



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104829728 B

(45)授权公告日 2019.03.12

(21)申请号 201510030283.9

C07K 16/30(2006.01)

(22)申请日 2015.01.21

C12N 15/85(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61K 39/395(2006.01)

申请公布号 CN 104829728 A

A61P 35/00(2006.01)

(43)申请公布日 2015.08.12

(56)对比文件

(73)专利权人 武汉友芝友生物制药有限公司

WO 2013/186719 A1,2013.12.19,

地址 430075 湖北省武汉市中国武汉东湖

CN 104271602 A,2015.01.07,

开发区高新大道666号光谷生物城C2-

审查员 皇甫洁琼

1栋

(72)发明人 张敬 胡伶俐 王瑞 周祥

范克索 周鹏飞

(74)专利代理机构 北京高文律师事务所 11359

代理人 程义贵

(51)Int.Cl.

权利要求书2页 说明书14页

C07K 16/46(2006.01)

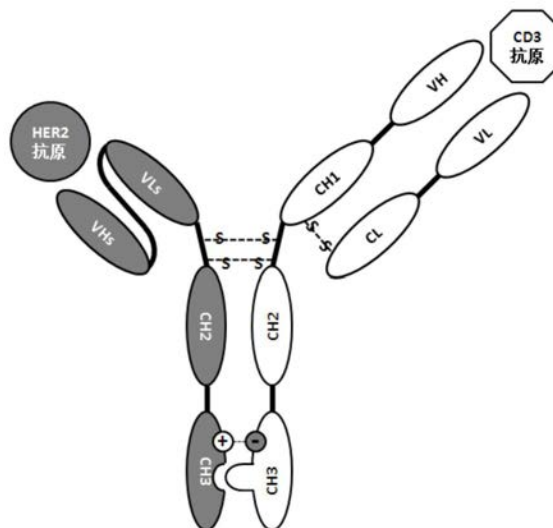
序列表21页 附图5页

(54)发明名称

一种双特异性抗体HER2XCD3的构建及应用

(57)摘要

本发明提供了一种双特异性抗体,本申请的双特异性抗体由单价单元和单链单元组成,其中该单价单元针对免疫细胞的表面抗原CD3具有特异性结合能力,该单链单元针对肿瘤细胞表面抗原HER2具有特异性结合能力;该单链单元包含与Fc片段融合的单链可变片段(ScFv),该单价单元包含轻链和重链对。本申请还提供双特异性抗体的制备方法,这些抗体的药学用途。



1. 双特异性抗体,其特征在于,所述抗体包含:(a) 单价单元,为轻链-重链对,该轻链-重链对针对免疫细胞表面抗原CD3具有特异性结合能力;和(b) 单链单元,为融合肽,该融合肽包含单链可变片段Scfv和具有铰链区、CH2结构域和CH3结构域的Fc片段,其中该融合肽针对肿瘤细胞表面HER2抗原具有特异性结合能力;

其中,单链单元包括针对HER2的抗体抗-HER2,单价单元包括针对CD3的抗体抗-CD3;并且

所述抗-CD3重链的氨基酸序列为序列号1所示的氨基酸序列,抗-CD3的轻链氨基酸序列为序列号3所示的氨基酸序列,以及所述抗-HER2Scfv-Fc的氨基酸序列为序列号5所示的氨基酸序列;并且抗-CD3重链在222位点上的半胱氨酸与抗-CD3的轻链212位点上的半胱氨酸以二硫键的形式连接,所述的抗-CD3重链在228和231位点上的半胱氨酸与抗-HER2Scfv-Fc的258和261位点上的半胱氨酸分别以二硫键的形式连接,所述的抗-CD3重链在370和401位点上与抗-HER2Scfv-Fc的441和424位点上形成盐桥连接,所述的抗-CD3重链在409位点上与抗-HER2Scfv-Fc的398位点上形成隆突-入-穴连接。

2. 制备权利要求1所述双特异性抗体的方法,其特征在于,所述方法包括步骤:

(1) 分别将单价单元的重、轻链分别构建到第一表达载体上,将单链单元构建到第二表达载体上,所述第一表达载体是pCH01.0;所述第二表达载体是pCH01.0-潮霉素;

(2) 将第一和第二表达载体一起共转染到细胞中,培养并取上清,所述细胞是CHO-S细胞;

(3) 将表达上清分离得到纯化后的双特异性抗体;所述分离步骤包括:蛋白A亲和层析柱从表达上清中捕获所有带Fc结构域的抗体,通过SP阳离子交换层析实现目标双特异性抗体与副产物的分离,再过Q柱,最后浓缩置换缓冲液PBS。

3. 根据权利要求2所述方法,其特征在于,所述方法的步骤(1)中:

所述单价单元为抗-CD3抗体,所述单价单元为抗-CD3抗体,扩增其轻链所用引物为Kozak (EcoR V) F、MK-Leader (EcoRV) F和hIgK (PacI) R,通过重叠PCR扩增,将Kozak序列、前导序列及酶切位点EcoR V与PacI引入轻链;扩增其重链所用引物为Kozak (Avr II) F、MK-Leader (AvrII) F和hIgG11 (BstZ17I) R,通过重叠PCR扩增,将Kozak序列、前导序列及酶切位点AvrII与BstZ17I引入重链;将扩增好的LC基因片段与用EcoR V与PacI酶切过的pCH01.0表达载体进行同源重组,获得装入抗CD3轻链的表达载体;然后用AvrII与BstZ17I酶切后再和HC进行同源重组,获得抗CD3的pCH01.0表达载体,质粒命名为pCH01.0-L2K-HL-KKW;所述引物Kozak (EcoRV) F、MK-Leader (EcoRV) F、hIgK (PacI) R、Kozak (Avr II) F、MK-Leader (AvrII) F、hIgG11 (BstZ17I) R核苷酸序列分别为SEQIDNO:9、10、11、12、13、14;

所述单链单元为抗-HER2ScFv-Fc抗体,扩增其所用引物为Kozak (AvrII) F、MK-Leader (AvrII) F、L2K-VH (MK) F1和hIgG11 (BstZ17I) R,通过PCR扩增抗HER2ScFv-Fc结构域,并将Kozak序列、前导序列及酶切位点AvrII与BstZ17I引入ScFv-Fc,将扩增好的基因片段与酶切过的pCH01.0-潮霉素表达载体进行同源重组,获得装入抗HER2Scfv-Fc的表达载体,质粒命名为pCH01.0-潮霉素-赫赛汀-ScFv-Fc-LDY;其中,所述引物Kozak (AvrII) F、MK-Leader (AvrII) F、L2K-VH (MK) F1、hIgG11 (BstZ17I) R核苷酸序列分别为SEQIDNO:15、16、17、18。

4. 权利要求1所述双特异性抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗HER2特异抗原表达所引起的肿瘤疾病,或者用于杀死表达HER2的细胞。

5. 权利要求1所述双特异性抗体在制备药物中的用途,所述药物用于在肿瘤细胞系中筛选用于治疗表达HER2特异抗原的肿瘤疾病的药物或者评价用于治疗表达HER2特异抗原的肿瘤疾病的药物的药效。

## 一种双特异性抗体HER2XCD3的构建及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学的技术领域。具体地说,涉及双特异性抗体的构建和制备方法。

### 背景技术

[0002] 双特异性抗体(bispecific antibody, BiAb)是含有两种特异性抗原结合位点的人工抗体,能在靶细胞和功能分子(细胞)之间架起桥梁,产生导向性的效应功能。BiAb在生物医学中,特别是在肿瘤的免疫治疗中具有广阔的应用前景。通过BiAb介导细胞毒作用杀死肿瘤细胞是当前免疫治疗应用研究的热点,其主要特点是BiAb能同时结合肿瘤相关抗原和免疫效应细胞上的靶分子,直接触发免疫效应细胞对肿瘤细胞的特异性杀伤。以下是针对所研究的免疫细胞抗原和肿瘤细胞抗原,以及相关技术发展的一些背景技术介绍。

#### [0003] 1. CD3

[0004] CD3分子由4个亚基组成: $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、 $\zeta$ ,其分子质量分别为18.9kDa、23.1kDa、20.5kDa、18.7kDa,其长度分别有171、207、182、164个氨基酸残基。它们一起组成6条肽链,常与T细胞受体(T cell receptor, TCR)紧密结合形成含有8条肽链的TCR-CD3复合体,结构示意图见图1。此复合体具有T细胞活化信号转导,稳定TCR结构的功能。CD3胞质段含免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM), TCR识别并结合由MHC(major histo-compatibility complex)分子提呈的抗原肽,导致CD3的ITAM的保守序列的酪氨酸残基被T细胞内的酪氨酸蛋白激酶p56lck磷酸化,然后可募集其他含有SH2(Scr homology 2)结构域的酪氨酸蛋白激酶(如ZAP-70)。ITAM的磷酸化和与ZAP-70的结合是T细胞活化信号传导过程早期阶段的重要生化反应之一。因此,CD3分子的功能是转导TCR识别抗原所产生的活化信号。

#### [0005] 2. HER2

[0006] 1981年Shih等(Shih C, Padhy LC, Murray M, et al. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts[J]. Nature, 1981, 290(5803):261-264.)首次从大鼠神经母细胞瘤基因组中克隆出癌基因neu, Slamon等(1987, Science 2;35;177-182)从人cDNA文库中分离出HER2基因。随后的序列分析和染色体谱分析发现neu和HER2为同一个基因,习惯上称为HER2/neu基因或c-erbB-2基因。HER2是人类表皮生长因子受体家族的第2个成员,该家族属于I型受体酪氨酸激酶,又称ErbB受体家族,其在许多正常和异常表皮细胞的生长、分化和转移过程中起着重要的调控作用,许多肿瘤的发生、发展和病情轻重与其活性大小密切相关。家族内共有四个受体:HER1, HER2, HER3和HER4。这些受体可以相互作用产生异源或同源二聚体,激活细胞内多条信号转导通路,其中HER2在细胞信号转导过程中起着重要作用。HER2的结构包括胞外生长因子的结合区,亲脂的跨膜区和带有调节羧基末端片段的胞内区。HER2受体胞内区有酪氨酸蛋白激酶PTK活性,自身也具有若干酪氨酸残基Tyr磷酸化位点。特异性生长因子与HER2受体结合后可诱导二聚体化并激发受体的交叉磷酸化,磷酸化的受体可以把细胞外的生长信号迅速转导至核内,刺激控制与细胞分裂有关的基因表达。

