



(12) 发明专利

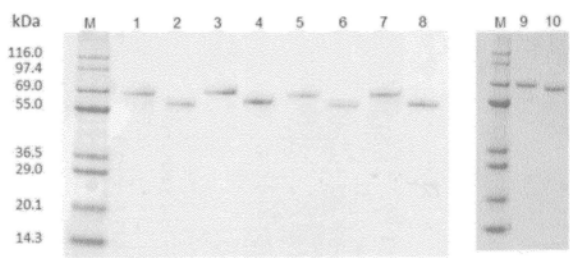
(10) 授权公告号 CN 113166249 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 24

(21) 申请号 201980077918.7	(72) 发明人 金洙铉 金孝惻 曹东铉 金正勋 金修利 姜东旻 黄度彬 郑竣昊
(22) 申请日 2019.10.07	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 113166249 A	(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127 专利代理师 肖轶 庞东成
(43) 申请公布日 2021.07.23	
(30) 优先权数据 62/741,733 2018.10.05 US	(51) Int.Cl. C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/44 (2006.01) A61K 47/68 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2021.05.26	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/KR2019/013122 2019.10.07	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02020/071881 KO 2020.04.09	(56) 对比文件 CN 101707882 A,2010.05.12 CN 102250246 A,2011.11.23
(73) 专利权人 首尔大学校产学协力团 地址 韩国首尔 专利权人 梨花女子大学校 产学协力团	审查员 何永培 权利要求书4页 说明书33页 序列表27页 附图32页

(54) 发明名称
PDGF受体抗体及其用途

(57) 摘要
本发明涉及:PDGF受体抗体;抗体-药物缀合物,其中化学治疗剂与PDGF受体抗体缀合;以及通过使用它们在预防或治疗眼新生血管性疾病中的用途。



1. 一种抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段,所述抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段特异性结合血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR- β),并且包含重链可变区和轻链可变区,其中所述抗PDGF受体抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的VL-CDR3,

(b) 由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的VL-CDR3,

(c) 由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:21的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:22的氨基酸序列组成的VL-CDR3,

(d) 由SEQ ID NO:25的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:26的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:27的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:28的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:29的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成的VL-CDR3,

(e) 由SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:34的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:35的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:36的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:37的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:38的氨基酸序列组成的VL-CDR3,

(f) 由SEQ ID NO:41的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:42的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:43的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:44的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:46的氨基酸序列组成的VL-CDR3,或

(g) 由SEQ ID NO:49的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:50的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:51的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:53的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:54的氨基酸序列组成的VL-CDR3。

2. 如权利要求1所述的抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段与PDGFR- β 的胞外区特异性结合。

3. 如权利要求1所述的抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段与PDGF-BB非竞争性结合。

4. 如权利要求3所述的抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段包含:

由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的轻链可变区,

由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的轻链可变区,

由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:24的氨基酸序列组成的轻链可变区,

由SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:32的氨基酸序列组成的轻链可变区,

由SEQ ID NO:39的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:40的氨基酸序列组成的轻链可变区,

由SEQ ID NO:47的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:48的氨基酸序列组成的轻链可变区,或

由SEQ ID NO:55的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:56的氨基酸序列组成的轻链可变区。

5. 如权利要求1所述的抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段由表达PDGFR- β 的细胞内化,并且

其中所述抗PDGF受体抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的VL-CDR3,

(c) 由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:21的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:22的氨基酸序列组成的VL-CDR3,

(d) 由SEQ ID NO:25的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:26的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:27的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:28的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:29的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成的VL-CDR3,

(e) 由SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:34的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:35的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:36的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:37的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:38的氨基酸序列组成的VL-CDR3,或

(f) 由SEQ ID NO:41的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:42的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:43的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:44的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:46的氨基酸序列组成的VL-CDR3。

6. 如权利要求1所述的抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗PDGF受体的抗体为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4形式的完整抗体。

7. 如权利要求1所述的抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体的抗原结合片段选自由scFv、(scFv)₂、scFv-Fc、Fab、Fab'和F(ab')₂组成的组。

8. 如权利要求7所述的抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体的抗原结合片段为scFv,所述scFv从N端至C端方向依次包含轻链可变区(VL)、接头及重链可变区(VH)。

9. 一种双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性结合血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR- β)的权利要求1-8中任一项所述的抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段,以及抗可替宁抗体或其抗原结合片段,

其中,所述抗可替宁抗体或其抗原结合片段包含:

由SEQ ID NO:64的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:65的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:66的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:67的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:68的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:69的氨基酸序列组成的VL-CDR3。

10. 如权利要求9所述的双特异性抗体,其中,所述双特异性抗体包含抗PDGF受体的抗体的抗原结合片段和抗可替宁抗体的抗原结合片段。

11. 如权利要求10所述的双特异性抗体,其中所述抗PDGF受体的抗体的scFv和抗可替宁抗体的scFv直接连接或通过第一接头连接。

12. 如权利要求11所述的双特异性抗体,其中所述抗PDGF受体的抗体的scFv的C端与抗可替宁抗体的scFv的N端通过第一接头连接。

13. 如权利要求12所述的双特异性抗体,其中,所述抗PDGF受体的抗体的scFv中的重链可变区和轻链可变区通过第二接头连接,抗可替宁抗体的scFv中的重链可变区和轻链可变区通过第三接头连接,且所述抗PDGF受体的抗体的scFv和所述抗可替宁抗体的scFv采用第一接头连接。

14. 如权利要求9所述的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体与可替宁-倍癌霉素缀合物缀合。

15. 一种用于将药物递送至表达PDGF受体的细胞的药物递送系统,其包含权利要求1至8中任一项所述的抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段,并且

其中所述抗PDGF受体抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的VL-CDR3,

(c) 由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:21的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:22的氨基酸序列组成的VL-CDR3,

(d) 由SEQ ID NO:25的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:26的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:27的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:28的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:29的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成的VL-CDR3,

(e) 由SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:34的氨基酸序列组成

的VH-CDR2,由SEQ ID NO:35的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:36的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:37的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:38的氨基酸序列组成的VL-CDR3,或

(f)由SEQ ID NO:41的氨基酸序列组成的VH-CDR1,由SEQ ID NO:42的氨基酸序列组成的VH-CDR2,由SEQ ID NO:43的氨基酸序列组成的VH-CDR3,由SEQ ID NO:44的氨基酸序列组成的VL-CDR1,由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成的VL-CDR2,和由SEQ ID NO:46的氨基酸序列组成的VL-CDR3。

16.如权利要求15所述的药物递送系统,其中所述药物是免疫治疗剂或化学治疗剂。

17.如权利要求15所述的药物递送系统,所述药物递送系统还包含抗可替宁抗体或其抗原结合片段,其中特异性结合所述PDGF受体和所述可替宁。

18.一种用于治疗眼新生血管性疾病的药物组合物,所述药物组合物包含与可替宁-倍癌霉素缀合的权利要求1至8中任一项所述的抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段、或与可替宁-倍癌霉素缀合的权利要求9至14中任一项所述的双特异性抗体,所述双特异性抗体包含抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段和抗可替宁抗体或其抗原结合片段。

19.如权利要求18所述的药物组合物,其中所述眼新生血管性疾病是缺血性视网膜病、虹膜新生血管形成、眼内新生血管形成、老年性年龄相关性黄斑变性、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性视网膜缺血或增生性糖尿病性视网膜病。

20.一种用于治疗癌症疾病的药物组合物,所述药物组合物包含与可替宁-倍癌霉素缀合的权利要求1至8中任一项所述的抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段、或与可替宁-倍癌霉素缀合的权利要求9至14中任一项所述的双特异性抗体,所述双特异性抗体包含抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段和抗可替宁抗体或其抗原结合片段。

PDGF受体抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及抗PDGF受体的抗体,其中化学治疗剂与抗PDGF受体的抗体缀合的抗体-药物缀合物,以及使用它们预防或治疗眼新生血管性疾病的用途。

背景技术

[0002] 血管生成,也称为新生血管形成,涉及从现有血管形成突起和它们浸润到周围组织的步骤。血管发生,与其相关的过程,涉及内皮细胞和已经存在于整个组织中的成血管细胞的分化,然后当它们连接在一起时形成血管。

[0003] 血管生成在发育期间广泛发生,并且也在创伤愈合期间发生,以在损伤或伤害后恢复血液流向组织,即使在健康的身体中。然而,血管生成也与癌症和肿瘤形成有关。

[0004] 各种眼部病症涉及血管生成的改变。例如,糖尿病性视网膜病是成人失明的原因之一,与过度血管生成有关。非增殖性视网膜病涉及视网膜中血管周围细胞的选择性损失,并且相关的毛细血管扩张和血流由于这种损失而增加。在扩张的毛细血管中,内皮细胞增殖并形成囊性突起,从而变成微动脉瘤,并且邻近的毛细血管被阻断,使得在这些微动脉瘤周围的视网膜区域中不发生灌注。事实上,在微动脉瘤的相邻区域之间出现分流血管,并且早期糖尿病性视网膜病的临床症状表现为具有微动脉瘤和非灌注的视网膜区域。在微动脉瘤中发生渗漏和毛细血管可破裂,这可导致渗出和出血。当视网膜的一些区域继续失去毛细血管并变得无法灌注时,发生增殖性糖尿病性视网膜病,导致在视网膜盘和其它区域出现新血管。这些新血管容易生长到玻璃体和出血部位,导致视网膜前出血。随着增殖性糖尿病性视网膜病的发展,过度的玻璃体出血可能填充大部分玻璃体腔。此外,新血管伴随有纤维组织增生,其可引起牵引性视网膜脱离。

[0005] 黄斑水肿和增殖性糖尿病性视网膜病的早期治疗在95%的患者中预防失明5年,但延迟治疗仅在50%的患者中预防失明。因此,早期诊断和早期治疗是必需的。

[0006] 另一种伴随血管生成的眼部病症是老年性黄斑变性(AMD)。AMD的特征在于一系列发生在视网膜中央区域的黄斑的病理变化,并伴随有特别影响中央视觉的视觉问题。视网膜色素上皮位于布鲁赫膜上,布鲁赫膜是在AMD中增厚和硬化的基底膜复合体。当新血管从含有丰富血管层的下脉络膜穿过布鲁赫膜时,可形成新血管。这些血管然后可在视网膜色素上皮和感觉视网膜之间以及在视网膜色素上皮之下泄漏流体或引起出血。随后的纤维性疤痕形成通过阻断营养物供应给感光细胞并杀死这些细胞而导致中心视觉的丧失。由于血管渗漏和视网膜下水肿或血液,这种类型的老年黄斑病变被称为“湿型”。老年性黄斑病的“干型”涉及视网膜色素上皮细胞的萎缩,伴随有位于视网膜色素上皮细胞上的感光细胞的损失。这种干型使视力退化。

[0007] 在这些血管生成调节剂中,正在研究属于信号传导分子PDGF家族的PDGF-B成员的作用,因为它们被认为在壁细胞(例如被称为血管平滑肌细胞或血管间细胞的血管周围细胞)的形成、增殖和正常运行中起一定作用。

[0008] PDGF家族由PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C和PDGF-D的单体以及PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-

BB、PDGF-CC和PDGF-DD的二聚体组成。一旦PDGF二聚体结合，PDGF就与PDGF受体 α 和 β 结合。PDGF受体是一种酪氨酸激酶，可以形成 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 和 $\alpha\beta$ 二聚体的三种组合。PDGF受体的胞外区由五个免疫球蛋白样区域组成，胞内区含有酪氨酸磷酸化区。PDGF受体的配体结合位点位于前三个免疫球蛋白样区域。PDGF与PDGF受体的免疫球蛋白样结构域2和3结合，以诱导受体的二聚化，并诱导包括免疫球蛋白样结构域4和5在内的受体-受体直接相互作用，以进一步稳定化。

[0009] PDGF-CC与PDGF受体- $\alpha\alpha$ 和PDGF受体- $\alpha\beta$ 特异性相互作用，但不与PDGFR- $\beta\beta$ 相互作用。因此，它与PDGF-AB相似。PDGF-DD被认为对PDGFR- $\beta\beta$ 具有特异性，因为它与PDGFR- β 的结合亲和力高，与PDGF受体 $\alpha\beta$ 的结合程度低得多。PDGF-AA仅与PDGF受体- $\alpha\alpha$ 结合。PDGF-BB以高亲和力独特地结合所有三种受体组合。

[0010] PDGF和PDGF受体之间的过度信号传导在许多癌症中起重要作用，例如肾细胞癌、肺癌、成胶质细胞瘤、慢性淋巴细胞性白血病和前列腺癌。PDGF受体通过直接影响肿瘤生长相关血管、间质成纤维细胞（体细胞成纤维细胞）等来促进肿瘤持久性，从而促进肿瘤生长。

[0011] 作为靶向PDGF和PDGF受体信号传导的单克隆抗体，奥拉木单抗（Olaratumab）（IMC-3G3, Lartruvo™）是针对PDGFR- α 的重组人IgG1抗体，其特异性结合PDGF受体 α ，阻断PDGF-AA、PDGF-BB和PDGF-CC的结合和受体的激活，并且不与PDGFR- β 交叉反应。基于对晚期软组织肉瘤的Ib/II期研究结果，奥拉木单抗在2016年10月在美国首次批准用于癌症治疗，该结果显示奥拉木单抗和阿霉素的组合与单独的阿霉素相比显著提高了总体平均存活。

[0012] 抗体-药物缀合物（ADC）是含有细胞毒性药物-单克隆抗体的治疗剂，并且将毒性剂递送至表达靶抗原的癌细胞，同时使脱靶毒性最小化。

[0013] 为了开发经优化的抗体-药物缀合物，存在复杂的考虑因素，例如抗体、接头、结合位点、肿瘤类型、抗原表达率、毒素、药物与抗体比率（DAR）等。例如，结合位点影响结合速率、亲和力和稳定性。因为药物-缀合物内化到细胞中并释放药物，所以毒性效应在它们如何有效地将药物递送到细胞中是重要的。另外，在与位于细胞表面的相同靶抗原连接的抗体之间，内化效率不同。因此，对抗体-药物复合物的功效而言，选择有效内化的抗体是非常重要的。因为存在许多因素，例如抗体-药物缀合物再循环到靶抗原，以及影响药物的细胞毒性效应的细胞内运输，所以在制备抗体-药物缀合物后可以检查准确地测量内化抗体的毒性比率的方法。不幸的是，已经花费了许多努力和时间来使用不同类型的抗体制备抗体-药物缀合物的候选物。

[0014] 目前可用的PDGFR- β 治疗剂集中在PDGF配体的拮抗作用，不能提供有效的PDGFR- β 内化。因此，需要开发一种抗体，其能有效地内化PDGFR- β ，以将抗体或抗体-药物缀合物递送到表达PDGFR- β 的细胞中。

发明内容

[0015] 技术问题

[0016] 本发明的一个实施方式涉及抗PDGF受体的抗体或识别PDGF受体，特别是PDGF受体- β 的抗体或其抗原结合片段。

[0017] 本发明的另一实施方式涉及抗体-药物缀合物，其中药物与抗PDGF受体的抗体或抗体的抗原结合片段缀合。抗体-药物缀合物可以是药物通过非共价键或共价键与抗PDGF

受体的抗体结合的缀合物。

[0018] 本发明的另一实施方式是双特异性抗体,其包含抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段,和特异性识别能够与药物缀合的半抗原的抗体或其抗原结合片段。

[0019] 抗体的抗原结合片段是指具有至少一个CDR的抗体片段,并且可以是scFv、(scFv)₂、scFv-Fc、Fab'或F(ab')₂。

[0020] 本发明的一个实施方式涉及药物递送系统用于将药物递送至在细胞表面上表达PDGF受体(特别是PDGF受体-β)的细胞或组织的用途,该药物递送系统包含抗PDGF受体的抗体。药物递送系统可以是双特异性抗体,其包含抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段和针对化疗药物用半抗原的抗体或其抗原结合片段。当药物递送系统包括识别半抗原的抗体或其抗原结合片段时,药物可以与半抗原(所述半抗原与抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段连接)连接,并被递送至靶细胞或组织。递送至靶细胞的药物可以是用于预防、改善或治疗与PDGF或PDGF受体相关的疾病如新生血管性疾病的药物。药物可以是免疫治疗剂或化学治疗剂,并且免疫治疗剂可以是抗体。

[0021] 本发明的一个实施方式涉及用于预防、改善或治疗新生血管性疾病的药物组合物,其包含其中药物与抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段缀合的抗体-药物缀合物,或其中药物经半抗原与抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段缀合的抗体-药物缀合物。

[0022] 本发明的一个实施方式是治疗被诊断为患有新生血管性疾病或具有发生新生血管性疾病的风险的个体的方法,其包括以足以预防、改善或治疗受试对象中的疾病的量,向受试对象施用作为第一治疗剂或辅助治疗剂的其中药物与抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段缀合的抗体-药物缀合物、或其中药物通过半抗原与抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段缀合的抗体-药物缀合物。

[0023] 技术方案

[0024] 以下,将更详细地描述本发明。

[0025] 本发明的一个实施方式涉及特异性识别PDGF受体、特别是PDGF受体-β(PDGFR-β)的抗体或抗体的抗原结合片段。

[0026] 如本公开中所用的“抗体”是通过抗原刺激产生的物质。抗体的实例包括但不限于动物抗体、嵌合抗体、人源化抗体等。

[0027] 此外,分离的抗原结合片段也在本发明抗体的范围内。互补决定区(CDR)是指对于抗原特异性重要的抗体的可变区。上述抗原结合片段是指具有至少一个CDR的抗体片段,其可以是scFv、(scFv)₂、scFv-Fc、Fab'和F(ab')₂,或优选scFv。抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。抗体可以选自所有亚型(例如IgA、IgD、IgE、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM等)的免疫球蛋白。IgG型抗体可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型,例如IgG1或IgG2亚型。

[0028] 如本发明中所用的,抗体或免疫球蛋白的链(重链或轻链)的“抗原结合片段”与全长链相比缺乏一些氨基酸,但含有能够特异性结合抗原的抗体部分。这些抗原结合片段可以是生物活性的,因为它们可以特异性结合靶抗原或与其他抗体或抗原结合片段竞争以结合特定表位。具体地,抗原结合片段是包含一个或多个互补决定区的抗体片段,并且例如可以是选自由scFv、(scFv)₂、scFv-Fc、Fab、Fab'和F(ab')₂组成的组中的一种,但不限于此。这些生物活性片段可以通过重组DNA技术或例如通过完整抗体的酶促或化学切割来产生。免疫球蛋白的免疫功能片段不限于此。

[0029] 非人(例如鸡、小鼠、大鼠等)抗体的“人源化”形式是特异性嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段,其含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列(例如抗体的Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂或其它抗原结合产物)。通常,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中从受体抗体CDR获得的残基被具有所需特异性、亲和力和能力的来自非人物种抗体(供体抗体)如小鼠、大鼠或兔CDR的残基取代。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被相应的非人FR残基取代。此外,人源化抗体可以含有在引入受体抗体的CDR或FR序列中未发现的残基。可以进行这些修饰以进一步改进和优化抗体性能。一般而言,人源化抗体中所有或基本上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白的区域,并且所有或基本上所有的FR残基可包括人免疫球蛋白共有序列的至少一个、通常两个可变结构域残基的全部。人源化抗体还将最佳地包括免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的至少一部分。

[0030] 本发明涉及针对PDGFR- β 同种型的胞外结构域的抗体。PDGF受体是一种酪氨酸激酶,包括两种同种型,PDGFR- α 和PDGFR- β ,它们可以形成三种类型的二聚体组合, $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 和 $\alpha\beta$ 二聚体。PDGF受体的结构包括由五个免疫球蛋白样结构域组成的胞外区、跨膜区和胞内区(酪氨酸激酶区)。受体的配体结合区位于胞外区的五个免疫球蛋白样结构域中的前三个免疫球蛋白样区域中。已知PDGF通过结合PDGF受体的免疫球蛋白样结构域2和3来诱导受体的二聚化,并直接引导包括免疫球蛋白样结构域4和5在内的受体-受体相互作用,以进一步稳定化。

[0031] 根据本发明的抗体可以是人抗体和通过使用噬菌体展示技术从免疫球蛋白可变(V)结构域的基因库产生的抗体片段(McCafferty等,(1990)Nature,348:552-553)。

[0032] 本发明涉及一种与PDGFR- β 特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段可以是多肽、蛋白或抗体或其包括重链的互补决定区和轻链的互补决定区的抗原结合片段,以与PDGFR- β 特异性结合。

[0033] 在一个具体的实例中,抗PDGFR- β 抗体及其抗原结合片段可以包括:

[0034] (i) 选自由H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3组成的组中的至少一个重链互补决定区,或包含所述至少一个重链互补决定区的重链可变区;

[0035] (ii) 选自由L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3组成的组中的至少一个轻链互补决定区,或包含所述至少一个轻链互补决定区的轻链可变区;

[0036] 所述至少一个重链互补决定区和所述至少一个轻链互补决定区的组合;或

[0037] 所述重链可变区和所述轻链可变区的组合。

[0038] 另外,在所述重链可变区、轻链可变区或所述重链可变区和轻链可变区的组合中,重链可变区可以包括选自由H-FR1、H-FR2、H-FR3和H-FR4组成的组中的一个或多个重链框架,并且轻链可变区可以包括选自由L-FR1、L-FR2、L-FR3和L-FR4组成的组中的一个或多个轻链框架。

[0039] 根据本发明的(i)H-CDR1、H-CDR2或H-CDR3的重链互补决定区选自下表1和2中所示的氨基酸序列,或包括至少一个与所选氨基酸序列具有实质序列同一性的氨基酸序列。此外,(ii)L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3的轻链互补决定区选自下表1和2中所示的氨基酸序列,或包括至少一个与所选氨基酸序列具有实质序列同一性的氨基酸序列。

[0040] 在本发明中,单链Fv是抗原结合区的单个多肽链,其中重链可变区和轻链可变区直接连接或通过接头连接,并且可以是选自以下中的至少一种:以单链形式连接的重链可

变区的和轻链可变区的scFv、scFv二聚体(二scFv)和其中重链可变区、轻链可变区和Fc以单链形式连接的scFv-Fc。scFv可以是通过接头连接的重链可变区和轻链可变区,所述接头没有特别限制,且例如可以是具有下表2中的SEQ ID NO:57的氨基酸序列的接头序列。

[0041] 本发明包括针对小鼠或人的血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR- β) 的抗体作为靶抗原的实例,并且所述抗体的scFv可用于产生双特异性抗体。例如,所述scFv可以是其中抗体的具有CDR1至CDR3的重链和具有CDR1至CDR3的轻链通过接头连接的抗体。另外,作为双特异性抗体,(抗PDGFR- β 抗体的scFv)-C κ -(抗可替宁抗体的scFv)的融合蛋白可以包括如下表2中所规定的可以与C κ 连接的每种抗体的重链的三个(3)CDR和轻链的三个(3)CDR。

[0042] 在一个具体的实例中,针对作为本发明靶抗原的实例的小鼠PDGFR- β (mPDGFR- β) 的抗体的具体实例是PRb-CN01、PRb-CC01、PRb-CC02和PRb-CC03,它们的重链可变区、轻链可变区和这些区域的CDR序列示于下表1中。

[0043] [表1]

克隆/名称	部分	氨基酸序列 (N->C)	SEQ ID NO
PRb-CN01	CDR1-VH	GFTFSDRAMH	1
PRb-CN01	CDR2-VH	LITNTGGSTNYGAAVKG	2
PRb-CN01	CDR3-VH	GVGSWAHGGRI	3
PRb-CN01	CDR1-VL	SGGSGSYG	4
PRb-CN01	CDR2-VL	SNNQRPS	5
PRb-CN01	CDR3-VL	GTRDSSYVGI	6
PRb-CN01	VH	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFT FSDRAMHWVRQAPGKGLEWVGLITNTG GSTNYGAAVKGRATISRDNGQSTVRLQ LNNLRAEDTGTYCTRGVGSWAHGGRI DAWGHGTEVIVSS	7
PRb-CN01	VL	LTQPSSVSANPGETVKITCSGGSGSYGW FQQKSPGSAPVTVIYSNNQRPSDIPSRFS GSKSGSTNTLTITGVQAEDEAIYYCGTR DSSYVGIFGAGTTLTVL	8
PRb-CC01	CDR1-VH	SGTFSSYNMG	9
PRb-CC01	CDR2-VH	GISAADNSTAYGAAVDG	10
PRb-CC01	CDR3-VH	GGGSDA	11
PRb-CC01	CDR1-VL	SGGGSYYG	12
PRb-CC01	CDR2-VL	YNDKRPS	13
PRb-CC01	CDR3-VL	GAWDNSAGYAG	14
PRb-CC01	VH	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKGSGFT FSSYNMGWVRQAPGKGLEFVAGISAAD NSTAYGAAVDGRATISRDNGQSTVRLQ LNNLRAEDTATYFCIRGGGSIDAWGHGT EVIVSS	15
PRb-CC01	VL	LTQPSSVSANLGGTVKITCSGGGSYYGW YQQKSPGSAPVTLIYYNDKRPSDIPSRFS GSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGAW DNSAGYAGFGAGTTLTVL	16
PRb-CC02	CDR1-VH	GFTFSSYGMF	17
PRb-CC02	CDR2-VH	GIDTGSGTNYGSAVKG	18
PRb-CC02	CDR3-VH	GYAGTIDA	19
PRb-CC02	CDR1-VL	SGGGSGSYG	20
PRb-CC02	CDR2-VL	YNDKRPS	21
PRb-CC02	CDR3-VL	GSYNSSDSL	22
PRb-CC02	VH	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFT FSSYGMFWVRQAPGKGLEWVAGIDTGS GTNYGSAVKGRATISRDNGQSTVRLQL	23

[0045]

		NNLRAEDTGTGYFCTRGYAGTIDAWGHG TEVIVSSTS	
PRb-CC02	VL	LTQPSSVSANPGETVKITCSGGGGSYGW YQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFS GSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSY NSSDSLFGAGTTLTVL	24
PRb-CC03	CDR1-VH	GFTFSSYAMG	25
PRb-CC03	CDR2-VH	GIDTAGGTAYGPAVKG	26
PRb-CC03	CDR3-VH	SSYIDT	27
PRb-CC03	CDR1-VL	SGGTNYNG	28
PRb-CC03	CDR2-VL	WNDKRPS	29
PRb-CC03	CDR3-VL	GSSDSSGLI	30
PRb-CC03	VH	AVTLDESGGGLQTPGGTSLVCKASGFT FSSYAMGWVRQAPGKGLEWVAGIDTA GGTAYGPAVKGRATISRDNGQSTVRLQ LNNLRAEDTATYYCTRSSYIDTWGHGTE VIVSSTS	31
PRb-CC03	VL	LTQPSSVSANPGETVKITCSGGTNYNGW YQQKSPGSAPVTVIYWNDKRPSDIPSRFS GSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYYCGSS DSSGLIFGAGTTLTVL	32

[0046] 在PRb-CN01、PRb-CC01、PRb-CC02和PRb-CC03抗体中,PRb-CC01、PRb-CC02和PRb-CC03与mPDGF-BB竞争,结合位点是PDGFR- β 的免疫球蛋白样结构域2或3,但PRb-CN01不与mPDGF-BB竞争,并预期结合PDGFR- β 的免疫球蛋白样结构域1、4或5。经确认,PRb-CN01和PRb-32显示相当的细胞毒性,且与是否存在mPDGF-BB无关,并且PRb-CN01和PRb-32是替代抗体(图20a和20b)。

[0047] 当本发明的新型抗体,如PRb-CN01、PRb-CC01、PRb-CC02和PRb-CC03抗体、其抗体片段、其混合物或其衍生物用于制备具有抗可替宁抗体的双特异性抗体时,对PDGF受体具有 1×10^{-7} M至 1×10^{-10} M的结合亲和力。

[0048] 经确认,PRb-CN01、PRb-CC02和PRb-CC03抗体通过内体内化进入细胞,但PRb-CC01未内化。因为抗体-药物缀合物内化到细胞中并释放药物,所以毒性作用在它们如何有效地将药物递送到细胞中很重要。此外,在细胞表面上附着相同靶抗原的抗体之间内化效率是不同的。因此,在抗体-药物复合物的功效方面,对抗体有效地内化的选择是非常重要的。

[0049] 此外,PRb-CN01、PRb-CC01、PRb-CC02和PRb-CC03抗体表现出细胞毒性,并且当与可替宁-倍癌霉素形成复合物时,四种抗体中PRb-CN01具有最高的细胞毒性。因此,它可以被认为是药物如倍癌霉素的最有效的靶向载体。即使在加入mPDGF-BB后,包括与cot-duo或cot-duo-cot复合的PRb-CN01的双特异性抗体的细胞毒性仍然很高。然而,当加入mPDGF-BB时,与和mPDGF-BB竞争的cot-duo或cot-duo-cot复合的三种抗体(PRb-CC01、PRb-CC02和PRb-CC03)的毒性稍微降低。在本发明中,与PRb-CN01相关的双特异性抗体不与PDGF-BB竞争,并且诱导细胞毒性,而与PDGF-BB的存在无关(图5a-5b)。

[0050] 作为本发明靶抗原的实例的抗人PDGFR- β (hPDGFR- β) 的抗体的具体实例是PRb-CN16、PRb-CN32和PRb-CN26。这些抗体的CDR序列示于下表2中。

[0051] [表2]

[0052]

克隆/名称	部分	序列	SEQ ID NO
PRb-CN16	CDR1-VH	GFTFSSFNMA	33
PRb-CN16	CDR2-VH	EISNTAGSTFYAPAVKG	34
PRb-CN16	CDR3-VH	AAGTCYSHSCTGYIDA	35
PRb-CN16	CDR1-VL	SGSSSSYG	36
PRb-CN16	CDR2-VL	ENNQRPS	37
PRb-CN16	CDR3-VL	GNADRSNSAGT	38
PRb-CN16	VH	AVTLDESGGGLQTPGTALSLVCKASGF TFSSFNMAWVRQAPGKGLEFVGEISNT AGSTFYAPAVKGRATISRDNGQSTVRL QLNNLRAEDTAIYYCAKAAGTCYSHSC TGYIDAWGHGTEVIVSSTS	39
PRb-CN16	VL	LTQPSSVSANPGETVKITCSGSSSSYGW YQQKSPGSAPVTLIYENNQRPSNIPSRF SGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYYCG NADRSNSAGTFGAGTTLTVL	40
PRb-CN32	CDR1-VH	GFTFSSFNMF	41
PRb-CN32	CDR2-VH	GISTTGRYTGYGSAVQG	42
PRb-CN32	CDR3-VH	SAGSTYSYWDSDAGLIDA	43
PRb-CN32	CDR1-VL	SGGSNAGSYYYG	44
PRb-CN32	CDR2-VL	SNNQRPS	45
PRb-CN32	CDR3-VL	GSGDSSSIAA	46
PRb-CN32	VH	AVTLDESGGGLQTPRGTLVCKASGF TFSSFNMFVVRQAPGKGLEFVAGISTT GRYTGYGSAVQGRGTISRDNGQSTVRL QLNNLRAEDTGTYYYCAKSAGSTYSYW DSDAGLIDAWGHGTEVIVSSTS	47
PRb-CN32	VL	LTQPSSVSANLGETVKITCSGGSNAGSY YYGWYQQKSPGSAPVTVIYSNNQRPS DIPSRFSGSTSGSTSTLTITGVQVDDEA VYFCGSGDSSSIAAFGAGTTLTVL	48
PRb-CN26	CDR1-VH	GFTFSDRGIH	49

[0053]

PRb-CN26	CDR2-VH	GIGNTGSYTAYAPAVKG	50
PRb-CN26	CDR3-VH	RGFMDAGGIDA	51
PRb-CN26	CDR1-VL	SGGGSYAGSYYYG	52
PRb-CN26	CDR2-VL	DNTNRPS	53
PRb-CN26	CDR3-VL	GGYDGISDTGI	54
PRb-CN26	VH	AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGF TFSDRGIHWVRQAPGKGLEWVAGIGN TGSYTAYAPAVKGRATISRDNGQSTVR LQLNNLRAEDTATYYCAKRGFMDAGG IDAWGHGTEVIVSSTS	55
PRb-CN26	VL	LTQPSSVSANPGETVKITCSGGGSYAGS YYYGWYQQKSPGSAPVTVIYDNTNRP SNIPSRFSGSLSGSTDTLTITGVQAEDEA VYFCGGYDGISDTGIFGAGTTLTVL	56
接头 (用于生成 scFv)	VL-VH	GQSSRSSGGGGSSGGGS	57
K 恒定区 (Ck)	*	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNREGS	58
接头 (用于生成 双特异性 抗体)	scFv-Ck	(GGGGS)3	59

[0054] PRb-CN16、PRb-CN32和PRb-CN26抗体不与hPDGF-BB竞争,因此,预期会结合hPDGFR-β的免疫球蛋白样结构域1、4或5。PRb-CN16、PRb-CN32和PRb-CN26抗体均被确认与hPDGFR-β、mPDGFRβ、恒河猴PDGFRβ、食蟹猴PDGFRβ和野猪PDGFR-β结合。经确认,PRb-CN01和PRb-32都显示相当的细胞毒性,而与是否存在mPDGF-BB无关,并且PRb-CN01和PRb-32是替代抗体(图20a和20b)。

[0055] 本发明的新型抗体,如PRb-CN16、PRb-CN32和PRb-CN26抗体、抗体片段、其混合物或其衍生物,在它们用于制备具有抗可替宁抗体的双特异性抗体的情况下,对PDGF受体具有 1×10^{-7} M至 1×10^{-11} M的结合亲和力。

