



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118388656 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 26

(21) 申请号 202410521871.1

玛丽亚·克罗伊茨贝格

(22) 申请日 2017.09.20

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

(30) 优先权数据

公司 11227

PCT/EP2016/072688 2016.09.23 EP

专利代理师 张福誉 韩晓帆

(62) 分案原申请数据

(51) Int. Cl.

201780056781.8 2017.09.20

C07K 16/46 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

(71) 申请人 生物技术公司

A61K 39/395 (2006.01)

地址 德国

A61P 35/00 (2006.01)

申请人 安斯泰来制药股份有限公司

A61P 35/04 (2006.01)

(72) 发明人 乌尔·沙欣

克里斯蒂亚娜·斯塔德勒

莱伊拉·菲舍尔

阿尔内·詹德雷茨基

厄兹莱姆·图雷奇

法布里斯·莱加尔

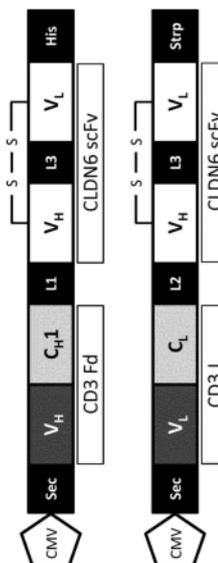
权利要求书4页 说明书78页  
序列表(电子公布) 附图39页

(54) 发明名称

用于治疗表达密蛋白之癌症疾病的与密蛋白6或密蛋白18.2和CD3结合的双特异性三价抗体

(57) 摘要

本申请涉及用于治疗表达密蛋白之癌症疾病的与密蛋白6或密蛋白18.2和CD3结合的双特异性三价抗体。本公开内容提供了包含至少三个结合结构域的结合剂,其中第一结合结构域与T细胞特异性抗原结合,并且第二结合结构域和第三结合结构域与密蛋白结合,以及使用这些结合剂或编码所述结合剂之核酸用于治疗癌症的方法。



1. 包含至少三个结合结构域的结合剂,其中第一结合结构域与T细胞特异性抗原结合,并且第二结合结构域和第三结合结构域与密蛋白结合。

2. 权利要求1所述的结合剂,其中所述第一、第二和第三结合结构域中的每一个包含免疫球蛋白重链可变结构域(VH)和免疫球蛋白轻链可变结构域(VL)。

3. 权利要求1或2所述的结合剂,其中所述第一结合结构域具有Fab分子的形式和/或所述第二结合结构域和所述第三结合结构域具有scFv分子的形式。

4. 权利要求1至3中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂包含:

(a) 第一多肽,其包含对所述T细胞特异性抗原具有特异性的VH结构域(VH(T))、对所述密蛋白具有特异性的VH结构域(VH(CLDN))和对所述密蛋白具有特异性的VL结构域(VL(CLDN));以及

(b) 第二多肽,其包含对所述T细胞特异性抗原具有特异性的VL结构域(VL(T))、对所述密蛋白具有特异性的VH结构域(VH(CLDN))和对所述密蛋白具有特异性的VL结构域(VL(CLDN)),

其中所述第一多肽和所述第二多肽缔合以形成所述结合剂。

5. 权利要求4所述的结合剂,其中所述第一多肽还包含免疫球蛋白重链恒定结构域1(CH1),并且所述第二多肽还包含免疫球蛋白轻链恒定结构域(CL),其中这两个结构域能够缔合。

6. 权利要求5所述的结合剂,其中所述第一多肽和所述第二多肽通过所述CH1结构域与所述CL结构域之间的二硫键共价连接。

7. 权利要求5或6所述的结合剂,其中,在所述第一多肽和所述第二多肽中,所述VH结构域、所述VL结构域、所述CH1结构域和所述CL结构域从N端至C端以如下顺序排列:

-VH(T) -CH1 -VH(CLDN) -VL(CLDN) 和VL(T) -CL -VH(CLDN) -VL(CLDN);或者

VH(T) -CH1 -VL(CLDN) -VH(CLDN) 和VL(T) -CL -VL(CLDN) -VH(CLDN)。

8. 权利要求7所述的结合剂,其中VH-VL或VL-VH结构域通过肽接头连接至所述CH1结构域或CL结构域,所述肽接头例如包含氨基酸序列DVPG<sub>2</sub>S或SGPG<sub>3</sub>RS(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>的肽接头。

9. 权利要求7或8所述的结合剂,其中所述VH和VL结构域通过肽接头连接以形成VH-VL或VL-VH结构域,所述肽接头例如包含氨基酸序列(G<sub>4</sub>S)<sub>x</sub>的肽接头,其中x是3、4、5或6。

10. 权利要求1至9中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是双特异性二聚体结合剂。

11. 权利要求1至10中任一项所述的结合剂,其中所述T细胞特异性抗原在T细胞表面上表达。

12. 权利要求1至11中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂与T细胞上的所述T细胞特异性抗原的结合导致所述T细胞的增殖和/或活化。

13. 权利要求1至12中任一项所述的结合剂,其中所述T细胞特异性抗原是CD3。

14. 权利要求13所述的结合剂,其中所述第一结合结构域与CD3的ε链结合。

15. 权利要求1至14中任一项所述的结合剂,其中所述密蛋白在癌细胞表面上表达。

16. 权利要求1至15中任一项所述的结合剂,其中所述密蛋白选自密蛋白6和密蛋白18.2。

17. 权利要求1至16中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂与所述密蛋白的细胞外结构域结合。

18. 权利要求1至17中任一项所述的结合剂,其中与T细胞特异性抗原的结合和/或与密蛋白的结合是特异性结合。

19. 权利要求1至18中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂诱导针对表达所述密蛋白的癌细胞的T细胞介导的细胞毒性。

20. 权利要求19所述的结合剂,其中所述结合剂以 $\leq 10\text{nM}$ 或 $\leq 1\text{nM}$ 或 $< 500\text{pM}$ 或 $< 250\text{pM}$ 或 $< 100\text{pM}$ 或 $< 50\text{pM}$ 的EC50诱导针对表达所述密蛋白的癌细胞的T细胞介导的细胞毒性。

21. 权利要求15至20中任一项所述的结合剂,其中所述密蛋白是密蛋白6,并且所述癌细胞来自选自以下的癌症:膀胱癌;卵巢癌,特别是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤;肺癌,包括小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),特别是鳞状细胞肺癌和腺癌;胃癌;乳腺癌;肝癌;胰腺癌;皮肤癌,特别是基底细胞癌和鳞状细胞癌;恶性黑素瘤;头颈癌,特别是恶性多形性腺瘤;肉瘤,特别是滑膜肉瘤和癌肉瘤;胆管癌;膀胱癌,特别是移行细胞癌和乳头状癌;肾癌,特别是肾细胞癌,包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌;结肠癌;小肠癌,包括回肠癌,特别是小肠腺癌和回肠腺癌;睾丸胚胎性癌;胎盘绒毛膜癌;宫颈癌;睾丸癌,特别是睾丸精原细胞瘤、睾丸畸胎瘤和胚胎性睾丸癌;子宫癌;生殖细胞肿瘤,例如畸胎瘤或胚胎性癌,特别是睾丸的生殖细胞肿瘤;及其转移形式。

22. 权利要求15至20中任一项所述的结合剂,其中所述密蛋白是密蛋白18.2并且所述癌细胞来自选自以下的癌症:胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌例如非小细胞肺癌(NSCLC)、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、胆囊癌、及其转移,克鲁肯贝格肿瘤、腹膜转移和/或淋巴结转移。

23. 权利要求4至22中任一项所述的结合剂,其中所述T细胞特异性抗原是CD3,并且VH(T)包含SEQ ID NO:5所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,和/或VL(T)包含SEQ ID NO:6所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成。

24. 权利要求4至21和23中任一项所述的结合剂,其中所述密蛋白是密蛋白6,并且VH(CLDN)包含SEQ ID NO:8所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,和/或VL(CLDN)包含SEQ ID NO:10所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成。

25. 权利要求4至21、23和24中任一项所述的结合剂,其中所述T细胞特异性抗原是CD3,所述密蛋白是密蛋白6,并且

-所述第一多肽包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

-所述第一多肽包含SEQ ID NO:15所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

-所述第一多肽包含SEQ ID NO:17所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:19所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;或者

-所述第一多肽包含SEQ ID NO:18所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片

段的变体或者由其组成,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:19所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成。

26. 权利要求4至20、22和23中任一项所述的结合剂,其中所述密蛋白是密蛋白18.2,并且(i) VH(CLDN) 包含SEQ ID NO:20所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,和/或VL (CLDN) 包含SEQ ID NO:22所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,或者(ii) VH(CLDN) 包含SEQ ID NO:21所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,和/或VL (CLDN) 包含SEQ ID NO:23所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成。

27. 权利要求4至20、22、23和26中任一项所述的结合剂,其中所述T细胞特异性抗原是CD3,所述密蛋白是密蛋白18.2,并且

-所述第一多肽包含SEQ ID NO:30所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且所述第二多肽包含由SEQ ID NO:32所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

-所述第一多肽包含SEQ ID NO:31所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:32所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

-所述第一多肽包含SEQ ID NO:33所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:35所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

-所述第一多肽包含SEQ ID NO:34所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:35所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

-所述第一多肽包含SEQ ID NO:36所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:37所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

-所述第一多肽包含SEQ ID NO:38所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:39所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

-所述第一多肽包含SEQ ID NO:40所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:41所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

-所述第一多肽包含SEQ ID NO:42所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:43所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成。

28. 核酸,其编码权利要求1至27中任一项所述的结合剂。

29. 核酸,其编码如权利要求4至27中任一项中所限定的第一多肽和/或第二多肽。

30. 权利要求28或29所述的核酸,其是载体形式或RNA形式。

31. 宿主细胞,其包含权利要求28至30中任一项所述的核酸。

32. 权利要求1至27中任一项所述的结合剂、权利要求28至30中任一项所述的核酸或权

利要求31所述的宿主细胞,其用作药物。

33. 权利要求1至27中任一项所述的结合剂、权利要求28至30中任一项所述的核酸或权利要求31所述的宿主细胞,其用于治疗或预防癌症。

34. 药物组合物,其包含权利要求1至27中任一项所述的结合剂、权利要求28至30中任一项所述的核酸或权利要求31所述的宿主细胞。

35. 治疗或预防癌症的方法,其包括向有此需要的对象施用权利要求1至27中任一项所述的结合剂、权利要求28至30中任一项所述的核酸、权利要求31所述的宿主细胞或权利要求34所述的药物组合物。

36. 权利要求33所述的结合剂、核酸或宿主细胞或者权利要求35所述的方法,其中所述癌症的细胞表达所述结合剂能够与之结合的密蛋白。

37. 权利要求36所述的结合剂、核酸、宿主细胞或方法,其中所述密蛋白是密蛋白6,并且所述癌症选自:膀胱癌;卵巢癌,特别是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤;肺癌,包括小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),特别是鳞状细胞肺癌和腺癌;胃癌;乳腺癌;肝癌;胰腺癌;皮肤癌,特别是基底细胞癌和鳞状细胞癌;恶性黑素瘤;头颈癌,特别是恶性多形性腺瘤;肉瘤,特别是滑膜肉瘤和癌肉瘤;胆管癌;膀胱癌,特别是移行细胞癌和乳头状癌;肾癌,特别是肾细胞癌,包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌;结肠癌;小肠癌,包括回肠癌,特别是小肠腺癌和回肠腺癌;睾丸胚胎性癌;胎盘绒毛膜癌;宫颈癌;睾丸癌,特别是睾丸精原细胞瘤、睾丸畸胎瘤和胚胎性睾丸癌;子宫癌;生殖细胞肿瘤,例如畸胎瘤或胚胎性癌,特别是睾丸的生殖细胞肿瘤;及其转移形式。

38. 权利要求36所述的结合剂、核酸、宿主细胞或方法,其中所述密蛋白是密蛋白18.2,并且所述癌症选自胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌例如非小细胞肺癌(NSCLC)、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、胆囊癌、及其转移,克鲁肯贝格肿瘤、腹膜转移和/或淋巴结转移。

## 用于治疗表达密蛋白之癌症疾病的与密蛋白6或密蛋白18.2和CD3结合的双特异性三价抗体

[0001] 本申请是申请号为201780056781.8的发明名称为“用于治疗表达密蛋白之癌症疾病的与密蛋白6或密蛋白18.2和CD3结合的双特异性三价抗体”的中国专利申请的分案申请,原申请是2017年09月20日提交的PCT国际申请PCT/EP2017/073773于2019年03月14日进入中国国家阶段的申请。

### 技术领域

[0002] 本申请涉及用于治疗表达密蛋白之癌症疾病的与密蛋白6或密蛋白18.2和CD3结合的双特异性三价抗体之领域。

### 背景技术

[0003] 密蛋白(claudin)是位于上皮和内皮的紧密连接内的整合膜蛋白(integral membrane protein)。预测密蛋白具有四个跨膜区段,具有两个胞外环,且N端和C端位于细胞质中。跨膜蛋白质的密蛋白(CLDN)家族在上皮和内皮紧密连接的维持中发挥关键的作用,并且还可能在细胞骨架的维持中以及细胞信号传到中发挥作用。

[0004] CLDN18以两种不同的剪接变体存在,其在小鼠和人中描述(Niimi, Mol.Cell.Biol.21:7380-90,2001)。剪接变体(Genbank登记号:剪接变体1(CLDN18.1):NP\_057453,NM\_016369和剪接变体2(CLDN18.2):NM\_001002026,NP\_001002026)具有约27.9/27.72kD的分子量。剪接变体CLDN18.1和CLDN18.2在包含第一跨膜(TM)区和环1的N端部分不同,而C端的主要蛋白质序列是相同的。

[0005] 在正常组织中,除了胃之外没有可检测的CLDN18.2表达,其中CLDN18.2仅在短寿命分化的胃上皮细胞上表达。CLDN18.2在恶性转化过程中维持,并因此经常在人胃癌细胞的表面上显示。此外,这种泛肿瘤抗原(pan-tumoral antigen)在食管癌、胰腺癌和肺腺癌中以显著水平异位激活。CLDN18.2蛋白还定位于胃癌腺癌的淋巴结转移和尤其是进入卵巢的远处转移(所谓的克鲁肯贝格肿瘤(Krukenberg tumor))。

[0006] CLDN6在一系列不同的人癌细胞中表达,而在正常组织中的表达限于胎盘。

[0007] 密蛋白(例如CLDN18.2和CLDN6)在癌症和正常细胞之间的差异表达、它们的膜定位和它们在绝大多数毒性相关的正常组织中的缺失使得这些分子成为用于癌症免疫治疗的有吸引力的靶标并且在癌症治疗中使用基于抗体的治疗剂以靶向密蛋白有望提供高水平的治疗特异性。

[0008] 本发明的一个目的是提供用于癌症疾病治疗的新的药剂和方法。

[0009] 构成本发明的基础的问题的解决方案基于产生结合剂的概念,所述结合剂包含对肿瘤相关密蛋白分子(即癌细胞)具有特异性的两个结合结构域。结合剂还包含对T细胞特异性抗原(例如CD3)具有特异性的结合结构域,其允许与T细胞结合并将T细胞拉入到复合体中,因此使其能够靶向T细胞对癌细胞的细胞毒性作用。该复合体的形成可独自诱导或与辅助细胞组合诱导细胞毒性T细胞中的信号传导,这导致细胞毒性介质的释放。

[0010] 我们首次报道了包含靶向密蛋白的两个结合结构域和靶向T细胞特异性抗原(例如CD3)的另一个结合结构域的结合剂可诱导强效的T细胞介导的裂解并且在治疗肿瘤疾病中有效。

## 发明内容

[0011] 本发明提供了包含至少三个结合结构域的结合剂,其中第一结合结构域与T细胞特异性抗原结合,并且第二结合结构域和第三结合结构域与密蛋白结合。本发明的结合剂可与T细胞(例如,通过接合CD3受体)和表达作为靶标被破坏的密蛋白的癌细胞结合。

[0012] 在一个实施方案中,结合剂包含六个抗体可变结构域,其中有至少三个结合结构域,其中至少两个结合结构域与密蛋白结合,并且至少一个结合结构域与T细胞特异性抗原结合。

[0013] 在一个实施方案中,第一、第二和第三结合结构域中的每一个包含免疫球蛋白重链可变结构域(VH)和免疫球蛋白轻链可变结构域(VL)。

[0014] 在一个实施方案中,第一结合结构域包含对T细胞特异性抗原具有特异性的免疫球蛋白重链可变结构域(VH)(VH(T))和对T细胞特异性抗原具有特异性的免疫球蛋白轻链可变结构域(VL)(VL(T)),并且第二结合结构域和第三结合结构域各自包含对密蛋白抗原具有特异性的免疫球蛋白重链可变结构域(VH)(VH(CLDN))和对密蛋白抗原具有特异性的免疫球蛋白轻链可变结构域(VL)(VL(CLDN))。

[0015] 在一个实施方案中,一个或多个结合结构域的所述重链可变结构域(VH)和对应的轻链可变结构域(VL)通过肽接头连接,特别是柔性肽接头,例如甘氨酸-丝氨酸肽接头。在一个实施方案中,肽接头包含氨基酸序列 $(G_4S)_x$ ,其中x是3、4、5或6。

[0016] 在一个实施方案中,一个或多个结合结构域的所述重链可变结构域(VH)和对应的轻链可变结构域(VL)具有Fab分子和/或scFv分子的形式。

[0017] 在一个实施方案中,第一结合结构域具有Fab分子的形式,和/或第二结合结构域和第三结合结构域具有scFv分子的形式。

[0018] 在一个实施方案中,本发明的结合剂是由两条多肽链构成的二聚体,其中第一多肽包含通过免疫球蛋白轻链恒定结构域(CL)与另外的VL结构域连接的scFv,并且第二多肽包含通过免疫球蛋白重链恒定结构域1(CH1)与另外的VH结构域连接的scFv。两条多肽链优选通过二硫键(disulfide bridge)连接在一起。二硫键优选在CL结构域中的Cys残基与CH1结构域中的Cys残基之间形成,使得在抗原结合构型中第一多肽的另外的VL结构域与第二多肽的另外的VH结构域缔合,使得结合剂整体包含三个抗原结合结构域。根据本发明,scFv部分中的VH和VL结构域优选通过肽接头连接,例如包含氨基酸序列 $(G_4S)_x$ 的肽接头,其中x是3、4、5或6,并且Fab链和scFv优选通过肽接头连接,例如包含氨基酸序列DVP $G_2$ S或SGPG $_3$ RS $(G_4S)_2$ 的肽接头。在一个实施方案中,scFv部分与密蛋白结合,并且Fab部分与T细胞特异性抗原结合。

[0019] 在一个实施方案中,第一结合结构域被Fab片段包含,并且第二和第三结合结构域各自被scFv包含,其中Fab片段的每条链与一个scFv连接,并且scFv优选在Fab片段的C端连接。

[0020] 在一个实施方案中,结合剂包含第一和第二多肽,所述第一和第二多肽包含对T细

胞特异性抗原具有特异性的VH结构域(VH(T))、对T细胞特异性抗原具有特异性的VL结构域(VL(T))、对密蛋白具有特异性的第一VH结构域(VH(CLDN))、对密蛋白具有特异性的第二VH结构域(VH(CLDN))、对密蛋白具有特异性的第一VL结构域(VL(CLDN))和对密蛋白具有特异性的第二VL结构域(VL(CLDN))，其中第一多肽和第二多肽缔合以形成结合剂。

[0021] 在一个实施方案中，结合剂包含：

[0022] (a) 第一多肽，其包含对T细胞特异性抗原具有特异性的VH结构域(VH(T))、对密蛋白具有特异性的VH结构域(VH(CLDN))和对密蛋白具有特异性的VL结构域(VL(CLDN))；以及

[0023] (b) 第二多肽，其包含对T细胞特异性抗原具有特异性的VL结构域(VL(T))、对密蛋白具有特异性的VH结构域(VH(CLDN))和对密蛋白具有特异性的VL结构域(VL(CLDN))，

[0024] 其中第一多肽和第二多肽缔合以形成结合剂。

[0025] 在一个实施方案中，第一多肽还包含免疫球蛋白重链恒定结构域1(CH1)，并且第二多肽还包含免疫球蛋白轻链恒定结构域(CL)，其中两个结构域能够缔合。

[0026] 在一个实施方案中，第一多肽和第二多肽通过CH1结构域与CL结构域之间的二硫键共价连接。

[0027] 在本发明的结合剂的一个实施方案中，在第一多肽和第二多肽中，VH结构域、VL结构域、CH1结构域和CL结构域从N端至C端以如下顺序排列：

[0028] -VH(T)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN)和VL(T)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN)；或

[0029] -VH(T)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN)和VL(T)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN)；或

[0030] -VH(T)-CH1-VH(CLDN)-VL-(CLDN)和VL(T)-CL-VL(CLDN)-VH-(CLDN)；或

[0031] -VH(T)-CH1-VL(CLDN)-VH-(CLDN)和VL(T)-CL-VH(CLDN)-VL-(CLDN)；或

[0032] -VH(CLDN)-CH1-VH(T)-VL(T)和VL(CLDN)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN)；或

[0033] -VH(CLDN)-CH1-VL(T)-VH(T)和VL(CLDN)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN)；或

[0034] -VH(CLDN)-CH1-VL(T)-VH(T)和VL(CLDN)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN)；或

[0035] -VH(CLDN)-CH1-VH(T)-VL(T)和VL(CLDN)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN)；或

[0036] -VH(CLDN)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN)和VL(CLDN)-CL-VH(T)-VL(T)；或

[0037] -VH(CLDN)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN)和VL(CLDN)-CL-VL(T)-VH(T)；或

[0038] -VH(CLDN)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN)和VL(CLDN)-CL-VH(T)-VL(T)；或

[0039] -VH(CLDN)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN)和VL(CLDN)-CL-VL(T)-VH(T)。

[0040] 在一个实施方案中，一条链的最N端VH结构域与另一条链的最N端VL结构域缔合，从而形成结合结构域，并且每条链内的每个VH-VL或VL-VH结构域形成一个结合结构域。

[0041] 在一个实施方案中，VH-VL或VL-VH结构域通过肽接头与CH1结构域或CL结构域连接，所述肽接头例如包含氨基酸序列DVPG<sub>2</sub>S或SGPG<sub>3</sub>RS(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>的肽接头。

[0042] 在一个实施方案中，VH和VL结构域通过肽接头连接以形成VH-VL或VL-VH结构域，所述肽接头例如包含氨基酸序列(G<sub>4</sub>S)<sub>x</sub>的肽接头，其中x是3、4、5或6。

[0043] 在本发明的结合剂中，对T细胞特异性抗原具有特异性的VH结构域(VH(T))和对T细胞特异性抗原具有特异性的VL结构域(VL(T))能够缔合以形成与T细胞特异性抗原结合的结合结构域。

[0044] 此外，在本发明的结合剂中，对密蛋白具有特异性的VH结构域(VH(CLDN))和对密蛋白具有特异性的VL结构域(VL(CLDN))能够缔合以形成与密蛋白结合的结合结构域。根据

本发明,对密蛋白具有特异性的VH结构域(VH(CLDN))和对密蛋白具有特异性的VL结构域(VL(CLDN))各自可相同或不同。在本发明的结合剂包含对密蛋白具有特异性的不同VH结构域(VH(CLDN)、VH(CLDN)\*)和/或对密蛋白具有特异性的不同VL结构域((VL(CLDN)、VL(CLDN)\*) )的情况下,VH(CLDN)和VL(CLDN)能够缔合以形成与密蛋白结合的第一结合结构域,并且VH(CLDN)\*和VL(CLDN)\*能够缔合以形成与密蛋白结合的第二结合结构域。

[0045] 在一个实施方案中,本发明的结合剂是双特异性二聚体结合剂。

[0046] 在一个实施方案中,T细胞特异性抗原在T细胞的表面上表达。

[0047] 在一个实施方案中,结合剂与T细胞上的T细胞特异性抗原的结合导致T细胞的增殖和/或活化。

[0048] 在一个实施方案中,T细胞特异性抗原是CD3。

[0049] 在一个实施方案中,第一结合结构域与CD3的 $\epsilon$ 链结合。

[0050] 在一个实施方案中,CD3在T细胞的表面上表达。在一个实施方案中,结合剂与T细胞上的CD3的结合导致T细胞的增殖和/或活化,其中所述T细胞优选释放细胞毒性因子,例如穿孔素和颗粒酶,并启动癌细胞的细胞溶解和凋亡。

[0051] 在一个实施方案中,密蛋白在癌细胞的表面上表达。

[0052] 在一个实施方案中,密蛋白选自密蛋白6和密蛋白18.2。

[0053] 在一个实施方案中,结合剂与密蛋白的细胞外结构域结合。

[0054] 在一个实施方案中,本发明的结合剂与存在于活细胞表面上的密蛋白的天然表位结合。在一个实施方案中,结合剂与密蛋白的第一胞外环结合。

[0055] 在一个实施方案中,与T细胞特异性抗原的结合和/或与密蛋白的结合是特异性结合。

[0056] 在一个实施方案中,结合剂诱导针对表达密蛋白的癌细胞的T细胞介导的细胞毒性。

[0057] 在一个实施方案中,结合剂以 $<10\text{nM}$ 或 $<1\text{nM}$ 或 $<500\text{pM}$ 或 $<250\text{pM}$ 或 $<100\text{pM}$ 或 $<50\text{pM}$ 的 $\text{EC}_{50}$ 诱导针对表达密蛋白的癌细胞的T细胞介导的细胞毒性。

[0058] 在一个实施方案中,密蛋白是密蛋白6,并且癌细胞来自选自以下的癌症:膀胱癌;卵巢癌,特别是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤;肺癌,包括小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),特别是鳞状细胞肺癌和腺癌;胃癌;乳腺癌;肝癌;胰腺癌;皮肤癌,特别是基底细胞癌和鳞状细胞癌;恶性黑素瘤;头颈癌,特别是恶性多形性腺瘤;肉瘤,特别是滑膜肉瘤和癌肉瘤;胆管癌;膀胱癌,特别是移行细胞癌和乳头状癌;肾癌,特别是肾细胞癌,包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌;结肠癌;小肠癌,包括回肠癌,特别是小肠腺癌和回肠腺癌;睾丸胚胎性癌(testicular embryonal carcinoma);胎盘绒毛膜癌;宫颈癌;睾丸癌,特别是睾丸精原细胞瘤、睾丸畸胎瘤和胚胎性睾丸癌;子宫癌;生殖细胞肿瘤,例如畸胎瘤或胚胎性癌,特别是睾丸的生殖细胞肿瘤;及其转移形式。

[0059] 在一个实施方案中,密蛋白是密蛋白18.2并且癌细胞来自选自以下的癌症:胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC))、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、胆囊癌、及其转移,克鲁肯贝格肿瘤、腹膜转移和/或淋巴结转移。

[0060] 在一个实施方案中,T细胞特异性抗原是CD3,并且VH(T)包含SEQ ID NO:5所示氨

氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,和/或VL(T)包含SEQ ID NO:6所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成。

[0061] 在一个实施方案中,密蛋白是密蛋白6,并且VH(CLDN)包含SEQ ID NO:8所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,和/或VL(CLDN)包含SEQ ID NO:10所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成。

[0062] 在一个实施方案中,T细胞特异性抗原是CD3,密蛋白是密蛋白6,并且

[0063] -第一多肽包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且第二多肽包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

[0064] -第一多肽包含SEQ ID NO:15所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且第二多肽包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

[0065] -第一多肽包含SEQ ID NO:17所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且第二多肽包含SEQ ID NO:19所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;或者

[0066] -第一多肽包含SEQ ID NO:18所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且第二多肽包含SEQ ID NO:19所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成。

[0067] 在一个实施方案中,密蛋白是密蛋白18.2,并且(i)VH(CLDN)包含SEQ ID NO:20所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,和/或VL(CLDN)包含SEQ ID NO:22所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,或者(ii)VH(CLDN)包含SEQ ID NO:21所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,和/或VL(CLDN)包含SEQ ID NO:23所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成。

[0068] 在一个实施方案中,T细胞特异性抗原是CD3,密蛋白是密蛋白18.2,并且

[0069] -第一多肽包含SEQ ID NO:30所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且第二多肽包含SEQ ID NO:32所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

[0070] -第一多肽包含SEQ ID NO:31所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且第二多肽包含SEQ ID NO:32所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

[0071] -第一多肽包含SEQ ID NO:33所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且第二多肽包含SEQ ID NO:35所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

[0072] -第一多肽包含SEQ ID NO:34所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且第二多肽包含SEQ ID NO:35所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

[0073] -第一多肽包含SEQ ID NO:36所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片

段的变体或者由其组成,并且第二多肽包含SEQ ID NO:37所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

[0074] -第一多肽包含SEQ ID NO:38所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且第二多肽包含SEQ ID NO:39所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

[0075] -第一多肽包含SEQ ID NO:40所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且第二多肽包含SEQ ID NO:41所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成;

[0076] -第一多肽包含SEQ ID NO:42所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成,并且第二多肽包含SEQ ID NO:43所示氨基酸序列或其片段或者所述氨基酸序列或片段的变体或者由其组成。

[0077] 在不同的实施方案中,本发明的结合剂或本发明的结合剂的一条或更多条多肽链包含或不包含分泌信号,例如N端分泌信号,特别是免疫球蛋白,例如IgG分泌信号,例如序列MGWSCIIILFLVATATGVHS,和/或包含或不包含标签,特别是C端标签,例如His-标签,特别是序列Gly-Gly-Ser-(His)<sub>6</sub>或(His)<sub>6</sub>,或Strep-标签。

[0078] 本发明还提供了编码本发明结合剂的核酸。

[0079] 本发明还提供了编码如本文中所限定的第一多肽和/或第二多肽的核酸。

[0080] 在一个实施方案中,本发明的核酸是载体形式或RNA形式。

[0081] 在一个实施方案中,本发明的核酸是重组核酸。

[0082] 本发明还提供了包含本发明核酸的宿主细胞。

[0083] 本发明还提供了本发明的结合剂、本发明的核酸或本发明的宿主细胞,其用作药物。

[0084] 本发明还提供了本发明的结合剂、本发明的核酸或本发明的宿主细胞,其用于治疗或预防癌症。

[0085] 本发明还提供了药物组合物,其包含本发明的结合剂、本发明的核酸或本发明的宿主细胞。

[0086] 在一个实施方案中,药物组合物还包含可药用载体和/或赋形剂。

[0087] 本发明还提供了治疗疾病的方法,其包括向有此需要的对象施用本发明的结合剂、本发明的核酸、本发明的宿主细胞或本发明的药物组合物。在一个实施方案中,所述疾病是癌症。

[0088] 本发明还提供了治疗或预防癌症的方法,其包括向有此需要的对象施用本发明的结合剂、本发明的核酸、本发明的宿主细胞或本发明的药物组合物。

[0089] 本发明还提供了本发明的结合剂、本发明的核酸、本发明的宿主细胞或本发明的药物组合物用于制备药物的用途。在一个实施方案中,所述药物用于治疗癌症。

[0090] 在一个实施方案中,所述癌症的细胞表达所述结合剂能够与之结合的密蛋白。

[0091] 在一个实施方案中,所述密蛋白是密蛋白6,并且所述癌症选自:膀胱癌;卵巢癌,特别是卵巢腺癌和卵巢畸胎癌;肺癌,包括小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),特别是鳞状细胞肺癌和腺癌;胃癌;乳腺癌;肝癌;胰腺癌;皮肤癌,特别是基底细胞癌和鳞状细胞癌;恶性黑素瘤;头颈癌,特别是恶性多形性腺瘤;肉瘤,特别是滑膜肉瘤和癌肉瘤;胆

管癌;膀胱癌,特别是移行细胞癌和乳头状癌;肾癌,特别是肾细胞癌,包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌;结肠癌;小肠癌,包括回肠癌,特别是小肠腺癌和回肠腺癌;睾丸胚胎性癌;胎盘绒毛膜癌;宫颈癌;睾丸癌,特别是睾丸精原细胞瘤、睾丸畸胎瘤和胚胎性睾丸癌;子宫癌;生殖细胞肿瘤,例如畸胎瘤或胚胎性癌,特别是睾丸的生殖细胞肿瘤;及其转移形式。

[0092] 在一个实施方案中,所述密蛋白是密蛋白18.2并且所述癌症选自胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC))、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、胆囊癌、及其转移,克鲁肯贝格肿瘤、腹膜转移和/或淋巴结转移。

[0093] 本发明还提供了如本文中所述的结合剂、核酸或宿主细胞,其用于本文中所述的治疗方法。在一个实施方案中,本发明提供了如本文中所述的药物组合物,其用于本文中所述的治疗方法。

[0094] 根据本发明,密蛋白18.2优选具有根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列,并且密蛋白6优选具有根据SEQ ID NO:2或3的氨基酸序列。

[0095] 本发明的其他特征和优点将通过以下详细描述和权利要求而变得明显。

## 附图说明

[0096] 图1:示出靶向TAACL6的DNA构建体和bstb蛋白的模块化方案。

[0097] (A) DNA水平上的bstb链的设计。(B) bstb分子的示意模型。在bstb\_369/367中, $C_H1$ 来源于IgG1;在bstb\_371/367中, $C_H1$ 来源于IgG2。

[0098] C表示恒定区域;CMV,巨细胞病毒启动子;Fd,Fab(抗原结合片段)的可消化片段/重链部分;H,重链;His, $6 \times$  His-标签;L,轻链;L1,SGPG<sub>3</sub>RS(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>接头;L2,DVPG<sub>2</sub>S接头;L3,(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>接头;S-S,二硫键;scFv,单链可变片段;Sec,分泌信号;Strp,Strep-标签;V,可变结构域。图2:从细胞培养上清液中纯化带标签和无标签的bstb蛋白。

[0099] 用相应的bstb构建体瞬时转染Expi293F<sup>TM</sup>细胞。转染之后7天收获上清液并进行纯化。(A) 示出通过Ni-NTA亲和色谱法(固定化金属离子亲和色谱-IMAC)带标签的bstb的第一纯化步骤的色谱图。将y轴上的mAU(毫吸光度单位)相对于x轴上的体积(ml)作图。左侧,bstb\_369/367的IMAC峰,右侧,bstb\_371/367的IMAC峰。各自的右峰包含HMW物质,并且各自的中间峰包含单体物质。各自的左峰显示出杂质。1) 指定合并为主峰的级分,其主要包含单体物质,2) 合并为HMW物质的级分。(B) 显示带标签的bstb的第二纯化步骤的色谱图。对IMAC主峰合并物进行Strep-Tactin<sup>®</sup>亲和色谱法。左图,bstb\_369/367的峰;右图,bstb\_371/367的峰。(C) 通过尺寸排阻色谱法(SEC)分离bstb\_369/367的HMW物质和单体物质。合并的HMW和合并的单体级分由方括号指定。(D) 纯化之后无标签的bstb\_5726/5725的SE-HPLC分析。将y轴上的mAU(毫吸光度单位)相对于x轴上的时间(分钟)作图。

[0100] Bstb表示双特异性TriMAB;HMW,高分子量物质;LMW,低分子量物质。

[0101] 图3:CLDN6x CD3蛋白bstb\_369/367的SDS-PAGE分析。

[0102] 通过IMAC纯化瞬时表达bstb\_369/367的Expi293F<sup>TM</sup>细胞的上清液。HMW物质从主峰单独洗脱。随后对主峰物质进行Strep-Tactin<sup>®</sup>亲和色谱法。通过SEC进一步分离洗脱的合并物以收获高度单体的bstb。将等份的细胞培养上清液(参比和不同的纯化步骤)在非还原

(左)和还原(右)条件下上样至4-15%Tris-甘氨酸免染凝胶(stain-free gel)上。(A)通过荧光在免染凝胶上显现条带。(B)使用抗His-标签检测抗体(上部印迹)或StrepMAB检测抗体的Western印迹分析。左侧的箭头表示非还原的单体和HMW,右侧的箭头表示还原的bstb链。Fd表示Fab(抗原结合片段)的可消化片段/重链部分;HMW,高分子量物质;His,6×His-标签;IMAC,固定化金属亲和色谱;L,轻链;scFv,单链可变片段;SEC,尺寸排阻色谱;Strp,Strep-标签。

[0103] 图4:确定由CLDN6x CD3蛋白bstb\_369/367和bstb\_371/367介导的比裂解(specific lysis)的体外细胞毒性测定。

[0104] 在基于萤光素酶的细胞毒性测定中,以5:1的效应物/靶标比例使用人PBMC作为效应细胞并且人稳定萤光素酶转导的癌细胞作为靶细胞,以确定比浓度依赖性裂解(specific concentration-dependent lysis)。CLDN6<sup>+</sup>细胞系PA-1(卵巢畸胎瘤)和/或OV-90(卵巢癌)作为阳性靶标,并且CLDN6<sup>-</sup>细胞系MDA-MB-231(乳腺癌)作为阴性靶标。示出了包括标准差的一式三份的平均值。半数最大裂解值(EC50)显示在相应的图下方。(A)孵育48小时之后由CLDN6<sup>+</sup>卵巢癌细胞OV-90的bstb\_369/367和bstb\_371/367介导的比裂解(标准斜率)。(B)由bstb\_369/367和CLDN6x CD3特异性bi-(scFv)<sub>2</sub>参照蛋白介导的比裂解(标准斜率)的比较。细胞系和孵育时间在单个图中显示。(C)bstb\_369/367的比裂解(可变斜率)和5%HMW对bstb\_369/367活性的影响。左:与PA-1一起孵育16小时;右:与OV-90一起孵育48小时。实线指定了单体bstb\_369/367的裂解曲线,虚线指定了包含5%HMW物质的单体bstb\_369/367的裂解曲线。(D)孵育48小时之后OV-90的比裂解(标准斜率)。左图:由bstb\_369/367以及作为单体和掺有5%HMW的无标签类似物bstb\_5726/5725介导的裂解。右图:由作为参照的bstb\_369/367以及由作为单体和掺有5%HMW的携带CH1(IgG2)的变体bstb\_5727/5725介导的裂解。

[0105] Bstb表示双特异性TriMAB;bi-(scFv)<sub>2</sub>,双特异性单链可变片段;EC50,半数最大有效浓度;HMW,高分子量物质。

[0106] 图5:由CLDN6x CD3蛋白bstb\_369/367和bstb\_371/367介导的靶标依赖性T细胞调节

[0107] 使用CLDN6<sup>+</sup>OV-90和PA-1和CLDN6<sup>-</sup>MDA-MB-231癌细胞系作为靶细胞。人PBMC以5:1的E:T比例作为效应细胞。以100ng/ml的浓度应用抗CD3IgG2a OKT3作为活化对照。用DPBS孵育模拟样品(mock sample)以从分析的样品值中减去背景信号。使用不含靶细胞的PBMC作为另外的特异性对照。所有样品以24孔形式一式两份地设置。施用升高浓度的bstb蛋白bstb\_369/367或bstb\_371/367(0.005至5000ng/ml)。(A)T细胞活化:共孵育(co-incubation)48小时之后收获PBMC,并用抗CD5-PE-Cy7、抗CD25-PE、抗CD69-APC和eFluor506标记以通过流式细胞术分析活T细胞的活化。(B)T细胞增殖:在测定设置之前对人PBMC进行CFSE染色。共孵育72小时之后收获PBMC,并用抗CD5-APC和eFluor506标记以排除非淋巴细胞和死细胞。通过流式细胞术分析了表明T细胞增殖的CFSE信号的降低。

[0108] Bstb表示双特异性TriMAB;ctrl,对照。

[0109] 图6:不同CLDN6x CD3双特异性抗体与肿瘤特异性抗原CLDN6的结合。

[0110] 通过流式细胞术检测浓度范围为9.77ng/ml至10μg/ml的bi-(scFv)<sub>2</sub>参照、bstb\_369/367和bstb\_5726/5725对内源性表达CLDN6的PA-1人癌细胞的相对结合亲和力。用蛋白

L-FITC (4 $\mu$ g/ml) 检测一抗。数据描述为平均值 $\pm$ 标准差 (n=2个重复)。(B) 对于单体bstb\_5726/5725或掺有约3%或5%HMW物质的单体bstb\_5726/5725(浓度范围为9.77ng/ml至10 $\mu$ g/ml),用流式细胞术分析高分子量(HMW)物质对单体bstb\_5726/5725结合的影响。用蛋白L-FITC (4 $\mu$ g/ml) 检测一抗。数据描述为平均值 $\pm$ 标准差 (n=2个重复)。Bstb表示双特异性TriMAB;MFI,中位荧光强度。图7:CLDN6x CD3蛋白bstb\_369/367在小鼠异种移植肿瘤模型中的体内效力。

[0111] 使用雄性和雌性免疫缺陷NSG小鼠。(A) 注射计划方案。用CLDN6<sup>+</sup>人卵巢癌细胞OV-90作为靶细胞皮下接种小鼠,并用人PBMC作为效应细胞进行腹膜内(i.p.)移植。治疗开始于每组的平均肿瘤体积,并且每周i.p.进行3次。第1组(G1)接受载剂缓冲液DPBS,第2组(G2)接受31 $\mu$ g/kg的低剂量bstb\_369/367,且第3组(G3)接受308 $\mu$ g/kg的更高剂量。(B) 所有小鼠和组随时间的肿瘤生长。在由边框突出显示的时间段内i.p.施用治疗。顶部,载剂组G1;左下,低bstb\_369/367剂量组G2;右下方,较高的bstb\_369/367剂量组G3。每条线代表单独的小鼠。(C) 从治疗开始当天直至安乐死日的所有组的Kaplan-Meier存活图。下表通过对数秩(Mantel-Cox)检验显示了每组的中位存活天数以及G2和G3与G1相比的存活的显著性。

[0112] Bstb表示双特异性TriMAB;d,天;G,组;GVHD,移植物抗宿主病;i.p.,腹膜内;PBMC,外周血单个核细胞;s.c.,皮下。

[0113] 图8:CLDN6x CD3蛋白bstb\_369/367的体内药动学的估计。

[0114] 在第0天将5mg/kg bstb\_369/367 i.p.注射到雌性免疫缺陷的NSG小鼠中。注射之前DPBS注射("0h")作为对照。注射之后0.25h、1h、2h、3h、6h和8h收获血浆。通过ELISA检测Bstb\_369/367血浆浓度。浓度在y轴上以对数标度绘制。每个点表示三只小鼠的具有标准差的平均值。

[0115] i.p.表示腹膜内。

[0116] 图9:在小鼠异种移植肿瘤模型中用CLDN6x CD3-bstb蛋白bstb\_5726/5725的体内剂量发现。

[0117] 用CLDN6<sup>+</sup>人卵巢癌细胞OV-90作为靶细胞皮下接种雄性和雌性免疫缺陷NSG小鼠,并用人PBMC作为效应细胞进行腹膜内(i.p.)移植。治疗开始于每组的平均肿瘤体积,并且每周i.p.进行3次。(A) 注射计划方案。(B) 肿瘤生长图。组的给药(n=6)如单个图中所示。对照组G7(n=8)接受DPBS。这些图显示所有小鼠和组随时间的肿瘤生长。治疗周期用边框突出显示。每条线代表单独的小鼠(小鼠ID=BIO-####)。

[0118] Bstb表示双特异性TriMAB;DPBS,Dulbecco磷酸盐缓冲盐水;i.p.,腹膜内;PBMC,外周血单个核细胞;s.c.,皮下。

[0119] 图10:示出靶向TAACLDN18.2的DNA构建体和bstb蛋白的模块化方案。

[0120] (A) DNA水平上的bstb链的设计。抗CLDN18.2-scFv以VH-VL顺序(上方案)或以VL-VH顺序(下方案)进行取向。设计了具有和不具有("+/-")二硫键(S-S)的构建体。(B) 以V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>或V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>顺序的具有抗CLDN18.2-scFv的示例性bstb分子的理论模型,其在scFv部分中具有标签但没有二硫键(S-S)(顶部),或者没有标签但具有S-S(底部)。C<sub>H</sub>1来源于IgG1或IgG2。

[0121] C表示恒定区;CMV,巨细胞病毒启动子;Fd,Fab(抗原结合片段)的可消化片段/重链部分;H,重链;His,6 $\times$ His-标签;L,轻链;L1,SGPG<sub>3</sub>RS(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>接头;L2,DVPG<sub>2</sub>S接头;L3,

(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>接头;L4,(G<sub>4</sub>S)<sub>5</sub>接头;S-S,二硫键;scFv,单链可变片段;Sec,分泌信号;Strp,Strep-标签;V,可变结构域。

[0122] 图11:比较由CLDN18.2 x CD3-bstb蛋白介导的比裂解的体外细胞毒性测定。

[0123] 在基于荧光素酶的细胞毒性测定中,以5:1的效应物/靶标比例使用人PBMC作为效应细胞和人稳定荧光素酶转导的癌细胞作为靶细胞。使用IMAC和**Strep-Tactin**<sup>®</sup>纯化的bstb受试物,而无需通过SEC进一步富集单体物质。左图:孵育48小时之后由bstb\_5730/5728、bstb\_5731/5729、bstb\_5732/5728和bstb\_5733/5729介导的CLDN18.2<sup>+</sup>胃癌细胞NUGC-4\_hCLDN18.2的比浓度依赖性裂解。右图:CLDN18.2<sup>-</sup>对照细胞系MDA-MB-231的裂解。显示了包括标准差的一式三份的平均值。

[0124] Bstb表示双特异性TriMAB。

[0125] 图12:纯化之后不同CLDN18.2 x CD3-bstb蛋白的SE-HPLC分析。

[0126] 用bstb\_5745/5747、bstb\_5749/5751、bstb\_5746/5748或bstb\_5750/5752构建体瞬时转染Expi293F<sup>™</sup>细胞。转染之后7天收获上清液并进行纯化。(A)纯化之后(下图)的bstb\_5745/5747(上图)和bstb\_5749/5751(下图)的SE-HPLC分析。将y轴上的mAU(毫吸光度单位)相对于x轴上的时间(分钟)作图。bstb\_5749/5751中的单体含量强烈提高,其在抗CLDN18.2scFv部分内含有另外的二硫键。(B)纯化之后(下图)的bstb\_5746/5748(上图)和bstb\_5750/5752(下图)的SE-HPLC分析。将y轴上的mAU(毫吸光度单位)相对于x轴上的时间(分钟)作图。bstb\_5749/5751中的单体含量强烈提高,其在抗CLDN18.2scFv部分内含有另外的二硫键。

[0127] Bstb表示双特异性TriMAB;HMW,高分子量物质;LMW,低分子量物质。

[0128] 图13:比较由包含高度单体二硫键的CLDN18.2 x CD3-bstb和bi-(scFv)<sub>2</sub>蛋白介导的比裂解的体外细胞毒性测定。

[0129] 在基于荧光素酶的细胞毒性测定中,以5:1的效应物/靶标比例使用人PBMC作为效应细胞和人稳定荧光素酶转导的CLDN18.2<sup>+</sup>胃癌细胞NUGC-4\_hCLDN18.2作为靶细胞。由SEC分离的单体bstb受试物及其bi-(scFv)<sub>2</sub>蛋白质类似物以10点的5倍系列稀释使用。(A)孵育48小时之后由bstb\_5749/5751和bstb\_5750/5752(左图)以及由bi-scFv\_5506和bi-scFv\_5538(右图)介导的比浓度依赖性裂解。EC50值总结在下表中。“板参照”的EC50值用于归一化。(B)在相对于“板参照”进行归一化之后二价bstb与相关的bi-(scFv)<sub>2</sub>类似物相比的倍数差异。相关的bi-(scFv)<sub>2</sub>EC50值设定为1用于计算。

[0130] Bi-scFv表示双特异性单链可变片段;bstb,双特异性TriMAB;EC50,半数最大有效浓度。

[0131] 图14:示出编码CLDN6x CD3bstb的RNA构建体的模块化方案。

[0132] RNA水平上的bstb Fd-(顶部)和L-链(底部)的设计。

[0133] C表示恒定区域;CMV,巨细胞病毒启动子;Fd,Fab(抗原结合片段)的可消化片段/重链部分;H,重链;His,6×His-标签;L,轻链;L1,SGPG<sub>3</sub>RS(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>接头;L2,DVPG<sub>2</sub>S接头;L3,(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>接头;S-S,二硫键;scFv,单链可变片段;Sec,分泌信号;Strp,Strep-标签;V,可变结构域。图15:生产细胞中IVT-mRNA编码的CLDN6x CD3bstb\_435/434和bstb\_436/434的Western印迹分析。

[0134] 通过电穿孔用相等IVT-mRNA量的Fd-链和L-链或仅用H<sub>2</sub>O(模拟)瞬时转染人慢性

髓性白血病细胞系K-562。在电穿孔之后48小时收获K-562上清液,并产生细胞裂解物。作为参照,将纯化的蛋白质类似物bstb\_369/367 (A) 或bstb\_371/367 (B) 作为单体和HMW制剂上样到凝胶上。进行梯度SDS-PAGE和Western印迹分析以检测经翻译和纯化的蛋白质产物。

[0135] 通过抗6×His-标签HRP (Fd-部分) 和抗-Strep-MAB-HRP (L-部分) 在K-562上清液和细胞裂解物中检测这两种bstb变体 ((A) bstb\_435/434, (B) bstb\_436/434)。抗-β-肌动蛋白免疫印迹用作细胞裂解物的上样对照。如在所附的样品上样表中所示,在非还原和还原条件下装载样品。箭头表示目的蛋白质条带。(A) bstb\_435/434, (B) bstb\_436/434。在(C) 中,在还原条件下用抗6×His-标签HRP和抗-Strep-MAB-HRP的混合物检测这两种bstb变体,以显现抗体衍生物的异二聚体状态。

[0136] Bstb表示双特异性TriMAB;Fd,Fab (抗原结合片段) 的可消化片段/重链部分;His, 6×His-标签;HMW,高分子量物质;HRP,辣根过氧化物酶;L,bstb的轻链部分;scFv,单链可变片段;SN,上清液。

[0137] 图16:确定由CLDN6x CD3bstb\_435/434和bstb\_436/434介导的比裂解的体外细胞毒性测定。

[0138] 在基于萤光素酶的细胞毒性测定中,以5:1的效应物/靶标比例使用人PBMC作为效应细胞和人稳定萤光素酶转导的癌细胞作为靶细胞。包含RNA编码的bstb\_435/434或bstb\_436/434的K-562SN以7点的5倍系列稀释进行施用。示出了在孵育48小时之后由CLDN6<sup>+</sup>卵巢癌细胞OV-90的bstb\_435/434和bstb\_436/434介导的比浓度依赖性裂解。CLDN6<sup>-</sup>乳腺癌细胞MDA-MB-231用作阴性对照。示出了包括标准差的一式三份的平均值。

