



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101583625 B

(45)授权公告日 2020.03.20

(21)申请号 200680018364.6

(22)申请日 2006.05.26

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 101583625 A

(43)申请公布日 2009.11.18

(30)优先权数据
0510790.9 2005.05.26 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2007.11.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2006/005057 2006.05.26

(87)PCT国际申请的公布数据
W02006/125668 EN 2006.11.30

(73)专利权人 阿菲姆德农业医药公司
地址 德国海德堡

(72)发明人 卡茵·霍夫曼 瑟基·可普芮加欧
斯蒂芬·早斯·鸠其姆·克拉克马
斯
伐布芮斯·勒盖儿 马威廉·利透
乌娃·芮优其

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限
公司 11002

代理人 谢顺星

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

WO 03101485 A1,2003.12.11,摘要、第5,69
段.

Ping Li et al..Recombinant CD16A-Ig
forms a homodimer and cross-blocks the
ligand binding functions of neutrophil
and monocyte Fc receptors.《Molecular
Immunology》.2001,第38卷527-538.

Jeffrey V.Ravetch and Bice
Perussia.ALTERNATIVE MEMBRANE FORMS OF
FcyRIII(CD16) ON HUMAN NATURAL KILLER
CELLS AND NEUTROPHILS Cell Type-Specific
Expression of Two Genes That Differ in
Single Nucleotide Substitutions.
《J.Exp.Med.》.1989,第170卷481-497.

审查员 李有朝

权利要求书3页 说明书31页
序列表20页 附图9页

(54)发明名称

抗-CD16结合分子

(57)摘要

本发明涉及能特异性结合于在自然杀伤
(NK)细胞和巨噬细胞表面表达的人Fc γ III受体
(即Fc γ RIIIA)的结合分子,且尤其是,特异地结
合于A型Fc γ RIII而不与B型Fc γ RIII结合的结
合分子,以及该结合分子在疾病诊断和治疗中的
应用.本发明进一步涉及编码此类结合分子的多
核苷酸,包含所述多核苷酸的宿主细胞以及利用
所述宿主细胞制备本发明结合分子的方法。

CN 101583625 B

1. 对至少一种抗原具有特异性的抗体或其抗原结合片段,其中所述至少一种抗原是Fc γ RIIIA,所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合于Fc γ RIIIB,且包括轻链可变区和重链可变区,其中:

重链可变区包含为SEQ ID NO:17的重链CDR1、为SEQ ID NO:18的重链CDR2和为SEQ ID NO:19的重链CDR3;并且轻链可变区包含选自以下的CDR1、CDR2和CDR3:

- (i) 为SEQ ID NO:20的CDR1、为SEQ ID NO:21的CDR2和为SEQ ID NO:22的CDR3;
- (ii) 为SEQ ID NO:23的CDR1、为SEQ ID NO:24的CDR2和为SEQ ID NO:25的CDR3;
- (iii) 为SEQ ID NO:26的CDR1、为SEQ ID NO:27的CDR2和为SEQ ID NO:28的CDR3;
- (iv) 为SEQ ID NO:29的CDR1、为SEQ ID NO:30的CDR2和为SEQ ID NO:22的CDR3;
- (v) 为SEQ ID NO:26的CDR1、为SEQ ID NO:31的CDR2和为SEQ ID NO:32的CDR3;
- (vi) 为SEQ ID NO:33的CDR1、为SEQ ID NO:21的CDR2和为SEQ ID NO:22的CDR3;
- (vii) 为SEQ ID NO:34的CDR1、为SEQ ID NO:35CDR2和为SEQ ID NO:22的CDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区由选自SEQ ID NO:10-16的氨基酸序列组成;且所述重链可变区由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自Fv、Fab、双-Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv。

4. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包括至少一种人CDR。

5. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段完全是人源的。

6. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其能够激活表达Fc γ RIIIA的人细胞。

7. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其能够诱导NK细胞介导的细胞杀伤。

8. 根据权利要求5所述的抗体或其抗原结合片段,其抑制表达Fc γ RIIIA的人细胞的激活。

9. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是多特异性的且对Fc γ RIIIA和至少一种其它抗原具有特异性。

10. 根据权利要求9所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述至少一种其它抗原是细胞表面抗原。

11. 根据权利要求10所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述细胞表面抗原选自CD19、CD20、CD30、层粘连蛋白受体前体、EGFR1、EGFR2、EGFR3、Ep-CAM、PLAP、Thomsen-Friedenreich抗原、MUC-1、IL4-R α 、IL13-R、IGFR、Fc ϵ RI和CD5。

12. 根据权利要求11所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段对(a)Fc γ RIIIA和CD30或对(b)Fc γ RIIIA和EGFR1具有特异性。

13. 根据权利要求9所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述至少一种其它抗原来自传染原。

14. 根据权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述传染原是病毒、细菌、真菌、支原体、寄生虫或朊病毒。

15. 根据权利要求9所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自Fv、

Fab、双-Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv。

16. 根据权利要求15所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段为双功能抗体或串联双功能性抗体TandAb。

17. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段对Fc γ RIIIA具有特异性且还包括选自以下的功能域:FcR结合肽、Fc-结构域、酶、血清白蛋白、细胞因子、标记分子和毒素。

18. 根据权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述功能域选自抗体Fc结构域、用于抗体依赖的酶前体药物治疗的酶、能与Fc受体结合的肽、用于增加结合分子血清半衰期的蛋白或肽。

19. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段能够以与结合于Fc γ RIIIA^{158V}等位变异体近乎相同的结合力结合于Fc γ RIIIA^{158F}等位变异体。

20. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与标记分子或毒素结合。

21. 包括权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段和至少一种其它组分的组合物。

22. 根据权利要求21所述的组合物,其中所述至少一种其它组分是合适的药用载体、赋形剂、稀释剂和/或稳定剂。

23. 编码权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

24. 根据权利要求23所述的多核苷酸,其中对Fc γ RIIIA具有特异性的抗体或其抗原结合片段包括:

- a) 由选自SEQ ID NO:2-8所示的核苷酸序列编码的人轻链可变区;和
- b) 由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列编码的人重链可变区。

25. 根据权利要求23所述的多核苷酸,其编码:由选自SEQ ID NO:2-8所示的核苷酸序列编码的第一轻链可变区,由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列编码的第一重链可变区,对CD19具有亲和力的第二轻链可变区和第二重链可变区。

26. 根据权利要求23所述的多核苷酸,其编码:由选自SEQ ID NO:2-8所示的核苷酸序列编码的第一轻链可变区,由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列编码的第一重链可变区,对CD30具有亲和力的第二轻链可变区和第二重链可变区。

27. 包括权利要求23所述的多核苷酸的载体,其可操作地连接于启动子区以及任选地连接于转录终止子区。

28. 根据权利要求27所述的载体,其中所述多核苷酸可操作地连接于启动子区以及信号序列。

29. 包括权利要求23所述的多核苷酸或者权利要求27所述的载体的宿主细胞。

30. 根据权利要求29所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞选自细菌细胞、真菌细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞或植物细胞。

31. 制备权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括,将权利要求23所述的多核苷酸或权利要求27所述的载体导入宿主细胞,并在能够表达结合分子的条件培养宿主细胞。

32. 根据权利要求31所述的方法,其还包括分离以及任选地进一步纯化所述抗体或其

抗原结合片段。

33. 制备权利要求1-20中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括下述步骤:

- (a) 将权利要求23所述的多核苷酸或权利要求27所述的载体导入宿主细胞;
- (b) 在能够表达权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段的条件下培养宿主细胞;
- (c) 分离步骤(b)中表达的抗体或其抗原结合片段;以及
- (d) 用标记物或毒素结合步骤(c)分离得到的抗体或其抗原结合片段。

34. 权利要求11所述的抗体或其抗原结合片段在制备治疗癌症的药物中的应用。

35. 根据权利要求34所述的应用,其中所述抗体或其抗原结合片段的细胞表面抗原为CD19或CD30。

36. 权利要求19所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于染色表达Fc γ RIIIA的细胞、离体分析患者细胞表达谱的试剂中的应用。

37. 包括权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段以及用于检测结合于Fc γ RIIIA的抗体或其抗原结合片段的工具的试剂盒。

抗-CD16结合分子

技术领域

[0001] 本发明涉及能特异性结合于在自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞表面表达的人Fc γ RIII受体(即Fc γ RIIIA)的结合分子,且尤其是,特异地结合于A型Fc γ RIII而不与B型Fc γ RIII结合的结合分子,以及该结合分子在疾病诊断和治疗中的应用。本发明进一步涉及编码此类结合分子的多核苷酸,包含所述多核苷酸的宿主细胞以及利用所述宿主细胞制备本发明结合分子的方法。

背景技术

[0002] CD16(也称作Fc γ RIII),一种对某些与抗体依赖细胞毒性(ADCC)有关的IgGs的Fc片段具有低亲和性的受体,该受体是得到最好表征的负责引发NK细胞对靶细胞的溶解的膜受体(Mandelboim等,1999,PNAS 96:5640-5644)。人NK细胞包括大约15%的淋巴细胞,其由表达CD56而不表达CD3的表型确定(Robertson和Ritz,1990,Blood 76:2421-2438)。大多数(约90%)人NK细胞中CD56的表达量低(CD56^{dim}),而高水平地表达Fc γ RIII(CD16)的(Cooper等,2001,Trends Immunol.22:633-640)。人Fc γ RIII具有Fc γ RIIIA和Fc γ RIIIB两种亚型,它们的胞外免疫球蛋白结合区域序列具有96%的序列同一性(van de Winkel和Capel,1993,Immunol Today 14(5):215-221)。

[0003] Fc γ RIIIA是在巨噬细胞、肥大细胞以及NK细胞上表达的跨膜受体。在NK细胞上,Fc γ RIIIA的 α 链与含有Fc ϵ RI γ -链的免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)和/或T细胞受体(TCR)/CD3 ζ -链结合于信号转导(Wirthmueller等,1992,J.Exp.Med.175:1381-1390)。在NK细胞中发现了Fc γ RIIIA与 γ 和 ζ 链的同型和异型二聚体的不同组合的互作,这就提供了在NK细胞中存在通过Fc γ RIIIA复合物变异体引起的不同信号通路的可能性(Anderson等,1990,PNAS 87(6):2274-2278;Ackerly等,1992,Int.J.Cancer Suppl.7:11-14)。

[0004] Fc γ RIIIB作为糖基-磷脂酰肌醇(GPI)-锚受体(Fc γ RIIIB亚型)存在于多核粒细胞(PMN)上,该受体不能引发对肿瘤细胞的杀伤作用(van de Winkel和Capel,1993, supra)。此外,Fc γ RIIIB以可溶性的受体存在于血清中,其在体内一旦与抗体结合就可能通过形成免疫复合体而引起副作用。

[0005] 研究表明Fc γ R-表达效应细胞通过ADCC作用来破坏肿瘤细胞。因此引起了几种通过利用Fc γ R的活性来治疗癌症的免疫治疗方法的发展,如肿瘤单克隆抗体能够通过与Fc γ Rs结合诱发ADCC效应来介导破坏肿瘤细胞,具有肿瘤细胞特异性以及粒性白细胞Fc γ RI或NK细胞Fc γ RIII特异性的双特异分子被利用来改善效应细胞复原(van Spriell等,2000 Immunol.Today,21:391-397)。

[0006] 作为细胞先天免疫性的介质,NK细胞是专业的细胞杀手,与T细胞不同,NK细胞趋向存在于组成性激活状态,不需要额外的(预-)刺激。相反地,静止的细胞毒T细胞需要通过与MHC抗原复合物结合以及后续通过CD28的共刺激来激活。因此,在所有的免疫效应细胞中,NK细胞是用于免疫治疗的较吸引人的候选细胞之一,并且现已开发了对CD16(Fc γ RIII)和HER-2/neu或CD16和CD30具有特异性的双特异性抗体(Arndt等,1999 Blood 94:

2562-2568;McCall等,2001 J.Immunol.166:6112-6117)。

[0007] 迄今为止,生产的大多数抗CD16抗体,除单克隆抗体(MAb)1D3外,都不能够区分CD16的Fc γ R11IA和Fc γ R11IB两种亚型,该单克隆抗体能够特异性地结合嗜中性粒细胞上表达的CD16亚型,即Fc γ R11IB,并且该单克隆抗体能够识别Fc γ R11IB的不同异型体(Ory等1989,J.Clin.Invest.83:1676-81;Huizinga等1990 Blood 75:213-7;Tamm&Schmidt 1996,J.Immunol.1996 157:1576-1581)。然而,到目前为止,还没有与在NK细胞上表达的Fc γ R11IA特异性结合而不与Fc γ R11IB结合的分子实例。

发明内容

[0008] 一种Fc γ R11IA特异性抗体,应当是能够直接抗疾病相关细胞的双特异性或多特异性结合分子的组分之一,它应当主要修复NK细胞,并且不能与循环中可溶的Fc γ R11IB结合,或通过与嗜中性粒细胞或活化的嗜酸性细胞结合而转向结合NK细胞。为了有效介导NK细胞的杀伤,Fc γ R11IA特异性的抗体不仅必须与NK细胞结合,还需要通过结合激活NK细胞。

[0009] 我们鉴定得出了几种新的具有这样有用特性的抗CD16 scFvs,例如它们能够特异结合Fc γ R11IA,而不结合Fc γ R11IB,并且它们一旦结合就能激活NK细胞。

[0010] 同样,众所周知,Fc γ R11IA具有几个等位基因多态性,尤其是在IgG结合区域的48位和158位。上述抗CD16的抗体与Fc γ R11IA不同的多态形式表现的亲和力不同,并且Koene等(1997,Blood90:1109-1114)已经发现这些抗体与158位多态性结合的差异。因为Fc γ R11IA^{158F}和Fc γ R11IA^{158V}等位基因的基因频率分别为约0.6和0.4,此对于任意能识别这2种等位基因的抗CD16A抗体是有利的,以确保任何病人的抗CD16A抗体能够结合并激活NK细胞群。

[0011] 因此这里描述的是一种抗CD16A scFv抗体,该抗体能够具有近似相同的亲和力识别Fc γ R11IA^{158V}和Fc γ R11IA^{158F},但却不与Fc γ R11IB结合。

[0012] 因此这里描述的新scFvs可用于生产用作治疗药物的新的结合分子。这里用的术语“结合分子”包括抗体和抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段选择性地和特异性地结合于Fc γ R11IA,这些抗体或抗原结合片段的融合蛋白以及包括所述的抗体或抗原结合片段的蛋白偶联物也选择性地和特异性地结合于Fc γ R11IA,但不特异性结合于Fc γ R11IB。

[0013] 因此,在本发明的第一个方面,提供了一种至少对抗原Fc γ R11IA具有特异性的结合分子,其中该结合分子不能与Fc γ R11IB特异性结合。

[0014] 在一个优选的实施方案中,Fc γ R11IA的特异性是由抗体或其抗原结合片段提供。因此,本发明的结合分子可包括,或在特定的实施方案中,由至少一种可以特异性识别Fc γ R11IA而不识别Fc γ R11IB的抗体(或其抗原结合片段)组成。

[0015] 具有特异结合Fc γ R11IA的抗体可以是自然产生的抗体或者是重组抗体。本发明的抗体,可以是任何一个免疫球蛋白家族,如它们可以是IgA,IgD,IgE,IgG和IgM抗体,优选地是IgG抗体。适用于本发明的抗原结合片段可以是自然产生或者重组产生,包括免疫球蛋白轻链、免疫球蛋白重链、V_H结构域、V_L结构域、Fvs、单链抗体(包括scFvs)、Fabs、di-Fabs、Fab's、F(ab')₂s以及CDRs。本领域的技术人员熟悉所述的抗原结合片段以及它们的制备。

为了避免质疑,这里所用的术语单链抗体是指一种基因工程单链分子,它由轻链的可变区和重链的可变区组成,并通过一个合适的多肽接头相连接。单链抗体的实例包括scFv和双特异性抗体。

[0016] 在一个实施方案中,对Fc γ RIIIA具有特异性的抗体或者抗原结合片段包括至少一种人的CDR,优选地选自表1中的CDRs。

[0017] 表1.来源于scFvs的能够选择性和特异性结合于Fc γ RIIIA而不特异性结合于Fc γ RIIIB的人的轻链和重链CDRs的氨基酸序列

链	CDR1	CDR2	CDR3
1.重链	TSYYMH (SEQ ID NO 17) SGDKLEEKYVS (SEQ ID NO 20)	IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO 18)	GSAYYYDFADY (SEQ ID NO 19) QVWDNYSVL (SEQ ID NO 22)
2.轻链	GGNNIESRNVH (SEQ ID NO 23)	RDNNRPS (SEQ ID NO 24)	QVWDNYTVI (SEQ ID NO 25) QVWDNYIVL (SEQ ID NO 28)
3.轻链	GGNIGSKNVH (SEQ ID NO 26)	RDSNRPS (SEQ ID NO 27)	QVWDNYSVL (SEQ ID NO 22) QVWDDYIVV (SEQ ID NO 32)
4.轻链	EGNIGSKNVH (SEQ ID NO 29)	DDSDRPS (SEQ ID NO 30)	QVWDNYSVL (SEQ ID NO 22) QVWDDYIVV (SEQ ID NO 32)
5.轻链	GANDIGKRVH (SEQ ID NO 33)	RDSSRPS (SEQ ID NO 31)	QVWDNYSVL (SEQ ID NO 22) QVWDNYSVL (SEQ ID NO 22)
6.轻链	GGHNIGSKNVH (SEQ ID NO 34)	QDNKRPS (SEQ ID NO 21)	QVWDNYSVL (SEQ ID NO 22)
7.轻链		QDNKRPS (SEQ ID NO 35)	
8.轻链			

[0019] 技术人员应能理解,除单链的CDRs外,一般而言,抗体以及抗原结合片段包括三个轻链CDRs和/或三个重链CDRs。进一步地说,对Fc γ RIIIA具有特异性的抗体或抗原结合片段包括人的三个轻链CDRs和/或三个重链CDRs。优选地,人的轻链CDR1具有选自SEQ ID NO 20,SEQ ID NO 23,SEQ ID NO 26,SEQ ID NO 29,SEQ ID NO 33和SEQ ID NO 34的氨基酸序列;人的轻链CDR2具有选自SEQ ID NO 21,SEQ ID NO 24,SEQ ID NO 27,SEQ ID NO 30,SEQ ID NO 31和SEQ ID NO 35的氨基酸序列;人的轻链CDR3具有选自SEQ ID NO 22,SEQ ID NO 25,SEQ ID NO 28和SEQ ID NO 32的氨基酸序列。优选地,人的重链CDR1具有SEQ ID NO 17所示的氨基酸序列;人的重链CDR2具有SEQ ID NO 18所示的氨基酸序列;人的重链CDR3具有SEQ ID NO 19所示的氨基酸序列。

[0020] 抗体或抗原结合片段包括一种轻链或者由一种轻链的可变区组成,轻链的可变区具有下列氨基酸序列中的一种:

[0021] SEQ ID NO 10:

[0022] syelmqppsvsvssgqtasipcsgdkleekyvswwyqqrpgqspvlviyqdnkrpvgiperfsgsngn tatltisgtqamdeadyycqvwdnysvlfgggkltvl;

[0023] SEQ ID NO 11:

[0024] syeltqplsesvaqqqtaritcggnniesrnvhwyqqkpgqapvlviyrdnnrpsgiperfsgsnsgn matltisraqagdaadyycqvwdnytvlfgggkltvl;

[0025] SEQ ID NO 12:

[0026] syeltqppsvavapgktaritcggnnigsknhwyqqkpgqapvlviyrdsnrpsgiperfsgsnsgn tatltisraqagdeadfycqvwdnyivlfgggkltvl;

[0027] SEQ ID NO 13:

[0028] qavltqppsvsvapgqtaripcegnnigsknhwyrqkpgqvpvlvmyddsrpsgiperfsgsnsgn tatltisgtqamdeadyycqvwdnysvlfgggkltvl;

[0029] SEQ ID NO 14:

[0030] qpvltpqlsvsvapgqtaritcggnnigsknhwyqqkpgqapvlviyrdssrpsgiperlsgsnsgd tatltisraqagdeadyycqvwdyivvlfgggkltvl;

[0031] SEQ ID NO 15:

[0032] syeltqppsvsvtpgqtatitcgandigkrnhwyqqrpgqspvlviyqdnkrpsgiperfsgsnsgn tatltisgtqamdeadyycqvwdnysvlfgggkltvl;

[0033] SEQ ID NO 16:

[0034] qpvltpqsssvsvapgqtatiscgghnigsknhwyqqrpgqspvlviyqdnkrpsgiperfsgsnsg

[0035] gntatltisgtqamdeadyycqvwdnysvlfgggkltvl.

[0036] 抗体或抗原结合片段包括一种重链或者由一种重链的可变区组成,该重链的可变区可具有下面所示的氨基酸序列(SEQIDNO9):evqlvqsgaevkkpgeslkvsckasgytftsyyhmwrqapggglewmgiinpsggstsyakfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargsayyydfadywgqgtlvtvss.

[0037] 在一个优选的实施方案中,对Fc γ RIIIA具有特异性的抗体或抗原结合片段应完全是人源的。

[0038] 在进一步优选的实施方案中,本发明的结合分子一旦与人细胞上表达的Fc γ RIIIA结合就能激活该细胞表达Fc γ RIIIA,如结合分子一旦与Fc γ RIIIA结合就能够或者引发一系列生物反应,尤其是信号反应。优选地,结合分子借助与细胞结合就能够以一种类似于抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的方式引发细胞杀伤。

[0039] 可以通过检测引起外周血NK细胞钙运动的能力来检测本发明的结合分子能否激活人细胞表达Fc γ RIIIA,如实施例所述。本发明的结合分子引发NK细胞介导的细胞毒性的能力同样可以被检测,如实施例所述,利用新鲜分离的NK细胞释放钙黄绿素试验来检测重定向的细胞裂解。

[0040] 本发明还提供了不但对Fc γ RIIIA具有特异性、对Fc γ RIIIB无特异性,而且对一或多种其它抗原具有特异性的结合分子。因此,本发明的结合分子具有多特异性。这里所说的术语多特异性是指,本发明的结合分子,在缺乏对Fc γ RIIIB特异性的同时具有至少两种特异性,其中一种是针对Fc γ RIIIA的。本发明的多特异性分子至少包括双特异性、三特异性以及四特异性的分子。例如,双特异性抗体包括单链双功能性抗体、(scFv)₂、串联双功能性抗体(TandAbs);三功能性抗体(三特异性抗体);四体(四特异性抗体)和复合体(参见LeGall等1999 FEBS Letts 453:164-168和WO 03/025018)。

[0041] 基于它们的多特异性,本发明的结合分子能够把巨噬细胞或NK细胞靶向到其它抗

原,甚至到产生(bearing)这种抗原的细胞,因此通过吞噬作用或者NK细胞介导的细胞杀伤作用可以根除这种抗原或产生这种抗原的细胞。例如,本发明的结合分子还可具有一种或多种针对肿瘤特异抗原的特异性,因此能够将NK细胞靶向到肿瘤细胞。结合分子与Fc γ R111A相结合,激活NK细胞,从而对肿瘤细胞产生杀伤。基于本发明结合分子的特性,其能够用于治疗 and/或消除病变细胞和传染介质(如细菌、真菌、支原菌、病毒、寄生虫、朊病毒)。

[0042] 因此,本发明的另一方面是提供一种如上所述的结合分子,它至少对一种其它抗原有特异性。在一个实施方案中,其它抗原是一种细胞表面抗原。能够与细胞表面抗原特异性结合的本发明结合分子的实例为CD19、CD20、CD30、层粘连蛋白受体前体蛋白(也称作做胎儿肿瘤抗原不成熟层粘连蛋白受体OFA-iLR)、EGFR1(也称作HER-1, ErbB1)、EGFR2(也称作HER-2, ErbB2, neu)、EGFR3(也称作HER-3)、Ep-CAM、PLAP(胎盘碱性磷酸酶)、Thomsen-Friedenreich (TF) 抗原、MUC-1(粘液素)、IGFR、IL4-R α 、IL13-R、Fc ϵ RI和CD5。

[0043] 在一个进一步的实施方案中,至少一种其它抗原是来源于病原体的抗原,例如该抗原可能是在宿主细胞、感染细胞、细菌、真菌、支原菌、寄生虫或者病毒外表面分泌或者表达的抗原;或该抗原可能是该病原体溶解释放的。例如,本发明的结合分子可能具有其它对病毒蛋白如CMV-感染的细胞表面的gp34或gp68的特异性,或存在流感病毒中的血凝素的特异性。因此,它作用于病毒感染的细胞或者直接作用于病毒。或者,当朊病毒是传染介质时,朊病毒蛋白本身可作为抗原。

[0044] 在进一步的实施方案中,至少一种其它抗原是一种变态反应原,或一种与机体变态反应应答有关的分子,如(尤其是)肥大细胞上的IgE或Fc ϵ RI受体。

[0045] 优选地,在本发明的结合分子中,对于至少一种其它抗原的特异性是由抗体或其抗原结合片段提供的。如上所述,技术人员熟知各种抗体(IgA, IgD, IgE, IgG和IgM)和来源于本发明抗体的抗原结合片段(如免疫球蛋白轻链,免疫球蛋白重链, V_H结构域, V_L结构域, Fvs, scFvs, Fabs, di-Fabs, Fab's, F(ab')₂和CDRs)。在一个优选的实施方案中,抗体为IgG抗体。

[0046] 本发明的结合分子具有多特异性,尤其是双特异性,所以该结合分子可含有如下任何一种形式:双特异IgGs、IgG-scFv₂、(scFv)₄-IgG、(Fab')₂、(scFv)₂、(dsFv)₂、Fab-scFv融合蛋白、(Fab-scFv)₂、(scFv)₂-Fab、(scFv-CH₂-CH₃-scFv)₂、双功能性抗体、三功能性抗体、双特异性抗体、二硫化物稳定的双特异性抗体、'knob-into-whole'双特异性抗体、单链双特异性抗体(scDb)、串联双特异性抗体(TandAb)、flexibody、DiBi微型抗体、[(scFv)₂-Fc]₂、(scDb-CH₃)₂、(scDb-Fc)₂、二-双功能性抗体、Tandemab(见综述Kipriyanov&Le Gall, 2004, Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 7:233-242以及Marvin和Zhu, 2005, Acta Pharmacol. Sin., 26:649-658), 优选的是TandAb或Flexibody。与其它许多双特异性抗体形式不同的是, TandAb是一种包括唯一一种抗体可变区的同源二聚体,并且它的形成取决于位于不同多肽链上V_H和V_L结构域的互补性的联合。TandAb的大小是双特异性抗体和(scFv)₂的2倍,它能够同时与效应器和靶细胞双价结合,并且相对于双功能抗体和(scFv)₂具有更好的药物代谢动力学特性,如它在体内和体外都具有更高的稳定性和更强的生物学活性(Kipriyanov等, 1999, J. Mol. Biol., 293:41-56; Cochlovius等, 2000, Cancer Res., 60:4336-4341; Reusch等, 2004, Int. J. Cancer, 112:509-518.)。具有相同特异性的同源V_H和V_L结构域的链间配对能用于双特异scFvB-diabodyA-scFvB串联分子的形成,因此称为

‘flexibodies’ (A和B具有相同或不同的特异性)。依据用于链间配对的互补结构域之间结合的牢固性以及分开它们的接头的长度可以形成双特异性的单链分子的二聚体,三聚体甚至四聚体。

[0047] 现有技术中描述了用于本发明的能够与CD19、CD20、CD30、层粘连蛋白受体前体蛋白、EGFR1、EGFR2、EGFR3、Ep-CAM、PLAP、Thomsen-Friedenreich (TF) 抗原、MUC-1 (mucin), IGFR、CD5, IL4-R α 、IL13-R, Fc ϵ RI和IgE特异性结合的抗体和抗原结合片段,它们都是作为传染介质的抗体。(参见例如,EP-A-1314741,Reff等1994 Blood 83:435-445,EP-A-1005870,WO 01/92340,US 6,033,876,WO 86/03223,Buto等1997 Int.J.Biol.Markers 12:1-5,US 6,699,473,WO 98/50433,US 5,770195,EP-A-0502812,Carter等1992 PNAS89:4285-4289,US 5,968,511,WO 04/106383,Nouri等2000 BJU Int.86:894-900,EP-A-0429242,Ravn等2004 J.Mol.Biol.343:985-996,Dahlenborg等1997 Int.J.Cancer 70:63-71,WO 88/05054,W002/053596,WO 04/071529,Studnicka等1994 Protein Eng.7:805-814,Presta等1993 J.Immunol.151:2623-2632)。这些引用的文献阐述了这些抗体或抗原结合片段的氨基酸序列或编码的核苷酸序列,本领域的技术人员可以直接利用这些序列来制备本发明所述的结合分子。这些引用的文献介绍了生产这些抗体或抗原结合片段的淋巴细胞杂交瘤或者细胞系,因此本领域的技术人员能够通过规范的分子生物学技术从合适的淋巴细胞杂交瘤或者细胞系中获得编码目标抗体或抗原结合片段的核酸序列,一旦得到核苷酸序列就能用于构建本发明的结合分子。

[0048] 本发明的另一个方面提供了本发明在这里描述的实施方案的任一方面结合分子,其能够以近似相同的亲和力结合于等位基因Fc γ RIIIA^{158F}和Fc γ RIIIA^{158V},即,结合分子结合于两个Fc γ RIIIA 158等位基因亲和力的差距不超过2倍。在本发明的一个优选的实施方案中,对Fc γ RIIIA的特异性由来自于本发明在这里描述的4-LS21 scFv的抗体或抗原结合片段提供。在本发明尤其优选的一个实施方案中,本发明的结合分子以TandAb形式且包括来源于4-LS21 scFv的抗原结合片段以及具有对CD19或CD30有特异性的抗原结合片段。

[0049] 本领域的技术人员可以理解本发明结合分子目的是用于人类的治疗上,结合分子潜在的免疫原性应降到最低。因此,这里提供的对Fc γ RIIIA和/或其它抗原的特异性的抗体或抗原结合片段,这些抗体或抗原结合片段最好是嵌合体的、CDR移植片的、人源化的或完全人源的。更加优选的是人源化的或完全人源的抗体或抗原结合片段。现在相关文献利用标准的分子生物学技术来介绍了抗体的人源化效应,提供了非人抗体序列,本领域技术人员能够很容易地生产此类抗体的人源化版本。这里利用的术语“完全人源”它是指在抗体和抗原结合片段范围内,这些抗体或抗原结合片段的氨基酸序列来源(即最初或可能发现于)于人。

[0050] 另外一种技术,可任选地,或此外,用于上述减少免疫原性的方法,即去免疫法。去免疫技术包括来源于抗体和其它蛋白质生物治疗试剂的辅助T (Th) 细胞抗原决定簇的识别和去除。辅助T细胞抗原决定簇包括能够结合于MHC II类的在蛋白质分子内的短肽序列。MHC II类合成物能够被T细胞所识别,并能引发辅助Th细胞的激活和分化,辅助T细胞通过与B细胞互作来启动和维持免疫原性,因此导致抗体分泌并特异性的结合到给予的生物学治疗药物。对于抗体的去免疫原性,可在抗体序列内鉴定辅助Th细胞抗原决定簇,例如通过

基于计算机的方法预测人MHC II类分子的结合缩氨酸(见Altuvia等,1995,J.Mol.Biol.,249:244-2450,以及Schueler-Furman等,2000,Protein Sci.,9:1838-1846)。因此辅助Th细胞抗原决定簇通过蛋白质序列氨基酸的取代来躲避T细胞的识别。该过程可以通过标准的分子生物学技术来实现,如治疗的蛋白质中通过定向诱变的方法来改变编码辅助Th细胞抗原决定簇的核苷酸序列。这样,可修饰抗体或抗原结合片段,从而减少或避免HAMA(人抗鼠抗原)和/或抗独特型反应(Bander等,2003,Semin.Oncol.,30:667-676;Nanus等,2003,J.Urol.,170:S84-S89)。因此,在进一步的实施方案中,对本发明的结合分子进行修饰,去除其序列中的任意Th细胞抗原决定簇。因此,这里指的结合分子是去免疫原性的结合分子。

[0051] 本发明的结合分子,还具有另外一个特性,它包含另外一个功能域。该功能域可能具有结合分子效应器的特性。例如,功能域可能是FcR结合肽或能够与Fc受体结合的抗体Fc区域,在结合分子上具有效应器的特性。可选择地,功能域可能是一种具有将前药转化为有活性药的能力的酶。这样,本发明的结合分子可能被用于抗体导向酶前药疗法(ADEPT)。在一个具体的实施方案中,结合分子的功能域是一种蛋白质或肽,它能够提高结合分子的血清半寿期。这样的蛋白质有血清白蛋白或IgG的Fc段,它可以通过与Fc γ Rn(新生Fc受体)结合来提高结合分子在血清中的半寿期。在一个具体的实施方案中,该功能域还可以是一种细胞因子。

[0052] 在本发明的另一个方面,本发明的结合分子可与标记分子或毒素结合。当所述的标记分子或毒素是蛋白质时,其可通过肽键或通过化学偶联与结合分子产生结合。因此,依据本发明涉及的此方面,结合分子可以是融合蛋白的形式,其中标记分子或毒素通过肽键,优选肽接头与结合分子连接,或者化学偶联的形式。为了避免疑问,这里所说的术语“偶联”是指两种组分通过化学键连接在一起,化学键包括肽键(因此偶联物包括融合蛋白)、酯键或二硫桥。

[0053] 本发明的结合分子与标记分子如放射性标记或荧光标记或发光的(包括化学发光)标记的结合,使得结合分子能够用于免疫着色试剂。这些试剂可以用于检测如表达Fc γ R111A的组织浸润NK细胞、巨噬细胞或肥大细胞或结合分子表现出的对其它抗原的特异性;用于检测NK细胞结合分子附加的抗原复合物。后者的检测对疾病诊断或者疾病恶化或疾病缓和的监控更加有用。

[0054] 本发明的结合分子,它能够与如核糖基转移酶、丝氨酸蛋白酶、脘基环化酶(cylcase)活化剂、钙调蛋白依赖性磷酸腺苷环化酶、核糖核酸酶、DNA烷化剂或有丝分裂抑制剂(如阿霉素)等毒素分子结合,它可用于靶向并杀死NK细胞和巨噬细胞。这样的结合分子也可用作免疫抑制剂。本领域技术人员可以理解,在本发明的这一方面,结合分子优选只对一种抗原即Fc γ R111A具有特异性。使用包括或者由选择性和特异性结合Fc γ R111A的单价抗原结合片段组成的结合分子来获得对免疫系统的抑制作用。这样的单价抗原结合分子其将作为阻遏Fc γ R111A受体的分子是优选的,其不是交联的,因此不能激活NK细胞或巨噬细胞。优选的单价抗Fc γ R111A抗原结合片段包括scFv、Fab、V_H、V_L和CDR。

[0055] 本领域技术人员可以理解,可以选择性的通过与标记分子或毒素的化学偶联进行标记,也可以用肽标记或肽毒素。例如,本发明的结合分子可以表达为在N-或C-末端肽具有标签的融合蛋白,如4-,5-,或6-组氨酸标签、c-myc标签或其它类似的标签。

[0056] 本发明的结合分子可以由在任何一个合适的蛋白质表达系统中编码其的核酸表达产生。因此,本发明的另一方面,提供了编码结合分子的多核苷酸。适用于本发明的优选多核苷酸为编码表1中所述CDRs的多核苷酸。尤其是,本领域技术人员利用表1中的轻链和重链CDRs的氨基酸序列,能够从如下的核酸序列中得到编码不同轻链和重链CDRs的多核苷酸序列:

[0057] SEQ ID NO 1:

[0058] gaggtccagctggtacagtctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtcctgaaggttctgcaaggcatctggatacaccttcaccagctactatatgcactgggtgcgacaggccccggacaagggcttgagtggatggataatcaaccctagtggtggtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtcacatgacccgggacacgtccacgagcacagtctacatggagcttagcagcctgagatctgaggacacggcctgtattactgtgctagaggtagtgcttattactacgattttgctgactactggggccagggaacctggtcaccgtctcctca;

[0059] SEQ ID NO 2:

[0060] tcctatgagctgatgcagccacctcagtgctcctcaggacagacagccagcatccccctgctctggagataaattggaggaaaaatgtttctggtatcaacagaggccaggccagtcacctgtgttggtcatttatcaggataataagcggccctcaggatccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacagccactctgaccatcagcgggaccaggcgatggatgaggctgactactattgtcaggtgtgggacaattacagtgtgctattcggcggagggaccaagctgaccgtccta

[0061] SEQ ID NO 3:

[0062] tcctatgagctgacacagccactctcagagtcagtgggccaggacagacggccaggattacctgtggggaaacaacattgaaagtagaaatgttccactggtaccagcagaagccaggccaggccccctgtgttggtcatctatagggataacaaccggccctctgggatccctgagcgattctctggctccaactcggggaacatggccaccctgaccatcagcagagcccaagccgggatgcagctgactattactgtcaggtgtgggacaactacactgtgctattcggcggagggaccaagctgaccgtccta

[0063] SEQ ID NO 4:

[0064] tcctatgagctgacacagccactctcagtgagtcagtgggccaggaaagacggccaggattacctgtggggaaacaacattggaagtaaaaatgtgcaactggtaccagcagaagccaggccaggccccctgtgctggtcatctatagggatagcaaccggccctctgggatccctgagcgattctctggctccaactcgggg aacacggccaccctgaccatcagcagagcccaagccgggatgaggctgacttttattgtcaggtgtgggacaactatattgtgctgttcggcggagggaccaagctgaccgtcctg

[0065] SEQ ID NO 5:

[0066] caggctgtgctgactcagccacctcagtgctcagtgggccaggacagacggccaggattccccctgtgaggaaacaacattggaagtaaaaatgtccactggtatcggcagaagccaggccaggtccctgtcctgggtcatgtatgatgatagcgaccggccctcaggatccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacagccactctgaccatcagcgggaccaggcgatggatgaggctgactactattgtcaggtgtgggacaattacagtgtgctattcggcggagggaccaagctgaccgtccta

[0067] SEQ ID NO 6:

[0068] cagcctgtgctgactcagccactctcagtgctcagtgggccaggacagacggccaggattacctgtggggaaacaacattggaagtaaaaatgtgcaactggtaccagcagaagccaggccaggccccctgtactgggtcatctatagggacagcagccggccctctgggatccctgagcgactctctggctccaactcgggggacacggccaccctgacca

tcagcagagcccaggccgggatgaggctgactattactgtcaggtgtgggacgactacattgtggtcttcggcgg
agggaccaagctgaccgtccta

[0069] SEQ ID NO 7:

[0070] tcctatgagctgacacagccaccctcggtgtcagtgaccccaggacagacggccacgattacctgcgg
ggcaaacgacattggaaaaagaaatgtccactggtaccaacagaggccaggccagtcccctgtgttggtcatttat
caggataataagcggccctcaggatccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacagccactctgacca
tcagcgggaccaggcgatggatgaggctgactactattgtcaggtgtgggacaattacagtgtgctattcggcgg
agggaccaagctgaccgtccta

[0071] SEQ ID NO 8:

[0072] cagcctgtgctgactcagccatectcggtgtcagtgggcccaggacagacggccacgatctcctgtgg
gggacacaacattgggagtaaaaatgtgcactggtaccagcagaggccaggccagtcccctgtg ttggtcattta
tcaggataataagcggccctcaggatccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacagccactctgacc
atcagcgggaccaggcgatggatgaggctgactactattgtcaggtgtgggacaattacagtgtgctattcggcg
gagggaccaagctgaccgtccta

[0073] SEQ ID NO 1编码源自人scFv的重链可变区,所述重链可变区能够选择性和特异性地结合于Fc γ RIIIA,而不能特异性结合于Fc γ RIIIB。SEQ ID NOs 2-8编码源自人scFv的轻链可变区,所述轻链可变区能够选择性地和特异性地结合于Fc γ RIIIA,而不能结合于Fc γ RIIIB特异。因此,SEQ ID NOs 1到8也是本发明的多核苷酸的实例,可以进一步用于制备发明中的结合分子。

[0074] 编码本发明的多特异性结合分子特别是双特异性结合分子的多核苷酸,可通过WO 03/025018描述的方法来构建,其可以是利用核酸编码选择性和特异性地结合于Fc γ RIIIA而不够特异性结合于Fc γ RIIIB的抗体的V_H和V_L结构域的核苷酸序列,结合编码能够与其它抗原特异性结合的抗体V_H和V_L结构域的核苷酸序列来构建得到。

[0075] 为了使结合分子能够在一个合适的蛋白质表达系统中表达,将编码结合蛋白多核苷酸可操作地连接到合适的启动子以及任意一个合适的转录终止子。其可通过将发明的多核苷酸引入宿主基因组,利用基因组内的启动子驱动多核苷酸的表达来实现。或者,可以将发明的多核苷酸通过包含多核苷酸与启动子和任意转录终止子可操作连接的载体导入宿主细胞。这些载体形成本发明的一个具体的方面。

[0076] 一般而言,在载体上可操作地与编码结合分子的多核苷酸连接的启动子,是当多核苷酸和载体导入宿主细胞后能够驱使结合分子在宿主细胞内的表达的任意启动子。因此,如果希望结合分子在细菌细胞内表达,则启动子在该细菌细胞中应是可操作的。类似地,如果希望结合蛋白在真菌表达系统中表达,那么应当启动子在该真菌细胞中应是可操作,依此类推,重组体在哺乳动物细胞表达系统、昆虫细胞表达系统或者植物表达系统中的表达也应如此。当本发明的多核苷酸可操作地连接于一个转录终止子区域时,其可以介导本发明的结合分子在宿主细胞内表达转录的终止。相关文献介绍了用于此目的的转录终止子区域。

[0077] 本发明的多核苷酸同样可操作地连接一个信号序列,它能够引导结合分子在目标细胞内或细胞外区域的表达。例如,它可以从它表达的宿主细胞分泌结合分子。信号序列能够编码信号肽。相关文献介绍了合适的细菌分泌信号肽,Pe1B引导序列就是其中例子之一。

在的实施例中,例如,在真核细胞中的表达,可能希望维持结合分子在内质网上(ER)表达。在这种情况下,信号序列包括一个编码“KDEL”基序的ER停滞序列(SEQ ID NO 54),尤其是编码“SEKDEL”的序列(SEQ ID NO 55)。

[0078] 本发明的多核苷酸也可以是根据本领域容易获得的方法优化的密码子,该密码子被改变以适应特定表达宿主的选择。

[0079] 本发明的多核苷酸和载体可以通过适当的方法导入宿主细胞。对于真核细胞,该技术包括磷酸钙转染法、二乙氨(基)乙基葡聚糖法、电穿孔法、粒子轰击法、脂质体介导的转染或利用逆转录病毒、慢病毒或其它病毒介导的转染,如牛痘苗或针对昆虫细胞的杆状病毒。适合于细菌细胞的方法包括氯化钙转化、电穿孔法或利用噬菌体的转染。适合与植物细胞的方法包括农杆菌属介导的转化、电穿孔法、植物细胞和原生质体的显微注射、微粒轰击法、依据于转化的植物物种的不同所用的细菌轰击器,特别是“fibre”或“whisker”方法。因此,本发明还提供了包括本发明的多核苷酸或载体的宿主细胞。下面介绍的来自于生物体的包含本发明多核苷酸或载体的宿主细胞,作为这方面的特定的实施方案。

[0080] 表达本发明结合分子的合适的表达系统包括微生物表达系统如细菌(例如大肠杆菌表达系统)和真菌表达系统如酵母(如酿酒酵母、裂殖酵母、毕赤酵母和*Hansenula*属)和其它真菌表达系统(如来自于曲霉、木霉和脉孢菌的丝状真菌表达系统);哺乳动物表达系统如CHO细胞系、NS0细胞系、HEK293细胞系;昆虫细胞表达系统和植物表达系统。红花是尤其优选的植物表达系统。技术人员熟知本领域的这些表达系统。

[0081] 本发明还提供一种生产本发明所述结合分子的方法。因此,这里描述的生产结合分子的方法,它包括向宿主细胞中导入本发明所涉及的多核苷酸或载体,在结合分子表达的条件下培养所述的宿主细胞。现有技术详细地介绍了宿主细胞的生长和维持以及发明涉及到的结合分子在此宿主细胞内表达的条件。在一个实施方案中,该方法将进一步包括结合分子的分离以及选择性地进一步的纯化。

[0082] 本发明的结合分子包括一个通过化学偶联在结合分子上的标记分子或毒素分子,结合分子可通过将本发明的多核苷酸或载体导入宿主细胞,在本发明的结合分子表达的条件下培养宿主细胞,分离表达的结合分子并将分离的结合分子与合适的标记或毒素偶联得到。典型地,偶联步骤需要利用异型双功能试剂产生文献所述的二硫化物或硫醚键(例如Hermanson,G.T.“Bioconjugate Techniques”Academic Press,London,1996,for standard methodologies relating to the use of cross-linking reagents)。

