



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105073776 B

(45)授权公告日 2019.04.12

(21)申请号 201380070299.1

(22)申请日 2013.11.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105073776 A

(43)申请公布日 2015.11.18

(30)优先权数据

PCT/EP2012/004712 2012.11.13 EP

PCT/EP2013/002270 2013.07.30 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.07.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/003399 2013.11.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/075788 EN 2014.05.22

(73)专利权人 拜恩科技股份有限公司

地址 德国美因茨市

专利权人 咖尼米德制药股份公司

TRON - 美因茨约翰尼斯·古腾

堡大学附属转化肿瘤医学院公益

有限公司

(72)发明人 尤格·萨因 欧兹兰·图勒茨

克里斯蒂娜·施塔德勒

茱莉亚·霍兰

哈亚特·巴尔-马哈茂德

提姆·拜塞特 劳拉·普拉姆

菲卜瑞斯·勒加尔

阿恩·杰德瑞兹克

马库斯·菲德勒

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

(56)对比文件

CN 102741289 A, 2012.10.17,

CN 102741289 A, 2012.10.17,

Nathalie Jacobs等.Efficiency of T

cell triggering by anti-CD3 monoclonal

antibodies (mAb) with potential

usefulness In bispecific mAb generation.

《Cancer Immunol Immunother》.1997,第44卷第257-264页.

Ugur Sahin等.Claudin-18 Splice

Variant 2 Is a Pan-Cancer Target Suitable for Therapeutic Antibody Development.

《Clin Cancer Res》.2008,第14卷(第23期),摘要、第7629页左栏第3段至第7633页右栏第4段.

审查员 李婧文

权利要求书1页 说明书101页

序列表133页 附图49页

(54)发明名称

用于治疗表达紧密连接蛋白的癌症疾病的制剂

(57)摘要

本发明提供了结合剂和使用这些结合剂或编码其的核酸的用于治疗癌症的方法,所述结合剂包含对CD3特异以允许与T细胞结合的结合结构域和对肿瘤相关紧密连接蛋白分子特异的结合结构域。

1. 包含两个结合结构域的双特异性抗体, 其中第一结合结构域能与紧密连接蛋白18剪接变体2 (CLDN18.2) 结合, 并且第二结合结构域能与CD3结合,

其中所述双特异性抗体包含选自SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41以及与SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:41相比缺乏SEQ ID NO:51和/或SEQ ID NO:107的序列的氨基酸序列。

2. 重组核酸, 其编码权利要求1所述的双特异性抗体。

3. 如权利要求2所述的重组核酸, 其为载体形式或RNA形式。

4. 宿主细胞, 其包含权利要求2或3所述的重组核酸。

5. 药物组合物, 其包含权利要求1所述的双特异性抗体、权利要求2或3所述的重组核酸或权利要求4所述的宿主细胞。

6. 权利要求1所述的双特异性抗体, 权利要求2或3所述的重组核酸或权利要求4所述的宿主细胞在制备用于治疗或预防特征为表达CLDN18.2的癌症疾病的药物中的用途。

7. 如权利要求6所述的用途, 其中所述癌症选自胃癌、食道癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、胆囊癌及以上的转移、克鲁根勃氏瘤、腹膜转移和/或淋巴结转移。

8. 如权利要求7所述的用途, 其中所述肺癌为非小细胞肺癌 (NSCLC) 。

用于治疗表达紧密连接蛋白的癌症疾病的制剂

[0001] 紧密连接蛋白为位于上皮细胞和内皮细胞的紧密连接的膜内在蛋白。预测紧密连接蛋白具有四个跨膜节段,带有两个细胞外环,并且 N-和C-末端位于胞浆内。跨膜蛋白的紧密连接蛋白 (CLDN) 家族在维持上皮细胞和内皮细胞紧密连接方面起关键的作用并且可能也在维持细胞骨架和细胞信号转导方面起作用。

[0002] 紧密连接蛋白18 (CLDN18) 分子为具有四个跨膜疏水区和两个细胞外环 (环1被疏水区1和疏水区2所包围;环2被疏水区3和4所包围)的膜内在蛋白 (四跨膜蛋白)。CLDN18以两种不同的剪接变体存在,在小鼠和人类中对其进行了描述 (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21: 7380-90, 2001)。剪接变体 (基因库登录号:剪接变体1 (CLDN18.1): NP_057453, NM_016369, 剪接变体2 (CLDN18.2): NM_001002026, NP_001002026) 具有大约27.9/27.72kD的分子量。剪接变体CLDN18.1和CLDN18.2 在包含第一跨膜 (TM) 区和环1的N末端部分不同,而C末端的一级蛋白序列是相同的。

[0003] 在正常组织中,除了胃之外没有可检测的CLDN18.2表达,其中 CLDN18.2仅仅表达在短期分化型胃上皮细胞上。恶性转化期间 CLDN18.2保持,因此其频繁显示在人胃癌细胞的表面。而且,在食道,胰腺和肺腺癌中以显著的水平异位地活化这种全肿瘤抗原。CLDN18.2蛋白也定位于胃癌腺癌的淋巴结转移并且尤其是到卵巢的远处转移 (所谓的克鲁根勃氏瘤)。

[0004] CLDN6表达在一系列不同的人类癌细胞中而在正常组织中的表达限于胎盘。

[0005] 紧密连接蛋白诸如CLDN18.2和CLDN6在癌症和正常细胞之间的差异表达,它们的膜定位和绝大多数的毒性相关的正常组织没有它们使得这些分子成为引人注目的癌症免疫疗法靶标并且在癌症治疗中用于靶向紧密连接蛋白的基于抗体疗法的使用保证了高水平的治疗特异性。

[0006] 使用T细胞的潜能用于癌症治疗的方法包括肿瘤衍生蛋白、RNA 或肽抗原的接种,肿瘤衍生的离体扩增的T细胞的输注 (称为过继转移),T细胞受体基因转移或双或三特异性抗体与T细胞的直接接合。同样地,临床地组合测试许多T细胞应答的刺激剂或作为单一疗法,诸如Toll样受体的配体,阻断T细胞上CTLA-4的抗体,免疫刺激细胞因子,或参与癌细胞的免疫逃逸的抗体中和分子诸如TGFβ或 B7-H1。如果患者的肿瘤被T细胞浸润,患者看起来明显活得更长的观察结果促进了基于T细胞的治疗的强烈研发。而且,许多小鼠模型已显示通过各种方法的T细胞接合可以根除甚至大的肿瘤,并且许多 T细胞治疗最近在治疗癌症适应症方面取得了显著的进展。

[0007] 提供用于癌症疾病治疗的新的制剂和方法是本发明的一个目标。

[0008] 本发明问题的解决方案基于产生结合剂的概念,其包含对肿瘤相关的紧密连接蛋白分子,即癌细胞,特异性的结合结构域。其他结合结构域为对CD3特异的以允许与T细胞结合,并且允许将T细胞拉到复合体中,因此使得T细胞的细胞毒性效应靶向于癌细胞成为可能。这种复合体的形成可以诱导细胞毒性T细胞中信号转导,无论是靠其自身还是与佐细胞组合,这导致细胞毒性介质的释放。

[0009] 我们首次报导了靶向于紧密连接蛋白和CD3的结合剂可以诱导强有力的T细胞介

导的溶解并且在治疗肿瘤疾病中有效。

[0010] 发明概述

[0011] 在一方面,本发明涉及包含至少两个结合结构域的结合剂,其中第一结合结构域能与紧密连接蛋白结合并且第二结合结构域能与CD3结合。本发明的结合剂与细胞毒性细胞(通过接合CD3受体)和待作为靶标被破坏的表达CLDN的癌细胞结合。

[0012] 在一实施方案中,结合剂为双特异性分子诸如双特异性抗体,尤其是双特异性单链抗体。在一实施方案中,所述紧密连接蛋白表达在癌细胞中。在一实施方案中,所述紧密连接蛋白表达在癌细胞的表面上。在一实施方案中,所述紧密连接蛋白选自紧密连接蛋白18.2和紧密连接蛋白6。在一实施方案中,所述第一结合结构域能与所述紧密连接蛋白的细胞外结构域结合。在一实施方案中,所述第一结合结构域能与活细胞的表面上存在的CLDN的天然表位结合。在一实施方案中,所述第一结合结构域能与CLDN的第一细胞外环结合。在一实施方案中,所述第二结合结构域能与CD3的 ϵ 链结合。在一实施方案中,所述CD3表达在T细胞的表面。在一实施方案中,所述结合剂与T细胞上的CD3结合导致所述T细胞的增殖和/或活化,其中所述活化的T细胞优选地释放细胞毒性因子,例如穿孔素和粒酶,并且引起癌细胞的细胞溶解和凋亡。在一实施方案中,所述与紧密连接蛋白的结合和/或所述与CD3的结合为特异性结合。

[0013] 在一实施方案中,结合剂为全长抗体或抗体片段的形式。在一实施方案中,结合剂包含四个抗体可变结构域,具有至少两个结合结构域,其中至少一个结合结构域与紧密连接蛋白结合并且至少一个结合结构域与CD3结合。在一实施方案中,结合剂包含对紧密连接蛋白抗原具有特异性的免疫球蛋白的重链可变结构域(VH) (VH (CLDN)),对紧密连接蛋白抗原具有特异性的免疫球蛋白的轻链可变结构域(VL) (VL (CLDN)),对CD3具有特异性的免疫球蛋白的重链可变结构域(VH) (VH (CD3)),和对CD3具有特异性的免疫球蛋白的轻链可变结构域(VL) (VL (CD3))。

[0014] 在一实施方案中,结合剂为包含在同一多肽链上与轻链可变结构域连接的重链可变结构域的双链抗体(diabody)的形式,从而使得这两个结构域不配对。在一实施方案中,双链抗体包含两条多肽链,其中一条多肽包含VH (CLDN) 与VL (CD3),并且另一条多肽链包含VH (CD3) 与VL (CLDN)。

[0015] 在一实施方案中,结合剂为由两个经由接头肽连接的scFv分子组成的双特异性单链抗体的形式,其中重链可变区(VH)和相应的轻链可变区(VL)优选地从N末端到C末端按以下顺序排列: VH (CLDN)-VL (CLDN)-VH (CD3)-VL (CD3)、VH (CD3)-VL (CD3)-VH (CLDN)-VL (CLDN)或VH (CD3)-VL (CD3)-VL (CLDN)-VH (CLDN)。在一实施方案中,所述重链可变区(VH)和相应的轻链可变区(VL)经由长的肽接头连接,优选地,包含氨基酸序列(GGGGS)₃或VE(GGGGS)₂GGVD的肽接头。在一实施方案中,所述两个VH-VL或VL-VH scFv单元经由短的肽接头连接,优选的包含氨基酸序列SGGGGS或GGGGS的肽接头。

[0016] 在一实施方案中,所述CLDN为CLDN18.2并且所述VH (CLDN) 包含SEQ ID NO:8所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体和VL (CLDN) 包含SEQ ID NO:15所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。

[0017] 在一实施方案中CLDN为CLDN18.2并且所述VH (CLDN) 包含SEQ ID NO:6所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体和VL (CLDN) 包含SEQ ID NO:11所代

表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。

[0018] 在一实施方案中所述CLDN为CLDN6并且所述VH (CLDN) 包含 SEQ ID NO:22所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体和VL (CLDN) 包含SEQ ID NO:23所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。

[0019] 在一实施方案中所述CLDN为CLDN6并且所述VH (CLDN) 包含 SEQ ID NO:22所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体和VL (CLDN) 包含SEQ ID NO:97、98、99或100所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。

[0020] 在一实施方案中所述VH (CD3) 包含SEQ ID NO:36、94或95所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体和 VL (CD3) 包含SEQ ID NO:37或96所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。

[0021] 在一实施方案中所述VH (CD3) 包含SEQ ID NO:36所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体和VL (CD3) 包含SEQ ID NO:37所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。

[0022] 在一实施方案中所述VH (CD3) 包含SEQ ID NO:95所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体和VL (CD3) 包含SEQ ID NO:96所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。

[0023] 在一方面本发明的结合剂为包含经由接头肽连接的两个scFv分子的双特异单链抗体的形式,其中重链可变区 (VH) 和相应的轻链可变区 (VL) 从N末端到C末端按以下顺序排列: VH (CLDN) -VL (CLDN) -VH (CD3) -VL (CD3)。在一实施方案中,所述 VH (CD3) 和VL (CD3) 经由,由15-20个、优选15或20个氨基酸,优选甘氨酸和/或丝氨酸组成的肽接头连接,并且优选经由包含氨基酸序列 (GGGGS) 4的肽接头连接。在一实施方案中,所述VH (CLDN) 和 VL (CLDN) 经由,由15-20个、优选15或20个氨基酸,优选甘氨酸和 /或丝氨酸组成的肽接头连接,并且优选经由包含氨基酸序列 (GGGGS) 4的肽接头连接。在一实施方案中,所述两个VH-VL scFv 单元经由包含氨基酸序列SGGGGS的接头肽连接。所述两个VH-VL scFv单元的其中一个或二者可包含一个或多个界面二硫键。

[0024] 在一方面本发明的结合剂为包含经由接头肽连接的两个scFv分子的双特异性单链抗体形式,其中重链可变区 (VH) 和相应的轻链可变区 (VL) 从N末端到C末端按以下顺序排列: VL (CLDN) -VH (CLDN) -VH (CD3) -VL (CD3)。在一实施方案中,所述 VH (CD3) 和VL (CD3) 经由,由15-20个、优选15或20个氨基酸,优选甘氨酸和/或丝氨酸组成的肽接头连接,并且优选经由包含氨基酸序列 (GGGGS) 4的肽接头连接。在一实施方案中,所述VL (CLDN) 和 VH (CLDN) 经由,由20-25个、优选20或25个氨基酸,优选甘氨酸和/或丝氨酸组成的肽接头连接,并且优选经由包含氨基酸序列 (GGGGS) 5的肽接头连接。在一实施方案中,所述VL-VH和 VH-VL scFv单元经由包含氨基酸序列SGGGGS的接头肽连接。所述两个 VL-VH或VH-VL scFv单元的其中一个或二者包含一个或多个界面二硫键。

[0025] 在一方面本发明的结合剂为包含经由接头肽连接的两个scFv分子的双特异性单链抗体形式,其中重链可变区 (VH) 和相应的轻链可变区 (VL) 从N末端到C末端按以下顺序排列: VH (CLDN) -VL (CLDN) -VL (CD3) -VH (CD3)。优选地,所述 VL (CD3) -VH (CD3) scFv单元包含一个或多个界面二硫键。在一实施方案中所述VL (CD3) 和VH (CD3) 经由,由20-25个、优选20或25个氨基酸,优选甘氨酸和/或丝氨酸组成的肽接头连接,并且优选经由包含氨基酸序列

(GGGGS) 5的肽接头连接。在一实施方案中所述 VH (CLDN) 和VL (CLDN) 经由,由15-20个、优选15或20个氨基酸,优选甘氨酸和/或丝氨酸组成的肽接头连接,并且优选经由包含氨基酸序列 (GGGGS) 4的肽接头连接。在一实施方案中所述VH-VL和VL-VH scFv单元经由包含氨基酸序列SGGGGS的接头肽连接。所述 VH (CLDN) -VL (CLDN) scFv单元可包含一个或多个界面二硫键。

[0026] 在一方面,本发明的结合剂为包含经由接头肽连接的两个scFv分子的双特异性单链抗体形式,其中重链可变区 (VH) 和相应的轻链可变区 (VL) 从N末端到C末端按以下顺序排列: VL (CLDN) -VH (CLDN) -VL (CD3) -VH (CD3)。优选地,所述 VL (CD3) -VH (CD3) scFv单元包含一个或多个界面二硫键。在一实施方案中,所述VL (CD3) 和VH (CD3) 经由,由20-25个、优选20或25个氨基酸,优选甘氨酸和/或丝氨酸组成的肽接头连接,并且优选经由包含氨基酸序列 (GGGGS) 5的肽接头连接。在一实施方案中,所述 VL (CLDN) 和VH (CLDN) 经由,由20-25个、优选20或25个氨基酸,优选甘氨酸和/或丝氨酸组成的肽接头连接,并且优选经由包含氨基酸序列 (GGGGS) 5的肽接头连接。在一实施方案中,所述两个VL-VH scFv 单元经由包含氨基酸序列SGGGGS的接头肽连接。所述 VL (CLDN) -VH (CLDN) scFv单元可包含一个或多个界面二硫键。

[0027] 在任何以上方面的一实施方案中,所述CLDN为CLDN18.2。优选地,所述VH (CLDN) 包含SEQ ID NO:8所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体,并且VL (CLDN) 包含SEQ ID NO: 15所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。可选地,所述VH (CLDN) 包含SEQ ID NO:6所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体,并且VL (CLDN) 包含SEQ ID NO: 11所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。在一实施方案中,所述VH (CD3) 包含SEQ ID NO:95所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体,并且VL (CD3) 包含SEQ ID NO:96所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。

[0028] 在一方面,本发明的结合剂为包含经由接头肽连接的两个scFv分子的双特异性单链抗体形式,其中重链可变区 (VH) 和相应的轻链可变区 (VL) 从N末端到C末端按以下顺序排列: VH (CLDN) -VL (CLDN) -VH (CD3) -VL (CD3) 或 VH (CD3) -VL (CD3) -VH (CLDN) -VL (CLDN)。在一方面,所述VH (CLDN) 和VL (CLDN) 经由,由15-20个、优选15或20个氨基酸,优选甘氨酸和/或丝氨酸组成的肽接头连接,并且优选经由包含氨基酸序列 (GGGGS) 3的肽接头连接。在一实施方案中所述VH (CD3) 和VL (CD3) 经由,由15-20个、优选15或20个氨基酸,优选甘氨酸和/或丝氨酸组成的肽接头连接,并且优选经由包含氨基酸序列 GGGGS (GGS) 3GGGS的肽接头连接。在一实施方案中,所述两个 VH-VL scFv单元经由包含氨基酸序列SGGGGS的接头肽连接。

[0029] 在以上方面的一实施方案中,所述CLDN为CLDN6。优选地所述VH (CLDN) 包含SEQ ID NO:22所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。优选地所述VL (CLDN) 包含SEQ ID NO: 98、99或100所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。最优选地,所述VL (CLDN) 包含SEQ ID NO:99所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。在一实施方案中,所述VH (CD3) 包含SEQ ID NO:95所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体,并且所述VL (CD3) 包含SEQ ID NO:96所代表的氨基酸序列或其片段或所述氨基酸序列或片段的变体。

[0030] 在一实施方案中,所述CLDN为CLDN18.2并且本发明的结合剂包含选自SEQ ID NO: 38、39、40和41或其片段或变体的氨基酸序列。

[0031] 在一实施方案中,所述CLDN为CLDN18.2并且本发明的结合剂包含选自SEQ ID NO: 103、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92和93或其片段或变体的氨基酸序列。在一实施方案中,所述CLDN为CLDN18.2并且所述结合剂包含选自SEQ ID NO: 103、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92和93或其片段或变体的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列缺乏分泌信号诸如N末端分泌信号,尤其是SEQ ID NO: 51序列和/或缺乏His标签诸如C末端 His标签,如果存在C末端His标签的话,尤其是序列Gly-Gly-Ser-(His)₆或(His)₆。

[0032] 在一实施方案中,所述CLDN为CLDN6并且本发明的结合剂包含选自SEQ ID NO: 42、43、44和45或其片段或变体的氨基酸序列。

[0033] 在一实施方案中,所述CLDN为CLDN6并且本发明的结合剂包含选自SEQ ID NO: 101、102、60、61、62、63、64和65或其片段或变体的氨基酸序列。在一实施方案中,所述CLDN为CLDN6并且本发明的结合剂包含选自SEQ ID NO: 101、102、60、61、62、63、64 和65或其片段或变体的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列缺乏分泌信号诸如N末端分泌信号,尤其是SEQ ID NO: 51序列和/或缺乏His标签诸如C末端His标签,如果存在C末端His标签的话,尤其是序列 Gly-Gly-Ser-(His)₆或(His)₆。

[0034] 在一实施方案中,所述表达CLDN18.2的癌细胞选自胃癌,食道癌,胰腺癌,肺癌诸如非小细胞肺癌(NSCLC),乳腺癌,卵巢癌,结肠癌,肝癌,头颈癌,胆囊癌及以上的转移,克鲁根勃氏瘤,腹膜转移和/或淋巴结转移。

[0035] 在一实施方案中,所述表达CLDN6的癌细胞选自膀胱癌,卵巢癌,尤其是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤,肺癌,其包括小细胞肺癌(SCLC) 和非小细胞肺癌(NSCLC),尤其是鳞状细胞肺癌和腺癌,胃癌,乳腺癌,肝癌,胰腺癌,皮肤癌,尤其是基底细胞癌和鳞状细胞癌,恶性黑色素瘤,头颈癌,尤其是恶性多形性腺癌,肉瘤,尤其是滑膜肉瘤和癌肉瘤,胆管癌,膀胱癌,尤其是移行细胞癌和乳头状癌,肾癌,尤其是肾细胞癌其包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌,结肠癌,小肠癌,其包括回肠癌,尤其是小肠腺癌和回肠腺癌,睾丸胚胎性癌,胎盘绒毛膜癌,宫颈癌,睾丸癌,尤其是睾丸精原细胞瘤,睾丸畸胎瘤和胚胎性睾丸癌,子宫癌,生殖细胞肿瘤诸如畸胎瘤或胚胎性癌,尤其是睾丸的生殖细胞肿瘤,和其转移形式。

[0036] 在一实施方案中,结合剂具有N末端分泌信号和/或C末端组氨酸表位标签,优选地六组氨酸表位标签。

[0037] 在一方面,本发明涉及编码本发明的结合剂的重组核酸。在一实施方案中,重组核酸为载体形式。在一实施方案中,重组核酸为RNA。

[0038] 在一方面,本发明涉及包含本发明的重组核酸的宿主细胞。

[0039] 在一方面,本发明涉及用于治疗,尤其是用于治疗或预防癌症的本发明的结合剂,本发明的重组核酸或本发明的宿主细胞。

[0040] 在一方面,本发明涉及药物组合物,其包含本发明的结合剂,本发明的重组核酸或本发明的宿主细胞。

[0041] 在一方面,本发明涉及治疗或预防癌症疾病的方法,包括向患者给予本发明的药

物组合物。

[0042] 在一实施方案中,所述癌症细胞表达能够被所述结合剂结合的紧密连接蛋白。

[0043] 在一实施方案中所述紧密连接蛋白为CLDN18.2并且所述癌症选自胃癌,食道癌,胰腺癌,肺癌诸如非小细胞肺癌(NSCLC),乳腺癌,卵巢癌,结肠癌,肝癌,头颈癌,胆囊癌及以上的转移,克鲁根勃氏瘤,腹膜转移和/或淋巴结转移。

[0044] 在一实施方案中,所述紧密连接蛋白为CLDN6并且所述癌症选自膀胱癌,卵巢癌,尤其是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤,肺癌,其包括小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),尤其是鳞状细胞肺癌和腺癌,胃癌,乳腺癌,肝癌,胰腺癌,皮肤癌,尤其是基底细胞癌和鳞状细胞癌,恶性黑色素瘤,头颈癌,尤其是恶性多形性腺癌,肉瘤,尤其是滑膜肉瘤和癌肉瘤,胆管癌,膀胱癌,尤其是移行细胞癌和乳头状癌,肾癌,尤其是肾细胞癌其包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌,结肠癌,小肠癌,其包括回肠癌,尤其是小肠腺癌和回肠腺癌,睾丸胚胎性癌,胎盘绒毛膜癌,宫颈癌,睾丸癌,尤其是睾丸精原细胞瘤,睾丸畸胎瘤和胚胎性睾丸癌,子宫癌,生殖细胞肿瘤诸如畸胎瘤或胚胎性癌,尤其是睾丸的生殖细胞肿瘤,和其转移形式。

[0045] 在一方面,本发明提供了用于如本文所述的治疗方法的结合剂或编码其的核酸或如本文所述的宿主细胞。在一实施方案中,本发明提供了用于如本文所述的治疗方法的如本文所述的药物组合物。

[0046] 根据本发明,CLDN18.2优选地具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列并且CLDN6优选地具有SEQ ID NO:2或3的氨基酸序列。

[0047] 在下列的详述和权利要求中,本发明的其他特性和优势将是明显的。

[0048] 附图简述

[0049] 图1. 说明重组双-scFv蛋白靶向TAA CLDN18.2设计的模块化方案。

[0050] 抗TAA可变区(A)N末端和(B)C末端位置中双-scFv的设计。抗 CLDN18.2_{V_H}和_{V_L}区产生于单克隆CLDN18.2抗体(mCLDN18.2ab)的序列。抗CD3广泛代表产生于下列单克隆CD3抗体的序列的_{V_H}和_{V_L}区:UCHT1-HU(人源化mAB),UCHT1,CLB-T3,TR66,145-2C11。双-scFv表示双特异性单链可变片段;His,六组氨酰标签;HU,人源化;LL,长接头(15-18个氨基酸);Sec,分泌信号;SL,短接头(5-6个氨基酸);TAA,肿瘤相关抗原;V,抗体重链(H)和轻链(L)的可变区。

[0051] 图2. 结构域定向和抗CD3-scFv选择对特异的靶细胞溶解的影响:5'-mCLDN18.2ab_{V_H}⁻_{V_L}⁻TR66_{V_H}⁻_{V_L}⁻3'双-scFv 1BiMAB和15号为最有效的变体。

[0052] 抗CLDN18.2和CD3的几个双-scFv变体瞬时于表达HEK293T细胞中,并且Ni-NTA柱小规模纯化用于在细胞毒性测定中比较它们的效价。稳定地表达荧光素酶的内源性表达CLDN18.2的NugC4细胞被当作靶细胞。在96孔版式中人T细胞和靶细胞以5:1的E:T比率与5ng/ml每一双-scFv蛋白孵育。作为阴性对照,采用35号靶向非表达的TAA,11号和16号-二者靶向鼠而不是人T细胞。每一测试样品以六倍接种,用于_{L_{min}}的对照样品以9倍接种。分析之前的共孵育时间为8小时,16小时和24小时。在给定的时间点添加荧光素溶液后,在Infinite M200TECAN酶标仪中测量发光。通过相对于对照的双-scFv 35号(_{L_{min}})样品标准化来计算特异性靶细胞溶解。最有效的双-scFv蛋白-1BiMAB和15号-分享mAB TR66的结构域定向和抗-CD3 原点但在它们的密码子优化(分别为HS和CHO)和长的接头序列方面不同。

CHO表示中国仓鼠卵巢;mAB,单克隆抗体;HU,人源化;TAA,肿瘤相关抗原。

[0053] 图3. 双-scFv蛋白1BiMAB的考马斯凝胶和蛋白印迹分析。

[0054] 经由Ni-NTA亲和色谱(IMAC)纯化稳定表达1BiMAB的单克隆 HEK293细胞的没有胎牛血清(FCS)的上清液。不同纯化步骤的等份加载到4-12%Bis-Tris凝胶。(A)细胞上清液,流通和洗出液的八部分的考马斯染色。丢弃第一洗脱峰的部分,汇集第二洗脱峰的部分用于进一步的研究,相对于PBS透析并且随后相对于200mM精氨酸缓冲液透析。(道1:HEK293/1BiMAB SN;道2:IMAC流通部分;道3-4:洗脱峰1的部分(丢弃);道5-10:洗脱峰2的部分(汇集)) (B)来自于三个独立的纯化(道1,2,3)的0.5 μ g 1BiMAB的蛋白印迹分析。用单克隆的一级抗-His和过氧化物偶联的抗小鼠二级抗体进行检测。IMAC 表示固定化金属亲和色谱;PBS,磷酸盐缓冲液;SN,上清液;WB,蛋白印迹。

[0055] 图4. 双-scFv蛋白1BiMAB与表达CLDN18.2的靶细胞和人T 细胞有效特异地结合。

[0056] (A)用50 μ g/ml 1BiMAB或作为阳性对照的10 μ g/ml mCLDN18.2ab和相应的APC偶联的第二抗体孵育 2.5×10^5 个内源性表达CLDN18.2的NugC4细胞。对照染色包括单独的APC偶联的第二抗体(g-a-h,g-a-m),抗His和g-a-m APC,或1BiMAB和g-a-m APC。经由流式细胞术进行分析。通过FlowJo软件计算APC信号的MFI。(B)用递增的1BiMAB浓度(20pg/ml-20 μ g/ml),抗-His和g-a-m APC 染色 1×10^5 个内源性表达CLDN18.2的NugC4细胞。作为阴性对照,用抗His和g-a-m APC孵育细胞。作为阳性对照使用mCLDN18.2ab 和g-a-h APC。通过FlowJo软件计算APC信号的MFI。(C)用递增的 1BiMAB浓度(2ng/ml-2 μ g/ml),抗His和g-a-m APC孵育 1×10^6 个人 T细胞。作为阴性对照单独用抗His和g-a-m APC或g-a-m APC孵育细胞。通过FlowJo软件计算APC信号的MFI。(D)用递增的1BiMAB 浓度(10ng/ml-10 μ g/ml),抗-His和g-a-m APC孵育 1×10^5 个CLDN18.2 阴性PA-1细胞。作为阴性对照,用抗His和g-a-m APC或g-a-h APC 单独地染色细胞。10 μ g/ml mCLDN18.2ab和g-a-h APC用于确认细胞的CLDN18.2阴性。G-a-h表示羊抗人;g-a-m,羊抗鼠;MFI,平均的荧光强度;TL,T淋巴细胞。

[0057] 图5. 双-scFv蛋白1BiMAB导致CLDN18.2阳性靶细胞上T细胞簇集。

[0058] 在6孔平板中用1ng/ml和1 μ g/ml 1BiMAB和人T细胞以效应细胞与靶标比率5:1孵育内源性表达CLDN18.2的NugC4细胞24小时。单独的T细胞(TL),单独的靶细胞(NugC4)和具有靶细胞的人T细胞(-对照)被选为对照样品。24小时后用200 $\times$ 放大率的Nikon Eclipse Ti显微镜对样品拍照。白色箭头指向靶细胞上的T细胞簇。TL表示T淋巴细胞。

[0059] 图6. 1BiMAB以剂量依赖方式介导T细胞活化。

[0060] 在24孔版式中用浓度递增的双-scFv蛋白1BiMAB(0.001-1000 ng/ml)和人T细胞以效应细胞与靶标比率5:1一式两份地孵育内源性表达CLDN18.2的NugC4细胞24小时和48小时。作为对照,用无NugC4 靶细胞的1-1000ng/ml 1BiMAB孵育人T细胞以便核实通过1BiMAB 介导的T细胞的靶标依赖活化。24小时(A)和48小时(B)后收获T细胞并且用抗CD3-FITC,抗CD25-PE和抗-CD69-APC标记和通过流式细胞术分析。TL表示T淋巴细胞。

[0061] 图7. 甚至在用高表达、低表达、和不表达CLDN18.2的细胞系长期孵育后1BiMAB介导严格的靶标依赖的T细胞活化。

[0062] (A)显示了来自于六个肿瘤细胞系的总RNA的RT-PCR数据。通过两个独立的实验计算相对于管家基因HPRT标准化的CLDN18.2表达的Ct值。乳腺癌细胞系MCF7(灰条)被选为阴性CLDN18.2表达对照细胞系。(B)6孔版式中一式两份地用5ng/ml双-scFv蛋白1BiMAB 孵育

来自于(A)的癌细胞系144小时,包括或未包括效应细胞与靶标比率5:1的人T细胞。用抗CD3-FITC,抗CD25-PE和抗CD69-APC标记T细胞从而通过流式细胞术分析总的T细胞群(CD3),T细胞的早期活化(CD69)或晚期活化(CD25)。TL表示T淋巴细胞。

[0063] 图8. 只有在CLDN18.2阳性靶细胞存在的情况下1BiMAB诱导 T细胞增殖和粒酶B上调。

[0064] (A) 人T细胞为CFSE染色的并且单独地培养(TL)或在1ng/ml 1BiMAB(TL+1ng/ml 1BiMAB),NugC4细胞(TL+NugC4),或NugC4 细胞和1ng/ml 1BiMAB(TL+1ng/ml 1BiMAB+NugC4)存在的情况下培养120小时。选择效应细胞与靶标比率5:1。通过流式细胞术分析表示T细胞增殖的CFSE信号的减少。(B) 用或不用NugC4靶细胞和用或不用5ng/ml 双-scFv 1BiMAB蛋白孵育人T细胞。6孔版式中效应细胞与靶标比率为5:1。96小时共孵育后收获T细胞并且用抗GrB-PE 在细胞内对其染色和通过流式细胞术分析。通过FlowJo软件计算抗GrB-PE信号的MFI。从所有样品中扣除未染色的样品TL+NugC4+5 ng/ml 1BiMAB的信号。CFSE表示羧基荧光素琥珀酰亚胺酯;GrB,粒酶B;MFI,平均的荧光强度;PE,薄红素;TL,T淋巴细胞。

[0065] 图9. 48小时后1BiMAB对特异性靶细胞溶解的EC50为大约10 pg/ml。

[0066] 96孔版式中用递增浓度的双-scFv蛋白1BiMAB(0.001-1000ng/ml) 用人T细胞以效应细胞与靶标比率5:1一式三份地孵育稳定表达荧光素酶的内源性表达CLDN18.2的NugC4细胞24小时和48小时。作为溶解最小值($L_{\min}$)对照,无双-scFv1BiMAB地平板接种效应细胞和靶细胞。通过稍早于荧光素添加,在无双-scFv存在的情况下将Triton X-100 添加到包含效应细胞和靶细胞的孔中实现溶解最大值($L_{\max}$)用于标准化自发发光计数。荧光素溶液添加后,24小时和48小时后在Infinite M200Tecan酶标仪中测量发光。通过公式计算特异性细胞溶解:特异溶解% = $[1 - (\text{发光}_{\text{受试样品}} - L_{\max}) / (L_{\min} - L_{\max})] \times 100$ 。值相对于1BiMAB浓度的log10绘图。EC50表示半最有效浓度;L,溶解。

[0067] 图10. 在先进的SC肿瘤模型中1BiMAB显示体内治疗有效性。

[0068] 将 1×10^7 个稳定表达CLDN18.2的HEK293SC注射到 NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtm1Wjl/SzJ(NSG)小鼠中。5天后IP注射 2×10^7 个人PBMC效应细胞到组G3和G4,对照组(G1和G2)只接受PBS。从第二天开始每只动物每日IP注射5 μ g双-scFv蛋白1BiMAB或载体作为对照。给予治疗22天,使用卡尺测量肿瘤体积并且通过公式 $\text{mm}^3 = \text{长mm} \times \text{宽mm} \times (\text{宽度mm} / 2)$ 计算。(A)显示了治疗第0天和第15天(上排),和治疗结束后3天和13天(下排)单个小鼠的肿瘤体积和每组中位数。(B)显示了植入人效应细胞的两个治疗组的平均肿瘤体积。段划线表示处死的动物。(C)Kaplan-Meier存活曲线呈现了从肿瘤接种到第41天的所有组。只要肿瘤体积超过500 mm^3 就处死动物。第41天后,处死所有剩下的动物以便分析人效应细胞植入小鼠脾脏。(D)分离所有小鼠的脾细胞并且用抗CD45-APC和抗CD3-FITC染色从而通过流式细胞术检测人T细胞。植入中位数显示在箱形图中。IP,腹膜内地;PBMC,外周血单核细胞;PBS,磷酸盐缓冲液;SC,皮下地。

[0069] 图11. 说明重组双-scFv蛋白靶向TAA CLDN6的设计的模块化方案。

[0070] 关于抗TAA可变区的(A)N末端和(B)C末端位置中双-scFv的设计。抗CLDN6 V_H 和 V_L 区产生于单克隆的CLDN6抗体(mCLDN6ab)的序列。抗CD3 V_H 和 V_L 区产生单克隆的CD3抗体TR66的序列。双-scFv表示双特异性单链可变片段;His,六组氨酰标签;LL,长接头(15-18个氨

基酸);Sec,分泌信号;SL,短接头(5个氨基酸);TAA,肿瘤相关抗原;V,抗体的重链(H)和轻链(L)的可变区。

[0071] 图12. 双-scFv蛋白6PHU5和6PHU3导致CLDN6阳性靶细胞上T细胞簇集。

[0072] 在6孔平板中用50ng/ml 6PHU5或6PHU3和人T细胞以效应细胞与靶标比率5:1孵育内源性表达CLDN6的PA-1细胞24小时。单独的T细胞(TL),单独的靶细胞(PA-1)和具有靶细胞的人T细胞(-对照)被选为对样品。24小时后用200×放大率的Nikon Eclipse Ti显微镜对样品拍照。白色箭头指向靶细胞上的T细胞簇。TL表示T淋巴细胞。

[0073] 图13. 结构域定向对效力的影响:双-scFv蛋白6PHU3比6PHU5 在诱导T细胞活化方面稍微更有效率。

[0074] 6孔版式中用递增浓度(5-200ng/ml)的6PHU5或6PHU3和人T细胞以效应细胞与靶标比率5:1一式两份地孵育内源性表达CLDN6的 PA-1细胞44小时。作为对照用100和200ng/ml 6PHU5或6PHU3无靶细胞孵育人T细胞。44小时后收获T细胞并且用抗CD3-FITC,抗-CD25-PE和抗-CD69-APC标记。通过流式细胞术分析剂量依赖的T 细胞活化。Hu表示人;TL,T淋巴细胞。

[0075] 图14. 6PHU3蛋白的考马斯凝胶和蛋白印迹分析。

[0076] 经由Ni-NTA亲和色谱(IMAC)纯化稳定表达6PHU3的多克隆 HEK293细胞的没有胎牛血清(FCS)的上清液。不同纯化步骤的等份加载到4-12%Bis-Tris凝胶。(A)细胞上清液,流通和洗出液的九部分的考马斯染色。丢弃第一洗脱峰的部分,汇集第二和第三洗脱峰的部分用于进一步的研究,相对于PBS透析并且随后相对于200mM精氨酸缓冲液透析。(道1:HEK293/6PHU3SN;道2:IMAC流通部分;道 3-5:洗脱峰1的部分(丢弃);道6-11:洗脱峰2和3的部分(汇集)) (B) 来自于两个独立纯化的0.5μg 6PHU3的蛋白印迹分析。用单克隆一级抗-His和过氧化物偶联的抗小鼠二级抗体进行检测。IMAC表示固定化金属亲和色谱;PBS,磷酸盐缓冲液;SN,上清液;WB,蛋白印迹。

[0077] 图15. 双-scFv蛋白6PHU3与表达CLDN6的靶细胞和人T细胞有效特异地结合。

[0078] (A) 用浓度递增的6PHU3或对照双-scFv 1BiMAB(10 ng/ml-10μg/ml)与10μg/ml mCLDN6ab或对照带有相应的APC偶联的第二抗体的mAB mCLDN18.2ab孵育 1×10^5 个内源性表达CLDN6的 PA-1和OV-90细胞。对照染色为单独的第二APC偶联的抗体(g-a-h, g-a-m)。经由流式细胞术进行分析。通过FlowJo软件计算APC信号的MFI。(B) 用递增的6PHU3浓度(100ng/ml-10μg/ml),抗-His和g-a-m PE孵育 5×10^5 个人T细胞。作为阴性对照,用抗His和g-a-m PE,或单独的g-a-m PE孵育细胞。通过FlowJo软件计算PE信号的MFI。(C) 用递增的6PHU3和1BiMAB浓度(10ng/ml-10μg/ml),抗His和g-a-m APC孵育 1×10^5 个CLDN6阴性NugC4细胞。作为阴性对照用单独的 g-a-m APC孵育细胞。10μg/ml mCLDN6ab和g-a-h APC用于确认细胞的CLDN6阴性。作为阳性对照使用mCLDN18.2ab和g-a-h APC。通过FlowJo软件计算APC信号的MFI。APC表示别藻蓝素;G-a-h 表示羊抗人;g-a-m,羊抗鼠;mAB,单克隆抗体;MFI,平均的荧光强度;PE,藻红素;TL,T淋巴细胞。

[0079] 图16. 6PHU3以剂量依赖方式介导T细胞活化。

[0080] 在24孔版式中用浓度递增的双-scFv蛋白6PHU3(0.001-1000 ng/ml)和人T细胞以效应细胞与靶标比率5:1一式两份地孵育内源性表达CLDN6的PA-1细胞24小时和48小时。作为对照,用无PA-1 靶细胞的1-1000ng/ml 6PHU3孵育人T细胞以便核实通过6PHU3介导的T

细胞的靶标依赖活化。24小时 (A) 和48小时 (B) 后收获T细胞并且用抗CD3-FITC, 抗CD25-PE 和抗-CD69-APC标记和通过流式细胞术分析。TL表示T淋巴细胞。

[0081] 图17. 48小时后6PHU3对特异性靶细胞溶解的EC50为大约10 pg/ml。

[0082] 96孔版式中用递增浓度的6PHU3蛋白 (0.001-1000ng/ml) 用人T 细胞以效应细胞与靶标比率5:1一式三份地孵育稳定表达荧光素酶的内源性表达CLDN6的PA-1细胞24小时和48小时。作为溶解最小值 (L_{min}) 对照, 无双-scFv 6PHU3地平板接种效应细胞和靶细胞。通过稍早于荧光素添加, 在无双-scFv存在的情况下将Triton X-100添加到包含效应细胞和靶细胞的对照孔中实现溶解最大值 (L_{max}) 用于标准化自发发光计数。荧光素溶液添加后, 24小时和48小时后在Infinite M200 Tecan酶标仪中测量发光。通过公式计算特异性细胞溶解: 特异溶解% = $[1 - (\text{发光受试样品} - L_{max}) / (L_{min} - L_{max})] \times 100$ 。值相对于6PHU3浓度的log10绘图。EC50表示半最有效浓度; L, 溶解。

[0083] 图18. 在先进的SC肿瘤模型中6PHU3显示体内治疗有效性。

[0084] 将 1×10^7 个稳定表达CLDN6的PA-1SC注射到NOD.Cg-Prkd^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) 小鼠中。15天后IP注射 2×10^7 个人PBMC到组 G3和G4, 对照组 (G1和G2) 只接受PBS。PBMC注射后5天开始每只动物每日IP注射5 μ g 6PHU3或对照双-scFv 1BiMAB或单独的载体作为对照。给予治疗25天, 使用卡尺测量肿瘤体积并且通过公式 $\text{mm}^3 = \text{长mm} \times \text{宽mm} \times (\text{宽度mm}/2)$ 计算。(A) 显示了治疗第0天和第14天 (上排), 第21天和第25天 (下排) 单个小鼠的肿瘤体积和每组中位数。(B) 显示了所有治疗组的平均肿瘤体积。段划线表示处死的动物。(C) 显示了从肿瘤接种到第45天所有组的Kaplan-Meier存活曲线。只要肿瘤体积超过1500 mm^3 就处死动物。第45天后, 处死所有剩下的动物以便分析人效应细胞植入小鼠脾脏。(D) 分离所有小鼠的脾细胞并且用抗 CD45-APC和抗CD3-FITC染色从而通过流式细胞术检测人T细胞。植入中位数显示在箱形图中。IP, 腹膜内地; PBMC, 外周血单核细胞; PBS, 磷酸盐缓冲液; SC, 皮下地。

[0085] 图19. 响应6PHU3治疗, 增强的T细胞浸润到SC PA-1肿瘤。

[0086] 用 1×10^7 个内源性表达CLDN6的PA-1SC注射NSG小鼠。15天后用 2×10^7 个人PBMC IP注射到组G3和G4, 对照组 (G1和G2) 只接受PBS。PBMC注射后5天开始每只动物每日IP注射5 μ g 6PHU3或对照双-scFv 1BiMAB或单独的载体作为对照。在1500 mm^3 大小或实验结束时切开肿瘤并且保存在4%缓冲的福尔马林溶液用于石蜡包埋。

[0087] 石蜡包埋的SC PA-1肿瘤的肿瘤组织经受免疫组化染色。用多克隆一级抗体抗紧密连接蛋白6或抗人CD3染色连续的切片。使用HRP 偶联的抗兔二级抗体检测一级抗体。A-E 的上排显示CLDN6染色, 下排为CD3染色。用Mirax扫描仪拍照。(A) 和 (B) 显示没有接受人效应细胞并且分别接受载体或双-scFv 6PHU3的PBS对照组G1和G2, (C) 显示接受人效应细胞和载体作为治疗的组G3, (D) 显示接受人效应细胞和双-scFv 6PHU3作为治疗的组G4, 和 (E) 显示接受人效应细胞和对照双-scFv 1BiMAB的对照组G5。阳性信号表现为红色染色。黑色箭头指向CD3信号的实例。IP表示腹膜内地; PBMC, 外周血单核细胞; PBS, 磷酸盐缓冲液; SC, 皮下地。

[0088] 图20. 编码靶向TAA CLDN18.2的双-scFv抗体的IVT-RNA分子的示意图。

[0089] 编码抗CLDN18.2双-scFv抗体的体外转录的RNA序列的示意图。(A) 在5'-和3'-位置IVT-mRNA关于抗TAA可变区。(B) 在5'-位置IVT α 病毒复制子关于抗TAA可变区。抗CLDN18.2V_H和V_L区产生于单克隆的CLDN18.2抗体 (mCLDN18.2ab) 的序列。“帽”统一用于

ARCA, β -S-ARCA (D1) 或 β -S-ARCA (D2)。在 (A) 中“抗CD3”广泛代表产生于下列单克隆的CD3抗体的V_H和V_L区: UCHT1-HU (人源化mAB), UCHT1, CLB-T3, TR66, 145-2C11, 在 (B) 中“抗CD3”只描述来自于 TR66的V_H和V_L。A表示腺嘌呤; 双-scFv, 双特异性单链可变片段; hAg, 人 α 球蛋白5'-UTR; hBg, 人 β 球蛋白3'-UTR; His, 六组氨酰标记; IVT, 体外转录; LL, 长的接头 (15-18个氨基酸); nsP1-4, 非结构蛋白1-4; Sec, 分泌信号; sgP, 次基因组启动子; SL, 短的接头 (5-6个氨基酸); TAA, 肿瘤相关抗原; UTR, 非翻译区; V, 抗体的重链 (H) 和轻链 (L) 的可变区。

[0090] 图21. 结构域定向和抗CD3-scFv选择对靶标依赖的T细胞活化和特异性靶细胞溶解的影响。

[0091] 用几个抗CLDN18.2和CD3的双-scFv变体瞬时转染内源性表达 CLDN18.2的NugC4细胞用于在细胞毒性测定中比较它们的效价。每个变体, 用20 μ g/ml IVT-mRNA电穿孔 5×10^6 个NugC4细胞。计数转染的靶细胞, 每个6孔平板接种 1×10^5 个细胞并且以5:1的E:T比率用人细胞毒性T细胞 (CD8⁺选择的T细胞) 孵育。作为阴性对照选择双-scFv IVT-mRNA靶向非表达的TAA (对照), 和靶向CLDN18.2但不靶向T细胞的亲代IgG mAb chCLDN18.2ab (对照IgG)。5ng/ml的浓度 1BiMAB蛋白用作阳性对照。作为背景死亡细胞参照, 接种没有T细胞的电穿孔的靶细胞, 并且作为背景活化参照, 接种没有靶细胞的T细胞。一式两份地接种每一样品。48小时后收获T细胞和靶细胞并且用抗CD3-FITC, 抗CD25-PE, 抗CD69-APC和7-AAD标记用于活的-死的染色和通过流式细胞术分析。(A) 所有抗CLDN18.2双-scFv变体观察到TAA依赖的双-scFv介导的T细胞活化。(B) 通过从7-AAD样品靶细胞群中扣除7-AAD参照群来确定特异性靶细胞溶解。导致高于临界的靶细胞溶解的双-scFv抗体-1BiMAB和第5号-共享mAb TR66 的结构域定向和抗CD3起点, 但是在他们的密码子优化 (分别为HS和 CHO) 和长的接头序列方面不同。双-scFv表示双特异性单链可变片段; 对照, 对照; IgG, 免疫球蛋白G; IVT, 体外转录; mRNA, 信使RNA; TL, T淋巴细胞。

[0092] 图22. 1BiMAB IVT-mRNA转染的靶细胞和人T细胞的共孵育导致T细胞簇集。

[0093] 用80 μ g/ml 1BiMAB IVT-mRNA通过电穿孔瞬时转染内源性表达 CLDN18.2的NugC4细胞并且在96孔平板中以效应细胞与靶细胞比率 5:1与人细胞毒性T细胞 (CD8⁺选择的T细胞) 共孵育。作为阴性对照样品, 使用与人细胞毒性T细胞共孵育的用靶向非表达的TAA的双-scFv IVT-mRNA (-对照) 转染的NugC4靶细胞 (上排, 左侧)。下排显示没有人T细胞的对照双-scFv (左) 或1BiMAB IVT-mRNA (右) 转染的 NugC4细胞。共孵育24小时后用200 $\times$ 放大率的Nikon Eclipse Ti显微镜对样品拍照。白色箭头指向靶细胞上的T细胞簇。CTL表示细胞毒性T淋巴细胞; 对照, 对照; hu, 人类。

[0094] 图23. IVT-mRNA转染后靶细胞所分泌的1BiMAB以浓度依赖的方式介导T细胞活化。

[0095] 通过用含有0.4-40 μ g/ml 1BiMAB IVT-mRNA的总数为40 μ g/ml IVT-mRNA加上适量的荧光素酶IVT-mRNA电穿孔瞬时转染内源性表达CLDN18.2的NugC4细胞。在6孔平板中转染的靶细胞一式两份地以效应细胞与靶细胞比率5:1与人细胞毒性T细胞 (CD8⁺选择的T细胞) 共孵育。作为T细胞活化参照, 人T细胞与用40 μ g/ml荧光素酶IVT-mRNA (0.0 μ g/ml 1BiMAB IVT-mRNA) 转染的NugC4靶细胞共孵育。24小时 (A) 和48小时 (B) 后收获T细胞并且用抗CD3-FITC, 抗CD25-PE, 抗CD69-APC标记和通过流式细胞术分析。图表展示了如用软件测定的阳性染色的细胞毒性人T细胞的百分比。IVT表示体外转录; mRNA, 信使RNA; TL, T淋巴细

胞。

[0096] 图24. IVT-mRNA转染后靶细胞所分泌的1BiMAB导致浓度依赖的靶细胞溶解。

[0097] 通过用含有0.4-40 μ g/ml 1BiMAB IVT-mRNA的总数为40 μ g/ml IVT-mRNA加上适量的荧光素酶IVT-mRNA或用40 μ g/ml荧光素酶 IVT-mRNA只用作参照样品的电穿孔瞬时转染内源性表达CLDN18.2的NugC4细胞。用人细胞毒性T细胞(CD8⁺选择的T细胞)以效应细胞与靶细胞比率5:1或没有效应细胞接种靶细胞以便通过每一单独的电穿孔确定背景死的靶细胞的百分比。6孔平板中一式两份地培养所有样品。24小时(A)和48小时(B)后收获T细胞,用碘化丙啶(PI)标记,用于活的/死的染色并且通过流式细胞术分析。通过FlowJo软件确定死的(PI⁺)靶细胞的百分比。值进一步相对于每一单独的背景样品和参照样品的标准化。IVT表示体外转录;mRNA,信使RNA;TL,T淋巴细胞。

[0098] 图25. 在CLDN18.2存在的情况下响应靶细胞所分泌1BiMAB特异地诱导T细胞增殖。

[0099] 用于测定的人T细胞为CFSE染色。没有靶细胞(T细胞)T细胞与5 μ g/ml OKT3和2 μ g/ml CD28作为阳性活化对照(+对照),5ng/ml 非靶向对照双-scFv(-对照蛋白)或5ng/ml 1BiMAB蛋白(1BiMAB蛋白)组合培养。共同孵育T细胞和过表达CLDN18.2的NugC4靶细胞(T细胞+CLDN18.2阳性靶细胞)没有任何(模拟)或与5ng/ml 1BiMAB蛋白(1BiMAB蛋白)。为测试IVT-mRNA,用20 μ g/ml 1BiMAB IVT-mRNA(1BiMAB mRNA)或双-scFv IVT-mRNA靶向非表达的TAA(-对照 mRNA)转染NugC4细胞并且用T细胞孵育。另外,双-scFv IVT-mRNA 靶向非表达的TAA转染的NugC4细胞与5ng/ml 1BiMAB蛋白(-对照 mRNA+1BiMAB蛋白)组合。作为进一步的特异性对照,诱导不表达 CLDN18.2的靶细胞系MDA-MB-231样品连同T细胞(T细胞 + CLDN18.2阴性靶细胞)。使用未处理的MDA-MB-231并且不用任何(模拟),用5ng/ml对照双-scFv蛋白(-对照蛋白)或5ng/ml 1BiMAB蛋白(1BiMAB蛋白)孵育或用20 μ g/ml 1BiMAB IVT-mRNA(1BiMAB mRNA)或双-scFv IVT-mRNA靶向非表达的TAA(-对照mRNA)转染 MDA-MB-231。96孔平板中效应细胞与靶细胞比率5:1进行测定,每一样品一式三份地并且孵育时间72小时。通过流式细胞术分析指示T 细胞增殖的CFSE信号的减少,通过FlowJo软件计算并且绘制为%增值的T细胞。CFSE表示羧基荧光素琥珀酰亚胺酯;IVT,体外转录的;mRNA,信使RNA。

[0100] 图26. 响应1BiMAB分泌T细胞活化和T细胞介导的靶细胞溶解开始效应细胞与靶细胞比率0.3:1。

[0101] 通过40 μ g/ml 1BiMAB IVT-mRNA电穿孔瞬时转染内源性表达 CLDN18.2的NugC4细胞。6孔平板中一式两份地指示的效应细胞与靶细胞比率范围0.3:1-10:1共孵育转染的靶细胞与人细胞毒性T细胞(CD8⁺选择的T细胞)。在没有效应细胞((B) 0:1)的情况下培养((A) 1:0) 和对照IVT-mRNA转染的靶细胞。作为阴性对照,以10:1((A)和(B) 对照IVT-mRNA 10:1)的E:T比率人T细胞与40 μ g/ml荧光素酶 IVT-mRNA(对照IVT-mRNA)转染的NugC4靶细胞共孵育。48小时后收获细胞并且用抗CD3-FITC,抗CD25-PE,抗CD69-APC和碘化丙啶(PI)标记用于活的/死的染色和通过流式细胞术分析。(A)显示阳性染色的细胞毒性人T细胞的百分比。(B)展示死的(PI⁺)靶细胞的百分比。经由FlowJo软件确定所有值。E:T表示效应细胞比靶细胞;IVT,体外转录;mRNA,信使RNA;TL,T淋巴细胞。

[0102] 图27. 人细胞毒性T细胞能够用作双-scFv IVT-mRNA受体和生产细胞。

[0103] 通过CD8阳性选择新近从PBMC分离人细胞毒性T细胞然后通过80或240 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 1BiMAB IVT-mRNA电穿孔瞬时转染。6孔平板中一式两份地效应细胞与靶细胞比率5:1转染的效应细胞与内源性表达 CLDN18.2的NugC4靶细胞共孵育。作为参照用靶细胞培养未处理的人T细胞。作为阴性对照,80或240 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eGFP对照IVT-mRNA转染的人T细胞与NugC4靶细胞共孵育。48小时后收获细胞并且用抗 CD3-FITC,抗CD25-PE,抗CD69-APC和碘化丙啶(PI)标记用于活的/死的染色和通过流式细胞术分析。(A)显示阳性染色的细胞毒性人T细胞的百分比。(B)中绘制死的(PI⁺)靶细胞标准化为参照样品的百分比。经由FlowJo软件确定所有值。Ctrl表示对照;IVT,体外转录;mRNA,信使RNA;TL,T淋巴细胞。

[0104] 图28. 1BiMAB IVT-mRNA转染的CLDN18.2阴性靶细胞不被T细胞所溶解。

[0105] 稳定表达荧光素酶的CLDN18.2阴性细胞系PA-1用作靶细胞系。用总数为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IVT-mRNA.4和40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 1BiMAB IVT-mRNA电穿孔转染 5×10^6 个PA-1/luc细胞或内源性表达CLDN6的靶向6RHU3作为阳性对照为转染的。作为双-scFv阴性对照,40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 双-scFv IVT-mRNA靶向非表达的TAA(-对照)为转染的。这种IVT-mRNA也用作4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IVT-mRNA样品中填补RNA(IVT-mRNA 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 1BiMAB, IVT-mRNA 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 6RHU3)。包括1BiMAB和6PHU3的蛋白对照样品与PA-1/luc细胞转染的双-scFv阴性对照组合和效应细胞。

[0106] 用人细胞毒性T细胞(全T细胞)接种转染的靶细胞,效应细胞与靶细胞比率5:1。在96孔版式中以一式三份地接种和共孵育所有样品 72小时。作为最小溶解对照(L_{min})没有效应细胞接种每一个体转染的靶细胞样品。通过添加Triton X-100到含有效应细胞和未处理的靶细胞(L_{max1})的对照孔或荧光素添加之前单独地未处理的靶细胞(L_{max2})实现标准化为自发发光计数的最大溶解(L_{max})。荧光素溶液添加后30分钟在Infinite M200Tecan酶标仪中测量发光。通过公式计算特异性靶细胞溶解:特异性溶解% = $[1 - (\text{发光}_{\text{受试样品}} - L_{\text{max1}}) / (L_{\text{min}} - \text{受试样品} - L_{\text{max2}})] \times 100$ 。Ctrl表示对照;IVT,体外转录;mRNA,信使RNA。

[0107] 图29. 双-scFv IVT-mRNA或-复制子RNA转染的哺乳动物细胞产生1BiMAB的证据。

[0108] (A) 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 1BiMAB IVT-mRNA或-复制子RNA电穿孔瞬时转染 5×10^6 个BHK21细胞。作为模拟对照,没有RNA电穿孔对照细胞。转染后18小时收获上清液和细胞。细胞为溶解的并且上清液受到50倍浓缩。使用Ni-NTA平板,抗chCLDN18.2ab独特型mAB和二级AP偶联的抗体通过ELISA分析未处理的和浓缩的上清液。2倍步骤稀稀释队列范围在2.3-37.5ng/ml的纯化的1BiMAB蛋白用作标准。(B) 经由SDS-PAGE分离浓缩的上清液,(A)的细胞溶解产物和0.1 μg 纯化的1BiMAB蛋白作为阳性对照。用一级单克隆的抗His和二级过氧化物酶偶联的抗鼠抗体进行蛋白印迹分析。(C) 通过40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 1BiMAB 或25号IVT-mRNA电穿孔瞬时转染 5×10^6 个BHK21细胞。作为模拟对照,没有RNA电穿孔细胞。转染后48小时收获上清液并且上清液受到40倍浓缩。经由SDS-PAGE分离SN和0.1 μg 纯化的1BiMAB蛋白作为阳性对照。用一级单克隆的抗His和二级过氧化物酶偶联的抗鼠抗体进行蛋白印迹分析。Ctrl表示对照;mAB,单克隆抗体;SN,上清液;WB,蛋白印迹。

[0109] 图30. 1BiMAB双-scFv IVT-mRNA或-复制子RNA的注射导致 1BiMAB双-scFv在小鼠中体内产生和可检测的。

[0110] 10 μg 1BiMAB IVT-mRNA与或不与EBK IVT-mRNA或10 μg 1BiMAB IVT-复制子IM注射到NSG小鼠。注射后收集2,4和7天的来自于血液的血清应用于体外细胞毒性测定。CLDN18.2和稳定表达荧光素酶的NugC4-LVT-CLDN18.2/luc靶细胞与人T细胞以E:T比率

30:1与20 μ l样品血清共孵育48小时。标准1BiMAB蛋白对照, L_{min} 和 L_{max} 包含20 μ l NSG模拟血清。EBK表示牛痘病毒蛋白混合物E3, B-18R,K3;IM,肌肉内地。

[0111] 图31. 编码靶向TAA CLDN6的双-scFv抗体的IVT-RNA分子的示意图。

[0112] 编码抗CLDN6双-scFv抗体的体外转录的RNA序列的示意图。(A)在5'-和3'-位置IVT mRNA关于抗TAA可变区。(B)在3'-位置IVT α 病毒复制子关于抗TAA可变区。抗CLDN6 V_H 和 V_L 区产生于单克隆的CLDN6抗体的序列(mCLDN6ab)。“帽”统一用作ARCA, β -S-ARCA (D1)或 β -S-ARCA (D2)。抗CD3 V_H 和 V_L 区产生于单克隆的CD3抗体 TR66的序列。A表示腺嘌呤;双-scFv,双特异性单链可变片段;hAg,人 α 球蛋白5'-UTR;hBg,人 β 球蛋白3'-UTR;His,六组胺酰胺标记;IVT,体外转录;LL,长的接头(15-18个氨基酸);nsP1-4,非结构蛋白1-4;Sec,分泌信号;sgP,次基因组启动子;SL,短的接头(5-6个氨基酸);TAA,肿瘤相关抗原;UTR,非翻译区;V,抗体的重链(H)和轻链(L)的可变区。

[0113] 图32. 抗CLDN6双-scFv IVT-mRNA转染的靶细胞和人T细胞的共孵育导致T细胞簇集。

[0114] 通过20 μ g/ml 6RHU5或6RHU3IVT-mRNA电穿孔瞬时转染内源性表达CLDN6的PA-1细胞并且在6孔平板中以效应细胞与靶细胞比率5:1与人T细胞共孵育。作为阴性对照样品使用与人T细胞共孵育的双-scFv IVT-mRNA靶向非表达的TAA(-对照)转染的PA-1靶细胞(上排,左图)。中间列显示未处理的PA-1细胞和人T细胞没有蛋白作为阴性对照(模拟,左图)或50 μ g/ml纯化的抗CLDN6双-scFv蛋白 6PHU5(中间或6PHU3(右)作为阳性对照。下排显示未处理的PA-1细胞(左)和单独的人T细胞(右)。共孵育24小时后用200 $\times$ 放大率的Nikon Eclipse Ti显微镜对样品拍照。白色箭头指向靶细胞上的T细胞簇。双-scFv表示双特异性单链可变片段;对照,对照;hu,人类;IVT,体外转录的;mRNA,信使RNA;TL,T淋巴细胞。

[0115] 图33. 结构域定向对效力的影响:抗CLDN6双-scFv 6RHU3转染靶细胞比6RHU5转染靶细胞导致活化T细胞的百分比更高。

[0116] 用抗CLDN6和CD3的两种双-scFv变体6RHU5和6RHU3瞬时转染内源性表达CLDN6的PA-1细胞用于比较它们在T细胞活化测定中的效价。用20 μ g/ml IVT-mRNA电穿孔每一变体5 $\times 10^6$ 个PA-1细胞。再计数转染的靶细胞,接种1 $\times 10^5$ 个细胞/6孔平板并且与人细胞毒性T细胞(CD8⁺选择的T细胞)以E:T比率5:1孵育。作为阴性对照选择未处理的靶细胞(hu TL+PA-1未处理的)和双-scFv IVT-mRNA靶向非表达的TAA转染的靶细胞(hu TL+PA-1-对照)。50ng/ml浓度的6PHU5蛋白用作阳性对照(hu TL+PA-1蛋白对照)。而且,用或不用6PHU5蛋白接种没有靶细胞的T细胞作为背景活化参照。以一式两份地接种每一样品。24小时和48小时后进行分析:收获T细胞并且用抗CD3-FITC,抗CD25-PE,抗CD69-APC和7-AAD标记用于活的-死的染色和通过流式细胞术分析。24小时(A)和48小时(B)共孵育后,观察到两种抗CLDN6双-scFv变体TAA依赖的双-scFv介导的T细胞活化。在两个时间点双-scFv 6RHU3转染导致大约20%更高的T细胞活化。双-scFv表示双特异性单链可变片段;对照,对照;hu,人类;IVT,体外转录的;mRNA,信使RNA;TL,T淋巴细胞。

[0117] 图34. 6RHU3分泌以浓度依赖方式介导T细胞活化。

[0118] 通过用含有0.2-20 μ g/ml 6RHU3IVT-mRNA的总数为20 μ g/ml IVT-mRNA加上适当量的双-scFv IVT-mRNA靶向非表达的TAA电穿孔瞬时转染内源性表达CLDN6的PA-1细胞。20 μ g/ml双-scFv IVT-mRNA靶向非表达的TAA(0.0 μ g/ml 6RHU3IVT-mRNA)的转染用作特异性对

照。在6孔平板中以一式两份地效应细胞与靶细胞比率5:1 共孵育转染的靶细胞与人细胞毒性T细胞(全T细胞)。作为T细胞活化参照,没有6PHU5蛋白(hu TL-)或用6PHU5蛋白(hu TL蛋白对照) 单独地培养人T细胞。作为阴性对照T细胞与未处理的PA-1靶细胞(hu TL+PA-1-对照)共孵育。50ng/ml浓度的6PHU5蛋白用作阳性对照(hu TL+PA-1蛋白对照)。48小时后,收获T细胞并且用抗CD3-FITC,抗 CD25-PE,抗CD69-APC标记和通过流式细胞术分析。图表展示了如经由FlowJo软件确定的阳性染色的人T细胞的百分比。双-scFv表示双特异性单链可变片段;对照,对照;hu,人类;IVT,体外转录的;mRNA,信使RNA;TL,T淋巴细胞。

[0119] 图35. 48小时后6RHU3对特异性靶细胞溶解的EC50为大约200 ng/ml。

[0120] 通过用含有0.004-13.3μg/ml 6RHU3总浓度13.3μg/ml双-scFv IVT-mRNA和适当量靶向非表达的TAA的双-scFv IVT-mRNA电穿孔瞬时转染稳定表达荧光素酶的内源性表达CLDN6的PA-1细胞。在96 孔版式中以一式三份地效应细胞与靶细胞比率5:1用人T细胞接种转染的细胞。作为最小的溶解对照(L_{min})不用效应细胞接种每一个体的转染的靶细胞。通过稍早于添加荧光素添加Triton X-100到包含效应细胞和未处理的靶细胞的对照孔中实现标准化为自发发光计数的溶解最大值(L_{max})。荧光素溶液添加后30分钟,24小时和48小时后在Infinite M200Tecan酶标仪中测量发光。通过公式计算特异性细胞溶解:特异溶解%=[1-(发光受试样品-L_{max})/(L_{min}受试样品-L_{max})]×100。值标绘为6RHU3 浓度的log10。EC50表示半最有效浓度;L,溶解。

[0121] 图36. 在CLDN6存在的情况下响应6RHU3T细胞增殖被靶细胞特异地诱导。

[0122] 用于测定的人T细胞为CFSE染色。没有靶细胞(T细胞)T细胞与 5μg/ml OKT3和2μg/ml CD28作为阳性活化对照(+对照),5ng/ml非靶向对照双-scFv(-对照蛋白)或5ng/ml 6PHU3蛋白(6PHU3蛋白)组合培养。共同孵育T细胞和内源性表达CLDN6的PA-1靶细胞(T细胞+ CLDN6阳性靶细胞)没有任何(模拟)或与5ng/ml 6PHU3蛋白(6PHU3 蛋白)。为测试IVT-mRNA,用20μg/ml 6RHU3IVT-mRNA(6RHU3 mRNA)或双-scFv IVT-mRNA靶向非表达的TAA(-对照mRNA)转染 PA-1细胞并且用T细胞孵育。另外,双-scFv IVT-mRNA靶向非表达的TAA转染的PA-1细胞与5ng/ml 6RHU3蛋白(-对照mRNA+6RHU3 蛋白)组合。作为进一步的特异性对照,诱导不表达CLDN6的靶细胞系MDA-MB-231连同T细胞(T细胞+CLDN6阴性靶细胞)。使用未处理的MDA-MB-231并且不用任何(模拟),用5ng/ml对照双-scFv蛋白(-对照蛋白)或5ng/ml 6PHU3蛋白(6PHU3蛋白)孵育或用20μg/ml 6PHU3IVT-mRNA(6PHU3mRNA)或双-scFv IVT-mRNA靶向非表达的 TAA(-对照mRNA)转染MDA-MB-231。96孔平板中效应细胞与靶细胞比率5:1进行测定,每一样品一式三份地并且孵育时间72小时。通过流式细胞术分析指示T细胞增殖的CFSE信号的减少,通过FlowJo 软件计算并且绘制为%增值的T细胞。CFSE表示羧基荧光素琥珀酰亚胺酯;IVT,体外转录的;mRNA,信使RNA。

[0123] 图37. 双-scFv IVT-mRNA或-复制子RNA转染的哺乳动物细胞产生6RHU3的证据。

[0124] (A) 40μg/ml 6RHU3IVT-mRNA或-复制子RNA电穿孔瞬时转染 5×10⁶个BHK21细胞。包括第25号IVT-mRNA的转染在内作为额外样品。作为模拟对照,没有RNA电穿孔对照细胞。转染后18小时收获上清液和细胞。细胞为溶解的并且上清液受到50倍浓缩。使用 Ni-NTA平板,抗mCLDN6ab独特型mAB和二级AP偶联的抗体通过 ELISA分析未处理的和浓缩的上清液。2倍步骤稀释队列范围在 2.3-150ng/ml的纯化的6PHU3蛋白用作标准。(B)经由SDS-PAGE分离浓缩的上清液,(A)的细胞溶解产物和0.1μg纯化的6PHU3蛋白作为阳性对照。用一级单克

隆的抗His和二级过氧化物酶偶联的抗鼠抗体进行蛋白印迹分析。(C)通过40 μ g/ml 6PHU3或25号IVT-mRNA电穿孔瞬时转染 5×10^6 个BHK21细胞。作为模拟对照,没有RNA电穿孔对照细胞。转染后48小时收获上清液并且上清液受到40倍浓缩。经由SDS-PAGE分离SN和0.1 μ g纯化的6PHU3蛋白作为阳性对照。用一级单克隆的抗His和二级过氧化物酶偶联的抗鼠抗体进行蛋白印迹分析。Ctrl表示对照;mAB,单克隆抗体;SN,上清液;WB,蛋白印迹。

[0125] 图38. 6PHU3双-scFv IVT-mRNA或-复制子RNA的注射导致双-scFv在小鼠中体内翻译和可检测的。

[0126] 10 μ g 6PHU3IVT-mRNA与或不与EBK IVT-mRNA或10 μ g 6PHU3IVT-复制子IM注射到NSG小鼠。注射后7天收集来自于血液的血清应用于体外细胞毒性测定。CLDN6和稳定表达荧光素酶的PA-1/luc靶细胞与人T细胞以E:T比率30:1与20 μ l样品血清共孵育48小时。标准6PHU3蛋白对照, L_{min} 和 L_{max} 包含20 μ l NSG模拟血清。EBK表示牛痘病毒蛋白混合物E3,B-18R,K3;IM,肌肉内地。

[0127] 图39. 含有蛋白的C末端部分scFv抗CD3结合结构域的抗CLDN18.2双-scFv蛋白的细胞毒性结果。

[0128] 抗CLDN18.2和CD3的双-scFv变体瞬时表达在CHO细胞中并且用蛋白-L树脂纯化用于比较它们在细胞毒性测定中的效价。稳定表达荧光素酶的内源性表达CLDN18.2的NugC4细胞被当作靶细胞。在96孔版式中以E:T比率5:1,每一双-scFv蛋白5000,1000,200和40ng/ml孵育人T细胞和靶细胞。每一受试样品3倍地平板接种,用于 L_{min} 的对照样品3倍地平板接种。分析之前共孵育时间为24小时和48小时。在给定的时间点添加荧光素溶液后,在Infinite M200TECAN酶标仪中测量发光。计算和报导每一浓度的特异性靶细胞。

[0129] a.抗CD3的可变结构域在VH-VL结构域顺序并且被LL4肽接头所分离。

[0130] b.抗CD3的可变结构域在VH-VL结构域顺序并且被LL4肽接头所分离。scFv抗CD3包含VH和VL结构域之间的界面二硫键。

[0131] c.抗CD3的可变结构域在VH-VL结构域顺序并且被LL5肽接头所分离。

[0132] d.抗CD3的可变结构域在VH-VL结构域顺序。scFv抗CD3包含VH和VL结构域之间的界面二硫键。

[0133] 图40. 抗CLDN6双-scFv蛋白荧光素酶细胞毒性测定中所获得的EC50值的内测定比较。

[0134] 用三种不同的用于T细胞制备的供体进行荧光素酶细胞毒性测定。计算的EC50值,24小时和48小时孵育后计算的6受试的抗CLDN6双-scFv蛋白,报导每一独立的测定(A,B和C)。在96孔版式中一式三份地以效应细胞与靶细胞比例5:1孵育内源性表达CLDN6的PA-1细胞与递增浓度(对A和B而言0.025-50000ng/ml,对C而言0.0025-5000ng/ml)抗CLDN6双-scFv蛋白和人T细胞24小时和48小时。作为最小的溶解对照(L_{min})不用双-scFv蛋白接种效应细胞和靶细胞。通过稍早于添加荧光素在双-scFv蛋白不存在的情况下添加Triton X-100到包含效应细胞和靶细胞的对照孔中实现标准化为自发发光计数的溶解最大值(L_{max})。荧光素溶液添加后30分钟,靶细胞和效应细胞孵育24小时和48小时后在Infinite M200Tecan酶标仪中测量发光。通过公式计算特异性细胞溶解:特异溶解% = $[1 - (\text{发光受试样品} - L_{max}) / (L_{min} - L_{max})] \times 100$ 。EC50表示半最有效浓度;L,溶解;NA,不适用的。

