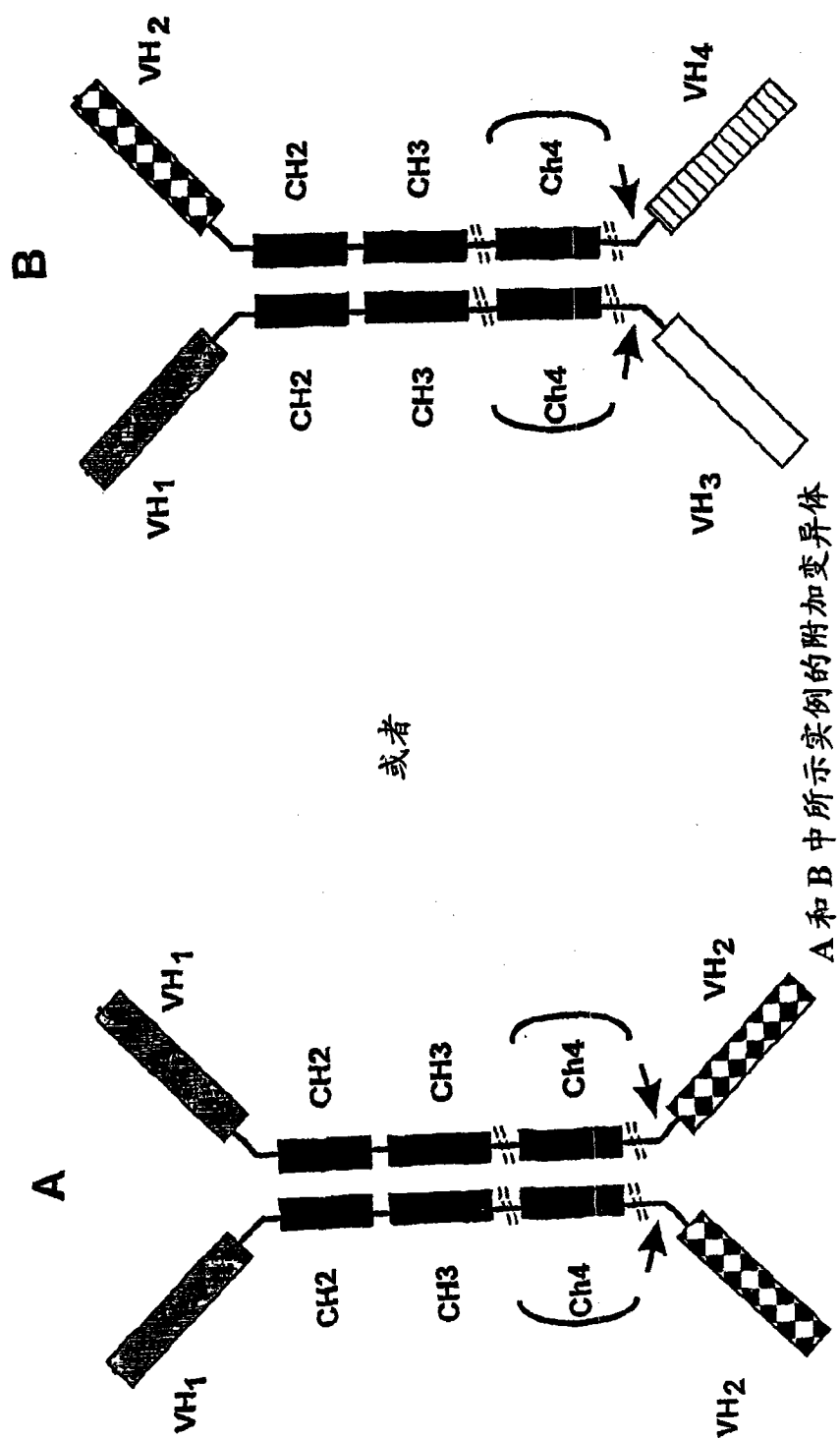


图 2

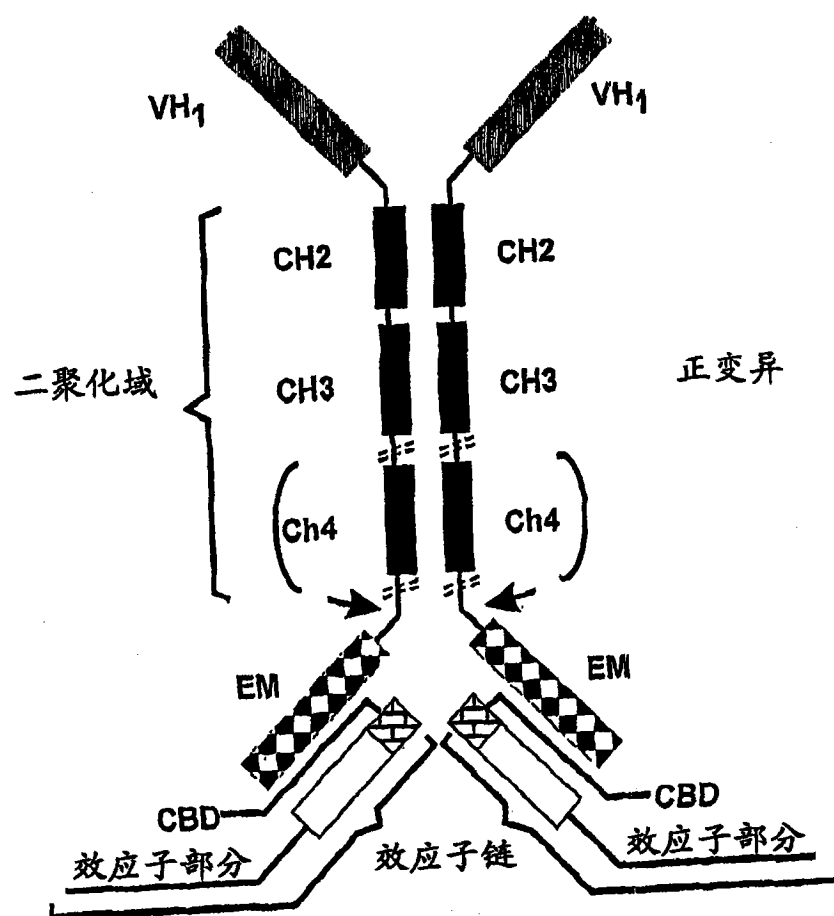


图 3

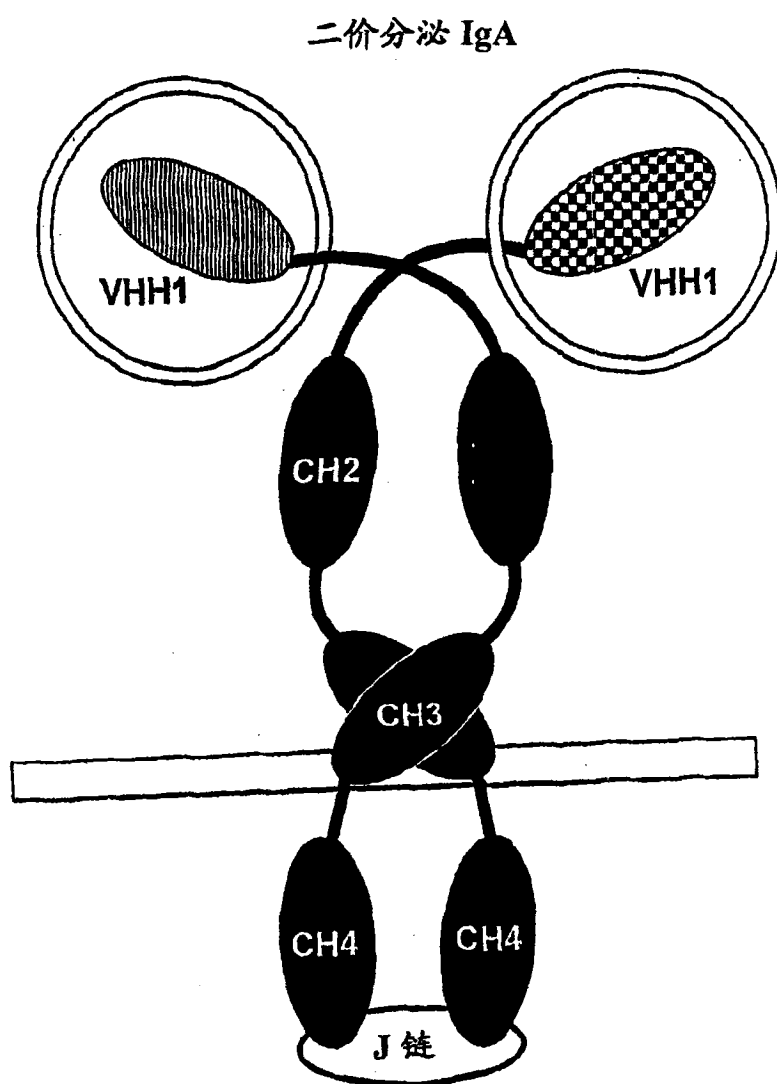


图 4

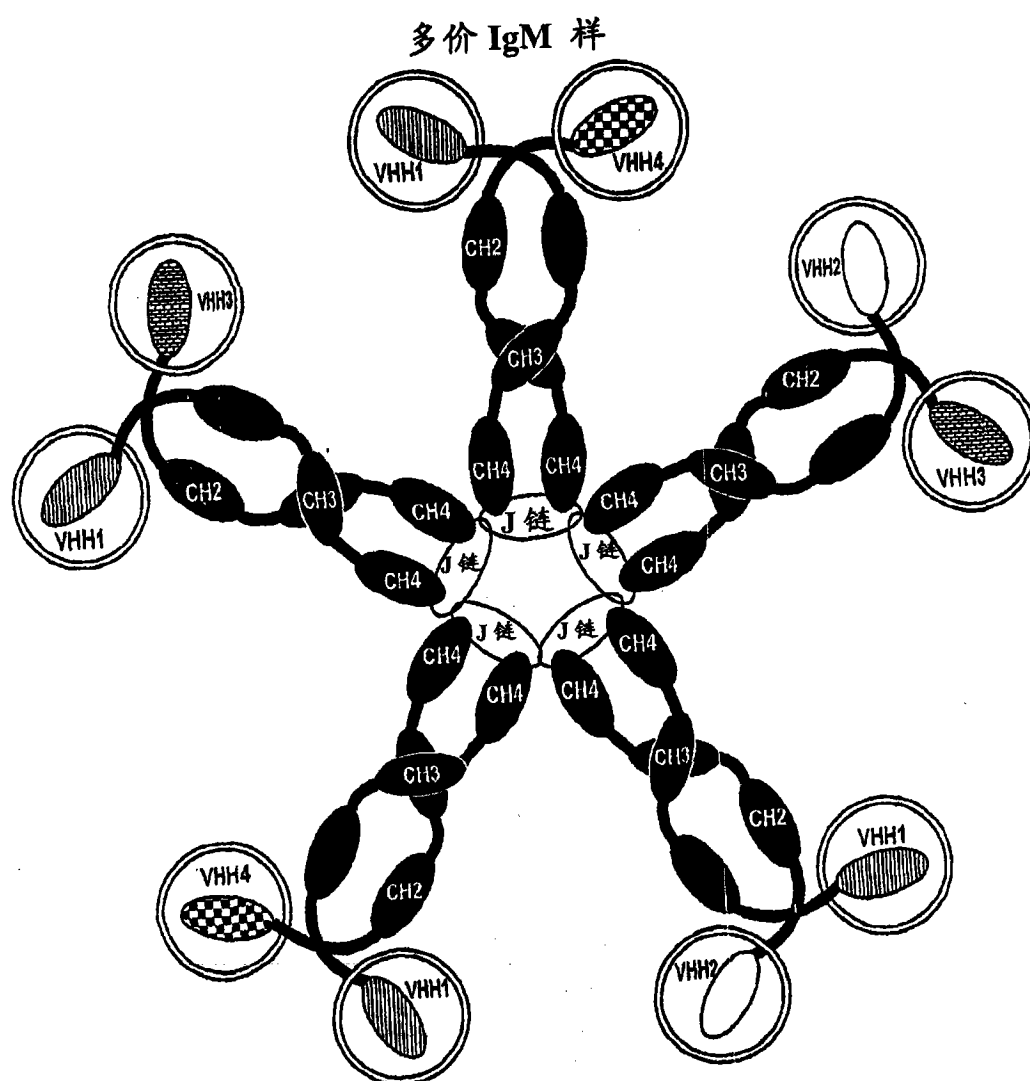


图 5

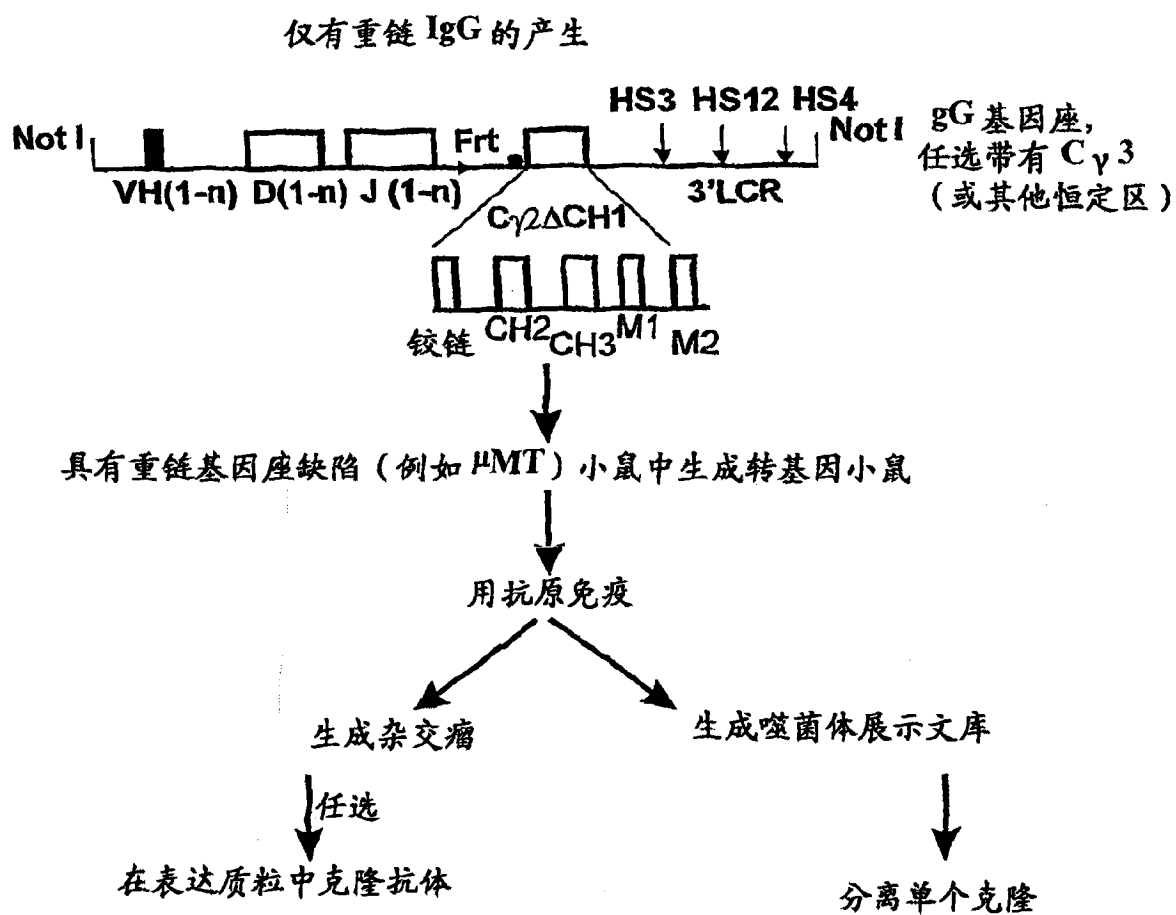


图 6

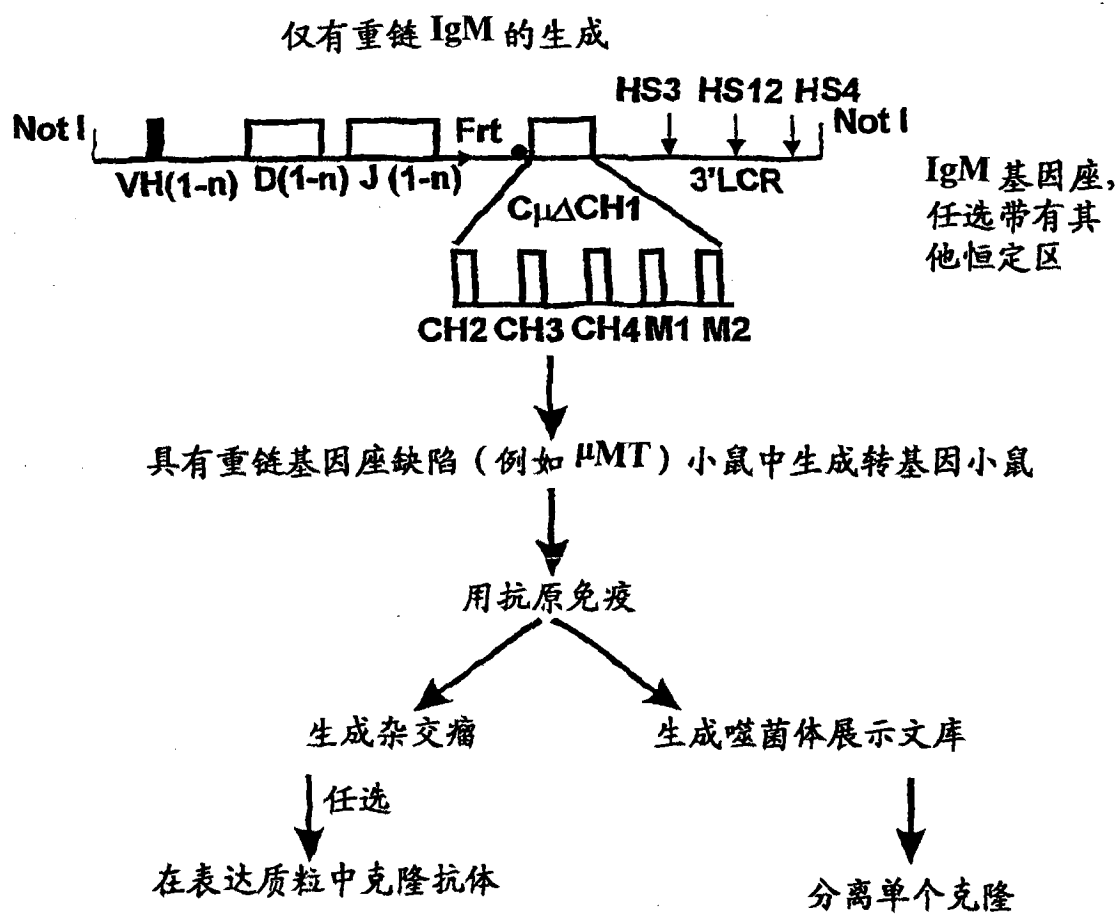


图 7

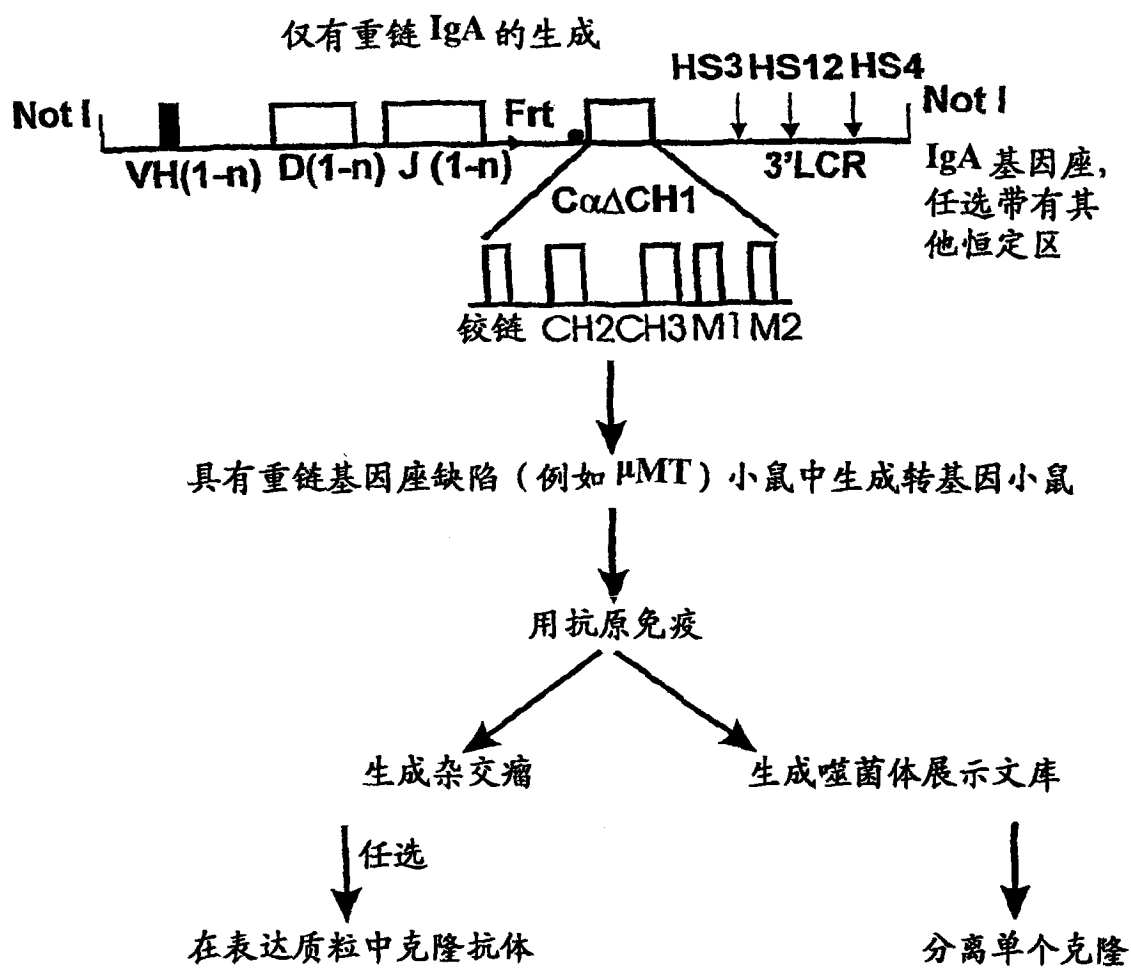