[0083] 本领域技术人员通过本发明的一些实施方案可以理解,在体内的结合分子可以提高循环的半寿期。此现象可以通过多种方式实现,例如上文中介绍的白蛋白。另外的众所周知提高一个分子在血清中的半寿期的方法,包括聚乙二醇化作用、唾液酸化作用和糖基化作用。因此本发明包括这里介绍的乙二醇化、唾液酸化或糖基化的结合分子。

[0084] 本发明还包括包含结合分子和至少一种其它组分的组合物。例如,本领域技术人员从表达后的宿主细胞中分离的结合分子,组合物包括大量的纯化的结合分子,其还含有杂质、稀释剂,缓冲液或其它类似物。这些中间物组分可以直接利用,或者可以通过这些中间物进一步纯化得到结合分子。

[0085] 本发明的组合物包括本发明的结合分子与药学接受的载体、赋形剂、稀释剂和/或稳定剂结合。本领域技术人员都熟悉文献描述的组分。该混合物的存在形式应该有利于对

病人给药,特别是适合安泰乐给药,如注射液或输注液。

[0086] 用于注射或输注的组合物,主要采用悬浮液、溶液或乳剂的形式存在于油或水的载体里,它包括配剂,如悬浮液、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。分子结合物或组合物也可以是干粉,在使用前用适当的无菌的液体来配制。

[0087] 本发明的结合分子以及组合物,尤其是多特异性结合分子和含有此的组合物,可以用于疾病的诊断和/或治疗,如自身免疫性疾病、炎性疾病、传染性疾病(包括移植物抗宿主病)、过敏症和癌症(如非-霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、霍奇金淋巴瘤/疾病;如出现在乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肾癌或胆管癌的实体瘤;微小残留疾病;转移肿瘤如肺、骨头、肝或脑中的转移)。

[0088] 本发明的多特异性的结合分子,其中至少一种附加特异性是针对CD19或CD20抗原,其对于治疗非-霍奇金淋巴瘤是尤其有用的。

[0089] 至少一种其它特异性是针对EGFR1的多特异性结合分子,其对于癌症的治疗尤其有用,其中EGFR1表达量是上调或者变化的,如乳腺癌、膀胱癌、头和颈癌、前列腺癌、肾癌、非小细胞肺癌、结肠直肠癌和神经胶质瘤。

[0090] 多特异性结合分子,其中至少一种附加特异性是针对TF抗原,对治疗乳腺癌或直肠癌和/或肝转移尤其有用。

[0091] 多特异性结合分子,其中至少一种附加特异性是针对CD30,对治疗霍奇金疾病尤其有用。

[0092] 多特异性结合分子,其中至少一种附加特异性是针对IL4受体 α 链(IL4Ra),对治疗实体瘤尤其有用,对治疗乳腺癌、卵巢癌、肾脏系统癌、头和颈癌、恶性黑色素瘤和AIDS相关的Kaposi's肉瘤尤其有用。

[0093] 多特异性结合分子,其中至少一种附加特异性是针对EGFR3/HER3和/或EGFR2/neu,对治疗乳腺癌尤其有用。

[0094] 多特异性结合分子,其中至少一种附加特异性是针对IGFR,对治疗前列腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌或乳腺癌尤其有用。

[0095] 特异性结合分子,其中至少一种附加特异性是针对CD5,对治疗慢性淋巴细胞性白血病尤其有用。

[0096] 特异性结合分子,其中至少一种附加特异性是针对MUC-1,对治疗胃癌和卵巢癌尤其有用。

[0097] 特异性结合分子,其中至少一种附加特异性是针对EpCAM,对治疗结肠、肾脏和乳腺的癌症尤其有用。

[0098] 特异性结合分子,其中至少一种附加特异性是针对PLAP,对治疗卵巢和睾丸的癌症尤其有用。

[0099] 特异性结合分子,其中至少一种附加特异性是针对OFA-iLR,对治疗转移性肿瘤尤其有用。

[0100] 本发明提供了利用在上文中提到的结合分子制造一种用于治疗自身免疫性疾病、炎性疾病、传染性疾病、过敏症或癌症(如非霍奇金淋巴瘤;慢性淋巴细胞性白血病;Hodgkin's淋巴瘤;如那些在肺、骨头、肝或脑中转移的实体瘤)的药物。上述的具有特定特异性的多特异性结合分子可用来治疗特定的疾病,这些结合分子同样可以用来制备治疗这些特

定疾病的药物。

[0101] 另外,本发明所涉及的结合分子可以作为试剂用于表达Fc γ RIIIA的细胞的染色。结合分子能够至少对另外的一种抗原具有特异性,它可以作为一种试剂用于鉴定Fc γ RIIIA表达细胞结合分子抗原复合物。本发明的结合分子能够用于分析和测定体外病人样本,以及作为生物标记和分离NK细胞用于体外治疗。

[0102] 另外,本发明另一个方面提供一个试剂盒,它包括上述的结合分子,用于与Fc γ RIIIA结合后结合分子的检测。结合分子由放射标记或化学发光物标记,检测方法包括使用对放射或化学发光标记物敏感胶片。结合分子带有组氨酸或c-myc标签,试剂盒包含能够识别那些标签的抗体。

[0103] 下面通过具体的实施例来进一步说明本发明。应当理解,在不偏离本发明的范围可对具体的细节进行修改,本领域的技术人员可按照实施例2所述的方法来获得用于本发明的抗体和抗原结合片段,有关与不同的Fc γ RIII亚型甚至Fc γ RIIIA不同的等位基因结合的特性,可以通过实施例中介绍的方法来检测。

[0104] 为了避免质疑,这里所用的术语“Fc γ RIII”,“Fc γ RIIIA”和“Fc γ RIIIB”与术语“CD16”,“CD16A”(表示A型CD16)与“CD16B”(表示B型CD16)可分别互换使用。

附图说明

[0105] 图1:证明scFv 50NI结合链霉亲和素捕获的CD16-Fc的ELISA结果

[0106] 在每孔加有100mM NaHCO₃ (pH8.6)的包被缓冲液的酶标板中加入500ng链霉亲和素和300ng人IgG (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, 德国)。接着将300ng生物素化的CD16A-Fc加入PBS溶液中,室温吸收30min。向链霉亲和素捕获的CD16A-Fc,链霉亲和素和人IgG中加入1 μ g/mL的鼠MAb A9或50 μ l用加有PBS/TWEEN 0.1%/2%脱脂奶粉的50NI克隆的天然胞质抽提物进行温育。用羊抗小鼠HRP结合抗体检测MAb A9的结合。用抗5组氨酸HRP结合抗体来检测scFv 50NI的结合。用50 μ l 0.5M的硫酸终止反应后,检测HRP-底物四甲基联苯胺(TMB)在450nm处的吸光值。

[0107] 图2:成熟人抗CD16 scFv对细胞转染表达的CD16A具有亲和力,但对细胞表达的CD16B不具有亲和力。

[0108] 用10 μ g/mL的MAb A9(抗CD16)或MAb 195314(抗NKp46)以及15 μ g/mL FITC偶联的羊抗鼠IgG对鼠BW细胞和CD16A稳定转染的鼠BW细胞(BW/CD16A)、HEK-293细胞和用CD16B、CD16A或NKp46转染的HEK-293细胞((293/CD16B)、(293/CD16A)或(293/NKp46))进行染色。抗CD16 scFv的浓度为50 μ g/mL,其用10 μ g/mL MAb 13/45/31-2(抗-六-组氨酸)和FITC偶联的羊抗小鼠IgG来检测。用流式细胞检测分析平均荧光强度,其通过减去单独用二级试剂对细胞着色的荧光值来校正,如图。

[0109] 图3:重组蛋白CD16A-Fc和CD16B的ELISA检测

[0110] 用0.1M NaHCO₃ (pH8.8)的缓冲液包被80nm的重组CD16A-Fc和CD16B的蛋白质。用含2%的脱脂奶粉PBS封闭。用HRP结合的c-Myc抗体(10 μ g/ml)来检测scFv与重组蛋白和gp34-Fc(阴性对照)的结合。加入抗CD16 MAb A9(1 μ g/mL)温育后再加入HRP结合的羊抗小鼠IgG(0.5 μ g/mL)。用抗组氨酸HRP(1 μ g/mL)染色来检测包被的重组蛋白CD16B,用HRP偶联的抗人IgG(0.5 μ g/mL)来检测包被的Fc融合蛋白。HRP的底物液为50 μ L的TMB。用50ml 0.5M

H₂SO₄终止反应后,检测450nm处的吸光值。

[0111] 图4:人高亲和力的成熟的抗CD16 scFv在新分离NK细胞中引发重导向细胞的毒性

[0112] 从健康人的外周血中分离并富集NK细胞,并作为效应细胞用于细胞毒性试验,用钙黄绿素标记的P815作为靶细胞。效应细胞(E)和靶细胞(T)按10:1的比例在1μg/mL的指示抗体中温育3个小时。通过悬液中释放的钙黄绿素的荧光量来计算特异性溶解的百分比。绘制三次重复的平均值和标准差。

[0113] 图5:成熟抗CD16 scFv对PMN和NK细胞亲和力的流式细胞

[0114] 检测分析

[0115] 从健康人外周血分离得到多核细胞(PMN)和自然杀伤细胞(NK),并用作流式细胞染色和分析。这些细胞利用10μg/mL的抗CD16 MA b A9和抗CD56 MA b B159以及15μg/mL FITC结合羊抗小鼠IgG染色。所有scFv的使用浓度为50μg/mL,检测使用10μg/mL的抗组氨酸,再用15μg/mL的FITC标记的羊抗小鼠IgG抗体。用流式细胞检测分析平均荧光强度,其通过减去单独用二级试剂对细胞着色的荧光值来校正,如图。

[0116] 图6:CD16A和CD16B亚型的等位基因变异体的氨基酸序列比对

[0117] 信号肽在图中用阴影显示。星号和斜体表示的是CD16B等位基因的变异体。CD16A和CD16B亚型的变异体用粗体和下划线标注。CD16A 158位Val/Phe多态位置用框线标记。

[0118] 图7:不同CD16亚型的ELISA检测

[0119] 用100mM含有200ng的CD16A-Fc^{48R/158V},CD16A-Fc^{48R/158F},CD16B-Fc^{SH},CD16B-Fc^{NA1},CD16B-Fc^{NA2}和NKp46-Fc的NaHCO₃ 包被MaxisorpTM酶标板的孔。所有的抗原先后与[A] scFv 4-LS21和HRP结合抗组氨酸抗体温育或先后与MA b A9和HRP偶联的羊抗鼠抗体(与人IgG最小交叉反应)温育。抗NKp46 scFv作为主要抗体用作阴性对照。

[0120] 图8:TandAb激活的NK细胞的靶向特异性杀伤

[0121] 将1×10⁴个有钙黄绿素标记的L540CY细胞(结果显示在培养板[A])或JOK-1靶细胞(结果显示在培养板[B]),与1×10⁵个NK细胞在CD30×CD16 TandAb(实心菱形)或CD19×CD16 TandAb(空心菱形)的指示浓度下温育3个小时。将靶细胞和NK细胞在无抗体条件下温育作为对照(实心正方形)。通过悬液中释放的钙黄绿素的荧光量来计算特异性溶解的细胞的百分比,并用GraphPadPrism软件的非线性回归来分析。

[0122] 实施例

[0123] 实施例1:人CD16A-Fc融合蛋白的瞬时表达以及纯化

[0124] 通过编码人CD16A与人IgG1的Fc片段重组蛋白的质粒pCDM-CD16-Fc瞬时转染HEK-293细胞来分泌获得可溶性的CD16A-Fc融合蛋白(Mandelboim等,1999, supra)。

[0125] 用全DMEM培养基(加有10%热灭活胎牛血清(FCS),2mM的L-谷氨酰胺,100U/mL青霉素G钠和100μg/mL硫酸链霉素;全部购自Invitrogen,Karlsruhe,Germany),在37℃,一定湿度和5%的CO₂的条件下,培养HEK-293细胞(ATCC保藏号CRL-1573)。下面介绍了这些细胞的钙磷酸盐介导的转染效率。

[0126] 在转染前一天,将1.5×10⁶ HEK-293细胞接种于加有10mL全DMEM培养基且直径10cm的细胞培养皿。取10μg的质粒DNA与500μL 250mM CaCl₂混匀,然后滴入到500μL 2×HEBS缓冲液(280mM NaCl,1.5mM Na₂HPO₄,50mM HEPES,pH7.05)中,室温温育15min。然后加入9mL全DMEM培养基混匀,转入到含有去除培养基的HEK-293细胞的培养皿。第二天,将转染

培养基换成无血清的DMEM培养基 (DMEM培养基添加2mM L-谷氨酰胺, 100U/mL青霉素G钠和100 μ g/mL硫酸链霉素和1 x胰岛素-转铁蛋白-硒-A(全部购自Invitrogen))。在转染后2-6天依据细胞的存活力, 分2次收集含有分泌的CD16A-Fc融合蛋白的上清液。每次收集后, 都要向细胞中加入无血清的培养基。将收集的上清液离心, 去掉细胞或细胞碎片, 置于-80 $^{\circ}$ C冻存, 供融合蛋白的纯化所用。重复转染, 直到收集到约1.2L含有融合蛋白的上清液。

[0127] 利用2mL的蛋白A柱 (Protein A SepharoseTM Fast Flow, Amersham Pharmacia) 来纯化CD16A-Fc融合蛋白的重组体。用10倍柱体积的DMEM pH7的溶液 (Invitrogen; 加有100 μ g/mL的链霉素, 100u/ml的青霉素, 1 x胰岛素-转铁蛋白-硒-A以及2mM L-谷氨酰胺) 进行平衡。将细胞培养的上清液 (1200ml) 用0.2 μ m的无菌过滤器过滤后, 用0.1M pH2.7的甘氨酸/HCl调整溶液pH到7, 然后上柱。柱子在重力作用下于4 $^{\circ}$ C运作。接着, 用10倍体积pH7的DMEM溶液洗柱。用6倍体积的pH2.7的0.1M glycine/HCl溶液进行洗脱。将收集到1ml洗脱物接加入55 μ l 1M Tris/HCl pH8.8。

[0128] 用12%PAA胶对片段号1-10的洗脱物进行分析, 结果显示洗脱物片段2-7大多数都是融合蛋白。将洗脱物收集在一起, 用5L pH7.0的PBS透析2次。按照Bradford法 (Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72:248-254) 测定蛋白的浓度, 得出CD16A Fc融合蛋白的总产量为21mg。即每升培养的上清液可以制备约17.5mg的融合蛋白。

[0129] 实施例2: CD16-A特异性抗体的鉴定和分离

[0130] 用上述的类似的方法获得的CD16A-Fc融合蛋白, 用于筛选IgM衍生的scFv噬菌体展示文库 (Drsam等, 1997 FEBS Letts 414:7-13, Little等, 1999 J. Immunol. Methods 231:3-9, Schwarz等, FASEB J. 18:1704-6)。该文库的克隆包含scFv编码序列和噬菌体M13 pIII基因之间的序列, 该序列编码一个六-组氨酸标签、一个琥珀终止密码子和一个c-myc抗原决定簇。

[0131] 利用ECL蛋白生物素化模块 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden) 对500 μ g CD16A Fc融合蛋白进行生物素化, 然后被用于进行三轮的筛选反对噬菌体展示文库。在对文库进行筛选之前, 要利用包被的有霉链亲和素的聚苯乙烯和人IgG (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) 进行连续的预吸收, 目的是消除其它潜在的分子对这些蛋白质的结合。来自文库的约 10^{12} 噬菌体被置于PBS溶液中重悬, 0.1%吐温和2%脱脂奶粉与可溶的生物素化的CD16A Fc融合蛋白进行共同温育。通过包被的有霉链亲和素的磁珠捕获, 并用磁力分离器 (Dyna1, Oslo, Norway) 分离得到噬菌体抗原复合物。不能与靶抗原特异性结合的噬菌体通过10步的PBS和0.1%吐温溶液洗 涤掉。利用2M Tris/HCl, pH8.0中和反应后, 加入甘氨酸-HCl pH2.2洗脱结合物, 洗脱物被用于感染新鲜生长的位于中对数期 (OD6000.2-0.5) 的E. coli XL1蓝菌株。含有成功转染的包含编码人scFvs的噬菌粒的菌株用氨苄青霉素抗性选择, 并用M13K07辅助噬菌体进行感染, 目的是能够产生可用于下一步离体筛选的噬菌体后裔显示scFv。在第三轮选择之后, 将单个的克隆培养于2mL PP-Masterblock培养板 (Greiner, Frickenhausen, Germany) 的含有100 μ g/mL氨苄青霉素和20 μ g/mL四环霉素的LB培养基上, 30 $^{\circ}$ C下培养。通过离心收集细胞, 并利用200 μ L 200mM Tris-HCl, pH7.5, 20%蔗糖和1mMEDTA重悬细胞。在冰上温育1个小时后, 细胞外膜破裂, 含有scFv的可溶的胞质蛋白质释放到培养基中。通过离心去掉原生质球和细胞碎片, 因为scFv可以与CD16A-Fc融合蛋白结合, 所以可以用ELISA方法来检测天然的胞质提取物。三次独立情况

下都检测到一个克隆(50NI)。

[0132] 可以通过人Fc融合蛋白来筛选从噬菌体展示文库中得到的克隆的亲合力,因此有必要证实克隆50NI对这个分子的CD16段的特异性。

[0133] 从克隆50NI提取胞质物的制备过程如上所述,它对CD16A-Fc融合蛋白和人IgG的结合能力用ELISA试验来检测。抗CD16鼠的单克隆抗体A9(Hombach等1993 Int.J.Cancer 55:830-836)作为对照。每孔加有100mM、pH8.6的NaHCO₃的Maxisorb™酶标板用500ng链霉亲和素和300ng人IgG(Sigma-Aldrich,Taufkirchen,Germany)进行预包被。然后,在PBS溶液中加入300ng生物素化的CD16A-Fc进行室温捕获30min。

[0134] 链霉亲和素捕获的CD16A-Fc,链霉亲和素和人IgG与1μg/mLMAb A9或50μl的来自克隆50NI的天然胞质提取物,以及PBS温0.1%/2%脱脂奶粉共同温育。利用HRP偶联的羊抗鼠的二抗来检测 MAb A9的结合,利用HRP标记抗戊组氨酸的抗体(1μg/mL,Qiagen,Hilden,Germany)来检测scFv 50NI的结合。加入50μL的HRP底物TMB溶液(KPL,Maryland,USA),会发现颜色的变化。最后加入50mL0.5M的硫酸溶液终止反应,并检测450nm处的吸光值。

[0135] 结果如图1所示。清晰可见,MAb A9和the scFv 50NI能够识别生物素化的链霉亲和素捕获的CD16A-Fc融合蛋白。scFv 50NI对人IgG和链霉亲和素都没有信号。用作二抗的HRP偶联的抗戊组氨酸抗体对抗原没有特异性的结合。然而,用作二抗的HRP偶联的羊抗鼠用于MAb A9的检测有背景染色,可能是由于与人CD16融合蛋白Fc段的交叉反应,人IgG是阴性对照。

[0136] 这些结果充分说明了scFv 50NI对融合蛋白的CD16A段具有特异性,而对Fc不具有特异性。

[0137] 实施例3:检测稳定转染CD16亚型的人外周血单核细胞和粒性白细胞scFv 50NI

[0138] 为了检测50NI scFv是否在细胞表面与天然的CD16A蛋白结合,我们利用流式细胞计量术检测两种不同的细胞系各自表达CD16A或CD16B的scFv在胞质提取物。用于试验的细胞系有:细胞系BW/CD16A表达CD16A(Mandelboim等,2001,Nature409:1055-1060);细胞系293-CD16(用编码人CD16B亚型的NA-2等位基因的质粒稳定转染HEK-293细胞系)。

[0139] 为了验证50NI scFv是否有能力结合自然杀伤细胞(NK)表面表达的CD16A和/或嗜中性粒细胞表面表达的CD16B(van de Winkel and Capel,1993, supra;van Spriell等,2000,Immunol.Today 21(8):391-397),我们利用流式细胞计量术检测其与新鲜分离的包含10-20%NK细胞和具有超过95%CD16B阳性(嗜)中性粒(性白)细胞的多形核细胞(PMN)的外周血单核细胞(PBMC)的结合。

[0140] 鼠MAb A9和鼠克隆scFv18 A9(一种来源于MAb A9的scFv)胞质提取物用作对照。

[0141] 3.1细胞系的生长以及PBMC和PMN的分离

[0142] BW/CD16A细胞培养于含有10%热灭活胎牛血清(FCS)、2mM的L-谷氨酰胺、100U/mL青霉素G钠、100μg/mL硫酸链霉素、1%的非必需氨基酸和5mg/mL的G418的DMEM培养基中。293/CD16B细胞培养在含有10%热灭活胎牛血清(FCS)、2mM的L-谷氨酰胺、100U/mL青霉素G钠、100μg/mL硫酸链霉素和0.5mg/mL的G418的DMEM培养基中。不用于转染的亲本细胞系BW和293也用上面的培养方法稳定转染,只是培养基中不加G418。

[0143] PBMC和PMN细胞都是从一个健康人的肝素化的外周血通过密度梯度离心得到。将

血用PBS稀释2倍,在由12mL Histopaque-1119™ (Sigma-Aldrich) 和12mL具有上垫子的 Histopaque-1077组成的双层垫子上分层。800g离心25min。PBMC位于Histopaque-1077™ (Sigma-Aldrich) 的上端,PMN位于Histopaque-1119™ 上,将细胞进行收集,在使用前用PBS洗涤3次。

[0144] 3.2含有scFv 50NI和scFv18 A9的胞质物的分离

[0145] 用5mL培养的菌液来分离天然的含有scFvs的胞质提取物。新鲜接种的菌于含有50mM葡萄糖、100μg/mL的氨苄青霉素和20μg/mL的四环霉素的培养基中置于37℃,过夜。利用含有氨苄青霉素和四环素的培养基稀释过夜培养物浓度到 $OD_{600nm}=0.1$,继续37℃培养直到浓度为 $OD_{600nm}=0.8$ 。将菌液离心收集,并用含有0.1mM的(IPTG)、100μg/mL的氨苄青霉素和20μg/mL的四环素的LB培养基进行重悬。诱导的菌在21℃温育过夜后,分离300μL的胞质提取物用于ELISA实验。在用作FACS分析之前,胞质提取物PBS透析过夜。

