

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580011496.1

[43] 公开日 2007年4月4日

[11] 公开号 CN 1942203A

[22] 申请日 2005.5.12

[21] 申请号 200580011496.1

[30] 优先权

[32] 2004. 6. 4 [33] US [31] 60/577,303

[86] 国际申请 PCT/US2005/016695 2005.5.12

[87] 国际公布 WO2005/121797 英 2005.12.22

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.16

[71] 申请人 金克克国际有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 Y·陈

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司  
代理人 赵蓉民 路小龙

权利要求书 4 页 说明书 19 页 附图 4 页

[54] 发明名称

使用抗体重链的筛选方法

[57] 摘要

本发明涉及一种筛选方法，包括抗体重链和报告基因，分别如骆驼抗体和  $\beta$ -内酰胺酶。

```

1   TPFVSEKQLAE VVANITPFLM KAQSVPGMAV AVIYQKPHY YTPGKADIAA
51  NKFTVPQTLF ELGSIKTFPT GVLGGDAIAR GEISLDDAVT RYWFQITGKQ
101 WQGIKMLDLA TYTAGGLPLQ VPDEVTDNAS LLRFYQNWQP QNKPGTTRLY
151 ANASIGLFGA LAVKPSGMPY EQAMTTRVLK PLKLDHTWIN VPKAEAHYA
201 WGYRDKAVR VSGMLDAQA YGVKTNVODM ANWVMANMAP ENVADASLKQ
251 GIALAQSRVW RIGSMYQSLG WEMLNWPVEA NTVVETSFGN VALALPVAE
301 VNPPAPPVKA SWVHKTGSTG GFGSYVAFIP EKQIGIVMLA NTSYFNPARV
351 EAYHILLEAL Q

```

1. 鉴定至少一种抗原或抗原结合物的方法，包括：
  - i) 免疫骆驼科动物；
  - ii) 从所述被免疫的骆驼科动物分离出至少一种  $V_HH$  基因；
  - iii) 将所述至少一种  $V_HH$  基因与报告基因融合，从而产生至少一种融合基因；
  - iv) 将所述至少一种融合基因转化进一个物种，所述物种允许分泌来自所述至少一种融合基因的至少一种融合蛋白；
  - v) 将所述至少一种该融合蛋白与至少一种靶一起温育，和；
  - vi) 鉴定所述至少一种抗原或抗原结合物。
2. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中所述骆驼科动物包括骆驼或美洲驼。
3. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中免疫是用完整细胞、细胞膜碎片或对感兴趣的抗原具有特异性的肽进行的。
4. 根据权利要求 3 中所述的方法，其中所述感兴趣的抗原包括 CEA、Muc-1、Tag72、 $\alpha V\beta 3$  或  $\alpha V\beta 5$ 。
5. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中免疫是用肿瘤提取物进行的。
6. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中所述至少一种  $V_HH$  基因是用 RT-PCR 被分离的。
7. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中所述物种是大肠杆菌 (E.Coli)。
8. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中所述至少一种抗原或抗原结合物是通过测定所述融合蛋白的活性被鉴定的。

9. 根据权利要求 8 中所述的方法，其中所述报告基因是 BLA。
10. 根据权利要求 9 中所述的方法，其中活性是通过头孢硝噻吩试验被确定的。
11. 根据权利要求 10 中所述的方法，其中结合情况是用 FACS、ELISA 或 IHC 被测定的。
12. 根据权利要求 11 中所述的方法，其中结合情况是用 FACS 被测定的。
13. 一种抗原或抗原结合物，所述抗原或抗原结合物是通过一种方法分离的，所述方法包括：
- i) 免疫骆驼科动物；
  - ii) 从所述被免疫的骆驼科动物分离出至少一种  $V_HH$  基因；
  - iii) 将所述至少一种  $V_HH$  基因与报告基因融合，从而产生至少一种融合基因；
  - iv) 将所述至少一种融合基因转化进一个物种，所述物种允许分泌来自所述至少一种融合基因的至少一种融合蛋白；
  - v) 将所述至少一种融合蛋白与至少一种靶一起温育，和；
  - vi) 鉴定所述至少一种分离抗原或抗原结合物。
14. 根据权利要求 13 中所述的抗原或抗原结合物，其中所述抗原是 CEA、Muc-1、Tag72、 $\alpha V\beta 3$  或  $\alpha V\beta 5$ 。
15. 根据权利要求 13 中所述的方法，其中免疫是用肿瘤提取物进行的。
16. 根据权利要求 13 中所述的方法，其中所述至少一种  $V_HH$  基因是用 RT-PCR 被分离的。

17. 根据权利要求 13 中所述的方法，其中所述至少一种抗原或抗原结合物是通过测定所述融合蛋白的活性被鉴定的。

18. 根据权利要求 17 中所述的方法，其中所述报告基因是 BLA。

19. 根据权利要求 18 中所述的方法，其中活性是通过头孢硝噻吩试验被确定的。

20. 根据权利要求 13 中所述的方法，其中结合情况是用 FACS、ELISA 或 IHC 被测定的。

21. 根据权利要求 20 中所述的方法，其中结合情况是用 FACS 被测定的。

22. 对靶上的抗原数量进行定量的方法，包括：

- i) 免疫骆驼科动物；
- ii) 从所述被免疫的骆驼科动物分离出至少一种  $V_HH$  基因；
- iii) 将所述至少一种  $V_HH$  基因与报告基因融合，从而产生至少一种融合基因；
- iv) 将所述至少一种融合基因转化进一个物种，所述物种允许分泌来自所述至少一种融合基因的至少一种融合蛋白；
- v) 将所述至少一种融合蛋白与至少一种靶一起温育；
- vi) 测量所述至少一种靶与所述至少一种融合蛋白之间的结合情况；和
- vii) 对抗原数量进行定量。

23. 根据权利要求 22 中所述的方法，其中免疫是用完整细胞、细胞膜碎片或对感兴趣的抗原具有特异性的肽进行的。

24. 根据权利要求 22 中所述的方法，其中所述至少一种抗原或抗原结合物是通过测定所述融合蛋白活性被鉴定的。

25. 根据权利要求 22 中所述的方法，其中所述报告基因是 BLA。

26. 根据权利要求 25 中所述的方法，其中活性是通过头孢硝噻吩试验被确定的。

27. 根据权利要求 22 中所述的方法，其中结合情况是用 FACS 被测定的。

28. 测定亲合力的方法，包括：

- i) 免疫骆驼科动物；
- ii) 从所述被免疫的骆驼科动物分离出至少一种  $V_HH$  基因；
- iii) 将所述至少一种  $V_HH$  基因与报告基因融合，从而产生至少一种融合基因；
- iv) 将所述至少一种融合基因转化进一个物种，所述物种允许分泌来自所述至少一种融合基因的至少一种融合蛋白；
- v) 将所述至少一种融合蛋白与至少一种靶一起温育；  
测量所述至少一种靶与所述至少一种融合蛋白之间的亲和力。

## 使用抗体重链的筛选方法

### 技术领域

【0001】本发明涉及一种筛选方法，包括抗体重链和报告基因，分别如骆驼抗体和 $\beta$ -内酰胺酶，以及该方法在诊断和治疗方面的应用。

### 背景技术

【0002】肿瘤抗原的鉴定是一个费时费力的过程。经典方法包括用肿瘤细胞或肿瘤提取物免疫小鼠或其它啮齿动物。然后将这些小鼠的 B 细胞与特定的肿瘤细胞融合从而产生无限增殖化的 B 细胞杂交瘤，这些杂交瘤将单克隆抗体分泌到培养物上清中。这些抗体的结合特异性可组合多种方法加以确认，包括蛋白质印迹、FACS（荧光激活细胞分选术）和免疫组织化学。

【0003】不过，这种方法的一个严重缺陷就是产生杂交瘤时的低效率，这通常会导致抗原特异性抗体的损失，尤其是在使用复合抗原（complex antigen）时。更新的方法已被用来避免这一问题，即通过 RT-PCR 克隆抗体基因并在其它宿主细胞中表达重组抗体蛋白。但是，重链与轻链间的原始配对构型可能在克隆过程中被打乱。因此，需要筛选大量更多的克隆以覆盖原抗体的所有组成成分（例如，为了覆盖 100 种不同 B 细胞所编码的多样性，需要筛选 >10,000 个克隆）。

【0004】传统的方法通常不稳定且费时。

### 发明概述

【0005】在第一方面，本发明被描述为鉴定至少一种抗原或抗原结合物的方法，包括：

- i) 免疫骆驼科动物；
- ii) 从该被免疫的骆驼科动物分离至少一种  $V_HH$  基因；
- iii) 将至少一种  $V_HH$  基因与报告基因融合，从而产生至少一种融合基因；

