



(21)申請案號：109133786

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 09 月 29 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

G01N33/574 (2006.01)

(30)優先權：2019/09/29

中國大陸

201910929614.0

(71)申請人：大陸商邁威（上海）生物科技股份有限公司（中國大陸） (CN)

中國大陸

(72)發明人：林鑒 LIN, JIAN (CN)；鄧小芳 DENG, XIAOFANG (CN)；高攀 GAO, PAN (CN)；

徐曉紅 XU, XIAOHONG (CN)；王驪淳 WANG, LICHUN (CN)；任紅媛 REN,

HONGYUAN (CN)；畢建軍 BI, JIANJUN (CN)；王晉 WANG, JIN (CN)

(74)代理人：陳翠華

(56)參考文獻：

CN 109762067A

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：10 共 150 頁

(54)名稱

抗人 Claudin18.2 抗體及其應用

(57)摘要

本發明提供一種結合人密連蛋白 (Claudin) 18.2 的抗體或其片段，以及它們的編碼核酸等。本發明的抗人密連蛋白 18.2 抗體對抗原密連蛋白 18.2 具有強親和力，對靶點表達細胞具有顯著的補體依賴性細胞毒性 (CDC) 活性和抗體依賴性細胞毒性 (ADCC) 活性，並且表現出與人 CLDN18.2 的高特異性。

指定代表圖：

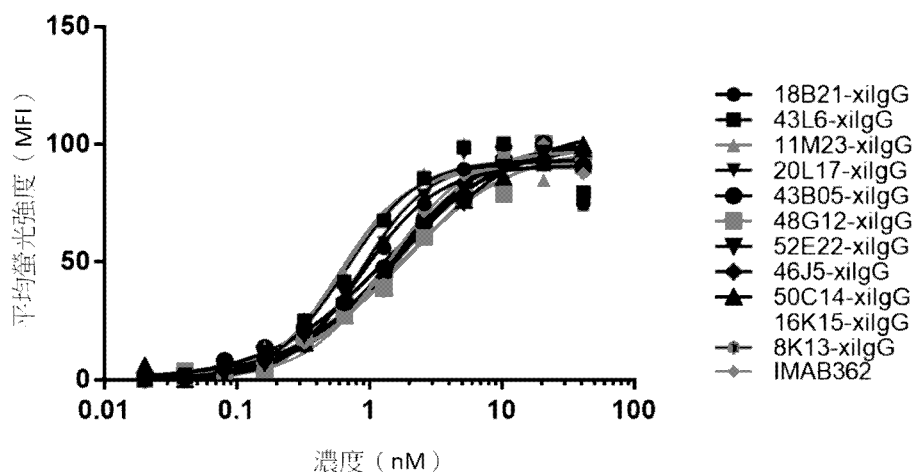


圖1

**【發明摘要】**

【中文發明名稱】 抗人Claudin18.2抗體及其應用

【中文】

本發明提供一種結合人密連蛋白 (Claudin) 18.2 的抗體或其片段，以及它們的編碼核酸等。本發明的抗人密連蛋白 18.2 抗體對抗原密連蛋白 18.2 具有強親和力，對靶點表達細胞具有顯著的補體依賴性細胞毒性 (CDC) 活性和抗體依賴性細胞毒性 (ADCC) 活性，並且表現出與人 CLDN18.2 的高特異性。

【指定代表圖】 圖1。

【代表圖之符號簡單說明】 無。

【特徵化學式】 無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗人Claudin18.2抗體及其應用

【技術領域】

【0001】 本發明屬於生物醫藥領域，涉及一種新的抗人密連蛋白（Claudin）18.2 抗體或其功能性片段。本發明還涉及所述抗體或其功能性片段的應用。

【先前技術】

【0002】 人密連蛋白 18（Claudin18；CLDN18）屬於密連接蛋白家族，這類蛋白於生物學上，在構建細胞緊密連接、維持細胞屏障功能和參與細胞間分子傳遞等方面發揮作用。密連蛋白 18 之蛋白分子量約 26KD，可以通過選擇性剪接使密連蛋白變成具有不同特性的密連蛋白亞型：CLDN18.1 和 CLDN18.2。CLDN18.1 和 CLDN18.2 均由 261 個胺基酸組成，均具有四個跨膜結構域，NH₂ 端和 COOH 端位於胞內，具有兩個胞外環（ExtracellularLoops：ECL1，ECL2）。CLDN18.1 和 CLDN18.2 之胞外區 1 中僅存在 8 個胺基酸差別。

【0003】 其中 CLDN18.2 在多種人上皮腫瘤類型的原發病灶和轉移病灶中表達，並在彌散性癌細胞中持續表達。在食管癌、胰腺癌、肺癌和胃癌細胞中，CLDN18.2 的表達水準更是有顯著的增高。Sahin 等人研究認為 CLDN18.2 是個重要的胃癌生物指標，它存在於 70% 的胃癌病人中，其中 90% 至 95% 被診斷為腺癌，另外 5-10% 包括淋巴瘤、胃腸道間質瘤（GIST）和類癌腫瘤。

【0004】 德國的生物科技公司 Ganymed 開發了一種針對 CLDN18.2 的單株抗體 IMAB362，目前處於臨床 III 期臨床試驗中，用於治療胃食管

癌晚期患者。單獨的 IMAB362 抗體結合，在體外和體內均導致表達 CLDN18.2 之靶細胞的增殖抑制，其抑制腫瘤生長和清除癌細胞的作用機制一是通過補體依賴性細胞毒性（CDC），二是通過抗體依賴性細胞毒性（ADCC），各種作用模式被證明獨立存在但有協同作用。IMAB362 抗體針對轉移性食管癌、轉移性胃癌適應症，目前在美國和歐盟處於臨床 3 期，預期將於 2021 年申請上市。

【0005】 然而，IMAB362 是一個嵌合抗體，還有較多的鼠源胺基酸，在人體內引起排斥免疫反應的機率相對比較高。因此，本領域仍然存在對人 CLDN18.2 具有更高特異性、親和力和生物活性的抗體、特別是人源化抗體的需要。此外，密連蛋白 18 的兩個亞型 CLDN18.1 和 CLDN18.2 的結構高度相似，而功能卻不相同，CLDN18.1 和 CLDN18.2 的高度同源性及 ECL1 存在高級結構，篩選針對 CLDN18.2 的高品質抗體具有較大的難度，在抗體特異性方面存在高度的不確定性。

【發明內容】

【0006】 本發明要解決的技術問題是，通過單株抗體製備方法的優化，提高密連蛋白 18.2 特異性抗體的篩選效率，通過融合瘤篩選和人源化技術，獲得特異性結合人 CLDN18.2 的高親和力抗體，其中通過人源化設計，該抗體最大程度地減少了鼠源胺基酸的數目，預期擁有更好的體內安全性和應用前景。

【0007】 針對上述技術問題，從免疫原方面，本發明採用了鼠源細胞表達人 CLDN18.2。一方面，作為宿主的鼠源細胞對小鼠不具備免疫原性或具有極低的免疫原性，從而避免了宿主細胞對目的免疫原 CLDN18.2 的遮蔽效應，避免因引入異源免疫原所導致的對 CLDN18.2 特異性融合瘤產生效率的不良影響；另一方面，以鼠源細胞表達人 CLDN18.2 可以實現膜

表面表達，使篩選獲得的單株抗體特異性結合 CLDN18.2 的胞外區，確保了 CLDN18.2 特異性抗體的生物活性。

【0008】 從篩選策略方面，本發明採用了正反向篩選相結合的策略。首先，利用表達人 CLDN18.2 的重組細胞進行正向篩選，獲得對其具有高親和力的單抗殖株；然後，對於能夠以高親和力結合人 CLDN18.2 重組細胞的抗體殖株，進一步利用表達人 CLDN18.1 的重組細胞進行反向篩選，反向篩選能排除特異性結合 CLDN18.2、CLDN18.1 共同胞外區結構的單抗。此外，本發明使用的免疫原、正向篩選抗原、反向篩選抗原採用的均是相同的鼠源細胞平台，不僅簡化了方法、避免了引入異種抗原，而且能夠通過反向篩選步驟消除因鼠源細胞對小鼠個體的同種異體抗原效應而產生的抗體，進一步提高特異性結合 CLDN18.2 之胞外區 2 的單株抗體製備效率。

【0009】 本發明的另一目的是提供一種特異性結合人 CLDN18.2 的抗體或其片段，並提供其用途。其中，本發明所述的抗體的片段涵蓋抗體的各种功能性片段，例如其抗原結合部分，如 Fab、F(ab')₂ 或 scFv 片段。

【0010】 本發明的技術方案如下。

一方面，本發明提供一種抗人密連蛋白 18.2 抗體的製備方法，包括：

(1) 利用表面表達人密連蛋白 18.2 蛋白的細胞作為免疫原來免疫動物；

(2) 利用步驟(1)中經過免疫的動物來製備能產生抗體的細胞殖株；

(3) 利用表面表達人密連蛋白 18.2 蛋白的細胞作為正向篩選抗原，篩選對該正向篩選抗原具有結合活性的抗體及產生該抗體的細胞；

(4) 利用表面表達人密連蛋白 18.1 蛋白的細胞作為反向篩選抗原，排除對該反向篩選抗原具有結合活性的抗體及產生該抗體的細胞。

【0011】 較佳的，本發明之製備方法，該步驟（1）中表達人密連蛋白 18.2 蛋白的細胞係源自與該被免疫動物相同的物種，較佳地，該表達人密連蛋白 18.2 蛋白的細胞為小鼠細胞、該被免疫動物為小鼠。

【0012】 較佳的，本發明之製備方法，該步驟（2）係以選自以下之技術製備能產生抗體的細胞殖株：融合瘤技術、及單細胞擴增技術。

【0013】 較佳的，本發明之製備方法，該步驟（3）中的正向篩選抗原與步驟（1）中的免疫原相同；該步驟（4）中的反向篩選抗原與步驟（1）中免疫原的區別僅在於其所表達的蛋白為人密連蛋白 18.1。

【0014】 較佳的，本發明之製備方法，該步驟（3）、（4）採用選自以下的方法進行篩選：酶聯免疫法（ELISA）、及螢光共振能量轉移（FRET）。

【0015】 另一方面，本發明更提供根據本發明之抗人密連蛋白 18.2 抗體的製備方法所獲得的抗人密連蛋白 18.2 抗體。

【0016】 較佳的，本發明之抗人密連蛋白 18.2 抗體，其特異性結合人密連蛋白 18.2 的 N 端，較佳特異性結合人密連蛋白 18.2 N 端的胞外區，包括第一胞外環（Extracellular Loop 1，ECL1）。

【0017】 較佳的，本發明之抗人密連蛋白 18.2 抗體，其對人 CLDN18.2 有 nM 級的特異性結合；並且，其對人 CLDN18.1 的結合與同種型陰性抗體或無關抗體相比無顯著差異。

【0018】 另一方面，本發明提供一種抗體或其片段，該抗體或其片段包含重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中該重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL）包含選自以下的 CDR 組合（VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3；VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3）：

(1) 如 SEQ ID NO: 31 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 32 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 33 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 34 所

示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 35 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL-CDR3；

(2) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 40 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 42 所示的 VL-CDR3；

(3) 如 SEQ ID NO: 43 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 44 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 45 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 46 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 47 所示的 VL-CDR3；

(4) 如 SEQ ID NO: 48 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 49 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 50 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 40 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 51 所示的 VL-CDR3；

(5) 如 SEQ ID NO: 52 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 53 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 54 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 55 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 56 所示的 VL-CDR3；

(6) 如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 58 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 33 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 59 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 60 所示的 VL-CDR3；

(7) 如 SEQ ID NO: 61 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 62 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 63 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 46 所

示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 64 所示的 VL-CDR3；

(8) 如 SEQ ID NO: 65 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 66 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 67 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 68 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 69 所示的 VL-CDR3；

(9) 如 SEQ ID NO: 65 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 70 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 71 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 72 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 73 所示的 VL-CDR3；

(10) 如 SEQ ID NO: 74 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 75 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 76 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 77 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 78 所示的 VL-CDR3；

(11) 如 SEQ ID NO: 79 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 80 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 81 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 82 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 83 所示的 VL-CDR3；

(12) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 85 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 42 所示的 VL-CDR3；

(13) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 85

所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 86 所示的 VL-CDR3；

(14) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 85 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 87 所示的 VL-CDR3；

(15) 如 SEQ ID NO: 74 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 75 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 76 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 89 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 90 所示的 VL-CDR3；以及

(16) 如 SEQ ID NO: 79 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 91 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 81 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 92 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 93 所示的 VL-CDR3。

【0019】 較佳地，在本發明所提供的抗體或其片段中，該重鏈可變區包含：

SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 29 中任一個所示之胺基酸序列、或與所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；及／或

該輕鏈可變區包含：

選自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO:

16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30 中任一個所示之胺基酸序列、或與所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列。

【0020】 根據本發明的具體實施方式，該抗體或其片段包含的重鏈可變區及輕鏈可變區係選自以下組合：

(1) 如 SEQ ID NO: 1 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 1 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 2 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 2 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(2) 如 SEQ ID NO: 3 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 3 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 4 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 4 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(3) 如 SEQ ID NO: 5 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 5 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 6 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 6 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(4) 如 SEQ ID NO: 7 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 7 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 8 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 8 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(5) 如 SEQ ID NO: 9 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 9 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO:

10 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 10 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(6) 如 SEQ ID NO: 11 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 11 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 12 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 12 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(7) 如 SEQ ID NO: 13 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 13 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 14 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 14 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(8) 如 SEQ ID NO: 15 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 15 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 16 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 16 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(9) 如 SEQ ID NO: 17 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 17 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 18 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 18 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(10) 如 SEQ ID NO: 19 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 19 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 20 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 20 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(11) 如 SEQ ID NO: 21 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 21 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID

NO: 22 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 22 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(12) 如 SEQ ID NO: 23 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 23 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 24 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 24 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(13) 如 SEQ ID NO: 23 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 23 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 25 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 25 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(14) 如 SEQ ID NO: 23 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 23 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 26 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 26 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(15) 如 SEQ ID NO: 27 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 27 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 28 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 28 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(16) 如 SEQ ID NO: 29 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 29 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 30 所示之胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 30 所示之胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列。

【0021】 本發明的上下文中，該至少 75% 同一性為例如至少 80%、較佳至少 85%、更佳至少 90%、進一步更佳至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或甚至 99% 同一性等 $\geq 75\%$ 的任何百分比的同一性。

【0022】 本發明提供的抗體或其片段可以為單株抗體、單鏈抗體、雙功能抗體、單域抗體、奈米抗體、完全或部分人源化的抗體或者嵌合抗體等任意形式，或者，該抗體或其片段為半抗體或半抗體的抗原結合片段，例如 scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv；關於本發明提供的抗體的片段，較佳地，該片段為抗體的能夠特異性結合人密連蛋白 18.2 的任何片段。

較佳地，該抗體或其片段更包含人或鼠的恆定區，較佳包含人或鼠的輕鏈恆定區（CL）及／或重鏈恆定區（CH）；

【0023】 更佳地，該抗體或其片段包含選自 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 的重鏈恆定區及／或 κ 或 λ 型輕鏈恆定區。

【0024】 較佳地，該抗體為單株抗體，較佳為鼠源、嵌合或人源化的單株抗體；更佳地，該單株抗體的重鏈恆定區為 IgG1 或 IgG4 亞型，輕鏈恆定區為 κ 型；

根據本發明的具體實施方式，該單株抗體的重鏈恆定區包含如 SEQ ID NO: 124 所示之胺基酸序列、或者與該胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

根據本發明的具體實施方式，該單株抗體的輕鏈恆定區包含如 SEQ ID NO: 125 所示胺基酸序列、或者與該胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列。

【0025】 另一方面，本發明提供一種核酸分子，其編碼本發明之抗體或其片段、或者編碼該抗體或其片段中所包含的重鏈 CDR、輕鏈 CDR、輕鏈可變區、重鏈可變區、重鏈或輕鏈。

【0026】 根據本發明的具體實施方式，該核酸分子編碼本發明之抗體或其片段中的重鏈可變區或輕鏈可變區，例如，該核酸分子包含如 SEQ ID NOs: 96-125 中任一個所示的核苷酸序列。

【0027】 本發明的核酸分子可以被轉殖到載體中，進而轉化或轉染宿主細胞。因此，還一方面，本發明提供一種載體，其包含本發明的核酸分子。該載體可以為真核表達載體、原核表達載體、人工染色體及噬菌體載體等。

【0028】 本發明的載體或核酸分子可以用於轉化或轉染宿主細胞或以任何方式進入宿主細胞內，用於保存或表達抗體等目的。因此，又一方面，本發明提供一種宿主細胞，該宿主細胞包含本發明的核酸分子及／或載體，或者該宿主細胞被本發明的核酸分子及／或載體轉化或轉染。宿主細胞可以是任何原核或真核細胞，例如細菌或昆蟲、真菌、植物或動物細胞。

【0029】 本發明提供的抗體可以利用本領域已知的任何方法獲得。例如，可以先由本發明提供的核酸分子獲得該抗體的重鏈可變區及／或輕鏈可變區，或者獲得該抗體的重鏈及／或輕鏈，然後與該抗體的任選其他結構域組裝成抗體；或者，在允許本發明提供的宿主細胞表達該抗體的重鏈可變區及／或輕鏈可變區或者該抗體的重鏈及／或輕鏈以組裝成該抗體的情況下，培養該宿主細胞。任選地，該方法還包括回收所產生的抗體的步驟。

