

序列表36页 附图49页

Ybaf Korak

1 H E T E L L L V L L L L L V L V P S T G
2 A R R G A C C A G C A T C G C T G T G T G A G T C T C T G C T G C T T G G C A G C A G A G A
3 信号肽
4 P I N T O T G S F L S E A S V G D R V T
5 G A G C A T C A G T A C A C A G A C C T T A G T C T C A G A G T T C C G T T G G A G A T A G G G T A C C
6 V Z
7 I T C R T R S R I S Q T L A N Y Q K Q P
8 A T C A C A G C G T G A C C T A G T T C C C A C T C C T G G T A C T G C G A G A G C C
9
10 G V P F K L I Y S T S L T L Q S G V R
11 G C A A C C C A C C T G T C A T T A T A G T A G G C A A C C T G C A A G C G A G T T C T T C
12
13 R F S G S G S G T D A S S L S L Q F
14 C G S T T T C C G A C T G G C T G G C A A G C A G T T A C C T G A C C T T C C A G C T G A C G C
15
16 E D V A T Y C Q Q H N E N F L T F S G
17 G A G A T C G T G C A C T A C T A C T G C A G A C A A G A A C C C T G A C T T C G C G G G
18
19 T K R V E I G G S G S G G G V Q V L F
20 G A C C A A C T G C A G A C A A G A T A G A G G T G G A G A G A G C A T G A G T G T C
21 底链子
22 Q S G A E G A T V E C K V S
23 C A A T G G C C G A G A A A G C G C A G T G C A C C T G A A G T C A G C A A G G T G C C
24
25 G N E D Y H N V Q A F K K L
26 G E T T C A C A T A G A G G A C C T A T A T G T G G G T G A G C A A C C C C G A A A A G C G T T
27
28 E N N G T F N D N D T L Y A E L S
29 G S T G S A T G G A C G A T G A C C T G C A A G C A C A C A C A T A T G C T T C A A G T T C G A
30
31 G R V T Y A D S T A T A T T A T A E L L S
32 G C A A S T T C A C A T C C C A C C A G C A G C A C A C A T T A T A T T A G T T G A T T C T C C
33
34 L R S E D A V Y V C A R G Y G Y V F
35 C T C G T C C A G A G T A C C G T C T A C T A G C A G G A G G G G T A G G C A T G C G T G T T
36
37 D N M G Q T V L V S S G G
38 G A C C T G A G G A C G G G A C C C T G S T A C A S G T G C A G A A G G T G C
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

sagitt SEQ ID NO:170

1. 一种微抗体,所述微抗体包括通过铰链序列与人IgG C_H3域连接的scFv,所述scFv从N端到C端按顺序包括:

如SEQ ID NO: 42所示的V_L;

如SEQ ID NO: 36所示的连接子;以及

如SEQ ID NO: 48所示的V_H,

其中所述微抗体与CD8特异性地结合。

2. 根据权利要求1所述的微抗体,包括含有与SEQ ID NO: 20有至少85%同一性的氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列包括:

所述scFv;

所述人IgG C_H3域;以及

将所述scFv与所述人IgG C_H3域直接连接的所述铰链序列,

其中所述多肽在所述N端不包含信号序列。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的微抗体,进一步包括通过螯合基团与所述微抗体结合的可检测的标记物。

4. 根据权利要求3所述的微抗体,其中所述可检测的标记物包括⁸⁹Zr并且其中所述螯合基团包含去铁胺。

5. 根据权利要求3所述的微抗体,其中所述可检测的标记物包括¹⁸F。

6. 一种编码权利要求1和2中任一项的微抗体的核酸。

7. 一种产生权利要求1和2中任一项的微抗体的细胞系。

8. 一种试剂盒,包括:

权利要求1和2中任一项的微抗体、权利要求6的核酸、或者权利要求7的细胞系的细胞中的至少一种;以及

可检测的标记物。

与CD8的抗原结合构建体

[0001] 本申请是申请日为2014年3月10日,申请号为201480024657.X,发明名称为“与CD8的抗原结合构建体”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2013年3月13日提交的美国临时申请号61/780,286的权益,其通过引用以其全部内容并入。

[0004] 对序列列表、表格或计算机程序列表的引用

[0005] 本申请与以电子格式的序列列表一起提交。序列列表提供为于2014年2月28日创建的名称为SeqListIGNAB014W0.txt的文件,其大小为68,230字节。在电子格式的序列列表中的信息通过引用以其全部内容并入本文。

技术领域

[0006] 本文描述的实施方式总体涉及与CD8结合的抗原结合构建体,如抗体,包括抗体片段(如微抗体、cys-双价抗体(cys-diabodies)、scFv),以及应用它们的方法。

背景技术

[0007] CD8(分化抗原簇8)是跨膜糖蛋白,其是T细胞(其包括细胞毒性T细胞)亚类的特异性标记物。CD8聚集体(assemblies)为CD8 α 和CD8 β 亚基的异二聚体或为CD8 α 同源二聚体。聚集的二聚CD8复合物作为与T细胞受体(TCR)一起的共受体来识别通过MHC类型I细胞的抗原提呈。CD8在T-细胞发育和活化成熟T-细胞中发挥作用。T-细胞定位的改变能反映免疫应答的进程并能随时间出现。

发明内容

[0008] 本文提供的一些实施方式涉及抗原结合构建体,如包括抗体片段的抗体,其包括SEQ ID NO:3或6中的HCDR1序列的HCDR1(“重链互补决定区1”);SEQ ID NO:3或6中的HCDR2序列的HCDR2(“重链互补决定区2”);SEQ ID NO:3或6中的HCDR3序列的HCDR3(“重链互补决定区3”);SEQ ID NO:9中的LCDR1序列的LCDR1(“轻链互补决定区1”);SEQ ID NO:9中的LCDR2序列的LCDR2(“轻链互补决定区2”);以及SEQ ID NO:9中的LCDR3序列的LCDR3(“轻链互补决定区3”)。在一些实施方式中,抗原结合构建体与CD8特异性地结合。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括如本文中描述的可检测的标记物。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括如本文中描述的治疗剂。

[0009] 本文中所提供的一些实施方式涉及与CD8结合的人化cys-双价抗体。人化cys-双价抗体可以包括含有以下的多肽:从N端到C端:包括与可变轻链(V_L)域(结构域,domain)连接的可变重链(V_H)域的单链可变片段(scFv);以及C-端半胱氨酸。

[0010] 本文中所提供的一些实施方式涉及与CD8结合的人化微抗体。人化微抗体可以包括含有以下的多肽:从N端到C端:包括与可变轻链(V_L)域连接的可变重链(V_H)域的单链可变片段(scFv);包括人IgG1或IgG2铰链区的铰链-延伸域(hinge-extension domain);以及人

IgG C_H3序列。在一些实施方式中,较链延伸域包括天然(原始,native)IgG2较链序列,例如包括SEQ ID NO:55的IgG2较链序列的较链序列。在一些实施方式中,较链延伸域包括人工IgG2较链序列,例如包括SEQ ID NO:79的较链序列的较链序列。

[0011] 本文中所提供的一些实施方式涉及编码如本文所描述的抗原结合构建体,例如CD8抗体或抗体片段的核酸。

[0012] 本文中所提供的一些实施方式涉及产生如本文所描述的抗原结合构建体,例如CD8抗体或抗体片段的细胞系。

[0013] 本文中所提供的一些实施方式涉及一种试剂盒。该试剂盒可以包括如本文所描述的抗原结合构建体,例如CD8抗原结合片段。在一些实施方式中,该试剂盒包括可检测的标记物。

[0014] 本文中所提供的一些实施方式涉及检测CD8存在或不存在的方法。该方法可以包括将如本文所描述的抗原结合构建体,例如CD8抗体结合构建体施加至样品。该方法可以包括检测抗原结合构建体与CD8的结合或不结合。在一些实施方式中,该方法在体内进行。在一些实施方式中,该方法在体外进行。在一些实施方式中,该方法的部分在体内进行,而该方法的部分在体外进行。

[0015] 本文中所提供的一些实施方式涉及将治疗剂靶向至CD8的方法。该方法可以包括给予受试者如本文所描述的抗原结合构建体,例如CD8抗体或抗体片段。在一些实施方式中,抗原结合构建体与治疗剂结合。

附图说明

[0016] 图1A图例说明微抗体与CD8二价结合的图解的一些实施方式。

[0017] 图1B图例说明微抗体的图解的一些实施方式。

[0018] 图1C提供CD8 α 的实例。

[0019] 图2A图例说明鼠OKT8可变重链(V_H)区比对人抗体和人化V_H区(huOKT8构建体)的一些实施方式。CDR区的一些实施方式(Chothia)由所框区指示。

[0020] 图2B图例说明鼠OKT8可变轻链(V_L)区比对人化V_L区和huOKT8构建体的一些实施方式。CDR区(Chothia)的一些实施方式由所框区指示。

[0021] 图3A图例说明显示与抗原二价结合的cys-双价抗体的图解的一些实施方式。

[0022] 图3B图例说明显示与抗原二价结合的cys-双价抗体的图解。

[0023] 图4图例说明嵌合OKT8微抗体V_L-V_H序列的一些实施方式。

[0024] 图5图例说明嵌合OKT8微抗体V_H-V_L序列的一些实施方式。

[0025] 图6图例说明人化OKT8微抗体V_L-V_H序列的一些实施方式。

[0026] 图7图例说明人化OKT8微抗体V_H-V_L序列的一些实施方式。

[0027] 图8图例说明人化OKT8 cys-双价抗体V_L-5-V_H序列的一些实施方式。

[0028] 图9图例说明人化OKT8 cys-双价抗体V_H-5-V_L序列的一些实施方式。

[0029] 图10图例说明人化OKT8 cys-双价抗体V_L-8-V_H序列的一些实施方式。

[0030] 图11图例说明人化OKT8 cys-双价抗体V_H-8-V_L序列的一些实施方式。

[0031] 图12A描绘cys-双价抗体的序列的一些实施方式。

[0032] 图12B描绘微抗体的序列的一些实施方式。

- [0033] 图12C描绘 V_L 的序列的一些实施方式。
- [0034] 图12D描绘 huV_L 的序列的一些实施方式。
- [0035] 图12E描绘 V_H 的序列的一些实施方式。
- [0036] 图12F描绘 huV_H 的序列(来自版本1的版本“a”)的一些实施方式。
- [0037] 图12G描绘 huV_H 的序列(来自版本1的版本“b”)的一些实施方式。
- [0038] 图12H描绘 huV_H 的序列(来自版本2的版本“c”)的一些实施方式。
- [0039] 图12I描绘 huV_H 的序列(来自版本2的版本“c”)的一些实施方式。
- [0040] 图13图例说明 $pcDNA^{TM}3.1/myc-His(-)$ 版本A、B、C的载体图。
- [0041] 图14图例说明检测目标存在或不存在的方法的一些实施方式。
- [0042] 图15图例说明嵌合和人化OKT8微抗体的蛋白印迹(western blot)分析。
- [0043] 图16是通过ELISA显示IAb_Mb_CD8变体与纯化的rhCD8结合的图。
- [0044] 图17A-图17D描绘来自IAb_Mb_CD8变体的流式细胞术分析的结果。
- [0045] 图18A和图18B是人化OKT8微抗体的蛋白印迹(western blot)凝胶的描绘图。
- [0046] 图19是通过ELISA显示IAb_Mb_CD8表达分析的图。
- [0047] 图20是通过ELISA描绘IAb_Mb_CD8变体A和B与rhCD8结合的图。
- [0048] 图21是通过ELISA描绘IAb_Mb_CD8变体C和D与rhCD8结合的图。
- [0049] 图22A和图22B是显示IAb_Mb_CD8变体A和B的流式细胞术分析的图。
- [0050] 图23A和图23B是显示IAb_Mb_CD8变体C和D的流式细胞术分析的图。
- [0051] 图24描绘IAb_Cys-Db3b_CD8变体的蛋白印迹(western blot)分析的图像。
- [0052] 图25是通过ELISA描绘IAb_Cys-Db3b_CD8变体与rhCD8的结合的图。
- [0053] 图26A和图26B显示IAb_Cys-Db3b_CD8变体的流式细胞术分析。
- [0054] 图27是一系列描绘IAb_Cys-Db3b_CD8变体的流式细胞术分析的图。
- [0055] 图28是描绘根据本文中的一些实施方式的OKT8构建体的流式细胞术分析的图。
- [0056] 图29A是描绘根据本文中的一些实施方式的IAb M1b CD8和IAb M2b CD8构建体的流式细胞术分析的图。
- [0057] 图29B是描绘根据本文中的一些实施方式的IAb M1b CD8和IAb M2b CD8构建体的流式细胞术分析的图。
- [0058] 图29C是描绘根据本文中的一些实施方式的IAb M1b CD8和IAb M1b CD8-Df构建体的流式细胞术分析的图。
- [0059] 图29D是描绘根据本文中的一些实施方式的IAb M1b CD8和IAb M1b CD8-Df构建体的流式细胞术分析的图。
- [0060] 图29E是描绘根据本文中的一些实施方式的IAb M1b CD8、IAb_M1bCD8 IgG2 EH, 和IAb M1b CD8 IgG2 NH构建体的流式细胞术分析的图。
- [0061] 图30A是描绘根据本文中的一些实施方式的IAb_CysDb3b_CD8构建体的流式细胞术分析的图。
- [0062] 图30B是描绘根据本文中的一些实施方式的IAb_CysDb3b_CD8构建体的流式细胞术分析的图。
- [0063] 图30C是描绘根据本文中的一些实施方式的IAb_CysDb3b_CD8和IAb_Cys-Db3b_CD8-Df构建体的流式细胞术分析的图。

[0064] 图31是一系列用根据本文中的一些实施方式的⁸⁹Zr-Df-IAb_Cys-Db3b_CD8构建体标记的小鼠的PET图像。

[0065] 图32A是一系列用根据本文中的一些实施方式的⁸⁹Zr-Df-IAb_M1b_CD8构建体标记的小鼠的冠面(冠状面,coronal)MIP PET/CT的叠加图像。

[0066] 图32B是与描绘离体肿瘤的标记的图并列的表,该离体肿瘤用根据本文中的一些实施方式的⁸⁹Zr-Df-IAb_M1b_CD8构建体标记。

[0067] 图33是一系列用根据本文中的一些实施方式的⁶⁴Cu-NODAGA-IAb_M1B_CD8 IgG2 EH(Cys)构建体标记的小鼠的MIP图像。

具体实施方式

[0068] 本文所描述的是其与目标分子CD8结合的抗原结合构建体,包括抗体及其片段,如cys-双价抗体和微抗体。这样的抗原结合构建体可以用于检测目标分子(CD8和/或CD8+细胞,例如,T-细胞的某些种类)的存在、定位和/或数量。这样的抗原结合构建体还能够用于将治疗剂靶向至表达目标分子的细胞。在一些实施方式中,提供用于利用抗原结合构建体(包括抗体,及构建体如cys-双价抗体和/或微抗体)检测目标分子(或“靶标”)存在或不存在的方法。在一些实施方式中,提供利用抗原结合构建体用于治疗目的的方法。

[0069] 定义及各种实施方式

[0070] “治疗”或“处理”疾病可以是指预防疾病(病症,condition)、减缓疾病发作和/或发展速度、减少疾病发展的风险、预防和/或延迟与疾病相关的症状、减少或结束与疾病相关的症状、产生疾病完全或部分的消退,或其一些的组合。术语“预防”不要求障碍或疾病的绝对禁止。

[0071] “治疗有效量”或“治疗有效剂量”是在受试者中产生需要的治疗效果的数量,如预防、治疗目标疾病,延迟紊乱和/或症状的发作,和/或缓解与疾病相关的症状。该量将根据各种因素而变化,这些因素包括但不限于治疗化合物的特性(包括活性、药代动力学、药效动力学,以及生物利用度)、受试者的生理状态(包括年龄、性别、疾病类型和阶段、一般身体状况、对给予剂量的响应性,以及药物治疗类型)、制剂中药用载体或多种载体的性质,和/或给药途径。考虑本披露,在临床和药理学领域的技术人员将能够通过常规实验来确定治疗有效量,例如,通过监测受试者对所给予化合物的应答并据此调整剂量。对于另外的指导原则,见Remington:The Science and Practice of Pharmacy 21.sup.st Edition, Univ.of Sciences in Philadelphia(USIP),Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia,Pa.,2005。

[0072] 术语“抗原结合构建体”包括各种各样的抗体,包括其结合片段。进一步包括的为包括1、2、3、4、5和/或6个CDR的构建体。在一些实施方式中,这些CDR能在常规抗体中在它们适当的框架区之间分散。在一些实施方式中,CDR能被包含在重和/或轻链可变区内。在一些实施方式中,CDR可以在重链和/或轻链内。在一些实施方式中,CDR可以在单肽链内。在一些实施方式中,CDR可以在共价连接在一起的二肽或多肽内。在一些实施方式中,它们可以通过二硫键共价连接在一起。在一些实施方式中,它们可以经连接分子或半体(部分,moiety)来连接。在一些实施方式中,抗原结合蛋白是非共价的,如二价抗体和单价scFv。如非本文中另外表示,本文所描述的抗原结合构建体与提到的目标分子结合。术语“靶标”或“目标分

子”表示CD8蛋白。CD8蛋白的实例是本领域中已知的,并包括,例如SEQ ID NO:24的CD8蛋白,图1C。

[0073] 术语“抗体”包括,但不限于,基因工程的或另外修饰的形式的免疫球蛋白,如胞内抗体、嵌合抗体、完全人抗体、人化抗体、抗体片段,和缀合抗体(例如,双特异性抗体、双价抗体、三价抗体、四价抗体等)。术语“抗体”包括cys-双价抗体和微抗体。因此,除非明确表示否则,本文中提供的关于“抗体”的每种或各种实施方式也设想为cys-双价抗体和/或微抗体实施方式。术语“抗体”包括免疫球蛋白家族的多肽或包括能可逆地非共价地以特异性方式结合相应抗原的免疫球蛋白片段的多肽。一种示例性抗体结构单元包括四聚物。在一些实施方式中,全长抗体可以由两个完全相同的多肽链对组成,每对有一个“轻”链和“重”链,通过二硫键连接。识别的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ ,和 μ 恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。对于全长链,轻链分类或为 κ 或 λ 。对于全长链,重链分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ ,或 ϵ ,其进而分别定义免疫球蛋白类型IgG、IgM、IgA、IgD,和IgE。每种链的N-端定义约100到110或更多氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别是指轻链和重链的这些区。如在本申请中所使用的,“抗体”包括抗体和其抗体片段的所有变体。因此,在该概念的范围为全长抗体、嵌合抗体、人化抗体、单链抗体(scFv)、Fab、Fab',以及这些片段的具有相同结合特异性的多聚形式(version)(如 $F(ab')_2$)。在一些实施方式中,抗体与期望的靶标特异性地结合。

[0074] “互补决定域”或“互补决定区”(“CDR”)互换地是指 V_L 和 V_H 的高度可变区。CDR是抗体链的靶蛋白结合位点,拥有对这些靶蛋白的特异性。在一些实施方式中,在各个 V_L 和/或 V_H 中有三个CDR(CDR1-3,从N端顺序编码),构成约15-20%的可变域。CDR结构上与靶蛋白的表位互补并因此直接负责结合的特异性。 V_L 或 V_H 剩余的延伸链,也称为框架区(FR),在氨基酸序列中显示较少变化(Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000)。

[0075] 可以利用本领域中各种熟知的定义确定CDR和框架区的位置,如Kabat (Wu, T.T., E.A. Kabat. 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J. Exp. Med. 132:211-250; Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K., and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242, Bethesda, MD)、Chothia (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:877-883 (1989); Chothia et al., J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol., 273:927-748 (1997))、ImMunoGeneTics数据库(IMGt)(见全球网(worldwide web)在imgt.org/上)、Giudicelli, V., Duroux, P., Ginestoux, C., Folch, G., Jabado-Michaloud, J., Chaume, D. and Lefranc, M.-P. IMGt/LIGM-DB, the **IMGt**® comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences Nucl. Acids Res., 34, D781-D784 (2006), PMID:16381979; Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, G., IMGt unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003). PMID:12477501;

Brochet, X., Lefranc, M.-P. and Giudicelli, V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis Nucl. Acids Res, 36, W503-508 (2008); AbM (Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); 接触定义 (the contact definition) (MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996)), 和/或自动建模和分析工具 (the automatic modeling and analysis tool) Honegger A, Plückthun A. (全球网在 bioc.uzh.ch/antibody/Numbering/index.html)。

[0076] 术语“结合特异性决定簇 (binding specificity determinant)”或“BSD”互换地是指在于互补决定区内用于确定抗体的结合特异性所必须的最小连续或非连续氨基酸序列。最小结合特异性决定簇可以在一个或多个 CDR 序列内。在一些实施方式中, 最小结合特异性决定簇处于 (即, 只决定于) 抗体的重链和轻链的 CDR3 序列的部分或全长内。在一些实施方式中, 重链可变区的 CDR3 是足够用于抗原结合构建体特异性的。

[0077] 如本文中所用的“抗体可变轻链”或“抗体可变重链”是指分别包含 V_L 或 V_H 的多肽。内源 V_L 由基因区段 V (可变) 和 J (连接) 编码, 而内源 V_H 由 V、D (多态性) 和 J 编码。 V_L 或 V_H 各自包括 CDR 以及框架区。在本申请中, 抗体可变轻链和/或抗体可变重链有时可以统称为“抗体链”。作为本领域技术人员将易于识别的, 这些术语包括包含突变的不破坏 V_L 或 V_H 的基本结构的抗体链。在一些实施方式中, 考虑全长重链和/或轻链。在一些实施方式中, 仅考虑存在重链和/或轻链的可变区。

[0078] 抗体可以作为完整的免疫球蛋白或许多由各种肽酶消化产生的片段存在。因此, 例如, 胃蛋白酶在铰链区中二硫键以下消化抗体来产生 $F(ab)'_2$, 为 Fab' 的二聚体, Fab' 自身是通过二硫键连接 V_H-C_H1 的轻链 (V_L-C_L)。 $F(ab)'_2$ 可以在温和条件下还原以破坏在铰链区中的二硫键, 由此将 $F(ab)'_2$ 二聚体转化成 Fab' 单体。 Fab' 单体是带有部分铰链区的 Fab (Paul, Fundamental Immunology 3d ed. (1993))。而以消化完整抗体方面定义各种抗体片段, 技术人员将理解这样的片段可以化学地或者通过利用重组 DNA 的方法从头合成。因此, 术语“抗体”, 如本文所使用的, 也包括或由修饰整个抗体所产生的或这些利用重组 DNA 方法从头合成的 (如单链 Fv) 或这些利用噬菌体展示库识别的抗体片段 (见, 如, McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990))。

[0079] 可以使用本领域中任何已知的技术来制备单克隆或多克隆抗体 (见, 如, Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96. Alan R. Liss, Inc. 1985; Advances in the production of human monoclonal antibodies Shixia Wang, Antibody Technology Journal 2011:11-4; J Cell Biochem. 2005 Oct 1; 96 (2): 305-13; Recombinant polyclonal antibodies for cancer therapy; Sharon J, Liebman MA, Williams BR; 和 Drug Discov Today. 2006 Jul, 11 (13-14): 655-60, Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics?, Haurum JS)。可以采用用于产生单链抗体的技术 (U.S. 专利号 4,946,778) 以产生本发明的抗体至多肽。而且, 可以使用转基因小鼠, 或其他生物体如哺乳类以表达全人单克隆抗体。可替换地, 可以使用噬菌体展示技术以识别与所选抗原高亲和力的结合体 (binders) (见, 例如, McCafferty et al., 同上; Marks et al., Biotechnology, 10:779-783, (1992))。

[0080] 用于人化或优化非人抗体的方法在本领域中是熟知的。通常,人化抗体具有引入进来自非人来源的抗体一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基经常是指为输入残基(import residues),其典型地取自输入可变域(import variable domain)。在一些实施方式中,可以采用术语“供体”和“受体”序列。人源化基本上可以按照Winter和合作者的方法通过用人抗体的相应序列取代啮齿动物的CDR或CDR序列来进行(见,如,Jones et al., Nature 321:522-525(1986);Riechmann et al., Nature 332:323-327(1988);Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536(1988)和Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992))。因此,这样的人化抗体是嵌合抗体(U.S. 专利号4,816,567),其中基本上少于完整人可变区由来自非人类物种的相应序列代替。在实践中,人化抗体是其中一些互补决定区(“CDR”)残基和可能的一些框架(“FR”)残基由来自啮齿动物抗体中的相似位点的残基取代的人抗体。

[0081] “嵌合抗体”是抗体分子,其中恒定区或其部分被改变、替换或交换,以致抗原结合位点(可变区)与不同或改变的类别、效应功能和/或种类的恒定区,或赋予嵌合抗体新的性质的完全不同的分子如酶、毒素、激素、生长因子和药物连接;或(b)可变区或其部分,用具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。

[0082] 抗体进一步包括一种或多种与其他蛋白化学连接或表达为与其他蛋白的融合蛋白的免疫球蛋白链。在一些实施方式中,抗原结合构建体可以是单价scFv构建体。在一些实施方式中,抗原结合构建体可以是双特异性构建体。双特异性或双功能的抗体是具有两种不同重/轻链对和两种不同结合位点的人工杂交抗体。本发明的其他抗原-结合片段或抗体部分包括二价scFv(双价抗体)、抗体分子识别两种不同表位的双特异性scFv抗体、单结合域(sdAb或纳米抗体),和微抗体。

[0083] 术语“抗体片段”包括,但不限于一种或多种单独的或与其他分子结合的抗体的抗原结合片段,包括,但不限于Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG(还原的IgG)、scFv片段(单价、三价等)、单域片段(纳米抗体)、多肽、微抗体、双价抗体以及cys-双价抗体。术语“scFv”是指单链Fv(“片段可变”)抗体,其中连接常规两链抗体的重链和轻链的可变域以形成一个链。

[0084] 药用载体可以是涉及从一种组织、器官或身体的部分携带或运送感兴趣的化合物至其他组织、器官或身体的部分的药用物质、组合物或运载体。例如,载体可以是液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装物质,或其一些组合。载体的每种组分是“药用的”在于其与制剂中的其他成份相容。其还必须适于与可以遇到的任何组织、器官或身体的部分接触,意为其必须不带有毒性、刺激、过敏反应、免疫原性,或任何其他过分超出其治疗益处的并发症的风险。本文所描述的药学组合物可以通过适合的给药途径给予。给药途径可以是指本领域中已知的任何给药途径,包括但不限于气、肠内、鼻内、眼部、口服、胃肠道外、直肠内、经皮(如局部用乳霜或药膏、贴剂),或阴道的。“经皮”给药可以利用局部用乳霜或药膏或通过透皮贴剂的方式来完成。“胃肠道外”是指给药途径与注射相关,包括眼眶下的、输注、动脉内、囊内、心脏内、皮肤内、肌肉内、腹膜内、肺内、脊柱内、胸骨内、鞘内、子宫内、静脉内、蛛网膜下、被膜下、皮下、透粘膜的,或经气管壁的。在一些实施方式中,抗原结合构建体可以在干预或切除期间以局部给药在手术内递送。

