



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106397593 B

(45)授权公告日 2019.09.10

(21)申请号 201610626384.7

C12N 7/01(2006.01)

(22)申请日 2016.08.02

C07K 19/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/68(2006.01)

申请公布号 CN 106397593 A

G01N 33/574(2006.01)

(43)申请公布日 2017.02.15

A61K 39/395(2006.01)

(66)本国优先权数据

A61K 39/44(2006.01)

201510481235.1 2015.08.03 CN

A61K 47/68(2017.01)

(73)专利权人 科济生物医药(上海)有限公司

A61K 38/19(2006.01)

地址 200031 上海市徐汇区银都路466号3  
号楼4层

A61K 38/20(2006.01)

A61K 38/21(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(72)发明人 王华茂 宋波

(56)对比文件

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公  
司 31100

CN 101633693 A,2010.01.27,

CN 103596985 A,2014.02.19,

CN 104140974 A,2014.11.12,

代理人 陈静

CN 102634486 A,2012.08.15,

(51)Int.Cl.

US 2014170114 A1,2014.06.19,

CN 103833852 A,2014.06.04,

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

审查员 张临政

权利要求书3页 说明书33页

序列表44页 附图5页

(54)发明名称

抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的抗体及其应用

(57)摘要

本发明涉及抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 (GPC3)的抗体及其应用。本发明揭示了新的特异性识别GPC3的抗体,包括单链抗体和人源化抗体。本发明的抗体可以被应用于制备靶向性抗肿瘤药物以及诊断肿瘤的药物。

1. 一种特异性识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的抗体,其特征在于,含有重链可变区和轻链可变区,其重链可变区包含:SEQ ID NO:73所示氨基酸序列的CDR1,SEQ ID NO:74所示氨基酸序列的CDR2,SEQ ID NO:75所示氨基酸序列的CDR3;其轻链可变区包含:SEQ ID NO:76所示氨基酸序列的CDR1,SEQ ID NO:77所示氨基酸序列的CDR2,SEQ ID NO:78所示氨基酸序列的CDR3。

2. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述的抗体是人源化的抗体。

3. 如权利要求2所述的抗体,其特征和在于,该抗体具有SEQ ID NO:58所示氨基酸序列的重链可变区和SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的轻链可变区。

4. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,该抗体具有SEQ ID NO:81所示氨基酸序列的重链可变区和SEQ ID NO:82所示氨基酸序列的轻链可变区。

5. 编码权利要求1-4任一所述的抗体的核酸。

6. 一种表达载体,其包含权利要求5所述的核酸。

7. 一种宿主细胞,其包含权利要求6所述的表达载体或基因组中整合有权利要求5所述的核酸。

8. 权利要求1-4任一所述的抗体的用途,用于制备特异性靶向表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤细胞的靶向性药物,抗体药物偶联物或多功能抗体;或

用于制备诊断肿瘤的试剂,该肿瘤表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3;或

用于制备嵌合抗原受体修饰的免疫细胞。

9. 一种多功能免疫缀合物,其特征在于,所述的多功能免疫缀合物包括:

权利要求1-4任一所述的抗体;以及

与之连接的功能性分子;所述的功能性分子选自:靶向肿瘤表面标志物的分子,抑制肿瘤分子,靶向免疫细胞的表面标志物的分子或可检测标记物。

10. 如权利要求9所述的多功能免疫缀合物,其特征在于,所述的靶向肿瘤表面标志物的分子是结合肿瘤表面标志物的抗体或配体;或

所述的抑制肿瘤分子是抗肿瘤的细胞因子或抗肿瘤的毒素。

11. 如权利要求10所述的多功能免疫缀合物,其特征在于,所述的细胞因子包括:IL-12、IL-15、IFN-beta、TNF-alpha。

12. 如权利要求9所述的多功能免疫缀合物,其特征在于,所述的可检测标记物包括:荧光标记物、显色标记物。

13. 如权利要求10所述的多功能免疫缀合物,其特征在于,所述的结合肿瘤表面标志物的抗体是指:识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3以外的其它抗原的抗体,所述的其它抗原包括:EGFR,EGFRvIII,mesothelin,HER2,EphA2,Her3,EpCAM,MUC1,MUC16,CEA,Claudin18.2,叶酸受体,Claudin6,WT1,NY-ESO-1,MAGE3,ASGPR1或CDH16。

14. 如权利要求9所述的多功能免疫缀合物,其特征在于,所述的靶向免疫细胞的表面标志物的分子是结合免疫细胞表面标志物的抗体,其与权利要求1-4任一所述的抗体形成T细胞参与的双功能抗体。

15. 如权利要求14所述的多功能免疫缀合物,其特征在于,所述的结合免疫细胞表面标志物的抗体是抗CD3抗体。

16. 如权利要求15所述的多功能免疫缀合物,其特征在于,其是融合多肽,权利要求1-4

任一所述的抗体以及与之连接的功能性分子之间,还包括连接肽。

17. 编码权利要求9-16任一所述的多功能免疫缀合物的核酸。

18. 权利要求9-16任一所述的多功能免疫缀合物的用途,用于制备抗肿瘤药物,或用于制备诊断肿瘤的试剂,该肿瘤表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3;或用于制备嵌合抗原受体修饰的免疫细胞。

19. 如权利要求18所述的用途,其特征在于,所述免疫细胞包括:T淋巴细胞、NK细胞或者NKT淋巴细胞。

20. 包含权利要求1-3任一所述的抗体的嵌合抗原受体,其特征在于,所述的嵌合抗原受体包含顺序连接的:权利要求1-3任一所述的抗体,跨膜区和胞内信号区;所述的胞内信号区选自:CD3 $\zeta$ ,Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ ,CD27,CD28,CD137,CD134,MyD88,CD40的胞内信号区序列,或其组合。

21. 如权利要求20所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述的跨膜区包含CD8或CD28的跨膜区。

22. 如权利要求20所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述的嵌合抗原受体包括如下的顺序连接的抗体,跨膜区和胞内信号区:

权利要求1-3任一所述的抗体、CD8和CD3 $\zeta$ ;

权利要求1-3任一所述的抗体、CD8、CD137和CD3 $\zeta$ ;

权利要求1-3任一所述的抗体、CD28分子的跨膜区、CD28分子的胞内信号区和CD3 $\zeta$ ;或

权利要求1-3任一所述的抗体、CD28分子的跨膜区、CD28分子的胞内信号区、CD137和CD3 $\zeta$ 。

23. 如权利要求20所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述的抗体是单链抗体或结构域抗体。

24. 如权利要求20所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述的嵌合抗原受体具有:

SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列;

SEQ ID NO:88所示的氨基酸序列;或

SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列。

25. 编码权利要求20-24任一所述的嵌合抗原受体的核酸。

26. 一种表达载体,其特征在于,其包含权利要求25所述的核酸。

27. 一种病毒,其特征在于,所述的病毒包含权利要求26所述载体。

28. 权利要求20-24任一所述的嵌合抗原受体、或权利要求25所述的核酸、或权利要求26所述的表达载体、或权利要求27所述的病毒的用途,用于制备靶向表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤的基因修饰的免疫细胞。

29. 如权利要求28,其特征在于,所述的表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤包括:肝癌,黑色素瘤,卵巢透明细胞癌、卵黄囊瘤、神经母细胞瘤。

30. 一种基因修饰的免疫细胞,其特征在于,其转导有权利要求25所述的核酸,或权利要求26所述的表达载体或权利要求27所述的病毒;或其表面表达权利要求20-24任一所述的嵌合抗原受体。

31. 如权利要求30所述的免疫细胞,其特征在于,其还携带外源的细胞因子的编码序列。

32. 如权利要求31所述的免疫细胞,其特征在于,所述的细胞因子包括:IL-12,IL-15或IL-21。

33. 如权利要求30所述的免疫细胞,其特征在于,其还表达另一种嵌合抗原受体,该受体不含有CD3 $\zeta$ ,但含有CD28的胞内信号结构域、CD137的胞内信号结构域或者这两者的组合。

34. 如权利要求30所述的免疫细胞,其特征在于,其还表达趋化因子受体。

35. 如权利要求34所述的免疫细胞,其特征在于,所述的趋化因子受体包括:CCR2。

36. 如权利要求30所述的免疫细胞,其特征在于,其还表达能降低PD-1表达的siRNA或者阻断PD-L1的蛋白。

37. 如权利要求30所述的免疫细胞,其特征在于,其还表达安全开关。

38. 如权利要求37所述的免疫细胞,其特征在于,所述的安全开关包括:iCaspase-9, Truncated EGFR或RQR8。

39. 如权利要求30所述的免疫细胞,其特征在于,所述的免疫细胞包括:T淋巴细胞,NK细胞或NKT细胞。

40. 权利要求30-39任一所述的基因修饰的免疫细胞的用途,其特征在于,用于制备抑制肿瘤的药物,所述的肿瘤是表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤。

41. 药物组合物,其特征在于,其包括:

权利要求1-4任一所述的抗体或编码该抗体的核酸;或

权利要求9-16任一所述的免疫缀合物或编码该缀合物的核酸;或

权利要求20-24任一所述的嵌合抗原受体或编码该嵌合抗原受体的核酸;或

权利要求30-39任一所述的基因修饰的免疫细胞。



## 抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤免疫治疗或诊断领域,更具体地,涉及特异识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 (GPC3) 的抗体及其应用。

### 背景技术

[0002] 目前,基于免疫效应细胞的过继性免疫治疗在部分肿瘤中取得了一定的效果,并且该种免疫治疗方法可以克服抗体治疗的上述缺陷,但在大多数肿瘤的疗效仍不能令人满意[Grupp SA,et al.Adoptive cellular therapy.Curr Top Microbiol Immunol.,2011; 344:149-72.].近年来,根据细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte,CTL)对靶细胞的识别特异性依赖于T淋巴细胞受体(T Cell Receptor,TCR)的发现,将针对肿瘤细胞相关抗原的抗体的scFv与T淋巴细胞受体的CD3 $\zeta$ 或Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 等胞内信号激活基序融合成嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor,CAR),并将其通过如慢病毒感染等方式基因修饰在T淋巴细胞表面。这种CAR T淋巴细胞能够以主要组织相容性复合物(Major Histocompatibility Complex,MHC)非限制性方式选择性地T淋巴细胞定向到肿瘤细胞并特异性地杀伤肿瘤。CAR T淋巴细胞是肿瘤免疫治疗领域的一个新的免疫治疗策略。设计CAR修饰的免疫效应细胞,特别T细胞时,所靶向的抗原基因实际上是一种关键性的选择,鉴于体内基因表达的复杂性以及各种不可控因素,选择到一个合适的用于CAR的基因是非常困难的。并且,很多肿瘤特异性的抗原,很难找到针对其的且适合于构建CAR修饰的免疫效应细胞的特异性分子。

[0003] 磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 (Glypican-3, GPC3, 又称DGSX, GTR2-2, MXR7, OCI-5, SDYS, SGB, SGBS或SGBS1) 是一种细胞表面蛋白,属于硫酸乙酰肝素蛋白多糖家族。GPC3基因编码产生70-kDa左右的前体核心蛋白,该前体蛋白能够被弗林蛋白酶(furin)剪切产生40-kDa左右的可溶性的能够进入血液的氨基端(N末端)肽和30-kDa左右含有2个硫酸乙酰肝素(HS)糖链的膜结合的羧基端(C末端)肽。GPC3蛋白通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚依附在细胞膜上。

[0004] GPC3高度表达于胎儿肝脏,而不表达于正常成年人的肝组织,但在肝细胞肝癌中恢复表达,与肝癌的发生发展有十分密切的关系,不仅在肝癌发生的早期检出率较高,而且随着肝癌的发展,其检出率也随之增高。而GPC3的表达在肝腺癌,胆管细胞癌,肝转移癌和12种常见实体瘤和21种非肝癌细胞系中均未检测出。此外,GPC3也在例如黑色素瘤,卵巢透明细胞癌、卵黄囊瘤、神经母细胞瘤等肿瘤中表达。考虑到GPC3在肝细胞肝癌,黑色素瘤等肿瘤中特异性的高表达,其被认为是肿瘤免疫治疗的一个候选靶标。

[0005] 虽然,利用抗GPC3抗体进行肝癌检测和利用抗GPC3抗体的抗体依赖的(ADCC)或补体依赖的(CDC)细胞毒性研究方案已有报道,但目前仍没有药用的抗GPC3抗体,仅有中外制药公司在CN200580000807.4公开的GC33抗体在进行一期临床研究,临床应用情况仍有待商榷。

[0006] 另外,抗GPC3抗体不仅可以直接作为治疗性抗体,而且还有望用于诊断、嵌合抗原

受体修饰 (CAR) 的 T 淋巴细胞等免疫治疗等等。现有研究表明不同的抗体可能会有不同的免疫原性, 这种免疫原性会导致抗体或其衍生出来的治疗制剂的疗效及副作用。如基于小鼠抗 mesothelin 抗体的 CAR T 细胞会导致过敏反应, 影响其在人体内的长期存活。基于这些考虑, 本领域需要进一步优化及制备新的抗 GPC3 抗体, 使其实体瘤的应用中具有良好的肿瘤杀伤活性和极佳的临床应用前景, 从而使得 GPC3 抗体可以切实地被用于肿瘤的诊断和治疗中, 惠及广大患者。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 的抗体及其应用。

[0008] 在本发明的第一方面, 提供一种特异性识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 (GPC3) 的抗体, 该抗体具有轻链可变区和重链可变区, 且,

[0009] 其轻链可变区的 CDR1 具有选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69;

[0010] 其轻链可变区的 CDR2 具有选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70;

[0011] 其轻链可变区的 CDR3 具有氨基酸序列: SEQ ID NO:20;

[0012] 其重链可变区的 CDR1 具有选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64;

[0013] 其重链可变区的 CDR2 具有选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71;

[0014] 其重链可变区的 CDR3 具有选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:72。

[0015] 在一个优选例中, 所述的抗体包括:

[0016] 抗体 (a) (P7D4), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO:16 所示的 CDR1、SEQ ID NO:18 所示的 CDR2、SEQ ID NO:20 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO:10 所示的 CDR1、SEQ ID NO:12 所示的 CDR2、SEQ ID NO:14 所示的 CDR3;

[0017] 抗体 (b) (am4), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO:16 所示的 CDR1、SEQ ID NO:18 所示的 CDR2、SEQ ID NO:20 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO:60 所示的 CDR1、SEQ ID NO:61 所示的 CDR2、SEQ ID NO:14 所示的 CDR3;

[0018] 抗体 (c) (am14), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO:16 所示的 CDR1、SEQ ID NO:18 所示的 CDR2、SEQ ID NO:20 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO:62 所示的 CDR1、SEQ ID NO:63 所示的 CDR2、SEQ ID NO:14 所示的 CDR3;

[0019] 抗体 (d) (am20), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO:16 所示的 CDR1、SEQ ID NO:18 所示的 CDR2、SEQ ID NO:20 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO:64 所示的 CDR1、SEQ ID NO:65 所示的 CDR2、SEQ ID NO:14 所示的 CDR3;

[0020] 抗体 (e) (am35), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO:67 所示的 CDR1、SEQ ID NO:68 所示的 CDR2、SEQ ID NO:20 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO:10 所示的 CDR1、SEQ ID NO:66 所示的 CDR2、SEQ ID NO:14 所示的 CDR3;

[0021] 抗体 (f) (am42), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO:69 所示的 CDR1、SEQ ID NO:70 所示的 CDR2、SEQ ID NO:20 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO:10 所示的 CDR1、SEQ ID

NO:66所示的CDR2、SEQ ID NO:14所示的CDR3;

[0022] 抗体(g)(T2-23),其轻链可变区具有SEQ ID NO:16所示的CDR1、SEQ ID NO:70所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;或其重链可变区具有SEQ ID NO:10所示的CDR1、SEQ ID NO:71所示的CDR2、SEQ ID NO:72所示的CDR3;

[0023] 抗体(h),其识别与(a)~(g)中任一项所述的抗体所识别的抗原决定部位相同的抗原决定部位。

[0024] 在另一优选例中,所述的特异性识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC3)的抗体可以是:单链抗体(scFv),单克隆抗体,结构域抗体,Fab片段,Fd片段,Fv片段,F(ab')<sub>2</sub>片段和其衍生物,或其它形式的抗体;较佳地为单链抗体。

[0025] 在另一优选例中,所述的特异性识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC3)的抗体是人源化的或全人源的;较佳地为全人源的。

[0026] 在另一优选例中,抗体(a)(P7D4)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4中第137-247位所示;

[0027] 抗体(b)(am4)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25中第137-247位所示;

[0028] 抗体(c)(am14)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:27中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:27中第137-247位所示;

[0029] 抗体(d)(am20)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:29中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:29中第137-247位所示;

[0030] 抗体(e)(am35)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:31中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:31中第137-247位所示;

[0031] 抗体(f)(am42)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:33中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:33中第137-247位所示;

[0032] 抗体(g)(T2-23)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:35中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:35中第137-247位所示。

[0033] 在本发明的另一方面,提供一种特异性识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC3)的抗体,该抗体是人源化的单克隆抗体,含有重链可变区和轻链可变区,其重链可变区包含:SEQ ID NO:73所示氨基酸序列的CDR1,SEQ ID NO:74所示氨基酸序列的CDR2,SEQ ID NO:75所示氨基酸序列的CDR3;或其轻链可变区包含:SEQ ID NO:76所示氨基酸序列的CDR1,SEQ ID NO:77所示氨基酸序列的CDR2,SEQ ID NO:78所示氨基酸序列的CDR3。

[0034] 在一个优选例中,该抗体具有:SEQ ID NO:58所示氨基酸序列的重链可变区,或SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的轻链可变区。

[0035] 在本发明的另一方面,提供编码前面任一所述的抗体的核酸。

[0036] 在本发明的另一方面,提供一种表达载体,其包含所述的核酸。

[0037] 在本发明的另一方面,提供一种宿主细胞,其包含所述的表达载体或基因组中整合有所述的核酸。

[0038] 在本发明的另一方面,提供前面任一所述的抗体的用途,用于制备特异性靶向表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤细胞的靶向性药物,抗体药物偶联物或多功能抗体;或用

于制备诊断肿瘤的试剂,该肿瘤表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3;或用于制备嵌合抗原受体修饰的免疫细胞。

[0039] 在本发明的另一方面,提供一种多功能免疫缀合物,所述的多功能免疫缀合物包括:前面任一所述的抗体;以及与之连接(包括共价连接、偶联、附着、吸附)的功能性分子;所述的功能性分子选自:靶向肿瘤表面标志物的分子,抑制肿瘤分子,靶向免疫细胞的表面标志物的分子或可检测标记物。

[0040] 在一个优选例中,所述的多功能免疫缀合物中,所述的靶向肿瘤表面标志物的分子是结合肿瘤表面标志物的抗体或配体;或所述的抑制肿瘤分子是抗肿瘤的细胞因子或抗肿瘤的毒素;较佳地,所述的细胞因子包括(但不限于):IL-12、IL-15、IFN-beta、TNF-alpha。

[0041] 在另一优选例中,所述的多功能免疫缀合物中,所述的可检测标记物包括:荧光标记物、显色标记物。

[0042] 在另一优选例中,所述的多功能免疫缀合物中,所述的结合肿瘤表面标志物的抗体是指:识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3以外的其它抗原的抗体,所述的其它抗原包括:EGFR, EGFRvIII, mesothelin, HER2, EphA2, Her3, EpCAM, MUC1, MUC16, CEA, Claudin 18.2, 叶酸受体, Claudin 6, WT1, NY-ESO-1, MAGE 3, ASGPR1或CDH16。

[0043] 在另一优选例中,所述的多功能免疫缀合物中,所述的靶向免疫细胞的表面标志物的分子是结合免疫细胞表面标志物的抗体,其与前面任一所述的抗体形成T细胞参与的双功能抗体(Bispecific T cell engager, BiTE)。

[0044] 在另一优选例中,所述的多功能免疫缀合物中,所述的结合免疫细胞表面标志物的抗体是抗CD3抗体。

[0045] 在另一优选例中,所述的抗CD3抗体是单链抗体(scFv),单克隆抗体,Fab片段,Fd片段,Fv片段,F(ab')<sub>2</sub>片段和其衍生物,或其它形式的抗体;较佳地为单链抗体。

[0046] 在另一优选例中,所述的抗CD3抗体是人源化的,嵌合的,全人源的或鼠源的。

[0047] 在另一优选例中,所述的多功能免疫缀合物是融合多肽,前面任一所述的抗体以及与之连接的功能性分子之间,还包括连接肽(接头)。

[0048] 在另一优选例中,所述的连接肽的序列为(GlyGlyGlyGlySer)<sub>n</sub>,其中n为1到5的整数;更佳地,n=3。

[0049] 在另一优选例中,所述的多功能免疫缀合物采用多肽给药或基因给药的方式。

[0050] 在本发明的另一方面,提供编码前面任一所述的多功能免疫缀合物的核酸。

[0051] 在本发明的另一方面,提供所述的多功能免疫缀合物的用途,用于制备抗肿瘤药物,或用于制备诊断肿瘤的试剂,该肿瘤表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3;或用于制备嵌合抗原受体修饰的免疫细胞;较佳地,所述免疫细胞包括:T淋巴细胞、NK细胞或者NKT淋巴细胞。

[0052] 在本发明的另一方面,提供包含前面任一所述的抗体的嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor, CAR),所述的嵌合抗原受体包含顺序连接的:前面任一所述的抗体,跨膜区和胞内信号区;所述的胞内信号区选自:CD3ζ, FcεRI γ, CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40的胞内信号区序列,或其组合。

[0053] 在另一优选例中,所述的嵌合抗原受体中,所述的跨膜区包含CD8或CD28的跨膜区。

[0054] 在另一优选例中,所述的嵌合抗原受体中,所述的嵌合抗原受体包括如下的顺序连接的抗体,跨膜区和胞内信号区:前面任一所述的抗体、CD8和CD3 $\zeta$ ;前面任一所述的抗体、CD8、CD137和CD3 $\zeta$ ;前面任一所述的抗体、CD28分子的跨膜区、CD28分子的胞内信号区和CD3 $\zeta$ ;或前面任一所述的抗体、CD28分子的跨膜区、CD28分子的胞内信号区、CD137和CD3 $\zeta$ 。

[0055] 在另一优选例中,所述的嵌合抗原受体中,所述的抗体是单链抗体或结构域抗体。在另一优选例中,所述的嵌合抗原受体具有:

[0056] SEQ ID NO:49或其中第22-346位所示的氨基酸序列;

[0057] SEQ ID NO:50或其中第22-447位所示的氨基酸序列;

[0058] SEQ ID NO:51或其中第22-491位所示的氨基酸序列;

[0059] SEQ ID NO:52或其中第22-494位所示的氨基酸序列;

[0060] SEQ ID NO:53或其中第22-536位所示的氨基酸序列;

[0061] SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列;

[0062] SEQ ID NO:88所示的氨基酸序列;或

[0063] SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列。

[0064] 在本发明的另一方面,提供编码所述的嵌合抗原受体的核酸。在另一优选例中,编码所述的嵌合抗原受体的核酸具有:

[0065] SEQ ID NO:44或其中第380-1420位或其中第443-1420位所述的核苷酸序列;

[0066] SEQ ID NO:45或其中第380-1723位或其中第443-1723位所述的核苷酸序列;

[0067] SEQ ID NO:46或其中第380-1855位或其中第443-1855位所述的核苷酸序列;

