[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[6]
C07K 16/46
C12N 15/62 C12N 15/63
C12N 15/87 C12P 21/00
A61K 39/395

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 99104958.6

[43]公开日 1999年11月10日

[11]公开号 CN 1234406A

[22]申请日 99.4.8 [21]申请号 99104958.6

[30]优先权

[32]98.4.9 [33]DE [31]19816141.7

[32]98.6.18 [33]DE [31]19827239.1

[71]申请人 德国赫彻斯特马里奥罗塞尔有限公司

地址 联邦德国法兰克福

[72]发明人 R·科特曼 H－H·萨德拉克

R·穆勒

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 黄革生

权利要求书4页 说明书26页 附图页数5页

[54]发明名称 单链的多抗原结合性分子,其制备和用途

[57]摘要

本发明涉及单链的多抗原结合性分子,所述分子具有免疫球蛋白重链和轻链的 多变区,所述区域以 VH－VL 构建体的形式相互连接,它们又通过肽而连接 在一起,本发明还涉及所述分子的制备及其作为药物或诊断辅助物的用途。

ISSN1008－4274

权 利 要 求 书

1.单链的多抗原结合性分子，所述分子含有下列组分:

a)具有第一特异性(A)的免疫球蛋白重链可变区(VH)及其功能性部分，

b)具有第二特异性(B)的免疫球蛋白轻链可变区(VL)及其功能性部分，

c)具有特异性(B)的免疫球蛋白重链可变区(VH)及其功能性部分，和

d)具有特异性(A)的免疫球蛋白轻链可变区(VL)及其功能性部分，

其中 VH 和 VL 区域以 VH-VL 构建体或 VL-VH 构建体的形式连接在一起，而这两个 VH-VL 构建体经由肽(P)连接。

2.权利要求 1 的单链的多抗原结合性分子，所述分子含有两个以上 VH-VL 构建体。

3.权利要求 1 或 2 的单链的多抗原结合性分子，其中 VH-VL 构建体经由具有相同特异性的区域而连接。

4.权利要求 1 至 3 中任一项的单链的多抗原结合性分子，其中特异性(A)和(B)基本上相同。

5.权利要求 1 至 4 中任一项的单链的多抗原结合性分子，其中通过肽接头(L)以 VH-L-VL 构建体或 VL-L-VH 构建体的形式连接 VH 和 VL 区域。

6.权利要求 5 的单链的多抗原结合性分子，其中接头(L)长约为 1-20 个氨基酸，优选约为 1-5 个氨基酸。

7.权利要求 5 的单链的多抗原结合性分子，其中接头(L)含有氨基酸序列 GGGGS。

8.权利要求 1 至 7 中任一项的单链的多抗原结合性分子，其中肽(P)约为 12-40 个氨基酸，优选约为 12-20 个氨基酸，特别是约 14 个氨基酸长。

9.权利要求 8 的单链的多抗原结合性分子，其中肽(P)含有氨基酸序列 GGGGSGGRASGGGS 或 GGGGSGGRASGGGGS。

10.权利要求 1 至 9 中任一项的单链的多抗原结合性分子，其中所述分子含有一个或多个效应物(E)作为另外的组分。

11.权利要求 10 的单链的多抗原结合性分子，其中所述效应物(E)是经由连接物(B)与所述分子连接。

12.权利要求 11 的单链的多抗原结合性分子，其中连接物(B)含有一个蛋白酶切割序列，优选含有 PSA、组织蛋白酶、纤溶酶原和/或纤溶酶原激活物切割序列。

13.权利要求 1 至 12 中任一项的单链的多抗原结合性分子，其中第一特异性(A)针对待分析的分子，第二特异性(B)针对分析物。

14.权利要求 13 的单链的多抗原结合性分子，其中所述分析物是一种放射性分子，荧光分子和/或酶。

15.权利要求 10 至 12 中任一项的单链的多抗原结合性分子，其中第一特异性(A)针对待分析的分子，第二特异性(B)针对待分析的另一分子，效应物(E)是一种分析物。

16.权利要求 15 的单链的多抗原结合性分子，其中所述分析物是放射性分子，荧光分子和/或酶。

17.权利要求 1 至 12 中任一项的单链的多抗原结合性分子，其中肽(P)和/或效应物(E)含有融合肽。

18.权利要求 1 至 17 中任一项的单链的多抗原结合性分子，其中第一特异性(A)针对靶细胞，第二特异性(B)针对载体。

19.权利要求 18 的单链的多抗原结合性分子，其中所述载体是核酸，阳离子肽或蛋白质，阳离子脂质，阳离子聚合物，阳离子卟啉或选自 AdV、AAV、痘苗病毒、RSV、HSV、流感病毒或慢病毒载体的病毒载体。

20.权利要求 1 至 12 中任一项的单链的多抗原结合性分子，其中第一特异性(A)针对细胞膜，特别是针对淋巴细胞、巨噬细胞、单核细胞、粒细胞、造血细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、横纹肌细胞、上皮细胞、肝细胞、肾细胞、胶质细胞、支持组织的细胞、肿瘤细胞或白血病细胞的细胞膜，或针对胞外基质、补体系统、凝结系统、激肽系

统、血浆、支持组织的蛋白质，或针对细胞因子或趋化因子，或针对内源或外源毒素，或针对药物，特别是毛地黄，和/或针对病原体，特别是例如细菌，病毒和/或寄生虫病原体。

21.权利要求 1 至 12 和 20 中任一项的单链的多抗原结合性分子，其中第二特异性(B)是针对细胞膜，特别是针对淋巴细胞、巨噬细胞、单核细胞或粒细胞的细胞膜，针对细胞因子、趋化因子或生长因子，针对补体系统的蛋白质，针对凝结系统的蛋白质，针对纤溶蛋白，针对能将靶结构上无活性的药物前体转变为有活性的、特别是有细胞毒性的药物的酶，针对肽激素或类固醇激素，针对免疫球蛋白的恒定部分，针对介体，特别是例如组胺、5-羟色胺、白三烯、前列环素或激肽，针对病原体，针对肿瘤细胞，针对内源性或外源性毒素，针对药物，特别是毛地黄。

22.权利要求 1 至 12、20 和 21 中任一项的单链的多抗原结合性分子，其中效应物(E)选自跨膜区域，糖磷脂锚，受体上的与配体结合的部分；受体的配体或配体的与受体结合的部分；肽激素；细胞因子；生长因子；生长因子抑制剂；趋化因子；干扰素；介体；对循环起作用的肽；将药物的无活性前体转变为有活性药物的酶；激活或抑制凝结的蛋白质；激活或抑制纤溶作用的蛋白质；激活或抑制补体系统的蛋白质；免疫球蛋白的一个或多个恒定区；细胞毒性肽，另一种单链的单抗原或多抗原、尤其是双抗原结合性分子；肿瘤抗原或病原体抗原，如细菌抗原或病毒抗原；含有半胱氨酸的肽；和/或二聚体化或多聚体化的肽。

23.编码权利要求 1 至 22 中任一项的单链的多抗原结合性分子的核酸。

24.权利要求 23 的核酸，其中所述核酸在其 5'末端含有编码信号或跨膜序列的核苷酸序列。

25.权利要求 23 或 24 的核酸，其中所述核酸在其 5'末端含有启动子和/或激活子。

26.权利要求 25 的核酸，其中激活子可被细胞特异性地、细胞周

期特异性地、代谢特异性地和/或被药物激活或抑制。

27.权利要求 23 至 26 中任一项的核酸，其中所述核酸在其起始密码子 5'末端含有序列 GCCACC 或 GCCGCC。

28.含有权利要求 23 至 27 中任一项的核酸的载体。

29.权利要求 28 的载体，其中所述载体是病毒或非病毒载体。

30.权利要求 29 的载体，其中所述非病毒载体选自阳离子脂质、阳离子聚合物，阳离子肽或阳离子卟啉。

31.含有权利要求 23 至 27 中任一项的核酸或权利要求 28 或 29 的载体的细胞。

32.权利要求 31 的细胞，其中细胞是细菌、酵母、昆虫或哺乳动物细胞。

33.权利要求 32 的细胞，其中哺乳动物细胞是淋巴细胞、巨噬细胞、胶质细胞、上皮细胞、肝细胞、肾细胞、骨髓细胞、内皮细胞、平滑肌或横纹肌细胞，或成纤维细胞。

34.制备单链的多抗原结合性分子的方法，所述方法包括培养权利要求 31 或 32 的细胞并适当地分离表达产物。

35.含有权利要求 1 至 12 和 17 至 22 中任一项的单链的多抗原结合性分子、权利要求 23 至 27 中任一项的核酸、权利要求 28 至 30 中任一项的载体或权利要求 31 至 33 中任一项的细胞的药物。

36.含有权利要求 13 至 16 中任一项的单链的多抗原结合性分子的诊断辅助物。

37.权利要求 1 至 22 中任一项的单链的多抗原结合性分子，权利要求 23 至 27 中任一项的核酸，权利要求 28 至 30 中任一项的载体或权利要求 31 至 33 中任一项的细胞用于治疗、预防或诊断癌症、自身免疫疾病、炎性疾病、血液病，尤其是血液凝结和/或循环系统疾病，神经系统障碍和/或传染病的用途。

说　明　书

单链的多抗原结合性分子，其制备和用途

本发明涉及单链的多抗原结合性分子，所述分子具有免疫球蛋白重链和轻链多变区，这些区域以 VH-VL 构建体的形式相互连接，它们又通过一种肽而连接在一起，本发明还涉及所述分子的制备及其作为药物或诊断辅助物的用途。

