

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 2 月 9 日 (09.02.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/020812 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/30 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/092833

(22) 国际申请日: 2016 年 8 月 2 日 (02.08.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201510481235.1 2015 年 8 月 3 日 (03.08.2015) CN

(71) 申请人: 科济生物医药(上海)有限公司 (CARSGEN THERAPEUTICS LTD) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区银都路 466 号 3 号楼 4 层, Shanghai 200231 (CN)。

(72) 发明人: 王华茂 (WANG, Huamao); 中国上海市徐汇区银都路 466 号 3 号楼 4 层, Shanghai 200231 (CN)。 宋波 (SONG, Bo); 中国上海市徐汇区银都路 466 号 3 号楼 4 层, Shanghai 200231 (CN)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC); 中国上海市桂平路 435 号, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则 4.17(iii))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: ANTIBODY AGAINST GLYPICAN-3 AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 的抗体及其应用

(57) Abstract: The present invention provides an antibody against glypican-3 (GPC3) and application thereof, and the antibody comprises a single chain antibody and humanized antibody.

(57) 摘要: 本发明提供了抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 (GPC3) 抗体及其应用, 所述抗体包括单链抗体和人源化抗体。

WO 2017/020812 A1

抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 的抗体及其应用

技术领域

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。

5

背景技术

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; 10 344:149-72.]. 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 ζ 或 Fc ϵ RI γ 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 15 (Major Histocompatibility Complex, MHC) 非限制性方式选择性地将 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 20 其的且适合于构建 CAR 修饰的免疫效应细胞的特异性分子。

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) 25 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。

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， 30 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。

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。

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

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。

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,

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;

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;

其轻链可变区的 CDR3 具有氨基酸序列: SEQ ID NO: 20;

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;

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;

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。

在一个优选例中,所述的抗体包括:

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;

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;

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；

5 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；

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；

10 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；

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；

15 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。

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')₂ 片段和其衍生物，或其它形式的抗体；较佳地为单链抗体。

20 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。

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；

25 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；

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；

30 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；

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；

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；或

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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 T 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)。

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。

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, 5 Fd 片段, Fv 片段, F(ab')₂ 片段和其衍生物,或其它形式的抗体;较佳地为单链抗体。

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。

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)。

在另一优选例中,所述的连接肽的序列为(GlyGlyGlyGlySer)_n,其中 n 为 1 到 5 的整 10 数;更佳地, n=3。

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。

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。

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 15 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。

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, 20 跨膜区和胞内信号区;所述的胞内信号区选自:CD3 ζ , Fc ϵ RI γ , CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40 的胞内信号区序列,或其组合。

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。

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 ζ ;前面任一所述 25 的抗体、CD8、CD137 和 CD3 ζ ;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 ζ ;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 ζ 。

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:

30 SEQ ID NO: 49 或其中第 22-346 位所示的氨基酸序列;
SEQ ID NO: 50 或其中第 22-447 位所示的氨基酸序列;
SEQ ID NO: 51 或其中第 22-491 位所示的氨基酸序列;
SEQ ID NO: 52 或其中第 22-494 位所示的氨基酸序列;
SEQ ID NO: 53 或其中第 22-536 位所示的氨基酸序列;

SEQ ID NO: 85 所示的氨基酸序列；

SEQ ID NO: 86 所示的氨基酸序列；或

SEQ ID NO: 87 所示的氨基酸序列。

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

5 码所述的嵌合抗原受体的核酸具有：

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；

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；

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；

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；

10 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；

SEQ ID NO: 85 所述的核苷酸序列；

SEQ ID NO: 87 所述的核苷酸序列；或

SEQ ID NO: 89 所述的核苷酸序列。

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。

15 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)。

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。

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。

20 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。

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。

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。

25 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 ζ ，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。

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。

30 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。

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。

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。

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。

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：

前面任一所述的抗体或编码该抗体的核酸；或

前面任一所述的免疫缀合物或编码该缀合物的核酸；或

5 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

前面任一所述的基因修饰的免疫细胞。

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

10 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。

图 2、人类 GPC3 的抗体纯化电泳图。

15 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。

图 4、P7D4 系列抗体对 GPC3 结合能力的 SPR 分析。

图 5、P7D4 系列抗体特异性结合重组人 GPC3。

图 6、表达纯化的 GPC3 蛋白的 SDS PAGE 电泳鉴定。

图 7、抗体 Y035 对人 GPC3 的结合动力学分析。

20 图 8、抗体 5A5 对人 GPC3 的结合动力学分析。

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

25 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。

抗 GPC3 抗体

30 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。

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。

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')₂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。

5 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β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
10 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。

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。
15 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。

免疫缀合物

20 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。

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
25 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。

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
30 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。

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。

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。

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。

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。

嵌合抗原受体及基因修饰的免疫细胞

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。

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。

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。

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。

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 α 或者 CD28 的跨膜区。此外，CD8 α 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。

胞内信号区可以选自 CD3 ζ , Fc ϵ RI γ , 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 ζ 亚单位(又称 CD3 zeta, 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 δ Z 是截短的不具有 ITAM 基序的 CD3 ζ 序列, 在实践中一般作为阴性对照的构建。Fc ϵ RI γ 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 ζ 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- γ 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。

10 本发明的嵌合抗原受体可以按如下方式顺序连接:

本发明的抗体、CD8 和 CD3 ζ ;

本发明的抗体、CD8、CD137 和 CD3 ζ ;

本发明的抗体、CD28 分子的跨膜区、CD28 分子的胞内信号区和 CD3 ζ ; 或

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 ζ 。

15 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。

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 α (elongation factor-1 α , EF-1 α)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。

25 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。

30 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 Amaxa 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 alloanergization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies. Cancer Res, 2010, 70(10): OF1-10.]，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。

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。

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 ζ ，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。

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。

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。

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。

药物组合物

本发明的抗体、包含该抗体的免疫组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、免疫组合物或免疫细胞，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。

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。

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。

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

实施例 1、结合人类 GPC3 的特异性单链抗体(scFv)的制备

1.1 基于噬菌体展示的 GPC3 特异性结合抗体的筛选

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 400 ml 2×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 $OD_{600} = 0.1$ ，在 37℃ 和 200 rpm 条件下振荡培养直至细胞密度达到 $OD_{600} = 0.5$ 。用 10^{12} pfu 的 M13KO7 辅助噬菌体(购自 Invitrogen)感染，在 30℃ 和 50 rpm 条件下培养 30 分钟。加入 50 mg/L 卡那霉素后在 37℃ 和 200 rpm 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 400 ml 2×YT/氨苄青霉素/卡那霉素培养基，在 37℃ 和 200 rpm 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 μm 规格滤膜过滤后，加入 1/4 体积 20%(w/v)PEG8000、2.5 M 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， $8000\times g$ ，4℃)，弃上清，将噬菌体重悬于 25 ml 预冷 PBS(137 mM NaCl，2.7 mM KCl，8 mM Na_2HPO_4 ，2 mM KH_2PO_4)中，离心(5 分钟， $20000\times g$ ，4℃)。向上清液加入 1/4 体积 20%(w/v)PEG8000、2.5 M 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， $20000\times g$ ，4℃)，再次将噬菌体沉淀重悬于 2 ml 预冷 PBS 中，在冰上保持 30 分钟并离心(30 分钟， $17000\times g$ ，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。

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 50 μ l、20 μ l、10 μ l 和 10 μ l，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。

1.2 GPC3 特异性结合抗体的鉴定

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 300 μ l 2 $\times$ 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 $^{\circ}$ C 和 250 rpm 下振荡培养 16 小时。用 20 μ l 培养物接种到 500 μ l 2 $\times$ YT/氨苄青霉素培养基(含 0.1%葡萄糖)，在 37 $^{\circ}$ C 和 250 rpm 下振荡培养 1.5 小时。准备辅助噬菌体溶液，取 75 μ l 的 M13KO7(滴度为 3×10^{12} pfu/ml)混入到 15 ml 2 $\times$ YT 培养基中，50 μ l/孔加到培养板中。在 37 $^{\circ}$ C 和 150 rpm 条件培养 30 分钟，然后加入准备好的卡那霉素溶液 50 μ l/孔(取 180 μ l 的 50 mg/ml 卡那霉素，加入到 15 ml 2 $\times$ YT 培养基)，在 37 $^{\circ}$ C 和 250 rpm 下振荡培养 16 小时。最后离心沉淀细胞(30 分钟，5000 $\times$ g，4 $^{\circ}$ C)，上清转移到新的 96 孔深孔培养板。

为进行单噬菌体 ELISA，在 96 孔 MediSorp ELISA 板(购自 Nunc)上分别使用 100 ng/孔抗原 GPC3 以及阴性对照蛋白 BSA(100 μ l/孔)，在 4 $^{\circ}$ C 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 100 μ l/孔上面制备的每种噬菌体溶液到板上各孔中。37 $^{\circ}$ C 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 100 μ l 加到每个孔中。37 $^{\circ}$ C 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 50 μ l TMB 底物加入到孔中，并在室温下显色 10 分钟，随后加入每孔 50 μ l 的 2M H_2SO_4 终止显色反应。用酶联免疫检测仪(Bio-Rad)在 450 nm 测量消光值。

