

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/62



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01807061.2

C07K 19/00 C12N 15/85

C12N 5/10 A61K 39/395

A61K 47/48 A61K 38/17

A61K 48/00 A61P 31/00

A61P 35/00 A61P 37/00

G01N 33/53 C12Q 1/68

[43] 公开日 2003 年 6 月 11 日

[11] 公开号 CN 1423700A

[22] 申请日 2001.3.26 [21] 申请号 01807061.2

[30] 优先权

[32] 2000. 3.24 [33] EP [31] 00106467.4

[86] 国际申请 PCT/EP01/03414 2001.3.26

[87] 国际公布 WO01/71005 英 2001.9.27

[85] 进入国家阶段日期 2002.9.23

[71] 申请人 麦克美特股份公司

地址 德国慕尼黑

[72] 发明人 P·库佛 G·利特米勒

R·路德布斯 K·伯尔施特

R·基斯切尔 M·迈耶

R·霍夫迈斯特

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

/(C07K14/705,16/28,
16/46,14/47)

权利要求书 5 页 说明书 39 页 附图 41 页

[54] 发明名称 含有针对 NKG2D 受体复合物的表位的结合位点的多功能多肽

[57] 摘要

本发明涉及含有第一结构域和第二结构域的多功能多肽,所述第一结构域含有特异性识别 NKG2D 受体复合物的细胞外表位的结合位点,所述第二结构域具有受体或配体功能。此外,本发明涉及编码多功能多肽的多核苷酸、含有所述多肽的载体和含有所述多核苷酸或所述载体的细胞。本发明还涉及含有任一种上述分子单独或组合的组合物,以及本发明多功能多肽的特殊的医学用途。

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

1. 一种多功能多肽，其特征在于，它含有
 - (a) 第一结构域，该结构域含有特异性识别 NKG2D 受体复合物的细胞外表
- 5 位的结合位点；
 - (b) 第二结构域，该结构域具有受体或配体功能。
2. 如权利要求 1 所述的多功能多肽，其特征在于，所述结合位点是免疫球蛋白链的结合位点。
3. 如权利要求 1 所述的多功能多肽，其特征在于，所述结合位点是所述受
- 10 体复合物的天然 NKG2D 配体。
4. 如权利要求 3 所述的多功能多肽，其特征在于，所述天然 NKG2D 配体选自 MIC-A、MIC-B、ULBP-1 和 ULPB-2。
5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的多功能多肽，其特征在于，所述结合位点特异地识别 NKG2D 或 DAP10 的细胞外表位。
- 15 6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的多功能多肽，其特征在于，所述受体或配体功能是针对下述物质的抗体或其片段或衍生物的抗原结合位点：(i) 肿瘤相关抗原，(ii) 传染剂的抗原，或(iii) 细胞亚群的表面标记物如分化抗原(CD 抗原)、与
所述肿瘤相关抗原或表面标记物相互作用的天然配体或受体或其片段或修饰物；
优选(i) 与肿瘤相关抗原 erbB-2、-3 和-4 结合的神经分化因子，(ii) 与感染了 HIV
20 的细胞的 gp 120 相互作用的 CD4，或者(iii) 结合于黑素细胞及其衍生肿瘤(恶性黑素瘤)上的 MSH 受体的促黑激素(MSH)，或者结合于相应的趋化因子受体的趋化因子，或者与流感病毒的血细胞凝集素(HA)相互作用的 NKp46，或者与肽结合的 MHC 分子或片段，其中，所述肽与预定特异性的 T 细胞受体结合从而识别某些 T 细胞亚群，或所述肽特异性地与预定的 MHC 肽复合物相互作用的 T 细胞受
25 体上的抗原结合位点结合。
7. 如权利要求 6 所述的多功能多肽，其特征在于，所述肿瘤相关抗原选自：
Lewis Y、Muc-1、erbB-2、erbB-3、erbB-4、Ep-CAM、EGF-受体(如 EGFR I 型或 EGFR II 型)、EGFR 缺失新表位、CA 19-9、Muc-1、LeY、TF-抗原、Tn-抗原、sTn-
抗原、TAG-72、PSMA、STEAP、Cora 抗原、CD7、CD19 和 CD20、CD22、CD25、
30 Ig- α 和 Ig- β 、A33 和 G250、CD30、MCSP 和 gp100、CD44-v6、MT-MMPs、(MIS) 受体 II 型、糖脱水酶 9、F19-抗原、Ly6、桥粒芯蛋白 4、PSCA、Wue-1、GD2

和 GD3 以及 TM4SF-抗原(CD63、L6、CO-29、SAS)或胎儿型乙酰胆碱受体(AChR)的 α 和 γ 亚基。

8. 如权利要求 6 所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述感染细胞的表面标记物选自: 病毒包膜抗原, 如人逆转录病毒(HTLV I 和 II、HIV 1 和 2)或者人疱疹病毒(HSV1 和 2、CMV、EBV)的病毒包膜抗原; 血细胞凝集素, 如流感病毒 A、B 或 C 的血细胞凝集素; 风疹病毒的糖蛋白 E1 和 E2; 或者狂犬病毒的 RGP。

9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述多肽是双特异性抗体。

10. 如权利要求 9 所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述多功能多肽选自合成的抗体、嵌合的抗体以及人源化的抗体。

11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述多肽是单链的。

12. 如权利要求 1-10 中任一项所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述两个结构域通过多肽连接物连接。

13. 如权利要求 1-12 中任一项所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述第一结构域和/第二结构域模拟或对应于天然抗体的 V_H 和 V_L 区域。

14. 如权利要求 1-13 中任一项所述的多功能多肽, 其特征在于, 至少一个所述结构域是抗体的可变区的单链片段。

15. 如权利要求 1-14 中任一项所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述结构域以 V_L NHK2G- V_H NKG2D- V_H TA- V_L -TA 或者 V_L -TA- V_H TA- V_H NKG2D- V_L NKG2D 的顺序排列, 其中 TA 代表靶抗原。

16. 如权利要求 15 所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述靶抗原选自: Lewis Y、Muc-1、erbB-2、erbB-3、erbB-4、Ep-CAM、EGF-受体(如 EGFR I 型或 EGFR II 型)、EGFR 缺失新表位、CA 19-9、Muc-1、LeY、TF-抗原、Tn-抗原、sTn-抗原、TAG-72、PSMA、STEAP、Cora 抗原、CD7、CD19 和 CD20、CD22、CD25、Ig- α 和 Ig- β 、A33 和 G250、CD30、MCSP 和 gp100、CD44-v6、MT-MMPs、(MIS) 受体 II 型、糖脱水酶 9、F19-抗原、Ly6、桥粒芯蛋白 4、PSCA、Wue-1、GD2 和 GD3 以及 TM4SF-抗原(CD63、L6、CO-29、SAS)或胎儿型乙酰胆碱受体(AChR)的 α 和 γ 亚基。

17. 如权利要求 12-16 中任一项所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述多肽连接物含有大量的甘氨酸、丝氨酸和/或丙氨酸残基。

18. 如权利要求 12-17 中任一项所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述多肽连接物含有大量的连续拷贝的氨基酸序列。

19. 如权利要求 12-18 中任一项所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述多肽连接物含有 1-5、5-10 或 10-15 个氨基酸残基。

5 20. 如权利要求 4-19 中任一项所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述多肽连接物含有 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 的氨基酸序列。

21. 如权利要求 1-20 中任一项所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述多肽至少含有另外一个结构域。

10 22. 如权利要求 21 所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述另外一个结构域通过共价键或非共价键连接的。

23. 如权利要求 21 或 22 所述的多功能多肽, 其特征在于, 至少一个所述另外的结构域包含效应分子, 该效应分子的构象适于生物活性、能螯合离子, 或者选择性结合于固体支持物或预先选择的决定簇。

15 24. 如权利要求 21-23 中任一项所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述另外的结构域赋予共刺激和/或共激活功能。

25. 如权利要求 24 所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述共刺激功能由 CD28 配体或 CD137 配体介导。

26. 如权利要求 25 所述的多功能多肽, 其特征在于, 所述 CD28 配体或 CD137 配体是 B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、衔接子或抗体或其功能性片段或功能性衍生物。

20 27. 一种多核苷酸, 其特征在于, 该多核苷酸在表达后编码权利要求 1-26 中任一项所述的多功能多肽的和/或其功能部分。

28. 一种载体, 其特征在于, 该载体含有权利要求 27 所述的多核苷酸。

29. 一种细胞, 其特征在于, 该种细胞被权利要求 27 所述的多核苷酸或权利要求 28 所述的载体转染。

25 30. 一种制备权利要求 1-26 中任一项所述的多功能多肽和/或其功能部分的方法, 其特征在于, 该方法包括培养权利要求 29 所述的细胞, 从培养物中分离出所述多功能多肽或其功能部分。

31. 一种组合物, 其特征在于, 它含有权利要求 1-26 中任一项所述的多肽、权利要求 27 所述的多核苷酸或者权利要求 28 所述的载体。

30 32. 如权利要求 31 所述的组合物, 其特征在于, 所述组合物还含有赋予共刺激和/或共激活功能的分子。

33. 如权利要求 31 所述的组合物, 其特征在于, 所述共刺激功能由 CD28 配体或 CD137 配体介导。

34. 如权利要求 31 所述的组合物, 其特征在于, 所述 CD28 配体或 CD137 配体是 B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、衔接子或抗体或其功能性片段或功能性衍生物。

5 35. 如权利要求 31-34 中任一项所述的组合物, 其特征在于, 所述组合物是药物组合物, 它还可任选地含有药学上可接受的载体。

36. 如权利要求 31-35 中任一项所述的组合物, 其特征在于, 所述组合物是诊断用组合物, 它还可任选地含有用于检测的合适工具。

37. 权利要求 1-26 中任一项所述的多功能多肽、权利要求 27 所述的多核苷酸或者权利要求 28 所述的载体在制备治疗下述疾病的药物组合物中的用途: 癌症, 传染病和/或自身免疫疾病, 癌症即恶性(实体)肿瘤以及造血癌症形式(白血病和淋巴瘤), 良性肿瘤如前列腺的良性增生(BPH)、甲状腺或或其他内分泌腺体的自身性腺瘤或者结肠的腺瘤; 恶性肿瘤的起始阶段, 由病毒、细菌、真菌、原生动植物或寄生虫引起的传染病, 因消除免疫细胞亚群所引起的自身免疫疾病; 移植排斥或变态反应的预防。

38. 如权利要求 37 所述的用途, 其特征在于, 所述感染是病毒、细菌或真菌感染; 所述癌症是头和颈癌、胃癌、食管癌、胃癌、结肠直肠癌、结肠癌、肝癌和肝内胆管癌、胰腺癌、肺癌、小细胞肺癌、喉癌、乳腺癌、乳房癌、恶性黑色素瘤、多发性骨髓瘤、肉瘤、横纹肌肉瘤、淋巴瘤、滤泡非何杰金氏淋巴瘤、白血病、T 细胞白血病和 B 细胞白血病、何杰金氏淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、前列腺癌、生殖器癌、肾癌、睾丸癌、甲状腺癌、膀胱癌、浆细胞瘤或脑癌; 或者其中所述自身免疫疾病是关节强硬性脊椎炎、急性前葡萄膜炎、古德帕斯彻综合症、多发性硬化、格雷夫斯病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、胰岛素依赖性糖尿病、类风湿性关节炎、普通天疱疮、桥本甲状腺炎或自身免疫性肝炎。

39. 权利要求 27 所述的多核苷酸或权利要求 28 所述的载体在制备基因治疗用组合物中的用途。

40. 一种治疗癌症、感染或自身免疫疾病的方法, 其特征在于, 该方法包括将权利要求 1-26 中任一项所述的多肽、权利要求 27 所述的多核苷酸或者权利要求 28 所述的载体或者权利要求 35 所述的组合物导入患了所述恶性肿瘤或疾病的哺乳动物中。

41. 一种延迟病理症状的方法，其特征在于，该方法包括将权利要求 1-26 中任一项所述的多肽、权利要求 27 所述的多核苷酸或者权利要求 28 所述的载体或者权利要求 35 所述的组合物导入患了所述病理症状的哺乳动物中。

42. 如权利要求 40 或 41 所述的方法，其特征在于，所述哺乳动物是人。

5 43. 一种试剂盒，其特征在于，该试剂盒含有权利要求 1-26 中任一项所述的多功能多肽、权利要求 27 所述的多核苷酸、权利要求 28 所述的载体、权利要求 29 所述的细胞或者权利要求 31-36 中任一项所述的组合物。

含有针对 NKG2D 受体复合物的表位的
结合位点的多功能多肽

5

本发明涉及含有第一结构域和第二结构域的多功能多肽，第一结构域含有特异性识别 NKG2D 受体复合物的细胞外表位的结合位点，第二结构域具有受体或配体功能。此外，本发明涉及编码多功能多肽的多核苷酸、含有所述多肽的载体和含有所述多核苷酸或所述载体的细胞。本发明还涉及含有任一种上述分子的单独或组合的组合物，以及本发明的多功能多肽的特殊医学用途。

在本说明书的整个文本中引用了几篇文献。本文在此将这些文献各自的公开内容(包括所有的制造商的规格、说明书等)纳入作为参考。

现有技术中描述的许多多功能多肽是不同分子形式的双特异性抗体，将它们开发用于再靶向抗恶性或受感染的靶细胞的免疫效应细胞，从血液循环系统中清除病原体或自身抗体，增强药物治疗，或者作为疫苗或载体，如放射性同位素的载体。设计用于再指导针对靶细胞的免疫效应细胞的细胞毒性的双特异性抗体通常含有识别靶细胞上肿瘤相关的抗原或病毒抗原的结合位点，及与效应细胞上的触发分子相互作用的第二结合位点。现有技术中采用双特异性抗体方法召集的效应细胞有 T 淋巴细胞、NK 细胞、单核细胞和多形核嗜中性白细胞。双特异性抗体的触发分子通常选自由 CD64、CD16、 α/β -T 细胞受体(TCR)和 CD3 组成的一组细胞表面受体，而且对替代的触发分子如 CD2、CD89、CD32、CD44、CD69 和 TCR- ζ 链也作了评价。能再指导针对靶细胞的细胞毒性 T 淋巴细胞(表型：CD3⁺/CD56⁺/CD8⁺)的双特异性抗体含有针对 TCR、CD3、 ζ 链或 CD2 的结合位点。但是，通过使用这些触发分子中的一种，借助于 TCR 复合物的抗原特异性信号受到干扰，因为要么涉及该 TCR 复合物自身的表位(TCR、CD3 或 ζ 链)，要么在 CD2 的例子中，涉及通过 src 相关的蛋白质酪氨酸激酶 lck，通过其胞质尾区，由该 TCR 复合物的共聚合作用而直接作用于该 TCR-信号的分子。

因此，技术问题是在疾病相关细胞的直接邻近区域中提供增强特异性激活淋巴(细胞)的多功能多肽，不干扰这些溶细胞淋巴细胞的受体特异性和/或功能。

通过提供权利要求中所述的实施方式可解决所述技术问题。

因此，本发明涉及含有第一结构域和第二结构域的多功能多肽，第一结构域

含有特异性识别 NKG2D 受体复合物的细胞外表位的结合位点, 第二结构域具有受体或配体功能。

术语“多功能多肽”在本发明中指在合适(包括体外)条件下(如生理条件, 包括病理的, 如体内或离体条件下)至少产生两种(如三、四、五或六种)不同生物学功能的多肽。体外生理条件包括缓冲液, 如 pH 为 5-9 的磷酸缓冲液, 还可进一步从附带的实施例中获得。这些功能将在下文进一步描述。它们包括特异的结构域与分子的结合在下文将作进一步描述。结合之后接着可引发进一步的生物学功能, 包括级联反应的开始、与受体的结合、信号通路或基因表达的调节和/或对细胞程序死亡的影响。具有不同生物学功能的这些结构域中至少有两个且较佳是上述两个结构域不是一起天然产生的, 即它们不是以这种构型天然产生的, 或者根本上不在同一多肽或蛋白质或蛋白质复合物上。

术语“受体或配体功能”指分子(如较佳位于具有适合的配体的细胞表面上的天然受体)的天然或非天然的结合功能; 这种受体/配体对的例子是抗体/抗原或 Ig 超家族的其它成员, 以及它们的相应配体, 或激素受体/激素或碳水化合物/凝集素相互作用。配体通常但不专有地指具有天然结合配偶体的分子。与上述一致, 它们可以是抗原或激素。但是, 它们还可以是非天然构型或来源的分子。上述受体/配体可以是天然来源的、重组来源的或(半)合成来源的。

NKG2D 是与 DAP10 (Wu(1999), Science, 285: 730) 一起形成 NKG2D 受体复合物的 C-类凝集素样 NK 细胞受体(Houchins(1991), J. Exp. Med., 172: 1017)。DAP10 在其胞质区携带 PI_3 -激酶的激活序列基元, 并起到在其胞质区缺乏信号基元的 NKG2D 的信号传导组件的作用。这种受体复合物的使用引发了能诱导 NK 细胞细胞毒性的信号级联反应。与其它 NK 细胞受体一样, 还发现 NKG2D 受体复合物在某些 T 细胞亚类(即 γ/δ -T 细胞、 $CD8^+ \alpha/\beta$ -T 细胞), 以及在递减的少数 $CD4^+ \alpha/\beta$ -T 细胞中表达 (Bauer(1999), Science, 285: 727)。

NK 细胞是体液免疫应答的显性效应器, 它们通过 IgG-抗体与它们的表面 Fc_γ -受体 CD16 的结合而获得抗原特异性。因此, CD16 起到使抗体支持的 NK 细胞以抗原特异性的方式破坏靶细胞的特异性抗原受体的作用。

T 淋巴细胞是细胞免疫应答的效应器, 它们携带了作为特异性抗原受体的 TCR 复合物。该 TCR 复合物由几条恒定链(包括 CD3 复合物和 ζ 链)和赋予克隆型抗原特异性的两条可变链组成。根据 TCR 复合物中发现的可变链的类型(α 链和 β 链或 γ 链和 δ 链), 可将 T 淋巴细胞分成 α/β -T 细胞和 γ/δ -T 细胞。由细胞毒性 T 细胞(即

CD8⁺α/β-T 细胞和 CD8⁺γ/δ-T 细胞)进行的 TCR 介导的对靶细胞的识别通常导致靶细胞裂解。

大多数已知的淋巴细胞介导的双特异性抗体要么召集了 NK 细胞, 要么仅仅召集 T 细胞。NK 细胞通常通过 CD16 的参与而被召集, 形成 Fc_γ-受体 IIIA 复合物的主要细胞外部分, 而 T 细胞的召集则通常由 T 细胞受体(TCR)的恒定多链组分 CD34 的参与而介导。针对与 NK 细胞上的 CD16 相关的 ζ 链以及 T 细胞上的 TCR 相关的双特异性抗体能与两类效应淋巴细胞结合(WO00/03016)。但是, 针对 ζ 链的双特异性抗体(如那些针对 CD3 的抗体)也激活非细胞毒性 CD4⁺T 细胞, 这类细胞与 CD8⁺T 细胞不同, 它们在体内会导致不需要的副作用, 如由于基本上没有导致靶细胞的细胞毒性消除的全身性酪氨酸释放而产生的副作用。

与现有技术中已知的淋巴细胞指导的双特异性抗体不同, 本发明的 NKG2D 特异性多功能分子(这些分子在较佳实施方式中是含有上述第一结构域和第二结构域的双功能分子)能以异常的精确度召集天然携带细胞毒性表型的整个范围的淋巴细胞(即 NK 细胞、CD8⁺α/β-T 细胞和γ/δ-T 细胞), 而基本上不触及通常无细胞毒性的其它细胞类型如 CD4⁺α/β-T 细胞。

术语“细胞毒性淋巴细胞的召集”在本发明中并不限于再指导性裂解, 它还包括细胞毒性和 T-细胞引发的增强。

因此, 本发明 NKG2D 指导的分子是独特的, 因为它们具有完全以及专有地召集所有相关细胞毒性淋巴细胞的精确性。与本领域已知的淋巴细胞指导的双特异性抗体的另一不同之处是, 本发明的多功能分子既不间接也不直接与细胞毒性淋巴细胞的特异性抗原受体结合, 包括对应的信号级联反应的上游胞质步骤。换言之, T 细胞受体复合物的功能不是修补性的, 因为本发明的多功能多肽不与之结合。因此, 由 T 细胞受体提供的信号的信号级联反应下游不受到与本发明的多功能多肽的相互作用的影响。结果, 细胞毒性淋巴细胞的激活和/或增殖得到选择性支持, 这是因为它们的抗原受体特异性参与了针对那些被本发明的多功能分子识别的靶细胞的特异性免疫应答。

T 细胞和 NK 细胞中所述的上游信号级联反应包括 ITAM 多肽、Src 激酶、ZAP-70/Syk 和衔接蛋白质(如负责召集下游信号级联反应的效应分子 LAT 和 SLP-76)。下游信号级联反应包括如 PI3 激酶之类的分子以及 PLC_γ、Grb₂、Vav、Cbl 和 Nck。

通过避免特异性抗原受体的参与和/或对应的信号级联反应的上游胞质步骤,

本发明的多功能分子与现有技术已知的其它淋巴细胞指导的双特异性抗体(如与NK细胞上的 Fc_γ -受体复合物的 CD16 结合, 或者与 T 淋巴细胞上的 TCR-复合物的 CD3 组分结合)相比, 在较小程度上有利地干扰了特异性抗原识别。具体而言, 由靶细胞特异性免疫应答介导的淋巴细胞效应功能可能通过特异性抗原受体的参与和/或由现有技术的双特异性抗体产生的对应的信号级联反应的上游胞质步骤而变得无效。相反, 本发明的多功能分子通过既不与特异性抗原受体也不与它们的胞质信号级联反应的上游步骤有直接联系的 NKG2D 受体复合物, 能增强通过它们的特异性抗原受体识别相同靶细胞的那些细胞毒性淋巴细胞的激活。

这解释了附带的实施例中所述的令人意外的结果, 即 NKG2D 介导的信号可加速原初的 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞的引发, 即使在下述条件存在的情况下:

- (i) 通过抗原特异性 T 细胞受体复合物的参与而介导的强的主要信号, 和
- (ii) 由第二 T 细胞信号的主导介体 B7-1 提供的最大共刺激。

此外, 令人意外的是, 由 TCR 复合物或 CD16 的参与触发的 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞和 NK 细胞的细胞毒性可通过 NKG2D 介导的信号而分别得到增强(实施例 6)。

但更让人意外的是, NK 细胞和 T 细胞的细胞毒性以及 T 细胞引发甚至可通过 NKG2D 指导的抗体分子而得到增强, 而这些分子自身并不诱导任何实质上的再指导性裂解(实施例 5 和 6)。

因此, 可有利地选择本发明具有召集细胞毒性淋巴细胞的不同特性的多功能 NKG2D 指导的多肽, 将其用于不同的目的。例如, 如果需要纯的免疫调节, 则优选 NKG2D 指导的分子, 这类分子自身不诱导再指导性裂解。但是, 当使用直接引发淋巴细胞细胞毒性的多功能 NKG2D 指导的多肽时, 靶细胞的消除可能更显著。而且, 有差别地召集 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞和 NK 细胞的多功能 NKG2D 指导的多肽在某些应用中也是优选的。

在本发明方法的一个优选实施方式中, 所述结合位点是免疫球蛋白链的结合位点。

在本发明方法的另一优选实施方式中, 所述结合位点是所述受体复合物的天然 NKG2D-配体。

在本发明方法的特别优选实施方式中, 所述天然 NKG2D-配体选自 MIC-A、MIC-B、ULBP1 和 ULBP2。

在本发明方法的另一实施方式中, 所述结合位点特异性识别 NKG2D 或 DAP10 的细胞外表位。

此外, 在本发明方法的一个优选实施方式中, 所述受体或配体功能是针对下述物质的抗体或其片段或衍生物的抗原结合位点: 肿瘤相关抗原、感染剂的抗原或细胞亚群的表面标记物如分化抗原(CD 抗原)、与肿瘤相关抗原或表面标记物相互作用的天然配体或受体或其片段或修饰物; 优选与肿瘤相关抗原 erbB-2、-3 和-4 结合的神经营分化因子(heregulin), 与 HIV 感染细胞的 gp 120 相互作用的 CD4 或者结合于黑素细胞及其衍生肿瘤(恶性黑素瘤)上的 MSH 受体的促黑激素(MSH), 或者结合于相应的趋化因子受体的趋化因子, 或者与流感病毒的血细胞凝集素(HA)相互作用的 NKp46, 或者与肽结合的 MHC 分子或其片段, 其中, 所述肽与预定的特异性的 T 细胞受体结合从而识别某些 T 细胞亚群, 或所述肽特异性地与预定的 MHC 肽复合物相互作用的 T 细胞受体的抗原结合位点结合。

以前的报道表明, 流感病毒的血细胞凝集素可通过 NK 细胞增强病毒感染的靶细胞的裂解, 以及直接激活 NK 细胞〔Trinchieri, Adv. Immunol., 47(1989), 187-376; 和 Alsheikhly, Scand J Immunol., 17(1983), 129-38; 和 Alsheikhly, Scand J Immunol., 22(1985), 529-38〕。最近的研究显示, 由 NKp46 的细胞外结构域与免疫球蛋白(Ig)的 Fc 部分组成的融合蛋白直接与在瞬时转染的 293 细胞的表面上表达的血细胞凝集素-神经氨酸酶(HN)糖蛋白结合〔Mandelboim, Nature, 409(2001), 1055-60〕。从健康的供体的外周血淋巴细胞获得的 NK 细胞系 NK Gal 细胞的加入, 以至少 4 倍于未转染细胞的效率诱导了 HN-转染的 293T 细胞的裂解〔Mandelboim, Nature, 409(2001), 1055-60〕。从流感病毒感染的靶细胞中获得了相同的结果。这些数据表明, NKp46 和血细胞凝集素之间存在直接的相互作用。而且, 还进一步证明, NK 细胞消除流感病毒感染的细胞的机制是由于在病毒感染的细胞上暴露的血细胞凝集素(HA)与在 NK 细胞表面上表达的 NKp46 的相互作用。

所述能结合流感病毒的血细胞凝集素(HA)的受体或配体功来源于如下单克隆抗体:

a) 结合 A 型流感病毒 H3 株的第 155、159、188、189、193、198、199、201 残基的单克隆抗体 IIB4〔Kostolansky, J Gen 81(2000), 1727-35〕;

b) 从依次用流感病毒 A/Aichi/2/68、A/Victoria/3/75 和 A/Philippines/2/82(所有的 H3N2)的菠萝蛋白酶裂解的血细胞凝集素(BHA)免疫的小鼠获得的单克隆抗体 LMBH6, 该 BHA 识别 H3N2 A 型流感病毒株的 HA〔Vanlandschoot, J. Gen. Virol., 79(1998), 1871-91〕。

c) 针对 HA-H2 的茎区域的单克隆抗体(MoAb) C179 (Lipatov, Acta Virol., 41(1997), 337-40)。

在本实施方式中, 所述第二结构域在一个较佳实施方式中代表一种抗原, 该抗原是涉及人疾病(如癌症、病毒感染或自身免疫疾病)病理过程的细胞上的表面分子的细胞外部分。通过体内应用本发明的双功能分子, 可促进这种靶细胞的功能性沉默的消除, 从而提供治疗利益。