[0068] SEQ ID NO:47或其中第380-1864位或其中第443-1864位所述的核苷酸序列;

[0069] SEQ ID NO:48或其中第380-1990位或其中第443-1990位所述的核苷酸序列;

[0070] SEQ ID NO:85所述的核苷酸序列;

[0071] SEQ ID NO:87所述的核苷酸序列;或

[0072] SEQ ID NO:89所述的核苷酸序列。

[0073] 在本发明的另一方面,提供一种表达载体,其包含编码所述的嵌合抗原受体的核酸。在另一优选例中,所述的表达载体来源于慢病毒质粒pWPT(或pWPT-eGFP)。

[0074] 在本发明的另一方面,提供一种病毒,所述的病毒包含所述载体。

[0075] 所述的嵌合抗原受体、或编码其的核酸、或包含该核酸的表达载体或病毒的用途,用于制备靶向表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤的基因修饰的免疫细胞。

[0076] 在另一优选例中,所述的表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤包括(但不限于):肝癌,黑色素瘤,卵巢透明细胞癌、卵黄囊瘤、神经母细胞瘤。

[0077] 在本发明的另一方面,提供一种基因修饰的免疫细胞,其转导有编码所述的嵌合抗原受体的核酸,或含有该核酸的表达载体或病毒;或其表面表达所述的嵌合抗原受体。

[0078] 在另一优选例中,所述的免疫细胞还携带外源的细胞因子的编码序列;较佳地,所述的细胞因子包括:IL-12,IL-15或IL-21。

[0079] 在另一优选例中,所述的免疫细胞还表达另一种嵌合抗原受体,该受体不含有CD3 $\zeta$ ,但含有CD28的胞内信号结构域、CD137的胞内信号结构域或者这两者的组合。

[0080] 在另一优选例中,所述的免疫细胞还表达趋化因子受体;较佳地,所述的趋化因子受体包括:CCR2。

[0081] 在另一优选例中,所述的免疫细胞还表达能降低PD-1表达的siRNA或者阻断PD-L1的蛋白。

[0082] 在另一优选例中,所述的免疫细胞还表达安全开关;较佳地,所述的安全开关包括:iCaspase-9,Truncated EGFR或RQR8。

[0083] 在另一优选例中,所述的免疫细胞包括:T淋巴细胞,NK细胞或NKT细胞。

[0084] 在本发明的另一方面,提供所述的基因修饰的免疫细胞的用途,用于制备抑制肿瘤的药物,所述的肿瘤是表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤。

[0085] 在本发明的另一方面,提供药物组合物(包括药物或诊断试剂),其包括:

[0086] 前面任一所述的抗体或编码该抗体的核酸;或

[0087] 前面任一所述的免疫缀合物或编码该缀合物的核酸;或

[0088] 前面任一所述的嵌合抗原受体或编码该嵌合抗原受体的核酸;或

[0089] 前面任一所述的基因修饰的免疫细胞。

[0090] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

## 附图说明

[0091] 图1、在单噬菌体ELISA实验中抗体P1B12E和P7D4对人类GPC3和对照BSA的结合情况。抗体P1B12E和P7D4对人类GPC3和阴性对照BSA的值证明筛选到的两个抗体能特异性结合人类GPC3。

[0092] 图2、人类GPC3的抗体纯化电泳图。

[0093] 图3、抗体scFv-P1B12E-Fc和scFv-P7D4-Fc对GPC3表达阳性的HepG2细胞结合活性分析。

[0094] 图4、P7D4系列抗体对GPC3结合能力的SPR分析。

[0095] 图5、P7D4系列抗体特异性结合重组人GPC3。

[0096] 图6、表达纯化的GPC3蛋白的SDS PAGE电泳鉴定。

[0097] 图7、抗体Y035对人GPC3的结合动力学分析。

[0098] 图8、抗体5A5对人GPC3的结合动力学分析。

[0099] 图9、抗体Y035特异性结合GPC3表达阳性的HepG细胞。

## 具体实施方式

[0100] 本发明人经过深入的研究筛选,获得了特异性识别GPC3的抗体,包括单链抗体和人源化抗体。本发明的抗体可以被应用于制备各种靶向性抗肿瘤药物以及诊断肿瘤的药物。

[0101] 抗GPC3抗体

[0102] 本发明人从全人源天然抗体库中筛选获得对于GPC3结合性能良好的特异性抗体,进一步还对其进行氨基酸突变获得了亲和力进一步呈现显著性提高的抗GPC3抗体,并且找到了其发挥结合性能的关键CDR区。

[0103] 本发明人还利用杂交瘤技术获得了抗GPC3的鼠源抗体,对其进行人源化,经过反复比较,获得对于GPC3结合性能极其优异的人源化抗GPC3抗体,并且找到了其发挥结合性

能的关键CDR区。

[0104] 本发明的抗体可以是完整的免疫球蛋白分子,也可以是抗原结合片段,包括但不限于Fab片段,Fd片段,Fv片段,F(ab')<sub>2</sub>片段、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、结构域抗体,二价单链抗体、单链噬菌体抗体、双特异双链抗体、三链抗体、四链抗体。

[0105] 抗体的抗原结合特性可由位于重链和轻链可变区的3个特定的区域来描述,称为互补决定区(complementarity determining region,CDR),所述的CDR区将可变区间隔成4个框架区域(FR),4个FR的氨基酸序列相对比较保守,不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构,通过其间的FR形成的 $\beta$ 折叠在空间结构上相互靠近,重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。CDR区是免疫学感兴趣的蛋白质的序列,本发明的抗体的CDR区是全新的。所述抗体可包含本文揭示的二、三、四、五或者所有六个CDR区。

[0106] 本发明的另一方面包括本文所述抗体的功能变体。所述变体能与亲代抗体竞争特异性结合GPC3,且其识别肿瘤细胞表达的GPC3的能力接近于本发明实施例中提供的具体的抗体。所述功能变体可以具有保守序列修饰,包括核苷酸和氨基酸取代、添加和缺失。这些修饰可以通过本领域已知的标准技术导入,例如定向诱变和随机PCR介导的诱变,并且可包含天然以及非天然核苷酸和氨基酸。较佳地,序列的修饰发生在所述抗体的CDR区以外的区域上。

[0107] 免疫缀合物

[0108] 本发明还提供了多功能免疫缀合物,其包含本文所述抗体以及进一步包含至少一种其它类型的功能性分子。所述的功能性分子选自但不限于:靶向肿瘤表面标志物的分子,抑制肿瘤分子,靶向免疫细胞的表面标志物的分子或可检测标记物。所述抗体与所述功能性分子可以通过共价连接、偶联、附着、交联等方式构成缀合物。

[0109] 作为一种优选方式,所述免疫缀合物可包含:本发明的抗体以及至少一种靶向肿瘤表面标志物的分子或抑制肿瘤分子。所述的抑制肿瘤分子可以是抗肿瘤的细胞因子,或抗肿瘤的毒素;较佳地,所述的细胞因子包括(但不限于):IL-12、IL-15、IFN-beta、TNF-alpha。所述的靶向肿瘤表面标志物的分子例如可以与本发明的抗体协同作用,更精准地靶向肿瘤细胞。

[0110] 作为一种优选方式,所述免疫缀合物可包含:本发明的抗体以及可检测标记物。所述的可检测标记物包括但不限于:荧光标记物、显色标记物;如:酶、辅基、荧光材料、发光材料,生物发光材料、放射性材料、正电子发射金属以及非放射性顺磁性金属离子。也可包含一个以上的标记物。为了检测和/或分析和/或诊断目的用于标记抗体的标记依赖于使用的特定检测/分析/诊断技术和/或方法例如免疫组织化学染色(组织)样品、流式细胞计量术等。对于本领域已知的检测/分析/诊断技术和/或方法合适的标记为本领域技术人员所熟知。

[0111] 作为一种优选方式,所述免疫缀合物可包含:本发明的抗体以及靶向免疫细胞的表面标志物的分子。所述靶向免疫细胞的表面标志物的分子可识别免疫细胞,其携带本发明的抗体达到免疫细胞,同时本发明的抗体可将免疫细胞靶向于肿瘤细胞,从而引发免疫细胞特异性地杀伤肿瘤。

[0112] 作为通过直接或间接(例如通过接头)缀合而化学产生免疫缀合物的一种方式,所

述免疫缀合物可以作为融合蛋白而产生,所述融合蛋白包含本发明的抗体及合适的其它蛋白。融合蛋白可以通过本领域已知方法产生,例如通过构建核酸分子以及随后表达所述核酸分子而重组产生,所述核酸分子包含符合读框的编码抗体的核苷酸序列以及编码合适标记的核苷酸序列。

[0113] 本发明另一方面提供了编码本发明的至少一种抗体、其功能变体或者免疫缀合物的核酸分子。一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0114] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。

[0115] 嵌合抗原受体及基因修饰的免疫细胞

[0116] 本发明提供了一种表达于免疫效应细胞(免疫细胞)表面的嵌合抗原受体,所述的嵌合抗原受体包含顺序连接的:胞外结合区,跨膜区和胞内信号区,其中所述胞外结合区包含本发明的抗体。将该嵌合抗原受体表达于免疫效应细胞的表面,可使得免疫效应细胞对表GPC3的肿瘤细胞具有高度特异性的细胞毒性作用。

[0117] 如本文所用,所述的“免疫细胞”与“免疫效应细胞”可互换使用,其包括:T淋巴细胞,NK细胞或NKT细胞等,优选的,为NK细胞和T淋巴细胞。

[0118] 作为本发明的优选方式,所述的嵌合抗原受体中,包含的抗体为单链抗体,其通过CD8铰链区与CD8或者CD28的跨膜区相连接,跨膜区后紧接胞内信号区。

[0119] 本发明也包括编码所述嵌合抗原受体的核酸。本发明还涉及上述多核苷酸的变体,其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。

[0120] 嵌合抗原受体的跨膜区可以选自CD8或CD28等蛋白的跨膜区。人CD8蛋白是个异二聚体,由 $\alpha\beta$ 或者 $\gamma\delta$ 两条链组成。在本发明的一个实施方案中,跨膜区选自CD8 $\alpha$ 或者CD28的跨膜区。此外,CD8 $\alpha$ 铰链区(hinge)是一个柔性区域,因此,CD8或CD28和跨膜区加上铰链区被用于将嵌合抗原受体CAR的靶点识别结构域scFv和胞内信号区连接起来。

[0121] 胞内信号区可以选自CD3 $\zeta$ ,Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ ,CD27,CD28,CD137,CD134,MyD88,CD4蛋白的胞内信号区,及其组合。CD3分子由五个亚单位组成,其中CD3 $\zeta$ 亚单位(又称CD3zeta,简称Z)含有3个ITAM基序,该基序是TCR-CD3复合体中重要的信号转导区。CD3 $\delta$ Z是截短的不具有ITAM基序的CD3 $\zeta$ 序列,在实践中一般作为阴性对照的构建。Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 主要分布在肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面,其含有一个ITAM基序,在结构、分布及功能上与CD3 $\zeta$ 类似。此外如前所述,CD28,CD137,CD134是共刺激信号分子,在与各自配体结合后其胞内信号区段产生的共刺激作用引起免疫效应细胞(主要是T淋巴细胞)的持续增殖,并能够提高免疫效应细胞分泌IL-2和IFN- $\gamma$ 等细胞因子的水平,同时提高CAR免疫效应细胞在体内的存活周期和抗肿瘤效果。

[0122] 本发明的嵌合抗原受体可以按如下方式顺序连接:

[0123] 本发明的抗体、CD8和CD3 $\zeta$ ;

[0124] 本发明的抗体、CD8、CD137和CD3 $\zeta$ ;

[0125] 本发明的抗体、CD28分子的跨膜区、CD28分子的胞内信号区和CD3 $\zeta$ ;或



[0126] 本发明的抗体、CD28分子的跨膜区、CD28分子的胞内信号区、CD137和CD3 $\zeta$ 。

[0127] 及其组合,其中相关嵌合抗原受体蛋白中CD28a代表CD28分子的跨膜区,CD28b代表CD28分子的胞内信号区。上述各种嵌合抗原受体统称为scFv (GPC3)-CAR。

[0128] 本发明还提供了包含上述编码表达于免疫效应细胞表面的嵌合抗原受体蛋白的核酸的载体。在一个具体实施方案中,本发明使用的载体是一种慢病毒质粒载体pWPT-eGFP。该质粒属于第三代自灭活慢病毒载体系统,该系统共有三个质粒即编码蛋白Gag/Pol、编码Rev蛋白的包装质粒psPAX2;编码VSV-G蛋白的包膜质粒PMD2.G;及空载体pWPT-eGFP,其可以用于重组引入目的核酸序列,即编码CAR的核酸序列。空载体pWPT-eGFP中由延长因子-1 $\alpha$  (elongation factor-1 $\alpha$ , EF-1 $\alpha$ ) 启动子调控增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, eGFP) 的表达。而包含编码CAR的目的核酸序列的重组表达载体pWPT-eGFP-F2A-CAR是通过由来自口蹄疫病毒 (food-and-mouth disease virus, FMDV) 的核糖体跳跃序列 (ribosomal skipping sequence 2A) (简称F2A) 实现eGFP与CAR的共表达的。

[0129] 本发明还包括包含上述载体的病毒。本发明的病毒包括包装后的具有感染力的病毒,也包括包含包装为具有感染力的病毒所必需成分的待包装的病毒。本领域内已知的其它可用于将外源基因转导入免疫效应细胞的病毒及其对应的质粒载体也可用于本发明。

[0130] 本发明还提供了基因修饰的免疫效应细胞,其被转导有本发明的核酸或被转导有本发明的上述包含所述含有该核酸的重组质粒,或包含该质粒的病毒。本领域常规的核酸转导方法,包括非病毒和病毒的转导方法都可以用于本发明。基于非病毒的转导方法包括电穿孔法和转座子法。近期Amaza公司研发的Nucleofector核转染仪能够直接将外源基因导入细胞核获得目的基因的高效转导。另外,基于睡美人转座子 (Sleeping Beauty system) 或PiggyBac转座子等转座子系统的转导效率较普通电穿孔有较大提高,将nucleofector转染仪与睡美人转座子系统联合应用已有报道 [Davies JK., et al. Combining CD19 redirection and alloantigenization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies. Cancer Res, 2010, 70 (10) : 0F1-10.], 该方法既具有较高的转导效率又能够实现目的基因的定点整合。在本发明的一个实施方案中,实现嵌合抗原受体基因修饰的免疫效应细胞的转导方法是基于病毒如逆转录病毒或慢病毒的转导方法。该方法具有转导效率高,外源基因能够稳定表达,且可以缩短体外培养免疫效应细胞到达临床级数量的时间等优点。在该转基因免疫效应细胞表面,转导的核酸通过转录、翻译表达在其表面。通过对各种不同的培养的肿瘤细胞进行体外细胞毒实验证明,本发明的免疫效应细胞具有高度特异性的肿瘤细胞杀伤效果 (亦称细胞毒性)。因此本发明的编码嵌合抗原受体蛋白的核酸,包含该核酸的质粒,包含该质粒的病毒和转导有上述核酸,质粒或病毒的转基因免疫效应细胞可以有效地用于肿瘤的免疫治疗。

[0131] 本发明所述的免疫细胞还可以携带外源的细胞因子的编码序列;所述的细胞因子包括但不限于:IL-12, IL-15或IL-21等。这些细胞因子具有免疫调节或抗肿瘤的活性,能增强效应T细胞及活化的NK细胞的功能,或直接发挥抗肿瘤作用。因此,本领域技术人员可以理解,这些细胞因子的运用有助于所述的免疫细胞更好地发挥作用。

[0132] 本发明所述的免疫细胞还可以表达除了上述嵌合抗原受体以外的另一种嵌合抗

原受体,该受体不含有CD3 $\zeta$ ,但含有CD28的胞内信号结构域、CD137的胞内信号结构域或者这两者的组合。

[0133] 本发明所述的免疫细胞还可以表达趋化因子受体;所述的趋化因子受体包括但不限于CCR2。本领域技术人员可以理解,所述的CCR2趋化因子受体可以使得体内的CCR2与之竞争性结合,对于阻断肿瘤的转移是有利的。

[0134] 本发明所述的免疫细胞还可以表达能降低PD-1表达的siRNA或者阻断PD-L1的蛋白。本领域技术人员可以理解,竞争性阻断PD-L1与其受体PD-1的相互作用,有利于恢复抗肿瘤T细胞反应,从而抑制肿瘤生长。

[0135] 本发明所述的免疫细胞还可以表达安全开关;较佳地,所述的安全开关包括:iCaspase-9,Truncated EGFR或RQR8。

[0136] 药物组合物

[0137] 本发明的抗体、包含该抗体的免疫缀合物以及基因修饰的免疫细胞可以应用于制备药物组合物或诊断试剂。所述的组合物除了包括有效量的所述抗体、免疫缀合物或免疫细胞,还可包含药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的”是指当分子本体和组合物适当地给予动物或人时,它们不会产生不利的、过敏的或其它不良反应。

[0138] 可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的具体例子是糖类,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和土豆淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和甲基纤维素;西黄蓍胶粉末;麦芽;明胶;滑石;固体润滑剂,如硬脂酸和硬脂酸镁;硫酸钙;植物油,如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油;多元醇,如丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;海藻酸;乳化剂,如Tween®;润湿剂,如月桂基硫酸钠;着色剂;调味剂;压片剂、稳定剂;抗氧化剂;防腐剂;无热原水;等渗盐溶液;和磷酸盐缓冲液等。

[0139] 本发明的组合物可根据需要制成各种剂型,并可由医师根据患者种类、年龄、体重和大致疾病状况、给药方式等因素确定对病人有益的剂量进行施用。给药方式例如可以采用注射或其它治疗方式。

[0140] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如J.萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,第三版,科学出版社,2002中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0141] 实施例1、结合人类GPC3的特异性单链抗体(scFv)的制备

[0142] 1.1基于噬菌体展示的GPC3特异性结合抗体的筛选

[0143] 利用噬菌体展示技术,从全人源天然抗体库中筛选人类GPC3(以下简称huGPC3)特异性抗体。为此目的,在400ml 2 $\times$ YT/氨苄青霉素培养基接种噬菌体展示全人源单链抗体天然库的甘油菌(购自上海锐劲生物技术有限公司),使细胞密度达到OD<sub>600</sub>=0.1,在37℃和200rpm条件下振荡培养直至细胞密度达到OD<sub>600</sub>=0.5。用10<sup>12</sup>pfu的M13K07辅助噬菌体(购自Invitrogen)感染,在30℃和50rpm条件下培养30分钟。加入50mg/L卡那霉素后在37℃和200rpm条件下振荡培养30分钟后,通过离心(15分钟,1600 $\times$ g,4℃)分离沉淀,重悬于400ml 2 $\times$ YT/氨苄青霉素/卡那霉素培养基,在37℃和200rpm条件下振荡培养16小时。最后细胞通过离心(20分钟,5000 $\times$ g,4℃)分离沉淀并丢弃,上清用0.45 $\mu$ m规格滤膜过滤后,加入1/4体

积20% (w/v) PEG8000、2.5M NaCl溶液并在冰浴中保温1小时沉淀噬菌体颗粒。随后离心沉淀(20分钟, 8000×g, 4℃), 弃上清, 将噬菌体重悬于25ml预冷PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 中, 离心(5分钟, 20000×g, 4℃)。向上清液加入1/4体积20% (w/v) PEG8000、2.5M NaCl溶液, 并冰浴30分钟再次沉淀噬菌体颗粒。离心沉淀(30分钟, 20000×g, 4℃), 再次将噬菌体沉淀重悬于2ml预冷PBS中, 在冰上保持30分钟并离心(30分钟, 17000×g, 4℃)。上清液与含4% (w/v) BSA的PBS溶液以1:1混合, 置于旋转混合器上, 室温下保温30分钟, 然后直接用于筛选。

[0144] 利用上述噬菌体抗体库, 针对生物素标记的人类GPC3重组蛋白(购自上海锐劲生物技术有限公司), 实施了四轮定向筛选, 筛选方案如下: 该噬菌体抗体库与生物素标记的抗原GPC3, 在室温下保温2小时, 然后与经封闭液2% (w/v) BSA(牛血清白蛋白, 购自上海生工) 封闭过的链霉亲和素磁珠MyOne C1(购自Invitrogen) 在室温下保温30分钟。随后用PBST(含0.1%吐温-20) 缓冲液洗涤磁珠, 除去非特异性结合或结合能力较弱的噬菌体。结合能力强的噬菌体, 则用甘氨酸-盐酸(pH 2.2) 从磁珠上洗脱下来, 用Tris中和液(pH 9.1) 中和后, 用于感染处于对数生长中期的大肠杆菌ER2738, 并被用于下一轮筛选。在四轮筛选中, 磁珠的用量分别为50μl、20μl、10μl和10μl, 生物素标记的抗原GPC3浓度分别为200nM、10nM、5nM和1nM, PBST的洗涤次数分别为10次、10次、15次和20次。

[0145] 1.2GPC3特异性结合抗体的鉴定

[0146] 从第四轮筛选所得的克隆中随机挑选96个, 并用单噬菌体ELISA(酶联免疫吸附实验) 分析其与人类GPC3的结合能力。为此目的, 每个单菌落接种300μl 2×YT/氨苄青霉素培养基(含2%葡萄糖) 于96孔深孔培养板, 并在37℃和250rpm下振荡培养16小时。用20μl培养物接种到500μl 2×YT/氨苄青霉素培养基(含0.1%葡萄糖), 在37℃和250rpm下振荡培养1.5小时。准备辅助噬菌体溶液, 取75μl的M13K07(滴度为3×10<sup>12</sup>pfu/ml) 混入到15ml 2×YT培养基中, 50μl/孔加到培养板中。在37℃和150rpm条件培养30分钟, 然后加入准备好的卡那霉素溶液50μl/孔(取180μl的50mg/ml卡那霉素, 加入到15ml 2×YT培养基), 在37℃和250rpm下振荡培养16小时。最后离心沉淀细胞(30分钟, 5000×g, 4℃), 上清转移到新的96孔深孔培养板。

[0147] 为进行单噬菌体ELISA, 在96孔MediSorp ELISA板(购自Nunc) 上分别使用100ng/孔抗原GPC3以及阴性对照蛋白BSA(100μl/孔), 在4℃包被过夜。每个孔用含2%BSA(w/v) 的PBST封闭。随后用PBST清洗孔三次并排净。然后加入100μl/孔上面制备的每种噬菌体溶液到板上各孔中。37℃保温2小时后, 用PBST洗涤三次。为了检测结合的噬菌体, 将抗M13抗体过氧化物歧化酶偶联物(购自GE Healthcare) 以1:5000稀释于PBST中, 并取100μl加到每个孔中。37℃保温1小时后用PBST漂洗孔三次, 然后用PBS漂洗三次。最后吸取50μl TMB底物加入到孔中, 并在室温下显色10分钟, 随后加入每孔50μl的2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止显色反应。用酶联免疫检测仪(Bio-Rad) 在450nm测量消光值。

[0148] 结合测序分析, 观察到两个不同的单链抗体P1B12E(SEQ ID NO:1(核苷酸), 2(氨基酸)) 和P7D4(SEQ ID NO:3(核苷酸), 4(氨基酸)), 在ELISA实验中对人类GPC3(huGPC3) 结合信号显著较强, 对BSA没有结合(图1)。