[0007] HER2定位于人染色体17q21,编码分子量为185kD的跨膜蛋白,具有酪氨酸激酶RTK活性,正常情况下处于非激活状态,参与细胞正常分化的调节,通常只在胎儿期表达,成年后,仅在极少数正常组织内微量表达。正常细胞中HER2基因为2个拷贝,基因突变可将其激活,其扩增将导致转录上调,蛋白合成增加,从而抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤细胞增殖,上调血管内皮生长因子VEGF/血管通透性因子VPF,促进肿瘤新生血管生成,增加肿瘤细胞侵袭力,破坏机体组织抗侵袭屏障等[Artufel MV,Valero AC,Llado RR,etal.Molecular Protocol for Her-2/neu analysis in breast carcinoma[J].Clin Transl Oncol,2005,7.(11):504-511.]。HER2蛋白的过度表达也在细胞的分裂、增殖、转化、促进肿瘤的转移、侵袭、粘附中发挥重要作用[Hynes NE,Stem DF.The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer[J].Biochem Biophys Acta,1994,1198(2-3):165-184.]。

[0008] 除可发生基因突变或扩增外,上调HER2的表达也可激HER2下游的两个主要信号转导途径:MAPK通路,PI3K/Akt通路,从而引发瀑布式连锁反应,调节凋亡相关基因,促进细胞无限增殖分化,抑制凋亡,从而发生癌变。前者主要参与细胞的有丝分裂,后者主要影响细胞的存活和凋亡。HER2可通过MAPK途径活化Ets转录因子家族成员ER81而上调人端粒末端转移酶逆转录酶hTERT,进而导致细胞端粒末端转移酶异常活化,使细胞转化并进入永久增殖状态[GoueliBS,JanknechtR.Upregulation of the catalytic telomerase subunit by the transcription factor ER81 and oncogenic HER2/Neu,Ras,or Raf.Mol Cell Biol,2004,24:25-35.]。PI3K活化后,可催化磷脂酰肌醇PI生成PIP2和PIP3,它们是细胞内重要的第二信使,能激活下游的蛋白激酶Akt/PKB,进一步导致下游BAD蛋白的磷酸化,从而阻止BAD与凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-XL组成复合物,同时还诱导叉头转录因子1磷酸化,从而抑制原凋亡基因的表达。

[0009] 另外,HER2癌基因也是肿瘤转移驱动因子,HER2过表达能通过启动多种转移相关机制而增加肿瘤细胞转移能力,如细胞迁移率、体外侵袭力、W型胶原酶活性等,还可以影响某些黏附分子如上皮细胞钙黏蛋白等的合成,从而促进转移。Carter等(CarterW,Hoying J,Boswell C,et al.HER-2/neu over-expression induces endothelial cell retraction[J].Int Cancer,2001,91(3):295-299.)研究认为,HER2过表达可使内皮细胞收缩,细胞间隙增宽,肿瘤细胞易于从内皮细胞间穿越,肿瘤细胞发生移位或转移。多数研究认为,HER2基因扩增和(或)蛋白过表达往往提示肿瘤恶性程度高,转移能力强。

[0010] HER2的过表达常与肿瘤的发生有关,例如:

[0011] (1)胃癌:胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,预后差,进展期胃癌5年生存率仅为5%~20%,中位生存时间不超过1年。不同的研究小组检测HER2蛋白在胃癌中过表达的比率变异为7%~43%。HER2蛋白在胃癌中的阳性表达与肿瘤分化程度、Lauren分型及WHO分型有关,与年龄、性别、肿瘤发生部位及临床分期不相关。

[0012] (2)乳腺癌:研究表明,HER2在20%~30%的原发性乳腺浸润性导管癌中有基因的扩增和蛋白的过度表达。HER2的高表达常导致细胞的恶性转移,因此HER2阳性的乳腺癌浸润性强,无病生存期短,预后差。体外实验显示,抑制HER2的表达可导致肿瘤细胞的凋亡。

[0013] (3)卵巢癌:卵巢癌是妇科肿瘤致死的主要原因。卵巢癌中HER2的过表达与乳腺癌中相似,占15%~30%。Verri等(Verri E,Guglielmini P,Puntoni M,et al.HER2/neu oncoprotein overexpression in epithelial ovarian cancer:evaluation of its

prevalence and prognostic significance[J].Oncology,2005,68:154-161.)的研究显示,HER2阳性(2+/3+)患者比阴性患者(0/1+)总生存期显著降低(29个月vs48个月, $P < 0.05$ )。观察Ⅲ、Ⅳ期的卵巢癌20个卵巢细胞株发现,均存在HER2蛋白过表达。

[0014] (4) 前列腺癌:前列腺癌发生时属于雄激素依赖性,在接受药物或手术去势治疗后肿瘤退缩,但最终会转变为雄激素非依赖性而继续生长,这是目前前列腺癌治疗中最主要的问题。研究表明,HER2是前列腺癌从激素依赖型转变为激素非依赖型过程中的主要介导者。Signoretti等(Signoretti S, Montironi R, Manola J, et al. Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92:1918-1925.)研究分析不同临床阶段肿瘤样本HER2的DNA、RNA以及蛋白质的表达水平,结果显示,25%的仅手术切除前列腺癌的患者(UNTumor),59%的手术前接受抗雄激素治疗的患者(TAAtumor)和78%的雄激素治疗失败后并且发生骨转移(雄激素非依赖型AI)的患者存在过表达的HER2。

[0015] (5) 肺癌:肺癌中HER2的过表达主要与基因转录和转录后修饰有关。国内研究显示,HER2过表达主要发生在非小细胞肺癌,且主要是腺癌,而不是鳞癌。但是,国外88例匈牙利非小细胞肺癌患者的检测结果显示,仅有5例存在HER2过表达,且均为鳞状细胞癌,研究结果存在差别。此外,对HER2在肺癌中过表达与细胞分化程度的关系也有不同的结论。

[0016] 针对HER2靶点的抗体药物:曲妥珠商品名为赫赛汀Herceptin,是以HER2为靶点的人源化单克隆抗体。Herceptin是通过基因工程方法将非特异性的人IgG的稳定区与鼠的抗HER2蛋白IgG的抗原决定簇嵌合在一起获得的,其不仅对HER2受体有高度亲和力,同时还解决了鼠源性抗体应用于人体的免疫源性问题,能减少人抗鼠抗体的产生,从而避免被网状内皮系统清除。体内外实验研究表明,应用Herceptin下调的表达,能使细胞生长减慢,并能显著提高其对放化疗的敏感性。1998年美国FDA批准该药用于HER2过表达的转移性乳腺癌二线和三线治疗,是第一个也是唯一一个被批准用于治疗HER2/neu蛋白表达阳性转移性乳腺癌和早期乳腺癌的人源化单克隆抗体药物。

[0017] 3. 双特异性抗体技术发展

[0018] 双特异性抗体,一个抗体分子中的两个抗原结合部位可分别结合两种不同的抗原表位的抗体。

[0019] 抗体药物是以细胞工程技术和基因工程技术为主体的抗体工程技术制备的生物大分子药物,具有特异性高、性质均一、可针对特定靶点定向制备等优点。单克隆抗体在临床上主要应用于以下三个方面:肿瘤治疗、免疫性疾病治疗以及抗感染治疗。其中肿瘤的治疗是目前单抗应用最为广泛的领域,目前已经进入临床试验和上市的双抗产品中,用于肿瘤治疗的产品数量占比大概为50%。单克隆抗体治疗肿瘤是一种针对病变细胞特异靶点刺激免疫系统来杀伤靶细胞的免疫疗法,为了增强抗体的效应功能,特别是杀伤肿瘤细胞的效果,人们尝试多种方法改造抗体分子,双特异性抗体是改善抗体治疗效果的发展方向之一,现已成为抗体工程研究领域的热点。

[0020] 用于免疫治疗的双特异性抗体是含有2种特异性抗原结合位点的人工抗体,能在靶细胞和功能分子(细胞)之间架起桥梁,激发具有导向性的免疫反应,在肿瘤的免疫治疗中具有广阔的应用前景。

[0021] 4. 双特异性抗体制备

[0022] 双特异性抗体可通过多种途径获得,其制备方法主要有:化学偶联法、杂交-杂交瘤法和基因工程抗体制备法。化学偶联法是将2个不同的单克隆抗体用化学偶联的方式连接在一起,制备出了双特异性单克隆抗体,这是最早的双特异性单克隆抗体概念。杂交-杂交瘤法是通过细胞杂交法或者三元杂交瘤的方式产生双特异性单克隆抗体,这些细胞杂交瘤或者三元杂交瘤是通过建成的杂交瘤融合,或者建立的杂交瘤和从小鼠得到的淋巴细胞融合而得到的,只能生产出鼠源的双特异性抗体,它的应用受到了极大的限制。而随着分子生物学技术的迅速发展,出现了基因工程人源化双特异性抗体的多种构建模式,并主要分为双特异性微抗体,双链抗体,单链双价抗体,多价双特异性抗体四类。目前,国际上已有数种基因工程双特异性抗体药物进入临床试验阶段,并显示有较好的应用前景。

[0023] 5. 肿瘤的过继免疫治疗

[0024] 肿瘤的过继免疫治疗是将自体或异体的免疫活性细胞经过体外扩增后输入患者体内,直接杀伤肿瘤细胞,调节和增强机体的免疫功能,主要包括LAK细胞、TIL细胞、激活的T淋巴细胞和CIK细胞的免疫治疗。而免疫疗法只能清除少量的、零散的肿瘤细胞,对于晚期的实体肿瘤疗效有限。故常将其作为一种辅助疗法与手术、化疗、放疗等常规方法联合应用。先用常规方法清扫大量的肿瘤细胞后,再用免疫疗法清除残存的肿瘤细胞,可提高肿瘤综合治疗的效果。其中,过继免疫治疗作为肿瘤综合治疗中的一个新方法,已经与常规手术治疗、放疗、化疗及其他细胞和分子治疗得到广泛配合,在多种肿瘤的治疗中展示了广泛的应用前景。然而,一种更理想的方式应该是,双特异性抗体一端可以结合培养好的免疫细胞的表面抗原CD3,并随之一起输入体内,而双特异性抗体的另一端能很好地结合肿瘤细胞的表面抗原;这样,双特异性抗体就能在体内架起肿瘤细胞和免疫细胞之间的桥梁,使免疫细胞集中在肿瘤细胞周围,进而对肿瘤细胞进行杀伤。通过这种方法可有效解决肿瘤细胞的转移和扩散,克服了手术、放化疗三大传统治疗方式后的“不彻底、易转移、副作用大”等弊端。