[0146] 3.3流式细胞计数

[0147] 1×10^6 的BW、BW/CD16A、HEK-293、293/CD16B、,PBMC和PMN细胞用单克隆抗体A9或含有scFv18A9和50NI的胞质提取物染色,以便用于流式细胞计数分析。

[0148] 1×10^6 的细胞中加入100μL经过透析的胞质提取物或MAb A9 (10mg/mL) 后置于冰上45min。抗体/scFv与加有1mg/mL的人多克隆IgG的PBMC和PMN共同温育,加多克隆IgG的目的是封闭PBMC和PMN细胞亚群表面的Fc受体。利用FACS缓冲液(添加2%热灭活胎牛血清和0.1%叠氮化钠的PBS)洗涤细胞后,在缓冲液中添加0.1mL的0.01mg/mL抗-(His)₆鼠MAb 13/45/31-2 (Dianova, Hamburg, Germany),置于冰上温育45min。接着进入第二次洗涤,然后在相同条件下,向细胞中加入0.1mL的0.015mg/mL FITC偶联的羊抗鼠IgG抗体 (Dianova, Hamburg, Germany)。再次洗涤细胞,添加0.5mL含有2μg/mL碘化吡啶 (Sigma-Aldrich) 的FACS来重悬细胞,目的是清除死细胞。利用Beckman-Coulter Epics XL流式细胞仪来测定 1×10^4 染色的细胞的荧光值。平均荧光强度通过System-II和Expo32软件 (Beckman-Coulter, Krefeld, Germany) 计算得到。结果减去了由于二抗反应单独引起的背景荧光的柱状图(未显示)有助于理解。

[0149] 3.4结果

[0150] 鼠单克隆抗CD16抗体A9和A9衍生的抗CD16 scFv18抗体用作实验的阳性对照,与没有转染的亲本细胞(BW)相比,结果清晰地显示它们能够结合于BW/CD16A。同样地,scFv 50NI也在与A9类似的水平上使BW/CD16A细胞着色。

[0151] 单克隆抗体A9和scFv₁₈ A9都表现与表面表达CD16B亚型都强烈的结合于293/CD16B转染子,而50 NI不与该细胞系结合。

[0152] 单克隆抗体A9和scFv₁₈ A9揭示了存在于NK细胞部分的少量PBMC亚群清楚的着色。同样地,scFv 50NI也表现出与该亚群的结合。

[0153] 来源于A9的scFv和A9两者在纯化的粒性白细胞中都显示出强的信号,而与它们不同的是50 NI scFv不能与PMN结合。

[0154] 数据显示50NI scFv能够特异性的结合到CD16A亚型,而不与CD16B亚型结合。scFv 50NI不仅能够识别CD16A的异构体,还能识别表达于NK细胞表面的天然抗原。

[0155] 实施例4:人抗CD16A scFv 50NI与富集的NK细胞的结合

[0156] 为了证明实施例所述的能够被50NI识别的PBMC亚群包含天然杀伤细胞(NK),我们

从PBMC细胞中分离了富集的NK细胞,并通过流式细胞测定仪检测其与scFv 50NI的结合。

[0157] 通过密度梯度离心从一个健康人的肝素化的外周血中分离PBMCs。血样用2倍的PBS稀释,用Histopaque-1077™ (Sigma-Aldrich) 进行分层,然后以800g离心25min。收集位于接口的PBMC,并用PBS洗涤3次。用2%FCS/PBS溶液重悬PBMC,用EasySEP™负NK细胞浓缩试剂盒按照使用手册分离NK细胞。PBMC和NK的染色以及流式细胞仪分析与上面所述的实施例3相同: 1×10^6 细胞用10 μ g/mL MAb A9或抗CD56单克隆抗体MAbB159 (BD Biosciences/Pharmingen) 染色,然后加入15 μ L的FITC标记的羊抗鼠IgG。用于染色的鼠scFv₁₈ A9和人scFv 50NI的浓度为50 μ g/mL,结合scFv的细胞用10 μ g/mL MAb抗(His)₆以及15 μ L FITC偶联的羊抗鼠IgG来检测。所有的染色在1mg/mL多克隆人IgG的存在下进行。根据上面介绍的方法利用碘化吡啶染色去除死细胞。数据分析也用实施例3介绍的方法进行分析。

[0158] 4.1结果

[0159] 用PBMC与抗CD56和抗CD16抗体的染色清晰表明存在NK细胞部分的亚群。scFv 50NI同样识别相同的小细胞群体表明其与NK细胞的结合。

[0160] 在获得阴性浓缩的NK细胞中,所有四种抗体都表现出清晰的着色。同时,抗CD56 MAb表现出与整个NK细胞群体都能结合,定向抗CD16的抗体对小部分细胞不能着色。因此可以说明在某些细胞存在CD16阴性表型。

[0161] 实施例5:scFv 50NI结合后Ca²⁺流的测定

[0162] IgG的亲合性受体CD16A,主要在大多数人外周血NK细胞中表达,并与包含有Fc ϵ RI的 γ 链或TCR/CD3复合物 ζ 链的免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)相关联。CD16A与抗体或免疫复合物的结合引发了NK细胞的细胞毒性以及细胞因子的分泌。 γ 链和 ζ 链的磷酸化各自都参与激活过程,以及随后的细胞内的信号传导如Ca²⁺流动。

[0163] 我们利用抗CD16单克隆抗体或scFv与新分离的NK细胞的表面受体连接后测定Ca²⁺流来检测人抗CD16 scFv 50NI是否具有激活NK的特性。由于一些抗CD16的抗体需要二抗的交联来释放出增加的细胞内的钙离子,用作细胞交联结合抗CD16抗体的二抗有抗myc和抗(His)₆与鼠抗IgG的联合。

[0164] NK细胞的准备:通过密度梯度离心从一个健康人的肝素化的外周血中分离PBMCs。血样用2倍的PBS稀释,用Histopaque-1077™ (Sigma-Aldrich) 进行分层,然后以800g离心25min。收集位于接口的PBMC,并用PBS洗涤3次。用2%FCS/PBS溶液重悬PBMC,用EasySEP™富集阴性NK细胞试剂盒按照使用手册(细胞系统)分离NK细胞。用HBSS洗涤NK细胞一次,然后加入浓度为2 μ M钙指示剂氟-4-乙酰氧基甲酯(Fluo-4-acetoxymethyl (AM) ester) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) 置于暗室,室温放置30min。用HBSS洗涤细胞后,再用HBSS继续温育20min,以便于细胞内AM酯的完全脱酯,接着再用HBSS液进行洗涤。首先用Beckman-Coulter Epics XL流式细胞仪来测定未添加任何抗体的标记的NK细胞的钙离子变化来确定背景荧光。大约60s后,添加抗CD16抗体(2 μ g MAb A9或5 μ g scFv₁₈ A9或5 μ g 50NI scFv)。大约开始180s后,往MAb A9s样品中加入20 μ g的多克隆羊抗鼠IgG抗体(GAM),交联使得A9能够与NK细胞表面的CD16结合。在继续测定前,添加2.5 μ g抗(His)₆鼠MAb 13/45/31-2和2.5 μ g抗c-mycMAb 9E10,以便scFvs的交联。关于加有scFvs的样品,后来再继续添加20 μ g多克隆羊抗鼠IgG抗体,目的是通过交联,使抗(His)₆和/或抗c-myc MAbs与scFv结合。短时间间隔内的荧光强度由Expo32软件(Beckman-Coulter, Krefeld,

Germany) 测定和绘制(未显示)。

[0165] 从新鲜分离的NK细胞的荧光测定结果清楚地显示MAb A9与抗鼠IgG抗体交联后,细胞内钙离子浓度显著增加,主要是通过荧光信号增强来体现的。与MAb A9不同地,来源于A9的cFv(scFv_{18 A9})、与抗(His)₆、抗c-myc和抗鼠IgG抗体交联后,细胞内钙离子浓度少许增加或者根本不增加。然而,人scFv 50NI在通过与抗体交联后与细胞表面的scFv结合,释放出清晰的荧光信号(尽管有点弱)。这些结果显示人scFv 50NI具有结合的特性,该结合能通过CD16A引发NK细胞的活性。

[0166] 实施例6:通过轻链替换引起的50NI scFv的亲合力成熟

[0167] 为了获得抗CD16 scFvs的高亲和力,我们用50NI V_H链与V_L链基因谱系替换产生的重组体构建的基于克隆50NI的链替换文库。

[0168] 基因谱系V_κ和V_λ是从前面介绍的大的人天然scFv文库中的pEXHAM1 DNA分离出来的(Schwarz等supra,2004)。这些谱系每个都包含有大约10⁵个单独的V_κ和V_λ链。将50NI重链克隆到pEXHAM1的MluI和NotI位点,并将1μg转化到E.coli XL1 blue(1.8kV,0.1cm gap cuvette 25F,200'Ω),结果产生了约2.6×10⁶(V_κ)和2.2×10⁶(V_λ)个成员文库。

[0169] 在转化后随机挑选3两个克隆进行测序,分析得出每个克隆都含有一个单独得轻链,24个克隆揭示了能够被Western Blot中的抗-组氨酸抗体(Qiagen,Hilden,Germany)检测的全长scFvs的表达。

[0170] 按照实施例2中介绍的方法,采用四轮选择生物素化的CD16A-Fc融合蛋白。通过限制抗原浓度(1st轮20nM,2nd轮1nM,3rd轮0.1nM,4th轮0.01nM)来选择高亲和力的结合者。κ-和λ-重组文库都单独保存。

[0171] 每个文库中取大约10⁸个噬菌体,重悬PBS/0.1%TWEEN/2%脱脂奶粉,与生物素化的CD16A-Fc融合蛋白一起温育。通过包被有链霉亲和素的磁珠分离噬菌体抗原复合物,与噬菌体结合的非特异性的抗原将通过10步的PBS/0.1%吐温洗涤步骤去除。第一步,用pH2.2的glycine-HCl洗脱结合物。用2M pH8 Tris/HCl中和后加入新鲜生长的E.coli XL1 Blue(中对数期OD₆₀₀ 0.2-0.5),目的是为了去除噬菌体,因为低pH不能去除。用酸洗脱的细胞与对数生长的XL1 blue宿主细胞混合。

[0172] 成功转化编码人scFv的噬菌粒的细胞,用氨苄青霉素抗性筛选,然后用M13K07辅助噬菌体进行感染产生噬菌体抑制scFv以备下面体内筛选用。接下来的几轮选择,通过酸性洗脱的噬菌体和XL1 blue感染的噬菌体单独处理。经过第三轮和第四轮的亲和力的选择后,单个的克隆用实施例2描述的ELISA实验进行检测。

[0173] 从重组的κ-文库中检测到没有一个克隆显示的信号高于同样条件下的用作对照的亲本克隆50NI。然而,我们选择了几个克隆进行测序,发现它们与亲本克隆序列相同,因此没有发现合适的κ-链提高结合的特性。

[0174] 相反地,从重组的λ-文库中检测到一定数量的克隆,它们产生的信号比对照高出5倍。通过第三轮筛选后我们选择30个克隆测序,通过第四轮选择后我们选择34个克隆进行测序。利用Long Read Tower(Visible Genetics,Toronto Canada)测序仪以及Deaza试剂盒(Visible Genetics,Toronto Canada)按照使用说明书进行操作。结合噬菌体颗粒的酸洗脱或宿主细胞的直接感染对后来克隆的分布影响不明显。鉴定得到了5个富含克隆的不同群以及几个单独的克隆。表2显示不同群的概况。

[0175] 表2 存在于具体群的克隆的名称,在下面的例子中用粗体显示

组别	总频率	3 rd 轮30个克隆序列	4 th 轮34个克隆序列
A	19/64	3-LB1,3-LB24,3-LB36,3-LB48, 3-LS1,3-LS4,3-LS19	4-LB28,4-LB34,4-LB27,4-LB43,4-LS6,4-LS10,4-LS22,4-LS26,4-LS68;4-LS80,4-LS88
B	9/64	3-LB3,3-LB41,3-LS23,3-LS35, 3-LS87	4-LB46,4-LS38,4-LS12,4-LS39
C	13/64	3-LB5,3-LB10,3-LB32,3-LS17, 3-LS22,3-LS79,3-LS36,3-LS89	4-LB4,4-LB13,4-LB414-LS25,4-LB25
D	5/64	3-LS72	4-LS73,4-LB32,4-LB33,4-LB33
E	5/64		4-LS14,4-LS37,4-LS87,4-LS72,4-LS44
individuals		3-LB6,3-LB23,3-LS49;3-LS34, 3-LS60,3-LS28,3-LS30,3-LS55, 3-LS40	4-LS5,4-LB14,4-LS21,4-LS46

[0177] A组的克隆表示亲本克隆50NI,它们同样出现在漂移文库中,原因是再连接或亲本载体没有切开或因为在文库构建中的重组。这个发现与这群中的克隆产生较弱的ELISA信号一致。

[0178] 其它组含有新的重组的轻链的克隆,与亲本克隆相比能够增加ELISA信号。通过第三轮和第四轮选择后发现了大量的C和D组的克隆。

[0179] 用V-base alignment软件 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>) 对序列进行分析得出所有新的V_L链以及亲本克隆的V_L链都属于VL3家族。

[0180] 这里给出了所有克隆的常见V_H链的氨基酸序列是SEQ ID NO 9,克隆50NI、3-LB3、3-LB5、3-LB6、3-LS49、4-LS14和4-LS21的特异V_L链的氨基酸序列分别是SEQ ID NOs 10-16。编码一般V_H链的核苷酸序列是SEQ ID NO 1,编码克隆的是50NI、3-LB3、3-LB5、3-LB6、3-LS49、4-LS14和4-LS21各自V_L链的核苷酸序列分别是 SEQ ID NOs 2-8。表1列出了每个重链和轻链CDRs的氨基酸序列,一般的重链CDRs位于表第一行,接着是50NI、3-LB3、3-LB5、3-LB6、3-LS49、4-LS14和4-LS21 (分别是2-8)的轻链CDRs。

[0181] 实施例7:成熟的scFv对用CD16A和CD16B转染的细胞系的亲和力的FACS检测

[0182] 利用所有单个克隆天然胞质提取物的初步FACS检测显示所有链漂移的scFv仍然具有与CD16A结合的能力。本实验利用HEK-293细胞瞬时转染CD16A(数据未显示)。基于此检测结果,克隆3-LB3,3-LB5,3-LB6,3-LS49,4-LS14和4-LS21被选择用于进一步的鉴定。

[0183] 编码这些scFvs的核酸序列经过在氨基端加入PelB前导序列,在羧基端用六-组氨酸和c-myc标签修饰后,被亚克隆到pSKK2表达载体中。亚克隆的核酸序列如下:

[0184] pSKK2-50NI (SEQ ID NO 36)

[0185] atgaaatacctattgacctacggcagccgctggcttgctgctgctggcagctcagccggccatggcgga
ggtccagctggtacagtctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtctctgaaggtttctgcaaggcatctgga
tacaccttcaccagctactatatgcaactgggtgacagagccctggacaagggcttgagtgatgggaataatca
accctagtggtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtcacatgacccgggacacgtccacgag
cacagtctacatggagcttagcagcctgagatctgaggacacggcctgtattactgtgctagaggtagtgcttat
tactacgattttgctgactactggggccaggaaccctggtcaccgtctcctcagggagtgcacccgcccccaacc

ttaagcttgaagaaggtgaat tttcagaagcacgcgtatcctatgagctgatgcagccaccctcagtggtccgtgtc
ctcaggacagacagccagcatccccctgctctggagataaattggaggaaaaatatgtttcctgggtatcaacagagg
ccaggccagtcacctgtgttggtcatttatcaggataataagcggccctcagggatccctgagcgatttctctggct
ccaactctgggaacacagccactctgaccatcagcgggaccaggcgatggatgaggctgactactattgtcaggt
gtgggacaattacagtggtctattcggcggaggaccaagctgaccgtcctaggtcagcccaaggctgccccctcg
gcactctgttcccgcctccgcgccgctggatccgaacaaaagctgatctcagaagaagacctaaactcacatca
ccatcaccatcactaa

[0186] pSKK2-3-LB3 (SEQ ID NO 37)

[0187] atgaaatacctattgcctacggcagccgctggcttgctgctgctggcagctcagccggccatggcgga
ggtccagctggtacagctctggagcagaggtgaaaaagcccggggagctctcgaaggtttctgcaaggcatctgga
tacacctcaccagctactatatgcactgggtgagcagagccctggacaagggttgagtggatgggaataatca
accctagtggtggtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtcacatgaccgggacacgtccacgag
cacagtctacatggagcttagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgctagaggtagtgtt
tactacgattttgctgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcaggagtgcatccgccccaa
ttaagcttgaagaaggtgaat tttcagaagcacgcgtatcctatgagctgacacagccactctcagagtcagtg
ccaggacagacggccaggattacctgtgggggaaacaacattgaaagtagaaatgttactggtaccagcagaag
ccaggccaggccccctgtgttggtcatctataggataacaaccggccctctgggatccctgagcgatttctctggct
ccaattcggggaacatggccaccctgaccatcagcagagcccaagccggggatgcagctgactattactgtcaggt
gtgggacaactacactgtgctattcggcggaggaccaagctgaccgtcctaggtcagcccaaggctgccccctcg
gtcactctgttcccgcctccgcgccgctggatccgaacaaaagctgatctcagaagaagacctaaactcacatc
accatcaccatcactaa

[0188] pSKK2-3-LB5 (SEQ ID NO 38)

[0189] atgaaatacctattgcctacggcagccgctggcttgctgctgctggcagctcagccggccatggcgga
ggtccagctggtacagctctggagcagaggtgaaaaagcccggggagctctcgaaggtttctgcaaggcatctgga
tacacctcaccagctactatatgcactgggtgagcagagccctggacaagggttgagtggatgggaataatca
accctagtggtggtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtcacatgaccgggacacgtccacgag
cacagtctacatggagcttagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgctagaggtagtgtt
tactacgattttgctgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcaggagtgcatccgccccaa
ttaagcttgaagaaggtgaat tttcagaagcacgcgtatcctatgagctgacacagccaccctcagtggtcagtg
cccaggaaagacggccaggattacctgtgggggaaacaacattggaagtaaaaaatgtgactggtaccagcagaag
ccaggccaggccccctgtgttggtcatctataggatagcaaccggccctctgggatccctgagcgatttctctggct
ccaactcgg ggaacacggccaccctgaccatcagcagagcccaagccggggatgaggtgacttttattgtcagg
tgtgggacaactatattgtgctgttcggcggaggaccaagctgaccgtcctgggtcagcccaaggctgccccctc
ggctcactctgttcccgcctccgcgccgctggatccgaacaaaagctgatctcagaagaagacctaaactcacat
caccatcaccatcactaa

[0190] pSKK2-3-LB6 (SEQ ID NO 39)

[0191] atgaaatacctattgcctacggcagccgctggcttgctgctgctggcagctcagccggccatggcgga
ggtccagctggtacagctctggagcagaggtgaaaaagcccggggagctctcgaaggtttctgcaaggcatctgga
tacacctcaccagctactatatgcactgggtgagcagagccctggacaagggttgagtggatgggaataatca

accctagtggtggtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtcacatgaccgggacacgtccacgag
cacagtctacatggagcttagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgctagaggtagtgttatt
tactacgattttgctgactactggggccaggaaccctggtcaccgtctcctcagggagtgcacccgccccaaacc
ttaagcttgaagaaggtgaattttcagaagcacgcgtacaggctgtgctgactcagccgacctcagtgctcagtgcc
cccaggacagacggccaggattccctgtgagggaaacaacattggaagtaaaaaatgtccactggatcggcagaag
ccaggccaggctccctgtcctggatcatgatgatagcagccggccctcagggatccctgagcgattctctggct
ccaactctgggaacacagccactctgaccatcagcgggaccaggcgatggatgaggtgactactattgtcaggt
gtgggacaattacagtgtgctattcggcggagggaaccaagctgaccgtccttaggtcagcccaaggctgccccctcg
gtcactctgttcccgcctccgcgccgctggatccgaacaaaagctgatctcagaagaagacctaaactcacatc
accatcaccatcactaa

[0192] pSKK2-3-LS49 (SEQ ID NO 40)

[0193] atgaaatacctattgcctacggcagccgctggcttgctgctgctggcagctcagccggccatggcgga
ggtccagctggtacagctctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtctctgaaggtttcctgcaaggcatctgga
tacaccttcaccagctactatatgcaactgggtgacagagccctggacaagggttgagtggatgggaataatca
accctagtggtggtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtcacatgaccgggacacgtccacgag
cacagtctacatggagcttagcagcctgagatctgaggacac ggcctgtattactgtgctagaggtagtgttatt
ttactacgattttgctgactactggggccaggaaccctggtcaccgtctcctcagggagtgcacccgccccaaacc
cttaagcttgaagaaggtgaattttcagaagcacgcgtacagcctgtgctgactcagccactctcagtgctcagtg
ccccgggacagacggccaggattacctgtggggaaacaacattggaagtaaaaaatgtgcactggatcaccagcaga
gccaggccaggccctgtactggatcctatagggacagcagccggccctctgggatccctgagcgactctctggc
tccaactcgggggacacggccacctgaccatcagcagagcccaggccggggatgaggctgactattactgtcagg
tgtgggacgactacattgtggtcttcggcggagggaaccaagctgaccgtccttaggtcagcccaaggctgcccccc
ggctcactctgttcccgcctccgcgccgctggatccgaacaaaagctgatctcagaagaagacctaaactcacat
caccatcaccatcactaa

[0194] pSKK2-4-LS14 (SEQ ID NO 41)

[0195] atgaaatacctattgcctacggcagccgctggcttgctgctgctggcagctcagccggccatggcgga
ggtccagctggtacagctctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtctctgaaggtttcctgcaaggcatctgga
tacaccttcaccagctactatatgcaactgggtgacagagccctggacaagggttgagtggatgggaataatca
accctagtggtggtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtcacatgaccgggacacgtccacgag
cacagtctacatggagcttagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgctagaggtagtgttatt
tactacgattttgctgactactggggccaggaaccctggtcaccgtctcctcagggagtgcacccgccccaaacc
ttaagcttgaagaaggtgaattttcagaagcacgcgtatcctatgagctgacacagccacctcgggtgtcagtgac
cccaggacagacggccacgattacctgccccgcaaacgacattggaaaaagaaaatgtccactggatccaacagagg
ccaggccagctccctgtgttggtcatttatcaggataataagcggccctcagggatccctgagcgattctctggct
ccaactctgggaacacagccactctgaccatcagcgggaccaggcgatggatgaggtgactactattgtcaggt
gtgggacaattacagtgtgctattcggcggagggaaccaagctgaccgtccttaggtcagcccaaggctgccccctcg
gtcactctgttcccgcctccgcgccgctggatccgaacaaaagctgatctcagaagaagacctaaactcacatc
accatcaccatcactaa

[0196] pSKK2-4-LS21 (SEQ ID NO 42)

[0197] atgaaatacctattgcctacggcagccgctggcttgctgctgctggcagctcagccggccatggcgga ggtccagctggtacagctctggagcagaggtgaaaaagcccggggagctctctgaaggtttctgcaaggcatctgga tacacctcaccagctactatatgcaactggtggcgacagggccctggacaagggcttgagtggatgggaataatca accctagtggtggtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtcacatgacccgggacacgtccacgag cacagtctacatggagcttagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgctagaggtagtgcttat tactacgattttgctgactactggggccaggaaccctggtcaccgtctcctcagggagtgcatccgccccaaccc ttaagcttgaagaaggtgaattttcagaagcacgcgtacagcctgtgctgactcagccatcctcgggtgctcagtgcc ccaggacagacggccacgatctcctgtgggggacacaacattggggagtaaaaaatgtgcaactggtaccagcagagg ccaggccagtcacctgtgttggtcatttatcaggataataagcggccctcagggatcctgagcgattctctggct ccaactctgggaacacagccactctgacatcagcgggaccagggcagtgatggatgaggtgactactattgtcaggt gtgggacaattacagtgcttattcgggcggagggaccaagctgaccgtcctaggtcagcccaaggctgccccctcg gtcactctgttcccgcctccggcgccgctggatccgaacaaaagctgatctcagaagaagacctaactcacatc accatcaccatcaactaa

[0198] 编码Pe1B引导序列的核酸序列是

[0199] atgaaatacctattgcctacggcagccgctggcttgctgctgctggcagctcagccggccatggcg (SEQ ID NO 43) .

