



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1911965 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 29

(21) 申请号 200610093692. 4

A61K 39/395(2006. 01)

(22) 申请日 2002. 01. 17

A61P 19/02(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 37/02(2006. 01)

09/765, 208 2001. 01. 17 US

A61P 21/04(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

02803820. 7 2002. 01. 17

(56) 对比文件

(73) 专利权人 新兴产品开发西雅图有限公司

地址 美国华盛顿州

M. S. Hayden 等. Single-chain mono- and bispecific antibody derivatives with novel biological properties and antitumour activity from a COScell transient expression system. Therapeutic Immunology 1. 1994, 1(1), 第 7 页, 第 12 页, 摘要.

(72) 发明人 J·A·勒贝特尔

M·海登-勒贝特尔

审查员 唐慧

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

72001

代理人 李波 刘玥

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006. 01)

C07K 16/30(2006. 01)

C07K 16/28(2006. 01)

C12N 15/62(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12P 21/02(2006. 01)

权利要求书3页 说明书70页 附图26页

(54) 发明名称

结合域-免疫球蛋白融合蛋白

(57) 摘要

结合域-免疫球蛋白融合蛋白本发明涉及新的结合域-免疫球蛋白融合蛋白,其特征在对相关结构,如抗原、反受体等的结合域、具有0或1个半胱氨酸残基的铰链区多肽、以及免疫球蛋白CH2和CH3结构域。尽管主要作为单体多肽存在,该融合蛋白能够ADCC和/或CDC。该融合蛋白可以高表达水平重组产生。也提供了相关的组合物和方法,包括免疫治疗应用。

CN 1911965 B

1. 一种结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 包含:
 - (a) 与免疫球蛋白铰链区多肽融合的结合域多肽, 其中所述铰链区多肽是含有一个半胱氨酸残基并且来源于具有两个或更多半胱氨酸残基的野生型免疫球蛋白铰链区多肽的突变的铰链区多肽;
 - (b) 与铰链区多肽融合的免疫球蛋白重链 CH2 恒定区多肽; 和
 - (c) 与 CH2 恒定区多肽融合的免疫球蛋白重链 CH3 恒定区多肽, 其中:
 - (1) 结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白具有至少一种选自抗体依赖性细胞介导的细胞毒性和补体固定的免疫活性, 并且
 - (2) 结合域多肽能够特异性结合于 CD37。
2. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 其中结合域多肽包括至少一种选自免疫球蛋白轻链可变区多肽和免疫球蛋白重链可变区多肽的免疫球蛋白可变区多肽。
3. 权利要求 2 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 其中免疫球蛋白可变区多肽来源于人免疫球蛋白。
4. 权利要求 1 的结合域免疫球蛋白融合蛋白, 其中结合域多肽包含:
 - (a) 至少一种免疫球蛋白轻链可变区多肽;
 - (b) 至少一种免疫球蛋白重链可变区多肽; 和
 - (c) 至少一种与 (a) 的多肽和与 (b) 的多肽融合的接头肽。
5. 权利要求 4 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 其中免疫球蛋白轻链可变区和重链可变区多肽来源于人免疫球蛋白。
6. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 其中免疫球蛋白重链 CH2 恒定区多肽和免疫球蛋白重链 CH3 恒定区多肽中的至少一种来源于人免疫球蛋白重链。
7. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 其中免疫球蛋白重链恒定区 CH2 和 CH3 多肽属于选自人 IgG 和人 IgA 的同种型。
8. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 其中结合域多肽是来源于单克隆抗体 G28-1 的单链 Fv。
9. 权利要求 4 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 其中接头多肽包括至少一种具有氨基酸序列 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser[SEQ ID NO:21] 的多肽。
10. 权利要求 4 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 其中接头多肽包括具有氨基酸序列 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser[SEQ ID NO:21] 的多肽的至少三次重复。
11. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 其中免疫球蛋白铰链区多肽含有一个半胱氨酸残基并且来源于具有两个或更多半胱氨酸残基的野生型 IgG 铰链区多肽。
12. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 其中免疫球蛋白铰链区多肽含有一个半胱氨酸残基并且来源于具有两个或更多半胱氨酸残基的野生型人 IgG 铰链区多肽。
13. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 其中免疫球蛋白铰链区多肽含有一个半胱氨酸残基并且来源于野生型人 IgG1 铰链区多肽。
14. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 其中免疫球蛋白铰链区多肽含有一个半胱氨酸残基并且来源于野生型人 IgG1 铰链区多肽, 并且含有一个或者两个丝氨酸残基取代一个或者两个半胱氨酸残基。
15. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白, 其中免疫球蛋白铰链区多肽含有一

个半胱氨酸残基并且来源于野生型 IgG2 铰链区多肽、野生型 IgG3 铰链区多肽,或者野生型 IgG4 铰链区多肽。

16. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白,其中免疫球蛋白铰链区多肽为 5-65 个氨基酸。

17. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白,其中免疫球蛋白铰链区多肽为 15-35 个氨基酸。

18. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白,其中免疫球蛋白重链 CH2 恒定区多肽是人 IgG 重链 CH2 恒定区多肽。

19. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白,其中免疫球蛋白重链 CH3 恒定区多肽是人 IgG 重链 CH3 恒定区多肽。

20. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白,其中免疫球蛋白重链 CH2 恒定区多肽是人 IgG1 重链 CH2 恒定区多肽,并且免疫球蛋白重链 CH3 恒定区多肽是人 IgG1 重链 CH3 恒定区多肽。

21. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白,其中免疫球蛋白重链 CH2 恒定区多肽是人 IgA 重链 CH2 恒定区多肽。

22. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白,其中免疫球蛋白重链 CH3 恒定区多肽是人 IgA 重链 CH3 恒定区多肽。

23. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白,其中免疫球蛋白重链 CH2 恒定区多肽是人 IgA 重链 CH2 恒定区多肽,并且免疫球蛋白重链 CH3 恒定区多肽是人 IgA 重链 CH3 恒定区多肽。

24. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白,其中结合域包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸 21-259。

25. 权利要求 8 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白,其中单链 Fv 是人源化的。

26. 权利要求 1 的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白,其中结合域多肽能够以至少 $10^7 M^{-1}$ 的 K_a 结合 CD37。

27. 编码权利要求 1-26 任一项的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白的分离的多核苷酸。

28. 一种包含与启动子可操作性连接的权利要求 27 的多核苷酸的重组表达构建体。

29. 用权利要求 28 的重组表达构建体转化或转染的宿主细胞。

30. 生产结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白的方法,包括以下步骤:

(a) 在允许结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白表达的条件下培养权利要求 29 的宿主细胞;
和

(b) 从宿主细胞培养物中分离结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白。

31. 含有与生理可接受载体组合的权利要求 1-26 任一项的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白的药物组合物。

32. 权利要求 31 的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗具有或怀疑具有恶性状况或 B 细胞疾病的受试者。

33. 权利要求 32 的用途,其中恶性状况或 B 细胞疾病选自 B 细胞淋巴瘤和以自身抗体产生为特征的疾病。

34. 权利要求 32 的用途,其中恶性状况或 B 细胞疾病选自类风湿性关节炎、重症肌无

力、格雷夫斯病、I 型糖尿病、多发性硬化和自身免疫病。

结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白

[0001] 本申请是申请日为 2002 年 1 月 17 日的中国专利申请 02803820.7“结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明一般涉及具有免疫学活性的重组结合蛋白,具体涉及分子工程化的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白,包括单链 Fv- 免疫球蛋白融合蛋白。本发明也涉及用于治疗恶性状况和 B 细胞疾病,包括特征在于自身抗体产生的疾病的组合物和方法。

背景技术

[0003] 免疫球蛋白分子由两条相同的轻链和两条相同的重链组成,它们通过链间二硫键连接成大分子复合物。链内二硫键连接相同多肽链的不同区域,这导致形成环,该环与邻近的氨基酸构成免疫球蛋白结构域。每条轻链和每条重链具有单个可变区,该区表现出抗体之间氨基酸组成的很大变异。轻链可变区 V_L 与重链可变区 V_H 缔合,形成免疫球蛋白的抗原结合位点 Fv。轻链具有单个恒定区结构域,重链有几个恒定区结构域。IgG, IgA 和 IgD 具有三个恒定区结构域,称为 CH1, CH2 和 CH3, IgM 和 IgE 具有四个恒定区结构域。

[0004] 免疫球蛋白重链可以分为三个功能区: Fd、铰链区和 Fc。Fd 区包含 V_H 和 CH1 结构域,与轻链一起形成 Fab。Fc 片段一般认为负责免疫球蛋白的效应物功能,例如,补体固定和结合与 Fc 受体。在 IgG, IgA 和 IgD 中发现的铰链区作为柔性的间隔基,允许 Fab 部分在空间中自由移动。与恒定区相反,铰链区结构域结构多样,各类和亚类的免疫球蛋白之间序列和长度都有变化。例如,人类 IgG 的三种亚类, IgG1, IgG2 和 IgG4 具有 12-15 个氨基酸的铰链区,而 IgG3 含有约 62 个氨基酸,包括 21 个脯氨酸残基和 11 个半胱氨酸残基。根据结晶学研究,铰链区可进一步根据功能细分为三个区:上铰链区、核心和下铰链区(Shin et al., Immunological Reviews 130:87(1992))。上铰链区包含 CH1 的羧基端的氨基酸至限制运动的铰链区的第一个残基,一般是第一个半胱氨酸残基,它在两条重链之间形成链间二硫键。上铰链区的长度与抗体的片段柔性相关。核心铰链区含有重链间二硫键,下铰链区连接 CH2 结构域的氨基末端并且包含 CH2 中的残基。(Id.) 人 IgG 的核心铰链区含有序列 Cys-Pro-Pro-Cys,当形成二硫键时,该序列形成一个环状八肽,人们认为该八肽作为一个轴,由此赋予柔性。铰链区也可以含有碳水化合物附着位点。例如, IgA1 在铰链区的一个 17 氨基酸的片段中含有 5 个碳水化合物位点,它们赋予了铰链区对肠蛋白酶的例外抗性,这被认为是分泌性免疫球蛋白的有利特征。

[0005] 铰链区的结构和柔性所允许的构象改变可以影响抗体的 Fc 部分的效应物功能。与 Fc 区相关的效应物功能的三个大类包括 (1) 激活经典的补体级联, (2) 与效应分子相互作用和 (3) 免疫球蛋白的区室化。不同的人 IgG 亚类在其激活和扩增补体剂量的步骤的相对效力方面有所不同。一般说来, IgG1 和 IgG3 最有效固定补体, IgG2 效力较低,而 IgG4 不激活补体。补体激活是由 C1q 与抗原抗体复合物的结合起始的, C1q 是级联中的第一个成分 C1 的一个亚基。尽管 C1q 的结合位点位于抗体的 CH2 结构域,铰链区影响抗体激活级联

的能力。例如,缺乏铰链区的重组免疫球蛋白不能激活补体。(Id.) 如果没有铰链区所赋予的柔性,与抗原结合的抗体的 Fab 部分可能不能采用允许 C1q 与 CH2 结合所需的构象。(见 id.) 研究表明,铰链区长度和片段柔性与补体激活相关;然而,该相关不是绝对的。具有与 IgG4 相同的刚性的改变的铰链区的人 IgG3 分子仍然有效激活该级联。

[0006] 铰链区的缺乏也影响人 IgG 免疫球蛋白结合免疫效应细胞上的 Fc 受体的能力。免疫球蛋白与 Fc 受体的结合促进抗体依赖性细胞毒性 (ADCC),它被推定为消除肿瘤细胞的重要方式。人 IgG Fc 受体家族被分为三组,即,能够结合具有高亲和性的 IgG 的 Fc γ RI (CD64)、都是低亲和性受体的 Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII (CD16)。三种受体的每一种和免疫球蛋白之间的分子相互作用还没有精确确定,但实验表明,CH2 结构域的铰链近端区中的残基对抗体和 Fc 受体之间的相互作用的特异性是重要的。此外,IgG1 骨髓瘤蛋白和缺乏铰链区的重组 IgG3 嵌合抗体不能结合 Fc γ RI,很可能是因为在 CH2 的可接近性减少 (Shin et al., Intern. Rev. Immunol. 10 :177,178-79(1993))。

[0007] 单克隆抗体技术和基因工程方法导致了用于诊断和治疗人疾病的免疫球蛋白分子的迅速开发。已经应用了蛋白工程改进抗体与其关联抗原的亲合性,以减少与免疫原性相关的问题,并且改变抗体的效应物功能。免疫球蛋白的域结构容易顺应工程化,这是由于抗原结合域和赋予效应物功能的结构域可以在免疫球蛋白种类和亚类之间交换。

[0008] 此外,构建了较小的免疫球蛋白分子,以克服与完整的免疫球蛋白的治疗相关的问题。单链 Fv (scFv) 包含通过短的接头肽与轻链可变区连接的重链可变区 (Huston et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 :5879-83,1988)。由于 scFv 分子较小,它们表现出很快从血浆和组织清除,并且比完整免疫球蛋白更有效穿透到组织中。抗肿瘤 scFv 表现出与相应嵌合抗体更迅速的肿瘤穿透和在肿瘤团块中更平均的分布 (Yokota et al., Cancer Res. 52,3402-08(1992))。ScFv 与另一种分子,如毒素的融合利用了特异性的抗原结合活性和 scFv 的小尺寸而将毒素递送到靶组织 (Chaudary et al., Nature 339 :394(1989); Batra et al., Mol. Cell. Biol. 11 :2200(1991))。

[0009] 尽管 scFv 分子的优点实现了血清疗法,该治疗方法仍存在一些缺陷。尽管 scFv 的迅速清除可以减少在正常细胞中的毒性作用,这种迅速清除可能阻碍向靶组织递送最小的有效剂量。由于不利影响产量的表达和分离的困难,制备足量的用于给予患者的 scFv 是具有挑战性的。在表达过程中,scFv 分子缺乏稳定性并且由于不同分子的可变区的配对而经常聚集。此外,哺乳动物表达系统中的 scFv 分子的产量水平低,因此限制了有效制备用于治疗 scFv 分子的可能性 (Davis et al, J Biol. Chem. 265 :10410-18(1990); Traunecker et al., EMBO J10 :3655-59(1991))。已经探索了改进产量水平的策略,包括向可变区添加糖基化位点 (Jost, C. R. US Patent $\#$ 5,888,773, Jost et al, J. Biol. Chem. 269 :26267-73(1994))。

[0010] 毒素与 scFv 的偶联或融合提供了非常强效的分子,但由于毒素分子的毒性,给药是有限的。毒性作用包括升高肝酶和血管渗漏综合征。此外,免疫毒素是高度免疫原性的,并且抗毒素的宿主抗体限制了其用于重复治疗的可能性。

[0011] 使用 scFv 进行治疗的其它缺点是缺乏效应物功能。与免疫球蛋白恒定区缔合的,没有细胞毒性功能、ADCC 和补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的 scFv 可能对于治疗疾病是无效的。尽管 scFv 的开发技术已经开始了 12 年多,目前还没有 scFv 被批准用于治疗。

[0012] 对疾病治疗的抗体恒定区相关效应物功能促进了融合蛋白的开发,其中用非免疫球蛋白序列取代了抗体可变区。例如,由 HIV 识别的 T 细胞表面蛋白 CD4 被重组融合于免疫球蛋白 Fc 效应物结构域(见 Sensel et al., Chem. Immunol. 65 :129158(1997))。这种分子的生物学活性将部分依赖于所选择的恒定区的类或亚类。IL-2-IgG1 融合蛋白实现了补体介导的具有 IL-2 受体的细胞的裂解(见 id.)。用免疫球蛋白恒定区构建这些和其它融合蛋白也可以赋予改进的药代动力学特征。

[0013] 认为容易顺应于一些类型的免疫球蛋白治疗的疾病和紊乱包括癌症和免疫系统紊乱。癌症包括宽范围的疾病,影响全世界大约四分之一的个体。恶性细胞的迅速和得到上调的增殖是许多癌症,包括血液系统恶性肿瘤的特点。在过去的 20 年中,具有血液系统恶性状况的患者从癌症治疗的进展得到了最多的益处(Multani et al., J. Clin. Oncology 16 :3691-3710, 1998)。尽管缓解率增加,大多数患者仍然复发并且难以治愈其疾病。用细胞毒性药物治疗的障碍包括肿瘤细胞抗性和化疗的高毒性,这阻碍了许多患者的最佳给药。基于导向于特异性结合恶性细胞的分子,包括单克隆抗体(mAbs)的新治疗可以改进有效性而不增加毒性。

[0014] 由于首先在 1975 年记载了单克隆抗体(Kohler et al., Nature 256 :49597(1975)),已经用肿瘤细胞上表达的单克隆抗体治疗了许多患者。这些研究产生了关于选择适于治疗的靶抗原的重要经验。首先,也是最重要的,关键的正常组织不应该表达靶抗原。幸运的是,血液系统恶性细胞表达许多在干细胞或其它关键细胞上不表达的抗原。减少了正常和血液系统来源的恶性细胞的血液系统恶性状况的治疗已经被接受,因为在治疗结束后发生了从祖细胞再生正常细胞。其次,靶抗原应该在所有克隆发生的肿瘤细胞群上都表达,并且尽管存在来自于免疫球蛋白治疗的选择压力,该表达应该持续。因此,尽管抗原表现出高度的肿瘤选择性,具有改变的独特型表达的肿瘤细胞变体的生长限制了用于治疗 B 细胞恶性肿瘤的表面独特型的选择(Meeker et al., N. Engl. J Med. 312 :1658-65(1985))。第三,所选择的抗原在与免疫球蛋白结合后必须适当运输。免疫球蛋白结合抗原后靶抗原的脱落或内化可以允许肿瘤细胞逃脱破坏,从而限制血清疗法的有效性。第四,免疫球蛋白与传送激活信号的靶抗原的结合可以导致肿瘤细胞中的功能性应答,从而导致生长停滞和凋亡。尽管所有的这些特征都是重要的,免疫球蛋白结合抗原后凋亡的引发可能是达到成功的血清疗法的关键因素。

[0015] 已经验证作为 B 和 T 细胞恶性肿瘤的血清疗法的靶点的抗原包括 Ig 独特型(Brown et al., Blood 73 :651-61(1989)), CD19(Hekman et al., Cancer Immunol. Immunother. 32 :364-72(1991); Vlasveld et al., Cancer Immunol. Immunother. 40 :37-47(1995)), CD20(Press et al., Blood 69 :584-91(1987); Maloney et al., J. Clin. Oncol. 15 :3266-74, (1997)), CD21(Scheinberg et al., J Clin. Oncol. 8 :792-803, (1990)), CD5 (Dillman et al., J Biol. Respn. Mod. 5 :394-410(1986)), 和 CD52(CAMPATH)(Pawson et al., J Clin. Oncol. 15 :2667-72, (1997))。其中,用 CD20 作为 B 细胞淋巴瘤的治疗靶获得了最大的成功。其它靶的每一种受到了抗原的生物学特征的限制。例如,通过体细胞突变可以改变表面独特型,允许肿瘤细胞逃脱。在单克隆抗体结合后, CD5, CD21 和 CD19 被迅速内化,允许肿瘤细胞逃脱破坏,除非单克隆抗体与毒素分子偶联。CD22 仅在 B 细胞淋巴瘤的一个亚型上表达,而 CD52 在 T 细胞和 B 细胞上都表达,并且由 T 细胞减少产

生免疫抑制。

[0016] CD20 实现了上述为治疗 B 细胞恶性状况而选择适当的靶抗原的基本标准。用嵌合 CD20 单克隆抗体在许多患者中诱导了部分或完全的反应 (McLaughlin et al, Blood 88 : 90a(abstract, suppl. 1) (1996) ;Maloney et al, Blood 90 :2188-95(1997))。然而,在 6 个月到 1 年内通常发生肿瘤复发。因此,需要进一步改进血清疗法以诱导低分级 B 细胞淋巴瘤的更持续反应,并且允许有效治疗高分级淋巴瘤和其它 B 细胞疾病。

[0017] 改进 CD20 血清疗法的一种方法是用 CD20 的特异性单克隆抗体将放射性同位素导向于 B 细胞淋巴瘤。尽管治疗的有效性增加,与放射性抗体的长体内半衰期相关的毒性也增加,有时要求患者进行干细胞拯救 (Press et al. , N. Eng. J Med. 329 :1219-1224, 1993 ; Kaminski et al. , N. Eng. J Med. 329 :459-65(1993))。用蛋白酶切割了 CD20 的单克隆抗体以便在连接于放射性同位素之前产生 F(ab')₂ 或 Fab 片段。这改进了放射性同位素偶联物穿透进入肿瘤,并且缩短了体内半衰期,从而减少了对正常组织的毒性。然而,CD20 单克隆抗体的 Fc 区提供的效应物功能,包括补体固定和 ADCC 的优点却丧失。因此,为改进放射性同位素的递送,需要一种策略来制备保留了 Fc 依赖性效应物功能,但尺寸更小的 CD20 单克隆抗体衍生物,从而增加肿瘤穿透并缩短单克隆抗体半衰期。

[0018] CD20 是第一个由单克隆抗体鉴定的人 B 细胞系特异性表面分子,但 CD20 在 B 细胞生物学中的功能仍然没有完全了解。CD20 是非糖基化的,疏水的 35Kda 的磷酸蛋白,具有在细胞质中的氨基和羧基端 (Einfeld et al, EMBO J. 7 :711-17(1988))。还没有鉴定 CD20 的天然配体。CD20 由所有正常的成熟 B 细胞,但前体 B 细胞不表达。

[0019] CD20 单克隆抗体向正常 B 细胞递送影响存活力和生长的信号 (Clark et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 :4494-98(1986))。最近的数据表明,CD20 的广泛交联可以诱导 B 淋巴瘤细胞系的凋亡 (Shan et al. , Blood 91 :1644-52(1998))。细胞表面的 CD20 的交联增加信号传导的强度和动力学,这是通过测量酪氨酸残基上的细胞底物的磷酸化而检测的 (Deans et al. , J. Immunol. 146 :846-53(1993))。重要的是,通过加入 Fc 受体阳性细胞而交联 CD20 单克隆抗体也诱导 Ramos 淋巴瘤细胞的凋亡 (Shan et al. , Blood 91 : 1644-52(1998))。因此,除了通过补体和 ADCC 机制减少细胞,Fc 受体与 CD20 单克隆抗体的体内结合可以通过 CD20 交联而促进恶性 B 细胞的凋亡。这一理论与表明 SCID 小鼠模型中人淋巴瘤的 CD20 治疗有效性依赖于 CD20 单克隆抗体对 Fc 受体的结合的实验相一致 (Funakoshi et al. , J. Immunotherapy 19 :93-101(1996))。

[0020] CD20 多肽含有 4 个跨膜结构域 (Einfeld et al. , EMBO J 7 :711-17, (1988) ; Stamenkovic et al. , J. Exp. Med. 167 :1975-80(1988) ;Tedder et al. , J Immunol. 141 : 4388-4394(1988))。多个跨膜结构域防止了抗体结合后的 CD20 内化。CD20 的该特性被识别为当给 B 细胞淋巴瘤患者注射鼠 CD20 单克隆抗体 1F5 时 B 细胞恶性肿瘤的有效治疗的重要特征,这导致恶性细胞的显著减少和部分临床反应 (Press et al. , Blood 69 : 584-91(1987))。

[0021] 由于正常成熟 B 细胞也表达 CD20,CD20 抗体治疗时正常 B 细胞减少 (Reff, M. E. et al, Blood 83 :435-445, 1994)。然而,治疗完成后,从 CD20 阴性 B 细胞前体再生正常 B 细胞;因此,用抗 CD20 疗法治疗的患者不经历严重的免疫抑制。在涉及自身抗体的不适当产生的疾病或 B 细胞可能起作用的其它疾病中,正常 B 细胞的减少可能是有益的。由与

人 IgG1 重链和人 κ 轻链恒定区融合的小鼠来源的重链和轻链可变区组成的 CD20 的特异性嵌合单克隆抗体保留了与 CD20 的结合和介导 ADCC 以及固定补体的能力 (Liu et al., J. Immunol. 139 :3521-26(1987) ;Robinson et al., U.S. Patent No. 5, 500, 362). 该研究导致了嵌合 CD20 单克隆抗体 Rituximab™ 的开发, 目前已经被美国食品和药品监督管理局批准用于 B 细胞淋巴瘤的治疗。尽管 Rituximab™ 治疗后经常观察到临床反应, 患者通常在约 6-12 个月后复发。

[0022] 静脉注射需要高剂量的 Rituximab™, 因为该分子是大约 150kDa 的大分子, 并且扩散限制于进入许多肿瘤细胞存留的淋巴组织。人们认为 Rituximab™ 的抗肿瘤活性机制是几种活性的结合, 包括 ADCC、补体固定和在恶性 B 细胞中激发促进凋亡的恶性 B 细胞。Rituximab™ 的大尺寸防止了该分子进入含有恶性 B 细胞的淋巴组织的最优扩散, 从而限制了这些抗肿瘤活性。如前面所讨论, 用蛋白酶切割为 Fab 或 F(ab')₂ 片段使它们更小, 并且更容易穿透到淋巴组织中, 但失去了对于抗肿瘤活性来说很重要的效应物功能。尽管 CD20 mAb 片段可能比完整抗体在递送放射性同位素方面更有效, 但仍然需要构建保留 Fc 部分的效应物功能, 但更小的 CD20 mAb 衍生物, 以促进更好的肿瘤穿透并导致更短的半衰期。

[0023] CD20 由 B 细胞来源的恶性细胞, 包括 B 细胞淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 表达。CD20 不被恶性的前 B 细胞, 例如急性成淋巴细胞白血病表达。因此 CD20 是治疗 B 细胞淋巴瘤、CLL 和 B 细胞参与疾病活性的其它疾病的良好靶点。其它 B 细胞疾病包括在 B 细胞分化为浆细胞期间产生自身抗体的自身免疫病。B 细胞疾病的例子包括自身免疫性甲状腺疾病, 包括格雷夫斯病和桥本氏甲状腺炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮 (SLE)、干燥综合征、免疫性血小板减少性紫癜 (ITP)、多发性硬化 (MS)、重症肌无力 (MG)、牛皮癣、硬皮病和炎性肠病, 包括克隆氏病和溃疡性结肠炎。

[0024] 从上文中看出, 确实需要用于治疗恶性状况和 B 细胞疾病的改进的组合物和方法。本发明的组合物和方法通过提供结合域-免疫球蛋白融合蛋白而克服了先有技术的限制, 该融合蛋白包含与免疫球蛋白铰链区多肽融合的结合域多肽, 该铰链区多肽与免疫球蛋白重链 CH2 恒定区多肽融合, CH2 恒定区多肽与免疫球蛋白肿瘤 CH3 恒定区多肽融合, 其中结合域-免疫球蛋白融合蛋白能够介导 ADCC 或补体固定。此外, 该组合物和方法提供了其它相关的益处。

发明内容

[0025] 本发明的一方面提供了结合域-免疫球蛋白融合蛋白, 包含 (a) 与免疫球蛋白铰链区多肽融合的结合域多肽, 其中所述铰链区多肽选自 (i) 不含半胱氨酸残基并且来源于具有一个或更多半胱氨酸残基的野生型免疫球蛋白铰链区多肽的突变的铰链区多肽, (ii) 含有一个半胱氨酸残基并且来源于具有两个或更多半胱氨酸残基的野生型免疫球蛋白铰链区多肽的突变的铰链区多肽, (iii) 野生型人 IgA 铰链区多肽, (iv) 不含半胱氨酸残基并且来源于野生型人 IgA 区多肽的突变的人 IgA 铰链区多肽和 (v) 含有一个半胱氨酸残基并且来源于野生型人 IgA 区多肽的突变的人 IgA 铰链区多肽; (b) 与铰链区多肽融合的免疫球蛋白重链 CH2 恒定区; 和 (c) 与 CH2 恒定区多肽融合的免疫球蛋白重链 CH3 恒定区多肽, 其中 (1) 结合域-免疫球蛋白融合蛋白具有至少一种选自抗体依赖性细胞介导的细胞毒性和补体固定的免疫活性, 并且 (2) 结合域多肽能够特异性结合于抗原。在一种实施方

案中,免疫球蛋白铰链区多肽是一种突变的铰链区多肽,并且相对于野生型人免疫球蛋白 G 铰链区多肽,表现出二聚化的能力降低。在另一种实施方案中,结合域多肽包括至少一种是免疫球蛋白轻链可变区多肽或免疫球蛋白重链可变区多肽的免疫球蛋白可变区多肽。在进一步的实施方案中,免疫球蛋白可变区多肽来源于人免疫球蛋白。

[0026] 在另一种实施方案中,结合域 Fv-免疫球蛋白融合蛋白的结合域多肽包含 (a) 至少一种免疫球蛋白轻链可变区多肽;(b) 至少一种免疫球蛋白重链可变区多肽;和 (c) 至少一种与 (a) 的多肽和与 (b) 的多肽融合的接头肽。在进一步的实施方案中,免疫球蛋白轻链可变区和重链可变区多肽来源于人免疫球蛋白。

[0027] 在另一种实施方案中,至少一种免疫球蛋白重链 CH2 恒定区多肽和免疫球蛋白重链 CH3 恒定区多肽来源于人免疫球蛋白重链。在另一种实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区 CH2 和 CH3 多肽属于选自人 IgG 和人 IgA 的同种型。在另一种实施方案中,抗原选自 CD19, CD20, CD37, CD40 和 L6。在上述融合蛋白的某些进一步的实施方案中,接头肽包括至少一种具有氨基酸序列 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 的多肽,在某些其它实施方案中,接头肽包括具有氨基酸序列 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 的多肽的至少三次重复。在某些实施方案中,免疫球蛋白铰链区多肽包括人 IgA 铰链区多肽。在某些实施方案中,结合域多肽包括 CD154 胞外域。在某些实施方案中,结合域多肽包括 CD154 胞外域和至少一种免疫球蛋白可变区多肽。

[0028] 在另一种实施方案中,本发明提供了一种编码上述任意一种结合域-免疫球蛋白融合蛋白的分离的多核苷酸,并且在相关的实施方案中,本发明提供了一种包含这种多核苷酸的重组表达构建体,并且在某些进一步的实施方案中,本发明提供了用这种重组表达构建体转化或转染的宿主细胞。在另一种实施方案中,本发明提供了生产结合域-免疫球蛋白融合蛋白的方法,包括以下步骤:(a) 在允许结合域-免疫球蛋白融合蛋白表达的条件下培养上述宿主细胞;和 (b) 从宿主细胞培养物中分离结合域-免疫球蛋白融合蛋白。

[0029] 本发明也在某些实施方案中提供了含有与生理可接受载体组合的上述结合域-免疫球蛋白融合蛋白的药物组合物。在另一种实施方案中,提供了一种治疗具有或怀疑具有恶性状况或 B 细胞疾病的受试者的方法,包括给予患者治疗有效量的上述结合域-免疫球蛋白融合蛋白。在某些进一步的实施方案中,恶性状况或 B 细胞疾病是 B 细胞淋巴瘤或以自身抗体产生为特征的疾病,并且在某些其它的实施方案中,恶性状况或 B 细胞疾病是类风湿性关节炎、重症肌无力、格雷夫斯病、I 型糖尿病、多发性硬化或自身免疫病。

[0030] 参考以下发明详述和附图将更明确本发明的这些和其它方面。在此引入此处公开的所有参考文献的完整内容作为参考,如同单独引入每一篇。

附图说明

[0031] 图 1 表示一种能够特异性结合 CD20 的结合域-免疫球蛋白融合蛋白 2H7scFv-Ig 的 DNA 和推测的氨基酸序列 [SEQ ID NO:15]。

[0032] 图 2 表示通过转染的、稳定的 CHO 细胞系产生的 2H7 scFv-Ig 的水平和通过纯化的 2H7scFv-Ig 与表达 CD20 的 CHO 细胞的结合产生标准曲线。

[0033] 图 3 表示分离的 2H7scFv-Ig 蛋白的多个制备物的 SDS-PAGE 分析。

[0034] 图 4 表示由 2H7scFv-Ig 进行的补体固定 (图 4A) 和抗体依赖性细胞毒性 (ADCC, 图 4B)。

- [0035] 图 5 表示 CD20 和 CD40 的同时连接对正常 B 细胞生长的作用。
- [0036] 图 6 表示 CD20 和 CD40 的同时连接对 B 类淋巴母细胞系中 CD95 表达和凋亡诱导的作用。
- [0037] 图 7 表示能够特异性结合 CD20 和 CD40 的 2H7scFv-CD154 L2(图 7A, SEQ ID NO : 33) 和 2H7scFv-CD154 S4(图 7B, SEQ ID NO :34) 结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白的 DNA 和推测氨基酸序列。
- [0038] 图 8 表示通过流式细胞术测定的 2H7scFv-CD154 结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白与 CD20+CHO 细胞的结合。
- [0039] 图 9 表示 2H7scFv-CD154 结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白与细胞结合后膜联蛋白 V 与 B 细胞系 Ramos, BJAB 和 T51 的结合。
- [0040] 图 10 表示 2H7scFv-CD154 结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白结合后对 B 细胞系 T51 的作用。
- [0041] 图 11 分别图示了称作 Cytox B 或 Cytox B 衍生物的 2H7ScFv-Ig 融合蛋白 [SEQ ID NOS :17、16 和 18] :Cytox B-MHWTG1C(2H7 ScFv, 突变的铰链区, 野生型人 IgG1 Fc 结构域), Cytox B-MHMG1C(2H7ScFv, 突变的铰链区, 突变的人 IgG1 Fc 结构域) 和 Cytox B-IgAHWTHG1C(2H7 ScFv, 人 IgA 来源的铰链区, 野生型人 IgG1 Fc 结构域) 的结构。箭头表示认为对 FcR 结合和 ADCC 活性(粗箭头)、以及补体固定(细箭头)起作用的氨基酸残基的位置编号。注意没有链间二硫键。
- [0042] 图 12 表示分离的 Cytox B 和 2H7scFv-CD154 结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白的 SDS-PAGE 分析。
- [0043] 图 13 表示 Cytox B 衍生物的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 活性。
- [0044] 图 14 表示 Cytox B 衍生物的补体依赖性细胞毒性 (CDC)。
- [0045] 图 15 表示猕猴血样中 Cytox B-MHWTG1C 的血清半衰期确定。
- [0046] 图 16 表示 Cytox B-MHWTG1C 对猕猴血样中循环的 CD40+B 细胞水平的作用。
- [0047] 图 17 表示转染的哺乳动物细胞系的 HD37(CD19 特异性的)ScFv-Ig 产量水平, 以及通过纯化的 HD37 ScFv-Ig 与表达 CD19 的细胞的结合产生标准曲线。
- [0048] 图 18 表示转染的稳定 CHO 细胞系的 L6(癌抗原)ScFv-Ig 产量水平, 以及通过纯化的 L6 ScFv-Ig 与表达 L6 抗原的细胞的结合产生标准曲线。
- [0049] 图 19 表示结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白 2H7 ScFv-Ig, HD37ScFv-Ig 和 G28-1(CD37 特异性)ScFv-Ig 的 ADCC 活性。
- [0050] 图 20 表示 L6 ScFv-Ig 融合蛋白的 ADCC 活性。
- [0051] 图 21 表示 L6 ScFv-Ig 和 2H7 ScFv-Ig 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析。
- [0052] 图 22 表示 G28-1 ScFv-Ig 和 HD37 ScFv-Ig 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析。

