



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104558192 B

(45)授权公告日 2018.12.28

(21)申请号 201510029954.X

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 104558192 A

A61P 35/00(2006.01)

(43)申请公布日 2015.04.29

(56)对比文件

(73)专利权人 武汉友芝友生物制药有限公司
地址 430075 湖北省武汉市中国武汉东湖
开发区高新大道666号光谷生物城C2-
1栋

CN 104271602 A,2015.01.07,

CN 103796677 A,2014.05.14,

CN 104203981 A,2014.12.10,

审查员 任长辉

(72)发明人 周鹏飞 王涛 方丽娟 杨锦霞
马莹莹 李娜

(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15页

C07K 16/46(2006.01)

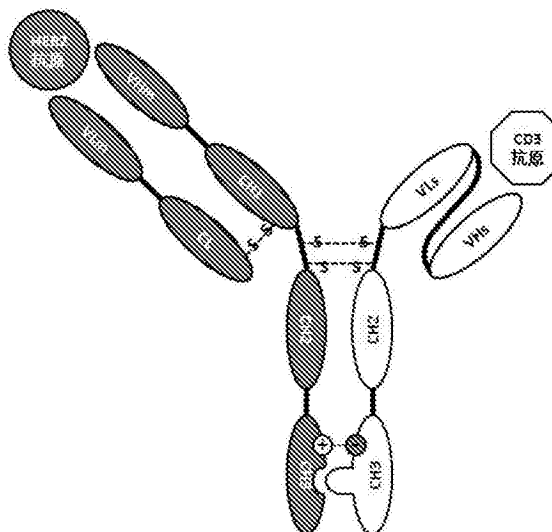
序列表20页 附图6页

(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链单元和单价单元组成,其中该单链单元针对免疫细胞的表面抗原CD3具有特异性结合能力,该单价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,轻链为序列号3所示的氨基酸序列,重链为序列号1所示的氨基酸序列,该轻链-重链针对肿瘤细胞表面抗原HER2具有特异性结合能力;和(b) 单链单元,为融合肽,该融合肽为序列号5所示的氨基酸序列,其中该融合肽针对免疫细胞表面抗原CD3具有特异性结合能力;

单链单元包含单链可变片段ScFv和具有铰链区、CH2结构域和CH3结构域的Fc片段,其中CH2结构域位于铰链区和CH3结构域之间,不包含CH1结构域,单链单元的铰链区位于ScFv和CH2结构域之间;所述单链可变片段由轻链可变区和重链可变区结构域通过连接肽连接组成;

抗-HER2重链在223位点上的半胱氨酸与抗-HER2的轻链214位点上的半胱氨酸以二硫键的形式连接,所述的抗-HER2重链在229和232位点上的半胱氨酸与抗-CD3 ScFv-Fc的255和258位点上的半胱氨酸分别以二硫键的形式连接,所述的抗-HER2重链在395和412位点上与抗-CD3 ScFv-Fc的428和397位点上形成盐桥连接,所述的抗-HER2重链在369位点上与抗-CD3 ScFv-Fc的436位点上形成隆突-入-穴连接。

2. 制备权利要求1所述的双特异性抗体的方法,其特征在于,所述的方法包括步骤:

(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;

(2) 将第一和第二表达载体一起共转染到CHO-S细胞中,培养并取上清;

(3) 将表达上清分离得到纯化后的双特异性抗体;所述的分离步骤包括: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所述的方法,所述的第一表达载体是pCH01.0;所述的第二表达载体是pCH01.0-潮霉素。

4. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述的方法的步骤(1)中:所述单价单元为抗-HER2抗体,扩增其轻链所用引物为Kozak EcoRV F、MK-leader EcoRV F和hIgK PacI R,通过重叠PCR扩增,将Kozak序列、MK-leader及酶切位点EcoRV与PacI引入轻链;扩增其重链所用引物为Kozak AvrII F、MK-leader AvrII F和hIgG1 BstZ17I R,通过重叠PCR扩增,将Kozak序列、MK-leader及酶切位点AvrII与BstZ17I引入重链;将扩增好的轻链基因片段与用EcoRV与PacI酶切过的pCH01.0表达载体进行同源重组,获得装入抗-HER2轻链的表达载体;然后用AvrII与BstZ17I酶切后再和重链进行同源重组,获得抗HER2的pCH01.0表达载体,质粒命名为pCH01.0-赫赛汀-HL-KKW;

所述单链单元为抗-CD3 ScFv-Fc抗体,扩增其所用引物为Kozak AvrIIF、MK-leader AvrII F、L2K-VH MK F1和hIgG1 BstZ17I R,通过重叠PCR扩增抗CD3 ScFv-Fc结构域,并将Kozak序列、MK-leader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CD3ScFv-Fc的表达载体,质粒命名为pCH01.0-潮霉素-L2K-ScFv-Fc-LDY。

5. 权利要求1所述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疾病,或者用于杀死表达HER2的细胞。

6. 权利要求1所述的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治疗表达HER2特异抗原的肿瘤细胞疾病的药物或者评价治疗表达HER2特异抗原的

肿瘤细胞疾病的药物的药效。

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,直接接触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: δ 、 ϵ 、 γ 、 ζ ,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: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;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,其中该融合肽针对的免疫细胞选自T细胞、NKT细胞或CIK细胞;优选地,该融合肽对免疫细胞表面抗原CD3具有特异性结合能力。

[0037] 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;所述单链单元不包含CH1结构域。

[0038] 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CD3。

[0039] 在一种实施方式中,在单价单元中,所述轻链的轻链恒定区结构域和轻链可变区结构域都靶向于肿瘤抗原表位HER2;所述重链的重链恒定结构域CH1和重链可变结构域也靶向于肿瘤抗原表位HER2;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,优选地所述一个或多个二硫键形成于该CH1(或VLs)和CH2结构域之间的铰链区的氨基酸残基之间。