[0056] 在不存在hPDGF-BB的情况下,在评价针对作为本发明靶抗原的实例的人PDGFR-β(hPDGFR-β)的抗体的细胞内化性能时,PRb-CN32最有效地内化至人周细胞,PRb-CN16的性能第二,而PRb-CN26不被内化。此外,在评价用hPDGF-BB处理的细胞内化性能时,PRb-CN16、PRb-CN32和PRb-CN26抗体均具有优异的细胞内化性能。当制备抗体-药物缀合物时,其被内化到细胞中并释放药物。因此,根据本发明的hPDGFR-β抗体向靶细胞移动,并被很好地内化。当使用所述抗体制备抗体-药物缀合物时,其被内化到细胞中并释放药物,从而有助于提高药物功效。患有与有问题的湿型AMD和PDGFR-β相关的疾病的患者具有增加的PDGFR-β表达水平和/或增加的PDGF-BB表达水平,并且这些增加的表达水平倾向于抑制抗体的内化或功效。在这一点上,本发明的抗PDGFR-β抗体具有即使PDGF-BB的表达量增加,抗体的内化水平也不被抑制或内化进一步增加的优点。

[0057] 当PRb-CN32和PRb-CN26与PRb-CN16、PRb-CN32和PRb-CN26抗体中的可替宁-倍癌霉素形成复合物时,它们表现出最高的细胞毒性。因此,它们可以被认为是药物如倍癌霉素的最有效的靶向载体。

[0058] 在具有或不具有hPDGF-BB的表达PDGFR- β 的细胞系中,PRb-CN16、PRb-CN32和PRb-CN26均表现出比对照抗mCD154x可替宁scFv-C κ -scFv更高的细胞毒性,尤其是PRb-CN26和PRb-CN32表现出高细胞毒性(图14a和14b)。此外,与对照抗mCD154x可替宁scFv-C κ -scFv相比,PRb-CN16、PRb-CN32和PRb-CN26在不表达hPDGFR- β 的细胞系中均具有等效的细胞毒性。因此,双特异性抗体-药物(IC₅₀)在不表达hPDGFR- β 的细胞系和表达hPDGFR- β 的细胞系中具有不同的毒性,在表达hPDGFR- β 的细胞系中以较低浓度显示毒性,并且在该浓度下,在表达大量hPDGFR- β 的病理细胞或组织中具有较高的毒性,而在正常细胞或正常组织中具有最小的毒性。此外,患有与有问题的湿型AMD和PDGFR- β 相关的疾病的患者具有增加的PDGFR- β 表达水平(CZehetner等,Invest Ophthalmol Vis Sci.55(2014)337-44)和/或增加的PDGF-BB表达水平(C.Zehetner,R.Kirchmair,SB Neururer,MT Kralinger,NE Bechrakis,GF Kieselbach,Systemic upregulation of PDGF-B in patients with neovascular AMD,Invest Ophthalmol Vis Sci.55(2014)337-44)),并且这些增加的表达水平倾向于抑制抗体的内化或功效。在这一点上,本发明的抗PDGFR- β 抗体的优点在于,即使PDGF-BB的表达水平增加,抗体的内化水平也不被抑制或内化进一步增加。

[0059] 更具体地,本发明的抗体特异性结合血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR- β),并且可以是抗PDGF受体的抗体或其包括重链可变区和轻链可变区的抗原结合片段,

[0060] 其中抗PDGF受体的抗体的重链可变区包括包含SEQ ID NO:1、9、17、25、33、41或49的氨基酸序列的VH-CDR1,包含SEQ ID NO:2、10、18、26、34、42或50的氨基酸序列的VH-CDR2,和包含SEQ ID NO:3、11、19、27、35、43或51的氨基酸序列的VH-CDR3,和

[0061] 其中抗PDGF受体的抗体的轻链可变区是包含SEQ ID NO:4、12、20、28、36、44或52的氨基酸序列的VL-CDR1,包含SEQ ID NO:5、13、21、29、37、45或53的氨基酸序列的VL-CDR2,和包含SEQ ID NO:6、14、22、30、38、46或54的氨基酸序列的VL-CDR3。

[0062] 抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段与PDGF-BB非竞争性结合,并包括,例如:重链可变区包括包含SEQ ID NO:1、33、41或49的氨基酸序列的VH-CDR1,包含SEQ ID NO:2、34、42或50的氨基酸序列的VH-CDR2,和包含SEQ ID NO:3、35、43或51的氨基酸序列的VH-CDR3,和

[0063] 轻链可变区包括包含SEQ ID NO:4、36、44或52的氨基酸序列的VL-CDR1,包含SEQ ID NO:5、37、45或53的氨基酸序列的VL-CDR2,包含SEQ ID NO:6、38、46或54的氨基酸序列的VL-CDR3。

[0064] 抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段可被表达PDGFR- β 的细胞内化,并且包括,例如:

[0065] 重链可变区,该重链可变区包括包含SEQ ID NO:1、17、25、33、41或49的氨基酸序列的VH-CDR1,包含SEQ ID NO:2、18、26、34、42或50的氨基酸序列的VH-CDR2,和包含SEQ ID NO:3、19、27、35、43或51的氨基酸序列的VH-CDR3,和

[0066] 轻链可变区,该轻链可变区包括包含SEQ ID NO:4、20、28、36、44或52的氨基酸序列的VL-CDR1,包含SEQ ID NO:5、21、29、37、45或53的氨基酸序列的VL-CDR2,和包含SEQ ID

NO:6、22、30、38、46或54的氨基酸序列的VL-CDR3。

[0067] 本发明的特异性抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段可以包括:

[0068] (a) 各自包含SEQ ID NO:1至3的氨基酸序列的VH-CDR1至VH-CDR3和各自包含SEQ ID NO:4至6的氨基酸序列的VL-CDR1至VL-CDR3,

[0069] (b) 各自包含SEQ ID NO:9至11的氨基酸序列的VH-CDR1至VH-CDR3和各自包含SEQ ID NO:12至14的氨基酸序列的VL-CDR1至VL-CDR3,

[0070] (c) 各自包含SEQ ID NO:17至19的氨基酸序列的VH-CDR1至VH-CDR3和各自包含SEQ ID NO:20至22的氨基酸序列的VL-CDR1至VL-CDR3,

[0071] (d) 各自包含SEQ ID NO:25至27的氨基酸序列的VH-CDR1至VH-CDR3和各自包含SEQ ID NOs:28至30的氨基酸序列的VL-CDR1至VL-CDR3,

[0072] (e) 各自包含SEQ ID NO:33至35的氨基酸序列的VH-CDR1至VH-CDR3和各自包含SEQ ID NO:36至38的氨基酸序列的VL-CDR1至VL-CDR3,

[0073] (f) 各自包含SEQ ID NO:41至43的氨基酸序列的VH-CDR1至VH-CDR3和各自包含SEQ ID NO:44至46的氨基酸序列的VL-CDR1至VL-CDR3,或

[0074] (g) 各自包含SEQ ID NO:49至50的氨基酸序列的VH-CDR1至VH-CDR3和各自包含SEQ ID NO:52至54的氨基酸序列的VL-CDR1至VL-CDR3。

[0075] 本发明的一个实施方式涉及药物递送系统的用途,所述药物递送系统将药物递送至在细胞表面上具有PDGF受体、特别是PDGF受体- β 的细胞或组织,并且包括抗PDGF受体的抗体。抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段靶向具有PDGF受体的靶细胞,并内化至靶细胞内部,以将与抗体或其抗原结合片段缀合的物质有效递送至靶细胞中。待递送的药物是能够直接或通过接头结合抗PDGF受体的抗体以形成抗体-药物缀合物的药物,或通过半抗原结合抗PDGF受体的抗体的半抗原-药物缀合物。

[0076] 本发明的一个实施方式提供一种复合物,其包括能够与化合物如化疗药物、酶、肽、适体、毒素、亲和配体或检测标记缀合的抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段,以及缀合化合物。根据缀合化合物的类型,该复合物可以以各种方式应用于疾病的诊断或治疗。

[0077] 本发明的另一实施方式涉及抗体-药物缀合物,其中药物与抗PDGF受体的抗体或抗体的抗原结合片段缀合。抗体-药物缀合物可以是药物通过非共价键或共价键与抗PDGF受体的抗体结合的缀合物。

[0078] 如本文所用,“缀合体”或“缀合物”是指抗体或其抗原结合片段和下文公开的其它分子,特别是下文所述的治疗剂的嵌合分子。在缀合物中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段通过共价键或范德华力或疏水相互作用的物理力、包封、包埋或上述组合与其它分子物理连接。在根据一个实施方式的缀合物中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以通过肽接头连接。

[0079] 本发明的另一个实施方式可以是双特异性抗体,其包括特异性识别能够与药物缀合的半抗原的抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段。抗体的抗原结合片段是指具有至少一个CDR的抗体片段,可以是scFv、(scFv)₂、scFv-Fc、Fab、Fab'和F(ab')₂。在本发明中,“多特异性抗原结合蛋白”或“多特异性抗体”靶向两个以上抗原或表位,并包括两个以上抗原结合位点。在本发明中,“双特异性”或“双重特异性”抗原结合蛋白或抗体是具有两个不同抗原结合位点的杂合抗原结合蛋白或抗体。这样的双特异性抗体是一种多特异性抗原结合蛋

白或多特异性抗体,并且可以通过各种已知方法制备,例如融合杂交瘤或连接Fab'片段。

[0080] 在根据本发明的药物递送系统包括半抗原识别抗体或其抗原结合片段的情况下,药物可结合半抗原,然后通过半抗原结合抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段,从而靶向细胞。递送至靶细胞的药物可以是用于预防、改善或治疗PDGF或PDGF受体相关疾病、例如新生血管疾病的药物。

[0081] 本发明的一个实施方式是用于预防、改善或治疗新生血管性疾病的药物组合物,其包含其中药物与抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段缀合的抗体-药物缀合物,或其中药物通过半抗原与抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段缀合的抗体-药物缀合物。

[0082] 本发明的一个实施方式涉及治疗被诊断为患有新生血管性疾病或具有发生新生血管性疾病的风险的受试者的方法,其包括以足以预防、改善或治疗受试者中的疾病的量向受试者施用作为第一治疗剂或辅助治疗剂的其中药物与抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段缀合的抗体-药物缀合物、或其中药物经由半抗原与抗PDGF受体的抗体或其抗原结合片段缀合的抗体-药物缀合物的步骤。

[0083] 在另一个实施方式中,本发明的药物组合物提供预防、改善、抑制或治疗眼新生血管性疾病的手段。

[0084] 可被本发明的药物组合物治疗或抑制的眼新生血管性疾病包括局部缺血性视网膜病、虹膜新生血管形成、眼内新生血管形成、老年性年龄相关性黄斑变性、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性视网膜缺血或增殖性糖尿病性视网膜病。

[0085] 具体地,具有氧诱导性视网膜疾病的动物模型是早产儿视网膜病的动物模型(A. Hellström, LE Smith, D. Dammann, Retinopathy of prematurity, Lancet. 382(2013) 1445-57)。具有激光诱导性脉络膜新生血管形成的动物模型是湿型老年性黄斑变性的动物模型(V. Lambert, J. Lecomte, S. Hansen, S. Blacher, ML. Gonzalez, et al, Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice, Nat Protoc. 8(2013) 2197-211)。它们都是由血管生成的重要机制引起的疾病。与增殖性糖尿病性视网膜病类似,其也可以用作疾病如增殖性糖尿病性视网膜病的治疗剂,其中血管生成是重要的机制(Y. Qazi, Mediators of ocular angiogenesis, J. Genet. 88(2009) 495-515)。

[0086] 在另一个实施方式中,本发明的药物组合物提供预防、改善、抑制或治疗新生血管性疾病如癌症或肿瘤的方法。癌症是具有PDGFR- β 方面问题的癌症,包括成视网膜细胞瘤、神经胶质瘤、睾丸癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌和前列腺癌,但不限于此。

[0087] 此外,具有在表达mPDGFRb的NIH3T3和表达hPDGFR- β 的人周细胞中显示细胞毒性的PDGFR- β 问题的疾病包括成视网膜细胞瘤(ZK Goldsmith等, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 59(2018) 4486-4495)、神经胶质瘤(I. Nazarenko等, J. Med. Sci. 117(2012) 99-112)、结直肠癌(S. Fujino等, Oncol. Rep. 39(2018) 2178-2184)、睾丸癌(S. Basciani等, Endocrinology. 149(2008) 6226-35)、乳腺癌(J. Paulsson等, J. Pathol Clin. Res. 3(2017) 38-43)、卵巢癌(S. Avril等, Oncotarget. 8(2017) 97851-97861)、黑素瘤、肺癌和前列腺癌(M. Raica等, Pharmaceuticals (Basels). 3(2010) 572-599)等。

[0088] 如本文所用,术语“血管生成”和“新血管形成”可互换使用。血管生成和新血管形成是指新血管向细胞、组织或器官的发育。血管生成的调节通常在某些疾病状态中改变,并且在许多情况下,与该疾病相关的病理性损伤与改变的、未调节的或未控制的血管生成相关。持续的、不受调节的血管生成发生在许多疾病状态中,包括那些以内皮细胞异常生长为特征的疾病状态,并且支持在这些病症中观察到的病理损伤,包括血管渗漏和渗透性。

[0089] 在本说明书中,“眼新生血管性疾病”或“眼部新生血管性疾病”是指特征在于受试者眼中未改变或控制的新血管形成的疾病。示例性眼新生血管性疾病包括缺血性视网膜病、虹膜血管生成、眼内血管生成、老年黄斑变性、角膜血管生成、视网膜血管生成、脉络膜血管生成、糖尿病性视网膜缺血、增殖性糖尿病性视网膜病等。

[0090] 如本文所用,“PDGF”或“血小板衍生生长因子”是指影响新血管形成或血管生成过程的哺乳动物血小板衍生生长因子。如本文所用,术语“PDGF”通常指一类生长因子,其通过血小板衍生生长因子细胞表面受体(即PDGF受体)与反应性细胞类型的结合和活化诱导DNA合成和有丝分裂。

[0091] 在本发明中,观察到针对血小板衍生生长因子受体 β (mPDGFR- β)- κ 恒定区(C κ)-scFv融合蛋白的抗体的单链可变片段(scFv)和可替宁-倍癌霉素形成抗体-药物缀合物复合物,以诱导针对表达PDGFR- β 的细胞的细胞毒性。通过制备双特异性scFv-C κ -scFv融合蛋白形式的许多抗-mPDGFR- β 抗体候选物并测试它们递送结合可替宁的细胞毒性药物的能力,证明了抗体-药物缀合物制备中的抗体选择的改进方法。

[0092] 本发明的一个实施方式涉及使用半抗原-药物缀合物和双特异性抗体选择将药物有效地递送到靶细胞中的抗体的方法。

[0093] 本发明的另一个实施方式涉及包含所选抗体和药物的药物-抗体缀合物,或包含所选抗体和药物-半抗原的复合物。

[0094] 本发明方法中使用的半抗原-药物缀合物是指其中待递送至靶细胞的靶药物与半抗原连接的缀合物。半抗原(hapten)是一种不是在体内天然存在的物质,其阻止与细胞结合,在体内不进行从头生物合成,不引起生理活性,并具有与待缀合的物质有效结合的化学官能团。对本发明中使用的半抗原没有特别的限制,例如可以选自可替宁、小分子量有机分子(例如,DNP(2,4-二硝基苯酚)、TNP(2,4,6-三硝基苯酚))、生物素和地高辛。

[0095] 作为半抗原的一个实例,可替宁是用于这个平台的理想半抗原,因为它是尼古丁的主要代谢产物,具有外源性、无毒性 and 生理惰性。反式-4-可替宁羧酸可以结合几种物质。可替宁-药物缀合物可以容易地合成,具有比现有的抗体-药物缀合物更高的纯度,并且可以合成为具有各种药物和接头的可替宁-药物缀合物。此外,由于药物不直接与抗体缀合,因此它不影响抗体的亲和性和稳定性。通过简单地使双特异性抗体与可替宁-药物缀合物反应来制备抗体-药物缀合物。

[0096] 可应用于本发明的药物是使用抗体递送至靶标的物质,并且没有特别限制,但是例如包括DNA合成抑制剂(例如,卡奇霉素、吡咯并苯并二氮草(PBD)、倍癌霉素衍生物、蒽环霉素/奈莫柔比星、阿霉素、伊立替康、鹅膏毒素)、微管抑制剂(例如,瑞奥西汀、美登素、微管蛋白溶素(tubulysin))、拓扑异构酶抑制剂(SN-38)、光敏剂(例如,5-氨基酮戊酸(ALA)、苯并卟啉衍生物单酸环A(BPD-MA)、二氢卟吩、四(间-羟基苯基)二氢卟吩(mTHPC)、德克萨卟啉(Lutetium texaphyrin))等。光敏剂单独不发挥其功效,但它被局部或全身递送至

靶细胞或组织或被递送,并通过将激光照射至特定区域,例如病变部位如眼球或眼睛来活化递送的药物,从而发挥药物的功效。因此,光敏剂可以与抗体缀合并施用于有需要的受试者,然后可以另外进行通过照射激光发挥药效的步骤。

[0097] 本发明的方法可以使用双特异性抗体,其特异性结合药物所递送至的靶组织或细胞中存在的靶抗原,并且还可以特异性结合半抗原-药物缀合物中包含的半抗原。例如,适用于本发明的双特异性抗体可以具有第一抗体-接头-第二抗体的结构,其中第一抗体和第二抗体分别是特异性结合半抗原或靶抗原的抗体。具有第一抗体-接头-第二抗体结构的双特异性抗体可以是第一抗体(scFv)-C κ (κ 恒定区)-第二抗体(scFv)的融合蛋白。例如,其可以从N-末端开始以VH-GQSSRSSGGGSSGGGGS-VL的顺序连接,并且接头将VH的C-末端连接到VL的N-末端。其可以是(抗PDGFR- β 抗体的ScFv)-(GGGGS)₃-C κ -(GGGGS)₃-(抗可替宁抗体的scFv)的结构。可应用于本发明的可替宁的氨基酸序列或核苷酸序列是本领域公知的,例如,参考US8008448B。

[0098] 在本发明的一个实施方式中,当靶抗原是血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR- β)且半抗原是可替宁时,双特异性抗体可以是其中针对靶抗原的抗体(抗PDGFR- β 抗体)和针对半抗原的抗体(抗半抗原抗体)用接头连接的抗体,且具体地是具有第一抗体(抗PDGFR- β 抗体的scFv)-C κ -第二抗体(抗半抗原抗体的scFv)的结构的融合蛋白。

[0099] 本发明人使用(抗人血小板衍生生长因子受体 β (hPDGFR β))的scFv x C κ x(抗可替宁抗体的scFv)的双特异性抗体融合蛋白测试了该平台的可行性,本发明人构建了单价或二价可替宁-倍癌霉素,其被称为可替宁-倍癌霉素(cot-duo)或可替宁-倍癌霉素-可替宁(cot-duo-cot)(图1b)。本发明表明,与常规平台相比,该平台可用于筛选用于开发抗体-药物缀合物的抗体和药物的最佳组合。

[0100] 包括双特异性抗体(例如,抗PDGFR β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白)和半抗原-药物缀合物(例如,可替宁缀合的倍癌霉素)的复合物在表达靶抗原(例如,mPDGFR- β)的NIH3T3细胞系中显示特异性细胞毒性。本发明可用于在抗体-药物缀合物的开发中选择内化抗体和药物的组合。例如,四个抗体克隆以剂量依赖性方式结合底部包被的mPDGFR- β (图3a),而它们对阴性对照-人Fc蛋白没有反应性。本发明人确认了单个克隆与表达mPDGR β 的NIH3T3细胞系的结合活性,并用流式细胞仪发现生物素-mPDGF-BB与细胞结合(图4b)。

[0101] 根据本发明的针对三种类型的小鼠抗原的抗体克隆(PRb-CC01、PRb-CC02和PRb-CC03)可通过与作为mPDGFR- β 配体的mPDGF-BB竞争而结合mPDGFR- β 的结构域2或3。一个抗体克隆(PRb-CN01)可结合结构域1、4或5而不是结构域2和3,因为它不与mPDGF-BB竞争。PRb-CC01、PRb-CC02和PRb-CC03与mPDGFR- β 的结合能力被mPDGF-BB抑制(图4a),但PRb-CN01的结合能力不被mPDGF-BB抑制。在表达mPDGFR- β 的NIH3T3细胞中存在mPDGF-BB时,本发明人利用流式细胞术测定了各克隆的细胞结合能力。本发明人发现scFv-C κ -scFv融合蛋白和生物素-mPDGF-BB的双特异性抗体与细胞结合。与竞争酶免疫分析的结果类似,在mPDGF-BB-生物素存在下,只有PRb-CN01能够结合mPDGFR- β (图4b),而其它三个克隆的结合能力被mPDGF-BB阻断。

[0102] 当本发明的抗体以scFv-C κ -scFv的双特异性抗体的形式表达时,双特异性抗体能够结合mPDGFR- β 和可替宁。此外,双特异性抗体可以与几种可替宁药物缀合,例如可替宁-倍癌霉素(cot-duo)和可替宁-倍癌霉素-可替宁(cot-duo-cot)。当用复合物如cot-duo和

cot-duo-cot进行毒性试验时,复合物是有毒性的。scFv-C κ -scFv融合蛋白的四种双特异性抗体(PRb-CC01、PRb-CN01、PRb-CC02、PRb-CC03)能够同时结合mPDGFR- β 和可替宁,这与对照双特异性抗体不同(图3d)。

[0103] 为了评价scFv-C κ -scFv和可替宁-倍癌霉素缀合物的四种双特异性抗体的毒性,在有或没有mPDGF-BB的两种条件下将NIH3T3细胞与缀合物一起培养,并使用细胞内三磷酸腺苷(ATP)测试相对细胞活力。添加mPDGF-BB时PRb-CN01和cot-duo复合物或PRb-CN01和cot-duo-cot复合物的毒性也高,但添加mPDGF-BB时与mPDGF-BB和cot-duo复合物或cot-duo-cot复合物竞争的融合蛋白(PRb-CC01、PRb-CC02、PRb-CC03)的毒性水平降低(图5)。

[0104] 在本发明中,分别制备scFv-C κ -scFv双特异性抗体融合蛋白和可替宁-倍癌霉素(cot-duo)(图1b),然后制备双特异性抗体scFv-C κ -scFv和可替宁-倍癌霉素的缀合物并进行毒性试验。结果,它们在表达hPDGFR- β 的人周细胞中显示出特有的毒性。本发明的结果表明,与常规平台相比,可以选择最佳的抗体和药物组合以用于开发抗体-药物缀合物。

[0105] 例如,显示了与根据本发明的靶抗原的实例的hPDGFR- β 结合的三个抗体克隆以浓度依赖性方式与hPDGFR- β 结合。三种融合蛋白浓度依赖性地结合包被在底部的hPDGFR- β (图12a),而阴性对照不结合包被的人Fc蛋白(图12b)。在本发明中,使用流式细胞仪分析确认了在hPDGF-BB的存在下各克隆与表达hPDGFR- β 的人周细胞结合的能力,从而产生与细胞结合的生物素-hPDGF-BB(图13b)。

[0106] 根据本发明的三种类型的针对hPDGFR- β 的抗体克隆(PRb-CN16、PRb-CN32、PRb-CN26)不与hPDGFR- β 配体的hPDGF-BB竞争,因此预期结合结构域1、4或5而不是结构域2和3。PRb-CN16、PRb-CN32和PRb-CN26与hPDGFR- β 的结合能力不受hPDGF-BB的抑制(图13a)。

[0107] 在本发明中,当表达hPDGFR- β 的人周细胞中存在hPDGF-BB时,使用流式细胞术测量每个克隆的细胞结合能力。确认了scFv-C κ -scFv融合蛋白的双特异性抗体和生物素-hPDGF-BB结合。与竞争酶免疫分析方法的结果类似,在hPDGF-BB-生物素的存在下,三种抗体克隆(PRb-CN16、PRb-CN32、PRb-CN26)能够结合hPDGFR- β (图13b)。当本发明的抗靶抗原的抗体以scFv-C κ -scFv的双特异性抗体的形式表达时,双特异性抗体可以与靶抗原和半抗原结合。此外,双特异性抗体可以与几种可替宁-药物缀合物例如可替宁-倍癌霉素(cot-duo)复合。当用缀合物如cot-duo进行毒性试验时,复合物是有毒的。

[0108] 不同于对照双特异性抗体,根据本发明的三种针对人PDGFR- β 的scFv-C κ -scFv融合蛋白的双特异性抗体(PRb-CN16、PRb-CN32、PRb-CN26)能够同时结合hPDGFR- β 和可替宁(图12d)。为了评价scFv-C κ -scFv的双特异性抗体和通过使用三种类型的hPDGFR- β 抗体制备的可替宁-倍癌霉素缀合物的毒性,在有或没有hPDGF-BB的两种不同条件下,将人周细胞与所述缀合物一起培养,并用细胞内三磷酸腺苷(ATP)测量相对细胞活力。由PRb-CN16、PRb-CN32、PRb-CN26的抗-hPDGFR- β 抗体和cot-duo组成的复合物的毒性在加入hPDGF-BB时也很高(图14a和14b)。

[0109] 本发明人测试了用于开发由双特异性scFv-C κ -scFv融合蛋白和可替宁-细胞毒性药物组成的抗体-药物缀合物的新平台,其简化了为最佳抗体-药物缀合物选择抗体和药物的工艺。理想地,选择确保有效内化和细胞毒性药物释放的抗体是实用的。然而,由于使用候选抗体生产单个特异性抗体-药物缀合物分子需要相当多的工作来优化和表征,包括DAR(药物-抗体比率),所以已经基于在初始筛选步骤中内化的速度和效率来筛选抗体。此外,

由于更好地理解抗体-药物缀合物作用于细胞的过程,可以看出抗体的内化不是决定抗体-药物缀合物的功效的唯一因素。

[0110] 可替宁是无毒的,在大鼠中具有 $4 \pm 0.1 \text{ g/kg}$ 的 LD_{50} 值。此外,在用至多 $1,800 \text{ mg}$ 可替宁连续4天治疗的人中没有诱导不利的副作用。本发明人已经观察到游离倍癌霉素和可替宁-倍癌霉素缀合物在离体环境中的细胞毒性之间存在轻微差异。scFv-C κ -scFv融合蛋白的抗HER2抗体x可替宁与可替宁-倍癌霉素缀合物之间复合物的形成降低了倍癌霉素在离体环境中的毒性。这意味着双特异性抗体与药物形成复合物并减少药物吸收进入细胞。在常规研究中,据报道倍癌霉素在小鼠中诱导显著的体重减轻。然而,使用本发明四价双特异性抗体的体内实验中,注射了与阴性对照IgG混合的可替宁-倍癌霉素缀合物的小鼠中没有显著的体重减轻。这一事实开辟了可在可替宁和毒性药物(倍癌霉素)之间引入各种类型的接头,以及仅在肿瘤环境(如金属蛋白酶)中从可替宁释放毒素的可能性。因为可替宁-药物缀合物在肿瘤环境中释放而不降解,所以其将从血流中快速移除而不损伤正常细胞。

[0111] 即使在加入mPDGF-BB后,与cot-duo或cot-duo-cot复合的含PRb-CN01的双特异性抗体的细胞毒性仍然很高,但是加入促进细胞增殖的mPDGF-BB,与cot-duo或cot-duo-cot复合的三种抗体(PRb-CC01、PRb-CC02和PRb-CC03)(其与mPDGF-BB竞争)的毒性略微降低。mPDGF-BB通过与已经结合PRb-CN01的PDGFR- β 结合可增强受体的内化,从而促进了cot-duo和cot-duo-cot的细胞毒性作用。在本发明中,PRb-CN01构建体不与PDGF-BB竞争,不依赖于PDGF-BB地诱导细胞毒性(图5a-5d)。PDGFR- β 与血管生成高度相关,并且主要在周细胞中过表达。

[0112] 本发明的效果

[0113] 在本发明的抗PDGF受体的抗体、其中化学治疗剂与抗体缀合的抗体-药物缀合物以及使用它们预防或治疗眼新生血管性疾病的用途中,抗PDGF受体的抗体特异性地在一定浓度下对表达大量hPDGFR- β 的病理细胞或组织显示出更高的毒性,同时使对正常细胞或正常组织的毒性降至最低,从而可用作优良的治疗剂。另外,所述抗PDGF受体的抗体的优点在于,即使PDGFR- β 和/或PDGF-BB的表达量增加,抗体的内化水平也不被抑制或内化水平增加。

附图说明

[0114] 图1a和图1b是显示根据本发明的实例的与抗-mPDGFR- β 抗体和可替宁-倍癌霉素相关的双特异性抗体的图。

[0115] 图2显示了根据本发明的实例的与抗-mPDGFR- β 抗体相关的双特异性抗体的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果。泳道1,还原PRb-CC03 x可替宁;泳道2,非还原PRb-CC03 x可替宁;泳道3,还原PRb-CC01 x可替宁;泳道4,非还原PRb-CC01x可替宁;泳道5,还原PRb-CN01 x可替宁;泳道6,非还原PRb-CN01 x可替宁;泳道7,还原PRb-CC02 x可替宁;泳道8,非还原PRb-CC02 x可替宁;泳道9,还原抗HER2 x可替宁(对照);泳道10,非还原抗HER2 x可替宁(对照)。M:分子量标志物。

[0116] 图3a是显示了根据本发明的一个实施方式的与抗-mPDGFR- β 抗体相关的双特异性抗体的结合能力,其中双特异性抗体PRb-CC01(●)、PRb-CN01(■)、PRb-CC02(▲)、PRb-CC03(▼)和阴性对照(◆)在包被有mPDGFR- β 嵌合体的平板上温育。每个孔与HRP-抗人C κ 抗

体和TMB反应。结果显示重复实验的平均值±标准误差。图3b显示了TNF- α 受体胞外区-人Fc融合蛋白,其用作酶免疫测定的阴性对照抗原。在图3c中,为了确保双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白与可替宁的结合能力,将双特异性抗体scFv-C κ -scFv与包被有可替宁-BSA的平板反应,并与HRP-抗人C κ 抗体和TMB反应。在图3d中,为了确认双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白与可替宁和mPDGFR- β 的同时结合能力,将mPDGFR- β -Fc嵌合体与包被有可替宁-BSA的平板反应,并处理HRP-抗人Fc抗体和TMB。结果显示三次重复实验的平均值±标准误差。将*** $p < 0.001$ 与对照组进行比较。

[0117] 图4a-4c是确认PDGF-BB和与抗-mPDGFR- β 抗体相关的双特异性抗体的竞争和细胞内内化作用的图。在图4a中,PDGFR- β -Fc嵌合体包被的平板与scFv-C κ -scFv在不存在(左)或存在(右)mPDGF-BB(100nM)的情况下反应,然后通过HRP-抗人C κ 抗体和TMB测定结合的双特异性抗体融合蛋白。在图4b中,将流式细胞术缓冲液中的双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白(100nM)与表达mPDGFR- β 的NIH3T3细胞在使用或不使用mPDGF-BB-生物素的情况下反应。用APC-抗人C κ 抗体和链霉亲和素-PE处理细胞。双特异性抗体抗HER2 x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白用作阴性对照。用共聚焦显微镜观察双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白的内化。NIH3T3细胞用融合蛋白处理后,除去结合在细胞表面的抗体。细胞固定后,用FITC-抗人C κ 抗体(绿色)对融合蛋白进行染色。为了对早期核内体成像,用抗-Rab5抗体和Alexa Fluor 546-山羊抗-兔抗体IgG(红色)对细胞染色。箭头所示部分显示了放大部分,其中抗PDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白和初始核内体的荧光共定位。用DAPI(蓝色)(标尺条,10 μ m)染色DNA。

[0118] 图5a至图5d是确认针对抗-mPDGFR- β 和可替宁-倍癌霉素复合物的双特异性抗体对表达PDGFR- β 的细胞毒性能力的图。图5a显示在没有mPDGF-BB的情况下用双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白和的cot-duo复合物处理NIH3T3细胞。测量细胞ATP以评估相对细胞活力。双特异性抗体抗-HER2 x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白用作阴性对照。在图5b中,在存在mPDGF-BB的情况下重复该实验。在图5c中,在没有mPDGF-BB的情况下用双特异性抗体和cot-duo-cot的复合物处理NIH3T3细胞。在图5d中,在存在mPDGF-BB的情况下重复该实验。DMSO用作cot-duo和cot-duo-cot的载体对照。结果显示三次重复实验的平均值±标准误差。

[0119] 图6是显示用流式细胞仪测定本发明的与抗-mPDGFR- β 抗体相关的双特异性抗体与不表达PDGFR- β 的MOLT-4细胞的结合能力的实验结果的图。用双特异性抗体(100nM)处理MOLT-4细胞,并用APC-抗人C κ 抗体(克隆TB28-2,BD Biosciences, San Jose, CA, 美国)染色。

[0120] 图7是确认与抗-mPDGFR- β 抗体和cot-duo复合物相关的双特异性抗体在不表达PDGFR- β 的细胞中的细胞毒性能力的图。在图7a中,MOLT-4细胞与双特异性抗体和cot-duo复合物(DAR4)反应。测量细胞ATP以评价相对细胞活力。在图7b中,使MOLT-4细胞与双特异性抗体和cot-duo复合物(DAR2)反应。将双特异性抗体抗HER2 x可替宁scFv-C κ -scFv用作阴性对照。DMSO被用作cot-duo的载体对照。结果显示了三个重复实验的平均值±标准误差。

[0121] 图8显示了含有本发明的抗-mPDGFR- β 抗体的双特异性抗体的尺寸排阻色谱结果。使用配备有Sepax SRT-C SEC-300柱的Dionex Tentacel 3000,用尺寸排阻色谱-HPLC分析根

据本发明的双特异性抗体、双特异性抗体和cot-duo的复合物、双特异性抗体和cot-duo-cot的复合物。PBS用作流动相,流动溶剂以1mL/min洗脱15分钟。将紫外检测器调节至254nm,并通过mAU监测结果。HMW是高分子量物质。

[0122] 图9是显示与本发明的抗-mPDGFR- β 抗体和cot-duo复合物相关的双特异性抗体在氧诱导的视网膜疾病动物模型中抑制血管生成的结果。

[0123] 图10显示与本发明的抗-mPDGFR- β 抗体和cot-duo复合物相关的双特异性抗体在激光诱导的脉络膜新生血管动物模型中抑制血管生成。

[0124] 图11是作为与本发明的抗hPDGFR- β 抗体相关的双特异性抗体的可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果:泳道1,还原PRb-CN16 x可替宁;泳道2,非还原PRb-CN16 x可替宁;泳道3,还原PRb-CN26 x可替宁;泳道4,非还原PRb-CN26 x可替宁;泳道5,还原PRb-CN32 x可替宁;泳道6,非还原PRb-CN32 x可替宁;泳道7,还原抗-mCD154 x可替宁(对照);泳道8,非还原抗-mCD154 x可替宁(对照);M,分子量标志物。