具体实施方式

[0053] 本发明涉及用于免疫治疗和免疫诊断应用, 并且提供比现有技术的抗原特异性多肽更有某些优势的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白。本发明的融合蛋白优选是在相关部分包含以下融合结构域的单多肽链: 结合域多肽、免疫球蛋白铰链区多肽、免疫球蛋白重链 CH2 恒定区多肽和免疫球蛋白重链 CH3 恒定区多肽。在特别优选的实施方案中, 结合域 - 免疫

球蛋白融合蛋白是或来源于人基因序列的产物,但本发明不需要限制于此,并且实际上可以涉及此处提供的来源于任何天然或人工来源的结合域-免疫球蛋白融合蛋白,包括基因工程化和/或突变的多肽。

[0054] 本发明部分涉及出人意料的观察结果,即,此处描述的结合域-免疫球蛋白融合蛋白具有免疫学活性。更具体地,尽管具有预计不能促进效应物活性的结构,这些蛋白保留了参与公知的免疫学效应物活性的能力,所述活性包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC,例如细胞表面的抗原结合后,在适当条件下募集和诱导具有适当Fc受体的细胞毒性效应细胞,如具有FcR γ III的天然杀伤(NK)细胞)和/或补体依赖性细胞毒性中的补体固定(CDC,例如细胞表面的抗原结合后,募集和激活作为血液补体级联成分的细胞裂解蛋白)。如下文的更详细描述,ADCC和CDC是包含免疫球蛋白重链区的单体蛋白的预料不到的功能,选用于该融合蛋白的结构,特别是对不利于它们形成链间同二聚体二硫键的能力的铰链区多肽的选择有利于该功能。

[0055] 本发明提供的另一优点是能以大量产生的结合域-免疫球蛋白融合多肽,其产量一般大于用现有技术的单链抗体构建体常规获得的量。在一种优选的实施方案中,本发明的结合域-免疫球蛋白融合多肽在哺乳动物表达系统中重组表达,这提供了以下优点,即提供了体内(例如在生理条件下)稳定的多肽。根据非限制性的理论,这种稳定性可能部分来源于融合蛋白的翻译后修饰和特异性糖基化。已经在静态细胞培养物中通过重组哺乳动物表达而以每升培养物上清液大于50mg蛋白的水平产生了本发明的结合域-免疫球蛋白融合蛋白,在这种培养物中一般观察到的产量是10-50mg/l,因此在静态培养条件下优选可以产生至少10-50mg/l;也考虑了用本领域接受的大规模方法如“补料分批”(即非静态)生产方法增加融合蛋白的产量,获得了至少5-500mg/l的产量,在一些情况下为至少0.5-1g/l,取决于特定的蛋白产物。

[0056] 本发明的结合域多肽可以是具有特异性识别和结合相关生物分子或一种以上分子的复合物或这种分子的稳定或瞬时组装物或聚集物的能力的任何多肽,所述分子包括蛋白、多肽、氨基酸或其衍生物;脂质、脂肪酸等或其衍生物;碳水化合物、糖等或其衍生物等;或其任意组合,例如,糖蛋白、糖肽、糖脂、脂蛋白、蛋白脂等;或可能存在于生物学样品中的任意其它生物分子。可以通过从受试者或生物来源获得血样、活检标本、组织外植体、器官培养物、生物流体或任意其它组织或细胞制备物而提供生物学样品。受试者或生物来源可以是人或非人动物、原代细胞培养物或适合培养的细胞系,包括但不限于可能含有染色体整合或附加型重组核酸序列的基因工程化的细胞系、永生化的可永生化的细胞系、体细胞杂交细胞系、分化的或可分化的细胞系、转化的细胞系等。在本发明的某些优选实施方案中,受试者或生物来源可以被怀疑或患有此处所述的恶性状况或B细胞疾病,或者具有患此处所述的恶性状况或B细胞疾病的风险,在某些进一步优选的实施方案中可以是自身免疫病,在本发明的某些其它优选实施方案中,受试者或生物来源可以已知没有患所述疾病的风险,或没有该疾病。

[0057] 因此,结合域多肽可以是任何天然存在或重组产生的此处提供的相关生物分子的结合配偶体,该相关生物分子是感兴趣的靶结构,此处称作“抗原”,但根据本发明的公开,意欲包括任何需要使本发明的融合蛋白特异性与其结合的靶生物分子。如果结合域-免疫球蛋白融合蛋白以大于或等于约 10^4M^{-1} ,优选大于或等于约 10^5M^{-1} ,更优选大于或等于约

10^6M^{-1} ,更优选大于或等于约 10^7M^{-1} 的 K_a 结合需要的靶分子,则该结合域-免疫球蛋白融合蛋白定义为“免疫特异性”或能够特异性结合。本发明的结合域-免疫球蛋白融合蛋白的亲合力可以使用常规技术,例如描述于 Scatchard et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 51 :660 (1949) 中的技术容易测定。也可以使用任何已知用于鉴定和获得特异性与其它蛋白或多肽相互作用的蛋白的方法,例如美国专利 5, 283, 173 和美国专利 5, 468, 614, 或其同族专利等描述的酵母双杂交筛选系统进行融合蛋白与感兴趣的靶抗原结合的这种测定。

[0058] 本发明的结合域-免疫球蛋白融合蛋白的优选实施方案包括含有至少一个免疫球蛋白可变区多肽的结合域,所述可变区多肽例如重链或轻链可变区的所有或部分或片段,前提是它能够特异性结合于抗原或此处描述的感兴趣的其它需要的靶结构。在其它优选的实施方案中,结合域包含一个单链免疫球蛋白来源的 Fv 产物,它可以包含至少一种免疫球蛋白轻链 V 区的所有或部分和至少一种免疫球蛋白重链 V 区的所有或部分;并且进一步包含与 V 区融合的接头;此处更详细描述了所述构建体的制备和检验,并且这也是本领域公知的。其它结合域多肽可以包括保留了特异性结合于此处提供的抗原的能力的任何蛋白或其部分,包括非免疫球蛋白。因此本发明考虑了包含来源于以下成分的结合域多肽的融合蛋白:多肽配体如激素、细胞因子、趋化因子等;这种多肽配体的细胞表面或可溶受体;凝集素;细胞间粘附受体如特异性白细胞整联蛋白、选择蛋白、免疫球蛋白基因超家族成员、细胞间粘附分子 (ICAM-1, -2, -3) 等;组织相容性抗原等。

[0059] 可以提供结合域多肽并且也可以选择为本发明的结合域-Ig 融合蛋白需要结合的靶分子或抗原的细胞表面受体的例子包括以下成分等:HER1 (如 GenBank 编号 U48722, SEG_HEGFREXS, K03193), HER2 (Yoshino et al., 1994 J. Immunol. 152 :2393; Disis et al., 1994 Canc. Res. 54 :16; 也见,例如 GenBank 编号 X03363, M17730, SEGHUMHER20), HER3 (例如 GenBank 编号 U29339, M34309), HER4 (Plowman et al., 1993 Nature 366 :473; 也见,例如 GenBank 编号 L07868, T64105), 表皮生长因子 (EGFR) (例如 GenBank 编号 U48722, SEG_HEGFREXS, K03193), 血管内皮细胞生长因子 (例如 GenBank 编号 M32977), 血管内皮生长因子受体 (例如 GenBank 编号 AF022375, 1680143, U48801, X62568), 胰岛素样生长因子 -I (例如 GenBank 编号 X00173, X56774, X56773, X06043, 也见欧洲专利 GB 2241703), 胰岛素样生长因子 -II (例如 GenBank 编号 X03562, X00910, SEG_HUMGFIA, SEG_HUMGF12, M17863, M17862), 转铁蛋白受体 (Trowbridge and Omary, 1981 Proc. Nat. Acad. USA 78 :3039; 也参见,例如 GenBank 编号 X01060, M11507), 雌激素受体 (如 GenBank 编号 M38651, X03635, X99101, U47678, M12674), 孕激素受体 (如 GenBank 编号 X51730, X69068, M15716), 滤泡刺激素受体 (FSH-R) (如 GenBank 编号 Z34260, M65085), 视黄酸受体 (如 GenBank 编号 L12060, M60909, X77664, X57280, X07282, X06538), MUC-1 (Barnes et al., 1989 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86 :7159; 也见,例如 GenBank 编号 SEG_MUSMUC10, M65132, M64928), NY-ESO-1 (如 GenBank 编号 AJ003149, U87459), NA17-A (如欧洲专利 WO 96/40039), Melan-A/MART-1 (Kawakami et al., 1994 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91 :3515; 也见,例如 GenBank 编号 U06654, U06452), 酪氨酸酶 (Topalian et al., 1994 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91 :9461; 也见,例如 GenBank 编号 M26729, SEG_HUMTYRO, 也见,例如 Weber et al., J; Clin. Invest (1998) 102 :1258), Gp-100 (Kawakami et al., 1994 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91 :3515; 也见,例如 GenBank 编号 S73003, 也见欧洲专利 EP 668350; Adema et al., 1994 J.

Biol. Chem. 269 :20126), MAGE(van den Bruggen et al., 1991 Science 254 :1643; 例如 GenBank 编号 U93163, AF064589, U66083, D32077, D32076, D32075, U10694, U10693, U10691, U10690, U10689, U10688, U10687, U10686, U10685, L18877, U10340, U10339, L18920, U03735, M77481), BAGE(例如 GenBank 编号 U19180, 也见美国专利 5,683,886 和 5,571,711), GAGE(例如 GenBank 编号 AF055475, AF055474, AF055473, U19147, U19146, U19145, U19144, U19143, U19142), 任意 CTA 类的受体, 具体包括由 SSX2 基因编码的 HOM-MEL-40 抗原(例如 GenBank 编号 X86175, U90842, U90841, X86174), 癌胚抗原(CEA, Gold and Freedman, 1985 J Exp. Med 121 :439; 也见, 例如 GenBank 编号 SEG_HUMCEA, M59710, M59255, M29540), 以及 PyLT(例如 GenBank 编号 J02289, J02038)。

[0060] 其它可以作为结合域多肽的来源或可以作为相关抗原的细胞表面受体包括以下受体等: CD2(例如 GenBank 编号 Y00023, SEGHUMCD2, M16336, M16445, SEG_MUSCD2, M14362), 4-1BB(CDw137, Kwon et al., 1989 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86 :1963), 4-1BB 配体(Goodwin et al., 1993 Eur. J. Immunol. 23 :2361; Melero et al., 1998 Eur. J. Immunol. 3 :116), CD5(例如 GenBank 编号 X78985, X89405), CD10(例如 GenBank 编号 M81591, X76732), CD27(例如 GenBank 编号 M63928, L24495, L08096), CD28(June et al., 1990 Immunol. Today 11:211; 也见, 例如 GenBank 编号 SEGHUMCD28, M34563), CTLA-4(例如 GenBank 编号 L15006, X05719, SEG_HUMIGCTL), CD40(例如 GenBank 编号 M83312, SEGMUSC040A0, Y10507, X67878, X96710, U15637, L07414), γ 干扰素(IFN- γ , 见例如 Farrar et al. 1993 Ann. Rev. Immunol. 11 :571 及其中引用的参考文献, Gray et al. 1982 Nature 295 :503, Rinderknecht et al. 1984 J Biol. Chem. 259 :6790, DeGrado et al. 1982 Nature 300 :379), 白介素-4(IL-4, 见例如 53rd Forum in Immunology, 1993 Research in Immunol. 144 :553-643; Banchereau et al., 1994 in The Cytokine Handbook, 2nd ed., A. Thomson, ed., Academic Press, NY, p. 99; Keegan et al., 1994 J Leukocyt. Biol. 55 :272, 及其中引用的参考文献), 白介素-17(IL-17)(例如, GenBank 编号 U32659, U43088) 和白介素-17 受体(IL-17R)(例如, GenBank 编号 U31993, U58917)。尽管包括前述内容, 本发明特意不包括 U. S. 5, 807, 734, U. S. 5, 795, 572 或 U. S. 5, 807, 734 所公开的任何免疫球蛋白融合蛋白。

[0061] 其它可以作为结合域多肽的来源或可以作为相关抗原的细胞表面受体包括以下受体等: CD59(例如, GenBank 编号 SEG_HUMCD590, M95708, M34671), CD48(例如, GenBank 编号 M59904), CD58/LFA-3(例如, GenBank 编号 A25933, Y00636, E12817, 也见 JP1997075090-A), CD72(例如, GenBank 编号 AA311036, S40777, L35772), CD70(例如, GenBank 编号 Y13636, S69339), CD80/B7.1(Freeman et al., 1989 J. Immunol. 43 :2714; Freeman et al., 1991 J. Exp. Med. 174 :625, 也见, 例如 GenBank 编号 U33208, I683379), CD86/B7.2(Freeman et al., 1993 J. Exp. Med. 178 :2185, Boriello et al., 1995 J Immunol. 155 :5490; 也见, 例如 GenBank 编号 AF099105, SEGMMB72G, U39466, U04343, SEGHSB725, L25606, L25259), CD40 配体(例如, GenBank 编号 SEG_HUMCD40L, X67878, X65453, L07414), IL-17(例如, GenBank 编号 U32659, U43088), CD43(例如, GenBank 编号 X52075, J04536) 和 VLA-4($\alpha_4\beta_7$)(例如, GenBank 编号 L12002, X16983, L20788, U97031, L24913, M68892, M95632)。以下细胞表面受体一般与 B 细胞相关: CD19(例如, GenBank 编号 SEG_HUMCD19W0, M84371, SEG MUSCD19W, M62542), CD20(例如, GenBank 编号 SEGHUMCD20,

M62541), CD22(例如, GenBank 编号 I680629, Y10210, X59350, U62631, X52782, L16928), CD30 配体(例如, GenBank 编号 L09753, M83554), CD37(例如, GenBank 编号 SEG_MMCD37X, X14046, X53517), CD106(VCAM-1)(例如, GenBank 编号 X53051, X67783, SEG_MMVCAM1C, 也见美国专利 5, 596, 090), CD54(ICAM-1)(例如, GenBank 编号 X84737, S82847, X06990, J03132, SEGMUSICAMO), 白介素 12(见, 例如 Reiter et al, 1993 Crit. Rev. Immunol. 13 :1, 及其中引入的参考文献)。辅助的细胞试剂也可以包括以下一般与树突细胞相关的细胞表面受体: CD83(例如, GenBank 编号 AF001036, AL021918), DEC-205(例如, GenBank 编号 AF011333, U19271)。

[0062] 上述免疫球蛋白铰链区多肽包括任何天然存在的、作为人工肽或作为基因工程结果和位于负责在 CH1 和 CH2 区中形成链内免疫球蛋白-结构域二硫键的氨基酸残基之间的免疫球蛋白重链多肽内的铰链区肽或多肽;用于本发明的铰链区多肽也可以包括突变的铰链区多肽。因此,免疫球蛋白铰链区多肽可以来源于上述经典地认为具有铰链区功能的免疫球蛋白链区域,或是其部分或片段(即以肽键连接的一个或多个氨基酸,一般 5-65 个氨基酸,优选 10-50 个,更优选 15-35 个,更优选 18-32 个,更优选 20-30 个,更优选 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 或 29 个氨基酸)。但用于本发明的铰链区多肽并不限于此,并且可以包括位于邻接的免疫球蛋白结构域,如 CH1 结构域或 CH2 结构域中的氨基酸(根据用于分配特定残基至特定结构域的结构标准可能不同,如本领域公知),或者在某些人工工程化的免疫球蛋白构建体的情况下,可以包括免疫球蛋白可变区结构域。

[0063] 野生型免疫球蛋白铰链区多肽包括任何位于免疫球蛋白的恒定区结构域 CH1 和 CH2 之间的天然存在的铰链区。野生型免疫球蛋白铰链区多肽优选是人免疫球蛋白铰链区多肽,优选包含来自人 IgG 免疫球蛋白的铰链区,更优选包含来自人 IgG1 同种型的铰链区多肽。如本领域所公知,尽管免疫球蛋白氨基酸序列具有极大的总体多样性,免疫球蛋白一级结构在免疫球蛋白多肽链的特定部分表现出高度序列保守性,特别是存在半胱氨酸残基,它们通过其巯基提供了与其它存在的巯基形成二硫键的潜能。因此,在本发明的内容中,野生型免疫球蛋白铰链区多肽可以被认为特征在于一个或多个高度保守的(如以统计学显著的方式普遍存在于人群中)半胱氨酸残基,在某些优选实施方案中,突变的铰链区多肽可以选自含有 0 或 1 个半胱氨酸残基的铰链区并且来源于这样的野生型铰链区。

[0064] 突变的免疫球蛋白铰链区多肽可以包含来源于不同于 CH2 和 CH3 结构域的物种、免疫球蛋白同种型或类、或免疫球蛋白亚类的铰链区。例如,在某些实施方案中,结合域-免疫球蛋白融合蛋白可以包含融合于含有野生型人 IgA 铰链区多肽或此处描述的含有 0 或仅仅 1 个半胱氨酸残基的突变的人 IgA 铰链区多肽的免疫球蛋白铰链区多肽的结合域多肽。这种铰链区多肽可以融合于来自于不同的 Ig 同种型或类,如 IgG 亚类的免疫球蛋白重链 CH2 区多肽,该 IgG 亚类在某些实施方案中优选为 IgG1 亚类。

[0065] 例如,如下面更详细的描述,在本发明的某些实施方案中,免疫球蛋白铰链区多肽选自来源于天然包括三个半胱氨酸的野生型人 IgA 铰链区,其中所选择的铰链区多肽相对于完整的铰链区被截短,使得只剩下一个半胱氨酸残基(如 SEQ ID NO :36)。同样,在本发明的某些其它实施方案中,结合域-免疫球蛋白融合蛋白包含融合于含有突变的铰链区多肽的免疫球蛋白铰链区多肽,突变的铰链区多肽中的半胱氨酸残基数通过氨基酸取代或缺失而减少。因此突变的铰链区多肽可以来源于含有一个或多个半胱氨酸残基的野生型免

疫球蛋白铰链区。在某些实施方案中,突变的铰链区多肽可以含有 0 个或仅仅 1 个半胱氨酸残基,其中突变的铰链区多肽来源于分别含有一个或多个或两个或多个半胱氨酸残基的野生型免疫球蛋白铰链区。在突变的铰链区多肽中,野生型免疫球蛋白铰链区的半胱氨酸残基优选被不能形成二硫键的氨基酸取代。在本发明的一个实施方案中,突变的铰链区多肽来源于人 IgG 野生型铰链区多肽,该野生型铰链区多肽可以包括四种人 IgG 同种型亚类 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 的任意一种。在某些优选的实施方案中,突变的铰链区多肽来源于人 IgG1 野生型铰链区多肽。作为举例,来源于人 IgG 野生型铰链区多肽的突变的铰链区多肽可以含有在野生型免疫球蛋白铰链区的三个半胱氨酸中的两个或三个上发生的突变。

[0066] 存在于野生型免疫球蛋白铰链区并且根据本发明的特别优选的实施方案而进行的诱变所缺失的半胱氨酸残基包括形成、或能够形成链间二硫键的半胱氨酸残基。不希望受到理论的限制,本发明考虑了这些铰链区半胱氨酸残基的突变,这些半胱氨酸残基被认为参与链间二硫桥形成,减少本发明的结合域-免疫球蛋白融合蛋白通过二硫键形成而二聚化(或形成更高级的寡聚物)的能力,同时出乎意料地不减少融合蛋白促进抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或固定补体的能力。具体地,介导 ADCC 的 Fc 受体(FcR)(如 FcRIII, CD16)具有对免疫球蛋白 Fc 结构域的低亲和性,表示 Fc 与 FcR 的功能性结合需要 Fc-FcR 复合物的亲和稳定,这是由于常规抗体中重链的二聚结构,和/或通过常规抗体 Fc 结构的 FcR 聚集和交联而导致的。(Sonderman et al., 2000 Nature 406 :267; Radaev et al., 2001 J BiolChem. 276 :16469; Radaev et al., 2001 J Biol. Chem. 276 :16478; Koolwijk et al., 1989 J Immunol. 143 :1656; Kato et al., 2000 Immunol. Today 21 :310.)。因此,本发明的结合域-免疫球蛋白融合蛋白提供了与单链免疫球蛋白融合蛋白相关的优点,同时也出乎意料地保留了免疫学活性。同样,固定补体的能力一般与包含 Fc 的重链恒定区为二聚化的免疫球蛋白相关,而本发明的结合域-免疫球蛋白融合蛋白表现出出乎意料的固定补体的能力。

[0067] 如上文所指出的,根据非限定性的理论,确信结合域-免疫球蛋白融合蛋白损害了它们二聚化的能力,并且进一步根据理论,该性质是减少存在于所选的包含于融合蛋白的构建中的免疫球蛋白铰链区多肽中的半胱氨酸残基数度的结果。确定多肽二聚化的相对能力的方法是本领域公知的,其中可以用许多确立的方法检测蛋白的二聚化(见,例如 Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, 1987 Springer-Verlag, New York)。例如,用于根据分子大小分辨蛋白的生化分离技术(例如凝胶电泳、凝胶过滤层析、分析性超速离心法等)和/或在引入巯基活性(例如碘乙酰胺、N-乙基马来酰亚胺)或二硫键还原性(如 2-巯基乙醇、二硫苏糖醇)试剂之前和之后比较蛋白的生理化学特征的方法,或其它相当的方法都可以用于检测多肽二聚化或寡聚化的程度,并且确定二硫键对这种潜在四级结构的可能作用。在某些实施方案中,本发明涉及此处提供的相对于野生型人免疫球蛋白 G 铰链区多肽表现出二聚化能力降低(即相对于适当的 IgG 来源的对照以统计学显著的方式降低)的结合域免疫球蛋白融合蛋白。因此,本领域的熟练技术人员能够容易确定特定融合蛋白是否表现出这种二聚化能力降低。

[0068] 用于制备免疫球蛋白融合蛋白的组合物和方法是本领域公知的,例如美国专利 5,892,019 的描述,该专利公开了作为单个编码性多核苷酸的产物但不是本发明的结合域-免疫球蛋白融合蛋白的重组抗体。

[0069] 对于用于人的本发明的免疫球蛋白融合蛋白,恒定区一般来源于人序列,以减少潜在的抗人免疫应答并且提供适当的效应物功能。操作编码抗体恒定区的序列描述于 Morrison 和 Oi 的 PCT 公开 W089/07142。在特别优选的实施方案中,CH1 结构域缺失,并且结合域的羧基端,或当结合域包含两个免疫球蛋白可变区多肽时,第二个(即更接近于 C 末端)可变区通过铰链区连接于 CH2 的氨基末端。描述两个示例性结合域-免疫球蛋白融合蛋白的结构概要图见图 11,应该注意,在特别优选的实施方案中,不存在链间二硫键,在其它实施方案中,相对于野生型铰链区多肽中的该键的数目,可以存在有限的链间二硫键数目,在其它实施方案中,融合蛋白包含相对于野生型人 IgG 铰链区多肽表现出二聚化能力降低的突变铰链区多肽。因此,分离的多核苷酸分子编码单链免疫球蛋白融合蛋白,该融合蛋白具有提供对所选择抗原的特异性结合亲和性的结合域。

[0070] 如上文所指出的,在某些实施方案中,结合域免疫球蛋白融合蛋白包含至少一个免疫球蛋白可变区多肽,该多肽可以是轻链或重链可变区多肽,并且在某些实施方案中,融合蛋白包含至少一个该轻链 V 区和一个该重链 V 区以及至少一个融合于每一个 V 区的接头肽。构建这种结合域,例如单链 Fv 结构域的方法是公知的,并且在下文的实施例中由详细描述,并且在例如美国专利 5,892,019 及其引用的参考文献中有详细描述;单链可变区和融合于每一个重链来源和轻链来源的 V 区的接头多肽的选择和组装(例如产生包含单链 Fv 多肽的结合域)也是本领域公知的,并且在本文和例如美国专利 5,869,620,4,704,692 和 4,946,778 中有描述。在某些实施方案中,来源于非人来源的免疫球蛋白序列的全部或一部分可以根据公知程序进行“人源化”,以制备人源化抗体,即,引入了人 Ig 序列以减少人免疫系统将该蛋白识别为外源蛋白的程度的免疫球蛋白序列(见,例如美国专利 5,693,762;5,585,089;4,816,567;5,225,539;5,530,101 及其中引用的参考文献)。

[0071] 一旦设计了此处提供的结合域-免疫球蛋白融合蛋白,可以通过描述于例如 Sinha et al., *Nucleic Acids Res.*, 12,4539-4557(1984) 中的寡核苷酸合成方法合成编码该多肽的 DNA,通过描述于例如 Innis, Ed., *PCR Protocols*, Academic Press(1990) 和 Better et al. *J. Biol. Chem.* 267,16712-16118(1992) 的 PCR 方法组装;通过描述于例如 Ausubel et al., Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York(1989) 以及 Robinson et al., *Hum. Antibod Hybridomas*, 2,84-93(1991) 的标准程序进行克隆和表达;并且通过描述于例如 Harlow et al., Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Chapter 14, ColdSpring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor(1988) 和 Munson et al., *Anal Biochem.*, 107,220-239(1980) 的方法检测特异性抗原结合活性。

[0072] Fv 区的单多肽链结合分子即单链 Fv 分子的制备描述于美国专利 4,946,778,在此引入作为参考。在本发明中,通过编码第一个重链或轻链可变区,然后分别编码相应轻链或重链可变区的一个或多个接头而合成单链 Fv 样分子。两个可变区之间的适当接头的选择描述于美国专利 4,946,778。此处描述的示例性的接头是 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃。接头用于将天然聚集但化学上分离的重链和轻链转化为单个多肽链的氨基末端抗原结合部分,其中该抗原结合部分将折叠成类似于由两条多肽链形成的原始结构,从而保持结合目的抗原的能力。通过编码接头的序列连接的编码重链和轻链可变区的核苷酸序列连接于编码抗体恒定区的核苷酸序列。恒定区是允许得到的多肽形成链间二硫键以形成具有所需效应物功能,例如介导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的二聚体的区域。对于意欲用于人类的本发明

的免疫球蛋白样分子来说,恒定区一般基本来自于人,从而使潜在的抗人免疫应答减少到最小并且提供适当的效应物功能。对编码抗体恒定区的序列的操作描述于 Morrison 和 Oi 的 PCT 公开 89/07142,在此引入作为参考。在优选实施方案中,缺失 CH1 结构域并且通过铰链区将第二个可变区的羧基末端连接于 CH2 的氨基末端。与轻链的相应 Cys 形成二硫键以保持天然抗体的重链和轻链的铰链区 Cys 残基可以缺失或被例如 Pro 残基等取代。

[0073] 如上文所述,本发明提供了能够指导此处提供的结合域免疫球蛋白融合蛋白的表达的重组表达构建体。存在于此处提到的各种氨基酸序列中的氨基酸是根据它们的公知三字母或单字母简称而鉴别的。存在于此处的各种 DNA 序列或其片段中的核苷酸是根据本领域中常用的标准单字母命名法进行命名的。特定的氨基酸序列也可以包括具有微小改变的相似氨基酸序列,例如说明性而非限定性的共价化学修饰、插入、缺失和取代,可以进一步包括保守取代。彼此相似的氨基酸序列可以具有很大的序列同源区。以相似的方式,核苷酸序列可以包括仅具有微小改变的基本相似的核苷酸序列,例如说明性而非限定性的共价化学修饰、插入、缺失和取代,可以进一步包括由于遗传密码子的简并性而导致的沉默突变。彼此相似的核苷酸序列可以具有很大的序列同源区。

[0074] 受试者中存在恶性状况是指存在受试者中存在发育异常的、癌性和 / 或被转化细胞,包括,例如赘生性、肿瘤、非接触抑制的或致癌性被转化细胞等。在优选实施方案中,本发明考虑了例如这些癌细胞是恶性造血细胞,例如淋巴系的被转化细胞,具体如 B 细胞淋巴瘤等;在某些优选实施方案中,癌细胞也可以是上皮细胞如上皮癌细胞。本发明也考虑了 B 细胞疾病,可以包括影响 B 细胞的某些恶性状况(如 B 细胞淋巴瘤),但不限于此,也可以包括自身免疫病,具体说是以自身抗体产生为特征的疾病、紊乱和状况。

[0075] 自身抗体是与自身抗原反应的抗体。在一些自身免疫病(即宿主免疫系统产生不适当的抗“自身”免疫反应的疾病、紊乱或状况)中检测到了自身抗体,它们参与疾病活动。目前这些自身免疫病的治疗是需要连续给药、缺乏特异性并导致严重副作用的免疫抑制药物。能够消除自身抗体的产生并具有最小的毒性的新方法将解决影响许多人的各种疾病的未满足的医学需要。本发明的结合域-免疫球蛋白融合蛋白是设计用于改进渗透到淋巴组织中。B 淋巴细胞的消除中断了自身抗体产生循环,并且允许免疫系统重新设置,同时从骨髓中的前体产生新的 B 淋巴细胞。

[0076] 根据非限制性理论已经鉴定,对于许多疾病 B 细胞消除理论导致了有益的效果,这些疾病的一些例子的简要描述如下。

[0077] 自身免疫性甲状腺疾病包括格雷夫斯病和桥本氏甲状腺炎。在美国,有约 2 千万人患有某种形式的自身免疫性甲状腺疾病。自身免疫性甲状腺疾病是由刺激甲状腺而导致甲状腺机能亢进(格雷夫斯病)或破坏甲状腺而导致甲状腺机能减退(桥本氏甲状腺炎)的自身抗体的产生而导致的。甲状腺的刺激是由结合并激活甲状腺刺激激素(TSH)受体的自身抗体所导致的。甲状腺的破坏是由与其它甲状腺抗原反应的自身抗体所导致的。

[0078] 当前格雷夫斯病的治疗包括手术、放射性碘或抗甲状腺药物治疗。放射性碘被广泛使用,因为抗甲状腺药物具有显著副作用,并且疾病复发率高。手术用于具有大的甲状腺肿的患者,或需要使甲状腺功能非常迅速地正常化的患者。目前还没有靶向于刺激 TSH 受体的自身抗体的产生的疗法。目前用于桥本氏甲状腺炎的治疗是左旋甲状腺素钠,并且该治疗是终身的,因为该疾病消退几乎是不可能的。已经发现抑制性治疗在桥本氏甲状腺炎

肿使甲状腺萎缩,但还没有已知一种疗法能够减少抗体产生从而靶向于疾病机制。

[0079] 类风湿性关节炎 (RA) 是一种以导致肿胀、疼痛和功能丧失的关节的炎症为特征的慢性疾病。RA 在美国影响了大约 250 万人。RA 是由包括起始的感染或损伤的事件、异常免疫应答和遗传因素的结合所导致的。尽管 RA 中存在自身反应性 T 细胞和 B 细胞, RA 的诊断中使用了在关节中采集的高水平抗体,即称作类风湿因子的抗体的检测。目前用于 RA 的治疗包括许多用于控制疼痛和延缓疾病进展的药物。还没有发现能够治愈该疾病的治疗。药物包括非甾体类抗炎药 (NSAIDS) 和疾病修饰性抗风湿药物 (DMARDs)。NSAIDS 在良性疾病中有效,但在严重 RA 中不能阻止进展为关节破坏和残疾。NSAIDS 和 DMARDs 都与严重的副作用相关。只在十多年中,只批准了一种新的 DMARD,即来氟米特。来氟米特阻断自身抗体的产生,减少炎症,并且延缓 RA 的进展。然而,该药物也导致严重的副作用,包括恶心、腹泻、脱发、皮疹和肝损伤。

[0080] 系统性红斑狼疮 (SLE) 是一种由于多个器官,包括肾、皮肤和关节中的血管的反复损伤导致的自身免疫病。SLE 在美国影响了超过 500,000 人。在 SLE 患者中,T 细胞和 B 细胞之间的异常相互作用导致了攻击细胞核的自身抗体的产生。这些抗体包括抗双链 DNA 和抗 Sm 抗体。在约半数的 SLE 患者中也发现了结合于磷脂的自身抗体,并且负责血管损伤和低血细胞计数。免疫复合物在 SLE 患者的肾、血管和关节中聚集,它们在此导致炎症和组织破坏。还没有发现治愈该疾病的疗法。根据疾病的严重程度,将 NSAIDS 和 DMARDs 用于治疗。用于去除自身抗体的带有血浆交换的血浆除去法可以导致 SLE 患者的暂时改进。普遍同意自身抗体与 SLE 有关,所以消除 B 细胞系,允许免疫系统重新设置,同时从前体产生新的 B 细胞的新疗法为 SLE 患者的长期持续益处带来了希望。

