



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109641037 B

(45) 授权公告日 2022.09.06

(21) 申请号 201780036241.3

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2017.04.12

A61K 39/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C07K 16/00 (2006.01)

申请公布号 CN 109641037 A

C07K 16/28 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.04.16

C07K 16/30 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/321,975 2016.04.13 US

(56) 对比文件

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

WO 2011121110 A1, 2011.10.06

2018.12.11

KR 20020047099 A, 2002.06.21

(86) PCT国际申请的申请数据

US 2005186214 A1, 2005.08.25

PCT/US2017/027154 2017.04.12

US 2010196265 A1, 2010.08.05

(87) PCT国际申请的公布数据

US 2013089516 A1, 2013.04.11

W02017/180713 EN 2017.10.19

US 2014030269 A1, 2014.01.30

(73) 专利权人 西安奥瑞单抗生物技术有限公司

US 2015322137 A1, 2015.11.12

地址 710075 陕西省西安市高新区丈八街

Karsten Winkler 等. Changing the

办科技二路65号7幢11301室

Antigen Binding Specificity by Single

(72) 发明人 赵爱志 W·温 韩月恒

Point Mutations of an Anti-p24 (HIV-1)

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

Antibody.《J Immunol》.2000, 第165卷第4505-

11105

4514页. (续)

专利代理人 张文辉

权利要求书2页 说明书100页

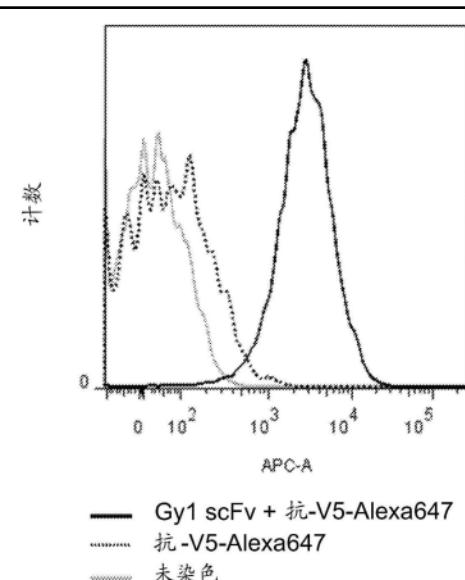
序列表56页 附图46页

(54) 发明名称

抗PSMA抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及与特异性结合PSMA的抗体或抗体片段相关的组合物和方法。



[接上页]

(56) 对比文件

Jennifer A. Maynard 等. Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity.《nature biotechnology》.2002, 第20卷第597-601页.

Vilia Tourkova 等.983. Human Derived Dual Reporter/Suicide Gene System for Simultaneous Pet Imaging of Independent Molecular-Biological Processes In Vivo.《Molecular Therapy》.2004, 第9卷(第S1期), 第S376-S377页.

苏燕胜 等.人源性抗前列腺特异性膜抗原单链抗体的基因构建、表达及鉴定.《中华男科学杂志》.2014, 第20卷(第12期), 第1063-1067页.

Rodrigo Barderas 等.Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling.《PNAS》.2008, 第105卷(第26期), 第9029-9034页.

Yansheng Su 等.PSMA specific single chain antibody-mediated targeted knockdown of Notch1 inhibits human prostate cancer cell proliferation and tumor growth.《Cancer Letters》.2013, 第338卷第282-291页.

1. 特异地结合到前列腺特异性膜抗原(PSMA)的抗体或其抗原结合抗体片段,所述抗体或抗原结合抗体片段包含:

轻链区域,其包含三个轻链互补决定区(LCDR):LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中所述LCDR1的序列是SEQ ID NO:9,所述LCDR2的序列是SEQ ID NO:13或41,且所述LCDR3的序列是SEQ ID NO:17;和

重链区域,其包含三个重链互补决定区(HCDR):HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中所述HCDR1的序列是SEQ ID NO:25或45,所述HCDR2的序列是SEQ ID NO:29,且所述HCDR3的序列是SEQ ID NO:33或49。

2. 权利要求1的抗体或抗体片段,其中所述轻链区域包含SEQ ID NO:5、7、11、15、19、39、43、61、63、65、67和69中的一个或多个。

3. 权利要求1的抗体或片段,其中所述重链区域包含21、23、27、31、35、47、51、53、55、57、59和68中的一个或多个。

4. 权利要求1的抗体或片段,其中所述抗体或片段包含SEQ ID NO:3和37中的一个或多个。

5. 权利要求1的抗体或片段,其中所述抗体或其片段的亚型为:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、或IgE;或者所述抗体或其片段具有IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgA或IgE的免疫球蛋白恒定域。

6. 权利要求1的抗体或片段,其中所述抗体或抗体片段是人源化抗体。

7. 权利要求1的抗体或片段,其中所述抗体或抗体片段是人抗体或嵌合抗体。

8. 权利要求1的抗体或片段,其中所述抗体或片段与细胞毒剂偶联。

9. 权利要求1的抗体或片段,其中所述抗体或片段与药物偶联。

10. 权利要求1的抗体或片段,其中所述抗体或片段与生长抑制剂偶联。

11. 权利要求1的抗体或片段,其中所述抗体或片段与毒素偶联。

12. 权利要求1的抗体或片段,其中所述抗体或片段与放射性同位素偶联。

13. 权利要求1的抗体或片段,其中所述抗体或片段与纳米颗粒偶联。

14. 多特异性抗体,其结合相同或不同抗原上的两个或更多个不同表位,其中所述表位之一在人前列腺特异性膜抗原(PSMA)上,并且所述多特异性抗体包含权利要求1的抗体或片段的所述轻链区域和重链区域。

15. 分离的嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR包含权利要求1的抗体或片段、跨膜域和包含一个或多个刺激域的细胞内信号传导域。

16. 分离的核酸分子,其编码权利要求1-13中任一项的抗体或片段或权利要求14的多特异性抗体或权利要求15的CAR。

17. 载体,其包含权利要求16的核酸分子。

18. 培养的宿主细胞,其包含权利要求17的载体。

19. 组合物,其包含权利要求1-13中任一项的抗体或片段,权利要求15的CAR,权利要求16的核酸分子,权利要求17的载体或权利要求18的宿主细胞。

20. 权利要求19的组合物,其是还包含药学可接受载体的药物组合物。

21. 权利要求19的组合物在制造用于治疗患有与PSMA表达相关的疾病的受试者的药物的用途。

22. 权利要求1-13中任一项的抗体或片段在制造用于诊断哺乳动物中与PSMA表达相关的疾病存在的方法的试剂的用途,所述方法包括用所述抗体或片段对从所述哺乳动物分离的组织样品取样,由此所述抗体或片段对所述组织样品的特异性结合指示所述哺乳动物中与PSMA表达相关的疾病的存。

23. 权利要求1-13中任一项的抗体或片段在制造用于在受试者中成像与PSMA表达相关的疾病的试剂的用途。

24. 权利要求23的用途,其中所述抗体或抗体片段与试剂可操作连接,其中所述试剂是可光活化的试剂。

25. 权利要求23的用途,其中所述抗体或抗体片段与试剂可操作连接,其中所述试剂是荧光团或放射性同位素。

26. 权利要求23的用途,其中所述抗体或抗体片段与试剂可操作连接,其中所述试剂是生物发光蛋白或生物发光肽。

27. 权利要求23的用途,其中所述抗体或抗体片段与试剂可操作连接,其中所述试剂是荧光标签。

28. 权利要求23的用途,其中所述抗体或抗体片段与试剂可操作连接,其中所述试剂是荧光蛋白或荧光肽。

29. 权利要求23的用途,其中所述抗体或抗体片段与试剂可操作连接,其中所述试剂是成像造影剂。

30. 权利要求23的用途,其中所述抗体或抗体片段与试剂可操作连接,其中所述试剂是酶。

31. 权利要求23的用途,其中所述抗体或抗体片段与试剂可操作连接,其中所述试剂是用于核磁共振成像的自旋标记物。

32. 权利要求23的用途,其中所述抗体或抗体片段与试剂可操作连接,其中所述试剂是纳米颗粒。

## 抗PSMA抗体及其用途

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年4月13日提交的美国临时申请No.62/321975的优先权。本申请的内容通过引用完整并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 显示了14%的男性在其一生中诊断出患有前列腺癌；2012年已诊断出多达280万例前列腺癌，死亡率为每10万人21.4人。然而，目前的方法，例如手术、放射疗法、化学疗法和雄激素剥夺疗法，对那些晚期癌症具有有限的效果。迄今为止，根治性手术仍是前列腺癌的主要治疗方法。因此，新兴的精准医学，特别是基于肿瘤靶向抗体的精确医学，有望改善前列腺治疗的结果。

[0005] 前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 已被确认为前列腺上皮细胞的特异性标志物 (Horoszewicz, J.S. et al. (1987) *Anticancer Res*, 7 (5B) : 927-35; Israeli, R.S., et al. (1993) *Cancer Res*, 53 (2) : 227-30; Israeli, R.S., et al. (1994) *Cancer Res*, 54 (7) : 1807-11; Wright, G.L., Jr., et al. (1995) *Urol Oncol*, 1 (1) : 18-28; Troyer, J.K. et al. (1995) *Int J Cancer*, 62 (5) : 552-8; Sokoloff, R.L., et al. (2000) *Prostate*, 43 (2) : 150-7) , 为前列腺癌靶向精准医学的发展奠定了基础。组织学研究表明几乎所有前列腺癌都表达PSMA (Bostwick, D.G., et al. (1998) *Cancer*, 82 (11) : 2256-61; Kusumi, T., et al. (2008) *Pathol Int*, 58 (11) : 687-94; Mannweiler, S., et al. (2009) *Pathol Oncol Res*, 15 (2) : 167-72; Ananias, H.J., et al. (2009) *Prostate*, 69 (10) : 1101-8) , 并且具有较高恶性，或转移或对雄激素剥夺疗法具有抗性的癌症通常表达高得多的PSMA (Ananias, H.J., et al. (2009) *Prostate*, 69 (10) : 1101-8; Wright, G.L., Jr., et al. (1995) *Urol Oncol*, 1 (1) : 18-28; Wright, G.L., Jr., et al. (1996) *Urology*, 48 (2) : 326-34; Sweat, S.D., et al. (1998) *Urology*, 52 (4) : 637-40)。尽管PSMA被认为是前列腺特异性标志物，但后来的研究表明肠细胞、肾近端小管和唾液腺也表达低水平的PSMA (Troyer, J.K. et al. (1995) *Int J Cancer*, 62 (5) : 552-8)。值得注意的是，正常组织中的PSMA表达水平比肿瘤低100-1000倍 (Sokoloff, R.L., et al. (2000) *Prostate*, 43 (2) : 150-7) , 并且这些正常组织通常不容易接近循环抗体 (Troyer, J.K. et al. (1995) *Int J Cancer*, 62 (5) : 552-8) , 其进一步确保PSMA靶向成像和疗法的安全性。

[0006] PSMA是谷氨酸羧肽酶 (Pinto, J.T., et al. (1996) *Clin Cancer Res*, 2 (9) : 1445-51) , 并且其在前列腺癌中的功能尚不清楚。然而，揭示高PSMA表达与癌症的高浸润有关。因此，PSMA靶向成像和治疗将显著改善前列腺癌的诊断和治疗结果。除前列腺外，PSMA在许多实体瘤中也在新血管系统中高度表达，而在正常血管中不存在 (Sokoloff, R.L., et al. (2000) *Prostate*, 43 (2) : 150-7)。因此，PSMA不仅是前列腺癌的理想标志物，也是其他实体瘤的新血管系统靶向治疗的理想标志物。

[0007] 抗体是肿瘤靶向的最有效工具，因为它们可以特异性识别肿瘤细胞上表达的肿瘤相关或肿瘤特异性抗原，这为基于抗体的精准医学开辟了道路，所述基于抗体的精准医学包括肿瘤靶向成像和治疗，如用于早期肿瘤检测的光学、PET、SPECT或MRI成像、抗体药物缀

合物和放射疗法、用于癌症治疗的嵌合抗原受体T细胞或NK细胞疗法。不幸的是,目前市场上还没有PSMA抗体。

[0008] 因此,本领域需要用于治疗癌症的靶向PSMA的组合物和方法。本发明满足了这种未满足的需求。

[0009] 附图简述

[0010] 当结合附图阅读时,将更好地理解本发明的优选实施方案的以下详细描述。出于示例本发明的目的,在附图中显示了目前优选的实施方案。然而,应当理解,本发明不限于附图中所示实施方案的精确布置和手段。

[0011] 图1是显示gy1 scFv特异性结合PSMA+细胞的图。使用流式细胞术在LNCap FGC细胞上研究PSMA上的ScFv gy1结合。简言之,用维尔烯(versene)溶液分离LNCap FGC细胞,用PBS清洗,并且与含有gy1的酵母上清液在冰上温育1小时,所述酵母上清液用FACS缓冲液稀释3倍。用冷PBS清洗细胞三次,然后在冰上与FACS缓冲液中的1:200稀释的抗-V5-Alexa647在黑暗中温育1小时。通过用冷PBS清洗三次除去未结合的抗V5-Alexa647,然后将细胞重悬于含有8 $\mu$ l via-probe(BD biosciences)的300 $\mu$ l FACS中。使用流式细胞术检测在LNCap FGC细胞上的Gy1结合,其中仅对活细胞进行门控和分析。流式细胞术对照包括:(1)未染色的细胞;和(2)用抗V5-Alexa647染色的细胞。实线灰色线表示未染色的细胞;黑色虚线表示抗V5-Alexa647染色的细胞;而黑色实线表示用gy1 scFv,然后用抗V5-Alexa647染色的细胞。

[0012] 图2描绘了实验结果,证明gy1 scFv在LnCap细胞上的抗原结合后显著内化。将LnCap FGC细胞接种在两个48孔板中。次日,将100 $\mu$ l含有gy1 scFv的酵母上清液在室温在200 $\mu$ l体积(100 $\mu$ l上清液加100 $\mu$ l细胞培养基)中与4 $\mu$ l抗V5-Alexa467预温育1小时。然后,用培养基清洗细胞一次,并且与200 $\mu$ l含有gy1的培养基(100 $\mu$ l新鲜培养基加100 $\mu$ l预温育的gy1-染料培养基)分别于37°C和4°C在黑暗中温育1小时。作为对照,对于这两种温度,还将细胞与相同浓度的抗-V5-Alexa467一起温育。用冷PBS清洗两次后,将200 $\mu$ l胰蛋白酶加入孔中以在室温消化细胞表面蛋白30分钟。然后,向每个孔中加入500 $\mu$ l培养基以停止胰蛋白酶处理,并将细胞清洗两次,然后悬浮在含有via-probe的FACS缓冲液中用于流式细胞术分析。左图代表4°C温育细胞,并且右图代表37°C温育细胞。灰色实线代表仅用普通培养基温育的细胞;黑色虚线表示用抗V5-Alexa647温育的细胞;而黑色实线代表用预先形成的gy1-抗V5-Alexa647复合物温育的细胞。

[0013] 图3描绘了测量gy1 scFv亲和力的实验结果。使用捕获ELISA测量Gy1 scFv亲和力。简言之,将抗Flag抗体(Sigma)在ELISA板上于4°C在PBS中包被过夜。将板清洗并用PBSTM封闭,并与一式三份3倍连续稀释的gy1 scFv一起温育。然后清洗平板并与生物素化的PSMA一起温育,并用链霉抗生物素蛋白-HRP检测结合,并使用TMB,然后使用停止缓冲液通过比色显色分析。测量OD 450的吸光度,并使用GraphPad Prism软件计算亲和力。

[0014] 图4,包括图4A至图4C,描绘了在大肠杆菌中gy1 scFv表达的实验结果。用0.05mM IPTG在30°C诱导4小时,使用载体pET302在大肠杆菌BL21中表达gy1 scFv。使用超声波仪裂解大肠杆菌细胞,并使用HisTrp HP柱纯化gy1蛋白。图4A: SDS-PAGE显示诱导的大肠杆菌中可溶性gy1的表达。泳道1:标志物;泳道2:未诱导的全细胞裂解;泳道3-5:诱导的细胞裂解,全细胞(3),上清液(4)和沉淀(5)。图4B: SDS-PAGE显示纯化的gy1蛋白。泳道1:标志物;泳道

2:未诱导的细胞裂解上清液;泳道3:诱导的细胞裂解的上清液;和泳道4:纯化的gy1 scFv。图4C:Western印迹分析通过抗His6Ab证实纯化的gy1重组蛋白。泳道1:未诱导的细胞裂解上清液;泳道2:诱导的细胞裂解的上清液;和泳道3:纯化的gy1 scFv。

[0015] 图5描绘了证明大肠杆菌表达的gy1 scFv特异性结合PSMA+细胞的实验结果。使用流式细胞术研究大肠杆菌表达的gy1 scFv对PSMA阳性和阴性细胞的结合。用维尔烯溶液分离前列腺癌细胞LNCaP、C4-2、PC3-PSMA+和PC3-PSMA-细胞,并与100nM gy1或对照scFv NCP1在4℃温育30分钟,然后清洗,并且与缀合有FITC的小鼠抗6His IgG (AbD Serotec; Bio-Rad) 在4℃的黑暗中温育30分钟。然后,清洗细胞并通过流式细胞术分析。平行地,通过缀合有PE的商业抗PSMA单克隆抗体检测PSMA蛋白表达。

[0016] 图6描绘了通过细胞ELISA再保证大肠杆菌表达的gy1 scFv的亲和力的实验结果。在PSMA阳性细胞系C4-2上测量大肠杆菌表达的gy1 scFv的亲和力。简言之,在96孔板中培养的C4-2用4%多聚甲醛固定,依次用3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和6%牛血清白蛋白封闭。然后,将细胞与三倍连续稀释的gy1和对照scFvNCP1一起温育,从8100nM降至0.005nM,在37℃下温育1小时。用缀合有HRP的小鼠抗-6His检测细胞结合,并通过TMB显色并通过停止缓冲液停止比色信号。使用GraphPad Prism 5.0软件,使用450nm处的吸光度计算gy1亲和力。

[0017] 图7描述了证明gy1 scFv能够在抗原结合时内化的实验结果。在前列腺癌细胞即LnCap、C4-2、PC3-PSMA+和PC3-PSMA-上研究抗原结合后的Gy1内化。将在50%汇合的盖玻片上生长的细胞与200nM gy1或NCP1在37℃温育2小时。清洗细胞,用4%多聚甲醛固定,通过缀合有FITC的小鼠抗-6His IgG检测内化的gy1。细胞核用DAPI染色。在共聚焦成像系统下观察到内化。

[0018] 图8,包括图8A和图8B,描绘了可视化gy1的细胞内运输的实验结果。图8A:将C4-2细胞与gy1 scFv一起温育4小时,然后用抗6His IgG和缀合有FITC的二抗检测。使用内体、溶酶体、ER和高尔基体和DAPI (蓝色) 的不同细胞器标志物 (RFP标记的,红色) 来共染色细胞器和细胞核。图8B:进一步研究gy1和高尔基体和ER的标志物的共定位达1小时、2小时、4小时和6小时的不同温育期时间。

[0019] 图9描绘了使用PC3-PSMA+/PC3-PSMA-小鼠模型的验证实验的结果。使用表达萤光素酶的PC3-PSMA+和PC3-PSMA-细胞建立PSMA阳性和阴性异种移植裸鼠模型。通过在每只小鼠的右臀部皮下注射0.1mL PBS中的5×10<sup>6</sup>个表达萤火虫萤光素酶的PC3-PSMA+或PC3-PSMA-细胞来开发异种移植肿瘤模型。接种后2周,分离肿瘤组织并进行H&E和免疫组织化学染色以检查组织形态和PSMA表达水平。

[0020] 图10描绘了证明IRDye800cw标记不损害gy1的PSMA结合的实验结果。使用未标记的gy1作为阳性对照,在PC3-PSMA+细胞上评估红外染料IRDye800cw标记的gy1 scFv的结合亲和力。结果表明染料标记不损害gy1的PSMA结合。

[0021] 图11描绘了评估gy1 scFv在前列腺肿瘤模型中的动态生物分布的实验结果。在尾静脉注射0.2μmol/kg IRDye800cw标记的gy1 scFv后,使用Xenogen IVIS动力学成像系统在745nm的激发波长研究gy1 scFv在PC3-PSMA<sup>+</sup>/PC3-PSMA<sup>-</sup>异种移植裸鼠中的动态分布。获得生物发光成像(BLI)以鉴定前列腺肿瘤组织(左)。在每组的相同小鼠中的指定时间点监测IRDye800cw标记的gy1的分布。显示了代表性的结果。

[0022] 图12描绘了gy1 scFv的体内PSMA靶向。在注射后6小时,gy1 scFv显示最佳的肿瘤

定位信号。本文显示了两组具有PSMA阳性或阴性肿瘤的小鼠。

[0023] 图13,包括图13A和图13B,描绘了在静脉内注射后12小时评估小鼠器官中gy1 scFv生物分布的实验结果。图13A:注射后12小时,处死小鼠并收获组织和器官。使用Xenogen IVIS动力学成像系统分析IRDye800cw标记的gy1在不同小鼠器官中的生物分布。1,脑;2,肺;3,心脏;4,肝;5,脾;6,肾;7,小肠;8,骨;9,PC3-PSMA<sup>+</sup>或PC3-PSMA<sup>-</sup>肿瘤组织;10,肌肉。图13B:使用通过IVIS软件测量的肿瘤和不同器官中的IRDye800cw信号强度来研究不同器官的荧光定量。棒,平均值;误差棒,SD;n=5;\*\*P<0.01。

[0024] 图14,包括图14A和图14B,描绘了测量PSMAb表达和亲和力的实验结果。图14A:纯化的PSMAb的SDS-GAGE。泳道1:抗体纯化前的CHO细胞上清液;泳道2:变性的纯化的PSMAb;泳道3:未变性的纯化的PSMAb。图14B:PSMAb的亲和力测量。在PSMA阳性细胞系C4-2上测量PSMAb亲和力。简言之,在96孔板中培养的C4-2用4%多聚甲醛固定,依次用3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和6%牛血清白蛋白封闭。然后,将细胞与三倍连续稀释的PSMAb一起温育,从100nM下降至0.19pM,在37℃温育1小时。用缀合有HRP的小鼠抗人IgG Fc Ab检测细胞结合,并通过TMB显色并通过停止缓冲液终止比色信号。使用GraphPad Prism 5.0软件,使用450nm处的吸光度计算亲和力。

[0025] 图15描绘了证明PSMAb特异性结合PSMA+细胞系的实验结果。使用流式细胞术研究PSMAb在PSMA阳性和阴性细胞上的结合。上排:阴性对照IgG(灰色);PSMAb(黑色);下排:阴性对照IgG(灰色);阳性对照抗体LNI-17(黑色)。

[0026] 图16描绘了实验结果,证明PC3-PSMA+细胞上的PSMAb结合被重组PSMA蛋白阻断。将浓度2nM的PSMAb分别与0、2、6和10nM重组PSMA或10nM对照蛋白BSA在室温预温育2小时,然后与PC3-PSMA+细胞一起温育。通过流式细胞术研究对PC3-PSMA+细胞上PSMAb结合的阻断效果。阴性对照:灰色实线;PSMAb 2nM:黑色实线;PSMAb 2nM被10nM BSA阻断:灰色虚线;PSMAb 2nM被2nM PSMA阻断:黑色点线;PSMAb 2nM被6nM PSMA阻断:黑色虚线;PSMAb 2nM被10nM PSMA阻断:灰色虚线。

[0027] 图17,包括图17A至图17D,描绘了检查PSMAb的PSMA特异性内化的实验结果。在前列腺癌细胞,即C4-2(图17A)、PC-3(图17B)、LnCap(图17C)和DU-145(图17D)细胞上研究PSMAb内化。将50%汇合的盖玻片上生长的细胞与200nM PSMAb或对照人IgG1在37℃温育2小时。清洗细胞,用4%多聚甲醛固定,并通过缀合有FITC的抗人IgG Fc抗体检测内化的PSMAb。细胞核用DAPI染色。在共聚焦成像系统下观察到内化。

[0028] 图18,包括图18A至图18C,描绘了研究PSMAb的体内PSMA靶向的实验结果。使用IRDye800CW标记的PSMAb研究肿瘤靶向的效率和PSMAb的术中光学成像的潜力。将50μg标记的PSMAb/小鼠尾静脉注射到PC3-PSMA+(图18A)或PC3-PSMA-(图18B)异种移植植物模型中,并且使用Xenogen IVIS动力学成像系统监测4小时、24小时、30小时、48小时、54小时、102小时,126小时和174小时的PSMAb的生物分布。在图18C中显示了注射后48小时各组中4只小鼠的图像。体内光学成像显示PSMAb在整个身体内迅速扩散,并且可以在注射后24小时起在肿瘤组织中检测到,然后逐渐从体内清除,而特异性保留在PSMA+肿瘤而非PSMA-肿瘤处。

[0029] 图19是描绘SMCC-DM1的示意图。

[0030] 图20是描绘MC-VC-PAB-MMAE和MC-VC-PAB-MMAE的一组示意图。

[0031] 图21描绘了证明PSMAb-ADC仍然在PSMA+细胞上有效结合的实验结果。使用流式细

胞术在PC-3(上部)和C4-2细胞(下部)上研究具有DM1、MMAE或MMAF的PSMAb缀合物的PSMA特异性结合。

[0032] 图22,包括图22A和图22B,描绘了证明PSMA+ADC被PSMA+细胞有效吸收的实验结果。在PC-3(图22A)和C4-2细胞(图22B)上研究具有DM1的PSMAb缀合物的PSMA特异性内化。将50%汇合的盖玻片上生长的细胞与200nM PSMAb-ADC或对照人IgG1-ADC在37℃温育2小时。清洗细胞,用4%多聚甲醛固定,并通过缀合有FITC的抗人IgG Fc抗体检测内化的PSMAb。细胞核用DAPI染色。在共聚焦成像系统下观察到内化。

[0033] 图23,包括图23A至图23C,描绘了评估PSMAb ADC的PSMA特异性细胞毒性的实验结果。在PSMA-细胞系PC-3和PSMA+细胞系C4-2上评估基于PSMAb的ADC的细胞毒性。简言之,将C4-2和PC-3细胞接种在含有10%FBS,2000个细胞/200mL/孔的DMEM培养基中的96孔板中。次日,细胞密度为约20-30%,并且将培养基更换为以333.33nM,133.33nM,66.67nM,33.33nM,6.67nM,3.33nM,0.67nM,0.33nM,0.067nM,0.0067nM,0.00067nM和0.000067nM含有PSMAb-DM1、PSMAb-MMAE或PSMAb-MMAF的新鲜培养基,每种浓度一式三份。每天更换培养基,每个孔的药物浓度相同。温育4天后,使用alamarBlue试剂盒按照制造方案评估细胞存活力。在C4-2细胞上计算的PSMAb-DM1(图23A)、PSMAb-MMAE(图23B)和PSMAb-MMAF(图23C)的IC50分别为0.12nM、0.59nM和0.92nM。

[0034] 图24,包括图24A至图24R,描绘了证明PSMAb ADC特异性诱导PSMA阳性细胞凋亡的实验结果。将PC-3和C4-2细胞以 $2 \times 10^5$ /2mL培养基/孔的密度接种在6孔板中并培养过夜。次日,更换培养基并将细胞与2mL培养基中50 $\mu$ g/mL,20 $\mu$ g/mL,10 $\mu$ g/mL,5 $\mu$ g/mL,1 $\mu$ g/mL,0.5 $\mu$ g/mL,0.01 $\mu$ g/mL, and 0.001 $\mu$ g/mL浓度的PSMAb-ADC一起温育。浓度50mg/mL的人IgG和PSMAb用作对照。温育48小时后,将细胞用胰蛋白酶处理并用PBS清洗两次,并用膜联蛋白-V/PI染色,并使用流式细胞术检测凋亡。具有膜联蛋白-V(+) /PI(-)的信号表明早期凋亡和双阳性染色,即膜联蛋白-V(+) /PI(+),表明晚期凋亡。总凋亡是早期和晚期凋亡的总和。C4-2(图24A-图24C,图24G-图24I,图24M-图24O)和PC-3(图24D-图24F,图24J-图24L,图24P-图24R)细胞上PSMAb-DM1(图24A-图24F),PSMAb-MMAE(图24G图24L)和PSMAb-MMAF(图24M-图24R)的结果在流式细胞术数据和计算的总凋亡(图24B,图24E,图24H,图24K,图24N和图24Q)和早期凋亡(图24B,图24E,图24H,图24K,图24N和图24Q)和晚期凋亡(图24C,图24F,图24I,图24L,图24O和图24R)中显示。

[0035] 图25,包括图25A至图25D,描绘了双特异性抗体的各种构造。

[0036] 发明详述

[0037] 本发明涉及用于治疗癌症的组合物和方法。本发明部分基于特异性结合PSMA胞外域的抗体片段的发现。因此,本发明提供了包含结合PSMA的抗体或抗体片段的组合物。本发明的示例性组合物包括抗体、抗体片段、双特异性抗体、抗体-药物缀合物、PSMA靶向成像剂、嵌合抗原受体、表达嵌合抗原受体的细胞等。

[0038] 定义

[0039] 除非另外定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管与本文描述的那些方法和材料类似或等同的任何方法和材料可用于本发明的实践或测试,但描述了优选的方法和材料。

[0040] 如本文所用,以下术语中的每一个具有与本节中其相关的含义。

[0041] 冠词“一”和“一个”在本文中用于指冠词的一个或超过一个(即至少一个)语法对象。举例来说,“元件”表示一个元素或超过一个元素。

[0042] 当提及诸如量、时间持续时间等可测量值时,如本文所用的“约”意味着包括与规定数值的±20%、±10%、±5%、±1%或±0.1%的变化,因为此类变化适合于进行所公开的方法。

[0043] 范围:贯穿本公开,本发明的各个方面可以以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,不应当被解释为对本发明范围的不灵活限制。因此,应当认为范围的描述具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的个别数值。例如,应当认为诸如1至6的范围的描述具有特别公开的子范围,例如1-3、1-4、1-5、2-4、2-6、3-6等以及该范围内的个别数字例如1,2,2.7,3,4,5,5.3和6。无论范围的广度如何,这都适用。

#### [0044] 描述

[0045] 本发明提供了用于治疗和预防癌症的组合物和方法。在某些实施方案中,组合物包含特异性结合PSMA胞外域的抗体或抗体片段。本发明基于与PSMA结合的抗体片段的发现。在表达抗体文库的酵母展示系统中鉴定片段。如本文所述,使用本发明提供的抗体片段来配制靶向前列腺癌和其他实体瘤的新血管系统中发现的PSMA的治疗和诊断组合物。在一个实施方案中,组合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体或抗体片段将药物靶向到肿瘤位置。在一个实施方案中,组合物是双特异性抗体,其中双特异性抗体包含特异性结合PSMA的抗体或抗体片段和结合T细胞抗原(例如CD3)的第二抗体或抗体片段。在一个实施方案中,组合物是嵌合抗原受体,其包含特异性结合PSMA的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,本发明包括编码抗体或抗体片段、双特异性抗体或嵌合抗原受体的分离的核酸。在一个实施方案中,本发明包括经修饰以表达抗体或抗体片段、双特异性抗体或嵌合抗原受体的细胞。

[0046] 本发明提供治疗或预防癌症的方法,所述癌症包括但不限于前列腺癌。在某些实施方案中,方法包括向受试者施用有效量的组合物,该组合物包含特异性结合PSMA的抗体或抗体片段。例如,在一个实施方案中,该方法包括向受试者施用抗体或抗体片段、双特异性抗体或嵌合抗原受体。在一个实施方案中,该方法包括向受试者施用有效量的组合物,该组合物包含编码抗体或抗体片段、双特异性抗体或嵌合抗原受体的分离的核酸。在一个实施方案中,该方法包括向受试者施用经修饰以表达抗体或抗体片段、双特异性抗体或嵌合抗原受体的细胞。

[0047] 本发明提供了用于检测受试者中的癌症的方法,包括向受试者施用包含特异性结合PSMA的抗体或抗体片段的靶向成像剂。抗体或抗体片段可以与任何成像剂缀合,以提供用于各种成像形式的靶向成像剂,所述成像形式包括但不限于PET、SPECT、MRI或光学成像。

#### [0048] 成分

[0049] 如本文所述,本发明提供包含特异性结合PSMA的抗体或抗体片段的组合物。本发明基于大酵母展示人scFv文库的构建和高亲和力抗PSMA scFv的分离。测得分离的scFv对PSMA的亲和力为 $9 \times 10^{-10}$  nM。此外,产生了几种scFv突变,这增加了其功能。scFv向全长抗体的转化使其亲和力增加至 $1 \times 10^{-10}$  nM。

[0050] 杂交瘤技术是用于单克隆抗体制备的完善开发的传统方法。然而,抗体的鼠来源极大地阻碍了其在人类中的应用。虽然人源化可以部分降低鼠抗体的免疫原性并且人源化

抗体目前在临幊上被广泛使用,但约50%的患者仍然会出现免疫原性相关的副作用,这是因为需要保留某种水平的鼠氨基酸保持抗体的抗原结合活性,人源化绝不能达到100%。具有约3nM亲和力的J591是人源化PSMA抗体,其已广泛用于研究和一些临幊试验(McDevitt,M.R.,et al.(2000) *Cancer Res*,60(21):6095-100)。因此,完全人抗体是临幊应用中最期望的抗体。

[0051] Medarex/GenPharm International和Abgenix已经开发了转基因小鼠humab-小鼠和xenomouse,用于通过传统的杂交瘤方法开发完全人抗体。PSMA Development Company, LLC(Progenics Pharmaceuticals, Inc.)已使用xenomouse来开发4种分别具有 $1 \times 10^{-9}$ nM,  $7.9 \times 10^{-10}$ nM,  $5.1 \times 10^{-10}$ nM和 $2.1 \times 10^{-10}$ nM的亲和力的全人抗PSMA抗体(美国专利No.8,470,330)。

[0052] 与转基因小鼠相比,抗体文库对于完全人抗体制备更方便且同样有效。理由是从健康或特定供体中分离外周血单个核细胞(PBMC),提取mRNA并扩增抗体的可变区,组装成单链抗体(scFv)或Fab形式,并通过分子生物学策略在噬菌体或酵母表面展示。抗体文库的优点是只要文库大小足够大,就可以容易地分离高亲和力抗体。若文库是由人B细胞构建的,则衍生的抗体将是100%人源,并且对于临幊应用不具有免疫原性问题。

[0053] 由于具有4个链间二硫键的复杂构象和结构,大肠杆菌或酵母难以表达全长抗体。因此,最常展示的抗体形式是scFv和Fab。scFv仅包含重链和轻链的可变区,而Fab也包含重链的轻链恒定区和第一个恒定区。在某些情况下,与小抗体片段(如Fv, scFv, Fab或scFv-Fc)相比,全长抗体具有最稳定的结构,最长的循环时间,最高的亲和力,对标记或修饰的最佳耐受性,并且可以介导抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)。因此,全长抗体是临幊上最流行的形式。

[0054] 使用抗体文库的策略是首先发现抗体片段,例如scFv或Fab,然后将它们转化为全长抗体。尽管许多scFv或Fab可以在不损害功能的情况下成功转化为全长抗体,但一旦转化为全长抗体,一些片段抗体将失去其亲和力(Schirrmann,T.,et al.*Molecules*, (2011) 16 (1):412-26; Baker,K.P.,et al.(2003) *Arthritis Rheum*, 48(11):3253-65; Thie,H.,et al.(2011) *PLoS One*, 6(1):e15921),这可能是因为由于添加恒定区导致的结合位点的构象变化。就scFv而言,链接头可能有助于一些scFv中的抗原结合构象,其在被转化为全长抗体时将被除去并因此损害抗原结合亲和力。因此,高亲和力scFv或Fab可能不能确保高亲和力的完整抗体衍生物。每次转换都应视为一个独特的情况,并且需要通过实验确认。

[0055] 在一个实施方案中,本发明提供了包含抗体药物缀合物(ADC)的组合物。ADC是武装抗体以进行抗原特异性毒性递送的的平台策略。基本原理是将抗体(通常是肿瘤靶向抗体)与超毒性药物缀合,从而以靶向方式选择性杀死肿瘤细胞,而保留正常组织。ADC中使用的药物主要分为两种类型,一种是微管蛋白抑制剂,如奥瑞他汀(auristatin)(MMAE, MMAF)(Stephan,J.P.,et al.(2008) *Bioconjug Chem*, 19(8):1673-83; Younes,A.,et al.(2010) *N Engl J Med*, 363(19):1812-21; Okeley,N.M.,et al.(2010) *Clin Cancer Res*, 16(3):888-970)和美登素类化合物(DM1和DM4)(Lambert,J.M. et al.(2014) *J Med Chem*, 57(16):6949-64; Bender,B.,et al.(2014) *AAPS J*, 16(5):994-1008; Raufi,A.,A.S.Ebrahim et al.(2013) *Cancer Manag Res*, 5:225-33);另一种类型是双链DNA裂解剂,例如加利车霉素。由于超级毒性,某些药物不能单独用作化学治疗剂,而是它们必须与抗体缀合以减少副

作用并提高治疗效果。

[0056] 在一个实施方案中,本发明提供了包含双特异性抗体的组合物。双特异性单克隆抗体(BsMAb, BsAb)是使用新型抗体制造强效抗肿瘤武器的另一种策略。BsAb是一种人工蛋白质,其由两种不同单克隆抗体的片段组成,因此与两种不同类型的抗原结合。这种方法的最广泛的应用是在癌症免疫疗法中,其中将BsMAb工程化,其同时结合细胞毒性细胞(使用受体如CD3)和要破坏的靶物如肿瘤细胞(Müller D et al. (2010) BioDrugs, 24 (2) : 89-98; Chames P1 et al. (2009) MAbs, 1 (6) : 539-47)。双特异性T细胞结合剂(BiTEs)和双亲和再靶向(DART)是小片段BsAb的例子,还开发了各种更大的BsAb,例如突出-入-空穴IgG, CrossMab, TrioMab, DVD Ig (Kontermann RE et al. (2015) Drug Discov Today, 20 (7) : 838-47)。在BsAbs中,一个臂可以是T或NK细胞活化抗体,例如抗CD3或抗CD16抗体,另一个臂可以是肿瘤靶向抗体;或两个臂靶向不同肿瘤标志物用于协同抑制肿瘤生长。

[0057] 在一个实施方案中,本发明提供了包含嵌合抗原受体(CAR)的组合物。例如,在某些实施方案中,组合物是经遗传修饰以CAR表达细胞。例如,在某些实施方案中,本发明提供经遗传工程化改造以在其表面上产生CAR的T或NK细胞,所述CAR允许T或NK细胞识别肿瘤细胞上的特定蛋白质(抗原)。scFv是此类工程化中最常用的受体,并已在临幊上成功用于癌症治疗(Grupp SA et al. (2013) N Engl J Med, 368 (16) : 1509-18; Porter DL et al. (2011) N Engl J Med, 365 (8) : 725-33)。scFv通过铰链和跨膜域融合至信号传导胞内域。此类分子响应于scFv对其靶物的识别而导致T-或NK-细胞的活化。当T或NK细胞表达此类CAR时,它们识别并杀死表达靶抗原的靶细胞。已经开发了几种针对肿瘤相关抗原的CAR,并且使用此类表达CAR的T细胞的过继转移方法目前正在用于治疗各种癌症的临幊试验中。

#### [0058] 抗体

[0059] 在一个实施方案中,本发明提供了包含特异性结合PSMA胞外部分的抗体或抗体片段的组合物。例如,在一个实施方案中,抗体或抗体片段结合的PSMA的胞外部分包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0060] 在一些实施方案中,术语“表位”是指抗原的结合抗体的区域。它是第一抗体识别的抗原区域,其中第一抗体与该区域的结合阻止第二抗体或其他二价分子与该区域的结合。该区域包括由一类抗体选择性识别的特定核心序列或序列。通常,表位由局部表面结构组成,所述局部表面结构可以由连续或非连续的氨基酸序列形成。

[0061] 在另一个实施方案中,术语“选择性识别”,“选择性结合”或“选择性识别的”是指抗体或其他二价分子与表位的结合比二价分子与无关表位的结合或比无关二价分子与表位的结合大至少2倍,优选2-5倍,并且最优选超过5倍,如通过本领域已知且本文所述的技术,例如ELISA和冷置换测定法(cold displacement assay)测定的。

[0062] 在一些实施方案中,术语“抗体”是指构成抗体的天然生物形式的结构。在大多数哺乳动物,包括人类和小鼠中,这种形式是四聚体,并且由相同的两对两个免疫球蛋白链组成,每对具有一条轻链和一条重链,每条轻链包含免疫球蛋白域VL和CL,以及每条重链包含免疫球蛋白域VH, C $\gamma$  1, C $\gamma$  2, C $\gamma$  3和C $\gamma$  4。在每对中,轻链和重链可变区(VL和VH)共同负责与抗原的结合,并且恒定区(CL, C $\gamma$  1, C $\gamma$  2, C $\gamma$  3和C $\gamma$  4, 特别地C $\gamma$  1, C $\gamma$  2和C $\gamma$  3)负责抗体效应器功能。在一些哺乳动物中,例如在骆驼和美洲驼羊(llamas)中,全长抗体可以仅由两条重链组成,每条重链包含免疫球蛋白域VH, C $\gamma$  2和C $\gamma$  3。“免疫球蛋白(Ig)”在本文中是

指由基本上由免疫球蛋白基因编码的一种或多种多肽组成的蛋白质。免疫球蛋白包括但不限于抗体。免疫球蛋白可具有许多结构形式,包括但不限于全长抗体,抗体片段和个别的免疫球蛋白域,包括但不限于VH,C $\gamma$ 1,C $\gamma$ 2,C $\gamma$ 3,C $\gamma$ 4,VL和CL。

[0063] 取决于其重链恒定域的氨基酸序列,可以将完整抗体指定为不同的“类别”。有五种主要类型的完整抗体:IgA,IgD,IgE,IgG和IgM,并且这些中的几种可进一步分为“亚类”(同种型),例如IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgA和IgA2。对应于不同类别抗体的重链恒定域分别称为 $\alpha$ , $\delta$ , $\epsilon$ , $\gamma$ 和 $\mu$ 。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是公知的。

[0064] 在一些实施方案中,术语“抗体”或“抗原结合片段”分别指完整分子及能够与期望靶物特异性地相互作用的其功能性片段,例如Fab,scFv-Fc二价分子,F(ab')2和Fv。在一些实施方案中,抗原结合片段包含:

[0065] (1)Fab,其含有抗体分子的单价抗原结合片段的片段,其可以通过用木瓜蛋白酶消化完整抗体以产生完整的轻链和一条重链的一部分来产生;

[0066] (2)Fab',抗体分子的片段,其可以通过用胃蛋白酶处理完整抗体,然后还原,以产生完整的轻链和重链的一部分来获得;每个抗体分子获得两个Fab'片段;

[0067] (3)(Fab')2,抗体片段可以通过在无随后还原的情况下用胃蛋白酶处理完整抗体获得;F(ab')2是由通过两个二硫键连接在一起的两个Fab'片段的二聚体;

[0068] (4)Fv,遗传工程化片段,含有作为两条链表达的轻链可变区和重链可变区;和

[0069] (5)单链抗体(SCA或scFv),遗传工程化分子,其含有通过合适的多肽接头连接作为遗传融合的单链分子的轻链可变区和重链可变区。

[0070] (6)scFv-Fc是通过将单链Fv(scFv)与来自免疫球蛋白(Ig)(例如IgG)的铰链区和Fc区融合而产生的。

[0071] 在一个实施方案中,本文提供的抗体是单克隆抗体。在另一个实施方案中,本文提供的抗原结合片段是单链Fv(scFv),双抗体,串联scFv,scFv-Fc二价分子,Fab,Fab',Fv或F(ab')2。

[0072] 在一个实施方案中,术语“二价分子”或“BV”是指能够同时结合两个分开的靶物的分子。二价分子不限于具有两个且仅两个结合域,并且可以是多价分子或由连接的单价分子组成的分子。二价分子的结合域可以选择性地识别位于同一靶物上或位于源自不同物种的靶物上的相同表位或不同表位。结合域可以以多种方式中的任何一种连接,包括但不限于二硫键,肽桥连,酰胺键和本领域已知的其他天然或合成连接(Spatola et al., “Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins,” B.Weinstein,eds.,Marcel Dekker,New York,p.267(1983)(一般综述);Morley,J.S., “Trends Pharm Sci”(1980)pp.463-468(一般综述);Hudson et al.,Int J Pept Prot Res(1979)14,177-185;Spatola et al.,Life Sci(1986)38,1243-1249;Hann,M.M.,J Chem Soc Perkin Trans I(1982)307-314;Almquist et al.,J Med Chem(1980)23,1392-1398;Jennings-White et al.,Tetrahedron Lett(1982)23,2533;Szelke et al., European Application EP 45665;Chemical Abstracts 97,39405(1982);Holladay,et al.,Tetrahedron Lett(1983)24,4401-4404;以及Hruby,V.J.,Life Sci(1982)31,189-199)。

[0073] 本发明提供从大酵母展示人scFv文库中分离的抗PSMA抗体或抗体片段。在一个实

施方案中,其抗原结合片段是高亲和力抗PSMA scFv gy1,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。[0074] 在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL FR1。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL CDR1。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL FR2。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL CDR2。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VL FR3。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR3。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL FR4。

[0075] 在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VH FR1。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VH CDR1。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR2。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR2。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH FR3。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH FR4。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的scFv接头。

[0076] 例如,在一个实施方案中,组合物包含抗体片段,其包含本文中称为gy1的scFv。在一个实施方案中,gy1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一个实施方案中,gy1含有包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链。在一个实施方案中,gy1含有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL FR1;包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL CDR1;包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL FR2;包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL CDR2;包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VL FR3;包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR3;包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL FR4;包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VH FR1;包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VH CDR1;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR2;包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR2;包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH FR3;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3;包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH FR4;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的scFv接头。

[0077] 在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有一个或多个突变。例如,在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VLFR2,其中SEQ ID NO:39相对于SEQ ID NO:11包含V→A点突变。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VLCDR2,其中SEQ ID NO:41包含相对于SEQ ID NO:13的G→E点突变。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VLFR4,其中SEQ ID NO:43包含相对于SEQ ID NO:19的V→A点突变。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VHCDR1,其中SEQ ID NO:45包含相对于SEQ ID NO:25的S→F点突变。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VHFR3,其中SEQ ID NO:47包含相对于SEQ ID NO:31的I→V点突变。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VHCDR3,其中SEQ ID NO:49包

含相对于SEQ ID NO:33的D→G点突变。在一个实施方案中,抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH FR4,其中SEQ ID NO:51包含相对于SEQ ID NO:35的G→E点突变。

[0078] 例如,在一个实施方案中,组合物包含抗体片段,其包含本文中称为gy1-st的scFv。在一个实施方案中,gy1-st含有包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VL FR2;包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR1,和包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH FR4。在一个实施方案中,gy1-st含有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL FR1;包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL CDR1;包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VL FR2;包含包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL CDR2;包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VL FR3;包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR3;包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL FR4;包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VH FR1;包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR1;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR2;包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR2;包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH FR3;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3;包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH FR4;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的scFv接头。

[0079] 例如,在一个实施方案中,组合物包含抗体片段,其包含本文中称为gy1-2的scFv。在一个实施方案中,gy1-2含有包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VL CDR2;包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VL FR4;包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR1,和包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH FR3。在一个实施方案中,gy1-2含有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL FR1;包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL CDR1;包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL FR2;包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VL CDR2;包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VL FR3;包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR3;包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VL FR4;包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VH FR1,包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR1;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR2;包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR2;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH FR3;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3;包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH FR4;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的scFv接头。

[0080] 例如,在一个实施方案中,组合物包含抗体片段,其包含本文中称为gy1-3的scFv。在一个实施方案中,gy1-3含有包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR1和包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR3。在一个实施方案中,gy1含有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL FR1;包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL CDR1;包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL FR2;包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL CDR2;包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VL FR3;包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR3;包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL FR4;包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VH FR1;包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR1;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR2;包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR2;包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH FR3;包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR3;包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH FR4;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的scFv接头。

[0081] 在一个实施方案中,本文中所述的scFv工程化改造成另一种片段抗体或全长抗体中,其中片段抗体指Fab,Fab', (Fab')2,Fv, scFv-Fc, scFv-CH2, scFv-CH3或完整抗体。

[0082] 在一个实施方案中,组合物含有包含本文中所述的scFv的抗体。例如,在一个实施方案中,组合物含有包含gy1-2 scFv的抗体。在一个实施方案中,包含gy1-2 scFv的抗体在本文中称为PSMAb。在一个实施方案中,抗体含有包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的重链。在一个实施方案中,抗体包含具有信号肽的重链,其中具有信号肽的重链包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链信号肽包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体含有包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的重链可变区。在一个实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:59的重链恒定区。在一个实施方案中,抗体含有包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的轻链。在一个实施方案中,抗体包含具有信号肽的轻链,其中具有信号肽的轻链包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。在一个实施方案中,轻链信号肽包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体含有包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的轻链可变区。在一个实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:67的轻链恒定区。

[0083] 可用于实现期望序列比对的序列比对方法包括在一些实施方案中,但不仅限于成对比对方法或多序列比对方法,如本领域技术人员将理解的。序列比对可以以各种基于文本的文件形式存储。在一个实施方案中,这通过在某些实施方案中使用转换程序和编程包(例如,READSEQ,EMBOSS和BioPerl,BioRuby)转换任何格式(例如FASTA或GenBank,SwissProt,Entrez和EMBL格式)来实现。应当理解,本领域技术人员可以根据需要使用任何程序或存储介质转换,修改,评分,更新和/或存储序列,如本领域技术人员将理解的。

[0084] 在一些实施方案中,术语“序列比对”包括使用本领域技术人员所理解的任何程序或方法,其用于进行核酸或氨基酸序列比对以产生可容易地探测,评估和进行数学和统计计算的结果。在一个实施方案中,用于序列或结构比对的方法是本领域公知的,并且包括基于序列和结构同源性的比对,如本领域技术人员将理解的。

[0085] 在一个实施方案中,术语“同源性”,“同源物”或“同源的”是指序列同一性,或结构同一性或功能同一性。通过使用术语“同源性”和其他类似形式,应理解相似发挥功能,和/或含有序列同一性,和/或在结构上保守以使其接近参考序列的任何分子(无论是核酸还是肽)被认为是本发明的一部分。在另一个实施方案中,术语“同源性”,“同源物”或“同源的”在任何情况下指提及的序列(无论氨基酸序列还是核酸序列)与指定的序列表现出至少86%对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出至少90%对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出至少92%对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出至少95%对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出至少95%或更多对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出至少97%或更多对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出97%-100%对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出100%对应性。类似地,在一个实施方案中,提及与特定序列的对应性包括与如本文中限定的所述序列的直接对应性以及同源性两者。因而并且在一个实施方案中,术语“非同源”指氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出不超过85%对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出不超过75%对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出不超过65-74%对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出不超过55-64%对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指

定的序列表现出不超过45-54%对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出不超过35-44%对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出不超过15-34%对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出不超过5-14%对应性。在另一个实施方案中,氨基酸序列或核酸序列与指定的序列表现出不超过0.1-4%对应性。在另一个实施方案中,术语“非同源”可以与术语“低序列相似性”互换使用。

[0086] 在一个实施方案中,轻链含有CDR1,CDR2和CDR3序列,其是上文列出的或者具有超过70%,例如,超过75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%的同源性;例如具有10,9,8,7,6,5,4,3,2或1个氨基酸突变、缺失或插入。

[0087] 在一个实施方案中,轻链含有FR1,FR2和FR3序列,其是上文列出的或者具有超过70%,例如,超过75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%的同源性;例如具有10,9,8,7,6,5,4,3,2或1个氨基酸突变、缺失或插入。

[0088] 在一个实施方案中,重链含有CDR1,CDR2和CDR3序列,其是上文列出的或者具有超过70%,例如,超过75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%的同源性;例如具有10,9,8,7,6,5,4,3,2或1个氨基酸突变、缺失或插入。

[0089] 在一个实施方案中,重链含有FR1,FR2和FR3序列,其是上文列出的或者具有超过70%,例如,超过75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%的同源性;例如具有10,9,8,7,6,5,4,3,2或1个氨基酸突变、缺失或插入。

[0090] 在一个实施方案中,全长抗体是IgG1,IgG2,IgG3或IgG4类型之一。在另一个实施方案中,将gy1 scFv工程化改造成IgG1完整抗体。

[0091] 在一个实施方案中,完整抗体具有lambda,kappa的恒定区或自它们突变的。在另一个实施方案中,使用CL2恒定区将gy1 scFv工程化改造成完整抗体。

[0092] 在一个实施方案中,重链包含SEQ ID NO:59的恒定区,或具有超过70%,例如,超过75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%同源性;例如具有10,9,8,7,6,5,4,3,2或1个氨基酸突变、缺失或插入的序列。

[0093] 在一个实施方案中,轻链包含SEQ ID NO:67的恒定区,或具有超过70%,例如,超过75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%同源性;例如具有10,9,8,7,6,5,4,3,2或1个氨基酸突变、缺失或插入的序列。

[0094] 在一个实施方案中,在信号肽和可变区之间,在重链和/或轻链的可变区和恒定区之间可以存在或不存在接头肽;此类接头肽的一个实例由限制酶位点编码。

[0095] 在一个实施方案中,抗体或抗体片段展示在酵母细胞表面上;在另一个实施方案中,抗体或抗体片段包被在纳米颗粒表面上;在另一个实施方案中,抗体或抗体片段展示在哺乳动物细胞表面上,例如T细胞,NK细胞或其他人或其他哺乳动物细胞;在另一个实施方案中,抗体或抗体片段由酵母,大肠杆菌或哺乳动物细胞作为分泌蛋白产生。

[0096] 在一个实施方案中,术语“结合”或语法等同物是指对彼此具有亲和力的组成。“特异性结合”是两个分子之间选择性结合的情况。特异性结合的具体实例是在抗体和抗原之间发生的特异性结合。通常,当解离常数(KD)小于约 $1\times10^{-5}$ M或小于约 $1\times10^{-6}$ M或 $1\times10^{-7}$ M时,可以将特异性结合与非特异性结合区分。特异性结合可以是例如通过ELISA,免疫沉淀,共沉淀(有或没有化学交联),双杂交测定等检测。适当的对照可用于区分“特异性”和“非特

异性”结合。

[0097] 在一个实施方案中,抗体或抗原结合片段以1nM范围内的Kd结合其靶物;在另一个实施方案中,抗体或抗原结合片段以0.1nM范围内的Kd结合其靶物。在另一个实施方案中,gy1 scFv具有Kd=1.165nM的亲和力,并且IgG1全抗体PSMAb具有Kd=0.1nM的亲和力。

[0098] 在一些实施方案中,抗体或抗体片段具有修饰。该修饰是如下文进一步定义的修饰。在一些实施方案中,修饰是N末端修饰。在另一个实施方案中,修饰是C末端修饰。在另一个实施方案中,修饰位于蛋白质的中间。在一个实施方案中,抗体或抗原结合片段的可分泌形式包含允许结合免疫球蛋白(Ig)铰链区的N末端修饰。在另一个实施方案中,Ig铰链区来自但不限于免疫球蛋白铰链区。在一些实施方案中,修饰是对抗体或抗体片段的直接修饰。在其他实施方案中,修饰是由一种或多种其他肽,蛋白质,化学物质,碳水化合物或甚至二抗桥接的间接修饰。

[0099] 本发明包括的其他翻译后修饰包括例如N-连接或O-连接的碳水化合物链,N末端或C-末端的加工,化学部分与氨基酸主链的连接,N-连接或O-连接的碳水化合物链的化学修饰,以及由于原核宿主细胞表达而添加或缺失N末端甲硫氨酸残基。

[0100] 在一个实施方案中,术语“多肽”通常是指本发明的抗体,抗原结合片段或变体。

[0101] 在一个实施方案中,本发明的多肽包含氨基酸取代。在一个实施方案中,氨基酸取代是保守的。“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的氨基酸取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸,精氨酸,组氨酸),酸性侧链(例如天冬氨酸,谷氨酸),不带电的极性侧链(例如甘氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸,半胱氨酸),非极性侧链(如丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,蛋氨酸,色氨酸), $\beta$ -支链侧链(如苏氨酸,缬氨酸,异亮氨酸)和芳香侧链(如酪氨酸,苯丙氨酸,色氨酸,组氨酸)。在另一个实施方案中,氨基酸取代不是保守的氨基酸取代,与天然多肽相比,其导致突变多肽的活性增强。

[0102] 本发明的抗体或抗原结合片段可以通过本领域公知的任何合成或重组方法产生。可以通过本领域已知的技术进一步修饰本发明的抗体或抗原结合片段以改变生物物理或生物学特性。例如,可以修饰多肽以增加其对蛋白酶的稳定性,或改变其对其天然受体的亲脂性,溶解性或结合亲和力。

[0103] 在一些实施方案中,抗体片段可以通过抗体的蛋白水解水解或通过在编码该片段的DNA在大肠杆菌或哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞培养物或其他蛋白质表达系统)中表达来制备。在一些实施方案中,抗体片段可通过常规方法通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗体而获得。例如,抗体片段可以通过用胃蛋白酶酶促切割抗体来产生,以提供表示为F(ab')2的5S片段。可以使用巯醇还原剂,并且任选地使用源自切割二硫化物连接的巯基的封闭基团进一步切割该片段,以产生3.5S Fab'单价片段。或者,使用胃蛋白酶的酶促切割直接产生两个单价Fab'片段和Fc片段。这些方法例如由Goldenberg,美国专利No.4,522,517和美国专利No.美国专利4,036,945和4,331,647,以及其中包含的参考文献描述,这些专利通过引入完整并入本文。另见Porter,R.R.,Biochem.J.,73:119-126,1959。也可以使用其他切割抗体的方法,例如形成单价轻-重链片段的重链分离,片段的进一步切割,或其他酶,化学或遗传技术,只要片段结合由完整抗体识别的抗原。

[0104] 在一个实施方案中,本发明的多肽,抗体或蛋白质的“变体”是指通过一个或多个氨基酸相对于所提及的多肽,抗体或蛋白质改变的氨基酸序列。在本发明中,多肽的变体保留所提及蛋白质的抗体结合特性。在另一个实施方案中,“变体”是指本发明的抗原结合片段。在另一个实施方案中,变体是抗原结合片段的变体,其保留对靶物或标志物的特异性。变体可具有“保守”变化,其中取代的氨基酸具有相似的结构或化学性质(例如,用异亮氨酸取代亮氨酸)。在另一个实施方案中,变体在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处具有保守氨基酸取代。在另一个实施方案中,“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基取代的氨基酸取代,其中在其他实施方案中,相反的情况是“非保守取代”。本领域已经定义了具有相似电荷侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸,精氨酸,组氨酸),酸性侧链(例如,天冬氨酸,谷氨酸),不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸,半胱氨酸),非极性侧链(例如丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,蛋氨酸,色氨酸), $\beta$ -支链侧链(例如,苏氨酸,缬氨酸,异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸,苯丙氨酸,色氨酸,组氨酸)。或者,可以沿着所有或部分编码序列随机引入突变,例如通过饱和诱变,并且可以筛选所得突变体的生物活性以鉴定保留活性的突变体。诱变后,可以常规地表达编码的蛋白质,并且可以使用本文描述的技术或通过本领域已知的常规修饰技术来确定编码的蛋白质的功能和/或生物活性。类似的微小变化也可包括氨基酸缺失或插入或两者。可以使用本领域公知的计算机程序,例如DNASTAR软件,找到确定哪些氨基酸残基可被取代,插入或缺失而不消除免疫反应性的指导。

[0105] 在一个实施方案中,术语“框架区”或“FR”是除超可变区残基之外的那些可变域残基。框架区域已经精确定义。参见,例如Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, National Institutes of Health, USA (5th ed. 1991)。每个可变域通常具有四个FR,标识为FR1,FR2,FR3和FR4。在一些实施方案中,“FR”还指抗体可变区,其包含邻接或接近CDR区域但在CDR区域外部的氨基酸残基,CDR区域即与抗原直接相互作用的区域,充当抗体可变区内的抗体分子的识别元件。在一个实施方案中,术语“框架区”旨在表示由CDR分开的框架的每个域。在一些实施方案中,不同轻链或重链的框架区的序列在物种内是相对保守的。抗体的组合的重链和轻链框架区用于定位和排列CDR以正确结合抗原。

[0106] 在一个实施方案中,术语“CDR”或“互补决定区”是指包含在重链和轻链多肽两者的可变区内发现的非连续抗原结合位点的氨基酸残基。在其他实施方案中,术语“CDR”将包含如Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977) 和Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), and Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) 和MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) 描述的区域。可变域的CDR的氨基酸最初由Kabat根据序列可变性定义为对于抗体的氨基酸残基使用Kabat的编号系统由人重链可变域(VH)中的氨基酸残基31-35B(H1),50-65(H2)和95-102(H3)和人轻链可变域(VL)中的氨基酸残基24-34(L1),50-56(L2)和89-97(L3)组成。参见Kabat et al., sequences of proteins of immunological interest, US Dept. Health and Human Services, NIH, USA (5th ed. 1991)。Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) 提出了基于包含在可变域区域的三维结构环中的残基的CDR的另一种定义,发现所述残基在

抗原结合活性中是重要的。Chothia等将CDR定义为由人重链可变区(VH)中的氨基酸残基26-32(H1),52-56(H2)和95-102(H3)以及人轻链可变区(VL)中的氨基酸残基24-34(L1),50-56(L2)和89-97(L3)组成。结合Kabat和Chothia的CDR定义,CDR由基于Kabat的编号系统的人VH中的氨基酸残基26-35B(H1),50-65(H2)和95-102(H3)和人VL中的氨基酸残基24-34(L1),50-56(L2)和89-97(L3)的组成。

[0107] 在一些实施方案中,当用于提及抗体或其重链或轻链时,“可变区”意指抗体的氨基末端部分,其赋予抗原结合到分子上并且不是恒定区。该术语旨在包括其功能片段,其保持整个可变区的所有结合功能中的一些。因此,术语“异聚体可变区结合片段”意指组装成异聚体复合物的至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区或其功能片段。异聚体可变区结合片段包括例如功能片段,例如Fab,F(ab)2,Fv,单链Fv(scfv)等。此类功能片段是本领域技术人员公知的。因此,这些术语在描述异聚体可变区的功能片段中的用途旨在对应于本领域技术人员公知的定义。这些术语记载于例如Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers, R.A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.); Huston et al., *Cell Biophysics*, 22:189-224 (1993); Plückthun and Skerra, *Meth. Enzymol.*, 178:497-515 (1989) 和 Day, E.D., *Advanced Immunochemistry*, 第二版, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. (1990)。

[0108] 在一个实施方案中,本发明的多肽是分离的多肽的同种型。在一个实施方案中,“同种型”是指分子(例如本发明的蛋白质或多肽)的形式,其与相同蛋白质或多肽的另一种同种型仅有轻微差异。在一个实施方案中,同种型由不同但相关的基因产生,或在另一个实施方案中,通过可变剪接源自同一基因。在另一个实施方案中,同种型由单核酸多态性引起。

[0109] 在一个实施方案中,本发明的分离的多肽是天然蛋白质的片段。在一个实施方案中,“片段”是指比全长蛋白质或多肽更短或包含更少氨基酸的蛋白质或多肽。在另一个实施方案中,片段是指核酸比全长核酸更短或包含更少核酸的核酸。在另一个实施方案中,片段是N末端片段。在另一个实施方案中,片段是C末端片段。在一个实施方案中,本发明的片段是蛋白质,肽或核酸的序列内部分。在另一个实施方案中,片段是蛋白质,肽或核酸的功能性序列内部分。在另一个实施方案中,片段是蛋白质,肽或核酸内的功能性序列内部分。在另一个实施方案中,片段是N末端功能片段。在一个实施方案中,片段是C末端功能片段。

[0110] 在一个实施方案中,术语“功能片段”是指与野生型相比保持一定程度的生物活性的片段,尽管它是天然或野生型抗体或多肽的修饰形式。与野生型相比,这种活性程度的范围可以为中等到高,其中“活性”是指其天然生物物理或生物化学特征例如结合能力,亲和力,半衰期等。

[0111] 在一个实施方案中,本发明的分离的多肽包含本发明多肽的衍生物。在一些实施方案中,“衍生物”应理解为指小于所讨论的蛋白质的天然序列的全长部分。在一些实施方案中,“衍生物”可以进一步包含(在其末端和/或在所述序列本身内)非天然序列,即不形成所讨论的天然蛋白质的一部分的序列。术语“衍生物”在其范围内还包括通过将化学基团与天然蛋白质或其片段的氨基残基侧链缀合而产生的分子种类,其中所述化学基团不形成所述天然蛋白质中存在的天然存在的氨基酸残基的一部分。

[0112] 制备抗体和抗体片段的方法是本领域已知的。(参见例如Harlow and Lane, *Antibodies:A Laboratory Manual*,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,1988,通过引用并入本文)。

[0113] 可以通过用靶抗原如PSMA或含有本发明的抗-PSMA表位的PSMA的肽片段免疫各种动物(包括小鼠,大鼠,兔,山羊,灵长类动物,人和鸡)来产生抗体。在一个实施方案中,在免疫动物之前纯化抗体或抗原结合片段。在一个实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段可以通过本领域已知的方法纯化,例如凝胶过滤,离子交换,亲和层析等。亲和层析或本领域已知的许多其他技术中的任何一种可用于从血清,腹水或杂交瘤上清液中分离多克隆或单克隆抗体。

[0114] “纯化的”是指将单克隆抗体与通常与单克隆抗体相关的至少一些蛋白质分离,并且优选与除蛋白质之外的所有细胞材料分离。

[0115] 本发明还提供了本发明抗体的化学修饰衍生物,其可提供额外的优点,例如增加的溶解度,稳定性和多肽的体内或体外循环时间,或降低的免疫原性(参见美国专利No.4,179,337)。用于衍生化的化学部分可选自水溶性聚合物,例如聚乙二醇,乙二醇/丙二醇共聚物,羧甲基纤维素,葡聚糖,聚乙烯醇等。抗体可以在分子内的随机位置或分子内的预定位置进行修饰,并且可以包括一个,两个,三个或更多个连接的化学部分。

[0116] 聚合物可以是任何分子量,并且可以是支链或非支链的。对于聚乙二醇,优选的分子量为约1kDa至约100kDa(术语“约”表示在聚乙二醇的制备中,一些分子将比所述分子量更重,略小)以便于处理和制造。可以使用其他尺寸,这取决于期望的治疗概况(例如,期望的持续释放的持续时间,对生物活性的影响(若有的话),处理的容易性,抗原性的程度或缺乏以及聚乙二醇对治疗性蛋白质或类似物的其他已知效果)。例如,聚乙二醇可具有约200,500,1000,1500,2000,2560,3000,3500,4000,4500,5000,5500,6000,6500,7000,7500,8000,8500,9000,9500,10,000,10,500,11,000,11,500,12,000,12,500,13,000,13,500,14,000,14,500,15,000,15,500,16,000,16,500,17,000,17,500,18,000,18,500,19,000,19,500,20,000,25,000,30,000,35,000,40,000,50,000,55,000,60,000,65,000,70,000,75,000,80,000,85,000,90,000,95,000,或100,000kDa的平均分子量。

[0117] 如上所述,聚乙二醇可具有分支结构。分支聚乙二醇描述于例如美国专利No.4,522,517,美国专利No.美国专利No.5,643,575;Morpurgo et al.,Appl.Biochem.Biotechnol.56:59-72(1996);Vorobjev et al.,Nucleosides Nucleic acids 18:2745-2750(1999);和Caliceti et al.,Bioconjug.Chem.10:638-646(1999),其各自的公开内容通过引用并入本文。

[0118] 考虑到对抗体的功能或抗原域的影响,聚乙二醇分子(或其他化学部分)应连接到抗体上。本领域技术人员可以使用许多连接方法,例如EP 0 401 384,其通过引用并入本文(将PEG偶联至G-CSF),还参见Malik et al.,Exp.Hematol.20:1028-1035(1992)(报道使用三氟乙烷磺酰氯(tresyl chloride))的GM-CSF聚乙二醇化)。例如,聚乙二醇可以通过氨基酸残基通过反应性基团,例如游离氨基或羧基共价结合。反应性基团是可以与活化的聚乙二醇分子结合的那些。具有游离氨基的氨基酸残基可包括例如赖氨酸残基和N末端氨基酸残基;具有游离羧基的氨基酸残基可包括天冬氨酸残基,谷氨酸残基和C-末端氨基酸残基。巯基也可用作连接聚乙二醇分子的反应基团。优先用于治疗目的是在氨基处连接,例如在N

末端或赖氨酸基团处的连接。

[0119] 如上文提出,聚乙二醇可以通过与许多氨基酸残基中的任何一个连接而与蛋白质(例如抗体)连接。例如,聚乙二醇可通过与赖氨酸,组氨酸,天冬氨酸,谷氨酸或半胱氨酸残基的共价键与蛋白质连接。可以使用一种或多种反应化学物质将聚乙二醇连接到蛋白质的特定氨基酸残基(例如,赖氨酸,组氨酸,天冬氨酸,谷氨酸或半胱氨酸)或蛋白质的超过一种类型的氨基酸残基(例如,赖氨酸,组氨酸,天冬氨酸,谷氨酸,半胱氨酸及其组合)。

[0120] 核酸

[0121] 在一个实施方案中,本发明提供了多核酸,其包含编码本发明抗体的核酸序列或者由编码本发明抗体的核酸序列组成(包括包含抗体片段或其变体的分子,或者由抗体片段或其变体组成的分子)。本发明还包括在高严格性下,或者在中间或更低严格性杂交条件(例如,如上所定义)下与具有编码本发明抗体或其片段或变体的多核酸序列的核酸互补的多核酸杂交的多核酸。

[0122] 在另一个实施方案中,获得多核酸,并通过本领域已知的任何方法测定多核酸的核酸序列。或者,从合适来源的核酸产生编码抗体(包括包含抗体片段或其变体的分子,或者由抗体片段或其变体组成的分子)的多核酸。若不能获得含有编码特定抗体的核酸的克隆,但抗体分子的序列是已知的,则编码免疫球蛋白的核酸可以在特定物种的天然或优化的密码子中化学合成或从合适的来源获得(例如,抗体cDNA文库,或从表达抗体的任何组织或细胞产生的cDNA文库,或者从表达抗体的任何组织或细胞分离的核酸,优选多聚A+RNA,诸如选择为表达本发明的抗体的杂交瘤细胞),其通过使用可与序列的3'和5'末端杂交的合成引物的PCR扩增来进行,或者通过使用对特定基因序列特异的寡核酸探针的克隆以鉴定例如来自编码抗体的cDNA文库的cDNA克隆来进行。然后可以使用本领域公知的任何方法将通过PCR产生的扩增核酸克隆到可复制的克隆载体中。

[0123] 在一些实施方案中,术语“核酸”是指多核酸或寡核酸,例如脱氧核糖核酸(DNA),并且在适当情况下,是指核糖核酸(RNA)或其模拟物。该术语还应理解为包括由核酸类似物制备的RNA或DNA的类似物作为等同物,并且如适用于所述实施方案,包括单(有义或反义)和双链多核酸。该术语包括由天然存在的核碱基,糖和共价核苷间(骨架)连接组成的寡核酸以及具有相似发挥功能的非天然存在部分的寡核酸。此类修饰或取代的寡核酸由于期望的性质,例如增强的细胞摄取,对核酸靶物的增强的亲和力和在核酸酶存在下增加的稳定性而通常优于天然形式。

[0124] 如本领域技术人员所理解的,编码蛋白质或肽的核酸序列或基因的片段或衍生物仍然可以与整个野生型基因或序列相同的方式起作用。同样地,与野生型序列相比,核酸序列的形式可以具有变异,然而编码保留表现出相同生物学效应的野生型功能的蛋白质或肽或其片段,尽管有这些变异。这些中的每一个代表本发明的单独实施方案。

[0125] 本发明的核酸可以通过本领域公知的任何合成或重组方法生产。可以通过本领域已知的技术进一步修饰根据本发明的核酸以改变生物物理或生物学特性。例如,可以修饰核酸以增加其对核酸酶的稳定性(例如,“封端”),或通过密码子优化提高表达水平,或改变其对互补序列的亲脂性,溶解度或结合亲和力。

[0126] 用于实现特定目的的修饰核酸的方法在本领域中公开于例如Sambrook等(1989)。此外,本发明的核酸序列可包括不编码目的蛋白质的核酸序列的一个或多个部分。本发明

进一步提供了DNA序列,其编码与本文所述序列编码的蛋白质类似的蛋白质,但由于遗传密码的简并性或等位变异而在密码子序列方面不同(物种群体中天然存在的碱基变化,其可以导致或可以不导致氨基酸改变),所述等位变异也可以编码本文所述的本发明的蛋白质。本发明也包括由点突变或通过诱导修饰(包括插入,缺失和取代)引起的DNA序列的变化以增强由其编码的多肽的活性,半衰期或产生。

[0127] 编码本文提供的抗体或抗原结合片段的DNA易于使用常规方法分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核酸探针)。分离后,可将DNA置于表达载体中,然后将其转染到在其它情况下不会产生免疫球蛋白的宿主细胞,如大肠杆菌细胞,猿COS细胞,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,酵母细胞或骨髓瘤细胞中以获得重组宿主细胞中抗体的合成。下面更详细地描述抗体的重组产生。

[0128] 在一个实施方案中,组合物包含核酸分子,其编码包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的scFv gy1。在一个实施方案中,组合物含有包含SEQ ID NO:2的核酸分子。

[0129] 在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链。例如,在一个实施方案中,编码轻链的核酸序列包含SEQ ID NO:4的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL FR1。例如,在一个实施方案中,编码VL FR1的核酸序列包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL CDR1。例如,在一个实施方案中,编码VL CDR1的核酸序列包含SEQ ID NO:8。在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL FR2。例如,在一个实施方案中,编码VL FR2的核酸序列包含SEQ ID NO:10。在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL CDR2。例如,在一个实施方案中,编码VL CDR2的核酸序列包含SEQ ID NO:12。在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VL FR3。例如,在一个实施方案中,编码VL FR3的核酸序列包含SEQ ID NO:14。在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR3。例如,在一个实施方案中,编码VL CDR3的核酸序列包含SEQ ID NO:16。核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL FR4。例如,在一个实施方案中,编码VL FR4的核酸序列包含SEQ ID NO:18。

[0130] 在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链。例如,在一个实施方案中,编码重链的核酸序列包含SEQ ID NO:20的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VH FR1。例如,在一个实施方案中,编码VH FR1的核酸序列包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VH CDR1。例如,在一个实施方案中,编码VH CDR1的核酸序列包含SEQ ID NO:24的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR2。例如,在一个实施方案中,编码VH FR2的核酸序列包含SEQ ID NO:26的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR2。例如,在一个实施方案中,编码VH CDR2的核酸序列包含SEQ ID NO:28的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH FR3。例如,在一个实施方案中,编码VH FR3的核酸序列包含SEQ ID NO:30的核苷酸序