【0030】 本發明提供的抗體或其片段還可與其他部分結合，例如細胞表面受體、小分子化合物如胺基酸和糖類、小分子聚合物或對本發明之抗體進行修飾的任何其它部分，或者甚至是活性蛋白或多肽。因此，另一方面，本發明提供一種共軛物或融合蛋白，其包含本發明提供的抗體或其片段。例如，該共軛物或融合蛋白可以是包含本發明之抗體或其片段的雙特异性抗體。

【0031】 本發明提供的抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞及／或共軛物或融合蛋白可以被包含在藥物組成物中，更特別地被包含在藥物製劑中，從而根據實際需要用於各種目的。因此，在又一方面，本發明還提供一種藥物組成物，所述藥物組成物包含本發明之抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞及／或共軛物或融合蛋白，以及視需要的藥學上可接受的輔料。

【0032】 出於任何使用目的，本發明更提供一種試劑盒，該試劑盒包括本發明的抗體分子或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、藥物組成物及／或共軛物或融合蛋白。

【0033】 另一方面，本發明提供上述抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、藥物組成物及／或共軛物或融合蛋白在製備用於預防及／或治療癌症的藥物中的用途。較佳地，該癌症選自胰腺癌、胃癌、結腸癌、食管癌、肝癌、卵巢癌、肺癌、膽囊癌和頭頸癌。

【0034】 再一方面，本發明更提供該抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、藥物組成物及／或共軛物或融合蛋白在製備用於診斷癌症的試劑中的用途。較佳地，該癌症選自胰腺癌、胃癌、結腸癌、食管癌、肝癌、卵巢癌、肺癌、膽囊癌和頭頸癌。

【0035】 另一方面，本發明更提供一種預防及／或治療癌症的方法，該方法包括給有此需要的受試者施用本發明的抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、藥物組成物及／或共軛物或融合蛋白，以及任選的其他藥物或手段。該任選的其他藥物或手段是指可以與本發明抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、藥物組成物及／或共軛物或融合蛋白聯合施用的其他藥物或手段，例如小分子化療藥、標靶藥、抗體等重組蛋白藥、疫苗、ADC、溶瘤病毒、基因和核酸治療藥物和放射療法。二者的聯合施用可以採取任意形式進行，例如同時、連續或間隔一定時間進行。

【0036】 較佳地，該癌症選自胰腺癌、胃癌、結腸癌、食管癌、肝癌、卵巢癌、肺癌、膽囊癌和頭頸癌。較佳地，該受試者為哺乳類動物；更佳地，該受試者為人。

【0037】 或者，本發明更提供一種診斷癌症的方法，該方法包括使本發明的抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、藥物組成物及／或共軛物或融合蛋白與來自受試者的樣品相接觸。較佳地，該癌症選自胰腺癌、胃癌、結腸癌、食管癌、肝癌、卵巢癌、肺癌、膽囊癌和頭頸癌。

【0038】 較佳地，該受試者為哺乳類動物；更佳地，該受試者為人。

【0039】 將本發明的抗人密連蛋白 18.2 抗體的編碼基因通過慢病毒載體轉導到原代健康供者的 T 細胞上，發現所製備的 CART 細胞能夠被表達人密連蛋白 18.2 的細胞有效活化。因此，還一方面，本發明更提供本發明的抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、藥物組成物及／或共軛物或融合蛋白在製備 CART 細胞中的用途。

【0040】 本發明提供了一種新型之能夠特異性結合人密連蛋白 18.2 的抗體。與現有抗人密連蛋白 18.2 抗體相比，本發明的抗體具有以下特點：

本發明提供的抗人密連蛋白 18.2 抗體對抗原密連蛋白 18.2 具有強親和力，對靶點表達細胞具有顯著的補體依賴性細胞毒性（CDC）活性和抗體依賴性細胞毒性（ADCC）活性，且該性質強於 IMAB362 或與其相當。此外，與 IMAB362 相比，本發明的抗體表現出與人 CLDN18.2 更高的特異性。

【0041】 此外，將本發明的抗人密連蛋白 18.2 抗體的編碼基因通過慢病毒載體轉導到原代健康供者的 T 細胞上，製備 CART 細胞。經靶細胞刺激後，檢測 CART 細胞的表面活化蛋白 CD25 和分泌的 IFN γ ，發現製得的 CART 細胞能夠被表達人密連蛋白 18.2 的細胞有效活化，同樣證明了本發明的抗體與人 CLDN18.2 的靶點特異性。

定義

【0042】 除非另有定義，本文中使用的科學和技術術語的含義是本領域技術人員所通常理解的含義。本文中所述的細胞和組織培養、分子生物學以及蛋白質、及寡核苷酸或多核苷酸化學及雜交中使用的命名和技術是本領域公知且普遍使用的。對於重組 DNA、寡核苷酸合成和組織培養與轉化（如電穿孔、脂質轉染），使用了標準技術。酶促反應和純化技術係根據生產商的說明書或本領域普遍使用或本文所述的方法進行。前述技術和方法通常根據本領域所公知且本說明書中所引用及討論的多部綜合和較具體的文獻中所描述的那樣使用。參見例如 Sambrook 等，Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 2 版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，紐約冷泉港(1989))。本文所述的分析化學、合成有機化學以及醫學和藥學化學中使用的命名以及實驗室方法和技術是本領域所公知且普遍使用的。

【0043】 術語「抗體」是指，是指通常由兩對多肽鏈（每對具有一條輕(L)鏈和一條重(H)鏈）所組成的免疫球蛋白分子。從一般意義上，重鏈可以理解為抗體中分子量較大的多肽鏈，輕鏈是指抗體中分子量較小的多肽鏈。輕鏈可分類為 κ 和 λ 輕鏈。重鏈通常可分類為 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，並且分別將抗體的同種型定義為 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在輕鏈和重鏈內，可變區和恆定區通過大約 12 或更多個胺基酸的「J」區連接，重鏈還包含大約 3 個或更多個胺基酸的「D」區。各重鏈由重鏈可變區（VH）和重鏈恆定區（CH）組成。重鏈恆定區由 3 個結構域（CH1、CH2 和 CH3）組成。各輕鏈由輕鏈可變區（VL）和輕鏈恆定區（CL）組成。輕鏈恆定區由一個結構域 CL 組成。抗體的恆定區可介導免疫球蛋白與宿主組織或因子，包括免疫系統的各种細胞（例如，效應細胞）和經典補體系統的第一組分（C1q）的結合。VH 和 VL 區還可被細分為具有高變性的區域（稱為互補決定區（CDR）），其間散佈有較保守的稱為構架區（FR）的區域。各 VH 和 VL 由按照下列順序從胺基末端至羧基末端排列的 3 個 CDR 和 4 個 FR 所組成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。各重鏈／輕鏈對應的可變區（VH 和 VL）分別形成抗體結合部位。胺基酸至各區域或結構域的分配遵循 Kabat EA. Et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest [National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1987 and 1991)], 或 Chothia & Lesk 1987)]. Mol. Biol. 196: 901-917；Chothia 等人(1989) Nature342:877-883 的定義。特別地，重鏈還可以包含 3 個以上 CDR，例如 6、9 或 12 個。例如在本發明的雙特異性抗體中，重鏈可以是 IgG 抗體的重鏈的 N 端連接另一個抗體的 ScFv，這種情況下重鏈含有 9 個 CDR。

【0044】 術語抗體的「抗原結合片段」是指包含全長抗體之片段的多肽，其保持特異性結合至全長抗體所結合之相同抗原的能力，及／或與全長抗體競爭對抗原的特異性結合，其也被稱為「抗原結合部分」。通常參見 *Fundamental Immunology*, Ch.7, Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y.(1989)，其以其全文通過引用合併入本文，用於所有目的。可通過重組 DNA 技術或通過完整抗體的酶促或化學斷裂產生抗體的抗原結合片段。在一些情況下，抗原結合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb 和互補決定區（CDR）片段、單鏈結合片段（例如，scFv）、嵌合抗體、雙抗體（diabody）和這樣的多肽，其包含足以賦予多肽特異性抗原結合能力的抗體的至少一部分。

【0045】 術語「Fv」意指由抗體的單臂的 VL 和 VH 結構域所組成的抗體片段；術語「Fab」意指由 VL、VH、CL 和 CH1（或者 CH）結構域所組成的抗體片段；術語「F(ab')₂」意指包含通過鉸鏈區上之二硫橋連接的兩個 Fab 片段的抗體片段。

【0046】 在一些情況下，抗體的抗原結合片段是單鏈結合片段（例如，scFv），其中 VL 和 VH 結構域通過使其能夠產生為單個多肽鏈的連接體配對形成單價分子（參見，例如，Bird 等人，*Science* 242:423-426(1988) 和 Huston 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883(1988)）。此類 scFv 分子可具有一般結構：NH₂-VL-接頭-VH-COOH 或 NH₂-VH-接頭-VL-COOH。合適的現有技術接頭由重複的 G4S 胺基酸序列或其變體組成。例如，可使用具有胺基酸序列(G4S)₄ 接頭，但也可使用其變體（Holliger 等人(1993)，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448）。

【0047】 可使用本領域技術人員已知的常規技術（例如，重組 DNA 技術或酶促或化學斷裂法）從給定的抗體獲得抗體的抗原結合片段（例如，

上述抗體片段），並且以與用於完整抗體之方式相同的方式，就特異性篩選抗體的抗原結合片段。

【0048】 在本文中，除非上下文明確指出，否則當提及術語「抗體」時，其不僅包括完整抗體，而且包括抗體的抗原結合片段。

【0049】 術語「分離的」或「被分離的」指的是，從天然狀態下經人工手段獲得的。如果自然界中出現某一種「分離」的物質或成分，那麼可能是其所處的天然環境發生了改變，或從天然環境下分離出該物質，或二者情況均有發生。例如，某一活體動物體內天然存在某種未被分離的多聚核苷酸或多肽，而從這種天然狀態下分離出來的高純度之相同的多聚核苷酸或多肽即稱之為分離的。術語「分離的」或「被分離的」不排除混有人工或合成的物質，也不排除存在不影響物質活性的其它不純物質。

【0050】 術語「宿主細胞」是指，可用於導入載體的細胞，其包括但不限於，如大腸桿菌等原核細胞，如酵母細胞等的真菌細胞，如 S2 果蠅細胞或 Sf9 等的昆蟲細胞，或者如纖維原細胞，CHO 細胞，COS 細胞，NSO 細胞，HeLa 細胞，BHK 細胞，HEK 293 細胞或人細胞等的動物細胞。

【0051】 術語「KD」是指特定抗體一抗原相互作用的解離平衡常數（KD），其用於描述抗體與抗原之間的結合親和力。平衡解離常數越小，抗體一抗原結合越緊密，抗體與抗原之間的親和力越高。通常，抗體以小於大約 10⁻⁵M，例如小於大約 10⁻⁶M、10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M 或 10⁻¹⁰M 或更小的解離平衡常數結合抗原，例如，如使用表面等離子體共振術（SPR）在 BIACORE 儀中所測定的。例如用 KINEXA 方法 KINEXA 400 儀器上檢測到的抗體和細胞結合的親和力。

【0052】 術語「特異性結合」指抗體與抗原的一種或多種抗原決定簇反應而不與其他多肽反應、或以很低的親和性（Kd > 10⁻⁶）結合其他多肽。

抗體包括但不限於多株、單株、嵌合、dAb (結構域抗體)、單鏈、Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段、Fv、scFv 及 Fab 表達庫。單株抗體 (mAb) 是由單一的選殖細胞株得到的抗體，所述的細胞株不限於真核的、原核的或噬菌體的選殖細胞株。單株抗體或抗原結合片段可以用如融合瘤技術、重組技術、噬菌體展示技術及合成技術如 CDR 移植 (grafting) 或其它現有技術進行重組得到。

【0053】 本發明所述的「鼠源抗體」為根據本領域知識和技能製備之對人 CLDN18.2 的單株抗體。製備時用 CLDN18.2 抗原注射試驗對象，然後分離表達具有所需序列或功能特性之抗體的融合瘤。

【0054】 本發明所述的「嵌合抗體」是將鼠源性抗體的可變區與人抗體的恆定區融合而成的抗體，可以減輕鼠源性抗體誘發的免疫應答反應。建立嵌合抗體，要先建立分泌鼠源性特異性單抗的融合瘤，然後從小鼠融合瘤細胞中選殖可變區基因，再根據需要選殖人抗體的恆定區基因，將小鼠可變區基因與人恆定區基因連接成嵌合基因後插入表達載體中，最後在真核工業系統或原核工業系統中表達嵌合抗體分子。

【0055】 本發明所述的「人源化抗體」也稱為 CDR 移植抗體，是將小鼠的 CDR 序列移植到人的抗體可變區框架 (FR) 中產生的抗體。此類可變區框架序列可以從公共的 DNA 資料庫或公開的參考文獻獲得，例如從 ImMunoGeneTics(IMG) 網站 <http://imgt.cines.fr> 得到或從免疫球蛋白雜誌，2001ISBN012441351 上獲得。

【0056】 術語「CLDN18.2」包括同種型、哺乳動物 (例如人) 的 CLDN18.2、人 CLDN18.2 的物種同源物和包含至少一個與 CLDN18.2 的共同表位的類似物。CLDN18.2 (例如人 CLDN18.2) 的胺基酸序列是本領域中已知的，如 NCBI 資料庫顯示。

【0057】 術語「CLDN18.1」包括同種型、哺乳動物（例如人）的 CLDN18.1、人 CLDN18.1 的物種同源物和包含至少一個與 CLDN18.1 的共同表位的類似物。CLDN18.1（例如人 CLDN18.1）的胺基酸序列是本領域中已知的，如 NCBI 資料庫顯示。

【0058】 「任選」、「任選地」、「任意」或「任一」意味著隨後所描述地事件或環境可以、但不必須發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生的場合。例如，「任選包含 1 個抗體重鏈可變區」意味著特定序列的抗體重鏈可變區可以、但不必須存在。

【0059】 術語「藥物組成物」表示含有一種或多種本發明之化合物或其生理學上／可藥用的鹽或前體藥物與其他化學組分的混合物，以及其他組分例如生理學／可藥用的載體和賦形劑。藥物組成物的目的是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。治療性組成物一般應當是無菌的並且在製造和儲存條件下穩定。可以將組成物配製為溶液、微乳液、分散劑、脂質體或適合高抗體濃度的其他有序結構。可以通過將活性化合物（即抗體或抗體部分）以要求的量連同上文所列舉的一種成分或成分組合在適宜的溶劑中併入，根據需要，隨後過濾消毒，製備無菌可注射溶液劑。

【0060】 本發明所述的方法、組成物、聯合治療可以與其他活性劑或治療方式併用，所述的方法包括向對象以有效治療或預防疾病（例如，癌症）的量，施用本發明之抗 CLDN18.2 抗體分子，任選地，與 PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、CTLA-4、Tim-3 抗體（免疫治療）或其它腫瘤治療抗體，Her-2、EGFR、VEGF、VEGFR 抗體等，以及 ADC（抗體藥物偶聯，如 T-DM1），雙特異抗體，化療藥物等的一種或多種抑制劑的組合，還包括施用抗 CLDN18.2 抗體分子、額外的活性劑或全部可以按這樣的量

或劑量施用，該量或劑量高於、低於或等於單獨（例如，作為單一療法）使用的每種活性劑的量或劑量。抗 CLDN18.2 抗體，額外的活性劑或全部的施用量或劑量比單獨（例如，作為單一療法）使用的每種活性劑的量或劑量低（例如，至少 20%、至少 30%、至少 40% 或至少 50%）。

【0061】 此外，本發明抗 CLDN18.2 抗體可以結合 CLDN18.2 誘導靶細胞（腫瘤細胞）凋亡，抑制腫瘤細胞生長，增加體內效應細胞對腫瘤細胞 ADCC，CDC 殺傷作用來達到治療癌症患者的目的。因此，在某些實施方案中，本發明所描述的抗 CLDN18.2 抗體分子通過這些機理顯示本發明抗體抗腫瘤效應。以及抑制腫瘤細胞生長的方法，包括將治療有效量的本發明中所述的抗 CLDN18.2 抗體分子施用於受試者。該方法適用於癌症的體內治療。為了獲得靶向特異性治療效果，抗 CLDN18.2 抗體分子可以與其它抗體一起施用。在將 CLDN18.2 抗體組合一種或多種活性劑施用時，該組合可以以任何順序或同時施用癌症類型，特別是 CLDN18.2 高表達的腫瘤患者。在某些方面中，提供在對象中治療對象（例如，減少或緩解）過度增生性病狀或疾病（例如，癌症），例如，實體瘤、血液學癌、軟組織腫瘤或轉移性病灶的方法。該方法包括向對象單獨、或與其他活性劑或治療方式組合地施用本發明之一種或多種抗 CLDN18.2 抗體分子。