- iv) 将至少一种融合基因转化进一个物种 (species), 该物种允许分泌来自至少一种融合基因的至少一种融合蛋白;
- v) 将至少一种融合蛋白与至少一种靶一起温育, 且;
- vi) 鉴定至少一种抗原或抗原结合物。

**【0006】** 在第二方面, 本发明被描述为至少一种被分离的抗原或抗原结合物, 该抗原或抗原结合物是用一种方法分离的, 该方法包括:

- i) 免疫骆驼科动物;
- ii) 从该被免疫的骆驼科动物分离至少一种  $V_{\text{H}}\text{H}$  基因;
- iii) 将至少一种  $V_{\text{H}}\text{H}$  基因与报告基因融合, 从而产生至少一种融合基因;
- iv) 将至少一种融合基因转化进一个物种, 该物种允许分泌来自至少一种该融合基因的至少一种融合蛋白;
- v) 将至少一种融合蛋白与至少一种靶一起温育, 且;
- vi) 鉴定至少一种分离抗原或抗原结合物。

**【0007】** 在第三方面, 本发明被描述为测定靶上的抗原数量的方法, 包括:

- i) 免疫骆驼科动物;
- ii) 从该被免疫的骆驼科动物分离至少一种  $V_{\text{H}}\text{H}$  基因;
- iii) 将至少一种  $V_{\text{H}}\text{H}$  基因与报告基因融合, 从而产生至少一种融合基因;
- iv) 将至少一种融合基因转化进一个物种, 该物种允许分泌来自至少一种该融合基因的至少一种融合蛋白;
- v) 将至少一种融合蛋白与至少一种靶一起温育;
- vi) 测量至少一种靶与至少一种融合蛋白之间的结合情况;
- vii) 测定抗原数量。

在一种优选的实施方案中, 步骤 vii)进一步表征为测定抗原的密度。

**【0008】** 在第四方面, 本发明被描述为测定亲合力的方法, 包括:

- i) 免疫骆驼科动物;
- ii) 从该被免疫的骆驼科动物分离至少一种  $V_{\text{H}}\text{H}$  基因;
- iii) 将至少一种  $V_{\text{H}}\text{H}$  基因与报告基因融合, 从而产生至少一种融

合基因；

- iv) 将至少一种融合基因转化进一个物种，该物种允许分泌来自至少一种融合基因的至少一种融合蛋白；
- v) 将至少一种融合蛋白与至少一种靶一起温育；
- vi) 测量至少一种靶与至少一种融合蛋白之间的亲和力。

**【0009】** 在各方面的优选实施方案中，骆驼科动物包括骆驼或美洲驼。在一种优选的实施方案中，骆驼科动物是骆驼。在一种优选的实施方案中，骆驼科动物是美洲驼。在一种优选的实施方案中，免疫接种所使用的是完整细胞、细胞膜碎片和对感兴趣的抗原例如 CEA、Muc-1、Tag72、 $\alpha V\beta 3$  及  $\alpha V\beta 5$  具有特异性的肽。在一种优选的实施方案中，免疫接种所使用的是肿瘤提取物。

**【0010】** 在各方面的优选实施方案中，至少一种  $V_H H$  基因是通过 RT-PCR 分离的。在各方面的优选实施方案中，物种是大肠杆菌 (E.Coli)。在各方面的优选实施方案中，靶是至少一种癌细胞系。(参见附加的靶清单，WO 03/105757 和 WO 03/107009，此处两者以引用方式并入本文，包括任何附图)

**【0011】** 在各方面的优选实施方案中，至少一种抗原或抗原结合物是通过测定融合蛋白的活性来鉴定的。在各方面的优选实施方案中，报告基因是 BLA。在各方面的优选实施方案中，活性是通过如实施例中公开的头孢硝噻吩试验(a nitrocefin assay)来测定的。

**【0012】** 在各方面的优选实施方案中，结合情况是通过 FACS (荧光激活细胞分选术)、ELISA (酶联免疫吸附试验) 及 IHC (免疫组织化学) 来检测的。在一种优选实施方案中，结合情况是通过 FACS 来检测的。在一种优选的实施方案中，结合情况是通过 ELISA 来检测的。在一种优选的实施方案中，结合情况是通过 IHC 来检测的。

### 附图简述

**【0013】** 图 1 阐明了  $\beta$ -内酰胺酶蛋白质的氨基酸序列。

**【0014】** 图 2 示出一些典型的抗体结构，其公开了例如重链和轻链。对于额外的说明，尤其是当涉及 VHH 时 (参见美国专利 6,005,079 和 5,874,541，此处以引用方式并入本文，包括任何附图)。

【0015】图 3 示出了质粒 pNA31.1 的质粒图，该质粒将被用于在大肠杆菌中创建美洲驼的 vHH 表达库。通过 NcoI 和 PinAI 酶对 vHH PCR 片断及载体 pNA31.1 的消化作用，将 vHH 基因所有组成成分按符合读框的方式与上游 pelB 信号序列及下游 BLA 序列融合。该表达将由 lacP 驱动并由 T7 终止子终止，如图所示。

【0016】图 4 示出了质粒 pNA31.1 完整的核苷酸序列。

### 发明详述

【0017】此处所用的所有科技术语，除非另作定义，具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与此处所述相似或相等的任何方法与材料可被用于本发明的实践或检验，还是描述了优选的方法与材料。为了本发明目的，使用了以下术语，如下所述。

【0018】术语“骆驼科动物 (camelid)”将包括，作为例子，旧大陆骆驼科动物（如双峰驼 (Camelus Bactrianus) 和单峰驼 (Camelus dromaderius)）和新大陆骆驼科动物（如羊驼 (Lama paccos)、驼羊 (Lama glama) 及骆马 (Lama vicugna)）。本发明范围内的骆驼科动物实例包括骆驼 (camels) 和美洲驼 (llamas)。

【0019】术语“报告分子 (reporter)”将指分子的一部分，如融合蛋白的一部分，如本发明所公开的，其使得能够量化该分子的某一特征，如酶活性。 $\beta$ -内酰胺酶 (BLA) 作为报告分子的非限制性实例在此公开。

【0020】术语“报告基因 (reporter gene)”在此用于指代编码是报告分子的基因。

【0021】如此处所用的术语“基因 (gene)”被用于指代包括两个或更多个脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的分子。其准确大小将由多种因素决定，所述因素又取决于寡核苷酸的最终功能或用途。基因可通过任何合适的方法制备，包括，例如克隆和限制酶切合适的序列及用方法如 Narang et al., 1979, Meth. Enzymol 68: 90-99 的磷酸三酯法；Brown et al., 1979, Meth. Enzymol. 68: 109-151 的磷酸二酯法；Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862 的二乙基二叔丁基亚磷酸酰胺酯法 (diethylphosphoramidite method)；和美国专利第 4,458,066 号的固体支持法直接化学合成，每一篇文献都以引用方式并入本文。合成方法的

综述在 Goodchild, 1990, *Bioconjugate Chemistry* 1(3): 165-187 中提供, 其以引用方式并入本文。

**【0022】** 术语“融合基因 (fusion gene)”在此被用于指代当任何一个基因与另一个基因融合时得到的基因构建体。所有已知的融合方法都意图于包含在本发明的范围内。

**【0023】** 术语“蛋白质”在本文中以及在本领域中, 可与术语“肽”及“多肽”互换使用, 并且指包含两个或更多个由肽键连接的氨基酸残基的分子。

**【0024】** 具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域内已被定义。这些家族包括带碱性侧链的氨基酸 (例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、带酸性侧链的氨基酸 (例如天冬氨酸、谷氨酸)、带非电荷极性侧链的氨基酸 (例如天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)、带非极性侧链的氨基酸 (例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、半胱氨酸、甘氨酸)、带  $\beta$ -支链侧链的氨基酸 (例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸) 及带芳香侧链的氨基酸 (例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。在本申请书中以及本领域中可以应用标准三字母或单字母氨基酸缩写。本领域技术人员可以做出等价替换 (例如, 用一种芳香族氨基酸替换另一种芳香族氨基酸), 且这种等价替换意图于在合适之处包含在本权利要求书的范围内。

**【0025】** 本发明的肽、多肽和蛋白质也可以包括一种或更多种非标准氨基酸。非标准氨基酸包括, 但不限于普通氨基酸的 D-同分异构体、 $\alpha$ -氨基异丁酸、4-氨基丁酸 (4-Abu)、2-氨基丁酸 (2-Abu)、6-氨基己酸 (Ahx)、2-氨基异丁酸 (2-Aib)、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、半胱磺酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、氟代氨基酸以及经过设计的氨基酸 (designer amino acid) 如  $\beta$ -甲基氨基酸、 $C\alpha$ -甲基氨基酸和  $N\alpha$ -甲基氨基酸。