列。在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3。例如,在一个实施方案中,编码VH CDR3的核酸序列包含SEQ ID NO:32的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核酸序列,其编码包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH FR4。例如,在一个实施方案中,编码VH FR4的核酸序列包含SEQ ID NO:34的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含编码scFv接头的核酸序列,所述scFv接头包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。例如,在一个实施方案中,编码scFv接头的核酸序列包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。

[0131] 例如,在一个实施方案中,核酸分子编码gy1。在一个实施方案中,核酸分子编码gy1,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。例如,在一个实施方案中,编码gy1的核酸序列包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列。在一个实施方案中,编码gy1的核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链的核苷酸序列和编码包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链的核苷酸序列。例如,在一个实施方案中,编码轻链的核苷酸序列包含包含SEQ ID NO:4的核苷酸序列,并且编码重链的核苷酸序列包含SEQ ID NO:20的核苷酸序列。

[0132] 在一个实施方案中,编码gy1的核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL FR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL CDR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL FR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL CDR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VL FR3的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR3的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL FR4的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VH FR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VH CDR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH FR3的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH FR4的核苷酸序列;和编码包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的scFv接头的核苷酸序列。

[0133] 例如,在一个实施方案中,编码VL FR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列;编码VL CDR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列;编码VL FR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:10的核苷酸序列;编码VL CDR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列;编码VL FR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:14的核苷酸序列;编码VL CDR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列;编码VL FR4的核苷酸序列包含SEQ ID NO:18的核苷酸序列;编码VH FR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列;编码VH CDR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:24的核苷酸序列;编码VH FR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:26的核苷酸序列;编码VH CDR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:28的核苷酸序列;编码VH FR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:30的核苷酸序列;编码VH CDR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:32的核苷酸序列;编码VH FR4的核苷酸序列包含SEQ ID NO:34的核苷酸序列;并且编码scFv接头的核苷酸序列包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。

[0134] 在一个实施方案中,核酸分子编码包含一个或多个突变的抗体或抗体片段。例如,在一个实施方案中,核酸分子包含核苷酸序列,所述核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VL FR2,其中SEQ ID NO:39包含相对于SEQ ID NO:11的V→A点突变。例如,在

一个实施方案中,编码突变体VL FR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:38的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核苷酸序列,所述核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VL CDR2,其中SEQ ID NO:41包含相对于SEQ ID NO:13的G→E点突变。例如,在一个实施方案中,编码突变体VL CDR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核苷酸序列,所述核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VL FR4,其中SEQ ID NO:43包含相对于SEQ ID NO:19的V→A点突变。例如,在一个实施方案中,编码突变体VL FR4的核苷酸序列包含SEQ ID NO:42的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核苷酸序列,所述核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:45氨基酸序列的VH CDR1,其中SEQ ID NO:45包含相对于SEQ ID NO:25的S→F点突变。例如,在一个实施方案中,编码突变体VH CDR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:44的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核苷酸序列,所述核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:47氨基酸序列的VH FR3,其中SEQ ID NO:47包含相对于SEQ ID NO:31的I→V点突变。例如,在一个实施方案中,编码突变体FR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:46的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核苷酸序列,所述核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:49氨基酸序列的VH CDR3,其中SEQ ID NO:49包含相对于SEQ ID NO:33的D→G点突变。例如,在一个实施方案中,编码突变体VH CDR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:48的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含核苷酸序列,所述核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:51氨基酸序列的VH FR4,其中SEQ ID NO:51包含相对于SEQ ID NO:35的G→E点突变。例如,在一个实施方案中,编码突变体VH FR4的核苷酸序列包含SEQ ID NO:50的核苷酸序列。

[0135] 例如,在一个实施方案中,组合物包含编码抗体片段的核酸分子,所述抗体片段包含本文中称为gy1-st的scFv。在一个实施方案中,编码gy1-st的核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VL FR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR1的核苷酸序列,和编码包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH FR4的核苷酸序列。在一个实施方案中,编码gy1-st的核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL FR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL CDR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VL FR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL CDR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VL FR3的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR3的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL FR4的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VH FR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH FR3的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH FR4的核苷酸序列;和编码包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的scFv接头的核苷酸序列。在一个实施方案中,编码VL FR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列;编码VL CDR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列;编码VL FR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:38的核苷酸序列;编码VL CDR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列;编码VLFR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:14的核苷酸序列;编码VL CDR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列;编码VL FR4的核苷酸序列包含SEQ ID NO:18的核苷酸序列;编码

VH FR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列;编码VH CDR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:44的核苷酸序列;编码VH FR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:26的核苷酸序列;编码VH CDR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:28的核苷酸序列;编码VH FR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:30的核苷酸序列;编码VH CDR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:32的核苷酸序列;编码VH FR4的核苷酸序列包含SEQ ID NO:50的核苷酸序列;并且编码scFv接头的核苷酸序列包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。

[0136] 例如,在一个实施方案中,组合物包含编码抗体片段的核酸分子,所述抗体片段包含本文中称为gy1-2的scFv。在一个实施方案中,编码gy1-2的核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VL CDR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VL FR4的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR1的核苷酸序列,和编码包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH FR3的核苷酸序列。在一个实施方案中,编码gy1-2的核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL FR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL CDR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL FR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VL CDR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VL FR3的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR3的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VL FR4的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VH FR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH FR3的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH FR4的核苷酸序列;和编码包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的scFv接头的核苷酸序列。在一个实施方案中,编码VL FR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列;编码VL CDR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列;编码VL FR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:10的核苷酸序列;编码VL CDR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列;编码VL FR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:14的核苷酸序列;编码VL CDR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列;编码VL FR4的核苷酸序列包含SEQ ID NO:42的核苷酸序列;编码VH FR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列;编码VH CDR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:44的核苷酸序列;编码VH FR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:26的核苷酸序列;编码VH CDR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:28的核苷酸序列;编码VH FR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:46的核苷酸序列;编码VH CDR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:32的核苷酸序列;编码VH FR4的核苷酸序列包含SEQ ID NO:34的核苷酸序列;并且编码scFv接头的核苷酸序列包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。

[0137] 例如,在一个实施方案中,组合物包含编码抗体片段的核酸分子,所述抗体片段包含本文中称为gy1-3的scFv。在一个实施方案中,编码gy1-3的核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR1的核苷酸序列和编码包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR3的核苷酸序列。在一个实施方案中,gy1包含编码包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL FR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL CDR1的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL FR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL CDR2的核苷酸序列;编码包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VL FR3的核苷酸序

列；编码包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR3的核苷酸序列；编码包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL FR4的核苷酸序列；编码包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VH FR1的核苷酸序列；编码包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VH CDR1的核苷酸序列；编码包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH FR2的核苷酸序列；编码包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR2的核苷酸序列；编码包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH FR3的核苷酸序列；编码包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH CDR3的核苷酸序列；编码包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH FR4的核苷酸序列；和编码包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的scFv接头的核苷酸序列。在一个实施方案中，编码VL FR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列；编码VL CDR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列；编码VL FR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:10的核苷酸序列；编码VL CDR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列；编码VL FR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:14的核苷酸序列；编码VL CDR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列；编码VL FR4的核苷酸序列包含SEQ ID NO:18的核苷酸序列；编码VH FR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列；编码VH CDR1的核苷酸序列包含SEQ ID NO:44的核苷酸序列；编码VH FR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:26的核苷酸序列；编码VH CDR2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:28的核苷酸序列；编码VH FR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:30的核苷酸序列；编码VH CDR3的核苷酸序列包含SEQ ID NO:48的核苷酸序列；编码VH FR4的核苷酸序列包含SEQ ID NO:34的核苷酸序列；并且编码scFv接头的核苷酸序列包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。

[0138] 在一个实施方案中，组合物包含编码PSMAb的核酸分子。在一个实施方案中，核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的重链的核苷酸序列。在一个实施方案中，核酸分子包含编码具有信号肽的重链的核苷酸序列，其中具有信号肽的重链包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列。在一个实施方案中，核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的重链信号肽的核苷酸序列。在一个实施方案中，核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的重链可变区的核苷酸序列。在一个实施方案中，核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:59的重链恒定区的核苷酸序列。在一个实施方案中，核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的轻链的核苷酸序列。在一个实施方案中，核酸分子包含编码具有信号肽的轻链的核苷酸序列，其中具有信号肽的轻链包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。在一个实施方案中，核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的轻链信号肽的核苷酸序列。在一个实施方案中，核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的轻链可变区的核苷酸序列。在一个实施方案中，核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:67的轻链恒定区的核苷酸序列。在一个实施方案中，编码具有信号肽的重链的核苷酸序列包含SEQ ID NO:52的核苷酸序列。在一个实施方案中，编码重链信号肽的核苷酸序列包含SEQ ID NO:54的核苷酸序列。在一个实施方案中，编码重链可变区的核苷酸序列包含SEQ ID NO:56的核苷酸序列。在一个实施方案中，编码重链恒定区的核苷酸序列包含SEQ ID NO:58的核苷酸序列。在一个实施方案中，编码具有信号肽的轻链的核苷酸序列包含SEQ ID NO:60的核苷酸序列。在一个实施方案中，编码轻链信号肽的核苷酸序列包含SEQ ID NO:62的核苷酸序列。在一个实施方案中，编码轻链可变区的核苷酸序列包含SEQ ID NO:64的核苷酸序列。在一个实施方案中，编码轻链恒定区的核苷酸序列包含SEQ ID NO:66的核苷酸序列。

[0139] 本发明包括核酸分子，其包含与本文所述的一种或多种核苷酸序列具有同源性的

核苷酸序列。例如,在某些实施方案中,核酸分子包含与本文所述的核苷酸序列具有70%或更多,75%或更多,80%或更多,82%或更多,85%或更多,87%或更多,90%或更多,91%或更多,92%或更多,93%或更多,94%或更多,95%或更多,96%或更多,97%或更多,98%或更多,99%或更多,或99.5%或更多同源性的核苷酸序列。

[0140] 本发明还提供了使用各种蛋白质表达系统表达或产生抗PSMA抗体或抗体片段的重组蛋白质的方法。

[0141] 在一个实施方案中,本发明还提供了转化细胞及其后代,其中已经通过体外,离体或体内重组DNA技术引入了编码抗体或抗原结合片段的核酸分子。转化的真核或原核细胞可用于产生重组抗体或抗体片段以进行纯化,或原位或分泌表达,用于各种目的,例如肿瘤的诊断或治疗。可以繁殖转化的细胞并将导入的核酸转录或将编码的蛋白质表达。应当理解,后代细胞可能与亲本细胞不同,因为在复制过程中可能存在突变。转化细胞包括但不限于原核和真核细胞,例如细菌,真菌,植物,昆虫和动物(例如哺乳动物,包括人)细胞。细胞可以离体存在于培养物,细胞,组织或器官中或存在于受试者中。

[0142] 通常,细胞转化使用载体。术语“载体”是指例如质粒,病毒,例如病毒载体,或可通过插入或掺入核酸来操纵以用于遗传操作(即,“克隆载体”),或可用于转录或翻译插入的多核酸(即“表达载体”)的本领域已知的其它媒介物。此类载体可用于引入核酸,包括与表达控制元件可操作地连接的编码抗体的核酸,以及在体外(例如,在溶液中或在固相中),在细胞或体内表达编码的蛋白质。

[0143] 在一个实施方案中,通过常规技术将表达载体转移至宿主细胞,然后通过常规技术培养转染的细胞以产生本发明的抗体或抗原结合片段。因此,本发明包括含有与异源启动子可操作连接的编码本发明抗体(例如,完整抗体,其重链或轻链,或其部分,或单链抗体,或其片段或变体)的多核酸的宿主细胞。在其他实施方案中,为了表达完整的抗体分子,编码重链和轻链两者的载体在宿主细胞中共表达以表达整个免疫球蛋白分子。

[0144] 多种宿主表达载体系统可用于表达本发明的抗体分子。此类宿主表达系统代表可以产生并随后纯化目的编码序列的载体,但也代表当用合适的核酸编码序列转化或转染时,原位表达本发明的抗体分子的细胞。这些包括但不限于经工程化改造以表达抗体片段或其变体(单链抗体)的噬菌体颗粒,用重组噬菌体DNA,质粒DNA或粘粒转化的微生物如细菌(例如大肠杆菌,枯草芽孢杆菌),含有抗体编码序列的DNA表达载体;用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,酵母属,毕赤酵母属);用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统;或哺乳动物细胞系统(例如COS,CHO,BHK,293,3T3,NS0细胞),其包含含有源自哺乳动物细胞基因组(例如金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子;CMV启动子或EF1 $\alpha$ 启动子)的启动子的重组表达构建体。优选地,细菌细胞如大肠杆菌,更优选真核细胞(尤其是用于表达完整重组抗体分子)可用于表达重组抗体分子。例如,哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢细胞(CHO),与诸如来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件的载体一起是抗体的有效表达系统(Foecking et al., Gene 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990); B ebbington et al., Bio/Techniques 10:169 (1992); Keen and Hale, Cytotechnology 18:

207 (1996)。这些参考文献通过引用整体并入本文。

[0145] 用于转化细胞或宿主表达载体的载体通常至少含有用于在细胞中繁殖的复制起点。包括存在于载体内的控制元件,包括本文所述的表达控制元件,以促进转录和翻译。术语“表达控制元件”旨在至少包括其存在可影响表达的一种或多种组分,并且可包括与启动子或增强子不同或除启动子或增强子之外的组分,例如前导物序列和融合配偶体序列,内部核糖体结合位点(IRES)元件,用于产生多基因或多顺反子信息,内含子的剪接信号,维持基因的正确阅读框架以允许mRNA的框内翻译,多腺苷酸化信号以提供目的基因的转录物的适当多腺苷酸化,终止密码子等。

[0146] 载体可包括选择标志物。如本领域所知,“选择标志物”是指允许选择含有基因的细胞的基因。“阳性选择”是指只有含有选择标志物的细胞在暴露于阳性选择后才能存活的过程。耐药性是阳性选择标志物的一个实例;含有标志物的细胞将在含有选择药物的培养基中存活,并且不含标志物的细胞将死亡。这些标记物包括耐药基因,例如neo,其赋予对G418的抗性,hygr,其赋予对潮霉素的抗性,或puro,其赋予对嘌呤霉素的抗性等。其他阳性选择标志物基因包括允许鉴定或筛选含有标志物的细胞的基因。这些基因包括荧光蛋白(GFP),lacZ基因,碱性磷酸酶基因和表面标志物如CD8等基因。

[0147] 载体可含有阴性选择标志物。“阴性选择”是指在暴露于合适的阴性选择剂时杀死含有阴性选择标志物的细胞的过程。例如,含有单纯疱疹病毒-胸昔激酶(HSV-tk)基因的细胞(Wigler et al., Cell 11:223 (1977))对药物丙氧鸟苷(gancyclovir,GANC)敏感。类似地,gpt基因使细胞对6-硫代黄嘌呤敏感。

[0148] 哺乳动物表达系统还包括专门设计用于体内和离体表达的载体。此类系统包括腺相关病毒(AAV)载体(美国专利No.5,604,090)。先前已显示AAV载体在人和小鼠中以足以获得治疗益处的水平提供因子IX的表达(Kay et al., Nat. Genet. 24:257 (2000); Nakai et al., Blood 91:4600 (1998))。腺病毒载体(美国专利No.5,700,470,5,731,172和5,928,944),单纯疱疹病毒载体(美国专利No.5,501,979)和逆转录病毒载体(例如慢病毒载体可用于感染分裂以及非分裂细胞和泡沫病毒)载体(美国专利No.5,624,820,5,693,508,5,665,577,6,013,516和5,674,703和WIPO公开文本W092/05266和W092/14829)和乳头瘤病毒载体(例如人和牛乳头瘤病毒)均已用于基因治疗(美国专利No.5,719,054)。载体还包括基于巨细胞病毒(CMV)的载体(美国专利No.5,561,063)。已经开发并且也可以使用有效递送基因至肠道细胞的载体(参见例如美国专利No.5,821,235,5,786,340和6,110,456)。在酵母中例如通过同源重组促进外源核酸序列整合到染色体中的载体是本领域已知的并且可以使用。当插入的核酸对于更常规的载体(例如,大于约12kb)而言太大时,通常使用酵母人工染色体(YAC)。

[0149] 在一个实施方案中,用于本发明的噬菌粒载体包括本领域适用于产生本发明的抗体/抗体模板/FR文库的任何物质,包括噬菌粒载体pCB04,pIT1,pIT2,CANTAB 6,pComb 3 HS。丝状载体和噬菌粒构建方法描述于例如美国专利No.6,054,312和美国专利No.6,803,230,各自通过引用并入本文。涉及称为细胞质噬菌体或裂解噬菌体的非丝状噬菌体载体的噬菌体展示系统也可以如例如美国专利No.5,766,905(通过引用并入本文)中所述进行利用。

[0150] 适用于本发明的细菌表达构建体包括但不限于pCAL,pUC,pET,pETBlue<sup>TM</sup>

(Novagen), pBAD, pLEX, pTrcHis2, pSE280, pSE380, pSE420 (Invitrogen), pKK223-2 (Clontech), pTrc99A, pKK223-3, pRIT2T, pMC1871, pEZ 18 (Pharmacia), pBluescript II SK (Stratagene), pALTER-Ex1, pALTER-Ex2, pGEMEX (Promega), pFivE (MBI), pQE (Qiagen)商品化表达构建体及其衍生物和本领域已知的其他构建体。在本发明的一些实施方案中,构建体还可以包括病毒,质粒,杆粒,噬菌粒,粘粒或噬菌体。

[0151] 使用脂质体将各种组合物引入细胞(包括核酸)是本领域技术人员已知的(参见例如美国专利No.4,844,904,5,000,959,4,863,740和4,975,282)。包括天然聚合物或天然聚合物的衍生物或水解产物的载体(描述于WO 94/20078和美国专利No.6,096,291)适用于分子,例如多肽和多核酸的粘膜递送。用于基因治疗的基于哌嗪的两亲阳离子脂质也是已知的(参见例如美国专利No.5,861,397)。阳离子脂质体系也是已知的(参见例如美国专利No.5,459,127)。因此,包括体外,体内和离体递送到细胞或组织中的病毒和非病毒载体手段。

[0152] 在一个实施方案中,核酸序列可以“可操作地连接”,即定位,以确保表达控制序列的功能发挥。这些表达构建体通常可以作为附加体或作为细胞染色体DNA的整合部分在细胞中复制,并且可以含有用于表达的各个原核菌株的适当复制起点。通常,表达构建体含有选择标志物,例如四环素抗性,氨苄青霉素抗性,卡那霉素抗性或氯霉素抗性,促进检测和/或选择用期望核酸序列转化的那些细菌细胞(参见例如美国专利No.4,704,362)。然而,这些标志物不是排他性的,并且可以使用许多其他标志物,如本领域技术人员已知的。在本发明的另一个实施方案中,表达构建体含有阳性和阴性选择标志物。

[0153] 类似地,报告基因可以掺入表达构建体中以促进转录产物的鉴定。因此,在本发明的一个实施方案中,所用的报告基因选自 $\beta$ -半乳糖苷酶,氯霉素乙酰转移酶,萤光素酶和荧光蛋白。

[0154] 原核启动子序列调节编码的多核酸序列的表达,并且在本发明的一些实施方案中,可操作地连接到编码本发明多肽的多核酸。在本发明的另外的实施方案中,这些启动子是组成型或诱导型的,并且提供本发明多肽的高水平和低水平表达的手段,并且在一些实施方案中,提供本发明的多种多肽的调节表达,所述多种多肽在一些实施方案中表达为融合蛋白。

[0155] 也可以使用许多公知的细菌启动子,包括T7启动子系统,乳糖启动子系统,色氨酸(Trp)启动子系统,Trc/Tac启动子系统, $\beta$ -内酰胺酶启动子系统,tetA启动子系统,阿拉伯糖调节启动子系统,噬菌体T5启动子,或者来自噬菌体 $\lambda$ 的启动子系统等,并且包括本发明的实施方案。启动子通常将控制表达,任选地在操纵基因序列的情况下,并且可以包括例如核糖体结合位点序列,用于启动和完成转录和翻译。根据另外的实施方案,载体还可以含有表达控制序列,可以调节启动子转录活性的增强子,适当的限制性位点以促进克隆与启动子相邻的插入物和其他必需的信息处理位点,例如RNA剪接位点,多腺苷酸化位点和转录终止序列以及可以促进插入的核酸表达的任何其他序列。

[0156] 在另一个实施方案中,本发明包括在治疗,抑制或预防中使用如本文所述的多核酸,载体,抗体和/或其片段和/或包含它们的组合物的方法。

[0157] 检测PSMA

[0158] 本领域技术人员应理解,本文提供的抗体,抗原结合片段或组合物可用于诊断或

治疗过程。

[0159] 在一个实施方案中,本文提供了诊断受试者中肿瘤或癌症生长的存在的方法。在另一个实施方案中,该方法包括用包含本文提供的抗体或抗原结合片段的组合物对从受试者分离的组织样品取样,由此所述抗体或抗原结合片段与组织样品的特异性结合表明存在受试者中的肿瘤或癌症生长。在另一个实施方案中,该方法还包括检测特异性结合抗体或抗原结合片段但不拮抗抗体或抗原结合片段与其靶物结合的第二试剂。在另一个实施方案中,“第二试剂”是可光活化的试剂,荧光团,放射性同位素,生物发光蛋白,生物发光肽,荧光标签,荧光蛋白或荧光肽。

[0160] 在一个实施方案中,术语“癌症”和“癌性”在一个实施方案中是指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于癌,淋巴瘤,母细胞瘤,肉瘤(包括脂肪肉瘤),神经内分泌肿瘤,间皮瘤,许旺细胞瘤,脑膜瘤,腺癌,黑素瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。

[0161] 在一个实施方案中,术语“癌症”包括但不限于卵巢癌,乳腺癌,成胶质细胞瘤,胃肠癌。在另一个实施方案中,癌症是前列腺癌。

[0162] 在另一个实施方案中,“取样”包括使用检测测定法测试或分析样品的步骤,所述检测测定法能够检测与抗体或抗原结合片段复合或缀合,并且当抗体或抗原结合片段与靶物特异性结合时发出可检测“信号”的第二试剂。在另一个实施方案中,使用本领域常规使用的测定法实现检测,例如但不限于免疫学测定(例如,免疫组织化学,ELISA等)或显微镜成像。

[0163] 在一个实施方案中,术语“标记的”是指为了在筛选中实现检测而具有连接的一个或多个元件,同位素或化学化合物的本发明的抗体。一般而言,标记物分为三类:a)免疫标记物,其可以是作为抗体识别的融合配偶掺入的表位,b)同位素标记物,其可以是放射性或重同位素,和c)小分子标记物,其可以包括荧光和量热染料,或生物素等分子,其能够实现其他标记方法。在一个实施方案中,用生物素标记本发明的抗体。在其他相关的实施方案中,本发明的生物素化的抗体可以用作例如成像剂或鉴定一种或多种配体分子的手段。在另一个实施方案中,标记物可以是纳米颗粒,其一旦与抗体或抗原结合片段结合就可以被检测或可视化。标记物可以在任何位置掺入化合物中,并且可以在蛋白质表达期间体外或体内掺入。

[0164] 在一个实施方案中,由本文提供的抗体或抗原结合片段和第二试剂形成的缀合物可用于各种应用,例如但不限于流式细胞术,ELISA,Western印迹法,免疫组织化学,膜测定和诊断和治疗方法,如本文进一步描述的或本领域常规应用的。

[0165] 具有异常PSMA表达的肿瘤的成像

[0166] 在一个实施方案中,将本发明的组合物施用于患有涉及靶抗原,蛋白质或其他分子的不适当表达的疾病的受试者。例如,在一个实施方案中,施用包含结合PSMA的抗体或抗体片段的组合物以检测受试者中PSMA的存在,丰度,位置或其组合。在本发明的范围内,这意味着包括以异常蛋白质(例如由于存在的蛋白质的量,蛋白质定位,翻译后修饰,构象状态的改变,突变体或病原体蛋白质的存在等所致)为特征的疾病和病症。类似地,疾病或病症的特征可在于改变分子,包括但不限于多糖和神经节苷脂。过多可能是由于任何原因引起的,包括但不限于分子水平的过表达,作用部位的延长或累积出现,或蛋白质相对于正常

的活性增加。该定义包括以蛋白质减少为特征的疾病和病症。此类减少可能是由于任何原因引起的,包括但不限于分子水平的表达降低,作用部位的缩短或减少的出现,蛋白质的突变形式,或蛋白质相对于正常的活性降低。可以相对于蛋白质的正常表达,出现或活性测量蛋白质的此类过多或减少,并且所述测量可以在本发明的抗体的开发和/或临床测试中起重要作用。

[0167] 在一个实施方案中,当在受试者中施用时,本发明的抗体或抗体片段结合在肿瘤细胞(例如前列腺癌细胞)上表达的抗原;在另一个实施方案中,在受试者中施用的本发明的抗体或抗体片段结合抗原实体瘤的新生血管系统上表达的抗原,所述实体瘤如具有PSMA阳性新生血管系统的肿瘤,包括但不限于肺癌,肝癌,胰腺癌,结肠癌,胃癌,乳腺癌,卵巢癌,肾癌,前列腺癌,膀胱癌,黑素瘤,胶质瘤等

[0168] 在一个实施方案中,本文提供了对含有PSMA的肿瘤进行成像的方法。在另一个实施方案中,该方法包括施用本文提供的抗体或抗原结合片段的步骤,所述抗体或抗原结合片段与第二试剂可操作地连接。在另一个实施方案中,一旦抗体或抗原结合片段结合其靶物,就可以可视化前列腺或其他类型的实体瘤。在另一个实施方案中,第二试剂是可光活化的试剂,荧光团,放射性同位素,生物发光蛋白,生物发光肽,荧光标签,荧光蛋白或荧光肽。下面提供了第二试剂的非限制性实例。

[0169] 在一个实施方案中,可检测标记或与其连接的第二试剂包括标记物,例如但不限于荧光标记物(例如,异硫氰酸荧光素(FITC),花青染料等),亲和标记物(例如,生物素),抗生物素蛋白,蛋白A等),酶标记物(例如,辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶),或同位素标记物(例如,124I)或任何其他此类可检测部分以允许检测和分离抗体。

[0170] 用于鉴定改变的可变区群体内的结合种类的检测方法可以是直接的或间接的,并且可以包括例如测量光发射,放射性同位素,量热染料和荧光染料。直接检测包括在没有中间体或第二测量程序的情况下操作以评估结合的抗原或配体的量的方法。此类方法通常使用配体,其本身由例如放射性,发光或荧光部分标记。相反,间接检测包括通过中间或第二测量程序操作的方法。这些方法通常使用与抗原或配体特异性反应的分子,并且它们本身可以通过第二试剂直接标记或检测。例如,再次使用上述用于直接检测的检测方法,可以使用能够与对配体特异的第一抗体相互作用的第二抗体检测对配体特异的抗体。间接方法可另外采用酶标记物的检测。此外,对于筛选催化抗体的具体实例,底物的消失或产物的出现可用作结合亲和力或催化活性的间接量度。

[0171] 在具体的实施方案中,本发明的抗体用近红外染料标记。例如,本发明的抗体可以用IRDye800CW或吲哚菁绿(Indocyanine Green,ICG)标记。

[0172] 在具体的实施方案中,本发明的抗体与大环螯合剂连接,所述大环螯合剂可用于将放射性金属离子(包括但不限于111In,177Lu,90Y,166Ho,153Sm,215Bi和225Ac)与多肽缀合。在一个优选的实施方案中,与连接到本发明抗体的大环螯合剂相关的放射性金属离子是111In。在另一个优选的实施方案中,与连接到本发明的抗体多肽的大环螯合剂相关的放射性金属离子是90Y。在具体的实施方案中,大环螯合剂是1,4,7,10-四氮杂环十二烷N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)。在具体的实施方案中,大环螯合剂是.quadrature.- (5-异硫氰酸根合-2-甲氧基苯基)-1,4,7,10-四氮杂-环-癸烷-1,4,7,10-四乙酸(.quadrature.- (5-isothiocyanato-2-methoxyphenyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyclodo-decane-1,4,7,10-

tetraacetic acid)。在其他具体实施方案中, DOTA通过接头分子与本发明的抗体连接。可用于将大环螯合剂如DOTA与多肽缀合的接头分子的实例是本领域公知的-参见例如 DeNardo et al., Clin Cancer Res. 4 (10) : 2483-90, 1998; Peterson et al., Bioconjug. Chem. 10 (4) : 553-7, 1999; 和 Zimmerman et al., Nucl. Med. Biol. 26 (8) : 943-50, 1999, 其通过引用完整并入本文。另外, 美国专利No. 5,652,361和5,756,065公开了可与抗体偶联的螯合剂, 以及制备和使用它们的方法, 其通过引用完整并入本文。

[0173] 治疗方法

[0174] 本发明还提供了治疗受试者中PSMA表达癌症的方法, 包括用所述抗体或抗原结合片段靶向所述肿瘤细胞的步骤。

[0175] 在某些实施方案中, 该方法包括向受试者施用包含抗体或抗体片段的组合物。在一个实施方案中, 抗体或抗体片段与生物活性剂或这些试剂的组合可操作地连接, 其中所述试剂是毒素, 放射性同位素, 纳米颗粒或生物活性肽。

[0176] 在一个实施方案中, 本发明提供了在受试者中治疗具有异常PSMA表达的实体瘤, 例如在新血管系统中具有高PSMA表达的前列腺癌或实体瘤的方法, 包括用所述抗体或抗原结合片段靶向PSMA高表达细胞的步骤。在某些实施方案中, 该方法包括向患有与高PSMA表达相关的肿瘤的受试者施用包含抗体或抗体片段的组合物。在一个实施方案中, 抗体或抗体片段与生物活性剂或这些试剂的组合可操作地连接, 其中所述试剂是毒素, 放射性同位素, 纳米颗粒或生物活性肽。这些肿瘤包括但不限于前列腺癌, 肺癌, 肝癌, 胰腺癌, 结肠癌, 胃癌, 乳腺癌, 卵巢癌, 肾癌, 前列腺癌, 膀胱癌, 黑素瘤, 神经胶质瘤等。

[0177] 在一个实施方案中, 本文提供了抑制或阻抑受试者中的肿瘤的方法。在另一个实施方案中, 该方法包括施用有效量的本发明的抗体或抗原结合片段的步骤。

[0178] 在另一个实施方案中, 本文提供了延迟受试者中实体瘤进展的方法。在另一个实施方案中, 该方法包括向受试者施用有效量的本文提供的抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方案中, 受试者对实体瘤的血管系统产生免疫应答, 从而延迟受试者中实体瘤的进展。

[0179] 在一个实施方案中, 术语“可操作地连接”是指将两种或更多种分子或序列以下述方式定位/连接, 使得确保分子和序列的正确功能或表达。

[0180] 在一个实施方案中, 术语“治疗有效量”是指为给定状况和施用方案提供治疗效果的量。在本发明中, 治疗效果是预防或抑制肿瘤生长, 浸润, 扩散, 转移或复发, 或优选减少肿瘤负荷, 或改善患者结果。

[0181] 在一个实施方案中, 术语“预防或治疗”是指以下任何一种或多种: 延迟症状的发作, 减轻症状的严重性, 降低急性发作的严重性, 减少症状的数量, 减少症状的数量, 减少疾病相关症状的发生率, 减轻症状的潜伏期, 改善症状, 减少继发症状, 减少继发感染, 延长患者存活率, 预防疾病复发, 减少复发事件的次数或频率, 增加症状发作之间的潜伏期, 增加持续进展前的时间, 加速缓解, 诱导缓解, 增加缓解, 加速恢复, 或增加替代治疗剂的效力或降低对替代治疗剂的抗性。在一个实施方案中, “治疗”是指治疗性处理和防范性或预防性措施两者, 其中目的是预防或减轻如上所述的靶定的病理状况或病症。

[0182] 在另一个实施方案中, “症状”是如上所述的疾病或病理状况的表现。

[0183] 在另一个实施方案中, 本文提供的方法还包含蛋白水解抑制剂, 药物载体, 稀释剂

和佐剂。

[0184] 在一个实施方案中,本发明的组合物包含单独的或在一些实施方案中与第二药物活性剂组合的本发明的多肽,抗体或抗原结合片段。在一个实施方案中,术语“药物活性剂”是指满足所示目的的任何药物。在一些实施方案中,本发明的药物活性剂包括但不限于化学治疗药物,放射治疗药物,血管生成抑制剂,肿瘤成像探针,免疫调节剂或任何其他肿瘤治疗和/或成像药物/试剂等。

[0185] 在另一个实施方案中,本文提供了递送生物活性剂和本发明的抗体或抗原结合片段用于治疗受试者的肿瘤的方法。在另一个实施方案中,该方法包括伴随但单独地施用生物活性剂和抗体或抗原结合片段的步骤。在另一个实施方案中,该方法包括分别施用生物活性剂和抗体或抗原结合片段的步骤。

[0186] 在一个实施方案中,本文提供的抗体或抗原结合片段本身是“生物学活性的”,意味着它们即使在修饰后也能够发挥其相应亲本抗体的生物学作用或增强作用,特别是在与靶抗原的结合,抑制配体与受体的结合中,进一步就调节而言,特别是抑制抗原介导的信号转导和预防或治疗抗原介导的疾病。当用于提及本文所述的任何生物活性剂时,术语“生物活性”还指试剂以能够导致预防,诊断或治疗效果的方式调节免疫应答的能力,如熟练技术人员理解。在一些实施方案中,用于实现该生物活性的试剂包括但不限于细胞因子,酶,趋化因子,放射性同位素,酶活性毒素,治疗性纳米颗粒或化学治疗剂,如熟练技术人员理解。

[0187] 在一个替代实施方案中,抗体多肽缀合或可操作地连接,以便在其预期目的下起作用于酶,以便使用抗体依赖性酶介导的前药治疗 (ADEPT)。ADEPT可以通过将抗体或Fc融合物与前药激活酶缀合或可操作地连接来使用,所述前药激活酶将前药(例如肽酰化疗剂)转化为活性抗癌药物。可用于ADEPT的免疫缀合物的酶组分包括能够以将其转化为其更具活性的细胞毒性形式的方式作用于前药的任何酶。本文考虑本文提供的修饰分子的其他额外修饰。例如,多肽/抗体可以与多种非蛋白质聚合物之一连接,例如聚乙二醇 (PEG),聚丙二醇,聚氧化烯,或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。

[0188] 在另一个实施方案中,本文提供的抗体/多肽与一种或多种免疫调节剂一起施用。此类试剂可以增加或减少一种或多种细胞因子的产生,上调或下调自身抗原呈递,掩蔽MHC抗原,或促进一种或多种类型免疫细胞的增殖,分化,迁移或活化状态。免疫调节剂包括但不限于:非类固醇抗炎药 (NSAID),例如阿司匹林,布洛芬,塞来昔布,双氯芬酸,依托度酸,非诺洛芬,吲哚美辛,ketorolac,奥沙普秦,萘布美酮(nabumentone),舒林酸,托麦汀(tolmentin),罗非考昔,萘普生,酮洛芬和萘丁美酮;类固醇(例如糖皮质激素,地塞米松,可的松,羟基可的松,甲泼尼龙,泼尼松,泼尼松龙,曲安奈德(trimcinolone),azulfidineicosanoids,如前列腺素,血栓烷和白三烯;以及局部类固醇,如地蒽酚,卡泊三烯,氯倍他索和他扎罗汀);细胞因子,诸如TGF $\beta$ ,IFNa,IFNb,IFNg,IL-2,IL-4,IL-10;细胞因子,趋化因子或受体拮抗剂,包括抗体,可溶性受体,和受体-Fc融合物,其针对BATF,B7,CCR2,CCR5,CD2,CD3,CD4,CD6,CD7,CD8,CD11,CD14,CD15,CD17,CD18,CD20,CD23,CD28,CD40,CD40L,CD44,CD45,CD52,CD64,CD80,CD86,CD147,CD152,补体因子(C5,D)CTLA4,eotaxin,Fas,ICAM,ICOS,IFN- $\alpha$ IFN- $\beta$ ,IFN- $\gamma$ ,IFNAR,IgE,IL-1,IL-2,IL-2R,IL-4,IL-5R,IL-6,IL-8,IL-9,IL-12,IL-13,IL-13R1,IL-15,IL-18R,IL-23,整联蛋白,LFA-1,LFA-3,MHC,选择蛋白,TGF- $\beta$ ,TNF- $\alpha$ ,TNF- $\beta$ ,TNF-R1,T-细胞受体,包括Enbrel®.(依那西普),Humira®.(阿达木单抗),

**Remicade®** (英利昔单抗), PD1抗体(**OPDIVO®** (纳武单抗), **KEYTRUDA®** (派姆单抗 (pembrolizumab)) 或PD-L1抗体 (durvalumab, MPDL3280A); 异源抗淋巴细胞球蛋白; 其他免疫调节分子, 如2-氨基-6-芳基-5取代的嘧啶, MHC结合肽和MHC片段的抗独特型抗体, 硫唑嘌呤, 布喹那, 溴隐亭, 环磷酰胺, 环孢菌素A, D-青霉胺, 脱氧精胍菌素 (deoxyspergualin), FK506, 戊二醛, 金, 羟氯喹, 来氟米特, malononitriloamides (如来氟米特), 甲氨蝶呤, 米诺环素, 咪唑立宾, 麦考酚酸吗乙酯, 雷帕霉素和柳氮磺胺吡啶 (sulfasasazine)。

[0189] 在备选实施方案中, 本发明的抗体与细胞因子一起使用。如本文所用, “细胞因子”是指由一种细胞群释放的蛋白质的通用术语, 所述蛋白质作为细胞间介质作用于另一种细胞。此类细胞因子的实例是淋巴因子, 单核因子和传统的多肽激素。细胞因子包括成纤维细胞生长因子; 催乳素; 胎盘催乳素; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和- $\beta$ ; 苗勒管抑制物质; 小鼠促性腺激素相关肽; 抑制素; 激活素; 血管内皮生长因子; 整联蛋白; 血小板生成素 (TPO); 神经生长因子如NGF- $\beta$ ; 血小板生长因子; 转化生长因子 (TGFs) 如TGF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ ; 胰岛素样生长因子-I和-II; 促红细胞生成素 (EPO); 骨诱导因子; 干扰素例如干扰素- $\alpha$ ,  $\beta$ 和- $\gamma$ ; 集落刺激因子 (CSF) 如巨噬细胞-CSF (M-CSF); 粒细胞-巨噬细胞-CSF (GM-CSF); 和粒细胞-CSF (G-CSF); 白细胞介素 (IL), 如IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, 肿瘤坏死因子如TNF- $\alpha$ 或TNF- $\beta$ ; 和其他多肽因子, 包括LIF和kit配体 (KL)。如本文所用, 术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质, 以及天然序列细胞因子的生物活性等同物。

[0190] 化学治疗剂或其他细胞毒性剂可以作为前药施用。术语“前药”是指药物活性物质的前体或衍生物形式, 与母体药物相比, 其对肿瘤细胞的细胞毒性较小, 并且能够被酶促活化或转化为更具活性的母体形式。参见例如Wilman, 1986, *Biochemical Society Transactions*, 615th Meeting Belfast, 14:375-382; 和Stella et al., “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,” *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., (ed.):247-267, Humana Press, 1985。可用于如本文提供的组合物和方法的前药包括但不限于含磷酸盐的前药, 含硫代磷酸盐的前药, 含硫酸盐的前药, 含肽的前药, D-氨基酸修饰的前药, 糖基化前药, 含 $\beta$ -内酰胺的前药, 含任选取代的苯氧基乙酰胺 (phenoxyacetamide) 的前药或含任选取代的苯基乙酰胺的前药, 5-氟胞嘧啶和其它5-氟尿苷前药, 其可转化为更具活性的细胞毒性游离药物。可以衍生成用于本文提供的组合物和方法的抗体/多肽的前药形式的细胞毒性药物的实例包括但不限于任何上述化学治疗剂。

[0191] 在一些实施方案中, 可以应用抗体/多肽与上文规定的生物活性剂, 即细胞因子, 酶, 趋化因子, 放射性同位素, 酶活性毒素或化学治疗剂的任何组合。在另一个实施方案中, 抗体/多肽可以与生物活性剂可操作地连接并用于本文所述的方法中, 或者本文提供的抗体/多肽可以仅与生物活性剂以下述方式组合使用, 其中两者均为单独施用 (即未缀合) 以达到期望的预防, 诊断或治疗效果。

[0192] PSMA靶向性抗体药物缀合物

[0193] 在一个实施方案中, 本发明提供抗体-药物偶联物 (ADC), 其包含与细胞毒剂缀合的抗体, 所述细胞毒剂如化学治疗剂, 药物, 生长抑制剂, 毒素 (例如, 细菌, 真菌, 植物或动物来源的酶活性毒素, 或其片段), 或放射性同位素 (即放射性缀合物)。在一个具体实施方案中, 药物包括但不限于微管蛋白抑制剂和DNA裂解试剂, 例如美登素类化合物, 澳瑞他汀,

多拉司他汀和加利车霉素。在另一个实施方案中,本发明还提供了使用ADC的方法。在一个方面,ADC包含共价连接到细胞毒剂或可检测试剂的任何上述PSMA抗体或抗体片段。

[0194] 使用抗体-药物缀合物以局部递送细胞毒剂或细胞抑制剂,即在癌症治疗中杀伤或抑制肿瘤细胞的药物(Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv.Drg Del.Rev. 26:151-172; 欧洲专利No.4,975,278)允许将药物部分靶向递送到肿瘤并且在其中胞内积累,其中这些未缀合的药物的系统性施用可以导致与寻求消除的肿瘤细胞一样对正常细胞的不可接受的水平(Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar.15,1986) :603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review," in Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical applications, A.Pinchera et al. (ed.s) , pp.475-506)。因此寻求最大效率且最小毒性。多克隆抗体和单克隆抗体两者都已经报告为可用于这些策略(Rowland et al., (1986) Cancer Immunol.Immunother., 21:183-87)。这些方法中使用的药物包括道诺霉素,多柔比星,甲氨蝶呤和长春地辛(Rowland et al., (1986) 上文)。抗体-毒素缀合物中使用的毒素包括细菌毒素,诸如白喉毒素,植物毒素诸如蓖麻毒蛋白,小分子毒素诸如格尔德霉素(geldanamycin) (Mandler et al (2000) Jour.of the Nat.Cancer Inst.92 (19) :1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic& Med.Chem.Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem.13:786-791) ,美登素类化合物(EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93: 8618-8623) 和加利车霉素(Lode et al (1998) Cancer Res.58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res.53:3336-3342)。毒素可以通过包括微管蛋白结合,DNA结合或拓扑异构酶抑制的机制影响其细胞毒性和细胞抑制效应。一些细胞毒性药物趋于在与较大抗体或蛋白质受体配体缀合时无活性或不太有活性。

[0195] 抗体药物缀合物的实例是ZEVALIN®(替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idec),其是抗体-放射性同位素缀合物,由针对正常和恶性B淋巴细胞上找到的CD20抗原的鼠IgG1kappa单克隆抗体和由硫脲接头-螯合剂结合的111In或90Y放射性同位素构成(Wiseman et al (2000) Eur.Jour.Nucl.Med.27 (7) :766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99 (12) :4336-42; Witzig et al (2002) J.Clin.Oncol.20 (10) :2453-63; Witzig et al (2002) J.Clin.Oncol.20 (15) :3262-69)。

[0196] 另外,MYLOTARG™(gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals),一种由与加利车霉素连接的人CD33抗体构成的抗体药物缀合物在2000年批准用于通过注射治疗急性髓样白血病(Drugs of the Future (2000) 25 (7) :686; 美国专利Nos.4,970,198; 5,079,233; 5,585,089; 5,606,040; 5,693,762; 5,739,116; 5,767,285; 5,773,001)。

[0197] 最后,澳瑞他汀肽,如单甲基澳瑞他汀E(MMAE),多拉司他汀的合成类似物与嵌合单克隆抗体cBR96(对癌症上的Lewis Y特异性)和cAC10(对血液学恶性上的CD30特异性)偶联(Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21 (7) :778-784)。cAC10正在进行治疗开发。

[0198] 此外,本文描述了可用于产生ADC的化学治疗剂。可以使用的酶活性毒素及其片段包括白喉A链,白喉毒素的非结合活性片段,外毒素A链(来自铜绿假单胞菌),蓖麻毒蛋白A链,相思豆毒蛋白A链,蒴莲根毒素A链,α-sarcin,油桐(Aleurites fordii)蛋白,石竹素

(dianthin)蛋白,美洲商陆(Phytolacaamericana)蛋白(PAPI,PAPII和PAP-S),苦瓜(momordica charantia)抑制剂,麻疯树毒蛋白,巴豆毒蛋白,石碱草(sapaonaria officinalis)抑制剂,白树毒素(gelonin),丝林霉素(mitogellin),局限曲菌素(restrictocin),酚霉素(phenomycin),依诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯族化合物(trichothecenes)。参见例如1993年10月28日公布的WO 93/21232。各种放射性核素可用于产生放射性偶联抗体。实例包括 $^{212}\text{Bi}$ , $^{131}\text{I}$ , $^{131}\text{In}$ , $^{90}\text{Y}$ 和 $^{186}\text{Re}$ 。使用多种双功能蛋白偶联剂如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)propionate,SPDP),亚氨酸酯(诸如盐酸二甲基己二亚酰胺化物)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)己二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6--二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物制备抗体和细胞毒性剂的缀合物。例如,可以如Vitetta et al (1987) Science, 238:1098中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于使放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂(WO94/11026)。

[0199] 本文还考虑抗体和一种或多种小分子毒素的缀合物,所述小分子毒素如加利车霉素,美登素类化合物,多拉司他汀,溴瑞他汀,单端孢霉烯族化合物和CC1065,以及具有毒素活性的这些毒素的衍生物。

[0200] 美登素:

[0201] 适合用作美登素类化合物药物部分的美登素化合物是本领域公知的,并且可以根据已知方法从天然来源分离,使用遗传工程技术产生(参见Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973),或美登醇和美登醇类似物根据已知方法合成制备。

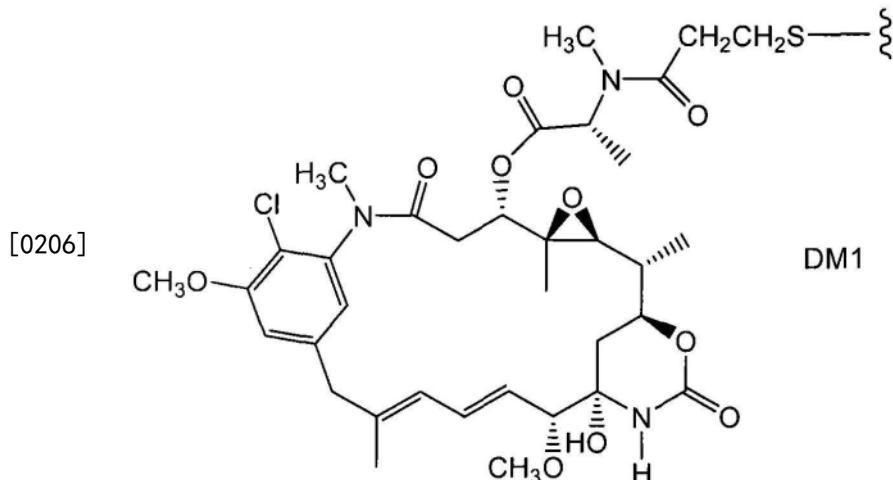
[0202] 示例性的美登素类化合物药物部分包括具有改性芳环的那些,例如:C-19-脱氯(美国专利No.4,256,746)(通过氢化铝锂还原安丝菌素(ansamycin)P2制备);C-20-羟基(或C-20-去甲基)+/-C-19-去氯(美国专利No.4,361,650和4,307,016)(通过使用链霉菌或放线菌进行去甲基化或使用LAH进行脱氯制备);和C-20-去甲氧基,C-20-酰氧基(-OCOR),+/-脱氯(美国专利No.4,294,757)(通过使用酰氯进行酰化制备)以及那些在其他位置进行修改的化合物。

[0203] 示例性的美登素类化合物药物部分还包括具有如下的修饰的那些化合物:C-9-SH(美国专利No.4,424,219)(通过美登醇与H2S或P2S5的反应制备);C-14-烷氧基甲基(去甲氧基/CH<sub>2</sub>OR)(US专利No.4,331,598);C-14-羟甲基或酰氧基甲基(CH<sub>2</sub>OH或CH<sub>2</sub>OAc)(美国专利No.4,450,254)(从诺卡菌属制备);C-15-羟基/酰氧基(美国专利No.4,364,866)(通过链霉菌转化美登醇制备);C-15-甲氧基(美国专利No.4,313,946和4,315,929)(从Trewia nudiflora分离);C-18-N-去甲基(美国专利No.4,362,663和4,322,348)(通过链霉素对美登醇的去甲基化制备);和4,5-脱氧(美国专利No.4,371,533)(通过美登醇的三氯化钛/LAH还原制备)。

[0204] 含有美登素类化合物的ADC,其制备方法及其治疗用途公开于例如美国专利No.5,208,020;5,416,064;6,441,163和欧洲专利EP 0 425 235 B1,其公开内容通过引用并入本文。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) 描述了ADC,其包含与针对人结肠直肠癌的单克隆抗体C242连接的命名为DM1的美登素类化合物。发现缀合物对培养

的结肠癌细胞具有高度细胞毒性,并且在体内肿瘤生长测定中显示出抗肿瘤活性。Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) 描述了ADC,其中美登素类化合物通过二硫化物接头与结合人结肠癌细胞系上的抗原的鼠抗体A7或结合HER-2/neu癌基因的另一种鼠单克隆抗体TA.1缀合。在人体乳腺癌细胞系SK-BR-3上体外测试TA.1-美登素类化合物偶联物的细胞毒性,所述SK-BR-3表达每个细胞 $3 \times 10^5$ 个HER-2表面抗原。药物缀合物实现与游离美登素类化合物类似的细胞毒性程度,其可以通过增加每个抗体分子的美登素类化合物分子的数量来增加。A7-美登素类化合物偶联物在小鼠中显示出低的全身细胞毒性。

[0205] 示例性美登素类化合物实施方案是DM1 (其中波浪线表示与抗体药物缀合物的接头(L)的共价连接)。



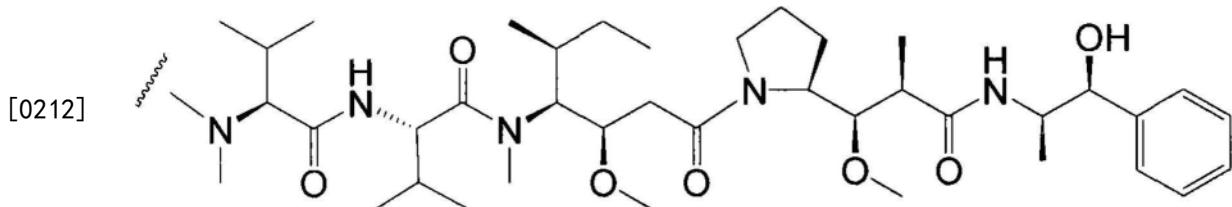
[0207] 澳瑞他汀和多拉司他汀:

[0208] 在一些实施方案中,ADC包含与多拉司他汀或多拉司他汀肽类似物和衍生物,澳瑞他汀(美国专利No.5,635,483;5,780,588)缀合的本发明抗体。已显示多拉司他汀和奥瑞他汀干扰微管动力学,GTP水解和核和细胞分裂(Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45 (12) :3580-3584)并且具有抗癌作用(美国专利No.5,663,149)和抗真菌活性(Pettit et al (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965)。多拉司他汀或奥瑞他汀药物部分可以通过肽药物部分的N(氨基)末端或C(羧基)末端与抗体连接(WO 02/088172)。

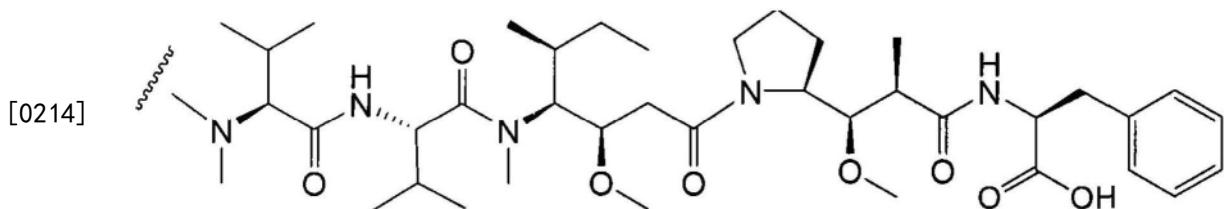
[0209] 示例性的澳瑞他汀实施方案包括N末端连接的单甲基奥瑞他汀药物部分DE和DF,在2004年3月28日呈现的“Senter et al, *Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623*中公开,并在美国专利公开No.2005/0238649中描述,其公开内容明确地通过引用整体并入。

[0210] 已经公开了具有各种接头组分的使用MMAE和MMAF的ADC (US2005/0238649, US08968742)。

[0211] 示例性的澳瑞他汀实施方案是MMAE (其中波浪线表示与抗体药物缀合物的接头(L)的共价连接)。



[0213] 另一个示例性的澳瑞他汀实施方案是MMAF,其中波浪线表示与抗体药物缀合物的接头(L)的共价连接(US 2005/0238649) :



[0215] 通常,可以通过在两个或更多个氨基酸和/或肽片段之间形成肽键来制备基于肽的药物部分。例如,可以根据肽化学领域中公知的液相合成方法制备此类肽键(参见 Schröder and K.Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press)。奥瑞他汀/多拉司他汀药物部分可以根据以下方法制备:美国专利No.5,635,483;美国专利No.5,780,588;Pettit et al (1989) J.Am.Chem.Soc.111:5463-5465;Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277;Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) J.Chem.Soc.Perkin Trans.1 5:859-863;和Doronina (2003) Nat Biotechnol 21 (7) :778-784。

[0216] 加利车霉素:

[0217] 在其他实施方案中,ADC包含与一种或多种加利车霉素分子缀合的本发明的抗体。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度下产生双链DNA断裂。对于制备加利车霉素家族的缀合物,参见美国专利No.5,712,374,5,714,586,5,739,116,5,767,285,5,770,701,5,770,710,5,773,001和5,877,296(均属于American Cyanamid Company)。可以使用的加利车霉素的结构类似物包括但不限于 $\gamma$ 1 I,  $\alpha$ 2 I,  $\alpha$ 3 I, N-乙酰基- $\gamma$ 1 I, PSAG和 $\theta$ 1 I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) 和American Cyanamid的前述美国专利)。抗体可以缀合的另一种抗肿瘤药物是QFA,它是一种抗叶酸剂。加利车霉素和QFA都具有细胞内作用位点,并且不容易穿过质膜。因此,通过抗体介导的内化作用对这些试剂的细胞摄取大大增强了它们的细胞毒性作用。

[0218] 其他细胞毒剂:

[0219] 可以与本发明的抗体缀合的其他抗肿瘤剂包括BCNU,链佐星(streptozocin),长春新碱和5-氟尿嘧啶,描述于美国专利No.5,053,394,5,770,710中的统称为LL-E33288复合物的试剂家族以及埃斯波霉素(esperamicins) (美国专利No.5,877,296)。

[0220] 可以使用的酶活性毒素及其片段包括白喉A链,白喉毒素的非结合活性片段,外毒素A链(来自铜绿假单胞菌),蓖麻毒蛋白A链,相思豆毒蛋白A链,蓖麻根毒素A链, $\alpha$ -sarcin,油桐(Aleurites fordii)蛋白,石竹素(dianthin)蛋白,美洲商陆(Phytolaca americana)蛋白(PAPI, PAPII和PAP-S),苦瓜(momordica charantia)抑制剂,麻疯树毒蛋白,巴豆毒蛋

白,石碱草(sapaonaria officinalis)抑制剂,白树毒素(gelonin),丝林霉素(mitogellin),局限曲菌素(restrictocin),酚霉素(phenomycin),依诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯族化合物(trichothecenes)。参见例如1993年10月28日公布的WO 93/21232。

[0221] 本发明进一步考虑在抗体和具有核溶解活性的化合物(例如核糖核酸酶或DNA核酸内切酶,例如脱氧核糖核酸酶;DNA酶)之间形成的ADC。

[0222] 为了选择性破坏肿瘤,抗体可包含高放射性原子。有多种放射性同位素可用于生产放射性缀合抗体。实例包括At211,I131,I125,Y90,Re186,Re188,Sm153,Bi212,P32,Pb212和Lu的放射性同位素。当缀合物用于检测时,它可包含用于闪烁法研究的放射性原子,例如tc99m或I123,或用于核磁共振(NMR)成像的自旋标记物(也称为磁共振成像,mri),例如碘-123,碘-131,铟-111,氟-19,碳-13,氮-15,氧-17,钆,锰或铁。

[0223] 放射性标记物或其他标记物可以以已知方式掺入缀合物中。例如,肽可以是生物合成的,或者可以通过化学氨基酸合成使用合适的氨基酸前体合成,所述氨基酸前体包括例如氟-19代替氢。诸如tc99m或I123,Re186,Re188和In111等标记物可以通过肽中的半胱氨酸残基连接。钇-90可以通过赖氨酸残基连接。IODOGEN方法(Fraker et al (1978) Biochem.Biophys.Res.Commun.80:49-57可用于掺入碘-123。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”(Chatal,CRC Press 1989)详细描述了其他方法。。

[0224] PSMA靶向性抗体-药物偶联物化合物:

[0225] 本发明尤其提供用于靶向递送药物的抗体-药物缀合物化合物。发明人已经发现抗体-药物缀合物化合物对表达PSMA的细胞具有有效的细胞毒性和/或细胞抑制活性。抗体-药物偶联化合物包含与至少一个药物单元共价连接的抗体单元。药物单元可以直接共价连接或通过接头单元(-LU-)共价连接。

[0226] 在一些实施方案中,抗体药物缀合物化合物具有下式:

[0227] Ab- (LU-D) p

[0228] 或其药学可接受盐或溶剂合物;其中:

[0229] Ab是抗体单元,例如gy1或其突变变体衍生的本发明的完整抗体或抗体片段,例如PSMAb,和

[0230] (LU-D)是接头单元-药物单元部分,其中:

[0231] LU-是接头单元,和

[0232] -D是对靶细胞具有细胞抑制或细胞毒活性的药物单位;和

[0233] p是1至20的整数。

[0234] 在一些实施方案中,p范围为1-10,1-9,1-8,1-7,1-6,1-5,1-4,1-3或1-2。在一些实施方案中,p范围为2-10,2-9,2-8,2-7,2-6,2-5,2-4或2-3。在其它实施方案中,p是1,2,3,4,5或6。在一些实施方案中,p是2或4。

[0235] 在一些实施方案中,抗体药物缀合物具有下式:

[0236] Ab- (Aa-Ww—Yy-D) p

[0237] 或其药学可接受盐或溶剂合物,其中

[0238] Ab是抗体单元,例如gy1或其突变变体衍生的本发明的完整抗体或抗体片段,例如PSMAb,和

[0239] -Aa-Ww—Yy—是接头单元(LU),其中:

- [0240] -A-是延伸器单元，
- [0241] a是0或1，
- [0242] 每个—W—独立是氨基酸单元，
- [0243] w是范围为0至12的整数，
- [0244] —Y—是自毁间隔物单元，
- [0245] y是0、1或2；
- [0246] -D是对靶细胞具有细胞抑制或细胞毒活性的药物单位；和
- [0247] p是1-20的整数。
- [0248] 在一些实施方案中，a是0或1，w是0或1，并且y是0、1或2。在一些实施方案中，a是0或1，w是0或1并且y是0或1。在一些实施方案中，p范围为1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 或1-2。在一些实施方案中，p范围为2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4或2-3。在其它实施方案中，p是1, 2, 3, 4, 5或6。在一些实施方案中，p是2或4。在一些实施方案中，当w不是0时，y是1或2。在一些实施方案中，当w是1-12时，y是1或2。在一些实施方案中，w是2-12并且y是1或2。在一些实施方案中，a是1并且w和y是0。
- [0249] 对于包含多种抗体的组合物，载药量由p表示，即每种抗体的药物分子的平均数。载药量的范围可以为每抗体1至20个药物(D)。制备缀合反应中每种抗体的平均药物数可以通过常规手段，例如质谱术，ELISA测定和HPLC表征。还可以确定就p而言抗体-药物-缀合物的定量分布。在一些情况下，同质抗体-药物-缀合物的分离，纯化和表征(其中p是来自具有其他载药量的抗体-药物-缀合物的特定值)可以通过诸如反相HPLC或电泳的手段实现。在示例性实施方案中，p为2至8。
- [0250] 抗体-药物缀合物化合物的产生可以通过熟练技术人员已知的任何技术完成。简言之，抗体-药物偶联化合物包含作为抗体单元的本发明的gy1或其突变变体衍生的完整抗体或抗体片段，药物和任选的连接药物和结合剂的接头。在优选的实施方案中，抗体是源自gy1或其具有点突变的变体的抗体或抗体片段，如本文别处所述。许多不同反应可用于药物和/或接头与结合剂的共价连接。这通常通过结合剂(例如抗体分子)的氨基酸残基，包括赖氨酸的胺基团，谷氨酸和天冬氨酸的游离羧酸基团，半胱氨酸的巯基基团和芳香族氨基酸的各个部分的反应来实现。最常用的共价连接的非特异性方法之一是碳二亚胺反应，以将化合物的羧基(或氨基)基团连接到抗体的氨基(或羧基)基团。另外，已经使用双功能试剂如二醛或亚氨酸酯将化合物的氨基与抗体分子的氨基基团连接。希夫碱反应也可用于将药物连接至结合剂。该方法涉及含有二醇或羟基的药物的高碘酸盐氧化，从而形成醛，然后醛与结合剂反应。通过与结合剂的氨基形成希夫碱而发生连接。异硫氰酸盐也可用作偶联剂，用于将药物共价连接到结合剂。其他技术是熟练技术人员已知的并且在本发明的范围内。
- [0251] 在某些实施方案中，作为接头前体的中间体在适当条件下与药物反应。在某些实施方案中，对药物和/或中间体使用反应性基团。随后在适当条件下使药物与中间体或衍生化药物之间的反应产物与gy1或其变体衍生的完整抗体或抗体片段反应。
- [0252] PSMA靶向性CAR-T或CAR-NK
- [0253] 使用嵌合抗原受体(CAR)修饰的自体T细胞(CART)疗法(其依赖于将T细胞重定向至癌细胞如B细胞恶性上的合适细胞表面分子)的最新发展在利用免疫系统治疗B细胞恶性和其他癌症的能力中显示有希望的结果(参见例如Sadelain et al., Cancer Discovery

3:388-398 (2013))。小鼠衍生的CART19(即“CTL019”)的临床结果显示了在患有CLL的患者以及儿童ALL中建立完全缓解的前景(参见例如Kalos et al., Sci Transl Med 3:95ra73 (2011), Porter et al., NEJM 365:725-733 (2011), Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013))。除了遗传修饰的T细胞上的嵌合抗原受体识别和破坏靶定细胞的能力之外,成功的治疗性T细胞疗法需要具有随时间增殖和持续,并进一步监测白血病细胞逃逸的能力。T细胞的可变质量(无论其是能量、抑制或耗竭的结果)都会对CAR转化的T细胞的表现产生影响,但是熟练从业人员此时对此具有有限的控制。为了有效,CAR转化的患者T细胞需要持续并保持响应CAR抗原而增殖的能力。已经显示,ALL患者T细胞可以在包含鼠scFv的CART19的情况下实现这点(参见例如Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)))。

[0254] 本发明通过提供整合到嵌合抗原受体(CAR)构建体中的结合PSMA的完全人抗体片段(例如scFv)来控制患者的免疫应答,所述嵌合抗原受体(CAR)构建体将重定向工程化T细胞以识别和杀死PSMA阳性肿瘤细胞。

[0255] 因此,一方面,本发明涉及编码嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸分子,其中CAR包含包括PSMA结合域的抗体或抗体片段,跨膜域和胞内信号传导域(例如,包含共刺激域的胞内信号传导域和/或主要信号传导域)。在一个实施方案中,CAR包含包括本文所述的完全人抗-PSMA结合域的抗体或抗体片段,本文所述的跨膜域和本文所述的胞内信号传导域(例如,包含共刺激域的细胞内信号传导域和/或主要信号传导域)。

[0256] 在一个实施方案中,编码的人抗-PSMA结合域包含本文所述的完全人抗-PSMA结合域的一个或多个(例如,所有三个)轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3),和/或本文所述的完全人抗-PSMA结合域的一个或多个(例如,所有三个)重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如包含一个或多个,例如所有三个LC CDR和/或一个或多个,例如所有三个HC CDR的完全人抗-PSMA结合域。在一个实施方案中,编码轻链可变区包括本文所述的一个,两个,三个或所有四个框架区。在一个实施方案中,编码的重链可变区包含下文描述的一个,两个,三个或所有四个框架区。在一个实施方案中,编码的完全人抗-PSMA结合域包含下文描述的人轻链可变区和/或下文描述的人重链可变区。在一个实施方案中,编码的抗PSMA结合域是包含下文所述氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,抗PSMA结合域(例如,scFv)包含:轻链可变区,其包含具有以下提供的轻链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如,取代)但不超过30,20或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或,或与下述氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含具有以下提供的重链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如,取代)但不超过30,20或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或,或与下述氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码的人抗-PSMA结合域包含下文描述的序列,或其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码人抗-PSMA结合域的核酸序列包含下文描述的序列,或其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码的人抗-PSMA结合域是scFv,并且轻链可变区通过接头(例如本文所述的接头)连接至重链可变区。在一个实施方案中,编码的人抗-PSMA结合域包括(Gly4-Ser)<sub>n</sub>接头,其中n为1,2,3,4,5,或6,优选3或4。在另一个实施方案中,编码的人抗PSMA结合域含有如SEQ ID NO:37中所述的接头序列。scFv的轻链可变区和重链可变区可以是例如以下任何方向:轻链可变区-接头-重链可变区

或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0257] 在某些实施方案中,抗PSMA结合域包含本文别处描述的抗体或抗体片段。例如,在某些实施方案中,抗PSMA结合域包含gy1,gy1-st,gy1-2,gy1-3或PSMAb,如本文别处所述。

[0258] 例如,在某些实施方案中,抗PSMA结合域包含下列一个或多个:SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:47,SEQ ID NO:49,SEQ ID NO:51,SEQ ID NO:53,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:57,SEQ ID NO:59,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:65,SEQ ID NO:67,SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69。

[0259] 例如,在某些实施方案中,抗PSMA结合域由以下一种或多种核苷酸序列编码:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:48,SEQ ID NO:50,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:54,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:58,SEQ ID NO:60,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:64,和SEQ ID NO:66。

[0260] 在一个实施方案中,编码的跨膜域是选自下组的蛋白质的跨膜域:T细胞受体的 $\alpha$ , $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD27,CD28,CD3epsilon,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154。在一个实施方案中,编码的跨膜域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列。在一个实施方案中,编码的跨膜域包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列中具有至少一个,两个或三个修饰(例如,取代)但不超过20,10或5个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码跨膜域的核酸序列包含SEQ ID NO:74的序列,或与其具有95-99%同一性的序列。

[0261] 在一个实施方案中,编码的抗PSMA结合域通过铰链区(例如本文所述的铰链区)与跨膜域连接。在一个实施方案中,编码的铰链区包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列,或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码铰链区的核酸序列包含SEQ ID NO:72的序列,或与其具有95-99%同一性的序列。

[0262] 在一个实施方案中,核酸分子还包含编码共刺激域的序列。在一个实施方案中,共刺激域是从选自OX40,CD2,CD27,CD28,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),ICOS(CD278)和4-1BB(CD137)的蛋白质获得的功能性信号传导域。在一个实施方案中,编码的共刺激域包含SEQ ID NO:77的序列。在一个实施方案中,编码的共刺激域包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列中具有至少一个,两个或三个修饰(例如,取代)但不超过20,10或5个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:77的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码共刺激域的核酸序列包含SEQ ID NO:76的序列,或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,分离的核酸分子还包含编码胞内信号传导域的序列,例如本文所述的胞内信号传导域。在一个实施方案中,编码的胞内信号传导域包含4-1BB的功能信号传导域和/或CD3 $\zeta$ 的功能信号传导域。在一个实施方案中,编码的功能性CD3 $\zeta$ 细胞内信号域包含SEQ ID NO:79的序列。在一个实施方案中,编码的共刺激域包含SEQ ID NO:79的氨基酸序

列中具有至少一个,两个或三个修饰(例如,取代)但不超过20,10或5个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:79的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码共刺激域的核酸序列包含SEQ ID NO:78的序列,或与其具有95-99%同一性的序列。在另一个实施方案中,CAR构建体可含有两个或更多个共刺激信号域,其选自OX40,CD2,CD27,CD28,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),ICOS(CD278)和4-1BB(CD137)。

[0263] 另一方面,本发明涉及编码CAR构建体的核酸分子,所述CAR构建体包含前导物序列,例如本文所述的前导物序列,例如SEQ ID NO:71的前导物序列;本文所述的人抗-PSMA结合域,例如人抗-PSMA结合域,其包含本文所述的LC CDR1,LC CDR2,LC CDR3,HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3,例如具有从SEQ ID NO:1到SEQ ID NO:69所列序列的人抗-PSMA结合域,或与其具有95-99%同一性的序列;本文所述的铰链区,例如SEQ ID NO:73的铰链区;本文所述的跨膜域,例如包含SEQ ID NO:75的跨膜域;和胞内信号传导域,例如本文所述的胞内信号传导域。在一个实施方案中,编码的胞内信号传导域包含共刺激域,例如本文所述的共刺激域,例如具有SEQ ID NO:77的序列的4-1BB共刺激域,和/或主要信号传导域,例如本文描述的主要信号传导域,例如具有SEQ ID NO:79序列的CD3zeta刺激域。在一个实施方案中,编码CAR构建体的分离的核酸分子包括由SEQ ID NO:71的核酸序列,或与其具有95-99%同一性的序列编码的前导物序列。

[0264] 在另一个实施方案中,CAR包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列,或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,CAR由包含SEQ ID NO:80的核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列编码。

[0265] 本发明提供了分离的宿主细胞,其表达编码本文所述CAR的本发明核酸序列。在一个实施方案中,宿主细胞是T细胞。本发明的T细胞可以是任何T细胞,例如培养的T细胞,例如原代T细胞,或来自培养的T细胞系的T细胞,或获自哺乳动物的T细胞。若从哺乳动物获得,T细胞可以从许多来源获得,包括但不限于血液,骨髓,淋巴结,胸腺或其他组织或液体。T细胞也可以富集或纯化。T细胞优选是人T细胞(例如,从人中分离)。T细胞可以是任何发育阶段的T细胞,包括但不限于CD4+/CD8+双阳性T细胞,CD4+辅助T细胞,例如Th和Th2细胞,CD8+ T细胞(例如,细胞毒性T细胞),肿瘤浸润细胞,记忆T细胞,幼稚T细胞等。在一个实施方案中,T细胞是CD8+ T细胞或CD4+ T细胞。T细胞系可从例如美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA)和德国微生物和细胞培养物保藏中心(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ)获得,并包括例如Jurkat细胞(ATCC TIB-152),Sup-T1细胞(ATCC CRL-1942),RPMI 8402细胞(DSMZ ACC-290),Karpas 45细胞(DSMZ ACC-545)及其衍生物。

[0266] 在另一个实施方案中,宿主细胞是天然杀伤(NK)细胞。NK细胞是一类细胞毒性淋巴细胞,其在先天免疫系统中起作用。NK细胞定义为大颗粒淋巴细胞,并且构成从也产生B和T淋巴细胞的共同淋巴样祖细胞分化的第三种细胞(参见例如Immunobiology, 5th ed., Janeway et al., eds., Garland Publishing, New York, NY (2001))。NK细胞在骨髓,淋巴结,脾,扁桃体和胸腺中分化和成熟。成熟后,NK细胞作为具有独特细胞毒性颗粒的大淋巴细胞进入循环。NK细胞能够识别并杀死一些异常细胞,例如一些肿瘤细胞和病毒感染的细胞,并且被认为在针对细胞内病原体的先天免疫防御中是重要的。如上关于T细胞所述,NK细胞可以是任何NK细胞,例如培养的NK细胞,例如原代NK细胞,或来自培养的NK细胞系的NK

细胞,或获自哺乳动物的NK细胞。若从哺乳动物获得,NK细胞可以从许多来源获得,包括但不限于血液,骨髓,淋巴结,胸腺或其他组织或液体。NK细胞也可以富集或纯化。NK细胞优选是人NK细胞(例如,从人中分离)。NK细胞系可从例如美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA)获得,并包括例如NK-92细胞(ATCC CRL-2407),NK92MI细胞(ATCC CRL-2408)及其衍生物。

[0267] 另一方面,本发明提供了CAR表达细胞,例如CART细胞的群体。在一些实施方案中,CAR表达细胞群体包含表达不同CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达具有本文所述的抗PSMA结合域的CAR的第一细胞和表达具有不同抗PSMA结合域,例如与由第一细胞表达的CAR中的抗PSMA结合域不同的本文中所述的抗PSMA结合域的CAR的第二细胞。作为另一个实例,CAR表达细胞群体可以包含表达包括例如本文所述的抗PSMA结合域的CAR的第一细胞和表达包含针对PSMA外的靶物(例如PSCA)的抗原结合域的CAR的第二细胞。在一个实施方案中,CAR表达细胞群体包含例如表达包含主要胞内信号传导域的CAR的第一细胞和表达包含第二信号传导域的CAR的第二细胞。

[0268] 另一方面,本发明提供细胞群体,其中群体中的至少一个细胞表达具有本文所述的抗PSMA域的CAR,并且第二细胞表达另一个试剂,例如增强CAR表达细胞的活性的试剂。例如,在一个实施方案中,试剂可以是抑制抑制分子的试剂。在一些实施方案中,抑制性分子例如可降低CAR表达细胞产生免疫效应器应答的能力。抑制分子的实例包括PD1,PD-L1, CTLA4,TIM3,LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160,2B4和TGFR beta。在一个实施方案中,抑制抑制性分子的试剂包含与向细胞提供阳性信号的第二多肽,例如本文所述的细胞内信号传导域结合的第一多肽,例如抑制性分子。在一个实施方案中,试剂包含第一多肽和第二多肽,所述第一多肽例如抑制性分子的第一多肽,例如PD1,CTLA4,TIM3,LAG3,VISTA,BTLA, TIGIT,LAIR1,CD160,2B4和TGFR beta,或这些中任一种的片段(例如,这些中任一种的胞外域的至少一部分,所述第二多肽是本文所述的胞内信号传导域(例如,包含共刺激域(例如,41BB,CD27或CD28,例如如本文所述)和/或主要信号传导域(例如本文所述的CD3zeta信号传导域)。在一个实施方案中,试剂包含PD1的第一多肽或其片段(例如,PD1的胞外域的至少一部分),和/或本文描述的胞内信号传导域的第二多肽(例如,本文所述的CD28信号传导域和/或本文所述的CD3ζ信号传导域)。