【0062】 術語「癌」、「癌症」、「癌症病人」意在包括全部類型的癌性生長物或致瘤過程、轉移性組織或惡性轉化的細胞、組織或器官，無論組織病理學類型或侵襲力階段是什麼。例子包括，但不限於實體瘤、血液學癌、軟組織腫瘤和轉移性病灶。實體瘤的例子包括惡性腫瘤，例如，多個器官系統的肉瘤和癌（包括腺癌和鱗狀細胞癌），如侵襲肝、肺、乳腺、淋巴、胃腸道（例如，結腸）、生殖泌尿道（例如，腎、膀胱上皮細胞）、前列腺和咽的那些。腺癌包括惡性腫瘤，如大部分結腸癌、直腸癌、

胃癌、腎細胞癌、肝癌、肺癌中的非小細胞癌、小腸癌和食道癌。鱗狀細胞癌包括惡性腫瘤，如在肺、食道、皮膚、頭部和頸部區域、口腔、肛門和子宮頸中。前述癌的轉移性病灶也可以使用本發明之方法和組成物治療或預防。針對 CLDN18.2 的抗體分子可以與免疫原性劑如癌細胞、純化的腫瘤抗原（包括重組蛋白、肽和糖分子）、細胞和用編碼免疫刺激性細胞因子之基因轉染的細胞組合。

【0063】 術語「抗體依賴性細胞介導的細胞毒性」（ADCC）描述了較佳需要靶細胞被抗體標記的效應細胞（特別是淋巴細胞）的細胞殺傷能力。當抗體與腫瘤細胞上的抗原結合並且抗體 Fc 結構域與免疫效應細胞表面上的 Fc 受體（FcR）接合時，較佳發生 ADCC。已經鑒定了數個 Fc 受體家族，並且特定細胞群特徵性地表達限定的 Fc 受體。ADCC 可被視為直接誘導導致抗原呈遞、和誘導腫瘤導向之 T 細胞應答之可變程度的立即腫瘤破壞的機制。較佳地，ADCC 的體內誘導將導致腫瘤導向的 T 細胞應答和宿主源性抗體應答。

【0064】 術語「補體依賴性細胞毒性」（CDC），是可由抗體指導的另一種細胞殺傷方法。IgM 是補體啟動最有效的同種型。IgG1 和 IgG3 二者在通過經典補體啟動途徑指導 CDC 方面也非常有效。較佳地，在該級聯反應中，抗原-抗體複合物的形成導致參與抗體分子（例如 IgG 分子）的 CH2 結構域上緊密接近的多個 C1q 結合位點暴露（C1q 是補體 C1 的三種亞組分之一）。較佳地，這些暴露的 C1q 結合位點將先前低親和力的 C1q-IgG 相互作用轉化為高親合力相互作用，其觸發涉及一系列其他補體蛋白的級聯事件並導致效應細胞趨化／活化劑 C3a 和 C5a 的蛋白水解釋放。較佳地，補體級聯以形成膜攻擊複合物結束，該複合物在細胞膜中產生有利於水和溶質自由進入和離開細胞的孔。

【0065】 令人吃驚地發現，以本文中抗 CLDN18.2 抗體製備的抗體-藥物共軛物能夠通過誘導補體依賴性細胞毒性（CDC）介導的裂解及／或抗體依賴性細胞的細胞毒性（ADCC）介導的裂解來介導殺傷細胞，特別是表達 CLDN18.2 的細胞，例如癌細胞。因此，在一個實施方案中，本發明的抗體-藥物共軛物通過誘導補體依賴性細胞毒性（CDC）介導的裂解及／或抗體依賴性細胞的細胞毒性（ADCC）介導的裂解（較佳通過誘導 CDC 介導的裂解和 ADCC 介導的裂解）來介導細胞殺傷。

【圖式簡單說明】

【0066】 以下，結合附圖來詳細說明本發明的實施方案，其中：

圖 1 顯示了抗人 CLDN18.2 嵌合抗體的體外細胞結合實驗結果。

圖 2 顯示了抗人 CLDN18.2 人源化抗體的補體依賴性細胞毒性(CDC) 實驗結果，其中 2A：CHOK1；2B：BxPC3；2C：NCI-N87。

圖 3 顯示了抗人 CLDN18.2 人源化抗體的抗體依賴性細胞毒性(ADCC) 實驗結果，其中 3A：CHOK1；3B：BxPC3；3C：NCI-N87。

圖 4 顯示了抗人 CLDN18.2 人源化抗體的同族蛋白結合特徵分析結果。

圖 5 顯示了抗人 CLDN18.2 人源化抗體在不同濃度下與人 CLDN18.1 表達細胞的結合情況。

圖 6 顯示了抗人 CLDN18.2 人源化抗體的種屬交叉結合特徵分析結果。

圖 7 顯示了製備的各組 CART 細胞的陽性率檢測結果。

圖 8 顯示了構建的各 CHO 細胞株的不同抗原表達情況。

圖 9 顯示了各組 CART 細胞與靶細胞孵育後上清液中 IFN- γ 檢測結果。

圖 10 顯示了各組 CART 細胞與靶細胞孵育後 CD25 表達的檢測結果。

【實施方式】

【0067】 以下參照具體的實施例來說明本發明。本領域技術人員能夠理解，這些實施例僅用於說明本發明，其不以任何方式限制本發明的範圍。

【0068】 下述實施例中的實驗方法，如無特殊說明，均為常規方法。下述實施例中所用的藥材原料、試劑材料等，如無特殊說明，均為市售購買產品。其中：

IMAB362 的重鏈和輕鏈序列參見 SEQ ID NO: 126 和 SEQ ID NO: 127。

抗原人 CLDN18.2 參見 NP_001002026.1，抗原人 CLDN18.1 參見 NP_057453.1。

附圖中的陰性對照 Isotype control (同型對照) 為抗 CD33 全長 IgG 抗體 Lintuzumab。

【0069】 實施例 1：鼠源單株抗體的篩選

【0070】 使用細胞表面穩定表達人 CLDN18.2 蛋白的 CHOK1 細胞免疫 Balb/c 小鼠，1 個月後用流式細胞儀術 (FACS) 分析小鼠血清，取血清抗體滴度高的小鼠取其脾臟，標準方法分離得到的脾細胞與骨髓瘤細胞 P3X63Ag8.653 使用 PEG 或者電融合方法進行融合。將融合後的融合瘤細胞接種於 384 孔板中，培養 10-14 天後，取上清液用 FACS 分析融合瘤細胞分泌的抗體，篩選得到若干殖株，該殖株能夠結合細胞表面穩定表達人 CLDN18.2 蛋白的 CHOK1 細胞而不能夠結合細胞表面穩定表達人 CLDN18.1 蛋白的 CHOK1 細胞。通過有限稀釋的方法將篩選到的殖株單細胞化，3 輪之後得到的每個融合瘤細胞殖株只分泌一個抗體。

【0071】 將分泌抗人 CLDN18.2 抗體的融合瘤細胞擴大培養後，按照 RNAfast200 試劑盒 (上海飛捷生物技術有限公司) 之說明書步驟提取細胞總 RNA；利用 5×PrimeScript RT Master Mix (Takara) 將融合瘤細胞總

RNA 反轉錄成 cDNA；使用退化性引子 (Anke Krebber.1997) 和 Extaq PCR 試劑 (Takara) 擴增抗體輕鏈可變區 IgVL(κ) 和重鏈可變區 VH 序列；利用 PCR clean-up Gel extraction 試劑盒 (Macherey-Nagel 公司) 純化 PCR 擴增產物；按照 pClone007 Simple Vector Kit 試劑盒 (擎科生物科技股份有限公司) 之說明書將擴增 PCR 產物連接至 T 載體並轉化大腸桿菌感受態細胞，菌株擴增、抽提質體後進行 DNA 測序獲得單株抗體可變區序列。

表 1. 鼠源抗體的輕重鏈可變區

鼠源抗體	重鏈可變區 (VH)	輕鏈可變區 (VL)
11M23	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
16K15	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
18B21	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
20L17	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
43B5	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
43L6	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
46J05	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14
48G12	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
50C14	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
52E22	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
8K13	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22

>11M23_vh (SEQ ID NO: 1)

QVQLKESGPDLVAPSQSLSITCTVSG**FSLTNYGVHWVRQPPGKGLEWLVIW**
SDGRINYNSALKSRLSITKDNSKRQVFLKMNSLQIDDTAIYYCVRHP**AFGPHA**
MDYWGQGISVTVSS

>11M23_vI (SEQ ID NO: 2)

DIVMTQDAPSIPVTPGESVSISCR**SSKSLNSNGNTYLYWFLQRPGQSPHLLL**
YRMSNPASGAPDRFSGSGSGTEFTLRISRVEAEDVGVYYC**MQYLEYPPTFGA**
GTRLELK

>16K15_vh (SEQ ID NO: 3)

EVMLVESGGGLVRPGGSLKLSCAGSGGITLSTYAMSWVRQTPERRLEWVAS**SIIS**
GGITYYLDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAIYYCARKY**HGNALDY**
WGQGTSVTVSL

>16K15_vI (SEQ ID NO: 4)

DIVMTQSPSSLPVTAGETVTMRCK**SSQSLNSGNQRNYL**TWYQRKPGQPPKK
LIY**WASTRES**GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISGVQAEDLAVYYC**QNNYFYPLTFG**
AGTKLELK

>18B21_vh (SEQ ID NO: 5)

QIQMVQSGPELKKPGETVRISCKAS**GYSFTTAGMQWVRKMPGEGLKWIGWII**
AHSGEPKYTEDFKGRFAFSLETSASTTYLQISNLKNEDTATYFCAR**WGKGNTM**
DYWGQGTSVIVSS

>18B21_vI (SEQ ID NO: 6)

DIVMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLNNGGNQRNYLTWYQQKPGQPPKL
LIYW**ASTRES**GVDPDRFTGSGSGTHFTLTISSVQAEDLAVYYC**QNAYFFPLTFG**
AGTKLELK

>20L17_vh (SEQ ID NO: 7)

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAAS**GFTFSSF**GMHWVRQAPEKGLEWV**AYI**
SSGSSTIYYPDTVKGRFTVSRDNPKNLFLQMTSLRSEDAMYYCVRLG**PRGN**
VMDHWGQGTSVTVSS

>20L17_vl (SEQ ID NO: 8)

DIVMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLN**SGNQRNYLTWYQQKPGQPPKL**
LIYW**ASTRES**GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC**QNVYFYPLTFG**
TGTKLELR

>43B5_vh (SEQ ID NO: 9)

DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTV**SGYSISGAYN**WHWIRQFPGNKLEWL**AYM**
QYSGSSNYNPSFKSRISISRDTSKNQFFLQLKSVTTEDTATYYC**ARMYNGNSF**
LYWGQGTLVTVSA

>43B5_vl (SEQ ID NO: 10)

DIVMTQSPSSLT VTAGEKVTMN**CKSSQSLFN**SGNQKNYLTWYQQKPGQPPRL
LIYW**ASTRES**GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLSLYYC**QNSYSYPLTFG**
AGTKLELK

>43L6_vh (SEQ ID NO: 11)

QVQLKESGPDLVAPSQSLSLTCSVSG**FSLTSYGIHWVRQPPGKGLEWLVIWS**
DGRTTYNSGLKSRLSISKDNSKSQVLLKMNSLRTDDTAIYYCVRHP**AFGPHAM**
DYWGQGTSVTVSS

>43L6_vI (SEQ ID NO: 12)

DIVMTQAAPSVPVTPGESVSI**SCRSSKSLLSNGNTYLYWFLQRPGQSPQLLI**
YRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAGDVGVIYY**CMQYLEYPVTFGA**
GTKLELK

>46J05_vh (SEQ ID NO: 13)

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAAS**GFTFSRFGMHWVRQAPKKGLEWVAYI**
SSGSNTIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQTTSLRSEDTAIYYCGRL**GFYGN**
FDHWGQGTLVTVSA

>46J05_vI (SEQ ID NO: 14)

NILMTQSPSSLTVTAGEKVTMN**CKSSQSLNNGGNQRNYL**TWYQQKAGQPPKL
LI**YWASTRES**GVPDRFTGGGSGTDFTLTISSVQAEDLALYY**CQNSYYYPLTFG**
AGTKLELK

>48G12_vh (SEQ ID NO: 15)

EVQLRQSGPELVKPGASVKMSCKAS**GYTFTTYIINWVKQKPGQGLEWIGYINP**
YNDTRYNERVKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAR**FYFGNSFT**
YWGQGTLVTVSA

>48G12_vI (SEQ ID NO: 16)

DIVMTQSPSSLPVTVGERVTMTCKSSQGLFN**SGNQ**RNYLTWYQQKPGQPPKL
LIY**WASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYC**QNNYIY**PLTFGA
GTKLELK

>50C14_vh (SEQ ID NO: 17)

EVQLRQSGPELVKPGASVKMSCKAS**GYTFTTYI**INWVKQKPGQGLEW**IGYINP**
YNDGTRYNERVKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAR**FHFGNSFT**
YWGQGT**LV**TVSA

>50C14_vl (SEQ ID NO: 18)

DIVMTQSPSSLPVTTGEKVTMTCKSSQGLFN**NGNQ**RNYLTWYQQKPGQPPKL
LIY**WASTRES**GVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYC**QNNYIF**PLTFGAG
TKLELK

>52E22_vh (SEQ ID NO: 19)

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS**GYTLTNYGM**NWVRQAPGKGLKWMG**WIR**
PNTGEPTYAEDFKGRFVFSLETSAAATAYLQITNLKSEDTSTYFCAR**LYRGNTLD**
NWGQGT**SVIV**SS

>52E22_vl (SEQ ID NO: 20)

DIVMTQSPSSLTVTTGEKVTMSCKSS**QNLLNSGNQ**RNYLTWYQQKPGQSPKL
LIY**WASTRES**GVPYRFTGSGSGTDFTLTISSVQTDDLAIYYC**QNGYSFP**FTFGS
GTKLEIK

>8K13_vh (SEQ ID NO: 21)

QVHLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSNYWMNWVRQRPQGQGLEWIGQI
YPGNGDTKYSGKFNSKDTLTADKSSNTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARFYGN
VMDYWGQGTSTVTVSS

>8K13_vI (SEQ ID NO: 22)

DIVLTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQTLLNGGNQKNYLTWYQQKSGQPPKL
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNGYSYPLTFG
VGTKLELK

【0072】 實施例 2：抗人 CLDN18.2 嵌合抗體的製備

【0073】 將鼠源抗人 CLDN18.2 單株抗體的重鏈可變區序列和公開發表的人單株抗體 IgG1 亞類的重鏈恆定區序列（參見 SEQ ID NO: 124）拼接在一起，構建到哺乳動物細胞表達載體中；將鼠源抗人 CLDN18.2 單株抗體的輕鏈可變區序列和公開發表的人單株抗體 κ 亞類的輕鏈恆定區序列（參見 SEQ ID NO: 125）拼接在一起，構建到哺乳動物細胞表達載體中。構建好的抗人 CLDN18.2 嵌合抗體的重鏈載體和輕鏈載體配對混合，使用聚乙烯亞胺（PEI）轉染 HEK293 細胞，約 7 天後收集細胞上清液，使用 ProteinA 純化得到抗人 CLDN18.2 嵌合抗體蛋白。

【0074】 本發明的嵌合抗體命名為「鼠源抗體簡稱-xiIgG」。

【0075】 實施例 3：抗人 CLDN18.2 嵌合抗體的體外細胞結合實驗

【0076】 將抗人 CLDN18.2 嵌合抗體從 100nM 的起始濃度開始做 2 倍的梯度倍比稀釋，共 16 個濃度點，各個濃度點的抗體取 10 μ l 加入 384 孔板。100g 室溫離心 5 分鐘收集細胞表面表達 CLDN18.2 的 CHOK1 細胞，用含 0.5% BSA 的 PBS 洗滌細胞一次，100g 室溫離心 5 分鐘，重懸細胞為密度約 2x10⁶ 個細胞／毫升，取 10 μ l 加入到已加抗體之 384 孔板的孔

中。4°C 孵育 1 小時後，加入螢光標記的羊抗人 IgG 二抗。繼續於 4°C 孵育 1 小時後，用流式細胞儀分析細胞群的平均螢光讀值。

【0077】 結果顯示嵌合抗體與表達人 CLDN18.2 細胞有 nM 級別的特異結合，見圖 1。

【0078】 實施例 4：抗人 CLDN18.2 鼠源抗體的人源化

【0079】 綜合卡巴特 (Kabat)、喬西亞 (Chothia) 的抗體編碼方案，確定鼠源抗體的重鏈和輕鏈的 6 個抗原互補決定簇 (CDR) 的胺基酸序列區域、及支撐抗體保守三維構象的框架區域 (framework region)。隨後通過分析搜索已知人源抗體序列，選擇與鼠源抗體最為相似接近的人源抗體重鏈可變區序列，如 IGHV1|IGHJ4*01，選擇其抗體框架區序列作為範本，將鼠源抗體重鏈 CDR 與人源抗體框架區結合，最終生成人源化抗體重鏈可變區序列。同樣過程，生成人源化抗體輕鏈可變區序列。

