



(10) 授权公告号 CN 116178552 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 07

(21) 申请号 202211739469.8	A61P 35/00 (2006.01)
(22) 申请日 2022.12.30	A61P 29/00 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号	A61P 37/02 (2006.01)
申请公布号 CN 116178552 A	A61P 19/02 (2006.01)
(43) 申请公布日 2023.05.30	A61P 9/14 (2006.01)
(73) 专利权人 合肥天港免疫药物有限公司	A61P 17/00 (2006.01)
地址 230001 安徽省合肥市经济技术开发区芙蓉路268号合肥创新创业园1#C二楼2001	A61P 7/00 (2006.01)
(72) 发明人 曹国帅 成赢 李洋洋 武玉伟	A61P 1/04 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所(普通合伙) 11201	A61P 5/14 (2006.01)
专利代理师 高梦梦	A61P 3/10 (2006.01)
(51) Int. Cl.	A61P 21/04 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)	A61P 7/06 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)	A61P 11/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)	A61P 13/12 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)	A61P 1/16 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)	A61P 25/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)	

(56) 对比文件
CN 106279438 A,2017.01.04
CN 108424457 A,2018.08.21

审查员 周振威

权利要求书2页 说明书25页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称
抗CD94的抗体及其应用

(57) 摘要
本发明提出了一种抗CD94的抗体及其应用,该抗体包括重链CDR1、CDR2和CDR3,以及轻链CDR1、CDR2和CDR3;其中:所述重链CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别与SEQ ID NO:1、2、3所示的序列具有至少80%的同源性,所述轻链CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别与SEQ IDNO:4、5、6所示的序列具有至少80%的同源性。本发明实施例的抗体能够与人CD94蛋白进行结合,解除CD94/NKG2A介导的免疫抑制,促进T细胞的活化,能够有效治疗和/或预防CD94介导的相关疾病。

CN 116178552 B

1. 一种抗CD94的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,为重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3,以及轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;其中:

所述重链CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示的序列,

所述重链CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示的序列,

所述重链CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示的序列,

所述轻链CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示的序列,

所述轻链CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示的序列,

所述轻链CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示的序列。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,包括:

1) 如SEQ ID NO: 23所示的重链可变区,和如SEQ ID NO: 24所示的轻链可变区;或

2) 如SEQ ID NO: 25所示的重链可变区,和如SEQ ID NO: 26所示的轻链可变区。

3. 根据权利要求1~2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段含有重链恒定区和轻链恒定区的至少之一,所述重链恒定区和轻链恒定区的至少之一的至少一部分来自于人源抗体和鼠源抗体或其突变体中的至少之一。

4. 根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述轻链恒定区和重链恒定区均来自于鼠源IgG抗体或其突变体或人源IgG抗体或其突变体。

5. 根据权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述轻链恒定区和重链恒定区均来自于鼠源IgG1、IgG4抗体或其突变体或人源IgG1、IgG4抗体或其突变体。

6. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段具有如SEQ ID NO: 27、29或31所示氨基酸序列的重链恒定区和/或如SEQ ID NO: 28、30或32所示氨基酸序列的轻链恒定区。

7. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段具有如SEQ ID NO: 27所示氨基酸序列的重链恒定区和如SEQ ID NO: 28所示氨基酸序列的轻链恒定区。

8. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段具有如SEQ ID NO: 29所示氨基酸序列的重链恒定区和如SEQ ID NO: 30所示氨基酸序列的轻链恒定区。

9. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段具有如SEQ ID NO: 31所示氨基酸序列的重链恒定区和如SEQ ID NO: 32所示氨基酸序列的轻链恒定区。

10. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段具有SEQ ID NO: 33、35、36和38任一项所示氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO: 34、37和39任一项所示氨基酸序列的轻链。

11. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段具有SEQ ID NO: 33所示氨基酸序列的重链和SEQ ID NO: 34所示氨基酸序列的轻链;

所述抗体或其抗原结合片段具有SEQ ID NO: 35所示氨基酸序列的重链和SEQ ID NO: 37所示氨基酸序列的轻链;

所述抗体或其抗原结合片段具有SEQ ID NO: 36所示氨基酸序列的重链和SEQ ID NO: 37所示氨基酸序列的轻链;或

所述抗体或其抗原结合片段具有SEQ ID NO:38所示氨基酸序列的重链和SEQ ID NO:39所示氨基酸序列的轻链。

12.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段包括单抗或多抗。

13.根据权利要求12所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述单抗包括全长抗体、Fv、单链抗体、Fab、单域抗体中的至少之一。

14.根据权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段能够结合SEQ ID NO: 40所示的氨基酸序列。

15.一种核酸分子,其特征在于,所述核酸分子编码权利要求1~14任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

16.一种表达载体,其特征在于,携带权利要求15所述的核酸分子。

17.一种重组细胞,其特征在于,携带权利要求15所述的核酸分子、权利要求16所述的表达载体或能够表达权利要求1~4任一项所述的抗体或其抗原结合片段;

所述重组细胞是通过将权利要求16所述的表达载体导入至宿主细胞中而获得的;

所述重组细胞为真核细胞,所述真核细胞为非植物细胞。

18.根据权利要求17所述的重组细胞,其特征在于,所述重组细胞为哺乳动物细胞。

19.一种组合物,其特征在于,包括权利要求1~14任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求15所述的核酸分子、权利要求16所述的表达载体或权利要求17~18任一项所述的重组细胞。

20.一种药物,其特征在于,包括权利要求1~14任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求15所述的核酸分子、权利要求16所述的表达载体、权利要求17~18任一项所述的重组细胞或权利要求19所述的组合物。

21.一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有权利要求1~14任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求15所述的核酸分子、权利要求16所述的表达载体或权利要求17~18任一项所述的重组细胞。

22.权利要求1~14任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求15所述的核酸分子、权利要求16所述的表达载体、权利要求17~18任一项所述的重组细胞或权利要求19所述的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗癌症;

所述癌症包括下列中的至少之一:肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌。

23.权利要求1~14任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求15所述的核酸分子、权利要求16所述的表达载体或权利要求17~18任一项所述的重组细胞在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测CD94。

抗CD94的抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体地,涉及一种抗CD94的抗体及应用。

背景技术

[0002] 癌症严重威胁人类的生命健康。除了手术切除、放疗、化疗等传统治疗方法,小分子靶向疗法、免疫检查点疗法、细胞及基因疗法等多种癌症治疗手段也在开发中。

[0003] 近年来,以PD-1/L1为代表的免疫治疗展示了巨大的潜力,且已经有PD-1/L1、CTLA-4、LAG-3三类免疫疗法获批成药,但是不能忽视的是,即便目前获批适应症最广的PD-1/L1疗法的总体响应率仍只有30%,仍有更多的患者无法从中受益。

[0004] 免疫检查点分子是表达于免疫细胞包括T、NK、单核巨噬细胞等表面的抑制性分子,与相应配体结合后,向免疫细胞内传递抑制性信号,抑制免疫细胞的抗癌功能。

[0005] 由于肿瘤、肿瘤浸润淋巴细胞的免疫检查点受配体表达具有非常大的异质性,导致单一种类的免疫检查点疗法无法适用于所有患者,多数患者无法从中获益;另一方面,部分接受过免疫检测点疗法的患者会复发肿瘤并产生对该免疫检查点疗法的耐受,继续给药也无法产生疗效。基于这两方面的原因,开发针对更多靶点的免疫检查点抗体是有必要的。

[0006] CD94表达在NK细胞、T细胞表面,与NKG2A、NKG2C形成异源二聚体,这些异源二聚体的配体均为HLA-E。其中CD94/NKG2A为抑制性受体,而CD94/NKG2C为活化性受体。但是,肿瘤浸润NK细胞、T细胞表面主要表达CD94/NKG2A,而非CD94/NKG2C,因而靶向CD94与靶向NKG2A的免疫检查点疗法均有潜在的价值。

[0007] 截止到目前为止,全球范围内没有靶向CD94的免疫检查点疗法公开报道或者进入临床试验阶段,靶向NKG2A的疗法进展最快的为Innate Pharma公司的huZ270抗体。因此,开发靶向CD94的免疫检查点疗法对于疾病的治疗和预防具有重要意义。

发明内容

[0008] 本申请是基于发明人对下列问题和事实的发现而提出的:

[0009] CD94表达在NK细胞、T细胞表面,与NKG2A、NKG2C形成异源二聚体,其中,肿瘤浸润NK细胞、T细胞表面主要表达CD94/NKG2A,且CD94/NKG2A为抑制性受体,因而靶向CD94与靶向NKG2A的免疫检查点疗法均有潜在的价值,但是针对这CD94—分子的肿瘤治疗以及研究手段并不多。

[0010] 本申请的发明人成功地筛选到一种鼠源抗CD94单克隆抗体,该单克隆抗体与人CD94蛋白具有较高的结合活性,此外,发明人对上述单克隆抗体的恒定区进行人源化,保留鼠源抗CD94单克隆抗体的CDR,以获得嵌合抗体,更进一步地,将所述嵌合抗体的轻链可变区或重链可变区中的框架区进行人源化,得到抗CD94的完全人源化抗体,所述人源化抗体能够特异性的靶向结合人CD94蛋白,具有免疫原性低的特点,能够有效治疗和/或预防CD94介导的相关疾病。本发明比较了CD94抗体与NKG2A抗体huZ270的体外活性,在报告体系中,CD94抗体对JurkatT细胞的活化能力优于NKG2A抗体。

[0011] 因此,在本发明的第一方面,本发明提出了一种抗体或抗原结合片段。根据本发明的实施例,包括重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3,以及轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;其中:

[0012] 所述重链CDR1的氨基酸序列与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少80%的同源性,

[0013] 所述重链CDR2的氨基酸序列与SEQ ID NO:2所示的序列具有至少80%的同源性,

[0014] 所述重链CDR3的氨基酸序列与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少80%的同源性,

[0015] 所述轻链CDR1的氨基酸序列与SEQ ID NO:4所示的序列具有至少80%的同源性,

[0016] 所述轻链CDR2的氨基酸序列与SEQ ID NO:5所示的序列具有至少80%的同源性,

[0017] 所述轻链CDR3的氨基酸序列与SEQ ID NO:6所示的序列具有至少80%的同源性。

根据本发明实施例的抗体或抗原结合片段能够与人CD94蛋白进行结合,有效治疗或预防CD94介导的相关疾病,并进行相关科学研究。

[0018] 根据本发明的实施例,上述抗体或抗原结合片段还可以进一步包括下列附加技术特征中的至少之一:

[0019] 根据本发明的实施例,所述抗体或抗原结合片段包括:重链FR区和轻链FR区中的至少之一。

[0020] 根据本发明的实施例,所述重链FR区和轻链FR区的至少之一的至少一部分来自于人源抗体、灵长目源抗体和鼠源抗体或其突变体中的至少之一。

[0021] 根据本发明的实施例,所述抗体或抗原结合片段包括:分别如SEQ ID NO:7~10所示的重链框架区HFR1、HFR2、HFR3和HFR4序列中的至少之一;或分别如SEQ ID NO:15~18所示的重链框架区HFR1、HFR2、HFR3和HFR4序列中的至少之一。

[0022] 根据本发明的实施例,所述抗体或抗原结合片段包括:分别如SEQ ID NO:11~14所示的轻链框架区LFR1、LFR2、LFR3和LFR4序列中的至少之一;或分别如SEQ ID NO:19~22所示的轻链框架区LFR1、LFR2、LFR3和LFR4序列中的至少之一。

[0023] 根据本发明的实施例,所述抗体或抗原结合片段包括:分别如SEQ ID NO:7~10所示的重链框架区HFR1、HFR2、HFR3和HFR4序列中的至少之一;分别如SEQ ID NO:11~14所示的轻链框架区LFR1、LFR2、LFR3和LFR4序列中的至少之一;或者分别如SEQ ID NO:15~18所示的重链框架区HFR1、HFR2、HFR3和HFR4序列中的至少之一;分别如SEQ ID NO:19~22所示的轻链框架区LFR1、LFR2、LFR3和LFR4序列中的至少之一。

[0024] 根据本发明的实施例,所述抗体或抗原结合片段包括:如SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:25所示的重链可变区;和/或如SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:26所示的轻链可变区。