[0269] 本发明还提供了编码本文所述的一种或多种CAR构建体的核酸分子。在一个方面,核酸分子作为信使RNA转录物提供。在一个方面,核酸分子作为DNA构建体提供。

[0270] 编码期望分子的核酸序列可以使用本领域已知的重组方法获得,例如通过从表达该基因的细胞中筛选文库,通过从已知包含该基因的载体中获得基因,或通过使用标准技术直接从含有基因的细胞和组织中分离获得。或者,目的基因可以合成产生,而不是克隆。

[0271] 本发明还提供了插入本发明DNA的载体。源自逆转录病毒如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因的长期稳定整合及其在子细胞中的繁殖。慢病毒载体相对于源自肿瘤逆转录病毒如鼠白血病病毒的载体具有额外的优势,因为它们可以转导非增殖细胞,例如肝细胞。它们还具有低免疫原性的附加优点。

[0272] 在另一个实施方案中,包含编码本发明的期望CAR的核酸的载体是腺病毒载体(A5/35)。在另一个实施方案中,编码CAR的核酸的表达可以使用转座子,例如sleeping beauty,crisper,CAS9和锌指核酸酶完成。见下文June et al.2009Nature Reviews

Immunology 9.10:704-716,通过引用并入本文。

[0273] 简言之,编码CAR的天然或合成核酸的表达通常通过将编码CAR多肽或其部分的核酸与启动子可操作地连接,并将构建体掺入表达载体中来实现。载体可适用于复制和整合真核生物。典型的克隆载体含有转录和翻译终止子,起始序列和可用于调节期望核酸序列表达的启动子。

[0274] 使用标准基因递送方案,本发明的表达构建体也可用于核酸免疫和基因治疗。用于基因递送的方法是本领域已知的。参见例如美国专利No.5,399,346,5,580,859,5,589,466,其通过引用整体并入本文。在另一个实施方案中,本发明提供了基因治疗载体。

[0275] 可以将核酸克隆到许多类型的载体中。例如,可以将核酸克隆到载体中,所述载体包括但不限于质粒,噬菌粒,噬菌体衍生物,动物病毒和粘粒。特别感兴趣的载体包括表达载体,复制载体,探针生成载体和测序载体。

[0276] 此外,表达载体可以以病毒载体的形式提供给细胞。病毒载体技术是本领域公知的,并且描述于例如Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY),以及其他病毒学和分子生物学手册。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒,腺病毒,腺相关病毒,疱疹病毒和慢病毒。通常,合适的载体含有在至少一种生物中有功能的复制起点,启动子序列,方便的限制性内切核酸酶位点和一种或多种选择标志物(例如WO 01/96584; WO 01/29058; 和美国专利No.6,326,193)。

[0277] 已经开发了许多基于病毒的系统用于将基因转移到哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒为基因递送系统提供了方便的平台。可以使用本领域已知的技术将选择的基因插入载体中并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可以分离重组病毒并在体内或离体递送至受试者的细胞。许多逆转录病毒系统是本领域已知的。在一些实施方案中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体是本领域已知的。在一个实施方案中,使用慢病毒载体。

[0278] 另外的启动子元件,例如增强子,调节转录起始的频率。通常,这些位于起始位点上游30-110bp的区域,尽管已经显示许多启动子也包含起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔通常是灵活的,因此当元件相对于彼此反转或移动时保持启动子功能。在胸昔激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间隔可以在活性开始下降之前增加至50bp。取决于启动子,似乎个别元件可以协同或独立地起作用以激活转录。

[0279] 能够在哺乳动物T细胞中表达CAR转基因的启动子的实例是EF1a启动子。天然EF1a启动子驱动延伸因子-1复合物的α亚基的表达,其负责将氨酰基tRNA酶促递送至核糖体。EF1a启动子已经广泛用于哺乳动物表达质粒,并且已经显示出有效地驱动克隆到慢病毒载体中的转基因的CAR表达。参见例如Milone et al., Mol. Ther. 17 (8) :1453-1464 (2009)。在一个方面,EF1a启动子包含SEQ ID NO:100提供的序列。

[0280] 启动子的另一个实例是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是强组成型启动子序列,其能够驱动与其可操作地连接的任何多核苷酸序列的高水平表达。然而,也可以使用其他组成型启动子序列,包括但不限于猴病毒40(SV40)早期启动子,小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV),人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子,MoMuLV启动子,禽白血病病毒启动子,埃巴病毒立即早期启动子,劳斯肉瘤病毒启动子,以及人基因启动子,例如但不限于肌动蛋白启动子,肌球蛋白启动子,延伸因子-1a启动子,血红蛋白启动子

和肌酸激酶启动子。此外,本发明不应限于组成型启动子的使用。诱导型启动子也被认为是本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关,其能够当期望此类表达时启动与其可操作连接的多核苷酸序列的表达,或者当不期望表达时关闭表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子,糖皮质激素启动子,孕酮启动子和四环素启动子。

[0281] 为了评估CAR多肽或其蛋白质的表达,待引入细胞的表达载体还可含有选择标志物基因或报告基因或两者,以促进从寻求通过病毒载体转染或感染的细胞群体中鉴定和选择表达细胞。在其他方面,选择标志物可以在单独的DNA片段上携带并用于共转染程序。选择标志物和报告基因两者在侧翼都可以有适当的调节序列以使其能够在宿主细胞中表达。有用的选择标志物包括例如抗生素抗性基因,例如neo等。

[0282] 报告基因用于鉴定潜在转染的细胞和用于评估调节序列的功能。通常,报告基因是下述基因,其不存在于受体生物体或组织中或不由受体生物体或组织表达,并且编码其表达通过一些易于检测的特性(例如酶活性)表现出来的多肽。在将DNA导入受体细胞后,在适当的时间测定报告基因的表达。合适的报告基因可包括编码萤光素酶,β-半乳糖苷酶,氯霉素乙酰转移酶,分泌性碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因(例如Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是公知的,可以使用已知技术制备或商业获得。通常,具有显示报告基因最高表达水平的最小5'侧翼区的构建体被鉴定为启动子。此类启动子区可以与报告基因连接,并用于评估试剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0283] 将基因导入并且表达到细胞中的方法是本领域已知的。在表达载体的背景下,可以通过本领域的任何方法将载体容易地引入宿主细胞,例如哺乳动物,细菌,酵母或昆虫细胞。例如,可以通过物理,化学或生物方式将表达载体转移到宿主细胞中。

[0284] 用于将多核苷酸导入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀,脂质转染,颗粒轰击,显微注射,电穿孔等。产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域公知的。参见例如Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第1-4卷,Cold Spring Harbor Press, NY)。将多核苷酸导入宿主细胞的优选方法是磷酸钙转染

[0285] 用于将目标多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体,尤其是逆转录病毒载体,已成为将基因插入哺乳动物例如人细胞中的最广泛使用的方法。其他病毒载体可以源自慢病毒,痘病毒,单纯疱疹病毒I,腺病毒和腺相关病毒等。参见例如美国专利No. 5,350,674和5,585,362。

[0286] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的化学方法包括胶体分散系统,例如大分子复合物,纳米胶囊,微球,珠和基于脂质的系统,包括水包油乳剂,胶束,混合胶束和脂质体。用作体外和体内递送载体的示例性胶体系统是脂质体(例如,人造膜囊泡)。现有技术的核酸靶向递送的其他方法是可用的,例如递送具有靶向纳米颗粒的多核苷酸或其他合适的亚微米尺寸的递送系统。

[0287] 在使用非病毒递送系统的情况下,示例性递送载体是脂质体。考虑使用脂质制剂将核酸引入宿主细胞(体外,离体或体内)。在另一方面,核酸可以与脂质结合。与脂质相关的核酸可以包封在脂质体的水性内部,散布在脂质体的脂质双层内,通过与脂质体和寡核苷酸结合的连接分子连接到脂质体,包埋在脂质体中,与脂质体复合,分散在含有脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质结合,作为脂质中的悬浮液包含,与胶束一起包含或复合,或以其他方式与脂质结合。脂质,脂质/DNA或脂质/表达载体相关组合物不限于溶液中的任何特定

结构。例如,它们可以以双层结构,胶束或“塌陷”结构存在。它们也可以简单地散布在溶液中,可能形成尺寸或形状不均匀的聚集体。脂质是脂肪物质,其可以是天然存在的或合成的脂质。例如,脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪液滴以及含有长链脂族烃以及其衍生物,例如脂肪酸,醇,胺,氨基醇和醛的化合物类别。

[0288] 适合使用的脂质可以从商业来源获得。例如,二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(dimyristyl phosphatidylcholine,“DMPC”)可以从Sigma, St. Louis, Mo. 获得;磷酸二十六烷基酯(dicetyl phosphate,“DCP”)可以从K&K Laboratories(Plainview, N.Y.)获得;胆固醇(“Choi”)可以从Calbiochem-Behring获得;二肉豆蔻基磷脂酰甘油(dimyristyl phosphatidylglycerol,“DMPG”)和其他脂质可以从Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.) 获得。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的储备溶液可以在约-20℃贮存。氯仿用作唯一的溶剂,因为它比甲醇更容易蒸发。“脂质体”是通用术语,包括通过产生封闭的脂质双分子层或聚集体形成的各种单层和多层脂质载体。脂质体可以表征为具有囊泡结构,其具有磷脂双层膜和内部水性介质。多层脂质体具有通过水性介质分离的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,它们自发形成。脂质组分在形成封闭结构之前经历自重排,并在脂质双层之间捕获水和溶解的溶质(Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5:505-10)。然而,还包括在溶液中具有与正常囊泡结构不同的结构的组合物。例如,脂质可呈现胶束结构或仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。还考虑lipofectamine-核酸复合物。

[0289] 无论用于将外源核酸引入宿主细胞中还是以其他方式将细胞暴露于本发明的抑制剂的方法,为了证实重组DNA序列在宿主细胞中的存在,可以进行多种测定。此类测定包括例如本领域技术人员公知的“分子生物学”测定,例如Southern和Northern印迹法,RT-PCR和PCR;“生物化学”测定,例如检测特定肽的存在或不存在,例如通过免疫学手段(ELISA和蛋白质印迹)或通过本文所述的测定来鉴定落入本发明范围内的试剂。

[0290] 本发明进一步提供了包含CAR编码核酸分子的载体。在一方面,CAR载体可以直接转导入细胞,例如T细胞或NK细胞。在一方面,载体是克隆或表达载体例如载体,包括但不限于一种或多种质粒(例如,表达质粒,克隆载体,小环(minicircle),微型染色体,双微小染色体),逆转录病毒和慢病毒载体构建体。在一方面,载体能够在哺乳动物T细胞中表达CAR构建体。在一个方面,哺乳动物T细胞是人T细胞。

[0291] T细胞来源

[0292] 在扩增和遗传修饰之前,从受试者获得T细胞来源。术语“受试者”旨在包括可以引发免疫应答的活生物体(例如哺乳动物)。受试者的实例包括人,狗,猫,小鼠,大鼠及其转基因物种。T细胞可以从许多来源获得,包括外周血单个核细胞,骨髓,淋巴结组织,脐带血,胸腺组织,来自感染部位的组织,腹水,胸腔积液,脾组织和肿瘤。在本发明的某些方面,可以使用本领域可用的任何数量的T细胞系。在本发明的某些方面,T细胞可以使用熟练技术人员已知的多种技术,例如Ficoll<sup>TM</sup>分离从例如从受试者收集的血液单位获得。在一个优选的方面,来自个体的循环血液的细胞通过单采血液成分术(apheresis)获得。单采血液成分产品通常含有淋巴细胞,包括T细胞,单核细胞,粒细胞,B细胞,其他有核白细胞,红细胞和血小板。在一方面,可以清洗通过单采血液成分术收集的细胞以除去血浆部分并将细胞置于合适的缓冲液或培养基中用于后续处理步骤。在本发明的一个方面,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)清洗细胞。在备选的方面,清洗溶液缺乏钙并且可能缺乏镁,或者可能缺少许多(若不

是所有)二价阳离子。在缺乏钙的情况下的初始活化步骤可以导致放大的激活。如本领域普通技术人员将容易理解的,清洗步骤可以通过本领域技术人员已知的方法,例如通过使用半自动“流通”离心机(例如Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)根据制造商的说明完成。清洗后,可以将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液,诸如例如无Ca无Mg的PBS,PlasmaLyte A,或含有或不含缓冲液的其它盐溶液。或者,可以除去单采血液成分样品的不期望的组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0293] 在一方面,通过裂解红细胞和耗尽单核细胞从外周血淋巴细胞分离T细胞,例如通过经由PERCOLLTM梯度离心或通过逆流离心淘洗进行。可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离特定的T细胞亚群,例如CD3+,CD28+,CD4+,CD8+,CD45RA+和CD45RO+ T细胞。例如,在一方面,通过与抗CD3/抗CD28(例如,3x28)缀合的珠(例如DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T)温育对于正向选择期望的T细胞足够的时间段来分离T细胞。在一方面,时间段是约30分钟。在进一步的方面,该时间段的范围为30分钟至36小时或更长以及其间的所有整数值。在进一步的方面,时间段为至少1,2,3,4,5或6小时。在另一个优选的方面,时间段是10至24小时。在一方面,温育时间段是24小时。与其他细胞类型相比,在有很少T细胞的任何情况下可以使用更长的温育时间来分离T细胞,例如从肿瘤组织或免疫受损个体中分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。此外,使用更长的温育时间可以提高CD8+ T细胞的捕获效率。因此,通过简单地缩短或延长T细胞与CD3/CD28珠结合的时间和/或通过增加或减少珠与T细胞的比例(如本文进一步描述的),可以在培养开始时或在过程中的其他时间点优先选择T细胞亚群。另外,通过增加或减少珠或其他表面上抗CD3和/或抗CD28抗体的比率,可以在培养起始时或在过程期间的其他期望时间点优先选择T细胞亚群。熟练技术人员将认识到在本发明的上下文中也可以使用多轮选择。在某些方面,可以期望进行选择程序并在激活和扩展过程中使用“未选择的”细胞。“未选择的”细胞也可以进行进一步的选择轮次。

[0294] 通过阴性选择富集T细胞群可以通过针对负选择细胞特有的表面标志物的抗体组合来实现。一种方法是通过负磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,其使用针对负面选择的细胞上存在的细胞表面标志物的单克隆抗体混合物。例如,为了通过阴性选择富集CD4+细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14,CD20,CD11b,CD16,HLA-DR和CD8的抗体。在某些方面,可以期望富集或正选择通常表达CD4+,CD25+,CD62Lhi,GITR+和FoxP3+的调节性T细胞。或者,在某些方面,T调节细胞被抗C25缀合的珠或其他类似的选择方法耗尽。

[0295] 在一个实施方案中,可以选择表达IFN- $\gamma$ ,TNF $\alpha$ ,IL-17A,IL-2,IL-3,IL-4,GM-CSF,IL-10,IL-13,颗粒酶B和穿孔蛋白,或其他合适的分子,例如其他细胞因子中的一种或多种的T细胞群体。筛选细胞表达的方法可以通过例如PCT公开号:W02013/126712中描述的方法测定。

[0296] 为了通过阳性或阴性选择分离期望的细胞群体,可以改变细胞和表面(例如珠等颗粒)的浓度。在某些方面,可以期望显著降低珠和细胞混合在一起的体积(例如,增加细胞浓度),以确保细胞和珠的最大接触。例如,在一个方面,使用20亿个细胞/ml的浓度。在一个方面,使用10亿个细胞/ml的浓度。在另一方面,使用大于1亿个细胞/ml。在另一方面,使用1000,1500,2000,2500,3000,3500,4000,4500或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在一个方面,使用7500,8000,8500,9000,9500或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在其他方面,可以使用

1.25或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可导致增加的细胞产量,细胞活化和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度可以更有效地捕获可以弱表达目的靶抗原的细胞,例如CD28阴性T细胞,或者来自存在许多肿瘤细胞的样品(例如,白血病血液,肿瘤组织等)的细胞。此类细胞群体可以具有治疗价值并且将期望获得。例如,使用高浓度的细胞允许更有效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8+ T细胞。

[0297] 在相关方面,可以期望使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面(例如,诸如珠的颗粒)的混合物,使颗粒和细胞之间的相互作用最小化。这选择表达大量要与颗粒结合的期望抗原的细胞。例如,CD4+ T细胞表达较高水平的CD28,并且比稀浓度的CD8+ T细胞更有效地捕获。在一方面,使用的细胞浓度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 。在其他方面,使用的浓度可以是约 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 以及其间的任何整数值。

[0298] 在其他方面,细胞可以在旋转器上以不同的速度在2-10°C或室温温育不同的时间长度。

[0299] 用于刺激的T细胞也可在清洗步骤后冷冻。不希望受理论束缚,冷冻和随后的解冻步骤通过除去细胞群体中的粒细胞并且在一定程度上除去单核细胞提供更均匀的产物。在除去血浆和血小板的清洗步骤之后,可以将细胞悬浮在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数在本领域中是已知的并且在这种情况下是有用的,但一种方法涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或含有10%葡聚糖40和5%右旋糖,20%人血清白蛋白和7.5%DMSO,或31.25%Plasmalyte-A,31.25%右旋糖5%,0.45%NaCl,10%葡聚糖40和5%右旋糖,20%人血清白蛋白和7.5%DMSO的培养基或含有例如Hespan和PlasmaLyte A的其他合适的细胞冷冻培养基,然后将细胞以1°C/分钟的速率冷冻至-80°C,并贮存在液氮储罐的气相中。可以使用其他控制冷冻方法以及在-20°C或液氮中立即不受控制的冷冻。

[0300] 在某些方面,将冷冻保存的细胞如本文所述进行解冻和清洗,并在使用本发明的方法活化之前在室温下静置1小时。

[0301] 在本发明的上下文中还考虑在可以需要如本文所述的扩增细胞之前的时间段从受试者收集血液样品或单采血液成分术产物。因此,可以在任何必要的时间点收集待扩增细胞的来源,并且分离和冷冻期望的细胞,例如T细胞,以便随后用于T细胞疗法中,以用于将受益于T细胞疗法,例如本文所述的那些T细胞疗法的任何数量的疾病或状况。在一个方面,血液样品或单采血液成分术取自一般健康的受试者。在某些方面,血液样品或单采血液成分术取自一般健康的受试者,该受试者有发展疾病的风险,但尚未患上疾病,并且将目的细胞分离并冷冻供以后使用。在某些方面,可以将T细胞扩增,冷冻,并在以后使用。在某些方面,在诊断如本文所述的特定疾病之后不久但在任何治疗之前从患者收集样品。在另一方面,在任何数量的相关治疗方式之前,从受试者的血液样品或单采血液成分术中分离细胞,所述相关治疗方式包括但不限于用诸如那他珠单抗(natalizumab),依法珠单抗(efalizumab),抗病毒剂,化疗,放射,免疫抑制剂,如环孢菌素,硫唑嘌呤,甲氨蝶呤,麦考酚酯和FK506,抗体或其他免疫消除剂如CAMPATH,抗CD3抗体,环磷酰胺,氟达拉滨,环孢菌素,FK506,雷帕霉素,霉酚酸,类固醇,FR901228和辐射治疗。

[0302] 在本发明的另一方面,在对受试者给予功能性T细胞的治疗后直接从患者获得T细胞。在这方面,已经观察到在某些癌症治疗,特别是用破坏免疫系统的药物的治疗之后,在患者通常从治疗中恢复期期间的治疗后不久,获得的T细胞的质量对于其离体扩增的能力

可以是最佳的或改善的。同样地,在使用本文所述的方法进行离体操作后,这些细胞可以处于优选的状态,以增强植入和体内扩增。因此,在本发明的上下文中考虑在该恢复期期间收集血细胞,包括T细胞,树突细胞或造血谱系的其他细胞。此外,在某些方面,动员(例如,用GM-CSF动员)和条件化方案可用于在受试者中产生状况,其中特定细胞类型的再增殖,再循环,再生和/或扩增是有利的,尤其是在治疗后限定的时间窗。示例性细胞类型包括T细胞,B细胞,树突细胞和免疫系统的其他细胞。

[0303] T细胞的激活和扩增

[0304] 一般可以使用如例如以下描述的方法活化和扩增T细胞:美国专利No.6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;和美国专利申请公开文本No.20060121005。

[0305] 通常,本发明的T细胞可以通过与表面接触来扩增,所述表面具有对其连接的刺激CD3/TCR复合物相关信号的试剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体。特别地,可以如本文所述刺激T细胞群体,例如通过与表面上固定的抗CD3抗体或其抗原结合片段,或抗CD2抗体接触,或通过与蛋白激酶C活化剂(例如苔藓抑素)以及钙离子载体接触。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用结合辅助分子的配体。例如,在适于刺激T细胞增殖的条件下,可以使T细胞群体与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4+ T细胞或CD8+ T细胞的增殖,抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括9.3,B-T3,XR-CD28(Diaclone,Besancon,France),可以用作本领域公知的其他方法(Berg et al.,Transplant Proc.30(8):3975-3977,1998;Haanen et al.,J.Exp.Med.190(9):13191328,1999;Garland et al.,J.Immunol.Meth.227(1-2):53-63,1999)。

[0306] 在某些方面,T细胞的主要刺激信号和共刺激信号可以由不同的方案提供。例如,提供每个信号的试剂可以在溶液中或与表面偶联。当与表面偶联时,试剂可以偶联到相同的表面(即,“顺式”形成)或不同的表面(即“反式”形成)。或者,可以将一种试剂偶联到表面而将另一种试剂在溶液中。在一方面,提供共刺激信号的试剂与细胞表面结合,并且提供主要活化信号的试剂在溶液中或偶联到表面。在某些方面,这两种试剂都可以在溶液中。在一方面,试剂可以为可溶形式,然后交联至表面,例如细胞,其表达Fc受体或抗体或将与试剂结合的其他结合剂。在这方面,关于预期用于激活和扩增本发明的T细胞的人工抗原呈递细胞(aAPC),参见例如美国专利申请公开文本No.20040101519和20060034810。

[0307] 在一方面,将两种试剂在珠上,在相同珠上,即“顺式”固定化或者固定化到不同珠,即“反式”。举例而言,提供主要活化信号的试剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段并且提供共刺激信号的试剂是抗CD28抗体及其抗原结合片段;并且将这两种试剂以等同的分子量共固定化到相同珠。在一方面,使用1:1比率的与珠结合的每种抗体,用于CD4+ T细胞扩增和T细胞生长。在本发明的某些方面,使用与珠结合的抗CD3:CD28抗体比率,使得与使用1:1比率观察到的扩增相比观察到T细胞扩增的增加。在一个具体的方面中,与使用1:1比率观察到的扩增相比观察到约1至约3倍的增加。在一方面,与珠结合的CD3:CD28抗体的比率的范围是100:1至1:100以及其间的所有整数值。在本发明的一方面,比抗CD3抗体更多的抗CD28抗体与颗粒结合,即CD3:CD28的比率小于1。在本发明的某些方面,与珠结合的抗CD28抗体与抗CD3抗体的比率大于2:1。在一个具体的方面,使用与珠结合的抗体的1:100CD3:

CD28比率。在一方面,使用与珠结合的抗体的1:75CD3:CD28比率。在另一方面,使用与珠结合的抗体的1:50CD3:CD28比率。在一方面,使用与珠结合的抗体的1:30CD3:CD28比率。在一个优选的方面,使用与珠结合的抗体的1:10CD3:CD28比率。在一方面,使用与珠结合的抗体的1:3CD3:CD28比率。在另一方面,使用与珠结合的抗体的3:1CD3:CD28比率。

[0308] 颗粒与细胞的比率为1:500至500:1以及其间的任何整数值可用于刺激T细胞或其他靶细胞。如本领域普通技术人员可以容易地理解,颗粒与细胞的比例可以取决于相对于靶细胞的颗粒大小。例如,小尺寸的珠只能结合几个细胞,而较大的珠可以结合许多细胞。在某些方面,细胞与颗粒的比率范围为1:100至100:1以及其间的任何整数值,并且在另外的方面,比率包括1:9至9:1,并且也可以使用其间的任何整数值来刺激T细胞。如上所述,导致T细胞刺激的抗CD3和抗CD28偶联颗粒与T细胞的比率可以变化,但是某些优选值包括1:100,1:50,1:40,1:30,1:20,1:10,1:9,1:8,1:7,1:6,1:5,1:4,1:3,1:2,1:1,2:1,3:1,4:1,5:1,6:1,7:1,8:1,9:1,10:1,和15:1,其中一个优选的比率是每个T细胞的至少1:1个颗粒。在一个方面,使用颗粒与细胞的比率1:1或更小。在一个具体的方面,优选的颗粒:细胞比率是1:5。在另外的方面,颗粒与细胞的比率可以随着刺激天数而变化。例如,在一方面,颗粒与细胞的比率在第一天为1:1至10:1,并且之后每天或每隔一天将其他颗粒加入细胞高达10天,最终比率1:1-1:10(基于添加当天的细胞计数)。在一个具体的方面,颗粒与细胞的比率在刺激的第一天是1:1并且在刺激的第三天和第五天调整为1:5。在一方面,每天或每隔一天添加颗粒至第一天的最终比率1:1,刺激的第三天和第五天的1:5。在一方面,在刺激的第一天,颗粒与细胞的比率为2:1,并且在刺激的第三天和第五天调整为1:10。在一方面,每天或每隔一天添加颗粒至第一天的最终比率1:1,并且在刺激的第三天和第五天为1:10。本领域技术人员将理解,各种其他比率可适用于本发明。特别地,比率将根据粒度和细胞大小和类型而变化。在一个方面,最典型的使用比率在第一天在1:1,2:1和3:1附近。

[0309] 在本发明的其他方面,将细胞如T细胞与试剂包被的珠组合,随后分离珠和细胞,然后培养细胞。在另一个方面,在培养之前,不将试剂包被的珠和细胞分开,但是一起培养。在另一方面,首先通过施加力(例如磁力)浓缩珠和细胞,导致细胞表面标志物的连接增加,从而诱导细胞刺激。

[0310] 举例来说,可以通过允许与抗CD3和抗CD28连接的顺磁珠(3×28珠)与T细胞接触来连接细胞表面蛋白。在一方面,将细胞(例如,104至109个T细胞)和珠(例如,比率1:1的DYNABEADS® M-450CD3/CD28T顺磁珠)组合在缓冲液,例如PBS(没有二价阳离子,如钙和镁)中。同样,本领域普通技术人员可以容易地理解可以使用任何细胞浓度。例如,靶细胞在样品中可能非常罕见,并且仅包含0.01%的样品或整个样品(即100%)可包含目标靶细胞。因此,任何细胞数在本发明的背景内。在某些方面,可以期望显著降低颗粒和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞浓度),以确保细胞和颗粒的最大接触。例如,在一方面,使用约20亿个细胞/ml的浓度。在一个方面,使用大于1亿个细胞/ml。在另一方面,使用1000,1500,2000,2500,3000,3500,4000,4500或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在一方面,使用7500,8000,8500,9000,9500或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在其他方面,可以使用1.25或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可导致增加的细胞产量,细胞活化和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度可以更有效地捕获可以弱表达目的靶抗原的细胞,例如CD28阴性T细胞。此类细胞群体可以具有治疗价值并且在某些方面将期望获得。例如,使用高浓度的细胞允许更有效地

选择通常具有较弱CD28表达的CD8+ T细胞。

[0311] 在本发明的一个方面,可以将混合物培养数小时(约3小时)至约14天或其间的任何以小时计的整数值。在一方面,可以将混合物培养21天。在本发明的一方面,将珠和T细胞一起培养约8天。在一个方面,珠和T细胞一起培养2-3天。也可以期望几个刺激周期,使得T细胞的培养时间可以是60天或更长。适合T细胞培养的条件包括适当的培养基(例如,最小必需培养基(Minimal Essential Media)或RPMI培养基1640或X-vivo 15,(Lonza)),其可包含增殖和存活力所必需的因子,包括血清(例如,胎牛或人血清),白细胞介素-2(IL-2),胰岛素,IFN- $\gamma$ ,IL-4,IL-7,GM-CSF,IL-10,IL-12,IL-15,TGF $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 或熟练技术人员已知的用于细胞生长的任何其他添加剂。用于细胞生长的其他添加剂包括但不限于表面活性剂,人血浆蛋白粉(plasmanate)和还原剂,例如N-乙酰基-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15, and X-Vivo 20, Optimizer, 添加氨基酸,丙酮酸钠和维生素,无血清或补充有适当量的血清(或血浆)或限定的一组激素,和/或足以使T细胞生长和扩增的细胞因子的量。抗生素,例如青霉素和链霉素,仅包括在实验培养物中,而不包括在要输注入受试者的细胞培养物中。将靶细胞在支持生长所必需的条件下例如适当的温度(例如37°C)和气氛(例如空气加5%CO<sub>2</sub>)维持。

[0312] 已暴露于不同刺激时间的T细胞可表现出不同的特征。例如,典型的血液或外周血单个核细胞产物具有辅助T细胞群(TH, CD4+),其大于细胞毒性或抑制性T细胞群(TC, CD8+).通过刺激CD3和CD28受体离体扩增T细胞产生T细胞群体,其在约8-9天之前主要由TH细胞组成,而在约8-9天之后,T细胞群体包含越来越大的TC细胞群体。因此,取决于治疗目的,向受试者输注主要由TH细胞构成的T细胞群可能是有利的。类似地,若已经分离TC细胞的抗原特异性亚组,则将该亚组扩增到更大程度可能是有益的。

[0313] 此外,除了CD4和CD8标志物之外,其他表型标志物显著变化,但在很大程度上,在细胞扩增方法的过程期间可再现性变化。因此,此类再现性实现针对特定目的改编活化的T细胞产物的能力。

[0314] 一旦构建PSMA CAR,可以使用各种测定来评估分子的活性,例如但不限于在抗原刺激后扩增T细胞的能力,在缺乏再刺激的情况下维持T细胞扩增,和在适当的体外和动物模型中的抗癌活性。评估PSMA CAR效果的测定在下面进一步详细描述

[0315] 原代T细胞中CAR表达的Western印迹分析可用于检测单体和二聚体的存在。参见例如Milone et al., Molecular Therapy 17 (8):1453-1464 (2009)。简言之,表达CAR的T细胞(CD4+和CD8+ T细胞的1:1混合物)在体外扩增超过10天,然后裂解和在还原条件下SDS-PAGE。使用针对TCR- $\zeta$ 链的抗体通过western印迹法检测含有全长TCR- $\zeta$ 细胞质域和内源性TCR- $\zeta$ 链的CAR。相同的T细胞亚群用于在非还原条件下的SDS-PAGE分析,以允许评估共价二聚体形成。

[0316] 抗原刺激后CAR+ T细胞的体外扩增可通过流式细胞术测量。例如,用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 aAPC刺激CD4+和CD8+ T细胞的混合物,然后用在待分析的启动子控制下表达GFP的慢病毒载体转导。示例性启动子包括CMV IE基因,EF-1 $\alpha$ ,遍在蛋白C或磷酸甘油激酶(PGK)启动子。

[0317] 还可以测量在缺乏再刺激的情况下持续的CAR+ T细胞扩增。参见例如Milone et al., Molecular Therapy 17 (8):1453-1464 (2009)。简言之,在第0天用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28包被的磁珠刺激,并在第1天用指定的CAR转导后,使用Coulter Multisizer III颗粒计数器在培

养的第8天测量平均T细胞体积(f1)。

[0318] PSMA靶向性双特异性抗体

[0319] 与天然抗体不同,双特异性抗体(BsAbs)是具有双重特异性的人工抗体,靶向两种不同的肿瘤抗原,或者一种在肿瘤细胞上,另一种在效应细胞上,可以有效地将免疫效应细胞募集到肿瘤部位并激活它们以特异性杀死肿瘤细胞。前者的实例,即靶向两种不同肿瘤相关抗原的BsAb是bH1,其同时结合Her2和VEGF(Bostrom J1 et al. 2009, Science 323: 1610-4),或ErBb2/ErBb3双靶向双特异性scFv(Robinson MK et al. 2008, Br J Cancer 99:1415-25)。两种肿瘤相关抗原都可以在肿瘤细胞上表达,或者一种可以在肿瘤细胞上表达,另一种在肿瘤细胞相关细胞上表达,例如肿瘤微环境细胞,例如肿瘤微环境中的成纤维细胞,血管细胞,内皮细胞,周细胞或免疫细胞(巨噬细胞,B细胞,T细胞等)。后者的实例,即靶向一种肿瘤相关抗原和免疫可活化抗原的BsAb是BsAb,其中一个臂靶向肿瘤抗原,如Her2,CD19或CD123,另一个臂靶向免疫可活化抗原,如CD3或CD16(Kontermann RE, et al. 2015, Drug Discovery Today 20:838-847),其可以结合肿瘤细胞和免疫细胞,如T细胞,NK细胞或巨噬细胞等。

[0320] 含有抗CD3抗体的BsAb将T细胞和肿瘤细胞结合在一起,导致活化的T细胞对肿瘤细胞的杀伤(Muller and Kontermann, BioDrugs 2010; 24:89-98, Baeuerle and Reinhardt 2009, Cancer Research 96:4941)。Blinatumomab(Bargou et al, Science 2008, 321:974-976)是名为BiTE的单链抗体构建体,其通过靶向CD19和CD3诱导细胞毒性。已经描述了其他基于抗体片段的T细胞接合双特异性(Moore et al. 2011, Blood 117: 4542-4551, Baeuerle et al. Current opinion in Molecular Therapeutics 2009, 11: 22-30)。BiTE<sup>TM</sup>形式是双特异性单链抗体构建体,其连接源自两种不同抗体的可变域。然而, Blinatumomab在体内具有差的半衰期,并且在生产和稳定性方面难以制造。因此,需要改进的双特异性抗体,其能够将T细胞靶向肿瘤细胞并具有改善的可制造性。

[0321] BsAb是可以通过化学交联,杂交瘤技术或遗传方法产生的杂合蛋白。在化学交联方法中,两种单克隆抗体及其片段通过还原剂解离以产生单价抗体及其片段。通过来自不同亲本抗体的两种单价抗体及其片段的化学交联构建所得的BsAb。该策略可用于大规模快速生产BsAb,但BsAb有时在交联过程中失活,难以保证产物的均一性。制备BsAb的另一种策略是杂交瘤技术,通过该技术将分泌一种单克隆抗体的已建立的杂交瘤细胞系与用其他抗原免疫的脾细胞融合,或者将分泌两种不同单克隆抗体的两种已建立的杂交瘤细胞系彼此融合以产生杂合的杂交瘤。前者产生的杂交瘤称为二聚体杂交瘤和四聚体杂交瘤。通常,由杂交瘤技术产生的BsAb保持高生物活性。然而,程序繁琐且耗时,并且不容易将BsAb与同时产生的其他非活性和不需要的抗体分离。这些BsAb形式遇到另一个可预测的问题:过大的大小和BsAb中包含的鼠组分在患者中是免疫原性的并且将诱导人抗小鼠抗体(HAMA)的产生,这可能阻止这些BsAb在临床中的再利用。此外,这些形式的BsAb的生产和纯化是昂贵的,这限制了BsAb在临床中的应用。用基因重组方法替换这些传统方法加速了这一领域的进展。基于小分子抗体技术,通过基因工程生产BsAb相对于上文所述的方法具有优点,如工艺稳定性,大规模生产,低成本和易于使用。基因工程通过连接两种不同的scFv导致各种小分子BsAb形式的发展。有按不同的连接分类的三种BsAb形式。(1)微型抗体是通过将两个scFv片段与寡聚化域(例如源自Fos或Jun转录因子的亮氨酸拉链基序)连接在一起而组装

的异二聚体。(2) 双抗体是非共价结合的二聚体,其由两条单链VH1-VL2和VH2-VL1组装,二者均通过短接头连接,所述短接头太短而不允许来自相同链的V域之间配对。因此,单独的每条链不能结合抗原,但是两条链(VH1-VL2和VH2-VL1)的共表达导致异二聚体双抗体的组装,其可以结合两种抗原。(3) ScBsAb: 使用互连接头(interlinker)连接具有不同特异性的两种不同scFv,并且ScBsAb在宿主细胞中表达为单一多肽。scFv中两个域之间的互连接头通常是(Gly4Ser)3。关于两个scFv之间的互连接头,有两种用于设计它的策略。为了避免异质性可变区之间的错误配对,互连接头通常是少于10个氨基酸残基的短肽接头,例如Gly4Ser。另一种策略是为互连接头选择更长的接头。总之,设计互连接头最重要的是确保可变域之间的正确配对以及蛋白质折叠,从而形成维持生物活性和稳定性的BsAb。应当引入一些促进纯化和延长血浆半衰期的新特性。

[0322] BsAb介导的免疫疗法在肿瘤的临床生物疗法中发挥有希望的作用。由BsAb介导的肿瘤杀伤作用基于刺激免疫系统,对肿瘤具有高度特异性并且没有MHC限制。因此,BsAb介导的疗法是传统方法,如手术,放疗和化疗的互补。BsAb不仅可以治愈肿瘤,还可以刺激免疫系统长时间提供和保持免疫保护。根据小鼠和临床实验结果,为了试验使用而制备的最佳BsAb应当至少具有以下五个特征:1) : 它以高特异性和亲和力靶向相关肿瘤抗原;2) : 它可以结合效应细胞-细胞毒性细胞上的触发因子,并且只有当BsAb与肿瘤抗原结合时才会产生交联;3) : BsAb能够促进肿瘤部位处相应白细胞组选择性产生的有效细胞毒性和炎症;4) : 必须将BsAb人源化以使重复使用后人抗小鼠应答的诱导最小化;最后,5) : BsAb不仅应当足够小以穿透肿瘤,还应当足够大以在循环中保持足够的时间。

[0323] 基于上述这些观点,在过去几年中已经开发了许多触发多种免疫效应细胞并靶向不同肿瘤细胞的BsAb,其中效应细胞包括T淋巴细胞,NK细胞,单核细胞,巨噬细胞,嗜中性粒细胞,LAK细胞(淋巴因子激活的细胞毒性细胞)和TIL细胞(肿瘤浸润淋巴细胞)等。T细胞通常被认为是免疫应答的主要特异性细胞。在所有成熟T细胞表面上表达的CD3是T细胞的常见表面标志物。CD3非共价结合TCR,形成完整的TCR-CD3复合物,并参与针对抗原刺激物的免疫应答。现在CD3是最广泛和成功使用的免疫效应细胞的表面触发分子。在BsAb内的抗CD3抗体结合T细胞表面上的CD3分子后,将产生如下的许多效果以杀死肿瘤细胞。这些作用包括:(1) T细胞的增殖和分化。首先,BsAb可以激活剩余的T细胞,导致源自具有CD4+或CD8+的未成熟(premature)效应T细胞的Th细胞和Tc细胞。其次,BsAb可激活许多记忆细胞以增殖并分化成效应T细胞,其将攻击并杀死肿瘤细胞。效应细胞的数量与肿瘤消除速率直接相关。(2) 细胞因子的释放:BsAb激活的CD4+ Th细胞可以分泌大量的IL-2。IL-2不仅刺激自分泌中Th细胞的增殖,而且还激活旁分泌中的幼稚CD8+ T细胞成为Tc细胞,导致Tc细胞的细胞毒性增大。此外,IL-2是激活T细胞的共刺激信号。因此,IL-2在BsAb介导的免疫效应中起重要作用。一些其他细胞因子,例如TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 在T细胞活化过程中产生,并且可以通过经由细胞间的介质抑制“旁观者”肿瘤细胞生长而产生“旁观者”效应。(3) 细胞毒性:体外实验表明,由BsAb介导,CD8+ Tc直接与肿瘤细胞相互作用,通过颗粒胞吐作用释放细胞毒性物质并裂解靶细胞,所述靶细胞通常在靶向肿瘤细胞后4-6小时内迅速发生。细胞毒性物质中的主要成分是穿孔蛋白和丝氨酸酯酶或粒酶。穿孔蛋白可以攻击质膜并形成离子通道,从而导致大量离子和水进入,导致细胞裂解和坏死,而粒酶类似于淋巴毒素,能够激活细胞中的DNA酶,从而导致核酸DNA裂解,导致靶细胞的凋亡。

[0324] 目前, Fv片段广泛用于构建BsAb, 因为它是具有完整抗原结合位点的最小单位, 小的(约为完整抗体的1/6), 缺乏Fc域, 免疫原性较低, 易于渗透到血管壁和实体瘤中。然而, Fv不稳定且易于在体内解离, 因为VH和VL域之间的共价键不能产生。为了改善Fv片段的稳定性, 使用VH和VL域之间的多肽互连接头形成所谓的ScFv。互连接头通常是具有15个氨基酸残基的短柔性肽, 例如(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>。在本发明的一个实施方案中, 所述互连接头用于抗CD3 ScFv, 而不同的互连接头用于抗PSMA scFv。

[0325] 具有标准IgG形式的双特异性抗体可能难以产生, 因为它们包括四种不同的多肽链。在非霍奇金淋巴瘤中临床证实了更小, 更容易产生的双特异性分子的功效。参见例如Bargou et al. (2008), Science 321 (5891) :974-977。

[0326] 由于这种小的单链分子的体内半衰期短, 通过连续静脉内输注的长期施用用于实现这些结果。因此, 本领域需要保持相似治疗功效的双特异性治疗剂, 其具有直接生产的形式, 并且具有有利的药代动力学特性, 包括更长的半衰期。

[0327] 如本文所述的双特异性-Fc (Bs-Fc) 可以结合两种不同的蛋白质并含有抗体的Fc区或其部分。相对于缺乏Fc区的双特异性单链分子, Bs-Fc可具有有利的药代动力学特性。Bs-Fc结合的一种蛋白质可以在免疫效应细胞如T细胞, NK细胞, 嗜中性粒细胞或巨噬细胞上表达, 另一种蛋白质可以在靶细胞, 例如癌细胞, 被病原体感染的细胞, 或介导疾病的细胞, 例如引起纤维化的成纤维细胞上表达。本文所述的Bs-Fc分子可以在靶细胞存在下引发免疫效应细胞的活化和/或在免疫效应细胞存在下杀死靶细胞。

[0328] 在一方面, 本文提供了Bs-Fc (图25A-图25D), 其可以包含: (a) 具有式V1-L1-V2-L2-V3-L3-V4-L4-Fc的多肽链, 其中Fc是Fc多肽链, 其中V1, V2, V3和V4各自是具有不同氨基酸序列的免疫球蛋白可变区, 其中L1, L2, L3和L4是接头, 并且其中L2和/或L4可存在或不存在(图25A); 或 (b) 具有式Fc-L4-V1-L1-V2-L2-V3-L3-V4的多肽链, 其中Fc是Fc多肽链, 其中V1, V2, V3和V4各自是具有不同氨基酸序列的免疫球蛋白可变区, 其中L1, L2, L3和L4是接头, 并且其中L2和/或L4可以存在或不存在, 其中Fc的二硫键可以位于N末端(图25C)或C末端(图25D); 其中Bs-Fc介导免疫效应细胞对展示靶细胞蛋白的靶细胞的细胞溶解, 并且不介导免疫效应细胞对未展示靶细胞蛋白的细胞的细胞溶解和/或其中Bs-Fc可以结合靶细胞和免疫效应细胞。第一和第二多肽链中的Fc多肽链可以是人IgG Fc多肽链。V1可以是重链可变(VH)区域, V2可以是轻链可变(VL)区域。在替代实施方案中, V1可以是VL区域, 并且V2可以是VH区域。V3和V4可以分别是VH和VL区, 或者V3和V4可以分别是VL和VH区, 其中图25B显示了一个实例。L1和L3可以是至少15个氨基酸长, 并且L2(当存在时)可以少于12个氨基酸长。V1和V2当它们是IgG的一部分和/或scFv抗体时可以与靶细胞或免疫效应细胞结合, 并且V3和V4当它们是IgG的一部分和/或scFv抗体时可以与靶细胞或免疫效应细胞结合。

[0329] 在本发明中, 构建通过Gly<sub>4</sub>Ser互连接头连接并与工程化IgG4 Fc融合的单链双特异性抗体(ScBsAb)以延长循环寿命。

[0330] 在本发明的一个实施方案中, ScBsAb的两种scFv之一是抗CD3 scFv。在本发明的一个实施方案中, 抗CD3 scFv源自OKT3抗体, 其具有SEQ ID N0.82中所示的核酸序列和SEQ ID N0.83中所示的氨基酸序列。在本发明的一个实施方案中, 抗CD3 scFv源自人源化OKT3抗体, 其具有SEQ ID N0.88中所示的核酸序列和SEQ ID N0.89中所示的氨基酸序列。

[0331] 在一个实施方案中,ScBsAb的另一种scFv靶向PSMA。在一个实施方案中,抗PSMA scFv是gy1,gy1-st,gy1-2或gy1-3,如本文中别处所述。例如,在一个实施方案中,BsAb的PSMA结合部分包含下列一种或多种:SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:47,SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:51。在某些实施方案中,BsAb的PSMA结合部分由下列一种或多种核苷酸序列编码:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:48,和SEQ ID NO:50。

[0332] 在本发明的一个实施方案中,ScBsAb中的抗PSMA scFv具有与本文所述gy1或gy1变体具有超过90%,91%,92%,93%,94%或95%同源性的氨基酸序列。

[0333] 为了延长ScBsAb的循环寿命,必须将大小增加至高于肾小球滤过的截留分子量,即约60kDa (Pisal DS et al. 2010, J Pharm Sci. 99:2557-2575)。在标签或融合蛋白中,Fc是完美的,因为它不仅通过扩大目的蛋白质的大小而且通过其与新生儿Fc受体(FcRn)的相互作用来延长循环时间。因此,在本发明的一个实施方案中,Fc域与ScBsAb融合。在本发明的另一个实施方案中,IgG4 Fc与ScBsAb融合。

[0334] ADC和CDC功能在BsAb中是不需要的,因为BsAb在CD3上的结合将通过这些功能触发T细胞的耗尽。IgG4不结合C1q,因此没有CDC。此外,IgG4对活化Fc  $\gamma$  R的亲和力低,而对抑制性Fc  $\gamma$  RIIb保持相对高的亲和力,因此IgG4具有非常弱的ADCC。为了完全消除ADCC,我们将N297突变为A297以抑制IgG4与Fc受体的结合。但是,IgG与FcRn结合不依赖于Fc糖基化,因此N297A突变不会影响IgG4Fc融合蛋白的半衰期。在本发明的一个实施方案中,N297A突变的IgG4 Fc与ScBsAb融合以延长循环寿命。核酸和氨基酸序列显示在SEQ ID NO.96和97中。

[0335] IgG4的Fab臂交换(FAE)需要铰链区处的S228和IgG4的CH3处的R409两者,所述Fab臂交换发生在生理条件下,例如在治疗性IgG4抗体那他珠单抗中观察到的。因此我们在ScBsAb和Fc之间使用IgG1铰链来避免FAE。使用IgG1铰链的另一个优点是IgG1铰链比IgG4 (12aa) 更长 (15aa),因此更具柔性。为了避免二硫键错配,负责与CL形成Fab的C220突变为A (C220A)。因此,在本发明的一个实施方案中,ScBsAb和Fc之间的接头是IgG1铰链;在另一个具体实施方案中,ScBsAb和Fc之间的接头是C220突变的IgG1铰链,其核酸和氨基酸序列显示在SEQ ID NO.94和95中。

[0336] 在本发明的一个实施方案中,ScBsAb表达的表达载体具有选自以下5种选择的表达盒:

[0337] 盒1: (Kozak) -SP-MCS-G4S-scFv2-mIgG1铰链-mIgG4 Fc

[0338] 盒2:SP-MCS-G4S-scFv2-mIgG1铰链-mIgG4 Fc

[0339] 盒3: (Kozak) -SP-scFv1-G4S-scFv2-mIgG1铰链-mIgG4 Fc

[0340] 盒4:SP-scFv1-G4S-scFv2-mIgG1铰链-mIgG4 Fc

[0341] 盒5:scFv1-G4S-scFv2-mIgG1铰链-mIgG4 Fc

[0342] (缩写:SP:信号肽;MCS:多克隆位点;mIgG1铰链:突变IgG1铰链;mIgG4 Fc:突变IgG4 Fc)

[0343] 在一个实施方案中,双特异性抗体包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列。在一个实施方案中,组合物包含编码SEQ ID NO.99的核苷酸序列。在本发明的一个具体的实施方案中,组合物包含SEQ ID NO.98的核苷酸序列。

[0344] 在一个实施方案中,双特异性抗体包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列。在一个实施方案中,组合物包含编码SEQ ID NO.101的核苷酸序列。在本发明的一个具体的实施方案中,组合物包含SEQ ID NO.100的核苷酸序列。

[0345] 在一个实施方案中,双特异性抗体包含包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。在一个实施方案中,组合物包含编码SEQ ID NO.103的核苷酸序列。在本发明的一个具体的实施方案中,组合物包含SEQ ID NO.100的核苷酸序列.amino acid sequence of SEQ ID NO:102.

[0346] 在一个实施方案中,抗PSMA和抗CD3 ScBsAb包含SEQ ID NO.105的氨基酸序列或其具有超过90%,91%,92%,93%,94%或95%同源性的氨基酸序列。

[0347] 在一个实施方案中,抗PSMA和抗CD3 ScBsAb包含SEQ ID NO.106的氨基酸序列或其具有超过90%,91%,92%,93%,94%或95%同源性的氨基酸序列。

[0348] 在一个实施方案中,抗PSMA和抗CD3 ScBsAb包含SEQ ID NO.108的氨基酸序列或其具有超过90%,91%,92%,93%,94%或95%同源性的氨基酸序列。

[0349] 在一个实施方案中,抗PSMA和抗CD3 ScBsAb包含SEQ ID NO.109的氨基酸序列或其具有超过90%,91%,92%,93%,94%或95%同源性的氨基酸序列。

[0350] 在一个实施方案中,BsAb表达载体包含SEQ ID NO.104的核酸序列或编码SEQ ID NO.105的氨基酸序列或其具有超过90%,91%,92%,93%,94%或95%同源性的氨基酸序列的核酸序列。

[0351] 在一个实施方案中,BsAb表达载体包含SEQ ID NO.107的核酸序列或编码SEQ ID NO.108的氨基酸序列或其具有超过90%,91%,92%,93%,94%或95%同源性的氨基酸序列的核酸序列。

[0352] 对于源自鼠抗体的大多数鼠抗体或BsAb,临幊上由鼠抗体诱导的人抗小鼠抗体(HAMA)问题强烈地限制了重复使用和剂量。小鼠抗体必须人源化以最小化它们的异源性,这是制备临幊中使用的抗体的紧迫事项。用于本发明的抗PSMA ScBsAb中针对CD3分子的scFv是人源化scFv,并且PSMA scFv是完全人抗体,其将显著最小化BsAb的免疫原性并改善癌症治疗的总体结果。联合疗法

[0353] 包含本文所述的抗体,抗体片段,ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体的组合物可以与其他已知的试剂和疗法组合使用。如本文所用,“组合”施用意指在受试者患有病症的过程中向受试者递送两种(或更多种)不同的治疗,例如,在受试者被诊断患有病症后且在已经治愈或消除病症或由于其它原因而停止治疗前递送两种或更多种治疗。在一些实施方案中,当递送第二治疗开始时仍然发生一种治疗的递送,从而就施用而言存在重叠。这有时在本文中称为“同时”或“同时递送”。在其他实施方案中,一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前结束。在任一种情况的一些实施方案中,由于联合施用,治疗更有效,例如用更

少的第二治疗看到等同的效果,或者第二治疗比在缺乏第一治疗的情况下施用第二治疗时看到的情况或者用第一治疗看到的类似情况以更大的程度降低症状。在一些实施方案中,递送使得症状或与病症相关的其他参数的减少大于在不存在另一种治疗时递送的一种治疗所观察到的。两种治疗的效果可以是部分叠加,完全叠加或大于叠加。递送可以使得在递送第二治疗时仍然可以检测到递送的第一治疗的效果。

[0354] 包含本文所述的抗体,抗体片段,ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体和至少一种另外的治疗剂的组合物可以在相同或分开的组合物中同时或序贯施用。对于序贯施用,可以首先施用本文所述的CAR表达细胞,并且可以第二次施用另外的试剂,或者可以逆转施用顺序。

[0355] 在其他方面,包含本文所述的抗体,抗体片段,ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体的组合物可以与手术,化疗,放射,免疫抑制剂如环孢菌素,硫唑嘌呤,甲氨蝶呤,麦考酚酯和FK506,抗体或其他免疫消除剂如CAMPATH,抗CD3抗体或其它抗体疗法,环磷酰胺,氟达拉滨,环孢菌素,FK506,雷帕霉素,霉酚酸,类固醇,FR901228,细胞因子和辐射组合用于治疗方案中。肽疫苗,例如记载于Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971。

[0356] 在一个实施方案中,包含本文所述的抗体,抗体片段,ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体的组合物可以与化学治疗剂组合使用。示例性化学治疗剂包括抗雄激素(雄激素拮抗剂),蒽环类抗生素(例如多柔比星(例如,脂质体多柔比星)),长春花生物碱(例如,长春碱,长春新碱,长春地辛,长春瑞滨),烷化剂(例如环磷酰胺,氨烯咪胺,美法仑,异环磷酰胺,替莫唑胺),免疫细胞抗体(例如,alemtuzamab,吉妥珠单抗,利妥昔单抗,托西莫单抗),抗代谢物(包括例如叶酸拮抗剂,嘧啶类似物,嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂(例如,氟达拉滨)),mTOR抑制剂,TNFR糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)激动剂,蛋白酶体抑制剂(例如,阿克拉霉素A,胶霉毒素或硼替佐米),免疫调节剂如沙利度胺(thalidomide)或沙利度胺衍生物(如来那度胺(lenalidomide))。

[0357] 认为可用于联合疗法的一般化疗剂包括阿那曲唑(Arimidex®)、比卡鲁胺(Casodex®)、硫酸博来霉素(Blenoxane®)、白消安(Myleran®)、消安注射液(Busulfex®)、卡培他滨(Xeloda®)、N4-戊氧基羰基-5-脱氧-氟胞昔,卡铂(Paraplatin®)、卡莫司汀(BiCNU®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、顺铂(Platinol®)、克拉屈滨(Leustatin®)、环磷酰胺(Cytoxan®或Neosar®)、阿糖胞昔,胞嘧啶阿糖核昔(Cytosar-U®)、阿糖胞昔脂质体注射液(DepoCyt®)、达卡巴嗪(DTIC-Dome®)、更生霉素(放线菌素D,Cosmegan)、盐酸柔红霉素(Cerubidine®)、柠檬酸柔红霉素脂质体注射液(DaunoXome®)、地塞米松、多西他赛(Taxotere®)、盐酸多柔比星(Adriamycin®, Rubex®)、依托泊昔(Vepesid®)、磷酸氟达拉滨(Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®, Efudex®)、氟他胺(Eulexin®)、tezacitidine、吉西他滨(二氟脱氧胞昔(difluorodeoxycytidine))、羟基脲(Hydrea®)、伊达比星(Idamycin®)、异环磷酰胺(IFEX®)、伊立替康(Camptosar®)、L-天冬酰胺酶(ELSPAR®)、甲酰四氢叶酸钙,美法仑(Alkeran®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、甲氨

蝶呤 (Folex®)、米托蒽醌 (Novantrone®)、麦罗塔 (mylotarg)、紫杉醇 (Taxol®)、phoenix (钇90/MX-DTPA)、喷司他丁、具有卡莫司汀植入物的聚苯丙生20 (Gliadel®)、柠檬酸他莫昔芬 (Nolvadex®)、替尼泊昔 (Vumon®)、6-硫鸟嘌呤、塞替派、替拉扎明 (Tirazone®)、托泊替康盐酸盐注射液 (Hycamtin®)、长春碱 (Velban®)、长春新碱 (Oncovin®)、和长春瑞滨 (Navelbine®)。

[0358] 示例性抗雄激素 (雄激素拮抗剂) 试剂包括比卡鲁胺, 乙酸戈舍瑞林SRDepo。

[0359] 示例性的烷基化剂包括但不限于氮芥, 乙烯亚胺衍生物, 烷基磺酸盐, 亚硝基脲和三氮烯) : 乌拉莫司汀 (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethyldopan®, Desmethyldopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil Nitrogen Mustard®, Uracillost®, Uracilmustaza®, Uramustin®, Uramustine®), 甲川氯 (Mustargen®), 环磷酰胺 (Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™), 异环磷酰胺 (Mitoxana®), 美法仑 (Alkeran®), 苯丁酸氮芥 (Leukeran®), 帕泊溴烷 (Amedel®, Vercyte®), 三乙基三聚氰胺 (triethylenemelamine) (Hemel®, Hexylen®, Hexastat®), 三乙基硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphor amine), 替莫唑胺 (Temozolomide) (Temosar®, Temodar®, Temodal®), 塞替派 (Thioplex®), 白消安 (Busilvex®, Myleran®), 卡莫司汀 (BiCNU®), 洛莫司汀 (lomustine) (CeeNU®), 链佐星 (Zanosar®) 和达卡巴嗪 (DTIC-Dome®)。另外的示例性烷化剂包括但不限于奥沙利铂 (Eloxatin®); 替莫唑胺 (Temodar® 和 Temodal®); 更生霉素 (也称为放线菌素-D, Cosmegen®); 美法仑 (也称为L-PAM, L-沙可来新, 和苯丙氨酸氮芥, Alkeran®); 六甲蜜胺 (也称为六甲基蜜胺 (HMM), Hexylen®, Hexylen®); 卡莫司汀 (BiCNU®); 苯达莫司汀 (Treanda®); 白消安 (Busulfex® 和 Myleran®); 卡铂 (Paraplatin®); 洛莫司汀 (也称为CCNU, CeeNU®); 顺铂 (也称为CDDP, Platinol® 和 Platinol®-AQ); 苯丁酸氮芥 (Leukeran®); 环磷酰胺 (Cytoxan® 和 Neosar®); 达卡巴嗪 (也称为DTIC, DIC 和达卡巴嗪, DTIC-Dome®); 六甲蜜胺 (也称为六甲基蜜胺 (HMM), Hexylen®, Hexylen®); 异环磷酰胺 (Ifex®); Prednumustine; 丙卡巴肼 (Matulane®); 氮芥 (也称为nitrogen mustard, mustine and mechloroethamine盐酸盐, Mustargen®); 链佐星 (Zanosar®); 塞替派 (也称为硫代磷酰胺 (thiophosphoamide), TESPA 和 TSPA, Thioplex®); 环磷酰胺 (Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®); 盐酸苯达莫司汀 (Treanda®)。

[0360] 示例性mTOR抑制剂包括例如替西罗莫司 (temsirolimus); ridaforolimus (称为 deferolimus, (1R, 2R, 4S)-4-[(2R)-2[(1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28Z, 30S, 32S, 35R)-1, 18-二羟基-19, 30-二甲氧基-15, 17, 21, 23, 29, 35-六甲基-2, 3, 10, 14, 20-戊氧代-11, 36-二恶-4-氮杂三环[30.3.1.04, 9]三十六-16, 24, 26, 28-四烯-12-基]

丙基]-2-甲氧基环己基二甲基次膦酸盐,又称AP23573和MK8669,并描述于PCT公开文本No.WO 03/064383);依维莫司(Afinitor®或RAD001);雷帕霉素(AY22989, Sirolimus®); simapimod (CAS164301-51-3); emsirolimus, (5-{2,4-二[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧基苯基)甲醇 (AZD8055); 2-氨基-8-[反式-4-(2-羟基乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮 (PF04691502, CAS 1013101-36-4); 和N2-[1,4-二氧代-4-[[4-(4-氧代-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2-基)吗啉-4-基]甲氧基]丁基]-L-精氨酰甘氨酰基-L- $\alpha$ -天冬氨酰L-丝氨酸-内盐 (SF1126, CAS 936487-67-1) 和XL765。

[0361] 示例性免疫调节剂包括例如afutuzumab(可从Roche®获得);培非司亭(Neulasta®);来那度胺(CC-5013, Revlimid®);沙利度胺(Thalomid®), actimid (CC4047); 和IRX-2(人细胞因子的混合物,包括白细胞介素1,白细胞介素2和干扰素 $\gamma$ , CAS 951209-71-5, 可从IRX Therapeutics获得)。

[0362] 示例性的蒽环类抗生素包括,例如多柔比星(Adriamycin®和Rubex®);博来霉素(Lenoxane®);柔红霉素(盐酸柔红霉素,道诺霉素和盐酸红比霉素(rubidomycin), Cerubidine®);柔红霉素脂质体(柠檬酸柔红霉素脂质体, DaunoXome®);米托蒽醌(DHAD), Novantrone®);表柔比星(Ellence™);伊达比星(Idamycin®, IdamycinPFS®);丝裂霉素C(Mutamycin®);格尔德霉素;除莠霉素;拉维霉素(ravidomycin);和去乙酰基拉维霉素(desacetyl ravidomycin)。

[0363] 示例性长春花生物碱包括例如酒石酸长春瑞滨(Navelbine®),长春新碱(Oncovin®)和长春地辛(Eldisine®);长春碱(也称为硫酸长春碱,长春碱和VLB, Alkaban-AQ®和Velban®);和长春瑞滨(Navelbine®)。

[0364] 示例性蛋白酶体抑制剂包括硼替佐米(Velcade®);卡非佐米(carfilzomib) (PX-171-007, (S)-4-甲基-N—((S)-1-((S)-4-甲基-1-((R)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-1-氧代戊烷-2-基)氨基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基)-2-((S)-2-(2-吗啉代乙酰胺基)-4-苯基丁酰胺基)-戊酰胺); marizomib (NPI-0052); 柠檬酸伊沙佐米(ixazomib) (MLN-9708); delanzomib (CEP-18770); 和0-甲基-N-[(2-甲基-5-噻唑基)羰基]-L-丝氨酰-0-甲基-N-[(1S)-2-[(2R)-2-甲基-2-环氧乙烷基]-2-氧代-1-(苯基甲基)乙基]-L-丝氨酰胺(ONX-0912))。

[0365] 示例性GITR激动剂包括例如GITR融合蛋白和抗GITR抗体(例如二价抗GITR抗体), 诸如例如美国专利No.6,111,090,欧洲专利No.:090505B1,美国专利No.8,586,023,PCT公开文本No.:WO 2010/003118和2011/090754描述的GITR融合蛋白;或例如欧洲专利No.7,025,962,欧洲专利No.:1947183B1,欧洲专利No.7,812,135,欧洲专利No.8,388,967,欧洲专利No.8,591,886,欧洲专利No.:EP 1866339,PCT公开文本No.:WO 2011/028683,PCT公开文本No.:WO 2013/039954,PCT公开文本No.:W02005/007190,PCT公开文本No.:WO 2007/133822,PCT公开文本No.:W02005/055808,PCT公开文本No.:WO 99/40196,PCT公开文本No.:WO 2001/03720,PCT公开文本No.:W099/20758,PCT公开文本No.:W02006/083289,PCT

公开文本No.:WO 2005/115451,欧洲专利No.7,618,632,和PCT公开文本No.:WO 2011/051726中描述的抗GITR抗体。

[0366] 在一个实施方案中,可以向受试者施用降低或改善与施用裸抗体或抗体片段,ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体相关的副作用的试剂。

[0367] 在一个实施方案中,可以向受试者施用增强裸抗体或抗体片段,ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体的活性的试剂。例如,在一个实施方案中,试剂可以是抑制抑制分子的试剂。在一些实施方案中,抑制性分子(例如程序性死亡1(PD1))可降低CAR表达细胞产生免疫效应器应答的能力。抑制性分子的实例包括PD1,PD-L1,CTLA4,TIM3,LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160,2B4和TGFR beta。抑制性分子的抑制(例如通过在DNA, RNA或蛋白质水平上的抑制)可以优化裸抗体或抗体片段,ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体性能。在实施方案中,抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA,可用于抑制CAR表达细胞或双特异性Ab反应细胞中抑制性分子的表达。在一个实施方案中,抑制剂是shRNA。在一个实施方案中,抑制信号的抑制剂可以是例如与抑制性分子结合的抗体或抗体片段。例如,试剂可以是与PD1,PD-L1,PD-L2或CTLA4结合的抗体或抗体片段(例如,伊匹单抗(ipilimumab)(也称为MDX-010和MDX-101,并以 Yervoy®销售;Bristol-Myers Squibb;曲美母单抗(Tremelimumab)(可从Pfizer获得的IgG2单克隆抗体,以前称为ticilimumab,CP-675,206)。在一个实施方案中,试剂是结合TIM3的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,试剂是结合LAG3的抗体或抗体片段。

[0368] PD1是CD28受体家族的抑制成员,所述CD28受体家族还包括CD28,CTLA-4,ICOS和BTLA。PD1在活化的B细胞,T细胞和髓样细胞上表达(Agata et al.1996 Int. Immunol 8: 765-75)。已显示PD1的两种配体PD-L1和PD-L2在与PD1结合后下调T细胞活化(Freeman et al.2000 J Exp Med 192:1027-34;Latchman et al.2001 Nat Immunol 2:261-8;Carter et al.2002 Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1在人类癌症中是丰富的(Dong et al.2003 J Mol Med 81:281-7;Blank et al.2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314;Konishi et al.2004 Clin Cancer Res 10:5094)。通过抑制PD1与PD-L1的局部相互作用可以逆转免疫抑制。PD1,PD-L1和PD-L2的抗体,抗体片段和其他抑制剂是本领域可获得的,并且可以与本文所述的PSMA靶向性裸抗体或抗体片段,ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体组合使用。例如,纳武单抗(也称为BMS-936558或MDX1106;Bristol-Myers Squibb)是完全人IgG4单克隆抗体,其特异性阻断PD 1。纳武单抗(克隆5C4)和其他特异性结合PD1的人单克隆抗体公开于美国专利No.8,008,449和W02006/121168。皮地利珠单抗(Pidilizumab)(CT-011;Cure Tech)是结合PD1的人源化IgG1k单克隆抗体。皮地利珠单抗和其他人源化抗PD1单克隆抗体公开于W02009/101611中。拉姆布罗力珠单抗(Lambrolizumab)(也称为MK03475;Merck)是结合PD1的人源化IgG4单克隆抗体。拉姆布罗力珠单抗和其他人源化抗PD1抗体公开于美国专利No.8,354,509和W02009/114335。MDPL3280A(Genentech/Roche)是结合PD-L1的人Fc优化的IgG1单克隆抗体。MDPL3280A和其他针对PD-L1的人单克隆抗体公开于美国专利No.7,943,743和美国公开文本No.:20120039906中。其他抗PD-L1结合剂包括YW243.55.S70(重链和轻链可变区在W02010/077634中的SEQ ID NO 20和21中显示)和MDX(也称为BMS-936559,和例如W02007/005874中公开的抗PD-L1结合剂)。AMP-224(B7-DCIg;Amplimmune;例如,在W02010/027827和W02011/066342中公开)是PD-L2Fc融合可溶性受体,

其阻断PD1和B7-H1之间的相互作用。其他抗PD1抗体包括AMP 514 (Amplimmune) 等,例如美国专利No.8,609,089,US 2010028330,和/或US 20120114649中公开的抗PD1抗体。

[0369] 在一些实施方案中,增强CAR表达细胞活性的试剂可以是例如包含第一域和第二域的融合蛋白,其中第一域是抑制性分子或其片段,并且第二域是与阳性信号相关的多肽,例如包含如本文所述的胞外信号传导域的多肽。在一些实施方案中,与阳性信号相关的多肽可包括CD28,CD27,ICOS的共刺激域,例如CD28,CD27和/或ICOS的胞内信号传导域,和/或主要信号传导域,例如,CD3 $\zeta$ 的,例如本文所述的。在一个实施方案中,融合蛋白由表达CAR的相同细胞表达。在另一个实施方案中,融合蛋白由细胞表达,例如不表达抗PSMA CAR的T细胞。

[0370] 配制剂和施用途径

[0371] 本发明的抗体,ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体可用于多种产品。在一个实施方案中,本发明的抗体,ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体是治疗剂,诊断剂或研究试剂。在一个实施方案中,本发明的抗体ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体是治疗剂。在一些实施方案中,本发明的抗体或抗体片段,ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体用于工业用途。本发明的抗体可用于单克隆或多克隆的抗体组合物中。本发明的抗体可以是激动性,拮抗性,中和性,抑制性或刺激性的。在一个实施方案中,本发明的抗体或抗体片段,ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体用于杀死携带靶抗原的靶细胞,例如癌细胞。在另一个实施方案中,本发明的抗体用于阻断,拮抗或激动靶抗原。在另一个实施方案中,本发明的抗体用于阻断,拮抗或激动靶抗原并杀死携带靶抗原的靶细胞。在另一个实施方案中,靶细胞是肿瘤细胞或其新血管系统。在一个实施方案中,新血管系统在血管发生中起重要作用,并且还被认为是本文提供的抗体或抗体片段,ADC,CAR表达细胞或双特异性抗体的靶物。

[0372] 本发明还提供了试剂盒,其包含包装在合适的包装材料中的一种或多种本发明的组合物,包括药物制剂。在另一个实施方案中,试剂盒包括编码本发明的抗体或抗原结合片段的核酸,Car T或Car NK细胞或其双特异性抗体。在另外的实施方案中,试剂盒包含核酸,其进一步包括表达控制元件;表达载体;病毒表达载体;腺相关病毒表达载体;腺病毒表达载体;和逆转录病毒表达载体。在另一个实施方案中,试剂盒包括表达本发明的抗体或其抗原结合片段的细胞,例如Car T或Car NK细胞。

[0373] 在另外的实施方案中,试剂盒包括标签或包装插页,其包括用于在体外,体内或离体在细胞中表达抗体或双特异性抗体或编码抗体,其抗原结合片段或双特异性抗体的核酸的用法说明。在另外的实施方案中,试剂盒包括标签或包装插页,其包括在体内或离体用本发明的抗体或抗体片段,ADC,CAR表达细胞或其双特异性抗体治疗受试者(例如,患有哮喘或有患哮喘风险的受试者)的用法说明。

[0374] 如本文所用,术语“包装材料”是指容纳试剂盒组分的物理结构。包装材料可以无菌地保持组分,并且可以由通常用于此类目的的材料(例如纸,瓦楞纤维,玻璃,塑料,箔,安瓿等)制成。标签或包装插页可包括适当的书面用法说明,如实施本发明的方法,例如治疗感冒。因此,本发明的试剂盒可另外包括在本发明的方法中使用试剂盒组分的用法说明。

[0375] 用法说明可包括用于实施本文所述的任何本发明方法的用法说明。因此,本发明的药物组合物可以与对受试者施用的用法说明一起包括在容器,包装或分配器中。用法说明可另外包括令人满意的临床端点或可能发生的任何不良症状的指示,或食品和药物管理

局要求用于人类受试者的额外信息。

[0376] 在一个实施方案中,本发明的多肽作为疫苗的一部分施用。在一些实施方案中,术语疫苗应理解为包括任何免疫调节组合物,并且除了本发明的多肽之外,此类疫苗可包含佐剂,抗原,免疫调节化合物或其组合。

[0377] 在一些实施方案中,佐剂可包括但不限于:(A)铝化合物(例如氢氧化铝,磷酸铝,羟基磷酸铝,羟基氧化物,正磷酸盐,硫酸盐等[例如参见参考文献96的第8和9章]),或不同铝化合物的混合物,化合物采取任何合适的形式(例如凝胶,结晶,无定形等),并且优选吸附;(B)MF59(5%角鲨烯,0.5%Tween 80,和0.5%Span 85,使用微流化器配制成为亚微米颗粒;(C)脂质体;(D)ISCOM,其可以不含额外的去污剂;(E)SAF,其含有10%角鲨烷,0.4%Tween 80,5%pluronic-嵌段聚合物L121和thr-MDP,微流化成亚微米乳液或涡旋以产生更大粒径的乳液;(F)Ribi<sup>TM</sup>佐剂系统(RAS),(Ribi Immunochem),其含有2%角鲨烯,0.2%Tween 80,和一种或多种细菌细胞壁组分,选自单磷酰脂质A(MPL),海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS),优选MPL+CWS(Detox<sup>TM</sup>);(G)皂昔佐剂,例如QuilA或QS21,也称为Stimulon<sup>TM</sup>;(H)壳聚糖;(I)完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA);(J)细胞因子,如白细胞介素(例如IL-1,IL-2,IL-4,IL-5,IL-6,IL-7,IL-12等),干扰素(如干扰素- $\gamma$ ),巨噬细胞集落刺激因子,肿瘤坏死因子等;(K)单磷酰脂质A(MPL)或3-O-脱酰化MPL(3dMPL);(L)3dMPL与例如QS21的组合和/或水包油乳液;(M)包含CpG基序的寡核酸,即含有至少一种CG二核酸,5-甲基胞嘧啶代替胞嘧啶使用;(N)聚氧乙烯醚或聚氧乙烯酯;(O)聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯表面活性剂与辛苯昔醇的组合或聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂与至少一种另外的非离子表面活性剂如辛苯昔醇的组合;(P)免疫刺激性寡核酸(例如CpG寡核酸)和皂昔;(Q)免疫刺激剂和金属盐颗粒;(R)皂昔和水包油乳液;(S)皂昔(例如QS21)+3dMPL+IL12(任选+固醇);(T)大肠杆菌不耐热肠毒素("LT"),或其解毒突变体,如K63或R72突变体;(U)霍乱毒素("CT"),或白喉毒素("DT")或任一种的解毒突变体;(V)双链RNA;(W)单磷酰脂质A模拟物,例如氨基烷基氨基葡萄糖昔磷酸盐衍生物,例如RC-529];(X)聚磷腈(PCPP);或(Y)生物粘合剂如酯化透明质酸微球或粘膜粘合剂如聚(丙烯酸),聚乙烯醇,聚乙烯吡咯烷酮,多糖和羧甲基纤维素的交联衍生物。

[0378] 在一些实施方案中,施用本发明化合物旨在降低病理状况的严重性。通过术语“降低病理状况的严重程度”,应理解通过本文公开的方法,化合物和组合物的任何减少都被认为包括在本发明中。在一个实施方案中,严重性的降低可以包括存活的增强,或者在另一个实施方案中,停止疾病进展,或者在另一个实施方案中,延迟疾病进展。

[0379] 在一个实施方案中,给药取决于对施用的分子/化合物或包含其的组合物的细胞响应性。通常,用于上述目的的剂量将变化,但是将是发挥期望效果的有效量,如本领域临床技术人员所确定的。如本文所用,术语“药学有效量”是指如本文所述的化合物的量,其将在患者中产生期望的症状缓解或其他期望的表型。