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)。

实施例 2、抗 GPC3 的单链抗体的表达和纯化

根据标准方案，使用引物对 V5-P1B12E-F(SEQ ID NO: 5)和 V5-P1B12E-R(SEQ ID NO: 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 NO: 7)和 V5-P7D4-R(SEQ ID NO: 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 T4 DNA 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。

将上述表达质粒分别转染生长良好的 HEK-293F 细胞，37℃，5%CO₂，125rpm 摇床连续培养 7 天，4000rpm 离心 10min，去除沉淀，收集上清，并用 0.45 μm 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 50 kD 左右。

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

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。

具体方法如下：

- 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。
- 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。
- 3). 200g×5min 离心，弃上清。
- 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 10 μg/ml，每管加入 100ul。冰浴，45 分钟。
- 5). 每管加入 2ml 1% NBS PBS，以 200g×5min 离心，共二遍。
- 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。
- 7). 每管加入 2ml 1%NBS PBS，以 200g×5min 离心，共二遍。
- 8). 弃上清，重悬于 300ul 1%NBS PBS 中，流式细胞仪检测。

9). 应用流式细胞仪数据分析软件 WinMDI 2.9 分析数据。

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。

5 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

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。

4.1、P7D4 轻链和重链及其 CDR 区

10 P7D4 scFv 核苷酸序列如下(SEQ ID NO: 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(Gly₄Ser)₃ 连接序列)。
 15 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTACGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC
 TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA
 AGGGGCTGGAGTGGGTCTCA GCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCG
 TGAAGGGCGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACA
 GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA GATCGACGAGGGAGCCACGCT
 GATGCTTTTGTATGTC TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTTCA
 20 GCGGAGGTGGTTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGG
 GTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGC ACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAAC
 TATGTCTCC TGGTACCAACAGTACCCAGGCAAAGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAACAGC
 AATCGGCCCTCA GGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG
 CCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGGGGCTGATTATTACTGC CAGTCCTATGACAGCAGCC
 25 TGCGTGTGGTA TTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

P7D4 scFv 氨基酸序列如下(SEQ ID NO: 4):

QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYA
 DSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DRRGSHADAFDV WGQGLTVTVSSGGGG
 30 SGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISC TGTSSDVGGYNYVS WYQQYPGKAPKLLIY GNSN
 RPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYC QSYDSSLRVVFEGGGTKVTVLG

P7D4 VH CDR1:

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

35 氨基酸序列: GFTFSSYAMH (SEQ ID NO: 10)。

P7D4 VH CDR2:

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

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

P7D4 VH CDR3:

核苷酸序列: gatcgacgagggagccacgtgatgcttttgatgtc (SEQ ID NO: 13);

5 氨基酸序列: DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO: 14)。

P7D4 VL CDR1:

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

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

10

P7D4 VL CDR2:

核苷酸序列: ggtaacagcaatcgccctca (SEQ ID NO: 17);

氨基酸序列: GNSNRPS (SEQ ID NO: 18)。

15

P7D4 VL CDR3:

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

氨基酸序列: QSYDSSLRVV (SEQ ID NO: 20)。

4.2、H12 亲和力成熟库的构建

20

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。

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 μ 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 μ M, 以及 5 μ l 10 $\times$ KOD Plus 缓冲液、4 μ l dNTPs(dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP, 每种 2 mM)、2 μ l 25 mM MgSO₄ 和 1 U 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, CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC) 和 74H12F1r (SEQ ID NO: 22, CCAGCCCCTTGCCTGGAGCCTGGCGGACCCAMNNCATAGCATAMNNACTGAAGGTGAATCCAG), 第二个片段利用引物 74H12F2f(SEQ ID NO: 23, GCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCANNKATTAGTNNKNNKGNTNNKNNKACATACTACGCAGACTCC)和 S6 (SEQ ID NO: 21, GTAAATGAATTTTCTGTATGAGG)。

30

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℃ 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 0.2 μM 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。

完整的文库 DNA 片段两端分别含有 *sf*II 和 *Not*I 限制性内切酶识别位点,经限制性内切酶 *sf*II/*Not*I 进行限制性消化,插入到经过同样双酶切的噬菌粒载体 pCANTAB 5E 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 8.9×10^9 个突变体的文库。

4.3、L12 亲和力成熟库的构建

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。

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 μl 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 μM,以及 5 μl 10× KOD Plus 缓冲液、4 μl dNTPs(dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP,每种 2 mM)、2 μl 25 mM MgSO₄ 和 1 U 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℃ 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。第一个片段的扩增利用引物 S1 和 74L12F1r(SEQ ID NO: 83, GTTTGGGGGCTTTGCCTGGGTACTGTTGGTACCAGGAGACM NNAHNMNNAHNACCAACGTCAGTCTGCTG),第二个片段利用引物 74L12F2f(SEQ ID NO: 84, ACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCCTCATCTATNNKNNKNNKNNKCGGCCCTCAGGGGTC)和 S6。

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 0.2 μM 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。

- 5 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。

完整的文库 DNA 片段两端分别含有 *sfi*I 和 *Not*I 限制性内切酶识别位点, 经限制性内切酶 *sfi*I/*Not*I 进行限制性消化, 插入到经过同样双酶切的噬菌粒载体 pCANTAB 5E 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, 10 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 1.1×10^{10} 个突变体的文库。

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 7.9×10^9 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。

- 15 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:

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(Gly₄Ser)₃ 连接序列):

25 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACGTATGCTATGACGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCACTCTATTAGTAGTAGTGGTCAAGTACATACTAC
30 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATCGA
CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTGATGTCITGGGGCCAAGGAACCCTGGTCAACGTCTCG
AGTGGTGGAGGCGGTTAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCCTGGA
35 ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCTCTGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
GCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAAGGGTCCCTGACCGATTC
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
GGGGCTGATTATTACTGCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTAATTCGGCGGAGGG
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

- 35 am4 氨基酸序列(SEQ ID NO: 25):

40 QVQLQESGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFSTYAMTWVRQAPGKLEWVSISSSGESTYY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRGSHADAFDVWGQGLTVTS
SGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISCITGTSSDVGGYNYVSWYQQYPGK
APKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYCQSYDSSLRVVFGGG
TKVTVLG

重链 CDR1: GFTFSTYAMT (SEQ ID NO: 60)

重链 CDR2: SISSSGESTYYADSVKG (SEQ ID NO: 61)

重链 CDR3: DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO: 14)

轻链 CDR1: TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 16)

5 轻链 CDR2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 18)

轻链 CDR3: QSYDSSLRVV (SEQ ID NO: 20)

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)₃连接序列。

10 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(Gly₄Ser)₃连接序列):

15 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTCAGTACTTATGCTATGGCTTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGAAATTAGTAGTCTGGTAGTAGGACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATCGA
CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTATGATGCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTACCGTCTCG
20 AGTGGTGGAGGCGGTTAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCCTGGA
ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCCTGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
GCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCT
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
25 GGGGCTGATTACTGCTCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTAATTCGGCGGAGGG
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

am14 氨基酸序列(SEQ ID NO: 27):

30 QVQLQESGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFSTYAMAVWRQAPGKGLEWVS^EISSSGSRTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK^DRRGSHADAFDVWGQGLTVTS
SGGGGSGGGGSGGGGQSALTQPPSASGSPGQSVTISC^TTGTSSDVGGYNYVS^SWYQQYPGK
APKLLIY^GGNSNRPS^GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYC^QSYDSSLRVV^FFGGG
TKVTVLG

重链 CDR1: GFTFSTYAMA (SEQ ID NO: 62)

重链 CDR2: EISSSGSRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 63)

35 重链 CDR3: DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO: 14)

轻链 CDR1: TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 16)

轻链 CDR2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 18)

轻链 CDR3: QSYDSSLRVV (SEQ ID NO: 20)

40 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)₃连接序列。

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(Gly₄Ser)₃ 连接序列):

5 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTCAGTACGTATGCTATGAATTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA¹⁰ GCGATTAGTATGTCTGGTGAATCTACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA¹⁵ GATCGA
CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTGATGTC²⁰ TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
AGTGGTGGAGGCGGTT²⁵ CAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGC³⁰ ACTGGA
ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATACTATGTCTCT³⁵ TGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
GCCCCAAACTCCTCATCTAT⁴⁰ GGTAACAGCAATCGGCCCTCA⁴⁵ GGGGTCCCTGACCGATTCT
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
GGGGCTGATTATTACTGC⁵⁰ CAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTA⁵⁵ TTCGGCGGAGGG
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

am20 氨基酸序列(SEQ ID NO: 29):

20 QVQLQESGGGLVQPGRLRLSCAAS²⁵ GFTFSTYAMN³⁰ WVRQAPGKGLEWVS³⁵ AISMSGESTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK⁴⁰ DRRGSHADAFDV⁴⁵ WGQGLTVTS
SGGGGSGGGGSGGGGSQ⁵⁰ SALTQPPSASGSPQS⁵⁵ VTISC⁶⁰ TGTSSDVGGYNYVS⁶⁵ WYQQYPGK
APKLLIY⁷⁰ GNSNRPS⁷⁵ GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYC⁸⁰ QSYDSSLRVV⁸⁵ FGGG
TKVTVLG