[0149] 实施例2、抗GPC3的单链抗体的表达和纯化

[0150] 根据标准方案, 使用引物对V5-P1B12E-F(SEQ ID NO:5) 和V5-P1B12E-R(SEQ ID

N0:6) 从筛选得到的克隆P1B12E的质粒 (pCantab 5E-P1B12E) 中扩增出scFv-P1B12E片段, 使用引物对V5-P7D4-F (SEQ ID N0:7) 和V5-P7D4-R (SEQ ID N0:8) 从筛选得到的克隆P7D4的质粒 (pCantab 5E-P7D4) 扩增出scFv-P7D4片段, 通过NheI/BamHI (购自NEB) 双酶切, 以T4DNA连接酶 (购自NEB) 于同样以NheI/BamHI双酶切载体质粒pCMV-V5-Fc (该载体在多克隆位点下游融合表达人抗体IgG1的Fc片段, 以下简称V5-Fc, 购自上海锐劲生物技术有限公司) 连接并转化于宿主菌TOP10中, 挑取克隆通过PCR鉴定阳性克隆并通过测序确认, 分别获得V5-scFv-P1B12E-Fc和V5-scFv-P7D4-Fc真核表达质粒。

[0151] 将上述表达质粒分别转染生长良好的HEK-293F细胞, 37℃, 5%CO<sub>2</sub>, 125rpm摇床连续培养7天, 4000rpm离心10min, 去除沉淀, 收集上清, 并用0.45μm滤膜过滤, 将处理好的样品以protein A (购自GE) 亲和柱进行亲和纯化, 最终获得纯化的抗体-Fc融合蛋白scFv-P1B12E-Fc和scFv-P7D4-Fc, 鉴定结果如图2所示, 其分子量在50kD左右。

[0152] 实施例3、流式细胞学分析各个细胞系与抗GPC3单链抗体的结合情况

[0153] 通过荧光激活细胞分选仪 (FACS) (BD公司, FACSCalibur) 分析抗体scFv-P1B12E-Fc和scFv-P7D4-Fc各自与GPC3阳性的肝癌HepG2细胞系 (ATCC) 的结合能力。

[0154] 具体方法如下:

[0155] 1). 取对数生长期的肝癌HepG2细胞系接种到6cm平皿中, 接种细胞密度约为90%, 37℃孵箱过夜培养。

[0156] 2). 使用10mM的EDTA消化细胞, 200g×5min离心收集细胞。以 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /mL的浓度重悬于1%含小牛血清的磷酸盐缓冲液 (NBS PBS) 中, 按100ul/管的量加入流式专用管中。

[0157] 3). 200g×5min离心, 弃上清。

[0158] 4). 分别加入待测抗体scFv-P1B12E-Fc和scFv-P7D4-Fc, 同时以PBS作为阴性对照, 抗体终浓度为10μg/ml, 每管加入100ul。冰浴, 45分钟。

[0159] 5). 每管加入2ml 1%NBS PBS, 以200g×5min离心, 共二遍。

[0160] 6). 弃上清, 加入1:50稀释的FITC荧光标记的羊抗人抗体 (来自上海康成生物工程有限公司), 每管加入100ul。冰浴, 45分钟。

[0161] 7). 每管加入2ml 1%NBS PBS, 以200g×5min离心, 共二遍。

[0162] 8). 弃上清, 重悬于300ul 1%NBS PBS中, 流式细胞仪检测。

[0163] 9). 应用流式细胞仪数据分析软件WinMDI 2.9分析数据。

[0164] 结果如图3, 流式细胞分析结果表明, 抗体scFv-P7D4-Fc可以特异识别表达GPC3的HepG2细胞, 抗体scFv-P1B12E-Fc与HepG2细胞不结合。

[0165] 实施例4、GPC3结合能力提高的P7D4单链抗体变体的筛选和制备

[0166] 为提高P7D4单链抗体对GPC3结合能力, 分别对其重链CDR1和CDR2区域、或者轻链CDR1和CDR2的部分氨基酸进行随机突变, 并构建对应的亲和力成熟文库H12和L12。

[0167] 4.1、P7D4轻链和重链及其CDR区

[0168] P7D4scFv核苷酸序列如下 (SEQ ID N0:3; 其中, 第76-105位为重链CDR1, 第148-198位为重链CDR2, 第295-330位为重链CDR3; 第475-516位为轻链CDR1; 第562-582位为轻链CDR2, 第679-708位为轻链CDR3; 其中, 第1-363位为重链核苷酸序列, 第409-741为轻链核苷酸序列, 第364-408位为(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>连接序列)。

[0169]

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCT  
CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCAC TGGGTCCGCCAGGCTCCA  
GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAG  
ACTCCGTGAAGGGC CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA  
AATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA GATCGACGAGG  
GAGCCACGCTGATGCTTTTGATGTC TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGT  
GGAGGCGGTT CAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCC  
TCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGC ACTGGAACCAGCAGTG  
ACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCC TGGTACCAACAGTACCCAGGCAAAGCCCCCAA  
CCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCA GGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGT  
CTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGGGGCTGATTATTAC

[0170]

TGC CAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTA TTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCC  
TAGGT

[0171] P7D4 scFv氨基酸序列如下 (SEQ ID NO:4) :

[0172]

QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTY  
YADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DRRGSHADAFDV WGQGT  
LVTVSS  
GGGGSGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISC TGTSSDVGGYNYVS WYQQY  
PGKAPKL  
LIY GNSNRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYC QSYDSSLRVV FGGG  
TKVTVLG

[0173] P7D4 VH CDR1:

[0174] 核苷酸序列:GGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCAC (SEQ ID NO:9) ;

[0175] 氨基酸序列:GFTFSSYAMH (SEQ ID NO:10) 。

[0176] P7D4 VH CDR2:

[0177] 核苷酸序列:gctattagtggtagtggtggtagcacatactacgcagactccgtgaagggc (SEQ ID NO:11) ;

[0178] 氨基酸序列:AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:12) 。

[0179] P7D4 VH CDR3:

[0180] 核苷酸序列:gatcgacgaggagccacgctgatgcttttgatgtc (SEQ ID NO:13) ;

[0181] 氨基酸序列:DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO:14) 。

[0182] P7D4 VL CDR1:

[0183] 核苷酸序列:actggaaccagcagtgacgttggtggttataactatgtctcc (SEQ ID NO:15) ;

[0184] 氨基酸序列:TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:16) 。

[0185] P7D4 VL CDR2:

[0186] 核苷酸序列:ggtaacagcaatcggccctca (SEQ ID NO:17) ;

[0187] 氨基酸序列:GNSNRPS (SEQ ID NO:18) 。

[0188] P7D4 VL CDR3:

[0189] 核苷酸序列:cagtcctatgacagcagcctgcgtgtggta (SEQ ID NO:19) ;

[0190] 氨基酸序列:QSYDSSLRVV (SEQ ID NO:20) 。

#### [0191] 4.2、H12亲和力和成熟库的构建

[0192] 通过对P7D4单链抗体进行序列比对和分析,P7D4重链第一个和第二个CDR区域的部分氨基酸被选定,通过引物引入随机化突变,用于构建重链亲和力成熟文库。

[0193] 为制备编码P7D4突变体文库的DNA片段,以质粒pCantab 5E-P7D4为模板,通过PCR方法分别得到两段DNA片段,随后通过搭桥PCR的方式拼接而成。具体使用以下操作步骤:为合成基因,在50 $\mu$ l体积中进行PCR反应,每个反应使用质粒pCantab 5E-P7D4作为模板,每条引物的终浓度为0.2 $\mu$ M,以及5 $\mu$ l 10 $\times$ KOD Plus缓冲液、4 $\mu$ l dNTPs (dATP、dCTP、dGTP和dTTP,每种2mM)、2 $\mu$ l 25mM MgSO<sub>4</sub>和1U KOD Plus (购自Takara),用水补足体积后,在热循环仪中开始PCR程序。反应先加热样品到94 $^{\circ}$ C预变性5分钟,然后保温25个循环,每个循环是94 $^{\circ}$ C 30秒、56 $^{\circ}$ C 30秒和68 $^{\circ}$ C 30秒。最后在68 $^{\circ}$ C保温10分钟。第一个片段的扩增利用引物S1 (SEQ ID NO:21,CAACGTGAAAAATTATTATTCGC) 和74H12F1r (SEQ ID NO:22,CCAGCCCCTTGCTGGAGCCTGGCGGACCCAMNNCATAGCATAMNNACTGAAGGTGAATCCAG),第二个片段利用引物74H12F2f (SEQ ID NO:23,GCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCANNKATTAGTNNKNNKGTNNKNNKACATACTACGCAGACTCC) 和S6 (SEQ ID NO:21,GTAAATGAATTTTCTGTATGAGG)。

[0194] 预期PCR产物通过分析琼脂糖凝胶电泳鉴定,并用Wizard SV Gel and PCR Clean-up试剂盒 (购自Promega) 从样品中纯化回收。两个片段以等摩尔比加入到第二轮搭桥PCR中作为模板,反应体系仍然使用上述提到的KOD Plus体系,反应先加热样品到94 $^{\circ}$ C预变性5分钟,然后保温10个循环,每个循环反应条件是94 $^{\circ}$ C 30秒、60 $^{\circ}$ C 30秒和68 $^{\circ}$ C 30秒。最后在68 $^{\circ}$ C保温10分钟。随后在反应体系中直接加入终浓度为0.2 $\mu$ M的引物S1和S6,并开始PCR程序。反应先加热样品到94 $^{\circ}$ C预变性5分钟,然后保温25个循环,每个循环是94 $^{\circ}$ C 30秒、56 $^{\circ}$ C 30秒和68 $^{\circ}$ C 30秒。最后在68 $^{\circ}$ C保温10分钟。预期PCR产物通过制备性琼脂糖凝胶电泳分离,并用Wizard SV Gel and PCR Clean-up试剂盒根据制造商的说明纯化回收。

[0195] 完整的文库DNA片段两端分别含有SfiI和NotI限制性内切酶识别位点,经限制性内切酶SfiI/NotI进行限制性消化,插入到经过同样双酶切的噬菌粒载体pCANTAB5E中。连接产物使用Wizard SV Gel and PCR Clean-up试剂盒分离样品中的DNA并脱盐,用于电转化。在电转化时,使用电转化杯和电穿孔仪Gene Pulser II (购自Bio-Rad),转化到自制的感受态大肠杆菌ER2738 (购自NEB)。最终确认得到一个含有8.9 $\times 10^9$ 个突变体的文库。

#### [0196] 4.3、L12亲和力和成熟库的构建

[0197] 通过对P7D4单链抗体进行序列比对和分析,P7D4轻链第一个和第二个CDR区域的部分氨基酸被选定,通过引物引入随机化突变,用于构建轻链亲和力成熟突变体文库。

[0198] 为制备编码P7D4突变体文库的DNA片段,以质粒pCantab 5E-P7D4为模板,通过PCR方法分别得到两段DNA片段,随后通过搭桥PCR的方式拼接而成。具体使用以下操作步骤:为合成基因,在50 $\mu$ l体积重进行PCR反应,每个反应使用质粒pCantab 5E-P7D4作为模板,每条引物的终浓度为0.2 $\mu$ M,以及5 $\mu$ l 10 $\times$ KOD Plus缓冲液、4 $\mu$ l dNTPs (dATP、dCTP、dGTP和dTTP,每种2mM)、2 $\mu$ l 25mM MgSO<sub>4</sub>和1U KOD Plus,用水补足体积后,在热循环仪中开始PCR程序。反应先加热样品到94 $^{\circ}$ C预变性5分钟,然后保温25个循环,每个循环是94 $^{\circ}$ C 30秒、56 $^{\circ}$ C 30秒和68 $^{\circ}$ C 30秒。最后在68 $^{\circ}$ C保温10分钟。第一个片段的扩增利用引物S1和74L12F1r (SEQ ID NO:83,GTGGGGGCTTGCCTGGGTACTGTTGGTACCAGGAGACMNNAHNMNNAHNACCAACGTCCTGCTG),第二个片段利用引物74L12F2f (SEQ ID NO:84,ACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCCTCATCTAT

NNKNNKNNKNNKCGGCCCTCAGGGGTC)和S6。

[0199] 预期PCR产物通过分析琼脂糖凝胶电泳鉴定,并用Wizard SV Gel and PCRClean-up试剂盒从样品中纯化回收。两个片段以等摩尔比加入到第二轮搭桥PCR中作为模板,反应体系仍然使用上述提到的KOD Plus体系,在没有引物存在的情况下,反应先加热样品到94℃预变性5分钟,然后保温10个循环,每个循环反应条件是94℃30秒、60℃30秒和68℃30秒。最后在68℃保温10分钟。随后在反应体系中直接加入终浓度为0.2μM的引物S1和S6,并开始PCR程序。反应先加热样品到94℃预变性5分钟,然后保温25个循环,每个循环是94℃30秒、56℃30秒和68℃30秒。最后在68℃保温10分钟。预期PCR产物通过制备性琼脂糖凝胶电泳分离,并用Wizard SV Gel and PCR Clean-up试剂盒根据制造商的说明纯化回收。

[0200] 完整的文库DNA片段两端分别含有sfiI和NotI限制性内切酶识别位点,经限制性内切酶sfiI/NotI进行限制性消化,插入到经过同样双酶切的噬菌粒载体pCANTAB5E中。连接产物使用Wizard SV Gel and PCR Clean-up试剂盒分离样品中的DNA并脱盐,用于电转化。在电转化时,使用电转化杯和电穿孔仪Gene Pulser II,转化到自制的感受态大肠杆菌ER2738。最终确认得到一个含有 $1.1 \times 10^{10}$ 个突变体的文库。

[0201] 另外,本发明人也采用error prone PCR的策略,对整个P7D4片段进行随机突变,构建了库容为 $7.9 \times 10^9$ 的文库T2,其中扩增引物对为S1和S6,克隆和构建方式与上述H12和L12一致。

[0202] 以上三个亲和力成熟文库的筛选与实施例1中的筛选过程一致。通过筛选,本发明人鉴定得到六个高亲和力P7D4系列突变体克隆am4、am14、am20、am35、am42和T2-23,其序列信息如下:

[0203] am4核苷酸序列(SEQ ID NO:24,其中,第76-105位为重链CDR1,第148-198位为重链CDR2,第295-330位为重链CDR3;第475-516位为轻链CDR1;第562-582位为轻链CDR2,第679-708位为轻链CDR3;其中,第1-363位为重链核苷酸序列,第409-741为轻链核苷酸序列,第364-408位为(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>连接序列):

```
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACGTATGCTATGACGTTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGTAGTAGTGGTGAAAGTACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATATCGA
CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTGATGCTTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
AGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCATCTGGA
ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCCTGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
GCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAAGGGTCCCTGACCGATT
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
GGGGCTGATTATTACTGCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTAATTCGGCGGAGGG
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT
```

[0204] am4氨基酸序列(SEQ ID NO:25):

```
QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYAMTWVRQAPGKGLEWVSISSSGESTYY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRGSHADAFDVWGQGLTVTS
SGGGSGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISC TGTSSDVGGYNYVS WYQQYPGK
APKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYCQSYDSSLRVVFGGG
TKVTVLG
```

[0205] am4氨基酸序列(SEQ ID NO:25):

```
QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYAMTWVRQAPGKGLEWVSISSSGESTYY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRGSHADAFDVWGQGLTVTS
SGGGSGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISC TGTSSDVGGYNYVS WYQQYPGK
APKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYCQSYDSSLRVVFGGG
TKVTVLG
```

[0207] 重链CDR1:GFTFSTYAMT (SEQ ID NO:60)

[0208] 重链CDR2:SISSSGESTYYADSVKG (SEQ ID NO:61)

[0209] 重链CDR3:DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO:14)

[0210] 轻链CDR1:TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:16)

[0211] 轻链CDR2:GNSNRPS (SEQ ID NO:18)

[0212] 轻链CDR3:QSYDSSLRVV (SEQ ID NO:20)

[0213] 其中,第1-121位为重链氨基酸序列,第137-247为轻链氨基酸序列。第122-136为(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>连接序列。

[0214] am14核苷酸序列 (SEQ ID NO:26,其中,第76-105位为重链CDR1,第148-198位为重链CDR2,第295-330位为重链CDR3;第475-516位为轻链CDR1;第562-582位为轻链CDR2,第679-708位为轻链CDR3;其中,第1-363位为重链核苷酸序列,第409-741为轻链核苷酸序列,第364-408位为(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>连接序列):

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGCTATGGCTTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGAAATTAGTAGTTCTGGTAGTAGGACATACTAC  
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
[0215] CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA[GATCGA]  
CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTGATGTC TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG  
AGTGGTGGAGGCGGTTGAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG  
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGC[ACTGGA]  
ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATACTATGTCTCC TGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA  
GCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCA GGGGTCCCTGACCGATTG  
[0216] TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT  
GGGGCTGATTATTACTGC[CAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTA]ITCGGCGGAGGG  
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0217] am14氨基酸序列 (SEQ ID NO:27):

QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAAS[GFTFSTYAMA]WVRQAPGKGLEWVS[EISSSGSRTYY]  
[ADSVKG]RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK[DRRGSHADAFDV]WGQGLVTVS  
[0218] SGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPSPASGSPGQSVTISC[TGTSSDVGGYNYVS]WYQQYPGK  
APKLLIY[GNSNRPS]GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYC[QSYDSSLRVV]FGGG  
TKVTVLG

[0219] 重链CDR1:GFTFSTYAMA (SEQ ID NO:62)

[0220] 重链CDR2:EISSSGSRTYYADSVKG (SEQ ID NO:63)

[0221] 重链CDR3:DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO:14)

[0222] 轻链CDR1:TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:16)

[0223] 轻链CDR2:GNSNRPS (SEQ ID NO:18)

[0224] 轻链CDR3:QSYDSSLRVV (SEQ ID NO:20)

[0225] 其中,第1-121位为重链氨基酸序列,第137-247为轻链氨基酸序列,第122-136为(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>连接序列。

[0226] am20核苷酸序列 (SEQ ID NO:28,第76-105位为重链CDR1,第148-198位为重链CDR2,第295-330位为重链CDR3;第475-516位为轻链CDR1;第562-582位为轻链CDR2,第679-708位为轻链CDR3;其中,第1-363位为重链核苷酸序列,第409-741为轻链核苷酸序列。第



364-408位为 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>连接序列) :

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACGTATGCTATGAATTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA<sup>[0227]</sup>GCGATTAGTATGTCTGGTGAATCTACATACTAC  
GCAGACTCCGTGAAGGGC<sup>[0227]</sup>CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA<sup>[0227]</sup>GATCGA  
CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTGATGTC<sup>[0227]</sup>TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG  
AGTGGTGGAGGCGGTT<sup>[0227]</sup>CAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG  
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGC<sup>[0227]</sup>ACTGGA  
ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCC<sup>[0227]</sup>TGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA  
GCCCCCAAACCTCATCTAT<sup>[0227]</sup>GGTAACAGCAATCGGCCCTCA<sup>[0227]</sup>GGGGTCCCTGACCGATTCT  
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT  
GGGGCTGATTATTACTGC<sup>[0227]</sup>CAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTA<sup>[0227]</sup>ITCGGCGGAGGG  
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0228] am20氨基酸序列 (SEQ ID NO:29) :

QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAAS<sup>[0228]</sup>GFTFSTYAMN<sup>[0228]</sup>WVRQAPGKGLEWVS<sup>[0228]</sup>AISMSGESTYY  
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<sup>[0228]</sup>DRRGSHADAFDV<sup>[0228]</sup>WGQGLTVTS  
[0229] SGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISC<sup>[0229]</sup>TGTSSDVGGYNYVS<sup>[0229]</sup>WYQQYPGK  
APKLLIY<sup>[0229]</sup>GNSNRPS<sup>[0229]</sup>GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYC<sup>[0229]</sup>QSYDSSLRVV<sup>[0229]</sup>FGGG  
TKVTVLG

[0230] 重链CDR1:GFTFSTYAMA (SEQ ID NO:64)

[0231] 重链CDR2:AISMSGESTYYADSVKG (SEQ ID NO:65)

[0232] 重链CDR3:DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO:14)

[0233] 轻链CDR1:TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:16)

[0234] 轻链CDR2:GNSNRPS (SEQ ID NO:18)

[0235] 轻链CDR3:QSYDSSLRVV (SEQ ID NO:20)

[0236] 其中,第1-121位为重链氨基酸序列,第137-247为轻链氨基酸序列,第122-136为 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>连接序列。

[0237] am35核苷酸序列 (SEQ ID NO:30,第76-105位为重链CDR1,第148-198位为重链CDR2,第295-330位为重链CDR3;第475-516位为轻链CDR1;第562-582位为轻链CDR2,第679-708位为轻链CDR3;其中,第1-363位为重链核苷酸序列,第409-741为轻链核苷酸序列。第364-408位为 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>连接序列) :

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACGTATGCTATGCAC<sup>[0238]</sup>TGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA<sup>[0238]</sup>GCTATTAGTAGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC<sup>[0238]</sup>  
GCAGACTCCGTGAAGGGC<sup>[0238]</sup>CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA<sup>[0238]</sup>GATCGA  
CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTGATGTC<sup>[0238]</sup>TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG  
AGTGGTGGAGGCGGTT<sup>[0238]</sup>CAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG  
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGC<sup>[0238]</sup>ACTGGA  
ACCAGCAGTGACGTTGGTCATAAGTTTCTGTCTCC<sup>[0238]</sup>TGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA  
GCCCCCAAACCTCATCTAT<sup>[0238]</sup>AAGAATCTTTTGC<sup>[0238]</sup>GGCCCTCA<sup>[0238]</sup>GGGGTCCCTGACCGATTCT  
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT  
GGGGCTGATTATTACTGC<sup>[0238]</sup>CAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTA<sup>[0238]</sup>ITCGGCGGAGGG  
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0239] am35氨基酸序列 (SEQ ID NO:31) :

QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAISSGGSTYY  
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRGSHADAFDVWGQGLTVTS  
[0240] SGGGSGGGSGGGSGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISC TGTSSDVGHKFPVS WYQQYPGK  
APKLLIYKNLLRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYCQSYDSSLRVVFGGG  
TKVTVLG

[0241] 重链CDR1:GFTFSSYAMH (SEQ ID NO:10)

[0242] 重链CDR2:AISSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:66)

[0243] 重链CDR3:DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO:14)

[0244] 轻链CDR1:TGTSSDVGHKFPVS (SEQ ID NO:67)

[0245] 轻链CDR2:KNLLRPS (SEQ ID NO:68)

[0246] 轻链CDR3:QSYDSSLRVV (SEQ ID NO:20)

[0247] 其中,第1-121位为重链氨基酸序列,第137-247为轻链氨基酸序列。第122-136为 (Gly4Ser)<sub>3</sub>连接序列。

[0248] am42核苷酸序列 (SEQ ID NO:32,第76-105位为重链CDR1,第148-198位为重链CDR2,第295-330位为重链CDR3;第475-516位为轻链CDR1;第562-582位为轻链CDR2,第679-708位为轻链CDR3;其中,第1-363位为重链核苷酸序列,第409-741为轻链核苷酸序列。第364-408位为 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>连接序列) :

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCAC TGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTAGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC  
GCAGACTCCGTGAAGGGCGGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA GATCGA  
CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTGATGCT TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG  
[0249] AGTGGTGGAGGCGGTT CAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG  
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGC ACTGGA  
ACCAGCAGTGACGTTGGTCTTATGCATAATGTCTCC TGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA  
GCCCCAAACTCCTCATCTAT AAGTCTTCGTCTCGGCCCTCA GGGGTCCCTGACCGATTC  
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT  
GGGGCTGATTATTACTGC CAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTA TTCGGCGGAGGG  
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0250] am42氨基酸序列 (SEQ ID NO:33) :

QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAISSGGSTYY  
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRGSHADAFDVWGQGLTVTS  
[0251] SGGGSGGGSGGGSGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISC TGTSSDVGLMHNVS WYQQYPGK  
APKLLIYKSSSRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYCQSYDSSLRVVFGGG  
TKVTVLG

[0252] 重链CDR1:GFTFSSYAMH (SEQ ID NO:10)

[0253] 重链CDR2:AISSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:66)

[0254] 重链CDR3:DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO:14)

[0255] 轻链CDR1:TGTSSDVGLMHNVS (SEQ ID NO:69)

[0256] 轻链CDR2:KSSSRPS (SEQ ID NO:70)

[0257] 轻链CDR3:QSYDSSLRVV (SEQ ID NO:20)

[0258] 其中,第1-121为重链氨基酸序列,第137-247为轻链氨基酸序列。第122-136为(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>连接序列。

[0259] T2-23核苷酸序列(SEQ ID NO:34,第76-105位为重链CDR1,第148-198位为重链CDR2,第295-330位为重链CDR3;第475-516位为轻链CDR1;第562-582位为轻链CDR2,第679-708位为轻链CDR3;其中,第1-363位为重链核苷酸序列,第409-741为轻链核苷酸序列。第364-408位为(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>连接序列):

```
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACGTGGGTCCGCCAGGCT
[0260] CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGCTATTAGTAGTAGTGGTCGTAGCACATACTAC
GCAGACTCCGTGGAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATGATCGA

CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTAAATGTCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
AGTGGTGGAGGCGGTTCAAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCCTGGA
[0261] ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCCTGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
GCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAAGGGTCCCTGACCGATTG
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
GGGGCTGATTATTACTGCCTAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTAATTCGGCGGAGGG
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT
```

[0262] T2-23氨基酸序列(SEQ ID NO:35):

```
QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSATSSSGRSTYY
ADSVEGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRGSHADALNVWGQGLTVTS
[0263] SGGGSGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISCITGTSSDVGGYNYVSWYQQYPGK
APKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYCQSYDSSLRVVFGGG
TKVTVLG
```

[0264] 重链CDR1:GFTFSSYAMH(SEQ ID NO:10)

[0265] 重链CDR2:ATSSSGRSTYYADSVEG(SEQ ID NO:71)

[0266] 重链CDR3:DRRGSHADALNV(SEQ ID NO:72)

[0267] 轻链CDR1:TGTSSDVGGYNYVS(SEQ ID NO:16)

[0268] 轻链CDR2:KSSSRPS(SEQ ID NO:70)

[0269] 轻链CDR3:QSYDSSLRVV(SEQ ID NO:20)

[0270] 其中,第1-121位为重链氨基酸序列,第137-247为轻链氨基酸序列。第122-136为(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>连接序列。

[0271] 4.4、P7D4系列抗体对GPC3结合能力的SPR分析

[0272] 为定量分析P7D4系列抗体与GPC3的结合,使用Biacore T200系统(购自GE)通过捕获法分别测量P7D4系列单链抗体的亲和力和动力学参数。根据制造商的说明,用NHS/EDC偶联通过伯氨基将抗人IgG(Fc)的抗体(购自GE)偶联到传感器芯片CM5的羧甲基葡聚糖表面。测量在25℃、30μl/min、1×HBS-EP+工作缓冲液中进行,再生条件为3M MgCl<sub>2</sub>、10μl/min作用30秒。在每一轮测试循环中,待测试抗体首先被捕获到芯片上,一定浓度的分析物GPC3流过芯片表面,人GPC3与被捕获的抗体相互作用而导致传感片表面分子浓度的变化将由SPR信号的改变而得到测定,并以共振单位(RU)表示。以时间对共振单位(RU)连续作图,得到的传感图记录了整个反应过程包括结合和解离过程(图4)。在所有的单循环动力学中,GPC3的

浓度分别为5nM、10nM、20nM、40nM和80nM。用Biacore T200 evaluation software评估所得作用曲线,并计算亲和力KD值。所有P7D4系列单链抗体分别对GPC3的结合数据总结在表1中。

[0273] 表1、P7D4系列单链抗体对GPC3的结合数据

[0274]	抗体样品	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
	P7D4	9.31E+04	6.17E-03	6.64E-08
	am4	5.39E+05	4.08E-05	7.56E-11
	am14	6.73E+05	4.43E-05	6.46E-11
[0275]	am20	2.12E+05	6.47E-05	3.06E-10
	am35	7.38E+05	5.2 E-05	7.14E-11
	am42	8.16E+05	6.70E-05	8.21E-11
	T2-23	8.86E+05	5.19E-05	5.85E-11

[0276] 由表1可见,改造获得的P7D4系列突变体单链抗体具有良好的亲和力,相对于P7D4单链抗体具有极其显著的提高。

[0277] 4.5、P7D4系列抗体的识别特异性分析

[0278] 为了分析P7D4系列抗体对GPC3蛋白的结合特异性,通过ELISA实验,分别测定P7D4系列单链抗体分别对人GPC家族成员,包括重组人GPC1 (rhGPC1)、GPC2 (rhGPC2)、GPC3 (rhGPC3)、GPC5 (rhGPC5) 和GPC6 (rhGPC6) (购自安迪生物科技(上海)有限公司)的结合活性。

[0279] 为此目的,用0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.6) 包被液稀释以上5种抗原,每孔包被100ng,50μl/孔,4℃包被过夜,并用含2% (w/v) BSA的PBST于室温下封闭2小时。然后用PBST漂洗平板三次并去除干净。随后,向每个孔板加入100ng各抗体蛋白的PBST溶液,每个样品的测定使用平行复孔分析。37℃保温2小时后,用PBST漂洗三次,随后加入1:20000稀释的HRP标记的兔抗人Fc抗体(购自上海锐劲生物技术有限公司) 100μl/孔,37℃反应1小时。为了检测,用PBST漂洗孔三次,然后用PBS漂洗三次,最后加入TMB显示10分钟,用每孔50μl的2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止显色反应,用酶联免疫检测仪 (Bio-Rad) 在450nm测量消光值。

[0280] 结果如图5所示,所有P7D4系列的单链抗体均只特异性结合人GPC3,不与人GPC1、GPC2、GPC5和GPC6结合。

[0281] 实施例5、人GPC3抗原及抗该抗原的人源化单克隆抗体的制备

[0282] 5.1人GPC3在真核表达系统中表达及纯化

[0283] 5.1.1GPC3载体构建及鉴定

[0284] 以人肝癌细胞系Hu h-7 cDNA为模板,以如下引物GPC3-F: GATCGCTAGCACAGCCCCCGCCGCCGC (SEQ ID NO:54), GPC3-R: GTACGGATCCTTCAGCGGGGAATGAACGTTC (SEQ ID NO:55) 进行PCR扩增,获得两端带有酶切位点NheI/BamHI的GPC3片段(1.6kb),将获得的PCR片段用内切酶NheI/BamHI(购自Fermentas公司)双酶切,同时将质粒载体V5H(购自Raygene公司),同样经内切酶NheI/BamHI双酶切,琼脂糖凝胶电泳后回收载体和插入片段,再通过T4DNA ligase(购自NEB公司)连接并转化于

宿主菌TOP10(购自LIFE公司)中,经氨苄抗性进行筛选,挑取克隆抽提质粒内切酶NheI/BamHI(购自Fermentas公司)双酶切鉴定含插入片断的阳性克隆,并通过测序验证,得到含有正确的人GPC3基因序列的真核表达质粒V5H-GPC3。

[0285] 5.1.2人GPC3蛋白的表达与纯化

[0286] 5.1.2.1. V5H-GPC3质粒的脂质体转染和培养

[0287] 将生长良好的HEK293F细胞(HEK293F,购自LIFE公司)以 $1 \times 10^6$ 细胞/毫升的密度接种于细胞三角培养瓶,37℃5%CO<sub>2</sub> 120rpm培养过夜备用;将上述步骤获得的质粒V5H-GPC3与脂质体293Fectin(购自LIFE公司)分别用DMEM稀释并温和混合,室温孵育20min,将孵育好的DNA-脂质体复合物加至293F细胞中,37℃5%CO<sub>2</sub>120rpm培养72h。收集细胞培养液,4500g离心15min,除去细胞,取上清。

[0288] 5.1.2.2. GPC3蛋白纯化

[0289] 取1ml的Ni-NTA Agarose亲和填料装柱,将Ni-NTA亲和柱用平衡缓冲液(50mMPB、0.3M NaCl、10mM咪唑、pH8.0)平衡10个柱体积。将离心后的细胞培养液上清以1ml/min通过Ni-NTA亲和柱,收集流穿液4℃保存。用清洗缓冲液1(50mM PB、0.3M NaCl、20mM咪唑、pH8.0)洗10个柱体积,收集流穿液于4℃保存。用洗脱缓冲液(50mM PB、0.3M NaCl、250mM咪唑、pH8.0)洗4-5个柱体积,收集洗脱液,在透析液(50mM PB,pH7.8,0.3M NaCl,5%甘油)中4℃透析过夜,即获得GPC3(H)蛋白,取少量进行SDS PAGE电泳(图6)。

[0290] 5.2人GPC3抗原免疫

[0291] 重组蛋白免疫:将上述实施例5.1中得到的1ml纯化人GPC3蛋白GPC3(H)(1.0mg/mL)作为抗原与1mL完全弗氏佐剂(购自Sigma-aldrich公司)充分乳化混合皮下免疫6-8周龄BALB/c小鼠,每只小鼠免疫100μg人GPC3(H)蛋白抗原。4周后人GPC3抗原与不完全弗氏佐剂乳化混合,腹腔注射免疫小鼠,50μg每只小鼠,其后间隔2周,继续腹腔50μg抗原加强免疫。在第4次加强免疫1周后,以GPC3(H)蛋白进行包被,通过ELISA法检测小鼠抗血清效价,继续加强免疫,直至小鼠的抗血清效价达到 $>10^5$ 。

[0292] 最后一次加强免疫3周后,脾内免疫上述人GPC3(H)蛋白20μg,备用。

[0293] 5.3抗人GPC3杂交瘤细胞株建立

[0294] 小鼠经脾内加强免疫后4天,在无菌情况下取脾,用100目滤网滤过分离淋巴细胞,与骨髓瘤细胞系SP2/0融合,经次黄嘌呤、氨基蝶呤与胸苷(hypoxanthine, aminopterin and thymidine, HAT)选择性培养3天后,补加HT培养基,继续培养1周。

[0295] 以GPC3(H)抗原包被,ELISA筛选阳性克隆,以有限稀释法进行3次亚克隆,继续连续培养2个月,最后获得稳定杂交瘤细胞系(克隆号分别命名为:5A5,7C9,11D3)。

[0296] 5.4腹水生产及抗体的纯化

[0297] 将8-10周龄F1小鼠腹腔注射100μL降植烷(购自Sigma-aldrich公司),1周后,取上述实施例5.4杂交瘤细胞克隆以 $5 \times 10^5$ 细胞/小鼠的量注射小鼠腹腔以制备腹水,7到10天后采集腹水,10000g离心10min,取上清备用。取蛋白G亲和柱(购自GE公司)回复室温,用PBS(0.01M PB,0.15M NaCl,pH 7.4)平衡5个柱体积。将腹水上清与等体积用PBS(0.01M PB,0.15M NaCl,pH 7.4)混匀,0.22μm滤器过滤,过滤的腹水上清液上蛋白G亲和柱,PBS洗5个柱体积。以洗脱缓冲液(0.1M Glycine HCl,pH2.7)洗脱,洗脱液加入1/10体积中和缓冲液(1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,pH9.0)中和。将溶液用PBS(0.01M PB,0.15M NaCl,pH 7.4)透析,其间换液两

次,两次换液时间间隔时间大于5小时。将透析溶液于10000g离心10min,上清液通过0.22um滤膜过滤保存,得到纯化的对应各克隆产生的抗人GPC3单抗的溶液。根据分析5A5具有良好的抗原结合能力。

[0298] 5.5GPC3克隆5A5的人源化

[0299] 5.5.1 5A5抗体的序列分析

[0300] 5A5具有良好的抗原结合能力。测定5A5抗体基因可变区序列VL与VH,综合Kabat、Chothia以及IMGT三种抗体CDRs区的命名方案,确定抗体轻链与重链的六个CDRs区序列。

[0301] 5A5重链的核苷酸序列如下(SEQ ID NO:56,其中,下划线的三个区段依次为CDR1、CDR2、CDR3):

[0302] CAGGTTCAACTGCAGCAGTCTGGGACTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTTGGGCTACACATTTACTGACTATGAAATGCACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAGTGGTGATACTGCCTACAATCAGAGGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCTTCCAGCACAGCCTACATGGAGTACAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATTTTATTCCTATGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0303] 5A5轻链的核苷酸序列如下(SEQ ID NO:57,其中,下划线的三个区段依次为CDR1、CDR2、CDR3):

[0304] GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACAGTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAATCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGAGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTTCTGCTCTCAAAGTATATATGTTCCGTACACGTTTCGGAGGAGGGACCAAGCTGGAAATAAACGG

[0305] 5A5重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:81,其中,下划线的三个区段依次为CDR1、CDR2、CDR3):

[0306] QVQLQQSGTELVRPGASVKLSCKALGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGDTAYNQRFK GKATLTADKSSSTAYMEYSSLTSEDSAVYYCTRFYSYAYWGQGLTVTSA

[0307] 5A5轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:82,其中,下划线的三个区段依次为CDR1、CDR2、CDR3)

[0308] DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGRSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSIYVPYTFGGGTKLEIKR

[0309] 5.5.2抗体模板的选择

[0310] 抗体模板框架区的选择主要有4个重要因素:免疫原性,抗原结合特性,表达以及抗体的稳定性。

[0311] (1)根据专利W02008021156确定抗体轻重链可变区中支持抗体loop结构的氨基酸残基以及轻重链结合区域的氨基酸残基。

[0312] (2)将5A5的轻链或者重链可变区全长与来自IMGT,V BASE或者NCBI的抗体种系进行序列相似性比对。

[0313] (3)将5A5的轻链或者重链可变区中CDR区内的loop支持相关的氨基酸残基去掉,然后与来自IMGT,V BASE或者NCBI的抗体种系进行序列相似性比对。

[0314] (4)将5A5的轻链或者重链可变区中CDR区的氨基酸残基去掉,然后与来自IMGT,V

BASE或者NCBI的抗体种系进行序列相似性比对。

[0315] (5) 只保留5A5的轻链或者重链序列中的与支持loop相关的氨基酸残基,然后与来自IMGT,V BASE或者NCBI的抗体种系进行序列相似性比对。

[0316] (6) 只保留5A5的轻链或者重链framework中与支持loop相关的氨基酸残基,然后与来自IMGT,V BASE或者NCBI的抗体种系进行序列相似性比对。

[0317] (7) 综合序列相似性比对的结果,选取相似度最高的抗体种系作为抗体模板。

[0318] (8) 重链的序列相似度比对结果:根据相似度,选取VH1\_69\*06 (IMGT,Accession numbers:L22583) 作为5A5重链的抗体模板。

[0319] (9) 轻链的序列相似对比结果:根据相似度,选取VK2D\_29\*02 (IMGT,Accession numbers:U41644) 作为5A5轻链的抗体模板。

[0320] 5.5.3CDR移植

[0321] 将5A5抗体的轻链或者重链CDR区替换掉抗体模板的CDR区。最终确定人源化抗体(Y035)。其氨基酸序列如下:

[0322] 人源化Y035重链(SEQ ID NO:58):

[0323] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFS<sup>1</sup>SDYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGDTAYNQRFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFY<sup>2</sup>SYAYWGQGT<sup>3</sup>LVTVSA

[0324] 重链CDR1氨基酸序列为:Asp Tyr Glu Met His(SEQ ID NO:73);

[0325] 重链CDR2氨基酸序列为:Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Gly(SEQ ID NO:74);

[0326] 重链CDR3氨基酸序列为:Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr(SEQ ID NO:75)。

[0327] 人源化Y035轻链(SEQ ID NO:59):

[0328] DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPQLLIYK<sup>1</sup>VS<sup>2</sup>NRFS<sup>3</sup>GV<sup>4</sup>PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCSQSIYVPYTFGQGT<sup>5</sup>KLEIKR

[0329] 轻链CDR1氨基酸序列为:Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln(SEQ ID NO:76);

[0330] 轻链CDR2氨基酸序列为:Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser(SEQ ID NO:77);

[0331] 轻链CDR3氨基酸序列为:Ser Gln Ser Ile Tyr Val Pro Tyr Thr(SEQ ID NO:78)。

[0332] 5.5.4表达和纯化人源化的抗体

[0333] (1) 根据人源化的抗体(Y035)的氨基酸序列,设计核苷酸序列并合成

[0334] 合成的轻链核苷酸序列(SEQ ID NO:79,包括信号肽编码序列):

[0335] GGATCGATATCCACCATGGACATGATGGTGTGCGCCAGTTCCTGGCCTTCCTGCTGCTGTGGTTCCCA  
GGCGCTAGATGCGACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTGACCCCCGGCGAGCCCCGCCAGCATCAG  
CTGCCGGAGCAGCCAGAGCCTGGTGACAGCAACGGCAACACCTACCTGCAGTGGTACCTGCAGAAGCCCCGGCCAGA  
GCCCCAGCTGCTGATCTACAAGGTGAGCAACCGGTTACGCGCGGTGCCCGACCGGTTACGCGGCAGCGGCAGCGGC  
ACCGACTTCACCTGAAGATCAGCCGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCAGCCAGAGCATCTACGT  
GCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCT

[0336] 合成的重链核苷酸序列(SEQ ID NO:80,包括信号肽编码序列):

[0337] GGATCGATATCTGCGCCTATCTAGCCACCATGCGGGTGTGATCCTGCTGTGGCTGTTTACCGCCTTC

CCCGGCTTCCTGAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCCAGCGTGAAGGTGAG  
CTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCAGCGACTACGAGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCGGCCAGGGCCTGGAGT  
GGATGGGCGCCATCCACCCGGCAGCGGCGACACCGCCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGGTGACCATCACCGCC  
GACAAGAGCACCAGCACC GCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCG  
GTTCTACAGCTACGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCGCCGCTAGCACCAAA

[0338] (2) 把合成的抗体核苷酸序列(信号肽是第16-81位(轻链)第31-84位(重链)), 抗体的可变区, 恒定区插入到哺乳动物细胞表达载体中从而分别构建出含有重链和轻链的抗体表达载体, 通过测序鉴定抗体序列跟设计一致。具体为:

[0339] 以EcoRV和BsiWI双酶切合成的轻链以及pIK-hu12L(购自上海锐劲生物技术有限公司), 将轻链插入pIK-hu12L。

[0340] 以EcoRV和NheI双酶切合成的重链以及改造过的pIH-hu12H(购自上海锐劲生物技术有限公司在CH1上通过同义突变增加了一个NheI酶切位点), 将重链插入pIH-hu12H。

[0341] 经酶切连接好的载体转化至TOP10感受态细胞, PCR鉴定阳性克隆, 经测序鉴定确定序列正确的克隆。将载体通过293Fectin瞬时转染至293F细胞中并表达。离心收集293F培养上清, 通过0.45um滤器过滤, 通过Protein A柱亲和层析。利用分光光度计测定A280来确定纯化抗体的浓度。

[0342] 5.6人源化抗体Y035对人GPC3结合能力的SPR分析

[0343] 为定量分析抗体Y035与抗原蛋白人GPC3的结合, 使用Biacore T200系统(购自GE)通过多循环动力学测定方法, 测量抗体Y035的亲力和动力学参数。根据制造商的说明, 用NHS/EDC偶联通过伯氨基将抗原蛋白人GPC3(购自上海锐劲生物技术有限公司)偶联到传感器芯片CM5的羧甲基葡聚糖表面, 配体最终偶联量为305RU。动力学测量在25℃、30μl/min、1×HBS-EP+工作缓冲液中进行, 再生条件为10mMGlycine-HCl (pH2.5)、10μl/min作用25秒。在每一个测量循环中, 特定浓度的抗体Y035流过芯片表面, 抗体与被固定在芯片上的抗原蛋白人GPC3相互作用而导致传感片表面分子浓度的变化将由SPR信号的改变而得到测定, 并以共振单位(RU)表示。以时间对共振单位(RU)连续作图, 并扣除了未固定抗原的参比通道的RU数值后, 得到的传感图记录了整个反应过程包括结合和解离过程。抗体Y035及抗体5A5对人GPC3的结合动力学分析如图7-8。在动力学测定的不同循环实验中, 抗体Y035的浓度分别为6.25nM、12.5nM、25nM、50nM和100nM。用Biacore T200evaluationsoftware评估所得作用曲线, 并计算亲和力KD值。采用同样的方法, 对Y035进行人源化改造前的亲本鼠单克隆抗体5A5的亲力和动力学参数也进行了测定分析。抗体Y035和5A5分别对人GPC3蛋白的结合数据总结在表2中, 经过人源化改造后的抗体Y035对人GPC3蛋白的结合能力大大优于鼠源的5A5。

[0344] 表2、抗体Y035与5A5对人GPC3的结合动力学参数

	抗 体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
[0345]	Y035	3.96E+05	2.51E-05	6.34E-11
	5A5	2.80E+05	2.30E-05	8.19E-11

[0346] 5.7抗体Y035的细胞结合活性FACS分析

[0347] 通过荧光激活细胞分选仪(FACS)分析抗体Y035与GPC3阳性的肝癌HepG2细胞系



(ATCC)的结合能力,使用GPC3表达阴性的293T(ATCC)细胞作阴性对照。

[0348] 具体方法如下:

[0349] 1) 取对数生长期的细胞HepG2和293T分别接种到6cm平皿中,接种细胞密度约为90%,37℃孵箱过夜培养。

[0350] 2) 使用10mM的EDTA消化细胞,200g×5min离心收集细胞。以 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /mL的浓度重悬于1%含小牛血清的磷酸盐缓冲液(NBS PBS)中,按100ul/管的量加入流式专用管中。

[0351] 3) 200g×5min离心,弃上清。

[0352] 4) 两个细胞系的实验组分别加入待测抗体Y035,另一个对照为不加抗体的PBS空白对照。抗体的终浓度均为20μg/ml,每管加入100ul。冰浴,45分钟。

[0353] 5) 每管加入2ml 1%NBS PBS,以200g×5min离心,共二遍。

[0354] 6) 弃上清,加入1:100稀释的羊抗人抗体-FITC(来自上海业力生物科技有限公司),每管加入100ul。冰浴,45分钟。

[0355] 7) 每管加入2ml 1%NBS PBS,以200g×5min离心,共二遍。

[0356] 8) 弃上清,重悬于300ul 1%NBS PBS中,流式细胞仪检测。

[0357] 应用流式细胞仪数据分析软件Flowjo7.6分析数据,结果如图9所示,流式细胞分析结果表明,抗体Y035可以特异性识别表达GPC3的HepG2细胞,与GPC3表达阴性的293T细胞不结合。