[0380] 在本发明的一个实施方案中,化合物的浓度取决于各种因素,包括待治疗状况的性质,患者的状况,施用途径和组合物的个体耐受性。

[0381] 在一些实施方案中,本发明的任何组合物包含如本文所述的任何形式或实施方案中的化合物。在一些实施方案中,本发明的任何组合物基本上由本文所述的任何形式或实施方案中的化合物组成。在一些实施方案中,术语“包含”是指包含指定的活性剂,例如本发

明的化合物,以及包含其他活性剂,和药学可接受载体,赋形剂,润肤剂,稳定剂等,如制药业所知。

[0382] 在一些实施方案中,本发明的组合物基本上由本文所述的多肽/多核酸/载体组成。在一些实施方案中,术语“基本上由……组成”是指其特定类别的试剂的唯一活性成分是指定的活性成分的组合物,然而,可以包括其他化合物,其直接参与制定有效成分的治疗效果。在一些实施方案中,术语“基本上由……组成”是指其靶向特定机制或通过特定途径起作用的唯一活性成分是指示的活性成分的组合物,然而,可以包括其他化合物,其直接参与指定活性成分的治疗效果,例如具有与指定试剂的治疗效果相关但不直接相关的作用机制。在一些实施方案中,术语“基本上由……组成”是指其唯一的活性成分是指定的活性成分的组合物,然而,可以包括用于稳定,保存制剂等,但不直接参与指定活性成分的治疗效果的其他化合物。在一些实施方案中,术语“基本上由……组成”可以指促进活性成分释放的组分。在一些实施方案中,术语“由……组成”是指组合物,其含有活性成分和药学可接受载体或赋形剂。

[0383] 应当理解,在特定情况下活性化合物的实际量将根据所用的具体化合物,配制的特定组合物,施用方式和所治疗的具体状况和生物体而变化。给定宿主的剂量可以使用常规考虑来确定,例如通过常规比较主题化合物和已知试剂的差异活性,例如通过适当的常规药理学方案。

[0384] 在一个实施方案中,短期施用本发明化合物以用于短暂状况的急性治疗,或者可以长期施用,尤其是在进行性,复发性或变性性疾病的情况下。在一个实施方案中,一种或多种本发明化合物可以同时施用,或者在另一个实施方案中,它们可以以交错方式施用。在一个实施方案中,交错方式可以由疾病的期或阶段决定。

[0385] 胃肠外载体(用于皮下,静脉内,动脉内或肌内注射)包括氯化钠溶液,林格氏葡萄糖,右旋糖和氯化钠,乳酸林格氏液和固定油。静脉内载体包括液体和营养补充剂,电解质补充剂,例如基于林格氏右旋糖的电解质补充剂等。实例是无菌液体,例如水和油,添加或不添加表面活性剂和其他药学可接受佐剂。通常,水,盐水,右旋糖水溶液和相关的糖溶液,以及二醇如丙二醇或聚乙二醇是优选的液体载体,特别是对于可注射溶液。油的实例是石油,动物,植物或合成来源的油,例如花生油,大豆油,矿物油,橄榄油,向日葵油和鱼肝油。

[0386] 在一个实施方案中,施用途径可以是胃肠外或其组合。在另一个实施方案中,途径可以是眼内,结膜,局部,透皮,皮内,皮下,腹膜内,静脉内,动脉内,阴道,直肠,瘤内,parcanceral,经粘膜,肌肉内,血管内,心室内,颅内,吸入(气溶胶),鼻呼吸(喷雾剂),鼻内(滴剂),舌下,口服,气溶胶或栓剂或其组合。在一个实施方案中,剂量方案将由熟练的临床医生基于诸如所治疗状况的确切性质,状况的严重程度,患者的年龄和一般身体状况,体重和个别病人的响应等因素来确定。

[0387] 对于鼻内施用或通过吸入施用,将化合物的溶液或悬浮液混合并在合适的适当载体存在下雾化或雾化。此类气溶胶可包含本文所述的任何试剂。

[0388] 对于胃肠外应用,特别合适的是可注射的无菌溶液,优选油性或水性溶液,以及悬浮液,乳液或植入物,包括栓剂和灌肠剂。安瓿是方便的单位剂量。此类栓剂可包含本文所述的任何试剂。

[0389] 可以配制持续或定向释放组合物,例如脂质体或其中活性化合物用可差异降解的

包衣材料保护(例如通过微囊化,多重包衣等)的那些。此类组合物可以配制成立即或缓慢释放。也可以冷冻干燥新化合物并使用所获得的冻干物,例如用于制备注射用产品。

[0390] 对于液体制剂,药学可接受载体可以是水性或非水性溶液,悬浮液,乳液或油。非水溶剂的实例是丙二醇,聚乙二醇和可注射的有机酯,例如油酸乙酯。

[0391] 含水载体包括水,醇/水溶液,乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。油的实例是石油,动物,植物或合成来源的油,例如花生油,大豆油,矿物油,橄榄油,向日葵油和鱼肝油。

[0392] 在一个实施方案中,本发明的组合物或用于本发明方法的组合物可以单独施用或在组合物中施用。在另一个实施方案中,可以使用本发明的组合物与常规赋形剂的混合物,即适用于胃肠外,肠内(例如口服)或局部施用的药学可接受有机或无机载体物质,其不与活性化合物不利反应。在一个实施方案中,合适的药学可接受载体包括但不限于水,盐溶液,醇,阿拉伯树胶,植物油,苄醇,聚乙二醇,明胶,碳水化合物如乳糖,直链淀粉或淀粉,硬脂酸镁,滑石,硅酸酸,粘性石蜡,白石蜡,甘油,藻酸盐,透明质酸,胶原,香料油,脂肪酸单甘油酯和甘油二酯,季戊四醇脂肪酸酯,羟甲基纤维素,聚乙烯吡咯烷酮等。在另一个实施方案中,药物制剂可以灭菌和若需要,可以与助剂混合,例如润滑剂,防腐剂,稳定剂,润湿剂,乳化剂,影响渗透压的盐,缓冲剂,着色剂,调味剂和/或芳香物质等,它们不会与活性化合物发生不利反应。在另一个实施方案中,它们还可以根据需要与其他活性剂例如维生素组合。

[0393] 药物组合物包括“药学可接受”和“生理学上可接受的”载体,稀释剂或赋形剂。在一个实施方案中,术语“药学可接受”和“生理学上可接受的”是指安全的,并且为有效量的至少一种用于本发明的化合物的期望施用途径提供适当递送的任何制剂。该术语也指缓冲制剂的使用,其中根据化合物的稳定性和施用途径将pH维持在特定的期望值,范围为pH4.0至pH9.0。该术语包括与药物施用相容的溶剂(水性或非水性),溶液,乳液,分散介质,包衣材料,等渗和吸收促进剂或延迟剂。此类制剂可以包含在液体;乳液,悬浮液,糖浆或酏剂,或固体形式;片剂(包衣或未包衣),胶囊(硬或软),粉末,颗粒,晶体或微珠中。补充的活性化合物(例如防腐剂,抗细菌剂,抗病毒剂和抗真菌剂)也可掺入组合物中。

[0394] 本发明的药物组合物可包括一种或多种另外的选自下组的化疗剂:氮芥(例如环磷酰胺和异环磷酰胺),氮丙啶(例如塞替派),烷基磺酸盐(例如白消安),亚硝基脲(例如卡莫司汀和链佐星),铂络合物(例如卡铂和顺铂),非经典烷化剂(例如达卡巴嗪和替莫唑胺),叶酸类似物(例如甲氨蝶呤),嘌呤类似物(例如氟达拉滨和巯嘌呤),腺苷类似物(例如,克拉屈滨和喷司他丁),嘧啶类似物(如氟尿嘧啶(单独或与亚叶酸钙组合)和吉西他滨),取代脲(如羟基脲),抗肿瘤抗生素(如博来霉素和多柔比星),表鬼臼毒素(如依托泊苷和替尼泊苷),微管剂(例如多西他赛和紫杉醇),喜树碱类似物(例如伊立替康和拓扑替康),酶(例如天冬酰胺酶),细胞因子(例如,白细胞介素-2和干扰素- $\alpha$ ),单克隆抗体(如曲妥珠单抗和贝伐单抗),重组毒素和免疫毒素(如重组霍乱毒素-B和TP-38),癌症基因治疗,物理治疗(如过热,放射治疗和手术)和癌症疫苗(例如,针对端粒酶的疫苗)。

[0395] 本发明的组合物(例如,抗体和双特异性分子)也可以与补体一起施用。因此,在本发明范围内的是包含人抗体,多特异性或双特异性分子和血清或补体的组合物。这些组合物的优点在于补体位于人抗体,多特异性或双特异性分子附近。或者,本发明的人抗体,多特异性或双特异性分子和补体或血清可以分开施用。

[0396] 可以配制药物组合物以与特定的局部或全身施用途径相容。因此，药物组合物包括适于通过特定途径施用的载体，稀释剂或赋形剂。本发明组合物的施用途径的具体非限制性实例是吸入或鼻内递送。另外的途径包括胃肠外，例如静脉内，皮内，皮下，口服，透皮(局部)，经粘膜和直肠施用。

[0397] 用于胃肠外，皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包括：无菌稀释剂，例如注射用水，盐溶液，固定油，聚乙二醇，甘油，丙二醇或其他合成溶剂；抗细菌剂，例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂如乙二胺四乙酸；缓冲剂如乙酸盐，柠檬酸盐或磷酸盐；和调节渗透压的试剂如氯化钠或右旋糖。可以用酸或碱，例如盐酸或氢氧化钠调节pH。

[0398] 用于注射的药物组合物包括无菌水溶液(在水溶性的情况下)或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用，合适的载体包括生理盐水，抑菌水，Cremophor EL<sup>TM</sup> (BASF, Parsippany, N.J.) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。载体可以是溶剂或分散介质，其含有例如水，乙醇，多元醇(例如，甘油，丙二醇和液体聚乙二醇等)，以及它们的合适混合物。例如，通过使用诸如卵磷脂的涂层材料，通过在分散的情况下保持所需的粒度和通过使用表面活性剂，可以保持流动性。抗细菌剂和抗真菌剂包括例如对羟基苯甲酸酯，氯丁醇，酚，抗坏血酸和硫柳汞。等渗剂，例如糖，多元醇如甘露醇，山梨糖醇，氯化钠可包括在组合物中。包括延迟吸收的试剂，例如单硬脂酸铝和明胶可以延长可注射组合物的吸收。

[0399] 无菌可注射溶液可以通过将所需量的活性化合物掺入具有上述成分之一或组合的适当溶剂中，然后过滤灭菌来制备。通常，通过将活性化合物掺入含有基本分散介质和上述其他成分的无菌载体中来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，制备方法包括例如真空干燥和冷冻干燥，其产生活性成分加上来自其先前无菌过滤溶液的任何其他期望成分的粉末。

[0400] 对于透粘膜或透皮施用，在制剂中使用适合于屏障渗透的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域已知的，并且包括例如用于经粘膜施用，去污剂，胆汁盐和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻喷雾剂，吸入装置(例如吸气器)或栓剂来完成。对于透皮施用，将活性化合物配制成本领域公知的软膏，油膏，凝胶或乳膏。

[0401] 本发明的抗体，包括亚序列和修饰形式以及编码它们的核酸，可以用提供保护而免于从身体中快速消除的载体制备，例如控释制剂或延时材料，例如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯。还可以使用植入物和微囊化递送系统递送组合物，以实现局部或全身持续递送或控制释放。

[0402] 可以使用可生物降解的生物相容性聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯，聚酸酐，聚乙醇酸，胶原，聚原酸酯和聚乳酸。制备此类制剂的方法对于本领域技术人员来说是显而易见的。该材料也可以从Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals, Inc商购获得。脂质体悬浮液(包括使用抗体或病毒外壳蛋白靶向细胞或组织的脂质体)也可以用作药学可接受载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备，例如如美国专利No.4,522,811中所述。

[0403] 适用于本发明方法中施用的组合物的其它药物制剂是本领域已知的(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa.; The Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, N.J.; and

Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993)。药物制剂可以以剂量单位形式包装,以便于施用和剂量均匀。如本文所用的“剂量单位形式”是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有预定量的活性化合物,所述预定量经计算以与药物载体或赋形剂一起产生期望的治疗效果。

[0404] 尽管本文提供的药物组合物主要涉及适合对人施用的药物组合物,但本领域技术人员将理解,此类组合物通常适合对所有种类的动物施用。适合于对人施用以使组合物适于施用于各种动物的药物组合物的修改是充分理解的,并且普通技术的兽医药理学家可以用很少的(若有的话)实验设计和进行此类修改。考虑施用本发明药物组合物的受试者包括但不限于人和其他灵长类和其他哺乳动物。

[0405] 应理解,与本文所述多肽显示序列,结构或功能同源性的任何氨基酸序列(无论是通过任何方式天然地或合成地获得)都被认为是本发明的一部分。

[0406] 在一个实施方案中,术语“约”在数量上表示加或减5%,或在另一个实施方案中加或减10%,或在另一个实施方案中加或减15%,或在另一个实施方案中加或减20%。

[0407] 在一个实施方案中,术语“受试者”是指哺乳动物,包括需要治疗或易患状况或其后遗症的人。受试者可包括狗,猫,猪,牛,绵羊,山羊,马,大鼠,小鼠和人。术语“受试者”不排除在所有方面都正常的个体。

[0408] 应理解,对任何出版物,专利申请或公告专利的引用应被视为通过引用整体并入本文。

[0409] 应当理解,可以使用用于测量由治疗化合物调节的特定活性的任何测定法作为确定化合物功效的手段,在一个实施方案中,测定化合物的最佳负载的手段,在另一个实施方案中,测定时机和剂量的手段,在另一个实施方案中,或测定其组合的手段。

## 实施例

[0410] 通过参考以下实验实施例进一步详细描述本发明。提供这些实施例仅用于示例的目的,并且不意图是限制性的,除非另有规定。因此,本发明决不应该解释为限于以下实施例,而是应当解释为包括由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[0411] 无需进一步描述,认为本领域普通技术人员可以使用前述描述和以下实例性实施例产生和利用本发明并实施所要求保护的方法。因此,以下工作实施例具体指出本发明的优选实施方案,并且不应解释为以任何方式限制本公开的剩余部分。

[0412] 实施例1:淘选酵母展示人scFv文库

[0413] 构建 $1 \times 10^{11}$ 个酵母展示天然人scFv文库,并且人PSMA的胞外域购自R&D systems。先前描述了文库淘选的方法(Zhao et al., J Immunol Methods. 2011; 363 (2): 221-32.)。简言之,将重组PSMA蛋白质生物素化并与诱导酵母展示scFv文库一起温育;使用链霉抗生物素蛋白(SA)缀合的微珠,然后使用流式细胞仪活化细胞分选(FACS)分离PSMA结合酵母细胞;从分离的酵母细胞中扩增scFv基因并且克隆到分泌性表达酵母菌株YVH10中;在96孔板中诱导个别的分泌性scFv表达,并通过高通量ELISA鉴定PSMA结合克隆。

[0414] PSMA重组蛋白的生物素化

[0415] 通过在4°C对PBS透析将PSMA重组蛋白缓冲液变为PBS,并将浓度调节至0.5mg/ml。

将EZ-Link Sulfo-NHS-生物素试剂(10mM;溶于冷水中)(life technologies)与PSMA重组蛋白混合至最终摩尔比1:20(蛋白质:生物素)。将PSMA重组蛋白混合物在4℃温育2小时。通过透析除去未反应的游离生物素试剂,并且将生物素化的蛋白质等分取样并贮存在-80℃。

**[0416] 使用磁珠的酵母展示scFv文库淘选**

[0417] 将酵母展示scFv文库从-80℃解冻并以3000rpm离心5分钟。弃去上清液,并且用12L SD-CAA培养基(1升SD-CAA培养基含有5g酪蛋白氨基酸、1.7g不含硫酸铵和氨基酸的酵母氮碱基、5.3g硫酸铵,10.2g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、8.6g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和20g右旋糖)重悬浮酵母细胞。在以200rpm摇动的情况下在30℃将细胞培养过夜。次日,通过以3000rpm离心5分钟收获酵母细胞,并将合适的量重悬浮于12L S-CAA-GRD诱导培养基(1升S-CAA-GRD培养基含有5g酪蛋白氨基酸、1.7g不含硫酸铵和氨基酸的酵母氮碱基、5.3g硫酸铵、10.2g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、8.6g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、1g右旋糖、20g半乳糖和20g棉子糖),从而最终浓度为OD600=0.5,并在20℃诱导过夜。通过以3000rpm离心5分钟收获诱导的酵母细胞,并用2L PBE缓冲液(PBE缓冲液是含有2mM EDTA和0.5%BSA的PBS缓冲液)清洗两次,最后重悬于200ml PBE中。将细胞与40μg生物素化的PSMA蛋白在室温(RT)温育1.5小时,然后在4℃温育0.5小时。以下步骤在4℃或冰上完成。通过以3000rpm离心5分钟收获细胞,并用2L PBE清洗两次,并重悬于200ml PBE中。然后,将2ml链霉抗生物素蛋白微珠(Miltenyi Biotec)加入细胞中并缓慢摇动温育1小时。向细胞加入1升PBE,将溶液涡旋振荡以确保细胞分离成单细胞,并使用70μm滤器过滤。使用16个Miltenyi LS柱进行PSMA结合酵母细胞分离。简言之,将7mL过滤的细胞悬浮液加入到柱。在每个7mL细胞进入柱并且停止流动后,将柱从磁体移除并立即放回磁体中。这重排柱中的铁珠,并允许物理捕获在珠之间的细胞通过。凭借磁铁中返回的柱,加入1ml清洗缓冲液,并且清洗液流过后,将另外7mL细胞加到柱上。在每次加载细胞之间重复柱移除程序。一旦将所有细胞加载到柱上,用3mL清洗缓冲液清洗柱。此清洗除去柱的空体积中的细胞。将柱从磁铁移除并立即更换,如先前的。清洗重复两次。一旦柱停止滴落,从磁铁移除柱,然后加入7mL清洗缓冲液。使用柱塞将所有剩余的细胞推入15-mL锥形管中。

[0418] 将收获的细胞再次加载到两个新柱以进一步除去非特异性细胞。通过以3000rpm离心5分钟收获最终洗脱的细胞。将细胞涂布在SD-CAA板上,并在30℃培养2天。从第一轮磁性分选中获得总共 $2.5 \times 10^7$ 个克隆。刮下细胞并诱导以用于第二轮磁性分选。将等分试样也于-80℃贮存在含有10%甘油的SD-CAA中。

[0419] 将 $5 \times 10^9$ 个第一轮磁性分选的酵母细胞接种到200ml S-CAA-GRD培养基中以在20℃诱导过夜。次日,通过以3000rpm离心5分钟收获 $2.5 \times 10^9$ 个诱导的细胞,并用15ml PBE清洗两次。将细胞重悬于3ml PBE中,并与3μg生物素化的PSMA蛋白在室温温育1.5小时,然后在4℃温育半小时。以下所有步骤均在4℃或冰上进行。温育后,通过以3000rpm离心5分钟沉淀细胞,然后用15ml PBE清洗三次。将细胞再次沉淀并重悬于3ml PBE中,并与50μl抗生物素抗体偶联的微珠在4℃温育1小时。用PBE清洗细胞一次,重悬于15ml PBE中并通过70μm滤器过滤,并使用如上所述的一个Miltenyi Macs LS柱分离PSMA结合酵母细胞。第二轮磁性分选产生 $5.1 \times 10^6$ 个克隆。

[0420] 进行第三轮磁性分选以进一步富集PSMA特异性酵母群体。简言之,在20℃在50ml S-CAA-GRD中诱导 $1 \times 10^9$ 个细胞过夜,并取 $5 \times 10^8$ 个细胞进行进一步淘选。用15ml PBE清洗细胞两次,并重悬于3ml PBE中,然后在室温与1μg生物素化PSMA蛋白一起温育1.5小时,然

后在4℃温育半小时。以下所有步骤均在4℃或冰上进行。温育后,通过以3000rpm离心5分钟沉淀细胞,然后用15ml PBE清洗三次。将细胞再次沉淀并重悬于3ml PBE中,并与50μl链霉抗生物素蛋白缀合的微珠在4℃温育1小时。用PBE清洗细胞一次,重悬于15ml PBE中并通过70μm滤器过滤,并使用如上所述的一个Miltenyi Macs LS柱分离PSMA结合酵母细胞。第三轮磁性分选产生 $1 \times 10^7$ 个克隆。

[0421] 使用流式分类的酵母展示scFv库淘选

[0422] 从第三次磁性分选中获得的酵母细胞进一步进行三轮流式分选。若没有另外说明,所有离心均为3000rpm,持续5分钟,所有步骤均在4℃或冰上。从第三次磁性分选中分离的 $2 \times 10^9$ 个细胞在100ml S-CAA-GRD培养基中于20℃诱导过夜,从中取出 $1 \times 10^8$ 个细胞进行第一轮流式分选。将细胞沉淀并用15ml PBE清洗两次,然后重悬于1ml PBE中,并在室温与0.2μg生物素化的PSMA蛋白一起温育1.5小时,然后在4℃温育半小时。用PBE清洗细胞三次,然后与50μl抗V5-Alexa647 (AbD Stereo) 和50μl链霉抗生物素蛋白-PE (SA-PE) (BD biosciences) 在1ml PBE中于4℃在黑暗中温育1小时。染色后,用15ml PBE清洗细胞三次,并重悬于1ml PBE中以通过流式细胞术进行流式分选,其中Alexa647和PE双阳性细胞作为PSMA结合群体分选。平行设置的染色对照包括:(1)未染色对照;(2)仅抗V5-Alexa647染色;和(3)仅SA-PE染色。将 $1.2 \times 10^6$ 个双阳性细胞分选并在SD-CAA平板上于30℃培养2天。

[0423] 从第一次流式分选中分离的细胞进一步进行第二和第三次流式分选。样品制备与第一次流式分选类似,只是在第二次流式分选中,使用50ng生物素化的PSMA蛋白和抗生物素-FITC (Abcam) 代替染色;并且在第三轮流式分选中,生物素化的PSMA蛋白进一步减少至2ng,并且使用SA-PE检测PSMA结合。最后,在第二和第三次流式分选中分选 $1 \times 10^6$ 和 $2 \times 10^4$ 个细胞(前0.1%群体)。

[0424] 实施例2:鉴定个别抗PSMA克隆

[0425] 将富集的展示scFv文库转换为分泌性scFv文库

[0426] 提取在展示EBY100细胞中含有scFv基因的质粒,扩增scFv基因片段并克隆到分泌载体pYS1中,并转化到酵母菌株YVH10中用于分泌性scFv表达。

[0427] 按照酵母质粒提取试剂盒 (Zymo Research) 的方案,在第三次流式分选期间分选的前0.1%群体扩增后提取酵母质粒,并使用以下引物通过PCR扩增scFv基因片段,正向:5' - G A C T A C A A G G A C G A C G A T G A C - 3' (SEQ ID NO:111) 和反向:5' - A G T A G A A T C A A G A C C T A G T A G A G G G - 3' (SEQ ID NO:112)。然后纯化扩增的scFv基因片段并与Sfi I/Not I线性化的分泌scFv表达载体pYS1一起共转化到酵母菌株YVH10中。scFv基因/载体的摩尔比为3:1,并且1μg载体用于转化。先前描述了YVH10感受态细胞制备和转化 (Zhao et al., J Immunol Methods. 2011;363 (2):221-32.)。将转化的细胞在SD-CCA-Trp (SD-CAA加0.008%色氨酸) 上于30℃培养2天。

[0428] 鉴定PSMA结合性scFv克隆

[0429] 挑选384个分泌性scFv克隆,在SD-CAA-Trp中培养,并在S-CAA-GRD-Trp中在20℃在96孔深孔板中诱导可溶性scFv表达2天。使用ELISA鉴定PSMA结合性scFv。简言之,ELISA板用50μl/孔1μg/ml抗Flag抗体 (Sigma) 在4℃包被过夜,用PBST (含有0.05% Tween 20的PBS) 清洗两次并用PBSTM (含有5%无脂奶粉 (Biorad) 的PBST) 在室温封闭2小时。然后将平板与100μl用PBSTM以1:1稀释的含有scFv的上清液在室温一起温育1小时,用PBST清洗6次,

然后在室温用PBSTM中的0.4 $\mu$ g/ml,50ml/ml生物素化的PSMA蛋白温育1小时。如上所述进行6次清洗后,将板与PBSTM中的100 $\mu$ l 1:1000稀释的链霉抗生物素蛋白-HRP (BD Biosciences) 在室温温育1小时,再次清洗6次,并且将TMB (KPL) 和终止缓冲液与平板序贯温育以显现比色法。在OD450测量吸光度。在分析的384个克隆中,260个显示阳性信号 (OD450值大于背景值的两倍)。进一步分析了96个随机挑选的克隆的PSMA结合。结果显示所有特异性结合PSMA但不结合对照蛋白Fc (人IgG1Fc重组蛋白),其中,挑选30个克隆进行质粒提取,将scFv片段进行PCR扩增,在使用Qiagen PCR纯化试剂盒纯化并进行测序。PCR引物是:正向:CTATTGCCAGCATTGCTGC (SEQ ID NO:113),反向:ATAGGGACCTAGACTTCAGG (SEQ ID NO:114);测序引物是:正向:CCTTCTACTCCTCCTACACC (SEQ ID NO:115),反向:GGAGGGCGTGAATGTAAGC (SEQ ID NO:116)。测序显示所有克隆具有几乎相同的scFv序列,即如SEQ ID NO 2、4和20中所示的gy1,其中一些点突变显示在SEQ ID NO:38、40、42、44、46、48和50。

[0430] 实施例3:抗PSMA scFv的表征

[0431] 酵母展示文库淘选使用PSMA的重组胞外域,其可以具有与活细胞表面上表达的构象不同的构象。因此,有必要评估gy1 scFv与细胞表面上表达的天然构象PSMA的结合能力,以及抗原结合时的内化。

[0432] gy1 scFv与细胞表面表达的PSMA的结合

[0433] 使用流式细胞术在LNCap FGC细胞上研究PSMA上的scFv gy1结合。简言之,将LNCap FGC细胞在含有10%FBS的RPMI 1640培养基中于37°C,5%CO<sub>2</sub>培养。用PBS清洗细胞,并通过与0.02%维尔烯缓冲液(1.37M NaCl,26.8mM KC1,80.7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,14.7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,5.4mM EDTA二钠,0.2%D-葡萄糖)一起温育来分离。用PBS清洗细胞一次,并用含有gy1的酵母上清液在冰上温育1小时,所述酵母上清液用FACS (含有0.2%FBS的PBS) 缓冲液稀释3倍。用冷PBS清洗细胞三次,然后在冰上用FACS缓冲液中的1:200稀释的抗-V5-Alexa647在黑暗中温育1小时。通过用冷PBS清洗三次除去未结合的抗V5-Alexa647,然后将细胞重悬于300 $\mu$ l含有8 $\mu$ l via-probe (BD biosciences) 的FACS中。使用流式细胞术检测在LNCap FGC细胞上的Gy1结合,其中仅对活细胞进行门控和分析。流式细胞术对照包括:(1)重悬于含有via-probe的FACS缓冲液中的死细胞。通过在-80°C和37°C下将细胞冷冻-融化两个循环来制备死细胞;(2)重悬于没有via-probe的FACS缓冲液中的死细胞;(3)具有via-probe的未染色的细胞;和(4)具有via-probe的仅抗V5-Alexa647染色。结果显示gy1 scFv可显著结合Ln-Cap FGC细胞(图1)。

[0434] 内化

[0435] 若用于将药物选择性地递送到肿瘤细胞中,则内化是抗体的先决条件。为了评估gy1用于开发ADC、免疫毒素和纳米药物的潜力,使用流式细胞术检查gy1内化。流式细胞术是用于内部化测定法的共聚焦的简单替代方法。原理是内化是活性过程,其在37°C非常有效,但不会在4°C发生。若染料标记的抗体分别与细胞在37°C和4°C温育,则抗体分子将在细胞表面上结合,并且其中一些将在37°C内化;而抗体仅在4°C时在细胞表面上结合,因为内化不会发生。然后使用胰蛋白酶除去所有细胞表面蛋白,包括染料标记的抗体。细胞中的阳性染料信号表明发生内化,而阴性染料信号表示没有发生内化。

[0436] 简言之,将LnCap FGC细胞接种在两个48孔板中。次日,将100 $\mu$ l含有gy1scFv的酵

母上清液在室温在200 $\mu$ l体积(100 $\mu$ l上清液加100 $\mu$ l细胞培养基)中与4 $\mu$ l抗V5-Alexa467预温育1小时。然后,用培养基清洗细胞一次,并在200 $\mu$ l含有gy1的培养基(100 $\mu$ l新鲜培养基加100 $\mu$ l预温育的gy1-染料培养基)中分别于37℃和4℃在黑暗中温育1小时。作为对照,对于这两种温度,还将细胞与相同浓度的抗-V5-Alexa467一起温育。用冷PBS清洗两次后,将200 $\mu$ l胰蛋白酶加入孔中以在室温消化细胞表面蛋白30分钟。然后向每个孔中加入500 $\mu$ l培养基以停止胰蛋白酶处理并将细胞清洗两次,然后悬浮在含有via-probe的FACS缓冲液中用于流式细胞术分析。还如上设置死细胞对照。

[0437] 流式细胞术结果显示当将gy1 scFv与Ln-Cap FGC细胞在4℃温育时,抗体只能在细胞表面上结合;而当温育温度为37℃时,gy1 scFv不仅可以与细胞结合,而且还可以显著内化(图2),其奠定了使用gy1抗体或抗体片段进行的PSMA靶向药物递送的基础。

[0438] 亲和力测量

[0439] 将SD-CAA-Trp培养基中培养的可溶性gy1表达YVH10克隆放大至500ml,然后将细胞沉淀并重悬于相同体积的YEPD-GRD-Trp诱导培养基(YEPD培养基含有蛋白胨20g/L,酵母提取物10g/L,右旋糖20g/L)。YEPD-GRD-Trp是含有1g/L右旋糖,20g/L半乳糖和20g/L棉子糖和0.008%色氨酸的YEPD培养基以在20℃诱导scFv表达4天。使用镍柱纯化scFv,因为scFv在C末端具有6xHis标签。将上清液通过0.45 $\mu$ m滤器过滤,通过与相同体积的EQ缓冲液(0.3M NaCl,0.05M磷酸盐缓冲液,pH8.0)混合将pH调节至8.0,并加载到用5个柱体积EQ缓冲液平衡的HisTrp HP柱(GE healthcare)上。用超过10个柱体积的清洗缓冲液(含有10mM咪唑的EQ缓冲液)清洗柱,并用洗脱缓冲液(含有250mM咪唑的EQ缓冲液)洗脱scFv。然后用离心滤器单元(Amico)浓缩scFv,并通过针对PBS透析除去咪唑。将等分的scFv在-80℃贮存。

[0440] 使用捕获ELISA来测量gy1 scFv的亲和力。在scFv的N和C末端有Flag标签和V5标签,因此使用针对这些标签的抗体来捕获scFv以用于ELISA测定。简言之,将抗Flag抗体(Sigma)以1 $\mu$ g/ml,50 $\mu$ l/孔,在4℃在PBS中在ELISA板上包被过夜。将板用PBST清洗两次,在室温用PBSTM封闭2小时,并与一式三份3倍连续稀释的gy1 scFv在室温一起温育1小时,从PBSTM中的100nM降低至0.137nM。将板用PBST清洗6次,然后在室温与PBSTM中的0.5 $\mu$ g/ml生物素化PSMA一起再温育1小时。清洗6次后,将板与PBSTM中的1:1000稀释的链霉抗生物素蛋白-HRP(BD Bioscience)在室温温育30分钟。将板再次清洗6次,并在室温与TMB温育20分钟,用终止缓冲液终止比色反应,并在OD 450读取吸光度。使用GraphPad Prism软件计算亲和力,其为Kd=1.165nM(图3)。

[0441] 实施例4:在大肠杆菌中的Gy1表达和纯化

[0442] 酵母中表达的重组蛋白质的过度糖基化通常会产生免疫原性问题,这可能会限制其临床应用。为克服这一潜在问题,追求gy1 scFv在大肠杆菌中的原核表达。将gy1基因扩增并克隆到原核表达载体pET302(命名为pET302-gy1)中,然后转化到大肠杆菌BL21中,在30℃用0.05mM异丙基-1-硫代-β-吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导表达4小时。使用超声波仪裂解大肠杆菌细胞,然后如上所述使用HisTrp HP柱纯化gy1蛋白(图4)。以相同方式表达并纯化抗HER2 scFv(称为NCP1)并用作阴性对照。

[0443] 使用流式细胞术研究大肠杆菌表达的gy1 scFv与PSMA阳性和阴性细胞的结合。简言之,用维尔稀溶液(1.37M NaCl,26.8mM KC1,80.7mM Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>,14.7mM KH2P04,5.4mM

EDTA二钠,0.2%D-葡萄糖)分离前列腺癌细胞LNCaP,C4-2,PC3-PSMA<sup>+</sup>和PC3-PSMA<sup>-</sup>细胞,并且以 $1\times10^6$ 个细胞/mL的密度悬浮在PBS中,用PBS清洗细胞,并与100nM gy1或对照scFv NCP1在4℃温育30分钟,然后清洗并且与缀合有FITC的小鼠抗6His IgG (AbD Serotec; Bio-Rad) 在4℃黑暗中和温育30分钟。然后清洗细胞并通过流式细胞术分析。平行地,通过缀合有PE的商业抗PSMA单克隆抗体 (Biolegend, CA, USA) 检测PSMA蛋白质表达。结果显示,大肠杆菌表达的gy1仅能结合PSMA阳性细胞,而不结合阴性细胞(图5)。

[0444] 实施例5:通过细胞ELISA测量gy1亲和力

[0445] 为了评估大肠杆菌表达的gy1 scFv与细胞表面PSMA的结合亲和力,将PSMA阳性C4-2细胞以每孔 $5\times10^4$ 接种于96孔板中并培养过夜。次日,用4%多聚甲醛固定细胞20分钟,然后用3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理20分钟以封闭内源性过氧化物酶,然后在室温用6%牛血清白蛋白封闭30分钟。加入三倍连续稀释的gy1和对照scFv NCP1,从8100nM降至0.005nM,并在37℃温育1小时。然后用PBST清洗细胞,并与缀合有HRP的小鼠抗-6His抗体 (AbD Serotec, Bio-Rad, Oxford, UK) 在室温温育1小时。通过加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB, eBioscience, CA, USA) 显色比色信号,并通过与1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>温育15分钟终止。使用Sunrise微板阅读器 (Tecan, Groedig, Austria) 在450nm测量吸光度,并使用GraphPad Prism 5.0软件分析结合曲线。使用单点结合双曲线方程的非线性回归分析计算gy1亲和力。大肠杆菌表达的scFv gy1的亲和力计算为Kd=4.134nM(图6)

[0446] 实施例6:使用共聚焦成像的gy1内化测定

[0447] 使用共聚焦成像,使用大肠杆菌表达的gy1 scFv来研究内化。将在50%汇合时在盖玻片上生长的前列腺癌细胞,即LnCap,C4-2,PC3-PSMA<sup>+</sup>和PC3-PSMA<sup>-</sup>与200nM gy1或NCP1在37℃温育2小时。清洗细胞,用4%多聚甲醛固定20分钟。通过缀合有FITC的小鼠抗6His IgG (AbD Serotec; Bio-Rad) 检测内化的gy1。然后用4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染色细胞以显现细胞核。最后,用PBS清洗细胞并固定在载玻片上,并在激光扫描共聚焦显微术 (FluoView FV1000, Olympus) 下观察。结果表明在PSMA阳性细胞系LNCaP,C4-2和PC3-PSMA<sup>+</sup>的细胞质中可以观察到强烈的荧光信号。然而在PSMA阴性PC3-PSMA细胞中,不能检测到荧光信号(图7)。这些结果进一步证明了gy1可以有效地内化到PSMA阳性细胞中。

[0448] 为了研究内化后gy1的亚细胞转运,进行免疫荧光染色以在C4-2细胞中检查gy1 (绿色荧光) 与某些细胞器(包括内体,溶酶体,高尔基体和ER(红色荧光))的共定位。使用CellLight<sup>®</sup>试剂 (Invitrogen Life technologies, CA, USA) ,包括CellLight<sup>®</sup> Lysosomes-RFP, CellLight<sup>®</sup> Endosomes-RFP, CellLight<sup>®</sup> Golgi-RFP和CellLight<sup>®</sup> ER-RFP根据制造商的方案进行细胞的细胞器的染色。通过激光扫描共聚焦显微术 (FluoView FV1000, Olympus) 捕获细胞图像。结果显示在温育4小时后,gy1主要在内体和溶酶体中积累(黄色荧光,图8A),表明gy1通过内体-溶酶体途径内化到靶细胞中。对于不同的温育时间段,gy1和高尔基体或ER的信号之间没有重叠(图8B)。

[0449] 内化蛋白质主要具有两种运输途径。一种是直接通过内体到溶酶体,而另一种是从高尔基体到ER,这被称为逆行运输,并且通常用于再循环运输。通过将gy1与高尔基体或ER共染色进一步研究gy1是否也可以使用第二途径。结果显示即使温育不同的时间点,在gy1和高尔基体或ER之间也未能观察到共定位(图8B),这消除了gy1内化后第二运输途径的

可能性。

[0450] 实施例7:gy1的体内肿瘤靶向

[0451] 为了评估gy1用于体内PSMA靶向的能力和效率,以及评估基于gy1的PCa术中光学成像的可行性,使用表达萤光素酶的PC3-PSMA+和PC3-PSMA-细胞建立PSMA阳性和阴性异种移植裸鼠模型。通过在每只小鼠的右臀部皮下注射0.1mL PBS中的 $5 \times 10^6$ 个萤火虫萤光素酶表达性PC3-PSMA+或PC3-PSMA-细胞来开发异种移植肿瘤模型。接种后2周,分离肿瘤组织并进行H&E和免疫组织化学染色以检查组织形态和PSMA表达水平。结果显示PSMA可以在PC3-PSMA+前列腺癌组织中检测到,但不能在PC3-PSMA-前列腺癌组织中检测到(图9)。通过Xenogen IVIS动力学成像系统在这两种异种移植模型中也证实了萤光素酶表达(图11,左图)。这对PSMA阳性和阴性前列腺癌异种移植小鼠模型用于gy1靶向评估。

[0452] 对于体内光学成像研究,以1mg/ml的浓度以蛋白质/染料比率为1:20使用IRDye800cw标记试剂盒(Li-Cor Biosciences, Nebraska, USA)按照制造商的方案标记gy1和NCP1蛋白。通过透析除去额外的染料。如通过流式细胞术分析在PC3-PSMA+细胞上证实的,染料标记不损害gy1的PSMA结合亲和力(图10)。对于每只小鼠,静脉内注射0.2 $\mu$ mol/kg的IRDye800标记的gy1或NCP1,并在指定的时间点麻醉小鼠,并以激发波长745nm在Xenogen IVIS动力学成像系统下以实时方式监测IRDye800荧光。对所有图像使用相同的照明设置(1秒曝光,f/stop=2)。与体内全身近红外荧光成像(FLI)平行,处死每组中处理12小时的5只小鼠,分离不同的组织并分析它们的荧光强度。使用LivingImage软件计算荧光强度,并以光子通量(p/s/cm<sup>2</sup>/sr)表示。

[0453] 结果显示,IRDye800标记的gy1在1小时后迅速扩散到全身,并且可以在2小时起在肿瘤组织中检测到。然后,将IRDye800标记的gy1逐渐从体内清除,但仍然特异地保留在PSMA阳性肿瘤组织中,但不在PSMA阴性肿瘤组织中(图11,右图,图12)。在注射后6小时获得肿瘤中最高的信号/背景比,并且在24小时后肿瘤中的信号几乎检测不到。在gy1注射后12小时处死每组中的5只小鼠,并收集不同的组织用于进一步的生物分布评估。与FLI数据一致,可以在PC3-PSMA+组的肿瘤组织中检测到最强的荧光信号,可以在肾脏,肝和脾中检测到相对较弱的信号,而在其他组织中只能检测到可忽略的信号。然而在PC3-PSMA-组中,在肿瘤组织中未能检测到明显的荧光信号(图13A和图13B)。这些数据表明gy1可以在体内特异地靶向和分布在PSMA阳性肿瘤组织中,这促进了使用gy1进行的PSMA靶向成像和治疗策略的发展,例如术中光学成像,PET成像,纳米医学和抗体药物缀合物。

[0454] 实施例8:将gy1 scFv工程化为完整抗体

[0455] 通过分别为重链和轻链植入信号肽和恒定区将具有SEQ ID NOS:40/41,42/43,44/45,46/47(gy1-2)突变的Gy1 scFv工程化为完整抗体。通过抗体种系数据库的序列分析,分别对重链和轻链选择IGHV3-30-3\*02和IGLV1-50\*01信号肽和IgG1和CL1恒定区。重链和轻链的核酸和氨基酸序列显示在SEQ ID N 0.52/53和60/61中,并且成熟的重链和轻链(在信号肽切割后)序列显示在SEQ ID N 0.68和69中。工程化的完整抗体命名为PSMAb。对重链和轻链的核酸序列进行密码子优化以进行CHO细胞表达,合成并分别克隆到载体pcDNA3中。按照制造方案(FreeStyle<sup>TM</sup>CHO Expression system of life technologies),通过以1:4的比例将重链和轻链表达载体瞬时共转染到悬浮CHO细胞(CHO-S)中来表达重组PSMAb。表达7天后,收集上清液,并使用HiTrap rProtein A FF柱(GE healthcare life

sciences) 纯化PSMAb。简言之,将上清液与相同体积的缓冲液A (20mM磷酸钠缓冲液, pH7.0) 混合,通过0.45μm膜过滤并施加到用5柱体积缓冲液A平衡的HiTrap rProtein A FF柱上。用10个柱体积的缓冲液A清洗柱,并且用缓冲液B (0.1M柠檬酸, pH3.5) 洗脱抗体,并用缓冲液C (1.0M Tris-HCl pH9.0) 中和。通过透析将抗体缓冲液更换为PBS,等分取样并在-80°C 贮存(图14A)。

[0456] 实施例9:PSMAb完整抗体的表征

[0457] 亲和力测量

[0458] 如实施例5中所述,使用ELISA测量PSMAb的亲和力,只是使用对照人IgG1 (Sigma) 代替PSMAb用于阴性对照,并且使用缀合有HRP的抗人IgG Fc Ab (1:20000, Abcam) 作为二抗。PSMAb 3倍连续稀释从100nM开始下降至0.19pM。PSMAb的计算亲和力为0.1nM (图14B)

[0459] 细胞结合和阻断测定

[0460] 已经通过流式细胞术在几种前列腺细胞系,即PSMA+细胞C4-2, LNCaP, PC-3-PSMA+和PSMA-细胞PC-3和DU-145上研究了PSMAb与细胞表面上表达的PSMA的结合。简言之,首先将分离的细胞与PSMAb,阴性对照人IgG (Sigma) 或阳性对照抗体LNI-17 (Biolegend) 一起温育,清洗3次,然后与1:20稀释的缀合有PE的二抗 (Biolegend) 一起温育。通过流式细胞术检测细胞结合信号。结果显示PSMAb仅结合PSMA阳性细胞,但不结合阴性细胞 (图15),这与LNI-17染色证实的PSMA表达水平一致。

[0461] 为了进一步证实PSMAb与PSMA+细胞的结合是PSMA特异性的,使用重组PSMA蛋白或对照蛋白BSA进行阻断测定。使用如上所述的流式细胞术在PC3-PSMA+细胞上研究阻断测定,只是在与细胞温育之前,将浓度2nM的PSMAb与2、6和10nM重组PSMA或10nM BSA (作为对照) 在室温预温育2小时。结果显示PSMA重组蛋白即使在相同的抗体浓度即2nM下也能完全阻断PSMAb与PC3-PSMA+细胞的结合 (图16)。

[0462] PSMAb的内化

[0463] 如实施例6所述,在前列腺癌细胞C4-2, LNCaP, PC-3和DU-145上研究PSMAb的内化,只是对照人IgG1用作阴性对照,并且二抗是缀合有FITC的抗人IgG Fc抗体 (1:50; Santa Cruz biotechnology, USA)。结果证明PSMAb可以选择性地和有效地内化到PSMA阳性细胞中 (图17)。

[0464] 实施例10:PSMAb的体内肿瘤靶向

[0465] 为了评估肿瘤靶向的效率和PSMAb术中光学成像的潜力,用近红外染料IRDye800CW标记PSMAb,并将50μg标记的PSMAb/小鼠尾静脉注射到PC3-PSMA+或PC3-PSMA-异种移植物模型,并且使用如实施例7中所述的Xenogen IVIS动力学成像系统监测PSMAb的实时生物分布。体内光学成像显示PSMAb在整个身体中快速扩散并且可以在注射后24小时起在肿瘤组织中检测到,并且然后逐渐从体内清除,而特异性地保留在PSMA+肿瘤中,而非PSMA-肿瘤中 (图18A-图18C)。注射后48小时观察到良好的信号/背景比 (图18A-图18C)。与scFv相比,完整抗体具有更长的循环时间,并且因此对于光学成像具有更好的信号/背景比。

[0466] 实施例11:DM1抗体药物缀合

[0467] 为了开发PSMA靶向性ADC,通过稳定的接头SMCC将PSMAb与DM1缀合 (图19)。简言之,将PSMAb缓冲液交换至50mM磷酸钾,50mM NaCl, 2mM EDTA, pH7.2, 并将浓度调节至4mg/

ml。将SMCC-DM1 (Consortis Biosystems) 溶解在DMA中以获得10mM的终浓度。向每个体积的抗体溶液中加入0.43% 体积的DMA, 混合, 然后加入2.67% 体积的10mM SMCC-DM1。DMA的最终浓度为3% (v/v) , 并且药物/Ab比率为10:1。使溶液在室温下混合3小时, 然后通过透析将缓冲液更换为PBS。如前所述 (US 20060088539 A1) , 基于缀合物在252和280nm处的吸光度, 测量药物/Ab缀合比率为3.3。

[0468] 实施例12:MMAE和MMAF抗体药物缀合

[0469] 为了开发PSMA靶向性ADC, 通过可切割的接头Mc-vc-PAB分别将PSMAb与MMAE和MMAF缀合 (图20)。将抗体浓度在0.025M硼酸钠pH8, 0.025M NaCl, 1mM DTPA中调节至8mg/ml, 并在37°C用2.75摩尔当量的TCEP部分还原2小时。然后将混合物冷却至0°C并将抗体浓度调节至5.625mg/ml并与0.25体积的溶解在冷乙腈中的700mM MC-vc-PAB-MMAE和MC-vc-PAB-MMAF混合并允许在冰上继续反应30分钟。用半胱氨酸 (1mM终浓度)淬灭过量的MC-vc-PAB-MMAE或MC-vc-PAB-MMAF。如所述 (Kevin J.Hamblett et al., 2004, Clin Cancer Res, 10;7063) , 使用PD-10柱纯化抗体药物缀合物。如上所述 (Kevin J.Hamblett et al., 2004, Clin Cancer Res, 10;7063) , 通过测量250和280nM的吸光度比率确定MMAE和MMAF的载药量为3.5和3.03/抗体。

[0470] 实施例13:PSMAb在药物缀合后保留PSMA结合和内化能力

[0471] 在与DM1, MMAE或MMAF缀合后, 如上所述分别通过流式细胞术和共聚焦成像评估PSMAb药物缀合物的PSMAb结合和内化。结果显示PSMAb药物缀合物的抗原结合和内化得到良好保留 (图21和图22)。

[0472] 实施例14:PSMAb抗体药物缀合物的PSMA特异性细胞毒性

[0473] 在PSMA-细胞系PC-3和PSMA+细胞系C4-2上评估基于PSMAb的ADC的细胞毒性。简言之, 以2000个细胞/200mL/孔将C4-2和PC-3细胞接种在含有10%FBS的DMEM培养基中的96孔板中。次日, 细胞密度为约20-30%, 并且将培养基更换为含有浓度333.33nM, 133.33nM, 66.67nM, 33.33nM, 6.67nM, 3.33nM, 0.67nM, 0.33nM, 0.067nM, 0.0067nM, 0.00067nM和0.000067nM的PSMAb-DM1, PSMAb-MMAE或PSMAb-MMAF的新鲜培养基, 每个浓度一式三份。每天更换培养基, 每个孔的药物浓度相同。温育4天后, 使用alamarBlue试剂盒 (Invitrogen) 按照制造方案评估细胞存活力。结果显示, PSMAb-DM1, PSMAb-MMAE和PSMAb-MMAF对PC-3细胞无毒性, 但对C4-2细胞具有剂量依赖性毒性, PSMAb-DM1, PSMAb-MMAE和PSMAb-MMAF的IC50分别为0.12nM, 0.59nM和0.92nM (图23)。

[0474] 实施例15:PSMA-ADC特异性诱导PSMA+细胞的凋亡

[0475] 为了进一步研究PSMAb ADC在PSMA特异性细胞杀伤中的机制, 在PC-3和C4-2细胞中研究PSMAb ADC诱导的凋亡。简言之, 将PC-3和C4-2细胞以 $2 \times 10^5$ /2mL培养基/孔的密度接种在6孔板中并培养过夜。次日, 更换培养基并将细胞与2mL培养基中浓度50 $\mu$ g/mL, 20 $\mu$ g/mL, 10 $\mu$ g/mL, 5 $\mu$ g/mL, 1 $\mu$ g/mL, 0.5 $\mu$ g/mL, 0.01 $\mu$ g/mL, 和0.001 $\mu$ g/mL的PSMAb-ADC一起温育。浓度50mg/mL的人IgG和PSMAb用作对照。温育48小时后, 将细胞用胰蛋白酶处理并用PBS清洗两次, 并用Annexin-V/PI (Roche) 按照制造说明染色。使用流式细胞术检测凋亡, 具有膜联蛋白-V (+) /PI (-) 的信号指示早期凋亡, 而双阳性染色即膜联蛋白-V (+) /PI (+) 的信号指示晚期凋亡。总凋亡是早期和晚期凋亡的总和。结果显示, 所有三种基于PSMAb的ADC, 即PSMAb-DM1, PSMAb-MMAE和PSMAb-MMAF均能够有效诱导早期和晚期凋亡两者, PSMAb-DM1主

要诱导晚期凋亡,而PSMAb-MMAE和PSMAb-MMAF主要诱导早期凋亡(图24)。

[0476] 实施例16:序列

[0477] SEQ ID NO:1 PSMA的胞外域

[0478] KSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAH  
YDVLLSYPNKTYPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPFFFFYENVDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLE  
RDMKINCAGKIVIARYGKVFRGNKVNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGVQRGNILNLNGAGD  
PLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSAPPDSSWRGSLKVPNVGPGFTGNFSTQKV  
MHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDYRVLGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFAS  
WDAEEFGLLGSTEWAEEENSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESW  
TKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHL  
TVAQVRGGMVFELANSIVLPFDRCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYVSFDSLFSAVKNFTEIASKFSERLQ  
DFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEV  
KRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA

[0479] SEQ ID NO:2 gy1 scFv核酸序列:

[0480] CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGTGTCAATTATCTCCTGCACT  
GGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTCTCATGTACACTGGTACCAGCAGGTTCCAGGAACAGCCCCAAACTCCT  
CATCTATGGAAACACCAATCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGGTTCC  
TGGCCATCACTGGACTCCAGCCTGAGGATGAGGCTGATTATTATTGTCAACATGGATGACAGTCTGAATGGTGA  
ATATTGGCGGAGGGACCAAGGTACCGTCCTAGGCGGATCCTCTAGGTCAAGTTCCAGCGCGGCGGTGGCAGCGG  
AGCGCGCGGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGCCCTGGCCAAGCCTGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT  
CAGCCTCTGGATCCACCCCTCAGTGGCTATGCTATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGT  
GCAGTTATATCATATGATGGAAGCAATAACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCGATTCAACCCTCAGAGACAA  
TTCCAAGAACACGCTGTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGTACTATTGTCTAAAGGC  
TTACTTGGGACTCGGTGACAATGATGCTCTCGATATCTGGGCCCGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0481] SEQ ID NO:3 gy1 scFv氨基酸序列:

[0482] QSVLTQPPSVGAPGQSVIISCTGSSSNIGAGSHVHWYQQVPGTAPKLLIYGNTNRPSGVPDFSGSKS  
GTSGSLAITGLQPEDEADYYCATWDDSLNGVIFGGGTKVTVLGGSSRSSSSGGGSGGGEVQLVESGGALAKPGGS  
LRLSCAASGSTLSGYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRPEDTAVY  
YCAKGLTWGLDNDALDIWGPGBTVTVSS

[0483] SEQ ID NO:4 gy1 VL核酸序列:

[0484] CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGTGTCAATTATCTCCTGCACT  
GGGAGCAGCTCCAACATCGGGCAGGTTCTCATGTACACTGGTACCAGCAGGTTCCAGGAACAGCCCCAAACTCCT  
CATCTATGGAAACACCAATCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGGTTCC  
TGGCCATCACTGGACTCCAGCCTGAGGATGAGGCTGATTATTATTGTCAACATGGATGACAGTCTGAATGGTGA  
ATATTGGCGGAGGGACCAAGGTACCGTCCTA

[0485] SEQ ID NO:5 gy1 VL氨基酸序列:

[0486] QSVLTQPPSVGAPGQSVIISCTGSSSNIGAGSHVHWYQQVPGTAPKLLIYGNTNRPSGVPDFSGSKS  
GTSGSLAITGLQPEDEADYYCATWDDSLNGVIFGGGTKVTVL

[0487] SEQ ID NO:6 gy1 VL框区1(FR1)核酸序列:

- [0488] CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGTGTCAATTATCTCCTGCACTGGGAGC
- [0489] SEQ ID NO:7 gy1 VL框区1(FR1)氨基酸序列:
- [0490] QSVLTQPPSVSGAPGQSVIISCTGS
- [0491] SEQ ID NO:8 gy1 VL CDR1核酸序列:
- [0492] AGCTCCAACATCGGGGCAGGTTCTCAT
- [0493] SEQ ID NO:9 gy1 VL CDR1氨基酸序列:
- [0494] SSNIGAGSH
- [0495] SEQ ID NO:10 gy1 VL框区2(FR2)核酸序列:
- [0496] GTACACTGGTACCAGCAGGTTCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTCATCTAT
- [0497] SEQ ID NO:11 gy1 VL框区2(FR2)氨基酸序列:
- [0498] VHWYQQVPGTAPKLLIY
- [0499] SEQ ID NO:12 gy1 VL CDR2核酸序列:
- [0500] GGAAACACC
- [0501] SEQ ID NO:13 gy1 VL CDR2氨基酸序列:
- [0502] GNT
- [0503] SEQ ID NO:14 gy1 VL框区3(FR3)核酸序列:
- [0504] AATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGGTTCCCTGGCCATC  
ACTGGACTCCAGCCTGAGGATGAGGCTGATTATTATTGT
- [0505] SEQ ID NO:15 gy1 VL框区3(FR3)氨基酸序列:
- [0506] NRPSGVPDRFSGSKSGTSGSLAITGLQPEDEADYYC
- [0507] SEQ ID NO:16 gy1 VL CDR3区核酸序列:
- [0508] GCAACATGGGATGACAGTCTGAATGGTGTAA
- [0509] SEQ ID NO:17:
- [0510] ATWDDSLNNGVI
- [0511] SEQ ID NO:18:
- [0512] TTCGGCGGAGGGACCAAGGTACCGTCCTA
- [0513] SEQ ID NO:19 gy1 VL框区4(FR4)氨基酸序列:
- [0514] FGGGTVTVL
- [0515] SEQ ID NO:20 gy1 VH核酸序列:
- [0516] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGCCCTGGCCAAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATCCACCCTCAGTGGCTATGCTATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGC  
AGTTATATCATATGATGGAAGCAATAACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATT  
CCAAGAACACGCTGTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGTACTATTGTGCTAAAGGCCTT  
ACTTGGGGACTCGGTGACAATGATGCTCTCGATATCTGGGCCCCGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
- [0517] SEQ ID NO:21 gy1 VH氨基酸序列:
- [0518] EVQLVESGGALAKPGGSLRLSCAASGSTLSGYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFT  
ISRDNSKNTLFLQMNSLRPEDTAVYYCAKGLTWGLGDNDALDIWGPGBTVTVSS
- [0519] SEQ ID NO:22 gy1 VH框区1(FR1)核酸序列:

- [0520] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGCCCTGGCCAAGCCTGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCT
- [0521] SEQ ID NO:23 gy1 VH框区1 (FR1) 氨基酸序列:
- [0522] EVQLVESGGALAKPGGSLRLSCAAS
- [0523] SEQ ID NO:24 gy1 VH CDR1核酸序列:
- [0524] GGATCCACCCTCAGTGGCTATGCT
- [0525] SEQ ID NO:25 gy1 VH CDR1氨基酸序列:
- [0526] GSTLSGYA
- [0527] SEQ ID NO:26 gy1 VH框区2 (FR2) 核酸序列:
- [0528] ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGCAGTT
- [0529] SEQ ID NO:27 gy1 VH框区2 (FR2) 氨基酸序列:
- [0530] MHWVRQAPGKGLEWVAV
- [0531] SEQ ID NO:28 gy1 VH CDR2区核酸序列:
- [0532] ATATCATATGATGGAAGCAATAAA
- [0533] SEQ ID NO:29 gy1 VH CDR2区氨基酸序列:
- [0534] ISYDGDSNK
- [0535] SEQ ID NO:30 gy1 VH框区3 (FR3) 核酸序列:
- [0536] TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTCTG  
CAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGTACTATTGT
- [0537] SEQ ID NO:31 gy1 VH框区3 (FR3) 氨基酸序列:
- [0538] YYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRPEDTAVYYC
- [0539] SEQ ID NO 32 gy1 VH CDR3区核酸序列:
- [0540] GCTAAAGGCCTTACTTGGGACTCGGTGACAATGATGCTCTCGATATC
- [0541] SEQ ID NO:33 gy1 VH CDR3区氨基酸序列:
- [0542] AKGLTWGLGDNDALDI
- [0543] SEQ ID NO:34 gy1 VH框区4 (FR4) 核酸序列:
- [0544] TGGGGCCCCGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
- [0545] SEQ ID NO:35 gy1 VH框区4 (FR4) 氨基酸序列:
- [0546] WGPGBTTVTVSS
- [0547] SEQ ID NO:36 gy1 scFv接头核酸序列:
- [0548] GGCGGATCCTCTAGGTCAAGTTCCAGCGGCGGCGGTGGCAGCGGAGGCAGCGGT
- [0549] SEQ ID NO:37 gy1 scFv接头氨基酸序列:
- [0550] GGSSRSSSSGGGGSGGG
- [0551] SEQ ID NO:38 具有点突变的gy1 VL框区2 (FR2) 核酸序列:
- [0552] GTACACTGGTACCACCGAGCTCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTCATCTAT
- [0553] SEQ ID NO:39 gy1 VL框区2 (FR2) 氨基酸序列:
- [0554] VHWYQQAPGTAPKLLIY (V=>A)
- [0555] SEQ ID NO:40 具有点突变的gy1 VL CDR2核酸序列:
- [0556] GAAAACACC

- [0557] SEQ ID NO:41 具有点突变的gy1 VL CDR2氨基酸序列:  
 [0558] E N T (G=>E)
- [0559] SEQ ID NO:42 具有点突变的gy1 VL框区4 (FR4) 核酸序列  
 [0560] TTCGGCGGAGGGACCAAGGCCACCGTCCTA
- [0561] SEQ ID NO:43 具有点突变的gy1 VL框区4 (FR4) 氨基酸序列:  
 [0562] F G G G T K A T V L (V=>A)
- [0563] SEQ ID NO:44  
 [0564] GGATTCACCCCTCAGTGGCTATGCT
- [0565] SEQ ID NO:45 具有点突变的gy1 VH CDR1氨基酸序列:  
 [0566] G F T L S G Y A (S=>F)
- [0567] SEQ ID NO:46:  
 [0568] TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTCTG  
 CAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGTACTATTGT
- [0569] SEQ ID NO:47 具有点突变的gy1 VH框区3 (FR3) 氨基酸序列:  
 [0570] Y Y A D S V K G R F T V S R D N S K N T L F L Q M N S L R P E D T A V  
 Y Y C (I=>V)
- [0571] SEQ ID NO:48 具有点突变的gy1 VH CDR3区核酸序列:  
 [0572] GCTAAAGGCCTTACTTGGGGACTCGGTGACAATGATGCTCTCGGTATC
- [0573] SEQ ID NO:49 具有点突变的gy1 VH CDR3区氨基酸序列:  
 [0574] A K G L T W G L G D N D A L G I (D=>G)
- [0575] SEQ ID NO:50:  
 [0576] TGGGGCCCCGAGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
- [0577] SEQ ID NO:51 具有点突变的gy1 VH框区4 (FR4) 氨基酸序列:  
 [0578] W G P E T T V T V S S (G=>E)
- [0579] SEQ ID NO:52 PSMAb重链核酸序列:  
 [0580] ATGGAGTTGGCTGAGCTGGTTTCTCGTTGCTCTTTAAGAGGTGTCAGTGTGAGGTGCAGCTG  
 GTGGAGTCTGGGGAGCCCTGGCCAAGCCTGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCCCTAG  
 TGGCTATGCTATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAA  
 GCAATAAAACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTCTG  
 CAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGTACTATTGTGCTAAAGGCCTACCTGGGACTCGGTGACAA  
 TGATGCTCTGATATCTGGGCCCCGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTCC  
 CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA  
 CCGGTGACGGTGTGGAACCTCAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCCGCTGCTACAGTCCTCAGG  
 ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC  
 ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC  
 CCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCG  
 GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG  
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTC  
 ACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT

CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTTCCCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTATGCATGAGGCTCTGCACAAAC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

[0581] SEQ ID NO:53 PSMAb重链氨基酸序列:

[0582] M E F G L S W V F L V A L L R G V Q C E V Q L V E S G G A L A K P G G S L R L S C A A S G F T L S G Y A M H W V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T V S R D N S K N T L F L Q M N S L R P E D T A V Y Y C A K G L T W G L G D N D A L D I W G P G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

[0583] SEQ ID NO:54 PSMAb重链信号肽核酸序列:

[0584] ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGGTTTCCTCGTTGCTCTTAAGAGGTGTCCAGTG

[0585] SEQ ID NO:55 PSMAb重链信号肽氨基酸序列:

[0586] M E F G L S W V F L V A L L R G V Q C

[0587] SEQ ID NO:56 PSMAb重链可变区核酸序列:

[0588] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGCCCTGGCCAAGCCTGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGATTCAACCTCAGTGGCTATGCTATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGC AGTTATATCATATGATGGAAGCAATAAAACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGTACTATTGTGCTAAAGGCCTT ACCTGGGGACTCGGTGACAATGATGCTCTCGATATCTGGGCCCGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0589] SEQ ID NO:57 PSMAb重链可变区氨基酸序列:

[0590] E V Q L V E S G G A L A K P G G S L R L S C A A S G F T L S G Y A M H W V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T V S R D N S K N T L F L Q M N S L R P E D T A V Y Y C A K G L T W G L G D N D A L D I W G P G T T V T V S S

[0591] SEQ ID NO:58 PSMAb重链恒定区核酸序列:

[0592] GCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTCCCCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCG GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG CGTGCACACCTTCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCCTCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC

AAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCAGTCCCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGCCTCACCGCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAATGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACGCGCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCTCTCCTCACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA

[0593] SEQ ID NO:59 PSMAb重链恒定区氨基酸序列：

[0594] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0595] SEQ ID NO:60 PSMAb轻链核酸序列：

[0596] ATGGCCTGGTCTCCTCTCCTCACTCTCCTCGCTACTGCACAGGGCCTGGGCCAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGTGTCAATTATCTCCTGCACTGGAGCAGCTCAAACATCGGGCAGGTTCTCATGTACACTGGTACCGAGGTTCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATCTATGAAAACACCAATCGGCCCTCAGGGGTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGGTTCCCTGGCCATCACTGGACTCCAGCCTGAGGATGAGGCTGATTATTATTGTGCAACATGGGATGACAGTCTGAATGGTGTAAATTCCGGGAGGGACCAAAGGCCACCGTCTAGGTCAAGCCAAGGCTGCCCTCGGTCACTCTGTTCCGCCCTCCTGAGGAGCTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTCTCATAAAGTGAATTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGTGCCAGGTACCGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCATGA

[0597] SEQ ID NO:61 PSMAb轻链氨基酸序列：

[0598] M A W S P L L L T L L A H C T G S W A Q S V L T Q P P S V S G A P G Q S V I I S C T G S S S N I G A G S H V H W Y Q Q V P G T A P K L L I Y E N T N R P S G V P D R F S G S K S G T S G S L A I T G L Q P E D E A D Y Y C A T W D D S L N G V I F G G G T K A T V L G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S

[0599] SEQ ID NO:62 PSMAb轻链信号肽核酸序列：

[0600] ATGGCCTGGTCTCCTCTCCTCACTCTCCTCGCTACTGCACAGGGCCTGGGCC

[0601] SEQ ID NO:63 PSMAb轻链信号肽氨基酸序列：

[0602] M A W S P L L L T L L A H C T G S W A

[0603] SEQ ID NO:64 PSMAb轻链可变区核酸序列：

[0604] CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGTGTCAATTATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGCAGGTTCTCATGTACACTGGTACCAGCAGGTTCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATCTATGAAAACACCAATCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGGTTCCCAGGCCATCACTGGACTCCAGCCTGAGGATGAGGCTGATTATTATTGTGCAACATGGGATGACAGTCTGAATGGTGATATTCGGCGGAGGGACCAAGGCCACCGTCCTA

[0605] SEQ ID NO:65 PSMAb轻链可变区氨基酸序列:

[0606] Q S V L T Q P P S V S G A P G Q S V I I S C T G S S S N I G A G S H V H W Y Q Q V P G T A P K L L I Y E N T N R P S G V P D R F S G S K S G T S G S L A I T G L Q P E D E A D Y Y C A T W D D S L N G V I F G G G T K A T V L

[0607] SEQ ID NO:66 PSMAb轻链恒定区核酸序列:

[0608] GGTCAAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTACTCTGTTCCCGCCCTCCTTGAGGAGCTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTCTCATAAGTGAACCTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACCCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGAGCCTGAGCAGTGGAACAGCTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA

[0609] SEQ ID NO:67 PSMAb轻链恒定区氨基酸序列:

[0610] G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S

[0611] SEQ ID NO:68 没有信号肽的PSMAb重链氨基酸序列:

[0612] E V Q L V E S G G A L A K P G G S L R L S C A A S G F T L S G Y A M H W V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T V S R D N S K N T L F L Q M N S L R P E D T A V Y Y C A K G L T W G L G D N D A L D I W G P G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

[0613] SEQ ID NO:69 没有信号肽的PSMAb轻链氨基酸序列:

[0614] Q S V L T Q P P S V S G A P G Q S V I I S C T G S S S N I G A G S H V H W Y Q Q V P G T A P K L L I Y E N T N R P S G V P D R F S G S K S G T S G S L A I T G L Q P E D E A D Y Y C A T W D D S L N G V I F G G G T K A T V L G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S

- [0615] SEQ ID NO:70 CD8a前导物核酸序列:
- [0616] ATGGCCTTACCACTGACCGCCTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG
- [0617] SEQ ID NO:71 CD8a前导物氨基酸序列:
- [0618] MALPVTALLPLALLHARP
- [0619] SEQ ID NO:72 CD8a铰链核酸序列:
- [0620] ACCACGACGCCAGCGCCGACCAACACCGCGCCACCATCGCGTCGAGCCCCGTCCCTGCGCCAGAGGCCTGCCAGCGTCGAGCGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT
- [0621] SEQ ID NO:73 CD8a铰链氨基酸序列:
- [0622] TTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACD
- [0623] SEQ ID NO:74 CD8a跨膜域核酸序列
- [0624] ATCTACATCTGGCGCCCTTGGCCGGACTGTGGGGCCTTCTCCTGTCAGGGTTATCACCCCTTAC  
TGC
- [0625] SEQ ID NO:75 CD8a跨膜域氨基酸序列:
- [0626] IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC
- [0627] SEQ ID NO:76 4-1 BB胞内域 (ICD) 核酸序列:
- [0628] AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAAACCATTATGAGACCAAGTACAAACTACTCAA  
GAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCATTCCAGAAGAAGAAGAGGAGATGTGAAGT
- [0629] SEQ ID NO:77 4-1 BB胞内域 (ICD) 氨基酸序列:
- [0630] KRGRKKLLYIFKQPMPRVQTTQEEEDGCSRFPEEEAGGCEL
- [0631] SEQ ID NO:78 CD3 zeta核酸序列
- [0632] AGAGTGAAGTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACAAGCAGGCCAGAACCAAGCTCTATAACGAG  
CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGACCTGAGATGGGGGAAAGCC  
GAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCGTACAATGAACGTGAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG  
GGATGAAAGGCGAGGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACC  
TACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC
- [0633] SEQ ID NO:79 CD3 zeta氨基酸序列:
- [0634] RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAE  
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0635] SEQ ID NO:80 gy1-2 CAR构建体核酸序列:
- [0636] ATGGCCTTACCACTGACCGCCTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGTAGA  
CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGTGTCAATTATCTCCTGCAGGGAGCAG  
CTCCAACATCGGGCAGGTTCTCATGTACACTGGTACCGAGCAGGTTCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATCTATG  
AAAACACCAATCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGGTTCCCTGGCCATC  
ACTGGACTCCAGCCTGAGGATGAGGCTGATTATTGTGCAACATGGATGACAGTCTGAATGGTGAATATTGG  
CGGAGGGACCAAGGCCACCGCTCTAGCCGATCCTCTAGGTCAAGTTCCAGCCGGGGTGGCACGGAGCCGGCG  
GTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGCCCTGGCCAAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT  
GGATTCAACCTCAGTGGCTATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTAT  
ATCATATGATGGAAGCAATAACTACGCAGACTCCGTGAAGGCCGATTCAACGTCTCCAGAGACAATTCCAAGA  
ACACGCTGTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGTACTATTGTGCTAAAGGCCTTACCTGG

GGACTCGGTGACAATGATGCTCTCGATATCTGGGGCCCCGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAAGATCCACCAACGAC  
GCCAGCGCCCGGACCACCAACACCGGGCCCACCATCGCTCGCAGCCCTGTCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGC  
CAGCGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGCGCCCTGGCCGGG  
ACTTGTGGGTCCTCTCTGTACTGGTTATCACCTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATT  
CAAACAACCATTATGAGACAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAG  
AAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCAGGCCAGAACAGCTC  
TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTGCCGGACCCTGAGATGGG  
GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACA  
GTGAGATTGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCAAGGGTCTCAGTACAGCCACC  
AAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGCTAA

[0637] SEQ ID NO:81 gy1-2 CAR构建体氨基酸序列

[0638] MALPV TALLPLALLLHAARPSRQSVLTQPPSVGAPGQSVIISCTGSSNIGAGSHVHWYQQVPGTAP  
KLLIYENTNRPSGVPDRFSKSGTSGSLAITGLQPEDEADYYCATWDDSLNGVIFGGGTATVLGGSSRSSSSGGG  
GSGGGGEVQLVESGGALAKPGGSLRLSCAASGFTLSGYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTVS  
RDNSKNTLFLQMNSLRPEDTAVYYCAKGLTWGLDNDALDIWGP GTTVSSRSTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLR  
PEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSCR  
FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK  
MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0639] SEQ ID NO:82 mOKT3鼠scFv核酸序列:

[0640] CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGCGCGGA ACTGGCGCGCCGGCGCGAGCGTGAAAATGAGCTGAAA  
GCGAGCGGCTATACTTACCGCTATACCATGCATTGGGTGAAACAGCGCCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGG  
CTATATTAACCGAGCCCGCGCTATACCAACTATAACCAGAAATTAAAGATAAGCGACCCCTGACCACCGATAAAA  
GCAGCAGCACCGCGTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCAGCGAAGATAGCGCGGTGTATTATTGCGCGCGTATTAT  
GATGATCATTATTGCCTGGATTATTGGGCCAGGGCACCACCCCTGACCGTGAGCAGCGCGCCGGCAGCGCG  
CGCGCGAGCGCGCGCGAGCCAGATTGTGCTGACCCAGAGCCCGCGATTATGAGCGCGAGCCCGGGCGAAA  
AAAGTACCATGACCTGCAGCGCAGCAGCGT GAGCTATATGAACCTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCG  
AAACGCTGGATTATGATACCAGCAA ACTGGCAGCGCGTGC CGCGCATTTCGCGCAGCGCAGCGCACCAG  
CTATAGCCTGACCATTAGCGGATGGAAAGCGGAAGATCGGGCACCTATTATTGCCAGCAGTGGAGCAGCAACCCGT  
TTACCTTGGCAGCGGCACCAA ACTGGAAATTAAACCGC

[0641] SEQ ID NO:83 mOKT3鼠scFv氨基酸序列:

[0642] QVQLQQSGAELARPGASVKSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKAT  
LTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSGGGSGGGGGGSQIVLTQSPA  
ASPGKVTMTCASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQ  
WSSNPFTFGSGTKLEINR

[0643] SEQ ID NO:84 mOKT3 VH核酸序列:

[0644] CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGCGCGGA ACTGGCGCGCCGGCGCGAGCGTGAAAATGAGCTGAAA  
GCGAGCGGCTATACTTACCGCTATACCATGCATTGGGTGAAACAGCGCCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGG  
CTATATTAACCGAGCCCGCGCTATACCAACTATAACCAGAAATTAAAGATAAGCGACCCCTGACCACCGATAAAA  
GCAGCAGCACCGCGTATATGCAGCTGAGCAGCCTGACCAGCGAAGATAGCGCGGTGTATTATTGCGCGCGTATTAT

GATGATCATTATTGCCTGGATTATTGGGCCAGGGCACCAACCCTGACCGTGAGCAGC

[0645] SEQ ID NO:85 mOKT3 VH氨基酸序列:

[0646] QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKAT  
LTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSS

[0647] SEQ ID NO:86 mOKT3 VL核酸序列:

[0648] CAGATTGTGCTGACCCAGAGGCCGGCGATTATGAGCGCGAGCCCCGGCGAAAAAGTACCATGACCTGC  
AGCGCGAGCAGCGTGAGCTATATGAACCTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGCCCACCGCTGGATTATGA  
TACCAAGCAAACCTGGCGAGCGCGTGCCTGGCGCATTTCGCGGCAGCGGCAGCGGCACCAGCTATAGCCTGACCATTA  
GCGGCATGGAAGCGGAAGATCGGGCGACCTATTATTGCCAGCAGTGGAGCAGCAACCCGTTACCTTGGCAGCGGC  
ACCAAACGGAAATTAAACCGC