图 8

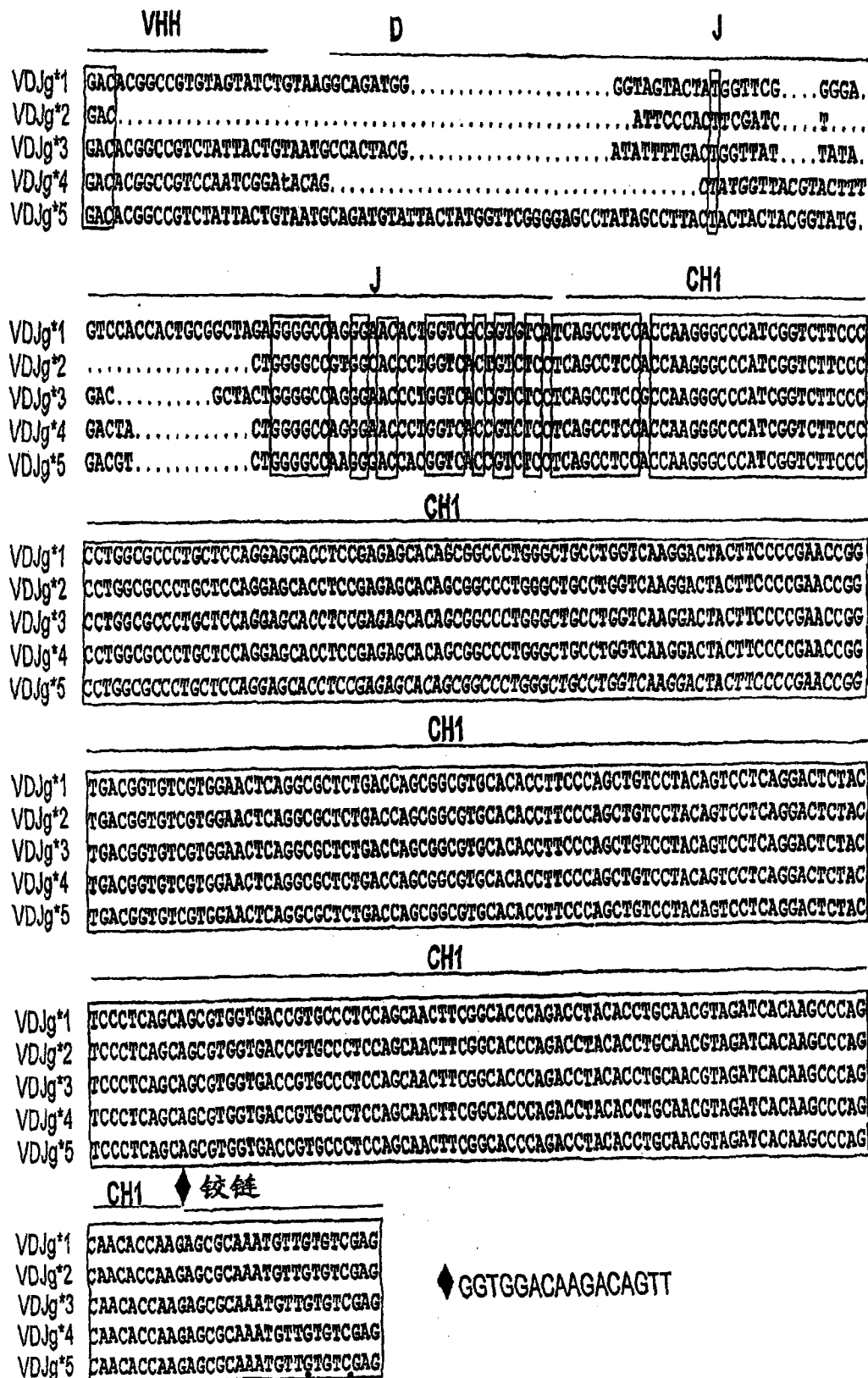


图 9

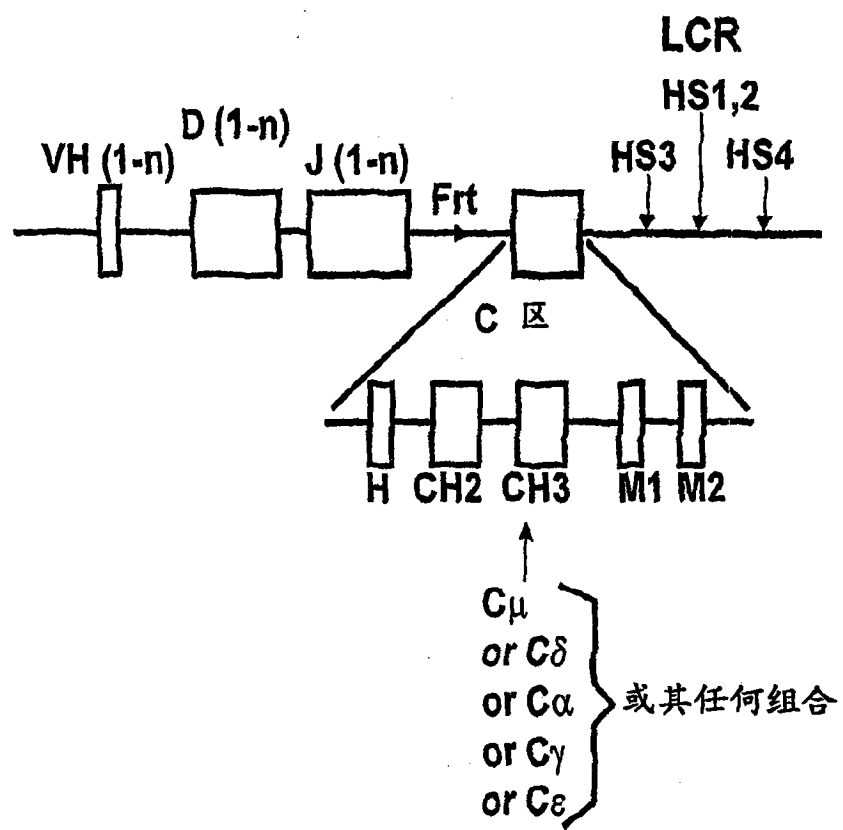


图 10

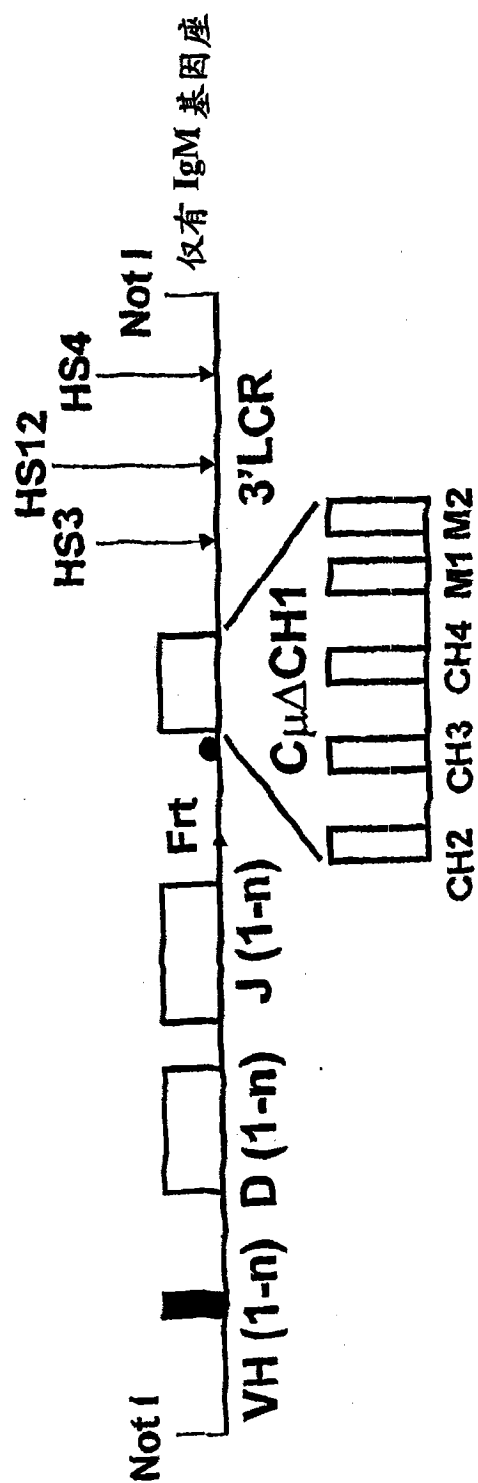


图 11

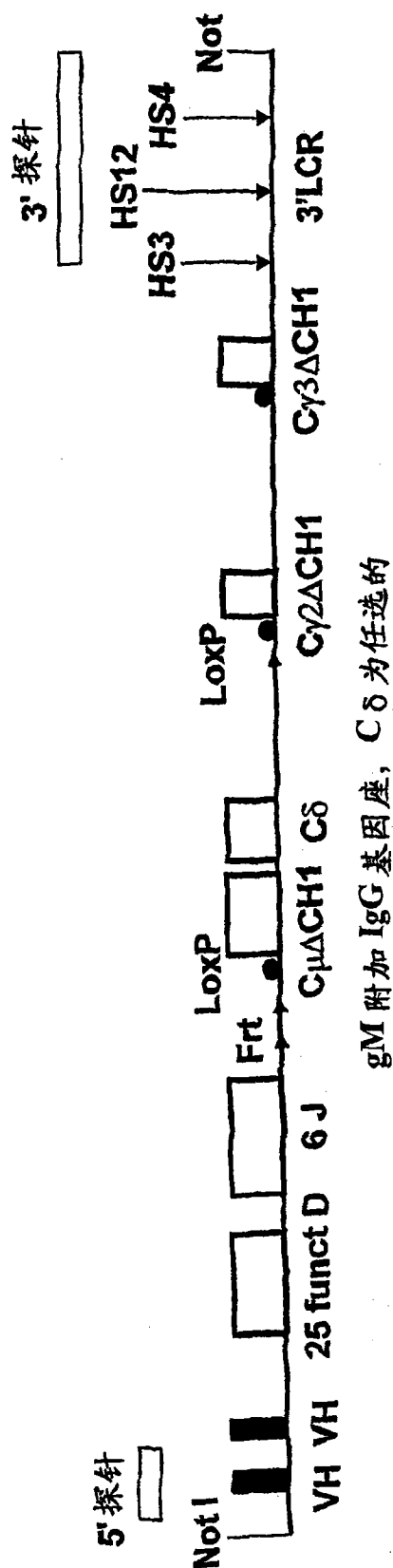


图 12

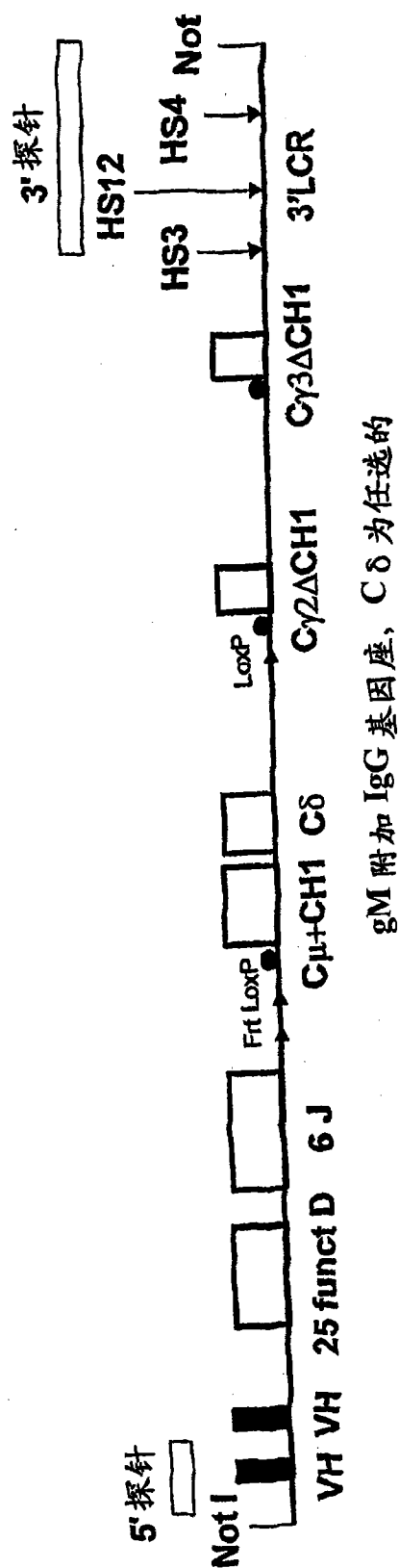


图 13

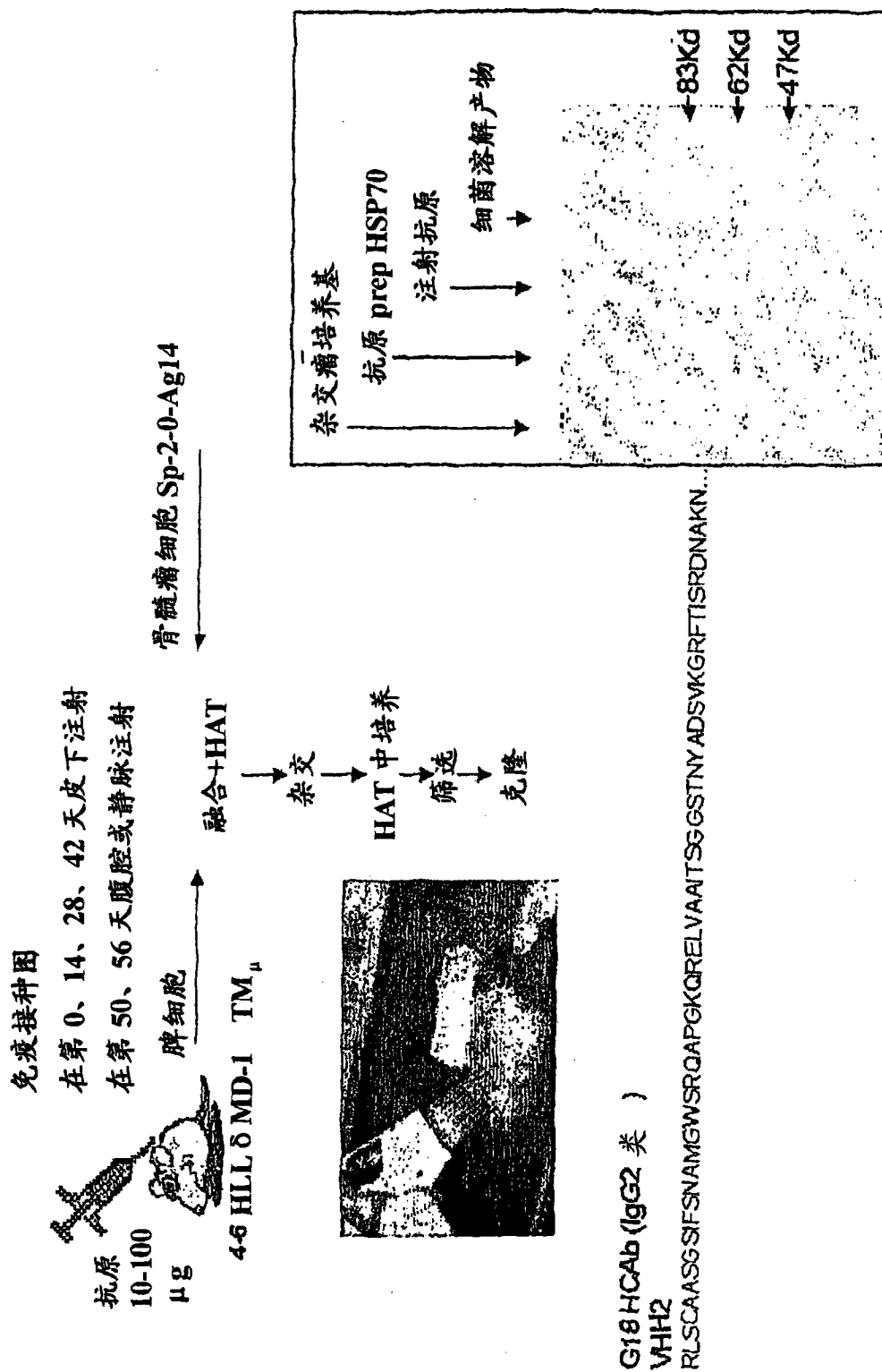


图 14

