



(43) 申请公布日 2023.03.31

序列表22页 附图4页

1. 一种抗独特型抗体或其抗原结合部分,所述抗独特型抗体或其抗原结合部分特异性结合包含GP5B83的靶抗体。

2. 根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述靶抗体或其抗原结合部分包含VH结构域和VL结构域,所述VH结构域具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列,所述VL结构域具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列。

3. 一种抗独特型抗体或其抗原结合部分,所述抗独特型抗体或其抗原结合部分特异性结合GP5B83,其中所述抗独特型抗体或抗原结合部分包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含具有选自自由SEQ ID NO:4-7组成的组的氨基酸序列的VH CDR1、具有选自自由SEQ ID NO:11-14组成的组的氨基酸序列的VH CDR2和具有选自自由SEQ ID NO:19-20组成的组的氨基酸序列的VH CDR3,并且所述抗独特型抗体或抗原结合部分还包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含具有选自自由SEQ ID NO:25-26组成的组的氨基酸序列的VL CDR1、具有选自自由SEQ ID NO:29-30组成的组的氨基酸序列的VL CDR2和具有选自自由SEQ ID NO:33-34组成的组的氨基酸序列的VL CDR3。

4. 根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述VH结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:45具有至少90%的序列同一性,并且所述VL结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:46具有至少90%的序列同一性。

5. 根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗独特型抗体或抗原结合部分包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:37具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,并且所述抗独特型抗体或抗原结合部分还包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:39具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述VH结构域具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列并且所述VL结构域具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

7. 根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗独特型抗体或抗原结合部分包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,并且所述抗独特型抗体或抗原结合部分还包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

8. 根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗原结合部分选自Fab、F(ab')₂或scFv。

9. 根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗体为单克隆抗体。

10. 根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗体是嵌合抗体。

11. 根据权利要求10所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗体包含鼠IgG2a框架。

12. 根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗体是完全人抗体。

13. 一种核酸,所述核酸编码根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分的所述重链、所述轻链或这两者。

14. 一种核酸,所述核酸编码特异性结合GP5B83的抗独特型抗体或其抗原结合部分的重链、轻链或这两者,其中所述核酸包含:

a) SEQ ID NO:38的核苷酸序列;

b) SEQ ID NO:40的核苷酸序列;

c) a) 和b) 两者。

15. 一种载体, 所述载体包含根据权利要求14所述的核酸。

16. 根据权利要求15所述的载体, 其中所述载体为表达载体。

17. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含根据权利要求16所述的载体。

18. 根据权利要求17所述的宿主细胞, 其中所述细胞是哺乳动物细胞。

19. 一种产生特异性结合GP5B83的抗独特型抗体或其抗原结合部分的方法, 所述方法包括: 在允许所述抗体或抗原结合部分进行表达的条件下培养根据权利要求17所述的宿主细胞, 其中所述宿主细胞包含对所述抗体或抗原结合部分的所述重链和所述轻链进行编码的核苷酸序列; 以及从培养物中分离所述抗体或抗原结合部分。

20. 一种用于在生物样品中检测GP5B83的方法, 所述方法包括: (a) 提供生物样品; (b) 使所述生物样品与根据权利要求1至3中任一项所述的抗独特型抗体或抗原结合部分接触; 以及 (c) 检测所述抗独特型抗体或抗原结合部分。

21. 一种用于在生物样品中检测包含GP5B83的嵌合抗原受体 (CAR) 的表达的方法, 所述方法包括: (a) 提供生物样品; (b) 使所述生物样品与根据权利要求1至3中任一项所述的抗独特型抗体或抗原结合部分接触; 以及 (c) 检测所述抗独特型抗体或抗原结合部分, 从而检测所述CAR的表达。

22. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述抗体包含可检测标签。

23. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述方法还包括在检测所述抗独特型抗体或抗原结合部分之前, 使所述抗独特型抗体或抗原结合部分与可检测标签接触。

24. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述生物样品是血液、血清或尿液。

25. 根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分, 其中GP5B83处于嵌合抗原受体 (CAR) 的细胞外部分的抗原结合结构域内。

26. 根据权利要求25所述的抗独特型抗体或抗原结合部分, 其中GP5B83是scFv, 并且所述抗独特型抗体或抗原结合部分特异性结合所述CAR的所述scFv中的表位。

27. 根据权利要求25所述的抗独特型抗体或抗原结合部分, 其中GP5B83特异性结合GPCR5d。

28. 根据权利要求25所述的抗独特型抗体或抗原结合部分, 其中所述抗体或抗原结合部分不与其他GPCR5d抗体或其他GPCR5d结合CAR交叉反应。

29. 根据权利要求25所述的抗独特型抗体或抗原结合部分, 其中所述CAR具有选自由SEQ ID NO: 43-44组成的组的氨基酸序列。

30. 一种用于在生物样品中检测GP5B83的试剂盒, 所述试剂盒包含:

(a) 根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分; 和 (b) 用于检测所述抗独特型抗体或抗原结合部分的使用说明。

31. 根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分, 用于在生物样品中检测GP5B83, 包括: (a) 提供生物样品; (b) 使所述生物样品与所述抗独特型抗体或抗原结合部分接触; 以及 (c) 检测所述抗独特型抗体或抗原结合部分。

32. 一种从样品中纯化GP5B83的方法, 所述方法包括: (a) 提供包含GP5B83的生物样品; (b) 使所述生物样品与根据权利要求1至3中任一项所述的抗独特型抗体或抗原结合部分接触; 以及 (c) 捕获所述抗独特型抗体或抗原结合部分, 从而纯化GP5B83。

33. 一种从细胞群中选择CAR-T细胞的方法,所述方法包括:(a) 提供包含CAR-T细胞的生物样品;(b) 使所述生物样品与根据权利要求1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c) 捕获所述抗独特型抗体或抗原结合部分,从而选择CAR-T细胞。

抗GPCR5D抗体的抗独特型抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求提交于2020年7月17日的美国临时申请序列号63/053,286的权益。上述申请的全部内容全文以引用方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已经以ASCII格式电子递交的序列表,并且据此全文以引用方式并入。所述ASCII副本创建于2021年7月7日,命名为JBI6352W0PCT1_SL.txt,并且大小为37,057字节。

技术领域

[0005] 本发明涉及抗独特型抗体及其抗原结合部分,该抗独特型抗体及其抗原结合部分特异性结合含有GP5B83的蛋白质,例如抗体或其抗原结合部分。还提供了用于检测和量化表达包括GP5B83的嵌合抗原受体的细胞的方法。

背景技术

[0006] 在理解基因组材料的递送和向靶基因组中的整合方面的最新进展在改变各种疾病的护理标准方面具有巨大潜力。T细胞疗法利用了分离的T细胞,这些T细胞已经被基因修饰以增强它们对特定肿瘤相关抗原的特异性。基因修饰可以涉及嵌合抗原受体(CAR)或外源性T细胞受体的表达,以将新的抗原特异性提供到T细胞上。表达嵌合抗原受体的T细胞(CAR-T细胞)可以诱导肿瘤免疫反应性。

[0007] 一个感兴趣的CAR靶标是G蛋白偶联受体家族C组5成员D(GPCR5D)。GPCR5D已被鉴定为多发性骨髓瘤以及其它潜在癌症免疫疗法的潜在靶标。因此,需要用于治疗此癌症的CAR-T细胞疗法。还需要针对此类CAR的抗独特型抗体,以便检测、纯化或选择表达该CAR的蛋白质和细胞。

发明内容

[0008] 本公开提供了抗独特型抗体及其抗原结合部分,该抗独特型抗体及其抗原结合部分特异性结合含有GP5B83的蛋白质,例如抗体或其抗原结合部分。本公开还提供了编码抗独特型抗体及其抗原结合部分的核酸、产生抗独特型抗体及其抗原结合部分的方法、使用抗独特型抗体及其抗原结合部分来检测GP5B83的方法以及包括抗独特型抗体及其抗原结合部分的试剂盒。

[0009] 在一个方面,本公开提供了抗独特型抗体或其抗原结合部分,该抗独特型抗体或其抗原结合部分特异性结合抗GPCR5D抗体,诸如包含GP5B83的靶抗体。在一些实施方案中,靶抗体或抗原结合部分包含VH结构域和VL结构域,该VH结构域具有包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列,该VL结构域具有包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。

[0010] 在其他实施方案中,抗独特型抗体或抗原结合部分用于在生物样品中检测GP5B83,包括:(a)提供生物样品;(b)使所述生物样品与所述抗独特型抗体或抗原结合部分

接触;以及(c)检测所述抗独特型抗体或抗原结合部分。

[0011] 在另一方面,本公开提供了抗独特型抗体或抗原结合部分,该抗独特型抗体或抗原结合部分特异性结合GP5B83,该抗独特型抗体或抗原结合部分包含重链可变(VH)结构域,该重链可变(VH)结构域包含具有选自SEQ ID NO:4-7组成的组的氨基酸序列的VH CDR1、具有选自SEQ ID NO:11-14组成的组的氨基酸序列的VH CDR2和具有选自SEQ ID NO:19-20组成的组的氨基酸序列的VH CDR3,并且该抗独特型抗体或抗原结合部分还包含轻链可变(VL)结构域,该轻链可变(VL)结构域包含具有选自SEQ ID NO:25-26组成的组的氨基酸序列的VL CDR1、具有选自SEQ ID NO:29-30组成的组的氨基酸序列的VL CDR2和具有选自SEQ ID NO:33-34组成的组的氨基酸序列的VL CDR3。

[0012] 在一些实施方案中,抗独特型抗体或其抗原结合部分包含VH结构域和VL结构域,该VH结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:45具有至少90%的序列同一性,该VL结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:46具有至少90%的序列同一性。在一些实施方案中,抗独特型抗体或其抗原结合部分包含重链,该重链包含与SEQ ID NO:37具有至少90%的序列同一性的氨基酸序列,并且抗独特型抗体或其抗原结合部分还包含轻链,该轻链包含与SEQ ID NO:39具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗独特型抗体或其抗原结合部分包含VH结构域,该VH结构域的氨基酸序列与SEQ ID No:45具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。在一些实施方案中,抗独特型抗体或其抗原结合部分包含VL结构域,该VL结构域的氨基酸序列与SEQ ID No:46具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0013] 在一些实施方案中,抗独特型抗体或其抗原结合部分包含VH结构域和VL结构域,该VH结构域具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列,该VL结构域具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗独特型抗体或其抗原结合部分包含重链,该重链包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,并且抗独特型抗体或其抗原结合部分还包含轻链,该轻链包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0014] 在一些实施方案中,抗原结合部分选自Fab、F(ab')₂或scFv。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,该嵌合抗体包含鼠IgG2a框架。在一些其他实施方案中,抗体是完全人抗体。在一些实施方案中,抗独特型抗体或其抗原结合部分对GP5B83有特异性,其中GP5B83处于嵌合抗原受体(CAR)的细胞外部分的抗原结合结构域内。在一些实施方案中,GP5B83是scFv,并且抗独特型抗体或抗原结合部分特异性结合CAR的scFv中的表位。在一些实施方案中,GP5B83特异性结合GPCR5D。在一些实施方案中,抗体或抗原结合部分不与其他GPCR5D抗体或其他GPCR5D结合CAR交叉反应。在一些实施方案中,CAR具有选自SEQ ID NO:43-44组成的组的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方案中,本公开提供了核酸,该核酸编码抗独特型抗体或抗原结合部分的重链、轻链或这两者。

[0016] 在另一方面,本公开提供了核酸,该核酸编码特异性结合GP5B83的抗独特型抗体或其抗原结合部分的重链、轻链或这两者,其中所述核酸包含:SEQ ID NO:38的核苷酸序列;SEQ ID NO:40的核苷酸序列;或这两者。在另一方面,本公开提供了包含核酸序列的载

体。在一些实施方案中,载体是表达载体。在另一方面,本公开提供了包含载体的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞为哺乳动物细胞。

[0017] 在另一方面,本公开提供了一种产生特异性结合GP5B83的抗独特型抗体或其抗原结合部分的方法,所述方法包括:在允许所述抗体或抗原结合部分进行表达的条件下培养宿主细胞,其中宿主细胞包含对抗体或抗原结合部分的重链和轻链进行编码的核苷酸序列;以及从培养物中分离所述抗体或抗原结合部分。在一些实施方案中,宿主细胞编码包含核酸的载体,该核酸编码抗独特型抗体或其抗原结合部分。

[0018] 在另一方面,本公开提供了一种用于在生物样品中检测GP5B83的方法,该方法包括:(a) 提供生物样品;(b) 使生物样品与抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c) 检测该抗独特型抗体或抗原结合部分。

[0019] 在另一方面,本公开提供了一种用于在生物样品中检测包含GP5B83的嵌合抗原受体(CAR)的表达的方法,该方法包括:(a) 提供生物样品;(b) 使生物样品与抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c) 检测该抗独特型抗体或抗原结合部分,从而检测CAR的表达。

[0020] 在一些实施方案中,该抗体包含可检测标签。在一些实施方案中,该方法还包括在检测抗独特型抗体或抗原结合部分之前,使抗独特型抗体或抗原结合部分与可检测标签接触。在一些实施方案中,生物样品为血液、血清或尿液。

[0021] 在一些方面,本公开提供了一种用于在生物样品中检测GP5B83的试剂盒,该试剂盒包含:(a) 抗独特型抗体或抗原结合部分;和(b) 用于检测抗独特型抗体或抗原结合部分的使用说明。

[0022] 在其他方面,本公开提供了一种从样品中纯化GP5B83的方法,该方法包括:(a) 提供包含GP5B83的生物样品;(b) 使该生物样品与抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c) 捕获抗独特型抗体或抗原结合部分,从而纯化GP5B83。

[0023] 在其他方面,本公开提供了一种从细胞群中选择CAR-T细胞的方法,该方法包括:(a) 提供包含CAR-T细胞的生物样品;(B) 使该生物样品与抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c) 捕获抗独特型抗体或抗原结合部分,从而选择CAR-T细胞。在一些实施方案中,抗独特型抗体或其抗原结合部分对GP5B83有特异性。

[0024] 本公开涵盖前述方面和实施方案中任一者的所有组合,以及与详细描述和实施例阐述的实施方案中的任一者的组合。

附图说明

[0025] 出于示出本发明的目的,附图中描绘的是本公开的某些实施方案。然而,本公开不限于附图中描绘的实施方案的精确布置和手段。

[0026] 图1示出了用多克隆ELISA检测的在第四轮淘选(panning)之后的GCDB332特异性结合富集的图形表示;

[0027] 图2示出了与HRP缀合链霉亲和素反向筛选试剂结合测定相比,GCDB332靶结合测定的单克隆Fab结合筛选的结果的图形表示;