[0085] 术语“CD8依赖性障碍”包括有免疫组分(包括对癌症免疫疗法应答)的癌症、自身免疫性疾病、炎症疾病,和癌症,包括但不限于肺、卵巢、结直肠黑色素瘤等。

[0086] 微抗体是具有比全长抗体更小的分子量同时保持对抗原的二价结合性质的抗体形式。因为其较小的尺寸,微抗体具有从系统中更快的清除和当靶向肿瘤组织时增强的浸入。拥有强靶向结合快速清除的能力,微抗体用于诊断成像和递送细胞毒性/放射性负载是有优势的,因为延长的循环时间可导致不利的患者剂量或剂量学。

[0087] 短语“特异性地(或选择性地)结合”,当在描述抗原如蛋白与抗体或抗体衍生的结合物之间的相互作用的背景中时,是指在异质种群的蛋白和其他生物制品中,例如在生物制品,例如血液、血清、血浆或组织样品中确定抗原的存在的结合反应。因此,在指定的免疫分析条件下,在一些实施方式中,具有特定的结合特异性的抗体或结合物质与特定的抗原在至少两倍的背景中结合并且大体上不与样品中存在的其他抗原以显著量结合。与抗体或结合物质在这样的条件下特异性结合可能需要对抗体或物质对特定蛋白的特异性进行选择。可使用各种免疫测试形式以选择对特定蛋白有特异性免疫反应性的抗体。例如,固相ELISA免疫分析常规用于选择对蛋白的特异性免疫反应性的抗体(见,例如,Harlow&Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), 描述可以用于确定特异免疫反应性的免疫分析形式和条件)。典型地特异性或选择性结合反应将产生超过背景信号至少两倍的并且更典型地至少超过背景10到100倍的信号。

[0088] 术语“平衡解离常数(K_d , M)”是指解离速率常数(k_d , 时间⁻¹)除以结合速率常数(k_a , 时间⁻¹, M⁻¹)。可以利用本领域中已知的方法测定平衡解离常数。本发明的抗体通常将具有小于约 10^{-7} 或 10^{-8} M,例如小于约 10^{-9} M或 10^{-10} M的平衡解离常数,在一些实施方式中,小于约 10^{-11} M、 10^{-12} M,或 10^{-13} M。

[0089] 术语“单独的(分离的)”,当用于核酸或蛋白时,表示核酸或蛋白基本上不含以自然状态相联系的其他细胞组分。在一些实施方式中,其可以是干燥物或水溶液。可以利用分析化学技术如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法来测定纯度和同质性。为在制备物中存在的占优势种类的蛋白大体上是纯化的。尤其是,单独的基因是除了感兴趣的基因从位于基因侧翼并编码蛋白的开放阅读框分离的。术语“纯化的”表示在电泳凝胶中基本上产生一条带的核酸或蛋白。在一些实施方式中,这可以表示核酸或蛋白是至少85%纯的,更优选地至少95%纯的,并且最优选地至少99%纯的分子在体内条件下存在。

[0090] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指以或单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特意限定,该术语包括含有天然核苷酸的已知类似物的具有与参照核酸相似的结合性质并以与天然存在的核苷酸相似的方式代谢的核酸。除非另外指出,特定的核酸序列还意图包括其保守地修改的变体(例如,简并密码子替换)、等位基因、直系同源物、SNP,和互补序列以及明确指出的序列。特定地,简并密码子替换可以通过产生其中用混合碱基和/或脱氧肌苷残基替换一个或多个(或所有)密码子的第三位置的序列来实现(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 和Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。

[0091] 本文中术语“多肽”、“肽”和“蛋白”互换使用以指的是氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,也适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0092] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的

方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是这些由遗传密码所编码的,以及后来修改的这些氨基酸,如羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸,以及O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即 α -碳与氢、羧基、氨基和R基团连接,如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸、亚砷、甲硫氨酸甲基磺(methionine methyl sulfonium)。这样的类似物具有修改的R基团(例如,正亮氨酸)或修改的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸一样的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的常规化学结构不同的结构,但以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用的化学化合物。

[0093] “保守地修改的变体”适用于氨基酸和核酸序列两者。关于特定核酸序列,保守地修改的变体是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的这些核酸,或当核酸不编码氨基酸序列时是指基本上相同的序列。由于遗传密码的简并性,许多功能上相同的核酸编码任何给定的蛋白。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在由密码子指定丙氨酸的每一个位置,可以将此密码子改变成所描述的任何相应密码子而不改变编码的多肽。这样的核酸变体是“沉默变体”,其是保守地修改的变体中的一种。本文中编码多肽的每种核酸序列也描述了核酸的每种可能的沉默变体。技术人员将认识到可以修改核酸中的每个密码子(AUG除外,其通常是甲硫氨酸的仅有密码子,和TGG,其通常是色氨酸的仅有密码子)以产生功能上相同的分子。因此,核酸的编码多肽的每种沉默变体暗含在每种描述的序列中。

[0094] 关于氨基酸序列,技术人员将认识到对核酸、肽、多肽或蛋白序列个别的替换、删除或添加,其改变、增加或删除编码序列中的单个氨基酸或小百分比的氨基酸,是“保守地修改的变体”,其中改变产生用化学上相似的氨基酸替换氨基酸。提供功能上相似的氨基酸的保守替换表是本领域中熟知的。这样的保守地修改的变体另外是并且不排除本发明的多态变体、种间同系物,和等位基因。

[0095] 以下八组各个含有对于另一个的保守替换:1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2)天(门)冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3)天(门)冬酰胺(N)、谷氨酸(Q);4)精氨酸(R)、赖氨酸(K);5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T);以及8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(见,例如,Creighton,Proteins(1984))。

[0096] 可以通过在比较窗口上面比较最佳对齐的序列来确定“序列相同的百分比”,其中对于最佳对齐的两条序列,在比较窗口中的多核苷酸序列的部分与不包括添加或删除的参照序列(例如,本发明的多肽)相比可能包含添加或删除(即,空缺(gap))。该百分比通过以下计算:确定均出现在两条序列中的相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数量以产生匹配位置的数量,由在比较窗口中的位置总数量除以匹配位置的数量并将结果乘以100来产生序列同一性的百分比。

[0097] 术语“相同的”或“同一性”百分比,在两条或多条核酸或多肽序列的背景中,是指两条或多条序列或子序列是相同的序列。当以最大一致性在比较窗口比较和对齐,或在利用下面的序列比较算法中的一种或通过手动对齐和目测来测量的指定区,如果两条序列具有特定百分比的氨基酸残基或核苷酸是相同的(例如,在一个指定的区域,或当不指定时,在参照序列的整个序列,70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同),则两条序列是“基本上相同的”。本文中提供的一些实施方式提供分别与本文中例证的

多肽或多核苷酸(例如,在图2A、图2B,或图4-图11、图12C-图12I的任一图中例证的可变区;在图2A、图2B,或图12C到图12I的任一图中例证的CDR;在图2A、图2B,或图12C-图12I的任一图中例证的FR;以及在图12A-图12I或图4-图11的任一图中例证的核酸序列)基本上相同的多肽或多核苷酸。可选地,相同存在于至少约15、25或50个核苷酸长度的区中,或更优选地存在于100到500或1000或更多个核苷酸长度的区中,或存在于参照序列的全长中。关于氨基酸序列,相同或基本相同可以存在于至少5、10、15或20个氨基酸长度的区中,可选地至少约25、30、35、40、50、75或100个氨基酸长度,可选地至少约150、200或250个氨基酸长度,或存在于参照序列的全长中。关于更短的氨基酸序列,例如,20个或更少氨基酸的氨基酸序列,在一些实施方式中,根据本文中定义的保守替换,当一种或两种氨基酸残基被保守地替换时,存在基本相同。

[0098] 对于序列比较,通常将一个序列作为参照序列,其与测试序列相比较。当利用序列比较算法时,将测试和参照序列输入电脑,如果需要的话,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或可以指定备选的参数。然后序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参照序列的序列同一性百分比。

[0099] “比较窗口”,如本文所用的,包括涉及选自20到600,通常约50到约200,更通常地约100到约150所组成的组的连续位置的任一数量的片段,其中序列可以与连续位置的相同数量的参照序列在两序列最佳对齐后相比较。对齐序列用于比较的方法在本领域中是熟知的。用于比较的最佳序列对齐可以,例如,按照Smith和Waterman(1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c的局部同源性算法、Needleman和Wunsch(1970) *J. Mol. Biol.* 48:443的同源性对齐算法、搜索Pearson和Lipman(1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444的相似性方法检索、这些算法的计算机实现(Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), 或通过手动对齐和目测(见,例如, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 增补)) 来进行。

[0100] 两种适用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法为BLAST和BLAST 2.0算法,其分别在Altschul et al. (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402和Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410中描述。用于进行BLAST分析的软件通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)是公开可用的。该算法包括通过在查询序列中识别长度W的短字段来首先识别高记分序列对(high scoring sequence pairs, HSP), 其当与在数据库序列中的相同长度的字段对齐时,或者匹配或者满足一些正值阈值分数T。T是指邻近字段分数阈值(Altschul et al., 同上)。这些初始邻近字段匹配记录(neighborhood word hit) 用作用于启动搜索的种子以找到含有它们的更长的HSP。字段匹配记录沿各个序列的两个方向延伸,只要可以增加累积的比对(对齐)分数。对于核苷酸序列,利用参数M(匹配残基对的奖励分数;总是>0)和N(错配残基对的罚分;总数<0)计算累积的分数。对于核酸序列,使用打分矩阵来计算累积的分数。当:累积的比对分数从其最大达到值下降数量X;由于累积的一个或多个负打分残基比对,累积分数降到0或更低;或到达任一序列的终点时,停止在各方向中的字段匹配记录延伸。BLAST算法参数W、T,和X决定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用默认字长(W) 11、期望值(E) 10、M=5、N=-4以及两条链的比较。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用默认字长3,和期望值(E)

10,和BLOSUM62打分矩阵(见Henikoff and Henikoff(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10915)比对(B)50,期望值(E)10、M=5、N=-4以及两条链的比较。

[0101] BLAST算法还进行两条序列之间的相似性统计分析(见,例如,Karlin and Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5787)。由BLAST算法提供的一种相似性测定为最小概率之和(P(N)),其提供两核苷酸或氨基酸序列之间的匹配可能将会出现的可能性指示。例如,如果在测试核酸与参照核酸的比较中最小概率之和小于约0.2,更优选地小于约0.01,并最优选地小于约0.001,认为核酸与参照核酸相似。

[0102] 如下面描述的,两核酸序列或多核苷酸基本上相同的指示为由第一核酸编码的多肽与抗由第二核酸编码的多肽的抗体是免疫交叉反应性的。因此,在一些实施方式中,多肽典型地基本上与第二多肽相同,例如,其中两肽仅通过保守替换而不同。如下面所描述的,两核酸序列是基本上相同的其他指示为两分子或其互补在严格条件下相互杂交。两核酸序列是基本上相同的其他指示还为可以使用相同引物以扩增序列。

[0103] 术语“受试者”、“患者”和“个体”可互换地是指被检查和/或治疗的实体。这可以包括,例如,哺乳动物,例如,人或非人灵长类哺乳动物。哺乳动物还可以是实验室哺乳动物,例如鼠、大鼠、兔子、仓鼠。在一些实施方式中,哺乳动物可以是农业哺乳动物(例如,马、羊、牛、猪、骆驼)或家养哺乳动物(如,犬、猫)。

[0104] 术语“治疗上可接受的量”或“治疗有效剂量”可互换地是指足够产生需要的治疗效果的量。在一些实施方式中,治疗上可接受的量不诱发或引起不期望的副作用。治疗上可接受的量可以通过首先给予低剂量,然后递增地增加剂量直到达到期望的效果。

[0105] 术语“共同给予”是指在个体的血液中或将测试的样品中给予两种活性物质。共同给予的活性物质可以是同时地或按顺序地递送。

[0106] 抗原结合构建体(包括抗体和结合片段)

[0107] 本文中描述了与目标结合的抗原结合构建体。抗原结合构建体是包括免疫球蛋白或免疫球蛋白相关分子的一种或多种部分的分子,其与靶分子特异性地结合或与靶分子是免疫反应性的。

[0108] 在一些实施方式中,抗原结合构建体允许检测其为在T细胞的子集的表面上发现的特异性生物标记物的人CD8,用于免疫系统的诊断成像。CD8成像允许在体内检测T-细胞定位。T-细胞定位的改变能反映免疫应答的进程并能随时间出现,作为各种治疗处理或甚至疾病状态的结果。

[0109] 在一些实施方式中,这有利于成像T-细胞定位用于免疫治疗。过继性免疫治疗是将患者自身T-细胞在体外操作并重新导入患者的治疗形式。对于该治疗形式,T-细胞成像有利于确定治疗状态。

[0110] 另外,CD8在激活下游信号通路中发挥作用,对于激活起到清除病毒病原体并提供对肿瘤的免疫性的作用的细胞毒性T细胞是重要的。CD8阳性T细胞可以识别存在于抗原呈递细胞的MHC I蛋白内的短肽。在一些实施方式中,指向CD8的工程片段能够增强通过T细胞受体的信号并增强受试者清除病毒病原和对肿瘤抗原的应答的能力。因此,在一些实施方式中,本文中提供的抗原结合构建体可以是激动剂并能活化CD8目标。在一些实施方式中,提供激动剂scFv、微抗体、cys-双价抗体,和/或抗体。在一些实施方式中,激动剂抗原结合构建体包括本文中提供的一种或多种CDR、重链可变区,或轻链可变区。在一些实施方式中,

激动剂可以激活用于激活细胞毒性T细胞的通过CD8的下游信号通路,细胞毒性T细胞起到清除病毒病原体并提供对肿瘤的免疫性的作用。

[0111] 在一些情况中,利用全长抗体用于成像不是优选的,因为它们通常在给予后由于全长抗体长的血清半衰期需要预定多于1周的成像时间。

[0112] 用于成像免疫细胞的亚型的其他基于目标的方法涉及小分子。例如,用于内源性免疫系统诊断成像的一种方法涉及使用小分子示踪剂,其检测在细胞中的代谢途径的变化如 ^{18}F -氟乙酸盐(酯) (^{18}F)FAC)。因为这样的示踪剂检测在代谢途径中的变化,它们靶向具有提高的代谢活动的细胞群,其主要包括激活的T-细胞。该方法的限制性在于其仅检测活化的T-细胞亚类,然而用CD8抗体片段成像将检测表达CD8的T-细胞的全部种群,因为目标在活化的和休眠的CD8细胞上均表达。

[0113] 通过蛋白质工程将OKT8抗体的可变区重新编排成各种备选的抗原结合构建体。微抗体形式是各个单体具有与人IgG1 C_H3域连接的单链可变片段(scFv)的同源二聚体(见图1A和图1B)。在一些实施方式中,scFv由可变重(V_H)和轻(V_L)域组成并由18个氨基酸的富含GlySer的连接子连接。在一些实施方式中,scFv与人IgG1 C_H3域通过后面是10个氨基酸GlySer连接子的人IgG1上部和核心铰链区(15个残基)拴定(tethered)。由于C_H3域之间的联合以及在铰链区内形成二硫键,微抗体(V_H-V_L-C_H3)作为稳定的二聚体存在。为了允许分泌微抗体,在可变重域的N-端融合信号序列。在一些实施方式中,GlySer残基允许柔性。在一些实施方式中,可以加入谷氨酸和/或赖氨酸残基以增强可溶性。

[0114] 设计制备嵌合OKT8微抗体的两种变体,其在可变区(V_H至V_L和V_L至V_H)方向上不同。每种抗体V域含有形成内部二硫键的两个半胱氨酸。鼠OKT8 V_H具有在框架3(FR3)中的外部半胱氨酸,其可以干扰蛋白的表达,因为其可以导致聚集并因此滞留在内质网(ER)中。用丝氨酸替换在框架(鼠V_H的C84S)中的外部半胱氨酸制备嵌合微抗体。在一些实施方式中,可以调整本文中提供的任何实施方式以包括C84S调整(adjustment)。表0.1、0.2,和0.3提供本文中提供的各种抗原结合构建体的设置的实现实施方式的总结。

[0115] 表0.1微抗体

[0116]	1	2	3	4	5	6
	名称	前导	区域 1	连接子	区域 2	其余
[0117]	嵌合 IAb_Mb1_C D8	前导 SEQ NO:34	ID 鼠 VL SEQ NO: 40	ID 18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	ID 鼠 V _H SEQ ID NO: 44	ID IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38
	嵌合 IAb_Mb2_C D8	前导 SEQ NO:34	ID 鼠 VH SEQ NO: 44	ID 18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	ID 鼠 V _L SEQ ID NO: 40	ID IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38
	人化 IAb_Mb1_C D8	前导 SEQ NO:34	ID huV _L SEQ NO: 9	ID 18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	ID huV _H (2 nd) SEQ ID NO: 6	ID IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38
	人化 IAb_Mb2_C D8	前导 SEQ NO:34	ID huV _H (2 nd) SEQ NO: 6	ID 18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	ID huVL SEQ ID NO: 9	ID IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38

[0118] 表0.2亲和力成熟的微抗体

[0119]

1	2	3	4	5	6
名称	前导	区域 1	连接子	区域 2	其余
IAb_Mb1 a_CD8	前导 SEQ ID NO:34	huVL SEQ ID NO: 42	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _H (版本 a) SEQ ID NO: 46	IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_Mb2 a_CD8	前导 SEQ ID NO:34	huV _H (版本 a) SEQ ID NO: 46	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _L SEQ ID NO: 42	IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_Mb1 b_CD8	前导 SEQ ID NO:34	huV _L SEQ ID NO: 42	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _H (版本 b) SEQ ID NO: 48	IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_M1b _CD8 IgG2 NH	前导 SEQ ID NO:34	huV _L SEQ ID NO: 42	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _H (版本 b) SEQ ID NO: 48	IgG2 天然铰链 SEQ ID NO: 55, IgG2 CH3 域, SEQ ID NO: 80
IAb_M1b _CD8 IgG2 EH	前导 SEQ ID NO:34	huV _L SEQ ID NO: 42	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _H (版本 b) SEQ ID NO: 48	IgG2 铰链-延伸 SEQ ID NO: 79, IgG2 CH3 域, SEQ ID NO: 80
IAb_Mb2 b_CD8	前导 SEQ ID NO:34	huV _H (版本 b) SEQ ID NO: 48	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _L SEQ ID NO: 42	IgG1 铰链/连接子 -CH3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_Mb1 c_CD8	前导 SEQ ID NO:34	huVL SEQ ID NO: 42	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _H (版本 c) SEQ ID NO: 50	IgG1 铰链/连接子 -CH3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_Mb2 c_CD8	前导 SEQ ID NO: 34	huV _H (版本 c) SEQ ID NO: 50	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huVL SEQ ID NO: 42	IgG1 铰链/连接子 -CH3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_Mb1 d_CD8	前导 SEQ ID NO: 34	huVL SEQ ID NO: 42	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _H (版本 d) SEQ ID NO: 52	IgG1 铰链/连接子 -CH3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_Mb2 d_CD8	前导 SEQ ID NO: 34	huV _H (版本 d) SEQ ID NO: 52	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huVL SEQ ID NO: 42	IgG1 铰链/连接子 -CH3 域 SEQ ID NO: 38

[0120] 表0.3 Cys-双价抗体

[0121]

1	2	3	4	5	6
名称	前导	区域 1	连接子	区域 2	其余
IAb_Cys-Db 1b_CD8	前导 SEQ ID NO: 26	huVL SEQ ID NO: 42	5 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 28	huV _H (版本 b) SEQ ID NO: 48	Cys 尾部 SEQ ID NO: 32
IAb_Cys-Db 2b_CD8	前导 SEQ ID NO: 26	huV _H (版本 b) SEQ ID NO: 48	5 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 28	huVL SEQ ID NO: 42	Cys 尾部 SEQ ID NO: 32
IAb_Cys-Db 3b_CD8	前导 SEQ ID NO: 26	huVL SEQ ID NO: 42	8 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 30	huV _H (版本 b) SEQ ID NO: 48	Cys 尾部 SEQ ID NO: 32
IAb_Cys-Db 4b_CD8	前导 SEQ ID NO: 26	huV _H (版本 b) SEQ ID NO: 48	8 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 30	huVL SEQ ID NO: 42	Cys 尾部 SEQ ID NO: 32

[0122] 在表0.1、0.2,和0.3中描绘的是可以用于微抗体(表0.1和0.2)和cys-双价抗体

(表0.3)的单体的序列设置。表的每一行表示单体构建体的序列,从左到右表示N-端到C端。在一些实施方式中,所显示的每种单体构建体的序列直接与彼此连接。因此,在一些实施方式中,构建体可以包括在表0.1、表0.2,或表0.3的单行上的任何构建体。在一些实施方式中,构建体可以包括在表0.1、表0.2,或表0.3中的任何组合。在一些实施方式中,例如,在第一行第2列的第一个条目可以与第一行第3列到第一行第4列、到第一行第5列、到第一行第6列进行组合。在一些实施方式中,第3列和第6列彼此可以交换。在一些实施方式中,在第一行第2列的第一个条目可以与第一行第3列到第二行第4列、到第二行第5列、到第二行第6列进行组合。因此,表格代表所有可能的组合,均在单行和跨各行(并有列交换)中。

[0123] 在一些实施方式中,抗原结合构建体包括在SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50或52中的HCDR1的重链CDR1 (HCDR1);在SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50或52中的HCDR2的重链CDR2 (HCDR2);在SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50或52中的HCDR3的重链CDR3 (HCDR3);在SEQ ID NO:9或42中的LCDR1的轻链CDR1 (LCDR1);在SEQ ID NO:9或42中的LCDR2的轻链CDR2 (LCDR2);和/或在SEQ ID NO:9或42中的LCDR3的轻链CDR3 (LCDR3)。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括在SEQ ID NO:48中的HCDR1的HCDR1、在SEQ ID NO:48中的HCDR2的HCDR2、在SEQ ID NO:48中的HCDR3的HCDR3、在SEQ ID NO:42中的LCDR1的LCDR1、在SEQ ID NO:42中的LCDR2的LCDR2,和在SEQ ID NO:42中的LCDR3的LCDR3。

[0124] 在一些实施方式中,抗原结合构建体包括6、5、4、3、2,或1种上面的CDR (CDR的一些实施方式在图2A、图2B、图12C-图12I中显示)。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括HCDR3。在一些实施方式中,抗原结合构建体与目标分子特异性地结合。在一些实施方式中,抗原结合构建体与一种或多种具有本文中提供的CDR的抗体竞争结合。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括至少3种本文中提到的重链CDR。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括重链CDR3。在一些实施方式中,抗原结合构建体进一步包括本文中所提供的任一种重链CDR2。

[0125] 在一些实施方式中,抗原结合构建体是人的或人化的。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括至少一种人框架区,或具有与人框架区至少约80%序列同一性,例如至少约80%、85%、90%、93%、95%、97%,或99%的同一性的框架区。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括在SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50,或52中的HFR1的重链FR1 (HFR1);在SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50,或52中的HFR2的重链FR2 (HFR2);在SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50,或52中的HFR3的重链FR3 (HFR3);在SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50,或52中的HFR4的重链FR4 (HFR4);在SEQ ID NO:9或42中的LFR1的轻链FR1 (LFR1);在SEQ ID NO:9或42中的LFR2的轻链FR2 (LFR2);在SEQ ID NO:9或42中的LFR3的轻链FR3 (LFR3);和在SEQ ID NO:9或42中的LFR4的轻链FR4 (LFR4)。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括在SEQ ID NO:48中的HFR1的重链FR1 (HFR1);在SEQ ID NO:48中的HFR2的重链FR2 (HFR2);在SEQ ID NO:48中的HFR3的重链FR3 (HFR3);在SEQ ID NO:48中的HFR4的重链FR4 (HFR4);在SEQ ID NO:42中的LFR1的轻链FR1 (LFR1);在SEQ ID NO:42中的LFR2的轻链FR2 (LFR2);在SEQ ID NO:42中的LFR3的轻链FR3 (LFR3);和在SEQ ID NO:42中的LFR4的轻链FR4 (LFR4)。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括8、7、6、5、4、3、2,或1种所列的FR。

[0126] 在一些实施方式中,抗原结合构建体包括可检测的标记物。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括治疗剂。

[0127] 在一些实施方式中,抗原结合构建体是二价的。二价抗原结合构建体可以包括至少第一抗原结合域,例如第一scFv,以及至少第二抗原结合域,例如第二scFv。在一些实施方式中,二价抗原结合构建体是包括至少两个单体的多聚体,例如至少2、3、4、5、6、7,或8个单体,其各自具有抗原结合域。在一些实施方式中,抗原结合构建体是微抗体。在一些实施方式中,抗原结合构建体是双价抗体,包括,例如,cys-双价抗体。scFv,和/或微抗体和/或cys-双价抗体可以包括任何本文中提供的CDR和重链可变区和/或轻链可变区实施方式(例如,在图2A、图2B,和图12C-图12I中所提供的CDR序列)。在一些实施方式中,抗原结合构建体是单价scFv。在一些实施方式中,提供的单价scFv包括:在图2A,图12E-图12I,或SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50或52的HCDR1中的HCDR1;在图2A,图12E-图12I,或SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50或52的HCDR2中的HCDR2;在图2A,图12E-图12I,或SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50或52的HCDR3中的HCDR3;在图2B、图12C、图12D、SEQ ID NO:9或42的LCDR1中的LCDR1;在图2B、图12C、图12D、SEQ ID NO:9或42的LCDR2中的LCDR2,和在图2B、图12C、图12D、SEQ ID NO:9或42的LCDR3中的LCDR3。在一些实施方式中,提供的单价scFv包括:在SEQ ID NO:48的HCDR1中的HCDR1、在SEQ ID NO:48的HCDR2中的HCDR2、在SEQ ID NO:48的HCDR3中的HCDR3、在SEQ ID NO:42的LCDR1中的LCDR1、在SEQ ID NO:42的LCDR2中的LCDR2,以及在SEQ ID NO:42的LCDR3中的LCDR3。在一些实施方式中,如在图12D中显示的,根据Chothia定义CDR。

[0128] 在一些实施方式中,单价scFv包括在图2A,图4-图11,图12C-图12I,或SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50或52中的重链可变区的重链可变区。在一些实施方式中,单价scFv包括在图2B、图4-图11、图12C、图12D,SEQ ID NO:9、42或40中的轻链可变区的轻链可变区。在一些实施方式中,单价scFv包括在图2A、图4-图11、图12C-图12I,或SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50或52中的重链可变区的重链可变区和在图2B、图4-图11、图12C、图12D,SEQ ID NO:9、42或40中的轻链可变区的轻链可变区。在一些实施方式中,单价scFv包括在SEQ ID NO:48中的重链可变区的重链可变区和在SEQ ID NO:42中的轻链可变区的轻链可变区。