[0040] 在一种实施方式中,单链单元包括针对CD3的抗体抗-CD3,单价单元包括针对HER2的抗体抗-HER2。

[0041] 在一种实施方式中,抗体抗-HER2的重链的氨基酸序列为序列号1所示的氨基酸序列,抗体抗-HER2的轻链的氨基酸序列为序列号3所示的氨基酸序列,以及所述的抗-CD3ScFv-Fc的氨基酸序列为序列号5所示的氨基酸序列;并且抗-HER2重链在223位点上的半胱氨酸与抗-HER2的轻链214位点上的半胱氨酸以二硫键的形式连接,所述的抗-HER2重链在229和232位点上的半胱氨酸与抗-CD3ScFv-Fc的255和258位点上的半胱氨酸分别以二硫键的形式连接,所述的抗-HER2重链在395和412位点上与抗-CD3ScFv-Fc的428和397位点上形成盐桥连接,所述的抗-HER2重链在369位点上与抗-CD3ScFv-Fc的436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,所述的细胞是CHO-S细

胞;或者优选地,所述的分离步骤包括: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-HER2抗体,扩增其轻链所用引物为Kozak (EcoRV)F、MK-leader (EcoRV)F和hIgK (PacI)R,通过重叠PCR扩增,将Kozak序列、MK-leader及酶切位点EcoRV与PacI引入轻链;扩增其重链所用引物为Kozak (AvrII)F、MK-leader (AvrI I)F和hIgG1 (BstZ17I)R,通过重叠PCR扩增,将Kozak序列、MK-leader及酶切位点AvrI I与BstZ17I引入重链;扩增好的LC基因片段与用EcoRV与PacI酶切过的pCH01.0表达载体进行同源重组,获得装入抗-HER2轻链的表达载体;然后用AvrI I与BstZ17I酶切后再和HC进行同源重组,获得抗-HER2的pCH01.0表达载体,质粒命名为pCH01.0-抗-HER2-HL-KKW;

[0050] 所述单链单元为抗-CD3ScFv-Fc抗体,扩增其所用引物为Kozak (AvrII)F、MK-leader (AvrI I)F、L2K-VH(MK)F1和hIgG1 (BstZ17I)R,通过重叠PCR扩增抗CD3ScFv-Fc结构域,并将Kozak序列、MK-leader及酶切位点AvrI I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CD3ScFv-Fc的表达载体,质粒命名为pCH01.0-潮霉素-L2K-ScFv-Fc-LDY。

[0051] 在一种实施方式中,上述任一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,所述的药物用于治疗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,上述任一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] 本发明提供了一种被称为双特异性抗体的新型抗体,并建立一种利用人体的免疫系统进行免疫治疗并开展双特异性抗体的药效研究的方法。这种双特异性抗体,作为一种新型抗体并用于药效模型,引入T细胞对HER2等肿瘤抗原的特异性细胞毒功效。

[0054] 本发明提供了一种新方法制备双特异性抗体MSBODY (monomer and ScFv-Fc bispecific antibody) (如图2所示),该双特异性抗体包括两组重轻链组合,其中一组特异结合一种抗原,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,而这两组重轻链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MSBODY,MSBODY各结构域排列顺序及结构示意图见图2。

[0055] 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CD3为靶点的双特异性抗体,被命名为HER2XCD3,如图2,抗-HER2这边为单价单元形式,包括抗-HER2重链与轻链,抗-CD3这边为ScFv-Fc形式,包括抗-CD3VH、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MSBODY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。根据单价单元轻链(LC),单价单元重链(HC),ScFv,Fc基因序列及载体中的多克隆位点设计引物。其中LC,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MSBODY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和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MSBODY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。

[0056] 本发明的技术方案的有益的技术效果有:

[0057] 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,从而较方便的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”。

[0058] 2. 本发明公开了一种新型双特异性抗体MSBODY介导的免疫细胞杀伤体外体内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体内药效模型的建立和检测。双特异性抗体MSBODY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),其中单价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;而另一组单链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。

[0059] 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IgG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。

[0060] 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

[0061] 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:

[0062] 图1.CD3分子结构示意图。

[0063] 图2.HER2×CD3双特异性抗体分子示意图。

[0064] 图3.纯化的双抗体电泳及纯度检测结果图,(A)非还原SDS-PAGE电泳,M:蛋白分子量标记;1:M802;(B)M802的HPLC-SEC纯度峰形图。

[0065] 图4.基于流式细胞分析方法测定的HER2×CD3双抗体与SK-BR-3细胞的亲和力情况图。

[0066] 图5.基于流式细胞分析方法测定的HER2×CD3双抗体与Jurkat细胞的亲和力情况图。

[0067] 图6.HER2阳性细胞NCI-N87(CFSE染色)和Jurkat细胞(PKH26染色)无抗体流式散点图。

[0068] 图7.HER2阳性细胞NCI-N87(CFSE染色)和Jurkat细胞(PKH26染色)有M802抗体共孵育流式散点图。

[0069] 图8.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。

[0070] 图9.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。

[0071] 图10.M802与hPBMC对SK-BR-3细胞的体外细胞毒实验结果图。

[0072] 图11.M802与hPBMC对NCI-N87细胞的体外细胞毒实验结果图。

[0073] 图12.M802与hPBMC对MDA-MB-231细胞的体外细胞毒实验结果图。

[0074] 图13.M802与hPBMC对HEK-293细胞的体外细胞毒实验结果图。

[0075] 图14.M802的体内动物实验结果图。

具体实施方式

[0076] 实施例1:双特异性抗体的表达载体构建(HER2×CD3,M802)

[0077] 1.双特异性抗体序列设计

[0078] 以HER2和CD3为靶点的双特异性抗体被命名为HER2×CD3MSBODY,其中单价单元为抗HER2的重链轻链对,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),包括抗HER2重链与轻链,含有Fab和Fc结构域;单链单元为抗CD3的ScFv-Fc形式,可变区氨基酸参考单克隆抗体L2K的序列(参考US20070123479序列号2),包括抗CD3VH、VL、Fc结构域。其中单价单元的重链Fc和单链单元的Fc(同人IgG1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×CD3MSBODY,编号为M802。同时,为了M802能在中国仓鼠卵巢细胞(CHO(Cricetus griseus,hamster,Chinese,ovary)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HER2×CD3的MSBODY,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MSBODY在本发明中编号为M801,作为对比抗体。

[0079] 单价单元重链氨基酸序列(赫赛汀,序列号1)