[0025] 根据本发明的实施例,所述抗体或抗原结合片段包括:1) 如SEQ ID NO:23所示的重链可变区,和如SEQ ID NO:24所示的轻链可变区;或2) 如SEQ ID NO:25所示的重链可变区,和如SEQ ID NO:26所示的轻链可变区。

[0026] 根据本发明的实施例,所述抗体或抗原结合片段含有重链恒定区和轻链恒定区的至少之一,所述重链恒定区和轻链恒定区的至少之一的至少一部分来自于人源抗体、灵长目源抗体和鼠源抗体或其突变体中的至少之一。

[0027] 根据本发明的实施例,所述轻链恒定区和重链恒定区均来自于鼠源IgG抗体或其突变体或人源IgG抗体或其突变体。

[0028] 根据本发明的实施例,所述轻链恒定区和重链恒定区均来自于鼠源IgG1、IgG4抗

体或其突变体或人源IgG1、IgG4抗体或其突变体。

[0029] 根据本发明的实施例,所述的轻链恒定区包含人源或鼠源的 κ 、 λ 链或其变体。

[0030] 根据本发明的实施例,所述抗体具有如SEQ ID NO:27、29或31所示氨基酸序列的重链恒定区和/或如SEQ ID NO:28、30或32所示氨基酸序列的轻链恒定区。

[0031] 根据本发明的实施例,所述抗体具有如SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链恒定区和如SEQ IDNO:28所示氨基酸序列的轻链恒定区。

[0032] 根据本发明的实施例,所述抗体具有如SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的重链恒定区和如SEQ IDNO:30所示氨基酸序列的轻链恒定区。

[0033] 根据本发明的实施例,所述抗体具有如SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的重链恒定区和如SEQ IDNO:32所示氨基酸序列的轻链恒定区。

[0034] 根据本发明的实施例,所述抗体或抗原结合片段具有SEQ ID NO:33、35、36和38任一项所示氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:34、37和39任一项所示氨基酸序列的轻链。

[0035] 根据本发明的实施例,所述抗体或抗原结合片段具有SEQ ID NO:33所示氨基酸序列的重链和SEQ ID NO:34所示氨基酸序列的轻链;所述抗体或抗原结合片段具有SEQ ID NO:35所示氨基酸序列的重链和SEQ ID NO:37所示氨基酸序列的轻链;所述抗体或抗原结合片段具有SEQ ID NO:36所示氨基酸序列的重链和SEQ ID NO:37所示氨基酸序列的轻链;或所述抗体或抗原结合片段具有SEQ ID NO:38所示氨基酸序列的重链和SEQ ID NO:39所示氨基酸序列的轻链。

[0036] 根据本发明的实施例,所述抗体或抗原结合片段包括单抗或多抗。

[0037] 根据本发明的实施例,所述单抗包括Fv、单链抗体、Fab、单域抗体以及最小识别单位中的至少之一。

[0038] 根据本发明的实施例,所述抗体或其抗原结合片段能够结合SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列。

[0039] 在本发明的第二方面,本发明提供了一种核酸分子,所述核酸分子编码第一方面所述的抗体或抗原结合片段。根据本发明一些具体实施方式中的核酸分子编码的抗体或抗原结合片段能够与人CD94蛋白进行结合,有效治疗或预防CD94介导的相关疾病。

[0040] 根据本发明的实施例,上述核酸分子还可以包括下列附加技术特征中的至少之一:

[0041] 根据本发明的实施例,所述核酸分子为DNA。

[0042] 需要说明的是,对于本发明说明书和权利要求书中所提及的核酸,本领域技术人员应当理解,实际包括互补双链的任意一条,或者两条。为了方便,在本说明书和权利要求书中,虽然多数情况下只给出了一条链,但实际上也公开了与之互补的另一条链。另外,本申请中的核酸序列包括DNA形式或RNA形式,公开其中一种,意味着另一种也被公开。

[0043] 在本发明的第三方面,本发明提出了一种表达载体,所述表达载体携带前面所述的核酸分子。所述表达载体可包括可选的控制序列,所述控制序列与所述核酸分子进行可操作地连接。其中,所述控制序列为可指导所述核酸分子在宿主中表达的一个或多个控制序列。本发明实施例所提出的表达载体可在适合的宿主细胞中高效大量表达所述抗体或抗原结合片段。

[0044] 本文中“可操作地连接”是指将外源基因连接到载体上,使得载体内的控制元件,

例如转录控制序列和翻译控制序列等等,能够发挥其预期的调节外源基因的转录和翻译的功能。在将上述核酸分子连接到载体上时,可以将核酸分子与载体上的控制元件直接或者间接相连,只要这些控制元件能够控制核酸分子的翻译和表达等即可。当然这些控制元件可以直接来自于载体本身,也可以是外源性的,即并非来自于载体本身。本领域技术人员可以理解,用来编码抗体或抗原结合片段的核酸分子,可以分别独立的插入到不同的载体上,常见的是插入到同一载体上。常用的载体例如可以为质粒、噬菌体等等。例如Plasmid-X质粒。

[0045] 在本发明的第四方面,本发明提出了一种制备前面所述的抗体或抗原结合片段的方法,包括:将前面所述的表达载体引入到细胞中;将所述细胞在适于蛋白表达和分泌的条件下进行培养,以便获得所述抗体或抗原结合片段。根据本发明一些具体实施方式所提出的方法可以有效体外大量获得所述抗体或抗原结合片段。

[0046] 根据本发明的一些具体实施方式,上述制备前面所述的抗体或抗原结合片段的方法还可以包括下列附加技术特征中的至少之一:

[0047] 根据本发明的一些具体实施方式,所述细胞不受特别限制,原核细胞或真核细胞均可使用。

[0048] 根据本发明的一些具体实施方式,所述细胞为真核细胞。

[0049] 根据本发明的一些具体实施方式,所述真核细胞为哺乳动物细胞。根据本发明的一些具体实施例,当所述细胞为真核细胞,如哺乳动物细胞时所述重组抗体的表达效率较高。

[0050] 在本发明的第五方面,本发明提出了一种重组细胞,所述重组细胞前面所述的核酸,或表达载体,或能够表达前面所述的抗体或抗原结合片段。所述重组细胞是通过转染或者转化所述表达载体获得的。根据本发明的一些具体实施方式,所述重组细胞在合适条件下可高效并大量表达上述抗体或抗原结合片段。

[0051] 需要注意的是,本发明所述重组细胞不受特别限制,可以为原核细胞、真核细胞或噬菌体。所述原核细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、链霉菌或奇异变形菌等。所述真核细胞包括巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌,草地粘虫等昆虫细胞,烟草等植物细胞,BHK细胞、CHO细胞、COS细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。在一些实施例中,本发明所述重组细胞优选为哺乳动物细胞,包括BHK细胞、CHO细胞、NS0细胞或COS细胞,且不包括动物生殖细胞、受精卵或胚胎干细胞。

[0052] 需要说明的是,本申请说明书中所述的“适合条件”,是指适合本申请所述抗体或抗原结合片段表达的条件。本领域技术人员容易理解的是,适合抗体或抗原结合片段表达的条件包括但不限于合适的转化或转染方式、合适的转化或转条件、健康的宿主细胞状态、合适的宿主细胞密度、适宜的细胞培养环境、适宜的细胞培养时间。“适合条件”不受特别限制,本领域技术人员可根据实验室的具体环境,优化最适的所述抗体或抗原结合片段表达的条件。

[0053] 在本发明的第六方面,本发明提出了一种免疫缀合物,包括前面所述的抗体或抗原结合片段,和治疗剂。如前所述,本发明实施例的抗体或抗原结合片段能够有效与CD94蛋白进行结合,有效治疗或预防CD94相关疾病,因此,包含所述抗体或抗原结合片段的免疫缀合物同样能够与人CD94蛋白进行结合,所述免疫缀合物具有良好的预防和/或治疗CD94介

导的疾病的效果。

[0054] 在本发明的第七方面,本发明提出了一种组合物,包括前面所述的抗体或抗原结合片段、核酸分子、表达载体或重组细胞。如前所述,本发明一些具体实施方式的所述抗体或抗原结合片段能够有效与人CD94蛋白进行结合并有效抑制肿瘤细胞的增殖,因此,包含上述物质的组合物同样可以有效与人CD94蛋白进行结合,具有良好的预防和/或治疗CD94介导的疾病效果的,所述组合物的种类不受特别限制,可以为食品组合物或药物组合物。

[0055] 本发明的组合物也可以相互组合、或与一种或多种其它的治疗化合物组合给药,例如,与化疗剂组合给药。因此,所述组合物还可以含有化疗剂。本发明的抗体或其抗原结合片段、或免疫缀合物还可以与第二治疗剂组合,所述第二治疗剂的示例性试剂包括但不限于抑制CD94活性的其他试剂(包括其他抗体或其抗原结合片段、肽抑制剂、小分子拮抗剂等)和/或干扰CD94上游或下游信号转导的试剂。

[0056] 需要注意的是,所述组合物包括在时间和/或空间上分开的组合,只要其能够共同作用以实现本发明的目的。例如,所述组合物中所含的成分可以以整体施用于受试者,或者分开施用于受试者。当所述组合物中所含的成分分开地施用于受试者时,各个成分可以同时或依次施用于受试者。

[0057] 在本发明的第八方面,本发明提出了一种药物,包括前面所述的抗体或抗原结合片段、核酸分子、表达载体、重组细胞或组合物。如前所述,本发明一些具体实施方式的所述抗体或抗原结合片段能够有效与人CD94蛋白进行结合,因此,包含有效量的所述抗体或抗原结合片段的活性成分或其一系列物质的药物同样可以有效与人CD94蛋白进行结合,具有良好的预防和/或治疗CD94介导的疾病效果的。

[0058] 根据本发明的实施例,上述药物还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0059] 根据本发明的实施例,所述药物还可以包括药学上可接受的载体。

[0060] 如本文所用,术语“有效量”或“有效剂量”是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人或/或动物所接受的量。

[0061] 本发明所述的抗体或抗原结合片段的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于:所述的活性成分的药代动力学参数例如生物利用率、代谢、半衰期等;患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。例如,由治疗状况的迫切要求,可每天给予若干次分开的剂量,或将剂量按比例地减少。

[0062] 如本文所用,“药学上可接受的”的成分是适用于人和/或哺乳动物而无过度不良反应(如毒性、刺激和变态反应)的,即具有合理的效益/风险比的物质。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体,包括各种赋形剂和稀释剂。

[0063] 本发明的药物含有安全有效量的本发明的活性成分以及药学上可接受的载体。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。通常药物制剂应与给药方式相匹配,其中,给药的方式可以为口服给药、经鼻给药、皮内给药、皮下给药、肌肉给药或静脉给药或腹腔内给药,本发明的药物的剂型为注射剂、口服制剂(片剂、胶囊、口服液)、透皮剂、缓释剂。例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。所述的药物宜在无菌条件下制造。所述抗体或抗原结合片段可通过静脉输注

或注射或肌肉内或皮下注射来施用。

[0064] 当然,本文中的抗CD94单抗还可以根据需要进行被制成试剂盒或者其他诊断性试剂的一部分。

[0065] 在本发明的第九方面,本发明提出了一种试剂盒,所述试剂盒含有前面所述抗体或其抗原结合片段、核酸分子、表达载体或重组细胞。如前所述,本发明一些具体实施方式的抗体或抗原结合片段能够有效与人CD94蛋白进行结合,因此,包含所述抗体或抗原结合片段的试剂盒能够有效的对人CD94蛋白进行定性或定量检测。本发明提供的试剂盒,例如可以用于免疫印迹、免疫沉淀等涉及到利用人CD94和抗体特异性结合性能来检测的试剂盒等。这些试剂盒可包含下列中的任意一种或多种:拮抗剂、抗CD94抗体或者药物参照材料;蛋白纯化柱;免疫球蛋白亲和纯化缓冲剂;细胞的测定稀释剂;说明书或者文献等。抗CD94抗体可被用于不同类型的诊断测试,例如可以在体外或者体内检测各种各样的疾病或者药物、毒素或者其他蛋白等的存在,例如可以通过对受试者的血清或者血液进行检测,用来测试相关疾病,也可以进行科学研究,利用所述试剂盒检测待测样品中的人CD94蛋白。这种相关疾病可包括CD94相关疾病,例如癌症。当然本文提供的抗体或抗原结合片段也可以用于上述疾病的放射免疫检测和放射免疫治疗等等。针对于上述应用场景,所述结合分子同样适用,此处不再累述。