[0139] Bstb表示双特异性TriMAB;EC50,半数最大有效浓度。

[0140] 图17:CLDN6x CD3RNA和蛋白质bstb以及bi-(scFv)<sub>2</sub>在小鼠异种移植肿瘤模型中的体内效力的比较。

[0141] 使用雄性(黑色符号)和雌性(白色符号)免疫缺陷NSG小鼠。(A) 注射计划方案。用CLDN6<sup>+</sup>人卵巢癌细胞OV-90作为靶细胞皮下(s.c.)接种小鼠,并用人PBMC作为效应细胞腹腔内(i.p.)植入。治疗开始于每组的平均肿瘤体积,并且每周静脉内(i.v.)进行一次。第1组(G1)接受RNA对照复合体(TransIT中的萤光素酶RNA),G2接受bstb RNA复合体并且G3接受bi-(scFv)<sub>2</sub>RNA复合体。每次注射包含总计3μg RNA。G4-6用作蛋白质对照/参照组:G4接受载剂缓冲液(蛋白质配制缓冲液),G5接受100μg/kg bstb参照并且G6接受200μg/kg bi-(scFv)<sub>2</sub>参照。(B) 所有小鼠和组随时间的肿瘤生长。如箭头所示i.v.施用治疗。每组治疗在图表标题中指定。每条线代表单独的小鼠。(C) 用对照RNA(G1)、bstb RNA(G2)或bi-(scFv)<sub>2</sub>RNA(G3)处理的小鼠的异种移植肿瘤组织浸润的人T细胞的流式细胞术分析。每个符号代表单独的小鼠,将每组的平均值连线。符号与(B)一致。

[0142] bi-scFv表示双特异性单链片段;bstb,双特异性TriMAB;d,天;G,组;GVHD,移植物抗宿主病;i.p.,腹腔内;i.v.,静脉内;PBMC,外周血单个核细胞;s.c.,皮下。

[0143] 图18:根据IMGT命名法的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>氨基酸序列。

[0144] 示出了在此处描述的bstb分子中使用的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域的标准单字母代码氨基酸序列。A) 抗CLDN18.2和抗CLDN6的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>序列,B) 抗-CD3的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>序列。

[0145] CDR表示互补决定区;FR,框架区;IMGT,国际ImMunoGeneTics信息系统;VH,可变重链;VL,可变轻链。

## 具体实施方式

[0146] 虽然在下文中对本发明进行了详细描述,但是应理解,本发明不局限于本文中所述的具体方法、方案和试剂,因为这些方法、方案和试剂可以改变。还应理解,本文中使用的术语仅出于描述具体实施方案的目的,而不旨在限制本发明的范围,本发明的范围将由所附权利要求限定。除非另有指明,否则本文中使用的全部技术和科学术语的含义与本领域普通技术人员通常所理解的含义相同。

[0147] 在下文中,将对本发明的要素进行描述。这些要素伴随具体实施方案列举,但是,应理解,它们可以以任何方式及任何数目组合从而形成另外的实施方案。多方面描述的实施例及优选实施方案不应被解释为将本发明仅局限于明确描述的实施方案。该描述应理解为支持和涵盖将明确描述的实施方案与任何数目的所公开的和/或优选的要素组合的实施方案。此外,应认为本申请所述全部要素的任何排列和组合均由本申请说明书所公开,除非上下文中另有指明。

[0148] 优选地,本文中使用的术语如“*A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)*”, H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl 编, *Helvetica Chimica Acta*, CH-4010 Basel, Switzerland (1995) 中所描述进行定义。

[0149] 除非另有指明,否则本发明的实施将采用本领域文献(参见例如 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, J. Sambrook 等编, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989) 中所解释的化学、生物化学、细胞生物学、免疫学和重组DNA技术的常规方法。

[0150] 在整个说明书和随后的权利要求书中,除非上下文中另外要求,否则词语“包括/包含”及其变化形式将被理解为意指包括所陈述的成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,但不排除任何其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,尽管在一些实施方案中,这样的其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组可被排除,即,主题在于包括所陈述的成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组。除非本文中另外指明或者与上下文明显矛盾,否则描述本发明的上下文中(尤其是在权利要求书的上下文中)使用的没有数量词修饰的名词表示一个/种或更多个/种。本文中数值范围的记载仅旨在作为单独地指落入该范围内之各独立值的速记方法。除非本文中另外指明,否则各单独的值均并入说明书中,如同其在本文中单独记载。除非本文中另外指明或者与上下文明显相矛盾,否则可以以任何合适的顺序进行本文中所描述的所有方法。除非另外要求,否则本文中提供的任意和全部实施例或示例性语言(例如,“例如”)的使用仅旨在更好地举例说明本发明,而并不对本发明的范围进行限制。本说明书中的任何语言都不应当被解释为表示对实施本发明而言必要的任何非要求保护之要素。

[0151] 本说明书通篇中引用了若干篇文献。本文中所引用的每篇文献(包括全部专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、指南等),无论是在上文中的还是在下文中的,均通过引用以其整体并入本文。本文中的任何内容都不应当被解释为承认本发明无权作为在先发明而先于这些公开内容。

[0152] 密蛋白是紧密连接中最重要组分的一个蛋白质家族,在紧密连接中,密蛋白建立了控制上皮细胞之间的细胞间空隙中分子流动的细胞旁屏障。密蛋白是4次跨膜的跨膜蛋白,N端和C端均位于细胞质中。第一胞外环(称为EC1或ECL1)平均由53个氨基酸组成,而第

二胞外环(称为EC2或ECL2)由约24个氨基酸组成。密蛋白家族的细胞表面蛋白质(例如CLDN6和CLDN18.2)在多种来源的肿瘤中表达,并且由于其选择性表达(在毒性相关的正常组织中不表达)和定位于质膜而特别适合作为与抗体介导的癌症免疫疗法相关的靶结构。

[0153] 在本发明的上下文中,优选的密蛋白是CLDN6和CLDN18.2。已经鉴定CLDN6和CLDN18.2在肿瘤组织中差异表达,其中表达CLDN18.2的唯一正常组织是胃,并且表达CLDN6的唯一正常组织是胎盘。

[0154] CLDN18.2在胃黏膜的分化的上皮细胞中的正常组织中选择性表达。CLDN18.2在多种来源的癌症中表达,例如胰腺癌、食管癌、胃癌、支气管癌、乳腺癌和ENT肿瘤。CLDN18.2是预防和/或治疗原发性肿瘤的有价值的靶标,所述肿瘤例如胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC))、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌和胆囊癌,及其转移,特别是胃癌转移,例如克鲁肯贝格肿瘤、腹膜转移和淋巴结转移。

[0155] 已发现CLDN6在例如,卵巢癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、黑素瘤、头颈癌、肉瘤、胆管癌、肾细胞癌和膀胱癌中表达。CLDN6是用于预防和/或治疗以下癌症的特别优选的靶标:卵巢癌(特别是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤)、肺癌(包括小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),特别是鳞状细胞肺癌和腺癌)、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌(特别是基底细胞癌和鳞状细胞癌)、恶性黑素瘤、头颈癌(特别是恶性多形性腺瘤)、肉瘤(特别是滑膜肉瘤和癌肉瘤)、胆管癌、膀胱癌(特别是移行细胞癌和乳头状癌)、肾癌(特别是肾细胞癌,包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌)、结肠癌、小肠癌(包括回肠癌,特别是小肠腺癌和回肠腺癌)、睾丸胚胎性癌、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌、睾丸癌(特别是睾丸精原细胞瘤、睾丸畸胎瘤和胚胎性睾丸癌)、子宫癌、生殖细胞肿瘤(例如畸胎瘤或胚胎性癌,特别是睾丸的生殖细胞肿瘤),及其转移形式。在一个实施方案中,与CLDN6表达相关的癌症疾病选自卵巢癌、肺癌、转移性卵巢癌和转移性肺癌。优选地,卵巢癌是上皮癌或腺癌。优选地,肺癌是上皮癌或腺癌,且优选细支气管癌,例如细支气管癌或细支气管腺癌。

[0156] 术语“密蛋白”或“CLDN”包括CLDN18.2和CLDN6。优选地,密蛋白是人密蛋白。

[0157] 术语“密蛋白18”或“CLDN18”包括任何变体,包括密蛋白18剪接变体1(密蛋白18.1(CLDN18.1))和密蛋白18剪接变体2(密蛋白18.2(CLDN18.2))。

[0158] 术语“密蛋白18.2”或“CLDN18.2”优选涉及人CLDN18.2,并且特别涉及包含根据序列列表的SEQ ID NO:1的氨基酸序列或所述氨基酸序列的变体、优选由其组成的蛋白质。CLDN18.2的第一胞外环优选包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的第27至81位氨基酸,更优选第29至78位氨基酸。CLDN18.2的第二胞外环优选包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的第140至180位或第144至167位氨基酸。所述第一和第二胞外环优选形成CLDN18.2的胞外部分。

[0159] 术语“密蛋白6”或“CLDN6”优选涉及人CLDN6,并且特别涉及包含序列列表的SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸序列或所述氨基酸序列的变体、优选由其组成的蛋白质。CLDN6的第一胞外环优选包含SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列或SEQ ID NO:3中所示氨基酸序列的第28至80位或第29至81位氨基酸,更优选第28至76位氨基酸。CLDN6的第二胞外环优选包含SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列或SEQ ID NO:3中所示氨基酸序列的第138至160位氨基酸,优选第141至159位氨基酸,更优选第145至157位氨基酸。所述第一和第二胞外环优选形成CLDN6的胞外部分。

[0160] 根据本发明,术语“变体”特别指突变体、剪接变体、构象、同种型、等位基因变体、种变体 (species variant) 和种同源物 (species homolog),特别是天然存在的那些。等位基因变体指基因的正常序列中发生了改变,其显著性通常不明显。对于给定的基因,全基因组测序通常鉴定出多种等位基因变体。种同源物是与给定的核酸或氨基酸序列具有不同物种来源的核酸或氨基酸序列。术语“变体”应涵盖任何经翻译后修饰的变体和构象变体。

[0161] 本文中所述的结合剂的第二靶分子是T细胞特异性抗原。T细胞特异性抗原是T细胞表面上的抗原。这种T细胞特异性抗原的一个优选实施方案是CD3 (分化群3 (cluster of differentiation 3)) 复合体。

[0162] CD3复合体表示作为多分子T细胞受体 (TCR) 复合体的一部分在成熟人T细胞、胸腺细胞和自然杀伤细胞亚群上表达的抗原。T细胞共受体是蛋白质复合体,且由四条不同的链构成。在哺乳动物中,该复合体包含CD3  $\gamma$  链、CD3 $\delta$ 链和两条CD3 $\epsilon$ 链。这些链与称为T细胞受体 (TCR) 的分子和 $\zeta$ 链缔合以在T淋巴细胞中产生活化信号。TCR、 $\zeta$ -链和CD3分子一起构成TCR复合体。

[0163] 人CD3 $\epsilon$ 以GenBank登记号NM\_000733表示,并包含SEQ ID NO:4。人CD3  $\gamma$  以GenBank登记号NM\_000073表示。人CD3 $\delta$ 以GenBank登记号NM\_000732表示。CD3负责TCR的信号转导。如Lin和Weiss,Journal of Cell Science 114,243-244 (2001) 所述,通过结合MHC呈递的特异性抗原表位激活TCR复合体导致Src家族激酶对基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 的磷酸化,引发其他激酶的募集,这导致T细胞活化,包括Ca<sup>2+</sup>释放。CD3例如通过固定化的抗CD3抗体而簇聚在T细胞上,导致T细胞活化,其类似于T细胞受体的接合,但与其克隆典型特异性无关。

[0164] 如本文中所示,“CD3”包括人CD3并且表示作为多分子T细胞受体复合体的一部分在人T细胞上表达的抗原。

[0165] 关于CD3,本发明的结合剂优选识别CD3的 $\epsilon$ 链,特别地,其识别对应于CD3 $\epsilon$ 的前27个N端氨基酸或该27个氨基酸区段 (stretch) 的功能性片段的表位。

[0166] 根据本发明,术语“密蛋白阳性癌症”或类似术语意指涉及表达 (优选在所述癌细胞的表面上) 密蛋白之癌细胞的癌症。

[0167] “细胞表面”根据其在领域中的通常含义使用,并因此包括易于被蛋白质和其他分子结合的细胞外部。

[0168] 如果密蛋白位于细胞的表面并且易于被添加至细胞的密蛋白特异性抗体结合,则密蛋白在所述细胞的表面上表达。

[0169] 在本发明的上下文中,术语“胞外部分”是指面对着细胞的胞外空间的分子 (例如蛋白质) 的一部分,且优选例如通过位于细胞外的抗原结合分子 (例如抗体) 而可接近所述细胞的外部。优选地,该术语是指一个或更多个胞外环或结构域或者其片段。

[0170] 术语“部分”或“片段”在本文中可互换使用,且是指连续的元件。例如,结构 (例如氨基酸序列或蛋白质) 的一部分是指所述结构的连续元件。结构的份 (portion)、部分 (part) 或片段优选包含所述结构的一个或更多个功能特性。例如,表位或肽的份、部分或片段优选与从其来源的表位、肽在免疫学上等同。蛋白质序列的一部分或片段优选包含所述蛋白质序列的至少4个,特别是至少6个、至少8个、至少12个、至少15个、至少20个、至少30个、至少50个或至少100个连续的氨基酸的序列。

[0171] 根据本发明,如果与胃细胞或胃组织中的表达相比表达水平更低,则CLDN18.2基本上不在细胞中表达。优选地,表达水平低于胃细胞或胃组织中的表达的10%,优选低于5%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或0.05%或甚至更低。优选地,如果表达水平超过胃以外的非癌组织中的表达水平不超过2倍、优选1.5倍,并且优选不超过所述非癌组织中的表达水平,则CLDN18.2基本上不在细胞中表达。优选地,如果表达水平低于检测限和/或如果表达水平太低而不允许被添加至细胞的CLDN18.2特异性抗体结合,则CLDN18.2基本上不在细胞中表达。

[0172] 根据本发明,如果表达水平超过胃以外的非癌组织中的表达水平,优选超过2倍,优选10倍、100倍、1000倍或10000倍,则CLDN18.2在细胞中表达。优选地,如果表达水平高于检测限和/或如果表达水平足够高以允许被添加至细胞的CLDN18.2特异性抗体结合,则CLDN18.2在细胞中表达。优选地,在细胞中表达的CLDN18.2在所述细胞的表面上表达或暴露。

[0173] 根据本发明,如果表达水平与胎盘细胞或胎盘组织中的表达相比更低,则CLDN6在细胞中基本不表达。优选地,表达水平低于胎盘细胞或胎盘组织中表达的10%,优选地,低于5%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或0.05%,或甚至更低。优选地,如果表达水平不超过非癌组织(除胎盘外)中表达水平的2倍,优选1.5倍,并且优选地不超过所述非癌组织中的表达水平,则CLDN6在细胞中基本不表达。优选地,如果表达水平低于检测限和/或如果表达水平太低以致于不能被添加至细胞的CLDN6特异性抗体结合,则CLDN6在细胞中基本不表达。

[0174] 根据本发明,如果表达水平超过非癌组织(除胎盘外)中表达水平的优选高于2倍,优选10倍、100倍、1000倍或10000倍,则CLDN6在细胞中表达。优选地,如果表达水平高于检测限和/或如果表达水平足够高以允许被添加至细胞的CLDN6特异性抗体结合,则CLDN6在细胞中表达。优选地,在细胞中表达的CLDN6在所述细胞表面上表达或暴露。

[0175] 根据本发明,术语“疾病”是指任何病理状态,包括癌症,特别是本文中所描述的那些形式的癌症。任何本文中提及的癌症或癌症的特别形式还包括其癌症转移。在一个优选实施方案中,根据本申请,待治疗的疾病涉及表达密蛋白(CLDN)(例如CLDN18.2和/或CLDN6)的细胞。

[0176] 根据本发明,“与表达密蛋白的细胞相关的疾病”或类似的表述意指密蛋白在患病组织或器官的细胞中表达。在一个实施方案中,与健康组织或器官中的状态相比,患病的组织或器官之细胞中的密蛋白表达提高。提高是指提高至少10%,特别是至少20%、至少50%、至少100%、至少200%、至少500%、至少1000%、至少10000%,或甚至更多。在一个实施方案中,表达仅见于患病的组织中,而健康组织中的表达被抑制。根据本发明,与表达密蛋白之细胞相关的疾病包括癌症疾病。此外,根据本发明,癌症疾病优选地为其中癌细胞表达密蛋白的那些。

[0177] 如本文中所用,“癌症疾病”或“癌症”包括具有如下特征的疾病:异常调节性细胞生长、增殖、分化、黏附和/或迁移。“癌细胞”意指通过迅速、不受控制的细胞增殖而生长并且在起始新生长的刺激停止后继续生长的异常细胞。优选地,“癌症疾病”以表达密蛋白的细胞为特征并且癌细胞表达密蛋白。表达密蛋白的细胞优选是癌细胞,优选本文中所述的癌症。

[0178] 根据本发明,术语“癌症”包括白血病、精原细胞瘤、黑素瘤、畸胎瘤、淋巴瘤、神经

母细胞瘤、神经胶质瘤、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾上腺癌、甲状腺癌、血癌、皮肤癌、脑癌、宫颈癌、肠癌、肝癌、结肠癌、胃癌、肠癌、头颈癌、胃肠癌、淋巴结癌、食管癌、结肠直肠癌、胰腺癌、耳鼻喉 (ENT) 癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、卵巢癌和肺癌、及其转移。其实例为肺癌、乳房癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、宫颈癌或上述癌症类型或肿瘤的转移。根据本发明的术语癌症还包括癌症转移。

[0179] 根据本发明,“上皮癌”是来源于上皮细胞的恶性肿瘤。该组代表最常见的癌症,包括乳腺癌、前列腺癌、肺癌和结肠癌的常见形式。

[0180] “腺癌”为源自腺组织的癌症。该组织也是称为上皮组织的一大类组织的一部分。上皮组织包括皮肤、腺体以及内衬于身体的腔和器官的多种其他组织。在胚胎学上,上皮来自外胚层、内胚层和中胚层。被归类为腺癌的细胞并不一定必须是腺体的一部分,只要它们具有分泌特性即可。该形式的癌可发生在一些包括人在内的高等哺乳动物中。良好分化的腺癌趋向于与其所来源的腺组织类似,而不良分化的腺癌则可以不是这样。通过对来自组织活检物的细胞进行染色,病理学家将确定肿瘤是腺癌还是其他类型的癌症。由于腺体在体内普遍存在的性质,腺癌可在身体的许多组织中产生。尽管每种腺体可不分泌相同的物质,但只要细胞具有外分泌功能,它就可被认为是腺性的,并且因而它的恶性形式被命名为腺癌。只要有充足的时间,恶性腺癌就侵袭其他组织并且常常转移。卵巢腺癌是最常见的卵巢癌类型。其包括浆液性和黏液性腺癌、透明细胞腺癌和子宫内膜样腺癌。

[0181] “转移”意指癌细胞从其初始部位扩散至身体的其他部位。转移的形成是非常复杂的过程,并依赖于恶性细胞从原发肿瘤脱离,侵袭胞外基质,穿透内皮基底膜进入体腔和血管,并随后在通过血液运输后,浸润靶器官。最后,新肿瘤在靶部位的生长依赖于血管生成。由于肿瘤细胞或组分可残留并发展出转移潜力,因此即使在去除原发肿瘤后仍经常发生肿瘤转移。在一个实施方案中,根据本发明的术语“转移”是指“远处转移”,其指远离原发肿瘤和局部淋巴结系统的转移。在一个实施方案中,根据本发明的术语“转移”是指淋巴结转移。可使用本发明的治疗来治疗的一种特定形式的转移是源自作为原发部位的胃癌的转移。在一些优选的实施方案中,这种胃癌转移是克鲁肯贝格肿瘤、腹膜转移和/或淋巴结转移。

[0182] 克鲁肯贝格肿瘤是卵巢的不常见转移性肿瘤,占有卵巢肿瘤的1%至2%。克鲁肯贝格肿瘤的预后仍然很差,并且对克鲁肯贝格肿瘤没有已建立的治疗。克鲁肯贝格肿瘤是卵巢的转移性印戒细胞腺癌。胃是大多数克鲁肯贝格肿瘤病例(70%)的主要部位。结肠癌、阑尾癌和乳腺癌(主要是浸润性小叶癌)是其次最常见的原发部位。已经报道了源自胆囊癌、胆道癌、胰腺癌、小肠癌、法特壶腹(ampulla of Vater)癌、宫颈癌和膀胱/脐尿管癌的罕见克鲁肯贝格肿瘤病例。

[0183] “治疗”意指向对象施用化合物或组合物或者化合物或组合物的组合以预防或消除疾病,包括降低对象中肿瘤的尺寸或肿瘤数目;阻止或减缓对象中的疾病;抑制或减缓对象中新疾病的发生;降低目前患有或先前患有疾病的对象中症状和/或复发的频率或严重程度;和/或延长,即提高对象的寿命。

[0184] 特别地,术语“疾病的治疗”包括治愈、缩短持续时间、改善、预防、减缓或抑制进展或恶化,或者预防或延缓疾病或其症状的发作。

[0185] 在本发明的上下文中,术语例如“保护”、“预防”、“预防的”、“预防性的”,或“保护性的”涉及对象中疾病发生和/或传播的预防或治疗或者这二者,并且特别地涉及使对象将

发生疾病的机会最小化或延迟疾病的发生。例如,处于癌症风险中的人将是用于治疗以预防癌症的候选者。

[0186] “处于风险中”意指与一般群体相比,被鉴定为具有比正常发病机会更高的发病(特别是癌症)机会的对象。此外,曾患有或目前患有疾病(特别是癌症)的对象具有发生疾病之提高的危险,因为这样的对象可继续发生疾病。目前患有或曾经患有癌症的对象也具有提高的癌症转移风险。

[0187] 根据本发明,术语“患者”意指治疗对象,特别是患病的对象,包括人、非人灵长类或其他动物,特别是哺乳动物,例如,牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。在一个特别优选的实施方案中,患者是人。

[0188] “靶细胞”应意指任何不期望的细胞,例如癌细胞。在一些优选的实施方案中,靶细胞表达密蛋白。

[0189] 术语“抗原”涉及优选地用于诱导免疫应答的包含药剂所针对和/或待针对之表位的分子,例如蛋白质或肽。在一个优选的实施方案中,抗原是肿瘤相关抗原(例如,CLDN18.2或CLDN6),即可来源于胞质、细胞表面和细胞核的癌细胞组成,特别是细胞内或作为癌细胞上的表面抗原优选大量产生的那些抗原。

[0190] 在本发明的上下文中,术语“肿瘤相关抗原”优选涉及在正常条件下在有限数目的组织和/或器官中或在特定发育阶段中特异性表达以及在一个或多个肿瘤或癌症组织中表达或异常表达的蛋白质。在本发明的上下文中,肿瘤相关抗原优选与癌细胞的细胞表面缔合,并且优选不在或仅很少在正常组织中表达。

[0191] 术语“表位”指分子中的抗原决定簇,例如,指分子中被免疫系统识别(例如,被抗体识别)的部分。例如,表位是被免疫系统识别的抗原上之离散的三维位点。表位通常由分子的化学活性表面基团(例如,氨基酸或糖侧链)组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象表位与非构象表位的区别在于,在存在变性溶剂的情况下,与前者的结合丧失,而与后者的结合则不丧失。蛋白质的表位优选包含所述蛋白质的连续或不连续部分,并且长度优选为5至100、优选5至50、更优选8至30、最优选10至25个氨基酸,例如,表位的长度可优选为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。

[0192] 如本文中所示,术语“结合剂”是指能够结合所期望抗原的任何药剂。在本发明的某些实施方案中,结合剂是抗体、抗体片段或其构建体。结合剂还可包含合成的、经修饰的或非天然存在的部分,特别是非肽部分。这样的部分可例如连接所期望的抗原结合官能团或区域,例如抗体或抗体片段。在一个实施方案中,结合剂是包含抗原结合CDR或可变区的合成构建体。

[0193] 术语“免疫球蛋白”涉及免疫球蛋白超家族的蛋白质,优选涉及抗原受体,例如抗体或B细胞受体(BCR)。免疫球蛋白的特征在于结构域,即免疫球蛋白结构域,其具有特征性免疫球蛋白(Ig)折叠。该术语涵盖膜结合的免疫球蛋白以及可溶性免疫球蛋白。可溶性免疫球蛋白通常被称为抗体。免疫球蛋白通常包含数条链,通常两条相同的重链和两条相同的轻链,它们通过二硫键连接。这些链主要由免疫球蛋白结构域构成,例如V<sub>L</sub>(可变轻链)结构域、C<sub>L</sub>(恒定轻链)结构域和C<sub>H</sub>(恒定重链)结构域C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>3和C<sub>H</sub>4。有五种类型的哺乳动物免疫球蛋白重链,即 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ ,它们负责了不同类别的抗体,即IgA、IgD、IgE、IgG和

IgM。与可溶性免疫球蛋白的重链相对,膜或表面免疫球蛋白的重链在其羧基末端包含跨膜结构域和短的胞质结构域。哺乳动物中有两种类型的轻链,即 $\lambda$ 和 $\kappa$ 。免疫球蛋白链包含可变区和恒定区。恒定区在免疫球蛋白不同的同种型内基本上是保守的,其中可变部分是高度多样的并且负责抗原识别。

[0194] 术语“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的免疫球蛋白或其抗原结合部分。术语“抗体”包括单克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体和嵌合抗体。每条重链由重链可变区(本文中缩写为VH)和重链恒定区构成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为VL)和轻链恒定区构成。术语“区”和术语“结构域”在本文中可互换使用。VH和VL区可进一步细分为高变区,称为互补决定区(complementarity determining region, CDR),其间散布着更保守的区域,称为框架区(framework region, FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR构成,从氨基端至羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0195] 本文中所述的术语“单克隆抗体”是指单分子组分的抗体分子的制备物(preparation)。单克隆抗体显示单一的结合特异性和亲和力。在一个实施方案中,单克隆抗体由杂交瘤产生,其包括与永生化细胞融合的从非人动物(例如,小鼠)获得的B细胞。

[0196] 本文中所述的术语“重组抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有抗体,例如(a)从免疫球蛋白基因是转基因的或转染色体的动物(例如,小鼠)或从其制备的杂交瘤中分离的抗体,(b)从转化以表达抗体的宿主细胞(例如,从转染瘤)分离的抗体,(c)从重组的、组合的抗体文库分离的抗体,以及(d)通过涉及将免疫球蛋白基因序列剪接成其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。

[0197] 本文中所述的术语“人抗体”旨在包括具有来自人种系免疫球蛋白序列之的可变区和恒定区的抗体。人抗体可包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机诱变或位点特异性诱变或者通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0198] 术语“人源化抗体”是指具有基本来自非人物种免疫球蛋白的抗原结合位点的分子,其中所述分子的其余免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。所述抗原结合位点可包含融合到恒定结构域上的完整可变结构域,或者仅包含移植(graft)到可变结构域中适当构架区上的互补决定区(CDR)。抗原结合位点可以是野生型的,或者通过一个或更多个氨基酸替换进行修饰,例如进行修饰以使其与人免疫球蛋白更类似。一些形式的人源化抗体保留了全部CDR序列(例如含有来自小鼠抗体的全部六个CDR的人源化小鼠抗体)。其他形式具有一个或更多个相对于原始抗体而言发生了改变的CDR。

[0199] 术语“嵌合抗体”是指这样的抗体,其中每个重链和轻链氨基酸序列的一部分与来自特定物种或者属于特定类别的抗体中的相应序列同源,而该链的其余区段则与其他物种或属于其他类别的相应序列同源。通常来说,轻链和重链的可变区均模拟来自一个哺乳动物物种之抗体的可变区,而恒定部分则与来自其他物种的抗体序列同源。这种嵌合形式的一个明显优点是可使用易于获得的B细胞或来自非人宿主生物体的杂交瘤从目前已知的来源方便地产生可变区,而与其组合的恒定区来自例如人细胞制备物。所述可变区具有易于制备的优点,并且特异性不受来源的影响,而由于恒定区为人的,因此该抗体在注射时引发

人对象免疫应答的可能性将比恒定区来自非人来源时更低。然而,定义不限于此特定实例。

[0200] 抗体可来源于不同物种,包括但不限于小鼠、大鼠、兔、豚鼠和人。

[0201] 本文中所述的抗体包括IgA(例如IgA1或IgA2)、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgM和IgD抗体。在多个实施方案中,所述抗体是IgG1抗体,更特别是IgG1, $\kappa$ 或IgG1, $\lambda$ 同种型(即IgG1, $\kappa$ , $\lambda$ )、IgG2a抗体(例如IgG2a, $\kappa$ , $\lambda$ )、IgG2b抗体(例如IgG2b, $\kappa$ , $\lambda$ )、IgG3抗体(例如IgG3, $\kappa$ , $\lambda$ )或IgG4抗体(例如IgG4, $\kappa$ , $\lambda$ )。

[0202] 本文中所述的“异源抗体”相对于产生这种抗体的转基因生物体进行定义。该术语是指这样的抗体,其具有对应于不由所述转基因生物体组成的生物体中可见的那些的氨基酸序列或编码核酸序列,并且通常来自与所述转基因生物体不同的物种。

[0203] 本文中所述的术语“异源杂合抗体(heterohybrid antibody)”是指具有不同生物来源的轻链和重链的抗体。例如,具有与鼠轻链缔合的人重链的抗体是异源杂合抗体。

[0204] 本文中所述的结合剂(例如抗体)优选是分离的。本文中所述的“分离的”旨在指基本不含具有不同抗原特异性之其他药剂的结合剂(例如,与CLDN18.2特异性结合的分离的抗体基本上不含特异性结合除CLDN18.2之外抗原的抗体)。分离的结合剂与人CLDN18.2的表位、同种型或变体特异性结合,然而,其可具有对其他相关抗原(例如,来自其他物种(例如,CLDN18.2物种同源物))的交叉反应性。此外,分离的结合剂可基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0205] 术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“结合部分”)或者抗体的“抗原结合片段”(或简称为“结合片段”)或者类似的术语是指抗体中保留与抗原特异性结合之能力的一个或更多个片段。已表明,抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段来进行。术语抗体的“抗原结合部分”中涵盖的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由VL、HL、CL和CH结构域组成的一价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,包含通过铰链区处二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等,(1989)Nature 341:544-546);(vi) 分离的互补决定区(CDR)以及(vii) 两个或更多个分离的CDR的组合,其可任选地通过合成接头连接。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,但是可使用重组方法通过合成接头将它们连接,使之可成为单个蛋白质链,其中VL和VH区配对以形成一价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如,Bird等(1988)Science 242:423-426;以及Huston等(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。此类单链抗体还旨在涵盖于术语抗体的“抗原结合片段”内。另一个实例是结合结构域免疫球蛋白融合蛋白,其包含(i) 与免疫球蛋白铰链区多肽融合的结合结构域多肽,(ii) 与所述铰链区融合的免疫球蛋白重链CH2恒定区,以及(iii) 与所述CH2恒定区融合的免疫球蛋白重链CH3恒定区。所述结合结构域多肽可以是重链可变区或轻链可变区。结合结构域免疫球蛋白融合蛋白在US2003/0118592和US2003/0133939中进一步公开。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并以与完整抗体相同的方式针对用途对片段进行筛选。

[0206] 单链可变片段(single-chain variable fragment,scFv)是免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)的可变区的融合蛋白,其与通常10至约30个氨基酸的短接头肽连接。接头通常富含甘氨酸以获得柔性,并且富含丝氨酸或苏氨酸以获得溶解性,并且可使VH的N端与VL的C端连接,反之亦然。可通过连接两个scFv来改造二价单链可变片段(di-scFv、bi-

scFv)。这可通过产生具有两个VH和两个VL区的单肽链来完成,产生串联scFv。本发明还包括含有多于两个scFv结合结构域的多特异性分子。一种常见的柔性连接肽是(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>x</sub>,其中x可以是3、4、5或6。任选地,VH与VL的缔合可通过一个或更多个分子间二硫键来稳定化。

[0207] 如本文中所用,术语“结合结构域”或“抗原结合结构域”是指位点,例如抗体位点,其与抗原结合并且包括抗体的抗原结合部分。结合结构域可包含重链和轻链可变结构域(VH和VL),其各自包括四个保守框架区(FR)和三个CDR。CDR在序列上变化并确定对特定抗原的特异性。VH和VL结构域一起可形成特异性结合特定抗原的位点。

[0208] Fab(抗原结合片段(fragment antigen binding))抗体片段是免疫反应性多肽,其包含由以下构成的抗体单价抗原结合结构域:由重链可变区(VH)和重链恒定区1(CH1)部分组成的多肽,以及由轻链可变区(VL)和轻链恒定区组成的多肽(其中CL和CH1部分结合在一起,优选通过Cys残基之间的二硫键)。优选地,在本文中所述的Fab片段中,CH1区和CL区是人来源的。在一个实施方案中,CL区是κ型CL区。在一个实施方案中,CH1区来源于IgG1或IgG2。

[0209] 出于本发明的目的,术语“抗体”涵盖如本文中所述的所有抗体和抗体衍生物(例如抗体片段)。术语“抗体衍生物”是指抗体的任何经修饰形式(例如,抗体与其他药剂或抗体的缀合物)或抗体片段。此外,如本文中所述的抗体和抗体衍生物可用于产生本发明的结合剂,例如抗体片段。

[0210] 天然存在的抗体通常是单特异性的,即它们与单一抗原结合。本发明提供了与细胞毒性细胞(例如T细胞(例如通过接合CD3受体))和靶细胞(例如癌细胞(通过接合密蛋白))结合的结合剂。本发明的结合剂与至少两种不同类型的抗原结合,并且至少是双特异性或多特异性的,例如三特异性、四特异性等。

[0211] 本发明的结合剂可以是至少三价的。如本文中所用,“价”意指结合剂中抗原结合位点或结合结构域的数目。与相同抗原结合的抗原结合位点可识别相同的表位或不同的表位。三价双特异性抗体和四价双特异性抗体是本领域中已知的。本发明的结合剂也可具有高于4的价。

[0212] 本文中所述的结合剂优选是人工蛋白质(包括蛋白质复合体),其可由至少两种不同抗体的片段构成(所述至少两种不同抗体的片段形成至少两个不同的结合结构域)并因此与至少两种不同类型的抗原结合。根据本发明的结合剂经改造以同时与免疫细胞(例如免疫效应细胞,特别是T细胞,例如细胞毒性细胞(例如通过与CD3结合))和待被破坏的靶细胞(例如癌细胞(通过与肿瘤相关抗原密蛋白结合))结合。

[0213] 已经开发了数种类型的三价抗体,并且所有类型都在本发明的范围内。三联体(triplebody)或单链三联抗体(single-chain triple antibody, sctb)由通过接头序列连接的三个不同的scFv区构成。此外,重链(CH1结构域)和轻链(CL结构域)的天然体内异源二聚化可用于形成可在其上添加多种scFv的支架。例如,对一种抗原具有特异性的scFv可与CH1结构域连接,所述CH1结构域还与对另一种抗原具有特异性的scFv连接,并且该链可与另一条链相互作用,所述另一条链包含对连接至CL结构域的任一抗原具有特异性的scFv(scFv3-CH1/CL)。三价结构的另一个实例涉及使用对一个表位具有特异性的Fab片段,所述表位C端连接至对另一表位具有特异性的两个scFv,每条链上有一个(Fab-scFv2)。三价(或四价)分子的又一个实例包括多种形式,其包含附接至抗体的N端或C端的另外的结合实体。

例如,一种形式由对一种抗原具有特异性的完整抗体分子组成,其中单链Fab(single chain Fab, scFab)与分子的C端连接(IgG-scFab)。对接和锁定(dock-and-lock, DNL)方法也已用于产生三价抗体(DNL-F(ab)<sub>3</sub>) (Chang, C.-H等,在Bispecific Antibodies. Kontermann RE(ed.)中, Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 第199至216页(2011))。前述抗体中的每一种都在本发明的范围内。

[0214] 还已构建了四价抗体,并且所有类型都在本发明的范围内。四价抗体的实例包括但不限于scFv2-Fc、F(ab')<sub>2</sub>-scFv2、scFv2-H/L和scFv-dh1x-scFv分子。双特异性scFv2-Fc构建体具有Fc结构域,其中两个scFv对与Fc链的N端连接的一个分子具有特异性,且另外两个scFv对与Fc链的C端连接的另一个分子具有特异性。双特异性F(ab')<sub>2</sub>-scFv2构建体包括与F(ab')<sub>2</sub>片段的C端连接的scFv片段。scFv2-H/L构建体具有对与重链连接的一个分子具有特异性的scFv,而对另一个分子具有特异性的scFv与轻链连接。最后,scFv-dh1x-scFv构建体包含一种类型的与螺旋二聚化结构域连接的scFv,然后是另一种类型的scFv。这种类型的两条链可二聚化,从而产生四价抗体。

[0215] 本发明的结合剂可以是以下形式:抗体分子或抗体样分子,或具有抗体样特性的蛋白质支架,或具有至少两种结合特异性的环肽。因此,结合剂可包含一种或更多种如本文中所述的抗体或其片段。

[0216] 在一个实施方案中,本发明的结合剂包含Fab片段的重链(Fd片段)和轻链(L),其能够异二聚化并且可在其上并入另外的结合功能或结构域。这种另外的结合结构域可独立地选自包含两个抗体可变区的结合结构域,例如scFv结合结构域,即VH-VL或VL-VH,以及包含一个抗体可变区的结合结构域,例如VH结合结构域和VHH结合结构域。

[0217] 在一个实施方案中,本发明的结合剂是Fab-scFv2构建体的形式,即具有两个scFv片段的Fab片段,优选在Fab片段的恒定区的C端处。在一个实施方案中,本发明的结合剂是由两条多肽链构成的二聚体,所述两条多肽链优选通过二硫键结合在一起,其中第一多肽包含通过CL多肽链与另外的VL结构域连接的scFv,并且第二多肽包含通过CH1多肽链与另外的VH结构域连接的scFv。二硫键优选在CL中的Cys残基与CH1中的Cys残基之间形成,使得在抗原结合构型中第一多肽的另外的VL与第二多肽的另外的VH缔合,使得结合剂整体上包括三个抗原结合结构域。因此,在一个实施方案中,本发明的结合剂包含Fab片段的重链(Fd片段)和轻链(L),其能够异二聚化并且在其上并入scFv结合结构域(优选在Fd/L的C端处)。根据本发明,scFv部分中的VH和VL结构域优选通过肽接头连接和/或Fab链和scFv优选通过肽接头连接。根据本发明,scFv部分中的VH和VL结构域优选通过肽接头连接,所述肽接头包含氨基酸序列(G<sub>4</sub>S)<sub>x</sub>,其中x是3、4、5或6。Fab链和scFv优选通过包含氨基酸序列DVPG<sub>2</sub>S或SGPG<sub>3</sub>RS(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>的肽接头连接。在一个实施方案中,包含氨基酸序列SGPG<sub>3</sub>RS(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>的接头使scFv结合结构域与Fd片段连接,并且包含氨基酸序列DVPG<sub>2</sub>S的接头使scFv结合结构域与L片段连接。在一个实施方案中,scFv部分与密蛋白结合,并且Fab部分与T细胞特异性抗原结合。

[0218] 在一个实施方案中,本发明的结合剂包含第一和第二多肽,其中第一多肽和第二多肽从N端至C端包含以下结构域:

[0219] VH-CH1-scFv和VL-CL-scFv,

[0220] 其中VH和VL缔合以形成结合结构域。

[0221] 在一个实施方案中,本发明的结合剂包含第一和第二多肽,其中,在第一多肽和第二多肽中,VH结构域、VL结构域、CH1结构域和CL结构域以如下顺序从N端至C端排列:

[0222] -VH(T) -CH1 -VH(CLDN) -VL(CLDN) 和VL(T) -CL -VH(CLDN) -VL(CLDN);或

[0223] -VH(T) -CH1 -VL(CLDN) -VH(CLDN) 和VL(T) -CL -VL(CLDN) -VH(CLDN);或

[0224] -VH(T) -CH1 -VH(CLDN) -VL - (CLDN) 和VL(T) -CL -VL(CLDN) -VH - (CLDN);或

[0225] -VH(T) -CH1 -VL(CLDN) -VH - (CLDN) 和VL(T) -CL -VH(CLDN) -VL - (CLDN);或

[0226] -VH(CLDN) -CH1 -VH(T) -VL(T) 和VL(CLDN) -CL -VH(CLDN) -VL(CLDN);或

[0227] -VH(CLDN) -CH1 -VL(T) -VH(T) 和VL(CLDN) -CL -VL(CLDN) -VH(CLDN);或

[0228] -VH(CLDN) -CH1 -VL(T) -VH(T) 和VL(CLDN) -CL -VH(CLDN) -VL(CLDN);或

[0229] -VH(CLDN) -CH1 -VH(T) -VL(T) 和VL(CLDN) -CL -VL(CLDN) -VH(CLDN);或

[0230] -VH(CLDN) -CH1 -VH(CLDN) -VL(CLDN) 和VL(CLDN) -CL -VH(T) -VL(T);或

[0231] -VH(CLDN) -CH1 -VL(CLDN) -VH(CLDN) 和VL(CLDN) -CL -VL(T) -VH(T);或

[0232] -VH(CLDN) -CH1 -VL(CLDN) -VH(CLDN) 和VL(CLDN) -CL -VH(T) -VL(T);或

[0233] -VH(CLDN) -CH1 -VH(CLDN) -VL(CLDN) 和VL(CLDN) -CL -VL(T) -VH(T)。

[0234] 术语“接头”是指用于连接两个不同功能单元(例如抗原结合部分)的任何工具。接头的类型包括但不限于化学接头和多肽接头。多肽接头的序列不受限制。多肽接头优选是非免疫原性和柔性的,例如包含丝氨酸和甘氨酸序列的那些。取决于具体的构建体,接头可以长或短。

[0235] 根据本发明,连接VH和VL结构域以形成VH-VL或VL-VH scFv结构域的接头优选包含柔性肽接头,例如甘氨酸-丝氨酸肽接头。在一个实施方案中,接头包含氨基酸序列 $(G_4S)_x$ ,其中x是3、4、5或6。在scFv结构域包含以VH-VL取向的VH和VL结构域的情况下,接头优选包含氨基酸序列 $(G_4S)_4$ 。在scFv结构域包含VL-VH取向的VH和VL结构域的情况下,接头优选包含氨基酸序列 $(G_4S)_5$ 。

[0236] 根据本发明,连接scFv结构域和Fd结构域的接头,优选在CH1的C端处,优选包含氨基酸序列DVP $G_2S$ 或SGPG $_3RS$   $(G_4S)_2$ ,优选SGPG $_3RS$   $(G_4S)_2$ 。根据本发明,连接scFv结构域和L结构域的接头,优选在CL的C端处,优选包含氨基酸序列DVP $G_2S$ 或SGPG $_3RS$   $(G_4S)_2$ ,优选DVP $G_2S$ 。

[0237] 根据本发明的结合剂还可包含用于有助于分子分泌的氨基酸序列,例如N端分泌信号,和/或有助于分子的结合、纯化或检测的一个或多个表位标签。

[0238] 优选地,分泌信号是信号序列(例如氨基酸序列MGWSCIIILFLVATATGVHS),其允许足够的通过分泌途径和/或结合剂或其多肽链分泌到细胞外环境中。优选地,分泌信号序列是可切割的并且从成熟结合剂中除去。优选地,相对于在其中产生结合剂的细胞或生物体选择分泌信号序列。

[0239] 表位标签的氨基酸序列可引入至结合剂的氨基酸序列内的任何位置,并且可在编码的蛋白质结构内呈环状,或者可在N端或C端与结合剂融合。优选地,表位标签在C端与结合剂融合。表位标签可包含切割位点,其允许从结合剂中除去标签。所述表位标签可以是在天然和/或变性条件下具有功能的任何种类的表位标签,优选组氨酸标签,最优选包含六个组氨酸的标签。

[0240] 除了所述第一、第二和第三结合结构域之外,本发明的结合剂还可包含一个或多个其他结合结构域,其用于例如增强对肿瘤细胞的选择性。这可例如通过提供与肿瘤细

胞上表达的其他抗原结合的结合结构域来实现。

[0241] 在本发明的上下文中,产生的结合剂优选能够引发如本文中所述的免疫效应物功能。优选地,所述免疫效应物功能针对在其表面上携带肿瘤相关抗原密蛋白的细胞。

[0242] 在本发明的上下文中,术语“免疫效应物功能”包括由免疫系统的组分介导的任何功能,其导致例如抑制肿瘤生长和/或抑制肿瘤发生,包括抑制肿瘤播散和转移。优选地,免疫效应物功能导致杀伤肿瘤细胞。这样的功能包括补体依赖性细胞毒性 (complement dependent cytotoxicity, CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用 (antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCP)、诱导携带肿瘤相关抗原之细胞的凋亡、携带肿瘤相关抗原之细胞的细胞溶解,和/或抑制携带肿瘤相关抗原之细胞的增殖。结合的物质还可通过与癌细胞表面上的肿瘤相关抗原结合来发挥作用。例如,抗体可只是通过与癌细胞表面上的肿瘤相关抗原结合来阻断肿瘤相关抗原的功能或诱导凋亡。

[0243] 本文中所述的结合剂可与治疗性部分或药剂(例如细胞毒素、药物(例如,免疫抑制剂)或放射性同位素)缀合。细胞毒素或细胞毒剂包括对细胞有害且特别地杀伤细胞的任何药剂。实例包括:泰素(taxol)、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙啶、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱(colchicin)、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽蒽菌素(anthracin)二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素,及其类似物或同源物。适于形成缀合物的治疗剂包括但不限于:抗代谢物(例如,甲氨喋呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪(decarbazine))、烷基化剂(例如,氮芥(mechlorethamine)、塞替派苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C和顺式-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类(例如,柔红霉素(原名道诺霉素)和多柔比星)、抗生素类(例如,更生霉素(原名放线菌素)、博来霉素、光辉霉素和氨基霉素(AMC))以及抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。在一个优选实施方案中,治疗剂为细胞毒剂或放射性毒剂。在另一个实施方案中,治疗剂为免疫抑制剂。在又一个实施方案中,治疗剂为GM-CSF。在一个优选实施方案中,治疗剂为多柔比星、顺铂、博来霉素、硫酸盐、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺或蓖麻毒蛋白A。

[0244] 结合剂还可与放射性同位素(例如,碘-131、钇-90或铟-111)缀合以产生细胞毒性放射性药物。

[0245] 用于将这样的治疗部分缀合至抗体的技术是公知的,参见例如Arnon等,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy中,Reisfeld等(编辑),第243-56页(Alan R.Liss, Inc.1985);Hellstrom等,“Antibodies For Drug Delivery”, Controlled Drug Delivery (第2版)中,Robinson等(编辑),第623-53页(Marcel Dekker, Inc.1987);Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”, Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications中,Pincheraet等(编辑),第475-506页(1985);“Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies For

Cancer Detection And Therapy中,Baldwin等(编辑),第303-16页(Academic Press1985),和Thorpe等,“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”,Immunol.Rev.,62:119-58(1982)。

[0246] 根据本发明的术语“结合”优选涉及特异性结合。

[0247] 根据本发明,在标准测定中,如果药剂(例如抗体)对预定靶标具有显著的亲和力并且与所述预定靶标结合,则其能够与所述预定靶标结合。“亲和力”或“结合亲和力”一般通过平衡解离常数( $K_D$ )来测量。优选地,术语“显著亲和力”是指以 $10^{-5}$ M或更低、 $10^{-6}$ M或更低、 $10^{-7}$ M或更低、 $10^{-8}$ M或更低、 $10^{-9}$ M或更低、 $10^{-10}$ M或更低、 $10^{-11}$ M或更低或者 $10^{-12}$ M或更低的解离常数( $K_D$ )与预定靶标结合。

[0248] 在标准测定中,如果药剂对靶标不具有显著的亲和力并且不与所述靶标显著地结合,特别是不与之可检出地结合,则所述药剂(基本上)不能与所述靶标结合。优选地,如果以高至 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、更优选 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 、特别是50或 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更高的浓度存在,则所述药剂不能与所述靶标可检出地结合。优选地,如果药剂与靶标以与预定靶标(所述药剂能够与其结合)结合之 $K_D$ 相比至少10倍、100倍、 $10^3$ 倍、 $10^4$ 倍、 $10^5$ 倍或 $10^6$ 倍的 $K_D$ 结合,则所述药剂对所述靶标不具有显著的亲和力。例如,如果药剂与所述药剂能够结合的靶标结合的 $K_D$ 为 $10^{-7}$ M,则所述药剂与对其无显著亲和力的靶标结合的 $K_D$ 为至少 $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M、 $10^{-4}$ M、 $10^{-3}$ M、 $10^{-2}$ M或 $10^{-1}$ M。

[0249] 在标准测定中,如果药剂(例如抗体)能够与预定靶标结合同时不能够与其他靶标结合,即对其他靶标不具有显著亲和力并且不与其他靶标显著结合,则所述药剂对所述预定靶标具有特异性。根据本发明,如果药剂能够与密蛋白结合,但(基本上)不能够与其他靶标结合,则所述药剂对密蛋白具有特异性。优选地,如果药剂与这样的其他靶标的亲和力和结合没有显著超过与密蛋白不相关的蛋白质(例如牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白、人血清白蛋白(HSA)或非密蛋白跨膜蛋白(例如MHC分子或转铁蛋白受体)或任何其他指定的多肽)的亲和力或结合,则所述药剂对密蛋白具有特异性。优选地,如果药剂与靶标以与非特异性靶标结合之 $K_D$ 相比低至少10倍、100倍、 $10^3$ 倍、 $10^4$ 倍、 $10^5$ 倍或 $10^6$ 倍的 $K_D$ 结合,则所述药剂对所述预定靶标具有特异性。例如,如果药剂与其特异性靶标结合的 $K_D$ 为 $10^{-7}$ M,则药剂与其无特异性的靶标结合的 $K_D$ 会为至少 $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M、 $10^{-4}$ M、 $10^{-3}$ M、 $10^{-2}$ M或 $10^{-1}$ M。

[0250] 可使用任何合适的方法实验性测定药剂与靶标的结合;参见例如Berzofsky等,“Antibody-Antigen Interactions”Fundamental Immunology中,Paul,W.E.编,Raven Press New York,N Y(1984),Kuby,Janis Immunology,W.H.Freeman and Company New York,N Y(1992)和本文中描述的方法。可使用常规技术容易地测定亲和力,例如,通过平衡透析;通过使用BIAcore2000仪器,使用制造商所描述的通用方法;通过使用放射标记的靶抗原的放射免疫测定;或通过技术人员已知的其他方法。例如,可通过Scatchard等,Ann N.Y.Acad.ScL,51:660(1949)的方法分析亲和力数据。如果在不同条件(例如,盐浓度、pH)下测量,则所测量的具体抗体-抗原相互作用的亲和力可以不同。因此,亲和力和其他抗原-结合参数(例如, $K_D$ 、 $IC_{50}$ )的测量优选地用抗体与抗原的标准化溶液以及标准化缓冲液进行。

[0251] 术语“竞争”是指两种抗体之间对于与靶抗原结合的竞争。如果两种抗体不为了与靶抗原结合而相互阻断,则此类抗体是非竞争性的,并且这表明所述抗体不与相同部分(即

靶抗原的表位)结合。本领域技术人员公知如何测试抗体对于与靶抗原结合的竞争。这种方法的一个实例是所谓的交叉竞争测定,其可例如作为ELISA或通过流式细胞术进行。例如,可通过用每种抗体包被ELISA板孔来进行基于ELISA的测定;添加竞争性抗体和抗原/靶标的His标记的细胞外结构域并孵育;可通过添加生物素化的抗His抗体,然后添加链霉亲和素-聚-HRP,并进一步使与ABTS的反应显色并测量405nm处的吸光度来检测所添加的抗体是否抑制His-标记的蛋白质与包被的抗体的结合。例如,可通过用过量的未标记抗体孵育表达抗原/靶标的细胞,用亚最佳(sub-optimal)浓度的生物素标记的抗体孵育细胞,然后用荧光标记的链霉亲和素孵育并通过流式细胞术进行分析来进行流式细胞术测定。