[0358] 实施例6、基于P7D4单链抗体的CAR表达载体的构建和慢病毒制备

[0359] 作为示例,以下构建本发明的慢病毒质粒载体使用的载体系统属于第三代自灭活慢病毒载体系统,该系统共有四个质粒:即编码蛋白Gag/Pol的包装质粒pMDLg RRE(购自addgene),编码Rev蛋白的包装质粒pRSV-REV(购自addgene),编码VSV-G蛋白的包膜质粒pCMV-VSV-G(购自addgene)及基于空载体pRRLSIN-cPPT.PGK-GFP.WPRE(购自addgene)的编码目的基因CAR的重组表达载体,该系统可以有效降低形成可复制性慢病毒颗粒的风险。

[0360] 在本系统中,本发明人首先通过常规分子克隆的技术方式,对空载体pRRLSIN-cPPT.PGK-GFP.WPRE进行改造,用延长因子-1α(elongation factor-1α,简称EF-1α)的启动子替代了原载体的启动子,并在启动子和CD8α<sub>sp</sub>信号肽之间增加了MluI酶切位点。具体地,使用C1aI/Sa1I(购自NEB)双酶切载体pWPT-EGFP(购自addgene),回收1.1Kb的DNA片段,用T4DNA连接酶连接于经C1aI/Sa1I双酶切的载体pRRLSIN-cPPT.PGK-GFP.WPRE,并转化于宿主菌TOP10中,挑取克隆通过菌落PCR鉴定阳性克隆并通过测序确认,获得重组质粒pRRLSIN-cPPT.EF-1α-EGFP.WPRE。

[0361] 利用前述优化获得的P7D4scFv制备嵌合抗原受体。表3解释了本发明示例的嵌合抗原受体各部分的连接顺序。

[0362] 表3

[0363]

嵌合抗原受体	胞外结合区-跨膜区-胞内信号区1-胞内信号区2etc	描述
P7D4-δZ	P7D4 scFv-CD8-CD3δzeta	阴性对照
P7D4-Z	P7D4 scFv-CD8-CD3 zeta	第一代
P7D4-BBZ	P7D4 scFv-CD8-CD137-CD3 zeta	第二代

P7D4-28Z	P7D4 scFv-CD28a-CD28b-CD3 zeta	第二代
P7D4-28BBZ	P7D4 scFv-CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta	第三代

[0364] 注:CD28a代表CD28分子的跨膜区,CD28b代表CD28分子的胞内信号区。

[0365] 1、核酸片段的扩增

[0366] (1) scFv序列的扩增

[0367] 分别以V5-scFv-P7D4-Fc质粒为模板,采用正向引物P7D4fd (SEQ ID NO:36,包含部分CD8signal peptide (CD8sp) 的序列,引物序列:ctccacgccgccaggccgcaggtgcagctgcaggag) 和反向引物P7D4re (SEQ ID NO:37,包含部分CD8hinge的序列,引物序列:CGGCGCTGGCGTCGTGGTACCTAGGACGGTGACCTTGG) 为引物对,PCR扩增获得P7D4scFv片段。

[0368] (2) 嵌合抗原受体其他部分的核酸序列

[0369] 抗GPC3嵌合抗原受体蛋白的除P7D4scFv外其它部分的核酸序列以专利申请号为201310164725.X中公开的序列SEQ ID NO:26,27,28,29和30为模板通过PCR方式获得。

[0370] 具体地,其中包含CD8 $\alpha$ sp序列的片段F1以本实施例中构建的质粒pRRLSIN-cPPT.EF-1 $\alpha$ -EGFP.WPRE为模板,以引物对PWXLf (SEQ ID NO:38,引物序列:gcaggggaaagaatagtagaca) 和PRRL-CD8SP-R1 (SEQ ID NO:39,引物序列:CGGCCTGGCGGCGTGGAG) 进行PCR扩增获得。

[0371] 包含CD8-CD3 $\delta$ zeta ( $\delta$ Z) 的片段F3- $\delta$ Z以申请专利201310164725.X中SEQ ID NO:26质粒为模板,采用引物对PRRL-CD8hinge (SEQ ID NO:40,引物序列:accacgacgccagcgccg) 和 $\delta$ Z re (SEQ ID NO:41,引物序列:GAGGTCGACCTACGCGGGGCGTCTGCGCTCCTGCTGAACCTTACTCT) 通过PCR扩增获得。

[0372] 包含CD8-CD3zeta (Z) 的片段F3-Z、包含CD8-CD137-CD3zeta (BBZ) 的片段F3-BBZ、包含CD28a-CD28b-CD3zeta (28Z) 的片段F3-28Z和包含CD28a-CD28b-CD137-CD3zeta (28BBZ) 的片段F3-28BBZ序列分别以申请专利201310164725.X中SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30对应的质粒为模板,采用引物对PRRL-CD8hinge (SEQ ID NO:42,引物序列:accacgacgccagcgccg) 和R3R (SEQ ID NO:43,引物序列:aatccagaggttgattgtcgacctagcgagggggcagggcctgc) 通过PCR扩增获得。

[0373] 2、核酸片段的拼接

[0374] 分别将如前述获得的F1核酸片段,与等摩尔的P7D4scFv核酸片段以及等摩尔的F3- $\delta$ Z或F3-Z或F3-BBZ或F3-28Z或F3-28BBZ核酸片段,进行三片段拼接PCR,拼接条件为:预变性:94℃,4min;变性:94℃,40s;退火:60℃,40s;延伸:68℃,140s,进行5个循环,然后总延伸68℃,10min,补充DNA聚合酶及正向引物PWXLf和反向引物R3R (CD8-CD3 $\delta$ zeta对应的反向引物为 $\delta$ Z re,其余的皆为R3R) 后PCR扩增30个循环,扩增条件为预变性:94℃,4min;变性:94℃,40s;退火:60℃,40s;延伸:68℃,140s,进行30个循环,然后总延伸68℃,10min。本实施例构建的由F1片段、P7D4scFv或P7D4突变体scFv、以及各类F3片段所组成的片段可以简称为CAR片段,扩增获得的片段分别称为:

- P7D4 scFv- $\delta$ Z (SEQ ID NO: 44),  
P7D4 scFv-Z (SEQ ID NO: 45),  
[0375] P7D4 scFv-BBZ (SEQ ID NO: 46),  
P7D4 scFv-28Z (SEQ ID NO: 47),  
P7D4 scFv-28BBZ (SEQ ID NO: 48)。

[0376] 3、慢病毒质粒载体的构建

[0377] 本实施例构建了由F1片段、P7D4scFv、以及F3片段组件简称为CAR)通过MluI/SalI限制性内切酶双酶切,连入同样双酶切的pRRLSIN-cPPT.EF-1 $\alpha$ -EGFP.WPRE载体中,从而构建表达各嵌合抗原受体的慢病毒载体pRRLSIN-cPPT.EF-1 $\alpha$ -CAR。构建成功的载体经MluI/SalI酶切鉴定及序列测定正确后,可以准备用于慢病毒包装。如前所述,相关CAR基因经转录翻译为一条肽链,在CD8 $\alpha$ 信号肽的引导下,抗GPC3嵌合抗原受体将定位在细胞膜上。

[0378] 通过以上构建,分别可获得五个CAR多肽序列,称为:

- [0379] P7D4- $\delta$ Z (SEQ ID NO:49);  
[0380] P7D4-Z (SEQ ID NO:50);  
[0381] P7D4-BBZ (SEQ ID NO:51);  
[0382] P7D4-28Z (SEQ ID NO:52);  
[0383] P7D4-28BBZ (SEQ ID NO:53)。

[0384] 4、质粒转染293T包装慢病毒

[0385] 以 $6 \times 10^6$ 的密度接种培养至第6~10代的HEK-293T细胞(ATCC:CRL-11268)于10cm培养皿中,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养过夜准备用于转染。培养基为含10%胎牛血清和DMEM(均购自Life公司)。

[0386] 转染的步骤如下:

[0387] 4.1A液配制:将5.2 $\mu$ g的各目的基因质粒pRRLSIN-cPPT.EF-1 $\alpha$ -CAR,分别与6.2 $\mu$ g包装质粒pMDLg RRE和pRSV-REV、以及2.4 $\mu$ g包膜质粒pCMV-VSV-G,溶于800 $\mu$ L的无血清DMEM培养液中,混匀。

[0388] 4.2B液配制:将60 $\mu$ g PEI(聚乙烯亚胺1 $\mu$ g/ $\mu$ L,购自Polysciences公司)溶解于800 $\mu$ L的无血清DMEM培养液中,轻轻混匀,室温孵育5min。

[0389] 4.3转染复合物的形成:将A液加入B液中轻轻混合,加入后立即涡旋混合或轻轻混匀,室温下孵育20min。

[0390] 4.4将转染复合物1.6ml滴加入HEK-293T细胞中,4-5h小时后,用2%FBS的DMEM培养基给转染的293T细胞换液。

[0391] 在转染孵育72h后,使用0.45 $\mu$ m滤器(购自Millipore公司)过滤收集病毒,然后采用Beckman Optima L-100XP超速离心机28000rpm,4℃离心2小时,弃离心上清,离心所得沉淀用1/10~1/50原液体积的AIM-V培养液(购自Life公司)进行重悬,以100 $\mu$ L/管分装冻存于-80℃,以待病毒滴定或感染T淋巴细胞。

[0392] 实施例7、重组慢病毒感染CTL细胞

[0393] 由健康人外周血通过密度梯度离心法获得人外周血单个核细胞(上海市血液中心提供),以约 $2 \times 10^6$ /mL密度加入AIM-V淋巴细胞培养基(购自Invitrogen公司)培养,并以细

胞:磁珠比例为1:1加入包被有抗CD3和CD28抗体的磁珠(Invitrogen公司),同时加入终浓度300U/mL的重组人IL-2(购自上海华新生物高技术有限公司)刺激培养48h,然后以用上述重组慢病毒(MOI $\approx$ 10)感染T细胞。感染后的细胞每隔一天采用 $5 \times 10^5$ /mL的密度进行传代,同时在淋巴细胞培养液中补加终浓度300U/mL的重组人IL-2。

[0394] 感染的CTL细胞在培养第8天时通过流式细胞检测各不同嵌合抗原受体表达。采用带His-tag的人类GPC3重组蛋白(购自上海锐劲生物技术有限公司)进行FACS检测;首先将细胞与该蛋白(50ug/ml)孵育1hr,D-PBS洗涤2次,然后加入抗His-tag的抗体(1:50稀释,购自上海睿星生物技术有限公司),孵育1hr,然后用D-PBS洗涤2次,然后加入FITC标记的羊抗鼠二抗(上海康成生物技术有限公司),孵育50min,D-PBS洗涤3次后,FACS检测。以未感染的T淋巴细胞作为阴性对照,表达不同嵌合抗原受体的病毒感染T细胞其阳性率如表4所示。该阳性率结果表明,通过慢病毒感染的方法能够获得一定阳性率的CAR<sup>+</sup>T细胞。

[0395] 表4

[0396]

转染有下列CAR的T细胞	T细胞转染阳性率
P7D4- $\delta$ Z(阴性对照)	59%
P7D4-Z	65%
P7D4-BBZ	53%
P7D4-28Z	61%
P7D4-28BBZ	54%

[0397] T细胞在分别感染包装有不同嵌合抗原受体的病毒后,以细胞密度为 $5 \times 10^5$ /ml隔天传代培养、计数、并对传代的细胞培养液补加IL-2(终浓度为300U/ml),培养第11天约有100~1000倍的扩增,表明表达不同嵌合抗原受体的T细胞在体外能够进行一定数量的扩增,为后续体外毒性试验及体内试验提供了保证。

[0398] 实施例8、表达嵌合抗原受体的T淋巴细胞的体外毒性效果实验

[0399] 体外毒性实验使用的材料如下:

[0400] 如表5所示的GPC3阳性肝癌细胞(HepG2和Huh-7)以及GPC3阴性肝癌细胞(SK-HEP-1)作为靶细胞,效应细胞为如实施例7所验证的体外培养12天的FACS检测嵌合抗原受体表达的阳性细胞记为嵌合抗原受体阳性(CAR<sup>+</sup>)的CTL,效靶比视情况分别为3:1,1:1和1:3,靶细胞数量为10000个/孔,根据不同效靶比对应效应细胞。各组均设5个复孔,取5个复孔的平均值。检测时间为第18h。

[0401] 其中各实验组和各对照组如下:

[0402] 各实验组:各靶细胞+表达不同嵌合抗原受体的CTL,

[0403] 对照组1:靶细胞最大释放LDH,

[0404] 对照组2:靶细胞自发释放LDH,

[0405] 对照组3:效应细胞自发释放LDH。

[0406] 检测方法:采用CytoTox 96非放射性细胞毒性检测试剂盒(Promega公司)进行。该方法是基于比色法的检测方法,可替代<sup>51</sup>Cr释放法。CytoTox 96<sup>®</sup>检测定量地测量乳酸脱氢酶(LDH)。LDH是一种稳定的胞质酶,在细胞裂解时会释放出来,其释放方式与<sup>51</sup>Cr在放射性分析中的释放方式基本相同。释放出的LDH培养基上清中,可通过30分钟偶联的酶反应来检

测,在酶反应中LDH可使一种四唑盐(INT)转化为红色的甲臜(formazan)。生成的红色产物的量与裂解的细胞数成正比。具体参照CytoTox 96非放射性细胞毒性检测试剂盒说明书。

[0407] 细胞毒性计算公式为:

$$[0408] \quad \text{细胞毒性}\% = \frac{\text{实验组}-\text{对照组 2}-\text{对照组 3}}{\text{对照组 1}-\text{对照组 2}} \times 100\%$$

[0409] 具体如表5所示,本发明的P7D4的单链抗体的CAR均有明显的杀伤GPC3阳性肝癌细胞的活性,其中第二代和第三代的P7D4CAR T细胞比第一代抗肿瘤活性略强。此外,所有CAR T细胞对GPC3阴性的SK-HEP-1阳性肝癌细胞均没有杀伤活性。这些结果表明P7D4可以选择性地针对GPC3阳性的肝癌细胞,并进行有效的杀伤。此外,本发明的表达P7D4的第一、二、三代CAR T对GPC3阳性肿瘤细胞呈现效靶比梯度依赖性即效靶比越高细胞毒性作用越强。

[0410] 表5、融合表达单链抗体P7D4的CAR T细胞的细胞毒性

[0411]

细胞毒性 (%)	P7D4-28BBZ			P7D4-BBZ			P7D4-28Z			P7D4-Z			P7D4-δZ		
	不同效靶比			不同效靶比			不同效靶比			不同效靶比			不同效靶比		
	3:1	1:1	1:3	3:1	1:1	1:3	3:1	1:1	1:3	3:1	1:1	1:3	3:1	1:1	1:3
HuH-7	75.3	48.4	17.2	69.2	32.2	10.2	62.4	31.3	7.8	42.9	20.2	5.6	3.2	1.3	5.3
HepG2	85.8	59.1	21.9	71.3	38.6	13.9	68.2	35.6	6.5	48.5	25.9	7.2	4.8	2.5	3.2
SK-HEP-1	2.5	3.2	3.9	4.5	2.1	3.8	1.9	2.4	3.6	2.3	3.7	4.8	3.1	2.3	1.2

[0412] 实施例9基于Y035和GC33的CAR-T细胞的制备和比较

[0413] 参照实施例6和7的操作,基于Y035的轻链可变区和重链可变区,分别制备得到Y035-BBZ、Y035-28Z和Y035-28BBZ两种CAR-T细胞;基于GC33的轻链可变区和重链可变区,分别制备得到GC33-28Z和GC33-28BBZ两种CAR-T细胞,作为对照。嵌合抗原受体各部分的连接顺序如表6所示。

[0414] 表6

[0415]	嵌合抗原受体	胞外结合区-跨膜区-胞内信号区 1-胞内信号区 2 etc
[0416]	Y035-BBZ	Y035 scFv-CD8-CD137-CD3 zeta
	Y035-28Z	Y035 scFv-CD28a-CD28b-CD3 zeta
	Y035-28BBZ	Y035 scFv-CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta
	GC33-28Z	GC33 scFv-CD28a-CD28b-CD3 zeta
	GC33-28BBZ	GC33 scFv-CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta

[0417] 其中,Y035-BBZ的核苷酸序列如下所示 (SEQ ID NO:85):

[0418] gaggtgcagctggtgcagagcggcgccgaggtgaagaagccccggcgccagcgtgaaggtgagctgcaa  
ggccagcggctacaccttcagcgactacgagatgcactgggtgcggcaggccccggccaggcctggagtggatg  
ggcgccatccacccccggcagcggcgacaccgcctacaaccagcggttcaagggccgggtgaccatcaccgccgaca  
agagcaccagcaccgcctacatggagctgagcagcctgcggagcagggacaccgccgtgtactactgcgcccggtt  
ctacagctacgcctactggggccagggcaccctgggtgaccgtgagcgccgggtggaggcggttcaggcggaggtggt  
tctggcggtggcggtatcgacatcgtgatgaccagacccccctgagcctgcccgtgacccccggcgagcccccca  
gcatcagctgccggagcagccagagcctggtgcacagcaacggcaaacctacctgcagtgggtacctgcagaagcc  
cgccagagccccagctgctgatctacaaggtgagcaaccggttcagcggcggtgcccagccggttcagcggcagc  
ggcagcggcaccgacttcaccctgaagatcagccgggtggaggccgaggacgtggcggtgtactactgcagccaga  
gcatctacgtgccctacaccttcggccagggcaccaagctggagatcaaacgtaccacgacgccagcggcgacc  
accaacaccggcgcccaccatcgctgcagccccctgtccctgcgcccagaggcggtgccggccagcggcggggggc  
gcagtgcacacgagggggctggacttcgctgtgatattacatctggcgcccttgccgggacttgtgggggtcc  
ttctcctgtcactggttatcaccctttactgcaaaggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatt  
tatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaaggaggatgt  
gaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgctacaagcaggccagaaccagctctataacgagc  
tcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagcc  
gagaaggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgaggcctacagtgagatt  
gggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggaca  
cctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctgc

[0419] Y035-BBZ的氨基酸序列如下所示 (SEQ ID NO:86)

[0420] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGDTAYNQRFKGRVT  
ITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARFYSYAYWGQGLTVTSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLPVT  
PGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV  
GVYYCSQSIYVPYTFGQGTKLEIKRTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSGRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD  
APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGER  
RRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0421] Y035-28Z的核苷酸序列如下所示 (SEQ ID NO:87) :

[0422] gaggtgcagctggtgcagagcggcgccgaggtgaagaagccccggcgccagcgtgaaggtgagctgcaa  
ggccagcggctacaccttcagcgactacgagatgcactgggtgcggcaggccccggccaggcctggagtggatg  
ggcgccatccacccccggcagcggcgacaccgcctacaaccagcggttcaagggccgggtgaccatcaccgccgaca  
agagcaccagcaccgcctacatggagctgagcagcctgcggagcagggacaccgccgtgtactactgcgcccggtt  
ctacagctacgcctactggggccagggcaccctgggtgaccgtgagcgccgggtggaggcggttcaggcggaggtggt  
tctggcggtggcggtatcgacatcgtgatgaccagacccccctgagcctgcccgtgacccccggcgagcccccca  
gcatcagctgccggagcagccagagcctggtgcacagcaacggcaaacctacctgcagtgggtacctgcagaagcc  
cgccagagccccagctgctgatctacaaggtgagcaaccggttcagcggcggtgcccagccggttcagcggcagc  
ggcagcggcaccgacttcaccctgaagatcagccgggtggaggccgaggacgtggcggtgtactactgcagccaga  
gcatctacgtgccctacaccttcggccagggcaccaagctggagatcaaacgtaccacgacgccagcggcgacc  
accaacaccggcgcccaccatcgctgcagccccctgtccctgcgcccagaggcggtgccggccagcggcggggggc

gcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatttttgggtgctgggtgggtgggtggagtcctggcttgct  
atagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgacta  
catgaacatgactccccgccgccccgggccaaccgcgaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgca  
gcctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgagacgcccccggtaccagcaggggcagaaccagctctata  
acgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggg  
aaagccgcagagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctac  
agttagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagcca  
ccaaggacacctacgacgcccttcacatgcagggcctgccccctcgc

[0423] Y035-28Z的氨基酸序列如下所示 (SEQ ID NO:88) :

[0424] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGDTAYNQRFKGRVT  
ITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARFYSYAYWGQTLTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLPVT  
PGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV  
GVYYCSQSIYVPYTFGQGTKLEIKRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWV  
LVVGGVLA CYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP  
AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG  
KGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR

[0425] Y035-28BBZ的核苷酸序列如下所示 (SEQ ID NO:89) :

[0426] gaggtgcagctggtgcagagcgcgccgaggtgaagaagccccggcgccagcgtgaaggtgagctgcaa  
ggccagcggctacaccttcagcgactacgagatgcactgggtgcggcaggccccggcaggcctggagtggatg  
ggcgccatccacccccgcagcggcgacaccgcctacaaccagcggttcaaggcgccggtgaccatcacgcgcgaca  
agagcaccagcaccgcctacatggagctgagcagcctgcggagcgaggacaccgccgtgtactactgcgccccggtt  
ctacagctacgcctactggggccagggcaccctggtgaccgtgagcgccggtggaggcggttcaggcgaggtggt  
tctggcggtggcggtatcgacatcgatgaccagacccccctgagcctgcccgtgacccccggcgagcccccca  
gcatcagctgccggagcagccagagcctggtgcacagcaacggcaacacctacctgcagtgggtacctgcagaagcc  
cgccagagccccagctgctgatctacaaggtgagcaaccggttcagcggcggtgcccagccggttcagcggcagc  
ggcagcggcaccgacttcacctgaagatcagccgggtggaggccgaggacgtggcggtgtactactgcagccaga  
gcatctacgtgccctacaccttcggccagggcaccaagctggagatcaaactgaccacgacgccagcgccgcgacc  
accaacaccggcgcccaccatcgcgctcgagccccctgtccctgcgcccagaggcggtgccggccagcggcggggggc  
gcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatttttgggtgctgggtgggtgggtggagtcctggcttgct  
atagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgacta  
catgaacatgactccccgccgccccgggccaaccgcgaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgca  
gcctatcgctccaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaccatttatgagaccagtacaaacta  
ctcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcag  
caggagcgcagacgcccccggtaccagcaggggcagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagag  
gagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgcagagaaggaagaaccctc  
aggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagttagattgggatgaaaggcgagcg  
ccggagggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcac  
atgcagggcctgccccctcgc

[0427] Y035-28BBZ的氨基酸序列如下所示 (SEQ ID NO:90)

[0428] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGDTAYNQRFKGRVT  
ITADKSTSTAYMELSSLRSEDYVYYCARFYSYAYWGQGLTVTSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLPVT  
EPASISCRSSQSLVHNGNTYLQWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGVYYC  
SQSIYVPYTFGQGTKLEIKRTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFVWL VVVGGVLA  
CYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT  
TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEGGKPKRRKNPQ  
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0429] 采用GPC3阳性肝癌细胞Huh-7作为靶细胞,参照实施例8采用的体外毒性实验方法进行体外测试,在效靶比为1:3时,Y035-28Z和Y035-28BBZ对Huh-7的杀伤率均达35%以上,而GC33-28Z的杀伤率仅为6%,GC33-28BBZ的杀伤率仅为23%,在效靶比为1:1,Y035-28Z对Huh-7的杀伤率达60%以上,而GC33-28Z的杀伤率仅为22%,以上结果表明,本申请Y035-CAR T细胞的细胞杀伤活性显著优于GC33-CART细胞。

