



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116964094 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 27

(21) 申请号 202280013631.X

韩国原子力研究院

(22) 申请日 2022.01.12

(72) 发明人 李志哲 朴慧仁 闵省远 权亨宣

(30) 优先权数据

郑相泽 林在清 都昭希 赵银河

10-2021-0004196 2021.01.12 KR

李昭怜 郑成喜

10-2022-0001356 2022.01.05 KR

(74) 专利代理机构 北京锺维联合知识产权代理

有限公司 11579

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

专利代理师 罗银燕

2023.08.04

(86) PCT国际申请的申请数据

(51) Int.Cl.

PCT/KR2022/000551 2022.01.12

C07K 16/28 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/154472 KO 2022.07.21

(71) 申请人 SG医疗株式会社

地址 韩国首尔特别市松坡区梧琴路13街3-

11

申请人 高丽大学校产学协力团

权利要求书2页 说明书22页

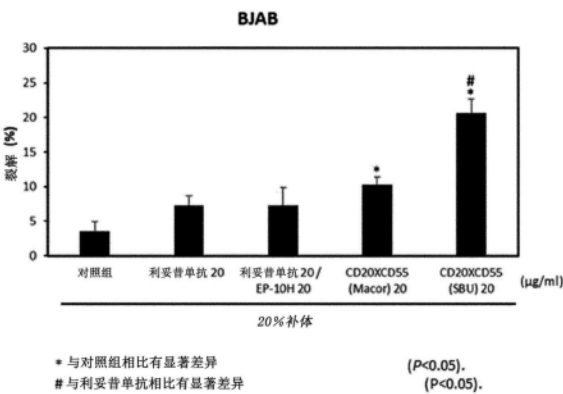
序列表19页 附图18页

(54) 发明名称

针对CD55的新型抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种与CD55特异性结合的抗体或其抗原结合片段;以及包含其的用于预防、治疗和/或诊断癌症的组合物。本发明的抗体对通过抑制补体免疫机制来促进肿瘤增殖的CD55蛋白表现出高结合力以及抑制力,从而可以用作各种由CD55介导的疾病的有效的治疗组合物。并且,本发明的抗体可以用地用作有效的治疗佐剂,其从根本上消除由于CD55的过表达而导致对治疗剂产生耐药性的各种疾病的耐药性并显著改善治疗反应性,上述治疗剂以补体依赖的细胞毒性(complement dependent cytotoxicity, CDC)作为作用机制。



1. 一种与CD55特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,包含重链可变区,上述重链可变区包含:
HCDR1区,具有如下述通式1所示的氨基酸序列;
HCDR2区,具有如序列表中的序列1所示的氨基酸序列;以及
HCDR3区,具有如下述通式2所示的氨基酸序列,
通式1:
D-R-G-M-X₁;
通式2:
N-A-X₂-A-G-G-W-H-A-A-Y-I-D-A,
在上述通式1中,X₁为Ala或Val,在上述通式2中,X₂选自由Val、Ala、Ile、Leu、Phe以及Met组成的组中。
 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,上述X₁为Ala。
 3. 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,上述X₂为Val。
 4. 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,上述抗体或其抗原结合片段还包含轻链可变区,
上述轻链可变区包含:
LCDR1区,具有如序列表中的序列2所示的氨基酸序列;
LCDR2区,具有如下述通式3所示的氨基酸序列;以及
LCDR3区,具有如序列表中的序列3所示的氨基酸序列,
通式3:
W-N-X₃-K-R-P-S,
在上述通式3中,X₃为Asn或Asp。
 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,上述X₃为Asp。
6. 一种与CD55特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,包含下述轻链可变区以及重链可变区:
 - a) 如序列表中的序列4所示的轻链可变区;或轻链可变区,包含选自由上述如序列表中的序列4所示的轻链可变区中的第32位氨基酸序列Y (Tyr) 被F (Phe) 取代以及第48位氨基酸序列D (Asp) 被N (Asn) 取代组成的组中的一种以上取代;以及
 - b) 如序列表中的序列5所示的重链可变区;或重链可变区,其包含选自由上述如序列表中的序列5所示的重链可变区中的第5位氨基酸序列V (Val) 被A (Ala) 取代、第23位氨基酸序列A (Ala) 被V (Val) 取代、第25位氨基酸序列S (Ser) 被R (Arg) 取代、第35位氨基酸序列A (Ala) 被V (Val) 取代、第40位氨基酸序列A (Ala) 被S (Ser) 取代、第68位氨基酸序列A (Ala) 被T (Thr) 取代、第85位氨基酸序列S (Ser) 被N (Asn) 取代以及第101位氨基酸序列G (Gly) 被V (Val) 、L (Leu) 、I (Ile) 、F (Phe) 、M (Met) 或A (Ala) 取代组成的组中的一种以上取代。
7. 根据权利要求1或6所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,上述抗原结合片段为scFv、Fab片段、F(ab')片段、F(ab')₂片段或Fv片段。
8. 一种核酸分子,其特征在于,编码权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
9. 一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其特征在于,包含权利要求1至6中任一项

所述的抗体或其抗原结合片段作为有效成分。

10. 根据权利要求9所述的用于预防或治疗癌症的药物组合物, 其特征在于, 上述组合物还包含选自由抗CD20抗体以及酪氨酸激酶抑制剂组成的组中的一种以上药理成分。

11. 根据权利要求10所述的用于预防或治疗癌症的药物组合物, 其特征在于, 上述抗CD20抗体为利妥昔单抗。

12. 根据权利要求10所述的用于预防或治疗癌症的药物组合物, 其特征在于, 上述酪氨酸激酶抑制剂为选自由伊马替尼以及吉非替尼组成的组中的一种以上抑制剂。

13. 根据权利要求9所述的用于预防或治疗癌症的药物组合物, 其特征在于, 上述癌症为CD55阳性癌症。

14. 一种用于诊断癌症的组合物, 其特征在于, 包含权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段作为有效成分。

15. 根据权利要求14所述的用于诊断癌症的组合物, 其特征在于, 上述癌症为CD55阳性癌症。

16. 一种双特异性抗体或其功能性片段, 其特征在于, 包含权利要求1至6中任一项所述的与CD55特异性结合的抗体的抗原结合片段以及与CD20特异性结合的抗体的抗原结合片段。

17. 根据权利要求16所述的双特异性抗体或其功能性片段, 其特征在于, 上述与CD20特异性结合的抗体为利妥昔单抗。

18. 根据权利要求16所述的双特异性抗体或其功能性片段, 其特征在于, 上述与CD55特异性结合的抗体的抗原结合片段包含scFv。

19. 根据权利要求16所述的双特异性抗体或其功能性片段, 其特征在于, 上述与CD55特异性结合的抗体的抗原结合片段为VL-接头-VH-CH2-CH3形式。

20. 根据权利要求16所述的双特异性抗体或其功能性片段, 其特征在于, 上述与CD20特异性结合的抗体的抗原结合片段包含Fab。

21. 根据权利要求16所述的双特异性抗体或其功能性片段, 其特征在于, 上述与CD20特异性结合的抗体的抗原结合片段为VL-CK-接头-VH-CH1-CH2-CH3形式。

针对CD55的新型抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种特异性识别CD55的新型抗体或其抗原结合片段以及利用其的用于预防、治疗和/或诊断癌症的组合物。

背景技术

[0002] 全球抗癌剂市场在过去10年表现出年均10-13%的生长率,预测2022年总额达到2000亿美元。截止2020年,全球每5名男性及每6名女性中就有1名一生中患上一次以上癌症,每8名男性及每11名女性中就有1名死于癌症,癌症的患病率及死亡率正在持续增加。

[0003] 全球抗癌剂市场正在进行从第一代化学疗法开始到第二代靶向抗癌剂及第三代免疫抗癌剂的模式转变。脱离早期旨在简单地减少/抑制癌症的治疗方法,正在积极研究选择性地仅攻击癌细胞而不损伤正常快速分裂的细胞的靶向抗癌治疗技术,这种靶向抗癌治疗技术的开发由筛选在癌细胞中特异性表达的受体以及开发与受体结合的靶向化合物的两个步骤组成,从而使其可以选择性地靶向癌细胞。

[0004] 另一方面,CD55(衰变加速因子,Decay-accelerating factor,DAF)作为一种抑制补体免疫机制的受体,在大肠癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌、白血病、头颈癌等各种实体癌中高表达,并通过抑制体内的补体免疫系统杀死癌细胞来促进癌细胞的增殖。因此,将CD55作为靶向抗癌治疗的靶分子正在进行积极的研究。

[0005] 尤其,由于CD55高表达的实体癌对以补体依赖的细胞毒性(complement dependent cytotoxicity,CDC)作为作用机制的各种抗癌剂表现出低治疗反应性,因此需要开发一种优异的抗体治疗剂,其可以通过以更高的亲和度及特异性与CD55结合来有效抑制其活性。

[0006] 本说明书全文参考了多个论文以及专利文献并指出其引用。引用的论文以及专利文献的公开内容整体以引用的方式并入本说明书中,以便更确切地说明本发明所属技术领域的水平以及本发明的内容。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:韩国授权第10-1800774号

发明内容

[0010] 技术问题

[0011] 本发明人为了开发一种优异的CD55抑制剂而锐意研究并努力,其特异性识别作为抑制补体免疫机制的受体的CD55蛋白,并特异性地抑制其活性,从而可以有效恢复由CD55抑制的免疫机制。结果发现,当使用取代可变区中关键抗原识别位点的一部分氨基酸的抗体时,由于显著增加的CD55结合力以及抑制力,导致显著恢复对癌细胞等的补体介导的细胞裂解(complement-mediated cell lysis)活性,从而完成了本发明。

[0012] 因此,本发明的目的在于,提供一种与CD55特异性结合的抗体或其抗原结合片段;

以及包含其的用于预防或治疗和/或诊断癌症的组合物。

[0013] 本发明的另一目的在于,提供一种双特异性抗体,包含与CD55特异性结合的抗体的抗原结合片段以及与CD20特异性结合的抗体的抗原结合片段。

[0014] 本发明的其他目的以及优点通过下述发明的详细说明、权利要求范围以及附图变得更明确。

[0015] 解决问题的方案

[0016] 根据本发明一实施方式,本发明提供一种与CD55特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区,上述重链可变区包含:HCDR1区,具有如下述通式1所示的氨基酸序列;HCDR2区,具有如序列表中的序列1所示的氨基酸序列;以及HCDR3区,具有如下述通式2所示的氨基酸序列,

[0017] 通式1:

[0018] D-R-G-M-X₁;

[0019] 通式2:

[0020] N-A-X₂-A-G-G-W-H-A-A-Y-I-D-A,

[0021] 在上述通式1中,X₁为Ala或Val,在上述通式2中,X₂选自由Val、Ala、Ile、Leu、Phe以及Met组成的组中。

[0022] 本发明人为了开发一种优异的CD55抑制剂而锐意研究并努力,其特异性识别作为抑制补体免疫机制的受体的CD55蛋白,并特异性地抑制其活性,从而可以有效恢复由CD55抑制的免疫机制。结果发现,当使用取代可变区中关键抗原识别位点的一部分氨基酸的抗体时,由于显著增加的CD55结合力以及抑制力,导致显著恢复对癌细胞等的补体介导的细胞裂解(complement-mediated cell lysis)活性,从而完成了本发明。

[0023] 在本说明书中,术语“抗体(antibody)”是指包含与特定抗原具有反应性的免疫球蛋白分子并充当特异性识别抗原的受体作用的蛋白质分子,包括多克隆抗体以及单克隆抗体。

[0024] 抗体不仅包括完整的全长(full-length)抗体形式,还包括抗体分子的抗原结合片段(抗体片段)。完整的抗体为具有2条全长的轻链以及2条全长的重链的结构,每条轻链通过二硫键与重链连接。重链恒定区具有伽马(γ)、缪(μ)、阿尔法(α)、德尔塔(δ)以及伊普西龙(ϵ)类型,具有伽马1(γ 1)、伽马2(γ 2)、伽马3(γ 3)、伽马4(γ 4)、阿尔法1(α 1)以及阿尔法2(α 2)作为亚型。轻链恒定区具有卡帕(κ)以及兰布达(λ)类型。

[0025] 在本说明书中,术语“抗体的抗原结合片段”是指在整个抗体分子中特异性识别抗原并具有抗原抗体结合功能的片段,包括单域抗体(sdAb)、单链抗体(scFv)、Fab、F(ab')、F(ab')₂以及Fv等。片段的例子包括:由VL、VH、CL以及CH1结构域组成的单价片段(Fab片段);包含铰链区二硫化物桥连接的两个Fab片段的二价片段(F(ab')₂片段);由VH以及CH1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂(arm)的VL、VH结构域以及二硫键连接的Fv(sdFv)组成的Fv片段;由VH结构域组成的dAb片段;以及分离的互补决定区(CDR)或可以通过接头选择性地连接的两个以上分离的CDR的组合。并且,scFv的VL与VH区可以通过接头连接成配对并形成具有单价分子的单条蛋白质链。这种单链抗体也包括在抗体的片段中。并且,上述抗体或抗体的片段包括:四聚体抗体,包含两个重链分子及两个轻链分子;抗体轻链单体;抗体重链单体;抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体;胞内抗体;单价抗体;骆驼抗体;以及单域抗体

(sdAb)。

[0026] Fv为仅具有重链可变区以及轻链可变区的最小抗体片段,用于生成Fv片段的重组技术公开于PCT国际公开专利申请WO 88/10649、WO 88/106630、WO 88/07085、WO 88/07086以及WO 88/09344中。双链Fv(two-chain Fv)由重链可变区与轻链可变区通过非共价键连接,单链Fv(single-chain Fv)通常由重链可变区与轻链可变区通过肽接头共价连接或直接连接至C-末端,因此可以形成如双链Fv的二聚体结构。可以利用蛋白酶得到这种抗体片段(例如,当用木瓜蛋白酶限制性切割整体抗体时可以得到Fab,当用胃蛋白酶切割时可以得到F(ab')₂片段),还可以通过重组技术制备。

[0027] 在本说明书中,术语“重链”是指包括可变区结构域V_H以及3个恒定区结构域C_{H1}、C_{H2}以及C_{H3}的全长重链及其片段,其包含具有足以对抗原赋予特异性的可变区序列的氨基酸序列。并且,在本说明书中,术语“轻链”是指包括可变区结构域V_L以及恒定区结构域C_L的全长轻链以及其片段,其包含具有足以对抗原赋予特异性的可变区序列的氨基酸序列。

[0028] 在本说明书中,术语“互补决定区(complementarity determining region,CDR)”是指免疫球蛋白的重链以及轻链的超变区(hypervariable region)的氨基酸序列(Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health(1987))。重链(HCDR1、HCDR2以及HCDR3)以及轻链(LCDR1、LCDR2以及LCDR3)中分别包含3个CDR,这些CDR提供用于抗体与抗原或表位结合的主要接触残基。

[0029] 本发明的抗体或抗体片段的范围包括在CDR区具有保守氨基酸取代的变异体,并且可以包括在能够特异性识别CD55的范围内对于所附序列中记载的氨基酸序列的变异体。例如,可以对抗体的氨基酸序列进行额外的改变,以更加改善除了抗体的结合亲和度以外的半衰期、生物相容性或其他生物特性。如果考虑具有这种生物等效活性的突变,则解释为本发明的抗体或编码其的核酸分子还包含与序列中所记载的序列表现出实质同一性(substantial identity)的序列。上述实质同一性是指当将本发明的上述序列与任何其他序列进行比对使得尽可能匹配,并利用本领域常用的算法分析比对的序列时,表现出至少61%的同源性、在一特定例中表现出70%的同源性、在再一特定例中表现出80%的同源性、在另一特定例中表现出90%的同源性的序列。用于比较序列的比对方法是本领域已知方法。用于比对的各种方法以及算法公开于Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2: 482; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. (1970) 48: 443; Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. (1988) 24: 307-31; Higgins and Sharp, Gene (1988) 73: 237-44; Higgins and Sharp, CABIOS (1989) 5: 151-3; Corpet et al. Nuc. Acids Res. (1988) 16: 10881-90; Huang et al. Comp. Appl. BioSci. (1992) 8: 155-65以及Pearson et al. Meth. Mol. Biol. (1994) 24: 307-31中。

[0030] 在本说明书中,术语“亲和力(affinity)”是指抗体或其抗原结合片段与抗原之间的结合强度,对此也可以表达为“结合力”。

[0031] 根据本发明具体实例,上述通式1的X₁为Ala。

[0032] 根据本发明具体实例,上述通式2的X₂为Val。

[0033] 更具体地,本发明的重链可变区包含选自由以下HFR1至HFR4组成的组中的一个以上骨架区(FR)。

[0034] HFR1:EVQLY₁ESGGGLVQPGGSLRLSCY₂AY₃GFTFS (Y₁为Val或Ala, Y₂为Val或Ala, Y₃为Ser或Arg)

[0035] HFR2:WVRQY₄PGKGLEWVS (Y₄为Ala或Ser)

[0036] HFR3:RY₅TISRDNSKNTLYLQMNY₆LRAEDTAVYYCAK (Y₅为Ala或Thr, Y₆为Ser或Asn)

[0037] HFR4:WGQGTTTVTVSS

[0038] 更加具体地,本发明的重链可变区具有选自由序列19至序列22组成的组中的氨基酸序列。

[0039] 根据本发明具体实例,本发明的抗体或其抗原结合片段还包含轻链可变区,上述轻链可变区包含:LCDR1区,具有如序列表中的序列2所示的氨基酸序列;LCDR2区,具有如下述通式3所示的氨基酸序列;以及LCDR3区,具有如序列表中的序列3所示的氨基酸序列,

[0040] 通式3:

[0041] W-N-X₃-K-R-P-S,

[0042] 在上述通式3中, X₃为Asn或Asp。

[0043] 更具体地,上述X₃为Asp。

[0044] 更具体地,本发明的轻链可变区包含选自由以下LFR1至LFR4组成的组中的一个以上骨架区(FR)。

[0045] LFR1:SYELTQPPSVSVSPGQTASITC

[0046] LFR2:WY₇QQKPGQSPVTVIY (Y₇为Phe或Tyr) (F或Y)

[0047] HFR3:GIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYC

[0048] HFR4:FGGGTKLTVL

[0049] 更加具体地,本发明的轻链可变区具有如序列表4或18所示的氨基酸序列。

[0050] 根据本发明再一实施方式,本发明提供一种与CD55特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其包含下述轻链可变区以及重链可变区:

[0051] a) 如序列表中的序列4所示的轻链可变区;或轻链可变区,包含选自由上述如序列表中的序列4所示的轻链可变区中的第32位氨基酸序列Y (Tyr) 被F (Phe) 取代以及第48位氨基酸序列D (Asp) 被N (Asn) 取代组成的组中的一种以上取代,以及

[0052] b) 如序列表中的序列5所示的重链可变区;或重链可变区,其包含选自由上述如序列表中的序列5所示的重链可变区中的第5位氨基酸序列V (Val) 被A (Ala) 取代,第23位氨基酸序列A (Ala) 被V (Val) 取代,第25位氨基酸序列S (Ser) 被R (Arg) 取代,第35位氨基酸序列A (Ala) 被V (Val) 取代,第40位氨基酸序列A (Ala) 被S (Ser) 取代,第68位氨基酸序列A (Ala) 被T (Thr) 取代,第85位氨基酸序列S (Ser) 被N (Asn) 取代以及第101位氨基酸序列G (Gly) 被V (Val) 、L (Leu) 、I (Ile) 、F (Phe) 、M (Met) 或A (Ala) 取代组成的组中的一种以上取代。

[0053] 根据本发明另一实施方式,本发明提供一种编码本发明的上述抗体或其抗原结合片段的核酸分子。

[0054] 在本说明书中,术语“核酸分子”是指广泛包括DNA (gDNA以及cDNA) 以及RNA分子,作为核酸分子的基本组成单位的核苷酸不仅包括天然核苷酸,还包括具有修饰的糖或碱基部位的类似物(analogue) (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York (1980); Uhlman以及Peyman, Chemical Reviews, (1990) 90:543-584)。可以对编码本发明的重链以及轻链可变区的核酸分子的序列进行修饰。上述修饰包括核苷酸的添加、缺失、非保守取代

或保守取代。

[0055] 本发明的核酸分子被解释为还包含与上述核苷酸序列表现出实质同一性的核苷酸序列。上述实质同一性是指当将本发明的上述核苷酸序列与任何其他序列进行比对使得尽可能匹配,并利用本领域常用的算法分析比对的序列时,表现出至少80%的同源性,在一特定例中表现出至少90%的同源性,在另一特定例中表现出至少95%的同源性的核苷酸序列。

[0056] 根据本发明还有一实施方式,本发明提供一种包含本发明的上述抗体或其抗原结合片段作为有效成分的用于预防或治疗癌症的组合物。

[0057] 根据本发明又一实施方式,本发明提供一种预防或治疗癌症的方法,上述方法包括将药学有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段给药到对象的步骤。

[0058] 根据本发明又一实施方式,本发明提供一种本发明的上述抗体或其抗原结合片段的治疗用途(for use in therapy)。

[0059] 在本说明书中,术语“预防”是指虽然尚未诊断为患有疾病或病症,但抑制可能患上该疾病或病症的风险的对象产生疾病或病症。

[0060] 在本说明书中,术语“治疗”是指(a)抑制疾病、病症或症状的进展;(b)减轻疾病、病症或症状;或(c)消除疾病、病症或症状。当将本发明的组合物给药到对象时抑制CD55受体的活性,从而通过恢复补体免疫机制并抑制癌细胞的增殖来发挥抑制癌症的进展或者消除或减轻由此产生的症状的作用。因此,可以将本发明的组合物本身用作治疗癌症的组合物,或者可以与其他药理成分,例如,以补体依赖的细胞毒性(complement dependent cytotoxicity,CDC)作为作用机制的治疗剂联合给药,从而可以用作提高其治疗反应性的治疗佐剂。对此,在本说明书中,术语“治疗”或“治疗剂”涵盖“辅助治疗”或“治疗佐剂”的含义。

[0061] 在本说明书中,术语“给药”或“施用”是指将治疗有效量的本发明的组合物直接施用到对象,从而使得对象体内形成相同的量。

[0062] 在本发明中,术语“治疗有效量”是指以足以向所要给药本发明的药物组合物的个体提供组合物中的药理成分的治疗或预防效果的量包含的组合物的含量,对此,涵盖“预防有效量”的含义。

[0063] 在本说明书中,术语“对象”包括但不限于人类、小鼠、大鼠、豚鼠、狗、猫、马、牛、猪、猴、黑猩猩、狒狒或恒河猴。具体地,本发明的对象为人类。

[0064] 根据本发明具体实例,上述组合物还包含选自由抗CD20抗体以及酪氨酸激酶抑制剂组成的组中的一种以上药理成分。

[0065] 更具体地,上述抗CD20抗体为利妥昔单抗(Rituximab)。

[0066] 更具体地,上述酪氨酸激酶抑制剂选自由伊马替尼(Imatinib)以及吉非替尼(gefitinib)组成的组中。

[0067] 根据本发明具体实例,可以用本发明的组合物预防或治疗的癌症为CD55阳性癌症。

[0068] 在本说明书中,术语“CD55阳性癌症”为由表达CD55受体的癌细胞组成的癌症,具体是指CD55的表达达到使得对象的补体免疫活性被抑制到可测量的程度的癌症。对此,术语“CD55阳性癌症”涵盖“CD55过表达癌症”的含义。根据本发明,本发明的组合物可以消除

由CD55的过表达诱导对治疗剂的耐药性的各种癌症的耐药性并增强治疗敏感性。

[0069] CD55阳性癌症包括例如,黑色素瘤、淋巴瘤、肺癌、甲状腺癌、乳腺癌、大肠癌、前列腺癌、头颈癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、肾癌、宫颈癌、胰腺癌、白血病、骨髓癌、卵巢癌、宫颈癌、肉瘤、胆管癌以及子宫内膜癌,但不限于此,包括表达CD55的所有实体癌以及血癌。

[0070] 根据本发明又一实施方式,本发明提供一种包含本发明的上述抗体或其抗原结合片段作为有效成分的用于诊断癌症的组合物。

[0071] 由于已经详细说明本发明中使用的抗体或其抗原结合片段以及作为对象的癌症,因此将省略其说明以避免过度冗余。

[0072] 在本说明书中,术语“诊断”包括判定个体对特定疾病的敏感性(susceptibility)、判定当前个体是否患有特定疾病、以及判定患上特定疾病的个体的预后(prognosis)。

[0073] CD55受体为典型的癌症诊断标志物,其在癌症组织中的表达水平高于正常组织,与CD55特异性结合的本发明的抗体可以准确判定生物试样中肿瘤的存在。而且,本发明的抗体通过各种免疫检测方法准确测定肿瘤中CD55的表达水平以预测该肿瘤对CDC药物的治疗敏感性,从而可以有用地用于根据癌症的性质早期构建针对性治疗策略。

[0074] 在本说明书中,术语“用于诊断的组合物”是指包含本发明的抗体的集成混合物(mixture)或装置(device)作为测定CD55蛋白的表达量的方法,以判断对象是否患有癌症或预测对CDC药物的治疗敏感性,对此,还可以表达为“用于诊断的试剂盒”。

[0075] 在本说明书中,术语“生物试样”包括组织、细胞、全血、血清、血浆、唾液、尿液、淋巴液、骨髓液、组织尸检试样(脑、皮肤、淋巴结、脊髓等)、细胞培养上清液、破碎的真核细胞以及细菌表达系统,但不限于此。

[0076] 生物试样中CD55蛋白的检测可以通过利用比色法(colormetric method)、电化学法(electrochemical method)、荧光法(fluorimetric method)、发光法(luminometry)、粒子计数法(particle counting method)、目测评估法(visual assessment)或闪烁计数法(scintillation counting method)检测抗原抗体复合物的形成来进行。在本说明书中,术语“检测”是指一系列用于判定是否形成抗原抗体复合物的过程。可以使用包括酶、荧光团、配体、发光团、微粒子或放射性同位素在内的各种标志物进行检测。

[0077] 用作检测标志物的酶可以包括例如,乙酰胆碱酯酶、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶以及 β -拉酰胺酶等,荧光团可以包括荧光素、 Eu^{3+} 、 Eu^{3+} 螯合物或穴合物等,配体可以包括生物素衍生物等,发光团可以包括吖啶酯以及异鲁米诺衍生物等,微粒子可以包括胶体金以及着色乳胶等,放射性同位素可以包括 ^{57}Co 、 ^3H 、 ^{125}I 以及 ^{125}I -巴顿亨特(Bonton Hunter)试剂等。

[0078] 根据本发明一实例,可以利用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测抗原抗体复合物。本发明的抗体可以具有检测标记,当不具有检测标记时,可以通过用能够捕获本发明的抗体并具有检测标记的另一抗体处理来确认。

[0079] 根据本发明又一实施方式,本发明提供一种双特异性抗体或其功能性片段,其包含本发明的上述抗原结合片段以及与CD20特异性结合的抗体的抗原结合片段。

[0080] 在本说明书中,术语“双特异性抗体”是指包含由不同的氨基酸序列定义的不同的2个抗原结合区的抗体。典型地,双特异性抗体中包含的2个抗原结合区分别对不同的抗原

或表位具有特异性。

[0081] 本发明的双特异性抗体为本发明的对CD55特异性的上述抗原结合片段与特异性识别CD20的另一抗原结合片段结合的一个抗体(CD20×CD55)分子,根据本发明,与联合给药每种抗CD55抗体(例如,后述的实施例的EP-10H)和抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)相比,对利妥昔单抗耐药性肿瘤表现出更优异的治疗效果。

[0082] 根据本发明具体实例,上述双特异性抗体中包含的抗CD55抗体的抗原结合片段为scFv形式。

[0083] 根据本发明具体实例,上述与CD55特异性结合的抗体的抗原结合片段包含scFv。

[0084] 根据本发明具体实例,上述与CD55特异性结合的抗体的抗原结合片段为VL-接头-VH-CH2-CH3形式。

[0085] 根据本发明具体实例,上述双特异性抗体中包含的抗CD20抗体的抗原结合片段为Fab形式。

[0086] 根据本发明具体实例,上述与CD20特异性结合的抗体的抗原结合片段包含Fab。

[0087] 根据本发明具体实例,上述与CD20特异性结合的抗体的抗原结合片段为VL-CK-接头-VH-CH1-CH2-CH3形式。

[0088] 根据本发明具体实例,上述与CD20特异性结合的抗体为利妥昔单抗(Rituximab)。

[0089] 本发明的双特异性抗体可以包含由能够稳定缔合的第一亚单位以及第二亚单位组成的Fc区。在本说明书中,术语“Fc区”是指包含全长抗体的至少一部分恒定区的抗体重链的C-末端区,其包括野生型序列Fc区以及变异体Fc区。IgG的Fc区包含IgG CH2结构域以及IgG CH3结构域。本发明的双特异性抗体的CH3区可以为野生型或变异体CH3结构域(例如,具有在其一条链中引入的“突出部”(“旋钮”)以及在其另一条链中相应地引入的“空洞(cavity)”(“孔”)的CH3结构域)。

[0090] 根据本发明具体实例,本发明的双特异性抗体可以使用旋钮入孔(knob-into-hole)方法,以防止CD20×CD55的重链之间不必要的配对。“旋钮入孔”方法[US 5,731,168; US7,695,936; Ridgway et al., Prot Eng 9,617-621(1996); Carter, J Immunol Meth 248, 7-15(2001)]在第一多肽的界面导入突出部(“旋钮”)以及在第二多肽的界面导入与其相应的空洞(“孔”),使得突出部可以位于空洞中,以促进异二聚体的生成并抑制同二聚体的生成。突出部是通过用更大的氨基酸侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)取代第一多肽的界面的小氨基酸侧链来构成。通过用更小的氨基酸侧链取代大的氨基酸侧链来在第二多肽的界面形成与突出部相同或相似大小的互补空洞。

[0091] 根据本发明具体实例,本发明的双特异性抗体可以为VL-接头(linker)-VH-CH2-CH3形式的抗CD55抗体的抗原结合片段与VL-CK-接头(linker)-VH-CH1-CH2-CH3形式的抗CD20抗体的抗原结合片段结合的形式。

[0092] 根据本发明具体实例,本发明的双特异性抗体可以使用10个至100个,更具体地15个至60个由Gly以及Ser组成的接头,以防止CD20×CD55的重链之间不必要的配对。

[0093] 具体地,本发明的双特异性抗体可以为CD55-scFv-旋钮(CD55-scFv-knob)(VL-接头20(linker20)-VH-CH2-CH3)与CD20-Fab-孔(CD20-Fab-hole)(VL-CK-接头40(linker40)-VH-CH1-CH2-CH3)结合的形式。

[0094] 接头20(linker20)为包含20个上述Gly或Ser,例如,可以包含Gly Gly Gly Gly

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser,但不限于此。

[0095] 接头40(linker40)为包含20个上述Gly或Ser,例如,可以包含Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ser,但不限于此。

[0096] 发明的效果

[0097] 本发明的特征以及优点的概括如下:

[0098] (a) 本发明提供一种与CD55特异性结合的抗体或其抗原结合片段;以及包含其的用于预防、治疗和/或诊断癌症的组合物。

[0099] (b) 本发明的抗体对通过抑制补体免疫机制来促进肿瘤增殖的CD55蛋白表现出高结合力以及抑制力,从而可以用作各种由CD55介导的疾病的有效的治疗组合物。

[0100] (c) 并且,本发明的抗体可以有用地用作有效的治疗佐剂,其从根本上消除由于CD55的过表达而导致对治疗剂产生耐药性的各种疾病的耐药性并显著改善治疗反应性,上述治疗剂以补体依赖的细胞毒性(complement dependent cytotoxicity,CDC)作为作用机制。

附图说明

[0101] 图1为示出测定4-1H及G4-1H对CD55的亲合度的ELISA分析结果的图。

[0102] 图2为示出测定通过从在G4-1H可变区的基因中引入随机突变的文库中进行筛选来制备的抗体对CD55的亲合度的ELISA分析结果的图。

[0103] 图3为示出测定通过用疏水性氨基酸取代用于提高结合力的关键位点来制备的抗体对CD55的亲合度的ELISA分析结果的图。

[0104] 图4示出分析利妥昔单抗和EP-10H的联合处理对BJAB细胞的凋亡效果的FACS分析结果。

[0105] 图5a示出比较分析Ramos及Ramos-RR中的CD20及CD55表达量的FACS分析结果。图5b示出分析利妥昔单抗和EP-10H抗体的联合处理对Ramos-RR细胞的凋亡效果的FACS分析结果。

[0106] 图6a示出比较分析K562及K562-IR中的CD55表达量的FACS分析结果。图6b示出分析伊马替尼和EP-10H抗体的联合处理对562-IR细胞的凋亡效果的FACS分析结果。

[0107] 图7a示出比较分析PC9及PC9-GR中的CD55表达量的FACS分析结果。图7b示出分析伊马替尼和EP-10H抗体的联合处理对PC9-GR细胞的凋亡效果的FACS分析结果。

[0108] 图8为示出比较本发明的作为CD20×CD55双抗的SBU与Macor报道的双抗形式的抗体示意图。

[0109] 图9示出本发明的SBU形式的CD20×CD55双抗的SDS-PAGE分析结果。

[0110] 图10a以及图10b分别示出测定CD20×CD55双抗对CD20(图10a)以及CD55(图10b)的亲合度的ELISA分析结果。

[0111] 图11a示出分析CD20×CD55双抗对BJAB细胞的凋亡效果的FACS分析结果。图11b示出分别比较单独用利妥昔单抗处理、用利妥昔单抗和EP-10H抗体联合处理以及用CD20×CD55双抗处理时的BJAB细胞凋亡率的结果。

[0112] 图12a示出分析CD20×CD55双抗对Ramos细胞的凋亡效果的FACS分析结果。图12b示出分别比较单独用利妥昔单抗处理、用利妥昔单抗和EP-10H抗体联合处理以及用CD20×CD55双抗处理时的细胞凋亡率的结果。

[0113] 图13a示出分析CD20×CD55双抗对Ramos-RR细胞的凋亡效果的FACS分析结果。图13b示出分别比较单独用利妥昔单抗处理、用利妥昔单抗和EP-10H抗体联合处理以及用CD20×CD55双抗处理时的Ramos-RR细胞凋亡率的结果。

[0114] 图14示出确认用利妥昔单抗、SBU形式的CD20×CD55双抗处理的Ramos-RR细胞的上清液中的C4d产量的结果。

具体实施方式

[0115] 以下,将通过实施例更详细地说明本发明。这些实施例仅用于更具体地说明本发明,对本领域的普通技术人员来说显而易见的是,根据本发明的主旨,本发明的范围不限于这些实施例。

[0116] 实施例

[0117] 实施例1:人源化4-1H

[0118] 通过如下方法进行人源化,以降低韩国专利申请第10-2016-0132333号中公开的4-1H的免疫原性。

[0119] 为了4-1H的人源化,4-1H的轻链可变区中的3个FR(LFR1、LFR2、LFR3)被IGLV3-1*01的FR取代,重链可变区中的3个FR(HFR1、HFR2、HFR3)被IGHV3-23D*02的FR取代。然后,考虑到氨基酸的物理化学性质的相似性或不相似性,特定氨基酸再次被亲本抗体(4-1H)的氨基酸取代。再次被亲本抗体(4-1H)取代的氨基酸为轻链可变区中的L46T、N66K,重链可变区中的F68A。抗体结构域的氨基酸残基编号根据本领域常用的Kabat EU编号系统编号(根据如Kabat EU numbering system, Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991所述的EU索引号)。轻链可变区的J基因(J gene)参考US2010-0056386固定为FGGGTKLTVL,重链可变区的J基因(J gene)参考US2014-0206849固定为WGQGTTTVSS。将人源化4-1H抗体命名为G4-1H,将其碱基序列示于表1中。