25 重链 CDR1: GFTFSTYAMA (SEQ ID NO: 64)

重链 CDR2: AISMSGESTYYADSVKG (SEQ ID NO: 65)

重链 CDR3: DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO: 14)

轻链 CDR1: TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 16)

轻链 CDR2: GNSNRPS (SEQ ID NO: 18)

30 轻链 CDR3: QSYDSSLRVV (SEQ ID NO: 20)

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)₃ 连接序列。

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(Gly₄Ser)₃ 连接序列):

35 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGCTATGCAC⁴⁰ TGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA⁴⁵ GCTATTAGTAGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA⁵⁰ GATCGA

CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTGATGTC TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
 AGTGGTGGAGGCGGTCAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
 ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGC ACTGGA
 ACCAGCAGTGACGTTGGTCATAAGTTTCTGTCTCC TGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
 5 GCCCCAAACTCCTCATCTAT AAGAATCTTTGCGGCCCTCA GGGGTCCCTGACCGATTCT
 TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
 GGGGCTGATTACTGCTCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTA TTCGGCGGAGGG
 ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

am35 氨基酸序列(SEQ ID NO: 31):

QVQLQESGGGLVQGRSLRLSCAAS GFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVS AISSSGGSTYY
 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAK DRRGSHADAFDV WGQGLTVTS
 SGGGSGGGGSGGGGSSALTQPPSASGSPGQSVTISC TGTSSDVGHKFPVS WYQQYPGK
 APKLLIYKNLLRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYC QSYDSSLRVVFEGG
 TKVTVLG

重链 CDR1: GFTFSSYAMH (SEQ ID NO: 10)

重链 CDR2: AISSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 66)

重链 CDR3: DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO: 14)

轻链 CDR1: TGTSSDVGHKFPVS (SEQ ID NO: 67)

轻链 CDR2: KNLLRPS (SEQ ID NO: 68)

轻链 CDR3: QSYDSSLRVV (SEQ ID NO: 20)

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)₃ 连接序列。

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(Gly₄Ser)₃ 连接序列):

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGCTATGCAT TGGGTCCGCCAGGCT
 30 CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA GCTATTAGTAGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGC CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA GATCGA
 CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTGATGTC TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
 AGTGGTGGAGGCGGTCAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
 35 ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGC ACTGGA
 ACCAGCAGTGACGTTGGTCTTATGCATAATGTCTCC TGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
 GCCCCAAACTCCTCATCTAT AAGTCTTCGTCTCGGCCCTCA GGGGTCCCTGACCGATTCT
 TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
 GGGGCTGATTACTGCTCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTA TTCGGCGGAGGG
 40 ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

am42 氨基酸序列(SEQ ID NO: 33):

QVQLQESGGGLVQGRSLRLSCAAS GFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVS AISSSGGSTYY
 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAK DRRGSHADAFDV WGQGLTVTS
 SGGGSGGGGSGGGGSSALTQPPSASGSPGQSVTISC TGTSSDVGLMHNVS WYQQYPGK

APKLLIY[KSSSRPS]GVPDRFSGSGSGTSASLAITGLQAEDGADYYC[QSYDSSLRVV]FGGG
TKVTVLG

重链 CDR1: GFTFSSYAMH (SEQ ID NO: 10)

重链 CDR2: AISSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 66)

5 重链 CDR3: DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO: 14)

轻链 CDR1: TGTSSDVGLMHNVS (SEQ ID NO: 69)

轻链 CDR2: KSSSRPS (SEQ ID NO: 70)

轻链 CDR3: QSYDSSLRVV (SEQ ID NO: 20)

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
10 (Gly₄Ser)₃ 连接序列。

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
15 为轻链核苷酸序列。第 364-408 位为(Gly₄Ser)₃ 连接序列):

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCT[GGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCAC]TGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA[GCTATTAGTAGTAGTGGTCGTAGCACATACTAC]
[GCAGACTCCGTGGAGGGG]CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
20 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA[GATCGA]
[CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTAAATGTC]TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
AGTGGTGGAGGCGGTTCAAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGC[ACTGGA]
[ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCC]TGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
25 GCCCCAAACTCCTCATCTAT[GGTAACAGCAATCGGCCCTCA]GGGGTCCCTGACCGATT
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
GGGGCTGATTATTACTGC[CAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTA]TTCGGCGGAGGG
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

T2-23 氨基酸序列(SEQ ID NO: 35):

30 QVQLQESGGGLVQPGRLRLSCAAS[GFTFSSYAMH]WVRQAPGKGLEWVS[AISSSGRSTYY]
[ADSVEG]RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK[DRRGSHADALNV]WGQGLTVTS
SGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISC[TGTSSDVGGYNYVS]WYQQYPGK
APKLLIY[GNSNRPS]GVPDRFSGSGSGTSASLAITGLQAEDGADYYC[QSYDSSLRVV]FGGG
TKVTVLG

35 重链 CDR1: GFTFSSYAMH (SEQ ID NO: 10)

重链 CDR2: AISSSGRSTYYADSVEG (SEQ ID NO: 71)

重链 CDR3: DRRGSHADALNV (SEQ ID NO: 72)

轻链 CDR1: TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 16)

轻链 CDR2: KSSSRPS (SEQ ID NO: 70)

40 轻链 CDR3: QSYDSSLRVV (SEQ ID NO: 20)

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)₃ 连接序列。

4.4、P7D4 系列抗体对 GPC3 结合能力的 SPR 分析

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
5 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 3 M MgCl₂、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
10 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。

表 1、P7D4 系列单链抗体对 GPC3 的结合数据

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
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

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。

4.5、P7D4 系列抗体的识别特异性分析

20 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。

25 为此目的，用 0.1M NaHCO₃(pH 9.6)包被液稀释以上 5 种抗原，每孔包被 100 ng，
50 μl/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 100 ng 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)100 μl/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 50 μl 的 2M H₂SO₄ 终止显色反应，用酶联免疫检测仪 (Bio-Rad)在 450 nm 测量消光值。

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。

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

5.1 人 GPC3 在真核表达系统中表达及纯化

5.1.1 GPC3 载体构建及鉴定

以人肝癌细胞系 Huh-7 cDNA 为模板，以如下引物 GPC3-F: GATCGCTAGCACAGCCCCGCGCCGC (SEQ ID NO: 54)，GPC3-R: GTACGGATCCTTCAGCGGGGAATGAACGTTT (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 T4 DNA 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段的阳性克隆，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。

5.1.2 人 GPC3 蛋白的表达与纯化

5.1.2.1. V5H- GPC3 质粒的脂质体转染和培养

将生长良好的 HEK293F 细胞(HEK293F，购自 LIFE 公司)以 1×10^6 细胞/毫升的密度接种于细胞三角培养瓶，37℃ 5% CO₂ 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% CO₂ 120rpm 培养 72h。收集细胞培养液，4500g 离心 15min，除去细胞，取上清。

5.1.2.2. GPC3 蛋白纯化

取 1ml 的 Ni-NTA Agarose 亲和填料装柱，将 Ni-NTA 亲和柱用平衡缓冲液(50mM PB、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)。

5.2 人 GPC3 抗原免疫

- 5 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 1 mL 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 100 μ g 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, 50 μ g 每只小鼠, 其后间隔 2 周, 继续腹腔 50 μ g 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, 10 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 $>10^5$ 。最后一次加强免疫 3 周后, 脾内免疫上述人 GPC3(H)蛋白 20 μ g, 备用。

5.3 抗人 GPC3 杂交瘤细胞株建立

- 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, 15 与骨髓瘤细胞系 SP2/0 融合, 经次黄嘌呤、氨基蝶呤与胸苷(hypoxanthine, aminop terin and thymidine, HAT)选择性培养 3 天后, 补加 HT 培养基, 继续培养 1 周。

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)。

20 5.4 腹水生产及抗体的纯化

- 将 8-10 周龄 F1 小鼠腹腔注射 100 μ L 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 5×10^5 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 25 积用 PBS(0.01M PB, 0.15M NaCl, pH 7.4)混匀, 0.22 μ m 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 NaH₂PO₄, 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 0.22 μ m 滤膜过滤保存, 得到纯化的对应各克隆 30 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。

5.5 GPC3 克隆 5A5 的人源化

5.5.1 5A5 抗体的序列分析

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。

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)：

5 CAGGTTCAACTGCAGCAGTCTGGGACTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCA
GTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTTGGGCTACACATTTACTGACTATGAAATGC
ACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGGAGCTATTC
ATCCAGGAAGTGGTGATACTGCCTACAATCAGAGGTTCAAGGGCAAGGCCA
CACTGACTGCAGACAAATCTTCCAGCACAGCCTACATGGAGTACAGCAGCC
10 TGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATTTTATTCCTATGCT
TACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