所述抗体的“片段”保留了完整抗体的结合特异性, 且包括 Fab、F(ab')₂ 和 Fv 片段。所述抗体的“衍生物”也保留了结合特异性, 且包括 scFv 片段。更进一步的信息可参见 Marlow 和 Lane, 《抗体-实验室手册》(“Antibody, A Laboratory Manual”), CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988。

例如, 人癌症疾病可以是乳房癌、乳腺癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、肾细胞癌和宫颈癌、黑素瘤、小细胞肺癌(SCLC)、头和颈癌、胃癌、横纹肌肉瘤、前列腺癌、滤泡非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、B 细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、T 细胞和 B 细胞白血病以及何杰金氏淋巴瘤。

15 肿瘤相关抗原包括 pan-癌抗原, 如 CEA (Sundblad, Hum. Pathol., 27, (1996), 297-301, Ilantzis Lab. Invest., 76(1997), 703-16)、EGFR I 型 (Nouri, Int. J. Mol. Med., 6(2000), 495-500) 和 EpcCAM (17-1A/KSA/GA733-2, Balzar, J. Mol. Med., 77(1999), 699-712)。EGFR I 型在神经胶质瘤中格外地超表达, EpCAM 在结肠癌、MRD(最小残留疾病)和结肠癌中也格外地超表达。EGFR II 型 (Her-2、ErbB2, Sugano, Int. J. Cancer, 89(2000), 329-36) 在乳房癌中被上调, 并已发现 TAG-72 糖蛋白 (sTN 抗原, Kathan, Arch. Pathol. Lab. Med., 124(2000), 234-9) 在乳腺癌中表达。EGFR 删除新表位还可能起到肿瘤相关抗原的作用 (Sampson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(2000), 7503-8)。抗原 A33 (Ritter, Biochem. Biophys. Res. Commun., 236(1997), 682-6)、Lewis-Y (DiCarlo Onco.I Rep., 8(2001), 387-92)、Cora 抗原 (CEA 相关的细胞粘附分子 CEACAM 6、CD66c、NCA-90, Kinugasa, Int. J. Cancer 76(1998), 148-53) 和 MUC-1(粘蛋白)与结肠癌有关 (Iida, Oncol. Res., 10(1998), 407-14)。Thomsen-Friedenreich 抗原(TF, Gal1 β -3GalNAc α 1-O-Thr/Ser) 不但在结肠癌中发现 (Baldus Cancer, 82(1998), 1019-27), 而且在乳腺癌中发现 (Glinsky, Cancer. Res., 60(2000), 2584-8)。已描述了 Ly-6 (Eshel, J. Biol. Chem., 275(2000), 12833-40) 和桥粒芯蛋白在头和颈癌中以及 E-钙粘着蛋白新表位在胃癌 (Fukudome, Int. J. Cancer, 88(2000), 579-83) 中的超表达。前列腺特异性膜

抗原 (PSMA, Lapidus Prostate, 45(2000), 350-4)、前列腺干细胞抗原 (PSCA, Gu Oncogene, 191(2000), 288-96) 和 STEAP (Hubert, Pro Natl Acad Sci USA, 96(1999), 14523-8) 与前列腺癌有关。胎儿型乙酰胆碱受体(AChR)的 α 和 γ 亚基是横纹肌肉瘤的特异性免疫组织化学标记物 (RMS, Gattenlohner Diagn. Mol. Pathol., 3(1998), 129-34)。

已描述 CD20 与滤泡非何杰金氏淋巴瘤的相关性 (Yatabe Blood 96(2000), 2253-61; Vose Oncology (Huntingt), 2(2001), 141-7)、CD19 与 B 细胞淋巴瘤的相关性 (Kroft, Am. J. Clin. Pathol., 115(2001), 385-95)、Wue-1 浆细胞抗原与多发性骨髓瘤的相关性 (Greiner Virchows Arch, 437(2000), 372-9)、CD22 与 B 细胞白血病的相关性 (dArena, Am. J. Hematol., 64(2000), 275-81)、CD7 与 T 细胞白血病的相关性 (Porwit-MacDonald Leukemia, 14(2000), 816-25) 以及 CD25 与某些 T 细胞和 B 细胞白血病的相关性 (Wu, Arch. Pathol. Lab. Med., 124(2000), 1710-3)。CD30 与何杰金氏淋巴瘤相关 (Mir Blood, 96(2000), 4307-12)。在黑素瘤中观察到黑素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖 (MCSP, Eisenmann Nat. Cell. Biol., 8(1999), 507-12) 和神经节苷脂 GD3 (Welte, Exp Dermatol, 2(1997), 64-9) 的表达, 而在小肺细胞癌(SLCC)中也发现 GD3 (Brezicka Lung Cancer, 1(2000), 29-36)。在 SLCC 和成神经细胞瘤中神经节苷脂 GD2 的表达也被上调 (Cheresh 等, Cancer Res., 10(1986), 5112-8)。卵巢癌与穆勒氏抑制物(MIS)受体 II 型相关 (Masiakoa, Clin. Cancer Res., 11(1999), 3488-99), 肾癌和宫颈癌与糖脱水酶 9 相关 (MN/CAIX, Grabmaier, Int. J. Cancer, 85(2000), 965-70)。在胰腺癌中发现 CA 19-9 的表达水平提高 (Nazli Hepatogastroenterology, 47(2000), 1750-2)。

在本发明方法的最佳实施方式中, 所述肿瘤相关抗原选自 Lewis Y、CEA、Muc-1、erbB-2、erbB-3 和 erbB-4、Ep-CAM、E-钙粘着蛋白新表位、EGF-受体(如 EGFR I 型或 EGFR II 型)、EGFR 缺失新表位、CA 19-9、Muc-1、LeY、TF-抗原、Tn-抗原和 sTn-抗原、TAG-72、PSMA、STEAP、Cora 抗原、CD7、CD19 和 CD20、CD22、CD25、Ig- α 和 Ig- β 、A33 和 G250、CD30、MCSP 和 gp100、CD44-v6、MT-MMPs、(MIS)受体 II 型、糖脱水酶 9、F19-抗原、Ly6、桥粒芯蛋白 4、PSCA、Wue-1、GD2 和 GD3 以及 TM4SF-抗原(CD63、L6、CO-29、SAS)或胎儿型乙酰胆碱受体(AChR)的 α 和 γ 亚基。

A、B 和 C 型流感病毒都具有节段基因组, 但仅有某些 A 型流感病毒亚类和 B 型流感病毒引起人严重的疾病。流感病毒的两种主要的蛋白质是表面糖蛋白-血

细胞凝集素(HA)和神经氨酸酶(NA)。血细胞凝集素(HA)参与病毒颗粒与宿主细胞受体的结合和膜融合,并代表中和抗体的主要靶标。流感病毒的感染性依赖于特异性宿主蛋白酶对 HA 的裂解,而 NA 参与子代病毒颗粒从细胞中释放。在流感病毒的天然宿主鸟类中,病毒引起胃肠道感染,并通过面部-口腔途径传递。在哺乳动物中,流感病毒亚型的复制似乎限制于呼吸道上皮细胞,但是会发生全身性并发症。

风疹病毒(RV)是已知的麻疹的病原体。风疹主要是儿童患的疾病,且是全世界的地方病。风疹的天然感染仅在人身上发生,并且通常是温和的,但是在成年人可能会发生并发症如多关节痛(polyarthralgia)。妇女在怀孕的前三个月期间被 RV 的感染可能会导致新生儿的各种先天性缺陷,称为先天性风疹综合症(CRS)。RV 感染导致畸胎发生的途径未得到阐明。受感染的胎儿组织的细胞病理学表明,在器官发生中涉及前体细胞的坏死和/或细胞程序死亡以及细胞分裂的抑制。风疹病毒(RV)颗粒含有两种糖基化的膜蛋白 E1 和 E2,它们以异二聚体的形式存在,并在病毒颗粒的表面上形成病毒穗状复合物。E1-E2 异二聚体的形成对于 E1 和 E2 的细胞内转运和细胞表面表达都是必需的(Yang, J. Virol., 72(1998), 8747-8755)。在感染风疹病毒的细胞上表达的糖蛋白 E1 和 E2 是本发明多功能多肽结合的靶分子。

狂犬病是野生动物中的重要疾病,狗的狂犬病仍是世界上许多发展中国家主要的公众健康问题。狂犬病病毒是通过动物唾液传播的。最近发现,蝙蝠也将狂犬病传给人,但人们常常没有意识到自己已接触了这种病毒。处于典型状态的狂犬病可很好识别,但对于患有模拟 Landre's Guillain-Barre 综合症的麻痹型狂犬病患者的诊断仍是问题。在接触病毒后,未经免疫的患者可通过局部伤口清洗和使用狂犬病疫苗和人的狂犬病特异性的免疫球蛋白来预防狂犬病。

狂犬病糖蛋白 RGP 是具有 505 个氨基酸的 I 型跨膜糖蛋白,它在狂犬病病毒感染的生物学和发病机理中是重要的。RGP 还通过宿主刺激中和抗体的发展。RGP 的免疫原性和细胞表面表达需要 N 连接的糖基化作用(Wojczyk, Biochemistry, 34(1995), 2599-2609)。在感染细胞的表面上表达的狂犬病毒的 RGP 是本发明多功能多肽结合的靶分子。

在本发明方法的另一最佳实施方式中,感染细胞的所述表面标记物选自:病毒包膜抗原,如人的逆转录病毒(HTLV I 和 II、HIV1 和 2)或人的疱疹病毒(HSV1 和 2、CMV、EBV);血细胞凝集素,如流感病毒(A、B 或 C 型流感病毒);从风

疹病毒中获得的糖蛋白 E1 和 E2; 或狂犬病毒的 RGP。

在本发明方法的另一较佳实施方式中, 所述多功能多肽是双特异性分子, 优选双特异性抗体。关于双特异性抗体的构建和产生的更进一步的信息可参见 WO/00/06605。

- 5 在本发明方法的特别优选的实施方式中, 所述多功能多肽选自合成的、嵌合的以及人源化抗体。

在本发明方法的另一较佳实施方式中, 所述多功能多肽是单链。

在本发明方法的又一较佳实施方式中, 所述两个结构域通过多肽连接物连接。

- 10 在本发明方法的另一较佳实施方式中, 所述第一和/或第二结构域模拟或对应于天然抗体的 V_H 和 V_L 。这种抗体的例子包括人、鼠、大鼠和骆驼的抗体; 从无限增殖的 B 细胞中获得的抗体(如杂交瘤细胞); 从组合的抗体库的体外切片(如通过谱斑显示)中获得的抗体或者从 Ig-转基因小鼠中获得的抗体。

- 15 在本发明方法的另一较佳实施方式中, 至少有一种所述的结构域是所述抗体的可变区的单链片段。

在本发明方法的另一较佳实施方式中, 所述结构域以下述顺序排列: V_L NKG2D- V_H NKG2D- V_H TA- V_L -TA 或者 V_L -TA- V_H TA- V_H NKG2D- V_L NKG2D, 其中 TA 代表靶抗原。

- 20 在本发明方法特别优选的实施方式中, 所述肿瘤相关的抗原选自 Lewis Y、CEA、Muc-1、erbB-2、erbB-3、erbB-4、Ep-CAM、E-钙粘着蛋白新表位、EGF-受体(如 EGFR I 型或 EGFR II 型)、EGFR 缺失新表位、CA 19-9、Muc-1、LeY、TF-抗原、Tn-抗原、sTn-抗原、TAG-72、PSMA、STEAP、Cora 抗原、CD7、CD19 和 CD20、CD22、CD25、Ig- α 和 Ig- β 、A33 和 G250、CD30、MCSP 和 gp100、CD44-v6、MT-MMPs、(MIS)受体 II 型、糖脱水酶 9、F19-抗原、Ly6、桥粒芯蛋白 4、PSCA、
25 Wuc-1、GD2 和 GD3 以及 TM4SF-抗原(CD63、L6、CO-29、SAS)或胎儿型乙酰胆碱受体(AChR)的 α 和 γ 亚单位。

在本发明方法的另一特别优选的实施方式中, 所述多肽连接物选自大量的甘氨酸、丝氨酸和/或丙氨酸残基。

- 30 在本发明方法的一个特别优选的实施方式中, 所述多肽连接物包括大量的氨基酸序列的连续拷贝。

此外, 在本发明特别优选的实施方式中, 所述多肽连接物包括 1-5、5-10 或

10-15 个氨基酸残基。

在本发明方法的最佳实施方式中，所述多肽连接物包括氨基酸序列 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser。

在本发明方法的另一优选实施方式中，所述多功能多肽包括至少一个另外的
5 结构域。

通过本发明的双功能分子与赋予靶细胞以共刺激性和共激活性的制剂相结合，可进一步支持靶细胞特异性免疫应答。

在与其它制剂结合的另一选择中，本发明的分子可自身具备其它功能结构域，这类结构域可通过如另一氨基酸连接物而被连接。这些额外的结构域可以介
10 导 CD28-或 CD137-参与(见下文)。此外，预计可构建含有 1 种以上额外的功能结构域的本发明的双功能分子的衍生物。

或者，本发明的分子可与具有如所述结合 CD28 的分子中的一种以及另一结合 CD137 的分子的组合物中一种以上额外的制剂混合。

上述这些制剂可由如特异性识别靶细胞的结合位点和 B7-1(CD80)或 B7-
15 2(CD86)的细胞外结构域组成，该细胞外结构域与 T 细胞和 NK 细胞上的 CD28 相互作用。或者，B7-1 或 B7-2 可被 CD28 特异性抗体的结合位点取代。在 T 淋巴细胞上，CD28 起到共刺激分子的作用，为了介导在通过抗原特异性 TCR 参与(第一信号)的主要 T 细胞激活过程中的所谓的第二信号，绝对需要这种抗原。在 NK 细胞上，CD28 促使对表达 CD28 配体的靶细胞的细胞毒性的诱导作用〔Chambers
20 (1996), Immunity, 5: 311〕。其它制剂可与本发明的双功能分子有利地组合，并且可由特异性识别靶细胞的结合位点和 CD137 特异性抗体的结合位点或者 CD137 配体的细胞外部分组成。

在本发明方法的最佳实施方式中，所述另外的结构域通过共价键或非共价键连接。

25 在本发明方法的另一最佳实施方式中，所述至少一个另外的结构域包含效应分子，该效应分子的构象适于生物活性、能螯合离子，或者选择性与固体支持物或预选的决定簇结合。

在本发明方法的另一最佳实施方式中，所述另一结构域产生共刺激性和/或共激活功能。

30 在本发明方法的特别优选的实施方式中，所述共刺激功能由 CD28 配体或 CD137 配体介导。

在本发明方法的另一特别优选的实施方式中，所述 CD28 配体或 CD137 配体是 B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、适体或抗体或功能性片段或功能性衍生物。

术语抗体的“功能性片段”定义为仍保留所述抗体的结合特异性的抗体的片段(例如可参见 Harlow 和 Lane,《抗体——实验室手册》(“Antibodies, A Laboratory Manual”), CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988)。这种片段的例子是 Fab 和 F(ab)₂ 片段。所述抗体的“功能性衍生物”保留或基本上保留其结合特异性。所述衍生物的例子是 scFv 片段。

本发明还涉及多核苷酸，该多核苷酸在表达后编码本发明的多功能多肽和/或其功能性部分。术语“功能性部分”在本发明中定义为产生本发明多功能多肽的第一、第二或任何其它结构域的特殊功能的部分。

多核苷酸可以是 DNA、RNA 或衍生物，如 PNA。所述的多核苷酸最好是 DNA。

此外，本发明涉及含有本发明的多核苷酸的载体。

对于分子生物学领域中的熟练技术人员来说，许多合适的载体是已知的，它们的选择将取决于所需的功能，且包括质粒、粘粒、病毒、噬菌体和通常用于遗传工程中的其它载体。可采用本领域熟练的技术人员已知的方法构建各种质粒和载体；例如可参见 Sambrook 在《分子克隆实验手册》(“Molecular Cloning A Laboratory Manual”，Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, N. Y.)和 Ausubel 在《分子生物学中的目前方法》(“Current Protocols in Molecular Biology”，Green Publishing Associates 和 Wiley Interscience, N. Y. (1989), (1994))中所述的方法。可将本发明的载体再构建到用于向靶细胞传送的脂质体中。

例如，载体可以是噬菌体、质粒、病毒或逆转录病毒载体。逆转录病毒载体可以是复制感受态型或者是复制缺陷型的。在后一种情况中，病毒的繁殖通常仅在补充的宿主细胞中产生。

多核苷酸可连接含有可选择的标记物的载体用于在宿主中繁殖。通常，将质粒载体导入沉淀物(如磷酸钙沉淀)或者具有带电的脂质的复合物中。如果载体是病毒，则可使用适当包装的细胞系在体外将它包装，然后传入宿主细胞中。

多核苷酸插头应可操作性地连接于适当的启动子，例如 λ 噬菌体 PL 启动子，大肠杆菌 lac、trp、phoA 和 tac 启动子，SV40 早期启动子和晚期启动子，逆转录病毒 LTR 的启动子等等。其它合适的启动子将被熟练的技术人员所熟知。表达构建物还可含有转录起始位点、转录终止位点以及在转录区域中用于翻译的核糖体

结合位点。构建物表达的转录产物的编码部分最好包括在起始密码子和终止密码子(UAA、UGA 或 UAG)处的翻译起始密码子，这一部分适当地位于将要翻译的多肽的末端。

如上所述，表达载体最好包括至少一种可选择的标记物。这种标记物包括二氢叶酸还原酶、真核细胞培养物的 G418 或新霉素抗性、在大肠杆菌和其它细菌中培养的四环素、卡那霉素或氨苄青霉素抗性基因。适当的宿主的代表性例子包括但不限于：细菌细胞，如大肠杆菌、链霉菌属细胞和鼠伤寒杆菌细胞；真菌细胞，如酵母细胞；昆虫细胞，如果蝇 S2 细胞和草地夜蛾 Sf9 细胞；动物细胞，如 CHO、COS、293 和 Bowes 黑素瘤细胞；以及植物细胞。培养上述宿主的适当的培养基和培养条件在本领域中是已知的。

较佳用于细菌的载体包括：可从 QIAGEN, Inc.购得的 pQE70、pQE60 和 pDE-9；从 Stratagene Cloning Systems, Inc.购得的 pBluescript 载体、Phagescript 载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A；从 Pharmacia Biotech, Inc.购得的 ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT5。

15 优选的真核细胞载体是：从 Stratagene 购得的 pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXTI 和 pSG；从 Pharmacia 购得的 pSVK3、pBPV、pMSG 和 pSVL。通常，典型的克隆载体包括 pBscpt sk、pGEM、pUC9、pBR322 和 pGBT9。典型的表达载体包括 pTRE、PCAL-n-EK、pESP-1、pOP13CAT。其它合适的载体将易于被熟练的技术人员所理解。

20 此外，可使用如这样的哺乳动物细胞：在其基因组中已经含有编码上述多肽的核酸分子，但该核酸并不表达该多肽或者由于如弱启动子的缘故并不以适当的方式表达，因此在靠近编码所述多肽的外源核酸分子的地方将调节序列如强的启动子引入哺乳动物细胞中，从而诱导该多肽的表达。

在上下文中，术语“调节序列”指由于在接近编码基因的地方被整合到细胞的基因组中，从而可用于增加多肽的表达的核酸分子。这种调节性序列包括启动子、增强子、激活的沉默子内含子序列、3'UTR 和/或 5'UTR 编码区域、蛋白质和/或 RNA 稳定化元件、编码调节蛋白质的核酸分子(如转录因子)，它们能诱导并引发已知会激活基因表达和/或增加基因产物数量的基因或其它基因表达控制元件的表达。所述调节序列的引入导致多肽表达的增加和/或诱导，结果导致细胞中多肽数量增加。因此，本发明的目的是提供多肽的重新和/或增加的表达。

30 本发明还涉及转染了本发明的多核苷酸的细胞。

本发明的细胞可以是真核细胞(如酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞)或原核细胞。最佳的是,本发明的细胞是哺乳动物细胞,如人的细胞,它们可以是细胞系的成员,如 CHO 细胞、COS、293 或 Bowes 黑素瘤细胞。

5 可通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、传导、感染或其它方法将构建物导入宿主细胞中。这些方法都已在许多标准的实验室手册中描述,如 Davis 的《分子生物学的基本方法》(“Basic Methods In Molecular Biology”)(1996)。特别期待的是,事实上多肽可被缺乏重组载体的宿主细胞所表达。

10 本发明还提供含有在表达后编码在此以及附带的实施例中所所述的本发明的多功能多肽和/或其功能性部分的多核苷酸的核酸分子。由图 1 所述的 cDNA 模板进行 PCR,扩增得到人 NKG2D 的两个不同片段的核酸序列,它们的不同在于第 64-462 个核苷酸(nt)和第 123-462 个核苷酸上,分别对应于氨基酸序列 SEQ ID 3 和 4。如附带实施例中所述,使用获得的质粒 VV1-NKG2-D(nt 64-462)和 VV1-NKG2-D(nt 123-462)免疫 6-8 周龄 BALB/c 小鼠。如附带的实施例中所述,为了进行杂交瘤选择,使获得的淋巴细胞与 SP2/0 小鼠黑素瘤细胞(美国典型培养物保藏所, USA)融合。分别称为 11B2、8G7 和 6E5 的三种杂交瘤显示可产生与人 CD8⁺T 淋巴细胞和 NK 细胞表面上的天然 NKG2D 反应的单克隆抗体(进一步的信息可参见附带的实施例)。亚克隆 11B2D10、8G7C10 和 6E5A7 的上清液显示与 CD56⁺NK 细胞和 CD8⁺T 细胞上的 NKG2-D 反应(如附带的实施例中所证明)。根据布达佩斯
15 条约的规定,这些亚克隆以于 2001 年 3 月 23 日保藏在德意志微生物保藏中心(Mascheroder Web 1b, 38124 Braunschweig, 德国),保藏号分别为是 DSM ACC2496、DSM ACC 2497 和 DSM ACC 2498。

此外,本发明涉及制备本发明多功能多肽和/或其部分的方法,该方法包括培养本发明的细胞,然后从培养物中分离所述多功能多肽或其功能性部分,如 Mack,
25 1995, PANS, 92, 7021 所述。

可采用已知的方法从重组细胞培养物中回收和纯化多肽,这些方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水性相互作用层析、亲和层析、羟磷灰石层析和凝集素层析。最佳是采用高效液相色谱(HPLC)进行纯化。

30 根据在重组生产过程中所使用的宿主,多肽可以是糖基化,或者是非糖基化的。此外,多肽还可含有原始(修饰的)甲硫氨酸残基,在一些例子中,这是宿主

介导的加工的结果。因此，本领域周知，在真核细胞中，由翻译起始密码子编码的 N 末端甲硫氨酸通常在翻译后被高效率地从所有蛋白质中除去。虽然在大多数原核细胞中，大多数蛋白质上的该 N 末端甲硫氨酸也是被高效率地除去，但是，对于一些蛋白质，这种原核细胞除去方法是无效的，这取决于该 N 末端甲硫氨酸所共价连接的氨基酸的性质。

还应理解的是，可采用如本领域已知的体外翻译检测在无细胞系统中表达这些蛋白质。

术语“表达”指在细胞中生产蛋白质或核苷酸序列。但是，该术语还包括蛋白质在无细胞系统中的表达。它包括转录成 RNA 产物的转录过程、由编码蛋白质产物或多肽的 DNA 得到的所述产物或多肽的转录后修饰和/或翻译它们的过程，以及可能的转录后修饰；参考文献同上。根据所使用的特殊的构建物和条件，可从细胞、培养物或者两者中回收该蛋白质。术语“蛋白质”和“多肽”在本说明书中可以互换。“多肽”指氨基酸的聚合物(氨基酸序列)，它并不指分子的具体长度。因此，肽和寡肽都包括在多肽的定义中。这个术语并不指或包括多肽的转录后修饰，例如，糖基化、乙酰化、磷酸化等，同样可参考上述文献。这个定义包括如含有氨基酸的一种或多种类似物(包括如非天然的氨基酸等)的多肽、具有取代键的多肽，以及本领域已知的其它修饰，这些可以是天然的或非天然的。例如，本领域熟练的技术人员已知，不仅可以表达天然的蛋白质，而且还可以将蛋白质表达为融合多肽，或者将指导蛋白质的信号序列加入宿主细胞的特殊区内，如确保蛋白质分泌到培养基中等等。本发明的蛋白质也可表达为具有一个(多肽)或多个可促进蛋白质纯化的额外的多肽结构域的重组蛋白质。这些促进纯化的结构域包括但不限于：金属螯合肽，如使纯化在固定化金属上进行的组氨酸-色氨酸组件；使纯化在固定化免疫球蛋白上进行的 A 蛋白结构域；和在 FLAGS 扩展/亲和纯化系统(Immunex 公司，Seattle WA)使用的结构域。纯化结构域和感兴趣的蛋白质之间的可解离的连接序列的加入(如 XA 因子或肠激酶(Invitrogen, San Diego CA))可用于促进纯化。这样一种表达载体提供了含有细胞周期相互作用蛋白质的融合蛋白质的表达，且含有编码后接硫氧还蛋白的 6 个组氨酸残基的核酸和肠激酶解离位点。这些组氨酸残基促进了 IMIAC (如 Porath 所述的固定化金属离子亲和层析，《蛋白质表达和纯化》(“Protein Expression and Purification”), 3(1992), 263-281) 上的纯化，而该肠激酶解离位点则提供了从融合蛋白质中纯化该蛋白质的手段。除了重组生产外，通过采用固相技术(参阅 Stewart 等(1969)，《固相肽

合成》(“Solid Phase Peptide Synthesis”), WH Freeman 公司, 旧金山; Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85(1963), 2149-2154), 通过直接的肽合成生产本发明的蛋白质片段。可使用人工技术或自动化技术进行体外蛋白质合成。可根据制造商提供的说明书, 使用如 Applied Biosystems 431A 肽合成仪(Perkin Elmer, Foster City CA) 5 实现自动化合成。可采用生产全长分子的化学方法化学合成和/或分别和组合修饰本发明多肽的各种片段。本发明的蛋白质一旦得以表达或合成, 即可根据本领域标准的方法进行纯化处理, 这些方法包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、凝胶电泳等等; 参见 Scopes, 《蛋白质纯化》(“Protein Purification”), Springer-Verlag, N. Y.(1982)。对于医药用途, 优选的是至少具有约 90-95%均质性的基本上纯的蛋 10 白质, 98-99%或以上的均质性最佳。这些蛋白质一旦部分纯化或纯化至所需的均质性, 则可将它们用于治疗(包括体外), 或者用于开发和进行检测方法。

本发明还涉及含有本发明多肽、本发明多核苷酸或本发明载体的组合物。

在本发明组合物的一个较佳实施方式中, 所述组合物还含有产生共刺激和/或共激活功能的分子。

15 在此实施方式中, 该组合物可含有多功能多肽, 该多肽可含有或不含有本文上面所定义的另一个结构域。如果该多功能多肽含有产生共刺激和/或共激活功能的另一个结构域, 则本发明所述组合物中含有的所述另一种分子可具有相同的或不同的共刺激和/或共激活功能。

在所述组合物中, 所含有的组分最好在无菌条件下包装在一起, 分装在一个 20 或多个容器(如小瓶)中, 视需要, 这种包装可在缓冲液或水性溶液中进行; 下文将对其其中的一些内容作进一步的描述。

在本发明组合物的特别优选的实施方式中, 所述共刺激功能由 CD28 配体或 CD137 配体介导。

25 在本发明组合物的另一特别优选的实施方式中, 所述 CD28 配体或 CD137 配体是 B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、适体或抗体或功能性片段或功能性衍生物。