[0200] 编码每个scFv轻链和重链变异区之间的连接区的核酸序列是 gaagaaggtgaattttcagaagca (SEQ ID NO 44) .

[0201] c-myc和六-组氨酸标签核酸序列分别是gaacaaaagctgatctcagaagaagaccta (SEQ ID NO 45) 和catcaccatcaccatcac (SEQ ID NO 46) .

[0202] 将含有亚克隆的载体转化到E.coli RV308中,在2L的摇瓶中培养,按照Le Gall等 (2004, J.Immunol.Methods 285:111-127),用固定化金属离子亲和层析(IMAC)纯化。

[0203] 为了评价scFv链的替换是否维持了如同实施例3中所示对50NI的对CD16A的特异性,用IMAC纯化的scFv检测既表达CD16A又表达CD16B的转染的细胞系。用于流式细胞分析,细胞系被使用如下:用同前面的方法培养BW和BW/CD16A转染子。293细胞和293-CD16B转染子处理同前。293-CD16A和293-NKp46由编码CD16A或NKp46的胞外结构域的质粒与人CD3 ζ 链跨膜和细胞质结构域融合后的质粒(pcDNA3-CD16A-zeta和pcDNA3-NKp46-zeta,来自Dr.O.Mandelboim,University of Jerusalem,Israel)。分别由瞬时转染293细胞系得到。利用实施例1描述的方法用磷酸钙的方法进行瞬时转染,转染后2天用流式细胞术染色和分析。流式细胞术染色和分析的方法如上介绍。 1×10^6 的细胞用50 μ g/mL纯化的scFv以及10 μ g/mL MAb 13/45/31-2(抗六-组氨酸)和15 μ g/mL FITC偶联的羊抗鼠IgG来染色。

[0204] 为了证明转染的细胞在细胞表面表达相应的抗原,细胞用并联的10 μ g/mL的MAb A9和抗NKp46单克隆抗体MAb 195314 (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) 进行染色。用15 μ g/mL标记有FITC的羊抗鼠IgG来检测MAbs A9和195314。通过减去由于二抗单独对细胞着色的荧光值来校正流式细胞检测分析得到的平均荧光强度,结果见图2。

[0205] Mab A9用作阳性对照,理论上它能够与所有的转染CD16的细胞结合,而不必考虑亚型的不同。实验观察到了它不结合NKp46转染子,而用直接抗NKp46的MAb 195314染色则清晰地显示细胞系被编码NKp46的对照质粒成功转染。

[0206] 亲本人抗CD16 scFv 50NI克隆用作对照揭示两种细胞系(BW/CD16A和293/CD16A

细胞系)表面表达CD16A微弱染色。相反地,新分离的重组轻链scFv表现出对这些细胞的高结合力。没有一个新的变异体结合稳定转染了CD16B的293细胞系,由此说明了对CD16A的特异性。

[0207] 实施例8:成熟scFv对新鲜分离的PMN和富集NK细胞的亲和力检测

[0208] 为了证明改善后的scFv是否仍然维持了其对于粒性白细胞上表达的CD16A的特异性结合,新鲜分离的来自于自愿者血的PMN细胞以及富集的NK细胞用前面介绍的IMAC纯化的scFv进行染色。浓缩的NK细胞用前面介绍的方法反向选择。从流式细胞检测分析得到的平均荧光强度位于图5。

[0209] 浓缩的白细胞群用抗CD16 MAb A9和抗CD56 MAb B159进行染色,结果清晰显示该细胞群含有CD16⁺/CD56⁺的外周血NK细胞。能够与CD16A阳性NK细胞部分染色的MAb A9和来源于鼠A9的scFv对CD16B阳性粒细胞表现出更强的信号。

[0210] MAb A9能够识别PBMCs的相应的CD16A阳性NK细胞亚群(18.5%)。同时观察到与富集的NK细胞和分离的粒细胞更强的结合(数据未显示)。

[0211] 亲本克隆50NI表现出弱但是清晰的与浓缩NK细胞的结合,同时未观察到粒细胞的染色。成熟变异体3-LB3、3-LB5、3-LB6、3-LS49、4-LS14和4-LS21的亲和力显示50NI染色模式相同,但是结合信号不同。数据进一步证明了成熟scFvs能够特异区分CD16两种亚型,并特异性的结合CD16A。

[0212] 实施例9:重组体CD16A-Fc和CD16B的ELISA实验

[0213] 为了得到scFvs对CD16A特异性的进一步支持数据,我们进行了用CD16A-Fc融合蛋白(实施例1)和商业上可利用的重组体CD16B-Fc(等位基因NA-2;无BSA;RD Systems)的ELISA实验。一种gp34-Fc融合蛋白用作阴性对照。浓度为80nM的重组蛋白用pH8.8、100mM NaHCO₃溶液包被过夜。

[0214] 利用HRP偶联的抗myc (10μg/ml)来检测scFv与重组蛋白的结合。用MAb A9 (1μg/mL)和HRP偶联的羊抗鼠IgG作为实验的阳性对照。直接用HRP偶联的抗组氨酸(1μg/mL)来检测与重组体CD16B的结合,用HRP偶联的抗人IgG (0.15μg/mL)来检测与Fc融合蛋白的结合。

[0215] 所有的scFv都表现出对CD16A-Fc强的结合,而对CD16B不结合(图3)。与gp34-Fc的结合有轻微的增强的背景。这可能是由于有少量的对gp34-Fc的非特异性结合,因为所有的二抗单独都对该蛋白质具有轻微的背景信号。

[0216] 如所期望的,A9能够很强的识别CD16A-Fc。然而,我们必须考虑的是HRP偶联的羊抗鼠的二抗与人Fc融合蛋白具有显著的交叉反应性(看单独用HRP偶联的羊抗鼠的二抗的对照)。利用HRP偶联的预吸附了得羊抗鼠IgG与人IgG具有很少的交叉反应(数据没有显示),显示了背景结合未显著减少。

[0217] MAb A9对CD16B有清楚的信号,它不受二抗的影响。

[0218] 实施例10:重组CD16A-Fc在还原和非还原条件下免疫印迹

[0219] 为了对所有的抗CD16A scFv进行进一步的鉴定,我们利用Western Blot检测抗CD16A scFv对重组CD16A-Fc和NKp46-Fc的结合。

[0220] 用12%SDS胶在还原条件下以及8%胶在非还原条件下分离的CD16A-Fc和NKp46-Fc作为阴性对照。将蛋白质用电印记转到尼龙膜上。在用丽春红S染色后,将膜切成5mm宽的细条。每个尼龙膜的细条都用含有PBS,0.1%吐温,2%脱脂奶粉的scFv (4μg/ml)温育。用

HRP偶联的抗戊组氨酸(1 μ g/mL)以及作为过氧化物酶底物的二氨基联苯(DAB)来检测。用作对照的尼龙膜的细条用A9(1 μ g/mL)或anti-NKp46 195314温育,然后加入HRP偶联的羊抗鼠IgG的二抗(0.2 μ g/mL,交叉反应性最小)。一种HRP偶联的羊抗人IgG(0.16 μ g/mL)的二抗作为另外的一种阳性对照,用于检测融合蛋白的Fc段。

[0221] 在还原条件以及非还原条件下,单克隆抗体A9和195314都能识别它们的抗原。HRP偶联的羊抗鼠作为MAb A9的二抗与CD16A-Fc的融合蛋白的Fc片段具有轻微的交叉反应。相反地,抗CD16scFvs的结合只在非还原条件下可以观察到,由此说明由二硫键提供的稳定的二级结构是识别所必需的。与成熟的scFvs的亲和力相比,亲本克隆50NI显示出较弱的信号。我们还未检测到scFv 3-LB6的结合,任何scFv都与NKp46-Fc对照蛋白不产生交叉反应,由此确定了其对CD16的特异性。

[0222] 实施例11:利用Superdex 200柱子的分子筛析色谱(法)来分析scFv

[0223] 为了确定是否scFv变异体的高亲和力主要取决于提高的单价结合,我们用蛋白质制品来通过Superdex 200凝胶过滤柱来分析它们的低聚物的组成。LMW凝胶过滤标准试剂盒(Amersham PharmaciaBiosciences, Freiburg, Germany)作为标准。表3概括介绍了蛋白质制剂中存在的分子形式。

[0224] 表3出现在单个蛋白质制品中的scFvs的分子形式。由于3-LB5的蛋白质浓度较低,因此不能用于分析。

[0225]

scFv	单体	二聚体
3-LS49	67.2%	32.8%
3-LB3	87.8%	12.2%
3-LB6	100%	-
4-LS14	57.6%	42.4%
4-LS21	100%	-

[0226] 分子筛析色谱(法)清晰地显示了scFv 3-LB6和4-LS21都是单个的单体。

[0227] 相反地,3-LS49、3-LB3和4-LS14具有显著比例的二聚体分子,说明了对于3-LB6和4-LS21这些分子改造的结合特性性不仅是因为高的亲和力,而且同样反应出由于二聚体形成的亲和力作用。

[0228] 实施例12:通过表面胞质共振现象(SPR)来测定scFv的亲和力

[0229] 通过生物传感器系统BIAcore 2000(Amersham-Pharmacia)的SPR来测定scFv的亲和常数(KD值)。将CD16A-Fc融合蛋白和用作阴性对照的BSA通过一般的NHS/EDC化学反应固定在羧甲基葡萄糖包被的传感器晶片CM5上,用于胺偶合过程(BIAcore)。利用HBS-EP缓冲液(BIAcore, Uppsala, Sweden)将纯化的scFvs进行稀释。将不同浓度的scFv的抗体(100nM、200nM、400nM、800nM和1600nM)通过固定的抗原产生了结合数据。抗CD16 MAb A9作为实验的阳性对照。所有SPR的测定都在25C、20 μ L/min的HBS-EP缓冲液都以稳定的流动速率中进行。每个注入的样本(100 μ l)与抗原接触5min,接着分离30min。每个循环后,传感器晶体的表面都用HBS-EP缓冲液进行冲洗。来自于包被有BSA的对照信道的信号被自动减除掉。利用BIAevaluation软件3.0版本(BIAcore)的1/1 Langmuir结合模型来计算动力学常数。计算的off-和on-rate常量以及各自的KD值请见表4。作为对照的MAb A9,计算得出的KD值为 1.75×10^{-9} M,而相关文献报导的KD值为 1.55×10^{-9} M(Renner等,2001

Cancer Immunol. Immunother. 50:102-108)。另外,还通过对scFv 50NI,4-LS21和3-LB6的SPR数据的动力平衡分析得出平衡解离常数。

[0230] 表4 单个scFvs结合的动力学数据

scFv	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_D = k_{off}/k_{on} (M)$	$K_{eq} (M)$
50NI4-	$(1.76 \pm 1.37) \times 10^4$	$(2.17 \pm 0.55) \times 10^{-2}$	1.23×10^{-6}	2.56×10^{-6}
LS213-	$(5.60 \pm 1.88) \times 10^4$	$(6.30 \pm 0.48) \times 10^{-3}$	1.13×10^{-7}	2.03×10^{-7}
LB63-	$(5.48 \pm 0.48) \times 10^4$	$(6.52 \pm 0.44) \times 10^{-3}$	1.19×10^{-7}	1.06×10^{-7}
LS493-	$(2.93 \pm 1.05) \times 10^4$	$(4.01 \pm 0.93) \times 10^{-3}$	1.37×10^{-7}	n.d.
LB34-	$(2.16 \pm 0.44) \times 10^4$	$(2.97 \pm 0.48) \times 10^{-3}$	1.38×10^{-7}	n.d.
LS143-	$(5.09 \pm 0.99) \times 10^4$	$(5.57 \pm 1.31) \times 10^{-3}$	1.09×10^{-7}	n.d.
LB5MAbA	$(7.33 \pm 0.44) \times 10^4$	$(2.97 \pm 0.48) \times 10^{-3}$	4.05×10^{-8}	n.d.
9	$(1.01 \pm 0.46) \times 10^5$	$(1.77 \pm 0.84) \times 10^{-4}$	1.75×10^{-9}	n.d.

[0232] 通过这两种方法相联系得到的单独计算动力学常数,能够很好的并且直接的比较亲本克隆50NI,揭示通过轻链的替换可以提高超过20倍的亲和力。所有的3种scFv单体蛋白群(参照表3,实施例11)表明改善结合的特性是由于基于抗原scFv接触面的最优化的高亲和力而不是亲和力效应。scFv 3-LS49,3-LB-3和3-LS14的KD值比较接近,但是它们却是属于含有具有显著差异的二聚体的不同分子群(参照表2,实施例13)。因此,这些抗体亲和力的改良可能至少部分是由于多价体的结合。

[0233] 实施例13:通过与亲和力的成熟的抗CD16 scFv的结合来诱导 Ca^{2+} 流

[0234] 为了鉴定亲和力成熟的scFv是否维持它们的引起外周血NK细胞中 Ca^{2+} 流动的能力, Ca^{2+} 流动的能力是通过亲本抗CD16 scFv 50NI体现的,从外周血中分离和浓缩的NK细胞用上面实施例5介绍的方法来测定 Ca^{2+} 流。

[0235] 结果清晰地显示,在新鲜分离的NK细胞中,添加MAb抗(His)₆后再只添加羊抗鼠IgG多克隆抗体(GAM)对细胞内的钙离子的浓度变化不显著。然而,在添加scFv 50NI后荧光信号增强,实施例5已经介绍了scFv 50NI与MAb抗(His)₆和GAM的交叉反应。

[0236] 当亲和力-成熟的抗CD16 scFv(3-LS49或4-LS21,用作例证)被应用,通过与抗(His)₆和GAM交联后增强的信号至少与50NI引发的信号一样强。因此,可以得出:通过人scFv 50NI链替换来的scFv能够维持它们激活NK细胞并通过与CD16A结合引发细胞内钙流动的能力。

[0237] 实施例14:在新鲜分离的NK细胞中引发溶细胞活性

[0238] CD16A涉及于由NK细胞介导的抗体依赖性细胞毒性作用(ADCC)。在体内,激活对CD16特异de单克隆抗体IgG同种型能够引发FcR阳性靶细胞的杀伤。为了确定是否亲和力-成熟的抗CD16A scFv在NK细胞中诱导钙流动,也同样能够介导NK细胞的细胞毒性,我们利用新鲜分离的NK细胞重导向杀伤作用于鼠FcR阳性P815细胞来检测scFv。因为scFv缺乏IgG,的Fc段,因此它们与抗(His)₆鼠的单克隆抗体一起使用。重定向细胞溶解通过释放的钙黄绿素含量来测定。

[0239] 按照上面介绍的方法从健康捐献者的PBMC中分离和富集NK细胞。流式细胞检测分析显示NK细胞群含有81%的CD16的阳性细胞和94%CD56阳性细胞;没有检测到一定数量的CD3阳性或CD19阳性细胞(数据未列出)。鼠P815细胞系(由Dr.G.Moldenhauer,DKFZ,

Heidelberg, Germany 惠赠) 是用添加10%的热灭活胎牛血清(FCS), 2mM的L-谷氨酰胺, 100U/mL青霉素G钠, 100 μ g/mL硫酸链霉素以及50 μ M b-巯基乙醇的RPMI 1640培养基培养的。对该实验, 所用的P815靶细胞是用10 μ M CalceinAM(分子探针) 在不含FCS的RPMI 1640培养基中37 $^{\circ}$ C条件下作用30min来标记的。将标记的P815细胞用RPMI 1640清洗2次, 然后用添加10%的热灭活FCS、2mM的L-谷氨酰胺、100U/mL青霉素G钠和100 μ g/mL硫酸链霉素RPMI 1640培养基重悬细胞, 使得细胞密度为 1×10^6 /mL。从细胞悬液中接种50 μ L即 1×10^4 个细胞于96孔圆形底部微量滴定板的各个孔中。将新鲜分离的 1×10^5 个NK细胞以50 μ L的体积添加到每孔中, 目的是使效应细胞与靶细胞的比例是10:1。每孔中添加终浓度为1 μ g/mL的抗CD16抗体和对照抗体, 同样说明1 μ g/mL的抗(His)₆鼠MAb 13/45/31-2也是适用的。单克隆抗体OKT3(一种抗CD3MAb), A9和13/45/31-2抗(His)₆都由Dr. G. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg, Germany 惠赠。抗体B159抗CD56是从BDBiosciences/Pharmingen (Heidelberg, Germany) 购买; 195314抗-NKp46是从R&D Systems (Wiesbaden, Germany) 购买。将这些平板置于一定湿度的含有5%CO₂条件下, 37 $^{\circ}$ C温育3小时。向一些孔中添加1% Triton \times 100 (Roth, Karlsruhe, Germany), 目的是使靶细胞能够最大程度的溶解。通过对不含效应细胞以及抗体的靶细胞的培养来测定自然释放的钙黄绿素。在温育后, 将微量滴定板以500g 离心5min, 收集约100 μ L的悬液, 在520nm处用多标记阅读器 (Victor3, Perkin Elmer, Rodgau, Germany) 来测定释放的钙黄绿素的荧光。细胞溶解的计算按照如下公式: $[F(\text{样品}) - F(\text{自发的})] / [F(\text{最大}) - F(\text{自发})] \times 100\%$ 。利用三个重复样产生了的平均值以及标准差绘制成图4。

[0240] 如所预测的, 用作对照的抗体OKT3抗CD3, B159抗CD56和抗(His)₆MAbs与没有添加任何抗体的样品一样, 只有背景杀伤。这就意味着一种抗体与非激活受体如CD56的结合是不能诱导NK细胞的细胞毒性。另外, 对照抗体与P815靶细胞Fc受体结合后, 能排斥IgGs的毒性效应, 但是对NK细胞的效应分子不起作用。相反地, MAb 195314(抗NKp46) 和A9(抗CD16), 两者都能靶向激活NK受体, 引发P815靶细胞较强的溶解, 其范围分别是35%和65%。抗CD16 scFv对靶细胞的溶解率为1.8%和11.5%之间, 这表明scFv单独不能激活NK细胞。然而, 在所有样品中, 添加MAb抗(His)₆都能促进FcR阳性P815细胞的交联以及结合, 进而引发细胞大量的溶解。亲和力-成熟的scFv 4-LS21中, 大约有60%的靶细胞溶解。亲本抗CD16 scFv 50NI与MAb抗(His)₆一起能够对NK细胞对P815靶细胞的重定向杀伤起着较小的作用。

[0241] 亲和力-成熟的抗CD16 scFv的重定向细胞毒性分析结果清楚显示了抗CD16A scFv不仅能够引起NK细胞的钙流, 还能引发NK细胞的细胞毒性。

[0242] 实施例15: 编码人CD16A-Fc48R/158F突变体以及人CD16B-Fc三种不同等位基因突变体的核酸序列的产生

[0243] 人Fc γ RIII存在Fc γ RIIIA(转膜蛋白) 和Fc γ RIIIB(GPI锚定物) 两种亚型, 两者在胞外免疫球蛋白结合区域的同源性为96% (vande Winkel and Capel, 1993, Immunol. Today 14(5):215-221)。这两个亚型具有不同的等位基因突变体 (Koene等, 1997 Blood 90:1109-1114; Koene等, 1998 Blood 91:673-679)。图6显示的是A和B亚型不同等位基因突变体氨基酸序列的对比结果。

[0244] 实施例1所述的, 用质粒pCDM-CD16-Fc瞬时转染HEK-293细胞产生的可溶性CD16A-Fc融合蛋白是人CD16A-Fc48R/158V (Mandelboim等, 1999, supra)。人体上这种亚型在158位

存在双等位基因多态 (FcγRIII-A 158Val/Phe), 它能影响自然杀伤细胞上的FcγRIII-A受体对IgG的亲合力。有报道指出等位基因FcγRIII-A 158 Val比等位基因158 Phe对IgG表现出更高的亲合力 (Koene等, 1997 supra)。

[0245] 为了说明scFv 4-LS21结合于Phe突变体, 利用pCDM-CD16A-Fc48R/158V定点突变产生pCDM-CD16A-Fc48R/158F。向10ng pCDM-CD16A-Fc48R/158V质粒中添加125ng引物P41, 5' CTGCAGGGGGCTTTTTGGGAGTAAAAATGTG 3' (SEQ ID NO 47) 和P42, 5' CACATTTTACTCCCAAAAAGCCCCCTGCAG 3' (SEQ ID NO 48), 25mM dNTP以及2.5U PfuUltra HF DNA聚合酶 (Stratagene)。反应程序为: 95°C, 30sec; 16个循环的95°C, 30sec; 66°C, 60sec; 68°C, 318sec。扩增产物用DpnI限制内切酶酶切3小时, 在80°C, 温育20min终止反应。用2μl的反应混合物转化Chemocompetent TOP10/P3细胞 (Invitrogen), 150μl涂在含有10μg/ml四环素和25μg/ml氨苄青霉素的LB平皿上。通过测序确认了编码pCDM-CD16A-Fc48R/158F的序列。按照实施例1的方法表达和纯化CD16A-Fc48R/158F。