[0081] 干燥综合征是以身体中产生湿润环境的腺体的破坏为特征的一种自身免疫病。干燥综合征是最普遍的自身免疫病之一,影响了多至 400 万美国人。约半数干燥综合征患者也患有结缔组织病,如类风湿性关节炎,而另一半患有原发性干燥综合征,没有其它并发的自身免疫病。干燥综合征患者中通常存在自身抗体,包括抗核抗体、类风湿因子、抗胞衬蛋白和抗毒草碱受体抗体。常规治疗包括皮质类固醇。

[0082] 免疫性血小板减少性紫癜 (ITP) 是由结合于血小板并导致其破坏的自身抗体所导致的。一些 ITP 病例是由药物导致的,其它与感染、妊娠或自身免疫病如 SLE 相关。约半数病例分类为“特发性”,表示原因未知。ITP 的治疗是由症状的严重性所决定的。在一些病例中,不需要治疗。在大多数病例中,用免疫抑制药物,包括皮质类固醇或静脉输注免疫球蛋白来消除 T 细胞。另一种通常导致血小板数目增加的治疗方法是切除脾,该器官破坏抗体包被的血小板。更强效的免疫抑制药物,包括环孢霉素、环磷酰胺或硫唑嘌呤用于治疗严重病例。通过使患者的血浆通过蛋白 A 株而去除自身抗体被用作严重疾病患者的二线疗法。

[0083] 多发性硬化 (MS) 是以中枢神经系统的炎症和髓鞘破坏为特征的自身免疫病,它刺激脑、脊髓和身体中的神经细胞纤维。尽管 MS 的原因未知,普遍认为自身免疫性 T 细胞是该疾病发病的主要原因。然而,高水平的抗体存在于 MS 患者的脑脊液中,一些理论预测,导致抗体产生的 B 细胞应答在介导该疾病中是重要的。在 MS 患者中还没有研究 B 细胞清除理论。MS 不能治愈。目前的治疗是皮质类固醇,它可以减少攻击的持续时间和严重性,但不影响 MS 随时间的进程。最近批准了 MS 的新的生物技术干扰素 (IFN) 治疗。

[0084] 重症肌无力 (MG) 是一种慢性免疫性神经肌肉疾病,特征在于随意肌群的衰弱。MG 影响了大约 40,000 美国人。MG 是由结合于在神经肌肉接头表达的乙酰胆碱受体的自身抗体导致的。该抗体减少或阻断乙酰胆碱受体,阻止信号从神经传递到肌肉。MG 还不能治愈。常见的疗法包括用皮质类固醇、环孢霉素、环磷酰胺或硫唑嘌呤进行免疫抑制。手术切除胸腺通常用于钝化自身免疫应答。用于降低自身抗体水平的血浆除去法在 MG 中有效,但作用时间短,因为持续产生自身抗体。血浆除去法通常在手术前用于严重的肌肉衰弱。

[0085] 牛皮癣影响了大约 500 万人。它是皮肤的自身免疫性炎症。30% 的牛皮癣与关节炎相关 (硬皮病关节炎)。有许多治疗方法,包括甾体类、紫外线维生素 A 类、维生素 D 衍生物、环孢霉素、氨甲喋呤。

[0086] 硬皮病是结缔组织的一种慢性自身免疫病,也称作系统性硬化。硬皮病的特征在于胶原的过量产生,导致皮肤增厚。大约 300,000 美国人患有硬皮病。

[0087] 包括克隆氏病和溃疡性结肠炎的炎症肠病是消化系统的自身免疫病。

[0088] 本发明进一步涉及编码结合域-免疫球蛋白融合蛋白的构建体,具体涉及用于给予编码可以表达为例如所述多肽的片段、类似物和衍生物的所述蛋白的重组构建体的方法。当提到结合域-免疫球蛋白融合多肽或融合蛋白时,“片段”、“衍生物”和“类似物”是指任何保持与所述多肽基本相同的生物功能或活性的任何结合域-免疫球蛋白融合多肽或融合蛋白。因此,类似物包括可以被前蛋白部分的切割所激活而产生活性结合域-免疫球蛋白融合多肽的前蛋白。

[0089] 此处提到的由 cDNA 编码的结合域-免疫球蛋白融合多肽或融合蛋白的片段、衍生物或类似物,包括结合域-免疫球蛋白融合多肽或融合蛋白可以是 (i) 其中的一个或多个氨基酸残基被保守的或非保守的氨基酸残基 (优选保守的氨基酸残基) 所取代,并且所述被取代的氨基酸残基可以或不可以由遗传密码编码,或 (ii) 其中的一个或多个氨基酸残基包含取代基,或 (iii) 其中的其它氨基酸融合于结合域免疫球蛋白融合多肽,包括用于检测结合域免疫球蛋白融合多肽或前蛋白序列,或对其进行特异性功能改变。根据此处的教导,所述片段、衍生物和类似物被认为在本领域技术人员公知的范围内。

[0090] 本发明的多肽包括具有与本领域公知的序列或其片段或部分相同或相似的结合域多肽氨基酸序列的结合域免疫球蛋白融合多肽和融合蛋白。例如用于说明而不是限定性的,人 CD154 分子胞外域可考虑用于本发明,作为与报道的多肽和所述多肽的部分具有至少 70% 相似性 (优选 70% 同一性),更优选 90% 相似性 (优选 90% 同一性),更优选 95% 相似性 (优选 95% 同一性) 的多肽,其中所述结合域免疫球蛋白融合多肽的部分一般含有至少 30 个氨基酸,更优选 50 个氨基酸。

[0091] 如本领域所公知,两个多肽间的“相似性”通过比较多肽的氨基酸序列和多肽的保守氨基酸取代与第二个多肽的序列而确定。编码本发明的多肽的核酸的片段或部分可以用于合成本发明的全长核酸。如此处所用到的,“百分比同一性”表示当使用有空位的 BLAST 算法如 Altschul et al., 1997 Nucl. Ac. Res. 25 :3389) 对两个或更多多肽进行比对并分析其序列时,相应氨基酸残基位置处的相同氨基酸百分比,该算法根据国家卫生部 /NCBI 数据库提供的缺省加权,对序列空位和序列错配进行加权 (Bethesda, MD ;见 WWW. ncbi. nlm. nih. gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast)。

[0092] “分离的”表示该物质被从其来源环境 (例如,如果天然存在,则为天然环境) 中取

出。例如,存在于活动物体内的天然存在的核酸或多肽不是分离的,但与天然系统中一些或全部共存物质分开的相同核酸或多肽则是分离的。所述核酸可以是载体的部分和/或所述核酸或多肽可以是组合物的一部分,并且仍然是分离的,因为所述载体或组合物不是其天然环境的一部分。

[0093] “基因”表示参与产生多肽链的DNA的片段,它包括在编码区之前和之后的区域“前导区和非转录尾区”以及各个编码片段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0094] 如此处所描述,本发明提供了由具有框内融合于额外的免疫球蛋白结构域编码序列的结合域编码序列的核酸编码的结合域免疫球蛋白融合蛋白,所述框内融合提供了与额外的功能性多肽序列融合的结合域多肽序列的表达,从而,例如但不限于允许了融合蛋白的检测、功能性改变、分离和/或纯化。所述融合蛋白可以通过含有影响融合产物行为的额外的免疫球蛋白来源的多肽序列而允许结合域的功能性改变,例如(以及上文所述)减少参与二硫键形成的巯基和赋予加强ADCC和/或CDC的能力。

[0095] 可以通过本领域技术人员公知的任何方法实现多肽的修饰。此处的优选方法依赖于编码融合蛋白的DNA的修饰和所述修饰DNA的表达。编码上文所讨论的结合域-免疫球蛋白融合蛋白之一的DNA可以采用标准方法进行诱变,包括下文所述方法。例如,可以从多肽中去除或取代促进多聚体形成或促进特定分子构象的半胱氨酸残基,例如负责聚集物形成的半胱氨酸残基。如果必要,可以通过缺失和/或取代半胱氨酸残基而从经验上确定有利于聚集的半胱氨酸残基,并且确定得到的蛋白在含有生理可接受的缓冲液和盐中是否聚集。此外,可以构建和使用结合域-免疫球蛋白融合蛋白的片段。如上文所指出,已经描述了许多候选结合域-免疫球蛋白融合蛋白的反受体/配体结合域,因此本领域技术人员可以容易选择用于引入本发明的瞬时表达构建体的编码产物中的适当多肽结构域。

[0096] 氨基酸的保守取代是本领域公知的,可以在不改变得到的结合域免疫球蛋白融合蛋白分子的生物活性的条件下进行。例如,所述取代一般是通过在极性残基、带电残基。疏水残基、小残基等之间进行的。如果必要,所述取代可以仅仅用体外生物测定法检测得到的修饰蛋白结合适当的细胞表面受体、或结合适当抗原或所需靶分子的能力而进行经验确定。

[0097] 本发明进一步涉及与此处提供的结合域-免疫球蛋白融合蛋白的编码多核苷酸序列杂交的核酸分子,或其互补序列,这对本领域技术人员是容易理解的,条件是在序列之间存在至少70%,优选至少90%,更优选至少95%同一性。本发明特别涉及在严格条件下与此处提到的结合域免疫球蛋白融合蛋白的编码核酸杂交的核酸。此处用到的“严格条件”表示只有当序列之间有至少95%,优选97%同一性时才能杂交的条件。与结合域-免疫球蛋白融合蛋白的编码核酸杂交的核酸在此处的优选实施方案中是指,编码保持与此处引用的参考的cDNA编码的结合域-免疫球蛋白融合多肽基本相同的生物功能或活性的多肽。

[0098] 此处用到的在特定的严格性条件下“杂交”是描述在两个单链核酸分子之间形成的杂交体的稳定性。杂交的严格性一般是以杂交体退火和洗涤的离子强度和温度条件表达的。“高”、“中”和“低”严格性包括以下条件或与其相当的条件:高严格性:0.1xSSPE或SSC,0.1% SDS,65°C;中严格性:0.2xSSPE或SSC,0.1% SDS,50°C;低严格性:1.0xSSPE或SSC,0.1% SDS,50°C。如本领域技术人员所公知,可以通过改变用于预杂交、杂交和洗涤步骤的溶液的时间、温度和/或浓度而达到杂交条件的严格性的改变,适当的条件也部分依

赖于所使用探针,以及印迹的先证者核酸样品的特定核苷酸序列。因此,可以理解,不用过多的实验就可以容易选择适当的严格条件,其中基于与一种或多种先证者序列杂交而不与某些其它先证者序列杂交的能力而鉴定探针的所需选择性。

[0099] 本发明的核酸分子,此处也称作多核苷酸,可以是 RNA 或 DNA 形式,所述 DNA 包括 cDNA,基因组 DNA 和合成 DNA。DNA 可以是双链或单链,如果是单链,则可以是编码链或非编码(反义)链。用于本发明的编码结合域免疫球蛋白融合多肽的编码序列可以与本领域公知的编码任何结合域-免疫球蛋白融合蛋白的序列同一,或者可以是不同的编码序列,其由于遗传密码的冗余或简并而编码相同的结合域-免疫球蛋白融合多肽。

[0100] 编码用于本发明的结合域-免疫球蛋白融合多肽的核酸可以包括,但不限于:只有结合域-免疫球蛋白融合多肽的编码序列;结合域-免疫球蛋白融合多肽的编码序列和额外的编码序列;结合域-免疫球蛋白融合多肽的编码序列(任选额外的变序列)和非编码序列,例如内含子或结合域-免疫球蛋白融合多肽的编码序列的 5' 和 / 或 3' 非编码序列,例如可以进一步包括,但不限于,可以是被调节的或可调节的启动子、增强子、其它转录调节序列、阻遏物结合序列、翻译调节序列或其它调节核酸序列的一种或多种调节性核酸序列。因此,编码结合域-免疫球蛋白融合蛋白的“核酸”或“多核苷酸”包括仅含有结合域-免疫球蛋白融合多肽的编码序列的核酸和含有额外的编码和 / 或非编码序列的核酸。

[0101] 用于此处的核酸和寡核苷酸可以通过本领域公知的任何方法合成(见,例如 WO 93/01286,美国申请系列号 07/723,454;美国专利 5,218,088;美国专利 5,175,269;美国专利 5,109,124)。用于本发明的寡核苷酸和核酸序列的鉴定包括本领域公知的方法。例如,有用的寡核苷酸的所需特性、长度和其它特征是公知的。在某些实施方案中,可以将合成寡核苷酸和核酸序列设计为抗内源性宿主细胞核酸裂解酶的降解,这是通过含有硫代硫酸酯、甲基膦酸酯、砒、硫酸酯、羰基、二硫代硫酸酯、氨基硫酸酯、磷酸酯等键和其它证明可用于反义应用的键而实现的(见,例如 Agrwal et al., Tetrahedron Lett. 28:3539-3542(1987);Miller et al., J Am. Chem. Soc. 93:6657-6665(1971);Stec et al., Tetrahedron Lett. 26:21912194(1985);Moody et al., Nucl. Acids Res. 12:4769-4782(1989);Uznanski et al., Nucl. Acids Res. (1989);Letsinger et al., Tetrahedron 40:137-143(1984);Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 54:367-402(1985);Eckstein, Trends Biol. Scie 14:97-100(1989);Stein In:Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression, Cohen, Ed, Macmillan Press, London, P97-117(1989);Jager et al., Biochemistry 27:7237-7246(1988))。

[0102] 在一种实施方案中,本发明提供了用于结合域-免疫球蛋白融合蛋白的截短成分(如结合域多肽、铰链区多肽、接头等),在另一种实施方案中,本发明提供了编码具有所述截短成分的结合域-免疫球蛋白融合蛋白的核酸。截短的成分可以是任何包含少于分子的全长形式的分子。本发明提供的截短分子可以包括截短的生物聚合物,在优选实施方案中,截短的成分可以是截短的核酸分子或截短的多肽。截短的成分具有已知或已描述过的核酸分子的少于全长的核苷酸序列,所述已知或已描述过的核酸分子可以是天然存在的、合成的或重组的核酸分子,只有本领域技术人员认为它是全长分子。这样,例如,相当于基因序列的截短的核酸分子含有少于全长的基因,其中该基因包含编码和非编码序列、启动子、增强子和其它调节序列、侧翼序列等,以及认为是基因的一部分的其它功能性和非功能性序

列。在另一实施例中,相当于 mRNA 序列的截短的核酸分子含有少于全长的 mRNA 转录物,该 mRNA 转录物可以包含各种翻译和非翻译区以及其它功能性和非功能性序列。

[0103] 在其它优选实施方案中,截短分子是包含少于特定蛋白或多肽成分的全长氨基酸序列的多肽。此处用到的“缺失”具有本领域技术人员所理解的其常用的含义,并可以在任意末端或非末端区相对于相应全长分子缺乏序列的一个或多个部分,例如,此处提供的截短分子。作为线性生物聚合物的截短分子如核酸分子或多肽可以在分子的任意末端具有一个或多个缺失,或者在分子的非末端区具有缺失,其中所述缺失可以是 1-1500 个连续核苷酸或氨基酸残基的缺失,优选 1-500 个连续核苷酸或氨基酸残基的缺失,更优选 1-300 个连续核苷酸或氨基酸残基的缺失。在某些特别优选的实施方案中,截短的核酸分子可以具有 270-330 个连续核苷酸的缺失。在某些其它特别优选的实施方案中,截短的多肽分子可以具有 80-140 个连续氨基酸的缺失。

[0104] 本发明进一步涉及此处提到的编码结合域-免疫球蛋白融合多肽的片段、类似物和/或衍生物的核酸的变体。编码结合域-免疫球蛋白融合多肽的核酸的变体可以是核酸的天然存在的等位变体或天然存在的变体。如本领域所公知,等位变体是可能具有一个或多个核苷酸的取代、缺失或添加中的至少一种的核酸序列,其中任意一种都基本不改变被编码的结合域-免疫球蛋白融合多肽的功能。

[0105] 可以通过编码结合域-免疫球蛋白融合多肽的核苷酸序列的突变而获得结合域-免疫球蛋白融合多肽的变体和衍生物。可以通过任意常规方法完成天然氨基酸序列的改变。可以通过合成含有突变序列的寡核苷酸将突变引入特定位点,其侧翼为能够与天然序列的片段连接的限制位点。连接后,得到的重构序列编码具有所需氨基酸插入、取代或缺失的类似物。

[0106] 或者,可以使用定位于寡核苷酸的位点特异性诱变程序来提供改变的基因,其中预定的密码子可以通过取代、缺失或插入来改变。进行所述改变的示例性的方法公开于 Walder et al. (Gene 42:133,1986); Bauer et al. (Gene 37:73,1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering. Principles and Methods, Plenum Press, 1981); Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985); Kunkel et al. (Methods in Enzymol. 154:367, 1987); 以及美国专利 4,518,584 和 4,737,462。

[0107] 例如,可以通过对编码蛋白的 DNA 进行定点诱变并联合使用 DNA 扩增方法而修饰 DNA,在扩增方法中使用引物在 DNA 模板中引入并扩增改变,例如通过重叠延伸 (SOE) 进行 PCR 剪接。定点诱变一般是采用具有单链和双链形式的噬菌体载体而实现的,所述载体如公知并可以购得的 M13 噬菌体载体。可以使用其它适当的含有单链噬菌体复制起点的载体(见,例如 Veira et al., Meth. Enzymol. 15:3, 1987)。概言之,通过制备编码目的蛋白(如特定结合域-免疫球蛋白融合蛋白的全部或组成部分)的单链载体进行定点诱变。在与单链载体中的 DNA 同源的区域内含有所需突变的寡核苷酸引物与载体退火,然后加入 DNA 聚合酶,例如大肠杆菌 DNA 聚合酶 I(克列诺片段),该聚合酶使用双链区作为引物,以产生异双链体,其中一条链编码改变的序列,另一条为最初的序列。将异双链体引入适当的细菌细胞并选择包含所需突变的克隆。得到的改变的 DNA 分子可以在适当宿主细胞中重组表达以

产生修饰的蛋白。

[0108] 本发明也包括编码各种氨基酸残基或序列的添加或取代,或末端缺失或生物活性所不需要的内部残基或序列缺失的等同的 DNA 构建体。例如,如上文所讨论,编码不需要的或对生物活性不是关键的 Cys 残基的序列可以进行改变,导致 Cys 残基缺失或被其它氨基酸取代,从而防止在复性时形成异常分子内二硫桥。

[0109] 宿主生物包括那些可以重组产生本发明的重组构建体编码的结合域-免疫球蛋白融合产物的生物,例如细菌(如大肠杆菌)、酵母(例如啤酒糖酵母和巴斯德毕赤氏酵母)、昆虫细胞和哺乳动物,包括体内和体外表达。因此宿主生物可以包括用于此处提供的疫苗的构建、繁殖、表达或其它步骤的生物;宿主也包括其中发生免疫应答的受试者,如上文所述。此处优选的宿主生物是大肠杆菌株,近交鼠系和鼠细胞系,以及人细胞、受试者和细胞系。

[0110] 将编码所需结合域-免疫球蛋白融合蛋白的 DNA 构建体引入用于在适当宿主中表达的质粒。在优选实施方案中,宿主是细菌宿主。编码配体或核酸结合域的序列优选进行了密码子优化,用于在特定宿主中表达。因此,例如,如果人结合域-免疫球蛋白融合蛋白在细菌中表达,将对密码子进行优化用于细菌使用。对于小的编码区,可以将基因合成为单个寡核苷酸。对于较大的蛋白,可以使用多个核苷酸的剪接、诱变或其它本领域公知的技术。质粒中的作为调节区的核苷酸序列,例如启动子和操纵子,进行了彼此的操作性结合,用于转录。编码结合域-免疫球蛋白融合蛋白的核苷酸序列也可以包括编码分泌信号的 DNA,由此得到的肽是前体蛋白。得到的加工后的蛋白可以从周质间隙或发酵培养基中回收。

[0111] 在优选实施方案中, DNA 质粒也包含转录终止子序列。此处用到的“转录终止子区”是传递转录终止信号的序列。完整的转录终止子可以从蛋白编码基因获得,该基因可以与插入的结合域-免疫球蛋白融合蛋白编码基因或启动子来源相同或不同。转录终止子任选是此处的表达系统的成分,但在优选实施方案中使用。

[0112] 此处使用的质粒包含与编码目的蛋白或多肽的 DNA 操作性连接的启动子,并且设计用于在上文所述宿主(例如细菌、鼠或人)中表达蛋白,这取决于质粒的所需用途(例如,给予含有结合域-免疫球蛋白融合蛋白编码序列的疫苗)。用于表达此处的蛋白和多肽的适当启动子可以从多种途径获得,并且是本领域公知的。优选连接于调节区的诱导型或组成型启动子。这些启动子包括,但不限于 T7 噬菌体启动子或其它 T7 样噬菌体启动子,例如 T3, T5 和 SP6 启动子, trp, lpp 和 lac 启动子,如大肠杆菌的 lacUV5 启动子;杆状病毒/昆虫细胞表达系统的 P10 或多角体蛋白基因启动子(见,例如美国专利 5, 243, 041, 5, 242, 687, 5, 266, 317, 4, 745, 051 和 5, 169, 784)以及来自于其它真核表达系统的诱导型启动子。对于表达蛋白,将这些启动子插入质粒,与控制区如 lac 操纵子处于操作性连接。

[0113] 优选的启动子区是在大肠杆菌中可诱导并且具有功能的。适当的诱导型启动子和启动子区的例子包括,但不限于,反应于异丙基-D-硫代吡喃半乳糖糖苷(IPTG;见 Nakamura et al., Cell 18:1109-1117, 1979)的大肠杆菌 lac 操纵子;反应于重金属(如锌)诱导的金属硫蛋白启动子金属调节元件(见例如 Evans 等的美国专利 4, 870, 009);反应于 IPTG 的噬菌体 T7lac 启动子(见例如美国专利 4, 952, 496;和 Studier et al., Meth. Enzymol. 185:60-89, 1990)以及 TAC 启动子。

[0114] 质粒可以任选包含在宿主中具有功能的一个或多个可选择标记基因。可选择标记

基因包括任何赋予细菌能够使被转化细菌细胞从大量未转化细胞中鉴定出来并选择性生长的表型的基因。用于细菌宿主的适当可选择标记,例如包括氨苄青霉素抗性基因(Amp^r)、四环素抗性基因(Tc^r)和卡那霉素抗性基因(Kan^r)。在此优选卡那霉素抗性基因。

[0115] 质粒也可以包含编码用于可操作性连接的蛋白的分泌信号的 DNA。使用的分泌信号可以从多种途径获得并且是本领域公知的。此处优选的分泌信号包括,但不限于,由以下大肠杆菌基因编码的信号:ompA, ompT, ompF, ompC, β -内酰胺酶和碱性磷酸酶等(von Heijne, J Mol Biol 184:99-105, 1985)。此外,可以使用细菌 pelB 基因分泌信号(Lei et al., J. Bacteriol. 169:4379, 1987), phoA 分泌细胞和在昆虫细胞中有功能的 cek2。最优的分泌信号是大肠杆菌 ompA 分泌信号。也可以使用本领域公知的其它原核和真核分泌信号(见,例如 vonHeijne, J Mol Biol. 184:99-105, 1985)。采用此处描述的方法,本领域技术人员可以替换在酵母、昆虫或哺乳动物细胞中有功能的分泌信号以从这些细胞分泌蛋白。

[0116] 用于转化大肠杆菌细胞的优选质粒包括 pET 表达载体(如 pET-11a, pET-12a-c, pET-15b;见美国专利 4,952,496;可以从 Novagen, Madison, WI. 获得)。其它优选的质粒包括 pKK 质粒,特别是 pKK223-3,它含有 tac 启动子(Brosius et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6929, 1984;Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology;美国专利 5,122,463,5,173,403,5,187,153,5,204,254,5,212,058,5,212,286,5,215,907,5,220,013,5,223,483 和 5,229,279)。已经通过用卡那霉素基因替代氨苄青霉素抗性基因而修饰质粒 pKK(可以从 Pharmacia;得自 pUC4K,见例如 Vieira et al(Gene 19:259-268, 1982;和美国专利 4,719,179.)。杆状病毒载体,例如 pBlueBac(也称作 pJVETL 及其衍生物),特别是 pBlueBac III(见例如美国专利 5,278,050,5,244,805,5,243,041,5,242,687,5,266,317,4,745,051 和 5,169,784;可以从 Invitrogen, San Diego 得到)也可以用于在昆虫细胞中表达多肽。其它质粒包括 pIN-IIIompA 质粒(见美国专利 4,575,013;也见 Duffaud et al., Meth. Enz. 153:492-507, 1987),例如 pIN-IIIompA2。

[0117] 优选地, DNA 分子在细菌细胞中复制,优选在大肠杆菌中复制。优选的 DNA 分子也包括细菌的复制起点,以保证 DNA 分子在细菌的各代中保留。以此方式,可以通过在细菌中的复制产生大量 DNA 分子。优选的细菌复制起点包括,但不限于 fl-ori 和 col E1 复制起点。优选的宿主细胞含有可操作性连接于诱导型启动子,如 lacUV 启动子的编码 T7 RNA 聚合酶的 DNA(见美国专利 4,952,496)。所述宿主包括,但不限于溶原体大肠杆菌株 HMS174(DE3) pLysS, BL21(DE3) pLysS, HMS174(DE3) 和 BL21(DE3)。菌株 BL21(DE3) 是优选的。pLys 提供了低水平的 T7 溶菌酶,即 T7 RNA 聚合酶的一种天然抑制剂。

[0118] 提供了 DNA 分子也可以含有编码阻遏蛋白的基因。阻遏蛋白能够抑制含有结合于阻遏蛋白的核苷酸序列的启动子的转录。可以通过改变细胞的生理条件而解除启动子的阻遏。例如,该改变可以通过在生长培养基中加入抑制与操纵子或调节蛋白或 DNA 的其它区域相互作用的能力的分子或通过改变生长培养基的温度而完成。优选的阻遏蛋白包括,但不限于反应于 IPTG 诱导的大肠杆菌 lacI 阻遏物,温度敏感性 λ cI857 阻遏物等。

[0119] 概言之,本发明的重组构建体也将含有转录和翻译的必要元件。具体地,这些元件是优选的,其中含有编码结合域-免疫球蛋白融合蛋白的核酸的重组表达构建体将用于在宿主细胞或生物中报道。在本发明的某些实施方案中,可以通过放置启动子调节下的基

因而完成细胞结合域免疫球蛋白-融合蛋白编码基因的细胞类型优选性或细胞类型特异性表达。启动子的选择将取决于待转化细胞类型和所需控制的程度或类型。启动子可以是组成型的或有活性的,并且可以进一步是细胞类型特异性的,组织特异性的、各个细胞特异性的、事件特异性的、时间特异性的或诱导型的。细胞类型特异性启动子和事件类型特异性的启动子是优选的。组成型或非特异性启动子的例子包括 SV40 早期启动子(美国专利 5,118,627)、SV40 晚期启动子(美国专利 5,118,627)、CMV 早期基因启动子(美国专利 5,168,062),以及腺病毒启动子。除病毒启动子外,细胞启动子也用于本发明的内容。具体地,可以使用用于所谓的管家基因的细胞启动子。病毒启动子是优选的,因为它们一般是比细胞启动子更强的启动子。已经在许多真核生物,包括高等真核生物中鉴定了启动子区,这样本领域技术人员可以容易选择用于特定宿主的适当启动子。

[0120] 也可以使用诱导型启动子。这些启动子包括由地塞米松诱导的 MMTV LTR(PCT WO 91/13160)、由重金属诱导的金属硫蛋白启动子;和由 cAMP 诱导的具有 cAMP 反应元件的启动子。通过使用诱导型启动子,编码结合域-免疫球蛋白融合蛋白的核酸序列可以由本发明的表达构建体递送至细胞,并且保持静止,直到加入诱导剂。这允许了对基因产物的产生时间的进一步控制。

[0121] 事件类型特异性启动子仅仅在发生某种事件,如致肿瘤性或病毒感染时才有活性或被上调。HIV LTR 是事件类型特异性启动子的公知例子。该启动子是无活性的,除非存在 tat 基因产物,这是在病毒感染时发生的。一些事件类型特异性启动子也是组织特异性的。

[0122] 此外,可以使用由特定细胞基因协同调节的启动子。例如,当需要特定结合域融合蛋白编码基因的表达与一个或多个额外内源性或外源性引入的基因协同时,可以使用协同表达的基因的启动子。当已知与在免疫系统的特定组织中引入免疫应答相关的基因表达模式时,这种类型的启动子特别有用,这样该组织内的特异性免疫感受态细胞可以被激活或募集参与免疫应答。

[0123] 除了启动子外,可以插入阻遏序列、负调节子、或组织特异性沉默子,以减少某些情况下结合域-免疫球蛋白融合蛋白编码基因的非特异性表达,所述情况例如,作为治疗策略的一部分而瞬时无免疫应答的宿主。可以在启动子区插入多种阻遏元件。转录的阻遏是不依赖于阻遏元件的方向或与启动子的距离的。一种类型的阻遏序列是绝缘序列。这种序列抑制转录(Dunaway et al., Mol Cell Biol 17:182-9,1997;Gdula et al., Proc Natl Acad Sci USA 93:9378-83,1996, Chan et al., JVirol 70:5312-28,1996;Scott and Geyer,EMBO J 14:6258-67,1995;Kalos and Fournier,Mol Cell Biol 15:198-207,1995;Chung et al., Cell 74:505-14,1993) 并将沉默本底转录。

[0124] 也在 II 型(软骨)胶原、碱性酰基转移酶、白蛋白(Hu et al., J. Cell Growth Differ. 3(9):577-588,1992)、磷酸甘油激酶(PGK-2)(Misuno et al., Gene 119(2):293-297,1992)的启动子区和 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶基因中鉴定了阻遏元件(Lemaigre et al., Mol. Cell Biol. 11(2):1099-1106)。此外,在许多肝脏特异性基因中鉴定了阴性负调节元件 Tse-1,发现其阻断 cAMP 反应元件-(CRE)介导的肝细胞中基因激活的诱导(Boshart et al., Cell 61(5):905-916,1990)。

[0125] 在优选实施方案中,将增加所需产物的表达的元件掺入构建体中。所述元件包括内部核糖体结合位点(IRES;Wang and Siddiqui, Curr. Top. Microbiol. Immunol 203:99,

1995 ;Ehrenfeld and Semler, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 203 :65, 1995 ;Rees et al. , *Biotechniques* 20 :102, 1996 ;Sugimoto et al. , *Biotechnology* 12 :694, 1994)。IRES 增加翻译效率。同样,其它序列也增加表达。对于一些基因,特别是在 5' 端的序列抑制转录和 / 或翻译。这些序列通常是可以形成发夹结构的回文序列。一般去除待递送核酸中的这种序列。对转录或翻译产物的表达水平进行了测定,以证实或确定哪些序列影响表达。可以用任何公知的方法测定转录水平,包括 RNA 印迹杂交, RNA 酶探针保护等。可以通过任意公知的方法测定蛋白水平,包括 ELISA, 蛋白印迹, 免疫细胞化学或其它公知方法。

[0126] 可以将其它元件掺入本发明的结合域免疫球蛋白融合蛋白中。在优选实施方案中,该构建体包含转录终止子序列,包括聚腺苷酸化位点,剪接供体和受体位点,以及增强子。也可以掺入其它用于表达构建体和将其维持在哺乳动物细胞或其它真核细胞中的元件(如复制起点)。由于这些构建体可以方便地在细菌细胞中产生,掺入了对于在细菌中增殖是必要的,或者增强在细菌中增殖的元件。所示元件包括复制起点、可选择标记等。

[0127] 此处通过同时递送两种或更多的不同调节的核酸构建体而使用本发明的构建体将对结合域-免疫球蛋白融合蛋白编码核酸的表达的附加控制递送给细胞。使用这样的多核酸构建体方法可以允许免疫应答的协同调节,例如,依赖于细胞类型和 / 或另一所表达的被编码成分的空间时间协同。本领域技术人员可以理解,通过选择适当的调节序列可以用相似的方式完成多个水平的被调节基因表达,所述调节序列包括但不限于启动子、增强子和其它公知的基因调节元件。

[0128] 本发明也涉及载体,以及通过包含本发明的核酸的公知载体制备的构建体,特别涉及包含结合域-免疫球蛋白融合蛋白的任何编码核酸的“重组表达构建体”和上文提供的本发明的多肽;涉及通过用本发明的载体和 / 或构建体而基因工程化的宿主细胞,以及通过重组技术施用包含本发明的所述结合域-免疫球蛋白融合多肽和融合蛋白,或其片段或变体的编码核酸的方法。结合域-免疫球蛋白融合蛋白基本可以在适当启动子的控制下在任何宿主细胞中表达,这取决于构建体的性质(如上文所述启动子的类型),以及所需宿主细胞的性质(如是有丝分裂后最终分化或活跃分裂;如表达构建体在宿主细胞中是作为附加体存在还是整合到宿主基因组中)。用于原核和真核宿主的适当克隆和表达载体描述于 Sambrook, et al. , *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, (1989), 如上文所指出,在本发明的特别优选的实施方案中,在用本发明的重组表达构建体转染或转化的哺乳动物细胞中进行重组表达。

[0129] 一般地,用质粒载体递送构建体。优选的构建体是改进的 pNASS 载体 (Clontech, Palo Alto, CA), 其具有编码氨苄青霉素抗性基因的核酸、聚腺苷酸化信号和 T7 启动子位点。其它适当的哺乳动物表达载体是公知的(见,例如, Ausubel et al. , 1995 ; Sambrook et al. , supra ; 也见,例如 catalogues from Invitrogen, San Diego, CA ; Novagen, Madison, WI ; Pharmacia, Piscataway, NJ, 及其它)。目前可以制备的优选构建体包含适当调控下的二氢喋呤还原酶 (DHFR) 编码序列,用于增加结合域-免疫球蛋白融合蛋白的产生水平,该水平是通过在施用适当选择试剂(如 methotrexate) 后进行基因扩增而达到的。