**【0026】** 术语“融合蛋白 (fusion protein)”用于此处, 指代当任何蛋白质和另一蛋白质融合在一起时产生的蛋白质。融合蛋白也可以在创造一种融合蛋白的努力中将一个基因与另一个基因融合, 然后表达所得到的融合基因时产生的。所有已知的融合方法都意欲包含在本发明

的范围内。

【0027】如此处所用，术语“结合物 (binder)”，将是指已被确定能够结合  $V_HH$  蛋白的分子，如此处所述。这可以通过任何已知的测定结合情况的方法来加以验证。所有结合亲和力意欲包含在由预期试验目的决定的本发明的预期范围内。

【0028】术语“细胞 (cell)”、“细胞系 (cell line)”、及“细胞培养物 (cell culture)”可以互换使用，且所有这些名称都包括后代。

【0029】术语“转化体 (transformants)”或“转化细胞 (transformed cell)”包括原代转化细胞以及来源于该细胞的培养物，不考虑转移数。由于故意的或无意的突变，所有后代在 DNA 组成上可能不是精确的一致。与在原初转化细胞中筛选的功能具有相同功能的突变体后代包括在转化体的定义中。该细胞可以是原核的或真核的。

【0030】术语“Ab”或“抗体 (antibody)”指多克隆抗体和单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、免疫球蛋白或抗体或结合抗原的抗体功能片断。这样的功能性实体的实例包括完整的抗体分子、抗体片断如  $F_v$ 、单链  $F_v$ 、互补决定区 (CDRs)、 $V_L$  (轻链可变区)、 $V_H$  (重链可变区) 以及它们或任何其它能够结合靶抗原的免疫球蛋白肽的功能性部分的组合。(参见例如，图 2)。

【0031】术语“ $V_HH$ ”指重链抗体部分，具体地例如，骆驼科动物的重链抗体部分。(参见如，美国专利 6,005,079 和 5,874,541，这两篇专利在此以引用方式并入本文，包括任何附图)。

【0032】术语“靶 (target)”指一种感兴趣的物质，此处所公开的融合蛋白可以与该物质一起温育，以至按照本发明的方法，可以鉴定感兴趣的抗原结合物或抗原。作为非限制性实例，靶可以包括癌细胞、癌细胞系或癌细胞培养物，肿瘤提取物或癌症组织或癌症器官，与癌细胞、癌细胞系或癌细胞培养物、肿瘤提取物或癌症组织或癌症器官相关的分子，或与癌细胞、癌细胞系或癌细胞培养物、肿瘤提取物或癌症组织或癌症器官相关的细胞、细胞系或细胞培养物、组织或器官。

【0033】术语“肿瘤提取物 (tumour extract)”将指癌细胞、癌细胞系或癌细胞培养物、或癌组织或癌症器官的分离物。

【0034】术语“抗原 (antigen)”指结合抗体的分子，如此处所定义的。

作为一实例，按照本发明，感兴趣的抗原可以是癌症抗原，其过量表达与特定病理学相互关联，如癌症的特定指征。

**【0035】**在第一方面，本发明被描述为鉴定至少一种抗原或抗原结合物的方法，包括：

- i) 免疫骆驼科动物；
- ii) 从该被免疫的骆驼科动物分离至少一种  $V_{H}H$  基因；
- iii) 将至少一种  $V_{H}H$  基因与报告基因融合，从而产生至少一种融合基因；
- iv) 将至少一种融合基因转化进一个物种，该物种允许分泌来自至少一种融合基因的至少一种融合蛋白；
- v) 将至少一种融合蛋白与至少一种靶一起温育，且；
- vi) 鉴定至少一种抗原或抗原结合物。

**【0036】**在第二方面，本发明被描述为至少一种被分离的抗原或抗原结合物，该抗原或抗原结合物是用一种方法分离的，该方法包括：

- i) 免疫骆驼科动物；
- ii) 从该被免疫的骆驼科动物分离至少一种  $V_{H}H$  基因；
- iii) 将至少一种  $V_{H}H$  基因与报告基因融合，从而产生至少一种融合基因；
- iv) 将至少一种融合基因转化进一个物种，该物种允许分泌来自至少一种融合基因的至少一种融合蛋白；
- v) 将至少一种融合蛋白与至少一种靶一起温育，且；
- vi) 鉴定至少一种分离抗原或抗原结合物。

**【0037】**在第三方面，本发明被描述为测定靶上的抗原数量的方法，包括：

- i) 免疫骆驼科动物；
- ii) 从该被免疫的骆驼科动物分离至少一种  $V_{H}H$  基因；
- iii) 将至少一种  $V_{H}H$  基因与报告基因融合，从而产生至少一种融合基因；
- iv) 将至少一种融合基因转化进一个物种，该物种允许分泌来自至少一种融合基因的至少一种融合蛋白；
- v) 将至少一种融合蛋白与至少一种靶一起温育；

- vi) 测量至少一种靶与至少一种融合蛋白之间的结合情况;
- vii) 测定抗原数量。

在一种优选的实施方案中, 步骤 vii)进一步描述为测定抗原的密度。

**【0038】**在第四方面, 本发明被描述为测定亲合力的方法, 包括:

- i) 免疫骆驼科动物;
- ii) 从该被免疫的骆驼科动物身上分离至少一种  $V_{H}H$  基因;
- iii) 将至少一种  $V_{H}H$  基因与报告基因融合, 从而产生至少一种融合基因;
- iv) 将至少一种融合基因转化进一个物种, 该物种允许分泌来自至少一种融合基因的至少一种融合蛋白;
- v) 将至少一种融合蛋白与至少一种靶一起温育;
- vi) 测量至少一种靶与至少一种融合蛋白之间的亲和力。

**【0039】**在各方面的优选实施方案中, 骆驼科动物包括骆驼或美洲驼。在一种优选的实施方案中, 骆驼科动物是骆驼。在一种优选的实施方案中, 骆驼科动物是美洲驼。在一种优选的实施方案中, 免疫接种所使用的是完整细胞、细胞膜碎片和对感兴趣的抗原例如 CEA、Muc-1、Tag72、 $\alpha V\beta 3$  及  $\alpha V\beta 5$  具有特异性的肽。在一种优选的实施方案中, 免疫接种所使用的是肿瘤提取物。

**【0040】**骆驼  $V_{H}H$  抗体仅由重链组成, 缺少轻链 (参见例如图 2; 亦参见例如美国专利 6,005,079 和 5,874,541, 这两篇专利在此以引用方式并入本文, 包括任何附图)。因此, 要覆盖整个抗体的所有组成成分 (对于上面的实例, 要覆盖 100 个  $V_{H}H$  编码 B 细胞, 只需 100 个克隆) 比较容易。实际上  $V_{H}H$ -报告分子 (例如 BLA) 的融合构建体也消除了克隆步骤中的背景。此外, 与需要二级试剂检测的其它亲和力标签不同, 由于  $V_{H}H$ -BLA 的酶活性将与  $V_{H}H$  结合数量呈线性相关, 因此 BLA 提供了一条能够直接监测抗体结合情况的方便途径, 该方法可用于测定靶细胞或细胞提取物上的抗原密度。同样地,  $V_{H}H$  与 BLA 之间 1:1 的关系使得能够相当精确地测定提供抗体亲和力信息的抗体解离速度。

**【0041】**在各方面的优选实施方案中, 至少一种  $V_{H}H$  基因是通过 RT-PCR 分离的。

【0042】在各方面的优选实施方案中，报告基因是 BLA。BLA 序列的一个代表性实例在图 1 中加以描述。

【0043】BLA 酶广泛分布于革兰氏阴性及革兰氏阳性细菌中。BLA 酶在专一性方面有所变化，但共有的是它们水解  $\beta$ -内酰胺，生成取代的  $\beta$ -氨基酸。因此，它们能提供对含  $\beta$ -内酰胺的抗生素的抗性。由于 BLA 酶对于哺乳动物来说不是内源性的，所以它们只是最低程度地受抑制剂、酶底物或内源性酶系统（例如，不同于蛋白酶）的干扰，并因此特别好地适合于报告功能。

【0044】按照本发明预期的特定的 BLA 的实例包括但不限于，A 类、B 类、C 类或 D 类  $\beta$ -内酰胺酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶，参见 Benito et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 123:107(1994)、纤连蛋白、葡萄糖氧化酶、谷胱甘肽 S-转移酶，参见 Napolitano et al., *Chem. Biol.* 3: 359 (1996) 以及组织纤溶酶原激活物，参见 Smith et al., *J. Biol. Chem.* 270: 30486 (1995)。