## 发明内容

[0025] 术语和缩略语

[0026] BiAb:双特异性抗体(bispecific antibody)

[0027] TA:肿瘤抗原(tumor antigen)

[0028] VH:重链可变区(heavy chain variable region)。

[0029] VL:轻链可变区(light chain variable region)。

[0030] CL:轻链恒定区(constant region of light chain)。

[0031] CDR:是英文Complementarity determining regions(CDRs)的缩写,是指抗体的抗原互补决定区。

[0032] ScFv:单链可变区抗体片段(single-chain variable fragment),又称为单链抗体。

[0033] CLD:细胞系开发(cell line development)

[0034] FACS:荧光激活细胞分选(Fluorescence-activated cell sorting),也称为流式细胞分选术。

[0035] 本发明针对常规单克隆抗体的不足之处,通过基因工程和抗体工程的方法进行的

新分子-双特异性抗体的创制,在传统单克隆抗体主要通过CDC,ADCC和凋亡能力来杀伤肿瘤细胞的基础上,增加了介导T细胞的免疫疗法,大大提高了免疫系统杀伤肿瘤细胞的功效。

[0036] 具体地,本发明提供了以下的技术方案:

[0037] 在一种实施方式中,提供一种双特异性抗体,其特征在于,所述该抗体包含:(a) 单价单元,为轻链-重链对,该轻链-重链对针对免疫细胞选自T细胞、NKT细胞或CIK细胞;优选地,该轻链-重链对对免疫细胞表面抗原CD3具有特异性结合能力;和(b) 单链单元,为融合肽,该融合肽包含单链可变片段Scfv和具有铰链区、CH2结构域和CH3结构域的Fc片段,其中该融合肽针对肿瘤细胞表面抗原具有特异性结合能力,优选地该肿瘤细胞表面抗原是HER2、CD20、CD30和CD133,更优选地该肿瘤细胞表面抗原是HER2。

[0038] 在一种实施方式中,所述双特异性抗体的单链单元的CH2结构域位于ScFv片段和CH3结构域之间。

[0039] 在一种实施方式中,双特异性抗体的单链可变片段由轻链可变区和重链可变区结构域组成,它们都靶向于抗原表位HER2。

[0040] 在一种实施方式中,在单价单元中,轻链通过二硫键与重链结合;重链通过一个或多个二硫键与所述融合肽结合。

[0041] 在一种实施方式中,单链单元包括针对HER2的抗体抗-HER2,单价单元包括针对CD3的抗体抗-CD3;优选地,所述抗-CD3重链的氨基酸序列为序列号1所示的氨基酸序列,抗-CD3的轻链的氨基酸序列为序列号3所示的氨基酸序列,以及所述抗-HER2Scfv-Fc的氨基酸序列为序列号5所示的氨基酸序列;并且抗-CD3重链在222位点上的半胱氨酸与抗-CD3的轻链212位点上的半胱氨酸以二硫键的形式连接,所述的抗-CD3重链在228和231位点上的半胱氨酸与抗-HER2Scfv-Fc的258和261位点上的半胱氨酸分别以二硫键的形式连接,所述的抗-CD3重链在370和401位点上与抗-HER2Scfv-Fc的441和424位点上形成盐桥连接,所述的抗-CD3重链在409位点上与抗-HER2Scfv-Fc的398位点上形成隆突-入-穴连接。

[0042] 在一种实施方式中,单价单元中的重链包含人或者人源化的Fc片段,优选地,该重链的Fc片段包含人IgG1Fc片段;所述融合肽的Fc片段包含人或者人源化的Fc片段,优选地,该融合肽的Fc片段包含人IgG1Fc片段。

[0043] 在一种实施方式中,所述单价单元的人IgG1Fc段和所述单链单元的IgG1Fc通过盐桥和隆突-入-穴结构连接。

[0044] 在一种实施方式中,提供一种双特异性抗体的制备方法,所述方法包括:

[0045] (1) 分别将单价单元的重、轻链分别构建到第一表达载体上,将单链单元构建到第二表达载体上;

[0046] (2) 将第一和第二表达载体一起共转染到细胞中,培养并取上清;

[0047] (3) 将表达上清分离得到纯化后的双特异性抗体;优选地,所述细胞是CHO-S细胞;或者优选地,所述分离步骤包括:蛋白A亲和层析柱从表达上清中捕获所有带Fc结构域的抗体,通过SP阳离子交换层析实现目标双特异性抗体与副产物的分离,再过Q柱,最后浓缩置换缓冲液PBS。

[0048] 在一种实施方式中,第一表达载体是pCH01.0;第二表达载体是pCH01.0-潮霉素。

[0049] 在一种实施方式中,所述单价单元为抗-CD3抗体,扩增其轻链所用引物为Kozak



(EcoR V)F、MK-Leader (EcoRV)F和hIgK (PacI)R,通过重叠PCR扩增,将Kozak序列、前导序列及酶切位点EcoR V与PacI引入轻链;扩增其重链所用引物为Kozak (Avr II)F、MK-Leader (AvrII)F、MK-Leader (AvrII)F和hIgG11 (BstZ17I)R,通过重叠PCR扩增,将Kozak序列、前导序列及酶切位点AvrII与BstZ17I引入重链;将扩增好的LC基因片段与用EcoR V与PacI酶切过的pCH01.0表达载体进行同源重组,获得装入抗CD3轻链的表达载体;然后用AvrII与BstZ17I酶切后再和HC进行同源重组,获得抗CD3的pCH01.0表达载体,质粒命名为pCH01.0-L2K-HL-KKW;

[0050] 所述单链单元为抗-HER2ScFv-Fc抗体,扩增其所用引物为Kozak (Avr II)F、MK-Leader (AvrII)F、L2K-VH(MK)F1和hIgG11 (BstZ17I)R,通过PCR扩增抗HER2ScFv-Fc结构域,并将Kozak序列、前导序列及酶切位点AvrII与BstZ17I引入ScFv-Fc,将扩增好的基因片段与酶切过的pCH01.0-潮霉素表达载体进行同源重组,获得装入抗HER2Scfv-Fc的表达载体,质粒命名为pCH01.0-潮霉素-赫赛汀-ScFv-Fc-LDY。

[0051] 在一种实施方式中,上述任意的双特异性抗体或者按照上述任一方法制备的双特异性抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗HER2特异抗原表达所引起的肿瘤或相关疾病,或者用于杀死表达HER2细胞。

[0052] 在一种实施方式中,上述任意的双特异性抗体或者按照上述任一方法制备的双特异性抗体在制备药物中的用途,所述药物用于在人肿瘤细胞系中筛选用于治疗表达HER2特异抗原的肿瘤细胞相关疾病的药物或者评价用于治疗表达HER2特异抗原的肿瘤细胞相关疾病的药物的药效。本发明还提供了以下的技术方案:

[0053] 本发明提供了一种新方法制备双特异性抗体SMBODY (ScFv and monomer bispecific antibody) (如图2所示),该双特异性抗体包括两组单元,其中一组单元为轻重链对,称为单价单元,特异结合一种抗原,并且在其重链Fc区进行一些改造,使其相对野生型,不易自身形成二聚体;而另一组单元为单链-重链Fc区融合肽,称为单链单元,特异结合另一种抗原,同样在其重链Fc区进行另外一些改造,也不易自身形成二聚体,而这两组单元之间很容易形成杂合二聚体。并且其中一组的抗体结构为单价单元,另一组为单链(ScFv-Fc),这样就避免了各自轻链与对方重链错配的可能性,从而形成125KD的双特异性抗体蛋白分子。Fc改造后,单价单元的重链和单链自然异二聚化,同时CL和CH1间自然二聚化,最后形成SMBODY。SMBODY各结构域排列顺序及结构示意图见图2。

[0054] 本发明中利用以上制备双特异性抗体的方法,制备双特异性抗体。其中是以HER2和人源CD3为靶点的双特异性抗体,被命名为HER2X CD3,如图2,抗-CD3这边为单价单元形式,包括抗-CD3重链与轻链,抗-HER2这边为Scfv-Fc形式,包括抗-HER2VH、连接肽、VL、Fc结构域。以上双特异性抗体通过抗体基因工程方法进行构建,双特异性抗体SMBODY的单价单元重链和单价单元轻链双启动子表达载体,以及ScFv-Fc表达载体。根据LC,HC,ScFv,Fc基因序列及载体中的多克隆位点设计引物。其中单价单元轻链(LC),单价单元重链(HC),ScFv和Fc分别进行PCR扩增,通过PCR或重叠延伸PCR法获得基因片段,然后通过同源重组法进行克隆。酶切pCH01.0或pCH01.0-潮霉素载体,然后纯化回收PCR产物和酶切后的载体,分二步分别将LC片段,HC片段同源重组克隆到pCH01.0载体上,ScFv-Fc片段同源重组克隆到pCH01.0-潮霉素载体上,并测序。重组蛋白质SMBODY在哺乳动物细胞中的表达、检测,使用转染试剂将表达单价单元重链和单价单元轻链的质粒以及表达单链单元的质粒共转染至

哺乳动物细胞中,再收集上清进行SDS-PAGE和蛋白质印迹检测SMBODY的表达情况。将转染表达后的培养液上清离心,过滤,用结合缓冲液稀释,过亲和层析柱,洗脱缓冲液洗脱,SDS-PAGE检测纯化蛋白质。

[0055] 本发明的技术方案的有益的技术效果有:

[0056] 1. 本申请提供了一种异二聚体抗体,该抗体包含两个不同的抗原结合多肽单元。该异二聚体与其对应的同二聚体分子量大小不同,可利用分子量的大小来区别异二聚体和同二聚体,从而较方便地确定双特异性抗体的纯度。这两个抗原结合多肽单元之一包含类似于野生型抗体的轻链-重链对,在整个本申请中,该单元也称为“单价单元”。另一抗原结合多肽单元包含单链可变片段(ScFv)。这样的ScFv可融合至抗体的恒定片段(Fc)。在本申请全文中此融合肽也被称为“单链单元”。