[0649] SEQ ID NO:87 mOKT3 VL氨基酸序列:

[0650] QIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCSSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTS  
YSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR

[0651] SEQ ID NO:88 hOKT3人源化scFv核酸序列:

[0652] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGCGGCGCGTGGTGCAGCCGGCCGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCAA  
GCGAGCGGCTATACCTTACCGCTATACCATGCATTGGTGCAGCCGCAGGCGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGATTGG  
CTATATTAACCGAGCCCGCGCTATACCAACTATAACCAGAAAAGTAAAGATCGCTTACCATAGCACCATAAAA  
GCAAAAGCACCAGCGTTCTGCAGATGGATAGCCTGCGCCCGGAAGATAACCGCGTGTATTTGCGCGCTATTAT  
GATGATCATTATTGCCTGGATTATTGGGCCAGGGCACCCCTGACCGTGAGCAGCGCGGCGGCGAGCGCG  
CGCGCGAGCGCGGCGCGAGCGATATTCAAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGCGATC  
GCGTGACCATTACCTGCAGCGCAGCAGCGTGAAGCTATATGAACCTGGTATCAGCAGACCCGGCAAAGCGCCG  
AAACGCTGGATTATGATACAGCAAACCTGGCGAGCGCGTGCAGCCGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGA  
TTATACCTTACCATAGCAGCCTGCAGCCGAAGATAACCGACCTATTATTGCCAGCAGTGGAGCAGCAACCCG  
TTACCTTGGCCAGGGCACCAAACCTGCAGATTACCGC

[0653] SEQ ID NO:89 hOKT3人源化scFv氨基酸序列:

[0654] QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKLEWIGYINPSRGYTNYNQKVDRFT  
ISTDKSSTAFQLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSGGGGSGGGGGSDIQMTQSPSSLS  
ASVGDRVITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLQPEDIATYYCQQ  
WSSNPFTFGQGTTKLQITR

[0655] SEQ ID NO:90 hOKT3 VH核酸序列:

[0656] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGCGGCGCGTGGTGCAGCCGGCCGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCAA  
GCGAGCGGCTATACCTTACCGCTATACCATGCATTGGTGCAGCCGCAGGCGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGATTGG  
CTATATTAACCGAGCCCGCGCTATACCAACTATAACCAGAAAAGTAAAGATCGCTTACCATAGCACCATAAAA  
GCAAAAGCACCAGCGTTCTGCAGATGGATAGCCTGCGCCCGGAAGATAACCGCGTGTATTTGCGCGCTATTAT  
GATGATCATTATTGCCTGGATTATTGGGCCAGGGCACCCCTGACCGTGAGCAGCAGCGCGGCGAGCGCG  
CGCGCGAGCGCGGCGCGAGCGATATTCAAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGCGATC  
GCGTGACCATTACCTGCAGCGCAGCAGCGTGAAGCTATATGAACCTGGTATCAGCAGACCCGGCAAAGCGCCG  
AAACGCTGGATTATGATACAGCAAACCTGGCGAGCGCGTGCAGCCGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGA  
TTATACCTTACCATAGCAGCCTGCAGCCGAAGATAACCGACCTATTATTGCCAGCAGTGGAGCAGCAACCCG  
TTACCTTGGCCAGGGCACCAAACCTGCAGATTACCGC

[0657] SEQ ID NO:91 hOKT3 VH氨基酸序列:

[0658] QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKLEWIGYINPSRGYTNYNQKVDRFT  
ISTDKSSTAFQLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSS

[0659] SEQ ID NO:92 hOKT3 VL核酸序列:

[0660] GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGC  
AGCGCGAGCAGCAGCGTGGCTATATGAAGCTGGTATCAGCAGACCCCGGGCAAAGCGCCGAAACGCTGGATTATGA  
TACCAAGCAAACGGCGAGCGCGTGGCGAGCCGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGACCGATTACCTTACCATTA  
GCAGCCTGCAGCCGAAAGATATTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTGGAGCAGCAACCCGTTACCTTGGCCAGGGC  
ACCAAACTGCAGATTACCCGC

[0661] SEQ ID NO:93 hOKT3 VL氨基酸序列：

[0662] DIQMTQSPSSLASVGDRVITICSAASSSVSYMWNWYQQTPGKAPKRWYDTSKLASGVPSRFSGSGLTD  
YTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTLQITR

[0663] SEQ ID NO:94 MUTATED IGG1 HINGE核酸序列：

[0664] GAGCCCCAAATCTGCTGACAAAACACATGCCAACCGTGCCCC

[0665] SEQ ID NO:95 突变IgG1铰链氨基酸序列：

[0666] EPKSADKTHCPCP

[0667] SEQ ID NO:96 突变IgG4 Fc (N297A) 核酸序列：

[0668] GCACCTGAGTCCTGGGGGACCATCAGTCTCTGTTCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATC  
TCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGT  
GGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTTCGTAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG  
TCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGCTCTCCAACAAAGGCCTCCGTCC  
TCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCAGGA  
GGAGATGACCAAGAACCAAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATGCCGTGGAGTGG  
AGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGGACTCCGACGGCTCCTCTCCTAC  
AGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAAATGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA  
CAACCACTACACACAGAACAGCCTCTCCCTGCTCTGGTAAA

[0669] SEQ ID NO:97 突变IgG4 Fc (N297A) 氨基酸序列：

[0670] APEFLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFAST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSRLTVDSRQEGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSLGK

[0671] SEQ ID NO:98 突变IgG1铰链-IgG4 Fc核酸序列：

[0672] GAGCCCCAAATCTGCTGACAAAACACATGCCAACCGTGCCCCAGCACCTGAGTCCTGGGGGACCA  
TCAGTCTCCTGTTCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGT  
GGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
AGCCCGGGAGGAGCAGTCGCTAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAAC  
GGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCAAACAAAGGCCTCCGTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGG  
GCAGCCCCGAGGCCACAGGTGTACCCCTGCCCATCCCAGGAGGAGTACCAAGAACCAAGGTACGTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAG  
ACCACGCCCTCCGTGGACTCCGACGGCTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GGAGGGGAATGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACACACAGAACAGCCTCTCCCTGT  
CTCTGGTAAA

[0673] SEQ ID NO:99 突变IgG1铰链-IgG4 Fc氨基酸序列：

[0674] EPKSADKTHCPCPAPEFLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV

HNAKTKPREEQFASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0675] SEQ ID NO:100 scFv1 MCS-G4S-hOKT3 scFv-IgG1铰链-IgG4 Fc表达盒核酸序列：

[0676] ACTAGTGCCACCATGGAGTTGGGCTGAGCTGGTCTCCTGGTGGCTATCTGAAGGGTGTCCAGTGTGAATTCAAGCTTCTAGAGCGCTGCTAGCGGTGGAGGTGGATCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCAGGGGGGGAGTCGTGCAGCCGGTCGGTCTCTGCGTCTGTCTGTAAGGCATCCGGTTATACTTTACCAGGTACACAATGCACTGGTGCGGCAGGCTCTGGCAAGGGCTGGAGTGGATCGGCTATATCAACCCATCCAGGGCTACACCAACTATAATCAGAAGGTGAAGGACCGGTTCACCATCTCTACAGATAAGAGCAAGTCTACAGCCTTCTGCAGATGGACTCCCTGAGACC TGAGGATACCGCGTGTACTTCTGCCTCGCTACTATGACGATCATTACTGTCTGGACTATTGGGCCAGGGCACCA CACTGACAGTGTCCAGCGGAGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCAGCGCGGCGGCGCTCTGACATCCAGATGACC CAGAGCCCATCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGCGATAGAGTGACCATCACATGCTCCGCCCTCCTCCGTGTCCTA CATGAACTGGTATCAGCAGACACCCGGCAAGGCCCTAACAGAGATGGATCTACGATACTCCAAGCTGGCTCCGGAG TGCCCTCTCGTTCTGGCTCCGGCAGCGCACAGACTATACCTTACAATCAGCTCTGCAGCCTGAGGATATC GCTACCTACTATTGTCAAGCAGTGGTCCAGCAATCCATTACCTTGGCCAGGGCACAAAGCTGCAGATCACCAGGCT CGAGCCAAGAGCGCCGACAAGACCCACACATGCCCTGTCCAGCTCCGAGTTCTGGCGGCCATCCGTGTCCTGAGTGGCTTCACCCAAGCCAAGGATACTGATGATCAGCCGGACCCAGAGGTGACATGCGTGGTGGACGTG TCTCAGGAGGACCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGGCCAG GGAGGAGCAGTTGCTTCTACATACCGGGTGGTCCGTGCTGACCGTGTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAG AGTATAAGTCAAGGTGTCCTAACAGGCCCTGTCCATCGAGAACATCAGCAAGGCTAACGGACAGCCT CGCGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCTCATCTCAGGAGGAGATGACAAAGAACCAAGGTGTCCTGACCTGTCTGGT GAAGGGCTTCTATCCCTCCGACATCGCTGTGGAGTGGAGAGCAATGCCAGCCTGAGAACAAATTACAAGACCAACAC CCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTTTCTGTATAGCAGACTGACCGTGGATAAGTCTCGCTGGCAGGAGGGC AACGTGTTCTCTGTTCCGTGATGCACGAGGCAGTGCACAACCAACTACACTCAGAAATCACTGTCAGTCCCTGGG CAAGTAGGCGGCCGC

[0677] SEQ ID NO:101 scFv1 MCS-G4S-hOKT3 scFv-IgG1铰链-IgG4 Fc表达盒氨基酸序列：

[0678] MEFGLSWVFLVAILKGVQC-MCS-QVQLVQSGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKG LEWIGYINPSRGYTNYNQVKDRFTISTDKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYDDHYCLDYWGQGTTLVSSGG GGSGGGGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVITITCSASSSVSYMNYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGS GSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTLQITRLEPKSADKTHCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0679] SEQ ID NO:102 scFv1 MCS-G4S-mOKT3 scFv-IgG1铰链-IgG4 Fc表达盒核酸序列：

[0680] ACTAGTGCCACCATGGAGTTGGGCTGAGCTGGTCTCCTGGTGGCTATCTGAAGGGTGTCCAGTGTGAATTCAAGCTTCTAGAGCGCTGCTAGCGGTGGAGGTGGATCCCAGGTCCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCCGAAC

GGCCCGTCCGGAGCAAGCGTAAAATGTCCTGTAAAGCAAGTGGCTATACCTCACCAAGGTACACAATGCACTGGG  
 TGAAGCAGAGGCCAGGACAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTATATCAACCCCTCTAGGGCTACACAAACTATAATCAG  
 AAGTTCAAGGACAAGGCCACCCGTACCACCGATAAGTCCAGCTACAGCTTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAG  
 CGAGGACTCTGCCGTACTATTGCGCTAGATACTATGACGATCATTACTGTCTGGATTATTGGGCCAGGGCACCA  
 CACTGACAGTGTCTCCGGAGGAGGAGGCAGCGGAGGAGGCTCTGGCGGCCGGCTCCAGATGTGCTGACC  
 CAGTCCCCAGCTATCATGTCCGCCTCCCTGGAGAGAAGGTGACCATGACATGCAGGCCAGCTCTCGTGTCTTA  
 CATGAATTGGTATCAGCAGAAGTCCGGACAAGCCCTAACAGATGGATCTACGACACCTCTAACAGCTGGCCTCCGGAG  
 TGCCAGCTCACTTCGCGGCTCCGGCAGCGGCACCTCTTATTCCCTGACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAGGATGCC  
 GCTACCTACTATTGTCAGCAGTGGTCATCAAATCCTTCACCTTCGGTTAGGGACAAAACGGAGATCAATAGGCT  
 CGAGCCAAAGAGCGCCGACAAGACCCACACATGCCCTGTCCAGCTCCGAGTTCTGGCGGCCATCCGTGT  
 TCCTGTTCCACCCAAGGCCAAGGATACTGATGATCAGCCGGACCCAGAGGTGACATGCGTGGTGGACGTG  
 TCTCAGGAGGACCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCAG  
 GGAGGAGCAGTTGCTTCTACATACCGGGTGGTCCGTGCTGACCGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGG  
 AGTATAAGTGCAAGGTGCTTCAATAAGGCCTGCCTCTTCCATCGAGAACATCAGCAAGGCTAACGGACAGCCT  
 CGCGAGCCACAGGTGTACACCCCTGCCTCCATCTCAGGAGGAGTACAAGAACCAAGGTGCTCCGTACCTGTCTGGT  
 GAAGGGCTTCTATCCCTCCGACATCGCTGTGGAGTGGAGAGCAATGCCAGCCTGAGAACAAATTACAAGACCAAC  
 CCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTTTCTGTATAGCAGACTGACCGTGGATAAGTCTCGCTGGCAGGAGGGC  
 AACGTGTTCTCCTGTTCCGTGATGCACGAGGCAGTGCACAACCACACTCAGAAATCACTGTCAGTCCCTGGG  
 CAAGTAGGCGGCCGC

[0681] SEQ ID NO:103 scFv1 MCS-G4S-mOKT3 scFv-IgG1铰链-IgG4 Fc表达盒氨基酸序列：

[0682] MEFGLSWVFLVAILKGVQC-MCS-QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQG  
 LEWIGYINPSRGYTNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSGG  
 GGSGGGGGGGGSQIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCSSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGS  
 GSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRLEPKSADKTHTCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK  
 DTLMISRTPETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
 KGLPSSIEKTISKAKGQPQREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG  
 SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0683] SEQ ID NO:104 抗PSMA&hOKT3双特异性Ab核酸序列 (gy1-2) :

[0684] ATGGAGTTGGCTGAGCTGGCTTCCTGGCTATCTGAAGGGTGTCCAGTGTGAATTCCAGTCT  
 GTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGCCAGGGCAGAGTGTCAATTATCTCCTGCACTGGAGCAGCTCCAA  
 CATCGGGGCAGGTTCTCATGTACACTGGTACCGAGCTCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATCTATGAAAACA  
 CCAATCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGGTTCCGTGCCATCACTGG  
 CTCCAGCCTGAGGATGAGGCTGATTATTGTGCAACATGGATGACAGTCTGAATGGTGAATATTGGGGAGG  
 GACCAAGGCCACCGTCTAGGGGATCCTCTAGGTCAAGTCCAGGGGGGGGTGGCAGGGAGGGGGGGGG  
 TGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGCCCTGGCCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT  
 ACCCTCAGTGGCTATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTATATCATA  
 TGATGGAAGCAATAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCGATTACCGTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC  
 TGTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGACTATTGTGCTAAAGGCCTACCTGGGACTC

GGTGACAATGATGCTCTCGATATCTGGGGCCCCGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGGTGGAGGTGGATC  
 CCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCAGGGGGGGAGTCGTGCAGCCCGGTGGCTCTGCCTGTCTTGTAAAGGCATCCG  
 GTTATACTTTACCAGGTACACAATGCACTGGTGCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCTGGAGTGGATCGGCTATATC  
 AACCCATCCAGGGCTACACCAACTATAATCAGAAGGTGAAGGACCGGTTACCATCTCTACAGATAAGAGCAAGTC  
 TACAGCCTTCTGCAGATGGACTCCCTGAGACCTGAGGATACCGCGTGTACTTCTGCCTCGCTACTATGACGATC  
 ATTACTGTCTGGACTATTGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTGTCCAGCGAGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGC  
 AGCGGCGGCGGCGCTGACATCCAGATGACCCAGAGGCCATCTCCCTGTCGCTTCTGGCTCCGGCAGCGCACAGACTATACC  
 CATCACATGCTCCGCCTCCTCCGTGCCTACATGAACCTGGTATCAGCAGACACCCGGCAAGGCCCTAACAGAT  
 GGATCTACGATACTCCAAGCTGCCCTCGGAGTGCCCTCTCGCTTCTGGCTCCGGCAGCGCACAGACTATACC  
 TTTACAATCAGCTCTGCAGCCTGAGGATATCGCTACCTACTATTGTCAGCAGTGGTCCAGCAATCCATTACCT  
 TGGCCAGGGACAAAGCTGCAGATCACCAGGCTCGAGCCAAGAGCGCCGACAAGACCCACACATGCCCTGTGTC  
 CAGCTCCCGAGTTCTGGCGGCCATCCGTGTTCTGTTCCACCAAGCCAAGGATACACTGATGATCAGCCGG  
 ACCCCAGAGGTGACATGCGTGGTGGACGTGTCAGGAGGACCCGAGGTGAGTTCAACTGGTACGTGGACCG  
 CGTGGAGGTGACAATGCCAAGCCAAGGCCAGGGAGGAGCAGTTGCTTCTACATACCGGTGGTCCGTGCTGA  
 CCGTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTCAAGGTGTCATAAGGGCCTGCTTCTCCATC  
 GAGAACACAATCAGCAAGGCTAAGGGACAGCCTCGCAGCCACAGGTGTACACCCGCTCCATCTCAGGAGGAGAT  
 GACAAAGAACAGGTGTCCTGACCTGTCTGGTAAGGGCTCTATCCCTCCGACATCGCTGTGGAGTGGAGAGCA  
 ATGGCCAGCCTGAGAACAAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTTTCTGTATAGCAGA  
 CTGACCGTGGATAAGTCTCGCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCTGTTCTGTGATGCACGAGGACTGCACAACCA  
 CTACACTCAGAAATCACTGTCAGTGTCCCTGGCAAGTAG

[0685] SEQ ID NO:105 抗-PSMA&hOKT3双特异性Ab氨基酸序列 (gy1-2) :

[0686] MEFGLSWVFLVAILKGVQCEFQSVLTQPPSVGAPGQSVIISCTGSSNIGAGSHVHWYQQVPGTAPKL  
 LIYENTNRPSGPDRFSGSKSGTSGSLAITGLQPEDEADYYCATWDDSLNGVIFGGGTAKATVLGGSSRSSSSGGGS  
 GGGGEVQLVESGGALAKPGSLRLSCAASGFTLSGYAMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNQKVDRFTISTDKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFC  
 NSKNTLFLQMNSLRPEDTAVYYCAKGLTWGLDNDALDIWGPGBTVTVSSASGGGSQVQLVQSGGGVQPGRLRL  
 SCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNQKVDRFTISTDKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFC  
 RYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCSASSSVSYMHWYQQTPG  
 KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSDYTFITISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRLEPKSADKTH  
 TCPPCPAPEFLGGPSVFLPPPKDLMISRTPETVTVSSASGGGSQVQLVQSGGGVQPGRLRL  
 VVSVTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
 VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0687] SEQ ID NO:106 不含信号肽的抗-PSMA&hOKT3双特异性Ab氨基酸序列 (gy1-2) :

[0688] EFQSVLTQPPSVGAPGQSVIISCTGSSNIGAGSHVHWYQQVPGTAPKLLIYENTNRPSGPDRFSGS  
 KSGTSGSLAITGLQPEDEADYYCATWDDSLNGVIFGGGTAKATVLGGSSRSSSSGGGGGGEVQLVESGGALAKPG  
 GSLRLSCAASGFTLSGYAMHWVRQAPGKGLEWAVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLFLQMNSLRPEDTA  
 VYYCAKGLTWGLDNDALDIWGPGBTVTVSSASGGGSQVQLVQSGGGVQPGRLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQ  
 APGKGLEWIGYINPSRGYTNQKVDRFTISTDKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYDDHYCLDYWGQGTTLT  
 VSSGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCSASSSVSYMHWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPS  
 RFSGSGSGTDYTFITISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRLEPKSADKTHCPPCPAPEFLGGPSVFLF

PPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV  
LSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSGK

[0689] SEQ ID NO:107 抗-PSMA&mOKT3双特异性Ab核酸序列 (gy1-2) :

[0690] ATGGAGTTGGCTGAGCTGGTCTTCCCTGGCTATCTGAAGGGTGTCCAGTGTGAATTCCAGTCT  
GTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGCCAGGGCAGAGTGTCAATTATCCTGCAGTGGAGCAGCTCAA  
CATCGGGCAGGTTCTCATGTACACTGGTACCGAGCAGGGTCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATCTATGAAAACA  
CCAATCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGGTTCCCTGCCATCACTGGA  
CTCCAGCCTGAGGATGAGGCTGATTATTATTGTCAACATGGGATGACAGTCTGAATGGTGTAAATTGGGGAGG  
GACCAAGGCCACCGTCTAGGCAGATCCTCTAGGTCAAGTCCAGCGCGCCGGTGGCAGCGGAGGCAGCGGTGAGG  
TGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGCCCTGGCCAAGCCTGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTC  
ACCCCTCAGTGGCTATGCTATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTATATCATA  
TGATGGAAGCAATAAAACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCGATTACCGTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC  
TGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTACTATTGTCTAAAGCCTTACCTGGGACTC  
GGTGACAATGATGCTCTCGATATCTGGGCCCGGACCACGGTACCGTCTCCAGCTAGCGTGGAGGTGGATC  
CCAGGTCCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCCGAACCTGGCCCGTCCGGAGCAAGCGTAAAATGTCCTGTAAAGCAAGTG  
GCTATACCTTCAACCAGGTACACAATGCACTGGTGAAGCAGAGGCCAGGACAGGGCTGGAGTGGATCGCTATATC  
AACCCCTCTAGGGCTACACAAACTATAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCCTGACCACCGATAAGTCAGCTC  
TACAGCTTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACTCTGCCGTGTACTATTGCGCTAGATACTATGACGATC  
ATTACTGTCTGGATTATTGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTGTCTCCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
TCTGGCGCGCGGCTCCAGATCGTGTGACCCAGTCCCAGCTATCATGTCGCCCTCCCTGGAGAGAAGGTGAC  
CATGACATGCAGCGCCAGCTTCCGTGTCTACATGAATTGGTATCAGCAGAAGTCCGGACAAGCCCTAAGAGAT  
GGATCTACGACACCTCTAACGCTGGCCTCCGGAGTGCCTACACTTGTAGCAGTGGTCATCAAATCCTTCACCTT  
CTGACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAGGATGCCGCTACCTACTATTGTAGCAGTGGTCATCAAATCCTTCACCTT  
CGGTTCAAGGACAAACTGGAGATCAATAGGCTCGAGCCAAAGAGCGCCGACAAGACCCACACATGCCCTTGTC  
CAGCTCCGAGTTCTGGCGGCCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAGCCAAGGATAACACTGATGATCAGCGG  
ACCCCAAGAGGTGACATGCGTGGTGGACGCTGTCAGGAGGACCCGAGGTGCAAGTCAACTGGTACGTGGACGG  
CGTGGAGGTGACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTTGCTTACATACCGGTGGTCCGTGCTGA  
CCGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGGCCTGCCCTTCCATC  
GAGAAGACAATCAGCAAGGCTAAGGGACAGCCTCGCGAGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCTCATCTCAGGAGGAG  
GACAAAGAACCAAGGTGCTCCCTGACCTGTCTGGTAAGGGCTCTATCCCTCCGACATCGCTGTGGAGTGGAGAGCA  
ATGGCCAGCCTGAGAACAAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTTTCTGTATAGCAGA  
CTGACCGTGGATAAGTCTCGCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCTGTTCCGTGATGCAAGGCACTGCACAACCA  
CTACACTCAGAAATCACTGCACTGTCCCTGGCAAGTAG

[0691] SEQ ID NO:108 抗PSMA&mOKT3双特异性Ab氨基酸序列 (gy1-2) :

[0692] MEFGLSWVFLVAILKGVQCEFQSVLTQPPSVSGAPGQSVIISCTGSSNIGAGSHVHWYQQVPGTAPKL  
LIYENTNRPSGVPDFSGSKSGTSGSLAITGLQPEDEADYYCATWDDSLNGVIFGGGTAKTVLGGSSRSSSSGGGS  
GGGEVQLVESGGALAKPGGSLRLSCAASGFTLSGYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTVSRD  
NSKNTLFLQMNSLRPEDTAVYYCAKGLTWGLDNDALDIWGPGBTVTVSSASGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKM

SCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDATALTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCASASSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRLEPKSADKTHTCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVQYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSLGK

[0693] SEQ ID NO:109 抗PSMA&mOKT3双特异性Ab氨基酸序列(gy1-2):

[0694] EFQSVLQTQPPSVSGAPGQSVIISCTGSSNIGAGSHVHWYQQVPGTAPKLLIYENTNRPSGVPDRFSGSKSGTSGSLAITGLQPEDEADYYCATWDDSLNGVIFGGGTATVLLGGSSRSSSSGGGGGGEVQLVESGGALAKPGGSLRLSCAASGFTLSGYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSKYYADSVKGRFTVSRDNSKNTLFLQMNSLRPEDTAVYYCAKGLTWGLGDNDALDIWGPGBTVTVSSASGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSGGGSGGGSGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRLEPKSADKHTCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLSDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0695] SEQ ID NO:110 EF1a启动子序列:

[0696] CGTGAGGCTCCGGTCCCCGTCACTGGCAGAGGCACATGCCAACAGTCCCCAGAGTTGGGGGAG  
GGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGAAAGTGTGACTGGCTCCGC  
CTTTTCCCGAGGGTGGGGAGAACGTATATAAGTGCAGTAGTCGGTGAACGTTCTTCGCAACGGTTGCG  
CGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGGTCCCGGGCCTGGCCTCTTACGGTTATGCCCTGCGTGCCTT  
GAATTACTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTGATCCCAGCTCGGGTGGAAAGTGGGTGGAGAGTTCGAGG  
CCTTGCCTTAAGGAGCCCTCGCCTCGTGCCTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGCGCTGGGCCGCGTGC  
CTGGTGGCACCTCGCGCTGCTCGCTGCTTCGATAAGTCTCTAGCCATTAAAATTTGATGACCTGCTGCGA  
CGCTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTCGGTTTGGGCCGCG  
GGCGCGACGGGGCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTGGCGAGGCGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGG  
ACGGGGTAGTCTCAAGCTGCCGCCCTGCTCTGGTGCCTGCCCTCGGCCGCCGTATGCCCGCCCTGGCGG  
CAAGGCTGGCCGGTGGCACCAAGTGCAGGGAAAGATGGCGCTCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTAAAA  
TGGAGGACGCGGCTCGGGAGAGCGGGGGTAGTCACCCACACAAGGAAAGGGCTTCCGTCTCAGCCG  
CGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTGATTAGTCTCGAGCTTGAGTACGTC  
CTTAGGTTGGGGGAGGGTTTATGCGATGGAGTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCT  
TGGCACTGATGTAATTCTCCTGGAATTGCCCTTTGAGTTGGATCTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGT  
GGTCAAAGTTTTCTTCAGGTGTCGTGA

## [0697] 示例性实施方案

[0698] 在本公开中别处描述的实施方案外,本发明的示例性实施方案包括但不限于下列各项:

[0699] 1. 包含抗体或抗体片段的组合物,其中所述抗体或抗体片段包含下列一项或多项:

- [0700] a.) 轻链可变区FR1,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:7的氨基酸序列和与SEQ ID NO:7具有大于约90%同源性的氨基酸序列;
- [0701] b.) 轻链CDR1,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9的氨基酸序列和与SEQ ID NO:9具有大于约90%同源性的氨基酸序列;
- [0702] c.) 轻链可变区FR2,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:11,与SEQ ID NO:11具有大于约90%同源性的氨基酸序列,SEQ ID NO:39和与SEQ ID NO:39具有大于约90%同源性的氨基酸序列;
- [0703] d.) 轻链CDR2,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:13,与SEQ ID NO:13具有大于约90%同源性的氨基酸序列,SEQ ID NO:41和与SEQ ID NO:41具有大于约90%同源性的氨基酸序列;
- [0704] e.) 轻链可变区FR3,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:15的氨基酸序列和与SEQ ID NO:15具有大于约90%同源性的氨基酸序列;
- [0705] f.) 轻链CDR3,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:17的氨基酸序列和与SEQ ID NO:17具有大于约90%同源性的氨基酸序列;
- [0706] g.) 轻链可变区FR4,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:19,与SEQ ID NO:19具有大于约90%同源性的氨基酸序列,SEQ ID NO:43和与SEQ ID NO:43具有大于约90%同源性的氨基酸序列;
- [0707] h.) 重链可变区FR1,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:23的氨基酸序列和与SEQ ID NO:23具有大于约90%同源性的氨基酸序列;
- [0708] i.) 重链CDR1,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:25,与SEQ ID NO:25具有大于约90%同源性的氨基酸序列,SEQ ID NO:45和与SEQ ID NO:45具有大于约90%同源性的氨基酸序列;
- [0709] j.) 重链可变区FR2,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:27的氨基酸序列和与SEQ ID NO:27具有大于约90%同源性的氨基酸序列;
- [0710] k.) 重链CDR2,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:29的氨基酸序列和与SEQ ID NO:29具有大于约90%同源性的氨基酸序列;
- [0711] l.) 重链可变区FR3,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:31,与SEQ ID NO:31具有大于约90%同源性的氨基酸序列,SEQ ID NO:47和与SEQ ID NO:47具有大于约90%同源性的氨基酸序列;
- [0712] m.) 重链CDR3,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:33,与SEQ ID NO:33具有大于约90%同源性的氨基酸序列,SEQ ID NO:49和与SEQ ID NO:49具有大于约90%同源性的氨基酸序列;
- [0713] n.) 重链可变区FR4,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:35,与SEQ ID NO:35具有大于约90%同源性的氨基酸序列,SEQ ID NO:51和与SEQ ID NO:51具有大于约90%同源性的氨基酸序列;和
- [0714] o.) 接头域,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:37的氨基酸序列,与SEQ ID NO:37具有大于约90%同源性的氨基酸序列。
- [0715] 2. 实施方案1的组合物,其中所述抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链。

[0716] 3. 实施方案1的组合物,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0717] 4. 实施方案1的组合物,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:51。

[0718] 5. 实施方案1的组合物,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:47。

[0719] 6. 实施方案1的组合物,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:49。

[0720] 7. 包含抗体或抗体片段的组合物,其中所述抗体或抗体片段包含下列下列一项或多项:

[0721] a.) 重链信号肽,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:55的氨基酸序列和与SEQ ID NO:55具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0722] b). 重链可变区,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:57的氨基酸序列和与SEQ ID NO:57具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0723] c.) 重链恒定区,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:59的氨基酸序列和与SEQ ID NO:59具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0724] d.) 轻链信号肽,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:63的氨基酸序列和与SEQ ID NO:63具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0725] e.) 轻链可变区,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:65的氨基酸序列和与SEQ ID NO:65具有大于约90%同源性的氨基酸序列;和

[0726] f.) 轻链恒定区,其包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:67的氨基酸序列和与SEQ ID NO:67具有大于约90%同源性的氨基酸序列。

[0727] 8. 实施方案7的组合物,其中所述抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的轻链。

[0728] 9. 实施方案7的组合物,其中所述抗体或抗体片段含有包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链。

[0729] 10. 实实施方案1-9中任一项的组合物,其中所述抗体或其抗体片段选自下组:IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE或具有IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgA or IgE的免疫球蛋白恒定域和/或可变域。

[0730] 11. 实实施方案1-9中任一项的组合物,其中所述抗体或抗原结合片段包含lambda, kappa或其变体的部分或完整轻链恒定区。

[0731] 12. 实实施方案1-11中任一项的组合物,其中所述抗体或抗体片段是重组抗体。

[0732] 13. 实实施方案1-11中任一项的组合物,其中所述抗体或抗体片段是单克隆抗体。

[0733] 14. 实实施方案1-11中任一项的组合物,其中所述抗体或抗体片段是多克隆抗体。

[0734] 15. 实实施方案1-11中任一项的组合物,其中所述抗体或抗体片段是单克隆和/或多克隆抗体的混合物。

[0735] 16. 实实施方案1-11中任一项的组合物,其中所述抗体或抗体片段是人抗体。

[0736] 17. 实实施方案1-11中任一项的组合物,其中所述抗体或抗体片段是人源化抗体。

[0737] 18. 实实施方案1-11中任一项的组合物,其中所述抗体或抗体片段是嵌合抗体。

[0738] 19. 组合物, 其包含编码抗体或抗体片段的分离的核酸分子, 其中所述分离的核酸分子包含下列一项或多项:

[0739] a.) 编码轻链可变区FR1的核苷酸序列, 所述轻链可变区FR1包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:7的氨基酸序列, 和与SEQ ID NO:7具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0740] b.) 编码轻链CDR1的核苷酸序列, 所述轻链CDR1包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:9的氨基酸序列和与SEQ ID NO:9具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0741] c.) 编码轻链可变区FR2的核苷酸序列, 所述轻链可变区FR2包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:11, 与SEQ ID NO:11具有大于约90%同源性的氨基酸序列, SEQ ID NO:39和与SEQ ID NO:39具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0742] d.) 编码轻链CDR2的核苷酸序列的编码核苷酸序列, 所述轻链CDR2包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:13, 与SEQ ID NO:13具有大于约90%同源性的氨基酸序列, SEQ ID NO:41和与SEQ ID NO:41具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0743] e.) 编码轻链可变区FR3的核苷酸序列, 所述轻链可变区FR3包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:15的氨基酸序列和与SEQ ID NO:15具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0744] f.) 编码轻链CDR3的核苷酸序列, 所述轻链CDR3包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:17的氨基酸序列和与SEQ ID NO:17具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0745] g.) 编码轻链可变区FR4的核苷酸序列, 所述轻链可变区FR4其包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:19, 与SEQ ID NO:19具有大于约90%同源性的氨基酸序列, SEQ ID NO:43和与SEQ ID NO:43具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0746] h.) 编码重链可变区FR1的核苷酸序列, 所述重链可变区FR1包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:23的氨基酸序列和与SEQ ID NO:23具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0747] i.) 编码重链CDR1的核苷酸序列, 所述重链CDR1包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:25, 与SEQ ID NO:25具有大于约90%同源性的氨基酸序列, SEQ ID NO:45和与SEQ ID NO:45具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0748] j.) 编码重链可变区FR2的核苷酸序列, 所述重链可变区FR2包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:27的氨基酸序列和与SEQ ID NO:27具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0749] k.) 编码重链CDR2的核苷酸序列, 所述重链CDR2包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:29的氨基酸序列和与SEQ ID NO:29具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0750] l.) 编码重链可变区FR3的核苷酸序列, 所述重链可变区FR3包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:31, 与SEQ ID NO:31具有大于约90%同源性的氨基酸序列, SEQ ID NO:47和与SEQ ID NO:47具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0751] m.) 编码重链CDR3的核苷酸序列, 所述重链CDR3包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:33, 与SEQ ID NO:33具有大于约90%同源性的氨基酸序列, SEQ ID NO:49和与SEQ ID NO:49具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0752] n.) 编码重链可变区FR4的核苷酸序列, 所述重链可变区FR4包含选自下组的氨基

酸序列:SEQ ID NO:35,与SEQ ID NO:35具有大于约90%同源性的氨基酸序列,SEQ ID NO:51和与SEQ ID NO:51具有大于约90%同源性的氨基酸序列;和

[0753] o.)编码接头域的核苷酸序列,所述接头域包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:37的氨基酸序列,与SEQ ID NO:37具有大于约90%同源性的氨基酸序列。

[0754] 20.实施方案19的组合物,其中所述分离的核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链的核苷酸序列和编码包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链的核苷酸序列。

[0755] 21.实施方案19的组合物,其中所述分离的核酸分子包含编码SEQ ID NO:3的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0756] 22.实施方案19的组合物,其中所述分离的核酸分子包含编码SEQ ID NO:39的核苷酸序列、编码SEQ ID NO:45的核苷酸序列和编码SEQ ID NO:51的核苷酸序列。

[0757] 23.实施方案19的组合物,其中所述分离的核酸分子包含编码SEQ ID NO:41的核苷酸序列、编码SEQ ID NO:43的核苷酸序列、编码SEQ ID NO:45的核苷酸序列和编码SEQ ID NO:47的核苷酸序列。

[0758] 24.实施方案19的组合物,其中所述分离的核酸分子包含编码SEQ ID NO:45的核苷酸序列和编码SEQ ID NO:49的核苷酸序列。

[0759] 25.组合物,其包含编码抗体或抗体片段的分离的核酸分子,其中所述分离的核酸分子包含下列一项或多项:

[0760] a.)编码轻链可变区FR1的核苷酸序列,所述轻链可变区FR1选自下组:SEQ ID NO:6的核苷酸序列和与SEQ ID NO:6具有大于约90%同源性的核苷酸序列;

[0761] b.)编码轻链CDR1的核苷酸序列,所述轻链CDR1选自下组:SEQ ID NO:8的核苷酸序列和与SEQ ID NO:8具有大于约90%同源性的核苷酸序列;

[0762] c.)编码轻链可变区FR2的核苷酸序列,所述轻链可变区FR2选自下组:SEQ ID NO:10的核苷酸序列、与SEQ ID NO:10具有大于约90%同源性的核苷酸序列、SEQ ID NO:38的核苷酸序列和与SEQ ID NO:38具有大于约90%同源性的核苷酸序列;

[0763] d.)编码轻链CDR2的核苷酸序列,所述轻链CDR2选自下组:SEQ ID NO:12的核苷酸序列、与SEQ ID NO:12具有大于约90%同源性的核苷酸序列、SEQ ID NO:40的核苷酸序列和与SEQ ID NO:40具有大于约90%同源性的核苷酸序列;

[0764] e.)编码轻链可变区FR3的核苷酸序列,所述轻链可变区FR3选自下组:SEQ ID NO:14的核苷酸序列和与SEQ ID NO:14具有大于约90%同源性的核苷酸序列;

[0765] f.)编码轻链CDR3的核苷酸序列,所述轻链CDR3选自下组:SEQ ID NO:16的核苷酸序列和与SEQ ID NO:16具有大于约90%同源性的核苷酸序列;

[0766] g.)编码轻链可变区FR4的核苷酸序列,所述轻链可变区FR4选自下组:SEQ ID NO:18的核苷酸序列、与SEQ ID NO:18具有大于约90%同源性的核苷酸序列、SEQ ID NO:42的核苷酸序列和与SEQ ID NO:42具有大于约90%同源性的核苷酸序列;

[0767] h.)编码重链可变区FR1的核苷酸序列,所述重链可变区FR1选自下组:SEQ ID NO:22的核苷酸序列和与SEQ ID NO:22具有大于约90%同源性的核苷酸序列;

[0768] i.)编码重链CDR1的核苷酸序列,所述重链CDR1选自下组:SEQ ID NO:24的核苷酸序列、与SEQ ID NO:24具有大于约90%同源性的核苷酸序列、SEQ ID NO:44的核苷酸序列

和与SEQ ID NO:44具有大于约90%同源性的核苷酸序列；

[0769] j.) 编码重链可变区FR2的核苷酸序列,所述重链可变区FR2选自下组:SEQ ID NO:26的核苷酸序列和与SEQ ID NO:26具有大于约90%同源性的核苷酸序列；

[0770] k.) 编码重链CDR2的核苷酸序列,所述重链CDR2选自下组:SEQ ID NO:28的核苷酸序列和与SEQ ID NO:28具有大于约90%同源性的核苷酸序列；

[0771] l.) 编码重链可变区FR3的核苷酸序列,所述重链可变区FR3选自下组:SEQ ID NO:30的核苷酸序列、与SEQ ID NO:30具有大于约90%同源性的核苷酸序列、SEQ ID NO:46的核苷酸序列和与SEQ ID NO:46具有大于约90%同源性的核苷酸序列；

[0772] m.) 编码重链CDR3的核苷酸序列,所述重链CDR3选自下组:SEQ ID NO:32的核苷酸序列、与SEQ ID NO:32具有大于约90%同源性的核苷酸序列、SEQ ID NO:48的核苷酸序列和与SEQ ID NO:48具有大于约90%同源性的核苷酸序列；

[0773] n.) 编码重链可变区FR4的核苷酸序列,所述重链可变区FR4选自下组:SEQ ID NO:34的核苷酸序列、与SEQ ID NO:34具有大于约90%同源性的核苷酸序列、SEQ ID NO:50的核苷酸序列和与SEQ ID NO:50具有大于约90%同源性的核苷酸序列；和

[0774] o.) 编码接头域的核苷酸序列,所述接头域选自下组:SEQ ID NO:36的核苷酸序列和与SEQ ID NO:36具有大于约90%同源性的核苷酸序列。

[0775] 26.实施方案25的组合物,其中所述分离的核酸分子包含SEQ ID NO:4的核苷酸序列和SEQ ID NO:20的核苷酸序列。

[0776] 27.实施方案25的组合物,其中所述分离的核酸分子包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列。

[0777] 28.实施方案25的组合物,其中所述分离的核酸分子包含SEQ ID NO:38的核苷酸序列、SEQ ID NO:44的核苷酸序列和SEQ ID NO:50的核苷酸序列。

[0778] 29.实施方案25的组合物,其中所述分离的核酸分子包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列、SEQ ID NO:42的核苷酸序列、SEQ ID NO:44的核苷酸序列和SEQ ID NO:46的核苷酸序列。

[0779] 30.实施方案25的组合物,其中所述分离的核酸分子包含SEQ ID NO:44的核苷酸序列和SEQ ID NO:48的核苷酸序列。

[0780] 31.组合物,其包含编码抗体或抗体片段的分离的核酸分子,其中所述分离的核酸包含下列一项或多项:

[0781] a.) 编码重链信号肽的核苷酸序列,所述重链信号肽包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:55的氨基酸序列和与SEQ ID NO:55具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0782] b.) 编码重链可变区的核苷酸序列,所述重链可变区包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:57的氨基酸序列和与SEQ ID NO:57具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0783] c.) 编码重链恒定区的核苷酸序列,所述重链恒定区包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:59的氨基酸序列和与SEQ ID NO:59具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0784] d.) 编码轻链信号肽的核苷酸序列,所述轻链信号肽包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:63的氨基酸序列和与SEQ ID NO:63具有大于约90%同源性的氨基酸序列;

[0785] e.) 编码轻链可变区的核苷酸序列,所述轻链可变区包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:65的氨基酸序列和与SEQ ID NO:65具有大于约90%同源性的氨基酸序列;和

[0786] f.) 编码轻链恒定区的核苷酸序列,所述轻链恒定区包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:67的氨基酸序列和与SEQ ID NO:67具有大于约90%同源性的氨基酸序列。

[0787] 32.实施方案31的组合物,其中所述分离的核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:68氨基酸序列的重链的核苷酸序列和编码包含SEQ ID NO:69氨基酸序列的轻链的核苷酸序列。

[0788] 33.实施方案31的组合物,其中所述分离的核酸分子包含编码包含SEQ ID NO:53氨基酸序列的重链的核苷酸序列和编码包含SEQ ID NO:61氨基酸序列的轻链的核苷酸序列。

[0789] 34.组合物,其包含编码抗体或抗体片段的分离的核酸分子,其中所述分离的核酸分子包含下列一项或多项:

[0790] a.) 编码重链信号肽的核苷酸序列,所述重链信号肽选自下组:SEQ ID NO:54的核苷酸序列和与SEQ ID NO:54具有大于约90%同源性的核苷酸序列;

[0791] b.) 编码重链可变区的核苷酸序列,所述重链可变区选自下组:SEQ ID NO:56的核苷酸序列和与SEQ ID NO:56具有大于约90%同源性的核苷酸序列;

[0792] c.) 编码重链恒定区的核苷酸序列,所述重链恒定区选自下组:SEQ ID NO:58的核苷酸序列和与SEQ ID NO:58具有大于约90%同源性的核苷酸序列;

[0793] d.) 编码轻链信号肽的核苷酸序列,所述轻链信号肽选自下组:SEQ ID NO:62的核苷酸序列和与SEQ ID NO:62具有大于约90%同源性的核苷酸序列;

[0794] e.) 编码轻链可变区的核苷酸序列,所述轻链可变区选自下组:SEQ ID NO:64的核苷酸序列和与SEQ ID NO:64具有大于约90%同源性的核苷酸序列;和

[0795] f.) 编码轻链可变区的核苷酸序列,所述轻链可变区选自下组:SEQ ID NO:66的核苷酸序列和与SEQ ID NO:66具有大于约90%同源性的核苷酸序列。

[0796] 35.实施方案34的组合物,其中得到分离的核酸分子包含SEQ ID NO:52的核苷酸序列和SEQ ID NO:60的核苷酸序列。

[0797] 36.实施方案19-35中任一项的组合物,其中所述组合物是包含所述分离的核酸分子的载体。

[0798] 37.实施方案36的组合物,其中所述载体选自下组:DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。

[0799] 38.实施方案1-18中任一项的组合物,其中所述组合物是包含所述抗体或抗体片段的细胞。

[0800] 39.实施方案19-35中任一项的组合物,其中所述组合物是包含所述分离的核酸分子的细胞。

[0801] 40.实施方案38-39中任一项的组合物,其中所述细胞是噬菌体、大肠杆菌、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞,例如CHO、HEK293或PER.C6。

[0802] 41.实施方案38-40中任一项的组合物,其中所述细胞是体外或体内表达系统,例如用于蛋白质表达的工程化动物。

[0803] 42.治疗患有与PSMA表达相关的疾病的受试者的方法,其包括向所述受试者施用有效量的实施方案1-41中任一项的组合物。

[0804] 43.实施方案1-18中任一项的组合物,其中所述组合物是抗体药物缀合物,其包含

与生物活性剂共价或非共价可操作连接的抗体或抗体片段,其中所述试剂是毒素、放射性同位素、纳米颗粒、酶、生物活性肽或核苷酸。

[0805] 44. 实施方案43的组合物,其中所述抗体药物缀合物具有下式:

[0806]  $Ab - (LU-D)_p$

[0807] 或其药学可接受盐或溶剂合物,其中:

[0808]  $Ab$ 是抗体或抗体片段,并且

[0809]  $(LU-D)$ 是接头单元-药物单元部分,其中:

[0810]  $LU$ -是接头单元,并且

[0811]  $-D$ 是代表毒素、放射性同位素、纳米颗粒、酶、生物活性肽或核苷酸的药物单位;并且

[0812]  $p$ 是1至20的整数。

[0813] 45. 实施方案43的组合物,其中抗体药物缀合物具有下式:

[0814]  $Ab - (A_a - W_w - Y_y - D)_p$

[0815] 或其药学可接受盐或溶剂合物,其中:

[0816]  $Ab$ 是抗体或抗体片段,并且

[0817]  $-A_a - W_w - Y_y$ —是接头单元 (LU),其中:

[0818]  $-A$ -是延伸器(延伸器)单元,

[0819]  $a$ 是0或1,

[0820] 每个 $-W-$ 独立是氨基酸单元,

[0821]  $w$ 是范围为0至12的整数,

[0822]  $-Y-$ 是自毁间隔物单元,

[0823]  $y$ 是0、1或2;

[0824]  $-D$ 是药物单元,其代表毒素、放射性同位素、纳米颗粒、酶、生物活性肽或核苷酸;并且

[0825]  $p$ 是1至20的整数。

[0826] 46. 实施方案43的组合物,其中经由载体将所述毒素、放射性同位素、纳米颗粒、酶、生物活性肽或核苷酸间隔标记到所述抗体或抗体片段,所述载体具有下式:

[0827]  $Ab - \{载体 - (LU-D)_p\}_n$

[0828] 或

[0829]  $Ab - \{载体 - (A_a - W_w - Y_y - D)_p\}_n$

[0830] 其药学可接受盐或溶剂合物,其中

[0831]  $Ab$ 是抗体或抗体片段;并且

[0832]  $(LU-D)$ 是接头单元-药物单元部分,其中:

[0833]  $LU$ -是接头单元,并且

[0834]  $-A_a - W_w - Y_y$ —是接头单元 (LU),其中:

[0835]  $-A$ -是延伸器单元,

[0836]  $a$ 是0或1,

[0837] 每个 $-W-$ 独立是氨基酸单元,

[0838]  $w$ 是范围为0至12的整数,

- [0839] —Y—是自毁间隔物单元，
- [0840] y是0、1或2；
- [0841] -D是代表毒素、放射性同位素、纳米颗粒、酶、生物活性肽或核苷酸的药物单位；并且
- [0842] p是1至20的整数，
- [0843] 载体是聚合物、PEG、肽、糖、化合物或核苷酸，其用于加载药物单元以与药物单元间接抗体缀合；并且
- [0844] N是1至20的整数。
- [0845] 47. 实实施方案43-46中任一项的组合物，其中所述接头是可切割的，或不可切割的，稳定的或耐酸的 (acid-labile)。
- [0846] 48. 实实施方案43-46中任一项的组合物，其中所述接头是肽、聚合物、PEG、糖、化合物、核苷酸。
- [0847] 49. 实实施方案43-46中任一项的组合物，其中所述接头是SMCC、MC、MP、val-cit (VC)、ala-phe、PAB、SPP、SPDB、SIAB、MC-vc、MC-vc-PAB、腙或马来酰亚胺己酰基 (maleimidocaproyl)。
- [0848] 50. 实实施方案43-46中任一项的组合物，其中所述毒素是美登素类化合物 (maytansinoids)、澳瑞他汀、加利车霉素、多拉司他汀、多柔比星或其组合，例如DM1、DM4、MMAE、MMAF、多拉司他汀10、多拉司他汀15、加利车霉素或多柔比星。
- [0849] 51. 实实施方案43-46中任一项的组合物，其中所述毒素是皂草素、白喉毒素、白喉毒素A、假单胞菌外毒素、假单胞菌外毒素PE38、胱天蛋白酶-3、胱天蛋白酶-9、颗粒酶B、淋巴毒素、穿孔蛋白、凋亡诱导因子、DNA酶、DNA酶A、细胞色素C、肉毒杆菌、血管生成素、大肠杆菌素、蓖麻毒蛋白A的部分、单位或全毒素或其组合。
- [0850] 52. 实实施方案43-46中任一项的组合物，其中所述放射性同位素发射 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  或正电子辐射。
- [0851] 53. 实实施方案43-46中任一项的组合物，其中所述放射性同位素选自钼-99，锝-99m，铋-213，铬-51，钴-60，铜-64，镝-165，铒-169，钬-166，碘-125，铼-192，铁-59，镥-177，钯-103，磷-32，钾-42，铼-186，铼-188，钐-153，硒-75，钠-24 (15h)，锶-89，氪-133，镱-169，钇-90，碳-11，氮-13，氧-15，钴-57，镓-67，铟-111，碘-123，碘-131，氪-81m，铷-82，锶-92，铊-201，锝-86，锝-188，铜-67，溴-77，铅-212，镭-224，镭-223Ra，溴-76，碘-124，钇-86，锝-94m，镓-68，镓-66，铜-60，锝-89，碳-11，氮-13，氧-15，氟-18，铷-82。
- [0852] 54. 实实施方案43-46中任一项的组合物，其中所述纳米颗粒是含有成像探针、成像造影剂、基因、药物、前药或其组合的诊断剂、治疗剂或治疗诊断剂。
- [0853] 55. 实实施方案43-46中任一项的组合物，其中所述生物活性肽是几种细胞因子中的一种或组合，所述细胞因子例如 $\alpha$ 干扰素、 $\beta$ 干扰素、 $\gamma$ 干扰素、白细胞介素-1、白细胞介素-2、白细胞介素-3、白细胞介素-4、白细胞介素-5、白细胞介素-6、白细胞介素-7、白细胞介素-8、白细胞介素-10、白细胞介素-12、白细胞介素-15、白细胞介素-18、白细胞介素-21、白细胞介素-23、 $\gamma$ TNF、 $\beta$ TGF、GM-CSF、G-CSF。
- [0854] 56. 实实施方案1-18中任一项的组合物，其中所述组合物包含结合相同或不同抗原上的两个或更多个不同表位的多特异性抗体，其中所述表位之一在人前列腺特异性膜抗原

(PSMA) 上。

[0855] 57. 实施方案56的组合物,其中所述多特异性抗体是双特异性抗体。

[0856] 58. 实施方案57的组合物,其中双特异性抗体包含

[0857] (a) 多肽链,其包含具有下式的氨基酸序列:V1-L1-V2-L2-V3-L3-V4-L4-Fc;其中Fc是人IgG Fc多肽链;其中V1、V2、V3和V4中的两个是免疫球蛋白重链可变区(VH),并且另外两个是免疫球蛋白轻链可变区(VL);其中L1、L2、L3和L4是接头;并且其中L2可以存在或不存在;和L4是C220处具有突变的IgG1铰链;

[0858] (b) 多肽链,其包含具有下式的氨基酸序列:Fc-L4-V1-L1-V2-L2-V3-L3-V4;其中Fc是人IgG Fc多肽链;其中Fc的二硫键可以位于Fc的N或C末端;其中V1、V2、V3和V4中的两个是VH区,并且另外两个是VL区;其中L1、L2、L3和L4是接头;并且其中L2可以存在或不存在;并且L4是C220处具有突变的IgG1铰链;

[0859] (c) 包含具有下式的氨基酸序列的多肽链:靶向部分-L4-Fc;其中Fc是人IgG Fc多肽链;其中L4是在C220处具有突变的IgG1铰链;或

[0860] (d) 包含具有下式的氨基酸序列的多肽链:靶向Fc-L4的部分;其中Fc是人IgG Fc多肽链;其中L4是在C220处具有突变的IgG1铰链

[0861] 其中所述双特异性抗体结合靶细胞和免疫效应细胞和/或介导免疫效应细胞对靶细胞的细胞溶解,且

[0862] 其中所述双特异性抗体是二聚体。

[0863] 59. 实施方案58的组合物,其中(a)或(b)的Fc多肽链是IgG1,IgG2,IgG3或IgG4 Fc多肽链。

[0864] 60. 实施方案58的组合物,其中(a)或(b)的Fc多肽链是具有一个或多个以下突变的IgG1,IgG2,IgG3或IgG4 Fc多肽链:L234A,L235A,N297A。

[0865] 61. 实施方案58的组合物,其中(a)或(b)的Fc多肽链是具有一个或多个以下突变的IgG4 Fc:L234A,L235A,N297A。

[0866] 62. 实施方案58的组合物,其中所述L4是在C220处具有突变,例如C220A,C220G,C220S的IgG1铰链。

[0867] 63. 实施方案58-62中任一项所述的组合物,其中所述双特异性抗体包含第一抗原结合区和第二抗原结合区,所述第二抗原结合区结合人CD3上的表位,并且所述第一抗原结合区包含抗体或抗原片段并且结合人前列腺特异性膜抗原(PSMA)上的表位。

[0868] 64. 实施方案58-62中任一项的组合物,其中双特异性抗体是二价,三价或四价的。

[0869] 66. 实施方案58-62中任一项的组合物,其中所述双特异性抗体选自下组串联scFv (taFv或scFv2),双抗体,dAb2A/HH2,突出-入-空穴衍生物,SEED-1gG,heteroFc-scFv,Fab-scFv,scFv-Jun/Fos,Fab'-Jun/Fos,tribody,DNL-F(ab)3,scFv3-CH1/CL,Fab-scFv2,IgG-scFab,IgG-scFv,scFv-IgG,scFv2-Fc,F(ab')2-scFv2,scDB-Fc,scDb-CH3,Db-Fc,scFv2-H/L,DVD-1g,tandAb,scFv-dh1x-scFv,dAb2-1gG,dAb-IgG,dAb-Fc-dAb及其组合。

[0870] 67. 实施方案58-62中任一项的组合物,其中所述双特异性抗体是双抗体或三体。

[0871] 68. 实施方案58-67中任一项的组合物,其中所述双特异性抗体包含第一抗原结合区和第二抗原结合区,所述第二抗原结合区结合人CD3上的表位,并且所述第一抗原结合区结合人前列腺特异性膜抗原(PSMA)上的表位,其中所述第二抗原结合区选自:

[0872] a) 抗体,所述抗体含有包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的可变重区(VH)和包含SEQ ID NO:87的序列的VL区,和

[0873] b) 抗体,所述抗体含有包含SEQ ID NO:91的序列的可变重区(VH)和包含SEQ ID NO:93的序列的可变轻(VL)区。

[0874] 69.实施方案68的组合物,其中所述第二抗原结合区(人CD3)的抗体或抗原结合区选自:

[0875] a) 包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的抗体或抗原结合区,和

[0876] b) 包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的抗体或抗原结合区。

[0877] 70.实施方案68的组合物,其中所述双特异性抗体包含编码SEQ ID NO:101的氨基酸序列或SEQ ID NO:103的氨基酸序列的信号肽-scFv1-MCS-scFv2-IgG1铰链-IgG4Fc表达盒。

[0878] 71.实施方案68的组合物,其中所述双特异性抗体包含编码SEQ ID NO:100的氨基酸序列或SEQ ID NO:102的氨基酸序列的信号肽-scFv1-MCS-scFv2-IgG1铰链-IgG4Fc表达盒。

[0879] 72.实施方案56-71中任一项的组合物,其中所述双特异性抗体包含选自下组的氨基酸序列:a) SEQ ID NO:105的氨基酸序列;b) SEQ ID NO:106的氨基酸序列;c) SEQ ID NO:108的氨基酸序列;d) SEQ ID NO:109的氨基酸序列。

[0880] 73.实施方案56-71中任一项的组合物,其中所述双特异性抗体由选自下组的核苷酸序列编码:a) SEQ ID NO:104的核酸序列;b) SEQ ID NO:107的核酸序列。

[0881] 74.组合物,其包含载体,所述载体包含编码实施方案56-73中任一项所述的双特异性抗体的核苷酸序列。

[0882] 75.实施方案74的组合物,其中载体选自DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。

[0883] 76.实施方案74的组合物,其中所述组合物是包含所述载体的细胞。

[0884] 77.实施方案76的组合物,其中所述细胞是噬菌体、大肠杆菌、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞,诸如CHO、HEK293、PER.C6或源自人的任何细胞。

[0885] 78.实施方案76-77中任一项的组合物,其中所述细胞是体外或体内表达系统,诸如用于蛋白质表达的工程化动物。

[0886] 79.实施方案1-18中任一项的组合物,其中所述组合物包含分离的嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR包含抗体或抗体片段、跨膜域和包含一个或多个刺激域的胞内信号传导域。

[0887] 80.实施方案79的组合物,其中所述CAR包含跨膜域,其包含选自下组的蛋白质的跨膜域:T细胞受体,CD28,CD3epsilon,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154的alpha, beta或zeta链。

[0888] 81.实施方案80的组合物,其中跨膜域包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:75和与SEQ ID NO:75具有大于约90%同源性的氨基酸序列。

[0889] 82.实施方案79的组合物,其中所述抗体或抗体片段通过铰链区与所述跨膜域连接。

[0890] 83.实施方案82的组合物,其中所述铰链区包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID

NO:73,和与SEQ ID NO:73具有大于约90%同源性的氨基酸序列。

[0891] 84.实施方案79的组合物,其还包含一个或多个共刺激域。

[0892] 85.实施方案84的组合物,其中所述一个或多个共刺激域是获自选自下组的一种或多种蛋白质的功能性信号传导域:OX40,CD2,CD27,CD28,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),ICOS(CD278)和4-1BB(CD137)。

[0893] 86.实施方案84或85的组合物,其中所述共刺激域包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:77,和与SEQ ID NO:77具有大于约90%同源性的氨基酸序列。

[0894] 87.实施方案79的组合物,其中胞内信号传导域包含4-1BB的功能性信号传导域和/或CD3zeta的功能性信号传导域。

[0895] 88.实施方案87的组合物,其中胞内信号传导域包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:77,与SEQ ID NO:77具有大于约90%同源性的氨基酸序列,SEQ ID NO:79,和与SEQ ID NO:79具有大于约90%同源性的氨基酸序列。

[0896] 89.实施方案79的组合物,其进一步包含前导物序列。

[0897] 90.实施方案89的组合物,其中所述前导物序列包含SEQ ID NO:71。

[0898] 91.实施方案79的组合物,其中所述CAR包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:81和与SEQ ID NO:81具有大于约90%同源性的氨基酸序列。

[0899] 92.实施方案19-35中任一项的组合物,其中所述组合物包含编码CAR的分离的核酸分子,其中所述CAR包含抗体或抗体片段、跨膜域和包含一个或多个刺激域的胞内信号传导域。

[0900] 93.实施方案92的组合物,其中所述组合物是包含编码CAR的核酸分子的载体。

[0901] 94.实施方案93的组合物,其中所述载体选自DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。

[0902] 95.实施方案93的组合物,其中所述载体还包含启动子。

[0903] 96.实施方案95的组合物,其中所述启动子是EF-1启动子。

[0904] 97.实施方案96的组合物,其中所述EF-1启动子包含SEQ ID NO:110的序列。

[0905] 98.实施方案92的组合物,其中所述组合物包含细胞,所述细胞包含编码CAR的分离的核酸分子,其中所述CAR包含抗体或抗体片段、跨膜域和包含一个或多个刺激域的胞内信号传导域。

[0906] 99.实施方案98的组合物,其中所述细胞是人T细胞。

[0907] 100.实施方案99的组合物,其中T细胞是CD8+ T细胞。

[0908] 101.制备细胞的方法,包括用实施方案93-97中任一项的组合物转导T细胞。

[0909] 102.治疗患有与PSMA表达相关的疾病的受试者的方法,包括向受试者施用有效量的实施方案79-100中任一项的组合物。

[0910] 103.实施方案102的方法,其中所述组合物是自体T细胞。

[0911] 104.实施方案102的方法,其中所述组合物是同种异体T细胞。

[0912] 105.治疗患有与PSMA表达相关的疾病的受试者的方法,其包括向受试者施用有效量的实施方案43-55中任一项的组合物。

[0913] 106.治疗患有与PSMA表达相关的疾病的受试者的方法,其包括向受试者施用有效量的实施方案56-78中任一项的组合物。

[0914] 107. 诊断哺乳动物中与PSMA表达相关的疾病的存在的方法,所述方法包括用包含实施方案1-18中任一项的组合物的组合物对从所述哺乳动物分离的组织样品取样,由此所述抗体或抗体片段对所述组织样品的特异性结合指示所述哺乳动物中与PSMA表达相关的疾病的存在的方法。

[0915] 108. 实施方案1-41中任一项的组合物,其还包含药学可接受载体、赋形剂、稳定剂、稀释剂、佐剂、细胞因子、趋化因子、化疗药物、其他治疗药物或其组合。

[0916] 109. 实施方案43-55中任一项的组合物,其还包含药学可接受载体、赋形剂、稳定剂、稀释剂、佐剂、细胞因子、趋化因子、化疗药物、其他治疗药物或其组合。

[0917] 110. 实施方案56-78中任一项的组合物,其还包含药学可接受载体、赋形剂、稳定剂、稀释剂、佐剂、细胞因子、趋化因子、化疗药物、其他治疗药物或其组合。

[0918] 111. 实施方案79-100中任一项的组合物,其还包含药学可接受载体、赋形剂、稳定剂、稀释剂、佐剂、细胞因子、趋化因子、化疗药物、其他治疗药物或其组合。

[0919] 112. 在受试者中成像与PSMA表达相关的疾病的方法,所述方法包括施用实施方案1-18中任一项的组合物的步骤,其中所述抗体或抗体片段与试剂可操作地连接。

[0920] 113. 实施方案112的方法,其中所述试剂是可光活化的试剂、荧光团、放射性同位素、生物发光蛋白、生物发光肽、荧光标签、荧光蛋白、荧光肽、成像造影剂、酶、核磁共振活性试剂或纳米颗粒。

[0921] 114. 实施方案42、102、105-107和112中任一项所述的方法,其中与PSMA表达相关的疾病选自增殖性疾病,例如癌症或恶性或癌前状况,例如前列腺癌,或在肿瘤细胞或新血管系统上具有PSMA高表达的其他实体瘤,或者是与PSMA表达相关的非癌相关适应症,其中实体瘤包括恶性上皮肿瘤,淋巴瘤,母细胞瘤,肉瘤(包括脂肪肉瘤),神经内分泌肿瘤,间皮瘤,许旺细胞瘤,脑膜瘤,恶性腺瘤,黑素瘤和白血病或恶性淋巴组织增生性疾病,特别是例如肉瘤,卵巢癌,乳腺癌,胶质母细胞瘤,胃癌,结肠癌,结肠直肠癌,肺癌,肝癌,甲状腺癌,淋巴瘤,鼻咽癌,上颌窦癌,肾癌,前列腺癌,膀胱癌,胰腺癌,胆囊癌,胆管癌。

[0922] 本文引用的每篇专利、专利申请和出版物的公开内容均通过引用整体并入本文。虽然已经参考具体实施方案公开了本发明,但是显而易见的是,在不脱离本发明的真实精神和范围的情况下,本领域的其他技术人员可以设计出本发明的其他实施方案和变型。所附权利要求书旨在解释为包括所有此类实施方案和等同变型。

- [0001] 序列表  
[0002] <110> Zhao, Aizhi  
[0003] Wen, Weihong  
[0004] Han, Yueheng  
[0005] <120> 抗PSMA抗体及其用途  
[0006] <130> 168273.00100  
[0007] <150> 62/321975  
[0008] <151> 2016-04-13  
[0009] <160> 116  
[0010] <170> PatentIn version 3.5  
[0011] <210> 1  
[0012] <211> 707  
[0013] <212> PRT  
[0014] <213> 智人  
[0015] <400> 1  
[0016] Lys Ser Ser Asn Glu Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys  
[0017] 1 5 10 15  
[0018] Ala Phe Leu Asp Glu Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr  
[0019] 20 25 30  
[0020] Asn Phe Thr Gln Ile Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln  
[0021] 35 40 45  
[0022] Leu Ala Lys Gln Ile Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser  
[0023] 50 55 60  
[0024] Val Glu Leu Ala His Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr  
[0025] 65 70 75 80  
[0026] His Pro Asn Tyr Ile Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe  
[0027] 85 90 95  
[0028] Asn Thr Ser Leu Phe Glu Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser  
[0029] 100 105 110  
[0030] Asp Ile Val Pro Pro Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu  
[0031] 115 120 125  
[0032] Gly Asp Leu Val Tyr Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys  
[0033] 130 135 140  
[0034] Leu Glu Arg Asp Met Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala  
[0035] 145 150 155 160  
[0036] Arg Tyr Gly Lys Val Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu  
[0037] 165 170 175  
[0038] Ala Gly Ala Lys Gly Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe  
[0039] 180 185 190  
[0040] Ala Pro Gly Val Lys Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly  
[0041] 195 200 205

[0042]	Gly Val Gln Arg Gly Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro		
[0043]	210	215	220
[0044]	Leu Thr Pro Gly Tyr Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile		
[0045]	225	230	235
[0046]	240		
[0047]	Ala Glu Ala Val Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr		
[0048]	245	250	255
[0049]	Tyr Asp Ala Gln Lys Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro		
[0050]	260	265	270
[0051]	Asp Ser Ser Trp Arg Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro		
[0052]	275	280	285
[0053]	Gly Phe Thr Gly Asn Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His		
[0054]	290	295	300
[0055]	Ser Thr Asn Glu Val Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg		
[0056]	305	310	315
[0057]	320		
[0058]	Gly Ala Val Glu Pro Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp		
[0059]	325	330	335
[0060]	Ser Trp Val Phe Gly Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val		
[0061]	340	345	350
[0062]	His Glu Ile Val Arg Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg		
[0063]	355	360	365
[0064]	Pro Arg Arg Thr Ile Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly		
[0065]	370	375	380
[0066]	Leu Leu Gly Ser Thr Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln		
[0067]	385	390	395
[0068]	400		
[0069]	Glu Arg Gly Val Ala Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn		
[0070]	405	410	415
[0071]	Tyr Thr Leu Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His		
[0072]	420	425	430
[0073]	Asn Leu Thr Lys Glu Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys		
[0074]	435	440	445
[0075]	Ser Leu Tyr Glu Ser Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser		
[0076]	450	455	460
[0077]	Gly Met Pro Arg Ile Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val		
[0078]	465	470	475
[0079]	480		
[0080]	Phe Phe Gln Arg Leu Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys		
[0081]	485	490	495
[0082]	Asn Trp Glu Thr Asn Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val		
[0083]	500	505	510
[0084]	Tyr Glu Thr Tyr Glu Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys		
[0085]	515	520	525
[0086]	Tyr His Leu Thr Val Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu		
[0087]	530	535	540

[0084] Ala Asn Ser Ile Val Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val  
 [0085] 545 550 555 560  
 [0086] Leu Arg Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro  
 [0087] 565 570 575  
 [0088] Gln Glu Met Lys Thr Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala  
 [0089] 580 585 590  
 [0090] Val Lys Asn Phe Thr Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln  
 [0091] 595 600 605  
 [0092] Asp Phe Asp Lys Ser Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln  
 [0093] 610 615 620  
 [0094] Leu Met Phe Leu Glu Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp  
 [0095] 625 630 635 640  
 [0096] Arg Pro Phe Tyr Arg His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys  
 [0097] 645 650 655  
 [0098] Tyr Ala Gly Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile  
 [0099] 660 665 670  
 [0100] Glu Ser Lys Val Asp Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln  
 [0101] 675 680 685  
 [0102] Ile Tyr Val Ala Ala Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser  
 [0103] 690 695 700  
 [0104] Glu Val Ala  
 [0105] 705  
 [0106] <210> 2  
 [0107] <211> 756  
 [0108] <212> DNA  
 [0109] <213> 人工序列  
 [0110] <220>  
 [0111] <223> scFv  
 [0112] <400> 2  
 [0113] cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag tgcattatc 60  
 [0114] tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttctc atgtacactg gtaccagcag 120  
 [0115] gttccaggaa cagcccccaa actcctatc tatggaaaca ccaatcggcc ctcaggggtc 180  
 [0116] cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcaggtt ccctggccat cactggactc 240  
 [0117] cagcctgagg atgaggctga ttattattgt gcaacatggg atgacagtct gaatgggtga 300  
 [0118] atattcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggcggat cctctaggtc aagttccagc 360  
 [0119] ggcggcggtg gcagcggagg cggcggtgag gtgcagctgg tggagtctgg gggagccctg 420  
 [0120] gccaaggctg ggggtccct gagactctcc tgtgcagcct ctggatccac cctcagtggc 480  
 [0121] tatgctatgc actgggtccg ccaggctcca ggcaagggc tggagtgggt ggcagttata 540  
 [0122] tcatatgtg gaagcaataa atactacgca gactccgtga agggccgatt caccatctcc 600  
 [0123] agagacaatt ccaagaacac gctgttctg caaatgaaca gcctgagacc tgaggacacg 660  
 [0124] gctgtgtact attgtgctaa aggcttact tggggactcg gtgacaatga tgctctcgat 720  
 [0125] atctggggcc cccggaccac ggtcaccgtc tcctca 756

[0126]	<210> 3		
[0127]	<211> 252		
[0128]	<212> PRT		
[0129]	<213> 人工序列		
[0130]	<220>		
[0131]	<223> scFv		
[0132]	<400> 3		
[0133]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln		
[0134]	1	5	10
[0135]	Ser Val Ile Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly		
[0136]	20	25	30
[0137]	Ser His Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu		
[0138]	35	40	45
[0139]	Leu Ile Tyr Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe		
[0140]	50	55	60
[0141]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu		
[0142]	65	70	75
[0143]	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser		
[0144]	85	90	95
[0145]	Leu Asn Gly Val Ile Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly		
[0146]	100	105	110
[0147]	Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[0148]	115	120	125
[0149]	Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ala Lys Pro Gly		
[0150]	130	135	140
[0151]	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Leu Ser Gly		
[0152]	145	150	155
[0153]	Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
[0154]	165	170	175
[0155]	Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser		
[0156]	180	185	190
[0157]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
[0158]	195	200	205
[0159]	Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
[0160]	210	215	220
[0161]	Cys Ala Lys Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Asp Asn Asp Ala Leu Asp		
[0162]	225	230	235
[0163]	Ile Trp Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0164]	245	250	
[0165]	<210> 4		
[0166]	<211> 333		
[0167]	<212> DNA		

- [0168] <213> 智人
- [0169] <400> 4
- [0170] cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag tgtcattatc 60
- [0171] tcctgcactg ggagcagetc caacatcggg gcaggttctc atgtacactg gtaccagcag 120
- [0172] gttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatgaaaca ccaatcggcc ctcaggggtc 180
- [0173] cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagggtt ccctggccat cactggactc 240
- [0174] cagcctgagg atgaggctga ttattattgt gcaacatggg atgacagtct gaatgggtta 300
- [0175] atattcggcg gagggaccaa ggtcaccggtc cta 333
- [0176] <210> 5
- [0177] <211> 111
- [0178] <212> PRT
- [0179] <213> 智人
- [0180] <400> 5
- [0181] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
- [0182] 1 5 10 15
- [0183] Ser Val Ile Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
- [0184] 20 25 30
- [0185] Ser His Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
- [0186] 35 40 45
- [0187] Leu Ile Tyr Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
- [0188] 50 55 60
- [0189] Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
- [0190] 65 70 75 80
- [0191] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser
- [0192] 85 90 95
- [0193] Leu Asn Gly Val Ile Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
- [0194] 100 105 110
- [0195] <210> 6
- [0196] <211> 75
- [0197] <212> DNA
- [0198] <213> 智人
- [0199] <400> 6
- [0200] cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag tgtcattatc 60
- [0201] tcctgcactg ggagc 75
- [0202] <210> 7
- [0203] <211> 25
- [0204] <212> PRT
- [0205] <213> 智人
- [0206] <400> 7
- [0207] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
- [0208] 1 5 10 15
- [0209] Ser Val Ile Ile Ser Cys Thr Gly Ser

---

[0210]	20	25
[0211]	<210> 8	
[0212]	<211> 27	
[0213]	<212> DNA	
[0214]	<213> 智人	
[0215]	<400> 8	
[0216]	agctccaaca tcggggcagg ttctcat 27	
[0217]	<210> 9	
[0218]	<211> 9	
[0219]	<212> PRT	
[0220]	<213> 智人	
[0221]	<400> 9	
[0222]	Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Ser His	
[0223]	1 5	
[0224]	<210> 10	
[0225]	<211> 51	
[0226]	<212> DNA	
[0227]	<213> 智人	
[0228]	<400> 10	
[0229]	gtacactgg accagcaggt tccaggaaca gcccccaaac tcctcatcta t 51	
[0230]	<210> 11	
[0231]	<211> 17	
[0232]	<212> PRT	
[0233]	<213> 智人	
[0234]	<400> 11	
[0235]	Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[0236]	1 5 10 15	
[0237]	Tyr	
[0238]	<210> 12	
[0239]	<211> 9	
[0240]	<212> DNA	
[0241]	<213> 智人	
[0242]	<400> 12	
[0243]	ggaaacacc 9	
[0244]	<210> 13	
[0245]	<211> 3	
[0246]	<212> PRT	
[0247]	<213> 智人	
[0248]	<400> 13	
[0249]	Gly Asn Thr	
[0250]	1	
[0251]	<210> 14	