【0080】 鼠源抗體 CDR 直接移植至人框架區的抗體常出現結合活性急劇下降，因此需要將框架區個別胺基酸從人源的改回鼠源的。確定回復突變位點，一是對照設計好的人源化抗體序列和原始的鼠源抗體序列，檢查有哪些胺基酸的不同；二是檢查這些胺基酸是否對支援抗體結構起到重要作用或者對與抗原的結合起到重要作用。人源化設計後的序列的同時需要檢查是否有一些潛在的翻譯後修飾位點 (PTM)，如 N (天門冬醯胺) 糖基化位點、N 脫醯胺化位點、D (天門冬胺酸) 異構化位點等。

【0081】 將人源化抗體重鏈可變區基因構建到含人單株抗體 IgG1 亞類的重鏈恆定區基因的哺乳動物細胞表達載體中；輕鏈可變區基因構建到含人單株抗體 κ 亞類的輕鏈恆定區基因的哺乳動物細胞表達載體中。構建好的抗人 CLDN18.2 人源化抗體的重鏈載體和輕鏈載體配對混合，使用聚

乙烯亞胺 (PEI) 轉染 HEK293 細胞，約 7 天後收集細胞上清液，使用 ProteinA 純化得到抗人 CLDN18.2 人源化抗體蛋白。

【0082】 本發明的人源化抗體命名為「鼠源抗體簡稱-hz」。鼠源抗體 CDR 直接移植至人框架區的抗體命名為「鼠源抗體簡稱-hz00」。進一步改造得到的抗體根據序列不同進行編號。

【0083】 利用 ForteBio (BLITZ pro1.1.0.28) 儀器分析鼠源嵌合抗體及其人源化抗體與抗原人 CLDN18.2 的結合動力學參數。測定前先將 NTA 生物探針浸泡於 PBS 中 10 分鐘；然後將該探針置於含 100nM 的抗原的 PBS 中 300 秒，捕獲帶 His 標籤的抗原；進一步將探針與 100nM 抗體進行結合反應，結合時間 400 秒；之後將探針轉移至 PBS 中，進行解離反應，時間為 600 秒。實驗完畢，扣除空白對照回應值，用軟體進行 1:1 Langmuir 結合模式擬合，計算抗原抗體結合的動力學常數。結果見表 2。

表 2. 鼠源抗體人源化後的結合動力學參數比較

抗體名 (Ab ID)	翻譯後修飾 位點 (PTM)	回應	親和力常數 (K_D) (M)	結合常數 (K_{on})	解離常數 (k_{off}) (s^{-1})	$K_{off}/$
				(1/Ms)		$K_{off}(Xi-$ IgG)
8K13- xiIgG	有	0.134	3.82E-10	2.98E+05	1.14E-04	1.00
8K13- hz00	有	0.133	7.44E-10	2.66E+05	1.98E-04	1.74
8K13- hz11	有	0.139	2.97E-10	2.27E+05	6.73E-05	0.59

8K13- hz24	無	0.133	1.51E-09	2.64E+05	3.99E-04	3.50
11M23- xiIgG	有	0.184	2.93E-10	3.66E+05	1.07E-04	1.00
11M23- hz00	有	0.164	1.49E-09	2.18E+05	3.24E-04	3.03
11M23- hz11	有	0.174	1.29E-09	3.56E+05	4.60E-04	4.30
11M23- hz22	無	0.136	2.92E-09	6.70E+05	1.95E-03	18.22
16K15- xiIgG	有	0.261	5.57E-10	2.76E+05	1.54E-04	1.00
16K15- hz00	有	0.176	8.95E-11	2.40E+05	2.15E-05	0.14
16K15- hz11	有	0.17	5.35E-10	1.88E+05	1.00E-04	0.65
16K15- hz22	無	0.266	1.10E-09	2.59E+05	2.86E-04	1.86
52E22- xiIgG	有	0.223	9.96E-11	3.57E+05	3.55E-05	1.00
52E22- hz00	有	0.188	3.09E-10	1.98E+05	6.11E-05	1.72

52E22- hz11	有	0.238	5.42E-10	3.63E+05	1.97E-04	5.55
52E22- hz12	無	0.226	3.60E-10	2.18E+05	7.83E-05	2.21

【0084】 結果顯示，人源化並移除了關鍵的翻譯後修飾位點 (PTM) 後，11M23-hz22 相對鼠源嵌合抗體，解離常數值上升了 10 倍以上，因此將其從候選分子名單中去除。其餘的 8K13-hz24、16K15-hz22 和 52E22-hz12 的解離常數值與原始鼠源嵌合抗體相比，上升幅度在 1-4 倍之間，可以選做先導分子繼續開展後續的研究。其中 16K15-hz22 輕鏈胺基酸序列中包含 2 個連續的「NN」殘基，做了進一步優化的 16K15-hz22_2 和 16K15-hz22_3 突變抗體，分別將「NN」殘基變為「SN」和「QN」殘基。

表 3. 人源化抗體的輕重鏈可變區

鼠源抗體	人源化的輕鏈可變區	人源化的重鏈可變區	人源化抗體
16K15	SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 129	16K15-hz00
	SEQ ID NO: 128， 同時在第 52 位和 89 位具有回復突變	SEQ ID NO: 129，同 時在第 24 位具有回 復突變	16K15-hz11
	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 23	16K15-hz22
	SEQ ID NO: 25		16K15-hz22_2
SEQ ID NO: 26	16K15-hz22_3		
52E22	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 131	52E22-hz00

	SEQ ID NO: 130 , 同時在第 89 位具有 回復突變	SEQ ID NO: 27	52E22-hz11
	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 27	52E22-hz12
8K13	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 133	8K13-hz00
	SEQ ID NO: 132 , 同時在第 4 位和第 89 位具有回復突變	SEQ ID NO: 133 , 同 時在第 74 位和第 77 位具有回復突變	8K13-hz11
	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 29	8K13-hz24
11M23	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 84	11M23-hz00
	SEQ ID NO: 88 , 同 時在第 41 位具有回 復突變	SEQ ID NO: 84 , 同 時在第 71 位具有回 復突變	11M23-hz11
	SEQ ID NO: 88 , 同 時在第 41 位具有回 復突變, 第 31 位和 第 33 位 N-S	SEQ ID NO: 84 , 同 時在第 71 位具有回 復突變, 第 54 位 D- E 和第 60 位 N-Q	11M23-hz22

>16K15_vl_hz2 (SEQ ID NO: 24)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSSGNQRNYLTWYQQKPGQPPKK
LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLAVYYCQNNYFYPLTFG
QGTKLEIK

>16K15_vl_hz2_N-S (SEQ ID NO: 25)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSSGNQRNYLTWYQQKPGQPPKK
LIYW**ASTRES**GVVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAVYYC**QSNYFYPLTFG**
QGTKLEIK

>16K15_vl_hz2_N-Q (SEQ ID NO: 26)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSSGNQRNYLTWYQQKPGQPPKK
LIYW**ASTRES**GVVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAVYYC**QQNYFYPLTFG**
QGTKLEIK

>16k15_vh_hz2 (SEQ ID NO: 23)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSG**ITLSTYAM**SWVRQAPGKGLEWV**SSIIS**
GGITYYLDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARKY**HGNALDY**
WGQGTLVTVSS

>52E22_vl_hz2 (SEQ ID NO: 28)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ**NLLSSGNQRNYLTWYQQKPGQPPKL**
LIYW**ASTRES**GVVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAVYYC**QQGYSPFTFG**
QGTKLEIK

>52E22_vh_hz1 (SEQ ID NO: 27)

QIQLVQSGSELKKPGASVKV**SCKASGYTLTNYGMN**WVRQAPGQGLEWM**GW**
RPNTGEPTYAEDFKGRVFVSLDTSVATAYLQITSLKAEDTAVYYC**ARLYRGNT**
LDNWGQGTLVTVSS

>8K13_vl_hz4_N-S_N-Q (SEQ ID NO: 30)

第 36 頁，共 44 頁(發明說明書)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTLLSGGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLL
IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAVYYCQQGYSYPLTFGQ
GTKLEIK

>8K13_vh_hz2 (SEQ ID NO: 29)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFS~~NY~~WMNWVRQAPGQGLEWMGQ
IYPGSGDTKYSGKFQSRVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFY~~Y~~GN
VMDYWGQGT~~LV~~TVSS

【0085】 實施例 5：抗人 CLDN18.2 人源化抗體的體外結合親和力的動力學實驗

【0086】 採用 GE 公司 BIAcore 儀器 S200 測定抗體抗原相互作用力。

【0087】 參考 GE 公司 Human antibody capture kit（貨號 BR-1008-39，Lot10261753）之操作說明，首先在傳感晶片 CM5 分析通道和對照樣品通道都飽和地偶聯最大量之抗人 Fc 抗體，然後在分析通道流過含有 7.5µg/ml 抗人 CLDN18.2 嵌合抗體、人源化抗體或對照抗體 IMAB362 的緩衝液使其均勻分佈，最後在分析通道和對照樣品通道一起流過經梯度稀釋的抗原樣品（起始濃度 20nM，1:3 稀釋 8 個濃度點，並且設定 0.741nm 濃度點重複），測定抗體抗原結合後發生的光反應值。經儀器軟體擬合分析，最終得到抗體的結合常數 K_{on} 和解離常數 K_{off} ，以及親和力常數 KD。

【0088】 結果表明，抗人 CLDN18.2 人源化抗體的體外結合親和力常數與原始鼠源抗體相比沒有顯著的改變，與 IMAB362 相比低了 1 個數量級，見表 4。

表 4. 本發明抗體的結合動力學

抗體	結合速率常數 (ka) (M ⁻¹ s ⁻¹)	解離速率常數 (kd) (s ⁻¹)	親和力常數 (KD) (M)
8K13- xiIgG	8.19E+04	5.73E-04	6.99E-09
8K13-hz24	7.09E+04	2.02E-03	2.85E-08
16K15- xiIgG	1.07E+05	1.44E-03	1.35E-08
16K15- hz22	5.71E+04	5.63E-04	9.85E-09
52E22- xiIgG	4.90E+05	5.45E-04	1.11E-09
52E22- hz12	1.46E+05	1.72E-04	1.18E-09
IMAB362	1.48E+06	0.201	1.36E-07

【0089】 實施例 6：抗人 CLDN18.2 人源化抗體的體外細胞學試驗

【0090】 6.1 補體依賴性細胞毒性 (CDC)

【0091】 使用 Quidel 公司的商品化人血清全補體對本發明人源化抗體進行分析，分析其對穩定表達人 CLDN18.2 的 CHOK1、BxPC3 和 NCI-N87 細胞誘導補體依賴性細胞毒性 (CDC) 的能力。

【0092】 將細胞與終濃度為 250 μ g/ml 至 3.8ng/ml 的待測抗體混勻；加入溶於細胞培養基 RPMI-1640 中的 6.25% 人血清全補體，在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 3 小時；然後通過 CCK-8 試劑盒進行細胞毒性檢測；最終通過 MD 酶標

儀檢測 450nm 吸光度。通過吸光值採用 softmax pro7 軟體進行 4 參數擬合曲線，計算樣品的 EC50 值。

【0093】 結果表明，抗人 CLDN18.2 人源化抗體針對靶點表達細胞有特異的補體依賴性細胞毒性（CDC）活性，並且細胞殺傷活性顯著優於 IMAB362，見圖 2 和表 5。

表 5. 本發明抗體的 CDC

靶點表達細胞	a. CHOK1	b. BxPC3	c. NCI-N87
抗體	EC50 (nM)	EC50 (nM)	EC50 (nM)
8K13-hz24 IgG	21.27	28.53	57.7
16K15-hz22 IgG	5.2	12.22	17.36
52E22-hz12 IgG	2.08	NA	NA
IMAB362	30.45	52.23	474.2

【0094】 6.2 抗體依賴性細胞毒性（ADCC）

【0095】 使用工程改造的 Jurkat 細胞作為效應細胞，該細胞穩定表達 FcγRIIIa-FcεRIα 雜合受體，由 NFAT 應答元件驅動表達螢火蟲螢光素酶。抗體在 ADCC 作用機制中的生物活性通過 NFAT 通路活化產生的螢光素酶定量。將 1.5E5 個效應細胞與終濃度為 33μg/ml 至 85pg/ml 的待測抗體混勻，然後將 2.5E4 個靶細胞加入其中（效應細胞與靶細胞 E:T 比例 6:1），在 37℃ 下孵育 16 小時；然後通過 Promega 公司試劑盒 Bio-Glo™ Luciferase Assay System 進行檢測；最終通過 MD 酶標儀檢測 LUM 值。

【0096】 資料處理方式如下，誘導倍數 = (受檢孔讀值 - 背景值) / (陰性對照孔讀值 - 背景值)，用 prism 軟體進行 4 參數擬合曲線，計算出樣品的 EC50 值。

【0097】 結果表明，抗人 CLDN18.2 人源化抗體針對靶點表達細胞有特異的抗體依賴性細胞毒(ADCC)活性，細胞殺傷活性與 IMAB362 相當，見圖 3 和表 6。

表 6. 本發明抗體的 ADCC

靶點表達細胞	a. CHOK1	b. BxPC3	c. NCI-N87
抗體	EC50 (nM)	EC50 (nM)	EC50 (nM)
8K13-hz24 IgG	0.5894	0.3045	0.1499
16K15-hz22 IgG	0.7122	0.1759	0.0677
52E22-hz12 IgG	0.5672	NA	NA
IMAB362	0.5929	0.1056	0.0909

【0098】 實施例 7：抗人 CLDN18.2 人源化抗體的同簇蛋白結合特徵分析

【0099】 將人 CLDN18.2 和 CLDN18.1 的基因分別構建到真核表達載體中，使用聚乙烯亞胺 (PEI) 轉染 HEK293 細胞。轉染後第三天離心收集細胞，用 PBS 洗滌細胞 1 次，重懸細胞密度為 $2 \times 10^6/\text{ml}$ ，每個 384 孔板中加入 $10 \mu\text{l}$ 的細胞；第二步往 384 孔板中加入不同濃度的人源化抗體， 4°C 孵育 1 小時；第三步加入螢光標記的羊抗人 IgG 二抗， 4°C 孵育 1 小時；使用流式細胞儀讀取 384 孔板的螢光值。分析資料獲得細胞與抗人 CLDN18.2 人源化抗體的結合特徵。實驗用的陽性對照為商品化抗人 CLDN18 兔單抗 34H14L15 (購自 Abcam 公司)，陰性同型對照 (Isotype control) 為抗 CD33 全長 IgG 抗體 Lintuzumab。

【0100】 結果表明，抗人 CLDN18.2 人源化抗體表現出結合人 CLDN18.2 而不結合人 CLDN18.1 的特徵，見圖 4；並且，在低、中、高三種濃度下與人 CLDN18.1 細胞的非特異結合均比 IMAB362 低，見圖 5。

【0101】 實施例 8：抗人 CLDN18.2 人源化抗體的人、猴、鼠種屬交叉結合特徵分析

【0102】 將人、鼠和恆河猴 (Rhesus) 的 CLDN18.2 基因分別構建到真核表達載體中，使用聚乙烯亞胺 (PEI) 轉染 HEK293 細胞，2 天後收集細胞。使用流式細胞儀術分析細胞與抗人 CLDN18.2 人源化抗體的結合特异性。流式細胞實驗方法參見實施例 7。

【0103】 結果表明，抗人 CLDN18.2 人源化抗體 16K15-22 IgG 和三個種屬的 CLDN18.2 均有結合，8K13-24 IgG 和 52E22-12 IgG 與猴子的 CLDN18.2 結合但不與小鼠的 CLDN18.2 結合。結果見圖 6。

【0104】 實施例 9：採用抗人 CLDN18.2 人源化抗體的 CART 細胞製備及其活化

【0105】 9.1 慢病毒包裝

【0106】 按照表 7 分組情況，進行慢病毒包裝。首先構建了包含不同抗體基因的慢病毒載體質體 pLTR，測序正確以後使用 Qiagen 公司的質體抽提試劑盒提取它們的質體 DNA，質體 DNA 溶於除菌的 TE 中，以紫外光吸收法測定其濃度及純度，保證所提取之質體 DNA 的 A260/A280 在 1.8 ~ 2.0 之間。同時提取兩種輔助包裝元件載體質體 pCMV-VSV-G 和 pCMV-dR8.2 的 DNA。準備轉染用的 HEK293T 細胞，需新鮮繼代，生長至約 60% 的匯合度。使用磷酸鈣作為轉染試劑將 3 種質體共轉入 HEK293T 細胞。轉染 48 小時後，低溫離心收集含有包裝好病毒的細胞上清液，使用 0.45 μ m 的篩檢程式去除細胞碎片。使用超濾離心管對病毒進行濃縮換液，分裝後保存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。取少量病毒濃縮液用 FACS 法測定病毒滴度。

表 7. 慢病毒分組

編號	病毒	病毒滴度	組別
----	----	------	----

第 41 頁，共 44 頁(發明說明書)

135	LV-135.N	8.75E+06	陰性對照
417	LV-417.N	1.65E+07	16k15 (16K15-hz22) scfv*
418	LV-418.N	1.38E+07	52E22 (52E22-hz12) scfv*
419	LV-419.N	5.13E+07	8K13 (8K13-hz24) scfv*
420	LV-420.N	1.50E+07	陽性對照

【0107】 表 7 中陰性對照是不結合 CLDN18.2 的其他抗體，陽性對照是科濟生物 hu8E5 抗體（參見 WO2018006882A1）。*所示單鏈抗體為相應的人源化 VH、VL 通過短肽（GSTSGGGSGGGSGGGSS）連接形成。