在本发明组合物的另一较佳实施方式中, 所述组合物是药物组合物, 还任选地包括药学上可接受的载体。

30 根据所需的制剂, 所述组合物还可包括药学上可接受的、通常无菌、无毒性的载体或稀释剂, 这类载体或稀释剂通常定义为用于配制动物用或人用药物组合物的媒介物。选择的稀释剂不影响组合物的生物活性。这种稀释剂的例子是蒸馏水、生理盐水、林格溶液、葡萄糖溶液和 Hanks 溶液。此外, 药物组合物或制剂

还可包括其它载体、佐剂，或无毒、非治疗性、非免疫原性的稳定剂等等。治疗有效剂量指改善症状或病症的蛋白质或其抗体、拮抗剂或抑制剂的量。在细胞培养物或实验动物中采用标准的药理学方法如 ED₅₀(有效治疗 50% 人群的剂量)和 LD₅₀(50% 人群的致死量)，可测定这种化合物的疗效和毒性。疗效和毒性效果之间的剂量比是治疗指标，这个比值可以 LD₅₀/ED₅₀ 之比表示。

适当的药学载体的另外的例子在本领域中是周知的，包括磷酸缓冲盐溶液、水、乳液(如油/水乳液)、各种类型的润湿剂、无菌溶液等等。可采用周知的常规方法配制含有这种载体的组合物。可以合适的剂量将这些药物组合物给予受试对象。可采用不同的方式给予适当的组合物，如通过静脉给药、腹膜内给药、皮下给药、肌肉内给药、局部或皮内给药。剂份方案由临床医师和临床因素确定。如药学领域所周知的，给予任何一个患者的剂量取决于许多因素，包括患者的大小、体表面积、年龄、所给予的具体化合物、性别、给药的时间和途径、总的健康状况和同时给予的其它药物。例如，典型的剂量可以是 0.001 到 1000 μ g 的范围(或者在此范围内用于表达的核酸或用于抑制表达的核酸)；但是，低于或高于这个示范性范围的剂量也是可以预见的，尤其是要考虑到上述因素。通常，该药物组合物的正常的给药方案应是每天 1 μ g 到 10mg 单位。如果给药方案是连续输注，那么应该是每分钟每千克体重 0.1 μ g-10mg 单位。

每日口服剂量方案最好是每千克总体重约 0.1-80mg，较佳是约 0.2-30mg，更佳是约 0.5-15mg。每日肠胃外剂量方案是每千克总体重约 0.1 μ g 到约 100mg，较佳约 0.3 μ g 到约 10mg，更佳约 1 μ g 到约 1mg。每日局部剂量方案较佳是 0.1-150mg，每天给药 1-4 次，较佳给药 2-3 次。每日吸入剂量方案较佳是每天约 0.01mg/kg 到约 1mg/kg。

通过定期评估可监测治疗的进展。剂量将会变化，但静脉内给予 DNA 的较佳剂量是大约 10⁶-10¹² 份 DNA 分子拷贝。也可向靶位点直接给予 DNA，如通过生物清单式(biolistic)传送到内部或外部靶位点，或者使用导管传送到动脉内的位点。可通过任何常规的给药途径如口服、局部、肠胃外或吸入方便地给予含有如多核苷酸、核酸分子、多肽、抗体、化合物药物、前体药物或药学上可接受的盐的组合物。可接受的盐包括醋酸盐、甲酯、盐酸、硫酸盐、氯化物等。可以常规的剂型给予这些药物，所述剂型可通过采用常规的方法将药物与标准的药学载体混合而制得。也可以常规的剂量给予根据本发明鉴别并获得的药物和前体药物，同时组合给予已知的第二种治疗活性化合物。这种治疗活性化合物含有如上述组

分。这些方法可涉及将成分混合、粒化和压制或溶解成所需的制剂。可理解的是，药学上可接受的载体或稀释剂的形式和特征由将与其混合的活性成分的量、给药途径以及其它已知的变量所确定。这些载体必需是“可接受的”，即它们应与制剂的其它成分可适配，并且不会有害于该制剂的接受者。例如，所使用的药学载体可以是固体或者液体。固体载体的例子是乳糖、白土、蔗糖、滑石粉、明胶、琼脂、果胶、阿拉伯树胶、硬脂酸镁、硬脂酸等等。液体载体的例子是磷酸缓冲盐溶液、糖浆、油(如花生油和橄榄油)、水、乳液、各种类型的润湿剂、无菌溶液等。类似地，载体或稀释剂可包括本领域周知的延时型材料，如单独的单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯或者与蜡的混合物。可使用大范围的药物形式。因此，如果使用固体载体，该制剂可以成片剂、以粉末或颗粒形式放在硬的明胶胶囊或者成锭剂或糖锭的形式。固体载体的量的变化将很大，但较佳约为 25mg 到约 1g。当使用液体载体时，制剂可以成糖浆、乳液、软的明胶胶囊、无菌可注射液体(如一安瓿或非水性液体悬浮液)的形式。

可局部给予所述组合物，即非全身性给药。这种给药包括外部应用于表皮或者口腔，以及将这种化合物加到耳、眼和鼻中，这样化合物不会明显地进入血流中。相反，全身性给药指口服、静脉内给药、腹膜内和肌肉内给药。

适合用于局部给药的制剂包括适合渗过皮肤到达炎症位点的液体或半液体制剂(如擦剂、洗剂、霜剂、软膏或糊状物)，和适合给予眼、耳或鼻的滴剂。对于局部给药，活性成分可占制剂的重量 0.001%-10%w/w，如占制剂重量的 1-2%。但是，活性成分的量可多达 10%w/w，但较佳少于 5%w/w，更佳为 0.1-1%w/w。本发明的洗剂包括那些适合用于皮肤或眼睛的洗剂，如适用于防紫外线。眼睛洗剂可包括任选地含有杀菌剂的无菌的水溶液，它可采用与制备滴剂相类似的方法制得。用于皮肤的洗剂或擦剂还可包括加速干燥并使皮肤凉爽的试剂(如酒精或丙酮)和/或增湿剂(如甘油)或油(如蓖麻油或花生油)。

本发明的霜剂、油膏或糊状物是活性成分的半固体制剂，用于外用。可在合适的机器的帮助下，将细微分离或粉末形式的活性成分单独或在溶液或悬浮在水性或非水性液体中的形式与油脂性基料或非油脂性基料混合，从而制得这些制剂。所述基料可包括：碳水化合物，如硬的、软的或液体石蜡、甘油、蜂蜡、金属皂；胶水；天然来源的油，如杏仁油、玉米油、花生油、蓖麻油或橄榄油；羊毛脂或其衍生物，或脂肪酸(如硬脂酸或油酸)与醇(如丙二醇)或者大粒凝胶。在该制剂中可加入任何合适的表面活性剂，如阴离子、阳离子或非离子性表面活性剂，

如山梨糖醇酯或其聚氧乙烯衍生物。还可包括悬浮剂(如天然树胶)、纤维素衍生物或无机物质(如硅质硅石)以及其它成分(如羊毛脂)。

本发明的滴剂可包括无菌水溶液或油性溶液或悬浮液, 可通过将活性成分溶解在具有杀菌剂和/或杀真菌剂和/或任何其它适当的防腐剂的合适的水性溶液中而制得本发明的滴剂, 且最好包括表面活性剂。经过滤, 使所得的溶液变得澄清, 然后转移到合适的容器中, 将该容器密封, 在高压灭菌锅中灭菌, 或者维持在 98-100 °C 灭菌一个半小时。或者, 通过过滤并采用无菌的技术将所得滤液转移到容器中, 对该溶液进行灭菌处理。滴剂中含有的杀菌剂和杀真菌剂的例子是硝酸苯汞或乙酸苯汞(0.002%)、氯苄烷铵(0.01%)和乙酸双氯苯双胍己烷(0.01%)。用于制备油性溶液的合适的溶剂包括甘油、稀的醇和丙二醇。可经肠胃外给予本发明的组合物, 即经静脉内、肌肉内、皮下、鼻内、直肠内、阴道内或腹膜内给药。通常优选皮下和肌肉内的肠胃外给药。可采用常规的技术制备用适当的剂型于这种给药方式。还可通过吸入方法给予该组合物, 即鼻内或口腔吸入给药。可采用常规的技术制备用于这种给药方式的适当剂型, 如气溶胶制剂或量的计剂量吸入器。

在本发明组合物的不同的较佳实施方式中, 所述组合物是诊断用组合物, 它还可任选地包括用于检测的适当的工具。

所述用于检测的工具包括如(a) 生色团、(a) 荧光染料、(a) 放射性核苷酸、生物素或 DIG。这些标记工具可与核苷酸类似物偶联。如附带的实施例或者尤其是 Spirin(1999), Invest. Opthamol. Vis. Sci., 40, 3108-3115 中所述的方法标记扩增的 cDNA。

本发明还涉及本发明多功能多肽、多核苷酸和载体在制备用于治疗如下疾病的药物组合物中的应用: 癌症、传染病和/或自身免疫疾病、癌症即恶性(实体)肿瘤以及造血癌症形式(白血病和淋巴瘤)、良性肿瘤(如前列腺的良性增生(BPH)、甲状腺或内分泌腺体的自身性腺瘤或结肠的腺瘤); 恶性肿瘤的起始阶段, 由病毒、细菌、真菌、原生动物或寄生虫引起的传染病, 因消除免疫细胞的亚群引起的自身免疫疾病; 移植排斥或变态反应的预防。

在本发明用途的较佳实施方式中, 所述感染是病毒、细菌或真菌感染, 其中所述癌症是头和颈癌、胃癌、食管癌、胃癌、结肠直肠癌、结肠癌、肝癌和肝内胆管癌、胰腺癌、肺癌、小细胞肺癌、喉癌、乳腺癌、乳房癌、恶性黑色素瘤、多发性骨髓瘤、肉瘤、横纹肌肉瘤、淋巴瘤、滤泡非何杰金氏淋巴瘤、白血病、T 细胞白血病和 B 细胞白血病、何杰金氏淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、卵巢癌、子宫癌、

宫颈癌、前列腺癌、生殖器癌、肾癌、睾丸癌、甲状腺癌、膀胱癌、浆细胞瘤或脑癌，或其中所述自身免疫疾病是关节强硬性脊椎炎、急性前葡萄膜炎、古德帕斯彻综合症、多发性硬化、格雷夫斯病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、胰岛素依赖性糖尿病、类风湿性关节炎、普通天疱疮、桥本甲状腺炎或自身免疫性肝炎。

5 本发明还涉及本发明多核苷酸或载体在制备用于基因治疗的组合物中的应用。

本发明设想，使用标准的载体和/或基因传送系统，可单独或以任何组合方式给予编码上述磷酸紧张素(phosphotonin)肽或多肽的各种多核苷酸和载体，同时可任选地给予药学上可接受的载体或赋形剂。例如，可单独使用本发明的多核苷酸，
10 或将其作为载体的一部分，用来在细胞中表达本发明的肽(多肽)，对上述相关的疾病进行基因治疗或诊断。将本发明的多核苷酸或载体导入细胞中，它们在细胞中又产生肽(多肽)。在给药之后，所述多核苷酸或载体可稳定地整合到受试对象的基因组中。另一方面，可使用对某些细胞或组织特异并存留在该细胞中的病毒载体。合适的药学载体和赋形剂在本领域中是周知的。根据本发明制得的多核苷酸
15 或载体可用于预防或治疗或延迟上述不同种类的疾病。

在上述实施方式中，本发明的载体较佳可以是基因转移载体或靶向载体。以导入治疗用基因为基础的基因治疗(如采用离体或体内技术将治疗用基因接种到细胞中)是基因转移最重要的应用之一。用于体外或体内基因治疗的合适的载体、方法或基因送递系统已在文献中有所描述，并且对于本领域熟练的技术人员来说是
20 已知的；例如可参见 Giordano,《自然医学》(“Nature Medicine”), 2(1996), 534-539; Schaper, Circ. Res., 79(1996), 911-919; Anderson,《科学》(“Science”), 256(1992), 808-813; Isner, Lancet, 348(1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res., 77(1995), 1077-1086; Onodua,《血液》(“Blood”), 91(1998), 30-36; Verzeletti, Hum. Gene Ther., 9(1998), 2243-2251; Verma,《自然》(“Nature”), 389(1997), 239-242;
25 Anderson,《自然》, 392(增刊, 1998), 25-30; Wang,《基因治疗》(“Gene Therapy”), 4(1997), 393-400; Wang,《自然医学》, 2(1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957; US-A-5,580,859; US-A-5,589,466; US-A-4,394,448 或 Schaper,《生物技术中目前的主张》(“Current Opinion in Biotechnology”), 7(1996), 635-640, 以及本文所引用的文献。

30 可将本发明的多核苷酸和载体设计成用于向细胞中直接导入，或者用于经由脂质体或病毒载体(如腺病毒、逆转录病毒)导入。较佳的是，上述细胞是微生物

系细胞、胚胎细胞或卵细胞或从其获得的细胞，最佳的是，所述用于导入的细胞是干细胞。如上所述，合适的基因递送系统可包括脂质体、受体介导的递送系统、裸 DNA 和病毒载体(如疱疹病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。也可使用生物清单传送系统(如 Williams, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88(1991), 2726-2729 所述)将核酸传送到体内的特定位置，以进行基因治疗。

应理解的是，所导入的多核苷酸和载体在导入所述细胞后表达基因产物，并且较佳在所述细胞的生命周期中维持在该状态上。例如，根据本领域熟练的技术人员所已知的方法，可对在适当的调节序列的控制下稳定表达多核苷酸的细胞系进行遗传工程改造。与其使用含病毒的复制起点的表达载体，还不如使用存在于同一或各自的质粒上的本发明的多核苷酸和可选择的标记物转化宿主细胞。在导入外源 DNA 后，使经改造的细胞在滋养培养基上生长 1-2 天，然后将其转移到选择性培养基中。重组质粒中可选择的标记物对选择产生了抗性，使其染色体中稳定地整合了质粒的细胞得以被选择，并长成转化灶，而该标记物反过来又被克隆并扩展到细胞系中。这类经改造的细胞系在检测涉及如磷酸盐摄取的激活或刺激的化合物的筛选方法中特别有用。

可使用大量的选择系统，它们包括但不限于分别在 tk、hgprt 或 aprt 细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶 (Wigler, 《细胞》(“Cell”), 11(1977), 223)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (Szybalska, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48(1962), 2026) 以及腺苷磷酸核糖基转移酶 (Lowy, 《细胞》, 22(1980), 817)。抗代谢物抗性可用作选择产生氨甲蝶呤抗性的 dhfr (Wigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(1980), 3567; O'Hare, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(1981), 1527)、产生霉酚酸抗性的 gpt (Mulligen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(1981), 2072)、产生氨基糖苷 G-418 抗性的 neo (Colberre-Garapin, J. Mol. Biol., 150(1981), 1)、产生潮霉素抗性的 hygromycin (Santerre, 《基因》(“Gene”), 30(1984), 147) 或者嘌呤霉素 (pat, 嘌呤霉素 N-乙酰基转移酶) 的基础。已描述了其它的可选择的基因，如使细胞可利用吡嗪来取代色氨酸的 trpB; 使细胞可使用组氨醇来取代组氨酸的 hisD (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85(1988), 8047); 以及产生鸟氨酸脱羧酶抑制剂抗性、2-(二氟甲基)-DL-鸟氨酸抗性、DFMO 抗性的 ODC(鸟氨酸脱羧酶) (McConlogue, 1987, 《分子生物学中当前的信息》(“Current Communication in Molecular Biology”), Cold Spring Harbor Laboratory 编辑)。

本发明还涉及治疗癌症、传染病或自身免疫疾病的方法，包括将本发明的多

肽、多核苷酸或载体或组合物导入感染所述恶性肿瘤或疾病的哺乳动物中。

给药的合适的途径和剂量等已在上文讨论本发明的药物组合物时加以论述。

此外，本发明涉及延迟病状的方法，该方法涉及将本发明的多肽、多核苷酸或载体或组合物导入感染所述病状的哺乳动物中。

5 在本发明一个方法的较佳实施方式中，所述哺乳动物是人。

最后，本发明涉及含有本发明的多功能多肽、多核苷酸、载体、细胞或组合物的试剂盒。

可将所述试剂盒中的成分或本发明的诊断用组合物包装在容器(如小瓶)中，可任选地存在于缓冲液和/或溶液中。如果适当的话，可将一种或多种所述成分包
10 装在一个或同一容器中。此外或两者择一地，一种或多种所述成分可吸附在固体支持物上，如硝酸纤维素膜或尼龙膜，或者吸附到微滴定盘的孔中。

附图如下：

图 1 显示含有 C 末端组氨酸标记物的可溶的 NKG2D 的核苷酸序列和氨基酸
15 序列。用于克隆的限制位点显示在核苷酸序列的起点(EcoRI)和末端(SalI)。

图 2 显示在 DNA 水平(图片 A)和蛋白质水平(图片 B)上 NKG2D 指导的双特异性单链抗体的分子设计。该双特异性抗体的功能模型也在图片 B 上显示。

图 3 显示抗-NKG2D(8R23)和抗-EpCAM(4-7)(右泳道)的双特异性单链抗体的 SDS-PAGE；左泳道显示分子量标记物。

20 图 4：编码用于遗传免疫的人 NKG2-D 的分泌的羧基末端片段的表达载体。NKG2-D 从所示载体的表达由人巨细胞病毒(CMV)的立即早期启动子所控制。该 NKG2-D 片段由从鼠免疫球蛋白 κ 轻链得到的前导肽和紧接着的人 myc 表位组成。NKG2-D 的编码序列由其同源终止密码子终止。图中，“BGH 聚腺苷酸化位点”是牛生长激素聚腺苷酸化位点；“amp”表示氨苄青霉素抗性基因；“ColE1
25 起点”表示 ColE1 的复制起点。

图 5：特异性结合于 NKG2-D 阳性靶细胞的杂交瘤的选择。通过 FACS 分析显示在杂交瘤上清液 6E5、8G7 和 11B2 中的三种不同的单克隆抗体与 CD8 阳性 T 细胞(A)或 CD56 阳性自然杀伤细胞的结合。缩写词是 6E5:6E5/A7；8G7:8G7C10 和 11B2:11B2/D10。10H9 是具有缺乏 NKG2-D 结合活性的杂交瘤上清液的对照。
30 各种检测抗体如图中所示。

图 6：单克隆抗体指导的抗 NKG2-D 对原初 T 细胞的引发的增强效果。

FACS 扫描中发现表达标记物 CD45RA 的原初 T 细胞在左上格中(图 A)。在表达 EpCAM 的靶细胞系(EpCAM/17-1A-转染的 CHO 细胞)的存在下, 原初 T 细胞在存在(图 B 和 C)或不存在(图 D 和 E)抗 NKG2-D 的单克隆抗体 BAT221 的条件下, 被 B7-1×抗-EpCAM 融合蛋白质和单链双特异性抗-EpCAM×抗-CD3 分子组合所引发。引发的表达标记物 CD45 RO 的 T 细胞出现在右下角的格子中。所给出的数字是先前为原初的后被引发的 T 细胞的百分数。荧光 1: FITC 标记的抗-CD45RO; 荧光 2: 藻红蛋白偶联的抗-CD45RA。

图 7: 单克隆抗体指导的抗 NKG2-D 通过 T 细胞对 TNF 生产的增强效果。

在表达 EpCAM 的靶细胞系(EpCAM-17-1A-转染的 CHO 细胞)的存在下, 原初 T 细胞被 B7-1×抗-EpCAM 融合蛋白质与浓度增加的(如图中所示)单链双特异性抗-EpCAM×抗-CD3 分子组合所引发。在抗 NKG2-D 的单克隆抗体 BAT221 存在(图 A)和不存在(图 B)的条件下, 使用商业的 TNF- α ELISA 测定 TNF 生产。

图 8: Melan A 细胞和 NKL 细胞通过 NKG2D 杂交瘤 BAT 221 的几份稀释物分别与单克隆抗体 CD16(5 μ g/ml)和 CD3(0.2 μ g/ml)的组合再指导的针对 P815 细胞的细胞毒性。在稀释的抗体的存在下, 将 200,000 个 NKL 细胞或 50,000 个 Melan A 细胞加到 10,000 个铬-51 标记的 Kato III 细胞中, 总体积是 200 μ l。背景对照(E+T)含有效应细胞和靶细胞, 但没有抗体稀释液。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下将这些微滴定板培育 4 小时。在培育后, 从各孔中取出 50 μ l 上清液, 在伽马计数器中测定 ⁵¹Cr 的释放。

图 9: 用编码人 NKG2-D 的分泌的 C 末端片段的表达载体免疫的小鼠中的特异性免疫应答的检测。对 1: 30 的 5 只免疫小鼠的血清稀释物与人 CD8⁺T 淋巴细胞和人 NK 细胞之比的结合活性进行流式细胞术分析。从健康供体的外周血获得的 200,000 个单核细胞与上述 5 只小鼠的稀释的血清培育。使用以 1: 100 稀释在 PBS 中的荧光素(FITC)-偶联的山羊-抗-大鼠 Ig(IgG+IgM)抗体检测结合的鼠抗体。进行三色荧光分析, 对 CD8⁺(三色, Tricolor)细胞使用正极, 而对 CD16⁺(PE)细胞使用负极, 从而使 FITC 介导的荧光检测的结果完全是 CD8⁺-T 淋巴细胞 (表型: CD8⁺、CD16⁺)造成的, 而没有任何受到 CD8⁺-NK 细胞的污染信号。类似地, 进行三色荧光分析, 对 CD56⁺(PE)细胞使用正极, 而对 CD3⁺(三色, Tricolor)细胞使用负极, 从而使得 FITC 介导的荧光检测的结果完全是 NK 细胞的(表型: CD56⁺、CD3⁺), 而没有任何来自 CD56⁺-T 淋巴细胞的污染信号。使用未免疫的小鼠的代表性血清(免疫前血清)作为阴性对照。在 FACSscan(Becton Dickinson)上通过流式

细胞术对细胞进行分析。

图 10: 在大肠杆菌的周质体中用于 N 末端阻断的单链抗体表达的噬菌粒的设计。P 表示细菌启动子; ompA 表示周质体转运的前导序列; N2 表示替代物 N 末端阻断结构域; VH 表示 scFv 的可变重链结构域; VL 表示 scFv 的可变轻链结构域; p53 表示转录因子 p53 的四聚体结构域; “Flag-标记物”表示流感病毒表位标记物。图形顶部给出的是各种限制酶切位点的位置。必需的编码序列于黑框表示。

图 11: 大肠杆菌周质体中产生的 NKG2-D 特异的 N 末端阻断的单链 Fv 片段的检测。为了增加敏感性, 通过将转录因子 p53 的四聚体结构域融合到 N 末端阻断的 scFv 的羧基末端上, 从而增加单链 Fv 抗体的结合活性。在周质体片段中, 使用可溶的重组 NKG2-D 作为俘获剂以及用于检测过氧化物酶偶联的抗-FLAG 抗体进行 ELISA, 检测了四聚体化的 scFv。描述了各种克隆的 ELISA 信号。对信号>0.05 的所有的克隆作了进一步的分析。

图 12: 靶向 NKG2-D 的 4 种双特异性分子的瞬时表达和 EpCAM 结合。使用编码 4 种不同的单链双特异性分子的表达载体瞬时转染 CHO/dhfr 细胞。在图 A 中, 将 β -半乳糖苷酶基因作为阴性对照进行转染。各种双特异性分子, 在图 B 中是 3B10xP4-3, 在图 C 中是 3B10xP4-14, 在图 D 中是 3B10xP5-2, 在图 E 中是 3B10xP5-23。在 5 天后收集细胞培养物上清液, 对其进行 FACS 分析, 分析其与人胃癌细胞系 Kato III 的 EpCAM 特异性结合, 以测试双特异性抗体的表达。使用 FITC 标记的绵羊-抗-小鼠抗体检测细胞结合的双特异性分子。显示了 FACS 直方图。

图 13: 用于 ELISA 中 NKG2-D 特异性结合的两单链双特异性抗体的特征。将这两种双特异性抗体 3B10xP4-3 和 3B10xP5-2 瞬时在 CHO 细胞培养物上清液中表达。使用过氧化物酶偶联的抗-六组氨酸抗体进行 ELISA, 检测六组氨酸标记的双特异性抗体, 从而测试与包被的、可溶的重组 NKG2-D 的结合。检测了两种不同的浓度, 在 A 中是 1: 1 稀释的培养物上清液, 在 B 中是 1: 2 稀释的培养物上清液。使用 EpCAM 特异的 3B10x 抗-CD3 双特异性抗体的结合作为对照。在所显示的读数中减去从这种非特异性对照中获得的值。

图 14: Melan A 细胞(A)和 NKL 细胞(B)通过双特异性 3B10xP4-3 抗体再指导的针对 EpCAM 阳性的 Kato 细胞的细胞毒性。在几种稀释的双特异性抗体的存在下, 将 200,000 个 NKL 细胞或 50,000 个 Melan A 细胞加到 10,000 个铬-51 标记

的 Kato III 细胞中，总体积是 200 μ l。背景对照(E+T)含有效应细胞和靶细胞，但没有抗体稀释液。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下将这些微滴定板培育 4 小时。在培育后，从各孔中取出 50 μ l 上清液，在伽马计数器中测定 ⁵¹Cr 的释放。

图 15: 通过 NKG2-D 召集外周血单核细胞(PBMC)的四种单链抗体进行的特异性靶细胞裂解。从对 NK/CD8 特异性受体 NKG2-D 特异的四种不同的 scFv 构建都识别人胃癌 Kato III 细胞系上的 EpCAM 靶标的四种双特异性抗体，是用从单克隆抗体 3B10 得到的单链 Fv 进行的。将编码四种双特异性抗体的表达载体转染到 CHO 细胞中，使其瞬时表达，收集上清液。在毒性试验中，测试具有分泌的双特异性抗体的指定稀释度的上清液在人免疫效应细胞(PBMC)的存在下对 Kato III 细胞的特异性裂解作用。在缺乏 CHO 上清液的情况下，在 PBMC 存在时并未观察到 Kato III 细胞的靶细胞裂解。所显示的数据是三个测定值的平均值。PBMC 通过几种稀释度的双特异性抗体 3B10 $\times$ P4-3、3B10 $\times$ P4-14、3B10 $\times$ P5-2 和 3B10 $\times$ P5-23 再指导针对 EpCAM 阳性 Kato III 细胞的细胞毒性。在稀释的双特异性抗体的存在下，将 200,000 个 PBMC 加到 10,000 个铬-51 标记的 Kato III 细胞中，总体积是 200 μ l。背景对照(E+T)含有效应细胞和靶细胞，但没有抗体稀释液。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下将这些微滴定板培育 4 小时。在培育后，从各孔中取出 50 μ l 上清液，在伽马计数器中测定 ⁵¹Cr 的释放。

图 16: 附带实施例中所所述的序列的编码。所示的核苷酸序列以通常的 5'-3'方向显示。

20

下述实施例阐述了本发明。

实施例 1: 重组 NKG2D 的产生

为了获得 NKG2-D 抗原的细胞外部分的编码 DNA 序列，将通过反转录从外周血单核细胞的 RNA 得到的 cDNA 用于聚合酶链式反应(PCR)的模板。从外周血单核细胞中制备总 RNA，这些细胞是通过菲可密度离心继之以标准方法(J. E. Coligan, Wiley Interscience, 1991)从全血样品中分离得到。