识别两种不同抗原，例如肿瘤细胞表面抗原和效应物分子的双特异性抗体被广泛用于实验免疫疗法中(Fanger 等，免疫学评述，12，101-124(1992)；van de Winkel 等，今日免疫学，18，562-564(1997))。由双特异性抗体募集的效应物功能包括在体内天然存在的那些效应物分子，例如细胞毒性细胞和吞噬细胞，补体成分，细胞因子，溶栓酶和纤维蛋白溶酶，以及外源效应物分子，例如毒素、前体药物转化酶和放射性核素。因此，例如，在异种移植的肿瘤中注射针对 Hodgkin 肿瘤相关抗原 CD30 和 T 细胞抗原 CD3 和 CD28 的双特异性抗体会导致细胞毒性 T 细胞的募集和刺激，并诱导杀肿瘤活性(Renner 等，科学，264，833，1994)。在另一方法中，使用了针对 CD30 和碱性磷酸酶的双特异性抗体将酶募集至肿瘤位点，从而将无毒性的药物前体转变为有毒的药物(Sahin 等，癌症研究，50，6944-6948，1990)。

注射纯化的双特异性抗体的替代方法是由体外或体内转染的细胞表达和分泌这些双特异性抗体。此策略的优点是由经转导细胞产生双特异性抗体的过程发生在体内，因此无需在注射前费力地生产和纯化双特异性抗体。另外，有可能通过选择适当的表达系统来控制双特异性抗体在器官或肿瘤中局部表达或在全身表达。

通过例如化学交联(Nisonoff 等，自然，194，355，1962)可制备双特异性抗体。动物来源的单克隆或多克隆抗体分子经化学交联后，大部分可能失去活性，另外，还产生了异型二聚体和同型二聚体，必需通过复杂的过程将同型二聚体与所需的异型二聚体分开。仅可以通

过相对费力的方法制备能产生双特异性抗体的杂交瘤细胞(被称为杂合杂交瘤)，因为其中需要将两种不同的杂交瘤融合在一起(Milstein 等，自然，305，537，1983)。功能性异型二聚体的比例相对较低，理论上仅为 10%，因为两种抗体分子的重链和轻链可以任何方式彼此结合。所用的起始物质主要包括鼠单克隆抗体，它对于人而言是有免疫原性的。

也可重组制备和在细菌或真核细胞中表达多种二价或双特异性抗体分子(WO 93/06217)。所有重组抗体分子的共同点是可使用始于鼠和人的分子制备它们。已开发了多种方法以尽可能有效地制备双特异性重组抗体分子。使用这些方法可制备多组分子。

在一组分子中，抗体的可变部分与免疫球蛋白的恒定区(Fc，CH3，CL)融合以达到二聚体化(Hu 等，癌症研究，56，3055-3061(1994)；Hayden 等，ther. Immunol，1，3-15(1994))。然而，在这种情况下，没有对异型二聚体分子的选择，使得以这种方法主要产生的是二价同型二聚体。另外，只有真核细胞能以功能形式表达这些分子。

在另一组分子中，抗体的可变部分与其它蛋白质的肽或蛋白质区域融合以制备二价或双特异性分子(Pluckthun 和 Pack，免疫技术，3，83-105(1997))。在这种情况下，由于随机结合，通常也会形成同型和异型二聚体。另外，这些分子含有一定比例(有时是相当大比例)的外源序列，因此估计有显著的免疫原性。

在第三组分子中，对重组 Fv 片段，通常为单链 Fv 片段(scFv)的少量修饰被用于制备二价或双特异性分子(Holliger 和 Winter，Curr. Opin. Biotechnol，4，446-449(1993))。这些修饰包括通过 scFv 链 C 末端额外的半胱氨酸进行二聚体化(MacCartney 等，蛋白质工程，8，301-314(1994))。然而，这会导致同型和异型二聚体，并且，当在细菌细胞中表达时，将产生无功能的聚集体。可以在细菌和真核细胞中表达结构为 scFv(A)-接头-scFv(B)的串联 scFv 分子(Mallender 和 Voss，生物化学杂志，269，199-206，1994)。然而，有时也会出现四个可变区的无功能的结合。

最近几年，重组抗体技术导致产生了一些新型的、小的二价或双特异性抗体片段。这种类型分子的例子例如有“间体”(diabody)(Holliger 等，美国国家科学院院报，90，6444-6448，1993)。这些分子含有免疫球蛋白的 VH 和 VL 可变区域，所述区域通过很短的接头连接在一起。所述接头非常短以致于不会导致单链 Fv 片段中会出现的一条链的 VH 和 VL 区域的结合。这意味着是两条链的 VH 和 VL 区域结合形成二聚体，从而产生具有两个结合位点的分子(Perisic 等，结构，2，1217-1226，1994)。通过在一个细胞中表达结构为 VH(A)-VL(B)和 VH(B)-VL(A)的两条链可产生双特异性的“间体”。在这种情况下，VL 指的是免疫球蛋白轻(L)链的可变(V)区，VH 指的是免疫球蛋白重(H)链的可变区(V)，这些可变区可结合抗原(A)或(B)。VH 部分与 VL 部分的结合产生了具有功能活性结合位点的异型二聚体片段。细菌表达的双特异性“间体”已被成功用于募集多种效应物分子，免疫球蛋白，C1q 或酶，或者效应细胞，如细胞毒性 T 淋巴细胞(Kontermann 等，自然生物技术，15，629(1997);Holliger 等，蛋白质工程，9，299(1996)；自然生物技术，15，632 (1997)；Zhu 等，生物技术，14，192(1996)；FitzGerald 等，蛋白质工程，10，1221(1997)；Krebs 等，生物化学杂志，273，2858 (1998))。

然而，“间体”具有下列缺点:

由于 VH(A)-VL(B)和 VH(B)-VL(A)这两条链在物理上不再连接在一起，故同等程度地产生同型和异型二聚体，这使得必需对异型二聚体进行很费力的纯化过程。另外，也会出现二聚体解离现象，正如已在 scFv 片段中看到的那样(Glockshuber 等，生物化学，29，1362-1367(1990))。为了解决此问题，已开发了二硫键稳定化的“间体”(FitzGerald 等，蛋白质工程，10，1221-1225，1997)或“球入穴(knob into hole)间体”(Zhu 等，蛋白质科学，6，781-788，1997)，然而，它们的制备相当复杂。另外，双特异性“间体”的基因工程表达中每条链均需要信号序列和核糖体结合位点，这很难实现。另外，有可能表达非等摩尔量的可变区，这可增加无功能的同型二聚体的比例。

因此，本发明的目的是找出不具有所谓的“间体”的上述缺点，并可经简单的方法以基本上均一的形式制备的多抗原结合性分子。

因此，本发明的一个方面是单链的多抗原结合性分子，所述分子含有下列组分:

a)具有第一特异性(A)的免疫球蛋白重链可变区(VH)及其功能性部分，

b)具有第二特异性(B)的免疫球蛋白轻链可变区(VL)及其功能性部分，

c)具有特异性(B)的免疫球蛋白重链可变区(VH)及其功能性部分，和

d)具有特异性(A)的免疫球蛋白轻链可变区(VL)及其功能性部分。

其中 VH 和 VL 区域以 VH-VL 构建体或 VL-VH 构建体的形式连接，而这两种 VH-VL 构建体经由肽(P)连接。

在另一个实施方案中，本发明的分子含有两个以上所述的 VH-VL 构建体(如 VH(B)-肽-VL(B))。这使得有可能得到含有几种特异性(A)，(B)，(C)等的分子。

在优选的实施方案中，各个 VH-VL 构建体经由其具有相同特异性的可变区结合在一起。本发明分子的特别优选的结构示于图 1。

在另一个优选的实施方案中，所述的各种特异性实质上相同。本发明的术语“实质上相同”指的是区域的分子结构很有可能不同，但它们的特异性，即特异性结合抗原的功能仍保持不变。结果是本发明的分子不仅可含有一种免疫球蛋白的重链或轻链的完整可变区，也可含有其功能性部分，即保留了其抗原结合特异性的部分。例如，本发明也包括人工构建体，所述构建体由免疫球蛋白可变区的各个 CDR 部分(“互补决定区”)组成(Jones, P. T等，自然，321，522，1986;Riechmann, L等，自然，332，323，1988; Verhoeyen, M等，科学，239，1534，1988)。

在一个优选实施方案中，通过肽接头(L)以 VH-L-VL 构建体或 VL-L-VH 构建体的形式连接 VH 和 VL 区域。此时接头一般应尽可能地短，

优选约为 1-20 个氨基酸，尤其是约 1-5 个氨基酸长，特别优选序列为 GGGGS 的接头。

与接头(L)形成对照的是，连接肽(P)可具有任何适当的长度。然而，优选肽(P)具有约 12-40 个氨基酸，尤其是约 12-20 个氨基酸，特别是约 14 个氨基酸。特别优选的肽(P)含有氨基酸序列 GGGGSGGRASGGGS 或 GGGGSGGRASGGGGS，尤其优选由所述氨基酸序列组成的肽(P)。

在另一个优选的实施方案中，本发明的分子含有效应物(E)作为另外的组分。所述效应物可直接，或适当时经由连接物(B)与本发明的分子连接。特别优选连接物(B)含有蛋白酶切割序列，尤其优选含有 PSA(前列腺特异性抗原)、组织蛋白酶、纤溶酶原和/或纤溶酶原激活子切割序列。

蛋白酶切割序列是特别优选的，因为这使得可以通过使用蛋白酶而将效应物从本发明的分子上脱离下来。当效应物的活性因效应物直接地或通过连接物间接地与本发明的分子结合而受到抑制时，这种分离尤其有利。