[0430] 实施例10双特异性抗体BiTE的制备

[0431] (1) Y035单链抗体核苷酸序列的制备

[0432] 培养分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株至对数生长期时,进行细胞计数,取 $1 \times 10^7$ 杂交瘤细胞。按照TRIzol® Plus RNA Purification kit (Invitrogen, 12183-555)说明书,从细胞沉淀中提取总RNA。

[0433] a. 逆转录得到cDNA

[0434] 以杂交瘤细胞总RNA做为模板,使用High capacity RNA to cDNA kit (Invitrogen, 4387406),按照说明书逆转录合成cDNA。

[0435] b. 5' -RACE法扩增抗体可变区

[0436] 以cDNA为模板,使用5' -Full RACE kit (TAKARA, D315),用引物tgctttggtttccaggtgcaagatgtgaggtgcagctggtgcaga (SEQ ID NO:91)和引物TATCGGATCCACCACCTCCACGTTTGATCTCCAGCTTGGTG (SEQ ID NO:92)扩增。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离后,得到的PCR产物为Y035单链抗体的核酸。

[0437] (2) CD3单链抗体核酸序列的构建

[0438] 以专利201310025302.X公开的抗EpCAM/CD3双特异性抗体为模板,通过引物 (SEQ ID NO:93, gatatcaaactgcagcagtcag)和引物 (SEQ ID NO:94, GAGAGGGAGTACTCACCCCAAC)进行PCR,具体反应参考KOD PLUS酶说明书,胶回收纯化,得到的PCR产物为CD3单链抗体的核酸。

[0439] (3) 引入NheI酶切位点

[0440] 以载体PIH为模板,通过引物 (ggctaactagagaacccactgc, SEQ ID NO:95)和PH-R (ACATCTTGACCTGGAAACCAAAGC, SEQ ID NO:96)进行PCR,具体反应参考KOD PLUS酶说明书,胶回收纯化PCR产物,得到带有NheI酶切位点的一小段片段。

[0441] (4) Y035/CD3双特异性抗体编码序列核酸的构建

[0442] 步骤(1)、(2)、(3)所得的PCR产物进行Overlap PCR,以引物 (SEQ ID NO:95)和引物 (SEQ ID NO:92)进行PCR,胶回收纯化PCR产物,即为Y035/CD3双特异性抗体编码序列 (SEQ ID NO:97),序列如下:

[0443] gaggtgcagctggtgcagagcggcgcgaggtgaagaagccccggcgccagcgtgaaggtgagctgcaa



ggccagcggctacaccttcagcgactacgagatgcactgggtgcggcaggccccggccaggcctggagtggatg  
ggcgccatccaccccggcagcggcgacaccgcctacaaccagcggttcaaggccgggtgacctaccgcccagaca  
agagcaccagcaccgcctacatggagctgagcagcctgcggagcaggacaccgccgtgtactactgcgcccggtt  
ctacagctacgcctactggggccagggcaccctgggtgaccgtgagcgccgggtggaggcgggttcaggcggaggtggt  
tctggcgggtggcggatcggacatcgtgatgaccagacccccctgagcctgcccgtgacccccggcgagcccgcga  
gcatcagctgccggagcagccagagcctgggtgcacagcaacggcaacacctacctgcagtgggtacctgcagaagcc  
cggccagagccccagctgctgatctacaaggtgagcaaccgggttcagcggcgtgcccagccgggttcagcggcagc  
ggcagcggcaccgacttcaccctgaagatcagccgggtggaggccgaggacgtgggcgtgtactactgcagccaga  
gcatctacgtgccctacaccttcggccagggcaccaagctggagatcaaactggaggtgggtggatccgatataca  
actgcagcagtcaggggctgaactggcaagacctggggcctcagtgaagatgtcctgcaagacttctggctacacc  
tttactaggtacacgatgcactgggtaaacagaggcctggacagggtctggaatggattggatacatattaactcta  
gccgtgggttataactaattacaatcagaagttcaaggacaaggccacattgactacagacaaatcctccagcacagc  
ctacatgcaactgagcagcctgacatctgaggactctgcagctctattactgtgcaagatattatgatgatcattac  
tgcccttgactactggggccaaggcaccactctcacagtctcctcagtcgaaggtggaagtggaggttctggtggaa  
gtggaggttcaggtggagtcgacgacattcagctgaccagctctccagcaatcatgtctgcattctccaggggagaa  
ggtcaccatgacctgcagagccagttcaagtgttaagttacatgaactggtaccagcagaagtcaggcacctcccc  
aaaagatggatttatgacacatccaaagtggcttctggagtcccttatcgcttcagtggcagtggggtctgggacct  
catactctctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgctgccacttattactgccaacagtgagtagtaaccc  
gctcacgttcgggtgctgggaccaagctggagctgaaa

[0444] (5) 靶向Y035/CD3的双特异性抗体的表达及纯化

[0445] 将Y035/CD3BiTE的质粒瞬时转染至真核细胞293F中,细胞转染过程参考293fectin说明书进行。培养上清用金属亲和层析柱NiSepharese™ 6Fast Flow(购自GEHealthcare Bio-Science公司)进行纯化,得到Y035/CD3的双特异性抗体(SEQ ID NO: 98),序列如下所示:

[0446] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGDTAYNQRFKGRVT  
ITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARFYSYAYWGQGLTVTSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLPVTPG  
EPASISCRSSQSLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC  
SQSIYVPYTFGQGTKLEIKRGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKRPGQGLEWIGYIN  
PSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGGSGG  
SGGSGGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTS  
YSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK

[0447] 选择GPC3表达阳性的HepG2和SK-Hep-1GPC3作为靶细胞,研究了Y035/CD3BiTE在体外的细胞毒性作用,结果显示,浓度为0.1ng/ml的Y035/CD3BiTE对HepG2的细胞杀伤作用达到约60%,对SK-Hep-1GPC3的细胞作用达到约40%。与CN103833852A所述的GPC3/CD3BiTE相比,细胞毒性显著增加。

[0448] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

## 序列表

<110> 科济生物医药(上海)有限公司

<120> 抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 的抗体及其应用

<130> 165497

<150> 201510481235.1

<151> 2015-08-03

<160> 98

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 729

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc\_feature

<223> 单链抗体 P1B12E 核苷酸序列

<400> 1

[0001]

```
caggtgcagc tgggtggaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcttgcgaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaaactac      180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaagtcacca      300
tttagtggga cccccgggga gtactggggc agaggaacce tggtcaccgt ctcgagtggg      360
ggaggcgggt caggcggagg tggttctggc ggtggcggat cggaaattgt gttgacacag      420
tetccaggea ccctgtcttt atctccaggg gaaagageca ccctctcctg cagggccagt      480
cagagtgtta gcagcaacta cttagectgg tatcagcaga aacctggeca ggctcccaga      540
ctcctcatct atggtgcate ccgcagggcc actggcatcc cagacagggt cagtggcagt      600
gggtctggga cagacttcac tctcaccatc agcagagtgg agcctgaaga ctttgcagtg      660
tatcactgtc agcagtatgg tgcctcacct aagactttcg gccaaaggac caagctggag      720
atcaaacgt                                     729
```

<210> 2

<211> 243

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 单链抗体 P1B12E 氨基酸序列

<400> 2

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
          50          55          60
```

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Ser Pro Phe Ser Gly Thr Pro Gly Glu Tyr Trp Gly Arg Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr  
 130 135 140  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 165 170 175  
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly  
 180 185 190  
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 195 200 205  
 Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr His Cys Gln  
 210 215 220  
 Gln Tyr Gly Ala Ser Pro Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
 225 230 235 240  
 Ile Lys Arg

[0002]

<210> 3  
 <211> 741  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 单链抗体 P7D4 核苷酸序列  
 <400> 3

caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt cgcagggt 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga 300  
 cgaggggagcc acgctgatgc ttttgatgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg 360  
 agtggtggag gcggttcagg cggaggtggt tctggcggtg gcggatcgea gtctgccctg 420  
 actcagcctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga 480  
 accagcagtg acgttggtgg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa 540  
 gccccaaac tctcatcta tgtaacagc aatcgccct caggggtccc tgaccgattc 600  
 tctggctcca agtctggcac ctacgcctcc ctggccatca ctgggtcca ggctgaggat 660  
 ggggctgatt attactgcca gtcctatgac agcagcctgc gtgtggtatt cggcggaggg 720  
 accaaggtca ccgtcctagg t 741

<210> 4  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

<223> 单链抗体 P7D4 氨基酸序列  
 <400> 4  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro  
 130 135 140  
 Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly  
 145 150 155 160  
 Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln  
 165 170 175  
 Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg  
 180 185 190  
 Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser  
 195 200 205  
 Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr  
 210 215 220  
 Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 245

[0003]

<210> 5  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 引物  
 <400> 5

acagtgc tag cacaggtgca gctggtgg

28

<210> 6  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 引物  
 <400> 6

	ttgtcggatc cacgtttgat ctccagc	27
	<210> 7	
	<211> 0	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 引物	
	<400> 7	
	<210> 8	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 引物	
	<400> 8	
	ttgtcggatc cacctaggac ggtgacc	27
	<210> 9	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0004]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> P7D4 VH CDR1 核苷酸序列	
	<400> 9	
	ggattcacct tcagtagcta tgctatgcac	30
	<210> 10	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<223> P7D4 VH CDR1 氨基酸序列	
	<400> 10	
	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His	
	1                      5                      10	
	<210> 11	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> P7D4 VH CDR2 核苷酸序列	
	<400> 11	
	gctattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c	51

	<210> 12	
	<211> 17	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<223> P7D4 VH CDR2 氨基酸序列	
	<400> 12	
	Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys	
	1 5 10 15	
	Gly	
	<210> 13	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> P7D4 VH CDR3 核苷酸序列	
	<400> 13	
	gatcgacgag ggagccacgc tgatgctttt gatgtc	36
	<210> 14	
	<211> 12	
	<212> PRT	
[0005]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<223> P7D4 VH CDR3 氨基酸序列	
	<400> 14	
	Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val	
	1 5 10	
	<210> 15	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> P7D4 VL CDR1 核苷酸序列	
	<400> 15	
	actggaacca gcagtgacgt tgggtggttat aactatgtct cc	42
	<210> 16	
	<211> 14	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	

	<223> P7D4 VL CDR1 氨基酸序列	
	<400> 16	
	Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser	
	1 5 10	
	<210> 17	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> P7D4 VL CDR2 核苷酸序列	
	<400> 17	
	ggtaacagca atcgccctc a	21
	<210> 18	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<223> P7D4 VL CDR2 氨基酸序列	
	<400> 18	
	Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser	
	1 5	
[0006]	<210> 19	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> P7D4 VL CDR3 核苷酸序列	
	<400> 19	
	cagtcctatg acagcagcct gcgtgtggta	30
	<210> 20	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<223> P7D4 VL CDR3 氨基酸序列	
	<400> 20	
	Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val	
	1 5 10	
	<210> 21	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	引物	
	<400>	21	
	caacgtgaaa aaattattat tcgc		24
	<210>	22	
	<211>	63	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	引物	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(33).. (34)	
	<223>	n is a, c, g, or t	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(45).. (46)	
	<223>	n is a, c, g, or t	
	<400>	22	
	ccagccctt gcctggagcc tggcggaccc amnnecatagc atamnnactg aaggtgaatc		60
	cag		63
[0007]	<210>	23	
	<211>	72	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	引物	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(31).. (32)	
	<223>	n is a, c, g, or t	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(40).. (41)	
	<223>	n is a, c, g, or t	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(43).. (44)	
	<223>	n is a, c, g, or t	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(47).. (47)	
	<223>	n is a, c, g, or t	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(49).. (50)	
	<223>	n is a, c, g, or t	



<220>	
<221> misc_feature	
<222> (52)..(53)	
<223> n is a, c, g, or t	
<400> 23	
gtccaggca aggggctgga gtgggtctca nnkattagtn nknnkgntnn knnkacatac	60
tacgcagact cc	72
<210> 24	
<211> 741	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> am4 核苷酸序列	
<400> 24	
caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tctgtgcag cctctggatt caccttcagt acgtatgcta tgacgtgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcatct attagtagta gtggtgaaag tacatactac	180
gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga	300
cgaggggagcc acgetgatgc ttttgatgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg	360
agtgtgtggag gcggttcagg cggaggtggt tctggcggtg gcggatcgea gtctgccctg	420
actcagcctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcaactgga	480
accagcagtg acgttgggtg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa	540
gccccaaac tctcatcta tggtaacagc aatcgccct cagggtccc tgaccgattc	600
tctggtccca agtetggcac ctccagctcc ctggccatca ctgggtccca ggctgaggat	660
ggggtgatt attactgcca gtcctatgac agcagcctgc gtgtgtgtatt cggcggaggg	720
accaaggtca ccgtcctagg t	741
<210> 25	
<211> 247	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<223> am4 氨基酸序列	
<400> 25	
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr	
20 25 30	
Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly	
100 105 110	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	

```

      115              120              125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro
      130              135              140
Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly
145              150              155              160
Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln
      165              170              175
Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg
      180              185              190
Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser
      195              200              205
Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr
      210              215              220
Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly
225              230              235              240
Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
      245

```

<210> 26  
 <211> 741  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> am14 核苷酸序列  
 <400> 26

[0009]

```

caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tctgtgcag cctctggatt caccttcagt acttatgcta tgcttgggt cgcgcaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagaa attagtagtt ctggtagtag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcagagaca attccaagaa cacgtgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga 300
cgaggagacc acgtgatgc tttgatgtc tggggccaag gaacctggt caccgtctcg 360
agtggtagg gcggttcagg cggaggtggt tctggcgggt gcggatcgca gtctgcctg 420
actcagctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgactgga 480
accagcagtg acgttgggtg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa 540
gccccaaac tctcatcta tgtaacagc aatcgccct cagggtccc tgaccgattc 600
tctggtcca agtctggcac ctcagctcc ctggccatca ctgggtcca ggctgaggat 660
ggggtgatt attactgcca gtcctatgac agcagcctgc gtgtgtgatt cggcggaggg 720
accaagtc a cgtcctagg t 741

```

<210> 27  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> am14 氨基酸序列  
 <400> 27

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
      20              25              30
Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

```

```

        35              40              45
Ser Glu Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
        85              90              95
Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly
    100              105              110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    115              120              125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro
    130              135              140
Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly
    145              150              155              160
Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln
        165              170              175
Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg
        180              185              190
Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser
        195              200              205
Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr
        210              215              220
Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly
    225              230              235              240
Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
        245

```

[0010]

```

<210> 28
<211> 741
<212> DNA
<213> 人工序列

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> am20 核苷酸序列
<400> 28

```

```

caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tctgtgtcag cctctggatt caccttcagt acgtatgcta tgaattgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagcg attagtatgt ctggtgaatc tacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga      300
cgaggggagcc acgctgatgc ttttgatgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg      360
agtgggtggag gcggttcagg cggaggtggt tctggcgggt gcggatcgca gtctgccctg      420
actcagcctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga      480
accagcagtg acgttgggtgg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa      540
gccccaaac tctcatcta tggtaacagc aatcgccct caggggtccc tgaccgattc      600
tctggctcca agtctggcac ctcagectcc ctggccatca ctgggctcca ggctgaggat      660
ggggtctgatt attactgcca gtctatgac agcagcctgc gtgtggtatt cggcggaggg      720
accaagtgca ccgtcctagg t

```

```

<210> 29
<211> 247
<212> PRT
<213> 人工序列

```

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> am20 氨基酸序列  
 <400> 29  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Met Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro  
 130 135 140  
 Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly  
 145 150 155 160  
 Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln  
 165 170 175  
 Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg  
 180 185 190  
 Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser  
 195 200 205  
 Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr  
 210 215 220  
 Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 245

[0011]

<210> 30  
 <211> 741  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> am35 核苷酸序列  
 <400> 30  
 caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tctgtgtcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtagta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tcagagaca attccaagaa cacctgtat 240  
 ctcaaatga acagcctgag agccgaggac acggcctgat attactgtgc gaaagatcga 300  
 cgagggagcc acgctgatgc ttttgatgic tggggccaag gaacctggt caccgtctcg 360  
 agtgggtggc gcggttcagg cggaggtggt tctggcggtg gcggatcgca gtctgccctg 420  
 actcagcctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga 480

```

accagcagtg acgttgggtca taagtttctt gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa 540
gcccccaaac tcctcatcta taagaatctt ttgcggccct caggggtccc tgaccgattc 600
tcctggtcca agtctggcac ctccagctcc ctggccatca ctgggtcca ggctgaggat 660
ggggtgatt attactgcca gtcctatgac agcagcctgc gtgtgtatt cggcggaggg 720
accaaggtca ccgtcctagg t 741

```

<210> 31  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> am35 氨基酸序列  
 <400> 31

[0012]

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly
100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115          120          125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro
130          135          140
Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly
145          150          155          160
Thr Ser Ser Asp Val Gly His Lys Phe Pro Val Ser Trp Tyr Gln Gln
          165          170          175
Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Asn Leu Leu Arg
          180          185          190
Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser
          195          200          205
Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr
210          215          220
Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly
225          230          235          240
Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
          245

```

<210> 32  
 <211> 741  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature

&lt;223&gt; am42 核苷酸序列

&lt;400&gt; 32

```

caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtagta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga      300
cgagggagcc acgctgatgc ttttgatgic tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg      360
agtgggtggag gcggttcagg cggaggtggt tctggcggtg gcggatcgca gtctgcctcg      420
actcagcttc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga      480
accagcagtg acgttggtct tatgcataat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa      540
gccccaaac tectcatcta taagtcttcg tctcgccctc caggggtccc tgaccgattc      600
tctggtccca agtctggcac ctacgctcc ctggccatca ctgggtccca ggctgaggat      660
ggggtgatt attactgcca gtctatgac agcagcctgc gtgtgtatt cggcggaggg      720
accaagtgca ccgtcctagg t                                     741

```

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 247

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; am42 氨基酸序列

&lt;400&gt; 33

[0013]

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20           25           30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45
Ser Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85           90           95
Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly
100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115          120          125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro
130          135          140
Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly
145          150          155          160
Thr Ser Ser Asp Val Gly Leu Met His Asn Val Ser Trp Tyr Gln Gln
165          170          175
Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ser Ser Ser Arg
180          185          190
Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser
195          200          205
Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr
210          215          220
Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly
225          230          235          240

```

Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
245

<210> 34  
<211> 741  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> T2-23 核苷酸序列  
<400> 34

```
caggtgcagc tgcaggagtc cgggggagge ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgeta tgcactgggt ccgccagget      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtagta gtggtcgtag cacatactac      180
gcagactccg tggagggccg gttcaccate tccagagaca attccaagaa cacgtgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga      300
cgagggaagg acgtgatgc tttaaatgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg      360
agtggtagg gcggttcagg cggaggtggt tctggcgggt gcggatcgca gtctgccctg      420
actcagctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga      480
accagcagtg acgttggtgg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa      540
gccccaaac tctcatcta tggtaacage aatcgccct cagggtccc tgaccgattc      600
tetggctcca agtetggcac ctccagctcc ctggccatca ctgggtcca ggetgaggat      660
ggggtgatt attactgcca gtctatgac agcagcctgc gtgtggtatt cggcggaggg      720
accaagtcac cgtctcagg t
```

[0014]

<210> 35  
<211> 247  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> T2-23 氨基酸序列  
<400> 35

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Ala Ile Ser Ser Ser Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Leu Asn Val Trp Gly
          100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
          115          120          125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro
          130          135          140
Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly
145          150          155          160
```

Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln  
 165 170 175  
 Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg  
 180 185 190  
 Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser  
 195 200 205  
 Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr  
 210 215 220  
 Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 245

<210> 36  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 引物  
 <400> 36

ctccacgccg ccaggccgca ggtgcagctg caggag

36

<210> 37  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0015]

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 引物  
 <400> 37

cggcgctggc gtcgtggtac ctaggacggt gaccttgg

38

<210> 38  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 引物  
 <400> 38

gcaggggaaa gaatagtaga ca

22

<210> 39  
 <211> 0  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> CGGCCTGGCGCGTGGAG  
 <400> 39



	<210> 40	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 引物	
	<400> 40	
	accacgacgc cagcgccg	18
	<210> 41	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 引物	
	<400> 41	
	gaggtcgacc tacgcggggg cgtctgcgt cctgctgaac ttcactct	48
	<210> 42	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0016]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 引物	
	<400> 42	
	accacgacgc cagcgccg	18
	<210> 43	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 引物	
	<400> 43	
	aatccagagg ttgattgtcg acctagcgag ggggcagggc ctgc	44
	<210> 44	
	<211> 1442	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> P7D4 scFv- $\delta$ Z 核苷酸序列	
	<400> 44	
	gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa	60
	caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccgggtg cccgtcagtg ggcagagcgc	120

```

acatcgccca cagtccccga gaagtgtggg ggagggtcg gcaattgaac cgggtgcctag 180
agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc 240
gagggtgggg gagaaccgta tataagtga gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac 300
gggtttgccg ccagaacaca ggtgtcgtga cgcggatcca ggctaagct tacgcgtcct 360
agcgctaccg gtcgccacca tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt 420
gctgctccac gccgccaggc cgcaggtgca gctgcaggag tccgggggag gcttagttca 480
gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcacctca gtagctatgc 540
tatgcaactg gtccgccagg ctccaggcaa ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg 600
tagtggtggt agcacatact acgcagactc cgtgaagggc cggttcacca tctccagaga 660
caattccaag aacacgtgt atctgcaaat gaacagcctg agagccgagg acacggcctg 720
atattactgt gcgaaagatc gacgagggag ccacgtgat gcttttgatg tctggggcca 780
aggaaacctg gtcaccgtct cgagtgtggt aggcgggttca ggccgagggtg gttctggcgg 840
tggcggtatc cagtctgccc tgactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacagtc 900
agtcaccatc tctgcactg gaaccagcag tgacgttggt ggttataact atgtctcctg 960
gtaccaacag taccaggca aagccccaa actctcctc tatgtaaca gcaatcggcc 1020
ctcagggtgc cctgaccgat tctctggctc caagtctgga acctcagcct ccctggccat 1080
cactgggctc caggtgagg atggggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct 1140
gcgtgtggta ttccggcgag ggaccaaggt caccgtccta ggtaccacga cgcagcgcc 1200
gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtgcagccc ctgtccctgc gccagaggc 1260
gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtga cagaggggg ctggacttcg cctgtgatat 1320
ctacatctgg gcgcccttgg ccgggacttg tgggtctctt ctcctgtcac tggttatac 1380
cagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctag gtcgacaatc aacctctgga 1440
tt 1442

```

<210> 45

<211> 1745

<212> DNA

[0017]

<213> 人工序列

<220>

<221> misc\_feature

<223> P7D4 scFv-Z 核苷酸序列

<400> 45