[0125] 在图12a中,scFv-C κ -scFv融合蛋白的双特异性抗体如PRb-CN16 (●)、PRb-CN32 (■)和PRb-CN26 (▲)和阴性对照(◆)以及可替宁scFv-C κ -ScFv融合蛋白以各种浓度在hPDGFR β 嵌合体包被的微量滴定板上反应。图12b是HRP-抗人C κ 抗体与TMB在各孔中反应的结果,其中结果显示为重复实验的平均值 $\pm$ 标准误差。在图12c中,TNF- α 受体胞外结构域-人Fc融合蛋白在酶免疫测定中用作阴性对照抗原。在图12d中,为了确认根据本发明的与抗hPDGFR- β 抗体相关的双特异性抗体的结合能力,将双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白在包被有可替宁-BSA的平板上培养,并用HRP-缀合的抗人C κ 抗体和TMB处理。为了确认双特异性scFv-C κ -scFv融合蛋白与可替宁和hPDGFR β 的同时结合,在包被有可替宁-BSA的微量滴定孔上培养hPDGFR β -Fc嵌合体,并用HRP-缀合的抗人Fc抗体和TMB处理。结果显示为三次实验的平均值 $\pm$ SD。将***p<0.001与对照进行比较。

[0126] 图13a至图13d是确认本发明的与抗-hPDGFR β 相关的双特异性抗体与PDGF-BB的竞争和细胞内化的图。在图13a中,将双特异性scFv-C κ -scFv融合蛋白在不含(左)或含(右)hPDGF-BB(100nM)的hPDGFR β -Fc嵌合体包被的微量滴定板上温育,并使用HRP缀合的抗人C κ 抗体和TMB确定结合的双特异性抗体融合蛋白的量。在图13b中,在没有或有hPDGF-BB-生物素的流式细胞术测定缓冲液中,用双特异性scFv-C κ -scFv融合蛋白(100nM)处理表达hPDGFR- β 的人周细胞。用APC缀合的抗人C κ 抗体和链霉亲和素-PE探测细胞。双特异性抗mCD154 x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白用作阴性对照。在图13c中,共聚焦显微镜观察到双特异性scFv-C κ -scFv融合蛋白的内化。在人周细胞与融合蛋白温育后,除去表面结合的抗体。细胞固定后,用FITC-缀合的抗人C κ 抗体(绿色)对融合蛋白进行染色。为了对早期核内体成像,将细胞与抗-Rab5抗体和Alexa Fluor 546缀合的山羊抗-兔IgG(红色)一起温育。所示部分显示了放大部分,其显示了抗hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白和早期核内体的共定位。用DAPI(蓝色)染色DNA。在初始捕获之后合并图像。比例尺,10 μ m。图3d显示了加入hPDGF-BB的重复测定。

[0127] 图14a和图14b是显示与cot-duo复合的根据本发明的与抗-hPDGFR β 抗体相关的双特异性抗体在表达PDGFR β 的细胞上的细胞毒性测定的图。在图14a中,用双特异性scFv-C κ -scFv融合蛋白和cot-duo复合物处理人周细胞。在图14b中,加入hPDGF-BB重复该测定。测量细胞ATP水平以确定相对细胞活力。双特异性抗mCD154 x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白用

作阴性对照。DMSO用作cot-duo复的载体对照。结果显示为三次重复实验的平均值 $\pm$ SD。

[0128] 图15是显示对与抗-hPDGFR- β 抗体反应的双特异性抗体对不表达hPDGFR- β 的细胞的反应性的流式细胞术分析的图。将A-431细胞与双特异性抗-hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白(100nM)一起温育,并用APC-缀合的抗人C κ 抗体(克隆TB28-2, BD Biosciences, San Jose, CA, 美国)探测。

[0129] 图16是显示与复合有cot-duo复合物的抗-hPDGFR- β 抗体相关的双特异性抗体对不表达hPDGFR- β 的细胞的细胞毒性测定的图。用抗hPDGFR- β x可替宁融合蛋白和cot-duo (DAR4)处理A-431细胞。测量细胞ATP水平以确定相对细胞活力。双特异性抗mCD154 x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白用作阴性对照。DMSO用作cot-duo的载体对照。结果显示为从三次重复实验获得的平均值 $\pm$ SD。

[0130] 图17是显示与抗hPDGFR- β 抗体相关的双特异性抗体的跨物种试验的图。将hPDGFR- β 、mPDGFR- β 、恒河猴PDGFR β 、食蟹猴PDGFR β 、野猪PDGFR β 和对照Fc包被的微量滴定板与含有抗hPDGFR β 抗体(100nM)的双特异性抗体一起温育,并使用HRP缀合的抗人C κ 抗体和TMB确定结合的双特异性融合蛋白的量。

[0131] 图18显示在流式细胞术缓冲液中的双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白(100nM)在表达mPDGFR- β 的NIH3T3细胞上温育。用APC-抗人C κ 抗体处理细胞。双特异性抗体抗HER2 x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白用作阴性对照。

[0132] 图19a-19b是确认PRb-CN01替代抗体竞争的结果。在图19a中,在3%BSA/PBS中稀释的各种浓度的PRb-CN01-兔Fc(0.01nM-1 μ M)、PRb-CN01、抗HER2对照抗体和PRb-CN32双特异性抗体scFv-C κ -scFv(100nM),在包被mPDGFR- β -hFc嵌合蛋白的平板上反应,并在37 $^{\circ}$ C下在各孔中反应2小时。然后,用HRP-抗兔Fc抗体和ABTS测定结合的PRb-CN01-兔Fc蛋白。在图19b中,表达mPDGFR- β 的NIH3T3细胞与PRb-CN01-兔Fc(50nM)和PRb-CN01(对照抗体)以及PRb-CN32双特异性抗体scFv-C κ -scFv(1 μ M)反应。将细胞与FITC-抗兔Fc抗体一起温育。双特异性抗体抗HER2 x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白用作阴性对照。

[0133] 图20a-20b是确认PRb-CN01和PRb-CN32双特异性抗体和可替宁-倍癌霉素复合物在表达PDGFR- β 的细胞中的细胞毒性活性差异的图。在图20a中,用双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白和不含mPDGF-BB的cot-duo复合物处理NIH3T3细胞。测量细胞ATP以评估相对细胞活力。双特异性抗体抗HER2 x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白用作阴性对照。在图20b中,在mPDGF-BB存在的情况下重复该实验。

具体实施方式

[0134] 将参考以下实施例更详细地描述本发明,但本发明的范围不旨在限于以下实施例。

[0135] 实施例1.mPDGFR- β 和C κ 融合蛋白的表达和纯化

[0136] mPDGFR- β 的胞外区是具有下表中SEQ ID NO:60的氨基酸序列的肽,并且制备了编码其的核苷酸序列,并且通过在核苷酸末端添加SfiI内切核酸酶识别位点(GenScript Biotech, 中国江苏)来化学合成。用SfiI酶消化并克隆到pCEP4载体中以制备重组pCEP4表达载体,其通过先前报道的方法表达[Y.Lee, H.Kim等, Exp.Mol.Med.46(2014) e114]。

[0137] [表3]

[0138]

名称	氨基酸序列	SEQ ID NO
hPDGFR-β	MRLPGAMPALALKGELLLLSLLLLLEPQISQGLVVT PPGPELVLVNSSTFVLTCSGSAPVWVERMSQEPPQE MAKAQDGTFFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNDSRG LETDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEI TIPCRVTDQPQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFS GIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINV SVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWTPR KESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILHIPSAELEDST YTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLLEGEVG TLQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTL DSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTIVRVKVAEAGH YTMRAFHEDA EVQLSFQLQINVPVRVLELSESHPD SGEQTIVRCRGRGMPQPNIIWSACRDLKRCPRELPPT LLGNSSEEEESQLETNVTYWEEEQEFVVSTLRLQH VDRPLSVRCTLRNAVGQDTQEVIVVPHSLPFK	60
mPDGFR-β	LVITPPGPEFVLNISSTFVLTCSGSAPVMWEQMSQV PWQEAAMNQDGTFFSVLTLTNVTGGDTGEYFCVY NNSLGPELSEKRIYIFVPDPTMGFLPMDSEDLFIFV TDVTETTIPCRVTDQPQLEVTLEKKVDIPLHVPYDH QRGFTGTFFEDKTYICKTTIGDREVDSDTYVYSLQ VSSINVSNAVQTVVRQGESITIRCIVMGNDVVNFQ	61

	WTYPRMKSGRLVEPVTDYLFQVPSRIGSILHIPTAE LSDSGTYTCNVSVSVNDHGDEKAINISVIENGYVRL LETLGDVEIAELHRSRTL RVVFEAYPMPSVLWLKD NRTLGD SGAGELVLSTRNMSETRYVSELILVRVKV SEAGYYTMRAFHEDEDEVQLSFQKLQVNPVRVLEL SESH PANGEQTIRCRGRGMPQPNVTWSTCRDLKRC PRKLSPTPLGNSSKEESQLETNVTFWEEDQEYEVVS TLRLRHVDQPLSVRCMLQNSMGGDSQEVTVPVPHS LPFK	
[0139]	食 蟹 猴 PDGFR-β MRLPGAMPALALKGQLLLLPLLLLLEPQVSQGLVI TPPGPELILNVSTFVLTCSGSAPVVWERMSQELPQ EMAKAQDN TFSSVLTLTNLTGLDTGEYFCTYNSR GLEPDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITE ITIPCRVTD PQLVVTLHEKKGDIALPVPYDHQRGFS GIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINV SVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFWEWMP RKESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILHIPS AELEDSG TYTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRL LGEV GALQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTL GDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAG HYTMRAFHEDAEVQLSFQLQINVPVRVLELSESH DSGEQTVRCRGRGMPQPNIIWSACRDLKRCPRELP PMLLGNSSEEEESQLETNVTYWEEEQEFEEVSTLRL QHVDRLPSVRCTLRNAVQGDMQEVIVVPHSLPFK	62
	野 猪 PDGFR-β MQLPRAVPASVLIGQVLLPLLLLGPQASWGLVIT PPGPELVNLSTFVLTCSGPAPVVWERMSQKPPQE MTGTQDGT FSSVLTLANVTGLDTGEYFCTYKGS PG LEASERKRLYIFVPDPAVGFLPVDPEELFIFLTEITET TIPCRVTD PRLVVTLHEKKVDVPLPISYDHQRGFSG TFEDKTYVCKTTIGDREVDSDAYYVYSLQVSSINV SVGAVQTVVRQGENITVMCIVTGNEVVNFWEWTP RLETGRLVEPVTDFLFEMPHIRSILHIPS AELEDSGT YICNVSESVDHRDEKAINVTVVESGYVRLIGELDA VQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTVIWFKDNRTLGD SGAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAGRY TMRAFHEDAEAQISFQLQVNPVRVLELSESH PAS GEQTVRCRGRGMPQPHLTWSTCSDLKRCPRELPPT PLGNSSEEEESQLETNVTYWPEEQEFEEVSTLRLRR VDQPLSVRCTLHNL LGHDAQEVTVPVPHSLPFQ	63

[0140] 具体地,根据以前报道的方法[S.E.Reed等,J.Vriol.Methods.138(2006)85-98],通过使用聚乙烯亚胺(Polysciences,Warrington,PA,美国)将重组pCEP4表达载体转入人胚肾293F细胞系(Invitrogen,Carlsbad,CA,美国)。将转导的细胞培养在含有10,000IU/L青霉素和100mg/L链霉素的GIBCO Freestyle 293表达培养基中[S.Yoon等,J.Cancer.Res.Clin.Oncol.140(2014)227-33]。转导后六天,收集培养上清,并根据制造商的说明书,使用KappaSelect树脂(GE Healthcare,Buckinghamshire,英国),通过亲和层析纯化mPDGFR-β-C_κ融合蛋白。该融合蛋白中,mPDGFR-β的氨基酸序列为从mPDGFR-β的第32位残基Leu到第530位残基Lys(其对应于胞外区),且通过接头(GGGGS)₃与mPDGFR-β氨基酸序

列C端的Cκ连接。

[0141] 实施例2. 双特异性抗体(scFv-Cκ-scFv)的表达和纯化

[0142] 2-1. 组合scFv-展示噬菌体文库的制备和生物淘选

[0143] 在由免疫鸡制备的表面上从表达scFv的噬菌体文库中选择抗mPDGFR-β抗体。

[0144] 用上述实施例1中获得的mPDGFR-β-Cκ融合蛋白对鸡进行共4次免疫。在免疫之前和期间从翼静脉采集血液获得的血清用于通过使用酶免疫测定法和流式细胞术测试动物的免疫状态。第四次免疫一周后,将它们处死,收获脾、粘液囊、法氏囊和骨髓,用TRI试剂(Invitrogen)分离RNA。

[0145] 使用分离的RNA作为模板,使用Superscript® III First-Strand合成系统(Invitrogen)合成cDNA,然后根据先前报道的方法[M.S.Lee等,Hybridoma (Larchmt).27(2008)18-24]产生表达scFv的噬菌体文库。即,使用cDNA制备表达 7.5×10^8 、 6.9×10^8 、 2.1×10^9 和 2.2×10^9 scFv的四个噬菌体文库。在与mPDGFR-β-Cκ结合的磁珠上用文库进行总共五次生物淘选[Y.Lee等,Exp.Mol.Med.46(2014)e114]。

[0146] 在第5次输出滴度时,随机选择scFv克隆,并在mPDGFR-β-Cκ-包被的微量滴定板(3690;Corning Life Sciences,Corning,NY,美国)上进行噬菌体酶免疫测定[C.F.Barbas III,D.R.Burton,J.K.Scott,G.J.Silverman,Phage display-a laboratory manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York,2001]。

[0147] 对mPDGFR-β-Cκ具有结合能力的克隆(A405>1.5)要求Macrogen Inc.用OmpSeq引物进行序列分析[W.Yang等,Exp.Mol.Med.49(2017)e308]。分析氨基酸序列后,发现总共9种类型的抗体克隆(表3)。考虑到表达率和结合能力,总共选择了四个克隆(PRb-CN01、PRb-CC01、PRb-CC02、PRb-CC03),并进行随后的实验。

[0148] 下表4显示了抗mPDGFR-βscFv克隆的H-CDR3氨基酸序列。表1中显示了获得的四个克隆的VH和VL及其CDR氨基酸序列信息。

[0149] [表4]

[0150]	克隆	H-CDR3序列	SEQ ID NO
	PRb-CN01	GVGSWAHGGRIDA	3
	PRb-CC01	GGGSIDA	11
[0151]	PRb-CC02	GYAGTIDA	19
	PRb-CC03	SSYIDT	27

[0152] 2-2: 双特异性抗体(scFv-Cκ-scFv)的表达和纯化

[0153] 使用实施例1中制备的抗mPDGFR-βscFv克隆,制备pCEP4表达载体,其含有编码(抗mPDGFR-βscFv)-Cκ-(抗可替宁scFv)双特异性抗体的基因。

[0154] 制备的(抗mPDGFR-βscFv)-Cκ-(抗可替宁scFv)双特异性抗体的特异性结构及各接头的结合位置如图1a所示。具体而言,抗mPDGFR-βscFv和抗可替宁scFv分别从N端开始按照VL-GQSSRSSGGGSSGGGGS(表2中SEQ ID NO:57)-VH的顺序连接,即,VL的C端和VH的N端连接。从N端开始,使用各接头连接抗mPDGFR-βscFv、Cκ和抗可替宁scFv,连接scFv的接头是表

2中的SEQ ID NO:59的(GGGGS)₃, Ck氨基酸示于表2中的SEQ ID NO:58。

[0155] 作为制备双特异性抗体的融合蛋白的具体方法, 用SfiI、AgeI和NotI (New England Biolabs) 消化编码抗-mPDGFR-βscFv的基因和编码抗-可替宁scFv的基因, 并将其连接到表达载体上。将编码抗mPDGFR-βscFv的基因从N端到C端, 按照表1的VL-接头-VH的顺序连接, 接头是通过使用表2的SEQ ID NO:57的序列制备的肽, 从而获得编码该肽的碱基序列。基于US8008448B中描述的内容获得了编码抗可替宁scFv的基因, 并且获得的可替宁的氨基酸序列示于下表中。

[0156] [表5]

部分	氨基酸序列	SEQ ID NO
CDR1-VH	GHLRRRDWM	64
CDR2-VH	IGRSGDT	65
CDR3-VH	IPYFGWNNNGDI	66
CDR1-VL	QSSQSPYSNEWLS	67
CDR2-VL	RISTLAS	68
CDR3-VL	AGGYNFGFLFLFG	69
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGHLRRR DWMNWRVQAPGKGLEWVAAIGRSGDTYYA TWAKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRIPYFGWNNNGDIWGQGLVTVSS	70
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQSSQSPYSNE WLSWYQQKPGKAPKLLIYRISTLASGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGYNFG LFLFGQGTKVEIK	71

[0158] 将曲妥珠单抗scFv克隆到表达载体中作为抗mPDGFR-βscFv的对照。排除CκC端部分的半胱氨酸以通过二硫键除去二聚化。将得到的DNA构建体转导入HEK293F细胞后, 制作scFv-Cκ-scFv融合蛋白, 使用KappaSelect树脂通过亲和层析纯化双特异性抗体(scFv-Cκ-scFv)。

[0159] 为了确认所表达的双特异性抗体的蛋白质纯度, 使用NuPage 4-12%Bis-Tris凝胶(Invitrogen)根据制造商的说明书进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。将1μg蛋白质加入到含有或不含还原剂的LDS样品缓冲液中, 然后在95℃反应10分钟。然后, 进行电泳, 用Ezway Protein-Blue II染色溶液(Koma Biotech, Seoul, 韩国)对凝胶进行染色以使蛋白质可视化。进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(图2)。电泳结果的照片如图2所示。

[0160] 如图2所示, 通过使用还原剂还原的蛋白质为67kDa, 未还原蛋白质在60kDa染色。通过使用计算机计算的融合蛋白的分子量为66.77kDa。没有看到多聚体条带。预期未还原蛋白质比还原蛋白质移动得更快, 因为未还原蛋白质由于其致密的固有形态而对凝胶上的移动的阻力更小。

[0161] 在SEC-HPLC中(图8)(其是含有根据本发明的实施方式的针对mPDGFR-β的抗体的双特异性抗体的尺寸排阻色谱的结果), PRb-CC01、PRb-CC02和PRb-CC03都显示了单体和三聚体条带, 这与PRb-CN01不同。当它们与cot-duo形成缀合物时, 在PRb-CC01、PRb-CC02和PRb-CC03中均观察到大量高分子量物质(HMW)。在PRb-CN01的情况下, 几乎观察不到HMW。对于所有四个克隆, cot-duo-cot不产生HMW。

[0162] 实施例3. 针对mPDGFR- β 和可替宁的抗体的结合亲和力分析(酶免疫测定)

[0163] 将包含在包被缓冲液(0.1M碳酸氢钠,pH 8.6)中的100ng mPDGFR- β -Fc嵌合体或TNF- α 受体胞外结构域-人Fc融合蛋白在4°C/0/N包被在微量滴定板上。每个孔用作为封闭剂的150 μ L的3% (w/v) BSA(牛血清白蛋白)的PBS溶液在37°C封闭1小时。处理稀释在3% BSA/PBS中的不同浓度(1:500-1:62,500)的鸡血清,并在37°C温育2小时。用0.05% PBST洗涤微量滴定板3次,用辣根过氧化物酶(HRP)-抗鸡IgY抗体(Millipore,Billerica,MA,美国)处理,并在37°C温育1小时。再次用0.05% PBST洗涤微量滴定板,然后用2,2'-连氮基-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸溶液(ABTS) (Pierce,Rockford,IL,美国)培养。然后,用Multiscan Ascent微孔板仪器(Labsystems,Helsinki,Finland)在405nm处测量吸光度。

[0164] 在4°C/0/N下将在包被缓冲液中的100ng mPDGFR- β -Fc嵌合体或TNF- α 受体-人Fc融合蛋白的胞外区包被在微量滴定板上。每个孔用作为封闭剂的150 μ L的3% (w/v) BSA(牛血清白蛋白)的PBS溶液在37°C封闭1小时。用稀释在3% BSA/PBS中的各种浓度的双特异性抗体(0.06nM-1 μ M)处理后,将它们在37°C温育2小时。用PBST洗涤平板3次,并使用HRP-抗人C κ 抗体(Millipore)在37°C温育1小时。用PBST洗涤平板3次后,使3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物溶液(TMB) (GenDEPOT,Barker,TX,美国)反应。然后,用Multiscan Ascent微板装置(Labsystems)在650nm处测量吸光度。

[0165] 为了确认本发明的双特异性抗体和mPDGF-BB之间的竞争,如上所述用mPDGFR- β -Fc嵌合体包被微量滴定板,然后封闭。用各种浓度的双特异性抗体(0.06nM-1 μ M)处理微量滴定板,加入或不加入mPDGF-BB(100nM),然后在37°C温育2小时。洗涤、温育和检测以与上述酶免疫测定相同的方式进行。

[0166] 进行酶免疫测定以确认scFv-C κ -scFv融合蛋白的双特异性抗体与mPDGFR- β 和可替宁的同时结合能力。四种双特异性抗体不与对照人Fc蛋白结合(图3b),但以浓度依赖性方式与mPDGFR- β -Fc嵌合蛋白结合(图3a)。

[0167] 含有本发明的抗mPDGFR- β 抗体的双特异性抗体具有与可替宁-BSA结合的能力,但在作为对照双特异性抗体的抗HER2 x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白的情况下,未观察到结合能力(图3c)。

[0168] 为了确认双特异性抗体是否具有同时结合可替宁和mPDGFR- β 的能力,在用可替宁-BSA包被的孔中使抗-mPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白反应。对每个过程进行洗涤,并依次温育mPDGFR- β -Fc嵌合蛋白和HRP-抗人Fc抗体。与其它对照组不同,scFv-C κ -scFv的四种双特异性抗体(PRb-CC01、PRb-CN01、PRb-CC02、PRb-CC03)同时结合mPDGR- β 和可替宁(图3d)。

[0169] 开发了竞争酶免疫测定来检查mPDGF-BB对抗-mPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白的结合能力的影响。在使用或不使用mPDGF-BB的情况下,将连续稀释的双特异性抗体(抗-mPDGFR- β scFv-C κ -可替宁scFv)在用mPDGFR- β -Fc嵌合融合蛋白包被的孔上温育。温育HRP-抗人C κ 抗体,然后加入TMB。在mPDGF-BB存在下,PRb-CC01、PRb-CC02和PRb-CC03与mPDGFR- β 结合的能力被抑制(图4a)。然而,PRb-CN01的结合能力没有被抑制,因此确认PRb-CN01以与mPDGF-BB非竞争性的方式结合mPDGFR- β 。

[0170] 实施例4. 抗体的内化分析(共聚焦显微镜分析)

[0171] 用共聚焦显微镜分析scFv-C κ -scFv融合蛋白的双特异性抗体以观察内化。用稀释

在含有10%FBS的DMEM中的scFv-C κ -scFv双特异性抗体(10 μ g/mL)处理NIH3T3细胞,并在37℃内化30分钟。用冷PBS洗涤细胞3次后,在室温下处理酸性缓冲液(0.2M乙酸,0.5M氯化钠)5分钟以除去结合到细胞表面的抗体。用冷PBS洗涤细胞两次,用4%多聚甲醛固定10分钟,然后如前所述进行免疫荧光染色[J.M.Lim等,J.Cell.Biol.210(2015)23]。

[0172] 简言之,为了封闭具有非特异性反应的抗体,将细胞在含有5%马血清和0.1% Triton X-100的PBS中温育30分钟,并在室温下加入2 μ g/mL FITC-抗人C κ 抗体(TB28-2,BD Biosciences)30分钟。为了对初始核内体成像,用PBS洗涤细胞3次,用含有5%马血清和0.1% Triton X-100的PBS温育30分钟,然后用稀释至1:200的anti-Rab5抗体(C8B1,Cell Signaling Technology,Danvers,MA,美国)温育。依次处理Alexa Fluor 546山羊抗兔IgG(A-11035,Invitrogen)。用0.2 μ g/mL DAPI处理细胞以检测DNA。使用Zeiss LSM 880显微镜获得共焦显微图像,并用Zen软件(Carl Zeiss,Thornwood,NY,美国)分析图像。

[0173] 确认了三种类型的抗mPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白通过核内体内化至细胞中。

[0174] 为了测量scFv-C κ -scFv的双特异性抗体的细胞内化,将抗mPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白在NIH3T3细胞中温育,然后用FITC-抗人C κ 抗体和核内体特异性抗体处理。使用共焦显微镜对其成像。仅在用PRb-CN01、PRb-CC02和PRb-CC03培养的细胞中检测到细胞内荧光(图4c)。PRb-CC01没有内化。当将图像合并时,本发明人确认三个抗体克隆的荧光和核内体特异性抗体是共定位的。

[0175] 实施例5. 针对mPDGFR- β 和可替宁的双特异性抗体的结合能力分析(流式细胞术分析)

[0176] NIH3T3细胞与在流式细胞术缓冲液(在0.05% [w/v]叠氮化钠中的1% [w/v]BSA/PBS)中1:100稀释的鸡血清在4℃温育1小时,并用流式细胞术缓冲液洗涤两次。用Alexa Fluor 488抗鸡IgY抗体(703-545-155,Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA,美国)在流式细胞仪缓冲液中处理细胞。洗涤后,用FACS Canto II仪(BD Biosciences, San Jose, CA,美国)分类和分析。每次测量使用10,000个细胞,并通过FlowJo(Tree Star,Ashland,OR,美国)分析结果。NIH3T3细胞通过从韩国细胞系库购买制备,并在添加了10%胎牛血清(FBS;GIBCO,Grand Island,NY,美国)、1%青霉素和链霉素的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM;Welgene,Seoul,韩国)中温育[S.Park等,Exp.Mol.Med.44(2012)554-61]。

[0177] 使用生物素-xx微量蛋白标记试剂盒(Invitrogen),按照制造商的说明书,将mPDGF-BB生物素化。在有或没有mPDGF-BB-生物素(100nM)的两种不同条件下,使用scFv-C κ -scFv融合蛋白的双特异性抗体(100nM)在4℃下培养NIH3T3细胞1小时。用流式细胞术缓冲液洗涤细胞4次,并用别藻蓝蛋白(APC)-抗人C κ 抗体(克隆TB28-2;BD Biosciences, San Jose,CA,美国)和链霉亲和素-藻红蛋白(PE)(12-4317-87;eBioscience,ThermoFisher)培养。洗涤后,用FACS Canto II instrument(BD Biosciences, San Jose,CA,美国)分类和分析。每次测量使用10,000个细胞,并通过FlowJo(Tree Star,Ashland,OR,美国)分析结果。与酶免疫测定法的结果相似,当添加mPDGF-BB时,仅PRb-CN01与细胞表面存在的PDGFR- β 结合(图4B)(图4B)。其它三个克隆的结合能力被mPDGF-BB抑制。

[0178] 本发明人通过流式细胞术分析测试了scFv-C κ -scFv融合蛋白的双特异性抗体在不表达mPDGFR- β 的MOLT-4细胞中的结合能力。将MOLT-4细胞与scFv-C κ -scFv融合蛋白的双

特异性抗体 (100nM) 在4℃培养1小时。按上述方法洗涤后,用APC-抗人Cκ抗体处理进行检测。MOLT-4细胞购自韩国细胞系库,并通过在加入10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的RPMI-1640 (Welgene, Seoul, 韩国) 培养基中培养而制备。确认了PRb-CN01和scFv-Cκ-scFv融合抗体的抗HER2双特异性抗体都不与相应的细胞结合 (图6)。

[0179] 实施例6. 双特异性抗体和可替宁-倍癌毒素 (cot-duo) 的复合物形成

[0180] 6-1: 可替宁-倍癌毒素缀合物的合成

[0181] 本发明制备了与可替宁缀合的缬氨酸-瓜氨酸-PAB-倍癌毒素、缬氨酸-瓜氨酸-PAB-单甲基瑞奥西汀E (MMAE) 或缬氨酸-瓜氨酸-PAB-马来酰亚氨基甲基环己烷-1-甲酸酯 (mcc) mertansine (DM1)。在本发明中,作为DAR1和DAR4的可替宁-细胞毒性药物试验结果,证实DAR4可替宁-细胞毒性药物比DAR1更有效,还发现当与可替宁结合时倍癌毒素是最有效的。因此,在实验中使用可替宁-倍癌毒素。

[0182] 使用Pepttron (Daejeon, 韩国) 的ASP48S自动肽合成仪,通过Fmoc固相肽合成9SPSS合成反式-4-可替宁羧基-(GSK) 4肽。使用Fmoc-氨基酸偶联法将反式-4-可替宁甲酸 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, 美国) 连接到肽的N-末端。

[0183] 合成完成后,通过处理TFA/EDT/茴香硫醚/TIS/DW (90/2.5/2.5/2,5/2.5体积) 2小时,将粗产物与树脂分离。通过使用冷乙醚进行离心来沉淀溶液。将沉淀物风干。使用ACE 10 C18-300反相柱 (250mm×21.2mm, 10μM), 通过反相HPLC纯化粗产物。用含有0.1% (v/v) 三氟乙酸 (Alfa Aesar, Warm Hill, MA, 美国) 的水-乙腈线性梯度 (10-75% (v/v) 乙腈) 洗脱。收集纯化的肽 (Cot-(GSK) 4肽) 并干燥。

[0184] Levena Biopharma (San Diego, CA, 美国) 将缬氨酸-瓜氨酸对氨基苄氧羰基 (PAB) 连接的二甲基氨基乙基倍癌毒素与可替宁 (GSK) 4中赖氨酸的游离四个氨基酸连接。将Cot-(GSK) 4肽 (3.5mg, 2μmol) 溶解在乙腈/水 (6/4, v/v, 1mL) 中。加入PAB-二甲基氨基乙基倍癌毒素-PEG3-缬氨酸-瓜氨酸的NHS酯,随后加入9μL饱和NaHCO₃水溶液。将混合物在室温下混合4小时,并通过反相HPLC技术使用Phenomenex Gemini® C18-100Å柱 (100mm×2mm×5μM) 纯化。将复合物 (可替宁-[GSK (倍癌毒素)] 4, DAR4) 命名为“cot-duo”。通过先前描述的方法 [J. Jin等, Exp. Mol. Med. 50 (2018) 67], 将二价可替宁-(GSK) 4K与倍癌毒素连接。简言之,使用碱性Fmoc-氨基酸偶联法,将来自Pepttron的两个反式-4-可替宁羧酸分子与GSKGSKGSKGSKK的N-末端的游离氨基酸和赖氨酸的C-末端的ε氨基酸连接。在Levena Biopharma中,将四个PAB-倍癌毒素与二价可替宁-GSKGSKGSKGSKK肽连接,形成命名为可替宁-[GSK (倍癌毒素)] 4K-可替宁 (DAR2) 或cot-duo-cot的复合物。图1a显示双特异性抗体和可替宁-倍癌毒素缀合物 (cot-duo, cot-duo-cot) 的融合蛋白,图1b显示cot-duo和cot-duo-cot的化学结构。“R”是缬氨酸-瓜氨酸PAB-连接的二甲基氨基乙基倍癌毒素。

[0185] 6-2: 与双特异性抗体的复合物的形成

[0186] 将实施例2中获得的溶于PBS的抗PDGFR-β_x可替宁scFv-Cκ-scFv融合蛋白 (15μM) 与溶于DMSO的cot-duo (15μM) 以1:1的比例混合,并与cot-duo-cot (7.5μM) 以2:1的比例混合。在室温下形成复合物30分钟后,将复合物在含有10%FBS和1%青霉素/链霉素 (25.6pM-2μM) 的DMEM培养基中稀释5倍。

[0187] 6-3: 双特异性抗体的复合物形成的确认

[0188] 为了确认复合物的形成,使用尺寸排阻色谱和HPLC,通过Y-Biologicals

(Daejeon, 韩国) 分析实施例2中制备的双特异性抗体和可替宁-倍癌霉素缀合物的 (抗-mPDGFR- β scFv)-C κ - (抗-可替宁scFv)。

[0189] 为了分析,使用Dionex Ultimate 3000(Thermo Fisher Scientific Inc.,MA,美国),其配备有Sepax SRT-C SEC-300柱(7.8 $\times$ 300mm),该柱填充有具有300 Å大小的孔的5 μ m颗粒。流动相为PBS(磷酸盐缓冲盐水),注入20 μ L样品(1mg/mL),洗脱液以1mL/min洗脱15分钟。用紫外检测器在254nm处监测柱的洗出液的mAU值。

[0190] 图8是含有本发明的抗-mPDGFR- β 抗体的双特异性抗体的尺寸排阻色谱结果。使用配备有Sepax SRT-C SEC-300柱的Dionex Ultimate 3000,用尺寸排阻色谱-HPLC分析根据本发明的双特异性抗体、双特异性抗体和cot-duo的复合物、双特异性抗体和cot-duo-cot的复合物。PBS用作流动相,流动溶剂以1mL/min洗脱15分钟。将紫外检测器调节至254nm,并通过mAU监测结果。HMW是高分子量物质。

[0191] 实施例7.表达PDGFR- β 的细胞系中的抗增殖分析(细胞毒性试验)

[0192] 将NIH3T3细胞加入到50 μ L补充了10%FBS和1%青霉素/链霉素的DMEM中,置于96孔板(CLS3595,Corning)中,在37 $^{\circ}$ C培养箱中在5%CO₂中温育过夜。在含有50 μ L细胞的每个孔中,加入50 μ L与实验例10中获得的cot-duo或cot-duo-cot复合的抗PDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白(25.6pM-2 μ M),并在37 $^{\circ}$ C温育器中在5%CO₂中温育72小时。为了测试mPDGF-BB对scFv-C κ -scFv和可替宁-倍癌霉素复合物的双特异性抗体的毒性作用,将mPDGF-BB(2nM)与50 μ L双特异性抗体scFv-C κ -scFv和可替宁-倍癌霉素复合物一起加入。向50 μ L NIH3T3细胞加入混合的复合物。