[0028] 图3示出了GP5B318与GP5DB83-LH SupT1细胞的剂量依赖性结合的图形表示;并且

[0029] 图4示出了用GPDB83-HL scFv-Fc融合蛋白阻断PE-P5B318与GP5DB83-HL SupT1细胞的剂量依赖性结合的图形表示;

具体实施方式

[0030] 概述

[0031] 本公开提供了抗独特型抗体及其抗原结合部分,该抗独特型抗体及其抗原结合部分特异性结合含有GP5B83的蛋白质,例如抗体或其抗原结合部分。本公开的抗独特型抗体和抗原结合部分可在用于检测和量化表达包括GP5B83的CAR的细胞的方法中使用。此类方法可允许研究人员确定给定批次的体外生成的CAR-T细胞是否已经表达了所需CAR,并且因此确定这些细胞对于靶向所需蛋白质是否在治疗上有用。在本公开中,抗独特型抗体和抗原结合部分靶向GP5B83,其本身靶向GPC5D,即与包括多发性骨髓瘤在内的癌症相关联的蛋白质。

[0032] 定义

[0033] 如本说明书和所附权利要求中所用,除非内容另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”包括复数指代。因此,例如,对“一个细胞”的提及包括两个或更多个细胞的组合等等。

[0034] 过渡术语“包括”、“基本上由……组成”和“由……组成”旨在暗示它们在专利用语中的公认含义;即,(i)“包括”与“包含”、“含有”或“其特征在于”同义,并且是包括端值在内或末端开放的,并且不排除附加的、未列出的要素或方法步骤;(ii)“由……组成”排除权利要求书未指定的任何要素、步骤或成分;以及(iii)“基本上由……组成”将权利要求的范围限制于指定的材料或步骤“以及本质上不影响受权利要求书保护的发明的基本及新颖特征的材料或步骤”。还提供了以短语“包括”(或其等同形式)描述的实施方案,如以“由……组成”和“基本上由……组成”独立描述的那些实施方案。

[0035] “活化”或“刺激”是指诱导细胞的生物状态变化,导致活化标志物的表达、细胞因子产生、增殖或介导靶细胞的细胞毒性。细胞可以被主要刺激信号激活。共刺激信号可以放大初级信号的幅度并抑制初始刺激后的细胞死亡,从而产生更持久的激活状态并因此产生更高的细胞毒性能力。“共刺激信号”是指与初级信号(诸如TCR/CD3连接)组合的信号导致T细胞和/或NK细胞增殖和/或关键分子的上调或下调。

[0036] “抗独特型抗体”是指与另一种抗体的可变区特异性结合的抗体。在GPC5D的情况下,抗独特型抗体特异性结合抗GPC5D2抗体。

[0037] “抗原结合部分”、“抗原结合片段”或“抗原结合结构域”是指蛋白质的结合抗原的部分。抗原结合结构域可以是合成的、可酶促获得的或经遗传工程化的多肽,并且包括免疫球蛋白的结合抗原的部分,诸如VH、VL、VH和VL、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd和Fv片段;由一个VH结构域或一个VL结构域组成的结构域抗体(dAb);鲨鱼可变IgNAR结构域;驼峰化VH结构域;VHH结构域;由模拟抗体的CDR诸如FR3-CDR3-FR4部分、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3以及LCDR1、LCDR2和/或LCDR3的氨基酸残基组成的最小识别单元;结合抗原的替代支架;以及包含抗原结合片段的多特异性蛋白质。抗原结合片段(诸如VH和VL)可经由合成接头连接在一起以形成各种类型的单抗体设计,其中在VH和VL结构域由单独的单链表达的那些情况下,VH/VL结构域可在分子内或分子间配对,以形成单价抗原结合位点,诸如单链Fv(scFv)或双链抗体。抗原结合片段也可以缀合至其它抗体、蛋白质、抗原结合片段或替代性支架缀合,所述支架可以是单特异性或多特异性的以工程化双特异性和多特异性蛋白质。

[0038] “癌症”是指广泛的各种疾病,其特征在于身体中异常细胞的不受控制的生长。未

受控制的细胞分裂和生长导致形成侵入相邻组织的恶性肿瘤,并且还可通过淋巴系统或血流转移到身体的远侧部分。“癌症”或“癌症组织”可包括肿瘤。

[0039] “全长抗体”由通过二硫键以及它们的多聚体(例如IgM)互连的两条重链(HC)和两条轻链(LC)构成。每条重链由重链可变结构域(VH)和重链恒定结构域构成,重链恒定结构域由亚结构域CH1、铰链、CH2和CH3构成。每条轻链由轻链可变结构域(VL)和轻链恒定结构域(CL)构成。VH和VL可被进一步细分成称作互补决定区(CDR)的超变区、散布其间的框架区(FR)。各个VH和VL由三个CDR和四个FR片段构成,并按以下顺序从氨基端至羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

[0040] “互补决定区(CDR)”是抗体中的抗原结合位点。CDR可以使用各种术语来定义:(i)三个在VH中(HCDR1、HCDR2、HCDR3)且三个在VL中(LCDR1、LCDR2、LCDR3)的互补决定区(CDR)是基于序列变异性(Wu和Kabat, J Exp Med 132:211-50, 1970; Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)。(ii)三个在VH中(H1、H2、H3)且三个在VL中(L1、L2、L3)的“高变区”、“HVR”或“HV”是指抗体可变结构域的在结构上高变的区域,如Chothia和Lesk所定义(Chothia和Lesk, Mol Biol 196:901-17, 1987)。国际免疫遗传学(IMG)数据库(<http://www.imgt.org>)提供了抗原结合位点的标准化编号和定义。CDR、HV和IMG描述之间的对应性在Lefranc等, Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003中有所描述。除非另有明确地说明,本文所用的术语“CDR”、“HCDR1”、“HCDR2”、“HCDR3”、“LCDR1”、“LCDR2”和“LCDR3”包括由任何上述方法(Kabat、Chothia或IMG)定义的CDR。

[0041] “人抗体”是指当施用于人受试者时被优化以具有最小限度的免疫应答的抗体。人抗体的可变区源自人免疫球蛋白序列。如果人抗体包含恒定区或恒定区的一部分,则该恒定区也源自人免疫球蛋白序列。如果人抗体的可变区由使用人种系免疫球蛋白或重排免疫球蛋白基因的系统获得,则该人抗体包含“源自”人起源序列的重链可变区和轻链可变区。此类示例性系统为在噬菌体上展示的人免疫球蛋白基因文库,以及转基因非人动物,诸如携带人免疫球蛋白基因座的小鼠或大鼠。因为用于获得人抗体和人免疫球蛋白基因座的系统之间的差异,所以体细胞突变的引入或有意将取代引入框架或CDR中或两者,因此“人抗体”与在人中表达的免疫球蛋白相比通常包含氨基酸差异。通常,“人抗体”的氨基酸序列与由人种系免疫球蛋白基因或重排免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些情况下,“人抗体”可以包含由人框架序列分析得出的共有框架序列(例如,如Knappik等人, (2000) J Mol Biol 296:57-86所述),或结合到展示在噬菌体上的人免疫球蛋白基因文库中的合成HCDR3(例如,如Shi等人, (2010) J Mol Biol 397:385-96和国际专利公开W02009/085462中所述)。“人抗体”的定义中不包括至少一个CDR源自非人物种的抗体。

[0042] “人源化抗体”是指其中至少一个CDR来源于非人物种并且至少一个框架来源于人免疫球蛋白序列的抗体。人源化抗体在框架中可包含取代,使得该框架可能不是表达的人免疫球蛋白或人免疫球蛋白种系基因序列的精确拷贝。

[0043] “分离的”是指已从产生分子的系统(诸如重组细胞)的其他组分中基本上分离和/或纯化出来的分子(诸如合成多核苷酸或多肽)的同质群体,以及已经受至少一个纯化或分

离步骤的蛋白质。“分离的”是指基本上不含其他细胞材料和/或化学物质的分子,并且涵盖分离至更高纯度(诸如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯度)的分子。

[0044] “调节”是指当与由对照或媒介物介导的应答相比时,测试分子介导增强或减少的应答(即,下游效应)的增强或降低的能力。

[0045] “自然杀伤细胞”和“NK细胞”在本文中可互换使用并且在本文中同义使用。NK细胞是指具有CD16⁺CD56⁺和/或CD57⁺TCR⁻表型的分化淋巴细胞。NK细胞的特征在于其能够给通过活化特异性溶细胞酶来结合并杀死不能表达“自身”MHC/HLA抗原的细胞,能够杀死表达NK活化受体的配体的肿瘤细胞或其他患病细胞,并且能够释放称为刺激或抑制免疫应答的细胞因子的蛋白质分子。

[0046] “特异性结合”或“结合”是指蛋白质类分子以比对其他抗原更大的亲和力与抗原或抗原内的表位结合。通常,蛋白质分子与抗原或抗原内的表位结合,平衡解离常数(K_D)为约 1×10^{-7} M或更低,例如约 5×10^{-8} M或更低、约 1×10^{-8} M或更低、约 1×10^{-9} M或更低、约 1×10^{-10} M或更低、约 1×10^{-11} M或更低或约 1×10^{-12} M、 1×10^{-13} M、 1×10^{-14} M、或 1×10^{-15} M更低,通常 K_D 比它与非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)结合的 K_D 低至少一百倍。在本文所述的前列腺新抗原的上下文中,“特异性结合”是指蛋白质类分子与前列腺新抗原的结合,而没有与新抗原为其变体的野生型蛋白质的可检测结合。

[0047] “肿瘤细胞”或“癌细胞”是指在体内、离体或组织培养物中的癌性、癌前或转化的细胞,其具有自发或诱导的表型变化。这些变化未必涉及新遗传物质的摄取。然而转化可由感染转化病毒以及结合新基因组核酸、摄取外源核酸而发生,或者其也可自发地发生或在暴露于致癌物之后发生,从而使内源基因突变。转化/癌症示例为合适的动物宿主(诸如裸小鼠等)中体外、体内和离体的形态变化、细胞永生、异常生长控制、病灶形成、增殖、恶性肿瘤、肿瘤特异性标志物水平调节、侵入、肿瘤生长。

[0048] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”被定义为细胞表面受体,该细胞表面受体包含细胞外靶结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,全部这些结构域的组合是在单个蛋白质上非天然地一起存在。这具体地包括其中细胞外结构域和细胞内信号传导结构域在单个受体蛋白质上非天然地一起存在的受体。本发明的嵌合抗原受体主要旨在与淋巴细胞诸如T细胞和自然杀伤(NK)细胞一起使用。

[0049] 术语“T细胞”和“T淋巴细胞”是可互换的,并且在本文中同义使用。如本文所用,T细胞包括胸腺细胞、初始T淋巴细胞、未成熟T淋巴细胞、成熟T淋巴细胞、静息T淋巴细胞或活化T淋巴细胞。T细胞可以是T辅助性(Th)细胞,例如T辅助性1(Th1)或T辅助性2(Th2)细胞。T细胞可以是辅助性T细胞(HTL;CD4+T细胞)、CD4+T细胞、细胞毒性T细胞(CTL;CD8+T细胞)、肿瘤浸润性细胞毒性T细胞(TIL;CD8+T细胞)、CD4+CD8+T细胞或T细胞的任何其他亚群。适用于特定实施方案的T细胞的其他例示性群体包括初始T细胞和记忆T细胞。还包括“NKT细胞”,是指表达半不变 $\alpha\beta$ T细胞受体但也表达通常与NK细胞相关联的多种分子标志物(诸如NK1.1)的特化T细胞群。NKT细胞包括NK1.1+细胞和NK1.1-细胞,以及CD4+细胞、CD4-细胞、CD8+细胞和CD8-细胞。NKT细胞上的TCR的独特之处在于它识别由MHC I样分子CD Id递呈的糖脂抗原。由于NKT细胞能够产生促进炎症或免疫耐受的细胞因子,因此它们可具有保护作用或有害作用。还包括“ γ - δ T细胞(γ δ T细胞)”,是指特化的群体,即在其表面上具

有独特TCR的T细胞的小子集,并且与其中TCR由被命名为 α -TCR链和 β -TCR链的两种糖蛋白链组成的大多数T细胞不同, $\gamma\delta$ T细胞中的TCR由 γ -链和 δ -链组成。 $\gamma\delta$ T细胞可以在免疫监视和免疫调节中起作用,并且被发现是IL-17的重要来源且诱导强烈的CD8+细胞毒性T细胞应答。还包括“调节性T细胞”或“Treg”,它们是指抑制异常或过度免疫应答并在免疫耐受中起作用的T细胞。Treg通常是转录因子Foxp3-阳性CD4+T细胞,并且还可包括转录因子Foxp3-阴性调节性T细胞,它们是产生IL-10的CD4+T细胞。

[0050] 如本文所用,术语“抗原”是指能够被T细胞受体结合的任何试剂(例如,蛋白质、肽、多糖、糖蛋白、糖脂、核酸、它们的部分或它们的组合)分子。抗原也能够引起免疫应答。免疫应答的示例可涉及但不限于抗体产生,或特异性免疫活性细胞的活化,或这两者。技术人员将理解,抗原根本不需要由“基因”编码。显而易见的是,抗原可通过合成方式生成或者可来源于生物样品,或者可以是除了多肽之外的大分子。此类生物样品可包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或具有其他生物组分的流体、生物体、蛋白质/抗原的亚基、杀死或灭活的全细胞或溶解物。

[0051] 术语“抗体”是指单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链Fv(scFv)、单链抗体、Fab片段、F(ab')片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、细胞内抗体、微抗体、双抗体和抗独特型(抗Id)抗体(包括例如抗原特异性TCR的抗Id抗体)和上述抗体中任一者的表位结合片段。术语“抗体”也指共价双抗体,诸如美国专利申请公布2007/0004909中公开的那些和Ig-DARTS,诸如美国专利申请公布2009/0060910中公开的那些。可用作TCR结合分子的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段,即含有抗原结合位点的分子。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM1、IgM2、IgA1和IgA2)或亚类。

[0052] 术语“宿主细胞”意指含有异源核酸的任何细胞。异源核酸可以是载体(例如,表达载体)。例如,宿主细胞可以是来自以任何方式选择、修饰、转化、生长、使用或操纵的任何生物体的细胞,用于通过细胞产生物质,例如通过细胞表达基因、DNA或RNA序列、蛋白质或酶。可以确定适当的宿主。例如,可以基于载体主链和期望的结果来选择宿主细胞。举例来说,可以将质粒或粘粒引入原核生物宿主细胞中以复制几种类型的载体。细菌细胞诸如但不限于DH5 α 、JM109和KCB、**SURE**[®]感受态细胞以及SOLOPACK黄金细胞可以用作载体复制和/或表达的宿主细胞。另外,细菌细胞诸如大肠杆菌LE392可以用作噬菌体病毒的宿主细胞。可以用作宿主细胞的真核细胞包括但不限于酵母(例如,YPH499、YPH500和YPH501)、昆虫和哺乳动物。用于载体的复制和/或表达的哺乳动物真核宿主细胞的示例包括但不限于HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、COS、CHO、Saos和PC12。