由于蛋白酶特别地存在于炎症区或肿瘤中，效应物，优选因通过蛋白酶切割序列与本发明的分子结合而被灭活的效应物，在此得到了广泛的局部释放。另外，通过选择本发明分子的适当靶结构，例如对肿瘤细胞上的抗原，肿瘤相关内皮细胞上的抗原或者炎症细胞如淋巴细胞或巨噬细胞上的抗原具有特异性的靶结构，也可能使本发明的分子与效应物累积于诸如炎症或肿瘤区域中。

根据本发明，本发明的分子也可以直接或间接地与几种效应物结合。

蛋白酶或相关切割序列详细描述于例如 DE1970430.1 中。

图 2 图示了本发明优选分子的一个例子，其具有通过连接物而与该分子结合的效应物。

对本发明分子中各个组分的选择一般取决于应用领域。

如果本发明的分子将被用作诊断辅助物，那么，例如在另外的实施方案中，第一特异性(A)针对的是待分析的分子，第二特异性(B)直

接或间接针对分析物。分析物可以是例如放射性分子、荧光分子或者通过其酶活性而将分析物前体转变为活性分析物的酶。

在另一个优选实施方案中，第一特异性(A)针对待分析的分子，第二特异性(B)针对待分析的另一分子，而效应物(E)是一种分析物，例如放射性分子、荧光分子和/或已在上文详细说明的一种酶。

然而，本发明的分子也可用作病毒或非病毒载体之靶细胞特异性结合的配体。在一个优选实施方案中，本发明的分子也可用作所谓的多功能配体。如果肽(P)和/或效应物(E)含有融合肽，则对于此目的是有利的。可将多功能配体用于核苷酸序列的靶细胞特异性转移，它一般是一种含有靶细胞特异性配体、基因构建体特异性配体和融合肽的蛋白质。可使用这种类型的多功能配体使基因构建体（即核酸构建体）与靶细胞特异性结合，而融合肽可使该核酸构建体有可能穿过细胞膜渗透至细胞核内，从而也从内体中释放出来。

将本发明的分子用作载体的配体或用作多功能配体时，第一特异性(A)针对靶细胞、第二特异性(B)针对载体是有利的。载体一般是核酸、阳离子肽或蛋白质、阳离子脂质、阳离子肽或阳离子卟啉。在本发明的一个具体实施方案中，载体是得自例如腺病毒(AdV)，腺相关病毒(AAV)、痘苗病毒、RSV、HSV、流感病毒或慢病毒的病毒载体。

靶细胞上膜结构的靶细胞特异性配体，衍生自免疫球蛋白（即含有 VH 和 VL 区域）的靶细胞特异性配体和基因构建体特异性配体，以及具有融合特性的肽的例子详细描述于 DE19649645.4。

本发明的分子也适用于预防和/或用作治疗剂。

为了这些目的，例如，第一特异性(A)可以是针对细胞膜，如淋巴细胞、巨噬细胞、单核细胞、粒细胞、造血细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、横纹肌细胞、上皮细胞、肝细胞、肾细胞、胶质细胞、支持组织的细胞、肿瘤细胞或白血病细胞的细胞膜，或者是针对胞外基质、补体系统、凝结系统、激肽系统、血浆、支持组织的蛋白质，或者是针对细胞因子或趋化因子，或者针对内源或外源毒素，或者针对如毛地黄之类的药物，和/或针对病原体如细菌、病毒和/或寄生虫病原体。

第二特异性(B)例如可针对诸如淋巴细胞、巨噬细胞、单核细胞或粒细胞的细胞膜，结果是它与靶结构的交联可在该处导致细胞毒性、免疫调节或炎症过程。

它也可针对细胞因子、趋化因子或生长因子，结果是它与靶结构的交联可在该处诱导免疫调节或增殖过程。它也可针对补体系统的蛋白质，所述蛋白质可启动、增强或抑制补体系统的激活。取决于对蛋白质的选择，这种类型的蛋白质与靶结构的交联可在该处诱导炎性和细胞裂解反应或者抗炎性反应和细胞保护性反应。它也可以针对凝结系统的蛋白质，所述蛋白质可启动、增强或抑制凝结系统的激活。取决于对蛋白质的选择，这种类型的蛋白质与靶结构的交联可诱导或防止血栓形成。另外，它也可以针对可导致靶结构上血纤蛋白块溶解的纤溶蛋白，针对能将靶结构上无活性的药物前体转变为有活性（例如有细胞毒性）的药物的酶，针对肽激素或类固醇激素，针对免疫球蛋白的恒定部分，针对介体，如组胺、5-羟色胺、白三烯、前列环素或激肽，针对病原体，如细菌、病毒和/或寄生虫病原体，或针对肿瘤细胞。

细胞因子作为靶结构，或者单核细胞、巨噬细胞和/或淋巴细胞作为靶结构可被具有感染或肿瘤抗原的本发明分子交联，从而在体内诱导针对该抗原的有所增强的免疫应答。在此方面，在本发明的分子中加入病原体或肿瘤的特定抗原，在适当时也加入细胞因子，并局部施用或注射该交联复合物是有利的。

第二特异性(B)也可针对内源或外源毒素以使靶结构上可发生毒素的中和作用和吞噬作用或者发生毒性反应。另外，它还可针对如毛地黄之类的药物以造成药物的络合和消除。

在另一个优选的实施方案中，具有效应物的本发明分子允许两个相同或不同的靶结构与一个或多个效应物交联。

适当效应物的例子是跨膜区域，糖磷脂锚，受体的与配体结合的部分；受体的配体或配体的与受体结合的部分；肽激素；细胞因子；生长因子；生长因子抑制剂；趋化因子；干扰素；介体；对循环起作

用的肽；将药物的无活性前体转变为有活性药物的酶；激活或抑制凝结作用的蛋白质；激活或抑制纤溶作用的蛋白质；激活或抑制补体系统的蛋白质；免疫球蛋白的一个或多个恒定区；细胞毒性肽，另一种单链的单或多抗原（尤其是双抗原）结合分子；肿瘤抗原或病原体抗原，如细菌抗原或病毒抗原；含有半胱氨酸以产生本发明分子之二聚体的肽；和/或二聚体化或多聚体化的肽(Pluckthun 和 Pack，免疫技术，3，83-105(1997))。

本发明的另一方面是编码本发明分子的核酸。该核酸一般为 DNA 或 RNA，优选为双链 DNA。

为了分泌本发明的表达产物(这在适当时是需要的)，本发明的核酸在其 5'末端含有编码信号或跨膜序列的核苷酸序列（例见 DE19639103.2 或 DE 19651443.6)。适当信号或跨膜序列的一个例子是免疫球蛋白的信号序列(DNA 位置≤63 至≥107)，CEA 的信号序列(DNA 位置≤33 至≥134)，或人呼吸道合胞病毒糖蛋白的信号序列(氨基酸序列≤38 至≥50 或 48 至 65 的 cDNA)。

在另一个实施方案中，本发明的核酸在其 5'末端含有启动子和/或激活子(activator)。优选激活子可被细胞特异性地、细胞周期特异性地、代谢特异性地和/或被药物激活或抑制。这种类型的激活子序列(包括其组合)被描述于 EP97101507.8，DE19617851.7，DE19639103.2，DE19651443.6，DE19704301.1，EP97102547.3 和 DE19710643.9。本发明特别优选的核酸构建体示于图 3 和 4。

在一个优选实施方案中，本发明的核酸在其起始密码子 5'末端含有序列 GCCACC 或 GCCGCC，这有可能导致翻译的增强。

本发明的另一实施方案涉及含有本发明核酸的载体。在这种情况下，载体可以是病毒或非病毒载体，优选为非病毒载体，尤其是选自阳离子脂质、阳离子聚合物、阳离子肽或阳离子卟啉的非病毒载体。

为了制备本发明的分子，将所述核酸克隆至表达载体，例如适当的质粒中，并导入适当的细胞，例如细菌、酵母、昆虫或哺乳动物细胞中，培养以此方式转化或转染的细胞，并在适当时分离表达产物。

方法一般是本领域技术人员已知的，详细描述于例如 Sambrook J 等，分子克隆，实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室出版社，1989。

在本发明一个特别优选的实施方案中，这些细胞表达具有效应物的本发明分子，该效应物优选为一种跨膜区。

因此，例如，编码人巨噬细胞集落刺激因子之跨膜序列的 DNA 序列(DNA 位置≤1485 至≥1554)或编码人呼吸道合胞病毒(RSV)糖蛋白 G 之信号和跨膜区(氨基酸 1 至 63，或其部分序列氨基酸 38 至 63)的 DNA 序列或编码流感病毒神经氨酸酶之信号和跨膜区(氨基酸 7 至 35，或部分序列氨基酸 7 至 27)的 DNA 序列可被插入到启动子序列和本发明分子之 DNA 序列之间或该基因的 3'末端。

然而，为了将药物锚定在表达本发明分子之细胞的细胞膜内，也可以将编码糖磷脂锚的核苷酸序列插入到核酸构建体中。

糖磷脂锚的插入一般是在编码本发明分子之核苷酸序列的 3'末端，并且可与信号序列的插入同时发生。

已描述了例如 CEA、N-CAM 和其它膜蛋白如 Thy-1 的糖磷脂锚。

由于存在这种跨膜区，该特定细胞在细胞膜上表达本发明的分子，因此获得了特异于靶或效应物结构的“受体”，所述结构由本发明分子中与抗原结合的部分所识别。

另一种优选的受体是受体（例如 T 细胞受体或 M-CSF 受体）的跨膜或信号转导区域。这使得在细胞膜上表达本发明分子的细胞有可能被靶结构与特异性功能的结合所激活。这种类型的特异性功能可以是例如 T 淋巴细胞的细胞毒性反应，巨噬细胞和粒细胞的吞噬反应，或者粒细胞、单核细胞和巨噬细胞的胞吐反应。