[0193] 抗HER2 x可替宁scFv-C κ -scFv的双特异性抗体用作对照。在细胞中温育72小时后,根据制造商的说明书将100 μ L Cell Titer-Glo试剂(Promega Corp.,Madison,WI,美国)加入到所有孔中,并在发光计(PerkinElmer,Waltham,MA,美国)中测量发光。重复实验3次。相对活力用下式计算:[%活力=(实验孔的发光-背景孔的发光)/(对照的发光-背景孔的发光) $\times$ 100]。仅含有新培养基的孔用作背景孔。

[0194] 确认了抗mPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合抗体和可替宁倍癌霉素(cot-duo、cot-duo-cot)的复合物对表达PDGFR- β 的小鼠成纤维细胞具有抗增殖作用。

[0195] 为了评价抗mPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv双特异性抗体和可替宁倍癌霉素(cot-duo、cot-duo-cot)的复合物的毒性,在存在/不存在mPDGF-BB的情况下将复合物加入NIH3T3细胞中。测定细胞的ATP的相对细胞活力。表6和图5中的IC₅₀显示了scFv-C κ -scFv融合抗体的双特异性抗体的毒性。下表6显示了抗mPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合抗体和可替宁倍癌霉素的复合物的体外滴度的IC₅₀和95%置信区间。

[0196] [表6]

双特异性抗-mPDGFR-β x 抗可替宁scFv-Cκ	Cot-duo		Cot-duo-cot	
	IC50 (nM)	95% CI	IC50 (nM)	95% CI
PRb-CC01				
有 mPDGF-BB	27.1	19.1 - 38.5	67.2	52.0 - 86.9
没有 mPDGF-BB	25.0	18.1 - 34.7	87.6	54.4 - 141.1
PRb-CN01				
有 mPDGF-BB	9.7	8.4 - 11.1	30.5	25.1 - 37.1
没有 mPDGF-BB	6.3	5.1 - 7.9	20.1	13.8 - 29.4
PRb-CC02				
有 mPDGF-BB	20.6	16.2 - 26.3	69.0	54.2 - 87.9
没有 mPDGF-BB	20.1	15.2 - 26.5	125.4	47.4 - 328.7
PRb-CC03				
有 mPDGF-BB	20.7	15.7 - 27.3	50.2	39.5 - 63.9
没有 mPDGF-BB	27.3	8.9 - 84.3	67.3	39.0-116.2
Anti-HER2				
有 mPDGF-BB	23.2	17.4 - 31.0	60.8	48.4 - 76.4
没有 mPDGF-BB	36.7	27.9 - 48.3	93.7	55.3-158.9
Cotinine duocarmycin conjugates				
有 mPDGF-BB	22.8	16.6 - 31.4	56.7	44.3 - 72.6
没有 mPDGF-BB	15.5	11.7 - 20.3	45.4	29.8 - 69.2
Free duocarmycin				
有 mPDGF-BB	23.8	18.2 - 31.0	60.3	41.1 - 88.5
没有 mPDGF-BB	9.7	7.3 - 12.9	35.7	23.4 - 54.4

[0197] 在四种所测试抗体中,与抗HER2 x可替宁scFv-Cκ-scFv的对照组相比,PRb-CN01在有或没有mPDGF-BB的情况下显示出最高的毒性($p < 0.01$;图5)。PRb-CC02和PRb-CC03与对照抗体和非内化抗体(PRb-CC01)相比显示毒性,但不显示统计学显著性。然而,在mPDGF-BB存在下,当与PRb-CN01复合时,可替宁-倍癌毒素的毒性显著高于游离倍癌毒素($p < 0.01$)。作为对照实验,用scFv-Cκ-scFv融合蛋白和cot-duo复合物的双特异性抗体对不表达mPDGFR-β的MOLT-4细胞进行毒性实验。PRb-CN01与抗HER2 x可替宁scFv-Cκ-scFv融合蛋白的对照抗体在毒性上没有差异(图7)。

[0199] 如图5所示,即使抗体浓度增加,scFv-Cκ-scFv也不会杀死细胞,因此无法计算IC₅₀值。在表6中,显示了同时添加cot-duo或cot-duo-cot的结果,而不是单独添加scFv-Cκ-scFv的IC₅₀。此外,由于MOLT-4细胞不表达mPDGFR-β,因此PRb-CN01-药物复合物和对照抗体-药物复合物之间的毒性没有差异。

[0200] 实施例8.体内新血管形成的分析

[0201] 确认了缀合有cot-duo的抗mPDGFR-βx可替宁scFv-Cκ-scFv融合抗体的复合物抑制了体内新生血管形成。

[0202] 8-1:具有氧诱导视网膜疾病动物的实验

[0203] C57BL/6小鼠在出生后第7天在高浓度氧(75%)室中饲养5天,并在第12天转移到正常氧饲养设施中以产生早产儿视网膜病的环境。

[0204] 在出生后第14天,将1μL每种双特异性抗体scFv-Cκ-scFv、双特异性抗体scFv-Cκ-scFv融合蛋白和cot-duo的复合物分别以1nM和10nM的浓度注射到玻璃体腔中。为了标记血管,在视网膜平板上处理同工凝集素B4-594(1:100;121413,Invitrogen)。

[0205] 在氧诱导的视网膜疾病动物模型中,PRb-CN01 x可替宁scFv-Cκ-scFv融合抗体cot-duo的复合物以浓度依赖性方式抑制新生血管形成(图9)。

[0206] 8-2:激光诱导的脉络膜新生血管动物模型

[0207] 麻醉小鼠后,用间接检眼镜系统(IL00DA)激光以300μm光斑大小、400mW强度、50ms持续时间和810nm波长照射小鼠视网膜,以诱导布鲁赫膜破坏。

[0208] 在激光照射4天后,将1μL每种双特异性抗体scFv-Cκ-scFv、双特异性抗体scFv-C

κ -scFv融合蛋白和cot-duo的复合物以10nM的浓度注射到玻璃体腔中。激光照射7天后,摘除眼睛,得到视网膜色素上皮-脉络膜-巩膜组织,用与Alexa Fluor 594缀合的同工凝集素B4抗体进行免疫荧光染色,以测定脉络膜新生血管膜的程度。确认了scFv-C κ -scFv融合蛋白和cot-duo复合物的新生血管形成抑制能力。为了定量分析脉络膜新生血管膜的程度,使用ImageJ程序(NIH)。

[0209] 在激光诱导的脉络膜新生血管动物模型中,PRb-CN01 x可替宁scFv-C κ -scFv融合抗体cot-duo复合物抑制了新生血管形成(图10)。

[0210] 双特异性抗体scFv-C κ -scFv的毒性以IC₅₀(最大抑制能力的50%)计算,并通过不成对学生t-检验或单向方差分析进行统计分析。Tukey事后多重比较检验用于观察双特异性抗体scFv-C κ -scFv的统计学显著性。0.05以下的P值被认为是统计学显著的。所有分析都使用Prism v5.0(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, 美国)进行。

[0211] 实施例9. hPDGFR- β -C κ 融合蛋白的表达和纯化

[0212] hPDGFR- β 、食蟹猴PDGFR- β 和野猪PDGFR- β 的胞外区的氨基酸序列示于以上表3中的SEQ ID NO:61、62和63,但恒河猴PDGFR- β 是可商购的,并作为抗原购买(Cat:90215-C02H)。合成所制备的核苷酸序列(Ginscript Biotag, 中国江苏),其中在所制备的核苷酸序列末端添加SfiI限制性识别序列,用SfiI酶消化,并克隆到pCEP4载体中。然后,根据以前报道的方法[Y. Lee, H. Kim等, Exp. Mol. Med. 46(2014) e114, S. Park, D. Lee等, Clin Chim Acta 411(2010) 1238],以C κ 或hFc的形式表达蛋白质。

[0213] 根据实施例1中的mPDGFR- β 的相同方法转染和纯化蛋白质,但是根据制造商的说明(Repligen Corp., Cambridge, MA)使用蛋白A凝胶亲和色谱法对其进行修饰以纯化hFc融合蛋白。融合蛋白具有其中C κ 通过接头(GGGGS)3与氨基酸序列hPDGFR- β 的C-末端连接的结构。

[0214] 实施例10. 双特异性抗体(scFv-C κ -scFv)的表达和纯化

[0215] 10-1:组合scFv展示的噬菌体文库的制备和生物淘选根据实施例2中的组合scFv展示的噬菌体文库的制备和生物淘选的相同方法进行,表达抗hPDGFR- β scFv的噬菌体文库使用实施例9中的hPDGFR- β -C κ 融合蛋白制备并进行生物淘选。

[0216] 在第5个输出滴度处,随机选择scFv克隆,并在mPDGFR- β -C κ 包被的微量滴定板上进行噬菌体酶免疫测定。分析氨基酸序列后,鉴定了所有3种类型的抗体克隆(表7)。下表7显示了抗hPDGFR- β scFv克隆的H-CDR3序列。表2显示了获得的三个克隆的VH和VL及其CDR氨基酸序列信息。

[0217] [表7]

[0218]

克隆	氨基酸序列of VH-CDR3	SEQ ID NO
PRb-CN16	AAGTCYSHSCTGYIDA	35
PRb-CN32	SAGSTYSYWDSAGLIDA	43
PRb-CN26	RGFMDAGGIDA	51

[0219] 10-2:双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白的表达和纯化

[0220] 使用实施例9中制备的抗-hPDGFR- β scFv克隆,(抗-hPDGFR- β scFv)-C κ -(抗可替宁scFv),按照与实施例2中抗mPDGFR- β scFv的制备相同的方法,制备含有编码双特异性抗体的基因的pCEP4表达载体。

[0221] 所制备的(抗-hPDGFR- β scFv)-C κ -(抗可替宁scFv)双特异性抗体的特异性结构和每个接头的结合位置显示在图1a中。具体而言,抗hPDGFR- β scFv和抗可替宁scFv各自从N端开始以VL-GQSSRSSGGGSSGGGGS(表2中的SEQ ID NO:57)-VH的顺序连接,即VL的C端与VH的N端连接。从N端开始,使用每个接头连接抗hPDGFR- β scFv、C κ 和抗可替宁scFv,连接scFv的接头是表2中SEQ ID NO:59的(GGGGS)₃,C κ 氨基酸显示在表2中的SEQ ID NO:58。

[0222] 双特异性抗体的融合蛋白的具体制备方法、所表达的双特异性抗体的纯化和纯度测定,以与实施例2基本相同的方法进行。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果示于图11。图11是作为针对根据本发明的抗hPDGFR- β 的双特异性抗体的可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果。

[0223] 如图11所示,将在泳道1(PRb-CN16 x可替宁双特异性抗体),泳道3(PRb-CN26 x可替宁双特异性抗体)和泳道5(PRb-CN32 x可替宁双特异性抗体)中使用还原剂还原的蛋白质在69.0kDa染色,经还原的蛋白在67kDa染色,未还原蛋白在60kDa染色。计算机计算的融合蛋白大小为66.77kDa。没有观察到多聚体条带。

[0224] 实施例11.双特异性抗体对hPDGFR- β 和可替宁的结合亲和力分析

[0225] 将包被缓冲液(0.1M碳酸氢钠,pH 8.6)中包含的100ng hPDGFR- β -Fc嵌合体或TNF- α 受体胞外结构域-人Fc融合蛋白在4℃0/N下包被在微量滴定板上。在37℃下,用150 μ L在PBS中的3%(w/v)BSA(牛血清白蛋白)作为封闭剂封闭每个孔1小时。处理在3%BSA/PBS中稀释的各种浓度(1:500-1:62,500)的鸡血清,并在37℃下温育2小时,并根据用于测试抗mPDGFR- β 的免疫鸡血清结合能力的方案相同的方法分析。

[0226] 将TNF- α 受体-人Fc融合蛋白的包被缓冲液或胞外区中的100ng hPDGFR- β -Fc嵌合体在4℃0/N下包被在微量滴定板上。在37℃下,用150 μ L在PBS中的3%(w/v)BSA(牛血清白蛋白)作为封闭剂封闭每个孔1小时。在用不同浓度的scFv-C κ -scFv融合蛋白双特异性抗体(0.01nM-1 μ M)处理后,以与抗mPDGFR- β scFv-C κ -scFv融合蛋白的浓度依赖性结合能力相同的方案进行分析。

[0227] 为了确认双特异性抗体scFv-C κ -scFv和hPDGF-BB之间的竞争,如实施例3中所述,将hPDGFR- β -Fc嵌合体包被在微量滴定板上,然后封闭。用各种浓度的双特异性抗体(0.01nM-1 μ M)在添加或不添加hPDGF-BB(100nM;220-BB;R&D系统)的情况下对微量滴定板进行处理,然后在37℃下温育2小时。洗涤、温育和检测以与上述酶免疫测定相同的方式进行。在存在hPDGF-BB的情况下,PRb-CN16、PRb-CN32和PRb-CN26与hPDGFR- β 的结合能力未被抑制(图12a)。

[0228] 100ng hPDGFR- β 、mPDGFR- β 、恒河猴PDGFR- β (90215-C02H,Sino Biological Inc.,中国北京)、食蟹猴PDGFR- β 、野猪PDGFR- β -Fc嵌合体或TNF- α 受体胞外结构域-人Fc融合蛋白用4℃的温度0/N下包被。封闭孔后,以与实施例3相同的方式依次培养抗hPDGFR- β scFv-C κ -scFv融合蛋白和HRP缀合的抗人C κ 抗体。

[0229] 进行酶免疫测定以确认scFv-C κ -scFv融合蛋白的双特异性抗体对hPDGFR- β 和可替宁的同时结合能力。四种双特异性抗体不与对照人Fc蛋白结合(图12b),但以浓度依赖性方式与hPDGFR- β -Fc嵌合蛋白结合(图12a)。

[0230] 抗hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白和抗mCD154 x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白的对照双特异性抗体都具有与可替宁-BSA结合的能力(图12c)。为了确定可替宁与

hPDGFR- β 的同时结合能力,将抗-hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白培养在用可替宁-BSA包被的孔中。对每个过程进行洗涤,并依次温育hPDGFR- β -Fc嵌合蛋白和HRP-抗人Fc抗体。三种双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白同时与hPDGFR- β 和可替宁结合(图12d)。

[0231] 经确认,即使在hPDGF-BB的存在下,抗-hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白也可以与hPDGFR- β 和可替宁同时结合(图13a)。

[0232] 使用酶免疫法来测试抗hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白的跨物种结合。除对照x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白外,所有三个克隆均与hPDGFR- β 、mPDGFR- β 、恒河猴PDGFR- β 、食蟹猴PDGFR- β 和野猪PDGFR- β 成功结合(图17)。

[0233] 图17是示出针对根据本发明的抗hPDGFR- β 抗体的双特异性抗体物种间反应的实验的图。在用hPDGFR- β 、mPDGFR- β 、恒河猴PDGFR- β 、食蟹猴PDGFR- β 、野猪PDGFR- β 和对照Fc包被的微量滴定板上,含有本发明的抗hPDGFR- β 抗体的双特异性抗体(100nM)反应,并使用缀合有HRP的抗人C κ 抗体和TMB测量结合的双特异性抗体的量。

[0234] 实施例12. 双特异性抗体的内化分析

[0235] 在补充有10%FBS的周细胞生长培养基中,用经稀释的双特异性抗体scFv-C κ -scFv(10 μ g/mL)处理人周细胞,并在37 $^{\circ}$ C下内化30分钟。以与根据实施例4的抗mPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白的共聚焦显微镜的方案相同的方式进行分析。在向双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白添加hPDGF-BB(50ng/mL)后,按照相同的方案进行共聚焦显微镜实验。

[0236] 确认了抗hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白通过核内体被内化到细胞中。

[0237] 将双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白的内化可视化。用融合蛋白处理人周细胞后,去除与细胞表面结合的抗体。细胞固定后,融合蛋白用FITC-抗人C κ 抗体(绿色)染色。为了可视化早期核内体,将细胞用抗Rab5抗体和Alexa Fluor 546山羊抗兔抗体IgG(红色)染色。箭头指示的部分表示其中抗hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白和初始核内体的荧光被共定位的放大部分。DNA用DAPI(蓝色)染色(比例尺,10 μ m)。用hPDGF-BB重复图13d。

[0238] 为了测量scFv-C κ -scFv的双特异性抗体的细胞内化作用,将抗hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白在人周细胞中温育,然后用FITC-抗人C κ 抗体和核内体特异性抗体处理。使用共聚焦显微镜成像。仅在用PRb-CN32和PRb-CN16培养的细胞中检测到细胞内荧光(图13c)。当图像合并时,本发明人确认了两个抗体克隆和核内体特异性抗体的荧光共定位。当用hPDGF-BB处理PRb-CN32、PRb-CN16和PRb-CN26时,它们与核内体特异性抗体共定位(图13d)。将PDGF-BB一起处理后,PRb-CN26在30分钟内大量内化。抗体的内化对于将药物递送至靶细胞非常重要。在某些疾病中PDGF-BB的水平升高的情况下,即使PDGF-BB的水平升高也不影响根据本发明的抗体的内化。因此,对于将药物细胞内递送至疾病患者是有用的。

[0239] 实施例13. 双特异性抗体与hPDGFR- β 和可替宁的结合能力分析

[0240] 将人周细胞与在流式细胞仪缓冲液(0.05% [w/v] 叠氮化钠中的1% [w/v] BSA/PBS)中以1:100稀释的鸡血清在4 $^{\circ}$ C温育1小时,然后用流式细胞仪缓冲液洗涤4次。该实验遵循与实施例4中测试抗mPDGFR- β 相同的方案。通过从PromoCell (Heidelberg, 德国) 购买而制备人周细胞,并在补充有10%胎牛血清(FBS; GIBCO, Grand Island, NY, 美国), 1%的青霉素和链霉素的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM; Welgene, Seoul, 韩国)中培养[S. Park等, Exp. Mol. Med. 44(2012) 554-61]。

[0241] 在有或没有hPDGF-BB-生物素(100nM, BT220; R&D系统)的两种不同条件下,使用scFv-C κ -scFv融合蛋白(100nM)的双特异性抗体在4℃下将人周细胞进行培养1小时。将细胞用流式细胞仪缓冲液洗涤4次,并用别藻蓝蛋白(APC)-抗人C κ 抗体(克隆TB28-2; BD Biosciences, San Jose, CA, 美国)和链霉亲和素-藻红蛋白(PE)(12-4317-87; eBioscience, ThermoFisher)培养。洗涤后,将其分类并用FACS Canto II仪器(BD Biosciences, San Jose, CA, 美国)进行分析。每次测量使用10,000个细胞,并通过FlowJo(Tree Star, Ashland, OR, 美国)分析结果。

[0242] 将双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白(100nM)在4℃下于A-431细胞中温育1小时。如上所述洗涤后,通过用APC-抗人C κ 抗体处理进行检测。A-431细胞购自Korea Cell Line Bank,并在含有10%胎牛血清(GIBCO)、1%青霉素和链霉素的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM; Welgene, Seoul, 韩国)中培养。

[0243] 本发明人通过流式细胞术分析测试了在hPDGF-BB存在下人周细胞中每个克隆的结合能力,并确认抗hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白和hPDGF-BB-生物素与细胞结合。当添加hPDGF-BB时,所有三个克隆都与细胞表面上存在的PDGFR- β 结合,这与酶免疫测定方法相似(图13b)。本发明人通过流式细胞术确认了双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白与不表达hPDGFR- β 的A-431细胞的结合能力,并且确认了所有抗hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白以及抗mCD154 x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白的对照双特异性抗体与相应的细胞不结合(图15)。

[0244] 实施例14. 双特异性抗体和可替宁-倍癌毒素(cot-duo)的复合物形成

[0245] 除了使用含有抗mPDGFR- β 抗体的双特异性抗体(与实施例10中制备的与抗hPDGFR- β 抗体有关的双特异性抗体)以外,以与实施例6基本相同的方法进行实验。如实施例6中抗mPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白的制备和转导中所述,以相同方式转导HEK293F细胞。通过亲和层析从上清液中纯化scFv-C κ -scFv融合蛋白的双特异性抗体,并进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(图11)。

[0246] 实施例15. 在表达PDGFR- β 的细胞系中的抗增殖分析(细胞毒性试验)

[0247] 将人周细胞添加到补充有10%FBS和1%青霉素/链霉素的50 μ L DMEM中,置于96孔板(CLS3595, Corning)中,并在5%CO₂中于37℃的温育器中温育过夜。在每个含有50 μ L细胞的孔中,加入50 μ L与cot-duo复合的抗-hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白(25.6pM-2 μ M),并在5%CO₂和37℃温育器中温育72小时。

[0248] 为了评估hPDGF-BB对scFv-C κ -scFv和cot-duo双特异性抗体复合物的毒性的影响,将hPDGF-BB(2nM)与50 μ L双特异性抗体scFv-C κ -scFv和cot-duo复合物一起添加。将混合的复合物添加到50 μ L的含细胞溶液中。使用双特异性抗体抗mCD154 x可替宁scFv-C κ -scFv作为对照。以与实施例7中的抗mPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白的方案相同的方式进行其他实验方法。

[0249] 为了评估抗hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白和cot-duo复合物的毒性,在有或没有hPDGF-BB的人周细胞中处理该复合物,并用腺苷三磷酸酯处理细胞以测量相对活力。抗hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白和cot-duo复合物的双特异性抗体的毒性通过IC₅₀显示(表8)。下表8显示了抗mPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合抗体和可替宁倍癌毒素的复合物的体外效价,其具有95%的置信区间。

[0250] [表8]

抗hPDGFR-β x抗可替宁scFv-Cκ-scFv		Cot-duo	
		IC50 (nM)	95% CI
[0251]	PRb-CN16		
	没有 hPDGF-BB	2.39	2.12-2.71
	有 hPDGF-BB	1.82	1.58-2.10
	PRb-CN32		
	没有 hPDGF-BB	0.78	0.75-0.81
	有 hPDGF-BB	0.67	0.58-0.76
	PRb-CN26		
	没有 hPDGF-BB	0.90	0.84-0.98
	有 hPDGF-BB	0.87	0.78-0.96
	Control		
没有 hPDGF-BB	4.47	6.73-13.87	
有 hPDGF-BB	3.48	3.05-3.97	
	没有 hPDGF-BB	13.70	12.58-14.93
	有 hPDGF-BB	12.42	10.42-14.80

[0252] 如表8的结果所示,在有或没有hPDGF-BB的情况下,三种测试抗体 (PRb-CN16、PRb-CN32、PRb-CN26) 均显示出比对照抗mCD154 x可替宁scFv-C κ -scFv的毒性高 ($p < 0.05$; 图14a和图14b)。作为对照实验,利用双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白和cot-duo复合物,对不表达hPDGFR- β 的A-431细胞进行毒性实验。所有抗hPDGFR- β x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白的毒性均不高于对照抗体抗mCD154 x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白 (图16)。因此,作为抗增殖分析结果的结果,与对照抗mCD154x可替宁scFv-C κ -scFv相比,双特异性抗体/cot-duo复合物在表达hPDGFR- β 的人周细胞细胞系中具有更高的细胞毒性,但是与对照抗mCD154 x可替宁scFv-C κ -scFv相比,在不表达hPDGFR- β 的A-431中,细胞毒性没有差异。这种细胞毒性结果是由hPDGFR- β 递送的倍癌霉素的功效引起的,这表明双特异性抗体scFv-C κ -scFv有效地将半抗原-药物 (cot-duo) 递送至靶细胞并有效地在细胞内释放药物。

[0253] 实施例16

[0254] 首先,使用实施例2中制备的PRb-CN01 scFv,构建了含有编码scFv-兔Fc抗体的基因的pCEP4表达载体。实验中使用的兔Fc抗体的氨基酸序列在序列表中以SEQ ID NO:72示出。

[0255] 具体而言,使用铰链 (QEPKSSDKTHTSPSP:SEQ ID NO:73) 在抗mPDGFR- β scFv的C端处将其与兔Fc连接。作为制备scFv-兔-Fc的具体方法,用SfiI (New England Biolabs) 消化编码抗mPDGFR- β 的基因,并将其连接到表达载体上。根据实施例中用于mPDGFR- β 的方法进行转染和纯化,但是根据制造商的说明 (Repligen Corp., Cambridge, MA), 对其进行修饰以使用蛋白A凝胶亲和色谱法纯化兔Fc融合蛋白。

[0256] 通过执行与实施例5的用于抗体结合能力的流式细胞术基本相同的方法,确认了PRb-CN01和PRb-CN32双特异性抗体scFv-C κ -scFv都与NIH3T3细胞结合 (图18)。具体地,将

流式细胞术缓冲液中的双特异性抗体scFv-C κ -scFv融合蛋白(100nM)培养在表达mPDGFR- β 的NIH3T3细胞上。用APC抗人C κ 抗体处理细胞。双特异性抗体抗HER2x可替宁scFv-C κ -scFv融合蛋白用作阴性对照。

[0257] 除了将mPDGFR- β -hFc嵌合蛋白在4℃的温度下在微量滴定板上以O/N包被以外,以与实施例3的抗体结合能力的酶免疫分析法基本相同的方式进行。在每个孔中温育封闭剂后,将在3%BSA/PBS中稀释的各种浓度的PRb-CN01-兔Fc(0.01nM-1 μ M)和PRb-CN01、对照抗-HER2抗体以及PRb-CN32双特异性scFv-C κ -scFv(100nM)在37℃下在每个孔中反应2小时。用PBST洗涤平板3次后,使HRP-抗兔Fc抗体在37℃下反应1小时,洗涤后,使用ABTS进行反应。然后,用Multiscan Ascent微板装置(Labsystems,Helsinki,芬兰)在405nm处测量吸光度(图19A)。图19a是确认PRb-CN01替代抗体的竞争的结果。如图19a所示,PRPD-CN01和PRb-CN32双特异性scFv-C κ -scFv抑制了mPDGFR- β -hFc嵌合蛋白与PRb-CN01-兔Fc的结合能力。

[0258] 按照与实施例5相同的方式,将PRb-CN01-兔Fc(50nM)和PRb-CN01、对照抗体、PRb-CN32双特异性抗体scFv-C κ -scFv(1 μ M)在NIH3T3细胞上培养1小时。洗涤后,使其与FITC-抗兔Fc抗体(172-1506,KPL,Gaithersburg,Maryland,美国)在4℃下反应1小时。洗涤后,将其分类并用FACS Canto II仪器(BD Biosciences, San Jose, CA, 美国)进行分析。每次测量鉴定10,000个细胞。结果通过FlowJo(Tree Star,Ashland,OR,美国)进行分析(图19b)。

[0259] 如图19b所示,存在于细胞表面上的mPDGFR- β 与PRb-CN01-兔Fc的结合能力被PRb-CN01和PRb-CN32双特异性抗体scFv-C κ -scFv抑制。

[0260] 除了使用与实施例10中制备的与抗mPDGFR- β 抗体相关的双特异性抗体和与抗hPDGFR- β 抗体相关的双特异性抗体以外,以与实施例7相同的方式进行。图20a至图20b是示出在表达PDGFR- β 的细胞中PRb-CN01和PRb-CN32双特异性抗体和可替宁-倍癌霉素复合物的细胞毒性活性的差异的图。在图20b中,在mPDGF-BB的存在下重复了实验。

[0261] 如图20a和图20b所示,两种测试抗体(PRb-CN01、PRb-32)均显示出等效的细胞毒性,而与是否存在mPDGF-BB无关。因此,确认了PRb-CN01和PRb-32是替代抗体。

[0001]	<110>	首尔大学校产学协力团
[0002]		梨花女子大学校 产学协力团
[0003]	<120>	PDGF受体抗体及其用途
[0004]	<130>	OPP20193834KR
[0005]	<150>	US 62/741,733
[0006]	<151>	2018-10-05
[0007]	<160>	73
[0008]	<170>	koPatentIn 3.0
[0009]	<210>	1
[0010]	<211>	10
[0011]	<212>	PRT
[0012]	<213>	人造序列
[0013]	<220>	
[0014]	<223>	PRb-CN01的CDR1-VH
[0015]	<400>	1
[0016]		Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg Ala Met His
[0017]	1	5 10
[0018]	<210>	2
[0019]	<211>	17
[0020]	<212>	PRT
[0021]	<213>	人造序列
[0022]	<220>	
[0023]	<223>	PRb-CN01的CDR2-VH
[0024]	<400>	2
[0025]		Leu Ile Thr Asn Thr Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Gly Ala Ala Val Lys
[0026]	1	5 10 15
[0027]		Gly
[0028]	<210>	3
[0029]	<211>	13
[0030]	<212>	PRT
[0031]	<213>	人造序列
[0032]	<220>	
[0033]	<223>	PRb-CN01的CDR3-VH
[0034]	<400>	3
[0035]		Gly Val Gly Ser Trp Ala His Gly Gly Arg Ile Asp Ala
[0036]	1	5 10
[0037]	<210>	4
[0038]	<211>	8

[0039] <212> PRT
 [0040] <213> 人造序列
 [0041] <220>
 [0042] <223> PRb-CN01的CDR1-VL
 [0043] <400> 4
 [0044] Ser Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Gly
 [0045] 1 5
 [0046] <210> 5
 [0047] <211> 7
 [0048] <212> PRT
 [0049] <213> 人造序列
 [0050] <220>
 [0051] <223> PRb-CN01的CDR2-VL
 [0052] <400> 5
 [0053] Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 [0054] 1 5
 [0055] <210> 6
 [0056] <211> 10
 [0057] <212> PRT
 [0058] <213> 人造序列
 [0059] <220>
 [0060] <223> PRb-CN01的CDR3-VL
 [0061] <400> 6
 [0062] Gly Thr Arg Asp Ser Ser Tyr Val Gly Ile
 [0063] 1 5 10
 [0064] <210> 7
 [0065] <211> 122
 [0066] <212> PRT
 [0067] <213> 人造序列
 [0068] <220>
 [0069] <223> PRb-CN01的VH
 [0070] <400> 7
 [0071] Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
 [0072] 1 5 10 15
 [0073] Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg
 [0074] 20 25 30
 [0075] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0076] 35 40 45
 [0077] Gly Leu Ile Thr Asn Thr Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Gly Ala Ala Val

[0078]	50	55	60
[0079]	Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg		
[0080]	65	70	75
[0081]	Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys		80
[0082]		85	90
[0083]	Thr Arg Gly Val Gly Ser Trp Ala His Gly Gly Arg Ile Asp Ala Trp		95
[0084]		100	105
[0085]	Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser		110
[0086]		115	120
[0087]	<210> 8		
[0088]	<211> 102		
[0089]	<212> PRT		
[0090]	<213> 人造序列		
[0091]	<220>		
[0092]	<223> PRb-CN01的VL		
[0093]	<400> 8		
[0094]	Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val Lys		
[0095]	1	5	10
[0096]	Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Gly Trp Phe Gln Gln Lys		15
[0097]		20	25
[0098]	Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg		30
[0099]		35	40
[0100]	Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr		45
[0101]	50	55	60
[0102]	Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Ile Tyr		
[0103]	65	70	75
[0104]	Tyr Cys Gly Thr Arg Asp Ser Ser Tyr Val Gly Ile Phe Gly Ala Gly		80
[0105]		85	90
[0106]	Thr Thr Leu Thr Val Leu		95
[0107]		100	
[0108]	<210> 9		
[0109]	<211> 11		
[0110]	<212> PRT		
[0111]	<213> 人造序列		
[0112]	<220>		
[0113]	<223> PRb-CC01的CDR1-VH		
[0114]	<400> 9		
[0115]	Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asn Met Gly		
[0116]	1	5	10

[0117]	<210>	10
[0118]	<211>	17
[0119]	<212>	PRT
[0120]	<213>	人造序列
[0121]	<220>	
[0122]	<223>	PRb-CC01的CDR2-VH
[0123]	<400>	10
[0124]	Gly Ile Ser Ala Ala Asp Asn Ser Thr Ala Tyr Gly Ala Ala Val Asp	
[0125]	1	5 10 15
[0126]	Gly	
[0127]	<210>	11
[0128]	<211>	7
[0129]	<212>	PRT
[0130]	<213>	人造序列
[0131]	<220>	
[0132]	<223>	PRb-CC01的CDR3-VH
[0133]	<400>	11
[0134]	Gly Gly Gly Ser Ile Asp Ala	
[0135]	1	5
[0136]	<210>	12
[0137]	<211>	8
[0138]	<212>	PRT
[0139]	<213>	人造序列
[0140]	<220>	
[0141]	<223>	PRb-CC01的CDR1-VL
[0142]	<400>	12
[0143]	Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly	
[0144]	1	5
[0145]	<210>	13
[0146]	<211>	7
[0147]	<212>	PRT
[0148]	<213>	人造序列
[0149]	<220>	
[0150]	<223>	PRb-CC01的CDR2-VL
[0151]	<400>	13
[0152]	Tyr Asn Asp Lys Arg Pro Ser	
[0153]	1	5
[0154]	<210>	14
[0155]	<211>	11

[0156]	<212>	PRT
[0157]	<213>	人造序列
[0158]	<220>	
[0159]	<223>	PRb-CC01的CDR3-VL
[0160]	<400>	14
[0161]	Gly	Ala Trp Asp Asn Ser Ala Gly Tyr Ala Gly
[0162]	1	5 10
[0163]	<210>	15
[0164]	<211>	116
[0165]	<212>	PRT
[0166]	<213>	人造序列
[0167]	<220>	
[0168]	<223>	PRb-CC01的VH
[0169]	<400>	15
[0170]	Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly	
[0171]	1	5 10 15
[0172]	Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0173]	20	25 30
[0174]	Asn Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val	
[0175]	35	40 45
[0176]	Ala Gly Ile Ser Ala Ala Asp Asn Ser Thr Ala Tyr Gly Ala Ala Val	
[0177]	50	55 60
[0178]	Asp Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg	
[0179]	65	70 75 80
[0180]	Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys	
[0181]	85	90 95
[0182]	Ile Arg Gly Gly Gly Ser Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val	
[0183]	100	105 110
[0184]	Ile Val Ser Ser	
[0185]	115	
[0186]	<210>	16
[0187]	<211>	103
[0188]	<212>	PRT
[0189]	<213>	人造序列
[0190]	<220>	
[0191]	<223>	PRb-CC01的VL
[0192]	<400>	16
[0193]	Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val Lys	
[0194]	1	5 10 15