[0080]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK-

[0081] 单价单元重链核酸序列(赫赛汀,序列号2)

[0082] GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGCCTGGTGCAGCCGGGCGGATCCCTGCGCCTGAGCTGCGCG

GCGAGCGGCTTTAACATTAAGATACCTATATTCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGC
GCGCATTTATCCGACCAACGGCTATACCCGCTATGCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATTAGCGCGGATACCA
GCAAAAACACCGCGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGAAGATACCGCGGTGATTATTGCAGCCGCTGGGGC
GGCGATGGCTTTTATGCGATGGATTATTGGGGCCAGGCGACCCCTGGTGACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC
ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTA
CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG
CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACAT
GCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG
TCAGCGTCTCACCCTGCTGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC
CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAAACAACTACGATACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCGATCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

[0083] 单价单元轻链氨基酸序列(赫赛汀,序列号3)

[0084]

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-

[0085] 单价单元轻链核酸序列(赫赛汀,序列号4)

[0086] GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGTCAAGCTTAAGCGGAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGC

CGCGGAGCCAGGATGTGAACACCGCGGTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATTTA
TAGCGGAGCTTTCTGTATAGCGGCGTCCGAGCCGCTTTAGCGGAGCCGAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCA

TTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTGCACCTATTATTGCCAGCAGCATTATACCACCCCGCCGACCTTTGGCCAG
GGTACCAAAGTGGAAATTAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCCGCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0087] 单链单链单元氨基酸序列(L2K,序列号5)

[0088]

DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSS
TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPA IMSASPGEKVT
MTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPIYRFSGSGSGLTSSMEADAATYYCQQWSSNPLTF
GAGTKLELKGAAAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LKSDGFFLASKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK-

[0089] 单链单链单元核酸序列(L2K,序列号6)

[0090]

GACATCAAAGTGCAGCAGTCAGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAG
ACTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGG
ATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAAT
CCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTAT
GATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGGAGGCGGCGTTTCAGGCGG
AGGTGGAAGTGGTGGAGGAGTTCTGACATTCAGCTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGA
AGGTACCATGACCTGCAGAGCCAGTTCAAGTGTAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCC
AAAAGATGGATTTATGACACATCCAAAAGTGGCTTCTGGAGTCCCTTATCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTC
ATACTCTCTACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACAGTGGAGTAGTAACCCGC
TCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGTGCAGGCGCCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
TGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCT
CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
GTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGTCTCCAACAAAGCCCT
CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCAT
CCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAATGGGACCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGAAGTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCGCCAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

[0091] 鼠kappa链的前导肽序列(氨基酸序列,序列号7)

[0092] METDTLLLWVLLLWVPGSTG

[0093] 鼠kappa链的前导肽序列(核酸序列,序列号8)

[0094] ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT

[0095] 2. 双特异性抗体基因克隆

[0096] 选择Freedom®pCH01.0ExpressionVector (简称pCH01.0, 购自Lifetechnologies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, pCH01.0-潮霉素表达载体是通过用潮霉素抗性基因替换pCH01.0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pCH01.0的表达载体上不同启动子下游, 将单链单元cDNA构建到pCH01.0-潮霉素的表达载体上。

[0097] 表1双特异性抗体基因克隆中使用的引物

[0098]

片段名称	引物名称	序列号	序列
抗-HER2LC	Kozak (EcoRV)F	1	GAGGAAGGATCTCGAGCTCAAGCTTGATATCGCCGCCACCATG
	MK-leader (EcoRV)F	2	CAATTGATATCGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTG CTC
	hIgK (PacI)R	3	CTTATCATGTCTGGATCGAAGCTTAATTAACACTCTCCCCTGTTGAAG
抗-HER2HC	Kozak (AvrII)F	4	CCCAGAGAGGAACGGTTCCGGGCCGCCTAGGGCCGCCACCATG
	MK-leader (AvrII)F	5	CAATTCCTAGGGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTG CTC
	hIgG1 (BstZ17I)R	6	CATAGAGTATAATATAGAGTATACACCTGCAGGTCATTTACCCGGAGACAGGGAG
抗-CD3ScFv-Fc	Kozak (AvrII)F	7	CCCAGAGAGGAACGGTTCCGGGCCGCCTAGGGCCGCCACCATG
	MK-leader (AvrII)F	8	CAATTCCTAGGGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTG CTC
	L2K-VII(MK)F1	9	GCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTCCAGGTTCCACTGGTGATCAAACCTGCAGC AGT
	hIgG1 (BstZ17I)R	10	CATAGAGTATAATATAGAGTATACACCTGCAGGTCATTTACCCGGAGACAGGGAG

[0099] 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 μ l的10 μ M正向引物和反向引物; 2.5 μ l的10xPCRBUFFER缓冲液; 1 μ l的10mM dNTP; 1 μ l的2.5单位/ μ l Pyrobest DNA聚合酶 (Takara, R005A); 和蒸馏水到25 μ l 总体积在200 μ 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Gene Amp 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。

[0100] 通过几轮重叠PCR扩增, 将Kozak序列、MK-leader及酶切位点EcoRV与PacI引入轻

链;以及相应的引物将Kozak序列、MK-leader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EcoRV与PacI酶切过的pCHO1.0表达载体进行同源重组,获得装入抗HER2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HER2的pCHO1.0表达载体,质粒命名为pCHO1.0-赫赛汀-HL-KKW。

[0101] 通过重叠PCR扩增抗CD3ScFv-Fc结构域,并将Kozak序列、MK-leader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pCHO1.0-潮霉素表达载体进行同源重组,获得装入抗CD3Scfv-Fc的表达载体,质粒命名为pCHO1.0-潮霉素-L2K-ScFv-Fc-LDY。

[0102] 实施例2:双特异性抗体表达与纯化

[0103] 1. 双特异性抗体的表达

[0104] 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CDFortiCHO培养基(Invitrogen,货号A11483-1)中,置于37℃,5%CO₂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MaxcyteSTX电转仪将质粒pCHO1.0-赫赛汀-HL-KKW与pCHO1.0-潮霉素-L2K-ScFv-Fc-LDY一起共转染到CHO-S细胞中,表达抗HER2×CD3的双特异性抗体M802。培养14天后,800Xg离心收获表达上清。