根据制造商的说明书，使用市售获得的制备试剂盒(Quiagen)制备 RNA。

根据标准方案(Sambrock, Cold Spring Harbor Laboratory, Press, 1989, 第二版)进行 cDNA 合成。

对于 PCR，采用以下序列的一对引物：

正向引物：5'-AGGTGTACACTCCTTATTCAACCAAGAAGTTCAAATTCC-

3'(SEQ ID 87); 反向引物: 5'-TCATCCGGACACAGTCCTTTGCATGCAGATG-3'(SEQ ID 88)。

除了与 NKG2-D cDNA 模板杂交的序列外, 该正向引物含有 BsrGI-位点, 而反向引物含有 BspEI 位点, 以便对 PCR 扩增产物进行克隆。

- 5 采用琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 反应产物, 根据制造商的说明书, 使用市售获得的试剂盒(Quiagen)进行纯化, 然后采用标准方案(Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 第二版)将所得产物与限制酶 BsrGI 和 BspEI 培育。之后进行最后的纯化步骤。如图 1 所示, NKG2-D 细胞外结构域的编码序列通过 BsrGI 融合到鼠 Ig-重链前导序列中, 该 BspEI 位点与 XmaI 位点融合, 从而连接多组氨酸标记物的编码序列, 紧接着是终止密码子(SEQ ID 1 和 2)。

- 10 将图 1 中所示的由 N 末端前导肽的编码序列(NKG2D 细胞外结构域)和 C 末端组氨酸-标记物组成的 EcoRI/SaII-DNA 片段克隆到质粒载体 pFastBac1 中, 此载体也是用限制酶 EcoRI 和 SaII 的消化制得的。此质粒是 Bac-to-Bac®杆状病毒表达系统的一部分(Gibco BRL, 制造商的说明书可在 http://www2.lifetech.com/catalog/techline/molecularbiology/Manuals_PPS/bac.pdf 上获取。除非另有说明, 涉及 Bac-to-Bac®杆状病毒系统的所有步骤都根据这些指导实施)。

- 然后将 1ng DNA 的正确质粒克隆转化到 DH10Bac 感受态细胞中(Bac-to-Bac®表达系统)。这种大肠杆菌菌株已经携带了两种另外的质粒: (i) 提供 Tn7 移位功能的辅助质粒(pMON7124)和(ii) 所谓的杆粒(pMON 14272), 它是杆状病毒穿梭载体。在将第三种质粒转化到这些细胞中后, 插入 pfastBac1 的编码序列通过移位作用转移到含有对此移位特异的靶位点的杆粒中。这会导致提供对具有重组杆粒的克隆进行选择的可能性的 LacZ 编码序列的破坏, 其中, 所述选择是根据制造商的说明书在含有 Bluo-gal、IPTG 和抗生素组合物的琼脂平板上进行的蓝白色选择。

- 25 选出含有具有可溶的 NKG2D 序列的重组杆粒的白色克隆, 然后将其培养过夜。使用制造商提供的特殊方案从这些过夜的培养物中制备杆粒-DNA。

- 然后根据制造商的说明书, 使用 CellFectin 试剂(Bac-to-Bac®表达系统)用该杆粒-DNA 转染 SF9-昆虫细胞。转染 3 天后, 收集转染细胞的培养上清液中的重组杆状病毒。这种上清液是低滴度 (每毫升大约 2×10^7 个蚀斑形成单位(pfu))、少量(2ml)的病毒原液。关于昆虫细胞培养物、杆状病毒的繁殖以及杆状病毒表达系统中的蛋白质表达的说明书可在 <http://www.invitrogen.com/manuals/html> 中获

取。除非另有说明，涉及昆虫细胞培养和蛋白质表达的所有步骤都是根据这些指导进行的。对于蛋白质表达，需要高滴度和大量的病毒原液。为了获得这种病毒原液，可进行下列步骤：

使两个接种了 2×10^6 个 SF9 细胞的 25cm^2 组织培养瓶分别感染 $30\mu\text{l}$ 原始病毒原液。10 天后，以少量-高滴度病毒原液的方式收集培养物上清液。然后用 500 毫升 SF9 细胞的悬浮培养物(密度为 2.0×10^6 个细胞/毫升)感染 5ml 的第二种病毒原液。采用锥虫蓝排斥法测定细胞存活力，从而监测感染的进展。在细胞存活力低于 10% 时收集病毒原液，通过离心从细胞中分离出病毒上清液。必须测定此大量的原液的病毒滴度。为此，以每孔 1×10^4 的密度将 SF9 细胞接种在 96 孔组织培育盘上。给总共 24 个孔各自感染高滴度原液的下述稀释液中的一种： $10\mu\text{l}$ 的 $1:10^5$ 稀释液/孔、 $10\mu\text{l}$ 的 $1:10^6$ 稀释液/孔和 $1\mu\text{l}$ 的 $1:10^7$ 稀释液/孔。必须将体积调节成每孔 $120\mu\text{l}$ 。14 天后，采用锥虫蓝排斥法测定细胞的存活力。具有活的和无法存活的细胞的对称的孔的稀释使得对病毒滴度有足够准确的估计，此滴度预计为 1×10^8 - 1×10^9 pfu/ml。

在感染试验中，使用密度为 2×10^6 细胞/ml 和 3×10^6 细胞/ml 的两份 SF9 细胞培养物，以每细胞 5pfu 和 10pfu 的 MOI(感染复数)测定蛋白质表达的时间过程。感染的培养物的样品在感染后第 24、48、72 和 96 小时取出。根据标准的方法，采用 western 印迹法分析这些样品。用过氧化物酶偶联的抗-组氨酸-标记物抗体检测可溶的 NKG2D。

因此，在多份 500ml 培养体积的悬浮培养物中使用最优的 MOI 和感染后最佳的培养时间来进行大规模的蛋白质表达。

如 Mack [(1995), Proc Natl Acad Sci USA, 92: 7021] 所述，使用 Ni-NTA-柱进行亲和层析，通过其 C 末端组氨酸标记物从培养物上清液中纯化可溶的 NKG2D。

实施例 2：针对人淋巴细胞上天然 NKG2D 的单克隆抗体的产生

用抗原 NKG2D 的可溶的细胞外结构域免疫 balb/c $\times$ C57black 杂交得到的两周龄 F1 小鼠。将抗原溶解在 0.9% NaCl 中，使其浓度为 $100\mu\text{g/ml}$ 。接着以 1:2 的比例用完全福氏佐剂将该溶液乳化，然后给每只小鼠腹膜内注射 $50\mu\text{l}$ 溶液。以相同的方式在第 4、8 和 12 周后给这些小鼠加强免疫，除了用不完全福氏佐剂取代完全福氏佐剂外。第一次加强免疫后 10 天，获取血液样品，并通过 ELISA 测

试针对 NKD2G 抗原的抗体血清。免疫动物的血清滴度比未免疫的动物高 1000 倍以上。第二次加强免疫后 3 天, 根据《免疫学中目前的方案》(“Current Protocols in Immunology”, Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach 和 Strober, Wiley-Interscience, 1992)中所述的标准方法, 将脾细胞与 P3×63Ag8.653 细胞(ATCC CRL-1580)融合, 产生杂交瘤细胞系。在 PEG 融合后, 以 100,000 个细胞/孔的密度将细胞接种在微滴定板上, 并使细胞在补充了 10%胎牛血清、300 单位/毫升重组人白介素 6 和用于选择的 HAT 添加物的 200μl RPMI 1640 培养基中生长。进行下述 ELISA, 以测试从致密生长的孔中得到的培养物上清液:

在 4℃, 用浓度为 5μg/ml 的重组 NKG2D 抗原包被 96 U-底平板(Nunc, maxisorb)的孔过夜。用洗涤缓冲液 (0.1M NaCl、0.05M Na₂HPO₄(pH 7.3), Tween 20, 0.05 % NaN₃) 将包被的孔洗涤 3 次, 接着在室温下使它们与 2%的脱脂奶粉悬浮在洗涤缓冲液中的悬浮液(200μl/孔)培育 1 小时, 对其进行阻断。接着在室温下, 以未稀释和几种稀释度的方式将杂交瘤上清液培育 2 小时。在进行 3 个额外的洗涤步骤后, 使用针对小鼠免疫球蛋白的辣根过氧化物酶偶联的多克隆抗体检测结合的单克隆抗体。洗涤 5 分钟后, 通过加入 TMB-底物溶液(四甲基联苯胺, Roche Mannheim)进行最后的 ELISA。15 分钟后使用 ELISA 读数器在 405nm 测定有色的沉淀物。

对从显示强的 ELISA 信号的 10 份克隆中得到的上清液进行选择, 以用于进一步的分析。为了鉴别出那些产生与完整的 NK 细胞和 T 淋巴细胞上的天然 NKG2D 抗原反应的单克隆抗体的杂交瘤克隆, 进行如下流式细胞术分析:

将 1×10^6 的 PBMC 与 50μl 未稀释的杂交瘤上清液在冰上培育 30 分钟, 接着使用以 1: 100 稀释在 PBS 中的兔抗-小鼠 Ig 抗体的荧光素(FITC)偶联的 F(ab')₂ 片段(Dako Hamburg, 编号 F0313)检测结合的单克隆抗体。接着通过与 50μl 稀释成 1: 10 的小鼠血清(Sigma immunochemicals, Deisenhofen, M-5905)培育 30 分钟, 将细胞结合的 FITC 偶联的抗体的游离化合价阻断。为了区别 NK 细胞和 T 细胞, 在这个点上分离出标记的 PBMC。一半用以 1: 100 稀释的 T 细胞特异性三色偶联的抗-CD8 抗体(Caltac Laboratories; Burlingame; USA, 编号 MHCD0306)染色, 另一半用以 1: 25 稀释的 NK 细胞特异性藻红蛋白(PE)偶联的抗-CD56 抗体(Becton Dickinson, Heidelberg, 目录号 347747)染色。将分别使 NK 细胞和 T 淋巴细胞特异性染色的未标记的抗-CD16 和抗-CD56 抗体用作主要标记步骤的阳性对照; 将具有不相关特异性的鼠单克隆抗体取代与重组 NKG2D 反应的杂交瘤上清液作为

阴性对照。

在 FACS-scan(Becton Dickinson, Heidelberg)上进行流式细胞术对细胞进行分析。如 Current Protocols in Immunology(Colegan, Kruisbeek, Margulies, Shevach 和 Strober, Wiley-Interscience, 1992)中所述的方法进行 FACS 染色和荧光强度的测定。

通过分别对 CD8⁺细胞和 CD56⁺细胞使用正极,从而进行两色荧光分析,由此可分别检测 CD8⁺-T-淋巴细胞和 NK 细胞上的 FITC 介导的荧光。与 CD8⁺-T-淋巴细胞和 NK 细胞与各自对照抗体的不同染色相比,杂交瘤细胞系 8R23 的上清液显示出与 NK 细胞和 T 细胞有强的反应性,而另两种上清液仅与这两种淋巴细胞起微弱的反应。

或者,通过小鼠的遗传免疫产生针对人 NKG2D 的单克隆抗体。为此,进行 PCR,从图 1 所示的 cDNA 模板扩增得到对应于氨基酸序列 SEQ ID 3 和 4 的两条不同的人 NKG2D 片段,它们分别是第 64 个核苷酸到第 462 个核苷酸的片段和从第 123 个核苷酸到第 462 个核苷酸的片段,这两条片段编码侧接了天冬酰胺(N)和缬氨酸(A)或色氨酸(W)和缬氨酸(V)的细胞外 NKG2D 片段。使用下列 PCR 引物;用于扩增核苷酸为第 123-462 个的 NKG2D 片段的引物:

NKG2D-短-f(5'-ATCAAGCTTGTGGATATGTTACAAAAATAACT-3'(SEQ ID 80) 和 NKG2D-停止-r(5'-CGCGGTGGCGGCCGCTTACACAGTCCTTTGCATG-3'(SEQ ID 82);用于扩增核苷酸为第 64-462 个的 NKG2D 片段的引物: NKG2D-f(5'ATCAAGCTTGAACCAAGAAGTTCAAATTCC-3')(SEQ ID 81)和 NKG2D-停止-r(5'-CGCGGTGGCGGCCGCTTACACAGTCCTTTGCATG-3'(SEQ ID 82)。

如图 4 所示,通过将所设计的这些 PCR 产物克隆到载体 VV1(GENOVAC AG, 德国)的限制性内切酶位点 Hind III 和 Not I 中,构建用于遗传免疫的质粒。

所得的质粒 VV1-NKG2-D(核苷酸 64-462)和 VV1-NKG-2D(核苷酸 123-462)使在 N 末端被 myc 表位标记的可溶的细胞外 NKG2-D 片段被分泌。该 myc 表位用于确证可溶的 NKG2-D 片段的表达。为此,通过将构建物瞬时转染到 BOSC023 细胞(Onishi(1996), Exp Hematol, 24: 324)中使其表达,通过加入 Cytoperm/ Cytofix (Becton Dickinson)使细胞穿孔;在与鼠抗-myc 单克隆抗体(9E10, ATCC, CRL-1729)反应以及随后的多克隆藻红蛋白标记的兔抗-小鼠免疫球蛋白抗体反应后,经 FACSscan 分析发现 myc 标记的 NKG2D 片段被细胞内染色。

根据公开的方法(Kilpatrick(1998), Hybridoma, 17: 569),使用 Helios 基

因枪(Bio-Rad, 德国)将 VV1-NKG2-D(核苷酸 64-462)免疫 3 只 6-8 周龄 BALB/c 小鼠 6 次; 用 VV1-NKG2-D(核苷酸 123-462)免疫 2 只小鼠 3 次, 接着用 VV1-NKG2-D(核苷酸 123-462)免疫 3 次。最后一次使用免疫质粒后 1 周, 通过在施加 DNA 的位点处皮下注射 300 μ l 重组人 NKG2-D 蛋白质(见实施例 1)给各小鼠加强免疫, 该蛋白质浓缩在 50 μ g/ml 的磷酸缓冲盐溶液中, 此缓冲液中没有 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 。

4 天后, 将小鼠杀死, 用聚乙二醇将它们的淋巴细胞和 SP2/0 小鼠骨髓瘤(美国模式培养物保藏所, 美国)融合, 然后以每孔 100,000 个细胞的密度接种在 96 孔微滴定板中, 并在补充了 10% 胎牛血清和用于杂交瘤选择的 HAT 添加物 (Kilpatrick(1998), Hybridoma, 17: 569) 的 200 μ l DMEM 培养基中培养。

如上所述, 在固定化重组 NKG2D 上进行 ELISA, 测试从致密生长的孔中获得的培养物上清液。对从显示阳性 ELISA 信号的 122 个克隆中获得的上清液进行选择, 以用于进一步的分析。为了鉴别那些产生与完整的 NK 细胞和 CD8⁺T 淋巴细胞上的天然 NKG2D 抗原反应的单克隆抗体的杂交瘤克隆, 在 FACS-scan(Becton Dickinson, Heidelberg)上进行流式细胞术, 对细胞进行分析:

采用菲可密度梯度离心从健康的供体的外周血中分离得到单核细胞 (PBMC)。在微滴定板的各孔中, 200,000 个 PBMC 与未稀释的杂交瘤上清液培育。培育 30 分钟后, 在冰上用 PBS 洗涤细胞两次, 接着在冰上用山羊抗-小鼠 IgG 和 IgM 抗体(Jackson ImmunoResearch Inc. West Grove, USA, 编号 115-096-068, 1: 100)的荧光素(FITC)偶联的 F(ab')₂ 片段染色。用 PBS 洗涤细胞 2 次, 接着用两种不同的抗原标记的混合物染色。对于 CD8⁺T 细胞的染色, 进一步将 100,000 个 PBMC 与藻红蛋白(PE)偶联的 CD16 抗体(Becton Dickinson, Heidelberg, 编号 347617)和三色偶联的 CD8 抗体(Caltac Laboratories, Burlingame, USA, 编号 MHCD0806)培育 30 分钟。对于 NK 细胞的染色, 另外一半 PBMC 进一步与藻红蛋白(PE)偶联的 CD56 抗体(Becton Dickinson, Heidelberg, 编号 34774)和三色偶联的 CD3 抗体(Caltac Laboratories, Burlingame, USA, 编号 MHCD0306)培育 30 分钟。为了避免标记的混合物内不同抗体间的交叉反应, 以最终稀释为 1: 10 的量加入小鼠血清(Sigma Aldrich, St. Louis, USA, 目录号 054H-8958)。

通过对 CD8⁺细胞(Tricolor)使用正极, 对 CD16⁺细胞(PE)使用负极, 进行三色荧光分析, 由此获得完全由 CD8⁺T 淋巴细胞(表型: CD8⁺、CD16⁺)产生的 FITC 介导的荧光的检测结果, 而没有任何受到 CD8⁺NK 细胞污染的信号。类似地, 进

- 行三色荧光分析,对 CD56⁺(PE)细胞使用正极,而对 CD3⁺(Tricolor)细胞使用负极,从而使得 FITC 介导的荧光检测的结果完全是 NK 细胞的(表型: CD56⁺、CD3⁺),而没有任何来自 CD56⁺-T 淋巴细胞的污染信号。如图 5 所示,称为 11B2、8G7 和 6E5 的杂交瘤的上清液含有与人 CD8⁺T 淋巴细胞和 NK 细胞表面上的天然
- 5 NKG2D 反应的单克隆抗体。使用杂交瘤 10H9 的上清液进行的染色是作为许多与固定化重组 NKG2D 反应的单克隆抗体的代表性例子,但是,这并不能将天然的 NKG2D 受体复合物结合到完整的细胞上。采用《免疫学中目前的方案》(Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach 和 Strober, Wiley-Interscience, 1992)中所述的方法进行 FACS 染色和荧光强度的测定。
- 10 通过在 96 孔微滴定板上进行有限稀释,使产生与 CD56⁺NK 细胞和 CD8⁺T 细胞上的 NKG2-D 反应的抗体的杂交瘤亚克隆一次。通过对与从显示有细胞生长的孔中收集得到的上清液培育的 NKG2D 阳性 NK 细胞进行流式细胞术分析,鉴别出阳性亚克隆 (Bauer(1999),《科学》,285:727)。使用兔的抗小鼠 Ig 抗体(Dako, Hamburg, 编号 F0313)的荧光素(FITC)偶联的 F(ab')₂ 片段检测细胞结合的单克隆
- 15 抗体。亚克隆 11B2D10、8G7C10 和 6E5A7 进一步用于 NKG2-D 指导的双特异性抗体的构建(见实施例 3)。

实施例 3: 双特异性单链抗体抗-NKG2-D×抗-EpCAM 的构建

- 如图 2 所述构建双特异性抗体。如 Orlandi(1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
- 20 86: 3833 中所述,从相应的杂交瘤细胞系的总 RNA 中克隆得到与完整细胞上的天然 NKG2D 结合的那些抗体的可变区 VL 和 VH,但与该方法不同的是,直接将
- 从杂交瘤 11B2D10(SEQ ID 7-16)、8G7C10(SEQ ID 27-36)、6E5A7(SEQ ID 37-46)和 6H7E7(SEQ ID 17-26)扩增得到的可变区的 PCR 片段克隆到 TA 克隆载体 GEM-T Easy(Promega, 目录号 A1360)。接着,将克隆得到的 VL 和 VH 区域用作产生具
- 25 有结构域排列 VL/VH 的相应的 scFv 片段的两步融合-PCR 的模板。用于此目的的 VL 特异性引物对由寡核苷酸 5'VLB5RRV (5' AGG TGT ACA CTC CGA TAT CCA GCT GAC CCA GTC TCC A 3', SEQ ID 83)和 3'VLGS15 (5' GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC TTT GAT CTC GAG CTT GGT CCC 3', SEQ ID 84)组成; VH 引物对由寡核苷酸 5' VHGS15 (5' GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT
- 30 GGT GGT TCT CAG GT (GC) (AC)A(AG) CTG CAG (GC)AG TC(AT) GG 3', SEQ ID 85)和 3'VHBspEI (5' AAT CCG GAG GAG ACG GTG ACC GTG GTC CCT TGG

CCC CAG 3', SEQ ID 86)组成。在第一个 PCR 步骤中, 采用下述 PCR 程序获得 VH 扩增产物和 VL 扩增产物: 在 94°C 变性 5 分钟, 在 37°C 退火 2 分钟, 在 72°C 延伸 1 分钟, 这是第一轮循环; 94°C 变性 1 分钟, 37°C 退火 2 分钟, 72°C 延伸 1 分钟, 进行 6 轮循环; 94°C 变性 1 分钟, 55°C 退火 1 分钟, 72°C 延伸 45 秒钟, 进行 18 轮循环; 72°C 进行末端延伸 2 分钟。对于融合-PCR 的第二步, 从琼脂糖凝胶中纯化出 VH-PCR 片段和 VL-PCR 片段, 将它们与寡核苷酸引物 5'VLB5RRV 和 3'VHBspEI 混合, 并采用下列的 PCR 程序: 94°C 变性 5 分钟一次; 94°C 变性 1 分钟, 55°C 退火 1 分钟, 72°C 延伸 1.5 分钟, 8 轮循环; 72°C 末端延伸 2 分钟。从琼脂糖凝胶中纯化出编码抗 NKG2D scFv-片段的 VL/VH 融合产物, 用限制酶 BsrGI/BspEI 消化。还用限制酶 BsrGI/BspEI 消化含有 WO0003016 的图 10 中所示的 EcoRI/SaII-克隆的 DNA 片段的哺乳动物表达载体 pEF-DHFR (Mack(1995), Proc Natl Acad Sci USA, 92: 7021), 释放出 750bp 的片段; 凝胶纯化余下的片段用于抗 NKG2D scFv 片段的克隆。

因此, 如 Mack(1995), Proc Natl Acad Sci USA, 92: 7021 所述, 哺乳动物表达载体 pEF-DHFR 的所得的衍生物含有编码针对 NKG2D 和 EpCAM 的双特异性单链抗体的 EcoRI/SaII-DNA 插入子。EpCAM 被许多上皮肿瘤所表达, 并且已经与鼠单克隆抗体一起被用作辅助治疗切除性结肠直肠癌的靶抗原。

采用电穿孔方法将抗-NKG2D×抗-EpCAM 双特异性单链抗体的表达质粒 (SEQ ID 47-49) 转染到 DHFR 缺陷的 CHO 细胞中; 然后如 Mack(1995), Proc Natl Acad Sci USA, 92: 7021 所述, 对稳定的转染子进行选择, 进行基因扩增和蛋白质生产。使用 Mack ((1995), Proc Natl Acad Sci USA, 92: 7021) 所述(还可参见图 3)的 Ni-NTA-柱, 借助于 C 末端组氨酸标记物, 从培养基上清液中纯化出双特异性抗体。

25 实施例 4: 针对 DAP-10 的细胞外结构域的抗体

也可采用下述方法获得与 NKG2D-受体复合物的细胞外结构域反应的抗体:

用对应于人 DAP-10 的完整的细胞外结构域的含有 30 个氨基酸(SEQ ID 5, QTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCSLSLP)的肽或其部分免疫 6-8 周龄 BALB/c 小鼠 (Wu(1999), 《科学》, 285: 730), 所述肽或其部分分别与一个载体蛋白质连接。例如, 可以定向的方式, 通过其 C 末端半胱氨酸的巯基, 可将含有 DAP10 的细胞外结构域的 21 个 N 末端氨基酸的肽 (SEQ ID 6,

QTTPGERSSLPAFYPGTSGSC)与顺丁烯二酰亚胺激活的 KLH 耦合。可将所得的偶联产物溶解在 0.9%NaCl 中,使其浓度为 100 μ g/ml,接着以 1:2 的比例用完全福氏佐剂将溶液乳化,然后给每只小鼠腹膜内注射乳液 50 μ l。在 4、8 和 12 周后,可给小鼠加强免疫,类似主要的免疫,但是可以使用不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂。第一次加强免疫后 10 天,获取血液样品,并在偶联了上述 21 聚体 DAP-10 肽的固定化 BSA 上进行 ELISA,从而检测抗体血清滴度,如上述对匙孔血蓝蛋白 (KLH)检测的那样。

第二次加强免疫后 3 天,可根据《免疫学中目前的方案》(Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach 和 Strober, Wiley-Interscience, 1992)中所述的标准方法,将从具有阳性血清滴度的小鼠中获得的脾细胞与 P3 $\times$ 63Ag8.653 细胞(ATCC CRL-1580)融合,产生杂交瘤细胞。PEG-融合后,以 100,000 个细胞/孔的密度将细胞接种在微滴定板上,并在补充了 10%胎牛血清、300 单位/ml 重组人白介素 6 和用于选择的 HAT-添加物的 200 μ l RPMI 1640 培养基中生长。采用下述 ELISA 测试从致密生长的孔中获得的培养物上清液与 DAP10-肽的反应性:

在 4 $^{\circ}$ C,用浓度为 5 μ g/ml 的肽-BSA 偶联物包涂 96 U-底平板(Nunc, maxisorb)的孔过夜。用洗涤缓冲液(0.1M NaCl, 0.05M Na₂HPO₄、pH7.3, 0.05%Tween 20, 0.05%NaN₃)洗涤包涂的孔 3 次,接着,在室温下使它们与 2%的脱脂奶粉悬浮在洗涤缓冲液中的悬浮液(200 μ l/孔)培育 1 小时,对其进行阻断。接着,室温下以未稀释和几种稀释度的方式将杂交瘤上清液培育 2 小时。在进行 3 个额外的洗涤步骤后,使用针对小鼠免疫球蛋白的辣根过氧化物酶偶联的多克隆抗体检测结合的单克隆抗体。洗涤 5 分钟后,通过加入 TMB-底物溶液(四甲基联苯胺, Roche Mannheim)进行最后的 ELISA。15 分钟后使用 ELISA 读数器在 405nm 测定有色的沉淀物。

为了鉴别那些产生能结合完整的 NK 细胞和 CD8⁺T 淋巴细胞上的 NKG2D 受体复合物中的 DAP-10 的单克隆抗体的肽反应性杂交瘤克隆,可如实施例 2 所述,在 PBMC 上进行三色荧光分析。

如实施例 3 所述,可从相应的杂交瘤细胞系中克隆出使完整的 NK 细胞和 CD8⁺T 淋巴细胞染色的单克隆抗体的可变区,并用于双特异性抗体的构建。

30 实施例 5: 由 NKG2D 指导的抗体增强的原初 CD8⁺T 细胞的引发

为了进行体外引发实验,如下分离出原初人 CD8⁺T 细胞:采用菲可密度离心,

从健康供体的 500ml 外周血中制备单核细胞(PBMC)。使用市售获得的细胞分离试剂盒(R&D Systems, HCD8C-1000), 通过阴性选择分离出 CD8⁺T 细胞。CD8⁺T 细胞柱上装有 2×10^8 个 PBMC, 这些细胞已预先与补充了 1 μ g 单克隆的抗-CD11b 抗体(Coulter 0190)/柱的制造商提供的抗体混合物培育。由于所引发的非增殖性细胞毒性 CD8⁺T 细胞具有与原初 CD8⁺T 淋巴细胞一样的 CD45RA⁺/RO⁻表型, 所以将 CD11b 作为额外的细胞纯化标记物引入, 以便除去先前的 T 细胞亚类。因此, 在最终产生类似于携带 CD45RA⁺/RO⁻表型的原初 CD4⁺T 细胞的原初 CD8⁺T 淋巴细胞的 CD45-同种型的基础上, 仅有 CD11b⁺/CD8⁺T 细胞进入纯化程序。通过抗-CD8 抗体的单染色后的流式细胞术, 成功地控制了 CD8⁺T 细胞的纯化。抗-CD28 抗体的单染色证实了 CD8⁺T 细胞制品中缺乏 CD11b⁺细胞, 因为 CD11b 阳性的 CD8⁺T 细胞总是 CD28 阴性的, 反之亦然。