[0120] 表1

[0121]	轻链可变区		
	G4-1H (VL)	<u>SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGSGYQGWYQQKPGQSPVTVIYW</u> <u>NDKRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCGGWDSS</u> <u>TVL</u>	序列 4
[0122]	重链可变区		
	G4-1H (VH)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS</u> <u>DRGMAWVRQAPGKGL</u> <u>EWVSGISSSGRYTTYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT</u> <u>AVYYCAKNAGAGGWHAAYIDAWGQGTTTVSS</u>	序列 5

[0123] G4-1H的重链以及轻链可变区氨基酸序列

[0124] 在上述表中,下划线表示CDR区,粗体表示再次被亲本抗体(4-1H)取代的氨基酸。

[0125] 实施例2:G4-1H克隆的完整抗体转化以及表达/纯化

[0126] 将实施例1中制备的G4-1H抗体的可变区的DNA合成为scFv形式(Cosmogenetech公司,韩国),然后通过PCR转化为完整抗体(full-length IgG)。首先,利用下述表2中的 V_H 、 C_H 以及 V_L 、 C_K 引物的组合通过PCR从包含scFv的pUC载体(Cosmogenetech公司,韩国)得到重链以及轻链的可变区以及恒定区的片段。利用得到的抗体的可变区以及恒定区并使用下述表2中的HC以及LC引物的组合进行PCR,结果确保G4-1H的重链以及轻链。重链用EcoRI以及NotI(纽英伦生物技术公司(New England Biolab),英国)酶处理,然后连接到同样用相同的限制酶处理的作为动物细胞表达用载体的pCMV载体中(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific),美国)。并且,轻链用XbaI(纽英伦生物技术公司(New England Biolab),英国)酶处理,然后连接到同样用相同的限制酶处理的pCMV载体中。通过热休克将完成连接的质粒转化至DH5 α 感受态细胞中(DH5 α competent cell)(纽英伦生物技术公司(New England Biolab),英国),然后大规模培养得到的集落以得到质粒。

[0127] 表2

[0128]	引物	序列	序号
[0129]	V_H	正向 CTT CCT GTC AGT AAC TAC AGG TGT CCA CTC CCA GGT GCA 反向 ACT GCA GCA GTC	6
		CCA GCG TGA CCG TAT CCA GCG CCT CCA CCA AGG GCC C CA	7
	C_H	正向 GCC TCC ACC AAG GGC CC	8
		反向 TCC CCC GGC AAG TGA GCG GCC GCT CAC	9
	HC	正向 CAG AAT TCA CTC TAA CCA TGG AAT GGA GCT GGG TCT T 反向 TC TCT TCT TCC TGT CAG TAA CTA CAG	10
		TCC CCC GGC AAG TGA GCG GCC GCT CAC	9
	V_L	正向 GGT CTT TGT ATA CAT GTT GCT GTG GTT GTC TGG TGT TG 反向 A AGG AAG CTA CGA GCT GAC AC	11
		CAA GCT CAC CGT CTT GCG GAC CGT GGC C	12
	C_K	正向 CGG ACC GTG GCC GCC CCC TC	13
		反向 CGG GGC GAG TGC TAG TTC TAG AAC TA	14
	LC	正向 GGG AAT TCT AGA GGA TCG AAC CCT TTG CAA GCT TCG G 反向 CA CGA GCA GAC CAG CAT GGG CAT CAA GAT GGA GAC A CA TTC TCA GGT CTT TGT ATA CAT GTT G	15
		CGG GGC GAG TGC TAG TTC TAG AAC TA	14

[0130] 用于G4-1H完整抗体克隆的引物

[0131] 利用聚乙烯亚胺(PEI) (Polysciences公司,美国)及150mM的NaCl将转化为完整抗

体的重链以及轻链各自的质粒转导至Expi293F细胞中(英杰公司(Invitrogen),美国),然后在Erlenmeyer锥形瓶的Freestyle 293表达培养基中(英杰公司(Invitrogen),美国)以37℃的温度、8%的CO₂以及55%的湿度的条件下悬浮培养7天。将表达细胞培养液以4000rpm的转速离心10分钟,然后取出上清液并用0.22μm的过滤器过滤。将过滤的上清液在4℃的温度下诱导与1ml的MabSelect sure树脂(GE医疗公司(GE Healthcare),美国)结合。用10cv(柱体积(column volume))的20mM的磷酸氢二钠及500mM的氯化钠(pH7.0)溶液清洗结合的树脂,然后用100mM的柠檬酸(pH3.0)溶液洗脱结合的抗体,然后用1M的Tris-HCL(pH9.0)中和。利用Slide-A-Lyzer Dialysis透析盒(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific),美国)将缓冲液更换为pH7.2-7.4的PBS,然后最终通过SDS-PAGE确认纯化的抗体的轻链以及重链的大小以及纯度,结果可以确认与理论值一致的分子量以及高纯度。

[0132] 实施例3:分析4-1H以及G4-1H对CD55的亲合度

[0133] 通过间接ELISA确认上述实施例2中制备的G4-1H单克隆抗体对CD55的结合力。对于间接ELISA,将重组人CD55(R&D Systems公司,美国)以1μg/ml的浓度稀释于50μl的PBS中并置于96孔免疫板(康宁公司(Corning),美国),然后在4℃的温度下保存过夜进行吸附。用包含3%的牛血清白蛋白(密理博公司(Millipore),美国)的缓冲溶液在常温下反应1小时,然后用包含0.5%的吐温20(Tween20)(Amresco公司,美国)的缓冲溶液清洗3次,每孔分别处理50μl的按连续浓度(0.0001nM、0.0003nM、0.001nM、0.003nM、0.01nM、0.03nM、0.1nM、0.3nM、1nM、3nM、10nM)稀释的抗体。在常温下反应2小时,使得抗原与抗体抗体结合,然后用包含0.5%的吐温20(Tween 20)(Amresco公司,美国)的缓冲溶液清洗3次。以1:3000稀释作为抗人免疫球蛋白的Fc-HRP抗体(Jackson Immunoresearch公司,美国)后每孔处理50μl,然后在常温下反应1小时。反应结束后,用包含0.5%的吐温20(Tween 20)(Amresco公司,美国)的缓冲溶液清洗3次,然后加入50μl的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific),美国)显色10分。利用分光光度计(伯腾公司(Biotek),美国)测定450nm处的吸光度的结果,与4-1H相比,G4-1H对CD55表现出低亲和力(图1)。

[0134] 实施例4:制备在可变区的基因中引入随机突变的文库

[0135] 通过易错PCR(Error prone PCR)过程构建在G4-1H抗体的可变区基因中引入随机突变的文库,以改善G4-1H对CD55的亲合度。具体地,在包含G4-1H scFv的pComb3x载体中加入scFv测序引物1及引物2、校对缺陷聚合酶(Takara公司,日本)、聚合酶缓冲液、dATP、dTTP、dCTP以及dGTP,然后通过调整盐浓度以及锰量来调整突变频率。重复进行30次易错PCR(Error prone PCR)过程,即在94℃的温度下预热5分钟,在91℃的温度下双螺旋分离1分钟,在55℃的温度下引物结合1分钟,在72℃的温度下进行3分钟的DNA合成反应,最后在72℃的温度下进行5分钟的DNA合成反应。利用SfiI(纽英伦生物技术公司(New England Biolab),英国)限制酶切割纯化的PCR产物以及作为噬菌粒载体的pComb3x载体后将其进行连接,然后转化至ER2738大肠杆菌并进行培养。

[0136] 表3

[0137]	scFv 测序引物		
	1	ACA CTT TAT GCT TCC GGC	序列 16
	2	CAA AAT CAC CGG AAC CAG AG	序列 17

[0138] 用于易错PCR(Error prone PCR)的引物

[0139] 实施例5:筛选对CD55的亲合度与4-1H相比改善的克隆

[0140] 通过利用上述实施例4中制备的文库的生物淘选(biopanning)来筛选与G4-1H以及4-1H相比改善对CD55的亲合度的克隆。

[0141] 首先,将磁珠(英杰公司(Invitrogen),美国)与2.5 μ g的重组人CD55(R&D Systems 2009-CD/CF,美国)接合。通过将噬菌体文库与接合到磁珠上的CD55在常温下反应2小时来使CD55与对其具有亲和力的噬菌体结合,然后将其与4-1H抗体在常温下反应30分钟以与4-1H进行竞争。用包含0.5%的吐温20(Tween 20)(Amresco公司,美国)的缓冲溶液清洗后利用酸性溶液洗脱。将洗脱的噬菌体感染到大肠杆菌ER2738中培养过夜进行增殖,以进行下一轮淘选(panning)。重复4次这种过程来进行生物淘选。清洗次数从第一次淘选中清洗1次,第二、三次淘选中清洗3次,第四次淘选中清洗5次,随着淘选次数增加而增加,从而累积结合力高的噬菌体。

[0142] 将从第三次以及第四次生物淘选产物的板中筛选的192个克隆置于96深孔板(deep well)中并加入100 μ g/ml的羧苄青霉素、70 μ g/ml的卡那霉素以及VCSM13辅助噬菌体,然后在37 $^{\circ}$ C的温度下培养过夜以诱导表达抗体的噬菌体的增殖。通过离心上述中得到的培养液来得到包含噬菌体的培养上清液,然后置于涂敷有重组人CD55(R&D Systems公司的2009-CD/CF,美国)的ELISA板中并在37 $^{\circ}$ C的温度下培养2小时,然后将接合有HRP的抗M13抗体(默克(Merck),美国)用作第二抗体,并且通过ELISA确认与CD55结合的抗体。使用4-1H克隆的噬菌体作为对照组,筛选结合力比其高的5个克隆。

[0143] 实施例6:筛选的克隆的完整抗体转化以及表达/纯化

[0144] 为了将EP-1E、EP-1F、EP-9B、3R-2-1H以及EP-10H转化为全长(full-length)的完整IgG形式进行克隆。上述EP-1E、EP-1F、EP-9B、3R-2-1H以及EP-10H具有如下表4所示的CDR序列。

[0145] 表4

[0146]

	氨基酸	序列号
EP-1E 轻链可变区	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGGSYGWFFQQKPGQSPVTVIY <u>WNNKRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCGGWDS</u> STYAIFGGGTKLTVL	18
EP-1E 重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGK GLEWVSGISSSGRYTTYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKNAVAGGWHAAYIDAWGQGTTVTVSS	19
EP-1F 轻链可变区	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGGSYGWYQQKPGQSPVTVIY <u>WNDKRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCGGWDS</u> STYAIFGGGTKLTVL	4
EP-1F 重链可变区	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGK GLEWVSGISSSGRYTTYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKNAVAGGWHAAYIDAWGQGTTVTVSS	20
EP-9B 轻链可变区	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGGSYGWYQQKPGQSPVTVIY <u>WNDKRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCGGWDS</u> STYAIFGGGTKLTVL	4
EP-9B 重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQSPGKG LEWVSGISSSGRYTTYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLR EDTAVYYCAKNAVAGGWHAAYIDAWGQGTTVTVSS	21
3R-2-1H 轻链可变区	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGGSYGWYQQKPGQSPVTVIY <u>WNDKRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCGGWDS</u> STYAIFGGGTKLTVL	4

[0147]

3R-2-1H 重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVARGFTFSDRGMAWVRQAPGK GLEWVSGISSSGRYTTYAPAVKGRATTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKNAVAGGWHAAYIDAWGQGTTVTVSS	22
EP-10H 轻链可变区	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGGSYGWYQQKPGQSPVTVIY <u>WNDKRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCGGWDS</u> STYAIFGGGTKLTVL	4
EP-10H 重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGK GLEWVSGISSSGRYTTYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKNAVAGGWHAAYIDAWGQGTTVTVSS	19

[0148] 筛选的克隆的轻链以及重链可变区的氨基酸序列

[0149] 在上述表中,下划线表示CDR区,粗体分别表示与G4-1H不同的氨基酸。作为上述实施例5中筛选的抗体的EP-1E、EP-1F、EP-9B、3R-2-1H以及EP-10H为scFv形式,因此将其转化为完整抗体,通过与上述实施例2相同的方法进行完整抗体转化以及表达/纯化。

[0150] 表5

	引物	序列	序列号
[0151]	V _L	正向 GGT CTT TGT ATA CAT GTT GCT GTG GTT GTC TGG TGT TGA AGG AAG CTA CGA GCT GAC AC	11
		反向 CAA GCT CAC CGT CTT GCG GAC CGT GGC C	12
	C _k	正向 CGG ACC GTG GCC GCC CCC TC	13
		反向 CGG GGC GAG TGC TAG TTC TAG AAC TA	14
	L _C	正向 GGG AAT TCT AGA GGA TCG AAC CCT TTG CAA GCT TCG GC A CGA GCA GAC CAG CAT GGG CAT CAA GAT GGA GAC ACA TTC TCA GGT CTT TGT ATA CAT GTT G	15
		反向 CGG GGC GAG TGC TAG TTC TAG AAC TA	14
	V _H	正向 CTT CCT GTC AGT AAC TAC AGG TGT CCA CTC CGA GGT CC A GCT GGT C	23
		反向 GTG ACC GTG TCC AGC GCC TCC ACC AAG GG	24
	C _H	正向 GCC TCC ACC AAG GGC CC	8
[0152]	反向	TCC CCC GGC AAG TGA GCG GCC GCT CAC	9
	H _C	正向 CAG AAT TCA CTC TAA CCA TGG AAT GGA GCT GGG TCT TT C TCT TCT TCC TGT CAG TAA CTA CAG	10
		反向 TCC CCC GGC AAG TGA GCG GCC GCT CAC	9

[0153] 用于筛选的克隆的完整抗体克隆的引物

[0154] 实施例7:分析通过筛选制备的完整抗体对CD55的亲合度

[0155] 通过间接ELISA确认上述实施例6中制备的抗体对CD55的亲合度。通过与上述实施例3相同的方法进行间接ELISA。

[0156] ELISA结果,与4-1H相比,实施例6的抗体对CD55表现出高亲合度(图2)。EP-1E、EP-1F、3R-2-1H以及EP-10H表现出相似的亲合度,EP-9B表现出高于4-1H但低于其他抗体的亲合度。对CD55的亲合度比4-1H高的抗体可以非常用地用于各种癌症诊断或药物治疗组合物的制备。

[0157] 实施例8:用于提高结合力的关键位点的氨基酸取代

[0158] 表4中记载的克隆均在根据Kabat EU编号系统的G4-1H中H100A位点处的G被V取代。上述位点包含在对抗体的抗原结合重要的HCDR3区中。本发明人将上述位点鉴定为用于提高结合力的关键位点,并为了用V以外的疏水性氨基酸取代其位点而进行克隆。将只有H100A位点处与G4-1H不同的EP-10H作为基本骨架制备的10H(A)、10H(I)、10H(L)、10H(F)以及10H(M)具有如下所示的CDR序列(表6)。

[0159] 表6

	氨基酸	序列号
[0160]	10H (A) 重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGKG LEWVSGISSSGRYTTYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKNAAAGGWHAAYIDAWGQGTTVTVSS 25
	10H (I) 重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGKG LEWVSGISSSGRYTTYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKNAAAGGWHAAYIDAWGQGTTVTVSS 26
[0161]	10H (L) 重链可变区	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGKG LEWVSGISSSGRYTTYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKNALAGGWHAAYIDAWGQGTTVTVSS 27
	10H (F) 重链可变区	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGKG LEWVSGISSSGRYTTYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKNAAAGGWHAAYIDAWGQGTTVTVSS 28
	10H (M) 重链可变区	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGKG LEWVSGISSSGRYTTYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKNAMAGGWHAAYIDAWGQGTTVTVSS 29

[0162] 在克隆到作为动物细胞表达用载体的pCMV载体(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific),美国)中的完整IgG形式的EP-10H的重链可变区中,发生与G4-1H不同的突变的重链互补决定区的氨基酸被疏水性氨基酸取代。

[0163] 首先,利用表4的HC1、HC2引物的组合通过PCR从包含EP-10H的重链可变区的pCMV载体得到重链可变区以及恒定区。利用HC3正向引物以及HC2反向引物对通过PCR得到的重链可变区以及恒定区进行重叠PCR(overlap PCR)过程以得到VH-CH1-CH2-CH3形式。像这样得到的重链用EcoRI以及NotI(纽英伦生物技术公司(New England Biolab),英国)限制酶切割,然后连接到同样用相同的限制酶处理的作为动物细胞表达用载体的pCMV载体中(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific))。通过热休克将完成连接的质粒转化至DH5 α 大肠杆菌中(纽英伦生物技术公司(New England Biolab),英国),然后大规模培养以得到质粒。

[0164] 表7

	引物	序列	序列号
[0165]	HC1 正向	CTT CCT GTC AGT AAC TAC AGG TGT CCA CTC CGA GGT CCA GCT GGT C	23
	反向	GTA CTA CTG CGC CAA G	30
	HC2 正向 1	GTA CTA CTG CGC CAA GAA CGC CGC GGC CGG GGG GTG GCA CGC	31
	正向 2	GTA CTA CTG CGC CAA GAA CGC CAT TGC CGG GGG GTG GCA CGC	32