【0108】 9.2 CART 細胞製備

【0109】 選擇 HBV、HCV 和 HIV 檢測陰性的健康提供者，於肘正中靜脈抽血 100ml，Ficoll 密度梯度離心分離 PBMC 白膜層，按 DynaBeads CD3/CD28（Lifetechnologies，貨號：40203D）與 CD3+ T 細胞為 3:1 之比例，分離 CD3+ T 細胞，活化 24 小時後流式檢測 CD25+CD69+T 細胞比例。CD3+T 活化後，進行慢病毒轉導，MOI 為 5。用 Novonectin 塗覆 24 孔板，於 37°C 孵育 2 小時，將上述操作後所得到的細胞懸浮液分別與製備所得到的各種慢病毒（MOI=5）、Synperonic® F108（Sigma，貨號：07579-250G-F）、Tscm（2U/ml）配製成轉導體系置於塗覆的 24 孔板中，細胞密度調整至 1.0E+06/ml，500g 離心 30 分鐘，離心後於 37°C CO₂ 培養箱靜置培養 48 小時。轉染後以含 5% FBS X-vivo15 之培養液（LONZA，貨號：04-418Q）培養，隔日補充 Tscm（終濃度 2U/ml），計數細胞，調整細胞密度至 0.5E+06/ml，培養至第 8-10 天收穫細胞。

【0110】 得到的各組 CART 細胞的陽性率檢測結果見圖 7。

【0111】 9.3 CART 細胞活化

【0112】 用 CHO 構建表達人 CLDN18.1 抗原和人 CLDN18.2 抗原的細胞，作為靶細胞。

【0113】 細胞的相關抗原表達檢測結果見圖 8。CHO-BLANK（空白對照）、CHO-CLDN18.1 無 CLDN18.2 抗原的表達，CHO-CLDN18.2 高表達 CLDN18.2 抗原。

【0114】 於 1.5mL 的離心管中將上述調整好密度的效應細胞，包括各組 CAR-T 細胞和未轉導之慢病毒 T 細胞，分別與靶細胞混合，效應細胞與靶細胞的比例為 16:1，用 T 細胞培養液 X-vivo15 培養液（不含自體血清以及 Tscm）將總體積補足至 200 μ L；將配製的 200 μ L 體系分別移入 96 孔 V 型板中共孵育 24 小時。

【0115】 孵育結束後，取各組培養體系的上清液檢測人 IFN γ 。發現 417 組 CART 與 CHO-CLDN18.1 以及 CHO-CLDN18.2 孵育後，IFN γ 釋放顯著增加，418、419、420 組 CART 僅與 CHO-CLDN18.2 孵育後，IFN γ 釋放增加。結果見表 8 和圖 9。

表 8. 培養體系的上清中檢測到的人 IFN γ

組別	T: CHO-BLANK	T: CHO-密連蛋白 18.1	T: CHO-密連蛋白 18.2
nc	1020.1	912	1095.2
135	1441.2	1458.6	1877
417	9016	60328.2	79178.6
418	3940.8	4540	78903.4
419	4486.2	4670.6	75516.8
420	7381.1	6973.2	78247

【0116】 取各組 CART 細胞檢測 T 細胞活化標誌蛋白 CD3/CD25。發現 417 CART 與 CHO-CLDN18.1 以及 CHO-CLDN18.2 孵育後，CD25 表達上調，418、419、420 CART 僅與 CHO-CLDN18.2 孵育後，CD25 表達上調。見圖 10。

【0117】 本專利申請要求於 2019 年 9 月 29 日提交之申請號為 CN201910929614.0 的中國發明專利申請案的優先權權益，在此將其全部內容引入作為參考。

【0118】 以上對本發明具體實施方式的描述並不限制本發明，本領域技術人員可以根據本發明作出各種改變或變形，只要不脫離本發明的精神，均應屬於本發明所附申請專利範圍的範圍。

35

40

45

Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Arg Ile Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Arg Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ile Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95

Arg His Pro Ala Phe Gly Pro His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Ile Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Asp Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser

20

25

30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro His Leu Leu Leu Tyr Arg Met Ser Asn Pro Ala Ser Gly Ala Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Tyr
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 3

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

20

25

30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Ile Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Lys Tyr His Gly Asn Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

Val Thr Val Ser Leu
 115

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Thr Ala Gly

<400> 5

Gln Ile Gln Met Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Gln Trp Val Arg Lys Met Pro Gly Glu Gly Leu Lys Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Ile Ala His Ser Gly Glu Pro Lys Tyr Thr Glu Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Gly Lys Gly Asn Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Ile Val Ser Ser
 115

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 6

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 Gly
 20 25 30

Gly Asn Gln Arg 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 His 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

Ala Tyr Phe Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys

<210> 7
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 7

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Leu Gly Pro Arg Gly Asn Val Met Asp His Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 8

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 Arg 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

Val Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Arg

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 9

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Gly Ala
 20 25 30

Tyr Asn Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Leu Ala Tyr Met Gln Tyr Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Met Tyr Asn Gly Asn Ser Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 10

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 Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe 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 Arg 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 Ser Leu Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Ser Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 11

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Arg Thr Thr Tyr Asn Ser Gly Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Leu Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95

Arg His Pro Ala Phe Gly Pro His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 12

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Tyr
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Val Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 13

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Asn Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Thr Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Leu Gly Phe Tyr Gly Asn Ser Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 14

Asn Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Gly
 20 25 30

Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Ala 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 Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Ser Tyr Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 15

Glu Val Gln Leu Arg 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 Thr Tyr
 20 25 30

Ile Ile Asn Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Glu Arg Val
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Phe Tyr Phe Gly Asn Ser Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Thr Val Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Gly Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Arg 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 Ile Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asn Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys

<210> 17

<211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 17

Glu Val Gln Leu Arg 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 Thr Tyr
 20 25 30

Ile Ile Asn Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Glu Arg Val
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Phe His Phe Gly Asn Ser Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 18
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Gly Leu Phe Asn Asn
 20 25 30

Gly Asn Gln Arg 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 Ile 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 Ile Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asn Tyr Ile Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu

100

105

110

Lys

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 19

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 Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Arg Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ala Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asn Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ser Thr Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Leu Tyr Arg Gly Asn Thr Leu Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Ile Val Ser Ser
 115

<210> 20

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 20

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Thr 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 Tyr Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

50

55

60

Asn Ser Lys Asp Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Phe Tyr Tyr Gly Asn Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 22

Asp Ile Val Leu 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 Thr Leu Leu Asn Gly
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser 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

Gly Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Val Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 23

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 Gly Ser Gly Ile Thr Leu Ser Thr Tyr

20

25

30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ile Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Lys Tyr His Gly Asn Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 24

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 24

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Lys Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asn Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 25

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 25

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Lys Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ser
 85 90 95

Asn Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Lys Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Asn Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 27
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 27

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Arg Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ala Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Arg Gly Asn Thr Leu Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Ser Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Arg 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 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Ser Gly Lys Phe
 50 55 60

Gln Ser Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

<400> 32

Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Arg Ile Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR3

<400> 33

Ala Phe Gly Pro His Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR1

<400> 34

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 輕鏈 CDR2

<400> 35

Arg Met Ser Asn Pro Ala Ser
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 輕鏈 CDR3

<400> 36

Met Gln Tyr Leu Glu Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 重鏈 CDR1

<400> 37

Gly Ile Thr Leu Ser Thr Tyr Ala Met Ser
1 5 10

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR2

<400> 38

Ser Ile Ile Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR3

<400> 39

Lys Tyr His Gly Asn Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR1

<400> 40

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR2

<400> 41

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR3

<400> 42

Gln Asn Asn Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 重鏈 CDR1

<400> 43

Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Ala Gly Met Gln
1 5 10

<210> 44
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 重鏈 CDR2

<400> 44

Gly Trp Ile Ile Ala His Ser Gly Glu Pro Lys Tyr Thr Glu Asp Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 45
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR3

<400> 45

Trp Gly Lys Gly Asn Thr Met Asp Tyr

1 5

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR1

<400> 46

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Gly Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Thr

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR3

<400> 47

Gln Asn Ala Tyr Phe Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR1

<400> 48

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His
1 5 10

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR2

<400> 49

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 50

1 5 10

<210> 53
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 重鏈 CDR2

<400> 53

Ala Tyr Met Gln Tyr Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 重鏈 CDR3

<400> 54

Met Tyr Asn Gly Asn Ser Phe Leu Tyr
1 5

<210> 55
<211> 17
<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR1

<400> 55

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR3

<400> 56

Gln Asn Ser Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR1

<400> 57

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Ile His
1 5 10

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR2

<400> 58

Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Arg Thr Thr Tyr Asn Ser Gly Leu Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR2

<400> 59

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 60

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 輕鏈 CDR3

<400> 60

Met Gln Tyr Leu Glu Tyr Pro Val Thr
1 5

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 重鏈 CDR1

<400> 61

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe Gly Met His
1 5 10

<210> 62
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 重鏈 CDR2

<400> 62

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Asn Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR3

<400> 63

Phe Tyr Gly Asn Ser Phe Asp His

1

5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR3

<400> 64

Gln Asn Ser Tyr Tyr Tyr Pro Leu Thr

1

5

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR1

<400> 65

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Ile Ile Asn
1 5 10

<210> 66

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR2

<400> 66

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Glu Arg Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR3

<400> 67

Phe Tyr Phe Gly Asn Ser Phe Thr Tyr
1 5

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR1

<400> 68

Lys Ser Ser Gln Gly Leu Phe Asn Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR3

<400> 69

Gln Asn Asn Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 70

<211> 18
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 重鏈 CDR2

<400> 70

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Glu Arg Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 重鏈 CDR3

<400> 71

Phe His Phe Gly Asn Ser Phe Thr Tyr
1 5

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 輕鏈 CDR1

<400> 72

Lys Ser Ser Gln Gly Leu Phe Asn Asn Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR3

<400> 73

Gln Asn Asn Tyr Ile Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR1

<400> 74

Gly Tyr Thr Leu Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 75
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 重鏈 CDR2

<400> 75

Trp Ile Arg Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 重鏈 CDR3

<400> 76

Leu Tyr Arg Gly Asn Thr Leu Asp Asn
1 5

<210> 77
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR1

<400> 77

Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR3

<400> 78

Gln Asn Gly Tyr Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR1

<400> 79

Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn

1 5 10

<210> 80
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 重鏈 CDR2

<400> 80

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Ser Gly Lys Phe
1 5 10 15

Asn Ser

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 重鏈 CDR3

<400> 81

Phe Tyr Tyr Gly Asn Val Met Asp Tyr
1 5

<210> 82
<211> 17
<212> PRT

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Ser Asp Gly Arg Ile Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg His Pro Ala Phe Gly Pro His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 85

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR1

<400> 85

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR3

<400> 86

Gln Ser Asn Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR3

<400> 87

Gln Gln Asn Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr

100

105

110

<210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 輕鏈 CDR1

<400> 89

Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 輕鏈 CDR3

<400> 90

Gln Gln Gly Tyr Ser Phe Pro Phe Thr
 1 5

<210> 91
 <211> 17
 <212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈 CDR2

<400> 91

Gln Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Ser Gly Lys Phe Gln
1 5 10 15

Ser

<210> 92

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR1

<400> 92

Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Ser Gly Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈 CDR3

<400> 93

Gln Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 94

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 94

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctgac ctggtggcgc cctcacagag cctgtccate 60

acatgcaccg tctcagggtt ctcttaacc aactatggtg tacactgggt tcgccagcct 120

ccaggaaagg gtctggaatg gctggtagtg atatggagtg atggaagaat aaactataat 180

tcagctctca aatccagact gagcatcacc aaggacaatt ccaagaggca agttttccta 240

aaaatgaaca gtctccaaat tgatgacaca gccatttatt attgtgtcag acatcccgcc 300

ttcggtcccc atgctatgga ctactggggt caaggaatct cagtcaccgt ctctca 357

<210> 95

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 95
 gatattgtga tgactcagga tgcacctct atacctgtca ctcttgaga gtcagtatcc 60
 atctctgca ggtctagtaa gagtctctg aatagtaatg gcaaacctta cttatattgg 120
 ttcttgaga ggccaggcca gtctctcac ctctgcttt atcggatgtc caacctgcc 180
 tcaggagccc cagacaggtt cagtggcagt gggtcagga ctgaattcac actgagaate 240
 agtagagtgg aggctgaaga tgtgggtgtt tattactgta tgcaatatct ggaatatecg 300
 cccacgttcg gtgctgggac caggctggag ctgaaa 336

<210> 96
 <211> 352
 <212> DNA
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 96
 gaagtgatgc tgggtgagtc tgggggaggc ttagtgaggc ctggagggtc cctgaaacte 60
 tctgtgcag gctctggaat cactctcagt acctatgcca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccagagagga ggctggagtg ggtcgcaccc attattagtg gtggtatcac ctattattta 180
 gacagtgtga agggccgctt caccatctcc agagataatg ccaggaacat cctgtacctg 240
 caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatttatt actgtgcaag aaaataccac 300
 gggaatgctt tggactactg gggtaagga acctcagtc cegtctcttt ag 352

<210> 97

<211>	340	
<212>	DNA	
<213>	人工(Artificial)	
<220>		
<223>	輕鏈可變區	
<400>	97	
	gacattgtga tgacacagtc tccatcgtcc ctgcctgtga cagcaggaga gacggteact	60
	atgcgctgca agtccagtca gagtctttta aacagtggaa atcaaaggaa ctacttgacc	120
	tgttaccagc gaaaccagg acagcctcct aagaaactga tctactgggc atccactagg	180
	gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc	240
	atcagtgggtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaataa ttatTTTTAT	300
	ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac	340
<210>	98	
<211>	354	
<212>	DNA	
<213>	人工(Artificial)	
<220>		
<223>	重鏈可變區	
<400>	98	
	cagatccaga tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaggatc	60
	tcttgaagg cttctgggta ttcttcaca actgctggaa tgcagtgggt gcgaaagatg	120
	cctggagagg gtttgaagtg gattggctgg ataatgccc actctggaga gccaaaatat	180
	acagaagact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactacatat	240

ttacagataa gtaacctcaa aaatgaggac acggctacgt atttctgtgc gagatgggga 300

aaggaaata ctatggacta ttgggtcaa ggaacctcag tcctcgtctc ctca 354

<210> 99

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 99

gacattgtga tgacacagtc gccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact 60

atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacggtggaa atcagaggaa ctacttgacc 120

tgtaccagc agaaaccagg acagcctcct aaacttttga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacacattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatgc ttatTTTTTT 300

ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagcta gagctgaaa 339

<210> 100

<211> 358

<212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 100

gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccgaaactc 60

tectgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120
ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtagtg gcagtagtac catctactat 180
ccagacacag tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240
ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgt aagattgggt 300
ccacggggga atgttatgga ccattgggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctcag 358

<210> 101
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>
<223> 輕鏈可變區

<400> 101
gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggteact 60
atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaggaa ctacttgacc 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatgt ttatTTTTAT 300
ccactcacgt tcggtactgg gaccaagctg gagctgaga 339

<210> 102
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 102

gatgtgcagc ttcaggagtc aggacctgac ctggtaaac cctctcagtc actttcactc 60

acctgcactg tcagtggtc ctccatcagc ggtgcttata actggcactg gatccggcag 120

tttcaggaa acaaactgga gtggctggcc tacatgcagt acagtggtag ctctaactac 180

aacccatctt tcaaaagtcg aatctctatc agtcgagaca cgtccaagaa ccaattcttc 240

ctgcagttga aatctgtgac tactgaagac acagccacat attactgtgc aagaatgtat 300

aacggaaact cgtttcttta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 354

<210> 103

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 103

gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggcga gaaggteact 60

atgaactgca agtccagtca gagtctgttt aacagtggaa atcaaaagaa ctatttgacc 120

tggtatcagc aaaaccagg gcagcctcct agattgttga tctattgggc atccactagg 180

gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctgtca ctttattact gtcagaattc ttatagttat 300

cctctcagct tcggtgctgg gaccaagctg gagttgaaa 339

<210> 104
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 104
 caggtgcagc tgaaggagtc aggacctgac ctggtggcgc cctcacagag cctgtccctc 60
 acatgctccg tctcagggtt ctccttaacc agctatggta ttcactgggt tcgccagcct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctggtggtg atatggagtg atggaagaac aacctataat 180
 tcaggtctca aatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttctctta 240
 aaaatgaaca gtctccgaac tgatgacaca gccatttact actgtgtcag acateccgcc 300
 ttcggtcccc atgctatgga ctactgggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctctca 357

<210> 105
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 105
 gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctcttgaga gtcagtatcc 60
 atctctgca ggtctagtaa gagtctctg aatagtaatg gcaacactta cttgtattgg 120
 ttctgcaga ggccaggcca gtctctcag ctctgatat atcggatgtc caaccttgcc 180

tcaggagtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaate 240

agtagagtgg aggctgggga tgtgggtggt tattactgta tgcaatatct agaatatccg 300

gtcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 106

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 106

gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccgaaacte 60

tctgtgcag cctctggatt cactttcagt cgctttgaa tgcactgggt tcgtcaggct 120

ccaaaaagg gactggagtg ggtgcatac attagtagtg gcagtaatac catctactat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaacga ccagtctaag gtctgaggac acggccatat attactgtgg aagattgggc 300

ttctatgga actcgtttga tcaactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357