【0045】在本发明一种优选的实施方案中，报告基因包括碱性磷酸酶，该酶可以将表鬼臼毒素葡萄糖苷的 4'-磷酸酯衍生物转变为活性药品。这样的衍生物包括依托泊苷-4'-磷酸酯、依托泊苷-4'-硫代磷酸酯和替尼泊苷-4'-磷酸酯。本发明的其它实施方案可包括这些葡萄糖苷的磷酸酯衍生物，其中磷酸酯部分位于该葡萄糖苷的其它羟基基团上。

【0046】在各方面的优选实施方案中，物种是大肠杆菌。除大肠杆菌外的微生物菌株也可以被使用，如杆菌(bacilli)，例如枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和沙门氏菌属(*Salmonella*)的各种类、以及其它细菌菌株。在这样的原核系统中，包含来源于宿主或与宿主相容物种的复制位点及调控序列的质粒载体被典型地使用。

【0047】为表达大多数细菌启动子控制下的构建，大肠杆菌 K12 菌株 MM294，其从大肠杆菌遗传储备中心(*E. coli* Genetic Stock Center)以 GCSC#6135 获得，可被用作宿主。对于带有  $P_{LN_{RBS}}$  或  $P_{LT7_{RBS}}$  调控序列的表达载体，大肠杆菌 K12 菌株 MC1000  $\lambda$  溶原菌，N<sub>7</sub>N<sub>53</sub>CI857 SusP<sub>80</sub>，ATCC39531，可以被使用。在 1987 年 4 月 7 日以 ATCC (ATCC53606) 保藏的大肠杆菌 DG 116，以及在 1985 年 3 月 29 日以 ATCC (ATCC53075) 保藏的大肠杆菌 KB2 也是有用的宿主。对于 M13 噬菌体重组体，使用的是对噬菌体感染敏感的大肠杆菌菌株，如

大肠杆菌 K12 菌株 DG98 (ATCC39768)。DG98 株于 1984 年 7 月 13 日保藏在 ATCC。

**【0048】**大肠杆菌可以被典型地转化，例如使用 pBR322 的衍生物，由 Bolivar et al., 1977, Gene 2: 95 描述。质粒 pBR322 含有氨苄青霉素和四环素的抗性基因。这些药物抗性标记在构建期望的载体时可被保留或者破坏，因此有助于检测所期望的重组体的存在。通常使用的原核调控序列即转录起始的启动子，任选地和操纵子，连同核糖体结合位点序列一起，包括  $\beta$ -内酰胺酶（青霉素酶）和乳糖（Lac）启动子系统，参见 Chang et al., 1977, Nature 198: 1056，色氨酸（trp）启动子系统，参见 Goeddel et al., 1980, Nuc.Acids Res. 8: 4057，以及  $\lambda$  来源的  $P_L$  启动子，参见 Shimatake et al., 1981, Nature 292: 128，和 N 基因核糖体结合位点 ( $N_{RBS}$ )。在发表于 1987 年 12 月 8 日的美国专利号 4,711,845 中公布了一种便携式调控系统序列盒 (portable control system cassette)。该序列盒包括一个  $P_L$  启动子，可操作地连接于  $N_{RBS}$  上，它们依次位于第三个 DNA 序列的上游，所述第三个 DNA 序列含有至少一个限制性位点，其允许在  $N_{RBS}$  序列 3' 端六个碱基对之内进行剪切。同样有用的是磷酸酯酶 A (phoA) 系统，该酶由 Chang et al. 在发表于 1986 年 10 月 8 日的欧洲专利出版物系列号 196,864 中有所描述。不过，与原核生物相容的任何可利用的启动子系统都可以被用于构建本发明的表达载体。

**【0049】**除细菌之外，真核微生物如酵母，也可以作为物种使用。尽管通常可得到大量其它的菌株，酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的实验室菌株面包酵母最常被应用。尽管使用两种微生物复制起点的载体是常见的，参见 Broach, 1983, Meth. Enz. 101: 307，其它适合于酵母表达的质粒载体也是已知的。参见如 Stinchcomb et al., 1979, Nature 282: 39; Tschempe et al., 1980, Gene 10: 157; 及 Clarke et al., 1983, Meth. Enz. 101: 300。酵母载体的调控序列包括用于糖酵解酶合成的启动子。参见 Hess et al., 1968, J. Adv. Enzyme Reg.7: 149; Holland et al., 1978, Biotechnology 17: 4900; 及 Holland et al., 1981, J. Biol. Chem. 256: 1385。本领域其它已知的启动子包括 3-磷酸甘油酸激酶启动子，参见 Hitzeman et al., 1980, J. Biol. Chem. 255: 2073，以及其它糖酵解酶如 3-

磷酸甘油醛脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶以及葡萄糖激酶的启动子。具有由生长条件控制的转录的额外优点的其它启动子是醇脱氢酶 2、同工细胞色素 C (isocytochrome C)、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶以及负责麦芽糖和乳糖利用的酶的启动子区。

**【0050】**当被放置于编码序列 3'末端时，终止子序列也可用于增强表达。这类终止子被发现于酵母来源基因编码序列后的 3'非翻译区。含酵母相容性启动子、复制起点以及其它调控序列的任何载体都适用于构建酵母表达载体。

**【0051】**编码序列也可以在来源于多细胞生物的真核宿主细胞培养物中表达。参见例如 Tissue Culture, Academic Press, Cruz and Patterson, editors (1973)。有用的宿主细胞系包括 COS-7、COS-A2、CV-1、鼠科动物细胞如鼠骨髓瘤 N51 和 VERO、Hela 细胞以及中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。用于这些细胞的表达载体通常包括与哺乳动物细胞相容的启动子和调控序列如，例如常用的来自猿猴病毒 40 (SV40) 的早期和晚期启动子，参见 Fiers et al., 1978, Nature 273: 113，或者其它病毒启动子如那些来源于多瘤病毒、腺病毒 2、牛乳头瘤病毒 (BPV) 或禽肉瘤病毒的启动子，或者免疫球蛋白启动子以及热激启动子。

**【0052】**增强子区对于优化表达也是重要的。如需要，复制起点可以从病毒来源获得。

**【0053】**物种也可以包括植物细胞，并且可得到与植物细胞相容的调控序列，如胭脂氨酸合成酶启动子和聚腺苷酸化信号序列，参见 Depicker et al., 1982, J. Mol. Appl. Gen. 1: 561。使用利用杆状病毒载体提供的调控系统的昆虫细胞的表达系统也已被描述。参见 Miller et al., Genetic Engineering (1986), Setlow et al., eds., Plenum Publishing, Vol. 8, pp. 277-97。基于昆虫细胞的表达可在 *Spodoptera frugiperda* 中完成。这些系统在制备重组酶方面也是成功的。

**【0054】**根据物种，使用适合于这些细胞的标准技术来进行转化。采用氯化钙进行的钙处理，如 Cohen, 1972, Proc Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110 所述，被用于原核生物或其它含大量细胞壁屏障的细胞。利用根

癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 进行的感染, 参见 Shaw et al., 1983, Gene 23: 315, 被用于某些植物细胞。对于哺乳动物细胞, 优选 Graham 等人, 1978, Virology 52: 546 的磷酸钙沉淀法。进入酵母的转化是按照 Van Solingen et al., 1977, J. Bact. 130: 946 及 Hsiao et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3829 的方法进行的。

**【0055】**令人期望的是修改编码多肽的 DNA 序列, 以便提供, 例如, 在不改变所编码蛋白的氨基酸序列的情况下, 与该物种的密码子用法更相容的序列。对于起始 5-6 个密码子的这种改变可以改善表达效率。被改变以改善表达效率但编码相同的氨基酸序列的 DNA 序列, 被认为是等效的并包括在本发明中。

**【0056】**许多位点专一性引物定向诱变方法 (site-specific primer-directed mutagenesis) 是可以利用的, 并且是本领域公知的。参见例如 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989, second edition, chapter 15.51, “Oligonucleotide-mediated mutagenesis,” 此处以引用方式将其并入本文。聚合酶链式反应 (PCR) 可以被用于进行位点专一诱变。在本领域目前另一项标准技术中, 编码所期望突变的合成寡核苷酸被用作引物来指导包含在单链载体如 pBSM13+ 衍生物中的互补核酸序列的合成, 该衍生物是作为构建诱变引物的延伸产物的模板来使用的。被诱变 DNA 被转化到宿主细菌中, 并且该转化细菌的培养物被铺板并鉴定。鉴定经过修改的载体可包括将所选转化体的 DNA 转移至硝酸纤维素滤膜或其它膜上, 并且在一定温度下将该“转移物 (lifts)”与激酶化的合成诱变引物杂交, 该温度允许引物与修改序列进行精确匹配的杂交, 而避免了与原未诱变链进行杂交。然后培养包含与探针杂交的 DNA 的转化体 (该 DNA 的序列一般是通过序列分析加以确认的), 并将其作为该修改后 DNA 的储存库。