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)：

15 GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCT
CTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACAGTGGTACCTGCA
GAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAGTTTCCAATCGATTTTCTGGGGTCCCA
GACAGGTTTCAGTGGCAGAGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT
20 GAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTATATATGTTCCGTACACGTTCCGAGGAGGGA
CCAAGCTGGAAATAAAACGG

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)：

QVQLQQSGTELVPRGASVKLSCKALGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGDTAYNQRF
25 KGKATLTADKSSSTAYMEYSSLTSEDSAVYYCTRFYSYAYWGQGLTVTSA

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)

DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGR
GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSIYVPYTFGGGKLEIKR

30

5.5.2 抗体模板的选择

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。

(1) 根据专利 WO2008021156 确定抗体轻重链可变区中支持抗体 loop 结构的氨基酸残基
35 以及轻重链结合区域的氨基酸残基。

(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。

(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。

(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。

5 (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。

(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。

(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。

10 (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。

(9) 轻链的序列相似对比对结果: 根据相似度, 选取 VK2D_29*02 (IMGT, Accession numbers: U41644)作为 5A5 轻链的抗体模板。

15 5.5.3 CDR 移植

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:

人源化 Y035 重链(SEQ ID NO: 58):

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGDTAYNQ
20 RFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFYSYAYWGQGTLLTVSA

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

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);

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

25 人源化 Y035 轻链(SEQ ID NO: 59):

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLOWYLYKPGQSPQLLIYKVSNNRFSQVDPDRF
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSIYVPYTFGQGTKLEIKR

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

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

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

5.5.4 表达和纯化人源化的抗体

(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

合成的轻链核苷酸序列(SEQ ID NO: 79, 包括信号肽编码序列):

GGATCGATATCCACCATGGACATGATGGTGCTGGCCAGTTCCTGGCCTTCCTGCTGCTGTGGTTCC
CAGGCGCTAGATGCGACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTGACCCCCGGCGA
5 GCCCCGCCAGCATCAGCTGCCGGAGCAGCCAGAGCCTGGTGACAGCAACGGCAACACCTACC
TGCAGTGGTACCTGCAGAAGCCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACAAGGTGAGCAAC
CGGTTTCAGCGGCGTGCCCCAGCGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
AGATCAGCCGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGACTACTGCAGCCAGAGCATCTACGTG
CCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCT

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

GGATCGATATCTGCGGCCTATCTAGCCACCATGCGGGTGCTGATCCTGCTGTGGCTGTTACCGCCT
TCCCCGGCTTCCTGAGCGAGGTGCAGCTGGTGACAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCCGGCG
CCAGCGTGAAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCAGCGACTACGAGATGCACTGG
GTGCGGCAGGCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGCCATCCACCCCGGCAGCGGCG
15 ACACCGCCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGC
ACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCCG
GTTCTACAGCTACGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCCGCTAGCACCAAA

(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
20 体, 通过测序鉴定抗体序列跟设计一致。具体为:

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。

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。

25 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。

30 5.6 人源化抗体 Y035 对人 GPC3 结合能力的 SPR 分析

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 的亲合力和动力学参数。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
35 量在 25℃、30μl/min、1×HBS-EP+工作缓冲液中进行, 再生条件为 10 mM Glycine-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 T200 evaluation software 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 的亲和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。

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)
Y035	3.96E+05	2.51E-05	6.34E-11
5A5	2.80E+05	2.30E-05	8.19E-11

5.7 抗体 Y035 的细胞结合活性 FACS 分析

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。

具体方法如下：

- 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。
- 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。
- 3) 200g×5min离心，弃上清。
- 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。
- 5) 每管加入2ml 1%NBS PBS，以200g×5min离心，共二遍。
- 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。
- 7) 每管加入2ml 1%NBS PBS，以200g×5min离心，共二遍。
- 8) 弃上清，重悬于300ul 1%NBS PBS中，流式细胞仪检测。

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，流式细胞分析结果标明，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。

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

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。

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-1 α (elongation factor-1 α ，简称 EF-1 α)的启动子替代了原载体的启动子，并在启动子和 CD8 α sp 信号肽之间增加了 MluI 酶切位点。具体地，使用 ClaI/SalI (购自 NEB)双酶切载体 pWPT-EGFP(购自 addgene)，回收 1.1Kb 的 DNA 片段，用 T4 DNA 连接酶连接于经 ClaI/SalI 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-1 α -EGFP.WPRE。

利用前述优化获得的 P7D4 scFv 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。

表 3

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	描述
P7D4- δ Z	P7D4 scFv-CD8-CD3 δ zeta	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

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

1、核酸片段的扩增

(1) scFv 序列的扩增

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 CD8 signal peptide(CD8sp) 的序列，引物序列为：ctccacgccgccaggccgcaggtgcagctgcaggag)和反向引物 P7D4re(SEQ ID NO: 37，包含部分 CD8 hinge 的序列，引物序列为：CGGCGCTGGCGTCGTGGTACCTAGGACGGTGACCTTGG)为引物对，PCR 扩增获得 P7D4 scFv 片段。

(2) 嵌合抗原受体其他部分的核酸序列

抗 GPC3 嵌合抗原受体蛋白的除 P7D4 scFv 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。

具体地, 其中包含 CD8 α sp 序列的片段 F1 以本实施例中构建的质粒
5 pRRLSIN-cPPT.EF-1 α -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。

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

包含 CD8-CD3 zeta(Z) 的片段 F3-Z、包含 CD8-CD137-CD3 zeta(BBZ) 的片段 F3-BBZ、
15 包含 CD28a-CD28b-CD3 zeta(28Z) 的片段 F3-28Z 和包含 CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta(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: aatccagaggttgattgtcgacctagcgaggggagggcctgc) 通过 PCR 扩增获得。

20 2、核酸片段的拼接

分别将如前述获得的 F1 核酸片段, 与等摩尔的 P7D4 scFv 核酸片段以及等摩尔的
25 F3- δ 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 $^{\circ}$ C, 4min; 变性: 94 $^{\circ}$ C, 40s; 退火: 60 $^{\circ}$ C, 40s; 延伸: 68 $^{\circ}$ C, 140s, 进行 5 个循环, 然后总延伸 68 $^{\circ}$ C, 10min, 补充 DNA 聚合酶及正向引物 PWXLF 和反向引物 R3R (CD8-CD3 δ zeta 对应的反向引物为 δ 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 $^{\circ}$ C, 4min; 变性: 94 $^{\circ}$ C, 40s; 退火: 60 $^{\circ}$ C, 40s; 延伸: 68 $^{\circ}$ C, 140s, 进行 30 个循环, 然后总延伸 68 $^{\circ}$ C, 10min。本实施例构建的由 F1 片段、P7D4 scFv 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:

30 P7D4 scFv- δ Z (SEQ ID NO: 44),
P7D4 scFv-Z (SEQ ID NO: 45),
P7D4 scFv-BBZ (SEQ ID NO: 46),
P7D4 scFv-28Z (SEQ ID NO: 47),
P7D4 scFv-28BBZ (SEQ ID NO: 48)。

3、慢病毒质粒载体的构建

本实施例构建了由 F1 片段、P7D4 scFv、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 α -EGFP.WPRE 载体中，
5 从而构建表达各嵌合抗原受体的慢病毒载体 pRRLSIN-cPPT.EF-1 α -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 α 信号肽的引导下，抗 GPC3 嵌合抗原受体将定位在细胞膜上。

通过以上构建，分别可获得五个 CAR 多肽序列，称为：

10 P7D4- δ Z (SEQ ID NO: 49);

P7D4-Z (SEQ ID NO: 50);

P7D4-BBZ (SEQ ID NO: 51);

P7D4-28Z (SEQ ID NO: 52);

P7D4-28BBZ (SEQ ID NO: 53)。

4、质粒转染 293T 包装慢病毒

以 6×10^6 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% CO₂ 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)。

20 转染的步骤如下：

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

25 4.2 B 液配制：将 60 μ g PEI (聚乙烯亚胺 1 μ g/ μ l，购自 Polysciences 公司)溶解于 800 μ L 的无血清 DMEM 培养液中，轻轻混匀，室温孵育 5min。

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。

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。

30 在转染孵育 72h 后，使用 0.45 μ 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 原液体体积的 AIM-V 培养液(购自 Life 公司)进行重悬，以 100 μ L/管分装冻存于-80℃，以待病毒滴定或感染 T 淋巴细胞。

实施例 7、重组慢病毒感染 CTL 细胞

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 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 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 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 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。

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(50 ug/ml)孵育 1 hr, 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 50 min, 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⁺ T 细胞。

表 4

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

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 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 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。

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

体外毒性实验使用的材料如下:

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⁺)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。

其中各实验组和各对照组如下：

各实验组：各靶细胞+表达不同嵌合抗原受体的 CTL，

对照组 1：靶细胞最大释放 LDH，

5 对照组 2：靶细胞自发释放 LDH，

对照组 3：效应细胞自发释放 LDH。

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 ^{51}Cr 释放法。CytoTox 96[®]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 ^{51}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)转化为红色的甲臍(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。