[0057] 2. 本发明公开了一种新型双特异性抗体SMBODY介导的免疫细胞杀伤体外药效实验方法的建立及其应用。本发明包括双特异性抗体药物研究过程中所介导的免疫细胞杀伤、双特异性抗体的制备,以及双特异性抗体体外药效模型的建立和检测。双特异性抗体SMBODY包括一组单链单元(ScFv连接Fc组合),另一组则为单价单元(重轻链组合),其中单链单元特异结合一种人的肿瘤细胞抗原,包括HER2等一系列肿瘤细胞膜表面抗原,并且在重链Fc区进行一些改造,使其相对野生型,不易自身形成二聚体;而另一组单价单元特异结合另一种人的T细胞抗原CD3,同样在其重链Fc区进行另外一些改造,也不易自身形成二聚体,而这两组单元之间很容易形成异二聚体。与此同时,双特异性抗体能在靶细胞和功能分子(细胞)之间架起桥梁,激发具有导向性的免疫反应,在免疫细胞的参与下,本发明的双特异性抗体对肿瘤细胞有极强的杀伤效果,在肿瘤的免疫治疗中具有广阔的应用前景。

[0058] 令人惊奇的是,本申请证明这种非对称的抗体是稳定的并具有高的抗原结合效率。这是令人感到意外的,因为已经证实在生理条件下即使是单链抗体的同二聚体都是不稳定的。例如,Ahmad等的“ScFv Antibody:Principles and Clinical Application,”*Clinical and Developmental Immunology*,2012:980250(2012),显示基于ScFv的IgG1类抗体不稳定,并且需要进一步改造以减少聚集并提高稳定性。

[0059] 另外,因为具有非对称性,异二聚体具有与由其中任一抗原结合多肽单元组成的同二聚体所不同的等电点。基于异二聚体和同二聚体之间的等电点差异,可以容易地将需要的异二聚体与同二聚体分离,大大减少了双特异性抗体普遍存在的下游工艺开发存在的困难。

## 附图说明

[0060] 为了更清楚地说明本申请实施例中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本申请中记载的一些实施例,对于本领域普通技术人员来说,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图,其中:

[0061] 图1.CD3分子结构示意图。

[0062] 图2.HER2X CD3双特异性抗体分子示意图。

[0063] 图3.纯化的双抗体电泳及纯度检测结果图;(A)非变性SDS-PAGE电泳,M:蛋白分子量标记;泳道1:S801;泳道2:S802;(B)纯化的S802的HPLC-SEC纯度峰形图。

- [0064] 图4.基于流式细胞分析方法测定的HER2×CD3双抗体与SK-BR-3细胞的亲和力结果图。
- [0065] 图5.基于流式细胞分析方法测定的HER2×CD3双抗体与Jurkat细胞的亲和力结果图。
- [0066] 图6.双抗原HER2和CD3的ELISA检测S802的结合活性结果图。
- [0067] 图7.流式检测热挑战实验处理后双抗体对SK-BR-3细胞的结合情况图。
- [0068] 图8.流式检测热挑战实验处理后双抗体对人PBMC细胞的结合情况图。
- [0069] 图9.S802与hPBMC对BT-474细胞的体外细胞毒实验结果图。
- [0070] 图10.S802与hPBMC对MCF-7细胞的体外细胞毒实验结果图。
- [0071] 图11.S802与hPBMC对HEK293细胞的体外细胞毒实验结果图。

### 具体实施方式

[0072] 实施例1:双特异性抗体的表达载体构建(HER2×CD3,S802)

[0073] 1.双特异性抗体序列设计

[0074] 以HER2和CD3为靶点的双特异性抗体被命名为HER2×CD3SMBODY,其中单价单元为抗CD3的重链轻链对,可变区氨基酸参考单克隆抗体L2K的序列,参考US20070123479序列2,包括抗CD3重链与轻链,含有Fab和Fc结构域;单链单元为抗HER2的ScFv-Fc形式,可变区氨基酸序列参考单克隆抗体赫赛汀的序列(PDB数据库No.1N8Z),包括赫赛汀单克隆抗体的VH、VL、Fc结构域。其中单价单元的重链Fc和单链单元的Fc(同人IgG11的重链Fc)均进行氨基酸突变改造,具体Fc改造过程参见PCT/CN2012/084982,使其各自不易形成同二聚体(homodimer),而易于形成异二聚体(heterodimer),该异二聚体即为双特异性抗体HER2×CD3SMBODY,编号为S802。同时,为了S802能在CHO细胞中表达,并能分泌到培养基中,选择了鼠源抗体kappa链的前导肽序列作为分泌信号肽。各个结构域及信号肽的氨基酸序列和核酸序列见如下序列号:1-8。信号肽直接连接于抗体可变区的N端。在专利PCT/CN2012/084982中,一种抗Her2XCD3的SMBODY,单价单元可变区来自赫赛汀,单链单元可变区来自人源化OKT3,该SMBODY在本发明中编号为S801,作为对比抗体。

[0075] L2K单价单元重链氨基酸序列(序列号1)

[0076] DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA  
TLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL  
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK  
SCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCRVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK-

[0077] L2K单价单元重链核酸序列(序列号2)

[0078] GACATCAAACCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAG  
ACTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGG  
ATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAAT  
CCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTAT

GATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATC  
GGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT  
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAG  
TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA  
CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC  
CACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATG  
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA  
CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA  
GCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA  
GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCG  
GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGT  
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGAAGTCCGACGGCTCCTTCTTCTC  
GCCAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT  
GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

[0079] L2K单价单元轻链氨基酸序列(序列号3)

[0080] DIQLTQSPA IMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPIRFSGSGSGTS  
YSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQW  
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0081] L2K单价单元轻链核酸序列(序列号4)

[0082] GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC  
AGAGCCAGTTCAAGTGTAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGA  
CACATCCAAAGTGGCTTCTGGAGTCCCTTATCGCTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCATACTCTCTCACAATCA  
GCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGTGTGGG  
ACCAAGCTGGAGCTGAAAACCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG  
AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCC  
TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG  
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT  
CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0083] 赫赛汀单链单元氨基酸序列(序列号5)

[0084] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF  
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS  
SLSASVGRVITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFAT  
YYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRGAAPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVIV  
DVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSR  
WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK-

[0085] 赫赛汀单链单元核酸序列(序列号6)

[0086] GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGCGCCCTGGTGCAGCCGGGCGGATCCCTGCGCCTGAGCTGCGCG  
GCGAGCGGCTTTAACATTAAGATACTATATTCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGC

GCGCATTTATCCGACCAACGGCTATACCCGCTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATTAGCGCGGATACCA  
 GCAAAAACACCGCGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCAGCCGCTGGGGC  
 GGCGATGGCTTTTATGCGATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCTCAGGAGGCGGCGGTTTCAGG  
 CGGAGGTGGAAGTGGTGGAGGAGTTCTGATATTCAGATGACCCAGAGCCCGTCAAGCTTAAGCGCGAGCGTGGGCG  
 ATCGCGTGACCATTACCTGCCGCGGAGCCAGGATGTGAACACCGCGGTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAA  
 GCGCCGAAACTGCTGATTTATAGCGCGAGCTTTCTGTATAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCCGCAGCGG  
 CACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTGCACCTATTATTGCCAGCAGCATTATACCA  
 CCCC GCCGACCTTTGGCCAGGGTACCAAAGTGGAAATTAACGAGGTGCGGCCGAGAGCCCAAATCTTGTGACAAA  
 ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAA  
 GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA  
 AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGC  
 TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAA  
 CAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC  
 TGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC  
 ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACGATACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGG  
 CTCCTTCTTCTCTACAGCGATCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA  
 TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

[0087] 鼠kappa链的前导肽序列氨基酸序列(序列号7)

[0088] METDTLLLWVLLLWVPGSTG

[0089] 鼠kappa链的前导肽序列核酸序列(序列号8)

[0090] atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggt

[0091] 2. 双特异性抗体基因克隆

[0092] 选择Freedom® pCHO 1.0 Expression Vector (简称pCHO1.0, 购自Life technologies的试剂盒Freedom® CHO-S® Kit, 货号A13696-01) 作为表达载体去克隆和表达单价单元的重链和轻链基因, pCHO1.0-潮霉素表达载体是通过用潮霉素抗性基因替换pCHO1.0载体中的嘌呤霉素基因改造而来, 被选择用来克隆和表达单链单元。表1中的引物根据克隆方案设计好后, 发送到苏州金唯智生物科技有限公司进行合成。以表1中的引物进行PCR扩增, 模板为早期实验中基因合成或亚克隆到pCDNA3.1或pUC57上的基因质粒, PCT/CN2012/084982专利有详细描述, 然后分别将单价单元的重、轻链cDNA分别构建到pCHO1.0的表达载体上不同启动子下游, 将单链单元cDNA构建到pCHO1.0-潮霉素的表达载体上。

[0093] 表1双特异性抗体基因克隆中使用的引物

[0094]

片段名称	引物名称	序列号	序列
L2K 轻链	Kozak (EcoR V) F	9	GAGGAAGGATCTCGAGCTCAAGCTTGATATCGCCGCCACCATG

[0095]

	MK-Leader (EcoRV) F	10	CAATTGATATCGCCGCCACCATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTC
	hIgK (PacI) R	11	CTTATCATGTCTGGATCGAAGCTTAATTAACACTCTCCCTGTTGAAG
L2K 重链	Kozak (Avr II) F	12	CCCGAGGAGGAACGGTTCGGGGCCGCCTAGGGCCGCCACCATG
	MK-Leader (AvrII) F	13	CAATTCCTAGGGCCGCCACCATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTC
	hIgG11 (BstZ17I)R	14	CATAGAGTATAATATAGAGTATACACCTGCAGGTCATTTACCCGGAGACAGGGAG
赫赛汀 ScFv-Fc	Kozak (Avr II) F	15	CCCGAGGAGGAACGGTTCGGGGCCGCCTAGGGCCGCCACCATG
	MK-Leader (AvrII) F	16	CAATTCCTAGGGCCGCCACCATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTC
	L2K-VH(MK) F1	17	GCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGATATCAAACGCAGCAGT
	hIgG11 (BstZ17I)R	18	CATAGAGTATAATATAGAGTATACACCTGCAGGTCATTTACCCGGAGACAGGGAG
HER2 抗原	Her2-F	19	GCACCATGGAGCTGGCGGCCTTGTG
	Her2-R	20	GATGATGGGTGCAGTTGATGGGGCAAGGCTGG
	Histag-R	21	AGACTCGAGCTAATGATGATGATGATGATGATGATGGGTGCAGTTG