[0053] 术语“表达(express和expression)”意指允许或引起基因或DNA序列中的信息产生,例如通过激活相应基因或DNA序列的转录和翻译中所涉及的细胞功能来产生蛋白质。DNA序列在细胞中或通过细胞表达以形成“表达产物”,诸如蛋白质。据称表达产物本身例如所得蛋白质也可以被细胞“表达”。表达产物可以表征为细胞内、细胞外或跨膜。

[0054] 术语“转染”意指使用重组DNA技术将“外来”(即外来的或细胞外的)核酸引入细胞中。术语“基因修饰”意指将“外来”(即外来的或细胞外的)基因、DNA或RNA序列引入宿主细胞中,使得宿主细胞将表达引入的基因或序列以产生所需物质,通常是由引入的基因或序列编码的蛋白质或酶。引入的基因或序列也可以称为“克隆”或“外来”基因或序列,可以包

括可操作地连接到编码嵌合抗原受体的多核苷酸的调控序列或控制序列,诸如起始、终止、启动子、信号、分泌或细胞的遗传机制使用的其他序列。基因或序列可以包括非功能性序列或无功能的序列。接受和表达引入的DNA或RNA的宿主细胞已经被“基因工程化”。引入宿主细胞中的DNA或RNA可以来自任何来源,包括与宿主细胞相同的属或物种的细胞,或来自不同的属或物种。

[0055] 术语“转导”意指使用病毒载体将外来核酸引入细胞中。

[0056] 术语“调控元件”是指控制核酸序列表达的一些方面的任何顺式作用基因元件。在一些实施方案中,术语“启动子”基本上包括起始转录所需的最小序列。在一些实施方案中,术语“启动子”包括起始转录的序列,并且另外还包括可以分别上调或下调转录的序列,通常称为“增强子元件”和“阻遏子元件”。

[0057] 如本文所用,术语“可操作地连接”和类似的短语,当用于指核酸或氨基酸时,分别是指核酸序列或氨基酸序列的操作连接,它们彼此处于功能关系。例如,可操作地连接的启动子、增强子元件、开放阅读框、5'和3'UTR和终止子序列导致核酸分子(例如,RNA)的精确产生。在一些实施方案中,可操作地连接的核酸元件导致开放阅读框的转录并最终产生多肽(即,开放阅读框的表达)。作为另一示例,可操作地连接的肽是其中功能结构域彼此相距适当距离以赋予每个结构域的预期功能的一种肽。

[0058] 所谓“增强”或“促进”或“增加”或“扩大”或“改进”通常是指与由媒介物或对照分子/组合物引起的响应相比,本文预期的组合物产生、引发或导致更大生理响应(即,下游作用)的能力。可测量的生理应答可包括T细胞扩增、活化、效应功能、持久性的增加,和/或癌细胞死亡杀伤能力的增加,以及从本领域的理解和本文的描述中显而易见的应答等。在某些实施方案中,“增加的”或“增强的”量可以是“统计意义上显著的”量,并且可包括比由媒介物或对照组合物产生的应答增加1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍或更多倍(例如,500倍、1000倍)(包括其间和高于1的所有整数和小数点,例如1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍等)。

[0059] “降低”或“下降”或“减少”或“减小”或“减弱”通常是指与由媒介物或对照分子/组合物引起的应答相比,本文设想的组合物产生、引发或引起更小生理应答(即,下游效应)的能力。在某些实施方案中,“降低的”或“减少的”量可以是“统计意义上显著的”量,并且可包括比由媒介物、对照组合物产生的应答(参考应答)或特定细胞谱系中的应答降低1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍或更多倍(例如,500倍、1000倍)(包括其间和高于1的所有整数和小数点,例如1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8等)。

[0060] 应用于剂量或量的术语“有效”是指足以在向有需要的受试者施用产生期望活性的化合物或药物组合物的量。注意,当施用活性成分的组合时,所述组合的有效量可以包括或不包括如果单独施用将有效的每种成分的量。所需的确切量将随受试者而变化,取决于受试者的物种、年龄和一般病状、所治疗的病状的严重程度、所采用的一种或多种特定药物、施用模式等。

[0061] 与本文所述的组合物结合使用的短语“药学上可接受的”是指此类组合物的分子实体和其他成分,是生理学上耐受的并且当施用于哺乳动物(例如人)时通常不会产生不良反应。优选地,术语“药学上可接受的”意味着由联邦或州政府的监管机构批准的或者在美国药典或其他公认的药典中列出的用于在哺乳动物并且更具体地人类中使用的物质。

[0062] 本文使用的术语“蛋白质”涵盖所有种类天然存在的和合成的蛋白质,包括所有长度的蛋白质片段、融合蛋白和修饰的蛋白质,包括但不限于糖蛋白类以及所有其他类型的修饰蛋白质(例如由磷酸化、乙酰化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化、糖基化、氧化、甲酰化、酰胺化、聚谷氨酰化、ADP核糖基化、聚乙二醇化、生物素酰化等)。

[0063] 除非另有说明,否则术语“核酸”、“核苷酸”和“多核苷酸”涵盖DNA和RNA两者。“核酸序列”或“核苷酸序列”意指编码氨基酸的核酸序列;这些术语还可以指包括编码作为克隆产品的任何氨基酸的部分的核酸序列,包括由接头编码的任何氨基酸。

[0064] 术语“载剂”是指与化合物一起施用的稀释剂、辅助剂、赋形剂或介质。此类药物载剂可以是无菌液体,诸如水和油,包括来源于石油、动物、植物的油或合成的那些油,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。水或水溶液盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液优选用作载剂,特别是用于可注射溶液。另选地,载剂可以是固体剂型载剂,包括但不限于粘结剂(用于压缩丸剂)、助流剂、包封剂、调味剂和着色剂中的一种或多种。合适的药物载剂描述于E.W.Martin的“Pharmaceutical Sciences”中。

[0065] 术语“约”或“大约”包括在统计学上有意义的值范围内。此类范围可以在给定值或范围的数量级内,优选地在50%以内,更优选地在20%以内,仍更优选地在10%以内,并且甚至更优选地在5%以内。术语“约”或“大约”涵盖的可允许的变化取决于所研究的具体系统,并且可以由本领域普通技术人员容易地理解。

[0066] “GPC5D”是指G蛋白偶联受体家族C组5成员D,一种已知的蛋白。全长人GPC5D的氨基酸序列示于SEQ ID NO:47中。

[0067] 术语“GP5B83”是指任何抗体、其抗原结合部分,或含有源自GP5B83-VH-N23S-N30S VH (SEQ ID 41) 和GP5B83 VL (SEQ ID 42) (包括CAR) 的可变区的任何其他蛋白质。“GP5B83”可与“GP5DB83”互换使用。在某些实施方案中,本公开的抗独特型抗体特异性结合包含如SEQ ID NO:41中所述的VH结构域和/或如SEQ ID NO:42中所述的VL结构域的蛋白质。在某些实施方案中,本公开的抗独特型抗体特异性结合包含如SEQ ID NO:41中所述的VH结构域的3个CDR和如SEQ ID NO:42中所述的VL结构域的3个CDR的蛋白质。

[0068] 术语“GCDB332”是指GP5B83衍生的scFv融合蛋白,特别是GP5B83-VH-N23S-N30S-LH-scFv。

[0069] 术语“GP5B318”是指具有靶向GP5B83衍生的scFv GCDB332和鼠IgG2a/k的人VH/VL的嵌合mAb。

[0070] 应当了解,本文所用的术语只是为了描述具体实施方案的目的,并非旨在进行限制。如本文所用,除非上下文另外明确地指出,否则不定冠词“一个”、“一种”和“该”应当被理解为包括复数指代。

[0071] 本公开还提供了本文所述的抗体、核酸、多肽和蛋白质的变体,例如功能性变体。“变体”是指因一处或多处修饰(例如,置换、插入或缺失)而不同于参考多肽或参考多核苷酸的多肽或多核苷酸。如本文所用,术语“功能性变体”是指与亲本抗体、多肽或蛋白质具有实质或显著的序列同一性或相似性的抗体、多肽或蛋白质,该功能性变体保留了它为其变体的抗体、多肽或蛋白质的生物活性。功能性变体涵盖例如本文所述的抗体、多肽或蛋白质(亲本抗体、多肽或蛋白质)的那些变体,该变体保留了与亲本抗体、多肽或蛋白质相似的程度、相同的程度或比其更高的程度识别靶细胞的能力。关于亲本抗体、多肽或蛋白质,该

功能性变体可以例如与亲本抗体、多肽或蛋白质的氨基酸序列具有至少约30%、约40%、约50%、约60%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更高的同一性。

[0072] 本文中,多肽的结构在基于与所述参考序列(具有给定的SEQ ID NO)的%序列同一性所定义的位置上。在该语境中,两条氨基酸序列之间的%序列同一性可以通过比较以最佳方式比对的这两条序列来确定,并且其中待比较的氨基酸序列可以包含相对于参考序列的添加或缺失,以用于这两条序列之间的最佳比对。同一性百分比通过如下方式计算:确定两条序列之间氨基酸残基相同的相同位置的数目,将相同位置的数目除以比较窗口中的位置总数,并且将所得结果乘以100,以便获得这两条序列之间的同一性百分比。通常,比较窗口对应于被比较序列的全长。例如,可以使用BLAST程序,“BLAST 2序列”(Tatusova等人,“Blast 2sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, FEMS Microbiol Lett.174:247-250),该序列可在网址<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>上获得,所使用的参数是默认给出的那些参数(特别是对于参数“开放缺口罚分”:5和“延伸缺口罚分”:2;所选择的矩阵是例如由该程序提出的矩阵“BLOSUM 62”),待比较的两个序列之间的同一性百分比是通过该程序直接计算。确定查询序列与参考序列的序列同一性在技术人员的能力范围内,并且可以使用可商购获得的分析软件(诸如BLAST™)进行。

[0073] 功能性变体可以例如包含具有至少一个保守氨基酸取代的亲本抗体、多肽或蛋白质的氨基酸序列。在另一个实施方案中,功能性变体可以包含具有至少一个非保守氨基酸取代的亲本抗体、多肽或蛋白质的氨基酸序列。在这种情况下,非保守氨基酸取代可以干扰或抑制功能性变体的生物活性。非保守氨基酸取代可以增强功能性变体的生物活性,使得功能性变体的生物活性相比于亲本抗体、多肽或蛋白质增加。

[0074] 本发明的抗体的氨基酸取代可以是保守氨基酸取代。保守氨基酸取代是本领域已知的,并且包括其中具有特定的物理性质和/或化学性质的一种氨基酸被替换为具有相同或相似的化学性质或物理性质的另一种氨基酸的氨基酸取代。例如,保守氨基酸取代可以是酸性氨基酸被另一种酸性氨基酸(例如,Asp或Glu)取代、具有非极性侧链的氨基酸被另一种具有非极性侧链的氨基酸(例如,Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val等)取代、碱性氨基酸被另一种碱性氨基酸(Lys、Arg等)取代、具有极性侧链的氨基酸被另一种具有极性侧链的氨基酸(Asn、Cys、Gln、Ser、Thr、Tyr等)取代,等等。

[0075] 本发明实施方案的抗体、多肽和蛋白质(包括本发明的功能性部分和功能性变体)可以包含替代一种或多种天然存在的氨基酸的合成氨基酸。此类合成氨基酸是本领域已知的,并且包括例如氨基环己烷羧酸、正亮氨酸、 α -氨基正癸酸、高丝氨酸、S-乙酰氨基甲基-半胱氨酸、反式-3-羟脯氨酸和反式-4-羟脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、 α -(2-氨基-2-降冰片烷)-羧酸、 α , γ -二氨基丁酸、 α , β -二氨基丙酸、高苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、 β -苯基丝氨酸、 β -羟基苯丙氨酸、苯基甘氨酸、 α -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、N'-苄基-N'-甲基-赖氨酸、N', N'-二苄基-赖氨酸、6-羟基赖氨酸、鸟氨酸、 α -氨基环戊烷羧酸、 α -氨基环己烷羧酸、 α -氨基环庚烷羧酸、二氢吡啶-2-羧酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸单酰胺和 α -叔丁基甘氨酸。

[0076] 本发明实施方案的抗体、多肽和蛋白质(包括功能性部分和功能性变体)可以经受

翻译后修饰。它们可以被糖基化、酯化、N-酰化、酰胺化、羧化、磷酸化、酯化、经由例如二硫桥环化,或者转化成酸加成盐。在一些实施方案中,它们是二聚的或聚合的,或者缀合的。

[0077] 本发明实施方案的抗体、多肽和/或蛋白质(包括其功能性部分和功能性变体)可以通过本领域已知的方法获得。全新合成多肽和蛋白质的合适方法描述于以下参考文献中:诸如Chan等人,Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2000;Peptide and Protein Drug Analysis,编辑Reid,R.,Marcel Dekker,Inc.,2000;以及Epitope Mapping,编辑Westwood等人,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2001。另外,可以使用标准重组方法,使用本文所述的核酸来重组产生多肽和蛋白质。参见例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.2001;以及Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and John Wiley&Sons,NY,1994。另外,本发明的抗体、多肽和蛋白质中的一些(包括其功能性部分和功能性变体)可以从诸如植物、细菌、昆虫、哺乳动物等来源分离和/或纯化。分离方法和纯化方法是本领域已知的。另选地,本文所述的抗体、多肽和/或蛋白质(包括其功能性部分和功能性变体)可以商业合成。在这方面,抗体、多肽和蛋白质可以是合成的、重组的、分离的和/或纯化的。

[0078] 本公开的方法和用途

[0079] 本公开提供了抗独特型抗体及其抗原结合部分,该抗独特型抗体及其抗原结合部分特异性结合含有GP5B83的蛋白质,例如抗体或其抗原结合部分。例如,抗独特型抗体可包括与GP5B83抗体的部分互补的氨基酸序列,以促进特异性结合。本公开还提供了编码抗独特型抗体及其抗原结合部分的核酸、产生抗独特型抗体及其抗原结合部分的方法、使用抗独特型抗体及其抗原结合部分来检测GP5B83的方法以及包括抗独特型抗体及其抗原结合部分的试剂盒。例如,抗独特型抗体可被包含在含有其他试剂的试剂盒中,并且用于确定给定生物样品是否包括例如在CAR中的T细胞表面上进行表达的GP5B83/GCDB332抗体或其片段。

[0080] 测试抗体结合GP5B83的任何功能性部分的能力的方法是本领域已知的,并且包括任何抗体-抗原结合测定,诸如,例如放射性免疫测定(RIA)、蛋白质印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀和竞争性抑制测定。