细胞毒性计算公式为：

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

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 P7D4 CAR 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，20 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。

表 5、融合表达单链抗体 P7D4 的 CAR T 细胞的细胞毒性

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

实施例 9 基于 Y035 和 GC33 的 CAR-T 细胞的制备和比较

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。

表 6

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
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

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

gaggtgcagctggtgcagagcggcgccgaggtgaagaagcccgccagcgtgaaggtgagctgcaaggccagcggc
 10 tacaccttcagcgactacgagatgcactgggtgcggcaggcccccgccagggcctggagtggatggcgccatccaccccgga
 gggcgacaccgcctacaaccagcgggtcaaggcgccgggtgacctaccgccaagagcaccagcaccgcctacatggagc
 tgagcagcctgcggagcgaggacaccgctgtactactgcgccgggtttacagctacgcctactggggccagggcaccctggtg
 accgtgagcgccggtggaggcggttcaggcgaggtggttctggcggtggcggtatcgacatcgatgaccagacccccctga
 gcctgcccgtgacccccggcgagccccccagcatcagctgcggagcagccagagcctggtgcacagcaacggcaacacctacc
 15 tgcagtggtaacctgcagaagcccgccagagccccagctgctgatctacaaggtgagcaaccgggttcagcgcggtgcccagccg
 gttcagcgccagcggcagcgccaccgacttaccctgaagatcagccgggtggaggccgaggacgtggcggtgtactactgcagc
 cagagcatctacgtgcctacaccttcggccagggcaccaagctggagatcaaactaccacgacgccagcggcgaccaccaa
 caccggcgcccaccatcgctgcagccccgtgccttgcgccagaggcgtgcggccagcggcgggggggcgagtgacacg
 agggggctggacttcgctgtgatctacatctggcgcccttggccgggacttgggggtccttctcctgtcactggttatcccttt
 20 actgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgt
 agctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgctacaagc
 agggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggacaagagacgtggccgggaccct
 gagatggggggaaagccgagaaggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgaggcctac
 agtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcgaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtagccaccaaggac
 25 acctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctgc

Y035-BBZ 的氨基酸序列如下所示（SEQ ID NO: 86）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIH
 PGSGDTAYNQRFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFYSYAYWGQGT
 LVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYL
 30 QWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSI
 YVPYTFGQGTKLEIKRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC
 DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
 EEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK
 PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDAL
 35 HMQALPPR

Y035-28Z 的核苷酸序列如下所示（SEQ ID NO: 87）：

gaggtgcagctggtgcagagcggcgccgaggtgaagaagcccgccagcgtgaaggtgagctgcaaggccagcggc

tacaccttcagcgactacgagatgcactgggtgcggcaggcccccgccagggcctggagtggatggcgccatccaccccgga
 gcggcgacaccgcctacaaccagcggttcaagggccgggtgacctaccgcccacaagagcaccagcaccgcctacatggagc
 tgagcagcctgcggagcgaggacaccgctgtactactgcgccggttctacagctacgctactggggccagggcaccctggtg
 accgtgagcgccggtggagggcggttcaggcgaggtggttctggcggtggcggtatcgacatcgtgatgaccagacccccctga
 5 gcctgcccgtgacccccggcgagcccggcagcatcagctgccggagcagccagagcctggtgcacagcaacggcaacacctacc
 tgagtggtacctgcagaagccccggccagagccccagctgctgatctacaaggtgagcaaccgggttcagcgcggtgcccgaccg
 gttcagcggcagcggcagcgccaccgacttcacctgaagatcagccgggtggaggccgaggacgtggcggtgtactactgcagc
 cagagcatctacgtgcctacaccttcggccaggcgaccaagctggagatcaaacgtaccacgacgccagcgccgagccgaccacaa
 caccggcgcccaccatcgctgcagccccgttccttgcgccagaggcgtgccggccagcgggggggcgagtgacacg
 10 agggggctgagcttcgctgtgattttgggtgctggtggtggtggtgagtcctggcttgcctatagcttgcctagtaacagtggcctttat
 tattttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtactacatgaacatgactcccccgcccccgggccaacccgcaa
 gcattaccagccctatgccccaccagcgacttcgcagcctatcgtccagagtgaagttcagcaggagcgagacgcccccgct
 accagcaggggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagcatgttttgacaagagacgtggccgg
 gacctgagatggggggaaagccgcagagaaggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcg
 15 gaggcctacagttagattgggatgaaaggcgagcgccggagggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagcca
 ccaaggacacctacgacgcccctcacatgcaggccctgccccctgcg

Y035-28Z 的氨基酸序列如下所示 (SEQ ID NO: 88) :

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIH
 20 PGSGDTAYNQRFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFYSYAYWGQGT
 LVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNGNTYL
 QWYLYKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSI
 YVPYTFGQGTKLEIKRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC
 DFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP
 25 YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
 MGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATK
 DTYDALHMQALPPR

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

gagggtgcagctggtgcagagcgggcgccgaggtgaagaagccccggcgccagcgtgaaggtgagctgcaaggccagcggc
 30 tacaccttcagcgactacgagatgcactgggtgcggcaggcccccgccagggcctggagtggatggcgccatccaccccgga
 gcggcgacaccgcctacaaccagcggttcaagggccgggtgacctaccgcccacaagagcaccagcaccgcctacatggagc
 tgagcagcctgcggagcgaggacaccgctgtactactgcgccggttctacagctacgctactggggccagggcaccctggtg
 accgtgagcgccggtggagggcggttcaggcgaggtggttctggcggtggcggtatcgacatcgtgatgaccagacccccctga
 gcctgcccgtgacccccggcgagcccggcagcatcagctgccggagcagccagagcctggtgcacagcaacggcaacacctacc
 35 tgagtggtacctgcagaagccccggccagagccccagctgctgatctacaaggtgagcaaccgggttcagcgcggtgcccgaccg
 gttcagcggcagcggcagcgccaccgacttcacctgaagatcagccgggtggaggccgaggacgtggcggtgtactactgcagc
 cagagcatctacgtgcctacaccttcggccaggcgaccaagctggagatcaaacgtaccacgacgccagcgccgagccgaccacaa
 caccggcgcccaccatcgctgcagccccgttccttgcgccagaggcgtgccggccagcgggggggcgagtgacacg
 agggggctgagcttcgctgtgattttgggtgctggtggtggtggtgagtcctggcttgcctatagcttgcctagtaacagtggcctttat
 40 tattttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtactacatgaacatgactcccccgcccccgggccaacccgcaa
 gcattaccagccctatgccccaccagcgacttcgcagcctatcgtccaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaa
 ccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttcagaagaagaaggaggatgtgaactg
 agagtgaagttcagcaggagcgagacgcccccggtaccagcaggggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaa
 gagaggagtagcatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgcagagaaggaagaacctcagg
 45 aaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgaggcctacagttagattgggatgaaaggcgagcgccggagggggca
 aggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccctcacatgcaggccctgccccctgcg

Y035-28BBZ 的氨基酸序列如下所示 (SEQ ID NO: 90)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIH
 PGSGDTAYNQRFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFYSYAYWGQGT
 50 LVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNGNTYL

QWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSI
YVPYTFGQGTKLEIKRTTTPAPRPPTAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC
DFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP
YAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF
5 SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

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
10 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-CAR T 细胞。

实施例 10 双特异性抗体 BiTE 的制备

(1) Y035 单链抗体核苷酸序列的制备

15 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 1×10^7 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。

a. 逆转录得到 cDNA

以杂交瘤细胞总 RNA 做为模板,使用 High capacity RNA to cDNA kit(Invitrogen, 20 4387406),按照说明书逆转录合成 cDNA。

b. 5'-RACE 法扩增抗体可变区

以 cDNA 为模板,使用 5'-Full RACE kit(TAKARA, D315),用引物
tgctttggtttccaggtgcaagatgtgaggtgcagctggtgcaga (SEQ ID NO: 91) 和引物
TATCGGATCCACACCTCCACGTTTGATCTCCAGCTTGGTG (SEQ ID NO: 92) 扩增。PCR
25 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。

(2) CD3 单链抗体核酸序列的构建

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, gatatacaactgcagcagtcag) 和引物 (SEQ ID NO: 94,
GAGAGGGAGTACTCACCCCAAC) 进行 PCR,具体反应参考 KOD PLUS 酶说明书,
30 胶回收纯化,得到的 PCR 产物为 CD3 单链抗体的核酸。