[0096] 初始PCR扩增模板DNA:35ng的模板DNA,如,目标抗体的轻链和重链;1 $\mu$ l的10 $\mu$ M正向引物和反向引物;2.5 $\mu$ l的10x PCR Buffer缓冲液;1 $\mu$ l的10mM dNTP;1 $\mu$ l的2.5单位/ $\mu$ l Pyrobest DNA聚合酶(Takara,R005A);和蒸馏水到25 $\mu$ l总体积在200 $\mu$ l PCR管中轻柔混合,并在微量离心机中快速旋转以收集反应混合物到管底。使用GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem)和以下设置进行PCR反应:95 $^{\circ}$ C,5分钟;以下的25个循环:95 $^{\circ}$ C,每次30秒;56 $^{\circ}$ C,30秒;和72 $^{\circ}$ C,1分钟。

[0097] 通过几轮重叠PCR扩增,将Kozak序列、前导序列及酶切位点EcoR V与PacI引入轻链;以及相应的引物将Kozak序列、前导序列及酶切位点AvrII与BstZ17I引入重链。先将扩增好的LC基因片段与用EcoR V与PacI酶切过的pCH01.0表达载体进行同源重组,获得装入抗CD3轻链的表达载体;然后用AvrII与BstZ17I酶切后再和HC进行同源重组,获得抗CD3的pCH01.0表达载体,质粒命名为pCH01.0-L2K-HL-KKW。

[0098] 通过重叠PCR扩增抗HER2ScFv-Fc结构域,并将Kozak序列、前导序列及酶切位点AvrII与BstZ17I引入ScFv-Fc,将扩增好的基因片段与酶切过的pCH01.0-潮霉素表达载体进行同源重组,获得装入抗HER2 Scfv-Fc的表达载体,质粒命名为pCH01.0-潮霉素-赫赛汀-ScFv-Fc-LDY。

[0099] 实施例2:双特异性抗体表达与纯化

[0100] 1. 双特异性抗体S802的表达

[0101] 利用无内毒素大提试剂盒(Qiagen,12391)进行质粒大提,具体操作按照厂商提供的说明书进行。CHO-S细胞培养根据厂商提供的说明书在CD FortiCHO培养基(Invitrogen,货号A11483-1)中,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中进行培养,准备好细胞后,根据制造商的说明书(Maxcyte),使用Maxcyte STX电转仪将质粒pCH01.0-L2K-HL-KKW与pCH01.0-潮霉素-赫赛汀-ScFv-Fc-LDY一起共转染到CHO-S细胞中,表达抗HER2 $\times$ CD3的双特异性抗体

S802。培养14天后,800×g离心收获表达上清。S801的表达实验步骤与S802相同。

[0102] 2. 双特异性抗体S802的纯化

[0103] 表达上清用0.22μm滤膜过滤,利用Mabselect SuRe亲和层析柱(购自GE公司,柱货号18-1153-45,填料货号17-5438-01)从表达上清中捕获所有带Fc结构域的抗体,用平衡缓冲液(9.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+40.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,pH7.0)平衡层析柱后,过亲和层析柱,用洗脱缓冲液(50mM柠檬酸+100mM精氨酸,pH3.2)洗脱。通过SP阳离子交换层析,实现目标双特异性抗体与副产物的分离,阳离子交换柱购自GE公司(柱货号18-1153-44,填料货号17-1087-01),用平衡缓冲液A(43.8mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+6.2mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,pH 6.0)平衡层析柱后,样品用双纯水稀释电导至3.0-3.5ms之间,过SP柱子结合后,用洗脱缓冲液B(43.8mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+6.2mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+1M NaCl,pH 6.0)20个柱体积线性洗脱;最后浓缩置换磷酸盐缓冲液(PBS)。S801的纯化实验步骤与S802相同。纯化后的双特异性抗体进行SDS-PAGE、SEC检测,纯度在95%以上(见图3)。

[0104] 实施例3:双特异性抗体与细胞的结合活性测定(FACS)

[0105] 本发明的双特异性抗体与相应细胞上的靶抗原结合。本发明以SK-BR-3(购自中国典型培养物保藏中心)作为HER2阳性的细胞,Jurkat(美国模式培养物集存库(ATCC),TIB-152)作为CD3阳性的细胞,并以本发明制备的双抗体测定其细胞结合活性。

[0106] 1. 利用流式分析法检测双特异性抗体与SK-BR-3细胞的结合活性

[0107] 培养足够的SK-BR-3细胞,用0.25%胰酶消化、离心收集细胞。同时稀释双特异性抗体,浓度从160nmol开始,4倍梯度稀释,得到6个浓度梯度,备用。将收集的细胞用PBS+1%FBS洗两遍,再加PBS+1%FBS重悬细胞至4×10<sup>6</sup>个细胞/ml,细胞铺板于96孔板中,每孔50ul(2×10<sup>5</sup>个细胞),加入50ul PBS稀释成不同浓度的抗体(赫赛汀购自Genentech,HOKT3是实验室制备的人源化OKT3,序列见PCT/CN2012/084982序列号2,表达和纯化方法同S802),室温孵育1小时;离心去上清,用PBS洗细胞两遍,再用稀释好的PE标记的抗人IgG1 FC抗体(Biolegend,409304)重悬细胞,室温避光孵育30分钟,PBS洗两遍,再用100ul PBS重悬,上机检测,再以平均荧光强度,通过用软件GraphPad Prism5.0进行分析计算双抗体与SK-BR-3的结合亲和力KD值。结果显示S802双抗体与HER2阳性的SK-BR-3细胞具有良好的结合活性,优于S801,见图4。与HER2阳性细胞SK-BR-3结合情况:S801的KD值是9.592nM,S802的KD值是6.365nM,赫赛汀的KD值是2.283nM。

[0108] 2. 流式分析法检测双特异性抗体与Jurkat细胞的结合活性

[0109] 培养足够的Jurkat悬浮细胞,离心收集细胞。接下来的实验过程与上述实施例相同,将100ul PBS重悬的细胞,上机检测,以平均荧光强度,通过用软件GraphPad Prism5.0进行分析计算双抗体与Jurkat细胞的结合亲和力KD值。结果显示HER2×CD3双抗体与CD3阳性的Jurkat细胞具有良好的结合活性,见图5。与CD3阳性细胞Jurkat结合情况:S801的KD值是0.5965nM,S802的KD值是0.2374nM,L2K的KD值是0.1860nM。

[0110] 3. 双抗原ELISA检测S802的双靶向结合能力

[0111] 1) 抗原制备:HER2抗原引物设计参考Genbank SeqNo.M11730.1,引物序列见表1的Her2-F和Her2-R;mRNA从SK-BR-3细胞中提取,使用的试剂为Trizol(Invitrogen)并反转录成cDNA,使用的反转录试剂盒为PrimeScript® RT-PCR Kit(TaKaRa),引物为Her2-R,再用引物Her2-F和Her2-R将该抗原的胞外结构域扩增出来,然后使用引物Her2-F和Histag-R以

PCR方法加上组氨酸标签(7XHis),构建至表达载体pcDNA3.1/Hygro(+)(Invitrogen)中,转染表达方法同S802的转染表达(见实施例2),纯化采用GE公司的镍柱(1mL规格预装柱)。

[0112] 2) 使用的抗原之一为HRP标记CD3抗原(CD3抗原为自制,详见专利CN201310399169),抗原之二为HER2(见步骤1)。

[0113] 3) 包被抗原:用包被液(pH=9.6,0.05mol/L碳酸钠缓冲液)将HER2稀释到1 $\mu$ g/mL加入酶标板孔中,100 $\mu$ l每孔,4 $^{\circ}$ C过夜或者37 $^{\circ}$ C孵育2小时。PBST(PBS+0.1%Tween20)洗板一次,100 $\mu$ L/孔;

[0114] 4) 封闭:加入封闭液,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1小时;PBST洗板一次,100 $\mu$ L/孔;

[0115] 5) 标准曲线:分别加入不同的抗体100 $\mu$ L/孔,浓度均为20 $\mu$ g/mL,每种抗体做3个复孔;37 $^{\circ}$ C孵育1小时;PBST洗板3次,100 $\mu$ L/孔;阴性对照为PBS;

[0116] 6) 加入酶标抗原:再加入HRP标记CD3抗原(PBS稀释到1 $\mu$ g/mL),100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟;PBST洗板5次,100 $\mu$ L/孔;

[0117] 7) 显色:加入显色液,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C避光显色1-10分钟;

[0118] 8) 终止:每孔加入100 $\mu$ l终止液(2M盐酸)终止显色反应,在酶标仪上读取各孔反应液OD450nm的值。

[0119] 由图6可知,S802可以同时结合HER2和CD3两种抗原。

[0120] 实施例4:双特异性抗体的热稳定性测定

[0121] 1. 双特异性抗体的热挑战性实验

[0122] 抗体用PBS稀释到0.5mg/mL,以50 $\mu$ L/管的规格分装到PCR管中,在PCR仪(ABI PCRsystem 9700)上热处理60min。PCR仪从左至右设置温度梯度,从37 $^{\circ}$ C至82 $^{\circ}$ C,每个样品对应一个温度。处理完后,冷却的样品转移至V型底96孔板(Corning)中,4 $^{\circ}$ C、2000rpm离心30min。取上清用于SK-BR-3细胞或人PBMC细胞结合分析。细胞与上清在室温下共孵育30min,用冰上预冷的1%FBS-PBS洗两遍,再用50倍稀释的PE标记的羊抗人二抗(Sigma, P9170)室温染色30min。染色后的细胞用预冷的1%FBS-PBS洗3遍,重悬于PBS中用流式细胞仪(FC500,Beckman)分析:10万个细胞计数。用GraphPad Prism5软件具有可变斜率的S形剂量响应(a sigmoidal dose response with variable slope)模型进行分析。热变形曲线的温度中点值为T<sub>50</sub>。