[0135] 发明详述

[0136] 尽管在下文详述本发明,应理解的是本发明不限于本文所述的特定的方法,方案和试剂,因为这些可以是改变的。还应理解的是本文所述的术语只出于描述特定的实施方案的目的,并不打算限制本发明的范围,本发明的范围仅受限于所附的权利要求。除非另有说明,所有本文所用的科技和科学术语具有本领域中技术人员通常所理解的相同的意义。

[0137] 下文中,描述本发明的要素。这些要素与具体的实施方案一起列出,然而,应理解的是,它们可以任何方式和任何数量组合产生额外的实施方案。各种所述的实施例和优选的实施方案不应解释为限制本发明只是为了明确地描述实施方案。这种描述应理解为支持和包含以任何数量的公开的和/或优选的要素与明确描述的实施方案组合的实施方案。而且,本申请中描述的所有要素的任何排列和组合应被认为被本申请的描述公开,除非上下文中另有所指。

[0138] 优选地,本文所用的术语被定义为“生物技术术语的多种语言汇编:(IUPAC推荐)”,H.G.W.Leuenberger,B.Nagel,和H. Kölbl,Eds., Helvetica Chimica Acta,CH-4010Basel,Switzerland,(1995)中所述的。

[0139] 除非另有所指,本发明的实践应用领域文献中所解释的化学,生物化学,细胞生物学,免疫学和重组DNA技术的常规方法(例如分子克隆:实验室手册,第2版,J.Sambrook等编辑.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor 1989)。

[0140] 本说明书自始至终和下列的权利要求,除非上下文另有所需,词语“包含”,和变化诸如“包含(单数形式)”和“含有”,应理解为意指包含规定的成员,整数或步骤或成员,整数或步骤组但不排除任何其他成员,整数或步骤或成员,整数或步骤组,尽管在一些实施方案中可排出此类其他成员,整数或步骤或步骤或成员,整数或步骤组,即主题-内容由规定的成员、整数或步骤或成员、整数或步骤组组成。术语“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”和描述本发明的上下文中所用的相似的参照物(尤其是在权利要求的上下文中)解释为覆盖单数和复数,除非本文另有说明或上下文有明显地矛盾。本文值范围的列举仅仅想要用作单独地提及范围内每一单独的值的速记的方法。除非本文另有说明,每一单独的值并入本文如同它被本文单独地列举。本文所述的所有方法可以任何合适的顺序进行除非本文另有说明或上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有实施例,或示例性语言(例如“诸如”)的使用仅仅想要更好地例证本发明并不施加本发明范围的限制除非另有所求。本说明书中没有语言应解释为表示任何本发明实践所必需的非权利要求的要素。

[0141] 本说明书通篇引用了若干文献。本文引用的每一文献(包括所有专利,专利申请,科学出版物,制造商说明书,说明等),无论是在上文还是在下文,通过引用将其全部并入本文。本文没有什么被解释为允许借助先前发明本发明有权享有先于此类公开内容。

[0142] 紧密连接蛋白为紧密连接最重要的组分的蛋白家族,其中它们建立了控制分子在上皮细胞间的细胞间隙流动的细胞旁路屏障。紧密连接蛋白为跨膜蛋白,跨膜4次,N末端和C末端都在胞质内。第一细胞外环,叫做EC1或ECL1,由平均53个氨基酸组成,第二细胞外环,叫做EC2或ECL2,由24个氨基酸左右组成。紧密连接蛋白家族的细胞表面蛋白,诸如CLDN6和CLDN18.2,表达于各种起源的肿瘤,并且由于它们的选择性表达(在毒性相关的正常组织中无表达)和定位在细胞质膜特别适合作为与抗体介导的癌症免疫疗法有关的靶组织。

[0143] 在本发明的上下文中,优选的紧密连接蛋白为CLDN6和 CLDN18.2。CLDN6和CLDN18.2被鉴定为在肿瘤组织中差异性表达,表达CLDN18.2的正常组织只有胃和表达

CLDN6的正常组织只有胎盘。

[0144] CLDN18.2在正常组织胃粘膜的分化型上皮细胞中选择性表达。CLDN18.2在各种起源的癌症中表达诸如胰腺癌,食道癌,胃癌,支气管癌,乳腺癌,和ENT肿瘤。对原发性肿瘤诸如胃癌,食道癌,胰腺癌,肺癌诸如非小细胞肺癌(NSCLC),卵巢癌,结肠癌,肝癌,头颈癌,胆囊癌及以上的转移,尤其是胃癌转移诸如克鲁根勃氏瘤,腹膜转移和淋巴结转移的预防和/或治疗而言,CLDN18.2为有价值的靶标。

[0145] 例如已发现CLDN6在卵巢癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、黑色素瘤、头颈癌、肉瘤、胆管癌、肾细胞癌、和膀胱癌中表达。对卵巢癌,特别是卵巢腺癌和卵巢畸胎瘤,肺癌,包括小细胞癌肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),尤其是鳞状细胞肺癌和腺癌,胃癌,乳腺癌,肝癌,胰腺癌,皮肤癌,尤其是基底细胞癌和鳞状细胞癌,恶性黑色素瘤,头颈癌,尤其是恶性多形性腺癌,肉瘤,尤其是滑膜肉瘤和癌肉瘤,胆管癌,膀胱癌,尤其是移行细胞癌和乳头状癌,肾癌,尤其是肾细胞癌其包括透明细胞肾细胞癌和乳头状肾细胞癌,结肠癌,小肠癌,其包括回肠癌,尤其是小肠腺癌和回肠腺癌,睾丸胚胎性癌,胎盘绒毛膜癌,宫颈癌,睾丸癌,尤其是睾丸精原细胞瘤,睾丸畸胎瘤和胚胎性睾丸癌,子宫癌,生殖细胞肿瘤诸如畸胎瘤或胚胎性癌,尤其是睾丸的生殖细胞肿瘤,和其转移形式的预防和/或治疗而言,CLDN6为特别优选的靶标。在一实施方案中,与CLDN6表达有关的癌症疾病选自卵巢癌、肺癌、转移性卵巢癌和转移性肺癌。优选地,卵巢癌为恶性肿瘤或腺癌。优选地,肺癌为恶性肿瘤或腺癌,并且优选地为细支气管癌诸如细支气管肿瘤或细支气管腺癌。

[0146] 如本文所用的术语“CLDN”意指紧密连接蛋白并且包括 CLDN18.2和CLDN6。优选地,紧密连接蛋白为人紧密连接蛋白。

[0147] 术语“CLDN18”涉及紧密连接蛋白18并且包括任何变体,其包括紧密连接蛋白18剪接变体1(紧密连接蛋白18.1(CLDN18.1))和紧密连接蛋白18剪接变体2(紧密连接蛋白18.2(CLDN18.2))。

[0148] 术语“CLDN18.2”优选地涉及CLDN18.2,并且尤其优选由序列表的SEQ ID NO:1氨基酸序列或所述氨基酸序列的变体组成的蛋白。CLDN18.2的第一细胞外环优选地包含SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列的氨基酸27-81,更优选氨基酸29-78。CLDN18.2的第二细胞外环优选地包含SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列的氨基酸140-180。所述第一和第二细胞外环优选地形成CLDN18.2的细胞外部分。

[0149] 术语“CLDN6”优选地涉及人CLDN6,并且尤其优选由序列表的 SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3氨基酸序列或所述氨基酸序列的变体组成的蛋白。CLDN6的第一细胞外环优选地包含SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列或SEQ ID NO:3中所示氨基酸序列的氨基酸28-80,更优选氨基酸28-76。CLDN6的第二细胞外环优选地包含SEQ ID NO:2 中所示氨基酸序列或SEQ ID NO:3中所示氨基酸序列的氨基酸 138-160,优选氨基酸141-159,更优选氨基酸145-157。所述第一和第二细胞外环优选地形成CLDN6的细胞外部分。

[0150] 本发明术语“变体”尤其指的是突变体,剪接变体,构象,同种型,等位基因变体,物种变体和物种同系物,尤其是天然存在的那些。等位基因变体涉及基因正常序列的改变,其意义经常是不清楚的。完整的基因测序经常鉴定给定基因的许多等位基因变体。物种同系物为与给定核酸或氨基酸序列的起源物种不同的核酸或氨基酸序列。术语“变体”应包含任何翻译后地修饰的变体和构象变体。

[0151] 本文所述的结合剂的第二靶分子为CD3(白细胞分化抗原3)。CD3 复合体指的是在成熟的人T细胞,胸腺细胞和自然杀伤细胞的亚型上表达的抗原作为多分子的T细胞受体(TCR)复合体的一部分。T细胞共受体为蛋白复合体并且由四条独特的链组成。哺乳动物细胞中,复合体包含CD3 γ 链,CD3 δ 链,和两条CD3 ϵ 链。这些链与被称为T细胞受体(TCR)的分子联系并且 ζ 链在T淋巴细胞中产生活化信号。TCR, ζ 链和CD3分子共同组成TCR复合体。

[0152] 基因库登录号NM_000733指的是人CD3 ϵ 并且包含SEQ ID NO: 4。基因库登录号NM_000073指的是人CD3 γ 。基因库登录号 NM_000732指的是人CD3 δ 。CD3负责TCR的信号转导。如Lin和 Weiss,细胞科学期刊114,243-244 (2001) 所述的,通过与MHC呈递的特异抗原表位结合TCR复合体的活化导致通过Src家族激酶基于免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)的磷酸化,触发进一步激酶的募集,这导致了包括Ca²⁺释放的T细胞活化。CD3簇集在T细胞上,例如通过固定化抗CD3抗体,引起与T细胞受体接触相似的T细胞活化,但是独立于它的克隆典型特异性。

[0153] 如本文所用的,“CD3”包括人CD3并且指的是人T细胞上表达的抗原作为多分子的T细胞受体复合体的一部分。

[0154] 关于CD3,本发明的结合剂优选地识别CD3的 ϵ 链,尤其是它识别相当于CD3 ϵ 的N末端前27个氨基酸或这27个氨基酸延伸的功能片段的表位。

[0155] 本发明术语“紧密连接蛋白阳性的癌症”或相似的术语意指癌细胞表达紧密连接蛋白,优选地在所述癌细胞的表面上表达紧密连接蛋白的癌症。

[0156] 所用的“细胞表面”与本领域中它的通常意义一致,并且因此包括通过蛋白和其他分子可接近结合的细胞的外部。

[0157] 如果紧密连接蛋白位于所述细胞的表面并且通过紧密连接蛋白特异性抗体可接近结合添加到细胞,那么紧密连接蛋白就表达在细胞表面。

[0158] 本发明的上下文中术语“细胞外部分”指的是分子的一部分诸如面向细胞的细胞外间隙的蛋白并且优选地从所述细胞外部可接近的,例如通过抗原结合分子诸如位于细胞外部的抗体。优选地,术语指的是一个或多个细胞外环或结构域或其片段。

[0159] 术语“部分”或“片段”在本文可互换地使用并且指的是连续的元素。例如,结构部分诸如氨基酸序列或蛋白指的是所述结构的连续的元素。结构的部分,一部分或片段优选地包含一个或多个所述结构的功能特性。例如,表位或肽的部分,一部分或片段优选地为它衍生的免疫等价的表位或肽。蛋白序列的一部分或片段优选地包含蛋白序列的至少6个、尤其是至少8个、至少12个、至少15个、至少20个、至少30个、至少50个、或至少100个连续的氨基酸。

[0160] 本发明如果与胃细胞或胃组织表达水平相比表达水平更低,那么基本上细胞中不表达CLDN18.2。优选地,表达水平小于10%,优选地小于5%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或0.05%胃细胞或胃组织的表达或甚至更低。优选地,如果除了胃之外表达水平超过非癌组织的表达水平不多于2倍,优选地1.5倍,并且优选地不超过所述的非癌组织的表达水平,那么基本上细胞中不表达CLDN18.2。优选地,如果表达水平低于检测极限和/或如果表达水平过低以致不允许通过 CLDN18.2特异性抗体结合添加到细胞,那么基本上细胞中不表达CLDN18.2。

[0161] 本发明中,如果表达水平超过除了胃之外非癌组织的表达水平2 倍,优选地10倍,

100倍,1000倍,或10000倍,那么细胞中表达 CLDN18.2。优选地,如果表达水平高于检测极限和/或如果表达水平足够高以至于允许通过CLDN18.2特异性抗体结合添加到细胞,那么细胞中表达CLDN18.2。优选地,细胞中表达的CLDN18.2为所述细胞表面表达或暴露在所述细胞表面。

[0162] 本发明中,如果与胎盘细胞或胎盘组织的表达水平相比表达水平更低,那么细胞中基本上不表达CLDN6。优选地,表达水平小于5%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或0.05%胎盘细胞或胎盘组织的表达或甚至更低。优选地,如果除了胎盘之外表达水平超过非癌组织的表达水平不多于2倍,优选地1.5倍,并且优选地不超过所述的非癌组织的表达水平,那么基本上细胞中不表达CLDN6。优选地,如果表达水平低于检测极限和/或如果表达水平过低以致不允许通过CLDN6特异性抗体结合添加到细胞,那么基本上细胞中不表达CLDN6。

[0163] 本发明中,如果表达水平超过除了胎盘之外非癌组织的表达水平 2倍,优选地10倍、100倍、1000倍、或10000倍,那么细胞中表达 CLDN6。优选地,如果表达水平高于检测极限和/或如果表达水平足够高以至于允许通过CLDN6特异性抗体结合添加到细胞,那么细胞中表达CLDN6。优选地,细胞中表达的CLDN6为所述细胞表面表达或暴露在所述细胞表面。

[0164] 本发明中术语“疾病”指的是任何病理状态,包括癌症,尤其是本文所述的那些癌症形式。本文引用的任何癌症或癌症的特别形式也包括其癌症转移。在一优选的实施方案中,本申请中待被治疗的疾病涉及表达紧密连接蛋白 (CLDN) 诸如CLDN18.2和/或CLDN6的细胞。

[0165] 本发明中“与表达CLDN的细胞有关的疾病”或相似的表达意指患病的组织或器官的细胞中表达CLDN。在一实施方案中,与健康组织或器官的状态相比,患病的组织或器官的细胞中CLDN的表达是增加的。增加指的是增加了至少10%,尤其是至少20%,至少50%,至少 100%,至少200%,至少500%,至少1000%,至少10000%或甚至更多。在一实施方案中,只在患病组织中发现表达,而在健康组织中表达是抑制的。本发明中与表达CLDN的细胞有关的疾病包括癌症疾病。而且,本发明中优选地癌症疾病为其中癌细胞表达CLDN的那些。

[0166] 如本文所用的“癌症疾病”或“癌症”包括通过异常调节的细胞生长,增殖,分化,粘附,和/或迁移表征的疾病。所谓“癌细胞”意指通过迅速,失控地细胞增殖而生长并且启动新的生长的刺激停止后继续生长的异常细胞。优选地,通过表达CLDN的细胞表征“癌症疾病”并且癌细胞表达CLDN。优选地表达CLDN的细胞为癌细胞,优选地本文所述的癌症的癌细胞。

[0167] 本发明中术语“癌症”包含白血病、精原细胞瘤、黑色素瘤、畸胎瘤、淋巴瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾上腺癌、甲状腺癌、血癌、皮肤癌、脑癌、宫颈癌、肠癌、肝癌、结肠癌、胃癌、小肠癌、头颈癌、胃肠癌、淋巴结癌、食道癌、结肠直肠癌、胰腺癌、耳鼻喉 (ENT) 癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、卵巢癌和肺癌和以上的转移。其实例为肺恶性上皮肿瘤、乳房恶性上皮肿瘤、前列腺恶性上皮肿瘤、结肠恶性上皮肿瘤、肾细胞恶性上皮肿瘤、宫颈恶性上皮肿瘤、或以上所述的癌症类型或肿瘤的转移。本发明中术语癌症也包含癌症转移。

[0168] 本发明中“恶性上皮肿瘤”为衍生自上皮细胞的恶性肿瘤。这一组代表最常见的癌症,包括乳腺癌,前列腺癌,肺癌和结肠癌的常见形式。

[0169] “腺癌”为起源于腺组织的癌症。这种组织也是较大的组织类别称为上皮组织的一

部分。上皮组织包括皮肤,腺体和各种其他排列在身体的腔洞和器官的组织。从胚胎学上而言,上皮组织衍生于外胚层,内胚层和中胚层。被归类为腺癌,细胞未必需要是腺体的一部分,只要它们具有分泌特性。这种恶性上皮肿瘤的形式可以在一些高等哺乳动物包括人类中发生。高度分化的腺癌倾向于类似它们所来源的腺组织,而低分化的则不能。通过活检染色细胞,病理学家可以确定肿瘤是腺癌还是一些其他癌症类型。由于身体中腺体普遍存在的性质,腺癌可以出现在身体的许多组织中。虽然每一腺体不可能分泌相同的物质,只要有细胞外分泌功能,就被认为是腺体并且它的恶性形式因此命名为腺癌。恶性腺癌侵袭其他组织并且经常给予足够的时间完成该侵袭。卵巢腺癌为卵巢癌最常见的类型。它包括浆液性腺癌和粘液性腺癌,透明细胞腺癌和子宫内膜样腺癌。

[0170] 所谓“转移”意指癌细胞从它的起源部位传播到身体的其他部分。转移形成是非常复杂的过程并且依赖于恶性细胞从原发肿瘤上脱离,细胞外基质侵袭,内皮基底膜渗透进入到体腔和血管,然后,通过血液运输后,浸润靶器官。最终,新肿瘤在靶标部位处生长依赖于血管形成。肿瘤转移经常发生甚至在原发肿瘤去除后因为肿瘤细胞或组分残留和进展转移潜能。在一实施方案中,本发明中术语“转移”涉及“远处转移”其指的是远离原发性肿瘤的转移和局部淋巴结系统。在一实施方案中本发明中“转移”指的是淋巴结转移。使用本发明的疗法可治疗的一种特别的转移形式为起源于胃癌作为原发部位的转移。在优选的实施方案中,此类胃癌转移为克鲁根勃氏瘤,腹膜转移和/或淋巴结转移。

[0171] 克鲁根勃氏瘤为一种不常见的卵巢的转移瘤,占有卵巢肿瘤的 1%-2%。克鲁根勃氏瘤的预后仍然非常不良并且没有确定的用于克鲁根勃氏瘤的治疗。克鲁根勃氏瘤为转移的卵巢印戒细胞腺癌。在大多数克鲁根勃氏瘤病例(70%)中胃为原发部位。结肠癌,阑尾癌,和乳癌(主要是浸润性小叶癌)为下一个最常见的原发部位。已报导了起源于胆囊癌,胆管癌,胰腺癌,小肠癌,肝胰管壶腹癌,子宫颈,和膀胱/ 脐尿管的克鲁根勃氏瘤的罕见病例。

[0172] 所谓“治疗”意指给予个体化合物或组合物或化合物或组合物的组合以便预防或根除疾病,包括减少个体的肿瘤大小或减少肿瘤数量;阻止或减慢个体疾病;抑制或减慢新的疾病在个体中的进展;降低频率或症状的严重性和/或目前患病或以前曾患病的个体的复发;和/或延长,即增加个体的预期寿命。

[0173] 术语“疾病治疗”特别地包括治愈,缩短持续时间,改善,预防,减速或抑制进展或恶化,或预防或延迟疾病或其症状的发作。

[0174] 在本发明的上下文中,术语诸如“保护”,“预防”,“预防的”,“防止的”,或“保护的”指的是预防或治疗或预防治疗个体疾病的复发和/或蔓延,并且特别指的是使个体发病的几率最小或延迟疾病进展。例如,处于癌症风险的个体可作为治疗的候选人以预防癌症。

[0175] 所谓“处于风险中”意指与一般人群相比被认为是具有比正常发病几率高的个体,尤其是癌症。另外,已患病或目前患病,尤其是癌症的个体为具有疾病进展风险增加的个体,就其本身而言个体可继续进展疾病。目前患有癌症或已患有癌症的个体也具有增加的癌症转移的风险。

[0176] 本发明中术语“患者”意指治疗的个体,尤其是患病的个体,包括人类,非人类的灵长类或其他动物,特别是哺乳动物诸如牛,马,猪,绵羊,山羊,狗,猫或啮齿动物诸如小鼠和大鼠。在一特别优选的实施方案中,患者为人类。

[0177] “靶细胞”意指任何不期望的细胞诸如癌细胞。在优选的实施方案中,靶细胞表达CLDN。

[0178] 术语“抗原”指的是诸如蛋白或肽的剂其包含抗免疫反应指向和/或待被指向的表位。在优选的实施方案中,抗原为肿瘤相关抗原诸如 CLDN18.2或CLDN6,即癌细胞的成分,其可衍生于胞质,细胞表面,和细胞核,尤其是优选大量产生的,细胞内的或作为癌细胞的表面抗原的那些抗原。

[0179] 在本发明的上下文中,术语“肿瘤相关的抗原”优选指的是在正常的条件下有限数量的组织和/或器官或特定的发育阶段特异地表达和在一个或多个肿瘤或癌组织中表达或异常表达的蛋白。在本发明的上下文中,优选地肿瘤相关抗原与癌细胞的细胞表面有关并且优选地不在正常组织中表达或在正常组织中仅很少表达。

[0180] 术语“表位”指的是分子中的抗原决定簇,即分子中被免疫系统所识别,例如被抗体所识别的部分。例如,表位为抗原上被免疫系统所识别的不连续的,三维立体位点。表位通常由化学活性的表面分子组诸如氨基酸或糖侧链组成并且通常具有特异的三维结构特征,以及特异的电荷特征。构象和非构象表位是有区别的因为在变性溶剂存在的情况下与前者结合但是与后者的结合消失。蛋白表位优选地包含所述蛋白的连续的或不连续的部分并且优选地5-100个,优选5-50个,更优选8-30个,最优选10-25个氨基酸长度,例如表位可为优选地8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,或25个氨基酸长度。

[0181] 术语“抗体”指的是由通过二硫键内部连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)组成的糖蛋白。术语“抗体”包括单克隆抗体,重组抗体,人抗体,人源化抗体和嵌合抗体。每一重链由重链可变区(本文缩写为 VH)和重链恒定区组成。每一轻链由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区组成。VH和VL区可以进一步地细分为超变区,称为互补决定区(CDR),散布着更保守的区域,称为骨架区(FR)。每一VH和VL由三个CDR和四个FR组成,下列从氨基端到羧基端排列顺序为:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子包括各种免疫系统的细胞(例如效应细胞)和经典的补体系统的第一补体(C1q)结合。

[0182] 本文所用的术语“单克隆抗体”指的是单一分子组成的抗体分子的制备。单克隆抗体显示单一结合特异性和亲和力。在一实施方案中,通过杂交瘤产生单克隆抗体,其包括自非人类动物,例如小鼠获取的与无限增殖化细胞融合的B细胞。

[0183] 如本文所用的术语“重组抗体”包括通过重组方法制备的,表达的,创建的或分离的所有抗体,诸如(a)从关于免疫球蛋白基因或自其中制备的杂交瘤转基因的或转染色体的动物(例如小鼠)分离的抗体,(b)从改造以表达抗体的宿主细胞例如从转染瘤分离的抗体,(c)从重组的,组合的抗体文库分离的抗体,以及(d)通过任何其他参与免疫球蛋白基因序列与其他DNA序列剪接的方法制备的,表达的,创建的或分离的抗体。

[0184] 如本文所用的术语“人抗体”想要包括衍生自人生殖细胞系免疫球蛋白序列具有可变区和恒定区的抗体。人抗体可包括不是通过人生殖细胞系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异的突变或体内体细胞突变引入的突变)。

[0185] 术语“人源化抗体”指的是基本上衍生于非人类物种来源的免疫球蛋白具有抗原结合位点的分子,其中分子剩余的免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。抗原结合位点可包含融合到恒定区的完整的可变区或只有嫁接到可变区中适当骨架区的互

补决定区 (CDR)。抗原结合位点可为野生型或通过一个或多个氨基酸取代所修饰的,例如修饰得以更接近类似人免疫球蛋白。人源化抗体的一些形式保留了所有CDR序列(例如人源化小鼠抗体,其包含来自于小鼠抗体的所有六个CDR)。其他形式具有一个或多个对原始的抗体改变的 CDR。

[0186] 术语“嵌合抗体”指的是那些抗体,其中每一重链和轻链的氨基酸序列的一部分与衍生自特别物种或属于特别种类的抗体的序列同源,而链的剩余节段与其他序列同源。通常轻链和重链的可变区模拟衍生于一种哺乳动物物种的抗体的可变区,而恒定区部分与其他来源的抗体的序列同源。此类嵌合形式的一个明显的优势为使用现成的B细胞或来自于非人宿主生物体的杂交瘤可以便利地从目前已知的来源衍生与例如衍生于人细胞制剂的恒定区组合的可变区。虽然可变区具有制备方便的优势和特异性不受来源影响,当注射抗体时人恒定区比来自于非人来源的恒定区更少可能引起人个体的免疫反应。然而,定义不限于这一特别实例。

[0187] 抗体可衍生于不同物种,包括但不限于小鼠,大鼠,兔,豚鼠和人类。

[0188] 本文所述的抗体包括IgA诸如IgA1或IgA2,IgG1,IgG2,IgG3, IgG4,IgE,IgM,和IgD抗体。在各种实施方案中抗体为IgG1抗体,更特别地IgG1, κ 或IgG1, λ 同种型(即IgG1, κ , λ),IgG2 α 抗体(例如 IgG2 α , κ , λ),IgG2 β 抗体(例如IgG2 β , κ , λ),IgG3抗体(例如IgG3, κ , λ)或IgG4抗体(例如IgG4, κ , λ)。

[0189] 如本文所用的“异源抗体”定义涉及转基因的生物体产生此类抗体。这一术语指的是具有氨基酸序列或编码核酸序列的抗体,对应于不是由转基因生物体组成的生物体中发现的那些,通常衍生于除了转基因生物体之外。

[0190] 如本文所用的“异源杂交抗体”指的是具有不同生物来源的轻链和重链的抗体。例如,具有人重链和鼠轻链的抗体为异源杂交抗体。

[0191] 优选地本文所述的抗体为分离的。如本文所用的“分离的抗体”想要指的基本上与具有不同的抗原特异性的其他抗体无关的抗体(例如特异地与CLDN18.2结合的分离的抗体,基本上与特异性结合除了 CLDN18.2之外的抗原的抗体无关)。然而,与人CLDN18.2的表位,同种型或变体特异地结合的分离的抗体具有与其他有关的抗原,例如来自于其他物种(例如CLDN18.2物种同系物)的交叉反应性。而且,分离的抗体基本上无其他细胞物质和/或化学物。在本发明的一实施方案中,“分离的单克隆的抗体”的组合涉及具有不同特异性并且在意义明确的组合物或混合物中组合的抗体。

[0192] 术语抗体的“抗原结合部分”(或简单地“结合部分”)或抗体的“抗原结合片段”(或简单地“结合片段”)或相似的术语指的是一个或多个保留与抗原特异地结合的能力的抗体片段。已显示通过全长抗体的片段可以进行抗体的抗原结合功能。包含在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由VL,VH,CL和CH结构域组成的单价的片段;(ii) F(ab')₂片段,由两个通过二硫键在铰链区连接的Fab片段组成的二价的片段;(iii) 由VH和CH结构域组成的Fd 片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v) dAb片段(Ward等,(1989) Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;(vi) 分离的互补决定区(CDR),和(vii) 两个或更多个分离的CDR的组合,其通过合成的接头任选地结合。而且,尽管Fv片段,VL和VH的结构域受单独的基因编码,使用重组方法,通过合成的接头它们可以使它们结合,所述接头能够使它们制造成为单一的蛋白链,其中VL和 VH区配对形成单价的分

子(称为单链Fv(scFv);例如见Bird等.(1988) Science 242:423-426;和Huston等(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85: 5879-5883)。此类单链抗体也想要包含术语抗体的“抗原结合片段”在内。另一实例为结合结构域融合蛋白,其包含(i)与免疫球蛋白铰链区多肽融合的结合结构域多肽,(ii)与铰链区融合的免疫球蛋白重链CH2 恒定区,以及(iii)与CH2恒定区融合的免疫球蛋白重链CH3恒定区。结合结构域多肽可以为重链可变区或轻链可变区。美国2003/0118592 和美国2003/0133939中进一步地公开了结合结构域免疫球蛋白融合蛋白使用本领域中技术人员已知的常规技术获取这些抗体片段,并且以与完整的抗体相同的方式筛选片段效用。

[0193] 本发明中术语“结合结构域”具有例如抗体的结构的特征,其与给定的靶结构/抗原/表位结合/相互作用。因此,本发明的结合结构域指的是“抗原-相互作用-位点”。

[0194] 出于本发明的目的,如本文所述的所有抗体和抗体衍生物诸如抗体片段都包含在术语“抗体”中。术语“抗体衍生物”指的是抗体的任何修饰形式,例如抗体和其他制剂或抗体的偶联物,或抗体片段。而且,如本文所述的抗体和抗体衍生物用于产生本发明的结合剂诸如抗体片段。

[0195] 天然存在的抗体通常为单特异性的,即它们与单一抗原结合。本发明提供了与细胞毒性细胞(通过接触CD3受体)和癌细胞(通过接触 CLDN)结合的结合剂。本发明的结合剂为至少双特异性或多特异性诸如三特异性,四特异性等。

[0196] 本发明的结合剂可为抗体分子的形式或抗体样分子的形式或具有抗体样特性蛋白支架的形式,或具有至少两种结合特异性的环肽的形式。因此,结合剂可包含一个或多个如本文所述的抗体或其片段。

[0197] 本发明中,双特异性分子,尤其是双特异性蛋白,诸如双特异性抗体为具有两种不同的结合特异性的分子并且因此与两种不同类型的抗原诸如CLDN和CD3结合。如本文所用的术语“双特异性抗体”特别指的是包含两个抗原结合位点的抗体,第一结合位点具有对第一抗原或表位的亲和力并且第二结合位点具有对不同于第一的第二抗原或表位的亲和力。尤其是双特异性抗体为由两种不同的抗体组成的人工蛋白(两种不同的抗体的所述片段形成两个结合结构域)并且因此与两种不同类型的抗原结合。本发明中基因改造双特异性抗体以便同时与免疫细胞结合,诸如免疫效应细胞,尤其是T细胞诸如细胞毒性细胞(通过与CD3结合)和待被破坏的靶细胞像癌细胞(通过与肿瘤相关抗原 CLDN)。

[0198] 术语“双特异性抗体”也包括双链抗体。双链抗体为二价的双特异性抗体,其中VH和VL结构域表达在单一多肽链上,但是使用过短以致不允许在相同链的两个结构域之间配对的接头,从而迫使结构域与另一链的互补结构域配对并且生成了两个抗原结合位点(例如见 Holliger,P.,等.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448; Poljak,R.J.等.(1994)Structure 2:1121-1123)。

[0199] “多特异性结合剂”为具有多于两种不同的结合特异性的分子。

[0200] 本发明中特别优选的是双特异性抗体,包括双特异性抗体片段,尤其是双特异性单链抗体,其包括双特异性单链抗体片段。术语“双特异性单链抗体”指的是包含两个结合结构域的单一多肽链。尤其是本发明中术语“双特异性单链抗体”或“单链双特异性抗体”或有关的术语优选地意指源于缺乏恒定区的单一多肽链至少两个抗体可变区和/或全部免疫球蛋白中存在的Fc部分结合的抗体构建体。

[0201] 例如,双特异性单链抗体可为总数为两个抗体可变区的构建体,例如两个VH区,每一个能够与单独的抗原特异地结合并且通过短的多肽间隔区彼此连接从而使得两个抗体可变区与它们插入的间隔区作为单一连续的多肽链存在。双特异性单链抗体的另一实例为具有三个抗体可变区的单一多肽链。此处,两个抗体可变区,例如,一个为VH 另一个为VL,可组成scFv,其中经由合成的多肽接头两个抗体可变区彼此连接,经常对后者基因改造以便使得免疫原性最小化而保留最大的抗蛋白水解性。这一scFv能够与特定抗原特异地结合,并且与另一抗体可变区连接,例如VH区,比通过scFv结合的抗原能够结合不同的抗原。另一双特异性单链抗体的实例为具有四个抗体可变区的单一多肽链。此处,第一两个抗体可变区,例如VH区和VL区,可形成一个能够与一种抗原结合的scFv,而第二VH区和VL区可形成能够与另一抗原结合的第二scFv。单一连续的多肽链中,通过合成的多肽接头可有利地分隔一个特异性的个体抗体可变区,而通过如以上所述的短的多肽间隔区有利地分隔各自的scFv。

[0202] 本发明的一实施方案中,双特异性抗体的第一结合结构域包含一个抗体可变区,优选地VHH结构域。本发明的一实施方案中,双特异性抗体的第一结合结构域包含两个抗体可变区,优选地scFv,即 VH-VL或VL-VH。本发明的一实施方案中,双特异性抗体的第二结合结构域包含一个抗体可变区,优选地VHH结构域。本发明的一实施方案中,双特异性抗体的第二结合结构域包含两个抗体可变区,优选地scFv,即VH-VL或VL-VH。在它的最小化形式中,因此本发明的双特异性抗体中抗体可变区的数量为只有两个。例如,此类抗体可包含两个VH或两个VHH结构域。

[0203] 本发明的一实施方案中,双特异性抗体的第一结合结构域和第二结合结构域每一个都包含一个抗体可变区,优选地VHH结构域。本发明的一实施方案中,双特异性抗体的第一结合结构域和第二结合结构域每一个都包含两个抗体可变区,优选地scFv,即VH-VL 或VL-VH。在这个实施方案中,本发明的结合剂优选地包含(i) CLDN 抗体的重链可变结构域(VH), (ii) CLDN抗体的轻链可变结构域(VL), (iii) CD3抗体的重链可变结构域(VH) 以及(iv) CD3抗体的轻链可变结构域(VL)。

[0204] 通过共价地连接两个单克隆的抗体或通常常规的杂交-杂交瘤技术可获得双特异性全长抗体。Anderson, Blood 80 (1992), 2826-34中描述了两个单克隆抗体的共价连接。在本发明的上下文中,抗体的其中之一对CLDN特异的并且另一个对CD3特异的。

[0205] 在一实施方案中,双特异性结合剂为抗体样分子形式,其重链具有两种不同特异性含有连续的N末端的可变结构域,并且轻链具有不同特异性的两个连续的可变结构域,导致形成具有两种不同特异性的四个结合结构域(Wu等, Nat. Biotechnology, 2007, 25 (11)), 其中一特异性为CD3并且另一特异性为CLDN。

[0206] 在优选的实施方案中,本发明的双特异性结合剂为抗体片段的形式。

[0207] 在一实施方案中,本发明的双特异性分子包含两个Fab区,一个抗CLDN并且另一个抗CD3。在一实施方案中,本发明的分子为抗原结合片段(Fab) 2复合体。Fab2复合体由两个Fab片段组成,一Fab片段包含Fv结构域,即VH和VL结构域,对CD3抗原特异的,并且另一Fab片段包含对CLDN特异的Fv结构域。每一Fab片段都由两条单链,VL-CL模块和VH-CH模块组成。可选地,个体的Fab片段的每一个可以单链排列,优选地VL-CL-CH-VH,并且可用肽接头连接个体的可变结构域和恒定结构域。通常,个体的单链和Fab片段可经由二硫键,粘附结

构域,化学连接和/或肽接头连接。双特异性分子也可包含多于两个Fab片段,尤其是分子可为Fab3,Fab4,或多聚体的Fab复合体,对2、3、4、或多个不同的抗原具有特异性。本发明也包括化学连接的Fab。

[0208] 在一实施方案中,本发明的结合剂包括各种类型的二价的和三价的单链可变片段(scFv),模拟两种抗体的可变结构域的融合蛋白。单链可变片段(scFv)为免疫球蛋白的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的融合蛋白,通过10个-大约25个氨基酸的短的接头肽连接。接头通常富于柔性甘氨酸,及可溶解的丝氨酸或苏氨酸,并且可以连接VH的N末端和VL的C末端,或反之亦然。通过连接两个scFv可以基因改造二价的(或二价的)单链可变片段(di-scFv,bi-scFv)。通过两个VH和两个VL区产生单一肽可以完成这个,生产出串联scFv。本发明也包括包含多于两个scFv结合结构域的多特异性分子。这使得分子包含多重抗原特异性并且为三特异性,四特异性或多特异性分子,或分子为包含超过一个scFv结合结构域的具有对相同抗原特异性的双特异性分子成为可能。尤其是本发明的分子可为多特异性单链Fv。

[0209] 另一可能性为接头肽对两个可变区而言过短(大约5个氨基酸)以致折叠起来创建scFv,促使scFv二聚化。这种类型称为双链抗体。仍然更短的接头(1个或2个氨基酸)导致三聚体的形成,所谓的三抗体或三体。四抗体也已产生。它们展示了比双链抗体甚至更高的靶标亲和力和。

[0210] 双特异性抗体片段的特别优选的实例为双链抗体(Kipriyanov,Int. J.Cancer 77 (1998),763-772),其为小的二价的双特异性抗体片段。双链抗体包含与同一多肽链(VH-VL)上轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH),通过肽接头连接,所述肽接头太短以致不允许相同链上两个结构域配对。这促使与其他链的互补结构域配对并且促进了二聚的分子与两个功能性抗原结合位点的组装。为构建本发明的双特异性双链抗体,抗CD3抗体和抗CLDN抗体的V结构域可融合创建两条链VH(CD3)-VL(CLDN),VH(CLDN)-VL(CD3)。它自身的每条链不能与各自的抗原结合,但是再建了与另一链配对抗CD3抗体和抗CLDN抗体的功能性抗原结合位点。为了这个目的,使用太短以致不允许相同链上两个结构域配对的肽接头。两个scFv分子,与重链可变结构域和轻链可变结构域之间对分子内二聚化而言过短的的接头,共表达并且自我组装而形成具有相反段处两个结合位点的双特异性分子。

[0211] 在一实施方案中,本发明的多特异性分子包含免疫球蛋白的可变结构域(VH,VL)和恒定(C)结构域。在一实施方案中,双特异性分子为微抗体,优选地包含两条单一的VH-VL-C链,彼此经由每一链的恒定(C)结构域连接的微抗体。在这方面,相应的重链可变区(VH),相应的轻链可变区(VL)和恒定结构域(C)从N末端到C末端按以下顺序排列:VH(CLDN)-VL(CLDN)-(C)和VH(CD3)-VL(CD3)-C,其中C优选地为CH3结构域。恒定结构域的配对导致微抗体的形成。

[0212] 在另一特别优选的方面,本发明的双特异性结合剂为双特异性单链抗体构建体的形式,借此所述构建体包含或由至少两个结合结构域组成,借此所述结构域的其中之一与CLDN结合并且第二结构域与CD3结合。此类分子,也称为“双特异性T细胞衔接器”(BiTE;术语BiTE仅仅指的是其中一臂对CD3特异的双特异性分子)由经由接头肽连接的两个scFv分子组成。

[0213] 如本文所用的,“双特异性单链抗体”指的是包含两个结合结构域的单一多肽链。

每一结合结构域包含来自于抗体重链的可变区(“VH 区”),其中第一结合结构域的VH区与CLDN特异地结合,并且第二结合结构域的VH区与CD3特异地结合。通过短的多肽间隔区两个结合结构域任选地彼此连接。多肽间隔区的非限制性实例为 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G-G-G-G-S) 和其重复序列。每一结合结构域可额外地包含来自于抗体轻链的一个可变区(“VL 区”),第一和第二结合结构域中每一个的VH区和VL区经由多肽接头彼此连接,所述接头足够长以至于允许第一结合结构域的VH区和VL区与第二结合结构域的VH区和VL区彼此配对。

[0214] 在这方面,相应的重链可变区(VH)和相应的轻链可变区(VL)从N末端到C末端按以下顺序排列: VH(CLDN)-VL(CLDN)-VH(CD3)-VL(CD3), VH(CD3)-VL(CD3)-VH(CLDN)-VL(CLDN)或 VH(CD3)-VL(CD3)-VL(CLDN)-VH(CLDN)。然而,设想本发明的双特异性单链抗体包含其他结构域排列,诸如 VL(CLDN)-VH(CLDN)-VH(CD3)-VL(CD3)、VL(CLDN)-VH(CLDN)-VL(CD3)-VH(CD3)、VH(CLDN)-VL(CLDN)-VL(CD3)-VH(CD3)、VL(CD3)-VH(CD3)-VH(CLDN)-VL(CLDN)、VL(CD3)-VH(CD3)-VL(CLDN)-VH(CLDN)。

[0215] 长的接头通常连接相应的重链可变区(VH)和相应的轻链可变区(VL)从而创建scFv结合结构域而短的接头通常连接两个scFv结合结构域。通常设计接头从而提供易弯曲性和蛋白酶抗性,并且优选地,接头包含甘氨酸和/或丝氨酸残基。短的肽接头可由12个或更少的诸如11、10、9、8、7、6、5、4、3或2个氨基酸,并且优选地5或6个氨基酸组成。短的肽接头优选地包含氨基酸序列SGGGGS或GGGGGS。长的肽接头可由12个或更多的,诸如15-25个或15-20个或15-18个氨基酸组成。长的肽接头优选地包含氨基酸序列(GGGGS)3或VE(GGGGS)2GGVD。长的肽接头还包含氨基酸序列(GGGGS)4,(GGGS)5或GGGS(GGS)3GGGS。

[0216] 本发明的结合剂也可包含用于促进分子分泌的氨基酸序列,诸如N末端分泌信号,和/或一个或多个促进分子结合,纯化或检测的表位标签。

[0217] 优选地,分泌信号为允许通过分泌途径充分的穿过和结合剂分泌到细胞外环境的信号序列(例如选自SEQ ID NO:51,52,53,54,55中任何一个)。优选地,分泌信号序列为可剪切的并且从成熟的结合剂上移除。优选地选择与其中产生结合剂的细胞或生物体有关的分泌信号序列。

[0218] 表位标签的氨基酸序列可引入到结合剂的氨基酸序列中的任何位置,并且在所编码的蛋白结构中呈现环形,或它的N末端或C末端与结合剂融合。优选地,表位标签为与结合剂融合的C末端。表位标签可包含允许标记从结合剂移除的剪切位点。所述表位标签可以为在天然的和/或变性条件下有功能性的任何类型的表位标签,优选组氨酸标签,最优选包含六组氨酸标签。

[0219] 除了所述第一和第二结合结构域之外,本发明的双特异性结合剂还可包含用于例如增强对肿瘤细胞的选择性的结合结构域。例如通过提供与肿瘤细胞上表达的其他抗原结合的结合结构域可以实现这种情况。

[0220] 在本发明的上下文中,所产生的结合剂优选地能够诱发如本文所述的免疫效应功能。优选地,所述免疫效应功能针对在其表面携带肿瘤相关抗原CLDN的细胞。

[0221] 在本发明的上下文中,术语“免疫效应功能”包括通过免疫系统组分介导的任何功能,导致,例如抑制肿瘤生长和/或抑制肿瘤进展,其包括抑制肿瘤传播和转移。优选地,免疫效应功能导致杀死肿瘤细胞。此类功能包含补体依赖的细胞毒性(CDC),抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC),抗体依赖的细胞介导的吞噬作用(ADCP),诱导运载肿瘤相关抗原

的细胞凋亡,运载肿瘤相关抗原的细胞溶解,和/或抑制运载肿瘤相关抗原的细胞增殖。结合剂也可简单地通过与癌细胞上的肿瘤相关抗原结合发挥作用。例如,仅仅通过与癌细胞表面上的肿瘤相关抗原结合,抗体可阻断肿瘤相关抗原的功能或诱导凋亡。

[0222] 本文所述的结合剂可与治疗部分或制剂,诸如细胞毒素,药物(例如免疫抑制剂)或放射性同位素偶联。细胞毒素或细胞毒性剂包括任何对细胞不利的,尤其是杀死细胞的制剂。实例包括紫杉醇,细胞松弛素B,短杆菌肽D,溴化乙锭,吐根碱,丝裂霉素,依托泊苷,替尼泊苷,长春新碱,长春花碱,秋水仙素,阿霉素,道诺霉素,二羟基炭疽菌素二酮,米托蒽醌,光神霉素,放线菌素D,1-去氢睾酮,糖皮质激素,普鲁卡因,丁卡因,利多卡因,普萘洛尔,和嘌呤霉素和其类似物或同系物。用于形成偶联物的合适的治疗剂包括但不限于抗代谢物(例如,甲氨蝶呤,6-巯基嘌呤,6-硫代鸟嘌呤,阿糖胞苷,氟达拉滨,5-氟二氧嘧啶),烷化剂(例如,氮芥,苯丁酸氮芥,美法仑,卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU),环磷酰胺,白消安,二溴甘露醇,链脲霉素,丝裂霉素C,和顺铂(II)(DDP)顺铂),氨基糖苷类(例如,道诺霉素(以前地柔红霉素)和阿霉素),抗生素(例如更生霉素(以前地放线菌素),博来霉素,光神霉素,和氨基糖苷类(AMC),和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春花碱)。在优选的实施方案中,治疗剂为细胞毒性剂或放射毒性剂。在另一实施方案中,治疗剂为免疫抑制剂。还在另一实施方案中,治疗剂为GM-CSF。在优选的实施方案中,治疗剂为阿霉素,顺铂,博来霉素,硫酸盐,卡莫司汀,苯丁酸氮芥,环磷酰胺或蓖麻毒素A。

[0223] 结合剂也可以与放射性同位素例如,碘-131,钇-90或铟-111偶联以便产生细胞毒性放射药剂。

[0224] 此类治疗部分与抗体偶联的技术为熟知的,例如见Arnon等,“癌症治疗中用于药物的免疫靶向的单克隆抗体”,单克隆抗体和癌症治疗中,Reisfeld等.(eds.),243-56页(Alan R.Liss,Inc.1985);Hellstrom等,“用于药物递送的抗体”,受控制药物递送中(第2版),Robinson等(eds.),623-53页(Marcel Dekker,Inc.1987);Thorpe,“癌症治疗中细胞毒性剂的抗体载体:综述”,单克隆抗体中'84:生物和临床应用,Pinchera et al.(eds.),475-506页(1985);“癌症治疗中放射性同位素标记的抗体的治疗用途的分析,结果和未来预期”,用于癌症检测和治疗的单克隆抗体中,Baldwin等(eds.),303-16页(Academic Press 1985),和Thorpe等,“抗体-毒素偶联物的制备和细胞毒性特性”,Immunol. Rev., 62:119-58(1982)。

[0225] 本发明中术语“结合”优选地指的是特异地结合。

[0226] 本发明中如果它具有对所述预定靶标显著的亲和力,诸如抗体的制剂能够与预定靶标结合并且在标准测定中与所述预定靶标结合。经常通过平衡解离常数(K_D)测量“亲和力”或“结合亲和力”。优选地,术语“显著的亲和力”指的是以 $10^{-5}M$ 或更低的, $10^{-6}M$ 或更低的, $10^{-7}M$ 或更低的, $10^{-8}M$ 或更低的, $10^{-9}M$ 或更低的, $10^{-10}M$ 或更低的, $10^{-11}M$ 或更低的,或 $10^{-12}M$ 或更低的解离常数(K_D)与预定靶标结合。

[0227] 本发明中如果它不具有对所述靶标显著的亲和力,制剂(基本上)不能与靶标结合并且结合不显著,尤其是在标准测定中不与所述靶标可检测地结合。优选地,如果存在浓度达到2,优选地10,更优选地20,特别是50或100 $\mu g/ml$ 或更高的,制剂不与所述靶标可检测地结合。优选地,如果它与所述靶标结合的 K_D 比制剂能够与预定靶标结合的 K_D 高至少10倍,100倍, 10^3 倍, 10^4 倍, 10^5 倍,或 10^6 倍,制剂对靶标没有显著的亲和力。例如,如果制剂能

够与预定靶标结合的 K_D 为 $10^{-7}M$, 制剂没有显著的亲和力与靶标结合的 K_D 为至少 $10^{-6}M$, $10^{-5}M$, $10^{-4}M$, $10^{-3}M$, $10^{-2}M$, 或 $10^{-1}M$ 。

[0228] 如果抗体的制剂能够与所述预定靶标结合同时不能与其他靶标结合, 即对其他靶标没有显著的亲和力并且在标准测定中不与其他靶标显著地结合, 诸如抗体的制剂对预定靶标是特异的。如果制剂能够与 CLDN 结合但 (基本上) 不能与其他靶标结合, 本发明中制剂对 CLDN 是特异的。优选地, 如果对于此类其他靶标的结合亲和力没有显著地超过与 CLDN 无关的蛋白诸如牛血清白蛋白 (BSA), 酪蛋白, 人血清白蛋白 (HSA) 或非紧密连接蛋白跨膜蛋白诸如 MHC 分子或转铁蛋白受体或任何其他特异性多肽结合的亲和力, 制剂对 CLDN 是特异的。优选地, 如果它与所述靶标结合的 K_D 比与靶标非特异性结合的 K_D 低至少 10 倍, 100 倍, 10^3 倍, 10^4 倍, 10^5 倍, 或 10^6 倍, 制剂对预定靶标是特异的。例如, 如果制剂与靶标特异地结合的 K_D 为 $10^{-7}M$, 与靶标非特异地结合的 K_D 为至少 $10^{-6}M$, $10^{-5}M$, $10^{-4}M$, $10^{-3}M$, $10^{-2}M$, 或 $10^{-1}M$ 。

[0229] 使用任何合适的方法可以实验性测定制剂与靶标的结合; 例如见 Berzofsky 等, 基础免疫学中“抗体-抗原相互作用”, Paul, W.E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company New York, N Y (1992), 和本文所述的方法。使用常规技术易于测定亲和力, 诸如通过平衡透析; 通过使用 BIAcore 2000 仪器, 使用制造商概述的通用程序; 通过使用放射性标记的靶抗原放射免疫测定; 或通过技术人员已知的其他方法。例如, 通过 Scatchard 等, Ann N.Y.Acad.ScL, 51:660 (1949) 的方法分析亲和力数据。如果在不同的条件下测试, 例如盐浓度, pH, 所测的特定的抗体-抗原相互作用的亲和力可以是变化的。因此, 亲和力和其他抗原结合参数例如 K_D , IC_{50} 的测试, 优选地使用抗体和抗原的标准化溶液, 和标准化缓冲液。

[0230] 如本文所用的“同种型”指的是通过重链恒定区基因编码的抗体种类 (例如 IgM 或 IgG1)。

[0231] 如本文所用的“同种型转换”指的是抗体的种类或同种型从一类 Ig 转变到另一类 Ig 的现象。

[0232] 如本文所用的术语“天然存在的”如应用于物体指的是物体可以在自然中找到的事实。例如生物体 (包括病毒) 中存在的, 可以从自然界来源分离并且没有被实验室人员有意修饰的多肽或多核苷酸序列为天然存在的。

[0233] 如本文所用的术语“重排的”指的是重链或轻链免疫球蛋白基因座的构型, 其中在编码基本上完整的 VH 或 VL 结构域的构象中 V 节段分别就位于邻近 D-J 或 J 节段。通过与生殖细胞系 DNA 比较, 可以鉴定重排的免疫球蛋白 (抗体) 基因座; 重排的基因座将具有至少一个重组的七聚体/九聚体同源元件。

[0234] 如本文所用的提及 V 节段“未重排的”或“生殖细胞系构型”指的是其中 V 节段未重组以便不能紧邻 D 或 J 节段的构型。

[0235] 在一实施方案中, 本发明的结合剂具有与 CLDN18.2 结合的能力, 即与 CLDN18.2 中存在的表位结合的能力, 优选地位于 CLDN18.2 的细胞外结构域内的表位, 尤其是第一细胞外环, 优选地 CLDN18.2 的氨基酸位置 29-78。在特别的实施方案中, 具有与 CLDN18.2 结合的能力的制剂与 CLDN18.1 上不存在的 CLDN18.2 上的表位结合。

[0236] 具有与 CLDN18.2 结合能力的制剂优选地与 CLDN18.2 但不是 CLDN18.1 结合。优选地, 具有与 CLDN18.2 结合能力的制剂对 CLDN18.2 是特异的。优选地, 具有与 CLDN18.2 结合

能力的制剂与细胞表面上表达的CLDN18.2结合。在特别优选的实施方案中,具有与CLDN18.2结合能力的制剂与活细胞表面上存在的CLDN18.2的天然表位结合。

[0237] 在优选的实施方案中,具有与CLDN18.2结合能力的制剂包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:5,6,7,8,9, 10和其片段的氨基酸。

[0238] 在优选的实施方案中,具有与CLDN18.2结合能力的制剂包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:11,12,13, 14,15,16,17,18,19和其片段的氨基酸。

[0239] 在某些优选的实施方案中,具有与CLDN18.2结合能力的制剂包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合,所述重链可变区和轻链可变区选自可能性(i)-(ix):

[0240] (i) VH包含SEQ ID NO:5或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:12或其片段代表的氨基酸,

[0241] (ii) VH包含SEQ ID NO:6或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:11或其片段代表的氨基酸,

[0242] (iii) VH包含SEQ ID NO:7或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:13或其片段代表的氨基酸,

[0243] (iv) VH包含SEQ ID NO:9或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:16或其片段代表的氨基酸,

[0244] (v) VH包含SEQ ID NO:8或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:15或其片段代表的氨基酸,

[0245] (vi) VH包含SEQ ID NO:10或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:14或其片段代表的氨基酸,

[0246] (vii) VH包含SEQ ID NO:10或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:17或其片段代表的氨基酸,

[0247] (viii) VH包含SEQ ID NO:10或其片段代表的氨基酸并且VL包含SEQ ID NO:18或其片段代表的氨基酸,

[0248] (ix) VH包含SEQ ID NO:10或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:19或其片段代表的氨基酸。

[0249] 在一特别优选的实施方案中,具有与CLDN18.2结合能力的制剂包含下列的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0250] VH包含SEQ ID NO:8或其片段代表的氨基酸并且VL包含SEQ ID NO:15或其片段代表的氨基酸。

[0251] 还在特别优选的实施方案中,具有与CLDN18.2结合能力的制剂包含下列的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0252] VH包含SEQ ID NO:6或其片段代表的氨基酸并且VL包含SEQ ID NO:11或其片段代表的氨基酸。

[0253] 术语“片段”特别指的是一个或多个互补决定区(CDR),优选地至少重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的CDR3可变区。在一实施方案中,所述一个或多个互补决定区(CDR)选自一组互补决定区CDR1, CDR2和CDR3。在特别优选的实施方案中,术语“片段”指的是重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的互补决定区CDR1,CDR2和CDR3。

[0254] 在一实施方案中,包含一个或多个如本文所述的CDR,一组CDR 或CDR组的组合的

结合剂包含所述CDR连同它们的介于其间的骨架区。优选地,部分也包括至少大约50%第一或第四骨架区或二者,50% C末端50%第一骨架区和第四骨架区的N末端50%。通过重组DNA 技术制造的结合剂的构建可导致N或C末端的残基被导入到所引入的接头编码的可变区以便促进克隆或其他操作步骤,其包括引进接头加入本发明的可变区到进一步的蛋白序列,包括免疫球蛋白重链,其他可变结构域(例如在双链抗体的产生中)或蛋白标记。

[0255] 在一实施方案中,包含一个或多个如本文所述的CDR,一组CDR 或CDR组的组合的结合剂包含人抗体骨架中所述CDR。

[0256] 在一实施方案中,本发明的结合剂具有与CLDN6结合的能力,即,与CLDN6中存在的表位结合的能力,优选地位于CLDN6的细胞外结构域中的表位,尤其是第一细胞外环,优选地CLDN6的氨基酸位置28-76或第二细胞外环,优选地CLDN6的氨基酸位置141-159。在特别的实施方案中,具有与CLDN6结合能力的制剂与CLDN6上而不是CLDN9上存在的表位结合。优选地,具有与CLDN6结合能力的制剂与CLDN6上而不是CLDN4和/或CLDN3上存在的表位结合。最优选地,具有与CLDN6结合能力的制剂与除了CLDN6之外CLDN 蛋白上不存在的CLDN6上的表位结合。

[0257] 具有与CLDN6结合能力的制剂优选地与CLDN6但不是CLDN9 结合并且优选地不与CLDN4和/或CLDN3结合。优选地,具有与 CLDN6结合能力的制剂对CLDN6是特异的。优选地,具有与CLDN6 结合能力的制剂与细胞表面表达的CLDN6结合。在特别优选的实施方案中,具有与CLDN6结合能力的制剂与活细胞表面上存在的 CLDN6的天然表位结合。

[0258] 在优选的实施方案中,具有与CLDN6结合能力的制剂包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:20,22,24,26 和其片段的氨基酸。

[0259] 在优选的实施方案中,具有与CLDN6结合能力的制剂包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:21,23,25,27, 28,29,97,98,99,100和其片段的氨基酸。

[0260] 在某些优选的实施方案中,具有与CLDN6结合能力的制剂包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合,所述重链可变区和轻链可变区选自可能性(i)-(xi):

[0261] (i) VH包含SEQ ID NO:20或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:21或其片段代表的氨基酸,

[0262] (ii) VH包含SEQ ID NO:22或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:23或其片段代表的氨基酸,

[0263] (iii) VH包含SEQ ID NO:24或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:25或其片段代表的氨基酸,

[0264] (iv) VH包含SEQ ID NO:26或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:27或其片段代表的氨基酸,

[0265] (v) VH包含SEQ ID NO:22或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:21或其片段代表的氨基酸,

[0266] (vi) VH包含SEQ ID NO:22或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:28或其片段代表的氨基酸,

[0267] (vii) VH包含SEQ ID NO:22或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:29或其片段代表的氨基酸,

[0268] (viii) VH包含SEQ ID NO:22或其片段代表的氨基酸并且VL包含SEQ ID NO:97或

其片段代表的氨基酸，

[0269] (ix) VH包含SEQ ID NO:22或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:98或其片段代表的氨基酸，

[0270] (x) VH包含SEQ ID NO:22或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:99或其片段代表的氨基酸，

[0271] (xi) VH包含SEQ ID NO:22或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:100或其片段代表的氨基酸。

[0272] 在一特别优选的实施方案中，具有与CLDN6结合能力的制剂包含下列的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 的组合：

[0273] VH包含SEQ ID NO:22或其片段代表的氨基酸并且VL包含SEQ ID NO:23或其片段代表的氨基酸。

[0274] 还在一特别优选的实施方案中，具有与CLDN6结合能力的制剂包含下列的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 的组合：

[0275] VH包含SEQ ID NO:22或其片段代表的氨基酸并且VL包含SEQ ID NO:97或其片段代表的氨基酸。

[0276] 还在一特别优选的实施方案中，具有与CLDN6结合能力的制剂包含下列的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 的组合：

[0277] VH包含SEQ ID NO:22或其片段代表的氨基酸并且VL包含SEQ ID NO:98或其片段代表的氨基酸。

[0278] 还在一特别优选的实施方案中，具有与CLDN6结合能力的制剂包含下列的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 的组合：

[0279] VH包含SEQ ID NO:22或其片段代表的氨基酸并且VL包含SEQ ID NO:99或其片段代表的氨基酸。

[0280] 还在一特别优选的实施方案中，具有与CLDN6结合能力的制剂包含下列的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 的组合：

[0281] VH包含SEQ ID NO:22或其片段代表的氨基酸并且VL包含SEQ ID NO:100或其片段代表的氨基酸。

[0282] 术语“片段”特别指的是一个或多个互补决定区 (CDR)，优选地至少重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL) 的CDR3可变区。在一实施方案中，所述一个或多个互补决定区 (CDR) 选自一组互补决定区CDR1，CDR2和CDR3。在特别优选的实施方案中，术语“片段”指的是重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL) 的互补决定区CDR1，CDR2和CDR3。

[0283] 在一实施方案中，包含一个或多个如本文所述的CDR，一组CDR 或CDR组的组合的结合剂包含所述CDR连同它们的介于其间的骨架区。优选地，部分也包括至少大约50%第一或第四骨架区或二者，50% C末端50%第一骨架区和第四骨架区的N末端50%。通过重组DNA 技术制造的结合剂的构建可导致N或C末端的残基被导入到所引入的接头编码的可变区以便促进克隆或其他操作步骤，其包括引进接头加入本发明的可变区到进一步的蛋白序列，包括免疫球蛋白重链，其他可变结构域 (例如在双链抗体的产生中) 或蛋白标记。

[0284] 在一实施方案中，包含一个或多个如本文所述的CDR，一组CDR 或CDR组的组合的结合剂包含人抗体骨架中所述CDR。

[0285] 对提供本发明的结合剂有用的抗CD3抗体包括但不限于 UCHT1-HS (人源化mAB), UCHT1-MM (鼠mAB), CLB-T3, TR66, 145-2C11。

[0286] UCHT1为单克隆的IgG1抗CD3单克隆抗体,在人类和灵长类动物样品类型中检测CD3。CLB-T3为小鼠单克隆的抗CD3抗体,其抗 CD3抗原并且与80-90%人外周T淋巴细胞和骨髓胸腺细胞起反应。TR66为小鼠IgG1单克隆的抗CD3抗体,其识别人CD3的 ϵ 链。145-2C11为亚美尼亚仓鼠单克隆的抗小鼠CD3抗体。

[0287] 优选地,CD3结合结构域的VH和VL区衍生于抗体/抗体分子和抗体样分子,所述在其他TCR亚基的背景下能够特异地识别人CD3,以它的天然构型存在于表达TCR的活化的原代人T细胞上。最优选地是衍生于对CD3 ϵ 链特异性抗体的VH和VL区并且所述(亲代的)抗体应能够特异地结合表位,反映在TCR复合体背景下存在的人CD3天然的或接近天然的结构或构象表型。在本发明优选的实施方案中,CD3 结合结构域的VH和VL区衍生于选自UCHT1-HS, UCHT1-MM, CLB-T3和TR66,优选地TR66的CD3特异性抗体。

[0288] 在优选的实施方案中,具有与CD3结合能力的制剂包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:30、32、34、36、94、95和其片段的氨基酸。

[0289] 在优选的实施方案中,具有与CD3结合能力的制剂包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:31、33、35、37、96 和其片段的氨基酸。

[0290] 在某些优选的实施方案中,具有与CD3结合能力的制剂包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合,所述重链可变区和轻链可变区选自下列可能性(i)-(ix):

[0291] (i) VH包含SEQ ID NO:30或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:31或其片段代表的氨基酸,

[0292] (ii) VH包含SEQ ID NO:32或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:33或其片段代表的氨基酸,

[0293] (iii) VH包含SEQ ID NO:34或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:34或其片段代表的氨基酸,

[0294] (iv) VH包含SEQ ID NO:36或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:37或其片段代表的氨基酸,

[0295] (v) VH包含SEQ ID NO:94或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:37或其片段代表的氨基酸,

[0296] (vi) VH包含SEQ ID NO:95或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:37或其片段代表的氨基酸,

[0297] (vii) VH包含SEQ ID NO:36或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:96或其片段代表的氨基酸,

[0298] (viii) VH包含SEQ ID NO:94或其片段代表的氨基酸并且VL包含SEQ ID NO:96或其片段代表的氨基酸,

[0299] (ix) VH包含SEQ ID NO:95或其片段代表的氨基酸并且VL包含 SEQ ID NO:96或其片段代表的氨基酸,

[0300] 在一特别优选的实施方案中,具有与CD3结合能力的制剂包含下列的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0301] VH包含SEQ ID NO:36或其片段代表的氨基酸并且VL包含SEQ ID NO:37或其片段

代表的氨基酸。

[0302] 还在一特别优选的实施方案中,具有与CD3结合能力的制剂包含下列的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0303] VH包含SEQ ID NO:94或其片段代表的氨基酸并且VL包含SEQ ID NO:37或其片段代表的氨基酸。

[0304] 还在一特别优选的实施方案中,具有与CD3结合能力的制剂包含下列的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

[0305] VH包含SEQ ID NO:95或其片段代表的氨基酸并且VL包含SEQ ID NO:96或其片段代表的氨基酸。

[0306] 术语“片段”特别指的是一个或多个互补决定区(CDR),优选地至少重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的CDR3可变区。在一实施方案中,所述一个或多个互补决定区(CDR)选自一组互补决定区CDR1, CDR2和CDR3。在特别优选的实施方案中,术语“片段”指的是重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的互补决定区CDR1,CDR2和CDR3。

[0307] 在一实施方案中,包含一个或多个如本文所述的CDR,一组CDR 或CDR组的组合的结合剂包含所述CDR连同它们的介于其间的骨架区。优选地,部分也包括至少大约50%第一或第四骨架区或二者,50% C末端50%第一骨架区和第四骨架区的N末端50%。通过重组DNA 技术制造的结合剂的构建可导致N或C末端的残基被导入到所引入的接头编码的可变区以便促进克隆或其他操作步骤,其包括引进接头加入本发明的可变区到进一步的蛋白序列,包括免疫球蛋白重链,其他可变结构域(例如在双链抗体的产生中)或蛋白标记。

[0308] 在一实施方案中,包含一个或多个如本文所述的CDR,一组CDR 或CDR组的组合的结合剂包含人抗体骨架中所述CDR。

[0309] 本发明中优选的结合剂靶向CLDN18.2包含选自SEQ ID NO:38, 39,40和41或其变体的氨基酸序列。

[0310] 本发明中另一优选的结合剂靶向CLDN18.2包含选自SEQ ID NO: 103、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92和93或其片段或变体的氨基酸序列。在一实施方案中,所述氨基酸序列缺少分泌信号诸如N末端分泌信号,尤其是SEQ ID NO:51序列和/或缺少 His标签诸如C末端His标签,如果存在的话尤其是序列 Gly-Gly-Ser-(His)₆或(His)₆。

[0311] 本发明中优选的结合剂靶向CLDN6包含选自SEQ ID NO:42,43, 44和45或其变体的氨基酸序列。

[0312] 本发明中另一优选的结合剂靶向CLDN6包含选自SEQ ID NO: 101、102、60、61、62、63、64和65或其片段或变体的氨基酸序列。在一实施方案中,所述氨基酸序列缺少分泌信号诸如N末端分泌信号,尤其是SEQ ID NO:51序列和/或缺少His标签诸如C末端His标签,如果存在的话尤其是序列Gly-Gly-Ser-(His)₆或(His)₆。

[0313] 应理解的是通过给予核酸诸如编码制剂的RNA和/或通过给予包含核酸诸如编码制剂的RNA的宿主细胞,可将本文所述的结合剂递送到患者。因此,当给予患者时编码结合剂的核酸可以裸露的形式存在或在合适的递送载体诸如脂质体或病毒颗粒的形式中,或在宿主细胞中。观察到提供的核酸可以随着延长的时间段以持续的方式产生治疗抗体制剂,尤其是双特异性抗体,至少部分地减轻不稳定性。通过重组方法可以产生待被递送到患者

的核酸。如果没有存在于宿主细胞中的核酸被给予患者,优选地占据患者用于核酸所编码的结合剂的表达的细胞。如果存在于宿主细胞中的核酸被给予患者,优选地通过患者中宿主细胞表达以便产生核酸所编码的结合剂。

[0314] 在本发明的上下文中术语“重组”意指“通过基因改造而制造”。优选地,在本发明的上下文中“重组物体”诸如重组的核酸不是天然存在的。

[0315] 如本文所用的术语“天然存在的”如应用于物体指的是物体可以在自然中找到的事实。例如生物体(包括病毒)中存在的,可以从自然界来源分离并且没有被实验室人员有意修饰的多肽或多核苷酸序列为天然存在的。

[0316] 如本文所用的术语“核酸”,想要包括DNA和RNA诸如基因组的 DNA, cDNA, mRNA, 重组产生的和化学化成的分子。核酸可为单链的或双链的。RNA包括体外转录的RNA (IVT RNA) 或合成的RNA。

[0317] 核酸可包含在载体中。如本文所用的术语“载体”包括技术人员已知的任何载体,其包括质粒载体,粘粒载体,噬菌体载体,诸如 λ 噬菌体,病毒载体诸如腺病毒或杆状病毒载体,或人工染色体载体诸如细菌人工染色体(BAC),酵母人工染色体(YAC),或P1人工染色体(PAC)。所述载体包括表达及克隆载体。表达载体包含质粒及病毒载体并且通常含有期望的编码序列和在特定的宿主生物体(例如细菌,酵母,植物,昆虫,或哺乳动物)或体外表达系统中可操作地连接的编码序列的表达所需的适当的DNA序列。克隆载体通常用于基因改造和扩大某些期望的DNA片段并且可缺少期望的DNA片段的表达所需的功能性序列。

[0318] 在本发明的上下文中,术语“RNA”指的是包含核糖核苷酸残基并且优选地为全部或基本上由核糖核苷酸残基组成的分子。“核糖核苷酸”指的是具有 β -D-呋核亚硝脒基的2'位置处羟基的核苷酸。术语包括双链RNA,单链RNA,分离的RNA诸如部分纯化的RNA,基本上纯的RNA,合成的RNA,重组产生的RNA及通过一个或多个核苷酸的添加,缺失,取代和/或改变与天然存在的RNA不同的修饰的RNA。此类改变可以包括非核苷酸物质的添加至RNA末端或内部,例如在一个或多个RNA的核苷酸处。RNA分子中的核苷酸也可以包含不标准的核苷酸,诸如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的RNA可以成为天然存在的RNA的类似物或同型物。

[0319] 本发明中术语“RNA”包括并且优选地指的是“mRNA”其意指“信使RNA”和“转录物”,使用DNA作为模板产生其并且编码肽或蛋白。mRNA通常包含5'非翻译区(5'-UTR),蛋白或肽编码区和3'非翻译区(3'-UTR)。mRNA在细胞中和体外具有有限的半衰期。优选地,通过体外转录使用DNA模板产生mRNA。在本发明的一实施方案中,通过体外转录或化学合成获取RNA。体外转录方法为技术人员已知的。例如,有各种商购的体外转录试剂盒。

[0320] 在本发明的实施方案中,RNA为自我复制的RNA,诸如单链自我复制的RNA。在一实施方案中,自我复制的RNA为正义的单链 RNA。在一实施方案中,自我复制的RNA为病毒的RNA或来源于病毒RNA的RNA。在一实施方案中,自我复制的RNA为 α 病毒的基因组RNA或来源于 α 病毒的基因组RNA。在一实施方案中,自我复制的RNA为病毒基因表达载体。在一实施方案中,病毒为塞姆利基森林病毒。在一实施方案中,自我复制的RNA包含一个或多个转基因所述转基因中至少一个编码本文所述的结合剂。在一实施方案中,如果 RNA为病毒RNA或来源于病毒RNA,那么转基因可部分地或完全地取代病毒序列诸如编码结构蛋白的病毒序列。在一实施方案中,自我复制的RNA为体外转录的RNA。

[0321] α 病毒的基因组为编码大的多聚蛋白的两个开放阅读框 (ORF) 的正义的单链RNA (ssRNA (+))。基因组5'末端的ORF编码非结构性蛋白nsP1-nsP4 (nsP1-4), 其被翻译和处理为RNA依赖的RNA聚合酶(复制酶); 3'末端的ORF编码结构蛋白-衣壳和糖蛋白。两个ORFs被所谓的次基因组启动子 (SGP) 所分离, 所述次基因组启动子控制结构ORF 的转录。当被开发利用为基因载体时, SGP后的结构蛋白通常被转基因取代。为了将此类载体包装到病毒颗粒中, 通常从辅助构建体反式表达结构蛋白。 α 病毒在受感染的细胞的胞质中专门地处于RNA水平。感染后, ssRNA (+) 基因组充当nsP1234多聚蛋白前体翻译的mRNA, 其处于病毒生命周期的早期自动蛋白水解地处理为片段nsP123和 nsP4。来自于从基因组RNA模板转录(-)链RNA的(-)链复制酶复合体的片段nsP123和nsP4。后期, 从单一蛋白完全地分裂nsP1234多聚蛋白, 组装为(+)链复制酶复合体合成新的(+)链基因组, 及编码结构蛋白或转基因的次基因组转录物。给次基因组的RNA及新的RNA带帽并且多腺苷酸化, 因此在靶细胞感染后作为mRNA所识别。只有新的基因组RNA包含包装信号, 其确保基因组的RNA专一地包装到发育期的病毒体。 α 病毒复制子对载体的吸引力基于带帽的和多腺苷酸化的RNA基因组的正性定向。体外可以容易地合成可翻译的复制子 RNA, 借此帽类似物添加到体外转录反应实现帽化并且在质粒模板上多聚A尾可编码为多聚T尾。通过常规的转染技术转染体外转录的 (IVT) 复制子和甚至低量的起始IVT RNA快速增加。转移后几小时内, 置于SGP下游的转基因转录为非常高的拷贝数大约40,000-200,000个拷贝次基因组的RNA/细胞, 因此重组蛋白强烈地表达并不令人惊奇。取决于明确的目的, IVT复制子可直接地转染到靶细胞或与提供反式结构基因的辅助载体包装到 α 病毒颗粒。到皮肤或肌肉的转移导致高的持续的局部表达, 伴随强烈诱导体液和细胞免疫反应。