因此，本发明的另一方面是含有本发明核酸或本发明载体的细胞，尤其是细菌、昆虫、酵母或哺乳动物细胞。除了通常已知的可用于表达核酸的细胞（例如 CHO 或 BHK 细胞）外，适当的哺乳动物细胞也可以是淋巴细胞，巨噬细胞，胶质细胞，上皮细胞，肝细胞，肾细胞，骨髓细胞，内皮细胞，平滑肌或横纹肌细胞或者成纤维细胞。

最后提及的细胞特别适用于基因治疗应用，因为含有本发明核酸

构建体的这些细胞可被局部或非肠道地（如静脉内、动脉内）注射到体腔、器官内，或者皮下注射入患者体内以预防或治疗疾病。

然而，为了通过基因疗法治疗疾病，也可将本发明的核酸构建体经皮下或肌内局部直接施用于患者体腔、器官、循环系统内。

因此，本发明的另一方面是含有本发明分子、本发明核酸、本发明载体或本发明细胞的药物，以及含有本发明分子的诊断辅助物，所述分子也针对上文已详细描述的分析物。

因此，本发明分子、本发明核酸、本发明载体或本发明细胞适用于治疗、预防或诊断诸如癌症，自身免疫疾病，炎性疾病，血液病，尤其是血液凝结和/或循环系统疾病，神经系统疾病和/或传染病。

在此方面，对各个组分的选择一般取决于本发明项目的用途。下文一般性地和以举例方式详细描述了各个组分及其用途:

为了制备本发明的项目，如图 3 和 4 中的例子所说明，可以将本发明核酸构建体的 5'末端与编码信号序列的核酸的 3'末端连接，再将后者的 5'末端与启动子序列的 3'末端连接。

选定的启动子序列包括例如能无限制地激活的启动子和激活子序列，如 RNA 聚合酶 III 的启动子，RNA 聚合酶 II 的启动子，CMV 启动子和/或增强子，SV40 启动子；或病毒启动子和激活子序列，如 HBV、HCV、HSV、HPV、EBV、HTLV、HIV 等的启动子和激活子序列。

使用 HIV 启动子时，优选将包括 TAR 序列的完整 LTR 序列[位置≤-453 至≥-80，Rosen 等，细胞，41，813(1985)]用作病毒特异性启动子。

可选的其它启动子序列是例如能被代谢地激活的启动子和增强子序列，如能被低氧诱导的增强子，能被细胞周期特异性地激活的启动子，如 cdc25C 基因、cdc25B 基因，细胞周期蛋白 A 基因、cdc2 基因、B-myb 基因、DHFR 基因或 E2F-1 基因的启动子，或者细胞周期特异性地出现或被激活的转录因子的结合序列。这些结合序列包括例如 c-myc 蛋白的结合序列。被称为 Myc E-Box 的核苷酸序列[5'-GGAAGCAGACCACGTGGTCTGCTTCC-3']的单体或多体也包括在这些结合序列中。

可选的其它启动子序列是例如能被四环素激活的启动子，如与相

应的阻抑子联合的四环素操纵基因，或嵌合启动子。嵌合启动子是位于上游的、能被细胞特异性地、代谢或病毒特异性地激活的激活子序列与位于下游、并含有 CDE-CHR 或 E2FBS-CHR 核苷酸序列的启动子元件的联合，在细胞周期 G_0 和 G_1 期，抑制蛋白与之结合从而抑制位于上游的激活子序列的激活(WO96/06943; Lucibello 等，EMBO J，14，132(1995))。

可选的其它启动子序列是例如能被细胞特异性地激活的启动子，优选例如得自编码优选在选定细胞中产生的蛋白质之基因的启动子或增强子的启动子或激活子序列。

例如，为本发明目的，在下述细胞中优选使用下列蛋白质的启动子:

在内皮细胞中被激活的启动子和激活子序列是编码例如下列蛋白质的基因的基因调节序列: 脑特异性内皮细胞葡萄糖 1 转运蛋白，endoglin，VEFG 受体 1(flt-1)，VEFG 受体 2(flk-1，KDR)，til-1 或 til-2，B61 受体(Eck 受体)，B61，内皮素，尤其是内皮素 B 或内皮素 1，内皮素受体，尤其是内皮素 B 受体，甘露糖-6-磷酸受体，von Willebrand 受体，IL-1α，IL-1β，IL-1 受体，血管细胞粘着分子(VCAM-1)或合成的、由在内皮细胞中优先或选择性地具有活性之转录因子的寡聚化结合位点组成的激活子序列。一个例子是转录因子 GATA-2，它在内皮素 1 基因中的结合位点是 5'-TTATCT-3'。

在与已被激活的内皮细胞相邻的细胞中被激活的启动子或激活子序列是编码例如下列蛋白质的基因的基因调节序列: VEGF，此时 VEGF 基因的基因调节序列是 5'侧翼区，3'侧翼区，c-Src 基因或 v-Src 基因，或类固醇激素受体；以及它们的启动子元件，尤其是小鼠乳腺肿瘤病毒启动子。

在肌肉细胞，尤其是平滑肌细胞中被激活的启动子或激活子序列是编码例如下列蛋白质的基因的基因调节序列: 原肌球蛋白，α-肌动蛋白，α-肌球蛋白，PDGF 受体，FGF 受体，MRF-4，果糖磷酸激酶 A，磷酸甘油酸变位酶，肌钙蛋白 C，肌浆蛋白，内皮素 A 受体，结蛋白，

VEGF(见上文)，“人工”启动子或肌肉特异性转录因子的启动子，所述转录因子如螺旋-环-螺旋(HLH)家族的因子(MyoD，Myf-5，肌浆蛋白，MRF4)或锌指蛋白 GATA-4。

不仅肌肉特异性基因的启动子可使 HLH 蛋白和 GATA-4 显示出肌肉特异性转录，异源启动子也可使上述蛋白质显示出肌肉特异性转录，因此人工启动子也可做到这一点。这种类型的人工启动子的例子是肌肉特异性 HLH 蛋白的多拷贝(DNA)结合位点，如 E 盒(MyoD)(例如 4×AGCAGGTGTTGGGAGGC)或α-肌球蛋白重链基因的 GATA-4 多拷贝 DNA 结合位点(如 5'-GGCCGATGGGCAGATAGAGGGGCCGATGGGCAGATAGAGG-3')。

在胶质细胞中被激活的启动子和激活子序列是例如来自编码下列蛋白质的基因的基因调节序列：Schwann 细胞特异性蛋白质 periaxin，谷氨酰胺合成酶，胶质细胞特异性蛋白质(胶质原纤维酸性蛋白质 = GFAP)，胶质细胞蛋白质 S100b，IL-6，CNTF，5-HT 受体，TNFα，IL-10，胰岛素样生长因子受体 I 和 II 或 VEGF(见上文)。

在血液形成细胞中被激活的启动子和激活子序列是例如在血液形成细胞或相邻细胞（如基质）中表达的细胞因子或其受体的基因的启动子序列。

这些启动子序列包括编码例如下列细胞因子及其受体之基因的启动子序列：干细胞因子受体，干细胞因子，IL-1α，IL-1 受体，IL-3，IL-3 受体(α亚基)，IL-3 受体(β亚基)，IL-6，IL-6 受体，GM-CSF，GM-CSF 受体(α链)，干扰素调节因子 1(IRF-1)（IL-6 激活 IRF-1 启动子的水平与 IFNγ或 IFNβ激活 IRF-1 启动子的水平相同），促红细胞生成素或促红细胞生成素受体。

在淋巴细胞和/或巨噬细胞中被激活的启动子和激活子序列是例如编码诸如下列细胞因子、细胞因子受体和粘附分子及抗体 Fc 片段受体之类的基因的启动子和激活子序列：IL-1 受体，IL-1α，IL-1β，IL-2，IL-2 受体，IL-3，IL-3 受体(α亚基)，IL-3 受体(β亚基)，IL-4，IL-4 受体，IL-5，IL-6，IL-6 受体，干扰素调节因子 1(IRF-1)（IL-6 激活 IRF-1 启动子的水平与 IFNγ或 IFNβ激活 IRF-1 启动子的水平相同），

IFNγ反应性启动子，IL-7，IL-8，IL-10，IL-11，IFNγ，GM-CSF，GM-CSF 受体(α链)，IL-13，LIF，巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)受体，I型和 II 型巨噬细胞清除受体,MAC-1(白细胞功能相关抗原),LFA-1α(白细胞功能相关抗原)或 p150,95(白细胞功能相关抗原)。

在滑膜细胞中被激活的启动子和激活子序列例如是编码诸如下列基质金属蛋白酶(MMP)之类的基因的启动子序列：MMP-1(间质胶原酶)，MMP-3(溶基质素/transin)或金属蛋白酶的组织抑制剂(TIMP)，如 TIMP-1，TIMP-2，TIMP-3。

在白血病细胞中被激活的启动子和激活子序列是例如编码下列蛋白质的基因的启动子：HSP-70，bcl-1/细胞周期蛋白 D-1，bcl-2，IL-6，IL-10，TNFα，TNFβ，HOX-11，BCR-Abl，E2A-PBX-1，PML-RAR(早幼粒细胞白血病视黄酸受体)或 c-myc，其中 c-myc 蛋白结合并激活被称为 Myc E 盒的核苷酸序列(5'-GGAAGCAGACCAGCTGGTCTGCTTCC-3')的多体。