- [0252] <211> 108  
[0253] <212> DNA  
[0254] <213> 智人  
[0255] <400> 14  
[0256] aatcgccct caggggtccc tgaccgattc tctggctcca agtctggcac ctcaggttcc 60  
[0257] ctggccatca ctggactcca gcctgaggat gaggctgatt attattgt 108  
[0258] <210> 15  
[0259] <211> 36  
[0260] <212> PRT  
[0261] <213> 智人  
[0262] <400> 15  
[0263] Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly  
[0264] 1 5 10 15  
[0265] Thr Ser Gly Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala  
[0266] 20 25 30  
[0267] Asp Tyr Tyr Cys  
[0268] 35  
[0269] <210> 16  
[0270] <211> 33  
[0271] <212> DNA  
[0272] <213> 智人  
[0273] <400> 16  
[0274] gcaacatggg atgacagtct gaatggtgta ata 33  
[0275] <210> 17  
[0276] <211> 11  
[0277] <212> PRT  
[0278] <213> 智人  
[0279] <400> 17  
[0280] Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Ile  
[0281] 1 5 10  
[0282] <210> 18  
[0283] <211> 30  
[0284] <212> DNA  
[0285] <213> 智人  
[0286] <400> 18  
[0287] ttccggcggag ggaccaaggt caccgtccta 30  
[0288] <210> 19  
[0289] <211> 10  
[0290] <212> PRT  
[0291] <213> 智人  
[0292] <400> 19  
[0293] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

[0294]	1	5	10
[0295]	<210> 20		
[0296]	<211> 369		
[0297]	<212> DNA		
[0298]	<213> 智人		
[0299]	<400> 20		
[0300]	gaggtgcagc tgggggagtc tgggggagcc ctggccaagc ctgggggtc cctgagactc	60	
[0301]	tcctgtgcag cctctggatc caccctcagt ggctatgcta tgcactgggt ccgccaggct	120	
[0302]	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagcaa taaatactac	180	
[0303]	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtt	240	
[0304]	ctgcaaatga acagcctgag acctgaggac acggctgtgt actattgtc taaaggcctt	300	
[0305]	acttggggac tcggtgacaa tgatgcttc gatatctgg gccccggac cacggtcacc	360	
[0306]	gtctcctca 369		
[0307]	<210> 21		
[0308]	<211> 123		
[0309]	<212> PRT		
[0310]	<213> 智人		
[0311]	<400> 21		
[0312]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ala Lys Pro Gly Gly		
[0313]	1 5 10 15		
[0314]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Leu Ser Gly Tyr		
[0315]	20 25 30		
[0316]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0317]	35 40 45		
[0318]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0319]	50 55 60		
[0320]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe		
[0321]	65 70 75 80		
[0322]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0323]	85 90 95		
[0324]	Ala Lys Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Asp Asn Asp Ala Leu Asp Ile		
[0325]	100 105 110		
[0326]	Trp Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0327]	115 120		
[0328]	<210> 22		
[0329]	<211> 75		
[0330]	<212> DNA		
[0331]	<213> 智人		
[0332]	<400> 22		
[0333]	gaggtgcagc tgggggagtc tgggggagcc ctggccaagc ctgggggtc cctgagactc	60	
[0334]	tcctgtgcag cctct 75		
[0335]	<210> 23		

- [0336] <211> 25  
[0337] <212> PRT  
[0338] <213> 智人  
[0339] <400> 23  
[0340] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ala Lys Pro Gly Gly  
[0341] 1 5 10 15  
[0342] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
[0343] 20 25  
[0344] <210> 24  
[0345] <211> 24  
[0346] <212> DNA  
[0347] <213> 智人  
[0348] <400> 24  
[0349] ggatccaccc tcagtggcta tgct 24  
[0350] <210> 25  
[0351] <211> 8  
[0352] <212> PRT  
[0353] <213> 智人  
[0354] <400> 25  
[0355] Gly Ser Thr Leu Ser Gly Tyr Ala  
[0356] 1 5  
[0357] <210> 26  
[0358] <211> 51  
[0359] <212> DNA  
[0360] <213> 智人  
[0361] <400> 26  
[0362] atgcactggg tccgccaggc tccaggcaag gggctggagt gggtggcagt t 51  
[0363] <210> 27  
[0364] <211> 17  
[0365] <212> PRT  
[0366] <213> 智人  
[0367] <400> 27  
[0368] Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
[0369] 1 5 10 15  
[0370] Val  
[0371] <210> 28  
[0372] <211> 24  
[0373] <212> DNA  
[0374] <213> 智人  
[0375] <400> 28  
[0376] atatcatatg atggaagcaa taaa 24  
[0377] <210> 29

- [0378] <211> 8  
[0379] <212> PRT  
[0380] <213> 智人  
[0381] <400> 29  
[0382] Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys  
[0383] 1 5  
[0384] <210> 30  
[0385] <211> 114  
[0386] <212> DNA  
[0387] <213> 智人  
[0388] <400> 30  
[0389] tactacgcag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaattc caagaacaacg 60  
[0390] ctgtttctgc aaatgaacag cctgagacct gaggacacgg ctgtgtacta ttgt 114  
[0391] <210> 31  
[0392] <211> 38  
[0393] <212> PRT  
[0394] <213> 智人  
[0395] <400> 31  
[0396] Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
[0397] 1 5 10 15  
[0398] Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp  
[0399] 20 25 30  
[0400] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
[0401] 35  
[0402] <210> 32  
[0403] <211> 48  
[0404] <212> DNA  
[0405] <213> 智人  
[0406] <400> 32  
[0407] gctaaaggcc ttacttgggg actcggtgac aatgatgctc tcgatatac 48  
[0408] <210> 33  
[0409] <211> 16  
[0410] <212> PRT  
[0411] <213> 智人  
[0412] <400> 33  
[0413] Ala Lys Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Asp Asn Asp Ala Leu Asp Ile  
[0414] 1 5 10 15  
[0415] <210> 34  
[0416] <211> 33  
[0417] <212> DNA  
[0418] <213> 智人  
[0419] <400> 34

- [0420] tggggcccg ggaccacggt caccgtctcc tca 33  
[0421] <210> 35  
[0422] <211> 11  
[0423] <212> PRT  
[0424] <213> 智人  
[0425] <400> 35  
[0426] Trp Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
[0427] 1 5 10  
[0428] <210> 36  
[0429] <211> 54  
[0430] <212> DNA  
[0431] <213> 人工序列  
[0432] <220>  
[0433] <223> 接头  
[0434] <400> 36  
[0435] ggccggatcct ctaggtcaag ttccagcggc ggccgtggca gcggaggcgg cggt 54  
[0436] <210> 37  
[0437] <211> 18  
[0438] <212> PRT  
[0439] <213> 人工序列  
[0440] <220>  
[0441] <223> 接头  
[0442] <400> 37  
[0443] Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
[0444] 1 5 10 15  
[0445] Gly Gly  
[0446] <210> 38  
[0447] <211> 51  
[0448] <212> DNA  
[0449] <213> 人工序列  
[0450] <220>  
[0451] <223> 突变体  
[0452] <400> 38  
[0453] gtacactggc accagcaggc tccaggaaca gccccaaac tcctcatcta t 51  
[0454] <210> 39  
[0455] <211> 17  
[0456] <212> PRT  
[0457] <213> 人工序列  
[0458] <220>  
[0459] <223> 突变体  
[0460] <400> 39  
[0461] Val His Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile

---

[0462]	1	5	10	15
[0463]	Tyr			
[0464]	<210> 40			
[0465]	<211> 9			
[0466]	<212> DNA			
[0467]	<213> 人工序列			
[0468]	<220>			
[0469]	<223> 突变体			
[0470]	<400> 40			
[0471]	gaaaacacc 9			
[0472]	<210> 41			
[0473]	<211> 3			
[0474]	<212> PRT			
[0475]	<213> 人工序列			
[0476]	<220>			
[0477]	<223> 突变体			
[0478]	<400> 41			
[0479]	Glu Asn Thr			
[0480]	1			
[0481]	<210> 42			
[0482]	<211> 30			
[0483]	<212> DNA			
[0484]	<213> 人工序列			
[0485]	<220>			
[0486]	<223> 突变体			
[0487]	<400> 42			
[0488]	ttcggcggag ggaccaaggc caccgtccta 30			
[0489]	<210> 43			
[0490]	<211> 10			
[0491]	<212> PRT			
[0492]	<213> 人工序列			
[0493]	<220>			
[0494]	<223> 突变体			
[0495]	<400> 43			
[0496]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Ala Thr Val Leu			
[0497]	1	5	10	
[0498]	<210> 44			
[0499]	<211> 24			
[0500]	<212> DNA			
[0501]	<213> 人工序列			
[0502]	<220>			
[0503]	<223> 突变体			

- [0504] <400> 44
- [0505] ggattcaccc tcagtggcta tgct 24
- [0506] <210> 45
- [0507] <211> 8
- [0508] <212> PRT
- [0509] <213> 人工序列
- [0510] <220>
- [0511] <223> 突变体
- [0512] <400> 45
- [0513] Gly Phe Thr Leu Ser Gly Tyr Ala
- [0514] 1 5
- [0515] <210> 46
- [0516] <211> 114
- [0517] <212> DNA
- [0518] <213> 人工序列
- [0519] <220>
- [0520] <223> 突变体
- [0521] <400> 46
- [0522] tactacgcag actccgtgaa gggccgattc accgtctcca gagacaattc caagaacacg 60
- [0523] ctgtttctgc aaatgaacag cctgagacct gaggacacgg ctgtgtacta ttgt 114
- [0524] <210> 47
- [0525] <211> 38
- [0526] <212> PRT
- [0527] <213> 人工序列
- [0528] <220>
- [0529] <223> 突变体
- [0530] <400> 47
- [0531] Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn
- [0532] 1 5 10 15
- [0533] Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
- [0534] 20 25 30
- [0535] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0536] 35
- [0537] <210> 48
- [0538] <211> 48
- [0539] <212> DNA
- [0540] <213> 人工序列
- [0541] <220>
- [0542] <223> 突变体
- [0543] <400> 48
- [0544] gctaaaggcc ttacttgggg actcggtgac aatgatgctc tcggatc 48
- [0545] <210> 49



[0588] gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccacccgt gcccagcacc tgaactcctg 780  
 [0589] gggggaccgt cagtcttcct ctccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg 840  
 [0590] acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900  
 [0591] aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgca ggaggagcag 960  
 [0592] tacaacagca cgtaccgggt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1020  
 [0593] ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaaacc 1080  
 [0594] atctccaaag ccaaaggca gccccgagaa ccacagggtgt acaccctgcc cccatcccg 1140  
 [0595] gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1200  
 [0596] gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1260  
 [0597] cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1320  
 [0598] aggtggcagc agggaaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1380  
 [0599] tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1419  
 [0600] <210> 53  
 [0601] <211> 472  
 [0602] <212> PRT  
 [0603] <213> 智人  
 [0604] <400> 53  
 [0605] Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly  
 [0606] 1 5 10 15  
 [0607] Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ala Lys  
 [0608] 20 25 30  
 [0609] Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu  
 [0610] 35 40 45  
 [0611] Ser Gly Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 [0612] 50 55 60  
 [0613] Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala  
 [0614] 65 70 75 80  
 [0615] Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 [0616] 85 90 95  
 [0617] Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val  
 [0618] 100 105 110  
 [0619] Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Asp Asn Asp Ala  
 [0620] 115 120 125  
 [0621] Leu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 [0622] 130 135 140  
 [0623] Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
 [0624] 145 150 155 160  
 [0625] Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
 [0626] 165 170 175  
 [0627] Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 [0628] 180 185 190  
 [0629] His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

[0630]	195	200	205
[0631]	Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
[0632]	210	215	220
[0633]	Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
[0634]	225	230	235
[0635]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
[0636]	245	250	255
[0637]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
[0638]	260	265	270
[0639]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
[0640]	275	280	285
[0641]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
[0642]	290	295	300
[0643]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
[0644]	305	310	315
[0645]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
[0646]	325	330	335
[0647]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
[0648]	340	345	350
[0649]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
[0650]	355	360	365
[0651]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		
[0652]	370	375	380
[0653]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
[0654]	385	390	395
[0655]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
[0656]	405	410	415
[0657]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
[0658]	420	425	430
[0659]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
[0660]	435	440	445
[0661]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
[0662]	450	455	460
[0663]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0664]	465	470	
[0665]	<210> 54		
[0666]	<211> 57		
[0667]	<212> DNA		
[0668]	<213> 智人		
[0669]	<400> 54		
[0670]	atggagtttggctgagctggtttcctcgttgcttttaagaggttgcagtgt 57		
[0671]	<210> 55		

[0672]	<211> 19																
[0673]	<212> PRT																
[0674]	<213> 智人																
[0675]	<400> 55																
[0676]	Met	Glu	Phe	Gly													
	Leu	Ser	Trp	Val													
				Phe													
				Leu													
				Val													
				Ala													
				Leu													
				Leu													
				Arg													
				Gly													
[0677]	1	5	10	15													
[0678]	Val	Gln	Cys														
[0679]	<210> 56																
[0680]	<211> 369																
[0681]	<212> DNA																
[0682]	<213> 智人																
[0683]	<400> 56																
[0684]	gaggtgcagc	tgggtggagtc	tgggggagcc	ctggccaagc	ctgggggtc	cctgagactc	60										
[0685]	tcctgtgcag	cctctggatt	caccctcagt	ggctatgcta	tgcactgggt	ccgccaggct	120										
[0686]	ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatcatatg	atggaagcaa	taaatactac	180										
[0687]	gcagactccg	tgaagggccg	attcaccgtc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgttt	240										
[0688]	ctgcaaatga	acagcctgag	acctgaggac	acggctgtgt	actattgtgc	taaaggcctt	300										
[0689]	acctggggac	tcggtgacaa	tgatgcttc	gatatctgg	gcccccggac	cacggtcacc	360										
[0690]	gttcctca	369															
[0691]	<210> 57																
[0692]	<211> 123																
[0693]	<212> PRT																
[0694]	<213> 智人																
[0695]	<400> 57																
[0696]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Lys	Pro	Gly	Gly	
[0697]	1	5				10				15							
[0698]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	Gly	Tyr	
[0699]						20			25					30			
[0700]	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
[0701]						35			40			45					
[0702]	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
[0703]						50			55			60					
[0704]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe	
[0705]						65			70			75			80		
[0706]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
[0707]						85				90			95				
[0708]	Ala	Lys	Gly	Leu	Thr	Trp	Gly	Leu	Gly	Asp	Asn	Asp	Ala	Leu	Asp	Ile	
[0709]						100			105			110					
[0710]	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
[0711]						115			120								
[0712]	<210> 58																
[0713]	<211> 990																

[0714]	<212> DNA		
[0715]	<213> 智人		
[0716]	<400> 58		
[0717]	gcctccacca agggcccatc ggtttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60		
[0718]	ggcacagcgg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc cgcgaaccgg gacgggtgtcg 120		
[0719]	tggaaactcag gcccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180		
[0720]	ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg cacccagacc 240		
[0721]	tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300		
[0722]	aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc ccgtgcccag cacatgaact cctgggggga 360		
[0723]	ccgtcagtct tccttttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420		
[0724]	gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagagcc ctgaggtcaa gttcaactgg 480		
[0725]	tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540		
[0726]	agcacgttacc ggggtgtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600		
[0727]	gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660		
[0728]	aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccggatgag 720		
[0729]	ctgaccaaga accaggttcag cctgacctgc ctggtaaag gcttctatcc cagcgacatc 780		
[0730]	gcgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccctgt 840		
[0731]	ctggactccg acggctcctt cttctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900		
[0732]	cagcagggga acgtttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960		
[0733]	cagaagagcc tctccctgtc tccggtaaa 990		
[0734]	<210> 59		
[0735]	<211> 330		
[0736]	<212> PRT		
[0737]	<213> 智人		
[0738]	<400> 59		
[0739]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
[0740]	1	5	10
[0741]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
[0742]	20	25	30
[0743]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
[0744]	35	40	45
[0745]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
[0746]	50	55	60
[0747]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
[0748]	65	70	75
[0749]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
[0750]	85	90	95
[0751]	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
[0752]	100	105	110
[0753]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
[0754]	115	120	125
[0755]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		

[0756]	130	135	140
[0757]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
[0758]	145	150	155
[0759]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
[0760]	165	170	175
[0761]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
[0762]	180	185	190
[0763]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
[0764]	195	200	205
[0765]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
[0766]	210	215	220
[0767]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
[0768]	225	230	235
[0769]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
[0770]	245	250	255
[0771]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gln Pro Glu Asn		
[0772]	260	265	270
[0773]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[0774]	275	280	285
[0775]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[0776]	290	295	300
[0777]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[0778]	305	310	315
[0779]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0780]	325	330	
[0781]	<210> 60		
[0782]	<211> 711		
[0783]	<212> DNA		
[0784]	<213> 智人		
[0785]	<400> 60		
[0786]	atggcctggc ctcctctcct cctcactctc ctcgctcaact gcacagggtc ctggggccag 60		
[0787]	tctgtgctga ctcagccgccc ctcagtgtct gggggcccccag ggcagagtgt cattatctcc 120		
[0788]	tgcactggga gcagctccaa catggggca gtttctcatg tacactggta ccagcaggtt 180		
[0789]	ccaggaacag ccccaaaact cctcatctat gaaaacacca atcgccctc aggggtccct 240		
[0790]	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcaggttccc tggccatcac tggactccag 300		
[0791]	cctgaggatg aggctgatta ttattgtgca acatggatg acagtctgaa tgggtgtata 360		
[0792]	ttcggcggag ggaccaaggc caccgtccta ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcaact 420		
[0793]	ctgttcccgc ctcctctga ggagctcaa gccaacaagg ccacactgggt gtgtctcata 480		
[0794]	agtgacttct acccgggagc cgtgacagtgc gcctggaaagg cagatagcag ccccgtaag 540		
[0795]	gcgggagtgaggg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc 600		
[0796]	tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcact 660		
[0797]	catgaaggga gcaccgtggaa gaagacagtgc gcccctacag aatgttcatg a 711		

[0798]	<210> 61		
[0799]	<211> 236		
[0800]	<212> PRT		
[0801]	<213> 智人		
[0802]	<400> 61		
[0803]	Met Ala Trp Ser Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly		
[0804]	1	5	10 15
[0805]	Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala		
[0806]	20	25	30
[0807]	Pro Gly Gln Ser Val Ile Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile		
[0808]	35	40	45
[0809]	Gly Ala Gly Ser His Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala		
[0810]	50	55	60
[0811]	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro		
[0812]	65	70	75 80
[0813]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Ala Ile		
[0814]	85	90	95
[0815]	Thr Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp		
[0816]	100	105	110
[0817]	Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Ile Phe Gly Gly Thr Lys Ala Thr		
[0818]	115	120	125
[0819]	Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro		
[0820]	130	135	140
[0821]	Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile		
[0822]	145	150	155 160
[0823]	Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser		
[0824]	165	170	175
[0825]	Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser		
[0826]	180	185	190
[0827]	Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln		
[0828]	195	200	205
[0829]	Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser		
[0830]	210	215	220
[0831]	Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
[0832]	225	230	235
[0833]	<210> 62		
[0834]	<211> 57		
[0835]	<212> DNA		
[0836]	<213> 智人		
[0837]	<400> 62		
[0838]	atggcctggc ctcctctcct cctcaactctc ctcgctcaact gcacagggtc ctgggcc 57		
[0839]	<210> 63		

[0840]	<211> 19															
[0841]	<212> PRT															
[0842]	<213> 智人															
[0843]	<400> 63															
[0844]	Met	Ala	Trp	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Ala	His	Cys	Thr	Gly
[0845]	1			5					10							15
[0846]	Ser	Trp	Ala													
[0847]	<210> 64															
[0848]	<211> 333															
[0849]	<212> DNA															
[0850]	<213> 智人															
[0851]	<400> 64															
[0852]	cagtctgtgc	tgactcagcc	gccctcagtg	tctggggccc	cagggcagag	tgtcattatc										60
[0853]	tcctgcactg	ggagcagctc	caacatcggg	gcaggttctc	atgtacactg	gtaccagcag										120
[0854]	gttccagggaa	cagcccccaa	actcctcatc	tatgaaaaca	ccaatcggcc	ctcaggggtc										180
[0855]	cctgaccgat	tctctggctc	caagtctggc	acctcagggtt	ccctggccat	cactggactc										240
[0856]	cagcctgagg	atgaggctga	ttattattgt	gcaacatggg	atgacagtct	gaatggtgta										300
[0857]	atattcggcg	gagggaccaa	ggccaccgtc	cta	333											
[0858]	<210> 65															
[0859]	<211> 111															
[0860]	<212> PRT															
[0861]	<213> 智人															
[0862]	<400> 65															
[0863]	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln
[0864]	1			5					10							15
[0865]	Ser	Val	Ile	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Gly
[0866]				20					25							30
[0867]	Ser	His	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu
[0868]				35					40							45
[0869]	Leu	Ile	Tyr	Glu	Asn	Thr	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe
[0870]				50				55								60
[0871]	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Leu
[0872]				65				70			75					80
[0873]	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Trp	Asp	Asp	Ser
[0874]					85					90						95
[0875]	Leu	Asn	Gly	Val	Ile	Phe	Gly	Gly	Thr	Lys	Ala	Thr	Val			Leu
[0876]					100				105							110
[0877]	<210> 66															
[0878]	<211> 318															
[0879]	<212> DNA															
[0880]	<213> 智人															
[0881]	<400> 66															

[0882] ggtcagccca aggctcccc ctcggtaact ctgtccgc cctcctctga ggagctcaa 60  
 [0883] gccaacaagg ccacactgggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120  
 [0884] gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180  
 [0885] caaagcaaca acaagtaacgc ggcacagcgc tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaa 240  
 [0886] tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300  
 [0887] gcccctacag aatgttca 318  
 [0888] <210> 67  
 [0889] <211> 106  
 [0890] <212> PRT  
 [0891] <213> 智人  
 [0892] <400> 67  
 [0893] Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
 [0894] 1 5 10 15  
 [0895] Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
 [0896] 20 25 30  
 [0897] Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro  
 [0898] 35 40 45  
 [0899] Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 [0900] 50 55 60  
 [0901] Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
 [0902] 65 70 75 80  
 [0903] Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
 [0904] 85 90 95  
 [0905] Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 [0906] 100 105  
 [0907] <210> 68  
 [0908] <211> 453  
 [0909] <212> PRT  
 [0910] <213> 智人  
 [0911] <400> 68  
 [0912] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ala Lys Pro Gly Gly  
 [0913] 1 5 10 15  
 [0914] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Gly Tyr  
 [0915] 20 25 30  
 [0916] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0917] 35 40 45  
 [0918] Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 [0919] 50 55 60  
 [0920] Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 [0921] 65 70 75 80  
 [0922] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0923] 85 90 95

[0924]	Ala Lys Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Asp Asn Asp Ala Leu Asp Ile		
[0925]	100	105	110
[0926]	Trp Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
[0927]	115	120	125
[0928]	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
[0929]	130	135	140
[0930]	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
[0931]	145	150	155
[0932]	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
[0933]	165	170	175
[0934]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
[0935]	180	185	190
[0936]	Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
[0937]	195	200	205
[0938]	Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys		
[0939]	210	215	220
[0940]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
[0941]	225	230	235
[0942]	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
[0943]	245	250	255
[0944]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
[0945]	260	265	270
[0946]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
[0947]	275	280	285
[0948]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
[0949]	290	295	300
[0950]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
[0951]	305	310	315
[0952]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
[0953]	325	330	335
[0954]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
[0955]	340	345	350
[0956]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
[0957]	355	360	365
[0958]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
[0959]	370	375	380
[0960]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
[0961]	385	390	395
[0962]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0963]	405	410	415
[0964]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0965]	420	425	430

[0966]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
[0967]	435	440	445
[0968]	Leu Ser Pro Gly Lys		
[0969]	450		
[0970]	<210> 69		
[0971]	<211> 217		
[0972]	<212> PRT		
[0973]	<213> 智人		
[0974]	<400> 69		
[0975]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln		
[0976]	1 5 10 15		
[0977]	Ser Val Ile Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly		
[0978]	20 25 30		
[0979]	Ser His Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu		
[0980]	35 40 45		
[0981]	Leu Ile Tyr Glu Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe		
[0982]	50 55 60		
[0983]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu		
[0984]	65 70 75 80		
[0985]	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser		
[0986]	85 90 95		
[0987]	Leu Asn Gly Val Ile Phe Gly Gly Thr Lys Ala Thr Val Leu Gly		
[0988]	100 105 110		
[0989]	Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu		
[0990]	115 120 125		
[0991]	Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe		
[0992]	130 135 140		
[0993]	Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val		
[0994]	145 150 155 160		
[0995]	Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys		
[0996]	165 170 175		
[0997]	Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser		
[0998]	180 185 190		
[0999]	His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu		
[1000]	195 200 205		
[1001]	Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
[1002]	210 215		
[1003]	<210> 70		
[1004]	<211> 63		
[1005]	<212> DNA		
[1006]	<213> 智人		
[1007]	<400> 70		

- [1008] atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
- [1009] ccg 63
- [1010] <210> 71
- [1011] <211> 21
- [1012] <212> PRT
- [1013] <213> 智人
- [1014] <400> 71
- [1015] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
- [1016] 1 5 10 15
- [1017] His Ala Ala Arg Pro
- [1018] 20
- [1019] <210> 72
- [1020] <211> 135
- [1021] <212> DNA
- [1022] <213> 智人
- [1023] <400> 72
- [1024] accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgctc gcagccccctg 60
- [1025] tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120
- [1026] gacttcgcct gtgat 135
- [1027] <210> 73
- [1028] <211> 45
- [1029] <212> PRT
- [1030] <213> 智人
- [1031] <400> 73
- [1032] Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
- [1033] 1 5 10 15
- [1034] Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
- [1035] 20 25 30
- [1036] Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
- [1037] 35 40 45
- [1038] <210> 74
- [1039] <211> 72
- [1040] <212> DNA
- [1041] <213> 智人
- [1042] <400> 74
- [1043] atctacatct gggcgccctt ggccggact tgtgggtcc ttctcctgtc actggttatc 60
- [1044] accctttact gc 72
- [1045] <210> 75
- [1046] <211> 24
- [1047] <212> PRT
- [1048] <213> 智人
- [1049] <400> 75

[1050] Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu  
 [1051] 1 5 10 15  
 [1052] Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys  
 [1053] 20  
 [1054] <210> 76  
 [1055] <211> 126  
 [1056] <212> DNA  
 [1057] <213> 智人  
 [1058] <400> 76  
 [1059] aaacggggca gaaagaaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60  
 [1060] actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120  
 [1061] gaactg 126  
 [1062] <210> 77  
 [1063] <211> 42  
 [1064] <212> PRT  
 [1065] <213> 智人  
 [1066] <400> 77  
 [1067] Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
 [1068] 1 5 10 15  
 [1069] Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
 [1070] 20 25 30  
 [1071] Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
 [1072] 35 40  
 [1073] <210> 78  
 [1074] <211> 336  
 [1075] <212> DNA  
 [1076] <213> 智人  
 [1077] <400> 78  
 [1078] agagtgaagt tcagcaggag cgccagacgcc cccgcgtaca agcaggccca gaaccagctc 60  
 [1079] tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg tttggacaa gagacgtggc 120  
 [1080] cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180  
 [1081] gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc tacagtgaga ttggatgaa aggcgagcgc 240  
 [1082] cggagggca agggcacga tggccttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300  
 [1083] tacgacgccc ttcacatgca ggcctgccc cctcgc 336  
 [1084] <210> 79  
 [1085] <211> 112  
 [1086] <212> PRT  
 [1087] <213> 智人  
 [1088] <400> 79  
 [1089] Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly  
 [1090] 1 5 10 15  
 [1091] Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

[1092]	20	25	30
[1093]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
[1094]	35	40	45
[1095]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
[1096]	50	55	60
[1097]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
[1098]	65	70	75
[1099]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
[1100]		85	90
[1101]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[1102]		100	105
[1103]	<210> 80		
[1104]	<211> 1503		
[1105]	<212> DNA		
[1106]	<213> 人工序列		
[1107]	<220>		
[1108]	<223> 构建体		
[1109]	<400> 80		
[1110]	atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60		
[1111]	ccgtctagac agtctgtgct gactcagccg ccctcagtgt ctggggccccc agggcagagt 120		
[1112]	gtcattatct cctgcactgg gagcagctcc aacatcgggg cagttctca tgtacactgg 180		
[1113]	taccagcagg ttccaggaac agccccaaa ctcctcatct atgaaaacac caatcgccc 240		
[1114]	tcaggggtcc ctgaccgatt ctctggctcc aagtctggca cctcagggttc cctggccatc 300		
[1115]	actggactcc agcctgagga tgaggctgat tattatttg 299 360		
[1116]	aatgggtaa tattcggcgg agggaccaag gccaccgtcc taggcccgtc ctcttaggtca 420		
[1117]	agttccagcg gcggcggtgg cagcggaggc ggcgggtgagg tgcagctggt ggagtctggg 480		
[1118]	ggagccctgg ccaagccctgg ggggtccctg agactctcct gtgcagccctc tggattcacc 540		
[1119]	ctcagtggtc atgctatgca ctgggtccgc caggctccag gcaagggct ggagtgggtg 600		
[1120]	gcagttatat catatgatgg aagcaataaa tactacgcag actccgtcaa gggccgattc 660		
[1121]	accgtctcca gagacaattc caagaacacg ctgttctgc aaatgaacag cctgagac 720		
[1122]	gaggacacgg ctgtgtacta ttgtgctaaa ggccttaccc gggactcgg tgacaatgat 780		
[1123]	gctctcgata tctggggccc cgggaccacg gtcaccgtct cctcaagatc caccacgac 840		
[1124]	ccagcgccgc gaccaccaac accggcgccc accatcgctg cgcagccct gtccctgcgc 900		
[1125]	ccagaggcgt gcccggcagc ggcggggggc gcagtgcaca cgaggggct ggacttcgccc 960		
[1126]	tgtgatatct acatctggc gcccggcggc gggacttgg gggccttct cctgtca 1020		
[1127]	gttatcaccc tttactgcaa acggggcaga aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca 1080		
[1128]	tttatgagac cagtacaaac tactcaagag gaagatggct gtatgtccg atttccagaa 1140		
[1129]	gaagaagaag gaggatgtga actgagagtg aagttcagca ggagcgcaga cgcccccgcg 1200		
[1130]	taccagcagg gccagaacca gctctataac gagctcaatc taggacgaag agaggagta 1260		
[1131]	gatgtttgg acaagagacg tggccggac cctgagatgg gggaaagcc gagaaggaag 1320		
[1132]	aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg cagaaagata agatggcggaa ggcctacagt 1380		
[1133]	gagattggaa tgaaaggcga gcggccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt 1440		

[1134] ctcagtacag ccaccaagga caccctacgac gcccttcaca tgcaggccct gccccctcgc 1500  
 [1135] taa 1503  
 [1136] <210> 81  
 [1137] <211> 500  
 [1138] <212> PRT  
 [1139] <213> 人工序列  
 [1140] <220>  
 [1141] <223> 构建体  
 [1142] <400> 81  
 [1143] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 [1144] 1 5 10 15  
 [1145] His Ala Ala Arg Pro Ser Arg Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser  
 [1146] 20 25 30  
 [1147] Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Ser Val Ile Ile Ser Cys Thr Gly Ser  
 [1148] 35 40 45  
 [1149] Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Ser His Val His Trp Tyr Gln Gln Val  
 [1150] 50 55 60  
 [1151] Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Asn Thr Asn Arg Pro  
 [1152] 65 70 75 80  
 [1153] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly  
 [1154] 85 90 95  
 [1155] Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr  
 [1156] 100 105 110  
 [1157] Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Ile Phe Gly Gly Gly  
 [1158] 115 120 125  
 [1159] Thr Lys Ala Thr Val Leu Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Gly  
 [1160] 130 135 140  
 [1161] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly  
 [1162] 145 150 155 160  
 [1163] Gly Ala Leu Ala Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
 [1164] 165 170 175  
 [1165] Ser Gly Phe Thr Leu Ser Gly Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala  
 [1166] 180 185 190  
 [1167] Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser  
 [1168] 195 200 205  
 [1169] Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg  
 [1170] 210 215 220  
 [1171] Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro  
 [1172] 225 230 235 240  
 [1173] Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Leu Thr Trp Gly Leu  
 [1174] 245 250 255  
 [1175] Gly Asp Asn Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr

[1176]	260	265	270
[1177]	Val Ser Ser Arg Ser Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro		
[1178]	275	280	285
[1179]	Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys		
[1180]	290	295	300
[1181]	Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala		
[1182]	305	310	315
[1183]	Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu		
[1184]	325	330	335
[1185]	Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys		
[1186]	340	345	350
[1187]	Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr		
[1188]	355	360	365
[1189]	Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly		
[1190]	370	375	380
[1191]	Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala		
[1192]	385	390	395
[1193]	Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg		
[1194]	405	410	415
[1195]	Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu		
[1196]	420	425	430
[1197]	Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn		
[1198]	435	440	445
[1199]	Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met		
[1200]	450	455	460
[1201]	Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly		
[1202]	465	470	475
[1203]	480	485	490
[1204]	Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala		
[1205]	495		
[1206]	Leu Pro Pro Arg		
[1207]	500		
[1207]	<210> 82		
[1208]	<211> 723		
[1209]	<212> DNA		
[1210]	<213> 人工序列		
[1211]	<220>		
[1212]	<223> scFv		
[1213]	<400> 82		
[1214]	caggtgcagc tgcagcagag cggcgccgaa ctggcgccgccc cgggcgcgag cgtaaaaatg	60	
[1215]	agctgcggaa cggcgccgatc taccttacc cgctataccca tgcattgggt gaaacagcgc	120	
[1216]	ccggggccagg gcctggaaatg gattggctat attaaccgca gccgcggcta taccaactat	180	
[1217]	aaccagaaat ttaaagataa agcggccctg accaccgata aaaggcggcag caccgcgtat	240	

[1218] atgcagctga gcagcctgac cagcgaagat agcgccgtt attattgcgc ggcgtattat 300  
 [1219] gatgatcatt attgcctgga ttattgggc cagggcacca ccctgaccgt gagcagcggc 360  
 [1220] ggcggcggca gcggcggcgg cggcagcggc ggcggcggca gccagattgt gctgacccag 420  
 [1221] agcccgccga ttatgagcgc gagcccgggc gaaaaagtga ccatgacctg cagcgcgagc 480  
 [1222] agcagcgtga gctatatgaa ctggtatcag cagaaaagcg gcaccagccc gaaacgctgg 540  
 [1223] atttatgata ccagcaaact ggcgagcggc gtgcggcgc atttcgcgg cagcggcagc 600  
 [1224] ggcaccagct atagcctgac cattagcggc atgaaagcgg aagatgcggc gacctattat 660  
 [1225] tgccagcagt ggagcagcaa cccgttacc tttggcagcg gcaccaaact ggaaattaac 720  
 [1226] cgc 723  
 [1227] <210> 83  
 [1228] <211> 241  
 [1229] <212> PRT  
 [1230] <213> 人工序列  
 [1231] <220>  
 [1232] <223> scFv  
 [1233] <400> 83  
 [1234] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
 [1235] 1 5 10 15  
 [1236] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
 [1237] 20 25 30  
 [1238] Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 [1239] 35 40 45  
 [1240] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [1241] 50 55 60  
 [1242] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [1243] 65 70 75 80  
 [1244] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [1245] 85 90 95  
 [1246] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [1247] 100 105 110  
 [1248] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 [1249] 115 120 125  
 [1250] Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 [1251] 130 135 140  
 [1252] Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
 [1253] 145 150 155 160  
 [1254] Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
 [1255] 165 170 175  
 [1256] Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 [1257] 180 185 190  
 [1258] Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 [1259] 195 200 205

[1260]	Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp																
[1261]	210	215	220														
[1262]	Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn																
[1263]	225	230	235	240													
[1264]	Arg																
[1265]	<210>	84															
[1266]	<211>	357															
[1267]	<212>	DNA															
[1268]	<213>	小家鼠															
[1269]	<400>	84															
[1270]	caggtgcagc	tgcagcagag	cggcgccgaa	ctggcgccg	cgggcgcgag	cgtaaaaatg	60										
[1271]	agctgcaaag	cgagcggcta	taccttacc	cgctatacca	tgcattgggt	gaaacagcgc	120										
[1272]	ccggggccagg	gcctggaatg	gattggctat	attaaccgga	gccgcggcta	taccaactat	180										
[1273]	aaccagaaat	ttaaagataa	agcgaccctg	accaccgata	aaagcagcag	caccgcgtat	240										
[1274]	atgcagctga	gcagcctgac	cagcgaagat	agcgcggtgt	attattgcgc	gcgctattat	300										
[1275]	gatgatcatt	attgcctgga	ttattgggc	cagggcacca	ccctgaccgt	gagcagc	357										
[1276]	<210>	85															
[1277]	<211>	119															
[1278]	<212>	PRT															
[1279]	<213>	小家鼠															
[1280]	<400>	85															
[1281]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	
[1282]	1		5		10		15										
[1283]	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	
[1284]			20		25		30										
[1285]	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
[1286]			35		40		45										
[1287]	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
[1288]			50		55		60										
[1289]	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
[1290]			65		70		75		80								
[1291]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
[1292]			85		90		95										
[1293]	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
[1294]			100		105		110										
[1295]	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser										
[1296]			115														
[1297]	<210>	86															
[1298]	<211>	321															
[1299]	<212>	DNA															
[1300]	<213>	小家鼠															
[1301]	<400>	86															

[1302] cagattgtgc tgacccagag cccggcgtattatgagcgcga gcccggcga aaaagtgacc 60  
 [1303] atgacactgca gcgcgagcag cagcgtgagc tatatgaact ggtatcagca gaaaagcggc 120  
 [1304] accagcccga aacgctggat ttatgatacc agcaaactgg cgagcggcgt gccggcgtat 180  
 [1305] tttcgccgca gcggcagcgg caccagctat agcctgacca ttagcggcat ggaagcggaa 240  
 [1306] gatgcggcga cctattattg ccagcagtgg agcagcaacc cgttacctt tggcagcggc 300  
 [1307] accaaactgg aaattaaccg c 321  
 [1308] <210> 87  
 [1309] <211> 107  
 [1310] <212> PRT  
 [1311] <213> 小家鼠  
 [1312] <400> 87  
 [1313] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 [1314] 1 5 10 15  
 [1315] Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 [1316] 20 25 30  
 [1317] Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
 [1318] 35 40 45  
 [1319] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser  
 [1320] 50 55 60  
 [1321] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu  
 [1322] 65 70 75 80  
 [1323] Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr  
 [1324] 85 90 95  
 [1325] Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg  
 [1326] 100 105  
 [1327] <210> 88  
 [1328] <211> 723  
 [1329] <212> DNA  
 [1330] <213> 人工序列  
 [1331] <220>  
 [1332] <223> 人源化scFv  
 [1333] <400> 88  
 [1334] caggtgcagc tgggtgcagag cggcggcggc gtgggtgcagc cggccgcag cctgcgcctg 60  
 [1335] agctgcaaag cgagcggcta taccttacc cgctataccca tgcattgggt ggcgcaggcg 120  
 [1336] ccggcggcaaag gcctggaaatg gattggctat attaaccgaa gccgcggcta taccaactat 180  
 [1337] aaccagaaag tgaaagatcg cttaccatt agcaccgata aaagcaaaag caccgcgtt 240  
 [1338] ctgcagatgg atagcctgcg cccggaagat accggcgtgt attttgcgc ggcgtattat 300  
 [1339] gatgatcatt attgcctgga ttattgggc cagggcacca ccctgaccgt gagcagcggc 360  
 [1340] ggcggcggca gcggcggcgg cggcagcggc ggcggcggca gcgatattca gatgacccag 420  
 [1341] agccccgagca gcctgagcgc gaggcgtggc gatcgcgtga ccattacctg cagcgcgagc 480  
 [1342] agcagcgtga gctatatgaa ctggtatcag cagaccccg gcaaagcggc gaaacgctgg 540  
 [1343] atttatgata ccagcaact ggcgagcggc gtgcccggc gctttacccgg cagcggcagc 600

- [1344] ggcaccgatt ataccttac cattagcagc ctgcagccgg aagatattgc gacctattat 660  
 [1345] tgccagcagt ggagcagcaa cccgttacc tttggccagg gcaccaaact gcagattacc 720  
 [1346] cgc 723  
 [1347] <210> 89  
 [1348] <211> 241  
 [1349] <212> PRT  
 [1350] <213> 人工序列  
 [1351] <220>  
 [1352] <223> 人源化scFv  
 [1353] <400> 89  
 [1354] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 [1355] 1 5 10 15  
 [1356] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
 [1357] 20 25 30  
 [1358] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 [1359] 35 40 45  
 [1360] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val  
 [1361] 50 55 60  
 [1362] Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Lys Ser Lys Ser Thr Ala Phe  
 [1363] 65 70 75 80  
 [1364] Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
 [1365] 85 90 95  
 [1366] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [1367] 100 105 110  
 [1368] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 [1369] 115 120 125  
 [1370] Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 [1371] 130 135 140  
 [1372] Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser  
 [1373] 145 150 155 160  
 [1374] Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala  
 [1375] 165 170 175  
 [1376] Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 [1377] 180 185 190  
 [1378] Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile  
 [1379] 195 200 205  
 [1380] Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 [1381] 210 215 220  
 [1382] Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 [1383] 225 230 235 240  
 [1384] Arg  
 [1385] <210> 90

- [1386] <211> 357
- [1387] <212> DNA
- [1388] <213> 智人
- [1389] <400> 90
- [1390] caggtgcagc tggtgcagag cggcgccggc gtggcgcagc cggccgcag cctgcgcctg 60
- [1391] agctgcaaag cgagcggcta taccttacc cgctataccca tgcattgggt gcccaggc 120
- [1392] ccggcggaaag gcctggaatg gattggctat attaaccgaa gccgcggcta taccaactat 180
- [1393] aaccagaaaag tgaaagatcg cttaccatt agcaccgata aaagcaaaag caccgcgtt 240
- [1394] ctgcagatgg atagcctgcg cccggaagat accggcgtgt attttgcgc ggcgttattat 300
- [1395] gatgatcatt attgcctgga ttattgggc cagggcacca ccctgaccgt gaggcagc 357
- [1396] <210> 91
- [1397] <211> 119
- [1398] <212> PRT
- [1399] <213> 智人
- [1400] <400> 91
- [1401] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
- [1402] 1 5 10 15
- [1403] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
- [1404] 20 25 30
- [1405] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
- [1406] 35 40 45
- [1407] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val
- [1408] 50 55 60
- [1409] Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Lys Ser Lys Ser Thr Ala Phe
- [1410] 65 70 75 80
- [1411] Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
- [1412] 85 90 95
- [1413] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
- [1414] 100 105 110
- [1415] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
- [1416] 115
- [1417] <210> 92
- [1418] <211> 321
- [1419] <212> DNA
- [1420] <213> 智人
- [1421] <400> 92
- [1422] gatattcaga tgacccagag cccgagcagc ctgagcgcga gcgtggcga tcgcgtgacc 60
- [1423] attacctgca gcgcgagcag cagcgtgagc tataatgact ggtatcagca gacccggc 120
- [1424] aaagcgccga aacgctggat ttatgatacc agcaaactgg cgagcggcgt gccgagccgc 180
- [1425] tttagcggca gcggcagcgg caccgattat accttacca tttagcggcct gcagccggaa 240
- [1426] gatattgcga cctattattg ccagcagtgg agcagcaacc cgtttacctt tggccaggc 300
- [1427] accaaactgc agattaccc c 321

- [1428] <210> 93
- [1429] <211> 107
- [1430] <212> PRT
- [1431] <213> 智人
- [1432] <400> 93
- [1433] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
- [1434] 1 5 10 15
- [1435] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
- [1436] 20 25 30
- [1437] Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
- [1438] 35 40 45
- [1439] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
- [1440] 50 55 60
- [1441] Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
- [1442] 65 70 75 80
- [1443] Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
- [1444] 85 90 95
- [1445] Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
- [1446] 100 105
- [1447] <210> 94
- [1448] <211> 45
- [1449] <212> DNA
- [1450] <213> 人工序列
- [1451] <220>
- [1452] <223> 突变体
- [1453] <400> 94
- [1454] gagcccaaat ctgctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccca 45
- [1455] <210> 95
- [1456] <211> 15
- [1457] <212> PRT
- [1458] <213> 人工序列
- [1459] <220>
- [1460] <223> 突变IgG1铰链氨基酸序列
- [1461] <400> 95
- [1462] Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
- [1463] 1 5 10 15
- [1464] <210> 96
- [1465] <211> 651
- [1466] <212> DNA
- [1467] <213> 人工序列
- [1468] <220>
- [1469] <223> 突变IgG4 Fc (N297A) 核酸序列

- [1470] <400> 96
- [1471] gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttccctgttcc ccccaaaacc caaggacact 60
- [1472] ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacf tgcgtggtag tggacgtgag ccaggaagac 120
- [1473] cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 180
- [1474] ccgcgggagg agcagttcgc tagcacgtac cgtgtggta gcgtcctcac cgtcctgcac 240
- [1475] caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgatcc 300
- [1476] tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc 360
- [1477] ctgccccat cccaggagga gatgaccaag aaccaggatca gcctgacact cctggtaaaa 420
- [1478] ggcttctacc ccagcgacat cgcgtggag tggagagca atggcagcc ggagaacaac 480
- [1479] tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctct tcttcctcta cagcaggcta 540
- [1480] accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg aatgtcttct catgtccgt gatgcatgag 600
- [1481] getctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctggtaa a 651
- [1482] <210> 97
- [1483] <211> 217
- [1484] <212> PRT
- [1485] <213> 人工序列
- [1486] <220>
- [1487] <223> 突变IgG4 Fc (N297A) 氨基酸序列
- [1488] <400> 97
- [1489] Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
- [1490] 1 5 10 15
- [1491] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
- [1492] 20 25 30
- [1493] Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
- [1494] 35 40 45
- [1495] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
- [1496] 50 55 60
- [1497] Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
- [1498] 65 70 75 80
- [1499] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
- [1500] 85 90 95
- [1501] Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
- [1502] 100 105 110
- [1503] Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
- [1504] 115 120 125
- [1505] Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
- [1506] 130 135 140
- [1507] Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
- [1508] 145 150 155 160
- [1509] Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
- [1510] 165 170 175
- [1511] Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val

[1512]	180	185	190
[1513]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
[1514]	195	200	205
[1515]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[1516]	210	215	
[1517]	<210> 98		
[1518]	<211> 696		
[1519]	<212> DNA		
[1520]	<213> 人工序列		
[1521]	<220>		
[1522]	<223> 突变IgG1铰链-IgG4 Fc核酸序列		
[1523]	<400> 98		
[1524]	gagcccaaat ctgctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgagttcctg 60		
[1525]	gggggaccat cagtcttctt gttccccc aaacccaagg acactctcat gatctccgg 120		
[1526]	acccttggagg tcacgtgcgt ggtgggtggac gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc 180		
[1527]	aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgca ggaggagcag 240		
[1528]	ttcgcttagca cgttaccgtgt ggtcagcgctc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac 300		
[1529]	ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc 360		
[1530]	atctccaaag ccaaaggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag 420		
[1531]	gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc 480		
[1532]	gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540		
[1533]	ccctgtctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc 600		
[1534]	aggtggcagg agggaaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660		
[1535]	tacacacaga agagcctctc cctgtctctg ggtaaa 696		
[1536]	<210> 99		
[1537]	<211> 232		
[1538]	<212> PRT		
[1539]	<213> 人工序列		
[1540]	<220>		
[1541]	<223> 突变IgG1铰链-IgG4 Fc氨基酸序列		
[1542]	<400> 99		
[1543]	Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
[1544]	1 5 10 15		
[1545]	Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
[1546]	20 25 30		
[1547]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
[1548]	35 40 45		
[1549]	Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val		
[1550]	50 55 60		
[1551]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
[1552]	65 70 75 80		
[1553]	Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		

[1554]	85	90	95
[1555]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly		
[1556]	100	105	110
[1557]	Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
[1558]	115	120	125
[1559]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr		
[1560]	130	135	140
[1561]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
[1562]	145	150	155
[1563]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
[1564]	165	170	175
[1565]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
[1566]	180	185	190
[1567]	Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe		
[1568]	195	200	205
[1569]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
[1570]	210	215	220
[1571]	Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[1572]	225	230	
[1573]	<210> 100		
[1574]	<211> 1547		
[1575]	<212> DNA		
[1576]	<213> 人工序列		
[1577]	<220>		
[1578]	<223> scFv1 MCS-G4S-hOKT3 scFv-IgG1铰链 - IgG4 Fc表达盒		
[1579]	核酸序列		
[1580]	<400> 100		
[1581]	actagtgcacccatggagtt tggctgagc tgggtcttcc tgggtggctat cttgaagggt 60		
[1582]	gtccagtgtaaattcaagct ttctagaagc gctgctagcg gtggaggtgg atcccagggtc 120		
[1583]	cagctgggtc agtcaggggg gggagtcgtc cagcccggtc ggtctctgcg tctgtctgt 180		
[1584]	aaggcatccg gttatacttt taccaggtac acaatgcact gggtgccgca ggctcctggc 240		
[1585]	aagggcctgg agtggatcgg ctatataaac ccatccaggg gctacaccaa ctataatcag 300		
[1586]	aaggtaagg accggttcac catctctaca gataagagca agtctacagc ctttctgcag 360		
[1587]	atggactccc tgagacctga ggataccggc gtgtacttct gcgcctcgcta ctatgacgat 420		
[1588]	cattactgtc tggactattt gggccagggc accacactga cagtgtccag cggaggagga 480		
[1589]	ggctccggag gaggaggcag cggccggcggc ggctctgaca tccagatgac ccagagccca 540		
[1590]	tctccctgt ccggcagcgt gggcgataga gtgaccatca catgctccgc ctccctcc 600		
[1591]	gtgtcctaca tgaactggta tcagcagaca cccggcaagg cccctaagag atggatctac 660		
[1592]	gatacctcca agctggcctc cggagtgcctc tctcgcttct ctggctccgg cagccgcaca 720		
[1593]	gactataacctt ttacaatcag ctctctgcag cctgaggata tcgctaccta ctattgtcag 780		
[1594]	cagtggtcca gcaatccatt cacctttggc cagggcacaa agctgcagat caccaggctc 840		
[1595]	gagccaaaga gcggccgacaa gaccacaca tgcccccgtt gtccagctcc cgagttctg 900		

[1596] ggcggccat ccgtgttccct gttccaccc aagcccaagg atacactgat gatcagccgg 960  
 [1597] accccagagg tgacatgcgt ggtggtggac gtgtctcagg aggaccccga ggtgcagttc 1020  
 [1598] aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aatgccaaga ccaagcccag ggaggagcag 1080  
 [1599] tttgcttcta cataccgggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcacatcagga ttggctgaac 1140  
 [1600] ggcaggagt ataagtgcaa ggtgtccaaat aaggccctgc cttcttccat cgagaagaca 1200  
 [1601] atcagcaagg ctaagggaca gcctcgcgag ccacagggtt acaccctgcc tccatctcag 1260  
 [1602] gaggagatga caaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggctt ctatccctcc 1320  
 [1603] gacatcgctg tggagtggga gagcaatggc cagcctgaga acaattacaa gaccacaccc 1380  
 [1604] cctgtgctgg acagcgatgg ctcttcttt ctgtatagca gactgaccgt ggataagtct 1440  
 [1605] cgctggcagg agggcaacgt gtttcctgt tccgtgatgc acgaggact gcacaaccac 1500  
 [1606] tacactcaga aatcaactgtc actgtccctg ggcaagtagg cggccgc 1547  
 [1607] <210> 101  
 [1608] <211> 496  
 [1609] <212> PRT  
 [1610] <213> 人工序列  
 [1611] <220>  
 [1612] <223> scFv1 MCS-G4S-hOKT3 scFv-IgG1铰链 - IgG4 Fc表达盒  
 [1613] 氨基酸序列  
 [1614] <400> 101  
 [1615] Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly  
 [1616] 1 5 10 15  
 [1617] Val Gln Cys Met Cys Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly  
 [1618] 20 25 30  
 [1619] Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 [1620] 35 40 45  
 [1621] Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 [1622] 50 55 60  
 [1623] Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr  
 [1624] 65 70 75 80  
 [1625] Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Lys  
 [1626] 85 90 95  
 [1627] Ser Lys Ser Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp  
 [1628] 100 105 110  
 [1629] Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu  
 [1630] 115 120 125  
 [1631] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 [1632] 130 135 140  
 [1633] Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met  
 [1634] 145 150 155 160  
 [1635] Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr  
 [1636] 165 170 175  
 [1637] Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln

[1638]	180	185	190
[1639]	Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys		
[1640]	195	200	205
[1641]	Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
[1642]	210	215	220
[1643]	Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr		
[1644]	225	230	235
[1645]	Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly		
[1646]	245	250	255
[1647]	Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr		
[1648]	260	265	270
[1649]	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser		
[1650]	275	280	285
[1651]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
[1652]	290	295	300
[1653]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
[1654]	305	310	315
[1655]	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
[1656]	325	330	335
[1657]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val		
[1658]	340	345	350
[1659]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr		
[1660]	355	360	365
[1661]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
[1662]	370	375	380
[1663]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
[1664]	385	390	395
[1665]	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
[1666]	405	410	415
[1667]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[1668]	420	425	430
[1669]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[1670]	435	440	445
[1671]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[1672]	450	455	460
[1673]	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[1674]	465	470	475
[1675]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[1676]	485	490	495
[1677]	<210> 102		
[1678]	<211> 1547		
[1679]	<212> DNA		

- [1680] <213> 人工序列
- [1681] <220>
- [1682] <223> scFv1 MCS-G4S-mOKT3 scFv-IgG1铰链 - IgG4 Fc表达盒
- [1683] 核酸序列
- [1684] <400> 102
- [1685] actagtgcc acatggagtt tggctgagc tggcttcc tggtgctat cttgaagggt 60
- [1686] gtccagtgt aattcaagct ttctagaagc gctgctagcg gtggaggtgg atcccaggtc 120
- [1687] cagctgcagc agagcgggtgc cgaactggcc cgtcccgag caagcgtaa aatgtcctgt 180
- [1688] aaagcaagtg gctataccctt caccaggta acaatgcaact gggtgaagca gaggccagga 240
- [1689] cagggcctgg agtggatcg ctatataaac ccctctaggg gctacacaaa ctataatcag 300
- [1690] aagttcaagg acaaggccac cctgaccacc gataagtcca gctctacagc ttacatgcag 360
- [1691] ctgtccagcc tgaccagcga ggactctgcc gtgtactatt gcgtctgata ctatgacat 420
- [1692] cattactgtc tggattatttgggcccaggaccacactgacatgtcttc cggaggagga 480
- [1693] ggcagcggag gaggaggctc tggcggcggc ggctccca gtcgtctgac ccagtcccc 540
- [1694] gctatcatgt ccgcctcccc tggagagaag gtgaccatga catgcagcgc cagctttcc 600
- [1695] gtgtcttaca tgaattggta tcagcagaag tccggcacaa gccctaagag atggatctac 660
- [1696] gacacctcta agctggcctc cggagtgcca gctcaatttc gcggctccgg cagcggcacc 720
- [1697] tcttattccc tgacaatcag cggcatggag gctgaggatg ccgcctaccta ctattgtcag 780
- [1698] cagtggtcat caaatccctt cacccctcggt tcagggacaa aactggagat caataggctc 840
- [1699] gagccaaaga gcgcccacaa gaccacaca tgcccccctt gtccagctcc cgagttctg 900
- [1700] ggcggcccat ccgtttccct gttccaccc aagcccaagg atacactgat gatcagccgg 960
- [1701] accccagagg tgacatcggt ggtgggtggac gtgtctcagg aggacccgaa ggtgcagttc 1020
- [1702] aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aatgccaaga ccaagcccag ggaggagcag 1080
- [1703] ttgttctta cataccgggt ggtgtccgtc ctgaccgtgc tgcatcagga ttggctgaac 1140
- [1704] ggcaggagt ataagtcaa ggtgtccaaat aagggcctgc cttttccat cgagaagaca 1200
- [1705] atcagcaagg ctaaggaca gcctcgcgag ccacagggtgt acaccctgcc tccatctcag 1260
- [1706] gaggagatga caaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaaggcctt ctatccctcc 1320
- [1707] gacatcgctg tggagtggga gagcaatggc cagcctgaga acaattacaa gaccacaccc 1380
- [1708] cctgtgctgg acagcgatgg ctcttctt ctgtatagca gactgaccgt ggataagtct 1440
- [1709] cgctggcagg agggcaacgt gtttcctgt tccgtatgc acgaggcact gcacaaccac 1500
- [1710] tacactcaga aatcactgtc actgtccctg ggcaagttagg cggccgc 1547
- [1711] <210> 103
- [1712] <211> 496
- [1713] <212> PRT
- [1714] <213> 人工序列
- [1715] <220>
- [1716] <223> scFv1 MCS-G4S-mOKT3 scFv-IgG1铰链 - IgG4 Fc表达盒
- [1717] 氨基酸序列
- [1718] <400> 103
- [1719] Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
- [1720] 1 5 10 15
- [1721] Val Gln Cys Met Cys Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu

[1722]	20	25	30
[1723]	Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly		
[1724]	35	40	45
[1725]	Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly		
[1726]	50	55	60
[1727]	Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr		
[1728]	65	70	75
[1729]	Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys		
[1730]		85	90
[1731]	Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp		
[1732]		100	105
[1733]	Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu		
[1734]		115	120
[1735]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly		
[1736]		130	135
[1737]	Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu		
[1738]		145	150
[1739]	Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr		
[1740]		165	170
[1741]	Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln		
[1742]		180	185
[1743]	Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys		
[1744]		195	200
[1745]	Ser Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
[1746]		210	215
[1747]	Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr		
[1748]		225	230
[1749]	235	235	240
[1749]	Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly		
[1750]		245	250
[1751]	255	255	255
[1751]	Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr		
[1752]		260	265
[1752]	270	270	270
[1753]	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser		
[1754]		275	280
[1754]	285	285	285
[1755]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
[1756]		290	295
[1756]	300	300	300
[1757]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
[1758]		305	310
[1758]	315	315	320
[1759]	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
[1760]		325	330
[1760]	335	335	335
[1761]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val		
[1762]		340	345
[1762]	350	350	350
[1763]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		

[1764]	355	360	365
[1765]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
[1766]	370	375	380
[1767]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
[1768]	385	390	395
[1769]	400	405	410
[1770]	415		
[1771]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[1772]	420	425	430
[1773]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[1774]	445	435	440
[1775]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[1776]	460	450	455
[1777]	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[1778]	480	465	470
[1779]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[1780]	495	485	490
[1781]	<210> 104		
[1782]	<211> 2265		
[1783]	<212> DNA		
[1784]	<213> 人工序列		
[1785]	<220>		
[1786]	<223> 抗PSMA & hOKT3双特异性Ab核酸序列 (gy1-2)		
[1787]	<400> 104		
[1788]	atggagtttggctgagctggttccctgtgtggctatcttgaagggtgtccagtgtgaa 60		
[1789]	ttccagtctgtgttgactcagccgcctcagtgtctggggccccaggcaagtcatt 120		
[1790]	atctcctgcactgggagcagctccaacatcggggcagggttctatgtacaatgggtaccag 180		
[1791]	caggttccaggaacagccccaaactcctcatactatgaaaacaccaatcgccctcaggg 240		
[1792]	gtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcaggttccctggccatcaactggaa 300		
[1793]	ctccagccttggatgaggctgttattatgtgtcaacatggatgacagttctaatgggt 360		
[1794]	gtaatattcggcggagggaccaggccaccgtcctaggcgatccctctaggtcaagttcc 420		
[1795]	agcggcggcgttggcaggcggaggcgggtgaggcgcgtggatgttggggagcc 480		
[1796]	ctggccaagcctgggggtccctgagactctctgtgcagcctctggattcacccctcagt 540		
[1797]	ggctatgcta tgcactgggtccgcaggctccaggcaaggggctggatgttggcagtt 600		
[1798]	atatcatatgatgaaagcaaataatactacgcagactccgttgcggccattcaccgtc 660		
[1799]	tccagagacaattccaagaacacgctgtttctgcaaataatgcacgcctgagacctgaggac 720		
[1800]	acggctgtgtactattgtctaaaggcattacgtggggacatggatgttgcgtctc 780		
[1801]	gatatctggggcccccggacacggtcaccgtctcctcagatggatgttgcgttcc 840		
[1802]	caggtccagctggcagtcaggggggatgcgtgcagccggcggcgttcgtctc 900		
[1803]	tcttgtaaggcatccggtaatctttaccaggcacacatgtcactgggtgcggcaggct 960		
[1804]	cctggcaagggcctggagtgatcgctatatcaacccatccaggggctacaccaactat 1020		
[1805]	aatcagaagg tgaaggaccgttaccatcttacagataagagcaagtcacacccctt 1080		

[1806]	ctgcagatgg actccctgag acctgaggat accggcgtgt acttctgcgc tcgctactat	1140
[1807]	gacgatcatt actgtctgga ctattgggc cagggcacca cactgacagt gtccagcggaa	1200
[1808]	ggaggaggct ccggaggagg aggccagcggc ggcggcggct ctgacatcca gatgacccag	1260
[1809]	agcccatctt ccctgtccgc cagcgtggc gatagagtga ccatcacatg ctccgcctcc	1320
[1810]	tcctccgtgt cctacatgaa ctggtatcag cagacacccg gcaaggcccc taagagatgg	1380
[1811]	atctacgata cctccaagct ggcctccgga gtgcctctc gcttctctgg ctccggcagc	1440
[1812]	ggcacagact ataccttac aatcagctct ctgcagccctg aggatatcgc tacctactat	1500
[1813]	tgtcagcagt ggtccagcaa tccattcacc tttggccagg gcacaaagct gcagatcacc	1560
[1814]	aggctcgagc caaagagcgc cgacaagacc cacacatgcc ccccttgcagc agctcccgag	1620
[1815]	tttctggcg gcccattcggt gttcctgttt ccacccaagc ccaaggatac actgatgatc	1680
[1816]	agccggaccc cagaggtgac atgcgtgggt gtggacgtgt ctcaggagga ccccgaggtg	1740
[1817]	cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcacaatg ccaagaccaa gcccagggag	1800
[1818]	gagcagtttgc ttctacata cgggtgggt tccgtgctga ccgtgctgca tcaggattgg	1860
[1819]	ctgaacggca aggagtataa gtcaagggtg tccaataagg gcctgccttc ttccatcgag	1920
[1820]	aagacaatca gcaaggctaa gggacagccct cgcgagccac aggtgtacac cctgcctcca	1980
[1821]	tctcaggagg agatgacaaa gaaccaggtg tccctgaccc gtctggtaaa gggcttctat	2040
[1822]	ccctccgaca tcgctgtgga gtgggagagc aatggccagc ctgagaacaa ttacaagacc	2100
[1823]	acacccctg tgctggacag cgatggctct ttctttctgt atagcagact gaccgtggat	2160
[1824]	aagtctcgct ggcaggaggg caacgtgttc tcctgttccg tgcacgatgcac ggcactgcac	2220
[1825]	aaccactaca ctcagaaatc actgtcactg tccctggca agtag	2265
[1826]	<210> 105	
[1827]	<211> 754	
[1828]	<212> PRT	
[1829]	<213> 人工序列	
[1830]	<220>	
[1831]	<223> 抗PSMA & hOKT3双特异性Ab氨基酸序列 (gy1-2)	
[1832]	<400> 105	
[1833]	Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
[1834]	1 5 10 15	
[1835]	Val Gln Cys Glu Phe Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser	
[1836]	20 25 30	
[1837]	Gly Ala Pro Gly Gln Ser Val Ile Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser	
[1838]	35 40 45	
[1839]	Asn Ile Gly Ala Gly Ser His Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly	
[1840]	50 55 60	
[1841]	Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly	
[1842]	65 70 75 80	
[1843]	Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu	
[1844]	85 90 95	
[1845]	Ala Ile Thr Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala	
[1846]	100 105 110	
[1847]	Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Ile Phe Gly Gly Thr Lys	

[1848]	115	120	125
[1849]	Ala Thr Val Leu Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Gly Gly Gly		
[1850]	130	135	140
[1851]	Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala		
[1852]	145	150	155
[1853]	Leu Ala Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly		
[1854]	165	170	175
[1855]	Phe Thr Leu Ser Gly Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly		
[1856]	180	185	190
[1857]	Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys		
[1858]	195	200	205
[1859]	Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn		
[1860]	210	215	220
[1861]	Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp		
[1862]	225	230	235
[1863]	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Asp		
[1864]	245	250	255
[1865]	Asn Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser		
[1866]	260	265	270
[1867]	Ser Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly		
[1868]	275	280	285
[1869]	Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala		
[1870]	290	295	300
[1871]	Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala		
[1872]	305	310	315
[1873]	Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly		
[1874]	325	330	335
[1875]	Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Thr		
[1876]	340	345	350
[1877]	Asp Lys Ser Lys Ser Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro		
[1878]	355	360	365
[1879]	Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr		
[1880]	370	375	380
[1881]	Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly		
[1882]	385	390	395
[1883]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile		
[1884]	405	410	415
[1885]	Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg		
[1886]	420	425	430
[1887]	Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp		
[1888]	435	440	445
[1889]	Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr		

[1890]	450	455	460
[1891]	Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser		
[1892]	465	470	475
[1893]	Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile		
[1894]	485	490	495
[1895]	Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly		
[1896]	500	505	510
[1897]	Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp		
[1898]	515	520	525
[1899]	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly		
[1900]	530	535	540
[1901]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
[1902]	545	550	555
[1903]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu		
[1904]	565	570	575
[1905]	Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
[1906]	580	585	590
[1907]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg		
[1908]	595	600	605
[1909]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
[1910]	610	615	620
[1911]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu		
[1912]	625	630	635
[1913]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
[1914]	645	650	655
[1915]	Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
[1916]	660	665	670
[1917]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
[1918]	675	680	685
[1919]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
[1920]	690	695	700
[1921]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp		
[1922]	705	710	715
[1923]	Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
[1924]	725	730	735
[1925]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu		
[1926]	740	745	750
[1927]	Gly Lys		
[1928]	<210> 106		
[1929]	<211> 735		
[1930]	<212> PRT		
[1931]	<213> 人工序列		

[1932]	<220>		
[1933]	<223> 抗PSMA & hOKT3双特异性Ab氨基酸序列 (gy1-2)		
[1934]	不含信号肽		
[1935]	<400> 106		
[1936]	Glu Phe Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro		
[1937]	1	5	10 15
[1938]	Gly Gln Ser Val Ile Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly		
[1939]	20	25	30
[1940]	Ala Gly Ser His Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro		
[1941]	35	40	45
[1942]	Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp		
[1943]	50	55	60
[1944]	Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Ala Ile Thr		
[1945]	65	70	75 80
[1946]	Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp		
[1947]	85	90	95
[1948]	Asp Ser Leu Asn Gly Val Ile Phe Gly Gly Thr Lys Ala Thr Val		
[1949]	100	105	110
[1950]	Leu Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
[1951]	115	120	125
[1952]	Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ala Lys		
[1953]	130	135	140
[1954]	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu		
[1955]	145	150	155 160
[1956]	Ser Gly Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
[1957]	165	170	175
[1958]	Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala		
[1959]	180	185	190
[1960]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
[1961]	195	200	205
[1962]	Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val		
[1963]	210	215	220
[1964]	Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Asp Asn Asp Ala		
[1965]	225	230	235 240
[1966]	Leu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
[1967]	245	250	255
[1968]	Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Val		
[1969]	260	265	270
[1970]	Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr		
[1971]	275	280	285
[1972]	Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
[1973]	290	295	300

[1974]	Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn			
[1975]	305	310	315	320
[1976]	Tyr Asn Gln Lys Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Lys Ser			
[1977]	325	330	335	
[1978]	Lys Ser Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr			
[1979]	340	345	350	
[1980]	Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp			
[1981]	355	360	365	
[1982]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly			
[1983]	370	375	380	
[1984]	Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr			
[1985]	385	390	395	400
[1986]	Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile			
[1987]	405	410	415	
[1988]	Thr Cys Ser Ala Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln			
[1989]	420	425	430	
[1990]	Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu			
[1991]	435	440	445	
[1992]	Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp			
[1993]	450	455	460	
[1994]	Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr			
[1995]	465	470	475	480
[1996]	Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr			
[1997]	485	490	495	
[1998]	Lys Leu Gln Ile Thr Arg Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His			
[1999]	500	505	510	
[2000]	Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val			
[2001]	515	520	525	
[2002]	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
[2003]	530	535	540	
[2004]	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu			
[2005]	545	550	555	560
[2006]	Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
[2007]	565	570	575	
[2008]	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
[2009]	580	585	590	
[2010]	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
[2011]	595	600	605	
[2012]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile			
[2013]	610	615	620	
[2014]	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
[2015]	625	630	635	640

[2016]	Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
[2017]	645	650	655
[2018]	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
[2019]	660	665	670
[2020]	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
[2021]	675	680	685
[2022]	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
[2023]	690	695	700
[2024]	Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
[2025]	705	710	715
[2026]	720		
[2027]	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[2028]	725	730	735
[2029]	<210> 107		
[2030]	<211> 2265		
[2031]	<212> DNA		
[2032]	<213> 人工序列		
[2033]	<220>		
[2034]	<223> 抗PSMA & mOKT3双特异性Ab核酸序列 (gy1-2)		
[2035]	atggagtttggctgagctggcttcctgtggctatcttgaagggtgtccagtgtgaa 60		
[2036]	ttccagtctgtgactcagccgcctcagtgtctggggccccaggcaagtgtcatt 120		
[2037]	atctcctgcactgggagcagctccaacatcgggcaggctctatgtacaatgggtaccag 180		
[2038]	caggttccaggaacagcccccaaaactcctcatactatgaaaacaccaatcgccctcaggg 240		
[2039]	gtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcaggtccctggccatcaactggaa 300		
[2040]	ctccagccctgaggatgaggctgattattatgtgcaacatggatgacagttctaatgggt 360		
[2041]	gtaatattcggcggagggaccaaggccaccgtcctaggcgatcctctaggtcaagttcc 420		
[2042]	agcggcggcgtggcagcggaggcgggtgaggcgcgtggtagtcggggagcc 480		
[2043]	ctggccaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccctcaggt 540		
[2044]	ggctatgcta tgcactgggtccgcaggctccaggcaagggtggagtggtggcagtt 600		
[2045]	atatcatatgatgaaagcaaataactacgcagactccgtggccattcaccgttc 660		
[2046]	tccagagacaattccaagaacacgctgtttctgcaaatgacagcctgagacctgaggac 720		
[2047]	acggctgtgtactattgtctaaaggcattacgtggacatcgatgtc 780		
[2048]	gatatctggggccggacacgggtcaccgtctcctcagctagggtggaggatcc 840		
[2049]	caggtccagctgcagcaggccgtggccaaatggccgtccggagcaagcgtaaaaatg 900		
[2050]	tcctgtaaagcaagtggctatcccttacgtggacatgtacgtgggtggatggagg 960		
[2051]	ccaggacagggcctggagtgatggctatatcaaccctctagggtggatggatgg 1020		
[2052]	aatcagaagtcaaggacaaggccaccctgaccaccgataagtccagctctacagttac 1080		
[2053]	atgcagctgtccgcctgaccagcgaggacatcgccgtgtactattgcgc 1140		
[2054]	gacgatcattactgtctggatattggggcaggcaccacactgacagtgtttccgg 1200		
[2055]	ggaggaggcagcggaggaggaggctgtggcggcggctccagatcggtgcacccag 1260		
[2056]	tccccagcta tcatgtccgcctccctggagaaagggtgaatgacatgcagcggcagc 1320		
[2057]	tcttcgtgtttacatgaaatgttgcgtggatcgacatgcggccccc 1380		

[2058] atctacgaca cctctaagct ggccctccgga gtgccagctc actttcgccg ctccggcagc 1440  
 [2059] ggcacctttt attccctgac aatcagcggc atggaggctg aggatgccgc tacctactat 1500  
 [2060] tgtcagcagt ggtcatcaaa tccttcacc ttcggttcag ggacaaaact ggagatcaat 1560  
 [2061] aggctcgagc caaagagcgc cgacaagacc cacacatgcc ccccttgcag agctcccgag 1620  
 [2062] tttctggcg gcccattccgt gttcctgttt ccacccaagc ccaaggatac actgatgatc 1680  
 [2063] agccggaccc cagaggtgac atgcgtggc gtggacgtgt ctcaggagga ccccgagggt 1740  
 [2064] cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcacaatg ccaagaccaa gcccaggag 1800  
 [2065] gagcagttt cttctacata ccgggtggc tccgtgctga ccgtgctgca tcaggattgg 1860  
 [2066] ctgaacggca aggagtataa gtcaagggtg tccaataagg gcctgccttc ttccatcgag 1920  
 [2067] aagacaatca gcaaggctaa gggacagcct cgcgagccac aggtgtacac cctgcctcca 1980  
 [2068] tctcaggagg agatgacaaa gaaccaggtg tccctgacact gtctggtaa gggcttctat 2040  
 [2069] ccctccgaca tcgctgtgga gtggagagc aatggccagc ctgagaacaa ttacaagacc 2100  
 [2070] acacccctg tgctggacag cgatggctct ttctttctgt atagcagact gaccgtggat 2160  
 [2071] aagtctcgct ggcaggaggg caacgtgttccg tgatgcacga ggcactgcac 2220  
 [2072] aaccactaca ctcagaaatc actgtcactg tccctggca agtag 2265  
 [2073] <210> 108  
 [2074] <211> 754  
 [2075] <212> PRT  
 [2076] <213> 人工序列  
 [2077] <220>  
 [2078] <223> 抗PSMA & mOKT3双特异性Ab氨基酸序列 (gy1-2)  
 [2079] <400> 108  
 [2080] Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly  
 [2081] 1 5 10 15  
 [2082] Val Gln Cys Glu Phe Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser  
 [2083] 20 25 30  
 [2084] Gly Ala Pro Gly Gln Ser Val Ile Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser  
 [2085] 35 40 45  
 [2086] Asn Ile Gly Ala Gly Ser His Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly  
 [2087] 50 55 60  
 [2088] Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly  
 [2089] 65 70 75 80  
 [2090] Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu  
 [2091] 85 90 95  
 [2092] Ala Ile Thr Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala  
 [2093] 100 105 110  
 [2094] Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Ile Phe Gly Gly Thr Lys  
 [2095] 115 120 125  
 [2096] Ala Thr Val Leu Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Gly Gly Gly  
 [2097] 130 135 140  
 [2098] Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala  
 [2099] 145 150 155 160

[2100]	Leu Ala Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly		
[2101]	165	170	175
[2102]	Phe Thr Leu Ser Gly Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly		
[2103]	180	185	190
[2104]	Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys		
[2105]	195	200	205
[2106]	Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn		
[2107]	210	215	220
[2108]	Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp		
[2109]	225	230	235
[2110]	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Asp		
[2111]	245	250	255
[2112]	Asn Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser		
[2113]	260	265	270
[2114]	Ser Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly		
[2115]	275	280	285
[2116]	Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala		
[2117]	290	295	300
[2118]	Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg		
[2119]	305	310	315
[2120]	Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly		
[2121]	325	330	335
[2122]	Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr		
[2123]	340	345	350
[2124]	Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser		
[2125]	355	360	365
[2126]	Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr		
[2127]	370	375	380
[2128]	Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly		
[2129]	385	390	395
[2130]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile		
[2131]	405	410	415
[2132]	Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys		
[2133]	420	425	430
[2134]	Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp		
[2135]	435	440	445
[2136]	Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr		
[2137]	450	455	460
[2138]	Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser		
[2139]	465	470	475
[2140]	Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala		
[2141]	485	490	495