[0195]	Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys
[0196]	20 25 30
[0197]	Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile Tyr Tyr Asn Asp Lys Arg
[0198]	35 40 45
[0199]	Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr
[0200]	50 55 60
[0201]	Gly Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val Tyr
[0202]	65 70 75 80
[0203]	Phe Cys Gly Ala Trp Asp Asn Ser Ala Gly Tyr Ala Gly Phe Gly Ala
[0204]	85 90 95
[0205]	Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
[0206]	100
[0207]	<210> 17
[0208]	<211> 10
[0209]	<212> PRT
[0210]	<213> 人造序列
[0211]	<220>
[0212]	<223> PRb-CC02的CDR1-VH
[0213]	<400> 17
[0214]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Phe
[0215]	1 5 10
[0216]	<210> 18
[0217]	<211> 16
[0218]	<212> PRT
[0219]	<213> 人造序列
[0220]	<220>
[0221]	<223> PRb-CC02的CDR2-VH
[0222]	<400> 18
[0223]	Gly Ile Asp Thr Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Gly Ser Ala Val Lys Gly
[0224]	1 5 10 15
[0225]	<210> 19
[0226]	<211> 8
[0227]	<212> PRT
[0228]	<213> 人造序列
[0229]	<220>
[0230]	<223> PRb-CC02的CDR3-VH
[0231]	<400> 19
[0232]	Gly Tyr Ala Gly Thr Ile Asp Ala
[0233]	1 5

[0234] <210> 20
[0235] <211> 8
[0236] <212> PRT
[0237] <213> 人造序列
[0238] <220>
[0239] <223> PRb-CC02的CDR1-V
[0240] <400> 20
[0241] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Gly
[0242] 1 5
[0243] <210> 21
[0244] <211> 7
[0245] <212> PRT
[0246] <213> 人造序列
[0247] <220>
[0248] <223> PRb-CC02的CDR2-VL
[0249] <400> 21
[0250] Tyr Asn Asp Lys Arg Pro Ser
[0251] 1 5
[0252] <210> 22
[0253] <211> 9
[0254] <212> PRT
[0255] <213> 人造序列
[0256] <220>
[0257] <223> PRb-CC02的CDR3-VL
[0258] <400> 22
[0259] Gly Ser Tyr Asn Ser Ser Asp Ser Leu
[0260] 1 5
[0261] <210> 23
[0262] <211> 118
[0263] <212> PRT
[0264] <213> 人造序列
[0265] <220>
[0266] <223> PRb-CC02的VH
[0267] <400> 23
[0268] Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
[0269] 1 5 10 15
[0270] Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0271] 20 25 30
[0272] Gly Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0273]	35	40	45
[0274]	Ala Gly Ile Asp Thr Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Gly Ser Ala Val Lys		
[0275]	50	55	60
[0276]	Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg Leu		
[0277]	65	70	75
[0278]	Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Phe Cys Thr		
[0279]	85	90	95
[0280]	Arg Gly Tyr Ala Gly Thr Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val		
[0281]	100	105	110
[0282]	Ile Val Ser Ser Thr Ser		
[0283]	115		
[0284]	<210> 24		
[0285]	<211> 101		
[0286]	<212> PRT		
[0287]	<213> 人造序列		
[0288]	<220>		
[0289]	<223> PRb-CC02的VL		
[0290]	<400> 24		
[0291]	Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val Lys		
[0292]	1	5	10
[0293]	Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys		
[0294]	20	25	30
[0295]	Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Tyr Asn Asp Lys Arg		
[0296]	35	40	45
[0297]	Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr		
[0298]	50	55	60
[0299]	Gly Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val Tyr		
[0300]	65	70	75
[0301]	Phe Cys Gly Ser Tyr Asn Ser Ser Asp Ser Leu Phe Gly Ala Gly Thr		
[0302]	85	90	95
[0303]	Thr Leu Thr Val Leu		
[0304]	100		
[0305]	<210> 25		
[0306]	<211> 10		
[0307]	<212> PRT		
[0308]	<213> 人造序列		
[0309]	<220>		
[0310]	<223> PRb-CC03的CDR1-VH		
[0311]	<400> 25		

[0312]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly
[0313]	1 5 10
[0314]	<210> 26
[0315]	<211> 16
[0316]	<212> PRT
[0317]	<213> 人造序列
[0318]	<220>
[0319]	<223> PRb-CC03的CDR2-VH
[0320]	<400> 26
[0321]	Gly Ile Asp Thr Ala Gly Gly Thr Ala Tyr Gly Pro Ala Val Lys Gly
[0322]	1 5 10 15
[0323]	<210> 27
[0324]	<211> 6
[0325]	<212> PRT
[0326]	<213> 人造序列
[0327]	<220>
[0328]	<223> PRb-CC03的CDR3-VH
[0329]	<400> 27
[0330]	Ser Ser Tyr Ile Asp Thr
[0331]	1 5
[0332]	<210> 28
[0333]	<211> 8
[0334]	<212> PRT
[0335]	<213> 人造序列
[0336]	<220>
[0337]	<223> PRb-CC03的CDR1-VL
[0338]	<400> 28
[0339]	Ser Gly Gly Thr Tyr Asn Tyr Gly
[0340]	1 5
[0341]	<210> 29
[0342]	<211> 7
[0343]	<212> PRT
[0344]	<213> 人造序列
[0345]	<220>
[0346]	<223> PRb-CC03的CDR2-VL
[0347]	<400> 29
[0348]	Trp Asn Asp Lys Arg Pro Ser
[0349]	1 5
[0350]	<210> 30

[0351]	<211> 9
[0352]	<212> PRT
[0353]	<213> 人造序列
[0354]	<220>
[0355]	<223> PRb-CC03的CDR3-VL
[0356]	<400> 30
[0357]	Gly Ser Ser Asp Ser Ser Gly Leu Ile
[0358]	1 5
[0359]	<210> 31
[0360]	<211> 116
[0361]	<212> PRT
[0362]	<213> 人造序列
[0363]	<220>
[0364]	<223> PRb-CC03的VH
[0365]	<400> 31
[0366]	Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
[0367]	1 5 10 15
[0368]	Thr Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0369]	20 25 30
[0370]	Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0371]	35 40 45
[0372]	Ala Gly Ile Asp Thr Ala Gly Gly Thr Ala Tyr Gly Pro Ala Val Lys
[0373]	50 55 60
[0374]	Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg Leu
[0375]	65 70 75 80
[0376]	Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr
[0377]	85 90 95
[0378]	Arg Ser Ser Tyr Ile Asp Thr Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val
[0379]	100 105 110
[0380]	Ser Ser Thr Ser
[0381]	115
[0382]	<210> 32
[0383]	<211> 101
[0384]	<212> PRT
[0385]	<213> 人造序列
[0386]	<220>
[0387]	<223> PRb-CC03的VL
[0388]	<400> 32
[0389]	Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val Lys

[0390]	1	5	10	15
[0391]	Ile Thr Cys Ser Gly Gly Thr Tyr Asn Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys			
[0392]	20	25	30	
[0393]	Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Trp Asn Asp Lys Arg			
[0394]	35	40	45	
[0395]	Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr			
[0396]	50	55	60	
[0397]	Gly Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val Tyr			
[0398]	65	70	75	80
[0399]	Tyr Cys Gly Ser Ser Asp Ser Ser Gly Leu Ile Phe Gly Ala Gly Thr			
[0400]	85	90	95	
[0401]	Thr Leu Thr Val Leu			
[0402]	100			
[0403]	<210> 33			
[0404]	<211> 10			
[0405]	<212> PRT			
[0406]	<213> 人造序列			
[0407]	<220>			
[0408]	<223> PRb-CN16的CDR1-VH			
[0409]	<400> 33			
[0410]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Asn Met Ala			
[0411]	1	5	10	
[0412]	<210> 34			
[0413]	<211> 17			
[0414]	<212> PRT			
[0415]	<213> 人造序列			
[0416]	<220>			
[0417]	<223> PRb-CN16的CDR2-VH			
[0418]	<400> 34			
[0419]	Glu Ile Ser Asn Thr Ala Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Pro Ala Val Lys			
[0420]	1	5	10	15
[0421]	Gly			
[0422]	<210> 35			
[0423]	<211> 16			
[0424]	<212> PRT			
[0425]	<213> 人造序列			
[0426]	<220>			
[0427]	<223> PRb-CN16的CDR3-VH			
[0428]	<400> 35			

[0429]	Ala Ala Gly Thr Cys Tyr Ser His Ser Cys Thr Gly Tyr Ile Asp Ala
[0430]	1 5 10 15
[0431]	<210> 36
[0432]	<211> 8
[0433]	<212> PRT
[0434]	<213> 人造序列
[0435]	<220>
[0436]	<223> PRb-CN16的CDR1-VL
[0437]	<400> 36
[0438]	Ser Gly Ser Ser Ser Ser Tyr Gly
[0439]	1 5
[0440]	<210> 37
[0441]	<211> 7
[0442]	<212> PRT
[0443]	<213> 人造序列
[0444]	<220>
[0445]	<223> PRb-CN16的CDR2-VL
[0446]	<400> 37
[0447]	Glu Asn Asn Gln Arg Pro Ser
[0448]	1 5
[0449]	<210> 38
[0450]	<211> 11
[0451]	<212> PRT
[0452]	<213> 人造序列
[0453]	<220>
[0454]	<223> PRb-CN16的CDR3-VL
[0455]	<400> 38
[0456]	Gly Asn Ala Asp Arg Ser Asn Ser Ala Gly Thr
[0457]	1 5 10
[0458]	<210> 39
[0459]	<211> 127
[0460]	<212> PRT
[0461]	<213> 人造序列
[0462]	<220>
[0463]	<223> PRb-CN16的VH
[0464]	<400> 39
[0465]	Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Thr
[0466]	1 5 10 15
[0467]	Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

[0468]	20	25	30
[0469]	Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val		
[0470]	35	40	45
[0471]	Gly Glu Ile Ser Asn Thr Ala Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Pro Ala Val		
[0472]	50	55	60
[0473]	Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg		
[0474]	65	70	75
[0475]	Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys		
[0476]	85	90	95
[0477]	Ala Lys Ala Ala Gly Thr Cys Tyr Ser His Ser Cys Thr Gly Tyr Ile		
[0478]	100	105	110
[0479]	Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser Thr Ser		
[0480]	115	120	125
[0481]	<210> 40		
[0482]	<211> 103		
[0483]	<212> PRT		
[0484]	<213> 人造序列		
[0485]	<220>		
[0486]	<223> PRb-CN16的VL		
[0487]	<400> 40		
[0488]	Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val Lys		
[0489]	1	5	10
[0490]	Ile Thr Cys Ser Gly Ser Ser Ser Ser Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys		
[0491]	20	25	30
[0492]	Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile Tyr Glu Asn Asn Gln Arg		
[0493]	35	40	45
[0494]	Pro Ser Asn Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser Thr		
[0495]	50	55	60
[0496]	Gly Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val Tyr		
[0497]	65	70	75
[0498]	Tyr Cys Gly Asn Ala Asp Arg Ser Asn Ser Ala Gly Thr Phe Gly Ala		
[0499]	85	90	95
[0500]	Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu		
[0501]	100		
[0502]	<210> 41		
[0503]	<211> 10		
[0504]	<212> PRT		
[0505]	<213> 人造序列		
[0506]	<220>		

[0507] <223> PRb-CN32的CDR1-VH
[0508] <400> 41
[0509] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Asn Met Phe
[0510] 1 5 10
[0511] <210> 42
[0512] <211> 17
[0513] <212> PRT
[0514] <213> 人造序列
[0515] <220>
[0516] <223> PRb-CN32的CDR2-VH
[0517] <400> 42
[0518] Gly Ile Ser Thr Thr Gly Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val Gln
[0519] 1 5 10 15
[0520] Gly
[0521] <210> 43
[0522] <211> 18
[0523] <212> PRT
[0524] <213> 人造序列
[0525] <220>
[0526] <223> PRb-CN32的CDR3-VH
[0527] <400> 43
[0528] Ser Ala Gly Ser Thr Tyr Ser Tyr Trp Asp Ser Asp Ala Gly Leu Ile
[0529] 1 5 10 15
[0530] Asp Ala
[0531] <210> 44
[0532] <211> 12
[0533] <212> PRT
[0534] <213> 人造序列
[0535] <220>
[0536] <223> PRb-CN32的CDR1-VL
[0537] <400> 44
[0538] Ser Gly Gly Ser Asn Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly
[0539] 1 5 10
[0540] <210> 45
[0541] <211> 7
[0542] <212> PRT
[0543] <213> 人造序列
[0544] <220>
[0545] <223> PRb-CN32的CDR2-VL

[0546] <400> 45
 [0547] Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 [0548] 1 5
 [0549] <210> 46
 [0550] <211> 10
 [0551] <212> PRT
 [0552] <213> 人造序列
 [0553] <220>
 [0554] <223> PRb-CN32的CDR3-VL
 [0555] <400> 46
 [0556] Gly Ser Gly Asp Ser Ser Ser Ile Ala Ala
 [0557] 1 5 10
 [0558] <210> 47
 [0559] <211> 129
 [0560] <212> PRT
 [0561] <213> 人造序列
 [0562] <220>
 [0563] <223> PRb-CN32的VH
 [0564] <400> 47
 [0565] Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Arg Gly
 [0566] 1 5 10 15
 [0567] Thr Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 [0568] 20 25 30
 [0569] Asn Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
 [0570] 35 40 45
 [0571] Ala Gly Ile Ser Thr Thr Gly Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val
 [0572] 50 55 60
 [0573] Gln Gly Arg Gly Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg
 [0574] 65 70 75 80
 [0575] Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys
 [0576] 85 90 95
 [0577] Ala Lys Ser Ala Gly Ser Thr Tyr Ser Tyr Trp Asp Ser Asp Ala Gly
 [0578] 100 105 110
 [0579] Leu Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser Thr
 [0580] 115 120 125
 [0581] Ser
 [0582] <210> 48
 [0583] <211> 106
 [0584] <212> PRT

[0585] <213> 人造序列
 [0586] <220>
 [0587] <223> PRb-CN32的VL
 [0588] <400> 48
 [0589] Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Glu Thr Val Lys
 [0590] 1 5 10 15
 [0591] Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ser Asn Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly Trp
 [0592] 20 25 30
 [0593] Tyr Gln Gln Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Ser
 [0594] 35 40 45
 [0595] Asn Asn Gln Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Thr
 [0596] 50 55 60
 [0597] Ser Gly Ser Thr Ser Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Val Asp Asp
 [0598] 65 70 75 80
 [0599] Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Ser Ile Ala Ala
 [0600] 85 90 95
 [0601] Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
 [0602] 100 105
 [0603] <210> 49
 [0604] <211> 10
 [0605] <212> PRT
 [0606] <213> 人造序列
 [0607] <220>
 [0608] <223> PRb-CN26的CDR1-VH
 [0609] <400> 49
 [0610] Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg Gly Ile His
 [0611] 1 5 10
 [0612] <210> 50
 [0613] <211> 17
 [0614] <212> PRT
 [0615] <213> 人造序列
 [0616] <220>
 [0617] <223> PRb-CN26的CDR2-VH
 [0618] <400> 50
 [0619] Gly Ile Gly Asn Thr Gly Ser Tyr Thr Ala Tyr Ala Pro Ala Val Lys
 [0620] 1 5 10 15
 [0621] Gly
 [0622] <210> 51
 [0623] <211> 11

[0624] <212> PRT
[0625] <213> 人造序列
[0626] <220>
[0627] <223> PRb-CN26的CDR3-VH
[0628] <400> 51
[0629] Arg Gly Phe Met Asp Ala Gly Gly Ile Asp Ala
[0630] 1 5 10
[0631] <210> 52
[0632] <211> 13
[0633] <212> PRT
[0634] <213> 人造序列
[0635] <220>
[0636] <223> PRb-CN26的CDR1-VL
[0637] <400> 52
[0638] Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly
[0639] 1 5 10
[0640] <210> 53
[0641] <211> 7
[0642] <212> PRT
[0643] <213> 人造序列
[0644] <220>
[0645] <223> PRb-CN26的CDR2-VL
[0646] <400> 53
[0647] Asp Asn Thr Asn Arg Pro Ser
[0648] 1 5
[0649] <210> 54
[0650] <211> 11
[0651] <212> PRT
[0652] <213> 人造序列
[0653] <220>
[0654] <223> PRb-CN26的CDR3-VL
[0655] <400> 54
[0656] Gly Gly Tyr Asp Gly Ile Ser Asp Thr Gly Ile
[0657] 1 5 10
[0658] <210> 55
[0659] <211> 122
[0660] <212> PRT
[0661] <213> 人造序列
[0662] <220>

[0663]	<223> PRb-CN26的VH																			
[0664]	<400> 55																			
[0665]	Ala	Val	Thr	Leu	Asp	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Gln	Thr	Pro	Gly	Gly				
[0666]	1				5					10					15					
[0667]	Gly	Leu	Ser	Leu	Val	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Arg				
[0668]					20					25					30					
[0669]	Gly	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
[0670]					35					40					45					
[0671]	Ala	Gly	Ile	Gly	Asn	Thr	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ala	Tyr	Ala	Pro	Ala	Val				
[0672]					50					55					60					
[0673]	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Gly	Gln	Ser	Thr	Val	Arg				
[0674]	65									70					75					80
[0675]	Leu	Gln	Leu	Asn	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys				
[0676]																				
[0677]	Ala	Lys	Arg	Gly	Phe	Met	Asp	Ala	Gly	Gly	Ile	Asp	Ala	Trp	Gly	His				
[0678]																				
[0679]	Gly	Thr	Glu	Val	Ile	Val	Ser	Ser	Thr	Ser										
[0680]																				
[0681]	<210> 56																			
[0682]	<211> 108																			
[0683]	<212> PRT																			
[0684]	<213> 人造序列																			
[0685]	<220>																			
[0686]	<223> PRb-CN26的VL																			
[0687]	<400> 56																			
[0688]	Leu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Asn	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys				
[0689]	1					5					10				15					
[0690]	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Gly				
[0691]																				
[0692]	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Pro	Gly	Ser	Ala	Pro	Val	Thr	Val	Ile	Tyr				
[0693]																				
[0694]	Asp	Asn	Thr	Asn	Arg	Pro	Ser	Asn	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser				
[0695]																				
[0696]	Leu	Ser	Gly	Ser	Thr	Asp	Thr	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Val	Gln	Ala	Glu				
[0697]	65																			
[0698]	Asp	Glu	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gly	Gly	Tyr	Asp	Gly	Ile	Ser	Asp	Thr				
[0699]																				
[0700]	Gly	Ile	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Leu								
[0701]																				

[0702]	<210>	57
[0703]	<211>	18
[0704]	<212>	PRT
[0705]	<213>	人造序列
[0706]	<220>	
[0707]	<223>	scFv中VL-VH用接头
[0708]	<400>	57
[0709]	Gly Gln Ser Ser Arg Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly	
[0710]	1 5 10 15	
[0711]	Gly Ser	
[0712]	<210>	58
[0713]	<211>	107
[0714]	<212>	PRT
[0715]	<213>	人造序列
[0716]	<220>	
[0717]	<223>	Kappa恒定区(Ck)
[0718]	<400>	58
[0719]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
[0720]	1 5 10 15	
[0721]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
[0722]	20 25 30	
[0723]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
[0724]	35 40 45	
[0725]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
[0726]	50 55 60	
[0727]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
[0728]	65 70 75 80	
[0729]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Leu	
[0730]	85 90 95	
[0731]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser	
[0732]	100 105	
[0733]	<210>	59
[0734]	<211>	15
[0735]	<212>	PRT
[0736]	<213>	人造序列
[0737]	<220>	
[0738]	<223>	scFv-Ck用接头
[0739]	<400>	59
[0740]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	

[0741]	1	5	10	15
[0742]	<210> 60			
[0743]	<211> 255			
[0744]	<212> PRT			
[0745]	<213> 人造序列			
[0746]	<220>			
[0747]	<223> hPDGFR-beta胞外域			
[0748]	<400> 60			
[0749]	Met Arg Leu Pro Gly Ala Met Pro Ala Leu Ala Leu Lys Gly Glu Leu			
[0750]	1	5	10	15
[0751]	Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu Leu Glu Pro Gln Ile Ser Gln Gly			
[0752]	20 25 30			
[0753]	Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser			
[0754]	35 40 45			
[0755]	Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg			
[0756]	50 55 60			
[0757]	Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr			
[0758]	65 70 75 80			
[0759]	Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly			
[0760]	85 90 95			
[0761]	Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu			
[0762]	100 105 110			
[0763]	Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu			
[0764]	115 120 125			
[0765]	Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu			
[0766]	130 135 140			
[0767]	Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu			
[0768]	145 150 155 160			
[0769]	His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln			
[0770]	165 170 175			
[0771]	Arg Gly Phe Ser Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr			
[0772]	180 185 190			
[0773]	Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg			
[0774]	195 200 205			
[0775]	Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val			
[0776]	210 215 220			
[0777]	Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn			
[0778]	225 230 235 240			
[0779]	Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly			

[0780]		245		250		255
[0781]	<210>	61				
[0782]	<211>	255				
[0783]	<212>	PRT				
[0784]	<213>	人造序列				
[0785]	<220>					
[0786]	<223>	mPDGFR-beta胞外域				
[0787]	<400>	61				
[0788]	Leu Val Ile Thr Pro Pro Gly Pro Glu Phe Val Leu Asn Ile Ser Ser					
[0789]	1	5		10		15
[0790]	Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Met Trp Glu Gln					
[0791]		20		25		30
[0792]	Met Ser Gln Val Pro Trp Gln Glu Ala Ala Met Asn Gln Asp Gly Thr					
[0793]		35		40		45
[0794]	Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Val Thr Gly Gly Asp Thr Gly					
[0795]		50		55		60
[0796]	Glu Tyr Phe Cys Val Tyr Asn Asn Ser Leu Gly Pro Glu Leu Ser Glu					
[0797]	65	70		75		80
[0798]	Arg Lys Arg Ile Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Met Gly Phe Leu					
[0799]		85		90		95
[0800]	Pro Met Asp Ser Glu Asp Leu Phe Ile Phe Val Thr Asp Val Thr Glu					
[0801]		100		105		110
[0802]	Thr Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Glu Val Thr Leu					
[0803]		115		120		125
[0804]	His Glu Lys Lys Val Asp Ile Pro Leu His Val Pro Tyr Asp His Gln					
[0805]		130		135		140
[0806]	Arg Gly Phe Thr Gly Thr Phe Glu Asp Lys Thr Tyr Ile Cys Lys Thr					
[0807]	145	150		155		160
[0808]	Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Thr Tyr Tyr Val Tyr Ser					
[0809]		165		170		175
[0810]	Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val					
[0811]		180		185		190
[0812]	Val Arg Gln Gly Glu Ser Ile Thr Ile Arg Cys Ile Val Met Gly Asn					
[0813]		195		200		205
[0814]	Asp Val Val Asn Phe Gln Trp Thr Tyr Pro Arg Met Lys Ser Gly Arg					
[0815]		210		215		220
[0816]	Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Tyr Leu Phe Gly Val Pro Ser Arg Ile					
[0817]	225	230		235		240
[0818]	Gly Ser Ile Leu His Ile Pro Thr Ala Glu Leu Ser Asp Ser Gly					

[0819]		245		250		255
[0820]	<210>	62				
[0821]	<211>	255				
[0822]	<212>	PRT				
[0823]	<213>	人造序列				
[0824]	<220>					
[0825]	<223>	食蟹猴PDGFR-beta				
[0826]	<400>	62				
[0827]	Met Arg Leu Pro Gly Ala Met Pro Ala Leu Ala Leu Lys Gly Gln Leu					
[0828]	1	5		10		15
[0829]	Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Glu Pro Gln Val Ser Gln Gly					
[0830]		20		25		30
[0831]	Leu Val Ile Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Ile Leu Asn Val Ser Ser					
[0832]		35		40		45
[0833]	Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg					
[0834]		50		55		60
[0835]	Met Ser Gln Glu Leu Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Asn Thr					
[0836]	65	70		75		80
[0837]	Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly					
[0838]		85		90		95
[0839]	Glu Tyr Phe Cys Thr Tyr Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Pro Asp Glu					
[0840]		100		105		110
[0841]	Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu					
[0842]		115		120		125
[0843]	Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu					
[0844]		130		135		140
[0845]	Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu					
[0846]	145	150		155		160
[0847]	His Glu Lys Lys Gly Asp Ile Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln					
[0848]		165		170		175
[0849]	Arg Gly Phe Ser Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr					
[0850]		180		185		190
[0851]	Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg					
[0852]		195		200		205
[0853]	Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val					
[0854]		210		215		220
[0855]	Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn					
[0856]	225	230		235		240
[0857]	Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Met Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly					

[0858]		245		250		255
[0859]	<210>	63				
[0860]	<211>	255				
[0861]	<212>	PRT				
[0862]	<213>	人造序列				
[0863]	<220>					
[0864]	<223>	野猪PDGFR-beta				
[0865]	<400>	63				
[0866]	Met Gln Leu Pro Arg Ala Val Pro Ala Ser Val Leu Ile Gly Gln Val					
[0867]	1	5		10		15
[0868]	Leu Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Leu Gly Pro Gln Ala Ser Trp Gly					
[0869]		20		25		30
[0870]	Leu Val Ile Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Leu Ser Ser					
[0871]		35		40		45
[0872]	Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Pro Ala Pro Val Val Trp Glu Arg					
[0873]		50		55		60
[0874]	Met Ser Gln Lys Pro Pro Gln Glu Met Thr Gly Thr Gln Asp Gly Thr					
[0875]	65	70		75		80
[0876]	Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Ala Asn Val Thr Gly Leu Asp Thr Gly					
[0877]		85		90		95
[0878]	Glu Tyr Phe Cys Thr Tyr Lys Gly Ser Pro Gly Leu Glu Ala Ser Glu					
[0879]		100		105		110
[0880]	Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu					
[0881]		115		120		125
[0882]	Pro Val Asp Pro Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu					
[0883]		130		135		140
[0884]	Thr Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Arg Leu Val Val Thr Leu					
[0885]	145	150		155		160
[0886]	His Glu Lys Lys Val Asp Val Pro Leu Pro Ile Ser Tyr Asp His Gln					
[0887]		165		170		175
[0888]	Arg Gly Phe Ser Gly Thr Phe Glu Asp Lys Thr Tyr Val Cys Lys Thr					
[0889]		180		185		190
[0890]	Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Ser					
[0891]		195		200		205
[0892]	Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Gly Ala Val Gln Thr Val					
[0893]		210		215		220
[0894]	Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Val Met Cys Ile Val Thr Gly Asn					
[0895]	225	230		235		240
[0896]	Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Leu Glu Thr Gly					

[0897]		245	250	255
[0898]	<210>	64		
[0899]	<211>	9		
[0900]	<212>	PRT		
[0901]	<213>	人造序列		
[0902]	<220>			
[0903]	<223>	抗可替宁抗体CDR1-VH		
[0904]	<400>	64		
[0905]	Gly His Leu Arg Arg Arg Asp Trp Met			
[0906]	1	5		
[0907]	<210>	65		
[0908]	<211>	7		
[0909]	<212>	PRT		
[0910]	<213>	人造序列		
[0911]	<220>			
[0912]	<223>	抗可替宁抗体CDR2-VH		
[0913]	<400>	65		
[0914]	Ile Gly Arg Ser Gly Asp Thr			
[0915]	1	5		
[0916]	<210>	66		
[0917]	<211>	11		
[0918]	<212>	PRT		
[0919]	<213>	人造序列		
[0920]	<220>			
[0921]	<223>	抗可替宁抗体CDR3-VH		
[0922]	<400>	66		
[0923]	Ile Pro Tyr Phe Gly Trp Asn Asn Gly Asp Ile			
[0924]	1	5	10	
[0925]	<210>	67		
[0926]	<211>	13		
[0927]	<212>	PRT		
[0928]	<213>	人造序列		
[0929]	<220>			
[0930]	<223>	抗可替宁抗体CDR1-VL		
[0931]	<400>	67		
[0932]	Gln Ser Ser Gln Ser Pro Tyr Ser Asn Glu Trp Leu Ser			
[0933]	1	5	10	
[0934]	<210>	68		
[0935]	<211>	7		

[0936] <212> PRT
 [0937] <213> 人造序列
 [0938] <220>
 [0939] <223> 抗可替宁抗体CDR2-VL
 [0940] <400> 68
 [0941] Arg Ile Ser Thr Leu Ala Ser
 [0942] 1 5
 [0943] <210> 69
 [0944] <211> 12
 [0945] <212> PRT
 [0946] <213> 人造序列
 [0947] <220>
 [0948] <223> 抗可替宁抗体CDR3-VL
 [0949] <400> 69
 [0950] Ala Gly Gly Tyr Asn Phe Gly Leu Phe Leu Phe Gly
 [0951] 1 5 10
 [0952] <210> 70
 [0953] <211> 119
 [0954] <212> PRT
 [0955] <213> 人造序列
 [0956] <220>
 [0957] <223> 抗可替宁抗体VH
 [0958] <400> 70
 [0959] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0960] 1 5 10 15
 [0961] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly His Leu Arg Arg Arg Asp
 [0962] 20 25 30
 [0963] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0964] 35 40 45
 [0965] Ala Ala Ile Gly Arg Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 [0966] 50 55 60
 [0967] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 [0968] 65 70 75 80
 [0969] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
 [0970] 85 90 95
 [0971] Arg Ile Pro Tyr Phe Gly Trp Asn Asn Gly Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 [0972] 100 105 110
 [0973] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0974] 115

[0975]	<210>	71
[0976]	<211>	110
[0977]	<212>	PRT
[0978]	<213>	人造序列
[0979]	<220>	
[0980]	<223>	抗可替宁抗体VL
[0981]	<400>	71
[0982]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0983]	1 5 10 15	
[0984]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Pro Tyr Ser Asn	
[0985]	20 25 30	
[0986]	Glu Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu	
[0987]	35 40 45	
[0988]	Leu Ile Tyr Arg Ile Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe	
[0989]	50 55 60	
[0990]	Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu	
[0991]	65 70 75 80	
[0992]	Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Asn Phe	
[0993]	85 90 95	
[0994]	Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0995]	100 105 110	
[0996]	<210>	72
[0997]	<211>	214
[0998]	<212>	PRT
[0999]	<213>	人造序列
[1000]	<220>	
[1001]	<223>	兔Fc抗体
[1002]	<400>	72
[1003]	Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys	
[1004]	1 5 10 15	
[1005]	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	
[1006]	20 25 30	
[1007]	Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr	
[1008]	35 40 45	
[1009]	Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln	
[1010]	50 55 60	
[1011]	Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His	
[1012]	65 70 75 80	
[1013]	Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys	

[1014]					85					90						95			
[1015]	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Arg	Gly	Gln			
[1016]					100					105						110			
[1017]	Pro	Leu	Glu	Pro	Lys	Val	Tyr	Thr	Met	Gly	Pro	Pro	Arg	Glu	Glu	Leu			
[1018]					115					120						125			
[1019]	Ser	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Asn	Gly	Phe	Tyr	Pro			
[1020]					130					135						140			
[1021]	Ser	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Lys	Asn	Gly	Lys	Ala	Glu	Asp	Asn			
[1022]					145					150						155			
[1023]	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Leu			
[1024]					165					170						175			
[1025]	Tyr	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Pro	Thr	Ser	Glu	Trp	Gln	Arg	Gly	Asp	Val			
[1026]					180					185						190			
[1027]	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln			
[1028]					195					200						205			
[1029]	Lys	Ser	Ile	Ser	Arg	Ser													
[1030]					210														
[1031]	<210>	73																	
[1032]	<211>	16																	
[1033]	<212>	PRT																	
[1034]	<213>	人造序列																	
[1035]	<220>																		
[1036]	<223>	连接兔Fc与抗-PDGFR-beta抗体的铰链																	
[1037]	<400>	73																	
[1038]	Gln	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro			
[1039]	1				5					10						15			