[0066] 所述试剂盒还可以包括常规用于检测CD94,如包被液等。

[0067] 在本发明的第十方面,本发明提出了前面所述的抗体或其抗原结合片段核酸分子、表达载体、重组细胞或组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防和/或治疗CD94介导的相关疾病。如前所述,本发明一些具体实施方式的所述抗体或抗原结合片段能够有效与人CD94蛋白进行结合,因此,包含有效量的所述抗体或抗原结合片段或其一系列物质的药物同样可以有效与人CD94蛋白进行结合,具有良好的预防和/或治疗CD94介导的疾病效果的。

[0068] 根据本发明的实施例,上述制备药物的用途还可以包括下列附加技术特征中的至少之一:

[0069] 根据本发明的实施例,所述CD94介导的相关疾病包括移植排斥、自身免疫性疾病、感染性疾病以及癌症。

[0070] 根据本发明的实施例,所述自身免疫性疾病包括下列中的至少之一:系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、系统性血管炎、硬皮病、皮肌炎、自身免疫性溶血性贫血、甲状腺自身免疫病、溃疡性结肠炎、慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症和急性特发性多神经炎。

[0071] 根据本发明的实施例,所述癌症包括下列中的至少之一:肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌。

[0072] 在本发明的第十一方面,本发明提出了前面所述的抗体或抗原结合片段、核酸分子、表达载体或重组细胞在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测CD94。如前所述,本发明一些具体实施方式的抗体或抗原结合片段能够有效与人CD94蛋白进行结合,并阻断所述CD94蛋白与其受体进行结合,因此,所述抗体或抗原结合片段可以用于制备检测CD94蛋

白的试剂盒,所述试剂盒能够有效的对人CD94蛋白进行定性或定量检测。

[0073] 在本发明的第十二方面,本发明提出了一种治疗或预防CD94介导的相关疾病的方法。根据本发明的实施例,所述方法包括向受试者施用以下中的至少之一:1)前面所述的抗体或抗原结合片段;2)前面所述的核酸分子;3)前面所述的表达载体;4)前面所述的重组细胞;4)前面所述的组合物;和6)前面所述的药物。如前所述,所述抗体或抗原结合片段能够与人CD94蛋白进行结合,能够有效治疗或预防CD94介导的相关疾病,优选为自身免疫性疾病或癌症,因此,根据本发明实施例的方法能够有效治疗或预防CD94介导的相关疾病。

[0074] 根据本发明的实施例,上述治疗或预防疾病的方法还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0075] 根据本发明的实施例,所述CD94介导的相关疾病包括移植排斥、自身免疫性疾病、感染性疾病以及癌症。本领域技术人员可以理解,CD94抗体在NK细胞表面高表达,而NK细胞在无菌性炎症(移植排斥、自身免疫性疾病)和有菌性炎症(感染性疾病)中过度活化会导致组织脏器损伤,因此,CD94抗体可以作为清除抗体,用于治疗或预防上述疾病。

[0076] 根据本发明的实施例,所述自身免疫性疾病包括下列中的至少之一:系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、系统性血管炎、硬皮病、皮炎、自身免疫性溶血性贫血、甲状腺自身免疫病、溃疡性结肠炎、慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症和急性特发性多神经炎。

[0077] 根据本发明的实施例,所述癌症包括下列中的至少之一:肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌。

[0078] 在本发明的第十三方面,本发明提出了一种诊断CD94介导的相关疾病的方法。根据本发明的实施例,包括使用下列中的至少之一对待测样品中的CD94进行检测:1)前面所述的抗体或抗原结合片段;2)前面所述的核酸分子;3)前面所述的表达载体;和4)前面所述的重组细胞,基于所述CD94的检测结果,确定所述待测样品中CD94的含量。本申请提出的所述抗体或抗原结合片段,或核酸分子、表达载体、重组细胞表达的抗体或抗原结合片段均可以有效与人CD94蛋白进行结合,或核酸分子、表达载体、重组细胞表达的抗体或抗原结合片段均可以有效与CD94进行结合,因此,采用本申请所述的方法可以有效检测来源于受试个体的待测样品中CD94的含量,并可以对CD94引起的相关疾病进行有效诊断。

[0079] 根据本发明的实施例,上述诊断疾病的方法还可以进一步包括下列附加技术特征中的至少之一:

[0080] 根据本发明的实施例,所述待测样品中CD94的含量不低于患病的最低标准是待测样品来源于患有CD94引起的相关疾病的患者的指示。所述最低标准的值可以通过对大量患有所述CD94引起的相关疾病的个体和大量健康个体的待测样本中的CD94的含量进行差异比较分析、以及验证,而确定下来。

[0081] 根据本发明的实施例,所述待测样品包括下列中的至少之一:血液、唾液、汗液、组织、细胞、血液、血清、血浆、粪便和尿液。

[0082] 根据本发明的实施例,所述CD94介导的相关疾病包括移植排斥、自身免疫性疾病、感染性疾病以及癌症。

[0083] 根据本发明的实施例,所述自身免疫性疾病包括下列中的至少之一:系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、系统性血管炎、硬皮病、皮炎、自身免疫性溶血性贫血、甲状腺自身免疫病、溃疡性结肠炎、慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症和急性特发性多神经炎。

[0084] 根据本发明的实施例,所述癌症包括下列中的至少之一:肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌。

[0085] 在本发明的第十四方面,本发明提出了一种对CD94介导的相关疾病进行分期的方法。根据本发明的实施例,包括使用下列中的至少之一对待测样品中的CD94进行检测:1)前面所述的抗体或抗原结合片段;2)前面所述的核酸分子;3)前面所述的表达载体;和4)前面所述的重组细胞,基于所述CD94的检测结果,确定所述待测样品中CD94的含量。本申请提出的所述抗体或抗原结合片段,或核酸分子、表达载体、重组细胞表达的抗体或抗原结合片段均可以有效与人CD94进行结合,因此,采用本申请所述的方法可以有效检测来源于受试个体的待测样品中CD94的含量,并基于所述CD94的含量对CD94引起的相关疾病所处的时期进行评估。

[0086] 根据本发明的实施例,上述对疾病进行分期的方法还可以进一步包括下列附加技术特征中的至少之一:

[0087] 根据本发明的实施例,所述待测样品中CD94的含量不低于肿瘤IV期患病标准水平是待测样品来源于患有肿瘤IV期的患者的指示,所述待测样品中CD94的含量位于肿瘤IV期和III期患病标准水平之间是待测样品来源于患有肿瘤III期的患者的指示;所述待测样品中CD94的含量处于肿瘤III期和II期患病标准水平之间是待测样品来源于患有肿瘤II期的患者的指示;所述待测样品中CD94的含量处于I期和II期患病标准水平之间是待测样品来源于患有肿瘤I期的患者的指示。本领域技术人员可以理解,所述的肿瘤I期、II期、III期、IV期患病时CD94的水平根据肿瘤种类的不同而变化,判断肿瘤所述时期,只要将所述待测样品中CD94的含量与对应的该肿瘤阶段CD94的标准水平进行对比即可知晓,或将所述待测样品中CD94的含量与已知患病时期的个体或群体来源的样品CD94的含量进行对比。所述肿瘤I期、II期、III期、IV期标准水平的值可以通过对大量所述患有CD94引起的相关疾病的个体和大量健康个体的待测样本中的CD94的含量的差异进行比较分析、以及验证,而确定下来。

[0088] 根据本发明的实施例,所述待测样品包括下列中的至少之一:血液、唾液、汗液、组织、细胞、血液、血清、血浆、粪便和尿液。

[0089] 根据本发明的实施例,所述CD94介导的相关疾病包括移植排斥、自身免疫性疾病、感染性疾病以及癌症。

[0090] 根据本发明的实施例,所述自身免疫性疾病包括下列中的至少之一:系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、系统性血管炎、硬皮病、皮炎、自身免疫性溶血性贫血、甲状腺自身免疫病、溃疡性结肠炎、慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症和急性特发性多神经炎。

[0091] 根据本发明的实施例,所述癌症包括下列中的至少之一:肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌。

[0092] 在本发明的第十五方面,本发明提出了一种评估CD94介导的相关疾病预后的方法。根据本发明的实施例,包括使用下列中的至少之一对待测样品中的CD94进行检测:1)前面所述的抗体或抗原结合片段;2)前面所述的核酸分子;3)前面所述的表达载体;和4)前面所述的重组细胞,基于所述CD94,的检测结果,确定所述待测样品中CD94的含量。如前所述,CD94的含量对癌症具有重要影响,患有相关疾病个体进行治疗后,通过监测其组织或排泄物,如外周血、尿液等中CD94的含量可以有效评估该类疾病的预后,例如,将治疗前后的受试者体内CD94的含量进行比较,或将治疗后的受试者体内CD94的含量与正常个体或患病个体的CD94水平进行比较等方式,本申请提出的所述抗体或抗原结合片段,或核酸分子、表达载体、重组细胞表达的抗体或抗原结合片段均可以有效与人CD94进行结合,因此,采用本申请所述的方法可以有效检测来源于受试个体的待测样品中CD94的含量,并基于所述CD94的含量对CD94引起的相关疾病的预后进行评估。

[0093] 根据本发明的实施例,上述评估疾病预后的方法还可以进一步包括下列附加技术特征中的至少之一:

[0094] 根据本发明的实施例,所述待测样品来源于治疗前或治疗后的患有CD94介导的相关疾病的患者。

[0095] 根据本发明的实施例,所述待测样品包括下列中的至少之一:血液、唾液、汗液、组织、细胞、血液、血清、血浆、粪便和尿液。

[0096] 根据本发明的实施例,基于所述治疗前或治疗后的患有CD94介导的相关疾病的患者的待测样品中的CD94的含量,确定CD94介导的相关疾病的预后效果。

[0097] 根据本发明的实施例,治疗后的患有CD94介导的相关疾病的患者的待测样品中的CD94的含量下降是患者预后良好的指示。

[0098] 根据本发明的实施例,所述CD94介导的相关疾病包括移植排斥、自身免疫性疾病、感染性疾病以及癌症。

[0099] 根据本发明的实施例,所述自身免疫性疾病包括下列中的至少之一:系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、系统性血管炎、硬皮病、皮炎、自身免疫性溶血性贫血、甲状腺自身免疫病、溃疡性结肠炎、慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症和急性特发性多神经炎。

[0100] 根据本发明的实施例,所述癌症包括下列中的至少之一:肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌。

[0101] 在本发明的第十六方面,本发明提出了本发明提出了前面所述的抗体或抗原结合片段,核酸分子,表达载体、重组细胞,组合物或药物在治疗或预防CD94介导的相关疾病中的用途。如前所述,所述抗体或抗原结合片段能够与人CD94进行有效结合,能够有效治疗或预防CD94介导的相关疾病。

[0102] 根据本发明的实施例,上述用途还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0103] 根据本发明的实施例,所述CD94介导的相关疾病包括移植排斥、自身免疫性疾病、感染性疾病以及癌症。

[0104] 根据本发明的实施例,所述自身免疫性疾病包括下列中的至少之一:系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、系统性血管炎、硬皮病、皮炎、自身免疫性溶血性贫血、甲状腺自身免疫病、溃疡性结肠炎、慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症和急性特发性多神经炎。

[0105] 根据本发明的实施例,所述癌症包括下列中的至少之一:肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌。

[0106] 在本发明的第十七方面,本发明提出了前面所述的抗体或抗原结合片段,核酸分子,表达载体或重组细胞在诊断CD94介导的相关疾病、对CD94介导的相关疾病进行分期或评估CD94介导的相关疾病预后中的用途。如前所述,本申请提出的所述抗体或抗原结合片段,或核酸分子、表达载体、重组细胞表达的抗体或抗原结合片段均可以有效与人CD94进行结合,因此,采用本申请所述的方法可以有效检测来源于受试个体的待测样品中CD94的含量,并可以对CD94介导的相关疾病进行有效诊断、疾病分期和疾病预后评估。

[0107] 根据本发明的实施例,上述用途还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0108] 根据本发明的实施例,所述CD94介导的相关疾病包括移植排斥、自身免疫性疾病、感染性疾病以及癌症。