[0105] 2. 双特异性抗体的纯化

[0106] 表达上清用0.22μm滤膜过滤,利用MabselectSuRe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 NaH₂PO₄+40.5mM Na₂HPO₄,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 NaH₂PO₄+6.2mM Na₂HPO₄,pH6.0)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 NaH₂PO₄+6.2mM Na₂HPO₄+1M NaCl,pH6.0)20个柱体积线性洗脱;最后浓缩置换BufferPBS。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。

[0107] 实施例3:双特异性抗体与细胞的结合活性测定(FACS)

[0108] 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。

[0109] 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

[0110] 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4×10⁶个细胞/ml,细胞铺板于96孔板中,每孔50μl(2×10⁵个细胞),加入50μl稀释好的双特异性抗体,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IgGFC抗体(Biolegend,409304)重悬细胞,室温避光孵育30分钟,PBS洗两遍,再用100μlPBS重悬,上机检测,再以平均荧光强度,通过用软件GraphPadPrism5.0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HER2×CD3双抗体与HER2阳性的SK-BR-3细胞具有良好的结合活性,见图4。与HER2阳性细胞SK-BR-3结

合情况:M801的KD值是14.84nM,M802的KD值是10.61nM,赫赛汀的KD值是3.772nM。

[0111] 2.流式分析法检测双特异性抗体与Jurkat细胞的结合活性

[0112] 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100u1PBS重悬的细胞,上机检测,以平均荧光强度,通过用软件GraphPad Prism 5.0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:M801的KD值是7.25nM,M802的KD值是6.61nM,赫赛汀的KD值是0.39nM。

[0113] 3.双抗体介导的免疫细胞与肿瘤细胞的共结合实验

[0114] 将培养好的NCI-N87 (HER2阳性胃癌细胞,购自中国典型培养物保藏中心)和Jurkat细胞,离心收集并用PBS洗2遍,分别用CFSE和PKH-26染色。同时稀释M802至160nM。将染色好的NCI-N87和Jurkat细胞离心去上清,用PBS+1%FBS洗两遍,再加PBS+1%FBS重悬细胞至 4×10^6 个细胞/ml,按1:1混合均匀,将细胞铺板于96孔板中,每孔50u1 (2×10^5 个细胞),加入50u1稀释好的双特异性抗体,室温孵育1小时;离心去上清,用PBS洗细胞两遍,最后用100u1PBS重悬,上机(FC500,Beckman)检测,分析双阳性细胞的比率,通过用软件GraphPadPrism5.0进行分析计算。结果显示没有M802的情况下,流式检测双荧光的比例非常低(图6);在加入HER2×CD3双抗体M802的情况下,流式检测双荧光的比例达到26.3%,表明M802能同时结合HER2阳性的NCI-N87细胞和CD3阳性的Jurkat细胞,促进两种细胞的共结合(见图7)。

[0115] 实施例4:双特异性抗体的热稳定性测定

[0116] 1.双特异性抗体的热挑战性实验

[0117] 抗体用PBS稀释到0.5mg/mL,以50 μ L/管的规格分装到PCR管中,在PCR仪(ABI PCRsystem9700)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 Prism 5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。热变性曲线的温度中点值为 T_{50} 。

[0118] 单链抗体片段(ScFv)通过一个连接肽(Gly₄Ser)₃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 JS,etc.,Farrington GK,LugovskoyA,Joseph I,Bailly V,Wang X,Garber E,Browning J,Glaser SM.Anti-tumoractivity of stability-engineered IgG-like bispecific antibodies targeting TRAIL-R2and LTbetaR.MAbs.2009Mar-Apr;1(2):128-41.)。M802的单价单元与M801完全一致,两者与SK-BR-3结合的 T_{50} 也非常接近(图8),M802的 T_{50} =60.60 $^{\circ}$ C,M801的 T_{50} =57.97 $^{\circ}$ C;但是,M802的单链单元使用的是L2K的可变区,M801的单链单元使用的是人源化OKT3的可变区,与T细胞结合的 T_{50} 值差别较大(图9),M802的 T_{50} =59.98 $^{\circ}$ C,M801的 T_{50} =48.79 $^{\circ}$ C,M802热稳定性明显优于M801。

[0119] 实施例5:双抗体介导的体外细胞杀伤检测

[0120] 1. 人外周血单核细胞 (hPBMC) 细胞的分离

[0121] 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℃ 400g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℃400g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。

[0122] 2. 双抗体有效介导PBMC细胞杀伤HER2阳性肿瘤细胞检测

[0123] 用胰酶消化靶细胞 (包括HER2高表达的SK-BR-3乳腺癌细胞, HER2高表达的NCI-N87胃癌细胞, HER2低表达的MDA-MB-231乳腺癌细胞和HER2阴性的HEK-293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 2×10^5 /ml, 按照 2×10^4 /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min。弃上清, 各孔加入150μl1%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) 染色。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。

[0124] M802对HER2高表达的肿瘤细胞杀伤效果非常明显, 最高杀伤率达80%, 且使用剂量远低于赫赛汀和L2K (图10, 11); 对HER2低表达的肿瘤细胞也有显著杀伤, 且效果大大优于赫赛汀和L2K (图12)。但是, 对于HER2完全阴性的细胞, M802没有表现出杀伤效果 (图13)。说明M802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, 而对于HER2不表达的细胞基本不具有毒性。

[0125] 实施例6: 双特异性抗体杀伤皮下移植瘤的药效检测

[0126] CIK细胞的培养: 用CIK细胞启动培养液 (无血清X-Vivo细胞培养液+750IU/ml IFN- γ \pm 2%自体血浆) 将每份细胞补满30ml, 加到75cm²培养瓶中, 置于饱和湿度、37℃、5.0% CO₂培养箱培养。培养24小时后, 加入CIK细胞刺激因子混合液1ml (无血清X-Vivo细胞培养液+75ng/ml OKT3单抗 (自制)、750IU/ml白介素2 (IL-2)、0.6ng/ml白介素1 (IL-1 α)), 继续置于饱和湿度、37℃、5.0% CO₂培养箱内培养。接下来的步骤根据CIK细胞的生长情况决定补液 (无血清X-Vivo培养液+750IU/ml IL-2 \pm 2%自体血浆)、传代的事情, 基本上要维持细胞在 2×10^6 /ml左右的密度生长。最后用流式细胞仪FC500对收集的CIK细胞进行表型检测, 包括: CD3, CD56, CD4, CD8, 检测这些细胞表面抗原在CIK细胞的表达情况。