双特异性 scFv- C_κ-scFv

Cot-duo



缬氨酸-瓜氨酸连接的倍癌霉素

Cot-duo-cot



可替宁

图1a

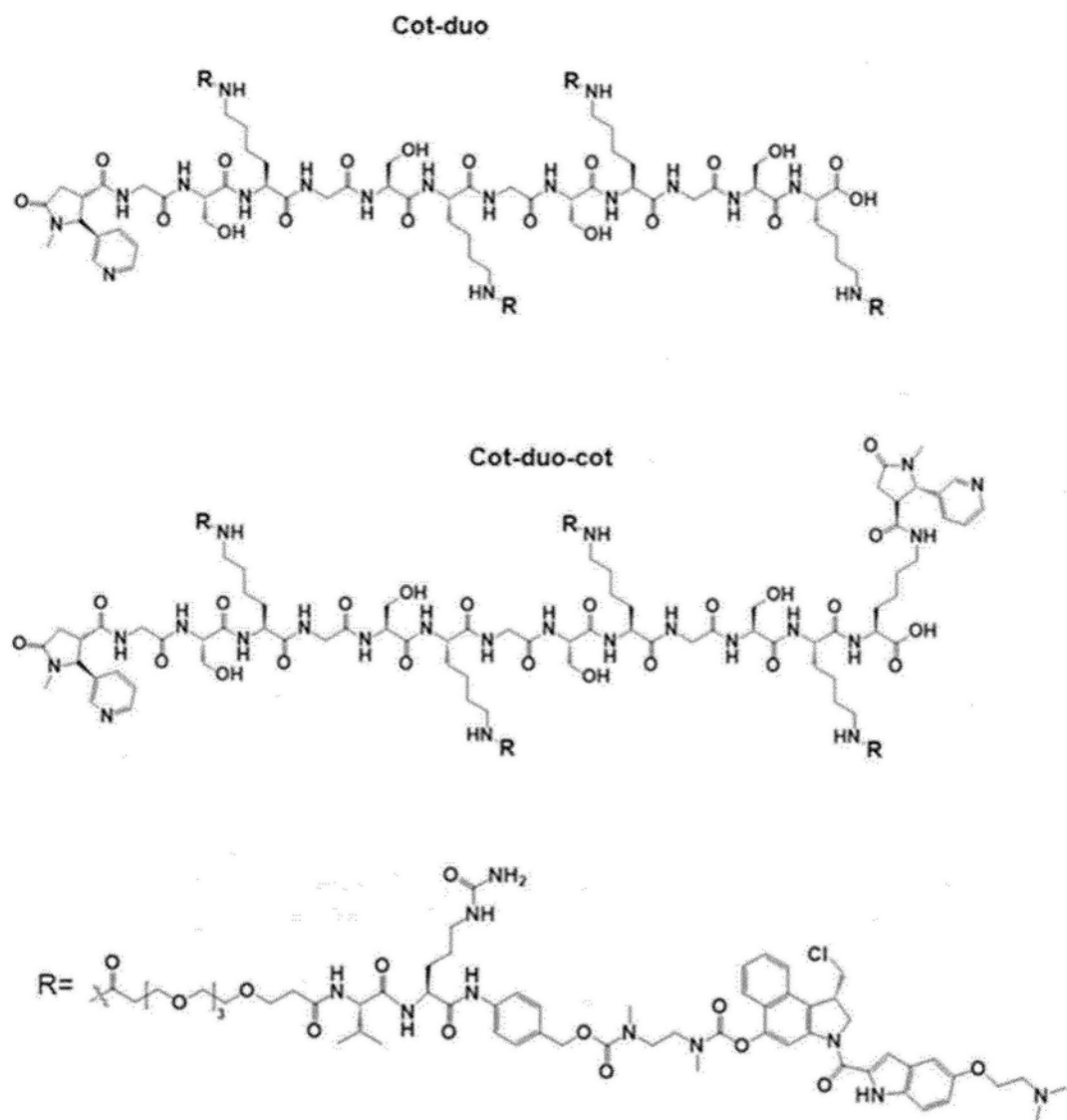


图1b

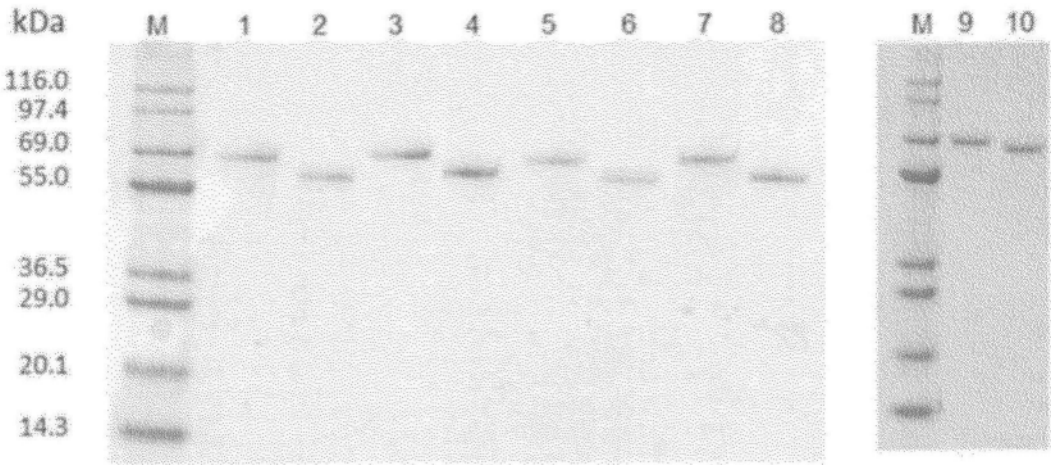


图2

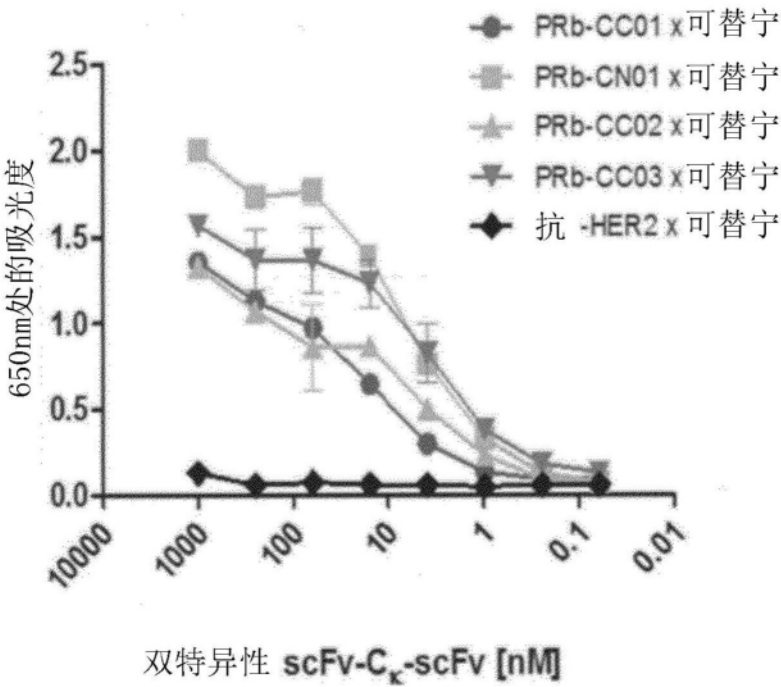


图3a

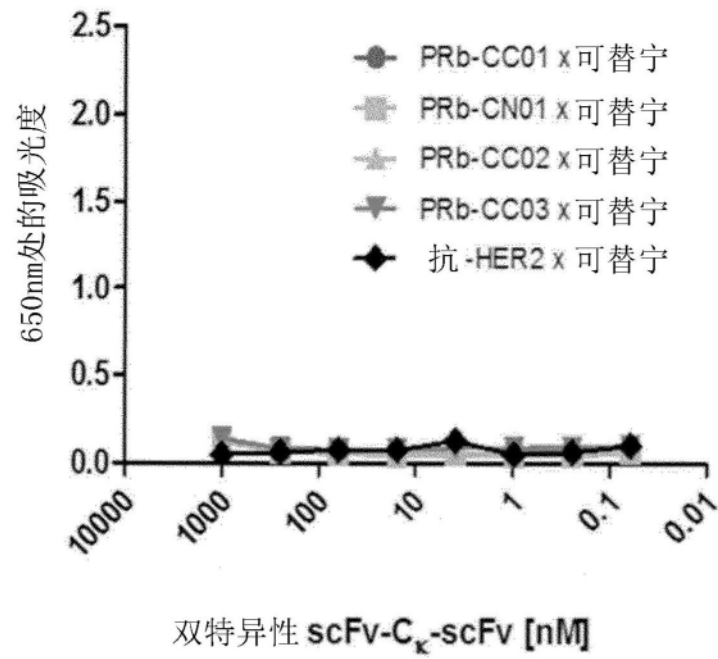


图3b

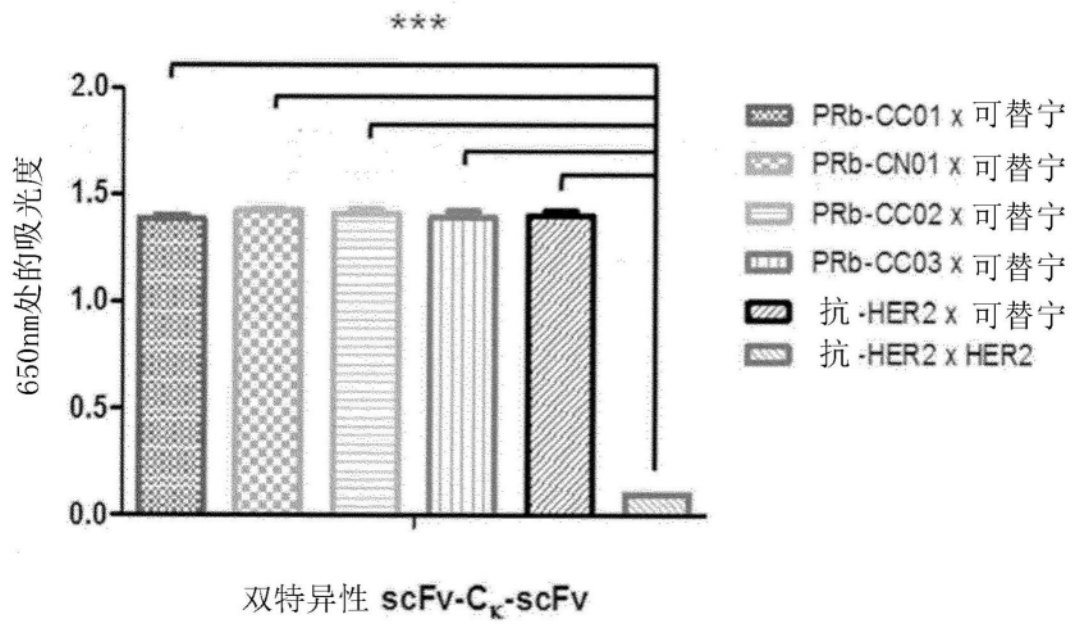


图3c

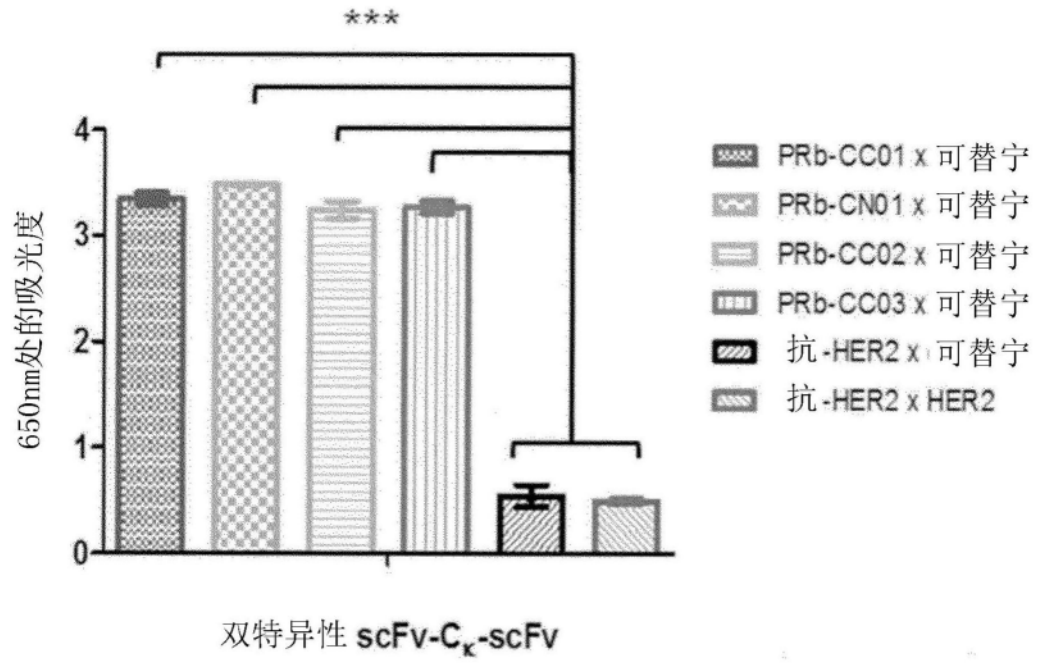


图3d

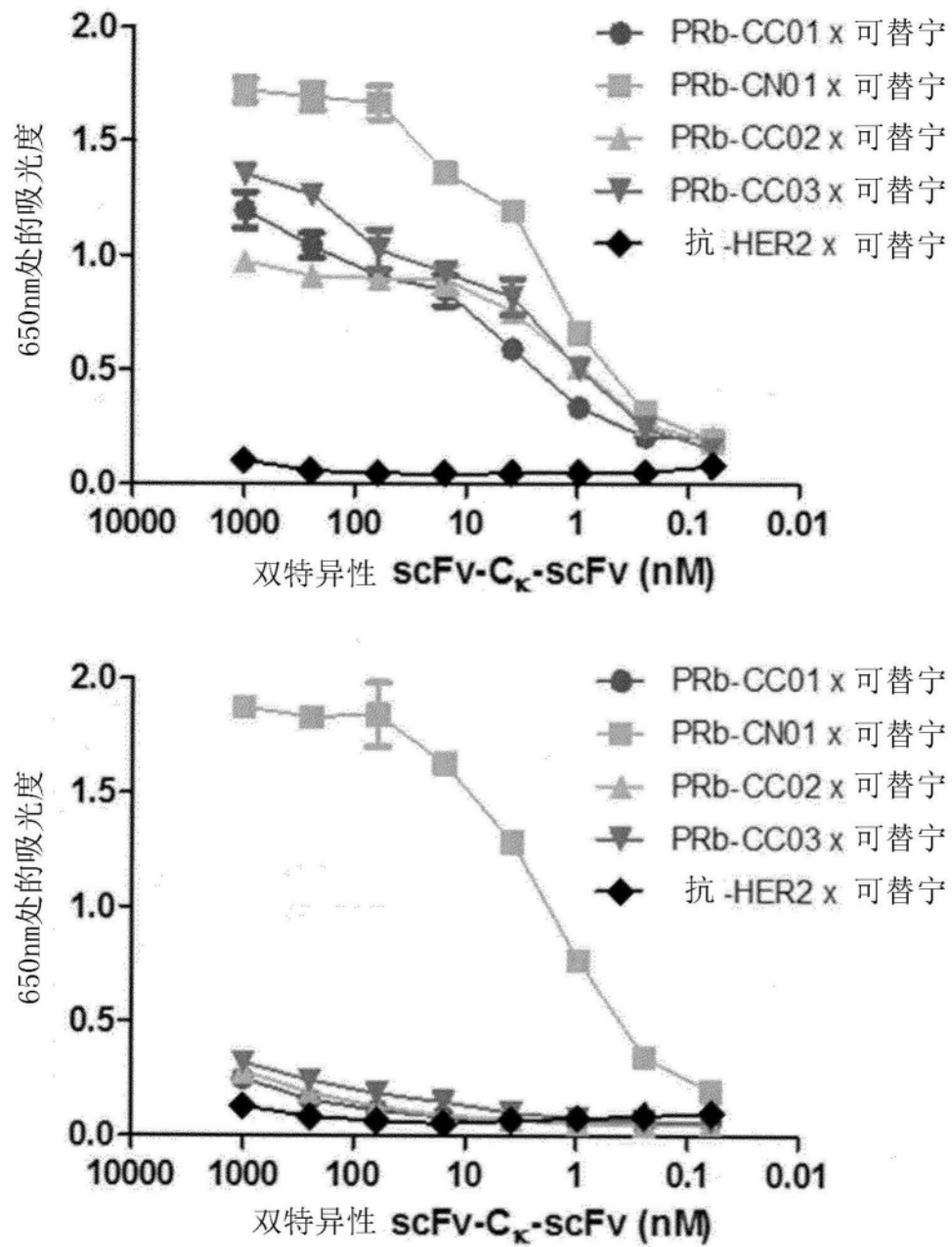


图4a

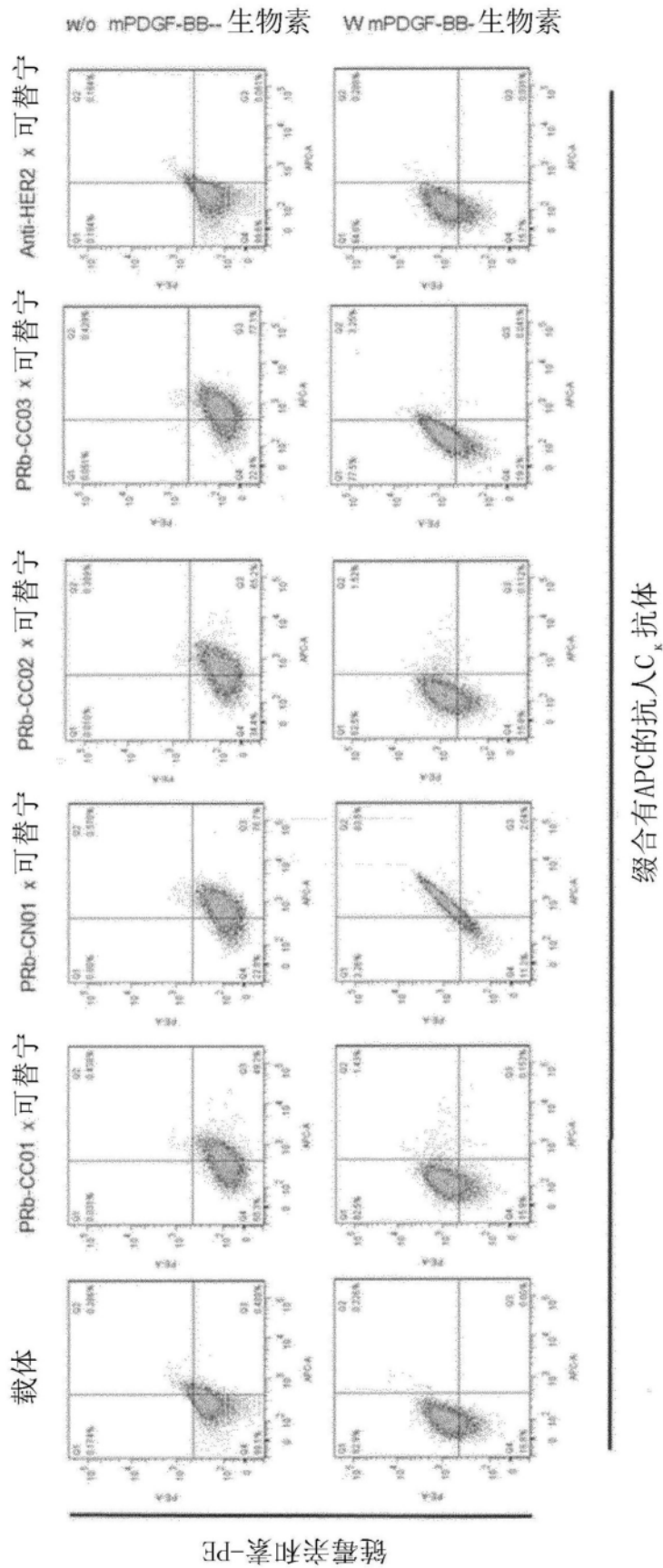


图4b

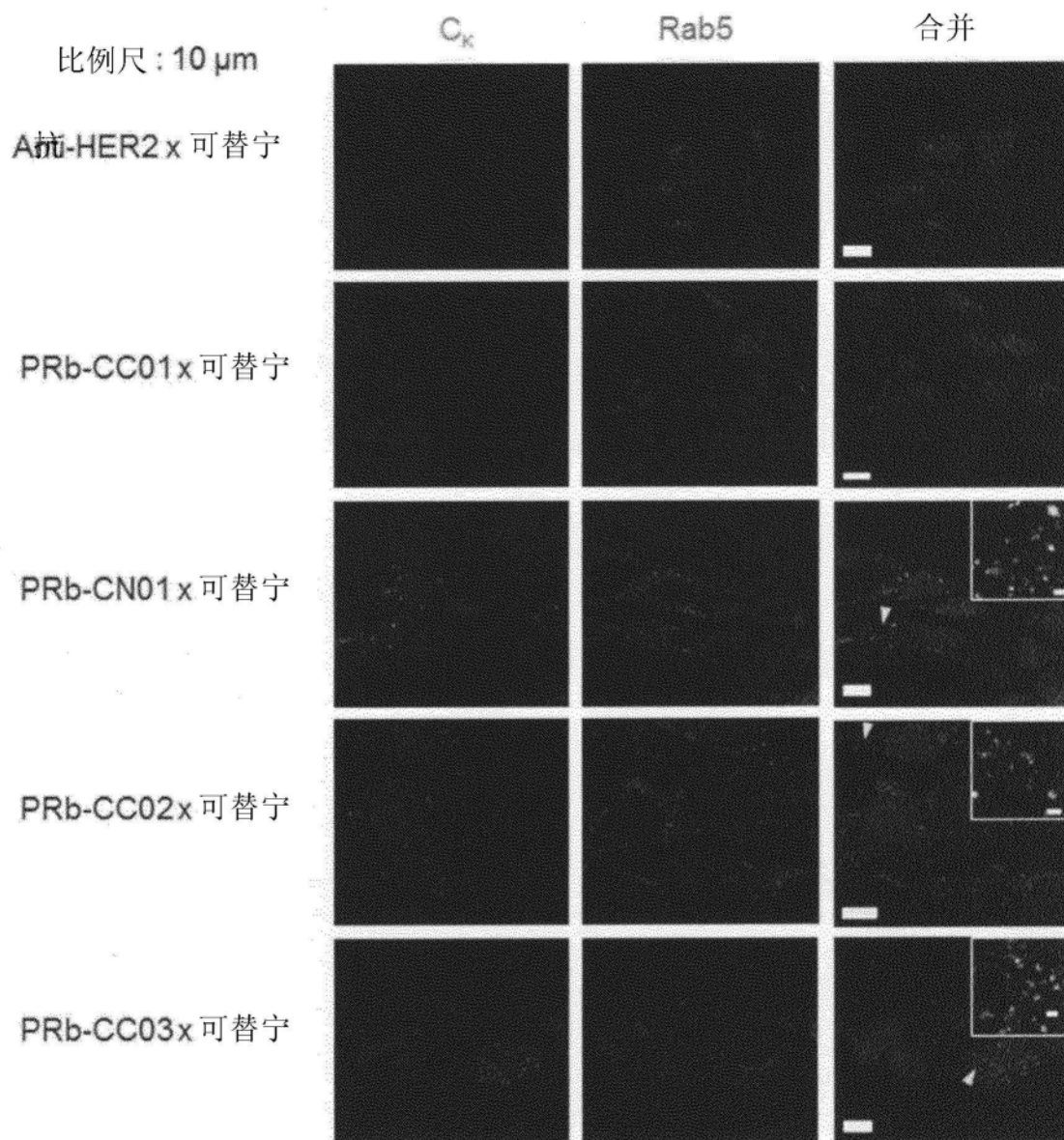


图4c

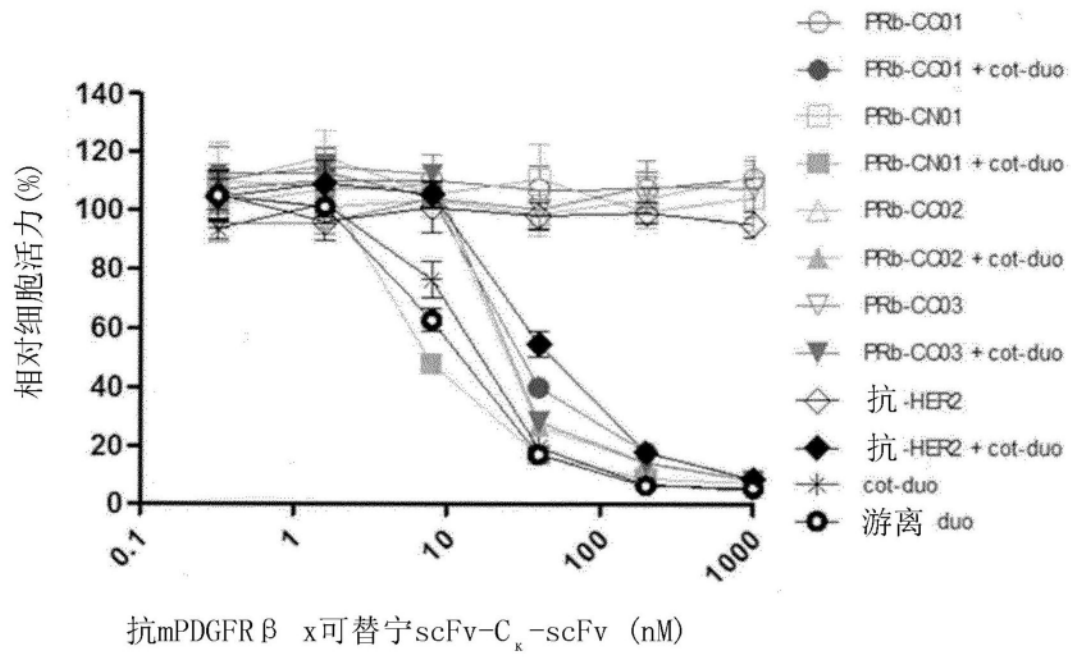


图5a

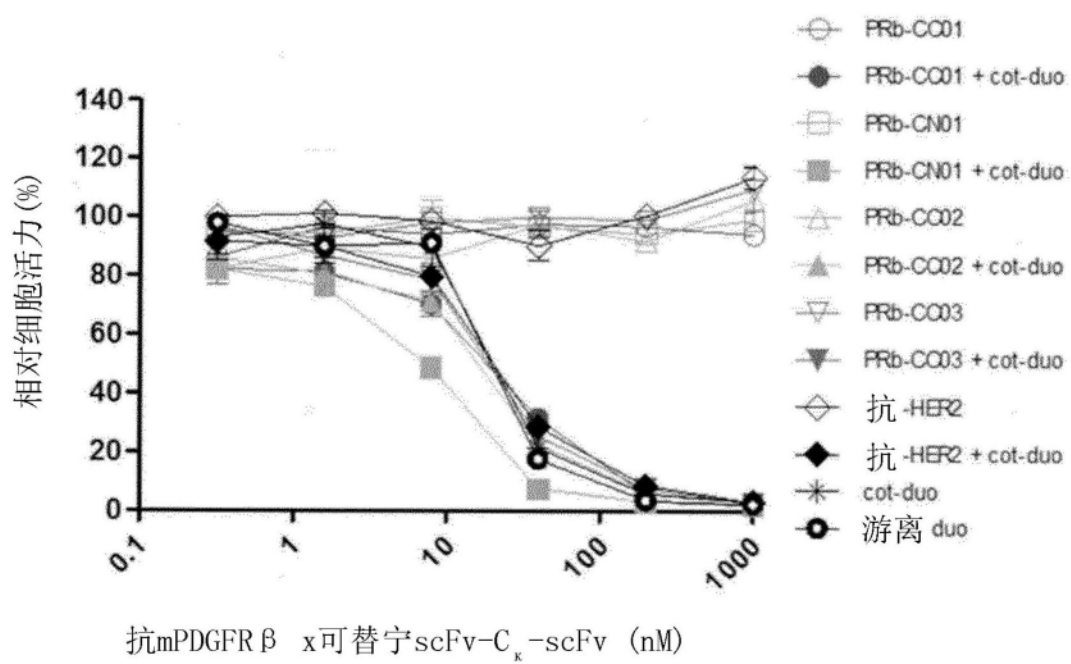


图5b

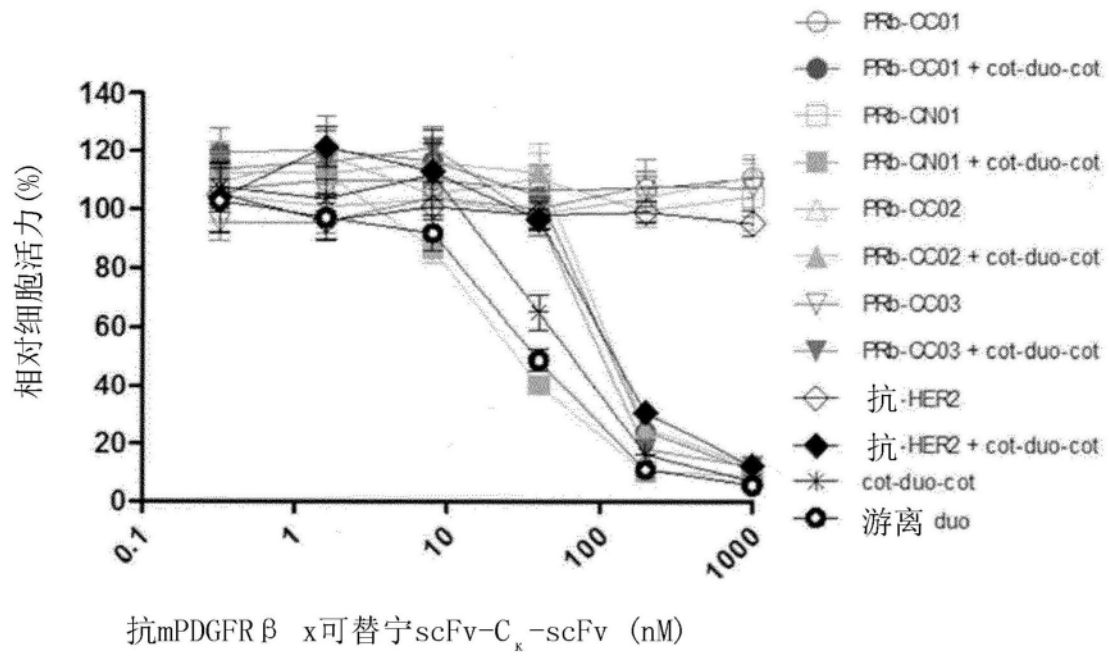


图5c

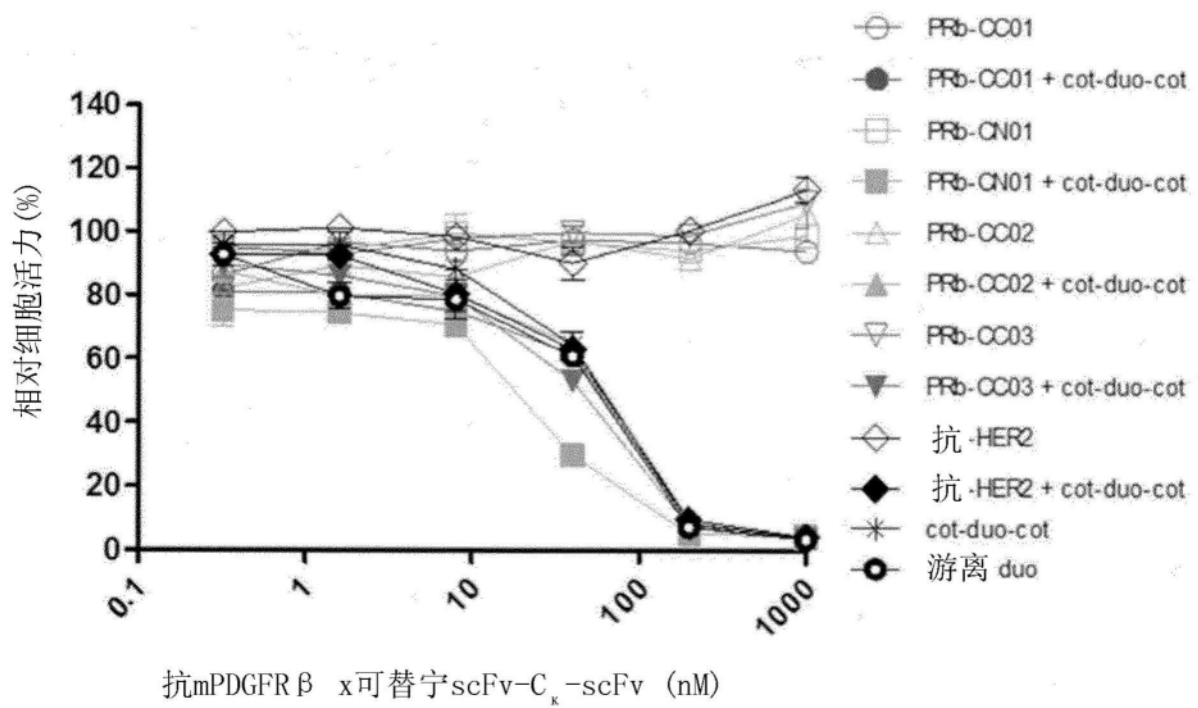
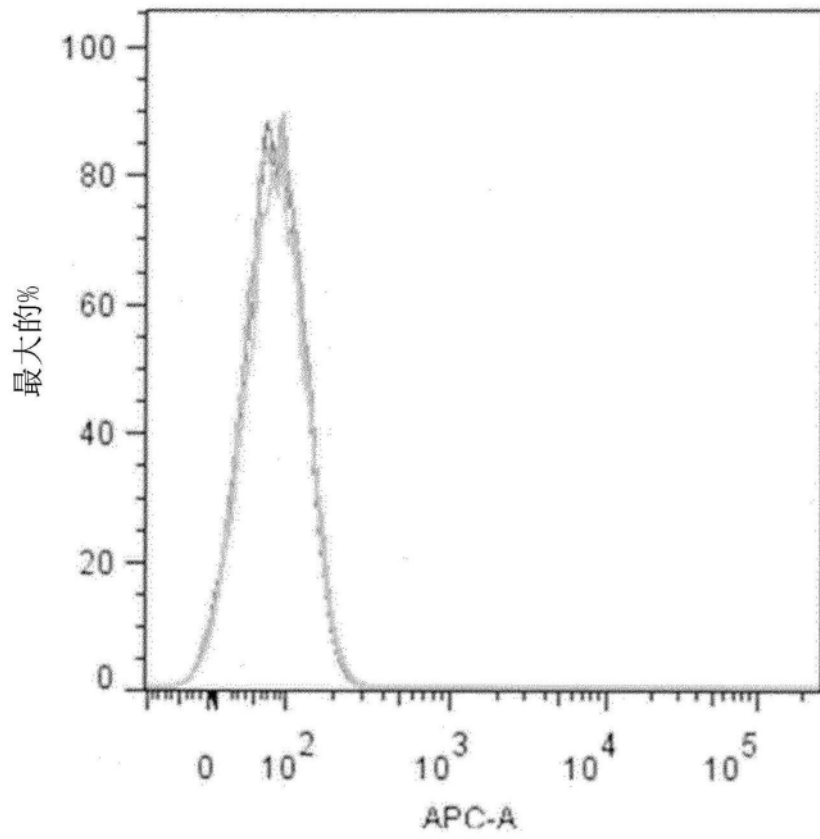


图5d



	双特异性 PRb-CN01 x 可替宁 scFv-C κ -scFv
	双特异性 抗-HER2 x 可替宁 scFv-C κ -scFv
	仅缀合有APC的抗人C κ 抗体
	无处理

