

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/30

A61K 39/395 G01N 33/574



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00818416. X

[43] 公开日 2003 年 6 月 11 日

[11] 公开号 CN 1423660A

[22] 申请日 2000.11.13 [21] 申请号 00818416. X
[30] 优先权
[32] 1999.11.18 [33] WO [31] PCT/GB99/03859
[32] 2000. 2. 15 [33] GB [31] 0003527. 9
[32] 2000. 3. 2 [33] GB [31] 0005071. 6
[86] 国际申请 PCT/GB00/04317 2000.11.13
[87] 国际公布 WO01/36486 英 2001.5.25
[85] 进入国家阶段日期 2002.7.15
[71] 申请人 牛津生物医学(英国)有限公司
地址 英国牛津
[72] 发明人 A·金斯曼 S·M·金斯曼
C·R·贝兵顿 M·W·克罗尔
F·M·埃拉德 K·A·迈尔斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 孟凡宇

权利要求书 5 页 说明书 75 页 序列表 28 页
附图 24 页

[54] 发明名称 抗体

[57] 摘要

描述了应用能够识别疾病相关分子(DAM)的 ScFv Ab(ScFv Ab)生产预防和/或治疗与 DAM 相关病症的药物。所述 ScFv Ab 具有治疗、诊断和预后应用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 能够识别疾病相关分子(DAM)的 ScFv 抗体(ScFv Ab)的应用, 用于生产预防和/或治疗与 DAM 相关病症的药物。
- 5 2. 权利要求 1 的 ScFv Ab 的应用, 其中所述 DAM 是一种肿瘤相关抗原(TAA)。
3. 权利要求 1 或权利要求 2 的应用, 其中所述 ScFv Ab 具有 SEQ ID No 1 或 SEQ ID No 2 所示的序列或其变异体、同源物、片段或衍生物。
- 10 4. 权利要求 1 或权利要求 2 的应用, 其中所述 ScFv Ab 具有 SEQ ID No 3 所示的序列或其变异体、同源物、片段或衍生物。
5. 权利要求 1 或权利要求 2 的应用, 其中所述 ScFv Ab 具有 SEQ ID No 4 所示的序列或其变异体、同源物、片段或衍生物。
6. 一种核苷酸序列, 所述核苷酸序列编码权利要求 1-5 中任一
- 15 项的 ScFv Ab。
7. 一种权利要求 6 的核苷酸序列, 其中所述核苷酸序列具有 SEQ ID No 5 或 SEQ ID No 6 所示的序列或其变异体、同源物、片段或衍生物。
8. 一种权利要求 6 的核苷酸序列, 其中所述核苷酸序列具有 SEQ
- 20 ID No 7 所示的序列或其变异体、同源物、片段或衍生物。
9. 一种权利要求 6 的核苷酸序列, 其中所述核苷酸序列具有 SEQ ID No 8 所示的序列或其变异体、同源物、片段或衍生物。
10. 一种核苷酸序列或与其互补的序列, 所述核苷酸序列能够与权利要求 6-9 中任一项的核苷酸序列杂交。
- 25 11. 一种权利要求 6-10 中任一项的核苷酸序列, 其中所述核苷酸序列与启动子有效连接。
12. 一种构建体, 所述构建体包含权利要求 6-11 中任一项的核苷酸序列。

13. 一种载体, 所述载体包含权利要求 6-12 中任一项的核苷酸序列。

14. 一种质粒, 所述质粒包含权利要求 6-13 中任一项的核苷酸序列。

5 15. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含权利要求 6-14 中任一项的核苷酸序列。

16. 一种制备权利要求 1-5 中任一项的 ScFv Ab 的方法, 所述方法包括表达权利要求 6-11 中任一项的核苷酸序列, 或当存在于权利要求 12-15 中任一项的表达实体中时表达权利要求 6-11 中任一项的核苷酸序列, 并且任选地分离和/或纯化所述 ScFv Ab。

17. 一种通过权利要求 16 的方法产生的 ScFv Ab。

18. 一种获得任一前述权利要求的 ScFv Ab 的体外方法, 所述方法包括:

15 (i) 制备噬菌体文库, 其中每种噬菌体包含一种编码含潜在结合结构域的蛋白的核酸构建体;

(ii) 使所述潜在蛋白表达, 并且使所述潜在结合结构域展示在所述噬菌体的外表面;

(iii) 使所述噬菌体文库与 DAM 靶接触, 其接触条件使得所述潜在结合结构域和所述 DAM 靶相互作用;

20 (iv) 将展示出结合所述 DAM 靶的结构域的噬菌体从不结合所述 DAM 靶的噬菌体中分离出来;

(v) 回收至少一种在其外表面展示结合所述 DAM 靶的蛋白的噬菌体;

25 (vi) 体外扩增所述结合蛋白, 以产生结合结构的第二富集文库;

(vii) 重复步骤(iii)至(vi)至少两次;

(viii) 在体外条件下表达编码所述结合蛋白的核酸; 和

(ix) 通过检测信号存在与否, 确定所述结合蛋白是否与所述

DAM 相互作用。

19. 一种权利要求 18 的体外方法，其中所述体外方法是筛选可用于治疗疾病的 ScFv Ab。

20. 一种方法，所述方法包括以下步骤：

- 5 (a) 进行权利要求 18 或权利要求 19 的体外方法；
 (b) 借助可检测信号，鉴定能够识别 DAM 的一种或多种 ScFv Ab；和
 (c) 制备大量的所述一种或多种 ScFv Ab。

21. 一种方法，所述方法包括以下步骤：

- 10 (a) 进行权利要求 18 或权利要求 19 的方法；
 (b) 借助可检测信号，鉴定能够识别 DAM 的一种或多种 ScFv Ab；和
 (c) 制备包含所述一种或多种经鉴定的 ScFv Ab 的药用组合物。

15 22. 一种方法，所述方法包括以下步骤：

- (a) 进行权利要求 18 或权利要求 19 的方法；
 (b) 鉴定能够识别 DAM 的一种或多种 ScFv Ab；
 (c) 修饰所述能够识别 DAM 的一种或多种经鉴定的 ScFv Ab；
 和
20 (d) 制备包含所述一种或多种经修饰的 ScFv Ab 的药用组合物。

23. 一种 ScFv Ab，所述 ScFv Ab 如权利要求 1-5 中任一项或权利要求 17 中所限定，或者是通过权利要求 18 或权利要求 19 的体外方法鉴定的，其中所述 ScFv Ab 能够识别一种 TAA。

25 24. 一种权利要求 23 的 ScFv Ab，其中所述 ScFv Ab 能够识别一种 5T4 抗原。

25. 一种用 ScFv Ab 在体内影响疾病的方法，其中所述 ScFv Ab 在一种体外方法中识别一种 DAM 抗原，并且其中所述体外方法是权

利要求 18 或权利要求 19 中限定的方法。

26. 权利要求 1-5 中任一项或权利要求 17 或权利要求 23 或权利要求 24 中限定的 ScFv Ab 的应用，用于制备药用组合物。

5 27. 一种权利要求 26 中限定的药用组合物，所述药用组合物包含一种 ScFv Ab 和另一种治疗有用的药物。

28. 一种权利要求 27 的药用组合物，其中所述另一种治疗有用的药物是一种前体药物活化酶。

29. 一种权利要求 28 的药用组合物，其中所述另一种治疗有用的药物是一种毒素。

10 30. 一种权利要求 26 或权利要求 27 或权利要求 28 或权利要求 29 的药用组合物，其中所述 ScFv Ab 能够识别一种 5T4 抗原。

31. ScFv Ab 的应用，用于制备用于治疗与 DAM 相关病症的权利要求 26-30 的一种药用组合物。

15 32. 权利要求 1 的能够识别 DAM 的 ScFv Ab 的应用，所述 ScFv Ab 与权利要求 27-30 中限定的另一种治疗有用药物或编码所述另一种治疗有用药物的感兴趣的核苷酸序列(NOI)联合，用于与 DAM 相关的病症的治疗。

33. 权利要求 31 或 32 的 ScFv Ab 的应用，用于与 DAM 相关疾病的体内成像和/或辅助治疗。

20 34. 权利要求 31-33 的应用，其中所述疾病是癌症。

35. ScFv Ab 的应用，用于筛选可以调节 ScFv Ab 的 DAM 结合特异性的药物，其中所述 ScFv Ab 是权利要求 1-5 或权利要求 17 或权利要求 23-24 中限定的 ScFv Ab，或由权利要求 6-12 的核苷酸或其变形体、同源物、片段或衍生物表达。

25 36. 一种用于诊断个体中涉及 DAM 的表达和/或活性的病症的方法，所述方法包括：

(i) 提供编码 6-12 中限定的 ScFv Ab 的核苷酸序列或其表达产物；

(ii) 分析所述 ScFv Ab 与得自所述个体的样品中的 DAM 的结合;

其中所述结合指示在所述个体中存在所述 DAM。

5 37. 一种在患有与 DAM 相关病症的哺乳动物中体内诱发治疗反应的方法, 所述方法包括给所述哺乳动物接种权利要求 1-5 或权利要求 17 或权利要求 23-24 中限定的 ScFv Ab 或指导权利要求 6-12 的核苷酸序列或其变异体、同源物、片段或衍生物表达的载体, 以便诱发治疗反应, 以保护所述哺乳动物抵抗所述病症。

38. 一种权利要求 37 的方法, 其中所述病症是癌症。

10 39. 基本上如本文所述并且参考附图的 ScFv Ab 的应用。

40. 一种用作药物的 ScFv。

41. 一种犬 5T4 多肽或其变异体、同源物、片段或衍生物, 所述犬 5T4 多肽具有 SEQ ID No 14 所示的氨基酸序列。

15 42. 一种核苷酸序列, 所述核苷酸序列能够编码权利要求 41 的犬 5T4 多肽。

43. 一种权利要求 42 的核苷酸序列或其变异体、同源物、片段或衍生物, 所述核苷酸序列具有 SEQ ID No 15 所示的序列。

44. 一种抗体, 所述抗体能够与权利要求 41 的犬 5T4 多肽特异性地结合。

20

抗体

5 发明领域

本发明涉及抗体。

具体地说，本发明涉及识别疾病相关分子(DAM)的抗体。

更具体地讲，本发明涉及这些抗体在与 DAM 相关疾病的诊断和治疗中的体外和体内/离体应用。

10

发明背景

在某些疾病状态下，细胞代谢的紊乱可以影响一种或多种 DAM 的表达水平。在某些情况下，这种细胞紊乱可能导致所述 DMA 表达水平的改变。因此，在宿主生物中，每种致病因子或疾病状态都可能与一种在免疫识别和/或致病因子或疾病状态的消除和/或控制中可能是关键性的 DAM 相关。这样，所述 DAM 可能能够不仅用作疾病状态诊断的标记，而且能够用作所述疾病全貌(disease profile)准确的病期分类的标记，使得可以设计合适的疗法。

已经充分表征的 DAM 的一个具体实例包括肿瘤相关抗原(TAA)。已经在人类和动物肿瘤中鉴定出许多癌胚抗原或肿瘤相关抗原(TAA)，并对其进行了表征。

这些 TAA 包括癌胚抗原(CEA)、TAG72、c-erB2、(糖基化不足的) MUC-1 和 p53、上皮糖蛋白-2 抗原(EGP-2; 也称为 EGP40、Ep-CAM、KSA、CO17-1A 或 GA733-2)和 5T4 抗原。一般而言，TAA 是在胎儿发育期间表达而在成体细胞中被负调节的抗原，因而在成体内通常不存在或仅以非常低水平存在。然而，在肿瘤发生期间，已经观察到肿瘤细胞重新开始表达 TAA。因而，认为恶性肿瘤细胞与其非恶性对应物的区别在于重新开始表达 TAA。因此，已有建议将 TAA (i)应用于

肿瘤疾病的体外和/或体内/离体诊断, (ii)应用于癌的成象和/或免疫疗法, 和(iii)用作肿瘤相关疾病进程的指标。

5 为了建立针对特定疾病的体液免疫应答和/或细胞免疫应答, 宿主免疫系统必须与 DAM 接触。除识别外来抗原外, T 细胞通常需要额外的刺激, 以完全被激活。现在更加明显的是, 原初 T 细胞被带有抗原的靶细胞的激活需要两种信号。一种信号是抗原特异性信号, 通过 T 细胞受体来传递, 而第二种信号是引起淋巴因子产生的不依赖抗原的信号或共同刺激信号。这些额外的信号通过 T 细胞上与专门的抗原呈递细胞(APC)(例如树突细胞和巨噬细胞)上存在、但在其它细胞上不存在的配体(例如 B7 和 CD40)相互作用的其它受体(例如 CD28 和
10 CD40L)来传递。这些共同刺激配体通常被称为共同刺激分子。

作为实例, B7 家族(即 B7.1、B7.2 和可能的 B7.3)代表最新发现的但却重要的一组共同刺激分子。B7.1 和 B7.2 都是 Ig 基因超家族的成员。如果 T 淋巴细胞遇到单独的抗原而无 B7 的共同刺激, 则它将
15 反应为或者无反应性, 或者细胞凋亡(程序性细胞死亡)。如果提供所述共同刺激信号, 则它将反应为针对所述靶抗原的克隆扩充。认为无共同刺激时不发生针对给定抗原的免疫应答的显著放大(June 等(Immunology Today 15:321-331, 1994); Chen 等(Immunology Today 14:483-486); Townsend等(Science 259:368-370)).Freeman等(J. Immunol.
20 143:2714-2722, 1989)。Azuma 等(Nature 366:76-79, 1993)。因此, 已经假定, 刺激对免疫原性差的患病细胞的免疫识别的一种方法可能是增强抗原呈递和在所述 DAM 存在下共同刺激淋巴细胞。

作为实例, 已经表明, 例如癌症、已建立的肿瘤的疾病状态虽然事实上它们共同表达 DAM, 但它们的免疫原性差。已经表明, 用或者
25 单独或者与细胞因子结合的编码 B7-1 和 B7-2 的基因转染, 在动物模型中增强了针对实验性肿瘤的免疫的产生(例如 Leong 等 1997 Int. J. Cancer 71: 476-482; Zitvogel 等 1996 Eur. J. Immunol. 26:1335-1341; Cayeux 等 1997 J. Immunol. 158:2834-2841)。然而, 在将这些结果转译

为对人类癌症的实际治疗时，有许多重大的问题需要解决。在这些研究中的一个主要问题一直是为达到功效需要将 B7 基因体内传递至大量的肿瘤细胞。第二个问题一直是将 B7 的表达选择性地靶向肿瘤细胞，以避免不当的针对其它细胞类型的免疫细胞的激活。在 WO 98/55607 中论述了这些问题的某些解决方法，其中使用肿瘤相互作用蛋白(TIP)例如肿瘤结合蛋白(TBP)将共同刺激分子选择性地靶向肿瘤细胞。

已经用重组 DNA 技术来产生识别 DAM 的抗体(Hoogenboom 等 (1998 Immunotechnology 4: 1-20; 和 Winter 1998 FEBS Lett 458: 92-94)。最近，非常关注应用抗体基因文库来产生抗体，例如单链抗体(ScFv Ab)。众所周知，在某些情况下，不用完整抗体，而使用 ScFv Ab 有许多优点。所述片段的大小更小，使得可以快速清除，并且可能导致改进肿瘤与非肿瘤的比率。然而，许多研究不能产生高特异性的 ScFv Ab。此外，完整的 IgG 被认为是供治疗 Mab 用比 ScFv Ab 更好的形式，因为认为它们的血清半寿期延长(参见 Vaughan 等 1998, Nature Biotech 16: 535-539)。

本发明力图提供针对 DAM 产生的、可用于治疗与 DAM 相关疾病状态的 ScFv Ab。

20 本发明的概述方面

本发明提供一种能够识别一种 DAM 并且在与 DAM 相关疾病中具有治疗效应的 ScFv Ab (ScFv Ab)。这种 ScFv Ab 可以作为肽(合成或基因表达的)或作为“裸 DNA”(例如在质粒中)直接给予，或者可以通过传递载体例如包含编码所述 ScFv Ab 的核苷酸序列的病毒载体给予。对于某些病例而言，这种 ScFv Ab 可能比与分泌型共同刺激分子(SCM)例如 B7 或 IgG 融合的 ScFv Ab 的功效更强。在例如癌的疾病的 25 治疗方面，使用 ScFv Ab 作为治疗剂并不是一种显而易见的选择，尤其是因为人们可能预计包含与 ScFv 融合的 SCM 的融合蛋白的表现可

能比单独的 ScFv 要好。

本发明由于以下原因是有利的：

- 5 (i) 它提供了一种能够识别 DAM 的 ScFv Ab。对于某些病例而言，其治疗效应比与 SCM 例如 B7 或免疫球蛋白例如 IgG 融合的 ScFv Ab 的治疗效应更强。
- (ii) 它提供了可应用于以下方面的高亲和性 ScFv Ab：
- (a) 体外和体内/离体诊断和治疗；
- (b) 表达 DAM 的细胞的成象和治疗；
- (c) 当将所述 ScFv Ab 单独使用或与合适的诊断上和/或治疗上
- 10 有用的因子联合使用时，预防和/或治疗不同的人类疾病例如癌；
- (d) 有关与分离和/或纯化与所述 ScFv Ab 特异性结合的 DAM 的研究；和
- (e) 提供用于进一步合理治疗性 ScFv Ab 设计的构件和筛选能够与靶 DAM 结合的 ScFv Ab 和/或筛选能够与靶 ScFv Ab 结合的
- 15 DAM。

本发明的详述方面

在所附的权利要求书和以下描述及附图中，介绍了本发明的其它方面。这些方面在独立小节标题下介绍。然而，应该理解，每一小节

20 下的内容不一定限于该特定的小节标题。

ScFv 抗体

一方面，本发明提供识别 DAM 的重组 ScFv Ab。

本文所用的术语“ScFv Ab”是指能够识别 DAM 抗原、具有一个

25 轻链可变区(VL)和一个重链可变区(VH)的抗体。所述 VH 配偶体区和 VL 配偶体区通常通过柔性寡肽/肽接头连接/结合。所述 VH 配偶体区和 VL 配偶体区可以以 VH 后接 VL 或 VL 后接 VH 的顺序连接。通常，所述序列可以通过一个接头序列，以 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH 的

顺序连接。本文所用的该术语包括蛋白酶解的或重组制备的 ScFv Ab 分子的多个部分的片段，该片段能够选择性地与 DAM 反应或识别 DAM。这类蛋白酶解和/或重组片段的非限制性实例包括嵌合 ScFv 抗体，所述嵌合 ScFv 抗体对于本发明而言可以是指具有由得自除人类免疫球蛋白基因以外的哺乳动物免疫球蛋白基因的核苷酸序列编码的重链和轻链可变区(VH 和 VL)中任一个或两者的 ScFv Ab 以及具有由得自人类免疫球蛋白基因的核苷酸序列编码的重链和轻链之一或两者的 ScFv Ab。所述 ScFv Ab 可以与另一个实体(例如另一 ScFv Ab)共价或非共价连接，形成具有两个或多个结合部位的抗体。例如，一个 ScFv Ab 可以与 DAM 例如 5T4 结合，而第二个 ScFv Ab 可以与免疫增强分子结合。

按照本发明，提及的术语“ScFv Ab”包括但不限于提及所述肽本身以及作为融合蛋白一部分的所述肽以及编码所述肽的核苷酸序列和/或编码所述融合蛋白的核苷酸序列。所述肽本身和/或融合蛋白可以是合成肽。或者，所述肽和/或融合蛋白可以是基因表达/重组肽/融合蛋白。对于某些应用而言，术语“ScFv Ab”是指肽本身。术语“ScFv Ab”也包括具有分泌前导(L)序列的 ScFv Ab，在本文中，这种 ScFv Ab 被称为 LScFv。

本文所用的术语“可变区”是指轻链(VL)和重链(VH)的可变区，含有结合识别特异性以所述 ScFv Ab 对 DAM 的总体亲和性的决定簇。每对轻链(VL)和重链(VH)的可变区参与抗原识别并形成抗原结合部位。轻链和重链的所述区具有相同的总体结构，每个区具有由三个互补性决定区(CDR)连接的四个构架(FR)区，构架区的序列相对保守。FR 区维持可变区的结构完整性。CDR是可变区中介导抗原(例如 DAM)结合的多肽区段。

最好是，本发明 ScFv Ab 对 5T4 抗原的亲和性(K_D)为约 5×10^{-10} 至约 10×10^{-10} 。

最好是，本发明 ScFv Ab 对 5T4 抗原的亲和性(K_D)为约 6×10^{-10}

至约 9×10^{-10} 。

最好是，本发明 ScFv Ab 对 5T4 抗原的亲和性(K_D)为约 7×10^{-10} 至约 8×10^{-10} 。

最好是，本发明 ScFv Ab 对于 5T4 抗原的亲和性(K_D)为约 7.9×10^{-10} 。所述 ScFv Ab 的 K_D 用 BIAevaluation 软件(Pharmacia)测定。

本文所用的术语“解离速率”是指 ScFv Ab 与抗原解离的速率(k_{off})。在本发明的正文中，它用 BIAevaluation 软件(Pharmacia)测定。由于解离速率反映 Fab 片段对抗原(例如 DAM)的亲和性，因而理想的是解离速率低。

本文所用的术语“亲和性”根据 ScFv Ab 与 DAM 抗原的解离速率(k_{off})来定义。解离速率越低，则 ScFv Ab 对抗原(例如 DAM)的亲和性越高。

DAM

本文所用的术语“DAM”可以包括但不限于生物反应调节物，包括但不限于免疫调节剂、细胞因子、生长因子、细胞表面受体、激素、循环分子、炎性细胞因子和致病因子(例如病毒、细菌、寄生虫或酵母)。这些生物反应调节物的实例包括但不限于 ApoE、Apo-SAA、BDNF、心脏营养蛋白(Cardiotrophin)-1、EGF、ENA-78、Eotaxin、Eotaxin-2、Exodus-2、酸性 FGF (FGF-acidic)、碱性 FGF、成纤维细胞生长因子-10 (Marshall 1998 Nature Biotechnology 16: 129)、FLT3 配体 (Kimura 等(1997) Fractalkine (CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF- β 1、胰岛素、IFN- γ 、IGF-I、IGF-II、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8 (72 a.a.)、IL-8 (77 a.a.)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18 (IGIF)、抑制素 α 、抑制素 β 、IP-10、角质形成细胞生长因子-2 (KGF-2)、KGF、Leptin、LIF、Lymphotactin、繆氏抑制物质、单核细胞集落抑制因子、单核细胞引诱蛋白(Marshall 1998 出处同上)、M-CSF、MDC (67 a.a.)、MDC (69 a.a.)、MCP-1

(MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC (67 a.a.)、MDC (69 a.a.)、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-3 α 、MIP-3 β 、MIP-4、骨髓祖细胞抑制因子-1 (MPIF-1)、NAP-2、Neurturin、神经生长因子、 β -NGF、NT-3、NT-4、制癌蛋白 M、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1 α 、SDF1 β 、SCF、SCGF、干细胞生长因子(SCF)、TARC、TGF- α 、TGF- β 、TGF- β 2、TGF- β 3、肿瘤坏死因子(TNF)、TNF- α 、TNF- β 、TNIL-1、TPO、VEGF、GCP-2、GRO/MGSA、GRO- β 和 GRO- γ 。

致病因子的实例可以包括但不限于病毒、细菌以及寄生虫和酵母。作为实例，致病病毒包括但不限于人免疫缺陷病毒(HIV)、流感病毒、单纯疱疹病毒、人乳头瘤病毒、马脑炎病毒、肝炎病毒、猫白血病病毒、犬瘟热病毒和狂犬病病毒、流感病毒、痘病毒、禽痘病毒(FPV)、金丝雀痘病毒、昆虫痘病毒、缺乏 DNA 复制酶的痘苗病毒、甲病毒属、腺病毒、疱疹病毒、委内瑞拉马脑炎病毒(VEE)。致病细菌的实例可以包括但不限于衣原体属(*Chlamydia*)、分枝杆菌属(*Mycobacteria*)、恶性疟原虫(*Plasmodium Falciparum*)、军团菌属(*Legionella*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、白喉棒杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)和鼠伤寒沙门氏菌。致病寄生虫的实例包括但不限于锥虫属(*Trypanosoma*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、利什曼原虫属(*Leishmania*)、杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)、热带利什曼原虫(*L. tropica*)、墨西哥利什曼原虫(*L. mexicana*)、巴西利什曼原虫(*L. Braziliensis*)、贾第鞭毛虫属(*Giardia*)、兰氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)、毛滴虫属(*Trichomonas*)、内阿米巴属(*Entamoeba*)、耐格里原虫属(*Naegleria*)、棘阿米巴属

(*Acanthamoeba*)、*Acanthamoeba castellanii*、*A. culbertsoni* 和其它物种疟原虫属、弓形虫属(*Toxoplasma*)、鼠弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、隐孢子虫属(*Cryptosporidium*)、微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)、等孢子球虫属(*Isospora*)、贝氏等孢子球虫(*Isospora belli*)、耐格里原虫属、
5 福氏耐格里原虫(*Naegleria fowleri*)、小袋纤毛虫属(*Balantidium*)、结肠小袋纤毛虫(*Balantidium coli*)、巴贝虫属(*Babesia*)、血吸虫属(*Schistosoma*)、*Toxoplasma* 和犬弓蛔虫(*Toxocara canis*)。致病酵母的实例包括曲霉属(*Aspergillus*)和侵袭性念珠菌属(*Candida*)。在一个优选实施方案中, 所述致病微生物是胞内生物。

10 所述 DAM 最好是胞内致病因子。

所述 DAM 最好是疾病相关细胞表面分子(DACSM)。

按照本发明, 所述 DACSM 可以包括但不限于粘着蛋白的受体, 例如生长因子受体。生长因子受体的实例包括但不限于 ApoE、Apo-SAA、BDNF、心脏营养蛋白-1、EGF、ENA-78、Eotaxin、Eotaxin-2、
15 Exodus-2、酸性 FGF、碱性 FGF、成纤维细胞生长因子-10 (Marshall 1998 Nature Biotechnology 16: 129)、FLT3 配体(Kimura 等(1997) Fractalkine (CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF- β 1、胰岛素、IFN- γ 、IGF-I、IGF-II、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8 (72 a.a.)、IL-8 (77 a.a.)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、
20 IL-18 (IGIF)、抑制素 α 、抑制素 β 、IP-10、角质形成细胞生长因子-2 (KGF-2)、KGF、Leptin、LIF、Lymphotactin、繆氏抑制物质、单核细胞集落抑制因子、单核细胞引诱蛋白(Marshall 1998 出处同上)、M-CSF、MDC (67 a.a.)、MDC (69 a.a.)、MCP-1 (MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC (67 a.a.)、MDC (69 a.a.)、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、
25 MIP-3 α 、MIP-3 β 、MIP-4、骨髓祖细胞抑制因子-1 (MPLF-1)、NAP-2、Neurturin、神经生长因子、 β -NGF、NT-3、NT-4、制癌蛋白 M、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1 α 、SDF1 β 、SCF、SCGF、干细胞生长因子(SCF)、TARC、TGF- α 、TGF- β 、TGF-

5 β 2、TGF- β 3、肿瘤坏死因子(TNF)、TNF- α 、TNF- β 、TNIL-1、TPO、VEGF、GCP-2、GRO/MGSA、GRO- β 、GRO- γ 、HCC1、1-309。生长因子受体的非竭尽一览表可以在 Molecular Biology and Biotechnology (RA Meyers 编著 1995 VCH Publishers Inc)的第 392-297 页上找到; 纤溶酶原激活物; 金属蛋白酶(例如胶原蛋白酶)、粘蛋白; 糖蛋白; 其组织分布有限的抗原; 和/或在肿瘤细胞生长、迁移或转移中起作用的细胞表面分子(例如 5T4 抗原、肿瘤特异性糖部分或癌胚抗原)。术语 DACSM 也可以包括抗原决定簇。

10 抗原决定簇

本文所用的术语“抗原决定簇”是指与疾病或障碍相关的任何抗原。作为实例, 所述抗原决定簇也可以来源于与在生物中无限制增殖并因此可能导致病理性生长的患病细胞(例如肿瘤细胞)相关的致病因子。在 Davis, B.D.等(Microbiology, 第 3 版, Harper International Edition)
15 中描述了这类致病因子的实例。所述抗原决定簇可以是抗原和/或抗原上的优势免疫表位。作为实例, 所述抗原决定簇可以包括可作为宿主免疫系统的靶并且诱发导致肿瘤破坏的应答的肿瘤相关抗原(TAA)。

TAA

20 术语“肿瘤相关抗原(TAA)”在本文用来指任何 TAA 或其抗原性肽。所述抗原是由肿瘤自身或与肿瘤相关的细胞(例如实质细胞或相关血管系统的细胞)表达的抗原。术语“肿瘤相关抗原(TAA)”包括使所述肿瘤细胞区别于其正常细胞对应物、在其中可能以微量存在的抗原。

25 TAA 的实例包括但不限于 MART-1 (T 细胞所识别的黑素瘤抗原-1)、MAGE-1、MAGE-3、5T4、gp100、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原(PSA)、粘蛋白(MUC-1)、酪氨酸酶。特别优选的 TAA 是细胞表面分子, 因为它们定位以供免疫系统的组分识别, 并且是治疗(例如

治疗和/或免疫疗法)极好的靶。本发明决不限于编码以上所列 TAA 的抗原决定簇。通过本领域已知的方法,例如在美国专利第 4,514,506 号中公开的方法,可以鉴定、分离和克隆其它 TAA。

5 5T4 TAA

TAA 5T4 (参见 WO 89/07947)已经被广泛地表征。它是一种在癌中广泛表达、但在正常成体组织中表达模式高度有限的 72kDa 糖蛋白。它看来在结肠直肠癌和胃癌中与转移密切相关。人 5T4 的完整核酸序列是已知的(Myers 等, 1994 J Biol Chem 169: 9319-24)。

10

共同刺激分子

为了对 DAM 应答,淋巴细胞需要至少两种不同的信号来激活其效应子功能(Bretscher 和 Cohn 1970 Science 169: 1042-1049; Crabtree 1989 Science 243: 355-361)。初级信号对于抗原是特异性的。在分离中
15 对初级信号的刺激通常导致所述淋巴细胞的细胞凋亡(程序性细胞死亡),或导致建立持续无应答性或无反应性状态(Weiss 等,参见上文)。为了达到对淋巴细胞的激活,需要辅助信号,辅助信号可能通过细胞因子或抗原呈递细胞(APC)上存在的细胞表面共同刺激配体来传递。

现在已鉴定出许多这类共同刺激分子,包括粘着分子、LFA-3、
20 ICAM-1、ICAM-2。APC 上存在的主要共同刺激分子是 B7 家族成员,包括 B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)和 B7-3。这些分子是淋巴细胞上共同刺激受体包括 CD28 (WO92/00092)的配体,CD28 也许是静息 T 细胞最为重要的共同刺激受体。糖蛋白 B7 家族的不同成员可能精细地将不同信号传递至 T 细胞(Nunes 等 1996 J. Biol. Chem. 271:
25 1591-1598)。

在本发明的一个实施方案中,使用一种 ScFv Ab,所述 ScFv Ab 包含一个对 DAM (例如肿瘤抗原)具有结合亲和性的分泌型共同刺激分子(“SCM”)。

ScFv Ab 的来源

5 本发明的 ScFv Ab 可由任何合适的来源(无论是天然的还是非天然的)获得或产生, 或者它可以是合成 ScFv Ab、半合成 ScFv Ab、模拟物、衍生化 ScFv Ab、重组 ScFv Ab、发酵优化的 ScFv Ab、融合蛋白或等同物、突变体和其衍生物, 只要它保留本发明 ScFv Ab 的所需 DNA 结合特异性即可。这些包括具有 DAM 结合特异性的 ScFv Ab, 所述 ScFv Ab 可以具有氨基酸取代, 或者可以具有与氨基酸官能团连接的糖或其它分子。

10 术语“模拟物”涉及具有与本发明的 ScFv Ab 相同的结合特异性的任何化学制剂, 它可以是肽、多肽、抗体或其它有机化学物质。

本文所用的术语“衍生物”或“衍生化的”包括对 ScFv Ab 的化学修饰。作为这类修饰的例证可以是氢被烷基、酰基或氨基取代。最好是, 所述 ScFv Ab 包括已经通过重组 DNA 技术制备或通过化学合成技术产生或其组合而制备或产生的 ScFv Ab 的至少一个部分。

15 所述 ScFv Ab 最好利用化学合成技术来制备。

化学合成方法

20 采用化学方法来完全或部分合成所述 ScFv Ab 的氨基酸序列, 可以产生本发明的 ScFv Ab 或其变异体、同源物、衍生物、片段或模拟物。例如, 可以通过固相技术合成肽, 将其从树脂上切下, 并通过制备性高效液相色谱纯化(例如 Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co., New York NY)。所述合成肽的组成可以通过氨基酸分析或测序加以证实(例如 Edman 降解法; Creighton, 参见上文)。

25 采用各种固相技术, 进行所述 ScFv Ab 或其变异体、同源物、衍生物、片段或模拟物的直接合成(Roberge JY 等(1995) Science 269: 202-204), 可以例如采用 ABI 431 A 肽合成仪(Perkin Elmer), 按照生产商提供的说明, 完成自动合成。另外, 可以在直接合成期间对可得

自所述 ScFv Ab 或其任何部分的氨基酸序列加以改变和/或采用化学方法将其与得自其它亚基的序列或其任何部分组合, 产生变异型 ScFv Ab。

5 在本发明的一个替代实施方案中, 采用本领域众所周知的化学方法, 可以完全或部分合成所述 ScFv Ab 或其变异体、同源物、衍生物、片段或模拟物的编码序列(参见 Caruthers MH 等(1980) Nuc. Acids Res Symp Ser 215-23, Horn T 等(1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232)。