[0129] 在一些实施方式中,抗原结合构建体是双特异性的。双特异性抗体可以包括至少第一结合域,例如与第一表位特异性结合的scFv,以及至少第二结合域,例如与第二表位特异性结合的scFv。因此,双特异性抗原结合构建体可以结合两种或多种表位。在一些实施方式中,第一表位和第二表位是相同抗原的部分,而双特异性抗原结合构建体可以因此与相同抗原的两个表位结合。在一些实施方式中,第一表位是第一抗原的部分,且第二表位是第二抗原的部分,而双特异性抗原结合构建体可以因此与两个不同抗原结合。在一些实施方式中,抗原结合构建体同时与两个表位结合。

[0130] 在一些实施方式中,抗原结合构建体具有在SEQ ID NO:3、6、16、18、20、22、44、46、48、50或52中的重链可变区的重链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与SEQ ID NO:3有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列的重链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与SEQ ID NO:6有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列的重链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与SEQ ID NO:44有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列的重链可变区。在一些实施

方式中,抗原结合构建体具有包括与SEQ ID NO:46有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列的重链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与SEQ ID NO:48有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列的重链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与SEQ ID NO:50有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列的重链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与SEQ ID NO:52有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列的重链可变区。

[0131] 在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括SEQ ID NO:9、16、18、20、22、40,或42的轻链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与SEQ ID NO:9有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列的轻链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与SEQ ID NO:40有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列的轻链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与SEQ ID NO:42有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列的轻链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体是人抗原结合构建体并具有重链可变区、轻链可变区,或至少与上面提到的重链和/或轻链可变序列至少相同的重链和轻链。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与SEQ ID NO:48有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列的重链可变区,和包括与SEQ ID NO:42有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列的轻链可变区。

[0132] 本文中提供的一些实施方式包括与本文中提供的一种或多种抗原结合构建体竞争结合目标分子的抗原结合构建体。在一些实施方式中,竞争性抗原结合构建体在与参照抗原结合构建体一样的目标分子上的表位结合。在一些实施方式中,参照抗原结合构建体与目标分子的第一表位结合,而竞争性抗原结合构建体与目标分子的第二表位结合,但干扰参照抗原结合构建体与目标分子的结合,例如通过空间上封阻参照抗原结合构建体,或通过引起目标分子的构形改变。在一些实施方式中,第一表位与第二表位重叠。在一些实施方式中,表0.1和/或表0.2的列3和5可以交换。在一些实施方式中,本文中提供的任何重链可变区可以与本文中的任何轻链可变区结合用于scFv、微抗体,和/或双价抗体。在一些实施方式中,表0.1、0.2,和0.3中的任何重链和/或轻链可变区(列3和5)可以彼此交换或与其他轻链或重链可变区交换,以产生抗原结合构建体(如scFv、cys-双价抗体、微抗体,或抗体)。

[0133] 在一些实施方式中,微抗体和cys-双价抗体形式具有用于诊断成像和某些治疗应用的有利药代动力学性质同时保留亲本抗体的高结合亲和力和特异性。与用全长亲本抗体成像相比,这些片段的药代动力学是更期望的,因为它们能够靶向抗原,然后快速清除系统

用于快速高对比度成像。在一些实施方式中,对于微抗体和cys-双价抗体较短的血清半衰期允许成像在注射微抗体后约8-48小时和注射cys-双价抗体后2-24小时的范围的时间发生。快速血清清除与较好的组织渗透一起可以允许同天成像,在临床中关于患者医护管理提供显著的优势。

[0134] 另外,cys-双价抗体抗体形式以C-端半胱氨酸尾部为特征。这两个巯基(温和还原后)为功能性半体的位点特异性结合提供了对策,如不干扰cys-双价抗体的结合活性的放射性示踪剂。

[0135] 与目标分子结合的双价抗体

[0136] 在一些实施方式中,抗原结合构建体可以是双价抗体。双价抗体可以包括含有与在第一多肽链上的轻链可变域(V_L)连接的重(V_H)链可变域的第一多肽链。在一些实施方式中,轻和重可变链域可以通过连接子连接。连接子可以是适合的长度以减少在第一多肽链和包括与在第二多肽链上的重链可变域 V_H 连接的轻链可变域(V_L)的第二多肽链上的通过连接子连接的两个域之间的配对可能性,连接子对于允许在第二多肽链上的两个域之间显著的配对来说太短。

[0137] 在一些实施方式中,连接子的适合长度促使第一和第二多肽链的互补域之间的链配对,并能促进具有两个功能性抗原结合位点的二聚分子聚集。因此,在一些实施方式中,双价抗体是二价的。在一些实施方式中,双价抗体可以是半胱氨酸连接的双价抗体(Cys-Db)。与两个抗原位点结合的Cys-Db图解在图3A和图3B中说明。

[0138] 在一些实施方式中,连接子可以是肽。在一些实施方式中,连接子可以是促进这样的,例如1到20个氨基酸,如5和10个氨基酸长度的组配的任何适合长度。如本文中进一步描述的,一些cys-双价抗体可以包括其为5到8个氨基酸长度的肽连接子。在一些实施方式中,连接子不需要是由氨基酸制成,或不需是仅由氨基酸制成,并可以包括,例如,修改的氨基酸(见,例如,Increased Resistance of Peptides to Serum Proteases by Modification of their Amino Groups,Rossella Galati,Alessandra Verdina, Giuliana Falasca,Alberto Chersi, (2003) Z.Naturforsch,58c,558-561)。在一些实施方式中,连接子可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19,或20个氨基酸长度。在一些实施方式中,连接子可以是2-30埃长度,例如2.5到27埃。

[0139] 在一些实施方式中,抗原结合构建体包括人化cys-双价抗体。人化cys-双价抗体可以包括含有与可变轻(V_L)域连接的可变重(V_H)域,和C端半胱氨酸的单链可变片段(scFv)。在一些实施方式中,人化cys-双价抗体是同源二聚体。在一些实施方式中,人化双价抗体是异源二聚体。在一些实施方式中,提供各自具有半胱氨酸残基的个体单体。

[0140] 在一些实施方式中,人化cys-双价抗体的scFv具有 V_H - V_L 方向或 V_L - V_H 方向。如本文中所使用的, V_H - V_L (其也可以称为“ $V_H V_L$ ”)方向意为scFv的可变重域(V_H)是可变轻域(V_L)的上游,而 $V_L V_H$ 方向意为scFv的 V_L 是 V_H 的上游。如本文中所使用的,“上游”意为接近氨基酸的N-端或接近核苷酸序列的5'端。

[0141] 抗体可变区可以通过如本文中描述的连接子连接。在一些实施方式中,连接子是如本文中描述的GlySer连接子。

[0142] 在一些实施方式中,cys-双价抗体包括可检测的标记物。

[0143] 在一些实施方式中,cys-双价抗体包括单体对。各单体可以包括多肽。在一些实施

方式中,单体的多肽是相同的(例如,cys-双价抗体可以是同源二聚体)。在一些实施方式中,单体的多肽是不同的(cys-双价抗体可以是异源二聚体)。

[0144] 在一些实施方式中,单体的多肽包括SEQ ID NO:12(见图8)。在一些实施方式中,单体的多肽包括具有与SEQ ID NO:12有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列(cys-双价抗体(V_L -5- V_H))。

[0145] 在一些实施方式中,单体的多肽包括SEQ ID NO:13(见图9)。在一些实施方式中,单体的多肽包括具有与SEQ ID NO:13有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列(cys-双价抗体(V_H -5- V_L))。

[0146] 在一些实施方式中,单体的多肽包括SEQ ID NO:14(V_L -8- V_H)(见图10)。在一些实施方式中,单体的多肽包括具有与SEQ ID NO:14有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的序列。

[0147] 在一些实施方式中,单体的多肽包括SEQ ID NO:15(人化OKT8 cys-双价抗体(V_H -8- V_L))(见图11)。在一些实施方式中,单体的多肽包括具有与SEQ ID NO:15至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的序列。

[0148] 在一些实施方式中,单体的多肽包括任何如在表0.3示出的组合的部分,包括具有与在表0.3中所列单体有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的序列的单体的多肽。

[0149] 在一些实施方式中,半胱氨酸彼此交叉连接。在一些实施方式中,半胱氨酸是还原的,并因此,这些形成尾部的半胱氨酸彼此之间不形成二硫键。在一些实施方式中,一个或多个“形成尾部的”半胱氨酸与一种或多种可检测标记物如荧光探针形成共价键。

[0150] 作为本领域技术人员将理解的,当本公开一般提及“cys-双价抗体”时,可以采用可替换设置以实现相同或类似的结果。在一些实施方式中,可以采用任何共价键可修改的半体代替一个或多个半胱氨酸。例如,这可以包括GlySer连接子、GlyLeu连接子,和/或在短标签后的插入的半胱氨酸。在一些实施方式中,可以经盘旋的卷或亮氨酸拉链建立连接。在一些实施方式中,“尾部”自身可以在其末端包括功能基团,以至于其能够在每个多肽的末端与期望的残基和/或位置选择性地结合,代替二硫键本身。在一些实施方式中,不是尾部提供两多肽链之间的空间,共价可修改的半体可以与重链或轻链多肽的末端直接连接,但两共价可修改的半体可以通过连接子连接。

[0151] 在一些实施方式中,提供了与目标分子结合的嵌合cys-双价抗体。在一些实施方式中,嵌合cys-双价抗体包括 V_L - V_H 形式的单体,并包括SEQ ID NO:12或14的序列,或具有与此至少约80%同一性,例如与此至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列。在一些实施方式中,嵌合cys-双价抗体包括 V_H - V_L 形式的单体,并包括SEQ ID NO:13或15的序列,或具有与此至少约80%同一性,例如与此至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列。

[0152] 在一些实施方式中,本文中提供的任何构建体(包括提出作为cys-双价抗体实施方式的这些设置),可以作为scFv实施方式提供。在这样的实施方式中,构建体可以仍包括在尾部上的半胱氨酸,但仅仅不是交联的。在其他实施方式中,构建体根本不需要具有在尾部的半胱氨酸或尾部。

[0153] 连接子和/或尾部选择

[0154] 在一些实施方式中,对于单个抗体,重链和轻链可变域可以以不同方式关联。为此,使用不同连接子长度允许构象柔性和活动范围以保证二硫键的形成。

[0155] 在一些实施方式中,两个连接子长度可以大约在(并包括)约1到50个氨基酸,例如2到15、2到14、3到13、4到10,或5个氨基酸到8个氨基酸。在一些实施方式中,在双价抗体对内的每个连接子可以是相同长度。在一些实施方式中,在该对内的每个连接子可以是不同的长度。在一些实施方式中,可以使用连接子长度对的任何组合,只要它们允许和/或促进期望的组合。在一些实施方式中,可以使用修改的氨基酸。

[0156] 图8-图11提供四种Cys-Db变体, V_H-5-V_L 、 V_H-8-V_L 、 V_L-5-V_H ,和VL8VH(见图8-图11,和表0.3)。产生和测试所有四种变体的表达和结合允许每种新Cys-Db的蛋白产生的期望形式的识别。评估一系列变体可以帮助确信产生高质量、稳定的蛋白,其中二硫键是有效的。因此,工程设计Cys-Db可以包括利用两种不同连接子长度,而不是一种-如在微抗体,以及可变区的两种方向 V_H-V_L 和 V_L-V_H 中。

[0157] 在一些实施方式中,连接子是GlySer连接子。GlySer连接子可以是富含Gly和/或Ser残基的多肽。在一些实施方式中,GlySer连接子的至少约40%的氨基酸残基是Gly、Ser,或Gly和Ser的组合,如至少约40%、50%、60%、70%、80%,或90%。在一些实施方式中,GlySer连接子为至少约2个氨基酸长,例如至少约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35,或40个氨基酸长。在一些实施方式中,连接子包括SEQ ID NO:28、30,和/或36中的至少一种。

[0158] 在一些实施方式中,在双价抗体的C-端添加半胱氨酸。该半胱氨酸可以允许双价抗体复合物形成共价的半胱氨酸键并提供用于功能性半体如放射线示踪剂的位点特异性连接的可用硫残基的选择。在一些实施方式中,改变抗体自身的末端以包含半胱氨酸。在一些实施方式中,在C-端添加尾部序列,例如(Gly-Gly-Cys)。在一些实施方式中,半胱氨酸尾部序列允许cys-双价抗体的两个单体彼此形成二硫键。在一些实施方式中,半胱氨酸尾部序列允许cys-双价抗体与可检测的半体如可检测的标记物和/或治疗剂形成二硫键。半胱氨酸尾部的巯基可以在与期望的功能半体例如可检测的标记物和/或治疗剂的位点特异性结合之前经历温和的还原。在一些实施方式中,尾部为至少约1个氨基酸长,例如至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35,或40个氨基酸长。在一些实施方式中,尾部包括SEQ ID NO:32中的至少一个。在一些实施方式中,尾部是3到8个氨基酸长度。在一些实施方式中,尾部可以和/或包括盘绕的卷和/或亮氨酸拉链。如上面提到的,在一些实施方式中,半胱氨酸位于C-端;然而,这不要求半胱氨酸位于成为最后的C-端氨基酸。反而,这表示半胱氨酸可以是位于蛋白的C-端的任何残基的部分。

[0159] 在一些实施方式中,两C-端之间的连接选择可以通过半胱氨酸实现,用于直接和/或间接的交联。

[0160] 与目标分子结合的微抗体

[0161] 如本文中所描述的“微抗体”包括同源二聚体,其中各单体是与人IgG1C_H3域通过连接子如铰链序列连接的单链可变片段(scFv)。在一些实施方式中,铰链序列是如在图12B、SEQ ID NO:53-60所示的IgG1或IgG2铰链序列。在一些实施方式中,CH3序列包括如在图12B、SEQ ID NO:37-38和80-81中所示的IgG1 C_H3,或IgG2 C_H3序列。

[0162] 在一些实施方式中,铰链序列是人工铰链序列。在一些实施方式中,铰链序列可以是来自四种分类的一种或多种IgG铰链。人工铰链序列可包括人IgG1或IgG2铰链和GlySer连接子的部分(当该部分与和V_H和V_L区连接的通用连接子序列区分时,也称为“延伸”)。

[0163] 在一些实施方式中,人工铰链序列包括大约首先人IgG1铰链的14或15个残基,随后是延伸序列。在一些实施方式中,延伸可以是任何那些本文中所提供的。在一些实施方式中,延伸可以是6、7、8、9,或10个氨基酸长度的GlySer延伸序列。在一些实施方式中,人工铰链序列包括大约首先IgG1铰链的15个残基,随后是约10个氨基酸长度的GlySer延伸序列。在一些实施方式中,C_H3域之间的关联使得微抗体作为稳定二聚体存在。

[0164] 在一些实施方式中,铰链序列包括人IgG2铰链序列。在一些实施方式中,铰链序列包括IgG2铰链序列。在一些实施方式中,铰链序列包括天然hIgG2IgG2铰链序列(“NH”)。可以用于与本文中的实施方式连接的示例性天然铰链序列在图12B、SEQ ID NO:55中显示。在一些实施方式中,本文中所提供的任何和所有的构建体可以与hIgG2铰链区一起使用。

[0165] 在一些实施方式中,铰链序列包括SEQ ID NO:55的天然人IgG2序列。在一些实施方式中,铰链序列包括人工IgG2铰链序列。在一些实施方式中,天然人IgG2序列包括人工铰链-延伸(EH)序列。在一些实施方式中,人工铰链-延伸序列包括SEQ ID NO:79。在一些实施方式中,人工铰链序列包括大约首先12到15个残基,例如人IgG2铰链序列的12个残基,随后是约6、7、8、9、10、11,或12个氨基酸长度的GlySer延伸序列。可以用于与本文中的实施方式连接的示例性人工铰链序列在图12B、SEQ ID NO:79中显示。在一些实施方式中,在微抗体中可以采用任何上面提到的铰链区选择(例如,表0.1或0.2)。在一些实施方式中,在表0.1或0.2中提到的任何铰链区可以用IgG2铰链区替换。在一些实施方式中,在表0.1或0.2中提到的任何构建体,和/或在图中描绘的任何构建体可以用来自人IgG2或IgG2的部分或所有铰链区替换描绘的铰链区。

[0166] 在一些实施方式中,微抗体scFv序列可以包括CDR和/或FR,和或与本文中所描述的双价抗体序列(例如,如在图2A、图2B、图4、图5、图6、图7、图8、图9、图10、图11,和图12C-图12I,以及表0.1和0.2中找到的)相似或相同的可变区序列。在一些实施方式中,微抗体scFv具有与本文中所描述的cys-双价抗体的scFv相同的序列(CDR、多种CDR、全套6种CDRS、重链可变区、轻链可变区、重链和轻链可变区等)。

[0167] 在一些实施方式中,微抗体具有与在SEQ ID NO:3、6、9、16、18、20、22、34、36、38、53-60、40、42、44、46、48、50和52中的序列,和/或在表0.1和/或0.2中设置的序列有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93、94、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列。

[0168] 在一些实施方式中,微抗体具有与在SEQ ID NO:3、6、9、16、18、20、22、40、42、44、46、48、50和52中的序列有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93、94、95%、96%、97%、98%,或99%的同一性的可变链区。

[0169] scFv具有V_H-V_L或V_L-V_H方向。在一些实施方式中,V_H和V_L通过氨基酸连接子序列彼此

连接。氨基酸连接子可以是如本文中描述的连接子。在一些实施方式中,连接子是富含GlySer的并且大约15-20个氨基酸长度。在另一个实施方式中,连接子是富含GlySer的并且大约18个氨基酸长度。在一些实施方式中,连接子长度在(并包括)约1到50个氨基酸,例如,2到30、3到20、4到15,或5个氨基酸到8个氨基酸之间变化。在一些实施方式中,微抗体scFv具有与本文中描述的cys-双价抗体有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列。scFv可以具有 $V_H V_L$ 或 $V_L V_H$ 方向。

[0170] 在一些实施方式中,微抗体的各单体从N-端到C-端包括以下要素(元件, element): (a) 包括与 V_L 域连接的 V_H 域并与目标分子连接的scFv序列; (b) 包括人IgG1铰链区的铰链-延伸域;以及(c) 人IgG C_H3 序列。在一些实施方式中,微抗体的各单体从N-端到C-端包括以下要素: (a) 包括与 V_L 域连接的 V_H 域并与目标分子连接的scFv序列; (b) 包括如本文描述的IgG2铰链区的铰链-延伸域;以及(c) 人IgG C_H3 序列。在一些实施方式中,微抗体的各单体包括IgG2、IgG3,或IgG4 C_H3 。在一些实施方式中,微抗体的各单体可以包括IgA或IgD的CH3域和/或IgM和/或IgE的CH4域。在一些实施方式中,微抗体由可以通过如本文所描述的细胞、细胞系或其他适合的表达系统表达的核酸编码。因此,可以将信号序列融合到scFv的N-端以保证当在细胞或细胞系中表达时微抗体的分泌。

[0171] 在一些实施方式中,scFv、微抗体、cys-双价抗体和/或抗体包括在图2A和/或图2B中显示的并用星号标记的人化序列中的一个或多个残基。在一些实施方式中,当用星号在图2A或图2B中标记的一个或多个残基存在时;可以改变其余的残基。例如,序列可以与其余部分的序列有百分之80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或更高的同一性。在一些实施方式中,人和/或人化抗原结合构建体将包括一个或多个在图2A中用信号标记的残基,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46,或47个。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括一个或多个在图2A中加下划线的残基。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括一个或多个在图2A中未加下划线的残基。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括一个或多个在图2A中加下划线的残基以及加框的CDR部分,而其他残基可以允许变化。在一些实施方式中,抗原结合构建体。

[0172] 可替换地,和/或另外,抗原结合构建体可以包括含有一个或多个在图2A或图2B中用信号标记的残基,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19,或20。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括一个或多个在图2A或图2B中未加下划线的残基。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括一个或多个在图2A或图2B中加下划线的残基以及加框的CDR部分,而其他残基可以允许变化。在一些实施方式中,CDR残基是保留的并且用星号标记的残基是保留的,但一个或多个其他残基允许改变。

[0173] 在一些实施方式中,提供与目标分子结合的嵌合微抗体。在一些实施方式中,嵌合微抗体包括以 V_L - V_H 形式的单体,并包括SEQ ID NO:16或20的序列,或具有与此至少约80%同一性,例如与此至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列。在一些实施方式中,嵌合微抗体包括以 V_H - V_L 形式的单体,并包括SEQ ID NO:18或22的序列,或具有与此至少约80%同一性,例如与此至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列。

[0174] 在一些实施方式中,单体的多肽包括任何如在表0.1和0.2中展示的组合部分,包括具有与在表0.1和0.2中所列的单体有至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93、94、95%、96%、97%、98%、99%,或100%同一性的序列的单体的多肽。

[0175] 核酸

[0176] 在一些实施方式中,抗原结合构建体的多肽可以由核酸编码并在体内或体外表达,或是这些可以化学合成的肽。因此,在一些实施方式中,提供编码抗原结合构建体的核酸。在一些实施方式中,核酸编码cys-双价抗体或微抗体的一部分或单体。在一些实施方式中,核酸编码两种或多种单体,例如,至少2种单体。编码多单体的核酸可以包括在至少两种单体之间的核酸切割位点、可以编码两种或多种单体之间的转录或翻译起始位点,和/或可以编码在两种或多种单体之间的蛋白水解目标位点。

[0177] 在一些实施方式中,表达载体包含编码如本文所描述的抗原结合构建体的核酸。在一些实施方式中,表达载体包括pcDNA3.1TM/myc-His(-)版本A载体用于哺乳动物表达(Invitrogen, Inc.),或其变体(见图13)。pcDNA3.1表达载体以用于哺乳动物表达的CCMV启动子和哺乳动物(新霉素)和细菌(氨苄青霉素)两者的选择标记物(见图10)为特征。在一些实施方式中,表达载体包括质粒。在一些实施方式中,载体包括病毒性载体,例如逆转录病毒或腺病毒载体。在一些实施方式中,载体包括粘粒、YAC,或BAC。

[0178] 在一些实施方式中,编码至少一种微抗体单体的核苷酸序列包括SEQ ID NO:17、19、21、23、39、41、43、45、47、49、51,或具有与其至少约80%同一性,例如约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93、94、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列中的至少一种。

[0179] 在一些实施方式中,编码至少一种cys-双价抗体单体的核苷酸序列包括SEQ ID NO:77、78、10、11、39、41、43、45、47、49、51,或具有与其至少约80%同一性,例如至少约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93、94、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列中的至少一种。

[0180] 细胞系

[0181] 在一些实施方式中,提供了表达至少一种本文中描述的抗原构建体的细胞系。在一些实施方式中,哺乳动物细胞系(如,CHO-K1细胞系)是以产生如本文中所描述的微抗体、cys-双价抗体或其他抗体的表达系统。在一些实施方式中,本文中所描述的微抗体、cys-双价抗体,和其他抗体,或抗体片段是非糖基化的,并且不要求哺乳动物表达系统,正因如此,不需要翻译后修饰。因此,在一些实施方式中,使用一种或多种宽种类的哺乳动物或非哺乳动物表达系统以产生本文所以披露的抗原结合构建体(例如,抗-CD8微抗体和cys-双价抗体),包括但不限于哺乳动物表达系统(例如,CHO-K1细胞)、细菌表达系统(如,大肠杆菌、枯草芽孢杆菌)、酵母表达系统(如毕赤酵母、酿酒酵母)或任何其他已知表达系统。其他系统可以包括昆虫细胞和/或植物细胞。

[0182] 抗原结合构建体修改

[0183] 在一些实施方式中,抗原结合构建体包括至少一种修改。示例性修改包括,但不限于,通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、由已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白酶切割,以及与细胞配体或其他蛋白连接进行修改的抗原结合构建体。可以由已知技术

进行任何众多的化学修改,包括,但不限于,特异性化学切割、乙酰化、甲酰化和衣霉素的代谢合成。在一些实施方式中,衍生物可以包含一种或多种非天然氨基酸。

[0184] 在一些实施方式中,抗原结合构建体与其他物质结合以形成抗-目标结合物。本文中描述的结合物可以通过用脂肪类、糖类,蛋白或其他原子或分子连接抗原结合构建体的已知方法来制备。在一些实施方式中,结合物通过利用合适的连接或键的位点特异性结合而形成。位点特异性结合更可能来保持抗原结合构建体的结合活性。物质可以经二硫键形成结合或附在还原的抗原结合构建体的铰链区。例如,在scFv片段的C-端引入半胱氨酸残基,例如可以在本文中描述的cys-双价抗体中引入的这些,允许位点特异的反应性巯基与宽种类的抗原在远离抗原结合位点的位点结合。用于形成结合物的其他连接或键可以包括,但不限于,共价键、非共价键、硫键、胺键、胍键、酯键、酰胺键,以及氨基酸连接、亚氨基连接、缩氨基硫脲(thiosemicabazone)连接、缩氨基脲(emicarbazone)连接、胍键和碳-碳连接。

[0185] 可检测的标记物

[0186] 在一些实施方式中,修改的抗原结合构建体与可检测的标记物连接。如本文所使用的,“可检测的标记物”包括有利于诊断、检测或可视化目标分子、细胞、组织、器官等的位置和/或数量的原子、分子,或化合物。根据本文描述的实施方式可以使用的可检测标记物包括,但不限于,放射性物质(例如,放射性同位素、放射性核素、放射性标记物或放射性示踪剂)、染料、造影剂、荧光化合物或分子、生物性发光化合物或分子、酶类或加强剂(如顺磁离子)。另外,一些纳米颗粒,例如量子点和金属纳米颗粒(下面所描述的)可以是适应于作为检测剂的。在一些实施方式中,可检测标记物是吖啶菁绿(靛菁绿,IndoCyanine Green, ICG)。

[0187] 根据本文描述的实施方式可以用作可检测标记物的示例性放射性物质包括,但不限于, ^{18}F 、 ^{18}F -FAC、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{45}Ti 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{75}Sc 、 ^{77}As 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{94}Tc 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{175}Lu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 和 ^{225}Ac 。可以用作可检测标记物的示例性顺磁离子包括,但不限于,过渡金属和镧系金属离子(例如,具有原子数量6到9、21-29、42、43、44,或57-71的金属)。这些金属包括Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb和Lu的离子。

[0188] 当可检测标记物是放射性金属或顺磁离子时,在一些实施方式中,标记物可以与具有长尾部的反应剂反应,该反应剂的长尾部有一个或多个附在长尾部上的与这些离子结合的螯合基团。长尾部可以是聚合剂如多聚赖氨酸、多糖,或其他衍生的或可衍生的具有可与用于结合离子的螯合基团结合的侧基的链。根据本文描述的实施方式可使用的螯合基团的实例包括,但不限于,乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙烯三胺五乙酸(DTAP)、DOTA、NOTA、NOGADA、NETA、去铁胺(DfO)、波菲利、聚胺类、冠醚类、双-缩氨基硫脲类、聚胍类等基团。螯合剂可以与抗原结合构建体通过基团连接,该基团允许以最低的免疫反应性损失和最小的聚集和/或内部交联与分子形成键。当一起使用本文描述的抗原构建体和载体时,相同的螯合剂,当与非放射性金属,如锰、铁和钆复合时,有利于MRI。大环螯合剂如NOTA、NOGADA、DOTA,和TETA与多种金属和放射性金属,分别包括但不限于放射性核素镓、钇和铜一起使