图6

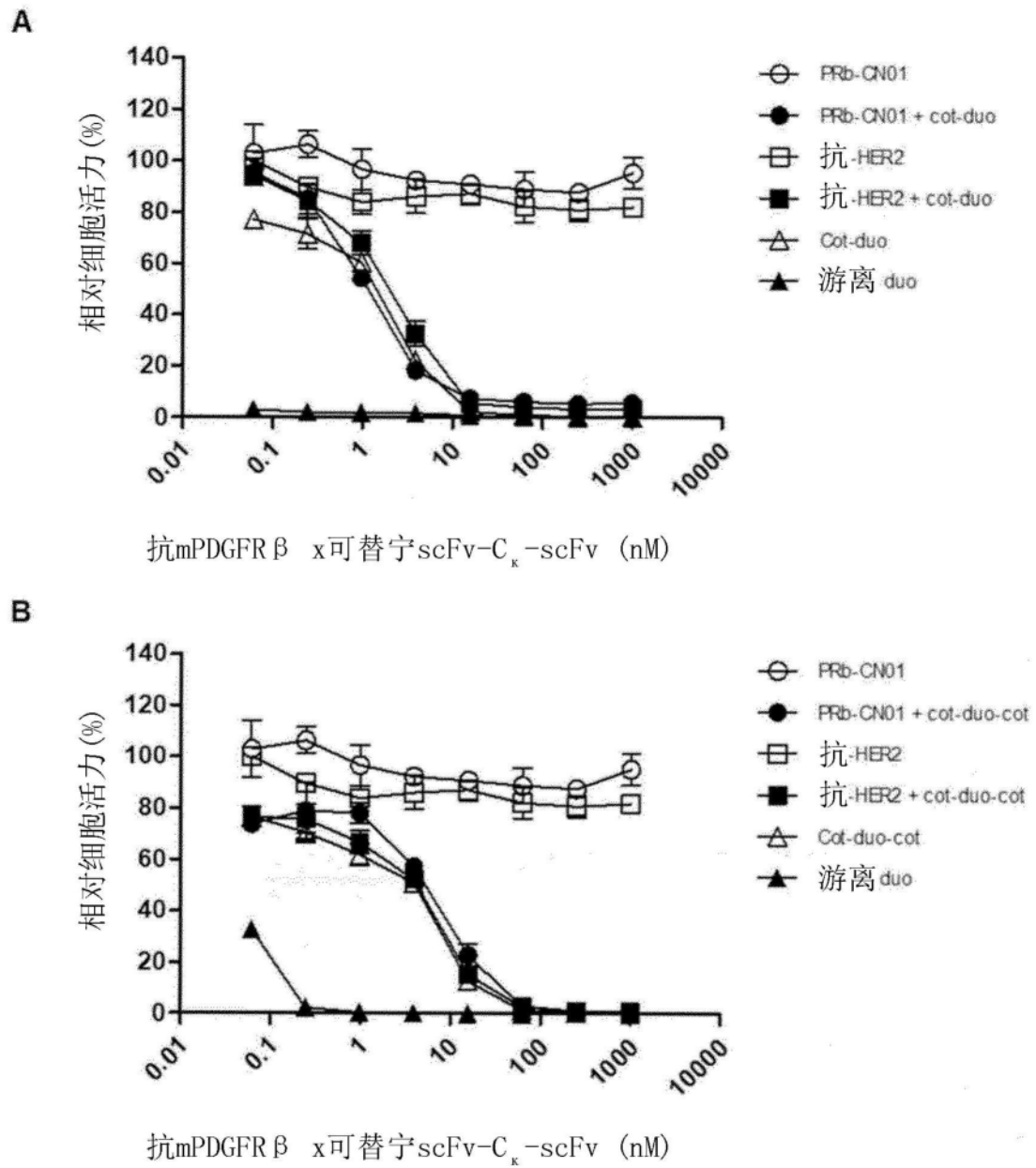


图7

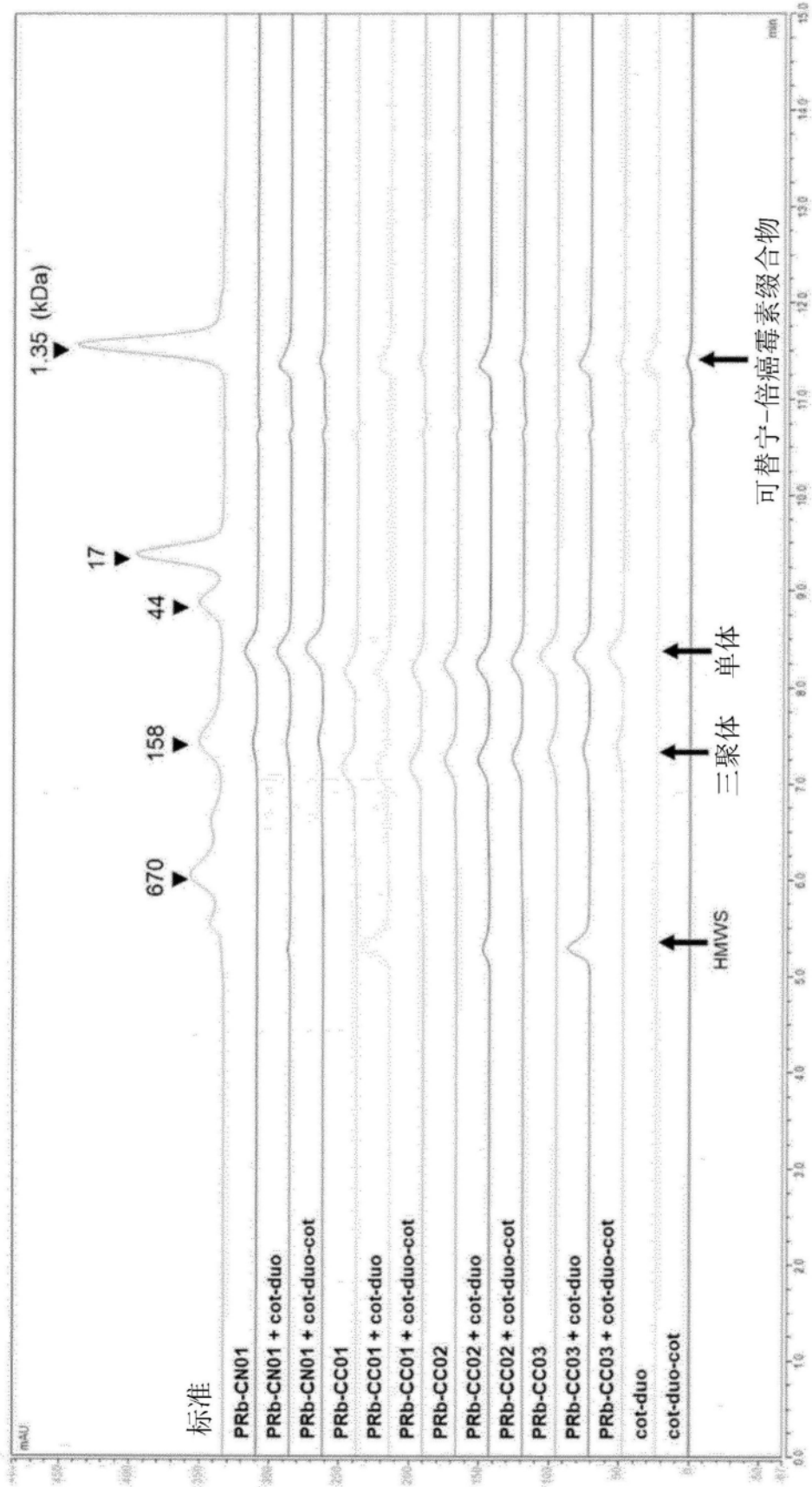


图8

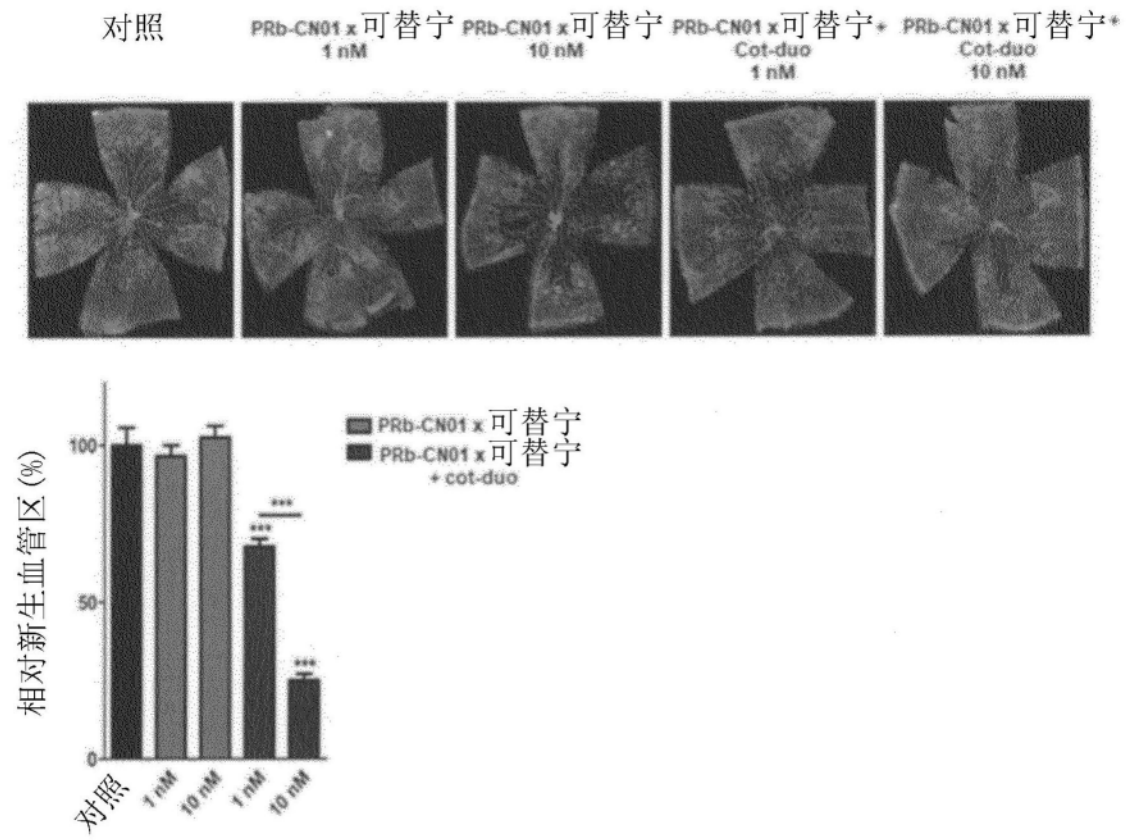


图9

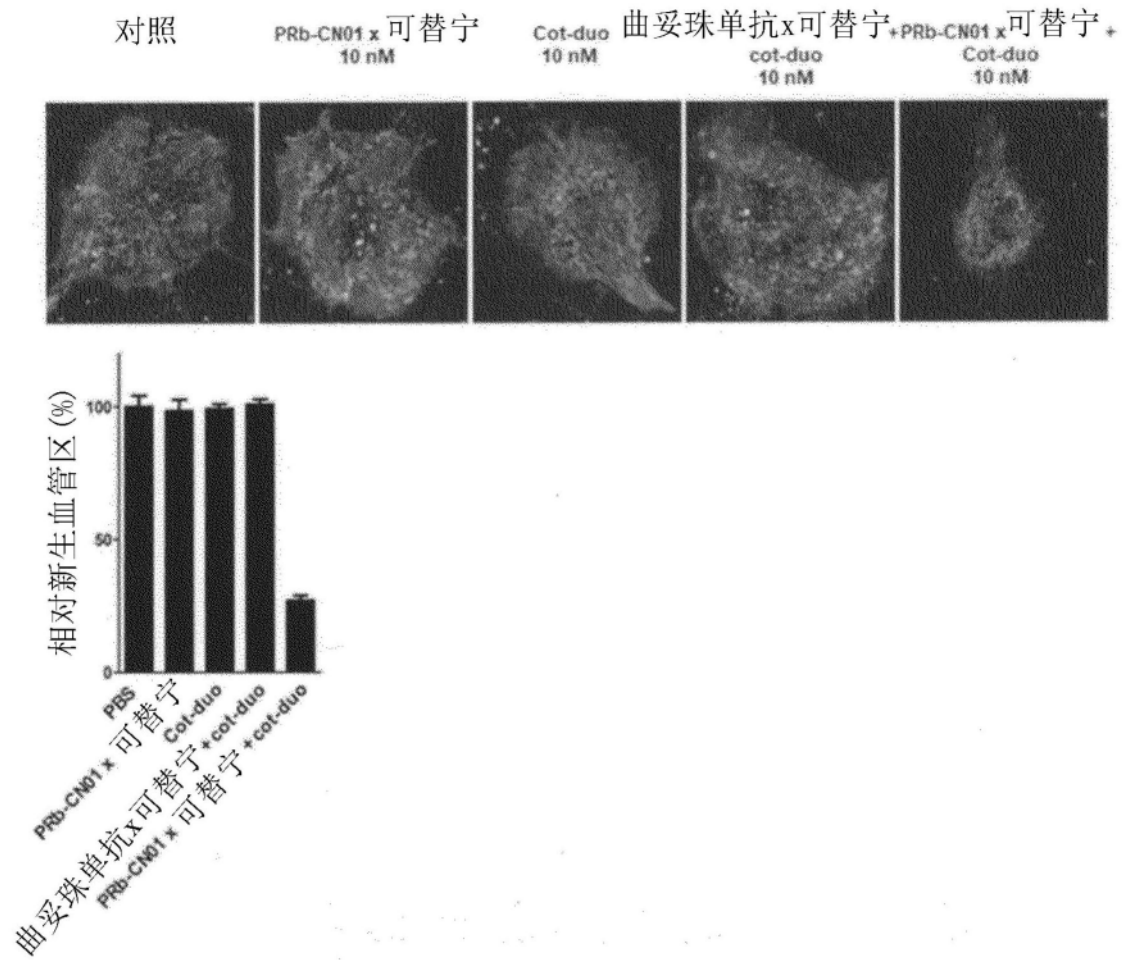


图10

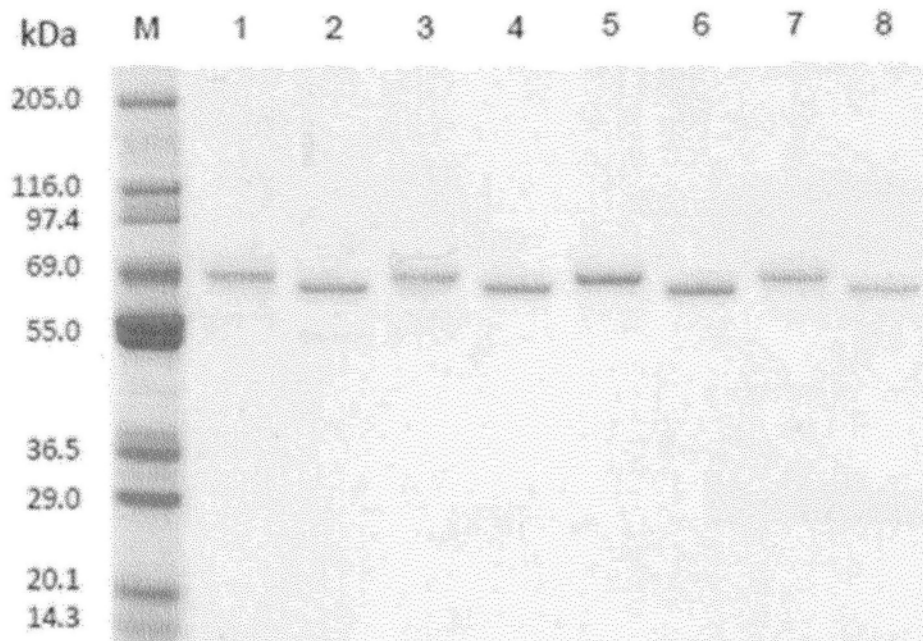


图11

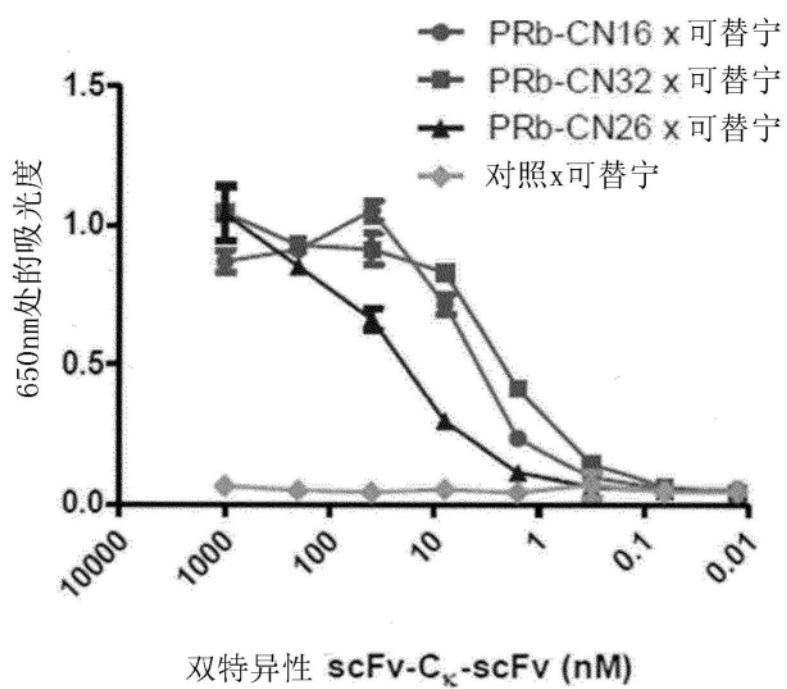


图12a

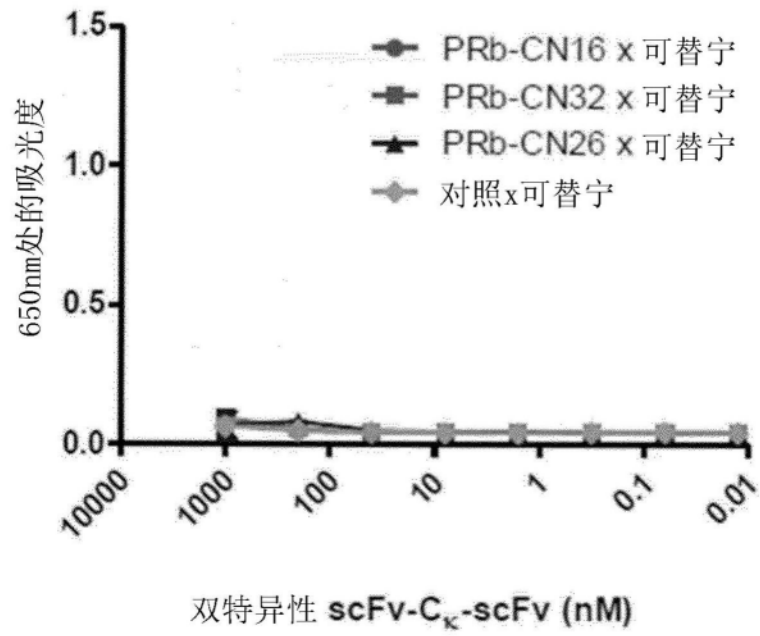


图12b

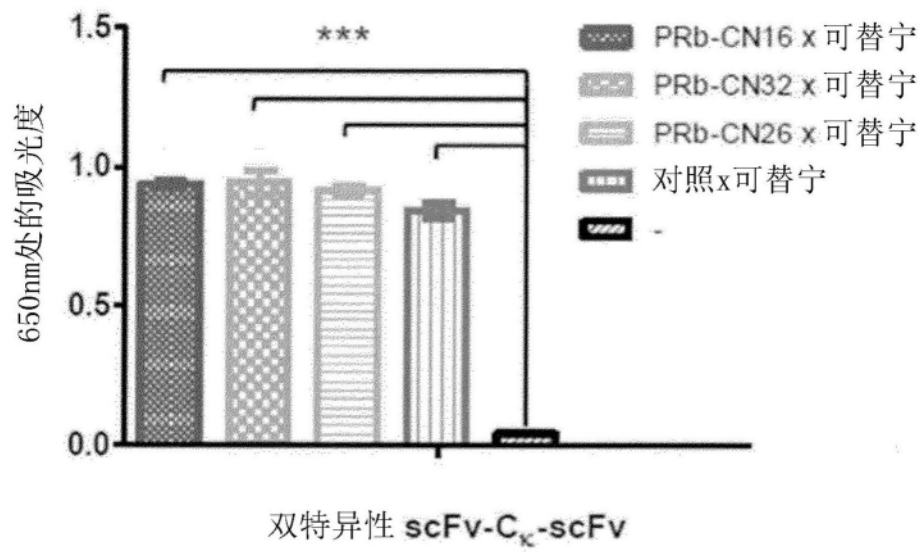


图12c

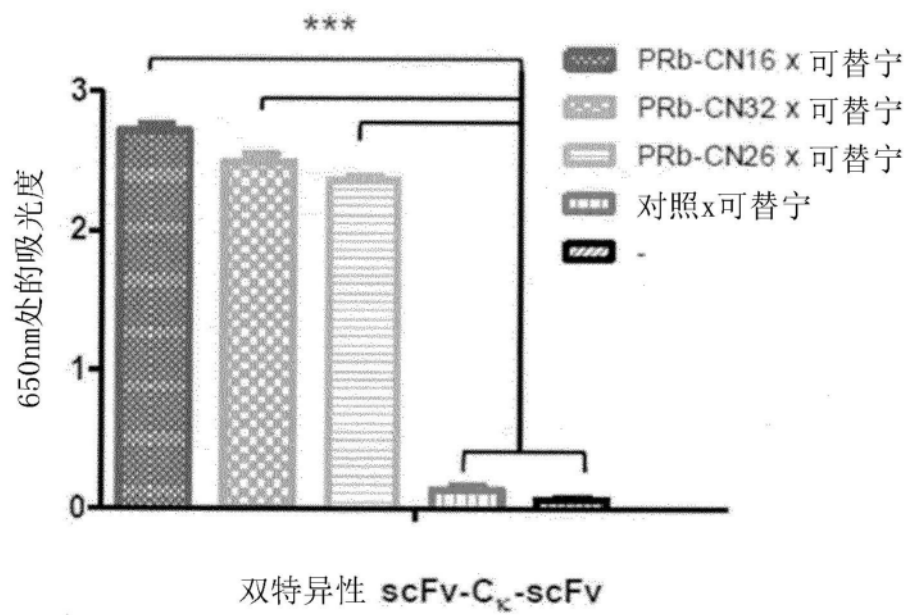


图12d

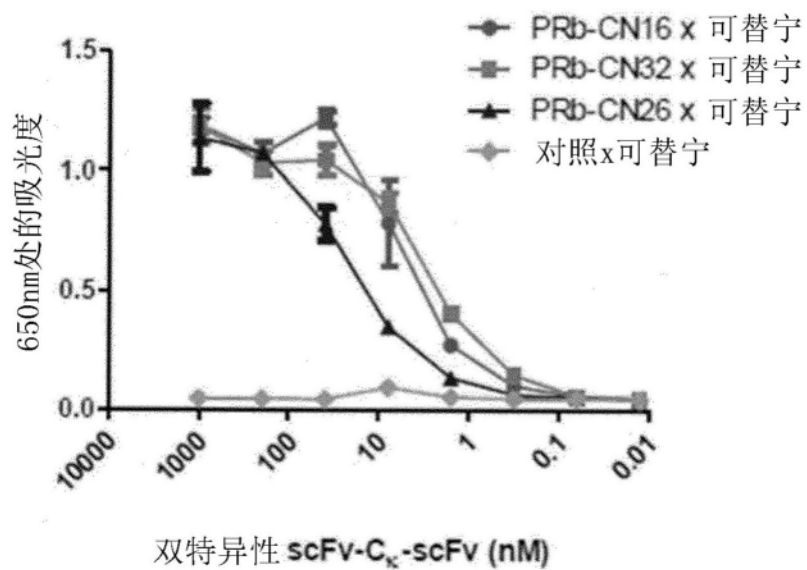
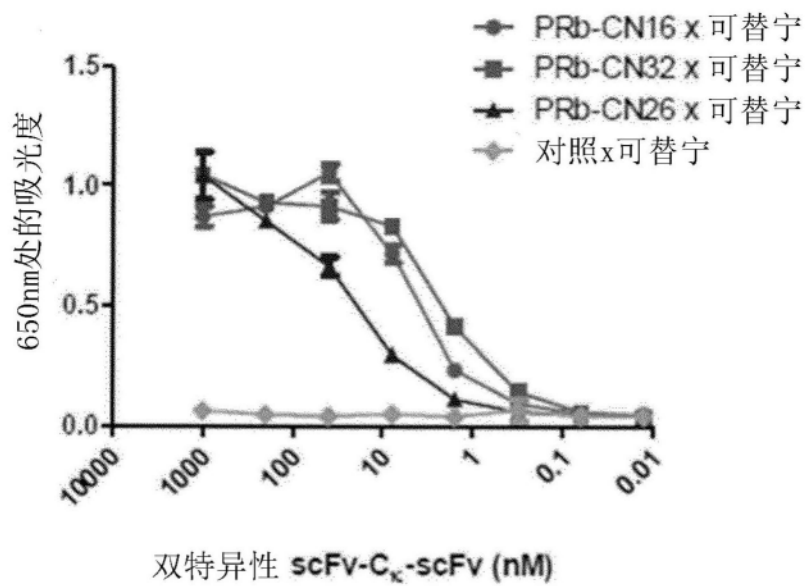