[0322] 为增加本文所用的RNA的表达和/或稳定性, 对其修饰, 优选地没有改变表达的肽或蛋白的序列。

[0323] 如本发明中所用的在RNA的背景下术语“修饰”包括不在所述 RNA中天然存在的RNA的任何修饰。

[0324] 在本发明的一实施方案中, 本发明中所用的RNA没有脱帽的5'-三磷酸盐。通过用磷酸酶处理RNA可以实现此类脱帽的5'-三磷酸盐的移除。

[0325] 本发明中RNA可具有修饰的天然存在的或合成的核糖核苷酸以便增加它的稳定性和/或降低细胞毒性。例如, 在一实施方案中, 本发明中所用的RNA中5-甲基胞苷部分地或完整地, 优选完整地, 被胞嘧啶核苷取代。可选地或任选地, 在一实施方案中, 在本发明所用的RNA 中假尿嘧啶核苷部分地或完整地, 优选完整地, 被尿嘧啶核苷取代。

[0326] 在一实施方案中, 术语“修饰”涉及提供具有5'帽或5'帽类似物的 RNA。术语“5'帽”指的是mRNA分子的5'末端发现的帽结构并且通常由与经由不寻常的5'-5'三磷酸盐连接与mRNA连接的鸟苷酸组成。在一实施方案中, 这一鸟嘌呤核苷在7位置处为甲基化的。术语“常规的 5'帽”指的是天然存在的RNA 5'帽, 优选7-甲基鸟苷帽 (m7G)。在本发明的上下文中, 术语“5'帽”包括与RNA帽结构相似并且修饰以拥有如果与其粘附稳定RNA的能力, 优选体内和/或细胞中的5'帽类似物。

[0327] 在所述5'帽或5'帽类似物存在的情况下, 通过DNA模板的体外转录可实现提供具有5'帽或5'帽类似物的RNA, 其中所述5'帽共转录地并入所产生的RNA链, 或例如, 通过体外转录可产生RNA, 并且使用加帽酶, 例如, 牛痘病毒的加帽5'帽可转录后地附在RNA上。

[0328] RNA可包含进一步的修饰。例如,本发明中所用的RNA的另一修饰为天然存在的多聚(A)尾的延长或截断或5'或3'非翻译区(UTR)的改变,诸如与所述RNA的编码区无关的UTR的引入,例如,一个或多个,优选球蛋白基因,诸如 $\alpha 2$ 球蛋白, $\alpha 1$ 球蛋白, β 球蛋白,优选地 β 球蛋白,更优选人 β 球蛋白来源的3'-UTR的两个拷贝。

[0329] 因此,为增加本发明中所用的RNA的稳定性和/或表达,对其修饰以便使其具有多聚A尾序列偶联存在,优选具有长度10-500个,更优选30-300个,甚至更优选65-200个并且特别是100-150个腺苷酸残基。在一特别优选的实施方案中,多聚A序列具有大约120个腺苷酸残基的长度。另外,两个或更多个3'非翻译区(UTR)并入到RNA分子的3'非翻译区可以导致翻译效率的增强。在一特别的实施方案中,3'-UTR来源于人 β -球蛋白基因。

[0330] 优选地,如果递送到,即转染到细胞,尤其是体内存在的细胞, RNA表达它所编码的蛋白,肽或抗原。

[0331] 术语“转染”涉及核酸尤其是RNA引入到细胞。出于本发明的目的,术语“转染”也包括通过此类细胞核酸引入到细胞或核酸的摄取,其中细胞可存在于个体中,例如患者。因此,本发明中本文所述的用于核酸转染的细胞可以体外或体内存在,例如,细胞可以形成器官,组织和/或患者有机体的一部分。本发明中,转染可以是瞬时的或稳定的。对一些转染应用而言,如果转染的基因物质只是瞬时地表达就已足够。由于转染过程中引入的核酸通常不整合到细胞核的基因组,通过有丝分裂或降解将稀释外来的核酸。允许核酸的游离基因扩增的细胞大大地降低了稀释的比率。如果期望转染的核酸实际上仍然在细胞和它的子代细胞的基因组中,稳定的转染必须发生。RNA可以转染到细胞中从而瞬时表达它的编码蛋白。

[0332] 术语RNA的“稳定性”指的是RNA的“半衰期”。“半衰期”指的是需要消除分子一半的活性,数量,或数目所需要的时间段。在本发明的上下文中, RNA的半衰期表示所述RNA的稳定性。RNA的半衰期可影响RNA的“表达持续时间”。可以期望的是具有长的半衰期的RNA 将表达延长的时间段。

[0333] 在本发明的上下文中,术语“转录”涉及其中DNA序列中的基因密码被转录到RNA的过程。随后, RNA可翻译成蛋白。本发明中术语“转录”包含“体外转录”,其中术语“体外转录”涉及其中在无细胞系统中优选地使用适当的细胞提取物体外合成RNA,尤其是mRNA的过程。优选地,应用克隆载体于转录物产生。这些克隆载体通常称为转录载体并且在本发明中包含在术语“载体”中。

[0334] 本发明中术语“翻译”涉及信使RNA的链指导氨基酸序列组装从而产生肽或蛋白的过程。

[0335] 本发明中术语“表达”以它的最通用的意义使用并且包含RNA和/或肽或蛋白的产生,例如,通过转录和/或翻译。关于RNA,术语“表达”或“翻译”特别涉及肽或蛋白的产生。它也包含核酸的部分表达。而且,表达可以是瞬时的或稳定的。本发明中,术语表达也包括“异常的表达”或“不正常的表达”。

[0336] 本发明中“异常的表达”或“不正常的表达”意指与参照,例如,不处于患有与某些蛋白,例如肿瘤抗原的异常的或不正常的表达有关的疾病的个体状态相比,表达为改变的,优选地增加的。表达增加指的是增加了至少10%,尤其是至少20%,至少50%或至少100%或更多。在一实施方案中,只有在患病组织中发现表达,而在健康组织中的表达为抑制的。

[0337] 术语“特异地表达”意指蛋白基本上只在特异的组织或器官中表达。例如，胃粘膜中特异地表达的肿瘤抗原意指所述蛋白主要在胃粘膜中表达并且不在其他组织中表达或在其他组织或奇观类型中没有表达达到一定程度。因此，在胃粘膜的细胞中专一地表达并且在任何其他组织诸如睾丸中表达程度显著低的蛋白，在胃粘膜的细胞中特异地表达。在一些实施方案中，正常条件下，在超过一种类型的组织或器官中，诸如2或3种组织类型或器官，但是优选不超过3种不同的组织或器官类型中肿瘤抗原也可特异地表达。例如，如果在正常条件下优选地在肺和胃中肿瘤抗原表达程度大致相等，所述肿瘤抗原在肺和胃中特异地表达。

[0338] 本发明中，术语“编码……的RNA”意指如果存在于适当的环境中，优选地细胞内，可以表达RNA从而产生它编码的蛋白或肽。

[0339] 本发明的一些方面依赖宿主细胞的过继转移，核酸诸如编码本文所述的结合剂的RNA的体外转染并且转移到接受者诸如患者，优选地在从低的前体频率体外扩增到临床相关的细胞数目后。本发明中用于治疗的宿主细胞与治疗的接受者可为自体同源的，同种异体的，或同基因的。

[0340] 术语“自体同源的”用于描述来源于相同个体的任何事物。例如，“自体移植”指的是来源于相同个体的组织或器官的移植。此类程序是有利的因为它们克服了不然可导致排斥的免疫屏障。

[0341] 术语“同种异体的”用于描述来源于相同物种的不同个体的任何事物。当一个或多个基因座上的基因不不同时，两个或更多个个体据说是彼此同种异体的。

[0342] 术语“同基因的”用于描述来源于具有相同的基因型的个体或组织的任何事物，即同卵双胞胎或相同纯系株的动物，或它们的组织。

[0343] 术语“异源的”用于描述由多个不同元素组成的一些事物。作为一个实例，个体的骨髓转移到不同的个体构成了异源移植。异源的基因为衍生于除了个体之外来源的基因。

[0344] 本发明中术语“肽”包含寡聚肽和多聚肽并且指的是包含两个或更多个，优选3个或更多个氨基酸，优选4个或更多个氨基酸，优选6个或更多个氨基酸，优选8个或更多个氨基酸，优选9个或更多个氨基酸，优选10个或更多个氨基酸，优选13个或更多个氨基酸，优选16个或更多个氨基酸，优选21个或更多个氨基酸并且达到特别的100个氨基酸中优选8，10，20，30，40或50个氨基酸通过肽键共价地连接的物质。术语“蛋白”指的是大的肽，优选超过100个氨基酸残基的肽，但是通常术语“肽”和“蛋白”在本文中为同义词并且互换地使用。

[0345] 本文关于特定氨基酸序列的教义，例如序列表中所列举的那些，解释为以便也与所述特定序列的变体有关，产生功能性等价于所述特定序列的序列，例如，展示与特定氨基酸序列的特性相同的或相似的特性的氨基酸序列。一重要的特性为保留与靶标结合或维持效应功能。优选地，当它在抗体中取代特定序列时，特定序列变体的序列保持所述抗体与CLDN和/或CD3结合并且优选地如本文所述的所述抗体的功能，例如CDC介导的细胞溶解或ADCC介导的细胞溶解。

[0346] 例如，可以修饰序列表中所示序列从而移除一个或多个，优选地所有游离的半胱氨酸残基，尤其是通过半胱氨酸残基被除了半胱氨酸之外的氨基酸优选丝氨酸，丙氨酸，苏氨酸，甘氨酸，酪氨酸，亮氨酸，或蛋氨酸，最优选丙氨酸或丝氨酸取代。例如，序列表的SEQ ID NO:36中所示的序列的位置103处半胱氨酸或包含所述序列的序列中相应的半胱氨酸可

以这种方式修饰。还可以这种方式修饰的半胱氨酸为SEQ ID NO:42的位置178,SEQ ID NO:43的位置197,SEQ ID NO:44的位置427,或SEQ ID NO:45的位置446处的半胱氨酸。

[0347] 本领域中技术人员应理解的是尤其是可以修饰CDR,超变区和可变区的序列而不损失与CLDN和/或CD3结合的能力。例如,CDR区与本文指定的抗体区相同或高度同源的。所谓“高度同源的”考虑CDR 中可产生1-5个,优选1-4个,诸如1-3个或1-2个取代基。另外,可修饰超变区和可变区从而使得它们显示与本文所公开的抗体区基本上同源。

[0348] 出于本发明的目的,氨基酸序列的“变体”包含氨基酸插入变体,氨基酸添加变体,氨基酸缺失变体和/或氨基酸取代变体。包含蛋白的 N末端和/或C末端处缺失的氨基酸缺失变体也称为N末端和/或C末端截断变体。

[0349] 氨基酸插入变体包含特定氨基酸序列中单个或两个或更多个氨基酸。在具有插入的氨基酸序列变体的情况下,一个或多个氨基酸残基插入到氨基酸序列中的特定位点,尽管由此得到的产物的适当筛选随机插入也是可能的。

[0350] 氨基酸添加变体包含一个或多个氨基酸诸如1,2,3,5,10,20,30,50个或更多个氨基酸的氨基和/或羰基末端融合。

[0351] 通过从序列移除一个或多个氨基酸,诸如通过移除1,2,3,5,10,20,30,50个或更多个氨基酸表征氨基酸缺失变体。缺失可在蛋白的任何位置中。

[0352] 通过被移除的序列中至少一个残基和在它的位置被插入的另一残基表征氨基酸取代变体。对同源的蛋白或肽之间不保守的氨基酸序列中位置和/或具有相似特性的其他氨基酸取代氨基酸的修饰给予优选。优选地,蛋白变体中的氨基酸变化为保守的氨基酸变化,即相似地带电荷的或不带电荷的氨基酸的取代。保守氨基酸变化涉及它们的侧链有关的氨基酸家族的其中之一取代。天然存在的氨基酸通常分成四个家族:酸性的(天冬氨酸,谷氨酸),碱性的(赖氨酸,精氨酸,组氨酸),非极性的(丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,蛋氨酸,色氨酸),和不带电荷的极性的(甘氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,半胱氨酸,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸)氨基酸。有时候苯丙氨酸,色氨酸,和酪氨酸共同地被分类为芳香族氨基酸。

[0353] 优选地给定的氨基酸序列和所述给定的氨基酸序列的变体的氨基酸序列之间相似性的程度,优选地同一性将至少大约60%,65%,70%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%。优选地给予至少大约10%,至少大约20%,至少大约30%,至少大约40%,至少大约50%,至少大约60%,至少大约70%,至少大约80%,至少大约90%或大约100%参照氨基酸序列的全长的氨基酸区域相似性或同一性的程度。例如,如果参照氨基酸序列由200个氨基酸组成,优选地给予至少大约20,至少大约40,至少大约60,至少大约80,至少大约100,至少大约120,至少大约140,至少大约160,至少大约180,或大约200个氨基酸,优选连续的氨基酸相似性或同一性的程度。在优选的实施方案中,给予参照氨基酸序列全长相似性或同一性的程度。利用已知的工具可以进行测定序列相似性,优选地序列同一性的比对,优选地使用最好的序列比对,例如,使用Align,使用标准设定,优选地EMBOSS::needle,矩阵:Blosum 62,缺口开口10.0,缺口延长0.5。

[0354] “序列相似性”指相同的或代表保守的氨基酸取代的氨基酸的百分比。两条氨基酸序列之间“序列同一性”指序列间相同的氨基酸的百分比。

[0355] 术语“百分比同一性”想要指待比较的两条序列之间相同的氨基酸残基的百分比，最好的比对后获得，这种百分比纯粹统计的并且两条序列之间差异随机分布跨越它们全长。通过最佳地比对它们之后比较这些序列，常规进行两条氨基酸序列之间序列比较，通过节段或通过“比较窗”进行所述比较以便鉴定和比较序列相似性的局部区域。除了手工之外，借助于Smith和Waterman,1981,Ads App.Math.2,482 的局部同源性算法，借助于Neddleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol. 48,443的局部同源性算法，借助于Pearson和Lipman,1988,Proc.Natl Acad.Sci.USA 85,2444的相似性研究方法，或借助于使用这些算法的计算机程序(GAP,BESTFIT,FASTA,BLAST P,BLAST N和 TFASTA in Wisconsin遗传学软件包，遗传学计算机组,575Science Drive,Madison,Wis.)可产生用于比较的序列的最佳算法。

[0356] 通过测定被比较的两条序列之间相同位置的数目，这一数目除以被比较的位置数目并且将获得结果乘以100以便获得这些两条序列之间的百分比同一性从而计算同一性百分比。

[0357] 本发明的结合剂可以在细胞内产生(例如胞质中，外周胞质中或包涵体中)然后从宿主细胞分离和任选地进一步地纯化；或它们可以在细胞外产生(例如在其中培养宿主细胞的介质中)然后从培养基分离和任选地进一步地纯化。多肽的重组产生所用的方法和试剂，诸如特定合适的表达载体，转化或转染方法，选择标记，蛋白表达的诱导方法，培养条件等，为本领域中已知的。相似地，蛋白分离和纯化技术为技术人员所熟知。

[0358] 术语“细胞”或“宿主细胞”优选地涉及完整的细胞，即具有完整的细胞膜没有释放它的正常的细胞内组分诸如酶，细胞器，或遗传物质的细胞。优选地完整的细胞为可存活的细胞，即能够进行它的正常新陈代谢功能的活细胞。优选地，本发明中所述术语涉及可以用外源性核酸转染的任何细胞。优选地，当用外源性核酸转染和转移到接受者时细胞可以在接受者中表达核酸。术语“细胞”包括细菌细胞；其他有用的细胞为酵母细胞，真菌细胞或哺乳动物细胞。合适的细菌细胞包括来自于革兰氏阴性细菌株诸如大肠杆菌株，变形杆菌株，和假单胞菌株的细胞，和革兰氏阳性细菌株诸如芽孢杆菌株，链霉菌株，葡萄球菌株，和乳球菌株的细胞。合适的真菌细胞包括来自于木霉菌属，脉孢菌属，和曲霉菌属的细胞。合适的酵母细胞包括来自酵母菌属(例如啤酒酵母)，裂殖酵母属(例如粟酒裂殖酵母)，毕赤酵母属(例如毕赤酵母和毕赤甲醇)，和汉逊酵母属的细胞。合适的哺乳动物细胞包括例如CHO细胞，BHK细胞，HeLa细胞，COS细胞，293HEK等。然而，也可以使用两栖动物细胞，昆虫细胞，植物细胞，和任何其他本领域中异源蛋白表达所用的细胞。哺乳动物细胞特别优选用于过继转移，诸如来自于人，小鼠，仓鼠，猪，山羊和灵长类动物的细胞。细胞可来源于大量的组织类型并且包括原代细胞和诸如免疫系统细胞的细胞系，尤其是抗原提呈细胞诸如树突状细胞和T细胞，干细胞诸如造血干细胞和间充质干细胞和其他细胞类型。抗原提呈细胞为在主要组织相容性复合体的背景下在它的表面展示抗原的细胞。利用它们的 T细胞受体(TCR) T细胞可识别这种复合体。

[0359] 如本文所用的“减少”，“降低”或“抑制”意指总体降低或引起总体降低的能力，优选地水平中5%或更大的，10%或更大的，20%或更大的，更优选50%或更大的，并且最优选75%或更大的，例如，在表达水平中或细胞增殖水平中。

[0360] 术语诸如“增加”或“增强”优选地涉及大约至少10%，优选地至少 20%，优选地至

少30%，更优选至少40%，更优选至少50%，甚至更优选至少80%，并且最优选至少100%，至少200%，至少500%，至少1000%，至少10000%或甚至更多的增加或增强。

[0361] 抗体依赖细胞介导的细胞毒性

[0362] ADCC描述了如本文所述的效应细胞的细胞杀伤能力，尤其是淋巴细胞，优选地要求抗体标记的靶细胞。

[0363] ADCC优选地发生在当抗体与肿瘤细胞上的抗原结合和抗体Fc 结构域占据免疫效应细胞表面的Fc受体(FcR)时。已鉴定了几个Fc受体家族，特定的细胞群特征性地表达定义的Fc受体。ADCC可以视为是直接地诱导即刻肿瘤破坏导致抗原提呈的可变程度的机制和肿瘤定向的T细胞应答的诱导。优选地，ADCC的体内诱导将引起肿瘤定向的T细胞应答和宿主衍生的抗体应答。

[0364] 补体依赖的细胞毒性

[0365] CDC为的另一抗体导向的细胞杀伤方法。IgM是对补体活化最有效的同种型。经由经典的补体活化途径IgG1和IgG3对指导CDC也是非常有效。优选地，在这种情况下，抗原-抗体复合物的形成导致暴露非常靠近参与抗体分子诸如IgG分子(C1q为补体C1的三种亚成分的其中之一)的C_H2结构域的多个C1q结合位点。优选地这些暴露的 C1q结合位点转变以前低亲和力C1q-IgG相互作用为高亲和力的其中之一，这触发了涉及一系列其他补体蛋白的级联放大反应并且引起效应细胞趋化剂/活化剂C3a和C5a的蛋白水解释放。优选地，补体级联反应终止于膜攻击复合物的形成，所述膜攻击复合物在细胞膜中产生孔洞，促进水和溶剂自由流通细胞内外。

[0366] 通过各种技术，包括常规的单克隆抗体方法，例如Kohle和 Milstein, Nature 256:495 (1975) 的标准体细胞杂交技术，可以产生本文所述的抗体，例如用于提供VL和VH区的抗体。尽管体细胞杂交程序为优选的，基本上，可以应用产生单克隆抗体的其他技术，例如，B淋巴细胞的病毒或致癌性转化或使用抗体基因文库的噬菌体展示技术。

[0367] 用于制备分泌单克隆抗体的优选的动物系统为鼠系统。小鼠杂交瘤产生是非常完善的程序。免疫方案和用于融合的免疫的脾细胞的分离技术为本领域中已知的。融合伴侣(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。

[0368] 其他优选的用于制备分泌单克隆抗体杂交瘤的动物系统为大鼠和兔系统(例如Spieker-Polet等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995) 中所述，也见于Rossi等, Am. J. Clin. Pathol. 124:295 (2005))。

[0369] 还在另一优选的实施方案中，使用携带部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因的或转染色体的小鼠可以产生人单克隆抗体。这些转基因的和转染色体的小鼠包括分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠，在本文中统称为“转基因小鼠”。如W02004 035607中对CD20详述的可以进行此类转基因小鼠中人抗体的产生。

[0370] 还有另一产生单克隆抗体的策略为从产生确定特异性抗体的淋巴细胞直接地分离编码抗体的基因，例如见Babcock等, 1996；从单个分离的产生确定特异性抗体的淋巴细胞产生单克隆抗体的新策略。重组抗体基因工程的细节也可见Welschof和Kraus, 用于癌症治疗的重组抗体ISBN-0-89603-918-8和Benny K.C.Lo抗体基因工程ISBN 1-58829-092-1。

[0371] 为产生抗体，可以用来源于抗原序列，即抗将被指导的抗体的序列，重组表达抗原的富集制剂或其片段和/或如所述的表达抗原的细胞的载体偶联肽免疫小鼠。可选地，可以

用编码抗原的DNA或其片段的免疫小鼠。如果使用抗原的纯化的或富集制剂的免疫不产生抗体,也可以用表达抗原的细胞,例如细胞系免疫小鼠从而促进免疫应答。

[0372] 随着通过尾静脉或眶后血获取的血浆和血清样品的免疫方案监测免疫应答。具有足够效价免疫球蛋白的小鼠可以用作融合。处死前3 天腹腔内或静脉内抗原表达细胞可以为小鼠加压并且移除脾脏可以增加特定抗体分泌杂交瘤的比率。

[0373] 为生产产生单克隆抗体的杂交瘤,可以从免疫小鼠分离脾细胞和淋巴结细胞并且融合到适当的无限增殖化细胞系,诸如小鼠骨髓瘤细胞系。然后可以筛选由此得到的杂交瘤用于抗原特异性抗体的产生。然后可以通过ELISA筛选单个孔用于抗体分泌杂交瘤。通过免疫荧光和FACS分析,使用抗原表达细胞,可以鉴定对抗原具有特异性的抗体。抗体分泌杂交瘤可以平板接种,再筛选,并且如果仍然对单克隆抗体阳性可以通过有限稀释亚克隆。然后可以体外培养稳定的亚克隆从而产生组织培养基中特征的抗体。

[0374] 例如,使用如本领域中熟知的重组DNA技术和基因转染方法,也可以在宿主细胞转染瘤中产生抗体 (Morrison,S.(1985) Science 229: 1202)。

[0375] 例如,在一实施方案中,感兴趣的基因,例如,抗体基因,可以绑定到表达载体诸如真核表达质粒诸如WO 87/04462,WO 89/01036 和EP 338 841中公开的GS基因表达系统所用的或本领域中熟知的其他表达系统。具有克隆的抗体基因的纯化质粒可以引入真核宿主细胞诸如CHO细胞,NS/O细胞,HEK293T细胞或HEK293细胞或可选地其他真核细胞像植物来源的细胞,真菌细胞或酵母细胞。用于引入这些基因的方法为本领域中所述的方法诸如电穿孔,脂质体,阳离子脂质体或其他。这些抗体基因引入宿主细胞后,可以鉴定和选择表达抗体的细胞。这些细胞代表然后可以扩增至它们的表达水平并且升高到产生抗体的转染瘤。从这些培养上清液和/或细胞可以分离和纯化重组抗体。

[0376] 可选地,克隆的抗体基因可以表达在其他表达系统中,包括原核细胞,诸如微生物,例如E.coli。而且,抗体可以在转基因的非人类的动物中产生,诸如来自于绵羊和兔的奶或来自于母鸡的蛋,或转基因植物中;例如见Verma,R等.(1998) J.Immunol.Meth.216: 165-181; Pollock等.(1999) J.Immunol.Meth.231:147-157;和Fischer,R等.(1999) Biol.Chem.380:825-839。

[0377] 嵌合化

[0378] 当重复地应用导致治疗效果降低时,未标记的鼠抗体在人体中为高度免疫原性。通过重链恒定区介导主要的免疫原性。如果各自的抗体为嵌合的或人源化,可以减少或完全地避免人体中鼠抗体的免疫原性。嵌合抗体为抗体,其不同部分来自于不同的动物物种,诸如那些具有来源于鼠抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区。通过鼠抗体重链和轻链可变区与人重链和轻链的恒定区的结合(例如,如Kraus等,在分子生物学方法系列中,用于癌症治疗的重组抗体 ISBN-0-89603-918-8所述)获得抗体嵌合。在一优选的实施方案中,通过人 κ 轻链恒定区与鼠轻链可变区结合,产生嵌合抗体。也在一优选的实施方案中,通过人 λ 轻链恒定区与鼠轻链可变区结合,可以产生嵌合抗体。用于嵌合抗体产生的优选的重链恒定区为IgG1,IgG3和 IgG4。用于嵌合抗体产生的其他优选的重链恒定区为IgG2,IgA,IgD 和 IgM。

[0379] 人源化

[0380] 主要地通过位于互补决定区(CDR) 第六重链和轻链的氨基酸残基,抗体与靶抗原

相互作用。为此,个体抗体之间的CDR内氨基酸序列比CDR外部序列更多样化。因为CDR序列对大多数抗体-抗原相互作用负责,通过构建包括来自于移植到源于具有不同特性的不同抗体的骨架序列的特异的天然存在的抗体的CDR序列的表达载体,表达模拟特异的天然存在的抗体的特性的重组抗体是可能的(例如见 Riechmann,L等.(1998) *Nature* 332:323-327; Jones,P.等.(1986) *Nature* 321:522-525; 和 Queen,C等.(1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*86: 10029-10033)。包括生殖细胞系抗体基因序列的此类骨架序列可以从公共DNA数据库获得。这些生殖细胞系序列与成熟的抗体基因序列不同,因为它们不包括B细胞成熟期间V(D)J连接所形成的完全组装的可变区基因。个体均匀地穿越可变区生殖细胞系基因序列也与高亲和力的二级抗体库的序列不同。

[0381] 使用标准结合测定(例如,ELISA,蛋白印迹,免疫荧光和流式细胞术分析)可以确定抗体和其他结合剂与抗原结合的能力。

[0382] 为纯化抗体,选择的生产细胞系可以生长在2L喷嘴烧瓶中用于重组抗体纯化。可选地,可以在基于生物反应器的透析中产生抗体。可以过滤上清液并且,如果有需要的话,在蛋白L-琼脂糖亲和色谱之前浓缩。可以通过凝胶电泳和高效液相色谱核查洗脱的IgG以确保纯度。缓冲液可以更换为PBS,使用各自的消光系数通过OD280可以确定浓度。重组抗体等份地储存在-80℃。

[0383] 为了证明单克隆抗体与表达抗原的活细胞的结合,可以使用流式细胞术。表达天然的或转染后抗原的细胞系和缺少抗原表达的阴性对照(在标准的条件下生长)可以与各种浓度的单克隆抗体在杂交瘤上清液或含1%FBS的PBS中混合,可以在4℃下孵育30分钟。洗涤后,在与一级抗体染色相同的条件下APC或Alexa647标记的抗IgG抗体可以与抗原结合的单克隆抗体结合。通过流式细胞术,用FACS仪器,使用光和侧向散射特性以门通单个活细胞可以分析样品。为了在单次测量中区别抗原特异性单克隆抗体和非特异性粘合剂,可以应用共转染的方法。编码抗原的质粒和荧光标记瞬时转染的细胞可以如以上所述的染色。除了抗体染色的细胞可以在不同的荧光通道检测转染细胞。因为大多数转染细胞表达转基因,抗原特异性单克隆抗体与荧光标记表达细胞优选地结合,而以与未转染的细胞可比较的比率非特异性抗体结合。除了流式细胞术测定之外或代替流式细胞术测定,可使用利用荧光显微镜的可选测定。可以如以上所述的精确地染色细胞并且通过荧光显微镜检查。

[0384] 为了证明单克隆抗体与表达抗原的活细胞的结合,可以使用免疫荧光显微术。例如,在标准的生长条件下,自发地表达或转染后表达抗原的细胞系和缺少抗原表达的阴性对照生长在载玻片添加10%胎牛血清(FCS),2mM左旋谷氨酰胺,100IU/ml青霉素和100μg/ml链霉素的DMEM/F12培养基中。然后可以用甲醇或多聚甲醛固定细胞或留下不处理。然后在25℃下细胞可以与抗抗原的单克隆抗体起反应30分钟。洗涤后,在相同的条件下细胞可以与Alexa555标记的抗小鼠IgG 二级抗体(分子探针)起反应。然后可以通过荧光显微镜检查细胞。

[0385] 可以制备来自于表达抗原的细胞的细胞提取物和适当的阴性对照并且经受十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,将分离的抗原转移到硝酸纤维素膜,封闭,待测的单克隆抗体探针探测。使用抗小鼠IgG过氧化物酶可以检测IgG结合并且ECL底物显影。

[0386] 以技术人员熟知的方式通过免疫组化可以进一步地测试抗体对抗原的反应性,例如使用多聚甲醛或丙酮固定的冰冻切片或多聚甲醛固定的石蜡包埋的组织切片,所述切片

来源于常规手术治疗期间获取自患者的非癌症组织或癌症组织样品或来源于与自发性表达抗原或转染后表达抗原的细胞系孵育的携带移植瘤的小鼠。对免疫染色而言,随后根据供应商说明书可以用辣根过氧化物酶标记羊抗鼠或羊抗兔抗体(DAKO)孵育对抗原反应的抗体。

[0387] 临床前试验

[0388] 本文所述的结合剂也可以在体内模型中测试(例如携带移植瘤免疫缺陷小鼠)与表达CLDN的细胞系孵育从而检测它们在控制表达CLDN的肿瘤细胞的生长方面的效力。

[0389] 在异体移植表达CLDN的肿瘤细胞到免疫功能不全的小鼠或其他动物后,可以使用本文所述的结合剂进行体内试验。可以给予无瘤小鼠结合剂,随后通过注射肿瘤细胞从而测量结合剂对阻止肿瘤形成或肿瘤相关症状的影响。可以给予荷瘤小鼠结合剂从而测定结合剂各自对减少肿瘤生长,转移或肿瘤相关症状的治疗效果。结合剂可以与其他物质如细胞抑制药物,生长因子抑制剂,细胞周期阻断剂,血管生成抑制剂或抗体组合应用从而测定组合协同效果和潜在毒性。为分析结合剂介导的毒性副作用,可以将动物与结合剂或对照试剂孵育并且彻底地研究可能与CLDN结合剂治疗有关的症状。

[0390] 可以如Glenn E.Morris的“表位作图方案(分子生物学的方法) ISBN-089603-375-9”和Olwyn M.R.Westwood, Frank C.Hay的“表位作图:实用方法”实用方法系列,248中详述的进行结合剂所识别的表位作图。

[0391] 本文所述的化合物和制剂可以任何合适的药物组合物的形式给药。

[0392] 本发明的药物组合物优选为无菌的并且包含有效量的本文所述的结合剂和任选地如本文所讨论的其他制剂从而产生期望的反应或期望的效果。

[0393] 通常以统一的剂型提供药物组合物并且可以本身已知的方式制备。药物组合物,例如可为溶液或悬浮液的形式。

[0394] 药物组合物可包含盐,缓冲物质,防腐剂,载体,稀释剂和/或赋形剂,所有这一切优选药学上可接受的。术语“药学上可接受的”指的是不与药物组合物的活性组分作用发生相互作用的无毒性物质。

[0395] 不是药学上可接受的盐可用于制备药学上可接受的盐并且包括在本发明中。这种药学上可接受的盐以非限制的方式从下列酸制备那些盐酸,氢溴酸,硫酸,硝酸,磷酸,马来酸,醋酸,水杨酸,柠檬酸,蚁酸,丙二酸,琥珀酸等。药学上可接受的盐也可制备为碱金属盐或碱土金属盐,诸如钠盐,钾盐或钙盐。

[0396] 药学组合物中所用的合适的缓冲物质包括醋酸盐,柠檬酸盐,硼酸盐和磷酸盐。

[0397] 药学组合物中所用的合适的防腐剂包括苯扎氯铵,氯丁醇,尼泊金和硫柳汞。

[0398] 可注射的制剂可包含药学上可接受的赋形剂诸如乳酸林格式液。

[0399] 术语“载体”指的是有机或无机组分,天然或合成,其中与活性组分组合以便促进,增强或使应用成为可能。本发明中,术语“载体”也包括一个或多个适用于患者给药的可相容的固体或液体填充剂,稀释剂或胶囊物质。

[0400] 用于胃肠外给药的可能的载体物质为,例如,无菌水,林格氏液,乳酸林格氏液,无菌氯化钠溶液,聚乙二醇,氢化萘,和尤其是生物可相容的丙交酯聚合物,丙交酯/乙交酯共聚物或聚乙二醇/聚氧丙烯共聚物。

[0401] 当本文使用术语“赋形剂”时想要指存在于药物组合物中并且不是活性成分的所

有物质诸如,例如载体,粘合剂,润滑剂,增稠剂,表面活性剂,防腐剂,乳化剂,缓冲剂,调味剂,或着色剂。

[0402] 本文所述的制剂和组合物可经由任何常规途径给药,诸如通过胃肠外给药,包括通过注射或输注。给药优选胃肠外地,例如,静脉内地,动脉内地,皮下地,皮内地或肌内地。

[0403] 适用于胃肠外给药的组合物通常包含优选与接受者的血液等渗的活性化合物的无菌的水制剂或非水制剂。可相容的载体和溶剂的实例为林格式溶液和等渗的氯化钠溶液。另外,通常无菌的不挥发性油用作溶液或悬浮介质。

[0404] 本文所述的制剂和组合物以有效量给药。“有效量”指的是单独或与其他剂量实现期望的反应或期望的效应的量。在特定疾病治疗或特定状况治疗的情况下,期望的反应优选地涉及抑制病程。这包括减慢疾病的进展和尤其是中断或逆转疾病的进展。疾病或状况治疗中期望的反应也可为延迟所述疾病或所述状况的发作或阻止所述疾病或所述状况的发作。

[0405] 本文所述的制剂或组合物的有效量将取决于待被治疗的状态,疾病的严重性,患者的个体参数,包括年龄,生理状态,身高和体重,治疗的持续时间,伴随治疗的类型(如果存在的话),给药的特定途径和相似的因素。因此,本文所述的制剂的给药剂量可取决于各种此类参数。在初始剂量对患者中的反应不足的情况下,可使用更高的剂量(或通过不同的,更局部的给药途径实现有效地更高剂量)。

[0406] 可以给药患者本文所述的制剂和组合物,例如体内,从而治疗或预防各种病症诸如本文所述的那些。优选的患者包括患有通过本文所述的制剂和组合物给药可以修正或改善病症的病人。这包括涉及通过 CLDN 诸如 CLDN18.2 和/或 CLDN6 的表达模式改变表征细胞的病症。

[0407] 例如,在一实施方案中,本文所述的制剂可以用于治疗癌症患者,例如癌症疾病诸如本文所述的通过存在表达 CLDN 的癌细胞所表征的癌症。

[0408] 本发明中所述的药物组合物和治疗方法也可用于免疫或疫苗接种从而预防本文所述的疾病。

[0409] 本发明的药物组合物可与免疫增强补充物质诸如一种或多种佐剂共同给药并且可包含一种或多种免疫增强物质从而进一步地增加它的效力,优选地实现免疫刺激的协同效应。术语“佐剂”涉及延长或增强或加速免疫应答的化合物。在这方面各种机制是可能的,取决于各种佐剂的类型。例如,允许 DC 成熟,例如脂多糖或 CD40 配体的化合物形成第一类合适的佐剂。通常,影响“危险信号”(LPS, GP96, dsRNA 等)或细胞因子,诸如 GM-CSF 类型的免疫系统的任何制剂都可以用作佐剂,所述佐剂能够使免疫应答强化和/或以控制的方式影响免疫应答。在这种背景下也可以任选地使用寡脱氧核苷酸 CpG,尽管要考虑如以上所解释的在某些情况下发生的它们的副作用。特别优选的佐剂为细胞因子,例如单核因子,淋巴因子,白细胞介素或趋化因子,例如 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, INF α , INF- γ , GM-CSF, LT- α , 或生长因子,例如 hGH。另一已知的佐剂为氢氧化铝,弗氏佐剂或诸如 **Montanide®** 的油,最优选 **Montanide®** ISA51。肽,诸如 Pam3Cys, 也适合用作本发明的药物组合物中的佐剂。

[0410] 本文所提供的制剂和组合物可单独使用或与常规的治疗方案诸如手术,放疗,化疗和/或骨髓移植(自体的,同基因的,同种异体的或无关的)联合使用。

[0411] 癌症治疗代表其中组合策略是尤其令人期望的领域,因为频繁地两种,三种,四种或甚至多种癌症药物/治疗的组合作用,产生比单一治疗方法的影响强得多的协同效应。因此,在本发明的另一实施方案中,利用基于免疫或疫苗接种机制诸如本发明的方法和药物组合物的癌症治疗与各种靶向相似的或其他特异机制的其他药物和/或方法有效地组合。例如,那些之中为常规的肿瘤治疗,多表位策略,额外的免疫疗法,和靶向于血管形成或细胞凋亡的治疗方法(综述例如见 Andersen等.2008:癌症治疗:疫苗接种与其他疗法的组合,Cancer Immunology Immunotherapy,57(11):1735-1743.)。不同制剂的连续给药可在不同的核对点上抑制癌细胞生长,而其他制剂可,例如抑制新的血管形成,恶性细胞的存活或转移,潜在地癌症转化为慢性疾病。以下列表提供了一些抗癌药物和疗法的非限制性实例,可与本发明组合使用。

[0412] 1. 化学疗法

[0413] 化学疗法为多种癌症类型的标准治疗。最常见的化疗剂通过杀伤癌细胞的主要特性之一的迅速分裂的细胞发挥作用。因此,常规化疗药物诸如烷化剂,抗代谢物质,蒽环类药物,植物生物碱,拓扑异构酶抑制剂,和其他影响细胞分裂或DNA合成的抗肿瘤药物的组合通过清除抑制细胞可显著地改善本发明的治疗效果,通过使肿瘤细胞对免疫介导的杀伤更为易感,或通过免疫系统的细胞额外的活化重新启动免疫系统。已在多个研究中证明了化疗剂和基于疫苗接种的免疫治疗药物的协同抗癌作用(例如见Quoix等.2011:晚期非小细胞肺癌中 TG4010治疗性疫苗接种和一线化疗:控制相2B试验.Lancet Oncol.12(12):1125-33.;也见于Liseth等.2010:人恶性肿瘤的治疗中强化化疗与抗癌疫苗的组合:血液学试验.J Biomed Biotechnol.2010:6920979;也见于Hirooka等2009:不能手术的局部晚期胰腺癌患者吉西他滨与免疫疗法的组合疗法.Pancreas 38(3):e69-74)。有数百种基本上适用于组合疗法的可用的化疗剂。可以与本发明组合的化疗药物的一些(非限制性)实例为卡铂(伯尔定),顺铂(顺铂,顺铂-AQ),环磷酰胺(癌得星,环磷酰胺),多西他赛(泰素帝),阿霉素(亚德里亚霉素),埃罗替尼(特罗凯),依托泊苷(凡毕士),氟尿嘧啶(5-FU),吉西他滨(健择),甲磺酸伊马替尼(格列卫),伊立替康(伊立替康),甲氨蝶呤(重氮片,氨甲喋呤钠,甲氨蝶呤),紫杉醇(Taxol,Abraxane),索拉菲尼(多吉美),舒尼替尼(索坦),拓扑替康(Hycamtin),长春新碱(Oncovin,Vincasar PFS),和长春花碱(Velban)。

[0414] 2. 手术

[0415] 癌症手术-去除肿瘤的操作-仍然是癌症治疗的基础。手术可以与其他癌症治疗组合以便去除任何残留的肿瘤细胞。已无数次证明手术方法与随后的免疫疗法的组合为有前途的方法。

[0416] 3. 放射

[0417] 放射治疗仍然是癌症治疗的重要组分,大约所有癌症患者50%的在他们发病期间接受放射治疗。放射治疗的主要目标为剥夺癌细胞它们的增殖(细胞分裂)潜力。用于治疗癌症的放射类型为光子放射(x射线和 γ 射线)和粒子放射(电子,质子和中子束)。有两种方式释放放射到癌症部位。外照射从体外释放,通过瞄准高能射线(光子,质子或粒子放射)到肿瘤部位。内放射或近距离放射疗法从体内释放,通过密封在导管中放射源或直接地播种到肿瘤部位。与本发明联合可应用的放射治疗技术为,例如分级法(分级方案释放的放射治疗,例如每日部分 1.5-3Gy,几周后停止),3D适形放射治疗(3DCRT;释放放射物到大体肿瘤

体积),强度调制放射治疗(IMRT;计算机控制的多放射束的强度调制),图像引导放射治疗(IGRT;包括为校正留出余地的放射治疗前成像的技术),和立体定向放射治疗(SRBT,只在几个治疗部分释放非常高的个体剂量)。放射治疗综述见Baskar等2012:癌症和放射治疗:目前进展和未来方向。Int.J Med Sci.9(3):193-199。

[0418] 4. 抗体

[0419] 抗体(优选单克隆抗体)通过各种机制实现它们抗癌细胞的治疗效应。在产生细胞凋亡或程序性细胞死亡方面它们可以具有直接效应。它们可以阻断信号转导途径的组分诸如,例如生长因子受体,有效地阻滞肿瘤细胞的增殖。在表达单克隆抗体的细胞中,他们可以引起抗独特型抗体形成。间接效应包括招募具有细胞毒性的细胞,诸如单核细胞和巨噬细胞。这种类型的抗体介导的细胞杀伤称为抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。抗体也结合补体,引起直接的细胞毒性,称为补体依赖的细胞毒性(CDC)。手术方法与免疫治疗药物联合是一种成功的方法,例如如Gadri等.2009:树突状细胞疫苗接种和抗CD20 抗体治疗在鼠淋巴瘤治疗中的协同效应。32(4):333-40中所证明的。以下列表提供了可以与本发明组合使用的抗癌抗体和潜在的抗体靶标(方括号中)的一些非限制性实例:阿巴伏单抗(CA-125),阿昔单抗(CD41),阿德木单抗(EpCAM),阿夫土单抗(CD20),培化阿珠单抗(VEGFR2),喷替酸阿妥莫单抗(CEA),Amatuxi单抗(MORAb-009),马安那莫单抗(TAG-72),阿伯珠单抗(HLA-DR),阿西莫单抗(CEA),巴维昔单抗(磷脂酰丝氨酸),贝妥莫单抗(CD22),贝利木单抗(BAFF),贝伐单抗(VEGF-A),比伐单抗(CD44v6),兰妥莫单抗(CD19),Brentuximab vedotin(CD30TNFRSF8),美坎珠单抗(黏蛋白CanAg),Cantuzumab ravtansine(MUC1),卡罗单抗喷他肽(前列腺癌细胞),Carlu 单抗(CNT0888),卡妥索单抗(EpCAM,CD3),西妥昔单抗(EGFR),泊西他珠单抗(EpCAM),西妥木单抗(IGF-1受体),克立昔单抗(紧密连接蛋白),Clivatuzumab tetraxetan(MUC1),可那木单抗(TRAIL-R2),达西珠单抗(CD40),Dalotuzumab(胰岛素样生长因子I受体),地诺单抗(RANKL),地莫单抗(B淋巴瘤细胞),达西珠单抗(DR5),依美昔单抗(GD3神经节苷脂),依夫洛昔单抗(EpCAM),Elotuzu单抗(SLAMF7),Enavatuzu单抗(PDL192),Ensituxi单抗(NPC-1C),依帕珠单抗(CD22),厄马索单抗(HER2/neu,CD3),伊瑞西珠单抗(整合素 $\alpha v \beta 3$),Farletuzu 单抗(叶酸受体1),FBTA05(CD20),Ficlatuzu单抗(SCH 900105),芬妥木单抗(IGF-1受体),Flanvotu单抗(糖蛋白75),夫苏木单抗(TGF- β),加利昔单抗(CD80),Ganitu单抗(IGF-I),吉妥单抗(CD33),Gevokizu 单抗(IL-1 β),Girentuxi单抗(碳酸酐酶9(CA-IX)),Glembatumu单抗 vedotin(GPNMB),替伊莫单抗(CD20),Icrucumab(VEGFR-1),伊戈伏单抗(CA-125),Indatuximab ravtansine(SDC1),Intetumu单抗(CD51),伊珠单抗奥佐米星(CD22),伊匹木单抗(CD152),伊妥木单抗(CD30),拉贝珠单抗(CEA),来沙木单抗(TRAIL-R2),利韦单抗(乙型肝炎表面抗原),林妥珠单抗(CD33),Lorvotuzumab mertansine(CD56),鲁卡木单抗(CD40),鲁昔单抗(CD23),马帕木单抗(TRAIL-R1),马妥珠单抗(EGFR),美泊利单抗(IL-5),米拉珠单抗(CD74),米妥莫单抗(GD3神经节苷脂),Mogamulizu单抗(CCR4),Moxetumo单抗pasudotox(CD22),他那可单抗(C242抗原),他那莫单抗(5T4),Narnatu单抗(RON),Necitumu单抗(EGFR),尼妥珠单抗(EGFR),Nivolu单抗(IgG4),奥法木单抗(CD20),Olaratu单抗(PDGF-R α),Onartuzu单抗(人离散因子受体激酶),莫奥珠单抗(EpCAM),奥戈伏单抗(CA-125),Oxelu 单抗(OX-40),帕尼单抗(EGFR),Patritu单抗(HER3),Pemtumo单抗(MUC1),帕妥珠

单抗 (HER2/neu), 平妥莫单抗 (腺癌抗原), 普托木单抗 (波形蛋白), Racotumo单抗 (N-羟乙酰神经氨酸), Radretu单抗 (纤连蛋白外结构域-B), 雷韦单抗 (狂犬病病毒糖蛋白), 雷莫芦单抗 (VEGFR2), 利妥木单抗 (HGF), 利妥昔单抗 (CD20), 罗妥木单抗 (IGF-1 受体), Samalizu单抗 (CD200), 西罗珠单抗 (FAP), Siltuxi单抗 (IL-6), Tabalu单抗 (BAFF), 他珠单抗 (α -甲胎蛋白), 帕他莫单抗 (CD19), 替妥莫单抗 (固生蛋白C), Teprotumu单抗 (CD221), 替西木单抗 (CTLA-4), 替加珠单抗 (TRAIL-R2), TNX-650 (IL-13), 托西莫单抗 (CD20), 曲妥珠单抗 (HER2/neu), TRBS07 (GD2), 曲美木单抗 (CTLA-4), 西莫白介素单抗 (EpCAM), Ublituxi单抗 (MS4A1), Urelu 单抗 (4-1BB), 伏洛昔单抗 (整合素 $\alpha 5\beta 1$), 伏妥昔单抗 (肿瘤抗原 CTAA16.88), 扎芦木单抗 (EGFR), 扎木单抗 (CD4)。

[0420] 5. 细胞因子, 趋化因子, 共刺激分子, 融合蛋白

[0421] 本发明的编码抗原的药物组合物与细胞因子, 趋化因子, 共刺激分子和/或其融合蛋白的联合使用从而引起有利的免疫调节或肿瘤抑制作用为本发明的另一实施方案。为增加免疫细胞到肿瘤的浸润和促进抗原提呈细胞到肿瘤引流淋巴结的移动, 可使用各种C, CC, CXC 和CX3C结构的趋化因子。一些最有前途的趋化因子为, 例如CCR7 和它的配体CCL19和CCL21, 此外CCL2, CCL3, CCL5, 和CCL16。其他实例为CXCR4, CXCR7和CXCL12。而且, 共刺激或调节分子诸如例如B7配体 (B7.1和B7.2) 是有用的。其他细胞因子也是有用的诸如例如白介素尤其是 (例如IL-1-IL17), 干扰素 (例如 IFN $\alpha 1$ -IFN $\alpha 8$, IFN $\alpha 10$, IFN $\alpha 13$, IFN $\alpha 14$, IFN $\alpha 16$, IFN $\alpha 17$, IFN $\alpha 21$, IFN $\beta 1$, IFN ω , IFNE1和IFNK), 血细胞生成因子, TGFs (例如TGF- α , TGF- β , 和TGF家族的其他成员), 最终受体和它们配体的肿瘤坏死因子家族成员及共刺激分子, 其包含但不限于4-1BB, 4-1BB-L, CD137, CD137L, CTLA-4GITR, GITRL, Fas, Fas-L, TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, p75NGF-R, DR6, LT. beta. R, RANK, EDAR1, XEDAR, Fn114, Troy/Trade, TAJ, TNFRII, HVEM, CD27, CD30, CD40, 4-1BB, OX40, GITR, GITRL, TACI, BAFF-R, BCMA, RELT, 和 CD95 (Fas/APO-1), 糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白, TNF受体相关凋亡介导蛋白 (TRAMP) 和死亡受体-6 (DR6)。尤其是因为它们直接对T细胞存活和增殖施加影响, CD40/CD40L和OX40/OX40L为联合免疫治疗重要的靶标。综述见Lechner等. 2011: 用于实体瘤免疫治疗的趋化因子, 共刺激分子和融合蛋白。Immunotherapy 3 (11), 1317-1340。

[0422] 6. 细菌治疗

[0423] 研究者使用厌氧菌, 诸如诺维梭状芽胞杆菌用于消耗缺氧肿瘤的内部。然后当它们接触肿瘤的含氧侧时这些应该死亡, 意味着它们对机体其他部分无害。另一策略为使用已转化的厌氧菌, 其具有可以将无毒的前体药物转变为有毒的药物的酶。随着细菌在肿瘤的坏死区和缺氧区增殖, 酶在肿瘤中唯一地表达。因此, 全身应用的前体药物只有在肿瘤中新陈代谢为有毒的药物。这已被不致病的厌氧产芽胞梭状芽胞杆菌有效性所证明。

[0424] 7. 激酶抑制剂

[0425] 用于补充癌症治疗的潜在靶标的另一大组包含激酶抑制剂, 因为癌细胞的生长和存活与激酶活性的失调密切连锁。为恢复激酶活性和因此减少肿瘤生长, 使用范围广泛的抑制剂。靶向的激酶组包含受体酪氨酸激酶, 例如BCR-ABL, B-Raf, EGFR, HER-2/ErbB2, IGF-IR, PDGFR- α , PDGFR- β , c-Kit, Flt-4, Flt3, FGFR1, FGFR3, FGFR4, CSF1R, c-Met, RON, c-Ret, ALK, 胞质酪氨酸激酶, 例如c-SRC, c-YES, Abl, JAK-2, 丝氨酸/苏氨酸激酶, 例如ATM, Aurora A&B, CDKs, mTOR, PKCi, PLKs, b-Raf, S6K, STK11/LKB1和脂质激酶, 例如PI3K, SK1。

小分子激酶抑制剂为,例如PHA-739358,尼洛替尼,达沙替尼,和PD166326,NSC 743411,拉帕替尼(GW-572016),卡奈替尼(CI-1033),Semaxinib(SU5416),瓦他拉尼(PTK787/ZK222584),索坦(SU11248),索拉菲尼(BAY 43-9006)和来氟米特(SU101)。更多信息例如见Zhang等2009:小分子激酶抑制剂靶向癌症。Nature Reviews Cancer 9,28-39。

[0426] 8. Toll样受体

[0427] Toll样受体(TLR)家族成员为固有免疫和适应性免疫之间重要的环节并且许多佐剂的效应依赖于TLR的活化。大量已建立的抗癌疫苗合并TLR配体用于推进疫苗反应。除了TLR2之外,在癌症治疗的被动免疫治疗方法中检验TLR3,TLR4尤其是TLR7和TLR 8。通过影响免疫细胞,肿瘤细胞,和肿瘤微环境,密切相关的TLR7和TLR8 有助于抗肿瘤反应并且通过核苷类似物结构可被活化。所有TLR们都用作独立的免疫疗法或癌症疫苗佐剂并且可与本发明的配方和方法协同地组合。更多信息见van Duin等.2005:疫苗接种中触发TLR信号转导。Trends in Immunology,27(1):49-55。

[0428] 9. 血管生成抑制剂

[0429] 除了靶向于受到肿瘤介导的逃逸机制和免疫抑制影响的免疫调节受体之外,有靶向于肿瘤环境的治疗。血管生成抑制剂阻止肿瘤存活所需的血管的广泛性生长(血管生成)。例如通过靶向不同的分子可以阻断肿瘤细胞所促进从而满足它们日益增长的营养素和氧气的血管生成。可与本发明组合的介导血管生成分子或血管生成抑制剂的非限制性实例为可溶的VEGF(VEGF同种型VEGF121和VEGF165,受体 VEGFR1,VEGFR2和共受体神经纤毛蛋白-1和神经纤毛蛋白-2)1和 NRP-1,血管生成素2,TSP-1和TSP-2,血管抑制素和相关分子,内皮抑素,血管抑制因子,钙网蛋白,血小板因子-4,TIMP和CDAI, Meth-1和Meth-2, IFN- α , - β 和- γ , CXCL10, IL-4, -12和-18,凝血素(三环结构域-2),抗凝血酶III片段,催乳素,VEGI,SPARC,骨调素,丝氨酸蛋白酶抑制剂,血管能抑素,增殖素相关蛋白,网状内皮系统刺激素和药物像,例如贝伐单抗,伊曲康唑,羧胺三唑,TNP-470, CM101, IFN- α ,血小板因子-4,苏拉明,SU5416,血小板反应蛋白, VEGFR拮抗剂,抑制血管生成的类固醇+肝素,软骨来源的血管生成抑制因子,基质金属蛋白酶抑制剂,2-甲氧雌二醇,替可加兰,四硫钼酸盐,血小板反应蛋白,催乳素 α V β 3抑制剂,利诺安,他喹莫德。综述见Schoenfeld和Dranoff 2011:抗血管生成免疫疗法。Hum Vaccin. (9):976-81。

[0430] 10. 小分子靶向治疗药物

[0431] 小分子靶向治疗药物通常为癌细胞内突变的,过表达的,或不然就是关键蛋白上酶促结构域的抑制剂。突出的和非限制性实例为酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼(格列卫/基利克)和吉非替尼(易瑞沙)。以前的专利申请美国2009004213中也描述了小分子,例如苹果酸舒尼替尼和 /或甲苯磺酸索拉非尼靶向一些激酶与用于癌症治疗的疫苗联合使用。

[0432] 11. 基于病毒的疫苗

[0433] 有许多可用的或处于研发下的基于病毒的癌症疫苗,其可以与本发明的配方共同用于联合的治疗方法中。此类病毒载体使用的优势为它们启动免疫应答的固有能力和作为病毒感染结果发生的炎症反应生成免疫活化所需的危险信号。理想的病毒载体应是安全的并且不应引入抗载体免疫应答从而为推进抗肿瘤的特异应答留出余地。重组病毒诸如牛痘病毒,单纯性疱疹病毒,腺病毒,腺相关病毒,逆转录病毒和禽痘病毒已用在动物肿瘤模型中并且基于它们令人鼓舞的结果,已启动人体临床试验。尤其重要的基于病毒的疫苗为

病毒样颗粒 (VLP), 包含来自于病毒外层的某些蛋白的小颗粒。病毒样颗粒不包含任何病毒来源的遗传物质并且不能引起感染但是可以构建它们在它们的外壳呈递肿瘤抗原。VLP 可以衍生于各种病毒诸如, 例如乙型肝炎病毒或其他病毒家族, 包括细小病毒科 (例如腺相关病毒), 逆转录病毒科 (例如HIV), 和黄病毒科 (例如丙型肝炎病毒)。综述可见Sorensen和Thompson 2007: 癌症的基于病毒的免疫疗法: 我们知什么和我们该去哪儿? APMIS 115 (11): 1177-93; 抗癌的病毒样颗粒综述于 Buonaguro等2011: 基于病毒样颗粒疫苗用于感染性疾病和癌症的进展。Expert Rev Vaccines 10 (11): 1569-83; 和Guillén等. 2010: 病毒样颗粒作为疫苗抗原和佐剂: 应用于慢性疾病, 癌症免疫疗法和感染性疾病预防策略。Procedia in Vaccinology 2 (2), 128-133。

[0434] 12. 多表位策略

[0435] 多表位的使用显示了疫苗接种的有前途的结果。与智能算法系统组合的快速测序技术允许肿瘤mutanome的开发利用并且可为个体化疫苗提供可以与本发明组合的多表位。更多信息见2007: 具有多重主要组织相容性复合物I类肽装载的成熟的树突状细胞转移性结直肠癌患者疫苗接种。J Immunother 30: 762-772; 而且Castle等. 2012: 开发利用mutanome用于肿瘤疫苗接种。Cancer Res 72 (5): 1081-91。

[0436] 13. 过继性T细胞转移

[0437] 例如, 肿瘤抗原疫苗接种和T细胞转移的联合描述于: Rapoport 等. 2011: ASCT用于骨髓瘤后在hTERT和生存素的基础上使用过继的 T细胞转移和肿瘤抗原疫苗接种的联合免疫疗法。Blood 117 (3): 788-97。

[0438] 14. 基于肽的靶标疗法

[0439] 肽可以与细胞表面受体或肿瘤周围受到影响的细胞外基质结合。如果核素在细胞附近衰减, 附着于这些肽 (例如RGDs) 的放射性核素最后杀死癌细胞。尤其这些结合模序的寡聚体或多聚体是令人很感兴趣的, 因为这可以导致增强的肿瘤特异性和亲和力。非限制性实例见 Yamada 2011: 用于前列腺癌, 膀胱癌和恶性胶质瘤基于肽的癌症疫苗疗法。Nihon Rinsho 69 (9): 1657-61。

[0440] 15. 其他疗法

[0441] 有许多其他可以与本发明的配方和方法组合的癌症疗法以便产生协同效应。非限制性实例为靶向细胞凋亡治疗, 热疗, 激素疗法, 端粒酶疗法, 胰岛素增效疗法, 基因疗法和光动力疗法。

[0442] 通过下列的实施例进一步地说明本发明, 其不应解释为限制本发明的范围。

实施例

[0443] 实施例1: 靶向CLDN18.2和CD3的双特异性结合剂的产生和测试

[0444] a. 序列起源, 双-scFv构建体的设计, 和克隆到表达载体

[0445] 制备包含对人T细胞受体组分CD3和人肿瘤相关抗原 (TAA) 特异的结合结构域的双特异性串联单链抗体构建体 (双-scFv)。每一构建体相应的重链可变区 (V_H) 和相应的轻链可变区 (V_L) 从N末端到C末端特异地按以下顺序排列:

[0446] N-V_H^{CLDN18.2}-V_L^{CLDN18.2}-V_H^{CD3}-V_L^{CD3}-C (1BiMAB, 18PHU5, no. 11-15)

[0447] N-V_H^{CD3}-V_L^{CD3}-V_H^{CLDN18.2}-V_L^{CLDN18.2}-C (18PHU3, no. 16-20)

[0448] 表1总结了本发明过程中产生的所有对TAA CLDN18.2和PLAC1 特异的双-scFv构建体。通过使用相应抗体的V_H和V_L序列通过 GeneArt AG (GeneArt/Life Technologies GmbH, Regensburg, Germany) 基因合成产生双-scFv构建体。通过GeneArt的 GeneOptimizer®软件实施密码子优化诸如智人 (HS), 小家鼠 (MM), 或中国仓鼠卵巢 (CHO), 并且列于表1中。表2中总结了关于所有应用的结构域的特异性, 来自于单克隆抗体 (mAB) 的序列起源, 密码子使用, 额外的序列特征和参考文献的信息。各个CD3抗体的可变结构域序列起源列于表2中。由于人和小鼠TAA的高同源性, 可以使用相同的抗TAA V_H和V_L序列产生双-scFv构建体, 但是与小鼠特异性抗CD3抗体克隆145-2C11 的V_H, V_L序列组合用于小鼠测定。

[0449] 根据技术人员熟知的标准方法 (Green/Sambrook, 分子克隆, 2012) 进行DNA克隆和表达载体构建。简单地说, 向最初的双-scFv DNA序列提供5' HindIII和3' XhoI限制位点 (在双-scFv 1BiMAB的情况下 HindIII和XbaI) 用于克隆到表达质粒。在双-scFv序列的5' 末端上游处引入分泌信号序列用于蛋白从细胞质分泌到培养基中。插入编码15-18 个氨基酸柔性甘氨酸-丝氨酸肽接头的序列以连接V_H和V_L结构域用于单链可变抗体片段 (scFv) 的组合物, 其中一个单链可变抗体片段与CD3 结合并且另一个与TAA结合。为形成双特异性单链抗体, 通过编码短肽接头的序列 (GGGS) 连接两个scFv结构域序列。将BamHI限制位点与这种接头序列一起引入, 用于scFv结构域交换用于即将来临的双 -scFv构建体的克隆。彻底地, 通过HindIII和BamHI限制可以交换 5' scFv结构域和通过BamHI和XhoI限制可以交换 3' scFv-结构域。构建体图解也见于图1。

[0450] 将所有使用的双-scFv抗体构建体克隆到标准的哺乳动物表达载体pcDNA™3.1/myc-His(+) (Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany)。C末端的6× His-标签用于蛋白的金属亲和层析纯化和检测分析。经由MWG的单阅读序列服务 (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) 通过测序复核所有构建体。

[0451] 表1: TAA和CD3特异性双特异性单链抗体构建体的总结

内部名称	TAA	特异性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	密码子使用
1BiMAB	CLDN18.2	人	mCLDN18.2ab	TR66	HS
11 号	CLDN18.2	鼠	mCLDN18.2ab	145-2C11	CHO
12 号	CLDN18.2	人	mCLDN18.2ab	UCHT1-HU	CHO
[0452] 13 号	CLDN18.2	人	mCLDN18.2ab	UCHT1	CHO
14 号	CLDN18.2	人	mCLDN18.2ab	CLB-T3	CHO
15 号	CLDN18.2	人	mCLDN18.2ab	TR66	CHO
16 号	CLDN18.2	鼠	145-2C11	mCLDN18.2ab	CHO
17 号	CLDN18.2	人	UCHT1-HU	mCLDN18.2ab	CHO

	18 号	CLDN18.2 人	UCHT1	mCLDN18.2ab CHO
	19 号	CLDN18.2 人	CLB-T3	mCLDN18.2ab CHO
	20 号	CLDN18.2 人	TR66	mCLDN18.2ab CHO
	18PHU5	CLDN18.2 人	mCLDN18.2ab TR66	HS
[0453]	18PHU3	CLDN18.2 人	TR66	mCLDN18.2ab HS
	18PMU5	CLDN18.2 鼠	mCLDN18.2ab 145-2C11	MM
	18PMU3	CLDN18.2 鼠	145-2C11	mCLDN18.2ab MM
	对照双-scFv			

	35 号	PLAC1 人	78H11	TR66	CHO
[0454]	CHO, 中国仓鼠卵巢; HS, 智人; HU, 人源化; MM, 小家鼠				
[0455]	表2: 双-scFv构建体信息的总结				
[0456]					

CD3 结合部分			TAA 结合部分					
内 部 名 称	mAB 起源	物种反 应性	TAA	mAB 起源	物种反 应性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	短接头
1BiMAB	TR66	人	CLDN1 8.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	TR66	GGGGS
11 号	145-2C11	鼠	CLDN1 8.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	145-2C11	SGGGGS
12 号	UCHT1-H U	人	CLDN1 8.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	UCHT1-H U	SGGGGS
13 号	UCHT1	人	CLDN1 8.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	UCHT1	SGGGGS
14 号	CLB-T3	人	CLDN1 8.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	CLB-T3	SGGGGS
15 号	TR66	人	CLDN1 8.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	TR66	SGGGGS
16 号	145-2C11	鼠	CLDN1 8.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	145-2C11	mCLDN18.2ab	SGGGGS

[0457]

17 号	UCHT1-H U	人	CLDN1 8.2	mCLDN18. 2ab	人, 鼠	UCHT1-H U	mCLDN18. 2ab	SGGGGS
18 号	UCHT1	人	CLDN1 8.2	mCLDN18. 2ab	人, 鼠	UCHT1	mCLDN18. 2ab	SGGGGS
19 号	CLB-T3	人	CLDN1 8.2	mCLDN18. 2ab	人, 鼠	CLB-T3	mCLDN18. 2ab	SGGGGS
20 号	TR66	人	CLDN1 8.2	mCLDN18. 2ab	人, 鼠	TR66	mCLDN18. 2ab	SGGGGS
18PHU5	TR66	人	CLDN1 8.2	mCLDN18. 2ab	人, 鼠	mCLDN18 .2ab	TR66	SGGGGS
18PHU3	TR66	人	CLDN1 8.2	mCLDN18. 2ab	人, 鼠	TR66	mCLDN18. 2ab	SGGGGS
18PMU5	145-2C11	鼠	CLDN1 8.2	mCLDN18. 2ab	人, 鼠	mCLDN18 .2ab	145-2C11	SGGGGS
18PMU3	145-2C11	鼠	CLDN1 8.2	mCLDN18. 2ab	人, 鼠	145-2C11	mCLDN18. 2ab	SGGGGS
35 号	TR66	人	PLAC1 78H11	78H11	人, 鼠	78H11	TR66	SGGGGS

[0458] 表2续表

[0459]

内部名称	5'-长接头	3'-长接头	分泌信号	密码子 使用	抗 CD3 mAB 参考文 献
1BiMAB	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCIIILFL VATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
11 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCIIILFL VATATGVHS	CHO	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
12 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCIIILFL VATATGVHS	CHO	Shalaby <i>et al.</i> , J Exp Med 1992
13 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCIIILFL VATATGVHS	CHO	Beverley <i>et al.</i> , Eur J Immunol 1981

[0460]

14 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFL	CHO	Van Lier <i>et al.</i> , Immunology 1989
			VATATGVHS		
15 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFL	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
			VATATGVHS		
16 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVF	CHO	Leo <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci, 1987
			FVLTLKGIQG		
17 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFL	CHO	Shalaby <i>et al.</i> , J Exp Med 1992
			VATATGVHS		
18 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVF	CHO	Beverley <i>et al.</i> , Eur J Immunol 1981
			FVLTLKGIQG		
19 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNFGLSLIFL	CHO	Van Lier <i>et al.</i> , Immunology 1989
			ALILKGVQC		
20 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MEWSWIFLF	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
			LLSVTTGVHS		
18PHU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFL	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
			VATATGVHS		
18PHU3	VE(GGSGG S) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MGWSCILFL	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
			VATATGVHS		
18PMU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFL	MM	Leo <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci, 1987
			VATATGVHS		
18PMU3	VE(GGSGG S) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVF	MM	Leo <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci, 1987
			FVLTLKGIQG		
35 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWLWLL	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
			FLMAAAQSA QA		

[0461] CHO表示中国仓鼠卵巢;HS,智人;mAB,单克隆抗体;MM,小家鼠;TAA,肿瘤相关抗

原。

[0462] b. 稳定生产细胞系的生产

[0463] 为产生CLDN18.2特异性双-scFv蛋白的稳定的生产细胞克隆,使用人胚胎肾细胞系HEK293 (ATCC CRL-1573) 和中国仓鼠卵巢细胞系 CHO-K1 (ATCC CCL-61)。

[0464] HEK293转染

[0465] 转染前将 1×10^7 个HEK293细胞平板接种到14.5cm组织培养皿上 20ml完全的DMEM培养基 (DMEM/F-12GlutaMax添加10%热失活的 FBS和0.5%青霉素-链霉素;所有试剂来自于Gibco/Life Technologies GmbH,Darmstadt,Germany) 中。转染前,用添加2mM EDTA的DPBS 洗涤细胞,然后添加20ml没有FBS或抗生素的纯DMEM培养基。实施例1.a所述的20 μ g构建体的线性DNA稀释在0.5ml纯 DMEM/F-12培养基中。向稀释的DNA添加75 μ l 1mg/ml线性PEI溶液(聚乙烯亚胺;Polysciences Europe GmbH,Eppelheim,Germany)并且强力涡旋。在RT下孵育15分钟后,将DNA/PEI复合物逐滴添加到细胞,缓慢涡旋细胞培养皿然后在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂下孵育。转染后 24小时更换培养基。转染后48小时用最终浓度0.8mg/ml的G418硫酸盐(Gibco/Life Technologies GmbH,Darmstadt,Germany)开始转染细胞的选择。永久地添加G418到培养基用于细胞培养。

[0466] CHO-K1转染

[0467] 转染前1天将 1×10^6 个CHO-K1细胞平板接种在6孔组织培养板上2ml完全的DMEM培养基 (DMEM/F-12GlutaMax添加10%热失活的FBS,没有抗生素;所有试剂来自于Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt,Germany)。转染前,用添加了2mM EDTA的DPBS洗涤细胞,然后添加1.5ml没有FCS或抗生素的纯DMEM培养基。将实施例1.a所述的构建体的4 μ g线性DNA稀释在0.25ml纯DMEM/F-12 培养基并且轻微混合。在第二反应管中,将2.5 μ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen/Life Technologies GmbH,Darmstadt,Germany) 稀释在0.25 ml纯DMEM/F12培养基中,轻微混合并且在RT下孵育5分钟。DNA 混合物与Lipofectamine混合物以1:1比率组合,轻微混合并且在RT 下孵育20分钟。将DNA/Lipofectamine 2000复合物逐滴地添加到细胞,缓慢涡旋细胞培养皿然后在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂下孵育。转染后6小时,将培养基改变为完全的DMEM/F-12培养基。第二天以1:10比率分开细胞。转染后48小时用最终浓度0.5mg/ml的G418硫酸盐(Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt,Germany)开始转染细胞的选择。永久地添加G418到培养基用于细胞培养。

[0468] c. 作为生产细胞HEK293的选择

[0469] 根据标准方法(免疫学实验指南,2012)通过免疫荧光染色以检测双-scFv表达,来表征由实施例1.b所述的稳定转染的HEK293和 CHO-K1细胞系的双-scFv蛋白表达。简单地说, 2×10^5 个细胞生长在载玻片上24小时然后用2%PFA渗透。添加5%BSA和0.2%皂素的DPBS用作封闭缓冲液。DPBS洗涤和封闭缓冲液封闭后,在RT下细胞与在封闭缓冲液中以1:500稀释的一级抗体抗HIS表位-标签 (Dianova GmbH,Hamburg,Germany) 孵育30分钟。封闭缓冲液洗涤后,添加在封闭缓冲液中以1:500稀释的二级Cy3偶联的羊抗鼠IgG (H+L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch Europe,Suffolk,England) 并且在 RT下孵育3小时。封闭缓冲液和水洗涤后,将细胞包埋在添加了 Hoechst 33342染料(Pierce/Thermo Fisher Scientific,Rockford,IL,USA) 的DAKO封固培养基(Dako,Carpinteria,CA,USA) 中。研究玻片并且用Nikon-Eclipse Ti荧光显微镜拍照用于双-scFv阳性细胞存在(数据未显示)。

HEK293细胞显示比CHO-K1细胞总体更好的双-scFv蛋白的表达因此被选为生产细胞系。

[0470] d. HEK293克隆#28的双-scFv蛋白1BiMAB的产生和检测

[0471] 双-scFv 1BiMAB被选为待被产生、纯化的第一双-scFv蛋白,并且用于各种测定的建立。出于这一目的,通过使用FACS Aria细胞分选仪(BD Biosciences, Heidelberg, Germany)分选单个细胞以产生稳定表达1BiMAB的HEK293大量细胞的克隆细胞系(见实施例1.b)。扩增到接近40个克隆系后,通过如实施例1.c所述的免疫荧光选择最好的生产克隆。在10层细胞工厂(Nunc, Roskilde, Denmark)在添加10% FBS, 0.5%青霉素-链霉素和0.8mg/ml G418的DMEM/F-12 GlutaMax中根据制造商的指南扩增和培养选择的生产克隆#28(所有试剂来自于 Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany)。在汇合阶段,用DPBS洗涤细胞并且培养基变为添加抗生素但没有FBS的 DMEM/F-12培养基。每3-5天收获包含双-scFv蛋白1BiMAB的细胞上清液直到4周。用500ml瓶顶式过滤器单元(Merck Millipore, Billerica, MA, USA)过滤上清液并且储存在-4℃下直到FPLC纯化。