(3) 引入 NheI 酶切位点

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。

(4) Y035/CD3 双特异性抗体编码序列核酸的构建

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:

gaggtgcagctggtgcagagcggcgccgaggtgaagaagcccgccagcgtgaaggtgagctgcaaggccagcggc
 5 tacaccttcagcactacgagatgactgggtgcggcagggcccgccagggcctggagtggtggcgccatccaccccgga
 cgggcgacaccgectacaaccagcgggtcaagggccgggtgacctaccgcccacaagagcaccagcaccgectacatggagc
 tgagcagcctgcggagcagggacaccgcccgtgtactactgcgcccgggtctacagctacgcctactggggccagggcaccctggtg
 accgtgagcggcggtggagggcggtcagggcgaggtgggtctggcggtggcggtatcgacatcgatgacctgacccagacccctga
 gcctgcccgtgaccccgggcgagcccggcagcatcagctgccggagcagccagagcctggtgcacagcaacggcaacacctacc
 10 tgcagtgtacctgcagaagcccgccagagcccccagctgctgatctacaaggtgagcaaccgggtcagcggcggtgcccagccg
 gttcagcggcagcggcagcggcaccgacttcacctgaagatcagccgggtggagggcgaggacgtggcggtgtactactgcagc
 cagagcatctacgtgccctacaccttcggccagggcaccaagctggagatcaaactgagggtgggtggatccgatataaactgcag
 cagtcaggggctgaactggcaagacctggggccctcagtgagatgtcctgcaagacttctggctacacctttactaggtacacgatgc
 actgggtaaacagaggcctggacaggggtctggaatggattggatacattaatcctagccgtgggtataactaattacaatcagaagtca
 15 aggacaaggccacattgactacagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactgagcagcctgacatctgaggactctgcagtct
 attactgtcaagatattatgatgatcattactgccttgactactggggccaaggcaccactctcacagctcctcagtcgaaggtggaa
 gtggaggttctggtggaagtggaggttcaggtggagtcgacgacattcagctgaccagctcctcagcaatcatgtctgcattcctcagg
 ggagaaggtccatgacctgcagagccagttcaagtgaagtacatgaactggtaggaccagcagaagtcaggcacctccccaaaag
 atggattatgacacatccaaagtggcttctggagtccttatcgttcagtgccagtggtgctgggacctcactctctcacaatcagc
 20 agcatggaggctgaagatgctgccactattactgccaacagtgagtagtaaccgctcacgttcggtgctgggaccaagctggag
 ctgaaa

(5) 靶向 Y035/CD3 的双特异性抗体的表达及纯化

将 Y035/CD3 BiTE 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 NiSepharose™ 6 Fast Flow (购自 GE Healthcare 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:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIH
 PGSGDTAYNQRFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARFYSYAYWGQGT
 25 LVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYL
 QWYLYKPKQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSI
 30 YVPYTFGQGTKLEIKRGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHW
 VKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY
 YCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGGGSGGGSGGGVDDIQLTQSPAISAS
 PGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPIYRFSGSGSGTSYS
 35 LTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK

选择 GPC3 表达阳性的 HepG2 和 SK-Hep-1 GPC3 作为靶细胞, 研究了 Y035/CD3 BiTE 在体外的细胞毒性作用, 结果显示, 浓度为 0.1ng/ml 的 Y035/CD3 BiTE 对 HepG2 的细胞杀伤作用达到约 60%, 对 SK-Hep-1 GPC3 的细胞作用达到约 40%。与 CN103833852A 所述的 GPC3/CD3 BiTE 相比, 细胞毒性显著增加。

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。

权 利 要 求

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，该抗体具有轻链可变区和重链可变区，且，

5 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；

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；

其轻链可变区的 CDR3 具有氨基酸序列：SEQ ID NO: 20；

10 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；

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；

15 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。

2. 如权利要求 1 所述的抗体，其特征在于，所述的抗体选自：

20 抗体(a)，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；

抗体(b)，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；

25 抗体(c)，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；

抗体(d)，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；

30 抗体(e)，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；

抗体(f)，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；

抗体(g)，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；

- 5 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。

3. 如权利要求 2 所述的抗体，其特征在于，抗体(a)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；

抗体(b)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；

抗体(c)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；

15 抗体(d)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；

抗体(e)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；

20 抗体(f)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；或

抗体(g)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。

4. 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，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。

30 5. 如权利要求 4 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，或 SEQ ID NO: 59 所示氨基酸序列的轻链可变区。

6. 编码权利要求 1-5 任一所述的抗体的核酸。

7. 一种表达载体，其包含权利要求 6 所述的核酸。

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

5

9. 权利要求 1-5 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。

10

10. 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 1-5 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，抑制肿瘤的分子，靶向免疫细胞的表面标志物的分子或可检测标记物。

15

11. 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
所述的抑制肿瘤的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：IL-12、IL-15、IFN-beta、TNF-alpha。

20

12. 如权利要求 10 所述的多功能免疫缀合物，其特征在于，所述的可检测标记物包括：荧光标记物、显色标记物。

13. 如权利要求 11 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, Claudin 18.2, 叶酸受体, Claudin 6, WT1, NY-ESO-1, MAGE 3, ASGPR1 或 CDH16。

14. 如权利要求 10 所述的多功能免疫缀合物，其特征在于，所述的靶向免疫细胞的表面标志物的分子是结合 T 细胞表面标志物的抗体，其与权利要求 1-5 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 1-5 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。

5

17. 编码权利要求 10-16 任一所述的多功能免疫缀合物的核酸。

18. 权利要求 10-16 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

10 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。

19. 包含权利要求 1-5 任一所述的抗体的嵌合抗原受体，其特征在于，所述的嵌合
15 抗原受体包含顺序连接的：权利要求 1-5 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 ζ ，Fc ϵ RI γ ，CD27，CD28，CD137，CD134，MyD88，CD40 的胞内信号区序列，或其组合。

20. 如权利要求 19 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述的跨膜区包含 CD8 或
20 CD28 的跨膜区。

21. 如权利要求 19 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 1-5 任一所述的抗体、CD8 和 CD3 ζ ；

25 权利要求 1-5 任一所述的抗体、CD8、CD137 和 CD3 ζ ；

权利要求 1-5 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 ζ ；或

权利要求 1-5 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 ζ 。

30

22. 如权利要求 19 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。

23. 如权利要求 19 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: 49 或其中第 22-346 位所示的氨基酸序列；
SEQ ID NO: 50 或其中第 22-447 位所示的氨基酸序列；
SEQ ID NO: 51 或其中第 22-491 位所示的氨基酸序列；
SEQ ID NO: 52 或其中第 22-494 位所示的氨基酸序列；
5 SEQ ID NO: 53 或其中第 22-536 位所示的氨基酸序列；
SEQ ID NO: 85 所示的氨基酸序列；
SEQ ID NO: 86 所示的氨基酸序列；或
SEQ ID NO: 87 所示的氨基酸序列。
- 10 24. 编码权利要求 19-23 任一所述的嵌合抗原受体的核酸。
25. 一种表达载体，其特征在于，其包含权利要求 24 所述的核酸。
26. 一种病毒，其特征在于，所述的病毒包含权利要求 25 所述载体。
- 15 27. 权利要求 19-23 任一所述的嵌合抗原受体、或权利要求 24 所述的核酸、或权利要求 25 所述的表达载体、或权利要求 26 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。
- 20 28. 如权利要求 27，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。
29. 一种基因修饰的免疫细胞，其特征在于，其转导有权利要求 24 所述的核酸，或权利要求 25 所述的表达载体或权利要求 26 所述的病毒；或
25 其表面表达权利要求 19-23 任一所述的嵌合抗原受体。
30. 如权利要求 29 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；较佳地，所述的细胞因子包括：IL-12，IL-15 或 IL-21。
- 30 31. 如权利要求 29 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 ζ ，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。
32. 如权利要求 29 所述的免疫细胞，其特征在于，其还表达趋化因子受体；较佳

地，所述的趋化因子受体包括：CCR2。

33. 如权利要求 29 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。

5

34. 如权利要求 29 所述的免疫细胞，其特征在于，其还表达安全开关；较佳地，所述的安全开关包括：iCaspase-9，Truuncated EGFR 或 RQR8。

35. 如权利要求 29 所述的免疫细胞，其特征在于，所述的免疫细胞包括：T 淋巴
10 细胞，NK 细胞或 NKT 细胞。

36. 权利要求 29-35 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。

15 37. 药物组合物，其特征在于，其包括：

权利要求 1-5 任一所述的抗体或编码该抗体的核酸；或

权利要求 10-16 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 19-23 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 29-35 任一所述的基因修饰的免疫细胞。