[0246] 在人体中表达的FcγRIIIB受体包含三种不同的等位基因的突变体, 分别命名为NA1, NA2和SH (Koene等, 1997 supra; Koene等, 1998 supra)。三种编码人CD16B等位基因胞外结构域的基因由Geneart (Regensburg, Germany) 合成。将核酸序列进行克隆, HindIII/BamHI双酶切后, 连接到含有受体Fc段核酸序列的pSEC质粒上。按照实施例1的方法表达和纯化CD16B-FcNA1, CD16B-FcNA2和CD16B-FcSH。

[0247] 实施例16: 人CD16不同等位基因突变体的Western-blot

[0248] 我们利用CD16A和CD16B不同等位基因变异体的Western-Blot检测来确定scFv 4-LS21对CD16A亚型的特异性。将750ng的CD16A-Fc^{48R/158V}、CD16A-Fc^{48R/158F}、CD16B-Fc^{SH}、CD16B-Fc^{NA1}、CD16B-Fc^{NA2}和NKp46-Fc (阴性对照) 置于8%的非还原SDS胶上, 并印迹到膜上。

[0249] 将4μg/ml的抗CD16 scFv A9、抗CD16A scFv 4-LS21和抗NKp46scFv (阴性对照) 印迹到膜上进行温育。利用HRP抗His (1μg/mL) 来检测scFv对重组蛋白的结合。HRP偶联的抗人IgG和HRP偶联的抗His (1μg/mL) 用作对照。

[0250] 4-LS21 scFv只与CD16A型等位基因有较强的结合: 与CD16B等位基因不结合。同时结果也说明了4-LS21 scFv对CD16A型的特异性, 4-LS21 scFv能识别CD16A的2种等位基因突变体。相反地, 鼠抗CD16 scFv A9能够与CD16A和CD16B的所有的等位基因突变体以相同的方式结合。

[0251] 实施例17: 人CD16不同等位基因突变体的ELISA检测

[0252] 利用不同的等位基因突变体的ELISA来进一步验证scFv 4-LS21对CD16A亚型的特异性。将Maxisorp板的各孔用100mM分别含有200ng的CD16A-Fc^{48R/158V}、CD16A-Fc^{48R/158F}、CD16B-Fc^{SH}、CD16B-Fc^{NA1}、CD16B-Fc^{NA2}或NKp46-Fc (阴性对照) 的NaHCO₃ 进行包被。

[0253] 往孔内加入浓度为4μg/ml抗CD16A 4-LS21 scFv和抗NKp46scFv进行温育。用HRP偶联的抗His (1μg/ml) 对scFv与重组蛋白的结合进行检测。结果显示scFv 4-LS21与CD16A的两个等位基因都有很强的结合, 而对CD16B等位基因不结合 (图7A), 由此说明了4-LS21 scFv对CD16A亚型的特异性结合。

[0254] 同时设置了相同包被板的抗CD16 MAbs A9 (1μg/ml) 的平行对照组 (图7B)。在加入MAb A9 (1μg/mL) 温育后, 加入浓度为0.5μg/ml的HRP偶联羊抗鼠IgG (对人Fc交叉反应最小)。MAb A9与所有的等位基因突变体都有较强的结合 (CD16A和CD16B两者)。

的构建

[0267] 编码抗CD19抗体的V_H和V_L可变的基因是来源于用质粒pSKK3_scFv_(G2S)3 α CD19 (HD37)的杂交瘤HD37。

[0268] 用Nco I/Bsm BI将pSKK3_scFv_(G2S)3 α CD19 (HC37) 质粒双酶切后,将插入片段用琼脂糖胶纯化。纯化后产物用限制性内切酶Eco RV切割。将Eco RV/Bsm BI双酶切后的片段插入到线性的用Eco RV/Bsm BI酶切的pHOG CD30 \times CD16^{LS21}TandAb/(G₂S)₃质粒上,这样就产生了pHOG CD30 \times CD16^{LS21}TandAb/(G₂S)₃质粒。将pHOG CD19 \times CD16^{LS21}TandAb/(G₂S)₃质粒用NcoI/XbaI进行双酶切,然后连接到用NcoI/XbaI双酶切过的线性pSKK3质粒上。最终获得编码抗CD19 \times 抗CD16A TandAb的pSKK3 CD19 \times CD16A^{LS21} TandAb/(G₂S)₃质粒。

[0269] 实施例21:CD30 \times CD16^{LS21}TandAb/(G₂S)₃和CD19 \times CD16^{LS21} TandAb/(G₂S)₃分子在细菌中的表达和纯化

[0270] 将转化了pSKK3 CD30 \times CD16^{LS21} TandAb/(G₂S)₃ and pSKK3CD19 \times CD16^{LS21} TandAb/(G₂S)₃表达质粒的E.coli K12菌株RV308 (Maurer等,1980,J.Mol.Biol.139:147-161)样品在含有50 μ g/ml氨苄青霉素和100mM葡萄糖(2 \times YT_{GA})的2 \times YT培养基中于28 $^{\circ}$ C培养过夜。过夜培养物用2 \times YT_{GA}稀释(1:50),在28 $^{\circ}$ C、200rpm下进行摇床培养。当培养物达到OD₆₀₀为0.8时,9500g下离心15min得到细胞沉淀,并用相同体积的含有50 μ g/ml氨苄青霉素的新鲜YTBS培养基(含有1M山梨醇和2.5mM甜菜碱的2 \times YT;Blacwell& Horgan,1991,FEBS Letters 295:10-12重悬。添加IPTG至终浓度为0.2mM,在21 $^{\circ}$ C下继续培养18-20h。4 $^{\circ}$ C,14000g下离心20min收集细胞。将细胞沉淀在5%初体积含有200mM Tris-HCl、20%蔗糖、1mM EDTA,pH8.0的冰冷缓冲液中重悬。间或搅拌下,在冰上温育1小时后,将原生质球在4 $^{\circ}$ C下14000g离心60min,可溶性的外周胞质提取物在上清中,与原生质球和在颗粒中的不可溶外周胞质物质分离。将外周胞质组分于4 $^{\circ}$ C用启动缓冲液(50mM Tris-HCl,1M NaCl,50mM咪唑,pH7.0)透析。1400g下于4 $^{\circ}$ C离心含有重组体产物的透析溶液。将1ml装有Cu²⁺的Chelating Sepharose Fast Flow柱(GEHealthcare Biosciences,Freiburg,Germany)用50mM Tris-HCl,1MNaCl,pH7.0(启动缓冲液)平衡后,在4 $^{\circ}$ C下进行固定化金属亲和层析。将样品上柱。然后用20倍柱体积的启动缓冲液洗柱,再用含有50mM咪唑的启动缓冲液洗柱,直至流出液在280nm处的吸光值最小(大约使用30倍柱体积的缓冲液)。用含有50mM Tris-HCl,1MNaCl,300mM咪唑,pH7.0的缓冲液洗脱得到吸附物质。含有TandAb分子的洗脱部分用Penta HisTM的无牛血清蛋白抗体(Qiagen,Hilden,Germany)以及辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG抗体进行免疫杂交鉴定。

[0271] 收集阳性部分,并采用PD-10预装柱(GE Healthcare Biosciences,Freiburg,Germany)(CD30 \times CD16^{LS21}TandAb/(G₂S)₃ and CD19 \times CD16^{LS21}TandAb/(G₂S)₃,分别地)用于与50mM咪唑、50mM NaCl (pH6.0) or 50mM MES,50mM NaCl (pH5.5)行缓冲液交换。离心去浊。使用0-1M NaCl浓度梯度的含50mM咪唑、50mM NaCl (pH6.0) or 50mM MES,50mM NaCl (pH5.5)(CD30 \times CD16^{LS21}TandAb/(G₂S)₃ and CD19 \times CD16^{LS21}TandAb/(G₂S)₃,respectively)缓冲液,采用MonoS HR5/5柱(GE HealthcareBiosciences,Freiburg,Germany)通过离子交换层析进行最终纯化。通过还原型15%SDS-PAGE以及考马斯染色鉴定含有TandAb分子的洗脱物。收集阳性组分,并采用PD-10预装柱(GE Healthcare Biosciences,Freiburg,Germany)与含有50mM咪唑和10mM Trehalose (pH6.0 或7.0)(CD30 \times CD16^{LS21}TandAb/(G₂S)₃和CD19 \times

CD16^{LS21} TandAb/ (G₂S)₃, 分别地) 的PBS进行缓冲液交换。

[0272] 实施例22: 通过流式细胞术鉴定CD30×CD16^{LS21}Tandab/ (G₂S)₃和CD19×CD16^{LS21}TandAb/ (G₂S)₃分子

[0273] 用磷酸钙法将pcDNA3-CD16A-zeta质粒瞬时转染HEK-293细胞(Dr.O.Mandelboim, University of Jerusalem, Israel), 转染40小时后按照实施例7所述的方法用流式细胞术测定与CD16A的结合。多毛状白血病细胞系JOK-1 (Schwartz-Albiez R, Dorken B, Monner DA, Moldenhauer G, (1991) Int Immunol 3:623, a kind gift from Dr.G.Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg) 用于判断与CD19的结合。通过人Hodgkin细胞系L540CY (由德国科隆大学V.Diehl博士友情提供; Kapp U, Wolf J, von Kalle C, Tawadros S, Rottgen A, Engert A, Fonatsch C, Stein H, Diehl V. (1992) Ann Oncol. Sep; 3 Suppl 4:21-3) 染色来检测与CD30的反应。按照上述基本相同的方法进行细胞染色和分析。所有重组抗体均用10μg/mL MAb抗6-组氨酸13/45/31-2 (Dianova, Hamburg, Germany) 和15μg/mL FITC偶联的羊抗鼠IgG (Dianova) 检测。

[0274] 流式细胞术分析证实CD30×CD16^{LS21} TandAb和CD19×CD16^{LS21} 抗体均对细胞表达的相应抗原具有强的结合力。

[0275] 实施例23: 亲和力的测定

[0276] 通过表面等离子体共振测定, scFv 4-LS21对CD16A抗原的等位基因变异体48R/158V和48R/158F的K_D值的测定结果显示与5×10⁻⁸M相当, 说明这两个等位基因变异体均能以大约相同的亲和力被识别。4-LS21产生TandAb CD30×CD16^{LS21}证实了这个发现, 其也显示与CD16A的两种等位基因变异体几乎以相同的亲和力相结合。与4-LS21 scFv相比, 用TandAb抗体可观测到在亲和力上超过10因素的进步, 这是由于亲和力的增加。

[0277] 实施例24: 通过分子细胞毒性实验鉴定CD30×CD16^{LS21}TandAb/ (G₂S)₃和CD19×CD16^{LS21}TandAb/ (G₂S)₃

[0278] 为了判断CD30×CD16^{LS21}和CD19×CD16^{LS21}TandAb抗体是否能够通过增加NK细胞以及由交叉反应受体对NK细胞的激活来介导内毒性反应, 按照T.Dreier等(2002, Int J Cancer 100:690-697) 描述的方法进行非放射性细胞毒性实验。按照前所方法从PBMC中富集作为效应细胞的NK细胞。用流式细胞仪检测各例中富集的NK细胞的纯度和抗原表达情况(不显示日期)。

[0279] 在含有10%FCS、2mM L-谷氨酰胺和100IU/mL青霉素G纳以及100100μg/mL硫酸链霉素的RPMI1640培养基中培养CD30⁺ L540CY靶细胞或CD19⁺JOK-1或Raji靶细胞(作为RPMI培养基的所有组分均来自Invitrogen)。用于细胞毒性式样的细胞均用10μM钙黄绿素AM (Molecular Probes/Invitrogen) 标记, 在37°C于RPMI培养基中培养30min。温和清洗标记的细胞, 用RPMI培养基重悬至浓度为1×10⁵/mL。将1×10⁴靶细胞与富集的1×10⁵NK细胞一起加入到具有CD30×CD16^{LS21}TandAb或CD19×CD16^{LS21}TandAb96的圆底微孔板中, 总体积200μL/孔。200g离心2分钟后, 在37°C, 一定湿度和5%的CO₂条件下温育3小时。温育结束前15分钟, 将20μL含10% Triton X-100的RPMI培养基加入到只含有靶细胞的孔中。其它每孔均加入20μL RPMI培养基。500g下离心5min每孔得到100μL细胞培养上清, 用荧光板读取器 (Victor 3, Perkin Elmer) 测定释放出的钙黄绿素在520nm处的荧光值。在测定的基础上, 用下述公式计算特异细胞裂解: (样品荧光值-自发荧光值)/(最大荧光值-自发荧光值) ×

100%。自发荧光值是在没有效应细胞或抗体的情况下对靶细胞的荧光计数,最大荧光值是加入Triton X-100使得全部细胞裂解进行的荧光计数。用Prism软件(GraphPad Software)绘制Sigmoidal dose response曲线,如图8所示。

[0280] 结果证实了TandAb激活的NK细胞对靶细胞的特异裂解。相反,CD19×CD16^{LS21}TandAb并不介导CD19-L540Y靶细胞的裂解,反之亦然,CD30×CD16^{LS21}TandAb并不激活NK细胞杀伤CD30⁻JOK-1细胞。在没有NK细胞存在的情况下,CD30×CD16^{LS21}TandAb和CD19×CD16^{LS21}TandAb均不显示针对靶细胞的细胞毒性作用。

序列表

<110> Syngenta Crop Protection AG
 Affimed Therapeutics AG

<120> 抗 CD16 结合分子

<130> S 70677/WO

<160> 54

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> H. sapiens

<400> 1
 gaggtccagc tggtagcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagggt 60
 tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtgggtggtag cacaagctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg acccgggaca cgtccacgag cacagtctac 240
 atggagctta gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc tagaggtagt 300
 [0001] gcttattact acgattttgc tgactactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 2
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> H. sapiens

<400> 2
 tcctatgagc tgatgcagcc accctcagtg tccgtgtcct caggacagac agccagcatc 60
 ccctgctctg gagataaatt ggaggaaaaa tatgtttcct ggtatcaaca gaggccaggc 120
 cagtcccctg tgttggatcat ttatcaggat aataagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggcgatg 240
 gatgaggctg actactattg tcaggtgtgg gacaattaca gtgtgctatt cggcggaggg 300
 accaagctga ccgtccta 318

<210> 3
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 3-LB3 VL region

<400> 3

tcctatgagc tgacacagcc actctcagag tcagtggccc agggacagac ggccaggatt	60
acctgtgggg gaaacaacat tgaaagtaga aatgttact ggtaccagca gaagccaggc	120
caggccctg tgttggtcat ctatagggat aacaaccggc cctctgggat ccctgagcga	180
ttctctggct ccaattcggg gaacatggcc accctgacca tcagcagagc ccaagccggg	240
gatgcagctg actattactg tcaggtgtgg gacaactaca ctgtgctatt cggcggaggg	300
accaagctga ccgtccta	318

<210> 4
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 3-LB5 VL region

<400> 4	
tcctatgagc tgacacagcc accctcagtg gcagtggccc caggaaagac ggccaggatt	60
acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa aatgtgact ggtaccagca gaagccaggc	120
caggccctg tgctggtcat ctatagggat agcaaccggc cctctgggat ccctgagcga	180
ttctctggct ccaactcggg gaacacggcc accctgacca tcagcagagc ccaagccggg	240
gatgaggctg acttttattg tcaggtgtgg gacaactata ttgtgctgtt cggcggaggg	300
accaagctga ccgtcctg	318

[0002]

<210> 5
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 3-LB6 VL region

<400> 5	
caggctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt	60
ccctgtgagg gaaacaacat tggaagtaaa aatgtccact ggtatcggca gaagccaggc	120
caggtcctg tcctggtcat gtatgatgat agcaccggc cctcagggat ccctgagcga	180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggcgtg	240
gatgaggctg actactattg tcaggtgtgg gacaattaca gtgtgctatt cggcggaggg	300
accaagctga ccgtccta	318

<210> 6
 <211> 318
 <212> DNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 3-LS49 VL region	
	<400> 6	
	cagcctgtgc tgactcagcc actctcagtg tcagtgcccc cgggacagac ggccaggatt	60
	acctgtgggg gaaacaacat tggaaagtaa aatgtgcact ggtaccagca gaagccaggc	120
	caggcccctg tactggatcat ctataggac agcagccggc cctctgggat ccctgagcga	180
	ctctctggct ccaactcggg ggacacggcc accctgacca tcagcagagc ccaggccggg	240
	gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacgactaca ttgtggtctt cggcggaggg	300
	accaagctga ccgtccta	318
	<210> 7	
	<211> 318	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 4-LS14 VL region	
	<400> 7	
[0003]	tcctatgagc tgacacagcc accctcggtg tcagtgacct caggacagac ggccacgatt	60
	acctgcgggg caaacgacat tggaaaaga aatgtccact ggtaccaaca gaggccaggc	120
	cagtcccctg tgttggatcat ttatcaggat aataagcggc cctcagggat ccctgagcga	180
	ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggcgatg	240
	gatgaggctg actactattg tcaggtgtgg gacaattaca gtgtgctatt cggcggaggg	300
	accaagctga ccgtccta	318
	<210> 8	
	<211> 318	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 4-LS21 VL region	
	<400> 8	
	cagcctgtgc tgactcagcc atcctcggtg tcagtgcccc caggacagac ggccacgatc	60
	tcctgtgggg gacacaacat tgggagtaaa aatgtgcact ggtaccagca gaggccaggc	120
	cagtcccctg tgttggatcat ttatcaggat aataagcggc cctcagggat ccctgagcga	180
	ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggcgatg	240
	gatgaggctg actactattg tcaggtgtgg gacaattaca gtgtgctatt cggcggaggg	300

accaagctga ccgtccta

318

<210> 9
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

<400> 9

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

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

Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys
 50 55 60

Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val
 65 70 75 80

[0004]

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

<400> 10

Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Ser Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Glu Glu Lys Tyr Val
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 11

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 3-LB3 VL 氨基酸序列

<400> 11

[0005]

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Glu Ser Val Ala Gln Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Glu Ser Arg Asn Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Arg Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Thr Val Leu
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序类

<220>

<223> 3-LB5 VL 氨基酸序列

<400> 12

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ile Val Leu
85 90 95

[0006]

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 3-LB6 VL 氨基酸序列

<400> 13

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Pro Cys Glu Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
20 25 30

His Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Val Leu Val Met Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 14
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 3-LS49 VL 氨基酸序列

<400> 14

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
20 25 30

[0007]

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Arg Asp Ser Ser Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Leu Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asp Tyr Ile Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 15
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-LS14 VL 氨基酸序列

<400> 15

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Thr Cys Gly Ala Asn Asp Ile Gly Lys Arg Asn Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

[0008]

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4-LS21 VL 氨基酸序列

<400> 16

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Ser Cys Gly Gly His Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> H. sapiens

<400> 17

Thr Ser Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> H. sapiens

<400> 18

Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

[0009]

Gly

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> H. sapiens

<400> 19

Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr
1 5 10

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> H. sapiens

<400> 20

Ser Gly Asp Lys Leu Glu Glu Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 21
<211> 7
<212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 21

Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 22

Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu
1 5

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 3-LB3 LC CDR1

<400> 23

[0010] Gly Gly Asn Asn Ile Glu Ser Arg Asn Val His
1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 3-LB3 LC CDR2

<400> 24

Arg Asp Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 3-LB3 LC CDR3

<400> 25

Gln Val Trp Asp Asn Tyr Thr Val Leu
1 5

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 3-LB6 LC CDR2

 <400> 30

 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5

 <210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 3-LS49 LC CDR2

 <400> 31

 Arg Asp Ser Ser Arg Pro Ser
 1 5

 [0012] <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 3-LS49 LC CDR3

 <400> 32

 Gln Val Trp Asp Asp Tyr Ile Val Val
 1 5

 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 4-LS14 LC CDR1

 <400> 33

 Gly Ala Asn Asp Ile Gly Lys Arg Asn Val His
 1 5 10

 <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

	ccgccgtccg cggccgctgg atccgaacaa aagctgatct cagaagaaga cctaaactca	900
	catcaccatc accatcacta a	921
	<210> 37	
	<211> 921	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> clone pSKK2-3-LB3	
	<400> 37	
	atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggcttgctgc tgctggcagc tcagccggcc	60
	atggcggagg tccagctggg acagtctgga gcagaggtga aaaagcccgg ggagtctctg	120
	aaggtttctt gcaaggcatc tggatacacc ttcaccagct actatatgca ctgggtgoga	180
	caggcccctg gacaagggct tgagtggatg ggaataatca accctagtgg tggtagcaca	240
	agctacgcac agaagttcca gggcagagtc accatgacct gggacacgtc cagcagcaca	300
	gtctacatgg agcttagcag cctgagatct gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgctaga	360
	ggtagtgctt attactacga ttttgctgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc	420
	tcctcagggg gtgcatccgc cccaaccctt aagcttgaag aaggtgaatt ttcagaagca	480
[0014]	cgcgatatcct atgagctgac acagccactc tcagagtcag tggcccaggg acagacggcc	540
	aggattacct gtgggggaaa caacattgaa agtagaaatg ttcactggta ccagcagaag	600
	ccaggccagg ccctgtggt ggcatctat agggataaca accggccctc tgggatccct	660
	gagcgattct ctggctccaa ttcgggggaa atggccacct tgaccatcag cagagcccaa	720
	gcccgggatg cagctgacta ttactgtcag gtgtgggaca actacactgt gctattcggc	780
	ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcgggt cactctgttc	840
	ccgccgtccg cggccgctgg atccgaacaa aagctgatct cagaagaaga cctaaactca	900
	catcaccatc accatcacta a	921
	<210> 38	
	<211> 921	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> clone pSKK2-3-LB5	
	<400> 38	
	atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggcttgctgc tgctggcagc tcagccggcc	60
	atggcggagg tccagctggg acagtctgga gcagaggtga aaaagcccgg ggagtctctg	120

```

aaggtttctt gcaaggcatc tggatacacc ttcaccagct actatatgca ctgggtgcga 180
caggcccctg gacaagggct tgagtggatg ggaataatca accctagtgg tggtagcaca 240
agctacgcac agaagttcca gggcagagtc accatgaccc gggacacgtc cacgagcaca 300
gtctacatgg agcttagcag cctgagatct gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgctaga 360
ggtagtgctt attactacga ttttgctgac tactggggcc aggaaccct ggtcaccgtc 420
tcctcagga gtgcatccgc cccaaccctt aagcttgaag aaggtgaatt ttcagaagca 480
cgcgtatcct atgagctgac acagccaccc tcagtggcag tggcccagc aaagacggcc 540
aggattacct gtgggggaaa caacattgga agtaaaaatg tgcactggta ccagcagaag 600
ccaggccagg ccctgtgct ggtcatctat agggatagca accggccctc tgggatccct 660
gagcgattct ctggctccaa ctcggggaac acggccaccc tgaccatcag cagagcccaa 720
gccgggatg aggctgactt ttattgtcag gtgtgggaca actatattgt gctgttcggc 780
ggagggacca agctgaccgt cctgggtcag cccaaggctg cccctcggc cactctgttc 840
ccgcgctccg cggccgctgg atccgaacaa aagctgatct cagaagaaga cctaaactca 900
catcaccatc accatcacta a 921