[0252] 如果两种抗体与相同的抗原和相同的表位结合,则它们具有“相同的特异性”。待测抗体是否识别与某种抗原结合抗体相同的表位(即抗体与相同表位结合)可基于它们对相同表位的竞争来分析。可通过交叉阻断测定来检测抗体之间的竞争。例如,竞争性ELISA测定可用作交叉阻断测定。例如,可将靶抗原包被在微量滴定板的孔上,并且可添加抗原结合抗体和候选竞争测试抗体。与孔中的抗原结合的抗原结合抗体的量与其竞争与相同表位结合的候选竞争测试抗体的结合能力间接相关。具体地,候选竞争性测试抗体对相同表位的亲和力越大,则与抗原包被孔结合的抗原结合抗体的量就越小。与孔结合的抗原结合抗体的量可通过用可检测或可测量的标记物质标记抗体来测量。

[0253] 与另一种抗体(例如包含如本文中所述的重链和轻链可变区的抗体)竞争与抗原结合的抗体,或对另一种抗体(例如包含如本文中所述的重链和轻链可变区的抗体)的抗原具有特异性的抗体可以是包含如本文中所述的所述重链和/或轻链可变区的变体的抗体,例如如本文中所述的CDR中的修饰和/或一定程度的同一性。

[0254] 本文中所述的“同种型”是指由重链恒定区基因所编码的抗体类别(例如,IgM或IgG1)。

[0255] 本文中所述的“同种型转换(isotype switching)”的指抗体的类别或同种型从一个Ig类别变成其他Ig类别之一的现象。

[0256] 本文中所述的术语“天然存在的”当应用于物体时是指该物体可见于自然界这一事实。例如,存在于可从自然界来源分离的生物体(包括病毒)中并且未经人在实验室中有意修饰的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0257] 本文中使用的术语“重排”是指重链或轻链免疫球蛋白基因座的构型,其中V区段在编码基本完整VH或VL结构域的构象中分别位于紧邻D-J或J区段的位置。重排的免疫球蛋白(抗体)基因座可通过与种系DNA进行比较来鉴定;重排的基因座将具有至少一个重组的七聚体/九聚体同源性元件。

[0258] 涉及V区段时,本文中使用的术语“未重排的”或“种系构型”是指其中V区段未重组从而未与D或J区段紧邻的构型。

[0259] 在一个实施方案中,本发明的结合剂具有与CLDN18.2结合的能力,即与CLDN18.2中存在的表位(优选位于CLDN18.2的细胞外结构域内的表位,特别是第一胞外环,优选CLDN18.2的第29至78位氨基酸)结合的能力。在一些特别的实施方案中,具有与CLDN18.2结合之能力的药剂与CLDN18.2上的表位(其不存在于CLDN18.1上)结合。

[0260] 具有与CLDN18.2结合之能力的药剂优选与CLDN18.2而不是与CLDN18.1结合。优选地,具有与CLDN18.2结合之能力的药剂对CLDN18.2具有特异性。优选地,具有与CLDN18.2结

合之能力的药剂与细胞表面上表达的CLDN18.2结合。在一些特别优选的实施方案中,具有与CLDN18.2结合之能力的药剂与存在于活细胞表面上的CLDN18.2的天然表位结合。

[0261] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:20、21、24或其片段或者氨基酸序列或片段的变体的氨基酸序列。

[0262] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:22、23、25或其片段或者氨基酸序列或片段的变体的氨基酸序列。

[0263] 在某些优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域包含选自以下可能性的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0264] (i) VH包含SEQ ID NO:20所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:22所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,

[0265] (ii) VH包含SEQ ID NO:20所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:23所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,

[0266] (iii) VH包含SEQ ID NO:21所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:22所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,

[0267] (iv) VH包含SEQ ID NO:21所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:23所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,

[0268] (v) VH包含SEQ ID NO:24所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:25所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体。

[0269] 在一个特别优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域包含以下重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0270] VH包含SEQ ID NO:20所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:22所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体。

[0271] 在一个特别优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域包含以下重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0272] VH包含SEQ ID NO:21所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:23所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体。

[0273] 术语“片段”特别是指重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的一个或更多个互补决定区(CDR),优选至少CDR3可变区。在一个实施方案中,所述一个或更多个互补决定区(CDR)选自一组互补决定区CDR1、CDR2和CDR3。在一个特别优选的实施方案中,术语“片段”是指重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3。

[0274] 在一个实施方案中,如本文中所述的包含一个或更多个CDR、一组CDR或CDR组之组合的结合结构域包含所述CDR以及它们的间插框架区。优选地,该部分还将包括至少约50%的第一和第四框架区中之一或二者,50%为第一框架区的C端50%和第四框架区的N端50%。通过重组DNA技术进行的结合剂的构建可导致将残基N端或C端引入至由引入的接头编码的可变区,以有助于克隆或其他操作步骤,包括引入接头以连接本发明的可变区与另外的蛋白质序列,包括免疫球蛋白重链、其他可变结构域或蛋白质标签。

[0275] 在一个实施方案中,如本文中所述的包含一个或更多个CDR、一组CDR或CDR组之组

合的结合结构域包含人抗体框架中的所述CDR。

[0276] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域包含以下重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0277] VH包含重链互补决定区3(HCDR3),其包含SEQ ID NO:58中所示序列,和

[0278] VL包含轻链互补决定区3(LCDR3),其包含SEQ ID NO:64中所示序列。

[0279] 在一个实施方案中,VH还包含HCDR1,其包含SEQ ID NO:56中所示序列,和/或HCDR2,其包含SEQ ID NO:57中所示序列,和/或VL还包含LCDR1,其包含SEQ ID NO:62中所示序列,和/或LCDR2,其包含SEQ ID NO:63中所示序列。

[0280] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域包含以下重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0281] VH包含含有SEQ ID NO:56中所示序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:57中所示序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:58中所示序列的HCDR3,并且VL包含含有SEQ ID NO:62中所示序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:63中所示序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:64中所示序列的LCDR3。

[0282] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域包含以下重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0283] VH包含重链互补决定区3(HCDR3),其包含SEQ ID NO:61中所示序列,以及

[0284] VL包含轻链互补决定区3(LCDR3),其包含SEQ ID NO:65中所示序列。

[0285] 在一个实施方案中,VH还包含HCDR1,其包含SEQ ID NO:59中所示序列,和/或HCDR2,其包含SEQ ID NO:60中所示序列,和/或VL还包含LCDR1,其包含SEQ ID NO:62中所示序列,和/或LCDR2,其包含SEQ ID NO:63中所示序列。

[0286] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域包含以下重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0287] VH包含含有SEQ ID NO:59中所示序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:60中所示序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:61中所示序列的HCDR3,并且VL包含含有SEQ ID NO:62中所示序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:63中所示序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:65中所示序列的LCDR3。

[0288] 在一个实施方案中,所述重链和轻链可变区包含散布在框架区内的所述互补决定区。在一个实施方案中,每个可变区包含三个互补决定区(CDR1、2和3)和四个框架区(FR1、2、3和4)。在一个实施方案中,所述互补决定区和所述构架区从氨基端至羧基端以如下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。

[0289] 在另一些实施方案中,与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域包含抗体的重链和轻链可变区,其(i)与包含如上所述的重链和轻链可变区的抗体竞争CLDN18.2结合和/或(ii)对包含如上所述的重链和轻链可变区的抗体的CLDN18.2具有特异性。

[0290] 在一个实施方案中,与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)具有scFv分子的形式。在该实施方案中,与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域包含选自SEQ ID NO:26、27、28、29的氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体。

[0291] 应当理解,与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域可以是相同的或基本上相同或不同的,并因此可与相同或基本相同的表位或不同的表位结合。因此,这两种与本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域可对应于或基本上对应于与本文中所述的本发明

结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域之一,或者它们可独立地选自与本文中所述的本发明结合剂的CLDN18.2结合的结合结构域。

[0292] 在一个实施方案中,本发明的结合剂具有与CLDN6结合的能力,即,能够与存在于CLDN6中的表位(优选位于CLDN6细胞外结构域内的表位,特别是第一胞外环,优选CLDN6的第28至76位或第29至81位氨基酸,或第二胞外环,优选CLDN6的第141至159位氨基酸)结合的能力。在一些特别的实施方案中,具有与CLDN6结合之能力的药剂与CLDN6上的表位(其不存在于CLDN9上)结合。优选地,具有与CLDN6结合之能力的药剂与CLDN6上的表位(其不存在于CLDN4和/或CLDN3上)结合。最优选地,具有与CLDN6结合之能力的药剂与CLDN6上的表位(其不存在于除CLDN6之外的密蛋白蛋白质)结合。

[0293] 具有与CLDN6结合之能力的药剂优选与CLDN6但不与CLDN9结合,且优选不与CLDN4和/或CLDN3结合。优选地,具有与CLDN6结合之能力的药剂对CLDN6具有特异性。优选地,具有与CLDN6结合之能力的药剂与在细胞表面上表达的CLDN6结合。在一些特别优选的实施方案中,具有与CLDN6结合之能力的药剂与存在于活细胞表面上的CLDN6的天然表位结合。

[0294] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域包含含有选自SEQ ID NO:7、8、11的氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体的重链可变区(VH)。

[0295] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域包含含有选自SEQ ID NO:9、10、12的氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体的轻链可变区(VL)。

[0296] 在某些优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域包含选自以下可能性的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0297] (i) VH包含SEQ ID NO:7所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:9所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,

[0298] (ii) VH包含SEQ ID NO:7所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:10所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,

[0299] (iii) VH包含SEQ ID NO:8所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:9所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,

[0300] (iv) VH包含SEQ ID NO:8所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:10所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,

[0301] (v) VH包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,

[0302] (vi) VH包含SEQ ID NO:7所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,

[0303] (vii) VH包含SEQ ID NO:8所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体。

[0304] 在一个特别优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域包含以下重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0305] VH包含SEQ ID NO:8所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:10所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体。

[0306] 在一个特别优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域包含以下重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0307] VH包含SEQ ID NO:7所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体。

[0308] 术语“片段”特别是指一个或更多个互补决定区(CDR),优选至少重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的CDR3可变区。在一个实施方案中,所述一个或更多个互补决定区(CDR)选自一组互补决定区CDR1、CDR2和CDR3。在一个特别优选的实施方案中,术语“片段”是指重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3。

[0309] 在一个实施方案中,如本文中所述包含一个或更多个CDR、一组CDR或CDR组之组合的结合结构域包含所述CDR及其间插框架区(interveningframework region)。优选地,该部分还将包含至少约50%的第一和第四框架区之一或二者,所述50%为第一框架区的C端50%和第四框架区的N端50%。通过重组DNA技术进行的结合剂构建可导致将残基N端或C端引入至由引入的接头所编码的可变区,以有助于克隆或其他操作步骤,包括引入接头以连接本发明的可变区与其他蛋白质序列,包括免疫球蛋白重链、其他可变结构域或蛋白质标签。

[0310] 在一个实施方案中,如本文中所述的包含一个或更多个CDR、一组CDR或CDR组之组合的结合结构域包含人抗体框架中的所述CDR。

[0311] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域包含以下重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0312] VH包含重链互补决定区3(HCDR3),其包含序列Ala Arg Asp Xaa1Gly Xaa2Val Xaa3Asp Tyr,其中Xaa1是任意氨基酸,优选芳香族氨基酸,更优选Phe或Tyr,最优选Tyr,Xaa2是任意氨基酸,优选芳香族氨基酸,更优选Phe或Tyr,最优选Tyr,并且Xaa3是任意氨基酸,优选Leu或Phe,更优选Leu。在一个实施方案中,HCDR3包含SEQ ID NO:46或47中所示序列,并且

[0313] VL包含轻链互补决定区3(LCDR3),其包含序列Gln Gln Arg Xaa1Xaa2Xaa3Pro Pro Trp Thr,其中Xaa1是任意氨基酸,优选Ser或Asn,最优选Ser,Xaa2是任意氨基酸,优选Tyr、Ser、Ile、Asn或Thr,更优选Ile、Asn或Thr,最优选Ile或Asn,Xaa3是任意氨基酸,优选Ser或Tyr,更优选Tyr。在一个实施方案中,LCDR3包含SEQ ID NO:52或53中所示序列。

[0314] 在一个实施方案中,VH还包含含有SEQ ID NO:44中所示序列的HCDR1和/或含有SEQ ID NO:48中所示序列的HCDR2,其中Xaa是任意氨基酸,优选Thr、Ser或Ile,最优选Thr,例如SEQ ID NO:45中所示序列,和/或VL还包含含有SEQ ID NO:54中所示序列的LCDR1,其中Xaa是任意氨基酸,优选Ser或Asn,最优选Ser,例如SEQ ID NO:50中所示序列,和/或包含SEQ ID NO:51中所示序列的LCDR2。

[0315] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域包含以下重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0316] VH包含含有SEQ ID NO:44中所示序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:45中所示序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:46中所示序列的HCDR3,并且VL包含含有SEQ ID NO:50中所示序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:51中所示序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:52中所示序列的LCDR3。

[0317] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域包含以下

重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 的组合:

[0318] VH包含含有SEQ ID NO:44中所示序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:45中所示序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:47中所示序列的HCDR3,并且VL包含含有SEQ ID NO:50中所示序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:51中所示序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:53中所示序列的LCDR3。

[0319] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域包含以下重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 的组合:

[0320] VH包含含有SEQ ID NO:44中所示序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:45中所示序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:46中所示序列的HCDR3,并且VL包含含有SEQ ID NO:50中所示序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:51中所示序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:53中所示序列的LCDR3。

[0321] 在一个实施方案中,所述重链和轻链可变区包含散布在框架区内的所述互补决定区。在一个实施方案中,每个可变区包含三个互补决定区 (CDR1、2和3) 和四个框架区 (FR1、2、3和4)。在一个实施方案中,所述互补决定区和所述构架区从氨基端至羧基端以如下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。

[0322] 在另一些实施方案中,与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域包含抗体的重链和轻链可变区,其 (i) 与包含如上所述的重链和轻链可变区的抗体竞争CLDN6结合和/或 (ii) 对包含如上所述的重链和轻链可变区的抗体的CLDN6具有特异性。

[0323] 在一个实施方案中,与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 具有scFv分子的形式。在该实施方案中,与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体。

[0324] 应当理解,与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域可以是相同的或基本上相同或不同的,并因此可与相同或基本相同的表位或不同的表位结合。因此,这两种与本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域可对应于或基本上对应于与本文中所述的本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域之一,或者它们可独立地选自与本文中所述的本发明结合剂的CLDN6结合的结合结构域。

[0325] 可用于提供根据本发明的结合剂的抗CD3抗体包括但不限于UCHT1-HS (人源化mAB)、UCHT1-MM (鼠mAB)、CLB-T3、TR66、145-2C11。

[0326] UCHT1是单克隆IgG1抗CD3单克隆抗体,其检测人和灵长类动物样品类型中的CD3。CLB-T3是小鼠单克隆抗CD3抗体,其针对CD3抗原并与80-90%的人外周T淋巴细胞和髓胸腺细胞反应。TR66是小鼠IgG1单克隆抗CD3抗体,其识别人CD3的 $\epsilon$ 链。145-2C11是亚美尼亚仓鼠单克隆抗小鼠CD3抗体。

[0327] 优选地,CD3结合结构域的VH和VL区来源于抗体/抗体分子和抗体样分子,在其他TCR亚基的情况下,其能够特异性识别人CD3,所述TCR亚基存在于表达天然构型的TCR的活化的原代人T细胞上。来源于对CD3- $\epsilon$ 链具有特异性的抗体的VH和VL区是最优选的,并且所述(亲本)抗体应该能够特异性结合反映天然或接近天然结构的表位或在TCR复合体的情况下存在的人CD3中的构象表位。在本发明的一个优选实施方案中,CD3结合结构域的VH和VL区来源于选自UCHT1-HS、UCHT1-MM、CLB-T3和TR66 (优选TR66) 的CD3特异性抗体。

[0328] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CD3结合的结合结构域包含重链可变区 (VH),其包含SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体。

[0329] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CD3结合的结合结构域包含轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:6中所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体。

[0330] 在一个优选的实施方案中,与本发明结合剂的CD3结合的结合结构域包含以下重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0331] VH包含SEQ ID NO:5所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体,并且VL包含SEQ ID NO:6所示氨基酸序列或其片段或者氨基酸序列或片段的变体。

[0332] 术语“片段”特别是指重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的一个或更多个互补决定区(CDR),优选至少CDR3可变区。在一个实施方案中,所述一个或更多个互补决定区(CDR)选自一组互补决定区CDR1、CDR2和CDR3。在一个特别优选的实施方案中,术语“片段”是指重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3。

[0333] 在一个实施方案中,如本文中所述的包含一个或更多个CDR、一组CDR或CDR组之组合的结合结构域包含所述CDR以及它们的间插框架区。优选地,该部分还将包括至少约50%的第一和第四框架区中之一或二者,50%为第一框架区的C端50%和第四框架区的N端50%。通过重组DNA技术进行的结合剂的构建可导致将残基N端或C端引入至由引入的接头编码的可变区,以有助于克隆或其他操作步骤,包括引入接头以连接本发明的可变区与另外的蛋白质序列,包括免疫球蛋白重链、其他可变结构域或蛋白质标签。

[0334] 在一个实施方案中,如本文中所述的包含一个或更多个CDR、一组CDR或CDR组之组合的结合结构域包含人抗体框架中的所述CDR。

[0335] 应理解,本文中所述的结合剂可通过施用核酸(例如编码药剂的RNA)和/或通过施用包含核酸(例如编码药剂的RNA)的宿主细胞而递送至患者。如果结合剂包含多于一条多肽链,则不同的多肽链可在相同的核酸上或在不同的核酸上编码。因此,待施用的核酸可以是不同核酸分子的混合物。当向患者施用,编码结合剂的核酸可以以裸露的形式或以合适的递送载体(例如以脂质体或纳米颗粒或病毒颗粒的形式)存在,或在宿主细胞内。经过长时间,提供的核酸可以以持续的方式产生药剂从而减轻对于治疗性抗体至少部分地观察到的不稳定性。可通过重组的方式产生递送至患者的核酸。如果将宿主细胞内不存在的核酸向患者施用,则优选被表达由所述核酸编码之药剂的患者的细胞摄取。如果在宿主细胞内存在核酸时向患者施用核酸,优选由患者中的宿主细胞进行表达以产生由所述核酸编码的药剂。

[0336] 在本发明的上下文中,术语“重组”意指“通过遗传改造制备”。优选地,在本发明的上下文中,“重组对象”(例如重组核酸)不是天然存在的。

[0337] 本文中使用的术语“天然存在的”是指该物体可见于自然界这一事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中并且可从自然界来源分离并且未经人在实验室中有意修饰的肽或核酸是天然存在的。

[0338] 本文中使用的术语“核酸”旨在包括DNA和RNA,例如基因组DNA、cDNA、mRNA、重组产生的和化学合成的分子。核酸可以是单链或双链。RNA包括体外转录的RNA(IVT RNA)或合成的RNA。

[0339] 核酸可包含在载体中。如本文中使用的术语“载体”包括技术人员已知的任何载体,其包括质粒载体、黏粒载体、噬菌体载体(例如λ噬菌体)、病毒载体(例如腺病毒或杆状病毒载体),或人工染色体载体(例如细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)或P1人

工染色体 (PAC))。所述载体包括表达载体以及克隆载体。表达载体包括质粒和病毒载体且一般含有用于在特定宿主生物体 (例如, 细菌、酵母、植物、昆虫或哺乳动物) 或者在体外表达系统中可操作地连接的编码序列之表达所必需的期望编码序列和合适的DNA序列。克隆载体一般用于改造和扩增某期望DNA片段, 并可缺乏表达所期望DNA片段所需要的功能性序列。

[0340] 在本发明的上下文中, 术语“RNA”涉及包含核糖核苷酸残基且优选完全或基本上由核糖核苷酸残基构成的分子。“核糖核苷酸”涉及在 $\beta$ -D-呋喃核糖基的2' -位上具有羟基的核苷酸。该术语包括双链RNA、单链RNA、分离的RNA例如部分纯化的RNA、基本上纯的RNA、合成的RNA、重组产生的RNA以及通过添加、缺失、替换和/或改变一个或更多个核苷酸而不同于天然存在的RNA之经修饰的RNA。这样的改变可包括例如向RNA的末端或内部 (例如在RNA的一个或更多个核苷酸处) 添加非核苷酸材料。在RNA分子中的核苷酸还可包含非标准核苷酸, 例如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的RNA可称为类似物或天然存在的RNA的类似物。

[0341] 根据本发明, 术语“RNA”包括并优选涉及“mRNA”, 其意指“信使RNA”并且涉及可使用DNA作为模板而产生且编码肽或蛋白质的“转录物”。mRNA通常包含5' 非翻译区 (5' -UTR)、蛋白质或肽编码区和3' 非翻译区 (3' -UTR)。mRNA在细胞中和体外具有有限的半衰期。优选地, 使用DNA模板通过体外转录来产生mRNA。在本发明的一个实施方案中, RNA通过在体外转录或化学合成来获得。体外转录方法是技术人员已知的。例如, 有多种市售的体外转录试剂盒。

[0342] 在本发明的一个实施方案中, RNA是自我复制的RNA, 例如单链自我复制的RNA。在一个实施方案中, 自我复制的RNA是正义单链RNA。在一个实施方案中, 自我复制的RNA是病毒RNA或来自病毒RNA的RNA。在一个实施方案中, 自我复制的RNA是甲病毒 (alphaviral) 基因组RNA或来自甲病毒基因组RNA。在一个实施方案中, 自我复制的RNA是病毒基因表达载体。在一个实施方案中, 病毒是塞姆利基森林病毒 (Semliki forest virus)。在一个实施方案中, 自我复制的RNA包含一个或更多个转基因, 所述转基因中至少一个编码本文中所述的结合剂。在一个实施方案中, 如果RNA是病毒RNA或来自病毒RNA, 则转基因可部分地或完全地替代病毒序列, 例如编码结构蛋白的病毒序列。在一个实施方案中, 自我复制的RNA是体外转录的RNA。

[0343] 甲病毒的基因组是正义单链RNA (ssRNA (+)), 其编码大型多蛋白的两个开放阅读框 (open reading frame, ORF)。在基因组5' 端的ORF编码非结构蛋白nsP1至nsP4 (nsP1-4), 其被翻译并加工成RNA依赖性RNA聚合酶 (复制酶); 在3' 端的ORF编码结构蛋白-衣壳和糖蛋白。这两个ORF均通过所谓的亚基因组启动子 (subgenomic promoter, SGP) 分离, 所述亚基因组启动子控制结构ORF的转录。当作为基因载体利用时, SGP后面的结构蛋白通常被转基因所替代。为了将这样的载体包装到病毒颗粒中, 通常由辅助构建体反式表达所述结构蛋白。在经感染细胞的细胞质中, 甲病毒专门在RNA水平上复制。感染后, ssRNA (+) 基因组充当用于nsP1234多蛋白前体翻译的mRNA, 所述nsP1234多蛋白前体在病毒生命周期的早期阶段自我蛋白水解加工成片段nsP123和nsP4。片段nsP123和nsP4形成从基因组RNA模板转录 (-) 链RNA的 (-) 链复制酶复合体。在稍后的阶段中, nsP1234多蛋白被彻底切割成组装为合成新 (+) 链基因组之 (+) 链复制酶复合体的单蛋白以及编码结构蛋白或转基因的亚基因组转录

物。亚基因组RNA以及新基因组RNA被加帽并聚腺苷酸化,并因此在靶细胞感染后被识别为mRNA。只有新基因组RNA含有确保专门将基因组RNA包装到出芽病毒体(budding virion)中的包装信号。甲病毒复制子对于载体学(vectorology)的吸引力基于加帽的和聚腺苷酸化之RNA基因组的正定向。可翻译的复制子RNA易于在体外合成,由此将帽类似物(cap-analoga)添加至体外转录反应可实现加帽且在质粒模板上poly-A尾可被编码为poly-T轨道(poly-T track)。通过常规的转染技术转染体外转录的(IVT)复制子,且即使少量的起始IVT RNA也被迅速增殖。在转移后的数小时内,位于SGP下游的转基因被转录为每个细胞约40,000至200,000个拷贝的非常高拷贝数的亚基因组RNA,因此,重组蛋白被强烈表达并不出人意料。根据具体的目的,可将IVT复制子直接转染到靶细胞中,或用反式提供结构基因的辅助载体包装到甲病毒颗粒中。转移到皮肤或肌肉中导致了高且持续的局部表达,同时强烈诱导体液免疫应答和细胞免疫应答。

[0344] 为了提高根据本发明使用的RNA的表达和/或稳定性,可将其修饰,优选不改变表达的肽或蛋白质的序列。

[0345] 在RNA的情况下,根据本发明所使用的术语“修饰”包括不在所述RNA中天然存在的RNA的任何修饰。

[0346] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明使用的RNA不具有未加帽的5'-三磷酸。可通过用磷酸酶处理RNA来实现除去这样的未加帽的5'-三磷酸。

[0347] 根据本发明的RNA可具有经修饰的天然存在的或合成的核糖核苷酸以提高其稳定性和/或降低细胞毒性和/或免疫原性。例如,在一个实施方案中,在根据本发明使用的RNA中,5-甲基胞苷被部分地或完全地(优选完全地)替换为胞苷。作为替代或补充,在一个实施方案中,在根据本发明使用的RNA中,假尿苷被部分地或完全地(优选完全地)替换为尿苷。

[0348] 在一个实施方案中,术语“修饰”涉及提供具有5'-帽或5'-帽类似物的RNA。术语“5'-帽”是指在mRNA分子的5'-端发现的帽结构且一般由通过不寻常的5'-至5'-三磷酸键连接至mRNA的鸟苷核苷酸组成。在一个实施方案中,该鸟苷在7位上被甲基化。术语“常规的5'-帽”是指天然存在的RNA 5'-帽,优选是指7-甲基鸟苷帽(m7G)。在本发明的上下文中,术语“5'-帽”包括类似于RNA帽结构的5'-帽类似物且被修饰以在与RNA连接时(优选在体内和/或在细胞中)具有稳定所述RNA的能力。

[0349] 在所述5'-帽或5'-帽类似物存在的情况下,可通过DNA模板的体外转录来实现提供具有5'-帽或5'-帽类似物的RNA,其中所述5'-帽共转录地并入到所产生的RNA链中,或者例如可通过体外转录产生RNA且使用加帽酶(例如,痘苗病毒(vaccinia virus)的加帽酶)将5'-帽在转录后连接至RNA。

[0350] RNA可包括进一步的修饰。例如,在本发明中使用的RNA的进一步修饰可以是天然存在的poly(A)尾的延长或截短或者5'-或3'-非翻译区(UTR)的改变,例如引入与所述RNA的编码区不相关的UTR,例如,插入一个或更多个、优选两个拷贝的来自珠蛋白基因(例如 $\alpha$ 2-珠蛋白、 $\alpha$ 1-珠蛋白、 $\beta$ -珠蛋白,优选 $\beta$ 珠蛋白,更优选人 $\beta$ -珠蛋白)的3'-UTR。

[0351] 因此,为了提高根据本发明所使用的RNA的稳定性和/或表达,可对其进行修饰以与polyA序列结合出现,优选长度为10至500、更优选30至300、甚至更优选65至200、且尤其是100至150个腺苷残基。在一个尤其优选的实施方案中,poly-A序列的长度为约120个腺苷残基。此外,两种或更多种3'-非翻译区(UTR)并入到RNA分子的3'-非翻译区中可导致翻译

效率的提高。在一个特别的实施方案中,3'-UTR来自人 $\beta$ -珠蛋白基因。

[0352] 优选地,如果RNA递送至细胞(即转染到细胞中),特别是存在于体内的细胞,则RNA表达其编码的蛋白质、肽或抗原。

[0353] 术语“转染”涉及向细胞中引入核酸(特别是RNA)。出于本发明的目的,术语“转染”还包括向细胞中引入核酸或由这样的细胞摄取核酸,其中所述细胞可存在于对象(例如患者)中。因此,根据本发明,用于转染本文中所述核酸的细胞可存在于体外或体内,例如,所述细胞可形成患者的器官、组织和/或生物体的一部分。根据本发明,转染可以是瞬时的或稳定的。对于转染的一些应用,即使所述转染的遗传材料仅瞬时表达也是足够的。由于在转染过程中引入的核酸通常不整合到核基因组中,因此外来核酸将通过有丝分裂稀释或被降解。允许核酸附加型扩增(episomal amplification)的细胞大幅降低了稀释的速率。如果希望经转染的核酸实际上保留在细胞及其子代细胞的基因组中,则必须发生稳定转染。RNA可被转染到细胞中以瞬时表达其所编码的蛋白质。

[0354] 术语RNA的“稳定性”涉及RNA的“半衰期”。“半衰期”涉及消除分子活性、量或数目之一半而所需的时间周期。在本发明的上下文中,RNA的半衰期指示所述RNA的稳定性。RNA的半衰期可能影响RNA的“表达持续时间”。可预期具有长半衰期的RNA将长期表达。

[0355] 在本发明的上下文中,术语“转录”涉及其中DNA序列中的遗传密码被转录为RNA的过程。随后,RNA可被翻译为蛋白质。根据本发明中,术语“转录”包括“体外转录”,其中术语“体外转录”涉及其中RNA(特别是mRNA)是优选使用合适的细胞提取物在无细胞系统中体外合成的RNA。优选地,克隆载体应用于生产转录物。这些克隆载体一般被指定为转录载体,并且由根据本发明的术语“载体”所涵盖。

[0356] 根据本发明的术语“翻译”涉及在细胞的核糖体中的过程,信使RNA的链通过其指导氨基酸序列的组装以形成肽或蛋白质。

[0357] 根据本发明,术语“表达”以其最通用的含义使用,并且包括例如通过转录和/或翻译生产RNA和/或肽或蛋白质。关于RNA,术语“表达”或“翻译”特别地涉及肽或蛋白质的产生。它还包括核酸的部分表达。此外,表达可以是瞬时的或稳定的。根据本发明,术语表达还包括“异常表达”或“反常表达”。

[0358] 根据本发明,“异常表达”或“反常表达”意指与参照(例如,不具有与某种蛋白质(例如肿瘤抗原)的异常或反常表达相关之疾病的对象中的状态)相比,表达被改变,优选提高。表达的提高是指提高至少10%,特别是至少20%,至少50%或至少100%,或更多。在一个实施方案中,表达仅见于患病组织中,而在健康组织中表达被抑制。

[0359] 术语“特异性表达”意指蛋白质基本上仅在特定的组织或器官中表达。例如,肿瘤抗原在胃黏膜中特异性表达意指所述蛋白质主要在胃黏膜中表达且在其他组织中不表达或在其他组织或器官类型中的表达没有达到显著程度。因此,即专门在胃黏膜的细胞中表达且在任何其他组织(例如睾丸)中表达显著程度较小的蛋白质在胃黏膜的细胞中特异性地表达。在一些实施方案中,肿瘤抗原也可在正常条件下在一种以上的组织类型或器官中(例如在2或3种组织类型或器官,但优选是在不超过3种不同的组织或器官类型中)特异性地表达。在这种情况下,则肿瘤抗原在这些器官中特异性地表达。例如,如果肿瘤抗原在正常条件下表达,优选在肺和胃中以大致相同的程度表达,则所述肿瘤抗原在肺和胃中特异性表达。

[0360] 根据本发明,术语“RNA编码”意指如果存在于合适的环境中(优选在细胞内),RNA可被表达以产生其所编码的蛋白质或肽。

[0361] 本发明的一些方面依赖于宿主细胞的过继转移,宿主细胞在体外转染有核酸(例如本文中所述的编码结合剂的RNA),并被转移至接受者(例如患者),优选在从低的前体频率向临床相关细胞数目离体扩增后进行。根据本发明,用于治疗的宿主细胞可与待治疗接受者是自体的(autologous)、同种异体的(allogeneic)或同基因的(syngeneic)。

[0362] 术语“自体的”用于描述来自同一对象的事物。例如,“自体移植”是指来自同一对象的组织或器官的移植。这样的过程是有利的,因为它们克服了免疫学屏障,否则会导致排斥。

[0363] 术语“同种异体的”用于描述来自相同物种之不同个体的事物。当在一个或多个基因座上的基因不不同时,将两个或多个个体称为彼此是同种异体的。

[0364] 术语“同基因的”用于描述来自具有相同基因型的个体或组织的任何事物,即,同卵双胞胎或同一近交品系的动物,或其组织。

[0365] 术语“异源的”用于描述由多个不同要素组成的事物。作为一个实例,将一个个体的骨髓转移到不同的个体中构成了异源移植。异源基因是来自不同于该对象之来源的基因。

[0366] 根据本发明的术语“肽”包括寡肽和多肽并且指包含两个或多个(优选3个或更多,优选4个或更多,优选6个或更多,优选8个或更多,优选9个或更多,优选10个或更多,优选13个或更多,优选16个或更多,优选21个或更多且至多优选8、10、20、30、40或50个,特别是100个)通过肽键共价连接的氨基酸。术语“蛋白质”是指大的肽,优选是指具有超过100个氨基酸残基的肽,但一般而言,术语“肽”和“蛋白质”是同义词并且在本文中可互换使用。

[0367] 本文中关于特定的氨基酸序列(例如,在序列表中所示的那些)给出的教导将被解释为也涉及产生与所述特定的序列在功能上等同之序列的所述特异性序列的变体,例如与特定氨基酸序列的性质显示出相同或相似性质的氨基酸序列。一个重要的性质是保留与靶标的结合或维持效应物功能。优选地,相对于特定序列为变体的序列,当它替代了抗体中的特定序列时保留了所述抗体与密蛋白和/或CD3的结合且优选保留如本文中所述抗体的功能,例如CDC介导的裂解或ADCC介导的裂解。此外,优选地,相对于特定序列为变体的序列,当它替代了结合剂中的特定序列时保留了所述结合剂与密蛋白和/或CD3的结合且优选保留如本文中所述结合剂的功能,例如细胞毒性T细胞介导的裂解。

[0368] 例如,序列表中示出的序列可被修饰以除去一个或多个、优选全部的游离半胱氨酸残基,特别是通过除半胱氨酸以外的氨基酸(优选丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸、甘氨酸、酪氨酸、色氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸)来替代半胱氨酸残基。

[0369] 本领域技术人员应当理解,特别是可对CDR、高变区和可变区的序列进行修饰而不丧失结合密蛋白和/或CD3的能力。例如,CDR区与本文中指定的区域相同或高度同源。对于“高度同源”,可考虑在CDR中进行1至5(优选1至4,例如1至3或1或2)个替换。此外,可对高变区和可变区进行修饰以使得它们显示出与本文中具体公开的区域的高度同源性。在一个实施方案中,可变区序列仅在框架序列中与本文中具体公开的可变区序列不同。

[0370] 出于本发明的目的,氨基酸序列的“变体”包括氨基酸插入变体、氨基酸添加变体、

氨基酸缺失变体和/或氨基酸替换变体。在蛋白质的N端和/或C端包含缺失的氨基酸缺失变体也被称为N端和/或C端截短变体。

[0371] 氨基酸插入变体包括在特定氨基酸序列中插入单个或两个或更多个氨基酸。在具有插入的氨基酸序列变体的情况下,向氨基酸序列中的特定位点中插入一个或更多个氨基酸残基,但是随机插入并对所产生的产物进行合适的筛选也是可能的。

[0372] 氨基酸添加变体包括一个或更多个氨基酸(例如1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸)的氨基端和/或羧基端融合。

[0373] 氨基酸缺失变体的特征在于从序列中除去一个或更多个氨基酸,例如,除去1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸。所述缺失可在蛋白质的任何位置中。

[0374] 氨基酸替换变体的特征在于除去序列中的至少一个残基,并且在其位置插入另一个残基。优选在氨基酸序列中同源蛋白质或肽之间非保守的位置处进行修饰和/或将氨基酸用具有类似特性的其他氨基酸替代。优选地,蛋白质变体中的氨基酸改变为保守氨基酸改变,即,替换带有类似电荷的或不带电荷的氨基酸。保守氨基酸改变涉及替换与其侧链相关的氨基酸家族之一。天然存在的氨基酸一般分为四个家族:酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)、碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、非极性氨基酸(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)和不带电荷的极性氨基酸(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时一起被归类为芳香族氨基酸。

[0375] 优选地,给定的氨基酸序列和所述给定的氨基酸序列之变体氨基酸序列之间的相似性(优选同一性)程度将为至少约60%、65%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。优选地针对氨基酸区域给出相似性或同一性程度,所述区域为参照氨基酸序列整个长度的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。例如,如果参照氨基酸序列由200个氨基酸组成,优选地针对至少约20、至少约40、至少约60、至少约80、至少约100、至少约120、至少约140、至少约160、至少约180或约200个氨基酸(优选连续的氨基酸)给出相似性或同一性程度。在一些优选的实施方案中,针对参照氨基酸序列的整个长度给出相似性或同一性程度。可用本领域已知的工具进行用于确定序列相似性(优选序列同一性)的比对,优选使用最佳序列比对,例如,使用Align,采用标准设定,优选EMBOSS::needle,Matrix:Blosum62,空位开放(Gap Open) 10.0,空位扩展(Gap Extend)0.5来进行。

[0376] “序列相似性”表明相同的或表示保守氨基酸替换的氨基酸的百分比。两条氨基酸序列之间的“序列同一性”表示所述序列之间相同的氨基酸的百分比。

[0377] 术语“百分比同一性”旨在表示在最佳比对之后获得的待比较的两条序列之间相同的氨基酸残基的百分比,该百分比完全是统计学意义上的,并且两条序列之间的差异随机分布在其整个长度上。通过在对这些序列进行最佳比对之后对其进行比较来常规地进行两条氨基酸序列之间的序列比较,所述比较通过区段或通过“比较窗”来进行以鉴定和比较局部区域的序列相似性。除手工产生以外,用于比较的序列的最佳比对还可通过以下手段产生:Smith和Waterman,1981,Ads App.Math.2,482的局部同源性算法,Neddleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48,443的局部同源性算法,Pearson和Lipman,1988,Proc.Natl

Acad.Sci.USA85,2444的相似性搜索法,或者使用这些算法的计算机程序(在Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N和TFASTA,Genetics Computer Group,575Science Drive,Madison,Wis.)。

[0378] 通过以下方法计算百分比同一性:确定进行比较的两条序列之间相同的位置数,用该数除以进行比较的位置数,并用所得结果乘以100,从而获得这两条序列之间的百分比同一性。

[0379] 本发明的结合剂可在细胞内产生(例如在胞质溶胶中,在周质中或在内含体中),并随后从宿主细胞中分离并任选地进一步纯化;或者它们可在细胞外产生(例如在培养宿主细胞的培养基中),并随后从培养基中分离并任选地进一步纯化。用于重组产生多肽的方法和试剂(例如特异性的合适表达载体、转化或转染方法、选择标志物、蛋白质表达的诱导方法、培养条件等)是本领域中已知的。类似地,蛋白质分离和纯化技术是本领域技术人员公知的。

[0380] 术语“细胞”或“宿主细胞”优选涉及完整的细胞,即具有完整的膜,尚未释放其正常的细胞内组分(例如酶、细胞器或遗传物质)的细胞。完整的细胞优选活细胞,即能够执行其正常代谢功能的活细胞。优选地,根据本发明,所述术语涉及可转染有外源核酸的任何细胞。优选地,当细胞转染有外源核酸并转移至接受者时可在接受者中表达所述核酸。术语“细胞”包括细菌细胞;其他可用的细胞是酵母细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。合适的细菌细胞包括来自革兰氏阴性细菌菌株的细胞,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、变形杆菌属(*Proteus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*),以及革兰氏阳性细菌菌株,例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和乳球菌属(*Lactococcus*)的菌株。合适的真菌细胞包括来自木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)和曲霉属(*Aspergillus*)物种的细胞。合适的酵母细胞包括来自酵母属(*Saccharomyces*) (例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*) (例如粟酒裂殖酵母(*Schizo saccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*) (例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*))和汉逊酵母属(*Hansenula*)物种的细胞。合适的哺乳动物细胞包括例如CHO细胞、BHK细胞、HeLa细胞、COS细胞、293HEK等。然而,也可使用两栖动物细胞、昆虫细胞、植物细胞和任何在本领域种用于表达异源蛋白质的其他细胞。特别优选哺乳动物细胞用于过继转移,例如来自人、小鼠、仓鼠、猪、山羊和灵长类的细胞。细胞可来源于大量的组织类型,且包括原代细胞和细胞系,例如免疫系统的细胞,特别是抗原呈递细胞(例如树突细胞和T细胞)、干细胞(例如造血干细胞和间充质干细胞)以及其他的细胞类型。抗原呈递细胞是在其表面上在主要组织相容性复合体的背景中展示抗原的细胞。T细胞可使用其T细胞受体(TCR)识别该复合体。

[0381] 本文中所述的“降低”、“减小”或“抑制”意指水平(例如,表达水平或细胞增殖水平)的总体降低或导致总体降低的能力,优选5%或更高,10%或更高,20%或更高,更优选50%或更高,最优选75%或更高。

[0382] 例如“提高”或“增强”的术语优选涉及提高或增强约至少10%,优选至少20%,优选至少30%,更优选至少40%,更优选至少50%,甚至更优选至少80%,最优选至少100%、至少200%、至少500%、至少1000%、至少10000%或甚至更多。

[0383] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

[0384] ADCC描述了如本文中所述的效应细胞(特别是淋巴细胞)的细胞杀伤能力,其优选需要被抗体标记的靶细胞。

[0385] ADCC优选在抗体与肿瘤细胞上的抗原结合以及抗体Fc结构域接合免疫效应细胞表面上的Fc受体(FcR)时发生。已鉴定出数个Fc受体家族,且特定的细胞群特征性地表达确定的Fc受体。可将ADCC视为直接诱导不同程度的直接肿瘤破坏的机制,所述破坏导致抗原呈递并诱导肿瘤指向性T细胞应答。优选地,ADCC的体内诱导将导致肿瘤指向性T细胞应答和宿主来源的抗体应答。

[0386] 补体依赖性细胞毒性

[0387] CDC是可通过抗体指引的另一种细胞杀伤方法。IgM是用于补体活化的最有效同种型。IgG1和IgG3在通过经典补体活化途径指引CDC方面也都很有效。优选地,在该级联中,抗原-抗体复合体的形成导致紧邻参与的抗体分子(例如,IgG分子)的C<sub>H</sub>2结构域的多个C1q结合位点暴露出来(C1q是补体C1的三种亚组分之一)。优选地,这些暴露的C1q结合位点将先前的低亲和力C1q-IgG相互作用转变为一种高亲合力相互作用,这触发了涉及一系列其他补体蛋白质的级联事件并且导致效应细胞趋化剂/活化剂C3a和C5a的蛋白水解释放。优选地,该补体级联最终形成膜攻击复合体,其在细胞膜中产生孔,这有利于水和溶质自由地进入和离开细胞。

[0388] 本文中所述的用于例如提供VL和VH区的抗体可通过多种技术产生,包括常规的单克隆抗体法,例如,Kohler和Milstein,Nature 256:495(1975)的标准体细胞杂交技术。尽管原则上优选体细胞杂交方案,但是也可采用其他用于产生单克隆抗体的技术,例如,B淋巴细胞的病毒或致癌转化或使用抗体基因文库的噬菌体展示技术。

[0389] 用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的优选动物系统为鼠系统。在小鼠中产生杂交瘤是已经非常成熟的方案。分离用于融合的经免疫接种脾细胞的免疫接种方案和技术是本领域中已知的。融合伴侣(fusion partner)(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合方案也是已知的。

[0390] 用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的另一些优选动物系统为大鼠系统和兔系统(例如,Spieker-Polet等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.92:9348(1995)中所描述的,还参见Rossi等,Am.J.Clin.Pathol.124:295(2005))。

[0391] 在又一个优选实施方案中,可使用携带部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生人单克隆抗体。这些转基因和转染色体小鼠包括分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并且在本文中统称为“转基因小鼠”。可按照W02004 035607中对CD20的详细描述在这样的转基因小鼠中进行人抗体的产生。

[0392] 用于产生单克隆抗体的又一策略为直接从产生具有确定特异性之抗体的淋巴细胞中分离编码抗体的基因,例如,参见Babcock等,1996;A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities。重组抗体工程的细节还可参见Welschof和Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8和Benny K.C.Lo Antibody Engineering ISBN1-58829-092-1。

[0393] 为了产生抗体,可如所述,利用来自抗原序列(即,抗体待指向的序列)的载体缀合肽、重组表达的抗原或其片段的富集制备物和/或表达抗原的细胞来免疫接种小鼠。或者,

可利用编码抗原或其片段的DNA来免疫接种小鼠。如果使用抗原的纯化制备物或富集制备物的免疫接种不产生抗体,还可用表达抗原的细胞(例如,细胞系)免疫接种小鼠来促进免疫应答。

[0394] 可用通过尾静脉或眶后取血获得的血浆和血清样品在免疫接种方案的全程中监测免疫应答。可使用具有足够效价的免疫球蛋白的小鼠来进行融合。可在处死并移出脾之前3天,利用抗原表达细胞腹膜内或经静脉内对小鼠进行加强以提高分泌特异性抗体之杂交瘤的比例。

[0395] 为了产生生产单克隆抗体的杂交瘤,可从经免疫接种小鼠中分离脾细胞和淋巴结细胞,并将其与合适的永生化细胞系(例如,小鼠骨髓瘤细胞系)融合。然后,可针对抗原特异性抗体的产生来筛选获得的杂交瘤。然后可通过ELISA对单个孔筛选分泌抗体的杂交瘤。使用抗原表达细胞通过免疫荧光和FACS分析,可对抗原有特异性的抗体进行鉴定。可将分泌抗体的杂交瘤重新平板接种(replate),再次筛选,并且如果单克隆抗体仍为阳性的,则可通过有限稀释进行亚克隆。然后,可在组织培养基中体外培养稳定的亚克隆以产生抗体用于表征。

[0396] 还可使用例如本领域公知的重组DNA技术与基因转染方法的组合在宿主细胞转染瘤中产生抗体(Morrison,S.(1985)Science 229:1202)。

[0397] 例如,在一个实施方案中,可将目的基因(例如,抗体基因)连接到表达载体(例如,真核表达质粒)中,例如通过使用WO 87/04462、W089/01036和EP 338 841中公开的GS基因表达系统或本领域中公知的其他表达系统来进行。可将具有所克隆抗体基因的纯化质粒引入真核宿主细胞中,例如CHO细胞、NS/0细胞、HEK293T细胞或HEK293细胞或者作为替代地其他真核细胞(例如,来自植物的细胞、真菌或酵母细胞)中。用于引入这些基因的方法可以是本领域中所所述的方法,例如电穿孔、lipofectine、lipofectamine等。在将这些抗体基因引入宿主细胞后,可对表达抗体的细胞进行鉴定和选择。这些细胞代表此后可扩增其表达水平并扩大规模以生产抗体的转染瘤。可从这些培养上清液和/或细胞中分离并纯化出重组抗体。

[0398] 或者,克隆的抗体基因可在其他表达系统中表达,包括原核细胞,例如微生物,例如大肠杆菌(E.coli)。此外,抗体可在转基因非人动物中产生,例如在绵羊和兔的乳汁中或在鸡蛋中产生,或者在转基因植物中产生;参见例如,Verma,R.,等(1998)J.Immunol.Meth.216:165-181;Pollock,等(1999)J.Immunol.Meth.231:147-157;以及Fischer,R,等(1999)Biol.Chem.380:825-839。

[0399] 嵌合

[0400] 未标记的鼠抗体在人中具有高免疫原性,当重复应用时导致治疗效果降低。通过重链恒定区介导主要的免疫原性。如果对各个抗体进行嵌合或人源化,则鼠抗体在人中的免疫原性可被降低或完全避免。嵌合抗体是不同部分来自不同动物物种的抗体,例如具有来自鼠抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些。通过将鼠抗体重链和轻链的可变区与人重链和轻链的恒定区连接来实现抗体的嵌合(例如,如Kraus等,Methods in Molecular Biology series中,Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8所述)。在一个优选实施方案中,通过将人 $\kappa$ -轻链恒定区连接至鼠轻链可变区来产生嵌合抗体。在另一优选实施方案中,可通过将人 $\lambda$ 轻链恒定区连接至鼠轻链可变区来产生嵌合抗

体。用于产生嵌合抗体的优选重链恒定区为IgG1、IgG3和IgG4。用于产生嵌合抗体的另一些优选重链恒定区为IgG2、IgA、IgD和IgM。

[0401] 人源化

[0402] 抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)的氨基酸残基与靶抗原相互作用。由于这个原因,在各抗体之间,CDR内的氨基酸序列比CDR外的序列更多样。由于CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,因此可能通过构建表达载体来表达模拟特定天然存在的抗体之特性的重组抗体,所述表达载体包含来自所述特定天然存在抗体的CDR序列,其移植到来自具有不同特性之不同抗体的框架序列上(参见,例如,Riechmann,L.等(1998) Nature 332:323-327; Jones,P.等(1986) Nature 321:522-525;和Queen,C.等(1989) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:10029-10033)。这样的框架序列可获自包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库。这些种系序列将不同于成熟的抗体基因序列,因为它们将不包含完整组装的可变基因,其是在B细胞成熟期间通过V(D)J连接而形成的。种系基因序列还将在均匀穿过可变区的个别处不同于高亲和力第二抗体库(secondary repertoire antibody)的序列。

[0403] 可使用标准结合测定(例如,ELISA、Western印迹、免疫荧光和流式细胞术分析)来确定抗体和其他结合剂结合抗原的能力。

[0404] 为了纯化抗体,选择的生产细胞系可在2升旋转烧瓶中培养以进行重组抗体纯化。或者,可在基于透析的生物反应器中产生抗体。可过滤上清液,并且如果必要的话,在用蛋白L-琼脂糖凝胶(L-sepharose)进行亲和色谱之前浓缩。可通过凝胶电泳和高效液相色谱检查洗脱的抗体以确保纯度。可将缓冲溶液交换到PBS中,并且可使用相应的消光系数通过OD280确定浓度。可将重组抗体等分并储存在-65至-85℃。

[0405] 为了示出单克隆抗体与表达抗原之活细胞的结合,可使用流式细胞术。可将天然或转染后表达抗原的细胞系和缺乏抗原表达的阴性对照(在标准培养条件下培养)与杂交瘤上清液或含有1%FBS的PBS中之不同浓度的单克隆抗体混合,并可于4℃下孵育30分钟。在洗涤之后,荧光标记的检测试剂(例如荧光缀合的抗IgG抗体、抗Fab抗体或蛋白-L)可在与一抗染色相同的条件下与抗原结合的单克隆抗体结合。通过流式细胞术,用FACS仪器利用光散射和侧向散射特性对单个活细胞设门来分析样品。为了在单次测量中区分抗原特异性单克隆抗体和非特异性结合物,可采用共转染方法。可如上所述对用编码抗原和荧光标志物的质粒瞬时转染的细胞进行染色。可在与抗体染色细胞不同的荧光通道中检测到经转染的细胞。由于大多数经转染的细胞同时表达这两种转基因,因此抗原特异性单克隆抗体优选与表达荧光标志物的细胞结合,而非特异性抗体以相当的比例与未转染的细胞结合。可利用使用荧光显微术的替代测定来补充或替代流式细胞术测定。可完全如上所述对细胞进行染色并通过荧光显微术进行检查。