通过与鼠单克隆的抗-CD45RO 抗体(PharMingen, UCHL-1, 31301)培育, 接着与偶联了多克隆的绵羊抗-小鼠 Ig 抗体(Dynal, 100.01)的磁珠培育, 可从纯化的 CD8⁺T 细胞中除去 CD45RO⁺细胞。用抗-CD45RA/抗-CD45RO 双染色后, 进行流式细胞术测定, 证实了剩余的原初 CD8⁺T 细胞的纯度>95%。每 500ml 外周血的原初 CD8⁺T 细胞的平均产量是 5×10^6 (CD8)。

如下进行使用原初 CD8⁺T 细胞进行体外引发实验: 将 25,000 个转染了 EpCAM 的 CHO 细胞在 96 孔平底培养板中培育 2 小时, 该培养板已经被以 1: 1000 稀释在 PBS 中的多克隆的兔抗-小鼠 IgG1 抗体(Dako, Z0013)包涂过夜。在细胞粘附到塑料上后, 以 14,000 拉德的辐射剂量辐照它们。接着, 将纯化的原初 CD8⁺T 细胞加到 RPMI 1640 培养基中, 每孔 50,000 个, 该培养基补充了 10% 人 AB 血清、100U/ml 青霉素、100mg/ml 链霉素、2mM 谷氨酰胺、1mM 丙酮酸钠、10mM HEPES 缓冲液、1X 非必需氨基酸(Gibco)和 50 μ M β -巯基乙醇。将 WO9925818 中所述的 EpCAM 特异的 B7-1/4-7 单链构建物(实施例 7)以 500ng/ml 与 1 μ g/ml 鼠 IgG1 同种型对照(Sigma, M-7894), 以及 250g/ml、50ng/ml 的双特异性单链抗体(bsc)EpCAM $\times$ CD3 一起加入, 或者不加入双特异性单链抗体 (Mack(1995), Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 92: 7021)。B7-1/4-7 单链构建物的 500ng/ml 浓度是使该构建物自身不影响 CD8⁺T 细胞上 CD45-同种型表达的最大浓度。在平行实验中, 也使用相同浓度和组合的 bsc EpCAM $\times$ CD3 和 B7-1/4-7 单链构建物, 但是用 Moretta 博士(Genova, Italy)友情提供的含有鼠 NKG2D 特异性 IgG1 抗体 BAT221 的稀释的杂交瘤上清液(最终浓度为 1 μ g/ml)代替 IgG1 同种型对照。或者, 可将

NKG2D 特异性单克隆抗体换成与 NKG2D 和 EpCAM 结合的双特异性抗体(如 SEQ ID 47-49 和 CEQ ID 72-79)。与单克隆抗体相反, 双特异性抗体被固定在固体支持物上。

所有的实验使用相同的孔进行 3 次。此外, 制备两组相同的 96 孔平板, 以
5 确保在第 3 和第 6 天有足够的细胞用于流式细胞术分析。在第 3 天, 从一个 96 孔平板中收集上清液, 使用市售获得的 ELISA 试剂盒(PharMingen, 2600KK)测定 TNF- α 浓度。同时也收集细胞, 并进行 CD45-同种型表达的流式细胞术分析。此外, 从第二块 96 孔平板的各孔中取出一半上清液, 代之以新鲜配制的培养基, 此培养基中 B7-1/4-7 单链构建物、bsc EpCAM $\times$ CD3、BAT221 和/或同种型对照的
10 浓度调整到相应的浓度。第 6 天, 收集这块平板的细胞, 通过流式细胞术分析它们的 CD45-同种型表达模式。通常, 将从 3 个相同的孔(3 倍)中获得的细胞和上清液汇集在一起, 分别用于流式细胞术分析及细胞因子分析。

在 FACSscan(Becton Dickinson)上进行流式细胞术分析。在冰上用偶联了 PE 的单克隆的抗-CD45RA 抗体(Coulter, 2H4, 6603904)和偶联了 FITC 的单克隆的
15 抗-CD45RO 抗体(DAKO, UCHL-1, F 0860)对 1×10^5 个细胞复染色 30 分钟, 以对 CD45-同种型表达进行流式细胞术分析。用偶联了三色(Tricolor)的单克隆的抗-CD8 抗体(Medac, MHC0806)和偶联了 FITC 的单克隆的抗-CD28 抗体(Medac, MHCD2801)进行单染色, 对 T 细胞纯化同样进行流式细胞术检测。

在这些引发实验中, 主要的信号由双特异性单链抗体(bscAb)EpCAM $\times$ CD3
20 所介导, 从而模拟了通过 T 细胞受体(TCR)的特异性抗原识别; 第二信号或共刺激信号由 EpCAM 特异性 B7-1/4-7 单链构建物通过 T 细胞上的 CD28 的参与而介导。因此, 可测定 NKG2D 指导的抗体对原初 CD8⁺T 细胞的引发的影响, 这种影响可通过与 TCR 类似的信号和共刺激信号激活。使用了非人类的具有 EpCAM 特异性构建物的刺激细胞, 以避免背景信号, 这种背景信号由于人的刺激细胞偶然
25 表达共刺激受体而产生。在第 3 天和第 6 天通过流式细胞术监测 T 细胞引发的动力学, 同时测定 CD45RA 和 CD45RO 的表达。如图 6 所示, 在 6 天内, 在 B7-1/4-7 单链构建物(500ng/ml)和 bscAb EpCAM $\times$ CD3(250ng/ml)的存在下, 几乎整个种群的原初 T 细胞都将 CD45 表型转变成引发的 T 细胞的表型, 即 CD45RA⁻/RO⁺。因此, 在第 3 天可观察到中间状态。令人惊讶的是, 额外存在的 NKG2D 指导的抗
30 体进一步加速了原初 CD8⁺T 细胞的增殖和引发。如图 6B 右下象限中所示, 接受了额外的 NKG2D 信号的第 3 天的 CD8⁺T 细胞, 与仅接受与 TCR 类似的信号和

共刺激信号刺激的原初 T 细胞相比,其百分数较高,从这一点可得出上述结论。

由于 TNF- α 通常由引发的 CD8⁺T 细胞而非它们的天然对应物产生,因此,与缺乏 NKG2D 指导的抗体的条件下引发的 TNF- α 的量相比,在第 3 天在接受了 NKG2D 信号的 CD8⁺T 细胞的上清液中测得较高浓度的 TNF- α 证实了增强的 T 细胞引发的效果(图 7)。

即使在第 6 天引发过程基本上完成的情况下,在该天测得的流式细胞术分析结果(图 6C 和 E)显示出 T 细胞引发的 NKG2D 介导的支持作用:所测得的位于图 6C 右下角区域中的 CD8⁺T 细胞的较高百分数表明,在 NKG2D 介导的信号存在的条件下,6 天内 CD45RA 表达的损失比不存在该信号的情况下要多得多。

实施例 6: NKG2D 指导的抗体分别通过 TCR 复合物或 Fc γ RIII-复合物的参与增强了 CD8⁺T 细胞和 NK 细胞引发的细胞毒性

为了测试通过 NKG2D 指导的抗体对细胞毒性淋巴细胞(即 CD8⁺T 细胞和 NK 细胞)的召集,我们使用鼠 Fc γ R-阳性 P815 细胞系作为靶细胞,用 Melan-A 特异性人 CD8⁺T 细胞克隆(Melan-A 细胞)或者 NKL 细胞 (Bauer(1999), Science, 285: 727) 作为效应器,进行 ⁵¹Cr 释放试验。对 Mack(1995), Proc Natl Acad Sci USA, 92: 7021 所述的方法作小的改动,然后进行测定细胞毒性的 ⁵¹Cr 释放试验。在圆底微滴定板上的每个孔中使 10,000 个标记了 ⁵¹Cr 的 P815 细胞与 50,000 个 Melan-A 细胞或 200,000 个 NKL 细胞混合。将 NKL 细胞在 5 μ g/ml CD16 抗体(3G8)的和/或含有鼠 NKG2D 特异性单克隆抗体 BAT221 的稀释的杂交瘤上清液的存在下培育 4 小时。将 Melan A 细胞在 0.2 μ g/ml CD3 抗体(OKT3)和/或稀释的 BAT221-上清液的存在下培育 4 小时。用 Maly 缓冲液(2%SDS/0.37%EDTA/0.53%Na₂CO₃)裂解靶细胞,以测定最大的 ⁵¹Cr 释放。用在缺乏效应细胞和抗体的条件下培育的靶细胞测定自发的 ⁵¹Cr 释放。将在缺乏抗体的条件下与效应细胞培育的靶细胞用作阴性对照。以 ((cpm, 试验释放)-(cpm, 自发释放)) / ((cpm, 最大释放)-(cpm, 自发释放)) 计算特异性裂解。使用三份样品进行细胞毒性试验。如图 8 所示,与已出版的 NKG2D 抗体的资料 (Bauer (1999), Science, 285: 727) 相比, BAT221 自身并不诱导任何大量的靶细胞裂解。如所预期的那样,所诱导的 CD16 抗体和 CD3 抗体分别使 NKL 细胞和 Melan A 细胞再指导了靶细胞裂解。但是,虽然 BAT221 本身不是细胞毒性的,但它通过 Melan A 细胞上的 TCR 复合物和 NKL 细胞上的 Fc γ RIII 复合物的参与令人惊讶地增强了所引发的靶细胞的细胞毒性。

或者,可使用如 EpCAM 阳性 Kato 细胞取代 P815 细胞,将 NKG2D 特异性单克隆抗体换成与 NKG2D 和 EpCAM 结合的双特异性抗体(如 SEQ ID 47-49 和 72-79)。CD8⁺T 细胞上的 TCR 复合物可与 CD3 和靶细胞上的表面抗原结合的双特异性抗体结合,或者与特异性 TCR 识别的经加工的 MHC I-络合的靶细胞抗原结合。NK 细胞上的 FcγRIII 复合物可与与 CD16 和靶细胞上的表面抗原结合的双特异性抗体结合,或者与通过其 Fc 部分结合于 FcγRIII 的靶细胞特异性单克隆抗体(如人 EpCAM 抗体)结合。

实施例 7: 在靶结合位点的 C 末端具有 NKG2D 结合位点的双特异性单链抗体

如实施例 2 所述,用人 NKG2D 遗传免疫 5 只 Balb/c 小鼠。为了鉴别具有人淋巴细胞表面上类似 NKG2D 受体复合物的表达模式的血清抗体反应性的小鼠,使用 1: 10、1: 20 和 1: 40 稀释的小鼠血清在 PBMC 上进行实施例 2 所述的三色荧光分析。如图 9 所示,仅有一只小鼠的血清(4 号)显示强的 CD8⁺T 淋巴细胞和 NK 细胞染色。如 WO9925818(实施例 6)所述,将该小鼠的脾细胞用作构建组合抗体库的免疫球蛋白的所有组成成分。该克隆的抗体的所有组成成分在丝状噬菌体上展示为 N2-VH-VL-融合蛋白,模拟双特异性单链抗体内相应的抗原结合位点的 C 末端位置。如 WO9925818 中所述的用于 17-1A 抗原或 EpCAM 抗原的方法,通过在固定化重组 NKG2D-蛋白质上进行两轮的文库淘选,对 NKG2D 反应性 scFv 片段进行选择,接着在 NKG2D 阳性 NKL 细胞上进行 3 轮淘选。在 PBS/10 %FCS 中,使 $2-5 \times 10^6$ 个 NKL 细胞再悬浮在 500μl 噬菌体悬浮液中,接着在 4℃ 适度摇动 45 分钟,从而进行细胞淘选。然后,用台式离心机中离心细胞和结合的噬菌体颗粒(2500rpm, 2 分钟)。然后,将所得的颗粒再悬浮在 1ml 的 PBS/10%FCS,然后再离心,重复一回这样的操作,从而洗涤这些颗粒(即第三轮的淘选)。第 4 轮淘选中进行 3 次洗涤步骤,第 5 轮淘选中进行 5 次洗涤步骤。通过在 500μl HCl-甘氨酸中再悬浮和培育 10 分钟,接着用 30μl 2M Tris-碱(pH12)中和,从 NKL 细胞中洗脱出特异性结合的噬菌体颗粒。使用该洗脱液感染新的未受感染的大肠杆菌 XL1 Blue 培养物。在 5 轮的噬菌体生产和接着对结合抗原的具有 scFv 的噬菌体的选择后,在第 4 轮和第 5 轮分离出大肠杆菌培养物中的质粒 DNA。对于在其 N 末端携带 N2 结构域的可溶性 scFv-抗体片段的生产,使用 SpeI/NotI 切除编码 geneIII 产物的 CT 结构域的 DNA 片段,以侧接 N 末端 Ig-铰合部区和 C 末端 Flag 表位的人 p53 (Rheinnecker (1996), J Immunol., 157: 2989) 的四聚体结构域(图

10, SEQ ID 50 和 51)取而代之。连接后,将所得的质粒 DNA 库转化到 100 μ l 的热激感受态大肠杆菌 XL1 Blue 细胞中,然后涂布在羧苄青霉素 LB-琼脂平板上。进行筛选-PCR,以检测克隆的 VH 区域和 VL 区域完整的单个集落,然后如 WO9925818(实施例 6)所述,将那些具有完整的可变区的细胞用于可溶性抗体片段的周质体表达。在固定化重组 NKG2D 上通过 ELISA 测试周质体制品,并使用偶联了过氧化物酶的抗-Flag M2 抗体(Sigma, A-8592)检测特异性结合 N2-scFv-p53 融合蛋白质。如图 11 所示,可鉴别出从第 4 轮和第 5 轮淘选中得到的许多 NKG2D 反应性克隆。用 BspEI 从噬菌体展示载体中切下阳性克隆的编码 scFv 的片段,然后将其亚克隆到质粒载体 BS-CTI(参见 WO 00-06605, 图 2)中,该载体用 BspEI 和 XmaI 消化,接着用牛肠磷酸酯酶进行脱磷酸作用而制得。使用限制酶 BspEI 和 SpeI 进行分析性消化,检测 scFv 片段的正确取向。通过插入 BS-CTI 中,该编码 scFv 的片段按计划被融合到 His₆-标记物(SEQ ID 52-71)中。接着,如 Mack(1995), Proc Natl Acad Sci USA, 92: 7021 中所述,用 BspEI 和 SalI 从 BS-CTI 上切下 scFv 片段,将 BspEI/SalI 片段亚克隆到哺乳动物表达载体 pEF-DHFR 中,此载体含有 EpCAM 特异的、CD3 指导的双特异性单链抗体,但是,已用以高亲和力与 EpCAM 结合的单克隆抗体 3B10 取代 EpCAM 特异性单克隆抗体 M79 的 scFv 片段(=bsc 3B10 $\times$ CD3)。因此,该 CD3 特异的 scFv 片段被 NKG2D 反应性 scFv 片段取代,产生 EpCAM 特异的 NKG2D 指导的双特异性单链抗体(SEQ ID 72-79)。

20 选择 CHO/dhfr 细胞用作抗体样分子的瞬时表达。根据制造商的方法,使用 TransFast 转染剂(Promega, Heidelberg)进行细胞的转染。简言之,在转染前 20 小时,在 6 孔平板的每个孔中接种 2.5×10^5 个细胞。通过将 6 μ g 具有抗体序列的质粒 DNA 或 β -半乳糖苷酶基因加到没有添加剂的 1ml MEM α 培养基中,从而制得转染混合液。在混合 30 μ l 后,加入 TransFast 试剂。使该混合液在室温下涡旋培育 15 分钟。然后,从细胞中移去培养基,用转染混合液替换。在 37 $^{\circ}$ C 培育 1 小时后,吸出该转染混合液,加入新鲜配制的完全 MEM α 培养基。转染后 4-5 天,采用 FACS 分析法分析蛋白质的生产。在 4-5 天之后收集上清液。为了去除细胞碎片,将上清液离心。在 Kato III 细胞上的抗-EpCAM 特异性部分的结合研究中分析了抗体的功能。将每份样品,即 4×10^5 个细胞,培育在 75 μ l 经 25 μ l FACS 缓冲液(1%热灭活 FBS、0.05%Na₃N 在 PBS 中的溶液)稀释的转染的细胞上清液中。将这些样品在 4 $^{\circ}$ C 培育 30 分钟。用 200 μ l FACS 缓冲液洗涤细胞两次后,细

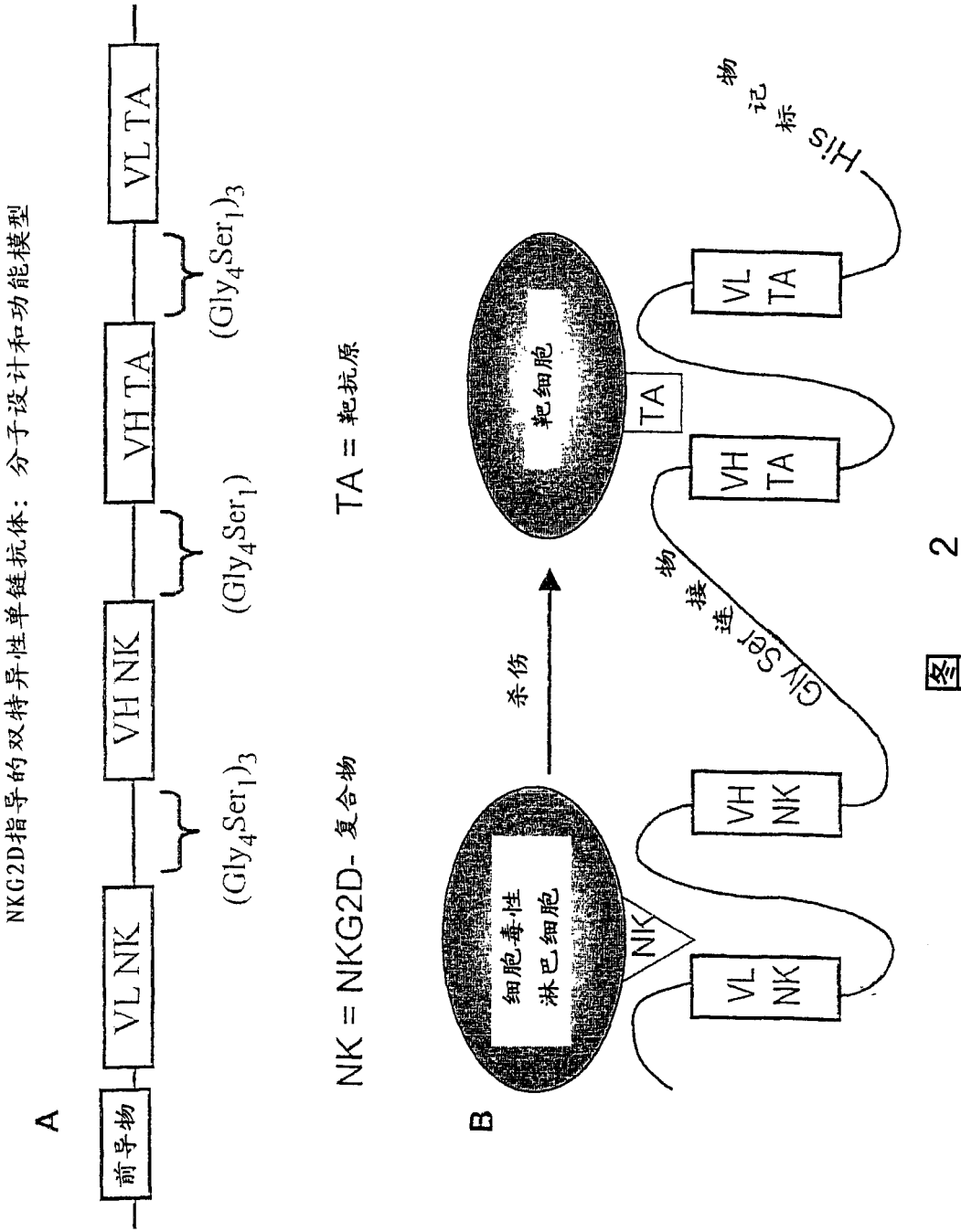
胞在 4℃ 与 2μg/ml 的抗-Penta.His 抗体(QIAGEN, Netherlands)培育 30 分钟。接着, 再次洗涤细胞, 然后与绵羊抗-小鼠 FITC 偶联物(SIGMA, Deisenhofen)培育 30 分钟。使用 FACS Calibur (Becton-Dickinson)检测结合(图 12)。在固定化重组 NKG2D-抗原上, 瞬时转染了 bsc 3B10×P4-3 和 bsc 3B10×P5-2 的 CHO 细胞的上清液显示 5 出阳性的 ELISA 信号(图 13)。作为 NKG2D 的另一选择, 可使用实施例 4 所述的 DAP10-肽偶联物免疫小鼠, 如本实施例所述, 经免疫的小鼠的脾细胞可用作构建重组抗体库的免疫球蛋白所有组成成分的来源。因此, 也可通过在固定的肽偶联物和/或表达 NKG2D 受体复合物的细胞上进行文库淘选, 从而选择出即使当靶结合位点的 C 末端定位于双特异性单链抗体内时, 仍可识别 CD8⁺T 淋巴细胞和 10 NK 细胞上的 NKG2D 受体复合物的 DAP10 反应性抗体结合位点。

实施例 8: 通过具有位于靶结合位点的 C 末端的 NKG2D 结合位点的双特异性单链抗体召集 CD8⁺T 效应细胞和 NK 效应细胞

为了测试通过 NKG2D 指导的双特异性抗体对细胞毒性淋巴细胞(即 CD8⁺T 15 细胞和 NK 细胞)的召集, 我们使用胃癌细胞系 Kato 作为靶细胞, 用 Melan-A 特异性人 CD8⁺T 细胞克隆(Melan-A 细胞)或者 NKL 细胞 (Bauer(1999), Science, 285: 727) 或从健康的供体获得的未刺激的 PBMC 作为效应器, 进行 ⁵¹Cr 释放试验。

对 Mack(1995), Proc Natl Acad Sci USA, 92: 7021 所述的方法作小的改动, 然后进行测定再指导针对 EpCAM 阳性 Kato 细胞的细胞毒性的 ⁵¹Cr 释放试验。在 20 圆底微滴定板上的每个孔中使 10,000 个标记了 ⁵¹Cr 的 Kato 细胞与 50,000 个 Melan-A 细胞或 200,000 个 NKL 细胞混合, 在从 CHO 细胞中得到的稀释成 1: 2 的培养物上清液的存在下培育 4 小时(Melan A 细胞或 NKL 细胞)或 18 小时(PBMC), 该 CHO 细胞已被实施例 8 所述的不同 EpCAM 特异性的 NKG2D 指导的双特异性单链抗体(3B10×P4-3、3B10×P4-14、3B10×P5-2 和 3B10×P5-23)转 25 染。使用 Maly 缓冲液(2%SDS/0.37%EDTA/0.53%Na₂CO₃)裂解靶细胞, 以测定最大的 ⁵¹Cr 释放。使用在缺乏效应细胞和双特异性抗体的条件下培育靶细胞的测定自发的 ⁵¹Cr 释放。将在缺乏抗体的条件下与效应细胞培育的靶细胞用作阴性对照。以 [(cpm, 试验释放)-(cpm, 自发释放)] / [(cpm, 最大释放)-(cpm, 自发释放)] 计算特异性裂解。使用三份样品进行细胞毒性试验。如图 14 所示, 在 4 小时的 ⁵¹Cr 30 释放试验中, 瞬时转染了 NKG2D 指导的双特异性单链抗体 3B10×P4-3 的 CHO 细胞的上清液, 使 Melan A 细胞和 NKL 细胞引发了弱的但可再现且可滴定的

EpCAM 阳性的 Kato 细胞的细胞裂解。此外，在 18 小时的 ^{51}Cr 释放试验中，分别瞬时转染了 NKG2D 指导的双特异性单链抗体 3B10×P4-3、3B10×P4-14、3B10×P5-2 和 3B10×P5-23 的 CHO 细胞的上清液，使 PBMC 引发了大量的靶细胞裂解(图 15)。



抗NKG2D (8R23) × 抗-EpCAM (4-7) 的双特异性单链抗体的SDS-PAGE

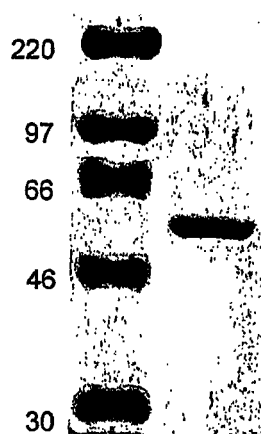
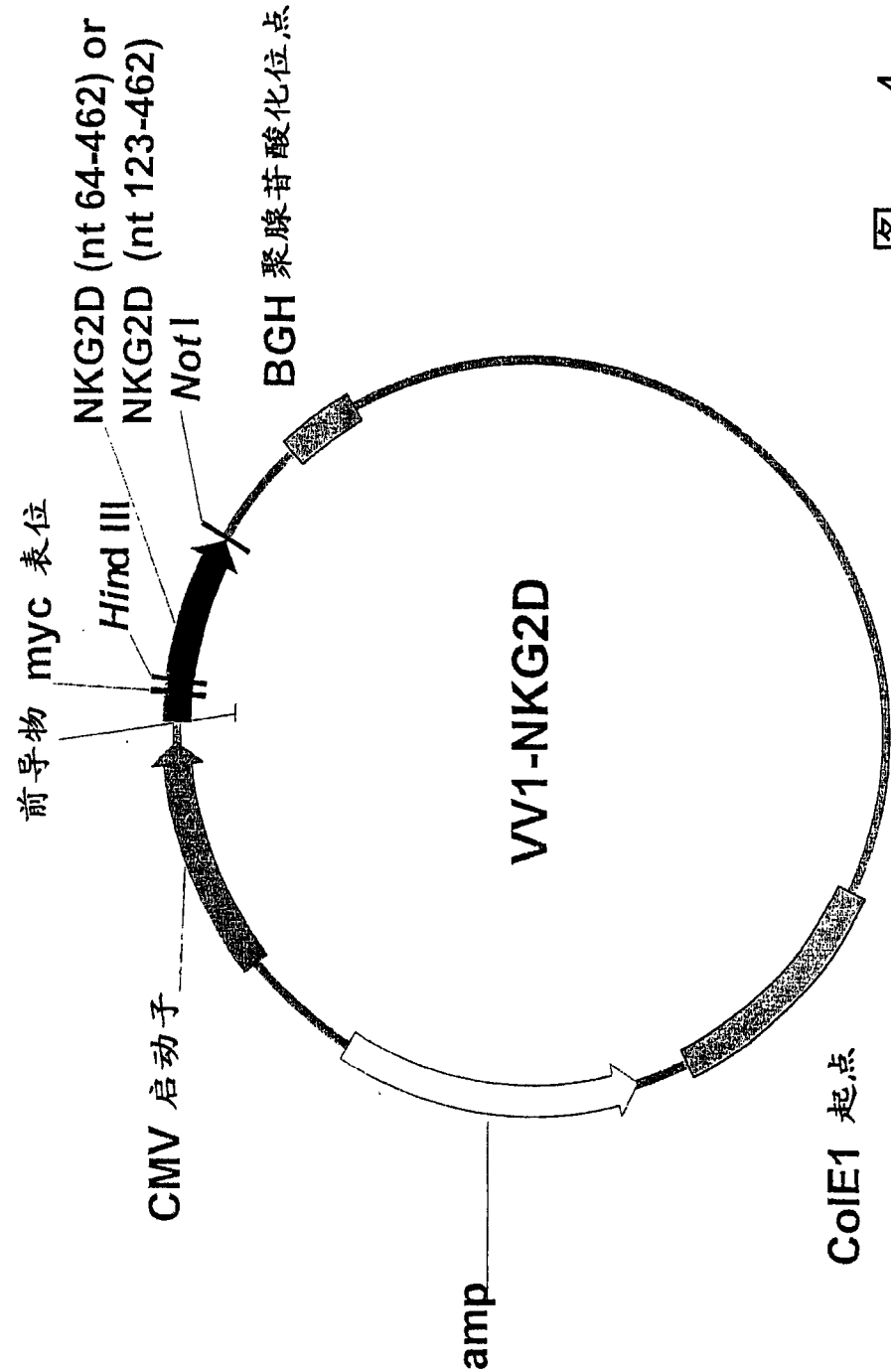