本发明的 ScFv Ab 最好包含 SEQ ID No 1 中所示的氨基酸序列(参见图 1)。

10 本发明的 ScFv Ab 最好包含 SEQ ID No 3 中所示的氨基酸序列(参见图 2)。

本发明的 ScFv Ab 最好包含 SEQ ID No 4 中所示的氨基酸序列(参见图 6)。

15 氨基酸序列

本文所用的术语“氨基酸序列”是指肽序列、多肽序列、蛋白质序列或其部分。

所述 ScFv Ab 最好是分离的 ScFv Ab 和/或纯化的和/或非天然的 ScFv Ab。

20 本发明的 ScFv Ab 可以是基本上分离的形式。人们会理解, 所述蛋白质可以与不干扰所述 ScFv Ab 计划目的的载体或稀释剂混合, 并且仍被认为是基本上分离的。本发明的 ScFv Ab 也可以是基本上纯化的形式, 在这种情况下, 它一般在制剂中包含所述 ScFv Ab, 其中在所述制剂中超过 90% (例如 95%、98%或 99%)的所述 ScFv Ab 是包含
25 SEQ ID No 1 或 SEQ ID No 3 或 SEQ ID No 4 的肽、或其变异体、同源物、衍生物或片段。

氨基酸序列的变异体/同源物/衍生物

5 本发明的优选氨基酸序列示于 SEQ ID No 1 或 SEQ ID No 3 或 SEQ ID No 4 中，它们是可得自本发明 ScFv Ab 的序列，但也包括得自任何来源的同源序列，例如相关的病毒/细菌蛋白、细胞同源物和合成肽以及其变异体或衍生物。

本发明也首次提供完整的犬 5T4 氨基酸序列和核酸序列(图 26 和 SEQ ID No 14 和 15)。因此，本发明也提供：

- i) 一种犬 5T4 多肽或其变异体、同源物、片段或衍生物，所述多肽具有 SEQ ID No 14 中所示的氨基酸序列；和
- 10 ii) 能够编码这种犬 5T4 多肽的核苷酸序列或其变异体、同源物、片段或衍生物，所述核苷酸序列最好具有 SEQ ID No 15 所示的序列。

因此，本发明包括本文介绍的氨基酸序列的变异体、同源物或衍生物、以及编码这些氨基酸序列的核苷酸序列的变异体、同源物或衍生物。

15

在本发明的正文中，用同源序列来包括在氨基酸水平上在至少例如本文序列表中 SEQ ID No 1 或 SEQ ID No 3 或 SEQ ID No 4 或 SEQ ID No 14 所示的氨基酸序列范围内有至少 75%、85%或 90%相同、优选至少 95%或 98%相同的氨基酸序列。具体地说，同源性应该通常根据所述序列中已知对于结合特异性而言必需的区(例如各位置的氨基酸)来考虑，而不是根据非必需的相邻序列来考虑。虽然同源性也可以根据相似性(即具有相似化学特性/功能的氨基酸残基)来考虑，但在本发明的正文中，最好是根据序列同一性来表示同源性。

20

同源性比较可以借助眼睛来进行，或更通常借助于容易获得的序列比较程序来进行。这些市售的计算机程序可以计算出两个或更多个序列之间的同源性百分率。

25

同源性百分率可以在连续序列范围内进行计算，即将一个序列与另一序列对齐，并且将一个序列中的每个氨基酸直接与另一序列中的

相应氨基酸进行比较，每次比较一个残基。这称为“没有空位的(ungapped)”比对。通常，这种没有空位的比对仅在相对短数目的残基范围内进行。

5 虽然这是一种非常简单而一致的方法，但它不能考虑例如在其它情况下相同的一对序列中，一个插入或缺失将引起随后的氨基酸残基不能对齐，从而当进行全序列比对时，潜在地导致同源性百分率大大降低。因此，大多数的序列比较方法设计产生最佳比对，最佳比对考虑到可能的插入和缺失，而对整体同源性分值不会处以过高的罚分。通过在序列比对中插入“空位”以尝试使局部同源性最大化，来达到
10 这一点。

然而，这些更为复杂的方法为在序列比对中发生的每个空位指定“空位处罚”，使得对于相同数目的相同氨基酸而言，具有尽可能少的空位、反映出两个比较序列之间较高相关性的序列比对将获得比具有许多空位的序列比对有更高的分值。“Affine 空位罚分”通常用来
15 对存在一个空位处以相对高的罚分，而对该空位的每个后续残基的罚分较低。这是最常用的空位打分系统。不用说，高空位处罚会产生具有较少空位的最佳序列比对。大多数的序列比对程序允许对空位处罚进行修改。然而，当使用这类软件进行序列比较时，最好使用默认值。例如，当使用 GCG Wisconsin Bestfit 软件包(参见下文)时，氨基酸序列
20 的默认空位处罚为：一个空位为-12，而每个空位延伸为-4。

因此，最大同源性百分率的计算首先需要考虑空位处罚，产生最佳比对。用于进行这种序列比对的合适计算机程序是 GCG Wisconsin Bestfit 软件包(University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux 等, 1984, Nucleic Acids Research 12:387)。可以进行序列比较的其它软件的实例
25 包括但不限于 BLAST 软件包(参见 Ausubel 等, 1999, 出处同上 - 第 18 章)、FASTA (Atschul 等, 1990, J. Mol. Biol., 403-410)和 GENEWORKS 比较工具程序组。BLAST 和 FASTA 都可用于脱机和在线搜索(参见 Ausubel 等, 1999, 出处同上, 第 7-58 页至第 7-60 页)。然而，最好是使

用 GCG Bestfit 程序。一种称为 BLAST 2 Sequences 的新工具可用来比较蛋白质和核苷酸序列(参见 FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 和 tatiana@ncbi.nlm.nih.gov)。

5 虽然可以根据同一性测量最终的同源性百分率,但序列比对过程本身通常不基于全或无成对比较。而是,通常用绘制的相似性分值矩阵,该分值矩阵根据化学相似性或进化距离,为每个成对比较指定分值。常用的这种矩阵的一个实例是 BLOSUM62 矩阵 - BLAST 程序组的默认矩阵。GCG Wisconsin 程序一般或者使用公共默认值,或者使用用户符号比较表(如果供应的话)(有关进一步的细节,参见用户手册)。
10 最好使用 GCG 软件包的公共默认值,或在其它软件的情况下,使用默认矩阵,例如 BLOSUM62。

一旦软件产生了最佳比对,则有可能计算出同源性百分率,最好是序列同一性百分率。软件通常将此作为序列比较的一部分来进行,并且产生数字结果。

15 与本发明氨基酸序列相关的术语“变异体”或“衍生物”包括所述序列中的一个(或多个)氨基酸的任何取代、变异、修饰、取代、缺失或添加,条件是所得氨基酸序列具有结合特异性,最好具有与本文序列表的 SEQ ID No 1 或 SEQ ID No 3 或 SEQ ID No 4 或 SEQ ID No 14 中所示氨基酸序列至少相同的结合特异性。

20 可以对本文序列表的 SEQ ID No 1 或 SEQ ID No 3 或 SEQ ID No 4 或 SEQ ID No 14 进行修饰,以用于本发明。通常,进行维持所述序列的结合特异性的修饰。可以进行例如 1 个、2 个或 3 个至 10 个或 20 个取代的氨基酸取代,条件是所述经修饰的序列保留所需的结合特异性。氨基酸取代可以包括利用非天然存在的类似物。

25 本发明的 ScFv Ab 也可以具有产生沉默改变并且产生功能等同的 ScFv Ab 的氨基酸残基的缺失、添加或取代。可以根据所述残基在极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性质方面的相似性,进行有意的氨基酸取代,只要保留所述 ScFv Ab 的结合特异性即可。例

如，带负电的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸；带正电的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸；而其不带电极性头基团具有相似亲水性值的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。这些也适用于犬 5T4 序列。

- 5 可以例如按照下表，进行保守取代。第二栏同一框中的氨基酸、最好是第三栏同一行中的氨基酸可以相互取代：

脂族	非极性	G A P
		I L V
	极性-不带电	C S T M
		N Q
	极性-带电	D E
		K R
芳族		H F W Y

- 10 最好是，利用重组技术制备所述分离的 ScFv Ab 和/或纯化的 ScFv Ab 和/或非天然 ScFv Ab 和/或 5T4 序列。

关于犬 5T4 序列的片段，所述片段最好包含 SEQ ID No 14 中所示氨基酸 1-182 和/或 297-420 中的至少一个、优选其中某些、最优选全部。

15 核苷酸序列

- 技术人员会理解，由于遗传密码的简并性，许多不同的核苷酸序列可以编码本发明的同一 ScFv Ab。另外，人们会理解，技术人员可以利用常规技术，制备不影响由本发明核苷酸序列编码的 ScFv Ab 的核苷酸取代，以反映出待表达本发明 ScFv Ab 的任何特定宿主生物的密码子选择。
- 20

与本发明的 SEQ ID No 5 (参见图 1)或 SEQ ID No 7 (参见图 2)或

程。

本发明的能够选择性地与本文所述核苷酸序列或其互补序列杂交的核苷酸序列，在至少 20 个、优选至少 25 个或 30 个、例如至少 40 个、60 个或 100 个或更多个连续核苷酸的区内与本文所述相应的核苷酸序列的同源性一般至少为 75%、优选至少为 85%或 90%，更优选至少为 95%或 98%。优选的本发明核苷酸序列将包含与本发明序列表的 SEQ ID No 5 或 SEQ ID No 7 或 SEQ ID No 8 或 SEQ ID No 15 中所示核苷酸序列同源的区域，所述同源区域与本发明序列表的 SEQ ID No 5 或 SEQ ID No 7 或 SEQ ID No 8 中所示核苷酸序列的同源性优选至少为 80%或 90%，更优选至少为 95%。

术语“选择性地杂交”是指用作探针的核苷酸序列在发现本发明的靶核苷酸序列可与所述探针以显著高于本底的水平杂交的条件下使用。本底杂交的发生可能是由于在例如待筛选的 cDNA 文库或基因组 DNA 文库中存在的其它核苷酸序列所致。在这一事件中，本底意味着通过所述探针和所述文库的非特异性 DNA 成员之间的相互作用而产生的信号水平，其强度是用靶 DNA 观测到的特异性相互作用的强度的 10 分之一，最好是 100 分之一。相互作用的强度可以例如通过用 ^{32}P 对所述探针进行放射性标记来测量。

杂交条件基于所述核酸结合复合物的解链温度(T_m)，如 Berger 和 Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, 第 152 卷, Academic Press, San Diego CA)中所述，并且提供在下文解释的限定的“严格性”。

最高严格性通常发生在约 $T_m - 5^\circ\text{C}$ (比所述探针 T_m 低 5°C)；高严格性发生在低于 T_m 约 5°C 至 10°C ；中等严格性发生在低于 T_m 约 10°C 至 20°C ；而低严格性发生在低于 T_m 约 20°C 至 25°C 。正如本领域技术人员会理解的，可以用最高严格性杂交来鉴定或检测相同的核苷酸序列，而可以用中等(或低)严格性杂交来鉴定或检测相似或相关的多核苷酸序列。

SEQ ID No 8 (参见图 6) 中所示核苷酸序列有关的术语“变异体”、“同源物”或“衍生物”，包括所述序列中一个(或多个)核酸的任何取代、变异、修饰、取代、缺失或添加，条件是所得核苷酸序列编码具有结合特异性的 ScFv Ab，最好是具有与本发明序列表的 SEQ ID No 5 或
5 SEQ ID No 7 或 SEQ ID No 8 中所示核苷酸序列至少相同的结合特异性的 ScFv Ab。

与本发明的 SEQ ID No 15 (参见图 26) 中所示核苷酸序列有关的术语“变异体”、“同源物”或“衍生物”，包括所述序列中一个(或多个)核酸的任何取代、变异、修饰、取代、缺失或添加，条件是所得
10 核苷酸序列编码犬 5T4 多肽、最好是本发明序列表的 SEQ ID No 14 中所示多肽。

如上所述，就序列同源性而言，优选与本文序列表中所示序列具有至少 75% 同源性，更优选具有至少 85% 同源性，更优选具有至少 90% 同源性。更优选具有至少 95% 同源性，更优选具有至少 98% 同源性。
15 核苷酸同源性比较可以如上所述进行。一种优选的序列比较程序是以上所述的 GCG Wisconsin Bestfit 程序。默认打分矩阵对于每个相同核苷酸的匹配值为 10，而每个错配为-9。对于每个核苷酸而言，默认空位产生罚分为-50，而默认空位延伸罚分为-3。

本发明也包括能够选择性地与本文所述序列的任何变异体、片段
20 或衍生物杂交的核苷酸序列或与任何上述序列互补的序列。核苷酸序列最好长至少 15 个核苷酸，更优选长至少 20 个、30 个、40 个或 50 个核苷酸。

就犬 5T4 序列的片段而言，所述片段优选包含 SEQ ID No 15 中
25 所示核酸 1-546 和/或 890-1263 中的至少一个、优选某些、最优选全部。

杂交

本文所用的术语“杂交”将包括“一条核酸链通过碱基配对与互补链结合的过程”以及在聚合酶链式反应(PCR)技术中进行的扩增过

在一个优选方面，本发明包括可以在严格条件下(例如 65℃和 0.1xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M 柠檬酸三钠 pH 7.0})与本发明的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。当本发明的核苷酸序列是双链时，则本发明包括或者单独或者组合的所述双链体的两条链。当所述核苷酸序列是单链时，人们会理解，该核苷酸序列的互补序列也包括在本发明的范围内。

可以以多种方式，获得与本发明序列并非 100%同源、但属于本发明范围内的核苷酸序列。本文所述序列的其它变异体可以例如通过探测由各种各样来源制备的 DNA 文库来获得。另外，可以获得其它病毒/细菌或细胞同源物、特别是在哺乳动物细胞(例如大鼠、小鼠、牛和灵长类细胞)中发现的细胞同源物，这类同源物及其片段一般将能够与本文序列表中所示序列选择性地杂交。通过探测由其它动物物种制备的 cDNA 文库或基因组文库，以及在中等严格性至高严格性条件下用包含本发明序列的 SEQ ID No 5 或 SEQ ID No 7 或 SEQ ID No 8 或 SEQ ID No 15 中所示核苷酸序列的全部或其部分的探针来探测这类文库，可以获得这类序列。相似的考虑适用于获得本发明氨基酸序列和/或核苷酸序列的物种同源物和等位基因变异体。

也可以利用简并 PCR 获得变异体和株系/物种同源物，简并 PCR 所利用的引物设计用以靶向所述变异体和同源物内编码本发明序列中保守氨基酸序列的序列。通过对来自几种变异体/同源物的氨基酸序列进行序列比对，可以预测保守序列。序列比对可以用本领域已知的计算机软件来进行。例如，广泛使用 GCG Wisconsin PileUp 程序。用于简并 PCR 的引物将含有一个或多个简并位置，并且将在低于用针对已知序列的单一序列引物克隆序列所用的严格性条件下使用。

或者，通过对已表征序列例如本发明序列的 SEQ ID No 5 或 SEQ ID No 7 或 SEQ ID No 8 或 SEQ ID No 15 中所示核苷酸序列进行定点诱变，可以获得这类核苷酸序列。这在例如需要对序列进行沉默密码子改变以对于表达所述核苷酸序列的特定宿主细胞优化密码子偏

好时可能是有用的。为了导入限制性酶识别位点,或为了改变由所述核苷酸序列编码的 ScFv Ab 的结合特异性,可能需要其它的序列改变。

5 可以利用本发明的核苷酸序列产生引物(例如 PCR 引物、用于可变扩增反应的引物)、探针(例如采用放射性或非放射性标记通过常规方法用揭示性标记来标记的探针),或可以将所述核苷酸序列克隆到载体中。这类引物、探针和其它片段的长度至少为 15 个核苷酸,优选至少 20 个核苷酸,例如至少 25 个、30 个或 40 个核苷酸,本文所用的术语本发明的核苷酸序列也包括这些引物、探针和其它片段。

10 按照本发明的核苷酸序列(例如 DNA 多核苷酸和探针)可以重组产生、合成产生,或通过本领域技术人员可利用的任何方法来产生。也可以通过标准技术将其克隆。

一般而言,通过合成方法产生引物,包括分步制备所需的核酸序列,每次一个核苷酸。采用自动化技术完成这一步的技术是本领域容易获得的。

15 较长的核苷酸序列一般采用重组方法产生,例如采用 PCR (聚合酶链式反应)克隆技术。这将包括制备邻接需要克隆的打靶序列中一个区的一对引物(例如约 15-30 个核苷酸),使所述引物与得自动物细胞或人类细胞的 mRNA 或 cDNA 接触,在引起扩增所需区的条件下进行聚合酶链式反应(PCR),分离所扩增的片段(例如通过在琼脂糖凝胶上纯化反应混合物),并且回收所扩增的 DNA。可以设计所述引物,以使其含有合适的限制性酶识别位点,使得可以将所扩增的 DNA 克隆到合适的克隆载体中。

20 由于遗传密码固有的简并性,可以运用编码基本相同或功能上等同的氨基酸序列的其它 DNA 序列,来克隆和表达所述 ScFv Ab。正如本领域技术人员会理解的,可能最好产生具有非天然存在的密码子的编码所述 ScFv Ab 的核苷酸序列。可以选择特定原核宿主或真核宿主优选的密码子(Murray E 等(1989) Nuc Acids Res 17:477-508),例如以增

加所述 ScFv Ab 的表达速率，或产生具有所需特性的重组 RNA 转录物，所述所需特性例如为半寿期比由天然存在的序列产生的转录物的半寿期长。

- 5 在本发明的一个实施方案中，所述 ScFv Ab 是一种重组 ScFv Ab。
所述重组 ScFv Ab 最好是用遗传载体来制备。

载体

- 10 正如本领域众所周知的，载体是一种工具，允许或促进一种实体从一种环境转移到另一种环境。按照本发明，并且作为实例，重组 DNA 技术中所用的某些载体允许实体例如 DNA 区段（例如异源 DNA 区段，例如异源 cDNA 区段）转移到宿主和/或靶细胞中，以复制包含本发明核苷酸序列的载体和/或表达本发明核苷酸序列所编码的本发明蛋白。重组 DNA 技术中所用的载体的实例包括但不限于质粒、染色体、人工染色体或病毒。

- 15 术语“载体”包括表达载体和/或转化载体。

术语“表达载体”是指能够体内或体外/离体表达的构建体。

术语“转化载体”是指能够从一个物种被转移到另一个物种的构建体。

20 “裸 DNA”

可以将包含编码本发明 ScFv Ab 的核苷酸序列、用于影响病毒感染的载体作为“裸核酸构建体”直接给予，所述构建体最好还包含与宿主细胞基因组同源的侧翼序列。

- 25 本文所用的术语“裸 DNA”是指包含编码本发明 ScFv Ab 的核苷酸序列以及控制其产生的短启动子区的质粒。它称为“裸”DNA，是因为所述质粒不载于任何传递载体中。当这样一种 DNA 质粒进入宿主细胞例如真核细胞中时，它所编码的蛋白质(例如所述 ScFv Ab)则可以在所述细胞中被转录和翻译。

非病毒传递

或者，可以采用本领域已知的各种各样的非病毒技术，例如转染、转化、电穿孔和基因枪转化，将包含本发明核苷酸序列的载体导入合适宿主细胞中。

- 5 本文所用的术语“转染”是指采用非病毒载体传递基因至靶哺乳动物细胞的过程。

转染方法通常包括电穿孔、DNA 基因枪、脂质介导的转染、压缩 (compacted) DNA 介导的转染、脂质体、免疫脂质体、脂质转染、阳离子试剂介导的转染、阳离子面式两亲物(CFA) (Nature Biotechnology 10
15 1996 14; 556)、多价阳离子例如精胺、阳离子脂质或聚赖氨酸、1,2-双(油酰氧基)-3-(三甲基铵基)丙烷(DOTAP)-胆固醇复合物(Wolff 和 Trubetskoy 1998 Nature Biotechnology 16: 421)和它们的组合。

通过几种已知的转染技术，例如包括利用转染剂的转染法，增强哺乳动物细胞对裸核酸构建体的摄取。这些试剂的实例包括阳离子试剂(例如磷酸钙和 DEAE-葡聚糖)和脂质转染剂(例如 lipofectam™和
15 transfectam™)。通常，将核酸构建体与转染剂混合，产生组合物。

病毒载体

或者，可以运用各种各样的本领域已知的病毒技术，例如用重组病毒载体(例如逆转录病毒、单纯疱疹病毒和腺病毒)感染，可以将包含本发明核苷酸序列的载体导入合适的宿主细胞中。
20

所述载体最好是一种重组病毒载体。合适的重组病毒载体包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、疱疹病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体、痘病毒载体或细小病毒载体(参见 Kestler 等 1999 Human Gene Ther 10(10):1619-32)。就病毒载体而论，
25 通过病毒感染靶细胞，介导基因传递。

逆转录病毒载体

逆转录病毒的实例包括但不限于：鼠类白血病病毒(murine leukemia virus) (MLV)、人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus) (HIV)、马传染性贫血病病毒(equine infectious anaemia virus) (EIAV)、
5 小鼠乳腺癌病毒(mouse mammary tumour virus) (MMTV)、劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus) (RSV)、弗吉纳米肉瘤病毒(Fujinami sarcoma virus) (FuSV)、莫洛尼鼠类白血病病毒(Moloney murine leukemia virus) (Mo-MLV)、FBR 鼠类骨肉瘤病毒(FBR murine osteosarcoma virus) (FBR MSV)、莫洛尼鼠类肉瘤病毒(Moloney murine sarcoma virus) (Mo-
10 MSV)、艾贝尔逊鼠类白血病病毒(Abelson murine leukemia virus) (A-MLV)、禽髓细胞瘤病毒-29 (Avian myelocytomatosis virus-29) (MC29) 和禽成红细胞增生病毒(Avian erythroblastosis virus) (AEV)。

按照本发明使用的优选载体是重组病毒载体，特别是重组逆转录病毒载体(RRV)，例如慢病毒载体。

15 术语“重组逆转录病毒载体”(RRV)是指具有足够逆转录病毒遗传信息以允许在包装组分存在下将 RNA 基因组包装到能够感染靶细胞的病毒粒子中的载体。对靶细胞的感染包括逆转录和整合到靶细胞基因组中。RRV 携带将由所述载体传递至靶细胞的非病毒编码序列。RRV 不能在最终的靶细胞中独立地复制产生感染性逆转录病毒粒
20 子。通常所述 RRV 缺乏功能性 *gag-pol* 和/或 *env* 基因和/或复制所必需的其它基因。本发明的载体可以构成为断裂-内含子载体。断裂内含子载体在 PCT 专利申请 WO 99/15683 中有描述。

在 Coffin 等(“Retroviruses” 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press 编著：JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus, 第 758-763 页)中可以
25 找到逆转录病毒的详细一览表。

慢病毒载体

慢病毒可以分为灵长类和非灵长类两个组。灵长类慢病毒的实例

包括但不限于：人免疫缺陷病毒(HIV)-人自身免疫缺陷综合征(AIDS)的病原体以及猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。非灵长类慢病毒组包括原型“慢病毒(slow virus)”维纳斯/梅迪病毒(visna/maedi virus) (VMS)以及相关的山羊关节炎-脑炎病毒 (caprine arthritis-encephalitis virus) (CAEV)、马传染性贫血病病毒(equine infectious anaemia virus) (EIAV) 5 和新近描述的猫免疫缺陷病毒(feline immunodeficiency virus) (FIV)和牛免疫缺陷病毒(bovine immunodeficiency virus) (BIV)。

慢病毒科和其它类型的逆转录病毒之间的区别在于：慢病毒有既可感染分裂中的细胞又可感染不分裂细胞的能力(Lewis等1992 EMBO. J 11: 3053-3058; Lewis和 Emerman 1994 J. Virol. 68: 510-516)。相反， 10 其它逆转录病毒例如 MLV 不能感染不分裂的细胞，例如构成例如肌肉、脑、肺和肝组织的那些细胞。

腺病毒

15 在本发明的一个实施方案中，可以将腺病毒的特征与逆转录病毒/慢病毒的遗传稳定性结合在一起，这可以用来转导靶细胞，使其成为能够稳定感染相邻细胞的瞬时逆转录病毒生产细胞。可以将已被工程改造以表达本发明 ScFv Ab 的这类逆转录病毒生产细胞植入生物(例如动物或人类)体内，用于治疗疾病例如癌症。

20

痘病毒

按照本发明使用的优选载体是重组痘病毒载体，例如禽痘病毒(FPV)、昆虫痘病毒、痘苗病毒例如 NYVAC、金丝雀痘病毒、MVA 或其它非复制型病毒载体系统，诸如在例如 WO 95/30018 中描述的那些病毒载体系统。 25

杂种病毒载体

在另一广义方面，本发明提供一种用于体内传递编码本发明 ScFv

Ab 的核苷酸序列的杂种病毒载体系统,该系统包含一种或多种第一病毒载体,所述第一病毒载体编码第二病毒载体,所述第一载体能够感染第一靶细胞并能够在所述细胞中表达所述第二病毒载体,所述第二载体能够转导第二靶细胞。

- 5 所述第一载体最好可得自或基于腺病毒载体和/或所述第二病毒载体可得自或基于逆转录病毒载体,最好是慢病毒载体。

定向载体

- 10 术语“定向载体”是指其感染/转染/转导细胞或在宿主和/或靶细胞中表达的能力被限于宿主生物中的某些细胞类型的载体,所述某些细胞类型通常为具有共同或相似表型的细胞。

复制型载体

- 15 可以将编码本发明 ScFv Ab 的核苷酸序列加入到重组复制型载体中。可以用所述载体在匹配的宿主细胞中复制所述核苷酸序列。因而在本发明的一个实施方案中,本发明提供一种制备本发明 ScFv Ab 的方法,所述方法包括将本发明的核苷酸序列导入一种复制型载体中,将所述载体导入匹配的宿主细胞中,并让所述宿主细胞在引起所述载体复制的条件下生长。可以从所述宿主细胞中回收所述载体。

20

表达载体

- 25 最好将插入到载体中的本发明的核苷酸序列与能够保证宿主细胞表达所述编码序列(例如本发明 ScFv Ab 的编码序列)的控制序列有效连接,即所述载体是一种表达载体。根据所用的序列和/或载体,由重组宿主细胞产生的 ScFv Ab 可以被分泌出或可以包含在细胞内。正如本领域技术人员会理解的,可以设计含有所述 ScFv Ab 编码序列的表达载体,使其具有指导所述 ScFv Ab 编码序列穿过特定的原核或真核细胞膜分泌的信号序列。

体外表达

可以如下所述，将本发明的载体转化或转染到合适的宿主细胞和/或靶细胞中，以保证本发明的 ScFv Ab 表达。这种方法可以包括在保证表达载体表达编码所述 ScFv Ab 的编码序列的条件下培养用所述载体转化的宿主细胞和/或靶细胞，并任选地回收所表达的 ScFv Ab。所述载体可以是例如配有复制起点、任选的用于表达所述多核苷酸的启动子和任选的所述启动子调节基因的质粒或病毒载体。所述载体可以含有一种或多种选择标记基因，例如就细菌质粒而言的氨苄青霉素抗性基因或就哺乳动物载体而言的新霉素抗性基因。本发明 ScFv Ab 的表达可以是组成型的，使得它们可以被持续产生，或可以是诱导型的，这需要刺激物来起始表达。在诱导型表达的情况下，需要时例如通过添加诱导物(例如地塞米松或 IPTG)至培养基中，可以起始 ScFv Ab 的产生。

15 **ScFv Ab 构建体**

融合蛋白

本发明的 ScFv Ab 也可以作为融合蛋白来产生，例如以便于提取和纯化。融合蛋白配偶体的实例包括谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、6xHis、GAL4 (DNA 结合结构域和/或转录激活结构域)和 β -半乳糖苷酶。融合蛋白配偶体的其它实例包括但不限于包含一种可使 ScFv Ab 蛋白增溶或有利于 ScFv Ab 蛋白的产生和纯化的抗原性辅蛋白融合的重组 ScFv Ab 蛋白，所述辅蛋白例如 GST、 β -半乳糖苷酶或相对大的辅蛋白流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)的脂蛋白 D。或者，所述融合蛋白可以包含一种载体蛋白，例如牛血清白蛋白(BSA)或匙孔鳗血蓝蛋白(KLH)。在本发明的某些实施方案中，所述标记序列是六组氨酸肽，六组氨酸肽在 pQE 载体(Qiagen Inc)中提供，并且在 Gentz 等(1989 PNAS 86: 821-824)中有描述。这类融合蛋白在酵母培养物中可容易地表达(如 Mitchell 等 1993 Yeast 5: 715-723 中所述)并且容易通过亲和层

析纯化。

其它重组构建可以将所述 ScFv Ab 编码序列加至编码有利于可溶性蛋白纯化的多肽结构域的核苷酸序列(Kroll DJ 等(1993) DNA Cell Biol 12: 441-53)。这种纯化促进结构域包括但不限于金属螯合肽例如便于在固定化金属上纯化的组氨酸-色氨酸模块(Porath J (1992) Protein Expr Purif 3 - .26328 1)、便于在固定化免疫球蛋白上纯化的 A 蛋白结构域、以及在 FLAGS 延伸/亲和纯化系统中利用的结构域(Immunex Corp, Seattle, WA)。

也可以方便地在所述融合蛋白配偶体和感兴趣的蛋白序列之间包括一个蛋白酶解位点，以便于除去融合蛋白序列。作为实例，也可以对融合蛋白进行工程改造，使其含有位于编码所述 ScFv Ab 的核苷酸序列和所述异源蛋白序列之间的一个切割位点，使得可以切割所述 ScFv Ab 并从所述异源部分纯化出。在纯化结构域和所述 ScFv Ab 之间包括一个可切割接头序列例如因子 XA 或肠激酶(Invitrogen, San Diego, CA)，也可以用来促进纯化。所述融合蛋白最好不妨碍包含本发明所述氨基酸序列的 ScFv Ab 的结合特异性。

在一个优选实施方案中，所述融合蛋白包含或编码一种分泌型共同刺激分子(SCM)。

20 SCM 融合蛋白

本发明的分泌型共同刺激分子(SCM)可以是一种工程融合蛋白，它包含可供从哺乳动物细胞中分泌的一个信号肽和至少一个用作免疫系统细胞的共同刺激信号的另一结构域。也可以想象利用含有不同共同刺激结构域的 SCM 组合。通过在待治疗个体的自体细胞中表达 SCM 编码基因，可以产生包含所述 SCM 的 ScFv Ab，因而由所述宿主细胞加入到所述蛋白质中的任何翻译后修饰都是真正的，并且提供具有完全功能性的蛋白和合适的药代动力学。

WO-A-02/00092 描述多种截短形式的 B7-1，所述截短形式的 B7-1

是通过将翻译终止密码子置于跨膜结构域之前而衍生的，并且从哺乳动物细胞中分泌。在这种特定情况下，使用来自制癌蛋白 M 基因的异源信号肽。WO-A92/00092 也描述含有与免疫球蛋白 Fc 区融合的 B7-1 的胞外结构域的融合蛋白。这类分子可以与 T 细胞上的 CD28 结合，并且可以用来刺激 T 细胞增殖。然而，这种刺激仅以中等程度发生，除非将所述 B7 或 B7 衍生物固定化于固相表面。

Gerstmayer 等(1997 J. Immunol. 158:4584-4590)描述了一种 B7-2 融合物，在所述融合物中 B7-2 与对 ErbB2 特异性的 ScFv 融合，后接一个 myc 附加表位和聚组氨酸标志，所述融合物在酵母巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中表达时被分泌。这种分子保留了对抗原的结合以及对用 PMA 和 IL-2 预先刺激的 T 细胞的共同刺激增殖。然而，这种分子的糖基化属于酵母类型，这有可能在人体内导致不当的药代动力学。

按照本发明，可以使用任何合适的共同刺激结构域。作为实例，共同刺激结构域可以选自细胞表面糖蛋白 B7 家族(包括 B7-1、B7-2 和 B7-3)或其它共同刺激细胞表面糖蛋白(例如但不限于共同刺激受体-配体分子，包括 CD2/LFA-3、LFA-1/ICAM-1 和 ICAM-3)的胞外部分。研究已经表明，单核细胞对 T 细胞的共同刺激依赖于两种受体配体途径 CD2/LFA-3 和 LFA-1/ICAM-1 中的每一种(Van Severter 等 1991 Eur J Immunol 21: 1711-1718)。另外，已经表明，第三种 LFA-1 反受体 ICAM-3 是静息和活化 T 淋巴细胞的共同刺激分子(Hernandez-Caselles 等 1993 Eur J Immunol 23: 2799-2806)。

其它可能的共同刺激分子可以包括名为 SLAM 的新型糖蛋白受体，该受体已经被鉴定出，当被占用时，以不依赖 CD28 的方式增强 T 细胞扩充，并诱导 Th0/Th1 细胞因子产生分布型(Cocks 等 1995 Nature 376: 260-263)。

CD6 是一种细胞表面糖蛋白，也已经表明它作为 T 细胞上的共同刺激和粘着受体起作用。已经描述了四种 CD6 同种型(CD6a、b、c、

d) (Kobarg 等 1997 Eur J Immunol 27: 2971-2980)。也已经提出了极晚期抗原(VLA-4)整联蛋白在人记忆 B 细胞活化中的作用(Silvy 等 1997 Eur J Immunol 27: 2757-2764)。内皮细胞也提供独特的影响活化 CD4+ T 细胞表型的共同刺激信号(Karmann 等 1996 Eur J Immunol 26: 610-617)。

5 已经描述了脂多糖活化的 B 细胞表面存在的一种 B3 蛋白, 该蛋白可以为静息 T 细胞提供共同刺激, 导致主要释放白介素-4 (IL-4)和 IL-5 以及可忽略量的 IL-2 和干扰素 γ (Vinay 等 1995 J Biol Chem 270: 23429-23436)。T 细胞和肿瘤细胞上的一种新型共同刺激 T 细胞抗原(A6H)的共同表达已经提示一种与这些细胞共同特性有关的可能的功能(Labuda 等 1995 Int Immunol 7: 1425-1432)。