[0472] 在FPLC纯化前,通过按标准方法(蛋白科学实验指南,2012)进行的聚丙烯酰胺凝胶电泳随后考马斯染色和蛋白印迹分析测试双-scFv 在细胞培养上清液中的存在。通过离心过滤器装置-10K MWCO (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)根据制造商指南浓缩上清液5倍-10倍。在NuPAGE Novex 4-12%Bis-Tris凝胶(Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany)上分离浓缩的和非浓缩的上清液。随后,根据标准方法用考马斯亮蓝溶液染色凝胶以检测50-60kD 间的双-scFv蛋白1BiMAB和细胞培养上清液中所含的其他蛋白。进行蛋白印迹分析以经由双-scFv蛋白1BiMAB的6×His标签特异地检测双-scFv蛋白1BiMAB。简单地说,在PVDF膜上印迹蛋白和用PBST/3%奶粉封闭后,在4℃下,膜与在封闭缓冲液中以1:500稀释的一级抗体抗HIS表位-标签(Dianova GmbH, Hamburg, Germany)孵育1小时。在封闭缓冲液洗涤后,在4℃下,膜与在封闭缓冲液中以1:1000稀释的Fc特异的二级过氧化物酶-偶联的羊抗鼠IgG抗体(Sigma Aldrich, Germany)孵育1小时。在封闭缓冲液洗涤后,通过SuperSignal West Femto化学发光底物(Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)显现信号并且通过ImageQuant LAS 4000成像仪(GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany)记录。与内部分子量标准相比在50-60 kD之间检测到双-scFv的信号(见图3A和B)。

[0473] e. 双-scFv蛋白1BiMAB的纯化和定量

[0474] 使用标准方法(蛋白科学实验指南,2012)对包含双-scFv蛋白 1BiMAB的HEK293克隆#28(实施例1.d所述的)的细胞培养上清液进行固相金属亲和色谱(IMAC)。简单地说,过滤的细胞培养上清液加载到与ÄKTA 净化器10FPLC系统连接的His Trap FF 5ml柱(GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany)。PBS洗涤缓冲液包含10 mM咪唑,PBS洗脱缓冲液包含500mM NaCl,50mM NaH₂PO₄和250 mM咪唑,二者的pH调至7.4。通过分级梯度进行洗脱。使用 Slide-A-Lyzer G2透析盒10K MWCO(Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)即刻对洗脱的双-scFv蛋白1BiMAB相对1倍PBS 透析。相对1倍PBS透析后,双-scFv基于200mM精氨酸缓冲液(左旋精氨酸盐酸盐;Roth, Karlsruhe, Germany)相对于水透析。

[0475] 在考虑经由ProtParam工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)测定的双-scFv蛋白1BiMAB的消光系数和分子量后,通过NanoDrop 2000c 在280nm处的测量来测定

双-scFv浓度。将纯化的蛋白等分并且在 -80°C 长期储存或保持在 4°C 即刻使用。

[0476] 通过如实施例1.d所述的考马斯亮染色和蛋白印迹分析(也见于图 3A和B)测试双-scFv蛋白1BiMAB的质量和纯度。BSA标准稀释包括在考马斯方法中以粗略地确认通过NanoDrop测量的浓度(数据未显示)。

[0477] f.ELISA测定的建立

[0478] 为对HEK293细胞的细胞培养上清液中1BiMAB进行定量,必须建立特异性ELISA测定。出于这一目的,使用来自于实施例1.d的上清液和实施例1.e所述的纯化的双-scFv蛋白1BiMAB。BSA预封闭的 Ni-NTA平板(Thermo Fisher Scientific,Rockford,IL,USA)用于经由双-scFv蛋白1BiMAB的 $6\times\text{His}$ 标签来固定化双-scFv蛋白1BiMAB。所有洗涤步骤用 $200\mu\text{l}$ 1倍PBS/0.05%吐温(洗涤缓冲液)/孔进行3次并且所有步骤在室温下进行。作为标准,使用纯化的1BiMAB蛋白,在 $10\text{--}500\text{ng/ml}$ 范围内在1倍PBS中稀释。在1倍PBS中以1:10稀释上清液。将 $100\mu\text{l}$ 稀释的蛋白或上清液转移到每个孔,在振荡下孵育1小时。洗涤后,在1倍PBS/3%BSA中将针对mCLDN18.2ab的 $V_{\text{H}}\text{--}V_{\text{L}}$ 结构域的抗独特型抗体稀释到最终浓度 $0.5\mu\text{g/ml}$ 。每孔添加 $100\mu\text{l}$ 抗mCLDN18.2ab溶液并在振荡下孵育1小时。洗涤后,在1倍 PBS/3%BSA中将AP偶联的抗小鼠Fc抗体(Jackson ImmunoResearch Europe,Suffolk,England)稀释到最终浓度 300ng/ml 。每孔添加 $100\mu\text{l}$ 这种二级抗体溶液并在振荡下再孵育1小时。作为阴性对照,使用仅二级抗体、1BiMAB+二级抗体、和抗mCLDN18.2ab+二级抗体。另外,没有双-scFv蛋白的HEK293细胞上清液包括在测定中。最后,洗涤后每孔添加 $50\mu\text{l}$ AP底物溶液(1.5mg pNPP/ml 底物缓冲液,AppliChem GmbH,Darmstadt,Germany)。5分钟,15分钟和30分钟暗处孵育后,用M200Tecan酶标仪(Tecan, Männedorf, Switzerland)测量 492nm 激发波长的 405nm 处的吸收。通过针对标准组计算来测定来自于上清液的双-scFv蛋白的浓度(数据未显示)。

[0479] g.用于比较研究的CLDN18.2-特异性双-scFv蛋白的瞬时转染

[0480] 为瞬时产生优选高含量的CLDN18.2特异性双-scFv蛋白,使用人胚胎肾细胞系HEK293T(ATCC CRL-11268)用于转染。转染前两天将 1×10^7 个HEK293T细胞接种在 14.5cm 组织培养皿的 20ml 完全的 DMEM培养基(DMEM/F-12GlutaMax添加10%热失活的FBS和0.5%青霉素-链霉素;所有试剂来自于Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt,Germany)中。转染前,用添加了 2mM EDTA的DPBS洗涤细胞,然后添加 20ml 没有FBS或抗生素的纯DMEM培养基。在 0.5ml 纯DMEM/F-12培养基中稀释 $20\mu\text{g}$ 环状DNA构建体1BiMAB, 11-20号,和35号(实施例1.b所述的)。将 $75\mu\text{l}$ 1mg/ml 线性PEI溶液(聚乙烯亚胺;Polysciences Europe GmbH,Eppelheim,Germany)添加至稀释的DNA并且强力涡旋。在RT下孵育15分钟后,将DNA/PEI 复合物逐滴添加到细胞,轻微涡旋细胞培养皿然后在 37°C ,5% CO_2 下孵育24小时。在培养基更换为纯DMEM/F-12后,在 33°C ,5% CO_2 下再孵育细胞48小时。孵育后收获细胞上清液并且用 $0.2\mu\text{m}$ Minisart 注射器式滤器无菌过滤(Sigma-Aldrich,Germany)。随后,根据制造商的指南(Qiagen,Hilden,Gemany)通过Ni-NTA吸附柱小规模地从细胞培养上清液纯化双-scFv蛋白。通过如实施例1.f所述的ELISA估算双 -scFv蛋白浓度并且通过如实施例1.e所述的蛋白印迹分析复核(数据未显示)。纯化蛋白储存在 4°C 下供即时使用。

[0481] 实施例2:通过双-scFv蛋白介导的重定向的T细胞监测特异的T 细胞活化和靶细胞溶解的功能测定的建立

[0482] FPLC纯化的双-scFv蛋白1BiMAB用于建立监测双-scFv蛋白将人效应细胞特异地重定向到TAA阳性靶细胞的能力的体内测定。目标为显现效应和对人T细胞的活化和特异性靶细胞溶解进行定量。

[0483] a.通过双-scFv蛋白将T细胞重定向到靶细胞的显微分析

[0484] 为显现双-scFv蛋白功能,必须建立经由显微镜显示通过双-scFv 蛋白将效应细胞重定向到表达CLDN18.2的靶细胞的测定。出于这一目的,内源性表达相对高水平的人CLDN18.2的胃癌细胞系NugC4 (Sahin U等,Clin Cancer Res.2008Dec 1;14(23):7624-34) 用作靶细胞系。

[0485] 根据标准方法(免疫学实验指南2012),新近从健康捐赠者的人血液分离人效应细胞:简单地说,用DPBS稀释血液,在Ficoll-Paque Plus(GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany)上分层和离心。从中间相收集外周血单核细胞(PBMC),用添加了2mM EDTA的冷的 DPBS洗涤并计数。随后,根据制造商的指南通过Pan T细胞分离试剂盒II(Miltenyi Biotec, Teterow, Germany)从PBMC通过磁性活化细胞分离(MACS)分离人T细胞。

[0486] 将每孔 1×10^5 个NugC4细胞接种到组织培养6孔平板。如以上所述的制备人细胞并且以效应细胞与靶细胞(E:T)比率5:1添加。所有细胞使用添加了5%热失活的AB血清,0.5%青霉素-链霉素,1倍NEAA 和1mM丙酮酸钠的RPMI 1640培养基(Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany)并且最后每孔体积调为2ml/孔。对照样品包含靶细胞或具有或不具有双-scFv蛋白的单独的T细胞。随后在37°C,5%CO₂下孵育组织培养平板。用Wilovert S倒置显微镜(Hund, Wetzlar, Germany)从孵育的6小时-48小时连续地观察测定。在24小时处见到在靶细胞上T细胞簇集,免疫突触形成和双-scFv蛋白1BiMAB存在的情况下靶细胞杀伤方面的显著影响。48小时后,几乎找不到存活的靶细胞。用Nikon Eclipse TS100侧置显微镜(Nikon, Japan) 在24小时处拍照。也见于图5。

[0487] 这一测定还包括各种孔格式中所有细胞毒性测定能见度控制。

[0488] b.通过双-scFv蛋白1BiMAB的靶依赖的T细胞活化

[0489] 为检测通过双-scFv蛋白人T细胞的特异活化,建立流式细胞术测定。为检测T细胞活化,选择早期活化标记CD69和晚期活化标记CD25 用于通过荧光偶联的抗体染色。为检测靶细胞和T细胞混合物中人T 细胞,对T细胞上的CD3染色。

[0490] 选择来自以上创建的测定(实施例2.a)。简单地说,在2ml完全的培养基中以E:T比率5:1NugC4靶细胞接种人T细胞并且添加浓度范围在0.001-1000ng/ml的双-scFv蛋白1BiMAB。对照样品包含靶细胞或单独的具有或不具有双-scFv蛋白1BiMAB的T细胞。24小时和/ 或48小时后,取决于-能见度控制的结果-通过细胞刮轻微刮擦收获所有细胞(Sarstedt AG&Co, Nürmbrecht, Germany)并且转移到5ml圆底试管(BD Falcon, Heidelberg, Germany)。离心细胞和DPBS洗涤细胞。为细胞染色,使用鼠抗人CD3-FITC,鼠抗人CD69-APC,和鼠抗人CD25-PE(所有抗体为BD Biosciences, Heidelberg, Germany)。细胞团重悬浮在50μl包含荧光偶联的抗体的FACS缓冲液(添加了5% FBS的DPBS)中。在暗处4°C下孵育20分钟后,用4ml DPBS洗涤样品并且细胞团重悬浮在200μl包含碘化丙啶(PI)或7-AAD(二者都是Sigma Aldrich, Germany)的FACS缓冲液,最后1:1000稀释用于死细胞的检测。整个测量过程样品都保持在冰上和暗处。用FACSCalibu 进行测定的建立,用FACSCanto II流式细胞分析仪进行稍后的测量(二者都是BD Biosciences, Heidelberg, Germany)。通

过FlowJo软件评估分析(Tree Star, San Carlos, CA, USA)。

[0491] 如图6A和B中所示,在靶细胞不存在的情况没有检测到1BiMAB介导的T细胞活化,这强调了双-scFv功能的严格的靶依赖性。在靶细胞存在的情况下,24小时后仅0.01ng/ml 1BiMAB时就发生显著的T细胞活化。使用100ng/ml 1BiMAB达到最大效率。

[0492] 除了T细胞活化研究之外,这种测定也允许通过门控靶细胞群和估算PI-或7-AAD阳性靶细胞定性分析来分析双-scFv介导的对靶细胞杀伤的效应(数据未显示)。用FlowJo软件(Tree Star, San Carlos, CA, USA)进行所有分析。

[0493] c. 荧光素酶细胞毒性测定

[0494] 为确定抗CLDN18.2和CD3的双-scFv蛋白在杀伤靶细胞潜力方面的细微差异,必须研发高度敏感的测定。目标是,建立以高通量方式定量地监测靶细胞杀伤的测定。为实现这一目标,选择荧光素酶细胞毒性测定。因此通过有活力的靶细胞的荧光素酶表达的测量允许间接地确定在抗体存在的情况下细胞毒性效应细胞介导的靶细胞溶解。

[0495] 首先,用携带萤火虫荧光素酶,EGFP报告基因和抗生素筛选标记的慢病毒载体转导NugC4细胞(以上所述的)。在转导的细胞经抗生素筛选后,通过FACS Aria细胞分选仪(BD Biosciences, Heidelberg, Germany)分选高表达EGFP的细胞,分析用于高荧光素酶表达和随后扩增用于进一步的研究。

[0496] 如实施例2.a所述的制备人效应细胞。在1-100ng/ml范围的双-scFv蛋白1BiMAB进行测定的建立,借此发现浓度5ng/ml导致效率很高和可重复效应所以用作标准浓度。稳定表达荧光素酶的NugC4(以上所述的)被用作靶细胞。每孔接种 1×10^4 个靶细胞到平底96孔平板。以E:T比率5:1添加人T细胞(如实施例2.a所述的制备)。使用以上所述的培养基(实施例2.a)并且每孔最终体积调为100 μ l。至少一式三份地平板接种受试样品和对照样品。

[0497] 在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂下孵育细胞培养微孔板24小时和48小时。为用于分析,每孔添加50 μ l含有1mg/ml荧光素(BD Monolight, BD Biosciences, Heidelberg, Germany)的水溶液和50mM HEPES随后在37 $^{\circ}$ C下暗处孵育30分钟。在酶标仪(Infinite M200, Tecan, Männedorf, Switzerland)中测量通过表达荧光素酶的活细胞由荧光素氧化引起的发光。通过下列公式计算特异性细胞溶解的百分比:特异溶解% = $[1 - (\text{发光受试样品} - L_{\max}) / (L_{\min} - L_{\max})] \times 100$,其中“L”表示溶解。 $L_{\min}$ 指的是在双-scFv不存在的情况下最小的溶解和 $L_{\max}$ 指的是在双-scFv不存在的情况下通过Triton X-100添加(2%最终浓度)实现的最大的溶解(等于自发光计数)。

[0498] 通过没有人T细胞包括所有对照 $L_{\min}$ 和 $L_{\max}$ 诸如平板接种靶细胞确定不依赖于效应细胞的双-scFv蛋白对靶细胞的潜在直接影响。

[0499] 这种测定进一步用于研究特异性T细胞介导的靶细胞溶解。例如通过改变双-scFv浓度,双-scFv蛋白,E:T比率,或效应细胞(CD8+, CD4+T细胞,PBMC)进行修改。

[0500] 实施例3:CLDN18.2特异性双-scFv先导候选的选择

[0501] 各种CLDN18.2特异性双-scFv蛋白荧光素酶细胞毒性测定用于最强效的双-scFv变体的选择

[0502] 测试所有10个对TAA CLDN18.2特异的CHO-密码子优化的构建体(11-20号),与内源性表达CLDN18.2和异位表达荧光素酶的NugC4靶细胞荧光素酶细胞毒性测定中人密码子优化的双-scFv蛋白(也见于实施例2.c)比较。表2中详细说明了所用的双-scFv蛋白的特

征。对TAA PLAC1特异的双-scFv 35号用作同种型对照因为NugC4细胞不表达 PLAC1。FACS结合测定中已证明了与人T细胞上CD3的结合活性(数据未显示)。如实施例1.g所述的产生所有双-scFv蛋白并且如实施例 2.c创建的用于细胞毒性测定。

[0503] 使用最终浓度5ng/ml的所有双-scFv蛋白。为测定 L_{min} ,与靶细胞和T细胞9倍地接种对照双-scFv蛋白35号,6倍地平板接种受试样品。一平板的每个时间点准备用于分析。

[0504] 绘制在每一分析的时间点(8小时,16小时,24小时)的抗所用的双-scFv蛋白的特异溶解。双-scFv蛋白1BiMAB(SEQ ID NO:39)和15号(SEQ ID NO:41)-其以相同的方向构建并且包含相同的抗CD3序列(TR66),只在它们的密码子使用方面核酸水平上和接头序列方面不同-已证明在介导靶细胞溶解方面为最强效的抗体(见图2)。因为1BiMAB和15号在它们的效率方面是相等的,选择迄今为止更好研究的双-scFv蛋白1BiMAB用于所有下列测定。构建体18PHU3和18PHU5(见表1和2)在后来的时间点上与1BiMAB是可相比的。18PHU5的效率等价于1BiMAB,18PHU3不如1BiMAB强(数据未显示)。

[0505] 实施例4:双-scFv蛋白1BiMAB的结合能力

[0506] 基于FACS结合测定的建立

[0507] 为评估双-scFv蛋白的CLDN18.2和CD3靶向部分的结合能力,建立流式细胞术测定。内源性表达CLDN18.2的NugC4细胞用于研究抗CLDN18.2位点并且人T细胞用于研究抗CD3位点。

[0508] 为研究抗CLDN18.2结合能力,使NugC4细胞胰蛋白酶化,用完全的RPMI 1640培养基洗涤随后用DPBS洗涤。通过在4℃下以1200 rpm离心6分钟进行所有洗涤步骤。将 2.5×10^5 个NugC4细胞转移到5 ml圆底试管并且在4℃下与50μg/ml FPLC纯化的1BiMAB蛋白在FACS缓冲液中孵育30分钟。用2ml FACS缓冲液洗涤随后在4℃下与3.3μg/ml单克隆抗体抗HIS表位-标签(Dianova GmbH,Hamburg, Germany)孵育30分钟。用2ml FACS缓冲液洗涤后,在4℃下暗处细胞团与APC偶联的羊抗鼠二级抗体(Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk,England)以1:200稀释度在FACS缓冲液中孵育20分钟。用2ml FACS缓冲液洗涤细胞2次并且最后重悬浮在添加了1 μg/ml PI(Sigma Aldrich,Germany)的150μlFACS缓冲液中以复染色死细胞。相同方法的另一染色包括使用50μg/ml 1BiMAB和APC偶联的羊抗鼠二级抗体(1:200)但是没有抗-HIS表位-标签抗体。阴性对照样品包括单独的二级的羊抗鼠APC抗体,单克隆抗体抗HIS表位-标签+ 二级的羊抗鼠APC抗体。作为阳性对照,应用10μg/ml用二级的羊抗人APC抗体(Jackson ImmunoResearch Europe,Suffolk,England)染色的单克隆的CLDN18.2特异抗体mCLDN18.2ab和它的二级抗体只有对照。

[0509] 用FACSCalibur流式细胞分析仪(BD Biosciences,Heidelberg, Germany)测量样品和通过FlowJo软件(Tree Star,San Carlos,CA,USA)分析。通过用1BiMAB,抗HIS表位-标签和羊抗鼠APC相继的染色检测强烈的信号。信号强度与阳性对照羊抗人APC mCLDN18.2ab可相比的。在1BiMAB染色的样品和羊抗鼠APC没有抗HIS表位-标签染色样品中观察到羊抗鼠APC与1BiMAB低的直接结合(见图4A)。

[0510] 为所有进一步的FACS结合测定以研究双-scFv蛋白的结合能力,使用双-scFv,抗HIS表位-标签和羊抗鼠APC相继的染色方案(见图 4B,C,和D)。为排除1BiMAB的非特异结合,通过RT-PCR复核的不表达CLDN18.2的靶细胞(数据未显示)经受基于FACS的结合测定。如图4D中所示没有检测到1BiMAB的非特异结合。

[0511] 为研究双-scFv蛋白1BiMAB的抗CD3臂的结合能力,使用人T 细胞。将如实施例2.a所述制备的 1×10^6 个T细胞转移到5ml圆底试管并且在4℃下与浓度范围0.002-2 μ g/ml的FPLC纯化的1BiMAB蛋白在FACS缓冲液中孵育30分钟。进一步的染色方法如以上所述。对照样品包括单独的二级羊抗鼠APC抗体和单克隆抗体抗HIS表位-标签+二级羊抗鼠APC抗体。如以上所述的进行测量和分析。用2 μ g/ml 1BiMAB获得显著的信号(见图4C)。

[0512] 实施例5:通过双-scFv 1BiMAB高度特异的靶依赖的T细胞活化的研究

[0513] 选择内源性表达高水平或低水平的CLDN18.2的癌细胞系和不表达CLDN18.2的癌细胞系用以证明双-scFv蛋白1BiMAB在体外细胞毒性测定中严格的靶标依赖性。所选的细胞系为表达CLDN18.2的两种主要的癌症类型:胃癌(NugC4,MKN7,SNU-1)和胰腺癌(DanG,KP-4)。乳腺癌细胞系MCF7用作阴性对照。

[0514] a. 癌细胞系的CLDN18.2RT-PCR

[0515] 根据制造商的指南通过RNEasy Mini Kit方法(Quiagen,Hilden, Germany)从以上监测的癌细胞系提取总RNA。5 μ g RNA用于 SuperScript II逆转录酶(Life Technologies GmbH,Darmstadt,Germany) 的cDNA合成。

[0516] 在ABI Prism 7300实时PCR系统(Applied Biosystems/Life Technologies GmbH,Darmstadt,Germany)上运行RT-PCR分析,使用 Sybr绿染料和下列的引物:

[0517] CLDN18.2:正向TGGCTCTGTGTCGACACTGTG;反向 GTGTACATGTTAGCTGTGGAC

[0518] HPRT:正向TGACACTGGCAAAACAATGCA;反向 GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

[0519] 通过从CLDN18.2的Ct值减去管家基因HPRT的Ct值计算 δ Ct(结果见图7A)。

[0520] b. 在CLDN18.2存在的情况下专一的T细胞活化

[0521] 如实施例2.a所述的创建细胞毒性测定。经由定量RT-PCR如实施例5.a检验的CLDN18.2转录的癌细胞系用作靶细胞。在这一测定中双-scFv蛋白1BiMAB的浓度设为5ng/ml。一式三份地接种靶细胞在人T细胞和1BiMAB内用以分析T细胞活化。为监测任何潜在的T细胞独立于双-scF蛋白之外抗靶细胞的同种异体反应,没有1BiMAB地一式两份地接种靶细胞和T细胞。通过显微镜连续地观测细胞以观察 T细胞簇集和靶细胞结合。在CLDN18.2高表达的细胞系NugC4的情况下,24小时后发生显著的效应;48小时后几乎见不到有活力的靶细胞。在低CLDN18.2表达的细胞系DanG的情况下,96小时后见到第一效应并且在120小时后见到显著的效应。CLDN18.2阴性细胞系没有效应指示甚至在144小时后见不到任何T细胞活化。与靶细胞共孵育144小时后经由流式细胞术如实施例2.a所述的分析所有样品的T 细胞,早期T细胞活化标记CD69和晚期活化标记CD25,CD3复染色T细胞群和PI染色死细胞。有趣地,多达100%的与NugC4共孵育的T细胞为CD25阳性但是CD69阴性,指示当CD69下调已经发生时T细胞的长期活化。粗略地75%的与DanG和1BiMAB共孵育的T 细胞为活化的,其中大约40%同时表达CD25和CD69,指示仍在继续的T细胞活化。与CLDN18.2阴性细胞系共孵育的T细胞没有显示任何T细胞活化诱导的迹象:与没有1BiMAB的样品水平相比无论是 CD69还是CD25表达都没有显著地升高(也见于图7B)。

[0522] 实施例6:双-scFv蛋白1BiMAB诱导T细胞活化的研究

[0523] a. T细胞增殖的诱导

[0524] T细胞增殖是T细胞活化的指标。为显示在CLDN18.2阳性靶细胞存在的情况下响应双-scFv蛋白1BiMAB的T细胞增殖,使用流式细胞术。简单地说,用溶解于DPBS中的0.5 μ M羧

基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (CellTrace CFSE, Invitrogen/Life Technologies GmbH, Germany) 将 1×10^6 个如实施例 2.a 所述的分离的人 T 细胞在 37°C 下暗处染色 10 分钟。通过添加 5 体积的冷的完全的 RPMI 1640 培养基停止染色。细胞保持在冰上 5 分钟并且用完全的 RPMI 培养基 (添加 5% 热失活的 AB 血清, 0.5% 青霉素-链霉素, 1 倍 NEAA 和 1mM 丙酮酸钠) 洗涤 3 次随后重悬浮为 1×10^5 个细胞/ml。创建如实施例 2.b 所述的细胞毒性测定, 内源性表达 CLDN18.2 的 NugC4 细胞和人 T 细胞作为效应细胞。添加 50U IL-2/ml 培养基至细胞。样品包括单独的 T 细胞, T 细胞与 1ng/ml 1BiMAB, T 细胞和 NugC4 细胞, T 细胞与 1ng/ml 1BiMAB 和 NugC4 细胞。共孵育 120 小时后, 收获 T 细胞, 收集在 5 ml 圆底试管中, 洗涤和在 4°C 下用 1:10007-AAD DPBS 溶液染色 15 分钟从而复染色死细胞。DPBS 洗涤后, 细胞重悬浮在 FACS 缓冲液中并且用 FACSCanto II (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) 分析。

[0525] 只有在靶细胞和双-scFv 蛋白 1BiMAB 存在的情况下通过渐减的 CFSE 信号检测到 T 细胞的增殖 (也见于图 8A)。

[0526] b. 丝氨酸蛋白酶粒酶 B 的诱导

[0527] 为证明在 CLDN18.2 阳性靶细胞存在的情况下通过双-scFv 蛋白 1BiMAB 介导的 T 细胞活化后蛋白水解分子的上调, 选择经由流式细胞术分析检测丝氨酸蛋白酶粒酶 B。如实施例 2.b 所述的创建细胞毒性测定, 内源性表达 CLDN18.2 的 NugC4 细胞和人 T 细胞作为效应细胞。样品包括单独的 T 细胞, T 细胞与 5ng/ml 1BiMAB, T 细胞与 NugC4 细胞, T 细胞与 5ng/ml 1BiMAB 和 NugC4 细胞。共孵育 96 小时后, 收获 T 细胞, 收集在 5ml 圆底试管中, 洗涤并且在 4°C 下用 1:1000 7-AAD DPBS 溶液染色 15 分钟从而复染色死细胞。在 RT 下用 100 μl Cytoperm/Cytofix 溶液固定细胞 20 分钟。用 1 倍 Perm/Wash 洗涤细胞随后在 RT 下用 PE 偶联的鼠抗人粒酶 B 抗体染色 20 分钟。洗涤后, 细胞重悬浮在 FACS 缓冲液中并且用 FACSCanto II (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) 分析。

[0528] 只有在靶细胞和双-scFv 蛋白 1BiMAB 存在的情况下检测到 T 细胞中粒酶 B 上调 (也见于图 8B)。

[0529] 实施例 7: 体外细胞毒性测定中双-scFv 蛋白 1BiMAB 的 EC50 的确定

[0530] 荧光素酶细胞毒性测定

[0531] 为确定双-scFv 蛋白 1BiMAB 的半最大有效剂量, 在主要如实施例 2.c 所述的体外荧光素酶细胞毒性测定中测试 1BiMAB 的滴定行。

[0532] 如实施例 2.c 所述的稳定表达荧光素酶的 NugC4 细胞与人 T 细胞和浓度范围为 1pg/ml-1 μg /ml 双-scFv 蛋白 1BiMAB (10 倍步骤) 或没有 1BiMAB 孵育以确定 $L_{\min}$ 值。测定创建后 24 小时和 48 小时用 Infinite M200 Tecan 酶标仪测量活细胞的发光。通过实施例 2.c 示例的公式计算特异性靶细胞溶解。

[0533] 1-10ng/ml 1BiMAB 在 48 小时后达到最大溶解。在这一测定中 48 小时后确定的 EC50 为大约 10pg/ml (也见于图 9)。这一测定的结果明显取决于随着如其他人也报导的 (例如 Lutterbuese, R 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010 Jul 13; 107 (28): 12605-10) 接受者的免疫状态变化的人 T 细胞的效价。另外, 所用的靶细胞系 NugC4 显示 CLDN18.2 不同的表达也影响结果。因此, 本发明过程中已观察到 10-300pg/ml 范围内的双-scFv 蛋白 1BiMAB 的 EC50 值。

[0534] 实施例 8: 小鼠移植瘤模型中的效力

[0535] 为研究双-scFv蛋白1BiMAB的体内治疗潜力,选择小鼠株 NOD.Cg-Prkd^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ或短的NSG (Jackson laboratory, Bar Harbour, ME, USA)。对于描述的研究,小鼠中人效应细胞和人T淋巴细胞对研究体内T细胞占据双-scFv的效应是必需的。因为完全缺少 B-细胞, T-细胞和NK细胞,小鼠株NSG适合这种异种移植研究。在 PBMC注射后主要移植人T细胞的小鼠模型确立为本发明的一部分。

[0536] a. 用双-scFv蛋白1BiMAB对小鼠中晚期高度表达CLDN18.2的肿瘤的迟发处理

[0537] 在示例性研究中,40只8周龄的雌性NSG小鼠皮下地接种 1×10^7 个稳定表达高水平CLDN18.2的HEK293细胞(HEK293-CLDN18.2)。肿瘤细胞接种后5天根据它们的肿瘤体积将小鼠分成处理组,排除没有肿瘤生长的小鼠。在同一天通过如实施例2.a所述的Ficoll密度梯度技术从健康捐献者的人体血液分离外周血单核细胞(PBMC)并且用作体内效应细胞。在分离那天腹腔内注射稀释在300 μ l DPBS中的 2×10^7 个PBMC到实验处理组指定为“PBMC”。“PBS”指定的处理组代替腹腔内接受300 μ l纯DPBS和用作没有人效应细胞的对照。“PBS”对照组,可以检验通过1BiMAB自身对肿瘤生长的潜在影响的研究或由 1BiMAB或载体和不是通过人效应细胞抗小鼠组织(即通过人效应细胞抗鼠组织施加的移植物抗宿主反应)引起的任何潜在的副作用。组“PBS/载体”包含4只小鼠(n=4),“PBS/1BiMAB”包含5只小鼠(n=5),“PBMC/载体”包含13只小鼠(n=13)和“PBMC/1BiMAB”包含15只小鼠(n=15)。在DPBS或PBMC应用后1天开始治疗:组“PBS/1BiMAB”和“PBMC/1BiMAB”腹腔内地接受200 μ l DPBS中稀释的5 μ g纯化的双-scFv蛋白1BiMAB/动物。组“PBS/载体”和“PBMC/载体”腹腔内地接受DPBS中稀释的200 μ l载体缓冲液(溶解于水中的200mM L-精氨酸-盐酸盐,无菌过滤的)。表3中总结了处理组。每天进行治疗,持续 22天。用数码的校准卡尺每周两次测量肿瘤大小并且根据公式 $\text{mm}^3 = \text{长} \times \text{宽} \times (\text{宽}/2)$ 计算肿瘤体积。图10A和B示例了“PBMC/1BiMAB”组一半的小鼠只有在人效应细胞存在的情况下通过抗体抑制肿瘤生长和消除肿瘤负荷。当肿瘤体积超过500 mm^3 时或在危重症(在一些小鼠中观察到移植物抗宿主的症状)的情况下通过颈椎脱臼法处死小鼠。

[0538] 表3:处理组

[0539]

处理组(G)	小鼠数(n)	效应细胞	双-scFv 蛋白	μ g 双-scFv 蛋白/小鼠
G1	4	-	-	-
G2	5	-	1BiMAB	5
G3	13	PBMC	-	-
G4	15	PBMC	1BiMAB	5

[0540] b. 治疗对体重影响的测定

[0541] 使用实验室天平每周两次检验每一小鼠的体重。任何组中没有小鼠显示随着治疗时间体重减轻(数据未显示)。“PBMC”组中一些小鼠显示PBMC注射后4周和治疗结束后几天移植物抗宿主反应的症状。没有观察到1BiMAB它自身对体重对影响或任何其他关于小鼠健康副作用。

[0542] c. 组织保存和脾细胞分离

[0543] 杀死小鼠后,切开肿瘤并且将组织立即固定在10ml Roti-Histofix 4% (Carl

Roth, Karlsruhe, Germany) 中用于免疫组化分析。而且, 切开脾脏通过流式细胞术分析以检测人细胞的移植。脾脏切开后通过将捣碎脾脏通过70 μ m细胞过滤网置于50ml具有3-5ml注射器的无菌活塞的反应管和重复用温暖的DPBS重复冲洗细胞过滤网, 立即进行脾细胞分离。离心分离的脾细胞, 将DPBS轻轻倒出并将脾细胞团重悬浮在1ml添加10% DMSO的热失活的胎牛血清。立即将样品冷冻在-80 $^{\circ}$ C下并且储存直到来自于所有小鼠的脾细胞样品为完整的。

[0544] d. 人T淋巴细胞在小鼠脾脏中移植的分析

[0545] 如实施例8.c所述的收集和冷冻来自于所有小鼠的脾细胞。一次解冻脾细胞样品的完整收集, 所有细胞用温暖的DPBS洗涤两次并且在4 $^{\circ}$ C下暗处孵育 1×10^6 个脾细胞/样品和荧光偶联的抗体20分钟以通过抗CD45染色检测人细胞的移植和通过抗CD3, 抗CD4和抗CD8 染色检测人T细胞的百分比。用FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) 进行流式细胞术分析。可以通过如图10D所示的高百分比的CD45-CD双阳性脾细胞确认“PBMC”组中人T细胞移植。

[0546] 实施例9: 靶向CLDN6和CD3的双特异性结合剂的产生和测试

[0547] a. 序列来源, 双-scFv构建体的设计, 和克隆到表达载体

[0548] 双特异性串联单链抗体构建体(双-scFv) 包含对人T细胞受体组分 CD3和人肿瘤相关抗原(TAA) 特异的结合结构域。每一构建体相应的重链可变区(V_H) 和相应的轻链可变区(V_L) 从N末端到C末端特异地排列连续顺序:

[0549] $N-V_H^{CLDN6}-V_L^{CLDN6}-V_H^{CD3}-V_L^{CD3}-C$ (6PHU5; SEQ ID NO: 43)

[0550] $N-V_H^{CD3}-V_L^{CD3}-V_H^{CLDN6}-V_L^{CLDN6}-C$ (6PHU3; SEQ ID NO: 45)

[0551] 表4总结了所有本发明过程中产生的对TAA CLDN6特异的双-scFv构建体。CLDN18.2特异性双-scFv构建体1BiMAB用作对照抗体。使用相应抗体的 V_H 和 V_L 序列通过GeneArt AG (GeneArt/Life Technologies GmbH, Regensburg, Germany) 基因合成产生双-scFv构建体。通过GeneArt's **GeneOptimizer**[®] 软件实施密码子优化诸如智人 (HS) 或小鼠 (MM) 并且列于表5中。表5中总结了所有应用的结构域关于特异性, 来自于单克隆抗体 (mAb) 的序列起源, 密码子使用, 额外的序列特性, 和参考文献的信息。各个CD3抗体的可变结构域序列来源列于表5中。由于人和小鼠TAA的高同源性, 相同的抗TAA V_H 和 V_L 序列用作小鼠测定的双-scFv构建体的产生, 但是与小鼠特异性抗CD3抗体克隆145-2C11的 V_H , V_L 序列组合。

[0552] 根据技术人员熟知的标准方法 (Sambrook, 1989) 进行DNA克隆和表达载体构建。简单地说, 提供给双-scFv DNA序列5' HindIII和3' BamHI限制位点用于克隆到表达质粒。在双-scFv序列的5'末端上游引入分泌信号序列用于蛋白从细胞质分泌到培养基。插入为15-18个氨基酸柔性甘氨酸-丝氨酸肽接头编码的序列以结合 V_H 和 V_L 结构域用于单链可变抗体片段(scFv) 的组合物, 其中一个与CD3结合并且另一个与TAA结合。为形成双特异性单链抗体, 通过为短肽接头编码的序列 (GGGGS) 连接两个scFv结构域序列。与这种接头序列一起, 将BamHI 限制位点引入用于scFv结构域交换和即将来临的双-scFv构建体的克隆。彻底地, 通过HindIII和BamHI限制可以交换5' scFv结构域和通过BamHI和XhoI限制可以交换3' scFv-结构域。

[0553] 所有使用的双-scFv抗体构建体克隆到标准的哺乳动物表达载体 pcDNATM3.1/

myc-His(+) (Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany)。C末端的6×His-标签用作蛋白的金属亲和层析纯化和检测分析。经由MWG的单阅读序列服务通过测序复核所有构建体(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)。构建体图解也见于图11。

[0554] 表4:TAA和CD3特异性双特异性单链抗体构建体的总结

[0555]

内部名称	TAA	特异性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	密码子使用
1BiMAB	CLDN18.2	人	mCLDN18.2ab	TR66	HS
6PHU5	CLDN6	人	mCLDN6ab	TR66	HS
6PHU3	CLDN6	人	TR66	mCLDN6ab	HS
6PMU5	CLDN6	鼠	mCLDN6ab	145-2C11	MM
6PMU3	CLDN6	鼠	145-2C11	mCLDN6ab	MM

[0556] HS, 智人; MM, 小家鼠; TAA, 肿瘤相关抗原

[0557] 表5: 双-scFv构建体信息的总结

[0558]

CD3 结合部分			TAA 结合部分					
内部名称	mAB 起源	物种反 应性	TAA	mAB 起源	物种反 应性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	短的接头
1BiMAB	TR66	人	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	TR66	GGGGS
6PHU5	TR66	人	CLDN6	mCLDN6ab	人, 鼠	mCLDN6ab	TR66	SGGGGS
6PHU3	TR66	人	CLDN6	mCLDN6ab	人, 鼠	TR66	mCLDN6ab	SGGGGS
6PMU5	145-2C11	鼠	CLDN6	mCLDN6ab	人, 鼠	mCLDN6ab	145-2C11	SGGGGS
6PMU3	145-2C11	鼠	CLDN6	mCLDN6ab	人, 鼠	145-2C11	mCLDN6ab	SGGGGS

[0559] 表5续表

[0560]

内部名称	5'长的接头	3'长的接头	分泌信号	密 码 子	抗 CD3 mAB
				使用	参考文献
1BiMAB	(GGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂	MGWSCILFLVA	HS	Lanzavecchia &
		GGVD	TATGVHS		Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6PHU5	(GGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂	MGWSCILFLVA	HS	Lanzavecchia &
		GGVD	TATGVHS		Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6PHU3	VE(GGSGGS) ₂	(GGGS) ₃	MGWSCILFLVA	HS	Lanzavecchia &
	GGVD		TATGVHS		Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6PMU5	(GGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂	MGWSCILFLVA	MM	Leo <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci, 1987
		GGVD	TATGVHS		
6PMU3	VE(GGSGGS) ₂	(GGGS) ₃	MNSGLQLVFFV	MM	Leo <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci, 1987
	GGVD		LTLKGIQG		

[0561] HS, 智人; mAB, 单克隆抗体; MM, 小家鼠; TAA, 肿瘤相关抗原。

[0562] b. 稳定生产细胞系的产生

[0563] 为产生CLDN6特异性双-scFv蛋白的稳定的生产细胞克隆, 使用人胚胎肾细胞系HEK293 (ATCC CRL-1573)。

[0564] 转染前两天将 1×10^7 个HEK293细胞平板接种到14.5cm组织培养皿上20ml完全的DMEM培养基中(DMEM/F-12GlutaMax添加10%热失活的FBS和0.5%青霉素-链霉素;所有试剂来自于Gibco/Life Technologies GmbH,Darmstadt,Germany)。转染前,用添加2mM EDTA的DPBS洗涤细胞,然后添加20ml没有FBS或抗生素的纯DMEM培养基。20μg构建体pcDNA3.1/6PHU5和pcDNA3.1/6PHU3(如实施例 9.a所述的)的线性DNA稀释在0.5ml纯DMEM/F-12培养基中。添加 75μl 1mg/ml线性PEI溶液(聚乙烯亚胺;Polysciences Europe GmbH,Eppelheim,Germany)到稀释的DNA并且强力涡旋。在RT下孵育15 分钟后,逐滴地添加DNA/PEI复合物到细胞,缓慢涡旋细胞培养皿然后在37℃,5%CO₂下孵育。转染后24小时更换培养基。转染后48 小时用最终浓度0.8mg/ml的G418硫酸盐(Gibco/Life Technologies GmbH,Darmstadt,Germany)开始转染细胞的选择。永久地添加G418 到培养基用于细胞培养。

[0565] c. 用多克隆的HEK293细胞小规模产生双-scFv蛋白6PHU5和 6PHU3

[0566] 从多克隆的HEK293细胞上清液小规模产生和纯化双-scFv蛋白 6PHU5和6PHU3用于体外比较。

[0567] 简单地说,在汇合状态,从实施例9.b所述的多克隆的细胞系收获没有FBS的上清

液并且用0.2 μ m Minisart注射器式滤器过滤 (Sigma-Aldrich, Germany)。随后,根据制造商的指南通过Ni-NTA吸附柱 (Qiagen, Hilden, Germany) 从细胞培养上清液小规模地纯化双-scFv蛋白。在考虑经由ProtParam工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 测定的双-scFv蛋白1BiMAB的消光系数和分子量中,通过NanoDrop 2000c在280nm处测定双-scFv蛋白浓度。纯化蛋白储存在4℃供即刻使用。

[0568] 通过按标准(蛋白科学实验指南,2012)进行的聚丙烯酰胺凝胶电泳随后考马斯染色和蛋白印迹分析测试双-scFv蛋白。在NuPAGE Novex 4-12%Bis-Tris凝胶 (Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) 上分离小规模纯化的蛋白。随后,根据标准方法用考马斯亮蓝染色凝胶以检测双-scFv蛋白6PHU5, 6PHU3和细胞培养上清液中所含的其他蛋白。进行蛋白印迹分析以经由它们的6 $\times$ His 标签特异地检测双-scFv蛋白6PHU5和6PHU3。简单地说,在PVDF膜上印迹蛋白和用PBST/3%奶粉封闭后,在4℃下在封闭缓冲液中以1:500稀释的膜与一级抗体抗His表位-标签 (Dianova GmbH, Hamburg, Germany) 孵育1小时。在封闭缓冲液洗涤后,在4℃下在封闭缓冲液中以1:1000稀释的膜与Fc特异的二级过氧化物酶-偶联的羊抗鼠IgG 抗体 (Sigma Aldrich, Germany) 孵育1小时。在封闭缓冲液洗涤后,通过SuperSignal West Femto化学发光底物 (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) 显现信号并且通过ImageQuant LAS 4000 成像仪 (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany) 记录。与内部分子量标准相比在50-60kD之间检测到双-scFv蛋白的信号。

[0569] d. 用多克隆的HEK293细胞大规模产生双-scFv蛋白6PHU3

[0570] 在10层细胞工厂 (Nunc, Roskilde, Denmark) 添加10%FBS, 0.5%青霉素-链霉素和0.8mg/ml G418的DMEM/F-12GlutaMax中根据制造商的指南培养多克隆的生产细胞系(所有试剂来自于Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany)。在汇合阶段,用DPBS洗涤细胞并且培养基变为添加抗生素但没有FBS的DMEM/F-12培养基。每3-5天收获包含双-scFv蛋白6PHU3的细胞上清液直到3周。用500ml瓶顶式过滤器元件 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) 过滤上清液并且储存在-4℃下直到FPLC纯化。

[0571] 在FPLC纯化前,通过如实施例9.c所述的按标准方法(蛋白科学实验指南,2012)进行的聚丙烯酰胺凝胶电泳随后考马斯染色和蛋白印迹分析测试双-scFv在细胞培养上清液中的存在。

[0572] e. 双-scFv蛋白6PHU3的纯化和定量

[0573] 使用标准方法(蛋白科学实验指南,2012)对包含双-scFv蛋白 6PHU3的多克隆的HEK293细胞(实施例9.b所述的)的细胞培养上清液进行固相金属亲和色谱(IMAC)。简单地说,细胞培养上清液加载到与ÄKTA 净化器10FPLC系统连接的His Trap FF 5ml柱 (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany)。包含10mM咪唑的PBS 洗涤缓冲液,包含500mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄和250mM咪唑的PBS洗脱缓冲液,二者缓冲液的pH调至7.4。通过分级梯度进行洗脱。使用Slide-A-Lyzer G2透析盒10K MWC0 (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) 即刻对洗脱的双-scFv蛋白6PHU3相对1倍PBS透析。抗PBS透析后,基于水透析双-scFv抗200mM精氨酸缓冲液(左旋精氨酸盐酸盐;Roth, Karlsruhe, Germany)。

[0574] 在考虑经由ProtParam工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 测定的双-

scFv蛋白1BiMAB的消光系数和分子量中,通过NanoDrop 2000c 在280nm处测定双-scFv浓度。纯化蛋白为等份的并且在-80℃长期储存或保持在4℃即刻使用。

[0575] 通过如实施例9.c所述的考马斯亮蓝染色和蛋白印迹分析测试双-scFv蛋白6PHU3的质量和纯度。BSA标准稀释以粗略地确认通过 NanoDrop测量的浓度包括在考马斯方法中(数据未显示)。

[0576] 实施例10:靶向CLDN6的双-scFv候选6PHU5和6PHU3的效率

[0577] a.通过双-scFv蛋白6PHU5和6PHU3的T细胞重定向到靶细胞的显微镜分析

[0578] 为经由显微镜分析通过双-scFv蛋白显现效应细胞重定向到表达 CLDN6的靶细胞,进行体外细胞毒性测定。NiNTA柱纯化的双-scFv 蛋白6PHU3和6PHU5(见于实施例9.c)用于根据它们的效率比较这两个变体。内源性表达高水平的人CLDN6的卵巢畸胎癌细胞系PA-1用作靶细胞系。

[0579] 根据标准方法(蛋白科学实验指南2012)新近从健康捐赠者人体血液分离人效应细胞:简单地说,用DPBS稀释血液,在Ficoll-Paque Plus(GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany)上分层和离心。从中间相收集外周血单核细胞(PBMC),用添加了2mM EDTA的冷的 DPBS洗涤和计数。随后,根据制造商的指南通过全T细胞分离试剂盒II(Miltenyi Biotec, Teterow, Germany)从PBMC通过磁性活化细胞分离(MACS)分离人T细胞。

[0580] 将每孔 1×10^5 个PA-1细胞接种到组织培养6孔平板。如以上所述的制备人细胞并且以效应细胞与靶细胞(E:T)比率5:1添加。所有细胞使用添加了10%热失活的FBS, 0.5%青霉素-链霉素, 1倍NEAA, 1mM 碳酸氢钠和1mM丙酮酸钠的MEM培养基(Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany)并且最后每孔体积调为2ml/孔。在这一测定中所用的双-scFv蛋白浓度为50ng/ml。对照样品包含靶细胞或单独的不具有双-scFv蛋白的T细胞。随后在37℃, 5%CO₂下孵育组织培养平板。用Wilovert S倒置显微镜(Hund, Wetzlar, Germany)从共孵育的6小时-24小时连续地观察测定。在24小时处见到在靶细胞上T 细胞簇集,免疫突触形成和双-scFv蛋白6PHU5和6PHU3存在的情况下靶细胞杀伤方面的显著影响和用Nikon Eclipse TS100侧置显微镜(Nikon, Japan)拍照。双-scFv蛋白都导致如图12所示的强烈的T细胞簇集和靶细胞杀伤。

[0581] b.双-scFv蛋白6PHU5和6PHU3介导的T细胞活化

[0582] 为检测T细胞活化和确定两种CLDN6特异性双-scFv变体的效率差异,使用基于FACS的T细胞活化测定。选择早期活化标记CD69 和晚期活化标记CD25用于通过荧光偶联的抗体染色。为检测靶细胞和T细胞混合物中人T细胞,对T细胞上的CD3染色。

[0583] 通常,选择来自以上创建的测定(实施例10.a)。简单地说,在2ml 完全的培养基中以E:T比率5:1人T细胞接种内源性表达CLDN6的 PA-1靶细胞并且添加浓度范围在5-200ng/ml的双-scFv蛋白6PHU5 或6PHU3。对照样品包含靶细胞或单独的具有或不具有双-scFv蛋白的T细胞。24小时和/或48小时后,通过冲洗收获T细胞并且转移到 5ml圆底试管(BD Falcon, Heidelberg, Germany)。离心细胞和用DPBS 洗涤细胞。为细胞染色,使用鼠抗人CD3-FITC,鼠抗人CD69-APC,和鼠抗人CD25-PE(所有抗体为BD Biosciences, Heidelberg, Germany)。细胞团重悬浮在50μl包含荧光偶联的抗体和2μl 7-AAD (BD Biosciences, Heidelberg, Germany)的FACS缓冲液(添加了5%FBS 的DPBS)中。在暗处4℃下孵育20分钟后,用4ml DPBS洗涤样品并且细胞团重悬浮在200μlFACS缓冲液中。整个用FACSCanto II流

式细胞分析仪(二者都是BD Biosciences,Heidelberg,Germany)进行测量过程,样品都保持在冰上和暗处。通过FlowJo软件评估分析(Tree Star, San Carlos, CA, USA)。

[0584] CDLN6特异性双-scFv变体导致达到60%的有效的T细胞活化。低浓度范围5-10ng/ml的变体6PHU3(双-scFv CD3×CLDN6)(也见于图13)更强有力并且因此选择其用于进一步的研究。

[0585] 实施例11:双-scFv 6PHU3的结合能力

[0586] FACS结合测定

[0587] 为评估双-scFv蛋白6PHU3的CLDN6-和CD3靶向部分的结合能力,使用流式细胞术分析。内源性表达CLDN6的PA-1和0V-90细胞用于研究抗CLDN6位点并且人T细胞用于研究抗CD3位点。CLDN6 阴性的NugC4细胞用作对照细胞。

[0588] 为研究抗CLDN6结合能力,使CLDN6阳性细胞(PA-1, 0V-90) 和CLDN6阴性细胞(NugC4)胰蛋白酶化,用完全的培养基洗涤随后用 DPBS洗涤。通过在4℃下以1200rpm离心6分钟进行所有洗涤步骤。将 1×10^5 个细胞转移到5ml圆底试管并且在4℃下与0.01-10μg/ml FPLC纯化的6PHU3蛋白或对照双-scFv蛋白1BiMAB在FACS缓冲液中孵育30分钟。用2ml FACS缓冲液洗涤随后在4℃下与3.3μg/ml 单克隆抗体抗HIS表位-标签(Dianova GmbH, Hamburg, Germany)孵育30分钟。用2ml FACS缓冲液洗涤后,在4℃下暗处细胞团与APC 偶联的羊抗鼠二级抗体(Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, England)以1:200稀释度在FACS缓冲液中孵育20分钟。用2ml FACS 缓冲液洗涤细胞2次并且最后重悬浮在添加了1μg/ml PI(Sigma Aldrich, Germany)的150μl FACS缓冲液以复染色死细胞。阴性对照样品包括单独的二级的羊抗鼠APC抗体。作为阳性对照,应用10μg/ml 用二级的羊抗人APC抗体(Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, England)染色的单克隆的CLDN6特异抗体mCLDN6ab和正确的二级抗体只有对照。

[0589] 用FACSCalibur流式细胞分析仪(BD Biosciences, Heidelberg, Germany)测量样品和通过FlowJo软件(Tree Star, San Carlos, CA, USA) 分析。10μg/ml 6PHU3的信号强度比阳性对照mCLDN6ab的低4-9倍(见图15A)。没有检测到6PHU3与CLDN6阴性细胞系NugC4的非特异性结合(图15C)。

[0590] 为研究双-scFv蛋白6PHU3的抗CD3臂的结合能力,使用人T细胞。将 5×10^5 个T细胞转移到5ml圆底试管并且在4℃下与浓度范围 100ng/ml-10μg/ml的FPLC纯化的6PHU3蛋白在FACS缓冲液中孵育30分钟。进一步的染色方法如以上所述。对照样品包括单独的二级羊抗鼠APC抗体和单克隆抗体抗HIS表位-标签+二级羊抗鼠APC抗体。如以上所述的进行测量和分析。用100ng/ml 6PHU3获得显著的信号(也见于图15B)。

[0591] 实施例12:通过双-scFv 6PHU3靶依赖性T细胞活化的研究

[0592] 如实施例10.a和b所述的进行细胞毒性测定。简单地说,在2ml 完全的培养基中以E:T比率5:1用人T细胞接种内源性表达CLDN6 的PA-1靶细胞并且添加浓度范围在0.001-1000ng/ml的双-scFv蛋白 6PHU3。为分析双-scFv介导的T细胞活化的靶依赖性,没有靶细胞接种T细胞但是与作为靶标的相同浓度的双-scFv 6PHU3加上T细胞样品孵育。24小时和/或48小时后,通过冲洗收获T细胞并且转移到5ml 圆底试管(BD Falcon, Heidelberg, Germany)。如实施例10.b所述的进行细胞染色和分析。

[0593] 如图16A和B中所示,在靶细胞不存在的情况没有检测到6PHU3 介导的T细胞活化,

这强调了双-scFv功能的严格的靶依赖性。48小时后仅0.01ng/ml 6PHU3时就发生显著的T细胞活化。

[0594] 实施例13:体外细胞毒性测定中双-scFv 6PHU3的EC50的测定

[0595] 荧光素酶细胞毒性测定

[0596] 为测定双-scFv蛋白6PHU3半最大有效剂量,在体外荧光素酶细胞毒性测定中测试6PHU3的滴定行。

[0597] 稳定表达荧光素酶的PA-1细胞和人T细胞以E:T比率5:1与浓度范围1pg/ml-1μg/ml的双-scFv蛋白6PHU3(10倍梯度)或没有6PHU3 孵育以测定 L_{min} 值。

[0598] 在37℃,5%CO₂下孵育细胞培养微孔板24小时和48小时。为分析,每孔添加50μl含1mg/ml荧光素(BD Monolight,BD Biosciences,Heidelberg,Germany)和50mM HEPES的水溶液并且随后在37℃下暗处孵育平板30分钟。用Inifinite M200Tecan酶标仪(Tecan, Männedorf,Switzerland)测量由通过表达荧光素酶的活细胞荧光素氧化引起的发光。通过下列公式计算特异性靶细胞溶解的百分比:特异性溶解%=[1-(发光受试样品- L_{max})/(L_{min} - L_{max})]×100,其中“L”表示溶解。 L_{min} 指的是在双-scFv不存在的情况下最小的溶解和 L_{max} 指的是在双-scFv不存在的情况下通过添加Triton X-100(2%最终浓度)实现的最大的溶解(等于自发的发光计数)。

[0599] 1-10ng/ml 6PHU3,48小时后达到最大溶解,48小时后测定的 EC50为大约10pg/ml(也见于图17)。这一测定的结果强烈地取决于如其他人也报导的(例如见Lutterbuese,R等,2010,Proc.Natl.Acad.Sci USA.2010Jul 13;107(28):12605-10)根据捐献者的免疫状态变化的人T细胞的效价。因此,在本发明过程中已观察到双-scFv蛋白6PHU3的 EC50值随3因子的变化。

[0600] 实施例14:小鼠移植瘤模型中的效力

[0601] 为研究双-scFv蛋白6PHU3的体内治疗潜力,选择小鼠株 NOD.Cg-Prkd^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ或短的NSG(Jackson laboratory,Bar Harbour,ME,USA)。为了描述研究小鼠中人效应细胞和人T淋巴细胞对研究体内T细胞占据双-scFv的效应是必需的。因为完全缺少B-, T-和NK细胞,小鼠株NSG适合这种异种移植研究。在PBMC注射后主要移植的人T细胞的小鼠模型确立为本发明的一部分。

[0602] a.用双-scFv蛋白6PHU3对小鼠中晚期高度表达CLDN6的肿瘤的迟发处理

[0603] 在示例性研究中,25只8-11周龄的雌性NSG小鼠和25只8-11周龄的雄性NSG小鼠皮下地接种 1×10^7 个稳定表达高水平CLDN6的 PA-1细胞。肿瘤细胞接种后15天根据它们的肿瘤体积将小鼠分成处理组,排除没有肿瘤生长的小鼠。在同一天通过Ficoll密度梯度技术从健康捐献者的人体血液分离外周血单核细胞(PBMC)并且用作体内效应细胞。在分离那天腹腔内注射稀释在200μl DPBS中的 2×10^7 个 PBMC到实验处理组指定为“PBMC”。“PBS”指定的处理组代替腹腔内接受200μl纯DPBS和用作没有人效应细胞的对照。“PBS”对照组,可以检验通过6PHU3自身对肿瘤生长的潜在影响的研究或由6PHU3 或载体和不是通过人效应细胞抗小鼠组织(即通过人效应细胞抗鼠组织施加的移植物抗宿主反应)引起的任何潜在的副作用。组“PBS/载体”包含8只小鼠(n=8),“PBS/6PHU3”包含8只小鼠(n=8),“PBMC/载体”包含7只小鼠(n=7)和“PBMC/6PHU3”包含7只小鼠(n=7)。在DPBS或 PBMC应用后7天开始治疗:组“PBS/6PHU3”,“PBMC/6PHU3”和“PBMC/1BiMAB”腹腔内地接受200μl DPBS中稀释

的5 μ g纯化的双-scFv蛋白6PHU3或1BiMAB/动物。组“PBS/载体”和“PBMC/载体”腹腔内地接受DPBS中稀释的200 μ l载体缓冲液(溶解于水中的200 mM L-精氨酸-盐酸盐,无菌过滤的)。表6中总结了处理组。每天进行治疗,持续26天。用数码的校准卡尺每周两次测量肿瘤大小并且根据公式 $\text{mm}^3 = \text{长} \times \text{宽} \times (\text{宽}/2)$ 计算肿瘤体积。图18A和B示例了“PBMC/6PHU3”组所有小鼠在人效应细胞存在的情况下通过抗体抑制肿瘤生长。当肿瘤体积超过1500 mm^3 时或在危重症(在一些小鼠中观察到移植物抗宿主的症状)的情况下通过颈椎脱臼法处死小鼠。

[0604] 表6:处理组

	处理组(G)	小鼠# (n)	效应细胞	双-scFv 蛋白	μ g 双-scFv 蛋白/小鼠
	G1	8	-	-	-
[0605]	G2	8	-	6PHU3	5
	G3	7	PBMC	-	-
	G4	7	PBMC	6PHU3	5
	G5	8	PBMC	1BiMAB	5

[0606] b. 治疗对体重影响的测定

[0607] 使用实验室天平每周两次检验每一小鼠的体重。任何组中没有小鼠显示随着治疗时间体重减轻(数据未显示)。

[0608] c. 组织保存和脾细胞分离

[0609] 杀死小鼠后,切开肿瘤并且将组织立即固定在10ml Roti-Histofix 4% (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) 中用于免疫组化分析。而且,切开脾脏通过流式细胞术分析以检测人细胞的移植。脾脏切开后通过将捣碎脾脏通过70 μ m细胞过滤网置于50ml具有3-5ml注射器的无菌活塞的反应管和重复用温暖的DPBS重复冲洗细胞过滤网,立即进行脾细胞分离。离心分离的脾细胞,将DPBS轻轻倒出和脾细胞团重悬浮在1ml添加10% DMSO的热失活的胎牛血清中。立即将样品冷冻在-80 $^{\circ}$ C下并且储存直到来自于所有小鼠的脾细胞样品为完整的。

[0610] d. 人T淋巴细胞在小鼠脾脏中移植的分析

[0611] 如实施例14.c所述的收集和冷冻来自于所有小鼠的脾细胞。一次解冻脾细胞样品的完整收集,所有细胞用温暖的DPBS洗涤两次并且在4 $^{\circ}$ C下暗处孵育 1×10^6 个脾细胞/样品和荧光偶联的抗体20分钟以通过抗CD45染色检测人细胞的移植和通过抗CD3,抗CD4和抗CD8 染色检测人T细胞的百分比。用FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) 进行流式细胞术分析。可以通过如图18D所示的高百分比的CD45-CD3双阳性脾细胞确认“PBMC”组中人T细胞移植。

[0612] e. 靶表达和T细胞浸润测定的免疫组化

[0613] 切开后使用4%缓冲的甲醛溶液 (Roti-Histofix, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) 在4 $^{\circ}$ C下固定肿瘤48小时。将固定的肿瘤分成两部分并且转移到自动化真空组织处理器ASP200 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) 用于脱水随后经由石蜡灌注器MPS/C (Slee Medical GmbH, Mainz, Germany) 包埋在石蜡 (Paraplast, Carl Roth,

Karlsruhe, Germany) 中。为免疫组化染色, 使用旋转式切片机RM2255 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) 产生甲醛固定的和石蜡包埋的3 μ m厚的组织切片。Deparaffinization and re-hydrations were conducted在双线性批染色器StainMate Max (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) 中进行去石蜡化和补水随后在120 $^{\circ}$ C下10mM柠檬酸缓冲液, pH6和0.05%吐温20中回复热诱导的表位10分钟。然后使用PBS中0.3%水溶液淬灭内源的过氧化物酶 (Carl Roth), 随后与10%羊血清在PBS (PAA Laboratories GmbH/GE Healthcare, Pasching, Austria) 中孵育30分钟以封闭非特异性抗体结合位点。通过与多克隆的一级抗体抗鼠紧密连接蛋白6 (C) 兔 (IBL-America, Minneapolis, MN, USA) 在4 $^{\circ}$ C下过夜孵育检测TAA紧密连接蛋白6; 在4 $^{\circ}$ C下连续切片上使用多克隆的抗CD3AB (Abcam, Cambridge, UK) 过夜检测T细胞随后与BrightVision聚合物HRP偶联的抗兔二级抗体 (ImmunoLogic, Duiven, Netherlands) 孵育。根据制造商的说明使用Vector NovaRED试剂盒 (Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK) 显现结合反应, 随后苏木精复染色 (Carl Roth), 脱水和固定。使用Axio 成像仪M2或Mirax扫描仪 (both Carl Zeiss Microscopy GmbH, Goettingen, Germany) 进行分析和证明。

[0614] 如图19所示的, 通过CD3染色在“PBMC/6PHU3”组的肿瘤中尤其是在CLDN6表达的边缘区检测到最高的T细胞浸润。对照组中TAA CLDN6的异源表达模式 (图19A, B, C, 和D) 作为治疗的结果改变为“PBMC/6PHU3”组的肿瘤中CLDN6表达的更紧密区 (图19D)。

[0615] 实施例15: 靶向CLDN18.2和CD3的双特异性结合剂的产生和测试

[0616] a. 序列起源, 双-scFv构建体的设计和克隆到模板载体

[0617] 制备包含对人T细胞受体组分CD3 ϵ 和人肿瘤相关抗原 (TAA) 特异性结合结构域双特异性串联单链抗体构建体 (双-scFv)。每一构建体相应的重链可变区 (V_H) 和相应的轻链可变区 (V_L) 从5'-到3'末端特异地排列顺序:

[0618] pST1-hAgKozak-V_H^{CLDN18.2}-V_L^{CLDN18.2}-V_H^{CD3}-V_L^{CD3}-His-2hBgUTR- A120

[0619] (1BiMAB, 18RHU5, 1-5号)

[0620] pST1-hAgKozak-V_H^{CD3}-V_L^{CD3}-V_H^{CLDN18.2}-V_L^{CLDN18.2}-His-2hBgUTR- A120

[0621] (18RHU3, 6-10号)

[0622] 表7总结了对TAA CLDN18.2和本发明过程中产生的PLAC1特异性的所有双-scFv构建体。使用相应抗体的V_H和V_L序列通过 GeneArt AG (GeneArt/Life Technologies GmbH, Regensburg, Germany) 通过基因合成产生双-scFv构建体。通过GeneArt's GeneOptimizer®软件实施密码子优化诸如智人 (HS), 小家鼠 (MM), 或中国仓鼠卵巢 (CHO) 并且列举在表7中。表8中总结了所有应用的结构域的关于特异性, 来自于单克隆抗体 (mAb) 的序列起源, 密码子使用, 额外的序列特征和参考文献的信息。各自的CD3抗体的可变结构域序列起源列于表8中。由于人和小鼠TAA的高同源性, 可以使用相同的抗TAA V_H和V_L序列产生双-scFv构建体, 但是与小鼠特异性抗CD3抗体克隆 145-2C11的V_H, V_L序列组合用于小鼠测定。

[0623] 根据技术人员熟知的标准方法 (Green/Sambrook, 分子克隆, 2012) 进行DNA克隆和表达载体构建。简单地说, 用5'-BsmBI和3'-XhoI限制位点提供最初的双-scFv DNA序列用于克隆到pST1质粒。在双-scFv 序列的5'末端上游处引入分泌信号序列用于蛋白从细胞质分泌到培养基中。插入为15-18个氨基酸柔性甘氨酸-丝氨酸肽接头编码的序列以结合V_H

和V_L结构域用于单链可变抗体片段(scFv)的组合物,其中一个与CD3结合并且另一个与TAA结合。为形成双特异性单链抗体,通过为短肽接头编码的序列(GGGGS)连接两个scFv结构域序列。与这种接头序列一起,将BamHI限制位点引入用于scFv结构域交换和即将来临的双-scFv构建体的克隆。简单地说,通过BsmBI和BamHI限制可以交换5' scFv结构域和通过BamHI和XhoI限制可以交换3' scFv- 结构域。C末端6×His-标签用于检测翻译蛋白的分析。双-scFv序列的人α球蛋白5'末端和人β球蛋白3'非翻译区存在于pST1载体(细节见 W02007/036366A2;Waggoner,S等.(2003) Exp.Biol.Med. (Maywood) 228 (4),pp.387-395)。

[0624] 为1BiMAB复制子载体产生,包括分泌信号和6×His-标签的全部的1BiMAB序列亚克隆到由K. **Lundström** (Lundstrom,K等.(2001) Histochem.Cell Biol.115(1),pp.83-91;Ehrengruber,M.U.et al.(1999) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.96(12),pp.7041-7046)友好提供的塞姆利基森林病毒复制子载体(pSFV)的次基因组的启动子3'。

[0625] 经由MWG的单阅读序列服务通过测序复核所有构建体(Eurofins MWG Operon,Ebersberg,Germany)并且只有具有正确的序列和多于 100个腺嘌呤的多聚(A)尾那些用作体外RNA转录。

[0626] 构建体图解也见于图20A。

[0627] 表7:TAA和CD3特异性双特异性单链抗体mRNA模板构建体的总结

[0628]

内部名称	TAA	特异性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	密码子使用
1BiMAB	CLDN18.2	人	mCLDN18.2ab	TR66	HS
1号	CLDN18.2	鼠	mCLDN18.2ab	145-2C11	CHO
2号	CLDN18.2	人	mCLDN18.2ab	UCHT1-HU	CHO
3号	CLDN18.2	人	mCLDN18.2ab	UCHT1	CHO
4号	CLDN18.2	人	mCLDN18.2ab	CLB-T3	CHO
5号	CLDN18.2	人	mCLDN18.2ab	TR66	CHO
6号	CLDN18.2	鼠	145-2C11	mCLDN18.2ab	CHO
7号	CLDN18.2	人	UCHT1-HU	mCLDN18.2ab	CHO
8号	CLDN18.2	人	UCHT1	mCLDN18.2ab	CHO
9号	CLDN18.2	人	CLB-T3	mCLDN18.2ab	CHO
10号	CLDN18.2	人	TR66	mCLDN18.2ab	CHO
18RHU5	CLDN18.2	人	mCLDN18.2ab	TR66	HS
18RHU3	CLDN18.2	人	TR66	mCLDN18.2ab	HS
18RMU5	CLDN18.2	鼠	mCLDN18.2ab	145-2C11	MM
18RMU3	CLDN18.2	鼠	145-2C11	mCLDN18.2ab	MM
对照双-scFv					
25号	PLAC1	人	78H11	TR66	CHO

[0629] 双-scFv表示双特异性单链可变片段;CHO,中国仓鼠卵巢;HS,智人;HU,人源化;MM,小家鼠;TAA,肿瘤相关抗原;V_H,重链可变区;V_L,轻链可变区。

[0630] 表8:双-scFv mRNA-模板构建体信息的总结

[0631]

CD3 结合部分			TAA 结合部分					
内部名称	mAB 来源	物种反应性	TAA	mAB 来源	物种反应性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	短的接头
1BiMA B 1 号	TR66	人	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	TR66	GGGG S
2 号	145-2C11	鼠	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	145-2C11	SGGG GS
3 号	UCHT1-HU	人	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	UCHT1-HU	SGGG GS
4 号	UCHT1	人	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	UCHT1	SGGG GS
5 号	CLB-T3	人	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	CLB-T3	SGGG GS
6 号	TR66	人	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	TR66	SGGG GS
7 号	145-2C11	鼠	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	145-2C11	mCLDN18.2ab	SGGG GS
8 号	UCHT1-HU	人	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	UCHT1-HU	mCLDN18.2ab	SGGG GS
9 号	UCHT1	人	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	UCHT1	mCLDN18.2ab	SGGG GS
10 号	CLB-T3	人	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	CLB-T3	mCLDN18.2ab	SGGG GS
18RHU 5	TR66	人	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	TR66	SGGG GS
18RHU 3	TR66	人	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	TR66	mCLDN18.2ab	SGGG GS

[0632]

18RM	145-2C11	鼠	CLDN18	mCLDN18.	人, 鼠	mCLDN18.	145-2C11	SGGG
U5			.2	2ab		2ab		GS
18RM	145-2C11	鼠	CLDN18	mCLDN18.	人, 鼠	145-2C11	mCLDN18.	SGGG
U3			.2	2ab		2ab		GS
25号	TR66	人	PLAC1	78H11	人, 鼠	78H11	TR66	SGGG
								GS

[0633] 表8续表

[0634]

内 部 名 称	5'长的接头	3'长的接头	分泌信号	密 码	抗 CD3 子 使 用 参 考 文 献
1BiMAB	(GGGGS) ₃	VE(GGSGG S) ₂ GGVD	MGWSCILFL VATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
1号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFL VATATGVHS	CHO	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
2号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFL VATATGVHS	CHO	Shalaby <i>et al.</i> , J Exp Med 1992
3号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFL VATATGVHS	CHO	Beverley <i>et al.</i> , Eur J Immunol 1981
4号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFL VATATGVHS	CHO	Van Lier <i>et al.</i> , Immunology 1989
5号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFL VATATGVHS	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFF VLTCLKGIQG	CHO	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
7号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFL VATATGVHS	CHO	Shalaby <i>et al.</i> , J Exp Med 1992

[0635]

8 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFF	CHO	Beverley <i>et al.</i> , Eur J Immunol 1981
			VLTLKGIQG		
9 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNFGLSLIFL	CHO	Van Lier <i>et al.</i> , Immunology 1989
			ALILKGVQC		
10 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MEWSWIFLF	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
			LLSVTTGVHS		
18RHU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGG S) ₂ GGVD	MGWSCILFL	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
			VATATGVHS		
18RHU3	VE(GGSGG S) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MGWSCILFL	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
			VATATGVHS		
1RPMU 5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGG S) ₂ GGVD	MGWSCILFL	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
			VATATGVHS		
18RMU 3	VE(GGSGG S) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFF	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
			VLTLKGIQG		
25 号	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWLWNLLF	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
			LMAAAQSAQ		
			A		

[0636] CHO表示中国仓鼠卵巢;HS,智人;mAB,单克隆抗体;MM,小家鼠;TAA,肿瘤相关抗原。

[0637] b. IVT-RNA合成

[0638] 为产生抗CLDN18.2特异性双-scFv IVT模板,使用二类核酸内切酶在多聚(A)尾下游线性化质粒。通过苯酚/氯仿提取和如别处所述的醋酸钠沉淀(Holtkamp,S等.(2006) Blood 108(13),pp.4009-4017)纯化线性化的模板。

[0639] 根据制造商的指南使用MEGAscript试剂盒(Ambion/Life Technologies, Darmstadt, Germany)线性化的DNA模板经受体外转录:用MEGAscript T7试剂盒转录pST1模板和用MEGAscript SP6试剂盒转录pSFV模板。为与帽类似物起反应,降低GTP浓度到1.5mM,和添加如别处所述的(Kowalska,J等.(2008) RNA 14(6),pp.1119-1131; Grudzien,E等.(2004) RNA 10(9),pp.1479-1487;Stepinski,J等.(2001) RNA 7(10),pp.1486-1495)合成的6mM ARCA,β-S-ARCA(D1)或β-S-ARCA(D2)至反应。根据指南用MEGAclean试剂盒(Ambion/