用。可以使用其他环形螯合剂如大环聚醚类,其对稳定结合放射性核素感兴趣如对于RAIT的镭-223。在某些实施方式中,可使用螯合性半体以将PET成像剂,如铝-¹⁸F复合物,附加至目标分子用于PET分析。

[0189] 可以用作根据本公开的实施方案的可检测标记物的示例性造影剂包括,但不限于,钡、泛影酸盐、乙碘油、枸缘酸镓、碘卡酸、碘酸胺酸、碘达胺、胆影酸、碘氧胺酸、碘古酰胺(iogulamide)、碘酯六醇(iohexyl)、碘异酞醇、碘番酸、碘普西酸、碘西法酸、碘丝酸、碘硃葡胺、碘西美酸(iosemetac acid)、碘肽硫、碘替酸、碘酞酸、碘曲西酸、碘克沙酸、羟泛影酸、胺碘苯丙酸、葡甲胺、甲泛葡胺、甲泛影酸盐、丙碘酮、氧化亚铈,或其组合。

[0190] 可以用作根据本公开的实施方案的可检测标记物的生物性发光和荧光化合物或分子以及染料包括,但不限于,荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、OREGON GREENTM、罗丹明、德克萨斯红、四甲基罗丹明异硫氰酸(tetraphenylrhodamine isothiocyanate, TRITC)、Cy3、Cy5等)、荧光标记物(例如,绿色荧光蛋白(GFP)、藻红蛋白等)、自动淬灭的通过肿瘤相关的蛋白酶激活的荧光化合物、酶类(例如,荧光素酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、纳米颗粒、生物素、地高辛或其组合。

[0191] 可以用作根据本公开的实施方案的可检测标记物的酶类包括,但不限于,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酸酶或 β -内酰胺酶。这些酶类可以与发色体、荧光化合物或发光化合物(luminogenic compound)组合以产生可检测的信号。

[0192] 在一些实施方式中,抗原结合构建体与纳米颗粒连接。术语“纳米颗粒”是指其大小以纳米测量的微小颗粒,例如具有至少一个维度小于约100nm的颗粒。纳米颗粒可以用作可检测物质,因为它们足够小以致分散可见光而不是吸收可见光。例如,金纳米粒子具有明显的可见光消失特性并在溶液中出现深红色到黑色。结果,包含与纳米颗粒连接的抗原结合构建体的组合物可以用于在受试者中T-细胞的体内成像。在尺寸范围的小末端,纳米颗粒经常是指簇。已经形成金属、电介质,或半导体纳米颗粒,以及杂交结构(例如,核-壳纳米颗粒)。纳米微球、纳米棒,以及纳米杯仅是已经开发的一些形状。半导体量子点和纳米晶体是纳米颗粒的其他类型的实例。这样的纳米级颗粒,当与抗原结合构建体连接时,可以用作用于如本文所描述的在体内检测T-细胞的成像剂。

[0193] 治疗剂

[0194] 在一些实施方式中,抗原结合构建体与治疗剂连接。如本文中所使用的“治疗剂”是有益于治疗癌症、炎症、其他疾病障碍,或其他抑制免疫应答,例如器官移植中的免疫抑制的原子、分子,或化合物。治疗剂的实例包括,但不限于,药物、化疗剂、治疗性抗体或抗体片段、毒素类、放射性同位素、酶类(例如,将前药在抗原结合构建体结合位点切割成细胞毒剂的酶类)、核酶类、激素类、免疫调节剂、反义寡核苷酸、螯合剂、硼化合物类、感光剂和染料,和纳米颗粒。

[0195] 化疗剂性质上通常是细胞毒性的或抑制细胞的,并可包括烷化剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂激素治疗、靶向治疗剂和免疫治疗剂。在一些实施方式中,可以用作根据本公开的实施方案的可检测标记物的化疗剂包括,但不限于,13-顺-维甲酸、2-氯代脱氧腺苷、5-阿扎胞苷、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、放线菌素-D、阿霉素、阿地白介素、阿仑单抗、阿利维A酸、全反式维甲酸、 α -干扰素、六甲蜜胺、氨

甲喋呤、氨磷汀、阿那格雷、阿那曲唑、阿糖胞苷、三氧化二砷、安吡啶、氨基喜树碱、氨鲁米特、天冬酰胺酶、氮胞苷、卡介苗 (BCG)、苯达莫司汀、贝伐单抗、贝沙罗汀、比卡鲁胺、硼替佐米、博莱霉素、白消安、甲酰四氢叶酸钙、嗜橙菌因子、卡培他滨、卡奈替尼、卡铂、卡莫司汀、西妥昔单抗、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、可的松、环磷酰胺、阿糖胞苷、阿法达贝泊汀、达沙替尼、柔红霉素、地西他滨、地尼白介素、地塞米松、氟美松、右丙亚胺、更生霉素、道诺霉素、氮烯咪胺、多西他赛、多柔比星、去氧氟尿苷、恩尿嘧啶、表柔比星、阿法依泊汀、厄洛替尼、依维莫司、依西美坦、雌莫司汀、依托泊苷、非格司亭、氟甲睾酮、氟维司群、夫拉平度、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟他胺、吉非替尼、吉西他滨、吉妥单抗奥唑米星、戈舍瑞林、粒细胞集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、六甲蜜胺、氢化可的松羟基豚、替伊莫单抗、 α -干扰素、白细胞介素-2、白细胞介素-11、异维A酸、伊沙匹隆、伊达比星、甲磺酸伊马替尼、异环磷酰胺、伊立替康、拉帕替尼、来那度胺、来曲唑、亚叶酸、亮丙瑞林、脂质体Ara-C、洛莫司汀、氮芥、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、甲基强的松龙、丝裂霉素C、米托坦、米托蒽醌、奈拉滨、尼鲁米特、奥曲肽、奥普瑞白介素、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸二钠、培美曲塞、帕尼单抗、PEG干扰素、培门冬酶、聚乙二醇非格司亭、PEG-L-天冬酰胺酶、喷司他丁、普卡霉素、强的松龙、强的松、甲基苄肼、雷洛昔芬、利妥昔单抗、咯咪珀咯、雷替曲唑、沙帕他滨 (sapacitabine)、沙格司亭、赛特铂、索拉非尼、舒尼替尼、司莫司汀、链脲菌素、他莫昔芬、替加氟、替加氟-尿嘧啶、替西罗莫司、替莫唑胺、替尼泊苷、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替哌、拓扑替康、托瑞米芬、托西莫单抗、曲妥珠单抗、维甲酸、三甲氧蝶呤 (trinitrexate)、氨柔比星、长春新碱、长春碱、硫酸长春新碱、长春瑞滨、伏立诺他、或唑来膦酸。

[0196] 可以用作根据本公开的实施方式的可检测标记物的毒素包括,但不限于,蓖麻毒素、相思子毒素、核糖核酸酶 (RNase)、DNase I (脱氧核糖核酸酶I)、金黄色葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、铜绿假单胞菌外毒素,和假单胞菌内毒素。

[0197] 在一些实施方式中,使用纳米颗粒用作治疗应用中的药物载体,其当与抗原结合构建体连接时,递送化学治疗剂、激素治疗剂、放射治疗剂、毒素,或任何在本领域中已知的其他细胞毒剂或抗癌剂至在细胞表面上过表达目标的癌细胞。

[0198] 本文中描述的任何抗原结合构建体可进一步与一种或多种另外的治疗剂、可检测标记物、纳米颗粒、载体,或其组合连接。例如,抗原结合构建体可用碘131进行放射性标记并与脂质载体连接,以致抗CD8-脂质结合物形成胶束。此胶束可以插入一种或多种治疗剂或可检测标记物。可替换地,另外,抗原结合构建体可用碘131进行放射性标记 (例如酪氨酸残基) 并与药物连接 (例如,在赖氨酸残基的 ϵ 氨基上),而载体可并入另外的治疗剂或可检测标记物。

[0199] 试剂盒

[0200] 在一些实施方式中,提供了试剂盒。在一些实施方式中,试剂盒包括如本文中描述的抗原结合构建体。在一些实施方式中,试剂盒包括编码如本文中描述的抗原结合构建体的核酸。在一些实施方式中,试剂盒包括产生如本文中描述的抗原结合构建体的细胞系。在一些实施方式中,试剂盒包括如本文中描述的可检测标记物。在一些实施方式中,试剂盒包括如本文中描述的治疗剂。在一些实施方式中,试剂盒包括缓冲剂。在一些实施方式中,试

剂盒包括阳性对照,例如CD8、CD8+细胞,或其片段。在一些实施方式中,试剂盒包括阴性对照,例如基本上没有CD8的表面或溶液。在一些实施方式中,试剂盒包括包装。在一些实施方式中,试剂盒包括使用说明。

[0201] 检测目标分子存在或不存在的方法

[0202] 抗原结合构建体可以用于在体内和/或体外检测目标分子的存在或不存在。因此,一些实施方式包括检测目标分子存在或不存在的方法。该方法可以包括将抗原结合构建体施加至样品。该方法可以包括检测抗原结合构建体与目标分子,CD8的结合或不存在结合。

[0203] 图14图例说明检测CD8存在或不存在的方法的一些实施方式。将理解的是在图14中显示的步骤可以以任何序列进行,和/或可选地重复和/或消除,并且可以可选地将另外的步骤添加至该方法中。如本文描述的抗原结合构建体可以施加至样品100。可以进行可选的清洗110。可选地,可以将第二抗原结合构建体施加至样品120。可以进行可选的清洗130。可以检测抗原结合构建体与目标分子的结合或不存在结合140。

[0204] 在一些实施方式中,将如本文描述的抗原结合构建体在体内施加至样品。可以将抗原结合构建体给予至受试者。在一些实施方式中,受试者是人。在一些实施方式中,受试者是非人哺乳动物,例如大鼠、鼠、豚鼠、仓鼠、兔、狗、猫、牛、马、山羊、绵羊、驴、猪、猴,或猿。在一些实施方式中,将抗原结合构建体输注进受试者。在一些实施方式中,输注是静脉内的。在一些实施方式中,输注是腹膜内的。在一些实施方式中,将抗原结合构建体局部外用或局部地(如在介入或手术中应用的情况中)施加至受试者。在一些实施方式中,可以将含有抗原结合构建体的胶囊施加至受试者,例如口服地或腹腔内地。在一些实施方式中,选择抗原结合构建体以减少受试者的免疫原性应答的风险。例如,对于人类受试者,如本文所描述的,可以将抗原结合构建体人化。在一些实施方式中,在体内施加抗原结合构建体后,将样品或部分样品从宿主中移去。在一些实施方式中,将抗原结合构建体在体内施加,如本文所描述的在体内培养一段时间,并移取样品用于体外分析,例如在体外检测本文所描述的抗原结合构建体与目标分子的结合或其的不存在结合。

[0205] 在一些实施方式中,将抗原结合构建体在体外施加至样品。在一些实施方式中,样品是从受试者中新鲜获得,例如活检。在一些实施方式中,样品在从受试者获得后进行培养。在一些实施方式中,样品是固定的。在一些实施方式中,样品包括全器官和/或组织。在一些实施方式中,样品包括一种或多种全细胞。在一些实施方式中样品来自细胞提取物,例如裂解物。在一些实施方式中,将在溶液中的抗原结合构建体添加至样品中的溶液。在一些实施方式中,将在溶液中的抗原结合构建体添加至不含溶液的样品,例如冻干样品,因此重构样品。在一些实施方式中,将冻干的抗原结合构建体添加至含有溶液的样品,因此重构抗原结合构建体。

[0206] 在一些实施方式中,将抗原结合构建体可选地与样品培养。抗原结合构建体可以培养不超过约10天的时间,例如不超过约10天、9、8、7、6、5、4、3、2或1天,或不超过约23小时,例如不超过约23小时、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.75、0.5、0.25或0.1小时,包括任何两种所列值之间的范围。在一些实施方式中,培养是在给予抗原结合构建体的受试者内。一些实施方式中,培养是在孵育器内。一些实施方式中,孵育器保持在固定的温度,例如约21℃、室温、25℃、29℃、34℃、37℃,或40℃。

[0207] 一些实施方式中,可选地将未与目标结合的抗原结合构建体从样品中移去。一些

实施方式中,样品是清洗了的。清洗样品可以包括去除含有未结合抗原结合构建体的溶液,并加入不含有抗原结合构建体的溶液,例如缓冲溶液。一些实施方式中,清洗体外样品,例如通过抽吸、吸取、泵送或排出含有未结合抗原结合构建体的溶液,并加入不含有抗原结合构建体的溶液。一些实施方式中,清洗体内样品,例如通过给予受试者不含有抗原结合构建体的溶液,或通过清洗局部给予抗原结合构建体的位点。在一些实施方式中,进行至少两次清洗,例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20次。一些实施方式中,在清洗或多次清洗后,至少约50%的未结合抗体从样品中移除,例如至少约50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或更高。

[0208] 一些实施方式中,未结合抗原结合构建体从样品中消除。在将抗原结合构建体施加至样品后,与目标结合的抗原结合构建体和未与目标结合的抗原结合构建体达到平衡,以至于在施加抗原结合构建体后的一些时间,与目标结合的抗原结合构建体的量基本上没有增加。在该时间后,至少部分的与目标未结合的抗原结合构建体的量可以被消除。在一些实施方式中,未结合的抗原结合构建体通过给予了抗体或片段的受试者的代谢或其他身体过程消除。在一些实施方式中,未结合的抗原结合构建体通过另外的破坏或不稳定未结合的抗原结合构建体的物质消除,例如蛋白酶或中和抗体。在一些实施方式中,在施加抗原结合构建体1天后,至少约30%的所施加的抗原结合构建体已经被消除,例如至少约30%、40%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%,或99.9%。在一些实施方式中,在施加抗原结合构建体2天后,至少约40%的所施加的抗原结合构建体已经被消除,例如至少约40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%,或99.9%。

[0209] 在一些实施方式中,检测目标,CD8的存在或不存在。目标的存在或不存在可以基于在样品中在抗原结合构建体的存在或不存在来检测。在从样品中去除和/或消除抗原结合构建体后,例如通过清洗和/或代谢消除,保留在样品中的抗原结合构建体可以指示目标的存在,而在样品中没有抗原结合构建体可以指示目标的不存在。在一些实施方式中,抗原结合构建体配置为致其偏向经肾脏消除。在一些实施方式中,抗原结合构建体配置为致其偏向经肝脏消除。在一些实施方式中,可以配置包括至少部分的如本文所描述的hIgG2或IgG2铰链和/或C_H3区的抗原结合构建体,以致其基本经肝脏清除。在一些实施方式中,可以配置包括至少部分的如本文所描述的IgG2铰链和/或C_H3区的抗原结合构建体,以致其基本经肝脏清除,但基本上不经肾脏清除。在一些实施方式中,经肝脏清除的抗原结合构建体与经肾脏清除的抗原结合构建体的比例为至少约2:1,例如约2:1、3:1、3.5:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、100:1,或200:1,包括任何所列值之间的范围。在一些实施方式中,抗原结合构建体在消除期间保持为二聚体,以便具有增加经肝脏而不是经肾脏清除的可能性的分子量。在一些实施方式中,抗原结合构建体维持大于约60kDa的肾阈值的原子质量,例如约65kDa、70kDa、80kDa、90kDa、100kDa、120kDa、150kDa,或200kDa,包括任何所列值之间的范围。

[0210] 在一些实施方式中,抗原结合构建体包括如本文所描述的可检测标记物。因此,可以通过检测可检测标记物来推测抗原结合构建体。

[0211] 在一些实施方式中,使用第二抗原结合构建体用于检测抗原结合构建体。第二抗原结合构建体可以与抗原结合构建体特异性地结合。例如,第二抗原结合构建体可以包括

抗宿主类型的抗体或抗抗原结合构建体自身的多克隆或单克隆抗体、双价抗体、微抗体等。第二抗原结合构建体可以与如本文中描述的可检测标记物连接。可以将第二抗原结合构建体施加至样品。在一些实施方式中,将第二抗原结合构建体以与抗原结合构建体基本上相同的方式施加至样品。例如,如果将抗原结合构建体输入受试者,则也可以将第二抗原结合构建体输入受试者。

[0212] 在一些实施方式中,抗原结合构建体的结合或不存在结合经以下中至少一种进行检测:正电发射断层显像(正电子放射断层造影术,positron emission tomography,PET)、单光子发射计算机断层显像(SPECT)、核磁共振成像(NMR),或检测的荧光发射。PET可以包括,但不限于微PET成像。在一些实施方式中,抗原结合构建体的结合或不存在结合经两种或多种成像形式检测。在一些实施方式中,可以经近红外(NIR)和/或切伦科夫辐射(Cerenkov)进行检测。

[0213] 将治疗剂靶向细胞的方法

[0214] 可以使用抗原结合构建体将治疗分子,例如细胞毒素靶向目标阳性细胞,如表达CD8的细胞。因此,一些实施方式包括将治疗剂靶向目标阳性细胞的方法。该方法可以包括将如本文描述的抗原结合构建体给予至受试者。受试者可以是有需要的受试者,例如需要消除或中和至少一些目标阳性细胞的受试者。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括至少一种如本文所描述的治疗剂。在一些实施方式中,治疗剂可以经共价键,例如二硫键与抗原结合构建体直接连接。在一些实施方式中,受试者可以从将CD8阳性细胞定位至其他细胞或试剂中受益。

[0215] 可选地,在给予包括至少一种治疗剂的抗原结合构建体之前和/或之后,目标阳性细胞的数量和/或位置是确定的。例如,在给予之前确定目标阳性细胞的数量和/或位置可以指示患者是否可能从中和和/或消除目标阳性细胞中受益。在给予之后确定目标阳性细胞的数量和/或位置可以指示目标阳性细胞是否在患者中消除。

[0216] 另外的实施方式

[0217] 一些实施方式包括检测其为在T细胞的子集的表面上发现的特异性生物标记物的人CD8,用于免疫系统的诊断成像。目标分子成像允许在体内检测T-细胞定位。T-细胞定位的改变能反映免疫应答的进程并能随时间出现,作为各种治疗处理或甚至疾病状态的结果。例如,成像T-细胞定位可以有利于免疫治疗。过继性免疫治疗是将患者自身T-细胞在体外操作并重新导入患者的治疗形式。对于该治疗形式,T-细胞成像可以有利于监测和/或确定治疗状态。因此,在一些实施方式中,监测目标分子的定位可以有利于分析药物开发中的作用机理、效果和/或安全性和/或可以有助于疾病的临床管理。

[0218] 在一些实施方式中,已经将与目标特异性结合的抗原结合构建体的CDR,例如抗体OKT8,调整成微抗体和cys-双价抗体设置。已经将鼠抗体的CDR接枝在人微抗体和cys-双价抗体框架上,因此产生嵌合微抗体。抗体V域通常含有形成内部二硫键的两个半胱氨酸。OKT8 V_H具有在框架3(FR3)中的外部半胱氨酸,其可以干扰蛋白的表达,因为其可以导致聚集并因此在内质网中滞留。因此,一些实施方式包括由用丝氨酸替换框架中的外部半胱氨酸制作的微抗体(见,例如,SEQ ID:16、18、20,和22)。

[0219] 在一些实施方式中,提供将CD8+细胞靶向至第一抗原的方法。该方法可以包括将双特异性抗原结合构建体施加至样品。双特异性抗原结合构建体可以包括如本文描述的

CD8抗原结合构建体。双特异性抗体可以包括与第一抗原结合的抗原结合构建体,例如微抗体或cys-双价抗体的1、2、3、4、5或6个CDR,scFv,或单体。在一些实施方式中,双特异性抗体包括本文所描述的抗原结合构建体的1、2或3个HCDR,和/或本文所描述的抗原结合构建体的1、2或3个LCDR。在一些实施方式中,双特异性抗原结合构建体包括如本文描述的抗原结合构建体的scFv。在一些实施方式中,双特异性抗原结合构建体包括如本文描述的 V_H 或 V_L 序列。在一些实施方式中,双特异性抗原结合构建体包括如本文描述的单抗体或cys-双价抗体单体。在一些实施方式中,将双特异性抗原结合构建体在体内施加至样品,例如受试者的器官或组织。在一些实施方式中,将双特异性抗原结合构建体施加至体外样品。不被任何一种原理所限制,在一些实施方式中,双特异性抗原结合构建体与目标在目标阳性细胞上结合,并与第一抗原(其可以区别于CD8)在第一细胞上结合,并因此带来目标阳性细胞与第一细胞的接近。例如,可以带来CD8+T细胞与癌细胞的接近,并能促进对该癌细胞的免疫应答。

[0220] 在一些实施方式中,抗-CD8抗原结合构建体可以是特异性靶向人CD8+T-细胞的成像剂。在一些实施方式中,抗-CD8片段可以直接连接并检测表达CD8的T-细胞的特定亚类的定位。在一些实施方式中,能够交联CD8的工程片段可以通过T细胞受体加强信号,并能够加强受试者清除病毒病原体并对肿瘤抗原和疫苗应答的能力。

[0221] 在一些实施方式中,微抗体和cys-双价抗体形式具有期望的药代动力学特征,用于诊断成像同时保持亲本抗体的高结合亲和力和特异性。与用与用全长亲本抗体成像相比,这些片段清除更快;它们还能够靶向抗原用于快速高对比度成像。相同的有利药代动力学性质有利于靶向免疫应答,允许更多的受控制的T细胞刺激并防止过度刺激的不期望效果(例如,细胞因子风暴)。在临床前模型中,对于微抗体和cys-双价抗体较短的血清半衰期允许在注射微抗体后约16-20小时和注射cys-双价抗体后约2-6小时时最佳成像。同天成像在临床中关于患者医护管理提供显著的优势。

[0222] 另外,cys-双价抗体的抗体形式以C-端半胱氨酸尾部为特征。这两个巯基(温和还原后)为功能性半体的位点特异性结合提供了对策,如不干扰cys-双价抗体的结合活性的放射性示踪剂。

[0223] 在一些实施方式中,这些抗原结合构建体可以是诊断成像剂(在用适合的放射性同位素如碘-124、Cu-64或Zr-89(用于PET成像)或荧光团(用于荧光成像)标记后)。作为临床成像剂,这些CD8抗原结合构建体可以帮助监测治疗并作为患者选择工具。

[0224] 在一些实施方式中,抗原结合构建体可以用于需要对CD8高特异性和高-亲和力结合的应用中。除诊断成像之外,这些片段将用于不同目的,这取决于带有的不同功能性基团。

[0225] 带有适合的红外线的或荧光的染料,这些构建体可以用作用于图像导向的术中手术的靶向剂。

[0226] 在一些实施方式中,除了对片段带有的功能性基团的修改,通过使用双特异性片段(其中该片段能与2种不同抗原结合),将CD8+细胞与第二抗原带到一起是可能的。双特异性全长抗体已经用于癌症免疫治疗以带来免疫系统的针对肿瘤细胞的细胞毒性细胞。因此,这样的实施方式还考虑适合的抗原结合构建体。

[0227] 在一些实施方式中,本文提供了在体外和体内均能结合并特异性靶向人CD8 α 的工程scFv、微抗体,和cys-双价抗体抗体片段。

[0228] 实施例1:CD8抗体和抗体片段的人化

[0229] OKT8抗体的鼠可变区通过将鼠互补决定区(CDR)接合到人框架上来进行人化。针对人V胚系数据库运行鼠V基因。检查带有最高序列同源性的人V基因的功能性残基和对抗原结合环(CDR)结构的相似性。然后将鼠的OKT8的 V_L 和 V_H CDR合并入人受体可变区框架,替换人CDR。显示了相应鼠、人胚系,和人化序列对于重链可变区(图2A)和轻链可变区(图2B)的比对。在这些图中,CDR被框出且星号指示彼此不同的残基。所选择的鼠残基,已知在环结构中的功能,被保留在人框架中。

[0230] 实施例2:CD8微抗体的表达

[0231] 将OKT8微抗体结构(如在表0.1中概括的序列组合)瞬时转染入CHO-K1细胞以验证表达。转染在6-孔板中利用脂质体转染试剂(Invitrogen)进行。在于CO₂孵育器中在37℃培养72小时后,收获上清液并过滤以去除任何细胞。

[0232] 在来自瞬时转染的上清液上进行蛋白印迹分析以确认抗体片段的表达。包括来自空载体转染的上清液作为阴性对照,而来自无关微抗体转染的上清液作为阳性对照。在非还原条件下,微抗体跑在预期的80-90kDa分子量处(图15)。在大约40kDa处还检测到代表单体形式的小带。这些结果确认嵌合的并人化的微抗体的适宜表达。

[0233] 实施例3结合

[0234] 嵌合微抗体变体1通过ELISA证明对CD8的最高结合,而人化变体没有显示对CD8的任何显著结合(图16)。虽然人化变体的SPR分析显示与可溶CD8结合,但观察到了与嵌合微抗体和亲本OKT8抗体相比亲和力的数倍丧失。用重组人CD8抗原覆盖96孔板并用从瞬时转染获得的上清液孵育。结合是用辣根过氧化物酶(HRP)结合的山羊抗-人IgG(Fc-特异性的)和显色底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)在405nm处测定吸光度来检测的。稀释以每次三份进行。数据显示为相对吸光度的均值。

[0235] 图17A-图17D显示IAb_Mb_CD8变体的流式细胞术分析的结果。所有直方图显示别藻蓝蛋白(allophycocyanin,APC)信号对计数。将来自变体的转染的上清液在不同稀释度用CD8+细胞孵育。清洗细胞并随后用第二抗-人IgG(Fc-特异性的)APC结合抗体染色。每点染色 1×10^5 个细胞并用10,000事件/点进行分析。

[0236] 嵌合并人化的微抗体显示与CD8+细胞浓度依赖性地结合(图17A-图17D)。虽然人化微抗体比嵌合的表达更好,但嵌合微抗体通过流式细胞术显示更强的信号,证明嵌合微抗体具有更强的结合亲和力。

[0237] 实施例4—抗原结合构建体的成熟

[0238] 为了提高人化抗体片段的结合亲和力,两种人化 V_H 区是进一步亲和力成熟的。对于1st版本 V_H ,亲和力成熟产生亚-版本a和b。对于2nd版本 V_H ,亲和力成熟产生亚-版本c和d。图12F-图12I显示产生的抗体可变轻(V_L)基因和可变重(V_H)基因。显示了带有氨基酸序列的DNA。利用Chothia定义框住CDR。

[0239] 将亲和力成熟的人化OKT8 V基因工程设计成区别在于在scFv中的V基因的方向的两种微抗体变体; V_L - V_H 方向指为号码1)而 V_H - V_L 方向指为号码2)。特定序列组合在表0.2中概括。

[0240] 实施例5:CD8微抗体的表达

[0241] 将上面的IAb_Mb_CD8表达构建体瞬时转染入CHO-K1细胞。通过蛋白印迹分析在来

自转染的上清液以确认微抗体的适宜表达。包括来自空载体转染的上清液作为阴性对照，而无关微抗体的纯化蛋白作为阳性对照。表达了所有变体，其由在预期的对于组合的微抗体复合物(约95kDa)的分子量处的带所证明(图18A和图18B)。出现在约45kDa的带代表单体。在SDS-PAGE上跑来自瞬时转染子的转染上清液并转到PVDF膜上。该膜用碱性磷酸酶(AP)结合的抗-人IgG(Fc-特异性的)抗体标记并通过用AP底物BCIP/NBT孵育来显影。这是多项实验的代表性印迹。