**【0057】**由于遗传密码的冗余性, 大量 DNA 序列典型地编码任何给定的氨基酸序列, 并且在此意义上它们是等效的。如下所述, 令人期望的是根据表达载体将要插入的宿主细胞的优选的密码子用法, 选择一种或者另一种等效的 DNA 序列用于该表达载体。本发明意欲包括编码所公开蛋白质的所有 DNA 序列。

**【0058】**可操纵的表达克隆可被使用, 并通过将编码序列以可操纵的

连接方式与合适的调控序列一起放入表达载体来构建。该载体可被设计为能够在宿主细胞中自主复制或者能够整合进宿主细胞染色体DNA中。所产生的克隆被用于转化合适的宿主，并在适合表达该编码序列的条件下培养经转化的宿主。

**【0059】**构建包含该编码序列及合适调控序列的合适克隆应用了本领域中公知的标准的连接技术和限制性技术。一般而言，分离的质粒、DNA序列或合成的寡核苷酸按照所期望的形式被剪切、修饰和重连接。如果通常无法得到合适的限制性位点，可以将合适的限制性位点加入到编码序列的末端，以便协助表达克隆的构建。

**【0060】**位点专一性DNA剪切是在本领域普遍理解并由商业上可得的限制性酶的生产商指定的条件下，通过用合适的限制性酶（或几种酶）处理来完成的。参见例如 Amersham (Arlington Heights, IL)、Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN) 及 New England Biolabs (Beverly, MA) 的产品目录。在针对特定酶的最适温度下温育约一至两小时的时间是典型的。每次温育后，蛋白质用酚-氯仿抽提被去除；这种抽提之后可进行醚抽提，并通过乙醇沉淀从水相部分中回收DNA。如果期望，可使用标准技术通过聚丙烯酰胺胶电泳或琼脂糖凝胶电泳，按大小分离所切片断。参见例如，Maxam et al., 1980, *Methods in Enzymology* 65: 499-560。

**【0061】**连接可以被完成，例如，在15-30 $\mu$ l 体积中按以下标准条件和温度：20mM Tris-Cl, pH 7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 33 $\mu$ g/ml BSA, 10-50mM NaCl, 以及在0 $^{\circ}$ C, 40 $\mu$ M ATP 和 0.01-0.02 (Weiss) 单位 T4 DNA 连接酶（用于带有互补单链末端的片段的连接），或者在14 $^{\circ}$ C, 1mM ATP 和 0.3-0.6 单位 T4 DNA 连接酶（用于“平端”连接）。对带有互补末端的片断进行的分子间连接反应通常是在33-100 $\mu$ g/ml 的总DNA浓度（5-100nM 的总末端浓度）下进行的。分子间的平端连接反应（任选地，通常应用摩尔数过量20-30倍的接头）是在1 $\mu$ M 总末端浓度下进行的。

**【0062】**质粒构建的正确连接可使用本领域已知的任何方法加以确认。例如，质粒构建的正确连接可通过用连接混合物初次转化合适的宿主如大肠杆菌菌株 DG101 (ATCC47043) 或大肠杆菌菌株 DG116

(ATCC53606) 来确定。成功的转化体是通过氨苄青霉素、四环素或其它抗生素的抗性或敏感性，或者通过使用其它标记来选择的，这有赖于如本领域所理解的质粒构建的方式。然后按照 Clewell 等人 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62: 1159 的方法制备来自转化体的质粒，任选地，在氯霉素扩增之后。参见 Clewell, 1972, J. Bacteriol. 110: 667。可选地，可以使用 Bethesda Research Laboratories publication—Focus 5(2) 第 11 页的“碱-酸”抽提法制备质粒 DNA，并且可以通过用 CsCl/溴化乙锭超速离心 DNA 代替该方案中的步骤 12 至 17 获得非常纯的质粒 DNA。作为另一选择，可经商业途径得到的质粒 DNA 分离试剂盒例如 HISPEED™、QIAFILTER™ 以及 QIAGEN® 质粒 DNA 分离试剂盒 (Qiagen, Valencia CA) 可按照供货商提供的方案来使用。分离后的 DNA 可通过例如限制性酶消化和/或 Sanger 等人, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463 的双脱氧法测序加以分析，如 Messing et al., 1981, Nuc. Acids Res. 9: 309 所进一步描述的，或者通过 Maxam 等人, 1980, Methods in Enzymology 65: 499 的方法加以分析。

**【0063】** 在各方面的一种优选实施方案中，活性是通过头孢硝噻吩试验来测定的（如实施例中所公开的，也可参见例如 WO 03/105757 和 WO 03/107009，此处两者以引用方式并入本文，包括任何附图）。

**【0064】** 在各方面的优选实施方案中，靶是至少一种癌细胞系。在另一种实施方案中，靶是与癌症有关的靶，它表达 CEA 或者具有结合到其自身的 CEA 或者在其附近有 CEA 分布。在另一种优选的实施方案中，该是 Muc-1 和 Tag72 $\alpha$ V $\beta$ 5。（对于其它靶，参见 WO 03/105757 和 WO 03/107009，此处两者以引用方式并入本文，包括任何附图）。

**【0065】** 细胞或组织的来源包括人类、所有其它动物、细菌、真菌、病毒及植物。组织是复杂的靶，并且是指单一细胞类型、几种细胞类型的集合或通常是特定种类的细胞的集合。组织可以是完好的或经过改变的。人类组织的一般分类包括但不限于上皮组织、结缔组织、神经组织和肌肉组织。

**【0066】** 在各方面的优选实施方案中，结合专一性是用 FACS、ELISA 或 IHC 来确定的。在一种优选的实施方案中，结合专一性是用 FACS 来确定的。

**【0067】**在一种优选的实施方案中，结合专一性是用 ELISA 来确定的。（参见例如 Yasuhito Abe, Teiri Sagawa, Ken Sakai and Shigeru Kimura. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for human epidermal growth factor (hEGF). *Clinica Chimica Acta*, 168: 87-95, 1987; Yasuhito Abe, Masazumi Miyake, Teiri Sagawa and Shigeru Kimura. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for human tumor necrosis factor (hTNF). *Clinica Chimica Acta*, 176: 213-218, 1988 和 Yasuhito Abe, Masazumi Miyake, Atsushi Horiuchi, Teiri Sagawa Hitoshi Ono and Shigeru Kimura. Non-specific reaction in the sandwich immunoassay for human tumor necrosis factor-a (hTNF-a). *Clinica Chimica Acta*, 181: 223-230, 1989, 此处其中的每一篇都以引用方式并入本文。)

**【0068】**在一种优选的实施方案中，结合专一性是用 IHC 来确定的。（参见例如 *Diagnostic Immunohistochemistry*. David J. Dabbs. W.B Saunders Company. Philadelphia, PA 2001, 此处以引用方式并入本文。)

## 实施例

### 实施例 1: 美洲驼的免疫接种

**【0069】**美洲驼可用完整细胞、细胞膜碎片以及对感兴趣的抗原例如 CEA、Muc-1、Tag72、 $\alpha V\beta 3$  或  $\alpha V\beta 5$  具有专一性的肽来进行免疫。目前用完整细胞进行免疫的方法是已知的（参见 *Current Protocols in Immunology* (1995). John Wiley & Sonc, Inc. Pages:2.5.1-2.5.17.）。

**【0070】**膜碎片可以通过标准技术来制备。细胞可使用氮弹(the nitrogen bomb)被均一化或空泡化。细胞碎片可采用连续离心被分离 (Selection of ScFv phages on intact cells under low pH conditions leads to a significant loss of insert free phages. (2001). Tur M.K., Huhn S., Sasse S., Engert A. and Barth S. *Biotechniques* 30: 404-413)。

**【0071】**用抗原进行免疫也可采用标准技术来完成。

**【0072】**采用动物实验委员会 (Animal Experimental Committee) 许可的方法 (Boersma W.J.A., Bogarts E.J.C., Bianch A.T.J., Claassen E. (1992) Adjuvant properties of stable water-in-oil emulsions: evaluation of the experience with specol. *Res Immunol.* 143: 503), 可用油包水乳液中的 250 $\mu$ g 抗原进行免疫接种。

【0073】例如，美洲驼可用靶细胞系 ZR75-1 和 T47D 或 1918 来免疫。该细胞系表达 Muc1 和 Tag72 抗原。初次免疫可使用完整细胞进行。随后的加强免疫可使用膜碎片进行，以富集针对感兴趣的细胞表面抗原的所有抗体组成成分。可在第 0、21 和 35 天对年青的成年美洲驼进行免疫接种（Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. (2000) van der Linden R, de Geus B, Stok W, Bos W, van Wassenaar D, Verrips T, Frenken L. J Immunol Methods. 240(1-2):185-95）。