[0130] 一般地,重组表达载体包括允许宿主细胞转化的复制起点和可选择标记,以及来自于高表达的基因、用于指导下游结构序列转录的上文所述的启动子。异源结构序列与翻译起始和终止序列组装在适当噬菌体中。因此,例如,此处提供的结合域-免疫球蛋白融

合蛋白编码核酸可以包含在各种表达载体中,所述载体构建为重组表达构建体,用于在宿主细胞中表达结合域-免疫球蛋白融合多肽。在某些优选实施方案中,构建体包含在体内给药的制剂中。所述载体和构建体包括染色体的、非染色体的和合成 DNA 序列,如,SV40 衍生物;细菌质粒;噬菌体 DNA;酵母质粒,来源于质粒和噬菌体 DNA 的联合的载体、病毒 DNA 如牛痘病毒、腺病毒、禽痘病毒,以及假狂犬病病毒或复制缺陷逆转录病毒的 DNA,如下文所述。然而,任何其它载体可以用于制备重组表达构建体,在优选实施方案中,所述载体是可复制的,并且可在宿主中存活。

[0131] 可以通过各种程序将适当的 DNA 序列插入载体中。概言之,通过本领域公知的程序将 DNA 序列插入适当的限制性内切酶位点。用于克隆、DNA 分离、扩增和纯化的标准技术,用于酶促反应的标准技术,包括 DNA 连接酶,DNA 聚合酶、限制性内切酶等,以及各种分离技术是本领域技术人员公知和通常使用的。许多标准技术描述于,例如 Ausubel et al. (1993 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA); Sambrook et al. (1989 *Molecular Cloning*, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis et al. (1982 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Glover (Ed.) (1985 *DNA Cloning Vol. I and II*, IRL Press, Oxford, UK); Hames and Higgins (Eds.), (1985 *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, UK); 及其它。

[0132] 表达载体中的 DNA 序列与至少一种适当的表达控制序列(如组成型启动子或受调节的启动子)操作性连接,以指导 mRNA 合成。这种表达控制序列的代表性例子包括真核细胞启动子或上述真核细胞病毒。可以使用 CAT(氯霉素转移酶)载体或其它具有可选择标记的载体从任何需要的基因选择启动子区。真核启动子包括 CMV 立即早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子、逆转录病毒 LTR 启动子和小鼠金属硫蛋白-I 启动子。适当启动子的选择处于本领域普通技术人员的水平之内,此处描述了某些特别优选的重组表达构建体的制备,其中包含与编码结合域-免疫球蛋白融合多肽的核酸可操作性连接的至少一种启动子或受调节启动子。

[0133] 由高等真核动物进行的编码本发明的多肽的转录可以通过将增强子序列插入载体而增强。增强子是 DNA 的顺式作用元件,通常约 10-300bp,作用于启动子以增加其转录。增强子的例子包括位于复制起点晚期侧 100-270bp 的 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点晚期侧的多瘤病毒增强子和腺病毒增强子。

[0134] 此处某些实施方案中提供的载体可以是病毒载体如逆转录病毒载体 (Miller et al., 1989 *BioTechniques* 7:980; Coffin and Varmus, 1996 *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.)。例如,可以得到逆转录病毒质粒载体的逆转录病毒包括,但不限于莫洛尼鼠类白血病病毒、脾坏死病毒、逆转录病毒如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽白血病病毒、长臂猿白血病病毒、人免疫缺陷病毒、腺病毒、骨髓增殖性肉瘤病毒和乳腺肿瘤病毒。

[0135] 逆转录病毒是一种通过 DNA 中间体能复制并整合到宿主细胞基因组中的 RNA 病毒。该 DNA 中间体,或前病毒,可以稳定整合到宿主细胞 DNA。根据本发明的某些实施方案,疫苗可以包含掺入了编码外源蛋白的外源基因而替代正常逆转录病毒 RNA 的逆转录病毒。当逆转录病毒伴随感染进入宿主细胞时,外源基因也引入细胞中,然后可以作为逆转录病

毒基因组的一部分而整合到宿主细胞 DNA 中。该外源基因的在宿主中的表达导致外源蛋白的表达。

[0136] 开发用于基因治疗的大多数逆转录病毒系统都是基于鼠逆转录病毒。所述逆转录病毒以两种形式存在,即作为称作毒粒的游离病毒颗粒,或作为整合到宿主细胞 DNA 中的前病毒。毒粒形式的病毒含有逆转录病毒的结构蛋白和酶蛋白(包括逆转录酶)、病毒基因组的两个 RNA 拷贝、以及含有病毒被膜糖蛋白的来源细胞质膜的部分。逆转录病毒基因组组织为四个主要区域:含有转录起始和终止所必须的顺式作用元件并且位于编码基因的 5' 和 3' 的长末端重复(LTR),以及三个编码基因 gag, pol 和 env。这三个基因 gag, pol 和 env 分别编码内部病毒结构、酶蛋白(如整合酶)以及赋予病毒感染性和宿主范围特异性的被膜糖蛋白(称为 gp70 和 p15e),以及未确定功能的“R”肽。

[0137] 已经开发了单独的包装细胞系和载体产生细胞系,这是出于逆转录病毒使用的安全性考虑,包括它们在本发明的疫苗中使用的安全性。简言之,该方法使用了两种成分,逆转录病毒载体和包装细胞系(PCL)。逆转录病毒载体含有长末端重复(LTRs)、待转移的外源 DNA 和包装序列(y)。该逆转录载体自身不会复制,因为编码结构蛋白和被膜蛋白的基因没有包含在载体基因组中。PCL 含有编码 gag, pol 和 env 蛋白的基因,但不含包装信号“y”。这样,PCL 自身只能形成空的毒粒。在此普通方法中,将逆转录病毒载体引入 PCL 中,从而建立载体产生细胞系(VCL)。该 VCL 制造仅含有逆转录病毒(外源)基因组的毒粒,因此被认为是用于质粒用途的安全的逆转录病毒载体。

[0138] “逆转录病毒载体”是指在本发明优选实施方案中能够指导目的序列或基因,如结合域-免疫球蛋白融合蛋白编码核酸序列的表达的组装体。简言之,逆转录病毒构建体可以包含 5' LTR、tRNA 结合位点、包装信号、第二条链 DNA 合成的起点和 3' LTR。可以将多种异源序列包含在载体构建体中,例如,编码蛋白(如细胞毒性蛋白、疾病相关抗原、免疫辅助分子或替代基因)的序列,或自身作为分子的序列(如作为核酶或反义序列)。

[0139] 可以容易从多种逆转录病毒构建本发明的逆转录病毒构建体,包括例如 B、C 和 D 型逆转录病毒以及泡沫病毒和慢病毒(见,例如 RNATumor Viruses, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985)。所述逆转录病毒可以容易从存放处或保藏中心获得,例如从美国典型培养物保藏中心(“ATCC”; Rockville, Maryland),或者使用常用技术从公知来源分离。根据此处提供的公开内容和标准重组技术,可以使用上述任意逆转录病毒以组装或构建本发明的逆转录病毒载体构建体、包装细胞或生产细胞(如 Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Kunkle, PNAS 82:488, 1985)。

[0140] 用于病毒载体中的适当启动子可以包括,但不限于描述于 Miller, et al., Biotechniques 7:980-990(1989)中的逆转录病毒 LTR; SV40 启动子和人巨细胞病毒(CMV)启动子,和任意其它启动子(如细胞启动子,如真核细胞启动子,包括但不限于组蛋白、pol III 和 β 肌动蛋白启动子)。其它可以使用的病毒启动子包括,但不限于腺病毒启动子、胸苷激酶(TK)启动子和 B19 细小病毒启动子。根据此处包含的教导和上文描述的受调节启动子或启动子,本领域技术人员可以明白适当启动子的选择。

[0141] 如此处所描述,使用逆转录病毒质粒载体转导包装细胞系以形成生产细胞系。可以转染的包装细胞系包括,但不限于 Miller, Human Gene Therapy, 1:5-14(1990)中描述

的 PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+E-86, GP+envAml2 和 DAN 细胞系。载体可以通过本领域的任何方法转导包装细胞系。这些方法包括,但不限于,电穿孔,脂质体的使用和 CaPO_4 沉淀。在另一选择中,逆转录病毒质粒载体可以包被在脂质体中,或偶联于脂,然后给予宿主。

[0142] 生产细胞系产生包含编码结合域-免疫球蛋白融合多肽或融合蛋白的核酸序列的感染性逆转录病毒载体颗粒。然后用这些逆转录病毒载体颗粒体外或体内转导真核细胞。被转导的真核细胞将表达编码结合域-免疫球蛋白融合多肽或融合蛋白的核酸序列。可以转导的真核细胞包括,但不限于,胚胎干细胞,以及造血干细胞、肝细胞、成纤维细胞、循环外周血单核细胞和多形核细胞,包括骨髓单核细胞、淋巴细胞、成肌细胞、组织巨噬细胞、树突细胞、肝巨噬细胞、淋巴结和脾的淋巴和网状内皮细胞、内皮细胞和支气管上皮细胞。

[0143] 作为本发明的用病毒载体制备重组结合域-免疫球蛋白融合表达构建体的实施方案的另一个例子,在一个优选实施方案中,用指导结合域免疫球蛋白融合多肽或融合蛋白表达的重组病毒构建体转导的宿主细胞可以产生病毒颗粒,该病毒颗粒含有被表达的来源于病毒出芽时由病毒颗粒掺入的宿主细胞膜的部分的结合域-免疫球蛋白融合蛋白融合多肽或融合蛋白。

[0144] 另一方面,本发明涉及含有上述重组结合域-免疫球蛋白融合表达构建体的宿主细胞。用本发明的载体和/或表达构建体基因工程化(转导、转化或转染)的宿主细胞可以是,例如,克隆载体、穿梭载体或表达构建体。该载体或构建体可以是,例如,质粒、病毒颗粒、噬菌体等形式。工程化的宿主细胞可以在经改进的常规营养培养基中培养,该培养基适于激活启动子、选择转化体或扩增特定基因如编码结合域-免疫球蛋白融合多肽或结合域-免疫球蛋白融合蛋白的基因。选择用于表达的特定宿主细胞的培养条件,如温度、pH 等对于本领域技术人员是容易理解的。

[0145] 宿主细胞可以是高等真核细胞,如哺乳动物细胞,或低等真核细胞,如酵母细胞,或宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞。适当宿主细胞的代表性例子包括,但不需要限于细菌细胞,如大肠杆菌、链霉菌、鼠伤寒沙门氏菌细胞;真菌细胞,如酵母;昆虫细胞,如果蝇 S2 和夜蛾 Sf9;动物细胞,如 CHO, COS 或 293 细胞;腺病毒;植物细胞,或适于体外繁殖或从头建立的适当细胞。本领域技术人员根据此处的教导应该能够选择适当宿主细胞。

[0146] 也可以使用多种哺乳动物细胞培养系统来表达重组蛋白。哺乳动物表达系统的例子包括由 Gluzman, Cell 23:175(1981) 描述的猴肾成纤维细胞的 COS-7 系,以及其它能够表达相容载体的细胞系,如 C127, 3T3, CHO, HeLa 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体将包含复制起点、适当的启动子和增强子,以及必要的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点、转录终止序列、和 5' 侧翼非转录序列,例如此处所提供的关于结合域-免疫球蛋白融合表达构建体的制备。来源于 SV40 剪接的 DNA 序列,以及聚腺苷酸化位点可以用于提供需要的非转录遗传元件。将构建体引入宿主细胞可以通过本领域技术人员熟悉的各种方法而实现,包括但不限于,例如,磷酸钙转染、DEAE-右旋糖苷介导的转染或电穿孔(Davis et al., 1986 Basic Methods in Molecular Biology)。

[0147] 可以将本发明的结合域-免疫球蛋白融合蛋白制剂化为药物组合物,用于根据常规方法给药。药物组合物一般包含一种或多种重组表达构建体,和/或所述构建体的表达

产物,并组合了可药用载体、赋形剂或稀释剂。所述载体在使用的剂量和浓度下对接受者是无毒的。对于基于核酸的制剂,或包含本发明的重组构建体的表达产物的制剂,将给予约 $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ –约 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重,一般通过真皮内、皮下、肌内或静脉途径或其它途径。优选的剂量为约 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ –约 $1\text{mg}/\text{kg}$,约 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ –约 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 是特别优选的。本领域技术人员将明白,给药的次数和频率将取决于宿主的反应。用于治疗用途的“可药用载体”是制药领域公知的,描述于,例如 Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)。例如,可以使用生理 pH 的无菌盐水和磷酸缓冲盐水。可以通过药物组合物形式提供防腐剂、稳定剂、染料和调味剂。例如,可以添加苯甲酸钠、山梨酸和 β -羟基苯甲酸的酯作为防腐剂。Id. 1449。此外,可以使用抗氧化剂和悬浮剂。Id.

[0148] “可药用盐”是指本发明的化合物的盐,它来自于所述化合物和有机或无机酸(酸加成盐)或有机或无机碱(碱加成盐)的组合。本发明的化合物可以以游离碱或盐形式使用,两种形式都考虑处于本发明的范围内。

[0149] 含有一种或多种结合域-免疫球蛋白融合蛋白编码构建体(或它们的表达产物)的药物组合物可以是允许将该组合物给予患者的任何形式。例如,该组合物可以是固体、液体或气体(气溶胶)。典型的给药途径包括,但不限于口服、局部、肠胃外(如舌下或颊)、舌下、直肠、阴道和鼻内给药。此处使用的术语肠胃外包括皮下注射、静脉内、肌内、胸骨内、鞘内、腔道内、尿道内注射和输注技术。对药物组合物进行制剂化,从而允许其中含有的活性成分在将组合物给予患者时是生物可利用的。将给予患者的组合物是一种或多种剂量单位的形式,例如,片剂可以是单剂量单位,本发明的气溶胶形式的一种或多种化合物的容器可以具有多个剂量单位。

[0150] 对于口服给药,可以存在赋形剂和/或粘合剂。其例子包括蔗糖、高岭土、甘油、淀粉糊精、藻酸钠、羧甲基纤维素和乙基纤维素。可以存在着色剂和/或调味剂。可以使用包衣。

[0151] 组合物可以是液体,如酏剂、糖浆、溶液、乳状液或悬浮液形式。该液体可以用于作为两个例子的口服给药或通过注射递送。当用于口服给药时,除一种或多种结合域-免疫球蛋白融合构建体或表达产物外,优选的组合物还含有一种或多种增甜剂、防腐剂、染料/着色剂和调味剂。在用于注射给药的组合物中,可以含有一种或多种表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂。

[0152] 不论是溶液、悬浮液或其它形式,此处用到的液体药物组合物可以包含一种或多种一些佐剂:无菌稀释剂如用于注射的水、盐溶液,优选生理盐水、林格氏液、等渗氯化钠,固定的油,如可以作为溶剂或悬浮介质的合成甘油单酯或甘油二酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂;抗菌剂如苯甲醇或甲基对羟基苯甲酸酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节渗透压的试剂如氯化钠或右旋糖。肠胃外制剂可以包含于玻璃或塑料制备的安瓿、一次性注射器或多剂量管形瓶中。生理盐水是优选的佐剂。可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0153] 制剂中也可能需要包含其它成分,如递送载体,包括但不限于铝盐、油包水乳状液、生物可降解油载体、水包油乳状液、生物可降解微胶囊和脂质体。用于所述载体中的免疫刺激物质(佐剂)包括 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(MDP)、脂多糖(LPS)、葡聚糖、IL-12、GM-CSF、 γ 干扰素和 IL-15。

[0154] 尽管在本发明的药物组合物中可以使用任何适当的本领域技术人员公知的载体，载体的类型将根据给药方式和是否需要持续释放而不同。对于肠胃外给药，如皮下注射，载体优选包括水、盐水、醇、脂肪、蜡或缓冲液。对于口服给药，可以使用任何上述载体或固体载体如甘露醇、乳糖、淀粉硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、蔗糖和碳酸镁。也可以将生物可降解微球体（如 polylactic galactide）也可以用作本发明的药物组合物的载体。适当的生物可降解微球体公开于，例如美国专利 4,897,268 和 5,075,109。在这一点上，微球体优选大于约 25 微米。

[0155] 药物组合物也可以包含稀释剂如缓冲液、抗氧化剂如抗坏血酸、低分子量（小于约 10 个残基）多肽、蛋白、氨基酸、糖，包括葡萄糖、蔗糖或糊精、螯合剂如 EDTA、谷胱甘肽及其它稳定剂和赋形剂。中性缓冲盐水或与非特异性血清白蛋白混合的盐水是极为适合的稀释剂。优选地，用作为稀释剂的适当赋性溶液（如蔗糖）将该产物制剂化为冻干物。

[0156] 如上文所述，本发明包括能够递送编码结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白的核酸分子的组合物。所述组合物包括重组病毒载体（如逆转录病毒（见 WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698 和 WO 94/03622），腺病毒（见 Berkner, *Biotechniques* 6: 616-627, 1988; Liet al., *Hum. Gene Ther.* 4:403-409, 1993; Vincent et al., *Nat. Genet.* 5:130-134, 1993; 和 Kolls et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219, 1994），以及痘病毒（见美国专利 4,769,330; 美国专利 5,017,487 和 WO 89/01973)), 复合于聚阳离子分子的重组表达构建体核酸分子（见 WO 93/03709），和脂质体相关的核酸（见 Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851, 1987）。在某些实施方案中，DNA 可以连接于杀死的或灭活的腺病毒（见 Curiel et al., *Hum. Gene Ther.* 3:147-154, 1992; Cotton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6094, 1992）。其它适当的组合物包括 DNA-配体（见 Wu et al., *J. Biol. Chem.* 264:16985-16987, 1989）和脂质-DNA 组合（见 Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1989）。

[0157] 除了定位于体内程序，也可以使用体外程序，其中从宿主取出细胞，进行修饰，然后置于相同或另一宿主动物。明显的是，可以使用上述任意一种组合物，将结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白或结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白编码核酸分子引入体外的组织细胞。病毒、物理和化学摄取方法的程序是本领域公知的。

[0158] 因此，本发明用于治疗 B 细胞疾病或恶性状况的患者，或用于治疗来源于所述患者的细胞培养物。此处用到的“患者”是指任何温血动物，优选人。患者可以患有癌症，如 B 细胞淋巴瘤或可以是正常的（即没有可检测的疾病和感染）。“细胞培养物”是任何可以进行离体处理的制备物，例如，含有免疫系统的免疫感受态细胞或分离细胞（包括但不限于 T 细胞、巨噬细胞、单核细胞、B 细胞和树突细胞）的制备物。所述细胞可以通过本领域公知的多种技术进行分离（如 Ficoll-hypaque 密度离心）。细胞可以（但不是必须）从 B 细胞疾病或恶性状况的患者中分离，并且可以在治疗后重新引入患者。

[0159] 用于肠胃外或口服给药的液体组合物可以含有一定量的结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白编码构建体或表达产物，从而获得适当的剂量。一般地，该量为组合物中含有至少 0.01wt% 结合域 - 免疫球蛋白融合构建体或表达产物。当用于口服给药时，该量可以是组合物的 0.1-70wt%。优选口服组合物含有约 4-50wt% 的结合域 - 免疫球蛋白融合构建体或表达产物。优选组合物和制剂制备物一个肠胃外剂量单位含有 0.01-1wt% 活性化合物。

[0160] 药物组合物可以用于局部给药,在此情况下载体可以适当包括溶液、乳状液、油膏或凝胶基质。该基质,例如可以包含一种或多种一些成分:矿脂、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、稀释剂如水和醇,以及乳化剂和稳定剂。用于局部给药的药物组合物中可以存在增稠剂。如果用于经皮给药,该组合物可以包含经皮贴剂或离子电渗设备。局部制剂可以含有浓度为约 0.1-10% w/v(每单位体积的重量)的结合域-免疫球蛋白融合构建体或表达产物。

[0161] 组合物可以用于在在直肠中溶解并释放药物的栓剂形式进行直肠给药。用于直肠给药的组合物可以含有油性基质,如适当的非刺激性赋形剂。所述基质包括,但不限于羊毛脂、可可油和聚乙二醇。

[0162] 在本发明的方法中,可以通过插入物、珠、时间控制释放制剂、贴剂或快速释放制剂的形式给予结合域-免疫球蛋白融合蛋白编码构建体或表达产物。

[0163] 以下实施例是作为举例而不是限制性的。

[0164] 实施例

[0165] 实施例 1

[0166] 2H7 可变区的克隆和 2H7SCFV-IG 的测序

[0167] 该实施例说明了编码单克隆抗体 2H7 的重链和轻链可变区的 cDNA 分子的克隆。该实施例也证明了 2H7scFv-Ig 的构建、测序和表达。

[0168] 特异性结合于 CD20 的表达 2H7 单克隆抗体的杂交瘤细胞是由华盛顿州西雅图的华盛顿大学的 Ed Clark 提供的。在收获之前,将杂交瘤细胞在补加了谷氨酰胺、丙酮酸、DMEM 非必须氨基酸和青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培养基 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 中维持于对数生长期。通过离心从培养基重沉淀细胞,用 2×10^7 个细胞制备 RNA。使用 Pharmingen (San Diego, CA) 总 RNA 分离试剂盒 (目录号 45520K) 根据试剂盒所附制造商的说明从产生 2H7 的杂交瘤细胞分离 RNA。用 1 微克 (μ g) 总 RNA 作为模板通过逆转录制备 cDNA。结合 RNA 和 300ng 随机引物并且在加入酶之前在 72°C 下变性 10 分钟。在 5X 第二条链缓冲液存在下以总体积 $25 \mu\text{l}$ 向 RNA 加引物混合物中加入 Superscript II 逆转录酶,并且随酶提供 0.1M DTT。在 42°C 下使逆转录反应进行 1 小时。

[0169] 用随机引发的逆转录酶反应产生的 2H7 DNA 和 V 区特异性引物通过 PCR 扩增 2H7 抗体轻链和重链的可变区。以公开序列 (V_L 的 Genbank 编号 M17954, V_H 为 M17953) 为指导,设计 V 区特异性引物。两个可变链设计为具有相容末端序列,使得可以通过在扩增和限制酶消化后连接两个 V 区而组装 scFv。

[0170] 通过向 2H7 的 V_L 的反义引物加入额外的核苷酸而掺入将在两个 V 区之间插入的 (gly4ser)₃ 肽接头。也在两个 V 区的接合处引入 Sac I 限制位点。用于扩增包含限制位点 HindIII 的 2H7 V_L 和轻链前导肽的有义引物为 5' -gtc aag ctt gcc gcc atg gat ttt caa gtc cag att ttt cag c-3' (SEQ ID NO:23)。反义引物为 5' -gtc gtc gag ctc cca cct cct cca gat ccacca ccg ccc gag cca ccg cca cct ttc agc tcc agc ttg gtc cc-3' (SEQ ID NO:24)。V 区的阅读框架表示为粗体,加下划线的密码子。Hind II 和 SacI 位点表示为加下划线的斜体序列。

[0171] 对 V_H 结构域进行扩增,而没有前导肽,但包含用于融合于 V_L 的 5' SacI 限制位点和用于融合于各种尾,包括人 IgG1 Fc 结构域和截短形式的 CD40 配体 CD154 的位于 3'

末端的 BclI 限制位点。有义引物为 5' -gct gct gag ctctca ggc tta tct aca gca agt ctg g-3' (SEQ ID NO:25)。SacI 位点表示为斜体和加下划线的字体。V_H 结构域的第一个氨基酸的密码子的阅读框架表示为粗体和加下划线的字体。反义引物为 5' -gtt gtc tga tca gag acg gtg acc gtg gtc cc-3' (SEQ ID NO:26)。BclI 位点表示为斜体和加下划线的字体。V_H 结构域序列的最后一个丝氨酸表示为粗体和加下划线的字体。

[0172] 通过将 2H7 scFv HindIII-BclI 片段插入含人 IgG1 铰链区、CH2 和 CH3 区、用限制性酶 HindIII 和 BclI 消化的 pUC19 中而组装 scFv-Ig。连接后,将连接产物转化到 DH5 α 细菌中。用位于作为诊断位点的 2H7 的 VL-VH 结合处的 SacI 位点筛选阳性克隆的适当插入的片段。使 2H7scFv-Ig cDNA 在热循环仪上进行循环测序,采用 25 个循环的程序,在 96°C 变性 10 秒,在 50°C 退火 30 秒,在 72°C 延伸 4 分钟。测序引物是 pUC 正向和反向引物和退火于 IgG 恒定区部分中的人 CH2 结构域的内部引物。用 Big Dye Terminator Ready 测序混合物 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), 根据制造商的说明进行测序反应。随后用 Centrisep 柱 (目录号 CS-901, Princeton Separations, Adelphia, N. J.) 纯化样品,并且在 Savant 真空干燥器中干燥,在模板抑制试剂 (PE-ABI) 中变性,并且在 ABI 310 基因分析仪 (PE-Applied Biosystems) 上分析。用 Vector Nti 6.0 版 (Informax, North Bethesda, MD) 编辑、翻译和分析序列。图 1 表示 2H7scFv-Ig 构建体的 cDNA 和推测氨基酸序列。

[0173] 实施例 2

[0174] 2H7 SCFV-IG 在稳定 CHO 细胞系中的表达

[0175] 该实施例说明在真核细胞中表达 2H7scFv-Ig, 以及通过 SDS-PAGE 和功能测定, 包括 ADCC 和补体固定鉴定被表达的 2H7scFv-Ig。

[0176] 将具有正确序列的 2H7scFv-Ig HindIII-XbaI (约 1.6kb) 插入哺乳动物表达载体 pD18, 用 QIAGEN 治疗制备试剂盒 (QIAGEN, Valencia, CA) 扩增阳性克隆的 DNA。然后在非必要区通过用 AscI 消化将重组质粒 DNA (100 μ g) 线性化, 通过酚提取而纯化, 在组织培养基 Excell302 (目录号 14312-79P, JRH Biosciences, Lenexa, KS) 中重悬。使用于转染的细胞 CHO DG44 细胞处于对数生长, 每个转染反应收获 10^7 个细胞。将线性化的 DNA 以 0.8ml 的总体积加入 CHO 用于电穿孔。

[0177] 通过可选择、可扩增质粒 pD18 的电穿孔至中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中完成 2H7 scFv-Ig 融合蛋白 (SEQ. ID NO:15) 的稳定产生, 该质粒含有 CMV 启动子控制下的 2H7 scFv-Ig cDNA。将 2H7 表达盒作为约 1.6kb 的 HindIII-XbaI 片段亚克隆至 CMV 启动子下游载体多克隆位点中。pD18 载体是编码 DHFR 可选择标记的 pcDNA3 的修饰形式, 用减弱的启动子增加质粒的选择压力。用 Qiagen maxiprep 试剂盒制备质粒 DNA, 然后在酚提取和乙醇沉淀之间在独特的 AscI 位点线性化纯化的质粒。将鲑鱼精子 DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 作为载体 DNA 加入, 用 100 μ g 每种质粒和载体 DNA 通过电穿孔转染 10^7 个 CHO DG44 细胞。在含有谷氨酰胺 (4mM)、丙酮酸、重组胰岛素、青霉素-链霉素和 2X DMEM 非必须氨基酸 (均来自于 Technologies, Gaithersburg, Maryland) 的 Excell 302 培养基 (JRHBiosciences, 此后称作“Excell 302 完全”培养基) 中使细胞生长至对数期。用于被转染细胞的培养基也含有 HT (从次黄嘌呤和胸苷的 100X 溶液稀释) (Life Technologies)。用于在选择下转染的培养基含有各种水平的作为选择试剂的氨甲喋呤 (Sigma-Aldrich), 浓度为 50nM-5 μ M。在 275 伏特, 950 μ F 下进行电穿孔。允许转染细胞在非选择性培养基

中回收过夜,然后在 96 孔平底板 (Costar) 中,以 125 细胞 / 孔 -2000 细胞 / 孔的各种系列稀释进行选择铺板。用于细胞克隆的培养基是 Excell 302 完全培养基,含有 100nM 氨甲喋呤。一旦克隆生长足够,筛选孔中的培养上清液的系列稀释液中与 CD20-CHO 转染细胞的结合。将具有最高融合蛋白产量的克隆扩增至 T25 烧瓶,然后扩增至 T75 烧瓶中,以提供足够数量的细胞,用于冷冻和 2H7scFv-Ig 的扩大产生。通过在含氨甲喋呤的培养基中逐步扩增而在三个克隆的培养物中进一步增加产生水平。在细胞的每个连续传代中,Excell 302 完全培养基含有增加浓度的氨甲喋呤,这样只有扩增了 DHFR 质粒的细胞可以存活。

[0178] 从表达 2H7scFv-Ig 的 CHO 细胞收集上清液,通过 0.2 μ m PES 加压滤膜 (Nalgene, Rochester, NY) 进行过滤,然后通过蛋白 A-琼脂糖 (IPA 300 交联琼脂糖) 柱 (Repligen, Needham, MA)。用 PBS 洗涤柱,然后用 pH 3.0 的 0.1M 柠檬酸缓冲液洗脱结合蛋白。收集级分并且用 1M Tris, pH 8.0 中和洗脱的蛋白,然后在 PBS 中透析过夜。通过 280nm 处的吸光度测定纯化的 2H7scFv-Ig (SEQ ID NO:15) 的浓度。用 VectorNti 软件包 (Informax, North Bethesda, MD) 中的蛋白分析工具测定出 1.77 的消光系数。该程序使用氨基酸组合物数据计算消光系数。通过流式细胞术分析转染的稳定 CHO 细胞的 2H7scFv-Ig 产生水平。使 CHO 细胞的纯化 2H7scFv-Ig 与表达 CD20 的 CHO 细胞 (CD20CHO) 结合,并且使用荧光素偶联的抗人 IgG 第二步骤试剂 (目录号 H10101 和 H10501, CalTag, Burlingame, CA) 进行流式细胞术分析。图 2(上) 表示通过滴定 2H7scFv-Ig 与 CD20 CHO 的结合产生的标准曲线。在 2H7scFv-Ig 的每一个浓度下,表示出了以线性单位表示的荧光信号平均亮度。从含有表达 2H7scFv-Ig 的稳定 CHO 细胞克隆的 T 烧瓶中收集上清液,然后使其与 CD20 CHO 结合,然后通过流式细胞术分析结合。测量由上清液中含有的 2H7scFv-Ig 产生的荧光信号,从标准曲线计算上清液中的 2H7scFv-Ig 浓度 (图 2,下)。

[0179] 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析纯化的 2H7scFv-Ig (SEQ ID NO:15)。通过独立的蛋白 A 琼脂糖柱纯化的 2H7scFv-Ig 样品在没有二硫键还原的 SDS 样品缓冲液中煮沸,并应用于 SDS 10% Tris-BIS 凝胶 (目录号 NP0301, Novex, Carlsbad, CA)。将 20 微克每种纯化的批量样品加载到凝胶上。电泳后通过考马斯亮兰 (Pierce Gel Code Blue Stain Reagent, 目录号 24590, Pierce, Rockford, IL) 显色,然后在蒸馏水中脱色。在相同的凝胶上包含分子量标记 (Kaleidoscope Prestained Standards, 目录号 161-0324, Bio-Rad, Hercules, CA)。结果表示于图 3。泳道上的数字表示独立的纯化批。以千道尔顿表示的大小标记的分子量表示于图左侧。用替代样品制备条件进行的进一步实验表示通过在含有 DTT 或 2-巯基乙醇的 SDS 样品缓冲液中煮沸蛋白而进行的二硫键还原导致 2H7scFv-Ig 聚集。

[0180] 用本领域公知的常规测定可以监测任何其它的免疫参数。这些测定可以包括,例如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 测定,第二体外抗体应答,采用确立的标记抗原系统进行的多种外周血或淋巴单核细胞亚群流式免疫细胞荧光测定分析,免疫组化或其它相关测定。这些和其它测定可以参加,例如 Rose et al. (Eds.), Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5th Ed., 1997 American Society of Microbiology, Washington, DC。

[0181] 用 B 细胞系 Ramos 和 Bjab 在补体存在下检测 2H7scFv-Ig 杀灭 CD20 阳性细胞的能力。在测定中使用最终稀释度为 1/10 的兔补体 (PelFreez, Rogers, AK)。用 B 细胞和补

体在 37℃ 下将纯化的 2H7scFv-Ig 孵育 45 分钟,然后通过台盼蓝排除计数活细胞和死细胞。图 4A 的结果表明,在兔补体存在下,2H7scFv-Ig 裂解表达 CD20 的细胞。

[0182] 通过在 4 小时测定中使用 100 : 1 的 PBMC 与 Bjab 细胞比例测量 ⁵¹Cr 从标记的 Bjab 细胞的释放而检验 2H7scFv-Ig 在外周血单核细胞 (PBMC) 存在下杀灭 CD20 阳性细胞的能力。图 4B 所示结果表明,2H7scFv-Ig 可以介导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC),因为 PBMC 和 2H7scFv-Ig 存在下的 ⁵¹Cr 释放高于 PBMC 或 2H7scFv-Ig 单独存在下的 ⁵¹Cr 释放。

[0183] 实施例 3

[0184] CD20 和 CD40 的同时连接对正常 B 细胞生长,以及对 CD95 表达和凋亡诱导的作用

[0185] 该实施例说明了细胞表面表达的 CD20 和 CD40 的交联对细胞增殖的作用。

[0186] 通过 Percoll 分步梯度从人扁桃体分离密集的静息 B 细胞,通过 E-rosetting 去除 T 细胞。通过 4 天实验的最后 12 个小时的 ³[H]-胸苷摄取测量密集的扁桃体 B 细胞。在四份培养物中测量增殖,平均值和标准差如图所示。使用单独的或与抗鼠 κ mAb 187.1 (抗 CD20XL) 交联的鼠抗人 CD20mAb 1F5 (抗 CD20)。使用与鼠 CD8 (CD154) (Hollenbaugh et al., EMBO J 11 :4212-21 (1992)) 融合的可溶性人 CD154 完成 CD40 激活,使用抗鼠 CD8 mAb 53-6 (CD154XL) 完成 CD40 交联。该程序允许细胞表面 CD20 和 CD40 的同时交联。结果见图 5。