图 3

用于遗传免疫的人NKG2-D的分泌的羧基末端片段的表达的构建



图

4

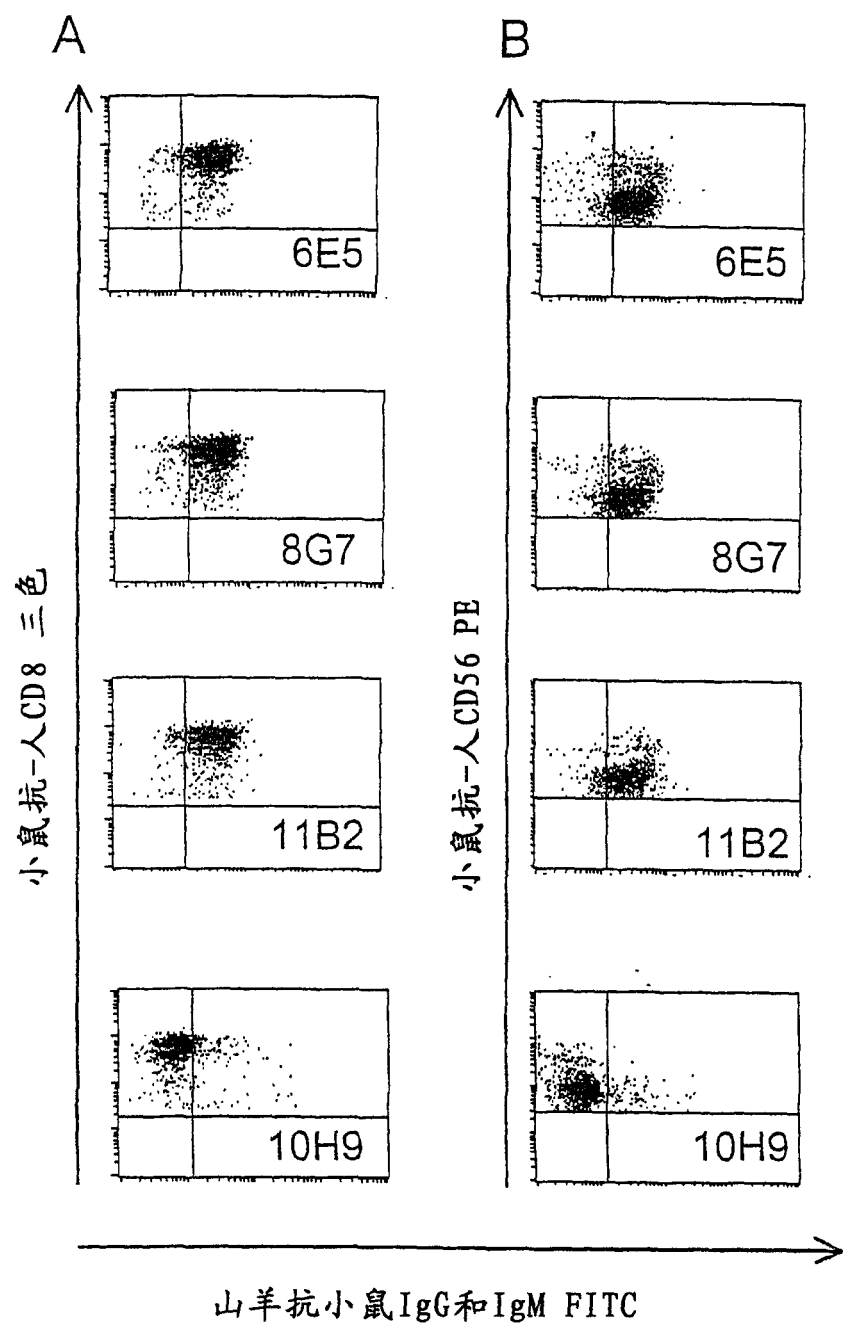
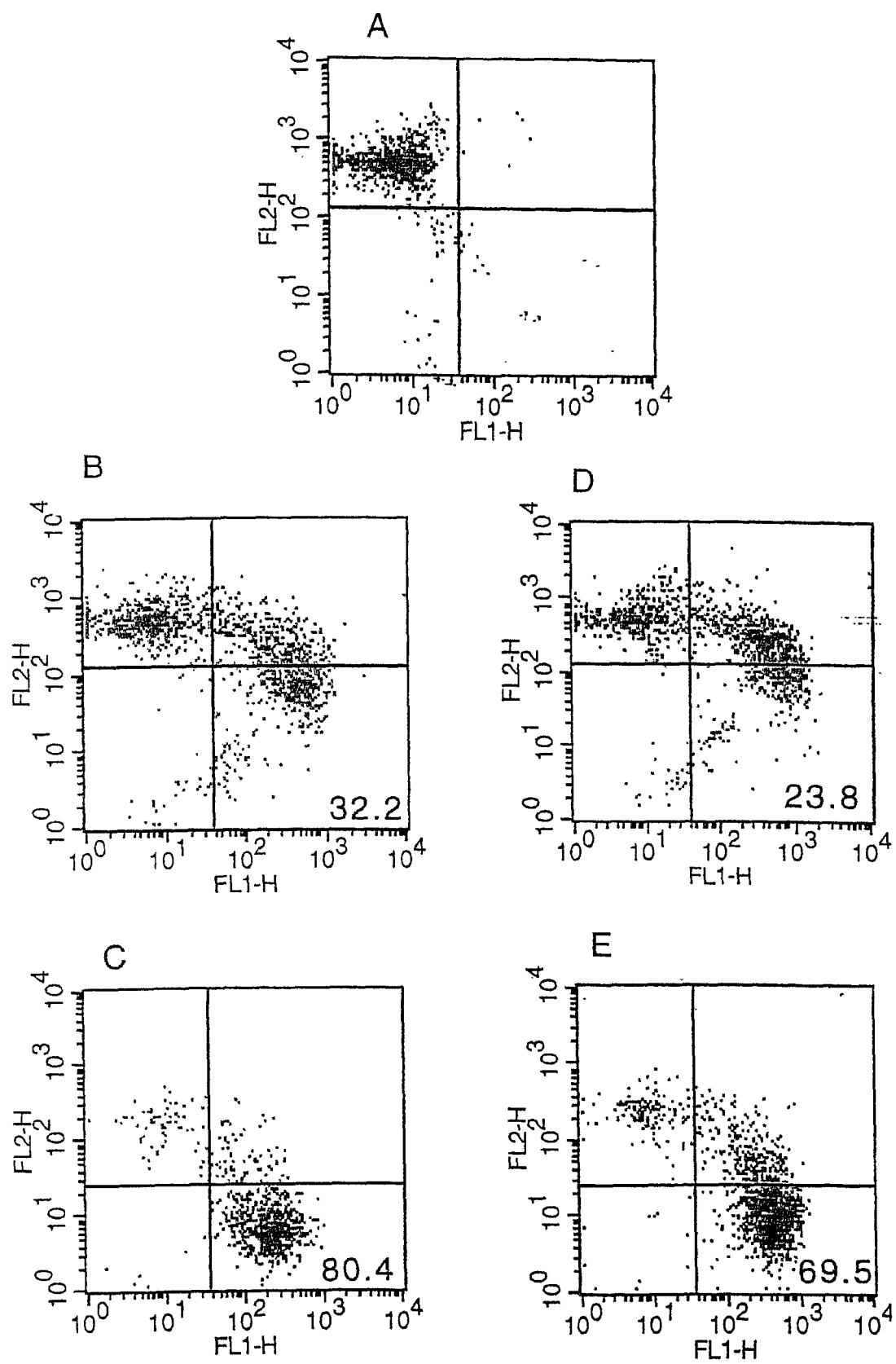


图 5



图

6

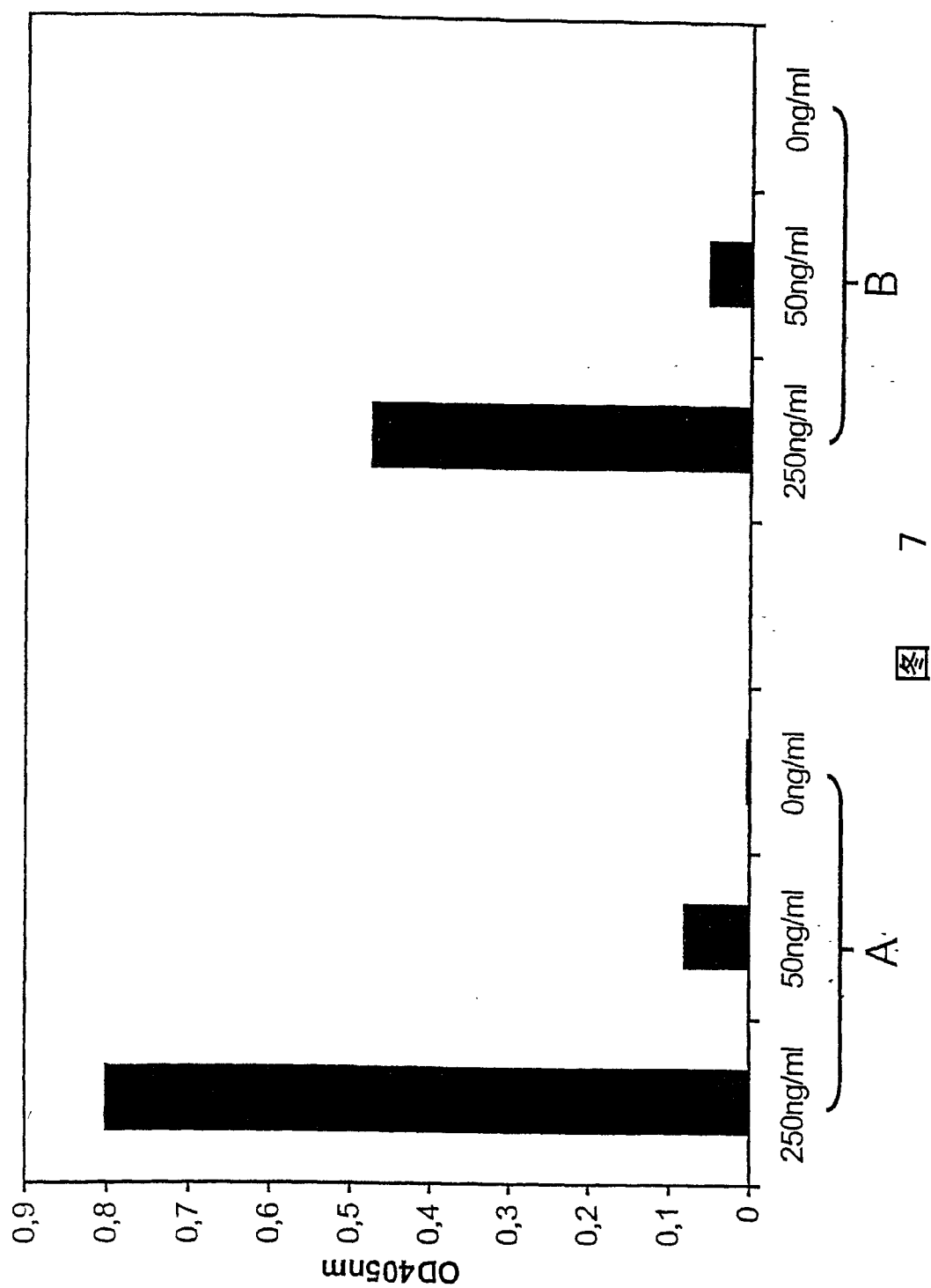
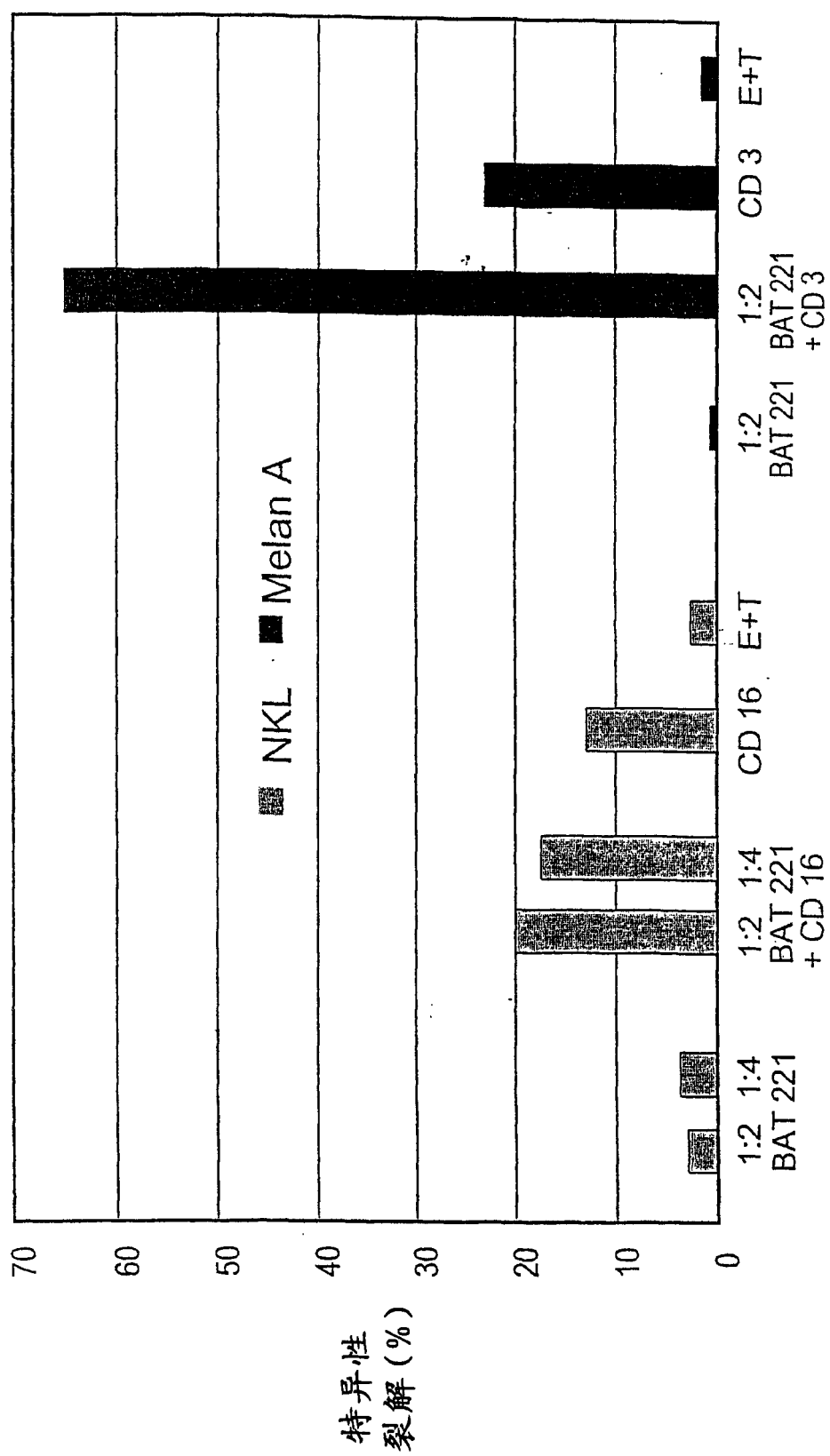