```

gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa 60
caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc 120
acatcgccca cagtccccga gaagtgtggg ggagggtcg gcaattgaac cgggtgcctag 180
agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc 240
gagggtgggg gagaaccgta tataagtga gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac 300
gggtttgccg ccagaacaca ggtgtcgtga cgcggatcca ggctaagct tacgcgtcct 360
agcgctaccg gtcgccacca tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt 420
gctgctccac gccgccaggc cgcaggtgca gctgcaggag tccgggggag gcttagttca 480
gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcacctca gtagctatgc 540
tatgcaactg gtccgccagg ctccaggcaa ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg 600
tagtggtggt agcacatact acgcagactc cgtgaagggc cggttcacca tctccagaga 660
caattccaag aacacgtgt atctgcaaat gaacagcctg agagccgagg acacggcctg 720
atattactgt gcgaaagatc gacgagggag ccacgtgat gcttttgatg tctggggcca 780
aggaaacctg gtcaccgtct cgagtgtggt aggcgggttca ggccgagggtg gttctggcgg 840
tggcggtatc cagtctgccc tgactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacagtc 900
agtcaccatc tctgcactg gaaccagcag tgacgttggt ggttataact atgtctcctg 960
gtaccaacag taccaggca aagccccaa actctcctc tatgtaaca gcaatcggcc 1020
ctcagggtgc cctgaccgat tctctggctc caagtctgga acctcagcct ccctggccat 1080
cactgggctc caggtgagg atggggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct 1140
gcgtgtggta ttccggcgag ggaccaaggt caccgtccta ggtaccacga cgcagcgcc 1200
gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtgcagccc ctgtccctgc gccagaggc 1260
gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtga cagaggggg ctggacttcg cctgtgatat 1320

```

```

ctacatctgg gcgcccttgg ccgggacttg tggggtcctt ctctgtcac tggttatcac 1380
cagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac cagcagggcc agaaccagct 1440
ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg 1500
ccgggaccct gagatggggg gaaagccgca gagaaggaag aaccctcagg aaggcctgta 1560
caatgaactg cagaaagata agatggcgga ggcctacagt gagattggga tgaaaggcga 1620
gcgccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt ctcagtacag ccaccaagga 1680
cacctacgac gcccttcaca tgcaggccct gccccctcgc taggtcgaca atcaacctct 1740
ggatt 1745

```

<210> 46

<211> 1877

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc\_feature

<223> P7D4 scFv-BBZ 核苷酸序列

<400> 46

[0018]

```

gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa 60
caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccgggt cccgtcagtg ggcagagcgc 120
acatgcccca cagtccccga gaagttgggg ggagggggtcg gcaattgaac cgggtgcctag 180
agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggtcccg cctttttccc 240
gagggtgggg gagaaccgta tataagtcca gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac 300
gggtttgccg ccagaacaca ggtgtcgtga cgcggatcca ggctaagct tacgcgtcct 360
agcgtacccg gtegccacca tggeettacc agtgaccgcc ttgtctctgc cgtggcctt 420
gtgtctccac cccgccaggc cgcaggtcca gctgcaggag tccgggggag gcttagttca 480
gcctgggagg tccctgagac tctctgtgc agcctctgga ttcacctca gtagctatgc 540
tatgcaactg gtccgccagg ctccaggcaa ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg 600
tagtggtggt agcacatact acgcagactc cgtgaagggc cggttcacca tctccagaga 660
caattccaag aacacgtgt atctgcaaat gaacagcctg agagccgagg acacggccgt 720
atattactgt gcgaaagatc gacgagggag ccacgtgat gcttttgatg tctggggcca 780
aggaaacctg gtcaccgtct cgagtgtgtg aggcggttca ggccgagggt gttctggcgg 840
tgccggatcg cagtctgcc tgactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacagtc 900
agtcaccatc tctgcactg gaaccagcag tgacgttggt ggtataact atgtctctg 960
gtaccaacag taccaggcca aagcccccaa actctcctc tatgtaaca gcaatcgccc 1020
ctcaggggtc cctgaccgat tctctggctc caagtctgga acctcagcct cctggccat 1080
cactgggctc caggctgagg atggggctga ttattactgc cagtctatg acagcagcct 1140
gcgtgtggtg ttcggcggag ggaccaaggt caccgtccta ggtaccacga cgcagcgc 1200
gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gccagagggc 1260
gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtcca cagagggggg ctggacttcg cctgtgatat 1320
ctacatctgg gcgcccttgg ccgggacttg tggggtcctt ctctgtcac tggttatcac 1380
cctttactgc aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacac catttatgag 1440
accagtacaa actactcaag aggaagatgg ctgtactgct cgatttccag aagaagaaga 1500
aggaggatgt gaactgagag tgaagttcag caggagcgca gacgccccg cgtacaagca 1560
ggccagaaac cagctctata acgagctcaa tctaggacga agagaggagt acgatgtttt 1620
ggacaagaga cgtggccggg accctgagat ggggggaaag ccgagaagga agaaccctca 1680
ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg gaggcctaca gtgagattgg 1740
gatgaaaggg gagcggcgga ggggcaaggg gcacgatggc ctttaccagg gtctcagtac 1800
agccaccaag gacacctacg acgcccttca catgcaggcc ctgccccctc gctaggtcga 1860
caatcaacct ctggatt 1877

```

<210> 47

<211> 1886

<212> DNA

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; P7D4 scFv-28Z 核苷酸序列

&lt;400&gt; 47

```

gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa    60
caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccgggtg cccgtcagtg ggcagagcgc    120
acatcgccca cagtcgccga gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac cgggtgcctag    180
agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctccg cttttttccc    240
gaggggtggg gagaacgta tataagtga gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgaac    300
gggtttgccg ccagaacaca ggtgtcgtga cgcggatcca ggcctaaget tacgcgtcct    360
agcgctaccg gtcgccacca tggccttacc agtgaccgcc ttgtcctgc cgtggcctt    420
gctgtccac gccgccaggc cgcaggtgca gctgcaggag tccgggggag gcttagttca    480
gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcacctca gtagctatgc    540
tatgcactgg gtccgccagg ctcaggcaa ggggtcggag tgggtctcag ctattagtgg    600
tagtggtggt agcacatact acgcagactc cgtgaaggcg cggttcacca tctccagaga    660
caattccaag aacacgctgt atctgcaaat gaacagcctg agagccgagg acacggccgt    720
atattactgt gcgaaagatc gacgagggag ccacgctgat gcttttgatg tctggggcca    780
aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgggtg agcgggttca ggcggagggtg gttctggcgg    840
tggcgatcgc cagtctgccc tgactcagcc tccctccgag tccgggtctc ctggacagtc    900
agtcaccatc tctgcactg gaaccagcag tgacgttggt ggttataact atgtctctg    960
gtaccaacag taccaggca aagccccaa actctcacc tatggtaca gcaatcggcc    1020
ctcaggggtc cctgaccgat tctctggtc caagtctgga acctcagcct cctggccat    1080
cactgggtc caggtgagg atggggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct    1140
gcgtgtggtg ttggcgagg ggaccaaggt caccgtccta ggtaccacga cggcagcgc    1200
gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gccagagge    1260
gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgca cagcaggggg ctggacttcg cctgtgattt    1320
ttgggtgctg gtggtggttg gtggagtctt ggcttgctat agcttgctag taacagtggc    1380
ctttattatt ttctgggtga ggagtaagag gacgagctc ctgcacagtg actacatgaa    1440
catgactccc cgcgcgcccg ggccaaccg caagcattac cagccctatg ccccaccag    1500
cgacttcgca gcctatcgt ccagagtga gttcagcagg agcgcagacg ccccccgtg    1560
ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga    1620
tgttttgac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccgc agagaaggaa    1680
gaacctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag    1740
tgagattggg atgaaaggcg agcgcgggag gggcaagggg cagcatggcc tttaccaggg    1800
tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgccttcac atgcagggcc tgcctcctcg    1860
ctaggtcgac aatcaacctc tggatt

```

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 2012

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; P7D4 scFv-28BBZ 核苷酸序列

&lt;400&gt; 48

```

gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa    60
caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccgggtg cccgtcagtg ggcagagcgc    120
acatcgccca cagtcgccga gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac cgggtgcctag    180
agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctccg cttttttccc    240
gaggggtggg gagaacgta tataagtga gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgaac    300
gggtttgccg ccagaacaca ggtgtcgtga cgcggatcca ggcctaaget tacgcgtcct    360
agcgctaccg gtcgccacca tggccttacc agtgaccgcc ttgtcctgc cgtggcctt    420
gctgtccac gccgccaggc cgcaggtgca gctgcaggag tccgggggag gcttagttca    480

```

[0019]

```

gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcaccttca gtagctatgc 540
tatgcactgg gtccgccagg ctccaggcaa ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg 600
tagtggtggt agcacatact acgcagactc cgtgaagggc cggttcacca tctccagaga 660
caattccaag aacacgctgt atctgcaaat gaacagcctg agagccgagg acacggccgt 720
atattactgt gcgaaagatc gacgaggag ccacgctgat gcttttgatg tctggggcca 780
aggaacctgt gtcaccgtct cgagtgtggt aggcgggttca ggcggagggtg gttctggcgg 840
tggcggatcg cagtctgccc tgactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacagtc 900
agtcaccatc tcctgcaactg gaaccagcag tgacgttggt ggttataact atgtctcctg 960
gtaccaacag taccaggca aagccccaa actctcctc tatggtataa gcaatcggcc 1020
ctcagggttc cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat 1080
cactgggttc caggtgagg atggggctga ttattactgc cagtctatg acagcagcct 1140
gcgtgtggtt ttccggcgag ggaccaaggt caccgtccta ggtaccacga cgcacgcgcc 1200
gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtgcagccc ctgtccctgc gccagaggc 1260
gtccggcca gcggcggggg gcgcagtga cagaggggg ctggacttcg cctgtgattt 1320
ttgggtgctg gtggtgtgtg gtggatcct ggcttgctat agcttgctag taacagtggc 1380
ctttattatt ttctgggtga ggagtaagag gagcagctc ctgcacagtg actacatgaa 1440
catgactccc cgcgcgcccg ggccaacccg caagcattac cagccctatg ccccaccacg 1500
cgacttcgca gcctatcgt ccaaagggg cagaaagaaa ctctgtata tattcaaaca 1560
accatttatg agaccagtac aaactactca agaggaagat ggctgtagct gccgatttcc 1620
agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagtgc agcaggagcg cagacgcccc 1680
cgcgtaccag caggccaga accagctcta taacagctc aatctaggac gaagagagga 1740
gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggcgc ggaccctgag atggggggaa agccgcagag 1800
aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc 1860
ctacagttag attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta 1920
ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacagcgc cttcacatgc aggcctgcc 1980
cctcgtctag gtcgacaatc aacctctgga tt 2012

```

[0020]

<210> 49  
 <211> 346  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> P7D4- $\delta$  Z 氨基酸序列  
 <400> 49

```

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1          5          10         15
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20         25         30
Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35         40         45
Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50         55         60
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65         70         75         80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85         90         95
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100        105        110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala
115        120        125
Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
130        135        140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala

```

```

145          150          155          160
Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr
          165          170          175
Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val
          180          185          190
Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
          195          200          205
Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
          210          215          220
Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu
225          230          235          240
Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val
          245          250          255
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr Thr Thr Pro
          260          265          270
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
          275          280          285
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
          290          295          300
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
305          310          315          320
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Arg Val
          325          330          335
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
          340          345

```

[0021]

```

<210> 50
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> P7D4-Z 氨基酸序列
<400> 50

```

```

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1          5          10          15
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu
          20          25          30
Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
          35          40          45
Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
          50          55          60
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65          70          75          80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
          85          90          95
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
          100          105          110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala
          115          120          125
Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
          130          135          140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala
145          150          155          160

```

[0022]

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

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 491

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; P7D4-BBZ 氨基酸序列

&lt;400&gt; 51

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu  
 20 25 30  
 Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe  
 35 40 45  
 Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 50 55 60  
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr

65	70	75	80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser			
	85	90	95
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr			
	100	105	110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala			
	115	120	125
Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly			
	130	135	140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala			
145	150	155	160
Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr			
	165	170	175
Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val			
	180	185	190
Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr			
	195	200	205
Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser			
	210	215	220
Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu			
225	230	235	240
Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val			
	245	250	255
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr Thr Thr Pro			
	260	265	270
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu			
	275	280	285
[0023] Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His			
	290	295	300
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu			
305	310	315	320
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr			
	325	330	335
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe			
	340	345	350
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg			
	355	360	365
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser			
	370	375	380
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr			
385	390	395	400
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys			
	405	410	415
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn			
	420	425	430
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu			
	435	440	445
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly			
	450	455	460
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr			
465	470	475	480
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	485	490	

&lt;210&gt; 52



<211> 494  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> P7D4-28Z 氨基酸序列  
 <400> 52

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu  
 20 25 30  
 Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe  
 35 40 45  
 Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 50 55 60  
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
 85 90 95  
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr  
 100 105 110  
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala  
 115 120 125  
 Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly  
 130 135 140  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala  
 [0024] 145 150 155 160  
 Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr  
 165 170 175  
 Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val  
 180 185 190  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 195 200 205  
 Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
 210 215 220  
 Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu  
 225 230 235 240  
 Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val  
 245 250 255  
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr Thr Thr Pro  
 260 265 270  
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu  
 275 280 285  
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His  
 290 295 300  
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val  
 305 310 315 320  
 Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile  
 325 330 335  
 Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr  
 340 345 350  
 Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln  
 355 360 365  
 Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys

```

370          375          380
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
385          390          395          400
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
          405          410          415
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg
          420          425          430
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
          435          440          445
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
          450          455          460
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
465          470          475          480
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
          485          490

```

```

<210> 53
<211> 536
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> P7D4-28BBZ 氨基酸序列
<400> 53

```

[0025]

```

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1          5          10          15
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu
          20          25          30
Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
          35          40          45
Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
          50          55          60
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65          70          75          80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
          85          90          95
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
          100          105          110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala
          115          120          125
Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
          130          135          140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala
145          150          155          160
Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr
          165          170          175
Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val
          180          185          190
Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
          195          200          205
Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
210          215          220
Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu
225          230          235          240

```

Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val  
 245 250 255  
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr Thr Thr Pro  
 260 265 270  
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu  
 275 280 285  
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His  
 290 295 300  
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val  
 305 310 315 320  
 Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile  
 325 330 335  
 Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr  
 340 345 350  
 Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln  
 355 360 365  
 Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly  
 370 375 380  
 Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val  
 385 390 395 400  
 Gln Thr Thr Gln Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu  
 405 410 415  
 Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp  
 420 425 430  
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn  
 435 440 445  
 [0026] Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg  
 450 455 460  
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu  
 465 470 475 480  
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser  
 485 490 495  
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly  
 500 505 510  
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu  
 515 520 525  
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 530 535

<210> 54

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc\_feature

<223> 引物

<400> 54

gacgcgtacg acagcccccg ccgcgcgc

27

<210> 55

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	引物	
<400>	55	
	gtacggatcc ttcagcgggg aatgaacgtt c	31
<210>	56	
<211>	345	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	5A5 重链的核苷酸序列	
<400>	56	
	caggttcaac tgcagcagtc tgggactgag ctggtgaggc ctggggttc agtgaagctg 60	
	tctgcaagg ctttgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca 120	
	cctgtgcatg gcctggagtg gattggagct attcatccag gaagtgggtga tactgcctac 180	
	aatcagaggt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcttccag cacagcctac 240	
	atggagtaca gcagcctgac atctgaggac tctgtgtct attactgtac aagattttat 300	
	tcctatgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345	
<210>	57	
<211>	339	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
[0027]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 5A5 轻链的核苷酸序列	
	<400> 57	
	gatgttgta tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60	
	atctcttga gatctagtca gaccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacagtgg 120	
	tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagttc caatcgattt 180	
	tctgggtcc cagacaggtt cagtggcaga ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240	
	agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtat atatgttccg 300	
	tacacgttcg gaggaggac caagctggaa ataaaacgg 339	
<210>	58	
<211>	115	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	MISC_FEATURE	
<223>	人源化 Y035 重链核苷酸序列	
<400>	58	
	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
	1 5 10 15	
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr	
	20 25 30	
	Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
	35 40 45	
	Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe	
	50 55 60	

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ala  
 115

<210> 59  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 人源化 Y035 轻链氨基酸序列  
 <400> 59

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

[0028]

<210> 60  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> am4 重链 CDR1 氨基酸序列  
 <400> 60

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Thr  
 1 5 10

<210> 61  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> am4 重链 CDR2 氨基酸序列  
 <400> 61

Ser Ile Ser Ser Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15  
Gly

<210> 62  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> am14 重链 CDR1 氨基酸序列  
<400> 62  
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Ala  
1 5 10

<210> 63  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> am14 重链 CDR2 氨基酸序列  
<400> 63

[0029]

Glu Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15  
Gly

<210> 64  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> am20 重链 CDR1 氨基酸序列  
<400> 64  
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Ala  
1 5 10

<210> 65  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> am20 重链 CDR2 氨基酸序列  
<400> 65  
Ala Ile Ser Met Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15  
Gly

[0030]

<210> 66  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> am35 重链 CDR2 氨基酸序列  
<400> 66  
Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15  
Gly

<210> 67  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> am35 轻链 CDR1 氨基酸序列  
<400> 67  
Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly His Lys Phe Pro Val Ser  
1 5 10

<210> 68  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> am35 轻链 CDR2 氨基酸序列  
<400> 68  
Lys Asn Leu Leu Arg Pro Ser  
1 5

<210> 69  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> am42 轻链 CDR1 氨基酸序列  
<400> 69  
Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Leu Met His Asn Val Ser  
1 5 10

<210> 70  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> am42 轻链 CDR2 氨基酸序列  
<400> 70  
Lys Ser Ser Ser Arg Pro Ser  
1 5

<210> 71  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> T2-23 重链 CDR2 氨基酸序列  
<400> 71  
Ala Ile Ser Ser Ser Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu  
1 5 10 15  
Gly

<210> 72  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

[0031] <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> T2-23 重链 CDR3 氨基酸序列  
<400> 72  
Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Leu Asn Val  
1 5 10

<210> 73  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 人源化 Y035 重链 CDR1 氨基酸序列  
<400> 73  
Asp Tyr Glu Met His  
1 5

<210> 74  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 人源化 Y035 重链 CDR2 氨基酸序列  
<400> 74  
Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe Lys  
1 5 10 15



Gly

<210> 75  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 人源化 Y035 重链 CDR3 氨基酸序列  
<400> 75  
Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr  
1 5

<210> 76  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 人源化 Y035 轻链 CDR1 氨基酸序列  
<400> 76  
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

[0032] <210> 77  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 人源化 Y035 轻链 CDR2 氨基酸序列  
<400> 77  
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

<210> 78  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> 人源化 Y035 轻链 CDR3 氨基酸序列  
<400> 78  
Ser Gln Ser Ile Tyr Val Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 79  
<211> 429  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>	
<221> misc_feature	
<223> 人源化的抗体 Y035 轻链核苷酸序列	
<400> 79	
ggatcgatat ccacatgga catgatggg ctggcccagt tctggcctt cctgctgctg	60
tggttccag gcgctagatg cgacatcgtg atgaccaga ccccccctgag cctgcccgtg	120
acccccggcg agccccccag catcagctgc cggagcagcc agagcctggt gcacagcaac	180
ggcaaacctt acctgcagtg gtacctgcag aagccccggc agagccccc gctgctgac	240
tacaaggtag gcaaccggtt cagcggcgtg cccgaccggt tcagcggcag cggcagcggc	300
accgacttca ccctgaagat cagccgggtg gagcccgagg acgtgggcgt gtactactgc	360
agccagagca tctacgtgcc ctacacctt gcccagggca ccaagctgga gatcaaacgt	420
acggtggt	429
<210> 80	
<211> 441	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 人源化的抗体 Y035 重链核苷酸序列	
<400> 80	
ggatcgatat ctgcggccta tctagccacc atgcgggtgc tgatcctget gtggtgttt	60
accgcttcc cggcttctt gacgaggtg cagctggtgc agagcggcgc cgaggtgaag	120
aagccccggc ccagcgtgaa ggtgagctgc aaggccagcg gctacacctt cagcactac	180
gagatgcact ggggtcggca ggccccggc caggccctgg agtggatggg cgccatccac	240
cccgccagcg gcgacaccgc ctacaaccag cggttcaagg gccgggtgac catcaccgcc	300
gacaagagca ccagcaccgc ctacatggag ctgagcagcc tgcggagcga ggacaccgcc	360
gtgtactact gcgcccggtt ctacagctac gcctactggg gccagggcac cctggtgacc	420
gtgagcggc ctagcaccaa a	441
<210> 81	
<211> 115	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<223> 5A5 重链的氨基酸序列	
<400> 81	
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
20 25 30	
Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe	
50 55 60	
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
Met Glu Tyr Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	
100 105 110	
Val Ser Ala	

115

<210> 82  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 5A5 轻链的氨基酸序列  
 <400> 82  
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                   25                   30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                   40                   45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                   55                   60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                   70                   75                   80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
                   85                   90                   95  
 Ile Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                  100                   105                   110  
 Arg

[0034]

<210> 83  
 <211> 68  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 引物  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (42)..(43)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (46)..(46)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (48)..(49)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (52)..(52)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 83  
 gtttgggggc ttgcttggg tactgttgg accaggagac mnahnmmna hnaccaacgt 60  
 cactgctg 68

<210> 84  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 引物  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (33)..(34)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (36)..(37)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (39)..(40)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (42)..(43)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 84

accagcgcaa agcccccaaa ctctctatct atnnknnknn knnkeggccc tcaggggtc 59

[0035]

<210> 85  
 <211> 1398  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Y035-BBZ 的核苷酸序列  
 <400> 85

gaggtgcagc tgggtcagag cggcgccgag gtgaagaagc cggcgccag cgtgaaggtg 60  
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcagc gactacgaga tgcactgggt gcggcaggcc 120  
 cccggccagg gcctggagt gatgggcgcc atccaccccg gcagcggcga caccgcctac 180  
 aaccagcggc tcaagggccg ggtgaccatc accgcccaga agagcaccag caccgcctac 240  
 atggagctga gcagcctgcg gagcgaggac accgcccgtg actactgcgc ccggttctac 300  
 agctacgctt actggggcca gggcaccttg gtgaccgtga gcgccgggtg aggcgggttca 360  
 ggcggaggtg gttctggcgg tggcggatcg gacatcgtga tgaccagac cccctgagc 420  
 ctgcccgtga ccccgccga gcccgccagc atcagctgcc ggagcagcca gagcctggtg 480  
 cacagcaacg gcaacaccta cctgcagtgg tactgcaga agcccgcca gagccccag 540  
 ctgctgatct acaaggtgag caaccggttc agcggcgtgc ccgaccggtt cagcggcagc 600  
 ggcagcggca ccgacttcac cctgaagatc agccgggttg agcccgagga cgtgggcgtg 660  
 tactactgca gccagagcat ctacgtgccc tacaccttcg gccagggcac caagctggag 720  
 atcaaacgta ccacgacgcc agcgcgcga ccaccaacac cggcgccac catcgcgtcg 780  
 cagccccgtg ccctgcgcc agagcgctgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg 840  
 agggggctgg acttcgcctg tgatatctac atctgggcgc ccttggccgg gacttgtggg 900  
 gtctttctcc tgctactggt taccacctt tactcaaac gggcgagaaa gaaactcctg 960  
 tatatatcca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt 1020  
 agctgccgat ttccagaaga agaagaagga ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg 1080  
 agcgagacg ccccgcgta caagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 1140

```

ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg 1200
ggaagccga gaaggaagaa cctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag 1260
atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 1320
gatggccttt accaggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc ccttcacatg 1380
caggccctgc cccctgc 1398

```

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 466

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; Y035-BBZ 的氨基酸序列

&lt;400&gt; 86

[0036]

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
          20          25          30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45
Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe
          50          55          60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100          105          110
Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115          120          125
Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr
130          135          140
Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
145          150          155          160
His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
          165          170          175
Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
          180          185          190
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
195          200          205
Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser
210          215          220
Gln Ser Ile Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
225          230          235          240
Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
          245          250          255
Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
          260          265          270
Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
          275          280          285
Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
290          295          300
Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu
305          310          315          320