[0187] 检验了 CD20 和 CD40 在一种 B 淋巴瘤细胞系 Ramos 细胞上的交联。使用特异性结合于 CD20 (1F5) 和 CD40 (G28-5) 的鼠单克隆抗体分析处理 (无山羊抗小鼠 IgG (GAM)) 后 18 小时 Ramos 细胞的 CD95 (Fas) 表达和凋亡百分比和 / 或交联 (+GAM)。用特异于 CD3 的非结合性同种型对照 (64.1) 处理对照细胞。

[0188] 收获处理后的 Ramos 细胞,用 FITC-抗-CD95 孵育,并且通过流式细胞术分析测定 CD20 或 CD40 交联后细胞表面上的 Fas 相对表达水平。将数据作图指出刺激处理后细胞的平均荧光 (图 6A)。

[0189] 收获相同实验的处理后的 Ramos 细胞,测定膜联蛋白 V 的结合,用于表示经处理的培养物中的凋亡百分比。使用 1F5 和 G28-5 以及随后的与 GAM 的交联,通过 CD20 和 CD40 交联 18 小时后的膜联蛋白 V 的结合而测量凋亡。使用 FITC-膜联蛋白 V 试剂盒 (目录号 PN-IM2376, Immunotech, Marseille, France,) 测量膜联蛋白 V 的结合。已知膜联蛋白 V 结合是细胞发展为凋亡中的早期事件。凋亡,或程序性细胞死亡,是以通过自杀导致细胞死亡的分解代谢反应级联为特征的过程。在凋亡的早期阶段中,在细胞改变外形和水解 DNA 之前,保持了细胞膜的完整性,但细胞失去了它们的膜磷脂的不对称性,暴露了带负电的磷脂,如细胞表面的磷脂酰丝氨酸。膜联蛋白 V,即一种钙和磷脂结合蛋白,优先结合磷脂酰丝氨酸,并且对其有高亲和力。证明 CD20 和 CD40 的交联对 FAS 受体 (CD95) 表达的作用的结果表示于图 6B。CD20 和 CD40 的交联对膜联蛋白结合于细胞的作用见图 6B。

[0190] 实施例 4

[0191] 2H7 ScFv-CD 154 融合蛋白的构建和表征

[0192] 为了构建能够结合 CD20 和 CD40 这两者的分子,将编码 2H7 scFv 的 cDNA 与编码 CD154,即 CD40 配体融合的 cDNA。从 2H7 scFvIg 构建体去除在 HindIII-BclI 片段上编码的 2H7 scFv cDNA,与编码人 CD154 的胞外域的 BamHI-XbaI cDNA 片段一起插入 pD18 载体。胞外域在 CD154 的羧基末端编码,与其它 H 型膜蛋白相似。

[0193] 用随机引物和来自于用 PHA(植物凝集素)激活的人 T 淋巴细胞的 RNA 对人 CD154 的胞外域进行 PCR 扩增。引物组包括两个不同的 5' 或有义引物,它们在 CD154 的胞外域中的两个不同位置产生融合接合处。两个不同融合接合处设计为产生一种包含胞外域的氨基酸 108(Glu)-261(Leu)+(Glu) 的短或截短形式(S4 形),以及包含胞外域的氨基酸 48(Arg)-261(Leu)+(Glu) 的长或完全形式(L2 形),它们都构建为 BamHI-XbaI 片段。将两个不同的截短胞外域融合于 2H7scFv 的有义引物包括用于克隆的 BamHI 位点。CD154 cDNA 的 S4 形的有义引物命名为 SEQUENCE ID NO:27 或 CD154BAM108,并且编码具有以下序列的 34 聚体:5' -gtt gtc gga tcc aga aaa cag ctt tgaat gca a-3', 而反义引物命名为 SEQUENCE ID NO:28 或 CD154XBA,并且编码具有以下序列的 44 聚体:5' -gtt gtt tct aga tta tca tca ctc gag ttt gag taa gcc aaa gga cg-3'。

[0194] 用于扩增 CD154 胞外域的长形式(L2)的编码氨基酸 48(Arg)-261(Leu)+(Glu) 的寡核苷酸引物如下:命名为 CD154 BAM48(SEQUENCE ID NO:29)的有义引物编码具有以下序列的 35 聚体:5' -gtt gtc gga tcc aag aag gtt gga caa gat aga ag-3'。命名为 CD154XBA(SEQUENCE ID NO:28)的反义引物编码具有以下序列的 44 聚体:5' -gtt gtt tct aga tta tca ctc gag ttt gag taa gcc aaa gga cg-3'。其它 PCR 反应条件与用于扩增 2H7 scFv 的条件相同(见实施例 1)。用 PCR 快速试剂盒(QIAGEN, San Diego, CA)纯化 PCR 片段,在 30 μ l ddH₂O 中洗脱,然后用 BamHI 和 XbaI(Roche)限制性内切酶在 37°C 下以 40 μ l 的反应体积消化 3 小时。凝胶纯化片段,根据制造商的说明(QIAGEN)用 QIAEX 试剂盒纯化,并且与 2H7 HindIII-BclI 片段一起连接到用 HindIII+XbaI 消化的 pD18 表达载体中。将连接反应转移到 DH5- α 化学感受态细菌中,并且铺于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 板上。使转染物在 37°C 生长过夜,用分离的菌落接种含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 Luria 培养液中的 3ml 液体培养物。微量质粒制备(QIAGEN)后筛选用于插入 2H7 scFv 和 CD154 胞外域片段的克隆。

[0195] 在 PE 9700 热循环仪上使用 25 个循环的程序对 2H7scFv-CD154 构建体 cDNA 进行循环测序,包括在 96°C 变性 10 秒,在 50°C 退火 5 秒,在 60°C 延伸 4 分钟。使用的测序引物为 pD18 正向(SEQ ID NO:30:5' -gtctatataagcagagctctggc-3') 和 pD18 反向(SEQ ID NO:31:5' -cgaggctgatcagcgagctctagca-3') 引物。此外,使用了与人 CD154 序列(SEQ ID NO:32:5' -ccgcaatttgaggattctgatcacc-3') 具有特异性的内部引物。测序反应包含 3.2 pmol 的引物,约 200ng DNA 模板,以及 8 μ l 测序混合物。使用 Big Dye Terminator Ready 测序混合物(PE-AppliedBiosystems, Foster City, CA),根据制造商的说明进行测序反应。随后用 Centrisep 柱(Princeton Separations, Adelphia, NJ)纯化样品。在 Savant 加速真空干燥器中干燥洗脱物,95°C 下在 20 μ l 模板抑制试剂(ABI)中变性 2 分钟,并且在 ABI 310 基因分析仪(PE-AppliedBiosystems)上分析。使用 Vector Nti 6.0 版(Informax, North Bethesda, MD)编辑、翻译和分析序列。2H7scFv-CD 154 L2 cDNA 序列和预测的氨基酸序列见图 7A, 2H7scFv-CD154 S4 cDNA cDNA 序列和预测的氨基酸序列见图 7B。

[0196] 通过流式细胞术测定了 2H7 scFv-CD154 融合蛋白(SEQ. ID NO:33 和 34)与 CD20 和 CD40 的同时结合活性。该测定使用表达 CD20 的 CHO 细胞靶。用 2H7 scFv-CD154 表达质粒转染的细胞的上清液孵育 CD20 CHO 细胞 45 分钟后,洗涤 CD20 CHO 细胞两次,用 PBS/2% FBS 中的生物素偶联的 CD40-Ig 融合蛋白孵育。45 分钟后,洗涤细胞两次,用 1:100 溶于

PBS/2% FBS 的藻红蛋白 (PE) 标记的链霉素 (Molecular Probes, Eugene OR) 进行孵育。孵育额外的 30 分钟后, 洗涤细胞两次, 通过流式细胞术进行分析。结果表明 2H7 scFv-CD154 分子能够结合细胞表面上的 CD20 并且从溶液中捕获生物素偶联的 CD40。

[0197] 为确定 2H7scFv-CD154 对 B 淋巴瘤和成淋巴细胞系的生长和存活的作用, 用 2H7scFv CD154 L2 (SEQ. ID NO :33) 孵育细胞 12 小时, 然后检验膜联蛋白 V 的结合。使用 FITC-膜联蛋白 V 试剂盒 (Immunotech, Marseille, France, 目录号 PN-IM2376) 测量膜联蛋白 V 的结合。用来自于表达分泌形式的 2H7scFv-CD 154 融合蛋白的细胞的浓缩、经渗透上清液的稀释液在 1ml 培养物中孵育 B 细胞系。

[0198] 通过 24 小时培养的最后 6 小时的 ³H- 胸苷摄取检验 2H7scFv-CD154 存在下 Ramos B 淋巴瘤细胞的生长速度。2H7scFv-CD154 对细胞增殖的作用见图 10。

[0199] 实施例 5

[0200] CYTOXB 抗体衍生物的构建和表征

[0201] Cytox B 抗体衍生自 2H7 scFv-IgG 多肽。通过改变的铰链区 (见图 11) 将 2H7 scFv (见实施例 1) 连接于人 IgG1 Fc 结构域。通过定点诱变和其它本领域公知的方法用丝氨酸残基取代铰链区的半胱氨酸残基。将突变铰链区融合于野生型 Fc 结构域以产生一种命名为 CytoB-MHWTG1C 的构建体, 或融合于在 CH2 结构域中引入了额外突变的突变 Fc 结构域 (CytoxBMHMG1C)。与效应物功能有关的 CH2 中的氨基酸序列见图 11。这些残基中的一个或多个的突变可以减少 FcR 结合和效应物功能的介导。在此实施例中, 在 2H7 scFv 融合蛋白 Cytox B [MG1H/MG1C] 中, 本领域公知对 Fc 受体结合具有重要性的亮氨酸残基 234 进行了突变。在另一构建体中, 用人 IgA 铰链区的一部分取代了人 IgG1 铰链区, 该部分与野生型人 Fc 结构域融合 (Cytox B-IgAHWTHG1C) (见图 11)。该突变的铰链区允许保持了人 IgG1 CH2 和 CH3 结构域的功能特性的单体和二聚体分子混合物的表达。根据实施例 2 中描述的方法构建了用于这些分子的重组 cDNA 表达盒并且在 CHODG44 细胞中表达了多肽。

[0202] 根据实施例 2 中描述的方法通过 SDS-PAGE 分析了 Cytox B-scFvIg 分子的纯化融合蛋白衍生物。在非还原和还原条件下进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳。在每个凝胶上加载两个不同的分子量标记系列 BioRad 预染色标记 (BioRad, Hercules, CA) 和 Novex Multimark 分子量标记。不同构建体和 RituximabTM 的迁移模式见图 12。

[0203] 用 Bjab B 淋巴瘤细胞作为靶和新制备的人 PBMCs 作为效应细胞测量 Cytox B-scFvIg 分子的不同衍生物介导 ADCC 的能力 (见实施例 2)。效应物与靶的比例改变如下: 70 : 1, 35 : 1, 和 18 : 1, 每孔的 Bjab 细胞数保持恒定, 但 PBMCs 的数目不同。用 ⁵¹Cr 标记 Bjab 细胞 2 小时, 以 5 × 10⁴ 细胞 / 孔的细胞密度等分至平底 96 孔板的每个孔中。以 10mg/ml 的浓度将纯化的融合蛋白或 rituximab 加入 PBMCs 的各种稀释液。在不添加 PBMC 或融合蛋白的情况下测量自发释放, 通过向适当的控制加入洗涤剂 (1% NP-40) 而测量最大释放。将反应孵育 4 小时, 将 100 μ l 培养上清液收获至 Lumaplate (Packard Instruments) 并且干燥过夜, 然后计数释放的 cpm。结果见图 13。

[0204] 也测量了 Cytox B 衍生物的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 活性。基本按实施例 2 中的描述进行反应。结果见图 14, 表示为每个融合蛋白浓度下死亡细胞占总细胞数的百分比。

[0205] 实施例 6

[0206] 在猕猴中进行的体内研究

[0207] 在非人灵长类动物中进行了 Cytox B 衍生物的初步体内研究。图 15 表示了鉴定 Cytox B 在猴中的血清半衰期的数据。在箭头所示日, 给予每只猴 6mg/kg 的剂量后, 对从两只不同的猕猴 (J99231 和 K99334) 获得的血清样品进行测量。对于每种样品, 通过与标准曲线比较评估存在的 2H7scFvIg 水平, 标准曲线是通过纯化 Cytox B-(MHWTG1C)-Ig 融合蛋白与 CD20 CHO 细胞的结合产生的 (见实施例 2)。数据见图 15 下部。

[0208] 研究了 Cytox B-(MHWTG1C) Ig 融合蛋白对所研究的猕猴中循环 CD40+ 细胞水平的作用。在图 16 所示的每一天进行全血计数。此外, 使用 CD40 特异性荧光素偶联的抗体对外周血淋巴细胞进行 FACS (荧光激活细胞分类) 测定, 以检测细胞群中的 B 细胞。然后用阳性细胞百分比计算原始样品中的 B 细胞数。数据作图为注射后的体定日测量的千 B 细胞数 / 升血液 (图 16)。

[0209] 实施例 7

[0210] 抗 -CD19 scFv-Ig 融合蛋白的构建和表达

[0211] 根据实施例 1、2 和 5 描述的方法以及本领域的标准构建了抗 -CD19scFv-Ig 融合蛋白, 将其转染到真核细胞, 并进行表达。从分离自产生抗体 HD37 的杂交瘤细胞的 RNA 克隆重链可变区和轻链可变区, HD37 特异性结合于 CD19。测量了 HD37scFv-IgAHWTG1C 和 HD37scFv-IgMHWTG1C 的表达水平, 并且与用纯化 HD37 scFvIg 产生的标准曲线相比较, 结果见图 17。

[0212] 实施例 8

[0213] 抗 -L6 scFv-Ig 融合蛋白的构建和表达

[0214] 用来源于抗癌 mAb 即 L6 的可变区构建 scFv-Ig 融合蛋白。根据实施例 1、2 和 5 描述的方法以及本领域的标准构建融合蛋白, 转染至真核细胞中, 并且进行表达。测量了 L6scFv-IgAHWTG1C 和 L6scFv-IgMHWTG1C 的表达水平, 并且与用纯化 HD37 scFvIg 产生的标准曲线相比较, 结果见图 18。

[0215] 实施例 9

[0216] 多种 scFv-Ig 融合蛋白的表征

[0217] 除已经描述的 scFv-Ig 融合蛋白, 基本按实施例 1 和 5 的描述制备 G28-1 (抗 CD37) scFv-Ig 融合蛋白。根据本领域公知的方法克隆重链和轻链可变区。根据上述方法 (见实施例 2) 确定 2H7-MHWTG1C, 2H7-IgAHWTG1C, G28-1-MHWTG1C, G28-1 IgAHWTG1C, HD37-MHWTG1C 和 HD37-IgAHWTG1C 的 ADCC 活性。结果见图 19。用 2981 人肺癌细胞系测量 L6scFv-IgAHWTG1C 和 L6scFv-IgMHWTG1C 的 ADCC 活性。结果见图 20。已知鼠 L6 单克隆抗体没有 ADCC 活性。

[0218] 通过 SDS-PAGE 在还原和非还原条件下分析纯化蛋白。基本按实施例 2 和 5 的描述制备样品和进行凝胶电泳。L6 和 2H7 scFv-Ig 融合蛋白的结果见图 21, G28-1 和 HD37 scFv-Ig 融合蛋白的结果见图 22。

[0219] 从上文中可以理解, 尽管处于说明的目的描述了本发明的许多特定实施方案, 可以在不偏离本发明的精神和范围的前提下进行多种修饰。因此, 本发明并不受其限制, 而是由所附权利要求进行限定。

[0220] 序列表

[0221] <110> 基因工艺公司

- [0222] J. A. 勒贝特尔
- [0223] M. 海登 - 勒贝特尔
- [0224] <120> 结合域 - 免疫球蛋白融合蛋白
- [0225] <130>390069. 401PC
- [0226] <140>PCT
- [0227] <141>2002-01-17
- [0228] <160>38
- [0229] <170>PatentIn version 3.0
- [0230] <210>1
- [0231] <211>812
- [0232] <212>DNA
- [0233] <213> 人工序列
- [0234] <220>
- [0235] <223> 合成的小鼠 SCFV 融合基因
- [0236] <220>
- [0237] <221>sig_ 肽
- [0238] <222>(13).. (78)
- [0239] <220>
- [0240] <221>V_ 区
- [0241] <222>(79).. (396)
- [0242] <223> 抗 CD20 scFv 的轻链可变区
- [0243] <220>
- [0244] <221>misc_ 特征
- [0245] <222>(397).. (444)
- [0246] <223>asp-gly3ser(gly4ser)2-ser 肽接头
- [0247] <220>
- [0248] <221>V_ 区
- [0249] <222>(445).. (808)
- [0250] <223> 抗 CD20 scFv 的重链可变区
- [0251] <400>1
- [0252] aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tctgctaata cagtgcctca 60
- [0253] gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
- [0254] ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
- [0255] taccagcaga agccaggatc ctccccaaa ccctggattt atgcccatac caacctgget 240
- [0256] tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc 300
- [0257] agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccea 360
- [0258] cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggtg gcggtggctc gggcgggtgt 420
- [0259] ggatctggag gaggtgggag ctctcagget tatctacagc agtctggggc tgagctgggt 480
- [0260] aggccctgggg cctcagtgaag gatgtctctc aaggtctctg gctacacatt taccagttac 540

[0261]	aatatgcaact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatztat	600
[0262]	ccaggacatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta	660
[0263]	gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg	720
[0264]	gtctatztat gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg	780
[0265]	ggcacagga ccacggteac cgtctctgat ca	812
[0266]	<210>2	
[0267]	<211>1518	
[0268]	<212>DNA	
[0269]	<213> 人工序列	
[0270]	<220>	
[0271]	<223> 合成的小鼠人嵌合融合基因	
[0272]	<220>	
[0273]	<221>misc_ 特征	
[0274]	<222>(13).. (807)	
[0275]	<223> 鼠抗人 CD20 scFv	
[0276]	<220>	
[0277]	<221>C_ 区	
[0278]	<222>(808).. (1513)	
[0279]	<223> 人工 IgG1 Fc 尾,野生型铰链区,CH2 和 CH3	
[0280]	<400>2	
[0281]	aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tctgctaata cagtgcctca	60
[0282]	gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct	120
[0283]	ccaggggaga aggtcacaat gacctgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg	180
[0284]	taccagcaga agccaggatc ctccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct	240
[0285]	tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc	300
[0286]	agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca	360
[0287]	cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcgggtgt	420
[0288]	ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagctggtg	480
[0289]	aggcctgggg cctcagtgaa gatgtctctc aaggcttctg gctacacatt taccagttac	540
[0290]	aatatgcaact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatztat	600
[0291]	ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta	660
[0292]	gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg	720
[0293]	gtctatztat gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg	780
[0294]	ggcacagga ccacggteac cgtctctgat caggagccca aatcttgtga caaaactcac	840
[0295]	acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagctctt cctcttcccc	900
[0296]	ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtgggtgtg	960
[0297]	gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggc acgtggacgg cgtggaggtg	1020
[0298]	cataatgcca agacaaaccc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc	1080
[0299]	gtcctcaccg tcttgacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	1140

[0300]	aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga	1200
[0301]	gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcage	1260
[0302]	ctgacctgcc tggteaagg cttctatccc agegacatcg ccgtggagtg ggagagcaat	1320
[0303]	gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc	1380
[0304]	ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca	1440
[0305]	tgctccgtga tgcattgagc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct	1500
[0306]	ccgggtaaat gatctaga	1518
[0307]	<210>3	
[0308]	<211>1518	
[0309]	<212>DNA	
[0310]	<213>人工序列	
[0311]	<220>	
[0312]	<223>合成的小鼠人嵌合融合基因	
[0313]	<220>	
[0314]	<221>misc_特征	
[0315]	<222>(13)..(807)<223>小鼠抗人CD20 scFv	
[0316]	<220>	
[0317]	<221>C_区	
[0318]	<222>(608)..(1513)	
[0319]	<223>突变为丝氨酸的铰链区半胱氨酸(826-829 ;844-847 ;853-856)	
[0320]	CH2 中脯氨酸至丝氨酸的突变破坏效应物功能	
[0321]	<400>3	
[0322]	aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tctgctaata cagtgcctca	60
[0323]	gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct	120
[0324]	ccaggggaga aggtcacaat gacttgcaag gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg	180
[0325]	taccagcaga agccaggatc ctccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct	240
[0326]	tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc	300
[0327]	agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca	360
[0328]	cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcgggtgt	420
[0329]	ggatctggag gaggtgggag ctctcaggtt tatctacagc agtctggggc tgagctgggt	480
[0330]	aggcctgggg cctcagtga gatgtctctc aaggcttctg gctacacatt taccagttac	540
[0331]	aatatgcaact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatztat	600
[0332]	ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta	660
[0333]	gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctccagcagc tgacatctga agactcgtgg	720
[0334]	gtctattttt gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg	780
[0335]	ggcacaggga ccacggctcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac	840
[0336]	acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagctctt cctcttcccc	900
[0337]	ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtgtg	960
[0338]	gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg	1020

[0339]	cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcage	1080
[0340]	gtcctcaccg tctcgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	1140
[0341]	aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagcccccga	1200
[0342]	gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcage	1260
[0343]	ctgacctgcc tggtc aaagg cttctatccc agegacatcg ccgtggagtg ggagagcaat	1320
[0344]	gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc	1380
[0345]	ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca	1440
[0346]	tgctccgtga tgc atgagge tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct	1500
[0347]	ccgggtaaat gatctaga	1518
[0348]	<210>4	
[0349]	<211>1518	
[0350]	<212>DNA	
[0351]	<213>人工序列	
[0352]	<220>	
[0353]	<223>合成的小鼠人嵌合融合基因	
[0354]	<220>	
[0355]	<221>misc_特征	
[0356]	<222>(13)..(807)	
[0357]	<223>小鼠抗人 CD20 scFv	
[0358]	<220>	
[0359]	<221>C_区	
[0360]	<222>(808)..(1513)	
[0361]	<223>突变为丝氨酸的铰链区半胱氨酸(826-829 ;844-847 ;853-856)	
[0362]	野生型 CH2 和 CH3 结构域介异效应物功能	
[0363]	<400>4	
[0364]	aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tctgcta at cagtgttca	60
[0365]	gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct	120
[0366]	ccaggggaga aggtcacaat gacttgcaagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg	180
[0367]	taccagcaga agccaggatc ctccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct	240
[0368]	tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc	300
[0369]	agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca	360
[0370]	cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcgggtgt	420
[0371]	ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagctgggtg	480
[0372]	aggcctgggg cctcagtgaa gatgtctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac	540
[0373]	aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat	600
[0374]	ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta	660
[0375]	gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagcagc tgacatctga agactctgag	720
[0376]	gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg	780
[0377]	ggcacaggga ccacggctcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac	840

[0378]	acatccccac cgtccccage acctgaacte ctggggggac cgtcagtett cctcttcccc	900
[0379]	ccaaaacca aggacacct catgatctcc eggaccctg aggtcacatg cgtgggtggtg	960
[0380]	gacgtgagcc acgaagacc tgaggtaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg	1020
[0381]	cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcage	1080
[0382]	gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	1140
[0383]	aacaaagccc tcccageccc catcgsgaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga	1200
[0384]	gaaccacagg tgtacacct gccccatcc egggatgagc tgaccaagaa ccaggtcage	1260
[0385]	ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc agegacatcg ccgtggagtg ggagagcaat	1320
[0386]	gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga eggctccttc	1380
[0387]	ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca	1440
[0388]	tgctccgtga tgcattgagc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct	1500
[0389]	ccgggtaaat gatctaga	1518
[0390]	<210>5	
[0391]	<211>1524	
[0392]	<212>DNA	
[0393]	<213> 人工序列	
[0394]	<220>	
[0395]	<223> 合成的小鼠人嵌合融合基因	
[0396]	<220>	
[0397]	<221>misc_ 特征	
[0398]	<222>(1).. (796)	
[0399]	<223> 小鼠抗人 CD20 scFv	
[0400]	<220>	
[0401]	<221>N_ 区	
[0402]	<222>(797).. (864)	
[0403]	<223> 人 IgA 铰链区	
[0404]	<220>	
[0405]	<221>C_ 区	
[0406]	<222>(865).. (1518)	
[0407]	<223> 人 IGG1 CH2 和 CH3 野生型 FC 结构域	
[0408]	<400>5	
[0409]	atggatttcc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaatca gtgcttcagt cataattgcc	60
[0410]	agaggacaaa ttgttctctc ccagttctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag	120
[0411]	gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tgcaactggtg ccagcagaag	180
[0412]	ccaggatcct cccccaaacc ctggatttat gccccatcca acctggcttc tggagtccct	240
[0413]	gctcgttcca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag	300
[0414]	gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagtt ttaaccacc cacgttcggt	360
[0415]	gctgggacca agctggagct gaaagatggc ggtggctcgg gcggtggtgg atctggagga	420
[0416]	ggtgggagct ctccagctta tctacagcag tctggggctg agctggtgag gcctggggcc	480

[0417]	tcagtgaaga tgcctgcaa ggcttctggc tacacattta ccagttacaa tatgcactgg	540
[0418]	gtaaagcaga cacctagaca gggcctggaa tggattggag ctatttatcc aggaaatggt	600
[0419]	gatacttctt acaatcagaa gttcaagggc aaggccacac tgactgtaga caaatcctcc	660
[0420]	agcacagcct acatgcagct cagcagcctg acatctgaag actctgcggt ctatttctgt	720
[0421]	gcaagagtgg tgtactatag taactcttac tggacttctg atgtctgggg cacagggacc	780
[0422]	acggtcaccg tctctgatca gccagttccc teaactccac ctaccccate tcctcaact	840
[0423]	ccacctacce catctcctc atgctcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc	900
[0424]	ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga ccctgaggt cacatgcgtg	960
[0425]	gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	1020
[0426]	gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	1080
[0427]	gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag	1140
[0428]	gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacaa tctccaaagc caaagggcag	1200
[0429]	ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatccggg ctgagctgac caagaaccag	1260
[0430]	gtcagcctga cctgcctggt caaaggctt tateccagcg acatcgcctg ggagtgggag	1320
[0431]	agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1380
[0432]	tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1440
[0433]	ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gacccctcc	1500
[0434]	ctgtctccgg gtaaattgatc taga	1524
[0435]	<210>6	
[0436]	<211>711	
[0437]	<212>DNA	
[0438]	<213> 人工序列	
[0439]	<220>	
[0440]	<223> 合成的人部分融合基因	
[0441]	<220>	
[0442]	<221>misc_ 特征	
[0443]	<222>(1)..(705)	
[0444]	<223> 突变为丝氨酸的铰链区半胱氨酸 (19-21 ;37-39 ;46-48)	
[0445]	<400>6	
[0446]	gatcaggagc ccaaattctt tgacaaaact cacacatccc caccgtcccc agcacctgaa	60
[0447]	ctcctggggg gaccgtcagt ctctctctt cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc	120
[0448]	tcccggacce ctgaggtcac atgctggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc	180
[0449]	aagtccaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag	240
[0450]	gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg	300
[0451]	ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag	360
[0452]	aaaacaatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca	420
[0453]	tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gctgtgtaa aggtctctat	480
[0454]	cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc	540
[0455]	acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac	600

[0456]	aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac	660
[0457]	aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgatctag a	711
[0458]	<210>7	
[0459]	<211>729	
[0460]	<212>DNA	
[0461]	<213> 人工序列	
[0462]	<220>	
[0463]	<223> 合成的人部分融合基因	
[0464]	<220>	
[0465]	<221>N_ 区	
[0466]	<222>(I).. (69)	
[0467]	<223> 人 IgA 铰链区	
[0468]	<220>	
[0469]	<221>C_ 区	
[0470]	<222>(70).. (723)	
[0471]	<223> 人野生型 IGG1 CH2 和 CH3, FC	
[0472]	<400>7	
[0473]	gatcagccag ttccctcaac tccacctacc ccatctccct caactccacc taccatct	60
[0474]	ccctcatgcg cacctgaact cctgggggga cegtcagtct tctcttccc cccaaaacc	120
[0475]	aaggacacc tcatgatctc cggaccct gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc	180
[0476]	cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	240
[0477]	aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc	300
[0478]	gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc	360
[0479]	ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag	420
[0480]	gtgtacacc tgccccatc cgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc	480
[0481]	ctgggtcaaag gcttctatcc cagegacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc	540
[0482]	gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac	600
[0483]	agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg	660
[0484]	atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	720
[0485]	tgatctaga	729
[0486]	<210>8	
[0487]	<211>825	
[0488]	<212>DNA	
[0489]	<213> 人工序列	
[0490]	<220>	
[0491]	<223> 合成的小鼠 SCFV 融合基因	
[0492]	<220>	
[0493]	<221>misc_ 特征	
[0494]	<222>(13).. (72)	

- [0495] <223> 轻链前导肽
- [0496] <220>
- [0497] <221>V_ 区
- [0498] <222>(73)..(405)
- [0499] <223> 小鼠抗人 CD19 :HD37 的轻链可变区
- [0500] <220>
- [0501] <221>misc_ 特征
- [0502] <222>(406)..(450)
- [0503] <223> 合成的 (GLY4SER)3 接头肽
- [0504] <220>
- [0505] <221>V_ 区
- [0506] <222>(454)..(825)
- [0507] <223> 小鼠抗人 CD19 :HD37 的重链可变区
- [0508] <400>8
- [0509] aagcttgccg ccatggagac agacacactc ctgctatggg tgctgctgct ctgggttcca 60
- [0510] ggctccactg gtgacattgt gctgacccaa tctccagctt ctttgctgt gtctctaggg 120
- [0511] cagagggcca ccatctctg caaggccagc caaagtgtg attatgatgg tgatagttat 180
- [0512] ttgaactggt accaacagat tccaggacag ccacccaaac tctcatcta tgatgcatcc 240
- [0513] aatctagttt ctgggatecc acccaggttt agtggcagtg ggtctgggac agacttcacc 300
- [0514] ctcaacatcc atcctgtgga gaagtgatg gctgcaacct atcactgtca gcaaagtact 360
- [0515] gaggatccgt ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaaggtgg cggtggctcg 420
- [0516] ggcggtggtg ggtcgggtgg cggcggatcg tcacagttc agctgcagca gtctggggct 480
- [0517] gagctggtga ggctgggtc ctcagtgaag atttctgca aggttcttg ctatgcattc 540
- [0518] agtagctact ggatgaactg ggtgaagcag aggcctggac aggtcttga gtggattgga 600
- [0519] cagatttggc ctggagatgg tgatactaac tacaatgaa agttcaaggg taaagccact 660
- [0520] ctgactgcag acgaatcctc cagcacagcc tacatgcaac tcagcagcct agcatctgag 720
- [0521] gactctgegg tctatttctg tgcaagacgg gagactacga cggtaggccg ttattactat 780
- [0522] gctatggact actggggtca agaacctca gtcaccgtct cctca 825
- [0523] <210>9
- [0524] <211>795
- [0525] <212>DNA
- [0526] <213> 人工序列
- [0527] <220>
- [0528] <223> 合成的小鼠 SCFV 融合基因
- [0529] <220>
- [0530] <221>misc_ 特征
- [0531] <222>(13)..(72)
- [0532] <223> 轻链前导肽序列
- [0533] <220>

[0534]	<221>V_区	
[0535]	<222>(73)..(393)	
[0536]	<223>小鼠抗人 CD19 :G28-1 的轻链可变区	
[0537]	<220>	
[0538]	<221>misc_特征	
[0539]	<222>(394)..(441)	
[0540]	<223>编码的合成接头肽 (GLY4SER) 3	
[0541]	<220>	
[0542]	<221>V_区	
[0543]	<222>(442)..(795)	
[0544]	<223>小鼠抗人 CD19 :G28-1 的轻链可变区	
[0545]	<400>9	
[0546]	aagcttgccg ccatggtatc cacagctcag ttccttgggt tgctgctgct gtggcttaca	60
[0547]	ggtggcagat gtgacatcca gatgactcag tctccagcct ccctatctgc atctgtggga	120
[0548]	gagactgtca ccatcacatg tcgaacaagt gaaaatgttt acagttattt ggcttggat	180
[0549]	cagcagaaac agggaaaatc tcctcagctc ctggctcttt ttgcaaaaac ctagcagaa	240
[0550]	ggtgtgccat caaggttcag tggcagtgga tcaggcacac agttttctct gaagatcagc	300
[0551]	agcctgcagc ctgaagattc tggaagttat ttctgtcaac atcattccga taatccgtgg	360
[0552]	acgttcggtg gaggcaccga actggagatc aaaggtggcg gtggctcggg cggtggtggg	420
[0553]	tcgggtggcg gcggatcgtc agcggctccag ctgcagcagt ctggacctga gctggaaaag	480
[0554]	cctggcgctt cagtgaagat ttctgcaag gcttctggtt actcattcac tggctacaat	540
[0555]	atgaactggg tgaagcagaa taatggaaag agccttgagt ggattggaaa tattgatcct	600
[0556]	tattatggtg gtactaccta caaccggaag ttcaagggca aggccacatt gactgtagac	660
[0557]	aaatcctcca gcacagccta catgcagctc aagagtctga catctgagga ctctgcagtc	720
[0558]	tattactgtg caagatcggg cggcctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc	780
[0559]	gtctcttctg atcag	795
[0560]	<210>10	
[0561]	<211>824	
[0562]	<212>DNA	
[0563]	<213>人工序列	
[0564]	<220>	
[0565]	<223>合成的小鼠 SCFV 融合基因	
[0566]	<220>	
[0567]	<221>sig_肽	
[0568]	<222>(1)..(61)	
[0569]	<223>天然轻链前导肽	
[0570]	<220>	
[0571]	<221>V_区	
[0572]	<222>(62)..(397)	