[0109] 根据本发明的实施例,所述自身免疫性疾病包括下列中的至少之一:系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、系统性血管炎、硬皮病、皮炎、自身免疫性溶血性贫血、甲状腺自身免疫病、溃疡性结肠炎、慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症和急性特发性多神经炎。

[0110] 根据本发明的实施例,所述癌症包括下列中的至少之一:肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌。

[0111] 本发明中涉及的“受试者”或“个体”一般指哺乳动物,如灵长类动物和/或啮齿类动物,特别是人、猴或鼠。

[0112] 本发明的有益效果:

[0113] 1) 截止到目前为止,尚没有阻断性CD94抗体用于抗癌研究的专利或者研究报道。

[0114] 2) 本发明所获得的CD94抗体与CD94蛋白具有高结合活性,并且在体外功能实验中,该CD94抗体的活性优于临床阶段的NKG2A抗体。

[0115] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0116] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0117] 图1为根据本发明实施例的人-鼠15C10嵌合抗体与293T-CD94/NKG2A细胞结合的结果图;

[0118] 图2为根据本发明实施例的人-鼠15C10嵌合抗体阻断HLA-E结合293T-CD94/NKG2A细胞的结果图;

[0119] 图3为根据本发明实施例的人-鼠15C10嵌合抗体、人源化15C10抗体结合293T-CD94/NKG2A细胞的结果图;

[0120] 图4为根据本发明实施例的人源化15C10抗体、作为对照的NKG2A抗体huZ199和huZ270结合293T-CD94/NKG2A细胞的结果图;

[0121] 图5为根据本发明实施例的人源化15C10抗体阻断HLA-E结合293T-CD94/NKG2A细胞的结果图;

[0122] 图6为根据本发明实施例的人源化15C10抗体与CD94/NKG2A-Fc异源二聚体蛋白结合的ELISA结果图;

[0123] 图7为根据本发明实施例的人源化15C10抗体促进Jurkat-NFAT-lucia-CD94/NKG2AT细胞活化的结果图;

[0124] 图8为根据本发明实施例的人源化15C10抗体促进免疫系统重建小鼠抗癌的结果图。

具体实施方式

[0125] 下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0126] 需要说明的是,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地,在本发明的描述中,除非另有说明,“多个”的含义是两个或两个以上。

[0127] 在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值,这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

[0128] 为了更容易理解本发明,以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见在本文件中的它处另有明确定义,否则本文中使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代20个常用L-氨基酸之一的标准3字母和/或1字母代码。

[0129] 本发明所述的抗体或抗原结合片段通常由生物合成的方法制备。根据本发明所述的核苷酸序列,本领域技术人员可方便地用各种已知方法制得本发明的编码核酸。这些方法例如但不限于:PCR,DNA人工合成等,具体的方法可参见J.萨姆布鲁克,《分子克隆实验指南》。作为本发明的一种实施方式,可通过分段合成核苷酸序列再进行重叠延伸PCR的方法来构建本发明的编码核酸序列。其中,所述抗体或抗原片段是采用Kabat编号系统进行编号和定义的。

[0130] 本发明的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体,优选人源化抗体。

[0131] 术语“鼠源抗体”在本发明中为根据本领域知识和技能制备的对人CD94的单克隆抗体。制备时用抗原注射试验对象,然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本发明一个优选的实施方案中,所述的鼠源CD94抗体或其抗原结合片段,可进一步包含鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区,或进一步包含鼠源IgG1、IgG2、IgG3或其变体的重链恒定区。

[0132] 术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”,是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体,可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。从小鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因,再根据需要克隆人抗体的恒定区基因,将小鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入人载体中,最后在真核表达系统或原核表达系统中表达嵌合抗体分子。在本发明一个优选的实施方案中,所述的CD94嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链Fc区。所述的CD94嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体的重链恒定区。

[0133] 术语“人源化抗体(humanized antibody)”,也称为CDR移植抗体(CDR-grafted antibody),是指将小鼠的CDR序列移植到人的抗体可变区框架,即不同类型的人种系抗体构架序列中产生的抗体。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在“VBase”人种系序列数据库找到。为避免免疫原性下降的同时,引起的活性下降,可对所述的人抗体可变区构架序列进行最少反向突变或回复突变,以保持活性。

[0134] 本文中,所述“单抗”是指具有单一抗原结合位点的抗体。

[0135] 本文中,所述“多抗”是指具有两个或以上不同抗原结合位点的抗体。

[0136] 在本文中,术语“突变体”或“变体”可以指包含对任何天然存在的或工程化的分子进行包含一个或多个核苷酸或氨基酸突变获得的分子。

[0137] 术语“互补决定区”或“CDR”或“CDR序列”是指抗体中负责抗原结合的氨基酸序列,例如,通常包括:轻链可变区中23-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)附近,和重链可变区中31-35B(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)附近的氨基酸残基(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991));和/或来自“高变环”(例如,轻链可变区中26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3),和重链可变区中26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)附近的氨基酸残基(Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987)))。

[0138] 在本文中,术语“同一性”用于描述相对于参考序列的氨基酸序列或核酸序列时,采用通过常规的方法进行确定两个氨基酸序列或核酸序列之间的相同氨基酸或核苷酸的百分比,例如参见,Ausubel等,编著(1995),Current Protocols in Molecular Biology,第19章(Greene Publishing and Wiley-Interscience,New York);和ALIGN程序(Dayhoff(1978),Atlas of Protein Sequence and Structure 5:Suppl.3(National Biomedical Research Foundation,Washington,D.C.))。关于比对序列和测定序列同一性有很多算法,包括,Needleman等(1970) J.Mol.Biol.48:443的同源性比对算法;Smith等(1981) Adv.Appl.Math.2:482的局部同源性算法;Pearson等(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.85:2444的相似性搜索方法;Smith-Waterman算法(Meth.Mol.Biol.70:173-187(1997));和BLASTP, BLASTN,和BLASTX算法(参见Altschul等(1990) J.Mol.Biol.215:403-410)。利用这些算法

的计算机程序也是可获得的,并且包括但不限于:ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件,或者WU-BLAST-2 (Altschul等,Meth.Enzym.,266:460-480 (1996));或者GAP,BESTFIT,BLASTAltschul等,上文,FASTA,和TFASTA,在Genetics Computing Group (GCG) 包,8版, Madison,Wisconsin,USA中可获得;和Intelligenetics,Mountain View,California提供的PC/Gene程序中的CLUSTAL。

[0139] 在不实质性影响抗体活性(保留至少95%的活性)的前提下,本领域技术人员可以对本发明的序列替换、添加和/或缺失一个或更多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个)氨基酸,以获得所述抗体或其功能性片段之序列的变体。它们都被视为包括在本发明保护的范围内。如在可变区将具有类似性质的氨基酸进行替换。本发明所述变体序列可以与参比序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的一致性(或同源性)。本发明所述的序列一致性可以使用序列分析软件测量。例如使用缺省参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。本发明述及的氨基酸序列均按照N端至C端的方式示出。

[0140] 如前所述,本发明的单抗可以是全长抗体或可仅包含其功能性片段(例如,Fab、F(ab')₂或scFv片段),或可以被修饰以影响功能。本发明包括具有修饰的糖基化模式的抗CD94抗体。在一些应用中,进行修饰以除去不期望的糖基化位点可以是有用的,或在寡糖链上不存在岩藻糖部分以例如增强抗体依赖性细胞毒性(ADCC)功能的抗体。在另一些应用中,可进行半乳糖基化修饰以改变补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0141] 在本文中,所述“全长抗体”是由两条相同的轻链和两条相同的重链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构,如免疫球蛋白G(IgG)、免疫球蛋白A(IgA)、免疫球蛋白M(IgM)、免疫球蛋白D(IgD)或免疫球蛋白E(IgE)。同一类免疫球蛋白也可以根据氨基酸组成为不同的亚类,如IgG1,IgG2,IgG3,IgG4。免疫球蛋白轻链根据恒定区的不同分为κ链或者λ链。

[0142] 本文所使用的术语“功能性片段”尤其是指抗体片段如CDR移植抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv,纳米抗体、或者通过化学修饰或通过掺入脂质体中应能够增加半寿期的任何片段,所述化学修饰例如添加聚(亚烷基)二醇,如聚乙二醇(“聚乙二醇化,PEG化”) (被称为Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG或Fab'-PEG的聚乙二醇化片段) (“PEG”为聚乙二醇),所述片段具有CD94结合活性。优选地,所述功能性片段将由其来源抗体的重链可变区或轻链可变区的部分序列构成或者包含它们,所述部分序列足以保留与其来源抗体相同的结合特异性和充分的亲和力,对于CD94,优选至少等于其来源抗体亲和力的1/100,在更优选方式中至少等于1/10。这种功能片段将包含最少3个氨基酸,优选其来源的抗体序列的5、10、15、25、50和100个连续氨基酸。

[0143] 在本发明中,在未作相反说明的情况下,使用的术语“抗原结合片段”通常是指抗原结合性抗体片段,可以包括完整抗体的一部分,一般是抗原结合区或可变区,示例性的,如包括CDR移植抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv,纳米抗体等。

[0144] 在本文中,术语“CDR移植抗体”是指将一个物种单抗的CDR移植至另一物种抗体可变区。例如,可将鼠源单抗的CDR移植至人源抗体可变区,以便替代人源抗体CDR,使人源抗体获得鼠源单抗的抗原结合特异性,同时减少其异源性。

[0145] 在本文中,术语“Fab抗体”或“Fab”通常是指仅含Fab分子的抗体,其由重链的VH和CH1以及完整的轻链构成,轻链和重链之间通过一个二硫键连接。

[0146] 在本文中,术语“纳米抗体”(单域抗体或VHH抗体),其最初被描述为“重链抗体”

(即“缺乏轻链的抗体”)的抗原结合免疫球蛋白(可变)域(Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: “Naturally occurring antibodies devoid of light chains”; Nature 363, 446-448 (1993)), 只包含重链可变区 (VH) 和常规的CH2与CH3区, 其通过重链可变区与抗原特异性结合。

[0147] 在本文中, 术语“Fv抗体”通常是指仅由轻链可变区 (VL) 和重链可变区 (VH) 通过非共价键连接而成的抗体, 是抗体分子保留完整抗原结合部位的最小功能片段。

[0148] 在本文中, 术语“单链抗体”或“scFv”是由抗体重链可变区和轻链可变区通过短肽连接而成的片段。

[0149] 本发明所涉及的氨基酸或核酸序列详见表1。

[0150] 表1:

[0151]

SEQ ID NO:	序列	说明
1	GFNIKDTY	鼠源抗体重链可变区 CDR1(HCDR1)
2	IDPANVNT	鼠源抗体重链可变区 CDR2(HCDR2)
3	VGGRGHTWFAY	鼠源抗体重链可变区 CDR3(HCDR3)
4	QDITNY	鼠源抗体轻链可变区 CDR1(LCDR1)
5	YTS	鼠源抗体轻链可变区 CDR2(LCDR2)
6	QQGNTLPYT	鼠源抗体轻链可变区 CDR3(LCDR3)
7	EVQLQQSGAELVMPGASVKLSCTAS	鼠源抗体重链可变区 FR1(mHFR1)
8	MHWVMQRPEQGLEWIGR	鼠源抗体重链可变区 FR2(mHFR2)
9	NYDPRFQGKATITADTSSNTAYLQFSSLTSEDVAVYYC	鼠源抗体重链可变区 FR3(mHFR3)
10	WGQGTLVTVSA	鼠源抗体重链可变区 FR4(mHFR4)
11	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRAS	鼠源抗体轻链可变区 FR1(mLFR1)
12	LNWYQQKPDGTVKLLIY	鼠源抗体轻链可变区 FR2(mLFR2)
13	RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC	鼠源抗体轻链可变区 FR3(mLFR3)
14	FGGGTKLEIK	鼠源抗体轻链可变区 FR4(mLFR4)
15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	人源化抗体 h15C10-hIgG4 重链可变区 FR1(hHFR1)
16	MHWVRQAPGQGLEWIGR	人源化抗体 h15C10-hIgG4 重链可变区 FR2(hHFR2)
17	NYDQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYC	人源化抗体 h15C10-hIgG4 重链可变区 FR3(hHFR3)
18	WGQGTTVTVSS	人源化抗体 h15C10-hIgG4 重链可变区 FR4(hHFR4)
19	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS	人源化抗体 h15C10-hIgG4 轻链可变区 FR1(LFR1)
20	LNWYQQKPGKAPKLLIY	人源化抗体 h15C10-hIgG4 轻链可变区 FR2(LFR2)
21	RLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC	人源化抗体 h15C10-hIgG4 轻链可变区 FR3(LFR3)
22	FGQGTKLEIK	人源化抗体