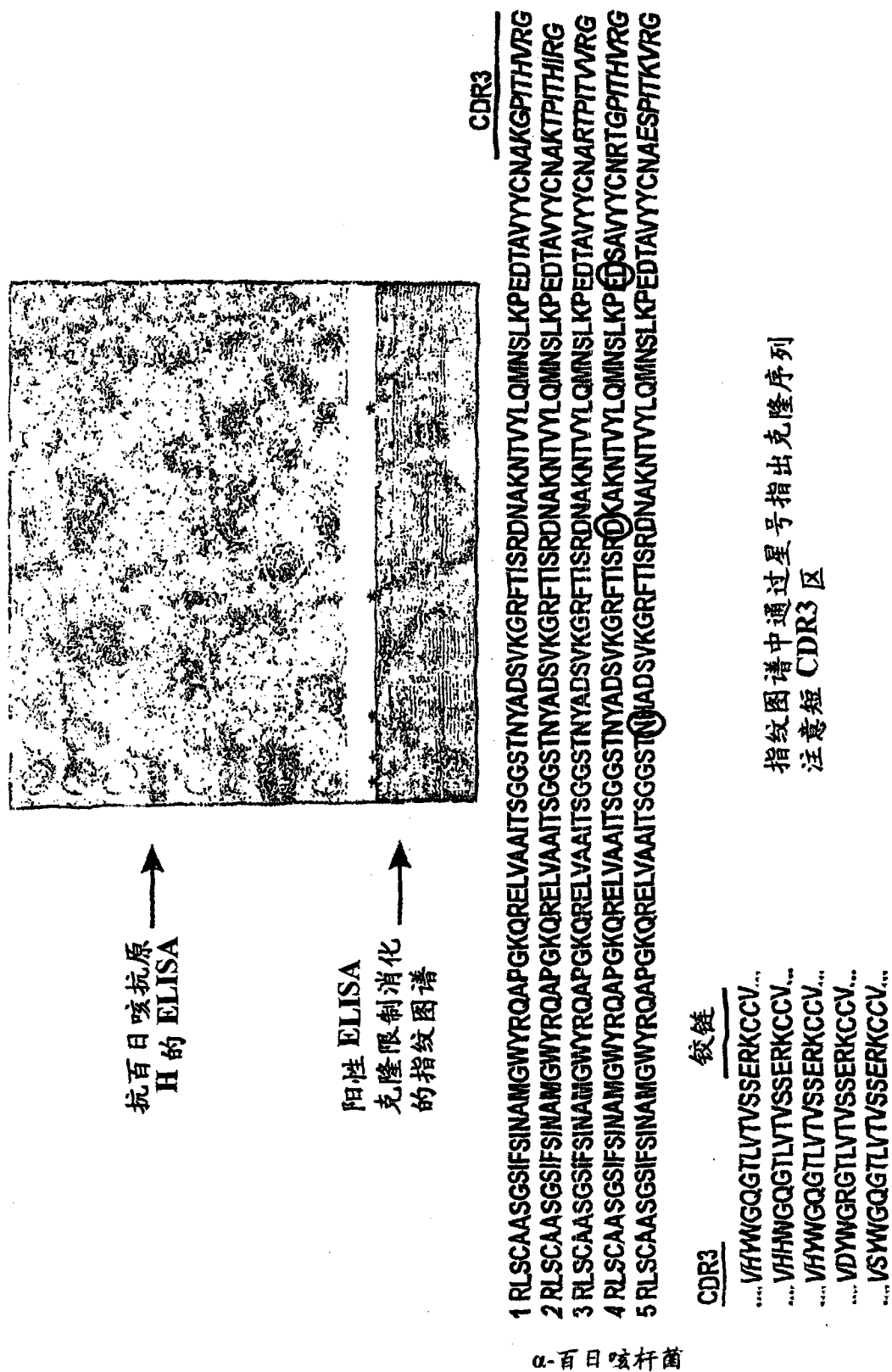


图 16



图 17

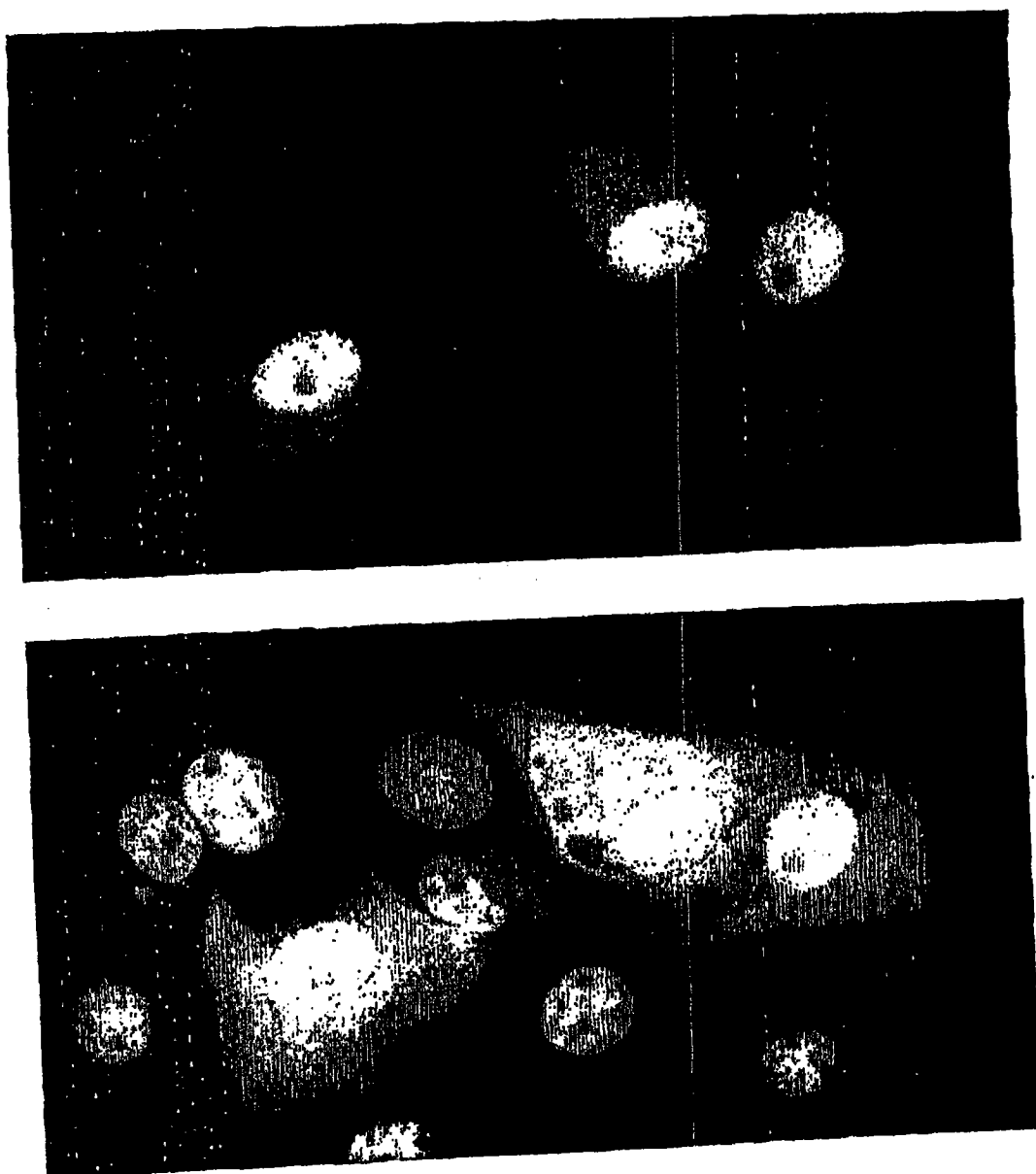


图 18

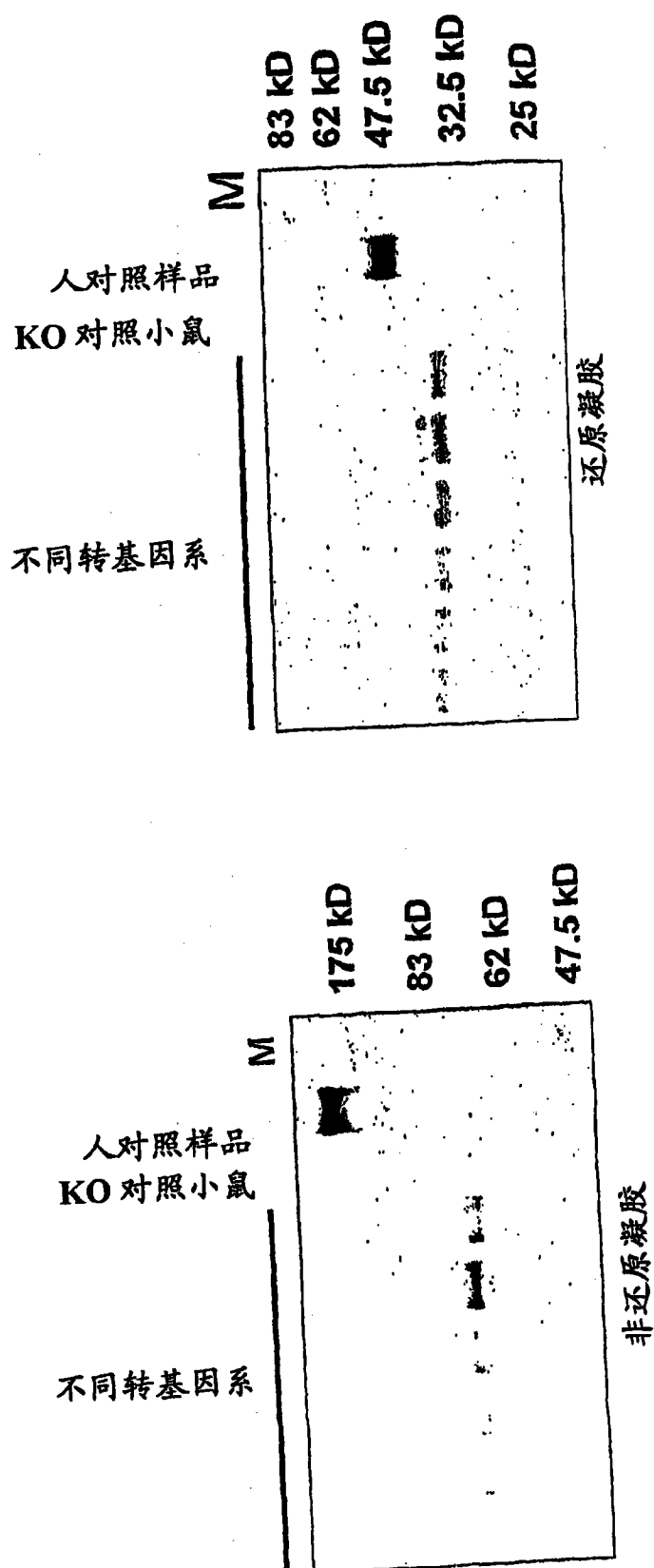


图 19

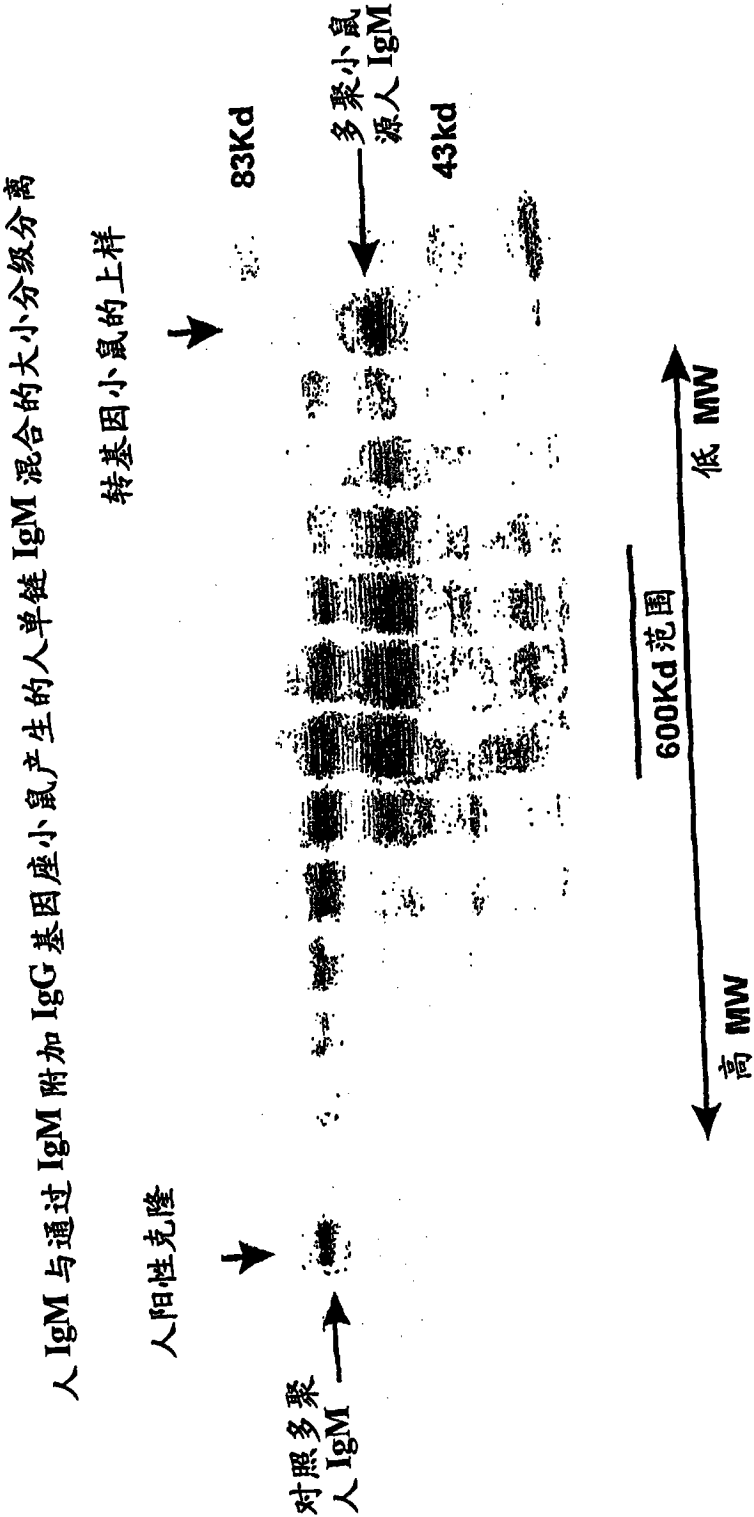


图 20

抗人 $\text{TNF}\alpha$ 的单链 IgM 和 IgG 抗体的 ELISA

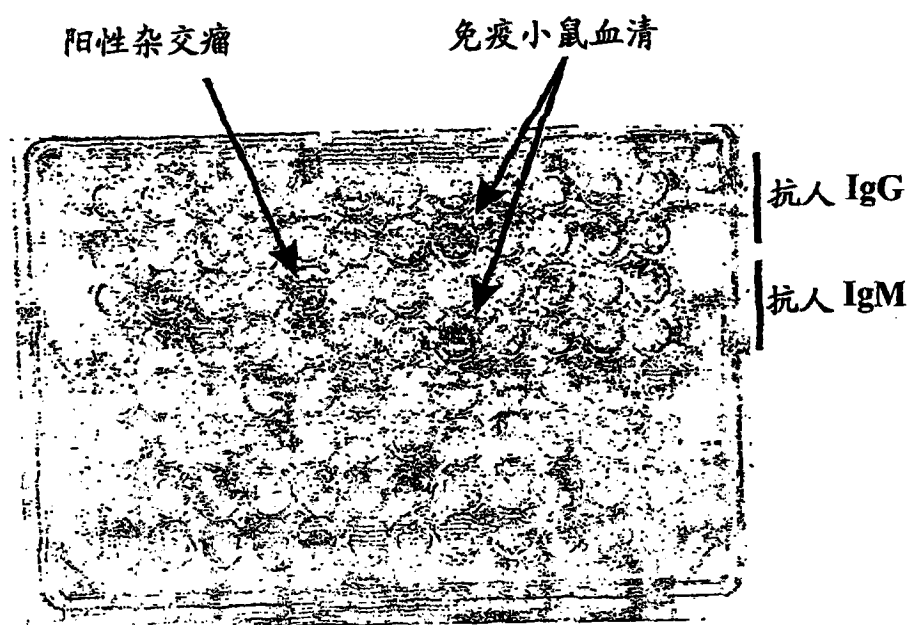


图 21

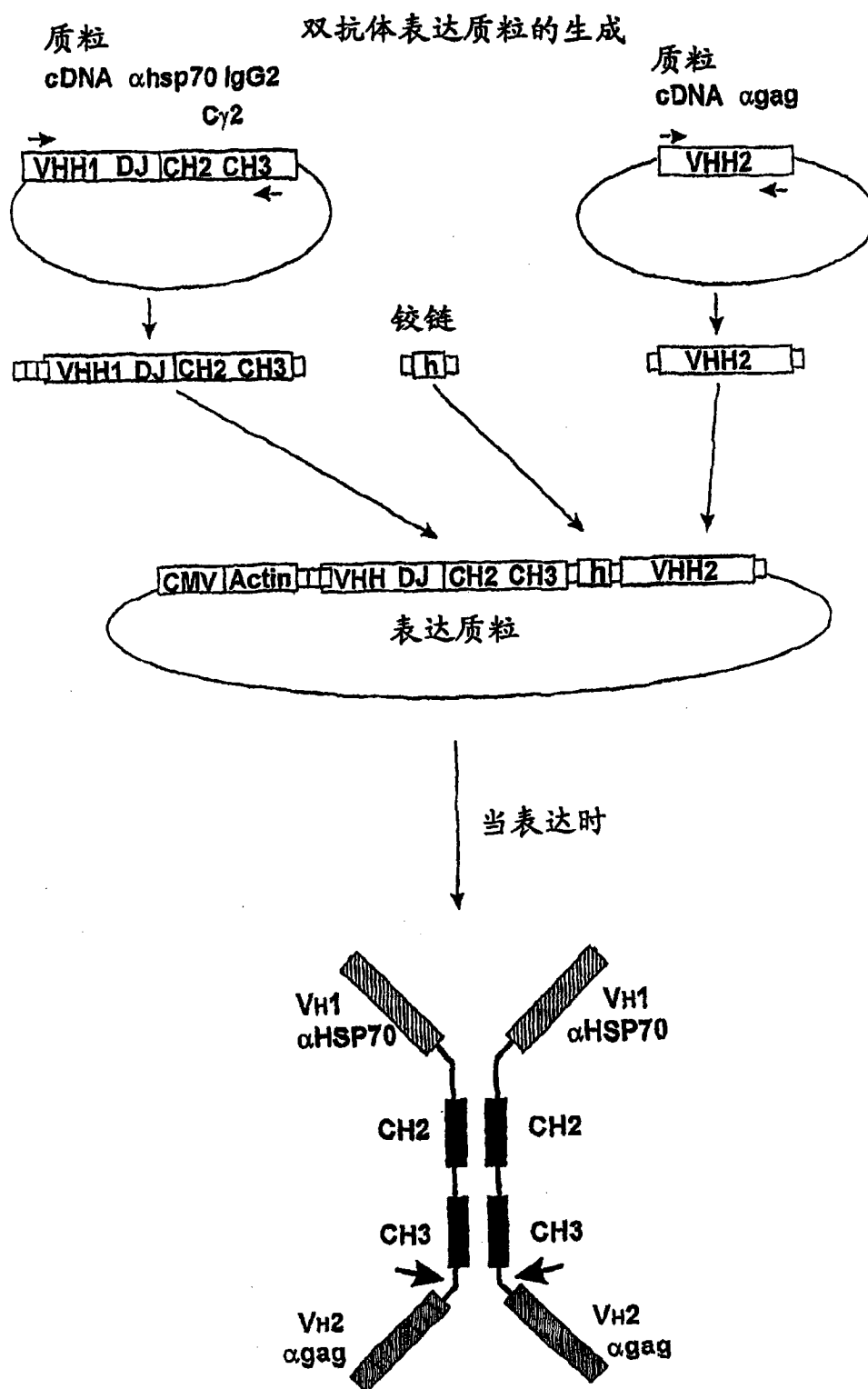