<210> 107

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 107

aacattttga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcgggaga gaaggtcact 60
 atgaactgca agtccagtca gagtctgtta aacggtggaa atcaaaggaa ctacttgacc 120
 tgggtaccagc agaaagcagg gcagcctccc aaactgttga tctactgggc atccactagg 180
 gagtctgggg tccctgatcg cttcacaggc ggtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca ctttattact gtcagaattc ttattattat 300
 ccgctcacgt tcggtgctgg taccaagctg gagctgaaa 339

<210> 108
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 108
 gaggtccagc tgcggcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcttgcaagg cttctggata cacattcact acctatatta taaactgggt gaagcagaag 120
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatga tacaaggtac 180
 aatgagaggg tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cactgcctac 240
 atggagctca gcagcctgac ctctgaagac tctgcggtct attactgtgc aagattttac 300
 tttggtaact cgtttactta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 354

<210> 109
 <211> 339
 <212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 109

gacattgtga tgacacagtc tccgtcctcc ctgcctgtga cagtaggaga gagggctact 60

atgacctgca agtccagtca gggctctgttt aacagtggaa atcaaaggaa ctacttgacc 120

tggtagcaac agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca atttattact gtcagaataa ttatatttat 300

ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagttg gagctgaaa 339

<210> 110

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 110

gaggtccagc tgcggcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcttgcaagg cttctggata cacattcact acctatatta taaactgggt gaagcagaag 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tactaggtac 180

aatgagaggg tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag tacagcctac 240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct actactgtgc aagatttcac 300

tttgtaatt cgtttactta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 354

<210> 111

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 111

gacattgtga tgacacagtc tccgtcctcc ctgcctgtga caacaggaga gaaggtcact 60

atgacttgca agtccagtca gggctctgttt aacaatggaa atcaaaggaa ctacttgacc 120

tggtagcagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcataggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca atttattact gtcagaataa ttatattttt 300

ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagttg gagctgaaa 339

<210> 112

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 112

cagatccagt tggtagcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcttgaagg cttctggata taccctcaca aactatggaa tgaattgggt gaggcaggct 120

ccaggaaagg gtttaaagt gatgggctgg ataaggccca aactggaga gccaacatat 180
 gctgaagact tcaaggacg atttgtcttc tctttgaaa cctctgccgc cactgcctat 240
 ttacagatca ccaacctcaa aagtggagc acgtctacat atttctgtgc aagactgtac 300
 aggggaaata ctttgacaa ctgggtcaa ggaacctcag tcatcgtctc ctca 354

<210> 113
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 113
 gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga caacagggga gaaggtcact 60
 atgagctgca agtccagtc gaatctgtta aacagtggaa atcaaaggaa ctacttgacc 120
 tggtagcagc agaagccagg acagtctcct aaactattga tctactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tcccttatcg cttcacagc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tacagactga tgacctggct atttattact gtcagaatgg ttatagtttt 300
 ccattcacgt tcggctcggg gacaaagttg gaaataaaa 339

<210> 114
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 114
 caggttcacc tgcagcagtc tggggctgaa ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60
 tcctgcaagg cttctggcta tgcattcagt aattactgga tgaactgggt gaggcagagg 120
 cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gaaatgggtga tactaagtac 180
 agtggaaagt tcaacagtaa agacacactg actgcagaca aatcctcaa cacagcctac 240
 atgcaactca acagcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagattttac 300
 tacgtaatg ttatggacta ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctgc 354

<210> 115
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 115
 gacattgtgt tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact 60
 atgagctgca agtccagtca gactctgtta aacggtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120
 tggtagcagc agaaatcagg gcagcctcct aaactgttga tctattgggc atcaactagg 180
 gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
 attagcagtg tccaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatgg ttatagttat 300
 ccgctcacgt tcggtgttgg gaccaagctg gagctgaaa 339

<210> 116

<211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 116
 gaggtgcagc tggaggagag cgggggggga ctggtgcagc caggaggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg gcagtggcat taccctgagc acatatgcc a tgagctgggt gagacaggcc 120
 cctggcaaag gactggagtg ggtgagcagc attatcagcg gaggaatcac ctactatctg 180
 gatagcgtga aggacggtt cacaatcagc aggataacg ccaagaacac actgtatctg 240
 cagatgagct ctctgagggc cgaagacacc gccgtgtatt attgcgccag aaagtaccac 300
 ggaaacgccc tggactactg gggccagggg accctggtga cagtgagctc c 351

<210> 117
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 117
 gacattgtga tgaccagag ccccgactcc ctggccgtga gcctgggaga aagagccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gagcctgctg agcagcggca accagagaaa ctacctgacc 120
 tggtagcagc agaaaccgg ccagcccccc aaaaagctga tctactgggc ctccaccgg 180
 gaatccggcg tgccagacag attctccggc tccggctccg gaaccgactt caccctgacc 240

atcagctccc tgcaggctga ggacctggcc gtgtactact gccagaacaa ctactttctac 300

ccctgacct tcggccaggg caccaaactg gagatcaag 339

<210> 118

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 118

gacattgtga tgaccagag ccccgactcc ctggccgtga gcctgggaga aagagccacc 60

atcaactgca agagcagcca gagcctgctg agcagcggca accagagaaa ctacctgacc 120

tggtaccagc agaaaccgg ccagccccc aaaaagctga tctactgggc ctccaccgg 180

gaatccggcg tgccagacag attctccggc tccggctccg gaaccgactt caccctgacc 240

atcagctccc tgcaggctga ggacctggcc gtgtactact gccagagcaa ctactttctac 300

ccctgacct tcggccaggg caccaaactg gagatcaag 339

<210> 119

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 119

gacattgtga tgaccagag ccccgactcc ctggccgtga gcctgggaga aagagccacc 60

atcaactgca agagcagcca ggcctgctg agcagcggca accagagaaa ctacctgacc 120
 tggtagcagc agaaaccgg ccagccccc aaaagctga tctactgggc ctccaccgg 180
 gaatccggcg tgccagacag attctccggc tccggctccg gaaccgactt caccctgacc 240
 atcagctccc tgcaggctga ggacctggcc gtgtactact gccagcagaa ctacttctac 300
 ccctgacct tcggccagg caccaaactg gagatcaag 339

<210> 120
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 120
 cagatccagc tggtagcagc cggcagcga ctgaagaagc ccggcggccag cgtgaaagtg 60
 agctgcaagg ccagcggcta caccctgacc aactacggca tgaactgggt gagacaggct 120
 cccggccagg ggctggaatg gatgggatgg atcagaccca acaccggaga gccaacctac 180
 gccgaggact tcaagggcag attcgtgttc agcctggaca cctctgtggc caccgcttac 240
 ctgcagatca ccagcctgaa agccgaggac accgccgtgt actactgtgc ccgctgtat 300
 agaggaaaca ccctggacaa ctggggccag ggcactctgg tgaccgtgag ctcc 354

<210> 121
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 121

gacattgtga tgaccagag ccccgactcc ctggccgtga gcctgggaga aagagccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gaacctgctg agcagcggca accagagaaa ctacctgacc 120
 tgggtaccagc agaaaccgg ccagccccc aaactgctga tctactgggc ctccaccaga 180
 gaaagcggcg tgcccagacag attctccgga agcggcagcg gcaccgactt caccctgact 240
 atcagcagcc tgcaggctga ggacctggcc gtgtactact gccagcaggg ctacagcttc 300
 cccttcacct tcggccaggg caccaaactg gagatcaaa 339

<210> 122

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 122

caggtgcagc tgggtcagag cggcgccgag gtgaaaaagc ccggctcctc agtgaaagtg 60
 agctgcaagg ccagcggcta cgccttctcc aactactgga tgaactgggt gagacaggcc 120
 ccaggccagg gcctggaatg gatgggacag atctaccccg gcagcggcga tacaaagtac 180
 agcggaaagt tccagagcag agtgaccatc accgccgaca aaagcaccaa caccgcctac 240
 atggagctga gcagcctgag aagtgaggac accgccgtgt actactgcgc cagattctac 300
 tacggcaacg tgatggacta ttggggccag ggaaccctgg tgaccgtgag ctct 354

<210> 123
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 123
 gacattgtgc tgaccagag ccccgactcc ctggctgtga gcctgggaga gagagccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gaccctgctg agtggaggaa accagaaaa ctacctgact 120
 tggtagcagc agaaaccgag ccagccccc aaactgctga tctactgggc ctccacaaga 180
 gaaagcggag tgcccagacag attcagcggc agcggcagcg gaaccgactt cacctgact 240
 atcagcagcc tgcaggctga ggacctggcc gtgtactact gccagcaggg ctacagctac 300
 ccactgacct tcggacaggg caccaagctg gagattaaa 339

<210> 124
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 重鏈恆定區

<400> 124

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

20

25

30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

330

<210> 125
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 輕鏈恆定區

<400> 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

<210> 126
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> IMAB362, 重鏈

<400> 126

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

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

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

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405

410

415

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

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

<210> 127
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> IMAB362, 輕鏈

<400> 127

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 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp						
	115			120		125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn						
	130			135		140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu						
	145			150		155
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp						
		165		170		175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr						
	180			185		190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser						
	195			200		205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys						
	210			215		220

<210> 128
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 128

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Arg 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 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asn Tyr Phe Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 129

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 129

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 Ile Thr Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ile Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Lys Tyr His Gly Asn Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 130
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工(Artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 130

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Arg 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 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Arg Gly Asn Thr Leu Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 132

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 132

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Asn Gly
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 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Gly Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

- <210> 133
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> 人工(Artificial)

- <220>
- <223> 重鏈可變區

<400> 133

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Ser Gly Lys Phe
50 55 60

Asn Ser Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Tyr Tyr Gly Asn Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種結合人密連蛋白（Claudin）18.2的抗體或其片段，該抗體或其片段包含重鏈可變區（VH）及輕鏈可變區（VL），其中該重鏈可變區（VH）及輕鏈可變區（VL）包含選自以下的CDR組合（VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3；VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3）：

(1) 如 SEQ ID NO: 79 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 91 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 81 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 92 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 93 所示的 VL-CDR3；

(2) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 85 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 42 所示的 VL-CDR3；以及

(3) 如 SEQ ID NO: 74 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 75 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 76 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 89 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 90 所示的 VL-CDR3。

【請求項2】 如請求項1之抗體或其片段，其中，該抗體或其片段特異性結合人密連蛋白18.2的N端。

【請求項3】 如請求項1之抗體或其片段，其中，該抗體或其片段特異性結合人密連蛋白18.2之N端的胞外區，包括第一胞外環（Extracellular Loop 1，ECL1）。

【請求項4】 如請求項1至3中任一項之抗體或其片段，其中，該抗體或其片段包含的重鏈可變區及輕鏈可變區係選自以下組合：

(1) 如 SEQ ID NO: 29 所示之胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 30 所示之胺基酸序列；

(2) 如 SEQ ID NO: 23 所示之胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 24 所示之胺基酸序列；以及

(3) 如 SEQ ID NO: 27 所示之胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 28 所示之胺基酸序列。

【請求項5】 如請求項1至4中任一項之抗體或其片段，其中，該抗體或其片段為單株抗體、單鏈抗體、雙功能抗體、完全或部分人源化的抗體或者嵌合抗體，或者，該抗體或其片段為半抗體或半抗體的抗原結合片段。

【請求項6】 如請求項5之抗體或其片段，其中，該抗原結合片段為 scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv。

【請求項7】 如請求項5之抗體或其片段，其中，該抗體或其片段包含選自IgG、IgA、IgM、IgD或IgE的重鏈恆定區及／或κ或λ型輕鏈恆定區。

【請求項8】 如請求項5之抗體或其片段，其中，該抗體為鼠源、嵌合或人源化的單株抗體。

【請求項9】 如請求項8之抗體或其片段，其中，該單株抗體的重鏈恆定區為IgG1或IgG4亞型，輕鏈恆定區為κ型。

【請求項10】 一種核酸分子，其編碼請求項1至9中任一項之抗體或其片段。

【請求項11】 一種載體，其包含請求項10之核酸分子。

【請求項12】 一種宿主細胞，該宿主細胞包含請求項10之核酸分子及／或請求項11之載體，或者該宿主細胞被請求項10之核酸分子及／或請求項11之載體轉化或轉染。

【請求項13】 一種共軛物或融合蛋白，該共軛物或融合蛋白包含請求項1至9中任一項之抗體或其片段。

【請求項14】 一種藥物組成物，其包含請求項1至9中任一項之抗體或其片段、請求項10之核酸分子、請求項11之載體、請求項12之宿主細胞及／或請求項13之共軛物或融合蛋白，以及視需要的藥學上可接受的輔料。

【請求項15】 一種試劑盒，該試劑盒包括請求項1至9中任一項之抗體或其片段、請求項10之核酸分子、請求項11之載體、請求項12之宿主細胞、請求項13之共軛物或融合蛋白及／或請求項14之藥物組成物。

【請求項16】 一種使用請求項1至9中任一項之抗體或其片段、請求項10之核酸分子、請求項11之載體、請求項12之宿主細胞、請求項13之共軛物或融合蛋白及／或請求項14之藥物組成物在製備用於預防及／或治療癌症之藥物中的用途。

【請求項17】 一種使用請求項1至9中任一項之抗體或其片段、請求項10之核酸分子、請求項11之載體、請求項12之宿主細胞、請求項13之共軛物或融合蛋白及／或請求項14之藥物組成物在製備用於診斷癌症之試劑中的用途。

【請求項18】 一種使用請求項1至9中任一項之抗體或其片段、請求項10之核酸分子、請求項11之載體、請求項12之宿主細胞、請求項13之共軛物或融合蛋白及／或請求項14之藥物組成物在製備CART細胞中的用途。