[0081] 制备抗体的合适方法是本领域已知的。例如,标准杂交瘤方法在以下文献中有所描述:例如Köhler和Milstein,Eur.J.Immunol.,5,511-519(1976),Harlow和Lane(编辑),Antibodies:A Laboratory Manual,CSH Press(1988),以及C.A.Janeway等人(编辑),Immunobiology,第5版,Garland Publishing,New York,N.Y.(2001年)。替代性地,其他方法诸如EBV杂交瘤方法(Haskard和Archer,J.Immunol.Methods,74(2),361-67(1984)以及Roder等人,Methods Enzymol.,121,140-67(1986))以及噬菌体载体表达系统(参见例如Huse等人,Science,246,1275-81(1989))是本领域已知的。另外,在非人动物中产生抗体的方法在例如美国专利号5,545,806、5,569,825和5,714,352以及美国专利申请公布号2002/0197266A1中有所描述。

[0082] 噬菌体展示也可以用于产生抗体。就这一点而言,编码抗体的抗原结合可变(V)结构域的噬菌体文库可以使用标准分子生物学技术和重组DNA技术产生(参见例如Sambrook

等人(出处同上)和Ausubel等人(出处同上))。选择编码具有期望的特异性的可变区的噬菌体以用于与期望的抗原特异性结合,并且重建包含所选可变区的完整或部分抗体。将编码重建抗体的核酸序列引入合适的细胞系(诸如用于产生杂交瘤的骨髓瘤细胞)中,使得具有单克隆抗体特性的抗体由该细胞分泌(参见例如,Janeway等人(出处同上)、Huse等人(出处同上)和美国专利号6,265,150)。

[0083] 在一个方面,本公开提供了抗独特型抗体或其抗原结合部分,该抗独特型抗体或其抗原结合部分特异性结合包含GP5B83的靶抗体或CAR。例如,抗独特型抗体或抗原结合部分可特异性结合片段抗原结合区(Fab)的一个或多个结构域,包括VH和VL。在一些实施方案中,抗独特型抗体或抗原结合部分包含VH结构域和VL结构域,该VH结构域具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列,该VL结构域具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0084] 在其他实施方案中,抗独特型抗体或抗原结合部分用于在生物样品中检测GP5B83,包括:(a)提供生物样品;(b)使生物样品与抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c)检测该抗独特型抗体或抗原结合部分。例如,抗独特型抗体可被添加到任何生物样品,包括:组织样品、肿瘤样品、细胞或具有其他生物组分的流体、生物体、蛋白质/抗原的亚基、杀伤或灭活的全细胞或溶解物。抗独特型抗体可被包含在含有药学上可接受的试剂的溶液中,该药学上可接受的试剂包括但不限于缓冲液、稳定剂和/或聚合物。抗独特型抗体可通过移液和/或与生物样品混合来接触。然后,抗独特型抗体可特异性结合生物样品中含有GP5B83的蛋白质,例如抗体或其抗原结合部分。作为一个示例,可通过洗涤未结合的抗独特型抗体,从而仅留下复合的抗独特型抗体来确定抗独特型抗体是否已经结合到GP5B83。继续该示例,抗独特型抗体可包括荧光团,该荧光团可被照射以产生与生物样品中的GP5B83的量成比例的信号。下文进一步描述了对抗独特型抗体与GP5B83的结合复合物的检测。

[0085] 在另一方面,本公开提供了抗独特型抗体或抗原结合部分,该抗独特型抗体或抗原结合部分特异性结合抗GPC5D2抗体,该抗独特型抗体或抗原结合部分包含重链可变(VH)结构域,该重链可变(VH)结构域包含具有选自自由SEQ ID NO:4-7组成的组的氨基酸序列的VH CDR1、具有选自自由SEQ ID NO:11-14组成的组的氨基酸序列的VH CDR2和具有选自自由SEQ ID NO:19-20组成的组的氨基酸序列的VH CDR3,并且该抗独特型抗体或抗原结合部分还包含轻链可变(VL)结构域,该轻链可变(VL)结构域包含具有选自自由SEQ ID NO:25-26组成的组的氨基酸序列的VL CDR1、具有选自自由SEQ ID NO:29-30组成的组的氨基酸序列的VL CDR2和具有选自自由SEQ ID NO:33-34组成的组的氨基酸序列的VL CDR3。可根据任何已知的方法来选择该六个CDR。在表3中示出了根据Kabat方法、AbM方法、Chothia方法和接触方法确定的VH CDR和VL CDR。

[0086] 在某些实施方案中,本公开提供了抗独特型抗体或抗原结合部分,该抗独特型抗体或抗原结合部分特异性结合抗GPC5D2抗体,该抗独特型抗体或抗原结合部分包含重链可变(VH)结构域,该重链可变(VH)结构域包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VH CDR3,并且该抗独特型抗体或抗原结合部分还包含轻链可变(VL)结构域,该轻链可变(VL)结构域包含具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VL CDR3。

[0087] 在某些实施方案中,本公开提供了抗独特型抗体或抗原结合部分,该抗独特型抗体或抗原结合部分特异性结合抗GPCR5D2抗体,该抗独特型抗体或抗原结合部分包含重链可变(VH)结构域,该重链可变(VH)结构域包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VH CDR3,并且该抗独特型抗体或抗原结合部分还包含轻链可变(VL)结构域,该轻链可变(VL)结构域包含具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VL CDR3。

[0088] 在某些实施方案中,本公开提供了抗独特型抗体或抗原结合部分,该抗独特型抗体或抗原结合部分特异性结合抗GPCR5D2抗体,该抗独特型抗体或抗原结合部分包含重链可变(VH)结构域,该重链可变(VH)结构域包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VH CDR3,并且该抗独特型抗体或抗原结合部分还包含轻链可变(VL)结构域,该轻链可变(VL)结构域包含具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VL CDR3。

[0089] 在某些实施方案中,本公开提供了抗独特型抗体或抗原结合部分,该抗独特型抗体或抗原结合部分特异性结合抗GPCR5D2抗体,该抗独特型抗体或抗原结合部分包含重链可变(VH)结构域,该重链可变(VH)结构域包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VH CDR3,并且该抗独特型抗体或抗原结合部分还包含轻链可变(VL)结构域,该轻链可变(VL)结构域包含具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VL CDR3。

[0090] 在一些实施方案中,特异性结合抗GPCR5D2抗体的抗独特型抗体或其抗原结合部分包含VH结构域和VL结构域,该VH结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:45具有至少90%的序列同一性,该VL结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:46具有至少90%的序列同一性。在一些实施方案中,特异性结合抗GPCR5D2抗体的抗独特型抗体或其抗原结合部分包含重链,该重链包含与SEQ ID NO:37具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,并且抗独特型抗体或其抗原结合部分还包含轻链,该轻链包含与SEQ ID NO:39具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0091] 在一些实施方案中,特异性结合抗GPCR5D2抗体的抗独特型抗体或其抗原结合部分包含VH结构域和VL结构域,该VH结构域具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列,该VL结构域具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列。在一些其他实施方案中,特异性结合抗GPCR5D2抗体的抗独特型抗体或其抗原结合部分包含重链,该重链包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,并且抗独特型抗体或其抗原结合部分还包含轻链,该轻链包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0092] 在一些实施方案中,抗原结合部分选自Fab、F(ab')₂或scFv。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,该嵌合抗体包含鼠IgG2a框架。在某些实施方案中,鼠IgG2a框架可包括来自混合FVB/N、C57BL/6J的鼠Ig重链信号肽,其包含序列MAVWVTLFLMAAAQSIQA (SEQ ID NO:48)。

[0093] 在一些其他实施方案中,抗体是完全人抗体。例如,该完全人抗体可以是IgG、IgM、IgA、IgE或IgD。在一些实施方案中,抗独特型抗体或其抗原结合部分对GP5B83有特异性,其

中GP5B83处于嵌合抗原受体(CAR)的细胞外部分的抗原结合结构域内。例如,可将编码GP5B83的核酸在体外引入T细胞中,然后其至少一部分在CAR的细胞外部分上进行表达。抗独特型抗体然后可特异性结合CAR的细胞外部分。在一些实施方案中,GP5B83是scFv,并且抗独特型抗体或抗原结合部分特异性结合CAR的scFv中的表位。在一些实施方案中,GP5B83特异性结合GPC5D。在一些实施方案中,抗体或抗原结合部分不与其他GPC5D抗体或其他GPC5D结合CAR交叉反应。例如,为了防止用于确定GP5B83是否已经在CAR的细胞外部分上进行表达的测定中的假阳性,抗独特型抗体可对GP5B83有特异性,并且与其靶GPC5D或非GP5B83的其他GPC5D靶向配体不具有可感知的结合。在一些实施方案中,CAR具有选自SEQ ID NO:43-44组成的组的氨基酸序列。

[0094] 在一些实施方案中,本公开提供了核酸,该核酸编码抗独特型抗体或抗原结合部分的重链、轻链或这两者。例如,核酸可以是DNA、RNA及其任何化学修饰(例如,核苷修饰)。

[0095] 在另一方面,本公开提供了核酸,该核酸编码特异性结合GP5B83的抗独特型抗体或其抗原结合部分的重链、轻链或这两者,其中所述核酸包含:SEQ ID NO:38的核苷酸序列;SEQ ID NO:40的核苷酸序列;或这两者。在另一方面,本公开提供了包含核酸序列的载体。例如,该载体可以是自我复制的核酸结构,或被整合到其所引入的宿主细胞的基因组中。在一些实施方案中,载体是表达载体。在另一方面,本公开提供了包含载体的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞为哺乳动物细胞。

[0096] 在另一方面,本公开提供了一种产生特异性结合GP5B83的抗独特型抗体或其抗原结合部分的方法,所述方法包括:在允许所述抗体或抗原结合部分进行表达的条件下培养宿主细胞,其中宿主细胞包含对抗体或抗原结合部分的重链和轻链进行编码的核苷酸序列;以及从培养物中分离所述抗体或抗原结合部分。例如,抗独特型抗体可通过在深槽搅拌发酵罐、灌注罐系统、气升式反应器和连续培养系统中进行均匀悬浮培养来生产。抗独特型抗体可通过物理或化学分离过程从反应和/或生长混合物中分离,包括使用蛋白质A或G的亲和力分离、尺寸排阻色谱法和电荷分离。在一些实施方案中,宿主细胞编码包含核酸的载体,该核酸编码抗独特型抗体或其抗原结合部分。

[0097] 在另一方面,本公开提供了一种用于在生物样品中检测GP5B83的方法,该方法包括:(a)提供生物样品;(b)使生物样品与抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c)检测该抗独特型抗体或抗原结合部分。例如,抗独特型抗体可结合在生物样品中表达的GP5B83。该结合复合物可通过任何检测方法来检测,包括化学检测方法和物理检测方法两者。例如,检测方法可用于识别生物样品中感兴趣抗体的纯粹存在,或可用于测试样品中感兴趣抗体是否以可检测水平存在,或可用于量化样品中感兴趣抗体的量并进一步比较来自不同样品的抗体水平。例如,检测方法可以是以下中的一种或多种方法:免疫沉淀测定、免疫细胞化学测定、免疫印迹测定和免疫吸附测定。作为具体示例,免疫吸附测定可以是ELISA或ELISA型测定,其包括结合的抗独特型抗体或其片段,生物样品在其上进行洗涤。

[0098] 在另一方面,本公开提供了一种用于在生物样品中检测包含GP5B83的嵌合抗原受体(CAR)的表达的方法,该方法包括:(a)提供生物样品;(b)使生物样品与抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c)检测抗独特型抗体或抗原结合部分,从而检测CAR的表达。

[0099] 在一些实施方案中,该抗体包含可检测标签。在一些实施方案中,该方法还包括在检测抗独特型抗体或抗原结合部分之前,使抗独特型抗体或抗原结合部分与可检测标签接

触。例如,该可检测标签可以是任何化学标签或组分,该化学标签或组分与抗独特型抗体整合、结合或以其他方式复合并且发出或以其他方式提供唯一可识别信号。例如,可检测标签可以是同位素标志物、比色生物传感器、光致变色化合物、荧光标签、荧光标签或电化学传感器。作为具体示例,荧光标签可以是绿色荧光蛋白质、黄色荧光蛋白质、蓝色荧光蛋白质、荧光素、若丹明、香豆素、青色素、藻红蛋白及其衍生物。

[0100] 在一些实施方案中,生物样品为血液、血清或尿液。例如,生物样品可以是全血、血清、血浆、尿液、粪便、脑脊髓液、腹水等。在一些实施方案中,生物样品是新鲜生物材料,诸如出于该分析的目的在给定时间采集的生物材料。生物样品还可以是出于该目的或其他目的在患者护理期间在另一点采集的生物材料,或使用存档的患者材料。生物样品可以是新鲜获得的或先前获得的,并且在先前获得的情况下,可能在使用前已经储存(例如,在室温下、冷藏或冷冻)。

[0101] 在一些方面,本公开提供了一种用于在生物样品中检测GP5B83的试剂盒,该试剂盒包含:(a) 抗独特型抗体或抗原结合部分;和(b) 用于检测抗独特型抗体或抗原结合部分的使用说明。例如,该试剂盒可包括作为固体粉末、冻干粉末、液体溶液或液体组分的抗独特型抗体或抗原结合部分以混合形成溶液,或结合到固体支持物上。该试剂盒可包括附加试剂,包括稳定剂、缓冲液和在生物样品的测定中促进使用试剂盒所需的其他药学上可接受的赋形剂。该试剂盒还可包括指导使用者如何进行测定的书面使用说明。

[0102] 在其他方面,本公开提供了一种从样品中纯化GP5B83的方法,该方法包括:(a) 提供包含GP5B83的生物样品;(b) 使该生物样品与本公开的抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c) 捕获抗独特型抗体或抗原结合部分,包括含有GP5B83的CAR或其他蛋白质,从而纯化GP5B83。例如,可使用任何分离方法(包括物理方法和化学方法)来捕获抗独特型抗体。具体地,可使用本领域已知的用于纯化蛋白质的技术(包括离子交换色谱法、凝胶过滤色谱法、超滤法、电泳法和用对抗独特型抗体的特定表位有特异性的抗体进行免疫亲和纯化)来从细胞培养基、宿主细胞或这两者中捕获和分离GP5B83。在一些实施方案中,抗独特型抗体是融合蛋白,该融合蛋白含有促进其纯化的结构域。在某些实施方案中,纯化的GP5B83组合物基本上从不含GP5B83的蛋白质中分离。在一些实施方案中,纯化的GP5B83组合物为100%纯、99%纯、98%纯、97%纯、96%纯、95%纯或90%纯或更高纯度。