10 在本发明的一个优选实施方案中, 所述共同刺激结构域是 B7-1 或 B7-2 的一部分, 更优选是 B7-1 或 B7-2 的完整胞外部分。

在一个优选实施方案中, 通过表达一种编码融合蛋白的新基因, 所述融合蛋白含有一个或多个所述 DAM 结合结构域和一个或多个所述共同刺激结构域, 来生成本发明的 ScFv Ab。在本发明的正文中, 15 所述共同刺激结构域与所述 ScFv 融合。可以将所述结构域以以下顺序(N 末端至 C 末端)放置: 抗原结合结构域后接共同刺激结构域; 或共同刺激结构域后接抗原结合结构域。共同刺激结构域最好置于 N 末端, 后接抗原结合结构域。在 N 末端包括一个信号肽, 所述信号肽可以例如是所述共同刺激胞外结构域的天然信号肽。所述不同的结构域 20 可以被额外的序列隔开, 所述额外序列可能是由于在所述新基因中包含便利的限制性酶切位点而产生, 以有利于其构建, 或者用作所述结构域之间的肽间隔区, 或用作柔性肽接头或提供另外的功能。所述结构域最好被一个柔性接头隔开。

25 可以用两种或更多种编码不同 SCM 的不同基因来达到改善的共同刺激或共同刺激原初 T 细胞并且诱导记忆反应。例如, 可以将含 B7-1 胞外结构域的 SCM 的编码基因与含 B7-2 胞外结构域的 SCM 的编码基因一起给予。

ScFv 抗体产生的定量

虽然标记基因表达的存在/缺乏可以提示也存在所述核苷酸序列和/或其 ScFv Ab, 但其存在和表达可以通过常规方法来证实。例如, 如果将编码所述 ScFv Ab 的核苷酸序列插入标记基因序列中, 则根据
5 所述标记基因功能的缺乏, 可以鉴定出含有所述 ScFv Ab 编码区的重组细胞。或者, 可以将标记基因与编码 ScFv Ab 的核苷酸序列串连置于单一启动子的控制之下。对诱导或选择应答而表达所述标记基因, 也表明所述 ScFv Ab 的表达。

定量测定特定分子表达的其它方法包括放射性标记(Melby PC 等
10 1993 J Immunol Methods 159: 235-44)或生物素化(Duplaa C 等 1993 Anal Biochem 229-36)核苷酸、共同扩增一种控制核酸、和可内推实验结果的标准曲线。通过以 ELISA 形式进行所述测定, 其中感兴趣的 ScFv Ab 以各种稀释度存在, 可以加速对多种样品的定量, 并且分光光度或量热反应可提供快速定量。

15

宿主细胞/靶细胞

可以用包含本发明核苷酸序列的宿主细胞和/或靶细胞来在体外、体内和离体条件下表达本发明的 ScFv Ab。

术语“宿主细胞和/或靶细胞”包括可来源于载体能够转染或转导的合适生物的任何细胞。宿主细胞和/或靶细胞的实例可以包括但不限于能够在体外、体内和离体条件下表达本发明 ScFv Ab 的细胞。这类
20 细胞的实例包括但不限于巨噬细胞、内皮细胞或它们的组合。其它实例包括呼吸道上皮细胞、肝细胞、肌细胞、心肌细胞、滑膜细胞、初级乳腺上皮细胞和有丝分裂后终末分化的非复制型细胞例如巨噬细胞
25 和/或神经元。

在一个优选实施方案中, 所述细胞是一种哺乳动物细胞。

在一个高度优选的实施方案中, 所述细胞是一种人类细胞。

术语“生物”包括任何合适的生物。在一个优选实施方案中, 所

述生物是哺乳动物。在一个高度优选的实施方案中，所述生物是人类。

虽然本发明的 ScFv Ab 可以采用原核细胞作为宿主细胞来生产，但最好使用真核细胞，例如酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞，特别是哺乳动物细胞。合适的宿主细胞包括细菌例如大肠杆菌、酵母、
5 哺乳动物细胞系和其它真核细胞系，例如昆虫 Sf9 细胞。

本发明也提供一种用一种或多种本发明的核苷酸序列转化宿主细胞和/或靶细胞的方法。

术语“转化细胞”是指具有经修饰遗传结构的宿主细胞和/或靶细胞。对于本发明而言，如果已经将按照本发明的载体导入细胞，则所述细胞具有经修饰的遗传结构。
10

可以在允许本发明的 ScFv Ab 表达的合适条件下培养宿主细胞和/或靶细胞。

本发明也提供一种方法，所述方法包括将转化宿主细胞即已经用一种或多种按照本发明的核苷酸序列转化了的细胞在适合于表达由所述核苷酸序列编码的 ScFv Ab 的条件下培养。
15

本发明也提供一种方法，所述方法包括将转化宿主细胞即已经用一种或多种按照本发明的核苷酸序列或其衍生物、同源物、变异体或片段转化了的细胞在适合于表达由所述核苷酸序列编码的 ScFv Ab 的条件下培养；然后从所述转化宿主细胞培养物中回收所述 ScFv Ab。

通过各种各样的本领域已知的技术，包括酶裂解、化学裂解和/或渗透压裂解和物理破碎，可以从宿主细胞中提取本发明的 ScFv Ab。所述 ScFv Ab 可以用本身已知的方法来纯化和分离。
20

体外/体内/离体表达的调节

本发明也包括体外/体内/离体调节本发明的 ScFv Ab 编码核苷酸序列的基因疗法。例如，通过给予与本发明的 ScFv Ab 编码核苷酸序列结合的化合物、或与本发明的 ScFv Ab 编码核苷酸序列相关的控制区、或其相应 RNA 转录物，以改变转录或翻译的速率，可以完成表达
25

的调节。

控制序列

5 与本发明的 ScFv Ab 编码序列有效连接的控制序列包括启动子/增强子以及其它表达调节信号。可以选择这些控制序列，以使其与设计在其中应用所述表达载体的宿主细胞和/或靶细胞相匹配。例如通过添加其它转录调节元件以使由控制序列所指导的转录水平对转录调节物的应答更强，可以对所述控制序列进行修饰。

10 有效连接的

术语“有效连接的”是指所述组分的关系使其以其计划的方式起作用。与编码序列“有效连接的”调节序列的连接方式，使得在与所述控制序列相匹配的条件下达到所述编码序列的表达。

本发明的核苷酸序列最好与转录单位有效连接。

15 本文所述的术语“转录单位”是含有编码序列和用来达到那些编码序列独立于任何其它编码序列表达的信号的核酸区。因而，每个转录单位一般包含至少一个启动子、一个任选的增强子和一个聚腺苷酸化信号。

20 启动子

术语启动子是本领域众所周知的，并且以本领域通常的含义使用，例如作为 RNA 聚合酶结合部位。该术语包括大小和复杂性的范围从基本启动子至包括上游元件和增强子的启动子的核酸区。

25 所述启动子通常选自在哺乳动物细胞中有功能的启动子，虽然可以使用原核启动子和在其它真核细胞中有功能的启动子。所述启动子通常来源于病毒或真核基因的启动子序列。例如，它可以是来源于将发生表达的细胞的基因组的启动子。对于真核启动子，它们可以是以普遍存在的方式起作用的启动子(例如 α -肌动蛋白、 β -肌动蛋白、

微管蛋白的启动子), 或者可以是以组织特异性方式起作用的启动子(例如丙酮酸激酶基因的启动子)。

低氧型启动子/增强子

5 所述增强子和/或启动子可以在低氧或局部缺氧环境或低葡萄糖环境中优先有活性, 使得所述 ScFv Ab 编码核苷酸序列优先在感兴趣的特定组织中表达, 例如优先在肿瘤、关节炎性关节或局部缺氧的其它部位的环境中表达。因而, 可以减轻或消除所述 ScFv Ab 编码核苷酸序列对待治疗个体的任何显著的生物学效应或有害效应。提供受调节表达的增强子元件或其它元件可以以多拷贝存在。同样, 或另外, 10 所述增强子和/或启动子可以优先在一个或多个特定细胞类型中有活性, 所述特定细胞类型例如为一种或多种巨噬细胞、内皮细胞或它们的组合。其它实例可以包括但不限于呼吸道上皮细胞、肝细胞、肌细胞、心肌细胞、滑膜细胞、初级乳腺上皮细胞和有丝分裂后终末分化的非复制型细胞, 例如巨噬细胞和/或神经元。 15

组织特异性启动子

 本发明的启动子可以是组织特异性启动子。合适的组织限制型启动子/增强子的实例是在肿瘤细胞中活性高的那些启动子, 例如来自 20 *MUC1* 基因、*CEA* 基因或 *5T4* 抗原基因的启动子/增强子。时序限制型启动子/增强子的实例是对局部缺氧和/或低氧应答的那些启动子/增强子, 例如低氧效应元件或 *grp78* 或 *grp94* 基因的启动子/增强子。甲胎蛋白(AFP)启动子也是一种肿瘤特异性启动子。一种优选的启动子-增强子组合是人巨细胞病毒(hCMV)主要立即早期(MIE)启动子/增强子 25 组合。

 本发明的启动子最好是组织特异性的。亦即它们能够驱动 ScFv Ab 编码核苷酸序列在一种组织中转录, 而在其它组织类型中基本上保持“沉默”。

术语“组织特异性”是指这样的启动子，所述启动子的活性被限于单一的组织类型，但是虽然如此，它也可表现出选择性，因为它们可以在一类组织中有活性，而在另一类组织中活性较低或沉默。本发明启动子的一个理想的特征是，它们在缺乏被激活的低氧调节型增强子元件的情况下，甚至在靶组织中，也具有相对低的活性。达到这一点的一种方法是运用“沉默子”元件，所述元件在缺乏低氧的情况下抑制所选定启动子的活性。

术语“低氧”是指特定器官或组织接受的氧供应不足的条件。

所述 ScFv Ab 编码核苷酸序列在特定启动子控制之下的表达水平，可以通过操作所述启动子区来加以调节。例如，启动子区内的不同结构域可能具有不同的基因调节活性。通常采用具有缺失特定区的所述启动子的不同变异体的载体构建体，来评估这些不同区的作用(亦即缺失分析)。这种方法可以用来鉴定例如能够提供组织特异性的最小区或提供低氧敏感性的最小区。

多种上述组织特异性启动子在实施本发明中可能特别有利。在大多数情况下，这些启动子可以作为便利的适合于在选定载体中克隆的限制性消化片段来分离。或者，可以用聚合酶链式反应来分离启动子片段。通过在引物的 5'端加入限制性位点，可以便于扩增片段的克隆。

20 诱导型启动子

本发明的启动子也可以是对特定刺激物应答的启动子，例如结合类固醇激素受体的启动子。也可以使用病毒启动子，例如莫洛尼鼠类白血病病毒长末端重复(MMLV LTR)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV) LTR 启动子或人巨细胞病毒(CMV) IE 启动子。

25 也可以最好是所述启动子是诱导型启动子，使得可以在所述细胞的生存期内调节异源基因的表达水平。诱导型是指采用可以被调节的启动子获得的表达水平。

增强子

另外，通过添加其它调节序列，例如增强子序列，可以对这些启动子中的任一种进行修饰。也可以使用包含来自两种或更多种上述不同启动子的序列元件的嵌合启动子。

- 5 术语“增强子”包括与转录起始复合物的其它蛋白组分结合并因此促进其相关启动子所指导的转录起始的 DNA 序列。

本发明 ScFv Ab 的体外/体内/离体表达可以与感兴趣的蛋白(POI)或编码其的感兴趣的核苷酸序列(NOI)联合使用。

10 与 POI/NOI 组合

- 本发明的 ScFv Ab 或编码其的核苷酸序列可以直接与 POI (例如为前体药物活化酶)联合使用，或通过载体传递至例如靶细胞或靶组织，与 POI 联合使用。不在靶组织中选择性表达，或者除外在靶组织中选择性表达外，本发明的 ScFv Ab 或编码其的核苷酸序列可以与另
- 15 外的 POI (例如一种或多种前体药物活化酶)或编码一种或多种前体药物活化酶的一种或多种感兴趣的核苷酸序列(NOI)联合使用。这些前体药物活化酶可以直至用所述合适的前体药物酶所作用的一种或多种前体药物治疗所述个体时才具有显著的效应或无有害效应。在存在所述活性 POI 或编码其的 NOI 的情况下，用所述合适的前体药物治疗个
- 20 体，可能导致增强病症的减轻，例如肿瘤生长减弱或生存率降低。

前体药物 POI

- 可以将 POI (例如前体药物活化酶)传递至患病部位，例如传递至肿瘤部位以治疗癌症。在所有情况下，联合使用合适的前体药物与合
- 25 适的前体药物活化酶，来治疗所述患者。合适的前体药物可以与所述 ScFv Ab 或包含编码 ScFv Ab 的核苷酸序列的载体一起给予。前体药物的实例包括：磷酸依托泊苷(与碱性磷酸酶，Senter 等 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 4842-4846); 5-氟胞嘧啶(与胞嘧啶脱氨酶，Mullen 等 1994

Cancer Res 54: 1503-1506); 多柔比星-N-对羟基苯氧基乙酰胺(与青霉素 V 酰胺酶, Kerr 等 1990 Cancer Immunol Immunother 31: 202-206); 对 N-双(2-氯乙基)氨基苯甲酰谷氨酸(与羧肽酶 G2); 头孢菌素氮芥氨基甲酸盐(与 β -内酰胺酶); SR4233 (与 P450 还原酶); 更昔洛韦(与 HSV 胸苷激酶, Borrelli 等 1998 Proc Natl Acad Sci 85: 7572-7576); 氮芥前体药物与硝基还原酶(Friedlos 等 1997 J Med Chem 40: 1270-1275)和环磷酰胺(与 P450, Chen 等 1996 Cancer Res 56: 1331-1340)。

用于本发明的合适前体药物活化酶的实例包括: 胸苷磷酸化酶, 它激活 5-氟尿嘧啶前体药物 capcetabine 和 furtulon; 得自单纯疱疹病毒的胸苷激酶, 它激活更昔洛韦; 细胞色素 P450, 它将例如环磷酰胺的前体药物激活为 DNA 损害剂; 和胞嘧啶脱氨酶, 它激活 5-氟胞嘧啶。最好使用来源于人类的前体药物活化酶。

POI 和 NOI

用于本发明中的其它合适的感兴趣的蛋白(POI)或编码其的 NOI 包括具有治疗用途和/或诊断用途的那些 POI 和 NOI, 例如但不限于编码以下分子的序列: 细胞因子、趋化因子、激素、抗体、工程免疫球蛋白样分子、单链抗体、融合蛋白、酶、免疫共同刺激分子、免疫调节分子、反义 RNA、靶蛋白的反式显性失活(transdominant negative)突变体、毒素、条件毒素、抗原、肿瘤抑制蛋白和生长因子、膜蛋白、血管活性蛋白和肽、抗病毒蛋白和核酶以及它们的衍生物(例如具有相关报道基团)。当包括所述 POI 或编码其的 NOI 时, 所述 POI 或 NOI 可以通常与合适的启动子有效连接, 所述启动子可以是在一种或多种特定细胞类型中驱动核酶表达的启动子、或一个或多个不同的启动子。

旁观者效应

所述 POI 和/或编码其的 NOI 可以从细胞分泌的蛋白质。或者,

所述 POI 表达产物不是分泌型的，而是在所述细胞内有活性。在任何一种情况下，所述 POI 表达产物都最好表现出旁观者效应或远距离旁观者效应；也就是说，在一个细胞中产生所述表达产物，导致杀伤具有一种共同表型的其它相关细胞，所述相关细胞或者是相邻的，或者是远离的(例如转移的)。

在本发明中用于治疗或预防癌症的合适 POI 或编码其的 NOI 包括以下蛋白质：破坏靶细胞的蛋白质(例如核糖体毒素)，用作：肿瘤抑制物(例如野生型 p53)；抗肿瘤免疫机制的激活物(例如细胞因子、共同刺激分子和免疫球蛋白)；血管生成的抑制剂；或提供增强药物敏感性的蛋白质(例如前体药物活化酶)；间接刺激天然效应细胞破坏靶细胞的蛋白质(例如刺激免疫系统的强抗原或将前体物质转化为破坏靶细胞的毒性物质的蛋白质(例如前体药物活化酶)。所编码的蛋白质也可以破坏旁观者肿瘤细胞(例如用分泌型抗肿瘤抗体-核糖体毒素融合蛋白)、间接刺激对旁观者肿瘤细胞的破坏(例如刺激免疫系统的细胞因子或引起局部血管闭合的前凝血素蛋白或将前体物质转化为破坏旁观者肿瘤细胞的毒性物质(例如将前体药物激活为可扩散药物的酶)。

此外，也可传递编码反义转录物或核酶的 NOI，而所述反义转录物或核酶是干扰有关肿瘤持续性的细胞基因的表达的反应转录物或核酶(例如针对伯基特氏淋巴瘤中的异常 *myc* 转录物或针对慢性髓细胞性白血病中的 *bcr-abl* 转录物)。也设计了应用这类 POI 和/或编码其的 NOI 的组合。

在 PCT/GB95/00322 (WO-A-9521927)中可以找到低氧可调节治疗性 NOI 的实例。

25 ScFv Ab 的偶联

可以采用标准方法，将本发明的 ScFv Ab 与其它分子偶联。ScFv Ab 的氨基末端和羧基末端可以用许多技术进行同位素标记和非同位素标记，例如用常规技术进行放射性标记(酪氨酸残基 - 氯胺 T、

iodogen、乳过氧化物酶；赖氨酸残基 - Bolton-Hunter 试剂)。这些偶联技术是本领域技术人员众所周知的。根据所述氨基酸上可利用的官能团，包括但不限于氨基、巯基、羧基、酰胺、酚和咪唑，来选择偶联技术。用来实现这些偶联的各种试剂其中包括戊二醛、重氮化联苯胺、
5 碳二亚胺和对苯醌。

化学偶联

可以将本发明的 ScFv Ab 与同位素、酶、载体蛋白、细胞毒性剂、荧光分子、放射性核素(radioactive nucleotides)或用于各种各样应用(包
10 括但不限于成象/预后、诊断和/或治疗)的其它化合物化学偶联。采用适合于特定反应的不同技术，测定偶联反应的效率。例如，用氯胺 T 和具有高比活的 Na^{125}I ，完成用 ^{125}I 对 ScFv Ab 肽进行放射性标记。用焦亚硫酸钠终止反应，混合物在一次性柱上脱盐。从该柱上洗脱标记的肽，收集各流分。从每个流分取出等份样品，并在 γ 计数器上测量放
15 射性。这样，将未反应的 Na^{125}I 与标记的 ScFv Ab 分离开。贮存具有最高比放射性的肽部分，以供随后的应用，例如分析与 ScFv Ab 结合的能力。

成象

20 用短寿同位素标记的本发明 ScFv Ab 的应用，使得可以用放射自显影技术或现代放射照相技术或其它膜结合技术(例如正电子发射断层摄影术)来定位具有 ScFv Ab 结合部位的肿瘤，在体内对 DAM 结合部位进行目测定量。这种应用提供了重要的诊断和/或预后研究的工具。

25

缀合物

在其它实施方案中，将本发明的 ScFv Ab 与以下物质偶联：闪烁照相放射性标记、细胞毒性化合物或放射性同位素、将非毒性前体药

物转化为细胞毒性药物的酶、激活免疫系统以将所得缀合物靶向患病部位(例如结肠肿瘤)的化合物、或刺激细胞的化合物。这类缀合物具有：一个“结合部分”，该部分由本发明的 ScFv Ab 组成；和一个“功能部分”，该部分由所述放射性标记、毒素或酶组成。可以合成不同的 ScFv Ab，以用于几种应用，包括但不限于将 ScFv Ab 与细胞毒性剂连接，以定向杀伤结合所述 ScFv Ab 的细胞。

或者，可以单独使用所述 ScFv Ab，以便仅仅阻断所述 DAM 的活性，特别是通过物理干扰所述 DAM 与另一化合物的结合。

通过交联多肽的任一常规方法，例如在 O'Sullivan 等(Anal. Biochem 1979: 100, 100-108)中全面描述的方法，将所述缀合物(如果也是肽或多肽的话)的结合部分和功能部分连接在一起。例如，一个部分可能富含巯基，而另一个部分与能够与那些巯基反应的双官能剂(例如碘乙酸的 N-羧基琥珀酰亚胺酯(NHIA)或 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯(SPDP))反应。例如用间马来酰亚胺基苯甲酰-N-羧基琥珀酰亚胺酯得到的酰胺键和硫醚键，一般在体内比二硫键更稳定。

另一方面，如果所述结合部分含有糖类，例如可能是抗体或某些抗体片段的情况，可以采用 EP 0 088 695 中的连接技术，将所述功能部分通过所述糖部分连接。

所述缀合物的功能部分可以是非毒性前体药物转化为毒性药物的酶，例如 Bagshawe 及其同事的缀合物(Bagshawe (1987) Br. J. Cancer 56, 531; Bagshawe 等(Br. J. Cancer 1988: 58, 700); WO 88/07378)或氰化物释放系统(WO 91/11201)。

可能不必整个酶都存在于所述缀合物中，但是当然，催化部分必须存在。可以使用所谓的“抗体酶”，其中针对参与人们所希望催化的反应的化合物(通常为反应性中间体状态)，产生 ScFv Ab。然后，所得的抗体可以用作该反应的酶。

所述缀合物可以通过大小排阻层析或亲和层析来纯化，并且测试双重生物学活性。可以运用酶联免疫吸附测定(ELISA)，用固定化抗

原，在活细胞放射免疫测定中，测量抗原免疫反应性。对于 β -葡萄糖苷酶而言，可以使用酶测定，使用当葡萄糖残基被水解时改变吸光度的底物，例如 oNPG (邻硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷)，被水解时释放 2-硝基苯酚，后者在 405 nm 下用分光光度计测量。

- 5 通过 在血清中于 37℃ 保温，然后通过大小排阻 FPLC 分析，可以初步体外测试所述缀合物的稳定性。可以通过在注射所述缀合物后不同时间分析血清，以相同的方式在小鼠中测试体内稳定性。另外，在缀合之前，用 ^{125}I 对所述 ScFv Ab 进行放射性标记，而用 ^{131}I 标记所述酶，并且测定小鼠体内所述缀合物、游离 ScFv Ab 和游离酶的生物分
- 10 布，这也是可行的。

另一方面，可以通过重组 DNA 技术，将所述缀合物作为融合化合物产生，从而一段 DNA 包含编码所述缀合物两个部分的相应区，所述相应的区或者相互邻近，或者被一个编码不破坏所述缀合物的所需特性的接头肽的区隔开。

- 15 可以想象，所述化合物的两个功能部分可以完全重叠或部分重叠。然后，用已知方式，使所述 DNA 在合适的宿主中表达。

诊断试剂盒

- 20 本发明也包括用于检测和测量生物体液和组织中 DAM 以及将组织中 DAM 定位的诊断方法和试剂盒。可以使用具有高结合特异性的本发明 ScFv Ab，来建立易于使用的试剂盒，以快速、可靠、灵敏和特异性地测量和定位血浆、尿、组织的提取物中和细胞培养基中的 DAM。本发明的 ScFv Ab 也可以用于诊断方法和试剂盒中，以允许测定循环 DAM，而在某些情况下，循环 DAM 又可以指示疾病状态的发展，例如原位原发性肿瘤的微转移瘤的播散。
- 25

这些试剂盒可以包括但不限于以下技术：竞争性测定和非竞争性测定、放射免疫测定、生物发光测定和化学发光测定、荧光测定、夹层测定、免疫放射分析、斑点印迹测定、酶联测定包括 ELISA、微量

滴定板、用于快速监测尿液或血液的抗体包被纸条或浸棒(dipstick)、以及免疫细胞化学。对于每种试剂盒而言,确定了所述测定的范围、灵敏度、精度、可靠性、特异性和再现性。位移或活性标准曲线上,测定内和测定间差异确定在 20%、50%和 80%点上。

- 5 通常用于研究和临床的测定试剂盒的一个实例是放射免疫测定(RIA)试剂盒。在成功地放射碘化和纯化 ScFv Ab 后,将几个稀释度的具有最高效价的抗血清加入在合适的缓冲体系中含有相对恒定量的放射性(例如 10,000 cpm)的试管中。其它试管含有缓冲液或免疫前血清,以测定非特异性结合。在于 4℃保温 24 小时后,加入 A 蛋白,将试管
- 10 涡旋混合,于室温保温 90 分钟,然后于 4℃以约 2000-2500 × g 离心,以沉淀与标记 ScFv Ab 结合的抗血清的复合物。通过吸取取出上清液,在γ计数器中对沉淀中的放射性进行计数。进一步鉴定在减去非特异性结合之后结合约 10-40%标记 ScFv Ab 的抗血清稀释度。

15 免疫组织化学

- 免疫组织化学试剂盒也可以用来对组织和细胞中 DAM 进行定位。这种免疫组织化学试剂盒提供说明、一种 ScFv Ab 以及可能的阻断性血清和第二抗血清,所述第二抗血清与荧光分子(例如异硫氰酸荧光素)连接,或与用来显现第一抗血清的某些其它试剂连接。免疫组织化学
- 20 技术是本领域技术人众所周知的。这种免疫组织化学试剂盒允许用光学显微镜以及电子显微镜,将组织切片和培养的细胞中 DAM 定位。它即可用于研究又可用于临床。例如,可以对肿瘤进行活组织检查或收集肿瘤,用切片机切组织切片,以检查 DAM 产生的部位。这种信息对于诊断以及可能的治疗目的而言,可用于检测和治疗诸如癌症的
- 25 疾病。

胎儿细胞分析

本发明的 ScFv 抗体和/或犬 5T4 序列也可用于从母体血液中分离

胎儿细胞的方法中。已经建议从母体血液中分离胎儿细胞，作为替代 aminocentesis 的非侵入性方法(参见 WO 97/30354)。

在本发明的该实施方案中，所述 DAM 可以是在母体细胞和胎儿细胞上以不同水平表达的任何分子。所述 DAM 最好是仅在胎儿细胞上表达。已知 5T4 在滋养层上以非常高的水平表达。因而，抗 5T4 的抗体可以用来从母体血液中分离滋养层。所述抗体可以是例如按照本发明的 ScFv、或是对不同物种的 5T4 多肽特异性的(例如针对其产生的)抗体。

因此，本发明也提供一种方法，采用本发明的 ScFv 抗体或来自不同物种的抗 5T4 抗体，从母体血液中分离胎儿细胞。本发明的犬 5T4 多肽可用来产生这类交叉反应性抗体。

所述胎儿细胞可以是例如滋养层或红细胞。

母体细胞/胎儿细胞可以来自人类或动物。因而，本发明的方法可以用于医学或兽医学应用。在一个优选实施方案中，母亲和胎儿是非人类的，因而所述分离方法是兽医学应用的一部分。

所述分离方法可以构成诊断方法的一部分。例如，然后可以使胎儿细胞经过生物化学取样或遗传学取样。这样一种方法应该用来测试胎儿异常(例如唐氏综合征)或用来检测胎儿的性别。

20 联合治疗

本发明的 ScFv Ab 可以与用于治疗疾病的其它组合物和方法联合使用。作为实例，所述 ScFv Ab 也可以与疾病(诸如癌症)的常规疗法联合使用。作为另一实例，可以用常规外科、放射疗法或化学疗法联合 ScFv Ab 来治疗肿瘤，或者可以随后将 ScFv Ab 给予所述患者，以延长微转移瘤休眠时间，并且稳定任何残留的原发性肿瘤。

ScFv Ab 的传递

可以将所述 ScFv Ab 与治疗有效药物在同一时间传递至同一部

位。或者，可以将所述 ScFv Ab 与所述治疗有效药物在不同时间传递至不同的部位。所述 ScFv Ab 和所述治疗有效药物甚至可以在同一传递载体内传递，以预防和/或治疗病症，例如癌症。

5 基于应用所述 ScFv Ab 的治疗策略包括：通过运用 DAM 反应性 ScFv Ab 片段与细菌超抗原葡萄球菌肠毒素(Dohlsten 等 1994)的融合体，或通过运用针对 DAM 和 T 细胞 CD3 抗原两者的双特异性抗体(Kroesen 等 1994)，募集和激活 T 细胞。抗 DAM 抗体也可以与不同的细菌毒素缀合，以产生有效的免疫毒素(LeMaistre 等 1987; Zimmermann 等 1997)。ScFv Ab 可以与细胞毒性药物联合使用，以预防和/或治疗疾病状态，例如血管生成和/或癌症。与 ScFv Ab 连接的细胞毒性药物(例如蓖麻毒蛋白)可以为破坏结合所述 ScFv Ab 的细胞提供工具。这些细胞可以在许多位置找到，包括但不限于微转移瘤和原发性肿瘤。

筛选

15 本发明的 ScFv Ab 或其衍生物或同源物和/或表达本发明 ScFv Ab 或其衍生物或同源物的细胞系，可以用来筛选能够影响所述 ScFv Ab 结合特异性的因子(例如肽、有机或无机分子)。

在一个实施方案中，本发明的筛选可以鉴定出本发明 ScFv Ab 的激动剂和/或拮抗剂。

20 在另一实施方案中，本发明的 ScFv Ab 可以用于各种各样的药物筛选技术中。用于这种试验的 ScFv Ab 可以游离于溶液中、固定于固相支持体上、载于细胞表面或位于细胞内。可以测量 ScFv Ab 结合特异性的消失或所述 ScFv Ab 和所述待测因子之间结合复合物的形成。

用于筛选的另一技术可供用于对所述 ScFv Ab 具有适当结合亲和性的药物的高通量筛选(HTS)，并且基于 WO 84/03564 中详细描述的方法。

可以预期，本发明的测定方法将既适合于试验化合物的小规模和大规模筛选，也适合于定量测定

噬菌体展示筛选

噬菌体展示可以用于鉴定因子，例如可被本发明 ScFv Ab 接合的因子，例如 DAM。噬菌体展示是一种利用重组噬菌体的分子筛选方案。所述技术涉及用编码能够与靶 ScFv Ab 反应的合适配体(例如候选 DAM)的核苷酸序列(或其衍生物或同源物)转化噬菌体，或用编码靶 ScFv Ab 的核苷酸序列(或其衍生物或同源物)转化噬菌体。所述转化噬菌体(它最好被束缚于固相支持体)表达所述合适的配体(例如所述候选因子)，并且在其噬菌体外壳上展示所述配体。分离并扩增带有识别所述候选 DAM 的靶 ScFv Ab 分子的一种或多种实体(例如细胞)。然后鉴定成功的候选的 DAM。

用本发明的 ScFv Ab 靶向表达 DAM 的细胞，便于开发 ScFv Ab 以调节表达所述 DAM 的细胞的活性。

在本发明的另一个实施方案中，可以用 ScFv Ab 文库来筛选针对特定 DAM 的抗体。作为实例，可以用编码能够与靶 DAM 反应的合适配体(例如候选 ScFv Ab)的核苷酸序列(或其衍生物或同源物)，或用编码靶 DAM 的核苷酸序列(或其衍生物或同源物)，转化噬菌体。所述转化噬菌体(它最好被束缚于固相支持体)表达所述合适的配体(例如所述候选 ScFv Ab)，并且在其噬菌体外壳上展示所述配体。分离并扩增带有识别所述候选 ScFv Ab 的靶 DAM 分子的一种或多种实体(例如细胞)。然后鉴定成功的候选的 ScFv Ab。

作为另一实例，通过将合成的重链和轻链可变区(VH 和 VL)从 lox 文库载体重新克隆到噬菌粒载体 pHEN2 中，已经构建了称为“Griffin-1 文库”的人类 ScFv 片段文库。对于洗脱方法和筛选方法的修改，导致成功地筛选出针对各种各样 DAM 的 ScFv 抗体的噬菌体展示文库(参见 de Bruin 等 1999, Nature Biotechnology 17: 397-399)。

噬菌体展示优于标准亲和配体筛选技术。噬菌体表面以三维构型展示出所述候选因子，更加非常类似其天然存在的构象。这提供特异性更强且亲和性更高的结合，以用于筛选。

用于模拟物的测定

使用噬菌体展示来正鉴定或者 DAM 或者 ScFv Ab, 可能便于应用组合文库来鉴定能够以相同或相似方式起作用的模拟物。这类模拟物可以单独给予, 或与用于治疗与本发明的 DAM 相关的疾病的其它治疗剂联合给予。

剂量

本发明 ScFv Ab 的剂量将取决于待治疗的疾病状态或病症以及其它临床因素, 例如所述病人或动物的体重和病症以及所述化合物的给药途径。根据所述 ScFv Ab 在特定动物或人体内的半寿期, 可以将所述 ScFv Ab 每日给予数次至每周给予一次。应该理解, 本发明既应用于人类, 也应用于兽医学。本发明的方法考虑到一次给药以及多次给药, 或者同时给予, 或者在延长的时间内给予。

制剂

适合于胃肠外给予的制剂包括: 水性和非水无菌注射液, 所述注射液可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使所述制剂与计划的受体的血液等渗的溶质; 和水性和非水无菌悬浮液, 所述悬浮液可以包括悬浮剂和增稠剂。所述制剂可以存在于单位剂量容器, 或存在于多剂量的容器中, 例如密封的安瓿和管形瓶中, 并且可以贮存于冷冻干燥(冻干)条件下, 仅需要在加入无菌液体载体例如注射用水之后立即使用。临时配制的注射液和悬浮液可以由无菌粉剂、颗粒剂和先前描述过的各种片剂来制备。

本发明的 ScFv Ab 可以有效地预防和/或治疗疾病, 例如癌症相关疾病。本发明包括用有效量的本发明 ScFv Ab 治疗疾病(例如癌症相关疾病)的方法。本发明的 ScFv Ab 可以用本领域技术人员已知的配制方法, 在药学上可接受的组合物中作为合成肽或者作为经分离并且基本纯化的蛋白质或蛋白片段或者它们的组合来提供。这些组合物可以通