[0127] 肿瘤接种和CIK注射同时进行, 5×10^6 NCI-N87肿瘤细胞和 5×10^6 CIK细胞混合后注射于雌性NOD/SCID小鼠的右背侧。两小时内将小鼠随机分组 (小鼠8只/组), 通过尾静脉注射给药, 剂量分别为4、2和1mg/kg的M802。对照组为: (1) 给药剂量为4mg/kg的赫赛汀, (2) 给药剂量为4mg/kg的MC0101。MC0101也是MSBODY, 其单链单元与M802完全一致, 单价单元可变区为4420 (一种抗荧光素抗体, 见Kranz DM, Voss EW Jr., Partial elucidation of an anti-hapten repertoire in BALB/c mice: comparative characterization of several monoclonal anti fluorescyl antibodies. Mol Immunol. 1981; 18 (10): 889-898) 的可变

区。(3) 阴性对照组, 只注射PBS。给药当天为第0天。第2天和第4天继续给药, 剂量不变。每3天测量一次肿瘤的体积, 计算体积公式为 $1/2 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{宽} (\text{mm}^3)$ 。

[0128] 在图14中, 肿瘤细胞NCI-N87与免疫细胞CIK以相同的数量共同注射于雌性NOD/SCID小鼠皮下; 两小时后给药, 尾静脉注射; 给药后3天和5天再分别给药一次, 剂量不变, 每3天量瘤一次。图14显示, 不同剂量的M802给药显示出良好的抑制肿瘤生长的疗效, 其中2和4mg/kg给药剂量治疗组的所有小鼠(共16只)肿瘤在53天时完全被抑制甚至消失, 而1mg/kg给药剂量治疗组的小鼠部分肿瘤也完全抑制(3/8), 其余的5只小鼠也只有较小的瘤块存在($<150\text{mm}^3$)。对照组中, 赫赛汀治疗组肿瘤被抑制, 在44天后有少量生长; MC0101治疗组肿瘤没有抑制, 瘤块体积达到 300mm^3 。阴性组的肿瘤生长情况正常, 53天时达到 800mm^3 左右。

[0129] 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。

[0130] 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, 在本文中所述的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HER2XCD3的构建及应用

<160> 18

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> 人源

[0001]

<400> 1

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

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

[0002] 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 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

[0003]

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

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

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

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

	275		280		285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg					
	290		295		300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys					
	305		310		315
					320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu					
		325		330	335
[0004]					
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr					
	340		345		350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu					
	355		360		365
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp					
	370		375		380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val					
	385		390		395
					400

[0005]

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

405

410

415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420

425

430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435

440

445

Gly Lys

450

<210> 2

<211> 1353

<212> DNA

<213> 人源

<400> 2

gaagtgcagc tggtgaaaag cggcggcggc ctggtgcagc cggcgggac cctgcgcctg 60

agctgcgcgg cgagcggcctt taacattaaa gatacctata ttcattgggt gcgccagcgc 120

ccgggcaaaag gcctggaatg ggtggegccc attatccga ccaacggcct tacccgctat 180

[0006]

gcggatagcg tgaaggccg ctttaccatt agcgcggata ccagcaaaaa caccgcgtat 240
 ctgcagatga acagcctgcg cgcggaagat accgcggtgt attattgcag ccgctggggc 300
 ggcgatggct tttatgcgat ggattattgg ggccagggca cctggatgac cgtgagctca 360
 gcctccacca agggcccata ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
 ggcacagcgg ccttgggctg cctggtaag gactacttc cgaaccggt gacggtgtcg 480
 tggaactcag gcgcccagc cagcggcgtg cacaccttc cggctgtct acagtcctca 540
 ggactctact ccctcagcag cgtggtagcc gtgcccctca gcagctggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 720
 ccgtcagttt tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcattgatct ccggacccct 780
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtaaa gttcaactgg 840
 tacgtggaag gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
 agcacgtacc gtgtggctag cgtctcacc gtctgcacc aggactgget gaatggcaag 960
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccattgagaa aaccatctcc 1020


```

aaagccaaaag ggcagccccc agaaccacag gigtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag ccctgggtgc ctggcacaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagaggca tgggcagccg gagaacaact acgataccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcgatctca ccgtggacaa gaggcaggtg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgtctccgtg atgatgagg ctctgcacaa ccactacag 1320
cagaagagcc tctccctgtc tcgggtaaa tga 1353

```

[0007] <210> 3
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人源

<400> 3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[0009]

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 4

<211> 645

<212> DNA

<213> 人源

<400> 4

gatattcaga tgaccagag cccgtcaagc ttaagegaga gcgigggaga tcgcgtgacc 60

attacctgcc gcgcgagcca ggaigigaac accgcggtgg cgtgglatea gcagaaaccg 120

ggcaaaagcgc cgaaactgct gatttatagc gcgagctttc tgtatagcgg cgtgccgagc 180

[0010]

cgetttagcg gcagecgcag cggcacegat tttaacctga ccattagcag cctgcagccg 240
 gaagattttg cgacctatta ttgccagcag cattataca cccgcgcgac ctttggccag 300
 ggtaccaaag tggaaattaa acgaactgtg gctgcacct ctgtcttcat ctcccgcga 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttggtt gcttctgaa taacttetat 420
 ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcaactaca gcctcagcag caacctgacg 540
 ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gegaagtcac ccatacgggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gacttcaac aggggagagt gtag 645

<210> 5

<211> 476

<212> PRT

<213> 人源

<400> 5

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

[0011]

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

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

130	135	140
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser		
145	150	155
Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser		
	165	170
		175
Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro		
	180	185
		190
[0012]		
Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile		
195	200	205
Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp		
210	215	220
Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
225	230	235
		240
Gly Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
	245	250
		255