[2142]	Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly		
[2143]	500	505	510
[2144]	Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp		
[2145]	515	520	525
[2146]	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly		
[2147]	530	535	540
[2148]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
[2149]	545	550	555
[2150]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu		
[2151]	565	570	575
[2152]	Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
[2153]	580	585	590
[2154]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg		
[2155]	595	600	605
[2156]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
[2157]	610	615	620
[2158]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu		
[2159]	625	630	635
[2160]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
[2161]	645	650	655
[2162]	Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
[2163]	660	665	670
[2164]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
[2165]	675	680	685
[2166]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
[2167]	690	695	700
[2168]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp		
[2169]	705	710	715
[2170]	Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
[2171]	725	730	735
[2172]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu		
[2173]	740	745	750
[2174]	Gly Lys		
[2175]	<210> 109		
[2176]	<211> 735		
[2177]	<212> PRT		
[2178]	<213> 人工序列		
[2179]	<220>		
[2180]	<223> 抗PSMA & mOKT3双特异性Ab氨基酸序列 (gy1-2)		
[2181]	<400> 109		
[2182]	Glu Phe Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro		
[2183]	1	5	10
			15

[2184]	Gly Gln Ser Val Ile Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly		
[2185]	20	25	30
[2186]	Ala Gly Ser His Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro		
[2187]	35	40	45
[2188]	Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp		
[2189]	50	55	60
[2190]	Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Ala Ile Thr		
[2191]	65	70	75
[2192]	80		
[2193]	Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp		
	85	90	95
[2194]	Asp Ser Leu Asn Gly Val Ile Phe Gly Gly Thr Lys Ala Thr Val		
[2195]	100	105	110
[2196]	Leu Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
[2197]	115	120	125
[2198]	Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ala Lys		
[2199]	130	135	140
[2200]	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu		
[2201]	145	150	155
[2202]	160		
[2203]	Ser Gly Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
	165	170	175
[2204]	Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala		
[2205]	180	185	190
[2206]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
[2207]	195	200	205
[2208]	Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val		
[2209]	210	215	220
[2210]	Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Asp Asn Asp Ala		
[2211]	225	230	235
[2212]	240		
[2213]	Leu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
	245	250	255
[2214]	Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu		
[2215]	260	265	270
[2216]	Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr		
[2217]	275	280	285
[2218]	Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln		
[2219]	290	295	300
[2220]	Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn		
[2221]	305	310	315
[2222]	320		
[2223]	Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser		
	325	330	335
[2224]	Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser		
[2225]	340	345	350

[2226]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp		
[2227]	355	360	365
[2228]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly		
[2229]	370	375	380
[2230]	Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr		
[2231]	385	390	395
[2232]	400	405	415
[2233]	Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met		
[2234]	415	420	425
[2235]	430	435	440
[2236]	445	450	455
[2237]	Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu		
[2238]	460	465	470
[2239]	475	480	485
[2240]	490	495	500
[2241]	505	510	515
[2242]	520	525	530
[2243]	535	540	545
[2244]	555	560	565
[2245]	570	575	580
[2246]	585	590	595
[2247]	600	605	610
[2248]	620	625	630
[2249]	635	640	645
[2250]	650	655	660
[2251]	665	670	675
[2252]	680	685	690
[2253]	695	700	705
[2254]	710	715	720
[2255]	725	730	735
[2256]	740	745	750
[2257]	755	760	765
[2258]	770	775	780
[2259]	785	790	795
[2260]	800	805	810
[2261]	815	820	825
[2262]	830	835	840
[2263]	845	850	855
[2264]	860	865	870
[2265]	875	880	885
[2266]	890	895	900
[2267]	905	910	915

- [2268] Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 [2269] 690 695 700  
 [2270] Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 [2271] 705 710 715 720  
 [2272] His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 [2273] 725 730 735  
 [2274] <210> 110  
 [2275] <211> 1184  
 [2276] <212> DNA  
 [2277] <213> 智人  
 [2278] <400> 110  
 [2279] cgtgaggctc cggtgccgt cagtggcag agcgcacatc gccacagtc cccgagaagt 60  
 [2280] tggggggagg ggtcgcaat tgaaccgtg cctagagaag gtggcgccc gtaaactggg 120  
 [2281] aaagtgtatgt cgtgtactgg ctccgcctt ttcccgaggg tggggagaa ccgtatataa 180  
 [2282] gtgcagtagt cgccgtgaac gttttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240  
 [2283] gtgccgtgtg tggttccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300  
 [2284] gaattacttc cacctggctg cagtagtga ttcttgatcc cgagttcgg gttgaaagt 360  
 [2285] ggtgggagag ttcgaggcct tgcgttaag gagcccccgc gcctgtgtc tgagttgagg 420  
 [2286] cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggt gcacccgtc gcctgtctcg 480  
 [2287] ctgcttcga taagtctcta gccattaaa attttgatg acctgtcg acgtttttt 540  
 [2288] tctggcaaga tagtcttgc aatgcggcc aagatctgca cactggatt tcggttttt 600  
 [2289] gggccgcggg cggcgacggg gcccgtgcgt cccagcgcac atgtcggcg aggccggg 660  
 [2290] tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtcata agctggccgg cctgtctgg 720  
 [2291] tgcctggcct cgccgcgcgg tgtatgcggc cgccctggc ggcaaggctg gcccggcgg 780  
 [2292] caccaggcgtc gtgagcggaa agatggccgc ttccggccc tgctgcagg agctcaaaaat 840  
 [2293] ggaggacgcg ggcgtcgaa gagcggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggccct 900  
 [2294] ttccgtcctc agccgtcgct tcgtgtact ccacggagta cggcgcccg tccaggcacc 960  
 [2295] tcgatttagtt ctcgagctt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggtttatg 1020  
 [2296] cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080  
 [2297] tctaattctc ctggaaattt gcccctttt agttggatc ttgggtcatt ctcaaggcctc 1140  
 [2298] agacagtggt tcaaagttt tttttccat ttcaggtgtc gtga 1184  
 [2299] <210> 111  
 [2300] <211> 21  
 [2301] <212> DNA  
 [2302] <213> 人工序列  
 [2303] <220>  
 [2304] <223> 引物  
 [2305] <400> 111  
 [2306] gactacaagg acgacgatga c 21  
 [2307] <210> 112  
 [2308] <211> 25  
 [2309] <212> DNA

- [2310] <213> 人工序列
- [2311] <220>
- [2312] <223> 引物
- [2313] <400> 112
- [2314] agtagaatca agacctagta gaggg 25
- [2315] <210> 113
- [2316] <211> 19
- [2317] <212> DNA
- [2318] <213> 人工序列
- [2319] <220>
- [2320] <223> 引物
- [2321] <400> 113
- [2322] ctattgccag cattgctgc 19
- [2323] <210> 114
- [2324] <211> 20
- [2325] <212> DNA
- [2326] <213> 人工序列
- [2327] <220>
- [2328] <223> 引物
- [2329] <400> 114
- [2330] atagggacct agacttcagg 20
- [2331] <210> 115
- [2332] <211> 20
- [2333] <212> DNA
- [2334] <213> 人工序列
- [2335] <220>
- [2336] <223> 引物
- [2337] <400> 115
- [2338] ccttctactc ctcctacacc 20
- [2339] <210> 116
- [2340] <211> 19
- [2341] <212> DNA
- [2342] <213> 人工序列
- [2343] <220>
- [2344] <223> 引物
- [2345] <400> 116
- [2346] ggagggcgtg aatgtaagc 19

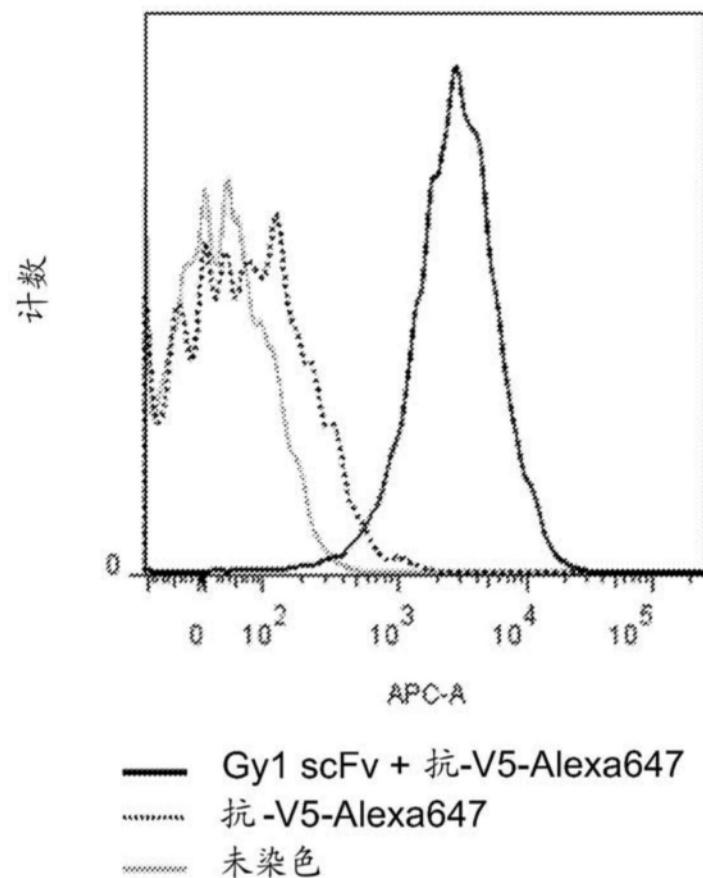


图1

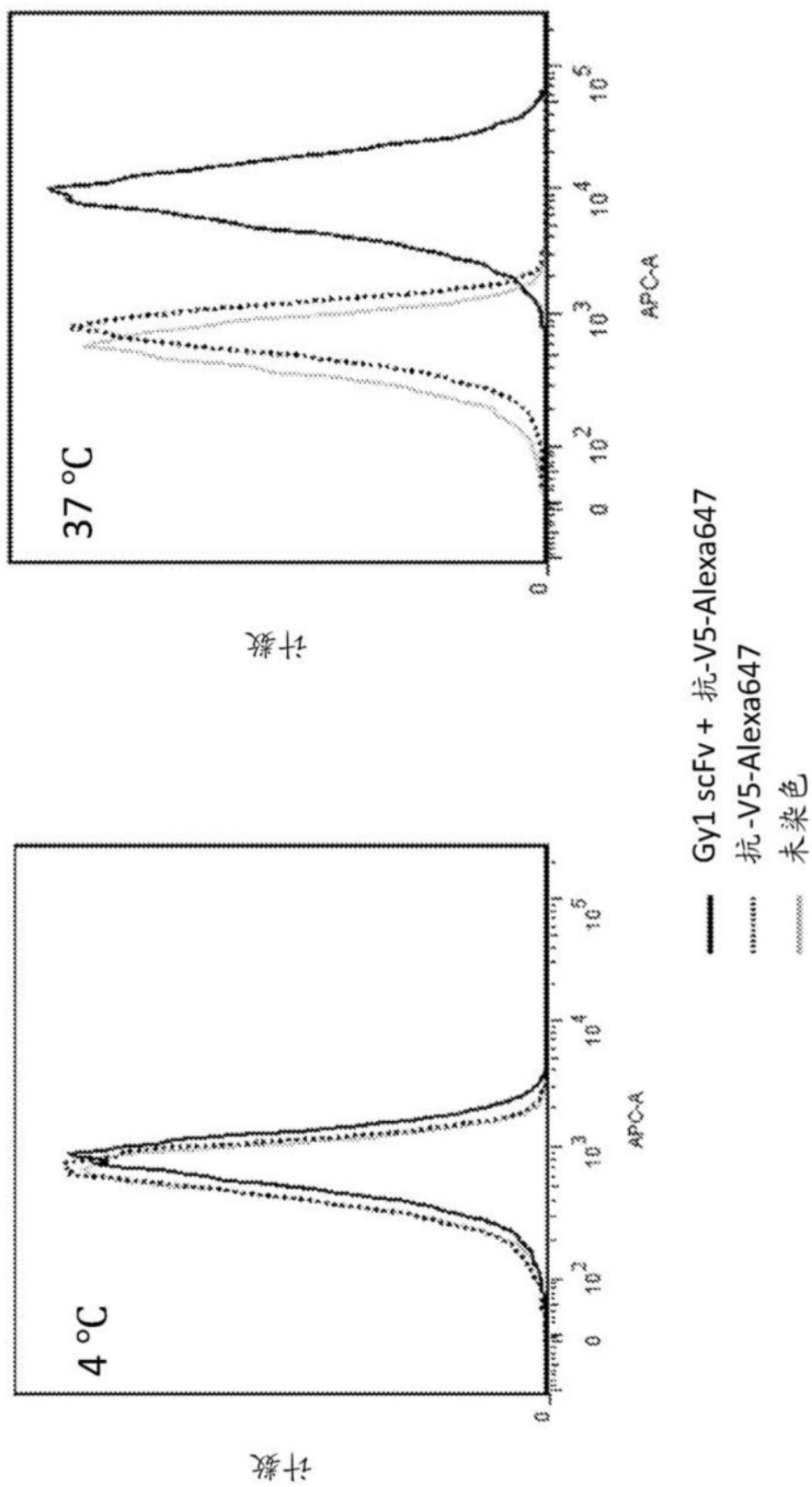


图2

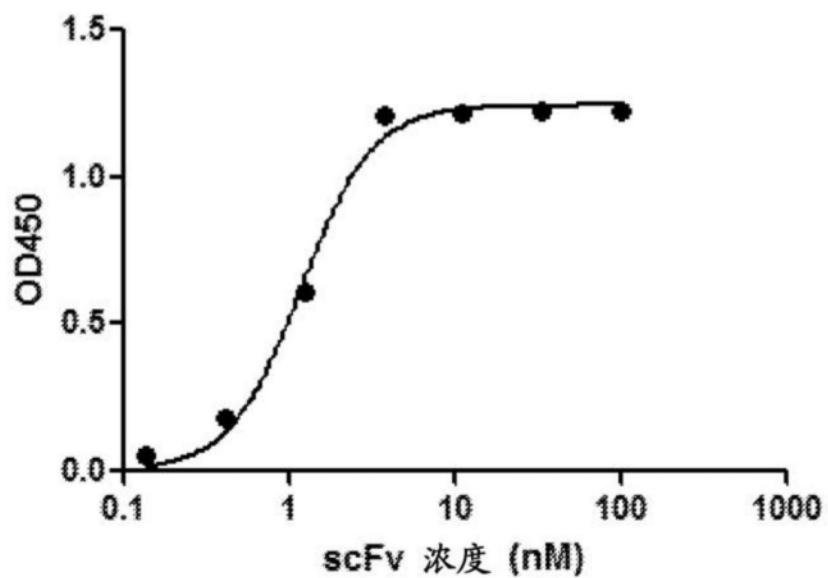


图3

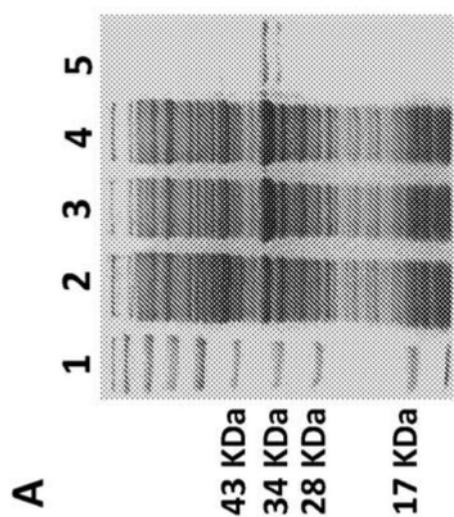


图4A

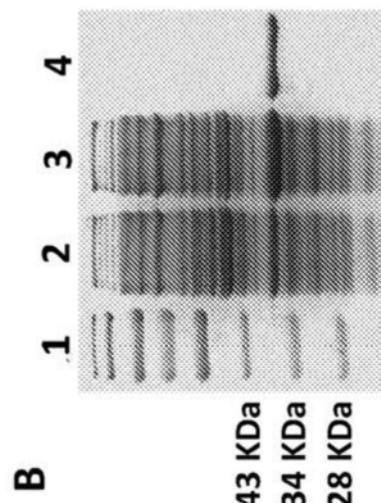


图4B

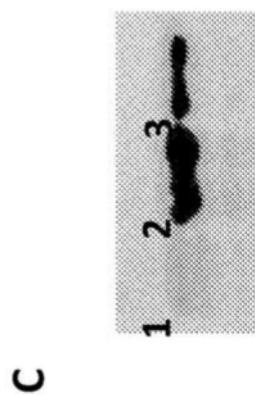


图4C

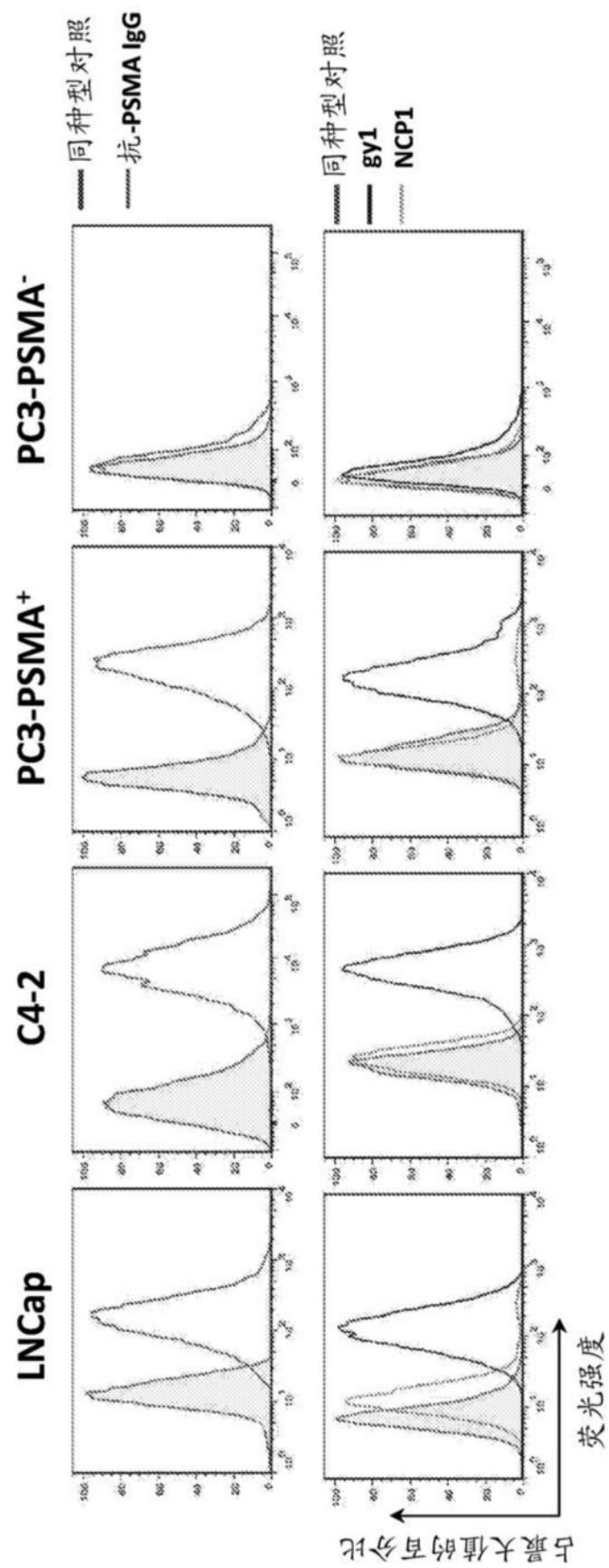


图5

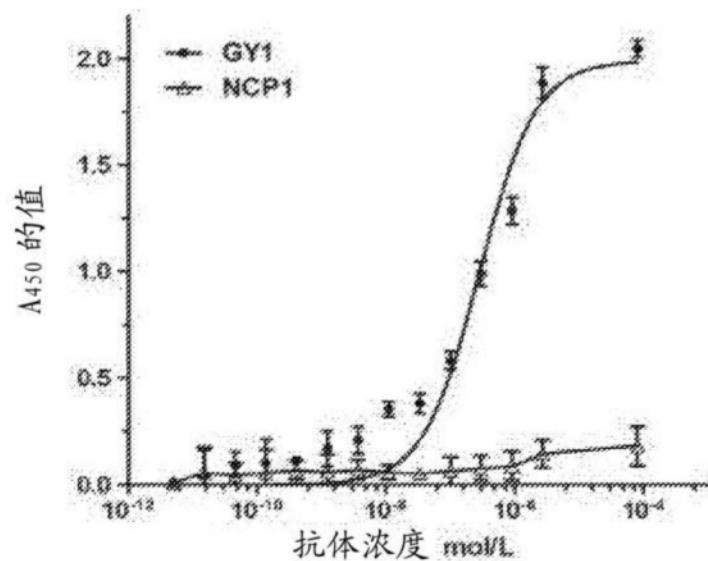


图6

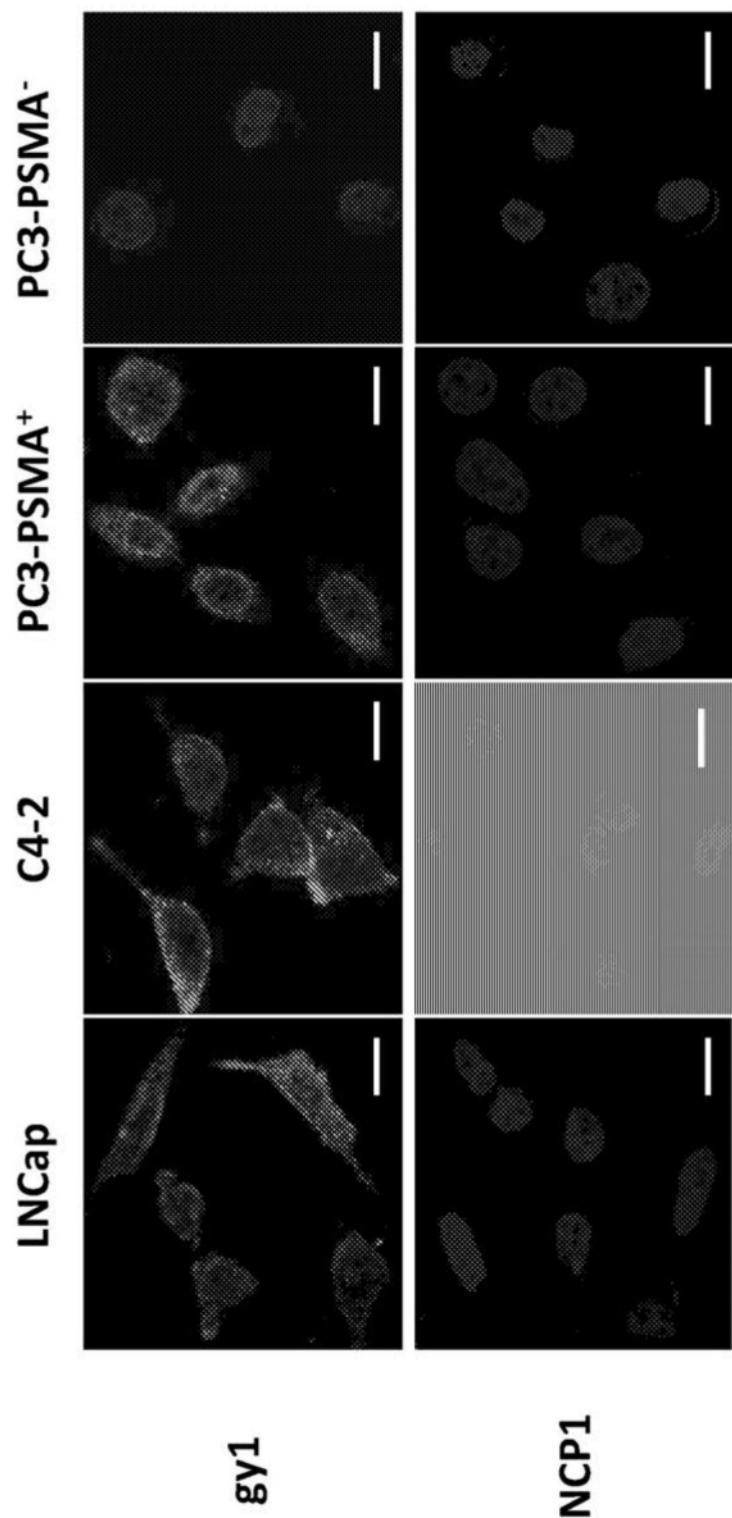


图7

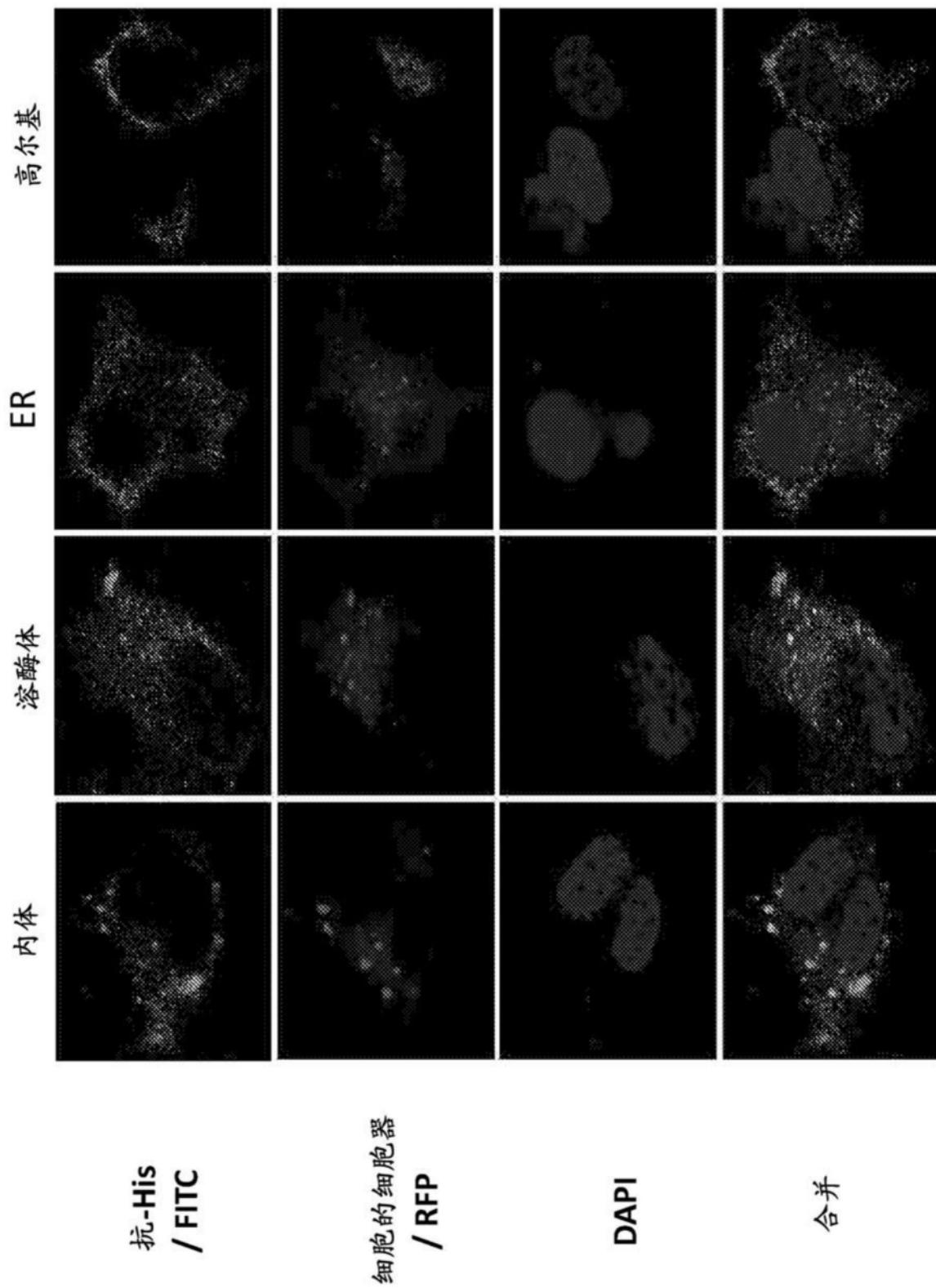


图8A

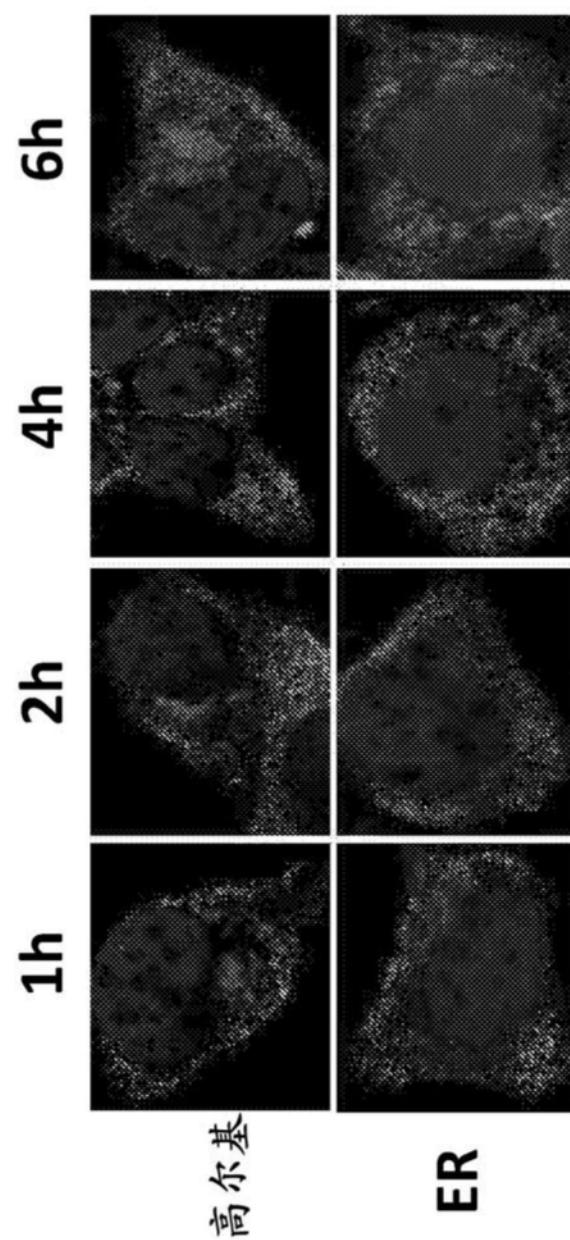


图8B

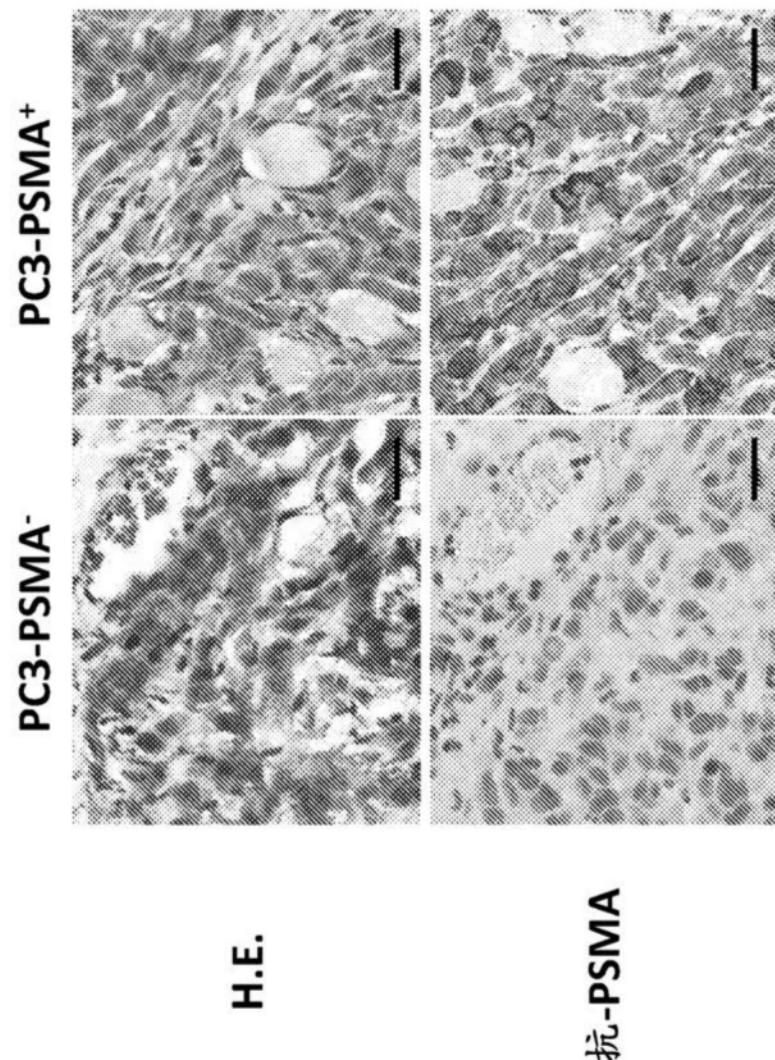


图9

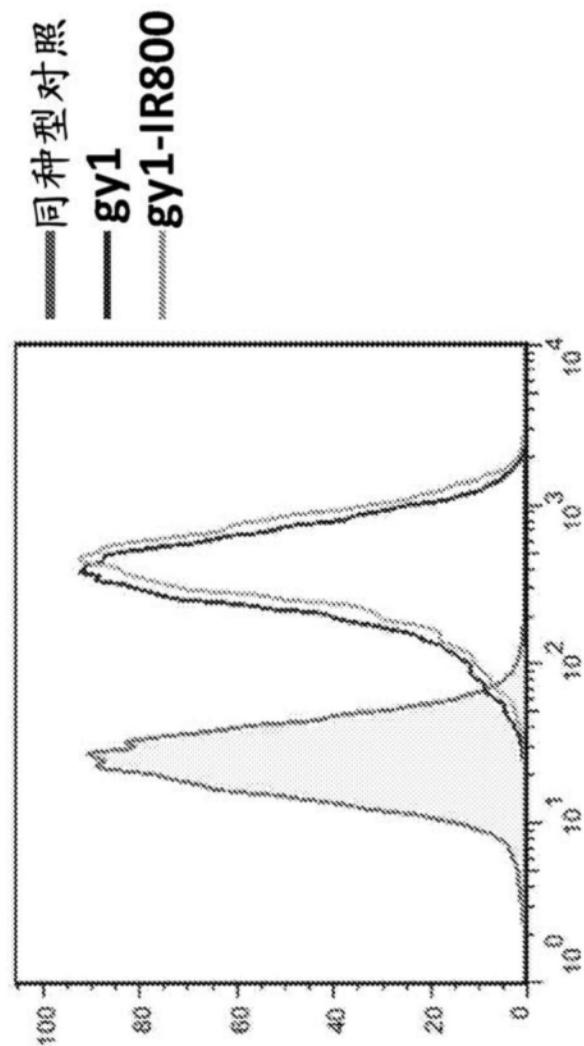


图10

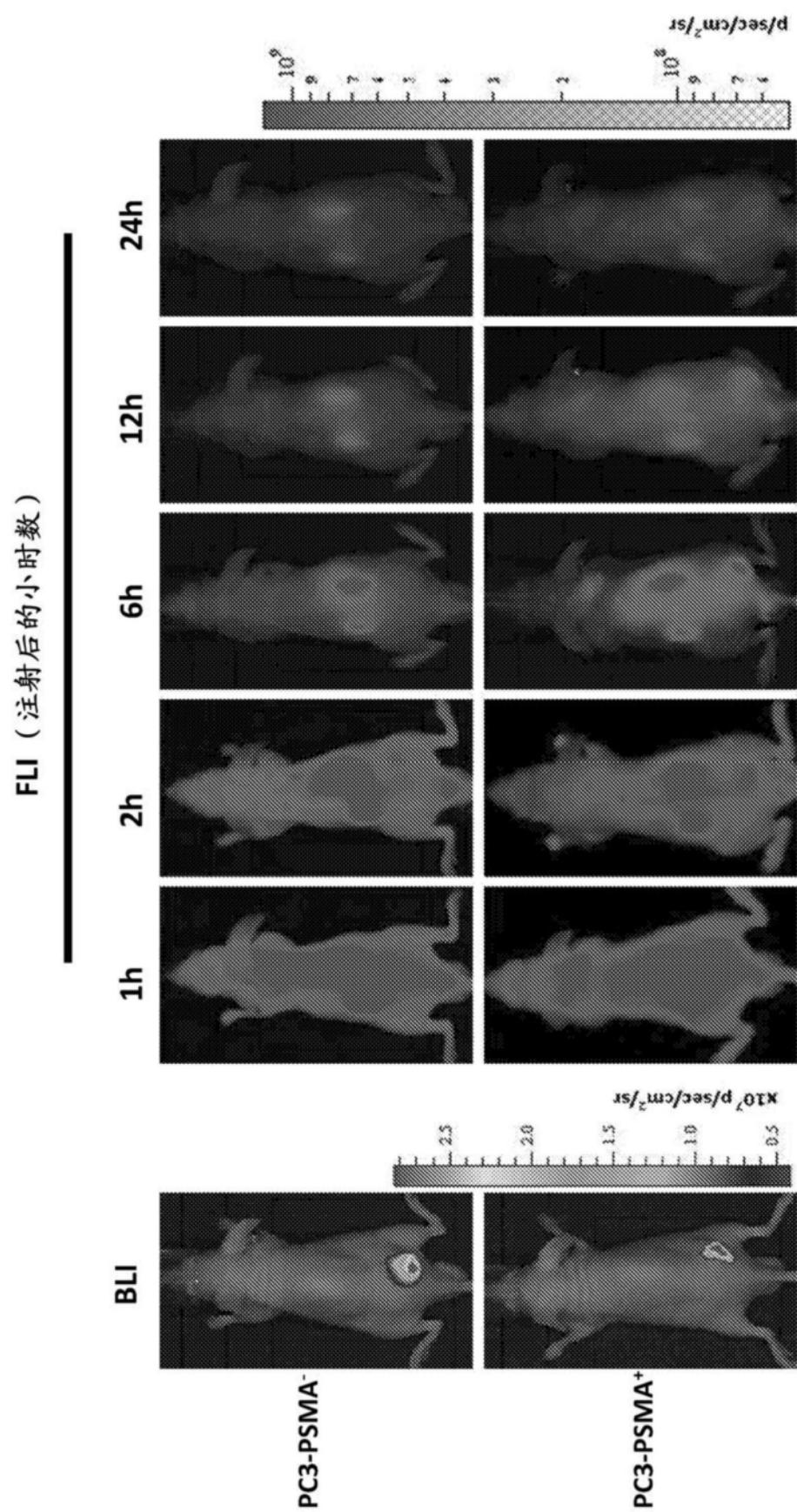


图11

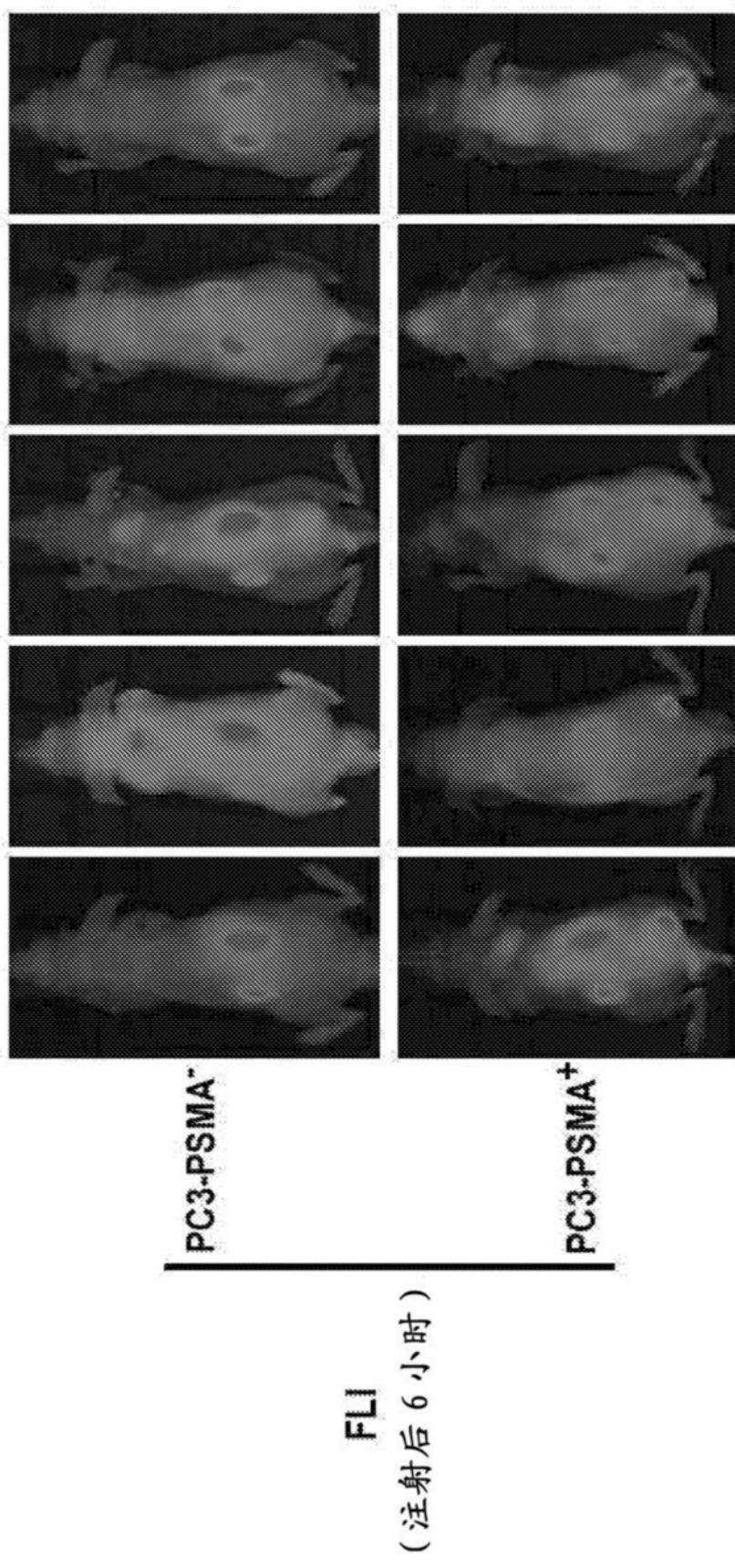


图12

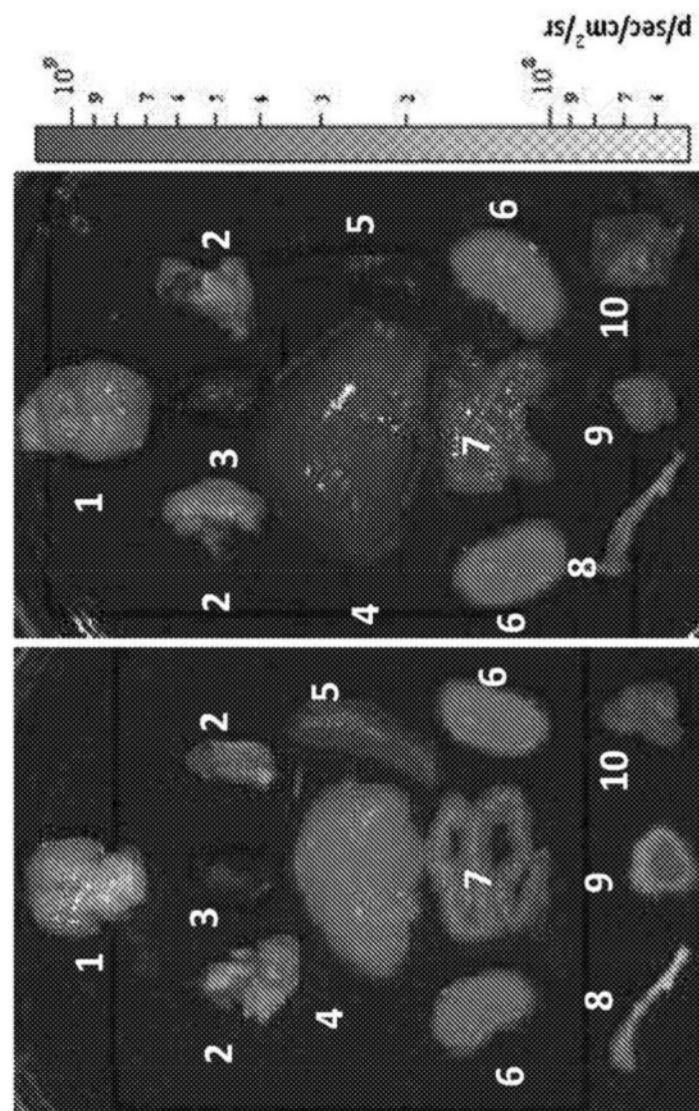


图13A

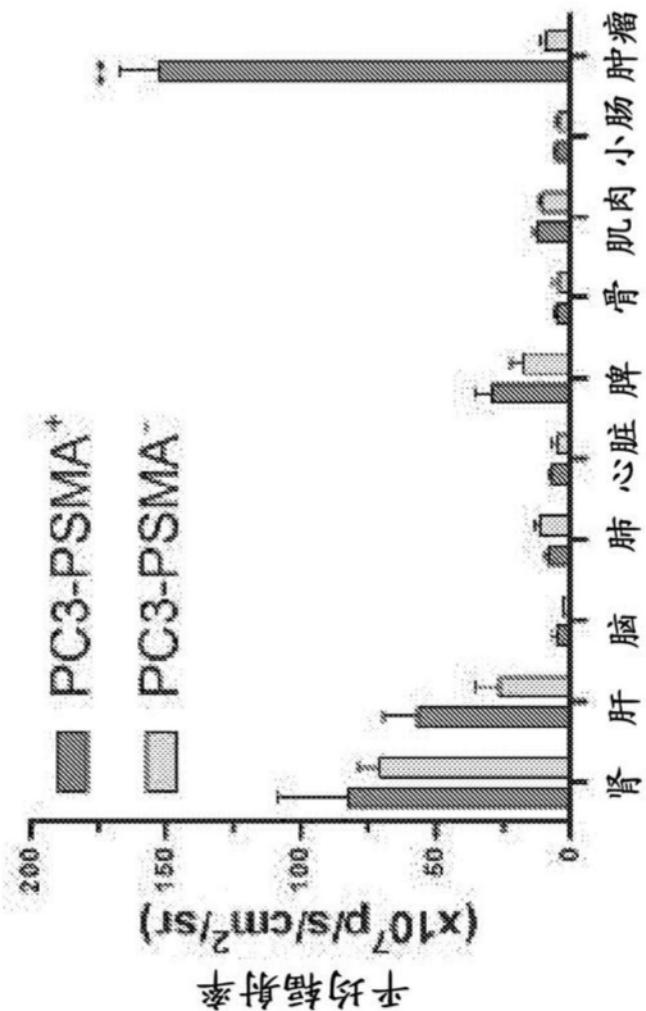


图13B

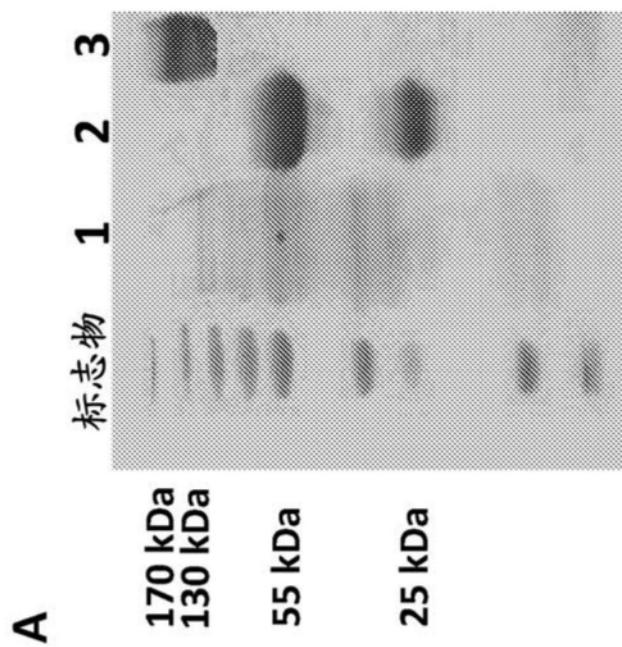


图14A

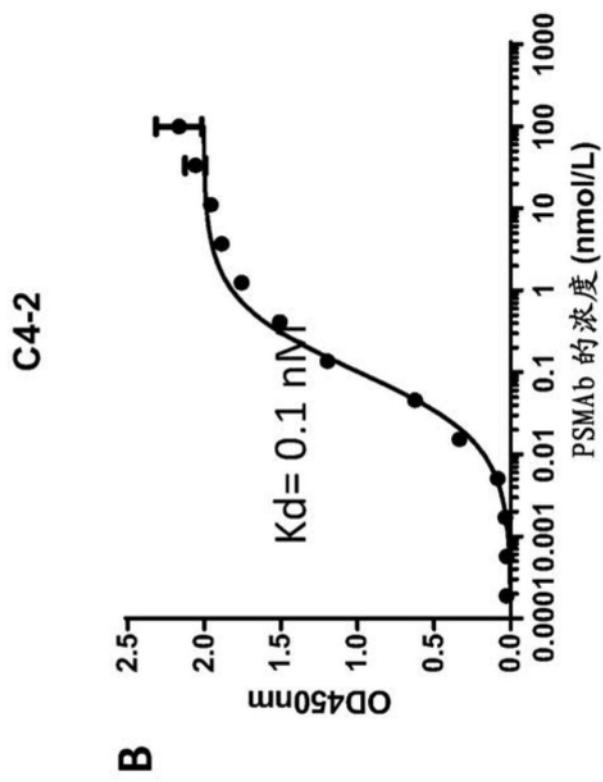


图14B

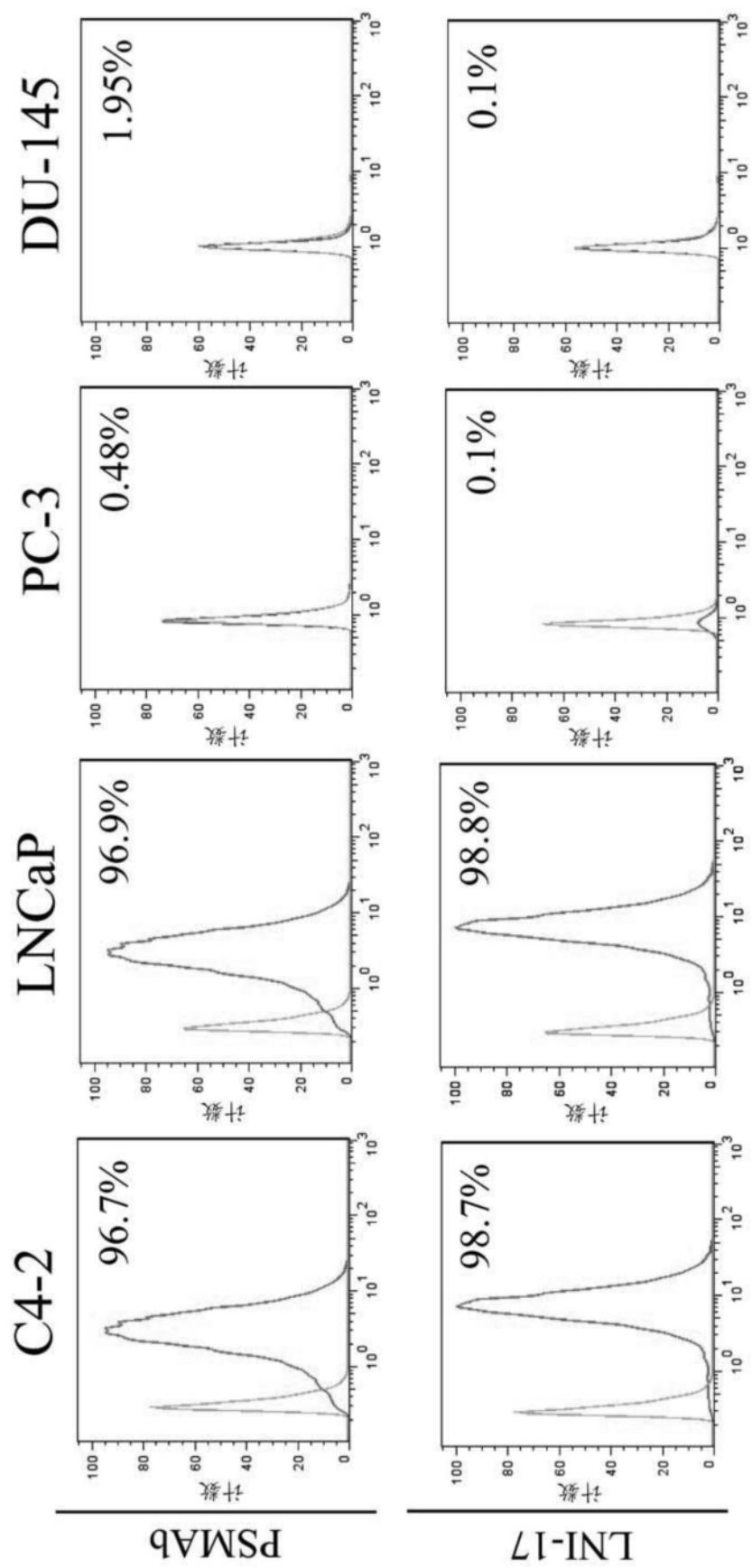


图15

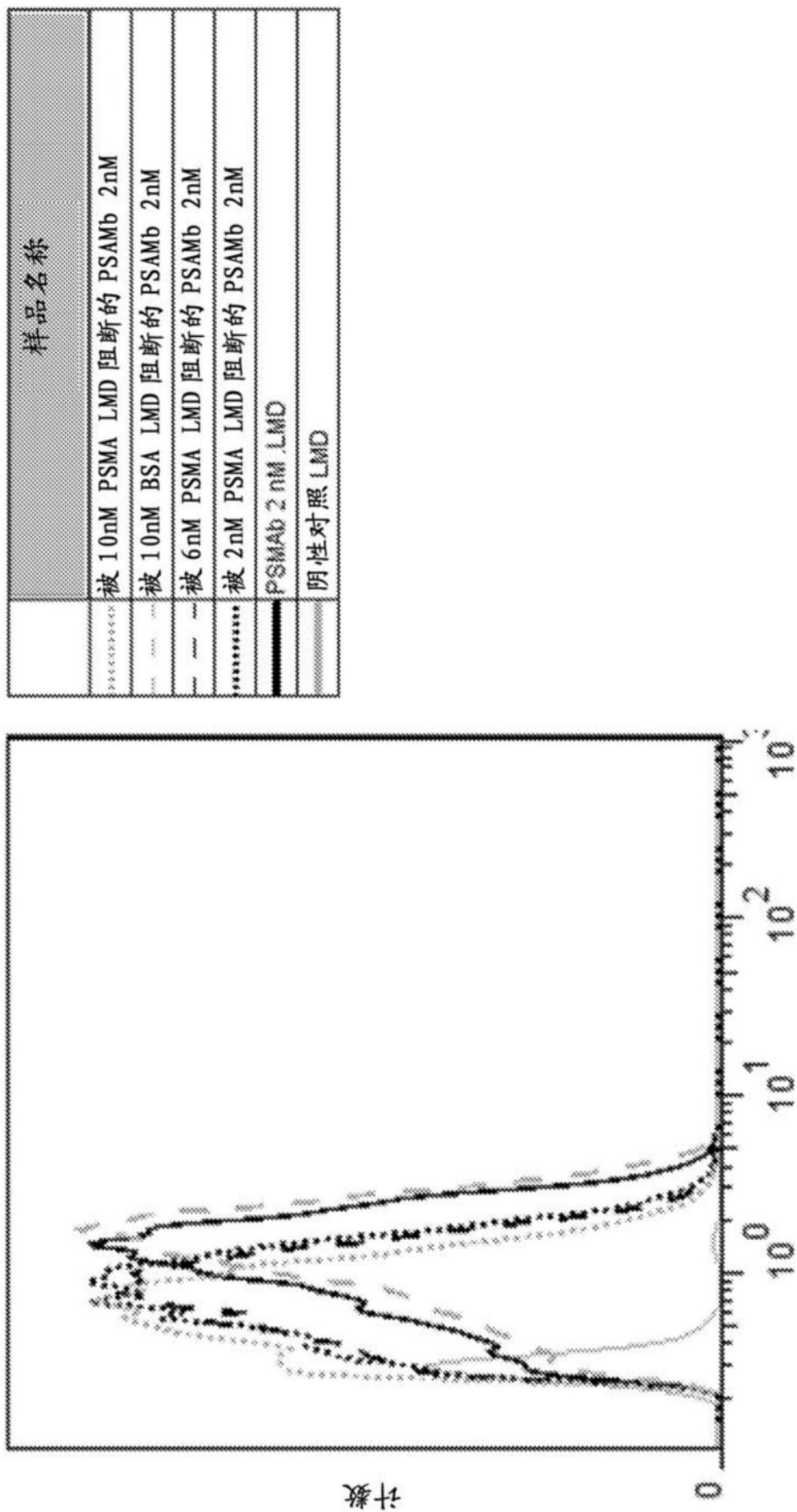


图16

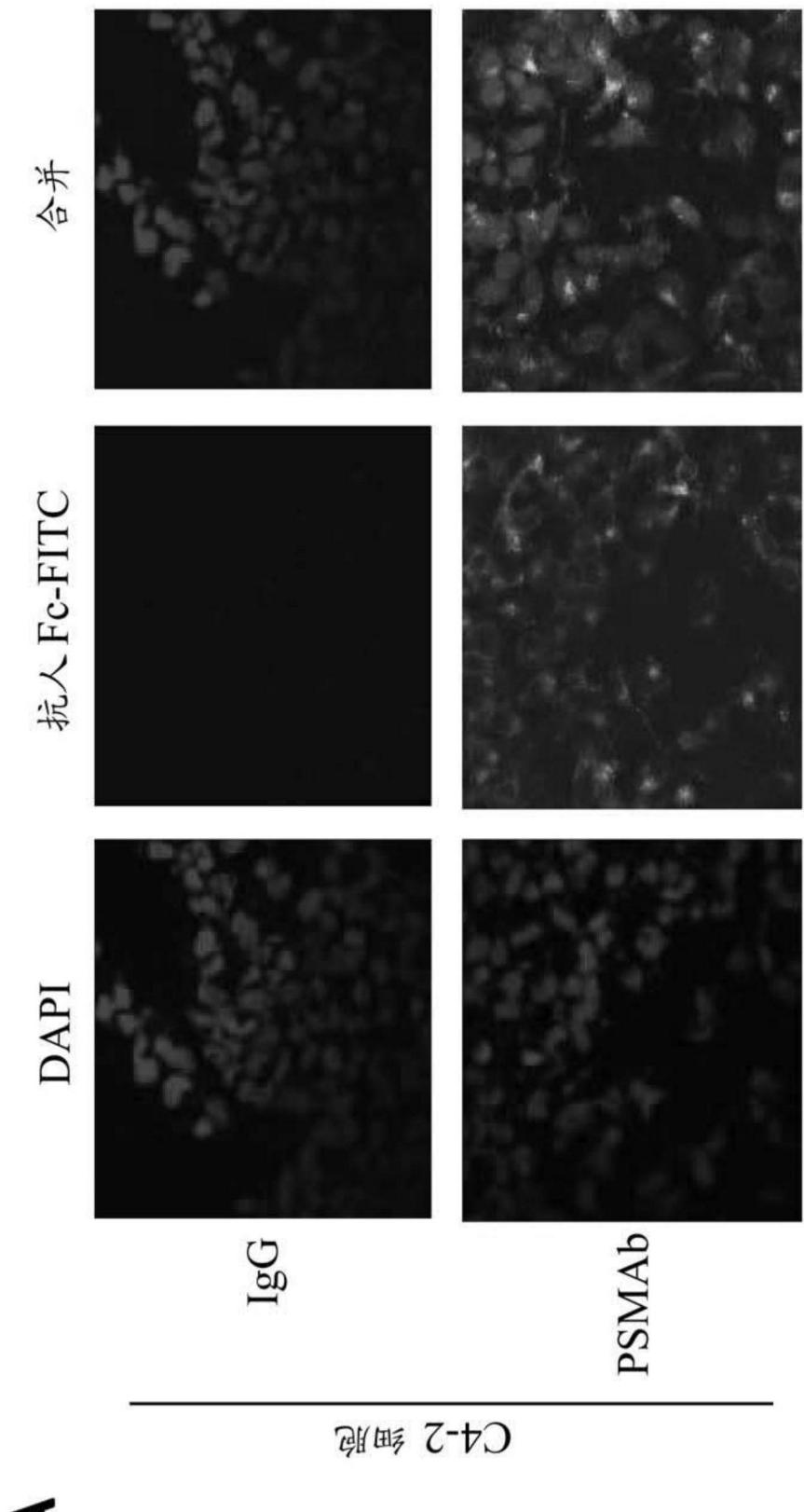


图17A

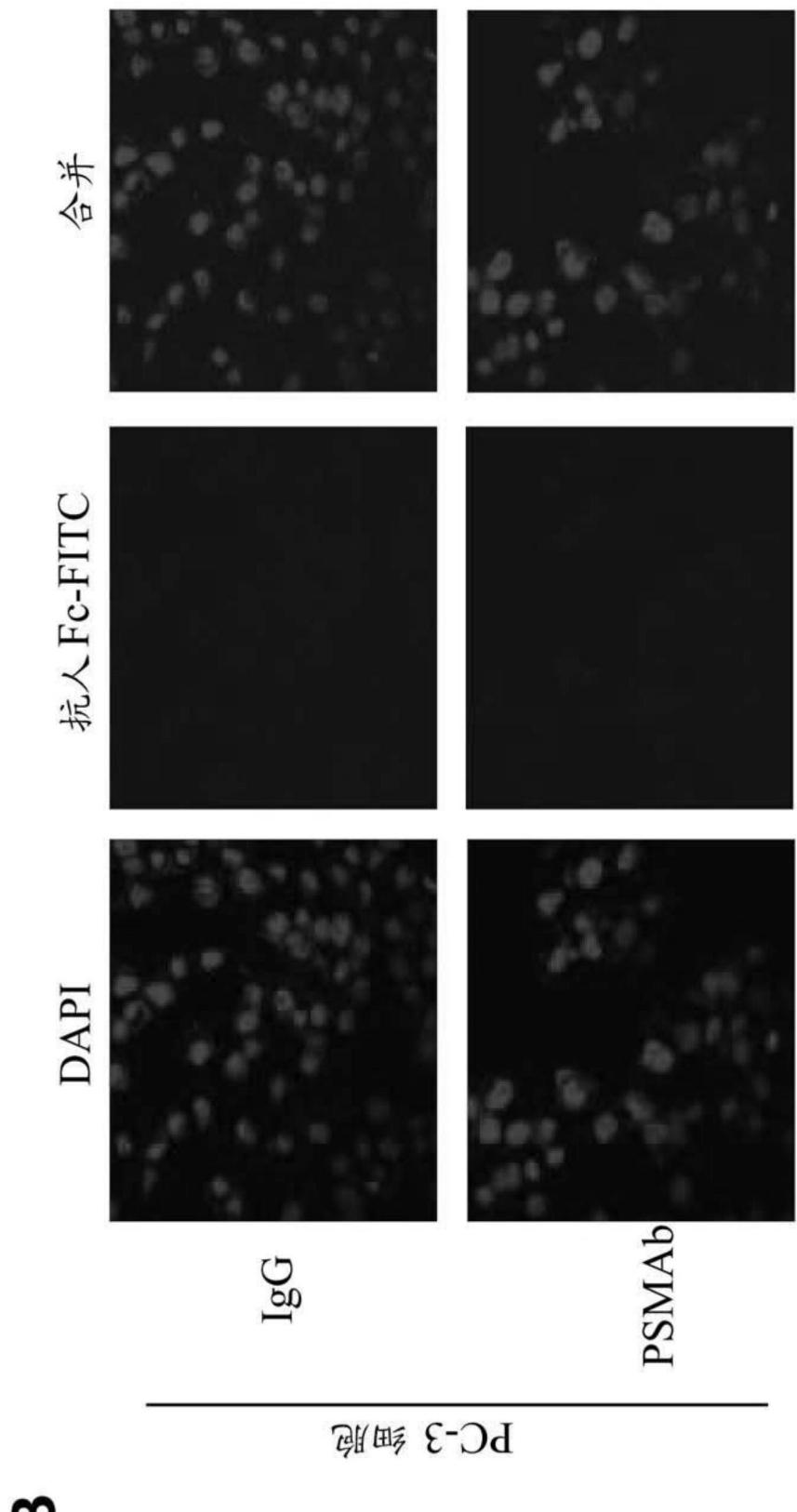
**B**

图17B

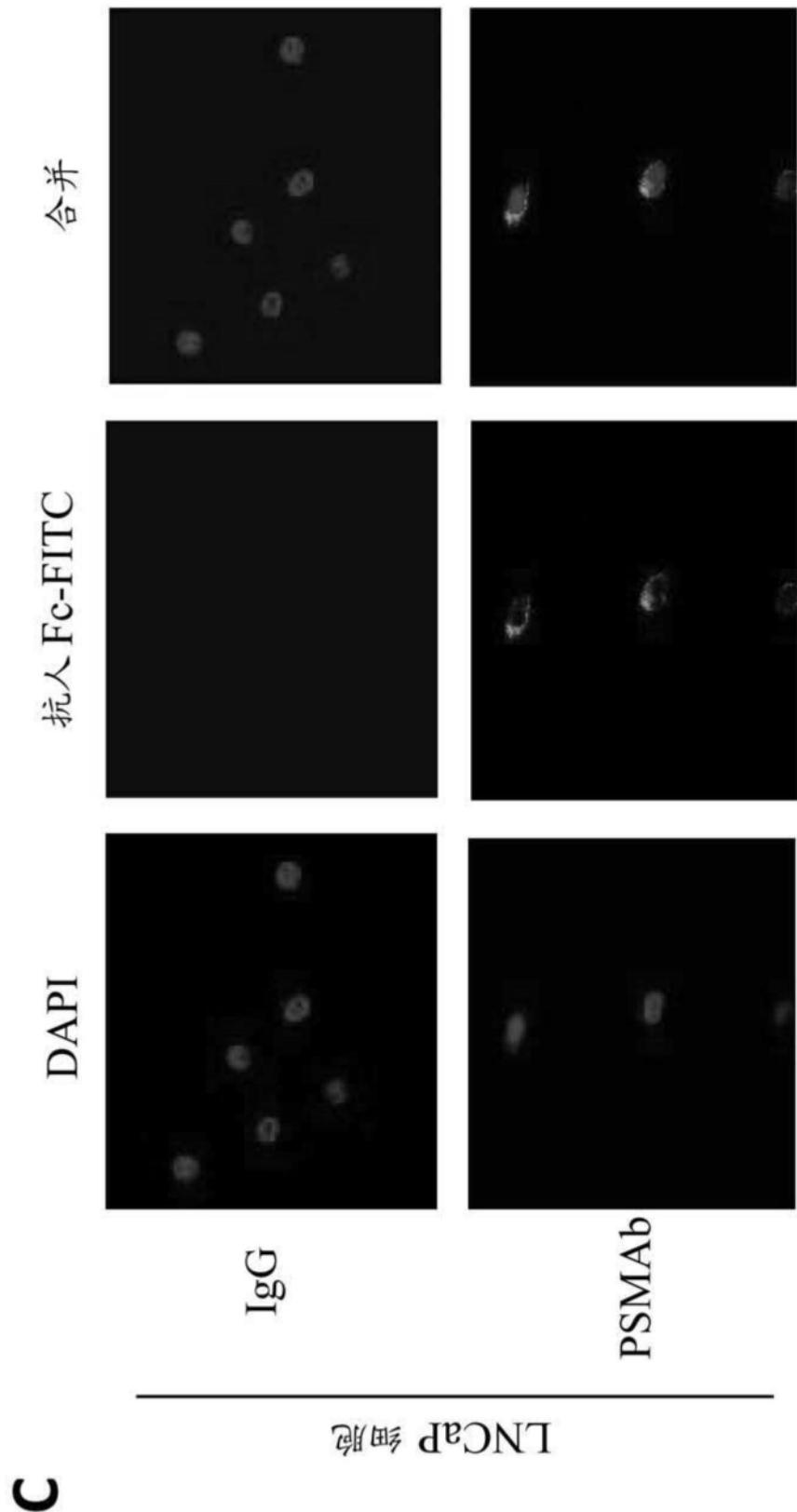


图17C

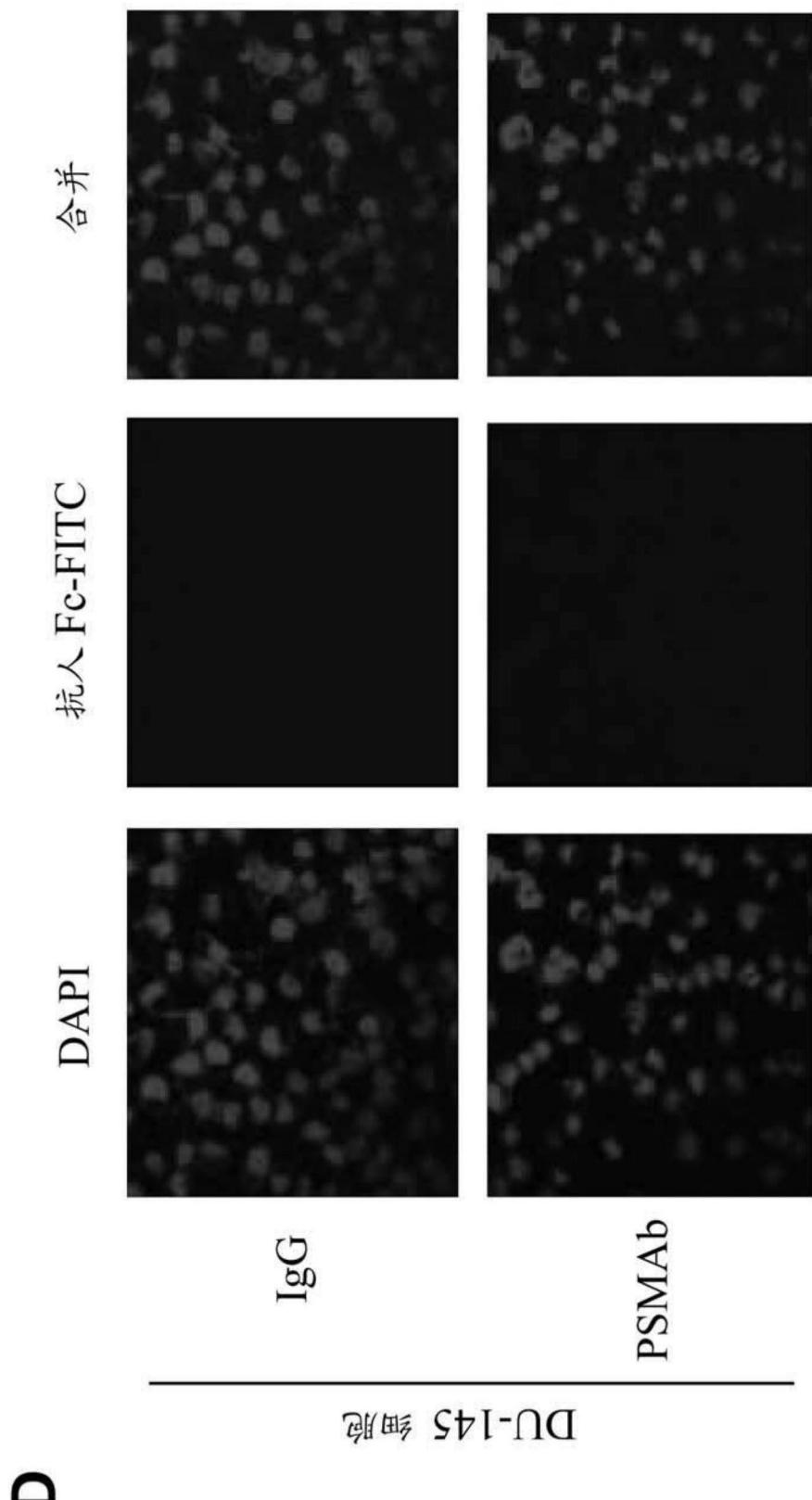


图17D

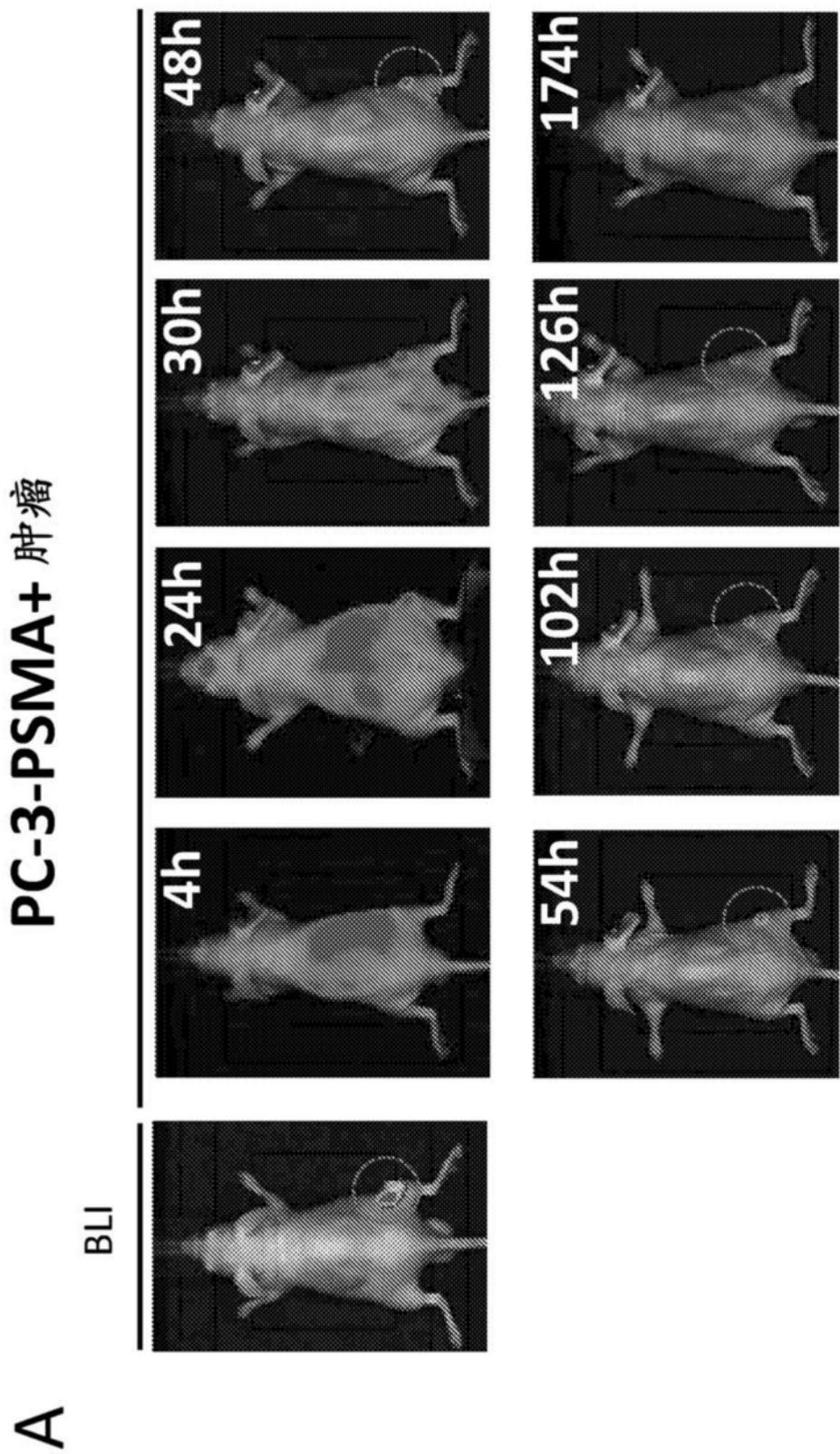


图18A

PC3-PSMA- 肺瘤  
B

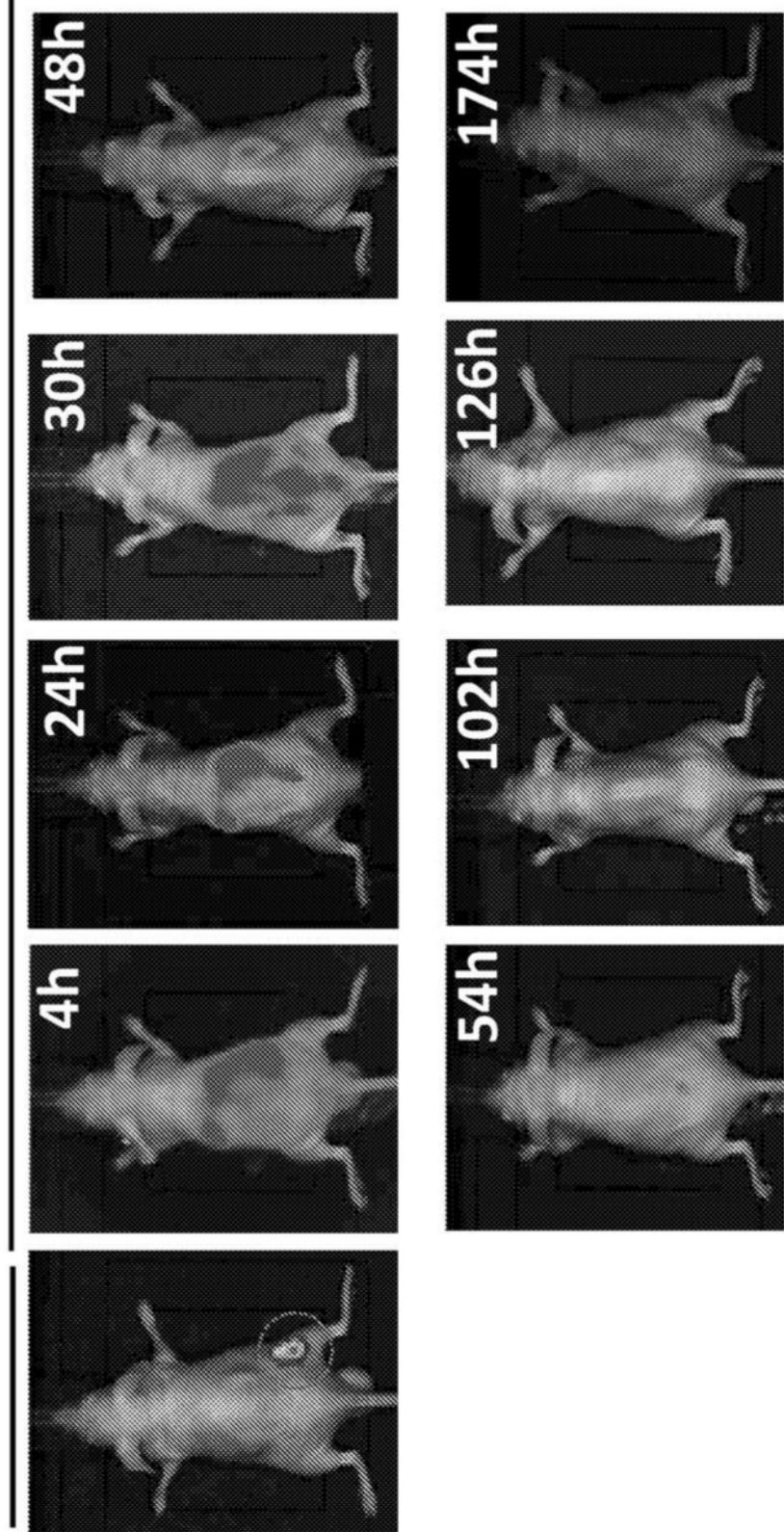
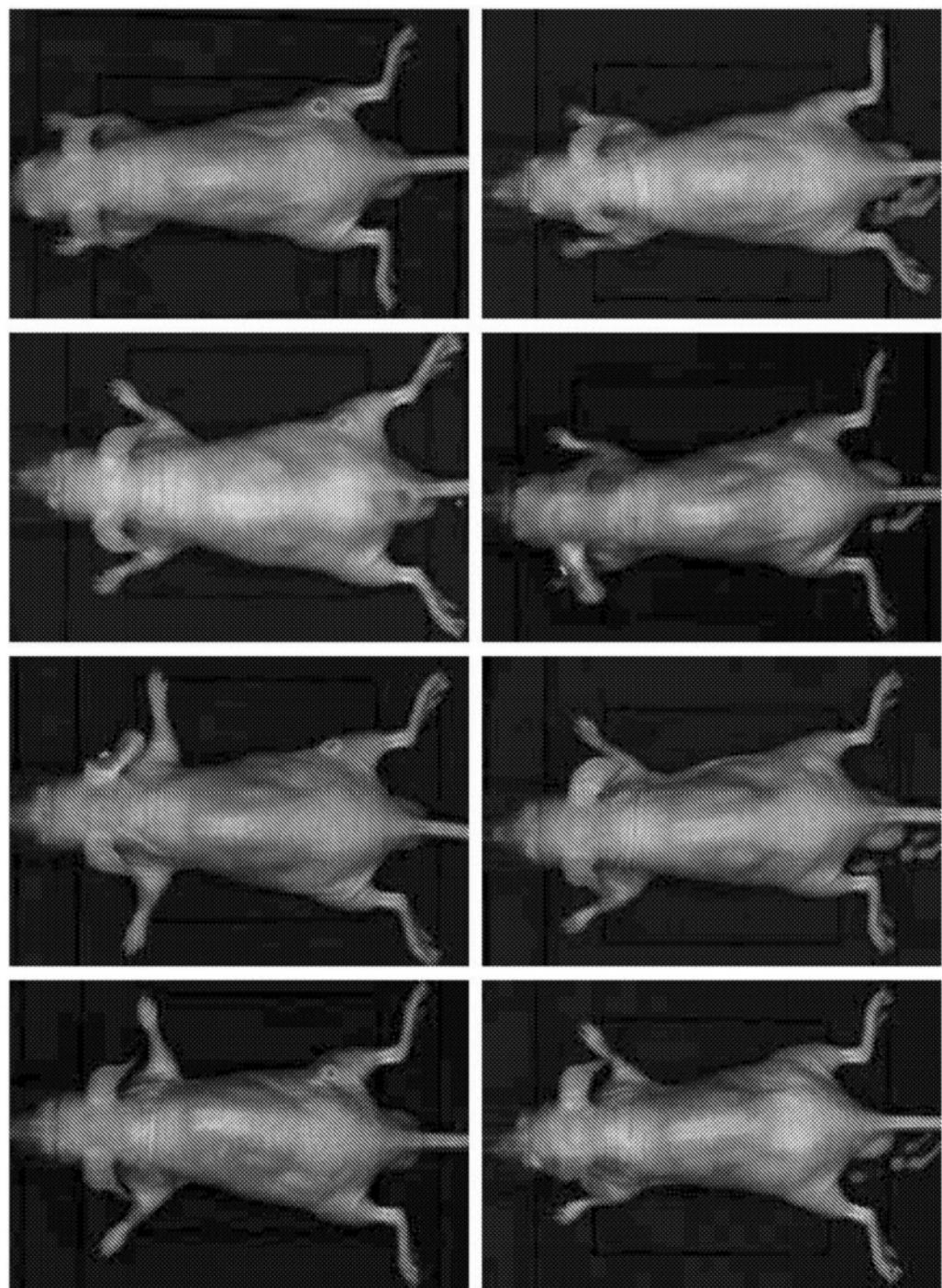