[0406] 为了示出单克隆抗体与表达抗原的活细胞结合,可使用免疫荧光显微术分析。例如,将自发或在转染后表达抗原的细胞系和缺乏抗原表达的阴性对照于标准培养条件下在腔室载玻片(chamber slide)中在补充有10%胎牛血清(fetal calf serum,FCS)、2mM L-谷氨酰胺、100IU/ml青霉素和100µg/ml链霉素的DMEM/F12培养基中培养。然后用甲醇或多聚甲醛固定细胞或者不做处理。然后,可将细胞与针对抗原的单克隆抗体于25℃下反应30分钟。在洗涤之后,使细胞与Alexa555标记的抗小鼠IgG二抗(Molecular Probes)在相同条

件下反应。然后,通过荧光显微术检查细胞。

[0407] 可制备来自表达抗原之细胞的细胞提取物和适当的阴性对照,并进行十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳之后,分开的抗原将被转移至硝酸纤维素膜,封闭,并用待测试的单克隆抗体进行探测。可使用抗小鼠IgG过氧化物酶检测IgG结合并用ECL底物进行显影。

[0408] 还可按照技术人员公知的方式,通过免疫组织化学来测试抗体与抗原的反应性,例如使用多聚甲醛或丙酮固定的冷冻切片或用多聚甲醛固定的石蜡包埋组织切片,其来自获自常规手术过程期间的患者或获自携带接种有自发表达抗原或在转染后表达抗原之细胞系的异种移植肿瘤的小鼠的非癌组织或癌组织样品。对于免疫染色,可根据供应商的说明孵育与抗原反应的抗体,然后孵育辣根过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠或山羊抗兔抗体(DAKO)。

[0409] 临床前研究

[0410] 还可在体内模型(例如,在携带有用表达密蛋白之细胞系接种的异种移植肿瘤的免疫缺陷性小鼠中)中对本文中所述的结合物质进行测试以确定它们控制表达密蛋白之肿瘤细胞生长的效力。

[0411] 可在将表达密蛋白的肿瘤细胞异种移植到免疫受损的小鼠或其他动物中后,使用本文中所述结合剂进行体内研究。可向无肿瘤小鼠施用结合剂,然后注射肿瘤细胞以测量所述结合剂防止肿瘤或肿瘤相关症状形成的效果。可向荷瘤小鼠施用结合剂以确定各结合剂降低肿瘤生长、转移或肿瘤相关症状的治疗效果。结合剂的应用可与其他物质(如细胞抑制药物、生长因子抑制剂、细胞周期阻断剂、血管生成抑制剂或抗体)的应用组合以测定组合的协同效力和潜在毒性。为了分析结合剂介导的毒性副作用,可用结合剂或对照试剂接种动物,并针对与密蛋白-结合剂治疗可能相关的症状进行彻底研究。

[0412] 结合剂识别的表位的作图可如Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9的“Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology)”和ISBN-089603-375-9的“Epitope Mapping: A Practical Approach” Practical Approach Series, 248和Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay的“Epitope Mapping: A Practical Approach” Practical Approach Series, 248中的详细描述进行。

[0413] 可以以任意合适的药物组合物的形式施用本文中所述的化合物和药剂。

[0414] 本发明的药物组合物优选是无菌的,并含有有效量的本文中所述结合剂和本文中讨论的任意的其他药剂以产生期望的反应或期望的效果。

[0415] 药物组合物通常以均一剂型提供,并且可以以本身已知的方式制备。药物组合物可例如是溶液或混悬液的形式。

[0416] 药物组合物可包含盐、缓冲物质、防腐剂、载体、稀释剂和/或赋形剂,所有这些均优选为可药用的。术语“可药用的”是指不与药物组合物的活性成分的作用相互作用之材料的无毒性。

[0417] 不可药用盐可用于制备可药用盐,并且也包括在本发明中。这类可药用盐以非限制性方式包括由以下酸制备的那些:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。可药用盐还可制备成碱金属盐或碱土金属盐,例如钠盐、钾盐或钙盐。

[0418] 适用于药物组合物的缓冲物质包括盐形式的乙酸、盐形式的柠檬酸、盐形式的硼酸和盐形式的磷酸。

[0419] 适用于药物组合物中的防腐剂包括苯扎氯铵、氯丁醇、对羟基苯甲酸酯和硫柳汞。

[0420] 可注射制剂可包含可药用赋形剂,例如乳酸林格液(Ringer Lactate)。

[0421] 术语“载体”是指天然或合成性质的有机或无机组分,其中将活性组分组合以有助于、增强或实现应用。根据本发明,术语“载体”还包括适于向患者施用的一种或更多种相容的固体或液体填充剂、稀释剂或包封物质。

[0422] 可用于肠胃外施用的载体物质为例如,无菌水、林格液、乳酸林格液、无菌氯化钠溶液、聚亚烷基二醇、氢化萘以及特别是生物相容性丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯/多氧-丙烯共聚物(polyoxyethylene/polyoxy-propylene copolymer)。

[0423] 术语“赋形剂”在本文中使用时旨在表示可存在于药物组合物中但不是活性成分的所有物质,例如,载体、黏合剂、润滑剂、增稠剂、表面活性剂、防腐剂、乳化剂、缓冲剂、矫味剂或着色剂。

[0424] 本文中所述的药剂和组合物可通过任意常规途径施用,例如,通过肠胃外施用,包括通过注射或输注。施用优选肠胃外施用,例如,静脉内施用、动脉内施用、皮下施用、皮内施用或肌内施用。

[0425] 适于肠胃外施用的组合物一般包括活性化合物的无菌水性或非水性制备物,其优选与接受者的血液等张。相容性载体和溶剂的一些实例为林格液和等张氯化钠溶液。此外,通常使用无菌固定油类作为溶液或混悬液介质。

[0426] 本文中所述的药剂和组合物以有效量施用。“有效量”是指单独或与其他剂量一起实现期望反应或期望效果的量。在治疗特定疾病或特定病症的情况下,期望的反应优选涉及抑制疾病的进程。这包括减缓疾病的进展并且特别是中断或逆转疾病的进展。治疗疾病或病症中的期望反应还可以是延迟或预防所述疾病或所述病症的发作。

[0427] 本文中所述药剂或组合物的有效量将取决于待治疗的病症、疾病的严重程度、患者的个体参数(包括年龄、生理状况、身材大小和体重)、治疗的持续时间、伴随治疗的类型(如果存在的话)、具体施用途径以及类似因素。因此,本文中所述药剂的施用剂量可取决于多个这样的参数。在患者对初始剂量反应不够的情况下,可使用更高的剂量(或通过不同的更局部化的施用途径实现的有效的更高剂量)。

[0428] 本文中所述的药剂和组合物可例如在体内向患者施用以治疗或预防多种病症,例如本文中所述的那些。优选的患者包括人患者,其具有可通过施用本文中所述药剂和组合物来矫正或改善的病症。这包括涉及以密蛋白(例如CLDN18.2和/或CLDN6)的表达模式改变为特征的细胞的病症。

[0429] 例如,在一个实施方案中,本文中所述的药剂可用于治疗患有癌症疾病的患者,所述癌症疾病例如本文中所述的癌症疾病,其特征存在于存在表达密蛋白的癌细胞。

[0430] 根据本发明描述的药物组合物和治疗方法也可用于免疫接种或疫苗接种以预防本文中所述的疾病。

[0431] 本发明的药物组合物可与补充免疫增强物质(例如一种或更多种佐剂)一起施用,并且可包含一种或更多种免疫增强物质以进一步提高其有效性,优选地实现免疫刺激的协同作用。术语“佐剂”涉及延长或增强或加速免疫应答的化合物。在这方面,多种机制是可能

的,这取决于多种佐剂类型。例如,允许DC成熟的化合物,例如,脂多糖或CD40配体,形成第一类合适的佐剂。通常来说,影响免疫系统的“危险信号”(LPS、GP96、dsRNA等)类型的任何药剂或者细胞因子(例如GM-CSF)均可用作佐剂,其使免疫应答能够以受控方式加强和/或受到影响。在本上下文中也可任选地使用CpG寡脱氧核苷酸,尽管考虑了如上所述的在某些情况下会发生的其副作用。特别优选的佐剂是细胞因子,例如单核因子、淋巴因子、白介素或趋化因子,例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、INF $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、GM-CSF、LT- $\alpha$ 或生长因子,例如hGH。另一些已知的佐剂是氢氧化铝、弗氏佐剂(Freund's adjuvant)或油类,例如Montanide<sup>®</sup>,最优选的是Montanide<sup>®</sup> ISA51。脂肽,例如Pam3Cys,也适合用作本发明药物组合物中的佐剂。

[0432] 本文中提供的药剂和组合物可单独使用或与常规的治疗方案组合使用,所述常规的治疗方案例如手术、辐照、化学治疗和/或骨髓移植(自体的、同基因的、同种异体的或不相关的)。

[0433] 癌症的治疗代表其中组合策略是尤其理想的领域,原因是两种、三种、四种或甚至更多种癌症药物/治疗的组合作用经常产生比单治疗方法的影响明显更强的协同效应。因此,在本发明的另一个实施方案中,利用基于免疫或疫苗接种的机制(例如本发明的方法和药物组合物)的癌症治疗可与靶向类似或其他特定机制的多种其他药物和/或方法有效组合。其中有例如与常规肿瘤治疗、多表位策略、另外的免疫治疗和靶向血管生成或凋亡之治疗方法的组合(综述参见例如Andersen等,2008:Cancer treatment:the combination of vaccination with other therapies.Cancer Immunology Immunotherapy,57(11):1735-1743)。不同药剂的依次施用可在不同的检查点(check point)抑制癌细胞生长,而另一些药剂可例如抑制新血管生成、恶性细胞的存活或转移,其有可能将癌症转化为慢性疾病。以下列表提供了可与本发明组合使用的抗癌药物和治疗的一些非限制性实例:

#### [0434] 1. 化学治疗

[0435] 化学治疗是用于多种类型癌症之护理的标准。最常见的化学治疗剂通过杀伤迅速分裂的细胞(癌症细胞的主要特性之一)而发挥作用。因此,与常规化学治疗药物(例如烷基化剂、抗代谢物、蒽环类、植物生物碱、拓扑异构酶抑制剂和影响细胞分裂或DNA合成的其他抗肿瘤剂)的组合通过清除抑制细胞、重新启动免疫系统,通过使肿瘤细胞更易受到免疫介导的杀伤,或通过另外活化免疫系统的细胞可显著改善本发明的治疗效果。在多个研究中已示出化学治疗和以接种疫苗为基础的免疫治疗药物的协同抗癌作用(参见例如Quoix等.2011:Therapeutic vaccination with TG4010and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer:a controlled phase 2B trial.Lancet Oncol.12(12):1125-33;还可参见Liseth等.2010:Combination of intensive chemotherapy and anticancer vaccines inthe treatment of human malignancies:the hematological experience.J Biomed Biotechnol.2010:6920979;还可参见Hirooka等2009:Acombination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer.Pancreas 38(3):e69-74)。有数以百计可获得的化学治疗药物,其基本上都适合用于组合治疗。可与本发明相组合的化学治疗药物的一些(非限制性)实施例是:卡铂(Paraplatin)、顺铂(Platinol、Platinol-AQ)、环磷酰胺(Cytoxan、Neosar)、多西他赛(Taxotere)、多柔比星(Adriamycin)、埃罗替尼

(Tarceva)、依托泊苷 (VePesid)、氟尿嘧啶 (5-FU)、吉西他滨 (Gemzar)、甲磺酸伊马替尼 (Gleevec)、伊立替康 (Camptosar)、甲氨蝶呤 (Folex、Mexate、Amethopterin)、紫杉醇 (Taxol、Abraxane)、索拉非尼 (Nexavar)、舒尼替尼 (Sutent)、拓扑替康 (Hycamtin)、长春新碱 (Oncovin、Vincasar PFS) 和长春碱 (Velban)。

#### [0436] 2. 手术

[0437] 癌症手术 (移出肿瘤的操作) 仍然是癌症治疗的基础。可将手术与其他癌症治疗相组合以去除任何剩余的肿瘤细胞。已无数次证明将手术方法与后续的免疫治疗性治疗组合是有前景的方法。

#### [0438] 3. 辐射

[0439] 放射治疗仍然是癌症治疗的重要组成部分,所有癌症患者中约50%在他们疾病的进程中接受放射治疗。放射治疗的主要目的是使癌症细胞丧失其增殖 (细胞分裂) 潜力。用于治疗癌症的辐射类型是光子辐射 (X射线和  $\gamma$  射线) 和粒子辐射 (电子、质子和中子束)。有两种方式将辐射递送至癌症的部位。外束辐射是通过对准高能射线 (光子、质子或粒子辐射) 从体外递送至肿瘤部位。内部辐射或近距离治疗 (brachytherapy) 是通过密封在导管或籽 (seed) 中的放射源从身体内部直接递送至肿瘤部位中。适用于与本发明组合的放射治疗技术是例如分级法 (fractionation) (以分级的方案递送的放射治疗,例如,在数周内每日给予1.5至3Gy的级分)、3D适形放射治疗 (3DCRT;递送辐射至总肿瘤体积)、强度调制放射治疗 (IMRT;电脑控制的多个辐射束的强度调制)、图像引导放射治疗 (IGRT;包括允许校正的放疗前成像的技术) 和立体定向体部放射治疗 (SBRT,在很少的治疗部分中递送极高的个体剂量的辐射)。关于放射治疗综述,参见Baskar等2012:Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. Int. J Med Sci. 9(3):193-199。

#### [0440] 4. 抗体

[0441] 抗体 (优选单克隆抗体) 通过多种机制实现其对癌细胞的治疗效果。它们可在产生凋亡或程序性细胞死亡中具有直接的作用。它们可阻断信号转导途径的组分 (例如,生长因子受体),有效地阻止肿瘤细胞的增殖。在表达单克隆抗体的细胞中,它们可引起抗独特型抗体 (anti-idiotypic antibody) 形成。间接作用包括募集具有细胞毒性的细胞,例如单核细胞和巨噬细胞。将这种类型的抗体介导的细胞杀伤称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。抗体还结合补体,导致直接的细胞毒性,称为补体依赖性细胞毒性 (CDC)。如例如在Gadri等2009:Synergistic effect of dendritic cell vaccination and anti-CD20 antibody treatment in the therapy of murine lymphoma. J Immunother. 32(4): 333-40中所示出的,将手术方法与免疫治疗药物或方法组合是一种成功的途径。以下的列表提供了可与本发明组合的抗癌抗体和潜在的抗体靶标 (在括号内) 的一些非限制性实例:阿巴伏单抗 (CA-125)、阿昔单抗 (CD41)、阿达木单抗 (EpCAM)、阿夫土珠单抗 (Afutuzumab) (CD20)、培化阿珠单抗 (Alacizumab pegol) (VEGFR2)、喷替酸阿妥莫单抗 (CEA)、阿麦妥昔单抗 (Amatuximab) (MORAb-009)、马安那莫单抗 (TAG-72)、阿泊珠单抗 (HLA-DR)、阿昔莫单抗 (CEA)、巴维昔单抗 (磷脂酰丝氨酸)、贝妥莫单抗 (CD22)、贝利木单抗 (BAFF)、贝伐珠单抗 (VEGF-A)、莫比伐单抗 (Bivatuzumab mertansine) (CD44v6)、博纳吐单抗 (Blinatumomab) (CD19)、布妥昔单抗 (CD30TNFRSF8)、莫坎妥珠单抗 (黏蛋白CanAg)、雷坎妥珠单抗 (MUC1)、卡罗单抗喷地肽 (前列腺癌细胞)、卡鲁单抗 (Carlumab) (CNT0888)、卡妥素单抗 (EpCAM、

CD3)、西妥昔单抗(EGFR)、泊西他珠单抗(Citatumumab bogatox)(EpCAM)、西妥木单抗(IGF-1受体)、克劳西单抗(Claudiximab)(密蛋白)、替坦司可利妥珠单抗(Clivatumumab tetraxetan)(MUC1)、西他土珠单抗(TRAIL-R2)、达西珠单抗(CD40)、达罗土珠单抗(Dalotuzumab)(胰岛素样生长因子I受体)、地诺单抗(RANKL)、地莫单抗(B-淋巴瘤细胞)、多兹图单抗(Drozitumab)(DR5)、依美昔单抗(GD3神经节苷脂)、依决洛单抗(EpCAM)、埃罗妥珠单抗(SLAMF7)、依那妥珠单抗(PDL192)、恩司昔单抗(Ensituximab)(NPC-1C)、依帕珠单抗(CD22)、厄妥索单抗(HER2/neu、CD3)、伊瑞西珠单抗(整合素 $\alpha v \beta 3$ )、法勒珠单抗(Farletuzumab)(叶酸受体1)、FBTA05(CD20)、芬克拉妥珠单抗(Ficlatuzumab)(SCH 900105)、芬妥木单抗(Figitumumab)(IGF-1受体)、弗拉伏妥单抗(Flanvotumab)(糖蛋白75)、弗拉伏妥单抗(Fresolimumab)(TGF- $\beta$ )、加利昔单抗(Galiximab)(CD80)、盖尼塔单抗(IGF-I)、吉妥单抗奥唑米星(CD33)、吉伏珠单抗(Gevokizumab)(IL-1 $\beta$ )、吉瑞妥昔单抗(Girentuximab)(碳酸酐酶9(CA-IX))、格莱木单抗-维多汀(Glembatumumab vedotin)(GPNMB)、替伊莫单抗(CD20)、依库单抗(Icrucumab)(VEGFR-1)、伊戈伏单抗(CA-125)、依坦希单抗(Indatuximab ravtansine)(SDC1)、英妥木单抗(Intetumumab)(CD51)、奥英妥珠单抗(CD22)、伊匹单抗(CD152)、伊妥木单抗(Iratumumab)(CD30)、拉贝珠单抗(CEA)、来沙木单抗(TRAIL-R2)、利韦单抗(乙型肝炎表面抗原)、林妥珠单抗(CD33)、洛妥珠单抗(Lorvotuzumab mertansine)(CD56)、鲁卡木单抗(CD40)、鲁昔单抗(CD23)、马帕木单抗(TRAIL-R1)、马妥珠单抗(EGFR)、美泊利单抗(IL-5)、米拉珠单抗(Milatuzumab)(CD74)、米妥莫单抗(GD3神经节苷脂)、莫加珠单抗(Mogamulizumab)(CCR4)、莫妥莫单抗(Moxetumomab pasudotox)(CD22)、他那可单抗(C242抗原)、他那莫单抗(5T4)、纳那妥单抗(Narnatumab)(RON)、耐昔妥珠单抗(Necitumumab)(EGFR)、尼妥珠单抗(EGFR)、纳武单抗(IgG4)、奥法木单抗(CD20)、奥拉单抗(Olaratumab)(PDGF-R $\alpha$ )、奥纳珠单抗(Onartuzumab)(人分散因子受体激酶)、莫奥珠单抗(Oportuzumab monatox)(EpCAM)、奥戈伏单抗(CA-125)、欧西鲁单抗(Oxelumab)(OX-40)、帕尼单抗(EGFR)、帕曲妥单抗(Patritumab)(HER3)、培妥莫单抗(Pemtumomab)(MUC1)、帕妥珠单抗(HER2/neu)、平妥单抗(腺癌抗原)、普托木单抗(波形蛋白)、雷妥莫单抗(Racotumomab)(N-羟乙酰神经氨酸)、雷德图单抗(Radretumab)(纤连蛋白额外结构域-B)、雷韦单抗(狂犬病病毒糖蛋白)、雷莫芦单抗(VEGFR2)、利妥木单抗(Rilotumumab)(HGF)、利妥昔单抗(CD20)、罗妥木单抗(Robatutumumab)(IGF-1受体)、沙玛立珠单抗(Samalizumab)(CD200)、西罗珠单抗(FAP)、司妥昔单抗(IL-6)、他贝鲁单抗(Tabalumab)(BAFF)、他珠单抗(甲胎蛋白)、帕他普莫单抗(CD19)、替妥莫单抗(Tenatumomab)(生腱蛋白C)、替妥木单抗(Teprotumumab)(CD221)、西木单抗(CTLA-4)、替加珠单抗(TRAIL-R2)、TNX-650(IL-13)、托西莫单抗(CD20)、曲妥珠单抗(HER2/neu)、TRBS07(GD2)、替西木单抗(CTLA-4)、西莫白介素图考珠单抗(tucotuzumab celmoleukin)(EpCAM)、优利妥昔单抗(Ublituximab)(MS4A1)、乌瑞鲁单抗(Urelumab)(4-1BB)、伏洛昔单抗(整合素 $\alpha 5 \beta 1$ )、伏妥莫单抗(肿瘤抗原CTAA16.88)、扎妥木单抗(EGFR)、扎木单抗(CD4)。

[0442] 5. 细胞因子、趋化因子、共刺激分子、融合蛋白

[0443] 本发明的另一个实施方案是组合使用本发明的抗原编码的药物组合物与细胞因子、趋化因子、共刺激分子和/或其融合蛋白以引起有益的免疫调节或肿瘤抑制效果。为了提高免疫细胞向肿瘤中的浸润并有助于抗原递呈细胞向肿瘤引流淋巴结的运动,可使用具

有C、CC、CXC和CX3C结构的多种趋化因子。一些最有前景的趋化因子是例如CCR7及其配体CCL19和CCL21,此外,CCL2、CCL3、CCL5和CCL16。另一些实例为CXCR4、CXCR7和CXCL12。此外,共刺激或调节分子,例如B7配体(B7.1和B7.2)是可用的。其他细胞因子也是可用的,例如白细胞介素由其是(例如,IL-1至IL17)、干扰素(例如IFN $\alpha$ 1至IFN $\alpha$ 8、IFN $\alpha$ 10、IFN $\alpha$ 13、IFN $\alpha$ 14、IFN $\alpha$ 16、IFN $\alpha$ 17、IFN $\alpha$ 21、IFN $\beta$ 1、IFN $\omega$ 、IFNE1和IFNK)、造血因子、TGF(例如,TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 和TGF家族的其他成员),最后,受体的肿瘤坏死因子家族的成员及其配体以及其他刺激分子,包括但不限于:4-1BB、4-1BB-L、CD137、CD137L、CTLA-4GITR、GITRL、Fas、Fas-L、TNFR1、TRAIL-R1、TRAIL-R2、p75NGF-R、DR6、LT. $\beta$ .R、RANK、EDAR1、XEDAR、Fn114、Troy/Trade、TAJ、TNFR2、HVEM、CD27、CD30、CD40、4-1BB、OX40、GITR、GITRL、TACI、BAFF-R、BCMA、REL1和CD95(Fas/AP0-1)、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白、TNF受体相关的凋亡介导蛋白(TRAMP)和死亡受体6(DR6)。尤其是CD40/CD40L和OX40/OX40L是用于联合免疫治疗重要的靶标,因为它们直接作用于T细胞存活和增殖。综述参见Lechner等2011:Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy* 3(11), 1317-1340。

#### [0444] 6. 细菌处理

[0445] 研究人员一直使用厌氧细菌(例如诺维氏梭状芽孢杆菌(*Clostridium novyi*))来消耗贫氧(oxygen-poor)肿瘤的内部。当厌氧细菌与肿瘤的氧化侧接触时,它们就死亡,这意味着它们对身体其余部分是无害的。另一个策略是利用已转化有可将无毒前药转换为有毒药物之酶的厌氧细菌。随着细菌在肿瘤的坏死区和低氧区的增殖,所述酶仅在肿瘤中表达。因此,全身性应用的前药仅在肿瘤中代谢为有毒药物。已用非致病性厌氧菌生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)表明这是有效的。

#### [0446] 7. 激酶抑制剂

[0447] 用于补充性癌症治疗的另一大组潜在靶标包括激酶抑制剂,原因是癌细胞的生长和存活与激酶活性的失调密切相关。为了恢复正常的激酶活性,并因此降低肿瘤生长,正在使用广泛的抑制剂。靶向的激酶的组包括受体酪氨酸激酶,例如BCR-ABL、B-Raf、EGFR、HER-2/ErbB2、IGF-IR、PDGFR- $\alpha$ 、PDGFR- $\beta$ 、c-Kit、Flt-4、Flt3、FGFR1、FGFR3、FGFR4、CSF1R、c-Met、RON、c-Ret、ALK;细胞质酪氨酸激酶,例如c-SRC、c-YES、Abl、JAK-2;丝氨酸/苏氨酸激酶,例如ATM、Aurora A&B、CDK、mTOR、PKC $\delta$ 、PLK、b-Raf、S6K、STK11/LKB1和脂质激酶,例如PI3K、SK1。小分子激酶抑制剂,例如PHA-739358、尼罗替尼、达沙替尼和PD166326、NSC743411、拉帕替尼(GW-572016)、卡奈替尼(CI-1033)、司马沙尼(semaxinib)(SU5416)、瓦他拉尼(PTK787/ZK222584)、Sutent(SU11248)、索拉非尼(BAY 43-9006)和来氟米特(SU101)。更多的信息参见例如Zhang等2009:Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 9, 28-39。

#### [0448] 8. Toll样受体

[0449] Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)家族的成员是固有免疫和适应性免疫的重要纽带,且许多佐剂的作用依赖TLR的活化。大量针对癌症已建立的疫苗并入TLR的配体以加强疫苗应答。除TLR2之外,已经检验了TLR3、TLR4、尤其是TLR7和TLR8在被动免疫治疗方法中用于癌症治疗。密切相关的TLR7和TLR8通过影响免疫细胞、肿瘤细胞和肿瘤微环境而有助于抗肿瘤应答,并且可被核苷类似物结构活化。全部TLR都已用作独立的免疫治疗或

癌症疫苗佐剂,并且可与本发明的制剂和方法协同组合。更多的信息参见van Duin等2005: Triggering TLR signaling in vaccination. Trends in Immunology, 27(1):49-55。

#### [0450] 9. 血管生成抑制剂

[0451] 除了靶向受肿瘤介导的逃逸机制 (escape mechanism) 和免疫抑制影响之免疫调节受体的治疗, 还有靶向肿瘤环境的治疗。血管生成抑制剂阻止了肿瘤生存所需要之血管的广泛生长 (血管生成)。例如, 可通过靶向不同的分子来阻断为满足肿瘤细胞提高的养分和氧需求而被促进的血管生成。可与本发明组合的血管生成介导分子或血管生成抑制剂的非限制性实例是可溶性 VEGF (VEGF 同种型 VEGF121 和 VEGF165、受体 VEGFR1、VEGFR2 和共受体神经毡蛋白 (Neuropilin) -1 和神经毡蛋白 2) 1 和 NRP-1、血管生成素 2、TSP-1 和 TSP-2、血管抑素 (angiostatin) 和相关分子、内皮细胞抑制素 (endostatin)、血管形成抑制素 (vasostatin)、钙网蛋白、血小板因子 4、TIMP 和 CD41、Meth-1 和 Meth-2、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  和 IFN- $\gamma$ 、CXCL10、IL-4、IL-12 和 IL-18、凝血酶原 (三环结构域-2)、抗凝血酶 III 片段、催乳素、VEGI、SPARC、骨桥蛋白、乳腺丝抑蛋白 (maspin)、血管能抑素 (canstatin)、增殖蛋白相关蛋白、休眠蛋白 (restin) 和药物例如贝伐珠单抗、伊曲康唑、羧胺三唑、TNP-470、CM101、IFN- $\alpha$ 、血小板因子-4、苏拉明、SU5416、血小板应答蛋白、VEGFR 拮抗剂、血管生成抑制性类固醇+肝素、软骨来源的血管生成抑制因子、基质金属蛋白酶抑制剂、2-甲氧基雌二醇、替可加兰 (tecogalan)、四硫钼酸盐、沙利度胺、血小板应答蛋白、催乳素 V $\beta$ 3 抑制剂、利诺胺 (linomide)、他喹莫德 (tasquinimod), 综述参见例如 Schoenfeld 和 Dranoff 2011: Anti-angiogenesis immunotherapy. Hum Vaccin. (9):976-81。

#### [0452] 10. 小分子靶向治疗药物

[0453] 小分子靶向治疗药物通常是癌细胞内在突变的、过表达的或其他关键蛋白质上酶促结构域的抑制剂。突出的和非限制性的实例是酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼 (Gleevec/Glivec) 和吉非替尼 (Iressa)。在先前的专利申请 US2009004213 中也描述了使用靶向一些激酶的小分子 (例如苹果酸舒尼替尼和/或甲苯磺酸索拉非尼) 与疫苗组合用于癌症治疗。

#### [0454] 11. 基于病毒的疫苗

[0455] 有许多可用的或正在开发的基于病毒的癌症疫苗可与本发明的制剂一起用于组合的治疗方法。使用此类病毒载体的一个优点在于其引发免疫应答的固有能力和作为产生免疫活化所必需的危险信号之病毒感染的结果出现炎症反应。理想的病毒载体应该是安全的, 并且不应该引入抗载体免疫应答以使得加强抗肿瘤特异性应答。重组的病毒例如痘苗病毒 (vaccinia virus)、单纯疱疹病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和禽痘病毒已用于动物肿瘤模型中且基于其令人鼓舞的结果, 已经开始了人临床试验。尤其重要的基于病毒的疫苗是病毒样颗粒 (virus-like particle, VLP), 其是包含来自病毒外层外壳之某些蛋白质的小颗粒。病毒样颗粒不含有来自病毒的任何遗传物质并且不会引起感染, 但是它们可被构建以呈递在其外壳上的肿瘤抗原。VLP 可来源于多种病毒, 例如乙肝病毒或其他病毒科, 包括细小病毒科 (Parvoviridae) (例如腺相关病毒)、逆转录病毒科 (Retroviridae) (例如, HIV) 和黄病毒科 (Flaviviridae) (例如, 丙型肝炎病毒)。一般性综述参见 Sorensen 和 Thompsen 2007: Virus-based immunotherapy of cancer: what do we know and where are we going? APMIS 115 (11):1177-93; 针对癌症的病毒样颗粒在 Buonaguro 等 2011: Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases

and cancer. *Expert Rev Vaccines* 10 (11):1569-83; 以及 Guillén 等 2010: Virus-like particles as vaccine antigens and adjuvants: application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. *Procedia in Vaccinology* 2(2), 128-133 中进行了综述。

[0456] 12. 多表位策略

[0457] 多表位的使用显示了用于接种疫苗的有前景成果。与智能算法系统组合的快速测序技术使得能够利用肿瘤突变组 (mutanome), 并且可为可与本发明组合的个性化疫苗提供多表位。更多的信息参见 2007: Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides. *J Immunother* 30:762-772; 此外, Castle 等 2012: Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* 72(5): 1081-91。

[0458] 13. 过继T细胞转移

[0459] 例如, 在 Rapoport 等 2011: Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of hTERT and survivin after ASCT for myeloma. *Blood* 117(3):788-97 中描述了肿瘤抗原疫苗接种与T细胞转移的组合。

[0460] 14. 基于肽的靶向治疗

[0461] 肽可与细胞表面受体或在肿瘤周围受影响的胞外基质结合。如果核素在细胞附近衰变, 则与这些肽 (例如, RGD) 连接的放射性核素最终杀伤癌细胞。这些结合基序的寡聚体或多聚体尤其受到极大的关注, 原因是其可导致增强的肿瘤特异性和亲合力。对于非限制性实例, 参见 Yamada 2011: Peptide-based cancer vaccine therapy for prostate cancer, bladder cancer, and malignant glioma. *Nihon Rinsho* 69(9):1657-61。

[0462] 15. 其他治疗

[0463] 还有许多其他的癌症治疗可与本发明的制剂和方法组合以产生协同效应。非限制性的实例是靶向凋亡的治疗、热疗 (hyperthermia)、激素治疗、端粒酶治疗、胰岛素增强治疗、基因治疗和光动力学治疗。

[0464] 通过以下实施例进一步举例说明本发明, 所述实施例不被解释为限制本发明的范围。

[0465] 实施例

[0466] 实施例

[0467] 实施例1: 靶向CLDN6和CD3 (CLDN6 × CD3) 的双特异性抗体衍生物的产生、纯化和分析

[0468] a. 序列来源、bstb构建体的设计, 以及克隆到表达载体中

[0469] 将双特异性嵌合TriMAB (bstb) 构建体设计为在恒定区的C端处配备有两个单链可变片段 (scFv) 的抗原结合片段 (Fab)。Fab结合结构域对人T细胞受体组分CD3 $\epsilon$ 具有特异性。抗CD3可变重链区 (V<sub>H</sub>) 和相应的可变轻链区 (V<sub>L</sub>) 结构域来源于鼠IgG TR66 (Lanzavecchia und Scheidegger 1987)。第114位处的半胱氨酸 (根据IMGT命名法) 已被丝氨酸替换。恒定重链区 (C<sub>H</sub>1) 和恒定轻链区 (C<sub>L</sub>) 是人来源的。我们为我们的构建体选择了 $\kappa$ 型恒定轻链区。两

个scFv结合部分对人肿瘤相关抗原(tumor associated antigen,TAA)CLDN6具有特异性。相应的 $V_H$ 和 $V_L$ 区来源于嵌合IgG1 IMAB206-SUBW (Ganymed Pharmaceuticals AG,Mainz, Germany)。图18示出了在本发明的过程中使用的 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域的氨基酸序列。

[0470] 产生了 $C_H1$ 区域不同的两种bstb分子。Bstb\_369/367包含来源于人IgG1的 $C_H1$ 区,而bstb\_371/367携带来自人IgG2的 $C_H1$ 区。原理是由于不同亚类的 $C_H1$ 和 $C_L$ 形成不同的二硫键而形成的异二聚体的比较(Röthlisberger等,2005)。由于 $\kappa$ 型 $C_L$ 的序列在IgG1和IgG2中是保守的,因此相同的 $C_L$ 构建体用于形成两种构建体。在蛋白质水平上获得以下分子以形成bstb分子:

[0471] Bstb\_369/367:

[0472] N- $V_H^{\alpha CD3}$ - $C_H1$ (IgG1)- $V_H^{\alpha CLDN6}$ - $V_L^{\alpha CLDN6}$ -6xHis-标签-C (Fd bstb\_369/367)

[0473] N- $V_L^{\alpha CD3}$ - $C_L$ - $V_H^{\alpha CLDN6}$ - $V_L^{\alpha CLDN6}$ -Strep-标签-C (L bstb\_369/367)

[0474] Bstb\_371/367:

[0475] N- $V_H^{\alpha CD3}$ - $C_H1$ (IgG2)- $V_H^{\alpha CLDN6}$ - $V_L^{\alpha CLDN6}$ -6xHis-标签-C (Fd bstb\_371/367)

[0476] N- $V_L^{\alpha CD3}$ - $C_L$ - $V_H^{\alpha CLDN6}$ - $V_L^{\alpha CLDN6}$ -Strep-标签-C (L bstb\_371/367)

[0477] C=C端, $C_H$ =恒定重链区, $C_L$ =恒定轻链区,Fd=可消化片段(Fab的重链部分),L=Fab的轻链部分,N=N端, $V_H$ =可变重链结构域, $V_L$ =可变轻链结构域。

[0478] 表1总结了关于在本发明的过程中产生的对TAA CLDN6具有特异性的bstb构建体的信息。bstb构建体片段由GeneArt AG (GeneArt/Thermo Fisher Scientific, Regensburg, Germany) 使用相应IgG抗体的 $V_H$ 和 $V_L$ 序列以及保守的人 $C_H$ 和 $C_L$ 序列作为GeneArt String通过基因合成产生。CHO密码子优化由GeneArt的GeneOptimizer®软件实施。关于特异性、来自单克隆抗体(mAb)的序列来源、密码子使用优化的参数和另外的序列特征的信息列于表1中。编码靶细胞结合部分的可变结构域的序列最初来自Ganymed Pharmaceuticals AG。

[0479] 使用本领域技术人员已知的Seamless PLUS Cloning and Assembly Kit (GeneArt/Thermo Fisher Scientific) 进行DNA克隆和表达载体构建。在Fd-和L-bstb V-区序列的5'-端上游处引入编码MGWSCIIILFLVATATGVHS的人IgG分泌信号序列,以使蛋白质分泌到培养基中。插入编码20个氨基酸(amino acid,AA)的柔性甘氨酸-丝氨酸(G-S)肽接头((GGGG)<sub>4</sub>)的序列以连接 $V_H$ -和 $V_L$ -结构域以获得抗TAAscFv的组成。每个 $V_H$ -和 $V_L$ -结构域引入一个替换,每个都替换成半胱氨酸,以形成scFv稳定化二硫键。通过编码18AA接头的序列(SGPGGGRS(GGGG)<sub>2</sub>)将一个scFv结构域序列与Fd部分( $C_H1$ 的C端)连接,并通过编码6AA接头的序列(DVPGGS)将另一个scFv与L部分( $C_L$ 的C端)连接。不同的接头长度允许通过尺寸区分Fd-和L-部分。将6×His-标签序列添加至Fd-scFv部分的3'-末端,并将Strep-标签添加至L-scFv部分的3'-末端,以有助于第一代纯异二聚体bstb的纯化。表2中列出了完整的编码bstb蛋白的DNA序列。表3示出了编码用作参照的bi-(scFv)<sub>2</sub>的DNA序列。

[0480] 将bstb抗体构建体克隆到标准哺乳动物基于pCEP4的表达载体(Invitrogen/Thermo Fisher Scientific,Darmstadt,Germany)中,所述表达载体由NaeI和PmlI切割得到平末端线性质粒。C端6×His-标签和Strep-标签用于蛋白质的亲和色谱纯化和用于检测目的。还产生了没有标签的构建体。所有构建体均由外部测序服务验证。构建体和蛋白质图

式如图1中所示。

[0481] 表1:CLDN6 x CD3-bstb抗体特征的总结

内部名称	特异性	scFv V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> 区的来源	Fab V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> 区的来源	密码子使用	C <sub>H</sub> 1	标签	scFv部分中的ds键
Bstb_369/367 (SEQ ID NO: 14/16)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG1	His/Strp	+
Bstb_371/367 (SEQ ID NO: 15/16)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG2	His/Strp	+
Bstb_5726/5725 (SEQ ID NO: 17/19)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG1	-	+
Bstb_5727/5725 (SEQ ID NO: 18/19)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG2	-	+

[0483] Bstb表示双特异性TriMAB;C,半胱氨酸;CH1,恒定重链区1;CG,中国仓鼠(Cricetulus griseus);IMAB,理想的单克隆抗体;His,6×His-标签;HS,智人(Homo sapiens);IgG,免疫球蛋白G;S,丝氨酸;Strp,Strep-标签;W,色氨酸。

[0484] 表2:CLDN6 x CD3-bstb DNA编码序列

质粒内部名称	相应的bstb片段	DNA编码序列
#367	L bstb_369/367, L bstb_371/367	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCCGTGTCTTAC ATGAACTGGTATCAGCAGAAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAAACCCCTGACCTTTGG CGTGGCACCAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGT TCATCTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG GTGTGCCTGTGAACAACCTTCTACCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAAAGCGTCAACGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGCGAGTGTGACG TGCCCTGGTGGTAGCGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGCCCTGAGCTGGTG AAACCCGGCGCTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTT CACC GGCTACACCATGAAGTGGGTGAAACAGAGCCACGGCAAGTGCCTGG AATGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCACCATCTACAACCAG AAGTTC AAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGC CTACATGGAAGTCTGAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACT GCGCCAGAGACTACGGCTTCTGTGCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACACC CTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGGCGG CGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGTGACCCAGTCCCCCT CCATCATGTCCGTGTCTCCCGGCGAGAAAGTGACAATTACCTGCTCCGCC TCCTCCTCCGTGTCTACATGCACTGGTTCAGCAGAAGCCCGGCACCTC CCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACTCCAACCTGGCCCTCCGGCGTGGCCG CCAGATTCTCCGGAAGAGGCTCCGGCACCAAGTACTCCCTGACCATCTCC AGAGTGGCCGCGGAGGACGCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGTCCAA CTACCCCCCTGGACCTTTGGCTGCGGCACCAAGCTGGAATCAAGTCTG CCTGGAGCCACCCACAGTTCGAGAAGTGA
#369	Fd bstb_369/367	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCCAGGTGCAGTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGCTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCAACCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAAGAGTTC

[0486]

		<p>AGGACAAGGCCACCTTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCGCTACATG  CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGTGTACTACTGCGCCG  GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGACCACAC  TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTTCGCTGTTCCTCTGGCC  CCTTCCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT  GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCC  TGACCAGCGGCGTGACACACTTCCCTGCGGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG  TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCTCCTCCCTGGGACCCCA  GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA  AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGTCTCCGGCCCTGGGGGGCGGACGCAGCGG  GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGCTCTGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGG  CCCTGAGCTGGTGAACCCGGCGCTAGCATGAAGATCAGTGAAGGCCA  GCGGCTACAGCTTACCCGGCTACACCATGAACCTGGGTGAACACAGAGCC  GGCAAGTGCCTGGAATGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCAC  CATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGA  GCAGCAGCACCCTTACATGGAACCTGCTGAGCCTGACCAGCGAGGACAGC  GCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGGCTTCGTGCTGGACTACTGGGG  CCAGGGCACCACCCTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGT  GCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGCTG  ACCCAGTCCCCCTCCATCATGTCCGTGTCTCCCGCGAGAAAGTGACAAT  TACCTGTCTCCGCCTCTCTCCGTGTCTTACATGCACTGGTTCAGCAGA  AGCCCGGCACCTCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCC  TCCGGCGTGCCCGCCAGATTCTCCGGAAGAGGCTCCGGCACCAGCTACTC  CCTGACCATCTCCAGAGTGGCCGCGGAGGACGCGCCACCTACTACTGCC  AGCAGCGGTCCAACCTACCCCCCTGGACCTTTGGCTGCGGCACCAAGCTG  GAAATCAAGGGCGGCTCCCACCACCACCATCACCCTGA</p>
#371	Fd bstb_371/367	<p>ATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTCTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT  GCACCTCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG  GCGCCTCCGTGAAGATGTCTTGAAGACCTCCGGCTACACCTTACCCGG  TACACCATGCCTGGTCAAGCAGAGGCTGGACAGGGCTGGAATGGAT  CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA  AGGACAAGGCCACCTTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCGCCTACATG  CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGTGTACTACTGCGCCCG  GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC  TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTTCGCTGTTCCTCTGGCC  CCTTGCTCCAAGTCCACCTCCGAAGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT  GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTCTCCGCCC  TGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCTGCGGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG  TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCTCCAACCTCCGGCACCCA  GACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA  AGACCGTGGAGCCTAAGTCCGCCTCCGGCCCTGGGGGGCGGACGCAGCGG  GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGCTCTGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGG  CCCTGAGCTGGTGAACCCGGCGCTAGCATGAAGATCAGTGAAGGCCA  GCGGCTACAGCTTACCCGGCTACACCATGAACCTGGGTGAACAGAGCCAC  GGCAAGTGCCTGGAATGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCAC  CATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGA  GCAGCAGCACCCTTACATGGAACCTGCTGAGCCTGACCAGCGAGGACAGC  GCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGGCTTCGTGCTGGACTACTGGGG  CCAGGGCACCACCCTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGT  GCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGCTG  ACCCAGTCCCCCTCCATCATGTCCGTGTCTCCCGCGAGAAAGTGACAAT  TACCTGTCTCCGCCTCTCTCCGTGTCTTACATGCACTGGTTCAGCAGA  AGCCCGGCACCTCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCC  TCCGGCGTGCCCGCCAGATTCTCCGGAAGAGGCTCCGGCACCAGCTACTC  CCTGACCATCTCCAGAGTGGCCGCGGAGGACGCGCCACCTACTACTGCC  AGCAGCGGTCCAACCTACCCCCCTGGACCTTTGGCTGCGGCACCAAGCTG  GAAATCAAGGGCGGCTCCCACCACCACCATCACCCTGA</p>
#5725	L bstb_5726/5725, L bstb_5727/5725	<p>ATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTCTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT  GCACCTCAGATCGTGTGACCCAGTCTCCCGCATCATGTCTGTCTAGCC  CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCGGGCCCTCTCCTCCGTGTCTTAC  ATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA  CGACACCTCCAAGGTGGCTCTGGCGTGCCCTACAGATTCTCCGGCTCTG</p>

[0487]

		GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCCTCCAACCCCTGACCTTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCCCTCCGTG GTGTGCCCTGCTGAACAACCTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAAAGCGTCAACGGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGTGACG TGCCTGGTGGTAGCGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGAGCTGGTG AAACCCGCGCTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTT CACCGGCTACACCATGAACTGGGTGAAACAGAGCCACGGCAAGTGCCTGG AATGGATCGGCCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCACCATCTACAACCA AAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCCG CTACATGGAAGTGTGAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACT GCGCCAGAGACTACGGCTTCGTGTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACC CTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGGCGG CGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGTGACCCAGTCCCCCT CCATCATGTCCGTGTCTCCCGGCGAGAAAGTGACAATTACCTGCTCCGCG TCCTCCTCCGTGTCTTACATGCACTGGTTCCAGCAGAAGCCCGCACCTC CCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCCG CCAGATTCCTCGGAAGAGGCTCCGGCACCAGTACTCCCTGACCATCTCC AGAGTGGCCGCGGAGGACGCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGTCCAA CTACCCCCCTTGACCTTTGGCTGCGGCACCAAGCTGGAATCAAGTGA
#5726	Fd bstb_5726/5725	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGTACCGCCACCGGCGT GCACTCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTACCCCGG TACACCATGCAGTGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTCTCCCTCTGGCC CCTTCCCTCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCGCTCTGGGTGCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTGAGCTGGAACCTGGCGCC TGACCAGCGGCGTGCACACCTCCCTGCGGTGTGAGTCTCCCTCCCGCCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGGTACCGTGCCTTCTCTCCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGTCTCCGGCCCTGGGGGCGGACGACGCGGC GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGG CCCTGAGCTGGTGAACCCGGCGCTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCA GGGCTACAGCTTACCGGCTACACCATGAACTGGGTGAAACAGAGCCAC GGCAAGTGCCTGGAATGGATCGGCTGATCAACCCCTACAACGGCGCAC CATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGA GCAGCAGCACCCTTACATGGAAGTGTGAGCCTGACCAGCGAGGACAGC GCCGTGTACTACTGCCAGAGACTACGGCTTCGTGTGACTACTGGGG CCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTG GCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGTCTG ACCCAGTCCCCCTCCATCATGTCCGTGTCTCCGGCGGAGAAAGTGACAAT TACCTGTCTCCGCTCCTCCTCCGTGTCTTACATGCACTGGTTCCAGCAGA AGCCCCGACCTCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCC TCCGGCGTGCCCGCCAGATTCTCCGGAAGAGGCTCCGGCACCAGTACTC CCTGACCATCTCCAGAGTGGCCGCGGAGGACGCGCCACCTACTACTGCC AGCAGCGGTCCAACCTACCCCCCTGGACCTTTGGCTGCGGCACCAAGCTG GAAATCAAGTGA
#5727	Fd bstb_5727/5725	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGTACCGCCACCGGCGT GCACTCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTACCCCGG TACACCATGCAGTGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCGCCCG

[0488]

		GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTGCTCCAAGTCCACCTCCGAAGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTTGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGAGTCCCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCCTCAACTTCGGCACCCA GACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGTGGACA AGACCGTGGAGCCTAAGTCCGCCTCCGGCCCTGGGGCCGACCGCAGCGG GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGG CCCTGAGCTGGTGAACCCGGCGCTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCA GCGGCTACAGCTTACCGGCTACACCATGAACTGGGTGAAACAGAGCCAC GGCAAGTGCCTGGAATGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCAC CATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGA GCAGCAGCACCGCCTACATGGAAGTGTGAGCCTGACCGCAGGACGACG GCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGGCTTCGTGCTGGACTACTGGGG CCAGGGCACCACCCTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTG GCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGTAGCCAGATCGTGCTG ACCCAGTCCCCCTCCATCATGTCCGTGTCTCCCGGCGAGAAAGTGACAAT TACCTGTCTCCGCTCCTCCTCCGTGCTTACATGCACTGGTTCAGCAGA AGCCCGCACCTCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCC TCCGGCGTGCCCGCCAGATTCTCCGGAAGAGGCTCCGGCACCAGCTACTC CCTGACCATCTCCAGAGTGGCCGCGGAGGACGCGGCCACCTACTACTGCC AGCAGCGGTCCAACCTACCCCCCTGGACCTTTGGCTGCGGCACCAAGCTG GAAATCAAGTGA
--	--	---

[0489] 表3:CLDN6 x CD3-bi- (scFv)<sub>2</sub>DNA编码序列

[0490]

质粒内部名称	相应的 bi-(scFv) <sub>2</sub>	DNA编码序列
#123	bi-scFv " 参照 "	ATGGGCTGGTCCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGT GCACAGCGACATCAAGCTGCAGCAGAGCGGAGCCGAGCTGGCCAGACCTG GGGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGACCAGCGGCTACACCTTACCCGG TACCCATGCACCTGGGTGAAACAGCGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCAGCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCTGACCACCGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATG CAGCTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GACTACGACGACCACTACAGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCC TGACAGTGTCTAGCGTGAAGGAGGAAGCGGAGGATCTGGCGGCTCTGGG GGAAGCGGTGGCGTGGACGACATCCAGCTGACCAGAGCCCCGCCATCAT GTCTGCCAGCCCTGGCGAGAAAGTGACCATGACCTGCCGGGCCAGCAGCA GCGTGTCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCAGCCCCAAG CGGTGGATCTACGACACCAGCAAGGTGGCAAGCGGCGTGCCTACAGATT CAGCGCAGCGGCTCCGGCACCTCCTACTCCCTGACCATCAGCAGCATGG AAGCCGAGGACGCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAACCCC CTGACCTTCGGAGCCGGCACCAGCTGGAAGTGAAGTCTGGCGGGGGAGG ATCCGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCTGAGCTGGTGAACCCGGCG CTAGCATGAAGATCTCTTGCAAGGCCTCCGGCTACAGCTTTACCGGCTAC ACAATGAATTGGGTGAAGCAGAGCCAGGCAAGAATCTGGAATGGATTGG CCTGATCAACCCTTACAACGGCGGCACAATCTATAATCAGAAGTTTAAAG GGAAGGCCACACTGACAGTGGACAAGTCCAGCTCCACAGCCTACATGGAA CTGCTGAGCCTGACCTCCGAGGACTCTGCCGTGTATTACTGTGCCAGAGA CTACGGCTTCGTGCTGGATTATTGGGGACAGGGAAACAACACTGACCGTGT CCTCCGGGGGAGGGGGATCAGGTGGGGGAGGTAGTGGGGGTGGCGGCTCT GATATCGTGTGACCCAGTCCCCTAGCATCATGAGCGTGTCCCCAGGCGA AAAAGTGACAATCACTTGCAGCGCCAGCTCCTCCGTGTCTTATATGCATT GGTTCAGCAGAAGCCTGGCACATCCCCAAACTGTTAATCTACAGCACC TCCAACCTGGCTTCCGGCGTGCCCGCAGATTTTCTGGCAGAGGCGAGCGG CACCAGCTACAGCCTGACAATCAGCCGGGTGGCCGCCGAAGATGCCGCCA CATATTATTGTGAGCAGCGGAGCAACTACCCCCCTGGACATTCCGGGGGA GGAACAAAGCTGGAATCAAGCACCACCACCACCACCACTGA