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

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

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

[0013]

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 305 310 315 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 325 330 335

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

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

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

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

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

[0014] Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser
 420 425 430

Phe Phe Leu Ala Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 435 440 445

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

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

	<210> 6	
	<211> 1431	
	<212> DNA	
	<213> 人源	
	<400> 6	
	gacatcaaac tgcagcagtc aggggcctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg	60
	tectgcaaga ctctctggcta cacctttaet aggtacacga tgcactgggt aaaaacagagg	120
	cttggacagg gtctggaatg gatiggatac attaatccta gccgtggta tactaattac	180
	aatcagaagt tcaaggacaa gaccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac	240
[0015]	atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tetgcagtet attactgtgc aagatattai	300
	gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagi ctctccagga	360
	ggcggcggtt caggcggagg tggaaagtgt ggaggagggt ctgacattca gctgaccag	420
	tctccagcaa teatgtctgc atctccaggg gagaaggcca ccatgacctg cagagccagt	480
	tcaagtgtaa gttacatgaa ctggtaccag cagaagtcag gcacctccc caaaagatgg	540
	atttatgaca catccaaagt ggcttctgga gtccttato gcttcagtgg cagtgggtct	600
	gggacctcat actctctcac aatcagcagc atggaggctg aagatgcctg cacttattac	660
	tgccaacagt ggagtagtaa cccgctcagc ttctggtctg ggaccaagct ggagctgaaa	720

[0016]

```

ggtgcggccg cagagcccaa atcttgtagc aaaactcaca catgeccacc gigeccagca 780
ectgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacecaa ggacaccctc 840
atgatctccc ggacccttga gtcacatgc ggggtggtgg acgtgagcca cgaagacct 900
gaggicaagt tcaactggta cgtggacggc ggggaggige ataatgccc gacaaagccg 960
cgggaggagc agtacaacag cacgtacct ggggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag 1020
gactggctga atggcaagga gtacaaggc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 1080
atcgagaaaa ccctctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaacctg 1140
ccccatccc gggatgaget gaccaagaac caggtcagcc tgacctgccc ggtcaaaagc 1200
ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1260
aagaccagc cteccgtget gaagtcagc ggctcttct tctctgccc caagctcacc 1320
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1380
ctgcacaacc actacacgca gaagagctc tccctgtctc cgggtaaatg a 1431

```

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

[0018]

<210> 10

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

caattgatat cgcgcgcacc atggagacag acacactcct gctatgggia ctgctgctc 59

<210> 11

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

cttatcatgt ctggatcgaa gcttaattaa ctaacacctt cccctgttga ag 52

<210> 12

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

cccgaggagg aacggttccg ggccgcctag ggccgcacc atg 43

<210> 13

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13

caattcctag ggccgccacc atggagacag acacactcct gctatgggta ctgtgctc 59

<210> 14

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

[0019] catagagtat aatatagagt atacacctgc aggtcattta cccggagaca gggag 55

<210> 15

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 15

cccgaggaggaacggttccg ggcgcctag ggccgccacc atg 43

<210> 16

<211> 59

<212> DNA

[0020]