[0123] 单链抗体片段(ScFv)通过一个连接肽(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>把重链可变区和轻链可变区连接起来而形成的。但是有报道ScFv内在的不稳定性可能会影响抗体药物的质量(Michaelson JS1, Demarest SJ, Miller B, Amatucci A, Snyder WB, Wu X, Huang F, Phan S, Gao S, Doern A, Farrington GK, Lugovskoy A, Joseph I, Bailly V, Wang X, Garber E, Browning J, Glaser SM. Anti-tumor activity of stability-engineered IgG1-like bispecific antibodies targeting TRAIL-R2 and LTbetaR. MAbs. 2009 Mar-Apr; 1(2): 128-41. S802的单链单元与S801完全一致,两者与SK-BR-3结合的T<sub>50</sub>也非常接近(图7),S802的T<sub>50</sub>=60.21 $^{\circ}$ C,S801的T<sub>50</sub>=59.96 $^{\circ}$ C;但是,S802的单价单元使用的是L2K的可变区,S801的单价单元使用的是人源化OKT3的可变区,与T细胞结合的T<sub>50</sub>值差别较大(图8),S802的T<sub>50</sub>=62.89 $^{\circ}$ C,S801的T<sub>50</sub>=59.33 $^{\circ}$ C,S802热稳定性优于S801。

[0124] 实施例5:双抗体介导的体外细胞杀伤检测

[0125] 1. 人外周血单核细胞(hPBMC)细胞的分离



[0126] 取新鲜抗凝人血,400g离心5min,弃上清。加入10倍细胞体积的红细胞裂解液,轻轻吹打混匀,室温或冰上裂解4-5分钟。在裂解过程中宜适当摇动以促进红细胞裂解。4℃400×g离心5min,弃红色上清。若红细胞裂解不完全,重复步骤2和3一次。洗涤1-2次。加入5倍细胞沉淀体积的PBS,重悬沉淀,4℃400×g离心2-3分钟,弃上清。可再重复1次,共洗涤1-2次。根据实验需要用适当4℃预冷PBS重悬细胞沉淀后即得hPBMC,可进行计数等后续实验。

[0127] 2. 双抗体有效介导PBMC细胞杀伤HER2阳性肿瘤细胞检测

[0128] 用胰酶消化靶细胞(包括HER2高表达的BT-474乳腺癌细胞,HER2低表达的MCF-7乳腺癌细胞和HER2阴性的HEK293人胚肾细胞,均购自中国典型培养物保藏中心),制备单细胞悬液。用终浓度为5μM的CFSE染色靶细胞,染色后用该细胞培养的10%FBS-1640将细胞重悬至 $2 \times 10^5$ /ml,按照 $2 \times 10^4$ /孔,即100μl/孔加入96孔板培养过夜。实验设计加入5倍于靶细胞数的效应细胞(hPBMC),50μl/孔,设置对照孔,无需加入PBMC细胞的孔则用相同体积的培养基补入。加入PBMC细胞的同时按实验设计加入相应抗体,50u1/孔,无需加入抗体的孔则用相同体积的培养基补入。48h后取出96孔板,用胰酶消化各孔细胞为单细胞悬液,此过程中的所有上清及细胞悬液均对应收集到1.5ml离心管中,500×g离心5min。弃上清,各孔加入150u1 1%FBS-PBS重悬混匀细胞。各管于流式上机前10-15min加入PI(终浓度为1μg/ml)流式上机检测CFSE、PI双阳性细胞占CFSE阳性细胞比例即为靶细胞的死亡率。

[0129] S802对HER2高表达的肿瘤细胞BT-474杀伤效果非常明显,最高杀伤率达80%,且使用剂量低于赫赛汀、HOKT3以及S801(图9);对HER2低表达的肿瘤细胞MCF-7也有显著杀伤,且效果大大优于S801以及HOKT3(图10)。但是,对于HER2完全阴性的细胞HEK293,S802没有表现出杀伤效果(图11)。说明S802双抗体在体外细胞毒实验中,在免疫细胞的参与下,对HER2阳性表达量不同的肿瘤细胞均有很好的杀伤效果且优于S801,而对于HER2不表达的细胞基本不具有毒性。

[0130] 应该理解到披露的本发明不仅仅限于描述的特定的方法、方案和物质,因为这些均可变化。还应理解这里所用的术语仅仅是为了描述特定的实施方式方案的目的,而不是意欲限制本发明的范围,本发明的范围仅受限于所附的权利要求。

[0131] 本领域的技术人员还将认识到,或者能够确认使用不超过常规实验,在本文中所述本发明具体的实施方案的许多等价物。这些等价物意欲包含在所附的权利要求中。

## 序列表

<110> 武汉友芝友生物制药有限公司

<120> 一种双特异性抗体的构建及应用

<160> 21

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

[0001] <213> 人源

<400> 1

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 Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

[0002]

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165

170

175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180

185

190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195

200

205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210

215

220

[0003]

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225

230

235

240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245

250

255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260

265

270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275

280

285

	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	290						295								300	
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
	305					310					315					320
	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
					325					330						335
[0004]	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
				340					345							350
	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
			355					360								365
	Cys	Arg	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
	370						375					380				
	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
	385					390					395					400

[0005]

Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Ala Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

Lys

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1350

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人源

&lt;400&gt; 2

gacatcaaac tgcagcagtc aggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60

tectgcaaga cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtggta tactaattac 180

	aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac	240
	atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat	300
	gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcagcc	360
	tccaccaagg gcccacggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
	acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
	aaetcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	540
	ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac	600
[0006]	atctgcaacg tgaatcacia gccacgcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa	660
	tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
	tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag	780
	gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac	840
	gtggacggcg tggagggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
	acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960
	tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc a tcgagaaaac catctccaaa	1020
	gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg	1080

[0007]

accaagaacc aggtcagcct gacctgccgg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

aagtccgacg gctccttctt cctcgccagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaata 1350

<210> 3

<211> 212

<212> PRT

<213> 人源

<400> 3

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



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

[0008] Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser  
 100 105 110

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala  
 115 120 125

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val  
 130 135 140

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser  
 145 150 155 160

[0009]

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr  
 165 170 175

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys  
 180 185 190

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn  
 195 200 205

Arg Gly Glu Cys  
 210

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 639

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人源

&lt;400&gt; 4

gacattcagc tgacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gagccagttc aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccc aaagatggat ttatgacaca tccaaagtgg cttctggagt cccttatcgc 180

	ttcagtggca gtgggtctgg gacctcatac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa	240
	gatgctgccca cttattactg ccaacagtgg agtagtaacc cgctcacgtt cgggtgctggg	300
	accaagctgg agctgaaaaac tgtggctgca ccactctgtct tcattctccc gccatctgat	360
	gagcagttga aatctggaac tgcctctggt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga	420
	gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt	480
	gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc	540
	aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc	600
[0010]	tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttag	639

<210> 5

<211> 479

<212> PRT

<213> 人源

<400> 5

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

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

	20		25		30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
	35		40		45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val					
	50		55		60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr					
65		70		75	80
[0011]					
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
		85		90	95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln					
	100		105		110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly					
	115		120		125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser					
	130		135		140

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
 145 150 155 160

Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 165 170 175

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly  
 180 185 190

[0012] Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 195 200 205

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 210 215 220

Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
 225 230 235 240

Ile Lys Arg Gly Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
 245 250 255

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 260 265 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 275 280 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 290 295 300

[0013] Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 305 310 315 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 325 330 335

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 340 345 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 355 360 365

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 370 375 380

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu  
 385 390 395 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 405 410 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 420 425 430

[0014]

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 435 440 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 450 455 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470 475

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1440

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人源

&lt;400&gt; 6

gaagtgcagc tgggtgaaaag cggcggcggc ctggtgcagc cgggcggatc cctg'gcctg 60

agctgcgcgg cgagcggcctt taacattaaa gatacctata ttcattgggt gcgccaggcg 120

ccgggcaaag gcctggaatg ggtggcgcgc atttatccga ccaacggcta taccgcctat 180

gcggatagcg tgaaggccg cttaccatt agcgcggata ccagcaaaaa caccgcctat 240

[0015]

ctgcagatga acagcctgcg cgcggaagat accgcggtgt attattgcag ccgctggggc 300

ggcgatggct tttatgcgat ggattattgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagctca 360

ggaggcggcg gttcaggcgg aggtggaagt ggtggaggag gttctgatat tcagatgacc 420

cagagcccgt caagcttaag cgcgagcgtg ggcgatcgcg tgaccattac ctgccgcgcg 480

agccaggatg tgaacaccgc ggtggcgtgg tatcagcaga aaccgggcaa agcgcggaaa 540

ctgctgattt atagcgcgag ctttctgtat agcggcgtgc cgagccgctt tagcggcagc 600

cgcagcggca ccgattttac cctgaccatt agcagcctgc agccggaaga ttttgcgacc 660

tattattgcc agcagcatta taccaccccg ccgacctttg gccagggtac caaagtggaa 720



	atataaacgag gtgcggccgc agagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg	780
	tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag	840
	gacaccctca tgatctcccc gacccctgag gtcacatgcg tggtaggtgga cgtgagccac	900
	gaagaccctg aggtcaagtt caactggtag gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag	960
	acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc	1020
	ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc	1080
	ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg	1140
[0016]	tacaccctgc ccccatcccc ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg	1200
	gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag	1260
	aacaactacg ataccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc	1320
	gatctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg	1380
	catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga	1440
	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> PRT	
	<213> 鼠源	

[0017]

&lt;400&gt; 7

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1

5

10

15

Gly Ser Thr Gly

20

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 鼠源

&lt;400&gt; 8

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 9

gaggaaggat ctcgagctca agcttgatat cgccgccacc atg 43

- <210> 10  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <400> 10  
caattgatat cgccgccacc atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctc 59
- <210> 11  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- [0018] <400> 11  
cttatcatgt ctggatcgaa gcttaattaa ctaacactct cccctgttga ag 52
- <210> 12  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <400> 12  
cccgaggagg aacggttccg ggccgcctag ggccgccacc atg 43
- <210> 13  
<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13

caattcctag ggccgccacc atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctc 59

<210> 14

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

catagagtat aatatagagt atacacctgc aggtcattta cccggagaca gggag 55

[0019]

<210> 15

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 15

cccgaggagg aacggttccg ggccgcctag ggccgccacc atg 43

<210> 16

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

[0020]