```

[0015]

<210> 39

<211> 921

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> clone pSKK2-3-LB6

<400> 39

```

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggcttctgctc tgctggcagc tcagccggcc 60
atggcggagg tccagctggt acagtctgga gcagaggatg aaaagcccgg ggagtctctg 120
aaggtttctt gcaaggcatc tggatacacc ttcaccagct actatatgca ctgggtgcga 180
caggcccctg gacaagggct tgagtggatg ggaataatca accctagtgg tggtagcaca 240
agctacgcac agaagttcca gggcagagtc accatgaccc gggacacgtc cacgagcaca 300
gtctacatgg agcttagcag cctgagatct gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgctaga 360
ggtagtgctt attactacga ttttgctgac tactggggcc aggaaccct ggtcaccgtc 420
tcctcagga gtgcatccgc cccaaccctt aagcttgaag aaggtgaatt ttcagaagca 480
cgcgtacagg ctgtgctgac tcagccgccc tcagtgtcag tggcccagc acagacggcc 540
aggattccct gtgagggaaa caacattgga agtaaaaatg tccactggta tcggcagaag 600
ccaggccagg tccctgtcct ggtcatgtat gatgatagcg accggccctc agggatccct 660

```

gagcgattct ctggctccaa ctctgggaac acagccactc tgaccatcag cgggacccag 720
 gcgatggatg aggctgacta ctattgtcag gtgtgggaca attacagtgt gctattcggc 780
 ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcgggt cactctgttc 840
 ccgccgtccg cggccgctgg atccgaacaa aagctgatct cagaagaaga cctaaactca 900
 catcaccatc accatcacta a 921

<210> 40
 <211> 921
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> clone pSKK2-3-LS49

[0016] <400> 40
 atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggcttgetgc tgctggcagc tcagccggcc 60
 atggcggagg tccagctggt acagtctgga gcagaggtga aaaagcccgg ggagtctctg 120
 aaggtttcct gcaaggcatc tggatacacc ttcaccagct actatatgca ctgggtgcca 180
 caggcccctg gacaagggct tgagtggatg ggaataatca accctagtgg tggtagcaca 240
 agctacgcac agaagttcca gggcagagtc accatgacct gggacacgtc cacgagcaca 300
 gtctacatgg agcttagcag cctgagatct gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgctaga 360
 ggtagtgctt attactacga ttttgctgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 420
 tcctcagga gtgcatccgc cccaaccctt aagcttgaag aaggtgaatt ttcagaagca 480
 cgcgtagcag ctgtgctgac tcagccactc tcagtgtcag tggccccggg acagacggcc 540
 aggattacct gtgggggaaa caacattgga agtaaaaatg tgcaactgta ccagcagaag 600
 ccaggccagg ccctgtact ggatcatctat agggacagca gccggccctc tgggatccct 660
 gagcgactct ctggctccaa ctcgggggac acggccacct tgaccatcag cagagcccag 720
 gccggggatg aggctgacta ttactgtcag gtgtgggacg actacattgt ggtcttcggc 780
 ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg ccccccgggt cactctgttc 840
 ccgccgtccg cggccgctgg atccgaacaa aagctgatct cagaagaaga cctaaactca 900
 catcaccatc accatcacta a 921

<210> 41
 <211> 921
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> clone pSKK2-4-LS14

<400> 41
atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggcttgctgc tgctggcagc tcagccggcc 60
atggcggagg tccagctggc acagtctgga gcagaggatg aaaagcccgg ggagtctctg 120
aaggtttctt gcaaggcatc tggatacacc ttcaccagct actatatgca ctgggtgcga 180
cagggcccctg gacaagggtc tgagtggatg ggaataatca accctagtgg tggtagcaca 240
agctacgcac agaagttcca gggcagagtc accatgaccc gggacacgtc cacgagcaca 300
gtctacatgg agcttagcag cctgagatct gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgctaga 360
ggtagtgcctt attactacga ttttgctgac tactggggcc agggaaacct ggtcaccgtc 420
tcctcagga gtgcatccgc cccaacctt aagcttgaag aaggatgaatt ttcagaagca 480
cgcgtatcct atgagctgac acagccaccc tcggtgtcag tgaccccagg acagacggcc 540
acgattacct gcggggcaaa cgacattgga aaaagaaatg tccactggta ccaacagagg 600
ccaggccagt cccctgtggt ggtcatttat caggataata agcggccctc agggatccct 660
gagcgattct ctggctcaa ctctgggaac acagccactc tgaccatcag cgggaccag 720
gcgatggatg aggtgacta ctattgtcag gtgtgggaca attacagtgt gctattcggc 780
[0017] ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcgggt cactctgttc 840
ccgccgtccg cggccgctgg atccgaaca aagctgatct cagaagaaga cctaaactca 900
catcaccatc accatcacta a 921

<210> 42
<211> 921
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> clone pSKK2-4-LS21

<400> 42
atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggcttgctgc tgctggcagc tcagccggcc 60
atggcggagg tccagctggc acagtctgga gcagaggatg aaaagcccgg ggagtctctg 120
aaggtttctt gcaaggcatc tggatacacc ttcaccagct actatatgca ctgggtgcga 180
cagggcccctg gacaagggtc tgagtggatg ggaataatca accctagtgg tggtagcaca 240
agctacgcac agaagttcca gggcagagtc accatgaccc gggacacgtc cacgagcaca 300
gtctacatgg agcttagcag cctgagatct gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgctaga 360
ggtagtgcctt attactacga ttttgctgac tactggggcc agggaaacct ggtcaccgtc 420
tcctcagga gtgcatccgc cccaacctt aagcttgaag aaggatgaatt ttcagaagca 480

	cgcgtagcgc ctgtgctgac tcagccatcc tcggtgtcag tggccccagg acagacggcc	540
	acgatctcct gtgggggaca caacattggg agtaaaaatg tgcaactggta ccagcagagg	600
	ccaggccagt cccctgtggt ggtcatttat caggataata agcggccctc agggatccct	660
	gagcgattct ctggctccaa ctctgggaac acagccactc tgaccatcag cgggacccag	720
	gcgatggatg aggctgacta ctattgtcag gtgtgggaca attacagtgt gctattcggc	780
	ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcgggt cactctgttc	840
	ccgccgtccg cggccgctgg atccgaacaa aagctgatct cagaagaaga cctaaactca	900
	catcaccatc accatcacta a	921
	<210> 43	
	<211> 66	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码 PelB 前导序列核苷酸	
	<400> 43	
	atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggcttgctgc tgctggcagc tcagccggcc	60
[0018]	atggcg	66
	<210> 44	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码 scFv 连接子核苷酸	
	<400> 44	
	gaagaaggtg aattttcaga agca	24
	<210> 45	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码 c-myc 标签的核苷酸	
	<400> 45	
	gaacaaaagc tgatctcaga agaagaccta	30
	<210> 46	
	<211> 18	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码 hexa-histidine 标签的核苷酸	
	<400> 46	
	catcaccatc accatcac	18
	<210> 47	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸引物 P41	
	<400> 47	
	ctgcaggggg ctttttggga gtaaaaatgt g	31
	<210> 48	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0019]	<223> 寡核苷酸引物 P42	
	<400> 48	
	cacattttta ctcccaaaaa gccccctgca g	31
	<210> 49	
	<211> 64	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸引物 P34	
	<400> 49	
	catcacgata tcagaaccac cggagccgcc gctaccacct gaggacacgg tgaccagggt	60
	tccc	64
	<210> 50	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸引物 P36	
	<400> 50	
	ccggccatgg cgcaggtcca gctggtacag tctgg	35