[0166]	正向 3	GTA CTA CTG CGC CAA GAA CGC CCT GGC CGG GGG GTG GCA CGC	33
	正向 4	GTA CTA CTG CGC CAA GAA CGC CAT GGC CGG GGG GTG GCA CGC	34
	正向 5	GTA CTA CTG CGC CAA GAA CGC CTT TGC CGG GGG GTG GCA CGC	35
	反向	TCC CCC GGC AAG TGA GCG GCC GCT CAC	9
HC3	正向	CAG AAT TCA CTC TAA CCA TGG AAT GGA GCT GGG TCT TTC TCT TCT TCC TGT CAG TAA CTA CAG	10
	反向	TCC CCC GGC AAG TGA GCG GCC GCT CAC	9

[0167] 用于进行用于提高结合力的关键位点的氨基酸取代的引物

[0168] 完成克隆后,利用EP-10H轻链质粒以及表6的重链质粒通过与上述实施例2相同的方法进行完整抗体的表达/纯化。

[0169] 实施例9:分析通过用于提高结合力的关键位点来制备的完整抗体对CD55的亲合度

[0170] 通过间接ELISA确认上述实施例8中制备的抗体对CD55的亲合度。通过与上述实施例3相同的方法进行间接ELISA。

[0171] ELISA分析结果,通过用疏水性氨基酸取代结合力关键位点来制备的抗体对CD55表现出高于4-1H的亲合度(图3)。然而,10H(A)、10H(I)、10H(L)、10H(F)以及10H(M)表现出低于EP-10H的亲合度。这意味着用V取代H100A位点处的G对结合力的提高表现出最有效的结果。

[0172] 实施例10:EP-10H对CD55过表达的耐药性癌细胞系的治疗效果

[0173] 实验例10-1:对伯基特淋巴瘤细胞系BJAB的利妥昔单抗和EP-10H的联合给药效果

[0174] BJAB具有补体抗性,这由CD55的表达所导致(Golay,et al.,Blood,95(12):3900-8,2000)。因此,对以补体依赖的细胞毒性(complement dependent cytotoxicity,CDC)作为主要治疗机制的利妥昔单抗的反应性低。已知伯基特淋巴瘤为B细胞淋巴瘤中的恶性肿瘤,确认与EP-10H的联合给药对伯基特淋巴瘤细胞系BJAB的细胞凋亡能力,以确认利妥昔单抗对伯基特淋巴瘤的治疗效果改善可能性。并且,为了确认联合给药效果,在分别100 μ l的补充有50%的人血清补体(complement sera human)(西格玛公司(Sigma),美国)的RPMI培养基中,以20 μ g/ml的浓度稀释利妥昔单抗、分别以20 μ g/ml以及50 μ g/ml的浓度稀释利妥昔单抗以及4-1H或EP-10H,然后用上述分别100 μ l的RPMI培养基处理每样品 5×10^5 个的BJAB细胞,然后在37 $^{\circ}$ C的温度、5%的CO₂条件下培养1小时。然后,利用带有7-AAD的FITC膜联蛋白V细胞凋亡检测试剂盒(FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD)(BioLegend公司,美国)并通过FACS分析设备Attune NxT(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific),美国)确认凋亡细胞来观察CDC(图4)。正如以往报道的,BJAB细胞对利妥昔单抗的反应性低,但当和抗CD55抗体(4-1H以及EP-10H)联合给药时其效果增加,并且利妥昔单抗和EP-10H组合的效果的增幅大于利妥昔单抗和4-1H组合。这种结果意味着虽然CD55的表达抑制利妥昔单抗的CDC效果,但当利用抗体抑制CD55时被抑制的利妥昔单抗的效果恢复,并表示这种效果由于对CD55的亲合度更优异的EP-10H而更为显著。

[0175] 实验例10-2a:确认利妥昔单抗耐药性细胞系Ramos-RR中的CD55表达

[0176] Ramos为利妥昔单抗反应性B细胞淋巴瘤细胞系,为了确认利用Ramos制备的利妥

昔单抗耐药性细胞系Ramos-RR中的CD55表达,如下进行实验。

[0177] 将每样品 5×10^5 个细胞的Ramos以及Ramos-RR悬浮于以 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度包含或不包含EP-10H单克隆抗体的PBS中,然后在 4°C 的温度下培养1小时。将培养液以4000rpm的转速离心5分钟后用 $100 \mu\text{l}$ 的PBS清洗,然后再次以4000rpm的转速离心5分钟。用以1:100的比例稀释至PBS中的山羊 (Goat) 抗人 (human) IgG抗体以及Alexa Fluor488 (赛默飞世尔科技公司 (ThermoFisher Scientific), 美国) 处理细胞后在 4°C 的避光状态下培养30分钟。用PBS清洗荧光染色的细胞后悬浮于 $400 \mu\text{l}$ 的PBS中,然后利用FACS分析设备Attune NxT (赛默飞世尔科技公司 (ThermoFisher Scientific), 美国) 进行分析,并将其结果示于图5a中。

[0178] 结果可以确认,与Ramos相比,Ramos-RR的CD55表达增加。这意味着CD55参与对利妥昔单抗的耐药性。

[0179] 实验例10-2b:对利妥昔单抗耐药性细胞系Ramos-RR的利妥昔单抗和EP-10H的联合给药效果

[0180] 通过实施例10-1的方法确认利妥昔单抗和EP-10H的联合给药在Ramos-RR中的细胞凋亡能力,上述Ramos-RR由于CD55过表达导致对利妥昔单抗表现出耐药性(图5b)。利妥昔单抗在Ramos中诱导细胞凋亡,相反,在Ramos-RR中诱导细胞凋亡的水平低于Ramos。然而,EP-10H和4-1H的联合给药增加Ramos-RR中的细胞凋亡,并且与BJAB中相同地,与利妥昔单抗与4-1H的联合给药相比,与EP-10H的联合给药更显著增加利妥昔单抗的细胞凋亡能力。这种结果表示,EP-10H不仅可以对B细胞淋巴瘤等原发癌(BJAB细胞系为原发性癌细胞系)表现出治疗效果,还可以对已对现有疗法产生耐药性的癌症表现出治疗效果。

[0181] 实验例10-3a:确认伊马替尼耐药性细胞系K562-IR中的CD55表达

[0182] K562为对酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼 (Imatinib) 具有反应性的白血病细胞系。通过与实验例10-2a相同的方法确认利用K562制备的伊马替尼耐药性细胞系K562-IR中的CD55表达。结果可以确认,与K562相比,K562-IR的CD55表达增加(图6a)。这意味着CD55参与对伊马替尼的耐药性。

[0183] 实验例10-3b:确认对K562-IR细胞系的伊马替尼和EP-10H的联合给药效果

[0184] 将K562以及由于CD55过表达导致对伊马替尼表现出耐药性的K562-IR分别以每孔 2×10^5 个细胞接种于12孔细胞培养板中,立即用 $2 \mu\text{M}$ 的伊马替尼,为了确认联合给药效果,用 $2 \mu\text{M}$ 的伊马替尼以及 $500 \mu\text{l}$ 的分别以 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度稀释4-1H或EP-10H的RPMI培养基处理,然后在 37°C 的温度、5%的 CO_2 条件下培养24小时。然后,利用7-AAD及FITC膜联蛋白V细胞凋亡 (FITC Annexin V Apoptosis) 检测试剂盒并通过FACS分析设备Attune NxT分析凋亡细胞(图6b)。

[0185] 伊马替尼在K562细胞系中诱导细胞凋亡,相反,在K562-IR中未表现出效果,但当与EP-10H或4-1H联合给药时在K562-IR中诱导细胞凋亡。并且,EP-10H和伊马替尼的联合给药表现出大于4-1H和伊马替尼的联合给药的细胞凋亡效果。这种结果与实验例10-3a的结果一起证明CD55是对酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼产生耐药性的原因,并意味着利用EP-10H抑制CD55是克服对伊马替尼的耐药性的有效策略。由于伊马替尼是一种广泛用于治疗白血病的长期服用药物,因此迫切需要一种克服可能因长期服用而诱导的耐药性的策略。对此,期待利用EP-10H克服对伊马替尼的耐药性的策略对白血病的治疗非常有效。

[0186] 实验例10-4a:确认吉非替尼耐药性细胞系PC9-GR中的CD55表达

[0187] PC9为对酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼(gefitinib)具有反应性的非小细胞肺癌(NSCLC)细胞系。通过实验例10-2a的方法确认利用PC9制备的吉非替尼耐药性细胞系PC9-GR中的CD55表达,结果可以确认与PC9相比,PC9-GR的CD55表达增加(图7a)。这意味着CD55参与对吉非替尼的耐药性。

[0188] 实验例10-4b:确认PC9-GR中的吉非替尼和EP-10H的联合给药效果

[0189] 将NSCLC细胞系PC9以及由于CD55过表达导致对吉非替尼表现出耐药性的PC9-GR分别以每孔 1×10^5 个细胞接种于12孔细胞培养板中,然后在37℃的温度、5%的CO₂条件下进行培养。接种24小时后,处理5μg/ml的吉非替尼,为了确认联合给药效果,用5μg/ml的吉非替尼以及500μl的分别以5μg/ml的浓度稀释4-1H或EP-10H的RPMI培养基处理,然后在37℃的温度、5%的CO₂条件下再次培养24小时。然后,利用7-AAD及FITC膜联蛋白V细胞凋亡(FITC Annexin V Apoptosis)检测试剂盒并通过FACS分析设备Attune NxT分析凋亡细胞(图7b)。

[0190] 吉非替尼在作为NSCLC细胞系的PC9细胞系中诱导细胞凋亡,相反在PC9-GR中未表现出效果,但EP-10H或4-1H和吉非替尼的联合给药在PC9-GR中诱导细胞凋亡。并且,EP-10H和吉非替尼的联合给药表现出大于4-1H和吉非替尼的联合给药的细胞凋亡效果。这种结果与实验例10-4a的结果一起证明CD55是对作为靶向抗癌剂中酪氨酸激酶抑制剂的吉非替尼产生耐药性的原因,并意味着利用EP-10H抑制CD55是克服对吉非替尼的耐药性的有效策略。吉非替尼是一种对治疗剂不多的NSCLC有效的药物,在治疗剂的其他选择不多的情况下,如果产生耐药性,则难以选择二次药物,因此迫切需要一种克服耐药性的策略。期待利用EP-10H克服吉非替尼的耐药性的策略对NSCLC的治疗非常有效。

[0191] 实施例11:利用EP-10H制备双抗并确认功效

[0192] 在实施例10中确认EP-10H与各种药物的联合给药效果。基于实施例10的实验例10-1、实验例10-2中确认的与利妥昔单抗的联合给药效果的结果,以比较联合给药靶向不同抗原的两种抗体的方法与可以用一种抗体同时靶向两种抗原的双抗的癌细胞凋亡能力,利用利妥昔单抗及EP-10H制备CD20×CD55双抗,以比较联合给药靶向不同抗原的两种抗体的方法与可以用一种抗体同时靶向两种抗原的双抗的癌细胞凋亡能力,并通过与联合给药进行比较来确认双抗的癌细胞凋亡能力。

[0193] 实验例11-1.克隆用于在动物细胞中表达的双抗(CD20×CD55)

[0194] 在本发明中,开发一种与以往报道的同时靶向CD20及CD55的双抗(Macor, et al., Leukemia, 29(2):406-14, 2014)不同的新型双抗,因此本发明人利用利妥昔单抗及EP-10H的基因克隆同时靶向CD20及CD55的双抗,以比较根据不同双抗形式的功效。将本发明中制备的双抗命名为特异性双功能单元(Specific Bi-functional Unit, SBU)(图8)。

[0195] SBU形式的CD20×CD55双抗使用旋钮入孔技术,以防止重链之间不必要的配对以及结合,并且使用由Gly以及Ser组成的接头,以防止轻链之间错误的。分别克隆CD55-scFv-旋钮(CD55-scFv-knob)(VL-接头20(linker20)-VH-CH2-CH3)及CD20-Fab-孔(CD20-Fab-hole)(VL-CK-接头40(linker40)-VH-CH1-CH2-CH3)形式,对于CD55-scFv-旋钮(CD55-scFv-knob),使用实施例6中制备的EP-10H作为模版并利用表8的引物组合进行PCR。用BssHII以及XbaI(纽英伦生物技术公司(New England Biolab),英国)酶处理扩增的基因组,并且连接到同样用相同的限制酶处理的作为动物细胞表达用载体的pMAZ载体中。通过

热休克将完成连接的质粒转化至DH5 α 感受态细胞中(DH5 α competent cell)(纽英伦生物技术公司(New England Biolab),英国),然后大规模培养得到的集落以得到质粒。

[0196] 为了制备CD20-Fab-孔(CD20-Fab-hole)(VL-CK-接头40(linker40)-VH-CH1-CH2-CH3)形式,基于药物数据库(Drug Data Bank)中公开的利妥昔单抗序列,利用表9的引物组合进行PCR。用BssHII以及XbaI酶处理扩增的基因组,并且连接到同样用相同的限制酶处理的作为动物细胞表达用载体的pMAZ载体中。通过热休克将完成连接的质粒转化至DH5 α 感受态细胞中(DH5 α competent cell)(纽英伦生物技术公司(New England Biolab),英国),然后大规模培养得到的集落以得到质粒并完成序列分析(表10)。

[0197] 表8

	引物	序列	序列号
[0198]	V _L 正向	CAG CGC GCA CTC CAG CTA CGA GCT GAC ACA GCC	36
	反向	GAC CAA GCT CAC CGT CTT GGG CGG AGG CGG GA G TGG TGG TGG CGG TAG CGG TGG AGG AGG C	37
[0199]	V _H 正向	GTG GAG GAG GCA GTG GAT CTG GCG GCT CTG AG G TCC AGC TGG TCG	38
	V _H 反向	GGC ACA ACC GTG ACC GTG TCC AGC GGC GGC TC A GAC AAA ACT CAC AC	39
	C _H 正向	CGT GTC CAG CGG CGG CTC AGA CAA AAC TCA CA C ATG C	40
	C _H 反向	CTC TCC CTG TCC CCG GGT AAA TGA CTA GAA CT A	41

[0200] 用于克隆CD55-scFv-旋钮(CD55-scFv-knob)的引物

[0201] 表9

	引物	序列	序列号
[0202]	V _L -C _K 正向	CGC AGC GAG CGC GCA CTC CCA GAT TGT CCT GTC TCA GTC TCC TGC	42
	V _L -C _K 反向	CGG CCG CCG TGC GAG ATC TTT TGA TTT CCA G TT TAG TTC CGC CG	43
	V _H 正向	CAA GTC CAA CTG CAA CAA CCG GG	44
	V _H 反向	GGA AGA CCG ATG GGC CCT TGA AGC TAG CGG CGG AAA CCG TTG TGC CAG AG	45
	C _H 正向	GCA AGC TTC AAG GGC	46
	C _H 反向	CTC TCC CTG TCC CCG GGT AAA TGA CTA GAA C TA	41

[0203] 用于克隆CD20-Fab-孔 (CD20-Fab-hole) 的引物

[0204] 表10

	CD55-scFv-knob SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGGSYGWYQQKPGQSPVTV IYWNDKRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCGG WDSSTYAIFFGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGKGL EWVSGISSGRYTYYPAPAVKGRATISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKNAVAGGWHAAAYIDAWGQGTTVTVSSGSD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	序列号 47
[0205]	CD20-Fab-hole QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSVSYIHWFFQKPGSSPK PWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC QQWTSNPPTFGGGTKLEIKRSRTAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC GGGGSGGGGSGGGGSGSGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSGSSQ VQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG RGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASF GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	序列号 48

[0206] SBU形式的CD55-scFv-旋钮 (CD55-scFv-knob) 以及CD20-Fab-孔 (CD20-Fab-hole) 的可变区氨基酸序列

[0207] 实验例11-2. 在动物细胞中的表达以及纯化

[0208] 通过与实施2相同的方法进行上述实验例11-1中制备的DNA的表达。对于SBU形式的CD20×CD55双抗,利用聚乙烯亚胺(PEI) (Polysciences,美国) 以及150mM的NaCl将序列号47、48的质粒分别转导至HEK293F细胞中(英杰公司(Invitrogen),美国),然后在Freestyle 293表达培养基中(英杰公司(Invitrogen),美国)以37℃的温度、8%的CO₂以及55%的湿度的条件下培养7天。尽管报道过与SBU类似的形式的双抗(Moore, et al., A robust heterodimeric Fc platform engineered for efficient development of bispecific antibodies of multiple formats. Methods, 154:38-50),但上述文献中公开的双抗的表达需要3种DNA。不同于需要3种DNA的现有的双抗制备方法,本发明的SBU使用由Gly以及Ser组成的接头,以防止轻链之间错误的结合,从而可以用2种DNA进行双抗的表达。将表达细胞培养液以4000rpm的转速离心10分钟,然后取出上清液并用0.22μm的过滤器过滤。将过滤的上清液在4℃的温度下诱导与1ml的KappaSelect树脂(GE医疗公司(GE Healthcare),美国)结合。用10cv(柱体积(column volume))的PBS溶液清洗结合的树脂,然后利用100mM的胺酸-盐酸(glycine-HCl, pH2.7)溶液洗脱结合的抗体,然后用1M的Tris-HCL (pH9.0)中和。将缓冲液更换为pH7.2-7.4的PBS,然后通过SDS-PAGE确认纯化的抗体的

轻链以及重量的大小以及纯度,结果可以确认与理论值一致的分子量以及高纯度(图9)。SBU形式的双抗为异源形式,其CD20结合位点为Fab、CD55结合位点为scFv。当利用Fab的C kappa位点并通过蛋白L (protein L) 进行纯化时,可以抑制已知在双抗纯化过程中最容易产生的旋钮-旋钮 (knob-knob) 同二聚体或旋钮 (knob) 单体 (Giese, et al., Biotechnol Prog, 34 (2) 397-404) 的生成,并仅得到所需形式的异二聚体。