[0152]

		h15C10-hIgG4 轻链可变区 FR4(hLFR4)
23	EVQLQQSGAELVMPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVWMQRPEQGLEWIGRIDPANVNTNYDPRFQGKATITADTSSNTAYLQFSSLTSEDVAVYYCVGGRGHTWFAYWGQGLTVTSA	鼠源抗体/人-鼠嵌合抗体 15C10-hIgG1mut 或 15C10-hIgG4 重链可变区
24	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDITNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIK	鼠源抗体/人-鼠嵌合抗体 15C10-hIgG1mut 或 15C10-hIgG4 轻链可变区
25	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYMHVWRQAPGQGLEWIGRIDPANVNTNYDQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCVGGRGHTWFAYWGQGLTVTVSS	人源化抗体 h15C10-hIgG4 重链可变区
26	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK	人源化抗体 h15C10-hIgG4 轻链可变区
27	AKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTN NGKTELNYKNTEPVLDSG SYFMYSKLRVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	鼠源抗体重链恒定区
28	RADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	鼠源抗体轻链恒定区
29	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	人-鼠嵌合抗体 15C10-hIgG1mut 重链恒定区
30	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	人-鼠嵌合抗体 15C10-hIgG1mut/15C10-hIgG4 轻链恒定区
31	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	人源化抗体 h15C10-hIgG4/人-鼠嵌合抗体 15C10-hIgG4 重链恒定区
32	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	人源化抗体 h15C10-hIgG4 轻链恒定区
33	EVQLQQSGAELVMPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVWMQRPEQGLEWIGRIDPANVNTNYDPRFQGKATITADTSSNTAYLQFSSLTSEDVAVYYCVGGRGHTWFAYWGQGLTVTSAAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSG SYFMYS	抗 CD94 鼠源抗体重链

[0153]

	KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	
34	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDITNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTS RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLE IKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQN GVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTDEYERHNSYTCEATHKSTSPIVKSF NRNEC	抗 CD94 鼠源抗体轻链
35	EVQLQQSGAELVMPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVWMQRPE QGLEWIGRIDPANVNTNYDPRFQGKATITADTSSNTAYLQFSSLT SEDTAVYYCVGGRGHTWFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	人 - 鼠 嵌 合 抗 体 15C10-hIgG1mut 重链
36	EVQLQQSGAELVMPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVWMQRPE QGLEWIGRIDPANVNTNYDPRFQGKATITADTSSNTAYLQFSSLT SEDTAVYYCVGGRGHTWFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK	人 - 鼠 嵌 合 抗 体 15C10-hIgG4 重链
37	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDITNYLNWYQQKPDGTV KLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	人 - 鼠 嵌 合 抗 体 15C10-hIgG1mut/15C1 0-hIgG4 轻链
38	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIKDTYMHVWRQAPG QGLEWIGRIDPANVNTNYDQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCVGGRGHTWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPSSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	人 源 化 抗 体 h15C10-hIgG4 重链
39	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDITNYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQ GNTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	人 源 化 抗 体 h15C10-hIgG4 轻链
40	MAVFKTTLWRLISGTLGIICLSMATLGILLKNSFTKLSIEPAFTPG PNIELQKDSDCSCQEKWVG YRCNCYFISSEKQTNWESRHLCA SQKSSLLQLQNTDELDFMSSSQFYWIGLSYSEEHTAWLWENG ALSQYLFPSFETFNKNCIAYNPNGNALDESCEDKNRYICKQQLI	CD94 蛋白氨基酸序列
41	ATGGCAGTCTTTAAGACCACACTGTGGAGG CTGATAAGCG GCACCCTGGG GATCATATGC CTGTCACTTA TGGCTACTCT CGGCATCTTGCTGAAGAACAGTTTCACCAAGCTGAGCATCGA GCCAGCTTTCACCCCCGGTCCCAACATCGAGCTCCAGAAGGA TTCCGACTGTTGCTCCTGCCAGGAAAAGTGGGTGGG CTACAGGTGTAACGCTATTTTCATATCCTCAGAGCAGAAGACA TGGAACGAATCCCGACATCTGTGCGCCAGCCAGAAGTCAAGC	编码 CD94 蛋白的核 苷酸序列

[0154]

	TTGCTGCAGCTCCAG AACACCGATGAGCTTGACTT TATGAGCTCC TCTCAGCAGT TCTATTGGAT TGGGTTGAGC TATTCTGAAG AGCATACTGCATGGTTGTGGGAAAAACGGCT CAGCCCTCTC ACAATATCTT TTCCCTTCAT TTGAAACCTT TAACACCAAG AATTGCATTG CCTATAACCC AAATGGCAAC GCACTGGATG AGTCCTGCGAAGATAAAAACCGATACATCT GTAAGCAGCA GCTTATC	
42	MDNQGVVYSDNLNPPNPKRQQRKPKGNKNSILATEQEITYAELN LQKASQDFQGNDKTYHCKDLPSAPEKLIVGILGHICLILMASVVT IVVIPSTLIQRHNNSSLNTRTQKARHCGHCPEEWITYSNSCYIG KERRTWEESLLACTSKNSSLLSIDNEEEMKFLSIISPSSWIGVFRN SSHHPWVTMNGLAFLKHEIKDSDNAELNCAVLQVNRLKSAQCGS SIIYHCKHKL	NKG2A 蛋白氨基酸序 列
43	ATGGACAACCAGGGCGTGAT CTATTCTGAC TTGAACCTGC CTCCCAACCCAAAACGCCAGCAGAGAAAGCCAAAGGGGAAT AAGAACAGTATCCTCGCCACAGAGCAGGAGATTACTTACGCC GAGCTCAACCTGCAGAAGGCATCTCAGGATTTTCAAGGAAAC GATAAAACCTACCACTGCAAAGACTTGCTTCCGCTCCTGAA AAGCTGATCGTCGGCATTCTCGGTATCATCTGC CTCATCCTTATGGCCTCCGTGGTGACAATTGTCGTCATTCCATC CACACT GATCCAACGA CACAATAATT CTTCTCTGAA TACCAGGACACAGAAGGCCAGACATTGCGGCCATTGTCCT GAGGAATGGA TCACCTATTC CAACTCTTGT TATTATATTG GGAAGGAGCGCAGAAGCTTGGAAGAATCTCTGCTCGCTTGCA CATCTAAGAACAGTTCTCTCCTGTCCATCGACAATGAA GAAGAGATGA AGTTTCTGAG CATCATTCT CCCTCCTCCT GGATCGGGGT GTTTCGTAAC TCAAGTCATC ATCCTTGGGT GACTATGAAT GGATTGGCCT TTAAGCACGA AATCAAGGAT TCCGATAATG CTGAGCTTAA CTGTGCCGTC CTGCAAGTCA ATAGGCTGAA GTCCGCTCAG TCGGGCTCCT CTATTATATA CCACTGCAAA CATAAGCTG	编码 NKG2A 蛋白的 核苷酸序列
44	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYAKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCARGGYDFDVGTLVWFFDVWGQGTTVTVSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	huZ270-hIgG1mut 抗 体重链
45	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAP KLLIYNKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ HHYGTPTRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSLSS TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	huZ270-hIgG1mut 抗 体轻链
46	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSEISSGGSYTYAASVKGRTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARHGDYPRFFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVES KYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQK SLSLSLGK	huZ199-hIgG4 抗体重 链
47	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSSYYWYQQKPGQAPRL	huZ199-hIgG4 抗体轻

[0155]

	LIYLTSLNLSGIPARFSGSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQWS GNPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	链
48	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFFDVWGQGTITVTSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK	huZ270-hIgG4 抗体重 链
49	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAP KLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQ HHYGTPTFTGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSST TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	huZ270-hIgG4 抗体轻 链
50	PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGKNSFTKLSIEPAFTPGPNIELQKDSDDCCSCQ EKWVGYYRCNCFISSEQKTWNESRHLCAQKSSLLQLQNTDEL DFMSSSAQFYWIGLSYSEEHTAWLWENGSAQSQYLFPSEFETNT KNCIAYNPNGNALDESCEDKNRYICKQQLI	CD94-Fcmutknob 氨基 酸序列
51	PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKPTSLIQRHNNSSLNTRTQKARHCGHCPEEWI TYSNSCYIIGKERRTWEESLLACTSKNSSLLSIDNEEMKFLSIIS PSSWIGVFRNSSHPWVTMNGLAFAKHEIKDSDNAELNCAVLQV NRLKSAQCGSSIIYHCKHKL	NKG2A-Fcmuthole 氨 基酸序列
52	MVDGTLTLLSEALALTQTWAGSHSLKYFHTSVSRPGRGEPFI SVGYVDDTQFVRFNDAAASPRMVPAPRWMEQEGSEYWDRETR SARDTAQIFRVNLRTRLRGYYNQSEAGSHTLQWMHGCELGPDGR FLRGYEQFAYDGKDYLTNEDLRSWTAVDTAAQISEQKSNDAE AEHQRAYLEDTCVEWLHKYLEKGKETLLHLEPPKTHVTHHPIS DHEATLRCWALGFYPAEITLTWQQDGEGHTQDELVETRPAGD GTFQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPVTLRWKPASQPTI PIVGIIAGLVLLGSVVSAGAVVAAVIWRKKSSGGKGGSYSKAEWS DSAQGSSEHSL	HLA-E 蛋白氨基酸序 列
53	ATGGTGGATGGAACACTGCT CCTGTTGCTT TCTGAGGCTC TGGCTTTGACTCAGACTTGGGCCGGGAGCC ATAGCCTGAA ATATTTCCACACAAGTGTTT CTAGGCCTGG AAGAGGCGAA CCAAGGTTTCATCAGTGTCTGGCTATGTGGAC GACACTCAGT TCGTGCGATTTCGATAACGAC GCTGCAAGTC CTCGCATGGT ACCCCGTGCTCCATGGATGGAGCAGGAAGG AAGTGAATAT TGGGACCGCGAAACACGAGCGCACGCGATACCGCCCAGATT TTCAGGGTGAACCTCCGTACCCTGAGGGGCTACTATAA TCAGAGCGAGGCCGGCTCCCATACTTTGCA GTGGATGCAC GGGTGCGAGCTGGGACCCGATGGCCGTTTTCTGCGGGGTTAC GAGCAGTTCGCCTACGACGGCAAGGACTATCTGACACTGAAC GAAGATCTCAGGAGCTGGACAGCTGTCGACACCGCTGCCAG	编码 HLA-E 蛋白的核 苷酸序列

[0156]	ATAAGTGAGCAGAAAAGCAATGACGCTTCAGAGGCTGAGCAT CAGAGGGCATACTTGGAGGATACCTGCGTGGAGTGGTTGCAT AAGTATCTCGAGAAGGGCAAAGAGACCTTGCTGCATTTGGAG CCCCCAAAACACATGTGACCCACCACCCCATAGTGATCATG AAGCCACCCTCCGATGCTGGGCCCTCGGATTCTATCCAGCCGA GATTACTCTGACATGGCAACAGGATGGAGAGGGTCATACCCA GGACACCGAGCTGGTTCGAGACCCGTCCTCGCTGGGGACGGTA CATTCCAGAAGTGGGCCGCGAGTGGTGGTCCCTAGCGGCGAAG AGCAGCGATACACATGTCATGTGCAGCATGAAGGTCTGCCTG AACCTGTTACCCTGCGGTGGAAACCTGCATCTCAGCCCACAT CCCTATTGTGGG CATCATCGCT GGCCTCGTAT TGTTGGGAAG CGTGGTGTCA GGCCTGTGGTGGCTGCTGTGATCTGGCGGAAGAAAAGCTCC GGAGGCAAGGGCGGGTCATATTCTAAGGCAGAATGGTCCGAT AGCGCTCAGGGTAGTG AGTCTCACTC TCTG	
54	NSFTKLSIEPAFTPGPNIELQKSDSCSQEKWVG YRCNCYFISS EQKTWNESRHL CASQKSSLLQLQNTDELFMSSSQFYWIGLS YSEEHTAWLWENGSA LSQYLFPSFETFNKNCIAYNPNGNALDE SCEDKNRYICKQQLILEPKSCDKTHTCP CPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	重组 CD94 胞外区 Fc 融合蛋白