在肿瘤细胞中被激活的启动子和激活子序列是例如基因调节核苷酸序列，所述序列与在肿瘤细胞中形成的或具有活性的转录因子可相互作用。

为了本发明的目的，优选的启动子或激活子序列包括编码特别地产生于癌细胞或肉瘤细胞中之蛋白质的基因的基因调节序列或元件。因此，优选用于小细胞支气管癌中的是 N-CAM 蛋白启动子，用于卵巢癌中的是肝炎生长因子受体或 L-丝束蛋白的启动子，用于胰腺癌中的是 L-丝束蛋白或多形上皮粘蛋白(PEM)的启动子。

本发明一个相当大的优点在于各个组分的连接有利于异型二聚体化结合，从而大量形成单链的多抗原结合性分子。二聚体的解离现象也有所减少，scFv 片段已显示出这一点(例见 Glockshuber 等，生物化学，29,1362-1367，1990)，因此，相对于所谓的“间体”而言，可以较简便地并以更均一的形式制备本发明的分子，即便是前者为二硫键稳定化的或“球入穴”的形式也是如此。

另外，制备本发明的分子仅需要一个信号序列和一个核糖体结合

位点(RBS)，与之形成对照的是在本发明的“间体”中每条链都需要信号序列和 RBS。本发明的另一个优点是，就本发明的分子，表达的是等摩尔量的可变区，而至于“间体”的两条链的表达，可能是以非等摩尔量进行的，因此后者中无功能的同型二聚体的比例有所增加。

本发明分子的另一优点是可以在细菌和酵母、杆状病毒和真核细胞中简单地并以功能形式表达本发明的分子。另外，除了对本发明的分子进行分泌表达外，也可以将它们表达在细胞内或与膜联合的形式(例见 Biocca & Cattaneo，细胞生物学动态，5，248-252(1995))。

本发明分子的另一优点是它们象双特异性抗体一样，可以广泛用作诊断辅助物以及预防和/或治疗疾病的药物。

选择效应物基因和启动子序列应考虑所需的用途和欲转导的靶细胞。例如，就下列疾病，可选择的启动子序列和效应物基因的组合如下所述:

肿瘤治疗

肿瘤治疗的靶细胞是例如增殖中的内皮细胞，或与内皮细胞相邻的基质细胞和肌肉细胞，或者肿瘤细胞或白血病细胞，所用启动子是例如内皮细胞特异性和细胞周期特异性启动子，或细胞非特异性或肌肉细胞特异性和细胞周期特异性启动子，或肿瘤细胞特异性(实体肿瘤，白血病)和细胞周期特异性启动子，所用效应物是例如下列基因:

细胞增殖抑制剂基因是例如成视网膜细胞瘤蛋白(pRb = p110)或相关的 p107 和 p130 蛋白的基因。成视网膜细胞瘤蛋白(pRb/p110)和相关的 p107 和 p130 蛋白可通过磷酸化而失活。应优选使用的细胞周期抑制剂基因是在所表达蛋白质的失活位点具有突变、而其功能未因此受损害的那些基因。已描述了 p110 中这些突变的例子。p107 蛋白或 p130 蛋白的 DNA 序列可以类似的方式突变。p53 蛋白的基因也是合适的。p53 蛋白在细胞中或者通过与特定蛋白质（如 MDM2）结合而失活，或者通过经由去磷酸化的 C-末端丝氨酸使 p53 寡聚体化而失活。因此，最好使用 C 末端截短至丝氨酸 392 的 p53 蛋白的 DNA 序列。其它的合适基

因是 p21(WAF-1)、p16 蛋白、其它 cdk 抑制剂、GADD45 蛋白或 bak 蛋白的基因。

凝结诱导因子和血管生成抑制剂的基因是例如纤溶酶原激活物抑制剂 1(PAI-1), PAI-2, PAI-3, 制管张素, 干扰素(IFNα, IFNβ或 IFNγ), 血小板因子 4, IL-12, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, 白血病抑制因子(LIF)或组织因子(TF)及其促进凝结的片断的基因。

细胞静止蛋白和细胞毒性蛋白的基因是例如穿孔素, 粒酶, IL-2, IL-4, IL-12, 如 IFNα、IFNβ或 IFNγ之类的干扰素, 如 TNFα或 TNFβ之类的 TNF, 制癌蛋白 M, 鞘磷脂酶或爪蟾抗菌肽和爪蟾抗菌肽衍生物的基因。

炎症诱导物的基因是例如下列物质的基因:IL-1, IL-2, RANTES(MCP-2), 单核细胞趋化和激活因子(MCAF), IL-8, 巨噬细胞炎症蛋白 1(MIP-1α, -β), 嗜中性白细胞活化蛋白-2(NAP-2), IL-3, IL-5, 人白血病抑制因子(LIF), IL-7, IL-11, IL-13, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, 在功能上相当于人补体因子 C3b 的眼镜蛇毒因子(CVF)或 CVF 的部分序列(即它能与补体因子 B 结合, 经 D 因子切割后, 代表一种 C3 转变酶), 人补体因子 C3 或其部分序列 C3b(C3b 是人补体因子 C3 的切割产物, 它在功能和结构上与 CVF 相似), 或者能激活补体或诱导炎症的细菌蛋白质, 例如鼠伤寒沙门氏菌的孔蛋白, 金黄色葡萄球菌的聚集因子, 革兰氏阴性细菌所特有的调节蛋白(modulin), 军团菌或乙型流感嗜血杆菌或克雷伯氏杆菌的主要外膜蛋白, 或 G 类链球菌的 M 分子。

激活细胞静止因子前体的酶的基因是例如将无活性的前体(前体药物)裂解为有活性的细胞静止因子(药物)的酶。这种类型的物质以及与它们中的每一个相关的前体药物和药物已由 Deonarain 等人(英国癌症杂志, 70, 786(1994)), Mullen(药物疗法, 63, 199(1994))和 Harris 等人(基因疗法, 1, 170(1994))进行了评述。例如, 可使用下列酶之一的 DNA 序列: 单纯疱疹病毒胸苷激酶, 水痘带状疱疹病毒胸苷激酶, 细菌硝基还原酶, 细菌β-葡糖醛酸糖苷酶, 得自黑麦的植物β-葡糖醛酸糖苷酶, 人β-葡糖醛酸酶, 人羧肽酶(CB), 例如肥大细胞 CB-A、胰

腺 CB-B 或细菌羧肽酶，细菌β-内酰胺酶，细菌胞嘧啶脱氨酶，人过氧化氢酶或过氧化物酶，磷酸酶，尤其是人碱性磷酸酶，人前列腺酸性磷酸酶或 5 型酸性磷酸酶，氧化酶，尤其是人赖氨酰氧化酶或人 D-氨基酸氧化酶，尤其是人谷胱甘肽过氧化物酶，人嗜酸性粒细胞过氧化物酶或人甲状腺过氧化物酶，β-半乳糖苷酶或α-半乳糖苷酶。将前体药物道诺霉素β-D-半乳糖吡喃糖苷转变为细胞静止因子道诺霉素(daunomycin)时特别优选β-半乳糖苷酶。

自身免疫疾病和炎症的治疗

自身免疫疾病和炎症治疗的靶细胞是例如增殖中的内皮细胞或巨噬细胞和/或淋巴细胞或滑膜细胞，所用启动子是例如内皮细胞特异性和细胞周期特异性启动子，或巨噬细胞和/或淋巴细胞特异性和/或细胞周期特异性启动子，或滑膜细胞特异性和/或细胞周期特异性的启动子，所用效应物是例如下列基因:

用于变态反应治疗的基因是例如 IFNβ，IFNγ，IL-10，针对 IL-4 的抗体或抗体片断，可溶性的 IL-4 受体，IL-12 或 TGFβ的基因。

用于预防移植器官排斥反应的基因是例如 IL-10，TGFβ，可溶性的 IL-1 受体，可溶性的 IL-2 受体，IL-1 受体拮抗剂或可溶性 IL-6 受体的基因。

用于抗体介导的自身免疫疾病的治疗的基因是例如 TGFβ，IFNα，IFNβ，IFNγ，IL-12，可溶性 IL-4 受体，可溶性 IL-6 受体，免疫抑制剂抗体或其含有 V_H和 V_L的片断的基因。

用于细胞介导的自身免疫疾病的治疗的基因是例如 IL-6，IL-9，IL-10，IL-13，TNFα或 TNFβ，IL-13，免疫抑制剂抗体或其含有 V_H和 V_L的片断的基因。

上文已详细描述了细胞增殖抑制剂、细胞静止蛋白或细胞毒性蛋白和可激活细胞静止因子前体的酶的基因。

用于关节炎治疗的基因是例如所表达的蛋白质能直接或间接地抑制如关节中的炎症和/或促进关节中胞外基质(软骨，结缔组织)的重建

的结构基因。

这些结构基因包括例如下述的基因：IL-1 受体拮抗剂(IL-1-RA)，因为 IL-1-RA 能抑制 IL-1α，β的形成；可溶性的 IL-1 受体，因为可溶性的 IL-1 受体能与 IL-1 结合并使其失活；IL-6，因为 IL-6 可使滑膜细胞和软骨细胞增加 TIMP 和超氧化物的分泌并减少 IL-1 和 TNFα的分泌；可溶性 TNF 受体，因为可溶性 TNF 受体能与 TNF 结合并使其失活；IL-4，因为 IL-4 抑制 IL-1，TNFα和 MMP 的形成和分泌；IL-10，因为 IL-10 抑制 IL-1，TNFα和 MMP 的形成和分泌，并增加 TIMP 的分泌；胰岛素样生长因子(IGF-1)，因为 IGF-1 刺激胞外基质的合成；TGFβ，尤其是 TGFβ1 和 TGFβ2，因为 TGFβ刺激胞外基质的合成；超氧化物歧化酶或 TIMP，尤其是 TIMP-1、TIMP-2 或 TIMP-3。