[0209] 实验例11-3. 通过ELISA确认双抗的结合力

[0210] 通过间接ELISA确认上述实验例11-2中制备的CD20×CD55双抗对分别靶向的抗原CD20以及CD55的亲合度。通过上述实施例3的方法进行间接ELISA,对CD20以及CD55均表现出优异的结合力(图10a以及图10b)。尤其,SBU形式的CD20×CD55双抗对CD20表现出更高于由Macor记述的现有文献中公开的CD20×CD55双抗的亲合度,对CD55表现出与由Macor记述的现有文献中公开的CD20×CD55双抗相似的亲合度。对CD20的亲合度更高的SBU形式的CD20×CD55双抗可以更有效地用作CD20过表达的血液癌治疗剂的CD20×CD55双抗。

[0211] 实验例11-4. 确认CD20×CD55双抗在BJAB中的细胞凋亡能力

[0212] 通过上述实验例10-1的方法确认CD20×CD55双抗的细胞凋亡能力。为了确认联合给药效果,在分别100μl的补充有20%的人血清补体 (complement sera human) (西格玛 (Sigma), 美国) 的RPMI培养基中,以20μg/ml的浓度稀释利妥昔单抗、以20μg/ml的浓度分别稀释EP-10H以及利妥昔单抗、以及以20μg/ml的浓度分别稀释CD20×CD55双抗中的由Macor记述的现有文献中公开的形式或SBU形式,然后用上述分别100μl的RPMI培养基处理每样品 5×10^5 个的BJAB细胞。除此以外,通过与实验例10-1相同的方法进行。

[0213] 结果,在对利妥昔单抗的反应性低的BJAB细胞中,与仅用人血清补体 (complement sera human) 处理的对照组 (control) 相比,CD20×CD55双抗在对利妥昔单抗的反应性低的BJAB细胞中表现出细胞凋亡能力的显著差异,尤其,与利妥昔单抗相比SBU表现出细胞凋亡能力的显著差异(图11a以及图11b)。这种结果意味着,与联合给药靶向不同抗原的两种抗体相比,可以同时靶向两种抗原的一种双抗更有效地在癌细胞中诱导CDC,与作为代表性CD20×CD55双抗的Macor双抗相比,本发明的SBU也更适合在癌细胞中诱导CDC。并且,已知伯基特淋巴瘤为B细胞淋巴瘤中的恶性肿瘤,SBU形式的CD20×CD55双抗可以成为对伯基特淋巴瘤有效的治疗剂。

[0214] 实验例11-5. 确认CD20×CD55双抗在Ramos中的细胞凋亡能力

[0215] 通过上述实验例11-4的方法确认CD20×CD55双抗在Ramos细胞系中的细胞凋亡能力(图12a以及图12b)。结果,在利妥昔单抗反应性Ramos细胞中,与利妥昔单抗相比,CD20×CD55双抗表现出细胞凋亡能力的显著差异。并且,本发明的SBU表现出优于Macor的双抗的细胞凋亡能力。这种结果意味着,与利妥昔单抗相比,CD20×CD55双抗可以在利妥昔单抗反应性癌细胞中表现出更有效的抗癌效果,并且SBU可以用作CD20×CD55双抗中对表达CD20的血液癌有效的治疗剂。

[0216] 实验例11-6. 确认CD20×CD55双抗在Ramos-RR中的细胞凋亡能力

[0217] 通过上述实验例11-4的方法确认CD20×CD55双抗在Ramos-RR细胞系中的细胞凋亡能力(图13a以及图13b)。结果,在对利妥昔单抗不表现出反应性的Ramos-RR细胞中,与利妥昔单抗相比,CD20×CD55双抗表现出细胞凋亡能力的显著差异。与BJAB细胞系中的结果一致,在双抗中,本发明的SBU表现出更优于Macor的双抗的细胞凋亡能力。这种结果意味

着, SBU形式的CD20×CD55双抗可以用作对表达CD20的血液癌中对利妥昔单抗表现出耐药性的癌症有效的治疗剂。

[0218] 实验例11-7. 分析SBU形式的CD20×CD55双抗激活CDC

[0219] 在上述实验例11-5中, 在对Ramos-RR细胞沉淀物进行流式细胞分析之前, 取出用利妥昔单抗以及SBU形式的CD20×CD55双抗处理的上清液进行CDC活化分析(图14)。CDC机制是由C1q与抗体的结合介导所产生的反应, 从而可以根据其副产物C4d的产量在整个CDC过程的中间阶段进行活化分析。当通过可以确认每种上清液中的C4d产量的ELISA试剂盒(ELISA kit)(快臻公司(Quidel), 美国)进行分析时, 用SBU形式的CD20×CD55双抗处理的上清液中的C4d产量大于用利妥昔单抗处理的上清液, 并且其差异显著。这种结果明确表明SBU形式的CD20×CD55双抗优异的细胞凋亡能力归因于CDC激活机制。

[0220] 以上, 详细说明本发明的特定部分, 但对本领域的普通技术人员显而易见的是, 这种具体说明只是优选实例, 本发明的范围不限于此。因此, 本发明的实质性范围应由所附的权利要求以及其等同物来定义。

<110> SG医疗株式会社
 <120> 针对 CD55 的新型抗体及其用途
 <130> HPC-10439
 <150> KR 10-2021-0004196
 <151> 2021-01-12
 <160> 48
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> HCDR2
 <400> 1
 Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> LCDR1
 <400> 2
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Gly
 1 5
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> LCDR3
 <400> 3
 Gly Gly Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Ala Ile
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 104
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G4-1H_VL

<400> 4

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1				5				10					15		
Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Tyr	Gly	Trp	Tyr
			20				25						30		
Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Thr	Val	Ile	Tyr	Trp	Asn	Asp
		35				40					45				
Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly
	50					55				60					
Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Met	Asp	Glu	Ala
65				70					75					80	
Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Gly	Trp	Asp	Ser	Ser	Thr	Tyr	Ala	Ile	Phe	Gly
			85					90					95		
Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu								
			100												

<210> 5

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G4-1H_VH

<400> 5

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1			5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Arg
		20					25					30			
Gly	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40					45				
Ser	Gly	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Pro	Ala	Val
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65			70					75					80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90				95			
Ala	Lys	Asn	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Trp	His	Ala	Ala	Tyr	Ile	Asp	Ala
			100					105				110			

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
115	120
<210> 6	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> G4-1H VH F primer	
<400> 6	
cttcctgtca gtaactacag gtgtccactc ccaggtgcaa ctgcagcagt c	51
<210> 7	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> G4-1H VH R primer	
<400> 7	
ccagcgtgac cgtatccagc gcctccacca agggcccca	39
<210> 8	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> G4-1H CH F primer	
<400> 8	
gcctccacca agggccc	17
<210> 9	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> G4-1H CH R primer	
<400> 9	
tcccccgga agtgagcggc cgctcac	27
<210> 10	
<211> 63	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	

<223>	G4-1H HC F primer	
<400>	10	
	cagaattcac tctaaccatg gaatggagct gggctcttct cttcttcctg tcagtaacta	60
	cag	63
<210>	11	
<211>	59	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	G4-1H VL F primer	
<400>	11	
	ggctctttgta tacatgttgc tgtggttgtc tggtgttgaa ggaagctacg agctgacac	59
<210>	12	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	G4-1H VL R primer	
<400>	12	
	caagctcacc gtcttgcgga ccgtggcc	28
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	G4-1H CK F primer	
<400>	13	
	cggaccgtgg ccgccccctc	20
<210>	14	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	G4-1H CK R primer	
<400>	14	
	cggggcgagt gctagttcta gaacta	26
<210>	15	
<211>	100	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	G4-1H LC F primer	
<400>	15	
	gggaattcta gaggatcgaa ccctttgcaa gcttcggcac gagcagacca gcatgggcat	60
	caagatggag acacattctc aggtctttgt atacatgttg	100
<210>	16	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	scFv primer 1	
<400>	16	
	acactttatg cttccggc	18
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	scFv primer 2	
<400>	17	
	caaaatcacc ggaaccagag	20
<210>	18	
<211>	104	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	EP-1E_VL	
<400>	18	
	Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln	
	1 5 10 15	
	Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Trp Phe	
	20 25 30	
	Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Thr Val Ile Tyr Trp Asn Asn	
	35 40 45	
	Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly	
	50 55 60	
	Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala	
	65 70 75 80	

Asp Tyr Tyr Cys Gly Gly Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Ala Ile Phe Gly
85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100

<210> 19

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EP-1E_VH

<400> 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asn Ala Val Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EP-1F_VH

<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg
20 25 30

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

	35		40		45												
	Ser	Gly	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Pro	Ala	Val	
	50						55					60					
	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65						70					75				80		
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90				95			
	Ala	Lys	Asn	Ala	Val	Ala	Gly	Gly	Trp	His	Ala	Ala	Tyr	Ile	Asp	Ala	
			100					105					110				
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
	115						120										
<210>	21																
<211>	123																
<212>	PRT																
<213>	Artificial Sequence																
<220>																	
<223>	EP-9B_VH																
<400>	21																
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15			
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Arg	
			20					25					30				
	Gly	Met	Val	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
	35					40					45						
	Ser	Gly	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Pro	Ala	Val	
	50						55					60					
	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65						70					75				80		
	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90				95			
	Ala	Lys	Asn	Ala	Val	Ala	Gly	Gly	Trp	His	Ala	Ala	Tyr	Ile	Asp	Ala	
			100					105					110				
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
	115						120										
<210>	22																
<211>	123																
<212>	PRT																
<213>	Artificial Sequence																
<220>																	

<223> 3R-2-1H_VH
 <400> 22
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Arg Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Thr Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asn Ala Val Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH F primer
 <400> 23

cttcctgtca gtaactacag gtgtccactc cgaggtccag ctggtc

46

<210> 24
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH R primer
 <400> 24

gtgaccgtgt ccagcgctc caccaaggg

29

<210> 25
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> 10H(A)_VH

<400> 25

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg

20 25 30

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asn Ala Ala Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 26

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 10H(I)_VH

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg

20 25 30

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asn Ala Ile Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 27
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 10H(L)_VH
 <400> 27
 Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asn Ala Leu Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 28
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 10H(F)_VH
 <400> 28
 Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val

50	55	60
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
85	90	95
Ala Lys Asn Ala Phe Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala		
100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210>	29	
<211>	123	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	10H(M)_VH	
<400>	29	
Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg		15
20	25	30
Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
85	90	95
Ala Lys Asn Ala Met Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala		
100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210>	30	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	HC1 R primer	
<400>	30	

gtactactgc gccaag	16
<210> 31	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> HC2 F1 primer	
<400> 31	
gtactactgc gccaagaacg ccgcggccgg ggggtggcac gc	42
<210> 32	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> HC2 F2 primer	
<400> 32	
gtactactgc gccaagaacg ccattgccgg ggggtggcac gc	42
<210> 33	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> HC2 F3 primer	
<400> 33	
gtactactgc gccaagaacg ccctggccgg ggggtggcac gc	42
<210> 34	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> HC2 F4 primer	
<400> 34	
gtactactgc gccaagaacg ccatggccgg ggggtggcac gc	42
<210> 35	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> HC2 F5 primer	

<400>	35	
gtactactgc gccagaacg cctttgccgg ggggtggcac gc		42
<210>	36	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CD55-scFv-knob_VL F primer	
<400>	36	
cagcgcgcac tccagctacg agctgacaca gcc		33
<210>	37	
<211>	61	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CD55-scFv-knob_VL R primer	
<400>	37	
gaccaagctc accgtcttgg gcggaggcgg gagggtggt ggcggtagcg gtggaggagg		60
c		61
<210>	38	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CD55-scFv-knob_VH F primer	
<400>	38	
gtggaggagg cagtggatct ggcggctctg aggtccagct ggtcg		45
<210>	39	
<211>	47	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CD55-scFv-knob_VH R primer	
<400>	39	
ggcacaaccg tgaccgtgtc cagcggcggc tcagacaaaa ctcacac		47
<210>	40	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220>		
<223>	CD55-scFv-knob_CH F primer	
<400>	40	
	cgtgtccagc ggcggctcag acaaaactca cacatgc	37
<210>	41	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CD55-scFv-knob_CH R primer	
<400>	41	
	ctctccctgt ccccgggtaa atgactagaa cta	33
<210>	42	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CD20-Fab-hole VL-CK F primer	
<400>	42	
	cgcagcgagc gcgcactccc agattgtcct gtctcagtct cctgc	45
<210>	43	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CD20-Fab-hole VL-CK R primer	
<400>	43	
	cggccgccgt gcgagatctt ttgatttcca gtttagttcc gccg	44
<210>	44	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CD20-Fab-hole VH F primer	
<400>	44	
	caagtccaac tgcaacaacc ggg	23
<210>	45	
<211>	50	
<212>	DNA	

40

145	150	155	160
Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser			
	165	170	175
Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val Lys Gly Arg Ala			
	180	185	190
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn			
	195	200	205
Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Ala			
	210	215	220
Val Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala Trp Gly Gln Gly			
225	230	235	240
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys			
	245	250	255
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu			
	260	265	270
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
	275	280	285
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys			
	290	295	300
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
305	310	315	320
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
	325	330	335
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
	340	345	350
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
	355	360	365
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
	370	375	380
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys			
385	390	395	400
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
	405	410	415
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
	420	425	430
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
	435	440	445
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
450	455	460	

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475
 <210> 48
 <211> 706
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD20-Fab-hole
 <400> 48
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Arg Thr Ala Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ser Gln			
	245	250	255
Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser			
	260	265	270
Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn			
	275	280	285
Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly			
	290	295	300
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys			
305	310	315	320
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met			
	325	330	335
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
	340	345	350
Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala			
	355	360	365
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Phe Lys Gly Pro Ser Val			
	370	375	380
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
385	390	395	400
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
	405	410	415
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	420	425	430
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
	435	440	445
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
	450	455	460
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
465	470	475	480
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
	485	490	495
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	500	505	510
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	515	520	525
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	530	535	540
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			

545	550	555	560
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
	565	570	575
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	580	585	590
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
	595	600	605
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
610	615	620	
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
625	630	635	640
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
	645	650	655
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	660	665	670
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	675	680	685
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
690	695	700	
Gly Lys			
705			