[0242] 进行定量ELISA以测定来自在CHO-K1细胞中瞬时转染的IAb_Mb_CD8的表达水平。IAb_Mb_CD8微抗体变体在约0.5-1.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的范围内表达，其范围的较高端与先前表达的参照微抗体相当(图19)。使用山羊抗-人IgG(Fc-特异性的)用于捕获微抗体并使用AP-结合的山羊抗-人IgG(Fc-特异性的)用于检测。使用纯化的不相关同型对照微抗体蛋白作为标准品。将IAb_Mb_CD8上清液连续稀释以找到符合标准曲线的线性范围的稀释点。

[0243] 实施例6:微抗体的功能性活性

[0244] 为了证明IAb_Mb_CD8微抗体变体的功能性活性，通过ELISA测试来自瞬时转染的上清液对于与纯化的重组人CD8蛋白的结合。基于在图19中出现的定量ELISA，标准化变体IAb_Mb1b_CD8、IAb_Mb2b_CD8，和IAb_Mb1a_CD8的浓度以匹配IAb_MB2a_CD8(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的浓度。然后将样品连续稀释以通过一系列的浓度评定结合。还包括亲本OKT8抗体作为用于分析的阳性对照(数据未显示)。所有微抗体变体显示与可溶重组人CD8(rhCD8)的浓度依赖性结合。

[0245] 图20表明IAb_Mb1a_CD8具有与抗原结合的最高水平的结合，随后是IAb_Mb1b_CD8。用rhCD8抗原覆盖96孔板并用从瞬时转染获得的上清液孵育。结合用HRP结合的山羊抗-人(Fc-特异性的)IgG和TMB底物来检测。在405nm测定吸光度。稀释以每次三份进行。数据显示为相对吸光度的均值。

[0246] 图21表明变体1c具有结合的最高水平的结合，随后是变体1c。用rhCD8抗原覆盖96孔板并用从瞬时转染获得的上清液孵育。用HRP结合的山羊抗-人(Fc-特异性的)IgG和TMB底物来检测结合。在405nm测定吸光度。稀释以每次三份进行。数据显示为相对吸光度的均值。

[0247] 实施例7:与细胞的人CD8结合

[0248] 利用流式细胞术评估IAb_Mb_CD8变体对于与细胞的人CD8的结合。测试来自瞬时转染的上清液对于与PC3-CD8细胞的结合(PC3细胞用人CD8稳定转染)(图22A和图22B以及图23A和图23B)。标准化微抗体上清液用于流式细胞术试验。包括使用亲本OKT8作为用于结合的阳性对照(数据未显示)。PC3细胞用作阴性对照并确认微抗体变体没有结合(数据未显示)。IAb_Mb1b_CD8显示四种微抗体变体中最大的平均荧光强度(MFI)。

[0249] 关于在图22A和图22B中显示的结果，所有直方图显示APC信号对计数。来自变体的转染的上清液与PC3-CD8细胞一起孵育。清洗细胞并随后用APC-结合的抗-人IgG(Fc-特异性的)抗体染色。每点染色 1×10^5 个细胞且分析以10,000事件/点进行。

[0250] 关于在图23A和图23B中显示的结果，所有直方图显示APC信号对计数。来自变体的转染的上清液与PC3-CD8细胞一起孵育。清洗细胞并随后用APC-结合的抗-人IgG(Fc-特异性的)抗体染色。每点染色 1×10^5 个细胞且分析以10,000事件/点进行。

[0251] 结果表明构建体仍与细胞的人CD8结合。

[0252] 实施例8:SPR分析

[0253] 使用表面等离子共振 (SPR) 用于确定对于所有 IAb_Mb_CD8 变体与重组人 CD8 的结合亲和力 (表 8.0)。利用抗-人 IgG (Fc-特异性的) 抗体将在上清液中的微抗体蛋白捕获到 BIAcore 芯片上。标准化在芯片上捕获的微抗体的量, 以使得在变体之间结合亲和力的直接比较作为以排列亲和力的动态“勘察 (scouting)”实验。rhCD8 蛋白经过捕获的微抗体蛋白以测定结合。所有变体显示对 CD8 蛋白的强结合, 这与亲本 OKT8 mAb 相似。

[0254] 表 8.0

	配体	分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	分析物 浓度	KA (1/M)	KD (M)
[0255]	OKT8 mAb	hCD8	5.6x10 ⁵	1.0x10 ⁻³	50 nM	5.5x10 ⁸	1.8x10 ⁻⁹
	IAb_Mb1b_CD8	hCD8	6.4x10 ⁵	1.2x10 ⁻³	50 nM	5.4x10 ⁸	1.9x10 ⁻⁹
	IAb_Mb2b_CD8	hCD8	5.4x10 ⁵	2.1x10 ⁻³	50 nM	2.6x10 ⁸	3.9x10 ⁻⁹
	IAb_Mb1a_CD8	hCD8	6.5x10 ⁵	1.2x10 ⁻³	50 nM	5.3x10 ⁸	1.9x10 ⁻⁹
	IAb_Mb2a_CD8	hCD8	4.8x10 ⁵	2.2x10 ⁻³	50 nM	2.2x10 ⁸	4.6x10 ⁻⁹
	IAb_Mb1d_CD8	hCD8	7.0x10 ⁵	2.0x10 ⁻³	50 nM	3.4x10 ⁸	2.9x10 ⁻⁹
	IAb_Mb2d_CD8	hCD8	5.4x10 ⁵	2.9x10 ⁻³	50 nM	1.8x10 ⁸	5.5x10 ⁻⁹
	IAb_Mb1c_CD8	hCD8	7.0x10 ⁵	1.8x10 ⁻³	50 nM	4.0x10 ⁸	2.5x10 ⁻⁹
	IAb_Mb2c_CD8	hCD8	7.2x10 ⁵	3.2x10 ⁻³	50 nM	2.2x10 ⁸	4.5x10 ⁻⁹

[0256] 表 8.0 总结了对于 IAb_Mb_CD8 变体与重组 hCD8 结合的结合常数 (ka)、解离常数 (kd), 和 kD 常数。利用抗-人 Fc 特异性 IgG 抗体在 BIAcore 芯片上捕获变体。

[0257] 在一些实施方式中, 提供在纳摩尔级范围内 (例如 1 至 2、2 至 10、10 至 100, 或 100 至 1,000 nM) 结合的抗原结合构建体并包括微抗体、cys-双价抗体, 和 scFv 设置 (例如)。

[0258] 实施例9:CD8 Cys-双价抗体的表达

[0259] 将如在表 0.3 (人化版本 b) 中概括的 cys-双价抗体瞬时转染入 CHO-K1 细胞以验证表达。转染在 6-孔板中利用脂质体转染试剂进行。在于 CO₂ 孵育器中在 37°C 培养 72 小时后, 收获上清液并过滤以去除任何细胞。

[0260] 利用在来自瞬时转染的上清液进行蛋白印迹分析以确认抗体片段的表达。包括来自空载体转染的上清液作为阴性对照, 而来自无关 cys-双价抗体转染的上清液作为阳性对照。在非还原条件下, 所有人化 OKT8 cys-双价抗体的四种变体跑在大约 55 kDa 的适当分子量处 (图 24)。在大约 25 kDa 处还检测到代表单体形式的小带。这些结果确认人化 OKT8 Cys-双价抗体的适宜表达。对于蛋白印迹, 在瞬时转染入 CHO-K1 细胞后收集上清液。通过 SDS-PAGE 在非还原条件下电泳转染上清液并转到 PVDF 膜上。该膜用 HAP 结合的抗-His 抗体标记并用 HAP 底物 TMB 显影。

[0261] 实施例10:对于CD8 Cys-双价抗体的结合

[0262] 通过 ELISA 测试来自 IAb_Cys-Dbb_CD8 变体的瞬时转染的上清液对于与重组人 CD8 (rhCD8) 蛋白的结合。将样品连续稀释以在与 CD8 孵育之前通过浓度范围评定结合。用 rhCD8 抗原覆盖 96 孔板。瞬时转染不同 cys-双价抗体变体后, 用上清液孵育覆盖的板, 然后用 HAP 结合的抗-His 抗体孵育。利用 TMB 和在 405 nm 测定的吸光度来检测信号。

[0263] 所有四种变体均显示出与rhCD8蛋白的浓度依赖性结合(图25)。包括在分析中的来自阴性对照cys-双价抗体的转染上清液未显示与CD8的任何结合(图25)。

[0264] 利用流式细胞术进一步测试所有四种IAb_Cys-Dbb_CD8变体对于与细胞的人CD8的结合。测试来自瞬时转染的上清液对于与PC3-CD8的结合(图26A和图26B)。亲本OKT8被包括为对于结合的阳性对照(数据未显示)。PC3细胞被包括为阴性对照并确认该细胞与cys-双价抗体变体没有特异性结合(数据未显示)。IAb_Cys-Db1b_CD8和IAb_Cys-Db3b_CD8证明与另外两种变体相比较高的平均荧光强度(MFI)。在图26A和图26B中的所有直方图显示APC信号对计数。评估来自变体转染的上清液对于与PC3-CD8细胞的结合。随后将细胞用APC-结合的抗-His抗体染色。每点以 1×10^5 个细胞和10,000事件/点进行分析。

[0265] 评估IAb_Cys-Dbb_CD8变体对于其与表达内源性CD8的HPB-ALL细胞的结合的能力。所有IAb_Cys-Db 1b和3b变体与HPB-ALL细胞结合(图27)。亲本OKT8被包括为对于结合的阳性对照,而PC3细胞被包括为阴性细胞系。在不表达CD8的PC3细胞上没有见到通过cys-双价抗体变体的结合(数据未显示)。评估来自变体转染的上清液对于与表达内源性CD8的HPB-ALL细胞的结合。随后将细胞用APC-结合的抗-His抗体染色。所有直方图显示APC信号对比计数。每点以 1×10^5 个细胞和10,000事件/点进行分析。

[0266] 实施例11:体内检测CD8

[0267] 表0.3的人化CD8 cys-双价抗体与相关螯合剂经C-端半胱氨酸在cys-双价抗体上结合,并随后用同位素In111放射性标记(或替换地,Zr-89或Cu-64)。选择性地,可以在将相关螯合剂附在赖氨酸残基后放射性标记或直接用碘放射性标记cys-双价抗体。

[0268] 将cys-双价抗体静脉输注到健康人类受试者中。将cys-双价抗体在输注后在人类受试者中培养10分钟。在培养的同天,经PET扫描或外部闪烁系统检测cys-双价抗体的定位。

[0269] Cys-双价抗体的定位是用于确定CD8在受试者中的定位。

[0270] 实施例12:体内检测CD8

[0271] 表0.2的微抗体与相关螯合剂经赖氨酸残基在微抗体上结合,并随后用同位素In111放射性标记(或替换地,Zr-89或Cu-64)。选择性地,可以通过直接用碘放射性标记经酪氨酸残基来放射性标记微抗体。

[0272] 将微抗体静脉输注到健康人类受试者中。将微抗体在输注后在人类受试者中培养10分钟。在培养的同天,经PET扫描或外部闪烁系统检测微抗体的定位。

[0273] Cys-双价抗体的定位是用于确定CD8在受试者中的定位。

[0274] 实施例13:体内检测CD8

[0275] 提供其为SEQ ID NO:22的单体的二聚体的人化CD8微抗体。将微抗体静脉输注到健康人类受试者中。将微抗体在输注后在人类受试者中培养1小时。提供第二抗体,其为与CD8微抗体特异性结合并结合33P的人化cys-双价抗体。在培养的同天,将第二抗体输注到健康人类受试者中。将第二抗体培养1小时。经PET成像,经在第二抗体上的标记物检测微抗体的定位。

[0276] 微抗体的定位是用于确定CD8在受试者中的定位。

[0277] 实施例14:利用cys-双价抗体的治疗处理

[0278] 提供其为表0.3的单体的二聚体的CD8 cys-双价抗体。将Cys-双价抗体以足以与

受试者中足够水平的CD8结合的量静脉输注到患有CD8相关障碍的受试者中,以提供CD8相关障碍的症状的减轻。Cys-双价抗体与钇90结合。

[0279] 实施例15:利用微抗体的治疗处理

[0280] 提供表0.2的CD8微抗体。将微抗体注射到用针对传染性疾病的抗原接种的或用肿瘤相关抗原接种的患者中。CD8定向片段加强免疫应答并增强表达CD8的T细胞的细胞毒性活性。

[0281] 实施例16:利用cys-双价抗体的治疗处理

[0282] 提供其为表0.3的单体的二聚体的CD8 cys-双价抗体。将Cys-双价抗体以足以与受试者中足够水平的CD8结合的量静脉输注到患有CD8相关障碍的受试者中,以提供CD8相关障碍的症状的减轻。Cys-双价抗体与Lu177Tx结合。CD8 Cys-双价抗体与表达CD8的细胞和Lu177Tx结合引起杀死细胞。

[0283] 实施例17:在HPB-ALL细胞上与CD8结合的OKT8mAb的流式细胞术分析

[0284] 进行在HPB-ALL细胞上与细胞表面人CD8结合的OKT8 mAb构建体的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的抗体染色、清洗,然后用第二抗-鼠-IgG(Fc-特异性的)APC-结合的抗体染色。以10,000事件/点进行分析,各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图28中显示。该图表代表平均荧光强度(MFI)对浓度(nM)的对数。误差线代表标准误差。数据指示0.22nM的EC₅₀。

[0285] 实施例18A:在HPB-ALL细胞上与CD8结合的微抗体的流式细胞术分析

[0286] 进行在HPB-ALL细胞上与细胞表面人CD8结合的微抗体的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的微抗体染色、清洗,然后用第二抗-人IgG(Fc-特异性的)APC-结合的抗体染色。以10,000事件/点进行分析,各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图29A中显示。该图表代表标准化的平均荧光强度(MFI)对浓度(nM)的对数。误差线代表标准误差。数据指示0.15nM和0.19nM的EC₅₀。

[0287] 实施例18B:在CD8+细胞上与CD8结合的微抗体的流式细胞术分析

[0288] 进行在原代人CD8+T细胞上与细胞表面人CD8结合的微抗体的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的微抗体染色、清洗,然后用第二抗-人IgG(Fc-特异性的)APC-结合的抗体染色。以10,000事件/点进行分析,各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图29B中显示。该图表代表标准化的平均荧光强度(MFI)对浓度(nM)的对数。误差线代表标准误差。数据指示0.1nM和0.26nM的EC₅₀。

[0289] 实施例18C:在HPB-ALL细胞上与CD8结合的Df标记的和未标记的微抗体的流式细胞术分析

[0290] 进行在HPB-ALL细胞上与细胞表面人CD8结合的微抗体(+/-赖氨酸与去铁胺(Df)结合)的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的微抗体染色、清洗,然后用第二抗-人IgG(Fc-特异性的)APC-结合的抗体染色。以10,000事件/点进行分析,各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图29C中显示。该图表代表平均荧光强度(MFI)对浓度(nM)的对数。误差线代表标准误差。数据指示0.13nM和0.12nM的EC₅₀。

[0291] 实施例18D:在PC3细胞上与CD8结合的Df标记的和未标记的微抗体的流式细胞术分析

[0292] 进行与过表达CD8的PC3细胞结合的微抗体(+/-赖氨酸与去铁胺结合)的流式细胞

术分析。将细胞分别与不同浓度的微抗体染色、清洗,然后用第二抗-人IgG (Fc-特异性的)APC-结合的抗体染色。以10,000事件/点进行分析,各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图29D中显示。该图表代表平标均荧光强度(MFI)对浓度(nM)的对数。误差线代表标准误差。数据指示0.64nM和0.83nM的 EC_{50} 。

[0293] 实施例18E:在PC3细胞上与CD8结合的Df标记的和未标记的微抗体的流式细胞术分析

[0294] 进行在HPB-ALL细胞上与细胞表面人CD8结合的IgG2微抗体的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的微抗体染色、清洗,然后用第二抗-人IgG (Fc-特异性的)APC-结合的抗体染色。以10,000事件/点进行分析,各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图29E中显示。该图表代表标准化的平标均荧光强度(MFI)对浓度(nM)的对数。误差线代表标准误差。数据指示0.1nM、0.13nM和0.08nM的 EC_{50} 。

[0295] 实施例19A:在HPB-ALL细胞上与CD8结合的cys-双价抗体的流式细胞术分析

[0296] 进行在HPB-ALL细胞上与细胞表面人CD8结合的cys-双价抗体的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的cys-双价抗体染色、清洗、用与生物素结合的第二蛋白L染色、清洗,然后用第三链霉亲和素-APC染色。以10,000事件/点进行分析,各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图30A中显示。该图表代表平标均荧光强度(MFI)对浓度(nM)的对数。误差线代表标准误差。数据指示0.04nM的 EC_{50} 。

[0297] 实施例19B:在CD8+细胞上与CD8结合的cys-双价抗体的流式细胞术分析

[0298] 进行在原代人CD8+T细胞上与细胞表面人CD8结合的cys-双价抗体的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的cys-双价抗体染色、清洗、用与生物素结合的第二蛋白L染色、清洗,然后用第三链霉亲和素-APC染色。以10,000事件/点进行分析,各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图30B中显示。该图表代表平标均荧光强度(MFI)对浓度(nM)的对数。误差线代表标准误差。数据指示0.02nM的 EC_{50} 。

[0299] 实施例19C:在HPB-ALL细胞上与CD8结合的Df标记的和未标记的cys-双价抗体的流式细胞术分析

[0300] 进行在HPB-ALL细胞上与细胞表面人CD8结合的cys-双价抗体(+/-C-端半胱氨酸与去铁胺结合)的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的cys-双价抗体染色、清洗、用与生物素结合的第二蛋白L染色、清洗,然后用第三链霉亲和素-APC染色。以10,000事件/点进行分析,各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图30C中显示。该图表代表平标均荧光强度(MFI)对浓度(nM)的对数。误差线代表标准误差。数据指示0.04nM和0.06nM的 EC_{50} 。

[0301] 实施例20:构建体通过流式细胞术的特性

[0302] 下面所示的表9总结了来自实例18A-18E和19A-19C的微抗体和cys-双价抗体构建体的特性结果。

[0303] 表9

[0304]	构建体名称	结合的细胞 (EC50)	SPR
	OKT8	0.33 nM HPB-ALL	KD 1.8 nM
	IAb_M1b_CD8	0.1 nM HPB-ALL 0.1 nM huCD8+ 0.6 nM CD8-PC3	KD 1.9 nM
[0305]	IAb_M2b_CD8	0.19 nM HPB-ALL 0.26 nM huCD8+	KD 3.6 nM
	IAb_M1b_CD8 IgG2 NH	0.08 nM HPB-ALL	N/A
	IAb_M1b_CD8 IgG2 EH	0.13 nM HPB-ALL	N/A
	IAb_Cys-Db3b_CD8	0.04 nM HPB-ALL 0.02 nM huCD8+	N/A

[0306] 实施例21:成像表达人CD8的肿瘤移植,有⁸⁹Zr-Df-IAb_Cys-Db3b_CD8的人CD8肿瘤移植

[0307] 研究了八(8)只雌性SCID小鼠。在右肩区,将 5×10^6 PC3-hCD8细胞植入四(4)只小鼠,而将PC3(hCD8阴性)细胞植入另外四(4)只小鼠。用⁸⁹Zr-Df-IAb_Cys-Db3b_CD8(C-端半胱氨酸残基与Df结合) i.v. 注射小鼠。在4h、6h和24h时通过PET(10分钟静态扫描)成像六(6)只小鼠(4只有阳性肿瘤和2只有阴性肿瘤)。一只小鼠还经受0-2h的动态扫描。在24小时时的最后一次扫描后进行体内分布。

[0308] 所获得的图像在图31中描绘。图31描绘了在右肩区(见箭头)带有PC3-hCD8移植瘤的同一SCID小鼠在4、6和24小时冠面和横断面PET图像。将小鼠i.v. 注射大约120 μ Ci的⁸⁹Zr-Df-IAb_Cys-Db3b_CD8(比活度为4.96 μ Ci/ μ g)。不被原理所限制,Cys-Db清楚地6h时描绘了肿瘤并经预期的肾清除。在24小时时,平均阳性比阴性肿瘤(PC3-hCD8比PC3)比例为约1.6倍。平均阳性肿瘤比血液比例为16.0(阴性比血液9.5)。

[0309] 实施例22:成像表达人CD8的肿瘤移植,有⁸⁹Zr-Df-IAb_M1b_CD8A的人CD8肿瘤移植

[0310] 研究了八(8)只雌性SCID小鼠。在右肩区,将 5×10^6 PC3-hCD8细胞植入四(4)只小鼠,而将PC3(hCD8阴性)细胞植入另外四(4)只小鼠。用⁸⁹Zr-Df-IAb_M1b_CD8(cys)-具有IgG1铰链-延伸和带有Df与在铰链区的半胱氨酸残基结合的C_H3的微抗体i.v. 注射小鼠。将六(6)只小鼠(4只有阳性肿瘤和2只有阴性肿瘤)在4h、24h和48h时通过PET(10分钟静态扫描)成像并随后进行10min CT扫描用于解剖参考。一(1)只小鼠还经受0-2h的动态扫描。在48小时时的最后一次扫描后进行体内分布。

[0311] 所获得的图像在图32A中描绘。图32A描绘了在右肩区(见箭头)带有PC3-hCD8移植瘤的同一SCID小鼠在2、4和24小时冠面冠面MIP PET/CT叠加图像。将小鼠i.v. 注射大约116 μ Ci的⁸⁹Zr-Df-IAb_M1b_CD8(cys)(比活度为5.16 μ Ci/ μ g)。在4和24小时时观察到一些瘤摄取。大部分活性经肾清除,其在48小时时具有比肝高4-5倍的摄取。不被原理所限制,高肾摄取表明Mb在与Df结合后瓦解以至于以40kDa(低于60kDa的肾阈值的大小)的单体(半个分子)存在而并不是80kDa的二聚体。在48h,收获肿瘤和器官并计算放射性。阳性肿瘤中的摄取显著高于在阴性肿瘤中的那些(P=0.02933)。阳性肿瘤比血液比例为11.0(阴性比血液

5.6)。

[0312] 将离体肿瘤在48小时单独成像。如在图32B中显示的,尽管主要是单体,存在Mb下,与阴性肿瘤(-)中的那些相比,较高活性保留在阳性肿瘤(+)中。如由上面所讨论的结果表明的,显然微抗体构建体在在铰链区的各半存在多于3个半胱氨酸时能具有另外的优点。

[0313] 实施例23:成像表达人CD8 T细胞,有⁶⁴Cu-NODAGA- IAb_M1b_CD8 IgG2 EH的细胞

[0314] 研究了六只雌性NOD Scid Gamma (NSG) 小鼠。将 20×10^6 新鲜人外周血单核细胞(PBMC;98%活力)通过注射入侧尾静脉移植到三只小鼠中。该处理带来在脾中与所用供者无关的均一地高移植。在3-4周后,用⁶⁴Cu-NODAGA- IAb_M1b_CD8 IgG2 EH(Cys)-具有IgG2铰链-延伸和有NODAGA与在铰链区中的半胱氨酸残基结合的C_H3域的Mb i.v.注射所有小鼠。将所有六只小鼠在4h成像。每组中的一只小鼠在7小时成像。在7小时进行体内分布。

[0315] 所获得的图像在图33中描绘。图33描绘了两只NSG小鼠(一只PBMC移植的而另一只不是)在4和7小时扫描的MIP图像。将大约84μCi的⁶⁴Cu-NODAGA- IAb_M1b_CD8 IgG2 EH(cys)(比活度为7.41μCi/μg)给入每只小鼠。在PBMC移植的鼠中观察到在脾(Sp)和可能地在腋淋巴结(LN)中的高摄取。在NSG鼠中,Mb主要经过肝(Li)清除。不被原理所限制,预期肝清除是80kDa的片段。在阴性对照鼠中,保持高的血液活性并且活性向肝和肾(Ki)均分布。在7h,在PBMC移植的NSG小鼠中的体内分布显示:与对照的相比,在脾中2.1倍更高的摄取,在肾中4.0倍较低的活性,在肝中1.7倍较高的活性和在血液中3.1倍较低的活性。

[0316] 在本申请中,单数的使用可以包括复数,除非或另外特意说明否则,作为将被本领域技术人员所理解的,根据本披露,单数仅是功能性实施例。因此,例如,“一”可以表示不只一种,并且“一种实施方式”可以表示适用于多种实施方式的描述。

[0317] 通过引用并入

[0318] 本文中所引用的所有参考,包括专利、专利申请、文章、课本,以及类似的,及其中所引用的,到它们没有准备好的程度,由此通过参考以其全部并入本文。在一种或多种并入的文献和相似的资料与本申请不同或相矛盾的情况中;包括但不限于所定义的术语、术语使用、所描述的技术,或类似的,本申请控制。

[0319] 等价物

[0320] 前面的描述和实例详述了某些实施方式。将理解的是,然而,无论前述的是如何详细地出现在文中,可以许多方式实践本发明,而本发明应该依照所附权利要求和其任何等价物来解释。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 伊麦吉纳博公司(Imaginab, Inc.)
- [0003] 大卫·T·霍(Ho, David T.)
- [0004] 托弗·奥拉夫森(Olafsen, Tove)
- [0005] 吉蒂·阿加希(Agahi, Giti)
- [0006] 克里斯蒂安·P·贝伦布鲁赫(Behrenbruch, Christian P.)
- [0007] <120> 与CD8的抗原结合构建体
- [0008] 参考序列表、表格,或计算机程序
- [0009] 列表
- [0010] <130> IGNAB.014W0
- [0011] <150> 61/780286
- [0012] <151> 2013-03-13
- [0013] <160> 81
- [0014] <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- [0015] <210> 1
- [0016] <211> 118
- [0017] <212> PRT
- [0018] <213> 鼠
- [0019] <400> 1
- [0020] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
- [0021] 1 5 10 15
- [0022] Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
- [0023] 20 25 30
- [0024] Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
- [0025] 35 40 45
- [0026] Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
- [0027] 50 55 60
- [0028] Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
- [0029] 65 70 75 80
- [0030] Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0031] 85 90 95
- [0032] Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
- [0033] 100 105 110
- [0034] Thr Leu Thr Val Ser Ser
- [0035] 115
- [0036] <210> 2
- [0037] <211> 120
- [0038] <212> PRT
- [0039] <213> 智人
- [0040] <400> 2
- [0041] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0042]	1	5	10	15
[0043]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr			
[0044]	20	25	30	
[0045]	Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0046]	35	40	45	
[0047]	Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val			
[0048]	50	55	60	
[0049]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr			
[0050]	65	70	75	80
[0051]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0052]	85	90	95	
[0053]	Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
[0054]	100	105	110	
[0055]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0056]	115	120		
[0057]	<210> 3			
[0058]	<211> 118			
[0059]	<212> PRT			
[0060]	<213> 人工序列			
[0061]	<220>			
[0062]	<223> 抗原结合构建体或其片段			
[0063]	<400> 3			
[0064]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0065]	1	5	10	15
[0066]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr			
[0067]	20	25	30	
[0068]	Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0069]	35	40	45	
[0070]	Ala Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe			
[0071]	50	55	60	
[0072]	Gln Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr			
[0073]	65	70	75	80
[0074]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0075]	85	90	95	
[0076]	Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr			
[0077]	100	105	110	
[0078]	Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0079]	115			
[0080]	<210> 4			
[0081]	<211> 118			
[0082]	<212> PRT			
[0083]	<213> 鼠			