5 过标准途径给予。这些包括但不限于：经口、直肠、眼(包括玻璃体内或眼房内)、鼻、局部(包括颊和舌下)、子宫内、阴道或胃肠外(包括皮下、腹膜内、肌内、静脉内、皮内、颅内、气管内和硬膜外)、经皮、腹膜内、颅内、脑室内、脑内、阴道内、子宫内或胃肠外(例如静脉内、脊柱内、皮下或肌内)途径。

10 所述 ScFv Ab 制剂可以方便地以单位剂型存在，可以用常规制药学技术来制备。这类技术包括使所述有效成分与所述药用载体或赋形剂结合的步骤。一般而言，通过使所述有效成分与液体载体或细碎的固体载体或这两者均匀地紧密结合，然后如有必要，使所述制品成型，来制备所述制剂。

15 另外，可以将本发明的 ScFv Ab 加入到生物可降解聚合物中，提供所述化合物的持续释放，将所述聚合物植入需要药物传递的部位的附近，例如肿瘤部位，或将其植入，使得系统缓释所述 ScFv Ab。所述生物可降解聚合物及其应用详细描述于例如 Brem 等(J. Neurosurg 1991 74:441-446)。渗透微量泵也可以用来通过插管达到将高浓度 ScFv Ab 控释到感兴趣部位中，例如直接释放到转移瘤生长部位或所述肿瘤的血管供应部位中。

20 本发明的 ScFv Ab 可以与细胞毒性剂连接，将其以设计用以将传递到所需位置的传递最大化的方式注入。例如，通过插管将蓖麻毒蛋白连接的高亲和性 ScFv Ab 传递到供应靶部位的血管中，或直接传递到所述靶中。这类药剂也可以通过与输注插管连接的渗透泵以受控方式传递。

25 优选的单位剂量制剂是含有如上文引述的一个日剂量或单位、每日分次剂量的所述给予的组分或其合适的部分。应该理解，除所述组分尤其是上述组分外，本发明的制剂可以包括本领域关于上述制剂类型中常规的其它药剂。

所述 ScFv Ab 缀合物可以以任何合适的方式给予，通常胃肠外给予，例如静脉内或腹膜内给予，以稀释剂和载体的标准无菌无热原制

剂例如等渗盐水(当静脉内给予时)给予。一旦所述 ScFv Ab 缀合物与所述靶细胞结合并且从血流中被清除(如有必要) (这通常需要一天左右)后, 立即给予所述前体药物, 通常以单次输注剂量给予, 或者对所述肿瘤成象。如果需要, 由于所述 ScFv Ab 缀合物可能具有免疫原性, 5 因而可以给予环孢菌素或某些其它免疫抑制剂, 以提供较长的治疗时期, 但通常这不是必不可少的。

可以以常规方式优化给予所述 ScFv Ab 缀合物和前体药物之间的时间, 因为缀合物的患病组织/正常组织之比(至少在静脉内传递之后)在约 4-6 天后最高, 而此时根据每克注射剂量的百分率而论, 与 DAM 10 结合的缀合物的绝对量低于较早的时间。

因此, 给予所述 ScFv Ab 缀合物和给予所述前体药物之间的最佳间隔将是患病部位所述酶的峰浓度和患病组织与正常组织之间最佳分布比率之间的折衷。所述 ScFv Ab 缀合物的剂量将由医师根据通常的标准来选择。至少就使用所靶向的酶(例如 β -葡萄糖苷酶)和利用静脉内苦杏仁苷作为毒性前体药物的方法而论, 每平方米机体表面积 0.1-10.0 15 克、优选 1.0-5.0 g/m² 的 1-50 个日剂量可能是合适的。对于口服疗法, 每日三剂 0.05-10.0 g、优选 1.0-5.0 g、给予 1-50 天可能是合适的。同样将根据正常的标准, 特别是参考疾病的类型、阶段和患病组织的位置以及患者的体重, 选择所述 ScFv Ab 缀合物的剂量。治疗持续时间 20 将部分取决于对所述 ScFv Ab 缀合物的任何免疫反应的速度和程度。

当将所述 ScFv Ab 缀合物用于诊断时, 所述 ScFv Ab 缀合物的功能部分通常包含以下原子或标记或可以由其组成: 用于闪烁照相研究的放射性原子, 例如锝 99m (^{99m}Tc)或碘-123 (¹²³I)); 或用于核磁共振 (nmr)成象(也称为磁共振成象, mri)的自旋标记物, 例如又是碘-123、 25 碘-313、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

当用于选择性破坏例如肿瘤的化合物中时, 所述 ScFv Ab 的功能部分可以包含发射足够能量以破坏相邻细胞的高放射性原子(例如碘-131、铯-136、铯-137、钷-147或钋-212)或细胞毒性化合物(例如氮甲蝶

吟、多柔比星、长春花生物碱(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、柔红霉素或其它嵌入剂)。

可以以已知方式，将放射标记或其它标记掺入所述 ScFv Ab 缀合物中。例如，可以生物合成所述肽，或者可以通过化学氨基酸合成，
5 采用例如涉及用氟-19 取代氢的合适的氨基酸前体合成所肽。例如 ^{99m}Tc 、 ^{123}I 、 ^{186}Rh 、 ^{188}Rh 和 ^{111}In 的标记，可以通过所述肽中的半胱氨酸残基连接。钇-90 可以通过赖氨酸残基连接。IODOGEN 法(Fraker 等(1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57)可以用来掺入碘-123。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”(Chatal, CRC Press
10 1989)详细描述了其它方法。

药用组合物

一方面，本发明提供药用组合物，所述药用组合物包含一种按照本发明的 ScFv Ab 和任选的一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂(包括它们的组合)。
15

所述药用组合物可以在人类医学和兽医学方面用于人类或动物，并且通常包含任何一种或多种药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。用于治疗应用的可接受的载体或稀释剂是制药领域众所周知的，并且描述于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack
20 Publishing Co. (A. R. Gennaro 编著 1985)。药用载体、赋形剂或稀释剂的选择可以根据计划的给药途径和标准制药实践来进行。所述药用组合物可以包含作为载体、赋形剂或稀释剂的任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂，或除载体、赋形剂或稀释剂外，还包含上述试剂。

25 在所述药用组合物中可以提供防腐剂、稳定剂、染料和甚至调味剂。防腐剂的实例包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。也可以使用抗氧化剂和悬浮剂。

根据不同的传递系统，可能有不同的组合物/制剂要求。作为实

例，本发明的药用组合物可以配制为采用微量泵传递，或通过粘膜途径传递，例如作为用于吸入的鼻用喷雾剂或气雾剂或可摄入溶液，或通过胃肠外给予，其中所述组合物配制成注射剂形式用于传递，例如通过静脉内、肌肉或皮下途径。或者，可以设计所述制剂通过两种途径传递。

在将所述药用组合物通过胃肠粘膜经粘膜传递的情况下，它应该能够在通过胃肠道传递期间保持稳定；例如，它应该抗蛋白水解降解，于酸性 pH 下稳定，并且抗胆汁的去垢剂效应。

合适时，所述药用组合物可以通过以下途径给予：吸入；以栓剂或阴道栓的形式；局部给药，以洗剂、溶液、乳膏、软膏或扑粉的形式；利用皮肤贴剂；口服，以含有赋形剂(例如淀粉或乳糖或白垩粉)的片剂、或以或者单独或者与赋形剂混合的胶囊或卵状体、或以含有调味剂和着色剂的酏剂、溶液或注射悬浮液的形式；或者所述药用组合物可以胃肠外注射，例如静脉内，肌肉或皮下注射。对于胃肠外给予，所述组合物可能最好以无菌水溶液的形式使用，它们可以含有其它物质，例如足够的盐和单糖，以使得所述溶液与血液等渗。对于口腔含化或舌下给药而言，所述组合物可以以用常规方法配制的片剂或锭剂形式给予。

给药

通常，医师将确定最适于个别受治疗者的实际剂量，这将随所述特定患者的年龄、体重和反应以及病症的严重程度而变化。以下剂量是一般情况的示例。当然，有剂量范围更高或更低的个别情况。

本发明的组合物(或其组分)可以经口给予。另外或在一个可供选择的方法中，可以通过直接注射，给予本发明的组合物(或其组分)。另外或在一个可供选择的方法中，可以局部给予本发明的组合物(或其组分)。另外或在一个可供选择的方法中，可以通过吸入给予本发明的组合物(或其组分)。另外或在一个可供选择的方法中，也可以通过以

下给药方法中的一种或多种给予本发明的组合物(或其组分): 胃肠外、粘膜、肌肉、静脉内、皮下、眼内或经皮给药, 并且配制用于这种给药。

5 作为另一实例, 本发明的药用组合物可以按照每日 1-10 次、例如每日一次或每日两次的方案给予。对于任何特定患者的具体的剂量水平和给药频率可以改变, 并且将取决于多种因素, 包括所用具体化合物的活性、该化合物的代谢稳定性和作用时间、年龄、体重、一般健康状况、性别、饮食、给药模式和时间、排泄速率、药物组合、具体病症的严重程度和宿主正经历的治疗。

10 术语“给予”也包括但不限于通过粘膜途径传递, 例如作为用于吸入的鼻用喷雾剂或气雾剂、或作为可摄入溶液传递; 经胃肠外途径传递, 其中以注射液形式传递, 例如静脉内、肌肉或皮下途径传递。

因此, 本发明的药用组合物可以通过以下的一种或多种途径给予: 口服、注射(例如直接注射)、局部、吸入、胃肠外给药、粘膜给
15 药、肌肉给药、静脉内给药、皮下给药、眼内给药或经皮给药。

疾病

包含有效量的 ScFv Ab 和/或编码 ScFv Ab 的 NOI 的药用组合物, 可以用于治疗疾病, 例如 WO-A-98/09985 中列出的那些疾病。为了易于参考, 现在提供该表的一部分: 巨噬细胞抑制活性和/或 T 细胞抑制活性和因此产生的抗炎活性; 抗免疫活性, 即针对细胞免疫应答和/或
20 体液免疫应答(包括与炎症不相关的应答)的抑制效应; 与病毒和/或其它细胞内病原体相关的疾病; 抑制巨噬细胞和 T 细胞粘着于胞外基质组分和纤连蛋白以及抑制被正调节的 T 细胞中 fas 受体表达的能力;
25 抑制不希望有的免疫反应和炎症, 包括: 关节炎包括类风湿性关节炎, 与过敏反应、变态反应、哮喘、系统性红斑狼疮、胶原病和其它自身免疫病相关的炎症, 与动脉粥样硬化、动脉硬化、动脉粥样硬化性心脏病、再灌注损伤、心搏停止、心肌梗塞、血管炎症、呼吸窘迫综合

征或其它心肺疾病相关的炎症,与以下疾病相关的炎症:消化性溃疡、
溃疡性结肠炎和其它胃肠道疾病,肝纤维变性、肝硬化或其它肝病、
甲状腺炎或其它腺体疾病、肾小球肾炎或其它肾病和泌尿科疾病、耳
5 炎或其它耳鼻喉疾病、皮炎或其它皮肤病、牙周病或其它牙科疾病、
睾丸炎或睾丸附睾炎、不育症、睾丸创伤或其它免疫相关的睾丸疾病、
胎盘功能障碍、胎盘机能不全、习惯性流产、子痫、先兆子痫和其它
免疫和/或炎症相关妇科疾病、后色素层炎、中间眼色素层炎、前眼色
素层炎、结膜炎、脉络膜视网膜病、眼色素层视网膜病、视神经炎、
10 眼内炎症(例如视网膜炎或囊样黄斑水肿)、交感性眼炎、巩膜炎、色
素性视网膜炎,抑制变性性 fundus 疾病的免疫和炎性组分,抑制以下
的炎性组分:眼部创伤、由感染所致的眼部炎症、增生性玻璃体视网
膜病、急性局部缺血视神经病、过度瘢痕形成(例如在青光眼过滤手术
之后)、针对眼移植物和其它免疫和炎症相关眼病的免疫反应和/或炎症
15 反应、与自身免疫病或免疫和/或炎症抑制可能有益的中枢神经系统
(CNS)或任何其它器官中的病症或疾病相关的炎症、帕金森病、由于治
疗帕金森病引起的并发症和/或副作用、AIDS 相关性痴呆、复合 HIV
相关脑病、德维克病、Sydenham 舞蹈病、老年性痴呆和其它变性性疾
病、CNS 病症或疾病,抑制中风、小儿麻痹症后综合征的炎性组分,
20 抑制以下的疾病的免疫和炎性组分:精神病、脊髓炎、脑炎、亚急性
硬化性全脑炎、脑脊髓炎、急性神经病、亚急性神经病、慢性神经病、
Guillain-Barre 综合征、Sydenham 舞蹈病、重症肌无力、脑假瘤、唐氏
综合征、亨廷顿舞蹈病、肌萎缩性侧索硬化,抑制 CNS 压迫或 CNS
创伤或 CNS 感染的炎性组分,抑制以下的炎性组分:肌萎缩和肌营养
不良,以及免疫和炎症相关的疾病、中枢神经系统和周围神经系统的
25 病症或疾病、创伤后炎症、败血症性休克、传染病,抑制外科的炎性
并发症或副作用、骨髓移植或其它移植并发症和/或副作用、基因治疗
的炎性和/或免疫性并发症和副作用(例如由于感染病毒载体所致)或与
AIDS 相关的炎症的炎性和/或免疫性并发症和副作用,以压抑或抑制

体液和/或细胞免疫应答,通过减少单核细胞或淋巴细胞的量,治疗或缓解单核细胞或白细胞增生性疾病(例如白血病),用于在移植天然或人工细胞、组织和器官(例如角膜、骨髓、器官、晶状体、起搏器、天然或人工皮肤组织)的情况下预防和/或治疗移植排斥。具体的癌症相关疾病包括但不限于:实体瘤、血传肿瘤(例如白血病);肿瘤转移瘤;良性肿瘤,例如血管瘤、听神经瘤、神经纤维瘤、沙眼和脓性肉芽肿;类风湿性关节炎;牛皮癣;眼血管生成性疾病,例如糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、黄斑变性、角膜移植排斥、新血管性青光眼、晶状体后纤维组织形成、潮红;Osler-Webber 综合征;心肌血管生成;噬斑新血管形成;毛细血管扩张;血友病性关节;血管纤维瘤;伤口肉芽形成;冠状动脉侧支(coromay collaterals);脑动脉侧支(cerebral collaterals);动静脉畸形;局部缺血性肢血管生成;新血管性青光眼;晶状体后纤维组织形成、糖尿病性新血管形成;螺杆菌相关的疾病、骨折、血管发生、血细胞生成、排卵、月经和胎盘形成。

附图

现在仅仅通过实施例进一步描述本发明,其中参考以下附图:

图 1. 显示编码名为 5T4ScFv.1 的 5T4 ScFv 的 DNA 序列(SEQ ID No 5)。提供成熟的分泌型蛋白质的序列(SEQ ID No 1)。

图 2. 显示编码 B7-1.5T4.1 融合蛋白的 DNA 序列(SEQ ID No 7)。也提供 B7-1.5T4.1 融合蛋白的推导氨基酸序列(SEQ ID No 3)。

图 3a. 显示了 B7-1.5T4.1 构建体的图式说明。

图 3b. 显示了 B7-1.5T4.2 构建体的图式说明。

图 4. 显示编码 B7-2.5T4.1 融合蛋白的 DNA 序列(SEQ ID No 9)。也提供 B7-2.5T4.1 融合蛋白的推导氨基酸序列(SEQ ID No 10)。

图 5. 显示 B7-ScFv 的序列(SEQ ID No 11)。

图 6. 显示编码 Ig-5T4 融合蛋白的 DNA 序列(SEQ ID No 8)。也提供 Ig-5T4 融合蛋白的推导氨基酸序列(SEQ ID No 4)。

图 7. 显示 ScFv-IgE 的序列(SEQ ID No 12)。

图 8. 显示 B7-EGF 的序列(SEQ ID No 13)。

图 9. 显示所述 ScFv Ab 在 35 天期间对 Balb/c 小鼠体内 CT26-neo 肿瘤细胞生长的影响。

5 图 10. 显示所述 ScFv Ab 在 35 天期间对 Balb/c 小鼠体内 CT26-h5T4 肿瘤细胞生长的影响。

图 11. 显示所述 ScFv Ab 在 35 天期间对 Balb/c 小鼠体内 B16-neo 肿瘤细胞生长的影响。

10 图 12. 显示所述 ScFv Ab 在 35 天期间对 Balb/c 小鼠体内 B16-h5T4 肿瘤细胞生长的影响。

图 13. 显示 ScFv 构建体。

图 14. 显示 B7-scFv 与 5T4 靶抗原的结合。

图 15. 显示 B7-scFv 与 CTLA4 的结合。

15 图 16. 显示对与单独的 scFv 蛋白或与 scFv-HG1 融合蛋白一起孵育后与山羊抗人 IgG-FITC 标记抗体一起孵育的 A9-5T4 (A)和 A9-neo (5T4 阴性)(B)细胞的 FACS 分析。

图 17. 显示 5T4 scFv-Hy1 ADCC 活性。

图 18. 显示 pONY8.1SM。

图 19. 显示 pONY 8.1SM 中的融合蛋白构建体

20 a. B7-5T4scFv

b. L-5T4scFv

图 20. 显示 pKLink

图 21. 显示 pBSII 中的 scFv 和前导序列

图 22. 显示 pONY8.1SM 中的前导序列-IL-5 scFv

25 图 23. 显示 pONY8.1SM 中的前导序列 HIV-gp120 scFv

图 24. 显示 pAdApt

图 25. 显示 pAdApt 中的融合蛋白构建体

a. B7-5T4scFv

b. L-5T4scFv

图 26. 显示犬 5T4 编码序列

略微更详细地描述:

5 图 14 显示将来自模拟转染的 293T 细胞或用标记的 B7-scFv 构建体转染的 293T 细胞的上清液与 A9 5T4 以及 A9 neo 细胞一起孵育。检测使用 FITC 缀合的 α His 或 α Myc 抗体。

图 15 显示 A9 5T4 和 A9 neo 细胞与单独的所述 ScFv、缺乏 Myc-His 标记的 B7-scFv 构建体或具有所述标记的 B7-scFv 构建体一起孵育。加入 B7.1 配体 CTLA4-Ig, 检测使用 FITC 缀合的 α 小鼠 IgG。

10 图 20 显示 pBluescript II SK (pBS II)中的 pKLink - (Gly₄Ser)₃ 接头。该柔性接头作为两种互补寡核苷酸合成, 将这两种寡核苷酸退火, 产生限制性酶突出端, 然后作为双链寡核苷酸克隆到 pBSII 中。(甘氨酸₄丝氨酸)₃氨基酸翻译以单字母代码显示于 DNA 序列之下。

15 图 21 显示了 PBSII 中的 scFv (例如 IL-5 或 HIV gp120 scFv)和随后添加所述前导序列。在该实施例中, 扩增在 5'端具有额外 *Spe I* 和 *Mfe I* 限制性位点并且在 3'端具有一个额外的 *Age I* 位点的 VH。所述 *Spe I* 和 *Age I* 位点用于克隆到 pKLink 中。扩增在 5'端具有一个额外 *Bam HI* 限制性位点并且在 3'端具有一个额外的 *Eco RI* 位点的 VL, 所述 *Bam HI* 和 *Eco RI* 位点用于克隆到 pKLink 中。前导信号肽作为两种互补寡核苷酸合成, 将这两种寡核苷酸退火产生限制性酶突出端, 然后作为双链寡核苷酸克隆到所述 scFv cDNA 5'端的 *Spe I* 和 *Mfe I* 位点之间。包括 ATG 起始密码子(下划线)的 Kozak 序列以粗体加斜体表示。

20

图 26 显示了犬 5T4 的编码序列。用根据 h5T4 cDNA 制备的探针, 筛选 γ dash 中的杂种基因组文库。鉴定阳性克隆, 并进行测序。

25

实施例

实施例 1 - 5T4 ScFv Ab 的构建和用逆转录病毒载体传递至肿瘤

采用标准技术 (Antibody engineering: a practical approach,

McCafferty 等编著, 1996 OUP), 克隆编码鼠 5T4 单克隆抗体的 cDNA, 并进行测序。可以用所述抗体可变区的序列来构建 ScFv 抗体。5T4 ScFv 的编码序列称为 5T4ScFv.1 (SEQ ID No 1), 示于图 1 中。在这种分子中, 所述 DNA 序列编码来自小鼠 5T4 单克隆抗体的 VH、后接一个 15 个氨基酸的柔性接头和小鼠 5T4 抗体的 VL 区。所述柔性接头编码 3 个拷贝的氨基酸序列 gly-gly-gly-gly-ser, 并且所述重复序列之间的 DNA 序列相似性已被减至最小, 以避免含有所述重复序列的质粒在大肠杆菌中生长时在所述重复序列之间重组的危险。

10 DNA 盒

盒 1 - 翻译起始信号和信号肽

为了达到正确的翻译起始和从哺乳动物细胞中分泌, 使用以下序列:

aagcttCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCT
ACAGGTGTCCACTCC

15 该序列含有一个便利的 *Hind*III 限制性位点(用于克隆到表达载体)(小写)、哺乳动物细胞的共有翻译起始信号(ANNATGPu)和免疫球蛋白基因信号肽序列的编码序列。

盒 2 - scFv

20 图 1 显示了 5T4ScFv.1 的分泌部分的序列。该分子可以以 Vh-(gly₄-ser)₃ 接头-Vl 来表示。

5T4 ScFv2 Ab 由以顺序 Vl-柔性接头 Vh 连接的 5T4 可变区序列构成。在这种情况下, 所述接头编码 20 个氨基酸的肽(gly₄-ser)₄。当所述 V 区区段以这种顺序存在时, 较长的接头改善 ScFv 的装配。(Pluckthun 等, Antibody Engineering: a practical approach, McCafferty 等编著, 1996 OUP)。

5T4 特异性 ScFv 的表达

为了在人类细胞中表达 5T4 特异性 ScFv, 将所述编码序列插入到载体 pCIneo (Promega) 中, 置于强启动子和聚腺苷酸化信号的控制之下。在编码区 5' 端的来自盒 1 的翻译起始信号和免疫球蛋白前导(信号肽)序列, 确保所述 ScFv 从哺乳动物细胞有效地分泌。

实施例 2 - 用编码 ScFv Ab 的表达载体转染巨噬细胞/单核细胞

以实验室规模, 采用标准技术程序(Sandlie 和 Michaelsen 1996, 载于: Antibody engineering: a practical approach. McCafferty 等编著, 第 9 章), 以及以大规模通过淘析法(例如得自 CellPro 的 Cephate), 从人外周血分离外周血单核细胞。通过过夜粘着至塑料上, 富集粘着细胞(基本上是单核细胞), 通过培养粘着细胞达 1-3 周, 可以让细胞沿巨噬细胞分化途径分化。

用能够在人类细胞中表达 ScFv Ab 的表达载体转染单核细胞和巨噬细胞。对于组成型高水平表达, 在利用 hCMV-MIE 启动子-增强子的载体 pCI (Promega) 中表达所述 ScFv Ab。对于低氧诱导型表达, 用含有至少一个 HRE 的启动子取代 hCMV 启动子。一种合适的启动子是具有 3 个拷贝小鼠 PGK HRE 的截短的 HSV TK 启动子(Firth 等, 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 6496-6500)。

可以用各种各样的转染法, 将载体导入单核细胞和巨噬细胞中, 包括粒子介导的 DNA 传递(基因枪)、电穿孔、阳离子剂介导的转染(例如采用 Superfect, Qiagen)。按照生产商的说明, 实施这些方法中的每种, 并且考虑改变所述参数, 以获得各个生产商具体描述的最佳结果。或者, 可以使用病毒载体, 例如缺陷型腺病毒载体(Microbix Inc 或 Quantum Biotechnologies Inc)。

实施例 3 - B7-ScFc 融合蛋白的构建

B7-1 的胞外结构域由天然人 B7-1 蛋白的氨基酸残基 1-215 来限

定。该序列与其信号肽编码序列一起，用来构建分泌型融合蛋白，所述融合蛋白也含有来源于所述 5T4 单克隆抗体的 ScFv。在图 1 中给出了所述 5T4 ScFv 的序列。

5 采用标准分子生物学技术，构建一种 DNA 编码序列，该 DNA 编码序列编码其中所述 5T4 ScFv 的 N 末端融合于人 B7-1 的氨基酸 215 之后的融合蛋白。该编码序列 B7-1.5T4.1 的序列(SEQ ID No 7)示于图 2。该融合蛋白在 B7-1 序列和 5T4 ScFv 序列之间含有一个柔性(gly-gly-gly-gly-ser)间隔区。在接头插入末端(始于核苷酸 733)导入一个便利的 BamHI 限制性位点，也使得可以筛选其它接头，以供双功能融合蛋白最佳表达用。图 3 以图式形式显示了该融合蛋白。同样可能的是构建 B7-1.5T4.2 (图 3b)，在 B7-1.5T4.2 中，所述 ScFv 是 N 末端，而 B7 胞外结构域是 C 末端。在这种情况下，仅需要成熟 B7-1 的编码序列(无信号肽)。在这种情况下，将信号肽例如免疫球蛋白的前导序列加至所述 ScFv 的 N 末端。

15 对于使用 B7-2 的共同刺激胞外结构域(Gerstmayr 等 1997 J Immunol 158(10): 4584-90)的融合蛋白而言，用 B7-2 的信号肽和胞外结构域取代 B7-1 的序列。图 4 显示了 SCM B7-2.5T4.1 共同刺激结构域的编码序列。它编码前接其信号肽的人 B7-2 的前 225 个氨基酸和一个柔性接头(gly4-ser)。在该序列末端的 BamHI 位点可以用来将所述结构域插入 5T4ScFv.1 上游(参见图 3)。该序列包括所述 B7-2 的信号肽，所述信号肽可以用来让该融合蛋白分泌，在所述融合蛋白中，所述 B7-2 结构域位于融合蛋白的 N 末端。

25 将每种工程 cDNA 插入哺乳动物表达载体 pCI 中，以允许在哺乳动物组织培养细胞中表达。为此，将一个接头序列加至该编码序列的 5'端，该接头序列导入一个用以插入 pCI 多接头中的便利的限制性位点，并且紧邻第一个 ATG 密码子加入翻译起始信号 CCACC。将 pCI 中的构建体转染到合适的哺乳动物宿主细胞系(例如 COS-1)中，以证实所述 SCM 的分泌。随后将来自 pCI 的转录盒或所述转录盒的合适区

段亚克隆到该表达载体中，以用作用于治疗应用的基因传递系统。

实施例 4 - 用编码含分泌型共同刺激分子(SCM)的 ScFv Ab 的表达载体转染巨噬细胞/单核细胞

5 以实验室规模，采用标准技术程序(Sandlie 和 Michaelsen 1996, 载于: Antibody engineering: a practical approach. McCafferty 等编著, 第 9 章), 以及以大规模通过淘析法(例如得自 CellPro 的 Ceprate), 从人外周血分离外周血单核细胞。通过过夜粘着至塑料上, 富集粘着细胞(基本上是单核细胞), 通过培养粘着细胞达 1-3 周, 可以让细胞沿巨噬细胞分化途径分化。

10 用能够在人类细胞中表达含 SCM 的 ScFv Ab 的表达载体转染单核细胞和巨噬细胞。对于组成型高水平表达, 在利用 hCMV-MIE 启动子-增强子的载体 pCI (Promega)中表达所述 SCM。对于低氧诱导型表达, 用含有至少一个 HRE 的启动子取代 hCMV 启动子。一种合适的启动子是具有 3 个拷贝小鼠 PGK HRE 的截短的 HSV TK 启动子(Firth 等, 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 6496-6500)。

15 可以用各种各样的转染法, 将载体导入单核细胞和巨噬细胞中, 包括粒子介导的 DNA 传递(基因枪)、电穿孔、阳离子剂介导的转染(例如采用 Superfect, Qiagen)。按照生产商的说明, 实施这些方法中的每种, 并且考虑改变所述参数, 以获得各个生产商具体描述的最佳结果。或者, 可以使用病毒载体, 例如缺陷型腺病毒载体(Microbix Inc 或 Quantum Biotechnologies Inc)。

实施例 5 - SCM 与 CTLA-4 和 5T4 抗原表达细胞结合的分析

25 预期 ScFv Ab-SCM 融合蛋白的 B7-1 或 B7-2 结构域与人 T 细胞上存在的 CD28 和 CTLA-4 特异性地结合。与用人 CTLA-4 或 CD28 转染的 T 细胞或中国仓鼠卵巢细胞的结合, 采用 FACS 分析如下测定。将 5×10^5 表达 CTLA-4 的靶细胞或缺乏 CTLA-4 的等同细胞(未转染的

CHO 细胞)与 0.1 ml 得自用 SCM 基因瞬时转染的 COS-1 细胞的培养上清液一起于 4℃ 孵育 1 小时。洗涤所述细胞, 并且与 1 mg 后接 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (Pharmingen)、对所述 B7 结构域特异性的单克隆抗体(例如 Mab 9E10)一起孵育, 然后通过 FACS 分析。

- 5 同样采用表达 5T4 抗原的靶细胞(5T4 转染的 A9 细胞)或对照细胞(A9), 评估 ScFv 与 5T4 抗原的结合。

实施例 6 - 共同刺激活性的分析

- 10 用插入到表达载体 pCIneo 中的编码人 5T4 抗原的 cDNA (Myers 等 1994 J. Biol. Chem. 269: 9319-9324), 转染 Balb/c 来源的已建立的小鼠细胞系, 例如 HC11 细胞。

- 15 通过标准方法(Johnstone 和 Thorpe 1996 载于: Immunochimistry in Practice. Blackwell. 第 4 章)分离来自 Balb/c 小鼠的脾 T 细胞。通过在含 10ng/ml PMA (Sigma)和 100 U/ml 人 IL-2 (Boehringer Mannheim)的培养基中培养 1-2 天, 预先刺激 T 细胞。将 HC11-5T4 细胞在 96 孔组织培养板中以 10^4 细胞/孔, 与至多 0.1 ml 得自用 SCM 基因转染的 COS 细胞的上清液一起孵育 2 小时。每孔中加入至多 10^5 预先刺激的 T 细胞, 所述细胞用 0.25 mCi/孔的 ^3H -胸苷进行脉冲处理, 并且在 24 小时后用液体闪烁计数器测量 ^3H -胸苷的掺入。

20

实施例 7 - 在动物模型中分析共同刺激

- 25 使用人 5T4 抗原基因转染的 HC11 细胞在 Balb/c 小鼠中生长为肿瘤。在植入之前, 将 SCM 基因 B7-1.5T4.1 或 B7-2.5T4.1 或这两种基因的组合导入所述肿瘤细胞中, 监测所述肿瘤的生长和在体内不表达 SCM 基因的对照肿瘤的生长。

实施例 8 - 对人 5T4 特异性的 B7-1/ScFv 融合蛋白的构建

用标准分子生物学技术, 构建一种融合蛋白, 该融合蛋白由通过

一个柔性接头与对人 5T4 特异性的鼠 Mab 5T4 的 V_H 和 V_L 融合的 B7-1 前导序列和胞外结构域构成。

用以下寡核苷酸:

5 上游寡核苷酸

5' GGG GGT GGT GGG AGC GGT GGT GGC GGC AGT GGC GGC GGC GGA A
3'

和下游寡核苷酸

5' CTA GTT CCG CCG CCG CCA CTG CCG CCA CCA CCG CTC CCA CCA
CCC CC 3'

10 通过将具有工程 5' Sma I 和 3' Spe I 位点两种同源寡核苷酸退火, 构建用来连接 B7.1 的胞外结构域和所述 ScFv 的柔性接头。

将该接头通过 Sma I 和 Spe I 克隆到 pBluescript (Stratagene) 中, 产生 pLINK。通过导入 5' EcoRI 和 3' Sma I 位点的引物, 从 pLK444-mB7.1 (由 R. Germain NIH, USA 供应), 通过 PCR 扩增鼠 B7.1 的信号肽(sp) 和胞外结构域 - 正向引物

5' C TCG AAT TCC ACC ATG GCT TGC AAT TGT CAG TTG ATG C 3'

15

反向引物

5' CTC CCC GGG CTT GCT ATC AGG AGG GTC TTC 3'

将 B7.1 PCR 产物通过 Eco RI 和 Sma I 克隆到 pLINK 中, 形成 pBS/B7Link。

20

通过引入 5' Spe I 和 3' Not I 位点的引物, 从 pHEN1-5T4 ScFv 扩增 5T4 特异性 ScFv 的 V_H 和 V_L ,

正向引物

5' CTC ACT AGT GAG GTC CAG CTT CAG CAG TC 3'

反向引物

5' CTC GCG GCC GCT TAC CGT TTG ATT TCC AGC TTG GTG CCT CCA CC
3'

用 Spe I 和 Not I 消化 PBS/B7Link, 并与所述 ScFv 连接, 形成由 SEQ ID No 11 所示序列构成的 OBM233: B7 Link ScFv 序列 (图 5)。

- 5 该融合体可以用来构建重组载体, 例如逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、痘病毒、痘苗病毒、杆状病毒。这类载体可以用来直接注射到患者肿瘤中。为了将所述融合蛋白传递至肿瘤细胞, 用所述重组载体转导离体的巨噬细胞/单核细胞/CD34+细胞, 然后将其注射回患者体内。这些细胞将运输至肿瘤。所述 ScFv 将结合于肿瘤细胞表面上表达的特定肿瘤抗原(例如 5T4)(Myers 等 1994 JBC)上。B7 存在于专门的抗原呈递细胞(例如巨噬细胞、树突细胞和 B 细胞)表面上。它与其配体 CD28 和位于 CD4 细胞和 CD8 细胞上的 CTL-A4 相互作用。B7-CD28/CTL-A4 和 MHC-肽/T 细胞受体同时相互作用, 导致促进 CD8 (细胞毒性 T 细胞)扩充的 IL-2 的显著增加(Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA J Exp Med 1991 年 3 月 1 日; 173(3): 721-730 B 细胞活化抗原 B7 与 CD28 的结合共同刺激 T 细胞增殖和 IL-2 mRNA 的积累)。已经用 B7 转染的肿瘤细胞在动物模型中显示出阻滞 (Townsend SE, Allison JP Science 1993 15;259(5093): 368-370)。
- 10
- 15