<213> 人工序列

<400> 16

caattcctag ggccgccacc atggagacag acacactct gctatgggta ctgctgctc 59

<210> 17

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 17

gctatgggta ctgctgctct ggattccagg ttcactggt gatateaac tgcagcagt 59

<210> 18

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 18

catagagtat aatataagat atacacctgc aggtcattta cccggagaca gggag 55

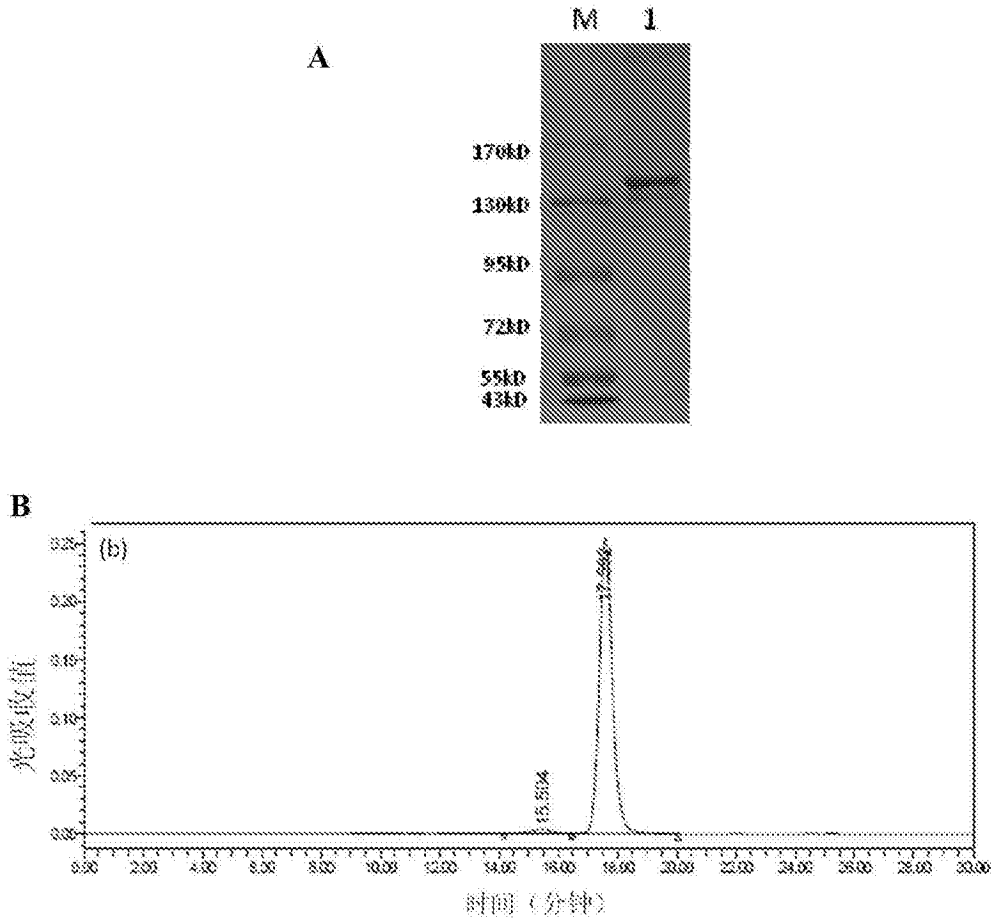


图3

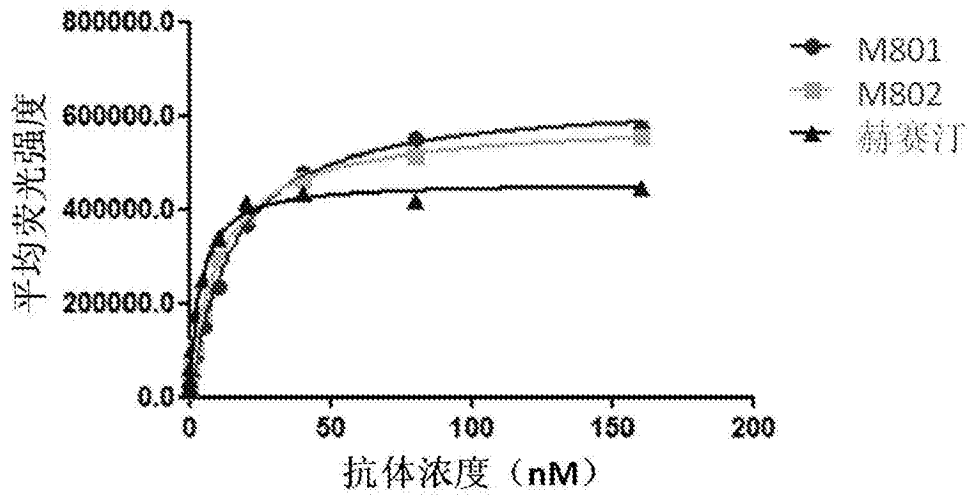


图4