[0157] 以下将通过实施例对本发明进行详细描述。实施例或测试例中,未注明具体条件的实验方法的,均按照常规条件进行。

[0158] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0159] 实施例1抗人CD94杂交瘤单克隆抗体的制备

[0160] 1.1杂交瘤细胞筛选

[0161] 本实施例用于获得针对人CD94的鼠源单克隆抗体,其中,免疫抗原为纯化的重组CD94胞外区Fc融合蛋白(CD94-Fc)(重组CD94胞外区Fc融合蛋白,氨基酸序列如SEQ ID NO: 54所示),免疫C57b1/6小鼠(9周龄,购自上海莱斯科,体重20g左右)。

[0162] 免疫小鼠使用纯化抗原和完全弗氏佐剂进行3次腹腔免疫,通过尾静脉放血后检测免疫应答。通过常规操作步骤进行ELISA、流式细胞术筛选血清,获取有抗人CD94免疫球蛋白的小鼠。并对有最高的抗CD94免疫球蛋白的小鼠取出脾细胞与鼠骨髓瘤细胞SP2/0细胞(ATCC编号CRL-1581)进行融合。将融合后的杂交瘤细胞进行抗体筛选,得到鼠单抗,具体操作为:

[0163] 用HAT完全培养基(含20%FBS、1×HAT和1×OPI的RPMI-1640培养基)重悬,分装于96孔细胞培养板中,37℃、5%CO₂孵育。融合后的第5天加入HAT完全培养基,50μL/孔。融合后第7天~8天,根据细胞生长密度,全换液,更换的培养基为HT完全培养基(含20%FBS、1×HT和1×OPI的RPMI-1640培养基),200μL/孔。

[0164] 融合后第10-11天,根据细胞生长密度,进行流式细胞术结合检测。阳性孔换液,并根据细胞密度及时扩大至24孔板中。移入24孔板的细胞株经过复测后进行保种和第一次亚克隆。第一次亚克隆筛选为阳性的进行保种,并进行第二次亚克隆。第二次亚克隆为阳性的进行保种和蛋白表达。通过无血清细胞培养法进一步制备抗体,通过protein G亲和层析纯

化抗体,用于后续功能活性检测。

[0165] 1.2杂交瘤细胞测序

[0166] 将上述1.1部分筛选到的候选杂交瘤细胞总数量培养到 10^6 ,800rpm离心10分钟收集细胞,并以Trizol试剂盒(Invitrogen)提取总RNA;以总RNA为模板,逆转录合成cDNA文库(Invitrogen),又以cDNA为模板PCR扩增杂交瘤细胞的所对应的CD94抗体可变区核酸序列。PCR扩增反应中所使用的引物序列与抗体可变区第一框架区或信号肽区和恒定区互补(具体序列选择参考Larrick,J.W.,et al.,(1990)Scand.J.Immunol.,32,121-128和Coloma,J.J.et al.,(1991)BioTechniques,11,152-156)。PCR扩增在50 μ L反应体系中进行,分别加入cDNA2 μ L,10 \times PCR缓冲液5 μ L,上游及下游引物2 μ L(5 μ M),dNTP 2 μ L,Taq酶1 μ L(Takara,Ex Taq),H₂O 38 μ L;95 $^{\circ}$ C预变性5min,进入温度循环,进行PCR扩增。反应条件为:94 $^{\circ}$ C变性30S,58 $^{\circ}$ C退火45S,72 $^{\circ}$ C延伸50S,共32个循环,然后于72 $^{\circ}$ C延伸7min。将扩增产物进行测序后,得到抗CD94的鼠单抗的重链可变区(SEQ ID NO:23)和轻链可变区(SEQ IDNO:24)序列。

[0167] 实施例2CD94嵌合抗体流式细胞术结合实验

[0168] 流式细胞术实验被用于检测CD94嵌合抗体的结合特性,于293T细胞(ATCC编号CRL-3216)中过表达CD94蛋白和NKG2A蛋白(293T-CD94/NKG2A),抗体加入后信号的强弱用于判断嵌合抗体和CD94的结合特性。

[0169] 2.1构建过表达人CD94的293T细胞

[0170] HEK293T细胞按照 5×10^5 细胞/孔铺六孔板,用不含双抗的DMEM培养基培养过夜。转染前弃去培养基,加入1mL新鲜的不含双抗的DMEM培养基。将pLVX-EF1a-CD94-IRES-puro(pLVX-EF1a-IRES-puro载体的酶切位点EcoRI与BamHI之间插入有人CD94蛋白(SEQ ID NO:40)的编码序列(SEQ ID NO:41),或者pLVX-EF1a-NKG2A-IRES-puro(pLVX-EF1a-IRES-puro载体的酶切位点EcoRI与BamHI之间插入有NKG2A蛋白(SEQ ID NO:42)的编码序列(SEQ ID NO:43)分别与pMD2G、psPAX2载体(共3 μ g)按照2:1:1的比例加入200 μ L无血清DMEM培养基中,加入12 μ g聚醚酰亚胺(PEI,Polysciences有限公司)。混匀后静置16min,然后将全部液体加入铺有HEK293T细胞的六孔板中。培养6h后,弃去培养基,加入新鲜的完全DMEM培养基培养。转染48h后,收细胞培养上清,过0.45 μ m滤器(Millipore),即为病毒上清。将病毒上清全部加入含有 1×10^4 293T细胞的6孔板中,加入终浓度4 μ g/mL的聚凝胺(Sigma),培养12h。随后弃尽上清,加入新鲜的完全DMEM培养基。所得细胞即为293T-CD94/NKG2A细胞。

[0171] 2.2嵌合抗体CD94结合活性检测

[0172] 本部分使用的CD94嵌合抗体15C10-hIgG1mut为本实验室表达获得,其中重链氨基酸序列如SEQ ID NO:33所示,轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示,此外,使用的阻断性NKG2A抗体huZ270-hIgG1mut同样为本实验室表达获得,其重链氨基酸序列如SEQ ID NO:44所示,轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:45所示。

[0173] 用PBS将293T-CD94/NKG2A细胞稀释为 2×10^6 /mL,以100 μ L/管的体积加于1.5mLEP管中,向其中加入10 μ L/管小鼠血清,于4 $^{\circ}$ C封闭30min。分别单独加入不同浓度梯度的CD94嵌合抗体15C10-hIgG1mut或阻断性NKG2A抗体huZ270-hIgG1mut,于4 $^{\circ}$ C孵育30min。向EP管中加入1mL PBS,于4 $^{\circ}$ C、3500rpm \times 5min离心,弃尽上清,再用PBS洗一遍。离心后弃尽上清,用100 μ L/管PBS重悬细胞,向其中加入1 μ L/管Alexa-647标记的小鼠抗人Fc抗体二抗(Biolegend),4 $^{\circ}$ C避光孵育30min。用PBS洗两遍,离心后弃尽上清。用200 μ L/管PBS重悬细

胞,用流式细胞仪进行检测,结果如图1所示,进一步显示本发明的15C10-hIgG1mut嵌合抗体能够结合CD94。

[0174] 实施例3CD94嵌合抗体阻断能力的检测

[0175] CD94抗体是通过和CD94蛋白胞外区的结合,从而阻断CD94/NKG2A和其配体HLA-E结合,流式细胞术实验被用于检测CD94抗体对HLA-E结合293T-CD94/NKG2A阻断。

[0176] 用PBS将293T-CD94/NKG2A细胞(同实施例2)稀释为 2×10^6 /mL,以100 μ L/管的体积加于1.5mL EP管中,向其中加入10 μ L/管小鼠血清,于4 $^{\circ}$ C封闭30min。分别单独加入上述CD94嵌合抗体15C10-hIgG1mut、阻断性NKG2A抗体huZ270-hIgG1mut,于4 $^{\circ}$ C孵育30min。加入0.1 μ g/管APC标记的HLA-E四聚体蛋白,4 $^{\circ}$ C孵育30min。用PBS洗两遍,离心后弃尽上清。用200 μ L/管PBS重悬细胞,用流式细胞仪进行检测,结果如图2所示,可以看出,本发明的CD94抗体能够阻断HLA-E与CD94/NKG2A的结合,并且阻断能力与NKG2A抗体huZ270相当。

[0177] 实施例4鼠源抗人CD94单克隆抗体的人源化

[0178] 在实施例1和2的基础上,通过比对IMGT人类抗体重轻链可变区种系基因数据库和MOE软件,分别挑选与鼠源单克隆抗体同源性高的重链或轻链可变区种系基因作为模板,将鼠源单克隆抗体的CDR分别移植到相应的人源模板中,形成次序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的可变区序列。其中氨基酸残基由Kabat编号系统确定并注释。

[0179] 为了保持CDR区构象,以鼠源抗体的三维结构为基础,对于VL和VH结合界面上的残基,靠近CDR并且包埋于蛋白内部的残基,与CDR有直接相互作用的残基进行回复突变,以保证可变区的活性不会受影响,得到人源化的抗体,人源化CD94抗体重链可变区的序列如SEQ ID NO:25所示,重链可变区序列如SEQ ID NO:26所示。

[0180] 实施例5CD94嵌合抗体和人源CD94抗体流式细胞术结合实验

[0181] 于293T细胞(ATCC编号)中过表达CD94蛋白和NKG2A蛋白(293T-CD94/NKG2A),ELISA实验用于检测CD94嵌合抗体和人源CD94抗体对293T-CD94/NKG2A的结合特性。

[0182] 用PBS将实施例2获得的过表达CD94蛋白和NKG2A蛋白的293T-CD94/NKG2A细胞稀释为 2×10^6 /mL,以100 μ L/管的体积加于1.5mL EP管中,向其中加入10 μ L/管小鼠血清,于4 $^{\circ}$ C封闭30min。分别单独加入梯度浓度(3倍稀释,终浓度最高10 μ g/mL)的CD94嵌合抗体15C10-hIgG4(本实验室表达,重链序列SEQ ID NO:36,以及轻链序列SEQ ID NO:37)、人源化抗体h15C10-hIgG4(本实验室表达,重链序列SEQ ID NO:38,以及轻链序列SEQ ID NO:39),于4 $^{\circ}$ C孵育30min。向EP管中加入1mL PBS,于4 $^{\circ}$ C,3500rpm \times 5min离心,弃尽上清,再用PBS洗一遍。离心后弃尽上清,用100 μ L/管PBS重悬细胞,向其中加入0.1 μ L/管Alexa-647标记的小鼠抗人Fc抗体二抗(Biolegend),4 $^{\circ}$ C避光孵育30min。用PBS洗两遍,离心后弃尽上清。用200 μ L/管PBS重悬细胞,用流式细胞仪进行检测。结果如图3所示,本发明的人源化抗体和嵌合抗体均具有较好的结合能力,其中,人源化抗体的结合能力优于嵌合抗体。

[0183] 实施例6人源CD94抗体ELISA结合实验

[0184] 于293T细胞(ATCC编号)中过表达CD94蛋白和NKG2A蛋白(293T-CD94/NKG2A),ELISA实验用于检测上述实施例获得的人源CD94抗体和NKG2A抗体对于293T-CD94/NKG2A的结合特性。

[0185] 用PBS将实施例2获得的过表达CD94蛋白和NKG2A蛋白的293T-CD94/NKG2A细胞稀释为 2×10^6 /mL,以100 μ L/管的体积加于1.5mL EP管中,向其中加入10 μ L/管小鼠血清,于4

℃封闭30min。分别单独加入梯度浓度(3倍稀释,终浓度最高30μg/mL)的人源化抗体h15C10-hIgG4(同实施例5)、非阻断性NKG2A抗体huZ199-hIgG4(本实验室表达,重链序列SEQ ID NO:46,以及轻链序列SEQ ID NO:47)及阻断性NKG2A抗体huZ270-hIgG4(本实验室表达,重链序列SEQ ID NO:48,以及轻链序列SEQ ID NO:49)或对照抗体hIgG4,于4℃孵育30min。向EP管中加入1mLPBS,于4℃,3500rpm×5min离心,弃尽上清,再用PBS洗一遍。离心后弃尽上清,用100μL/管PBS重悬细胞,向其中加入0.1μL/管Alexa-647标记的小鼠抗人Fc抗体二抗(Biolegend),4℃避光孵育30min。用PBS洗两遍,离心后弃尽上清。用200μL/管PBS重悬细胞,用流式细胞仪进行检测。结果如图4所示,本发明的人源化抗体结合293T-CD94/NKG2A细胞的能力优于NKG2A抗体huZ199和huZ270。