图 22

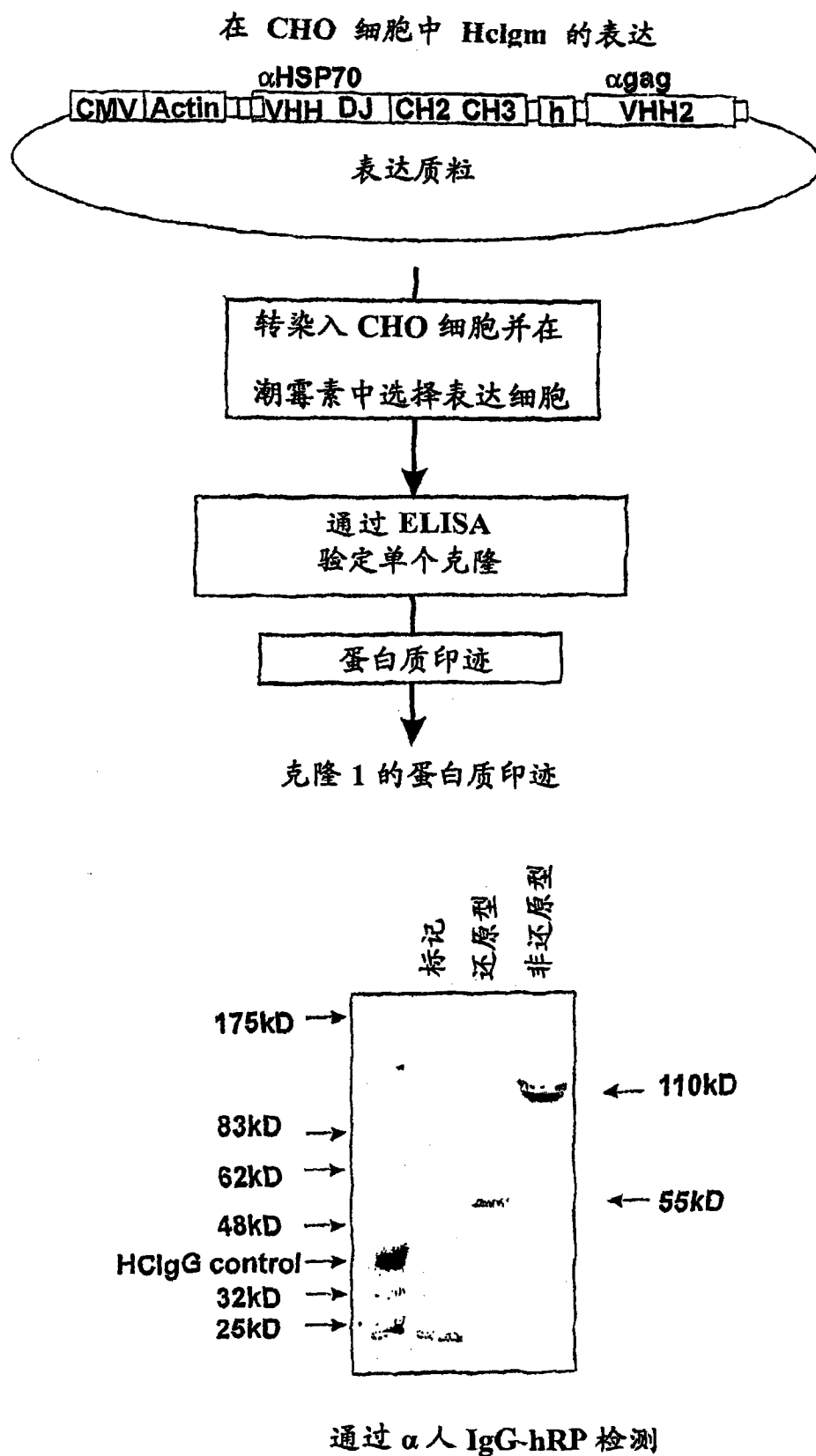


图 23

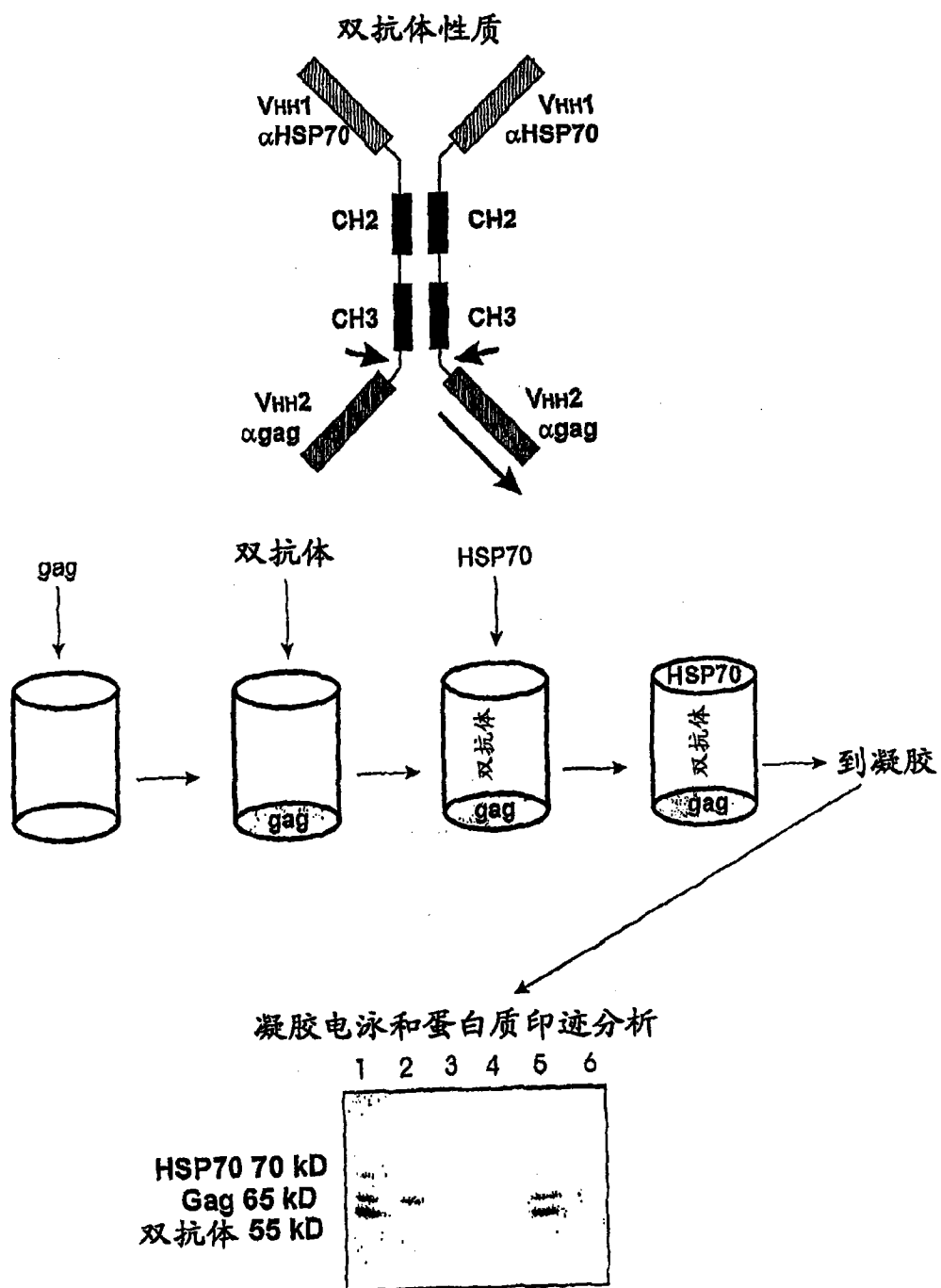


图 24

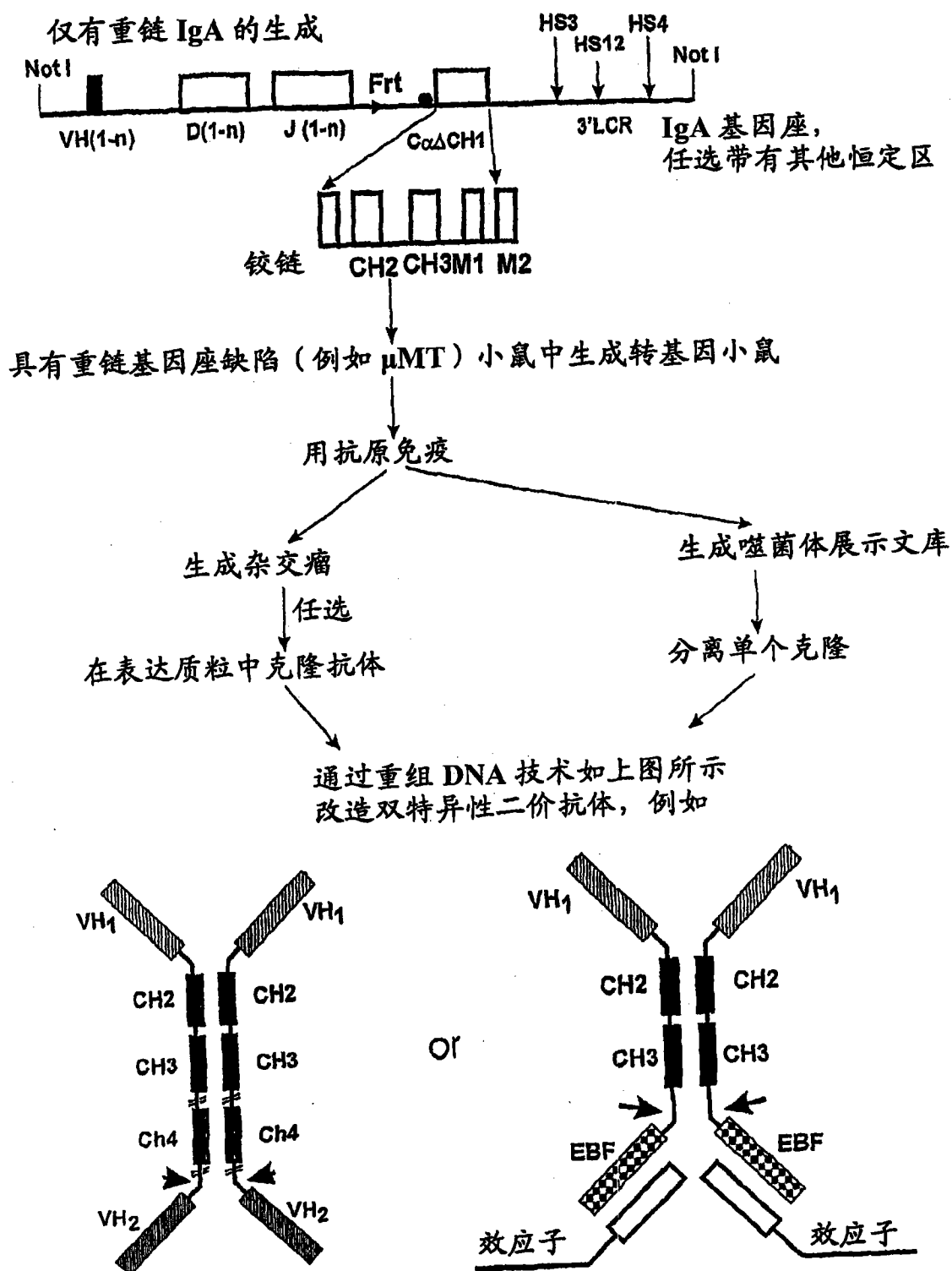
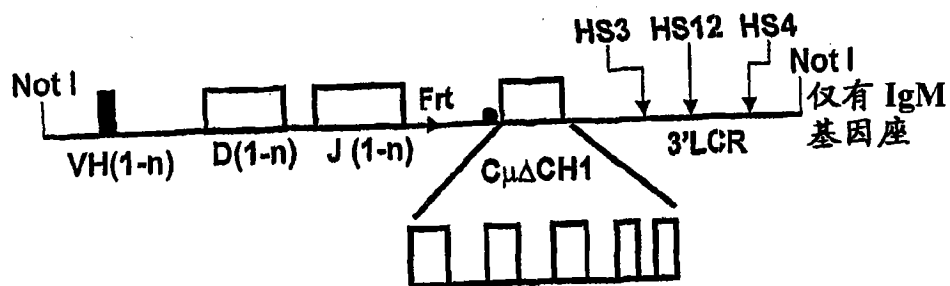


图 25

多价仅有 IgM 抗体的生成



具有重链基因座缺陷（例如 μMT ）小鼠中生成转基因小鼠

用抗原免疫

生成杂交瘤

生成噬菌体展示文库

在质粒中克隆抗体

分离单个克隆

不同特异性