Life Technologies, Darmstadt, Germany) 进行 IVT-mRNA 的纯化并且通过分光光度法评估 IVT-RNA 的质量和在 2100 生物分析仪上分析 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)。

[0640] 实施例16:通过各种CLDN18.2特异性IVT-mRNA转染的靶细胞响应双-scFv分泌的T细胞活化

[0641] 为检验CLDN18.2特异性双-scFv IVT-RNA功能,内源性表达相对高水平的人CLDN18.2的胃癌细胞系NugC4 (Sahin,U等.(2008) Clin. Cancer Res.14 (23), pp.7624-7634) 用作靶细胞系。

[0642] NugC4靶细胞-通常在每个测定前通过FACS分析常规地测试TAA 表达-用冰冷的X-Vivo 15培养基 (LONZA, Basel, Switzerland) 洗涤两次并且重悬浮为密度 2×10^7 个细胞/ml。将250 μ l细胞悬液转移到预冷的0.4cm Gene Pulser/MicroPulser比色皿 (Bio-Rad, Dreieich, Germany) 并且添加20 μ g/ml IVT-mRNA。所用的IVT-mRNA为:1BiMAB, 2号, 3号, 4号, 5号, 7号, 8号, 9号和10号。关于双-scFv变体的详细信息见表7和8。仔细混合后,使用下列的条件,用BTX ECM 830 电转化仪 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) 转染细胞:250V, 2个脉冲,12ms脉冲长度,400ms间隔长度。电穿孔后就将比色皿短暂地放在冰上然后将细胞悬液转移到15ml试管中RT温暖的测定培养基 (添加了5%热失活的人AB血清,0.5%青霉素-链霉素,1倍NEAA 和1mM丙酮酸钠的RPMI 1640培养基 (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany))。计数转染的靶细胞并且调为 1×10^5 个细胞/ml。

[0643] 根据标准方法 (免疫学实验指南2012) 新近从健康捐赠者人体血液分离人效应细胞:简单地说,用DPBS稀释血液,在Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany) 上分层和离心。从中间相收集外周血单核细胞 (PBMC), 用添加了2mM EDTA 的冷的DPBS 洗涤和计数。随后,根据制造商的指南通过CD8⁺T细胞分离试剂盒 II (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany) 从PBMC通过磁性活化细胞分离 (MACS) 分离人T细胞。经由FACS分析 (CD4, CD8染色) 常规地测试效应细胞分离用于成功的T细胞分离。测定培养基中T细胞调为 5×10^5 个细胞/ml。

[0644] 6孔平板的每孔接种 1×10^5 个靶细胞并且以E:T比率5:1添加人细胞毒性T细胞。最终体积/孔为2ml。包含效应细胞和靶细胞的对照样品包含靶细胞分泌25号,亲代的IgG mAb chCLDN18.2ab和1BiMAB 蛋白作为阳性对照最终浓度5ng/ml。对照包括单独的电穿孔的靶细胞或单独的具有和没有1BiMAB蛋白的T细胞。48小时后收获T细胞和靶细胞,标记,并且通过流式细胞术分析。简单地说,通过细胞刮轻微刮擦收获所有细胞 (Sarstedt AG&Co, Nürmbrecht, Germany) 并且转移到5ml圆底试管 (BD Falcon, Heidelberg, Germany)。离心细胞和 DPBS洗涤细胞。为细胞染色,使用鼠抗人CD3-FITC,鼠抗人 CD69-APC,和鼠抗人CD25-PE (所有抗体为BD Biosciences, Heidelberg, Germany)。细胞团重悬浮在50 μ l包含荧光偶联的抗体的 FACS缓冲液 (添加了5%FBS的DPBS) 中。在暗处4℃下孵育20分钟后,用4ml DPBS 洗涤样品并且细胞团重悬浮在200 μ l包含碘化丙啶 (PI) (Sigma Aldrich, Germany), 最后1:1000稀释用于死细胞的检测。直到测量样品都保持在冰上和暗处。用FACSCalibu进行测定的建立。通过FlowJo软件评估分析 (Tree Star, San Carlos, CA, USA)。

[0645] 如图21A所示,每一CLDN18.2特异性IVT-mRNA导致如在有效的T细胞活化中所见的双-scFv蛋白的分泌。在T细胞活化方面只有边缘差异的最强效的变体为5号>8号>10号>3号

>1BiMAB递减次序。所有这些变体引起高于55%的总T细胞活化而变体2号,4号,7 号和9号引起40%-50%的总T细胞活化。

[0646] 通过公式计算特异性靶细胞溶解:%溶解=(%PI⁺靶细胞_{样品}-%PI⁺靶细胞_{EP参照}) 其中“样品”特指共孵育的效应细胞和靶细胞并且“EP参照”每一单独的个体的IVT-mRNA电穿孔的电穿孔的靶细胞。如图21B 所示,通过变体1BiMAB>5号>8号>3号递减次序实现高于65%的靶细胞溶解。其他变体介导55-64%的靶细胞溶解。

[0647] 最强效的CLDN18.2特异性双-scFv携带TR66 (1BiMAB,5号, 10号)或UCHT1 (n3号,8号)的V_H和V_L结构域。关于结构域定向,与蛋白双-scFv变体相比没有观察到显著的差异(见实施例与蛋白研究 3)。与蛋白研究一致,选择编码1BiMAB的IVT-mRNA用于进一步的研究。

[0648] 在后期时间点比较构建体18RHU5和18RHU3(将表7和8)与 1BiMAB。18RHU5的效率与1BiMAB等价,18RHU3弱一些(数据未显示)。

[0649] 实施例17:T细胞再定向到分泌CLDN18.2特异性双-scFv 1BiMAB的靶细胞的显微分析

[0650] 测定设置基本上如实施例2.a所述的。

[0651] 根据制造商指南通过CD8⁺T细胞分离试剂盒,人(Miltenyi Biotec, Teterow, Germany)从新近分离的PBMC通过MACS分离人细胞毒性 T细胞。

[0652] 除了使用80μg/ml 1BiMAB IVT-mRNA或80μg/ml 25号对照 IVT-mRNA之外如实施例16所述的制备和转染NugC4细胞。计数转染的靶细胞并且调为2×10⁵个细胞/ml。向96孔平板的每孔接种1×10⁴个靶细胞并且按照E:T比率5:1添加人细胞毒性T细胞。每孔最终体积为100μl。对照样品包含单独的转染靶细胞以证明电穿孔后的健康,以及对照双-scFv转染的靶细胞和效应细胞。随后在37℃,5%CO₂下孵育组织培养板。在24小时处见到包含1BiMAB转染的靶细胞的样品中靶细胞上T细胞簇集,免疫突触形成和靶细胞杀伤方面的显著影响,并且用Nikon Eclipse TS100倒置显微镜(Nikon,Japan)记录。在 25号转染的靶细胞的对照样品中没有观察到T细胞簇集或靶细胞溶解,这意味着诱导T细胞活化的严格的TAA表达依赖性。也见于图 22。

[0653] 实施例18:通过CLDN18.2特异性双-scFv 1BiMAB浓度依赖的 T细胞活化的流式细胞检测分析

[0654] 为研究在表达TAA的靶细胞存在的情况下双-scFv浓度依赖的T 细胞活化,将3倍的稀释系列应用于转染过程。

[0655] 如实施例16所述的但是用最终浓度40μg/ml的IVT-mRNA制备和转染NugC4靶细胞。1BiMAB IVT-mRNA浓度范围在0.4-40μg/ml 并且用适当量的荧光素酶IVT-mRNA填满,出于将所有样品暴露于关于IVT-mRNA量的相同胁迫水平的目的。

[0656] 在6孔版式的2ml测定培养基中以E:T比率10:1接种1×10⁵个转染的靶细胞和人细胞毒性T细胞(如实施例16所述分离的)。对照样品包含用40μg/ml 荧光素酶IVT-mRNA但不是用1BiMAB IVT-mRNA 转染的靶细胞。靶细胞和效应细胞共孵育24小时和48小时后,如实施例16所述收获细胞,染色并分析。

[0657] 如图23A和B中所示,在包含4μg/ml 1BiMAB IVT-mRNA转染的靶细胞的样品中观察到显著的T细胞活化。在40μg/ml 1BiMAB IVT-mRNA这一测定中达到最大的T细胞活化。CD69和CD25的表达随着共孵育时间(图23A-B)和IVT-mRNA浓度而变化。较高的 1BiMAB IVT-

mRNA量(12和40 μ g/ml)引起更快的明显可见的T细胞活化机制启动,例如图23B中CD25表达与CD69的表达相比增加。总的T细胞活化没有超过~40%。

[0658] 实施例19:通过CLDN18.2-特异性双-scFv 1BiMAB的浓度依赖的T细胞介导的靶细胞溶解的流式细胞检测分析

[0659] 为研究双-scFv浓度依赖的T细胞介导的靶细胞溶解,使用如实施例18所述的实验设置。除了效应细胞和靶细胞共孵育样品(“样品”)之外,也单独接种个体地电穿孔的靶细胞。后者用作参照样品(“EP参照”),以从T细胞溶解的靶细胞中扣除被电穿孔过程本身杀伤的靶细胞。

[0660] 根据实施例18进行收获和染色。最后用FACSCalibur(BD Biosciences, Heidelberg, Germany)经由碘化丙啶向靶细胞的掺入分析靶细胞。

[0661] 通过两步骤的死细胞背景扣除测定特异性靶细胞溶解百分比:

[0662] 1. T细胞介导的溶解% = (PI⁺靶细胞_{样品}% - PI⁺靶细胞_{EP参照}%)

[0663] 2. 特异性溶解% = (T细胞介导的溶解_{样品}% - T细胞介导的溶解_{对照}%)

[0664] 从具有和不具有效应细胞的对照样品(只有40 μ g/ml荧光素酶 IVT-mRNA)的PI⁺靶细胞的差异推导“T细胞介导的溶解_{对照}”。

[0665] 通过这种计算,这个实验中12 μ g/ml 1BiMAB IVT-mRNA达到最大的55.5%+/-5.6特异性溶解%。由于NugC4靶细胞对电穿孔胁迫的敏感性和减去了随后不可避免的死的背景靶细胞,绘制的特异性靶细胞溶解在这一实验设置中可能低于实际的溶解百分比。

[0666] 实施例20:响应1BiMAB IVT-mRNA转染的T细胞增殖

[0667] T细胞增殖是T细胞活化的指标。为显示在CLDN18.2阳性靶细胞存在的情况下,响应编码双-scFv的IVT-mRNA 1BiMAB的特异性T细胞增殖,使用流式细胞术。简单地说,用溶解于DPBS中的1 μ M 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CellTrace CFSE, Invitrogen/Life Technologies GmbH, Germany)将 1×10^7 个如实施例16所述分离的人T细胞在RT下暗处染色5分钟。用DPBS/5%FCS洗涤细胞两次并且重悬浮在测定培养基中至 2×10^6 个细胞/ml。作为靶细胞,选择用人CLDN18.2慢病毒转导的NugC4细胞,为了特异性测试,选择 CLDN18.2阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231。20 μ g/ml IVT-mRNA 1BiMAB或非靶向对照用于电穿孔。如实施例16所述的进行NugC4的电穿孔。使用下列条件进行MDA-MB-231电穿孔:400V, 3ms脉冲长度, 1个脉冲, 400ms间隔长度, 0.4cm Gene Pulser/MicroPulser 比色皿(Bio-Rad, Dreieich, Germany)中。用转染的靶细胞和作为效应细胞的人CFSE-标记的T细胞创建如实施例16所述的细胞毒性测定。单独的T细胞,和未转染的或对照转染的靶细胞加上T细胞用作阴性对照。用5 μ g/ml OKT3(Bio X Cell, West Lebanon, NH, USA)和2 μ g/ml 抗CD28(BioLegend, Fell, Germany)单独刺激的T细胞用作阳性对照。5ng/ml浓度的1BiMAB蛋白应用于未转染的靶细胞+T细胞以确认测定有效性。包括作为特异性对照的与非靶向双-scFv蛋白6PHU3组合的样品。96孔中0.2ml测定培养基的总体积中一式三份地创建所有样品。共孵育72小时后,收获T细胞,收集在5ml圆底试管,洗涤并在4 $^{\circ}$ C下在200 μ l DPBS中用2 μ l抗CD45-APC染色30分钟从而区分人T细胞和肿瘤细胞,并用0.25 μ l eFluor506(BD Biosciences, Heidelberg, Germany)染色以复染色死细胞。DPBS洗涤后,细胞重悬浮在FACS缓冲液中并且用FACSCanto II(BD Biosciences, Heidelberg, Germany)分析。

[0668] 只有在CLDN18.2阳性靶细胞和双-scFv 1BiMAB存在的情况下通过CFSE信号降低

检测到T细胞增殖(也见于图25)。除了阳性对照之外,在与1BiMAB蛋白组合的CDLN18.2阳性靶细胞存在的情况下可以观察到42-48%T细胞增殖。用1BiMAB IVT-mRNA转染的靶阳性细胞引起22% $\pm$ 3%。响应IVT-mRNA比响应蛋白低的增殖可能由于NugC4靶细胞可实现的低的转染效率。与CDLN18.2阴性靶细胞MDA-MB-231孵育的T细胞在任何系列及除了阳性对照之外没有靶细胞的T细胞中没有显示出显著的增殖。

[0669] 实施例21:滴定效应细胞与靶标的比率以确定效价比

[0670] 为在基于FACS分析的体外细胞毒性测定设定中测定合适的E:T比率,选择E:T比率范围为0.3:1-10:1的3倍梯度。

[0671] 如实施例16所述的用40 μ g/ml的IVT-mRNA制备和转染NugC4靶细胞。1BiMAB IVT-mRNA转染细胞的一制剂用于所有受试样品。选择40 μ g/ml荧光素酶IVT-mRNA的转染作为阴性对照。

[0672] 如实施例16所述的从新近分离的PBMC分离人细胞毒性T细胞并且用作效应细胞。在6孔平板中一式两份地以下列的效应细胞与靶标比率共孵育 1×10^5 个转染靶细胞与细胞毒性T细胞:0.3:1-1:1-3:1-10:1。额外地,在靶细胞不存在的情况下培养人细胞毒性T细胞以确定背景T细胞活化。在效应细胞不存在的情况下也培养对照IVT-mRNA或1BiMAB IVT-mRNA转染的靶细胞以确定通过电穿孔胁迫的背景死亡细胞。只在最大的E:T比率10:1时接种荧光素酶阴性对照。共孵育48小时后,如实施例16所述收获细胞,标记和分析。

[0673] 图26A显示对由NugC4靶细胞的1BiMAB分泌响应的细胞毒性T细胞的特异活化。不受样品中T细胞数目的影响,检测到50-60%的总活化。而且,样品中CD25和CD69表达的分布是高度吻合的。这表示在细胞毒性T细胞群中有给定百分比的T细胞可以被活化。

[0674] 在图26B中,有效的靶细胞溶解对细胞毒性T细胞数目的依赖性变得明显。尽管靶细胞在只有0.3:1的E:T比率溶解,强效的溶解从3:1比率开始。

[0675] 实施例22:使用1BiMAB IVT-mRNA转染的效应细胞的基于FACS的测定中T细胞活化和靶细胞溶解的分析

[0676] 在这个实验中目标为测试在IVT-mRNA转染后人效应细胞是否也能够产生和分泌1BiMAB。这背后的合理性为假设的患者情境,其中患者自身的T细胞能够被双-scFv转染随后再转移到患者。

[0677] 人细胞毒性T细胞-如实施例16所述的分离-用X-Vivo 15培养基(LONZA,Basel, Switzerland)洗涤两次并且重悬浮为 2×10^7 个细胞/ml的密度。将250 μ l细胞悬液转移到预冷的0.4cm Gene Pulser/MicroPulser比色皿(Bio-Rad,Dreieich,Germany)并且添加80或240 μ g/ml IVT-mRNA。所用的IVT-mRNA为1BiMAB,eGFP作为对照。仔细混合后,用BTX ECM 830(Harvard Apparatus,Holliston, MA,USA)电转化仪使用下列的条件电穿孔细胞:500V,1个脉冲,3ms脉冲长度,400ms间隔长度。电穿孔后即刻将比色皿短暂地放在冰上然后将细胞悬液转移到含有10U/ml IL-2的测定培养基(添加了5%热失活的人AB血清,0.5%青霉素-链霉素,1倍NEAA和1mM 丙酮酸钠的RPMI 1640培养基(Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt,Germany))。在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下过夜培养转染的效应细胞。第二天,通过FACS分析转染效率,提示两种eGFP IVT-mRNA浓度的转染效率高于70%。计数每一效应细胞样品并且调为 5×10^5 个细胞/ml。通过胰蛋白酶处理收获NugC4靶细胞,用测定培养基洗涤,计数,并且调为 1×10^5 个细胞/ml。混合效应细胞和靶细胞并且一式两份地

以最终E:T比率5:1、最终体积2ml接种到6孔。没有靶细胞接种未处理的T细胞用于背景活化信号的确定。在37℃,5%CO₂下共孵育48小时后如实施例16所述的进行测定分析。

[0678] 如图27A中所示获得用1BiMAB IVT-mRNA转染和与靶细胞共孵育的细胞毒性T细胞的显著活化。通过1BiMAB IVT-mRNA转染的T细胞的靶细胞溶解如图27B中所绘制的高于60%。80μg/ml 1BiMAB IVT-mRNA的效应不能随着更高的RNA量而增加。

[0679] 从这个实验得出结论,效应细胞在理论上可用作产生和分泌双-scFv的受体细胞。

[0680] 实施例23:使用CLDN18.2阴性靶细胞在基于荧光素酶的细胞毒性测定中1BiMAB IVT-mRNA的靶特异性的研究

[0681] 严格的靶特异性为避免在患者中不想要的副作用的重要问题。在这一初步研究中,选择CLDN18.2阴性细胞系-畸胎癌细胞系PA-1 (ATCC CRL-1572)用以检测作为IVT-mRNA导入的1BiMAB的非特异性细胞溶解潜力。

[0682] 用慢病毒荧光素酶载体稳定地转导所用的PA-1细胞系并且因此其能够应用在基于荧光素酶的细胞毒性测定中。制备PA-1/luc靶细胞用于如实施例16所述的电穿孔。每一样品转染总共40μg/ml IVT-mRNA。所用的IVT-mRNA为:1BiMAB,25号和6RHU3。在PA-1/luc细胞中25号靶向非表达的TAA PLAC-1,并且6RHU3靶向高表达的靶标CLDN6。关于双-scFv变体的详细信息见表7和8。在电穿孔样品中25号与4μg/ml IVT-mRNA一起用作填充物IVT-mRNA 从而对于所有靶细胞样品确保由RNA转染引起的相同胁迫水平。仔细混合后,用BTX ECM 830电转化仪(Harvard Apparatus,Holliston, MA,USA)对于0.4cm比色皿使用下列的条件转染细胞:200V,2个脉冲,12ms脉冲长度,400ms间隔长度。电穿孔后即刻将比色皿短暂地放在冰上然后将细胞悬液转移到15ml试管中RT温的PA-1测定培养基(添加了10%热失活的FCS,0.5%青霉素-链霉素,1倍NEAA,1.5g/l碳酸氢钠和1mM丙酮酸钠的MEM培养基(Gibco/Life Technologies GmbH,Darmstadt,Germany))。计数转染的靶细胞并且调为1×10⁵个细胞/ml。

[0683] 如实施例16所述分离人效应细胞。根据制造商的指南通过全T细胞分离试剂盒II,人(Miltenyi Biotec,Teterow,Germany)从PBMC通过磁性活化细胞分离(MACS)分离人细胞毒性T细胞。将T细胞在PA-1测定培养基中调为5×10⁵个细胞/ml。

[0684] 96孔平板的每孔接种1×10⁴个靶细胞并且以E:T比率5:1添加人细胞毒性T细胞。每孔的最终体积为100μl。Control samples containing 包含效应细胞和靶细胞的对照样品包含分泌25号的靶细胞作为阴性对照,分泌6RHU3或6PHU3蛋白作为阳性对照的靶细胞和分泌1BiMAB蛋白的靶细胞。设定蛋白浓度为最终浓度100ng/ml并且与25号转染的靶细胞组合从而确保对于所用靶细胞的相同条件。最小的溶解对照(L_{min})包括单独的电穿孔的靶细胞样品。自发溶解对照(L_{max})由为从L_{受试样品}减去的未处理的靶标和效应细胞(L_{max1})或为从L_{min}减去的单独未处理的靶细胞(L_{max2})组成。一式三份地接种每一样品。在37℃,5%CO₂下孵育72小时后进行测定分析。用最终浓度2%的Triton X-100处理自发溶解对照(L_{max})。

[0685] 为分析,每孔添加50μl含有1mg/ml荧光素(BD Monolight,BD Biosciences,Heidelberg,Germany)和50mM HEPES的水溶液随后在37℃下暗处孵育平板30分钟。在酶标仪(Infinite M200,Tecan, Männedorf,Switzerland)中测量通过表达荧光素酶的活细胞由荧光素氧化引起的发光。通过下列公式计算特异性细胞溶解的百分比:特异溶解%=[1-

$[(\text{发光受试样品}-L_{\max 1}) / (L_{\min }-L_{\max 2})] \times 100$ 。

[0686] 图28显示特异性靶细胞溶解的百分比。阴性对照25号或1BiMAB 转染的CLDN18.2 阴性PA-1/luc细胞即使在孵育72小时后都没有显示显著的溶解。100ng/ml 1BiMAB蛋白也没有产生显著的溶解,而通过 TAA靶向6RHU3的双-scFv分泌引起的溶解或通过100ng/ml 6PHU3 蛋白引起的溶解在85-93%。也在24小时和48小时时间点分析和显示了等价的结果(数据未显示)。

[0687] 实施例24:哺乳动物细胞的IVT-RNA转染后1BiMAB蛋白产生的定性分析

[0688] 为研究哺乳动物细胞中RNA翻译为蛋白,选择细胞系BHK21 (ATCC CRL-13001) 作为表达系统。如实施例16所述的通过电穿孔转染 2×10^7 个BHK21细胞/ml,与实施例16区别在于所有步骤在RT下进行。将250 μ l细胞悬液转移到0.4cm Gene Pulser/MicroPulser比色皿(Bio-Rad,Dreieich,Germany)并添加40 μ g/ml 1BiMAB IVT-mRNA 或IVT-复制子RNA。电穿孔条件如下:300V,16ms脉冲长度,1个脉冲,400ms间隔长度。

[0689] 电穿孔的细胞重悬浮在RT培养基(RPMI1640,10%FCS)中并且转移到15cm培养皿。接种后5小时,包含FCS的培养基被无FCS 培养基代替。在实施例24a和b的情况下,电穿孔后18小时分别地收获细胞培养上清液和细胞。细胞团溶解在1倍LDS样品缓冲液(目录号NP0008;Life technologies,Darmstadt,Germany)中并且在72°C下加热15分钟。为ELISA分析使用非浓缩的和大约50倍浓缩的上清液。根据制造商说明用Amicon ultra-15离心过滤器单元(Merck Millipore, Billerica,MA,USA)进行浓缩。在实施例24c的情况下(只有IVT-mRNA),转染后48小时收获上清液并且经受如以上所述的40倍浓缩。

[0690] a.使用上清液的ELISA

[0691] 为ELISA分析使用镍包被的平板(Thermo Fisher Scientific,Bonn, Germany)经由分析物的His-标签用于捕获分析物。首先,每孔用200 μ l 洗涤缓冲液(1倍PBS中0.01%吐温-20)洗涤平板三次。作为标准,将纯化的1BiMAB蛋白稀释为1倍PBS中1.75%Na-酪蛋白(=稀释度)。稀释队列范围为2.34-37.50ng/ml,2倍梯度。每标准稀释液100 μ l转移到每一浓度一式三份的孔中。因此,一式三份地转移100 μ l样品。用胶膜密封平板并且在37°C下孵育30分钟。然后,每孔用200 μ l洗涤缓冲液洗涤平板三次。为了1BiMAB的检测,使用与mCLDN18.2ab 的 V_H - V_L 特异地结合因此也与1BiMAB特异性结合的抗独特型单克隆抗体IgG 8B1F3。8B1F3混合到稀释液中至最终浓度1 μ g/ml。将100 μ l 抗独特型抗体溶液转移到每孔,随后在37°C下孵育30分钟。随后,每孔用200 μ l洗涤缓冲液洗涤平板3次并添加100 μ l AP-偶联的抗小鼠检测抗体(Jackson Immuno Research Laboratories,West Grove,PA, USA)——在稀释液中以1:500稀释——至每孔随后在37°C下孵育30 分钟。在最后洗涤步骤(3 $\times$ 200 μ l洗涤缓冲液)后,向每孔添加适当底物缓冲液(1M二乙醇胺,0.5mM $MgCl_2$,0.01%叠氮化钠,pH 9.8)中 1.5mg/ml底物pNPP,随后在RT下暗处孵育30分钟。每孔使用100 μ l 3M KOH从而停止酶促反应。用酶标仪(Infinite M200,Tecan, Männedorf, Switzerland)测量吸光度。对于双波长分析,设定405nm 为测量波长和设定492nm为参照波长。通过从测量波长减去参照波长计算吸光度值。

[0692] 在图29A中绘制包括标准差的405nm处平均的吸光度值。来自于1BiMAB IVT-mRNA和IVT-复制子转染的细胞的浓缩上清液引起显著信号,证明编码双-scFv的IVT-RNA的翻译。来自于模拟转染的细胞的浓缩上清液没有产生任何信号。因为IVT-mRNA和IVT-复制子

构建体的不同毒性和轻微不同的x倍浓缩物,不能提出实际蛋白浓度。未浓缩的上清液中大概的蛋白浓度的估算范围为对IVT-复制子样品而言1.5ng/ml和对IVT-mRNA样品而言2.4ng/ml。

[0693] b. 上清液和细胞溶解产物的蛋白印迹分析 (IVT-mRNA和IVT-复制子样品)

[0694] 为蛋白印迹分析,在NuPAGE Novex 4-12%Bis-Tris凝胶 (Invitrogen/Life Technologies GmbH,Darmstadt,Germany) 上分离浓缩的上清液和细胞溶解产物。加载1BiMAB IVT-mRNA,IVT-复制子RNA 转染的BHK21细胞或未处理的细胞的上清液和细胞溶解产物和阳性对照-0.1μg纯化的1BiMAB蛋白。通过标准方法(蛋白科学实验指南,2012)进行蛋白印迹分析。简单地说,在PVDF膜上印迹蛋白和用 PBST/3%奶粉封闭后,在4℃下,膜与在封闭缓冲液中以1:500稀释的一级抗体抗HIS表位-标签 (Dianova GmbH,Hamburg, Germany) 孵育1小时。在封闭缓冲液重复洗涤后,在4℃下,膜与在封闭缓冲液中以1:10000稀释的Fc特异的二级过氧化物酶-偶联的羊抗鼠IgG抗体 (Sigma Aldrich,Germany) 孵育1小时。在封闭缓冲液重复洗涤后,通过SuperSignal West Femto化学发光底物 (Pierce/Thermo Fisher Scientific,Rockford,IL,USA) 显现信号并且通过ImageQuant LAS 4000 成像仪 (GE Healthcare Life Sciences,Munich,Germany) 记录。与内部分子量标准相比在50-60kD之间检测到1BiMAB的信号。

[0695] 如图29B所示,IVT-mRNA (2道) 和IVT-复制子RNA (3道) 转染的细胞的上清液中检测到弱的信号,而道4来自于未处理的细胞的上清液没有信号。IVT-mRNA (5道) 和IVT-复制子RNA (6道) 转染的细胞的细胞溶解产物可以产生强烈的信号。来自于未处理的细胞溶解产物 (7道) 再次没有产生信号。所有信号在于纯化的1BiMAB蛋白对照 (8 道) 相同的高度出现。上清液中弱的信号和与其一起弱的1BiMAB分泌可能归因于转染后相对短的孵育时间。由于复制子RNA的毒性作用,不能测试更长的孵育时间。

[0696] 分析为定性性质并且不用作蛋白浓度测定。

[0697] c. 上清液 (IVT-mRNA样品) 的蛋白印迹分析

[0698] 转染后48小时通过SDS-PAGE分离收集的上清液,随后如实施例24b所述进行蛋白印迹分析。如图29C所示,经由25号和1BiMAB 的His-标签检测从IVT-mRNA翻译并且分泌到上清液中的25号和1BiMAB。因此,可以证明1BiMAB的产生和分泌以及用作双-scFv特异性对照的25号的产生和分泌。

[0699] 实施例25:肌肉内RNA注射后体内翻译和功能性1BiMAB蛋白的检测

[0700] 选择8-16周龄的雌性和雄性NSG小鼠并且分为4组,每组5只小鼠。每只小鼠股肌注射40μl RNA溶液。40μl RNA溶液由1倍PBS, 5μg D2-帽化的1BiMAB IVT-mRNA或复制子,2μg D1-帽化的荧光素酶IVT-mRNA和0或15μg D1-帽化的EBK IVT-mRNA组成。出于RNA 翻译增强的目的(专利申请PCT/EP2012/04673),共注射编码牛痘病毒蛋白E3L,B18R和K3L (EBK) 的EBK IVT-mRNA从而抑制IFN应答和抵消PKR活化。注射后24小时用Xenogen IVIS 2000监测荧光素酶信号,从样品集排除没有信号的小鼠。

[0701] 注射后2、4和7天收集血液。收获血清随后在-80℃冰冻。RNA 注射后4天,切开具有强烈的发光信号的小鼠肌肉并且组织固定用于 IHC或休克-冷冻用于蛋白印迹分析。

[0702] 细胞毒性测定

[0703] 在体外细胞毒性测定中分析NSG小鼠的血清。用萤火虫荧光素酶和人CLDN18.2稳

定转导用于更好靶表达的NugC4靶细胞与人T细胞（如实施例16所述分离）以E:T比率30:1接种用于最大敏感性。测定培养基由添加了10%热失活的FCS, 0.5%青霉素-链霉素, 1倍NEAA 和1mM丙酮酸钠(Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) 的RPMI 1640培养基组成。每个受试样品孔中添加20 μ l解冻的受试血清。用20 μ l未处理的NSG小鼠的血清完成标准的1BiMAB蛋白对照孔, L_{min} 和 L_{max} 孔。每孔最终体积为100 μ l。 L_{min} 接种12份, L_{max} 接种6份, 并且受试样品接种三份。在37℃和5%CO₂下孵育48小时后, 将 L_{max} 孔与10 μ l 2% Triton X-100溶液混合并且孵育10分钟。向所有其他孔添加10 μ l测定培养基。添加50 μ l荧光素溶液(见实施例 23), 在37℃下暗处30分钟孵育步骤后, 在Infinite M200酶标仪(TECAN, Männedorf, Switzerland)中测量平板。如实施例23所述的进行特异性靶细胞溶解的计算

[0704] 图30中绘制了特异溶解的百分比。在每组中检测到显著的细胞毒性效应。在含有EBK和1BiMAB IVT-mRNA注射的小鼠血清并在注射后2天收获的小鼠的血清的孔中, 细胞毒性效应增加至1.7倍。注射后4或7天收获的样品实现显著低的效应。在1BiMAB-复制子样品的情况下, 后期时间点收获的血清也产生了强烈的细胞溶解效应。

[0705] 这些数据证明了肌肉注射后, 来自于IVT-mRNA或-复制子的 1BiMAB体内翻译和分泌到血流。

[0706] 实施例26: 靶向CLDN6和CD3的双特异性结合剂的产生和测试

[0707] a. 序列起源, 双-scFv构建体的设计, 和克隆到模板载体

[0708] 制备包含对人T细胞受体组分CD3和人肿瘤相关抗原(TAA) 特异的结合结构域的双特异性串联单链抗体构建体(双-scFv)。每一构建体相应的重链可变区(V_H) 和相应的轻链可变区(V_L) 从5'到3'末端以下连续顺序特异排列:

[0709] pST1-5'hAgKozak- V_H^{CLDN6} - V_L^{CLDN6} - V_H^{CD3} - V_L^{CD3} -His-2hBgUTR-A1 20 (6RHU5)

[0710] pST1-5'hAgKozak- V_H^{CD3} - V_L^{CD3} - V_H^{CLDN6} - V_L^{CLDN6} -His-2hBgUTR-A1 20 (6RHU3)

[0711] 表9总结了对本发明过程中产生的TAA CLDN6特异的所有双 -scFv构建体。CLDN18.2-特异性双-scFv构建体1BiMAB用作对照抗体。使用相应抗体的 V_H 和 V_L 序列通过GeneArt AG (GeneArt/Life Technologies GmbH, Regensburg, Germany) 通过基因合成产生双-scFv 构建体。通过GeneArt's GeneOptimizer®软件实施密码子优化诸如智人 (HS) 或小鼠 (MM) 并且列举在表9中。表10中总结了所有应用的结构域的特异性信息, 来自于单克隆抗体 (mAb) 的序列起源, 密码子使用, 额外的序列特征和参考文献。各个CD3抗体的可变结构域序列起源列于表10中。由于人和小鼠TAA的高同源性, 可以使用相同的抗 TAA V_H 和 V_L 序列产生双-scFv构建体, 但是与小鼠特异性抗CD3抗体克隆145-2C11的 V_H , V_L 序列组合用于小鼠测定。

[0712] 根据技术人员熟知的标准方法 (Green/Sambrook, 分子克隆, 2012) 进行DNA克隆和表达载体构建。简单地说, 向最初的双-scFv DNA序列提供5'-BsmBI和3'-XhoI限制位点用于克隆到pST1质粒。在双-scFv 序列的5'末端上游处引入分泌信号序列用于双-scFv分泌。插入编码 15-18个氨基酸的柔性甘氨酸-丝氨酸肽接头的序列以结合 V_H 和 V_L 结构域用于单链可变抗体片段(scFv)的组合成, 其中一个单链可变抗体片段与CD3结合, 并且另一个与TAA结合。为形成双特异性单链抗体, 通过编码短肽接头(GGGGS)的序列连接两个scFv结构

域序列。与这种接头序列一起,将BamHI限制位点引入用于scFv结构域交换和即将来临的双-scFv构建体的克隆。简单地说,通过BsmBI和BamHI限制可以交换5' scFv结构域和通过BamHI和XhoI限制可以交换3' scFv- 结构域。C末端6×His-标签用于翻译蛋白的检测分析。对于6RHU3 复制子载体产生,将包括分泌信号和6×His-标签的全长6RHU3序列亚克隆到由K. Lundström (Lundstrom, K等. (2001) Histochem. Cell Biol. 115 (1), pp. 83-91; Ehrengreuber, M. U. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (12), pp. 7041-7046) 友好提供的塞姆利基森林病毒复制子载体 (pSFV) 的次基因组的启动子的3'。

[0713] 经由MWG的单阅读序列服务 (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) 通过测序复核所有构建体并且只有具有正确的序列和多于 100个腺嘌呤的多聚(A)尾的那些构建体用作体外RNA转录。

[0714] 构建体图解也见于图31A。

[0715] 表9: TAA和CD3特异性双特异性单链抗体mRNA模板构建体的总结

[0716]

内部名称	TAA	特异性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	密码子使用
1BiMAB	CLDN18.2	人	mCLDN18.2ab	TR66	HS
6RHU5	CLDN6	人	mCLDN6ab	TR66	HS
6RHU3	CLDN6	人	TR66	mCLDN6ab	HS
6RMU5	CLDN6	鼠	mCLDN6ab	145-2C11	MM
6RMU3	CLDN6	鼠	145-2C11	mCLDN6ab	MM

[0717] 双-scFv表示双特异性单链可变片段; HS, 智人; MM, 小家鼠; TAA, 肿瘤相关抗原; V_H, 重链可变区; V_L, 轻链可变区。

[0718] 表10: 双-scFv mRNA-模板构建体信息的总结

[0719]

CD3 结合部分			TAA 结合部分					
内部名称	mAB 来源	物种反应性	TAA	mAB 来源	物种反应性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	短接头
1BiMAB	TR66	人	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	人, 鼠	mCLDN18.2ab	TR66	GGGGS
6RHU5	TR66	人	CLDN6	mCLDN6ab	人, 鼠	mCLDN6ab	TR66	SGGGGS
6RHU3	TR66	人	CLDN6	mCLDN6ab	人, 鼠	TR66	mCLDN6ab	SGGGGS
6RMU5	145-2C11	鼠	CLDN6	mCLDN6ab	人, 鼠	mCLDN6ab	145-2C11	SGGGGS
6RMU3	145-2C11	鼠	CLDN6	mCLDN6ab	人, 鼠	145-2C11	mCLDN6ab	SGGGGS

[0720] 表10续表

[0721]

内部名称	5'长接头	3'长接头	分泌信号	密码子 使用	抗 CD3 mAB 参考文献
1BiMAB	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS)) ₂ GGVD	MGWSCILFL VATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6RHU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS)) ₂ GGVD	MGWSCILFL VATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987

[0722]

6RHU3	VE(GGSGGS)) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MGWSCILFL VATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6RMU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS)) ₂ GGVD	MGWSCILFL VATATGVHS	MM	Leo <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci, 1987
6RMU3	VE(GGSGGS)) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVF FVLTLKGIQG	MM	Leo <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci, 1987

[0723] HS, 智人; mAB, 单克隆抗体; MM, 小家鼠; TAA, 肿瘤相关抗原。

[0724] b. IVT-RNA合成

[0725] 为产生抗CLDN6特异性双-scFv IVT模板, 使用二类核酸内切酶在多聚(A)尾下游线性化质粒。通过如别处所述的苯酚/氯仿提取和醋酸钠沉淀 (Holtkamp, S等. (2006) Blood 108 (13), pp. 4009-4017) 纯化线性化的模板DNA。

[0726] 根据制造商的指南使用MEGAscript试剂盒 (Ambion/Life Technologies, Darmstadt, Germany) 使线性化的DNA模板经受体外转录: 用MEGAscript T7试剂盒转录pST1模板和用MEGAscript SP6试剂盒转录pSFV模板。为与帽类似物起反应, 降低GTP浓度到1.5mM, 和添加6mM如别处 (Kowalska, J等. (2008) RNA 14 (6), pp. 1119-1131; Grudzien, E等. (2004) RNA 10 (9), pp. 1479-1487; Stepinski, J等. (2001) RNA 7 (10), pp. 1486-1495) 所述合成的ARCA, β-S-ARCA (D1) 或β-S-ARCA (D2) 至反应。根据指南用MEGAclear试剂盒 (Ambion/Life Technologies, Darmstadt, Germany) 进行IVT-mRNA的纯化并且通过分光光度法评估IVT-RNA的质量和在2100生物分析仪上分析 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)。

[0727] 实施例27: T细胞重定向到分泌CLDN6特异性双-scFv 1BiMAB 的靶细胞的显微分析

[0728] 如实施例2.a所述的原则上进行测定设置。

[0729] 作为靶细胞系, 使用内源性表达高水平的人CLDN6的卵巢畸胎癌细胞系PA-1 (ATCC CRL-1572)。根据制造商指南通过全T细胞分离试剂盒II, 人 (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany) 从新近分离的PBMC 通过MACS分离人细胞毒性T细胞。

[0730] PA-1靶细胞在每个测定前通过FACS分析常规测试TAA表达, 用冰冷的X-Vivo 15培养基 (LONZA, Basel, Switzerland) 洗涤PA-1靶细胞两次并且重悬浮为 2×10^7 个细胞/ml的

密度。将250 μ l细胞悬液转移到预冷的0.4cm Gene Pulser/MicroPulser比色皿(Bio-Rad, Dreieich, Germany)并且添加20 μ g/ml IVT-mRNA。使用BTX ECM 830电转化仪(Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)的条件为:200V, 12ms 脉冲长度, 2个脉冲, 400ms间隔长度。所用的IVT-mRNA为:6RHU5, 6RHU3, 25号(细节见表9和10)。计数转染的靶细胞并且调为 1×10^5 个细胞/ml。6孔平板的每孔接种 1×10^5 个靶细胞并且按照E:T比率5:1 添加人细胞毒性T细胞。每孔的最终体积为2ml。对照样品包含单独的转染的靶细胞以证明电穿孔后的健康, 以及对双-scFv转染的靶细胞和效应细胞。作为阳性对照, 以50 μ g/ml的浓度应用相应的CLDN6- 特异性双-scFv蛋白6PHU5和6PHU3。因此, 使用未处理的PA-1细胞和人T细胞。随后在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂下孵育组织平板。在24小时后在包含6PHU5和6PHU3转染的靶细胞的样品中见到在靶细胞上T 细胞簇集, 免疫突触形成和靶细胞杀伤方面的显著影响并且用Nikon Eclipse TS100倒置显微镜(Nikon, Japan)记录。如图32所示, 在25 号转染的靶细胞的对照样品中没有观察到T细胞簇集或靶细胞溶解, 这意味着诱导T细胞活化的严格TAA表达依赖性。没有双-scFv的模拟对照也没有显示T细胞簇集。反而蛋白对照引起强烈的T细胞簇集和靶细胞溶解。

[0731] 实施例28:通过CLDN6靶向双-scFv候选6RHU5和6RHU3的 T细胞活化诱导

[0732] 为检测T细胞活化和确定两种CLDN6特异性双-scFv变体的效率差异, 使用基于FACS的T细胞活化测定。选择早期活化标记CD69 和晚期活化标记CD25用于通过荧光偶联的抗体染色。为检测靶细胞和T细胞混合物中人T细胞, 对所有T细胞表达的CD3进行染色。

[0733] 如以上所述的(实施例27)制备靶细胞和效应细胞。简单地说, 用 20 μ g/ml下列IVT-mRNA通过电穿孔转染内源性表达CLDN6的PA-1 靶细胞:6RHU5, 6RHU3和25号。25号, 靶向非表达的TAA, 用作特异性对照, 未处理的靶细胞作为模拟对照。作为阳性对照, 使用50 ng/ml 6PHU5蛋白。而且, 没有靶细胞, 用或不6PHU5蛋白接种T细胞作为背景活化参照。每一样品一式两份地接种在6孔平板中并且在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂下孵育。24小时和48小时后, 通过刮擦收获细胞并且转移到5ml圆底试管(BD Falcon, Heidelberg, Germany)。离心细胞并且用DPBS洗涤。为细胞染色, 使用鼠抗人CD3-FITC, 鼠抗人 CD69-APC, 和鼠抗人CD25-PE(所有抗体为BD Biosciences, Heidelberg, Germany)。细胞团重悬浮在包含荧光偶联的抗体和2 μ l 7-AAD(BD Biosciences, Heidelberg, Germany)的50 μ l FACS缓冲液(添加5%FBS的DPBS)中。在4 $^{\circ}$ C下暗处孵育20分钟后, 用4ml DPBS 洗涤样品并且将细胞团重悬浮在200 μ l FACS缓冲液中。FACSCanto II 流式细胞分析仪(both BD Biosciences, Heidelberg, Germany)测量的整个过程中, 样品保持在冰上暗处。通过FlowJo软件(Tree Star, San Carlos, CA, USA)评估分析。

[0734] 如图33A和B所示, 两种变体都引起T细胞活化而阴性对照没有显示显著的T细胞活化标记CD69或CD25的显著表达。

[0735] 共孵育24小时后(A) 响应6RHU3的总的T细胞活化比响应6RHU5 总的T细胞活化高1.53倍, 共孵育48小时后(B) 响应6RHU3总的T 细胞活化比响应6RHU5总的T细胞活化高1.35倍。基于这些发现所有进一步的研究只使用变体6RHU3。

[0736] 实施例29:通过与6RHU3转染的靶细胞共孵育浓度依赖的T细胞活化

[0737] 为测定诱导靶依赖的T细胞活化所需要的最低的6RHU3 IVT-mRNA浓度, 将稀释度范围在0.2-20 μ g/ml IVT-mRNA转染到PA-1 靶细胞。为使所有样品暴露在相同的RNA电穿孔

压力水平,转染总浓度20 μ g/ml IVT-mRNA。25号-靶向非表达的TAA-用作填充 IVT-mRNA。因此,0 μ g/ml 6RHU3与20 μ g/ml 25号相关联。如实施例27所述的进行电穿孔。人T细胞用作效应细胞。根据制造商手册(全 T细胞分离试剂盒II,Miltenyi,Teterow,Germany)进行从PBMC的分离。以5:1比率混合效应细胞和靶细胞。未处理的靶细胞和T细胞用作模拟对照。而且,没有靶细胞用或不6PHU5蛋白接种T细胞作为背景活化参照。作为阳性对照,未处理的靶细胞与T细胞和50ng/ml 6PHU5蛋白混合。所有样品以一式两份地在6孔平板中制备。

[0738] 在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下孵育靶细胞和效应细胞48小时。如实施例 28所述的制备样品用于流式细胞检测分析。

[0739] 图34中绘制表达活化标记的CD3阳性的T细胞的百分比。对照中没有观察到T细胞活化。在浓度0.7 μ g/ml 6RHU3IVT-mRNA时开始检测到显著的T细胞活化。响应2.0 μ g/ml 6RHU3IVT-mRNA的效应与通过50ng/ml 6PHU5蛋白对照介导的那些是可比较的。因此,来自于转染的IVT-mRNA的翻译和分泌看来为有效的过程。

[0740] 实施例30:6RHU3的EC₅₀的测定

[0741] 为测定编码双-scFv的IVT-mRNA 6RHU3的半最大有效剂量,在体外荧光素酶细胞毒性测定中测试6PHU3的滴定行。通过如实施例 27所述的电穿孔瞬时转染稳定表达荧光素酶的PA-1细胞。在6倍稀释步骤中所用的6RHU3IVT-mRNA浓度范围为0.004-13.3 μ g/ml。将25号用作填充IVT-mRNA,将总IVT-mRNA浓度恒定地设定为13.3 μ g/ml。作为最小溶解对照(L_{min}),接种所有转染的靶细胞样品,没有效应细胞。通过这种方法减去每一单独电穿孔样品的背景死细胞,并且将获得仅T细胞介导的溶解效应。

[0742] 在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下,96孔版式中一式三份地以效应细胞与靶细胞比率5:1用人T细胞接种转染的靶细胞。通过稍早于添加荧光素添加Triton X-100到包含效应细胞和未处理的靶细胞的对照孔中实现标准化为自发发光计数的溶解最大值(L_{max})。荧光素溶液添加后-每孔50 μ l含1mg/ml荧光素(BD Monolight,BD Biosciences,Heidelberg, Germany)和50mM HEPES的水溶液,24小时和48小时后在Infinite M200Tecan酶标仪中测量发光。通过公式计算特异性细胞溶解:特异性溶解%=[1-(发光受试样品-L_{max})/(L_{min}受试样品-L_{max})] $\times$ 100。

[0743] 图35描述了响应6RHU3的特异性靶细胞溶解的浓度依赖曲线。使用GraphPad Prism方程式“log(激动剂)与反应-可变斜率”用于计算 EC₅₀值,显示EC₅₀(24h)=548.0ng/ml,和EC₅₀(48h)=194.5ng/ml。这个测定的结果强烈地取决于如其他人也报导的(例如见Lutterbuese, R等,2010,Proc.Natl.Acad.Sci USA.2010Jul 13;107(28):12605-12610)随捐献者的免疫状态变化的人T细胞的效价。因此,每一捐献者结果可以不同。

[0744] 实施例31:响应6RHU3IVT-mRNA转染的T细胞增殖

[0745] T细胞增殖是T细胞活化的指标。为显示在CLDN6阳性靶细胞存在的情况下响应编码双-scFv的IVT-mRNA 1BiMAB的特异性T细胞增殖,使用流式细胞分析测定。简单地说,用溶解于DPBS中的1 μ M 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CellTrace CFSE,Invitrogen/Life Technologies GmbH,Germany)将1 $\times$ 10⁷个如实施例16所述分离的人T 细胞在RT下暗处染色5分钟。用DPBS/5%FCS洗涤细胞两次并且重悬浮在测定培养基中至2 $\times$ 10⁶个细胞/ml。作为靶细胞,选择内源性表达CLDN6的PA-1和用于特异性测试的CLDN6阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231。20 μ g/ml IVT-mRNA 6RHU3或非靶向对照用于电穿孔。如实施例27所述的进行PA-1的电穿孔。使用下列条件进行 MDA-MB-231电穿孔:0.4cm Gene Pulser/

MicroPulser比色皿 (Bio-Rad,Dreieich,Germany) 中400V,3ms脉冲长度,1个脉冲, 400ms间隔长度。用转染的靶细胞和作为效应细胞的人CFSE-标记的 T细胞创建如实施例27所述的细胞毒性测定。单独的T细胞和未转染的或对照转染的靶细胞加上T细胞用作阴性对照。5 $\mu\text{g/ml}$ OKT3 (Bio X Cell,West Lebanon,NH,USA) 和2 $\mu\text{g/ml}$ 抗CD28 (BioLegend,Fell, Germany) 单独刺激的T细胞用作阳性对照。5ng/ml浓度的6PHU3蛋白应用于未转染的靶细胞+T细胞用以确认测定有效性。包括作为特异性对照的与非靶向双-scFv蛋白1BiMAB组合的样品。96孔中0.2ml 测定培养基的总体积中一式三份地创建所有样品。共孵育72小时后,收获T细胞,收集在5ml圆底试管,洗涤并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下在200 μl DPBS 中用2 μl 抗CD45-APC染色30分钟从而区分人T细胞和肿瘤细胞和用0.25 μl eFluor506 (BD Biosciences,Heidelberg, Germany) 染色以复染色死细胞。DPBS洗涤后,细胞重悬浮在FACS缓冲液中并且用FACSCanto II (BD Biosciences,Heidelberg,Germany) 分析。

[0746] 只有在CLDN6阳性靶细胞和抗CLDN6特异性双-scFv存在的情况下通过CFSE信号降低检测到T细胞增殖(也见于图36)。除了阳性对照之外,在与6PHU3蛋白组合的CDLN6阳性靶细胞存在的情况下可以观察到49-61% T细胞增殖。6RHU3IVT-mRNA转染的靶阳性细胞引起62% $\pm$ 2%。与CLDN6阴性靶细胞MDA-MB-231孵育的T细胞在任何系列及除了阳性对照之外没有靶细胞的T细胞中没有显示出显著的增殖。

[0747] 实施例32:哺乳动物细胞的6RHU3IVT-RNA转染后蛋白产生的定性分析

[0748] 为研究哺乳动物细胞中RNA翻译为蛋白,选择细胞系BHK21 (ATCC CRL-13001) 作为表达系统。如实施例16所述的通过电穿孔转染 2×10^7 个BHK21细胞/ml,与实施例16区别在于所有步骤在RT下进行。将250 μl 细胞悬液转移到0.4cm Gene Pulser/MicroPulser比色皿 (Bio-Rad,Dreieich,Germany) 并添加40 $\mu\text{g/ml}$ 25号IVT-mRNA, 6RHU3IVT-mRNA或6RHU3IVT-复制子RNA。电穿孔条件如下:300 V,16ms脉冲长度,1个脉冲,400ms间隔长度。

[0749] 电穿孔的细胞重悬浮在RT培养基(RPMI1640,10%FCS) 中并且转移到15cm培养皿。接种后5小时,包含FCS的培养基被无FCS 培养基代替。在实施例32a和b的情况下,电穿孔后18小时分别地收获细胞培养上清液和细胞。细胞团溶解在1倍LDS样品缓冲液(目录号NP0008;Life technologies,Darmstadt,Germany) 中并且在72 $^{\circ}\text{C}$ 下加热15分钟。为ELISA分析,使用非浓缩的和大约50倍浓缩的上清液。根据制造商说明用Amicon ultra-15离心过滤器单元(Merck Millipore,Billerica,MA,USA) 进行浓缩。在实施例32c的情况下(只有IVT-mRNA),转染后48小时收获上清液并且经受如以上所述的40 倍浓缩。

[0750] a. 使用上清液的ELISA

[0751] 为ELISA分析使用镍包被的平板(Thermo Fisher Scientific,Bonn, Germany) 经由分析物的His-标签用于捕获分析物。首先,每孔用200 μl 洗涤缓冲液(1倍PBS中0.01%吐温-20) 洗涤平板三次。作为标准,将纯化的6PHU3蛋白稀释为1倍PBS中1.75%Na-酪蛋白(=稀释度)。稀释队列范围为2.34-150ng/ml,2倍梯度。每标准稀释液100 μl 转移到每一浓度一式三份的孔中。因此,一式三份地转移100 μl 样品。用胶膜密封平板并且在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30分钟。然后,每孔用200 μl 洗涤缓冲液洗涤平板三次。为6PHU3/6RHU3的检测,使用与mCLDN6ab的 V_H - V_L 特异地结合因此也与6PHU3/6RHU3特异性结合的抗独特型单克隆抗体IgG 4F9。4F9混合到稀释液中至最终浓度2.5 $\mu\text{g/ml}$ 。将 100 μl 抗独特型抗体溶液转移到每孔随后在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30分钟。随后,每孔用200 μl 洗涤缓冲液洗涤平板3次和添加100 μl AP-偶联的抗小鼠

检测抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) —— 稀释液中以 1:500 稀释——至每孔随后在 37℃ 下孵育 30 分钟。在最后洗涤步骤 (3×200μl 洗涤缓冲液) 后, 向每孔添加适当底物缓冲液 (1M 二乙醇胺, 0.5mM MgCl₂, 0.01% 叠氮化钠, pH 9.8) 中 1.5mg/ml 底物 pNPP, 随后在 RT 下暗处孵育 30 分钟。每孔使用 100μl 3M KOH 从而停止酶促反应。用酶标仪 (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Switzerland) 测量吸光度。对于双波长分析, 设定 405nm 为测量波长和设定 492nm 为参照波长。通过从测量波长减去参照波长计算吸光度值。

[0752] 在图 37A 中绘制包括标准差的平均的吸光度值。来自于 6RHU3 IVT-mRNA 和 IVT-复制子转染的细胞的浓缩的上清液引起显著信号, 证明编码双-scFv 的 IVT-RNA 的翻译。来自于模拟转染的细胞和 25 号对照 (-对照) 转染的细胞的浓缩上清液没有产生任何如预期的信号。因为 IVT-mRNA 和 IVT-复制子构建体的不同毒性和轻微不同的 x 倍浓缩物, 不能提出实际蛋白浓度。未浓缩的上清液中大概的蛋白浓度的估算范围为对 IVT-复制子样品而言 1.4ng/ml 和对 IVT-mRNA 样品而言 5.9ng/ml。

[0753] b. 上清液和细胞溶解产物的蛋白印迹分析 (IVT-mRNA 和 IVT-复制子样品)

[0754] 为蛋白印迹分析, 在 NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) 上分离浓缩的上清液和细胞溶解产物。加载 6RHU3 IVT-mRNA, IVT-复制子 RNA, 25 号 IVT-mRNA 转染的 BHK21 细胞或未处理的细胞的上清液和细胞溶解产物和阳性对照-0.1μg 纯化的 6PHU3 蛋白。通过标准方法 (蛋白科学实验指南, 2012) 进行蛋白印迹分析。简单地说, 在 PVDF 膜上印迹蛋白和用 PBST/3% 奶粉封闭后, 在 4℃ 下膜与在封闭缓冲液中以 1:500 稀释的一级抗体抗 HIS 表位-标签 (Dianova GmbH, Hamburg, Germany) 孵育 1 小时。在封闭缓冲液重复洗涤后, 在 4℃ 下膜与在封闭缓冲液中以 1:10000 稀释的 Fc 特异的二级过氧化物酶-偶联的羊抗鼠 IgG 抗体 (Sigma Aldrich, Germany) 孵育 1 小时。在封闭缓冲液重复洗涤后, 通过 SuperSignal West Femto 化学发光底物 (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) 显现信号并且通过 ImageQuant LAS 4000 成像仪 (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany) 记录。与内部分子量标准相比在 50-60kD 之间检测到 6PHU3 的信号。

[0755] 如图 37 B 所示, 在 25 号 IVT-mRNA (1 道), 6RHU3 IVT-mRNA (4 道) 和 6RHU3 IVT-复制子 RNA (5 道) 转染的细胞的上清液中检测到信号, 而道 6 来自于未处理的细胞的上清液没有信号。6RHU3 IVT-mRNA (8 道) 和 IVT-复制子 RNA (9 道) 转染的细胞的细胞溶解产物可以产生强烈的信号。来自于 25 号转染细胞的细胞溶解产物产生非常弱的信号 (2 道), 来自于未处理的细胞溶解产物 (10 道) 没有显示产生信号。可以检测纯化的 6PHU3 蛋白对照 (11 道)。上清液中相对弱的信号和与其一起弱的 6RHU3 分泌可能归因于转染后相对短的孵育时间。由于复制子 RNA 的毒性作用, 不能测试更长的孵育时间。

[0756] ELISA 和蛋白印迹分析都为定性性质并且不用作蛋白浓度测定。

[0757] c. 上清液 (IVT-mRNA 样品) 的蛋白印迹分析

[0758] 转染后 48 小时通过 SDS-PAGE 分离收集的上清液随后如实施例 32b 所述进行蛋白印迹分析。如图 37C 所示, 经由 25 号和 6RHU3 的 His-标签检测 IVT-mRNA 翻译并且分泌到上清液中的 25 号和 6RHU3。因此, 可以证明 6RHU3 的产生和分泌以及用作双-scFv 特异性对照的 25 号的产生和分泌。

[0759] 实施例33:肌肉内RNA注射后体内翻译和功能性CLDN6特异性双-scFv蛋白的检测

[0760] 选择8-16周龄的雌性和雄性NSG小鼠并且分为4组,每组5只小鼠。每只小鼠股肌注射40 μ l RNA溶液。40 μ l RNA溶液由1倍PBS, 5 μ g D2-帽化的6RHU3IVT-mRNA或复制子,2 μ g D1-帽化的荧光素酶IVT-mRNA和0或15 μ g D1-帽化的EBK IVT-mRNA组成。出于RNA 翻译增强的目的(专利申请PCT/EP2012/04673),共注射编码牛痘病毒蛋白E3L,B18R和K3L(EBK)的EBK IVT-mRNA从而抑制IFN应答和抵消PKR活化。注射后24小时用Xenogen IVIS 2000监测荧光素酶信号,从样品集排除没有信号的小鼠。

[0761] 注射后7天收集血液。收获血清随后在-80 $^{\circ}$ C冰冻。

[0762] 细胞毒性测定

[0763] 在体外细胞毒性测定中分析NSG小鼠的血清。用萤火虫荧光素酶稳定转导和内源性表达CLDN6的PA-1靶细胞与人T细胞(如实施例16所述分离)以E:T比率30:1接种用于最大敏感性。测定培养基由添加了10%热失活的FCS,0.5%青霉素-链霉素,1倍NEAA和1mM 丙酮酸钠(Gibco/Life Technologies GmbH,Darmstadt,Germany)的RPMI 1640培养基组成。每个受试样品孔中添加20 μ l解冻的受试血清。用20 μ l未处理的NSG小鼠的血清完成标准的6PHU3蛋白对照孔, L_{min} 和 L_{max} 孔。每孔最终体积为100 μ l。 L_{min} 接种12份, L_{max} 接种6份,并且受试样品接种三份。在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下孵育48小时后,将 L_{max} 孔与10 μ l 2%Triton X-100溶液混合并且孵育10分钟。想所有其他孔添加10 μ l测定培养基。添加50 μ l荧光素溶液(见实施例23),在37 $^{\circ}$ C下暗处30分钟孵育步骤后,在Infinite M200酶标仪(TECAN, Männedorf, Switzerland)中测量平板。如实施例23所述的进行特异性靶细胞溶解的计算。

[0764] 图38中绘制了特异溶解的百分比。在每组中检测到显著的细胞毒性效应。在6RHU3IVT-mRNA的情况下,CLDN6-特异性双-scFv蛋白浓度随EBK共注射而显著增加。这些数据证明了肌肉注射后,来自于IVT-mRNA或-复制子的6RHU3体内翻译和分泌到血流。

[0765] 实施例34:靶向CLDN18.2或CLDN6和CD3双特异性结合剂的产生和测试

[0766] 进一步地研究抗CLDN18.2和抗CLDN6特异性双-scFv抗体片段中,处理针对原始蛋白优化的不同方面。这些方面主要涉及相对于可能由重组蛋白产生形成的不同折叠种类,二硫化同分异构体,和低聚物,获取具有高度同源性的制品。这些修饰不对双-scFv蛋白的功能不利。

[0767] 双-scFv蛋白的抗CD3结合结构域中额外的(未配对的)半胱氨酸残基的取代

[0768] 为了研究Ig结构域的一级序列中存在的未配对的半胱氨酸残基是否干扰对由此得到的抗体片段的正确折叠和稳定性必不可少的链内和/或链间二硫键的正确形成,产生几种合成的构建体。此类未配对的半胱氨酸可损害最终蛋白产物的效力,同源性,生产力和稳定性因此应避免。除了参与二硫键配对的半胱氨酸的“标准的”设置外,可变结构域中可存在游离的半胱氨酸残基。

[0769] 例如在来自于OKT3抗体的VH结构域中,CDR-H3开始之前3个残基位置H92处存在保守的半胱氨酸并且并且与位置H22形成结构性二硫键。但是在这个分子的位置H100A(CDR-H3)中,其他半胱氨酸(Cys)可允许参与与H22形成二硫键的其中H92取代H100A的错误折叠,因此产生错误折叠的,不能溶解的和无功能的产物。为克服半胱氨酸残基这一可能的错误配对,进行游离半胱氨酸的针对位点的取代(Kipriyanov,Protein Engineering 10: 445-453,1997)。通过这种单一取代,实现了来源于OKT3的scFv的显著增加的生产力和稳定

性,维持总体结合活性。

[0770] 本研究中所用的抗CD3抗体TR66的VH结构域(SEQ ID NO:36) 包含如SEQ ID NO:36中所示的一级序列的位置H103处此类游离的半胱氨酸。抗CD3抗体TR66的VH结构域(SEQ ID NO:36) 与抗CD3 抗体OKT3的VH结构域的序列对比显示96.6%序列同源性。

[0771] 根据这些结果,进行抗CD3抗体TR66的VH结构域的CDR-H3 内半胱氨酸被丝氨酸残基的取代用于靶向CD3的双-scFv蛋白(SEQ ID NO:94) 或CLDN18.2或CLDN6。此类取代基的导入产生双-scFv蛋白 1-BiMAB-S(SEQ ID NO:103) 和6-PHU3-S(SEQ ID NO:101) 的设计(分别见表11和12)。

[0772] 抗CLDN6双-scFv蛋白中额外的(未配对的)半胱氨酸残基的取代

[0773] 亲代的抗CLDN6抗体mCLDN6ab,它的可变结构域用于相应的双-scFv蛋白6PHU3(SEQ ID NO:45) 和6PHU5(SEQ ID NO:43) 的组装,包含相应一级序列的位置46处VL结构域的CDR-L2的侧翼区内未配对的半胱氨酸残基。这对应SEQ ID NO:23内位置45,其中VL 的第一个氨基酸已被删除。进行这一游离的半胱氨酸被以下取代基的取代:

[0774] ●抗CD3抗体TR66(SEQ ID NO:100) 的VH结构域中与取代基类似的丝氨酸残基

[0775] ●通过与其他抗CLDN6抗体(SEQ ID NO:97和98) 的氨基酸序列比较,亮氨酸残基

[0776] ●通过与生殖细胞系数据库(SEQ ID NO:99) 的氨基酸序列比较,色氨酸残基

[0777] 抗CLDN18.2双-scFv蛋白中接头长度,V区顺序和人工界面二硫键的评估

[0778] 作为其他实例,Arndt等(Biochemistry 37:12918-12926,1998) 描述了所谓的结构域交换作为出现非共价连接的scFv片段的低聚物的可能的解释。在这种模型下,由于不断发生的VL/VH界面接触的分子内和分子间交换,蛋白状态经受单体和二聚体/低聚体之间可能的热力学平衡。细胞培养上清液中已存在这些低聚物并且在纯化过程期间不应消除。然而,在纯化的单体种类储存期间也可形成这些分子种类。

[0779] 蛋白优选的能量状态受到它的总体设计(一级序列接头长度,VL/VH方向等) 的强烈影响。

[0780] **Wörn** 和Plückthun(JMB 305:989-1010,1999) 监测通过使用20个或更多个残基的接头可实现高含量单体种类的形成。Desplancq等(Protein Eng.7:1027-1033,1994) 指出可变结构域方向也可对二聚体和高分子形式的形成施加影响。在相同的出版物中,Desplancq显示25 个或30个氨基酸(aa) 的接头对他们特定的抗体给予了最佳的单体与二聚体比率。VL的C末端和VH的N末端之间的距离为约**39-43 Å**,并且VH的C末端和VL的N末端之间的距离为**32-34 Å** (Plückthun等., From PCR to fermentation.(J.McCafferty, H.R.Hoogenboom,&D.J. Chriswell,Eds.) (IRL Press.,pp.203-252,1996)。为获得相似的分子特性,用于VL-VH方向的接头必须比VH-VL接头长。Plückthun等(From PCR to fermentation.(J.McCafferty,H.R.Hoogenboom,&D.J. Chriswell,Eds.) (IRL Press., pp.203-252,1996) 推荐使用VH/VL方向中15个或20个氨基酸长度的接头和VL/VH方向中20个或25个氨基酸长度的接头。

[0781] 迫使单体形成和稳定VH/VL结构域相互作用的其他可能性为改造界面二硫键为两个结构域之间接触表面。位置H44-L100(Kabat编号) 处二硫键的导入已成为scFv中最为频繁使用的,取得令人满意的结果(Brinkmann等,PNAS.90:7538-7542,1993; **Wörn** 和Plü

ckthun, Biochemistry 38:8739-8750,1999;Weatherill等,PEDS.25:321-329, 2012)。这种策略已成功地用于稳定结合与IgG全长融合的组合scFv 的IgG样双特异性抗体 (Michaelson等,mAbs 1:128-141,2009; Schanzer等,抗microb.Agents.Chemother.55: 2369-2378,2011)。

[0782] Weatherill等(PEDS 25:321-239,2012)用位置V_H44和V_L-100之间的二硫键稳定人scFv (VH-(G4S)₄-VL和VL-(G4S)₄-VH)。而且,这一出版物通过在不同装载体积和浓度进行不同的SE-HPLC实验解决了不包含界面二硫键的scFv可能的结构域交换的问题。取决于非稳定的 scFv的样品装载条件,测定给出不同的结果,但是无论使用的条件,二硫化物稳定的分子以单体样洗脱。Zhao等(Int.J.Mol.Sci.12:1-11, 2011)介绍了scFv中相同的突变并且观察到在37℃下20小时储存后稳定的分子的更高的稳定性。

[0783] 对使用融合到IgG全长的scFv的双特异形式而言,Schanzer等(抗 microb.Agents Chemother.55:2369-23782011)比较接头长度和界面二硫键的影响。他们在重链或轻链的C末端或N末端融合亲代的scFv 或scdFv (VH-(G4S)₃-VL)。对不同的接头长度(20个,25个和30个氨基酸)而言,他们融合亲代的scFv到重链或轻链的C末端部分。不同接头长度获得的结果鉴定30个氨基酸肽作为用于稳定的单体产生的更优选的接头。在40℃下储存7天后聚集水平为scFv₁₅ 50%, scFv₂₀18%,scFv₂₅ 8%和scFv₃₀ 6%。但是界面二硫键稳定的二硫键 scFv₁₅稍微优越于scFv₃₀。Michaelson等(mAbs,1:128-1412009)使用相同的方法,并且他们改进了他们的含有具有VH/VL方向中15个氨基酸接头的scFv (产生40%聚集)的亲代IgG-样双特异性抗体,通过增加scFv的接头长度为20个氨基酸并且在位置V_H44和V_L-100之间引入界面二硫键。由此得到的分子在4℃下3个月后产生超过98%稳定的单体。作者决定致力于在成为双特异性形式之前改善scFv分子。

[0784] 在抗CLDN18.2特异性双-scFv蛋白的情况下,未知二聚体和高分子形式的形成是否发生和抗紧密连接蛋白和/或抗CD3scFv分子的隐含含义。为评估抗CLDN18.2特异性双-scFv蛋白每一单独的scFv的最佳总体分子,已评估下列修饰:

- [0785] • 结构域方向
- [0786] • 接头长度
- [0787] • 界面二硫键的引入
- [0788] • 三种修饰的组合

[0789] 对抗Claudin18.2结合结构域而言,除了来源于mCLDN18.2ab的可变结构域(VH: SEQ ID NO:8;VL:SEQ ID NO:15),来源于 mCLDN18.2ab1的序列(VH:SEQ ID NO:6;VL:SEQ ID NO:11)已用于抗CLDN18.2特异性双-scFv蛋白的构建。

[0790] A.a部分“序列来源,32种抗CLDN18.2特异性双-scFv构建体的设计,和克隆到表达载体”中的表11描述了不同的构建体。

[0791] A. 靶向CLDN18.2和CD3的双特异性结合剂的产生和测试

[0792] a. 序列起源,32种抗CLDN18.2特异性双-scFv构建体的设计,和克隆到表达载体

[0793] 此处呈现的双特异性串联单链抗体构建体双-scFv包含两个独特的结合结构域,其中第一个对人肿瘤相关抗原(TAA)特异,而第二个对人T细胞受体(CD3)的ε链特异。双特异性分子的这两个结合结构域的每一个都包含两个抗体可变结构域,scFv部分以VH-VL或VL-VH 方向排列。抗体可变结构域经由柔性甘氨酸-丝氨酸肽接头连接,所述肽接头取决于

方向由G₄S亚基的四个或五个重复序列组成。因此，VH-VL方向排列的scFv部分通过20个氨基酸接头(称为“LL4”)连接，VL-VH通过25个氨基酸接头(称为“LL5”)连接。在另一方面两个scFv 部分经由6个氨基酸长的SG₄S接头(称为“SL”)连接。表11中总结了关于来自于单克隆抗体(mAB)的序列来源和结构域组织的信息。

[0794] 变体5504,5505,5506,5507,5512,5513,5514,5515,5520, 5521,5522,5523,5528,5529,5530,5531,5536,5537,5538, 5539,5544,5545,5546,5547,5552,5553,5554,5555,5560, 5561,5562和5563包含SEQ ID NO:95的VH抗CD3和SEQ ID NO: 96的VL抗CD3。

[0795] 在1-BiMAB-S的具体情况下,与1-BiMAB序列(SEQ ID NO:39) 的氨基酸序列比较,VH抗CD3(SEQ ID NO:94)中只有游离的半胱氨酸被丝氨酸取代。应注意的是SEQ ID NO:39仍然包含N末端信号序列的氨基酸序列,在哺乳动物表达后,所述信号序列介导1-BiMAB双-scFv蛋白分泌到细胞培养上清液。这个信号序列不是分泌的重组蛋白的一部分,因为它在内质网的内腔中通过信号肽酶被剪切。

[0796] 使用GeneOptimizer® 软件经由GeneArt® 基因合成(Life Technologies GmbH,Darmstadt,Germany)产生编码-scFv构建体的基因,从而优化密码子使用用于在CHO细胞中表达。除了常见的分泌信号之外,所有DNA构建体在5' 末端包含相同的Kozak序列和HindIII 限制位点。3' 末端添加BsiWI和XhoI识别位点从而允许灵活地亚克隆到不同表达载体。通过Life Technologies使用HindIII和XhoI限制位点进行选择pCEP4 (Life Technologies GmbH,Darmstadt,Germany)的亚克隆到表达载体。

[0797] 表11:双-scFv抗CLDN18.2构建体的总结

[0798]

变体鉴定	抗 CLDN18.2 起源	抗 CD3 起源	TR66 的位置 H103 的取代	结构域顺序 (从 N-末端到 C-末端)	结构域组织 ^{*)}	SEQ ID NO:
1BiMAB-S	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	见实施例 1 中的 1 BiMAB	103
5504	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VH-LL4-VL-SL-VH-LL4-VL	66
5505	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-(VH-LL4-VL)-SL-VH-LL4-VL	67
5506	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VH-LL4-VL-SL-VH-LL4-VL	68
5507	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-(VH-LL4-VL)-SL-VH-LL4-VL	69
5512	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VH-LL4-VL-SL-ds (VH-LL4-VL)	70
5513	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-VH-LL4-VL-SL-ds (VH-LL4-VL)	71
5514	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VH-LL4-VL-SL-ds (VH-LL4-VL)	72
5515	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-VH-LL4-VL-SL-ds (VH-LL4-VL)	73
5520	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VH-LL4-VL-SL-VL-L5-VH	74
5521	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-(VH-LL4-VL)-SL-VL-LL5-VH	75
5522	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VH-LL4-VL-SL-VL-L5-VH	76
5523	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-(VH-LL4-VL)-SL-VL-LL5-VH	77

[0799]