图 7



8

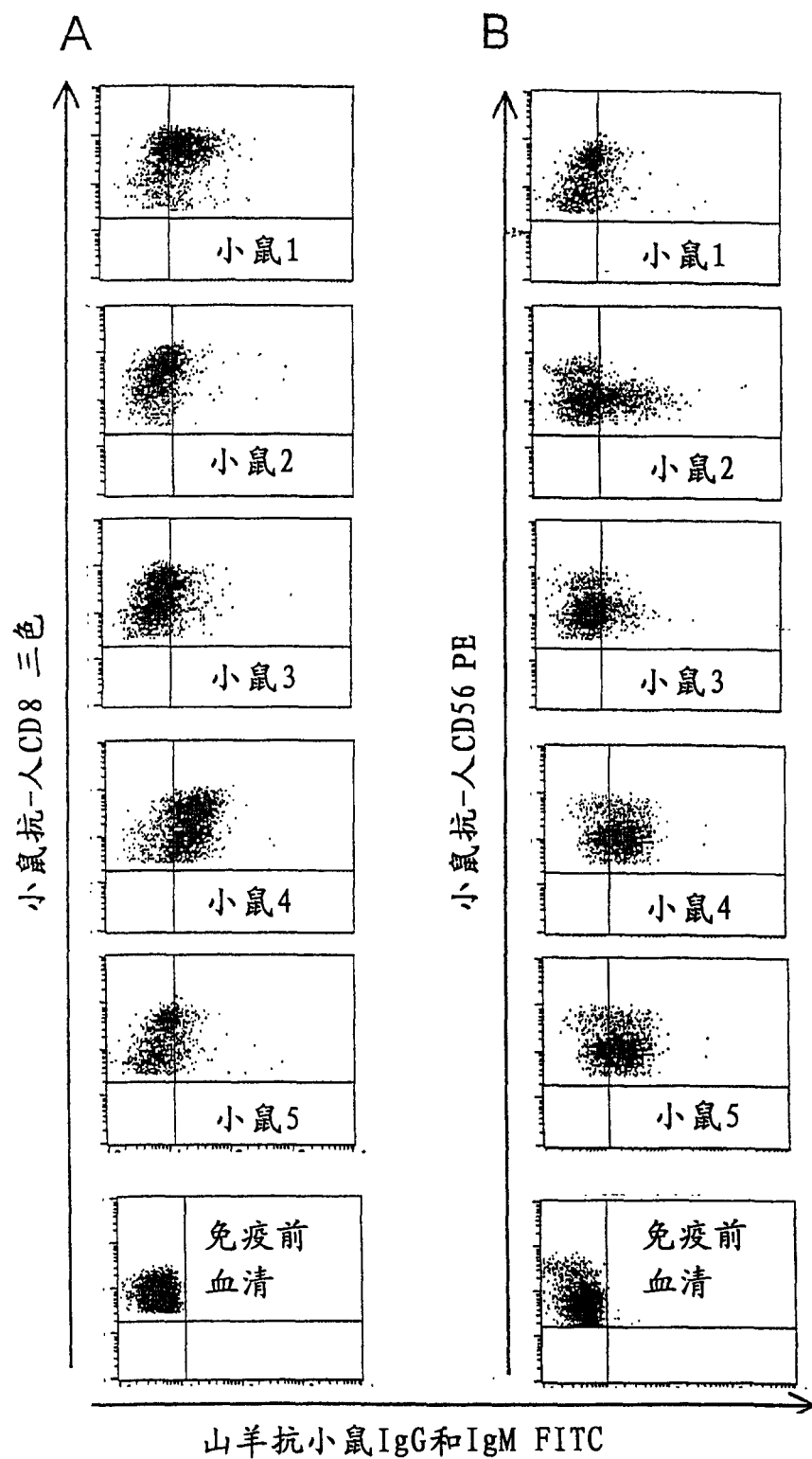


图 9

噬菌粒设计

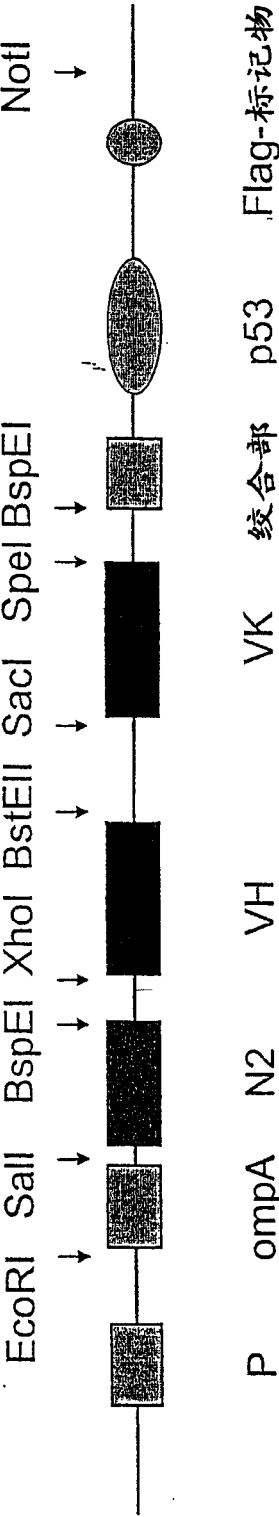


图 10

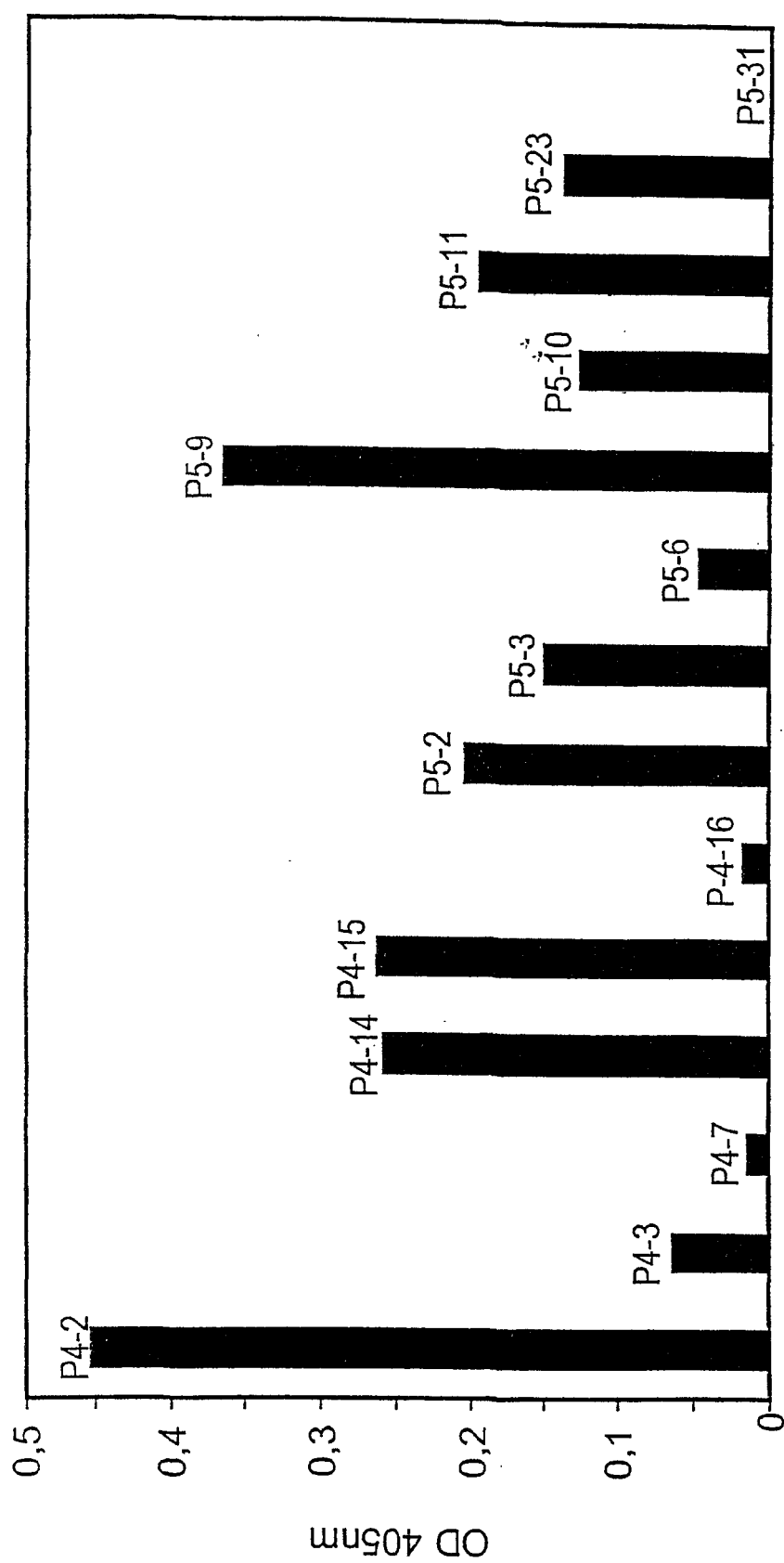


图 11

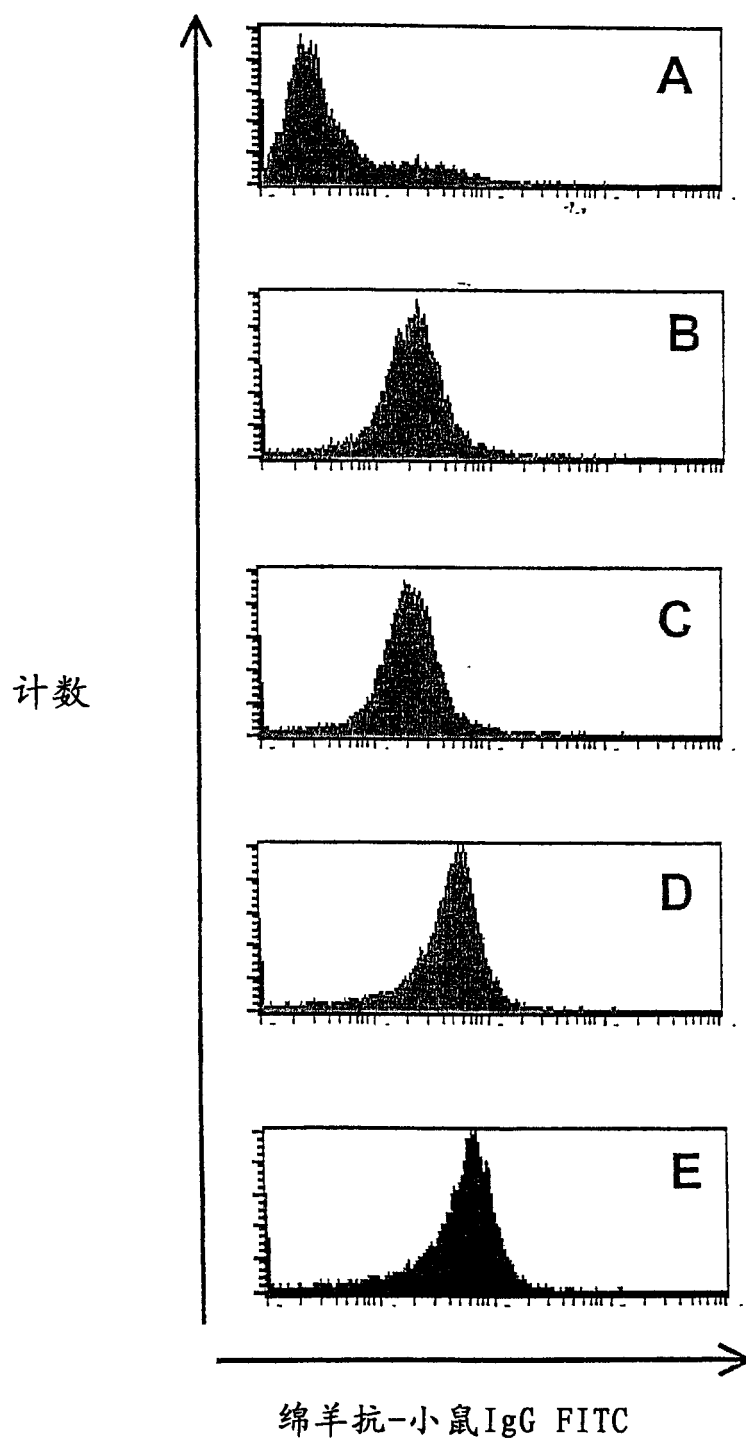


图 12

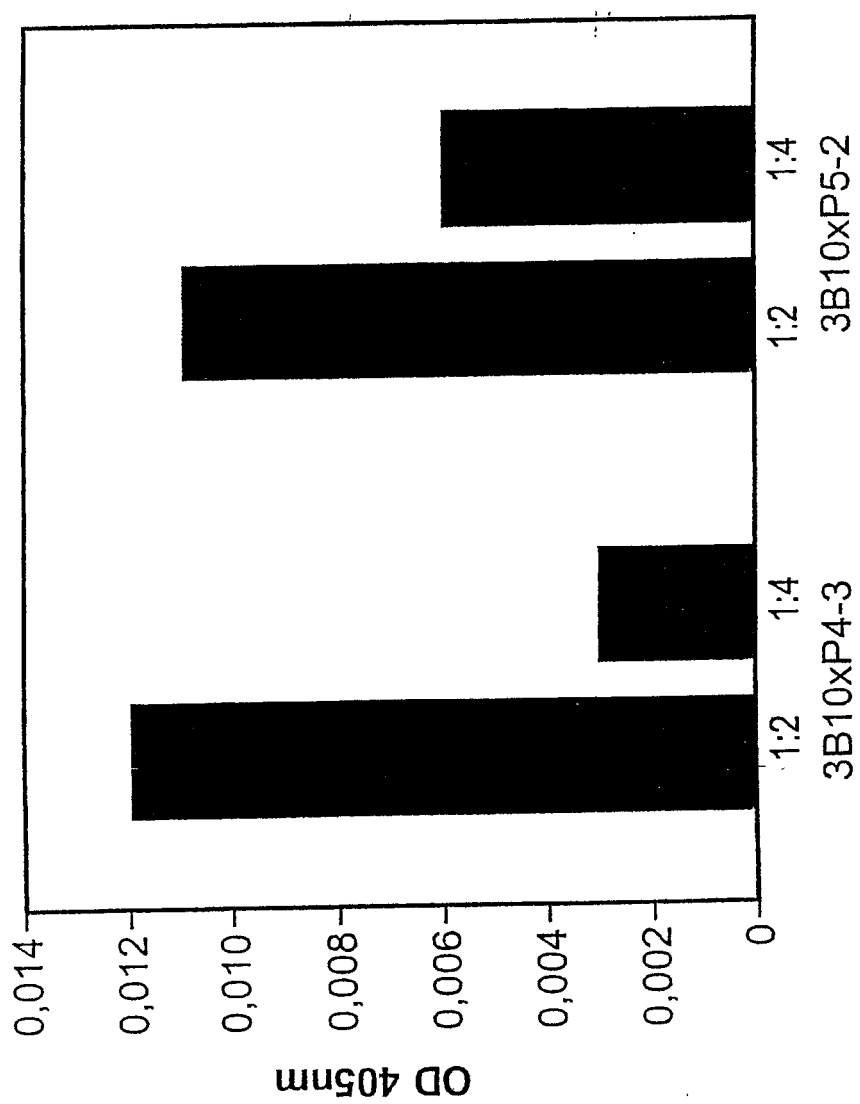


图 13



图 14

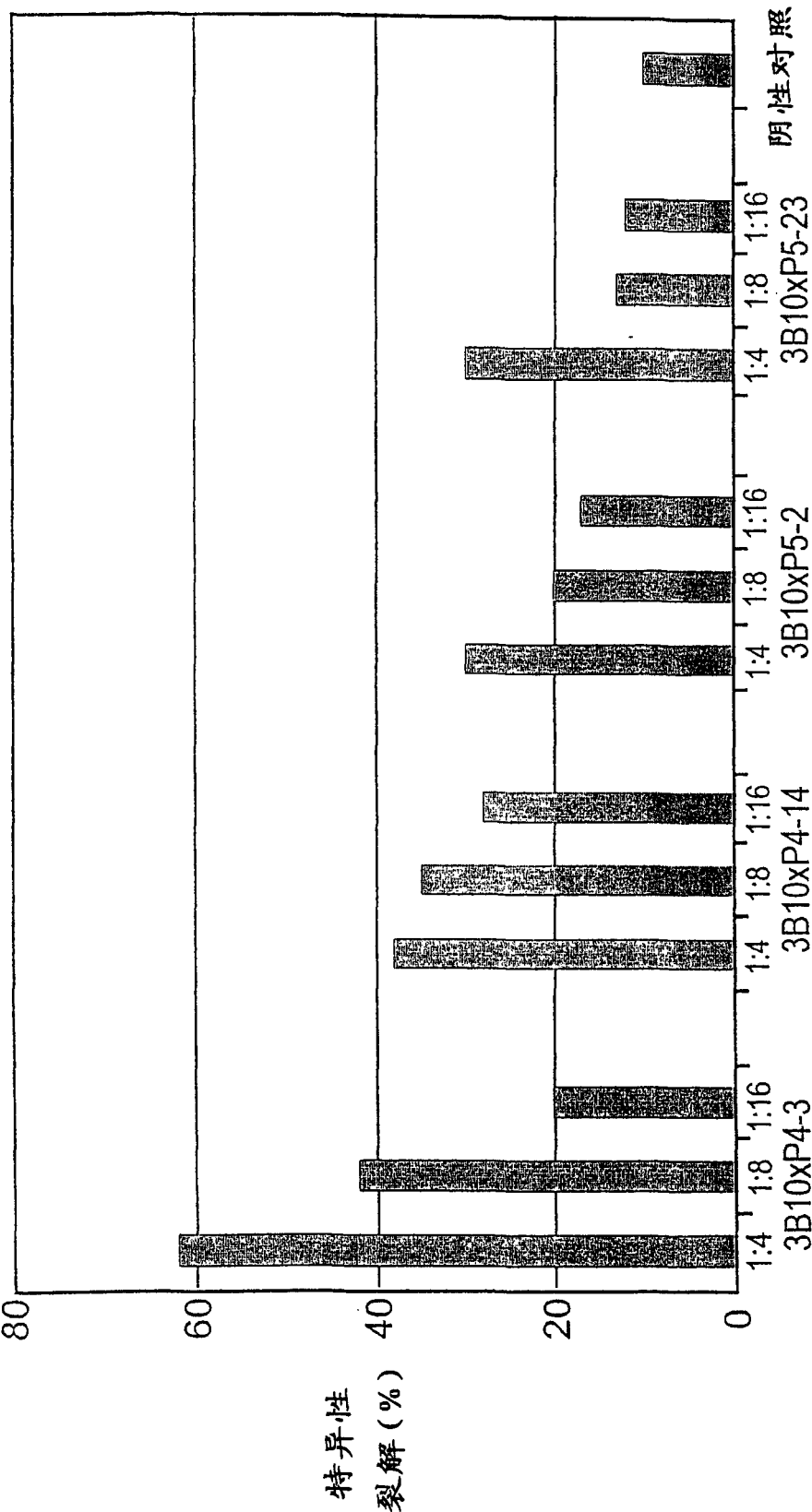


图 15

序列号	描述	序列类型	序列
1	人NKG2D 细胞外结 构域	NN	ttattcaaccaagaagttcaaattcccttgaccgaaa gttactgtggcccatgtcctaaaaactggatatgttac aaaaataactgctaccaatttttgatgagagtaaaa actggtatgagagccaggcttctgtatgtctcaaat gccagccttctgaaagtatacagcaaaggaggacc aggatttactaaactggggaagtcatacattggatg ggactagtaacacattccaacaaatggatcttggcag tggaagatggctccattcttcacccaacctactaa caataattgaaatgcagaaggaggagactgtgcactc tatgcctcgagctttaaaggctatatagaaaactgttc aactccaaatacatacatctgcatgcaaaggactgt gtccgggcatcatcaccatcatcat
2	人NKG2D 细胞外结 构域	AA	LFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYK NNCYQFFDESKNWWYESQASCMSQN ASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMG LVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIIE MQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTY ICMQRTVSGHHHHHH
3	人NKG2D 细胞外 片段1 (核苷酸 64-462)	AA	NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNN CYQFFDESKNWWYESQASCMSQNAS LLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLV HIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQ KGDALYASSFKGYIENCSTPNTYIC MQRTV
4	人NKG2D细胞 外片段2 (核苷酸 123-462)	AA	WICYKNNCYQFFDESKNWWYESQASC MSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYH WMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNL LTIIEMQKGDALYASSFKGYIENCST PNTYICMQRTV
5	人DAP10 细胞外 结构域	AA	QTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCQ SLSLP
6	人DAP10 细胞外 片段	AA	QTPGERSSLPAFYPGTSGSC

图

16

7	抗-NKG2D 杂交瘤 11B2D10 可变轻链	NN	gacattcagctgacccagctctccagcctccctatctg catctgtgggagaaactgtcaccatcacatgtcgag caagtgggaatattcacaattatttagcttggtatcag cagaaacagggaaaatctcctcaggtcctggtctat aatgcaaaaaccttagcagatggtgtgccatcaag gttcagtgccagtggtatcaggaacacaatattctctc aagatcaacagcctgcagcctgaagattttgggagt tattactgtcaacatttttgagtgactacgtggacgttc ggtggaggggaccaagctggagatcaaa
8	抗-NKG2D 杂交瘤 11B2D10 可变轻链	AA	DIQLTQSPASLSASVGETVTITCRASG NIHNYLAWYQQKQKGKSPQVLVYNAK TLADGVPSRFSGSGSGGTQYSLKINSL QPEDFGSYQCQHFWSSTTWTFTGG GTKLEIK
9	抗NKG2D 杂交瘤11B 2D10可变 轻链CDR1	AA	RASGNIHNYLA
10	抗NKG2D 杂交瘤11B 2D10可变 轻链CDR2	AA	NAKTLAD
11	抗NKG2D 杂交瘤11B 2D10可变 轻链CDR3	AA	QHFWSSTWT
12	抗NKG2D 杂交瘤11B 2D10可变 重链	NN	caggtccaactgcagcagctctggacctgagctggt gaggcctggggcttcagtgaagctgtcctgcaagg ctctggctacacgttcaccagctactggatgaactg gggtcagcagaggcctgagcaaggccttgagtgga ttggaaggattgatccttacgatagtgaactcacta caatcaaaaagttcaaggacaaggccatattgactgt agacaaatccgccagcacagcctacatgcaactc agcagcctgacatctgaggactctgcggctctattact gtgcaaaaatgggtgattactccttgactactgggg ccaaggggaccacggtcaccgtctcctca
13	抗NKG2D 杂交瘤11B 2D10可变 重链	AA	QVQLQQSGPELVRPGASVKLSCKAS GYTFTSYWMNWVQQRPEQGLEWIG RIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSA STAYMQLSSLTSEDSAVYYCAKMGD YSFDYWGGQGTITVTVSS

图 16(续)

14	抗NKG2D 杂交瘤11B 2D10可变 重链CDR1	AA	GYTFTSYWMN
15	抗NKG2D 杂交瘤11B 2D10可变 重链CDR2	AA	RIDPYDSETHYNQKFKD
16	抗NKG2D 杂交瘤11B 2D10可变 重链CDR3	AA	MGDYSFDY
17	抗NKG2D 杂交瘤 6H7E7 可变轻链	NN	gacattcagctgaccagctctccagcaatcctgtctg catctccaggggagaaggcacaatgacttgagg gccagctcaagtgaagttacatgcactggtaccag cagaagccaggatcctcccccaccctggatttat gccacatccaacctggcttctggagtcctgtcgtc tcagtggcagtggtctgggacctctactctcac aatcagcagagtggaggctgaagatgctgccactt attactgccagcagtggaatagtaaccgcgtcacgt tcggtgctgggaccaagctggagatcaaa
18	抗NKG2D 杂交瘤 6H7E7 可变轻链	AA	DIQLTQSPAILSASPGEKVTMTCRAS SSVSYMHYQQKPGSSPKPWYATS NLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRV EAEDAATYYCQQWNSNPLTFGAGTK LEIK
19	抗NKG2D 杂交瘤 6H7E7 可变轻链 CDR1	AA	RASSSVSYMH
20	抗NKG2D 杂交瘤 6H7E7 可变轻链 CDR2	AA	ATSNLAS
21	抗NKG2D 杂交瘤 6H7E7 可变轻链 CDR3	AA	QQWNSNPLT

图 16(续)

22	抗NKG2D 杂交瘤 6H7E7 可变重链	NN	cagggtgcagctgcaggagtcaggacctggcctggt ggcgccctcacagagcctgtccatcactgcaactgt ctctgggtttcattaaccagctatggtgtacactggat tcgccagcctccaggaaagggctctggagtggctgg gagtaatatgggctggtggaagcacaattataatt cggctctcatgtccagactgagcatcagcaaagac aactccaagagccaagttttcttaaaaatgaatagtc tgcaaattgatgacacagccatgtactactgtgcca gaggggggtacgagggggcggcctggtttggttac tggggccaaggaccacgggtcacccgtctcctca
23	抗NKG2D 杂交瘤 6H7E7 可变重链	AA	QVQLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSG FSLTSYGVHWIRQPPGKGLEWLGVI WAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKS QVFLKMNSLQIDDTAMYYCARGGYE GAAWFGYWGQGTTTVTVSS
24	抗NKG2D 杂交瘤 6H7E7 可变重链 CDR1	AA	GFSLTSYGVH
25	抗NKG2D 杂交瘤 6H7E7 可变重链 CDR2	AA	VIWAGGSTNYNSALMS
26	抗NKG2D 杂交瘤 6H7E7 可变重链 CDR3	AA	GGYEGAAWFGY
27	抗NKG2D 杂交瘤 8G7C10 可变轻链	NN	Gacattcagctgacccagctctccagccatcctgtct gtgagtcaggagaaagagtcagtttctctgcagg gccagtcagaccattggcacaagcattcactggtat cagcaaagaacaaatggttctcaaggcttctcata aagtatgcttctgagtctatctctgggatcccttcag gttagtggcagtggtatcaggacagattttactotta gcatcaacgggtggtgagtcgaagatattgcagatt attactgtcaacaaagtaatacctggccactcacgtt cgggtgctgggaccaagctggagatcaaa
28	抗NKG2D 杂交瘤 8G7C10 可变轻链	AA	DIQLTQSPAILSVPGERVSFSCRAS QTIGTSIHWYQQR TNGSPRL LIKYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTL SINGVE SEDIADYYCQQSNTWPLTFGA GTKLEIK

图 16(续)

29	抗NKG2D杂 交瘤8G7C10 可变轻链 CDR1	AA	RASQTIGTSIH
30	抗NKG2D杂 交瘤8G7C10 可变轻链 CDR2	AA	YASESIS
31	抗NKG2D杂 交瘤8G7C10 可变轻链 CDR3	AA	QQSNTWPLT
32	抗NKG2D 杂交瘤 8G7C10 可变重链	NN	cagggtgcagctgcagcagtcaggacctggcctagt gcagccctcacagagcctgtccatcacctgcacag tctctggtttctcattaactatctatggtgtacactgggtt cgccagctctccaggaaagggctctggagtggctggg agtgatatggagtggcgaagcacagactataatg cagcttccatatccagactgagcatcagcaaggac aattccaagcgccaagttttctttaaatagagcagctt gcaagctaatagacacagccatatattactgttccag aaagtcccatgatggttactacggagtaatggacta ctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctca
33	抗NKG2D 杂交瘤 8G7C10 可变重链	AA	QVQLQQSGPGLVQPSQSL SITCTVS GFSLTIYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI WSGGSTDYNAAFISRLSISKDNSKRQ VFFKMSSLQANDTAIYYCSRKSHDGY YGVMDYWGQGTTVTVSS
34	抗NKG2D 杂交瘤 8G7C10 可变重链 CDR1	AA	GFSLTIYGVH
35	抗NKG2D 杂交瘤 8G7C10 可变重链 CDR2	AA	VIWSGGSTDYNAAFIS
36	抗NKG2D 杂交瘤 8G7C10 可变重链 CDR3	AA	KSHDGY YGVMDY

图 16(续)

37	抗NKG2D 杂交瘤 6E5A7 可变轻链	NN	gacattcagctgacccagctctccagccatcctgtctg tgagtcaggagaaagagtcagtttctcctgcaggg ccagtcagagcatggcacaagcattcactggatc agcaaagaacaaatggttctccaaggcttctcataa agtatgcttctgagtcctatctctgggatccctccaggt ttagtggcagtggtcagggacagattttactcttag catcaacgggtgtggagtctgaagatattgcagattat tactgtcaacaaagtaataacctggccactcacgttc ggtgctgggaccaagctggagatcaaa
38	抗NKG2D 杂交瘤 6E5A7 可变轻链	AA	DIQLTQSPAILSVSPGERVSFSCRAS QSIGTSHWYQQRTNGSPRLLIKYS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINGVE SEDIADYYCQQSNTWPLTFGAGTKLE IK
39	抗NKG2D 杂交瘤 6E5A7 可变轻链 CDR1	AA	RASQSIGTSH
40	抗NKG2D 杂交瘤 6E5A7 可变轻链 CDR2	AA	YASESIS
41	抗NKG2D 杂交瘤 6E5A7 可变轻链 CDR3	AA	QQSNTWPLT
42	抗NKG2D 杂交瘤 6E5A7 可变重链	NN	cagggtgcagctgcagcagtcaggacctggcctagt gcagccctcacagagcctgtccatcacctgcacag tctctgggttctcattaactatctatggtgtacactgggt cgccagctctccaggaaagggctggtgagtggtggg agtgatatggagtggcggaagcacagactataatg cagcttccatatccagactgagcatcagcaaggac aattccaagcgccaagtttctttaaataagcagctct gcaagctaataacacagccatatattactgttccag aaagtcccatgatggttactacggagtaatggacta ctggggccaagggaaccacgggtcacctgtctctca
43	抗NKG2D 杂交瘤 6E5A7 可变重链	AA	QVQLQQSGPGLVQPSQSLITCTVS GFSLTIYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI WSGGSTDYNAAFISRLSISKDNSKRQ VFFKMSSLQANDTAIYYCSRKSHDGY YGVMDYWGQGTTTVTVSS

图 16(续)

44	抗NKG2D 杂交瘤 6E5A7 可变重链 CDR1	AA	GFSLTIYGVH
45	抗NKG2D 杂交瘤 6E5A7 可变重链 CDR2	AA	VIWSGGSTDYNAAFIS
46	抗NKG2D 杂交瘤 6E5A7 可变重链 CDR3	AA	KSHDGYYGVM DY
47	11B2D10 × 4-7双特 异性单链Fv		DIQLTQSPASLSASVGETVTITCRASG NIHNYLAWYQQKQKSPQVLVYNAK TLADGVPSRFSGSGSGGTQYSLKINSL QPEDFGSYQCQHFWSSTTWTFGGGT KLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQL QQSGPELVRPGASVKLSCKASGYTF TSYWMNWVQQRPEQGLEWIGRIDP YDSETHYNQKFKDKAILTVDKSASTA YMQLSSLTSEDSAVYYCAKMGDYSF DYWGQGTITVTVSSGGGGSEVQLLE QSGAELARPGASVKLSCKASGYTFT NYGLSWVKQRPQGQVLEWIGEVYPR GNAYYNEKFKGKATLTADKSSSTAS MELRSLTSEDSAVYFCARRGSYDTN YDWYFDVWGQGTITVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSELVMTQTPLSLPVSLG DQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIYKVSNRFGVDPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC SQSTHVPYTFGGGTKEIKRTTSHHH HHHTS

图 16(续)

48	8G7C10 × 4-7 双特 异性单链Fv		DIQLTQSPAILSVSPGERVSFSCRAS QTIGTSIHWYQQRTNGSPRLLIKAYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINGVE SEDIADYYCQQSNTWPLTFGAGTKLE IKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQS GPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTIYGV HWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGSTD YNAAFISRLSISKDNSKRQVFFKMSSL QANDTAIYYCSRKSHDGYYGVM DYW GQGTTVTVSSGGGGSEVQLLEQSGA ELARPGASVKLSCKASGYTFTNYGLS WVKQRPGQVLEWIGEVYPRIGNAYY NEKFKGKATLTADKSSSTASME LRSL TSEDSAVYFCARRGSYDTNYDWYFD VWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSELVMTQTPLSLPVSLGDQASIS CRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ SPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHV PYTFGGG TKLEIKRT TSHHHHHHTS
49	6E5A7 × 4-7 双特 异性单链Fv		DIQLTQSPAILSVSPGERVSFSCRAS QSIGTSIHWYQQRTNGSPRLLIKAYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINGVE SEDIADYYCQQSNTWPLTFGAGTKLE IKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQS GPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTIYGV HWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGSTD YNAAFISRLSISKDNSKRQVFFKMSSL QANDTAIYYCSRKSHDGYYGVM DYW GQGTTVTVSSGGGGSEVQLLEQSGA ELARPGASVKLSCKASGYTFTNYGLS WVKQRPGQVLEWIGEVYPRIGNAYY NEKFKGKATLTADKSSSTASME LRSL TSEDSAVYFCARRGSYDTNYDWYFD VWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSELVMTQTPLSLPVSLGDQASIS CRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ SPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHV PYTFGGG TKLEIKRTTSHHHHHHTS
50	人p53 四聚体化 结构域	NN	actagttccggaaccccgctgggtgacaccacca cacctotggaaaaccactggatggagaatatttcac ccttcagatccgtgggogtgagcgcttcgagatgttc cgagagctgaatgaggccttggaactcaaggatgc ccaggctgggaaggagccaggggggagcgacta caaggatgacgatgacaagtaagcggccgc

图 16(续)

51	人p53 四聚体化 结构域	AA	TSSGTPLGDTTHTSGKPLDGEYFTLQ IRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGK EPGGSDYKDDDDK
52	P4-2单链Fv	NN	gaggtgcagctgctcgaggagctggaggaggctt ggtacagcctgggggtctctgagactctcctgtgca actctgggtcaccttactgattactacatgagctg ggtccgccagcctccaggaaaggcacttgagtgtt tgggtttattagaacaaaagctaattggttacacaac agagtacagtgcattgtgaagggtcgggtcaccat ctccagagataattoccaaagcatcctctatcttcaa atgaacacctgagagctgaggacagtcccactta ttactgtgcaagagataagacagacttcgatgtctg gggccaagggaaccaeggtcacctctcctcagggtg gtggtggttctggcgccggcggtccggtggtggtg gttctgagctcgtgatgacacagctctccatcctcctg actgtgacagcaggagagaaggctactatgagct gcaagtcagtcagagctctgtaaacagtggaaatc aaaagaactactgacctggtaccagcagaaacc agggcagcctcctaaactgttgatctactgggcatc cactaggggaatctgggggtccctgatcgcttcacagg cagtggatctggaacagattcactctcaccatcag cagtgtgcaggctgaagacctggcagttattactgt cagaatgattatagttatccgctcacgttcggtgctgg gaccaagcttgagatcaaacgtacgactagttccg ggcatcatcaccatcatcat
53	P4-2单链Fv	AA	EVQLLEESGGGLVQPGGSLRLSCAT SGFTFTDYYMSWVRQPPGKALEWL GFIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISR DNSQSILYLQMNTLRAEDSPTYCAR DKTDFDVWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSELVMTQSPSSLTVTAG EKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTW YQQKPGQPPKLLIWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVY YQNDYSYPLTFGAGTKLEIKRTTSS GHHHHHH

图 16(续)

54	P4-3单链Fv	NN	gaggtgcagctgctcgagctctggaggtggcctggtg cagcctggaggatccctgaaactctcctgtgcagcc tctggattcgatttttagtagatactggatgagttgggtc cggcaggctccagggaaagggtagaatggattg gagaaattaatccagatagcagtagcagataaactat acgccatctctaaaggataaattcatcatctccaga gacaacgccaaaaatacgtgtacctgcaaatga gcaaagtgagatctgaggacacagccctttattact gtgcaagaggggcggtagtagctccctttgactact ggggccaagggaaccacggtcaccgtctcctcaggt ggtggtggttctggcggcggcggctcgggtggtggt ggttctgagctcgtcatgaccagctcctcatcctcctt atctgcctctctgggagaaagagtcagctcacttgt cgggcaagtcaggacattggtagtagcttaaaactg gcttcagcaggaaccagatggaactattaacgcc tgatctacgccacatccagtttagattctggtgtcccc aaaagggtcagtggcagtaggtctgggtcagattatt ctctaccatcagcagccttgagctgaagattttgta gactattactgtctacaatatgctagttctcgtacac gttcggaggggggaccaagcttgagatcaaacgt acgactagttccgggcatcatcaccatcatcat
55	P4-3单链Fv	AA	EVQLLES GGGGLVQPGGSLKLS CAAS GFD FSR YWMSWVRQAPGKGLEWIG EINPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMSKVRSEDTALYYCARGAVV APFDYWGGQTTVTVSSGGGGSGGG SGGGGGSELVMTQSPSSLSASLGER VSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTI KRLIYATSSLD SGV PKRFSGSRSGSD YSLTISSLESEDFVDYYCLQYASSPYT FGGGTKLEIKRTTSSGHHHHHH

图 16(续)

56	P4-14 单链Fv	NN	gaggtgcagctgctcgagtctggaggtggcctggtg cagcctggaggatccctgaaactctcctgtgcagcc tcaggattcgattttagtagatactggatgagtgggt ccggcaggctccagggaaagggctagaatggatt ggagaaattaatccagatagcagtagcataaacta tacgccatctctaaaggataaattcatcatctccaga gacaacgccaaaaatacgtgtacctgcaaatga gcaaagtgagatctgaggacacagccctttattact gtgcaagacgcagctacggtagtagctacgactgg tacttcgatgtctggggccaagggaaccacggtcac cgtctctcaggtggtggtggttctggcggcggcgg ctccggtggtggtggttctgagctccagatgacca gtctccagcctccctatctgcatctgtgggagaaaact gtcaccatcacatgtcgagcaagtgagaatatttac agttatttagcatggtatcagcagaaaacagggaaa atctctcagctcctggtctataatgaaaaacctta gcagaaggtgtgccatcaagggtcagtagcagtgg atcaggcacacagttttctctgaagatcaacagcct gcagcctgaagattttgggagttattactgtcaacatc attatggtactccgctcacgttcggtgctgggaccaa gcttgagatcaaacgtacgactagttccgggcatca tcaccatcatcat
57	P4-14 单链Fv	AA	EVQLLES GGG LVQP GGS LKLS CAAS GFDFSR YWMS WVRQ APGK LEWIG EINPDS STINY TPSL KDKFI ISRD NAKN TLYLQMS KVRSE DTAL YYCARR SYG SSYDWY FDVWG QGTT VT VSSGGGG SGGGGSGGGGSELQMTQSPASLSA SVGETVTITCRASENI SYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKT LAEGVPSRFSS SGSGTQFSLKINSLQPEDFGSY YCQH HYGTPLTFGAGTKLEIKRTTSSGHHH HHH