[0491] b. 瞬时转染和产生

[0492] 为了瞬时产生CLDN6特异性bstb蛋白,根据制造商的手册使用Expi293™表达系统 (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) (人胚肾细胞系HEK293的衍生物)。为此,将Expi293F™细胞在细胞悬浮培养烧瓶中预培养至2.0×10<sup>6</sup>个/ml Expi293™表达培养

基的密度,持续两天。在转染当天,将 $2.5 \times 10^6$ 个Expi293F<sup>TM</sup>细胞/ml新鲜Expi293<sup>TM</sup>表达培养基转移到具有5倍体积容量的无菌玻璃锥形瓶(Erlenmeyer glass flask)中。包含pCEP4质粒的Fd-和L-片段在Opti-MEM(Gibco/Thermo Fisher Scientific)中以1:1的比例混合。在分开的管中将每ml细胞悬液1 $\mu$ g DNA混合物在50 $\mu$ l Opti-MEM中预稀释,并且将每ml细胞悬液2.7 $\mu$ l ExpiFectamine<sup>TM</sup> 293试剂在50 $\mu$ l Opti-MEM中预稀释,并在RT下孵育5分钟。随后,将预稀释的DNA混合物添加至预稀释的ExpiFectamine<sup>TM</sup> 293试剂,混合并在RT下孵育20分钟,然后添加至细胞悬液。将细胞培养烧瓶在8% CO<sub>2</sub>,37 $^{\circ}$ C湿润的Multitron Cell振荡器(Infors HT,Bottmingen,Switzerland)中以125rpm搅拌16至18小时。然后,每ml细胞悬液添加3.9 $\mu$ l增强剂1和39 $\mu$ l增强剂2,并进一步孵育细胞培养烧瓶。转染之后7天收获含蛋白质的上清液。用0.22 $\mu$ m Nalgene Rapid Flow 90mm过滤单元,低蛋白结合(ThermoFisherScientific)过滤上清液。根据制造商的方案,使用Protein L Biosensors(Pall/ForteBio,Dreieich,Germany)通过BLItz定量评估分泌的蛋白质含量。将上清液储存在2-8 $^{\circ}$ C下直至纯化。

[0493] c.带标签的蛋白质bstb\_369/367和bstb\_371/367的纯化

[0494] 使用标准程序(Coligan等,2001b)对包含蛋白质bstb\_369/367或bstb\_371/367的瞬时转染的Expi293F<sup>TM</sup>细胞的细胞培养上清液(在实施例1b中描述)进行固定化金属亲和色谱(immobilized metal affinity chromatography,IMAC)。简言之,将补充有10mM咪唑的细胞培养上清液上样到连接至ÄKTA pure 25FPLC系统的HisTrap HP 1ml柱(均为GE Healthcare Life Sciences,Freiburg,Germany)上,并用洗涤缓冲液(20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,500mM NaCl,10mM咪唑,pH 7.5)平衡。以1ml/min的速度上样样品。洗脱缓冲液与洗涤缓冲液的不同之处在于咪唑浓度为500mM。用10倍柱体积(column volume,CV)洗涤之后,使用0-100%线性梯度的洗脱缓冲液来洗脱蛋白质。以1ml/min的速度将洗脱物收集在1ml级分中。收集高分子量(high molecular weight,HMW)和单体物质(主峰)(图2A)。合并洗脱的bstb蛋白并立即使用Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassette 10K MWCO(Pierce/Thermo Fisher Scientific,Rockford,IL,USA)针对**Strep-Tactin**<sup>®</sup>结合缓冲液DPBS(Dulbecco's磷酸盐缓冲盐水,Gibco/Thermo Fisher Scientific)进行透析,所述DPBS包含137mM NaCl,2.7mM KCl,10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4。通过进一步的**Strep-Tactin**<sup>®</sup>亲和色谱法(GE Healthcare Life Sciences)纯化来自IMAC主峰的经透析bstb蛋白。所有随后的**Strep-Tactin**<sup>®</sup>纯化步骤均以1ml/min的流量进行。

[0495] 在施用bstb蛋白之前,用结合缓冲液平衡**Strep-Tactin**<sup>®</sup>柱。在5CV结合缓冲液的洗涤步骤之后,用包含2.5mM脱巯生物素(SigmaAldrich,Taufkirchen,Germany)的结合缓冲液通过0-100%的线性梯度进行bstb蛋白的洗脱(图2B)。合并1ml级分中的经洗脱bstb蛋白,并将其亚进样(sub-inject)到经平衡的尺寸排阻色谱法(size exclusion chromatography,SEC)HiLoad 16/600Superdex 200pg柱(GE Healthcare Life Sciences)上,然后用1CV DPBS进行等度洗脱。将经洗脱的HMW和单体bstb物质收集在1ml级分中(图2C)并合并。

[0496] 通过在考虑消光系数和通过ProtParam工具(<http://web.expasy.org/>)

protparam/)所测定的理论分子量的情况下用NanoDrop 2000c在280nm处测量来确定Bstb浓度。将经纯化蛋白质等分并在2-8℃下储存。

[0497] d. 无标签蛋白bstb\_5726/5725和bstb\_5727/5725的纯化

[0498] 使用Supracap™ 50深度过滤器胶囊 (Pall corporation, Crailsheim, Germany) 过滤包含蛋白质bstb\_5726/5725和bstb\_5727/5725 (在实施例1b中描述, 二者都没有标签) 的瞬时转染的Expi293F™细胞的细胞培养上清液, 并随后进行蛋白质纯化过程。通过尺寸排阻-高效液相色谱法, 短SE-HPLC分析经纯化bstb蛋白 (图2D)。

[0499] 使用具有尺寸排阻TSKgel G3000SWx1柱 (300×7.8mm, Tosoh Bioscience, Griesheim, Germany) 的Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) 进行SE-HPLC。进样多至100μl。用SE-HPLC缓冲液 (0.3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2) 冲洗柱, 并通过等度洗脱分离bstb蛋白。

[0500] 用已建立的方法可高效地纯化bstb\_5726/5725和bstb\_5727/5725二者 (数据未示出), 并且在纯化过程之后单体含量提高至>93% (图2D)。为了进一步将单体级分富集至约100%, 最后使用HiLoad 26/600Superdex 200pg柱 (GE Healthcare Life Sciences) 对针对PBS透析的样品进行制备型SEC。

[0501] 因此, 可显示对没有标签的bstb的纯化策略。

[0502] e. 具有标签的蛋白质bstb\_369/367和bstb\_371/367的分析

[0503] 根据本领域技术人员公知的标准程序通过使用4-15% Criterion™ TGX Stain-Free™凝胶 (Bio-Rad Laboratories, Dreieich, Germany) 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后使用免染凝胶 (图3A) 和Western印迹分析 (图3B) 测试具有标签的bstb蛋白的质量和纯度。用于Western印迹分析的抗体是抗6×His-标签®抗体 (HRP) (1:10,000, Abcam, Cambridge, MA, USA) 和StrepMAB-Classic, HRP缀合物 (1:10,000, IBA GmbH, Göttingen, Germany)。用来自Bio-Rad的Chemidoc MP成像系统记录凝胶和Western印迹膜。与内部分子量标准相比, 在还原条件 (添加DTT) 下在50-55kD处和在非还原条件下在约100kD处检测到bstb蛋白的信号 (图3)。通过在还原条件下在免染凝胶中分离Fd-和L-片段, bstb的异二聚体组成变得明显。

[0504] 通过分析型SE-HPLC随时间确定经纯化蛋白质的聚集状态。使用Agilent 1260Infinity系统 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) 用尺寸排阻TSKgel G3000SWx1柱 (300×7.8mm, Tosoh Bioscience) 进行SE-HPLC。进样多至100μl。用SE-HPLC缓冲液 (0.3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2) 冲洗柱, 并通过等度洗脱分离bstb蛋白。如表4中总结的, 纯化的bstb\_369/367蛋白已经通过分析型SE-HPLC在超过6个月的过程中进行了测试, 并且在DPBS中在2-8℃下显示出高稳定性, 而没有任何聚集或降解的迹象。

[0505] 表4: 如通过SE-HPLC所分析的bstb\_369/367的稳定性

在DPBS中在2-8℃ 下的储存时间 [天]	HMW	单体	LMW
	[%]	[%]	[%]
0	0.59	99.41	0
7	0.54	99.46	0
30	0.76	99.24	0
56	0.74	99.26	0
203	0.66	99.34	0

[0507] 因此, 可显示出bstb分子的高稳定性。之后的纯化产生甚至100%的单体bstb\_

369/367蛋白。

[0508] 实施例2:在体外细胞毒性测定中确定bstb\_369/367和bstb\_371/367的比裂解活性

[0509] 为了确定比裂解作用,我们使用体外萤光素酶细胞毒性测定。使用稳定表达萤光素酶和内源性CLDN6的人卵巢癌细胞系OV-90(ATCC CRL-11732)和畸胎癌细胞系PA-1(ATCC CRL-1572)作为靶细胞系。同样稳定表达萤光素酶的人CLDN6阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231(ATCC HTB-26)用作特异性(脱靶)对照。

[0510] 根据标准程序(Coligan等,2001a),从健康供体(University Medicine of the JGU Mainz,Blood Transfusion Centre,Mainz,Germany)的人血液中分离的人外周血单个核细胞(PBMC)被选为效应细胞。

[0511] a. EC50确定

[0512] 为了确定高度单体的bstb\_369/367的半数最大有效浓度(EC50),在体外萤光素酶细胞毒性测定中测试蛋白质的滴定行(titration row)。在所描述的实施例中,将效应物(E)和靶(T)细胞以5:1的E:T比例混合并接种到白色96孔细胞培养板(Nunclon®Delta Surface,Thermo Scientific,Braunschweig,Germany)中,其中每孔最终细胞数为 $1 \times 10^4$ 个靶细胞和 $5 \times 10^4$ 个效应细胞。将细胞与浓度范围为4.85aM至48.50nM的bstb\_369/367或bstb\_371/367蛋白的10点、10倍连续稀释行一起孵育。用作 $L_{\min}$ 和 $L_{\max}$ 值的孔(见下文)补充有DPBS而不是bstb蛋白。

[0513] 将细胞培养微孔板在37°C,5% CO<sub>2</sub>下孵育48小时。为了分析,每孔添加50μl含有1m<sub>g</sub>/ml萤光素(BD Monolight,BD Biosciences,Heidelberg,Germany)和50mM HEPES的水溶液,随后将板在黑暗中于37°C下孵育30分钟。用Infinite M200 Tecan微孔板读取仪器(Tecan,Männedorf,Switzerland)测量由表达萤光素酶的活细胞氧化萤光素而产生的发光。通过下式计算特定靶细胞裂解的百分比:

[0514] 比裂解% =  $[1 - (\text{发光}_{\text{受试样品}} - L_{\max}) / (L_{\min} - L_{\max})] \times 100$ ,而“L”表示裂解。 $L_{\min}$ 是指在没有bstb的情况下最小裂解时的发光,并且 $L_{\max}$ 是指在不存在bstb的情况下通过添加Triton X-100(2%终浓度)实现的最大裂解时的发光(等于自发发光计数)。

[0515] 使用整合到PRISM 6软件(GraphPad Software,San Diego,California,USA)中的S形剂量-响应算法(log(激动剂)相对于应答(三个参数))计算EC50值。

[0516] 对于CLDN6阳性OV-90细胞,确定的bstb\_369/367的EC50为39.71pM,并因此比bstb\_371/367的117.00pM的EC50低三倍(图4A)。用CLDN6阴性对照细胞系MDA-MB-231未观察到裂解。该测定的结果强烈依赖于人PBMC的效力,其根据供体的免疫状态而变化,如其他人所报道的(参见例如Lutterbuese等,2010)。因此,我们使用八个不同的PBMC供体确定了bstb\_369/367蛋白的EC50值范围为0.98fM至39.71pM(数据未示出)。

[0517] b. bstb\_369/367与CLDN6 x CD3 bi-(scFv)<sub>2</sub>的比较

[0518] 将二价CLDN6结合bstb\_369/367与高度单体(99.5%)的内部产生的CLDN6 x CD3 bi-(scFv)<sub>2</sub>(BioNTech AG,Stadler等2015)进行比较以研究二价抗肿瘤靶向对裂解效力的有益亲合力作用。

[0519] 出于此目的,基本上如实施例2a中所述,在细胞毒性测定中,以等摩尔浓度使用bstb和bi-(scFv)<sub>2</sub>,并针对PA-1、OV-90和MDA-MB-231测试裂解作用(图4B)。将PA-1细胞共

孵育仅24小时。引人注意的是,用仅0.24pM(用于PA-1的最低浓度)引起了58%的bstb\_369/367介导的PA-1细胞杀伤,而bi-(scFv)<sub>2</sub>参照显示出从0%杀伤开始的裂解曲线。在OV-90的情况下,bstb\_369/367与bi-(scFv)<sub>2</sub>相比的更高效力通过bstb的低55倍的EC50而变得明显。这两种分子都没有发挥脱靶裂解作用。

[0520] 因此,与被bi-(scFv)<sub>2</sub>分子结合的单价CLDN6相比,被bstb分子结合的二价CLDN6强烈地提高了靶细胞杀伤潜力。

[0521] c.bstb\_369/367高分子量物质对裂解活性的影响的研究

[0522] 与单体物质相比,HMW物质(例如二聚体或多聚体)可发挥不同的活性,这是由于它们对于相应抗原的多价性。尽管已经显示分子在其单体状态下稳定,但为了未来的安全性方面而测试了HMW物质对活性的影响。

[0523] 为此,在纯化程序期间收集HMW物质,通过SEC进行富集并掺入到单体制备物中至5%的规定量。随后,在如实施例2a中所述的细胞毒性测定中,但是在15点、20倍连续稀释行中比较99.3%单体和补充有5% HMW物质的94.3%单体。PA-1和OV-90用作靶细胞。bstb\_369/367与相当敏感的细胞系PA-1一起进行16小时的共孵育,与更稳健的细胞系OV-90进行48小时的共孵育。如图4C中所示,使用整合到PRISM 6软件(GraphPad Software)中的S形剂量-响应算法(log(激动剂)相对于响应-可变斜率(四个参数))计算EC50值。计算出的5% HMW bstb\_369/367样品的EC50在PA-1的情况下高1.5倍,且在OV-90的情况下低2.3倍。因此,用PA-1观察到轻微的活性降低,而用OV-90观察到轻微的活性提高。总体而言,5% HMW物质对活性的影响很低,并且可能取决于靶细胞系和/或孵育时间。关于bstb蛋白的稳定性和相当高百分比的HMW物质的低影响,bstb分子有资格用于治疗产品开发。

[0524] d.bstb\_369/367与无标签变体bstb\_5726/5725和bstb\_5727/5725的比较

[0525] 在细胞毒性测定中评价无标签的bstb变体,并与bstb\_369/367进行比较。此外,测试了HMW物质对活性的影响。测定设置如实施例2c中所述,但受试物仅以10点、5倍系列稀释向作为CLDN6<sup>+</sup>靶细胞的OV-90施用。

[0526] bstb\_369/367及其无标签类似物bstb\_5726/5725(99.9%单体)呈现相等的裂解效率,其中EC50值为约9.3pM。(图4D,左图)。5% HMW导致低1.4倍的EC50值。携带C<sub>H</sub>1(IgG2)的变体bstb\_5727/5725(100%单体)的EC50比参照bstb\_369/367高约1.6倍,证实该变体的效力略低,如同在实施例2a中的无标签变体所示出的那样。对于bstb\_5727/5725,5%HMW几乎不影响效力(图4D,右图)。掺杂HMW的EC50仅比该示例性研究中的单体低1.1倍。

[0527] 总之,带标签的和无标签的携带C<sub>H</sub>1(IgG1)的bstb的功能相同,并且与携带C<sub>H</sub>1(IgG2)的bstb相比发挥稍高的效力。这两种变体的HMW物质的影响都较低。

[0528] 实施例3:由bstb\_369/367和bstb\_371/367介导的T细胞调节

[0529] 在如实施例2中所述的类似设置中用相同靶细胞系研究了由bstb\_369/367和bstb\_371/367介导的T细胞的调节,精确地说是T细胞的活化和增殖。简言之,在24孔板中的0.5ml完全培养基中用人PBMC以5:1的E:T比例接种CLDN6<sup>+</sup>靶细胞OV-90和PA-1以及CLDN6<sup>-</sup>MDA-MB-231对照细胞。为了进一步证实靶标依赖性,PBMC在没有靶细胞的情况下与bstb蛋白共孵育。在4点、100倍连续稀释行中以0.005至5,000ng/ml的浓度范围添加bstb蛋白bstb\_369/367和bstb\_371/367。施用100ng/ml人抗CD3 IgG2a克隆OKT3(BioXCell,West Lebanon,NH,USA),即靶标非依赖性T细胞活化鼠IgG作为阳性对照。我们添加了DPBS(即

bstb缓冲液)作为阴性对照。

[0530] a. T细胞活化

[0531] 将效应细胞和靶细胞与bstb共孵育48小时。收获PBMC,转移至圆底96孔(Fisher Scientific, Schwerte, Germany),离心并洗涤。用抗人荧光标记的抗体抗CD5-PE-Cy7 (Abcam)、CD69-APC、CD25-PE (BD Biosciences)和活/死染料eFluor506 (eBioscience, Frankfurt am Main, Germany)对细胞进行染色。用BD FACSCantoII测量样品,并记录10,000个CD5<sup>+</sup>活单峰(singlet)淋巴细胞。用FlowJo软件V10(Tree Star, San Carlos, CA, USA)和Microsoft Excel 2010(Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Germany)分析数据。减去来自模拟样品的背景信号。

[0532] 如图5A中所示,这两种bstb介导强CLDN6依赖性T细胞活化。48小时之后,T细胞处于中间活化阶段,如通过早期活化标志物CD69和晚期活化标志物CD25的高双阳性百分比以及缺乏仅CD25阳性T细胞所确定的。此外,数据表明bstb浓度越低,活化状态越早。仅在5,000ng/ml的高浓度下bstb蛋白导致可测量的靶标非依赖性T细胞活化,其低于5.5%。在靶标依赖性T细胞活化的介导中,Bstb\_369/367显示出比bstb\_371/367略微但不显著的更高效力(同样参见表5)。

[0533] 表5:通过bstb\_369/367和bstb\_371/367的T细胞活化

细胞系	PA-1-SC12				OV-90-SC12				MDA-MB-231				无靶细胞			
	CLDN6 表达 +								-							
受试物	Bstb_369/367		Bstb_371/367													
浓度 [ng/ml]	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000
总活化 [%]	67.1	70.6	60.4	70.9	17.4	83.1	2.8	80.1	0.0	4.2	0.5	3.8	1.4	4.4	0.6	5.4
CD69 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> [%]	33.6	25.0	43.6	27.2	16.2	15.7	2.8	18.8	0.0	3.6	0.4	3.5	1.1	3.4	0.6	3.9
CD69 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> [%]	33.5	45.6	16.9	43.7	1.2	67.4	0.0	61.2	0.0	0.3	0.0	0.3	0.2	0.2	0.0	0.2
CD69 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> [%]	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3	0.1	0.0	0.0	0.8	0.0	1.3

[0535] b. T细胞增殖

[0536] 在测定设置之前,根据制造商的方案用CellTrace™ CFSE细胞增殖试剂盒(Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany)标记PBMC。将效应细胞和靶细胞与bstb共孵育72小时。如上文实施例3.a中所述收获PBMC。用抗人荧光标记的抗体抗CD5-APC (BD Biosciences)和活/死染料eFluor506 (eBioscience)对细胞进行染色。用BD FACSCantoII测量样品,并记录10,000个CD5<sup>+</sup>活单峰淋巴细胞。用来自Tree Star的FlowJo软件V10和Microsoft Excel 2010分析数据。

[0537] 如图5B中所示,这两种bstb介导强CLDN6依赖性T细胞增殖,如通过表明细胞分裂的CFSE阳性衰退所确定的。在PA-1存在下,不能确定这两种bstb分子在更强增殖方面的效力的明显差异。正如同样对于在OV-90存在下的T细胞活化所见的,bstb\_369/367介导比bstb\_371/367更强的作用。未检测到非特异性或靶标非依赖性T细胞增殖。

[0538] 总之,这两种bstb分子在严格的靶标依赖性中介导强T细胞调节。

[0539] 实施例4:bstb\_369/367和bstb\_5726/5725与CLDN6的结合

[0540] 使用流式细胞术分析确定bi-(scFv)<sub>2</sub>参照蛋白bstb\_369/367及其无标签类似物bstb\_5726/5725的相对结合亲和力。用0.05%胰蛋白酶/EDTA收获内源表达CLDN6的PA-1细

胞,用PBS洗涤,并以 $2 \times 10^6$ 个细胞/ml的浓度重悬于FACS缓冲液(含有2% FCS和0.1%叠氮化钠的PBS)中。将100 $\mu$ l细胞悬液与在FACS缓冲液中稀释的不同相应抗体的浓度系列(11点、2倍稀释系列,9.77至10,000ng/ml)一起孵育,并在4 $^{\circ}$ C下孵育45分钟。然后用FACS缓冲液洗涤细胞三次,并在4 $^{\circ}$ C下与通过Squarix(Squarix Biotechnology,Marl,Germany)而与FITC缀合的蛋白L(Pierce/Thermo Scientific)以4 $\mu$ g/ml的浓度孵育45分钟。随后,将细胞洗涤两次并重悬于100 $\mu$ l FACS缓冲液中。使用BD FACSArray(BD Biosciences)通过流式细胞术分析结合。使用GraphPad Prism 6One site-Specific binding确定半数最大结合的EC50。

[0541] 具有单价CLDN6结合位点的bi-(scFv)<sub>2</sub>蛋白表现出低的相对结合亲和力(EC50:约8.3 $\mu$ g/ml,对应于约150nM)。相比之下,bstb\_369/367和bstb\_5726/5725在约1.9 $\mu$ g/ml浓度(对应于约19nM)下显示出半数最大结合,因此相对结合亲和力比bi-(scFv)<sub>2</sub>参照蛋白高约8倍(图6A)。这表明通过使用二价结合位点可强烈地改善与靶CLDN6的结合,因此通过实施亲合力作用来提高结合亲和力。值得注意的是,带标签和无标签的bstb的结合曲线是一致的。

[0542] 我们使用浓度为4 $\mu$ g/ml的蛋白质L-FITC或浓度为6 $\mu$ g/ml的PE缀合的小鼠抗人IgG(Fab区)抗体(antikoerper-online,Aachen,Germany)作为二级检测试剂,在流式细胞术中进一步分析了HMW物质对bstb\_5726/5725单体结合特性的影响。半数最大结合的EC50在100%单体、97%单体/3% HMW和95%单体/5% HMW之间没有差异(在28nM和31至34nM之间变化,这取决于二级检测试剂)。在图6B中,仅示例性地示出了蛋白质L-FITC的检测。这些数据与来自细胞毒性测定的数据(参见实施例2c)一致,其清楚地示出5% HMW对bstb\_369/367分子的活性没有相关影响,因此有利于该形式的产品开发。

[0543] 实施例5:小鼠异种移植模型中的效力

[0544] 为了研究蛋白质bstb\_369/367在体内的治疗潜力,选择了免疫缺陷小鼠品系NOD.Cg-Prkd<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ或短NSG(Jackson laboratory,Bar Harbor,ME,USA)。所有小鼠均按照Institutional Animal Care Committee of the Johannes Gutenberg University,Mainz,Germany的指导原则使用。

[0545] a.用蛋白质bstb\_369/367处理小鼠中表达CLDN6的晚期肿瘤

[0546] 在示例性研究中,使用8周龄且体重为21至36g的雄性和雌性NSG小鼠。CLDN6阳性的OV-90细胞用作肿瘤细胞,且PBMC用作效应细胞。

[0547] 皮下(s.c.)接种 $5 \times 10^6$ 个肿瘤细胞,并在8天之后腹膜内(i.p.)施用 $1 \times 10^7$ 个PBMC。仅PBMC移植的小鼠(如在PBMC注射之后5天在外周血中分析的)根据肿瘤体积和性别(所有组中都具有两种性别)进行分组。治疗起始于每组的平均肿瘤体积。通过i.p.注射用载剂(DPBS)、31 $\mu$ g/kg bstb(低剂量)或308 $\mu$ g/kg bstb(高剂量)每周处理小鼠三次(周一-周三-周五)。“G1-载剂”组包含4只小鼠(n=4),“G2-bstb\_369/367(低剂量)”包含8只小鼠(n=8)并且“G3-bstb\_369/367(高剂量)”包含9只小鼠(n=9)。处理组总结在表6中。根据肿瘤体积读出(read-out),进行腹膜内施用5个连续周(G1)、6个连续周(G2)或4个连续周(G3)(图7A)。用数字校准卡尺每周两次测量肿瘤尺寸,并通过下式计算肿瘤体积:肿瘤体积[mm<sup>3</sup>]=长度[mm]×(宽度[mm])<sup>2</sup>/2。当肿瘤体积达到1500mm<sup>3</sup>时或在严重病态(主要是移植抗宿主病(graft-versus-host disease,GVHD)的症状)的情况下,通过颈脱位处死小

鼠。

[0548] 图7B示出了bstb处理组G2和G3的所有小鼠中肿瘤生长的抑制。抗肿瘤效力作为与载体对照G1相比的肿瘤生长抑制/消除和存活而测量。与对照组相对,用受试物bstb\_369/367的处理导致这两个给药组中的肿瘤消除。在7次注射之后,较高bstb\_369/367剂量组(G3)中的所有9只小鼠均无肿瘤。在15次注射之后,较低bstb\_369/367剂量组(G2)中的所有8只小鼠均无肿瘤。观察无肿瘤小鼠的肿瘤复发,直至发生GVHD症状。在这段时间内没有记录到肿瘤复发的发生。

[0549] 为了产生Kaplan-Meier存活图(图7C),治疗开始日被认为是第0天。如通过与Mantel-Cox对数秩检验组合的Kaplan-Meier生存统计进行成对比较所确定的,与对照组G1相比,这两个bstb\_369/367处理组的存活显著延长。G2与G1的比较结果是 $p < 0.0001$ 的P值,并且G3与G1的比较结果是 $p = 0.0043$ 。对照组G1的中位存活期为31天,相对处理组G2和G3的中位存活期分别为52天和42天。总之,bstb\_369/367在肿瘤消除方面示出是高效的,而且在该GVHD限制性小鼠模型中的存活方面是有益的。

[0550] 表6:处理组

处理组 (G)	小鼠编号 (n)	肿瘤细胞	效应细胞	bstb 蛋白	bstb蛋白剂量 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
G1	4	OV-90	PBMC	-	0
G2	8	OV-90	PBMC	369/367	31
G3	9	OV-90	PBMC	369/367	308

[0551] b. 确定治疗对体重的影响

[0553] 使用实验室规模每周两次检查每只小鼠的体重。在治疗期间在任何组中没有小鼠显示出显著的体重减轻(数据未示出)。

[0554] c. 脾细胞分离

[0555] 在小鼠安乐死之后,解剖脾以通过流式细胞术分析来检测人细胞的植入。脾解剖之后,通过以下立即进行脾细胞分离:将脾通过置于50ml反应管中的70 $\mu\text{m}$ 细胞过滤器(strainer)用3至5ml注射器的无菌柱塞捣碎,并用RT DPBS反复冲洗细胞过滤器。将分离的脾细胞离心,倾析DPBS,将脾细胞沉淀重悬于补充有10% DMSO的1ml加热灭活的胎牛血清中。将样品立即在-65至-85 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻并储存直至来自所有小鼠的脾细胞样品完成。

[0556] d. 小鼠脾中人T淋巴细胞植入的分析

[0557] 将脾细胞样品的完整收集物一次解冻,用温DPBS将所有细胞洗涤两次,并将每个样品 $1 \times 10^6$ 个脾细胞与荧光缀合的抗体(BD Biosciences)在4 $^{\circ}\text{C}$ 下在黑暗中孵育20分钟,以通过抗hCD45-APC染色检测人细胞的植入,并通过抗hCD3-FITC染色检测人T细胞的百分比。用FACSCanto II(BD Biosciences)进行流式细胞术分析。人T细胞植入可通过50-95% hCD45/hCD3双阳性单峰脾细胞的百分比确认(数据未示出)。

[0558] 实施例6:免疫缺陷小鼠中药动学行为的评估

[0559] 为了确定小鼠中bstb\_369/367蛋白的近似半衰期和清除率,我们使用了9至49周龄的雌性NSG小鼠。每只小鼠i.p.注射DPBS中的5mg/kg高度单体(100%)的bstb\_369/367。组大小包括三只小鼠,其中每组对应于一个血液提取时间点。一组仅注射载体缓冲液(DPBS)作为基础值(“注射后时间”=0h)。血液提取的其他时间点设定为15min、1h、2h、3h、6h和8h。将血液直接收集在Li-肝素管(Microvette 300LH, Sarstedt, Nürmbrecht,

Germany) 中, 并如本领域技术人员已知的通过离心分离血浆。收获血浆, 立即在液氮中震荡冷冻并储存在 $-65$ 至 $-85^{\circ}\text{C}$ 下直至使用。

[0560] 进行ELISA以量化血浆中的bstb\_369/367。为此, 将每组的血浆等分试样在RT下解冻并在PBS/0.2% BSA中稀释。将经稀释的含bstb\_369/367的血浆和作为标准行的bstb\_369/367蛋白(0.39ng/ml至3.41 $\mu\text{g}$ /ml)添加至包被有山羊抗人IgG F(ab')<sub>2</sub>抗体(Abd Serotec, Oxford, UK)的MaxiSorp™板(Thermo Scientific), 并用3%乳封闭。在洗涤步骤之后, 孵育浓度为3.5 $\mu\text{g}$ /ml的对bstb\_369/367的抗CLDN6结合位点具有特异性的鼠IgG (Ganymed Pharmaceuticals AG), 然后进行洗涤步骤并用与1:500的稀释度的碱性磷酸酶缀合的山羊抗小鼠IgG (Fc) 抗体(Dianova, Hamburg, Germany)孵育。最后, 添加4-硝基苯基磷酸二钠盐6-水合物短PNPP (PanReac AppliChem, Darmstadt, Germany) 作为碱性磷酸酶的底物, 并在30分钟之后用3M氢氧化钾终止反应。用微孔板读取仪M200 Pro (Tecan) 在405/492nm处测量ELISA。在bstb\_369/367标准曲线的基础上, 将所测量的吸收值转换成浓度值。

[0561] 如图8中所示, 在i.p.注射之后1小时内达到34 $\mu\text{g}$ /ml的最大bstb\_369/367血浆浓度。在分析的终点, 即在i.p.注射之后8小时, 血清中仍可检测到bstb\_369/367蛋白(8ng/ml)。

[0562] 考虑到患者中的与肿瘤靶标和T细胞的结合(其确保持久循环), 可考虑每周一次至两次bstb分子的注射循环。

[0563] 实施例7: 用无标签bstb\_5726/5725的体内剂量发现研究

[0564] 根据图9A中所示的日程安排, 如实施例5中所述建立异种移植模型。简言之, 用OV-90(s.c.) 和人PBMC(i.p.) 植入10至36周龄的44只雄性和雌性NSG。将小鼠随机分成7组, 其中6个处理组每组6只小鼠, 且1个PBS对照组8只小鼠。为了确定最佳bstb\_5726/5725剂量, 选择高于和低于实施例5中使用的bstb\_369/367的有效剂量(约300和30 $\mu\text{g}$ /kg)的浓度, 精确地为1,000 $\mu\text{g}$ /kg、300 $\mu\text{g}$ /kg、100 $\mu\text{g}$ /kg、30 $\mu\text{g}$ /kg、10 $\mu\text{g}$ /kg和3 $\mu\text{g}$ /kg。在处理开始当天, 随机组的平均肿瘤体积为约150mm<sup>3</sup>。从肿瘤细胞接种之后第28天开始每周三次i.p.施用处理。每组给予共计注射11次。用数字卡尺每周测量肿瘤两次。

[0565] 如图9B中所示, 肿瘤减小率与剂量相关。在处理开始时约400mm<sup>3</sup>的肿瘤体积似乎呈现临界尺寸, 其仅通过>30 $\mu\text{g}$ /kg的bstb剂量消除。有趣的是, 考虑到bstb在肿瘤块中的累积作用, 即使3 $\mu\text{g}$ /kg也会导致肿瘤生长和体积随时间降低。

[0566] 在该设置中, 100 $\mu\text{g}$ /kg被确定为高度有效且安全的剂量。在1,000 $\mu\text{g}$ /kg的最高剂量组中, 我们观察到不利效果, 例如皮肤的变黄(yellow discoloration)和体重减轻。

[0567] 实施例8: 靶向CLDN18.2和CD3的双特异性抗体衍生物的产生、纯化和分析

[0568] a. 序列来源、bstb构建体的设计, 以及克隆到表达载体中

[0569] 将双特异性嵌合TriMAB(bstb)构建体设计为在恒定区的C端处配备有两个单链可变片段(scFv)的抗原结合片段(Fab)。Fab结合结构域对人T细胞受体组分CD3 $\epsilon$ 具有特异性。抗CD3可变重链区(V<sub>H</sub>)和相应的可变轻链区(V<sub>L</sub>)结构域来源于IgG TR66(Lanzavecchia und Scheidegger1987)。第114位的半胱氨酸被丝氨酸替换。恒定重链区(C<sub>H</sub>1)和恒定轻链区(C<sub>L</sub>)是人来源的。我们为我们的构建体选择了 $\kappa$ 型恒定轻链区域。两个scFv结合部分对人肿瘤相关抗原(TAA)CLDN18.2具有特异性。相应的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区来源于目前处于临床试验(例如NCT01630083和NCT01671774)中的嵌合IgG1 IMAB362(Ganymed Pharmaceuticals AG,

Mainz, Germany) (例如Woll等, 2014)。scFv部分中 $V_H$ 和 $V_L$ 区的取向和接头的选择与专利申请PCT/EP2013/003399中描述的bi-(scFv)<sub>2</sub>分子5506和5538相关。图18显示了在本发明的过程中使用的 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域的氨基酸序列。

[0570] 产生四种bstb分子作为第一代, 它们的 $C_H1$ 区和IMAB362 scFv部分不同。Bstb\_5730/5728和bstb\_5731/5729包含源自人IgG1的 $C_H1$ 区, bstb\_5732/5728和bstb\_5733/5729源自人IgG2的 $C_H1$ 区。此外, bstb\_5730/5728和bstb\_5732/5728携带 $V_H-V_L$ 取向的IMAB362 scFv-部分, 而bstb\_5731/5729和bstb\_5733/5728携带 $V_L-V_H$ 取向的IMAB362 scFv-部分。在蛋白质水平上获得以下分子以形成bstb分子:

[0571] Bstb\_5730/5728:

[0572]  $N-V_H^{\alpha CD3}-C_H1(IgG1)-V_H^{\alpha CLDN18.2}-V_L^{\alpha CLDN18.2}-6xHis\text{-标签-C}$  (Fd bstb\_5730/5728)

[0573]  $N-V_L^{\alpha CD3}-C_L-V_H^{\alpha CLDN18.2}-V_L^{\alpha CLDN18.2}\text{-Strep-标签-C}$  (Lbstb\_5730/5728)

[0574] Bstb\_5732/5728:

[0575]  $N-V_H^{\alpha CD3}-C_H1(IgG2)-V_H^{\alpha CLDN18.2}-V_L^{\alpha CLDN18.2}-6xHis\text{-标签-C}$  (Fdbstb\_5732/5728)

[0576]  $N-V_L^{\alpha CD3}-C_L-V_H^{\alpha CLDN18.2}-V_L^{\alpha CLDN18.2}\text{-Strep-标签-C}$  (L bstb\_5732/5728)

[0577] Bstb\_5731/5729:

[0578]  $N-V_H^{\alpha CD3}-C_H1(IgG1)-V_L^{\alpha CLDN18.2}-V_H^{\alpha CLDN18.2}-6xHis\text{-标签-C}$  (Fd bstb\_5731/5729)

[0579]  $N-V_L^{\alpha CD3}-C_L-V_L^{\alpha CLDN18.2}-V_H^{\alpha CLDN18.2}\text{-Strep-标签-C}$  (L bstb\_5731/5729)

[0580] Bstb\_5733/5729:

[0581]  $N-V_H^{\alpha CD3}-C_H1(IgG2)-V_L^{\alpha CLDN18.2}-V_H^{\alpha CLDN18.2}-6xHis\text{-标签-C}$  (Fd bstb\_5733/5729)

[0582]  $N-V_L^{\alpha CD3}-C_L-V_L^{\alpha CLDN18.2}-V_H^{\alpha CLDN18.2}\text{-Strep-标签-C}$  (L bstb\_5733/5729)

[0583] C=C端,  $C_H$ =恒定重链区,  $C_L$ =恒定轻链区, Fd=可消化片段(Fab的重链部分), L=Fab的轻链部分, N=N端,  $V_H$ =可变重链结构域,  $V_L$

[0584] =可变轻链结构域。

[0585] 表7总结了关于在本发明的过程中产生的对TAACLDN18.2具有特异性的bstb构建体的信息。列出了关于特异性、来自单克隆抗体(mAb)的序列来源、密码子使用和其他序列特征的信息。编码靶细胞结合部分的可变结构域的序列最初来自Ganymed Pharmaceuticals AG。

[0586] 通过GeneArt(GeneArt/Thermo Fisher Scientific)进行DNA克隆和pCEP4表达载体构建。在Fd-和L-bstb V-区序列的5'-末端上游处引入编码MGWSCIIILFLVATATGVHS的人IgG分泌信号序列, 以使蛋白质分泌至培养基中。插入编码20个氨基酸(AA)的柔性甘氨酸-丝氨酸(GS)肽接头((GGGGS)<sub>4</sub>)的序列以连接 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域用于 $V_H-V_L$ 取向的抗TAA scFv的组成, 而插入25AA的柔性(GGGGS)<sub>5</sub>-肽接头用于 $V_L-V_H$ 取向的抗TAA scFv的组成。通过编码18AA接头(SGPGGGRS(GGGGS)<sub>2</sub>)的序列将一个scFv结构域序列与Fd部分( $C_H1$ 的C-端)连接, 并通过编码6AA接头(DVPGGS)的序列将另一个scFv与L部分( $C_L$ 的C端)连接。不同的接头长度允许通过尺寸区分Fd-和L-部分。将6×His-标签序列添加至Fd-scFv部分的3'-端, 并将Strep-标签添加至L-scFv部分的3'-端, 以有助于第一代纯异二聚体bstb的纯化。表8中列出了完整的bstb蛋白编码DNA序列。表9中列出了用于体外研究的亲本bi-(scFv)<sub>2</sub>和参照bi-(scFv)<sub>2</sub>的蛋白质编码DNA序列。

[0587] C端6×His-标签和Strep-标签用于蛋白质的亲和纯化和用于检测分析。所有构建

体均由外部测序服务验证。构建体图式在图10A中示出。第二代bstb设计为没有标签,并且将二硫键引入到scFv部分中。

[0588] 表7:CLDN18.2 x CD3-bstb抗体特征的总结

内部名称	特异性	scFv V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> 区的来源	CLDN18.2-scFv V <sub>H</sub> /V <sub>L</sub> 取向	CDLN18.2-scFv参照bi-(scFv) <sub>2</sub>	Fab V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> 区的来源	密码子使用	C <sub>H</sub> 1	标签	scFv部分中的ds键
Bstb_5730/5728 (SEQ ID NO: 30/32)	HS	IMAB362	V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub>	5506 (SEQ ID NO: 76)	TR66(C114S)	CG	IgG1	His/Strp	-
Bstb_5732/5728 (SEQ ID NO: 31/32)	HS	IMAB362	V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub>	5506 (SEQ ID NO: 76)	TR66(C114S)	CG	IgG2	His/Strp	-
Bstb_5731/5729 (SEQ ID NO: 33/35)	HS	IMAB362	V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub>	5538 (SEQ ID NO: 77)	TR66(C114S)	CG	IgG1	His/Strp	-
Bstb_5733/5729 (SEQ ID NO: 34/35)	HS	IMAB362	V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub>	5538 (SEQ ID NO: 77)	TR66(C114S)	CG	IgG2	His/Strp	-
Bstb_5745/5747 (SEQ ID NO: 36/37)	HS	IMAB362	V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub>	5506 (SEQ ID NO: 76)	TR66(C114S)	CG	IgG1	-	-
Bstb_5746/5748 (SEQ ID NO: 38/39)	HS	IMAB362	V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub>	5538 (SEQ ID NO: 77)	TR66(C114S)	CG	IgG1	-	-
Bstb_5749/5751 (SEQ ID NO: 40/41)	HS	IMAB362	V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub>	5506 (SEQ ID NO: 76)	TR66(C114S)	CG	IgG1	-	+
Bstb_5750/5752 (SEQ ID NO: 42/43)	HS	IMAB362	V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub>	5538 (SEQ ID NO: 77)	TR66(C114S)	CG	IgG1	-	+

[0590] C<sub>H</sub>1表示恒定重链区1;CG,中国仓鼠;ds,二硫(disulfide);IMAB,理想的单克隆抗体;His,6×His-标签;HS,智人;IgG,免疫球蛋白G;Strp,Strep-标签。

[0591] 表8:CLDN18.2 x CD3-bstb DNA编码序列

质粒内部名称	相应的bstb片段	DNA编码序列
#5728	L bstb_5730/5728, L bstb_5732/5728	ATGGGCTGGTCTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACCTCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCGTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCCGTGTCTCTAC ATGAACCTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCCTACAGATCTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTTCCACCCCTGACCTTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTG GTGTGCTGTGAACAACCTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCGAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTACCCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGCCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGTGACG TGCCCTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCCGTGAAGTGGT CGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTCCGGCTACACCTT CACCAGTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGCCTGGCCAGGGCCTGG AATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCAACTACAACCAG AAGTTC AAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTCTCCACCAGC CTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCCGTGACTACT GCACCCGGTCTGGCGGGGCAACTCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACC ACCTGACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGG CGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCC CCTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAG TCCTCCAGTCCCTGTGAAGTCCGGCAACCAGAAAGTACCTGACCTG GTATCAGCAGAAGCCCGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCT CCACCCGCGAGTCTGGCGTGGCCGATAGATTACCCGGCTCCGGCAGCGCC ACCGACTTACCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCCGT GTATTACTGTGAGAAGGACTACTCTACCCCTTACCTTCGGCTCTGGCA

[0593]

#5729	L bstb_5731/5729, L bstb_5733/5729	<p>CCAAGCTGGAATCAAGTCTGCCTGGAGCCACCCACAGTTCGAGAAGTGA  ATGGGCTGGTCCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT  GCACCTCAGATCGTGTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTAGCC  CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCCGTGTCTTAC  ATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA  CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCTTACAGATTCTCCGGCTCTG  GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT  GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCCAACCCCTGACCTTTTGG  CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGT  TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG  GTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA  GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTACCAGGAGC  AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCTGTCTCCACCTGACCTGATCTCC  AAGGCCGACTACGAGAAGCACAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCA  GGGCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGTGACG  TGCTTGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACC  GTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCT  GCTGAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGC  CCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTCCACCCGCGAGTCT  GGCGTGCCGATAGATTACCAGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCT  GACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTATTACTGTGAGA  ACGACTACTCCTACCCTTACCTTCGGCTCTGGCACCAAGCTGGAATC  AAGGGAGGCGGTGGTTCAGGGCGCGGAGGCAGCGGTGGAGGTGGTAGTGG  CGGTGGCGGTTTCAAGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGCTG  GCGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCC  TCCGGTACACCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCC  TGGCCAGGGCTGGAATGGATCGGCAACATTACCCTCCGACTCCTACA  CCAAC TACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAG  TCCTCCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTC  CGCGTGTACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGGCAACTCCTTCGACTATT  GGGGCCAGGGCACCCCTGACAGTGTCTTCTGCCTGGAGCCACCCA  CAGTTCGAGAAGTGA</p>
#5730	Fd bstb_5730/5728	<p>ATGGGCTGGTCCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT  GCACCTCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCCTG  GCGCTCCGTGAAGATGTCTTCAAGACCTCCGGCTACACCTTACCCTGG  TACACCATGCACTGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGCCCTGGAATGGAT  CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA  AGGACAAGGCCACCCTGACAACCGACAAGTCTCCTCCACCGCTACATG  CAGCTGTCTCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGTGTACTACTGCGCCCG  GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACACAC  TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTCTCCTCTGGCC  CCTTCCCTCAAGTCCACTCCGGCGGCACCGCGCTCTGGGCTGCCTGGT  GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTGAGCTGGAACCTTGGCGCC  TGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCTGCGTGTGAGTCTCCGGCCTG  TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCTCCTCCCTGGGCACCCA  GACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA  AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGTCCGGCCCTGGGGCGGACGACGCGCTG  GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTCAGGTGCAGTGCAGCAGCTGG  CGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCCT  CCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCCT  GGCCAGGGCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCTCCGACTCCTACAC  CAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGT  CCTCCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCCACCTCCGAGGACTCC  GCCGTGTACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGGCAACTCCTTCGACTATTG  GGGCCAGGGCACCCCTGACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTG  GTGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTG  ATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCGTGGCGAGAAAGTGAC  CATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCTGTGAACTCCGGCAACCAGAAGA  ACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCAGCCCCCAAGCTGTG  ATCTACTGGGCTCCACCCGCGAGTCTGGCGTGGCCGATAGATTACCCTG  CTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCG  AGGACCTGGCCGTGTATTACTGTGCAACGACTACTCCTACCCTTACC</p>

[0594]

		TTCGGCTCTGGCACCAAGCTGGAAATCAAGGGCGGCTCCCACCACCACCA TCACCCTGA
#5731	Fd bstb_5731/5729	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCCCAGGTGCAGTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTACCCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTTGGCGCCC TGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCTCTCCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCTCCGGCCCTGGGGCGGACCGAGCGGC GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGACATCGTGATGACCCAGTCCCT CTCCAGCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGACCTGACAGT CCTCCAGTCCCTGTGAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGTGATCTACTGGGCTC CACCCGCGAGTCTGGCGTGCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCA CCGACTTACCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTG TATTACTGTGAGAACGACTACTCTTACCCTTACCTTCCGGCTCTGGCAC CAAGCTGAAATCAAGGGAGGCGGTGGTTCAAGCGCGGAGGCGAGGTG GAGGTGTAAGTGGCGGTGGCGGTTCAAGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAG CTGCAGCAGCCTGGCGTGAAGTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCT GTCTTCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCAGTACTGGATCAACTGGG TCAAGCAGCGCCTGGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCC TCCGACTCCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCT GACCGTGGACAAGTCTTCTCCACCCTTACATGACAGTGTCCAGCCCA CCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCACCCGCTCTGGCGGGGCAAC TCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACCCTGACAGTGTCTCTTCTCA CCACCACCATCACCCTGA
#5732	Fd bstb_5732/5728	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCCCAGGTGCAGTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTACCCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTGTCCAAGTCCACCTCCGAAGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTTGGCGCCC TGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCTCCAACCTTCCGCACCCA GACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGTGGACA AGACCGTGGAGCCTAAGTCCGCCCTCCGGCCCTGGGGCGGACCGCAGCGGC GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTCAGGTGCAGTGCAGCAGCCTGG CGTGAAGTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTTCAAGGCCT CCGGCTACACCTTACCAGTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCCT GGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACAC CAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCTGGACAAGT CCTCTCCACCCTTACATGCAGTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCC GCCGTGTACTACTGCACCCGCTCTGGCGGGGCAACTCCTTCGACTATTG GGGCCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTCTGGAGCGGAGGATCTGGTG GTGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTG ATGACCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCGTGGCGAGAAAGTGAC CATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCTGTAACCTCCGGCAACAGAAGA ACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCAGCCCCCAAGCTGTG ATCTACTGGGCTCCACC CGGAGTCTGGCGTGCCGATAGATTACCGG

[0595]

		CTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCG AGGACCTGGCCGTGTATTACTGTGAGAACGACTACTCCTACCCCTTCACC TTCGGCTCTGGCACCAGCTGGAAATCAAGGGCGGCTCCCACCACCACCA TCACCCTGA
#5733	Fd bstb_5733/5729	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCATGCAGTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTGCTCCAAGTCCACCTCCGAAGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCTGCGGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCTCCAACCTTCGGCACCCA GACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGACCGTGGAGCCTAAGTCCGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGACGCGG GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGACATCGTGATGACCAGTCCCC CTCCAGCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGT CCTCCAGTCCCTGTGAACTCCGGCAACCAGAAGAATACCTGACCTGG TATCAGCAGAAGCCCGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTC CACCCGCGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCA CCGACTTTACCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTG TATTACTGTGAGAACGACTACTCTACCCCTTCACCTTCGGCTCTGGCAC CAAGCTGGAATCAAGGGAGGCGGTGGTTTCAGGCGGCGGAGGACGCGGTG GAGGTGATGAGCGGTGGCGGTTTCAGGGGGAGGTGGCTCCGAGGTGCAG CTGCAGCAGCCTGGCGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGT GTCTGCAAGGCCCTCCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGG TCAAGCAGCGCCCTGGCCAGGGCCTGGAATGGATCCGGCAACATCTACCC TCCGACTCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCT GACCGTGGACAAGTCTCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCA CCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGGCAAC TCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACCCTGACAGTGTCTCTTCTCA CCACCACCATCACCCTGA
#5745	Fd bstb_5745/5747	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCATGCAGTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCTGACAACCGACAAGTCTCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCTGCGGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCTCCTCCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGACGCGGC GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTCAGGTGCAGTGCAGCAGCCTGG CGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGTGTCTGCAAGGCCCT CCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCCCT GGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCTTACAC CAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGT CCTCTCCACCGCTACATGCAGTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCC GCCGTGTACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGGCAACTCTTCGACTATTG GGGCCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTG GTGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTG ATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCGTGGCGAGAAAGTGAC CATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCTGCTGAACTCCGGCAACCAGAAGA

[0596]

		ACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTG ATCTACTGGGCCCTCCACCCGCGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCCGG CTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCG AGGACCTGGCCGTGATTACTGTGAGAACGACTACTCCTACCCTTCCAC TTCGGCTCTGGCACCAGCTGGAATCAAGTGA
#5746	Fd bstb_5746/5748	ATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTACCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGCTACACCACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCTGACAACCAGACAAGTCTCCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCTGGACTACTGGGGCCAGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTCCCTCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAAGCTGGAACCTGGCGCCC TGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCTCCTCCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCTCCGGCCCTGGGGGCGGACGCAGCGGC GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGACATCGTGATGACCAGTCCCC CTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGT CCTCCAGTCCCTGTGAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACTGACCTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCCT CACCCGCGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCCGGCTCCGGCAGCGGCA CCGACTTTACCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTG TATTACTGTGAGAAGCACTACTCCTACCCCTTACCTTCCGGCTCTGGCAC CAAGCTGGAATCAAGGGAGGCGGTGGTTTCCAGCGCGGAGGCGAGCGGTG GAGGTGGTAGTGGCGGTGGCGGTTCCAGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAG CTGCAGCAGCCTGGCGTGAACGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCT GTCCCTGCAAGGCCCTCCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGG TCAAGCAGCGCCTGGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCC TCCGACTCCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCT GACCGTGGACAAGTCTCCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCA CCTCCGAGGACTCCGCCGTGACTACTGCACCCCGTCTGGCGGGCAAC TCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACCCTGACAGTCTCCTTTGA
#5747	L bstb_5745/5747	ATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGCCCTCCTCCTCCGTGCTCTAC ATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCCTACAGATTTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCTCCAACCCCTGACCTTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCTCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTACCAGGAC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCTGTCTCCACCCTGACCTGTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCA GGCCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGCGAGTGTGACG TGCTTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAACTGGT CGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTT CACCAGTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGCCTGGCCAGGGCCTGG AATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCAACTACAACCAG AAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTCCTCCACCGC CTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCCGTGACTACT GCACCCGGTCTGGCGGGCAACTCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACC ACCCTGACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGG CGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCC CCTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAG TCCTCCAGTCCCTGTGAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACTGACCTG GTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCT

[0597]

		<p>CCACCCGCGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCCGGCTCCGGCAGCGGC  ACCGACTTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGT  GTATTACTGTGAGAACGACTACTCCTACCCCTTACCTTCGGCTCTGGCA  CCAAGCTGGAATCAAGTGA</p>
#5748	L bstb_5746/5748	<p>ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT  GCACCTCAGATCGTGTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTAGCC  CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGCCCTCCTCCTCCGTGTCTAC  ATGAACCTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA  CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCCTACAGATTCTCCGGCTCTG  GCTCTGGCACCTCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT  GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCACCCCTGACCTTTGG  CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGT  TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCAGCCCTCCGTG  GTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCTCCTGGGAGGCCAAGGTGAGTGGAA  GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAAAGCGTCAACCGAGC  AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCTGTCTCCACCCTGACCTGTCC  AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA  GGGCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGTGACG  TGCTTGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCTGACG  GTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCT  GCTGAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGC  CCGGCCAGCCCCCAAGCTGTGATCTACTGGGCTCCACCCGCGAGTCT  GGCGTGCCTGATAGATTACCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCT  GACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGATTAAGTGTGAGA  ACGACTACTCCTACCCCTTACCTTCCGGCTCTGGCACCAAGCTGGAATGAA  AAGGGAGGCGGTGGTTCAGGCGGGGAGGCAGCGGTGGAGGTGGTAGTGG  CGGTGGCGGTTTCAGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTG  GCGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCC  TCCGGTACACCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCC  TGGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCTCCGACTCCTACA  CCAACCTACAACAGAAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAG  TCCTCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTC  CGCCGTGACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGGCAACTCCTTCGACTATT  GGGGCCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTCTTGA</p>
#5749	Fd bstb_5749/5751	<p>ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT  GCACCTCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG  GCGCCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTACCCCGG  TACCCATGCACCTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT  CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA  AGGACAAGGCCACCTGACAACCGACAAGTCTCCTCCACCGCTACATG  CAGCTGTCTCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTGACTACTGCGCCCG  GTACTACGACGACCACTACTCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC  TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCC  CCTTCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT  GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAAGTCTGGCGCCC  TGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG  TACTCCTGTCTCCTGGTGGTACCCTGCTTCTCCTCCTGGGCACCCA  GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA  AGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCAGCGGC  GGAGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTCAGGTGCAGTGCAGCAGCCTGG  CGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGTGTCTGCAAGGCCT  CCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCCT  GGCCAGTGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCTCCGACTCCTACAC  CAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGT  CCTCCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCC  GCCGTGACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGGCAACTCCTTCGACTATTG  GGGCCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTCTGGAGCGGAGGATCTGGTG  GTGGCGGATCTGGCGCGGTGGAAGTGGCGGAGTGGTAGCGACATCGTG  ATGACCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGCAGCTGGCGGAGAAAGTGAC  CATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCTGCTGAACTCCGGCAACCAGAAGA  ACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCAGCCCCCAAGCTGTG  ATCTACTGGGCTCCACCCGCGAGTCTGGCGTGCCTGATAGATTACCGG</p>

[0598]

		CTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCG AGGACCTGGCCGTGTATTACTGTGAGAACGACTACTCCTACCCCTTCACC TTCGGCTGCGGCACCAAGCTGGAAATCAAGTGA
#5750	Fd bstb_5750/5752	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCATGCCTGGGTCAAGCAGAGGCTGGACAGGGCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTCA AGGACAAGGCCACCTGACAACCGACAAGTCTCCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCTCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAC TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTTCGGTGTTCCTCTGGCC CCTTCCCTCAAGTCCACTCCGGCGGCACCGCGCTCTGGGTGGTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCCTGAGCTGGAATCTGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCTGCGGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTTCTCCTCCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCAACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGTGGAGCCTAAGTCTGCTCCGGCCCTGGGGGGCGGACGACGCGG GGAGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGACATCGTGATGACCCAGTCC CTCCAGCCTGACCGTACCCTGGCGAGAAAGTGAACATGAGCTGCAAGT CCTCCAGTCCCTGCTGAACTCCGGCAACCAGAAGAATACTGACCTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCGCT CACCCGCGAGTCTGGCGTGCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCA CCGACTTTACCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCGGAGGACCTGGCCGTG TATTACTGTGAGAACGACTACTCCTACCCCTTACCTTCCGGCTGCGGCAC CAAGCTGGAAATCAAGGGAGGCGGTGGTTCAGGCGGCGGAGGCGGCGT GAGGTGGTAGTGGCGGTGGCGGTTAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAG CTGCAGCAGCCTGGCGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCT GTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGG TCAAGCAGCGGCTGGCCAGTGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCC TCCGACTCCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAGGACAAGGCCACCCCT GACCGTGGACAAGTCTCCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCA CCTCCGAGGACTCCGCGTGTACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGGCAAC TCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACCTGACAGTGTCTCTTGA
#5751	L bstb_5749/5751	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCATCATGCTGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGCCCTCCTCCTCCGTGTCTTAC ATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTTGG CGTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAAAGCGTACCAGGAC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCCTGTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGCGAGTGTGACG TGCCTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGTGAAGTGGT CGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTT CACCAGTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGCCTGGCCAGTGCCTGG AATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCTTACACCAACTACAACC AAGTTCAGGACAAGGCCACCTGACCGTGGACAAGTCTCCTCCACCGC CTACATGCAGCTGTCCAGCCCACTCCGAGGACTCCGCGGTGTACTACT GCACCCGGTCTGGCGGGGCAACTCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACC ACCCTGACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGG CGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCC CCTCCAGCCTGACCGTGACCGTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAG TCCTCCAGTCCCTGTGAACTCCGGCAACCAGAAGAATACTGACCTG GTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCT CCACCCGCGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGC ACCGACTTTACCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCGGAGGACCTGGCCGT

[0599]

		GTATTACTGTGTCAGAACGACTACTCCTACCCCTTCACCTTCGGCTGCGGCA CCAAGCTGGAAATCAAGTGA
#5752	L bstb_5750/5752	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCTCAGATCGTGTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCCTCCTCCTCCGTGTCTAC ATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCTTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTTGG CGCTGGCACCAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGT TCATCTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCCGCTCCGTG GTGTGCCTGTGAACAACCTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTACCCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCTGTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGTGACG TGCCTGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACC GTGACCCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCT GCTGAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGC CCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTCCACCCGCGAGTCT GGCGTGCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCT GACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTATTACTGTFCAGA ACGACTACTCCTACCCTTACCTTCGGCTGCGGCACCAAGCTGGAAATC AAGGGAGGCGGTGGTTCAAGGCGGCGAGGCAGCGGTGGAGGTGGTAGTGG CGGTGGCGGTTCAAGGGGAGGTGGTTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGCTG GCGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCC TCCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCC TGGCCAGTGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCTCCGACTCCTACA CCAATAACAACAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAG TCCTCCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTC GCCTGTACTACTGCACCCGGTCTTGGCGGGCAACTCCTTCGACTATT GGGCCAGGCCACCACCTGACAGTGTCTCTTGA

[0600] 表9:CLDN18.2 x CD3-bi-(scFv)<sub>2</sub>DNA编码序列

[0601]

质粒内部名称	相应的 bi-(scFv) <sub>2</sub>	DNA编码序列
#5506	bi-scFv_5506	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCTCAGGTGCAGTGCAGCAGCCTGGCGTGAAGTGGTCCGACCTG GCGCCTCCGTGAAGCTGTCTTGCAGGCCTCCGGCTACACCTTACCAGC TACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCCTGGCCAGGGCCTGGAATGGAT CGCAACATCTACCCTCCGACTCCTACACCAACTACAACCGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTCCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCACCCG GTCTTGGCGGGCAACTCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACCCTGA CAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGT GGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAG CCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCTCCTCC AGTCCCTGCTGAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAG CAGAAGCCCGCCAGCCCCCAAGCTGTGTACTACTGGGCTCCACCCG CGAGTCTGGCGTGCCTGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACT TTACCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTATTAC TGTGAAACGACTACTCCTACCCTTACCTTCGGCTCTGGCACCAGCT GGAATCAAGTCTGGCGGAGGCGGATCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTG GCGCTGAGCTGGCTAGACCTGGCGCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACC TCCGGCTACACCTTACCAGGTACACCATGCAGTGGTCAAGCAGAGGCC TGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCAACCCTCCCGGGCTACA CCAATAACAACAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACAACCGACAAG TCCTCCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCTCCTGACCTCCGAGGACTC CGCCGTGTACTACTGCACCCGGTACTACGACGACCACTACTCCTGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTGTCTAGCGGTGGTGGAGGAAGC

[0602]

		<p>GGAGGGGGTGGTAGCGGTGGTGGAGGCTCTGGCGGGGGAGGGAGTCAGAT  CGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTAGCCCTGGCGAGAAAG  TGACAAATGACCTGCCGGCCTCCTCCTCCGTGTCTACATGAACTGGTAT  CAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCTCCAA  GGTGGCCTCTGGCGTGCCTTACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCT  CCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGATGCCGCCACCTAC  TACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTTGGCGCTGGCACCAA  GCTGGAACCTGAAGGGCGGCTCTCACCACCACCATCACCCTGA</p>
#5538	bi-scFv_5538	<p>ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT  GCACTCTGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCG  CTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCTCCAGTCCCTGCTGAAC  TCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCA  GCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTCCACCCGCGAGTCTGGCGTGC  CCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCTGACCATC  TCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTATTACTGTGAGAACGACTA  CTCCTACCCCTTACCTTCGGCTCTGGCACCAAGCTGGAATCAAGGGAG  GCGGTGGTTACGGCGGCGGAGGCAGCGGTGGAGGTGGTAGTGGCGGTGGC  GGTTCAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGTGA  ACTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTCCGGCT  ACACCTTACACAGTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGCCTGGCCAG  GGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCAACTA  CAACCAGAAGTTCAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTCCT  CCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCGGTG  TACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGGCAACTCCTTCGACTATTGGGGCCA  GGGCACCACCCTGCAGTGTCTCTTCTGGCGGAGGCGGATCCCAAGTGC  AGCTGCAGCAGTCTGGCGTGTAGCTGGCTAGACCTGGCGCCTCCGTGAAG  ATGTCTTGAAGACCTCCGGCTACACCTTACCCGGTACACCATGCACTG  GGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCAACC  CCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAGGACAAGGCCACC  CTGACAACCGACAAGTCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCTCCTCCT  GACCTCCGAGGACTCCGCGTGTACTACTGCGCCCGTACTACGACGACC  ACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTGTCTAGC  GGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGG  AGGTGGTAGCCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTA  GCCCTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCCGTGTCC  TACATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGAT  CTACGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCT  CTGGCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAG  GATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTT  TGGCGTGGCACCAAGCTGGAACCTGAAGGGCGGCTCTCACCACCACCATC  ACCACTGA</p>
#5376	bi-scFv "板参照"	<p>ATGGGATGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT  GCACAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGAGCTGAACTGGTGCAGGCTG  GAGCCAGCGTGAAGCTGTCTTCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCCAGC  TACTGGATCAACTGGGTGAAGCAGCGGCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT  CGGCAACATCTACCCAGCGACAGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTC  AGGACAAGGCCACCTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCAGCTACATG  CAGCTGTCCAGCCCACTCCGAGGACAGCGCGTGTACTACTGCACCCAG  AAGCTGGCGGGGCAACAGCTTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACACTGA  CAGTCAGCAGCGGAGGAGGGGGATCTGGCGGGGAGGAAGCGGAGGGGGG  GGAAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGACCGTGACAGC  CGGGGAAAAGGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACA  CGGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAG  CCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCGGGAGAGCGCGTGC  CGACCGGTTTACCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTACCCCTGACCATCA  GCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTATTACTGTGAGAACGACTAC  AGCTACCCCTTACCTTCGGCAGCGGCACCAAGCTGGAATCAAGAGCGG  AGGGGGAGGATCCGATATCAAGCTGCAGCAGAGCGGAGCTGAACTGGCTA  GGCCAGGCGCCTCCGTGAAGATGAGCTGTAAGACTCCGGCTATACCTTT  ACCCGGTACACCATGCACTGGGTGAAACAGAGGCCCGGACAGGGGCTGGA  ATGGATTGGCTATATCAACCCCTCCCGGGGCTACACAAATTACAATCAGA  AATTCAAAGATAAAGCCCACTGACAACCGACAAGTCCAGCTCCACAGCC</p>

[0603]	<p>TATATGCAGCTGTCCCTCCCTGACCAGCGAGGACTCTGCCGTGTACTATTG  CGCCCGGTACTACGACGACCCTACAGCCTGGATTATTGGGGGCAGGGGA  CAACACTGACAGTCTCCAGCGTGGAGGGCGGCAGCGGAGGATCTGGCGGG  AGCGGGCGGCTCTGGGGGCGTCGACGACATCCAGCTGACCCAGTCCCCCGC  CATCATGAGCGCCAGCCCTGGCGAGAAGGTGACAATGACCTGCCGGGCCA  GCAGCAGCGTGAGCTACATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGC  CCCAAGCGGTGGATCTACGACACCAGCAAGGTGGCCTCCGGCGTGCCCTA  CAGATTCTCCGGCTCCGGCTCTGGCACCAGCTACAGCCTGACAATTTCTA  GCATGGAAGCCGAGGACGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGCAGC  AACCCCTGACCTTTGGCGCCGGAACAAAGCTGGAAGTGAAGTGA</p>
--------	--

[0604] 实施例9:体外细胞毒性测定中四种CLDN18.2 x CD3-bstb的比裂解活性的比较

[0605] 如实施例1b和c所述制备蛋白质bstb\_5730/5728、bstb\_5731/5729、bstb\_5732/5728和bstb\_5733/5729(在scFv部分中均包含标签但没有二硫键)并纯化。在通过SEC分离高度单体物质之前,在体外萤光素酶细胞毒性测定中研究蛋白质(50-77%单体物质)的功能,基本上如实施例2a中所述。偏差描述如下。

[0606] 在该示例性研究中,使用稳定表达萤光素酶和CLDN18.2的人胃癌细胞系NUGC-4\_hCLDN18.2作为靶细胞系。人CLDN18.2阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231用作特异性对照。将PBMC效应细胞和靶细胞与浓度范围为47.44aM至47.44nM的bstb蛋白的10点、10倍连续稀释行一起孵育。

[0607] 如图11所示,在示例性研究中共孵育48小时之后,所有四种CLDN18.2x CD3-bstb分子(图10B)都导致了NUGC-4\_hCLDN18.2细胞的高效裂解。裂解最多93%的靶细胞。用CLDN18.2阴性对照细胞系MDA-MB-231未观察到裂解。关于SEC之前的单体含量和细胞毒性测定中的效率,选择携带IgG1的C<sub>H</sub>1部分的两个bstb变体bstb\_5730/5728和bstb\_5731/5729用于进一步研究,而在scFv部分中没有标签并且具有或不具有二硫键。

[0608] 实施例10:经纯化无标签CLDN18.2 x CD3-bstb的物理化学性质的比较

[0609] 使用Supracap<sup>TM</sup> 50深度过滤器囊(depth filter capsule)(Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)过滤包含蛋白质bstb\_5745/5747、bstb\_5746/5748、bstb\_5749/5751或bstb\_5750/5752的瞬时转染的Expi293F<sup>TM</sup>细胞的细胞培养上清液,并随后进行蛋白质纯化过程。

[0610] 为了分析不同纯化的CLDN18.2 x CD3-bstb蛋白的聚集状态,我们使用具有尺寸排阻TSKgel G3000SWx1柱(300x 7.8mm, Tosoh Bioscience)的Dionex Ultimate 3000(Thermo Scientific)进行尺寸排阻-高效液相色谱法(SE-HPLC)。用SE-HPLC缓冲液(0.3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2)冲洗柱,并通过等度洗脱分离bstb蛋白。当bstb\_5745/5747和bstb\_5746/5748表明单体蛋白质的量相对较低(分别为约60%和约40%)时,bstb\_5749/5751和bstb\_5750/5752在纯化之后是高度单体的(分别为约96%和约89%)(图12A和B)。此外,在RT下短时间储存bstb\_5745/5747和bstb\_5746/5748导致形成视觉上的聚集体。

[0611] Bstb\_5745/5747和bstb\_5749/5751以及bstb\_5746/5748和bstb\_5750/5752各自仅在相应的抗CLDN18.2 scFv部分的两个氨基酸上不同,从而允许在bstb\_5749/5751和bstb\_5750/5752的抗CLDN18.2 scFv部分内形成二硫键。在抗CLDN18.2 scFv部分中引入另外的二硫键有利于单体蛋白质的形成,因此改善了相应bstb的物理化学性质。

[0612] 将初始纯化之后的所有bstb变体透析到PBS中,并最后使用HiLoad26/600Superdex 200pg柱(GE Healthcare Life Sciences)进行制备型SEC,以使单体级分富集至约100%用于进一步表征活性和结合。

[0613] 实施例11:CLDN18.2 x CD3 bstb和bi-(scFv)<sub>2</sub>蛋白的活性的直接比较

[0614] 在体外萤光素酶细胞毒性测定中研究单体蛋白质bstb<sub>5749/5751</sub>和bstb<sub>5750/5752</sub> (在scFv部分中均包括二硫键) 和它们相应的bi-(scFv)<sub>2</sub>类似物bi-scFv<sub>5506</sub>和bi-scFv<sub>5538</sub> (无二硫键), 基本上如实施例9所述。除了之前描述的之外, 施用浓度范围为24.64fM至48.11nM的10点、5倍连续稀释行。此外, 出于归一化原因, 在每个板上包括参照。Bstb和bi-(scFv)<sub>2</sub>蛋白以等摩尔浓度使用。

[0615] Bstb<sub>5750/5752</sub>显示出比bstb<sub>5749/5751</sub> (70.94pM) 低1.8倍的EC50 (40.63pM) (图13A, 左图), 从而说明了前者bstb的稍高的活性。最高浓度的这两种bstb蛋白均导致约95%靶细胞的高效裂解。用CLDN18.2阴性对照细胞系MDA-MB-231未观察到裂解 (数据未示出)。有趣的是, 相应的bi-(scFv)<sub>2</sub>-bi-scFv<sub>5506</sub>和5538-类似物 (图13A, 右图) 表示出EC50值的显著差异, 分别为9.99pM和777.20pM。随后将EC50值相对于板参照进行归一化 (bi-scFv<sub>5376</sub>), 并且将bi-(scFv)<sub>2</sub>EC50设定为1计算倍数差异。令人惊讶的是, bstb<sub>5749/5751</sub>的EC50比bi-scFv<sub>5506</sub>高6倍, 表明前者约80%的活性损失 (图13B, 左图)。另一方面, bstb<sub>5750/5752</sub>的EC50比bi-scFv<sub>5538</sub>低23倍, 这意味着通过使用bstb形式而活性提高>2000% (图13B, 右图)。

[0616] 总之, 从单价向二价的转换取决于所使用的结合结构域以及它们的取向可改善双特异性抗体的活性, 如通过与bi-scFv<sub>5538</sub>相比bstb<sub>5750/5752</sub>的显著活性提高所示出的。此外, 就稳定性而言, bstb形式的蛋白质特征可能优于bi-(scFv)<sub>2</sub>形式。

[0617] 实施例12: 靶向CLDN6和CD3的基于IVT-mRNA的双特异性抗体衍生物的产生

[0618] a. bstb IVT-mRNA模板载体的克隆和IVT-mRNA合成

[0619] 为了产生CLDN6 x CD3双特异性嵌合TriMAB (bstb) 作为体外转录的信使RNA (IVT-mRNA), 我们使用标准技术将bstb<sub>369/367</sub>和bstb<sub>371/367</sub> (在实施例1中描述) 的DNA序列亚克隆到IVT-mRNA模板载体pST1-TEV-MCS-FI (BioNTech AG, Mainz, Germany) 中。TEV前导序列已在别处描述 (Zenko和Gallie 2005; Weingarten-Gabbay等2016; Gallie等1995), 且F-I序列在专利申请“3' UTR Sequences for Stabilization of RNA” (PCT/EP2015/073180) 中描述。获得以下构建体用于形成bstb分子:

[0620] Bstb<sub>435/434</sub>:

[0621] pST1-5' TEV-Sec-V<sub>H</sub><sup>αCD3</sup>-C<sub>H1</sub> (IgG1) -V<sub>H</sub><sup>αCLDN6</sup>-V<sub>L</sub><sup>αCLDN6</sup>-6xHis-标签-F-I-A30接头A70 (Fd)

[0622] pST1-5' TEV-Sec-V<sub>L</sub><sup>αCD3</sup>-C<sub>L</sub>-V<sub>H</sub><sup>αCLDN6</sup>-V<sub>L</sub><sup>αCLDN6</sup>-Strep-标签-F-I-A30接头A70 (L)

[0623] Bstb<sub>436/434</sub>:

[0624] pST1-5' TEV-Sec-V<sub>H</sub><sup>αCD3</sup>-C<sub>H1</sub> (IgG2) -V<sub>H</sub><sup>αCLDN6</sup>-V<sub>L</sub><sup>αCLDN6</sup>-6xHis-标签-F-I-A30接头A70 (Fd)

[0625] pST1-5' TEV-Sec-V<sub>L</sub><sup>αCD3</sup>-C<sub>L</sub>-V<sub>H</sub><sup>αCLDN6</sup>-V<sub>L</sub><sup>αCLDN6</sup>-Strep-标签-F-I-A30接头A70 (L)

[0626] A=腺嘌呤, Fd=可消化片段 (Fab的重链部分), FI=3' UTR序列, L=Fab的轻链部分, Sec=分泌信号, 5' TEV=来自烟草蚀纹病毒 (tobacco etch virus) 的5' UTR。

[0627] 表10总结了在本发明的过程中产生的关于对TAA CLDN6具有特异性的bstb构建体的信息。列出了特异性、来自单克隆抗体 (mAb) 的序列来源、密码子使用、其他序列特征的信息。编码靶细胞结合部分的可变结构域的序列最初来自Ganymed Pharmaceuticals AG。

[0628] 表10:CLDN6 x CD3-bstb抗体特征的总结

内部名称	特异性	scFv V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> 区的来源	Fab V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> 区的来源	密码子使用	C <sub>H</sub> 1	标签
[0629] Bstb_435/434 (SEQ ID NO: 79/78)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG1	His/Strp
Bstb_436/434 (SEQ ID NO: 80/78)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG2	His/Strp

[0630] Bstb表示双特异性TriMAB;C,半胱氨酸;C<sub>H</sub>1,恒定重链区1;CG,中国仓鼠;IMAB,理想的单克隆抗体;His,6×His-标签;HS,智人;IgG,免疫球蛋白G;S,丝氨酸;Strp,Strep-标签;W,色氨酸。

[0631] b. IVT-mRNA合成

[0632] 为了产生用于体外转录的模板,使用II类限制性内切核酸酶将质粒DNA在poly(A)尾编码区的下游线性化,从而产生模板以转录没有额外的核苷酸通过poly(A)-尾的RNA(Holtkamp等,2006)。纯化线性化的模板DNA,用分光光度法定量,并随后基本上如前所述(Grudzien-Nogalska等,2013)在存在每种7.5mM的ATP、CTP、UTP,1.5mM GTP和6mMβ-S-ARCA(D2)帽类似物(Kuhn等,2010)的情况下用T7 RNA聚合酶进行体外转录。使用磁性颗粒(Berensmeier 2006)纯化RNA。对于体内研究,使用非免疫原性RNA。为此,并入N1-甲基假尿苷-5'-三磷酸(TriLink Biotechnologies, San Diego, CA, USA)代替UTP,并除去双链RNA。用ScriptCap m7G加帽系统和2' O-甲基转移酶(CellScript, Madison, WI, USA)对RNA进行酶促加帽。通过分光光度法和用2100生物分析仪(Agilent, Santa Clara, CA, USA)进行的分析对RNA浓度和品质进行评估。图14中示出了形成完整bstb分子所需的两种IVT-mRNA的示意图。

[0633] 实施例13:体外细胞毒性测定中bstb\_435/434和bstb\_436/434的比裂解活性的确定

[0634] a. 生产细胞的电穿孔

[0635] 为了从IVT-mRNA产生bstb蛋白,使用具有以下设置的GenePulser MXCell(Bio-Rad Laboratories Dreieich, Germany)在0.4mm比色皿中用H<sub>2</sub>O(模拟)或用每条bstb链25μg/ml IVT-mRNA对在对数期生长的每毫升4×10<sup>6</sup>个K-562细胞(ATCC CCL-243, LGC Standards GmbH, Wesel, Germany)进行电穿孔:200V,2次脉冲,8ms。随后将细胞以5×10<sup>5</sup>/ml的密度接种到6孔组织培养板的完全培养基中。孵育48小时之后,通过离心收获上清液,并用0.2μm Minisart NML注射器过滤器(Sartorius, Göttingen, Germany)无菌过滤。

[0636] b. 通过ELISA对生产细胞上清液中的bstb进行定量

[0637] 将来自经电穿孔K-562的上清液进行内部设计的ELISA以进行定量。简言之,将96孔MaxiSorp™板(Thermo Scientific, Braunschweig, Germany)用DPBS中的4.5μg/ml山羊抗人IgG F(ab')<sub>2</sub>抗体(Abd Serotec, Puchheim, Germany)在37°C下包被1小时,洗涤三次(洗涤缓冲液:PBS/0.05% Tween-20)并在2-8°C下用DPBS中的3%乳粉封闭过夜。在洗涤步骤之后,将作为参照的bstb\_369/367和bstb\_371/367蛋白的连续稀释液和含有K-562上清液(稀释剂:0.2% BSA)的bstb\_435/434和bstb\_436/434的连续稀释液一式三份添加至经包被的板。在RT下2小时之后,将板洗涤三次。为了检测与抗F(ab')<sub>2</sub>结合的bstb,添加3.5μg/ml鼠抗IMAB206(Ganymed Pharmaceuticals AG, Mainz, Germany),在RT下孵育1小时,并将板再次洗涤三次。将稀释度为1:500的AP缀合的山羊抗小鼠IgG Fc抗体(Jackson

ImmunoResearch, Newmarket, UK) 在RT下孵育1小时。为了可视化,将板与自制的pNPP-底物溶液在RT下在黑暗中孵育30分钟,并最后用3M KOH终止反应。分析在Tecan M200微孔板读取仪(Tecan, Männedorf, Switzerland) 中在405/492nm下进行。用GraphPad Prism软件6和Microsoft Excel 2010分析数据(数据未示出)。

[0638] 可确定K-562上清液中bstb\_435/434的浓度为253ng/ml,且bstb\_436/434为427ng/ml。因此,这两种bstb都被翻译和分泌,但量不同。获得的蛋白质量很大程度上取决于电穿孔并且每次都变化。在多种实验过程中,与bstb\_435/434相比,产生了1.0至1.7倍的bstb\_436/434。

[0639] c. 生产细胞裂解物和上清液的Western印迹分析

[0640] K-562细胞的上清液和细胞裂解物(实施例13a.) 用于分析bstb蛋白的翻译和分泌。通过在200 $\mu$ l包含20单位Benzonase (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) 的4x Laemmli缓冲液(Bio-Rad Laboratories) 中孵育 $1 \times 10^6$ 个经洗涤的细胞而获得细胞裂解物。随后,在用(还原)或不用(非还原)1M二硫苏糖醇(DTT,终浓度0.1M)的条件下将样品加热至95 $^{\circ}$ C持续10分钟。用Laemmli缓冲液同样处理上清液。根据本领域技术人员已知的标准程序通过聚丙烯酰胺凝胶电泳使用4-15% Criterion<sup>TM</sup> TGX Stain-Free<sup>TM</sup>凝胶(Bio-Rad Laboratories) 所分离制备的细胞裂解物和上清液以及相应的纯化bstb蛋白,然后进行Western印迹分析(图15)。对于Western印迹分析,使用了辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗体抗-6 $\times$ His-标签(1:10,000, Abcam, Cambridge, MA, USA), StrepMAB-Classic(1:10,000, IBA GmbH, Göttingen, Germany) 和抗 $\beta$ -肌动蛋白(1:25,000, Abcam)。用Bio-Rad的Chemidoc MP成像系统记录Western印迹膜。与内部分子量标准相比,在还原条件下在50-55kD处和在非还原条件下在约100kD处检测到bstb蛋白的信号。Bstb\_435/436(图15A) 和bstb\_436/434(图15B) 主要在上清液中检测到,但也在细胞裂解物中检测到,表明在收获时间点时分泌不完全。bstb蛋白的异二聚体组成在还原条件和用抗6 $\times$ His-标签HRP和StrepMAB-Classic HRP的混合物检测下变得明显(图15C):Fd-和L-片段的尺寸相差约2kD(分别为约51kD和约49kD)。通过对对应于在非还原条件下检测的HMW和单体bstb的蛋白质条带进行定量,我们确定了3% HMW和88%单体bstb\_435/434物质和1.4% HMW和92%单体bstb\_436/434物质。检测到仅几个较小的条带(总计分别为约8%和约6%),表明在细胞培养期间的轻微降解。

[0641] 总之,这两种bstb都可以从IVT-mRNA高效地翻译并分泌至细胞培养上清液。Bstb\_436/434显示出关于HMW物质和降解产物的稍微更有利的蛋白质模式,但是对于这两种bstb分子, HMW物质的百分比都较低。

[0642] d. 萤光素酶细胞毒性测定和EC50确定

[0643] 细胞毒性测定原则上如实施例2a中所述进行。Bstb蛋白用作参照。将来自实施例13a的K-562上清液样品在K-562模拟上清液(电穿孔而没有IVT-mRNA) 中稀释。K-562上清液样品的 $L_{min}$ 和 $L_{max}$ 补充有K-562模拟上清液。

[0644] 向与作为效应细胞的PBMC一起平板接种(E:T 5:1)的OV-90和MDA-MB-231癌细胞(用萤光素酶稳定转导) 施加从33.1fM至516.5pM的7点、5倍系列稀释行的上清液中的20 $\mu$ l bstb。共孵育48小时之后,添加萤光素酶溶液用于测量,并对板进行分析。

[0645] 如图16中所示,这两种bstb均介导CLDN6<sup>+</sup>OV-90的高效裂解,但不介导CLDN6<sup>-</sup>MDA-

MB-231的裂解。分别用516.5pM的bstb\_436/434和bstb\_435/434达到约77-80%的最大裂解。EC50值表明bstb\_435/434的活性高1.3倍。RNA翻译的bstb的EC50值分别比相应的蛋白质bstb\_369/367和bstb\_371/367低4倍和7.5倍。这种作用可能源于由于缺乏任何进一步的蛋白质操作的较高的蛋白质活性、HMW物质的影响、定量的偏差或其组合。

[0646] 总之,关于蛋白质表达的遗漏、纯化、稳定性和分析问题,RNA方法是可行、高度高效和节省时间的。

[0647] 实施例14:小鼠异种移植模型中编码双特异性抗体的IVT-RNA相较于蛋白质参照的效力

[0648] 为了研究编码双特异性bstb和bi-(scFv)<sub>2</sub>抗体的IVT-mRNA相较于体内蛋白质参照的治疗潜力,再次选择了免疫缺陷小鼠品系NOD.Cg-Prkd<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ或短NSG (Jackson laboratory, Bar Harbour, ME, USA)。所有小鼠均按照Institutional Animal Care Committee of the Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany的指导原则使用。

[0649] a.相较于蛋白质用编码bstb和bi-(scFv)<sub>2</sub>的IVT-RNA处理小鼠中表达CLDN6的晚期肿瘤

[0650] 在示例性研究中,使用6至25周龄且体重为18至38g的雄性和雌性NSG小鼠。CLDN6阳性的OV-90细胞用作肿瘤细胞,且PBMC用作效应细胞。

[0651] 皮下(s.c.)接种 $5 \times 10^6$ 个肿瘤细胞,且19天之后腹膜内(i.p.)施用 $1 \times 10^7$ 个PBMC。如在PBMC注射之后6天在外周血中分析的,根据肿瘤体积和性别(所有组中均具有两种性别)对PBMC植入的小鼠进行分组。在相当晚期的肿瘤阶段(其中每组的平均肿瘤体积为约250mm<sup>3</sup>)在施用PBMC之后8天开始处理。通过静脉内(i.v.)注射到眶后静脉丛中(注射方案图17A)每周一次对小鼠进行处理。组“G1-RNA对照”、“G2-bstb RNA”和“G3-bi-scFv RNA”接受每只小鼠200μl体积的与TransIT®-mRNA转染试剂盒(Mirus Bio, Madison, WI, USA)复合的3μg IVT-mRNA。使用萤光素酶IVT-mRNA作为RNA对照,编码bstb的RNA是CLDN6 x CD3bstb Fd和LC链IVT-mRNA 435和434(1:1混合)并且编码bi-(scFv)<sub>2</sub>的RNA是CLDN6 x CD3 bi-(scFv)<sub>2</sub>IVT-RNA 123r。根据实施例12b,在体内合成所有IVT-RNA。“G4-载体对照”包括用DPBS处理的6只小鼠和用10mM NaOAc缓冲液,pH 5.5(分别为bstb和bi-(scFv)<sub>2</sub>配制缓冲液)处理的6只小鼠。“G5-bstb蛋白”和“G6-bi-scFv蛋白”用IVT-mRNA物的蛋白质类似物处理。bstb蛋白是bstb\_369/367(剂量为100μg/kg, 5μl/g体重)并且bi-(scFv)<sub>2</sub>蛋白质是bi-scFv\_123(剂量为200μg/kg, 5μl/g体重)。处理组总结在表11中。施用进行四个连续周。每周两次用数字校准卡尺测量肿瘤尺寸,并通过下式计算肿瘤体积:肿瘤体积[mm<sup>3</sup>]=长度[mm]×(宽度[mm])<sup>2</sup>/2。当肿瘤体积达到1500mm<sup>3</sup>时或在严重病态(主要是移植物抗宿主病(GVHD)的症状)的情况下,通过颈脱位处死小鼠。

[0652] 图17B示出了对肿瘤生长的处理效果。抗肿瘤效力作为与RNA对照组G1或载体对照G4相比肿瘤生长抑制/降低以及存活而测量。与其中0/10小鼠具有降低的肿瘤生长的对照组G1相比,用受试物bstb\_435/434(G2)处理导致8/9小鼠的肿瘤减小,而用受试物bi-scFv\_123r(G3)处理导致9/9小鼠的肿瘤减小。对于bstb,蛋白质类似物(G5,G6)的处理是类似的,但对于bi-(scFv)<sub>2</sub>,不那么高效。重要的是,根据RNA注射方案(每周一次,i.v.,意指眼眶后)施用蛋白质用于直接比较而不是根据每周三次i.p.的建立的蛋白质治疗方案来施用蛋

白质。RNA的更高效率可能是由于蛋白质在数天中更持久的翻译和分泌,而注射的蛋白质快速地被消除。RNA注射之后体内的蛋白质血液浓度未知。处死G1-G3的3只小鼠,随后通过流式细胞术分析研究肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte,TIL)。为此,用抗人CD45和CD3荧光标记的抗体(BD Biosciences,Heidelberg,Germany)对肿瘤的单细胞悬液进行染色,并用BD FACS CantoII流式细胞仪分析总肿瘤的单峰细胞。在RNA对照组中,检测到<3%浸润的人T细胞,而在bstb-和bi-(scFv)<sub>2</sub>-RNA组中分别检测到>7%和>12%的人T细胞(图17C)。这些数据显示了通过编码RNA的双特异性抗体接合的人T细胞的定向浸润。

[0653] b. 确定治疗对体重的影响

[0654] 使用实验室规模每周检查一次每只小鼠的体重。没有观察到与治疗相关的体重减轻(数据未示出)。

[0655] 参考文献

[0656] Berensmeier,Sonja(2006):Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids.In:Applied microbiology and biotechnology 73(3),S.495-504.DOI:10.1007/s00253-006-0675-0.

[0657] Coligan,John E.;Bierer,Barbara E.;Margulies,David H.;Shevach,Ethan M.;Strober,Warren(2001a):Current Protocols in Immunology.Hoboken,NJ,USA:John Wiley&Sons,Inc.Coligan,John E.;Dunn,Ben M.;Speicher,David W.;Wingfield,Paul T.(2001b):Current Protocols in Protein Science.Hoboken,NJ,USA:John Wiley& Sons,Inc.

[0658] Gallie,D.R.;Tanguay,R.L.;Leathers,V.(1995):The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation.In:Gene 165(2),S.233-238.DOI:10.1016/0378-1119(95)00521-7.

[0659] Grudzien-Nogalska,Ewa;Kowalska,Joanna;Su,Wei;Kuhn,Andreas N.;Slepenkov,Sergey V.;Darzynkiewicz,Edward et al.(2013):Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties.In:Methods in molecular biology (Clifton,N.J.)969,S.55-72.DOI:10.1007/978-1-62703-260-5\_4.

[0660] Holtkamp,S.;Kreiter,S.;Selmi,A.;Simon,P.;Koslowski,M.;Huber,C.etal.(2006):Modification of antigen-encoding RNA increases stability,translational efficacy,and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells.In:Blood 108(13),S.4009-4017.DOI:10.1182/blood-2006-04-015024.

[0661] Kuhn,A.N.;Diken,M.;Kreiter,S.;Selmi,A.;Kowalska,J.;Jemielity,J. et al.(2010):Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo.In:Gene Ther 17(8),S.961-971.DOI:10.1038/gt.2010.52.

[0662] Lanzavecchia,A.;Scheidegger,D.(1987):The use of hybrid hybridomas to target human cytotoxic T lymphocytes.In:Eur.J.Immunol.17(1),S.105-111.DOI:10.1002/eji.1830170118.

[0663] Lutterbuese,Ralf;Raum,Tobias;Kischel,Roman;Hoffmann,Patrick;Mangold,

Susanne;Rattel,Benno et al. (2010):T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potently eliminate KRAS-and BRAF-mutated colorectal cancer cells.In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(28),S.12605-12610.DOI:10.1073/pnas.1000976107.

[0664] **Röthlisberger**,Daniela;Honegger,Annemarie;Plückthun,Andreas(2005):Domain interactions in the Fab fragment:a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability.In: Journal of molecular biology 347(4),S.773-789.DOI:10.1016/j.jmb.2005.01.053.

[0665] Stadler,Christiane R.;**Bähr-Mahmud**,Hayat;Plum,LauraM.;Schmoltdt,Kathrin;**Kölsch**,Anne C.;Türeci,**Özlem**;Sahin,Ugur(2015):Characterization of the first-in-class T-cell-engaging bispecific single-chain antibody for targeted immunotherapy of solid tumors expressing the oncofetal protein claudin 6.In: OncoImmunology 5(3),S.e1091555.DOI:10.1080/2162402X.2015.1091555.

[0666] Weingarten-Gabbay,Shira;Elias-Kirma,Shani;Nir,Ronit;Gritsenko,AlexeyA.;Stern-Ginossar,Noam;Yakhini,Zohar et al. (2016):Comparative genetics.Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes.In:Science(New York,N.Y.) 351(6270).DOI:10.1126/science.aad4939.

[0667] Woll,Stefan;Schlitter,Anna Melissa;Dhaene,Karl;Roller,Marc;Esposito,Irene;Sahin,Ugur;Tureci,Ozlem(2014):Claudin 18.2 is a target for IMAB362 antibody in pancreatic neoplasms.In:International journal of cancer 134(3), S.731-739.DOI:10.1002/ijc.28400.

[0668] Zeenko,Vladimir;Gallie,Daniel R. (2005):Cap-independent translation of tobacco etch virus is conferred by an RNA pseudoknot in the 5'-leader.In:The Journal of biological chemistry 280(29),S.26813-26824.DOI:10.1074/jbc.M503576200.