20

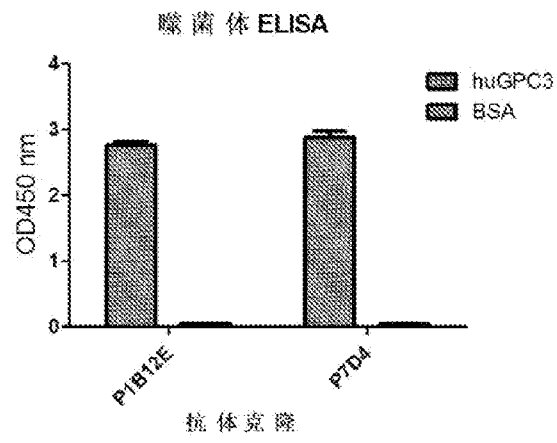


图 1

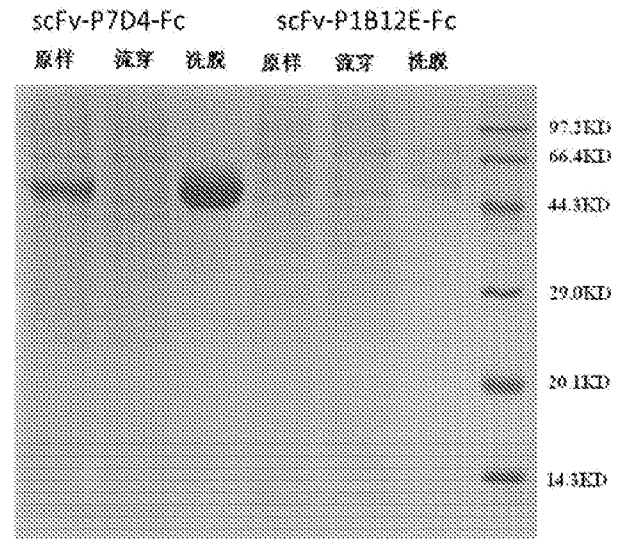


图 2

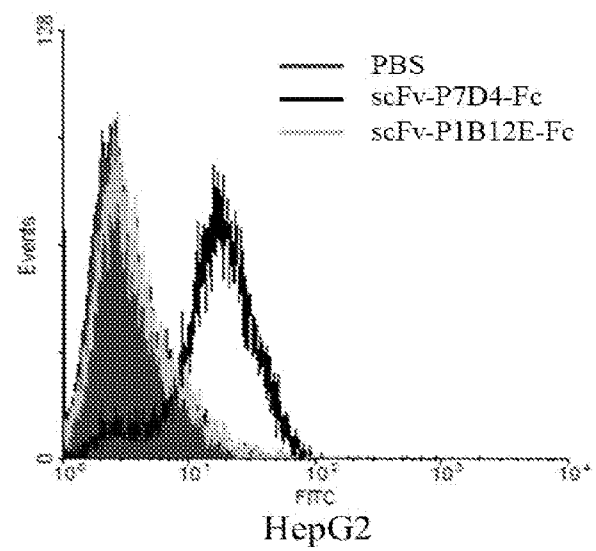


图 3

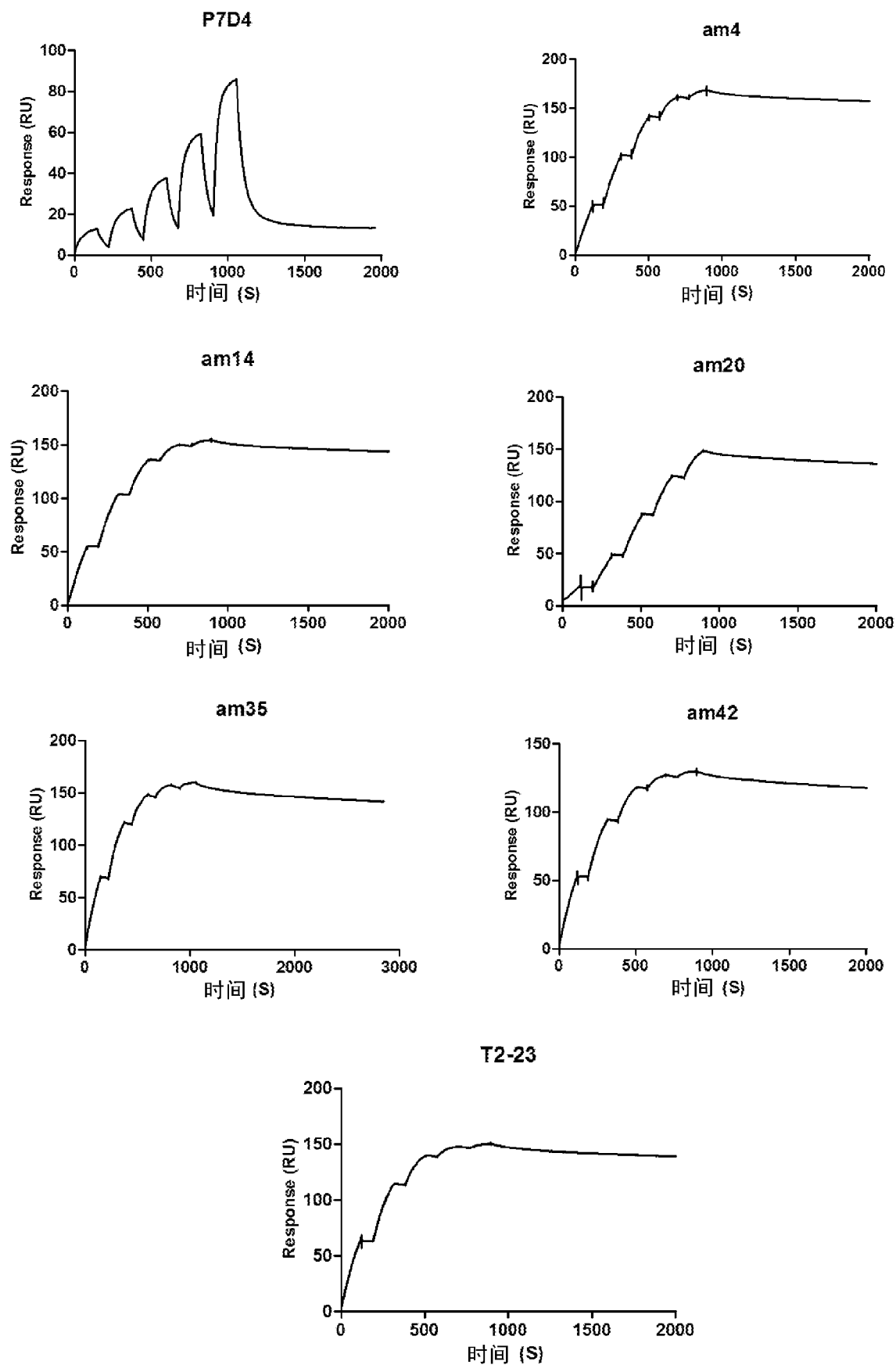


图 4

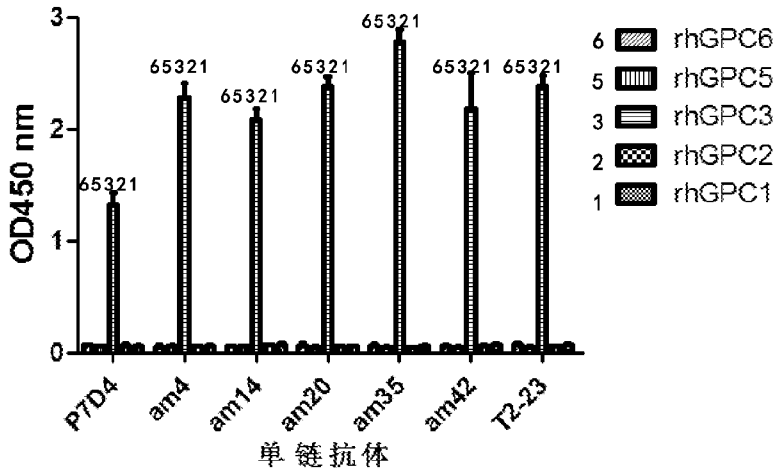


图 5

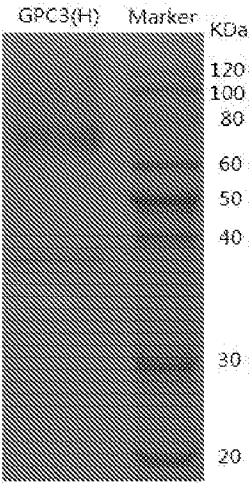


图 6

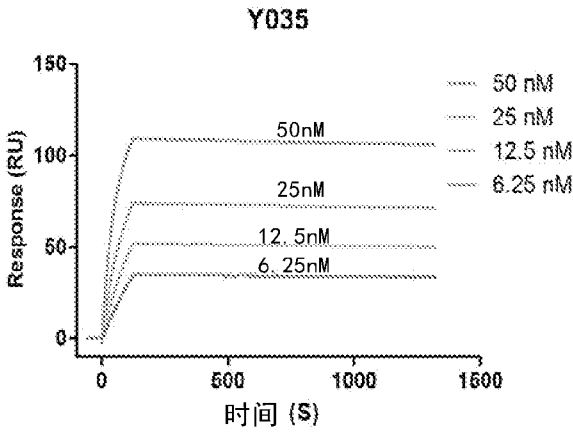


图 7

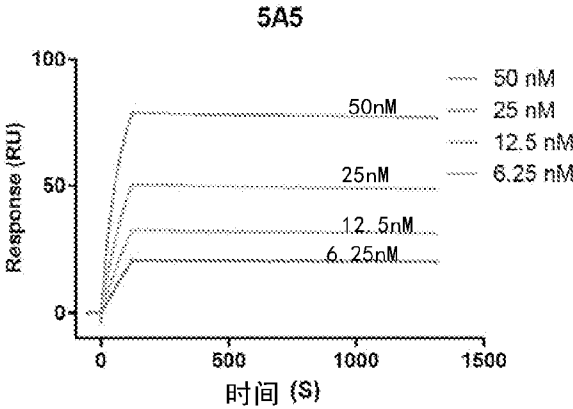


图 8

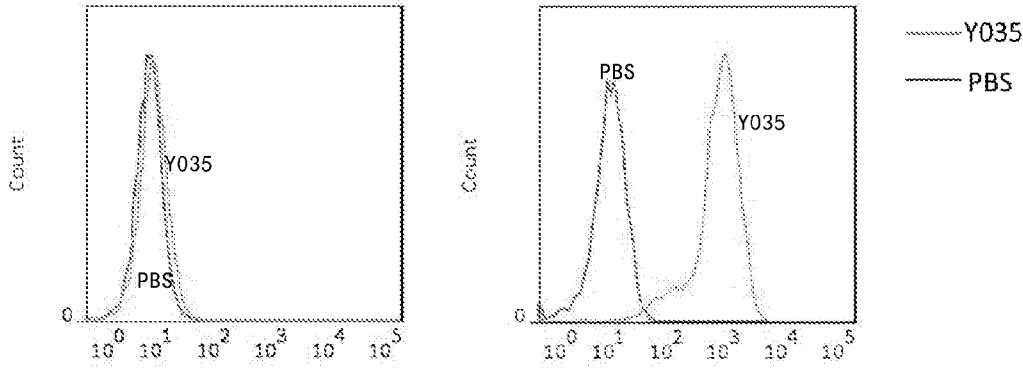


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/092833**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07K 16/30 (2006.01) i; C07K 19/00 (2006.01) i; C07K 16/46 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12N 15/62 (2006.01) i; C12N 5/10 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61K 48/00 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE and Search Terms:
anti-glypican-3, GPC3, Glypican-3, single-chain antibody, humanized antibody, et al.;

GENBANK, EMBL, National Bio-sequence Database of Chinese Patent and sequence of search: SEQ ID NOs: 1-98

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103596985 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES), 19 February 2014 (19.02.2014), the whole document, particularly claims 1-52	1-37
A	CN 1842540 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 04 October 2006 (04.10.2006), the whole document, particularly claims 1-32	1-37
A	CN 103833852 A (SHANGHAI CANCER INSTITUTE), 04 June 2014 (04.06.2014), the whole document, particularly claims 1-13	1-37

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
23 September 2016 (23.09.2016)

Date of mailing of the international search report
27 October 2016 (27.10.2016)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer

LI, ChenTelephone No.: (86-10) **62411100**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/092833

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103596985 A	19 February 2014	EP 2998320 A1 US 2016208015 A1 WO 2012145469 A8 US 2015368340 A1 EP 2699603 A1 US 9394364 B2 US 9206257 B2 WO 2012145469 A1 US 2014044714 A1 EP 2699603 B1 CN 103596985 B	23 March 2016 21 July 2016 07 November 2013 24 December 2015 26 February 2014 19 July 2016 08 December 2015 26 October 2012 13 February 2014 02 March 2016 08 June 2016
CN 1842540 A	04 October 2006	EP 2898897 A3 EP 2314317 A3 EP 1674111 A1 NO 20063539 A ES 2353967 T3 US 2007190599 A1 IL 172938 D0 TW I455946 B BR PI0506125 A EP 2314317 A2 RU 2427588 C2 CY 1111649 T1 MX PA06002890 A KR 101413402 B1 AT 486610 T KR 20070034448 A US 7919086 B2 WO 2006006693 A1 JP 5715603 B2 EP 2216046 A2 EP 1674111 A4 US 2010248359 A1 EP 2216046 A3 RU 2006104842 A CN 105820249 A JP 2013039131 A AU 2005256113 A8 KR 20130014698 A SI 1674111 T1 CN 1842540 B AU 2005256113 B2 EP 1674111 B1 KR 101300545 B1 MY 145073 A DK 1674111 T3 RU 2011115845 A US 2015259417 A1 NZ 579543 A IL 172938 A	14 October 2015 29 June 2011 28 June 2006 09 January 2007 08 March 2011 16 August 2007 11 June 2006 11 October 2014 24 October 2006 27 April 2011 27 August 2011 07 October 2015 05 June 2006 27 June 2014 15 November 2010 28 March 2007 05 April 2011 19 January 2006 07 May 2015 11 August 2010 19 March 2008 30 September 2010 22 December 2010 27 August 2007 03 August 2016 28 February 2013 11 September 2008 08 February 2013 28 February 2011 04 July 2012 10 February 2011 03 November 2010 02 September 2013 15 December 2011 07 February 2011 27 October 2012 17 September 2015 29 July 2011 30 September 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/092833