图 16(续)

58	P4-15 单链Fv	NN	gaggtgcagctgctcgagcagctcggagctgagct gatgaagcctggggcctcagtgaaagatctctgca aggctactggctacacattcagtagctactggatag agtgggtaaagcagaggcctggacatggcctga gtggattggagagattttacctggaagtggtagtact aactacaatgagaagttcaagggcaaggccacatt cactgcagatacatcctccaacacagcctacatgc aactcagcagcctgacatctgaggactctgccgtct attactgtgcaagaggattacgacgttggttgcttac tggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcagg tggtggtggttctggcggcgccggtccggtggtggt ggttctgagctcgtgatgacacagctctccatcctcct gactgtgacagcaggagagaaggtcactatgagc tgcaagtccagtcagagctctgtaaacagtggaat caaaagaactactgacctggtaccagcagaaac cagggcagcctcctaaactgttgatctactgggcatt ccactaggggaatctggggctccctgatcgcttcacag gcagtggtctggaacagatttcactctcaccatca gcagtggtcaggctgaagacctggcagtttattactg tcagaatgattatagttatccgctcacgttcggtgctg ggaccaagcttgagatcaaacgtacgactagttcc gggcattcatcaccatcatcat
59	P4-15 单链Fv	AA	EVQLLEQSGAELMKPGASVKISCKAT GYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEI LPGSGSTNYNEKFKGKATFTADTSSN TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGLR WFAYWGQGTTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSELVMTQSPSSLTVTAGEK VTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFT GSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQ NDYSYPLTFGAGTKLEIKRTTSSGHH HHHH

图 16(续)

60	P5-2 单链Fv	NN	gaggtgcagctgctcgaggagtctggaggaggctt ggtgcaacctggaggatccatgaaactctcctgtgt gcctctggattcacttcagtaactactggatgaactg ggtccgccagctccagagaaggggcttgagtggg ttgctgaaattagattgaaatctaataattatgaaca cattatgCGGagtctgtgaaagggagggtcaccatct caagagatgattccaaaagtagtgtctacctgcaaa tgaacaactaagagctgaagacactggcatttatt actgtaccaggctcccctacggctttgctatggacta ctggggccaagggabccacggtcaccgtctcctcag gtggtggtggttctgCGGCGGCGGctccggtggtg gtggttctgagctcgtgctcaccagctccaaccac catggctgcatctccCGGGgagaagatcactatca cctgcagtGCCagctcaagtataagtccaattactt gcattggtatcagcagaagccaggattctcccctaa actcttgatttataggacatccaatctggctcttgagt cccagctcgttcagtggcagtggtctgggacctct tactcttcacaattggcaccatggaggctgaagat gttgccacttactactGCCagcagggtagtagtatac cgctcacgttcggtgctgggaccaagcttgagatca aacgtacgactagttccgggcacatcacccatcatc at
61	P5-2 单链Fv	AA	EVQLLEESGGGLVQPGGSMKLSCTVA SGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWV AEIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISR DSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCTRL PYGFAMDYWGQGTTTVTVSSGGGGS GGGSGGGGSELVLTQSPTTMAASP GEKITITCSASSISSNYLHWYQQKP GFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSG SGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGS SIPLTFGAGTKLEIKRTTSSGHHHHHH

图 16(续)

62	P5-3单链Fv	NN	gaggtgcagctgctcgaggagtcaggacctggcct ggtggcgccctcacagagcctgtccatcacttgac tgtctctgggttttcattaaccagctatggtgtacactg ggttcgccagcctccaggaaagggctcggagtggc tgggagtaatatgggctggtggaagcacaattata attcggctctcatgtccagactgagcatcagcaaag acaactccaagagccaagtttcttaaaaatgaaca gtctgcaaactgatgacacagccatgtactactgtg ccagagatcggtactacgtgggtgctatggactact ggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcagg ggtggtggttctggcggcgggcggtccgggtggtggt ggttctgagctccagatgacccagctcctcagcatcc ctgtccatggctataggagaaaaagtcaccatcag atgcataaccagcactgatattgatgatgatgaa ctggtagcagcagaagccagggaacctcctaag ctcctatttcagaaggcaataactcttcgtcctggagt cccatcccgattctocagcagtggtatggtacagat ttgtttttacaattgaaaacatgctctcagaagatggt gcagattactactgttgcaaagtataacttgccgta cacgttcggaggggggaccaagcttgagatcaaa cgtacgactagtccgggcatcatcaccatcatcat
63	P5-3单链Fv	AA	EVQLLEESGPGLVAPSQSLSITCTVS GFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLG VIWAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSK SQVFLKMNSLQTDDTAMYCARDRY YVGAMDYWGQGTTTVTVSSGGGGSG GGSGGGGGSELQMTQSPASLSMAIG EKVTIRCITSTDIDDDMNWYQQKPGE PPKLLISEGNTLRPGVPSRFSSSGYG TDFVFTIENMLSEVDYDYCLQSDNL PYTFGGGTKLEIKRTTSSGHHHHHH

图 16(续)

64	P5-9单链Fv	NN	gaggtgcagctgctcgagtctggaggtggcctggtg cagccigaggatccctgaaactctctgtgcagcc tcaggattcgattttagtagatactggatgagttgggt ccggcaggctccagggaagggttagaatggatt ggagaaattaatccagatagcagtacgataaacta tacgccatctctaaaggataaattcatcatctccaga gacaacgcaaaaatacgtgtacctgcaaataga gcaaagtggatctgaggacacagccctttattact gtgcaagggaaactgggacggagttgactactgg ggccaagggaccacggtcaccgtctcctcaggtgg tgggtgtctggtggcggtccgggtggtggtggt tctgagctcgtgatgaccagactccatcctccatgt atgcatcgtctgggagagagagtcactatcacttgca aggcgagtcaggacattaaaagctatttaagctggt accagcagaaacctggaaatctcctaagaccct gatctattatgcaacaagcttggcagatgggggtccc atcaagattcagtggcagtggtctgggcaagatta ttcttaacctcagcagcctggagtctgacgatac agcaacttattactgtctacagcatggtgagagccc gtacacgttcggaggggggaccaagcttgagatga aacgtacgactagtccgggcatcatcaccatcatc at
65	P5-9单链Fv	AA	EVQLLES GGGLVQPGGSLKLS CAAS GFDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIG EINPDSSTINYTPSLKDKFIISRDN AKN TLYLQMSKVRSEDTALYYCARETGTE FDYWGGGTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSELVMTQTPSSMYASLGERVT ITCKASQDIKSYLSWYQQKPWKSPKT LIYYATSLADGVPSRFS GSGSGQDYS LTISSLESDDTATYYCLQHGESPYTF GGG TKLEIKRTTSSGHHHHHH

图 16(续)

66	P5-10 单链Fv	NN	gaggtgcagctgctcgagcagctctggagctgagctt gtgaggccaggggccttagtcaagttgtcctgcaaa gcttctggcttcaacattaaagactactatatgcactg ggtgaagcagaggcctgaacagggcctggagtg gattggatggattgatcctgagaatggtaatactatat atgacccgaagttccagggcaaggccagtataac agcagacacatcctccaacacagcctacctgcag ctcagcagcctgacatctgaggacactgccgcctat tactgtgcttctttattactacggtagtagctacaggt acttcgatgtctggggccaagggaccacggtcacc gtctctcaggtgggtgggttctggcggcggcggt ccggtgggtgggtgttgagctcgtgatgaccaga ctcctcctccttatctgcctctctgggagaaagagtc agtctcactgtcgggcaagtcaggacattggtagta gcttaaactggcttcagcaggaaccagatggaact attaaacgcctgatctacgccacatccagtttagatt ctggtgtcccaaaaagggtcagtggcagtagggtctg ggcagattattctctcaccatcagcagccttgagtct gaagattttgtagactattactgtctacaatatgctagt tctccgtacacgttcggaggggggaccaagctga gatcaaacgtacgactagttccgggcatcatcacc atcatcat
67	P5-10 单链Fv	AA	EVQLLEQSGAELVRPGALVKLSOKAS GFNIKDYMHVVKQRPEQGLEWIG WIDPENGNTIYDPKFQGKASITADTS SNTAYLQLSSLTSEDTAAYYCASFYY YGSSYRYFDVWGQGTITVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSELVMTQTTPSSLS ASLGERVSLTCRASQDIGSSLNLWLQ QEPDGTIKRLIYATSSLD SGVPKRFS GSRSGSDYSLTISSESEDFVDYYCL QYASSPYTFGGGTKLEIKRTTSSGHH HHHH

图 16(续)

68	P5-11 单链Fv	NN	gaggtgcagctgctcgaggagtctggaggaggctt ggtgcaacctggaggatccatgaaactctctgtatt gcctctggattcactttcagtaattctggatgaactg ggtccgccagctctccagagaaggggcttgagtggg ttggtgaaattagattgaaatctaataattatgcaaca cattatgcgagagtctgtgaaagggagggtcaccatct caagagatgattccaaaagtagtgtctacctacaaa tgaacaacttaagagttgaagacactggcatttatta ctgtacgaagggtggactactggggccaagggacc acggtcaccgtctcctcagggtggtggtgtctggtg gcggcggctcgggtggtggtggtgtctgagctcgtgat gacacagttccatcctcctggctatgtcagtagga cagaaggtcactatgagctgcaagtccagtcagag cctttaaatagtagcaatcaaaagaactacttgacc tggtaccagcagaaaccagggcagcctcctaaac tgttgatctactgggcatccactagggaatctgggt ccctgatcgcttcacaggcagtggtatctggaacag attcactctcaccatcagcagtggtcaggctgaag acctggcagtttactgtcagaatgattatagttatc cgctcacgttcgggtgctgggaccaagctigagatca aacgtacgactagttccgggcatcatcaccatcatc at
69	P5-11 单链Fv	AA	EVQLLEESGGGLVQPGGSMKLSIA SGFTFSNSWMNWVRQSPKGLEWV GEIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISR DDSKSSVYLQMNNLRVEDTGIYYCTK VDYWGGQTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSELVMTQSPSSLAMSVGQKVT MSCKSSQSLLNSSNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGS GSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQND YSYPLTFGAGTKLEIKRTTSSGHHHH HH

图 16(续)

70	P5-23 单链Fv	NN	gaggtgcagctgctcgagtctggaggtggcctggg cagcctggaggatccctgaaactctcctgtgcagcc tcaggattcgattttagtagatactggatgagttgggt ccggcaggctccagggaagggttagaatggatt ggagaaattaatccagatagcagtagcagataaacta tacgccatctctaaaggatagattcatcatctccaga gacaacgccccaaaatacgtgtacctgcaaatga gcaaagtgaggtctgaggacacagccctttattact gtgcaagattggggcaatgggggtactttgactact ggggccaagggaaccacgggcaccgtctcctcaggt ggtggtggttctggcggcggcggctccggtggtggt ggtctgagctcgtgatgacacagctctccatcctccct gactgtgacagcaggagagaggggtactatgagc tgcaagtccagtcagagtctgttaaacagtggaaat caaaagaactacttgacctggtaccagcagaaac cagggcagcctcctaaactgttgatctactgggcat ccactaggggaatctggggtccctgatcgttcacag gcagtggatctggaacagatttcactctcacatca gcagtgtgcaggctgaagacctggcagtttattactg tcagaatgattatagttatcctctcacgttcggtgctgg gaccaagcttgagatcaaacgtacgactagttccg ggcatcatcaccatcatcat
71	P5-23 单链Fv	AA	EVQLLESGLVQPGGSLKLSKAAS GFDLSRYWMSWVRQAPGKGLEWIG EINPDSSTINYTPSLKDRFIISRDNANK TLYLQMSKVRSEDTALYYCARLGQW GYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSELVMTQSPSSLTVTAGER VTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIWASTRESGVDPDRFT GSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQ NDYSYPLTFGAGTKLEIKRTTSSGHH HHHH

图 16(续)

72	3B10 × P4-3 双特异性 单链Fv	NN	gatatgtgatgacgcaggctgcatttccaatccag tcactcttgaacatcagcttccatctctgcaggct agtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatt gtattggtatctgcagaagccaggccagctcctca gctcctgattatcagatgtccaacctgcctcagga gtcccagacagggtcagtagcagtggtcaggaac tgattcacactgagaatcagcagagtggaggctg aggatgtgggtgttattactgtgtcaaaatctagaa cttctcggacgttcggtggaggcaccaagctgga aatcaaagggtgggtgtgtctggcggcggtc cggtgggtgtgtgtcagggtgcaactgcagcagtc agggcctgagctgaagaagcctggagagacagtc aagatctcctgcaaggcttctgggtataccttcacaa actatggaatgaactgggtgaagcaggctccagg aaagggttcaagtggatgggtggataaacacct acactggagagccaacatattggtgatgacttcaag ggacggttgccttctcttggaaacctctgccagcac tgctatttgcatcaacaacctcaaaatgagga cacggctacataattctgtgcaagattcacctccctg actactggggccaagggaaccacggtcacgtctcc tccggagggtgtggtatccgagggtcagctgtcga gtctggagggtggcctggtgcagcctggaggatccct gaaactctcctgtgcagcctctggattcgatttagta gatactggatgagttgggtccggcaggctccaggg aaagggtagaatggattggagaaattaatccaga tagcagtacgataaactatacgccatctctaaagga taaattcatcatctccagagacaacgccaaaaata cgctgtacctgcaaatgagcaaagtgagatctgag gacacagcccttattactgtgcaagagggcggtg gtagctcccttgactactggggccaagggaaccac ggtcaccgtctcctcagggtgggtgtgtcggcggc ggcggctccggtgggtgtgtcgtcgtcgtatga cccagctccatcctccttatctgcctctctgggagaa agagtcagctcacttgcgggcaagtcaggacatt ggtagtagcttaaactggcttcagcaggaaccagat ggaactatataacgcctgatctacgccacatccagt ttagattctggtgtcccaaaagggtcagtggcagta ggtctgggtcagattattctcaccatcagcagcct gagtctgaagatttttagactattactgtctacaatat gctagtctccgtacacgttcggaggggggaccaa gcttgagatcaaacgtacgactagttccgggcatca tcaccatcatcat
----	--------------------------------	----	---

图 16(续)

73	3B10 × P4-3 双特异性 单链Fv	AA	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSS KSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLL IYQMSNLAGVDPDRFSSSGSGTDFTL RISRVEAEDVGVYYCAQNLELPRTFG GGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ VQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGY TFTNYGMNWVKQAPGKGFKWMGWI NTYTGEPTYGDDFKGRFAFSLETSAS TAYLQINNLIKNEEDTATYFCARFTSPD YWGQGTITVTVSSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPSRY WMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSST INYTEPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYYCARGAVVAPFDYWG QGTTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS ELVMTQSPSSLSASLGERVSLTCRAS QDIGSSLNWLQQEPDGTIKRLIYATSS LD SGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSE SEDFVDYYCLQYASSPYTFGGGTKL EIKRTTSSGHHHHH
----	--------------------------------	----	--

图 16(续)

74	3B10 × P4-14 双特异性 单链Fv	NN	gatattgtgatgacgcaggctgcattotccaatocag tcaactcttgaacatcagcttccatctcctgcaggctc agtaagagtctcctacatagtaatggcatcaactat gtattggatctgcagaagccaggccagctcctca gctcctgatttatcagatgtccaacctgcctcagga gtcccagacagggtcagtagcagtggtcaggaac tgattcacactgagaatcagcagagtgaggctg aggatgtgggtgtttattactgtgctcaaaatctaga ctctcctggacgttcgggtggaggcaccaagctgga aatcaaagggtggtggtgttctggcggcggcggctc cgggtggtggtggttctcagggtgcaactgcagcagtc agggcctgagctgaagaagcctggagagacagtc aagatctcctgcaaggcttctgggtataccttcaca actatggaatgaactgggtgaagcaggctccagg aaagggtttcaagtggatgggtggtgataaacact acactggagagccaacatatggtgatgacttcaag ggacgggttgccttctcttggaaacctctgccagcac tgctatttgcagatcaacaacctcaaaatgagga cacggctacatatttctgtgcaagattcacctcccctg actactggggccaagggaaccagggtcacctcctcc tccggagggtggtggtatccgagggtgcagctgctcga gtctggagggtggcctggtgcagcctggaggatccct gaaactctcctgtgcagcctcaggattcgatttagta gatactggatgagttgggtccggcagggtccaggg aaagggttagaatggattggagaaattaatccaga tagcagtagataaaactatacgccatctctaaagga taaattcatcatctccagagacaacgcaaaaata cgctgtacctgcaaatgagcaaaagtgagatctgag gacacagccctttattactgtgcaagacgcagctac ggtagtagctacgactggtacttcgatgtctggggcc aagggaaccagggtcacctgtcctcagggtggtggt ggttctggcggcggcggctccgggtggtggtggttctg agtccagatgaccagctcctcagcctccctatctg catctgtgggagaaactgtcacatcacatgtcgag caagtgagaatatttacagttatttagcatggtatcag cagaaacagggaataatctcctcagctcctggtctat aatgcaaaaaccttagcagaagggtgtgcatcaag gttcagtagcagtggtatcaggcacacagtttctctg aagatcaacagcctgcagcctgaagatttgggagt tattactgtcaacatcattatggtactccgctcagcttc ggtgctgggaccaagcttgagatcaaacgtacgac tagttccgggcatcatcac catcatcat
----	---------------------------------	----	--

图 16 (续)

75	3B10 × P4-14 双特异性 单链Fv	AA	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSS KSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLL IYQMSNLASGVDPDRFSSSGSGTDFTL RISRVEAEDVGVYYCAQNLELPRTFG GGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSSQ VOLQQSGPELKKPGETVKISKASGY TFTNYGMNWVKQAPGKGFKWMGWI NTYTGEPTYGDDFKGRFAFSLETSAS TAYLQINNLIKNEEDTATYFCARFTSPD YWGQGTITVTVSSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPSRY WMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSST INYTEPSLKDKFIISRDNKNTLYLQMS KVRSEDTALYYCARRSYGSSYDWYF DVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSELQMTQSPASLSASVGETVT ITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQL LVYNAKTLAEGVPSRFSSSGSGTQFS LKINSLQPEDFGSYQCQHHYGTPLTF GAGTKLEIKRTTSSGHHHHHH
----	---------------------------------	----	---

图 16(续)

76	3B10 × P5-2 双特 异性单链Fv	NN	gatattgtgatgacgcaggctgcatttccaatccag tcactcttgaacatcagcttccatctcctgcaggctc agtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatt gtattggatctgcagaagccaggccagctcctca gctcctgattatcagatgtccaaccttgccctcagga gtcccagacagggtcagtagcagtggtcaggaac tgatttcacactgagaatcagcagagtggaggctg aggatgtgggtgtttattactgtgctcaaaatctagaa cttctcggacgttcgggtggaggcaccaagctgga aatcaaagggtgggtgggtctggcggtggcggtc cggtgggtgggtctcaggtgcaactgcagcagtc agggcctgagctgaagaagcctggagagacagtc aagatctcctgcaaggcttctgggtataccttcacaa actatggaatgaactgggtgaagcaggctccagg aaagggtttcaagtggatgggtggataaacacct acactggagagccaacatattggtgatgacttcaag ggacggtttgccttctcttggaaacctctgccagcac tgctatttgcagatcaacaacctcaaaaatgagga cacggctacatatttctgtgcaagattcacctccctg actactggggccaagggaccacgggtcacctctcc tcggagggtgggtgatccgagggtgcagctgctga ggagtctggaggaggcttgggtgcaacctggaggat ccatgaaactctcctgtgtgcctctggattcacttca gtaactactggatgaactgggtccgccagctccag agaaggggctgagtgggtgctgaaattagattga aatctaataattatgcaacacattatgaggagtctgt gaaagggagggtcaccatctcaagagatgattoca aaagtagtctacctgcaaatgaacaactaaga gctgaagacactggcatttattactgtaccaggctcc cctacggctttgctatggactactggggccaaggga ccacggtcaccgtctcctcagggtgggtgggtctgg cggtgggtgggtccgggtgggtgggtctgagctcgt gctcaccagctctcaaccaccatgggtgcatctcc cggggagaagatcactatcacctgcagtgccagct caagtataagttccaattactgcattggtatcagcag aagccaggattctcccctaaactcttgatttagga catccaatctggcttctggagtccagctcgctcagt ggcagtggtctgggacctcttactctctcacaattg gcaccatggaggctgaagatgttgccacttactact gccagcagggtagtagtataccgctcacgttcgggtg ctgggaccaagcttgagatcaaacgtacgactagtt ccgggcatcatcac catcatcat
----	-----------------------------	----	---

图 16(续)

77	3B10 × P5-2 双特 异性单链Fv	AA	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSS KSLHNSNGITYLYWYLQKPGQSPQLL IYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTL RISRVEAEDVGVYYCAQNLELPRTFG GGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ VQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGY TFTNYGMNWVKQAPGKGFKWMGWI NTYTGEPTYGDDFKGRFAFSLETSAS TAYLQINNPKNEDTATYFCARFTSPD YWGGGTTVTVSSGGGGSEVQLLEES GGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNY WMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSN NYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVY LQMNNLRAEDTGIYYCTRLPYGFAM DYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSELVLTQSPTTMAASPGEKITI TCSASSSISSNYLHWYQQKPGFSPKL LIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYS LTIGTMEAEDVATYYCQQGSSIPETF GAGTKLEIKRTTSSGHHH HHH
----	-----------------------------	----	---

图 16 (续)

78	3B10 × P5-23 双特异性 单链Fv	NN	gatattgtgatgacgcaggctgcattctccaatccag tcactcttggaaacatcagcttccatctcctgcaggct agtaagagtctctacatagtaatggcatcacttattt gtattggtatctgcagaagccaggccagctcctca gctcctgattatcagatgtccaacctgcctcagga gtcccagacagggtcagtagcagtggtcaggaac tgattcacactgagaatcagcagagtgaggctg aggatgtgggtgttattactgtgctcaaaatctagaa cttctcggacgttcggtggaggaccaagctgga aatcaaagggtggtggtgtctggcggcggcggtc cgggtggtggtgtctcagggtgcaactgcagcagtc agggcctgagctgaagaagcctggagagacagtc aagatctcctgcaaggcttctgggtataccttcacaa actatggaatgaactgggtgaagcaggctccagg aaagggttcaagtggatgggtggataaacacct acactggagagccaacatatggtgatgactcaag ggacggttgcttctcttggaaacctctgccagcac tgctatttgcagatcaacaacctcaaaaatgagga cacggctacatatttctgtgcaagattcacctccctg actactggggccaagggaaccacggtcaccgtctcc tccggagggtggtgatccgaggtgcagctgctga gtctggagggtgctgtgagcctggaggatccct gaaactctcctgtgcagcctcaggattcgatttagta gatactggatgagtggttccggcagggtccaggg aaagggtagaatggattggagaaattaatccaga tagcagtacgataaactatacgcctctctaaagga tagattcatctctccagagacaacgcaaaaata cgctgtacctgcaaagtgcagaaagtgaggtctgag gacacagcccttattactgtgcaagattggggcaat gggggtacttgaactactggggccaagggaaccacg gtcacctctcctcagggtggtggtgtctggcggcg gcggctccggtggtggtgtctgagctcgtgatgac acagtctccatcctcctgactgtgacagcaggaga gagggtcactatgagctgcaagtccagtcagagct gttaaacagtggaaatcaaaagaactacttgacct. ggtaccagcagaaaccaggggcagcctcctaaact gttgatctactgggcatccactagggaatctggggtc cctgatcgcttcacaggcagtggaatctggaacagat ttcactctcaccatcagcagtggtgcaggctgaagac ctggcagtttattactgtcagaatgattatagttatcctc tcacgttcgggtgctgggaccaagcttgagatcaaac gtacgactagttccgggcatcatcaccatcatcat
----	---------------------------------	----	--

图 16(续)

79	3B10 × P5-23 双特异性 单链Fv	AA	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSS KSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLL IYQMSNLAGVDPDRFSSSGSGTDFTL RISRVEAEDVGVIYCAQNLELPRTFG GGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ VQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGY TFTNYGMNWVKQAPGKGFKWMGWI NTYTGEPTYGDDFKGRFAFSLETSAS TAYLQINNKNEDTATYFCARFTSPD YWGGQTTVTVSSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPSRY WMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSST INYPSTLKDRIISRDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYYCARLGQWGYFDYW GQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGG GSELVMTQSPSSLTVTAGERVTMSC KSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIWASTRESGVPDRFTGSGS GTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYS YPLTFGAGTKLEIKRTTSSGHHHHH
80	NKG2D 短-f		atcaagcttgatgatgttacaaaaataact
81	NKG2D-f		atcaagctgaaccaagaagttcaaattcc
82	NKG2D- 停止-f		cgcggtggcgccgcttacacagtccttgcatg
83	5'VLB5RRV		agg tgt aca ctc cga tat cca gct gac cca gtc tcc a
84	3'VLGS15		gga gcc gcc gcc gcc aga acc acc acc acc ttt gat ctc gag ctt ggt ccc
85	5'VHGS15		ggc ggc ggc ggc tcc ggt ggt ggt tct cag gt(gc) (ac)a(ag) ctg cag (gc)ag tc(at) gg
86	3'VHBspEI		aat ccg gag gag acg gtg acc gtg gtc cct tgg ccc cag
87	NKG2D- 正向		aggtgtacactccttattcaaccaagaagttcaaatt cc
88	NKG2D- 反向		tcatccggacacagtccttgcatgcagatg

图 16(续)

专利名称(译)	含有针对NKG2D受体复合物的表位的结合位点的多功能多肽		
公开(公告)号	CN1423700A	公开(公告)日	2003-06-11
申请号	CN01807061.2	申请日	2001-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	麥克美特股份公司		
[标]发明人	P库佛 G利特米勒 R路德布斯 K伯尔施特 R基斯切爾 M迈耶 R霍夫迈斯特		
发明人	P·库佛 G·利特米勒 R·路德布斯 K·伯尔施特 R·基斯切爾 M·迈耶 R·霍夫迈斯特		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7088 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61K39/395 A61K47/48 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P13/08 A61P13/12 A61P17/00 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/02 A61P33/10 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/28 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/62 C12N15/85 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	C07K2317/31 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2319/00 C07K16/2851 A61K2039/53 A61P1/16 A61P3/10 A61P13/08 A61P13/12 A61P17/00 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/02 A61P33/10 A61P35/00		
代理人(译)	徐迅		
优先权	2000106467 2000-03-24 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及含有第一结构域和第二结构域的多功能多肽,所述第一结构域含有特异性识别NKG2D受体复合物的细胞外表位的结合位点,所述第二结构域具有受体或配体功能。此外,本发明涉及编码多功能多肽的多核苷酸、含有所述多肽的载体和含有所述多核苷酸或所述载体的细胞。本发明还涉及含有任一种上述分子单独或组合的组合物,以及本发明多功能多肽的特殊的医学用途。