```

Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu  
 325 330 335  
 Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys  
 340 345 350  
 Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys  
 355 360 365  
 Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu  
 370 375 380  
 Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly  
 385 390 395 400  
 Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu  
 405 410 415  
 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly  
 420 425 430  
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser  
 435 440 445  
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro  
 450 455 460  
 Pro Arg  
 465

<210> 87  
 <211> 1407  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0037]

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Y035-28Z 的核苷酸序列  
 <400> 87

gaggtgcagc	tggtgcagag	cggcgcgcag	gtgaagaagc	cgggcgccag	cgtgaaggtg	60
agctgcaagg	ccagcggeta	caccttcage	gactacgaga	tgcactgggt	gcggcaggcc	120
cccggccagg	gcctggagtg	gatgggcgcc	atccaccccg	gcagcggcga	caccgcctac	180
aaccagcggg	tcaagggcgc	ggtgaccatc	accgcgcaca	agagcaccag	caccgcctac	240
atggagctga	gcagcctgcg	gagcgaggac	accgcctgtg	actactgcgc	ccggttctac	300
agctacgcct	actggggcca	gggcaccctg	gtgaccctga	gcgcgggtgg	aggcggttca	360
ggcgagagtg	gttctggcgg	tggcggatcg	gacatcgtga	tgaccagac	ccccctgagc	420
ctgccctga	ccccggcgga	gcccgcacgc	atcagctgcc	ggagcagcca	gagcctgggtg	480
cacagcaacg	gcaacaccta	cctgcagtgg	tacctgcaga	agcccggcca	gagccccag	540
ctgctgatct	acaaggtgag	caaccgggtc	agcggcgtgc	ccgaccggtt	cagcggcagc	600
ggcagcgcca	ccgacttcac	cctgaagatc	agccgggtgg	aggccgagga	cgtgggcgtg	660
tactactgca	gccagagcat	ctacgtgcc	tacaccttcg	gccagggcac	caagctggag	720
atcaaagcta	ccacgacgcc	agcgcgcgga	ccaccaacac	cggcgcccac	catcgcgctc	780
cagccctgtg	ccctgcgcgc	agagggcgtc	cggccagcgg	cggggggcgc	agtgcacacg	840
agggggtg	acttcgcctg	tgatttttgg	gtgctggtgg	tggttggtgg	agtcctggct	900
tgtatagct	tgctagtaac	agtggccttt	attattttct	gggtgaggag	taagaggagc	960
aggtcctgc	acagtgacta	catgaacatg	actccccgcc	gccccgggcc	aaccgcgaag	1020
cattaccagc	cctatgcccc	accacgcgac	ttcgagcct	atcgctccag	agtgaagttc	1080
agcaggagcg	cagacgcccc	cgcgtaccag	caggccagga	accagctcta	taacgagctc	1140
aatctaggac	gaagagagga	gtacgatgtt	ttggacaaga	gacgtggccg	ggaccctgag	1200
atggggggaa	agccgcagag	aaggaagaac	cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	1260
aaagataaga	tgcgaggagc	ctacagtgag	attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	1320
aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	1380
cttcacatgc	agccctgcc	ccctgc				1407

<210> 88  
 <211> 469  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Y035-28Z 的氨基酸序列  
 <400> 88

[0038] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr  
 130 135 140  
 Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val  
 145 150 155 160  
 His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly  
 165 170 175  
 Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly  
 180 185 190  
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 195 200 205  
 Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser  
 210 215 220  
 Gln Ser Ile Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
 225 230 235 240  
 Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro  
 245 250 255  
 Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro  
 260 265 270  
 Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp  
 275 280 285  
 Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu  
 290 295 300  
 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser  
 305 310 315 320  
 Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly  
 325 330 335  
 Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala  
 340 345 350  
 Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala  
 355 360 365

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg  
 370 375 380  
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu  
 385 390 395 400  
 Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr  
 405 410 415  
 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly  
 420 425 430  
 Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln  
 435 440 445  
 Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln  
 450 455 460  
 Ala Leu Pro Pro Arg  
 465

<210> 89  
 <211> 1533  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Y035-28BBZ 的核苷酸序列  
 <400> 89

[0039]

gaggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaaggtg 60  
 agctgcaagg ccagcggtc caccttcagc gactacgaga tgcactgggt gcggcaggcc 120  
 cccggccagg gcctggagt gatgggcgcc atccaccccg gcagcgcgca caccgcctac 180  
 aaccagcggt tcaaggccg ggtgaccatc acccgcgaca agagcaccag caccgcctac 240  
 atggagctga gcagcctgcg gacgaggac accgcctgt actactgcgc ccggttctac 300  
 agctacgct actggggcca gggcacctg gtgacctga gcgccgtgg aggcggttca 360  
 ggcgaggtg gttctggcgg tggcgatcg gacatcgtga tgaccagac cccctgagc 420  
 ctgcccgtga ccccgcgga gcccgccagc atcagctgcc ggagcagcca gacgctgtg 480  
 cacagcaacg gcaacaccta cctgcagtgg tactgcaga agcccgcca gagccccag 540  
 ctgctgatct acaaggtgag caaccggtc agcgcgctgc ccgaccggt cagcggcagc 600  
 ggcagcgga cgcacttcac cctgaagatc agccgggtgg agcccgagga cgtgggcgtg 660  
 tactactgca gccagagcat ctacgtgcc tacacctcg gccagggcac caagctggag 720  
 atcaaagta ccacagccc agcgccgca ccaccaacac cggcgccac catcgctcg 780  
 cagccccgt cctcgcccc agagcgctgc cgccagcgg cggggggcgc agtgcacacg 840  
 agggggctgg acttcgctg tgatttttgg gtgctggtgg tggttggtg agtcctggct 900  
 tgctatagct tgctagtaac agtggccttt attattttct gggtagagg taagaggagc 960  
 aggtcctgc acagtacta catgaacatg actccccgc gcccgggcc aaccgcaag 1020  
 cattaccagc cctatgccc accacgcgac ttcgagcct atcgctcaa acggggcaga 1080  
 aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca tttatgagac cagtacaaac tactcaagag 1140  
 gaagatggct gtagctgccg atttcagaa gaagaagaag gaggatgtga actgagagt 1200  
 aagttcagca ggagcgaga cgcggcgcg taccagcagg gccagaacca gctctataac 1260  
 gagctcaatc taggacgaag agaggagtac gatgttttgg acaagagacg tggccgggac 1320  
 cctgagatgg ggggaaagcc gcagagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 1380  
 ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg 1440  
 aggggcaagg ggcacgatgg cttttaccag ggtctcagta cagccacca ggacacctac 1500  
 gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct cgc 1533

<210> 90  
 <211> 511  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列



<400> 90  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr  
 130 135 140  
 Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val  
 145 150 155 160  
 His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly  
 165 170 175  
 Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly  
 180 185 190  
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 195 200 205  
 [0040] Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser  
 210 215 220  
 Gln Ser Ile Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
 225 230 235 240  
 Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro  
 245 250 255  
 Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro  
 260 265 270  
 Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp  
 275 280 285  
 Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu  
 290 295 300  
 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser  
 305 310 315 320  
 Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly  
 325 330 335  
 Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala  
 340 345 350  
 Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys  
 355 360 365  
 Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys  
 370 375 380  
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val  
 385 390 395 400  
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn  
 405 410 415  
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val  
 420 425 430

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln  
 435 440 445  
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp  
 450 455 460  
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg  
 465 470 475 480  
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr  
 485 490 495  
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 500 505 510

<210> 91  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 引物  
 <400> 91

tgcttttggtt tccaggtgca agatgtgagg tgcagctggt gcaga

45

<210> 92  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0041]

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 引物  
 <400> 92

tatcggtatcc accacctcca cggttgatct ccagcttggt g

41

<210> 93  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 引物  
 <400> 93

gatataaac tgcagcagtc ag

22

<210> 94  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> 引物  
 <400> 94

gagaggagat actcaccca ac

22

	<210> 95	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 引物	
	<400> 95	
	ggctaactag agaaccact gc	22
	<210> 96	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 引物	
	<400> 96	
	acatcttgca cctggaaacc aaagc	25
	<210> 97	
	<211> 1473	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0042]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> Y035/CD3 双特异性抗体编码序列	
	<400> 97	
	gaggtgcagc tgggtcagag cggcgccgag gtgaagaagc cggcgccag cgtgaaggtg	60
	agctgcaagg ccagcgcta caccttcagc gactacgaga tgcactgggt gcggcaggcc	120
	cccggccagg gcctggagt gatgggcgcc atccaccccg gcagcgccga caccgcctac	180
	aaccagcgg tcaaggccg ggtgaccatc accgcccaga agagcaccag caccgcctac	240
	atggagtga gcagcctgcg gagcgaggac accgcccgtg actactgcgc ccggttctac	300
	agctacgct actggggcca gggcacctg gtgacctga gcgccgttg aggcggttca	360
	ggcgaggtg gttctggcgg tggcggatcg gacatcgtga tgaccagac cccctgagc	420
	ctgccctga ccccgccga gcccgccagc atcagctgcc ggagcagcca gacccctggtg	480
	cacagcaacg gcaacaccta cctgcagtgg tactgcaga agcccgcca gagccccag	540
	ctgctgatct acaaggtgag caaccggttc agcggcgtgc ccgaccggtt cagcggcagc	600
	ggcagcgga ccgacttcac cctgaagatc agccgggttg agcccgagga cgtgggcgtg	660
	tactactgca gccagagcat ctacgtgccc tacaccttcg gccagggcac caagctggag	720
	atcaaacgtg gaggtggttg atccgatc aaactgcagc agtcaggggc tgaactggca	780
	agacctgggg cctcagtga gatgtctgc aagacttctg gctacacctt tactaggtac	840
	acgatgcact gggtaaaaca gaggcctgga cagggtcttg aatggatttg atacattaat	900
	cctagccgtg gttatactaa ttacaatcag aagttcaagg acaaggccac attgactaca	960
	gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcaa ctgagcagcc tgacatctga ggactctgca	1020
	gtctattact gtgcaagata ttatgatgat cattactgcc ttgactactg gggccaaggc	1080
	accacttca cagtctctc agtcgaaggt ggaagtggag gttctggttg aagtggaggt	1140
	tcaggtggag tcgacgacat tcagctgacc cagtctccag caatcatgtc tgcactcca	1200
	ggggagaagg tcaccatgac ctgcagagcc agttcaagt taagttacat gaactggtac	1260
	cagcagaagt caggcacctc ccccaaaaga tggatttatg acacatcaa agtggcttct	1320
	ggagtccctt atcgcttcag tggcagttgg tctgggacct catactctct cacaatcagc	1380
	agcatggagg ctgaagatgc tgccacttat tactccaac agtggagtag taaccgcctc	1440

acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa

1473

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 491

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; Y035/CD3 的双特异性抗体氨基酸序列

&lt;400&gt; 98

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

[0043]

Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr

130 135 140

Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val

145 150 155 160

His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly

165 170 175

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly

180 185 190

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu

195 200 205

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser

210 215 220

Gln Ser Ile Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu

225 230 235 240

Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly

245 250 255

Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr

260 265 270

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg

275 280 285

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly

290 295 300

Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr

305 310 315 320

Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser

325 330 335

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr

340 345 350

[0044]

Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Val
		355					360					365			
Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Val
		370				375				380					
Asp	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro
385					390					395					400
Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr
				405					410					415	
Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile
			420					425					430		
Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Phe	Ser	Gly
		435						440					445		
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala
		450				455					460				
Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu
465					470					475					480
Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys					
				485					490						

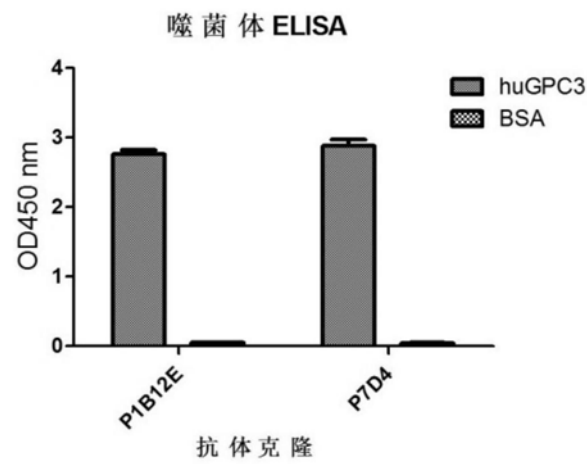


图1

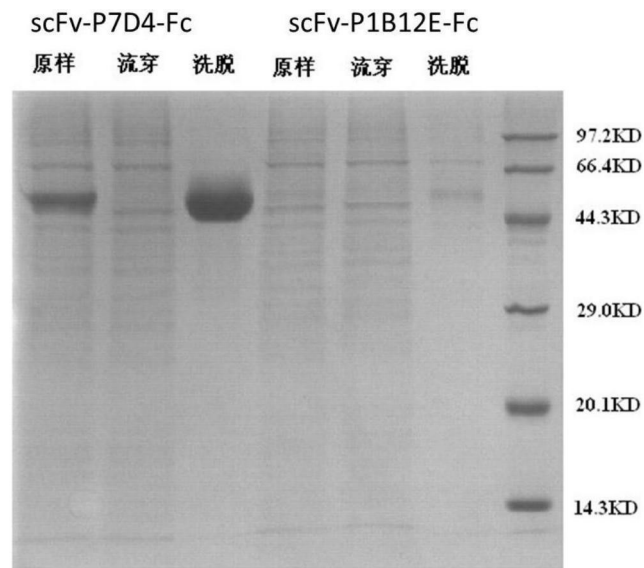


图2

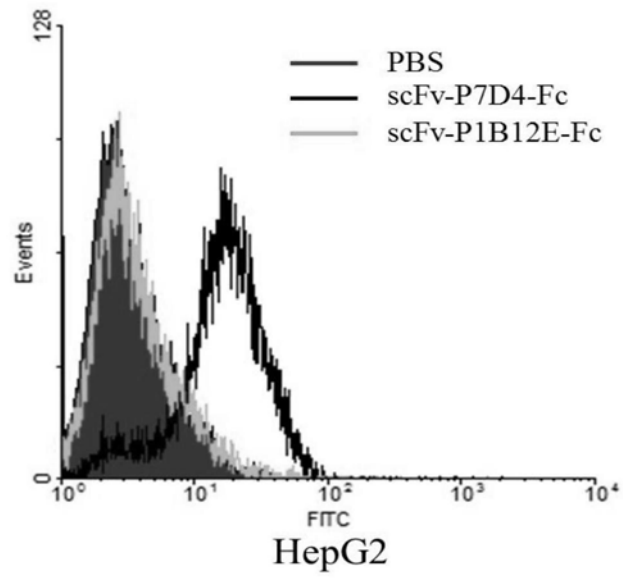


图3

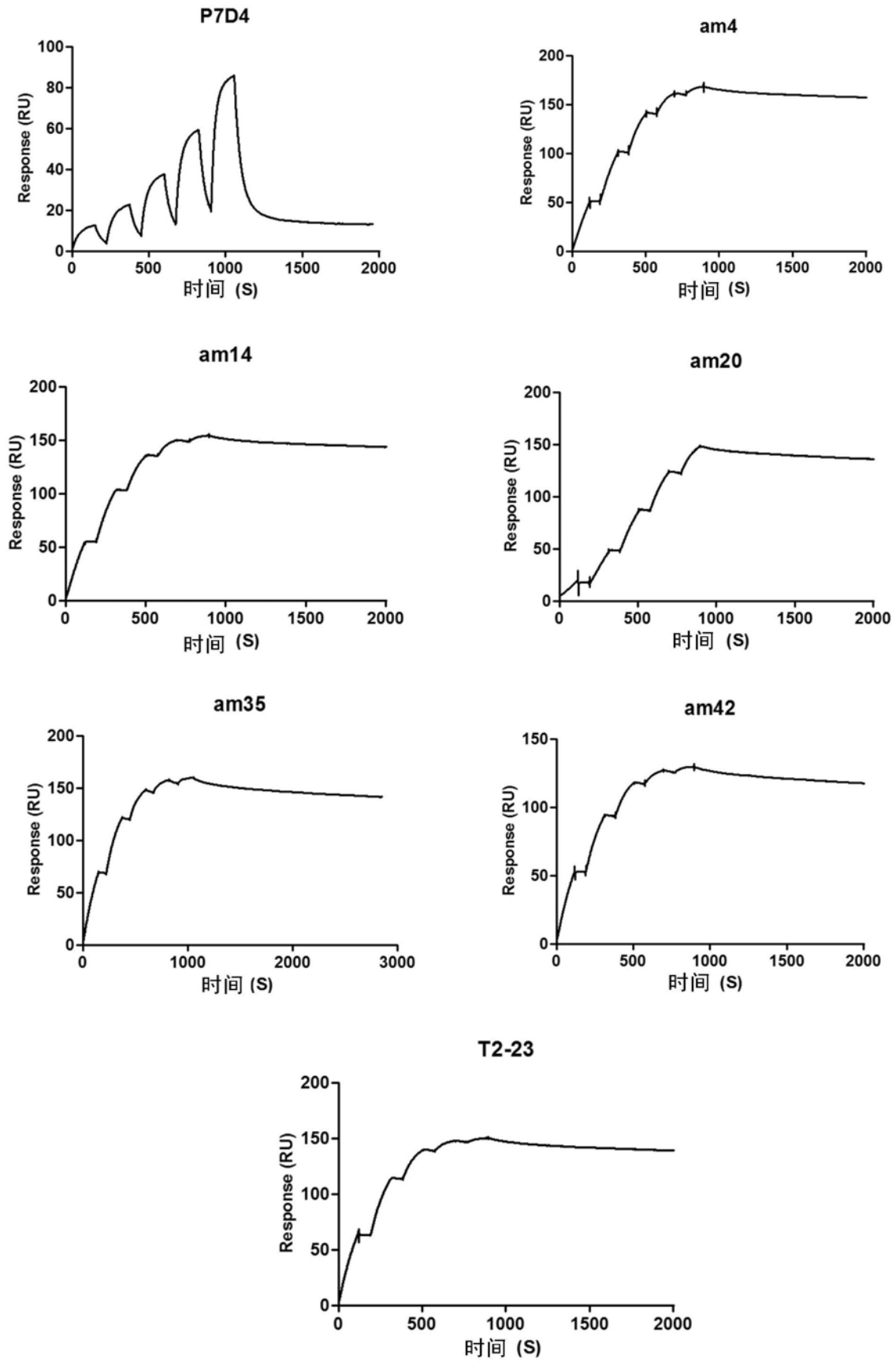


图4



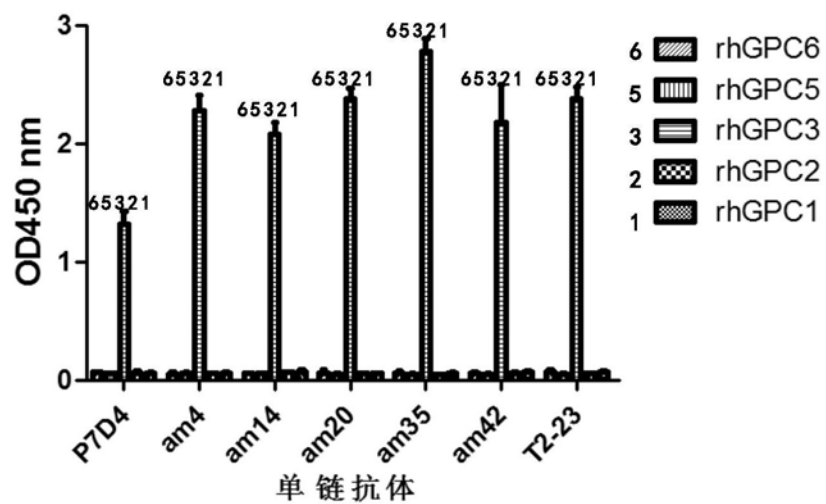


图5

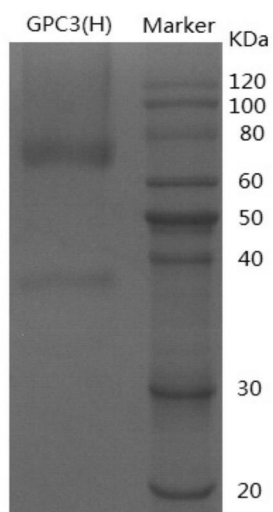


图6

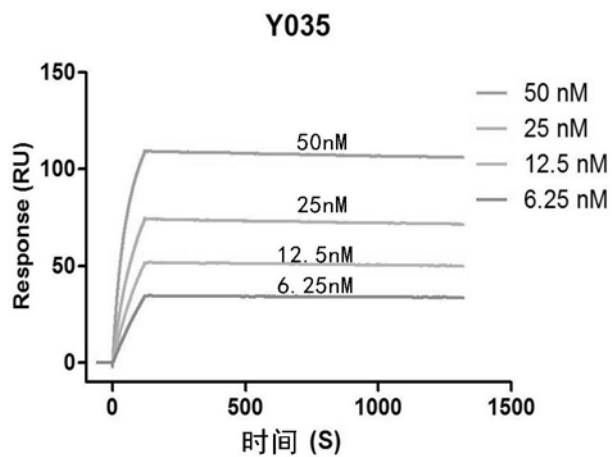


图7

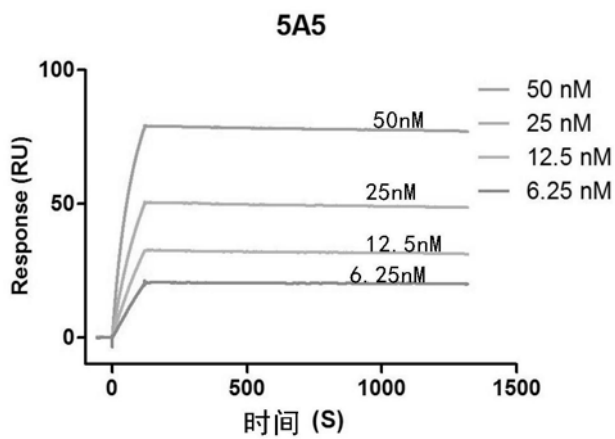


图8

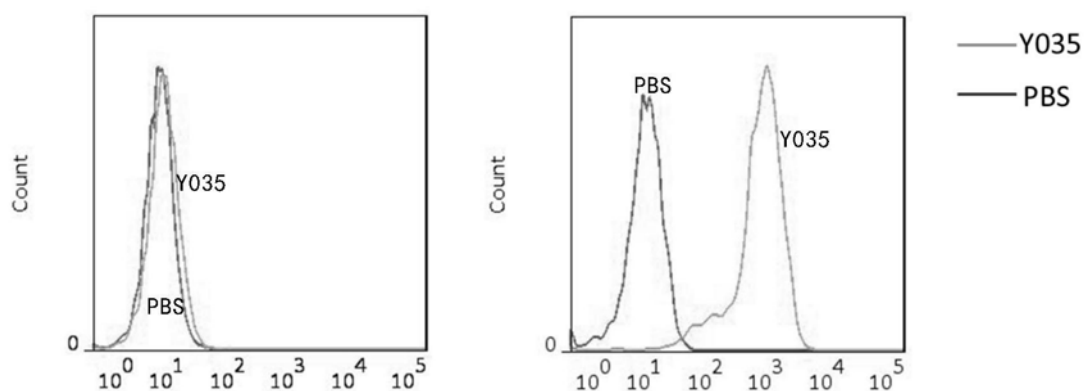


图9