血液形成系统的治疗

血液细胞形成缺陷之治疗的靶细胞是例如血液形成系统的增殖中的未成熟细胞或与血液形成细胞相邻的基质细胞；所用启动子是例如血液形成细胞特异性和/或细胞周期特异性启动子或细胞非特异性和细胞周期特异性的启动子，所用效应物是例如下列基因：用于贫血症治疗的基因是例如促红细胞生成素的基因。

用于白细胞减少症治疗的基因是例如 G-CSF，GM-CSF 或 M-CSF 的基因。

用于血小板减少症治疗的基因是例如 IL-3，白血病抑制因子(LIF)，IL-11 或血小板生成素的基因。

神经系统治疗

对神经系统损伤的治疗的靶细胞是例如胶质细胞或增殖中的内皮细胞，所用启动子是例如胶质细胞特异性和细胞周期特异性启动子或内皮细胞特异性和细胞周期特异性启动子，或细胞非特异性和细胞周期特异性启动子，所用效应物是例如下列基因：

神经元生长因子的基因是例如 FGF，神经生长因子(NGF)，脑衍生

神经营养因子(BDNF)，神经营养蛋白-3(NT-3)，神经营养蛋白-4 (NT-4)或睫状神经营养因子(CNTF)的基因。

酶的基因是例如酪氨酸羟化酶或多巴脱羧酶的基因。

细胞因子及其抑制或中和 TNFα之神经毒性作用的抑制剂的基因是例如编码下述的基因：TGFβ；可溶性 TNF 受体，因为 TNF 受体可中和 TNFα；IL-10，因为 IL-10 可抑制 IFNγ、TNFα、IL-2 和 IL-4 的形成；可溶性 IL-1 受体，如 IL-1 受体 I 或 IL-1 受体 II，因为可溶性 IL-1 受体能中和 IL-1 的活性；IL-1 受体拮抗剂或可溶性 IL-6 受体。

血液凝结和循环系统的治疗

血液凝结和循环系统障碍的治疗的靶细胞是例如内皮细胞，增殖中的内皮细胞，与内皮细胞和平滑肌细胞相邻的体细胞；或巨噬细胞，所用启动子是例如细胞非特异性和细胞周期特异性启动子，或者内皮细胞、平滑肌细胞或巨噬细胞特异性和细胞周期特异性启动子；所用效应物是例如下列基因：

用于抑制凝结或促进纤溶的基因是例如组织纤溶酶原激活物(tPA)，尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)，tPA 和 uPA 的杂合体，C 蛋白，水蛭素，丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin)，如 C-1S 抑制剂，α1-抗胰蛋白酶或抗凝血酶 III，或组织因子途径抑制剂(TFPI)的基因。

用于促进凝结的基因是例如 F VIII，F IX，von Willebrand 因子，F XIII，PAI-1，PAI-2 或组织因子及其片断的基因。

血管生成因子的基因是例如 VEGF 或 FGF 的基因。

用于降低血压的基因是例如激肽释放酶或内皮细胞“氧化氮合酶”的基因。

用于抑制内皮细胞层受伤后的平滑肌细胞增殖的基因是例如抗增殖性、细胞静止性或细胞毒性蛋白的基因，或上文所述的将细胞静止因子的前体裂解为细胞静止因子的酶的基因，或这些药物之一与配体（如特异于肌肉细胞的抗体或抗体片断）的融合蛋白的基因。

其它血浆蛋白的基因是例如白蛋白、C1 灭活剂、血清胆碱酯酶、

运铁蛋白或 1-抗胰蛋白酶的基因。

预防和/或治疗传染病

用于接种的靶细胞是例如肌肉细胞或巨噬细胞和/或淋巴细胞，所用启动子是例如非特异性和细胞周期特异性启动子，或靶细胞特异性和细胞周期特异性启动子，所用效应物是例如可用于预防传染病的基因。

选定的活性物质一般是蛋白质的 DNA，所述蛋白质是由病原体产生的，并且通过注射可引起免疫应答，即通过抗体结合和/或通过细胞毒性 T 淋巴细胞可导致病原体被中和和/或杀死。这种类型的所谓中和性抗原已被用作疫苗抗原(例见 Ellis，高等实验医学生物学(Adv. Exp. Med. Biol.)，327，263(1992))。

本发明优选编码下列病原体之中和性抗原的核酸：甲型流感病毒，HIV，狂犬病毒，HSV(单纯疱疹病毒)，RSV(呼吸道合胞病毒)，副流感病毒，轮状病毒，VZV(水痘带状疱疹病毒)，CMV(巨细胞病毒)，麻疹病毒，HPV(人乳头状瘤病毒)，HBV(乙型肝炎病毒)，HCV(丙型肝炎病毒)，HDV(丁型肝炎病毒)，HEV(戊型肝炎病毒)，HAV(甲型肝炎病毒)，霍乱弧菌抗原，布氏疏螺旋体，幽门螺杆菌或疟疾抗原。

用于本发明的这种类型的活性物质也包括抗独特型抗体或其与抗原结合之片段的 DNA，所述抗体的结合抗原的结构(互补决定区)代表病原体的中和性抗原的多拷贝蛋白质或糖类结构(见上文)。

这种类型的抗独特型抗体及其裂解产物可特别地代替细菌病原体的糖类抗原，Hawkins 等人(免疫疗法杂志，14，273(1993))和 Westerink 和 Apicella(Springer Seminars in Immunopathol，15，227(1993))对此进行了综述。

其它效应物的例子是“肿瘤疫苗”的基因，它们包括肿瘤细胞上的抗原，Sedlacek 等(肿瘤学成就，32，Karger Verlag，Munich(1988)和肿瘤学成就，43，Karger Verlag，Munich (1992))对此也进行了综述。

其它例子是下列抗原或下列抗独特型抗体的基因：sialyl-Lewis; 肿瘤上由 T 细胞识别的肽；癌基因表达的蛋白质；血型抗原及其前体; 多形上皮粘蛋白上的抗原；或热激蛋白上的抗原。

慢性传染病治疗的靶细胞是例如肝细胞，淋巴细胞和/或巨噬细胞，上皮细胞或内皮细胞，所用启动子是例如病毒特异性或细胞特异性和细胞周期特异性启动子，所用效应物是例如下列基因:

编码具有细胞静止效应、细胞编程性死亡效应或细胞毒性效应的蛋白质或编码将抗病毒或细胞毒性物质的前体切割为活性物质的酶的基因。

已描述了编码抗病毒蛋白质，如有抗病毒活性的细胞因子和生长因子（如 IFNα，IFNβ，IFNγ，TNFβ，TNFα，IL-1 或 TGFβ），或具有灭活特定病毒之特异性的抗体或其含有 V_H 和 V_L 的片段或其经接头而连接的 V_H 和 V_L 片段的基因。针对病毒抗原的抗体的例子是：抗 HBV、抗 HCV、抗 HSV、抗 HPV、抗 HIV、抗 EBV、抗 HTLV、抗柯萨奇病毒或抗汉坦病毒抗体。

另一种有抗病毒活性的蛋白质是 rev-结合蛋白。这些蛋白质与 rev RNA 结合并抑制逆转录病毒基因表达中依赖于 rev 的转录后阶段。rev-结合蛋白的例子是 RBP9-27，RBP1-8U，RBP1-8D 或 RBP1-8 的假基因。

编码抗细菌蛋白质的基因例如是可中和细菌毒素或调理细菌的抗体的基因。这些抗体的例子是针对脑膜炎球菌 C 或 B，大肠杆菌，疏螺旋体，假单胞菌，幽门螺杆菌或金黄色葡萄球菌的抗体。

下列图和实施例旨在详细阐明本发明，而并非将本发明局限于此。

图的描述

图 1 图解描述了单链的双抗原结合性分子的结构。

图 2 图解描述了具有效应物的单链的双抗原结合性分子。

图 3 和图 5 图解描述了编码单链的双抗原结合性分子的核酸构建体。

图 4 图解描述了编码具有效应物的单链的双抗原结合性分子的核

酸构建体。

图 6 显示出与针对 CEA 和大肠杆菌β-半乳糖苷酶的间体(CEAGal)相比，β-半乳糖苷酶通过本发明的单链的双抗原结合性蛋白而在结合于塑料的 CEA 上的募集 (scDb-CEAGal)，用 BSA 包被一块微量滴定板以用作阴性对照。

图 7 显示出由哺乳动物细胞分泌的 scDb-CEAGal 对β-半乳糖苷酶的募集，其中在被 CEA 包被的微量滴定板上使用了不同量的 scDb-CEAGal 和β-半乳糖苷酶。所用底物是邻硝基苯基 β-D-半乳糖吡喃糖苷，用 BSA 包被微量滴定板以用作阴性对照。

图 8A 显示出 LoVo 细胞在本发明的单链的双抗原结合性蛋白(scDb)，β-半乳糖苷酶(β-Gal)，道诺霉素β-D-半乳糖吡喃糖苷(前体药物)和/或道诺霉素(药物)存在下的死亡情况。

图 8B 显示出用 CEA 阴性细胞系(A549)进行的对照实验。

实施例：

实施例 1

单链的双抗原结合性蛋白的制备和细菌表达

以识别抗原癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)和大肠杆菌β-半乳糖苷酶的蛋白质为例来描述单链的双抗原结合性蛋白的制备。

在 5'至 3'方向上依次将下列 DNA 序列连接在一起:

- LacZ 启动子
- 细菌核糖体结合结构(AAGGAG)
- 细菌信号序列 pelB(Power 等，基因，113，95-99(1992))
- 抗 CEA 的 VH(Kontermann 等，免疫技术，3，137(1997))
- 接头 GGGS(Kontermann 等，(1997))
- 抗β半乳糖苷酶的 VL(Kontermann 等，(1997))
- 连接肽 GGGGSGGRASGGGGS
- 抗β半乳糖苷酶的 VH(Kontermann 等，(1997))