20 实施例 9 - B7-1/ScFv 和前导序列 ScFv (LScFv)的瞬时表达和纯化

- 对于 B7-1/ScFv 的瞬时表达, 使用人 CMV 表达质粒 pCIneo (Promega)。通过用 EcoR I/Not I 消化, 从 OBM 233 上切下 B7/ScFv, 将其克隆到用 EcoRI/Not I 预先消化的 pCIneo 中。通过利用磷酸钙, 用相关的质粒转染 293T 细胞(Profectin, Promega), 进行重组蛋白的瞬时表达。采用的条件与生产商建议的条件相似。为了降低牛血清污染, 使用无血清最适培养基(serum free optimum media) (Gibco BRL)。36-48 小时之后, 收获转染上清液, 通过 Centriprep (Amicon, Glos. UK) 10 滤
- 25

器(纯化/浓缩大于 10 kDa 的所有蛋白质)和 Centricon (Amicon) 10 滤器离心(spin)。上清液被浓缩大约 30 倍。

对于具有生物学功能的 B7-1 而言, 它必须能够显示出与特定 T 细胞群(例如 CD4+)表面上存在的其天然配体之一(或者 CTLA-4 或者 CD28)结合。分析 B7-1/ScFv 融合蛋白与其天然配体 CTLA-4 (为 CTLA4-Ig 形式, 由 Ancell, MN, USA 供应)和表达人 5T4 的 A9 细胞同时相互作用的生物活性。简而言之, 让大约 5×10^5 A9-h5T4 细胞与 100 ul 或者 B7.1/ScFv 或者 LScFv 上清液一起在 U 形底的 96 孔板中于 4℃ 孵育 1 小时。洗涤后, 让细胞与 CTLA4-Ig (Ancell)一起孵育 1 小时。洗涤后, 用 FITC 缀合的抗小鼠 Ig (Dako)检测结合的 CTLA4-Ig。

结果表明, 具有 CTLA-Ig 与通过所述 ScFv 结合的 B7-1 胞外结构域明显结合于人 5T4 阳性 A9 细胞的表面。缺乏与 5T4 阴性 A9 细胞的结合活性, 进一步说明 B7 与 CTLA4-Ig 以及 ScFv 与 5T4 的相互作用是特异性的。

实施例 10 - ScFv-IgG 融合体实施例

ScFv-IgG 的构建

编码一个翻译起始序列和人免疫球蛋白κ轻链信号肽的序列, 以两种互补的单链寡核苷酸来合成, 这两种寡核苷酸当退火时, 在 5'端也含有一个内部 *Xho I* 位点, 并且另外还留下一个 *Xba I* 匹配的 5'突出端和一个 *Pst I* 匹配的 3'突出端,

ctagactcgagCCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA
GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAG GTC CAG ctgca

和

g CTG GAC CTC GGA GTG GAC ACC TGT AGC TGT TGC TAC CAA GAA
GAG GAT GAT ACA GCT CCA TCC CAT GGTGGctcgagt

然后, 将其克隆到用 *Xba I* 和 *Pst I* 限制的 pBluescript II (Stratagene)中,

产生 pBSII/Leader。

使用在产物的 5'端掺入一个 *Pst* I 位点和在 3'端掺入一个 *Hind* III 的寡核苷酸：

GTC CAG CTG CAG CAG TCT GG

5 和

CG TTT GAT TTC AAG CTT GGT GC

通过 PCR 从 pHEN1 中扩增 5T4 ScFv。将其用那些酶来限制，并插入到用相同的酶限制的 pBSII/Leader 中，产生 pBSII/Leader/ScFv。

10 使用在 5'端掺入一个 *Hind* III 位点和在 3'端掺入一个 *Xho* I 的寡核苷酸：

gcgc AAG CTT gaa atc aaa cgg GCC TCC ACC AAG GGC CCA

和

gcgc ctcgag TCA TTT ACC CGG AGA CAG GG

15 通过 PCR 从所克隆的基因中扩增 HIgG 1 恒定区。然后将其用那些酶来限制，并插入到用相同的酶限制的 pBSII/Leader/ScFv 中，产生 pBSII/Leader/ScFv/HG1。该构建体的序列示于图 4 (SEQ ID No 10)。

20 该融合体可以用来构建重组载体，例如逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、痘病毒、痘苗病毒、杆状病毒。这类载体可以用来直接注射到患者肿瘤中。为了将所述融合蛋白传递至肿瘤细胞，用所述重组载体转导离体的巨噬细胞/单核细胞/CD34+细胞，然后将其注射回患者体内。这些细胞将运输至肿瘤。所述 ScFv 将结合于肿瘤细胞表面上表达的特定肿瘤抗原例如 5T4 (Myers 等 1994 JBC)上。结合的 IgG 将通过统称为依赖于抗体的细胞的细胞毒性的机制的集合，促进特异性的肿瘤破坏(Munn 等 Can res 1991 出处同上, Primus 等 1993 Cancer Res 出处同上)。

25

实施例 11 - ScFv-IgE1 (人 IgE1 重链恒定区)的构建

制备 5T4 ScFv-人 IgE 重链恒定区的相似的融合构建体, 该构建体由示于图 7 的序列(SEQ ID No. 12)构成。

从通过 RT 从人 B 细胞 RNA 获得的 cDNA, 用在 5'端掺入一个
5 *Hind III* 位点和在 3'端掺入一个 *Xho I* 位点的寡核苷酸:

gcgc AAG CTT gaa atc aaa cgg GCC TCC ACA CAG AGC CCA

和

gcgc ctcgag TCA TTT ACC GGG ATT TAC AGA

通过 PCR 扩增人 IgE1 重链恒定区, 制备该融合构建体。然后将其用
10 那些酶来限制, 并插入到用相同的酶限制的 pBSII/Leader/ScFv 中, 产生 pBSII/Leader/ScFv/HE1。

如上所述, 可以将所述 ScFv-IgE 构建体加入到重组病毒载体中, 用于癌症的基因治疗, 例如直接注射到患者组织中, 或转导得自患者的离体巨噬细胞/单核细胞/CD34+细胞。该融合蛋白将分泌出来, 并且
15 结合于带有所述 ScFv 对其特异性的抗原的肿瘤细胞上。IgE 与肿瘤细胞的结合, 应该通过激活肥大细胞, 促进强的组胺应答。这将导致强的炎症反应和破坏肿瘤细胞, 正如关于 IgE 对寄生虫例如蠕虫幼虫的细胞毒性破坏所报道的(Capron M 1988 疾病中的嗜酸性粒细胞: 受体和介质。载于: Progress in allergy and clinical immunology (Proc. 13th Int.
20 Congress of Allergy and Clinical Immunology) Hogrefe 和 Huber Toronto 第 6 页)。这种炎症和肿瘤破坏, 应该起动其它免疫效应细胞的募集。过去的报道表明, 用 MMTV 抗原特异性 IgE Mab 治疗, 引起抵抗表达 MMTV 抗原的肿瘤的保护作用(Nagy E Istanvan B, Schon AH 1991 Cancer Immunol. Immunotherapy 34: 63-69)。

25

实施例 12 - B7/EGF 的构建

B7-EGF 合成基因

从编码成熟 EGF 肽的基因(参见登记号 X04571)的区中扩增 PCR 产物, 通过将所述 PCR 产物插入 pBS/B7 Link 中, 制备 B7-EGF 的融合构建体。该构建体具有示于图 8 的序列(SEQ ID No. 13)。

通过对从细胞系例如 293 人肾细胞系(ATCC: CRL1573)分离的 RNA 进行 RT 获得 cDNA, 采用所述 cDNA, 采用在 N 末端含有一个 *Spe I* 限制性酶切位点和在 C 末端含有一个终止密码子和一个 *Not I* 位点的寡核苷酸:

GG ACT AGT AAT AGT GAC TCT GAA TGT CCC

和

ATT AGC GGC CGC TTA GCG CAG TTC CCA CCA CTT C

通过 PCR 扩增所述 DNA。用那些酶消化所产生的产物, 连接到已经用相同的酶限制的 pBS/B7 Link 中, 产生 pBS/B7 Link EGF。然后用 *Eco RI* 和 *Not I* 切下所述 B7 Link EGF 盒, 将其插入到不再带有 *LazZ* 基因的 pHIT111 (Soneoka 等, 1995, Nucl Acid Res 23: 628)的衍生物中。

替代使用 ScFv 的一个方法是使用对其相应受体具有高亲和性的生长因子, 例如与几种受体(包括与肿瘤发生高度相关的 *erb-2*)结合的表皮生长因子。

如上所述, 可以将所述融合构建体加入到重组病毒载体中, 用于基因治疗, 例如直接注射到患者组织中, 或离体转导患者来源的巨噬细胞/单核细胞/CD34+细胞。所述融合蛋白将分泌出来, 并将结合于带有 *erb-2* 抗原的肿瘤细胞。

表皮生长因子(EGF)将与其配体 *erb-2* (一种 EGF 受体)结合, 因而消除了对 ScFv 的需求。*erb-2* 与肿瘤细胞高度相关(Hynes NE Semin Cancer Biol 1993 年 2 月; 4(1): 19-26, 人类肿瘤中 *erbB-2* 基因的扩增和超量表达: 它涉及肿瘤的发生, 作为预后因素的重要性和作为癌症治

疗靶的潜力)。B7 存在于专门的抗原呈递细胞(例如巨噬细胞、树突细胞和 B 细胞)表面上。它与其配体 CD28 和位于 CD4 细胞和 CD8 细胞上的 CTL-A4 相互作用。B7-CD28/CTL-A4 和 MHC-肽/T 细胞受体同时相互作用, 导致促进 CD8 (细胞毒性 T 细胞)扩充的 IL-2 的大量增加 (Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA J Exp Med 1991 年 3 月 1 日; 173(3): 721-730 B 细胞活化抗原 B7 与 CD28 的结合共同刺激 T 细胞增殖和白介素 2 mRNA 的积累)。已经用 B7 转染的肿瘤细胞在动物模型中显示出阻滞(Townsend SE, Allison JP Science 1993 15;259(5093): 368-370 直接共同刺激 CD8+ T 细胞后 B7 转染的黑素瘤细胞对肿瘤的排斥)。已经报道, B7 将增强对肿瘤细胞特有的肿瘤抗原的 CTL 应答, 从而导致对所有这类细胞的破坏。

实施例 13 - 表达融合构建体的细胞系的产生

通过 Xho I 消化, 从 pBSII/L/ScFv/hIgG1 切下 ScFv-IgG 基因, 通过 Xho I 位点将其克隆到 pLXSN 中, 产生 pLXSN/ScFv-IgG, 使得在染色体整合后, 它处于 LTR 的转录控制之下。采用三联质粒 HIT 系统 (Landau 和 Littman 1992 J Virol 66, 5110, Soneoka Y 等 1995 NAR 23:628-633), 通过共同转染含有 MLV gap-pol 基因的质粒(pCIEGPPD)和包含 VSV G 包膜的质粒(pRV67), 在人肾细胞系 293T 中制备病毒。48 小时后收获病毒, 将其用来转导 BHK-21 细胞(ATCC# CCL-10)。转导后大约 24 小时, 通过添加 1 mg/ml G418 (Gibco BRL)至培养基中, 选择转导的细胞。收获得自阳性菌落的上清液, 通过 Centriprep (Amicon, Glos, UK) 10 滤器(纯化/浓缩大于 10 kDa 的所有蛋白质)和 Centricon (Amicon) 10 滤器离心进行浓缩。上清液被浓缩约 30 倍。

将其它融合蛋白通过 Xho I 位点克隆到 pLXSN 中, 采用相似的方案进行表达和浓缩。

融合蛋白与表达特异性配体的细胞结合的FACS分析

为了确定所述 ScFv-IgG 融合蛋白是否对其抗原 - 人 5T4 是特异性的, 对人膀胱癌肿瘤系(EJ)或表达 h5T4 的稳定的鼠细胞系 A9-h5T4 (Myers 等 1994 JBC)以及 5T4 阴性系 A9-neo 进行 FACS 分析。在圆底 5 96 孔板(Falcon)中, 将约 5×10^5 A9 细胞或 EJ 细胞与 100 ul 经浓缩的上清液(如上所述)的 1:5 稀释液一起于 4℃温育 1 小时。洗涤后, 用抗人 IgG/FITC 缀合抗体(Dako)检测结合的蛋白。在 Becton Dickinson FACS 仪上分析细胞。FACS 结果表明, 与仅由所述 ScFv 蛋白构成的阴性对照构建体相比, 用所述 ScFv-IgG 构建体处理的那些 5T4 阳性细胞中, 荧光活性有至少 1 log 的位移。A9 neo FACS 表明, 没有所述融合蛋白的 ScFv 组分的非特异性结合。

与上述相似地进行 ScFv-IgE 的 FACS 分析, 只是用抗人 IgE-FITC (Dako)检测所述融合蛋白的结合。

用 FACS 和 HC11-erb-2 阳性细胞, 分析所述 B7/EGF 融合蛋白的结合(Hynes 等 1990)。用 CTLA4-Ig (Ansell, USA)来分析结合的融合蛋白的 B7 组分的生物活性。用抗小鼠 IgG-FITC 来显示 CTLA-4 结合。 15

融合蛋白的分析

B7-scFv 的 FACS 分析

如下所述, 通过从稳定转染的 BHK-21 细胞系表达, 产生重组蛋白(以允许鉴定以及纯化)。在质粒 pCIneo (Promega)中 scFv 的 C 末端(图 13B)。为了证实所述 scFv 能够与所述 5T4 抗原结合, 将来自这些细胞和来自模拟转染的 293T 细胞的上清液加至表达 h5T4 的小鼠 A9 细胞 (具有 h5T4/新霉素抗性表达构建体的稳定转染子)。用 FITC 缀合的 α His 25 或 α Myc 抗体检测, 证实所述 scFv 与 A9-5T4 细胞结合, 但不与 5T4 阴性 A9 neo 细胞结合, 表明所述融合构建体能够结合所述靶抗原(图 14)。

进行进一步的 FACS 分析, 表明 B7-scFv 蛋白能够同时结合 B7.1

配体 CTLA4 以及表达 h 5T4 的细胞。将 A9 5T4 细胞和 A9 neo 细胞与单独的所述 scFv、缺乏 Myc-His 标记的 B7-scFv 构建体或具有所述标记的 B7-scFv 构建体一起孵育。加入 B7.1 配体 CTLA4-Ig, 并且用 FITC 缀合的 α 小鼠 IgG 检测(图 15)。Myc-His 标记的存在与否, 对所述蛋白与 5T4 抗原和 CTLA-4 的同时结合产生很小的差异。

5T4 scFv HIgG 1 蛋白的分析

通过用含有在 CMV 立即早期启动子控制之下的或者单独的 5T4 scFv 或者 5T4scFv-Hg1 融合体(分别为图 13A 和 C)的构建体稳定转染 BHK-21 细胞, 产生重组蛋白。图 16 显示了小鼠 A9 5T4 细胞的 FACS 分析。将所述细胞与来自或者表达单独的 scFv 或者 scFv-HG1 的 BHK-21 细胞的细胞上清液一起孵育, 然后与山羊抗人 IgG-FITC 标记抗体一起孵育。正如可以观察到的, scFv-HG1 能够结合表达 5T4 的细胞, 并且可以用山羊抗人 IgG-FITC 标记抗体检测到。图 16b 表明, 这是由于在细胞表面存在 5T4, 因为用表达新霉素抗性标记、但不表达 h5T4 的 A9 细胞没有观察到结合。

将上述上清液用于依赖于抗体的细胞介导细胞毒性(ADCC)测定中, 证明 scFv-Hy1 融合蛋白能够指导 A9 5T4 细胞的裂解。将 A9 5T4 和 neo 细胞系用于铬释放测定中。在用 ^{51}Cr 标记后, 将细胞或者与无蛋白单独的 scFv 或者与 scFv-Hy1 融合构建体一起孵育。加入新鲜分离的外周血淋巴细胞, 并孵育 4 小时。取 1 等份上清液进行闪烁计数。

$$\text{裂解百分率计算为: } \frac{\text{试验释放-自发释放}}{\text{最大释放-自发释放}} \times 100$$

与单独的 scFv 比较时, 随着效应子:靶比率的增加, 获得至多约 40% 的裂解。5T4 阴性细胞系没有表现出裂解增加(图 17)。

实施例 14 - 在动物模型中的功效分析

按照很好建立的技术(参见例如 Strobel 等 1997 Cancer Res. 57: 1228-1232; McLeod 等 1997 Pancreas 14: 237-248), 将人类肿瘤来源的细胞系和组织在遗传免疫缺陷型“裸”鼠中进行体内培养。也可以使用其中将同源肿瘤系导入免疫活性小鼠品系的同源小鼠模型。这些用作适合于评估本发明基因传递系统的动物模型。将载体或工程细胞系统给予或直接给予到肿瘤中, 在受治疗和未治疗动物体内监测肿瘤的生长。该系统用来确定本发明治疗的有效剂量范围和最合适的给药途径。

10

ScFv 融合蛋白的体内抗肿瘤功效的数据

该项研究的目的是测试一系列单链抗体融合蛋白的功效。

小鼠模型基于 CT26 (一种 BALB/c 来源的化学诱导性腺癌)(Brittain 等(1980) Cancer Res. 40:179-184)和基于 B16 (一种来源于 C57 B6 小鼠的黑素瘤系)。CT26 系和 B16 系都被稳定转化, 表达人和鼠 5T4。给小鼠静脉内注射(以诱发肺部小节, CT26)或皮下注射(CT26 和 B16), 以产生单个的皮下大肿瘤。

实验设计

表达人 5T4 的 CT26 细胞(CT26-h5T4)和 CT26-neo

将细胞与以下物质预孵育:

PBS、LScFv-1、LScFv-2、B7-ScFv、ScFv-Ig。

LScFv-1 和 LScFv-2 在 BHK 细胞系中表达。LScFv-1 通过其组氨酸标记在镍柱上纯化, 而 ScFv-2 采用过滤系统纯化。B7-ScFv 通过 His 标记从 BHK 系中纯化, 而 ScFv-Ig 通过过滤柱纯化。用于该实验的每种 ScFv 的浓度以在 FACS 测定中 CT26-h5T4 细胞的饱和结合所需的蛋白量来限定。

将 CT26-h5T4 和 CT26-neo 细胞与饱和量的每种 ScFv 一起预孵

育，然后孵育 1 小时。洗涤细胞后，将 5×10^5 细胞皮下注射到同源 BALB/c 小鼠的肋腹中。

每两天进行肿瘤测量，并计算体积。

5 结果 14

图 9: CT26-neo

除用 LScFv-1 治疗外，在所研究的各组之间没有显著差异，对于 LScFv-1 而言，在肿瘤接种后 36 天，与 PBS 对照相比，肿瘤大小减至约三分之一。

10

图 10: CT26-h5T4

用所有的 5T4 ScFv 构建体治疗的肿瘤都对肿瘤生长有显著影响。用 5T4 ScFv-1 治疗的 5 只小鼠中的 4 只在第 36 天时没有肿瘤。第 36 天时，经 ScFv-1 治疗的肿瘤细胞是用 PBS 治疗的肿瘤的 60 分之一以下。

15

当用工程改造以表达 h5T4 的小鼠黑素瘤系(B16)进行相似的实验时，用所用的 ScFv 构建体发现最小的抗肿瘤效应(参见图 11 和图 12)。CT26 看来对 ScFv 结合所诱发的抗肿瘤免疫应答比 B16 细胞更为敏感。另外，B16 细胞不表达鼠 5T4，而 CT26 细胞具有鼠 5T4 的 mRNA。

20

总之，看来在 CT26 和 B16 鼠模型中，将 B7 或 IgG 与 5T4 特异性 ScFv 融合没有益处。事实上，我们已经发现，在我们的实验中，单独的 ScFv 比 ScFv 融合构建体更为有效，因为其结合亲和性更高(如 BIACORE 中所示，与 B7-ScFv 相比)。因此，这些数据表明，在所述 5T4 模型中，单独的 ScFv 对肿瘤阻滞有显著的效应，可能不需要与所述 ScFv 融合的免疫增强分子来显示对肿瘤阻滞的效应。

25

实施例 15 - 表达所述融合构建体的慢病毒载体的产生

将 B7-5T4 scFv 和 L-5T4 scFv 克隆到 pONY 8.1SM 中

pONY8.1SM (图 18) 是一种在 CMV 启动子下游具有 4 个单一克隆位点的 ELAV 载体。它可从 WO 99/32646 的图 1 中所示的载体衍生。

5 鉴于它含有的 ELAV 序列 (~1.1 kb) 和它所表达的 ELAV 蛋白 (无), pONY8.1SM 是一种迄今最小的 ELAV 载体。

10 为了将 B7-5T4 scFv 和 Leader-5T4 scFv (L-5T4 scFv) 克隆到 pONY 8.1SM 中, 采用以下所示的引物, 通过 PCR 从先前克隆到 pBluescript II 的构建体 (参见实施例 8 和 10) 扩增所述序列, 以在所述基因的 5' 端掺入一个 Sbf I 位点和在终止密码子后掺入一个 Eco RI 位点。然后将所述产物直接连接至用相同的酶预先消化的 pONY 8.1SM。

对于 B7-5T4 scFv, 所述引物如下所示:

引物 1. B7-Sbf

15 ATCGCCTGCAGGCCACCA**ATGG**CTTGCAATTGTCAG

Sbf I 位点 = 下划线

Kozak 序列 = 粗体和斜体, 并且用下划线标注 ATG 起始密码子。

引物 2. 5T4sc-RI

20 GCGCGA**ATTCTT**ACCGTTTGATTTCAGCTTGGT

Eco RI 位点 = 下划线

TAA 终止密码子 = 粗体和斜体

然后将所得的产物克隆到 pONY 8.1 SM 中, 产生图 19a 中所示的融合蛋白构建体。

25

对于 L-5T4 scFv, 所述引物如下所示:

引物 1. L-Sbf

ATCGCCTGCAGGCCACCATG**GGG**ATGGAGCTGTAT

Sbf I 位点 = 下划线

- 5 Kozak 序列 = 粗体和斜体, 并且用下划线标注 ATG 起始密码子。

引物 2. 5T4sc-RI

GCGCGAATTC**TT**ACCGTTTGATTTCAGC**TT**GGT

Eco RI 位点 = 下划线

- 10 TAA 终止密码子 = 粗体和斜体

然后将所得的产物克隆到 pONY 8.1 SM 中, 产生图 19b 中所示的构建体。

IL-5 特异性的 scFv 的装配和克隆

- 15 采用由杂交瘤系例如表达抗 IL-5 的人源化 Mab SB 240563 (Leckie, MJ, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 159, A624 1999) 的杂交瘤系制备的物质, 通过 RT-PCR 装配抗 IL-5 scFv。技术类似于 Clackson 等描述的技术(遗传工程单克隆抗体。Br. J Rheumatol. 1991; 30 增刊 2: 36-9)。简而言之, 由 SB 240563 细胞制备总 RNA。运用 oligo dT 引物, 采用 MMLV
- 20 逆转录酶进行第一条链的合成。用 V_H 和 V_L 基因特异性引物对, 通过 PCR 扩增模板 cDNA, 所述引物对例如为如下所示的, 包含限制性酶切位点以允许克隆到 pKLink 中, pKLink 是一种 pBluescript II SK (pBSII) 质粒, 含有一个柔性接头序列(Gly₄Ser)₃ (图 20)。这构成了单链抗体 cDNA (图 19)。然后, 将与 scFv-5T4 构建中描述的(参见实施例 10)相
- 25 似的双链寡核苷酸克隆到所述 scFv 上游, 所述双链寡核苷酸编码一个翻译起始序列、Kozak 序列和用于分泌的人 Ig κ 轻链信号肽(图 21)。

然后, 用 *Sbf I* 和 *Eco RI* 切下完整的构建体, 将其克隆到 pONY

8.1SM 中(图 22)。

HIV 包膜蛋白 gp120 特异性的 scFv 的装配和克隆

由表达抗 HIV 包膜蛋白 gp120 的 mAb 例如 mAb 110.3 (Conelly 等,
5 Virology **295**: 554-557, 1994)的杂交瘤系制备的物质, 通过 RT-PCR 装
配抗 HIV scFv。或者, 利用指导的选择(guided selection)来制备人源化
抗体(参见 Beiboer SH 等, *J Mol Biol*, 2000; **296**: 833-849), 然后由其衍
生所述 scFv。技术类似于 Clackson 等描述的技术(遗传工程单克隆抗
体。Br J Rheumatol. 1991; 30 增刊 2: 36-9)。简而言之, 由所述杂交瘤
10 细胞制备总 RNA。运用 oligo dT 引物, 采用 MMLV 逆转录酶进行第
一条链的合成。用 V_H 和 V_L 基因特异性引物对, 通过 PCR 扩增模板
cDNA, 所述引物对例如为如下所示的, 包含限制性酶切位点以允许克
隆到 pKLink 中, pKLink 是一种 pBluescript II SK (pBSII)质粒, 含有一
个柔性接头序列(Gly₄Ser)₃ (图 20)。这构成了单链抗体 cDNA (图 21)。
15 然后, 将与 scFv-5T4 构建中描述的(参见实施例 10)相似的双链寡核苷
酸克隆到所述 scFv 上游, 所述双链寡核苷酸编码一个翻译起始序列、
Kozak 序列和用于分泌的人 Ig κ 轻链信号肽(图 19)。

然后, 用 *Sbf I* 和 *Eco RI* 切下完整的构建体, 将其克隆到 pONY
8.1SM 中(图 18), 产生图 23 中所示的构建体。

20

实施例 16 – 表达所述融合构建体的腺病毒载体的产生

*表达 5T4scFv 融合构建体 IL-5 scFv 和 HIV gp120 scFv 的重组腺病毒的
产生*

将 B7-5T4 scFv 和 L-5T4 scFv 克隆到 pAdApt 中

25 在 CMV 启动子下游具有 8 个单一克隆位点的腺病毒转移载体
(pAdApt; 参见图 24)可得自 Crucell, Leiden, Netherlands。

为了将 B7-5T4 scFv 和 Leader-5T4 scFv (L-5T4 scFv)克隆到
pAdApt 中, 从先前克隆到 pBluescript II 中的构建体(参见实施例 8 和

10)切下所述序列，然后如下连接到所述载体中：

对于 B7-5T4 scFv:

5 用 *Xho I* 切下 B7-scFv，补平以产生平端，然后用 *Eco RI* 消化。然后将该片段与用 *Hpa I* 和 *Eco RI* 预先消化的 pAdApt 载体连接(图 25A)。

对于 L-5T4 scFv:

10 用 *Xba I* 消化 L-5T4 scFv，补平以产生平端，然后与用 *Hpa I* 预先消化的 pAdApt 载体连接。然后对后来的克隆检查 L-5T4 scFv 插入片段的正确定向(图 25B)。

将 IL-5 特异性 scFv 克隆到 pAdApt 中

15 克隆到 pBSII 中的 L-scFv (参见实施例 13)用 *Xba I* 消化，补平以产生平端，然后用 *Eco RI* 消化。pAdApt 载体用 *Hind III* 消化，补平以产生平端，然后用 *Eco RI* 消化。然后将这两种分子连接，产生类似以上图 25B 的重组转移载体(只是 *Eco RI* 限制性位点在融合构建体的 3' 端，所述基因的 5'端邻接补平的 *Hind III* 位点)。

20 *HIV 包膜蛋白 gp120 特异性 scFv 的克隆*

25 克隆到 pBSII 中的 L-scFv (参见实施例 13)用 *Xba I* 消化，补平以产生平端，然后用 *Eco RI* 消化。pAdApt 载体用 *Hind III* 消化，补平以产生平端，然后用 *Eco RI* 消化。然后将这两种分子连接，产生类似以上图 25B 的重组转移载体(只是 *Eco RI* 限制性位点在融合构建体的 3' 端，所述基因的 5'端邻接补平的 *Hind III* 位点)。

表达所述 scFv 融合构建体的重组腺病毒的产生

为了产生表达所述 scFv 融合构建体的重组腺病毒，用等摩尔量的含有所述融合构建体的重组转移载体和腺病毒基因组(Genome)载体

(AdEasy, 得自 Quantum Apligene, Harefield UK)转染 PerC6 细胞。然后按照 Crucell 方案中的描述, 收获重组病毒。

总结

5 因此, 本发明提供能够识别疾病相关细胞表面标记(DAM)的抗体。这些抗体可以用于诊断和治疗与 DAM 相关的疾病。

 在以上说明书中提及的所有出版物通过引用结合到本文中。在不偏离本发明范围和精神的情况下对本发明所述方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员是显而易见。虽然结合具体优选实施方案
10 描述了本发明, 但应该理解, 要求保护的本发明不应该被过分限于这类具体的实施方案。实际上, 本发明将包括对分子生物学或相关领域技术人员显而易见的所述实施本发明的模式的各种修改。

5 <110> 牛津生物医学(英国)有限公司(Oxford Biomedica (UK) Limited)
 Kingsman, Alan

10 <120> 抗体

 <130> P8161W0 CTH

10 <140> PCT/GB00/04317

 <141> 2000-11-13

 <160> 37

15 <170> PatentIn version 3.0

 <210> 1

 <211> 243

 <212> PRT

20 <213> 人工序列

 <220>

 <223> 5T4ScFv. 1

25 <400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 30 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

35 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Leu Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

40 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

	85	90	95
	Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
	100	105	110
5	Val Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
	115	120	125
	Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Thr		
10	130	135	140
	Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala		
	145	150	155 160
15	Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly		
	165	170	175
	Gln Ser Pro Thr Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Ser Arg Tyr Ala Gly		
	180	185	190
20	Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe		
	195	200	205
	Thr Ile Ser Thr Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln		
25	210	215	220
	Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu		
	225	230	235 240
30	Ile Lys Arg		
	<210> 2		
	<211> 68		
	<212> DNA		
35	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> Cassette 1 - Translation initiation signal and signal peptide		
40	<400> 2		
	aagcttccac catgggatgg agctgtatca tcctcttctt ggtagcaaca gctacaggtg		60

tccactcc 68

<210> 3
 <211> 488
 5 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> B7-1.5T4ScFv.1

10 <400> 3
 Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
 1 5 10 15

15 Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
 20 25 30

Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
 35 40 45

20 Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
 50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
 25 65 70 75 80

Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
 85 90 95

30 Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
 100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
 115 120 125

35 Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr
 130 135 140

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
 40 145 150 155 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu

	165	170	175
	Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp		
	180	185	190
5	Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met		
	195	200	205
	Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg		
10	210	215	220
	Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro		
	225	230	235 240
15	Asp Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp		
	245	250	255
	Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly		
	260	265	270
20	Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly		
	275	280	285
	Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr		
25	290	295	300
	Leu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys		
	305	310	315 320
30	Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp		
	325	330	335
	Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val		
	340	345	350
35	Met Asp Tyr Trp Gly Gln Val Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly		
	355	360	365
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ile Val		
40	370	375	380
	Met Thr Gln Thr Pro Thr Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val		

	385	390	395	400
	Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala Trp			
	405	410	415	
5	Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Thr Leu Leu Ile Ser Tyr Thr			
	420	425	430	
	Ser Ser Arg Tyr Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Tyr			
10	435	440	445	
	Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Leu Gln Ala Glu Asp Leu			
	450	455	460	
15	Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Pro Thr Phe Gly			
	465	470	475	480
	Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	485			
20	<210> 4			
	<211> 592			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
25	<220>			
	<223> 5T4ScFv. 1-IgG			
	<400> 4			
30	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly			
	1	5	10	15
	Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys			
	20	25	30	
35	Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe			
	35	40	45	
	Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu			
	50	55	60	
40	Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Leu Tyr Asn			
	65	70	75	80

	Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr	
	85	90 95
5	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
	100	105 110
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr	
	115	120 125
10	Trp Gly Gln Val Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
	130	135 140
	Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ile Val Met Thr Gln	
15	145	150 155 160
	Thr Pro Thr Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr	
	165	170 175
20	Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln	
	180	185 190
	Lys Pro Gly Gln Ser Pro Thr Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Ser Arg	
	195	200 205
25	Tyr Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp	
	210	215 220
	Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr	
30	225	230 235 240
	Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr	
	245	250 255
35	Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro	
	260	265 270
	Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly	
	275	280 285
40	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn	
	290	295 300

	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	
	305	310 315 320
5	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	
	325	330 335
	Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	
	340	345 350
10	Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr	
	355	360 365
	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser	
15	370	375 380
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	
	385	390 395 400
20	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	
	405	410 415
	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
	420	425 430
25	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	
	435	440 445
	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
30	450	455 460
	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	
	465	470 475 480
35	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
	485	490 495
	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
	500	505 510
40	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
	515	520 525