5528	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VH-LL4-VL-SL-ds (VL-LL5-VH)	78
5529	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-VH-LL4-VL-SL-ds (VL-LL5-VH)	79
5530	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VH-LL4-VL-SL-ds (VL-LL5-VH)	80
5531	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-VH-LL4-VL-SL-ds (VL-LL5-VH)	81
5536	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VL-LL5-VH-SL-VH- LL4-VL	82
5537	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-(VL-LL5-VH)-SL- VH-LL4-VL	83
5538	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VL-LL5-VH-SL-VH- LL4-VL	84
5539	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-(VL-LL5-VH)-SL- VH-LL4-VL	85
5544	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VL-LL5-VH-SL-ds (VH-LL4-VL)	86
5545	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-VL-LL5-VH-SL-ds (VH-LL4-VL)	87
5546	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VL-LL5-VH-SL-ds (VH-LL4-VL)	88
5547	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-VL-LL5-VH-SL-ds (VH-LL4-VL)	89
5552	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VL-LL5-VH-SL-VL-L L5-VH	--
5553	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-(VL-LL5-VH)-SL- VL-LL5-VH	--
5554	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VL-LL5-VH-SL-VL-L L5-VH	--

[0800]

5555	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-(VL-LL5-VH)-SL- VL-LL5-VH	--
5560	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VL-LL5-VH-SL-ds (VL-LL5-VH)	90
5561	mCLDN18.2ab1	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-VL-LL5-VH-SL-ds (VL-LL5-VH)	91
5562	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	VL-LL5-VH-SL-ds (VL-LL5-VH)	92
5563	mCLDN18.2ab	TR66	丝氨酸	scFv- 抗 -CLDN18.2-scFv 抗-CD3	ds-VL-LL5-VH-SL-ds (VL-LL5-VH)	93

[0801] *) LL4, (G₄S)₄; LL5, (G₄S)₅; SL, SG₄S

[0802] 应注意的是SEQ ID NO:66-93仍然包含N末端信号序列的氨基酸序列,在哺乳动物表达后,所述信号序列介导1-BiMAB双-scFv蛋白分泌到细胞培养上清液。这个信号序列不是分泌的重组蛋白的一部分,因为它在内质网的内腔中通过信号肽酶被剪切。

[0803] b. 32种抗CLDN18.2特异性双-scFv蛋白通过瞬时转染的产生和纯化

[0804] 悬浮液适合的CHO细胞在湿润的CO₂摇床的无血清培养基中亚培养。转染前一天,将细胞接种在摇床烧瓶中的无血清培养基中。转染当天,离心细胞(5分钟,200×g)并且重悬浮在摇床烧瓶的新鲜的DMEM培养基(Invitrogen,41965-039)中。添加DNA和转染试剂至细胞并且通过振动轻轻地混合。在CO₂孵箱中静态孵育后,用没有血清的生长培养基稀释细胞并且在孵育摇床中进一步地培养用于表达。根据营养素需要量,用CHO CD EfficientFeed™ C(Invitrogen,A13275)饲养细胞。在细胞活力开始减少后收获双-scFv蛋白。通过Capto L琼脂糖凝胶纯化抗体构建体。通过280nm处吸光度测定蛋白浓度。

[0805] c. 32种抗-CLDN18.2特异性双-scFv蛋白的荧光素酶细胞毒性测定

[0806] 为了功能筛选32种抗-CLDN18.2特异性双-scFv蛋白,在如实施例2.c所述的体外荧光素酶细胞毒性测定中测试四个点滴定(5000, 1000, 200和40ng/ml)。

[0807] 实施例2.c所述的稳定表达荧光素酶的NugC4细胞与人T细胞和双-scFv蛋白或没有双-scFv蛋白孵育以测定L_{min}值。测定开始后24小时和48小时用Infinite M200酶标仪测量活细胞的发光。通过实施例2.c示例的公式计算特异性靶细胞溶解。

[0808] 通过基于scFv抗-CD3TR66结合结构域进行细胞毒性结果的定性分析(图39a,b,c和d),取得下列观察结果。

[0809] 荧光素酶细胞毒性测定中最佳表现的抗-CLDN18.2-特异性双-scFv蛋白包含通过“LL4”接头连接的VH/VL结构域方向的抗-CD3部分,具有或不具有界面二硫键(5504、5505、5506、5507、5536、5537、5538、5539、5512、5513、5514、5515、5544、5545、5546、5547;图39a和b)。包含VL/VH结构域方向的抗-CD3部分,具有肽接头“LL5”并包含界面二硫键的变体(5528、5529、5530、5531、5560、5561、5562、5563;图39d)获得较低的细胞毒性活性。包含

VL/VH结构域方向抗 CD3部分,具有肽接头“LL5”,没有界面二硫键的变体(5520、5521、5522、5523、5552、5553、5554、5555;图39c)获得最低的细胞毒性活性。

[0810] B. 靶向CLDN6和CD3的双特异性结合剂的产生和测试

[0811] a. 序列起源,双-scFv构建体的设计,和克隆到表达载体

[0812] 此处呈现的双特异性串联单链抗体构建体双-scFv包含两个独特的结合结构域,其中一个对人肿瘤相关抗原(TAA)特异,而另一个对人T细胞受体(CD3)的ε链特异。双特异性分子的这两个结合结构域的每一个都包含两个抗体可变结构域,scFv部分以VH-VL或VL-VH方向排列。抗体可变结构域经由柔性甘氨酸-丝氨酸肽接头连接。靶向TAA的scFv部分以VH-VL方向排列并且通过15个氨基酸的接头(称为“LL3”)连接,所述接头由G₄S亚基的三个相同的重复序列组成。靶向CD3的scFv部分也以VH-VL方向排列,但是通过18个氨基酸的接头(称为LLv1)连接,所述接头序列为G₄S(G₂S)₃G₃S。在另一方面,两个scFv部分经由6个氨基酸长的SG₄S接头(称为“SL”)连接。表12中总结了关于来自于单克隆抗体(mAB)的序列来源和结构域组织的信息。变体5454、5456、5458、5460、5462和5464包含抗-CD3结合结构域VH抗-CD3SEQ ID NO:95和VL抗-CD3SEQ ID NO:96。变体5454和5458包含VL抗-CLDN6SEQ ID NO:98;变体5456和5460包含VL抗-CLDN6SEQ ID NO:99;变体5462和5464包含VL抗-CLDN6SEQ ID NO:100。

[0813] 在6PHU3-S(SEQ ID NO:101)的具体情况下,与6-PHU3序列(SEQ ID NO:45)的氨基酸序列比较,VH抗-CD3(SEQ ID NO:94)中只有游离的半胱氨酸被丝氨酸残基取代。应注意的是SEQ ID NO:45仍然包含N末端信号序列的氨基酸序列,在哺乳动物表达后,所述信号序列介导所述信号序列介导6-PHU-3双-scFv蛋白分泌到细胞培养上清液。这个信号序列不是分泌的重组蛋白的一部分,因为它在内质网的内腔中通过信号肽酶被剪切。而且,对6PHU3-SL(SEQ ID NO:102)而言,与6PHU3-S的氨基酸序列比较,VL抗-CLDN6(SEQ ID NO:97)中相应一级序列的位置46处游离的半胱氨酸被亮氨酸残基取代。这对应SEQ ID NO:23中位置45,SEQ ID NO:23中第一氨基酸VL已被删除。

[0814] 使用GeneOptimizer®软件经由GeneArt®基因合成(Life Technologies GmbH,Darmstadt,Germany)产生编码双-scFv构建体的基因从而优化密码子使用用于在CHO细胞中表达。除了常见的分泌信号之外,所有DNA构建体在5'末端包含相同的Kozak序列和HindIII限制位点。3'末端添加BsiWI和XhoI识别位点从而允许灵活地亚克隆到不同表达载体。使用HindIII和BsiWI限制位点使用标准技术进行选择pEE12.4(Lonza Group Ltd,Basel,Switzerland)的亚克隆到表达载体。

[0815] 表12: 双-scFv抗-CLDN6构建体的总结

[0816]

变体鉴定	抗-CLDN6起源	mCLDN6ab的位置 L46处取代	抗-CD3来源	TR66 的位置 H103 处取代	结构域顺序 (从 N-末端到 C-末端)	结构域组织 ^{*)}	SEQ ID NO:
------	-----------	--------------------	---------	-------------------	----------------------	---------------------	------------

[0817]

5454	mCLDN6ab	亮氨酸	TR66	丝氨酸	scFv 抗 -CLDN6-scFv 抗-CD3	VH-LL3-VL-SL -VH-LLv1-VL	60
5456	mCLDN6ab	色氨酸	TR66	丝氨酸	scFv 抗 -CLDN6-scFv 抗-CD3	VHLL3VL-SL- VH-LLv1-VL	61
5462	mCLDN6ab	丝氨酸	TR66	丝氨酸	scFv 抗 -CLDN6-scFv 抗-CD3	VH-LL3-VL-SL -VH-LLv1-VL	62
6PHU3-S	mCLDN6ab	NA	TR66	丝氨酸	scFv 抗 -CD3-scFv 抗 -CLDN6	见实施例 9 中 6PHU3	101
6PHU3-SL	mCLDN6ab	亮氨酸	TR66	丝氨酸	scFv 抗 -CD3-scFv 抗 -CLDN6	见实施例 9 中 6PHU3	102
5458	mCLDN6ab	亮氨酸	TR66	丝氨酸	scFv 抗 -CD3-scFv 抗 -CLDN6	VH-LLv1-VL-S L-VH-LL3-VL	63
5460	mCLDN6ab	色氨酸	TR66	丝氨酸	scFv 抗 -CD3-scFv 抗 -CLDN6	VH-LLv1-VL-S L-VH-LL3-VL	64
5464	mCLDN6ab	丝氨酸	TR66	丝氨酸	scFv 抗 -CD3-scFv 抗 -CLDN6	VH-LLv1-VL-S L-VH-LL3-VL	65

[0818] *) LL3, (G₄S)₃; LLv1, G₄S (G₂S)₃G₃S; SL, SG₄S

[0819] b. 6抗CLDN6特异性双-scFv蛋白通过瞬时转染的产生和纯化

[0820] 悬浮液适合的CHO细胞在湿润的CO₂摇床的无血清培养基中亚培养。转染前一天，将细胞接种在摇床烧瓶中的无血清培养基中。转染当天，离心细胞 (5分钟, 200×g) 并且重悬浮在摇床烧瓶的新鲜的 DMEM培养基 (Invitrogen, 41965-039) 中。添加DNA和转染试剂至细胞并且通过振动轻轻地混合。在CO₂孵箱中静态孵育后，用没有血清的生长培养基稀释细

胞并且在孵育摇床中进一步地培养用于表达。根据营养素需要量,用CHO CD EfficientFeed™ C (Invitrogen, A13275) 饲养细胞。在细胞活力开始减少后收获双-scFv 蛋白。通过Capto L琼脂糖凝胶纯化抗体构建体。通过280nm处吸光度测定蛋白浓度。

[0821] c.6种抗-CLDN6特异性双-scFv蛋白的EC50测定

[0822] 为了测定6种抗-CLDN6特异性双-scFv蛋白的半最大有效剂量,在如实施例13所述的体外荧光素酶细胞毒性测定中测试双-scFv蛋白的滴定行。

[0823] 稳定表达荧光素酶的PA-1细胞与人T细胞以E:T比率5:1和浓度范围在2.5pg/ml-5 µg/ml (10倍梯度) 双-scFv蛋白或没有抗-CLDN6特异性双-scFv蛋白孵育以测定L_{min}值。

[0824] 用不同的捐献人制备的人T细胞进行三个独立的测定。结果显示在图40中。

[0825] 通过基于CDR-L2的侧翼区内和抗-CLDN6和抗CD3结合结构域位置上半胱氨酸残基被丝氨酸,亮氨酸或色氨酸取代,进行细胞毒性结果的定量比较,取得下列观察结果。

[0826] 荧光素酶细胞毒性测定中最佳表现的抗-CLDN6-特异性双-scFv 蛋白包含双-scFv蛋白的N末端部分中具有半胱氨酸被色氨酸取代的抗-CLDN6结合结构域(变体5456)。包含C末端部分中具有半胱氨酸被色氨酸(变体5460)或丝氨酸(变体5464)取代的抗-CLDN6的变体获得稍微低的细胞毒性活性。与之前的变体比较,包含双-scFv蛋白的N末端部分中具有半胱氨酸被亮氨酸取代的抗-CLDN6结合结构域的变体(变体5454)和包含双-scFv蛋白的C末端部分中具有半胱氨酸被亮氨酸取代的抗-CLDN6结合结构域的变体(变体5458)中测量的细胞毒性活性较低。令人吃惊地,双-scFv蛋白的N末端部分中具有半胱氨酸被丝氨酸取代的抗-CLDN6结合结构域的变体(变体5462)具有最低的细胞毒性活性。

序列表

<110> 拜恩科技股份有限公司等
<120> 用于治疗表达紧密连接蛋白的癌症疾病的制剂
<130> 674-86 PCT
<150> PCT/EP2012/004712
<151> 2012-11-13
<150> PCT/EP2013/002270
<151> 2013-07-30
<160> 108
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 261
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 1

Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
1 5 10 15

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
20 25 30

[0001]

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
50 55 60

Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
100 105 110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
245 250 255

Lys His Asp Tyr Val
260

<210> 2
<211> 220
<212> PRT
<213> 智人

[0002]

<400> 2

Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu
1 5 10 15

Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val
20 25 30

Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
35 40 45

Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
50 55 60

Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
65 70 75 80

Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu
85 90 95

Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp
100 105 110

Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser
115 120 125

Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Ile Ile
130 135 140

Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu
145 150 155 160

Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
165 170 175

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly
180 185 190

Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser
195 200 205

Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
210 215 220

<210> 3
<211> 220
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

[0003]

Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu
1 5 10 15

Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val
20 25 30

Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
35 40 45

Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
50 55 60

Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
65 70 75 80

Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu
85 90 95

Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp
100 105 110

Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser
115 120 125

Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Val Ile
130 135 140

Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu
145 150 155 160

Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
165 170 175

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly
180 185 190

Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser
195 200 205

Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
210 215 220

<210> 4
<211> 207
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

[0004]

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 5
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

[0005]

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 6

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

[0006]

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

[0007] Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 9

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

[0008]

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗体片段
 <400> 10

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

Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 11
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 11

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

[0009] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 12
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 12

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

[0010]

<400> 13

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 14
<211> 113

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 14

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

[0011]

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 15
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 15

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 16

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

[0012]

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 17
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 17

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

[0013]

<210> 18
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗体片段
 <400> 18

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

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 19
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 19

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

[0014]

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 20
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 20

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

[0015] <400> 21

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu His
20 25 30

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Val Tyr Ser
35 40 45

Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp
65 70 75 80

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ile Tyr Pro Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 22
<211> 117
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 22

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0016] Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 23

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 23

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
20 25 30

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr Ser
35 40 45

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
50 55 60

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
65 70 75 80

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 24

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 24

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

[0017]

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Phe Gly Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 25

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 25

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

1	5	10	15
Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His	20	25	30
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser	35	40	45
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly	50	55	60
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp	65	70	75
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Pro Trp Thr	85	90	95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	100	105	
<210> 26			
<211> 117			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗体片段			
<400> 26			
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	1	5	10
Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr	20	25	30
Thr Leu Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile	35	40	45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe	50	55	60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	65	70	75
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr	100	105	110

[0018]

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 27

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
20 25 30

Trp Phe Gln Leu Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser
35 40 45

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
50 55 60

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp
65 70 75 80

[0019]

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 28
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 28

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
20 25 30

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Gly Ile Tyr Ser
35 40 45

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly

50

55

60

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
65 70 75 80

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 29

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 29

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
20 25 30

[0020]

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Ser Ile Tyr Ser
35 40 45

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
50 55 60

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
65 70 75 80

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 30

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Gln Asp Tyr Asp Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

[0021]

<220>
<223> 抗体片段

<400> 31

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 32
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 32

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

[0022]

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体片段

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 34
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0023]

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Phe Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Tyr Ser Arg Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Pro Leu Tyr Gly Ser Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 35

Asp Ile Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
1 5 10 15

Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr
20 25 30

Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Asn Thr Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Val Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Arg
100 105

[0024]

<210> 36

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体片段

<400> 36

Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val
1 5 10 15

Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met
20 25 30

His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
35 40 45

Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp
50 55 60

Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
65 70 75 80

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体片段

<400> 37

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

[0025] Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 38
<211> 495
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 双特异性分子

<400> 38

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

[0026]

Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn
290 295 300

Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala
305 310 315 320

Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
325 330 335

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr
340 345 350

Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
355 360 365

Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
370 375 380

Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met
385 390 395 400

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser
405 410 415

[0027]

Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro
420 425 430

Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr
435 440 445

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
450 455 460

Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
465 470 475 480

Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
485 490 495

<210> 39

<211> 520

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双特异性分子

<400> 39

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

[0028]

Ile	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	
		275					280					285				
Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	
	290					295					300					
Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	
305					310					315					320	
Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	
				325					330					335		
Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	
			340					345					350			
Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
		355					360					365				
Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
	370					375					380					
Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
385					390					395					400	
[0029]	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	Asp	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro
				405						410					415	
Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	
			420					425					430			
Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	
		435					440					445				
Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	
	450					455					460					
Val	Pro	Tyr	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	
465					470					475					480	
Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	
				485					490					495		
Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	
			500					505					510			
Leu	Lys	His	His	His	His	His	His									
		515					520									
<210>	40															

<211> 490
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 双特异性分子

<400> 40

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

[0030]

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 130 135 140

Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln
 145 150 155 160

Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln
 165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr
 180 185 190

Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val
 210 215 220

	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly
	225					230					235					240
	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Lys	Leu	Gln	Gln
					245					250					255	
	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys
				260					265					270		
	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys
			275					280					285			
	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser
		290					295					300				
	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu
	305					310					315					320
	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu
					325					330					335	
	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp
				340					345					350		
[0031]	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser
			355					360					365			
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
		370					375					380				
	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
	385					390					395					400
	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
					405					410					415	
	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr
				420					425					430		
	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
			435					440					445			
	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu
		450					455					460				
	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr
	465					470					475					480
	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys						

485

490

<210> 41
 <211> 515
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 双特异性分子

<400> 41

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

[0032]

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro
 145 150 155 160

Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys
 165 170 175

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr
 180 185 190

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
 195 200 205

Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	210	215	220	
Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	225	230	235	240
Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	245	250	255	
Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Lys	260	265	270	
Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	275	280	285	
Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	290	295	300	
Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	305	310	315	320
Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	325	330	335	
[0033]	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	340	345	350
Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	355	360	365	
Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	370	375	380	
Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	385	390	395	400
Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	405	410	415	
Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	420	425	430	
Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	435	440	445	
Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Phe	450	455	460	
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met				

465	470	475	480
Glu Ala Glu Asp	Ala Ala Thr Tyr Tyr	Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn	
	485	490	495
Pro Leu Thr Phe	Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	His His His	
	500	505	510
His His His			
	515		
<210>	42		
<211>	487		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	双特异性分子		
<400>	42		
Glu Val Gln Leu	Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
1	5	10	15
Ser Met Lys Ile	Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr		
	20	25	30
Thr Met Asn Trp	Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile		
	35	40	45
Gly Leu Ile Asn	Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe		
	50	55	60
Lys Gly Lys Ala	Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
	65	70	75
Met Glu Leu Leu	Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
Ala Arg Asp Tyr	Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
	100	105	110
Leu Thr Val Ser	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
	115	120	125
Gly Gly Gly Ser	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser		
	130	135	140
Val Ser Pro Gly	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser		
	145	150	155
			160

[0034]

	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	
					165					170					175		
	Leu	Cys	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	
				180					185					190			
	Phe	Ser	Gly	Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	
			195					200					205				
	Val	Ala	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	
		210					215					220					
	Tyr	Pro	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Ser	
	225					230					235					240	
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	
					245					250					255		
	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	
				260					265					270			
	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	
			275					280					285				
[0035]	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	
		290					295					300					
	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	
	305					310					315					320	
	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	
				325						330				335			
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	
				340					345					350			
	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Gly	
			355					360					365				
	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	Asp	Asp	Ile	
		370					375					380					
	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	
	385					390					395					400	
	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	
					405					410					415		
	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	

	420	425	430
	Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser		
	435	440	445
	Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala		
	450	455	460
	Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly		
	465	470	475 480
	Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu		
	485		
<210>	43		
<211>	513		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	双特异性分子		
<400>	43		
[0036]	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly		
	1	5	10 15
	Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys		
	20	25	30
	Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe		
	35	40	45
	Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu		
	50	55	60
	Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn		
	65	70	75 80
	Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser		
	85	90	95
	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		
	100	105	110
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln		
	115	120	125
	Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
	130	135	140

	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	
	145					150					155					160	
	Ile	Met	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	
				165						170					175		
	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Thr	
				180					185					190			
	Ser	Pro	Lys	Leu	Cys	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	
			195					200					205				
	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	
		210					215					220					
	Ile	Ser	Arg	Val	Ala	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	
	225					230					235					240	
	Arg	Ser	Asn	Tyr	Pro	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	
					245					250					255		
	Ile	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	
				260					265					270			
[0037]	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	
			275					280					285				
	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	
		290					295					300					
	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	
	305					310					315					320	
	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	
					325					330					335		
	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	
				340					345					350			
	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	
			355					360					365				
	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Val	
		370					375					380					
	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	
	385					390					395					400	
	Asp	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	

	405	410	415
Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr			
	420	425	430
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile			
	435	440	445
Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly			
	450	455	460
Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala			
	465	470	475
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu			
	485	490	495
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His His His His			
	500	505	510
His			

[0038]

<210> 44
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 双特异性分子

<400> 44

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

	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	
			115					120					125				
	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	Asp	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	
		130					135					140					
	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	
	145					150					155					160	
	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	
					165					170					175		
	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	
				180					185					190			
	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	
		195						200					205				
	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	
		210					215					220					
[0039]	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	
	225					230					235					240	
	Glu	Leu	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	
					245					250					255		
	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Met	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	
				260					265					270			
	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Thr	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	
			275					280					285				
	Ser	His	Gly	Lys	Asn	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Leu	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	
		290					295					300					
	Gly	Gly	Thr	Ile	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	
	305					310					315				320		
	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	
					325					330					335		
	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly	Phe	Val	
				340					345					350			
	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	

355	360	365
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val 370 375 380		
Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val 385 390 395 400		
Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe 405 410 415		
Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr Ser Thr Ser 420 425 430		
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly 435 440 445		
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala 450 455 460		
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly 465 470 475 480		
[0040] Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 485		
<210> 45		
<211> 513		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 双特异性分子		
<400> 45		
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly 1 5 10 15		
Val His Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg 20 25 30		
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe 35 40 45		
Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu 50 55 60		
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn 65 70 75 80		

	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	
					85					90					95		
	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	
				100					105					110			
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	
			115					120					125				
	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	
		130					135					140					
	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	Asp	Asp	Ile	Gln	Leu	
	145					150					155					160	
	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	
					165					170					175		
	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	
				180					185					190			
	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	
			195					200					205				
[0041]	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	
		210					215					220					
	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	
	225					230					235					240	
	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	
				245						250					255		
	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	
				260					265					270			
	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Met	Lys	Ile	
			275					280					285				
	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Thr	Met	Asn	Trp	
		290					295					300					
	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Asn	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Leu	Ile	Asn	
	305					310					315					320	
	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Ile	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	
				325						330					335		
	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Leu	

	340	345	350
	Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr 355 360 365		
	Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser 370 375 380		
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 385 390 395 400		
	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly 405 410 415		
	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met 420 425 430		
	His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr 435 440 445		
	Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg 450 455 460		
[0042]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu 465 470 475 480		
	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp 485 490 495		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His 500 505 510		
	His		
	<210> 46 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 接头		
	<400> 46		
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 1 5 10 15		
	<210> 47 <211> 16 <212> PRT <213> 人工序列		

<220>

<223> 接头

<400> 47

Val Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp
1 5 10 15

<210> 48

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 48

Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

[0043]

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 50

Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Val Asp

<210> 51

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 分泌信号

<400> 51

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 52
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 分泌信号

<400> 52

Met Asn Ser Gly Leu Gln Leu Val Phe Phe Val Leu Thr Leu Lys Gly
1 5 10 15

Ile Gln Gly

<210> 53
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

[0044] <220>
<223> 分泌信号

<400> 53

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 54
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 分泌信号

<400> 54

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 55
<211> 19

	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 分泌信号	
	<400> 55	
	Met Gly Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser	
	1 5 10 15	
	Ala Gln Ala	
	<210> 56	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸	
	<400> 56	
	tggctctgtg tcgacactgt g	21
	<210> 57	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0045]	<220>	
	<223> 寡核苷酸	
	<400> 57	
	gtgtacatgt tagctgtgga c	21
	<210> 58	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸	
	<400> 58	
	tgacactggc aaaacaatgc a	21
	<210> 59	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸	
	<400> 59	
	ggtccttttc accagcaagc t	21
	<210> 60	

<211> 507
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工抗体

<400> 60

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

[0046]

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser
 145 150 155 160

Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala
 165 170 175

Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr
 180 185 190

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
 195 200 205

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
 210 215 220

	Ile	Ser	Arg	Val	Ala	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	
	225					230					235					240	
	Arg	Ser	Asn	Tyr	Pro	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	
					245					250					255		
	Ile	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	
				260					265					270			
	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	
			275					280					285				
	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	
		290					295					300					
	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	
	305					310					315					320	
	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	
					325					330					335		
	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	
				340					345					350			
[0047]	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	
			355					360					365				
	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	
		370					375					380					
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
	385				390					395						400	
	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	
				405						410					415		
	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	
				420					425					430			
	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	
			435					440					445				
	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Phe	Ser	Gly	
		450					455					460					
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	
	465					470					475				480		
	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	

	485	490	495
	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
	500	505	
<210>	61		
<211>	507		
<212>	PRT		
<213>	人工的		
<220>			
<223>	人工抗体		
<400>	61		
	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly		
	1	5	10 15
	Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys		
	20	25	30
	Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe		
	35	40	45
	Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu		
	50	55	60
[0048]			
	Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn		
	65	70	75 80
	Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser		
	85	90	95
	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		
	100	105	110
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln		
	115	120	125
	Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
	130	135	140
	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser		
	145	150	155 160
	Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala		
	165	170	175
	Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr		
	180	185	190

	Ser	Pro	Lys	Leu	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	
			195					200					205				
	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	
		210					215					220					
	Ile	Ser	Arg	Val	Ala	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	
	225					230					235					240	
	Arg	Ser	Asn	Tyr	Pro	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	
					245					250					255		
	Ile	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	
				260					265					270			
	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	
			275					280					285				
	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	
		290					295					300					
	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	
	305					310					315					320	
[0049]	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	
					325					330					335		
	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	
				340					345					350			
	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	
			355					360					365				
	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	
		370					375					380					
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
	385					390					395					400	
	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	
					405					410					415		
	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	
				420					425					430			
	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	
			435					440					445				
	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Phe	Ser	Gly	

[0050]

Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala	165	170	175
Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr	180	185	190
Ser Pro Lys Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val	195	200	205
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr	210	215	220
Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	225	230	235
Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu	245	250	255
Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly	260	265	270
Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr	275	280	285
[0051] Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg	290	295	300
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly	305	310	315
Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr	325	330	335
Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser	340	345	350
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr	355	360	365
Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly	370	375	380
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly	385	390	395
Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro	405	410	415
Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr			

	420	425	430
	Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile 435 440 445		
	Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly 450 455 460		
	Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala 465 470 475 480		
	Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu 485 490 495		
	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys 500 505		
	<210> 63 <211> 507 <212> PRT <213> 人工的		
	<220> <223> 人工抗体		
[0052]	<400> 63		
	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly 1 5 10 15		
	Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg 20 25 30		
	Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe 35 40 45		
	Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu 50 55 60		
	Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn 65 70 75 80		
	Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser 85 90 95		
	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val 100 105 110		
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp 115 120 125		

	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	130						135					140				
	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu
	145					150					155					160
	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr
					165					170					175	
	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln
				180					185					190		
	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys
			195					200					205			
	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr
	210						215					220				
	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr
	225					230					235					240
	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly
					245					250					255	
[0053]	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu
			260						265					270		
	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Met	Lys	Ile
			275					280					285			
	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Thr	Met	Asn	Trp
	290						295					300				
	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Asn	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Leu	Ile	Asn
	305					310					315					320
	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Ile	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala
					325					330					335	
	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Leu
				340					345					350		
	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Tyr
			355					360					365			
	Gly	Phe	Val	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser
	370						375					380				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser

385	390	395	400
Gln Ile Val Leu Thr	Gln Ser Pro Ser	Ile Met Ser Val Ser	Pro Gly
405		410	415
Glu Lys Val Thr	Ile Thr Cys Ser	Ala Ser Ser Ser	Val Ser Tyr Met
420		425	430
His Trp Phe	Gln Gln Lys Pro	Gly Thr Ser Pro	Lys Leu Leu Ile Tyr
435		440	445
Ser Thr Ser	Asn Leu Ala Ser	Gly Val Pro Ala	Arg Phe Ser Gly Arg
450		455	460
Gly Ser Gly Thr	Ser Tyr Ser Leu Thr	Ile Ser Arg Val	Ala Ala Glu
465	470	475	480
Asp Ala Ala Thr	Tyr Tyr Cys Gln	Gln Arg Ser Asn	Tyr Pro Pro Trp
	485	490	495
Thr Phe Gly	Gly Gly Thr Lys	Leu Glu Ile Lys	
	500	505	

[0054]

<210> 64
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工抗体

<400> 64

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

	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	
				100					105						110		
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	
			115					120					125				
	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
		130					135					140					
	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	
	145					150					155					160	
	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	
					165					170					175		
	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	
				180					185					190			
	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	
			195					200					205				
	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	
		210					215					220					
[0055]	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	
	225					230					235					240	
	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	
					245					250					255		
	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	
				260					265					270			
	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Met	Lys	Ile	
			275					280					285				
	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Thr	Met	Asn	Trp	
		290					295					300					
	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Asn	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Leu	Ile	Asn	
	305					310					315					320	
	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Ile	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	
					325					330					335		
	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Leu	
				340					345					350			
	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Tyr	

	355	360	365
	Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser 370 375 380		
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 385 390 395 400		
	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly 405 410 415		
	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met 420 425 430		
	His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr 435 440 445		
	Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg 450 455 460		
	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu 465 470 475 480		
[0056]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp 485 490 495		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 500 505		
	<210> 65 <211> 507 <212> PRT <213> 人工的		
	<220> <223> 人工抗体		
	<400> 65		
	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly 1 5 10 15		
	Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg 20 25 30		
	Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe 35 40 45		
	Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu 50 55 60		

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu
 145 150 155 160
 Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
 165 170 175
 Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln
 180 185 190
 [0057] Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys
 195 200 205
 Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 210 215 220
 Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly
 245 250 255
 Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 260 265 270
 Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile
 275 280 285
 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp
 290 295 300
 Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn
 305 310 315 320
 Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala

	325	330	335
	Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu 340 345 350		
	Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr 355 360 365		
	Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser 370 375 380		
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 385 390 395 400		
	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly 405 410 415		
	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met 420 425 430		
	His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Ser Ile Tyr 435 440 445		
[0058]	Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg 450 455 460		
	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu 465 470 475 480		
	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp 485 490 495		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 500 505		
	<210> 66 <211> 530 <212> PRT <213> 人工的		
	<220> <223> 人工抗体		
	<400> 66		
	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly 1 5 10 15		
	Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys 20 25 30		

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
 145 150 155 160
 [0059] Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
 165 170 175
 Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
 180 185 190
 Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 195 200 205
 Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
 210 215 220
 Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 225 230 235 240
 Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
 245 250 255
 Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala
 275 280 285
 Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr

[illegible]

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工抗体

<400> 67

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
85 90 95

[0061] Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
145 150 155 160

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
165 170 175

Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
180 185 190

Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
195 200 205

Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
210 215 220

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

225	230	235	240
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser	245	250	255
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly	260	265	270
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala	275	280	285
Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr	290	295	300
Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly	305	310	315
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr	325	330	335
Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser	340	345	350
Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala	355	360	365
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr	370	375	380
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser	385	390	395
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln	405	410	415
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu	420	425	430
Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn	435	440	445
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp	450	455	460
Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly	465	470	475
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp	485	490	495

[0062]

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
500 505 510

Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
515 520 525

His His
530

<210> 68
<211> 530
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工抗体

<400> 68

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

[0063] Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
145 150 155 160

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

	165	170	175
	Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln 180	185	190
	Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys 195	200	205
	Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg 210	215	220
	Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser 225	230	235
	Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser 245	250	255
	Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly 260	265	270
	Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala 275	280	285
[0064]	Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr 290	295	300
	Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly 305	310	315
	Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr 325	330	335
	Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser 340	345	350
	Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala 355	360	365
	Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr 370	375	380
	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser 385	390	395
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln 405	410	415
	Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu 420	425	430

Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
435 440 445

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
450 455 460

Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465 470 475 480

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
485 490 495

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
500 505 510

Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
515 520 525

His His
530

<210> 69
<211> 530
<212> PRT
<213> 人工的

[0065]

<220>
<223> 人工抗体

<400> 69

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

	100	105	110	
	Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp	Arg Gly Asn Ser Phe Asp	Tyr Trp Gly	
	115	120	125	
	Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val	Ser Ser Gly Gly Gly Gly	Ser Gly Gly	
	130	135	140	
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	Ser Gly Gly Gly Ser Asp	Ile Val	
	145	150	155	160
	Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser	Leu Thr Val Thr Ala Gly	Glu Lys Val	
	165	170	175	
	Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser	Gln Ser Leu Leu Asn Ser	Gly Asn Gln	
	180	185	190	
	Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro Gly Gln	Pro Pro Lys	
	195	200	205	
	Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser	Thr Arg Glu Ser Gly Val	Pro Asp Arg	
	210	215	220	
[0066]	Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Phe Thr Leu Thr	Ile Ser Ser	
	225	230	235	240
	Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala	Val Tyr Tyr Cys Gln Asn	Asp Tyr Ser	
	245	250	255	
	Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Cys	Gly Thr Lys Leu Glu Ile	Lys Ser Gly	
	260	265	270	
	Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln	Leu Gln Gln Ser Gly Ala	Glu Leu Ala	
	275	280	285	
	Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys	Met Ser Cys Lys Thr Ser	Gly Tyr Thr	
	290	295	300	
	Phe Thr Arg Tyr Thr Met His	Trp Val Lys Gln Arg Pro	Gly Gln Gly	
	305	310	315	320
	Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile	Asn Pro Ser Arg Gly Tyr	Thr Asn Tyr	
	325	330	335	
	Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys	Ala Thr Leu Thr Thr Asp	Lys Ser Ser	
	340	345	350	
	Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu	Ser Ser Leu Thr Ser Glu	Asp Ser Ala	
	355	360	365	

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr
370 375 380

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
405 410 415

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
420 425 430

Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
435 440 445

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
450 455 460

Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465 470 475 480

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
485 490 495

[0067]

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
500 505 510

Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
515 520 525

His His
530

<210> 70
<211> 530
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工抗体

<400> 70

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

171

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys
305 310 315 320

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
325 330 335

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser
340 345 350

Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
355 360 365

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr
370 375 380

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
405 410 415

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
420 425 430

[0069]

Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
435 440 445

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
450 455 460

Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465 470 475 480

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
485 490 495

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
500 505 510

Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
515 520 525

His His
530

<210> 71
<211> 530
<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工抗体

<400> 71

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
85 90 95

[0070]

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
145 150 155 160

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
165 170 175

Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
180 185 190

Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
195 200 205

Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
210 215 220

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
225 230 235 240

Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
245 250 255

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala
275 280 285

Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr
290 295 300

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys
305 310 315 320

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
325 330 335

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser
340 345 350

Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
355 360 365

[0071]

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr
370 375 380

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
405 410 415

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
420 425 430

Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
435 440 445

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
450 455 460

Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465 470 475 480

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
485 490 495

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
500 505 510

Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
515 520 525

His His
530

<210> 72
<211> 530
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工抗体

<400> 72

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

[0072] Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
145 150 155 160

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
165 170 175

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

[0073]

Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
435 440 445

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
450 455 460

Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465 470 475 480

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
485 490 495

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
500 505 510

Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
515 520 525

His His
530

<210> 73
<211> 530
<212> PRT
<213> 人工的

[0074]

<220>
<223> 人工抗体

<400> 73

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
 145 150 155 160
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
 165 170 175
 Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
 180 185 190
 Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 195 200 205
 Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
 210 215 220
 Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 225 230 235 240
 Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
 245 250 255
 Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala
 275 280 285
 Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr
 290 295 300
 Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys
 305 310 315 320
 Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
 325 330 335
 Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser
 340 345 350
 Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 355 360 365

[0075]

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr
370 375 380

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
405 410 415

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
420 425 430

Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
435 440 445

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
450 455 460

Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465 470 475 480

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
485 490 495

[0076]

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
500 505 510

Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
515 520 525

His His
530

<210> 74
<211> 535
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工抗体

<400> 74

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
145 150 155 160

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
165 170 175

[0077]

Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
180 185 190

Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
195 200 205

Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
210 215 220

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
225 230 235 240

Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
245 250 255

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
275 280 285

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
290 295 300

Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
305 310 315 320

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
325 330 335

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
340 345 350

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
355 360 365

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
385 390 395 400

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
405 410 415

Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
420 425 430

[0078]

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
435 440 445

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
450 455 460

Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
465 470 475 480

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
485 490 495

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
500 505 510

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
515 520 525

Ser His His His His His His
530 535

<210> 75

<211> 535

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工抗体

<400> 75

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

[0079]

Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
145 150 155 160

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
165 170 175

Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
180 185 190

Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
195 200 205

Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
210 215 220

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
225 230 235 240

Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
 245 250 255
 Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
 275 280 285
 Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
 290 295 300
 Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
 305 310 315 320
 Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
 325 330 335
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
 340 345 350
 Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
 355 360 365
 [0080]
 Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
 370 375 380
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
 405 410 415
 Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
 420 425 430
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
 435 440 445
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 450 455 460
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
 465 470 475 480
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
 485 490 495

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
500 505 510

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
515 520 525

Ser His His His His His His
530 535

<210> 76
<211> 535
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工抗体

<400> 76

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

[0081] Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
145 150 155 160

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
165 170 175

Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
180 185 190

Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
195 200 205

Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
210 215 220

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
225 230 235 240

Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
245 250 255

Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
275 280 285

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
290 295 300

[0082]

Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
305 310 315 320

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
325 330 335

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
340 345 350

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
355 360 365

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
385 390 395 400

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
405 410 415

Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
420 425 430

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
435 440 445

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
450 455 460

Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
465 470 475 480

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
485 490 495

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
500 505 510

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
515 520 525

Ser His His His His His His
530 535

<210> 77
<211> 535
<212> PRT
<213> 人工的

[0083]

<220>
<223> 人工抗体

<400> 77

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
 145 150 155 160
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
 165 170 175
 Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
 180 185 190
 Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 195 200 205
 Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
 210 215 220
 Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 225 230 235 240
 Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
 245 250 255
 Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
 275 280 285
 Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
 290 295 300
 Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
 305 310 315 320
 Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
 325 330 335
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
 340 345 350
 Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
 355 360 365

[0084]

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
385 390 395 400

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
405 410 415

Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
420 425 430

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
435 440 445

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
450 455 460

Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
465 470 475 480

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
485 490 495

[0085]

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
500 505 510

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
515 520 525

Ser His His His His His His
530 535

<210> 78
<211> 535
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工抗体

<400> 78

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
 145 150 155 160

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
 165 170 175

[0086]

Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
 180 185 190

Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 195 200 205

Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
 210 215 220

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 225 230 235 240

Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
 245 250 255

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly
 260 265 270

Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
 275 280 285

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
 290 295 300

Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
305 310 315 320

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
325 330 335

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
340 345 350

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
355 360 365

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
385 390 395 400

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
405 410 415

Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
420 425 430

[0087]

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
435 440 445

Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
450 455 460

Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
465 470 475 480

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
485 490 495

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
500 505 510

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
515 520 525

Ser His His His His His
530 535

<210> 79

<211> 535

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工抗体

<400> 79

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

[0088]

Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
145 150 155 160

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
165 170 175

Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
180 185 190

Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
195 200 205

Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
210 215 220

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
225 230 235 240

	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Asp	Tyr	Ser	
					245					250					255		
	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Ser	Gly	
				260					265					270			
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	
			275					280					285				
	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	
		290					295					300					
	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	
	305					310					315					320	
	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	
					325					330					335		
	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	
				340					345					350			
	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	
			355					360					365				
[0089]	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Gly	
		370					375					380					
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
	385					390					395					400	
	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	
					405				410						415		
	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	
				420					425					430			
	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	
			435					440					445				
	Gly	Gln	Cys	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	
		450					455					460					
	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	
	465					470					475					480	
	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	
					485					490					495		
	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	

	500	505	510
	Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly 515 520 525		
	Ser His His His His His His 530 535		
<210>	80		
<211>	535		
<212>	PRT		
<213>	人工的		
<220>			
<223>	人工抗体		
<400>	80		
	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly 1 5 10 15		
	Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg 20 25 30		
	Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe 35 40 45		
[0090]	Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu 50 55 60		
	Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn 65 70 75 80		
	Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser 85 90 95		
	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val 100 105 110		
	Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly 115 120 125		
	Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 130 135 140		
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val 145 150 155 160		
	Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val 165 170 175		

	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Gln	
				180					185					190			
	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	
			195					200					205				
	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	
		210					215					220					
	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	
	225					230					235					240	
	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Asp	Tyr	Ser	
					245					250					255		
	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Ser	Gly	
				260					265					270			
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	
			275					280					285				
	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	
		290					295					300					
[0091]	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	
	305					310					315					320	
	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	
					325					330					335		
	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	
				340					345					350			
	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	
			355					360					365				
	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Gly	
		370					375					380					
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
	385					390					395					400	
	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	
					405					410					415		
	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	
				420					425					430			
	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	

	435	440	445
	Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr 450	455	460
	Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp 465	470	475 480
	Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu 485	490	495
	Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser 500	505	510
	Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly 515	520	525
	Ser His His His His His His 530	535	
[0092]	<210> 81		
	<211> 535		
	<212> PRT		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 人工抗体		
	<400> 81		
	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly 1	5 10	15
	Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg 20	25	30
	Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe 35	40	45
	Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu 50	55	60
	Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn 65	70	75 80
	Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser 85	90	95
	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val 100	105	110

Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Ser	Trp	Arg	Gly	Asn	Ser	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly				
		115					120					125							
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly				
	130					135					140								
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val				
145					150					155				160					
Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Thr	Ala	Gly	Glu	Lys	Val				
				165					170					175					
Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Gln				
			180					185					190						
Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys				
		195					200					205							
Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg				
	210					215					220								
Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser				
225					230					235					240				
[0093]	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Asp	Tyr	Ser			
				245						250					255				
Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Ser	Gly				
			260					265					270						
Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser				
		275					280					285							
Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser				
	290					295					300								
Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys				
305					310					315					320				
Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg				
				325					330					335					
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser				
			340					345					350						
Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser				
		355					360					365							
Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Gly				

197

Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
50						55					60				
Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu
65					70					75					80
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
				85					90					95	
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr
			100					105						110	
Cys	Gln	Asn	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys
		115					120					125			
Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
130						135					140				
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Gln
145					150					155					160
Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys
				165					170					175	
[0095]	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Gly	Met
			180						185					190	Asn
Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile
		195					200					205			
Asn	Thr	Asn	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Glu	Glu	Phe	Lys	Gly	Arg
	210					215					220				
Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile
225					230					235					240
Asn	Asn	Leu	Lys	Asn	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Leu
				245					250					255	
Gly	Phe	Gly	Asn	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr
			260					265					270		
Val	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser
		275					280					285			
Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys
290						295					300				
Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln

305	310	315	320
Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg	325	330	335
Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr	340	345	350
Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr	355	360	365
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His	370	375	380
Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	385	390	395
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	405	410	415
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser	420	425	430
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser	435	440	445
Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys	450	455	460
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg	465	470	475
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser	485	490	495
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser	500	505	510
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly	515	520	525
Ser His His His His His His	530	535	
<210>	83		
<211>	535		
<212>	PRT		
<213>	人工的		
<220>			

<223> 人工抗体

<400> 83

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
20 25 30

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
100 105 110

[0097] Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln
145 150 155 160

Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys
165 170 175

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
180 185 190

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile
195 200 205

Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg
210 215 220

Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
225 230 235 240

Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu

	245	250	255
	Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr 260	265	270
	Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser 275	280	285
	Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys 290	295	300
	Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln 305	310	315
	Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg 325	330	335
	Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr 340	345	350
	Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr 355	360	365
[0098]	Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His 370	375	380
	Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser 385	390	395
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 405	410	415
	Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser 420	425	430
	Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser 435	440	445
	Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys 450	455	460
	Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg 465	470	475
	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser 485	490	495
	Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser 500	505	510

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
515 520 525

Ser His His His His His His
530 535

<210> 84
<211> 535
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工抗体

<400> 84

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
20 25 30

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

[0099] Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
145 150 155 160

Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
165 170 175

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn

	180	185	190	
	Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly	Gln Gly Leu Glu Trp	Ile Gly Asn Ile	
	195	200	205	
	Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr	Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	Lys Asp Lys	
	210	215	220	
	Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys	Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	Met Gln Leu	
	225	230	235	240
	Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp	Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	Thr Arg Ser	
	245	250	255	
	Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	Thr Leu Thr	
	260	265	270	
	Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Gln Val Gln Leu	Gln Gln Ser	
	275	280	285	
	Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro	Gly Ala Ser Val Lys Met	Ser Cys Lys	
	290	295	300	
[0100]	Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	Arg Tyr Thr Met His Trp	Val Lys Gln	
	305	310	315	320
	Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu	Trp Ile Gly Tyr Ile Asn	Pro Ser Arg	
	325	330	335	
	Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln	Lys Phe Lys Asp Lys Ala	Thr Leu Thr	
	340	345	350	
	Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr	Ala Tyr Met Gln Leu Ser	Ser Ser Leu Thr	
	355	360	365	
	Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr	Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr	Asp Asp His	
	370	375	380	
	Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr Thr Leu Thr	Val Ser Ser	
	385	390	395	400
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	Gly Gly Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Gly	
	405	410	415	
	Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val	Leu Thr Gln Ser Pro Ala	Ile Met Ser	
	420	425	430	
	Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val	Thr Met Thr Cys Arg Ala	Ser Ser Ser	
	435	440	445	

Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
450 455 460

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
465 470 475 480

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
485 490 495

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
500 505 510

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
515 520 525

Ser His His His His His His
530 535

<210> 85
<211> 535
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工抗体

[0101]

<400> 85

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
20 25 30

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys

	115	120	125	
	Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
	130	135	140	
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln			
	145	150	155	160
	Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys			
	165	170	175	
	Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn			
	180	185	190	
	Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile			
	195	200	205	
	Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys			
	210	215	220	
	Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu			
	225	230	235	240
[0102]	Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser			
	245	250	255	
	Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr			
	260	265	270	
	Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser			
	275	280	285	
	Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys			
	290	295	300	
	Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln			
	305	310	315	320
	Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg			
	325	330	335	
	Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr			
	340	345	350	
	Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr			
	355	360	365	
	Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His			
	370	375	380	

Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
405 410 415

Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
420 425 430

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
435 440 445

Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
450 455 460

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
465 470 475 480

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
485 490 495

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
500 505 510

[0103]

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
515 520 525

Ser His His His His His His
530 535

<210> 86
<211> 535
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工抗体

<400> 86

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
20 25 30

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

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

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

[0104]

Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg
325 330 335

Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
340 345 350

Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
355 360 365

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
370 375 380

Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
405 410 415

Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
420 425 430

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
435 440 445

[0105]

Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
450 455 460

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
465 470 475 480

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
485 490 495

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
500 505 510

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
515 520 525

Ser His His His His His His
530 535

<210> 87

<211> 535

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工抗体

<400> 87

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
20 25 30

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
115 120 125

[0106]

Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln
145 150 155 160

Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys
165 170 175

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
180 185 190

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile
195 200 205

Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg
210 215 220

Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
225 230 235 240

Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu
245 250 255

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

[0107]

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
515 520 525

Ser His His His His His His
530 535

<210> 88
<211> 535
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工抗体

<400> 88

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
20 25 30

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

[0108] Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
145 150 155 160

Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
165 170 175

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn
180 185 190

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

[0109]

Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
450 455 460

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
465 470 475 480

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
485 490 495

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
500 505 510

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
515 520 525

Ser His His His His His His
530 535

<210> 89
<211> 535
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工抗体

[0110]

<400> 89

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
20 25 30

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
 145 150 155 160

Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
 165 170 175

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn
 180 185 190

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile
 195 200 205

Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys
 210 215 220

Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
 225 230 235 240

Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser
 245 250 255

[0111]

Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 260 265 270

Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
 275 280 285

Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
 290 295 300

Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln
 305 310 315 320

Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg
 325 330 335

Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
 340 345 350

Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
 355 360 365

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
 370 375 380

Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
405 410 415

Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
420 425 430

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
435 440 445

Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
450 455 460

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
465 470 475 480

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
485 490 495

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
500 505 510

[0112]

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
515 520 525

Ser His His His His His His
530 535

<210> 90

<211> 540

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工抗体

<400> 90

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
20 25 30

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

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

[0113]

Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
325 330 335

Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
340 345 350

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
355 360 365

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
370 375 380

Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
385 390 395 400

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
405 410 415

Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met
420 425 430

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp
435 440 445

[0114]

Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn
450 455 460

Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala
465 470 475 480

Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
485 490 495

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr
500 505 510

Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
515 520 525

Val Ser Ser Gly Gly Ser His His His His His His
530 535 540

<210> 91

<211> 540

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工抗体

<400> 91

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
20 25 30

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
115 120 125

[0115]

Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln
145 150 155 160

Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys
165 170 175

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
180 185 190

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile
195 200 205

Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg
210 215 220

Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
225 230 235 240

Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu
245 250 255

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

[0116]

Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
515 520 525

Val Ser Ser Gly Gly Ser His His His His His His
530 535 540

<210> 92
<211> 540
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工抗体

<400> 92

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
20 25 30

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

[0117] Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
145 150 155 160

Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
165 170 175

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn
180 185 190

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

[0118]

Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn
450 455 460

Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala
465 470 475 480

Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
485 490 495

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr
500 505 510

Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
515 520 525

Val Ser Ser Gly Gly Ser His His His His His His
530 535 540

<210> 93
<211> 540
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工抗体

[0119]

<400> 93

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
20 25 30

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
 145 150 155 160

Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
 165 170 175

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn
 180 185 190

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile
 195 200 205

Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys
 210 215 220

Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
 225 230 235 240

Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser
 245 250 255

[0120]

Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 260 265 270

Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser
 275 280 285

Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
 290 295 300

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
 325 330 335

Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 340 345 350

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 355 360 365

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
 370 375 380

	Glu	Leu	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
	385					390					395						400
	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	
				405						410					415		
	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	
				420					425					430			
	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	
			435					440					445				
	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Cys	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	
		450					455					460					
	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	
	465					470					475					480	
	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	
					485					490					495		
	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	
				500					505					510			
[0121]	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	
			515					520					525				
	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His					
		530					535					540					
	<210>	94															
	<211>	119															
	<212>	PRT															
	<213>	小家鼠 (Mus musculus)															
	<400>	94															
	Asp	Ile	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	
				20					25					30			
	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35						40					45				
	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
		50					55					60					
	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 95
<211> 116
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 95

Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
1 5 10 15

Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His
20 25 30

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
35 40 45

[0122] Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys
50 55 60

Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
65 70 75 80

Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr
85 90 95

Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 96
<211> 103
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 96

Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
1 5 10 15

Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr

	20	25	30
	Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser 35 40 45		
	Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly 50 55 60		
	Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala 65 70 75 80		
	Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala 85 90 95		
	Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys 100		
	<210> 97 <211> 107 <212> PRT <213> 小家鼠		
	<400> 97		
[0123]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly 1 5 10 15		
	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met 20 25 30		
	His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr 35 40 45		
	Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg 50 55 60		
	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu 65 70 75 80		
	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp 85 90 95		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105		
	<210> 98 <211> 106 <212> PRT <213> 小家鼠		
	<400> 98		

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

<210> 99
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

[0124]

<400> 99

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

<210> 100
 <211> 106

<212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 100
 Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 20 25 30
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Ser Ile Tyr Ser
 35 40 45
 Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
 50 55 60
 Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
 65 70 75 80
 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

[0125]

<210> 101
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 双特异性分子 107
 <400> 101
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr
355 360 365

Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
370 375 380

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385 390 395 400

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly
405 410 415

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
420 425 430

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr
435 440 445

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
450 455 460

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
465 470 475 480

[0127]

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp
485 490 495

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His
500 505 510

His

<210> 102

<211> 513

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性分子 123

<400> 102

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

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

[0128]

Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn
305 310 315 320

Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
325 330 335

Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu
340 345 350

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr
355 360 365

Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
370 375 380

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385 390 395 400

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly
405 410 415

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
420 425 430

[0129]

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
435 440 445

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
450 455 460

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
465 470 475 480

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp
485 490 495

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His
500 505 510

His

<210> 103
<211> 520
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 双特异性分子 124

<400> 103

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

[0130]

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro
145 150 155 160

Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys
165 170 175

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr
180 185 190

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
195 200 205

Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
210 215 220

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp
225 230 235 240

Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe
245 250 255

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

[0131]

Leu Lys His His His His His
515 520

<210> 104
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头

<400> 104

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 105
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头

<400> 105

[0132] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 106
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头

<400> 106

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 107
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> His标签

<400> 107

His His His His His His
1 5

[0133] <210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

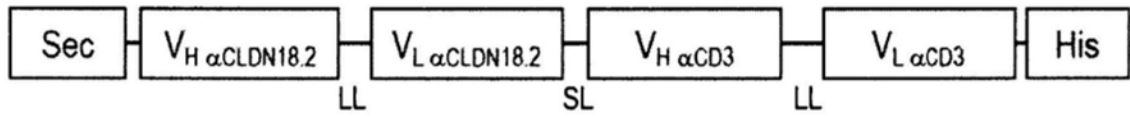
<220>
<223> His标签

<400> 108

Gly Gly Ser His His His His His His
1 5

A

双-scFv CLDN18.2 x CD3



B

双-scFv CD3 x CLDN18.2

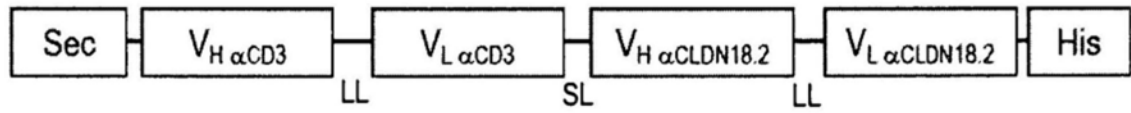


图1

NugC4靶细胞的细胞溶解
(8小时-24小时共孵育)

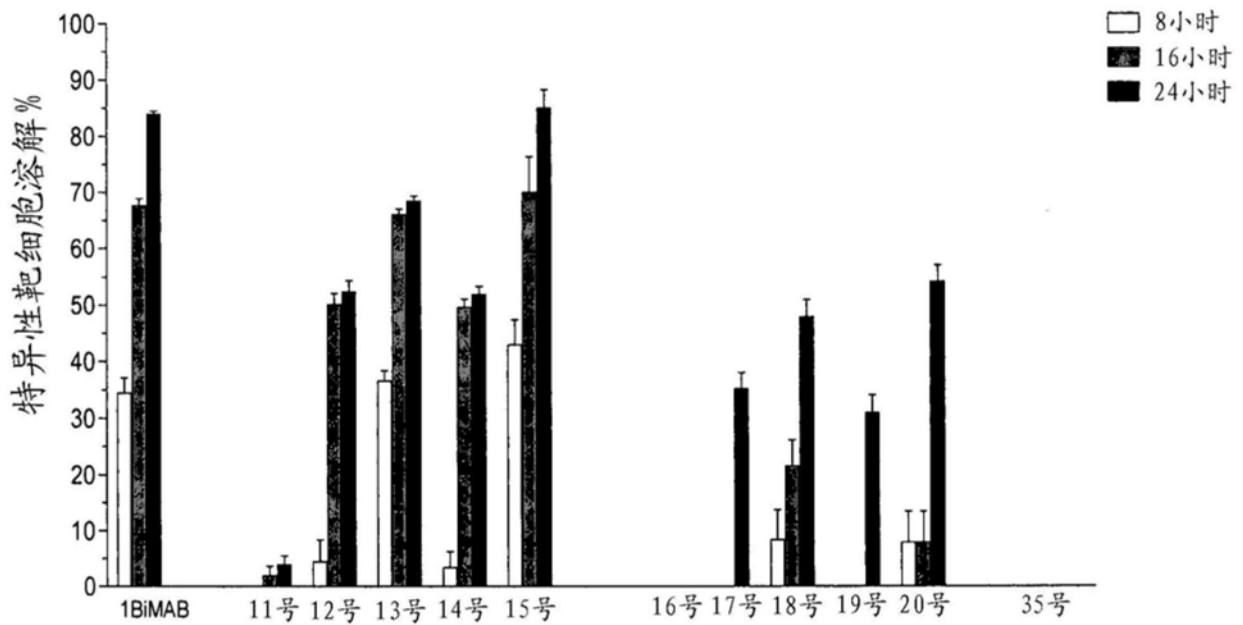


图2

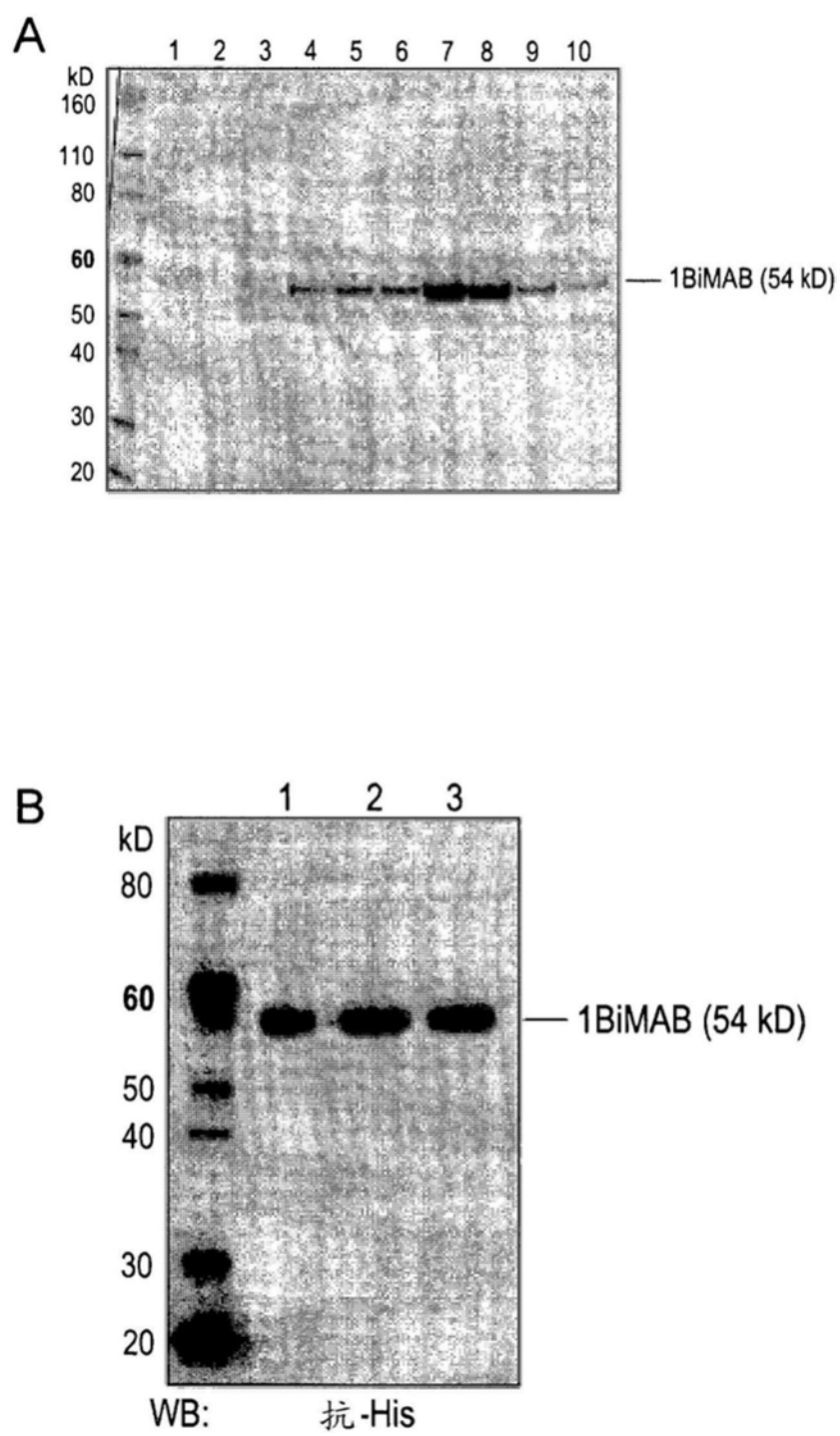
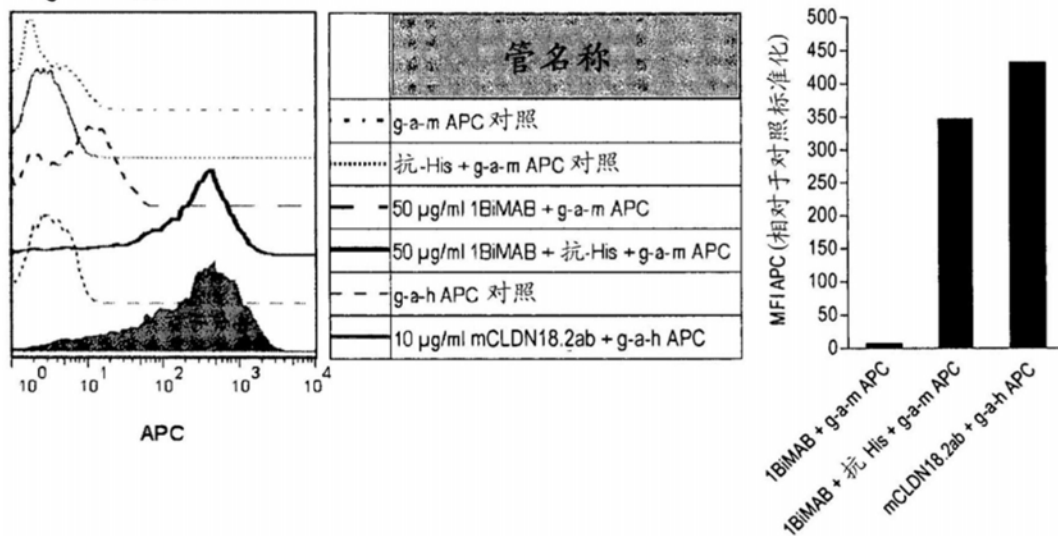


图3

A

NugC4 细胞



B

NugC4 细胞

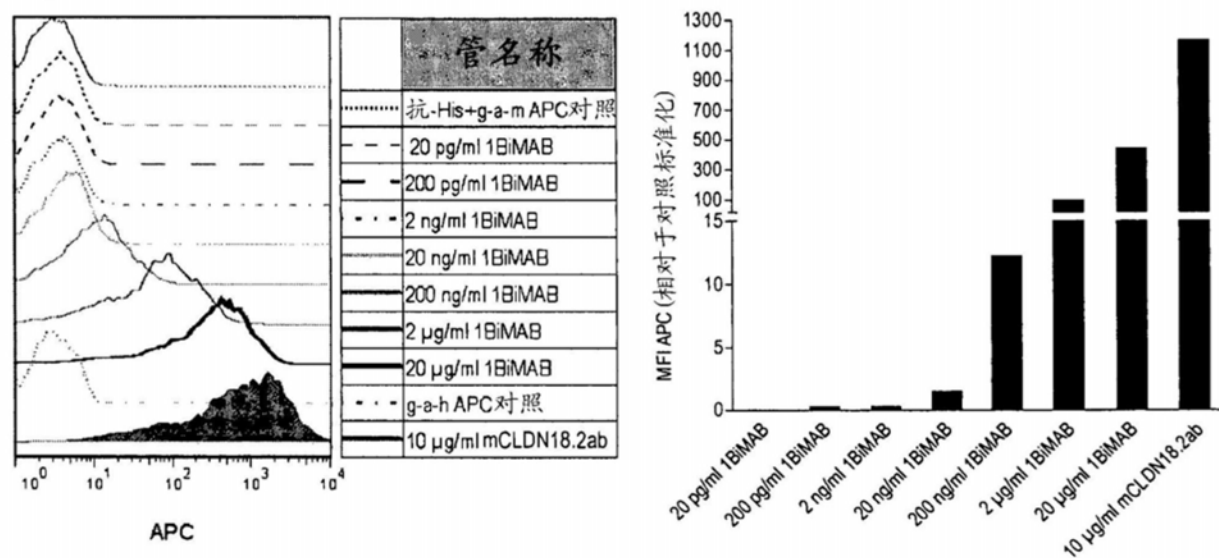
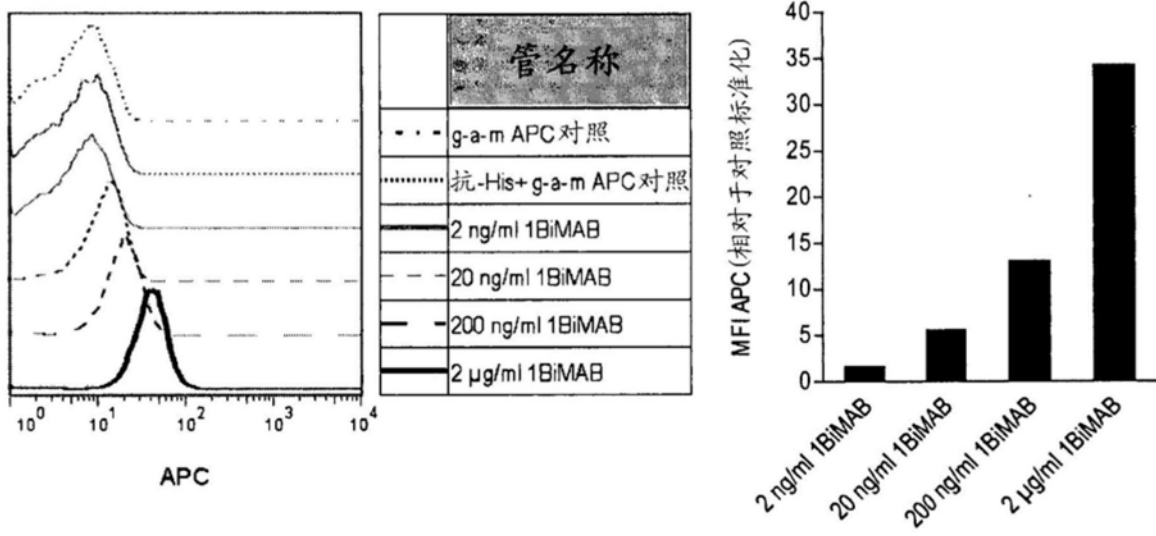


图4

C

人 TL



D

CLDN18.2 阴性细胞系 (PA-1)