[0103] 在其他方面,本公开提供了一种从细胞群中选择CAR-T细胞的方法,该方法包括:(a) 提供包含CAR-T细胞的生物样品;(B) 使该生物样品与抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c) 捕获抗独特型抗体或抗原结合部分,从而选择CAR-T细胞。在一些实施方案中,抗独特型抗体或其抗原结合部分对GP5B83有特异性。

[0104] 实施方案

[0105] 本发明的特定非限制性实施方案在以下编号的段落中阐述:

[0106] 1. 一种抗独特型抗体或其抗原结合部分,所述抗独特型抗体或其抗原结合部分特异性结合包含GP5B83的靶抗体。

[0107] 2. 根据段落1所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述靶抗体或其抗原结合部分包含VH结构域和VL结构域,所述VH结构域具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列,所述VL结构域具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列。

[0108] 3. 一种抗独特型抗体或其抗原结合部分,所述抗独特型抗体或其抗原结合部分特

异性结合GP5B83,其中所述抗独特型抗体或抗原结合部分包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含具有选自SEQ ID NO:4-7组成的组的氨基酸序列的VHCDR1、具有选自SEQ ID NO:11-14组成的组的氨基酸序列的VH CDR2和具有选自SEQ ID NO:19-20组成的组的氨基酸序列的VH CDR3,并且所述抗独特型抗体或抗原结合部分还包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含具有选自SEQ ID NO:25-26组成的组的氨基酸序列的VL CDR1、具有选自SEQ ID NO:29-30组成的组的氨基酸序列的VL CDR2和具有选自SEQ ID NO:33-34组成的组的氨基酸序列的VL CDR3。

[0109] 4.根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述VH结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:45具有至少90%的序列同一性,并且所述VL结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:46具有至少90%的序列同一性。

[0110] 5.根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗独特型抗体或抗原结合部分包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:37具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,并且所述抗独特型抗体或抗原结合部分还包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:39具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0111] 6.根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述VH结构域具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列,并且所述VL结构域具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0112] 7.根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗独特型抗体或抗原结合部分包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,并且所述抗独特型抗体或抗原结合部分还包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0113] 8.根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗原结合部分选自Fab、F(ab')₂或scFv。

[0114] 9.根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗体为单克隆抗体。

[0115] 10.根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗体是嵌合抗体。

[0116] 11.根据段落10所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗体包含鼠IgG2a框架。

[0117] 12.根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗体是完全人抗体。

[0118] 13.一种核酸,所述核酸编码根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分的重链、轻链或这两者。

[0119] 14.一种核酸,所述核酸编码特异性结合GP5B83的抗独特型抗体或其抗原结合部分的重链、轻链或这两者,其中所述核酸包含:

[0120] a) SEQ ID NO:38的核苷酸序列;

[0121] b) SEQ ID NO:40的核苷酸序列;

[0122] c) a) 和b) 两者。

[0123] 15.一种载体,所述载体包含根据段落14所述的核酸。

[0124] 16.根据段落15所述的载体,其中所述载体为表达载体。

[0125] 17.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据段落16所述的载体。

[0126] 18. 根据段落17所述的宿主细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

[0127] 19. 一种产生特异性结合GP5B83的抗独特型抗体或其抗原结合部分的方法,所述方法包括:在允许所述抗体或抗原结合部分进行表达的条件下培养根据段落17所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞包含对所述抗体或抗原结合部分的所述重链和所述轻链进行编码的核苷酸序列;以及从所述培养物中分离所述抗体或抗原结合部分。

[0128] 20. 一种用于在生物样品中检测GP5B83的方法,所述方法包括:(a) 提供生物样品;(b) 使所述生物样品与根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c) 检测所述抗独特型抗体或抗原结合部分。

[0129] 21. 一种用于在生物样品中检测包含GP5B83的嵌合抗原受体(CAR)的表达的方法,所述方法包括:(a) 提供生物样品;(b) 使所述生物样品与根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c) 检测所述抗独特型抗体或抗原结合部分,从而检测所述CAR的表达。

[0130] 22. 根据段落20所述的方法,其中所述抗体包含可检测标签。

[0131] 23. 根据段落20所述的方法,其中所述方法还包括在检测所述抗独特型抗体或抗原结合部分之前,使所述抗独特型抗体或抗原结合部分与可检测标签接触。

[0132] 24. 根据段落20所述的方法,其中所述生物样品是血液、血清或尿液。

[0133] 25. 根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中GP5B83处于嵌合抗原受体(CAR)的细胞外部分的抗原结合结构域内。

[0134] 26. 根据段落25所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中GP5B83是scFv,并且所述抗独特型抗体或抗原结合部分特异性结合所述CAR的所述scFv中的表位。

[0135] 27. 根据段落25所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中GP5B83特异性结合GPCR5d。

[0136] 28. 根据段落25所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分不与其他GPCR5d抗体或其他GPCR5d结合CAR交叉反应。

[0137] 29. 根据段落25所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,其中所述CAR具有选自自由SEQ ID NO:43-44组成的组的氨基酸序列。

[0138] 30. 一种用于在生物样品中检测GP5B83的试剂盒,所述试剂盒包含:(a) 根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分;和(b) 用于检测所述抗独特型抗体或抗原结合部分的使用说明。

[0139] 31. 根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分,用于在生物样品中检测GP5B83,包括:(a) 提供生物样品;(b) 使所述生物样品与所述抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c) 检测所述抗独特型抗体或抗原结合部分。

[0140] 32. 一种从样品中纯化GP5B83的方法,所述方法包括:(a) 提供包含GP5B83的生物样品;(b) 使所述生物样品与根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c) 捕获所述抗独特型抗体或抗原结合部分,从而纯化GP5B83。

[0141] 33. 一种从细胞群中选择CAR-T细胞的方法,所述方法包括:(a) 提供包含CAR-T细胞的生物样品;(b) 使所述生物样品与根据段落1至3中任一段所述的抗独特型抗体或抗原结合部分接触;以及(c) 捕获所述抗独特型抗体或抗原结合部分,从而选择CAR-T细胞。

[0142] 实施例

[0143] 实施例1:结合GCDB332的Fab的确定

[0144] 结合GP5B83衍生的scFv-融合蛋白GCDB332的Fab选自两组全新Fab-pIX噬菌体展示文库,如以下文件中所述:Shi等人,J Mol Biol 397:385-96,2010;国际专利公布W02009/085462;美国专利公布US2010/0021477。

[0145] 在使用经纯化重组抗原进行噬菌体选择时,生物素化的GCDB332被用作“诱饵”以捕获和固定噬菌体结合剂。在几轮选择后,执行使用经纯化抗原的多克隆噬菌体ELISA以检测单个淘选实验的特异性富集。从针对GCDB332的结合剂表现出富集的那些淘选实验中收集的噬菌体在大肠杆菌中进行表达以用于初级筛选。从富集的Fab文库中制备单克隆Fab溶解物,用ELISA进行筛选,以与GCDB332结合,但不与背景对照结合。对所选择的Fab进行测序以识别独特的Fab克隆并且分离它们的V区基因。将独特的Fab V区克隆到哺乳动物表达载体中以表达具有鼠IgG2a/鼠Kappa恒定区的嵌合mAb。针对与在SupT1细胞(GP5B83)上表达的scFv(其对应于GCDB332 scFv融合蛋白中的scFv)特异性结合,对嵌合mAb进行评估,并且使用SPR来测量结合动力学。

[0146] 噬菌体淘选

[0147] 使用单个V3.0和V5.0全新Fab噬菌体文库,根据标准方案(Cheadle,E.J.等人,Antibody Engineering.907,645-666(2012)),对生物素化的GCDB332进行六次单个淘选实验。简言之,将噬菌体文库和顺磁性链霉亲和素(SA)珠在50% Chemiblocker(Millipore cat#2170)/50%1xTBST(Teknova cat#T0310)中封闭一小时。将文库添加到SA珠以吸附与珠非特异性结合的克隆。将SA-珠丢弃,将预吸附的文库加到生物素化的GCDB332中。通过添加SA-珠来回收结合剂,以形成珠/抗原/噬菌体复合物,该复合物在1xTBST中进行洗涤。最后一次洗涤后,通过感染对数期TG1大肠杆菌细胞(OD_{600nm}=0.4-0.6)拯救噬菌体。将噬菌体感染的TG1细胞分散在含有75μg/ml羧苄青霉素和1%葡萄糖的三个150-mm LB/琼脂板上,然后在37℃生长过夜。产生了噬菌体,并使其经受另外的淘选。为了增加选择压力,随后每轮降低抗原浓度并增加温育时间:R1 100nM,1小时;R2 10nM,1小时;R3 10nM,16小时;

[0148] 多克隆噬菌体ELISA

[0149] 通过多克隆噬菌体ELISA根据每个淘选实验确定结合剂的富集。简而言之,将100μl的20nM非生物素化GCDB332在1xTBS(Teknova cat#T9530)中进行稀释,并捕获在NA涂覆板(Thermo cat#15217)上。在37℃下温育一小时后,将该板在300μl 1xTBST中洗涤3次。将300μl的封闭缓冲液(50%Chemiblocker/50%1xTBST)添加到板的每个孔中,并在室温下温育1小时。封闭后,将板用300μl的1xTBST洗涤3次。将在测定缓冲液(10%Chemiblocker/90%TBST)中以1/100稀释的来自每轮淘选的100μl的多克隆噬菌体输出物添加到ELISA板,并在室温下温育1小时,以允许展示在噬菌体颗粒上的Fab与固定化的GCDB332结合。温育后,将该板用1xTBST洗涤3次。将在测定缓冲液中以1:2500稀释的100μl的HRP-缀合的抗M13(pVIII)抗体(GE Healthcare cat#27942101)添加到板中并在室温下温育。温育1小时后,将该板用300μl的1xTBST洗涤6次。将100μl的经制备的BM化学发光ELISA底物(Roche cat#11582950001)添加到板中。通过Envision板读数器测量化学发光或相对光单位(RLU)。如图1中所示,所有六个淘选实验在3轮淘选后显示出GCDB332特异性结合富集。GP5B318源自XP3淘选实验。

[0150] Fab生产

[0151] 从噬菌体淘选实验(这些噬菌体淘选实验被认定用于展示GCDB332的结合剂的富集)的特定轮的甘油储备中分离和纯化质粒DNA,并且将其转化到TG-1大肠杆菌细胞中并且在LB/琼脂板上生长过夜。过夜培养物用于(i) 菌落PCR和V区测序,和(ii) 开始培养用于Fab生产。对于Fab生产,将过夜培养物在新培养基中稀释10-100倍并在37℃下生长5-6小时。通过加入含有IPTG的新鲜培养基来诱导Fab生产,并将培养物在30℃下生长过夜。将培养物减速自旋,并且使用BugBuster™(Millipore)来溶解细菌沉淀物以释放可溶性Fab蛋白。将细胞溶解物减速自旋并且将上清液用于Fab ELISA。

[0152] 初级筛选

[0153] 从针对GCDB332的结合剂表现出富集的淘选实验中收集的噬菌体在大肠杆菌中进行表达以用于初级筛选。通过多克隆绵羊抗人Fd (CH1) 抗体(结合位点)将可溶性Fab蛋白捕获到板上。适当洗涤和封闭后,加入50nM生物素化GCDB332。该生物素化GCDB332采用HRP缀合链霉亲和素和ELISA Pico化学发光底物(Thermo cat#37069)进行检测,然后在板读数器中读数。另外,HRP缀合链霉亲和素用于反向筛选。选择与GCDB332的结合信号是阴性对照Fab的四倍或更高并且与链霉亲和素HRP的结合信号等于或小于阴性对照Fab的Fab克隆,并进行测序。

[0154] 图2示出了初级筛选的结果。在ELISA中筛选单克隆Fab以与GCDB332结合。选择在背景上具有4倍结合信号的克隆以及序列。由星号识别的两个克隆是生成GP5B318中VH和VL的克隆。

[0155] 实施例2:生成GP5B83的单克隆抗体 (GP5B318)

[0156] Fab选择

[0157] 对从初级筛选中选择的Fab进行测序以确定V区序列并识别独特的克隆。将独特的Fab V区克隆到哺乳动物表达载体中以表达为具有鼠IgG2a/鼠Kappa恒定区的嵌合mAb。

[0158] 通过使用人Fab-pIX全新文库对可溶性scFv-Fc融合蛋白GCDB332的噬菌体展示来识别GP5B318的可变区。这些V区不经历任何亲和力成熟。从全新Fab文库获得DNA序列,而无需任何密码子优化。

[0159] V_H和V_L的克隆

[0160] 使用两个pcDNA3.1衍生的哺乳动物表达载体(vDR000368和vDR000961)来生成单个基因构建体,该单个基因构建体编码嵌合mAb的重链(HC)或轻链(LC)。每个载体含有人巨细胞病毒(hCMV)启动子以驱动HC和LC的表达,并且均含有氨苄青霉素抗性基因(Amp(R))以促进克隆。vDR000368具有用于克隆的独特的HindIII和DraIII限制性酶位点以及还有鼠IgG2a恒定区;vDR000961具有用于克隆的独特的HindIII和Tth111I限制性酶位点以及还有鼠Kappa恒定区。

[0161] 通过IDT合成包含HC(VH)或LC(VL)的可变区的DNA片段,并且将该DNA片段绑扎到HC载体vDR000368和LC载体vDR000961中。HC合成片段包括HindIII限制性酶位点,Kozak序列,编码信号肽、VH和部分CH1的DNA序列,以及DraIII克隆位点。LC合成片段包括HindIII限制性酶位点,Kozak序列,编码信号肽、VL和部分Kappa恒定区的DNA序列,以及Tth111I限制性克隆位点。最终HC构建体是PBD000094819,并且最终LC构建体是PBD000094818。将这两个构建体共转染到哺乳动物表达细胞株HEK293 Expi或CHO中以制备GP5B318。

[0162] 蛋白质表达

[0163] 在转染前对HC构建体PBD000094819和LC构建体PBD000094818进行序列验证。HEK Expi293TM细胞 (Thermo cat#A14527) 在Expi293TM表达培养基 (Thermo cat#A1435101) 中生长。在8%CO₂下在125RPM的振荡下,使细胞在37℃下生长。使用Expi293TM表达试剂盒 (Thermo cat#A14524) 以 2.5×10^6 个细胞/ml转染细胞。对于每升转染的细胞,将1mg总DNA稀释于25ml Opti-MEM (Thermo cat#319850620) 中,并且将2.6ml Expi293TM试剂稀释于25ml Opti-MEM中,并在室温下温育5分钟。将稀释的DNA和稀释的Expi293试剂混合,并在室温处温育20分钟。然后将DNA复合物加入细胞中。将细胞置于振荡的培养箱中过夜。转染后第二天,将5ml增强子1稀释到50ml增强子2中,并且将两种增强子的总体积加入细胞中。将转染的细胞放回培养箱中4天,直至收获。通过以4,500g离心35分钟来取出细胞,然后在检查表达水平之前用0.2μm过滤器过滤。