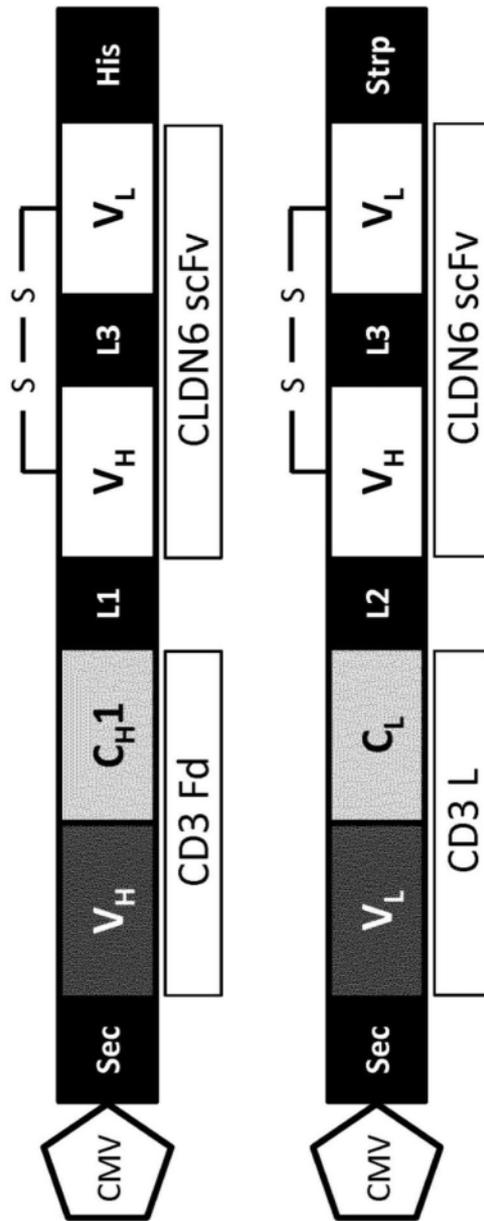


图1A

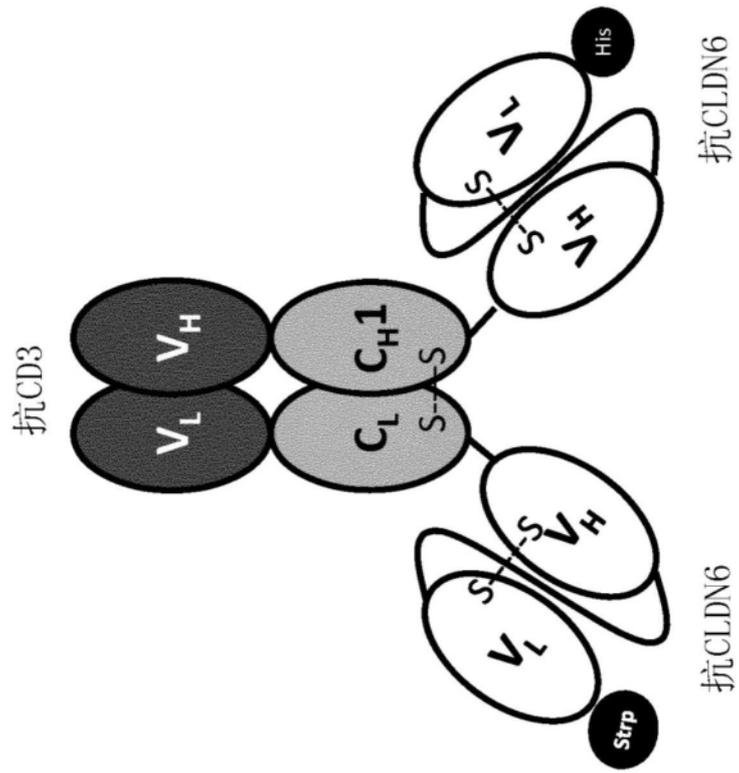


图1B

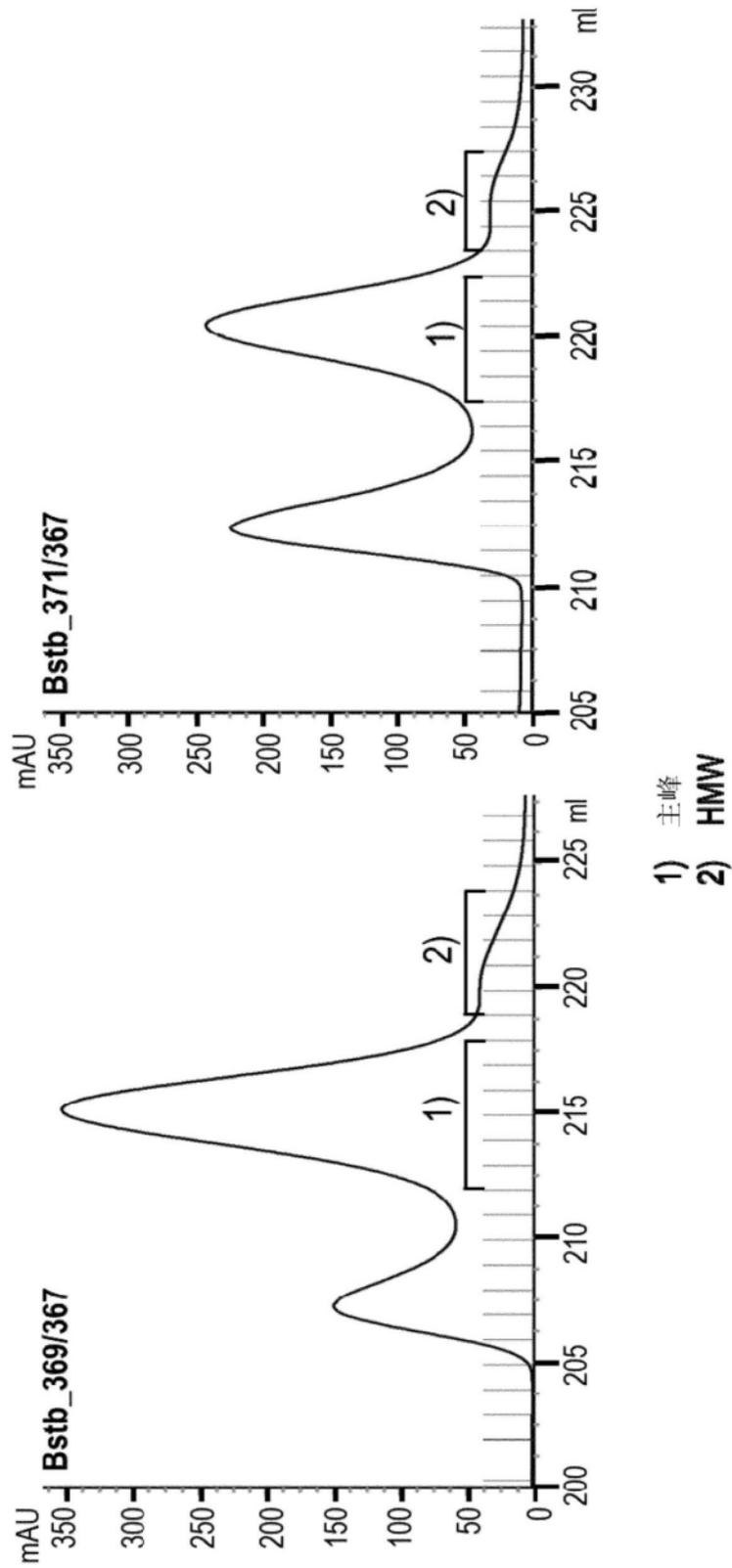


图2A

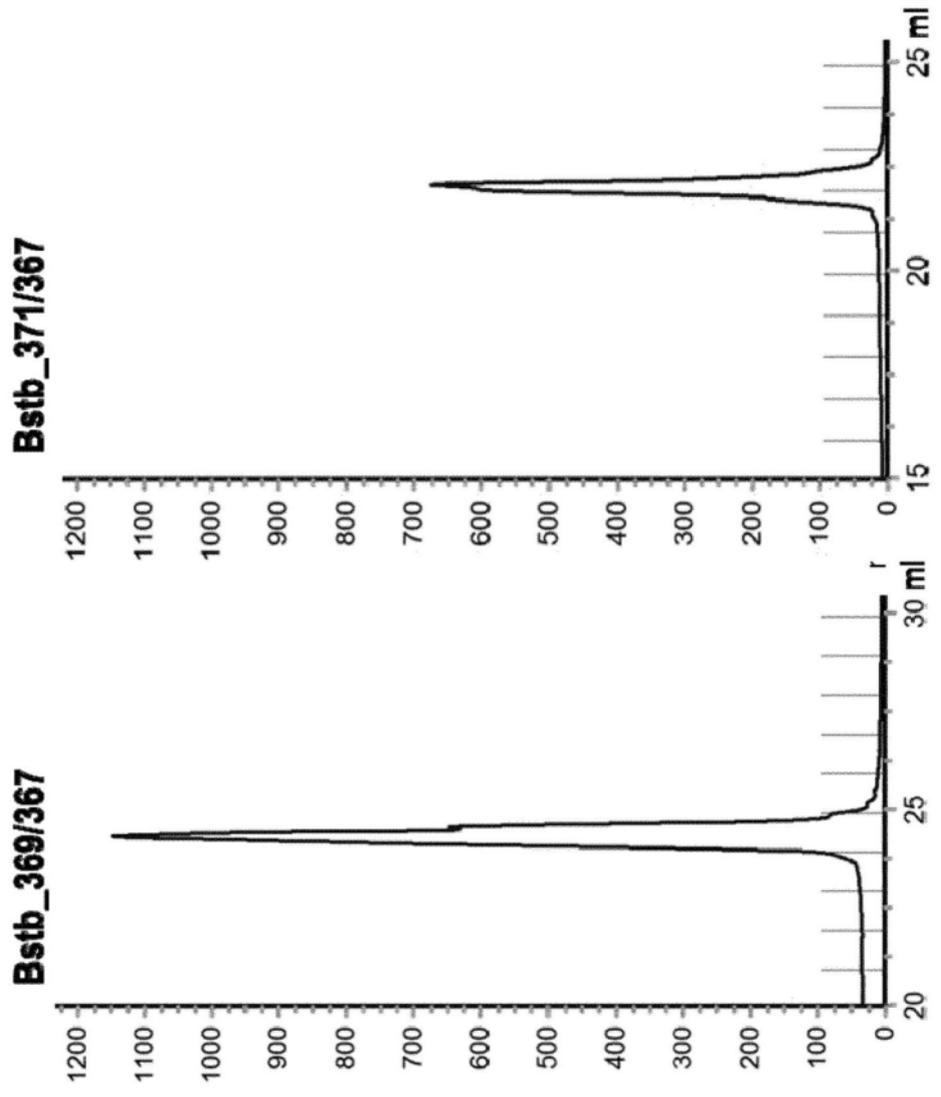


图2B

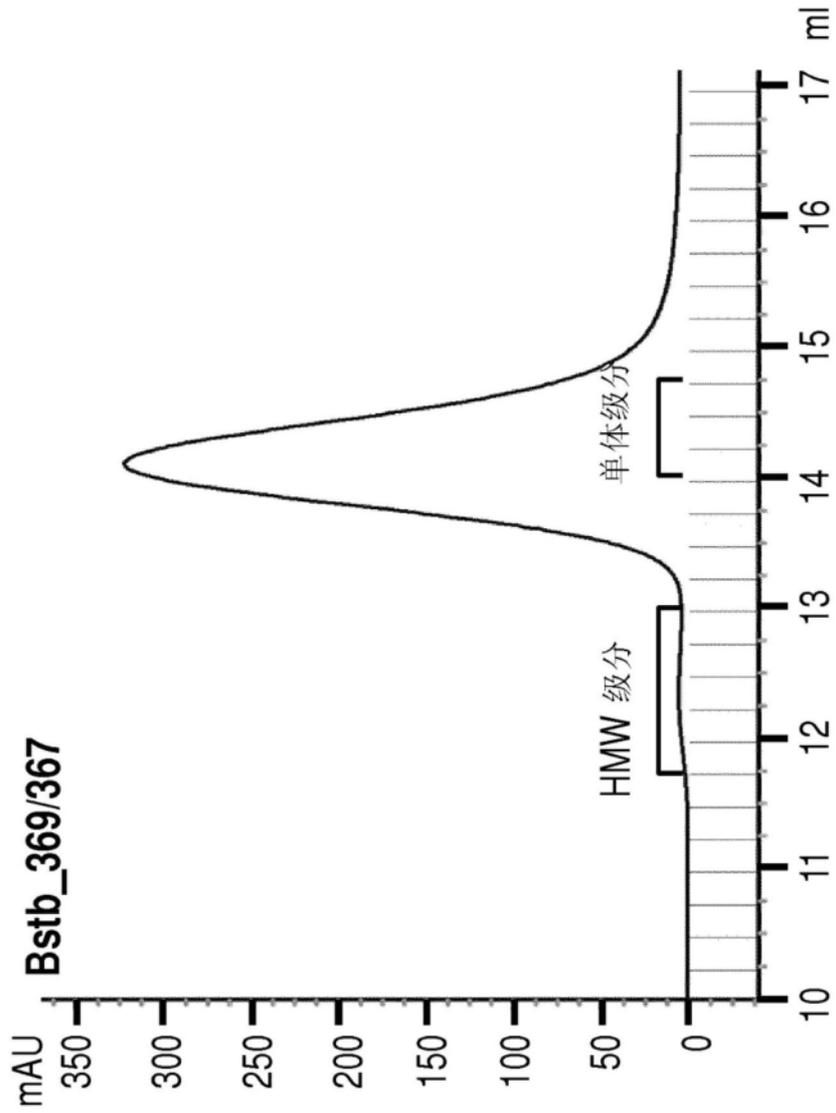


图2C

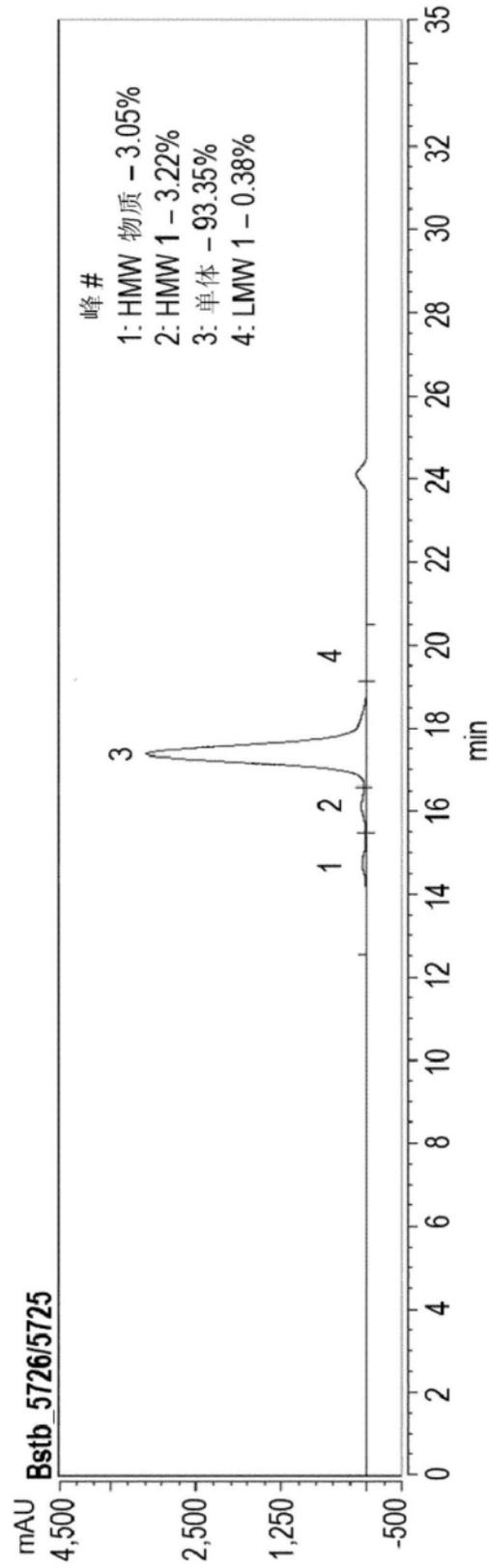


图2D

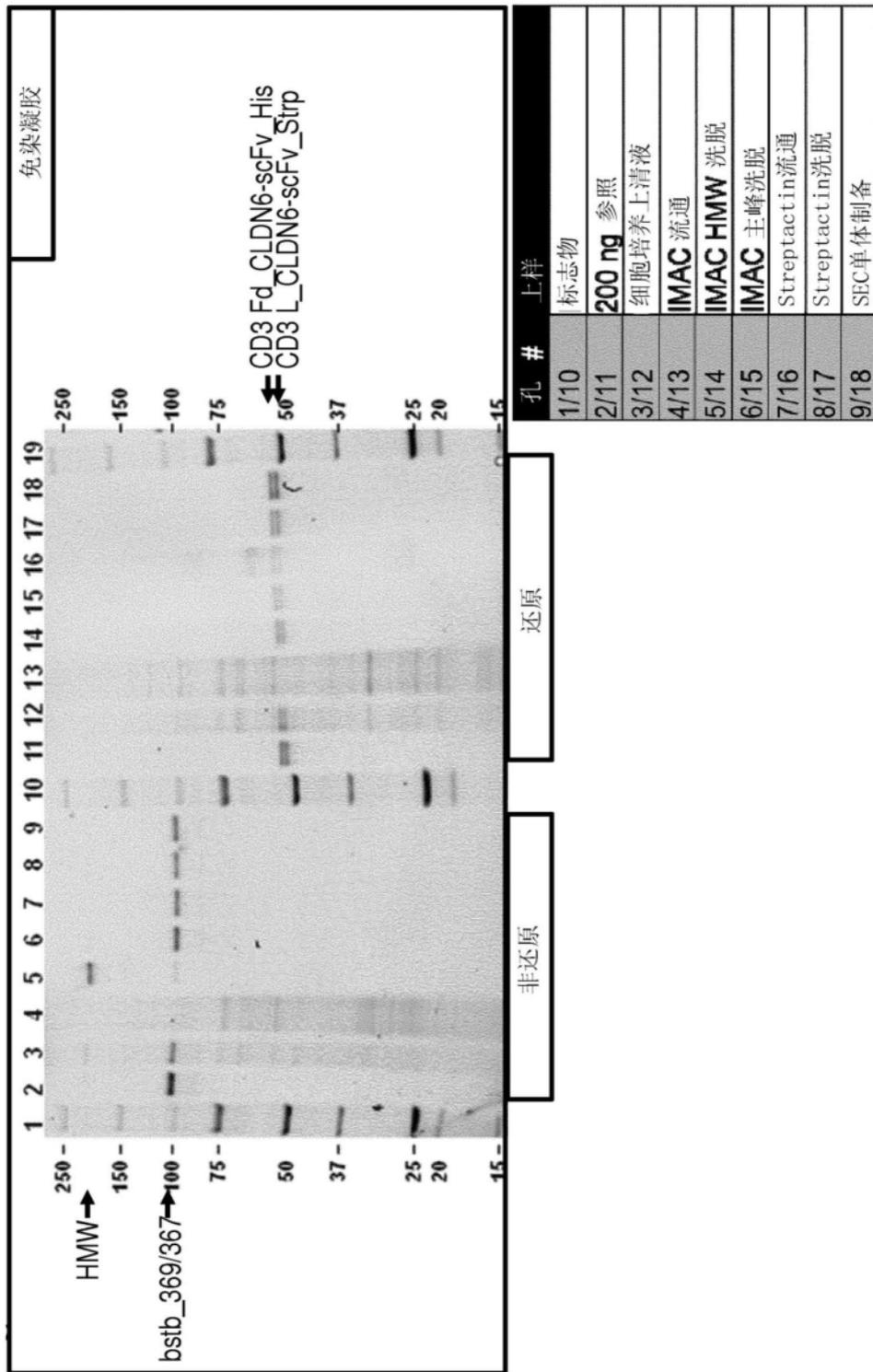


图3A

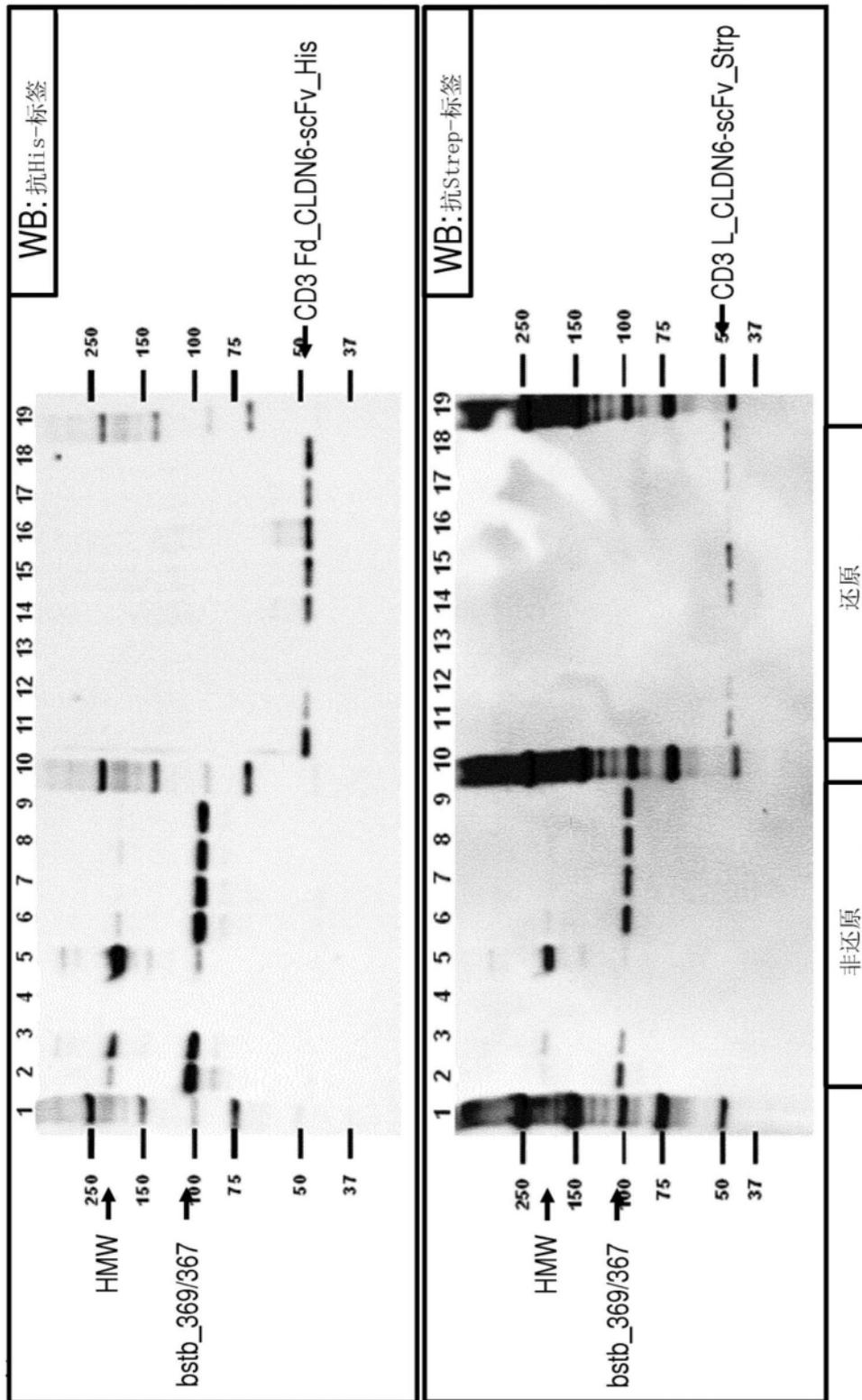


图3B

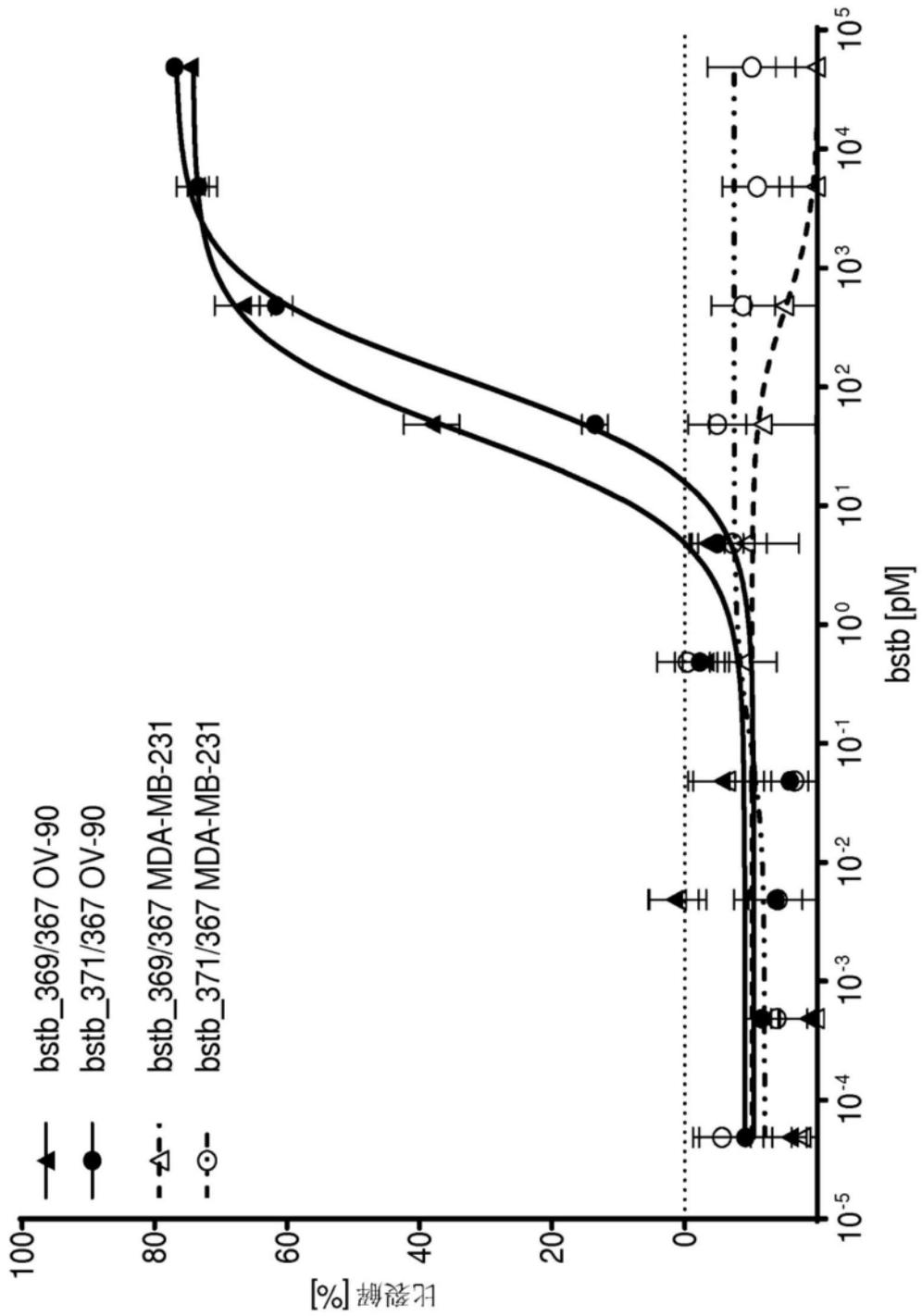


图4A

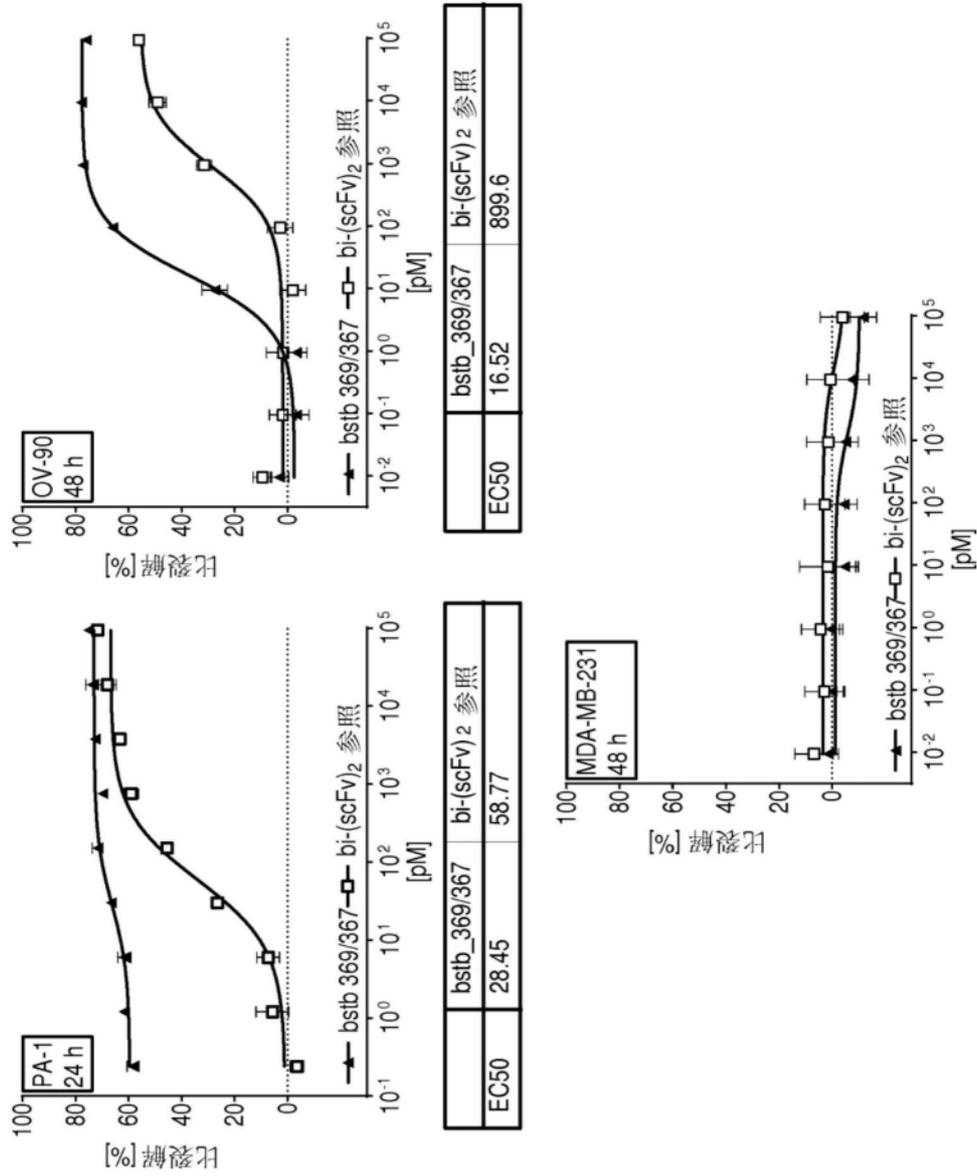


图4B

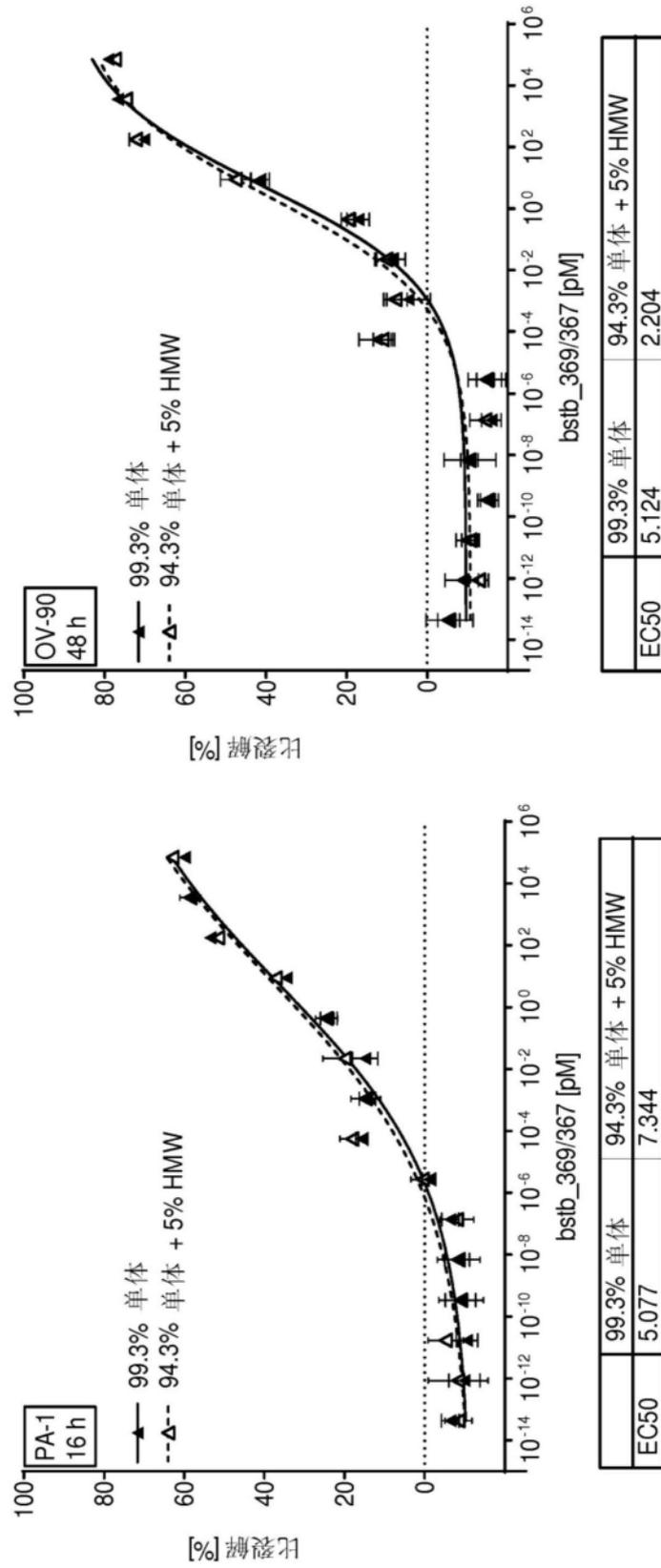


图4C

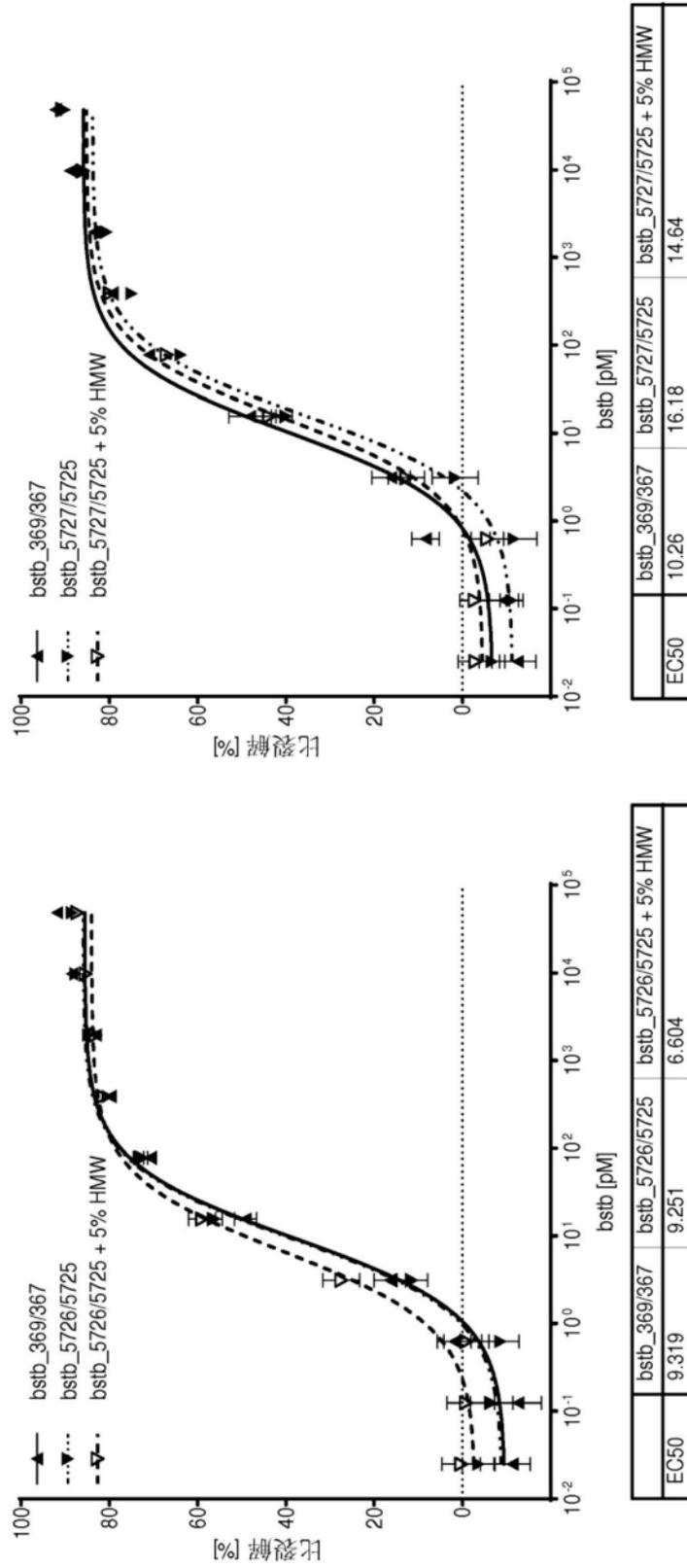


图4D



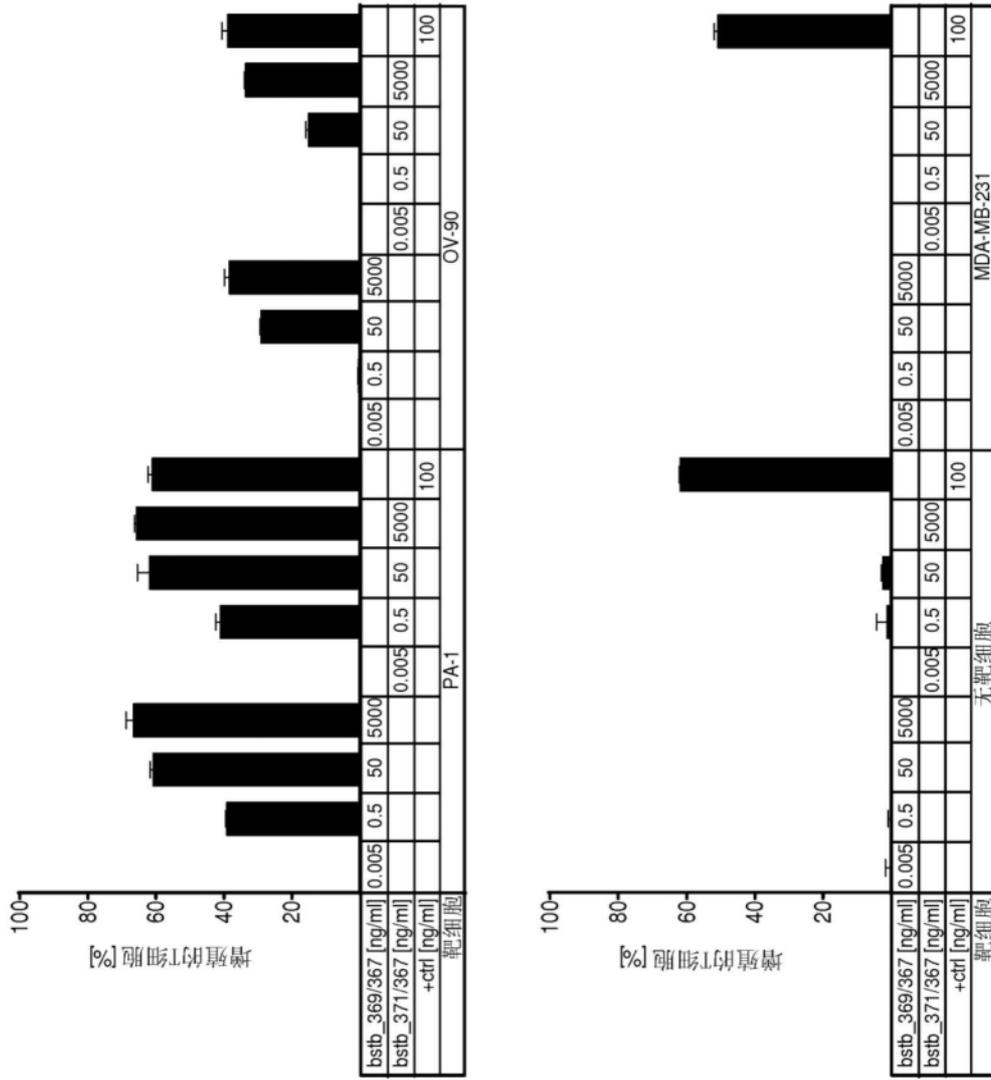


图5B

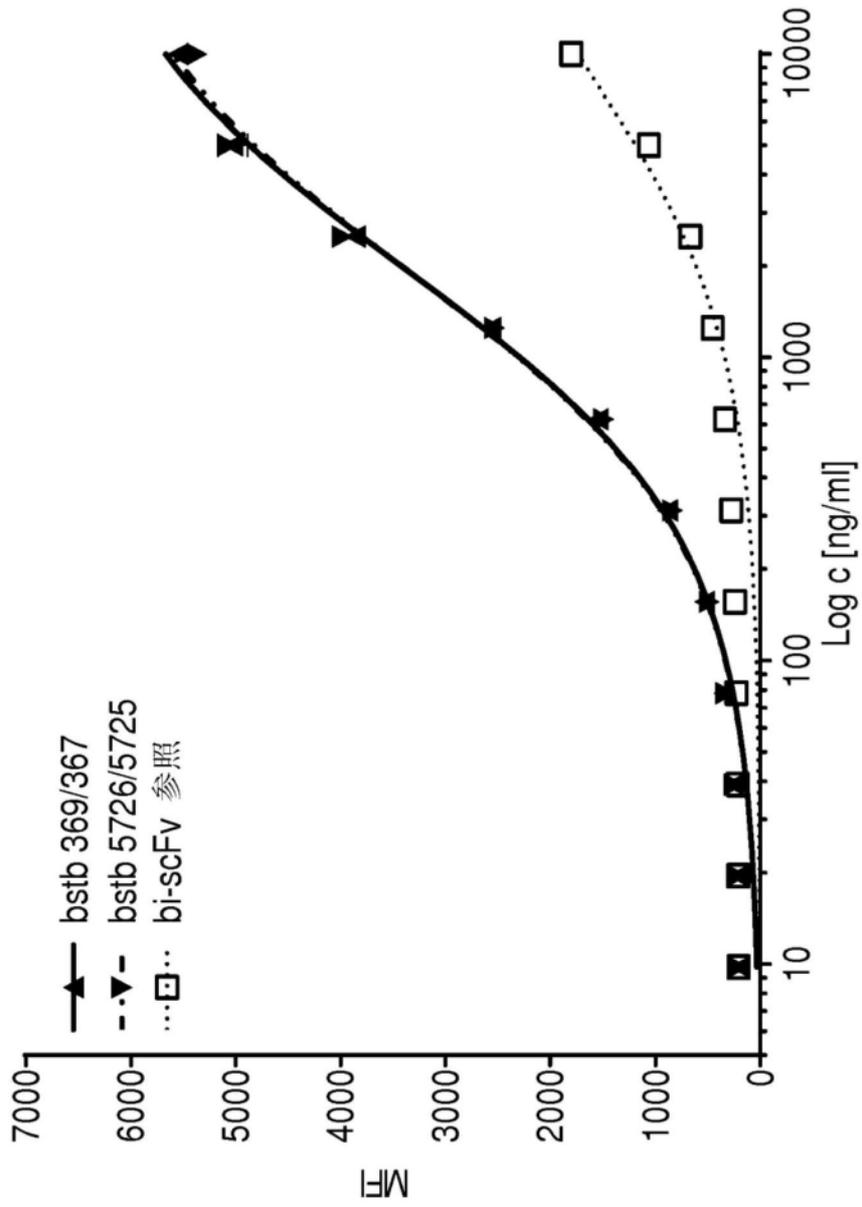


图6A

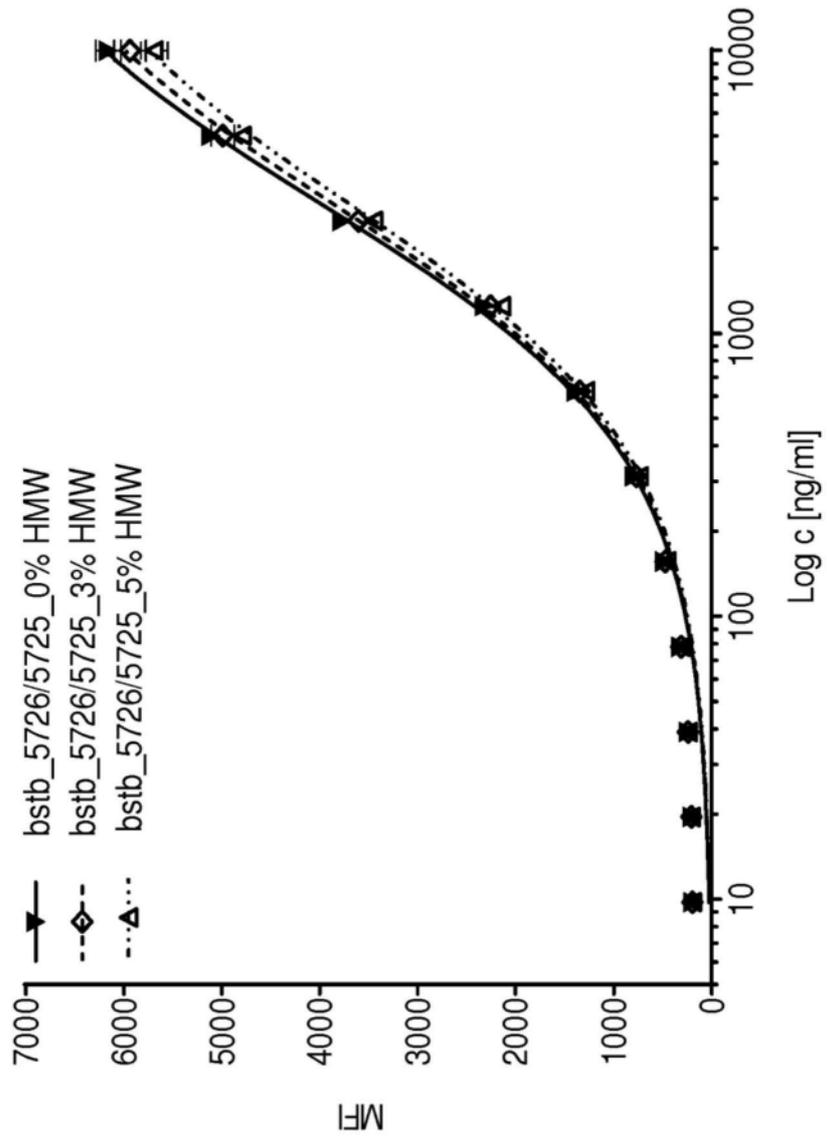


图6B

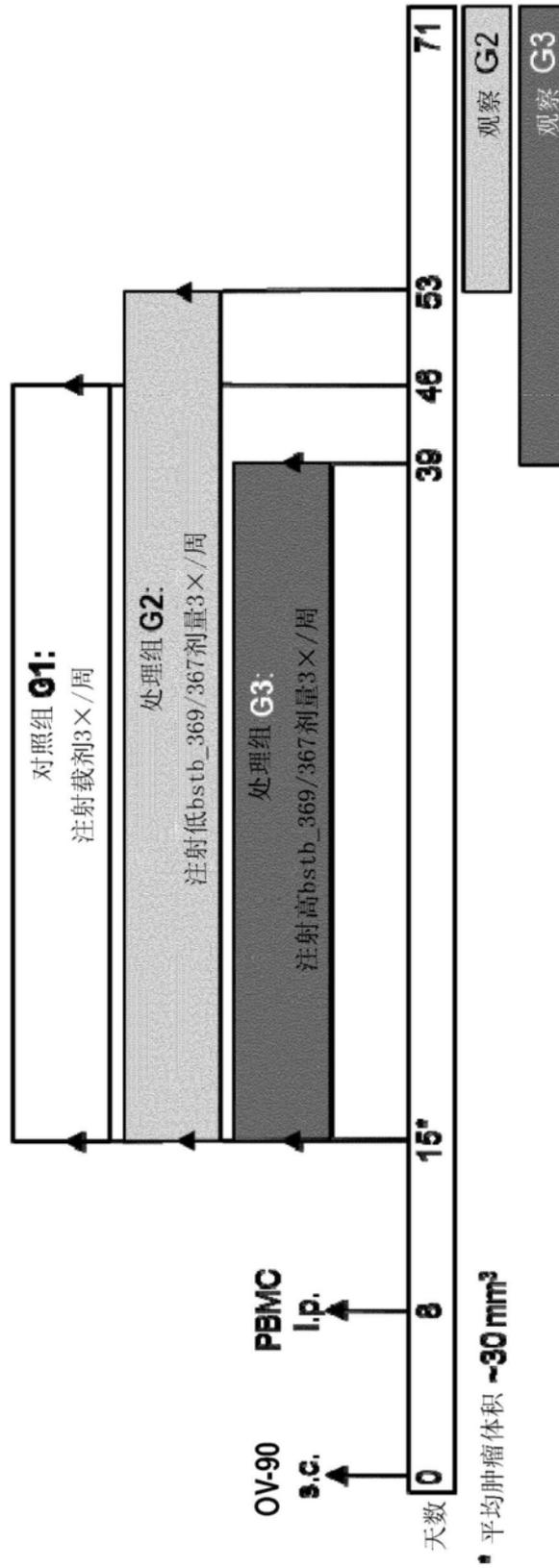


图7A

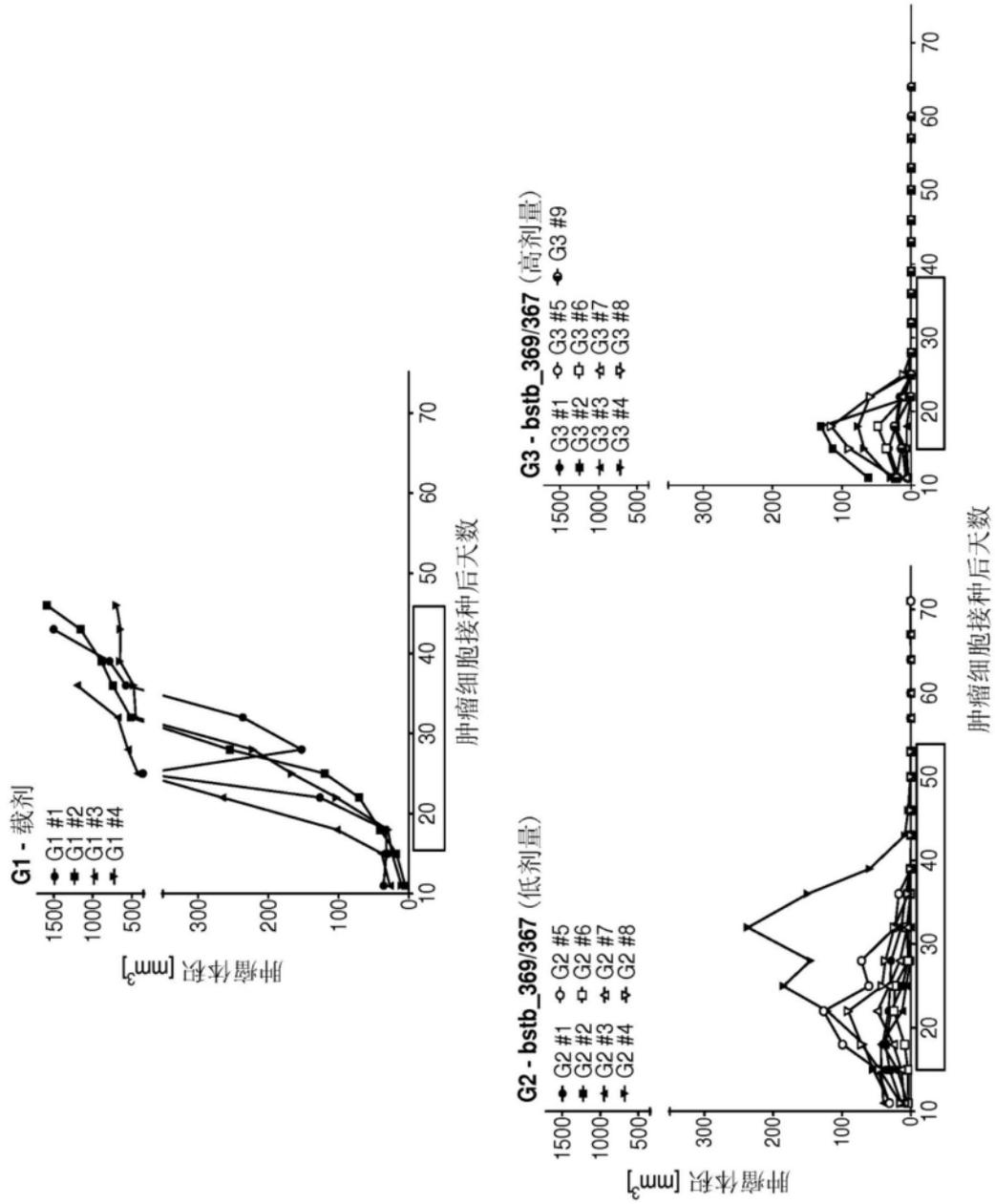


图7B

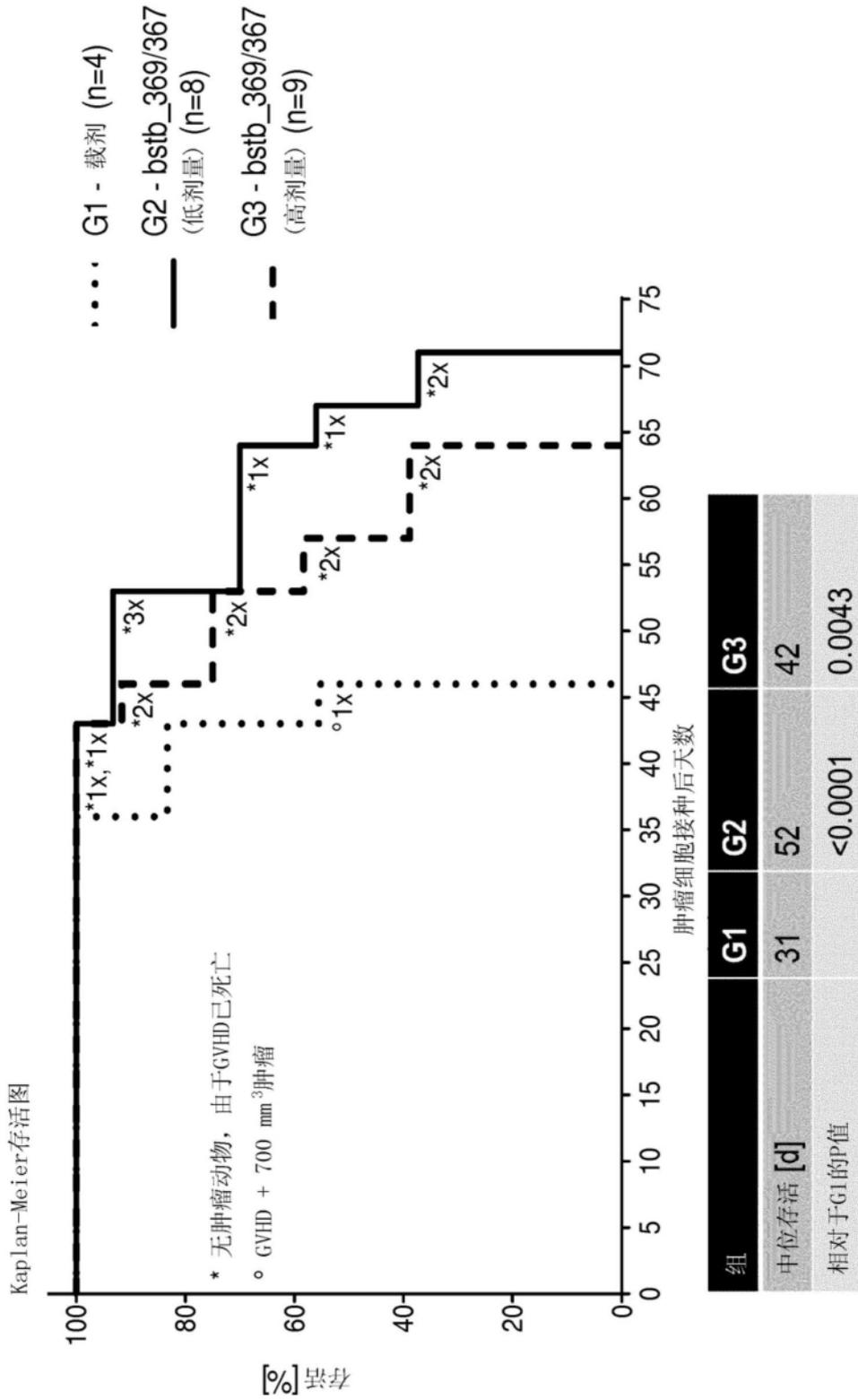


图7C