[0084]	<400> 4
[0085]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0086]	1 5 10 15
[0087]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
[0088]	20 25 30
[0089]	Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0090]	35 40 45
[0091]	Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
[0092]	50 55 60
[0093]	Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
[0094]	65 70 75 80
[0095]	Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0096]	85 90 95
[0097]	Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
[0098]	100 105 110
[0099]	Thr Leu Thr Val Ser Ser
[0100]	115
[0101]	<210> 5
[0102]	<211> 115
[0103]	<212> PRT
[0104]	<213> 智人
[0105]	<400> 5
[0106]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0107]	1 5 10 15
[0108]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[0109]	20 25 30
[0110]	Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0111]	35 40 45
[0112]	Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
[0113]	50 55 60
[0114]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
[0115]	65 70 75 80
[0116]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0117]	85 90 95
[0118]	Ala Thr Ala Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[0119]	100 105 110
[0120]	Val Ser Ser
[0121]	115
[0122]	<210> 6
[0123]	<211> 118
[0124]	<212> PRT
[0125]	<213> 人工序列

[0126]	<220>
[0127]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0128]	<400> 6
[0129]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0130]	1 5 10 15
[0131]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
[0132]	20 25 30
[0133]	Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0134]	35 40 45
[0135]	Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
[0136]	50 55 60
[0137]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
[0138]	65 70 75 80
[0139]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0140]	85 90 95
[0141]	Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
[0142]	100 105 110
[0143]	Leu Val Thr Val Ser Ser
[0144]	115
[0145]	<210> 7
[0146]	<211> 107
[0147]	<212> PRT
[0148]	<213> 鼠
[0149]	<400> 7
[0150]	Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
[0151]	1 5 10 15
[0152]	Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
[0153]	20 25 30
[0154]	Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
[0155]	35 40 45
[0156]	Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0157]	50 55 60
[0158]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Pro
[0159]	65 70 75 80
[0160]	Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
[0161]	85 90 95
[0162]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0163]	100 105
[0164]	<210> 8
[0165]	<211> 107
[0166]	<212> PRT
[0167]	<213> 智人

[0168]	<400> 8
[0169]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0170]	1 5 10 15
[0171]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
[0172]	20 25 30
[0173]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
[0174]	35 40 45
[0175]	Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0176]	50 55 60
[0177]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0178]	65 70 75 80
[0179]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Leu
[0180]	85 90 95
[0181]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0182]	100 105
[0183]	<210> 9
[0184]	<211> 107
[0185]	<212> PRT
[0186]	<213> 人工序列
[0187]	<220>
[0188]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0189]	<400> 9
[0190]	Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0191]	1 5 10 15
[0192]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
[0193]	20 25 30
[0194]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
[0195]	35 40 45
[0196]	Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0197]	50 55 60
[0198]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0199]	65 70 75 80
[0200]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
[0201]	85 90 95
[0202]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0203]	100 105
[0204]	<210> 10
[0205]	<211> 768
[0206]	<212> DNA
[0207]	<213> 人工序列
[0208]	<220>
[0209]	<223> 抗原结合构建体或其片段

[0210]	<400> 10
[0211]	atggagaccg atacactgct gctgtgggtg ctgctgctct gggtccttgg cagcacagga 60
[0212]	gacatccaga tgacacagag ccctagctcc ctgagcgctt ccgtgggaga tagggtgacc 120
[0213]	atcacatgcc ggacctccag gtccatctcc cagtacctgg cctggtacca gcagaagccc 180
[0214]	ggcaagggtgc ccaagctgct catctatagc ggcagcaccc tgcagagcgg agtgccttcc 240
[0215]	cggttttccg gatccggctc cggcacagac tttacctga ccatctccag cctgcagcct 300
[0216]	gaggatgtcg ccacctacta ctgccaacag cacaacgaga acccctgac ctteggcggc 360
[0217]	ggaaccaagg tcgagatcaa gggaggaggc tccggaggag gaggccaagt gcagctggtc 420
[0218]	caatccggcg ccgaagtga aaagcccggc gccaccgtga agatcagctg caaggtgtcc 480
[0219]	ggcttcaaca tcaaggacac ctatatccac tgggtccagc aagcccccg aaaaggcctg 540
[0220]	gagtggatgg gacggattga ccccgccaac gacaacacac tctatgctc caagttccag 600
[0221]	ggcagggtga caatcaccgc cgacaccagc accgacacag cttatatgga gctgtcctcc 660
[0222]	ctccggtccg aggataccgc cgtctactac tgcgccagg gctacggcta ctacgtgttt 720
[0223]	gaccactggg gccagggcac cctggtgaca gtgtccagcg gaggctgc 768
[0224]	<210> 11
[0225]	<211> 768
[0226]	<212> DNA
[0227]	<213> 人工序列
[0228]	<220>
[0229]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0230]	<400> 11
[0231]	atggagaccg acaccctgct gctctgggtc ctctgctgt gggtccttgg cagcacagga 60
[0232]	caggtgcaac tgggtcagag cggcgccgag gtcaagaaac ctggcgccac cgtgaagatc 120
[0233]	agctgcaagg tgtccggctt caacatcaag gacacctaca tccactgggt ccaacaagcc 180
[0234]	cccggaaagg gcctggaatg gatgggcccg attgacccc ccaacgacaa caccctctat 240
[0235]	gccagcaagt tccaggcag ggtcaccatc accgccgaca ccagcaccga caccgcctac 300
[0236]	atggagctga gcagcctgcg gagcgaagac accgccgtgt actactgcgc caggggttac 360
[0237]	ggctactacg tcttcgacca ttggggacag ggcaccctcg tgacagtgc cagcgagga 420
[0238]	ggatccggcg gaggaggaga tatccagatg acccagagcc ctccagcct gtccgcttcc 480
[0239]	gtgggagatc gggtgaccat cacatgcagg acctccaggt ccatctccca gtacctggcc 540
[0240]	tggtaccaac agaagcccgg caaggtgccc aagctgctga tctacagcgg cagcacactg 600
[0241]	caatccggcg tcccttcccg gttttccgga tccggatccg gcaccgactt caccctgacc 660
[0242]	atcagctccc tgcaaccgga ggacgtggcc acctactact gtcagcagca caacgagaac 720
[0243]	ccctcacct ttggcgggcg aaccaaggtc gagatcaagg gcggctgc 768
[0244]	<210> 12
[0245]	<211> 253
[0246]	<212> PRT
[0247]	<213> 人工序列
[0248]	<220>
[0249]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0250]	<400> 12
[0251]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

[0252]	1	5	10	15
[0253]	Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser			
[0254]	20	25	30	
[0255]	Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser			
[0256]	35	40	45	
[0257]	Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro			
[0258]	50	55	60	
[0259]	Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser			
[0260]	65	70	75	80
[0261]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
[0262]	85	90	95	
[0263]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn			
[0264]	100	105	110	
[0265]	Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser			
[0266]	115	120	125	
[0267]	Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys			
[0268]	130	135	140	
[0269]	Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn			
[0270]	145	150	155	160
[0271]	Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly			
[0272]	165	170	175	
[0273]	Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr			
[0274]	180	185	190	
[0275]	Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr			
[0276]	195	200	205	
[0277]	Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala			
[0278]	210	215	220	
[0279]	Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp			
[0280]	225	230	235	240
[0281]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys			
[0282]	245	250		
[0283]	<210> 13			
[0284]	<211> 253			
[0285]	<212> PRT			
[0286]	<213> 人工序列			
[0287]	<220>			
[0288]	<223> 抗原结合构建体或其片段			
[0289]	<400> 13			
[0290]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro			
[0291]	1	5	10	15
[0292]	Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys			
[0293]	20	25	30	

[0294]	Lys	Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly	Phe	Asn
[0295]			35					40					45			
[0296]	Ile	Lys	Asp	Thr	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Gln	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
[0297]			50					55					60			
[0298]	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Asn	Asp	Asn	Thr	Leu	Tyr
[0299]	65					70					75					80
[0300]	Ala	Ser	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr
[0301]					85					90						95
[0302]	Asp	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala
[0303]					100					105						110
[0304]	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Val	Phe	Asp	His	Trp
[0305]					115					120						125
[0306]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp
[0307]					130					135						140
[0308]	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp
[0309]	145					150					155					160
[0310]	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Arg	Ser	Ile	Ser	Gln	Tyr	Leu
[0311]						165				170						175
[0312]	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
[0313]						180				185						190
[0314]	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
[0315]						195				200						205
[0316]	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu
[0317]						210				215						220
[0318]	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Asn	Glu	Asn	Pro	Leu	Thr
[0319]	225						230				235					240
[0320]	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Cys			
[0321]						245					250					
[0322]	<210> 14															
[0323]	<211> 256															
[0324]	<212> PRT															
[0325]	<213> 人工序列															
[0326]	<220>															
[0327]	<223> 抗原结合构建体或其片段															
[0328]	<400> 14															
[0329]	Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro
[0330]	1					5					10					15
[0331]	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser
[0332]						20				25					30	
[0333]	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Arg	Ser
[0334]						35				40					45	
[0335]	Ile	Ser	Gln	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro

[0336]	50	55	60
[0337]	Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser		
[0338]	65	70	75
[0339]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[0340]	85	90	95
[0341]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn		
[0342]	100	105	110
[0343]	Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly		
[0344]	115	120	125
[0345]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala		
[0346]	130	135	140
[0347]	Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser		
[0348]	145	150	155
[0349]	Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro		
[0350]	165	170	175
[0351]	Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn		
[0352]	180	185	190
[0353]	Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp		
[0354]	195	200	205
[0355]	Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu		
[0356]	210	215	220
[0357]	Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe		
[0358]	225	230	235
[0359]	Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys		
[0360]	245	250	255
[0361]	<210> 15		
[0362]	<211> 256		
[0363]	<212> PRT		
[0364]	<213> 人工序列		
[0365]	<220>		
[0366]	<223> 抗原结合构建体或其片段		
[0367]	<400> 15		
[0368]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro		
[0369]	1	5	10
[0370]	Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys		
[0371]	20	25	30
[0372]	Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn		
[0373]	35	40	45
[0374]	Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly		
[0375]	50	55	60
[0376]	Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr		
[0377]	65	70	75

[0378]	Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
[0379]	85 90 95
[0380]	Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
[0381]	100 105 110
[0382]	Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp
[0383]	115 120 125
[0384]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[0385]	130 135 140
[0386]	Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
[0387]	145 150 155 160
[0388]	Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser
[0389]	165 170 175
[0390]	Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu
[0391]	180 185 190
[0392]	Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
[0393]	195 200 205
[0394]	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
[0395]	210 215 220
[0396]	Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn
[0397]	225 230 235 240
[0398]	Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Cys
[0399]	245 250 255
[0400]	<210> 16
[0401]	<211> 394
[0402]	<212> PRT
[0403]	<213> 人工序列
[0404]	<220>
[0405]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0406]	<400> 16
[0407]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
[0408]	1 5 10 15
[0409]	Gly Ser Thr Gly Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala
[0410]	20 25 30
[0411]	Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser
[0412]	35 40 45
[0413]	Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn
[0414]	50 55 60
[0415]	Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser
[0416]	65 70 75 80
[0417]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[0418]	85 90 95
[0419]	Gly Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn

[0420]	100	105	110
[0421]	Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly		
[0422]	115	120	125
[0423]	Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
[0424]	130	135	140
[0425]	Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly		
[0426]	145	150	155
[0427]	Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp		
[0428]	165	170	175
[0429]	Thr Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp		
[0430]	180	185	190
[0431]	Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys		
[0432]	195	200	205
[0433]	Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala		
[0434]	210	215	220
[0435]	Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
[0436]	225	230	235
[0437]	Cys Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly		
[0438]	245	250	255
[0439]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
[0440]	260	265	270
[0441]	Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
[0442]	275	280	285
[0443]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
[0444]	290	295	300
[0445]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
[0446]	305	310	315
[0447]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
[0448]	325	330	335
[0449]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[0450]	340	345	350
[0451]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[0452]	355	360	365
[0453]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[0454]	370	375	380
[0455]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0456]	385	390	
[0457]	<210> 17		
[0458]	<211> 1185		
[0459]	<212> DNA		
[0460]	<213> 人工序列		
[0461]	<220>		

[0462]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0463]	<400> 17
[0464]	atggagacag acacctgct cctgtgggtg ctgctcctct gggtccttg atccaccggc 60
[0465]	gatgtccaga tcaaccaaag cccagcttt ctggctgcct cccctggaga gacaatcacc 120
[0466]	atcaattgcc ggaccagccg gagcatttcc cagtacctcg cctggtacca ggaaaagcct 180
[0467]	ggcaagacca acaagctgct gatctactcc ggctccacac tccagagcgg cattccttcc 240
[0468]	aggttttagcg gatccggatc cggaaccgac ttcacactca ccatctccgg cctggagccc 300
[0469]	gaggacttcg ccatgtatta ttgccagcag cacaatgaga accccctgac cttcggcgct 360
[0470]	ggcaccaagc tggagctgaa aggtccacc agcggaggcg gatccggagg aggaagcggc 420
[0471]	ggcggaggct cctccgaagt gcagctgcaa cagagcggcg ccgaactggt gaagcctgga 480
[0472]	gcttccgtga aactcagctg taccgccagc ggcttcaaca tcaaggatac ctacatccac 540
[0473]	ttcgtgcggc aaaggcctga gcagggcctg gaatggatcg gcaggatcga ccccgccaac 600
[0474]	gacaacaccc tctacgcctc caagttccaa ggcaaggcca caatcaccgc tgatacaagc 660
[0475]	tccaacaccg cctacatgca cctcagctcc ctgaccagcg gagacaccgc cgtgtactac 720
[0476]	tgcggacggg gatacggcta ctatgtgttc gaccactggg gccaaaggcac cacactcacc 780
[0477]	gtgtcctcgg agcccaagtc ctgcgacaag acacacacct gtcccccttg tggaggagga 840
[0478]	tcctccggag gcggctccgg cggacagcct agggagcccc aggtgtacac actgccccct 900
[0479]	tccagggacg aactcaccaa gaaccagtg tcctgacct gcctggtgaa gggattctac 960
[0480]	cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagtc aacggccaac ccgagaacaa ttacaagacc 1020
[0481]	acccccctg tgctcgatc cgacggtcc ttcttctgt actccaagct caccgtggac 1080
[0482]	aagtcccggt ggcaacagg caatgtgttc tctgcagcg tcatgcacga ggccctgcat 1140
[0483]	aaccactaca ccagaaatc cctcagcctc tcccctggaa aatga 1185
[0484]	<210> 18
[0485]	<211> 394
[0486]	<212> PRT
[0487]	<213> 人工序列
[0488]	<220>
[0489]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0490]	<400> 18
[0491]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
[0492]	1 5 10 15
[0493]	Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val
[0494]	20 25 30
[0495]	Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn
[0496]	35 40 45
[0497]	Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly
[0498]	50 55 60
[0499]	Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr
[0500]	65 70 75 80
[0501]	Ala Ser Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser
[0502]	85 90 95
[0503]	Asn Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala

[0504]	100	105	110
[0505]	Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp		
[0506]	115	120	125
[0507]	Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly		
[0508]	130	135	140
[0509]	Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Val Gln Ile		
[0510]	145	150	155
[0511]	Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile Thr		
[0512]	165	170	175
[0513]	Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr		
[0514]	180	185	190
[0515]	Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser		
[0516]	195	200	205
[0517]	Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
[0518]	210	215	220
[0519]	Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala		
[0520]	225	230	235
[0521]	Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala		
[0522]	245	250	255
[0523]	Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
[0524]	260	265	270
[0525]	Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
[0526]	275	280	285
[0527]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
[0528]	290	295	300
[0529]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
[0530]	305	310	315
[0531]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
[0532]	325	330	335
[0533]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[0534]	340	345	350
[0535]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[0536]	355	360	365
[0537]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[0538]	370	375	380
[0539]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0540]	385	390	
[0541]	<210> 19		
[0542]	<211> 1185		
[0543]	<212> DNA		
[0544]	<213> 人工序列		
[0545]	<220>		

[0546]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0547]	<400> 19
[0548]	atggagaccg acacactcct gctctgggtg ctctgtctgt gggtgccctgg cagcacagga 60
[0549]	gaagtgcagc tgcagcagtc cggcgccgaa ctctgtcaaac ccggagcctc cgtcaaaactg 120
[0550]	tcctgcacag ccagcggtt caacatcaag gacacctaca tccatttcgt gcggcaaagg 180
[0551]	cctgaacagg gactcgagtg gatcggcagg atcgaccccg ccaacgacaa taccctctac 240
[0552]	gcctccaagt tccaggaaa ggccaccatt accgccgaca catccagcaa caccgcctac 300
[0553]	atgcacctca gctccctgac atccggcgac accgccgtgt actactgcgg caggggctac 360
[0554]	ggctactacg tgtttgacca ctggggccag ggaacaaccc tgaccgtgtc cagcggtcc 420
[0555]	acctccggag gcggaagcgg cggaggatcc ggaggaggag gtcctccga cgtgcaaadc 480
[0556]	aaccagtccc ctagcttctt ggccgctagc cctggcgaga caatcacaat caattgtcgg 540
[0557]	accagccggt ccatctccca gtatctggcc tggtaccagg agaagcccg caagacaaac 600
[0558]	aagtgtctca tctacagcg cagcaccctc caatccggca tcccttccc gtttagcggc 660
[0559]	tccggatccg gaaccgactt taccctgacc atcagcggcc tggaaccga ggatttcgcc 720
[0560]	atgtactact gccagcagca caacgagaat cccctgacct ttggagccgg cacaaagtc 780
[0561]	gagctgaagg agcccaagag ctgcgacaaa acccacacct gtccccctt cggaggagga 840
[0562]	tcctccggcg gcggaagcgg aggacaaccc agggagcccc aggtctacac cctgcctcct 900
[0563]	agccgggacg aactgacaaa gaaccaggtg tccctgacct gtctcgtcaa gggcttctac 960
[0564]	ccttccgaca tcgccgtcga gtgggaaagc aacggccagc ccgagaacaa ttacaagacc 1020
[0565]	acaccccccg tcctggacag cgatggcagc ttcttctct actccaagct gaccgtggac 1080
[0566]	aagagccggt ggcaacaagg caacgtgttc tcctgcagcg tcatgcatga ggccctgcac 1140
[0567]	aatcactaca ccagaagag cctgagcctc tccccggca agtga 1185
[0568]	<210> 20
[0569]	<211> 394
[0570]	<212> PRT
[0571]	<213> 人工序列
[0572]	<220>
[0573]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0574]	<400> 20
[0575]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
[0576]	1 5 10 15
[0577]	Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
[0578]	20 25 30
[0579]	Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser
[0580]	35 40 45
[0581]	Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro
[0582]	50 55 60
[0583]	Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
[0584]	65 70 75 80
[0585]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[0586]	85 90 95
[0587]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn

[0588]	100	105	110
[0589]	Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly		
[0590]	115	120	125
[0591]	Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser		
[0592]	130	135	140
[0593]	Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly		
[0594]	145	150	155 160
[0595]	Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp		
[0596]	165	170	175
[0597]	Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
[0598]	180	185	190
[0599]	Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys		
[0600]	195	200	205
[0601]	Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala		
[0602]	210	215	220
[0603]	Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
[0604]	225	230	235 240
[0605]	Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly		
[0606]	245	250	255
[0607]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
[0608]	260	265	270
[0609]	Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
[0610]	275	280	285
[0611]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
[0612]	290	295	300
[0613]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
[0614]	305	310	315 320
[0615]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
[0616]	325	330	335
[0617]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[0618]	340	345	350
[0619]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[0620]	355	360	365
[0621]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[0622]	370	375	380
[0623]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0624]	385	390	
[0625]	<210> 21		
[0626]	<211> 1185		
[0627]	<212> DNA		
[0628]	<213> 人工序列		
[0629]	<220>		

[0630]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0631]	<400> 21
[0632]	atggagacag acaccctcct gctgtgggtc ctgctgctgt gggcgcctgg cagcacagga 60
[0633]	gacatccaaa tgaccagtc ccctagcagc ctgagcgctt ccgtcggaga cagggtcacc 120
[0634]	atcacatgca ggacctccag gtccatcagc cagtatctgg cctggtatca gcagaaaccc 180
[0635]	ggcaaggtgc ctaagctgct gatctacagc ggcagcacac tccagagcgg agtgcccagc 240
[0636]	cggttttccg gaagcggatc cggaaccgac ttaccctga ccatttccag cctgcaacct 300
[0637]	gaagacgtgg ccacctacta ctgtcagcag cacaacgaga accccctcac cttcggcgga 360
[0638]	ggcaccaaag tcgagatcaa gggcagcacc agcggaggag gaagcggcgg aggctccgga 420
[0639]	ggaggaggct cctcccaagt gcagctcgtc caaagcggcg ctgagggtga aaagcccggc 480
[0640]	gccacagtca aaatctcctg caaggtcagc ggcttcaaca tcaaggatac ctacatccac 540
[0641]	tgggtgcaac aggcccccg caaaggactc gaatggatgg gccggtatga ccctgctaac 600
[0642]	gacaacacac tctacgcctc caagttccag ggcagggtga ccataccgc cgatacctcc 660
[0643]	accgacacag cctacatgga gctgagcagc ctgagggtccg aggacaccgc cgtctattac 720
[0644]	tgcgccccgg gatacggcta ctacgtgttt gaccattggg gacaggaac actcgtgacc 780
[0645]	gtgagctccg agcccaagag ctgcgacaag acccacacat gtctctcttg cggaggaggc 840
[0646]	agctccggag gcggtatccg cggacaacct agggagcccc aggtctatac cctgcccccc 900
[0647]	agcagggacg agctgacaaa gaaccagtc tccctgacct gcctggtgaa aggattctac 960
[0648]	cccagcgaca tcgctgtcga atgggagtcc aacggccagc ccgagaacaa ctacaagaca 1020
[0649]	accccccccg tgctggatc cgacggcagc ttcttctct actccaagct gaccgtcgac 1080
[0650]	aagtccaggt ggcagcagg caacgtgttt tctgtctccg tgatgcatga ggccctgcac 1140
[0651]	aaccactaca ccagaagtc cctgagcctc agccctggca agtga 1185
[0652]	<210> 22
[0653]	<211> 394
[0654]	<212> PRT
[0655]	<213> 人工序列
[0656]	<220>
[0657]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0658]	<400> 22
[0659]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
[0660]	1 5 10 15
[0661]	Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
[0662]	20 25 30
[0663]	Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn
[0664]	35 40 45
[0665]	Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly
[0666]	50 55 60
[0667]	Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr
[0668]	65 70 75 80
[0669]	Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
[0670]	85 90 95
[0671]	Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala

[0672]	100	105	110
[0673]	Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp		
[0674]	115	120	125
[0675]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly		
[0676]	130	135	140
[0677]	Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Gln Met		
[0678]	145	150	155 160
[0679]	Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr		
[0680]	165	170	175
[0681]	Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr		
[0682]	180	185	190
[0683]	Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser		
[0684]	195	200	205
[0685]	Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
[0686]	210	215	220
[0687]	Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala		
[0688]	225	230	235 240
[0689]	Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly		
[0690]	245	250	255
[0691]	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
[0692]	260	265	270
[0693]	Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
[0694]	275	280	285
[0695]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
[0696]	290	295	300
[0697]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
[0698]	305	310	315 320
[0699]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
[0700]	325	330	335
[0701]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[0702]	340	345	350
[0703]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[0704]	355	360	365
[0705]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[0706]	370	375	380
[0707]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0708]	385	390	
[0709]	<210> 23		
[0710]	<211> 1185		
[0711]	<212> DNA		
[0712]	<213> 人工序列		
[0713]	<220>		

[0714]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0715]	<400> 23
[0716]	atggagaccg atacactgct gctctgggtg ctgctgctgt gggcgcctgg aagcaccgga 60
[0717]	caggtgcaac tgggtccagtc cggcgccgag gtgaaaaagc ctggcgccac cgtcaagatc 120
[0718]	tcctgtaagg tgagcggtt caacatcaag gacacctaca tccactgggt gcagcaggct 180
[0719]	cccggaaaagg gactggagtg gatgggcagg atcgaccctg ccaatgacaa caccctctac 240
[0720]	gccagcaagt tccaaggacg ggtgaccatc acagccgaca catccaccga cacagcctat 300
[0721]	atggagctct ccagcctgag gtccgaggac accgccgtgt actactgtgc caggggatac 360
[0722]	ggctattacg tggtcgacca ctggggacag ggcaccctgg tgaccgtgag cagcggaagc 420
[0723]	accagcggcg gaggcagcgg aggcggaagc ggcgcgcgcg gatcctccga cattcagatg 480
[0724]	acccaatccc cctccagcct gtccgctagc gtgggagaca gggtgacaat cacatgtcgg 540
[0725]	acctccaggt ccatcagcca atatctcgcc tggatcagc agaagcccg caaggtgccc 600
[0726]	aagtcctga tctacagcg ctccaccctc caaagcggag tgccttccc gtttagcgga 660
[0727]	agcggcagcg gcacagactt taccctgaca atcagctccc tgcaacctga ggacgtcgcc 720
[0728]	acatactact gccagcagca caacgagaac cctctcacct ttggcgcgcg caccaaagt 780
[0729]	gagatcaagg agcccaaate ctgcgacaag acacacacct gcccccttg tggaggaggc 840
[0730]	agctccggcg gcggcagcgg cggacaaccc cgggaacctc aggtgtatac actccccct 900
[0731]	tccagggatg agtgaccaa gaaccaagtc tccctgacct gtctggtgaa aggttctac 960
[0732]	ccctccgaca tcgtgtcga gtgggagagc aacggccagc ccgaaaacaa ctataagacc 1020
[0733]	accccccccg tgctcgatc cgatggcagc ttcttctgt actccaagct cacagtcgac 1080
[0734]	aagagccggt ggcaacagg caacgtcttc tctgtagcg tcatgcacga ggccctccac 1140
[0735]	aaccactaca ccagaagtc cctctccctg agccccgaa aatga 1185
[0736]	<210> 24
[0737]	<211> 235
[0738]	<212> PRT
[0739]	<213> 智人
[0740]	<400> 24
[0741]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0742]	1 5 10 15
[0743]	His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr
[0744]	20 25 30
[0745]	Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser
[0746]	35 40 45
[0747]	Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala
[0748]	50 55 60
[0749]	Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala
[0750]	65 70 75 80
[0751]	Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp
[0752]	85 90 95
[0753]	Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr
[0754]	100 105 110
[0755]	Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe

[0756]	115	120	125
[0757]	Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg		
[0758]	130	135	140
[0759]	Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg		
[0760]	145	150	155
[0761]	Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly		
[0762]	165	170	175
[0763]	Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr		
[0764]	180	185	190
[0765]	Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His		
[0766]	195	200	205
[0767]	Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser		
[0768]	210	215	220
[0769]	Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val		
[0770]	225	230	235
[0771]	<210> 25		
[0772]	<211> 60		
[0773]	<212> DNA		
[0774]	<213> 人工序列		
[0775]	<220>		
[0776]	<223> 抗原结合构建体或其片段		
[0777]	<400> 25		
[0778]	atggaaaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctct gggtcccagg ctccaccggt 60		
[0779]	<210> 26		
[0780]	<211> 20		
[0781]	<212> PRT		
[0782]	<213> 人工序列		
[0783]	<220>		
[0784]	<223> 抗原结合构建体或其片段		
[0785]	<400> 26		
[0786]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro		
[0787]	1	5	10
[0788]	Gly Ser Thr Gly		
[0789]	20		
[0790]	<210> 27		
[0791]	<211> 15		
[0792]	<212> DNA		
[0793]	<213> 人工序列		
[0794]	<220>		
[0795]	<223> 抗原结合构建体或其片段		
[0796]	<400> 27		
[0797]	agtgggtggag gaggc 15		

[0798]	<210> 28
[0799]	<211> 5
[0800]	<212> PRT
[0801]	<213> 人工序列
[0802]	<220>
[0803]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0804]	<400> 28
[0805]	Ser Gly Gly Gly Gly
[0806]	1 5
[0807]	<210> 29
[0808]	<211> 24
[0809]	<212> DNA
[0810]	<213> 人工序列
[0811]	<220>
[0812]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0813]	<400> 29
[0814]	ggcggaggga gtggcggagg cggc 24
[0815]	<210> 30
[0816]	<211> 8
[0817]	<212> PRT
[0818]	<213> 人工序列
[0819]	<220>
[0820]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0821]	<400> 30
[0822]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[0823]	1 5
[0824]	<210> 31
[0825]	<211> 9
[0826]	<212> DNA
[0827]	<213> 人工序列
[0828]	<220>
[0829]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0830]	<400> 31
[0831]	ggcggctgc 9
[0832]	<210> 32
[0833]	<211> 3
[0834]	<212> PRT
[0835]	<213> 人工序列
[0836]	<220>
[0837]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0838]	<400> 32
[0839]	Gly Gly Cys

[0840]	1
[0841]	<210> 33
[0842]	<211> 60
[0843]	<212> DNA
[0844]	<213> 人工序列
[0845]	<220>
[0846]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0847]	<400> 33
[0848]	atggaaaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctct ggggtcccagg ctccaccggt 60
[0849]	<210> 34
[0850]	<211> 20
[0851]	<212> PRT
[0852]	<213> 人工序列
[0853]	<220>
[0854]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0855]	<400> 34
[0856]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
[0857]	1 5 10 15
[0858]	Gly Ser Thr Gly
[0859]	20
[0860]	<210> 35
[0861]	<211> 54
[0862]	<212> DNA
[0863]	<213> 人工序列
[0864]	<220>
[0865]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0866]	<400> 35
[0867]	ggctccacat ccggcggagg ctctggcggt ggatctggcg gaggcggctc atcc 54
[0868]	<210> 36
[0869]	<211> 18
[0870]	<212> PRT
[0871]	<213> 人工序列
[0872]	<220>
[0873]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[0874]	<400> 36
[0875]	Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[0876]	1 5 10 15
[0877]	Ser Ser
[0878]	<210> 37
[0879]	<211> 393
[0880]	<212> DNA
[0881]	<213> 人工序列

[0882] <220>
 [0883] <223> 抗原结合构建体或其片段
 [0884] <400> 37
 [0885] gagcctaagt cctgcgacaa gaccacacac tgtccccctt gcggcggagg aagcagcgga 60
 [0886] ggcggtatccg gtggccagcc tcgggagcct caggtgtaca ccctgcctcc ctcccgggac 120
 [0887] gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctgggtca agggcttcta cccttccgat 180
 [0888] atcgccgtgg agtgggagtc caacggccag cctgagaaca actacaagac caccctcct 240
 [0889] gtgctggact ccgacggctc cttcttctctg tactccaagc tcacagtgga taagtcccgg 300
 [0890] tggcagcagg gcaacgtgtt ctctgtctcc gtgatgcacg aggccttgca caaccactat 360
 [0891] acccagaagt ccctgtccct gtctcctggc aag 393
 [0892] <210> 38
 [0893] <211> 131
 [0894] <212> PRT
 [0895] <213> 人工序列
 [0896] <220>
 [0897] <223> 抗原结合构建体或其片段
 [0898] <400> 38
 [0899] Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly
 [0900] 1 5 10 15
 [0901] Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 [0902] 20 25 30
 [0903] Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 [0904] 35 40 45
 [0905] Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 [0906] 50 55 60
 [0907] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 [0908] 65 70 75 80
 [0909] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 [0910] 85 90 95
 [0911] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 [0912] 100 105 110
 [0913] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 [0914] 115 120 125
 [0915] Pro Gly Lys
 [0916] 130
 [0917] <210> 39
 [0918] <211> 321
 [0919] <212> DNA
 [0920] <213> 鼠
 [0921] <400> 39
 [0922] gatgtccaga taaaccagtc tccatctttt cttgctgcgt ctcctggaga aaccattact 60
 [0923] ataaattgca ggacaagtag gagtattagt caatathtag cctggtatca agagaaacct 120

[0924] gggaaaacta ataagcttct tatctactct ggatccactc tgcaatctgg aattccatca 180
 [0925] aggttcagtg gcagtggatc tggtagatg ttcactctca ccatcagtg cctggagcct 240
 [0926] gaagattttg caatgtatta ctgtcaacag cataatgaaa acccgctcac gttcggtgct 300
 [0927] gggaccaagc tggagctgaa g 321
 [0928] <210> 40
 [0929] <211> 107
 [0930] <212> PRT
 [0931] <213> 鼠
 [0932] <400> 40
 [0933] Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
 [0934] 1 5 10 15
 [0935] Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
 [0936] 20 25 30
 [0937] Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
 [0938] 35 40 45
 [0939] Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0940] 50 55 60
 [0941] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Pro
 [0942] 65 70 75 80
 [0943] Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
 [0944] 85 90 95
 [0945] Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 [0946] 100 105
 [0947] <210> 41
 [0948] <211> 321
 [0949] <212> DNA
 [0950] <213> 人工序列
 [0951] <220>
 [0952] <223> 抗原结合构建体或其片段
 [0953] <400> 41
 [0954] gacgtccaga taaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 [0955] atcacttgca ggacaagtag gactattagt caatatttag cctggtatca gcagaaacca 120
 [0956] gggaaagttc ctaagtcct gatctattct ggatccactc tgcaatctgg agtcccatct 180
 [0957] cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 [0958] gaagatgttg caacttatta ctgtcaacag cataatgaaa acccgctcac gttcggcgga 300
 [0959] gggaccaagg tggagatcaa a 321
 [0960] <210> 42
 [0961] <211> 107
 [0962] <212> PRT
 [0963] <213> 人工序列
 [0964] <220>
 [0965] <223> 抗原结合构建体或其片段

[0966]	<400> 42
[0967]	Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0968]	1 5 10 15
[0969]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
[0970]	20 25 30
[0971]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
[0972]	35 40 45
[0973]	Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0974]	50 55 60
[0975]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0976]	65 70 75 80
[0977]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
[0978]	85 90 95
[0979]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0980]	100 105
[0981]	<210> 43
[0982]	<211> 354
[0983]	<212> DNA
[0984]	<213> 鼠
[0985]	<400> 43
[0986]	gaggtccagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
[0987]	tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gacacctata tacacttcgt gaggcagagg 120
[0988]	cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatgataa tactttatat 180
[0989]	gcctcaaaagt tccagggcaa ggccactata acagcagaca catcatccaa cacagcctac 240
[0990]	atgcacctct gcagcctgac atctggggac actgccgtct attactgtgg tagaggttat 300
[0991]	ggttactacg tatttgacca ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354
[0992]	<210> 44
[0993]	<211> 118
[0994]	<212> PRT
[0995]	<213> 鼠
[0996]	<400> 44
[0997]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0998]	1 5 10 15
[0999]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
[1000]	20 25 30
[1001]	Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[1002]	35 40 45
[1003]	Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
[1004]	50 55 60
[1005]	Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
[1006]	65 70 75 80
[1007]	Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[1008]	85	90	95
[1009]	Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr		
[1010]	100	105	110
[1011]	Thr Leu Thr Val Ser Ser		
[1012]	115		
[1013]	<210> 45		
[1014]	<211> 354		
[1015]	<212> DNA		
[1016]	<213> 人工序列		
[1017]	<220>		
[1018]	<223> 抗原结合构建体或其片段		
[1019]	<400> 45		
[1020]	gaagtgcagc tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcagc cgggcggcag cctgcgcctg	60	
[1021]	agctgcgcgg cgagcggtt taacattaaa gataacctata ttcattttgt gcgccaggcg	120	
[1022]	ccgggcaaag gcctggaatg gattggccgc attgatccgg cgaacgataa caccctgtat	180	
[1023]	gcgagcaaat ttcaggcaa agcgaccatt agcgcggata ccagcaaaaa caccgcgtat	240	
[1024]	ctgcagatga acagcctgcg cgcgggagat accgcggtgt attattgcgg ccgcggctat	300	
[1025]	ggctattatg tgtttgatca ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc	354	
[1026]	<210> 46		
[1027]	<211> 118		
[1028]	<212> PRT		
[1029]	<213> 人工序列		
[1030]	<220>		
[1031]	<223> 抗原结合构建体或其片段		
[1032]	<400> 46		
[1033]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1034]	1 5 10 15		
[1035]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr		
[1036]	20 25 30		
[1037]	Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
[1038]	35 40 45		
[1039]	Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe		
[1040]	50 55 60		
[1041]	Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr		
[1042]	65 70 75 80		
[1043]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1044]	85 90 95		
[1045]	Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr		
[1046]	100 105 110		
[1047]	Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1048]	115		
[1049]	<210> 47		

[1050]	<211> 354
[1051]	<212> DNA
[1052]	<213> 人工序列
[1053]	<220>
[1054]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[1055]	<400> 47
[1056]	gaagtgcagc tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcagc cggcggcgag cctgcgcctg 60
[1057]	agctgcgcgg cgagcggtt taacattaaa gataacctata ttcattttgt gcgccaggcg 120
[1058]	ccgggcaaag gcctggaatg gattggccgc attgatccgg cgaacgataa caccctgtat 180
[1059]	gcgagcaaat ttcaggcaa agcgaccatt agcgcgata ccagcaaaaa caccgcgtat 240
[1060]	ctgcagatga acagcctgcg cgcggaagat accgcggtgt attattgcgg ccgcggctat 300
[1061]	ggctattatg tgtttgatca ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354
[1062]	<210> 48
[1063]	<211> 118
[1064]	<212> PRT
[1065]	<213> 人工序列
[1066]	<220>
[1067]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[1068]	<400> 48
[1069]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1070]	1 5 10 15
[1071]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
[1072]	20 25 30
[1073]	Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[1074]	35 40 45
[1075]	Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
[1076]	50 55 60
[1077]	Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
[1078]	65 70 75 80
[1079]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1080]	85 90 95
[1081]	Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
[1082]	100 105 110
[1083]	Leu Val Thr Val Ser Ser
[1084]	115
[1085]	<210> 49
[1086]	<211> 354
[1087]	<212> DNA
[1088]	<213> 人工序列
[1089]	<220>
[1090]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[1091]	<400> 49

[1092]	caggtgcagc tggtgcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgac cgtgaaaatt 60
[1093]	agctgcaaag tgagcggtt taacattaaa gataacctata ttcattttgt gcagcaggcg 120
[1094]	ccgggcaaag gcctggaatg gattggccgc attgatccgg cgaacgataa caccctgtat 180
[1095]	gcgagcaaat ttcagggcaa agcgaccatt accgcggata ccagcaccga taccgcgtat 240
[1096]	atggaactga gcagcctgcg cagcggagat accgcggtgt attattgcgg ccgcggctat 300
[1097]	ggctattatg tgtttgatca ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354
[1098]	<210> 50
[1099]	<211> 118
[1100]	<212> PRT
[1101]	<213> 人工序列
[1102]	<220>
[1103]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[1104]	<400> 50
[1105]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[1106]	1 5 10 15
[1107]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
[1108]	20 25 30
[1109]	Tyr Ile His Phe Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[1110]	35 40 45
[1111]	Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
[1112]	50 55 60
[1113]	Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
[1114]	65 70 75 80
[1115]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1116]	85 90 95
[1117]	Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
[1118]	100 105 110
[1119]	Leu Val Thr Val Ser Ser
[1120]	115
[1121]	<210> 51
[1122]	<211> 354
[1123]	<212> DNA
[1124]	<213> 人工序列
[1125]	<220>
[1126]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[1127]	<400> 51
[1128]	caggtgcagc tggtgcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgac cgtgaaaatt 60
[1129]	agctgcaaag tgagcggtt taacattaaa gataacctata ttcattttgt gcagcaggcg 120
[1130]	ccgggcaaag gcctggaatg gattggccgc attgatccgg cgaacgataa caccctgtat 180
[1131]	gcgagcaaat ttcagggcaa agcgaccatt accgcggata ccagcaccga taccgcgtat 240
[1132]	atggaactga gcagcctgcg cagcgaagat accgcggtgt attattgcgg ccgcggctat 300
[1133]	ggctattatg tgtttgatca ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354

[1134]	<210> 52
[1135]	<211> 117
[1136]	<212> PRT
[1137]	<213> 人工序列
[1138]	<220>
[1139]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[1140]	<400> 52
[1141]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[1142]	1 5 10 15
[1143]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
[1144]	20 25 30
[1145]	Tyr Ile His Phe Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[1146]	35 40 45
[1147]	Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
[1148]	50 55 60
[1149]	Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
[1150]	65 70 75 80
[1151]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1152]	85 90 95
[1153]	Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
[1154]	100 105 110
[1155]	Leu Val Thr Val Ser
[1156]	115
[1157]	<210> 53
[1158]	<211> 23
[1159]	<212> PRT
[1160]	<213> 人工序列
[1161]	<220>
[1162]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[1163]	<400> 53
[1164]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[1165]	1 5 10 15
[1166]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
[1167]	20
[1168]	<210> 54
[1169]	<211> 25
[1170]	<212> PRT
[1171]	<213> 人工序列
[1172]	<220>
[1173]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[1174]	<400> 54
[1175]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Gly

[1176]	1	5	10	15
[1177]	Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly			
[1178]	20	25		
[1179]	<210> 55			
[1180]	<211> 19			
[1181]	<212> PRT			
[1182]	<213> 人工序列			
[1183]	<220>			
[1184]	<223> 抗原结合构建体或其片段			
[1185]	<400> 55			
[1186]	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val			
[1187]	1	5	10	15
[1188]	Ala Gly Pro			
[1189]	<210> 56			
[1190]	<211> 70			
[1191]	<212> PRT			
[1192]	<213> 人工序列			
[1193]	<220>			
[1194]	<223> 抗原结合构建体或其片段			
[1195]	<400> 56			
[1196]	Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys			
[1197]	1	5	10	15
[1198]	Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro			
[1199]	20	25	30	
[1200]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu			
[1201]	35	40	45	
[1202]	Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro			
[1203]	50	55	60	
[1204]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
[1205]	65	70		
[1206]	<210> 57			
[1207]	<211> 25			
[1208]	<212> PRT			
[1209]	<213> 人工序列			
[1210]	<220>			
[1211]	<223> 抗原结合构建体或其片段			
[1212]	<400> 57			
[1213]	Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys			
[1214]	1	5	10	15
[1215]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
[1216]	20	25		
[1217]	<210> 58			

[1218]	<211> 23
[1219]	<212> PRT
[1220]	<213> 人工序列
[1221]	<220>
[1222]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[1223]	<400> 58
[1224]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
[1225]	1 5 10 15
[1226]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
[1227]	20
[1228]	<210> 59
[1229]	<211> 20
[1230]	<212> PRT
[1231]	<213> 人工序列
[1232]	<220>
[1233]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[1234]	<400> 59
[1235]	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
[1236]	1 5 10 15
[1237]	Leu Gly Gly Pro
[1238]	20
[1239]	<210> 60
[1240]	<211> 20
[1241]	<212> PRT
[1242]	<213> 人工序列
[1243]	<220>
[1244]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[1245]	<400> 60
[1246]	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
[1247]	1 5 10 15
[1248]	Leu Gly Gly Pro
[1249]	20
[1250]	<210> 61
[1251]	<211> 15
[1252]	<212> DNA
[1253]	<213> 人工序列
[1254]	<220>
[1255]	<223> 限制位点
[1256]	<400> 61
[1257]	tctagagccg ccacc 15
[1258]	<210> 62
[1259]	<211> 15

[1260]	<212> DNA
[1261]	<213> 人工序列
[1262]	<220>
[1263]	<223> 限制位点
[1264]	<400> 62
[1265]	tctagagccg ccacc 15
[1266]	<210> 63
[1267]	<211> 6
[1268]	<212> DNA
[1269]	<213> 人工序列
[1270]	<220>
[1271]	<223> 限制位点
[1272]	<400> 63
[1273]	aagctt 6
[1274]	<210> 64
[1275]	<211> 6
[1276]	<212> DNA
[1277]	<213> 人工序列
[1278]	<220>
[1279]	<223> 限制位点
[1280]	<400> 64
[1281]	aagctt 6
[1282]	<210> 65
[1283]	<211> 15
[1284]	<212> DNA
[1285]	<213> 人工序列
[1286]	<220>
[1287]	<223> 限制位点
[1288]	<400> 65
[1289]	tctagagccg ccacc 15
[1290]	<210> 66
[1291]	<211> 6
[1292]	<212> DNA
[1293]	<213> 人工序列
[1294]	<220>
[1295]	<223> 限制位点
[1296]	<400> 66
[1297]	aagctt 6
[1298]	<210> 67
[1299]	<211> 15
[1300]	<212> DNA
[1301]	<213> 人工序列

[1302] <220>
[1303] <223> 限制位点
[1304] <400> 67
[1305] tctagagccg ccacc 15
[1306] <210> 68
[1307] <211> 6
[1308] <212> DNA
[1309] <213> 人工序列
[1310] <220>
[1311] <223> 限制位点
[1312] <400> 68
[1313] aagctt 6
[1314] <210> 69
[1315] <211> 15
[1316] <212> DNA
[1317] <213> 人工序列
[1318] <220>
[1319] <223> 限制位点
[1320] <400> 69
[1321] tctagagccg ccacc 15
[1322] <210> 70
[1323] <211> 6
[1324] <212> DNA
[1325] <213> 人工序列
[1326] <220>
[1327] <223> 限制位点
[1328] <400> 70
[1329] aagctt 6
[1330] <210> 71
[1331] <211> 15
[1332] <212> DNA
[1333] <213> 人工序列
[1334] <220>
[1335] <223> 限制位点
[1336] <400> 71
[1337] tctagagccg ccacc 15
[1338] <210> 72
[1339] <211> 6
[1340] <212> DNA
[1341] <213> 人工序列
[1342] <220>
[1343] <223> 限制位点

[1344]	<400> 72
[1345]	aagctt 6
[1346]	<210> 73
[1347]	<211> 15
[1348]	<212> DNA
[1349]	<213> 人工序列
[1350]	<220>
[1351]	<223> 限制位点
[1352]	<400> 73
[1353]	tctagagccg ccacc 15
[1354]	<210> 74
[1355]	<211> 6
[1356]	<212> DNA
[1357]	<213> 人工序列
[1358]	<220>
[1359]	<223> 限制位点
[1360]	<400> 74
[1361]	aagctt 6
[1362]	<210> 75
[1363]	<211> 15
[1364]	<212> DNA
[1365]	<213> 人工序列
[1366]	<220>
[1367]	<223> 限制位点
[1368]	<400> 75
[1369]	tctagagccg ccacc 15
[1370]	<210> 76
[1371]	<211> 6
[1372]	<212> DNA
[1373]	<213> 人工序列
[1374]	<220>
[1375]	<223> 限制位点
[1376]	<400> 76
[1377]	aagctt 6
[1378]	<210> 77
[1379]	<211> 759
[1380]	<212> DNA
[1381]	<213> 人工序列
[1382]	<220>
[1383]	<223> 抗原结合构建体或其片段
[1384]	<400> 77
[1385]	atggagaccg atacactgct gctgtgggtg ctgctgctct gggtcctgg cagcacagga 60

[1386]	gacatccaga tgacacagag ccctagctcc ctgagcgctt ccgtgggaga tagggtgacc	120
[1387]	atcacatgcc ggacctccag gtccatctcc cagtacctgg cctggtacca gcagaagccc	180
[1388]	ggcaaggtgc ccaagctgct catctatagc ggcagcacc tgcagagcgg agtgccttcc	240
[1389]	cggttttccg gatccggctc cggcacagac tttaacctga ccatctccag cctgcagcct	300
[1390]	gaggatgtcg ccacctacta ctgccaacag cacaacgaga acccctgac cttcggcggc	360
[1391]	ggaaccaagg tcgagatcaa gtccggagga ggaggccaag tgcagctggt ccaatccggc	420
[1392]	gccgaagtga aaaagcccgg cgccaccgtg aagatcagct gcaaggtgtc cggcttcaac	480
[1393]	atcaaggaca cctatatcca ctgggtccag caagccccg gaaaaggcct ggagtggatg	540
[1394]	ggacggattg accccgcca cgacaacaca ctctatgcct ccaagttcca gggcaggggtg	600
[1395]	acaatcaccg ccgacaccag caccgacaca gcttatatgg agctgtcctc cctccggctc	660
[1396]	gaggataccg ccgtctacta ctgcgccagg ggctacggct actacgtgtt tgaccactgg	720
[1397]	ggccagggca ccctggtgac agtgtccagc ggaggtgc	759
[1398]	<210>	78
[1399]	<211>	759
[1400]	<212>	DNA
[1401]	<213>	人工序列
[1402]	<220>	
[1403]	<223>	抗原结合构建体或其片段
[1404]	<400>	78
[1405]	atggagaccg acacctgct gctctgggtc ctctgctgt gggtgccctg cagcacagga	60
[1406]	caggtgcaac tgggtcagag cggcgccgag gtcaagaaac ctggcgccac cgtgaagatc	120
[1407]	agctgcaagg tgtccggtt caacatcaag gacacctaca tccactgggt ccaacaagcc	180
[1408]	cccggaaagg gcctggaatg gatgggcccg attgaccccg ccaacgaaa caccctctat	240
[1409]	gccagcaagt tccagggcag ggtcaccatc accgccgaca ccagcaccga caccgcctac	300
[1410]	atggagctga gcagcctgcg gagcgaagac accgccgtgt actactgcgc caggggctac	360
[1411]	ggctactacg tcttcgacca ttggggacag ggcaccctcg tgacagtgtc cagctccggc	420
[1412]	ggaggaggag atatccagat gaccagagc ctttcagcc tgtccgttc cgtgggagat	480
[1413]	cgggtgacca tcacatgcag gacctccagg tccatctccc agtacctggc ctggtacca	540
[1414]	cagaagcccg gcaagtgcc caagctgtg atctacagcg gcagcacaact gcaatccggc	600
[1415]	gtcccttccc ggttttccgg atccggatcc ggcaccgact tcacctgac catcagctcc	660
[1416]	ctgcaacccg aggacgtggc cacctactac tgtcagcagc acaacgagaa cccctcacc	720
[1417]	tttggcggcg gaaccaaggt cgagatcaag ggcggctgc	759
[1418]	<210>	79
[1419]	<211>	22
[1420]	<212>	PRT
[1421]	<213>	人工序列
[1422]	<220>	
[1423]	<223>	抗原结合构建体或其片段
[1424]	<400>	79
[1425]	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gly Gly Ser	
[1426]	1 5 10 15	
[1427]	Ser Gly Gly Gly Ser Gly	

[1428]	20	
[1429]	<210> 80	
[1430]	<211> 107	
[1431]	<212> PRT	
[1432]	<213> 人工序列	
[1433]	<220>	
[1434]	<223> 抗原结合构建体或其片段	
[1435]	<400> 80	
[1436]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu	
[1437]	1 5 10 15	
[1438]	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	
[1439]	20 25 30	
[1440]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu	
[1441]	35 40 45	
[1442]	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe	
[1443]	50 55 60	
[1444]	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly	
[1445]	65 70 75 80	
[1446]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr	
[1447]	85 90 95	
[1448]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
[1449]	100 105	
[1450]	<210> 81	
[1451]	<211> 107	
[1452]	<212> PRT	
[1453]	<213> 人工序列	
[1454]	<220>	
[1455]	<223> 抗原结合构建体或其片段	
[1456]	<400> 81	
[1457]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp	
[1458]	1 5 10 15	
[1459]	Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	
[1460]	20 25 30	
[1461]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu	
[1462]	35 40 45	
[1463]	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe	
[1464]	50 55 60	
[1465]	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly	
[1466]	65 70 75 80	
[1467]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr	
[1468]	85 90 95	
[1469]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	

[1470]	100	105
--------	-----	-----

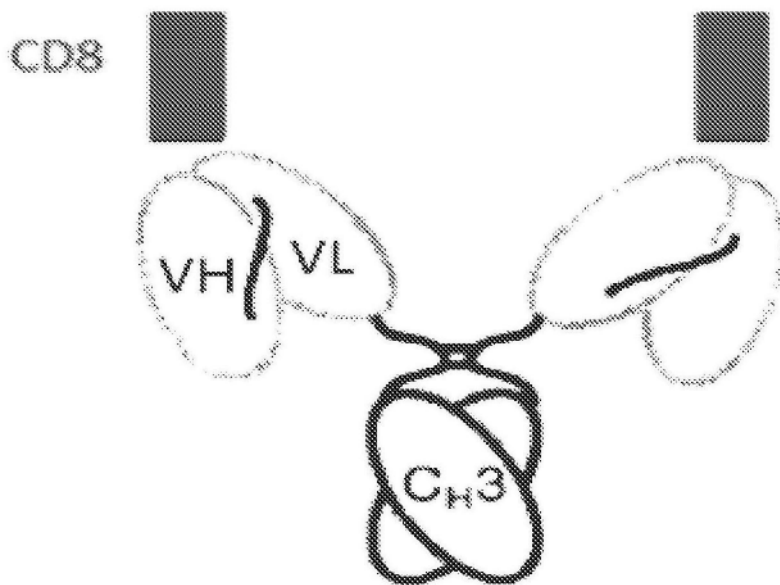


图1A



图1B

10	20	30	40	50	60
MALFVTALLL	PLALLLHAAR	PSQFRVSPLD	RTWNLGETVE	LKCQVLLSNP	TSGCSWLFQP
70	80	90	100	110	120
RGAAASPTFL	LYLSQNKPKA	AEGLDTQRFS	GKRLGDTFVL	TLSDFRRENE	GYFCSALSN
130	140	150	160	170	180
SIMYFSHEVP	VFLPAKPTTT	PAPRPPTPAP	TIASQPLSLR	PEACKPAAGG	AVHTRGLDFA
190	200	210	220	230	
CDIYIWAPLA	GTCGVLLLSL	VITLYCNHRN	RRRVCKCPRP	VVKSGDKPSL	SARYV