[0164] 通过Octet量化表达。将鼠IgG2 (Sigma Cat#M9144) 用作标准物。使用蛋白质A生物传感器。用用过的Expi293培养基稀释样品和标准物。标准曲线从100ug/ml开始,以两倍稀释。将样品按1:10稀释。标准曲线是线性点曲线。通过Forte生物系统软件来执行计算。

[0165] 实施例3:抗独特型抗体GP5B318的结合测定

[0166] 使用可溶性蛋白质与Proteon进行的结合测定

[0167] 使用ProteOn XPR36系统 (BioRad) 来执行结合测定。ProteOn GLC芯片 (BioRad, Cat#176-5011) 用抗小鼠Fc抗体进行涂覆。将文库抗体 (小鼠IgG2a) 稀释至0.25ug/ml至1ug/ml以达到大约100RL-200RL。抗原 (scFv Fc融合物) 在50nM至0.2nM、1:4稀释下关联3分钟。解离30分钟。测定结果 (下表1) 显示GP5B318与GP5B305具有微量亲和力。GP5B305是双特异性抗体,其包括HC1 N-末端CD3B376-Fab/C-末端BCMB516-LH-scFv*和HC2 N-末端GP5B83 N23T、N30S-LH-scFv*。

[0168]	与 GP5B305 的 Proteon 结合		
	蛋白质 AA 名称	Ka 1/Ms	Kd 1/s
	GP5B318	>1.0E+07	<2.9E-05

[0169] 表1:GP5B318与GP5B305的Proteon结合结果。

[0170] 细胞结合测定

[0171] 在RMPI 1640、10%FBS、1%非必需氨基酸、1mM丙酮酸钠、2mM左旋谷氨酰胺、10mM HEPES、0.1%碳酸氢盐中培养scFv转染的SupT1-GP5B680 HL、SupT1-GP5B680 LH或GP5B83细胞。细胞培养基和补充剂是ThermoFisher Scientific Gibco产品。将mAb在染色缓冲液 (BSA) (BD Pharmingen cat#554657) 中稀释至1.0或0.1微克/mL。将表达SupT1细胞的scFv以50,000个细胞/孔加入到384孔V底聚丙烯板 (Greiner Bio-One#781280或#781281) 中。将含有细胞的板以450xg速度离心2分钟,并吸出上清液。将稀释后的mAb样品加入到细胞沉淀物中,混合,并在冰上孵育1小时。将含有细胞的板以450xg速度离心2分钟,并吸出上清液。将抗小鼠IgG重链和轻链PE缀合的第二检测抗体 (JacksonImmunoResearch,cat#115-116-146) 用染色缓冲液 (BSA) 以1:200比例稀释,然后加入到细胞沉淀物中,混合,并在冰上孵育30分钟。将含有细胞的板以450xg速度离心2分钟,吸出上清液,将细胞沉淀物重悬浮于染色缓冲液 (BSA) 中,混合,采用HTS自动进样器 (Beckton Dickinson) 在LSR II流式细胞仪上进行分析,用Flowjo软件 (Treestar) 分析门控的活细胞群的平均荧光强度。所有液体处理都

在Agilent Bravo系统上进行,并且384-孔板的抽吸在BioTek 405Select板洗涤器上进行。
 [0172] 如表2中所示,GP5B318与表达细胞系的GP5B83特异性结合,但不与阴性对照SupT1-GP5B680-HL和SupT1-GP5B680-LH特异性结合。

[0173]		细胞结合 1ug/ml			细胞结合 0.1ug/ml		
	蛋白质 AA 名称	GP5B680 LH	GP5B680 HL	GP5B83	GP5B680 LH	GP5B680 HL	GP5B83
	GP5B318	139	140	19895	116	103	21483

[0174] 表2:GP5B318与GP5B680 LH和HL GP5B680细胞以及表达细胞的GP5B83的细胞结合结果

[0175] 实施例4:在CAR+SupT1细胞上表征GPRC5D CAR GP5B83-LH的检测抗体

[0176] 从源自噬菌体展示筛选的蛋白质组中识别出用于检测在NK细胞和T细胞上表达的GPRC5D CAR (GP5DB83-HL) 的抗体。如前述实施例中所讨论的,最初测试蛋白质与重组CAR蛋白质的结合,并按比例放大潜在的结合剂。纯化这些蛋白质,并且通过流式细胞术测试其与表达GP5DB83-HL的SupT1细胞的剂量依赖性结合。通过与Fc-GP5DB83-HL融合蛋白的竞争性结合实验和通过缺乏与亲本SupT1细胞的结合,确定结合对CAR有特异性。在选择最佳结合剂后,将抗体直接缀合至重组藻红蛋白(“PE”)以用作CAR检测试剂。将这些抗体纯化至1:1的PE:抗体比率,以使得能够进行受体枚举研究(在细胞表面表达的CAR数)。

[0177] 纯化

[0178] 将细胞培养物上清液上样至MabSelect柱并用低pH缓冲液诸如100mM乙酸钠pH 3.0洗脱,随后使用Sephadex G-25柱将缓冲液交换至1xSSC、8.5%蔗糖pH 7.0。收集含有蛋白质的级分。纯化后,使用SDS-PAGE、SEC-HPLC和LC-MS方法对蛋白质进行QC。

[0179] 藻红蛋白标记

[0180] 向待标记的每10μL抗体中加入1μL改性试剂,并轻轻混合。将抗体样品(具有添加的改性试剂)直接移液到冻干的PE (Expedeon, Cat#703-0015) 上,然后轻轻地再悬浮并且在室温(20℃-25℃)下避光温育1小时。每10μL所用抗体加入1μL猝灭试剂,并且温育30分钟。

[0181] 标记后,在尺寸排阻色谱柱上纯化PE-抗体缀合物。收集级分并在SEC-HPLC上进行分析。将仅含有一种抗体和一种PE的级分合并在一起,并且在必要的情况下进行浓缩。在SEC-HPLC上分析最终产物。

[0182] GPRC5D CAR (GP5DB83-HL) CAR抗独特型抗体GP5B318的表征

[0183] 将表达GP5DB83-HL的SupT1细胞与亲本CAR-SupT1细胞进行比较。将表达GP5DB83-HL的SupT1细胞和亲本CAR-SupT1细胞用近IR LIVE/DEAD荧光活性染料在冰上染色20分钟。温育后,将细胞洗涤并重悬浮于BSA染色缓冲液中,然后将细胞(100,000个细胞/孔)接种于96孔板中,在冰上温育30分钟,并逐渐增加GP5B318浓度,添加或不添加10μg/mL CAR-Fc融合蛋白、GP5B83_N24T_N315-HL-hu Fc-scFv (GP5B30.002)。温育后,将这些样品用BSA染色缓冲液洗涤,并用PE-羊抗小鼠IgG多克隆抗体染色,以检测活SupT1细胞上的结合抗体。温育、洗涤和固定后,在10色FACSCanto II流式细胞仪上获取样品。使用FlowJo进行分析,并且在图3中绘制活SupT1细胞的PE中值荧光强度。如图3所示,GP5B318与GP5DB83-LH SupT1细胞呈剂量依赖性结合。在CAR-SupT1亲本细胞上没有检测到结合。

[0184] 如上所述将GP5B318缀合至R-PE,并且在存在或不存在10μg/mL GP5DB83-scFv Fc

融合蛋白的情况下测试其与GP5DB83-HL SupT1的结合,以评估GP5B318与GP5DB83-HL CAR结合的特异性,并确保CAR检测不受PE标记的影响。将GP5DB83-HL SupT1细胞在50mL试管中用近IR LIVE/DEAD荧光活性染料在冰上染色20分钟。温育后,将细胞洗涤并再悬浮于BSA染色缓冲液中,浓度达 2×10^6 个细胞/mL。按100,000个细胞/孔将细胞接种在96孔板中,逐渐增加PE-GP5B318浓度,并添加10 μ g/mL GP5DB83-scFv Fc,在冰上温育45分钟。温育、洗涤和固定后,在10色FACSCanto II流式细胞仪上获取样品。使用FlowJo分析软件执行分析,并且在图4中绘制活SupT1细胞的PE中值荧光强度。如图4所示,PE-P5B318与GP5DB83-HL SupT1细胞的剂量依赖性结合对GP5DB83-HL CAR有特异性,并且可被10 μ g/mL GPDB83-HL scFv Fc阻断。

[0185] 序列

[0186] 表3:CDR序列和框架序列

[0187] VH CDR和框架

SEQ ID NO.	区域	定义	序列片段	残基	长度
1	HFR1	Chothia	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS-----	1 -25	25
1		AbM	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS-----	1 -25	25
2		Kabat	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	1 -30	30
3		Contact	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSF-	1 -29	29
4	CDR-H1	Chothia	GYSFTSY---	26 -32	7
5		AbM	GYSFTSYWIG	26 -35	10
6		Kabat	-----SYWIG	31 -35	5
7		Contact	----TSYWIG	30 -35	6
8	HFR2	Chothia	WIGWVRQMPGKGLEWMGII	33 -51	19
9		AbM	---WVRQMPGKGLEWMG--	36 -49	14
9		Kabat	---WVRQMPGKGLEWMG--	36 -49	14
10		Contact	---WVRQMPGKGLE----	36 -46	11
11	CDR-H2	Chothia	-----YPGDS-----	52 -57	6
12		AbM	---IYPGDS-----	50 -59	10
13		Kabat	---IYPGDS-----	50 -66	17
14		Contact	WMGIYPGDS-----	47 -59	13
15	HFR3	Chothia	TRYSPSFQGVITISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	58 -98	41
16		AbM	--YSPSFQGVITISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	60 -98	39
17		Kabat	-----QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	67 -98	32
18		Contact	--YSPSFQGVITISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC--	60 -96	37
19	CDR-H3	Chothia	--GWDYGTGEFDY	99 -109	11
19		AbM	--GWDYGTGEFDY	99 -109	11
19		Kabat	--GWDYGTGEFDY	99 -109	11
20		Contact	ARGWDYGTGEFD-	97 -108	12
21	HFR4	Chothia	-WGQGTSLTVSS	110 -120	11
21		AbM	-WGQGTSLTVSS	110 -120	11
21		Kabat	-WGQGTSLTVSS	110 -120	11
22		Contact	YWGQGTSLTVSS	109 -120	12

[0190] VL CDR和框架

SEQ ID NO.	区域	定义	序列片段	残基	长度
23	LFR1	Chothia	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC-----	1-23	23
23		AbM	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC-----	1-23	23
23		Kabat	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC-----	1-23	23
24		Contact	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSI	1-29	29
25	CDR-L1	Chothia	RASQSIGNWLN--	24-34	11

25		AbM	RASQSIGNWLN--	24-34	11
25		Kabat	RASQSIGNWLN--	24-34	11
26		Contact	-----GNWLNWY	30-36	7
27	LFR2	Chothia	WYQQKPGKAPKLLIY	35-49	15
27		AbM	WYQQKPGKAPKLLIY	35-49	15
27		Kabat	WYQQKPGKAPKLLIY	35-49	15
28		Contact	--QQKPGKAPK----	37-45	9
29	CDR-L2	Chothia	----YASSLQS	50-56	7
29		AbM	----YASSLQS	50-56	7
29		Kabat	----YASSLQS	50-56	7
30		Contact	LLIYYASSLQ-	46-55	10
31	LFR3	Chothia	-GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAVYYC	57-88	32
31		AbM	-GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAVYYC	57-88	32
31		Kabat	-GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAVYYC	57-88	32
32		Contact	SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAVYYC	56-88	33
33	CDR-L3	Chothia	QQSLSFPIT	89-97	9
33		AbM	QQSLSFPIT	89-97	9
33		Kabat	QQSLSFPIT	89-97	9
34		Contact	QQSLSFPI-	89-96	8
35	LFR4	Chothia	-FGQGTKVEIK	98-107	10
35		AbM	-FGQGTKVEIK	98-107	10
35		Kabat	-FGQGTKVEIK	98-107	10
36		Contact	TFQGQTKVEIK	97-107	11

[0192] SEQ ID No.37:具有muIgG2a的GP5B318的重链(氨基酸)

[0193] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS DTRYSPSFQGGVT
ISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGWDYGTGEFDYWGQGT LVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLG
CLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPT
IKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYN
STLRVVSALPIQH QDWM SGEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMP
EDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

[0194] SEQ ID No.38:具有muIgG2a的GP5B318的重链(DNA)

[0195] GAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGAAAGCCTGAAAATTAGCTGCAAA
GGCAGCGGCTATAGCTTTACCAGCTATTGGATTGGTTGGGTGCGCCAGATGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGATGGG
CATTATTTATCCGGGTGATAGCGATACCCGTTATAGCCCGAGCTTTCAGGGCCAGGTGACCATTAGCGCGGATAAAA
GCATTAGCACCGCGTATCTGCAGTGAGCAGCCTGAAAGCGAGCGATACCGCGATGTATTATTGCGCGCGCGGCTGG
GACTATGGTACCGGCGAGTTTCGACTATTGGGGCCAGGACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAAAACAACAGCACC
AAGTGTCTATCCACTGGCCCCCTGTGTGTGGAGATACAACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAGGGTT
ATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTG
CAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAA
TGTGGCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAGGGCCCAATCAAGCCCTGTCCTC

CATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTC
ATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTG
GTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGG
TCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTC
CCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACC
AGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGG
AGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTC
ATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTTCACTGGTCCACGAGGG
TCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAA

[0196] SEQ ID No. 39: 具有muKappa的GP5B318的轻链 (氨基酸)

[0197] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSIGNWLNWYQQKPGKAPKLLIYYASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFAVYYCQQLSFPITFGQGTKVEIKRADAAPTVISFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINV
KWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSPIVKSFNREK

[0198] SEQ ID No. 40: 具有muKappa的GP5B318的轻链 (DNA)

[0199] GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACCTGAGCTGAGCCCGGGCGAACGCGGACCCTGAGCTGC
CGCGCGAGCCAGAGCATCGGTAAGTGGCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATTTA
TTACGCGAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTCCGAGCCGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCA
TTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTGCAGGTGATTATTGCCAGCAGTCCCTTTCCTTTCGATTACATTTGGCCAG
GGCACCAAAGTGGAAATTAACGGGCTGATGCTGCACCGACTGTGTCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAAC
ATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATG
GCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGC
ACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTC
ACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT

[0200] SEQ ID No. 41: GP5B83 N23T/N30S VH

[0201] QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLSSSSYWWGTRQPPGRGLEWIGTMYYSNGNIYYNPSLQSRA
TISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHVGYSYGRRFWYFDLWGRGTLTVSS