	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	
	530 535 540	
5	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	
	545 550 555 560	
	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
	565 570 575	
10	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	580 585 590	
	<210> 5	
	<211> 729	
15	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 5T4ScFv. 1	
20	<400> 5	
	gagggtccagc ttcagcagtc tggacctgac ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata	60
	tcttgcgaagg cttctgggta ctcattcact ggctactaca tgcactgggt gaagcagagc	120
25	catggaaaga gccttgagtg gattggacgt attaataccta acaatgggtgt tactctctac	180
	aaccagaaat tcaaggacaa ggccatatta actgtagaca agtcatccac cacagcctac	240
30	atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagatctact	300
	atgattacga actatgttat ggactactgg ggtcaagtaa cctcagtcac cgtctcctca	360
	ggtgggtggtg ggagcgggtg tggcggcact ggcggcggcg gatctagtat tgtgatgacc	420
35	cagactccca cattcctgct tgtttcagca ggagacaggg ttaccataac ctgcaaggcc	480
	agtcagagtg tgagtaatga tgtagdttgg taccaacaga agccagggca gtctcctaca	540
40	ctgctcatat cctatacatc cagtcgctac gctggagtcc ctgatcgtt cattggcagt	600
	ggatatggga cggatttcac tttcaccatc agcactttgc aggetgaaga cctggcagtt	660

	tattttctgtc agcaagatta taattctcct cgcaggttcg gtggaggcac caagctggaa	720
5	atcaaacgg	729
	<210> 6	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
10	<220>	
	<223> Flexible linker to join the extracellular domain of B7.1 and ScFv	
	<400> 6	
15	gggggtggtg ggagcgggtg tggcggcagt ggcggcggcg gaa	43
	<210> 7	
	<211> 1467	
	<212> DNA	
20	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> B7-1. 5T4ScFv. 1	
25	<400> 7	
	atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt	60
	cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag	120
30	gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca	180
	caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatgggtgc tgactatgat gtctggggac	240
	atgaatatat ggcccgagta caagaacgg accatctttg atatcactaa taacctctcc	300
35	attgtgatcc tggtctctgc cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag	360
	tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggtctgaag tgacgttatc agtcaaagct	420
40	gacttcoccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata	480
	atttgcctaa cctctggagg tttccagag cctcacctct cctggttgga aaatggagaa	540

	gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt	600
5	agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat	660
	ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct	720
	gatggaggcg ggggatccga ggtccagctt cagcagtctg gacctgacct ggtgaagcct	780
10	ggggottcag tgaagatata ctgcaaggt tctggttact cattcactgg ctactacatg	840
	cactgggtga agcagagcca tggaaagagc cttgagtgga ttggacgtat taatcctaac	900
15	aatggtgtta ctctctacaa ccagaaattc aaggacaagg ccatattaac tgtagacaag	960
	tcatccacca cagctacat ggagctccgc agcctgacat ctgaggactc tgcggtctat	1020
	tactgtgcaa gatctactat gattacgaac tatgttatgg actactgggg tcaagtaacc	1080
20	tcagtcaccg tctctcagg tgggtgtggg agcgggtgtg gcggcactgg cggcggcgga	1140
	tctagtattg tgatgacca gactcccaca ttctgcttg ttccagcagg agacagggtt	1200
25	accataacct gcaaggccag tcagagtgtg agtaatgatg tagcttggtta ccaacagaag	1260
	ccagggcagt ctctacact gtcatatcc tatacatcca gtcgctacgc tggagtcct	1320
	gatcgcttca ttggcagtgg atatgggacg gatttcactt tcaccatcag cactttgcag	1380
30	gctgaagacc tggcagttta tttctgtcag caagattata attctcctcc gacgttcggt	1440
	ggaggcacca agctggaaat caaataa	1467
35	<210> 8	
	<211> 1796	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
40	<220>	
	<223> 5T4ScFv. 1-IgG	
	<400> 8	

	ctcgagccac catgggatgg agctgtatca tcctcttctt ggtagcaaca gctacaggtg	60
	tccactccga ggtccagctg cagcagtctg gacctgacct ggtgaagcct ggggcttcag	120
5	tgaagatata ctgcaagct tctggttact cattcactgg ctactacatg cactgggtga	180
	agcagagcca tggaaagagc cttgagtga ttggacgtat taatcctaac aatggtgtta	240
10	ctctctacaa ccagaaattc aaggacaagg ccatattaac tgtagacaag tcatccacca	300
	cagcctacat ggagctccgc agcctgacat ctgaggactc tgcggtctat tactgtgcaa	360
	gatctactat gattacgaac tatgttatgg actactgggg tcaagtaact tcagtcaccg	420
15	tctcttcagg tgggtgtggg agcgggtggg gcggcactgg cggcggcgga tctagtattg	480
	tgatgaccca gactcccaca ttctgcttg ttccagcagg agacaggggt accataacct	540
20	gcaaggccag tcagagtgtg agtaatgatg tagcttggtg ccaacagaag ccagggcagt	600
	ctctacact gctcatatcc tatacatcca gtcgctacgc tggagtcctt gatcgttca	660
	ttggcagtgg atatgggacg gatttcactt tcaccatcag cactttgcag gctgaagacc	720
25	tggcagttta tttctgtcag caagattata attctcctcc gacgttcggt ggaggcacca	780
	agcttgaaat caaacgggcc tccaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcacctcct	840
30	ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg	900
	aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg	960
	ctgtcctaca gtccctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca	1020
35	gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaaggtgg	1080
	acaagaaagt tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac	1140
40	ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc ttttcccccc aaaacccaag gacacctca	1200
	tgatctcccg gaccttgag gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg	1260

	aggatcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc	1320
	gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacgcgc ctgcaccagg	1380
5	actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc	1440
	tggagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc	1500
	ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct	1560
10	tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca	1620
	agaccagccc tcccgctgtg gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg	1680
15	tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc	1740
	tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct cctgtcccc gggtaaatga ctcgag	1796
	<210> 9	
20	<211> 738	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
25	<223> B7-2. 5T4. 1	
	<400> 9	
	atgggactga gtaacattct ctttgtgatg gccttctgc tctctggtgc tgcctctctg	60
30	aagattcaag cttatttcaa tgagactgca gacctgccat gccaatgtgc aaactctcaa	120
	aaccaaagcc tgagtgaact agtagtattt tggcaggacc aggaaaactt gggtctgaat	180
	gaggtatact taggcaaaga gaaatttgac agtgttcatt ccaagtatat ggccgcaca	240
35	agttttgatt cggacagttg gacctgaga cttcacaatc ttcagatcaa ggacaagggc	300
	ttgtatcaat gtatcatcca tcacaaaaag cccacaggaa tgattcgcat ccaccagatg	360
40	aattctgaac tgtcagtgtc tgctaacttc agtcaacctg aaatagtacc aatttctaat	420
	ataacagaaa atgtgtacat aaatttgacc tgctcatcta tacacggta cccagaacct	480

	aagaagatga gtgttttgct aagaaccaag aattcaacta tcgagtatga tggattatg	540
5	cagaaatctc aagataatgt cacagaactg tacgacgttt ccatcagctt gtctgtttca	600
	ttccctgatg ttacgagcaa tatgaccatc ttctgtattc tggaaactga caagacgcgg	660
	cttttatctt cacctttctc tatagagctt gaggaccctc agcctccccc agaccacatt	720
10	cctggaggcg ggggatcc	738
	<210> 10	
	<211> 246	
	<212> PRT	
15	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> B7-2. 5T4. 1	
20	<400> 10	
	Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met Ala Phe Leu Leu Ser Gly	
	1 5 10 15	
	Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu	
25	20 25 30	
	Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val	
	35 40 45	
30	Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu	
	50 55 60	
	Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr	
	65 70 75 80	
35	Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile	
	85 90 95	
	Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr	
40	100 105 110	
	Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala	

	115	120	125	
	Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn			
	130	135	140	
5	Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro			
	145	150	155	160
	Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr			
10	165	170	175	
	Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp			
	180	185	190	
15	Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met			
	195	200	205	
	Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser			
	210	215	220	
20	Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile			
	225	230	235	240
	Pro Gly Gly Gly Gly Ser			
25	245			
	<210> 11			
	<211> 1518			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
30				
	<220>			
	<223> B7-ScFv			
	<400> 11			
35	atggccttgca attgtcagtt gatgcaggat acaccactcc tcaagtttcc atgtccaagg			60
	ctcattcttc tctttgtgct gctgattcgt ctttcacaag tgtcttcaga tgttgatgaa			120
	caactgtcca agtcagtga agataaggta ttgctgcctt gccgttacaa ctctccgc			180
40	gaagatgagt ctgaagaccg aatctactgg caaaaacatg acaaagtggt gctgtctgtc			240

	attgctggga aactaaaagt gtggcccag tataagaacc ggactttata tgacaacact	300
	acctactctc ttatcatcct gggcctggtc ctttcagacc ggggcacata cagctgtgtc	360
5	gttcaaaaga aggaaagagg aacgtatgaa gttaaact tggctttagt aaagttgtcc	420
	atcaaagctg acttctctac cccaacata actgagtctg gaaaccctc tgcagacact	480
10	aaaaggatta cctgctttgc ttccgggggt ttcccaaagc ctgcttctc ttggttgaa	540
	aatggaagag aattacctg catcaatacg acaatttccc aggatcctga atctgaattg	600
	tacaccatta gtagccaact agatttcaat acgactcgca accacaccat taagtgtctc	660
15	attaaatatg gagatgtca cgtgtcagag gacttcacct gggaaaaacc ccagaagac	720
	cctcctgata gcaagcccg ggggtgtggg agcgggtgtg gggcagtgg cggcggcgga	780
20	actagtgagg tccagcttca gcagtctgga cctgacctg tgaagcctg ggcttcagt	840
	aagatatact gcaaggttc tggttactca ttcactggct actacatgca ctgggtgaag	900
	cagagccatg gaaagagcct tgagtggatt ggacgtatta atcctaaca tggtgttact	960
25	ctctacaacc agaaattcaa ggacaaggcc atattaactg tagacaagtc atccaccaca	1020
	gcctacatgg agctccgag cctgacatct gaggactctg cggctctatta ctgtgcaaga	1080
30	tctactatga ttacgaacta tgttatggac tactggggtc aagtaacttc agtcaccgtc	1140
	tcttcaggtg gtggtgggag cgggtgtggc ggcactggcg gggcggatc tagtattgtg	1200
	atgaccaga ctccacatt cctgcttgtt tcagcaggag acagggttac cataacctgc	1260
35	aaggccagtc agagtgtgag taatgatgta gcttggtacc aacagaagcc agggcagtct	1320
	cctacactgc tcatatccta tacatccagt cgtacgtg gagtcctga tgccttcatt	1380
40	ggcagtggat atgggacgga tttaacttcc accatcagca ctttcaggc tgaagacctg	1440
	gcagtttatt tctgtcagca agattataat tctcctcga cgttcgggtg aggcaccaag	1500

	ctggaaatca aacggtaa	1518
	<210> 12	
	<211> 2090	
5	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ScFv-IgE	
10	<400> 12	
	ctcgagccac catgggatgg agctgtatca tctctttott ggtagcaaca gctacaggtg	60
	tccactccga ggtccagctg cagcagtctg gacctgacct ggtgaagcct ggggcttcag	120
15	tgaagatata ctgcaagget tctggttact cattcaactgg ctactacatg cactgggtga	180
	agcagagcca tggaaagagc cttgagtgga ttggacgtat taatcctaac aatgggtgta	240
20	ctctctacaa ccagaaattc aaggacaagg ccatattaac tgtagacaag tcattccacca	300
	cagcctacat ggagctccgc agcctgacat ctgaggactc tgcggtctat tactgtgcaa	360
	gatctactat gattacgaac tatgttatgg actactgggg tcaagtaact tcagtcaccg	420
25	tctcttcagg tgggtggtggg agcgggtggtg gcggcactgg cggcggcgga tctagtattg	480
	tgatgaccca gactcccaca ttctgcttg tttcagcagg agacagggtt accataacct	540
30	gcaaggccag tcagagtgtg agtaatgatg tagcttggtg ccaacagaag ccagggcagt	600
	ctctacact gctcatatcc tatacatcca gtcgtacgc tggagtccct gatcgcttca	660
	ttggcagtgg atatgggacg gatttcactt tcaccatcag cactttgcag gctgaagacc	720
35	tggcagttta tttctgtcag caagattata attctctccc gacgttcggt ggaggcacca	780
	agcttgaaat caaacgggcc tccacacaga gccatccgt cttccccctg acccgctgct	840
40	gcaaaaacat tccctccaat gccacctccg tgactctggg ctgcctggcc aagggtact	900
	tcccggagcc ggtgatggtg acctgggaca caggtccct caacgggaca actatgacct	960

	taccagccac caccctcacg ctctctggtc actatgccac catcagcttg ctgaccgtct	1020
5	cggtgtcgtg ggccaagcag atgttcacct gccgtgtggc acacactcca tcgtccacag	1080
	actgggtcga caacaaaacc ttcagcgtct gctccaggga cttcaccccg cccaccgtga	1140
	agatcttaca gtctctctgc gacggcggcg ggcacttccc cccgaccatc cagctcctgt	1200
10	gcctcgtctc tgggtacacc ccagggacta tcaacatcac ctggctggag gacgggcagg	1260
	tcattggacgt ggacttgtec accgcctcta ccacgcagga gggtagctg gcctccacac	1320
15	aaagcgagct caccctcagc cagaagcact ggctgtcaga ccgcacctac acctgccagg	1380
	tcacctatca aggtcacacc tttaggaca gcaccaagaa gtgtgcagat tccaaccga	1440
	gaggggtgag cgcctaccta agccggccca gcccgttoga cctgttcate cgcaagtgc	1500
20	ccacgatcac ctgtctgggtg gtggacctgg caccacgaa ggggacctg aacctgacct	1560
	ggtcccgggc cagtgggaag cctgtgaacc actccaccag aaaggaggag aagcagcgca	1620
25	atggcacgtt aacctcacg tccacctgc cgggtggcac ccgagactgg atcgaggggg	1680
	agacctacca gtgcagggtg accaccccc acctgccag ggcctcatg cgggtccaga	1740
	ccaagaccag cggcccgtgt gctgccccgg aagtctatgc gtttgcgacg ccggagtggc	1800
30	cggggagccg ggacaagcgc accctgcct gccatgcca gaattcatg cctgaggaca	1860
	tctcgggtgca gtggtgcac aacgaggtgc agctcccgga cggccggcac agcacgacgc	1920
35	agccccgcaa gaccaagggc tccggcttct tcgtcttcag ccgcctggag gtgaccagg	1980
	ccgaatggga gcagaaagat gagttcatct gccgtgcagt ccatgaggca gcgagccct	2040
	cacagaccgt ccagcgagcg gtgtctgtaa atcccgtaa atgagagctc	2090
40	<210> 13	
	<211> 945	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> B7-EGF	
5	<400> 13	
	atggcettgca attgtcagtt gatgcaggat acaccactcc tcaagtttcc atgtccaagg	60
	ctcattcttc tctttgtgct gctgattcgt cttcacaaag tgtcttcaga tgttgatgaa	120
10	caactgtcca agtcagtgaag agataaggta ttgtgcctt gccgttacaa ctctccgcat	180
	gaagatgagt ctgaagaccg aatctactgg caaaaacatg acaaagtggg gctgtctgtc	240
15	attgctggga aactaaaagt gtggcccagag tataagaacc ggactttata tgacaacact	300
	acctactctc ttatcatcct gggcctggtc ctttcagacc ggggcacata cagctgtgtc	360
	gttcaaaaga aggaaagagg aacgtatgaa gttaaact tggctttagt aaagttgtcc	420
20	atcaaagctg acttctctac ccccaacata actgagtctg gaaaccatc tgcagacact	480
	aaaaggatta cctgctttgc ttccgggggt ttccaaagc ctgcttctc ttggttgga	540
25	aatggaagag aattacctgg catcaatacg acaatttccc aggatcctga atctgaattg	600
	tacaccatta gtagccaact agatttcaat acgactcgca accacaccat taagtgtctc	660
	attaaatatg gagatgctca cgtgtcagag gacttcacct gggaaaaacc ccagaagac	720
30	cctctgata gcaagcccgg ggggtggggg agcgggtggg gcggcagtg cgggcgcgga	780
	actagtaata gtgactctga atgtccctg tcccacgatg ggtactgcct ccatgatggg	840
35	gtgtgcatgt atattgaagc attggacaag tatgcatgca actgtgttgt tggctacatc	900
	ggggagcgat gtcagtaccg agacctgaag tgggtgggaac tgcgc	945
	<210> 14	
40	<211> 1263	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<223> 5T4	
5	<400> 14	
	atgcctgggg ggtgctcccg gggccccgcc gccggggacg ggcggttgcg gctggcgogg	60
	ctggcgctgg tgcctctggg ctgggtctcc tcgtcctcgc tcacctctg ggcgccctcc	120
10	gccgccgct ccacgtgcc gccggcctcc gcggcgctcg ccccgcccc gctgccgggc	180
	cagtgcctcc agccttgcca gtgctcggag gcggcgogca cggtaagtg cgttaaccgc	240
	aacctgaccg aggtgcccc ggacctgccc ccctacgtgc gcaacctctt cctcacgggc	300
15	aaccagctgg cgggtctgcc ccccggcgcc ttgcctcgcc ggccgcgct ggccgagctg	360
	gccgcgtca acctgagcgg cagcagcctg cgggaggtgt gcgcgggcg cttcagcac	420
20	ctgccagcc tgcgccagct cgacctcagc cacaaccgc tgggcaacct cagcgcttc	480
	gccttcgagg gcagcgacgc cagccgctcg ggccccagcc ccctggtgga gctgatgctg	540
	aaccacatcg tgcccccca cgaccggcgg cagaaccgga gcttcgagg catggtggcg	600
25	gctgcctcc gagcgggcg cgccttcgc gggtgcagt gcctggagct ggccggcaac	660
	cgttcctct acttgctcg cgacgtcctg gccagctac ccggcctcg gcacctggac	720
30	ctgcgaaca actccctggt gagcctcacc tacgtgtct tccgcaacct gacgcacttg	780
	gagagcctcc acctggagga caacgcctc aaggtcctc acaacgccac cctggcggag	840
	ctgcagagcc tgccccacgt ccgggtcttc ctggacaaca acccctgggt ctgcgattgt	900
35	cacatggcag acatggtggc ctggctcaag gagacagagg tggcgccggg caaagccggg	960
	ctcacctgtg cattcccga gaaaatgagg aatcgggccc tcttggaact caacagctcc	1020
40	cacctggaact gtgacctat cctccctcca tccctgcaga cttcttatgt cttcctaggt	1080
	attgtcttag cctgatagg cgccatcttc ctactggttt tgtatttgaa ccgcaagggg	1140

	ataaagaagt ggatgcataa catcagagat gcctgcaggg atcacatgga agggatatcac	1200
5	tacagatacg aaatcaatgc agaccccagg ttaacaaacc tcagttccaa ttoggatgtc	1260
	tga	1263
10	<210> 15 <211> 420 <212> PRT <213> 人工序列	
15	<220> <223> 5T4 <400> 15	
20	Met Pro Gly Gly Cys Ser Arg Gly Pro Ala Ala Gly Asp Gly Arg Leu 1 5 10 15	
	Arg Leu Ala Arg Leu Ala Leu Val Leu Leu Gly Trp Val Ser Ser Ser 20 25 30	
25	Ser Leu Thr Ser Trp Ala Pro Ser Ala Ala Ala Ser Thr Ser Pro Pro 35 40 45	
	Ala Ser Ala Ala Ser Ala Pro Pro Pro Leu Pro Gly Gln Cys Pro Gln 50 55 60	
30	Pro Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn Arg 65 70 75 80	
35	Asn Leu Thr Glu Val Pro Ala Asp Leu Pro Pro Tyr Val Arg Asn Leu 85 90 95	
	Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu Pro Pro Gly Ala Phe Ala 100 105 110	
40	Arg Arg Pro Pro Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Asn Leu Ser Gly Ser 115 120 125	
	Ser Leu Arg Glu Val Cys Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Ser Leu	

	130	135	140	
	Arg Gln Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Gly Asn Leu Ser Ala Phe			
	145	150	155	160
5	Ala Phe Ala Gly Ser Asp Ala Ser Arg Ser Gly Pro Ser Pro Leu Val			
	165	170	175	
	Glu Leu Met Leu Asn His Ile Val Pro Pro Asp Asp Arg Arg Gln Asn			
10	180	185	190	
	Arg Ser Phe Glu Gly Met Val Ala Ala Ala Leu Arg Ala Gly Arg Ala			
	195	200	205	
15	Leu Arg Gly Leu Gln Cys Leu Glu Leu Ala Gly Asn Arg Phe Leu Tyr			
	210	215	220	
	Leu Pro Arg Asp Val Leu Ala Gln Leu Pro Gly Leu Arg His Leu Asp			
	225	230	235	240
20	Leu Arg Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr Val Ser Phe Arg Asn			
	245	250	255	
	Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu Glu Asp Asn Ala Leu Lys Val			
25	260	265	270	
	Leu His Asn Ala Thr Leu Ala Glu Leu Gln Ser Leu Pro His Val Arg			
	275	280	285	
30	Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys His Met Ala Asp			
	290	295	300	
	Met Val Ala Trp Leu Lys Glu Thr Glu Val Val Pro Gly Lys Ala Gly			
	305	310	315	320
35	Leu Thr Cys Ala Phe Pro Glu Lys Met Arg Asn Arg Ala Leu Leu Glu			
	325	330	335	
	Leu Asn Ser Ser His Leu Asp Cys Asp Pro Ile Leu Pro Pro Ser Leu			
40	340	345	350	
	Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile Val Leu Ala Leu Ile Gly Ala			

	355	360	365	
	Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn Arg Lys Gly Ile Lys Lys Trp			
	370	375	380	
5	Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg Asp His Met Glu Gly Tyr His			
	385	390	395	400
	Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro Arg Leu Thr Asn Leu Ser Ser			
10	405	410	415	
	Asn Ser Asp Val			
	420			
	<210> 16			
15	<211> 47			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
20	<223> 连接 B7.1 的胞外结构域和 ScFv 的柔性接头			
	<400> 16			
	ctagttccgc cgcgcgcact gccgccacca ccgtccccc ccccccc			47
25	<210> 17			
	<211> 38			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
30	<220>			
	<223> PCR 引物			
	<400> 17			
	ctcgaattcc accatggctt gcaattgtca gttgatgc			38
35	<210> 18			
	<211> 30			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
40	<220>			
	<223> PCR 引物			

	<400> 18	
	ctccccgggc ttgctatcag gaggtcttc	30
5	<210> 19	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
10	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 19	
	ctcactagtg aggtccagct tcagcagtc	29
15	<210> 20	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
20	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 20	
25	ctcgcggcgcg cttaccgttt gatttcagc ttggtgcctc cacc	44
	<210> 21	
	<211> 87	
	<212> DNA	
30	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 翻译起始序列和人免疫球蛋白κ轻链信号肽	
35	<400> 21	
	ctagactcga gccaccatgg gatggagctg tatcatcctc ttcttggtag caacagctac	60
	aggtgtccac tccgaggtcc agctgca	87
40	<210> 22	
	<211> 79	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 翻译起始序列和人免疫球蛋白κ轻链信号肽	
5		
	<400> 22	
	gctggacctc ggagtggaca cctgtagctg ttgctaccaa gaagaggatg atacagctcc	60
	atcccatggt ggctcgagt	79
10		
	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
15		
	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 23	
20	gtccagctgc agcagtctgg	20
	<210> 24	
	<211> 22	
	<212> DNA	
25	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	
30	<400> 24	
	ogtttgattt caagcttggt gc	22
	<210> 25	
	<211> 40	
35	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	
40		
	<400> 25	
	gogcaagctt gaaatcaaac gggcctccac caagggccca	40

5	<210> 26 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> PCR 引物	
10	<400> 26 gcgcctcgag tcatttaccc ggagacaggg	30
15	<210> 27 <211> 40 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> PCR 引物	
20	<400> 27 gcgcaagctt gaaatcaaac gggcctccac acagagccca	40
25	<210> 28 <211> 31 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> PCR 引物	
30	<400> 28 gcgcctcgag tcatttaccc ggatttacag a	31
35	<210> 29 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
40	<220> <223> PCR 引物	

	<400> 29	
	ggactagtaa tagtgactct gaatgtccc	29
5	<210> 30	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
10	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 30	
	attagcggcc gcttagcgca gttcccacca cttc	34
15	<210> 31	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
20	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 31	
	atgcgctgca ggccaccatg gcttgcaatt gtcag	35
25	<210> 32	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
30	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 32	
35	gcgcgaattc ttaccgtttg atttcagct tggt	34
	<210> 33	
	<211> 34	
	<212> DNA	
40	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> PCR 引物	
	<400> 33	
5	atcgccctgca ggccaccatg ggatggagct gtat	34
	<210> 34	
	<211> 34	
	<212> DNA	
10	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 34	
15	gcgcgaattc ttaccgtttg atttcagct tggt	34
	<210> 35	
	<211> 48	
	<212> DNA	
20	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> pBS II 中的接头序列	
25	<400> 35	
	ctagtaccgg tgggtggtggg agcgggtggtg gcggcagtg cggcggcg	48
	<210> 36	
	<211> 15	
30	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> pBS II 中的接头序列	
35	<400> 36	
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
40	1 5 10 15	
	<210> 37	
	<211> 76	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
5	<223> pBS II 中的前导序列	
	<400> 37	
	ctagacctgc aggccaccat gggatggagc tgtatcatcc tcttcttggt agcaacagct	60
10	acaggtgtac actccc	76

图 1

1 GAGGTCCAGC TTCAGCAGTC TGGACCTGAC CTGGTGAAGC CTGGGGCTTC
E V Q L Q Q S G P D L V K P G A S

51 AGTGAAGATA TCCTGCAAGG CTTCTGGTTA CTCATTCACT GGCTACTACA
V K I S C K A S G Y S F T G Y Y

101 TGCACTGGGT GAAGCAGAGC CATGGAAAGA GCCTTGAGTG GATTGGACGT
M H W V K Q S H G K S L E W I G R

151 ATTAATCCTA ACAATGGTGT TACTCTCTAC AACCAGAAAT TCAAGGACAA
I N P N N G V T L Y N Q K F K D K

201 GGCCATATTA ACTGTAGACA AGTCATCCAC CACAGCCTAC ATGGAGCTCC
A I L T V D K S S T T A Y M E L

251 GCAGCCTGAC ATCTGAGGAC TCTGCGGTCT ATTACTGTGC AAGATCTACT
R S L T S E D S A V Y Y C A R S T

301 ATGATTACGA ACTATGTTAT GGACTACTGG GGTCAAGTAA CCTCAGTCAC
M I T N Y V M D Y W G Q V T S V T

351 CGTCTCCTCA GGTGGTGGTG GGAGCGGTGG TGGCGGCACT GGC GGCGGCG
V S S G G G G S G G G G T G G G

401 GATCTAGTAT TGTGATGACC CAGACTCCCA CATTCTGCT TGTTCAGCA
G S S I V M T Q T P T F L L V S A

451 GGAGACAGGG TTACCATAAC CTGCAAGGCC AGTCAGAGTG TGAGTAATGA
G D R V T I T C K A S Q S V S N D

501 TGTAGD TTGG TACCAACAGA AGCCAGGGCA GTCTCCTACA CTGCTCATAT
V A W Y Q Q K P G Q S P T L L I

551 CCTATACATC CAGTCGCTAC GCTGGAGTCC CTGATCGCTT CATTGGCAGT
S Y T S S R Y A G V P D R F I G S

601 GGATATGGGA CGGATTTCAC TTTCACCATC AGCACTTTGC AGGCTGAAGA
G Y G T D F T F T I S T L Q A E D

651 CCTGGCAGTT TATTTCTGTC AGCAAGATTA TAATTCTCCT CCGACGTTCTG
L A V Y F C Q Q D Y N S P P T F

701 GTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAACGG
G G G T K L E I K R

图 2

ATGGGCCACA CACGGAGGCA GGAACATCA CCATCCAAGT GTCCATACCT	50
M G H T R R Q G T S P S K C P Y L	
CAATTTCTTT CAGCTCTTGG TGCTGGCTGG TCTTTCTCAC TTCTGTTCAG	100
N F F Q L L V L A G L S H F C S	
GTGTTATCCA CGTGACCAAG GAAGTGAAAG AAGTGGCAAC GCTGTCCTGT	150
G V I H V T K E V K E V A T L S C	
GGTCACAATG TTTCTGTTGA AGAGCTGGCA CAAACTCGCA TCTACTGGCA	200
G H N V S V E E L A Q T R I Y W Q	
AAAGGAGAAG AAAATGGTGC TGACTATGAT GTCTGGGGAC ATGAATATAT	250
K E K K M V L T M M S G D M N I	
GGCCCGAGTA CAAGAACCGG ACCATCTTTG ATATCACTAA TAACCTCTCC	300
W P E Y K N R T I F D I T N N L S	
ATTGTGATCC TGGCTCTGCG CCCATCTGAC GAGGGCACAT ACGAGTGTGT	350
I V I L A L R P S D E G T Y E C V	
TGTTCTGAAG TATGAAAAAG ACGCTTTCAA GCGGGAACAC CTGGCTGAAG	400
V L K Y E K D A F K R E H L A E	
TGACGTTATC AGTCAAAGCT GACTTCCCTA CACCTAGTAT ATCTGACTTT	450
V T L S V K A D F P T P S I S D F	
GAAATCCAA CTTCTAATAT TAGAAGGATA ATTTGCTCAA CCTCTGGAGG	500
E I P T S N I R R I I C S T S G G	
TTTTCCAGAG CCTCACCTCT CCTGGTTGGA AAATGGAGAA GAATTAAATG	550
F P E P H L S W L E N G E E L N	
CCATCAACAC AACAGTTTCC CAAGATCCTG AAAGTGAGCT CTATGCTGTT	600
A I N T T V S Q D P E T E L Y A V	
AGCAGCAAAC TGGATTTCAA TATGACAACC AACCACAGCT TCATGTGTCT	650
S S K L D F N M T T N H S F M C L	
CATCAAGTAT GGACATTTAA GAGTGAATCA GACCTTCAAC TGGAATACAA	700
I K Y G H L R V N Q T F N W N T	
CCAAGCAAGA GCATTTTCCT GATGGAGGCG GGGGATCCGA GGTCCAGCTT	750
T K Q E H F P D G G G G S E V Q L	

图 2 续

CAGCAGTCTG GACCTGACCT GGTGAAGCCT GGGGCTTCAG TGAAGATATC	800
Q Q S G P D L V K P G A S V K I S	
CTGCAAGGCT TCTGGTTACT CATTCACTGG CTACTACATG CACTGGGTGA	850
C K A S G Y S F T G Y Y M H W V	
AGCAGAGCCA TGGAAAGAGC CTTGAGTGGA TTGGACGTAT TAATCCTAAC	900
K Q S H G K S L E W I G R I N P N	
AATGGTGTTA CTCTCTACAA CCAGAAATTC AAGGACAAGG CCATATTAAC	950
N G V T L Y N Q K F K D K A I L T	
TGTAGACAAG TCATCCACCA CAGCCTACAT GGAGCTCCGC AGCCTGACAT	1000
V D K S S T T A Y M E L R S L T	
CTGAGGACTC TGCGGTCTAT TACTGTGCAA GATCTACTAT GATTACGAAC	1050
S E D S A V Y Y C A R S T M I T N	
TATGTTATGG ACTACTGGGG TCAAGTAACC TCAGTCACCG TCTCCTCAGG	1100
Y V M D Y W G Q V T S V T V S S G	
TGGTGGTGGG AGCGGTGGTG GCGGCACTGG CGGCGGCGGA TCTAGTATTG	1150
G G G S G G G G T G G G G S S I	
TGATGACCCA GACTCCCACA TTCCTGCTTG TTTCAGCAGG AGACAGGGTT	1200
V M T Q T P T F L L V S A G D R V	
ACCATAACCT GCAAGGCCAG TCAGAGTGTG AGTAATGATG TAGCTTGGTA	1250
T I T C K A S Q S V S N D V A W Y	
CCAACAGAAG CCAGGGCAGT CTCCTACACT GCTCATATCC TATACATCCA	1300
Q Q K P G Q S P T L L I S Y T S	
GTCGCTACGC TGGAGTCCCT GATCGCTTCA TTGGCAGTGG ATATGGGACG	1350
S R Y A G V P D R F I G S G Y G T	
GATTTCACTT TCACCATCAG CACTTTGCAG GCTGAAGACC TGGCAGTTTA	1400
D F T F T I S T L Q A E D L A V Y	
TTTCTGTCAG CAAGATTATA ATTCTCCTCC GACGTTCCGGT GGAGGCACCA	1450
F C Q Q D Y N S P P T F G G G T	
AGCTGGAAAT CAAATAA	
K L E I K .	