【0074】作为另一实例，可以用购得的整联蛋白 CEA、Muc-1、Tag72、 $\alpha V\beta 3$  或  $\alpha V\beta 5$  的蛋白制品，按照上述免疫规程对美洲驼进行免疫接种。

### 实施例 2：美洲驼血样的采集

【0075】外周血样品典型地取自骆驼科动物的颈静脉。进针点应当为背部与颈部边缘之间的大致中部位置。该进针点避开了较薄的肌肉组织和其上面的项韧带（mucha ligament）。使用单腿式脚绊限制动物并使其头部固定不动以避免伤及操作者。可使用注射器或真空采集管。推荐的针为 18g×37mm。血清样品采用与任何其它哺乳动物相同的方式被处理。

【0076】当需要连续样品时，放置留置导管可以是最方便的方法。该导管可与伸缩管相连。此装置可以充满 1:10 的肝素:水而留置，通过简单缝合固定或通过几滴超级胶（super glue）“缝合（stitched）”在皮肤上。

### 实施例 3：cDNA 的制备和重链片断的 PCR 扩增

【0077】按照 Chomzeynski and Sachi, 1987 中所述的方法，可从血液和淋巴结中分离 RNA。如前所述（de Haard et al., 1999），用 100 $\mu$ g 总 RNA、M-MLV 反转录酶（Gibco BRL）及六核苷酸随机引物（Amersham Biosciences）或 oligo-dT 引物可制备 cDNA。该 cDNA 可用酚/氯仿抽提结合乙醇沉淀被纯化并随后用作模板以特异性地扩增 VHH 的所有组成成分。来自骆驼科动物重链抗体（1.3-kB）和常规抗体（1.65-kB）的完整的重链来源 IgG 基因可用 oligo-dT 引物结合 FR1-特异性引物

HR-NBF1 (5'-GAGGTBCARCCATGGGASTCYGG-3' ; 黑体表示 NcoI 位点), 以 oligo-dT 引物合成的 cDNA 为模板, 按照 EP01205100.9 中所述的方法加以扩增, EP01205100.9 在此处以引用方式并入本文, 包括任何附图。该重链抗体来源的 IgG 扩增子可以被凝胶纯化并在 NcoI 酶和 PinAI 酶消化后用于克隆, 其中 NcoI 酶切点是由 HR-NBF1 引物引入, 而 PinAI 酶切点可以天然存在于 FR4 区。

【0078】可选地, 该 vHH 所有组成成分可以按绞链-依赖法 (hinge-dependent approach) 用两种 IgG-特异性寡核苷酸引物加以扩增, 如 WO03050531A2 中所述。在单个 PCR 反应(a single PCR reaction) 中, HR-NBF1 (5'-GAGGTBCARCCATGGGASTCYGG-3'; 黑体表示 NcoI 位点) 引物将与短 HR-NBR1 (5'-AACAGTTAAGCTTCCGCTTACCGGTGGAGCTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3'; 黑体表示 PinAI 位点) 或长 HR-NBR2 (5'-AACAGTTAAGCTTCCGCTTACCGGTTGGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGGTT-3'; 黑体表示 PinAI 位点) 绞链引物组合, 已知该绞链引物对于扩增重链可变区基因片断是特异性的。

【0079】同样请参见 WO03050531A2, 此处以引用方式将其并入本文, 包括任何附图。对于从被免疫的美洲驼中克隆和选择 vHH 基因的策略的概括性评述, 同样请参考 Serge Muyltermans 在 *Molecular Biotechnology* 74 (2001) 277-302 中的综述文章。

#### 实施例 4: vHH-BLA 表达库的创建

【0080】如上面实施例 3 中所述的 PCR-扩增的美洲驼抗体 vHH 片断可被克隆到大肠杆菌表达载体 pNA31.1 中, 如图 3 所示。质粒 pNA31.1 是带有失活 BLA 基因的填充载体 (stuffer vector), 该基因来源于质粒 pME27.1 (参见例如 CAB1, WO 03/105757 和 WO 03/107009, 此处两者都以引用方式并入本文, 包括任何附图), 是通过 PstI 酶消化去除了含 MFE-23 scFv 大部分的 461-bp 区后得到的。如上面实施例 3 所述得到的 vHH PCR 产物以及质粒 pNA31.1 经 NcoI 和 PinAI 酶消化后, 0.6-kb 的插入片断和 4.4-kb 的载体片断将分别被凝胶纯化出来。然后将它们连接, 随之转化到大肠杆菌 TOP10F'(Invitrogen, Carlsbad, CA) 感受态细

胞中并在 LA+Cm10+0.1CTX 板上筛选。vHH 片断以 vHH-BLA 融合蛋白形式的表达将由乳糖启动子 (lacP) 驱动, 并且 vHH-BLA 融合蛋白将被 pelB 信号序列靶向于大肠杆菌的外周胞质, 用于分泌。

【0081】重链与 BLA 结构域可通过它们之间的短接头序列如 GGGGS 或(GGGGS)<sub>2</sub> 融合在一起。对于在抗体工程领域成功应用的各种接头的论述, 请参考 Carl A. Borrebaeck (Second edition, Oxford University Press, 1995) 编辑的图书 ‘Antibody Engineering’ 中的第七章, 题目是 ‘Single-chain Fv design and production by preparative folding’, 由 J.S.Huston 等人所著。‘。

【0082】来自 TOP10F’细胞的转化体可被挑出并接种到 96 孔板中的 LB+10ppm 氯霉素 (cmp) 中。可以在 30°C 将其温育 48 小时。可以在每孔中加入 Bper 试剂 (Bper reagent) (PIERCE) 并在室温下温育 30 分钟。可以将 Bper 提取物在 PBS 中稀释, 并使用荧光底物头孢硝噻吩 (Oxoid) 测量 BLA 活性。

#### 实施例 5: 融合蛋白与癌细胞的温育以及结合克隆的鉴定

【0083】将癌细胞接种到 96 孔板中, 并在 37°C 温育 24-48 小时。可以用传统的甲醛固定法或乙醇固定法将它们固定。将不同浓度的来自实施例 4 的 Bper 抽提融合蛋白加入带有癌细胞的 96 孔板中。将该板在室温下温育 1 小时。然后用 PBST (PBS+0.1%Tween20) 洗去未结合的融合蛋白。结合的 BLA 可通过向 96 孔板中加入头孢硝噻吩底物来测量。可以挑选出具有最高结合的克隆。在结合实验中可包括 BLA 的阴性对照, 以便测量非特异性结合背景。

【0084】本领域的技术人员应当很容易意识到本发明很适合于完成该目标, 并获得所提到的结果和优势, 以及其中所固有的结果和优势。目前, 此处所述的分子复合物与该方法、步骤、处理、分子、特定化合物代表了优选实施方案, 是示范性的, 不意图于成为对本发明范围的限制。对于本领域的技术人员来说, 应当很容易意识到在不背离本发明范围和精神的情况下, 可对此处公开的本发明做出替代和修改。

【0085】本说明书中提及的所有专利和出版物指出了本发明所属领域的技术人员的水平。此处所有的专利和出版物都以引用方式并入本文

至这样的程度，其如同每一单独的出版物以引用方式被特异地并且单独地指明并入本文。

**【0086】**本文中适当地例证性地描述的发明可以在缺少未具体公开的任一元素或许多元素、限定或许多限定的情况下被实施。已使用的术语和表述是作为描述性术语而不是限定性的，并且本发明的意图不是在使用这些术语和表述时排除显示和描述的特征或其部分的等同物，而是认识到在要求保护的发明范围内各种修改是可能的。因此，应该理解，尽管本发明通过优选的实施方案和可选的特征被具体地公开，但本领域技术人员可以对本文公开的概念进行修改和变化，而这些修改和变化被认为包含在本发明的范围之内，如所附权利要求所限定的。

**【0087】**在本文中，本发明已以宽范的和一般性的方式被描述。落入该概括性公开内容中的每一较窄的种类和亚类也形成本发明的一部分。这包括发明的这样的概括性描述，其带有附加条件或从该类中除去任何主题的负限定，不论删除的该物质是否在本文中被具体地叙述。

```

1   TPVSEKQLAE VVANTITPLM KAQSVPGMAV AVIYQGKPHY YTFGKADIAA
51  NKPVTPQTLF ELGSISKTFE GVLGGDAIAR GEISLDDAVT RYWPQLTGKQ
101 WQIRMLDLA  TYTAGGLPLQ VPDEVTDNAS LLRFYQNWQP QWKPGTTRLY
151 ANASIGLFGA LAVKPSGMPY EQAMTTRVLK  PLKLDHTWIN VPKAEEAHYA
201 WGYRDGKAVR VSPGMLDAQA YGVKTNVQDM ANWVMANMAP ENVADASLKQ
251 GIALAQSRYW RIGSMYQGLG WEMLNWPVEA NTVVETSFGN VALAPLPVAE
301 VNPPAPPVKA SWVHKTGSTG GFGSYVAFIP EKQIGIVMLA NTSYPNPARV
351 EAAYHILEAL Q