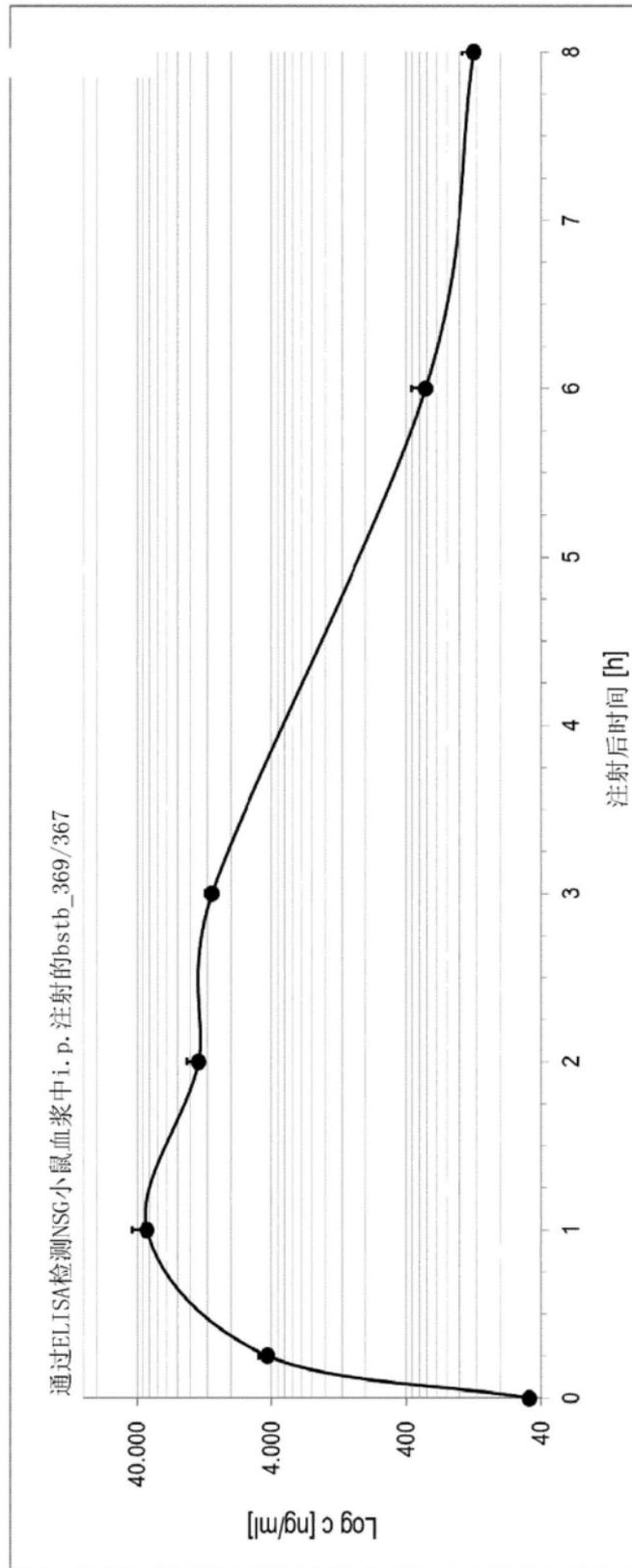


图8

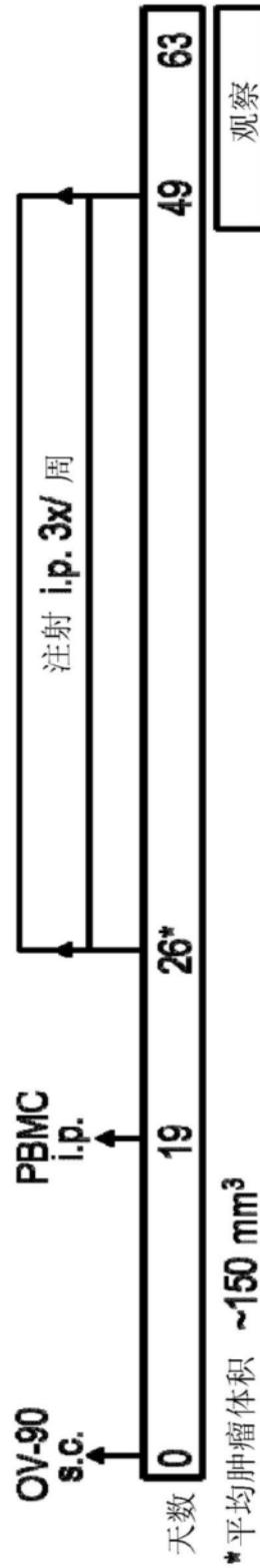


图9A

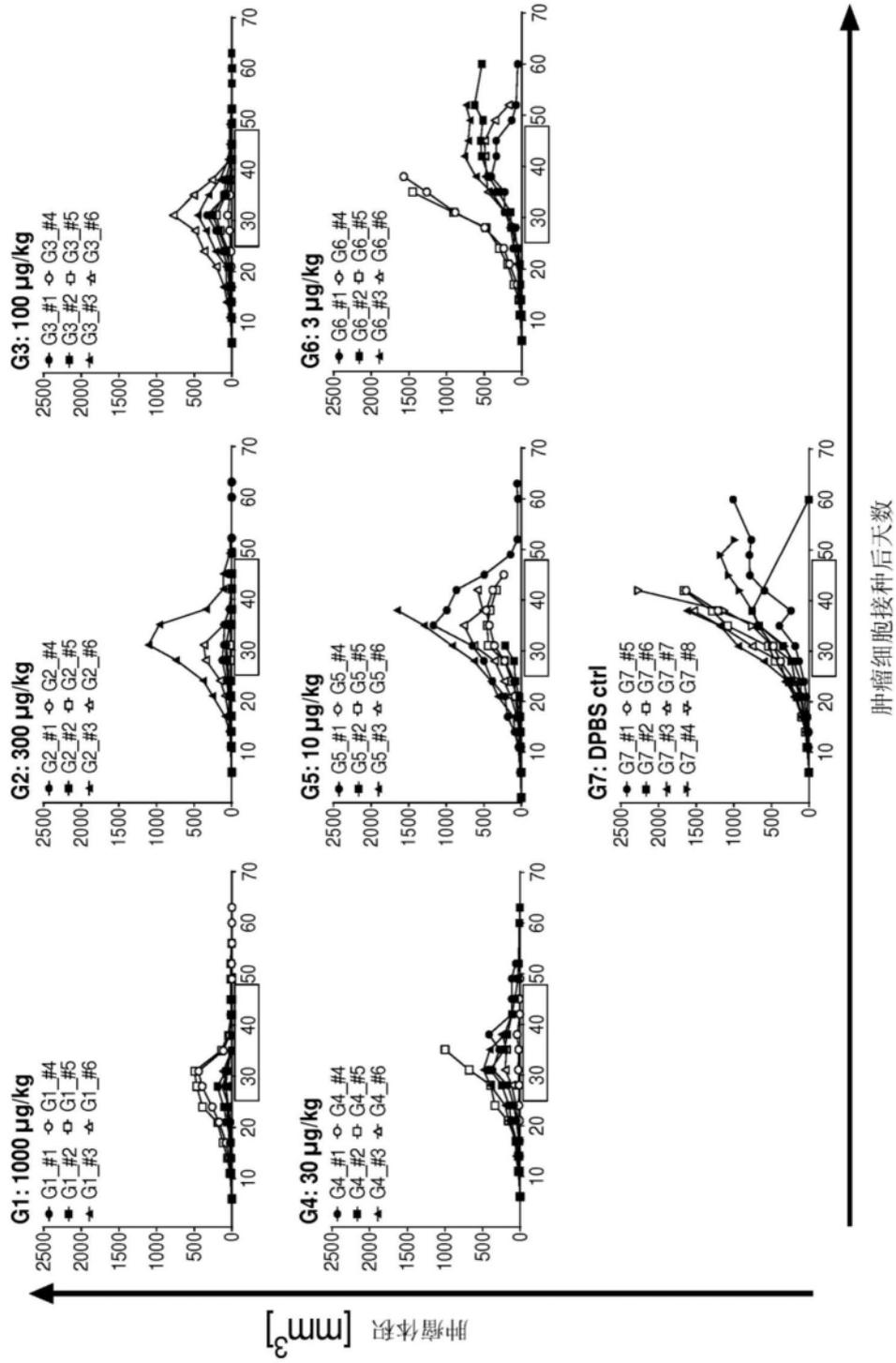


图9B

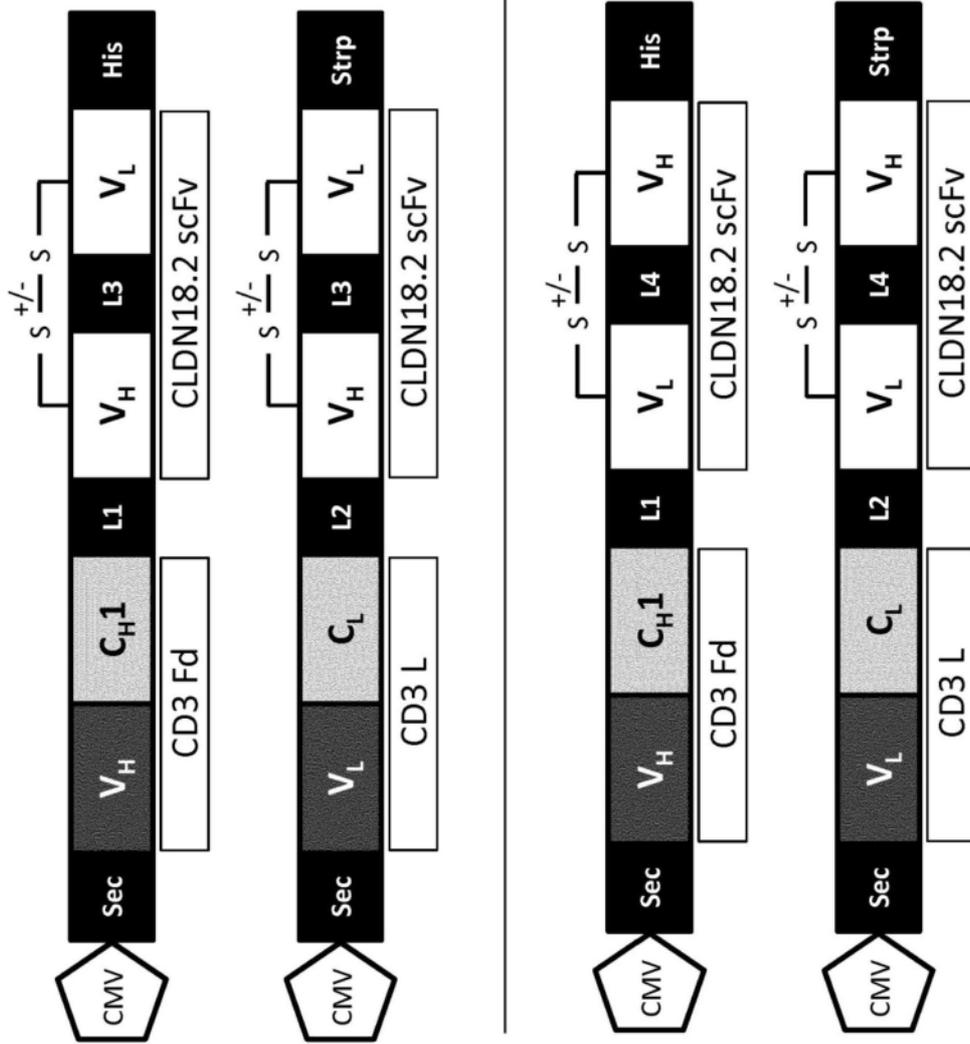


图10A

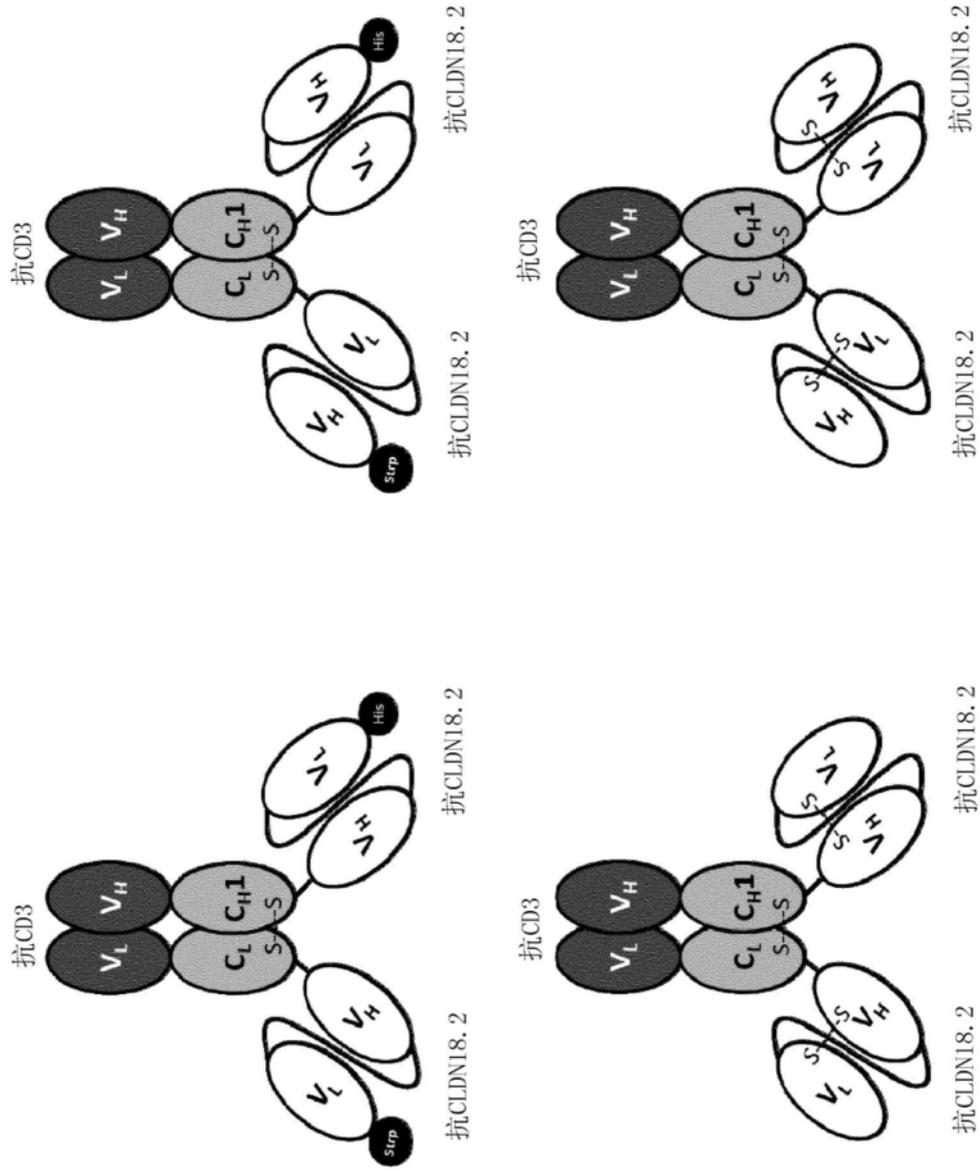


图10B

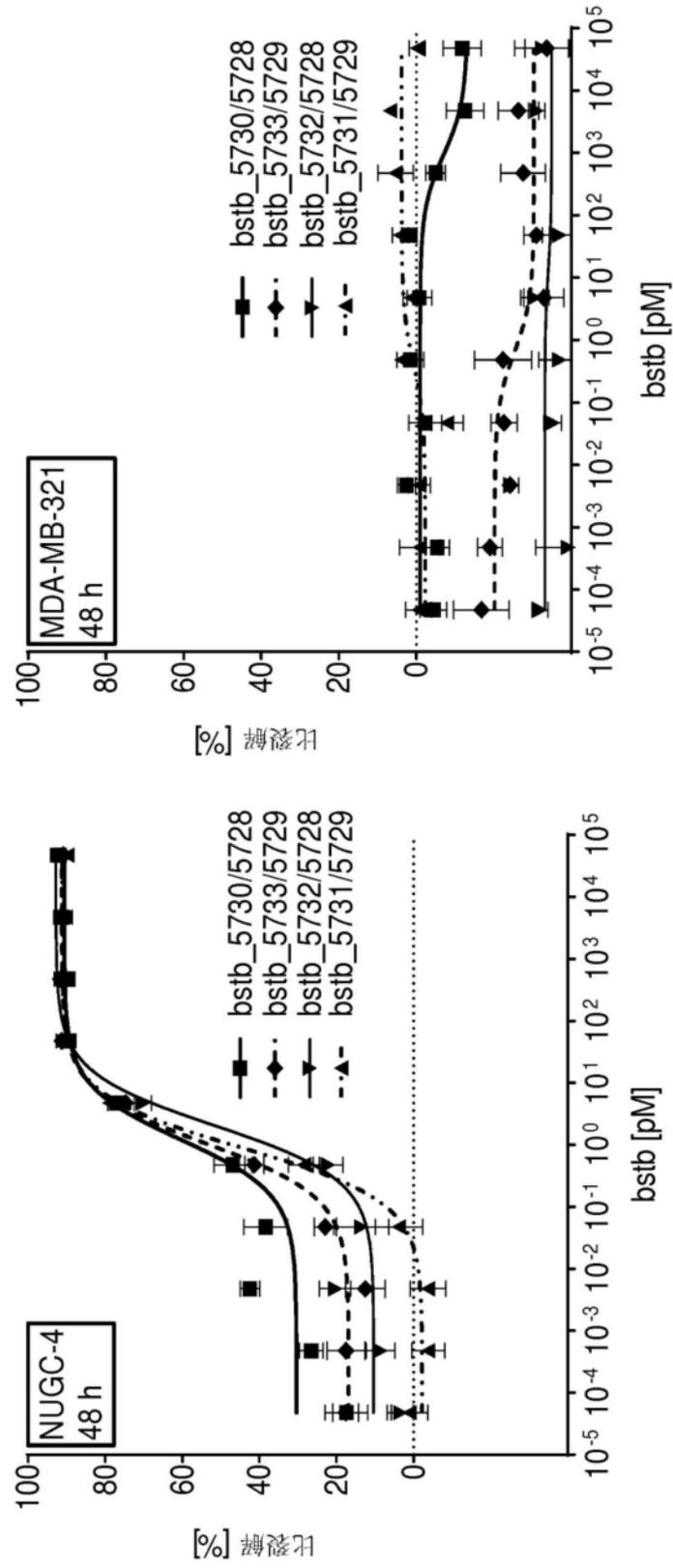


图11

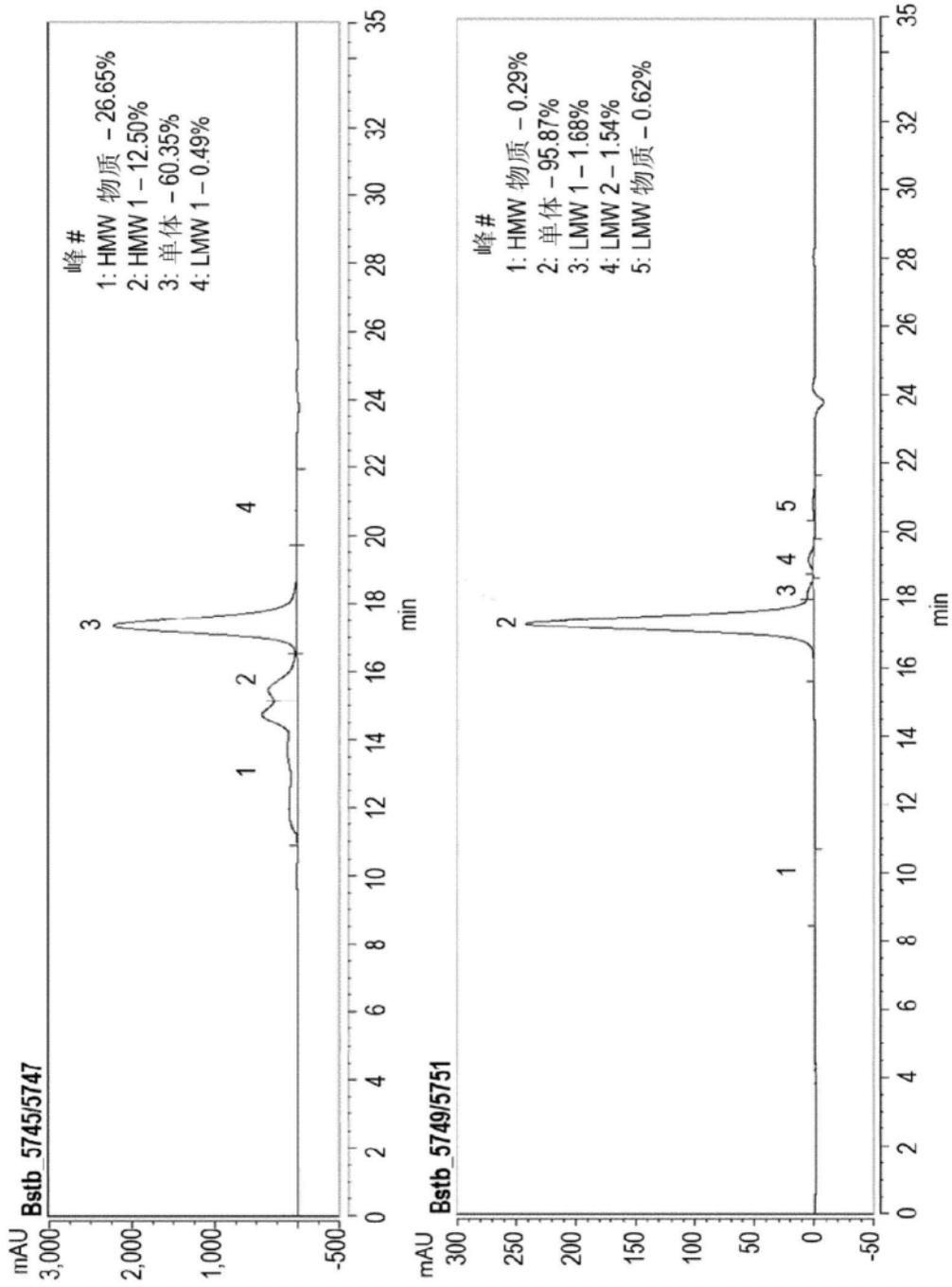


图12A

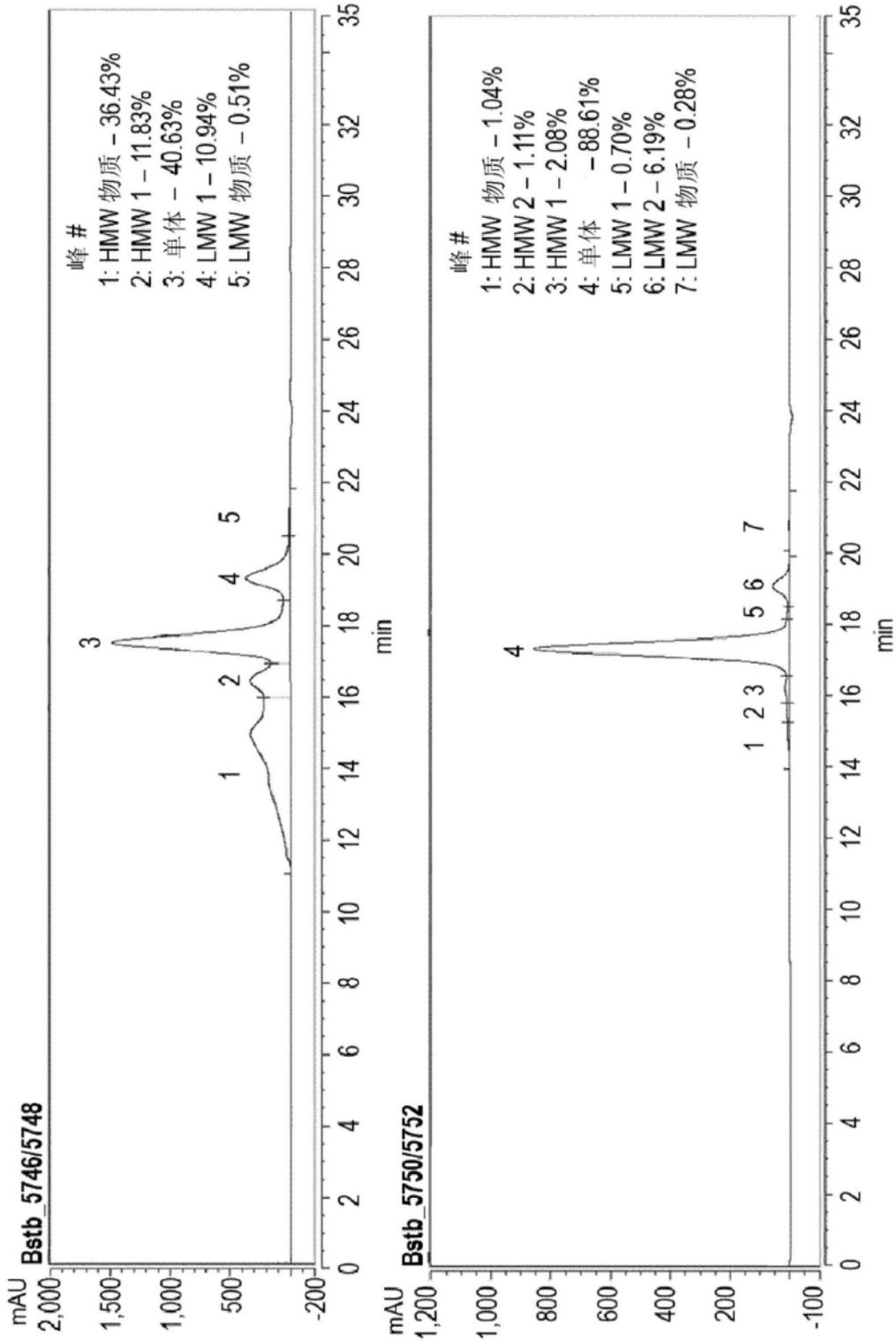


图12B

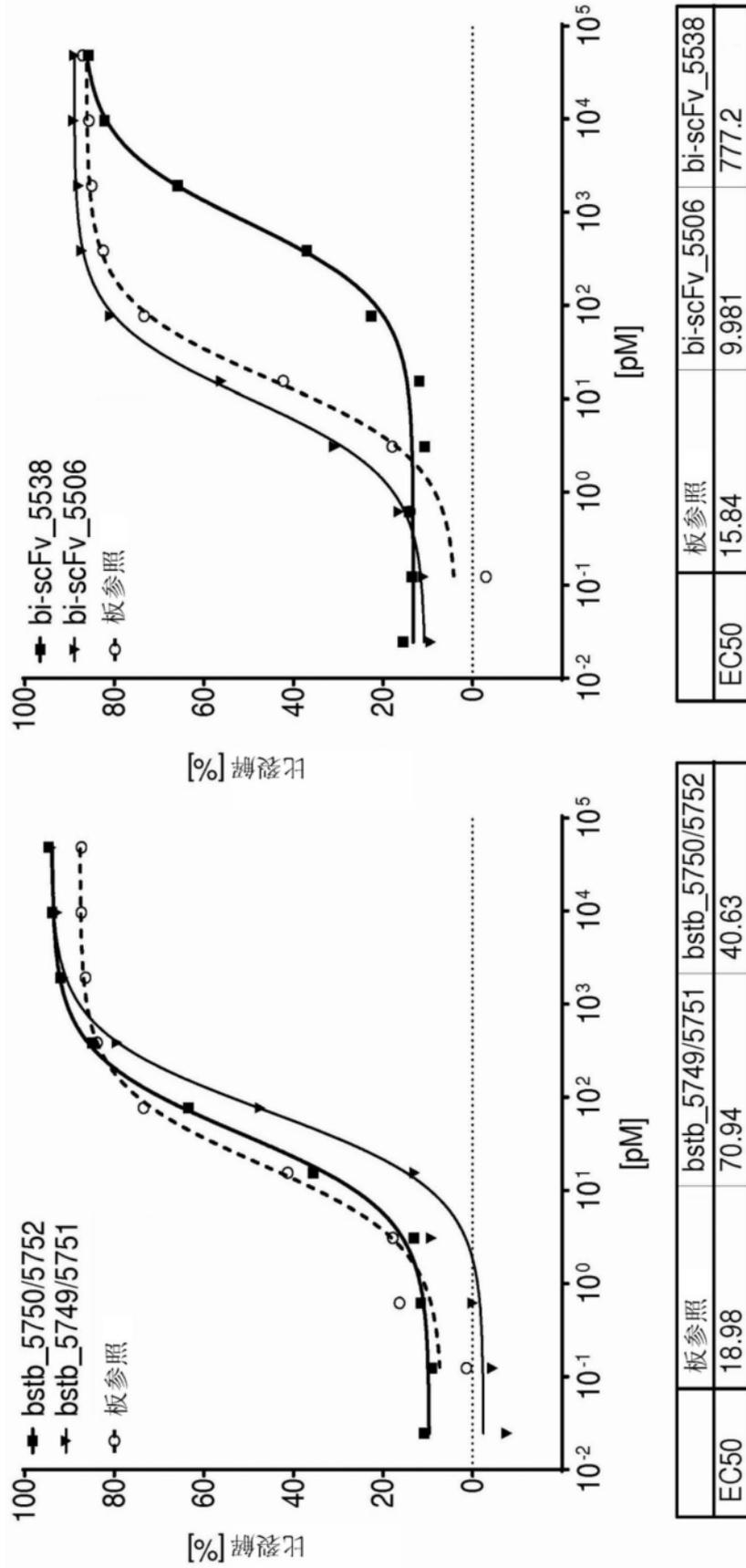


图13A

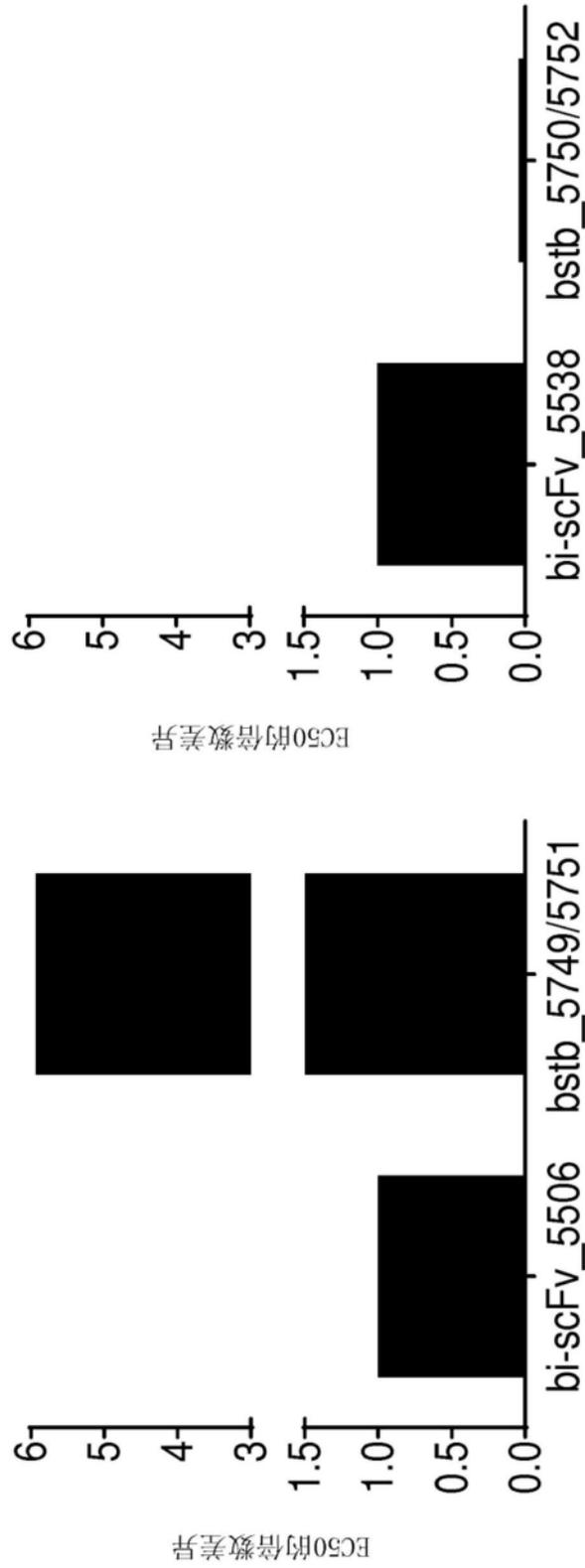


图13B

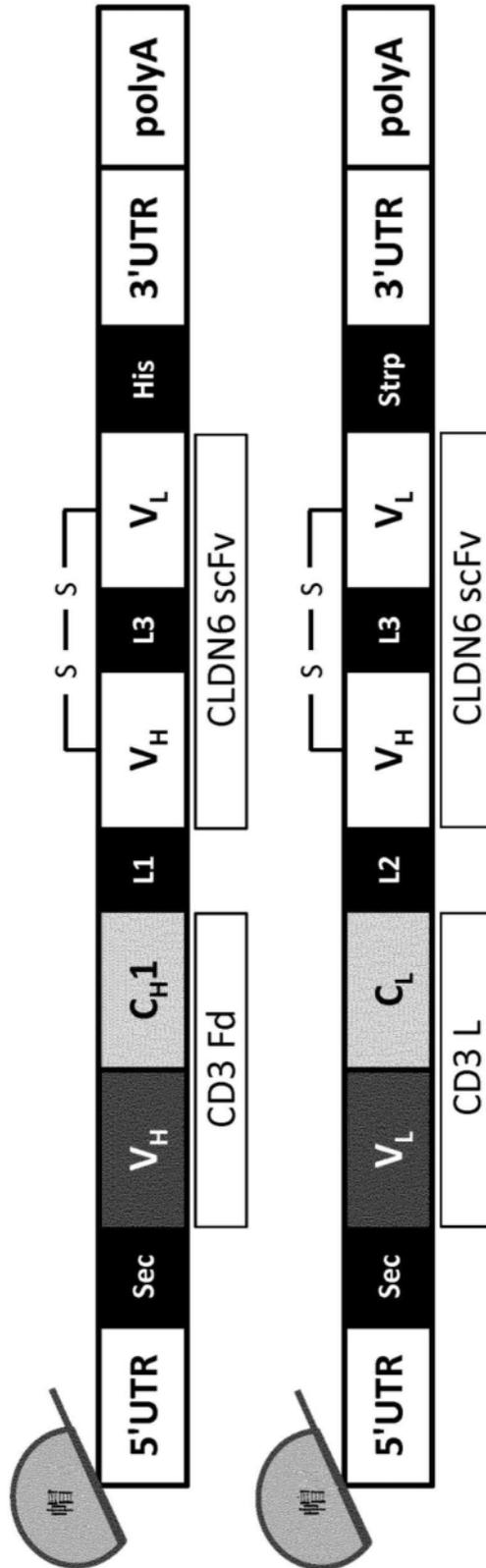


图14

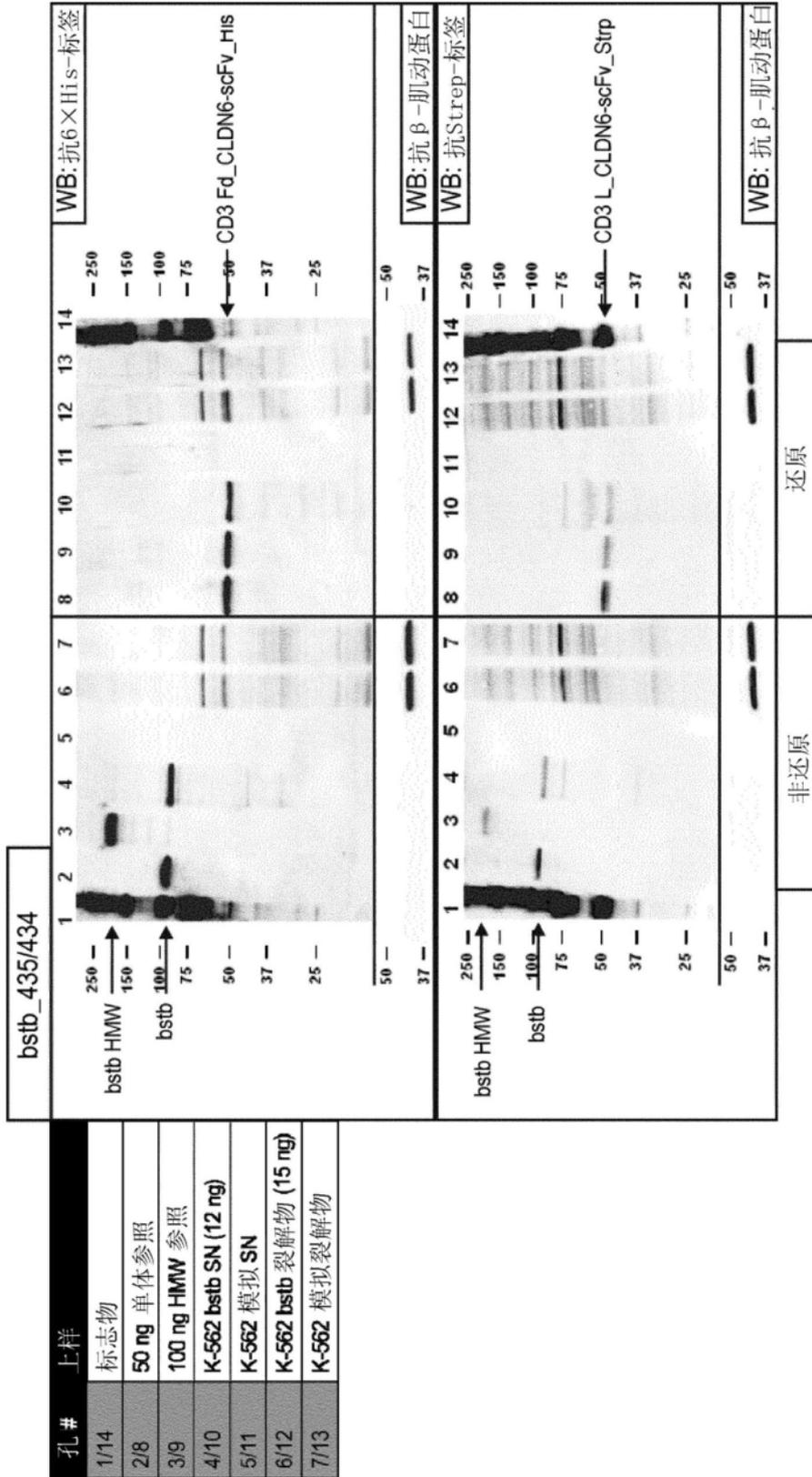


图15A

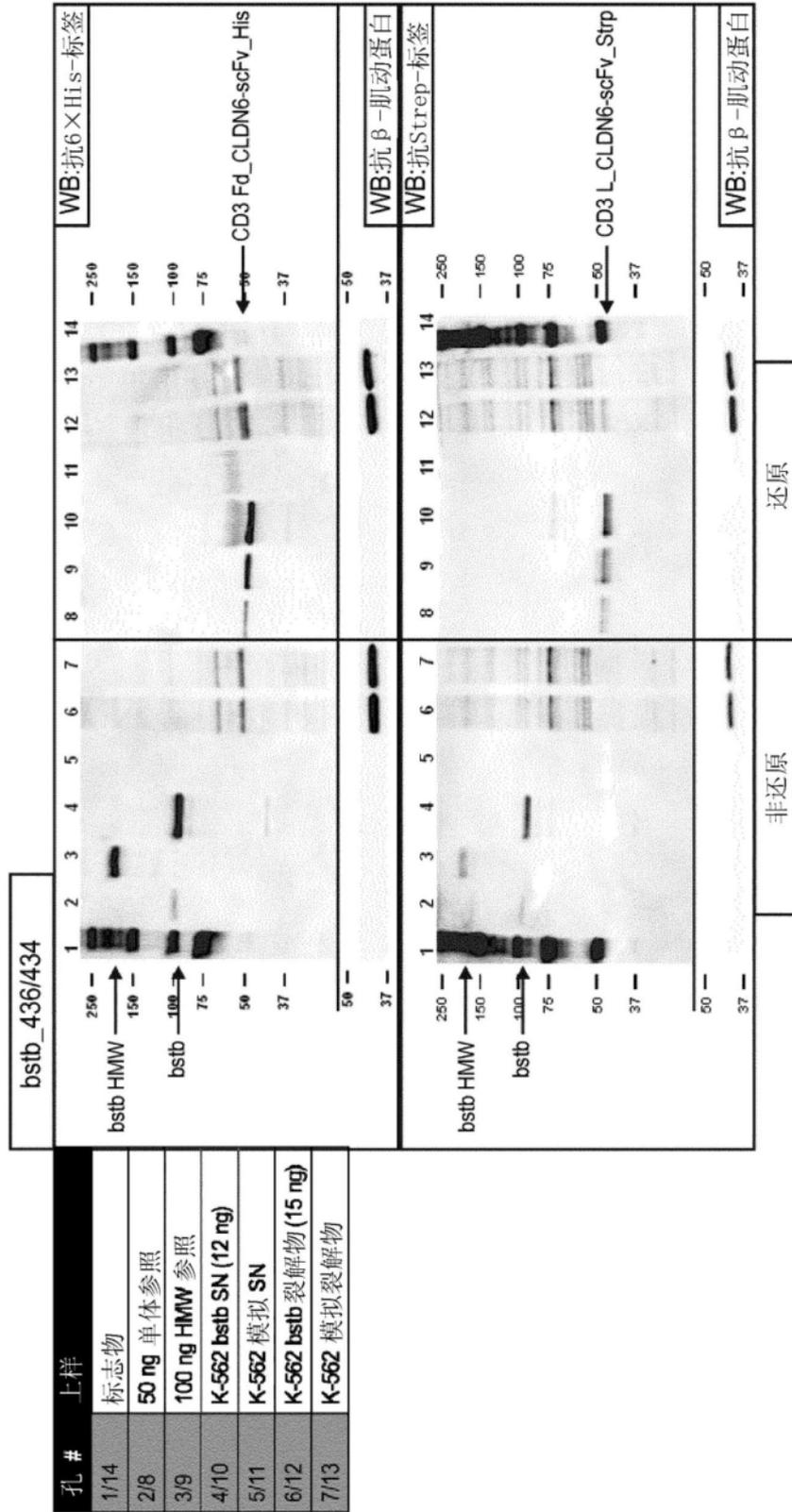


图15B

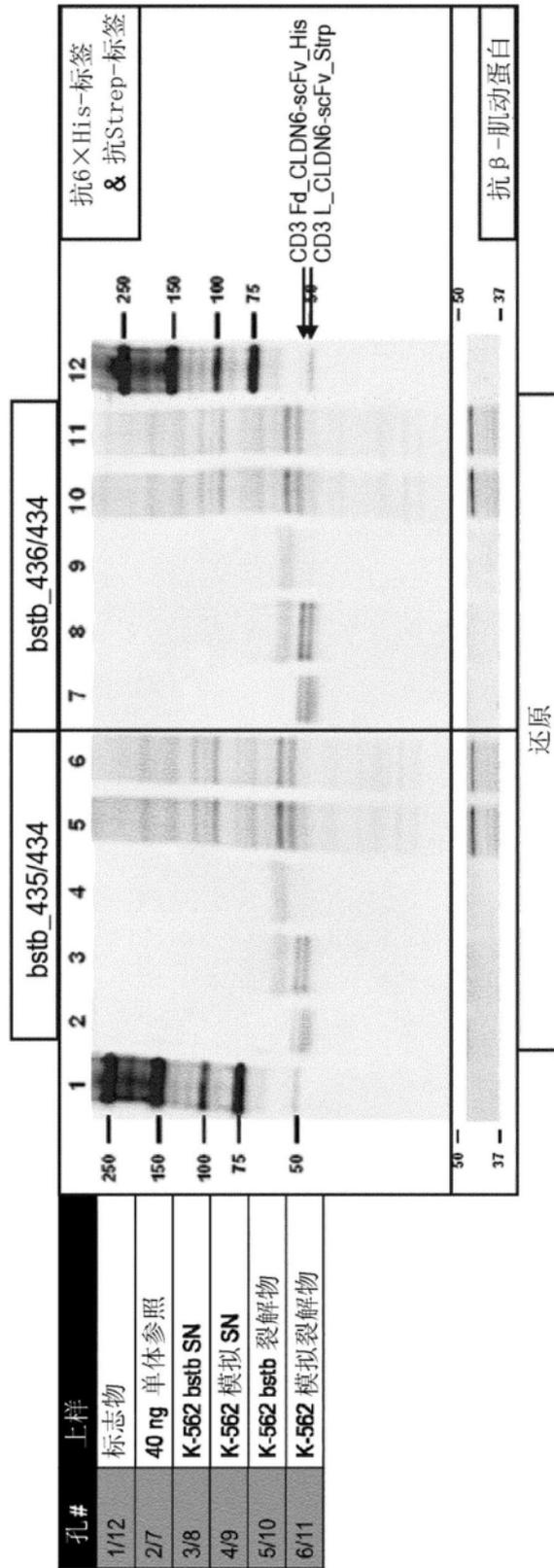


图15C

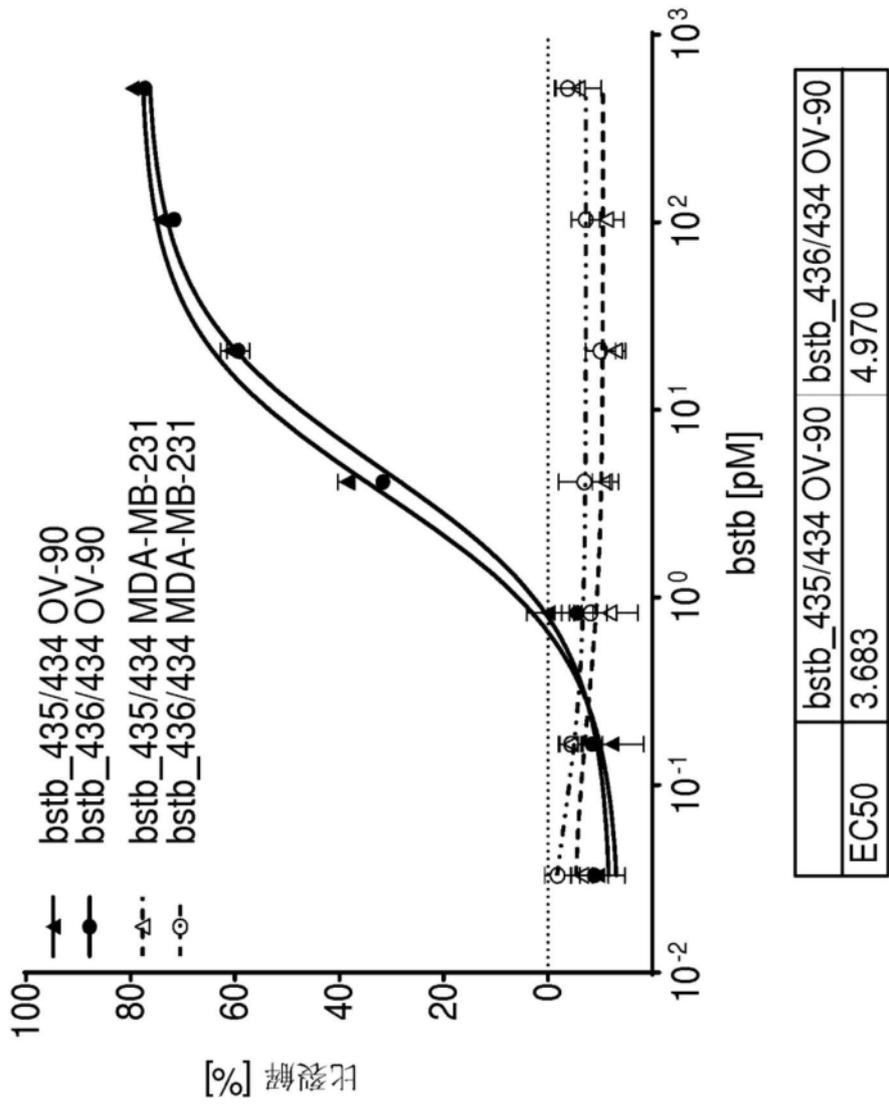


图16

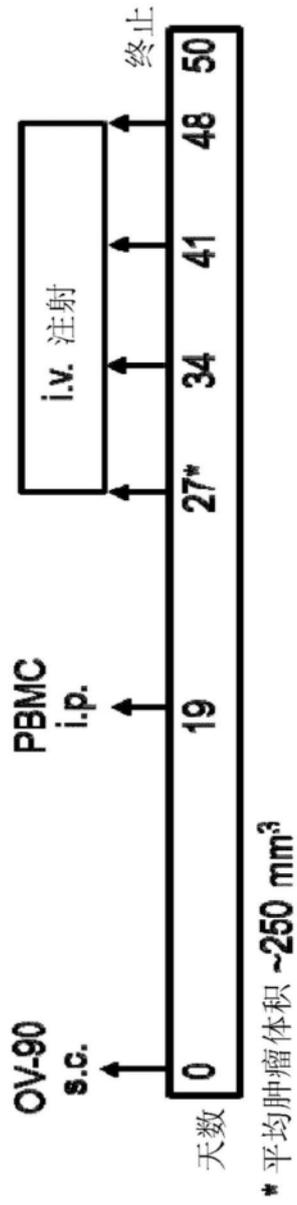


图17A

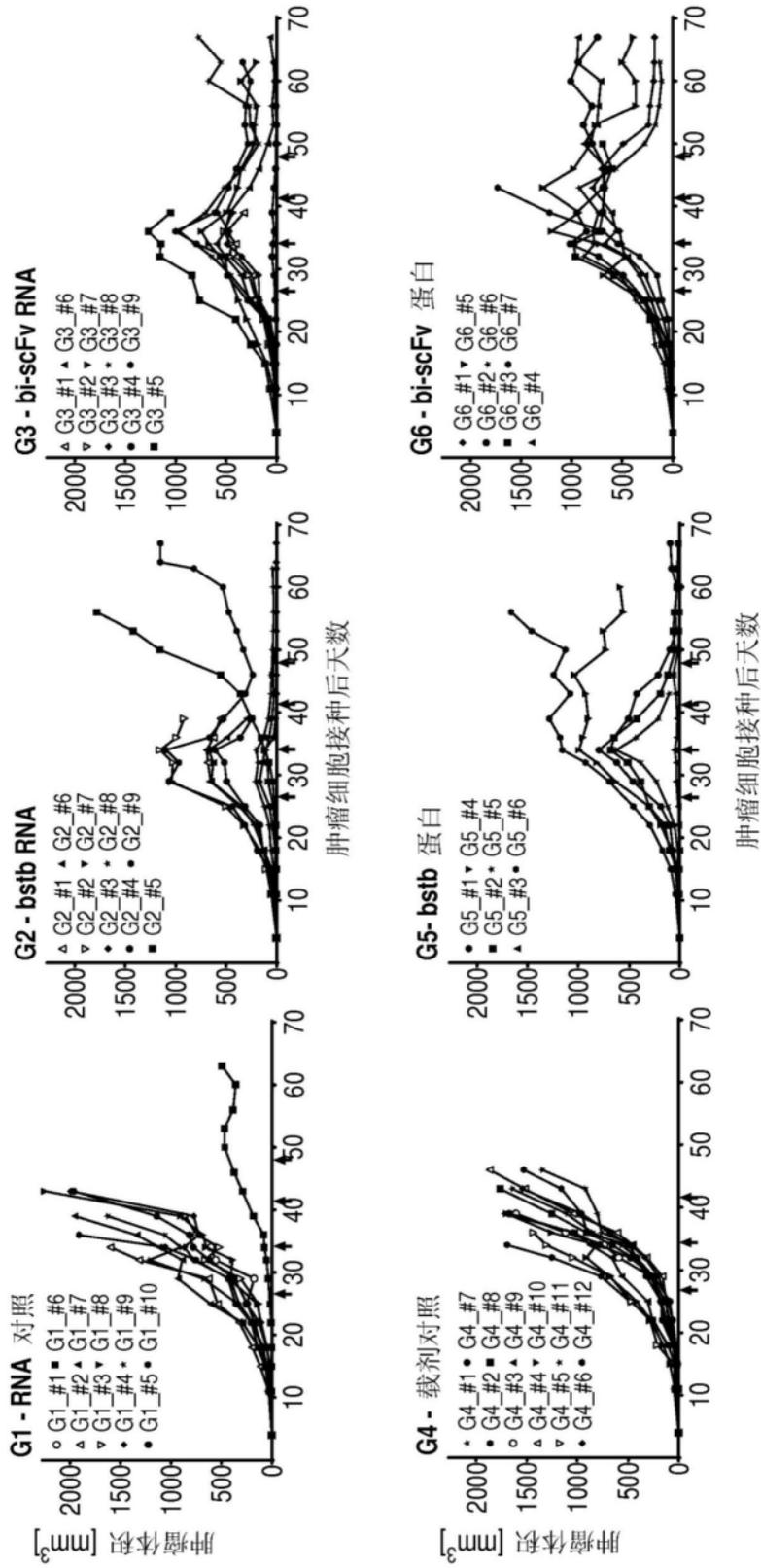


图17B

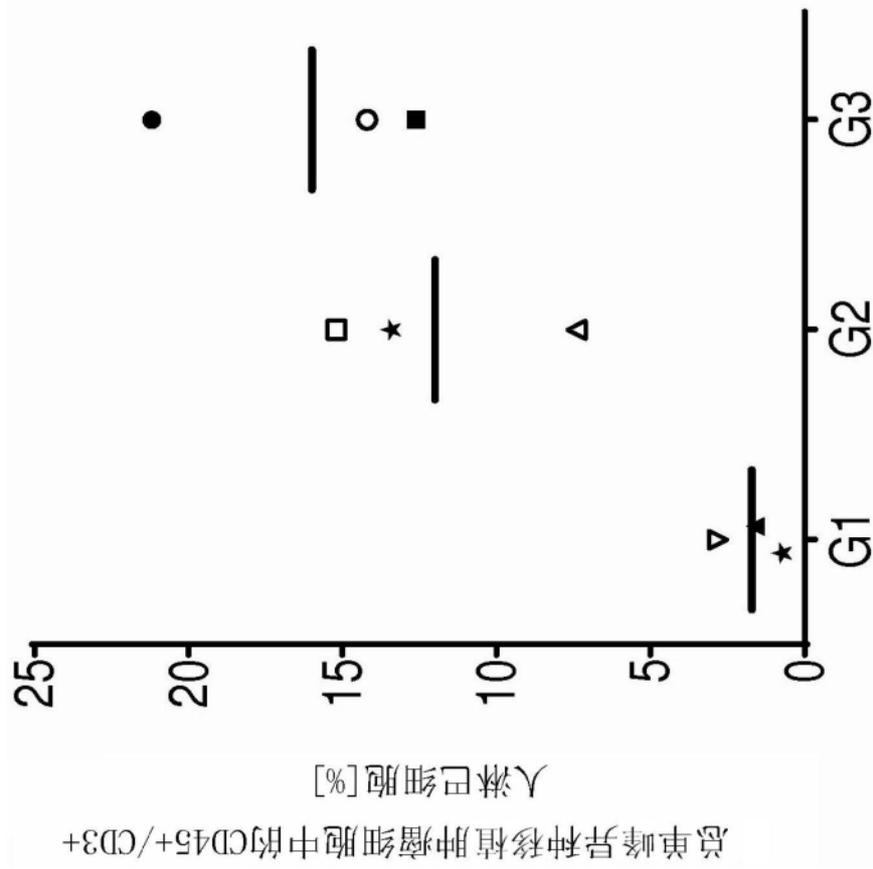


图17C