图 3a

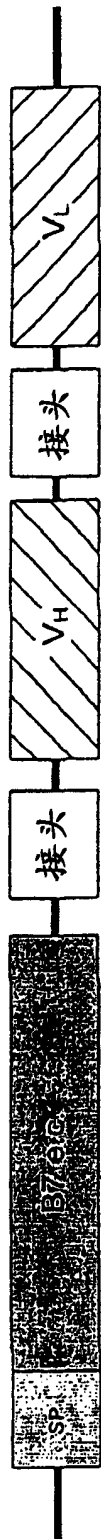


图 3b



图 4

```

1   ATGGGACTGA GTAACATTCT CTTTGTGATG GCCTTCCTGC TCTCTGGTGC
    M G L S N I L F V M A F L L S G A

51  TGCTCCTCTG AAGATTCAAG CTTATTTCAA TGAGACTGCA GACCTGCCAT
    A P L K I Q A Y F N E T A D L P

101 GCCAATTTGC AAACCTCTCAA AACCAAAGCC TGAGTGAGCT AGTAGTATTT
    C Q F A N S Q N Q S L S E L V V F

151 TGGCAGGACC AGGAAAACCTT GGTTCCTGAAT GAGGTATACT TAGGCAAAGA
    W Q D Q E N L V L N E V Y L G K E

201 GAAATTTGAC AGTGTTCATT CCAAGTATAT GGGCCGCACA AGTTTTGATT
    K F D S V H S K Y M G R T S F D

251 CGGACAGTTG GACCCTGAGA CTTCAACAATC TTCAGATCAA GGACAAGGGC
    S D S W T L R L H N L Q I K D K G

301 TTGTATCAAT GTATCATCCA TCACAAAAAG CCCACAGGAA TGATTCGCAT
    L Y Q C I I H H K K P T G M I R I

351 CCACCAGATG AATTCTGAAC TGTCAGTGCT TGCTAACTTC AGTCAACCTG
    H Q M N S E L S V L A N F S Q P

401 AAATAGTACC AATTTCTAAT ATAACAGAAA ATGTGTACAT AAATTTGACC
    E I V P I S N I T E N V Y I N L T

451 TGCTCATCTA TACACGGTTA CCCAGAACCT AAGAAGATGA GTGTTTTGCT
    C S S I H G Y P E P K K M S V L L

501 AAGAACCAAG AATTCAACTA TCGAGTATGA TGGTATTATG CAGAAATCTC
    R T K N S T I E Y D G I M Q K S

551 AAGATAATGT CACAGAACTG TACGACGTTT CCATCAGCTT GTCTGTTTCA
    Q D N V T E L Y D V S I S L S V S

601 TTCCCTGATG TTACGAGCAA TATGACCATC TTCTGTATTC TGGAAACTGA
    F P D V T S N M T I F C I L E T D

651 CAAGACGCGG CTTTATCTTT CACCTTTCTC TATAGAGCTT GAGGACCCTC
    K T R L L S S P F S I E L E D P

701 AGCCTCCCCC AGACCACATT CCTGGAGGCG GGGGATCC
    Q P P P D H I P G G G G S

```

图 5

```

atggcttgca attgtcagtt gatgcaggat acaccactcc tcaagtttcc atgtccaagg 60
ctcattcttc tctttgtgct gctgattcgt ctttcacaag tgtcttcaga tgttgatgaa 120
caactgtcca agtcagtgaag agataaggta ttgctgcctt gccgttaca ctctccgcat 180
gaagatgagt ctgaagaccg aatctactgg caaaaacatg acaaagtggg gctgtctgtc 240
attgctggga aactaaaagt gtggccccgag tataagaacc ggactttata tgacaacact 300
acctactctc ttatcatcct gggcctgggc ctttcagacc ggggcacata cagctgtgtc 360
gttcaaaaga aggaaagagg aacgtatgaa gttaaacact tggctttagt aaagttgtcc 420
atcaaagctg acttctctac ccccaacata actgagtctg gaaacccatc tgcagacact 480
aaaaggatta cctgctttgc ttccgggggt ttcccaaagc ctgcttctc ttggttgaa 540
aatggaagag aattacctgg catcaatacg acaatttccc aggatcctga atctgaattg 600
tacaccatta gtagccaact agatttcaat acgactcgca accacaccat taagtgtctc 660
attaatatg gagatgctca cgtgtcagag gacttcacct gggaaaaacc cccagaagac 720
cctcctgata gcaagcccgg ggggtggtgg agcgggtggtg gcggcagtg cgccggcgga 780
actagtggag tccagcttca gcagtctgga cctgacctgg tgaagcctgg ggcttcagtg 840
aagatatcct gcaaggcttc tggttactca ttactggct actacatgca ctgggtgaag 900
cagagccatg gaaagagcct tgagtggatt ggacgtatta atcctaaca tgggtgttact 960
ctctacaacc agaaattcaa ggacaaggcc atattaactg tagacaagtc atccaccaca 1020
gcctacatgg agctccgcag cctgacatct gaggactctg cggctctatta ctgtgcaaga 1080
tctactatga ttacgaacta tggtatggac tactgggggc aagtaacttc agtcaccgtc 1140
tcttcagggtg gtggtgggag cgggtggtgg ggcactggcg gcggcggtac tagtattgtg 1200
atgacccaga ctccacatt cctgcttggt tcagcaggag acagggttac cataacctgc 1260
aaggccagtc agagtgtgag taatgatgta gcttggtacc aacagaagcc agggcagtc 1320
cctacactgc tcatatccta tacatccagt cgctacgctg gagtccctga tcgcttcatt 1380
ggcagtggat atgggacgga ttctacttcc accatcagca ctttgcaggc tgaagacctg 1440
gcagtttatt tctgtcagca agattataat tctcctccga cgttcggtgg aggcaccaag 1500
ctggaaatca aacggtaa
1518

```

图 6

Leader/5T4 scFv/HlgG DNA 和推导的蛋白质序列

CTCGAGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGAGGTCCAGCTG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S E V Q L

CAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGG
Q Q S G P D L V K P G A S V K I S C K A S G Y S F T

CTACTACATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAATCCTAACAAATGGTGTTA
G Y Y M H W V K Q S H G K S L E W I G R I N P N N G V

CTCTCTACAACCAGAAATTCAAGGACAAGGCCATATTAAGTGTAGACAAGTCATCCACCACAGCCTACATGGAGCTCCGC
T L Y N Q K F K D K A I L T V D K S S T T A Y M E L R

AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCTACTATGATTACGAACTATGTTATGGACTACTGGGG
S L T S E D S A V Y Y C A R S T M I T N Y V M D Y W

TCAAGTAACTTCAGTCAACGCTCTCTTCAGGTGGTGGTGGGAGCGGTGGTGGCGGCACTGGCGGCGGCGGATCTAGTATTG
G Q V T S V T V S S G G G G S G G G G T G G G G S S I

TGATGACCCAGACTCCACATTCCTGCTTCTTCAGCAGGAGACAGGGTTACCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTG
V M T Q T P T F L L V S A G D R V T I T C K A S Q S V

AGTAATGATGTAGCTTGGTACCAACAGAAGCCAGGGCAGTCTCCTACACTGCTCATATCCTATACATCCAGTCGCTACGC
S N D V A W Y Q Q K P G Q S P T L L I S Y T S S R Y

TGGAGTCCCTGATCGCTTCATTGGCAGTGGATATGGGACGGATTTCACCTTCACCATCAGCACTTTGCAGGCTGAAGACC
A G V P D R F I G S G Y G T D F T F T I S T L Q A E D

TGGCAGTTTATTTCTGTCAAGATTATAATTCTCCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTTGAATCAACGGGCC
L A V Y F C Q Q D Y N S P P T F G G G T K L E I K R A

TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTCGCT
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C

GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGG
L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P

CTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC
A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y

ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACAC
I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H

ATGCCACCGTGCCAGCACTGAACTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAGGACACCCCTCA
T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L

TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y

GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S

CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCA
V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P

TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGCGAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTG
I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E M

ACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N

GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCG
G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T

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

AAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAATGACTCGAG
K S L S L S P G K .

图 7

```

ctcgagccac catgggatgg agctgtatca tcctcttctt ggtagcaaca gctacaggtg 60
tccactccga ggtccagctg cagcagtctg gacctgacct ggtgaagcct ggggcttcag 120
tgaagatata ctgcaaggct tctggttact cattcactgg ctactacatg cactgggtga 180
agcagagcca tggaaagagc cttgagtggg ttggacgtat taatcctaac aatgggtgta 240
ctctctacaa ccagaaattc aaggacaagg ccatattaac ttagacaag tcatccacca 300
cagcctacat ggagctccgc agcctgacat ctgaggactc tgcggtctat tactgtgcaa 360
gatctactat gattacgaac tatgttatgg actactgggg tcaagtaact tcagtcaccg 420
tctcttcagg tgggtggggg agcgggtggg gcggcactgg cggcggcgga tctagtattg 480
tgatgaccsa gactcccaca ttctgtcttg tttcagcagg agacagggtt accataacct 540
gcaaggccag tcagagtgtg agtaatgatg tagcttggtg ccaacagaag ccagggcagt 600
ctcctacact gctcatatcc tatacatcca gtcgctacgc tggagtccct gatcgcttca 660
ttggcagtgg atatgggacg gatttcactt tcaccatcag cactttgcag gctgaagacc 720
tggcagttta tttctgtcag caagattata attctcctcc gacgttcggt ggaggcacca 780
agcttgaaat caaacgggcc tccacacaga gccatccgt ctccccttg acccgctgct 840
gcaaaaacat tccctccaat gccacctccg tgactctggg ctgcctggcc acgggctact 900
tcccggagcc ggtgatggg agctgggaca caggctccct caacgggaca actatgacct 960
taccagccac caccctcacg ctctctgggc actatgccac catcagcttg ctgaccgtct 1020
cgggtgcgtg ggccaagcag atgttcacct gccgtgtggc acacactcca tcgtccacag 1080
actgggtcga caacaaaacc ttcagcgtct gctccaggga cttcaccccg cccaccgtga 1140
agatcttaca gtcgtcctgc gacggcgggg ggcacttccc cccgaccatc cagctcctgt 1200
gcctcgtctc tgggtacacc ccagggacta tcaacatcac ctggctggag gacgggcagg 1260
tcattggacg ggacttgctc accgctctc ccacgcagga gggtagctg gcctccacac 1320
aaagcgagct caccctcagc cagaagcact ggctgtcaga ccgcacctac acctgccagg 1380
tcacctatca aggtcacacc tttgaggaca gcaccaagaa gtgtgcagat tccaaccgga 1440
gaggggtgag cgcctacctc agccggccca gcccggttca cctgttctc cgcaagtcgc 1500
ccacgatcac ctgtctggg gtggacctgg caccagcaa ggggaccgtg aacctgacct 1560
ggtcccgggc cagtgggaag cctgtgaacc actccaccag aaaggaggag aagcagcgca 1620
atggcacgtt aaccgtcacg tccaccctgc cgggtgggcac ccgagactgg atcgaggggg 1680
agacctacca gtgcagggtg acccaacccc acctgccag ggcctcatg cgggccacga 1740
ccaagaccag cggcccgcgt gctgccccgg aagtctatgc gtttgcgacg ccggagtggc 1800
cggggagccg ggacaagcgc accctcgctt gcctgatcca gaacttcatg cctgaggaca 1860
tctcggtgca gtggctgcac aacgaggtgc agtcccggga cggccggcac agcacgacgc 1920
agccccgcaa gaccaagggc tccggcttct tcgtcttcag ccgcctggag gtgaccaggg 1980
ccgaatggga gcagaaagat gaggttcatc gccgtgcagt ccatgaggca gcgagccctt 2040
cacagaccgt ccagcgagcg gtgtctgtaa atcccggtaa atgagagctc 2090

```

图 8

```

atggcttgca attgtcagtt gatgcaggat acaccactcc tcaagtttcc atgtccaagg 60
ctcattcttc tctttgtgct gctgattcgt ctttcacaag tgtcttcaga tgttgatgaa 120
caactgtcca agtcagtga agataaggta ttgctgcctt gccgttaca ctctccgcac 180
gaagatgagt ctgaagaccg aatctactgg caaaaacatg acaaagtggg gctgtctgtc 240
attgctggga aactaaaagt gtggcccagg tataagaacc ggactttata tgacaacact 300
acctactctc ttatcatcct gggcctggtc ctttcagacc ggggcacata cagctgtgtc 360
gttcaaaaga aggaaagagg aacgtatgaa gttaaacact tggttttagt aaagtgtgcc 420
atcaaagctg acttctctac cccaacata actgagtctg gaaacccatc tgcagacact 480
aaaaggatta cctgctttgc ttccgggggt tcccaaagc ctgccttctc ttggttgga 540
aatggaagag aattacctgg catcaatac acaatttccc aggatcctga atctgaattg 600
tacaccatta gtagccaact agatttcaat acgactcgca accacaccat taagtgtctc 660
attaaatatg gagatgctca cgtgtcagag gacttcacct gggaaaaacc ccagaagac 720
cctcctgata gcaagcccgg ggggtggggg agcgggtggg gcggcagtgg cggcggcgga 780
actagtaata gtgactctga atgtcccctg tcccacgatg ggtactgcct ccatgatggg 840
gtgtgcatgt atattgaagc attggacaag tatgcatgca actgtgttgt tggctacatc 900
ggggagcgat gtcagtaccg agacctgaag tgggtgggaac tgcgc 945

```

图 9
CT26-neo 转染子

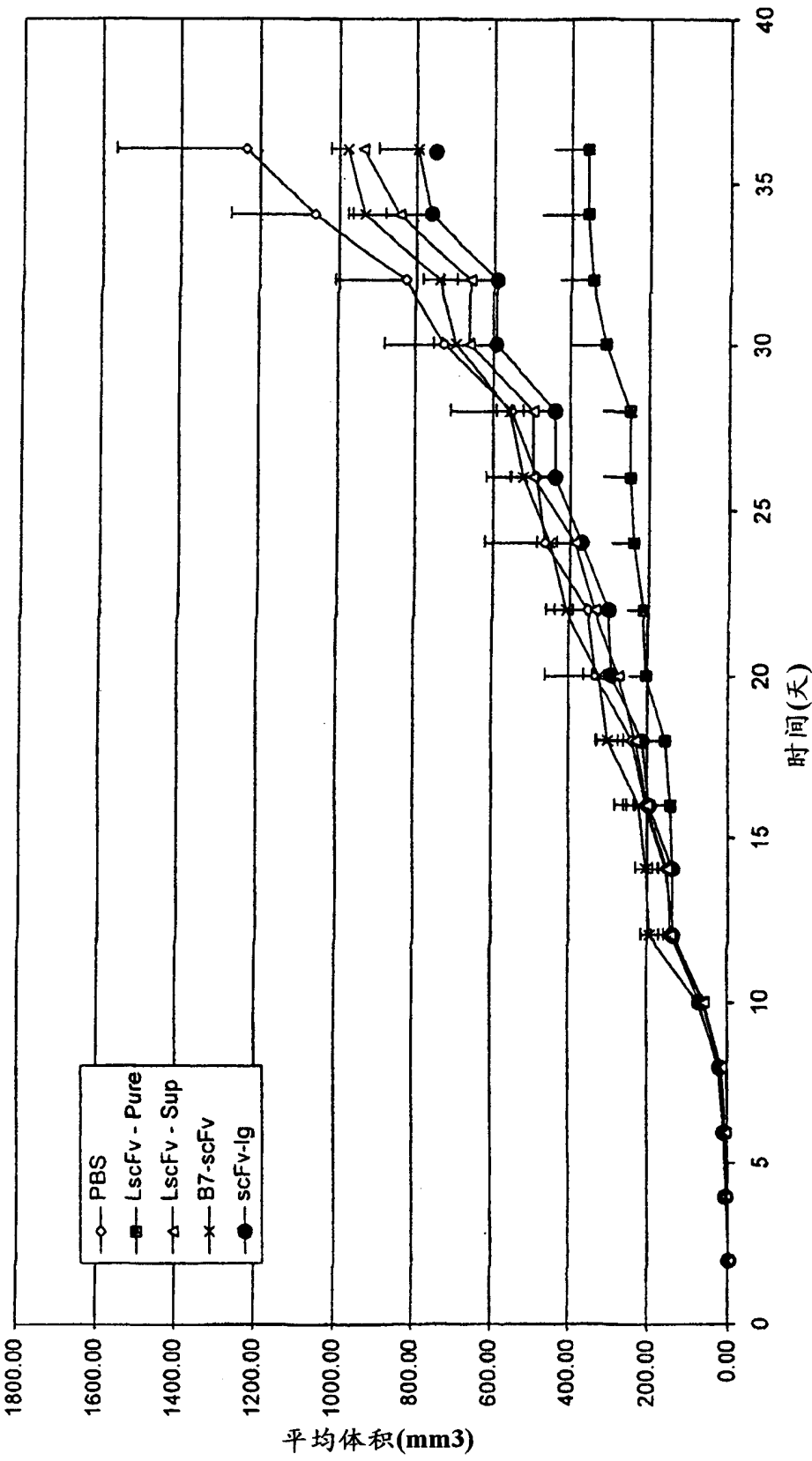


图 10
CT26-h5T4 转染子

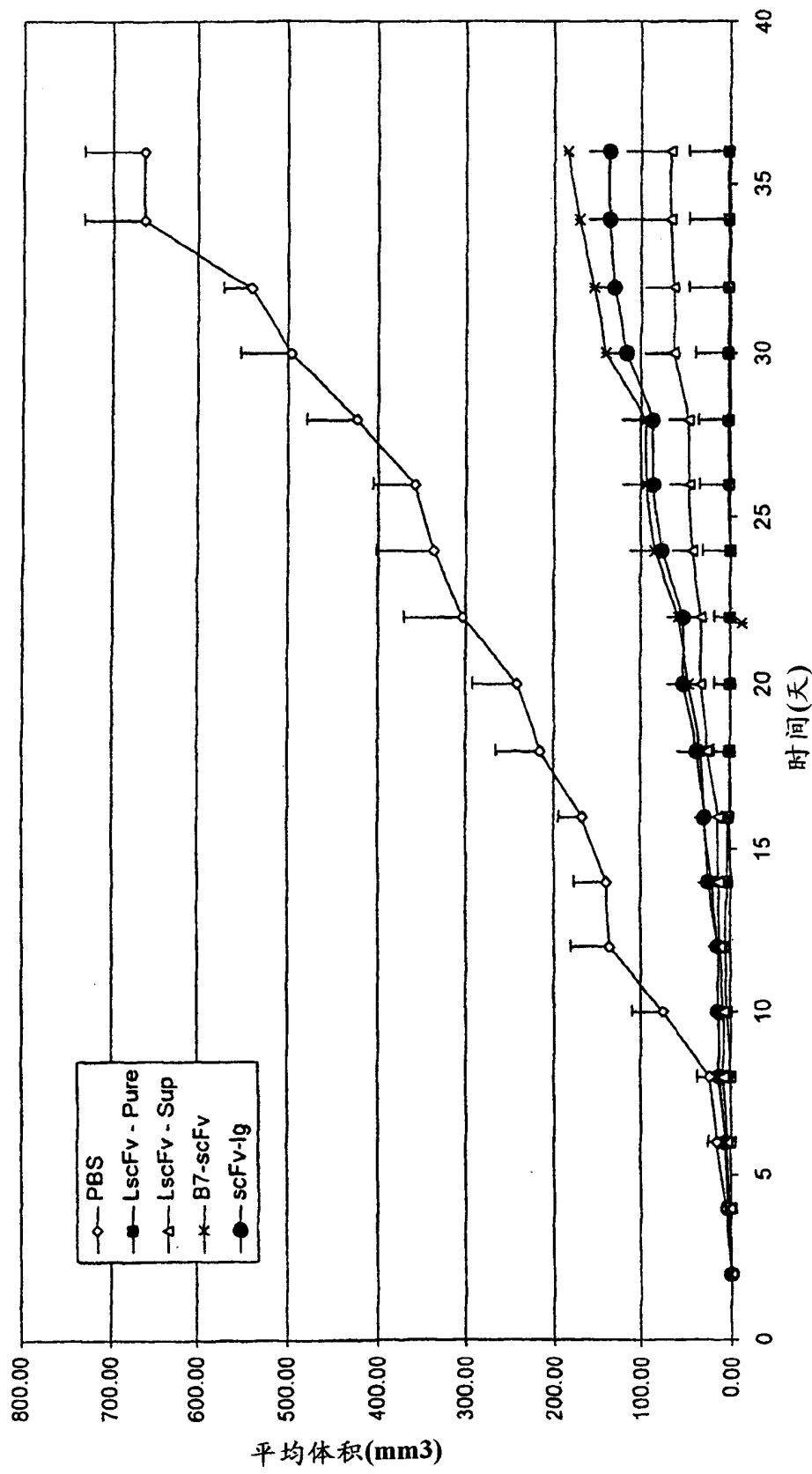


图 11
B16-h5T4 肿瘤生长

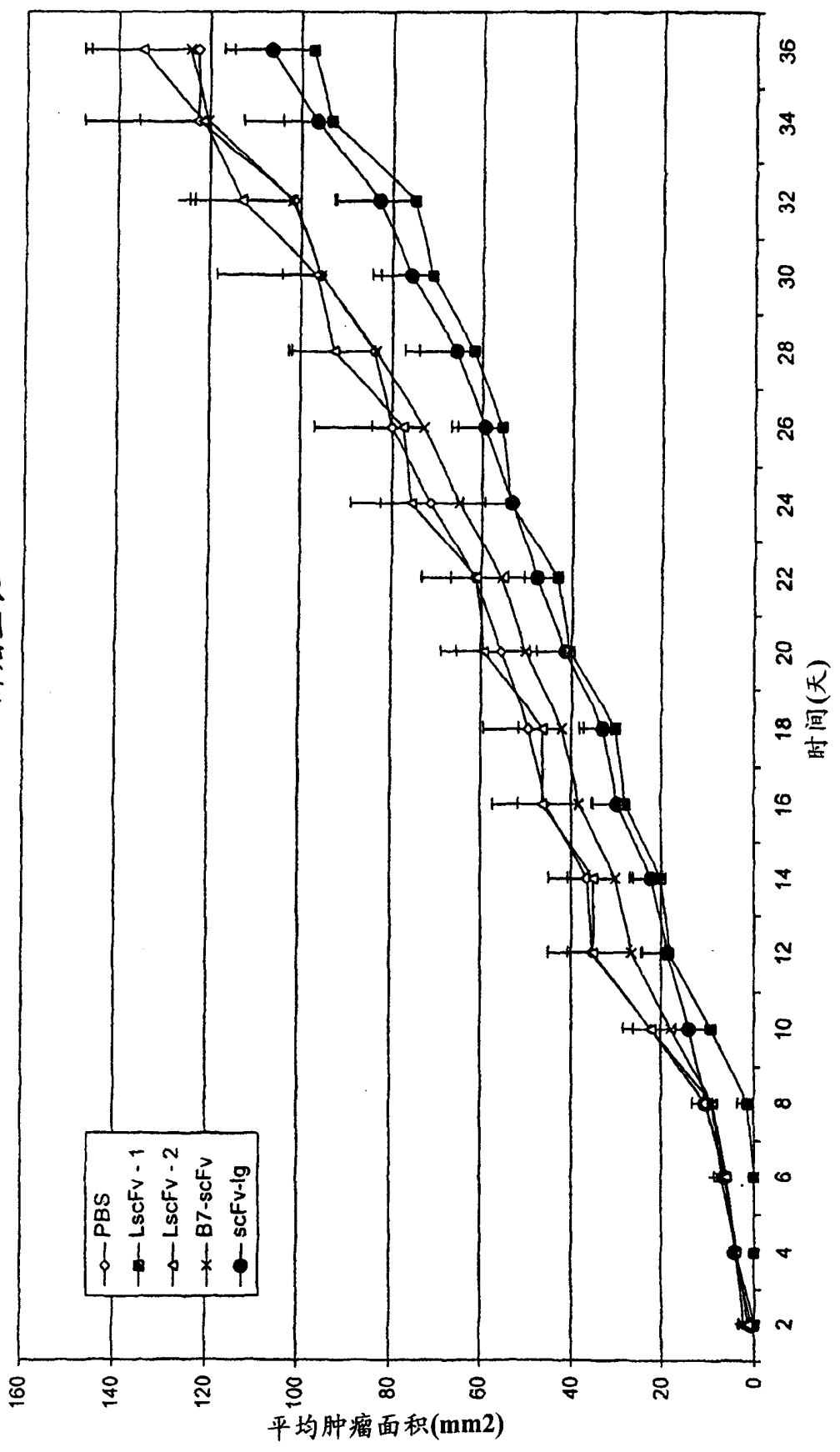
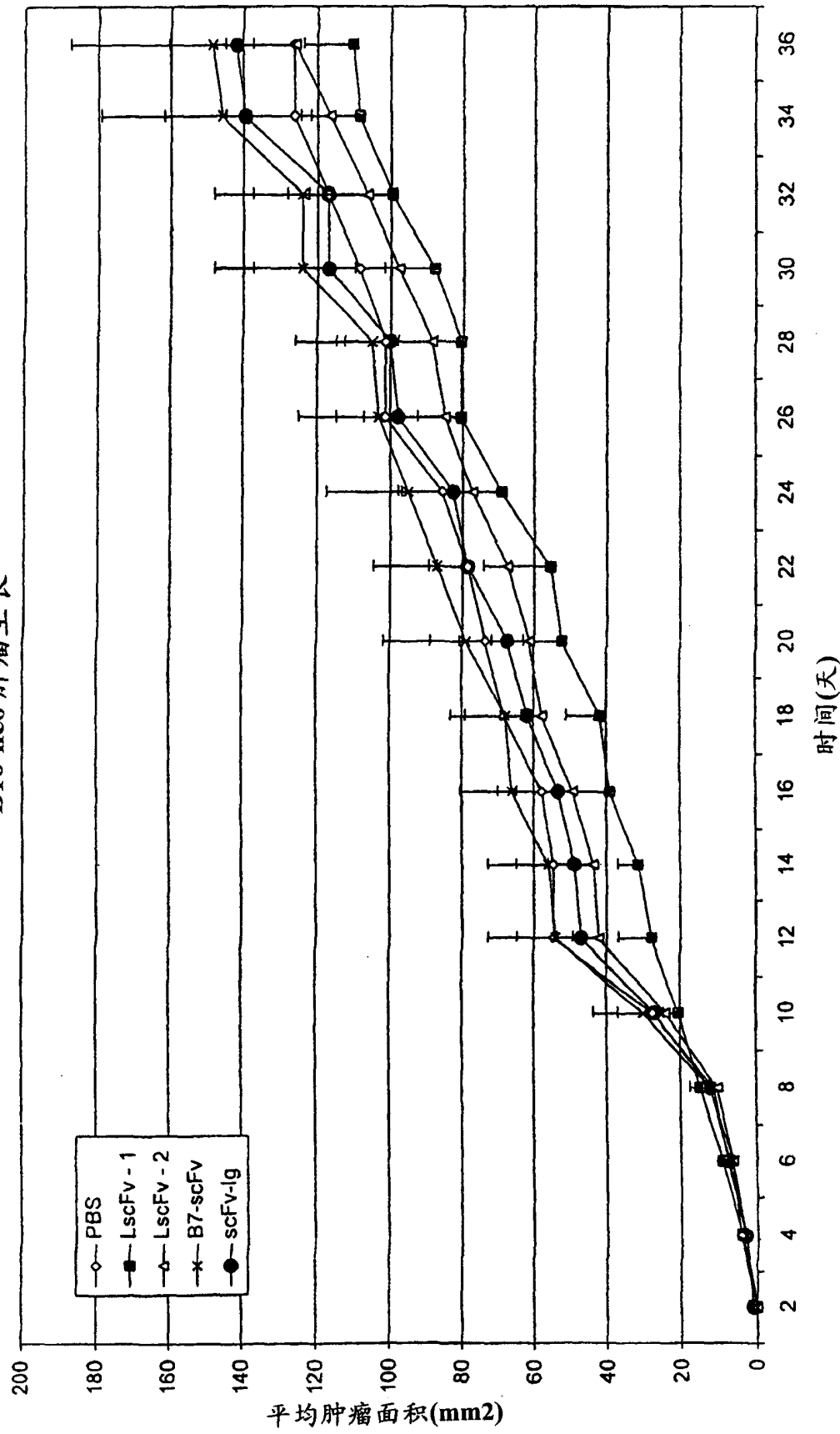


图 12
B16-neo 肿瘤生长



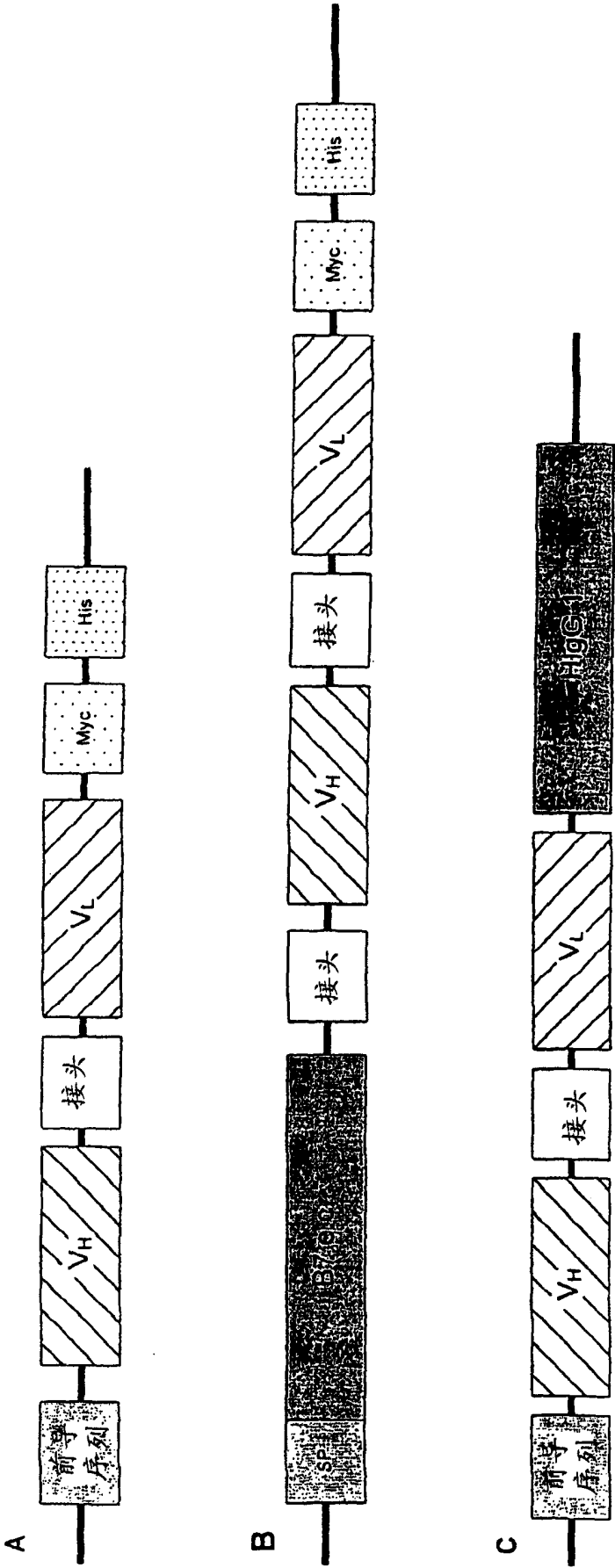


图 13

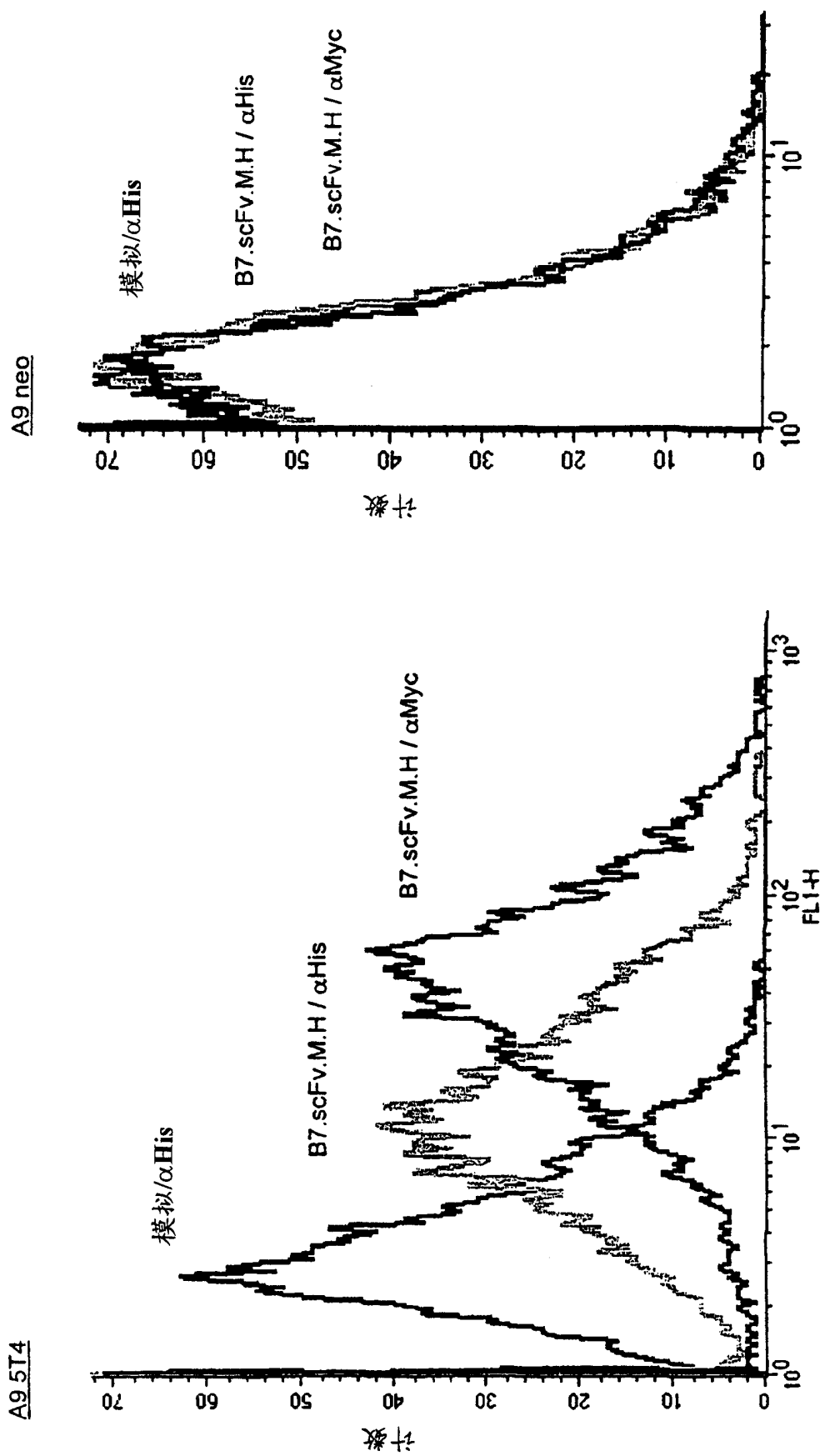
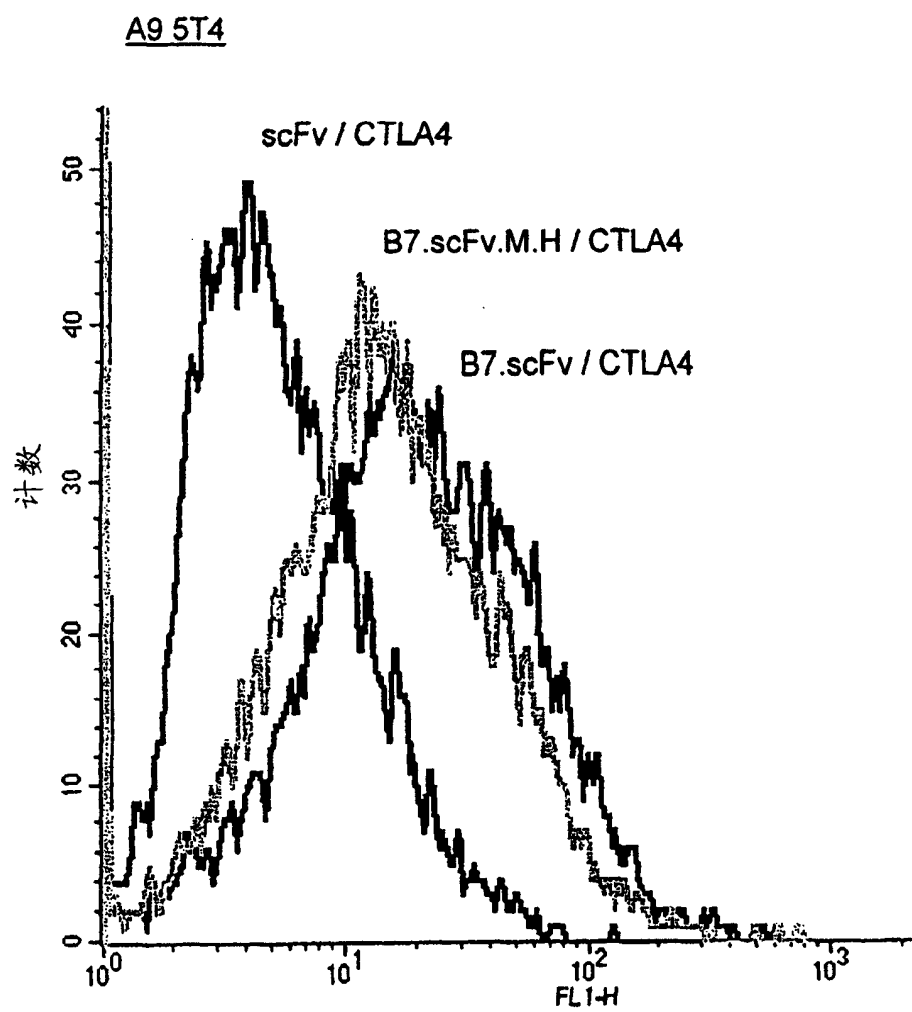