【發明圖式】

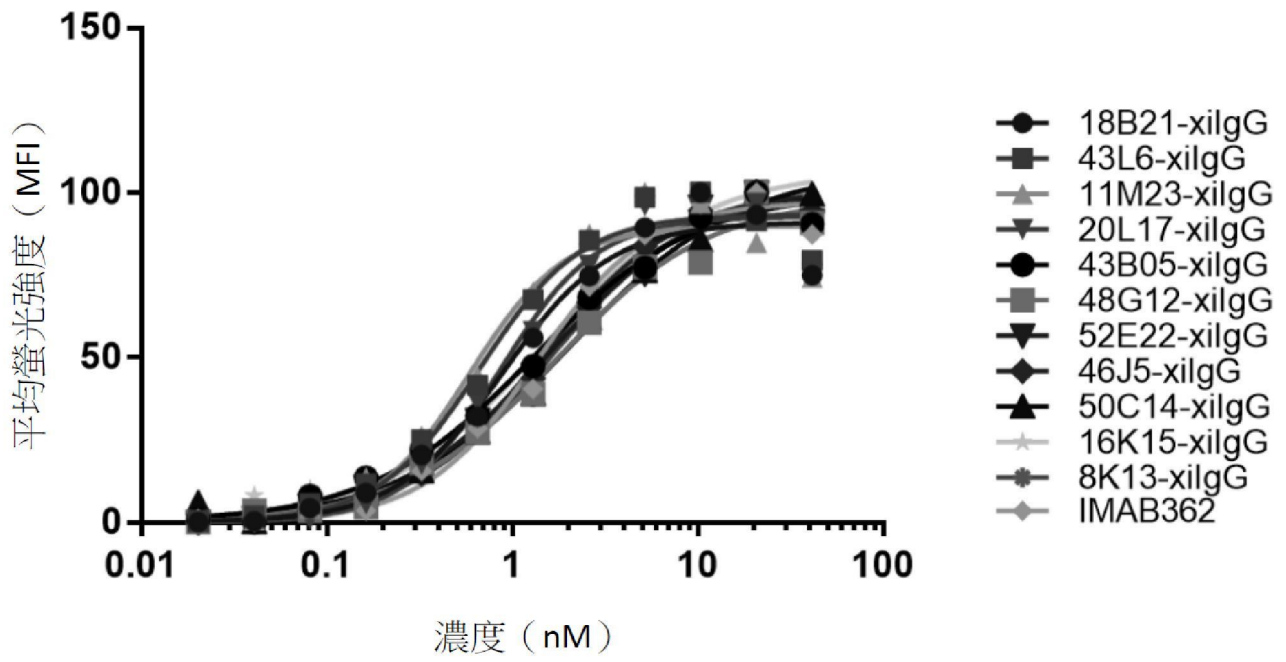


圖1

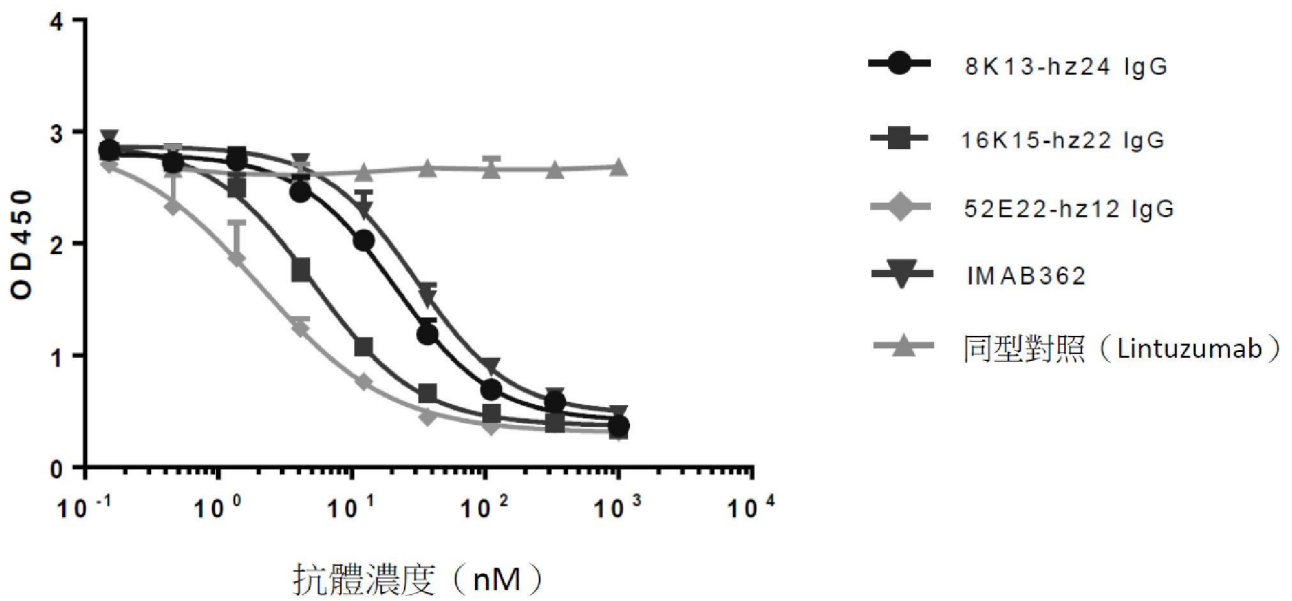


圖2A

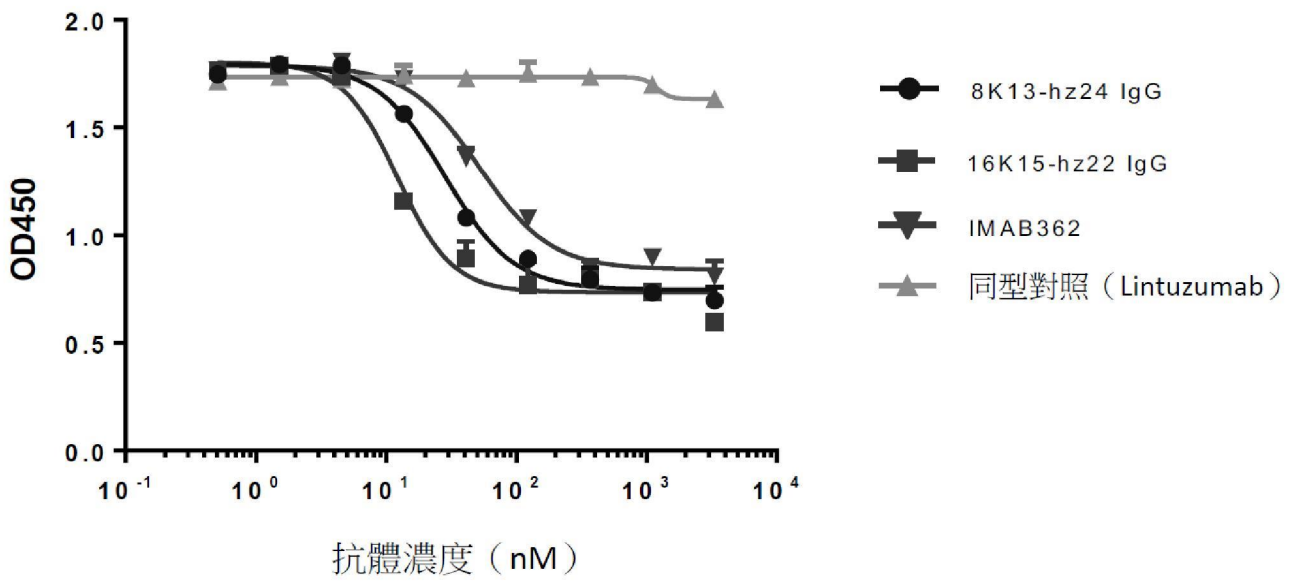


圖2B

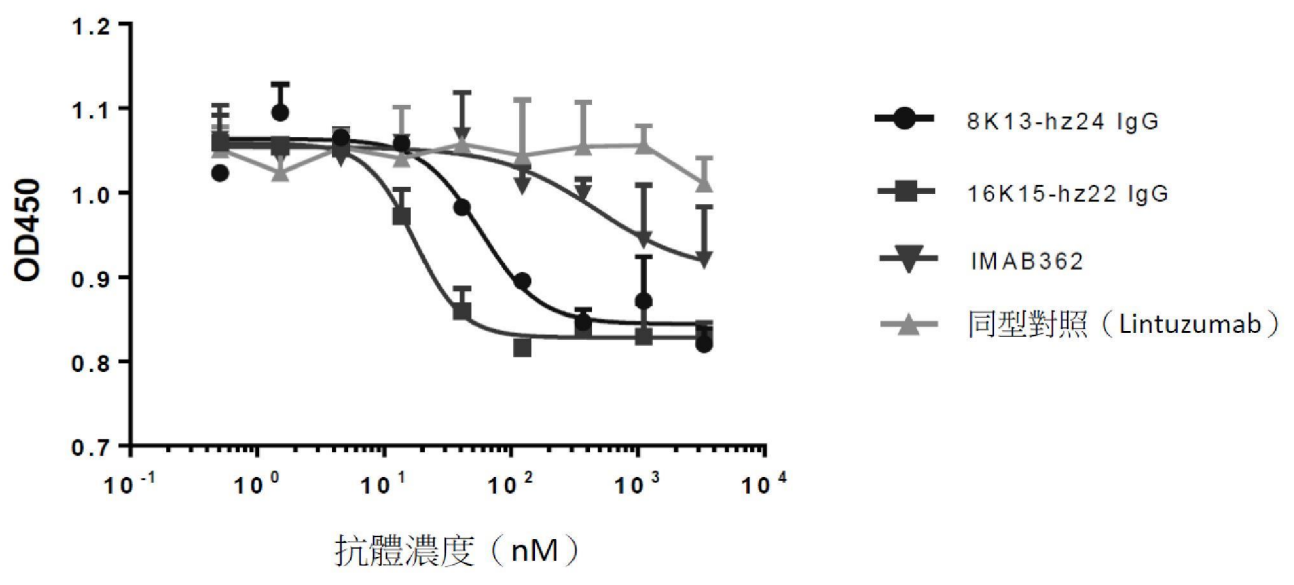


圖2C

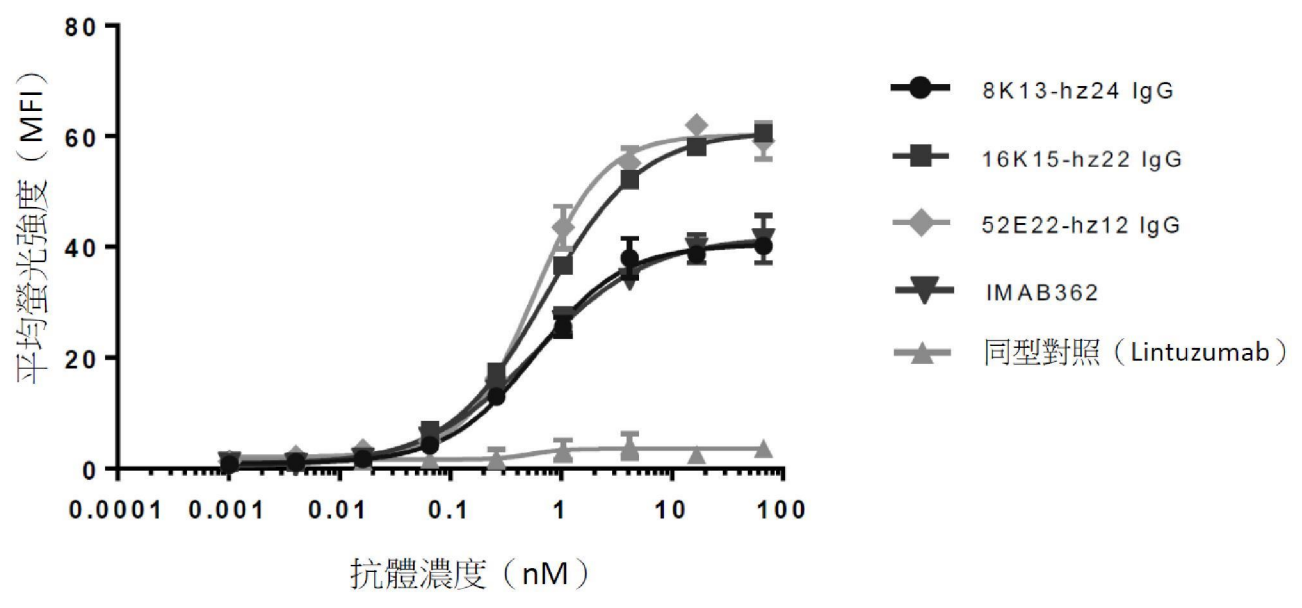


圖3A

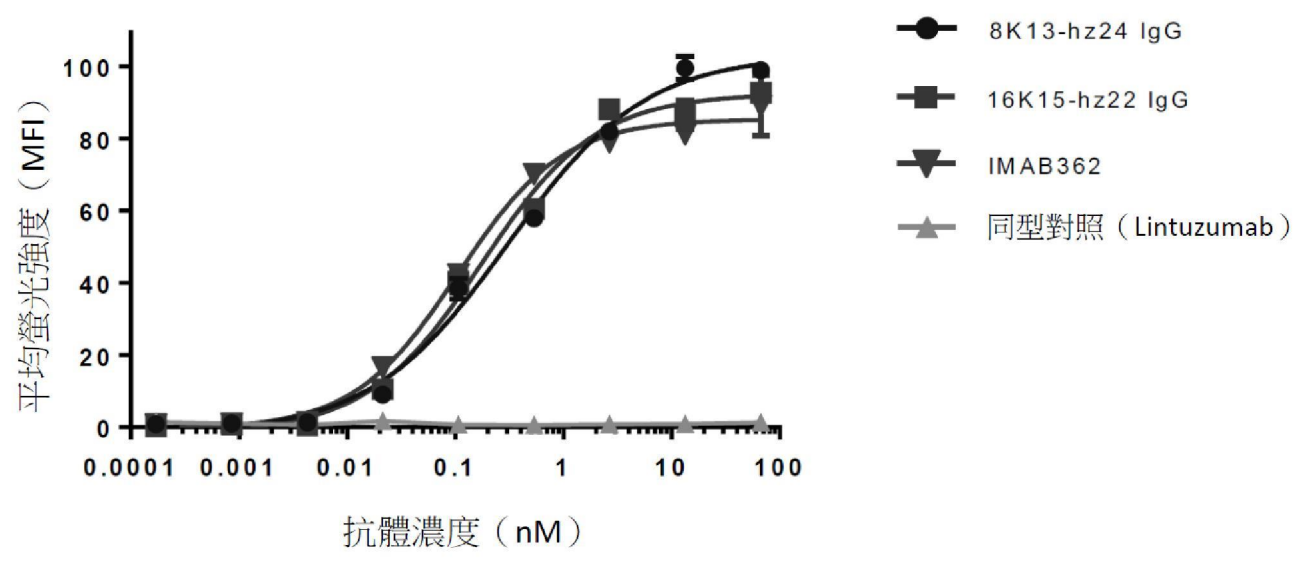


圖3B

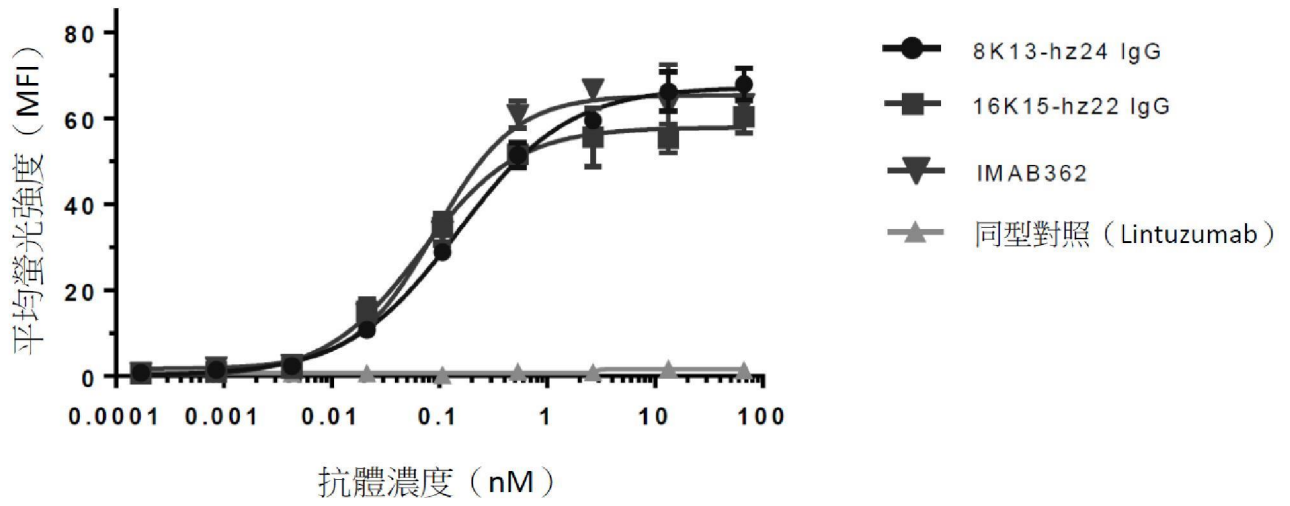