[0186] 实施例7:CD94人源化抗体阻断能力检测

[0187] CD94抗体是通过和CD94胞外区的结合,从而阻断CD94/NKG2A和其配体HLA-E结合。流式细胞术实验被用于检测CD94抗体对HLA-E结合293T-CD94/NKG2A阻断。

[0188] 用PBS将293T-CD94/NKG2A细胞(同上)稀释为 2×10^6 /mL,以100μL/管的体积加于1.5ml EP管中,向其中加入10μL/管小鼠血清,于4℃封闭30min。加入上述实施例使用的CD94人源化抗体h15C10-hIgG4、NKG2A抗体huZ270-hIgG4或对照抗体hIgG4,于4℃孵育30min。加入0.1μg/管APC标记的HLA-E四聚体蛋白,4℃孵育30min。用PBS洗两遍,离心后弃尽上清。用200μL/管PBS重悬细胞,用流式细胞仪进行检测,结果如图5所示,可以看出,本发明的CD94人源化抗体能够有效阻断HLA-E与CD94/NKG2A的结合,且阻断能力与NKG2A抗体huZ270相当。

[0189] 实施例8:CD94抗体ELISA结合实验

[0190] ELISA实验被用于检测CD94抗体的结合特性。CD94胞外区Fc融合蛋白与NKG2A胞外区Fc融合蛋白异源二聚体蛋白包被到96孔板中,抗体加入后信号的强弱用于判断抗体和CD94蛋白的结合特性。

[0191] 用PBS缓冲液将CD94胞外区Fc融合蛋白与NKG2A胞外区Fc融合蛋白(CD94/NKG2A-Fc)异源二聚体融合蛋白(本实验室表达,CD94-Fcmutknob氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示,以及NKG2A-Fcmuthole氨基酸序列如SEQ ID NO:51所示)稀释为2μg/mL,以100μL/孔的体积加于96孔板中,于4℃放置过夜。将96孔板中PBS缓冲液吸掉,用PBST(pH7.2PBS含0.1% Tween 20)缓冲液洗板6次后,加入200μL/孔PBS/10%BSA,37℃孵育2h进行封闭。移去封闭液,用PBST洗板6次后,加入100μL/孔用PBST/0.05%BSA稀释至合适浓度的待测CD94人源化抗体h15C10-hIgG4(同实施例5)、NKG2A抗体huZ270-hIgG4,37℃孵育1h。移去反应体系,用PBST洗板6次后,以100μL/孔用PBST/0.05%BSA稀释HRP(辣根过氧化物酶)标记的抗人IgG-Fab抗体二抗,37℃孵育1h。用PBST洗板6次后,加入80μL/孔TMB(四甲基联苯胺),于室温孵育3min,加入80μL/孔4M硫酸终止反应。用酶标仪在450nm处读取吸光值。结果如图6表明本发明的CD94抗体能够结合CD94/NKG2A二聚体蛋白,且结合强于NKG2A抗体huZ270。

[0192] 实施例9:CD94抗体促进Jurkat T细胞活化实验

[0193] 报告细胞实验被用于检测CD94抗体的功能活性,将K56233220-HLA-E细胞与Jurkat-NFAT-lucia-CD94/NKG2A细胞共孵育,抗体加入后化学发光的强弱用于判断CD94抗体促进T细胞活化的功能活性。

[0194] HEK293T细胞按照 5×10^5 细胞/孔铺六孔板,用不含双抗的DMEM培养基培养过夜。

转染前弃去培养基,加入1mL新鲜的不含双抗的DMEM培养基。将pLVX-EF1a-CD94-IRES-puro (pLVX-EF1a-IRES-puro载体的酶切位点EcoRI与BamHI之间插入有CD94蛋白(SEQ ID NO: 40)的编码序列(SEQ ID NO:41)或者pLVX-EF1a-NKG2A-IRES-puro (pLVX-EF1a-IRES-puro载体的酶切位点EcoRI与BamHI之间插入有NKG2A蛋白(SEQ ID NO:42)的编码序列(SEQ ID NO:43)、pMD2G、psPAX2载体(共3 μ g)按照2:1:1的比例加入200 μ L无血清DMEM培养基中,加入12 μ g聚醚酰亚胺(PEI,购自Polysciences)。混匀后静置16min,然后将全部液体加入铺有HEK293T细胞的六孔板中。培养6h后,弃去培养基,加入新鲜的完全DMEM培养基培养。转染48h后,收细胞培养上清,过0.45 μ m滤器(Millipore),即为病毒上清。将病毒上清全部加入含有 1×10^4 Jurkat-NFAT-lucia细胞(购自Invivogen)的6孔板中,加入终浓度4 μ g/mL的聚凝胺(Sigma),培养12h。随后弃尽上清,加入新鲜的完全IMDM培养基。所得细胞即为Jurkat-NFAT-lucia-CD94/NKG2A细胞。

[0195] HEK293T细胞按照 5×10^5 细胞/孔铺六孔板,用不含双抗的DMEM培养基培养过夜。转染前弃去培养基,加入1mL新鲜的不含双抗的DMEM培养基。将pLVX-EF1a-HLA-E-IRES-puro (pLVX-EF1a-IRES-puro载体的酶切位点EcoRI与BamHI之间插入有HLA-E蛋白(SEQ ID NO:52)的编码序列(SEQ ID NO:53)、pMD2G、psPAX2载体(共3 μ g)按照2:1:1的比例加入200 μ L无血清DMEM培养基中,加入12 μ g聚醚酰亚胺(PEI,购自Polysciences)。混匀后静置16min,然后将全部液体加入铺有HEK293T细胞的六孔板中。培养6h后,弃去培养基,加入新鲜的完全DMEM培养基培养。转染48h后,收细胞培养上清,过0.45 μ m滤器(Millipore),即为病毒上清。将病毒上清全部加入含有 1×10^4 K56233220细胞的6孔板中,加入终浓度4 μ g/mL的聚凝胺(Sigma),培养12h。随后弃尽上清,加入新鲜的完全IMDM培养基。所得细胞即为K56233220-HLA-E细胞。

[0196] (1) 用完全IMDM培养基将Jurkat-NFAT-lucia-CD94/NKG2A细胞稀释为 1×10^5 /mL,加入96孔板中,100 μ L/孔;

[0197] (2) 用完全IMDM培养基将CD94人源化抗体h15C10-hIgG4、NKG2A抗体huZ270-hIgG4以及对照抗体hIgG分别稀释为一系列梯度,加入96孔板中,20 μ L/孔;

[0198] (3) 用完全IMDM培养基将K56233220-HLA-E细胞稀释为 7.5×10^5 /mL,加入96孔板中,80 μ L/孔;

[0199] (4) 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂培养箱中培养24h后,吸取50 μ L上清,加入50 μ L底物,检测化学发光。

[0200] 结果如图7所示,进一步显示本发明的CD94抗体能够促进Jurkat-NFAT-lucia-CD94/NKG2A细胞活化,并且活化功能强于NKG2A抗体huZ270。

[0201] 实施例10:人源化CD94抗体对小鼠抗癌的影响

[0202] 体内药效实验用于检测实施例6获得的所述亲和力成熟的人源化CD94抗体h15C10-hIgG4促进免疫重建小鼠的抗癌功能。

[0203] (1) 在第-1天,将人PBMC(购自赛笠生物)尾静脉转输给NCG小鼠(购自集萃药康),注射量为 1×10^7 /只;

[0204] (2) 第0天,NCG小鼠右腹侧皮下荷瘤,每只鼠注射 1×10^6 个肿瘤细胞,并将小鼠随机分组;

[0205] (3) 于第0、3、6、9天,为小鼠腹腔注射所述人源化抗体h15C10-hIgG4以及对照抗体

hIgG, 每只鼠250 μ g;

[0206] (4) 注射上述抗体后每3天测量一次肿瘤体积。

[0207] 结果如图8所示, 可以看出, 本发明的CD94抗体可以有效促进PBMC抗癌。

[0208] 从以上实验结果可以看出, 本发明得到的抗体的能够结合CD94; 能够阻断CD94/NKG2A和HLA-E的相互作用; 能够促进免疫细胞抗癌。

[0209] 在本说明书的描述中, 参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中, 对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且, 描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外, 在不相互矛盾的情况下, 本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0210] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例, 可以理解的是, 上述实施例是示例性的, 不能理解为对本发明的限制, 本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