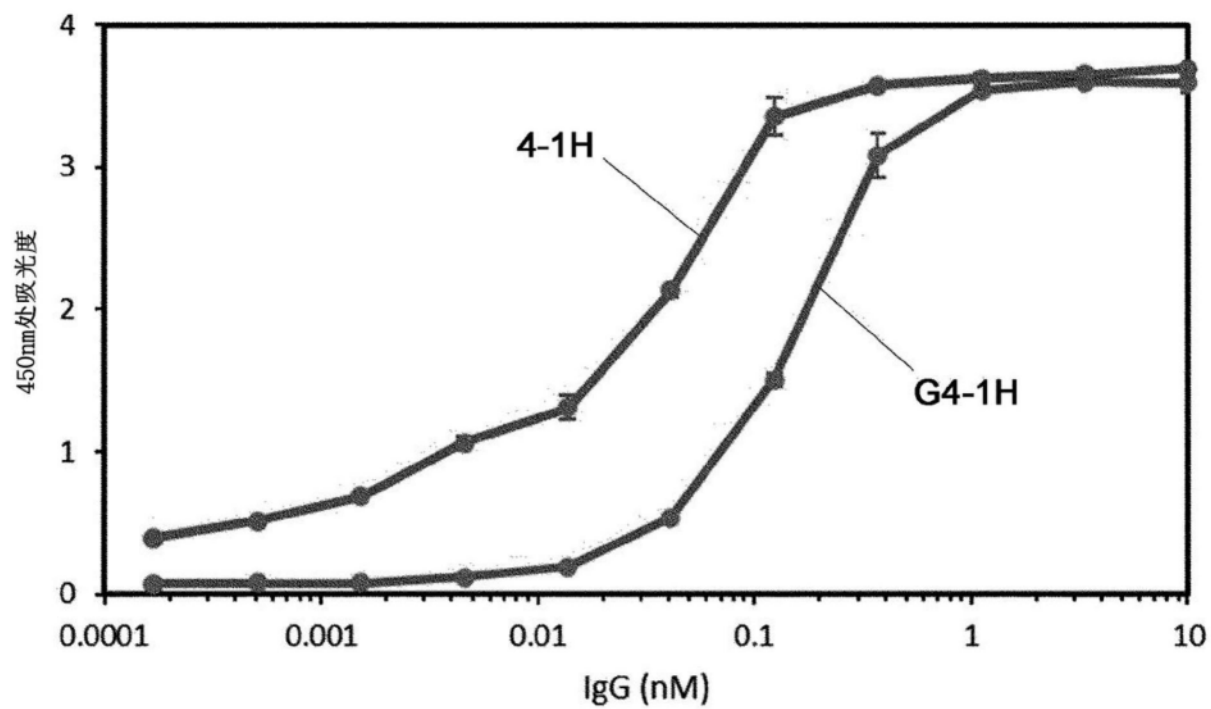


图1

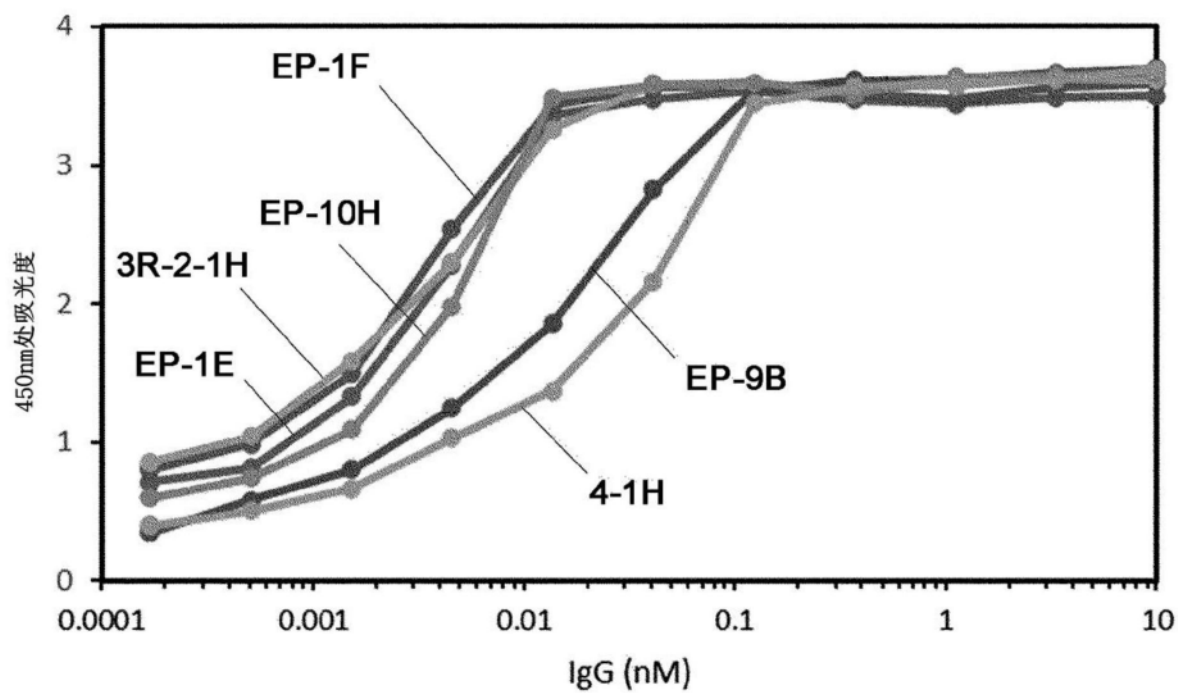


图2

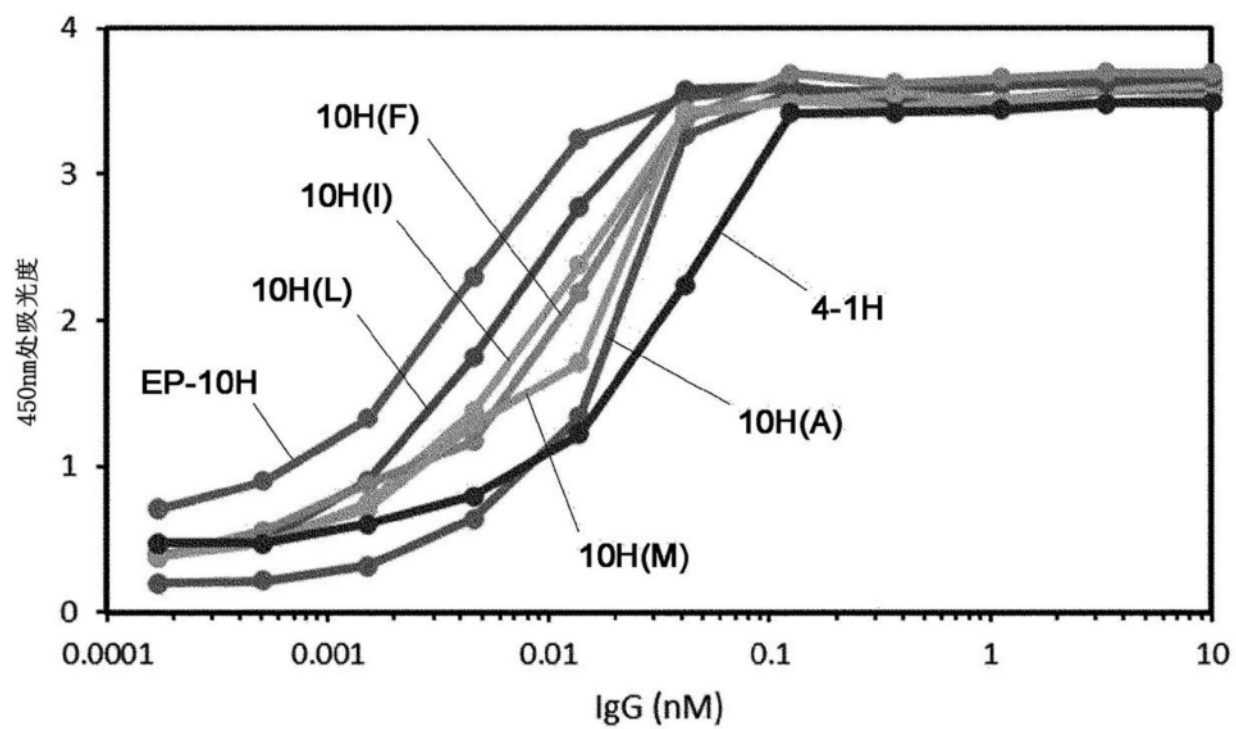


图3

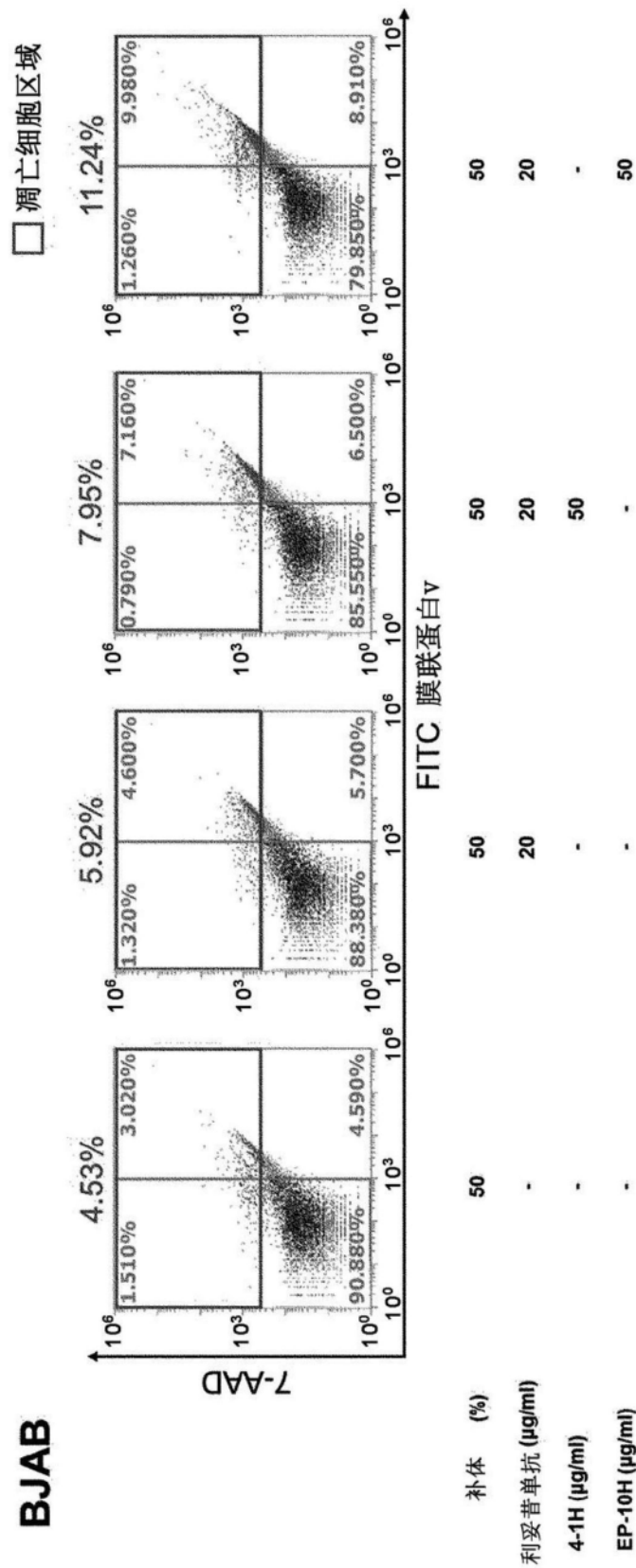


图4

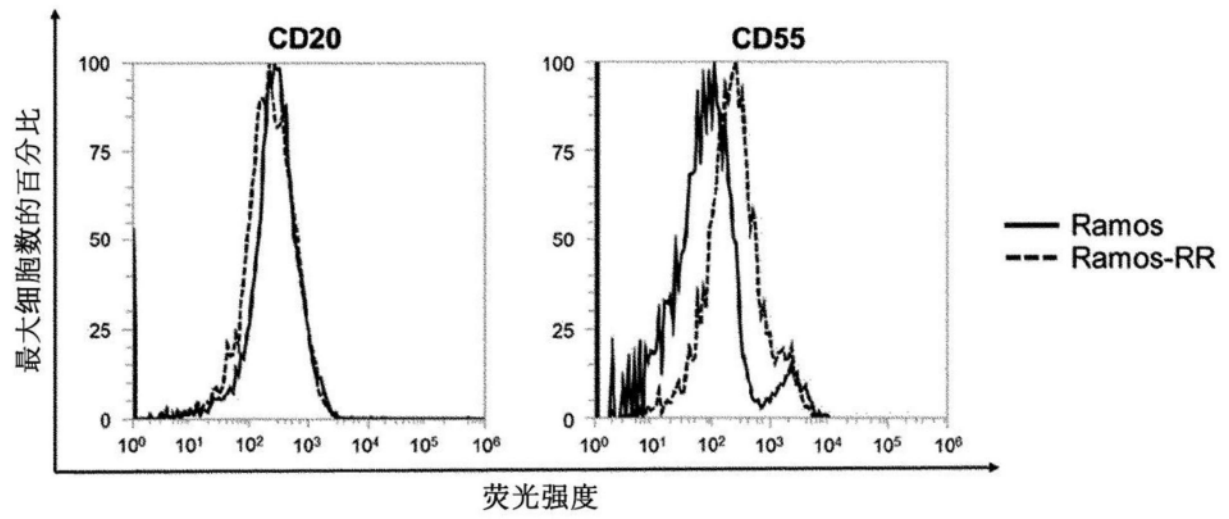


图5a

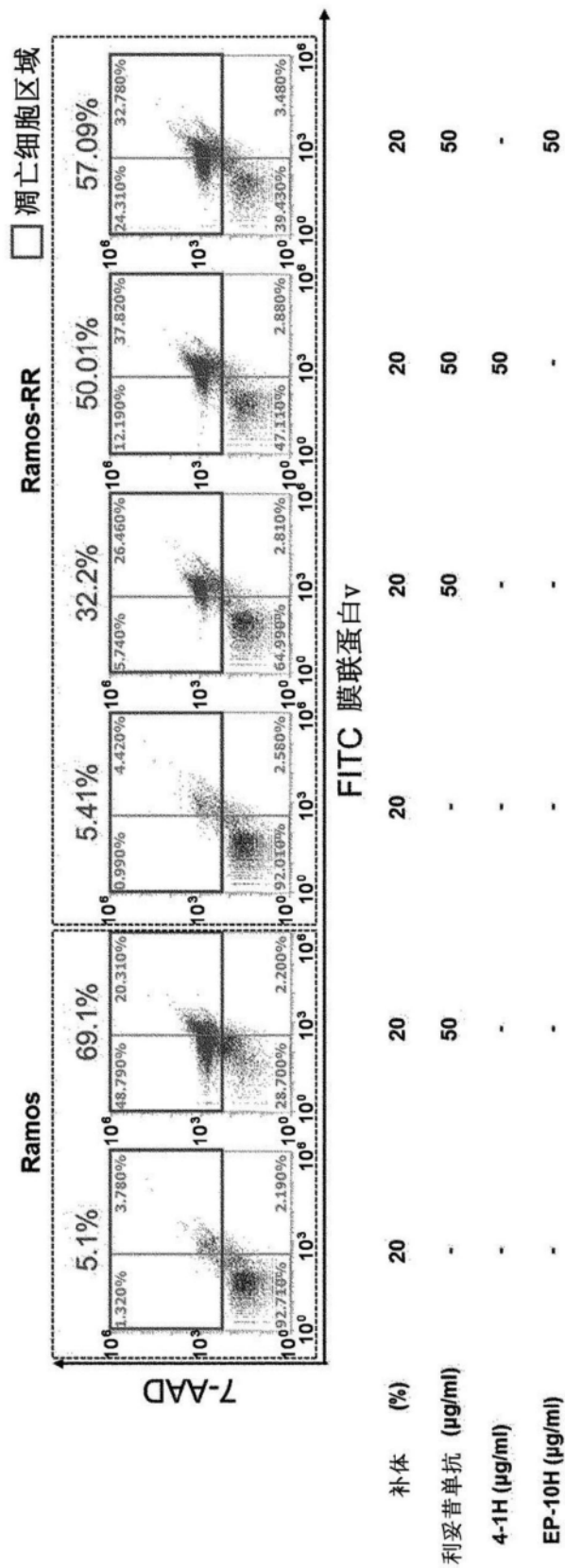


图5b

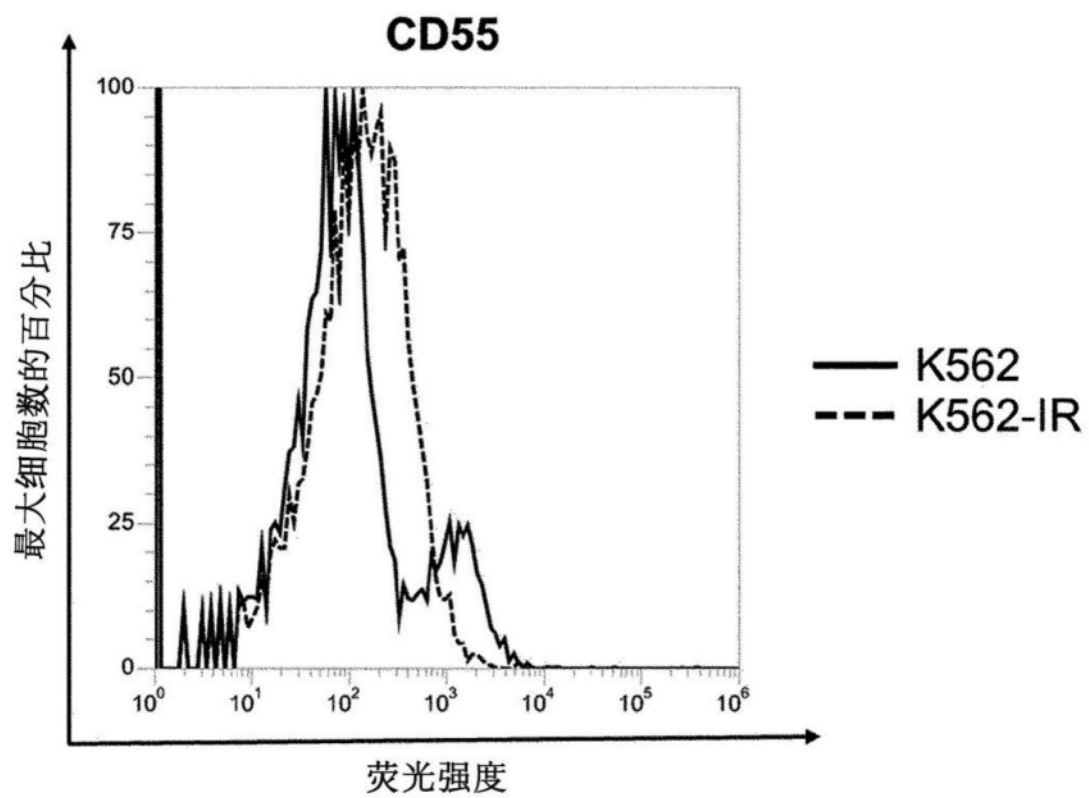


图6a