```

图1

IgG1的结构

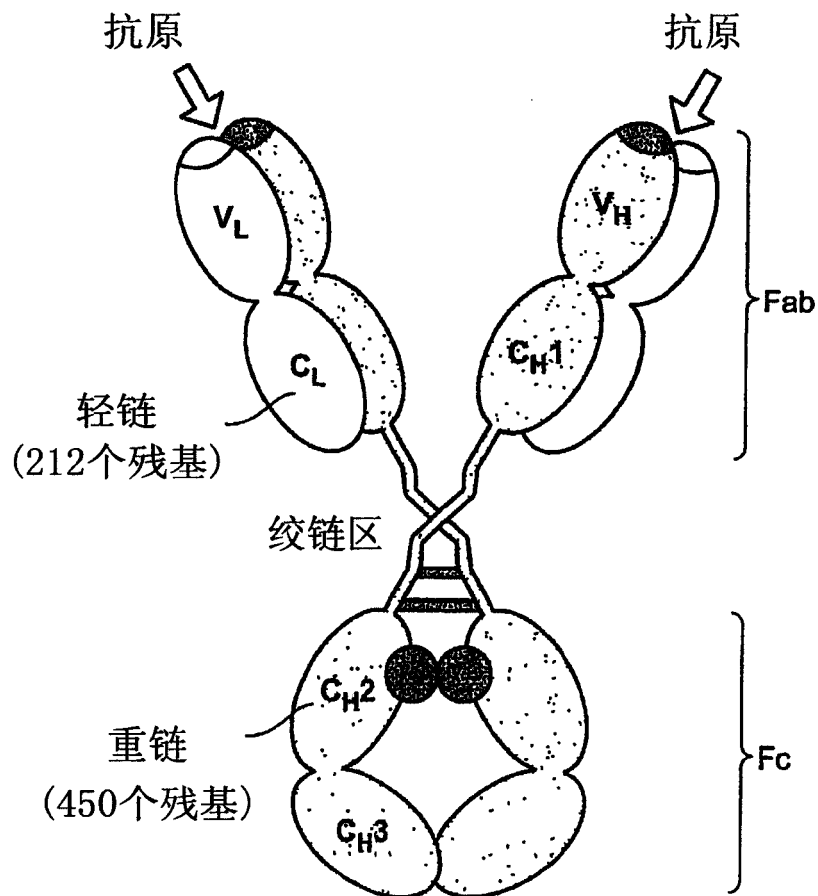


图2

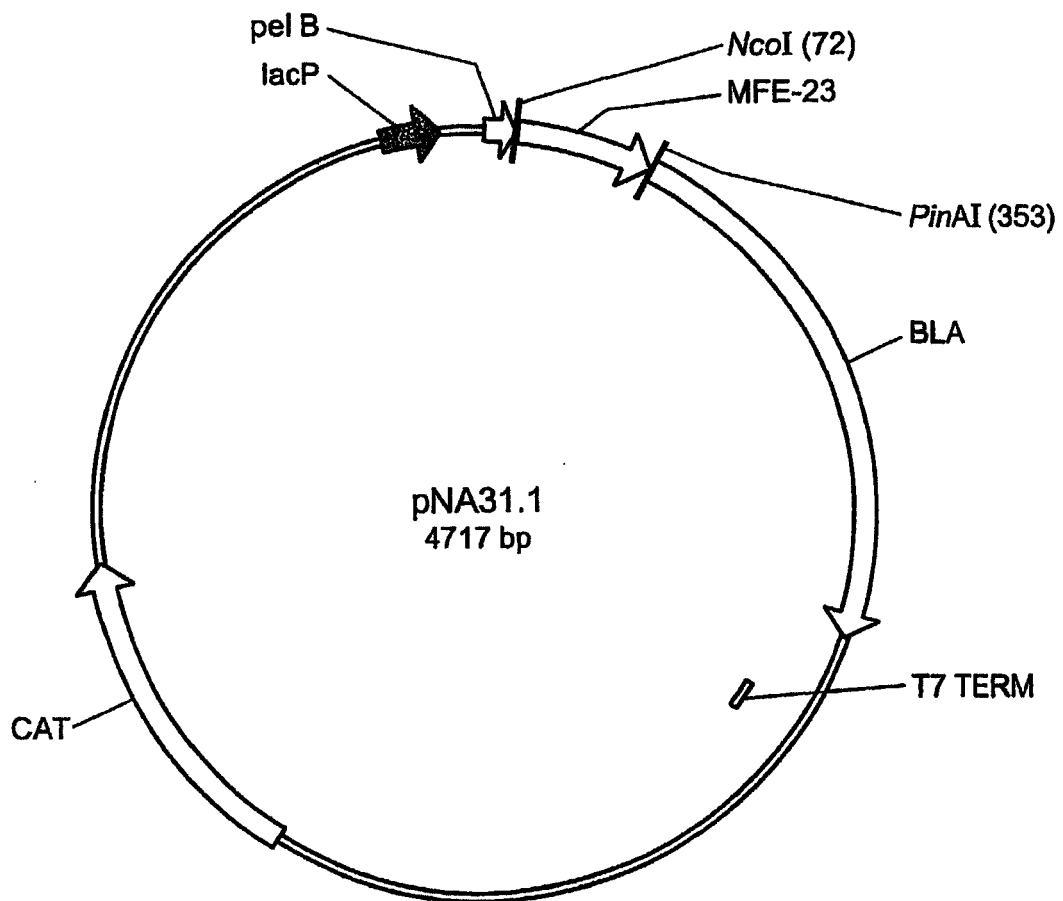


图3

```

1      AGGAATTATC ATATGAAATA CCTGCTGCCG ACCGCTGCTG CTGGTCTGCT
51     GCTCCTCGCT GCCCAGCCGG CCATGGCCCA GGTGAAACTG CAGTGCCAGC
101    TCAAGTGTA  GTTACATGCA CTGGTTCCAG CAGAAGCCAG GCACCTTCTCC
151    CAAACTCTGG ATTTATAGCA CATCCAACCT GGCTTCTGGA GTCCCTGCTC
201    GCTTCAGTGG CAGTGGATCT GGGACCTCTT ACTCTCTCAC AATCAGCCGA
251    ATGGAGGCTG AAGATGCTGC CACTTATTAC TGCCAGCAAA GATCTAGTTA
301    CCCACTCACG TTCGGTGCTG GCACCAAGCT GGAGCTGAAA CGGGCGGCCA
351    CACCGGTGTC AGAAAAACAG CTGGCGGAGG TGGTCGCGAA TACGATTACC
401    CCGCTGATGA AAGCCCAGTC TGTTCCAGGC ATGGCGGTGG CCGTTATTTA
451    TCAGGGAAAA CCGCACTATT ACACATTTGG CAAGGCCGAT ATCGCGGCCA
501    ATAAACCCGT TACGCCTCAG ACCCTGTTCC AGCTGGGTTT TATAAGTAAA
551    ACCTTCACCG GCGTTTTAGG TGGGGATGCC ATTGCTCGCG GTGAAATTTT
601    GCTGGACGAT GCGGTGACCA GATACTGGCC ACAGCTGACG GGCAAGCAGT
651    GGCAGGGTAT TCGTATGCTG GATCTCGCCA CCTACACCGC TGGCGGCCTG
701    CCGCTACAGG TACCGGATGA GGTCACGGAT AACGCCTCCC TGCTGCGCTT
751    TTATCAAAAC TGGCAGCCGC AGTGGAAAGC TGGCACAACG CGTCTTTACG
801    CCAACGCCAG CATCGGTCTT TTTGGTGCGC TGGCGGTCAA ACCTTCTGGC
851    ATGCCCTATG AGCAGGCCAT GACGACGCGG GTCCTTAAGC CGCTCAAGCT
901    GGACCATACC TGGATTAACG TGCCGAAAGC GGAAGAGGCG CATTACGCCCT
951    GGGGCTATCG TGACGGTAAA GCGGTGCGCG TTTCGCCGGG TATGCTGGAT
1001   GCACAAGCCT ATGGCGTGAA AACCAACGTG CAGGATATGG CGAACTGGGT
1051   CATGGCAAAC ATGGCGCCGG AGAACGTTGC TGATGCCTCA CTTAAGCAGG
1101   GCATCGCGCT GCGCAGTCG CGCTACTGGC GTATCGGGTC AATGTATCAG
1151   GGTCTGGGCT GGGAGATGCT CAACTGGCCC GTGGAGGCCA ACACGGTGGT
1201   CGAGACGAGT TTTGGTAATG TAGCACTGGC GCCGTTGCCC GTGGCAGAAG
1251   TGAATCCACC GGCTCCCCCG GTCAAAGCGT CCTGGGTCCA TAAAACGGGC
1301   TCTACTGGCG GGTTTGGCAG CTACGTGGCC TTTATTCCTG AAAAGCAGAT
1351   CGGTATTGTG ATGCTCGCGA ATACAAGCTA TCCGAACCCG GCACGCGTTG
1401   AGGCGGCATA CCATATCCTC GAGGCGCTAC AGTAGGAATT CGAGCTCCGT
1451   CGACAAGCTT GCGGCCGCAC TCGAGATCAA ACGGGCTAGC CAGCCAGAAC
1501   TCGCCCCGGA AGACCCCGAG GATGTGAGC ACCACCACCA CCACCACTGA
1551   GATCCGGCTG CTAACAAAGC CCGAAAGGAA GCTGAGTTGG CTGCTGCCAC
1601   CGCTGAGCAA TAACTAGCAT AACCCCTTGG GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA
1651   GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA GGAActATAT CCGGATTGGC GAATGGGACG
1701   CGCCCTGTAG CGGCGCATT AAGCGGCGCG GTGTGGTGGT TACGCGCAGC
1751   GTGACCGCTA CACTTGCCAG CGCCCTAGCG CCCGCTCCTT TCGCTTTCTT
1801   CCCTTCCTTT CTCGCCACGT TCGCCGGCTT TCCCCGTC A GCTCTAAATC
1851   GGGGGCTCCC TTTAGGGTTC CGATTTAGTG CTTTACGGCA CCTCGACCCC
1901   AAAAACTTG ATTAGGGTGA TGGTTCACGT AGTGGGCCAT CGCCCTGATA
1951   GACGGTTTTT CGCCCTTTGA CGTTGGAGTC CACGTTCTTT AATAGTGGAC
2001   TCTTGTTCCA AACTGGAACA AACTCAACC CTATCTCGGT CTATTCTTTT
2051   GATTTATAAG GGATTTTGCC GATTTCCGCC TATTGGTTAA AAAATGAGCT
2101   GATTTAACAA AAATTTAACG CGAATTTTAA CAAAATATTA ACGCTTACAA
2151   TTTCTGATG CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTACACCC
2201   GCATATGGTG CACTCTCAGT ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC
2251   CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT
2301   GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA
2351   TGTGTCAGAG GTTTTCACCG TCATCACCGA AACGCGCGAG ACGAAAGGGC