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 甘氨酸-丝氨酸 连接子

<400> 51

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5

<210> 52
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸引物 P35

<400> 52
 ggtcaccgctc tcctcaggtg gtagcggcgg ctccggtggt tcttcctatg tgctgactca 60

[0020] gccatcctc 69

<210> 53
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> ER 保留信号

<400> 53
 cctctagatt agtgatggtg atggtgatgg gatcctagga cggtcagctt ggtccc 56

<210> 54
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> ER 保留信号

<400> 54

Lys Asp Glu Leu
 1

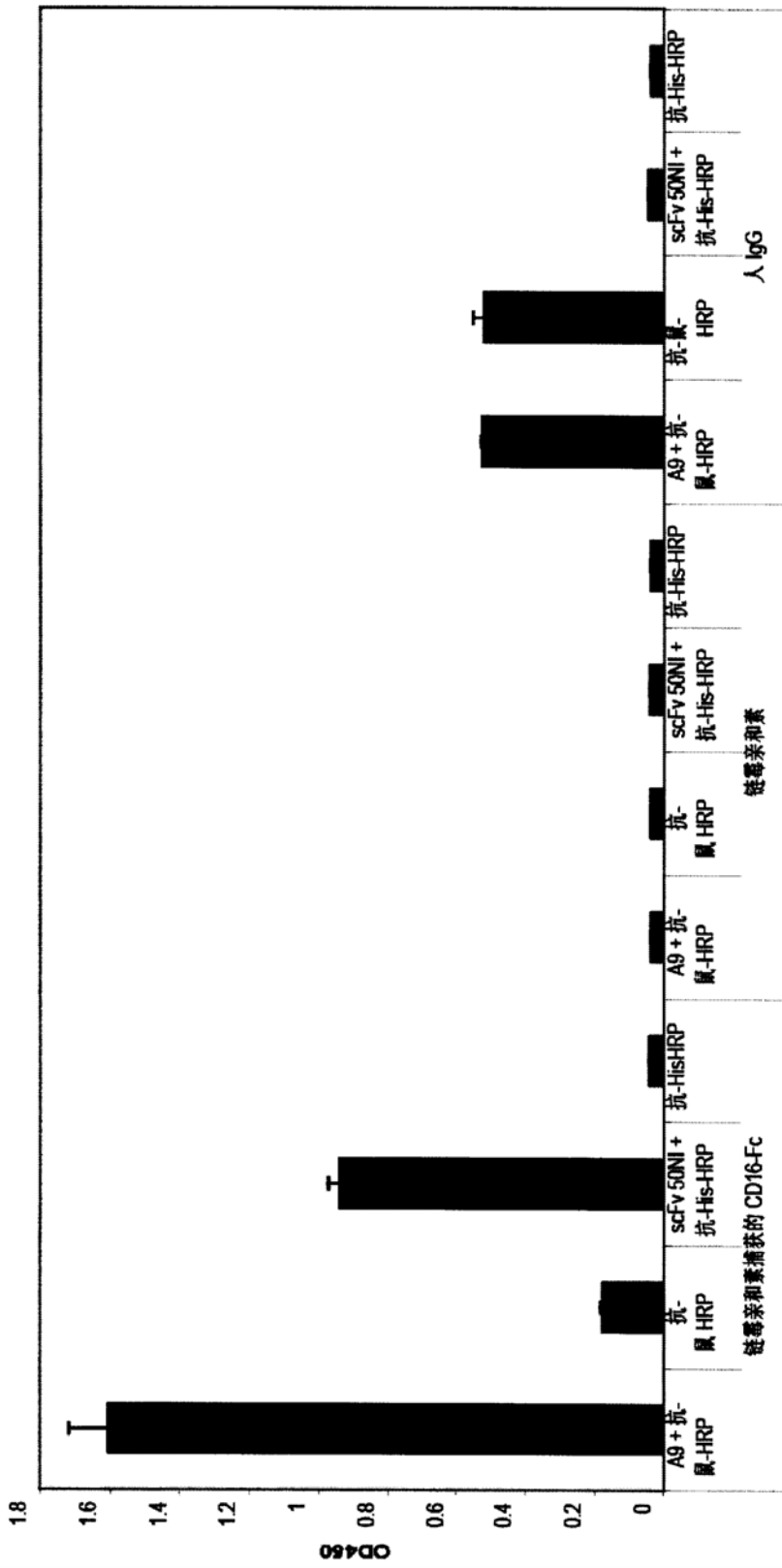


图 1

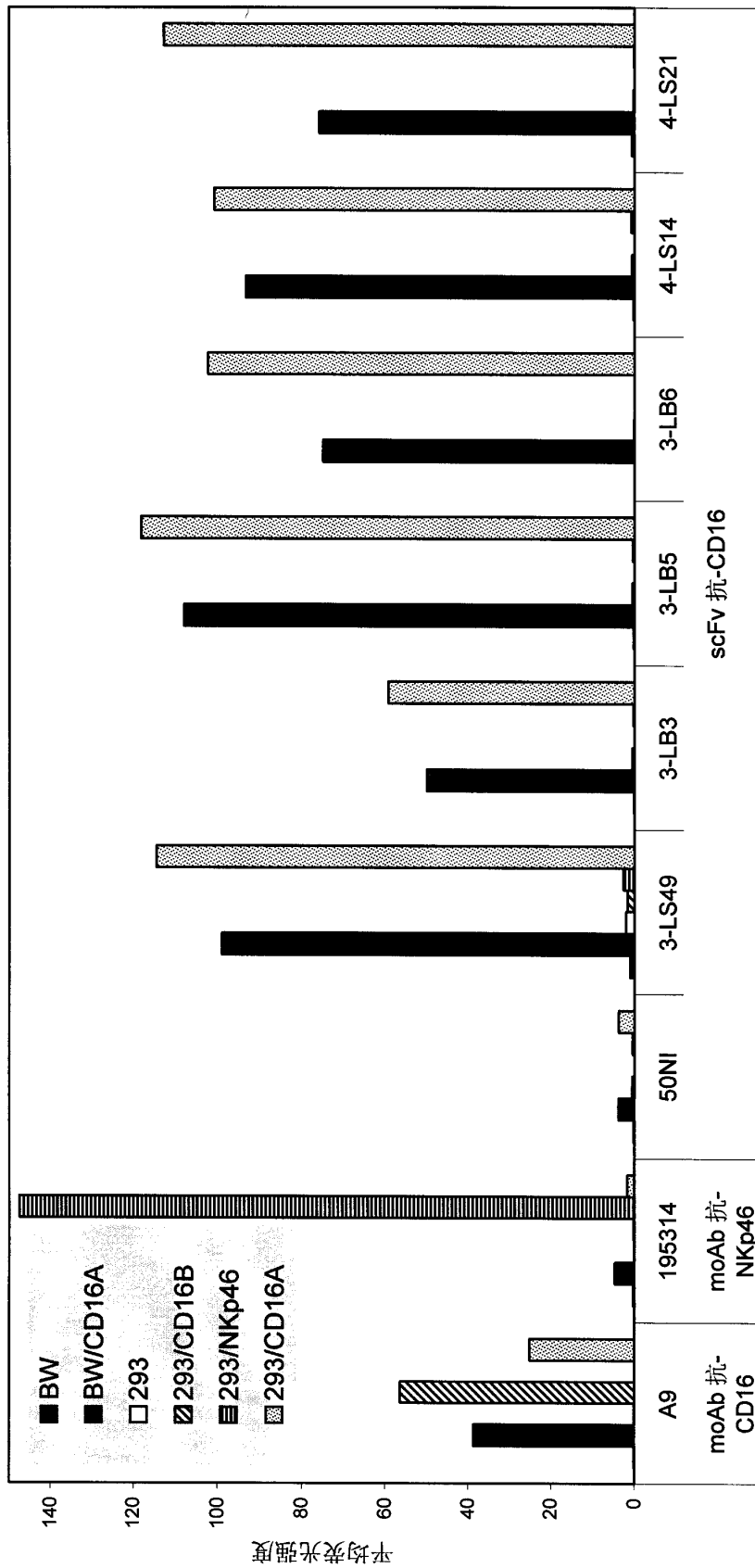


图 2

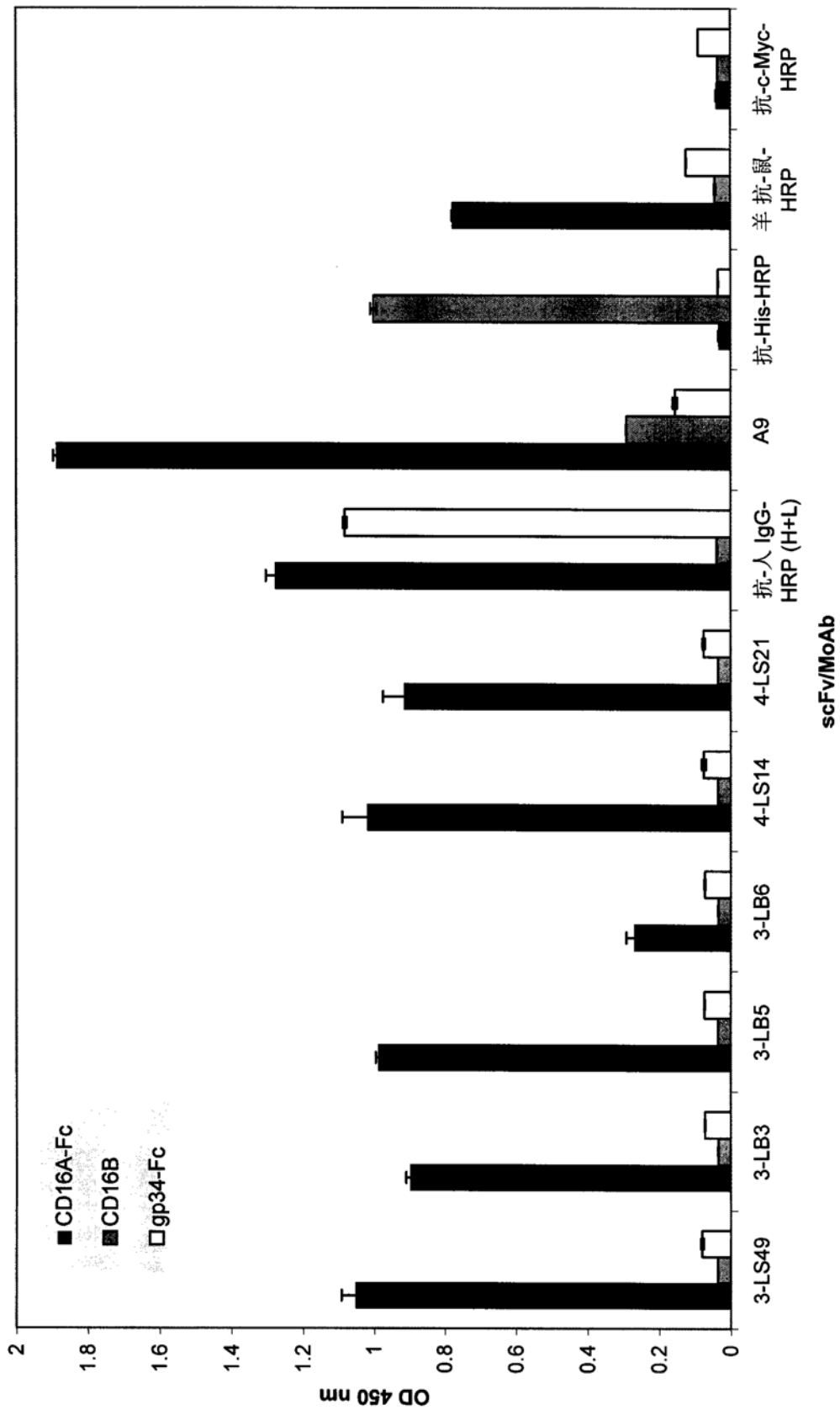


图 3

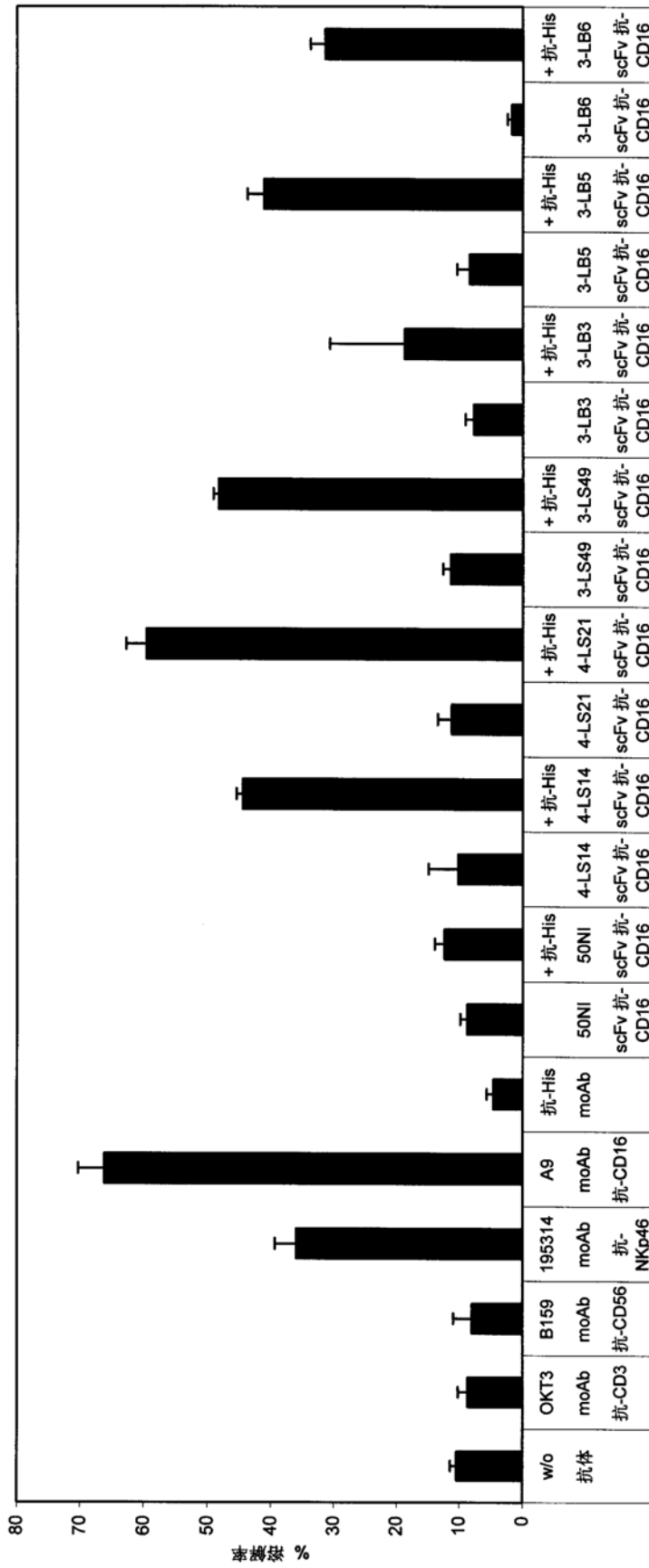


图 4

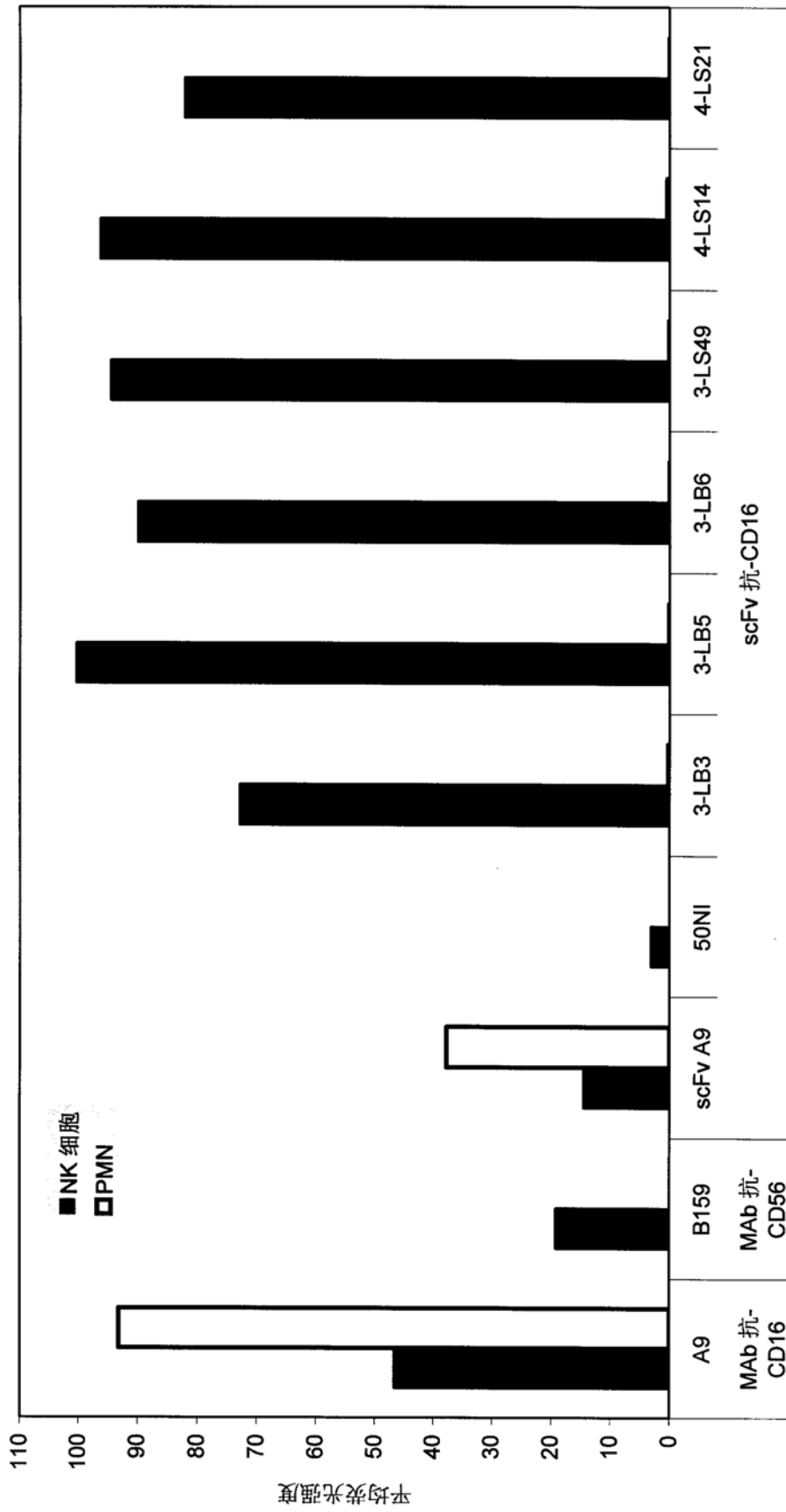


图 5

CD16B_NA1	RT EDLPKAVVFL EPQWYRVLEK DSVTLKCQGA	32 (50)
CD16B_NA2	RT EDLPKAVVFL EPQWYRVLEK DSVTLKCQGA	32 (50)
CD16B_SH	RT EDLPKAVVFL EPQWYRVLEK DSVTLKCQGA	32 (50)
CD16A_48R_158F	RT EDLPKAVVFL EPQWYRVLEK DSVTLKCQGA	32 (50)
CD16A_48R_158V	RT EDLPKAVVFL EPQWYRVLEK DSVTLKCQGA	32 (50)
*		
CD16B_NA1	YSPEDNSTQW FHNESLISSQ ASSYFIDAAT VDDSGEYRCQ TNLSTLSDPV	82 (100)
CD16B_NA2	YSPEDNSTQW FHNESLISSQ ASSYFIDAAT VDDSGEYRCQ TNLSTLSDPV	82 (100)
CD16B_SH	YSPEDNSTQW FHNESLISSQ ASSYFIDDAT VDDSGEYRCQ TNLSTLSDPV	82 (100)
CD16A_48R_158F	YSPEDNSTQW FHNESLISSQ ASSYFIDAAT VDDSGEYRCQ TNLSTLSDPV	82 (100)
CD16A_48R_158V	YSPEDNSTQW FHNESLISSQ ASSYFIDAAT VDDSGEYRCQ TNLSTLSDPV	82 (100)
*		
CD16B_NA1	QLEVHVGWLL LQAPRWVFKE EDPIHLRCHS WKNTALHKVT YLQNGKDRKY	132 (150)
CD16B_NA2	QLEVHVGWLL LQAPRWVFKE EDPIHLRCHS WKNTALHKVT YLQNGKDRKY	132 (150)
CD16B_SH	QLEVHVGWLL LQAPRWVFKE EDPIHLRCHS WKNTALHKVT YLQNGKDRKY	132 (150)
CD16A_48R_158F	QLEVHVGWLL LQAPRWVFKE EDPIHLRCHS WKNTALHKVT YLQNGKDRKY	132 (150)
CD16A_48R_158V	QLEVHVGWLL LQAPRWVFKE EDPIHLRCHS WKNTALHKVT YLQNGKDRKY	132 (150)
*		
CD16B_NA1	FHHNSDFHIP KATLKDSGSY FCRGIVGSKN VSSETVNIITI TQGLAVSTIS	182 (200)
CD16B_NA2	FHHNSDFHIP KATLKDSGSY FCRGIVGSKN VSSETVNIITI TQGLAVSTIS	182 (200)
CD16B_SH	FHHNSDFHIP KATLKDSGSY FCRGIVGSKN VSSETVNIITI TQGLAVSTIS	182 (200)
CD16A_48R_158F	FHHNSDFHIP KATLKDSGSY FCRGIVGSKN VSSETVNIITI TQGLAVSTIS	182 (200)
CD16A_48R_158V	FHHNSDFHIP KATLKDSGSY FCRGIVGSKN VSSETVNIITI TQGLAVSTIS	182 (200)
*		
CD16B_NA1	SFSPPG	188 (206)
CD16B_NA2	SFSPPG	188 (206)
CD16B_SH	SFSPPG	188 (206)
CD16A_48R_158F	SFSPPG	188 (206)
CD16A_48R_158V	SFSPPG	188 (206)

图 6

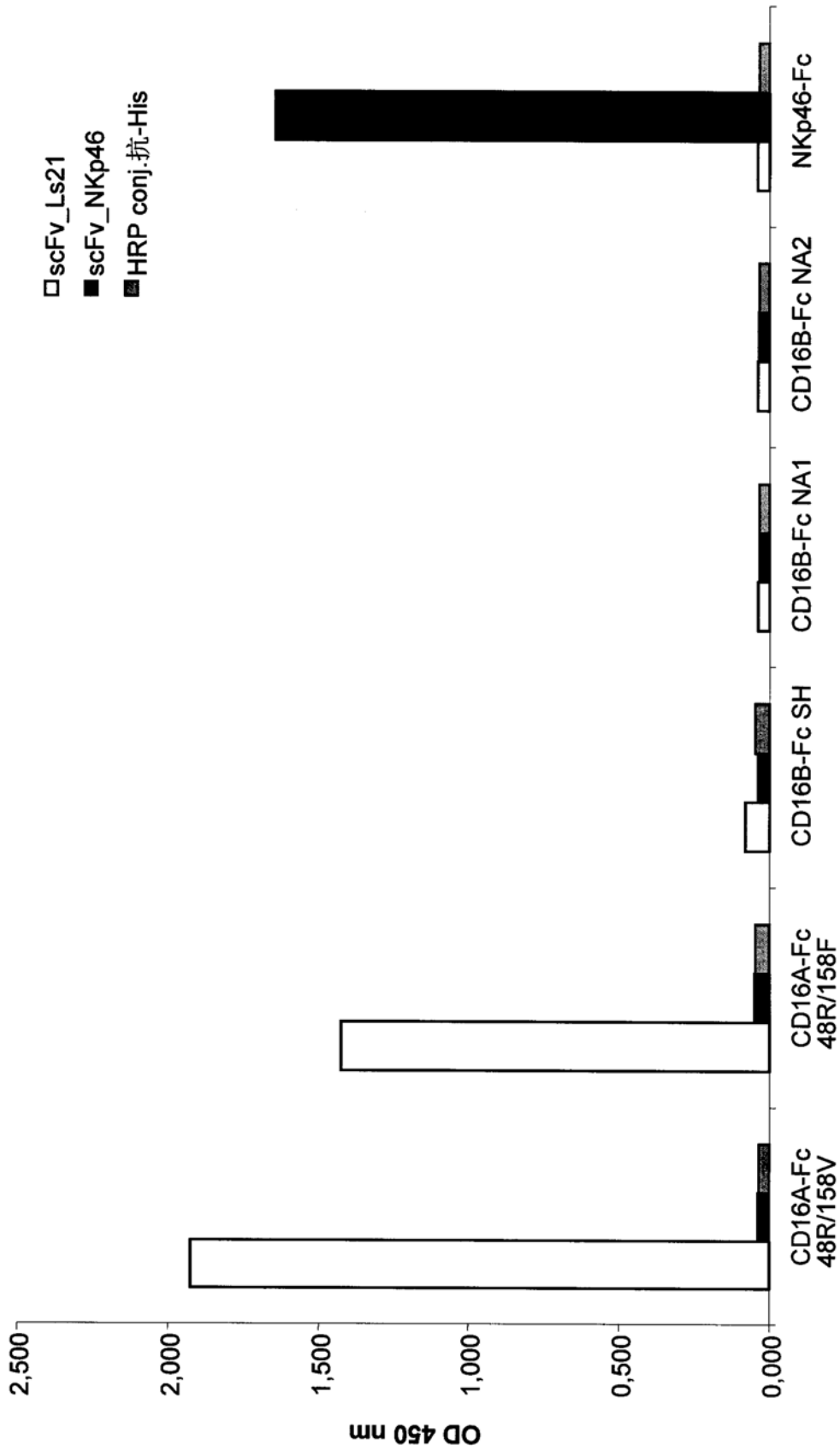
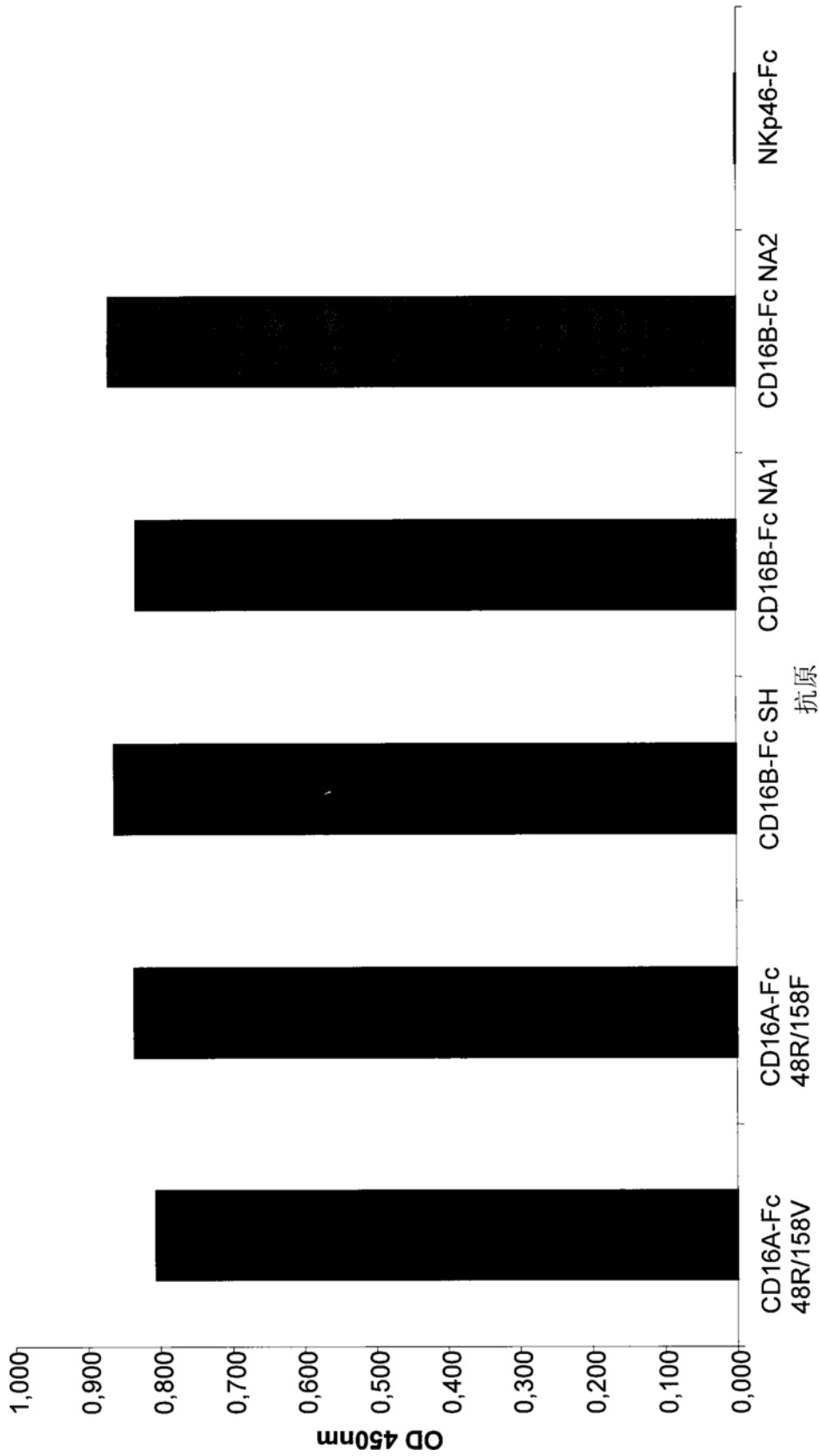


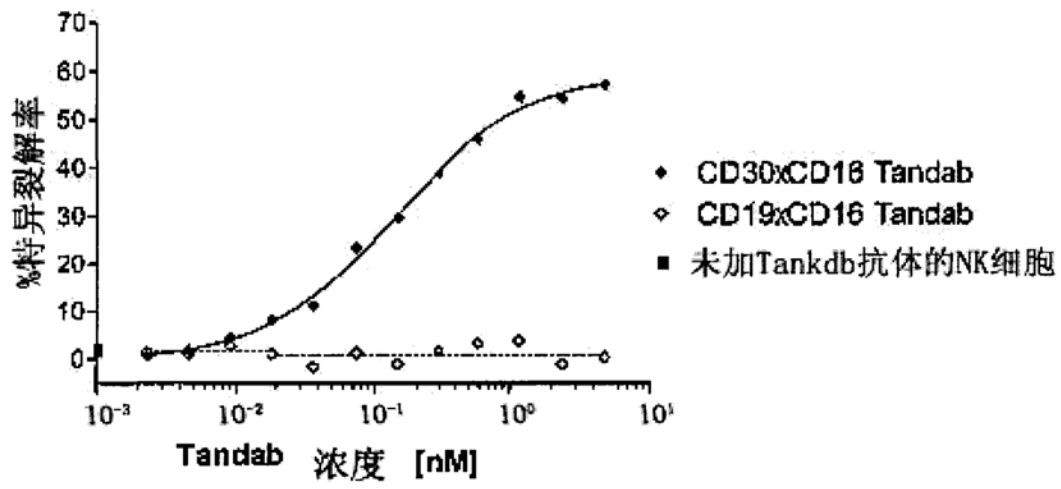
图 7A



抗原

图 7B

[A]



[B]

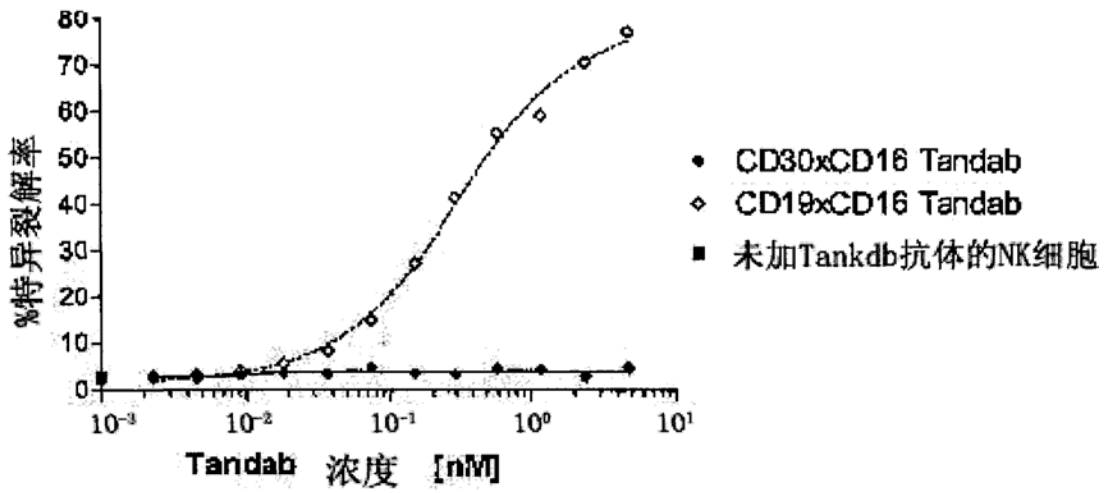


图8

专利名称(译)	抗-CD16结合分子		
公开(公告)号	CN101583625B	公开(公告)日	2020-03-20
申请号	CN200680018364.6	申请日	2006-05-26
申请(专利权)人(译)	阿菲姆德农业医药公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿菲姆德农业医药公司		
[标]发明人	卡芮霍夫曼 瑟基可普芮加欧 斯蒂芬早斯鸠其姆克拉克马斯 伐布芮斯勒盖儿 马威廉利透 乌娃芮优其		
发明人	卡芮·霍夫曼 瑟基·可普芮加欧 斯蒂芬·早斯·鸠其姆·克拉克马斯 伐布芮斯·勒盖儿 马威廉·利透 乌娃·芮优其		
IPC分类号	C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53 A61K47/48		
CPC分类号	A61K47/6879 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K16/283 C07K16/2878 C07K2317/31 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2317/732 C07K2317/92 C07K2319/30 C07K16/18 C07K2317/56 C07K2317/565		
优先权	2005010790 2005-05-26 GB		
其他公开文献	CN101583625A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及能特异性结合于在自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞表面表达的人FcγRIII受体(即FcγRIIIA)的结合分子，且尤其是，特异地结合于A型FcγRIII而不与B型FcγRIII结合的分子，以及该结合分子在疾病诊断和治疗中的应用。本发明进一步涉及编码此类结合分子的多核苷酸，包含所述多核苷酸的宿主细胞以及利用所述宿主细胞制备本发明结合分子的方法。

序列表						
<110>	Syngenta Crop Protection AG Affimed Therapeutics AG					
<120>	抗 CD16 结合分子					
<130>	S 70677/WO					
<160>	54					
<170>	PatentIn version 3.3					
<210>	1					
<211>	360					
<212>	DNA					
<213>	H. sapiens					
<400>	1					
gaggctccagc	tggtacagtc	tgagccagag	gtgaaaaagc	ccggggagtc	tctgaaggtt	60
tctgtccaaag	catctggata	caecttcaac	agctactata	tgcactgggt	gcqacagggc	120
cctggacaag	ggccttgagt	gatgggaata	atcaacccta	gtgggtgtag	cacaagctac	180
gcacaqaagt	tcagggcag	agtcaccatg	accggggaca	cgccacagag	cacagctaac	240
atggagctta	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	tagaggtagt	300
gcttattact	acgattttgc	tgactactg	ggccagggaa	ccctggtcac	cgctctctca	360
<210>	2					
<211>	318					
<212>	DNA					
<213>	H. sapiens					
<400>	2					
tcttatgagc	tgatgcaagc	accctcagtg	tcctgttctt	caggacagac	agccagcacc	60
ccctgctctg	gagataaatt	ggaggaaaaa	tatgtttcct	ggtatcaaca	gaggccagggc	120
cagtcctcctg	tgcttgctat	ttatcaggat	aataagggcg	cctcagggat	ccctgagcga	180
ttctctggct	ccaactctgg	gaacacagcc	actctgacca	tcagcgggac	ccagggcgatg	240
gatgagcctg	actactattg	tcaggtctgg	gacaattaca	gtgtgctatt	cgggcgaggg	300
accagctgca	ccgtccta					318
<210>	3					
<211>	318					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>	3-LB3 VL region					
<223>						
<400>	3					