- 接头 GGGGS
- 抗 CEA 的 VL(Kontermann 等, (1997))
- 抗体 9E10 EQKLISEEDLN 的 Myc 表位(Munro & Pelham, 细胞, 46, 291-300(1986))
- 可用于通过固定化金属亲和层析(IMAC)进行纯化的多组氨酸 HHHHHH(Kontermann 等, (1997))

通过经 PCR 扩增而在各个 DNA 序列的末端引入的适当限制性位点可以进行构建体的连接(Kontermann 等, 免疫技术, 3, 137(1997))中。

使用本领域技术人员已知的特异于限制性位点的酶和 DNA 连接酶进行连接。酶可以商购,将构建体克隆至细菌表达载体 pAB1(Kontermann 等, (1997))。

使用寡核苷酸引物 LMB2 和 LMB3(Kontermann, R.E. (1997), 文献同上)和

VK-NotFor: 5′-TTG TTC TGC GGC CGC CCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT GCC AGC ACC-3′,
scDb-AscBack: 5′-TGC ATG CTA GGG CGC GCC TCG GGC GGA GGT GGC TCA CAG GTG CAG CTG GTG CAA TCT GG-3′,
scDb-AscForK: GCT CGG TAA GGC GCG CCC ACC GCT GCC ACC GCC TCC ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC-3′ 和
pelB-Metminus: 5′-TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ACG GCC CAG GT-3′.

进行克隆。

为此, 使用引物 LMB2 和 LMB3 扩增得自间体 CEAGal(Kontermann, R.E. (1997))的片段 VHB-VLA(片段 1)和 VHA-VLB(片段 2)并凝胶纯化所述片段。然后使用引物 VK-NotFor 和 scDb-AscBack 扩增片段 1 以导入一个 AscI 位点和 7 个氨基酸的接头。使用引物 LMB3 和 scDb-AscForλ 扩增片段 2 以导入一个 AscI 位点和 8 个氨基酸的接头。用 AscI 和 NotI(片段 1)与 SfiI 和 AscI(片段 2)水解两种片段并克隆至细菌表达载体 pAB1(Kontermann, R.E. (1997))。所得的插入片段编码一种单链

多肽，其中 VHA-VLB 经由 15 个氨基酸长、序列为 GGGGSGGRASGGGGS 的接头与 VHB-VLA 连接。

然后将质粒插入 TG1 细菌，用本领域技术人员熟悉的方法培养所述细菌(Kontermann, R.E.(1997))。

破碎细菌，通过固定化金属亲和层析(IMAC)(Hochuli 等，生物/技术，6，1321-1325(1988))从壁膜间隙制品中纯化单链的双抗原结合性蛋白，此方法的细节由 Kontermann 等人(1997)作了描述。

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和凝胶过滤结果表明纯化的蛋白质的分子量为 60KDa。每升细菌培养物可以纯化出约 200 至 300 微克这种分子。在 ELISA 中，细菌表达的单链的双抗原结合性蛋白能与 CEA 和β-半乳糖苷酶反应，并能将这种酶募集至结合于塑料的 CEA 上，通过邻硝基苯基 β-D-半乳糖吡喃糖苷的转变可以说明这一点(图 6)。另外，这种单链的双抗原结合性蛋白通过募集β-半乳糖苷酶并转变底物 5-溴-4-氯-3-吲哚β-D-半乳糖吡喃糖苷(X-Gal)而能对活的和被固定的表达 CEA 的 LoVo 细胞进行染色。为此，将 LoVo 细胞与 10μg/ml 适当的抗原结合蛋白，10μg/ml β-半乳糖苷酶和 X-Gal(0.8mg/ml，于 PBS，3mM 钾铁(III)氰化物，3mM 钾铁(II)氰化物中)一起保温。在多种对照细胞(A549，HEK293)中或用针对鸡蛋溶菌酶和β-半乳糖苷酶的间体(HELGal; Kontermann 等，(1997))未观察到染色。

实施例 2

单链的双抗原结合性蛋白的真核细胞表达

为了在真核细胞中表达，将单链的双抗原结合性蛋白的编码区克隆至真核表达载体 pSecTagA (Invitrogen)中，其中的细菌信号序列已被载体中存在的 Ig-κ信号序列所取代。

为此，使用引物 LMB2 和 pelB-Metminus 扩增单链构建体，籍此，pelB 前导序列中的甲硫氨酸(第 21 位)被苏氨酸所取代。接着用 SfiI 和 EcoRI 消化并克隆至载体 pSecTagA 中。成熟的单链抗原结合蛋白在 VHA 区域的 N 末端含有 7 个额外的氨基酸(AAQPATA)。

用脂质转染胺试剂(Gibco)将质粒瞬时转染至真核 HEK293 细胞中。在 zeocin 的存在下选择稳定的细胞。在免疫荧光实验中用这些细胞可以检测到内质网 ER 和高尔基体的染色。另外，通过 60KDa 蛋白质从 ^{35}S-Met 标记的细胞的上清液中的免疫沉淀和通过用固定化金属亲和层析(IMAC)进行的纯化还可能检测到单链的双抗原结合性蛋白的分泌。该纯化蛋白质在与β-半乳糖苷酶和包被有 CEA 的微量滴定板结合方面和将β-半乳糖苷酶募集至结合于塑料的 CEA 上这一方面是有功能活性的(图 7)。

实施例 3

通过与分泌单链的双抗原结合性蛋白的细胞共培养在体外募集酶

通过将产生单链的双抗原结合性蛋白的 HEK293 细胞与 CEA 阳性的 LoVo 细胞共培养而在体外研究募集现象。为此，首先在 Transwell 细胞培养皿(Costar)中将产生本发明蛋白质的细胞与 LoVo 细胞一起培养，其中通过膜将两种细胞系分隔开。2 天后，加入β-半乳糖苷酶(10μg/ml)，再通过加入底物 X-Gal 检测募集现象。在与产生单链的双抗原结合性蛋白的细胞的共培养物上发现了特异性的染色，而用未经转染的 HEK293 细胞进行的对照实验未显示出染色。

其中 LoVo 细胞被 A549 细胞(CEA 阴性)替代的实验中，和其中产生单链的双抗原结合性蛋白的细胞与酶和底物一起保温的实验中同样都是负结果。后者阐明了仅仅是产生单链的双抗原结合性蛋白的细胞本身不能结合酶。

在另一个实验中，按 1:4 至 1:24 的接种比例将分泌单链的双抗原结合性蛋白的 HEK293 细胞和 LoVo 细胞直接共培养。为了将 HEK293 细胞和 LoVo 细胞区分开，加入 LoVo 细胞之前用 CM-Dil(分子探针)(红色荧光)将 HEK293 细胞染色。2 天后，加入β-半乳糖苷酶，再通过加入底物 X-Gal(10μg/ml)和用抗β-半乳糖苷酶抗体(Biotrend)直接进行免疫荧光术可检测与细胞的结合。这些实验也显示出酶特异性地被募集至 LoVo 细胞，而 HEK293 细胞未被染色。用未经转染的 HEK293 细胞

进行的对照实验为负结果。这些实验证明单链的双抗原结合性蛋白能特异性地和选择性地识别肿瘤细胞。

在另一个实验中，研究了无毒性的道诺霉素β-D-半乳糖吡喃糖苷向细胞毒性的道诺霉素的转变。通过将 LoVo 细胞与纯化的单链的双抗原结合性蛋白(10μg/ml)一起保温 1 小时，随后于 37°C 与β-半乳糖苷酶(1μg/ml)和道诺霉素β-D-半乳糖吡喃糖苷(2μM)一起保温 1 小时，就有可能通过所得道诺霉素的自身荧光而检测到该物质在核中的特异性定位，所述荧光比得上因直接与道诺霉素保温而致的染色。在缺乏单链的双抗原结合性蛋白或β-半乳糖苷酶时，和用对照细胞(HEK293;产生单链的双抗原结合性蛋白的 HEK)时未检测到核染色。这些实验证明该单链的双抗原结合性蛋白能将酶募集至肿瘤细胞，并且该酶可被用于将无毒性的前体转变为毒性物质。

在进一步的实验中此效应可被用于特异性地杀死肿瘤细胞。

为此，在 96 孔培养板中将 LoVo 细胞与一种单链的双抗原结合性蛋白(10μg /ml)一起保温，然后于 37°C 与道诺霉素β-D-半乳糖吡喃糖苷(5μM)一起保温 1 小时。2 天后，使用 WST 试验(Boehringer Mannheim)分析细胞的死亡情况(图 8)。在这种情况下，前体药物转变为药物时细胞的死亡情况几乎和药物存在时效果一样好(图 8A)。在缺乏一个组分时或用 CEA 阴性的 A549 细胞基本上未发现上述效应。

实施例 4

用于在细胞内表达单链的双抗原结合性蛋白的构建体的制备

为了在细胞内表达单链的双抗原结合性蛋白，用多个引物扩增单链的双抗原结合性蛋白基因的 DNA:

- 跨膜的单链双抗原结合性蛋白(TM-scDAP)。对它使用了能在该基因 3'末端插入 PDGFR 跨膜区的引物

- (LPFKVVVISAIIALVVLTIISLIILIMLWQKKPRYES)