[0202] SEQ ID No. 42: GP5B83 VL

[0203] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

[0204] SEQ ID NO: 43-CAR 1 (GP5B83-HL)

[0205] QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLSSSSYWWGTRQPPGRGLEWIGTMYYSNGNIYYNPSLQSRA
TISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHVGYSYGRRFWYFDLWGRGTLTVSSGGSEKSSGSGSEKSTGGSE
IVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYK
QQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ
GLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0206] SEQ ID NO: 44-CAR 2 (GP5B83-LH)

[0207] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGT

DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKGGSEKSSSGSGSESKSTGGSQLQLQESGPGLVKPSETLS
LTCTVSGGSLSSSSYWWGWTRQPPGRGLEWIGTMYYSNGNIYNNPSLQSRATISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY
CARHVGYSYGRRFWYFDLWGRGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYK
QGGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQ
GLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0208] SEQ ID No.45:GP5B318的重链可变结构域(氨基酸)

[0209] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS DTRYSPSFQGGVT
ISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARGWDYGTGEFDYWGQGT LVTVSS

[0210] SEQ ID No.46:GP5B318的轻链可变结构域(氨基酸)

[0211] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSIGNWLNWYQQKPGKAPKLLIYYASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFAVYYCQQSLSFPTFGQGTKVEIK

[0212] SEQ ID NO:47-人GPCR5D序列(氨基酸)

[0213] MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGI ILESLAILGIVVTILLLLAFLFLMRKIQDCSQWNVLPTQLLFLLS
VLGLFGLAFAFIIELNQQTAPVRYFLFGVLFALCFSCLLAHASNVLKVRGCVSFSWTTILCIAIGCSLLQII IATE
YVTLMTRGMMFVNMTPCQLNVDFVLLVYVFLMALTFFVSKATFCGPCENWKQHGRLLIFITVLFSSIIIWVWVISM
LLRGNPQFQRQPQWDDPVVCIALVTNAWVFLLLYIVPELCILYRSCRQECPLQGNACPVTAYQHSFQVENQELSRAR
DSDGAEDVALTSYGTPIQPQTVDPTQECFIPQAKLSPQQDAGGV

[0214] 以引用方式并入

[0215] 本文提及的所有出版物和专利都据此全文以引用方式并入本文,就如同明确且独立地指明每个单独的出版物或专利都是以引用方式并入的。

[0216] 虽然已经讨论了本公开的具体实施方案,但是以上说明书是例示性的而非限制性的。在查看本说明书和以下权利要求后,本公开的许多变化对于本领域技术人员将变得显而易见。本公开的全部范围应参考权利要求书以及其等同物的全部范围和说明书以及此类变化来确定。

<110> JANSSEN BIOTECH, INC.

<120> 抗GPCR5D抗体的抗独特型抗体

<130> JBI6352W0PCT1

<140>

<141>

<150> 63/053,286

<151> 2020-07-17

<160> 48

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 1

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser

20 25

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 2

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20 25 30

<210> 3

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 3

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe

20 25

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 4

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

1 5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 5

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 6

Ser Tyr Trp Ile Gly

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 7

Thr Ser Tyr Trp Ile Gly

1 5

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 8

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

1 5 10 15

Gly Ile Ile

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 9

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

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 10

Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu

1 5 10

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 11

Tyr Pro Gly Asp Ser Asp

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 12

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg

1 5 10

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 13

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 14

Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg

1 5 10

<210> 15

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 15

Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp

1 5 10 15

Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser

20 25 30

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg

35 40

<210> 16

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 16

Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser

1 5 10 15

Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr

20 25 30

Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg

35

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 17

Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln

1	5	10	15												
Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
		20						25					30		

<210> 18

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 18

Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser
1				5					10					15	
Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr
				20					25					30	

Ala Met Tyr Tyr Cys

35

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 19

Gly	Trp	Asp	Tyr	Gly	Thr	Gly	Glu	Phe	Asp	Tyr
1				5					10	

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 20

Ala	Arg	Gly	Trp	Asp	Tyr	Gly	Thr	Gly	Glu	Phe	Asp
1					5				10		

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 21

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 22

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 23

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 24

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 24

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1	5	10	15									
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile
20				25								

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 25
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Trp Leu Asn

1	5	10
---	---	----

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 26
Gly Asn Trp Leu Asn Trp Tyr

1	5
---	---

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 27
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 28

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 29

Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 30

Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln

1 5 10

<210> 31

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 31

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 32

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 32

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr

20 25 30

Cys

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 33

Gln Gln Ser Leu Ser Phe Pro Ile Thr

1 5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 34

Gln Gln Ser Leu Ser Phe Pro Ile

1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 35

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

40

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser		
180	185	190
Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala		
195	200	205
Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile		
210	215	220
Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp		
260	265	270
Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His		
275	280	285
Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg		
290	295	300
Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys		
305	310	315
Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr		
340	345	350
Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu		
355	360	365
Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp		
370	375	380
Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val		
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu		
405	410	415
Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His		
420	425	430
Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro		
435	440	445
Gly Lys		
450		
<210> 38		

<211> 1350

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多核苷酸"

<400> 38

gaagtgcagc	tggtgcagag	cggcgcggaa	gtgaaaaaac	cgggcgaaag	cctgaaaatt	60
agctgcaaag	gcagcggcta	tagctttacc	agctattgga	ttggttgggt	gcgccagatg	120
ccgggcaaag	gcctggaatg	gatgggcatt	atttatccgg	gtgatagcga	tacccgttat	180
agccccagct	ttcagggcca	ggtgaccatt	agcgcggata	aaagcattag	caccgcgtat	240
ctgcagtgga	gcagcctgaa	agcagcagat	accgcgatgt	attattgcgc	gcgcggctgg	300
gactatggta	ccggcgagtt	cgactattgg	ggccagggca	ccctggtgac	cgtgagcagc	360
gccaaaacaa	cagcaccaag	tgtctatcca	ctggccccctg	tgtgtggaga	tacaactggc	420
tcctcggtga	ctctaggatg	cctgggtcaag	ggttattttcc	ctgagccagt	gaccttgacc	480
tggaactctg	gatccctgtc	cagtgggtgtg	cacaccttcc	cagctgtcct	gcagtctgac	540
ctctacaccc	tcagcagctc	agtgactgta	acctcgagca	cctggccccag	ccagtccatc	600
acctgcaatg	tggccccacc	ggcaagcagc	accaaggtgg	acaagaaaat	tgagcccaga	660
gggcccacaa	tcaagcccctg	tcctccatgc	aaatgcccag	cacctaacct	cttgggtgga	720
ccatccgtct	tcatcttccc	tccaaagatc	aaggatgtac	tcatgatctc	cctgagcccc	780
atagtcatat	gtgtggtggt	ggatgtgagc	gaggatgacc	cagatgtcca	gatcagctgg	840
tttgtgaaca	acgtggaagt	acacacagct	cagacacaaa	cccatagaga	ggattacaac	900
agtactctcc	gggtggtcag	tgccctcccc	atccagcacc	aggactggat	gagtggcaag	960
gagttcaaat	gcaaggtcaa	caacaaagac	ctcccagcgc	ccatcgagag	aaccatctca	1020
aaacccaaag	ggtcagtaag	agctccacag	gtatatgtct	tgccctccacc	agaagaagag	1080
atgactaaga	aacaggtcac	tctgacctgc	atggtcacag	acttcatgcc	tgaagacatt	1140
tacgtggagt	ggaccaacaa	cgggaaaaca	gagctaaact	acaagaacac	tgaaccagtc	1200
ctggactctg	atggttctta	cttcatgtac	agcaagctga	gagtggaaaa	gaagaactgg	1260
gtggaaaagaa	atagctactc	ctgttcagtg	gtccacgagg	gtctgcacaa	tcaccacacg	1320
actaagagct	tctccccggac	tccgggtaaa				1350

<210> 39

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 39

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Trp			
20	25	30	
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Leu Ser Phe Pro Ile			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala			
100	105	110	
Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly			
115	120	125	
Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile			
130	135	140	
Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu			
145	150	155	160
Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser			
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr			
180	185	190	
Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Asn Glu Cys			
210			
<210> 40			
<211> 642			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 源			
<223> /注释=“人工序列的描述:合成多核苷酸”			
<400> 40			
gaaattgtgc tgaccagag cccgggcacc ctgagcctga gcccgggcga acgcgcgacc			60
ctgagctgcc gcgcgagcca gagcatcggt aactggctga actggtatca gcagaaaccg			120
ggcaaagcgc cgaaactgct gatttattac gcgagcagcc tgcagagcgg cgtgccgagc			180
cgctttagcg gcagcggcag cggcaccgat ttaccctga ccattagcag cctgcagccg			240

```

gaagattttg cgggtgtatta ttgccagcag tccctttcct ttccgattac atttggccag      300
ggcaccaaag tggaaattaa acgggctgat gctgcaccga ctgtgtccat cttcccacca      360
tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac      420
cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg      480
aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg      540
ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca      600
tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt                                642

```

<210> 41

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 41

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Trp Trp Gly Trp Thr Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Thr Met Tyr Tyr Ser Gly Asn Ile Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Gln Ser Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg His Val Gly Tyr Ser Tyr Gly Arg Arg Phe Trp Tyr Phe

100 105 110

Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 42

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

<210> 43

<211> 475

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 43

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

130	135	140
Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro		
145	150	155
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser		
165	170	175
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
180	185	190
Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser		
195	200	205
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu		
210	215	220
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro		
225	230	235
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Ser Thr Pro		
245	250	255
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu		
260	265	270
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His		
275	280	285
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu		
290	295	300
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr		
305	310	315
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe		
325	330	335
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg		
340	345	350
Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser		
355	360	365
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
370	375	380
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
385	390	395
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
405	410	415
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
420	425	430
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly		
435	440	445

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 450 455 460
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470 475
 <210> 44
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 源
 <223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”
 <400> 44
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Glu Gly
 100 105 110
 Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gly Gly Ser Gln
 115 120 125
 Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
 130 135 140
 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Ser Ser Ser
 145 150 155 160
 Tyr Trp Trp Gly Trp Thr Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 165 170 175
 Ile Gly Thr Met Tyr Tyr Ser Gly Asn Ile Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
 180 185 190
 Gln Ser Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 195 200 205
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

210	215	220
Ala Arg His Val Gly Tyr Ser Tyr Gly Arg Arg Phe Trp Tyr Phe Asp		
225	230	235
Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Pro		240
	245	250
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu		255
	260	265
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His		270
	275	280
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu		285
290	295	300
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr		
305	310	315
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe		320
	325	330
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg		335
	340	345
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser		350
355	360	365
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
370	375	380
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
385	390	395
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		400
	405	410
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		415
	420	425
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly		430
	435	440
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		445
450	455	460
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
465	470	475

<210> 45

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 45

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

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 46

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

100	105
<210> 47	
<211> 345	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 47	
Met Tyr Lys Asp Cys Ile Glu Ser Thr Gly Asp Tyr Phe Leu Leu Cys	
1 5 10 15	
Asp Ala Glu Gly Pro Trp Gly Ile Ile Leu Glu Ser Leu Ala Ile Leu	
20 25 30	
Gly Ile Val Val Thr Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu Phe Leu Met	
35 40 45	
Arg Lys Ile Gln Asp Cys Ser Gln Trp Asn Val Leu Pro Thr Gln Leu	
50 55 60	
Leu Phe Leu Leu Ser Val Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Phe Ala Phe	
65 70 75 80	
Ile Ile Glu Leu Asn Gln Gln Thr Ala Pro Val Arg Tyr Phe Leu Phe	
85 90 95	
Gly Val Leu Phe Ala Leu Cys Phe Ser Cys Leu Leu Ala His Ala Ser	
100 105 110	
Asn Leu Val Lys Leu Val Arg Gly Cys Val Ser Phe Ser Trp Thr Thr	
115 120 125	
Ile Leu Cys Ile Ala Ile Gly Cys Ser Leu Leu Gln Ile Ile Ile Ala	
130 135 140	
Thr Glu Tyr Val Thr Leu Ile Met Thr Arg Gly Met Met Phe Val Asn	
145 150 155 160	
Met Thr Pro Cys Gln Leu Asn Val Asp Phe Val Val Leu Leu Val Tyr	
165 170 175	
Val Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Phe Phe Val Ser Lys Ala Thr Phe	
180 185 190	
Cys Gly Pro Cys Glu Asn Trp Lys Gln His Gly Arg Leu Ile Phe Ile	
195 200 205	
Thr Val Leu Phe Ser Ile Ile Ile Trp Val Val Trp Ile Ser Met Leu	
210 215 220	
Leu Arg Gly Asn Pro Gln Phe Gln Arg Gln Pro Gln Trp Asp Asp Pro	
225 230 235 240	
Val Val Cys Ile Ala Leu Val Thr Asn Ala Trp Val Phe Leu Leu Leu	
245 250 255	
Tyr Ile Val Pro Glu Leu Cys Ile Leu Tyr Arg Ser Cys Arg Gln Glu	

260	265	270
Cys Pro Leu Gln Gly Asn Ala	Cys Pro Val Thr Ala Tyr Gln His Ser	
275	280	285
Phe Gln Val Glu Asn Gln Glu Leu Ser Arg Ala Arg Asp Ser Asp Gly		
290	295	300
Ala Glu Glu Asp Val Ala Leu Thr Ser Tyr Gly Thr Pro Ile Gln Pro		
305	310	315
Gln Thr Val Asp Pro Thr Gln Glu Cys Phe Ile Pro Gln Ala Lys Leu		
325	330	335
Ser Pro Gln Gln Asp Ala Gly Gly Val		
340	345	
<210> 48		
<211> 19		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 源		
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”		
<400> 48		
Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser		
1	5	10
Ile Gln Ala		15