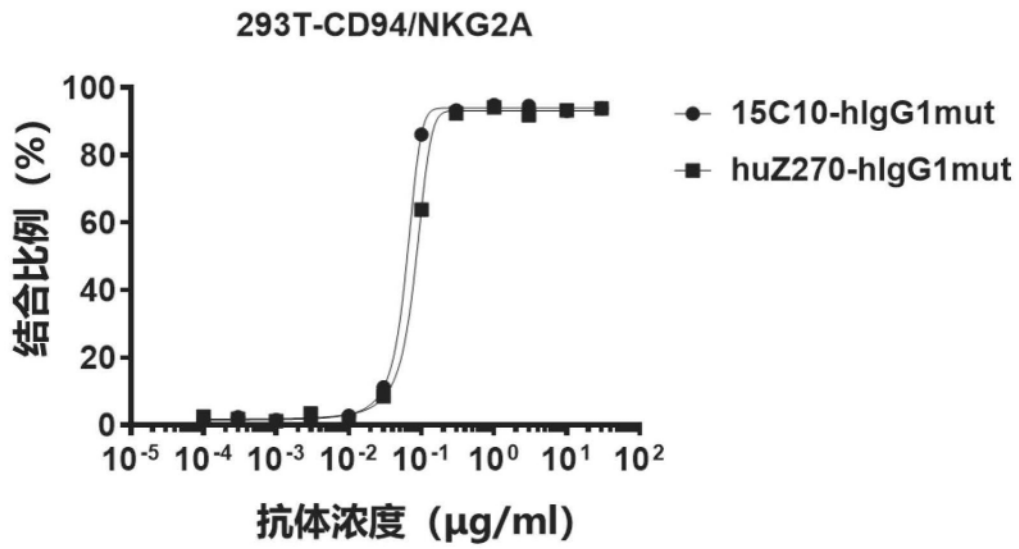


图1

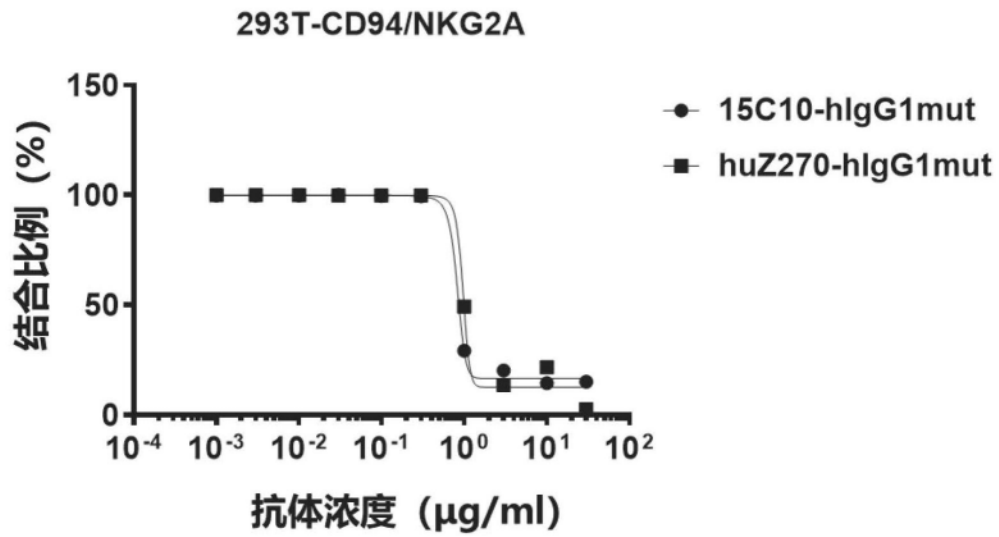


图2

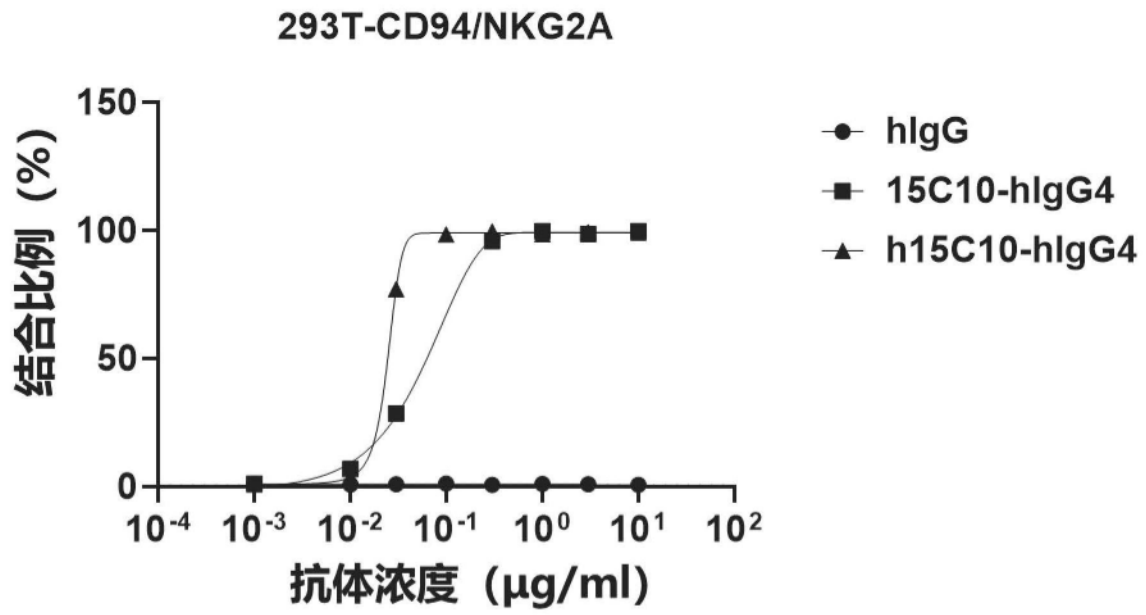


图3

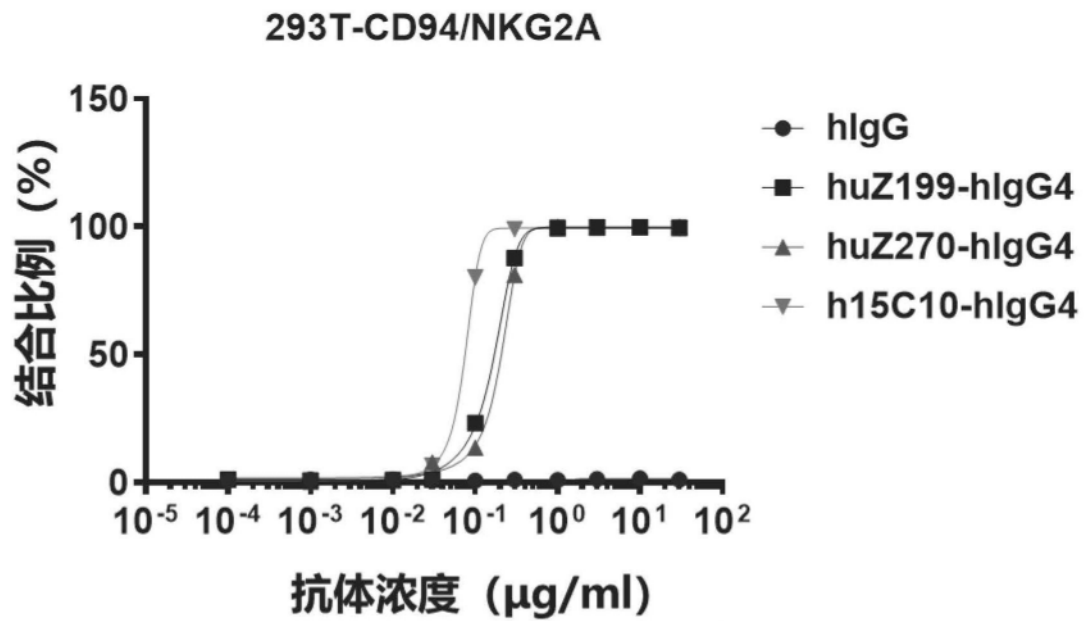


图4

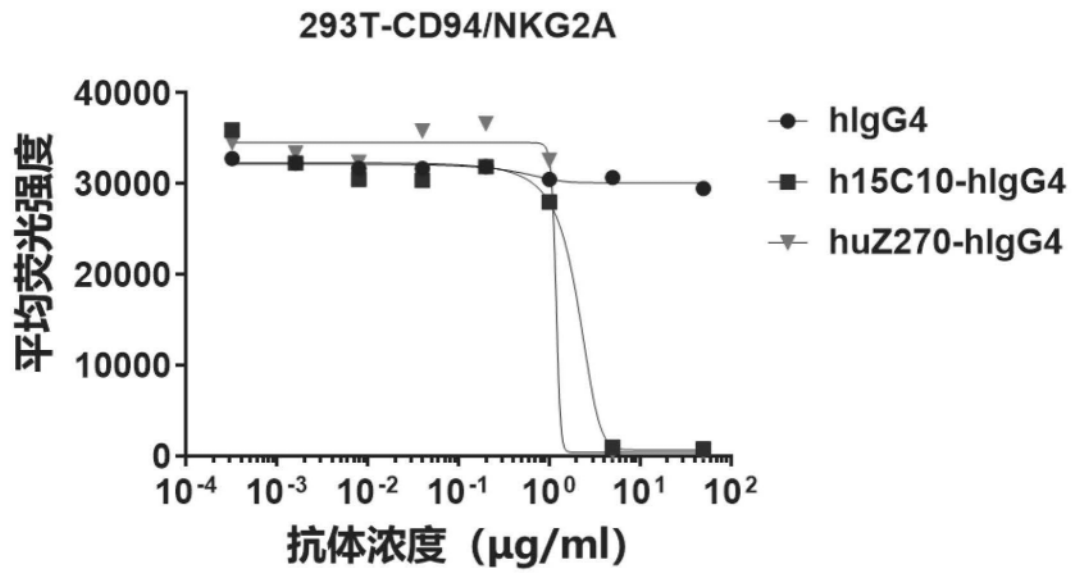


图5

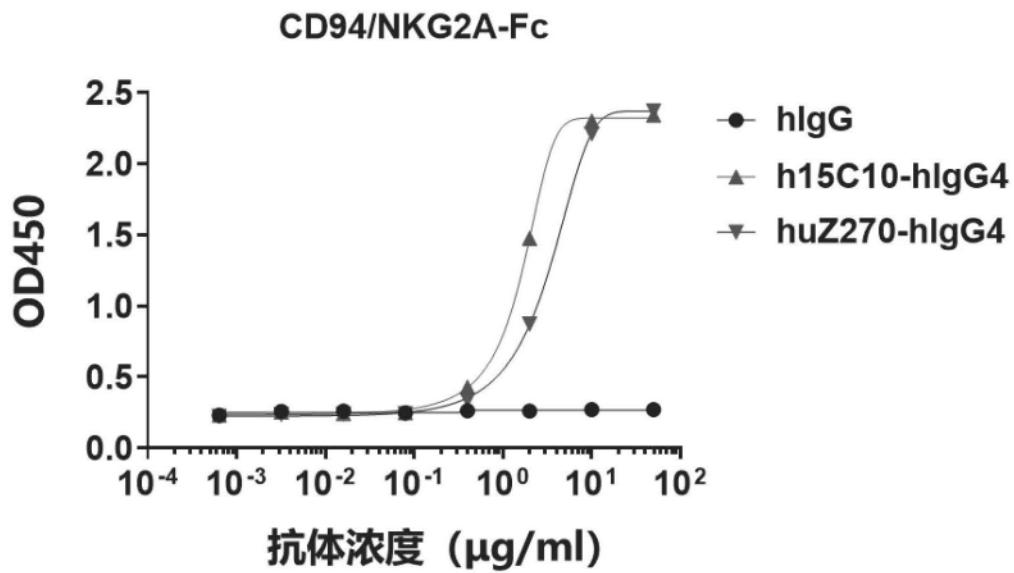


图6

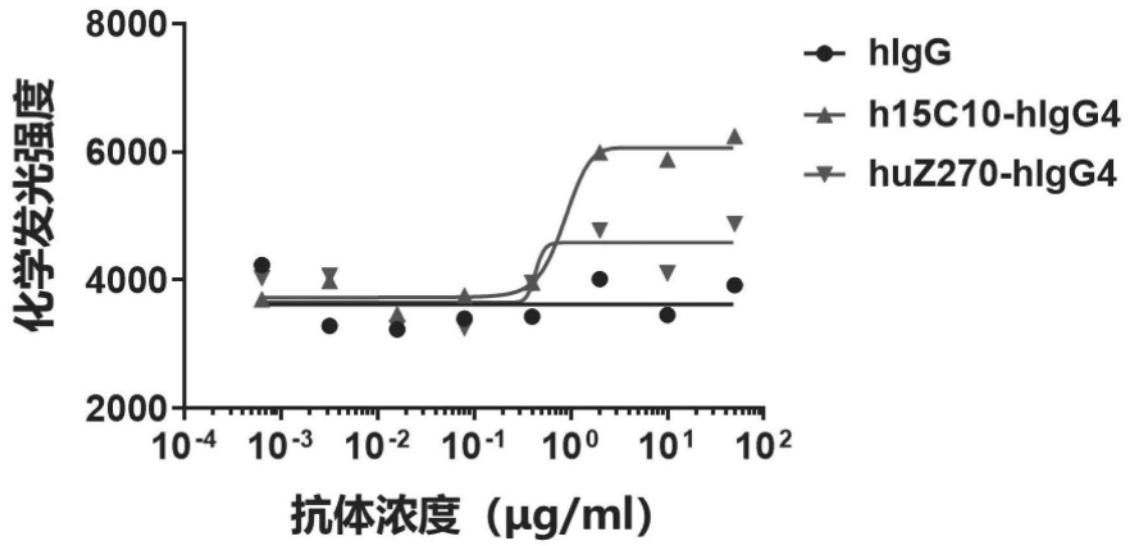


图7

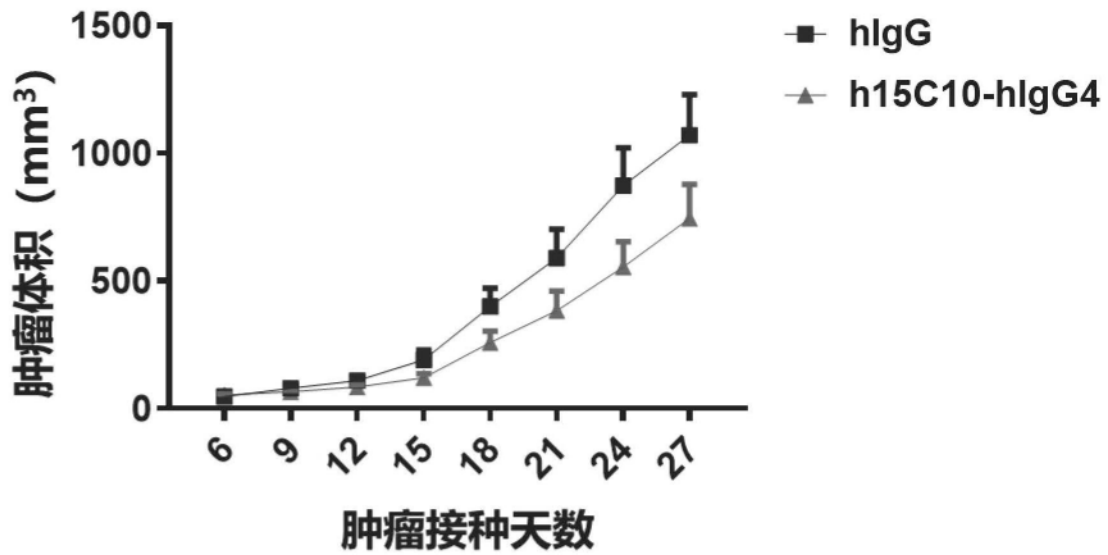


图8