图 14

图 15



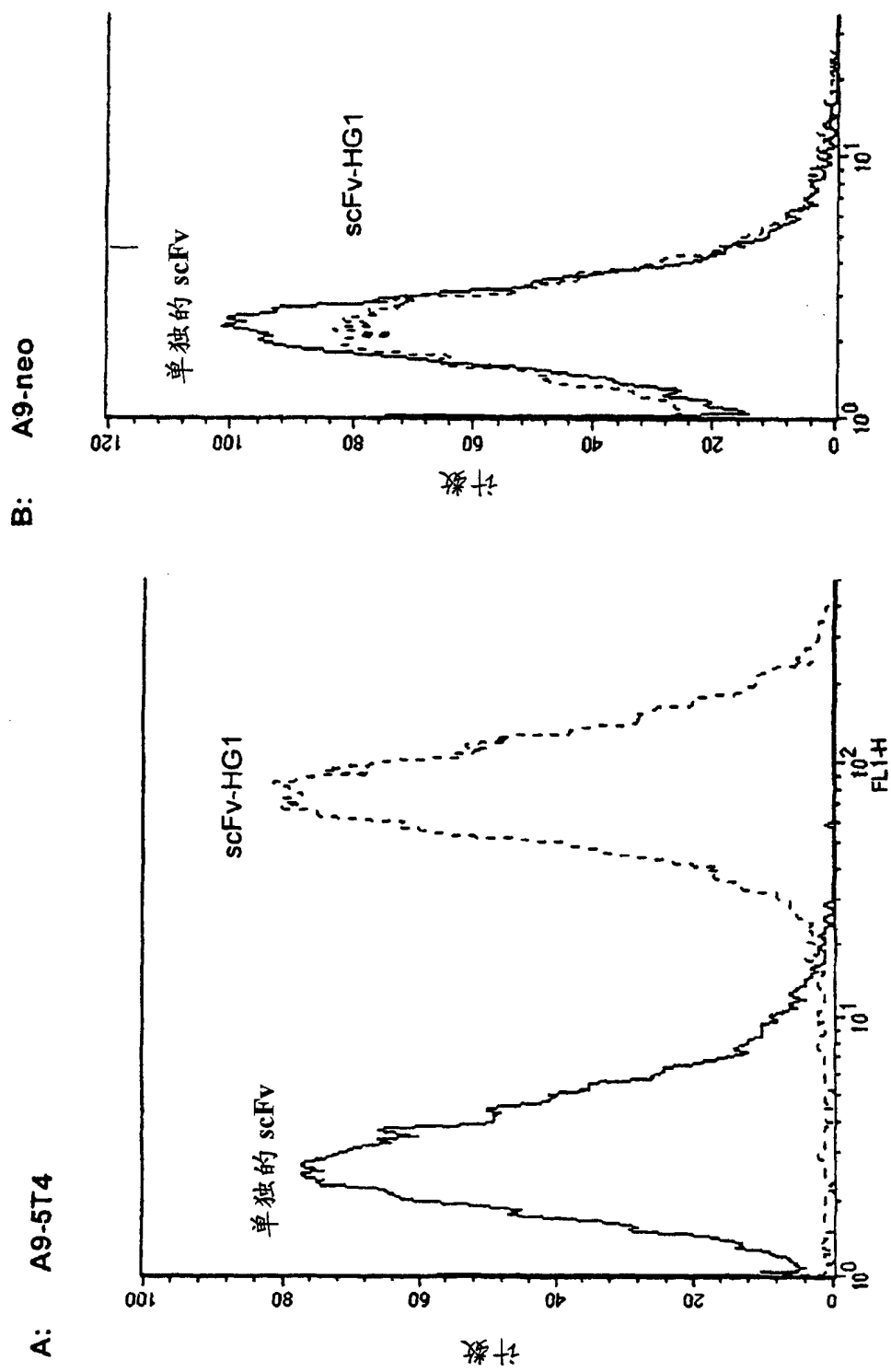


图 16

图 17

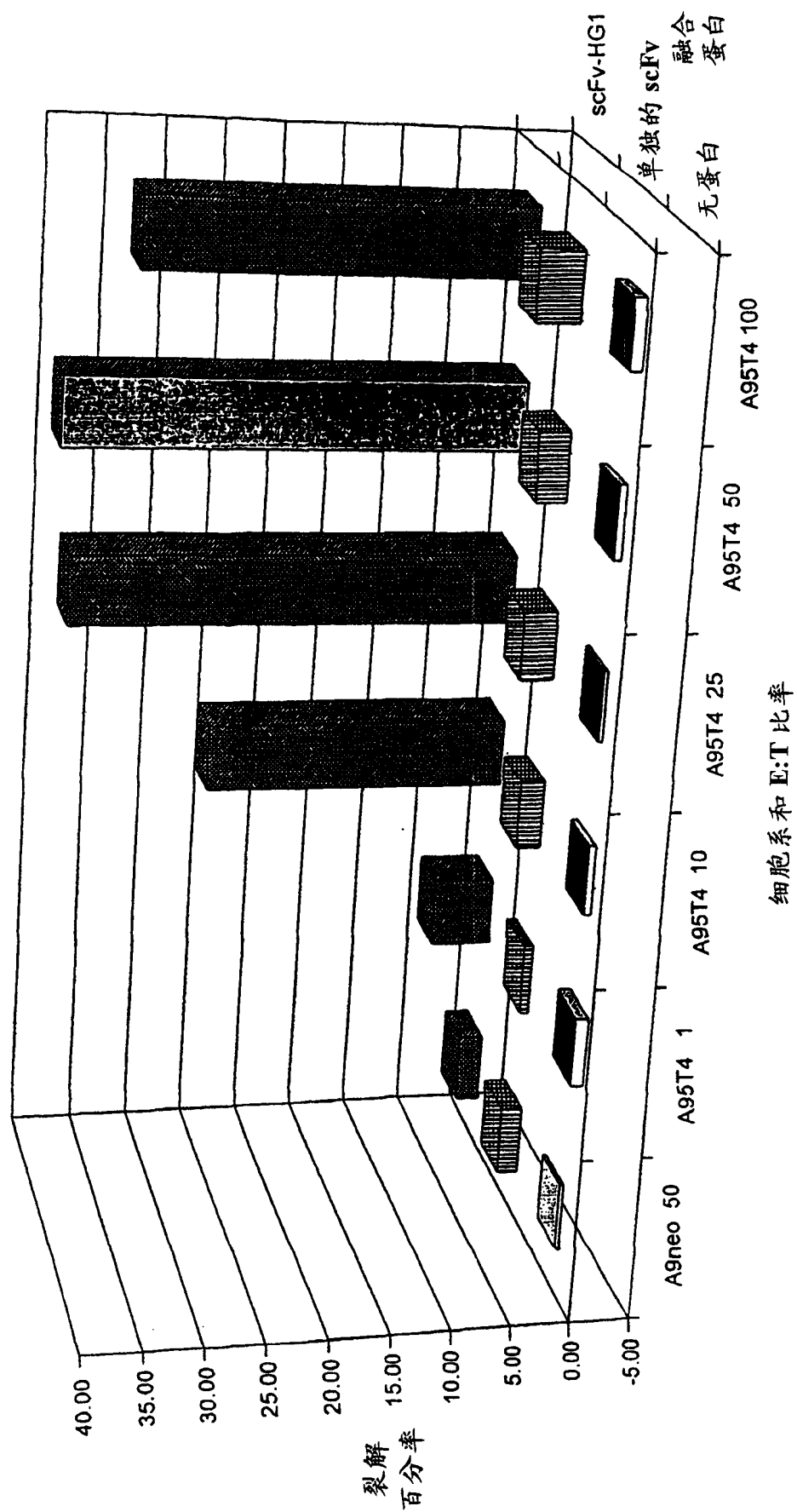


图 18

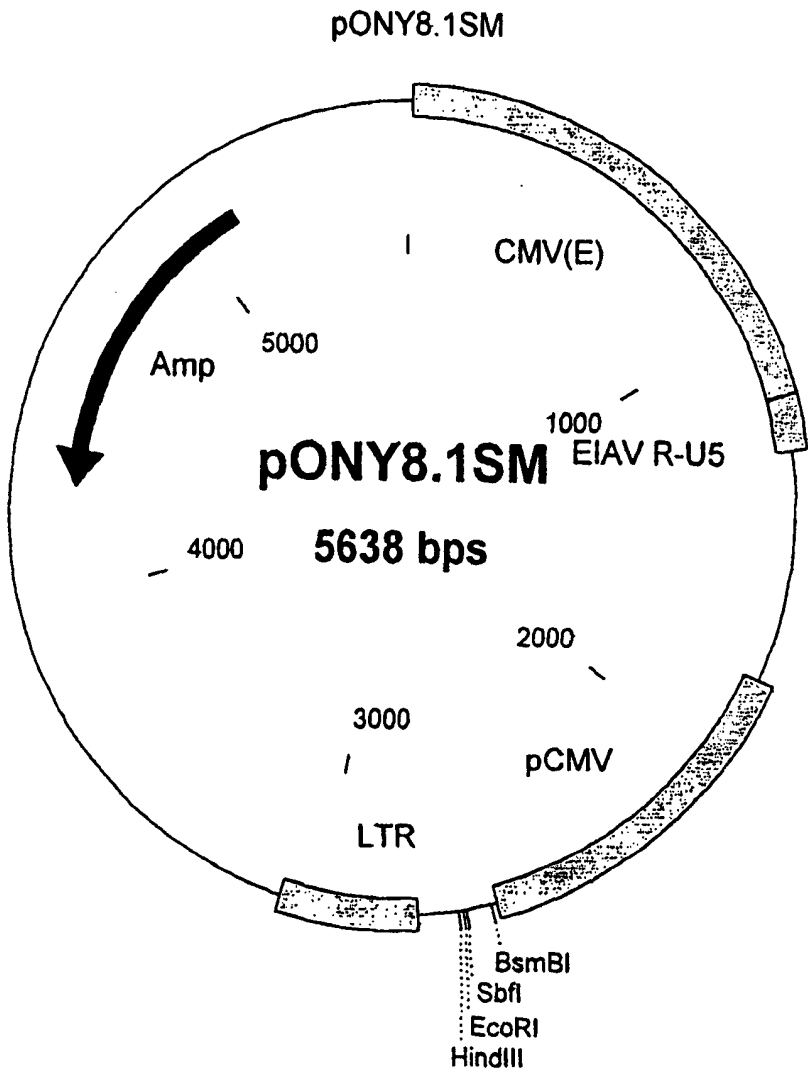


图 19
pONY 8.1SM 中的融合蛋白构建体

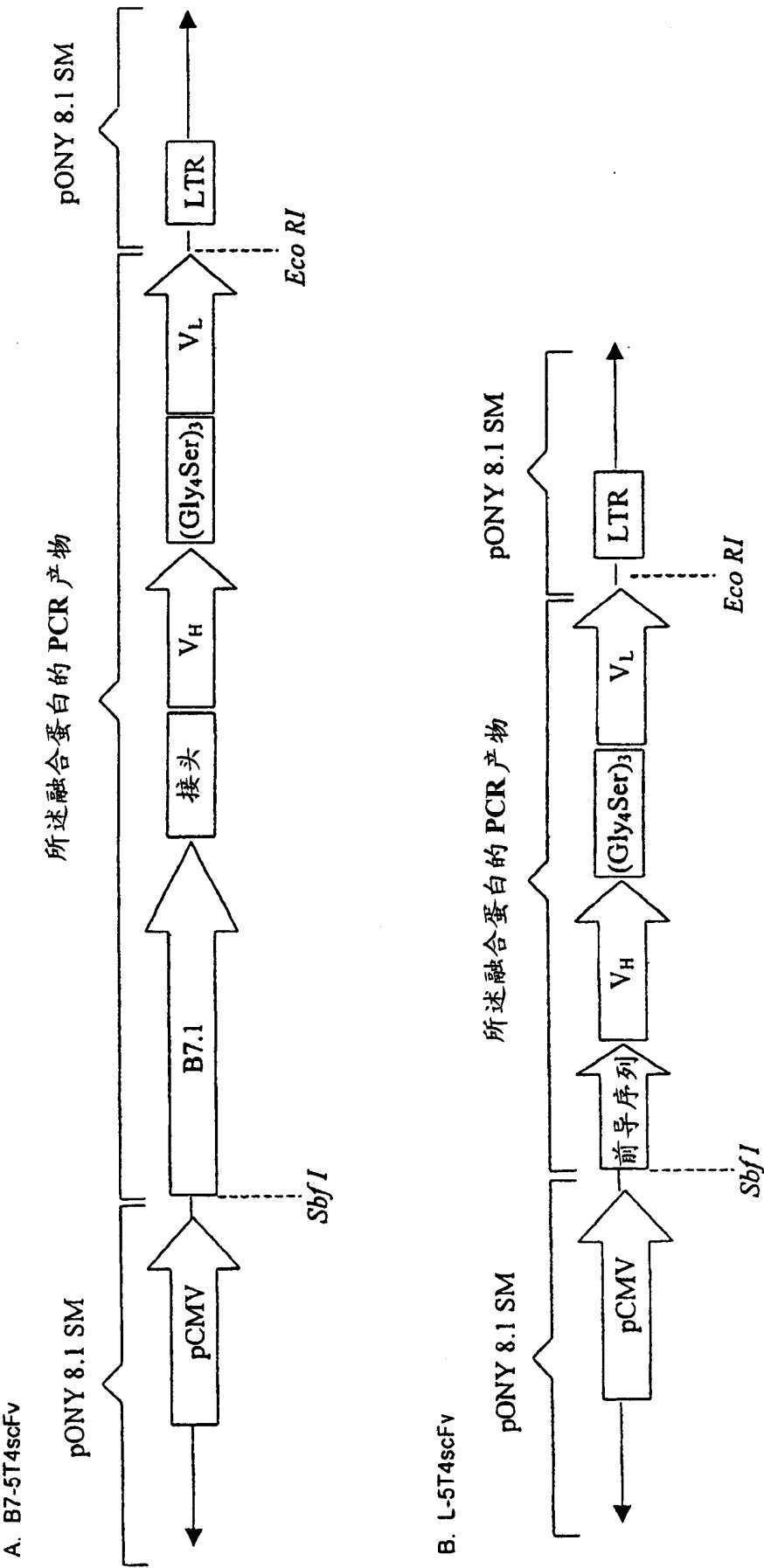


图 20

pKLink - pBluescript II SK (pBS II) 中的(Gly₄Ser)₃接头

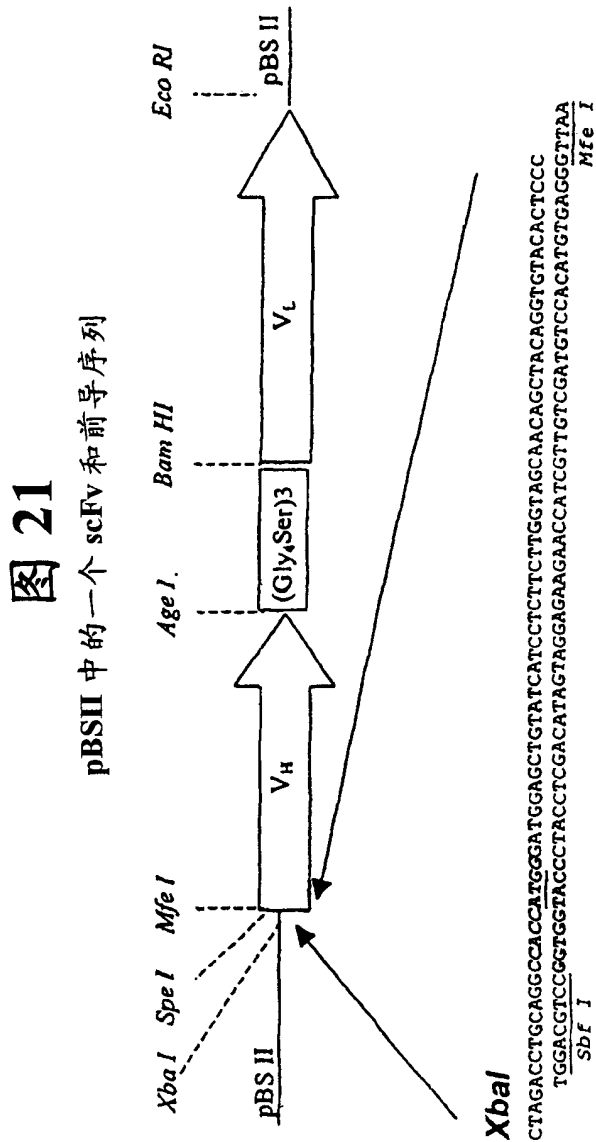
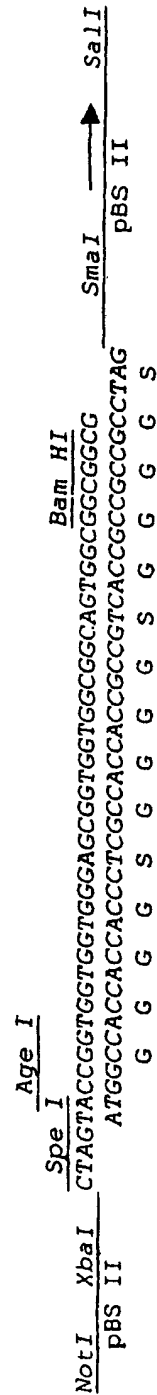


图 22

pONY 8.1SM 中的 Leader-IL-5 scFv

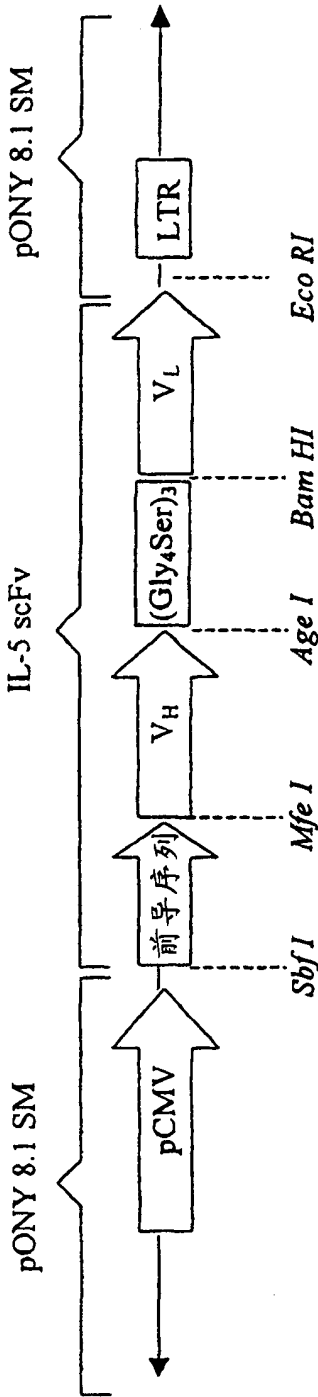


图 23

pONY 8.1SM 中的 Leader-HIV gp120 scFv

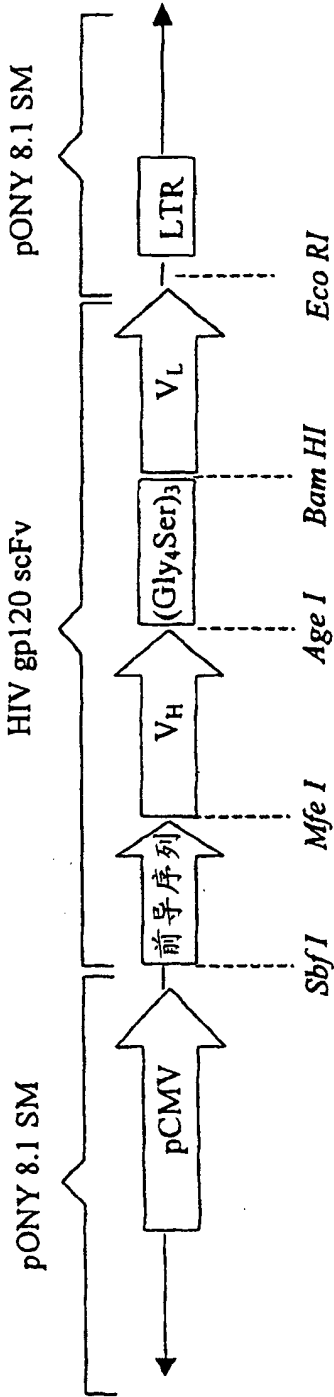


图 24

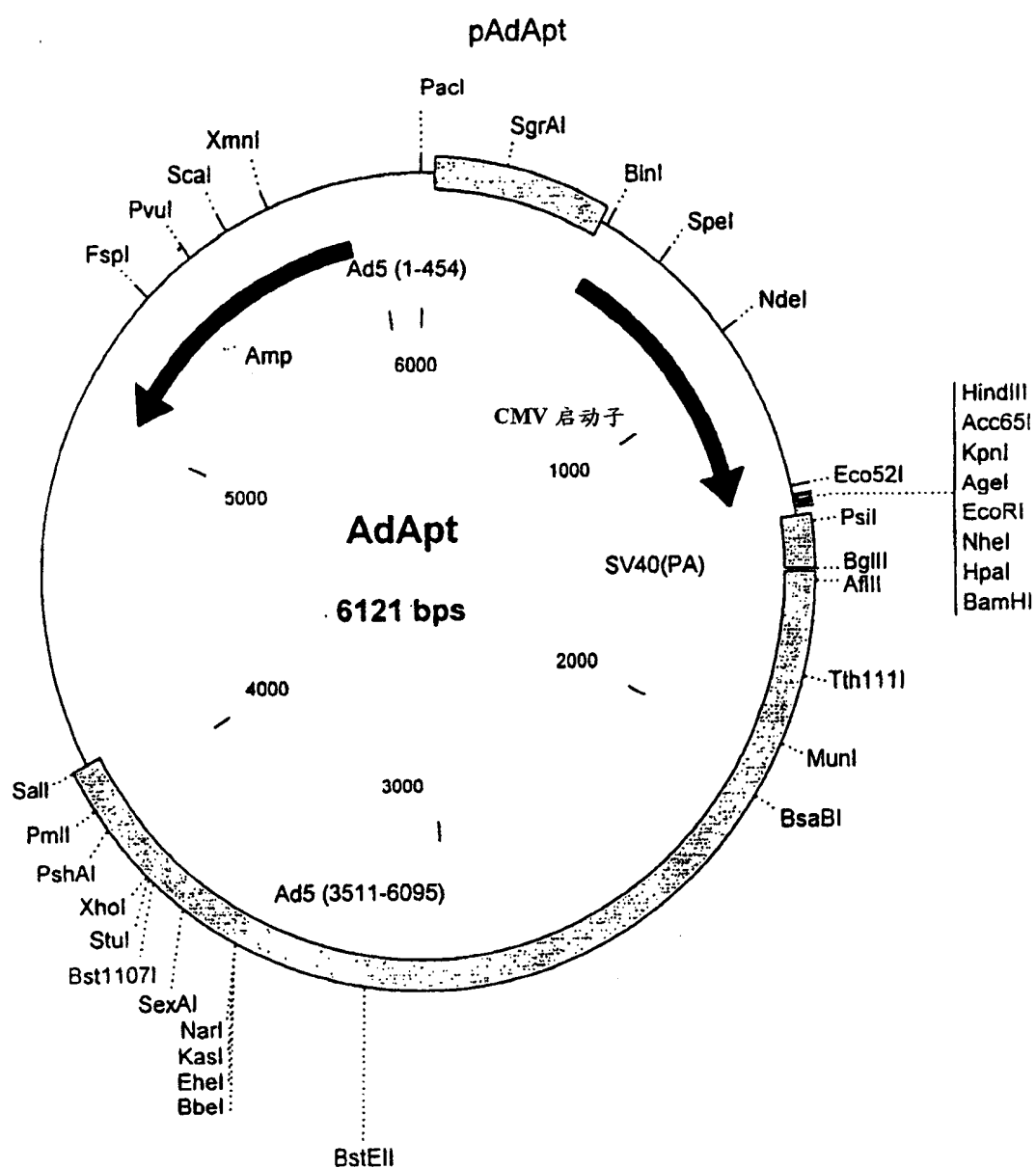


图 25
pAdApt 中的融合蛋白构建体

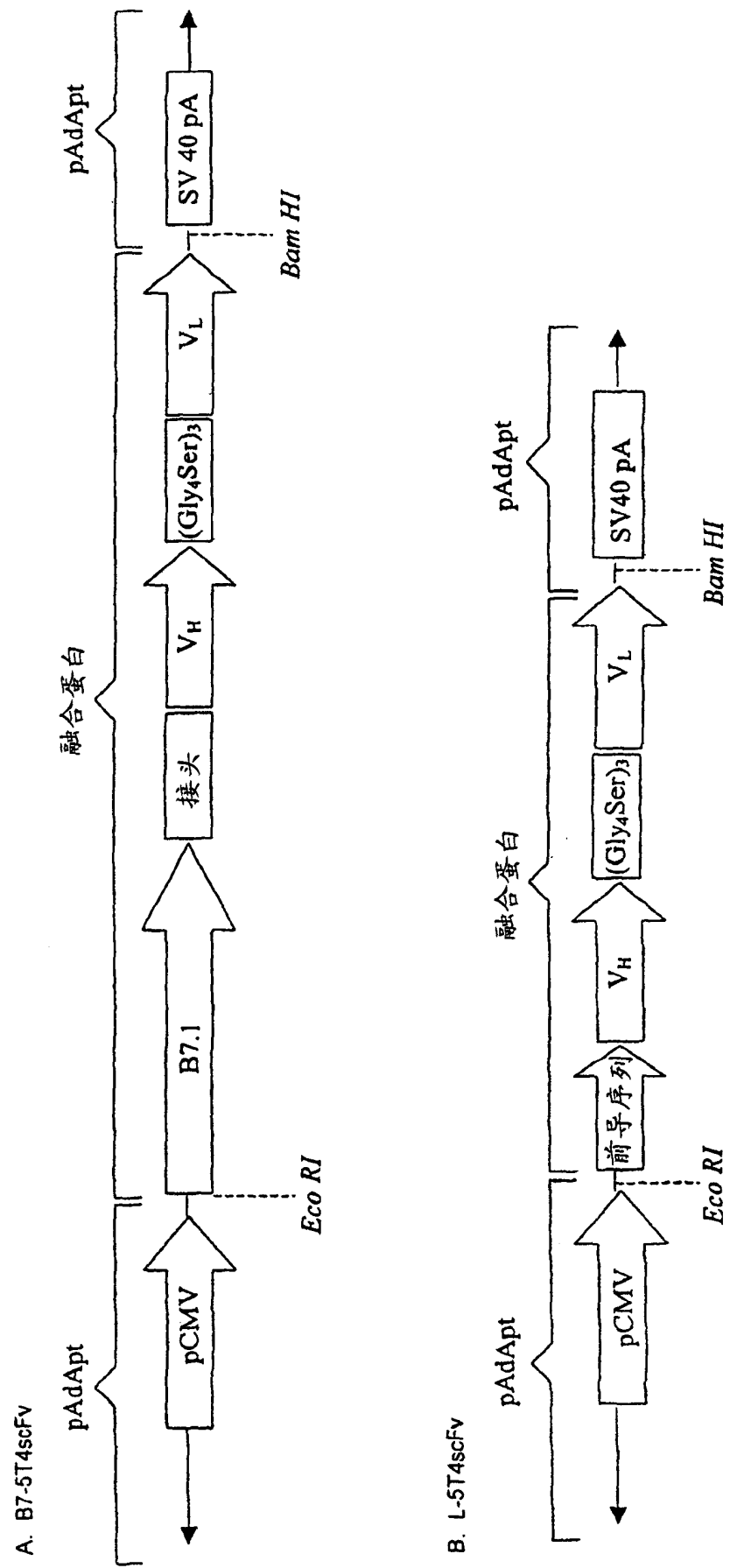


图 26

犬 5T4 编码序列

ATGCCTGGGGGGTCTCCCGGGGCCCCGCCGGGGACGGGCGGTTGCGGCTGGCGGGCTGGCGGCTGCTCCTGGG 80
M P G G C S R G P A A G D G R L R L A R L A L V L L

CTGGGTCTCCTCGTCTCGCTCACCTCCTGGGCGCCCTCCGCCGCCCTCCACGTCGCCGCCGGCTCCGCCGGCTCCG 160
G W V S S S S L T S W A P S A A A S T S P P A S A A S

CCCCGCCCGCTGCCGGGCCAGTGCCCCAGCCTTGCGAGTGCTCGGAGGCGGCGGCACGGTCAAGTGCGTTAACCGC 240
A P P P L P G Q C P Q P C E C S E A A R T V K C V N R

AACCTGACCGAGGTGCCCGGGACCTGCCCCCTACGTGCGCAACCTCTTCCTCACGGGCAACCAGCTGGCGGTGTGCC 320
N L T E V P A D L P P Y V R N L F L T G N Q L A V L

CCCCGGCGCTTCGCCCGCGCGCGCGCTGGCCGAGCTGGCCGCGCTCAACCTGAGCGGCAGCAGCCTGCCGGAGGTGT 400
P P G A F A R R P P L A E L A A L N L S G S S L R E V

GCGCGGGCGCTTCGAGCACCTGCCAGCCTGCGCCAGCTCGACCTCAGCCACAACCGCTGGGCAACCTCAGCGCTTC 480
C A G A F E H L P S L R Q L D L S H N P L G N L S A F

GCCTTCGCGGGCAGCGACGCCAGCGCTCGGGCCCCAGCCCCCTGGTGGAGCTGATGCTGAACCACATCGTCCCCCGGA 560
A F A G S D A S R S G P S P L V E L M L N H I V P P

CGACCGGGCGGAGAACCGGAGCTTCGAGGGCATGGTGGCGGCTGCCCTCCGAGCGGGCGCGGCTTCGCGGGCTGCAGT 640
D D R R Q N R S F E G M V A A A L R A G R A L R G L Q

GCCTGGAGCTGGCCGGCAACCGCTTCCTCTACTTGCTCGCGACGTCCTGGCCAGCTACCCGGCTCCGGCACCTGGAC 720
C L E L A G N R F L Y L P R D V L A Q L P G L R H L D

CTGCGCAACAACCTCCCTGGTGAGCCTCACCTACGTGTCCTTCGCAACCTGACGCACCTGGAGAGCCTCCACCTGGAGGA 800
L R N N S L V S L T Y V S F R N L T H L E S L H L E

CAACGCCCTCAAGGTCTTCACAACGCCACCTGGCGGAGCTGCAGAGCCTGCCCCAGTCCGGGTCTTCCTGGACAACA 880
D N A L K V L H N A T L A E L Q S L P H V R V F L D N

ACCCCTGGGTCTGCGATTGTACATGGCAGACATGGTGGCCTGGCTCAAGGAGACAGAGGTGGTGCCGGGCAAGCCGGG 960
N P W V C D C H M A D M V A W L K E T E V V P G K A G

CTCACCTGTGCATTCCCGGAGAAAATGAGGAATCGGGCCCTCTTGAACCTCAACAGCTCCACCTGGACTGTGACCCTAT 1040
L T C A F P E K M R N R A L L E L N S S H L D C D P

CCTCCCTCCATCCCTGCAGACTTCTTATGTCTTCTAGGTATTGTCTTAGCCCTGATAGGCGCCATCTTCTACTGGTTT 1120
I L P P S L Q T S Y V F L G I V L A L I G A I F L L V

TGTATTTGAACCGCAAGGGGATAAAGAAGTGGATGCATAACATCAGAGATGCCTGCAGGGATCACATGGAAGGGTATCAC 1200
L Y L N R K G I K K W M H N I R D A C R D H M E G Y H

TACAGATACGAAATCAATGCAGACCCAGGTTAACAACCTCAGTTCGAATTCGGATGTCTGA 1263
Y R Y E I N A D P R L T N L S S N S D V .