[0573]	<223> 小鼠抗人 CD22 :G28-7 的轻链可变区	
[0574]	<220>	
[0575]	<221>misc_ 特征	
[0576]	<222>(398)..(445)	
[0577]	<223>(gly4ser)3 接头肽	
[0578]	<220>	
[0579]	<221>V_ 区	
[0580]	<222>(445)..(818)	
[0581]	<223> 小鼠抗人 CD22 :C28-7 的重链可变区	
[0582]	<220>	
[0583]	<221>misc_ 特征	
[0584]	<222>(819)..(824)	
[0585]	<223>BcII 限制位点	
[0586]	<400>10	
[0587]	atggagtcac attcccaggt ctttctctcc ctgctgctct gggatctctgg tacctgtggg	60
[0588]	aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt cagcaggaga aaaggtcact	120
[0589]	atgaactgta agtccagtca aagtgttttc tacagttcaa atcagaggaa ttatttgcc	180
[0590]	tggtatcagc agaaaccagg gcagtctccc aaattgctga tctactgggc atctactagg	240
[0591]	gaatctgggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatccg ggacagactt tactcttacc	300
[0592]	atcagcagtg tacatactga agacctggca gtttattact gtcatacaatt cctctcttcg	360
[0593]	tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaaggcg gtggtggttc ggggtggtggt	420
[0594]	ggttcgggtg gcggcggatc ttctcaggtc caactgcagc agcctggggc tgaactgggtg	480
[0595]	aagcctggga cttcagtga gctgtcctgc aaggcctctg gctacacctt caccaactac	540
[0596]	tggatggtct gggatgaagca gacgcctgga gaaggccttg agtgattgg agaaattatt	600
[0597]	cctagcaacg gtcgtactaa atacaatgag aagttcaagc gcaaggccac actgactgca	660
[0598]	gacaaatcct cccgcacagc ctacatgcaa ctacagcagcc tggcatctga ggactctgcg	720
[0599]	gtctattatt gtgcaagaga gatgtccatt attactacgg tactgactcc cggtttgctt	780
[0600]	actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgcagcctg atca	824
[0601]	<210>11	
[0602]	<211>266	
[0603]	<212>PRT	
[0604]	<213> 小鼠 (Mus musculus)	
[0605]	<220>	
[0606]	<221>INIT_MET	
[0607]	<222>(1)..(1)	
[0608]	<220>	
[0609]	<221> 信号	
[0610]	<222>(1)..(22)	
[0611]	<220>	

[0612] <221> 结构域
 [0613] <222>(23)..(128)
 [0614] <223> 小鼠抗人 CD20 的轻链可变区
 [0615] <220>
 [0616] <221> 位点
 [0617] <222>(129)..(144)
 [0618] <223>ASP-(GLY3SER)-(GLY4SER)2-SER 接头肽
 [0619] <220>
 [0620] <221> 结构域
 [0621] <222>(145)..(266)
 [0622] <223> 小鼠抗人 CD20 的重链可变区
 [0623] <400>11
 [0624] Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 [0625] 1 5 10 15
 [0626] Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 [0627] 20 25 30
 [0628] Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Mer Thr Cys Arg Ala Set
 [0629] 35 40 45
 [0630] Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 [0631] 50 55 60
 [0632] Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 [0633] 65 70 75 80
 [0634] Ala Arg Phe Set Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 [0635] 85 90 95
 [0636] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cya Gln Gln Trp
 [0637] 100 105 110
 [0638] Ser Phe Aan Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 [0639] 115 120 125
 [0640] Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Set Gly Gly Gly Gly Ser Ser
 [0641] 130 135 140
 [0642] Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Set Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 [0643] 145 150 155 160
 [0644] Set Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [0645] 165 170 175
 [0646] Asn Met His Trp Val Lya Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0647] 180 185 190
 [0648] Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lya Phe
 [0649] 195 200 205
 [0650] Lye Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Aap Lye Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0651]	210	215	220
[0652]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
[0653]	225	230	235
[0654]	Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Pha Asp Val Trp		
[0655]		245	250
[0656]	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp		
[0657]		260	265
[0658]	<210>12		
[0659]	<211>271		
[0660]	<212>PRT		
[0661]	<213>小鼠 (Mus musculus)		
[0662]	<220>		
[0663]	<221>位点		
[0664]	<222>(1).. (271)		
[0665]	<223>小鼠抗人 CD19 SCFV		
[0666]	<400>12		
[0667]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro		
[0668]	1	5	10
[0669]	Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala		
[0670]		20	25
[0671]	Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser		
[0672]		35	40
[0673]	Val Aap Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro		
[0674]		50	55
[0675]	Gly Gln Pro Pro Lya Leu Leu Ile Tyr Alp Ala Ser Asn Leu Val Ser		
[0676]	65	70	75
[0677]	Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr		
[0678]		85	90
[0679]	Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys		
[0680]		100	105
[0681]	Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys leu		
[0682]		115	120
[0683]	Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[0684]		130	135
[0685]	Gly Ser Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg		
[0686]	145	150	155
[0687]	Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe		
[0688]		165	170
[0689]	Ser Ser Tyr TrP Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gly Gly Leu		

[0690] 180 185 190
 [0691] Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn
 [0692] 195 200 205
 [0693] Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser
 [0694] 210 215 220
 [0695] Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val
 [0696] 225 230 235 240
 [0697] Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr
 [0698] 245 250 255
 [0699] Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 [0700] 260 265 270
 [0701] <210>13
 [0702] <211>259
 [0703] <212>PRT
 [0704] <213> 小鼠
 [0705] <220>
 [0706] <221> 位点
 [0707] <222>(1).. (259)
 [0708] <223> 小鼠抗人 CD37 SCFV
 [0709] <400>13
 [0710] Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 [0711] 1 5 10 15
 [0712] Gly Gly Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 [0713] 20 25 30
 [0714] Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn
 [0715] 35 40 45
 [0716] Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lya Gln Gly Lys Ser Pro
 [0717] 50 55 60
 [0718] Gln Leu Leu Val Ser Phe Ala Lya Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser
 [0719] 65 70 75 80
 [0720] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ila Sar
 [0721] 85 90 95
 [0722] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cya Gln His His Ser
 [0723] 100 105 110
 [0724] Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lya Gly
 [0725] 115 120 125
 [0726] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ala
 [0727] 130 135 140
 [0728] Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala Ser

[0729]	145	150	155	160
[0730]	Val Lys Ile Ser Cys Lys Ale Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn			
[0731]		165	170	175
[0732]	Met Asn Trp Vsl Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly			
[0733]		180	185	190
[0734]	Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lye			
[0735]		195	200	205
[0736]	Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met			
[0737]		210	215	220
[0738]	Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cya Ala			
[0739]		225	230	235
[0740]	Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr			
[0741]		245	250	255
[0742]	Val Ser Ser			
[0743]	<210>14			
[0744]	<211>272			
[0745]	<212>PRT			
[0746]	<213> 小鼠			
[0747]	<220>			
[0748]	<221> 位点			
[0749]	<222>(1).. (272)			
[0750]	<223> 小鼠抗人 CD22 SCFV			
[0751]	<400>14			
[0752]	Met Glu Ser His Ser Gln Vel Phe Leu Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser			
[0753]	1	5	10	15
[0754]	Gly Thr Cya Gly Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala			
[0755]		20	25	30
[0756]	Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Asn Cye Lye Ser Ser Gln Ser			
[0757]		35	40	45
[0758]	Val Pha Tyr Ser Ser Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln			
[0759]		50	55	60
[0760]	Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala ser Thr Arg			
[0761]		65	70	75
[0762]	Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp			
[0763]		85	90	95
[0764]	Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Hie Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr			
[0765]		100	105	110
[0766]	Tyr Cys His Gln Phe Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys			
[0767]		115	120	125

[0768] Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 [0769] 130 135 140
 [0770] Gly Gly Ser Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val
 [0771] 145 150 155 160
 [0772] Lys Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 [0773] 165 170 175
 [0774] Phe Thr Asn Tyr Trp Met Val Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Glu Gly
 [0775] 180 185 190
 [0776] Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Ile Pro Ser Asn Gly Arg Thr Lys Tyr
 [0777] 195 200 205
 [0778] Asn Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys ser ser
 [0779] 210 215 220
 [0780] Arg Thr Ala Tyr Mer Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala
 [0781] 225 230 235 240
 [0782] Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Mot Ser Ile Ile Thr Thr Val Leu Thr
 [0783] 245 250 255
 [0784] Pro Gly Leu Leu Thr Gly Ala Lya Gly Leu Trp Ser Leu Ser Leu Gln
 [0785] 260 265 270
 [0786] <210>15
 [0787] <211>499
 [0788] <212>PRT
 [0789] <213>人工序列
 [0790] <220>
 [0791] <223>小鼠-人杂交融合蛋白
 [0792] <220>
 [0793] <221>位点
 [0794] <222>(1)..(265)
 [0795] <223>小鼠抗人 CD20 SCFV, 2H7
 [0796] <220>
 [0797] <221>结构域
 [0798] <222>(266)..(499)
 [0799] <223>人 IgG1 野生型铰链区, Ch2, CH3 FC
 [0800] <400>15
 [0801] Met Asp Phe Gln Val Gln Ila Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 [0802] 1 5 10 15
 [0803] Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 [0804] 20 25 30
 [0805] Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 [0806] 35 40 45

[0807]	Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
[0808]	50 55 60
[0809]	Pro Lya Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
[0810]	65 70 75 80
[0811]	Ale Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
[0812]	85 90 95
[0813]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Aap Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
[0814]	100 105 110
[0815]	Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0816]	115 120 125
[0817]	Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser
[0818]	130 135 140
[0819]	Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
[0820]	145 150 155 160
[0821]	Ser Val Lye Met Ser Cya Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[0822]	165 170 175
[0823]	Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0824]	180 185 190
[0825]	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
[0826]	195 200 205
[0827]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0828]	210 215 220
[0829]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[0830]	225 230 235 240
[0831]	Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Aap Val Trp
[0832]	245 250 255
[0833]	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lye Ser Cys
[0834]	260 265 270
[0835]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[0836]	275 280 285
[0837]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[0838]	290 295 300
[0839]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Vel Asp Val Ser His
[0840]	305 310 315 320
[0841]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Aan Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[0842]	325 330 335
[0843]	His Aan Ala Lye Thr Lye Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[0844]	340 345 350
[0845]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

[0846]	355	360	365
[0847]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
[0848]	370	375	380
[0849]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[0850]	385	390	395
[0851]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
[0852]	405	410	415
[0853]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0854]	420	425	430
[0855]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0856]	435	440	445
[0857]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
[0858]	450	455	460
[0859]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[0860]	465	470	475
[0861]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[0862]	485	490	495
[0863]	Pro Gly Lys		
[0864]	<210>16		
[0865]	<211>499		
[0866]	<212>PRT		
[0867]	<213>人工序列		
[0868]	<220>		
[0869]	<223>小鼠-人杂交融合蛋白		
[0870]	<220>		
[0871]	<221>位点		
[0872]	<222>(1)..(265)		
[0873]	<223>靶向于人 CD20 的 2H7 SCFV		
[0874]	<220>		
[0875]	<221>结构域		
[0876]	<222>(265)..(499)		
[0877]	<223>突变为丝氨酸的铰链区半胱氨酸(氨基酸 272,278,281)		
[0878]	CH2 中突变为丝氨酸的脯氨酸(氨基酸 290)		
[0879]	<400>16		
[0880]	Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser		
[0881]	1	5	10
[0882]	Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile		
[0883]	20	25	30
[0884]	Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser		

[0885]	35	40	45
[0886]	Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser		
[0887]	50	55	60
[0888]	Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro		
[0889]	65	70	75
[0890]	Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile		
[0891]	85	90	95
[0892]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp		
[0893]	100	105	110
[0894]	Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
[0895]	115	120	125
[0896]	Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser		
[0897]	130	135	140
[0898]	Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Lau Val Arg Pro Gly Ala		
[0899]	145	150	155
[0900]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
[0901]	165	170	175
[0902]	Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0903]	180	165	190
[0904]	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0905]	195	200	205
[0906]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Sar Thr Ala Tyr		
[0907]	210	215	220
[0908]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
[0909]	225	230	235
[0910]	Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp		
[0911]	245	250	255
[0912]	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Vel Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser		
[0913]	260	265	270
[0914]	Aep Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
[0915]	275	280	285
[0916]	Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
[0917]	290	295	300
[0918]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
[0919]	305	310	315
[0920]	Glu Asp Pro Glu Val Lye Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
[0921]	325	330	335
[0922]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
[0923]	340	345	350

[0924] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Aep Trp leu Aan Gly
 [0925] 355 360 365
 [0926] Lys Glu Tyr Lys Cye Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 [0927] 370 375 380
 [0928] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 [0929] 385 390 395 400
 [0930] Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 [0931] 405 410 415
 [0932] Leu Thr Cys Leu Val Lye Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 [0933] 420 425 430
 [0934] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 [0935] 435 440 445
 [0936] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 [0937] 450 455 460
 [0938] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 [0939] 465 470 475 480
 [0940] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 [0941] 485 490 495
 [0942] Pro Gly Lys
 [0943] <210>17
 [0944] <211>499
 [0945] <212>PRT
 [0946] <213>人工序列
 [0947] <220>
 [0948] <223>小鼠-人杂交融合蛋白
 [0949] <220>
 [0950] <221>位点
 [0951] <222>(1)..(265)
 [0952] <223>小鼠抗人 CD20 SCFV ;2H7
 [0953] <220>
 [0954] <221>结构域
 [0955] <222>(266)..(499)
 [0956] <223>突变为丝氨酸的铰链区半胱氨酸(氨基酸 272,278,281)
 [0957] CH2 和 CH3 结构域的序列是野生型
 [0958] <400>17
 [0959] Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 [0960] 1 5 10 15
 [0961] Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 [0962] 20 25 30

[0963]	Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
[0964]	35 40 45
[0965]	Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
[0966]	50 55 60
[0967]	Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Aan Leu Ala Ser Gly Val Pro
[0968]	65 70 75 80
[0969]	Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
[0970]	85 90 95
[0971]	Ser Arg Vel Glu Ale Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
[0972]	100 105 110
[0973]	Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0974]	115 120 125
[0975]	Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser
[0976]	130 135 140
[0977]	Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
[0978]	145 150 155 160
[0979]	Ser Val Lya Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[0980]	165 170 175
[0981]	Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0982]	180 185 190
[0983]	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
[0984]	195 200 205
[0985]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Aep Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0986]	210 215 220
[0987]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cya
[0988]	225 230 235 240
[0989]	Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
[0990]	245 250 255
[0991]	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
[0992]	260 265 270
[0993]	Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[0994]	275 280 285
[0995]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[0996]	290 295 300
[0997]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cya Val Val Val Asp Val Ser His
[0998]	305 310 315 320
[0999]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Vel Asp Gly Vel Glu Val
[1000]	325 330 335
[1001]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

[1002]	340	345	350
[1003]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
[1004]	355	360	365
[1005]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
[1006]	370	375	380
[1007]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[1008]	385	390	400
[1009]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
[1010]	405	410	415
[1011]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[1012]	420	425	430
[1013]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[1014]	435	440	445
[1015]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
[1016]	450	455	460
[1017]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[1018]	465	470	480
[1019]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[1020]	485	490	495
[1021]	Pro Gly Lys		
[1022]	<210>18		
[1023]	<211>505		
[1024]	<212>PRT		
[1025]	<213>人工序列		
[1026]	<220>		
[1027]	<223>小鼠-人杂交融合蛋白		
[1028]	<220>		
[1029]	<221>位点		
[1030]	<222>(1)..(265)		
[1031]	<223>小鼠抗人 CD20 SCFV ;2H7		
[1032]	<220>		
[1033]	<221>结构域		
[1034]	<222>(266)..(288)		
[1035]	<223>野生型 2GA 铰链区		
[1036]	<220>		
[1037]	<221>结构域		
[1038]	<222>(289)..(505)		
[1039]	<223>人 IGG1 CH2 和 CH3 结构域,野生型序列		
[1040]	<400>18		

[1041] Met Aap phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 [1042] 1 5 10 15
 [1043] Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ilo Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 [1044] 20 25 30
 [1045] Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 [1046] 35 40 45
 [1047] Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 [1048] 50 55 60
 [1049] Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Lau Ala Ser Gly Val Pro
 [1050] 65 70 75 80
 [1051] Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ila
 [1052] 85 90 95
 [1053] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 [1054] 100 105 110
 [1055] Ser Phe Asn pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 [1056] 115 120 125
 [1057] Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser
 [1058] 130 135 140
 [1059] Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 [1060] 145 150 155 160
 [1061] Ser Vel Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [1062] 165 170 175
 [1063] Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [1064] 180 185 190
 [1065] Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Aan Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 [1066] 195 200 205
 [1067] Lys Gly Lys Als Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [1068] 210 215 220
 [1069] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu AsP Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 [1070] 225 230 235 240
 [1071] Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 [1072] 245 250 255
 [1073] Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Pro Val Pro Ser Thr
 [1074] 250 255 270
 [1075] Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys
 [1076] 275 280 285
 [1077] Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro pro Lya
 [1078] 290 295 300
 [1079] Pro Lys Aep Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

[1080]	305	310	315	320
[1081]	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
[1082]		325	330	335
[1083]	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
[1084]		340	345	350
[1085]	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
[1086]		355	360	365
[1087]	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
[1088]		370	375	380
[1089]	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
[1090]	385	390	395	400
[1091]	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu			
[1092]		405	410	415
[1093]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
[1094]		420	425	430
[1095]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
[1096]		435	440	445
[1097]	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
[1098]		450	455	460
[1099]	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
[1100]	465	470	475	480
[1101]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
[1102]		485	490	495
[1103]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[1104]		500	505	
[1105]	<210>19			
[1106]	<211>234			
[1107]	<212>PRT			
[1108]	<213> 人 (Homo sapiens)			
[1109]	<220>			
[1110]	<221> 结构域			
[1111]	<222>(1)..(234)			
[1112]	<223> 突变的 IGG1 铰链区 (氨基酸 7, 13, 16)			
[1113]	野生型 CH2 和 CH3 结构域			
[1114]	SCFVIG 融合蛋白的替代羧基末端			
[1115]	<400>19			
[1116]	Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser			
[1117]	1	5	10	15
[1118]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			

[1119]	20	25	30
[1120]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
[1121]	35	40	45
[1122]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Aep Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
[1123]	50	55	60
[1124]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
[1125]	65	70	75
[1126]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
[1127]	85	90	95
[1128]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lye Glu Tyr Lye Cys Lys Vel Sar Asn		
[1129]	100	105	110
[1130]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lya Ala Lys Gly		
[1131]	115	120	125
[1132]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
[1133]	130	135	140
[1134]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
[1135]	145	150	155
[1136]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
[1137]	165	170	175
[1138]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[1139]	180	185	190
[1140]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[1141]	195	200	205
[1142]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[1143]	210	215	220
[1144]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[1145]	225	230	
[1146]	<210>20		
[1147]	<211>240		
[1148]	<212>PRT		
[1149]	<213>人 (Homo sapiens)		
[1150]	<220>		
[1151]	<221>位点		
[1152]	<222>(1)..(23)		
[1153]	<223>SCFVIG 融合蛋白的替代羧基末端		
[1154]	<220>		
[1155]	<221>结构域		
[1156]	<222>(24)..(240)		
[1157]	<223>人 IGG1 野生型 CH2 和 CH3 FC		

- [1158] <400>20
- [1159] Asp Gln Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro
- [1160] 1 5 10 15
- [1161] Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
- [1162] 20 25 30
- [1163] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
- [1164] 35 40 45
- [1165] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
- [1166] 50 55 60
- [1167] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
- [1168] 65 70 75 80
- [1169] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
- [1170] 85 90 95
- [1171] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
- [1172] 100 105 110
- [1173] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ila Glu Lys Thr
- [1174] 115 120 125
- [1175] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
- [1176] 130 135 140
- [1177] Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
- [1178] 145 150 155 160
- [1179] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Aap Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
- [1180] 165 170 175
- [1181] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
- [1182] 180 185 190
- [1183] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
- [1184] 195 200 205
- [1185] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
- [1186] 210 215 220
- [1187] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
- [1188] 225 230 235 240
- [1189] <210>21
- [1190] <211>1470
- [1191] <212>DNA
- [1192] <213> 人工序列
- [1193] <220>
- [1194] <223> 小鼠 - 人杂交体
- [1195] <220>
- [1196] <221>misc_ 特征

[1197]	<222>(1).. (808)	
[1198]	<223> 小鼠抗人 CD20 SCFV	
[1199]	<220>	
[1200]	<221>misc_ 特征	
[1201]	<222>(814).. (1455)	
[1202]	<223> 人胞外域长型, CD154	
[1203]	<400>21	
[1204]	aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tctgctaata cagtgcctca	60
[1205]	gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct	120
[1206]	ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcaactgg	180
[1207]	taccagcaga agccaggatc ctccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct	240
[1208]	tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc	300
[1209]	agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca	360
[1210]	cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcgggtgt	420
[1211]	ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagctgggtg	480
[1212]	aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac	540
[1213]	aatatgcaact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat	600
[1214]	ccaggaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta	660
[1215]	gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagcagcc tgacatctga agactctgcg	720
[1216]	gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg	780
[1217]	ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat ccaagaaggt tggacaagat agaagatgaa	840
[1218]	aggaatcttc atgaagattt tgtattcatg aaaacgatac agagatgcaa cacaggagaa	900
[1219]	agatccttat ccttactgaa ctgtgaggag attaaaagcc agtttgaagg ctttgtgaag	960
[1220]	gatataatgt taaacaaaga ggagacgaag aaagaaaaca gctttgaaat gcaaaaaggt	1020
[1221]	gatcagaatc ctcaaattgc ggcacatgac ataagtgagg ccagcagtaa aacaacatct	1080
[1222]	gtgttacagt gggctgaaaa aggatactac accatgagca acaacttggc aaccctggaa	1140
[1223]	aatgggaaac agctgaccgt taaaagacaa ggactctatt atatctatgc ccaagtcacc	1200
[1224]	ttctgttcca atcgggaagc ttcgagtcaa gctccattta tagccagcct ctgcctaaag	1260
[1225]	tccccggta gattcgagag aatcttactc agagctgcaa ataccacag ttccgcaaaa	1320
[1226]	ccttgcgggc aacaatccat tcaactggga ggagtatttg aattgcaacc aggtgcttcg	1380
[1227]	gtgtttgtca atgtgactga tccaagccaa gtgagccatg gcaactggctt cacgtccttt	1440
[1228]	ggcttactca aactcgagtg ataactctaga	1470
[1229]	<210>22	
[1230]	<211>1290	
[1231]	<212>DNA	
[1232]	<213> 人工序列	
[1233]	<220>	
[1234]	<223> 小鼠 - 人杂交体	
[1235]	<220>	

[1236]	<221>misc_ 特征	
[1237]	<222>(13).. (808)	
[1238]	<223> 小鼠抗人 CD20 SCFV	
[1239]	<220>	
[1240]	<221>misc_ 特征	
[1241]	<222>(814).. (1275)	
[1242]	<223> 人胞外域,短型, CD154	
[1243]	<400>22	
[1244]	aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tctgctaata cagtgcctca	60
[1245]	gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct	120
[1246]	ccaggggaga aggtcacaaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg	180
[1247]	taccagcaga agccaggatc ctccccaaa ccctggattt atgcccate caacctggct	240
[1248]	tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc	300
[1249]	agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaacca	360
[1250]	cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcgggtgt	420
[1251]	ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctgggag taggctgggt	480
[1252]	aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac	540
[1253]	aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatztat	600
[1254]	ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagtccaagg gcaaggccac actgactgta	660
[1255]	gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctccagcagcc tgacatctga agactctgag	720
[1256]	gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg	780
[1257]	ggcacaggga ccacggteec cgtctctgat ccagaaeaca gctttgaeet gcaaaaeggt	840
[1258]	gatcagaatc ctcaaattgc ggcacatgct ataagtgagg ccagcagtaa aacaacatct	900
[1259]	gtgttacagt gggctgaaaa aggatactac accatgagca acaacttggg aaccctggaa	960
[1260]	aatgggaaac agctgaccgt taaaagacaa ggactctatt atatctatgc ccaagtcacc	1020
[1261]	ttctgttcca atcgggaagc ttcgagtcaa gctccattta tagccagcct ctgcctaaag	1080
[1262]	tccccggta gattcgagag aatcttactc agagctgcaa atacccacag ttccgccaaa	1140
[1263]	ccttgcgggc aacaatccat tcaactggga ggagtatttg aattgcaacc aggtgcttcg	1200
[1264]	gtgtttgtca atgtgactga tccaagccaa gtgagccatg gcaactggctt cacgtccttt	1260
[1265]	ggcttactca aactcgagtg ataactctaga	1290
[1266]	<210>23	
[1267]	<211>43	
[1268]	<212>DNA	
[1269]	<213> 人工序列	
[1270]	<220>	
[1271]	<223> 寡核苷酸	
[1272]	<400>23	
[1273]	gtcaagcttg ccgcatgga ttttcaagtg cagatttttcagc	43
[1274]	<210>24	

[1275]	<211>74	
[1276]	<212>DNA	
[1277]	<213> 人工序列	
[1278]	<220>	
[1279]	<223> 寡核苷酸	
[1280]	<400>24	
[1281]	gtcgtcgagc tcccacctcc tccagatcca ccaccgcccc agccaccgcc acctttcagc	60
[1282]	tccagcttgg tccc	74
[1283]	<210>25	
[1284]	<211>37	
[1285]	<212>DNA	
[1286]	<213> 人工序列	
[1287]	<220>	
[1288]	<223> 寡核苷酸	
[1289]	<400>25	
[1290]	gctgctgagc tctcaggctt atctacagca agtctgg	37
[1291]	<210>26	
[1292]	<211>32	
[1293]	<212>DNA	
[1294]	<213> 人工序列	
[1295]	<220>	
[1296]	<223> 寡核苷酸	
[1297]	<400>26	
[1298]	gttgtctgat cagagacggt gaccgtggtc cc	32
[1299]	<210>27	
[1300]	<211>34	
[1301]	<212>DNA	
[1302]	<213> 人工序列	
[1303]	<220>	
[1304]	<223> 寡核苷酸	
[1305]	<400>27	
[1306]	gttgtcggat ccagaaaaca gctttgaaat gcaa	34
[1307]	<210>28	
[1308]	<211>44	
[1309]	<212>DNA	
[1310]	<213> 人工序列	
[1311]	<220>	
[1312]	<223> 寡核苷酸	
[1313]	<400>28	

[1314]	gttgtttctagattatcact cgagtttgag taagccaaag gacg	44
[1315]	<210>29	
[1316]	<211>35	
[1317]	<212>DNA	
[1318]	<213> 人工序列	
[1319]	<220>	
[1320]	<223> 寡核苷酸	
[1321]	<400>29	
[1322]	gttgtcggat ccaagaaggt tggacaagat agaag	35
[1323]	<210>30	
[1324]	<211>23	
[1325]	<212>DNA	
[1326]	<213> 人工序列	
[1327]	<220>	
[1328]	<223> 寡核苷酸	
[1329]	<400>30	
[1330]	gtctatataa gcagagctct ggc	23
[1331]	<210>31	
[1332]	<211>25	
[1333]	<212>DNA	
[1334]	<213> 人工序列	
[1335]	<220>	
[1336]	<223> 寡核苷酸	
[1337]	<400>31	
[1338]	cgaggctgat cagcgagctc tegca	25
[1339]	<210>32	
[1340]	<211>25	
[1341]	<212>DNA	
[1342]	<213> 人工序列	
[1343]	<220>	
[1344]	<223> 寡核苷酸	
[1345]	<400>32	
[1346]	ccgcaatttg aggattctga tcacc	25
[1347]	<210>33	
[1348]	<211>482	
[1349]	<212>PRT	
[1350]	<213> 人工序列	
[1351]	<220>	
[1352]	<223> 小鼠 - 人杂交融合蛋白	

[1353] <220>
 [1354] <221> 位点
 [1355] <222>(1)..(266)
 [1356] <223> 小鼠抗人 CD20 SCFV
 [1357] <220>
 [1358] <221> 结构域
 [1359] <222>(268)..(481)
 [1360] <223> 细胞外域,长型,人 CD154
 [1361] <400>33
 [1362] Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 [1363] 1 5 10 15
 [1364] Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 [1365] 20 25 30
 [1366] Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 [1367] 35 40 45
 [1368] Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 [1369] 50 55 60
 [1370] Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 [1371] 65 70 75 80
 [1372] Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 [1373] 85 90 95
 [1374] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 [1375] 100 105 110
 [1376] Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 [1377] 115 120 125
 [1378] Aap Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
 [1379] 130 135 140
 [1380] Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 [1381] 145 150 155 160
 [1382] Ser Val Lye Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [1383] 165 170 175
 [1384] Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ila
 [1385] 180 185 190
 [1386] Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 [1387] 195 200 205
 [1388] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Set Thr Ala Tyr
 [1389] 210 215 220
 [1390] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Set Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 [1391] 225 230 235 240

[1392]	Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
[1393]	245 250 255
[1394]	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Pro Arg Arg Leu Asp Lys
[1395]	260 265 270
[1396]	Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val Phe Met Lys Thr
[1397]	275 280 285
[1398]	Ile Gln Arg Cys Aan Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys
[1399]	290 295 300
[1400]	Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys Asp Ile Met Leu
[1401]	305 310 315 320
[1402]	Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu Met Gln Lys Gly
[1403]	325 330 335
[1404]	Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser
[1405]	340 345 350
[1406]	Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met
[1407]	355 360 365
[1408]	Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys
[1409]	370 375 380
[1410]	Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn
[1411]	385 390 395 400
[1412]	Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys
[1413]	405 410 415
[1414]	Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His
[1415]	420 425 430
[1416]	Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val
[1417]	435 440 445
[1418]	Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro
[1419]	450 455 460
[1420]	Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys
[1421]	465 470 475 480
[1422]	Leu Glu
[1423]	<210>34
[1424]	<211>422
[1425]	<212>PRT
[1426]	<213>人工序列
[1427]	<220>
[1428]	<223>小鼠-人杂交融合蛋白
[1429]	<220>
[1430]	<221>位点

[1431] <222>(1).. (266)
 [1432] <223> 小鼠抗人 ScFv
 [1433] <220>
 [1434] <221> 结构域
 [1435] <222>(268).. (421)
 [1436] <223> 细胞外域,短型,人 CD154
 [1437] <400>34
 [1438] Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 [1439] 1 5 10 15
 [1440] Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 [1441] 20 25 30
 [1442] Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu LyS Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 [1443] 35 40 45
 [1444] Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 [1445] 50 55 60
 [1446] Pro Lya Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 [1447] 65 70 75 80
 [1448] Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 [1449] 85 90 95
 [1450] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 [1451] 100 105 110
 [1452] Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ale Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 [1453] 115 120 125
 [1454] Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
 [1455] 130 135 140
 [1456] Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 [1457] 145 150 155 160
 [1458] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [1459] 165 170 175
 [1460] Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [1461] 180 185 190
 [1462] Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 [1463] 195 200 205
 [1464] Lys Gly Lya Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [1465] 210 215 220
 [1466] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 [1467] 225 230 235 240
 [1468] Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 [1469] 245 250 255

[1470]	Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Pro Glu Asn Ser Phe Glu	
[1471]	260	265 270
[1472]	Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser	
[1473]	275	280 285
[1474]	Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly	
[1475]	290	295 300
[1476]	Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Glu	
[1477]	305	310 315 320
[1478]	Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr	
[1479]	325	330 335
[1480]	Phe CyS Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser	
[1481]	340	345 350
[1482]	Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala	
[1483]	355	360 365
[1484]	Ala Aan Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile Hie	
[1485]	370	375 380
[1486]	Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Pha Val Asn	
[1487]	385	390 395 400
[1488]	Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser Hia Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe	
[1489]	405	410 415
[1490]	Gly Leu Leu Lys Leu Glu	
[1491]	420	
[1492]	<210>35	
[1493]	<211>63	
[1494]	<212>DNA	
[1495]	<213> 人 (Homo sapien)	
[1496]	<220>	
[1497]	<221>N_ 区	
[1498]	<222>(1).. (63)	
[1499]	<223> 只含 1 个半胱氨酸的人 IGA 铰链区的部分	
[1500]	<400>35	
[1501]	ccagttcct caactccacc taccatct cctcaact cactaccc atctcctca	60
[1502]	tgc	63
[1503]	<210>36	
[1504]	<211>21	
[1505]	<212>PRT	
[1506]	<213> 人 (Homo sapien)	
[1507]	<400>36	
[1508]	Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr	