圖3C

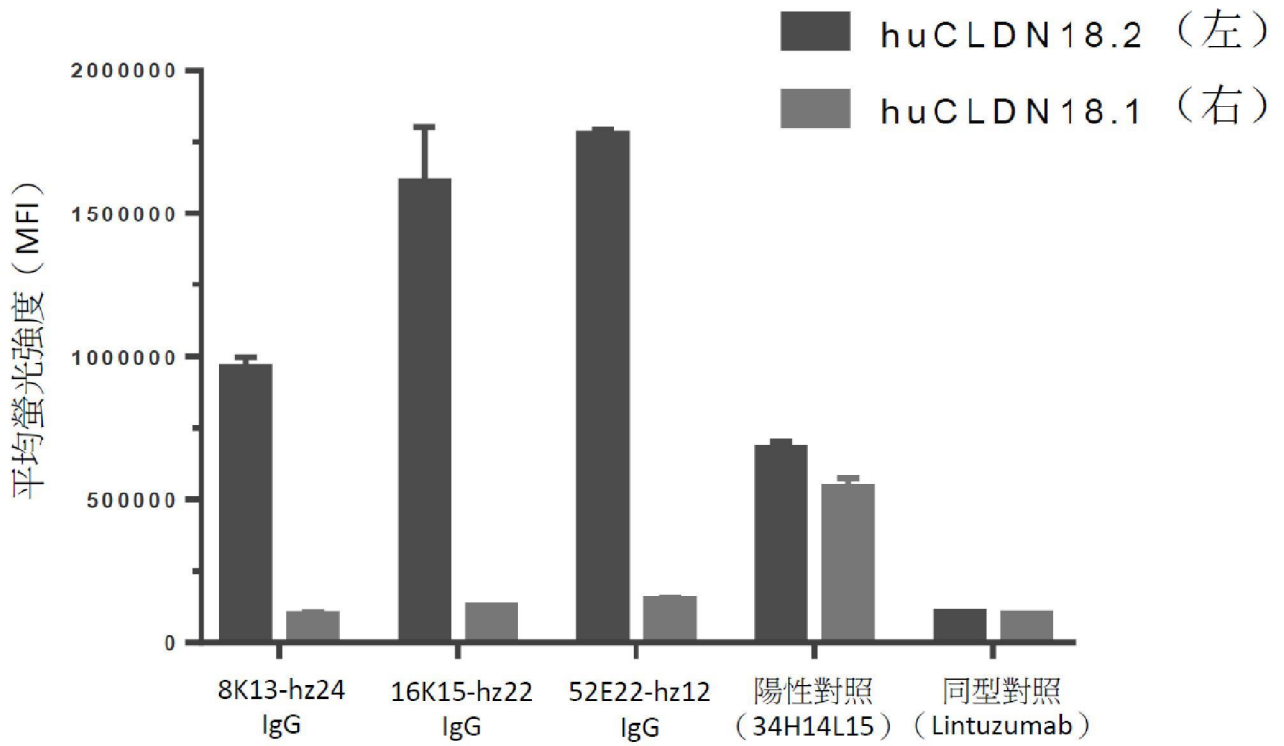


圖4

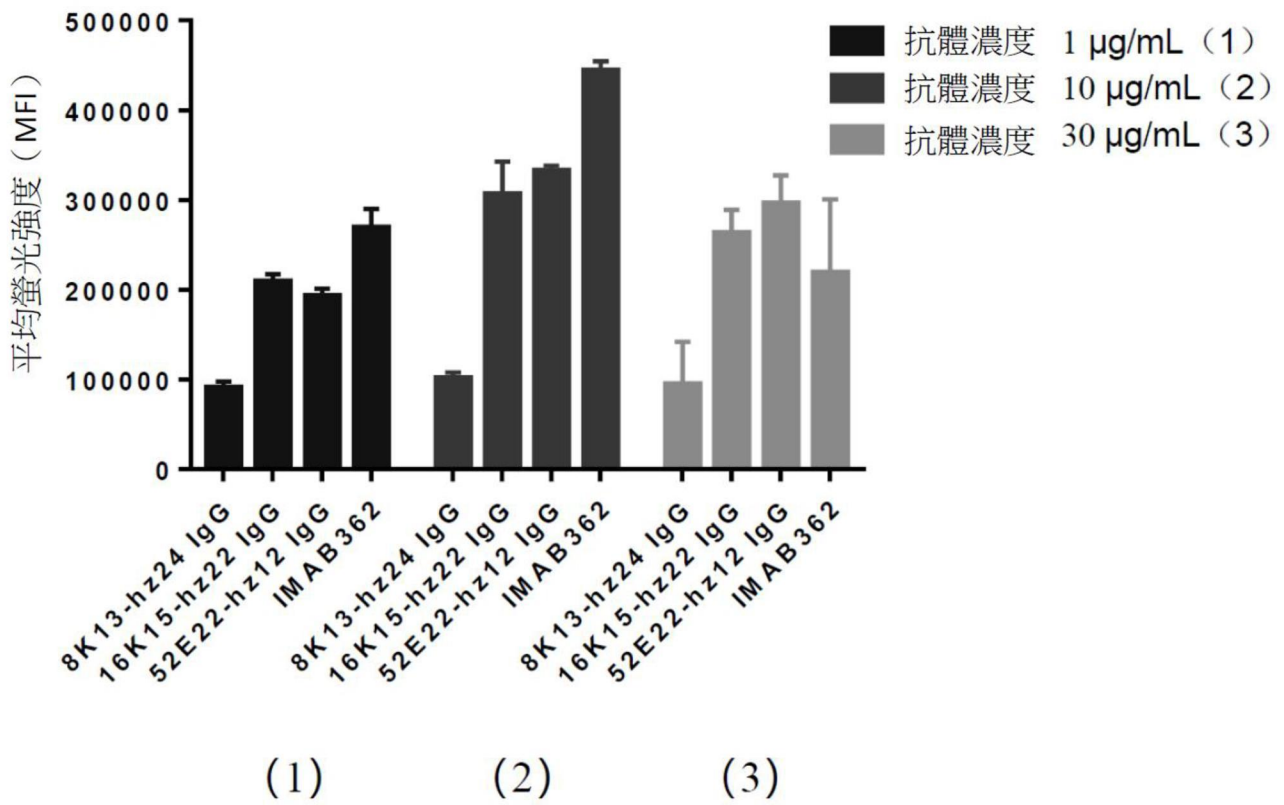


圖5

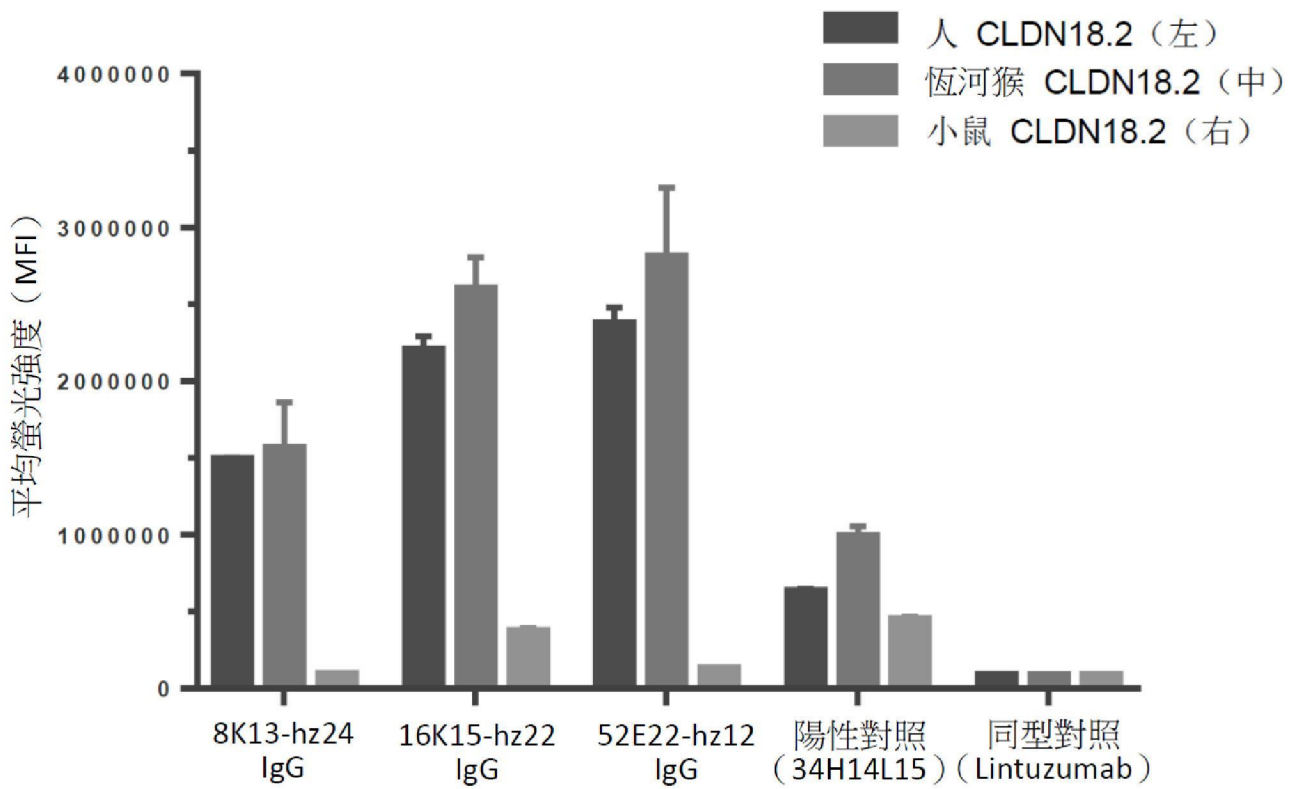


圖6

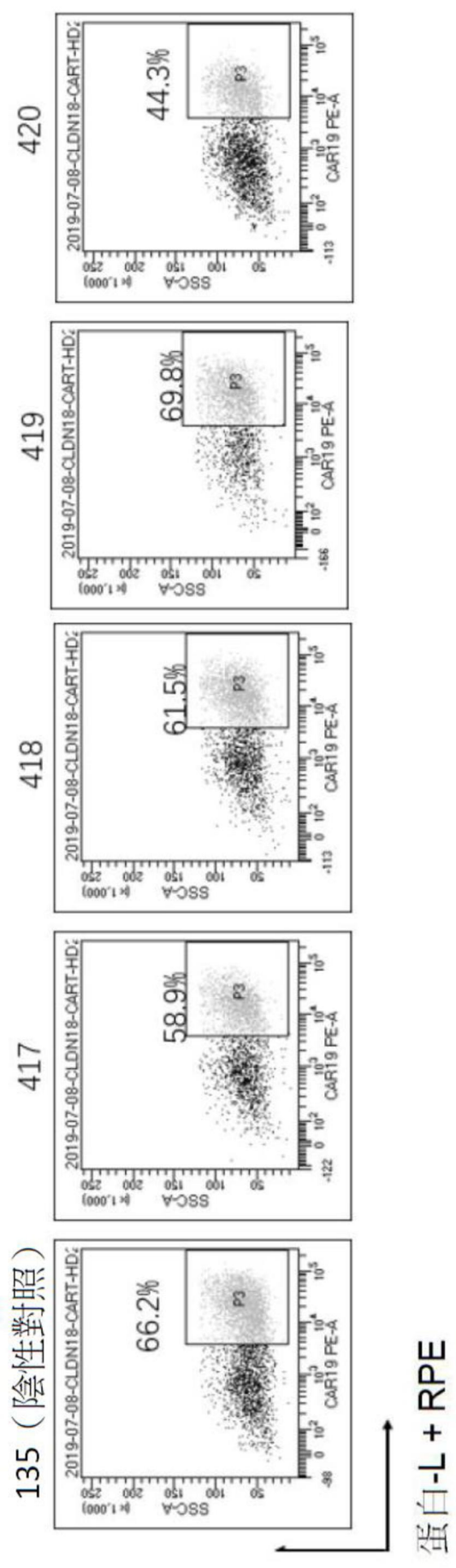


圖7

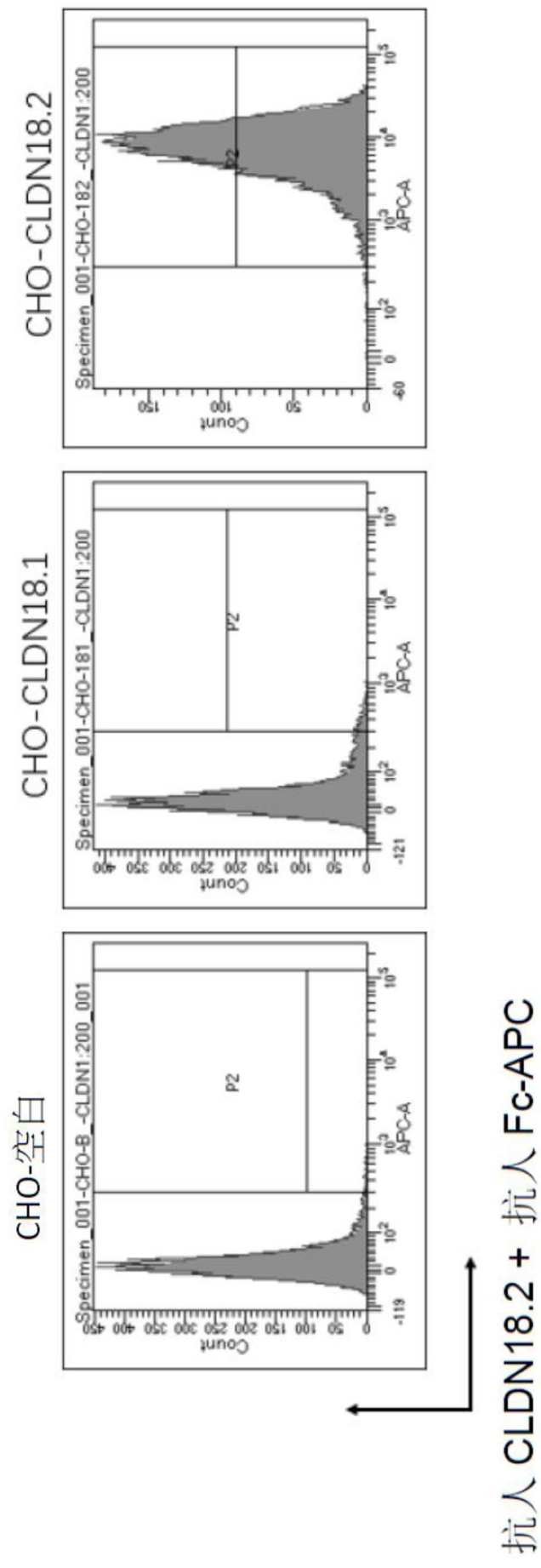


圖8

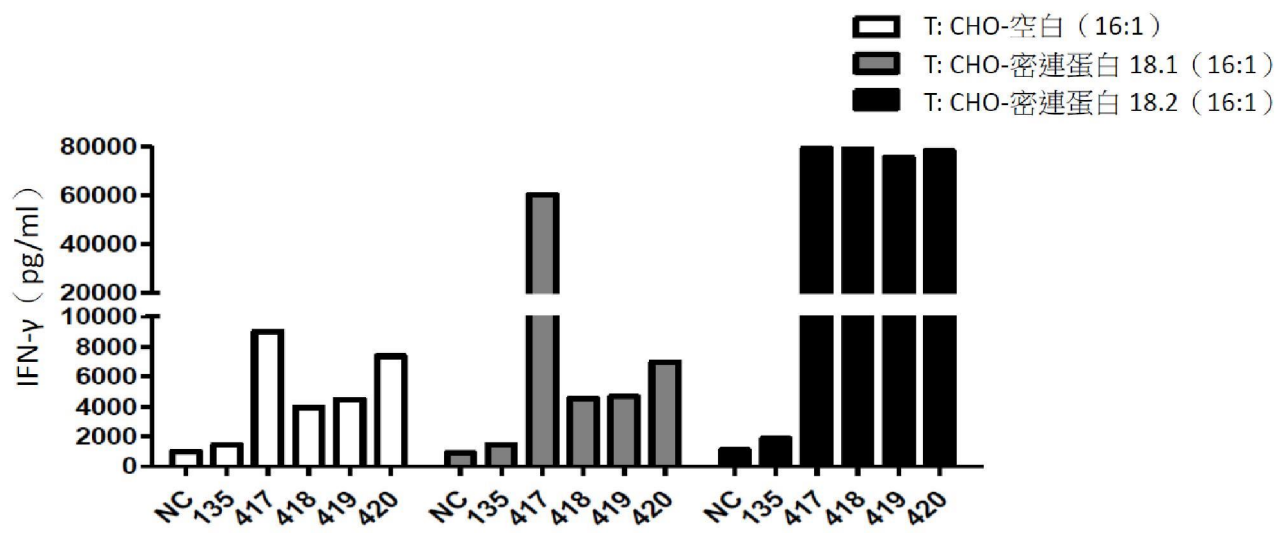


圖9

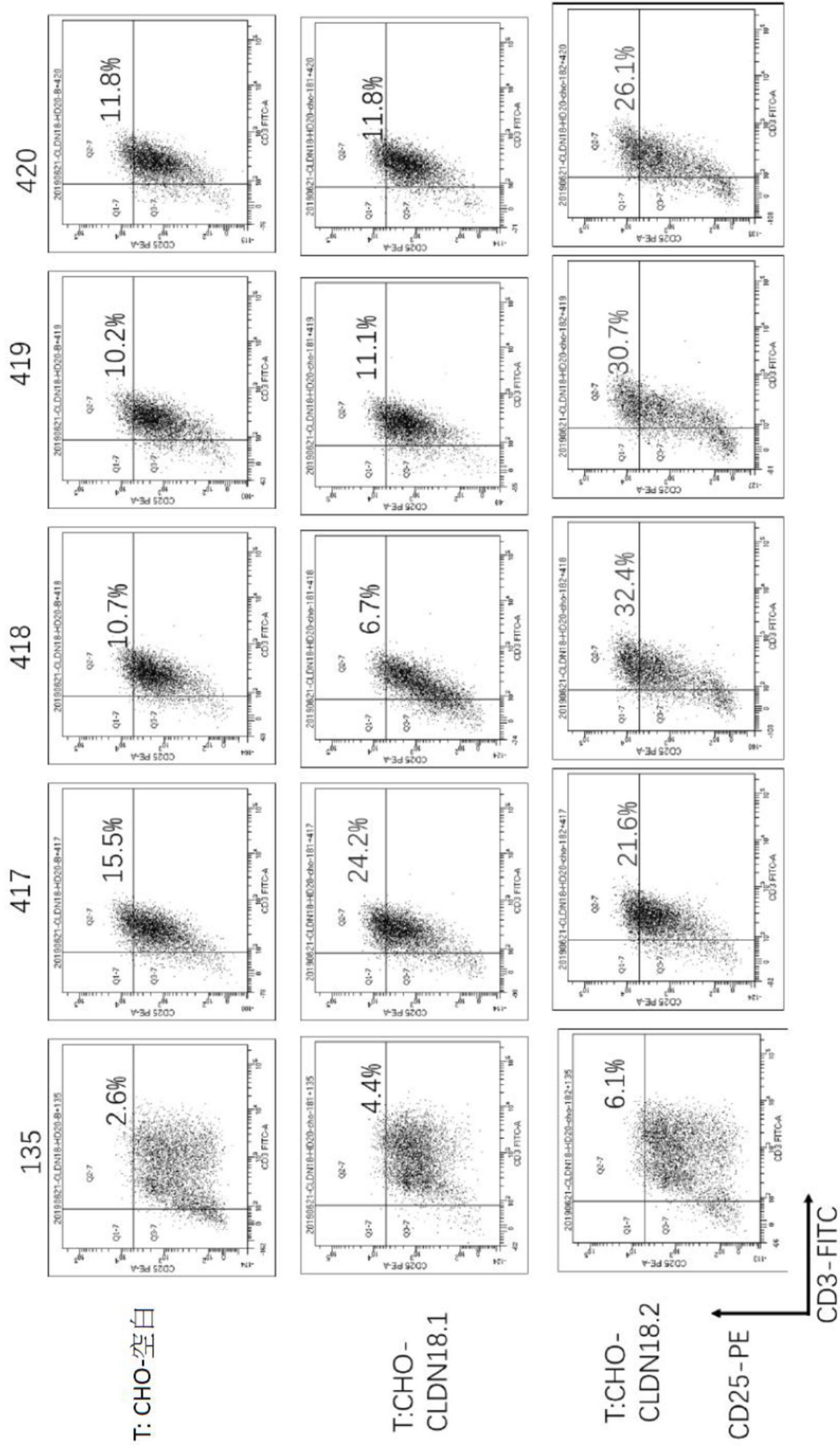


圖10