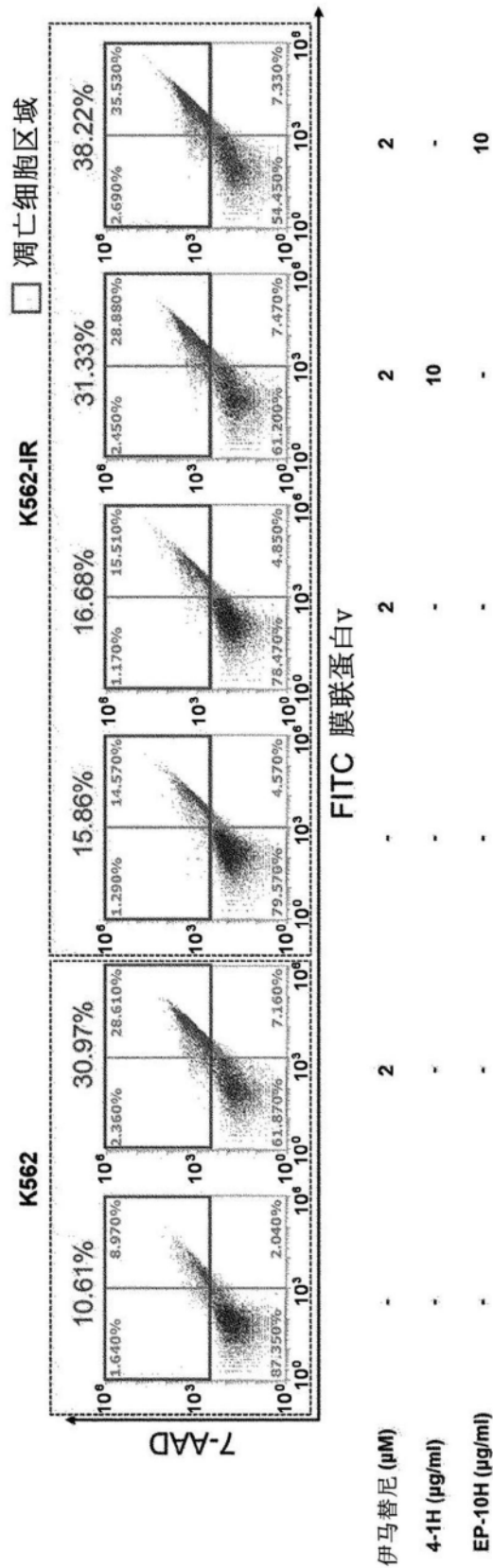


图6b

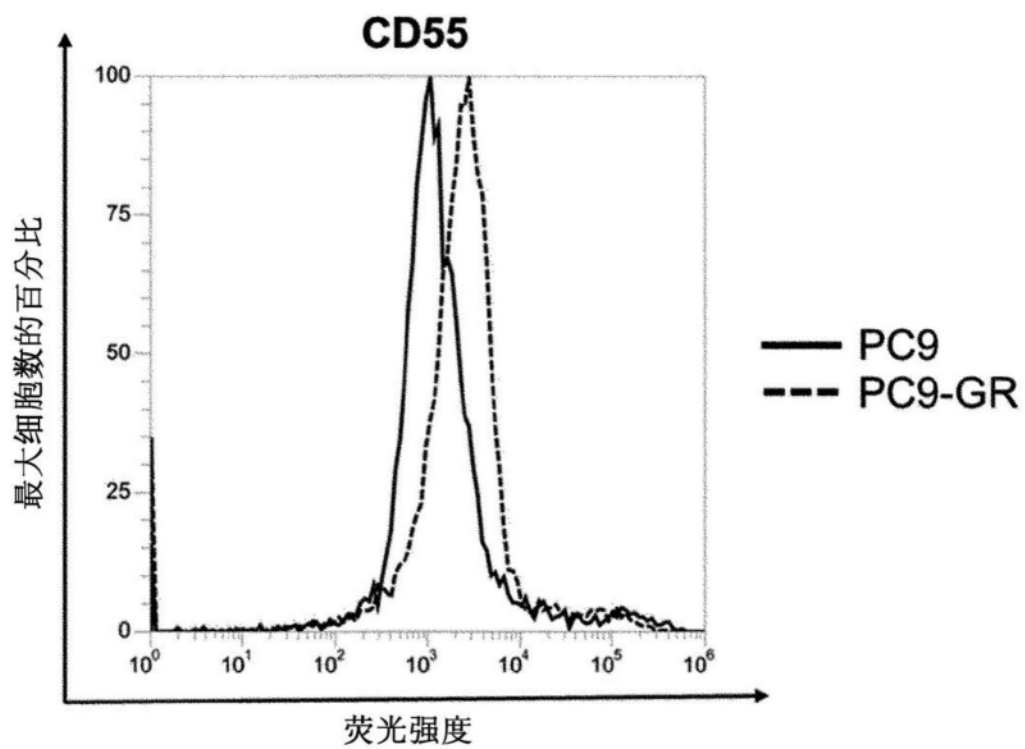


图7a

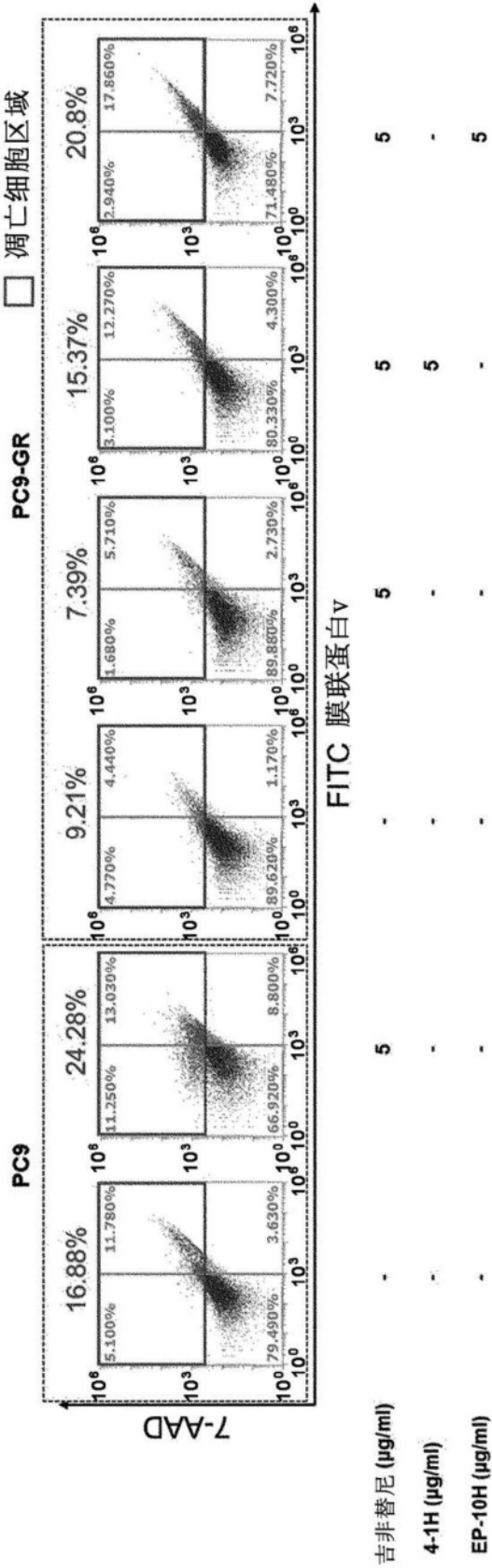


图7b

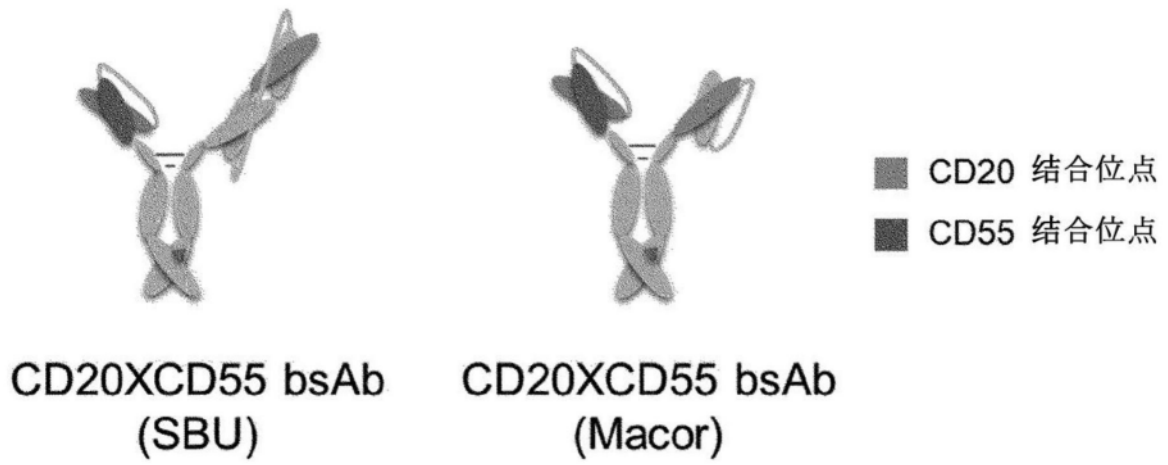


图8

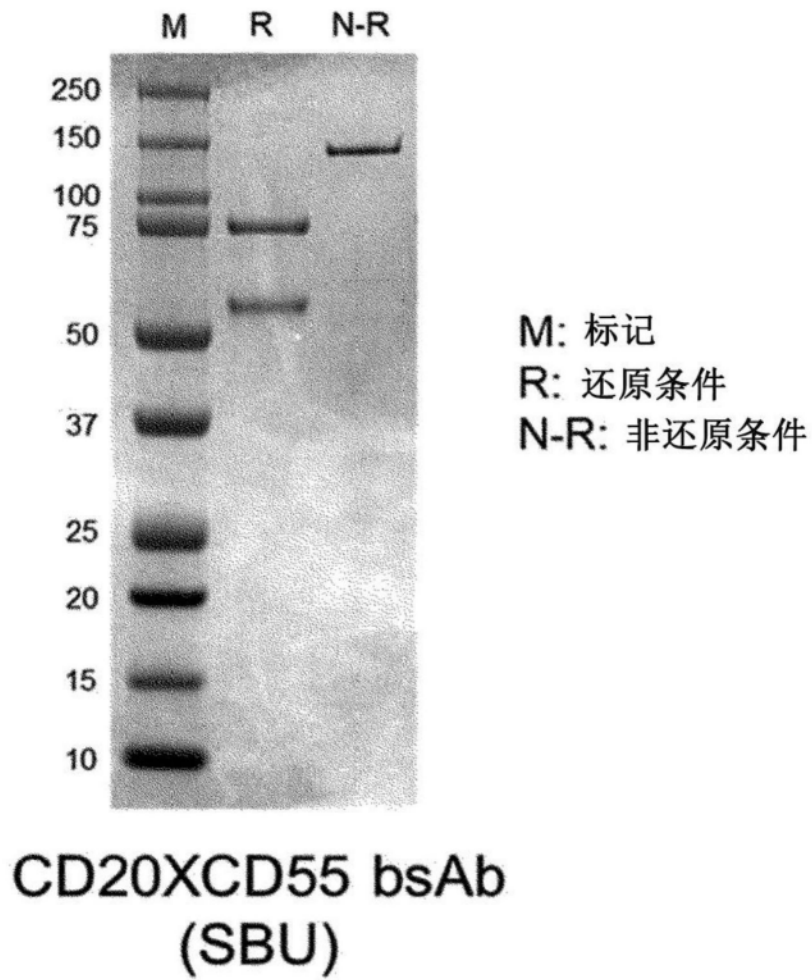


图9

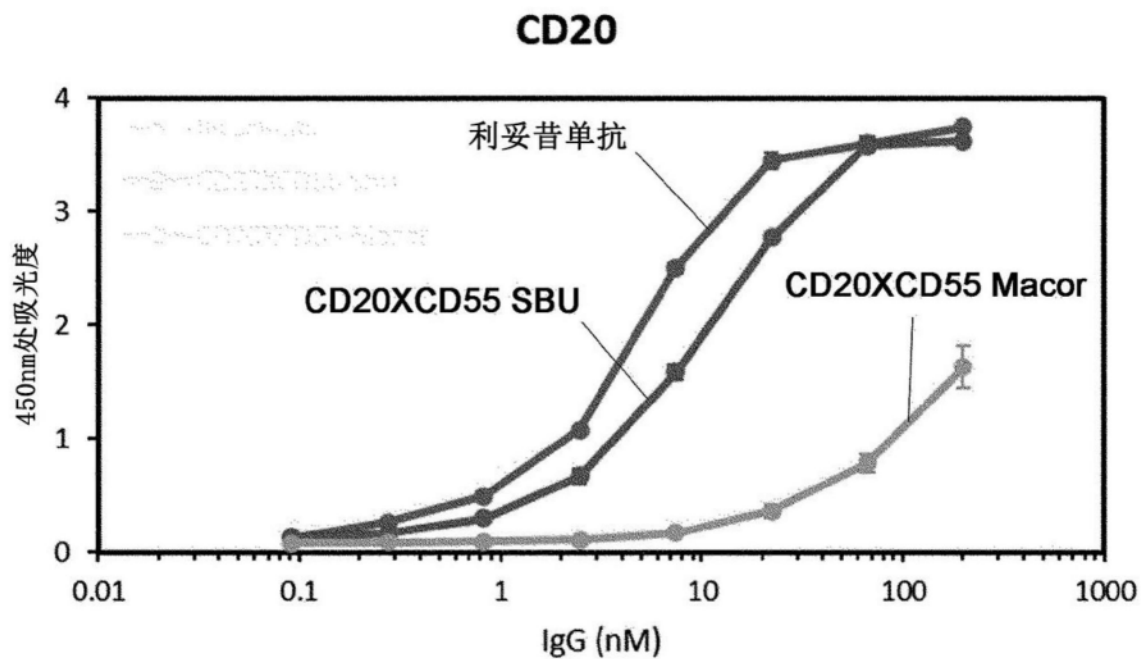


图10a

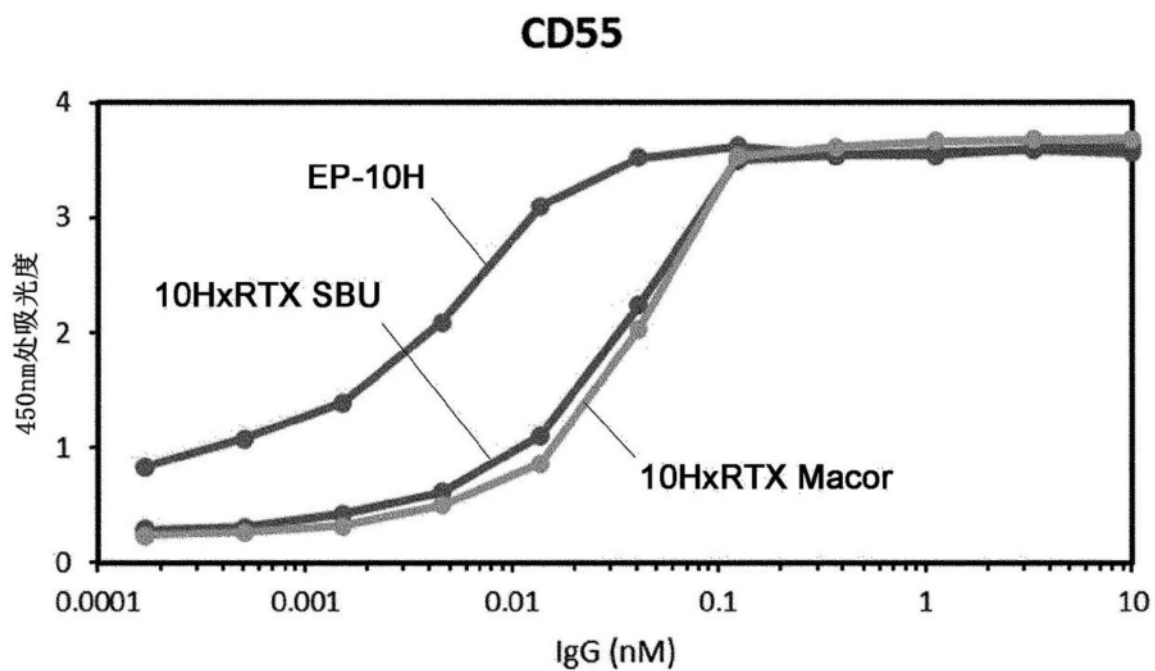


图10b