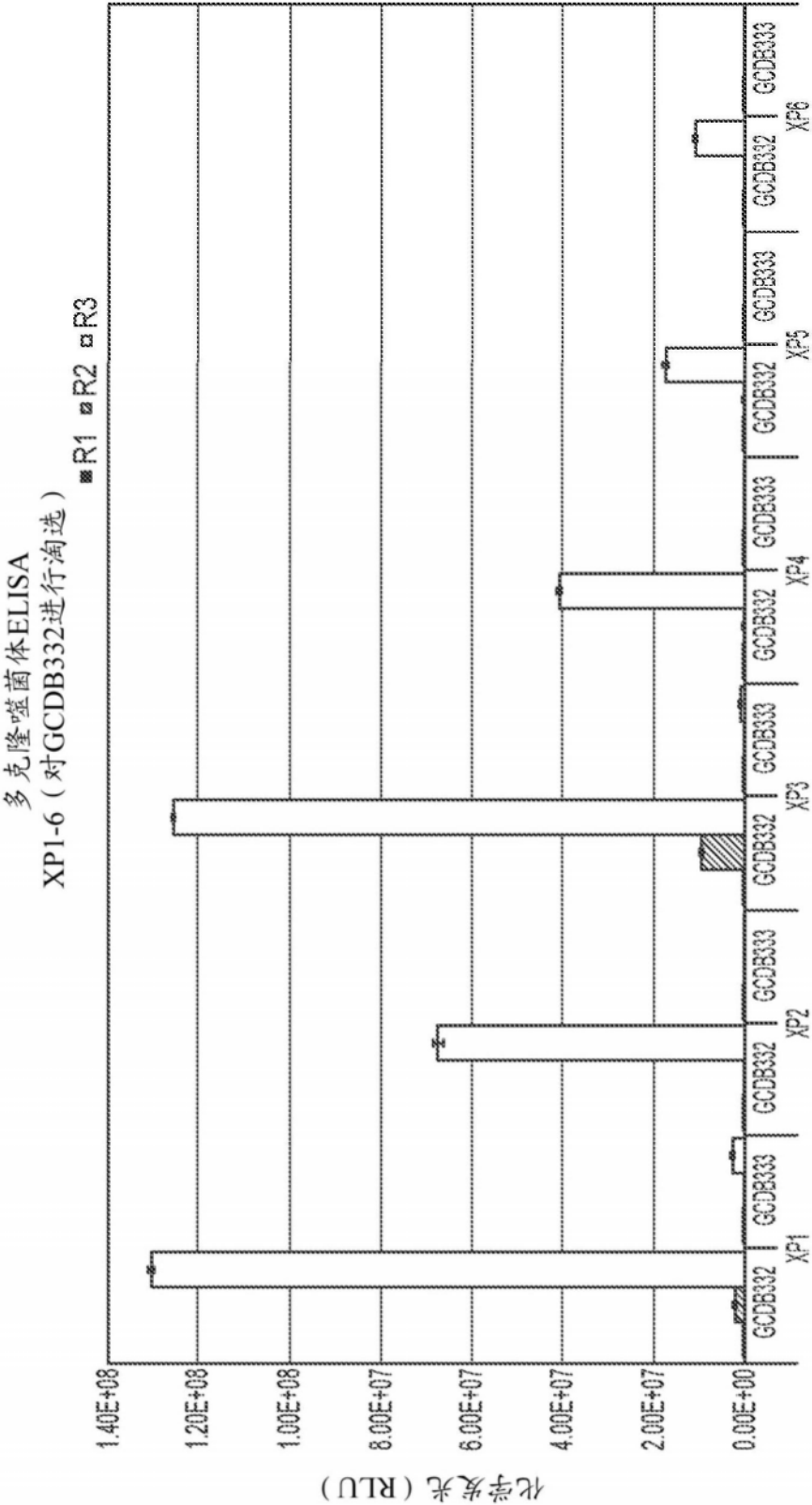


图1

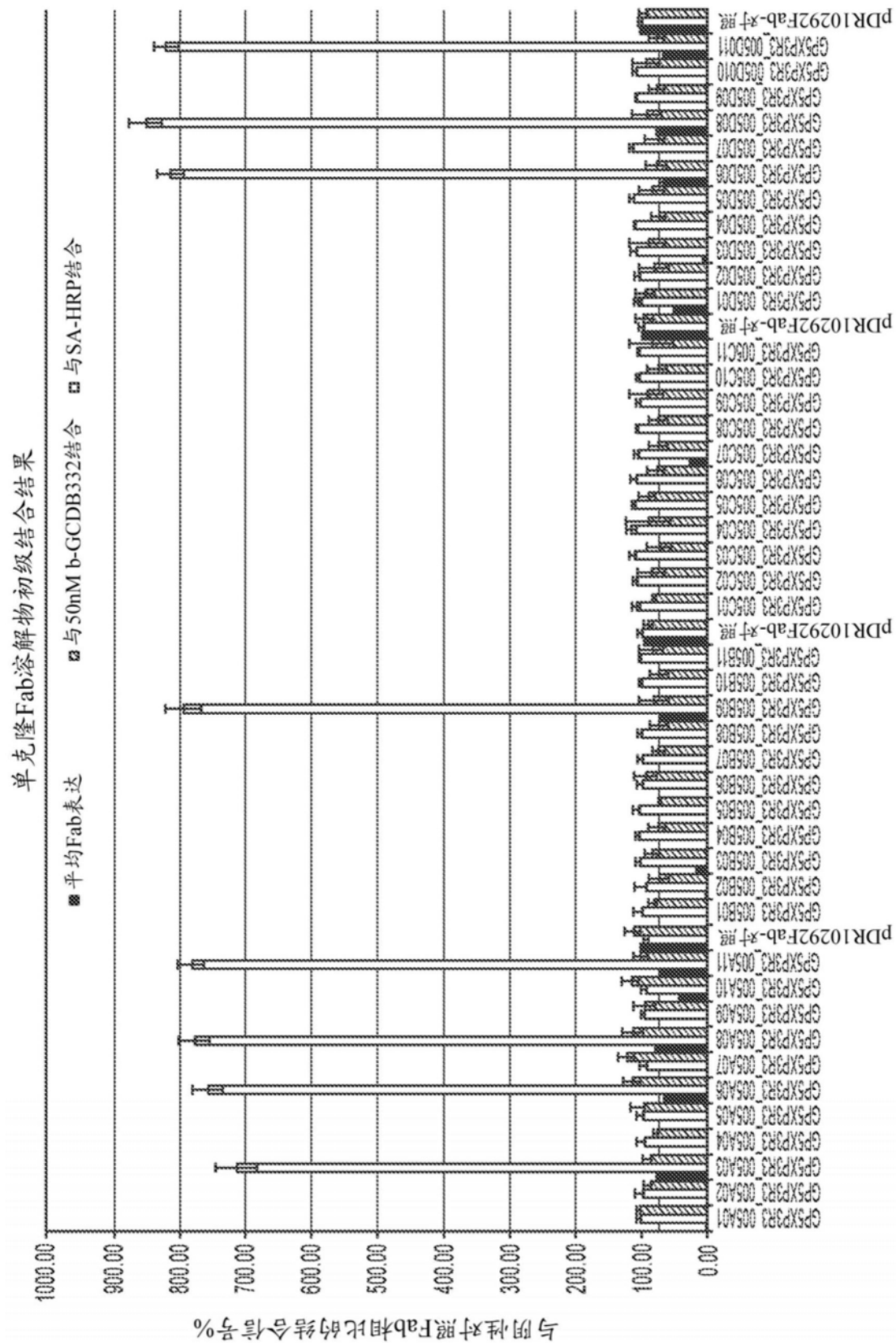


图2

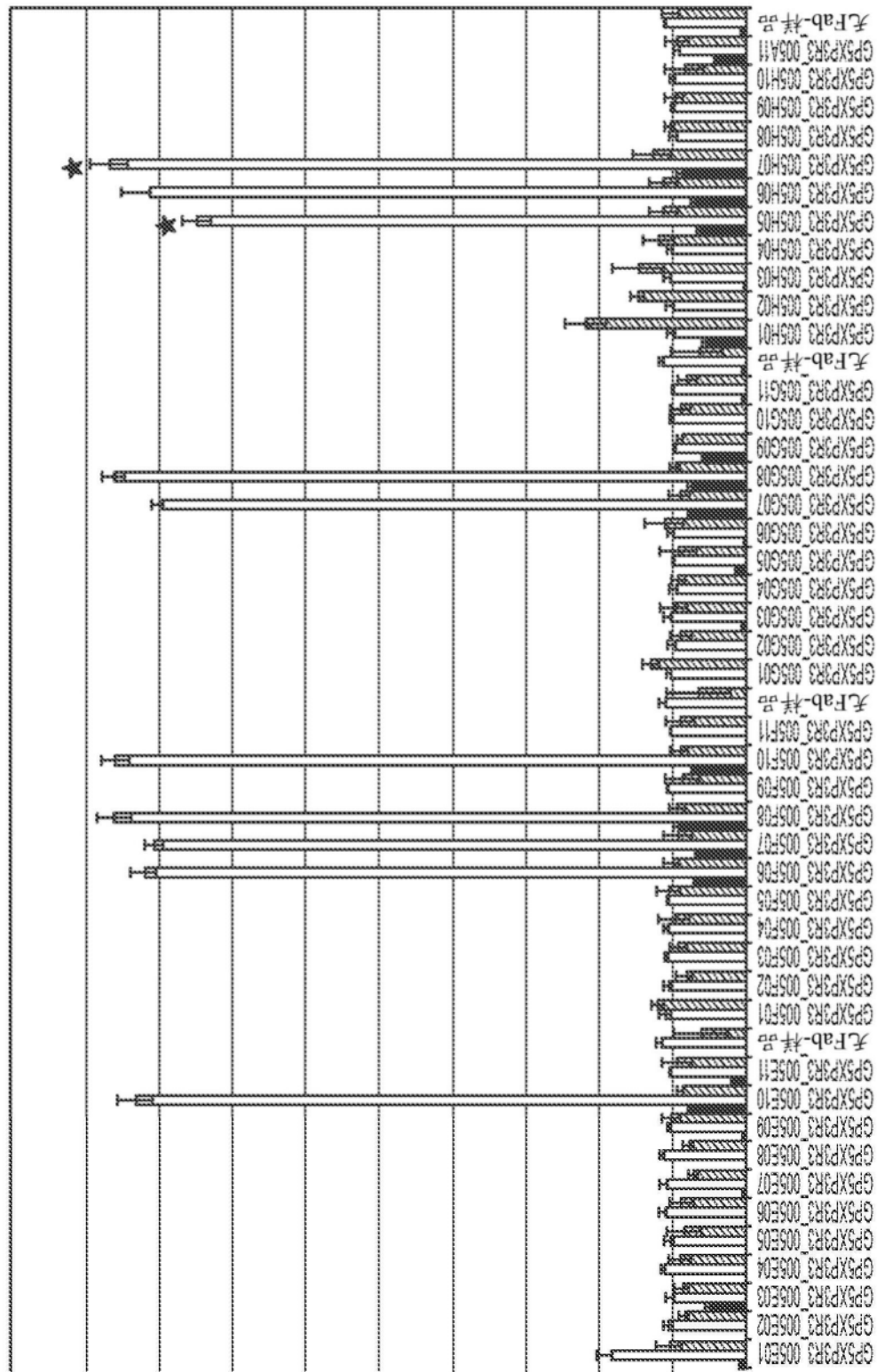


图2(续)

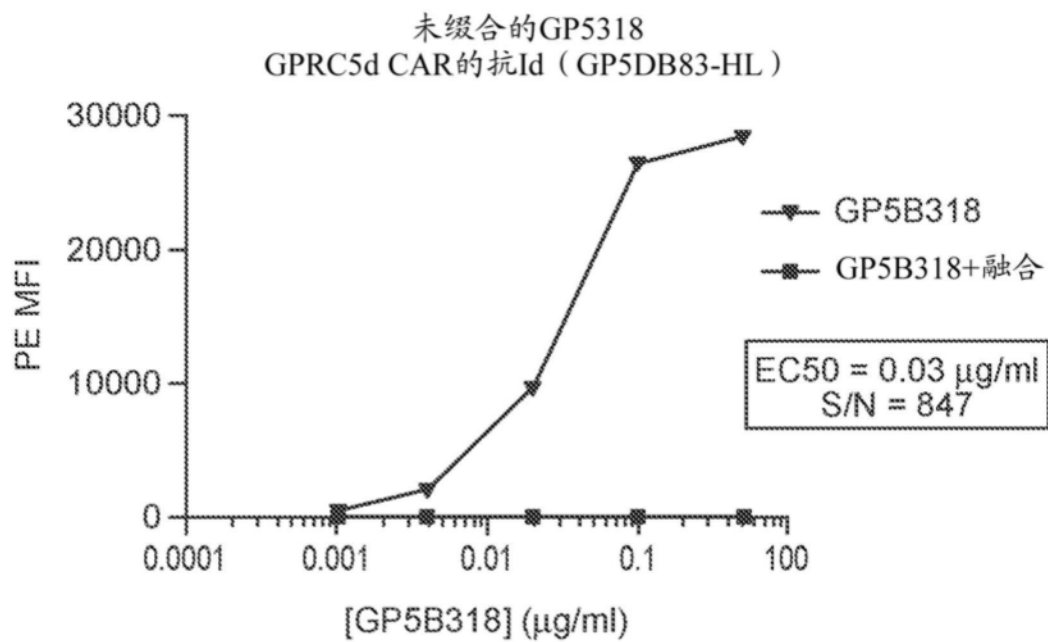


图3

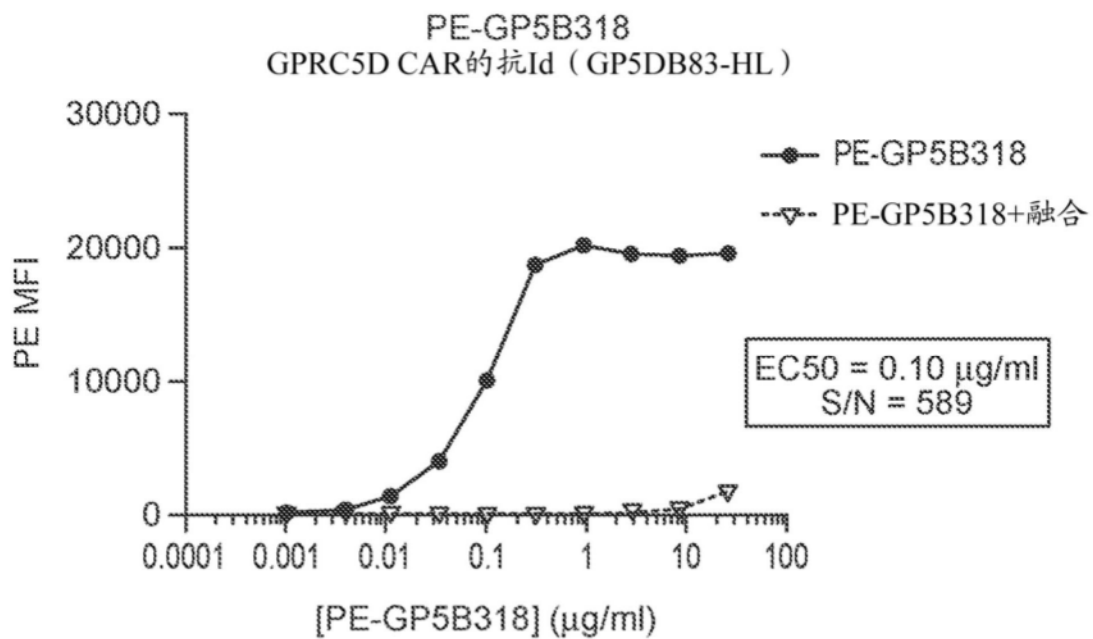


图4