[1509]	1	5	10	15			
[1510]	Pro Ser Pro Ser Cya						
[1511]	20						
[1512]	<210>37						
[1513]	<211>763						
[1514]	<212>DNA						
[1515]	<213>人 (Homo sapien)						
[1516]	<220>						
[1517]	<221>misc_ 特征						
[1518]	<222>(1).. (6)						
[1519]	<223>融合于氨基末端 SCFVS 的 BCL1 位点						
[1520]	<220>						
[1521]	<221>N_ 区						
[1522]	<222>(8).. (752)						
[1523]	<223>野生型 ICA 铰链区, CH2, CH3 结构域						
[1524]	截短以去除分泌成分连接						
[1525]	<400>37						
[1526]	tgatcagcca	gttcacctca	ctccacctac	cccatctccc	tcaactccac	ctaccccatc	60
[1527]	tccctcatgc	tgccaccccc	gactgtcact	gcaccgaccg	gccctcgagg	acctgctctt	120
[1528]	aggttcagaa	gcgacctca	cgtgcacact	gaccggcctg	agagatgcct	caggtgtcac	180
[1529]	cttcacctgg	acgccctcaa	gtgggaagag	cgctgttcaa	ggaccacctg	accgtgacct	240
[1530]	ctgtggctgc	tacagcgtgt	ccagtgtcct	gccgggctgt	gccgagccat	ggaacctatg	300
[1531]	gaagaccttc	acttgcaactg	ctgcctacc	cgagtccaag	accccgctaa	ccgccaccct	360
[1532]	ctcaaatcc	gaaacacat	tccggcccga	ggtccacctg	ctgccgccgc	cgctcgagga	420
[1533]	gctggccctg	aacgagctgg	tgacgtgac	gtgcctggca	cgtggcttca	gccccaaagga	480
[1534]	tgtgctggtt	cgctggctgc	aggggtcaca	ggagctgccc	cgcgagaagt	acctgacttg	540
[1535]	ggtatcccgg	caggagccca	gccagggcac	caccaccttc	gctgtgacca	gcatactgcg	600
[1536]	cggtggcagc	gaggactgga	agaaggggga	caccttctcc	tgcatggtgg	gccacgaggc	660
[1537]	cctgccgctg	gccttcacac	agaagacct	cgaccgcttg	gcgggtaaac	ccacctatgt	720
[1538]	caatgtgtct	gttgtcatgg	cggaggtgga	ctgataatct	aga		763
[1539]	<210>38						
[1540]	<211>250						
[1541]	<212>PRT						
[1542]	<213>人 (Homo sapien)						
[1543]	<220>						
[1544]	<221>结构域						
[1545]	<222>(3).. (250)						
[1546]	<223>截短的形式, 去除介导与分泌成分连接的最后三个氨基酸						
[1547]	<400> 38						

2H7scFv-Ig cDNA 和推测的氨基酸序列:

```

HindIII      NcoI      2H7 VL 前导肽 →
-----
1  AAGCTTGCCG CC  ATGGATTT TCAAGTCAG ATTTCAGCT TCCTGCTAAT CAGTGCTTCA
      M D F Q V Q I F S F L L I S A S

      2H7 VL →
61  V I I A R G Q I V L S Q S P A I L S A S
    GTCATAATG CCAGAGGACA AATTGTTCTC TCCAGTCTC CAGCAATCCT GTCTGCATCT

    P G E K V T M T C R A S S S V S Y M H W
121  CCAGGGGAGA AGGTCACAAT GACTGTCAGG GCCAGTCAA GTGTAAGTTA CATGCACTGG

      BamHI
      -----
181  Y Q Q K P G S S P K P W I Y A P S N L A
    TACCAGCAGA AGCCAGGATC CTCCCCAAA CCCTGGATTT ATGCCCATC CAACCTGGCT

    S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I
241  TCTGGAGTCC CTGCTCGCTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CCTCTTACTC TCTCACAATC

    S R V E A E D A A T Y Y C Q Q W S F N P
301  AGCAGAGTGG AGGCTGAAGA TGCTGCCACT TATTACTGCC AGCAGTGGAG TTTAAACCCA

      (Gly4Ser)3 接头
361  P T F G A G T K L E L K G G G G S G G G
    CCCACGTTCTG GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAAGGTG GCGGTGGCTC GGC CGGTGGI

      2H7 VH →
421  G S G G G G S S Q A Y L Q Q S G N E L V
    GGATCTGGAG GAGGTGGGAG CTCTCAGGCT TATCTACAGC AGTCTGGGGC TGAGCTGGTG

    R P G A S V K M S C K A S G Y T E T S Y
481  AGGCCTGGGG CCTCAGTGAA GATGTCTGTC AAGGCTTCTG GCTACACATT TACCAGTTAC

    N M H W V K Q T P R Q G L E W I C A I Y
541  AATATGCACT GGGTAAAGCA GACACCTAGA CAGGGCCTGG AATGGATTGG ACCTATTAT

    P G N G D T S Y N Q K F K G K A T L T V
601  CCAGGAAATG GTGATACTTC CTACAATCAG AAGTTCAAGG GCAAGGCCAC ACTGACTGTA

    D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A
661  GACAAATCCT CCAGCACAGC CTACATGCAG CTCAGCAGCC TGACATCTGA AGACTCTGCG

    V Y F C A R V V Y Y S N S Y W Y F D V W
721  GTCTATTTCT GTGCAAGAGT GGTGACTAT AGTAACTCTT ACTGGTACTT CGATGTCTGG
  
```

图 1A

BclI
 ~~~~~ 人 IgG1 Fc 结构域 →

781 G T G T T V T V S D Q E P K S C D K T H  
 GGCACAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGAT CAGGAGCCCA AATCTTGTGA CAAAACCTCAC

841 T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P  
 ACATGCCAC CGTGCCAGC ACCTGAATC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC

901 P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V  
 CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTACATG CGTGGTGGTG

961 D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V  
 GACGTGAGCC ACGAAGACC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG

1021 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S  
 CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC

1081 V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S  
 GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC

1141 N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R  
 AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACAATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA

1201 E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S  
 GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCATCC CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTGAGC

1261 L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N  
 CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT

1321 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F  
 GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCAGC CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC

1381 F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S  
 TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTGA

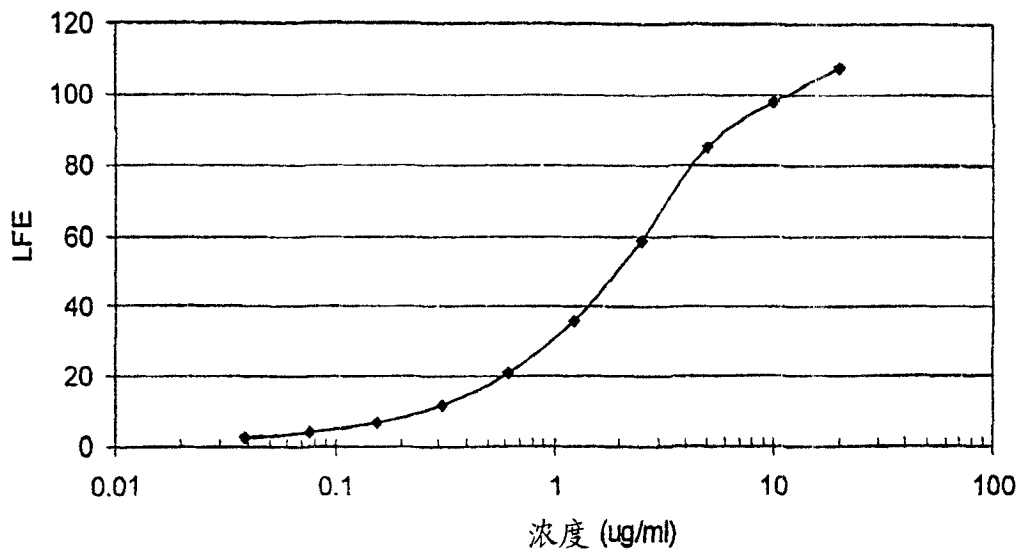
1441 C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S  
 TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACAGCG AGAAGAGCCT CTCCTGTCT

XbaI  
 ~~~~~

1501 P G K * S R
 CCGGGTAAAT GATCTAGA

图 1B

2H7scFvlg 标准曲线



克隆	LFE @ 1:50	估计浓度 (ug/ml)
D2	26.1	56
IIIC6	25.7	55
IVA3	28.6	61
Spent bulk	29.6	64

图 2

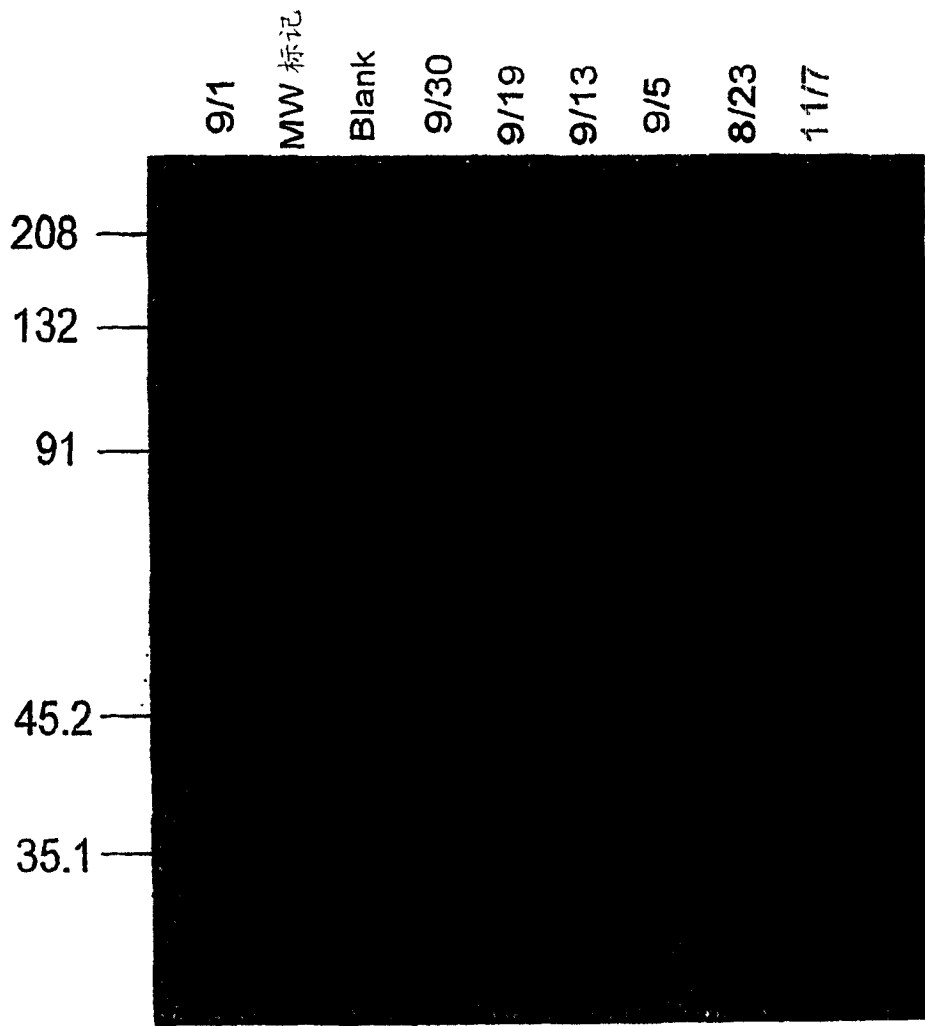


图 3

靶向于CD20的2H7衍生物结合后的补体介导的B细胞杀灭

2H7scFv-Ig Concentration	RAMOS	BJAB
20 µg/ml + 补体	0.16	0.07
5 µg/ml + 补体	0.2	N.D.
1.25 µg/ml + 补体	0.32	0.1
单独的补体	0.98	0.94

*通过台盼蓝排斥测定存活率, 并且计算为存活细胞占计数的细胞总数的比例

**N.D. (未测定)

图 4A

2H7scFv-Ig介导的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)

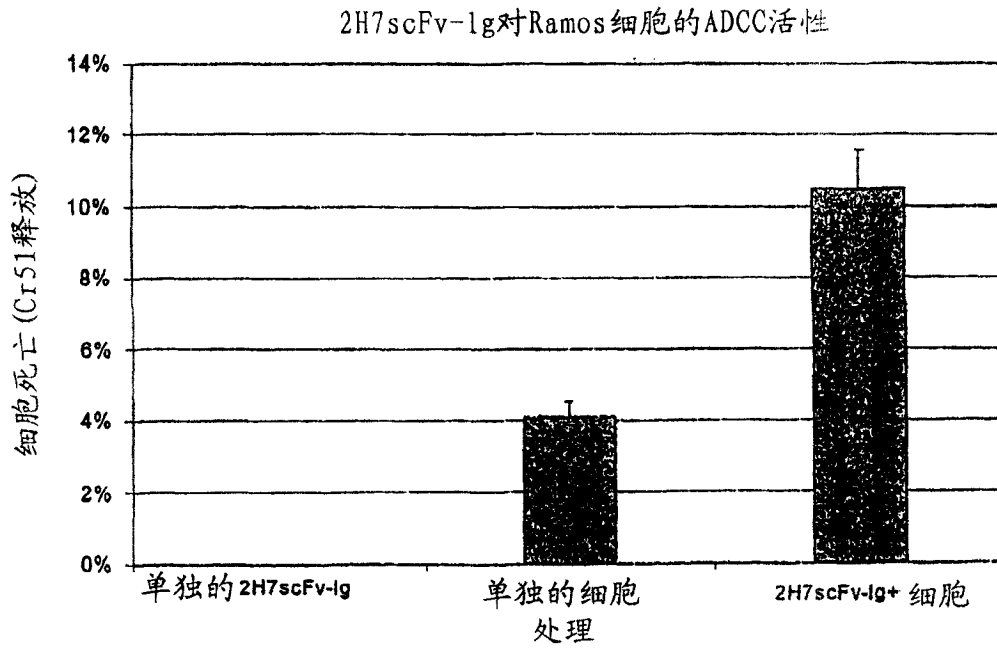


图 4B

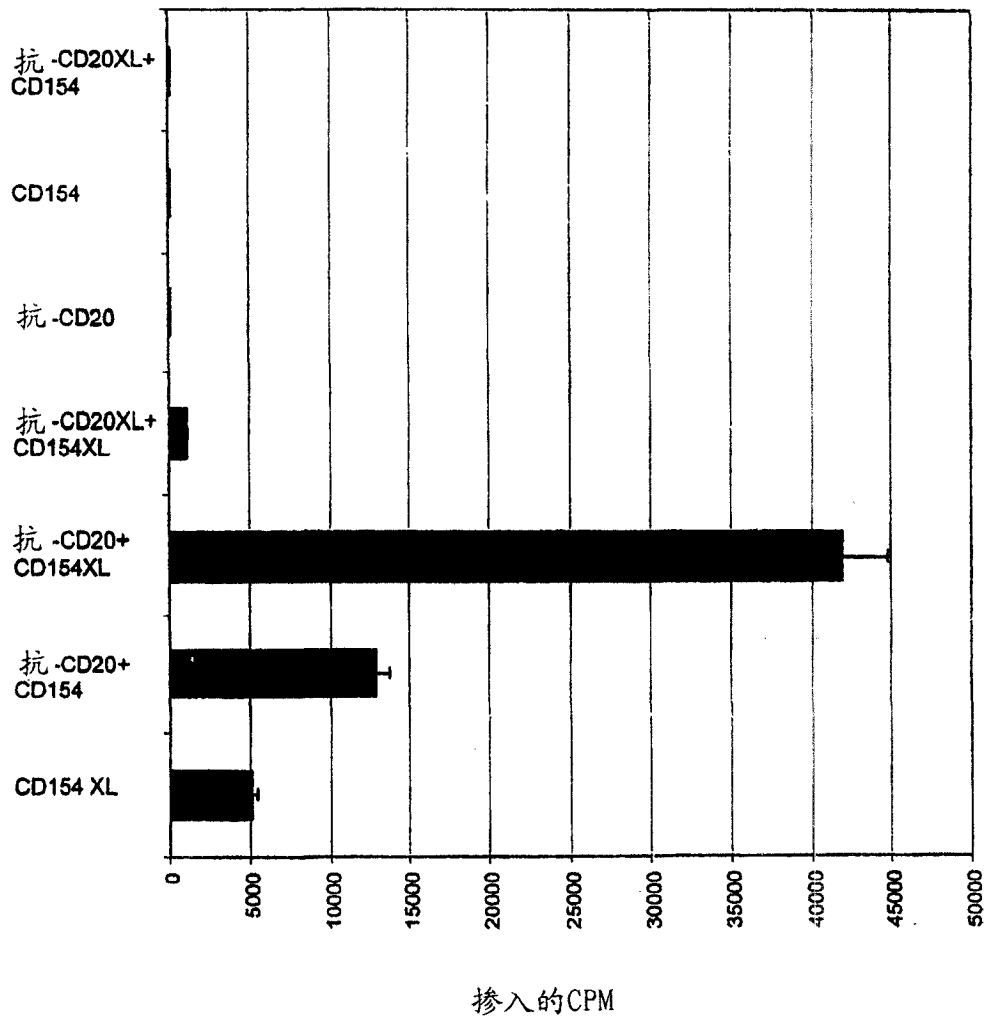


图 5

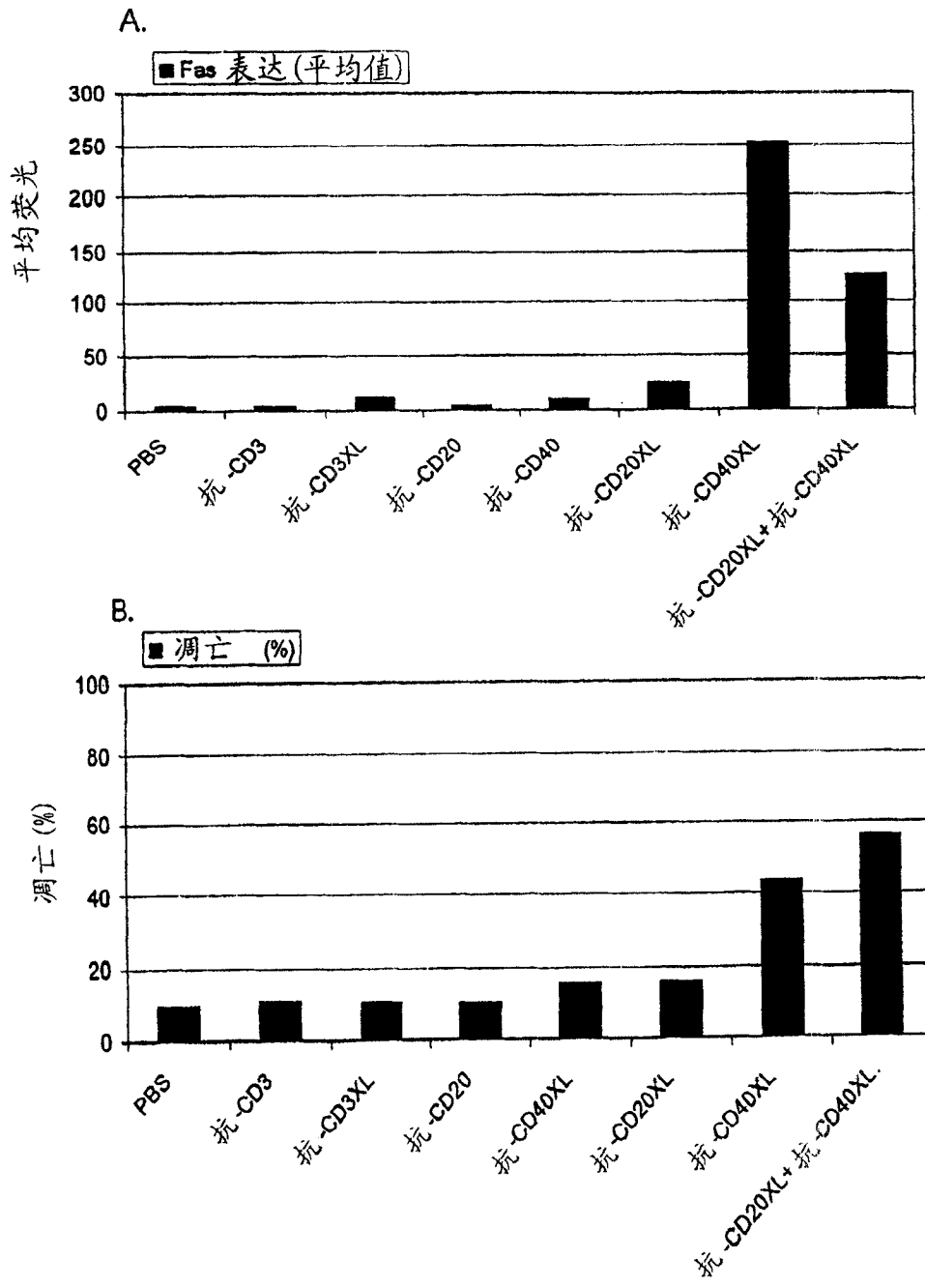


图 6A和6B

2H7-CD154 L2 cDNA 和推测的氨基酸序列:

```

HindIII      NcoI  2H7 VL  前导肽  →
~~~~~      ~~~~~
1  AAGCTTGCCG CC  ATGGATT TCAAGTGCAG ATTTTCAGCT TCCTGCTAAT CAGTGCTTCA
                                M D F Q V Q I F S F L L I S A S

                                2H7 VL →
61  V I I A R G Q I V L S Q S P A I L S A S
    GTCATAATTG CCAGAGGACA AATTGTCTC TCCAGTCTC CAGCAATCCT GTCTGCATCT
121  P G E K V T M T C R A S S S V S Y M H W
    CCAGGGGAGA AGGTCACAAT GACTTGCAAG GCCAGCTCAA GTGTAAGTTA CATGCACTGG

                                BamHI
                                ~~~~~
181  Y Q Q K P G S S P K P W I Y A P S N L A
    TACCAGCAGA AGCCAGGATC CTCCCCAAA CCCTGGATT TATGCCCCATC CAACCTGGCT
241  S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I
    TCTGGAGTCC CTGCTCGCTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CCTCTACTC TCTCACAATC
301  S R V E A E D A A T Y Y C Q Q W S F N P
    AGCAGAGTGG AGGCTGAAGA TGCTGCCACT TATTACTGCC AGCAGTGGAG TTTTAACCCA

                                (Gly4Ser)3 接头 →
361  P T F G A G T K L E L K G G G G S G G G
    CCCACGTTTC GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAAGGTG GCGGTGGCTC GGGCGGTGGT

                                2H7 VH →
421  G S G G G G S S Q A Y L Q Q S G A E L V
    GGATCTGGAG GAGGTGGGAG CTCTCAGGCT TATCTACAGC AGTCTGGGGC TGAGCTGGTG
481  R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y
    AGGCCTGGGG CCTCAGTCAA GATGTCCTGC AAGGCTTCTG GCTACACATT TACCAGTTAC
541  N M H W V K Q T P R Q G L E W I G A I Y
    AATATGCACT GGGTAAAGCA GACACCTAGA CAGGGCCTGG AATGGATTGG AGCTATTTAT
601  P G N G D T S Y N Q K F K G K A T L T V
    CCAGGAAATG GTGATACTTC CTACAATCAG AAGTTCAAGG GCAAGGCCAC ACTGACTGTA
661  D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A
    GACAAATCCT CCAGCACAGC CTACATGCAG CTCAGCAGCC TGACATCTGA AGACTCTGGC
721  V Y F C A R V V Y Y S N S Y W Y F D V W
    GTCTATTTCT GTGCAAGAGT GGTGTACTAT AGTAACTCTT ACTGGTACTT CGATGTCTGG

```

图 7A

人CD154/氨基酸 48→

Bcl/Bam 杂交位点

781 G T G T T V T V S D P R R L D K I E D E
GGCACAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGAT CCAAGAAGGT TGGACAAGAT AGAAGATGAA

841 R N L H E D F V F M K T I Q R C N T G E
AGGAATCTTC ATGAAGATT TGTATTTCATG AAAACGATAC AGAGATGCAA CACAGGAGAA

901 R S L S L L N C E E I K S Q F E G F V K
AGATCCTTAT CCTTACTGAA CTGTGAGGAG ATTAAGAGCC AGTTTGAAGG CTTTGTGAAG

BclI

961 D I M L N K E E T K K E N S F E M Q K G
GATATAATGT TAAACAAAGA GGAGACGAAG AAAGAAAACA GCTTTGAAAT GCAAAAAGGT

BclI
~~~~~

1021 D Q N P Q I A A H V I S E A S S K T T S  
GATCAGAATC CTCAAATTGC GGCACATGTC ATAAGTGAGG CCAGCAGTAA AACAACTCT

1081 V L Q W A E K G Y Y T M S N N L V T L E  
GTGTTACAGT GGGCTGAAA AGGATACTAC ACCATGAGCA ACAACTGGT AACCCCTGGAA

1141 N G K Q L T V K R Q G L Y Y I Y A Q V T  
AATGGGAAAC AGCTGACCCT TAAAAGACAA GGACTCTATT ATATCTATGC CCAAGTCACC

HindIII  
~~~~~

1201 F C S N R E A S S Q A P F I A S L C L K
TTCTGTTCCA ATCGGGAAGC TTCGAGTCAA GCTCCATTA TAGCCAGCCT CTGCCTAAG

1261 S P G R F E R I L L R A A N T H S S A K
TCCCCGGTA GATTGAGAG AATCTTACTC AGAGCTGCAA ATACCCACAG TTCGCGCAA

1321 P C G Q Q S I H L G G V F E L Q P G A S
CCTTGCGGGC AACAAATCCAT TCACTTGGGA GGAGTATTG AATTGCAACC AGGTGCTTCG

NcoI
~~~~~

1381 V F V N V T D P S Q V S H G T G F T S F  
GTGTTTGTCA ATGTGACTGA TCCAAGCCAA GTGAGCCATG GCACTGGCTT CACGTCCTTT

XhoI                      XbaI  
~~~~~                      ~~~~~

1441 G L L K L E * * S R
GGCTTACTCA AACTCGAGTG ATAATCTAGA

图 7B

2H7scFv-CD154 S4 cDNA 和推测的氨基酸序列:

```

HindIII      NcoI
-----2H7 VL 前导肽 →
      M D F Q V Q I F S F L L I S A S
1  AAGCTTGCCG CC  ATGGATT TCAAGTGCAG ATTTTCAGCT TCCTGCTAAT CAGTGCTTCA

      2H7 VL →
      V I I A R G Q I V L S Q S P A I L S A S
61 GTCATAATTG CCAGAGGACA AATGTTCTC TCCCAGTCTC CAGCAATCCT GTCTGCATCT

      P G E K V T M T C R A S S S V S Y M H W
121 CCAGGGGAGA AGGTCACAAT GACTTGCAGG GCCAGCTCAA GTGTAAGTTA CATGCACTGG

      BamHI
      ~~~~~
      Y Q Q K P G S S P K P W I Y A P S N L A
181 TACCAGCAGA AGCCAGGATC CTCCCCAAA CCCTGGATT ATGCCCATC CAACCTGGCT

      S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I
241 TCTGGAGTCC CTGCTCGCTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CCTCTACTC TCTACAATC

      S R V E A E D A A T Y Y C Q Q W S F N P
301 AGCAGAGTGG AGGCTGAAGA TGCTGCCACT TATTACTGCC AGCAGTGGAG TTTTAACCCA

      (Gly4Ser)3 接头 →
      P T F G A G T K L E L K G G G S G G G
361 CCCACGTTG GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAAGGTG GCGGTGGCTC GGGCGGTGGT

      2H7 VH →
      G S G G G G S S Q A Y L Q Q S G A E L V
421 GGATCTGGAG GAGGTGGGAG CTCTCAGGCT TATCTACAGC AGTCTGGGGC TGAGCTGGTG

      R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y
481 AGGCCTGGGG CCTCAGTGAA GATGTCCTGC AAGGCTTCTG GCTACACATT TACCAGTTAC

      N M H W V K Q T P R Q G L E W I G A I Y
541 AATATGCACT GGTAAAGCA GACACCTAGA CAGGGCCTGG AATGGATTGG AGCTATTTAT

      P G N G D T S Y N Q K F K G K A T L T V
601 CCAGGAAATG GTGATACTTC CTACAATCAG AAGTCAAGG GCAAGGCCAC ACTGACTGTA

      D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A
661 GACAAATCCT CCAGCACAGC CTACATGCAG CTCAGCAGCC TGACATCTGA AGACTCTGGC

      V Y F C A R V V Y Y S N S Y W Y F D V W
721 GTCTATTCT GTGCAAGAGT GGTGTACTAT AGTAACTCTT ACTGGTACTT CGATGTCTGG

```

图 7C

人 CD154/ 氨基酸 108 →

BclI/Bam 杂交位点 BclI

781 G T G T T V T V S D P E N S F E M Q K G
GGCACAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGAT CCAGAAAACA GCTTTGAAAT GCAAAAAGGT

BclI
~~~~~

841 D Q N P Q I A A H V I S E A S S K T T S  
GATCAGAATC CTCAAATTGC GGCACATGTC ATAAGTGAGG CCAGCAGTAA AACAACTCT

901 V L Q W A E K G Y Y T M S N N L V T L E  
GTGTTACAGT GGGCTGAAA AGGATACTAC ACCATGAGCA ACAACTGGT AACCCTGAA

961 N G K Q L T V K R Q G L Y Y I Y A Q V T  
AATGGGAAAC AGCTGACCGT TAAAAGACAA GGACTCTATT ATATCTATGC CCAAGTCACC

HindIII  
~~~~~

1021 F C S N R E A S S Q A P F I A S L C L K
TTCTGTTCCA ATCGGGAAGC TTCGAGTCAA GCTCCATTTA TAGCCAGCCT CTGCCTAAAG

1081 S P G R F E R I L L R A A N T H S S A K
TCCCCGGTA GATTCGAGAG AATCTTACTC AGAGCTGCAA ATACCCACAG TTCGCCAAA

1141 P C G Q Q S I H L G G V F E L Q P G A S
CCTTGCGGGC AACATCCAT TCACTTGGGA GGAGTATTTG AATTGCAACC AGGTGCTTCG

NcoI
~~~~~