IgM 如不同 VH sol 的共表达

通过重组 DNA 技术
如上图所示改造双
特异性二价抗体，例如

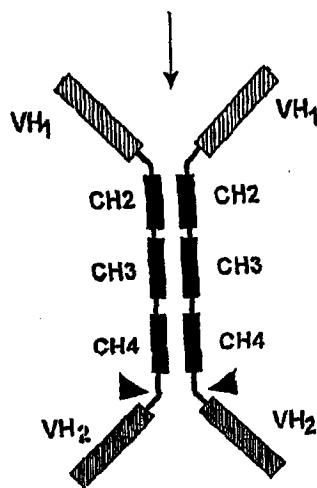
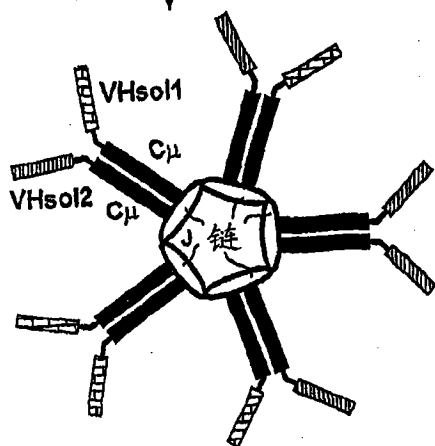


图 26

专利名称(译)	结合分子		
公开(公告)号	CN102659941A	公开(公告)日	2012-09-12
申请号	CN201210057684.X	申请日	2005-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	伊拉兹马斯大学鹿特丹医学中心 罗杰·金登·克雷格		