<400> 16

caattcctag ggccgccacc atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctc 59

<210> 17

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 17

gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt gatatcaaac tgcagcagt 59

<210> 18

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 18

catagagtat aatatagagt atacacctgc aggtcattta cccggagaca gggag 55

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 19

[0021]

gcacccatgga gctggcggcc ttgtg 25

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 20

gatgatgggt gcagttgatg gggcaaggct gg 32

<210> 21

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 21

agactcgagc taatgatgat gatgatgatg atgggtgcag ttg 43

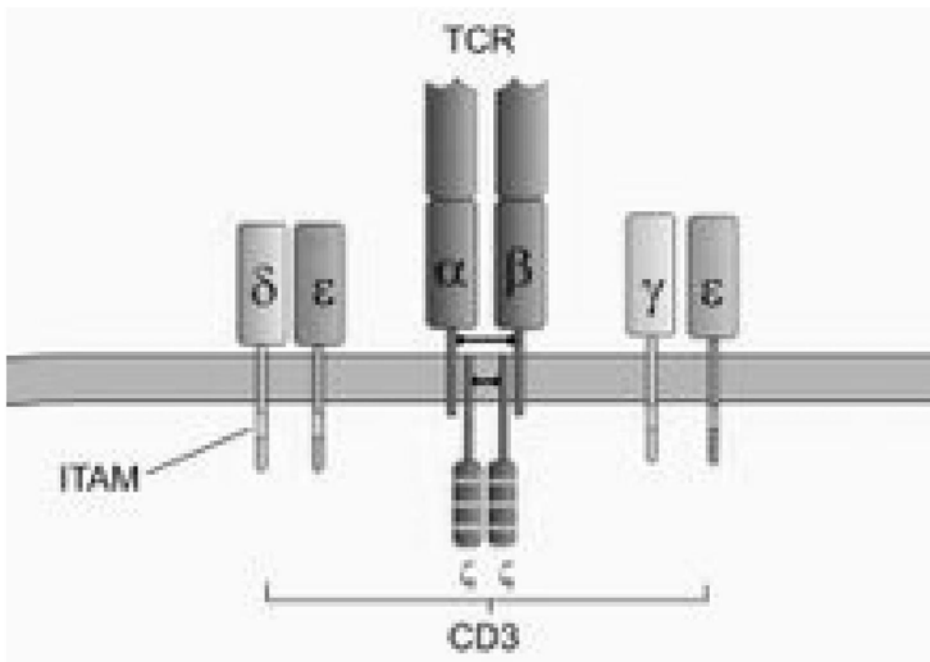


图1

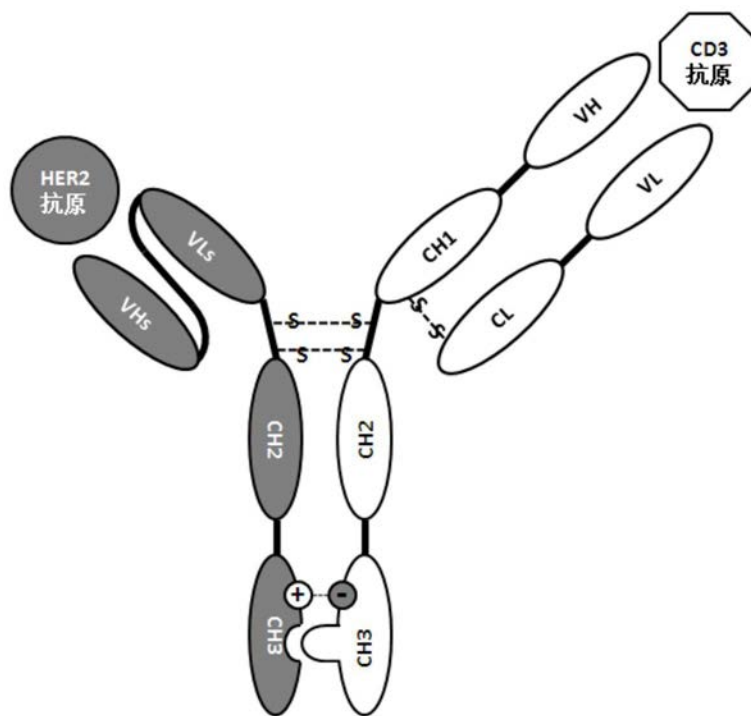


图2

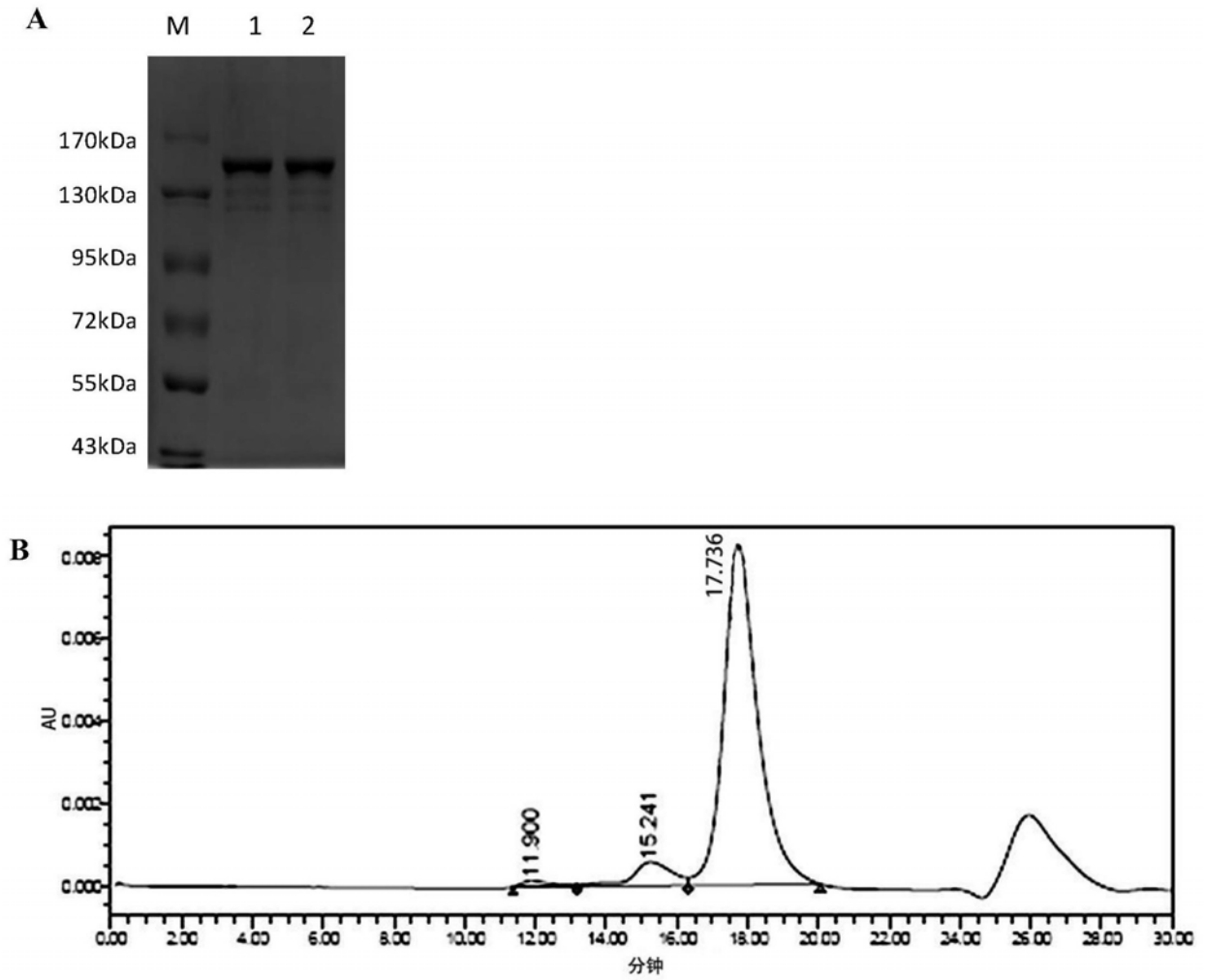


图3

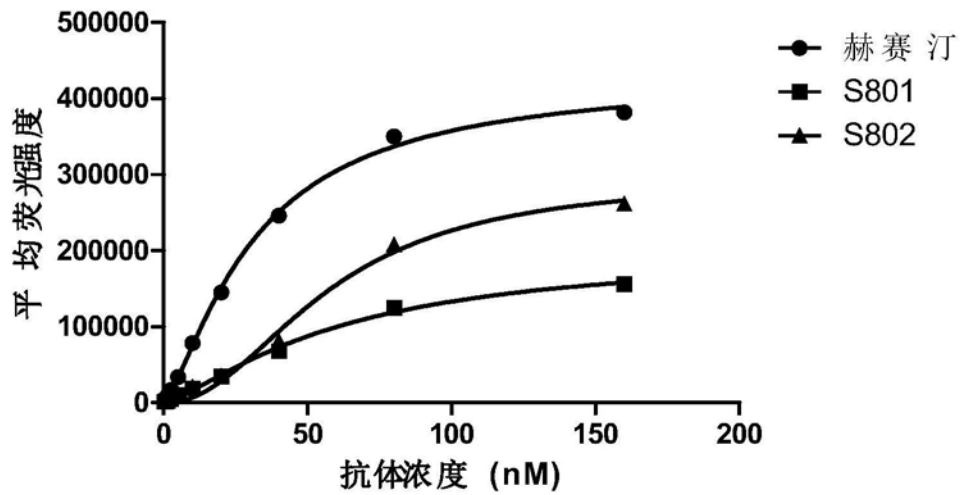


图4



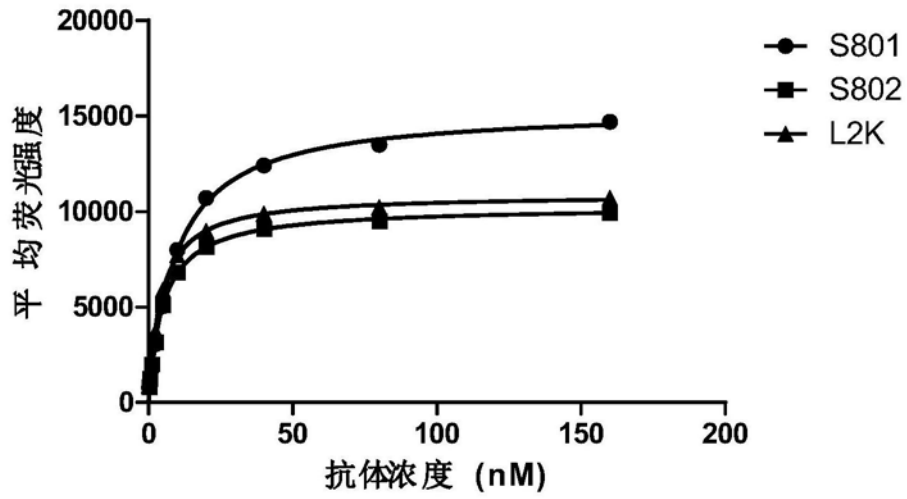


图5

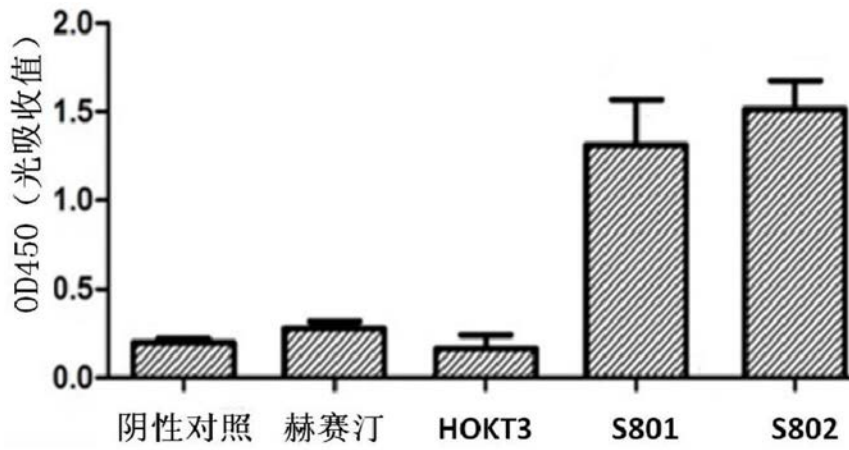


图6

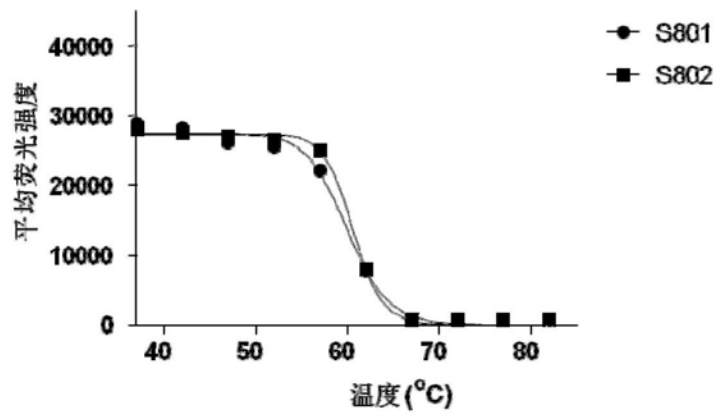


图7

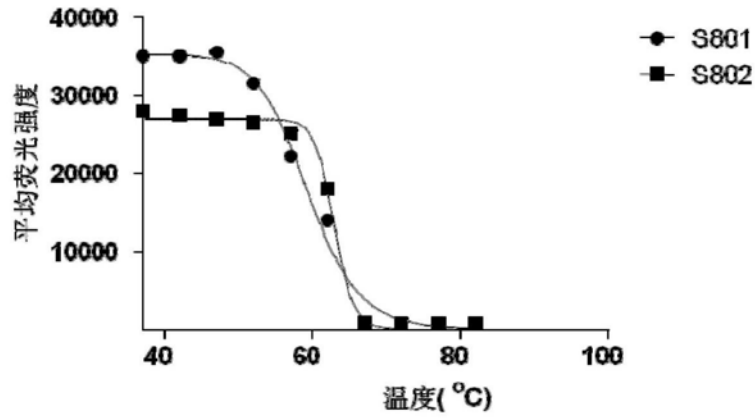


图8

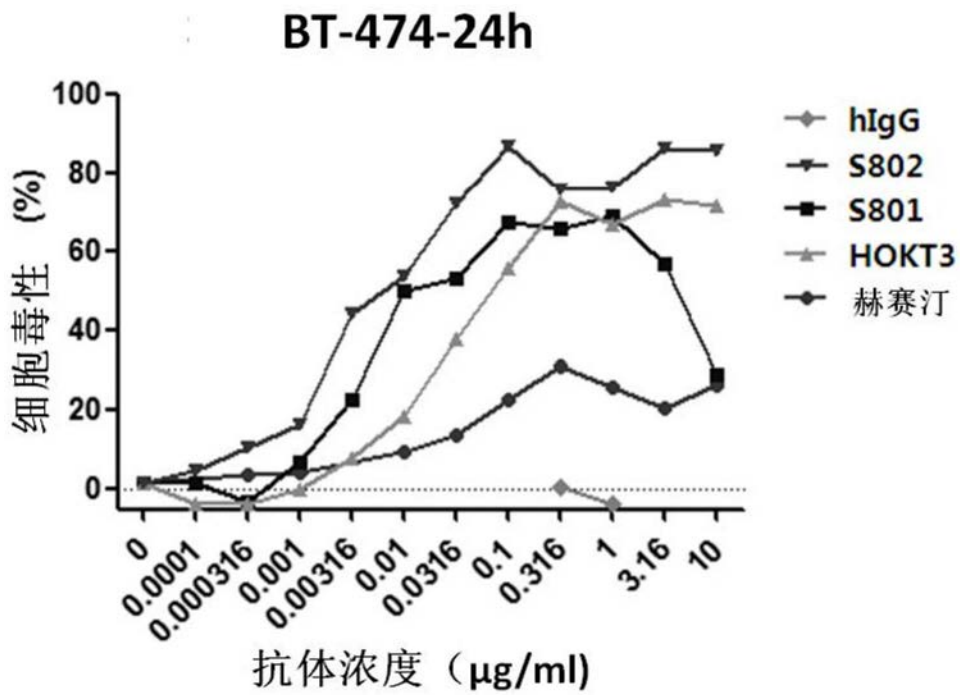


图9

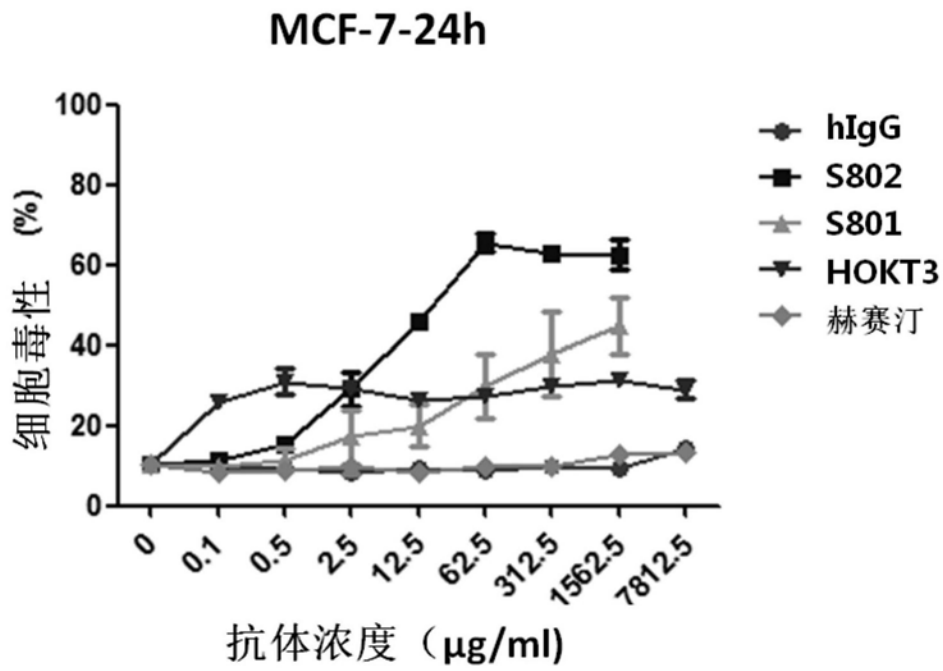


图10

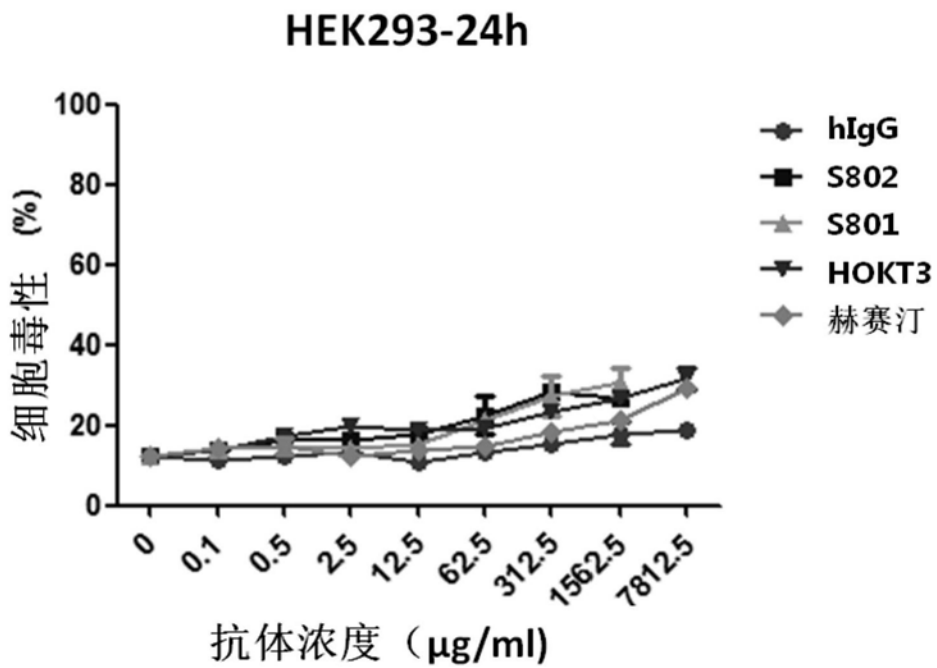


图11