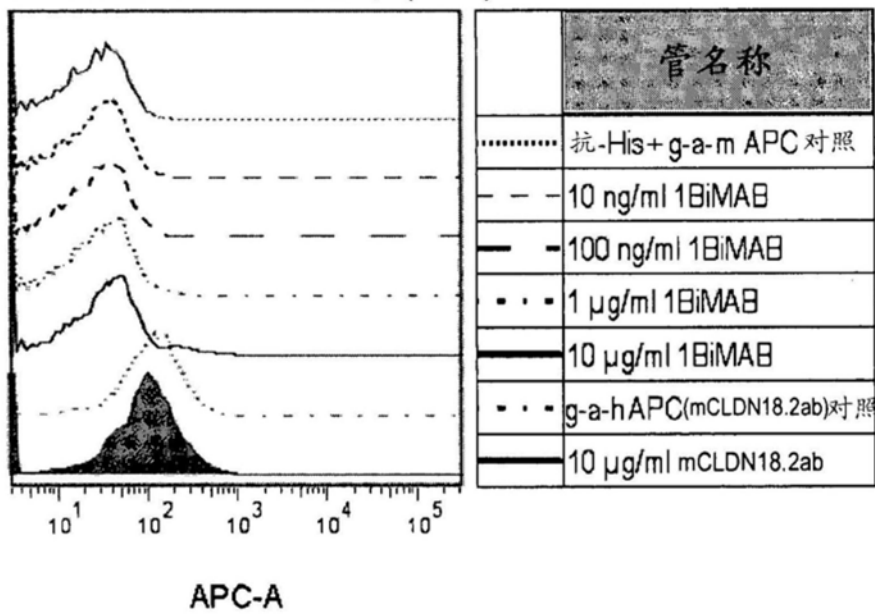


图4

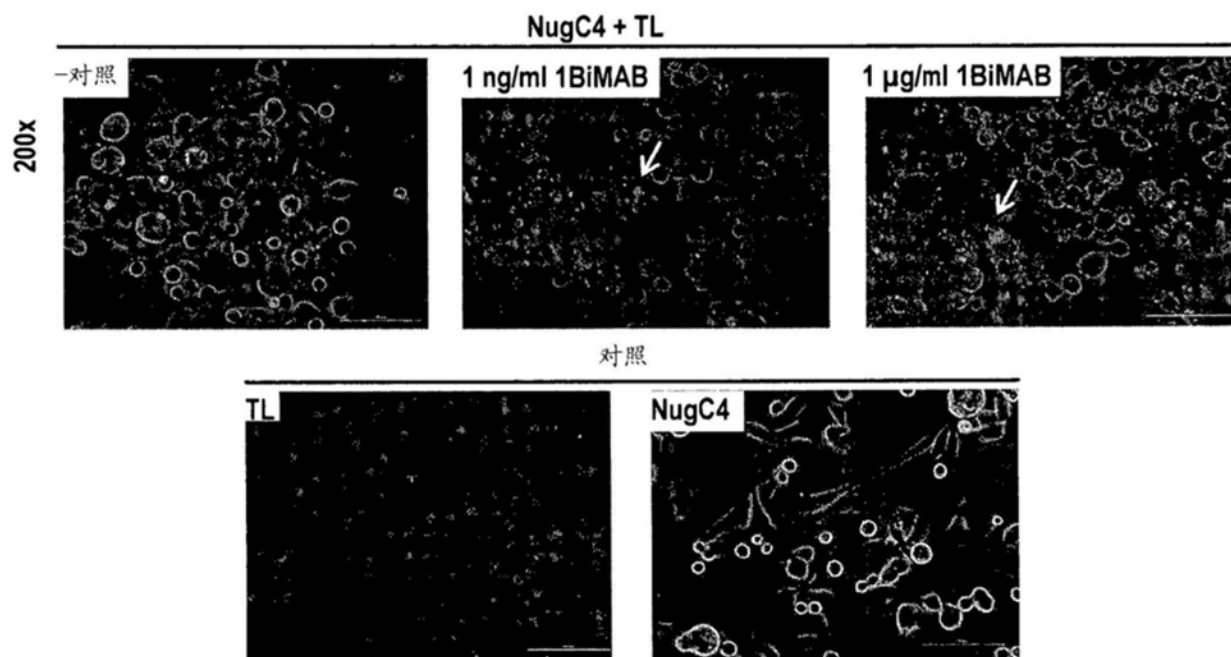


图5

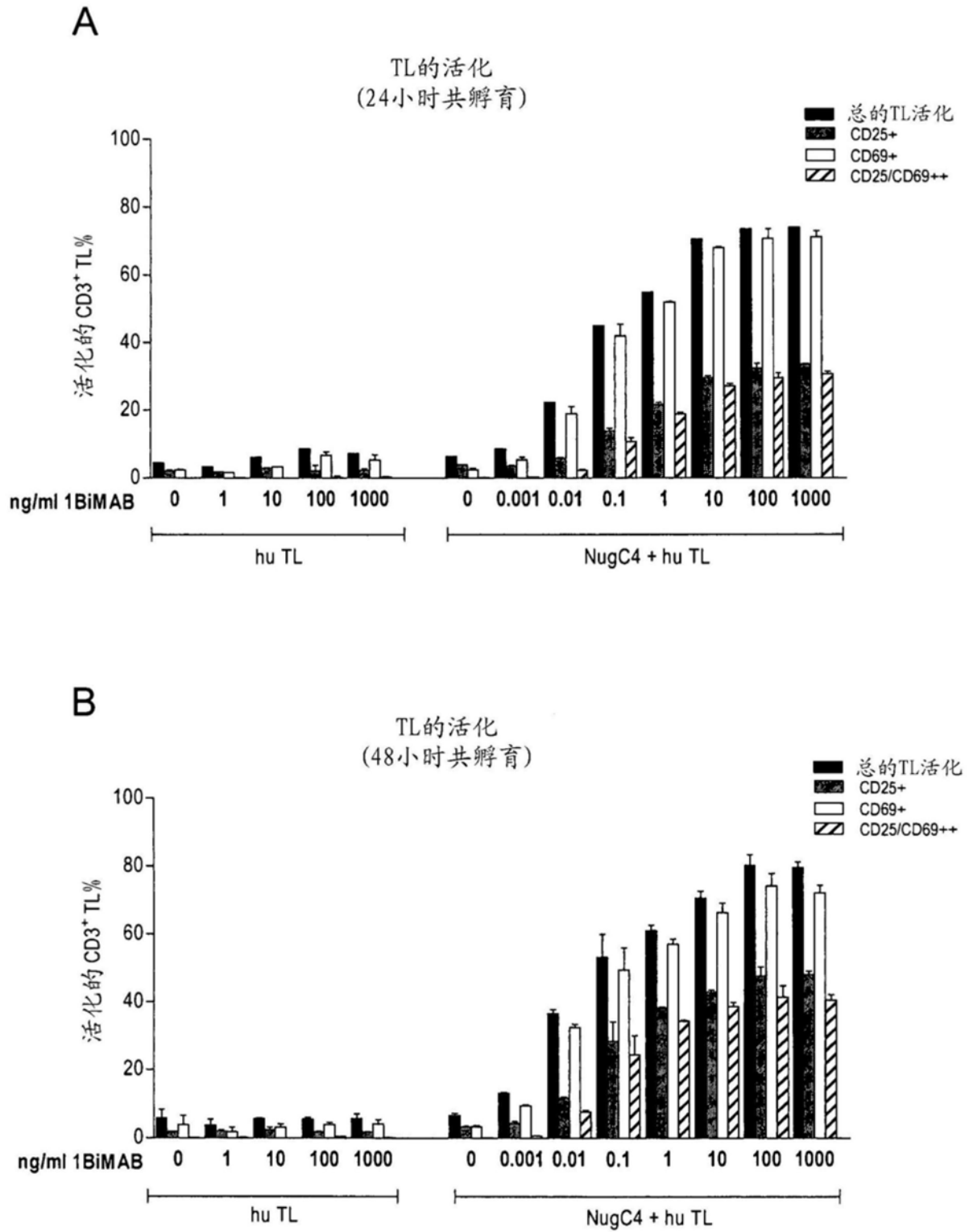


图6

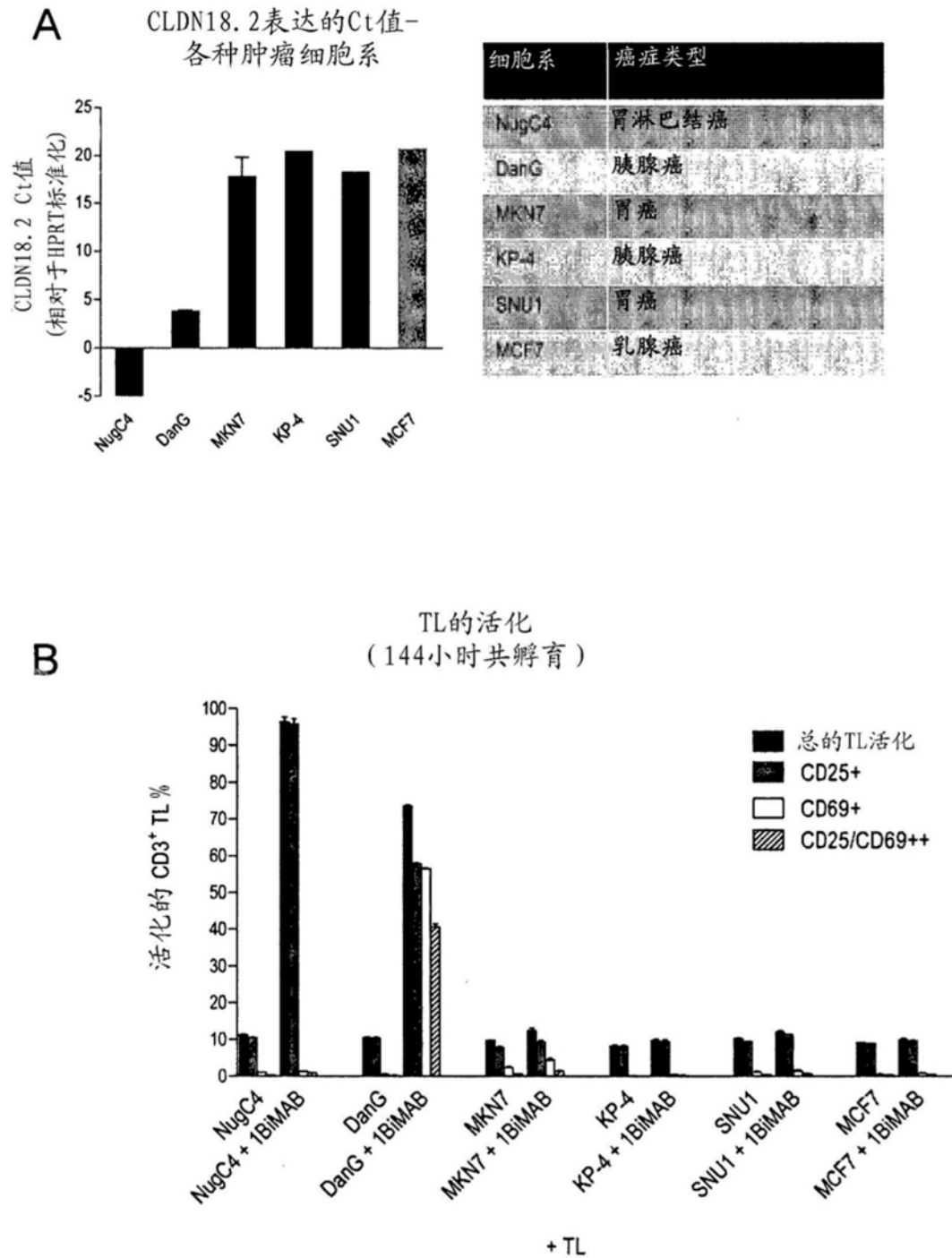


图7

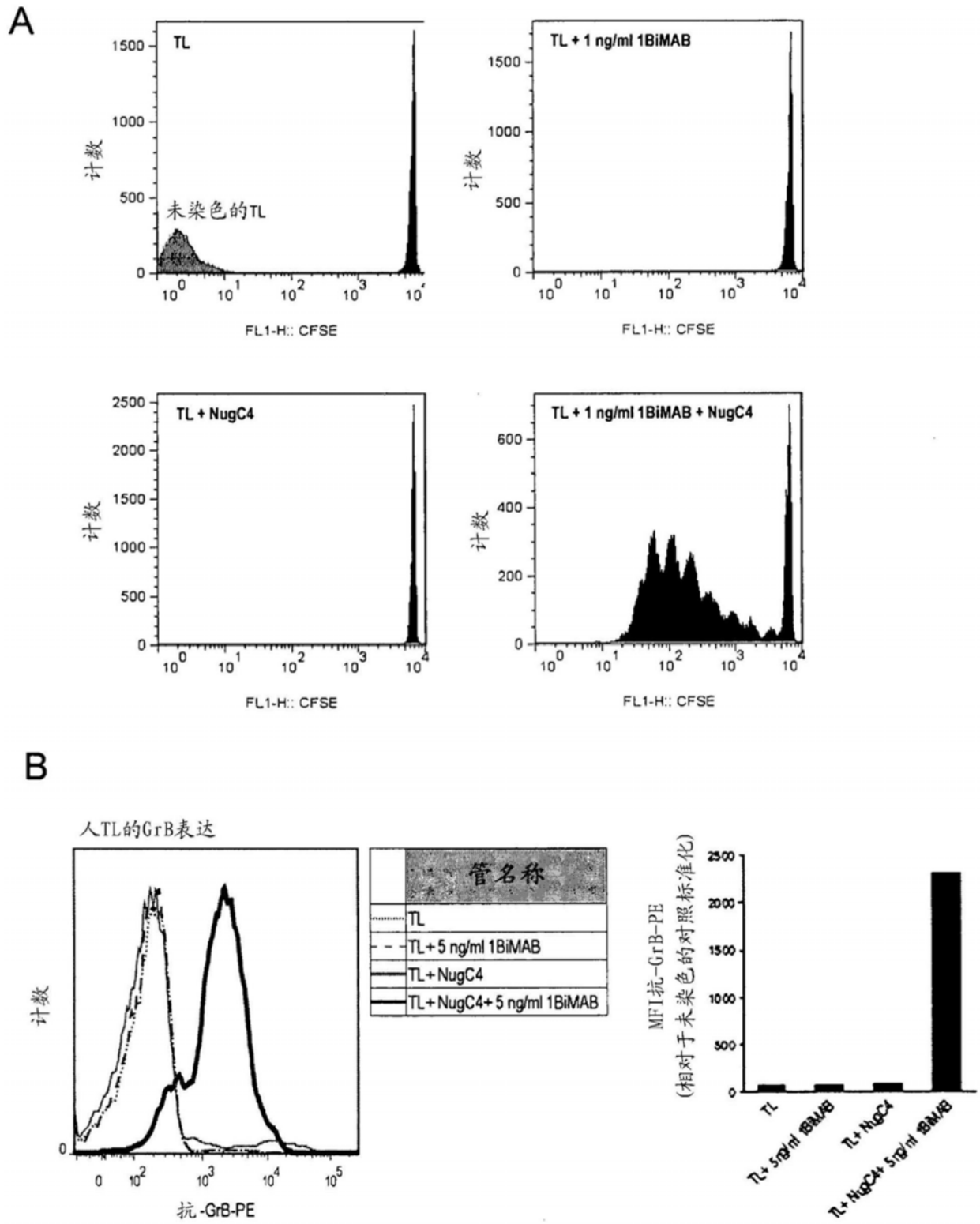


图8

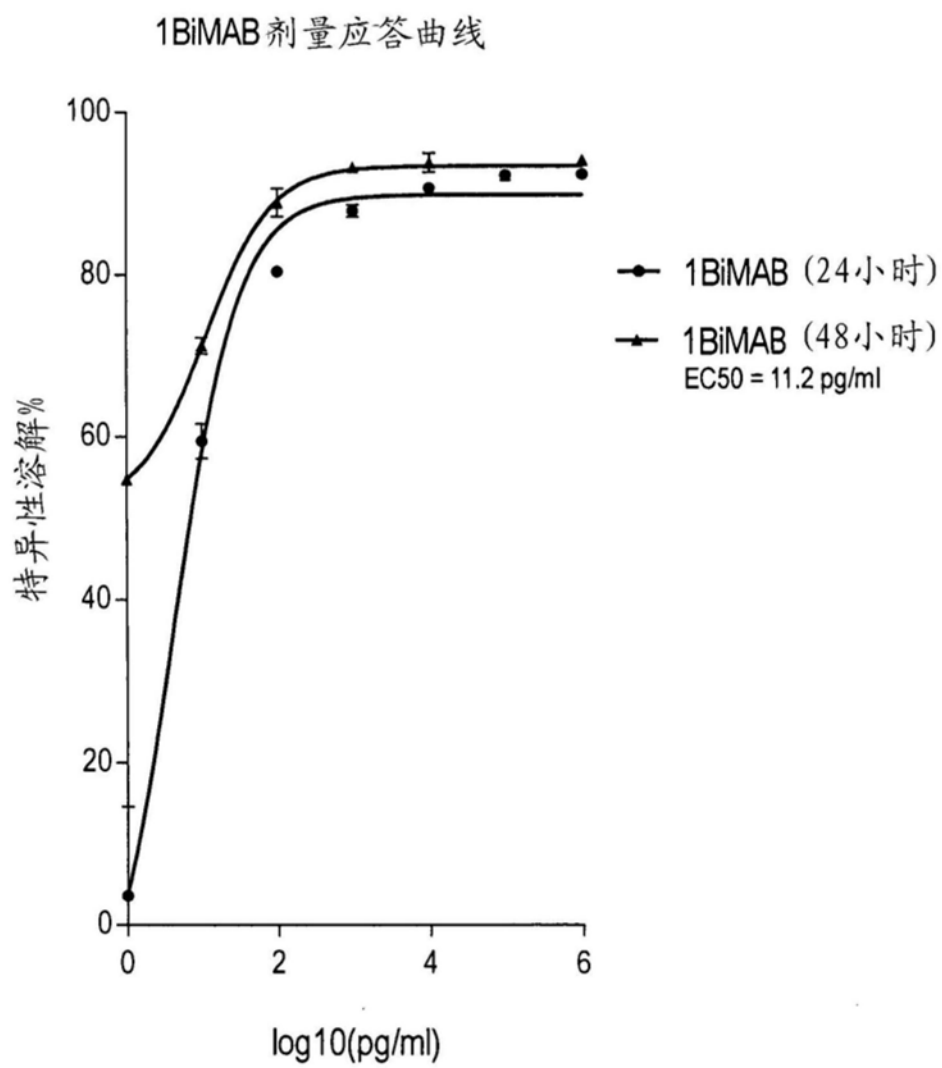
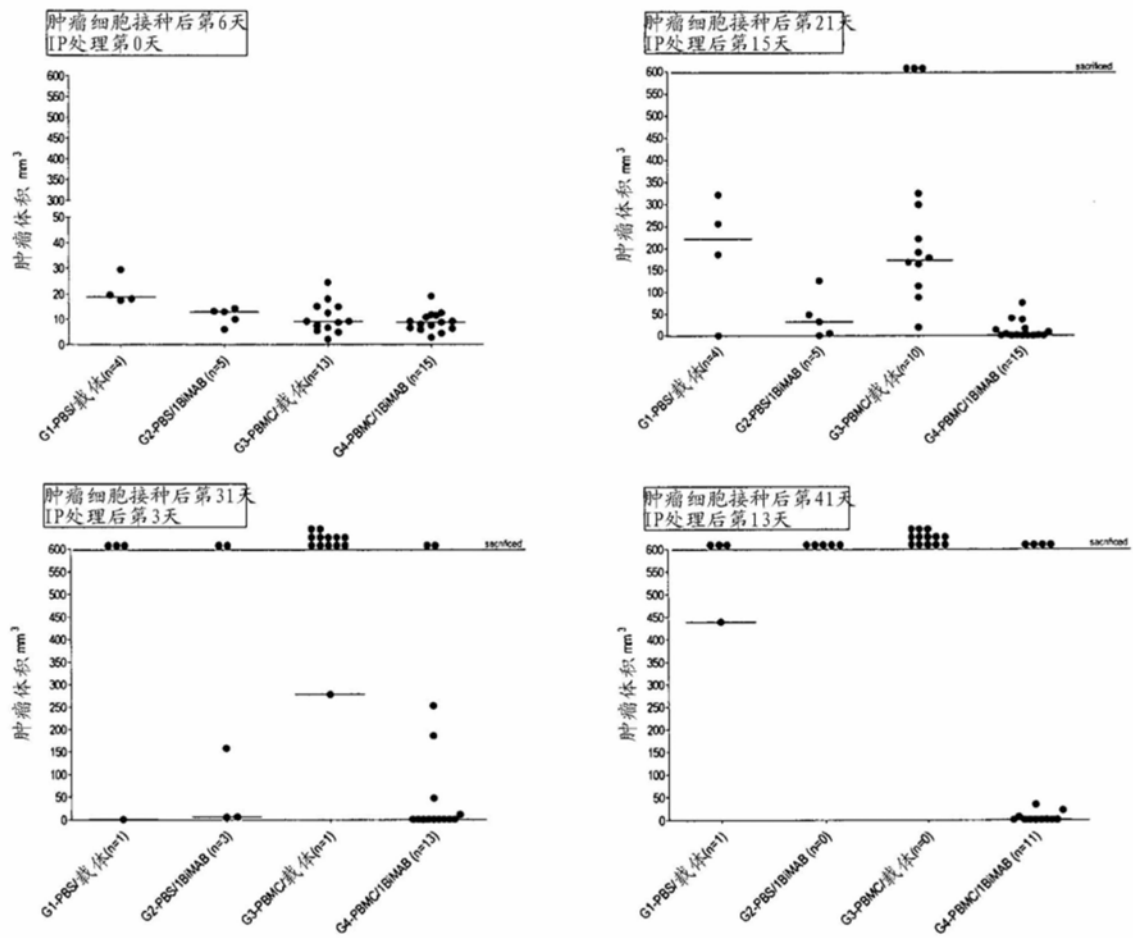


图9

A



B

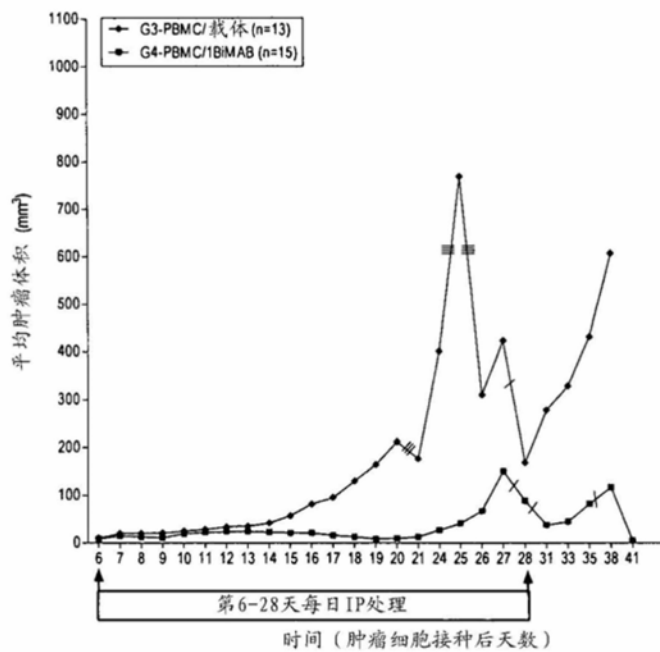
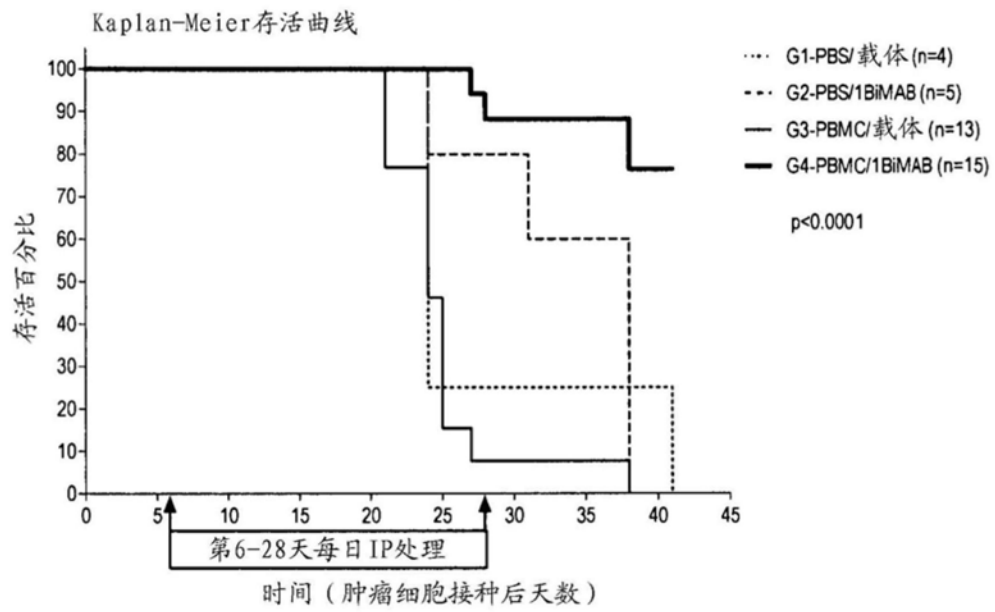


图10

C



D

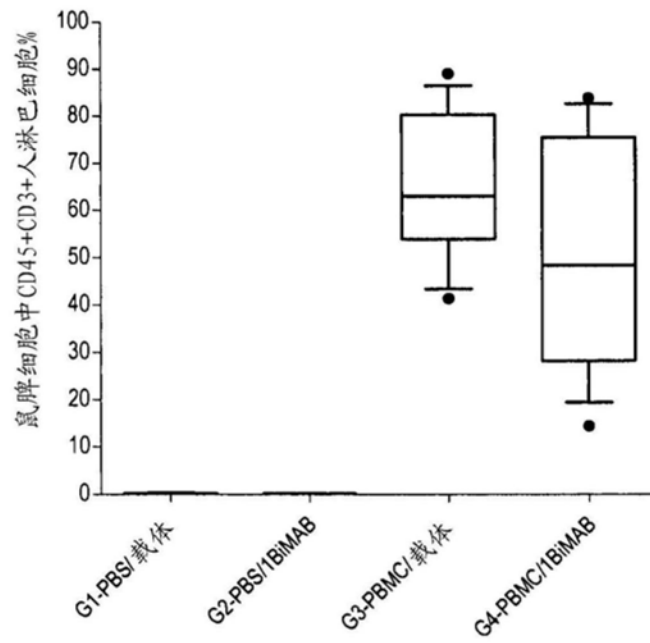


图10

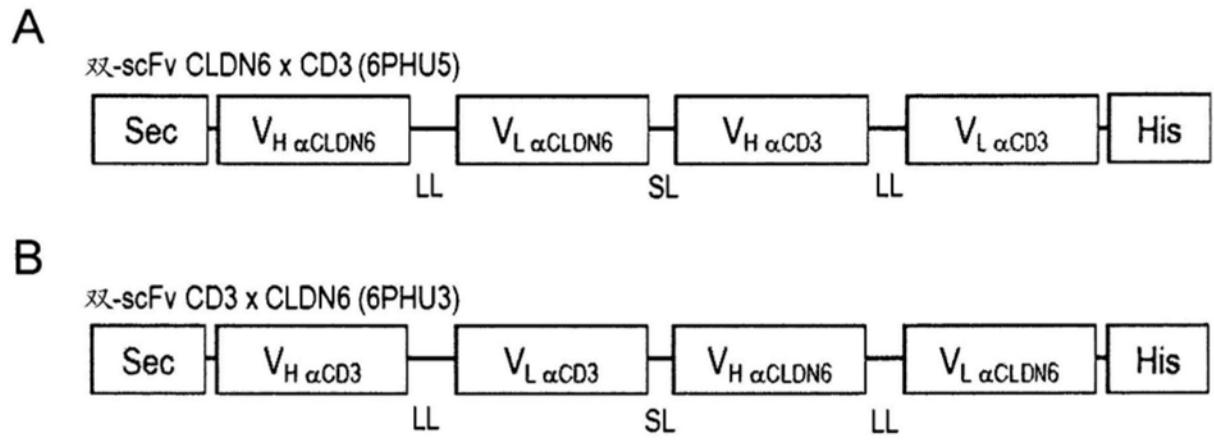


图11

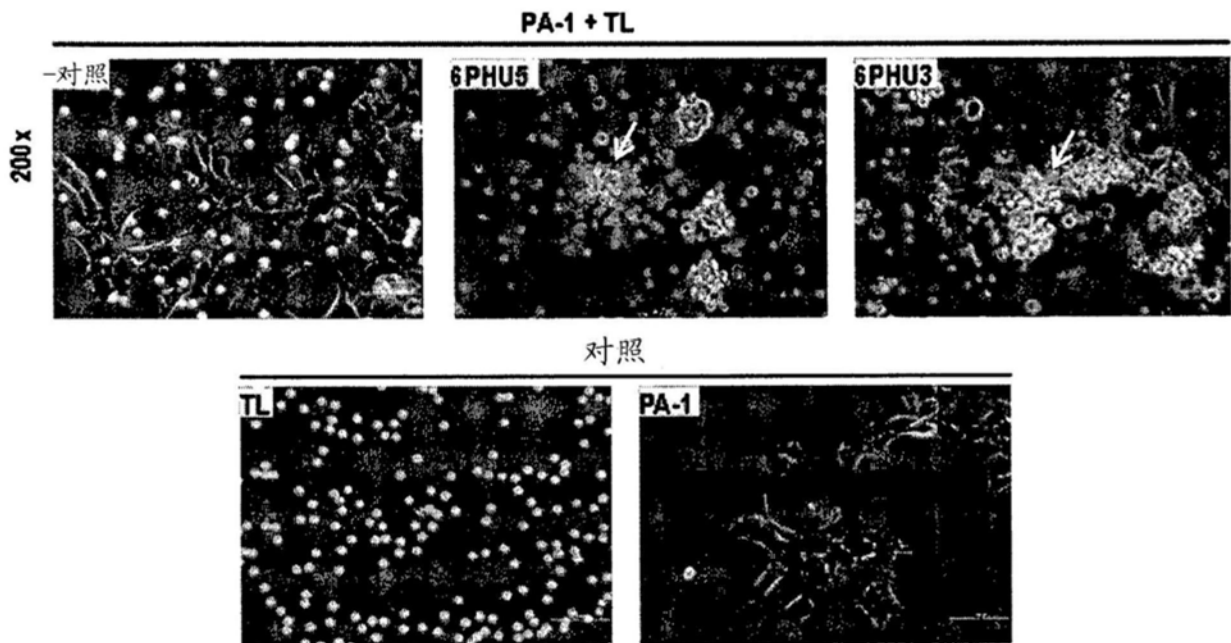


图12

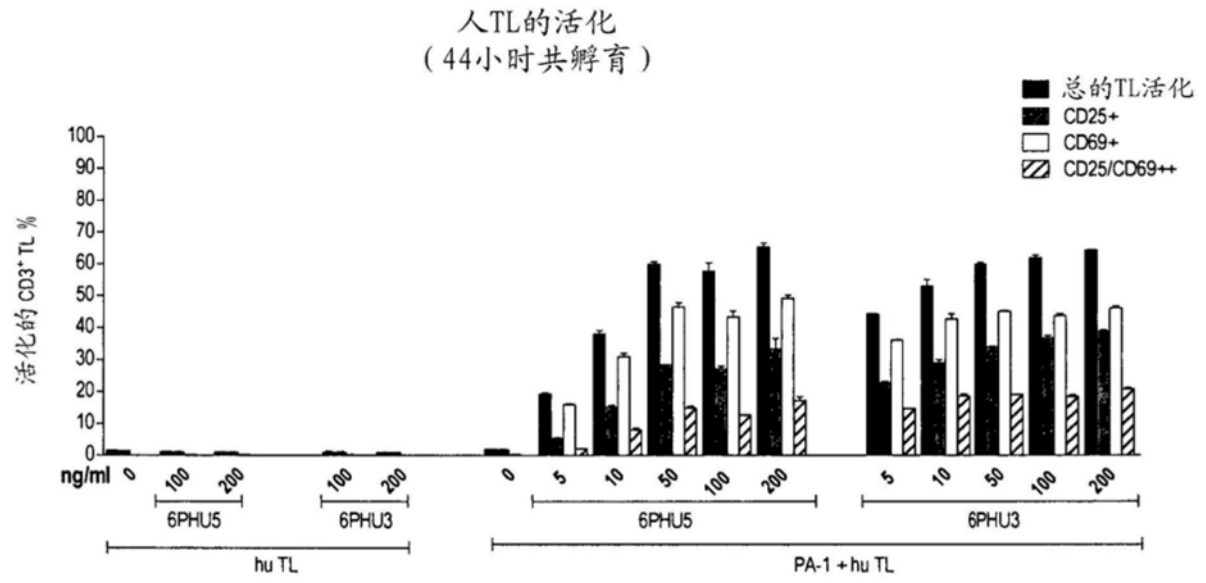
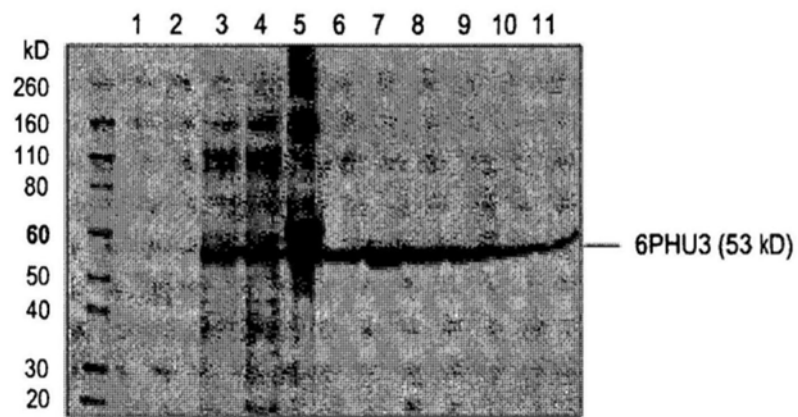


图13

A



B

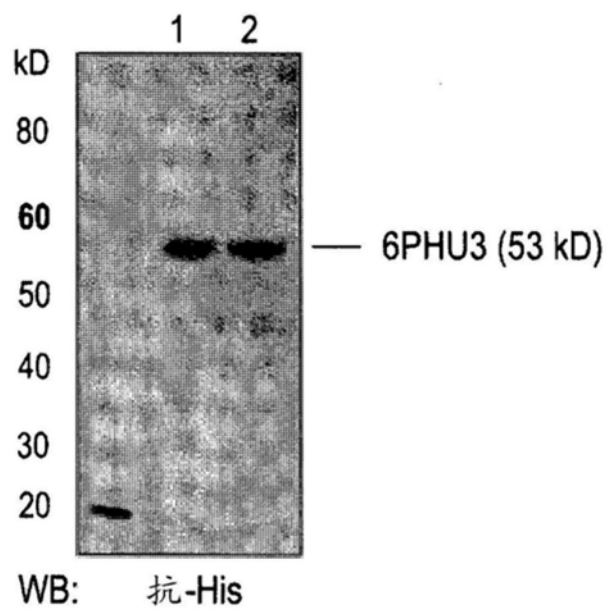


图14

A

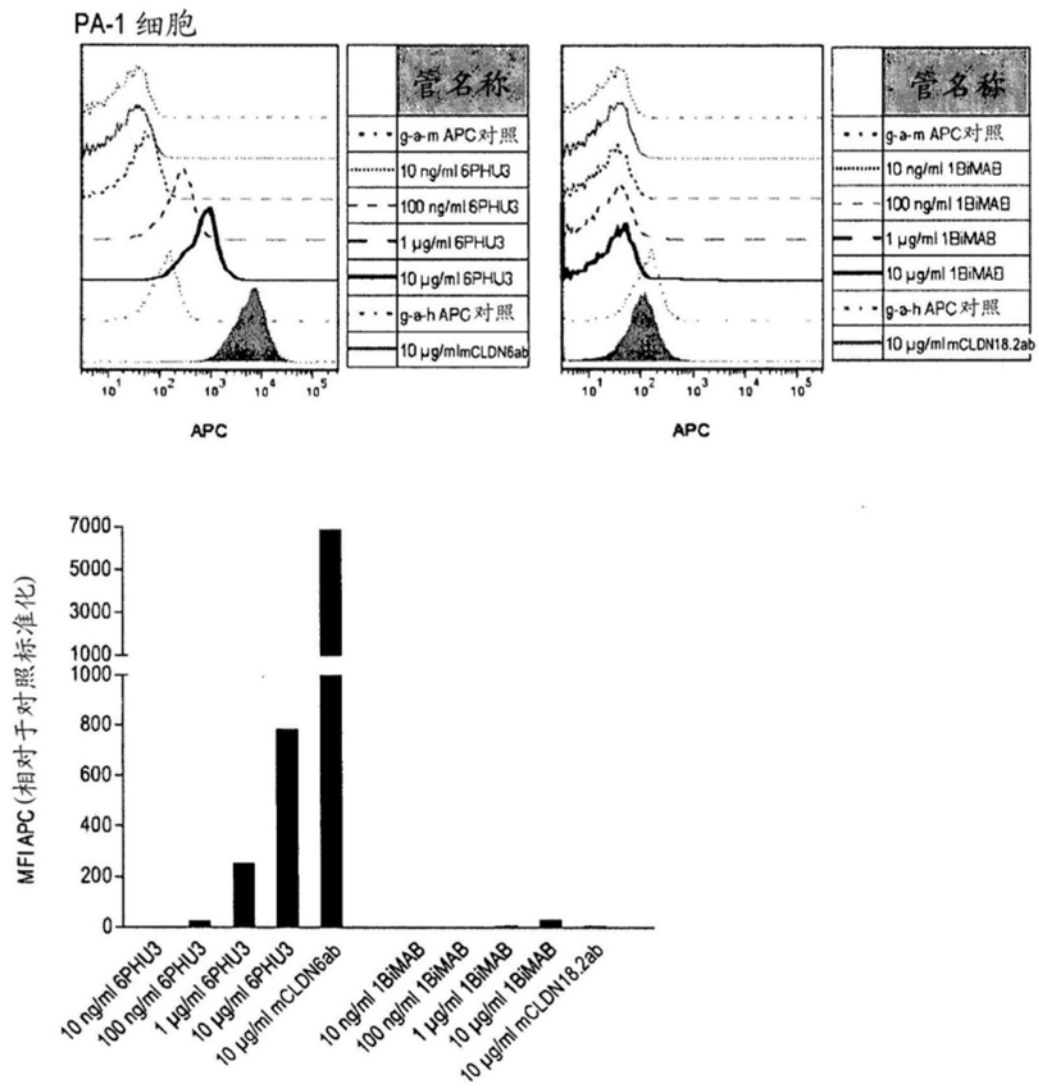


图15

A

OV-90 细胞

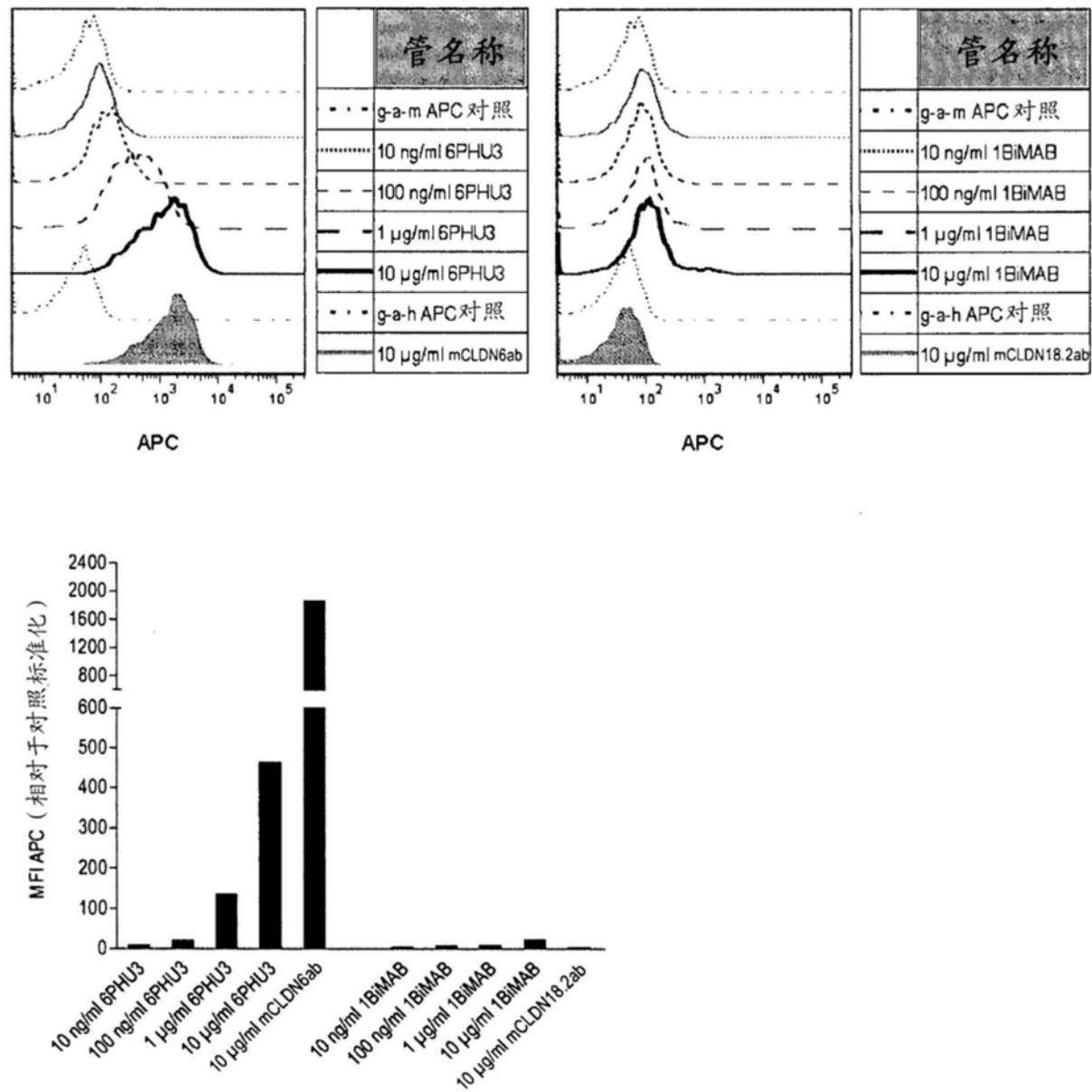


图15

B

人 TL

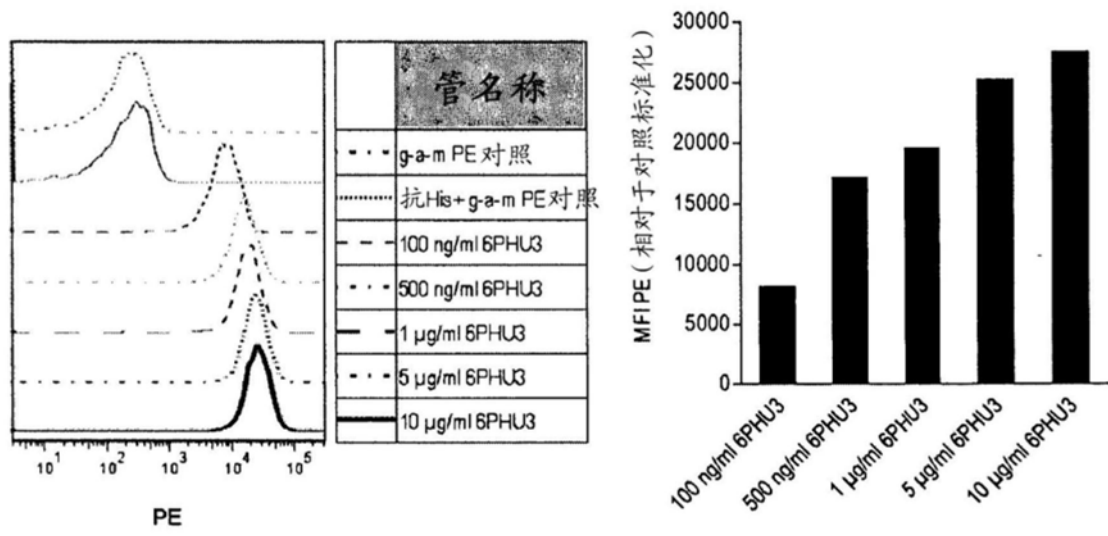


图15

C

CLDN6 阴性细胞系 (NugC4)

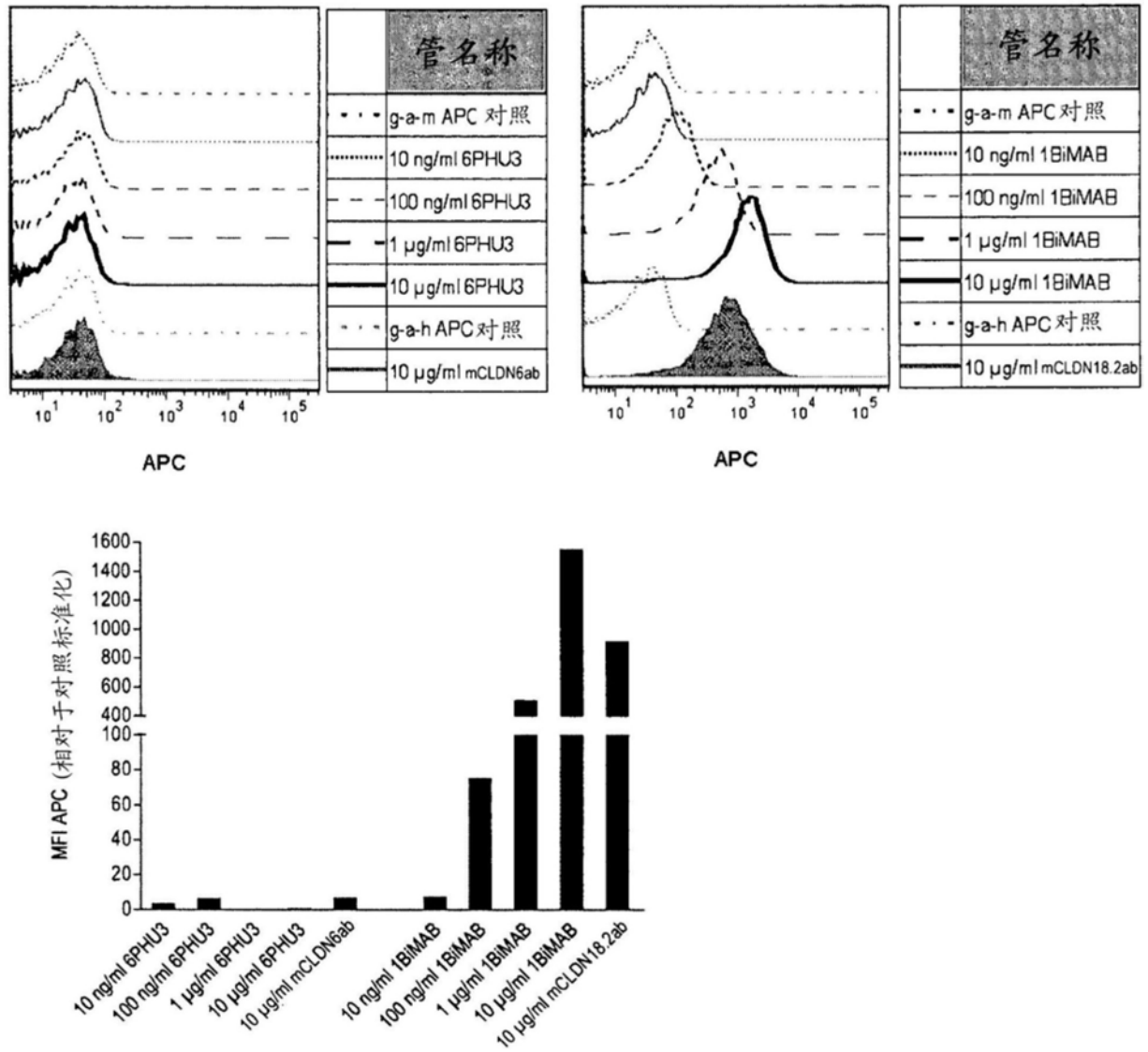


图15

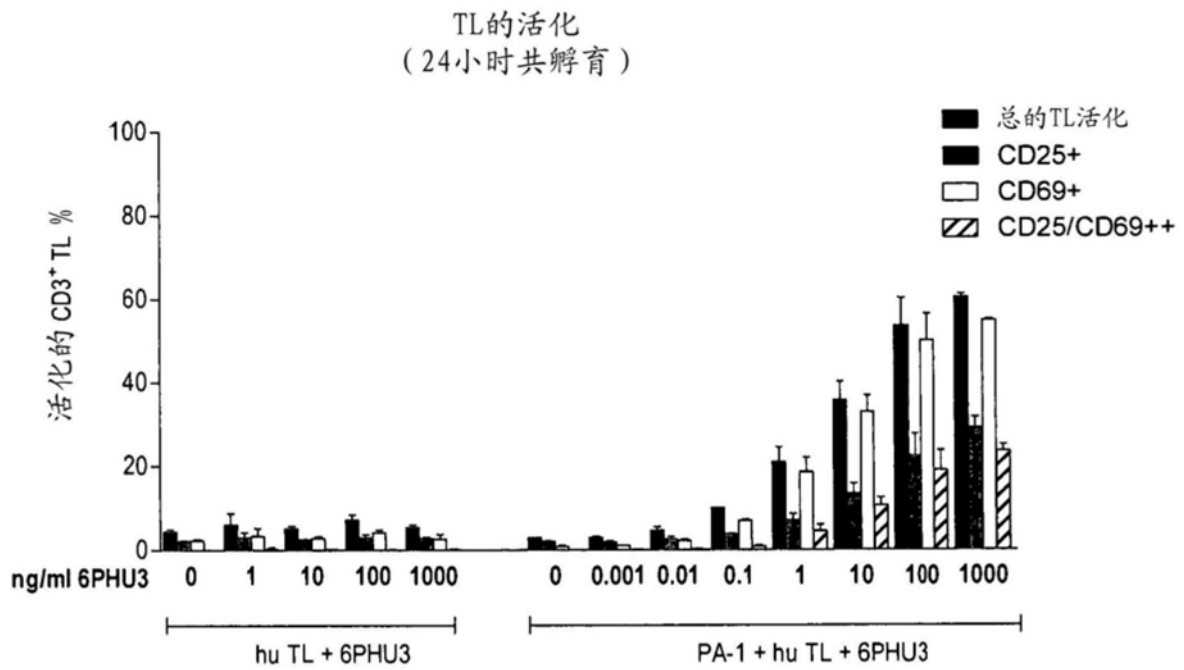
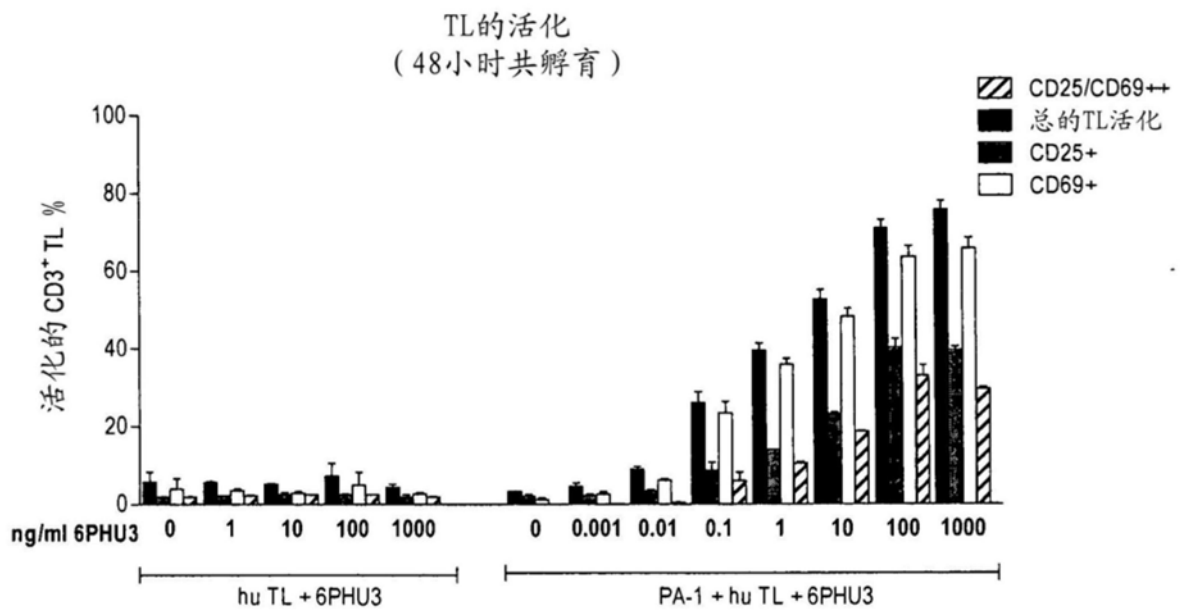
A**B**

图16

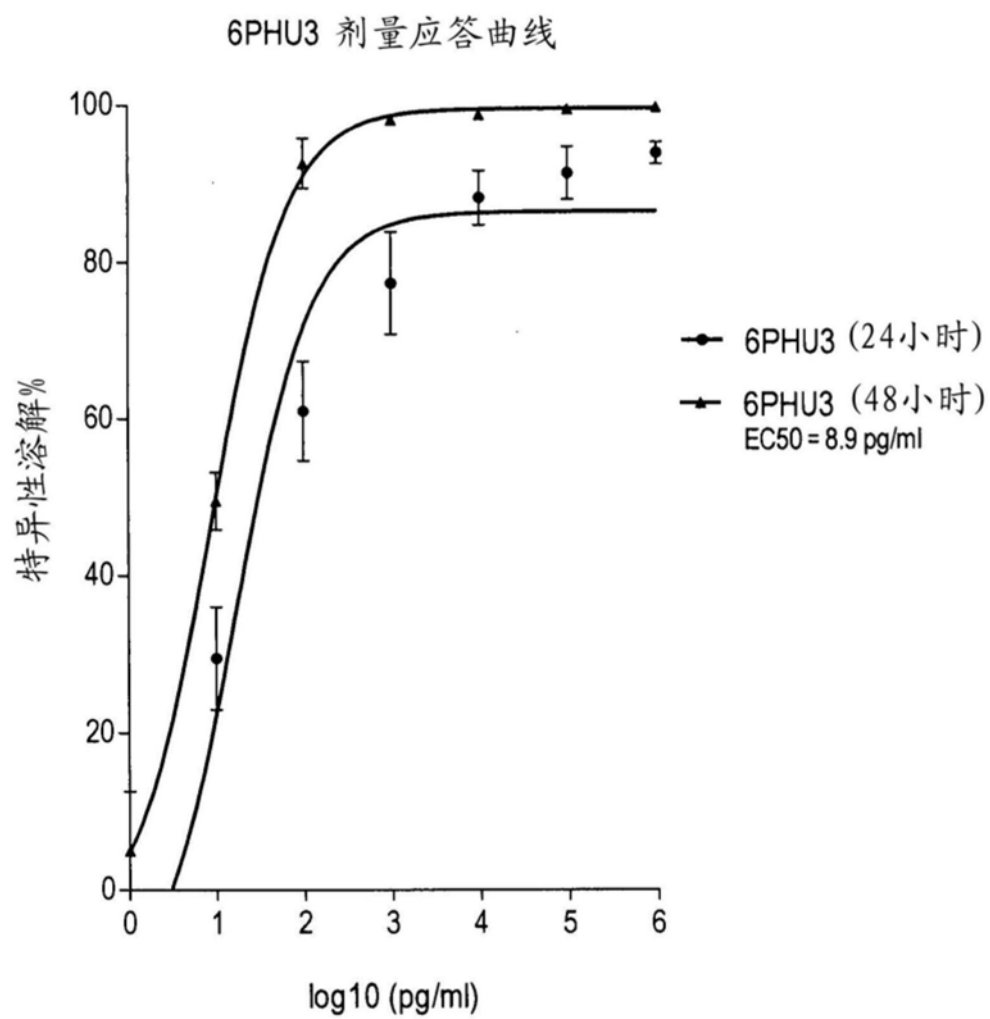


图17

A

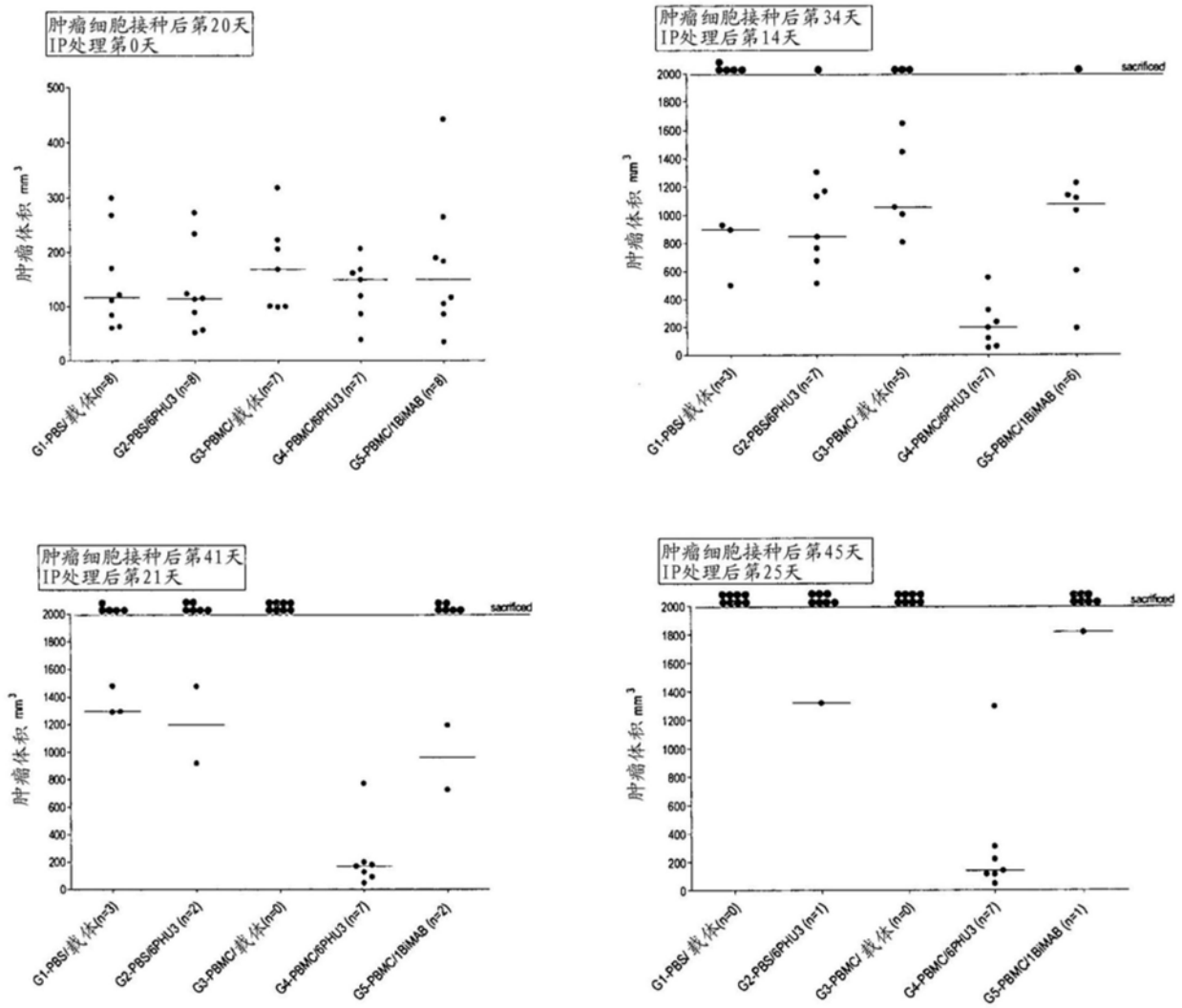
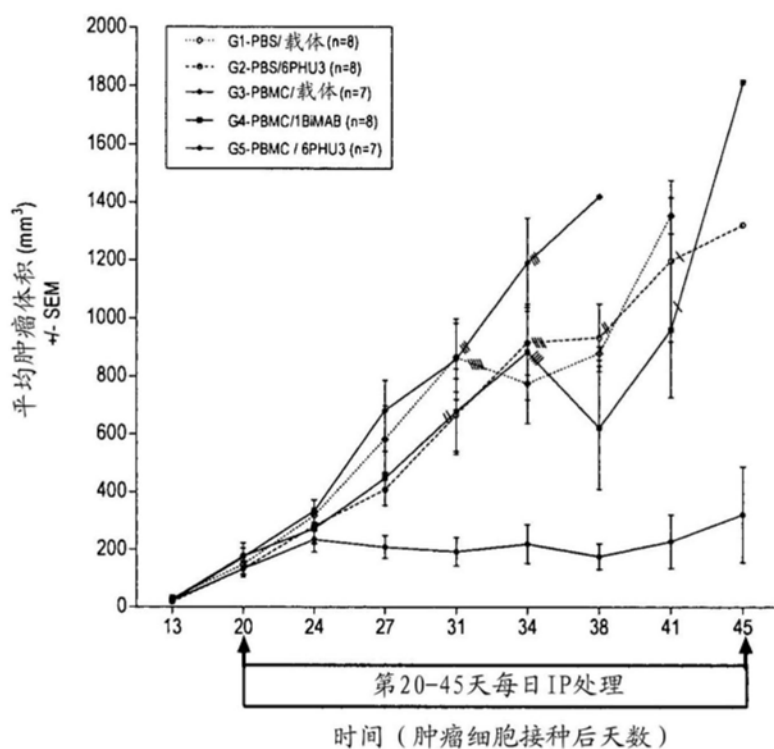


图18

B



C

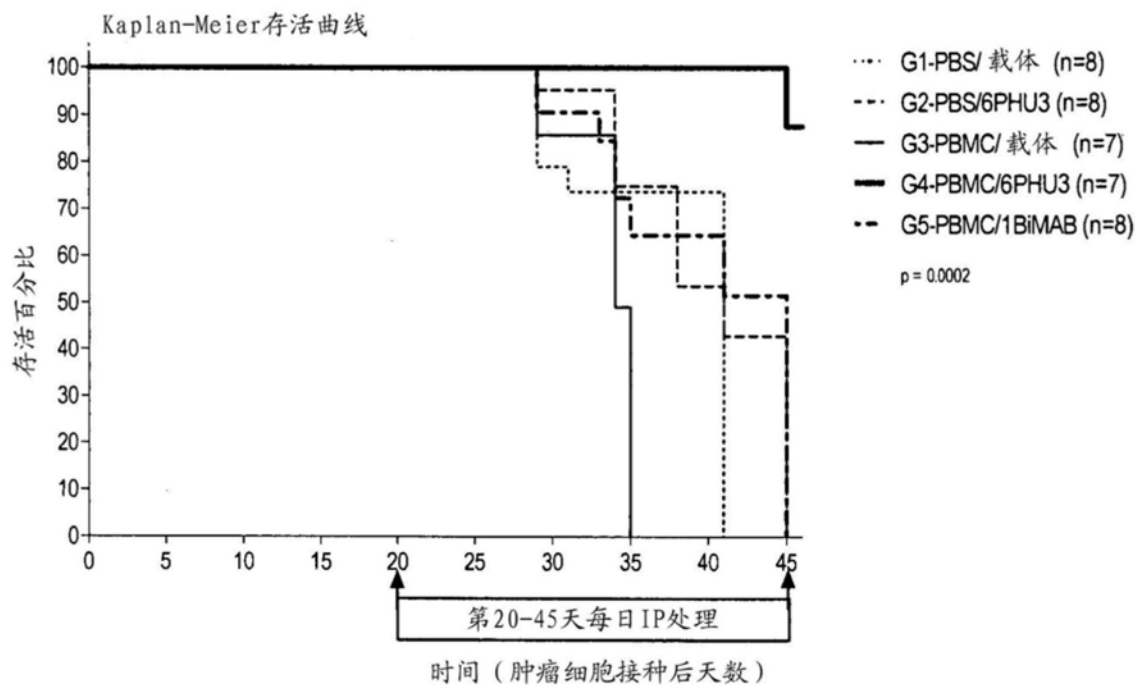


图18

D

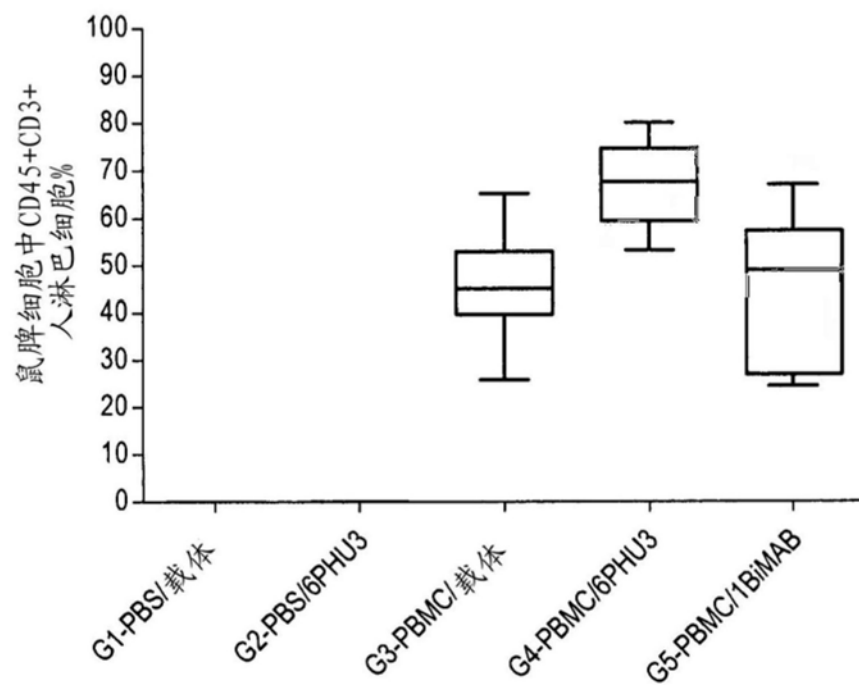


图18

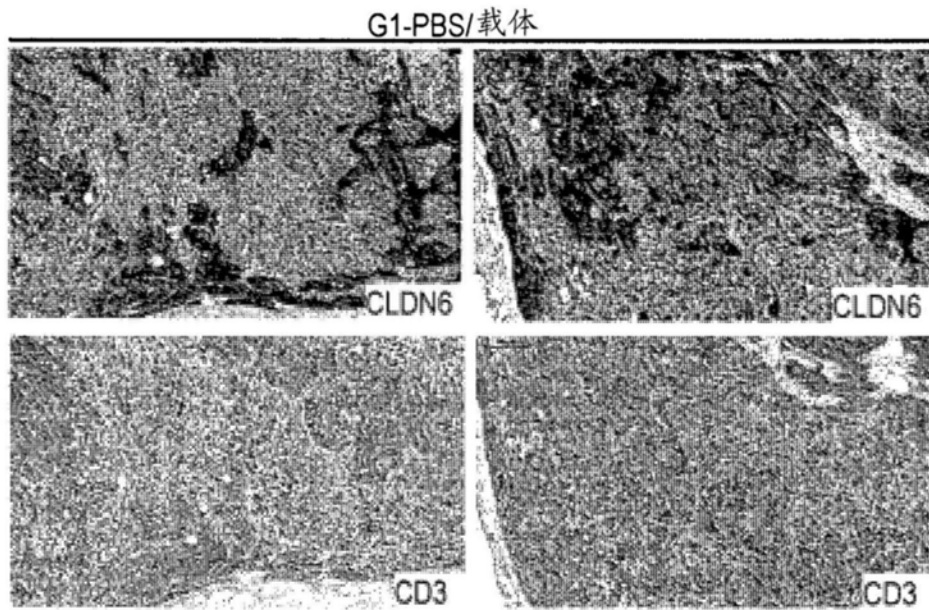
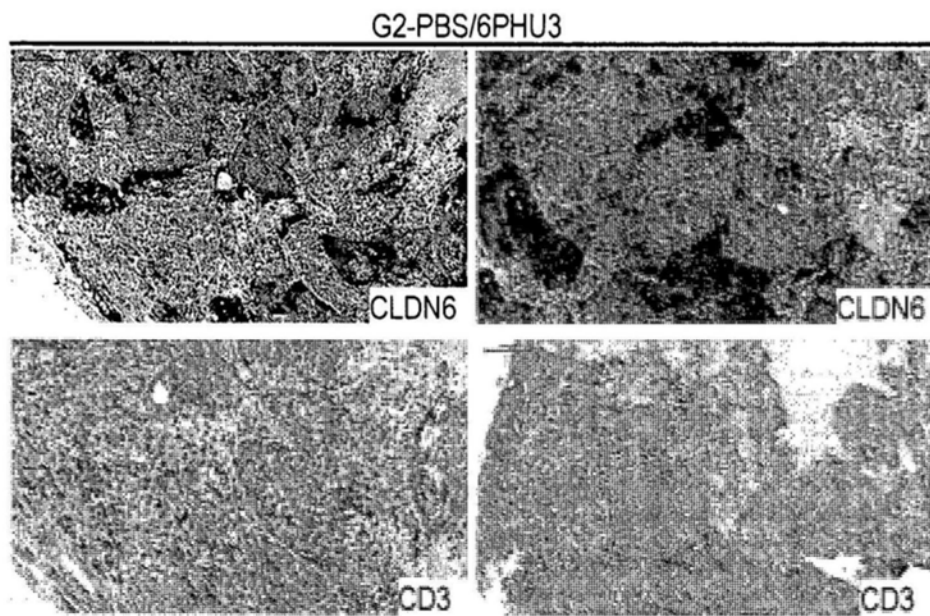
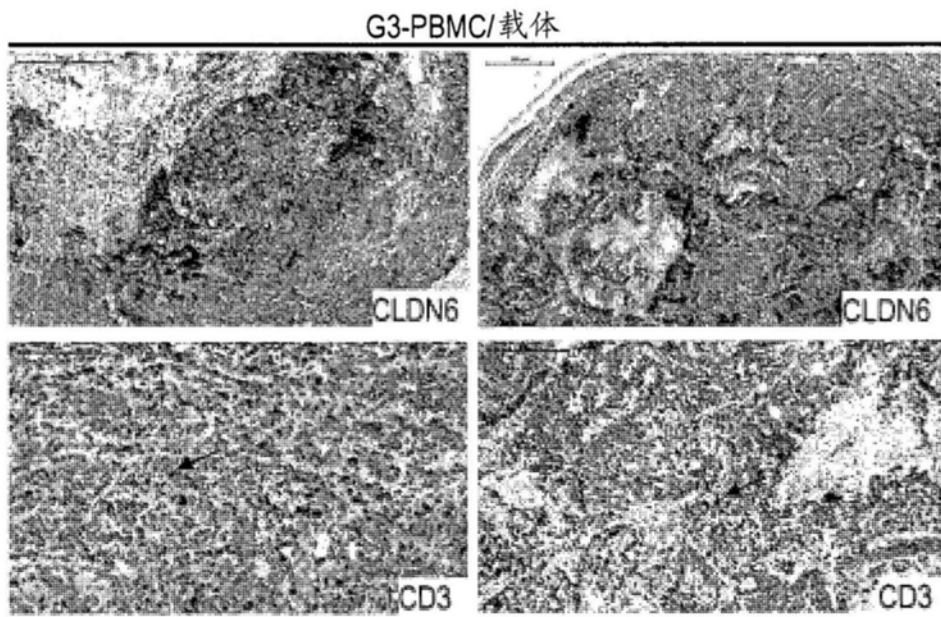
A**B**

图19

C



D

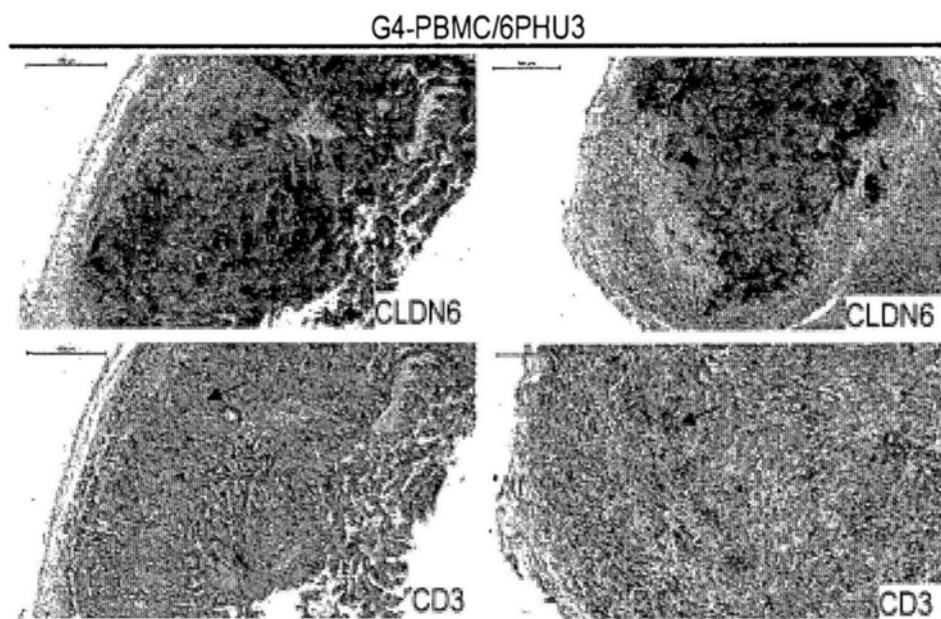


图19

E

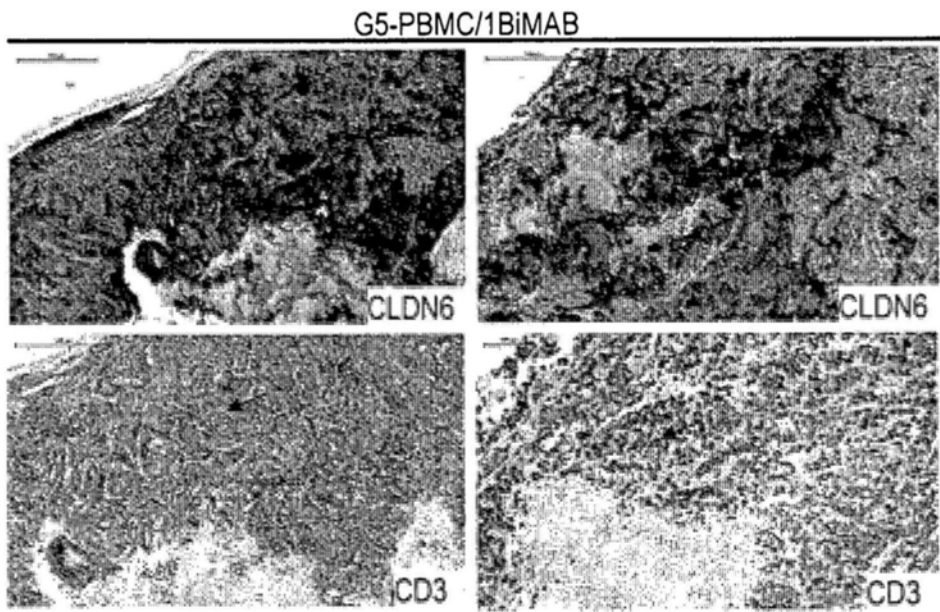


图19

A

双-scFv CLDN18.2 x CD3



双-scFv CD3 x CLDN18.2



B



图20

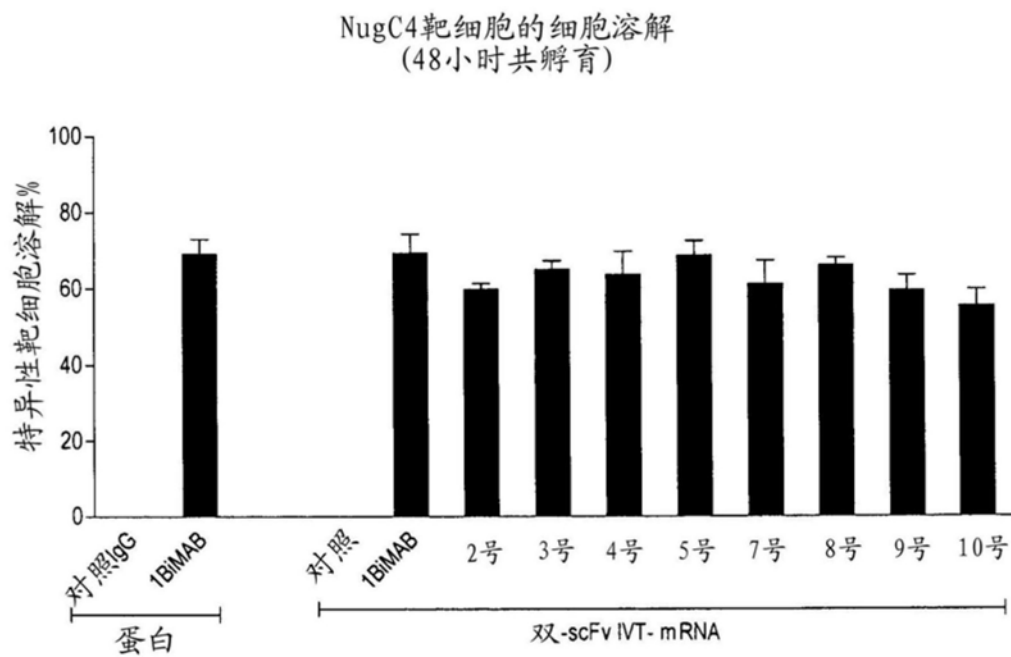
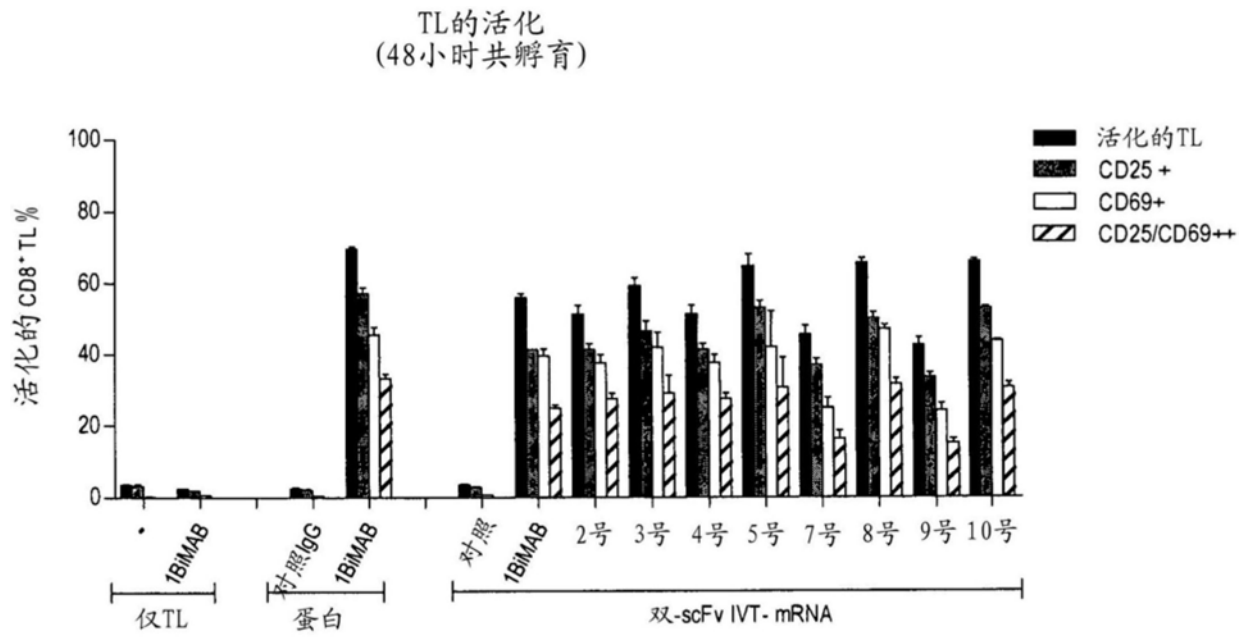