图13a

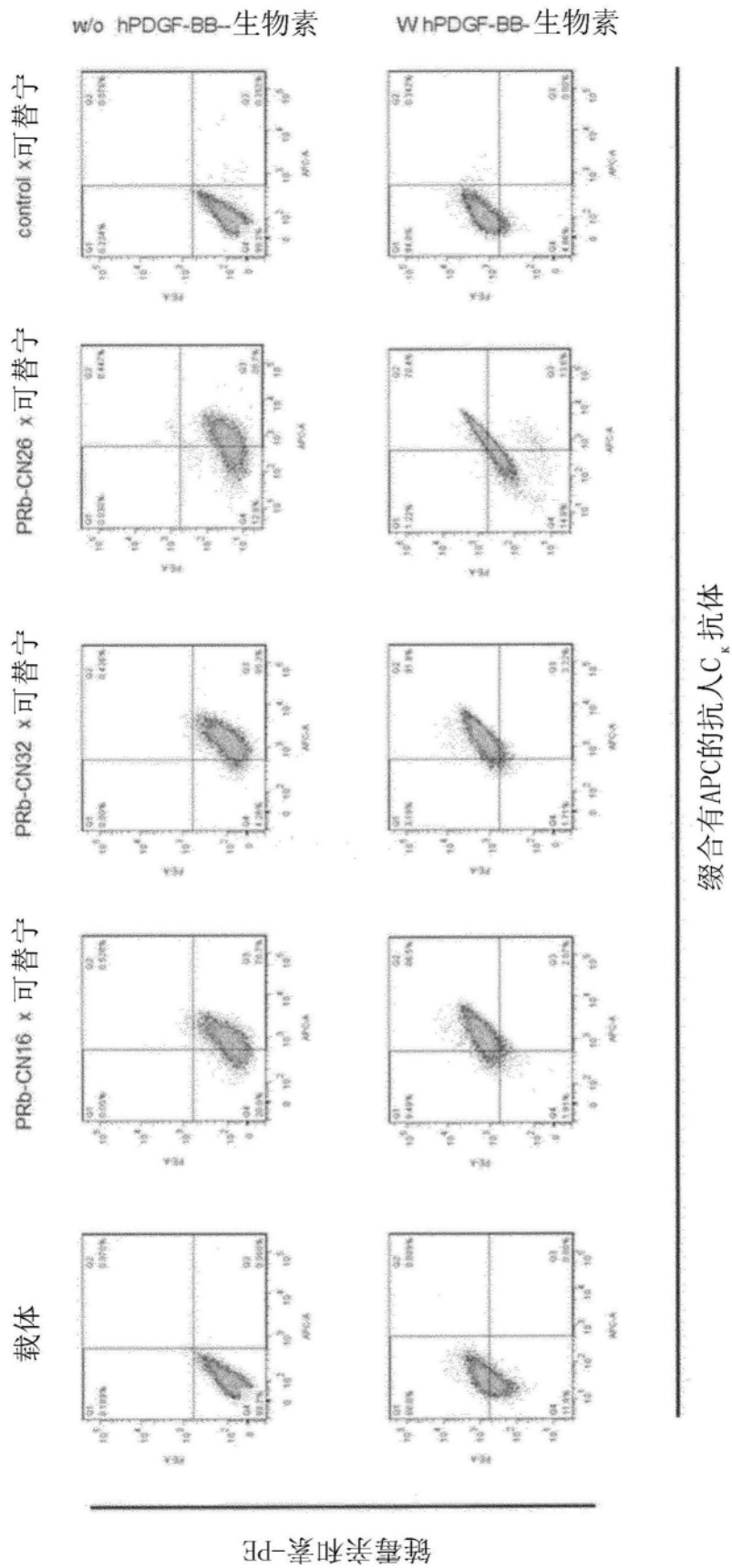


图13b

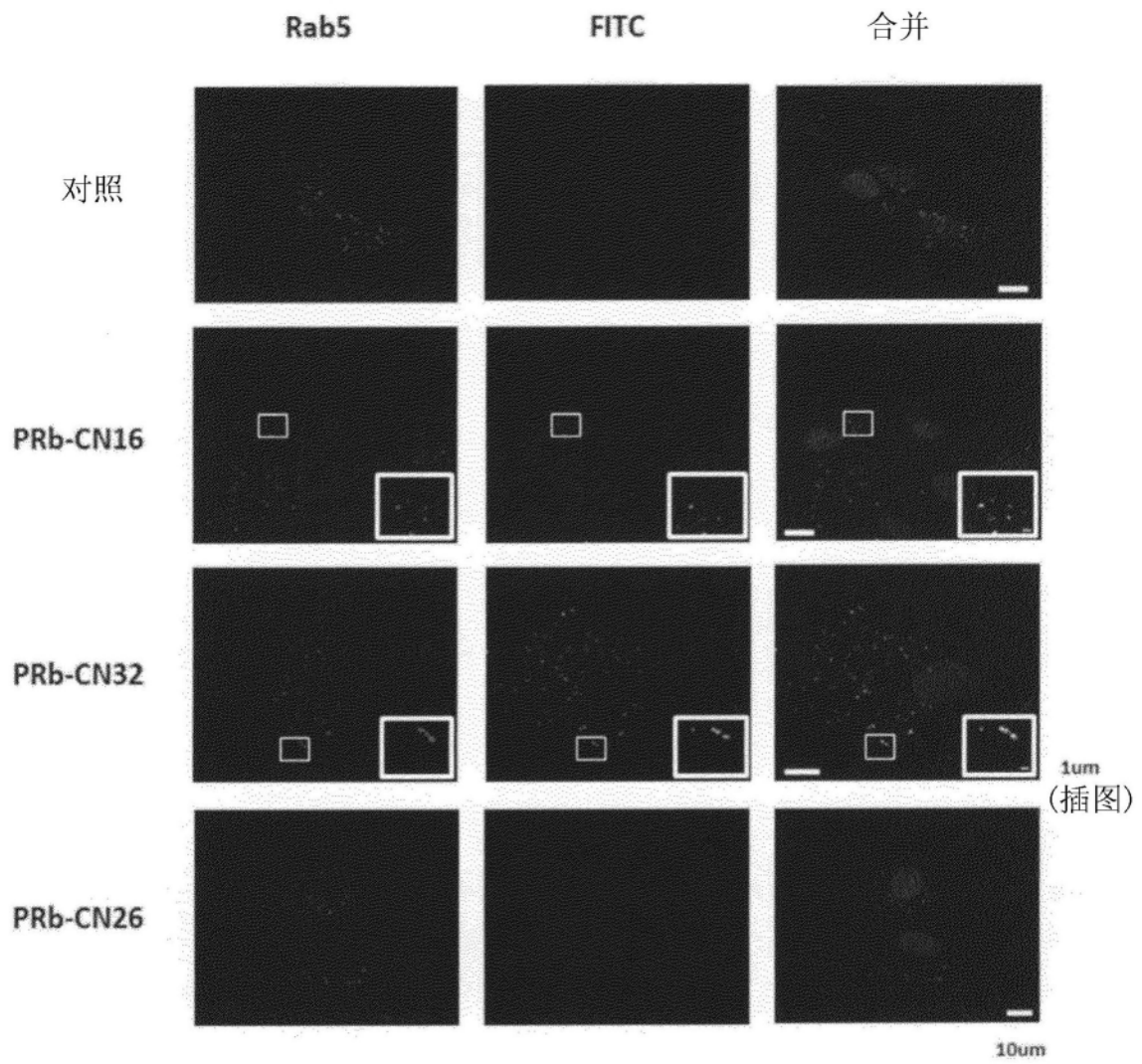


图13c

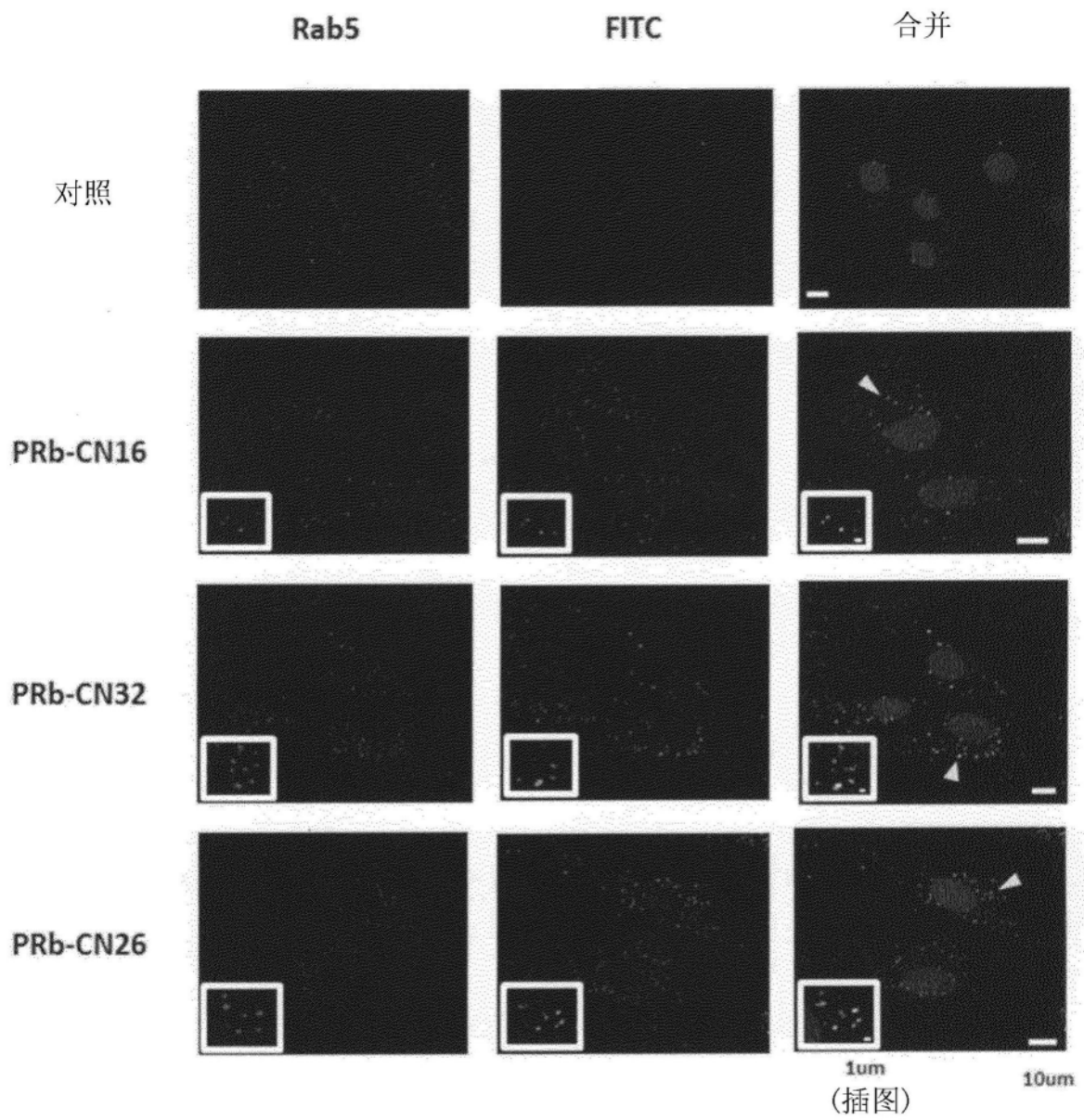


图13d

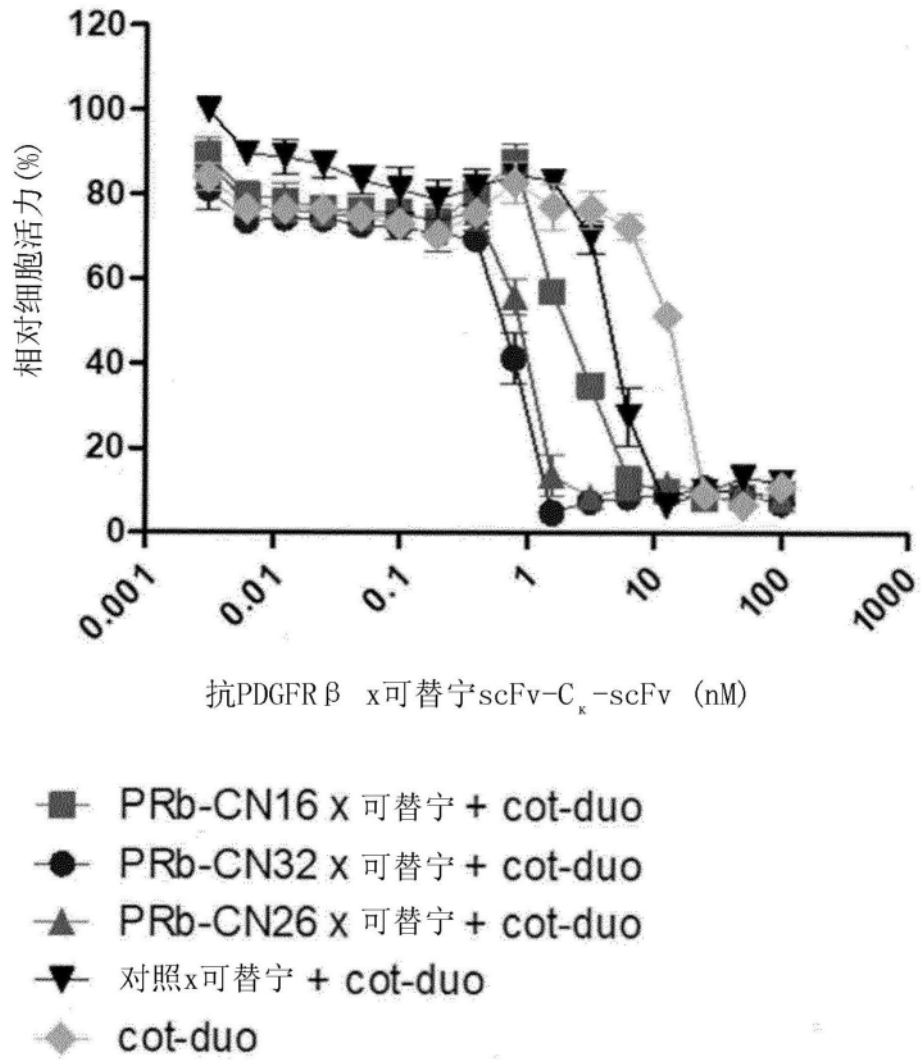


图14a

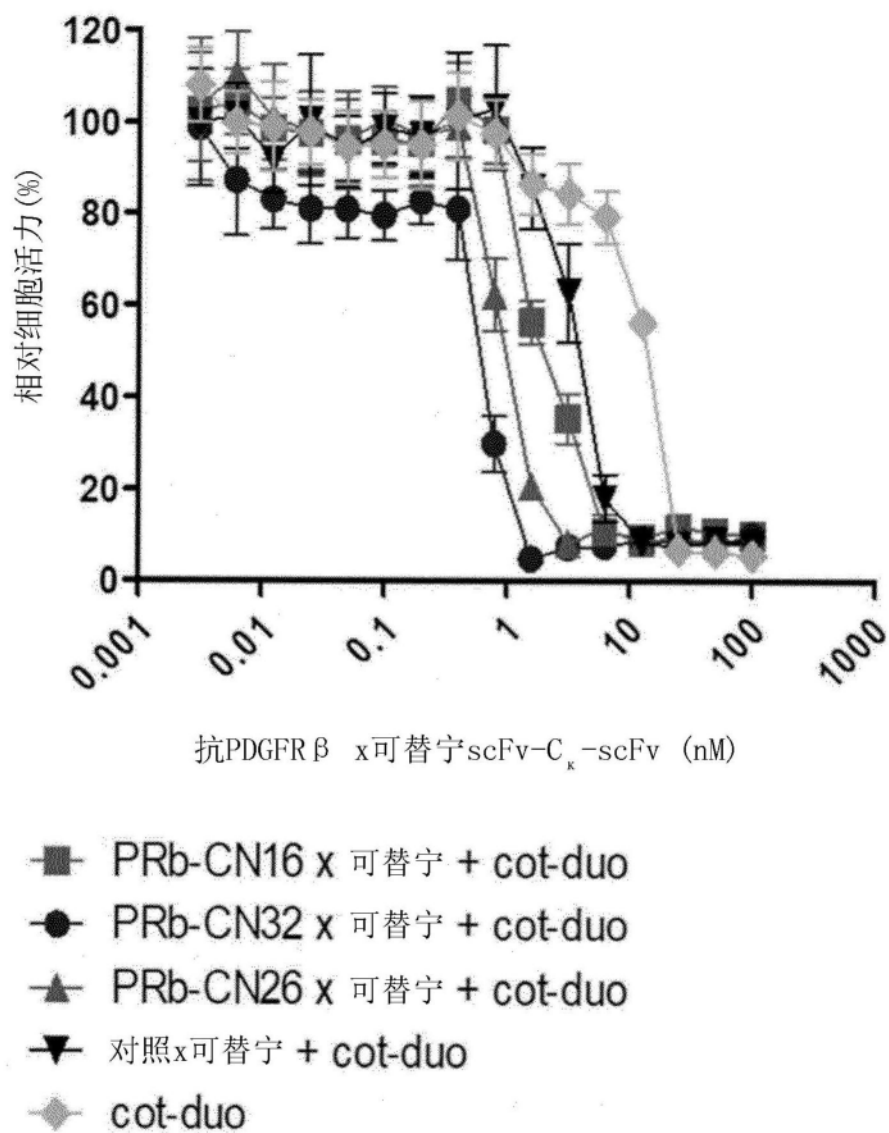


图14b

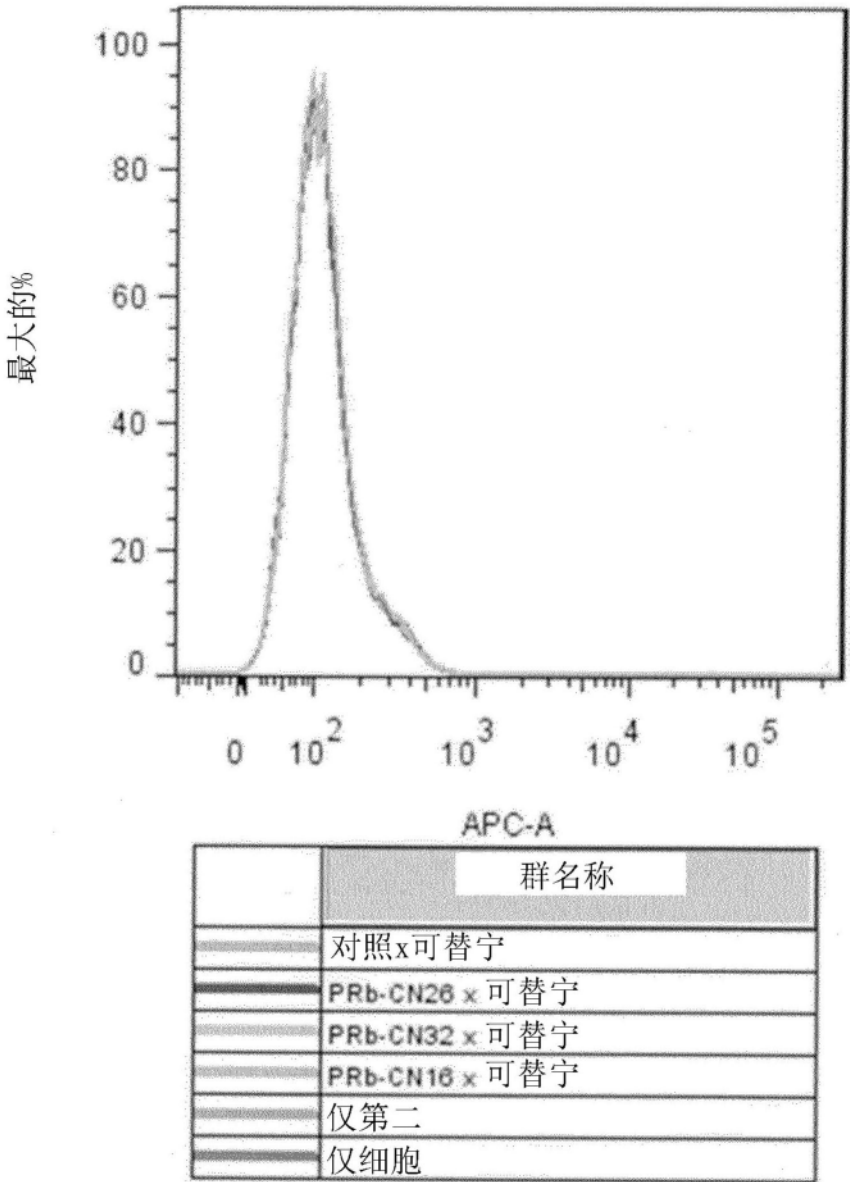


图15

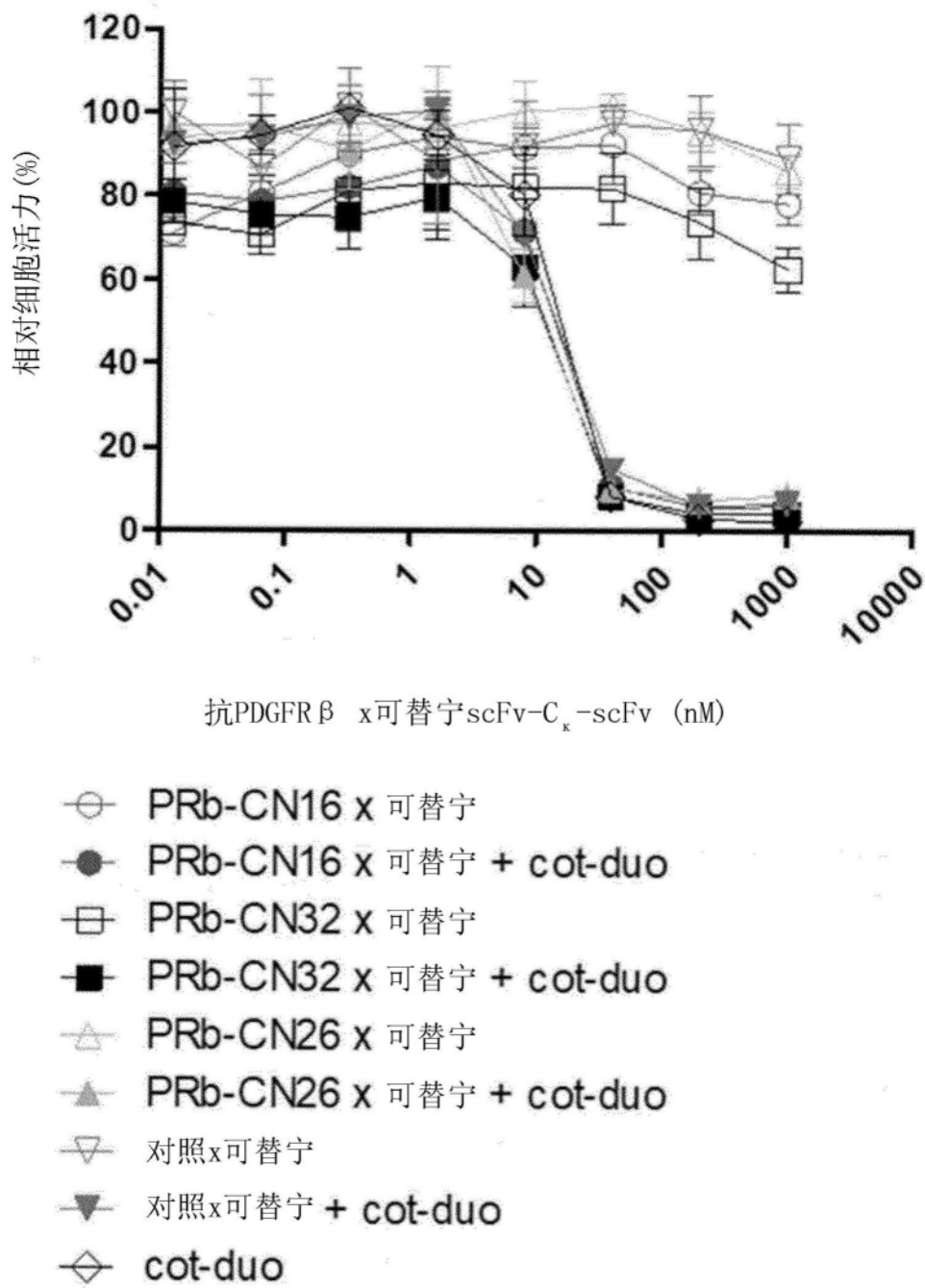


图16

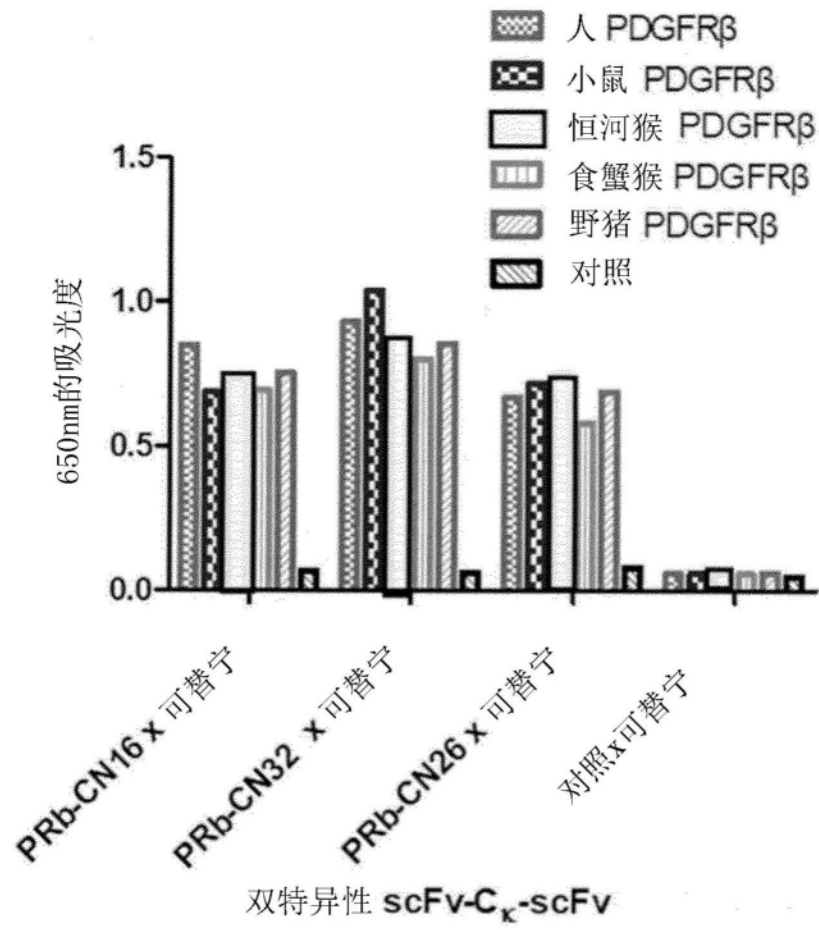
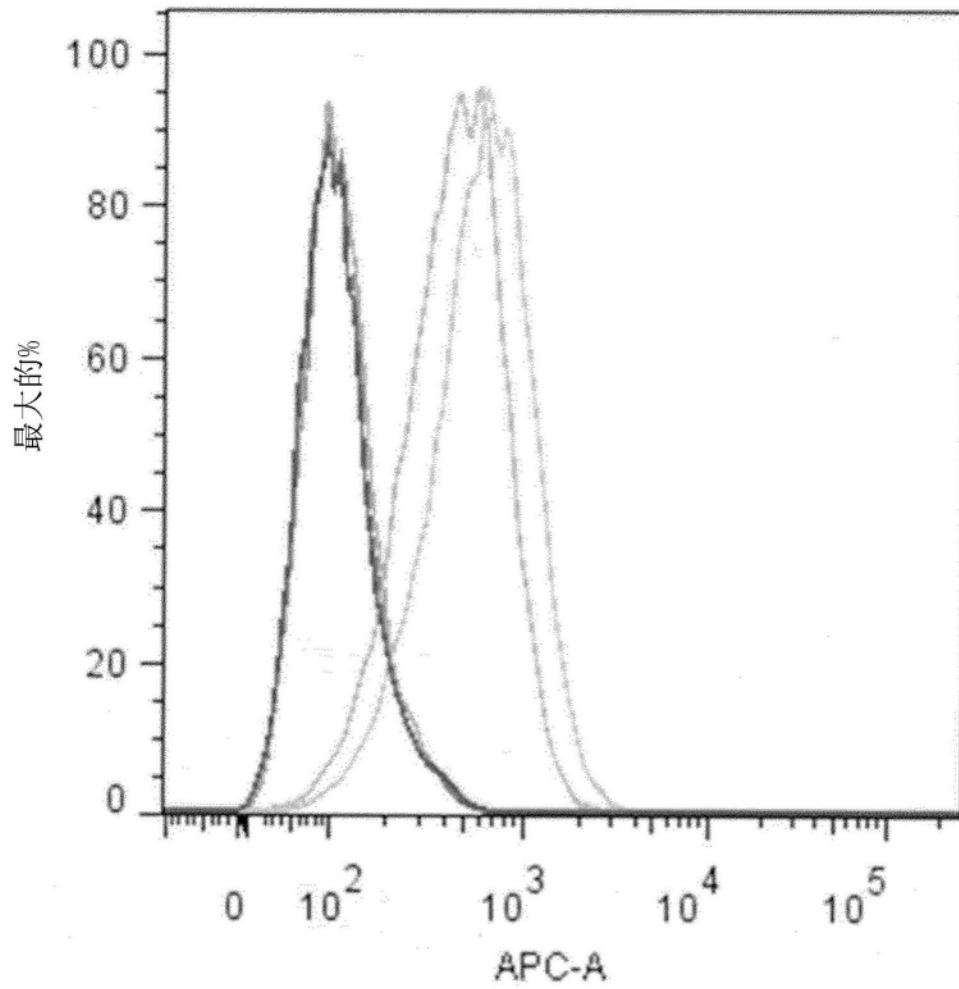


图17



	群名称
	对照x可替宁
	PRb-CN32 x 可替宁
	PRb-CN01 x 可替宁
	仅第二
	仅细胞

图18

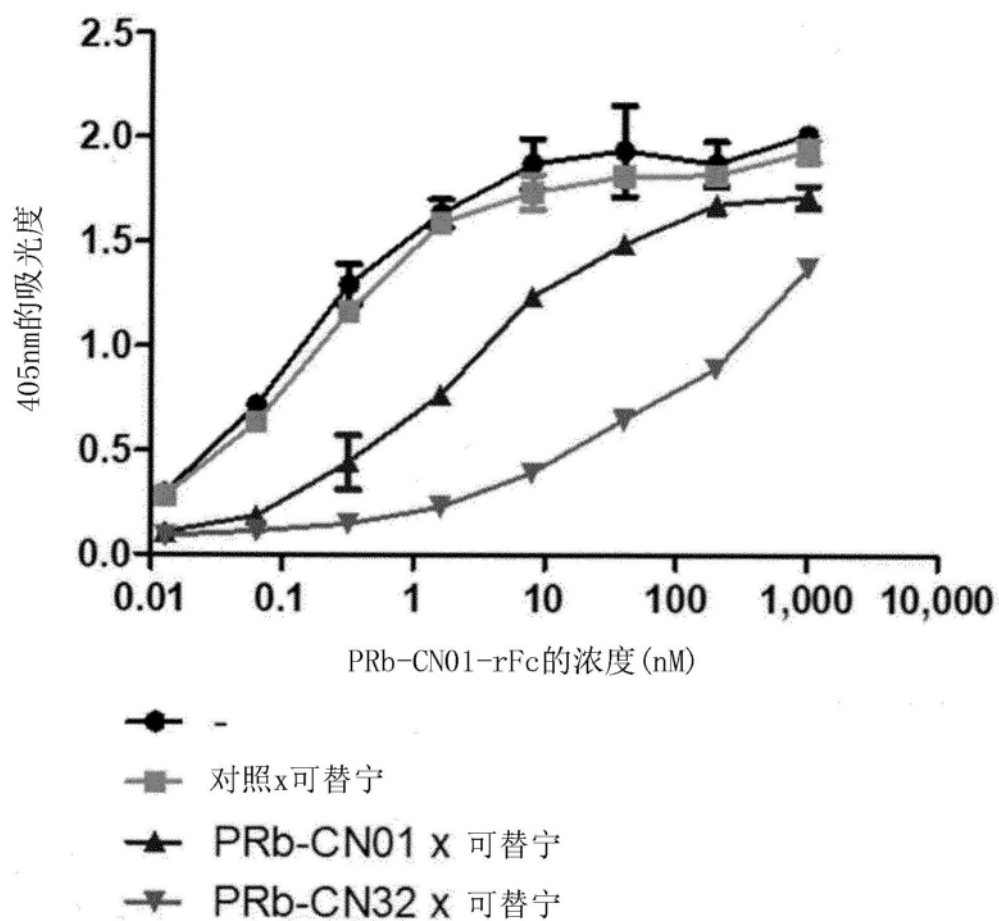


图19a

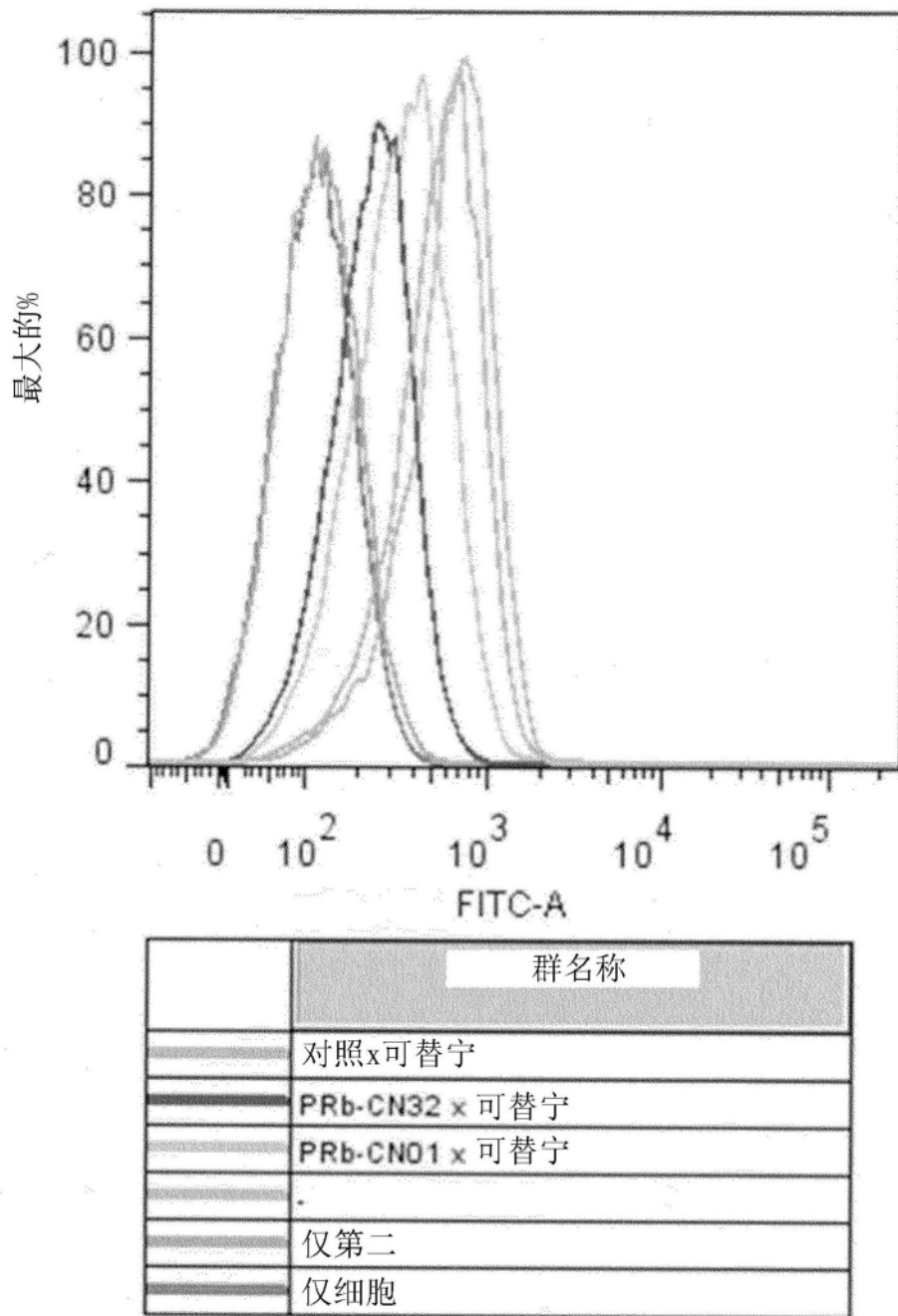


图19b

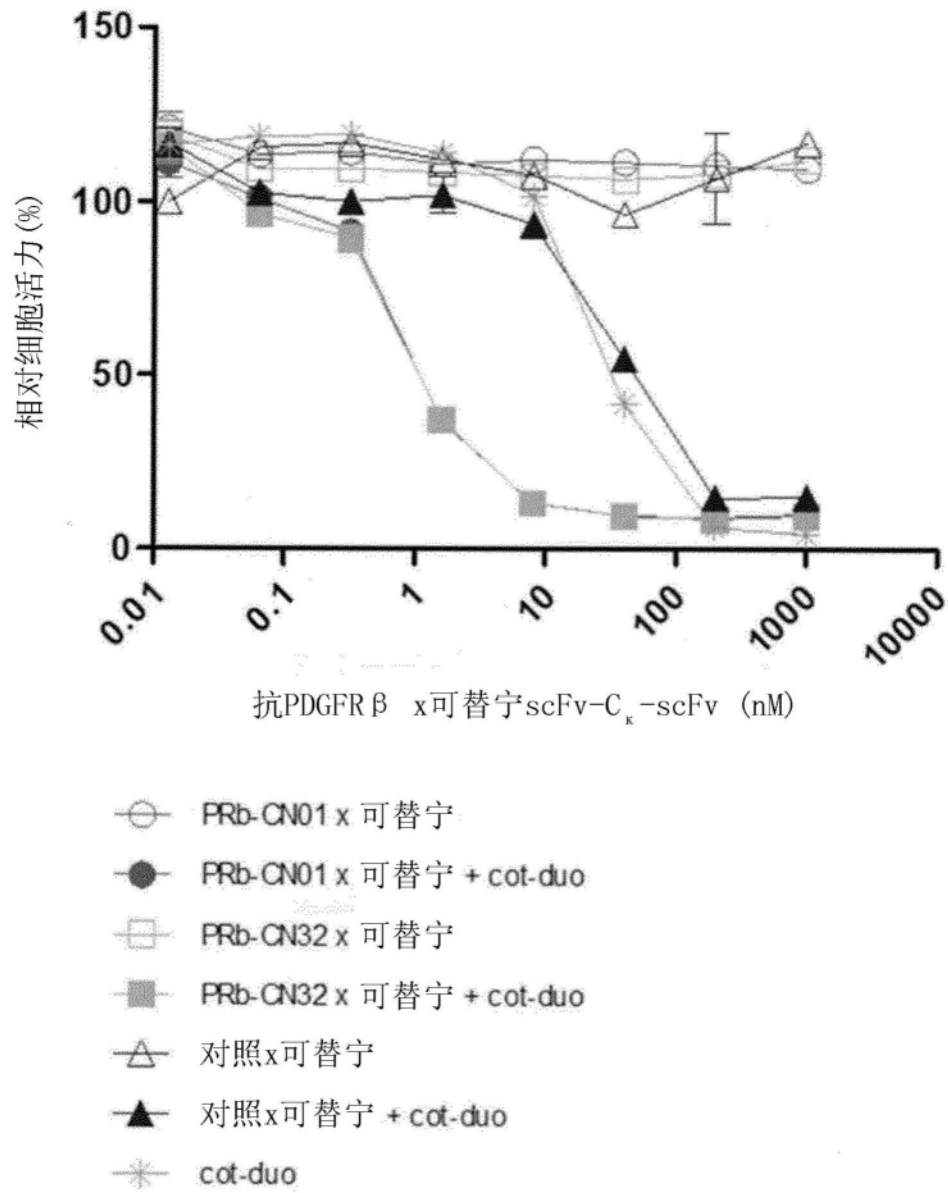


图20a

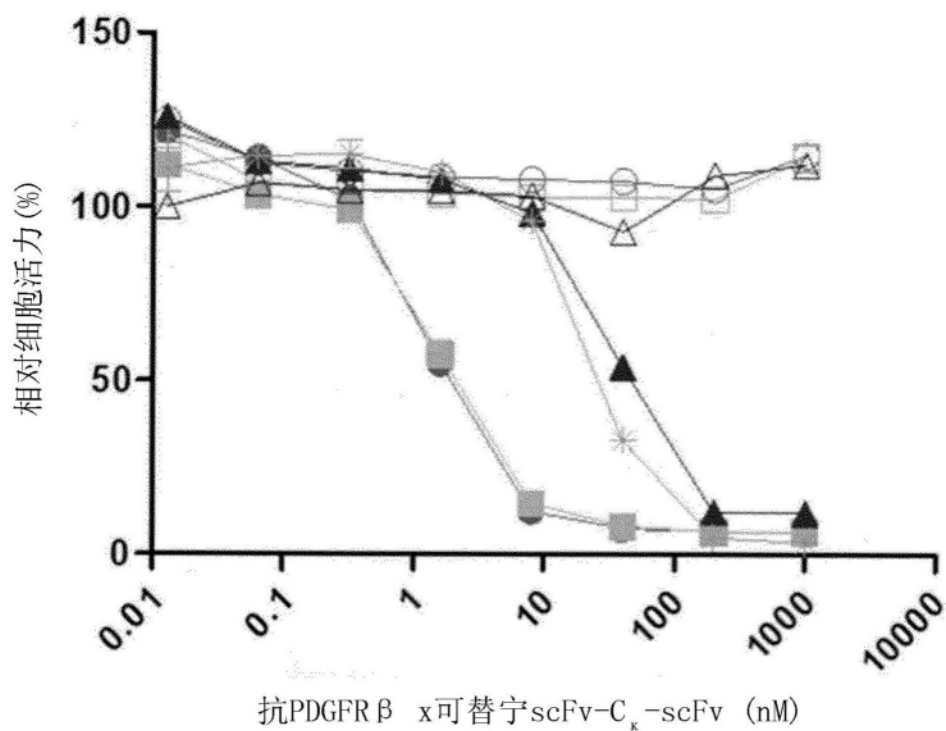


图20b