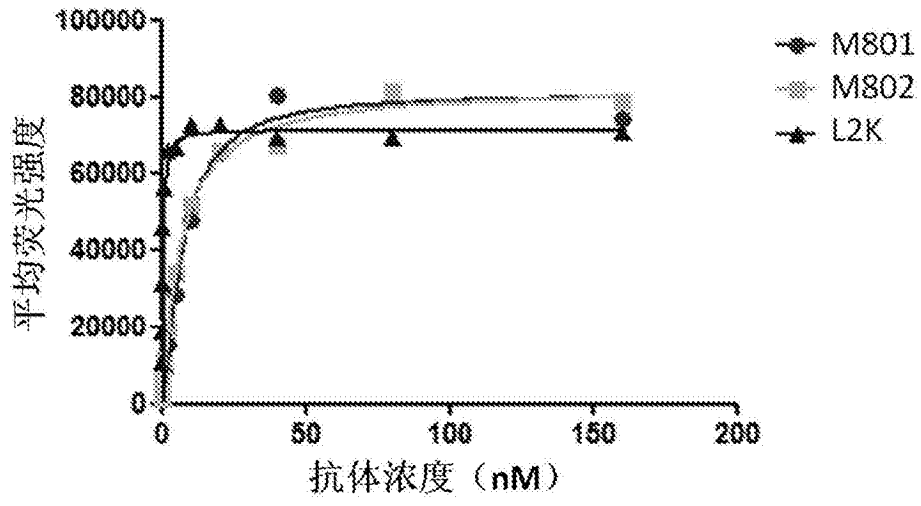


图5

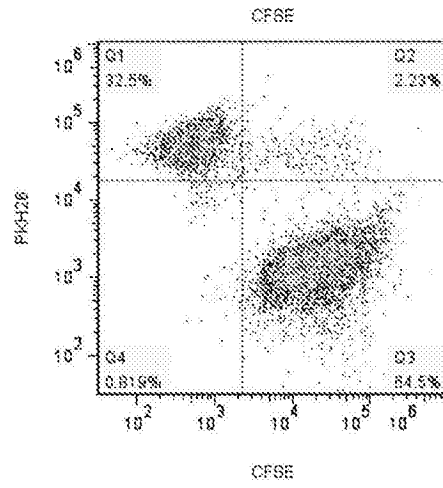


图6

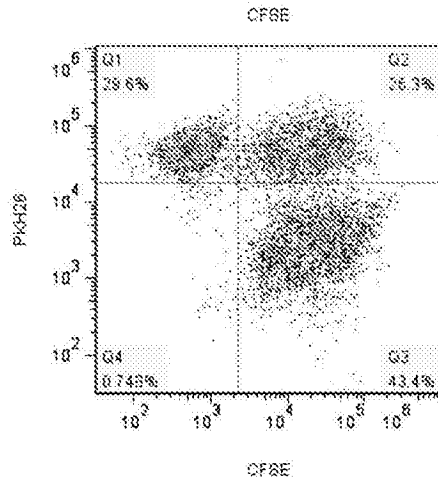


图7

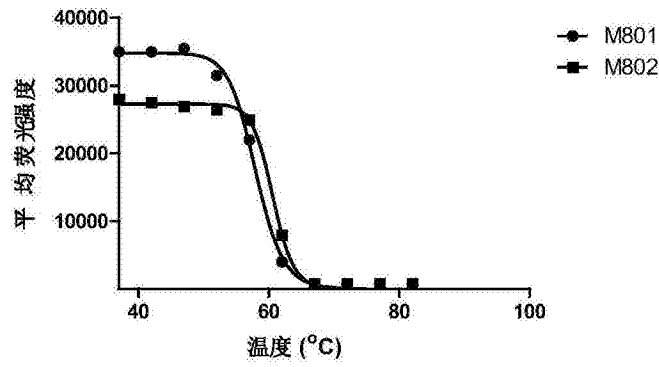


图8

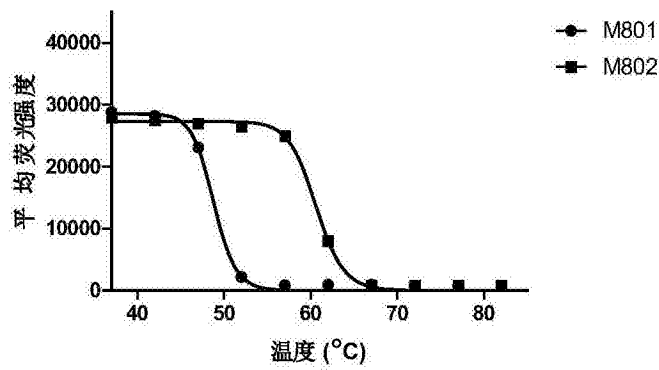


图9

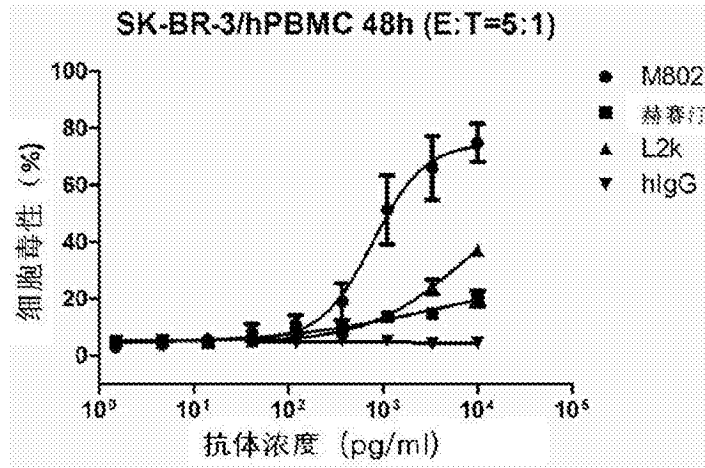


图10

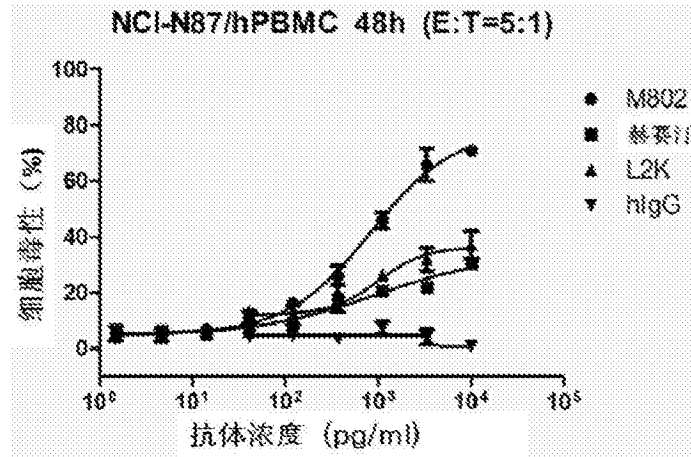


图11

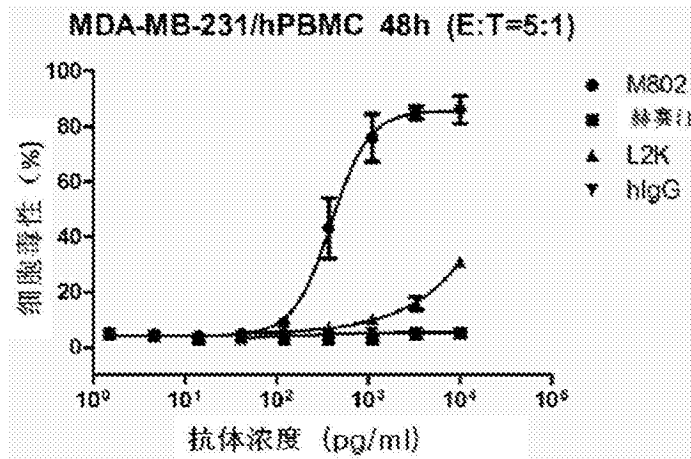


图12

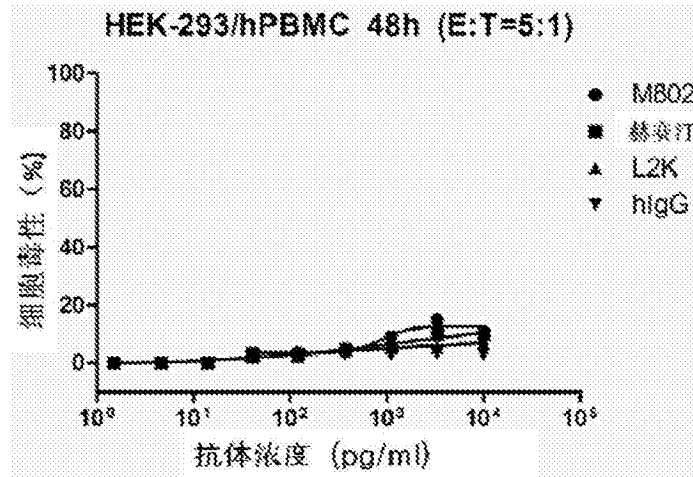


图13

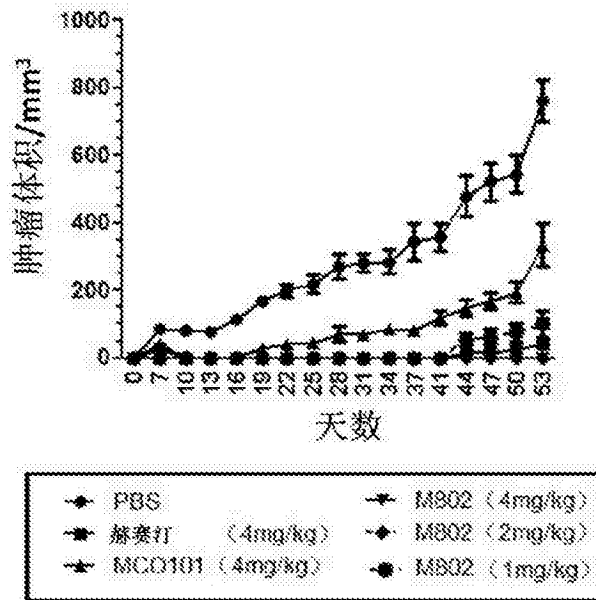


图14