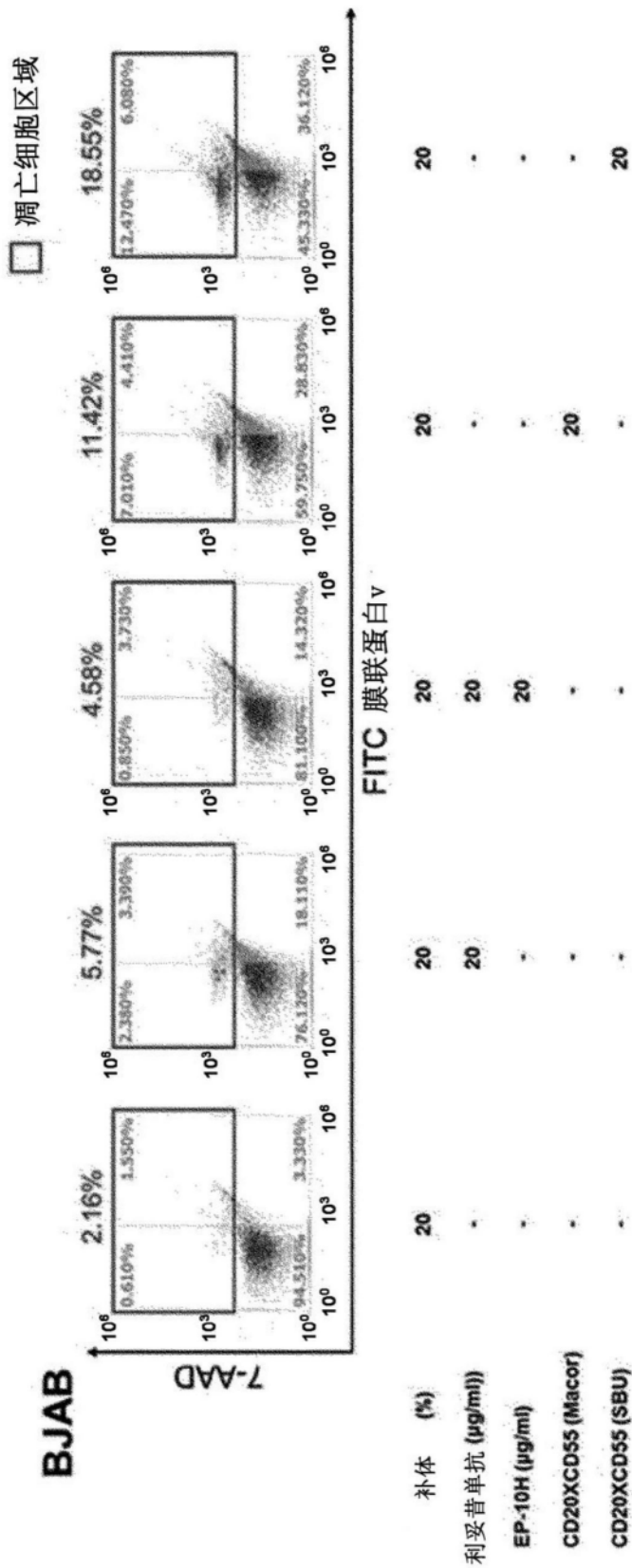


图11a

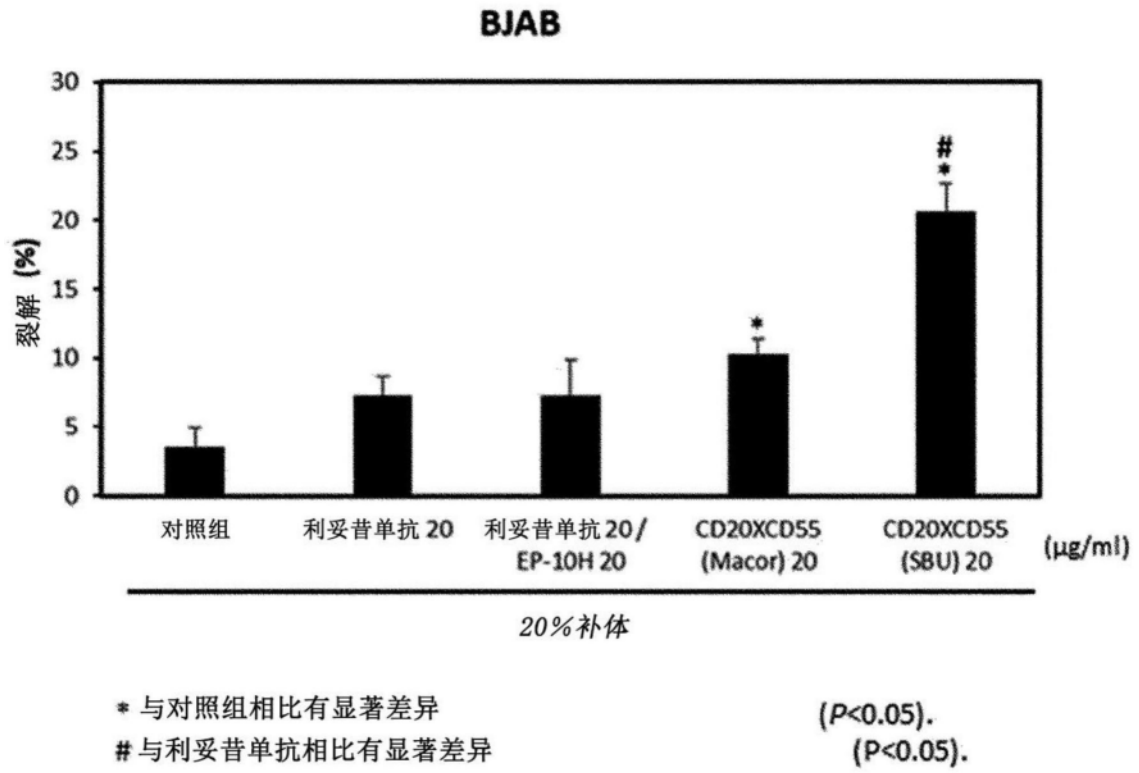


图11b

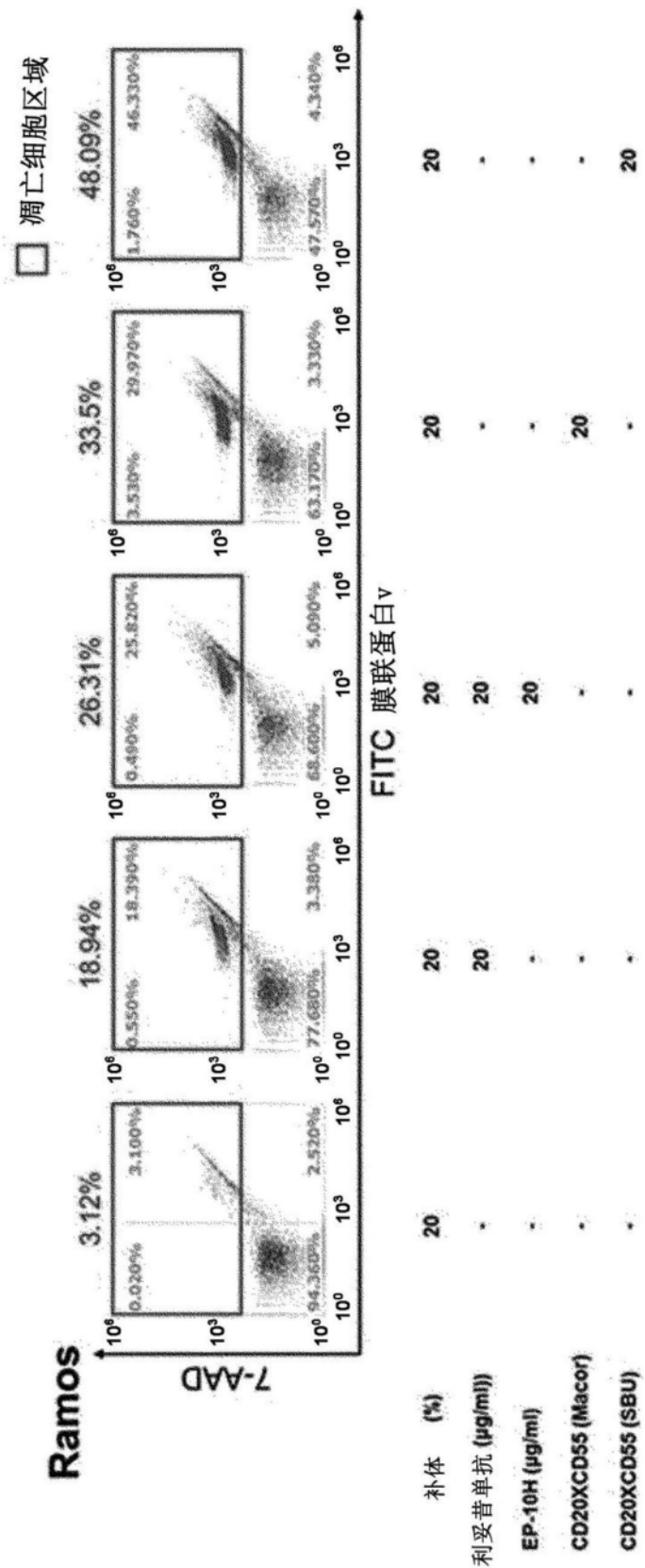


图12a

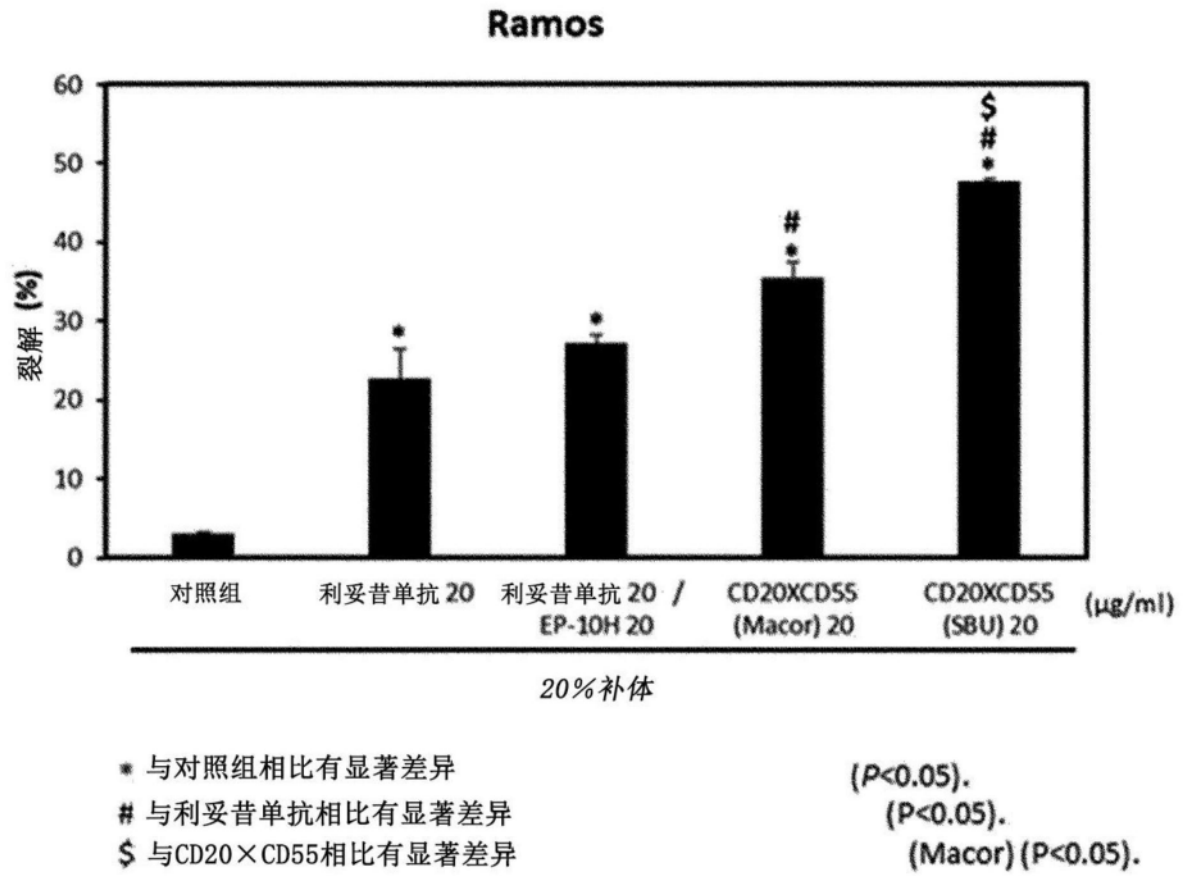


图12b

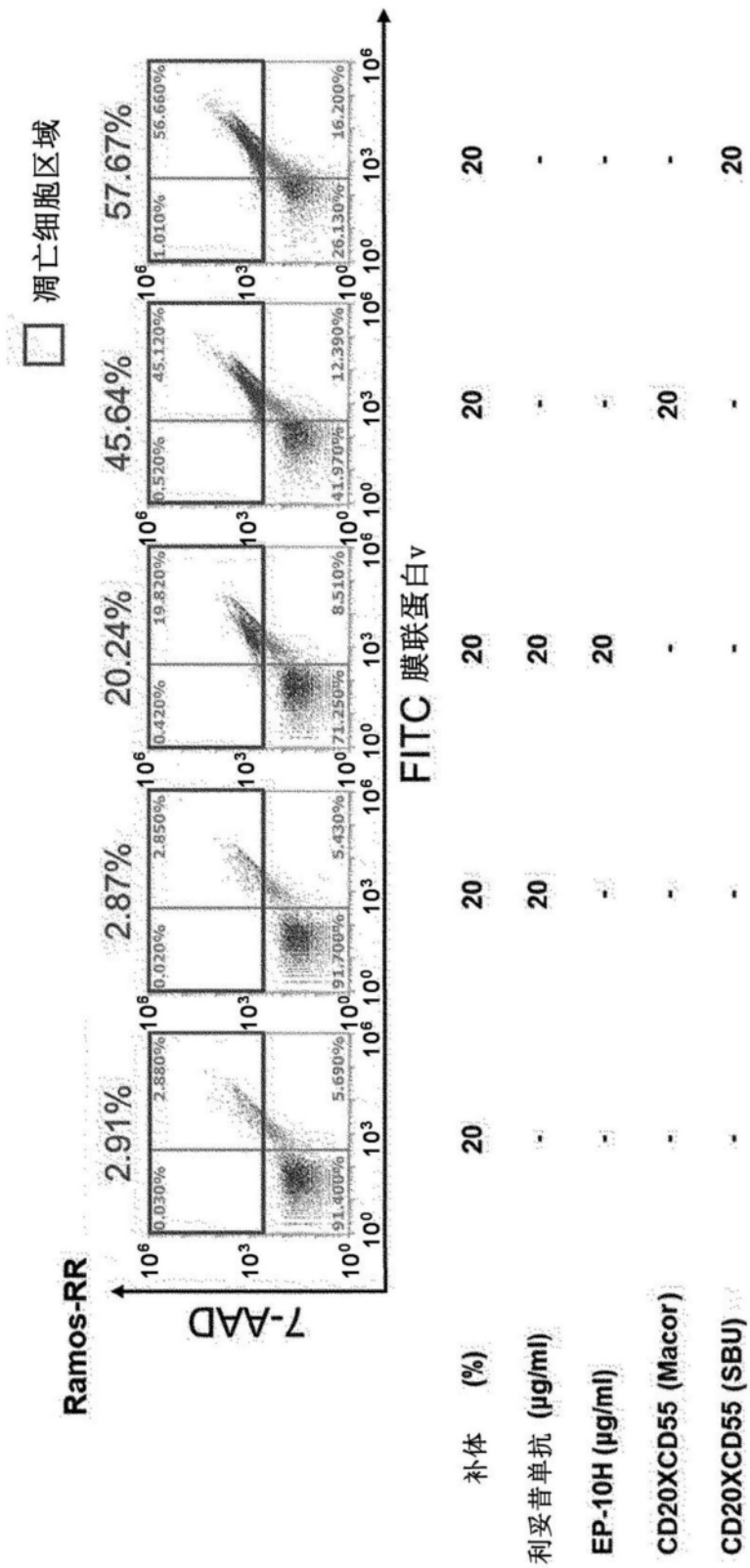


图13a

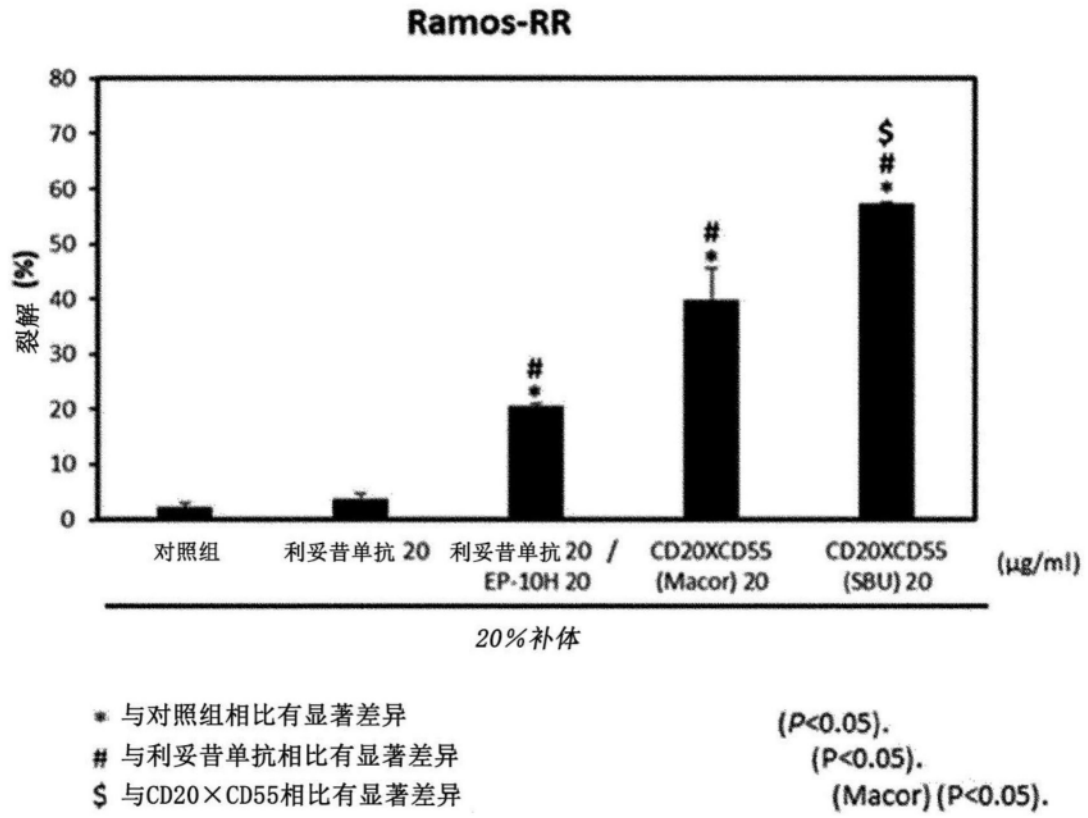


图13b

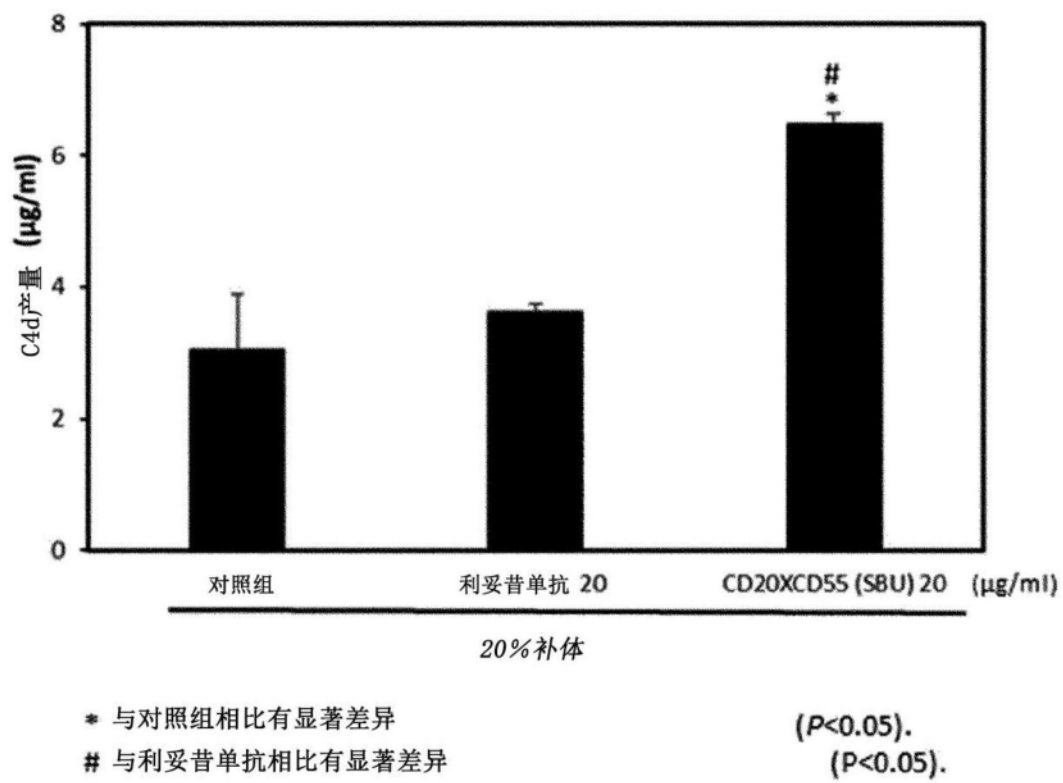


图14