```

图4A

```

2401   CTCGTGATAC GCCTATTTTT ATAGGTTAAT GTCATGATAA TAATGGTTTC
2451   TTAGACGTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA TGTGCGCGGA ACCCCTATTT
2501   GTTTATTTTT CTAAATACAT TCAAATATGT ATCCGCTCAT GAGACAATAA
2551   CCCTGTGGCA GCATCACCCG ACGCACTTTG CGCCGAATAA ATACCTGTGA
2601   CGGAAGATCA CTTCGCAGAA TAAATAAATC CTGGTGTCCC TGTTGATACC
2651   GGGAAAGCCCT GGGCCAACCTT TTGGCGAAAA TGAGACGTTG ATCGGCACGT
2701   AAGAGGTTCC AACTTTTACC ATAATGAAAT AAGATCACTA CCGGGCGTAT
2751   TTTTTGAGTT ATCGAGATTT TCAGGAGCTA AGGAAGCTAA AATGGAGAAA
2801   AAAATCACTG GATATAACCAC CGTTGATATA TCCCAATGGC ATCGTAAAGA
2851   ACATTTTGAG GCATTTTCACT CAGTTGCTCA ATGTACCTAT AACCAGACCG
2901   TTCAGCTGGA TATTACGGCC TTTTAAAGA CCGTAAAGAA AAATAAGCAC
2951   AAGTTTATC CGGCCTTTAT TCACATTCTT GCCCGCCTGA TGAATGCTCA
3001   TCCGGAATTC CGTATGGCAA TGAAAGACGG TGAGCTGGTG ATATGGGATA
3051   GTGTTACACC TTGTTACACC GTTTTCCATG AGCAAACCTGA AACGTTTTCA
3101   TCGCTCTGGA GTGAATACCA CGACGATTTT CGGCAGTTTC TACACATATA
3151   TTCGCAAGAT GTGGCGTGTT ACGGTGAAAA CCTGGCCTAT TTCCCTAAG
3201   GGTTTATTGA GAATATGTTT TTCGTCTCAG CCAATCCCTG GGTGAGTTTC
3251   ACCAGTTTTG ATTTAAACGT GGCCAATATG GACAACTTCT TCGCCCCGT
3301   TTTACGATG GGCAAATATT ATACGCAAGG CGACAAGGTG CTGATGCCGC
3351   TGGCGATTCA GGTTCATCAT GCCGTCTGTG ATGGCTFCCA TGTCCGCAGA
3401   ATGCTTAATG AATTACAACA GTACTGCGAT GAGTGGCAGG GCGGGCGTA
3451   AAGACAGATC GCTGAGATAG GTGCCTCACT GATTAAGCAT TGGTAACTGT
3501   CAGACCAAGT TACTCATAT ATACTTTAGA TTGATTTAAA ACTTCATTTT
3551   TAATTTAAAA GGATCTAGGT GAAGATCCTT TTTGATAATC TCATGACCAA
3601   AATCCCTTAA CGTGAGTTTT CGTTCCTACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA
3651   AGATCAAAGG ATCTTCTTGA GATCCTTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC
3701   TTGCAAACAA AAAAACCACC GCTACCAGCG GTGGTTTGTG TGCCGGATCA
3751   AGAGCTACCA ACTCTTTTTC CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC AGAGCGCAGA
3801   TACCAAATAC TGTTCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG
3851   AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTACCAGT
3901   GGCTGCTGCC AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC
3951   GATAGTTACC GGATAAGGCG CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC
4001   ACACAGCCCA GCCTGGAGCG AACGACCTAC ACCGAACTGA GATACCTACA
4051   GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA AAGGCGGACA
4101   GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT
4151   CCAGGGGGAA ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTGCGGT TTCGCCACTT
4201   CTGACTTGAG CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT
4251   GGAAAAACGC CAGCAACGCG GCCTTTTTTAC GGTTCCTGGC CTTTTGCTGG
4301   CCTTTTGCTC ACATGTTCTT TCCTGCGTTA TCCCCTGATT CTGTGGATAA
4351   CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC AGCCGAACGA
4401   CCGAGCGCAG CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG CGGAAGAGCG CCCAATACGC
4451   AAACCGCCTC TCCCCGCGCG TTGGCCGATT CATTAAATGCA GCTGGCACGA
4501   CAGGTTTCCC GACTGGAAAG CGGGCAGTGA GCGCAACGCA ATTAATGTGA
4551   GTTAGCTCAC TCATTAGGCA CCCAGGCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT
4601   CGTATGTTGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTTACA CAGGAAACAG
4651   CTATGACCAT GATTACGCCA AGCTATTTAG GTGACACTAT AGAATACTCA
4701   AGCTTTCTAG ATTAAGG

```

图4B

专利名称(译)	使用抗体重链的筛选方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1942203A</a>	公开(公告)日	2007-04-04
申请号	CN200580011496.1	申请日	2005-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	金克克国际有限公司		
申请(专利权)人(译)	金克克国际有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	金克克国际有限公司		
[标]发明人	Y陈		
发明人	Y·陈		
IPC分类号	A61K39/00 G01N33/53 C12P19/34 C07K16/00 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	C07K2317/22 G01N33/6857 C07K16/005		
代理人(译)	路小龙		
优先权	60/577303 2004-06-04 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种筛选方法，包括抗体重链和报告基因，分别如骆驼抗体和β-内酰胺酶。

```

1  TFFGEKQLAE VVANTITPLW KAQVPCMAV AVTIYQKPHY YTFGKADLAA
51  NKPVTFQTLF ELGSISKTTI QVLGGDALAR GEISLDDAVT EYWDQLTGKQ
101  WQGIKMLDLA TTAGGLPLQ VFDIVTERAS LLRFYQNWQP QNRPGTTRLY
151  ANASIGLPCA LAVKPSCHPY EQAMTTRVLK PLKLDHTWLN VPKAZAKAYA
201  WGYREGKAVR VSPGMDDAQA YGVKINVDQM ANWVWNNAP ENVAQASLQ
251  QIALAQSKYW RIGSMYQGLG WENLAWPVEA NTVVETSFGN VALAPLVVAE
301  VNPAPPPVKA SWVHTGSGTQ GFGSYVAFIP EKQIGIVMLA NTSYENEARV
351  EAAYHLEAL Q

```