图21

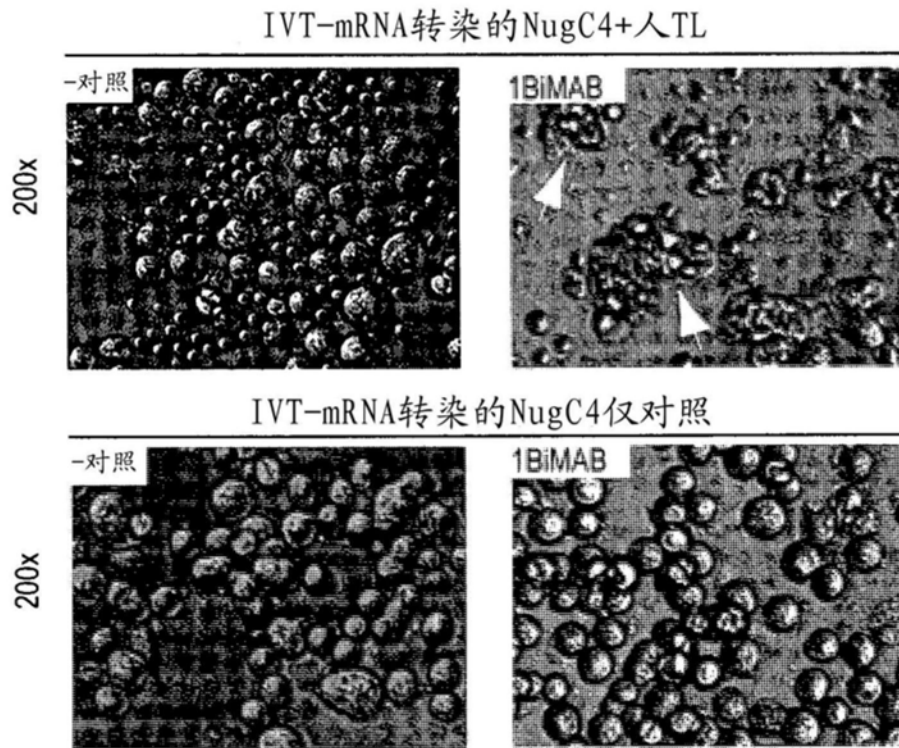


图22

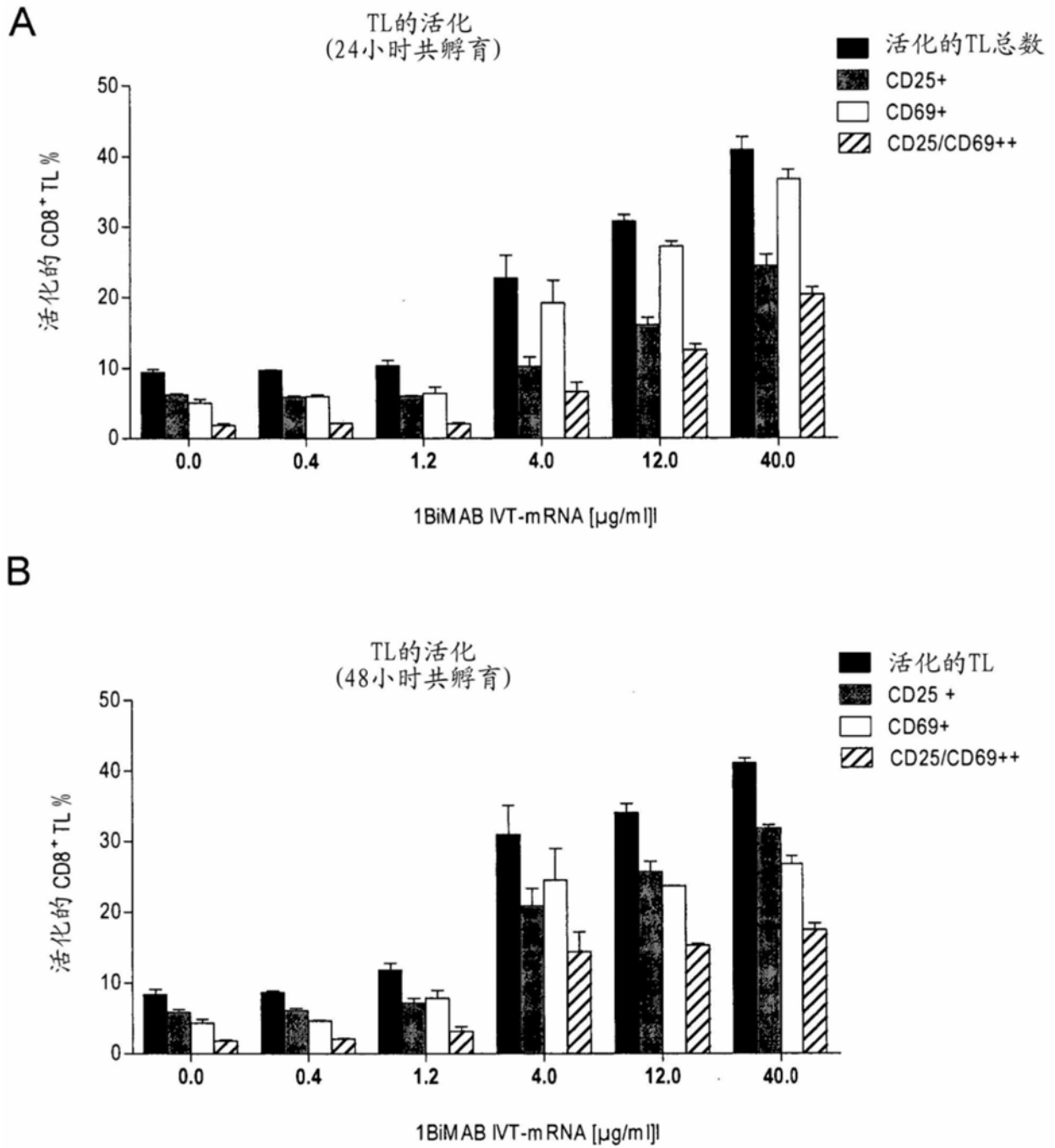


图23

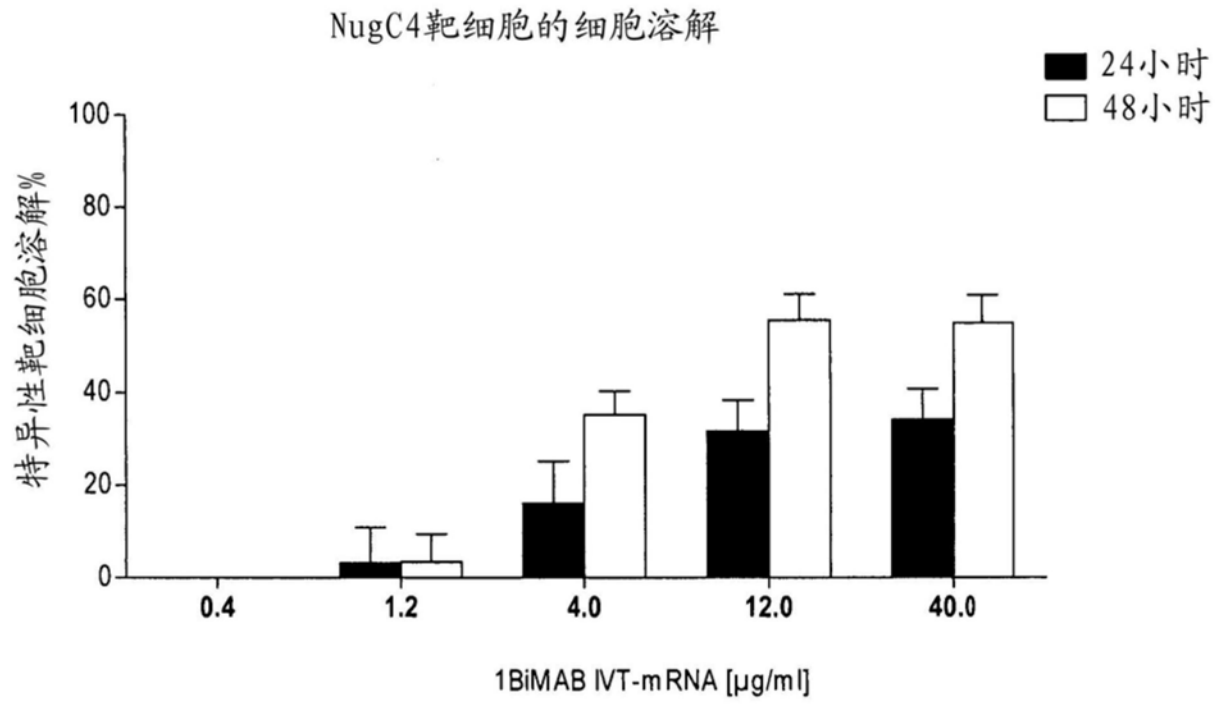


图24

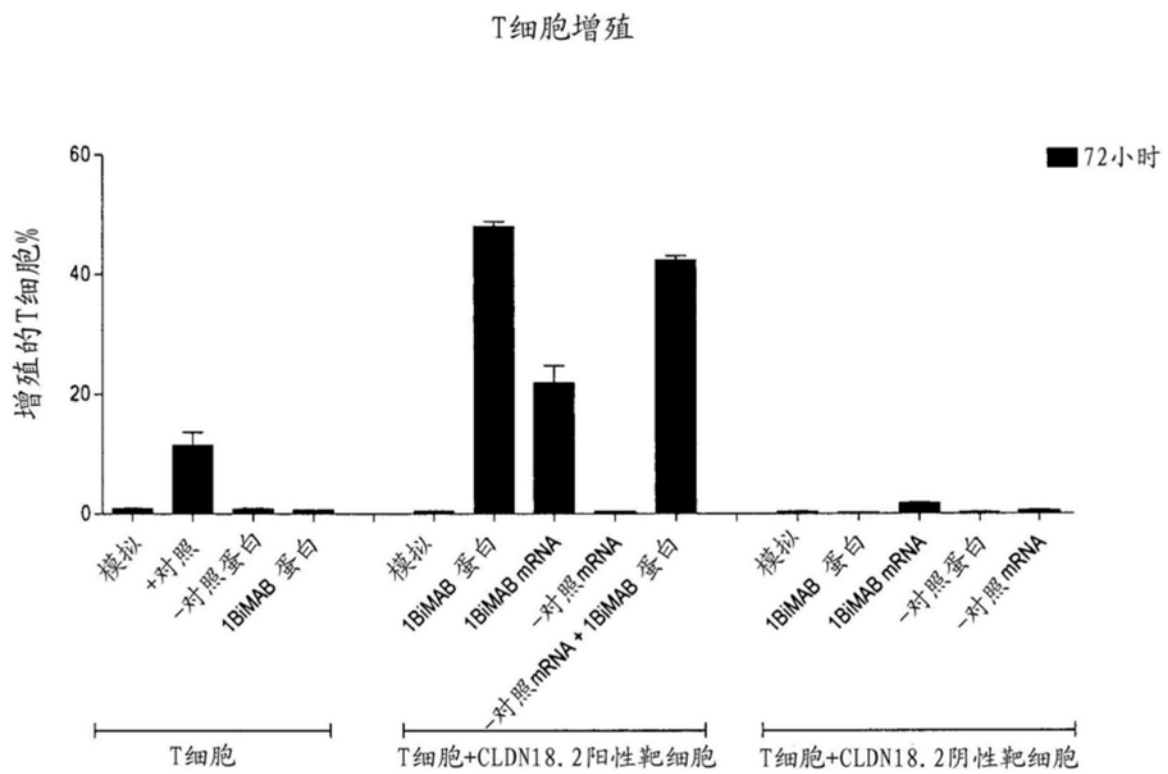


图25

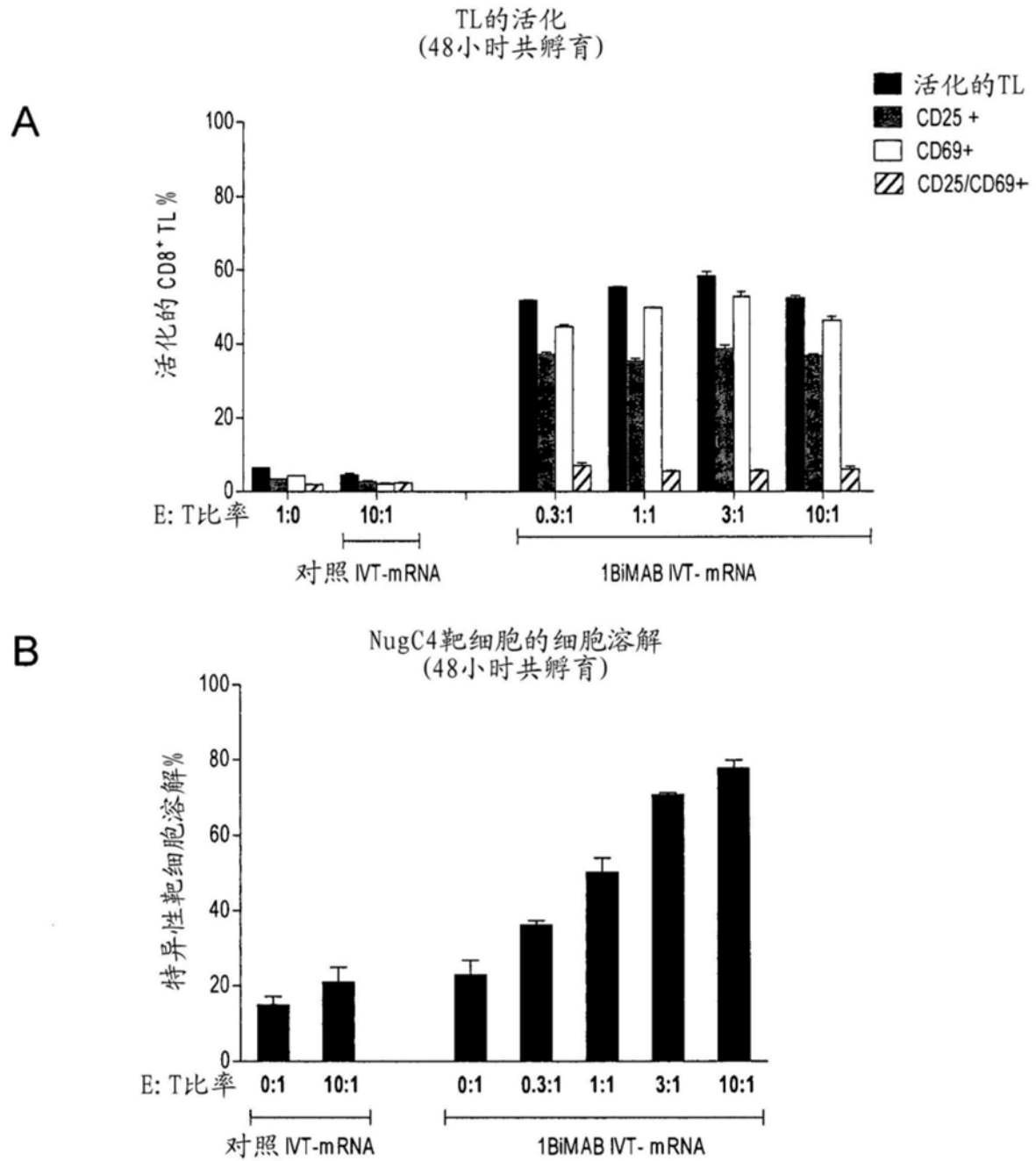


图26

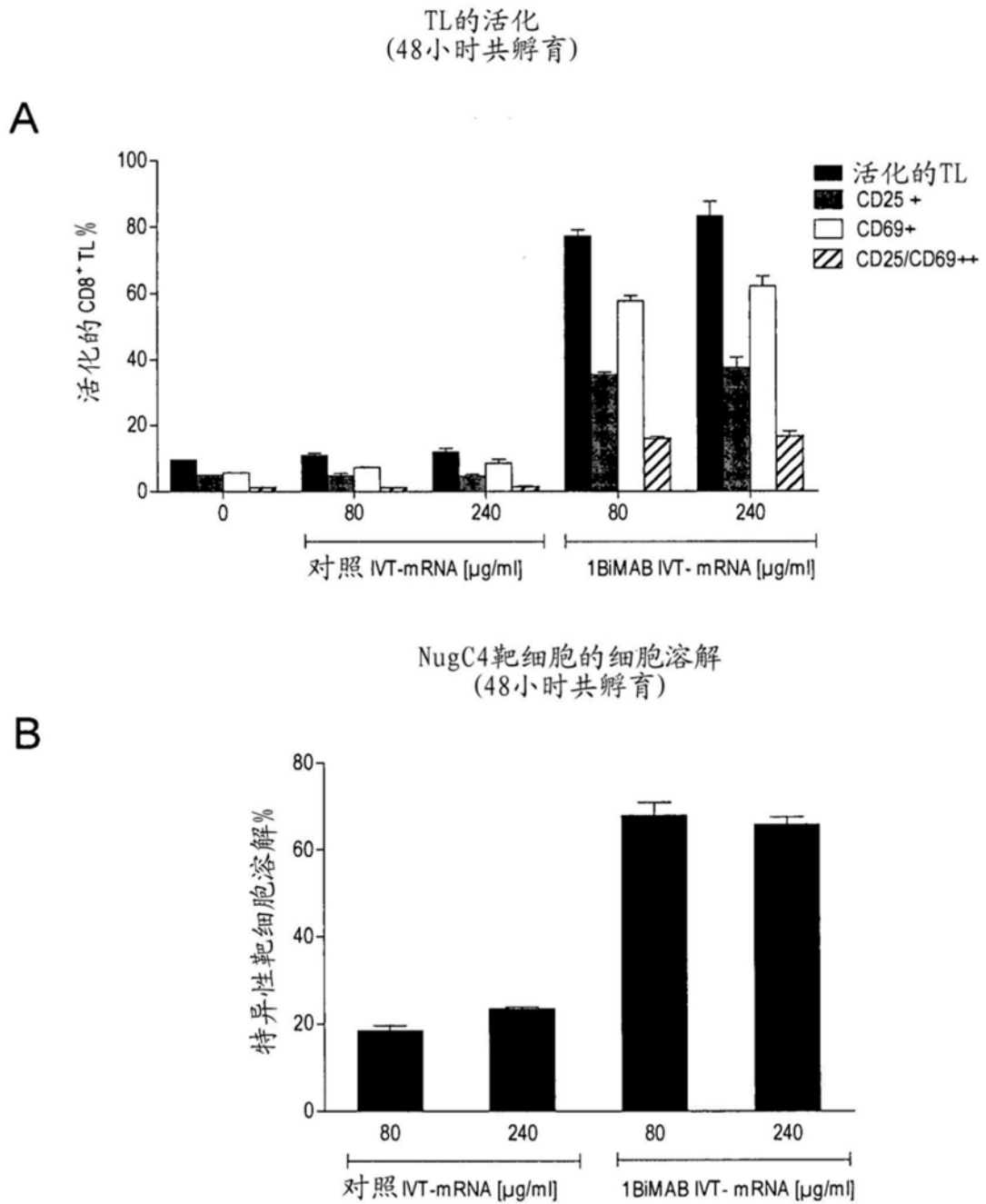


图27

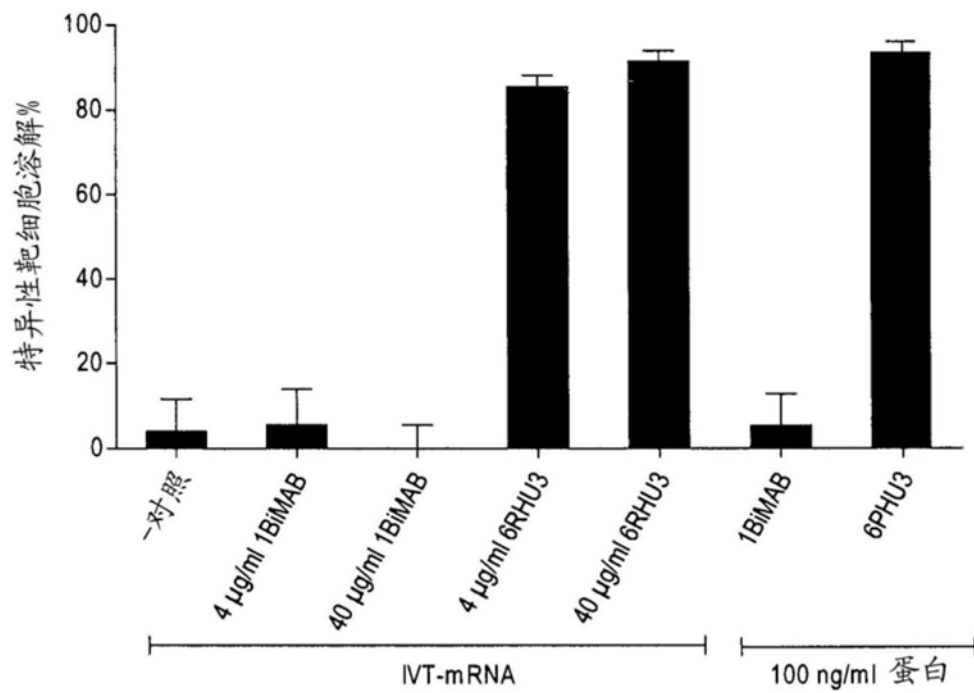
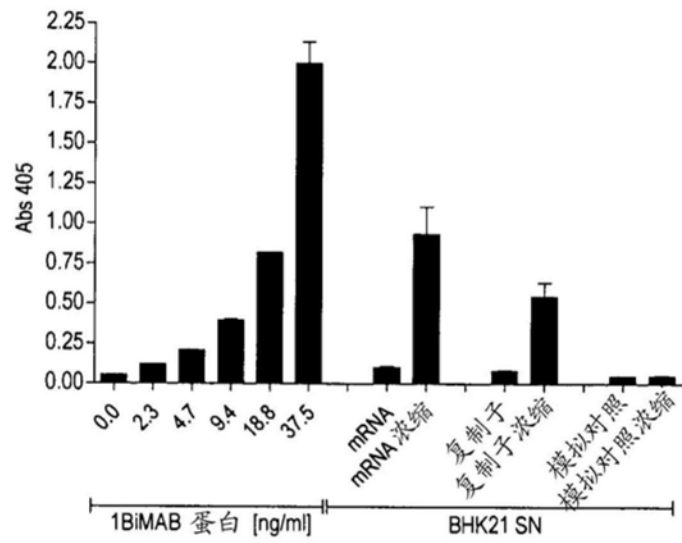
CLDN18.2阴性靶细胞的细胞溶解
(72小时共孵育)

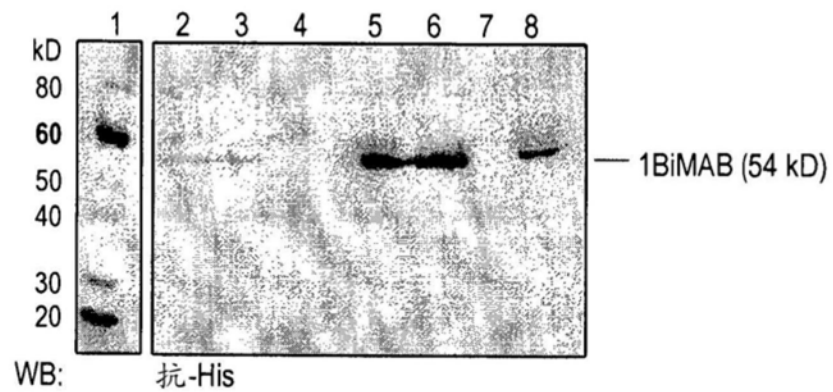
图28

A

BHK21上清液中1BiMAB IVT-mRNA和复制子



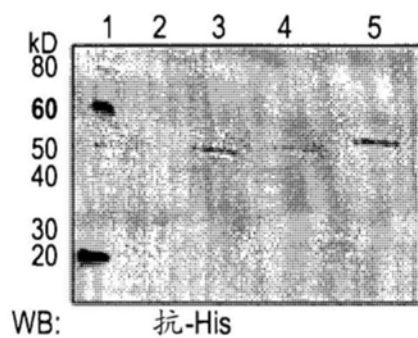
B



道	样品
1	标准蛋白
2	SN中1BiMAB IVT-mRNA
3	SN中1BiMAB IVT-复制子
4	模拟对照SN
5	细胞溶解产物中的1BiMAB IVT-mRNA
6	细胞溶解产物中的1BiMAB IVT-复制子
7	模拟对照细胞溶解产物
8	0.1 μg纯化的1BiMAB蛋白

图29

C



道	样品
1	标准蛋白
2	模拟对照SN
3	SN中对照BiMAB
4	SN中1BiMAB
5	0.1 μ g纯化的1BiMAB蛋白

图29

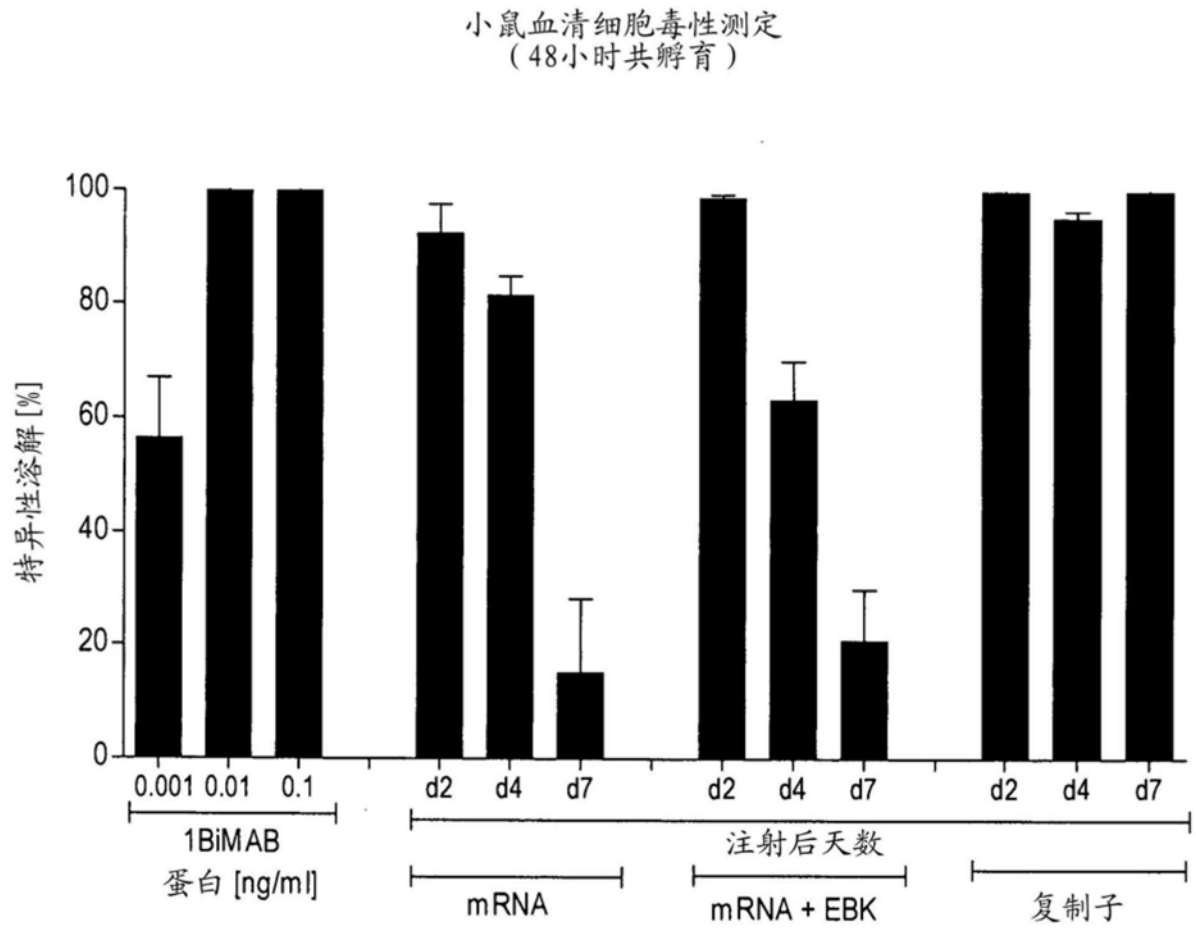
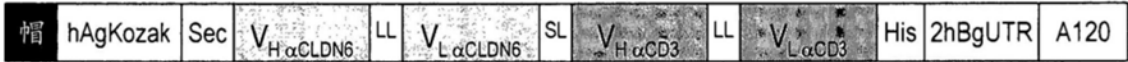


图30

A

双-scFv CLDN6 x CD3



双-scFv CD3 x CLDN6



B



图31

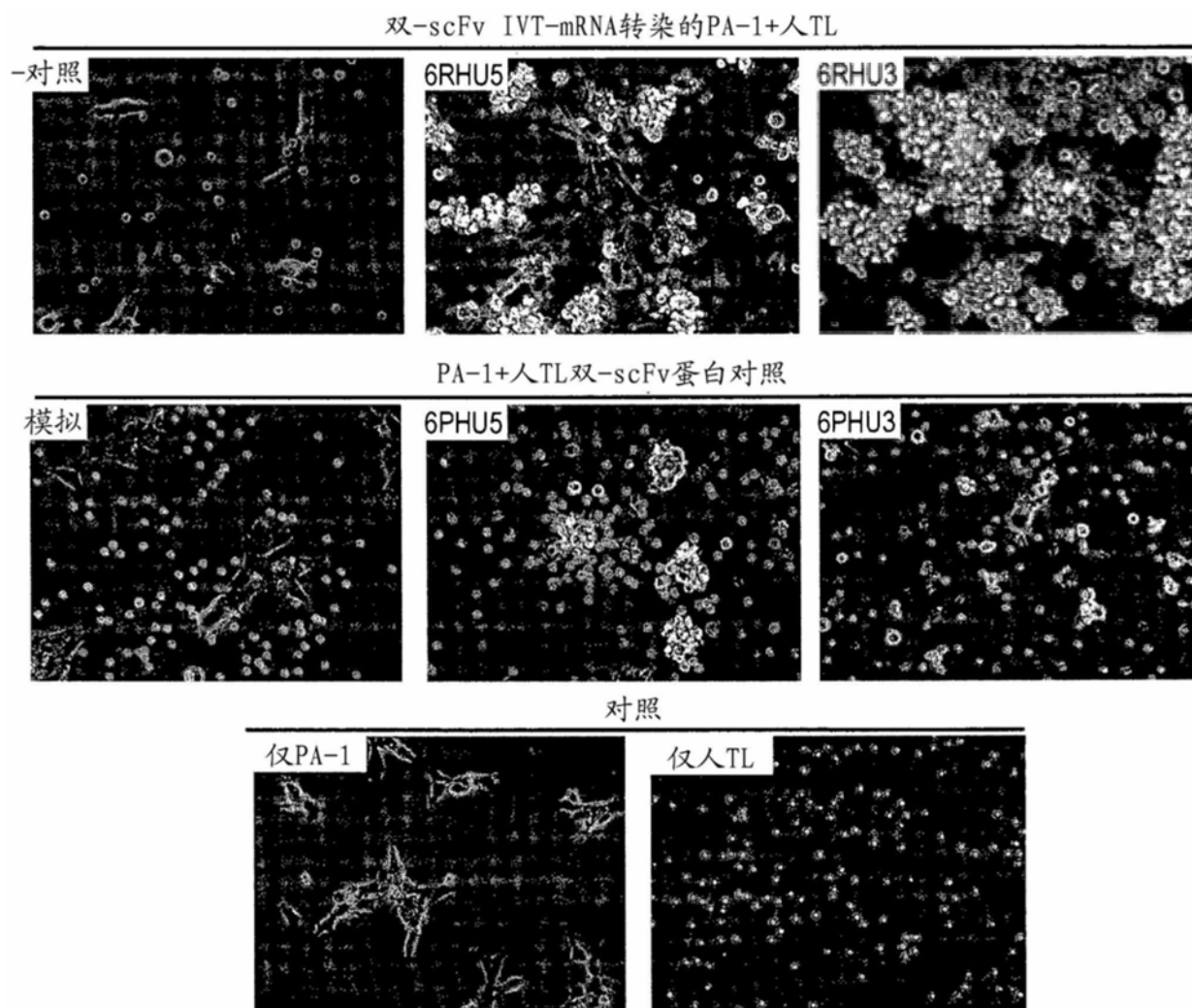


图32

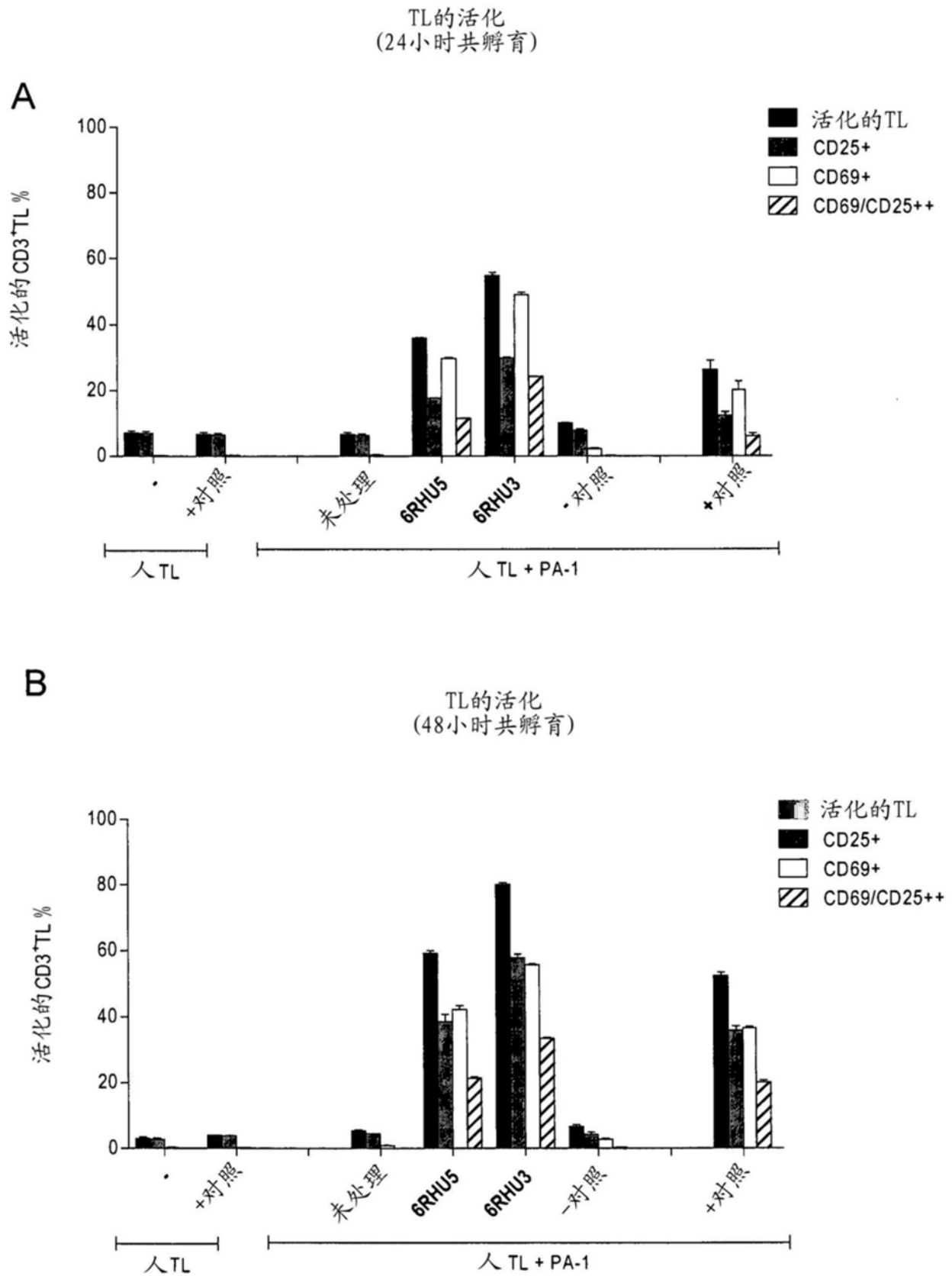


图33

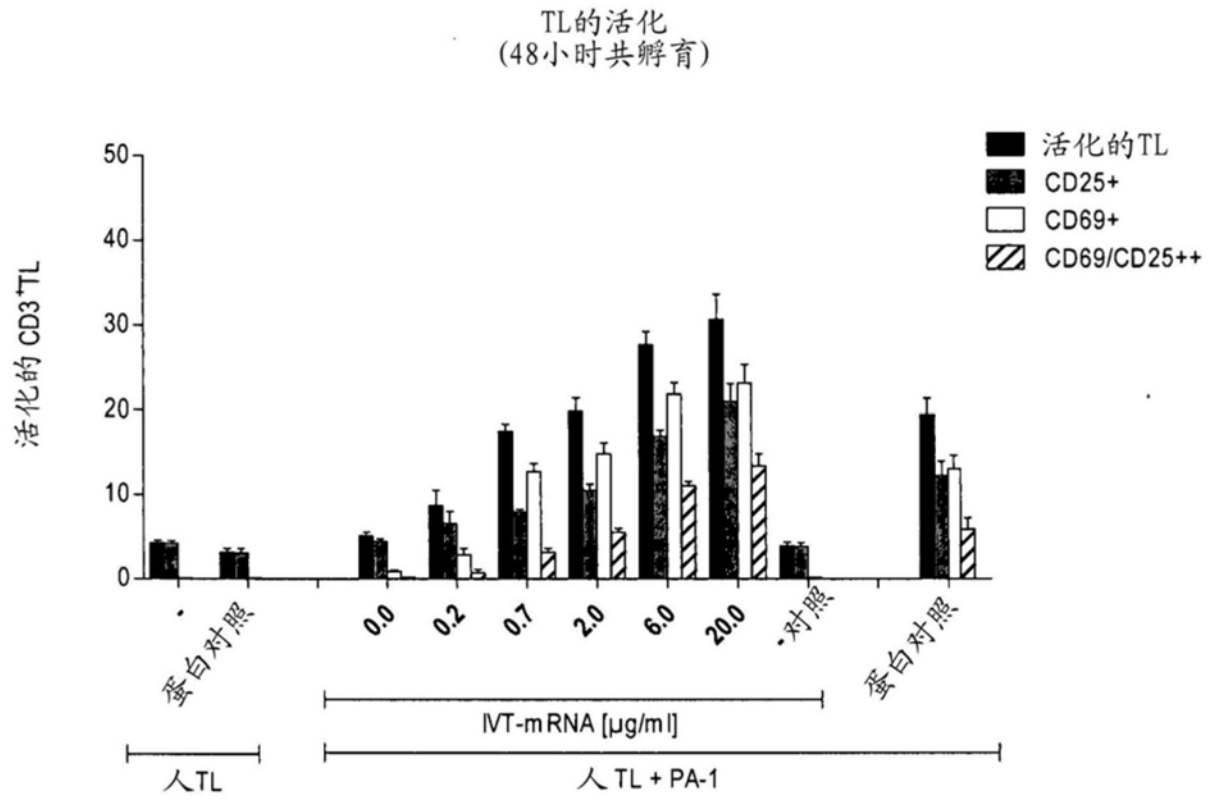


图34

6RHU3浓度依赖曲线

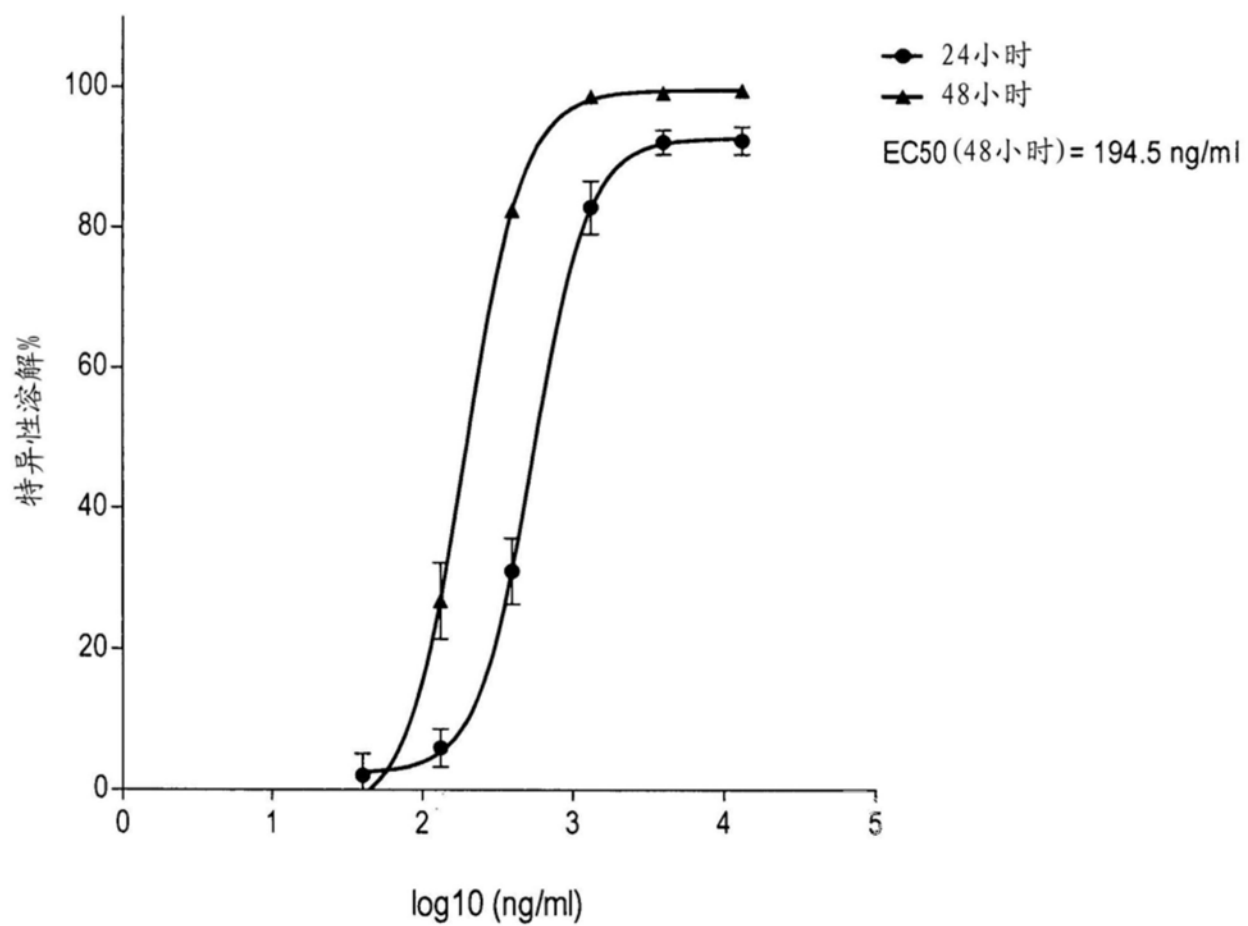


图35

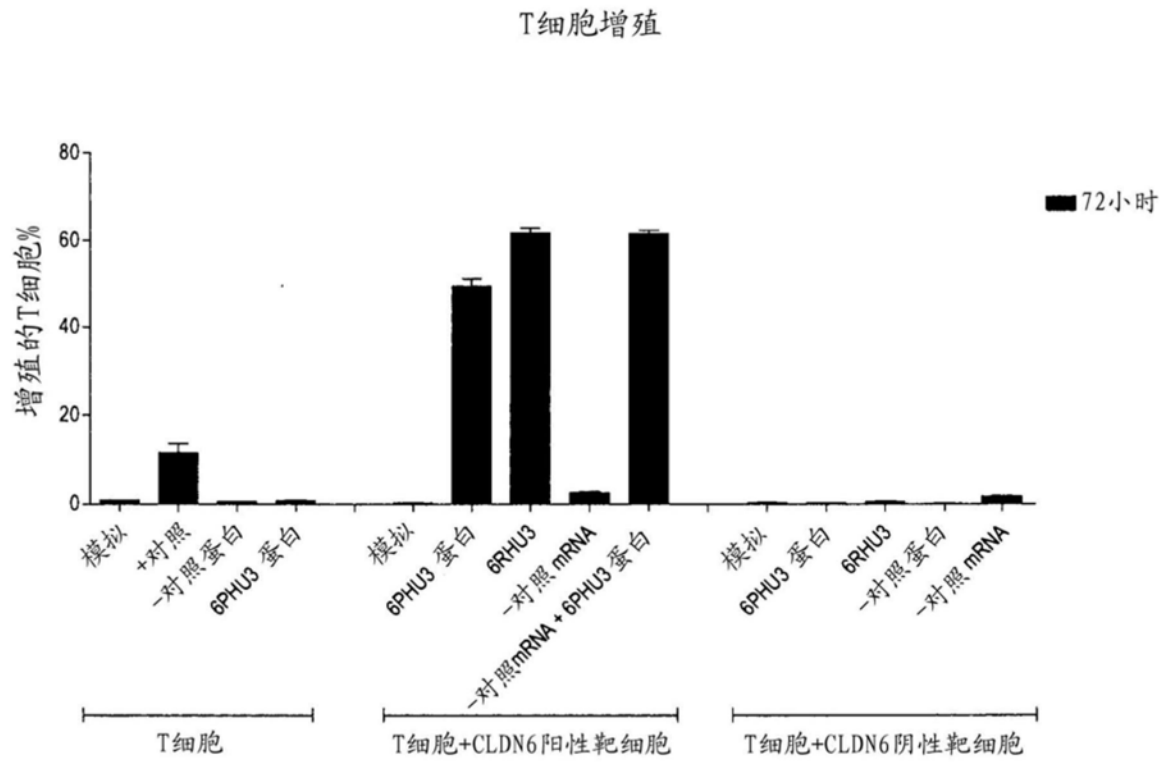
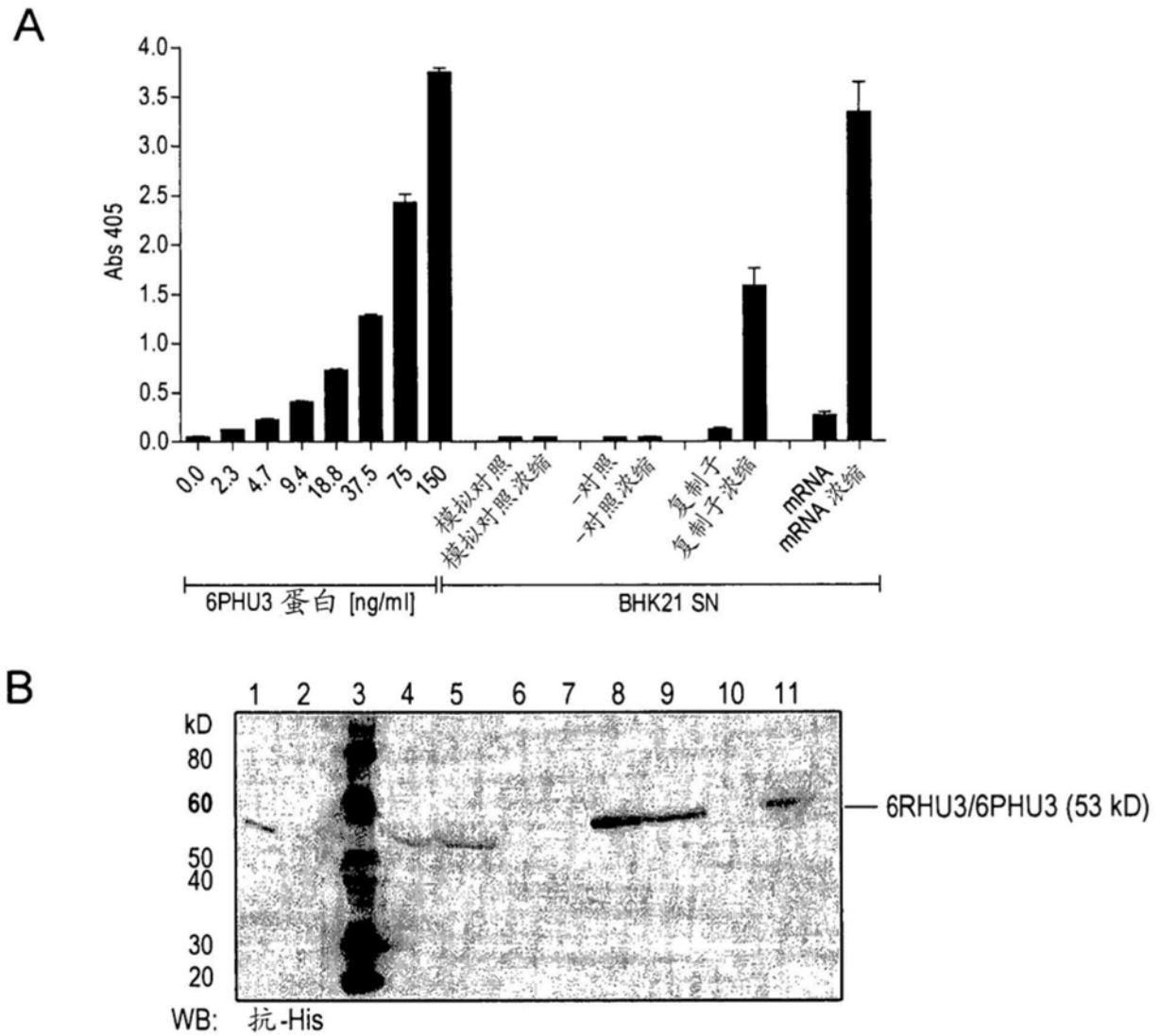


图36

BHK21上清液中6RHU3 IVT-mRNA和复制子



道	样品
1	SN中25号
2	细胞溶解产物中25号
3	标准蛋白
4	SN中6RHU3 IVT-mRNA
5	SN中6RHU3 IVT-复制子
6	模拟对照SN
7	-
8	细胞溶解产物中6RHU3 IVT-mRNA
9	细胞溶解产物中6RHU3 IVT-复制子
10	模拟对照细胞溶解产物
11	0.1 μ g纯化的6PHU3蛋白

图37

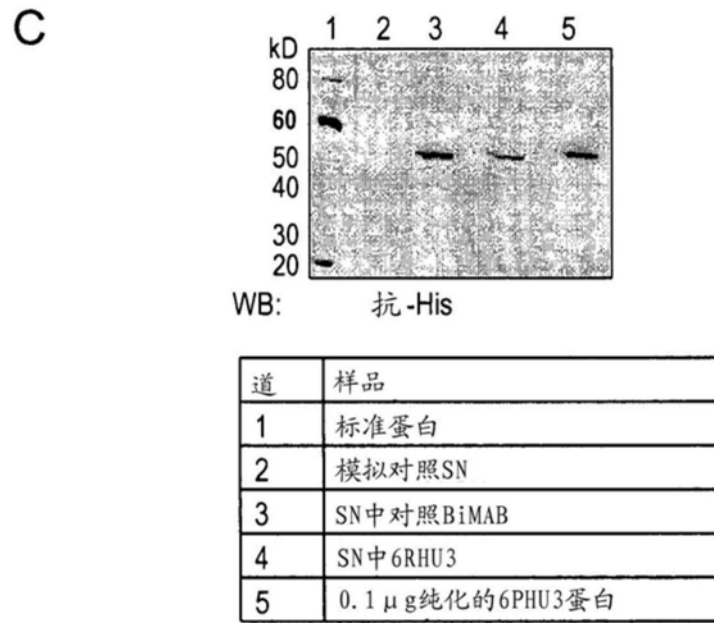


图37

小鼠血清细胞毒性测定
(48小时共孵育)

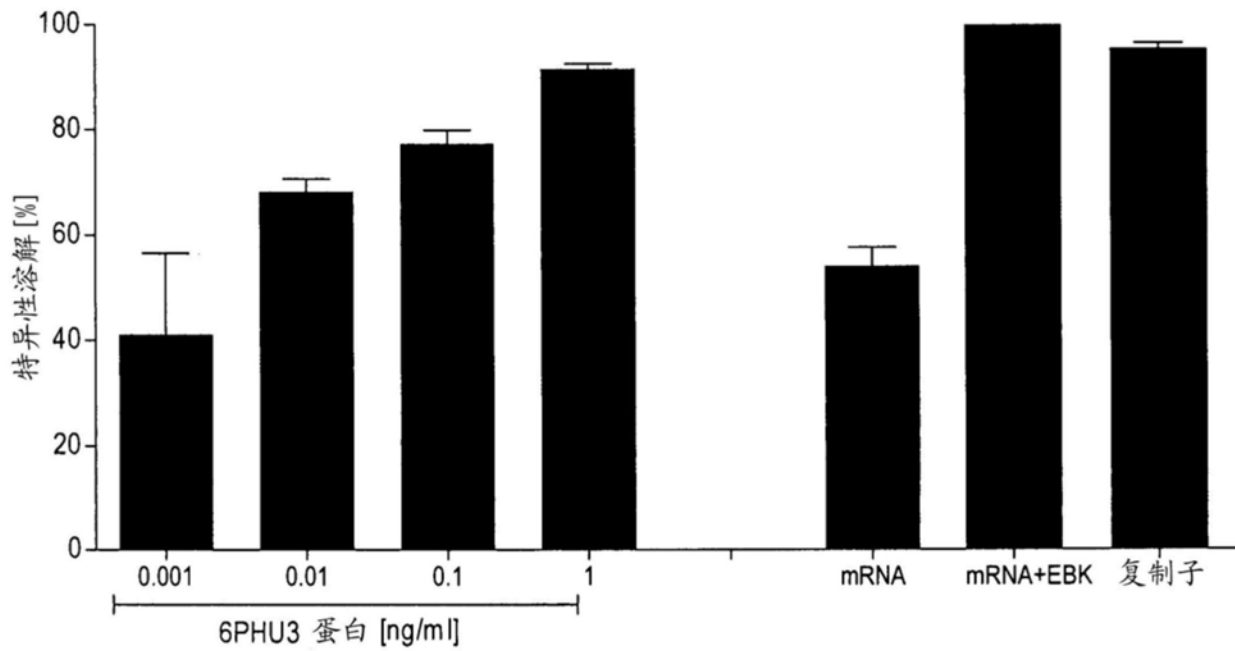


图38

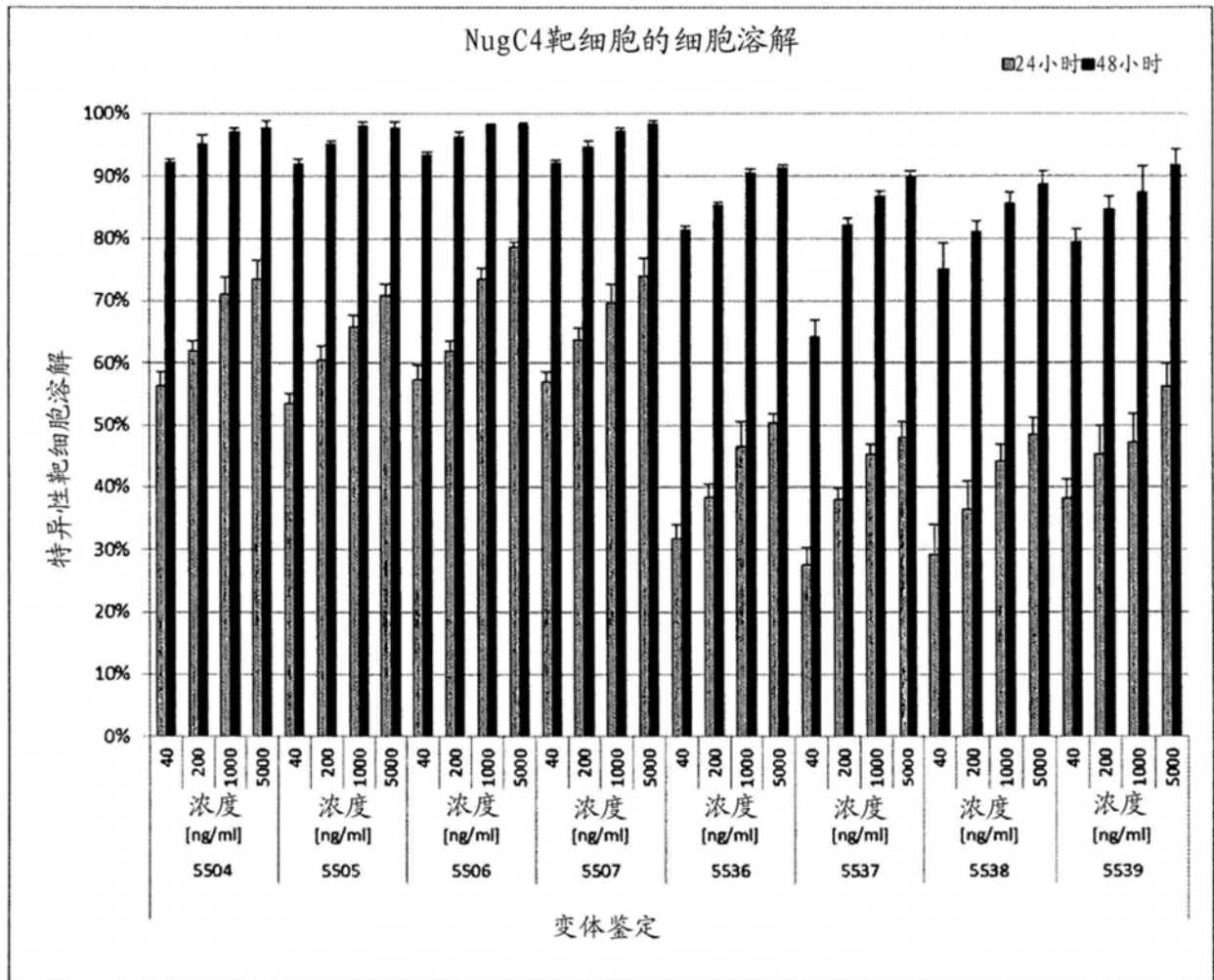


图39a

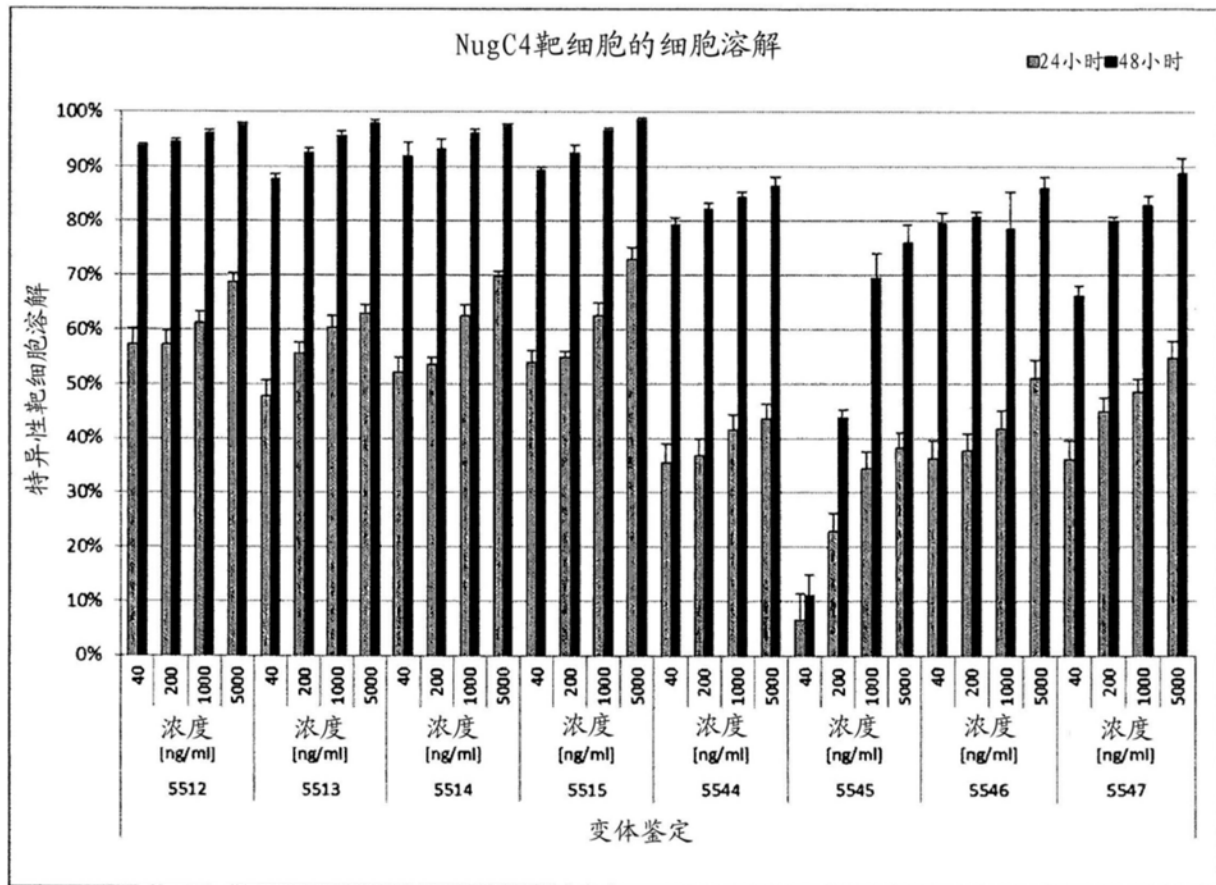


图39b

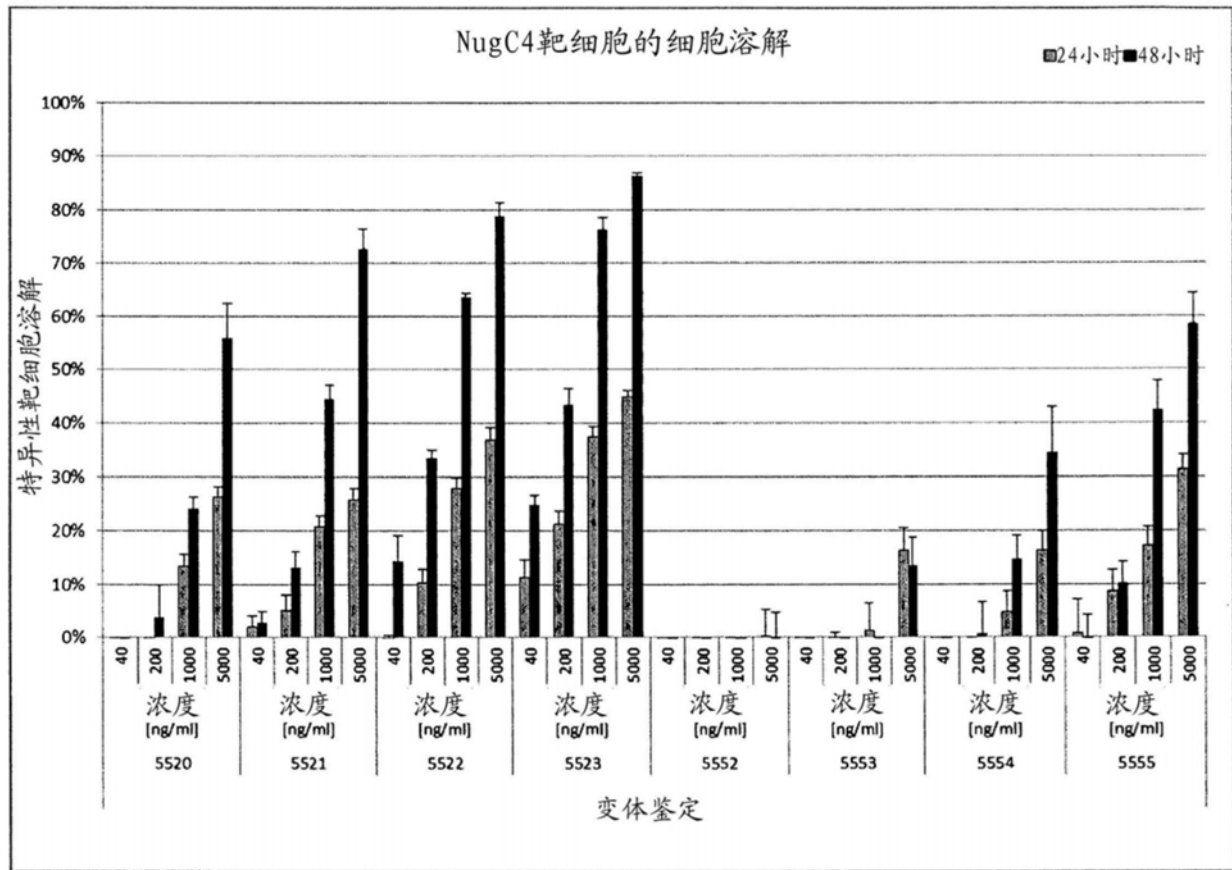


图39c

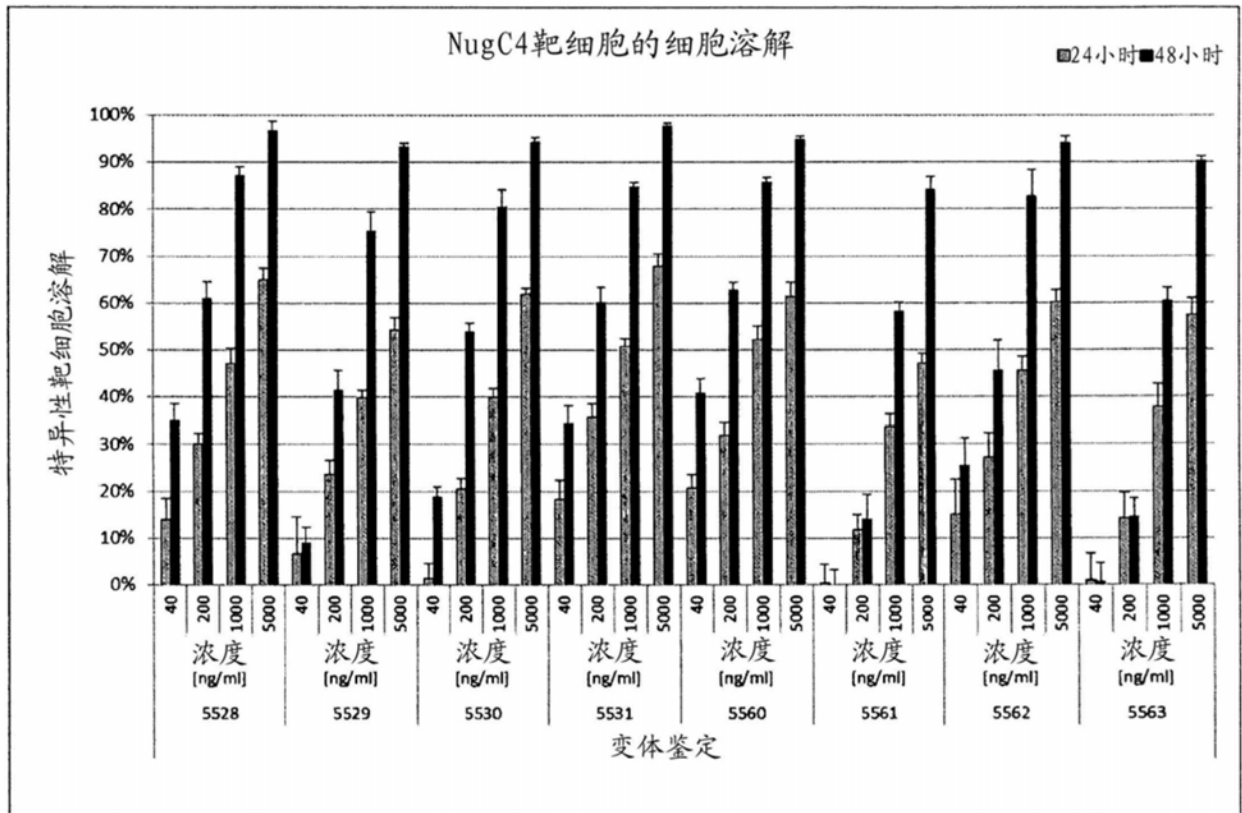


图39d

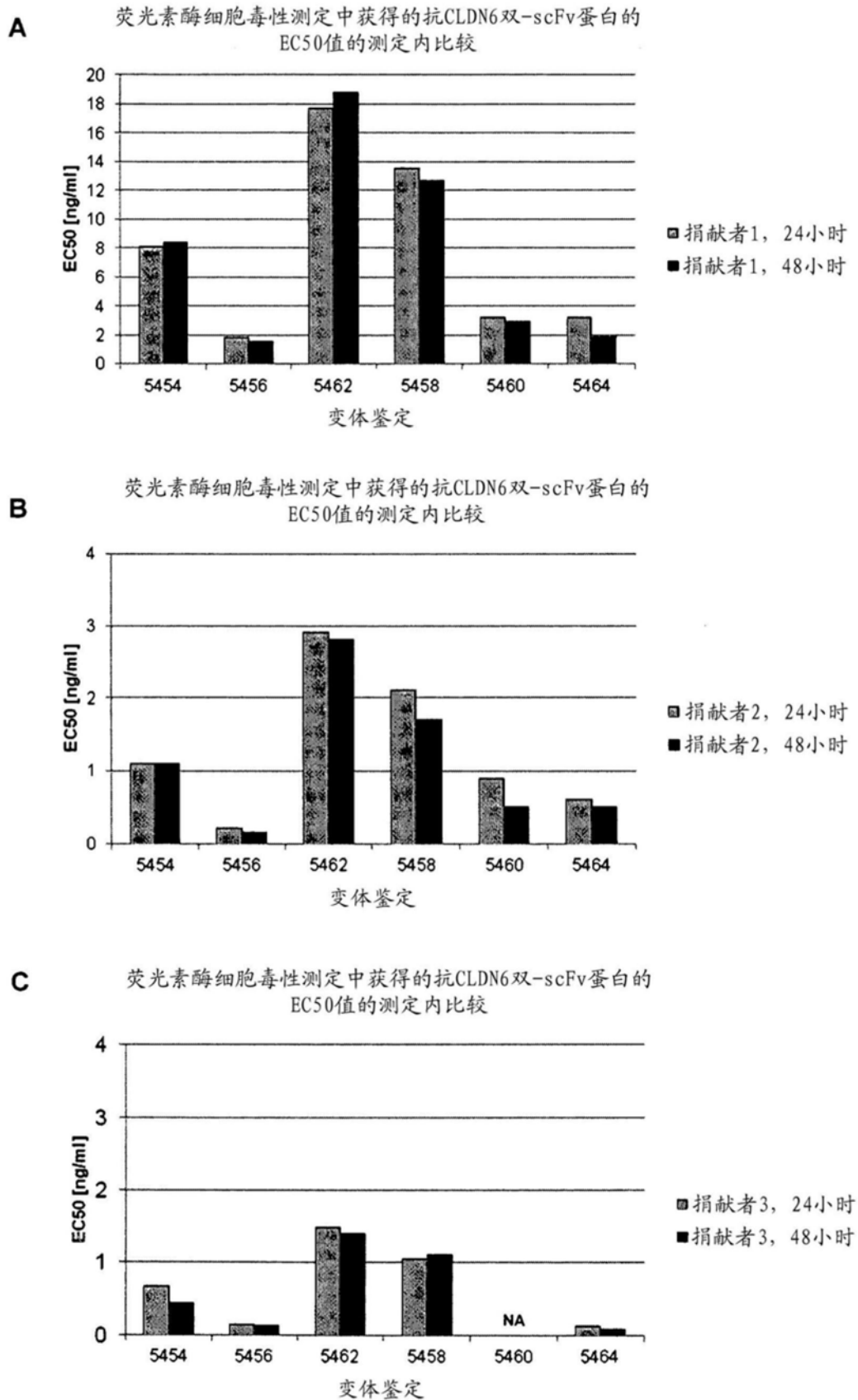


图40