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103833852 A	04 June 2014	DE 602005024502 D1	16 December 2010
		UA 94019 C2	11 April 2011
		HK 1092161 A1	09 November 2012
		CA 2544692 C	01 April 2014
		EP 2216046 B1	12 March 2014
		NZ 545720 A	29 January 2010
		CA 2544692 A1	19 January 2006
		PT 1674111 E	15 December 2010
		EP 2898897 A2	29 July 2015
		JP 2009232848 A	15 October 2009
		None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/092833

A. 主题的分类

C07K 16/30(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE和检索词: 抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3, GPC3, 单链抗体, 人源化抗体, Glypican-3, single-chain antibody, humanized antibody, 等; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NOs: 1-98

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103596985 A (美国政府由卫生和人类服务部的部长所代表) 2014年 2月 19日 (2014 - 02 - 19) 全文, 特别是权利要求1-52	1-37
A	CN 1842540 A (中外制药株式会社) 2006年 10月 4日 (2006 - 10 - 04) 全文, 特别是权利要求1-32	1-37
A	CN 103833852 A (上海市肿瘤研究所) 2014年 6月 4日 (2014 - 06 - 04) 全文, 特别是权利要求1-13	1-37

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 9月 23日

国际检索报告邮寄日期

2016年 10月 27日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

李晨

电话号码 (86-10)62411100

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/092833

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103596985	A	2014年 2月 19日	EP	2998320	A1	2016年 3月 23日
				US	2016208015	A1	2016年 7月 21日
				WO	2012145469	A8	2013年 11月 7日
				US	2015368340	A1	2015年 12月 24日
				EP	2699603	A1	2014年 2月 26日
				US	9394364	B2	2016年 7月 19日
				US	9206257	B2	2015年 12月 8日
				WO	2012145469	A1	2012年 10月 26日
				US	2014044714	A1	2014年 2月 13日
				EP	2699603	B1	2016年 3月 2日
				CN	103596985	B	2016年 6月 8日
CN	1842540	A	2006年 10月 4日	EP	2898897	A3	2015年 10月 14日
				EP	2314317	A3	2011年 6月 29日
				EP	1674111	A1	2006年 6月 28日
				NO	20063539	A	2007年 1月 9日
				ES	2353967	T3	2011年 3月 8日
				US	2007190599	A1	2007年 8月 16日
				IL	172938	D0	2006年 6月 11日
				TW	I455946	B	2014年 10月 11日
				BR	PI0506125	A	2006年 10月 24日
				EP	2314317	A2	2011年 4月 27日
				RU	2427588	C2	2011年 8月 27日
				CY	1111649	T1	2015年 10月 7日
				MX	PA06002890	A	2006年 6月 5日
				KR	101413402	B1	2014年 6月 27日
				AT	486610	T	2010年 11月 15日
				KR	20070034448	A	2007年 3月 28日
				US	7919086	B2	2011年 4月 5日
				WO	2006006693	A1	2006年 1月 19日
				JP	5715603	B2	2015年 5月 7日
				EP	2216046	A2	2010年 8月 11日
				EP	1674111	A4	2008年 3月 19日
				US	2010248359	A1	2010年 9月 30日
				EP	2216046	A3	2010年 12月 22日
				RU	2006104842	A	2007年 8月 27日
				CN	105820249	A	2016年 8月 3日
				JP	2013039131	A	2013年 2月 28日
				AU	2005256113	A8	2008年 9月 11日
				KR	20130014698	A	2013年 2月 8日
				SI	1674111	T1	2011年 2月 28日
				CN	1842540	B	2012年 7月 4日
				AU	2005256113	B2	2011年 2月 10日
				EP	1674111	B1	2010年 11月 3日
				KR	101300545	B1	2013年 9月 2日
				MY	145073	A	2011年 12月 15日
				DK	1674111	T3	2011年 2月 7日
				RU	2011115845	A	2012年 10月 27日
				US	2015259417	A1	2015年 9月 17日
				NZ	579543	A	2011年 7月 29日
				IL	172938	A	2013年 9月 30日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/092833

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		DE 602005024502 D1	2010年 12月 16日
		UA 94019 C2	2011年 4月 11日
		HK 1092161 A1	2012年 11月 9日
		CA 2544692 C	2014年 4月 1日
		EP 2216046 B1	2014年 3月 12日
		NZ 545720 A	2010年 1月 29日
		CA 2544692 A1	2006年 1月 19日
		PT 1674111 E	2010年 12月 15日
		EP 2898897 A2	2015年 7月 29日
		JP 2009232848 A	2009年 10月 15日
CN 103833852 A	2014年 6月 4日	无	

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)