1201 V F V N V T D P S Q V S H G T G F T S F  
GTGTTTGTC AATGTGACTGA TCCAAGCCAA GTGAGCCATG GCACTGGCTT CACGTCCTTT

XhoI XbaI  
~~~~~

1261 G L L K L E * * S R
GGCTTACTCA AACTCGAGTG ATAATCTAGA

图 7D

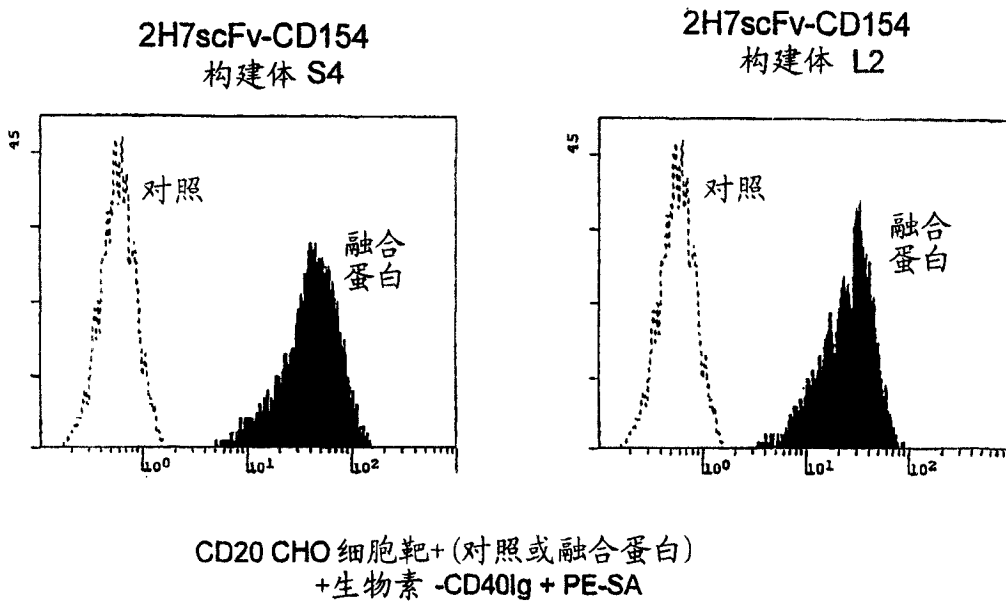
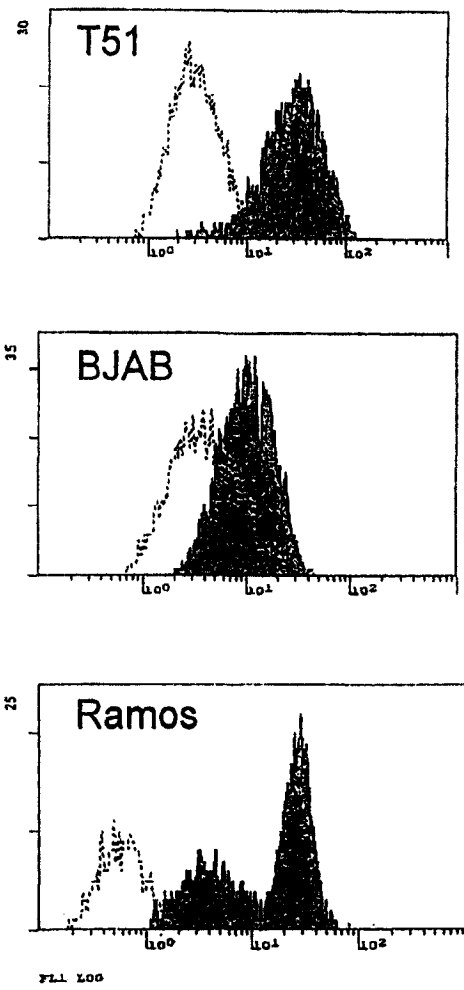


图 8



..... 对照上清液 _____ 2H7scFv-CD154 上清液

图 9

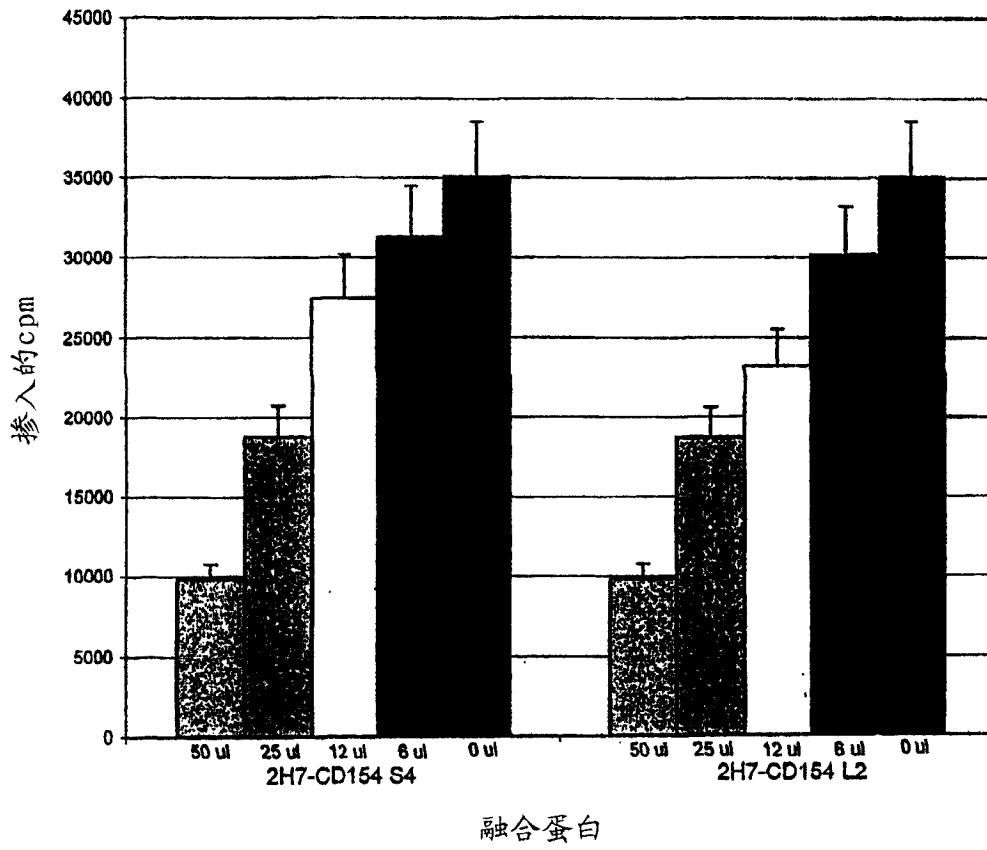


图 10

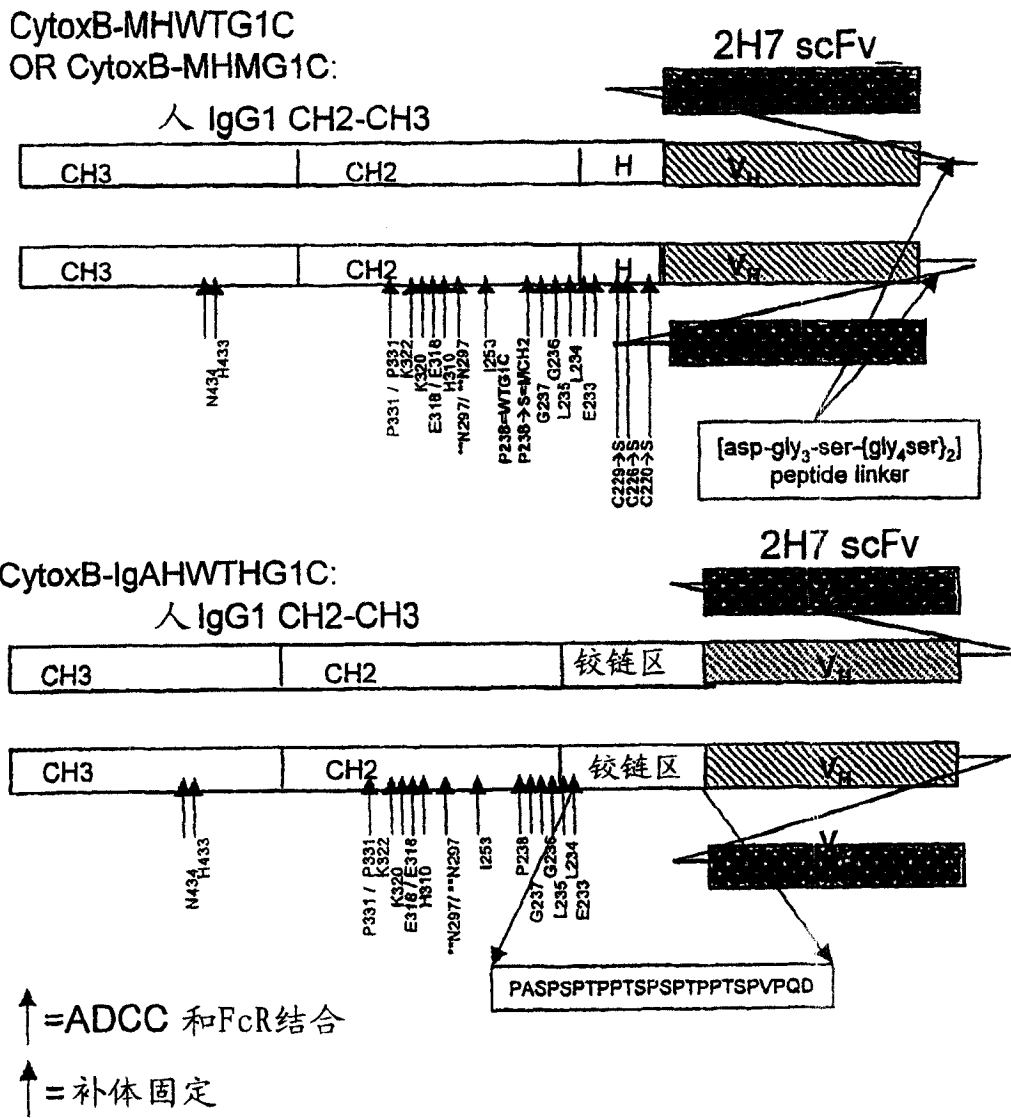


图 11

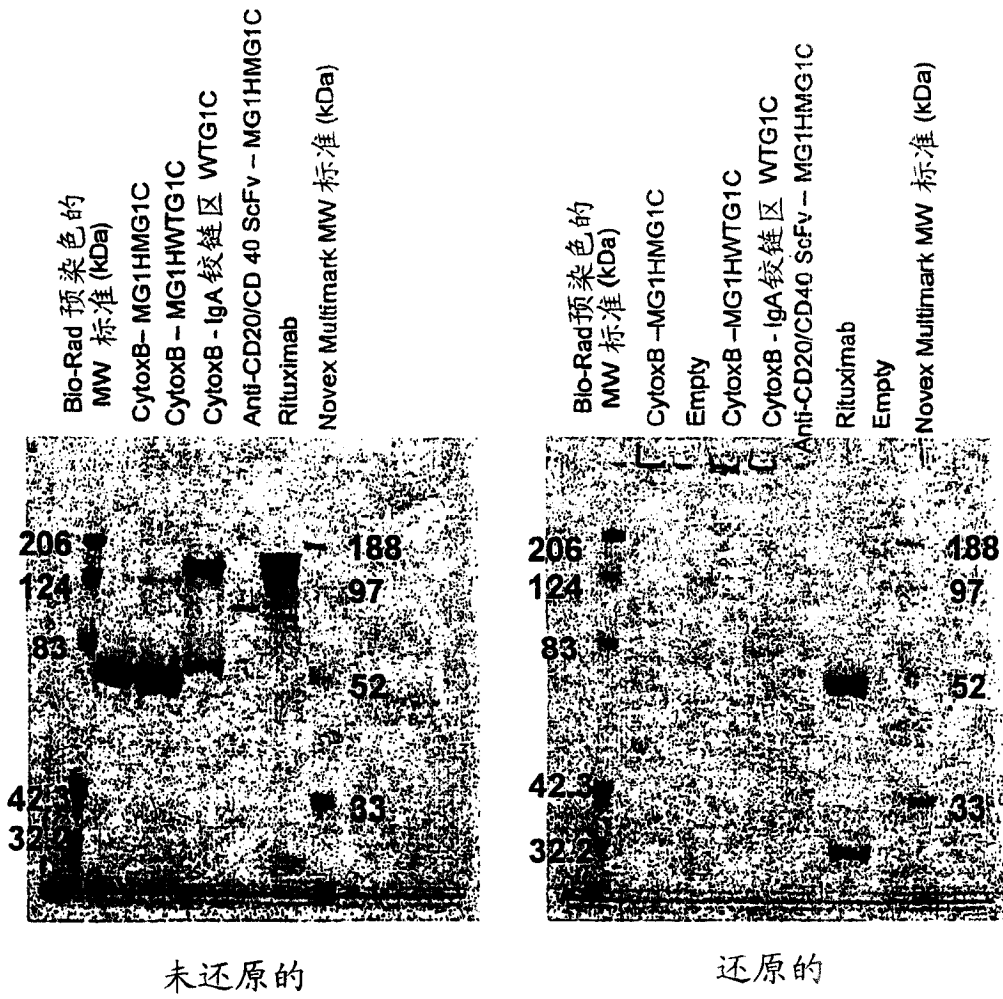


图 12

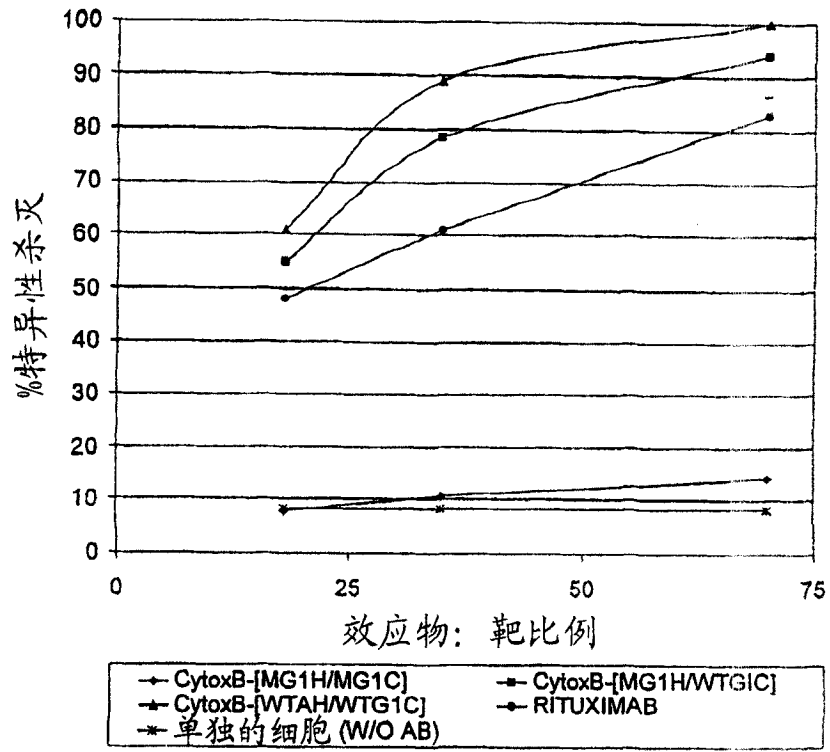


图 13

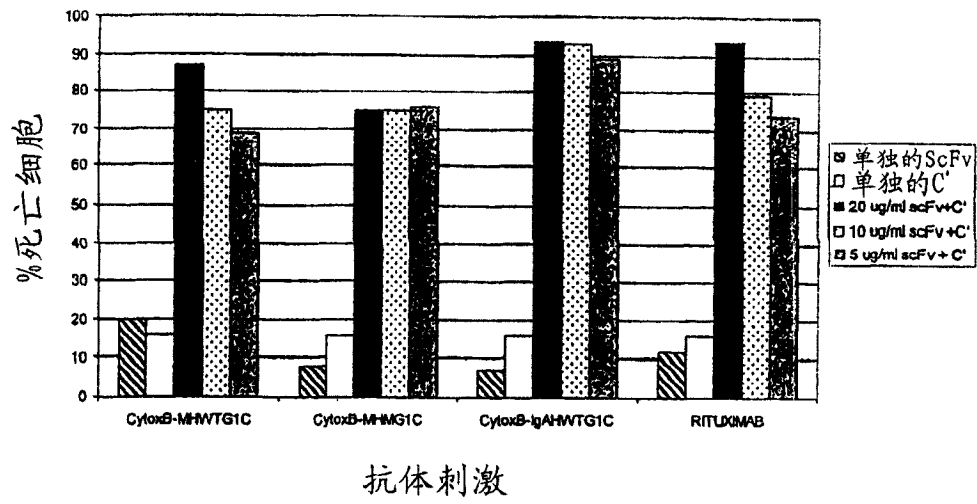
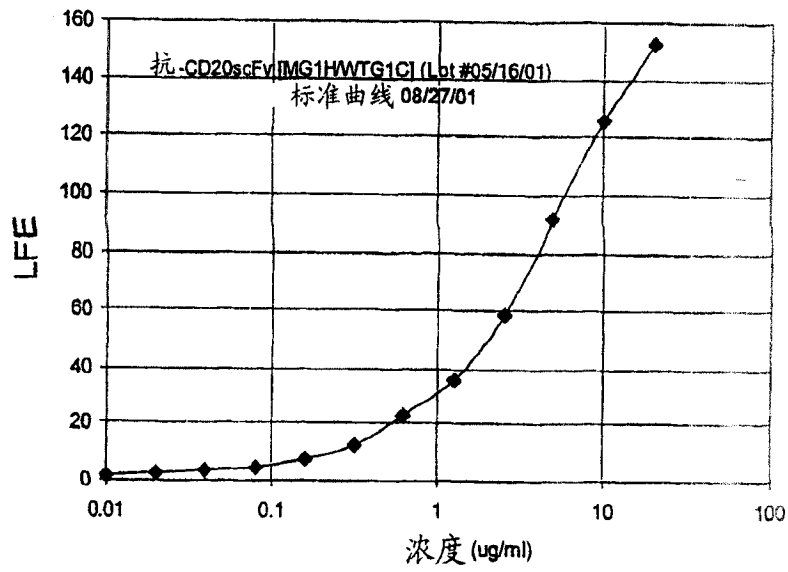


图 14



| 天数 | 猴 J99231 | | 猴 K99334 | |
|---------|-----------|------------|-----------|------------|
| | LFE(1:40) | 浓度 (ug/mL) | LFE(1:40) | 浓度 (ug/mL) |
| 注射 → -7 | 2.41 | <0.6ug/mL | 1.51 | <0.4ug/mL |
| 0 | 2.22 | <0.6ug/mL | 1.63 | <0.4ug/mL |
| 注射 → 1 | 73.8 | 220ug/mL | 44.4 | 100ug/mL |
| 3 | 20.0 | 28ug/mL | 40.2 | 80ug/mL |
| 7 | 15.6 | 24ug/mL | 15.7 | 24ug/mL |
| 8 | 39.1 | 80ug/mL | 42.6 | 92ug/mL |
| 10 | 11.5 | 18ug/mL | 2.74 | 1.2ug/mL |
| 14 | 2.05 | 0.6mg/mL | 1.96 | 0.6ug/mL |

图 15

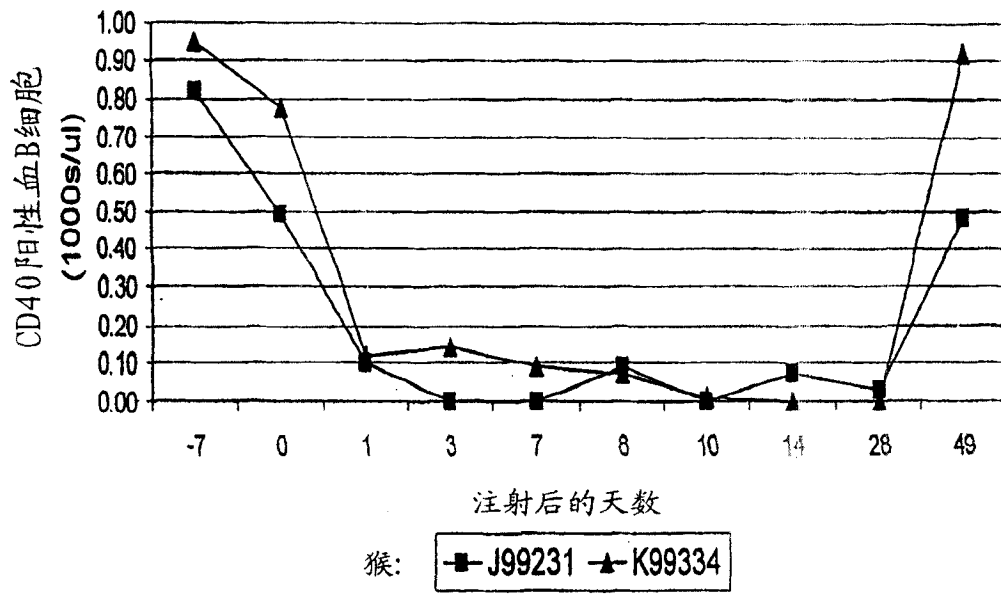
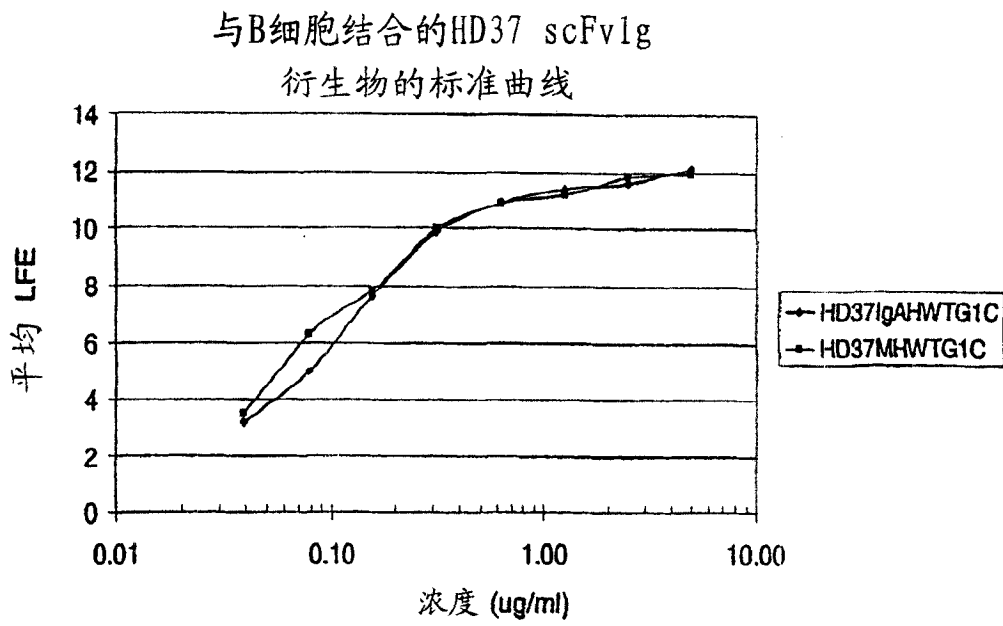


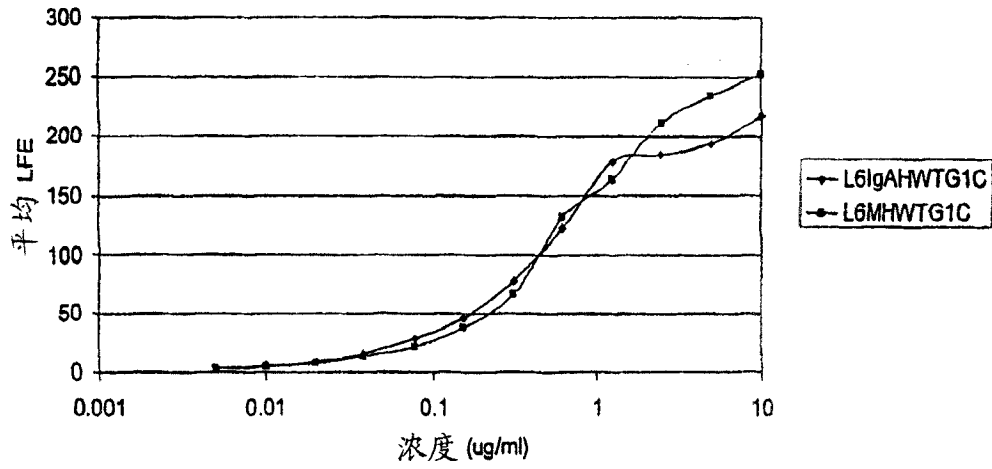
图 16



| 克隆/分离物 | 1:100的平均LFE | 估计浓度 |
|----------------|-------------|------------|
| Bulk IgAHWTG1C | 11.2 | > 60 ug/ml |
| 1B2 | 10.4 | >50 ug/ml |
| 6C5 | 10.5 | >50 ug/ml |
| 4B1 | 8.6 | >40 ug/ml |
| Bulk MHWTG1C | 10.9 | > 50 ug/ml |
| 2G8 | 10.6 | > 50 ug/ml |
| 3F3 | 8.3 | >40 ug/ml |
| 3D9 | 11.1 | > 60 ug/ml |

图 17

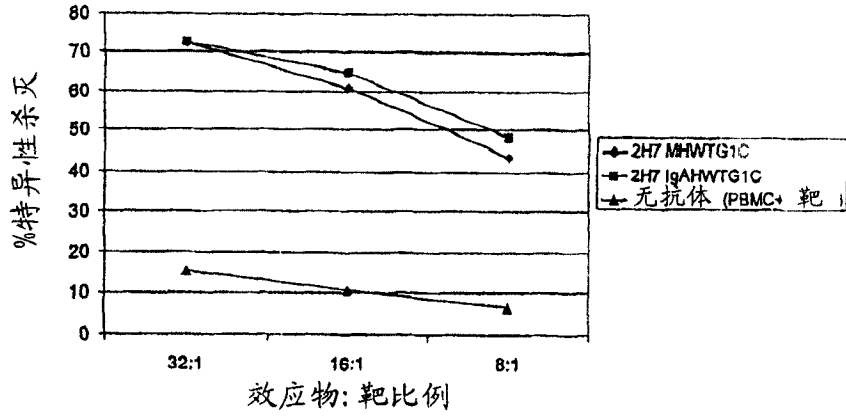
L6 scFvlg 标准曲线



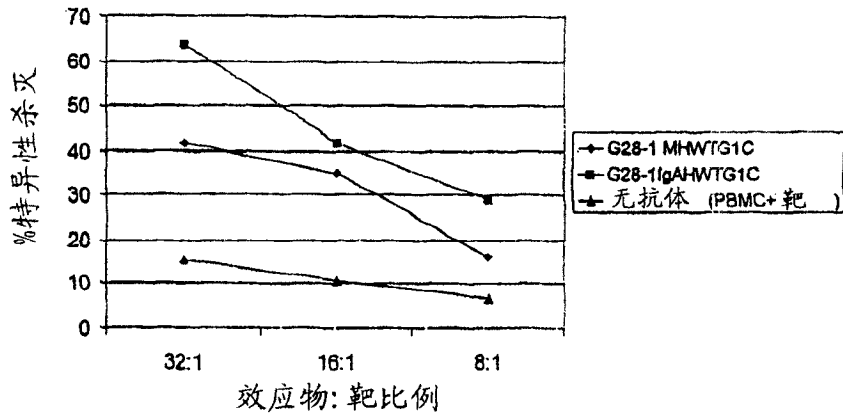
| 构建体 | 平均 LFE 1:20 | 估计浓度 |
|------------------------------|-------------|------------|
| L6IgAHWTG1C
未扩增的 CHO sup | 51.1 | 6.25 ug/ml |
| L6IgGMHWTG1C
未扩增的 CHO sup | 23.0 | 3.2 ug/ml |

图 18

A. 2H7 (抗-CD20) scFv 衍生物



B. G28-1 (抗-CD37) scFv 衍生物



C. HD37 (抗-CD19) scFv 衍生物

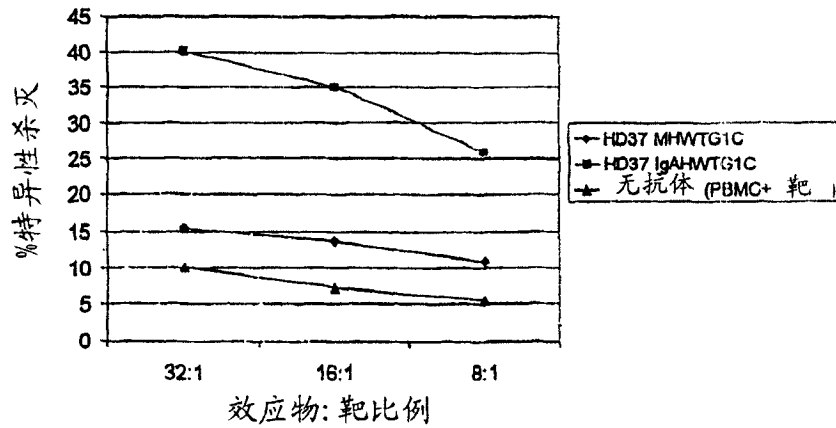


图 19

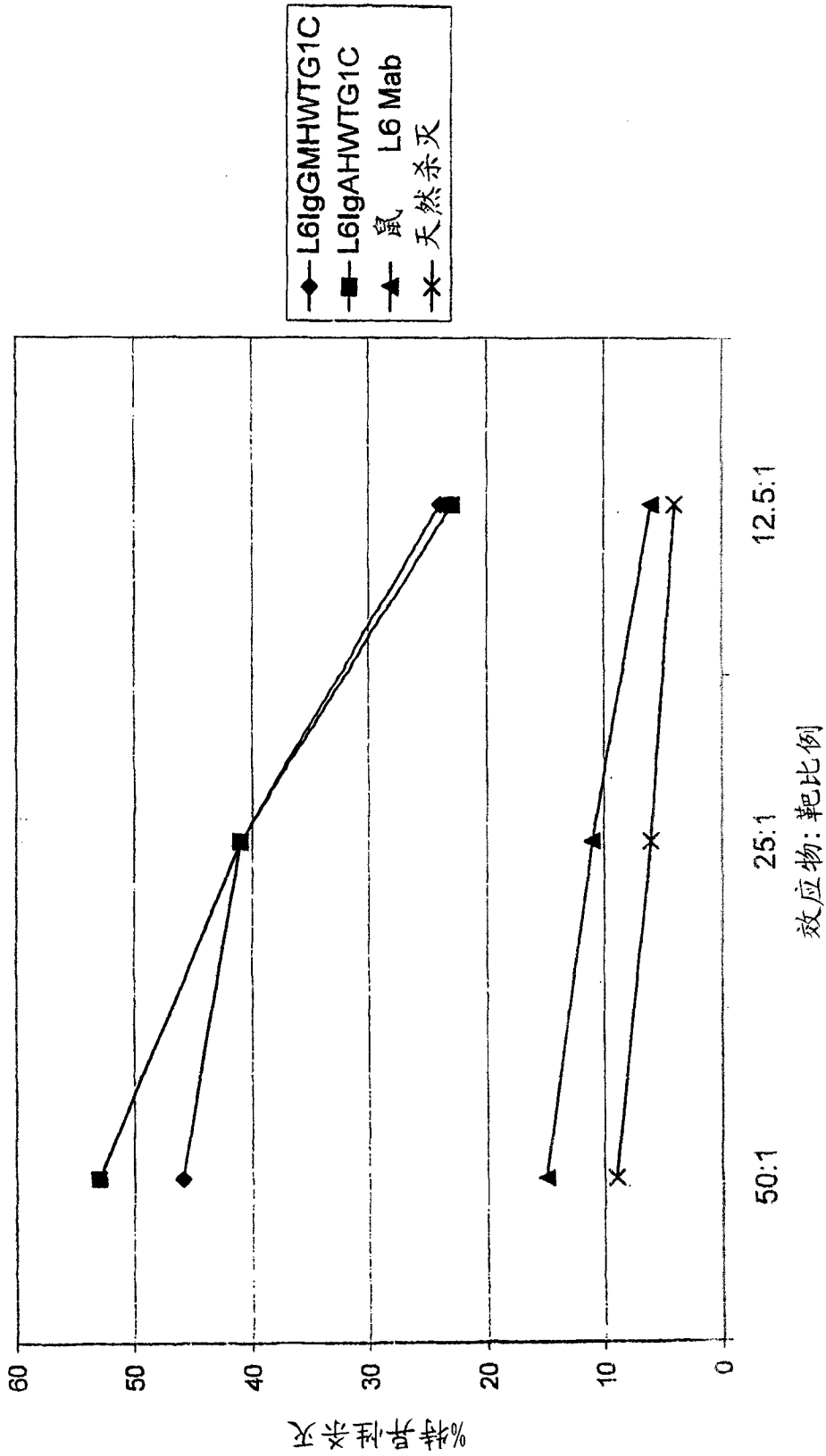


图 20

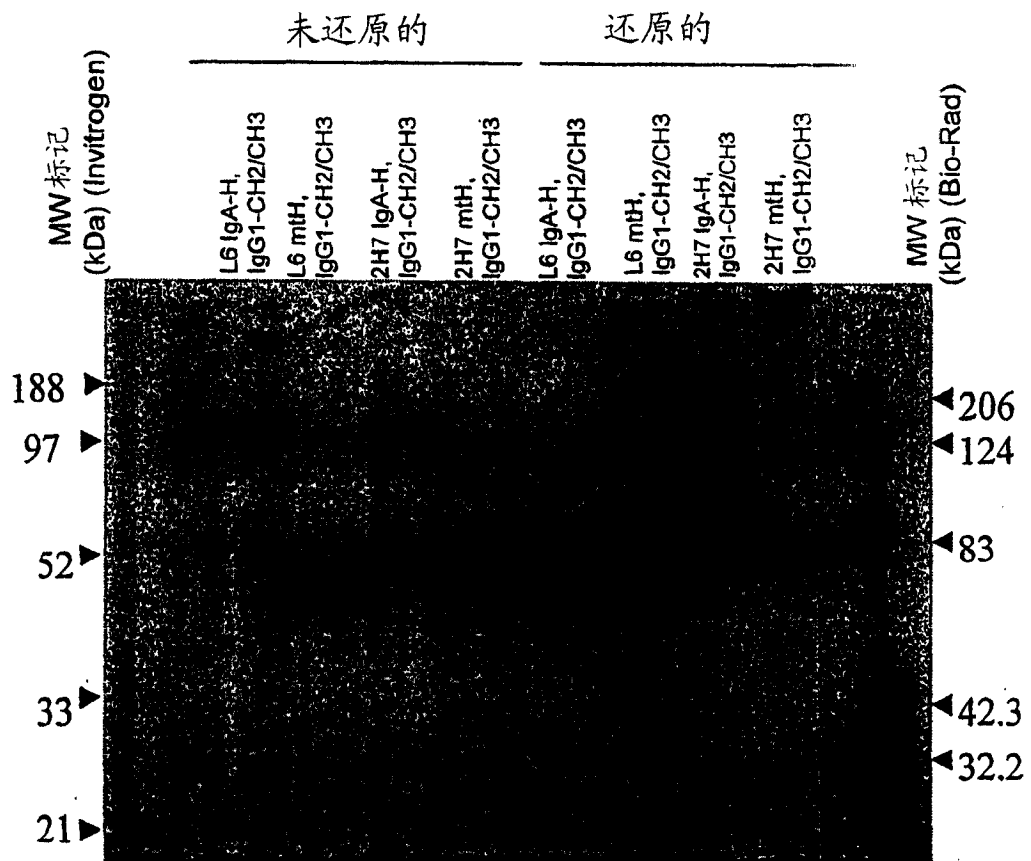


图 21

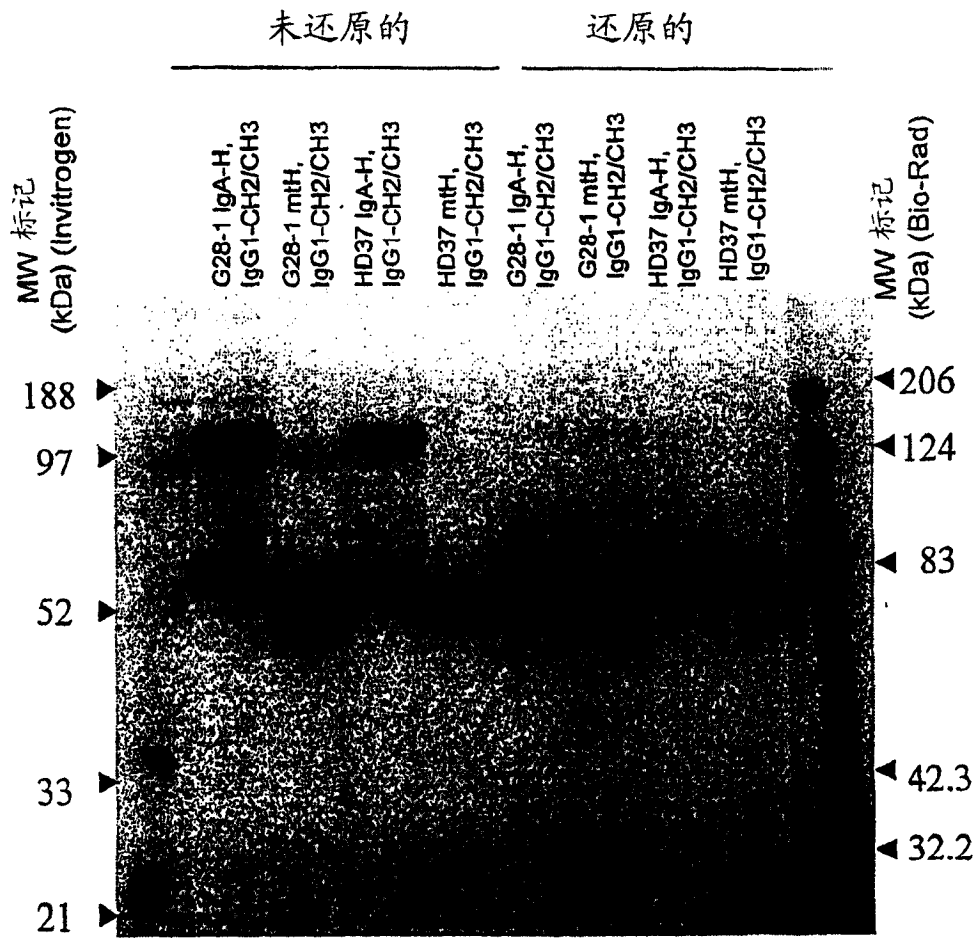


图 22