申请(专利权)人(译)	伊拉兹马斯大学鹿特丹医学中心 罗杰·金登·克雷格		
当前申请(专利权)人(译)	伊拉兹马斯大学鹿特丹医学中心 罗杰·金登·克雷格		
[标]发明人	罗杰金登克雷格 FG格洛斯费尔德 RW杨森斯 D德拉贝克		
发明人	罗杰·金登·克雷格 F·G·格洛斯费尔德 R·W·杨森斯 D·德拉贝克		
IPC分类号	C07K16/00 C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/00 A61K39/395 A61P37/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P7/02 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/28 A61P31/04 A61P31/12 A61P31 /18 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 C07K16/00 C07K16/1054 C07K16/1063 C07K16/1232 C07K16/241 C07K2317/22 C07K2317/31 C07K2317/53 C07K2317/569 C07K2317/64 C07K2319/00		
代理人(译)	孔青 郭文洁		
优先权	2004016392 2004-07-22 GB 2005011881 2005-06-10 GB		
其他公开文献	CN102659941B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种结合分子。本发明涉及经历了亲和力成熟的功能性仅有重链的抗体多样性库的制造及其用途。本发明也涉及类别特异性仅有重链的抗体多样性库的制造和用途，也涉及具有抗体重链功能性优选抗体重链结合功能性、恒定区效应子活性及任选其他效应子功能的多价多肽复合物的制造和用途。本发明还涉及在转基因小鼠中响应抗原激发产生全功能性仅有重链的抗体的方法。本发明特别涉及产生任何种类的人抗原特异性、高度亲和力、仅有重链的抗体或多种混合物的方法，以及分离及表达全功能性VH抗原结合域的方法。