- 位于内质网的单链的双抗原结合性蛋白(ER-scDAP)。对它使用了能在该基因 3'末端插入 ER 保留信号(SEKDEL)的引物。

- 位于细胞质中的单链的双抗原结合性蛋白(cyto-scDAP)。对它使用了用最适于翻译起始的甲硫氨酸和 Kozak 序列替代基因 5'末端信号序列的引物。
- 位于核中的单链的双抗原结合性蛋白(nuc-scDb)。对它使用了用最适于翻译起始的甲硫氨酸和 Kozak 序列替代基因 5'末端信号序列、并在基因 3'末端插入核定位序列(PKKKRKVGGGT; 下划线的是核定位序列)的引物。

将这些片段克隆至适当的真核表达载体(pSecTagA 和 pcDNA3; Invitrogen)中。然后将所得构建体(TM-scDAP, ER-scDAP, cyto-scDAP, nuc-scDAP 和 sec-scDAP(=分泌的蛋白质; 见实施例 2))瞬时转染至真核细胞(3T3)中, 通过使用抗 Myc 表位的抗体进行免疫荧光分析来研究所表达的蛋白质的定位。在构建体 sec-scDAP, ER-scDAP 和 TM-scDAP 中可检测到分泌途径典型的染色, 而 cyto-scDAP 显示出在细胞质中的扩散定位, nuc-scDAP 显示出定位于核中。

说 明 书 附 图

图1

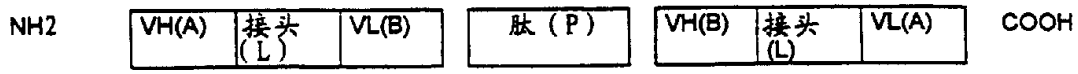


图2



图3

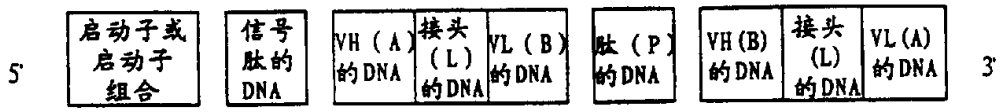


图4

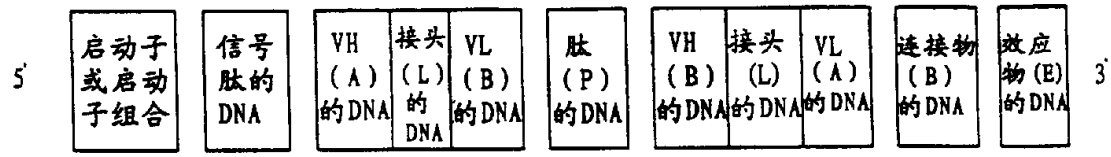


图5

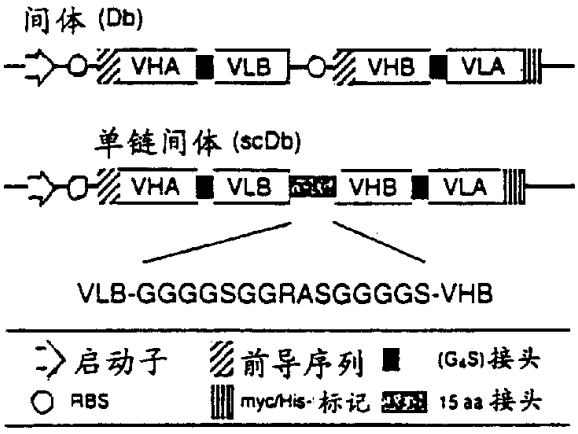

间体 (Db)
VHA
VLB
VHB
VLA
单链间体 (scDb)
VHA
VLB
VHB
VLA
VLB-GGGGSGGRASGGGGS-VHB
启动子
前导序列
(G4S)接头
RBS
myc/His-标记
15 aa 接头

图6

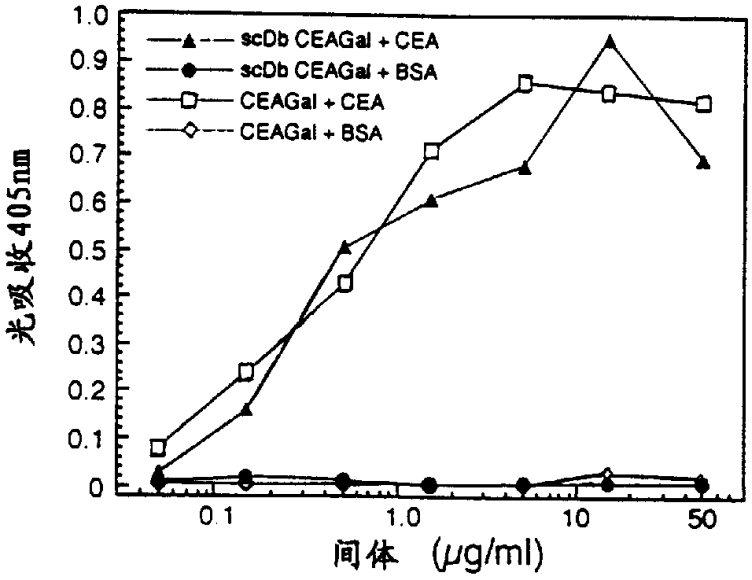

scDb CEAGal + CEA
scDb CEAGal + BSA
CEAGal + CEA
CEAGal + BSA
光吸收405nm
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0.1
1.0
10
50
间体 (μg/ml)

图7

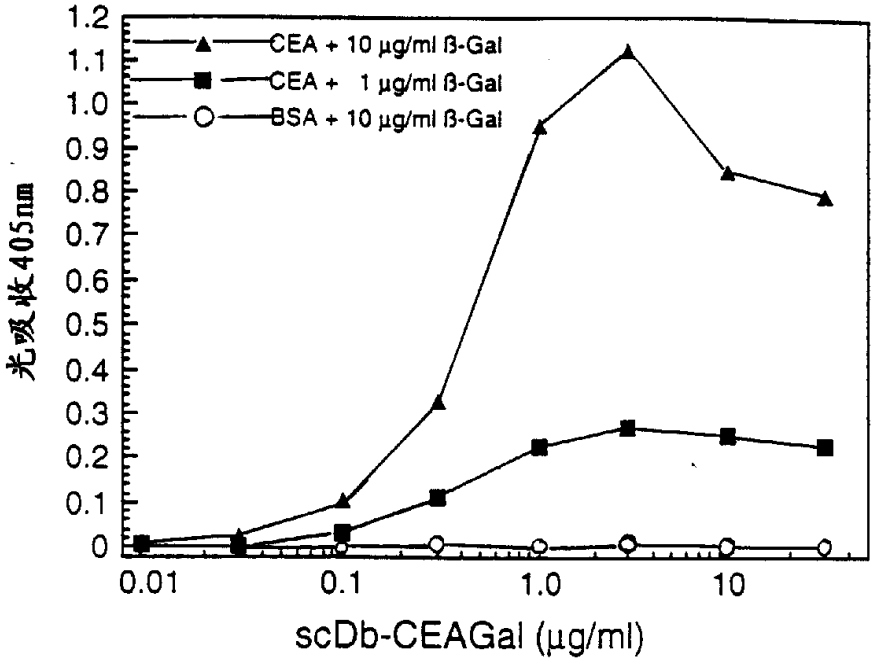
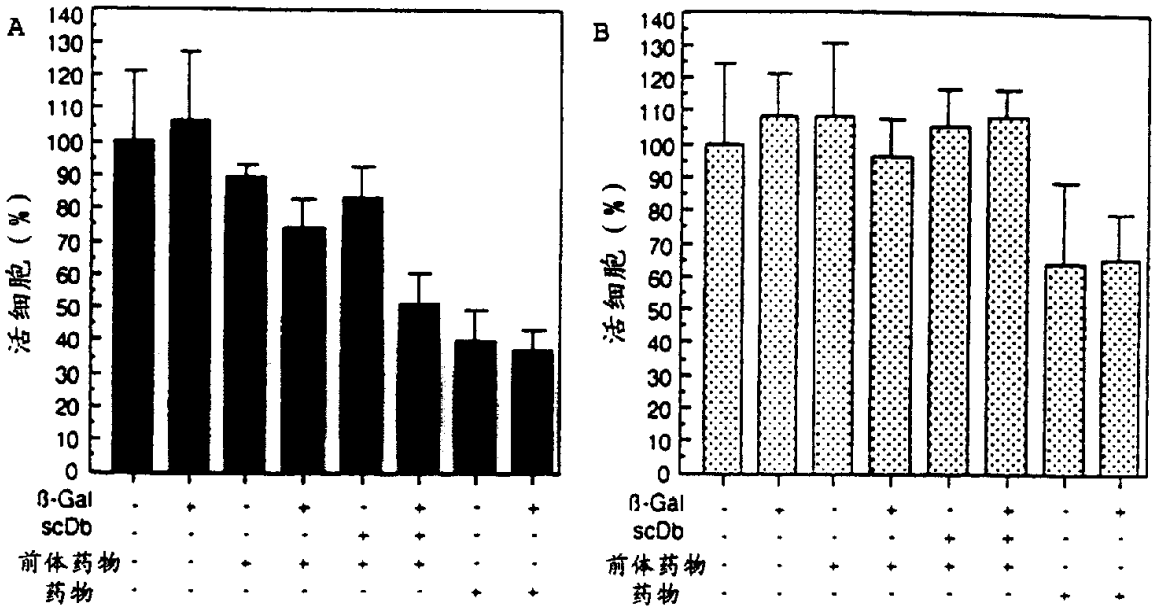

CEA + 10 µg/ml ß-Gal
CEA + 1 µg/ml ß-Gal
BSA + 10 µg/ml ß-Gal
光吸收405nm
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0.01
0.1
1.0
10
scDb-CEAGal (µg/ml)

图8


A
B
活细胞（%）
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ß-Gal
scDb
前体药物
药物