图18B



C

PC3-PSMA+

PC3-PSMA-

图18C

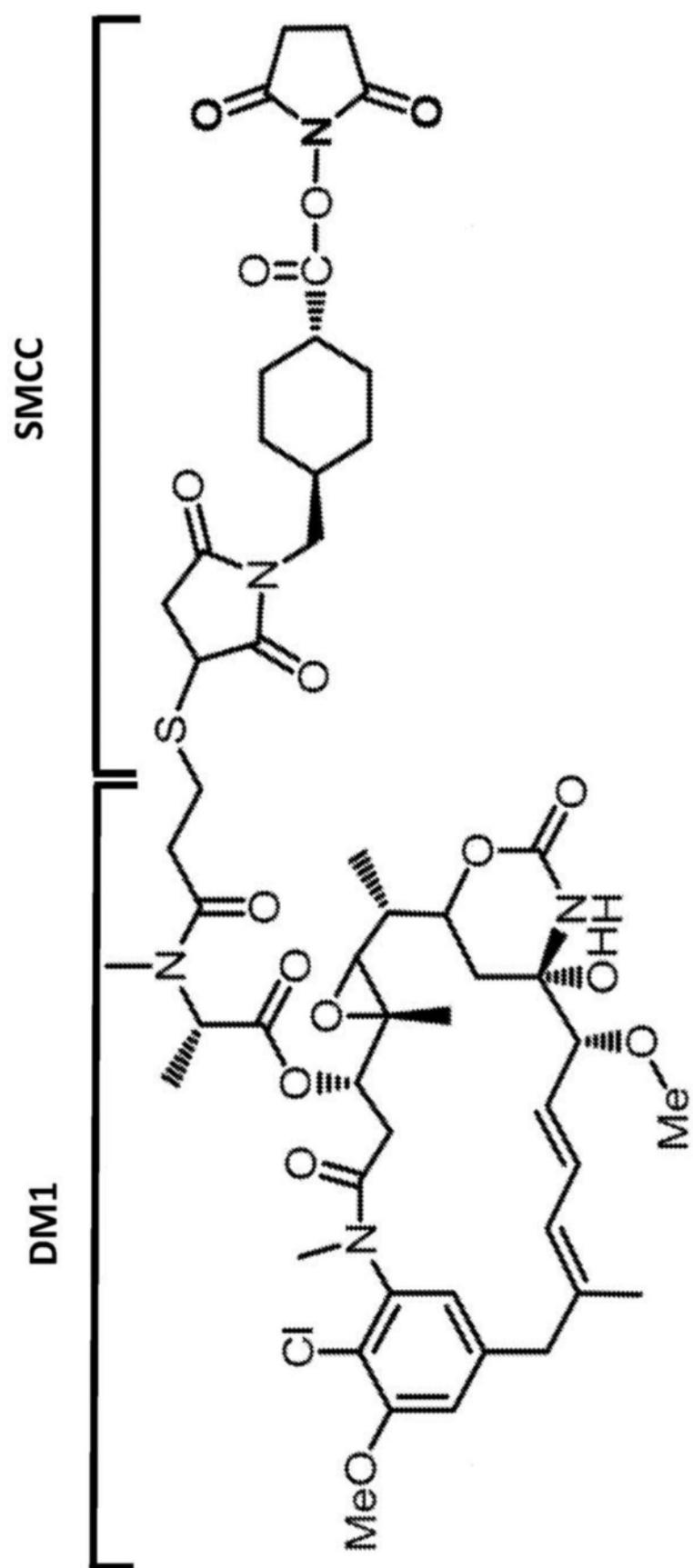


图19

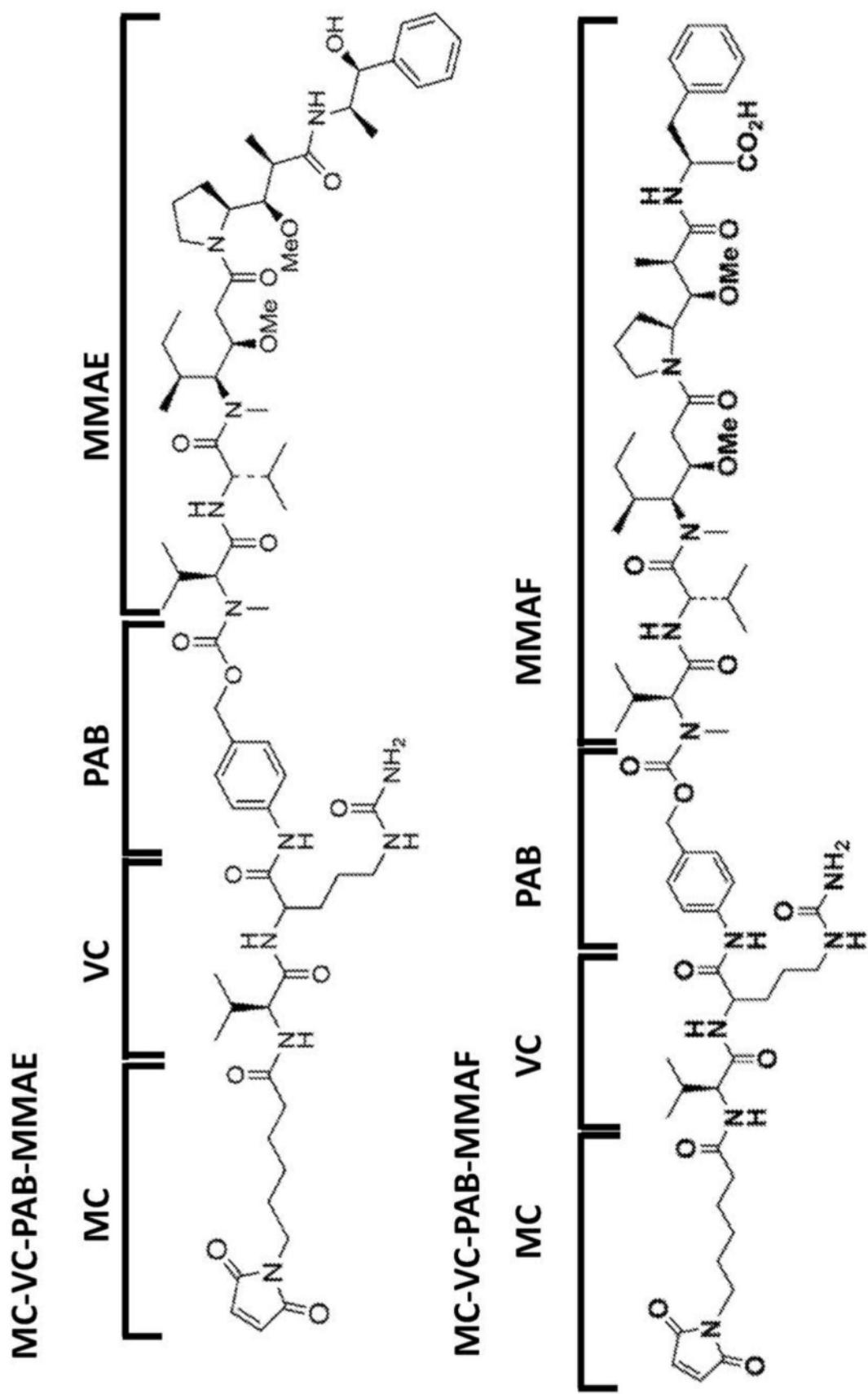


图20

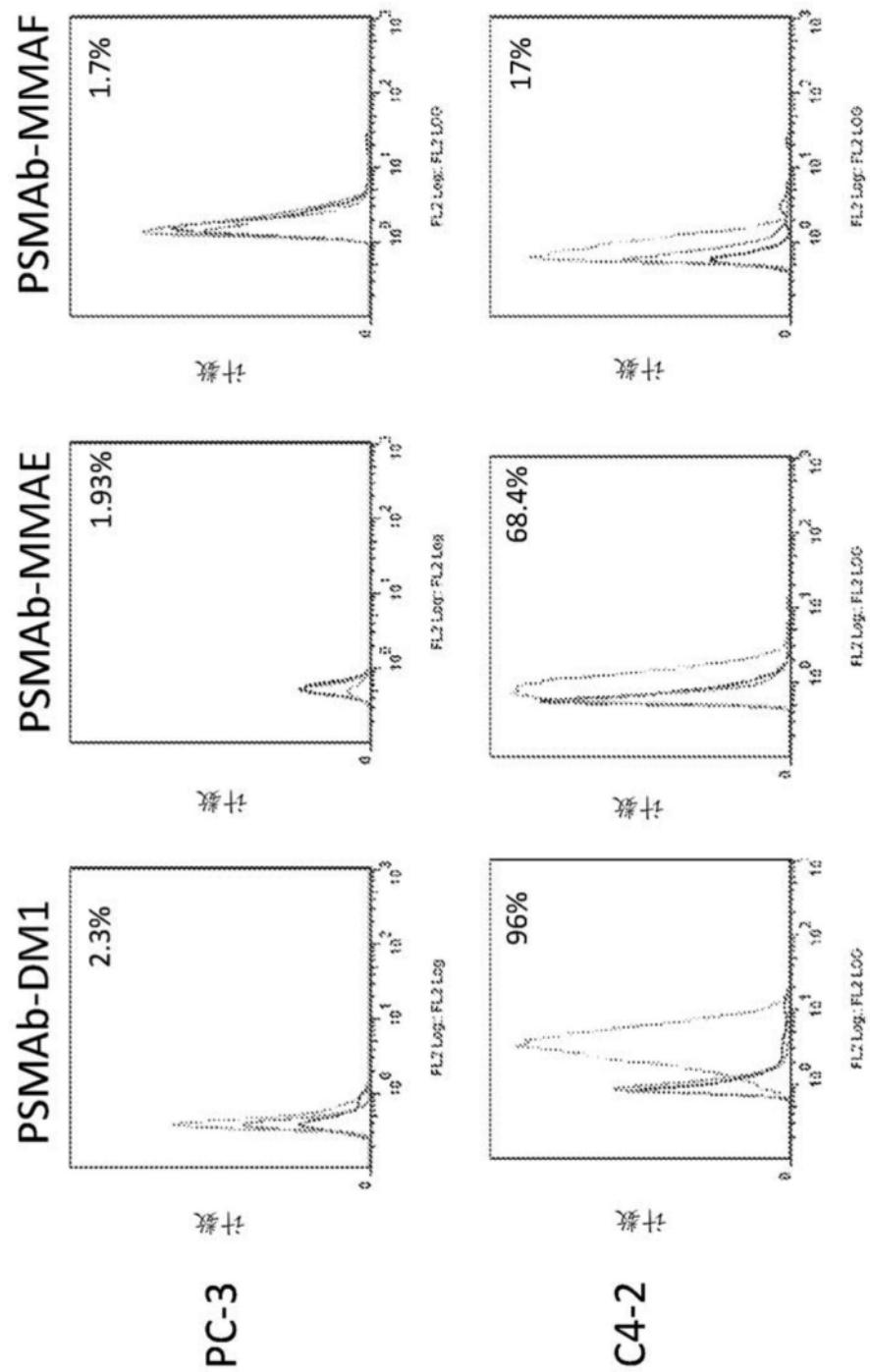


图21

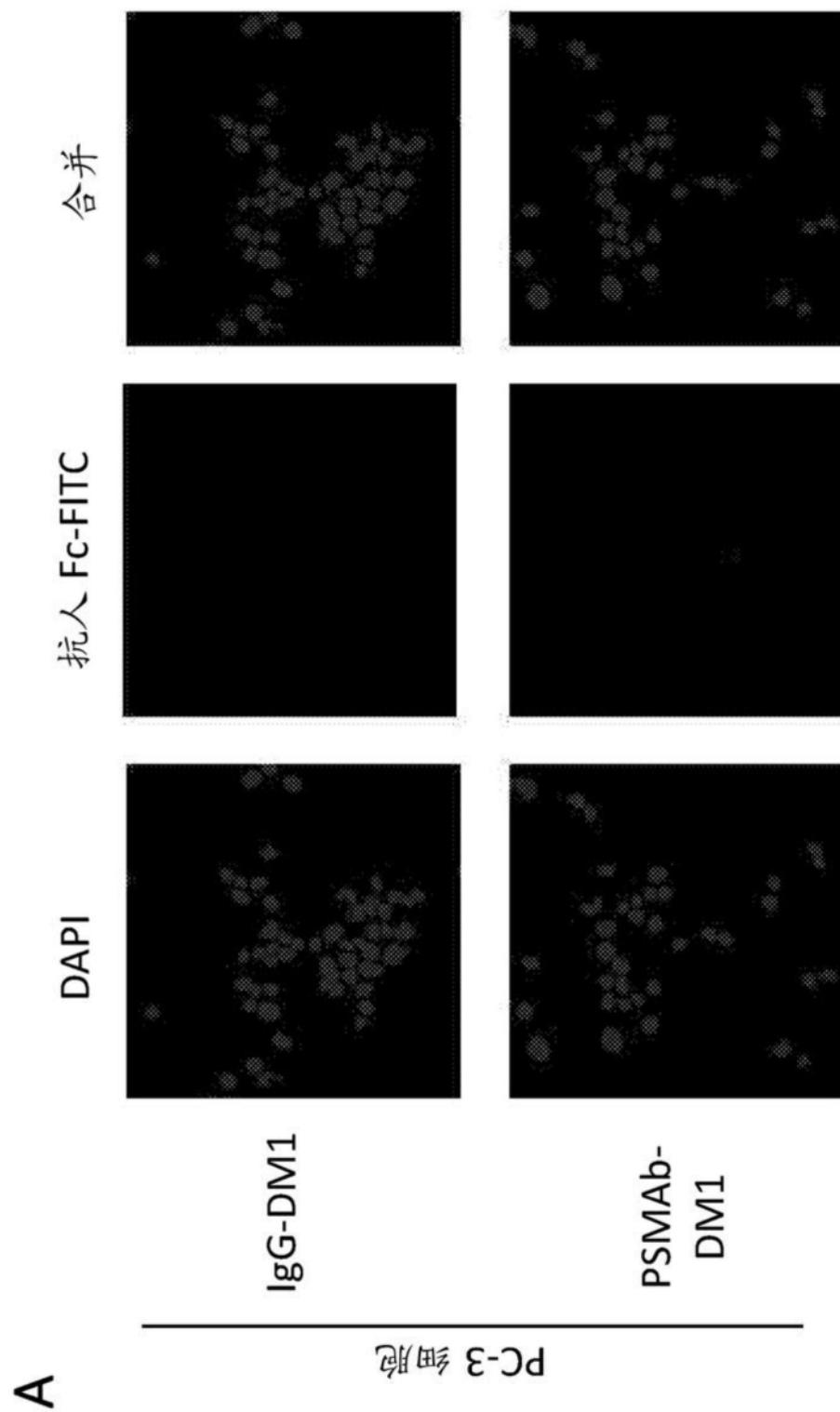


图22A

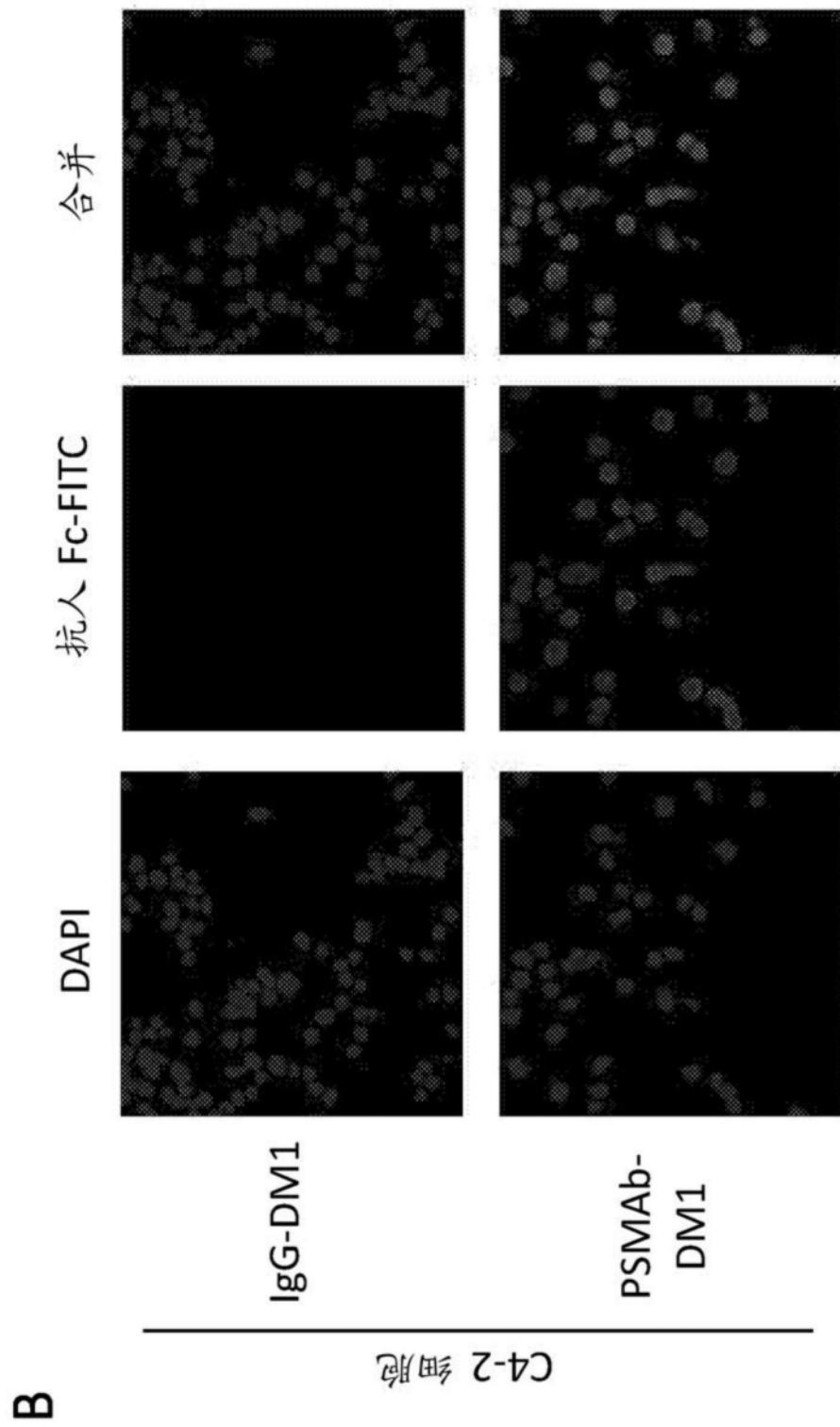


图22B

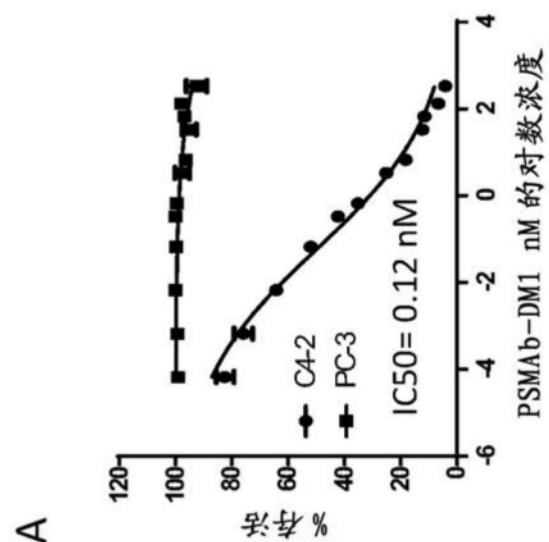


图23A

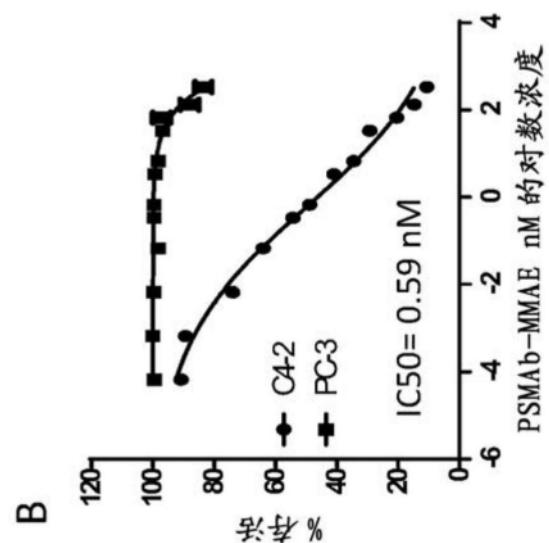


图23B

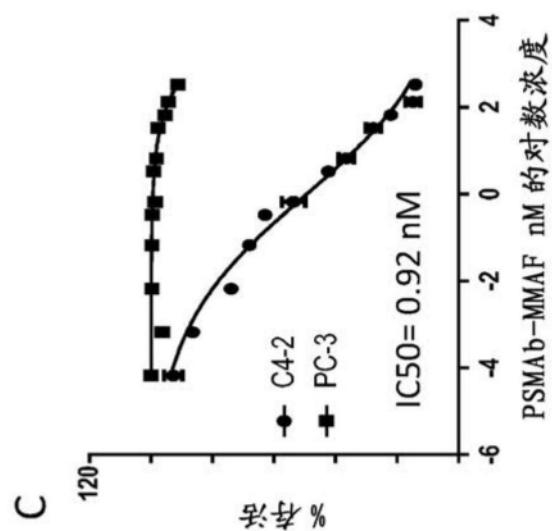


图23C

## C4-2 细胞

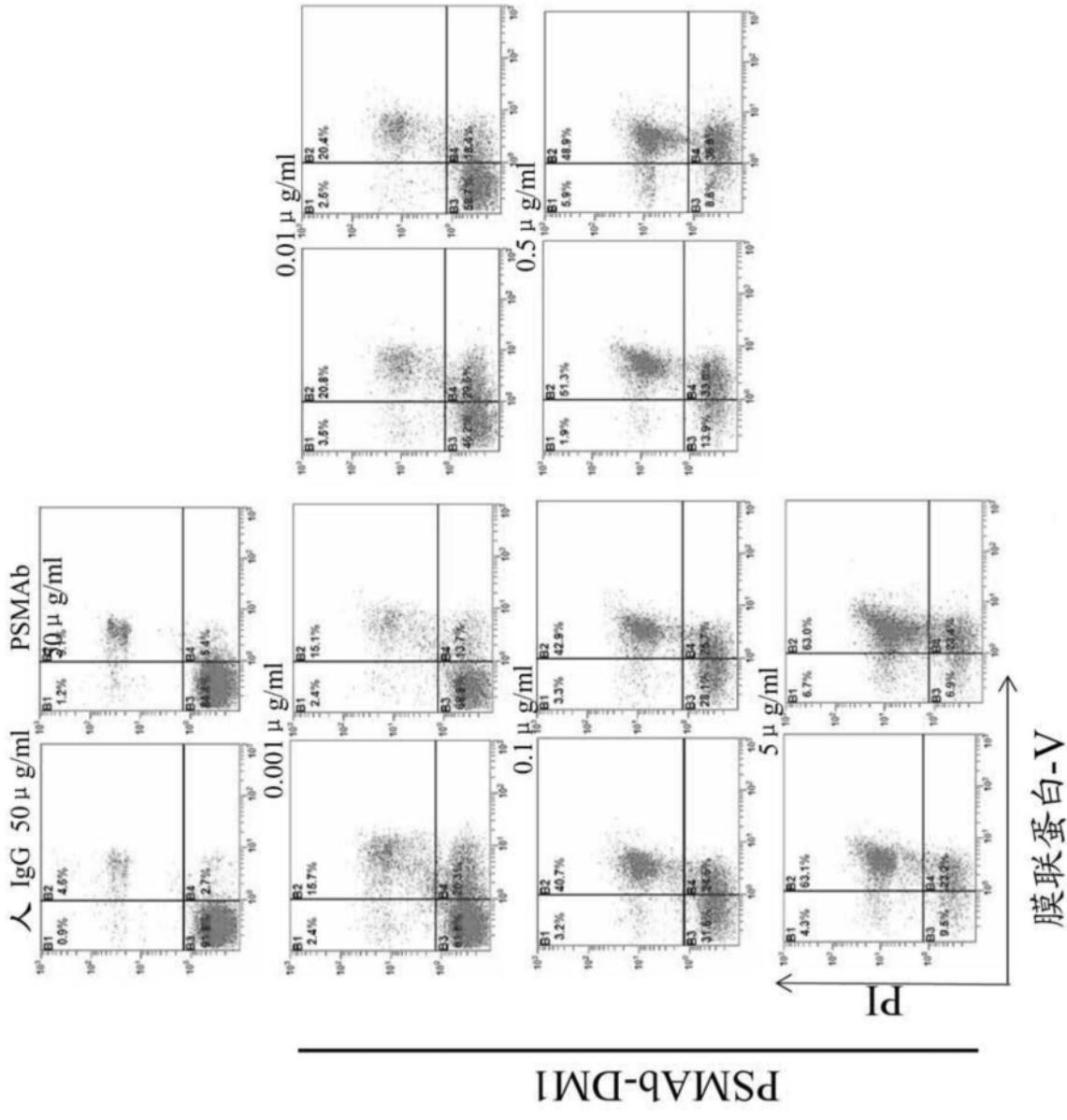


图24A

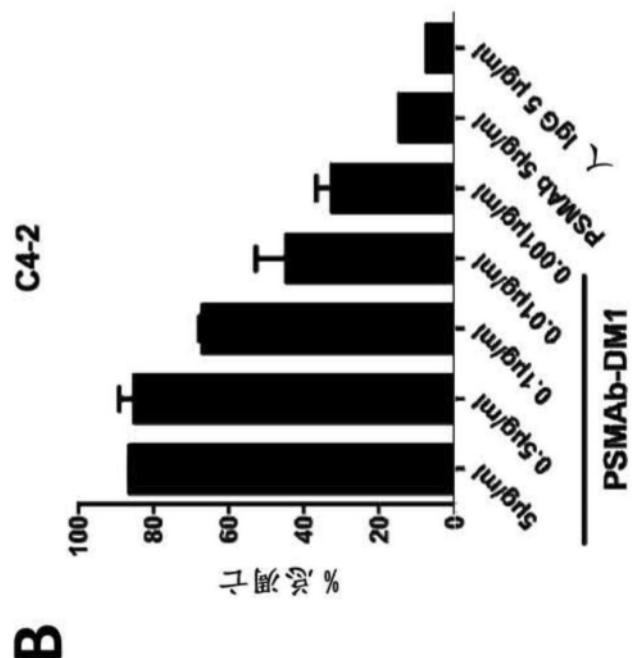
**B**

图24B

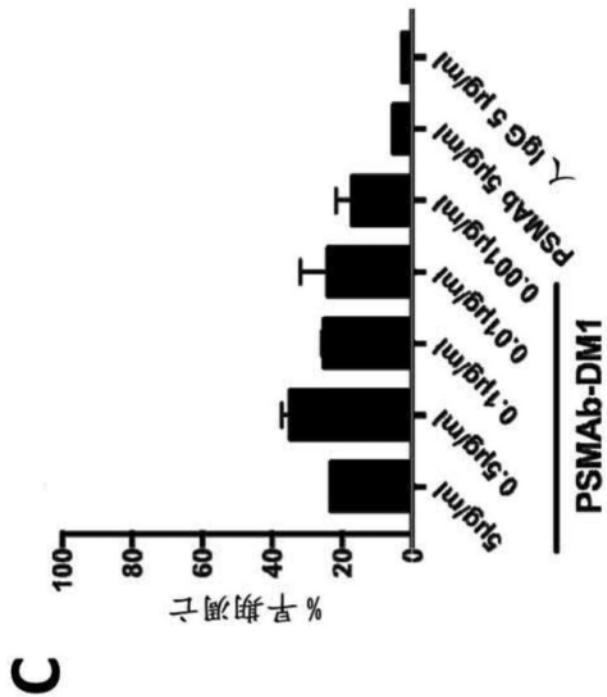
**C**

图24C

## PC-3 细胞

D

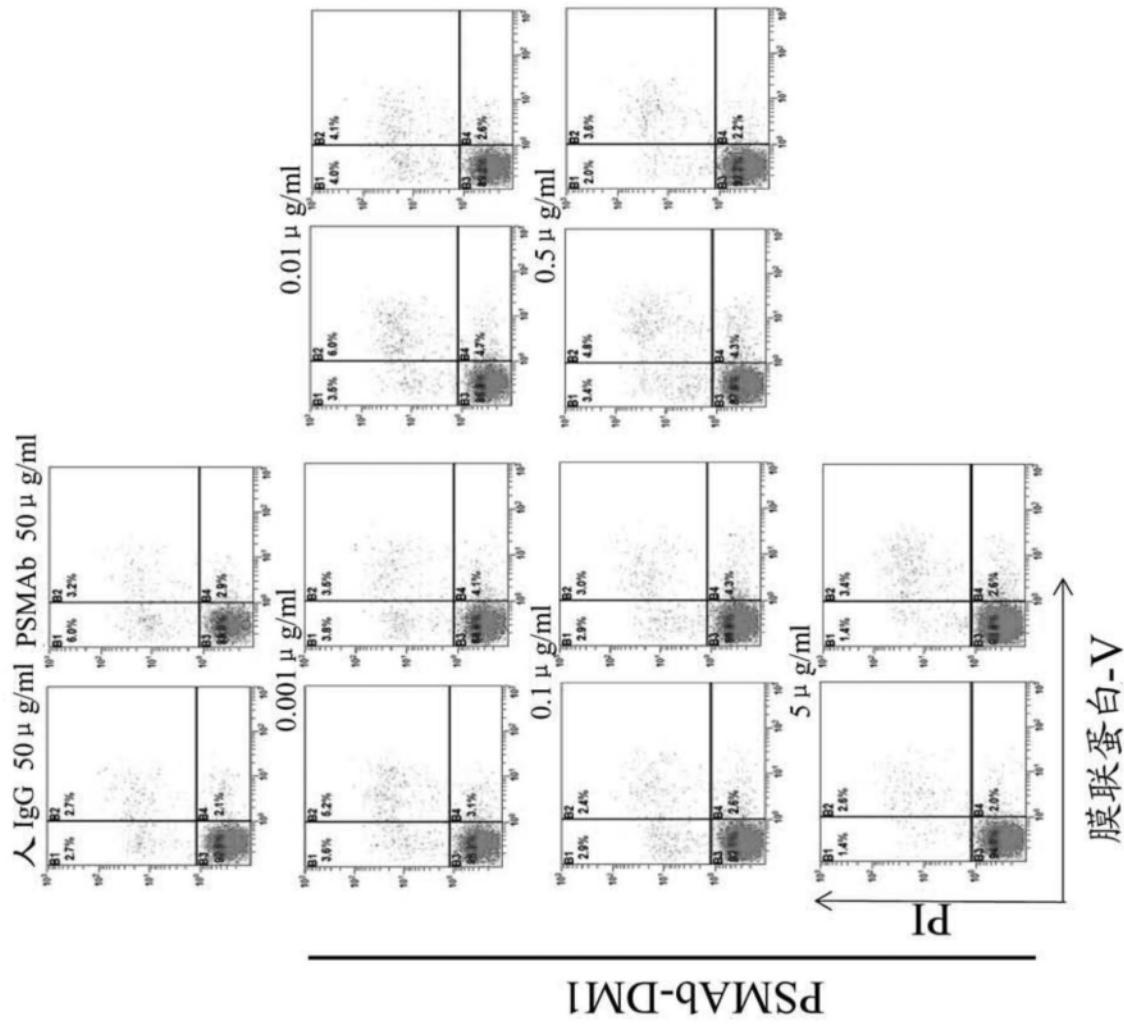


图24D

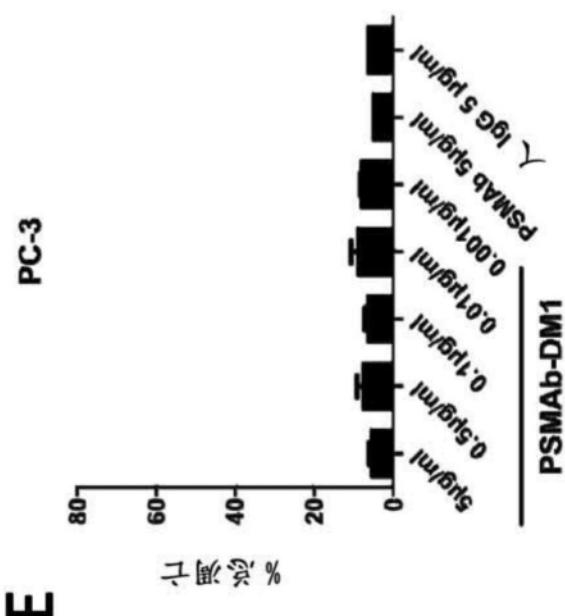


图24E

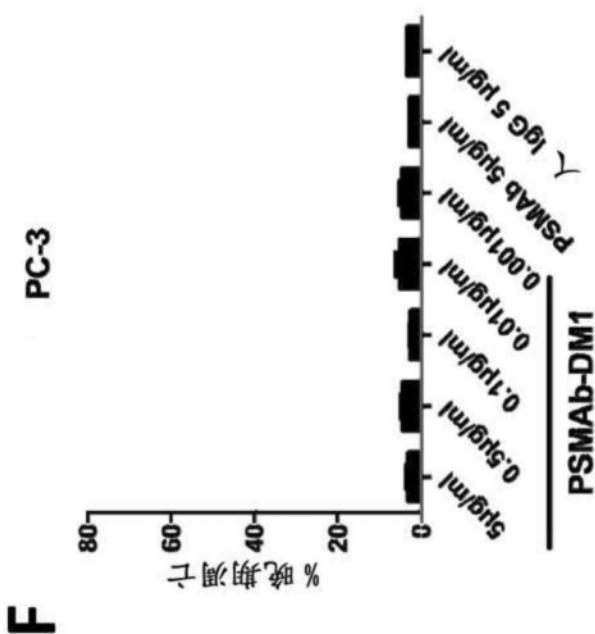
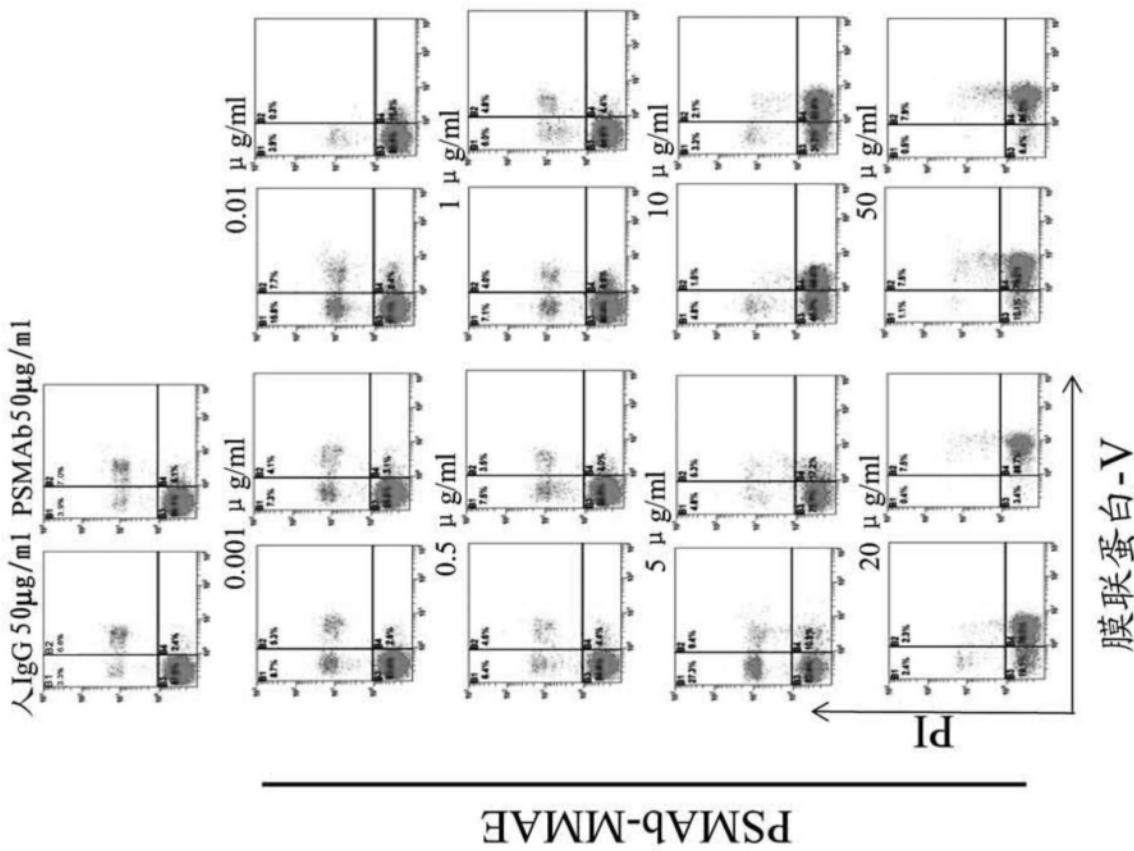


图24F

C4-2 细胞

G



PSMAb-MAAE

膜联蛋白-V

图24G

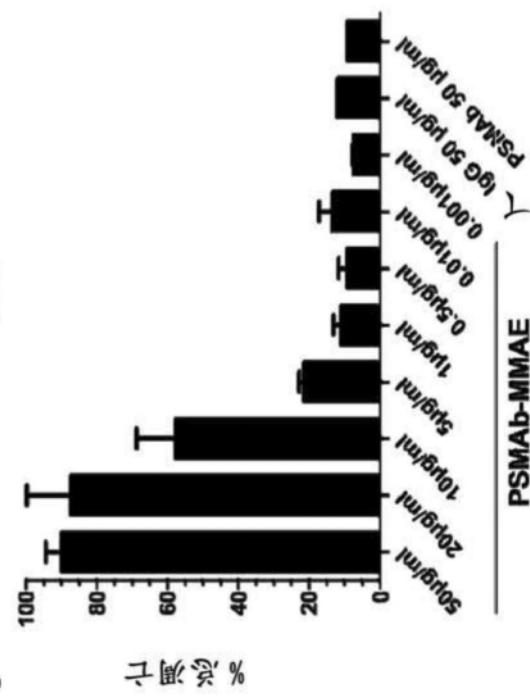
C4-2  
H

图24H

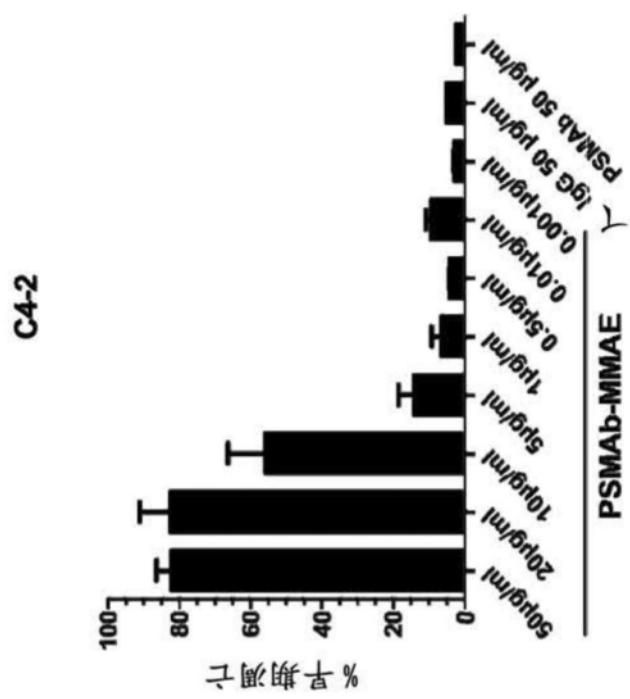
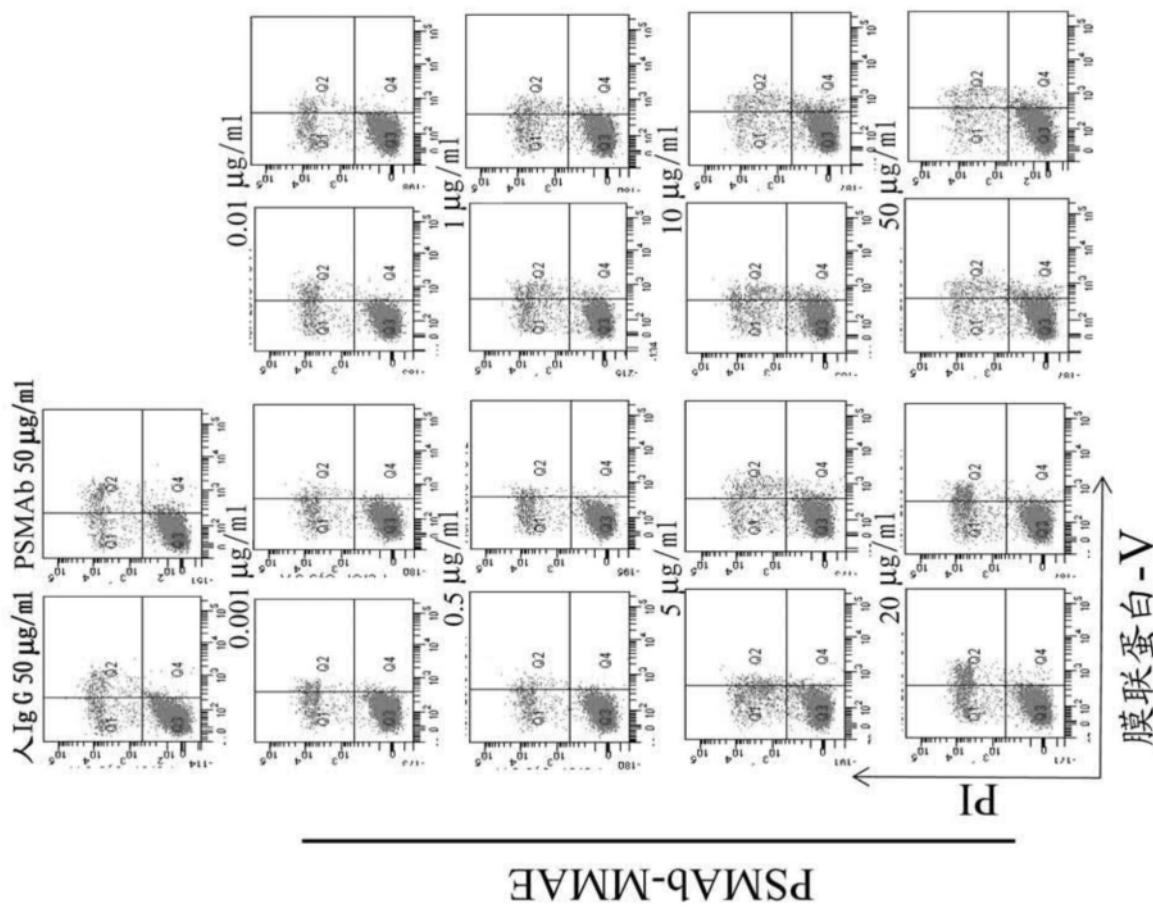


图24I

PC-3 细胞



J

PSMAb-MMAE

图24J

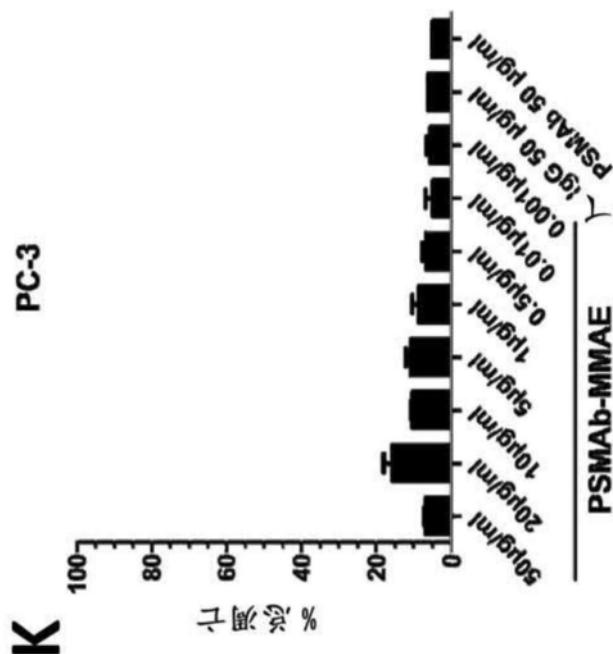


图24K

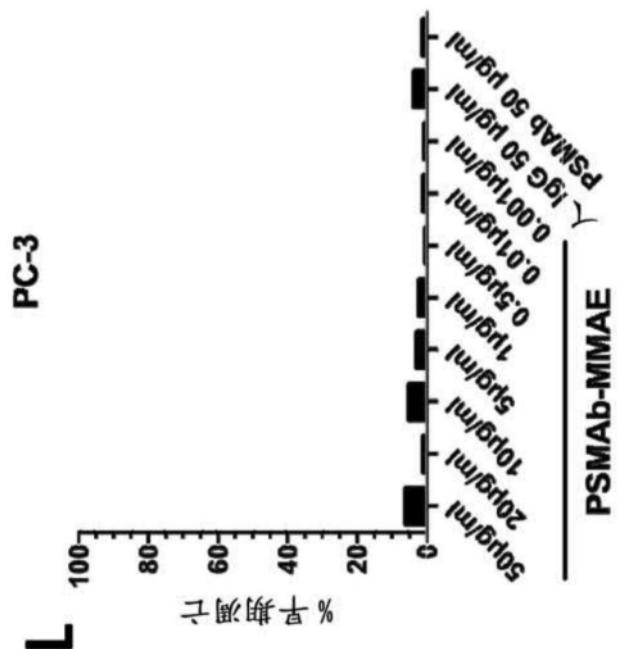


图24L

## C4-2 细胞

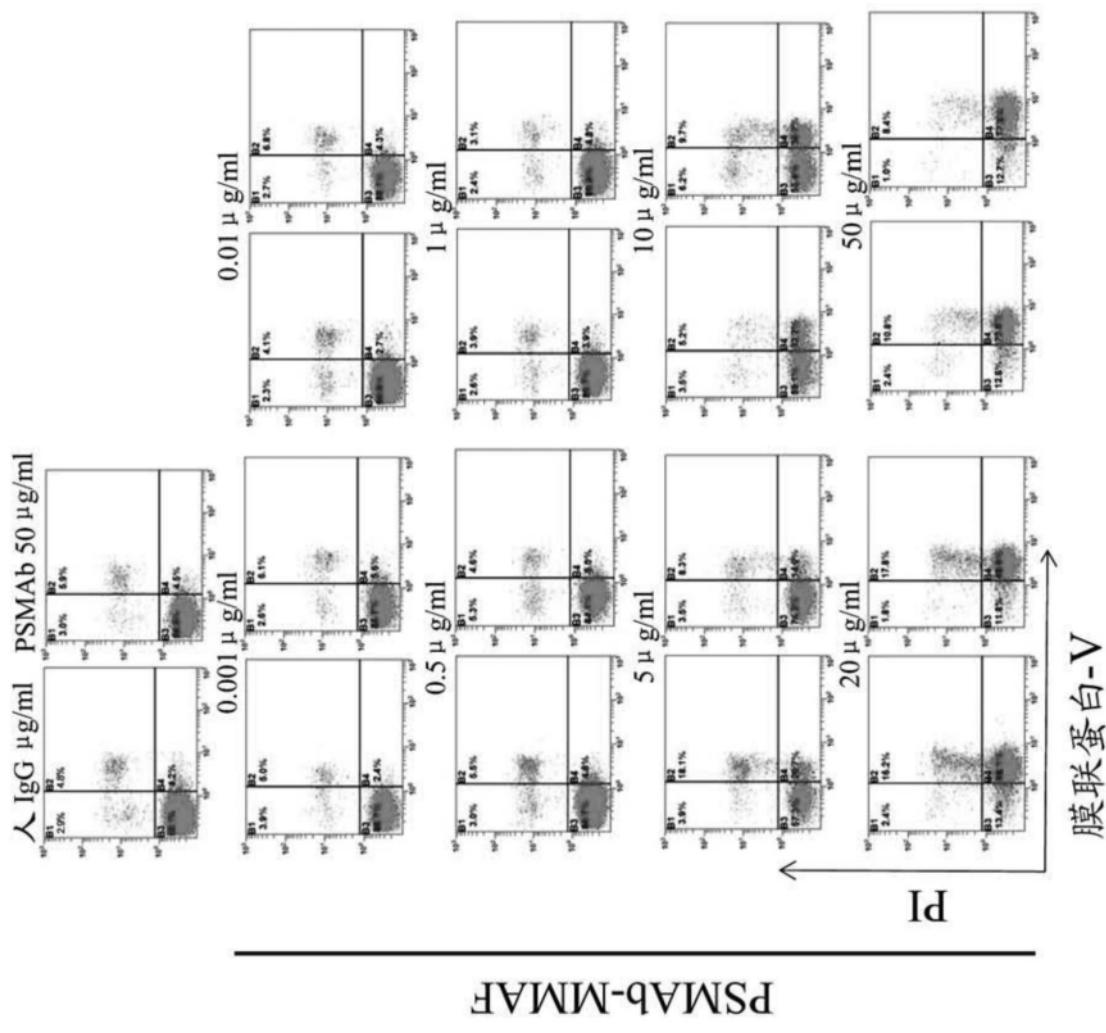


图 24M

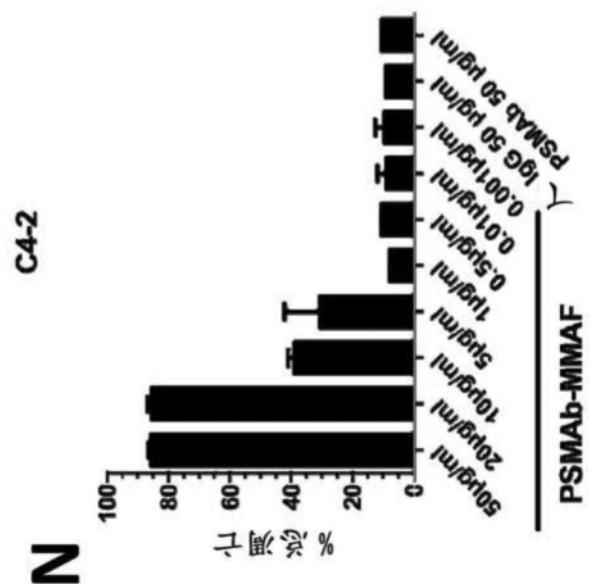


图24N

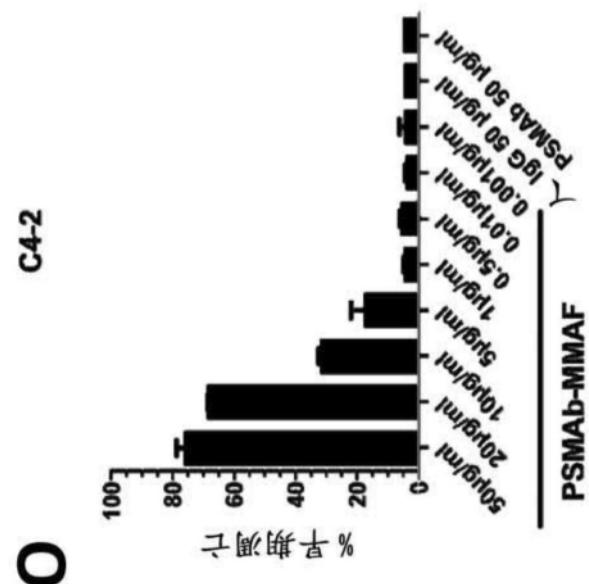


图24O

## PC-3 细胞

P

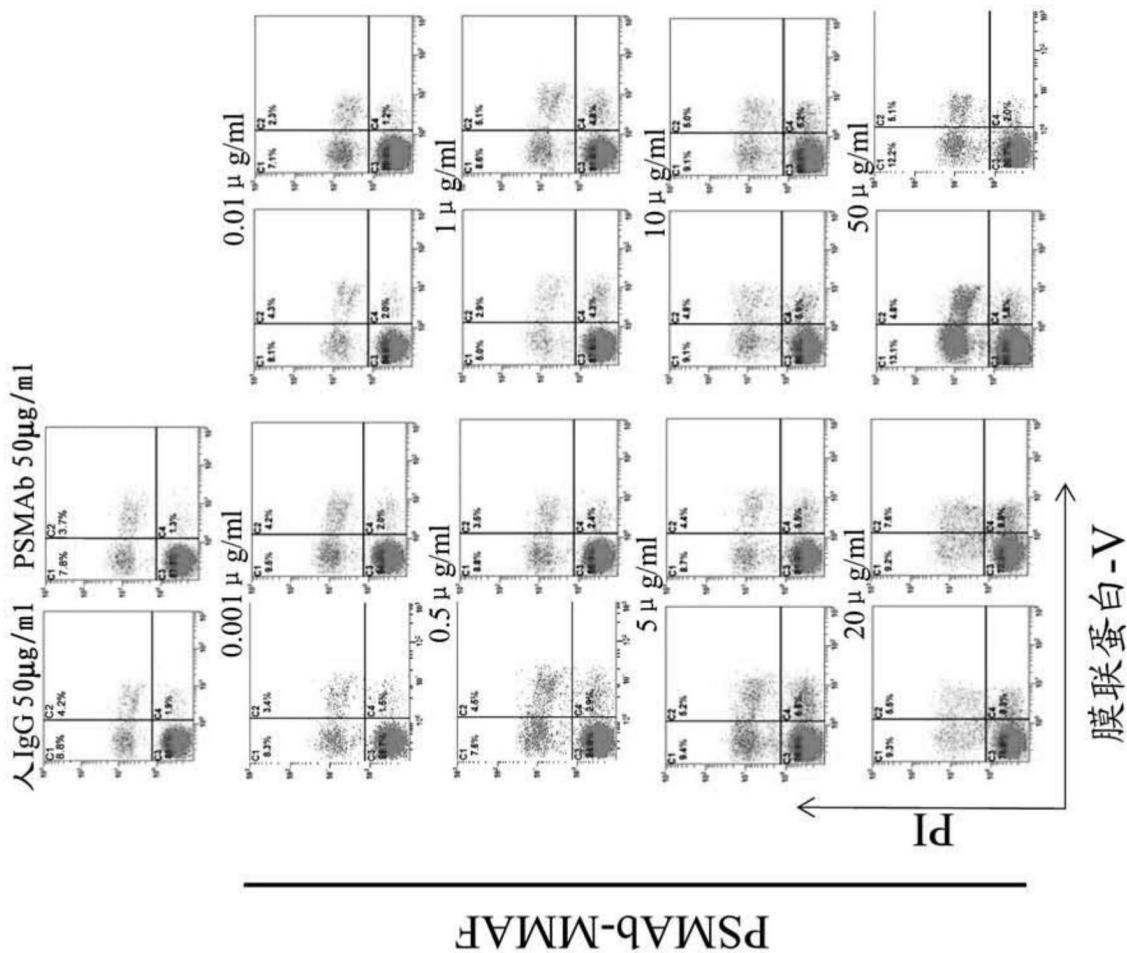


图24P

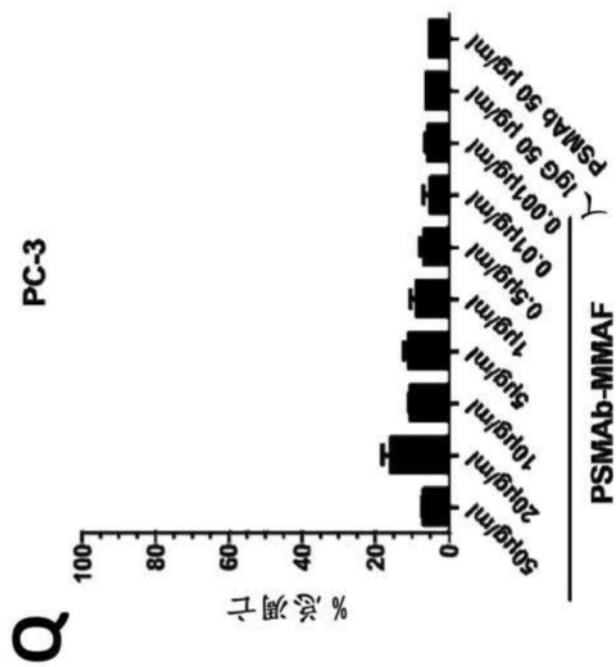


图24Q

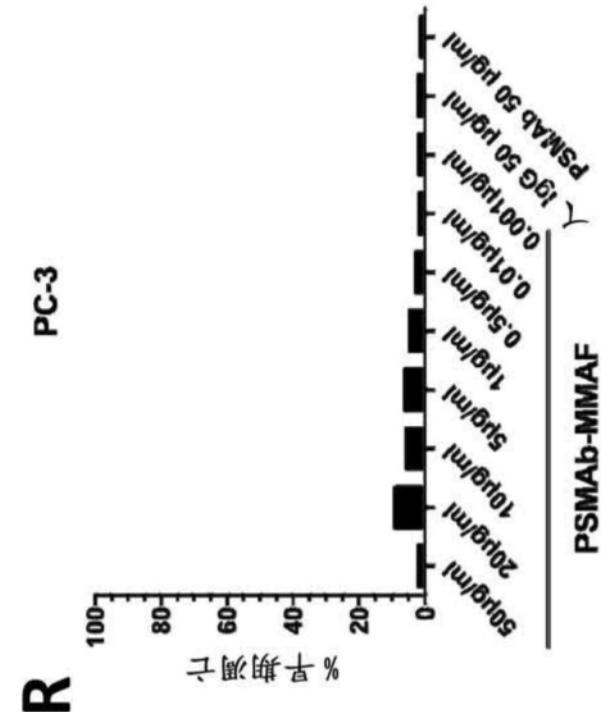


图24R

BS-FC 形式

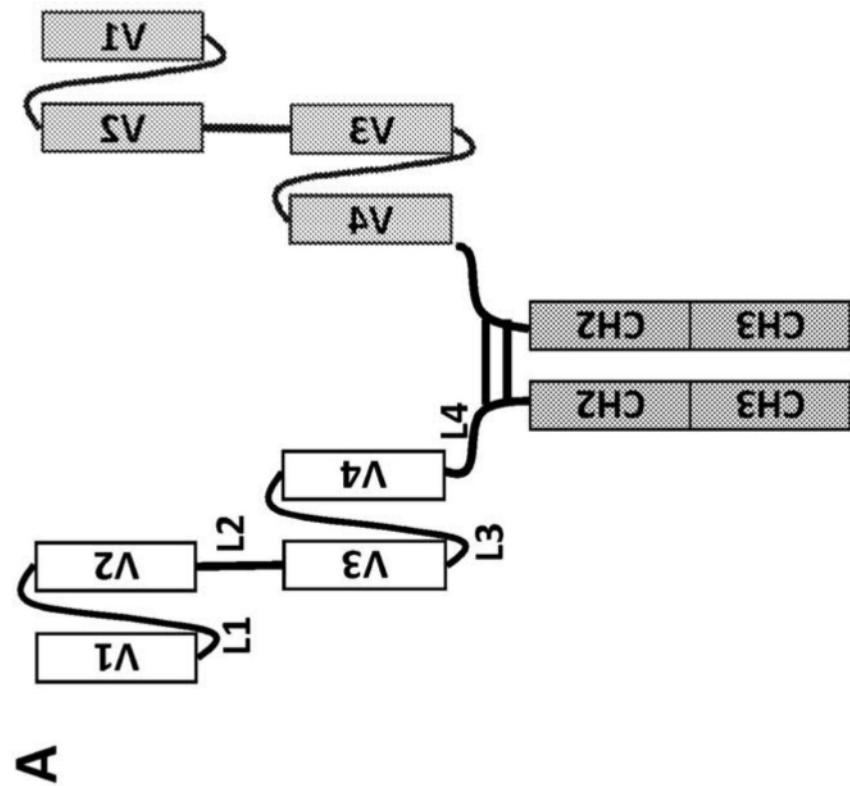


图25A

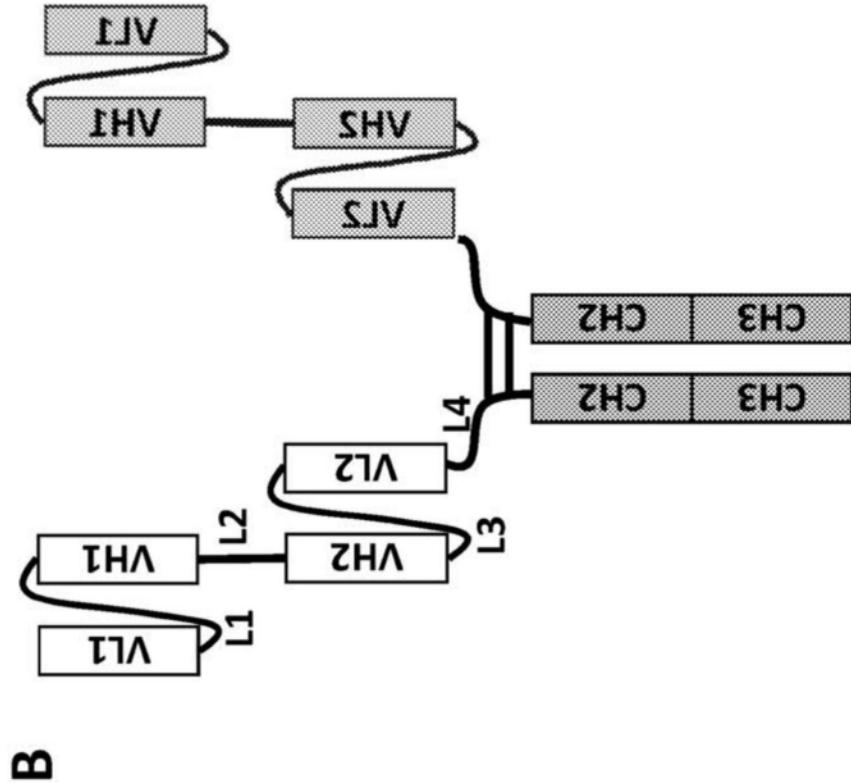


图25B

BS-FC 形式

C

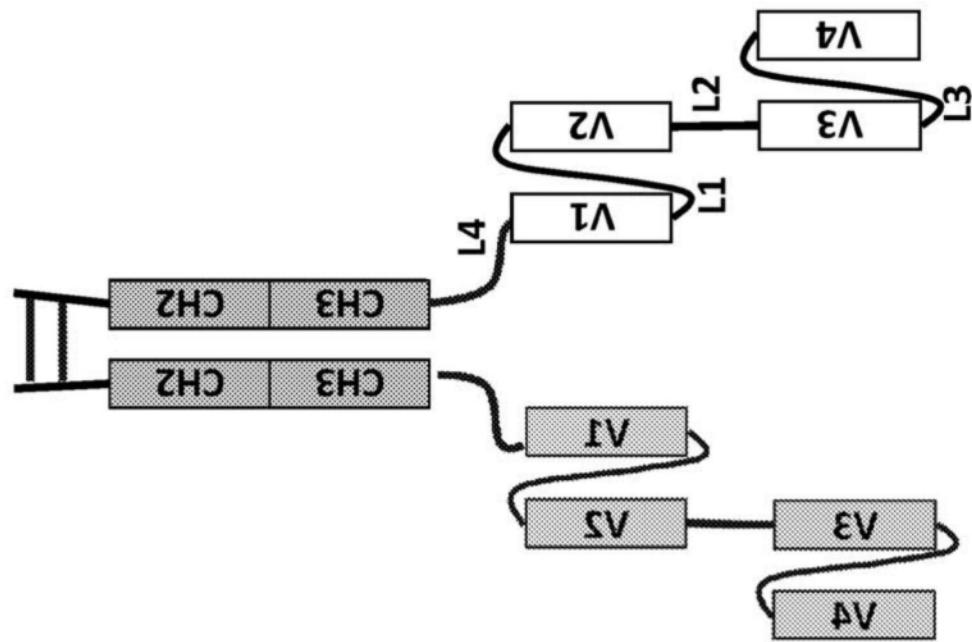


图25C

D

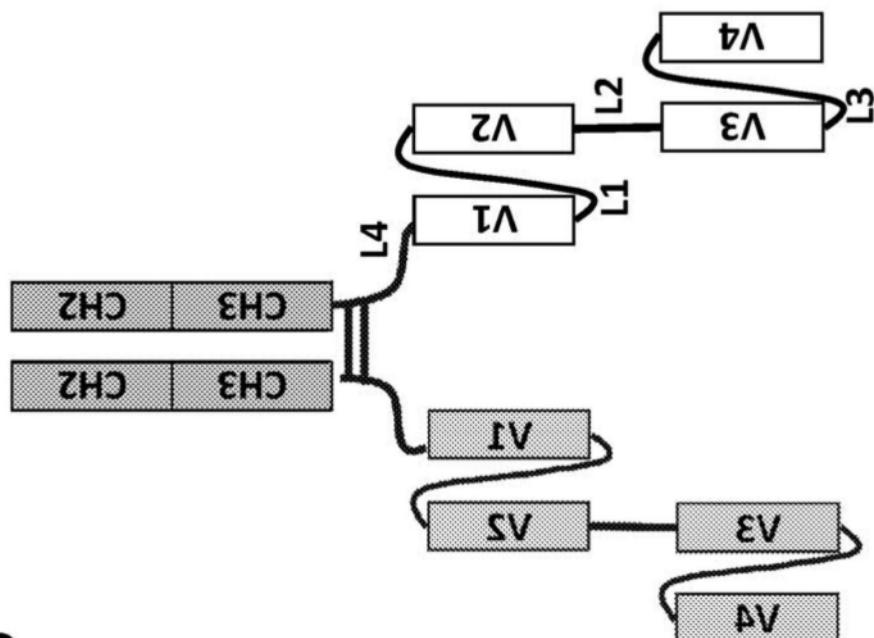


图25D