SEQ ID NO: 24

图1C

人化 VH (1st 版本):

huOKT8	EVQLQQSGAEIVKPGASVKLSCTAS	GENIKD	TYTHFVQRPEQGLEWIG	RIDFANDNT	LY	SEQ ID NO: 1
	** ** *	** ** *	*	*	*	
4D5v8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GENIKD	TYTHWVRQAPGKGLEWVA	RIYPTNGYT	RY	
huOKT8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GENIKD	TYTHWVRQAPGKGLEWVA	RIDFANDNT	LY	
						ACDR3
huOKT8	ASKFQKATITADTSNTAYMHLSLTSGDTAVVYQGR	GENIKD	TYTHFVQRPEQGLEWIG	RIDFANDNT	LY	SEQ ID NO: 2
	**** ** *	**** ** *	*	*	*	
4D5v8	ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRADTAVVYCSR	GENIKD	TYTHWVRQAPGKGLEWVA	RIYPTNGYT	RY	
huOKT8	ASKFQGRATISADTSKNTAYLQMSLRADTAVVYQGR	GENIKD	TYTHWVRQAPGKGLEWVA	RIDFANDNT	LY	SEQ ID NO: 3
	**** ** *	**** ** *	*	*	*	

人化 VH (2nd 版本):

人化 VH (2nd 版本):										
huOKT8	QVQLQQSGAEIVKPGASVKLSCTAS									
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
人	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVS									
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
huOKT8	QVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVS									
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
huOKT8	ASKFQKATITADTSNTAYMHLSLTSGDTAVVYQGR									
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
人	AEKFGQGVTTTADTSNTAYMELSLRSEDVAVYCAT									
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
huOKT8	ASKFQGRVTTTADTSNTAYMELSLRSEDVAVYCAR									
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

图2A

人化 VL:		LCDR1		LCDR2	
huOKT8	DVQINQSPSFLAASGETITINC	RTSRSSISQYLA	WYQENPGKVKLLIY	SGSTLQS	GVPSS
	* * * * *	* * * *	* * *	**	*
人	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQELSNYLA	WYQKPGKVKPKLLIY	AASTLQS	GVPSS
huOKT8	DVQITQSPSSLSASVGDRVTITC	RTSRSSISQYLA	WYQKPGKVKPKLLIY	SGSTLQS	GVPSS

		LCDR3		SEQ ID NO: 7	
huOKT8	RFSGSGSGTDFTLTISGLEPEDVATYYC	QQHNENPLT	FGAGTKIELN	SEQ ID NO: 7	
	* * * *	* * *	* * *		
人	RFSGSGSGTDFTLTISGLEPEDVATYYC	QKYNAPLT	FGGKTKVEIK	SEQ ID NO: 8	
huOKT8	RFSGSGSGTDFTLTISGLEPEDVATYYC	QQHNENPLT	FGGKTKVEIK	SEQ ID NO: 9	

图2B

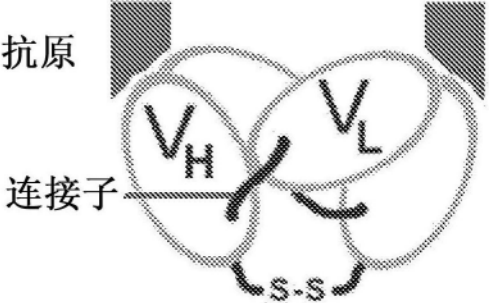


图3A

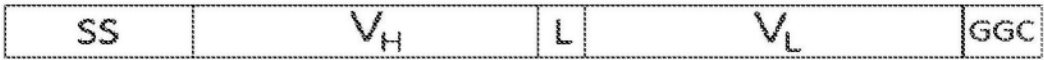


图3B

图4

TCTAGAGCCGCCACC SEQ ID NO: 62
XbaI Kozak
 1 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
 1 ATGGAGACCGACACACTCTCTGCTCTGGTGCTCTCTGCTGTGGGTGCCTGGCAGCACAGGA
信号肽
 21 E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L
 61 GAAATGCAGCTGCAGCAGTCCGGGCGCCGAACTCGTCAAAACCGGAGCCTCCCTCAAACTG
VH
 41 S C T A S G F N I K D T Y I H F V R Q R
 121 TCCTGCACAGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCATTTCTGTGGGCAAAGG
 61 P E Q G L E W I G R I D P A N D N T L Y
 181 CCTGAACAGGGACTCGACTGGATCGGCAGGATCGAACC CGCAACGACAATACCTCTAC
 81 A S K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y
 241 GCCTCCAAGTTCAGGGAAAGGCCACCAATTACCGCGGACACATCCAGCAACACCGCCTAC
 101 M H L S S L T S G D T A V Y Y C G R G Y
 301 ATGCACCTCAGCTCCCTGACATCCGGCGACACCGCGGTGTACTACTGCGGCGGGGCTAC
 121 G Y Y V F D H W G Q G T T L T V S S G S
 361 GGCTACTACGTGTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACAACCTGACCGTGTCCAGCGGCTCC
连接子
 141 T S G G G S G G G S G G G S S D V Q I
 421 ACCTCCGGAGGCGGAAGCGGCGGAGGATCCGGAGGAGGAGGCTCCTCCGACGTGCAAATC
VL
 161 N Q S P S F L A A S P G E F I T I N C R
 481 AACCAGTCCCTAGCTTCCTGGCCGCTAGCCCTGGCGAGACAATCACAATCAATTGTCCG
 181 T S R S I S Q Y L A W Y Q E K P G K T N
 541 ACCAGCCGCTCCATCTCCAGTATCTGGCTGGTACCAGGAGAAGCCCGGCAAGACAAAC
 201 K L L I Y S G S T L Q S G I P S R F S G
 601 AAGCTGCTCATCTACAGCGGCAGCACCTTCCAATCCGGCATCCCTTCCCGTPTAGCGGC
 221 S G S G T D F T L T I S G L E P E D F A
 661 TCCGGATCCGGAACCGACTTTACCTGACCATCAGCGGCTTGAACCCGAGGATTTCGCC
 241 M Y Y C Q Q H N E N P L T F G A G T K L
 721 ATGTACTACTGCCAGCAGCACAACGAGAATCCCTGACCTTTGGAGCCGCGACAAAGCTC
 261 E L K E P K S C D K T H T C P P C G G G
 781 GAGCTGAAGGAGCCCAAGAGCTSCGACAAAACCCACACCTGTCCCCCTTSCGGAGGAGGA
铰链 / 延伸
 281 S S G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P
 841 TCCTCCGGCGGCGGAAGCGGAGGACAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTACACCTGCCTCT
CH3
 301 S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y
 901 AGCCGGGACGAAGTACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTCAAGGGCTTCTAC
 321 P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T
 961 CCTTCCGACATCGCCGTGAGTGGGAAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATTACAAGACC
 341 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D
 1021 ACACCCCCGCTCCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTCTACTCCAAGCTGACCGTGGAC
 361 K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L N
 1081 AAGAGCCGGTGGCAACAAGGCAACGTGTTCTCTCTGACGGTCATGCATGAGGCCCTGCAC
 381 N H Y T Q K S L S L S P G K - SEQ ID NO: 18
 1141 AATCACTACACCCAGAGAGCCTGAGCCTCTCCCCCGCAAGTGA SEQ ID NO: 19
终止
AAGCTT SEQ ID NO: 53 **HindIII**

图5

Tctagagccggccacc SEQ ID NO: 65

XbaI Kozak

1 M R T D T L L L W V L L L W V P G S T G
 1 ATGGAGACAGACACCCCTCCTGCTGTGGGTCTGCTGCTGTGGGTGCTGGCAGCACAGGA
信号肽

21 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 61 GACATCCAAATGACCCAGTCCCCTAGCAGCCTCAGCGCTTCCGTCCGAGACAGGGTCACC
VL

41 I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
 121 ATCACATGCAGGACCTCCAGGTCCATCAGCCAGTATCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCC
 61 G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
 181 GGCAAGGTGCTTAAGCTGCTGATCTACAGCGGCAGCACACTCCAGACCGGAGTGCACAGC
 81 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 241 CGGTTTTCCGGAAGCGGATCCGGAACCGACTTCACCTGACCAITTCAGCCTGCAACCT
 101 E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
 301 GAAGACGTGCCACCTACTACTGTGTCAGCAGCACAAAGAGAACCCCTCACCTTCGGCGGA
 121 G T K V E I K G S T S G G G S G G G S G
 361 GGCACCAAAGTCGAGATCAAGGGCAGCACCAGCGGAGGAGGAAGCGCGGAGGCTCCGGA
连接子

141 G G G S S Q V Q L V Q S G A E V K K P G
 421 GGAGGAGGCTCCTCCCAAGTGCAGCTCCTCCAAAGCGGCGCTGAGGTGAAAAAGCCCCGGC
VH

161 A T V K I S C K V S G F N I K D T Y I H
 481 GCCACASTCAAAATCTCCTGCAAGGTTCAGCGCTTCAACATCAAGGATACCTACATCCAC
 181 W V Q Q A F G K G L E W M G R I D P A N
 541 TGGGTGCAACAGGCCCCCGCAAGGACTCGAATGGATGGGCGGATCGACCTGCTAAC
 201 D N T L Y A S K F Q G R V T I T A D T S
 601 GACAACACACTCTACGCTTCAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCAICACCGCCGATACCTCC
 221 T D T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y
 661 ACCGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGCTCATTAC
 241 C A R G Y G Y Y V F D H W G Q G T L V T
 721 TGGCCCCGGGATACGCTACTACGTGTTTGACCATTTGGGACAGGGAACACTCGTGACC
 261 V S S E P K S C D K T H T C P P C G G G
 781 GTGAGCTCCGAGCCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACATGTCTCCTTGGCGAGGAGGC
铰链 / 延伸

281 S S G G S G G Q P R E F Q V Y T L P P
 841 AGCTCCGGAGGCGGATCCGCGGACAACTAGGGAGCCCCAGGTCTATACCCTGCCCCC
CH3

301 S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y
 901 AGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTCCTCCTGACCTGCCTGGTGAAAGGATTCTAC
 321 P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T
 961 CCCAGCGACATCGCTGTGGAATGGGAGTCCAAACGGCCAGCCCGAGAAACACTACAAGACA
 341 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D
 1021 ACCCCCCCGTCTGCTGGATTCCGACGGCAGCTTCTTCTCTACTCCAAGCTGACCTCGAC
 361 K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H
 1081 AAGTCCAGGTGCCAGCAGGGCAACGTGTTTTCTGCTCCGCGATGCATGAGGCCCTGCAC
 381 N H Y T Q K S L S L S F G K - SEQ ID NO: 20
 1141 AACCCTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTCAGCCCTGGCAAGTGA SEQ ID NO: 21
终止

aagctt SEQ ID NO: 66 HindIII

图6

Tctagagccgcaccc SEQ ID NO: 67

XbaI Kozak

1 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
 1 ATCGAGACCGATACACTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTGCTGGGTGGCTGGAAGCACCGGA
信号肽
 21 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
 61 CAGGTGCAACTGGTCCAGTCCGGCCCGGAGGTGAAAAAGCCTGGCCGCCACCGTCAAGATC
VH
 41 S C K V S G F N I K D T Y I H W V Q Q A
 121 TCCTGTAAGGTGAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTGCAGCAGGCT
 61 P G K G L E W M G R I D P A N D N T L Y
 181 CCGCGAAAGGGACTGGAGTGGATGGGCAGGATCGACCCCTGCCAATGACAACACCCCTCTAC
 81 A S K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y
 241 GCCAGCAAGTTCCAAGGACGGGTGACCATCACAGCCGACACATCCACCGACACAGCCTAT
 101 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y
 301 ATGGAGCTCTCCAGCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGGGGATAC
 121 G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S G S
 361 GGCTATTACGTGTTCGACCACTGGGACAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGAAGC
连接子
 141 T S G G G S G G G S G G G S S D I Q M
 421 ACCAGCGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGAAGCGGCGGCGGCGGATCCTCCGACATTGAGTG
VL
 161 T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R
 481 ACCCAATCCCCCTCCAGCCTGTCCGCTAGCGTGGGAGACAGGGTGACAAATCATGTGGG
 181 T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P G K V P
 541 ACCTCCAGGTCCATCAGCCAAATATCTCCGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGTGCCC
 201 K L L I Y S G S T L Q S G V P S R F S G
 601 AAGCTCCTGATCTACAGCGGCTCCACCCCTCCAAAGCGAGTGCCCTCCCGGTTTAGCGGA
 221 S G S G T D F T L T I S S L Q P E D V A
 661 AGCGGCAGCGGCACAGACTTTACCTGACAATCAGCTCCCTGCAACCTGAGGACGTGCCC
 241 T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G G T K V
 721 ACATACTACTGCCAGCAGCACAACGAGAACCCCTCTCACCTTTGGCGGCGGCACCAAGTG
 261 E I K E P K S C D K T H T C F P C G G G
 781 GAGATCAAGGAGCCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGCCCCCTGTGGAGGAGGC
铰链 / 延伸
 281 S S G G G S G G G Q P R E P Q V Y T L P P
 841 AGCTCCGCGCGGCGCAGCGGCGGACAACCCCGGSAACCTCAGGTGTATACACTCCCCCT
CH3
 301 S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y
 901 TCCAGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTAC
 321 P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T
 961 CCCTCCGACATCGCTGTGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAAAACAATAAGACC
 341 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D
 1021 ACCCCCCCGTGTCTCGATTCCGATGCGAGCTTCTTCCTGTACTCCAAGCTCACAGTCGAC
 361 K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L R
 1081 AAGAGCCGGTGGCAACAGGGCAACGTCTTCTCCTGTAGCGTCATGCACGAGGCCCTCCAC
 381 N H Y T Q K S L S L S P G K - SEQ ID NO: 22
 1141 AACCACTACACCCAGAAGTCCCTCTCCCTGAGCCCCGGAATGA SEQ ID NO: 23
终止
 aagctt SEQ ID NO: 68 _HindIII

图7

Tettagagccggccacc SEQ ID NO: 69

XbaI Kozak

```

1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAGACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTCCCTGGCAGCACAGGA
信号肽
21  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
61  GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCTCCCTGAGCGCTTCCGTGGGAGATAGGGGTGACC
VL
41  I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
121  ATCACATGCCGGACCTCCAGGTCCATCTCCAGTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCC

61  G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
181  GGCAAGGTGCCCAAGCTGCTCATCTATAGCGGCAGCACCCCTGCAGAGCGGAGTGCCTTCC

81  R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
241  CGGTTTTCCGGATCCGGCTCCGGCACAGACTTTACCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCT

101  E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
301  GAGGATGTGCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAACGAGAACCCCTGACCTTCGGCGGC

121  G T K V E I K S G G G G Q V Q L V Q S G
361  GGAACCAAGGTGAGATCAAGTCCGGAGGAGGAGGCCAAGTGCAGCTGGTCCAATCCGGC
连接子 VH
141  A E V K K P G A T V K I S C K V S G F N
421  GCCGAAGTGAAAAAGCCCGGCGCCACCGTGAAGATCAGCTGCAAGGTGTCCGGCTTCAAC

161  I K D T Y I H W V Q Q A P G K G L E W M
481  ATCAAGGACACCTATATCCACTGGGTCCAGCAAGCCCCCGGAAAAGGCCTGGAGTGGATG

181  G R I D P A N D N T L Y A S K F Q G R V
541  GGACGGATTGACCCCGCCAACGACAACACACTCTATGCCTCCAAGTTCAGGGCAGGGTG

201  T I T A D T S T D T A Y M E L S S L R S
601  ACAATCACC GCCGACACCAGCACCGACACAGCTTATATGGAGCTGTCTCCCTCCGGTCC

221  E D T A V Y Y C A R G Y G Y Y V F D H W
661  GAGGATACCGCGTCTACTACTGCGCCAGGGGCTACGGCTACTACGTGTTTGACCACTGG

241  G Q G T L V T V S S G G C SEQ ID NO: 12
721  GGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCAGCGGAGGCTGC SEQ ID NO: 77
Cys

```

aagctt SEQ ID NO: 70

HindIII

图8

Tctagagccgcccacc SEQ ID NO: 71

XbaI Kozak

```

1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTCTGGGTCCCTCTGCTGTGGGTGCCTGGCAGCACAGGA
信号肽
21  Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
61  CAGGTGCAACTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTCAAGAAACCTGGCGCCACCGTGAAGATC
VH
41  S C K V S G F N I K D T Y I H W V Q Q A
121  AGCTGCAAGGTGTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTCCAACAAGCC

61  P G K G L E W M G R I D P A N D N T L Y
181  CCCGGAAGGGCCTGGAATGGATGGGCGCGATTGACCCCGCAACGACAACACCCCTCTAT

81  A S K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y
241  GCCAGCAAGTTCAGGGCAGGGTCACCATCACCGCCGACACCAGCACCGACACCGCCCTAC

101  M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y
301  ATGGAGCTGAGCAGCCTGCGGAGCGAAGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCTAC

121  G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S S G
361  GGCTACTACGTCTTCGACCATTGGGGACAGGGCACCCCTCGTGACAGTGTCCAGCTCCGGC
连接子
141  G G G D I Q M T Q S P S S L S A S V G D
421  GGAGGAGGAGATATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGAGAT
VL
161  R V T I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q
481  CGGGTGACCATCACATGCAGGACCTCCAGGTCCATCTCCCAGTACCTGGCCTGGTACCAA

181  Q K P G K V P K L L I Y S G S T L Q S G
541  CAGAAGCCCGCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGGCAGCACACTGCAATCCGGC

201  V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S
601  GTCCCTTCCCGGTTTTTCCGGATCCGGATCCGGCACCGACTTCACCCGTGACCATCAGCTCC

221  L Q P E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T
661  CTGCAACCCGAGGACGTGGCCACCTACTACTGTCAGCAGCACAACGAGAACCCCCCTCACC

241  F G G G T K V E I K G G C SEQ ID NO: 13
721  TTTGGCGGCGGAACCAAGGTGAGATCAAGGGCGGCTGC SEQ ID NO: 78
Cys

```

aaqett SEQ ID NO: 72

HindIII

图9

Tctagagccgcccacc SEQ ID NO: 73

XbaI Kozak

```

1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAGACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTCCCTGGCAGCACAGGA
   信号肽
21  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
61  GACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCTCCCTGAGCGCTTCCGTGGGAGATAGGGTGACC
   VL
41  I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
121 ATCACATGCCCGACCTCCAGSTCCATCTCCCAGTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCC

61  G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
181 GGCAAGGTGCCCAAGCTGCTCATCTATAGCGGCAGCACCCCTGCAGAGCGGAGTGCCCTTCC

81  R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
241 CCGTTTTCCGGATCCGGCTCCGGCACAGACTTTACCCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCT

101 E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
301 GAGGATGTCCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAAAGAGAACCCCTGACCTTCGGCGGC

121 G T K V E I K G G G S G G G G Q V Q L V
361 GGAACCAAGGTCGAGATCAAGGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCCAAGTGACAGCTGGTC
   连接子
141 Q S G A E V K K P G A T V K I S C K V S
421 CAATCCGGCGCCGAGTGAAAAAGCCCGGCCACCCTGAAGATCAGCTGCAAGGTGTCC

161 G F N I K D T Y I H W V Q Q A P G K G L
481 GGCTTCAACATCAAGGACACCTATATCCACTGGGTCCAGCAAGCCCCCGGAAAAGGCCTG

181 E W M G R I D P A N D N T L Y A S K F Q
541 GAGTGGATGGGACGGATTGACCCCGCCAACGACAAACACACTCTATGCCTCCAAGTTCAG

201 G R V T I T A D T S T D T A Y M E L S S
601 GGCAGGGTGACAAATCACCSCCGACACCAGCACCAGACACAGCTTATATGGAGCTGTCTCTCC

221 L R S E D T A V Y Y C A R G Y G Y Y V F
661 CTCCGGTCCGAGGATACCGCCCTCTACTACTGCGCCAGGGGCTACGGCTACTACGTGTTT

241 D H W G Q G T L V T V S S G G C      SEQ ID NO: 14
721 GACCACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCCAGCGGAGGCTGC      SEQ ID NO: 10
   CYS

```

aagctt SEQ ID NO: 74

HinDIII

图10

Totagagcgcgcacc SEQ ID NO:75

XbaI Kozak

```

1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTCTCTGCTGTGGGTGCTGGCAGCACAGGA
   信号肽
21  Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
61  CAGGTGCAACTGGTGCAGAGCGGCCCGAGGTCAAGAAACCTGGCGCCACCGTGAAGATC
   VH
41  S C K V S G F N I K D T Y I H W V Q Q A
121 AGCTGCAAGGTGTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTCCAACAAGCC

61  P G K G L E W M G R I D P A N D N T L Y
181 CCCGAAAGGGCCTGGGATGGATGGGCCGGATTGACCCCGCAACGACAACACCCCTCTAT

81  A S K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y
241 GCCAGCAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATCACCGCCGACACCAGCACCGACACCGCCTAC

101 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y
301 ATGGAGCTGAGCAGCCTGCGGAGCGAAGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCTAC

121 G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S G G
361 GGCTACTACGTCTTCGACCATTTGGGGACAGGGCACCCCTCGTGACAGTGTCCAGCGGAGGA
   连接子
141 G S G G G G D I Q M T Q S P S S L S A S
421 GGATCCCGCGGAGGAGGATATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCTTCC
   VL
161 V G D R V T I T C R T S R S I S Q Y L A
481 GTGGGAGATCGGGTGACCATCACATGCAGGACCTCCAGGTCCATCTCCAGTACCTGGCC

181 W Y Q Q K P G K V P K L L I Y S G S T L
541 TGGTACCAACAGAAAGCCCGCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGGCAGCACACTG

201 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
601 CAATCCGGCGTCCCTTCCCCGGTTTTCCGGATCCGGATCCGGCACCGACTTCACCCTGACC

221 I S S L Q P E D V A T Y Y C Q Q H N E N
661 ATCAGCTCCCTGCAACCCGAGGACGTGGCCACCTACTACTGTGAGCAGCACAAACGAGAAC

241 P L T F G G G T K V E I K G G C      SEQ ID NO: 15
721 CCCCTCACCTTTGGCGGCGGAACCAAGGTGAGATCAAGGGCGGCTGC      SEQ ID NO: 11
   CYS

```

aagctt SEQ ID NO:76

HindIII

图11

Cys- 双价抗体**前导序列:**

atggaaacccgacacccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtcccaggtcccaccggt SEQ ID NO: 25
 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G SEQ ID NO: 26

五氨基酸连接子:

agtgggtggaggaggc SEQ ID NO: 27
 S G G G G SEQ ID NO: 28

八氨基酸连接子:

ggcggaggaggagtgaggcggaggcggc SEQ ID NO: 29
 G G G S G G G G SEQ ID NO: 30

半胱氨酸尾部:

ggcgggtgc SEQ ID NO: 31
 G G C SEQ ID NO: 32

图12A

微抗体**前导序列:**

atggaaacccgacacccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtcccaggtcccaccggt SEQ ID NO: 33
 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G SEQ ID NO: 34

十八氨基酸连接子:

ggctcccacatccggcggaggctctggcgggtggatctggcggaggcgggtccatcc SEQ ID NO: 35
 G S T S G G G S G G G S G G G S S SEQ ID NO: 36

IgG1 铰链 / 连接子 -CH3 域:

gagcctaagtcctgcgacaagacccacacccctgtcccccttgccggcggagggaagcagcggga
 E P K S C D K T H T C P P C G G G S S G
 ggccggatccgggtggccagcctcgggagcctcagggtgtacacccctgcctccctcccgaggac
 G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P S R D
 gagctgaccaagaaccagggtgtccctgacctgtctgtgtaagggtcttctacccttccgat
 E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D
 atcgccgtggagtgaggagtcacaacggccagcctgagaacaactacaagaaccacccctcct
 I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
 gtgctggactccgaagggtccctcttctctgtactccaagctcacagtggtataagtcocgg
 V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R
 tggcagcagggcaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactat
 W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y
 acccagaagtcctctgtccctgtctcctggcaag SEQ ID NO: 37
 T Q K S L S L S P G K SEQ ID NO: 38

图12B

鼠 VL

```

gatgtccagataaaccagtcctccatctttttcttgctgogtctcctggagaaaccattact
  D V Q I N Q S P S F L A A S P G E T I T
ataaattgc aggacaagtaggagtagtattagtcgaatatttagcc ttggtatcaagagaaacct
  I N C R T S R S I S Q Y L A W Y Q E K P
gggaaaactaataagctttcttattctac tctggatccactctgcaatct ggaattccatca
  G K T N K L L I Y S G S T L Q S G I P S
aggttcagtggcagtggtatctggtacagatttcactctcaccatcagtggcctggagcct
  R F S G S G S G T D F T L T I S G L E P
gaagattttgcaatgtattactgt caacagcataatgaaaaccogotcagc ttcgggtgot
  E D F A M Y Y C Q Q H N E N P L T F G A
gggaccaagctggagctgaag SEQ ID NO: 39
  G T K L E L K SEQ ID NO: 40

```

图12C

huVL

```

gaagtcagataaaccagtcctccatctcctctgtctgcatctgttaggagacagagtcacc
  D V Q I T Q S P S S L S A S V G D R V T
atcaattgc aggacaagtaggagtagtattagtcgaatatttagcc ttggtatcagcagaaacca
  I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
gggaaagttcctaagctcctgatctat tctggatccactctgcaatct ggagtcocatct
  G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
cggttcagtggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcct
  R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
gaagatgttgcaacttattactgt caacagcataatgaaaaccogotcagc ttcgggogga
  E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
gggaccaaggtggagatcaaa SEQ ID NO: 41
  G T K V E I K SEQ ID NO: 42

```

图12D

鼠 VL

```

gagggtccagctgcagcagctctggggcagagcttgtgaagccaggggcctcagtcagggtg
E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L
tootgcacagcttct gggttcaacattaaagac acctatatacacttcgtgaggcagagg
S C T A S G F N I K D T Y I H F V R Q R
cctgaacaggggcctggagtggttggga aggtattgatcctgogaatgataataact ttatat
P E Q G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gcctcaaagttccagggcaggccactataacagcagacacatcatccaacacagcctac
A S K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y
atgcacctctgcagcctgacatctggggacaactgccgtotattactgttggtaga ggttat
M H L S L T S G D T A V Y Y C G R G Y
ggttactaogtattttgacccac tggggccaaggcaccactctcacagttctctca SEQ ID NO: 43
G Y Y V F D H W G Q G T T L T V S S SEQ ID NO: 44

```

图12E

huVH 版本 a (来自 VH 版本 1)

```

gaagtgcagctgggtggaaagcggcggcgggcctgggtgcagccggggcggcagcctgggcctg
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L
agotgcgcggcgagc gggttcaacattaaagat acctatattcattttgtgcgcaggcg
S C A A S G F N I K D T Y I H F V R Q A
ccgggcaaaaggcctgggaatggattggc cgcattgatccggcgaaacgataaacacc ctgtat
P G K G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gcgagcaaatctcagggcgaagcaccattagcgcgggataccagcaaaaacaccgggtat
A S K F Q G K A T I S A D T S K N T A Y
ctgcagatgaacagcctgcgcgcggggagataccgcgggtgtattattgcgggcgc ggctat
L Q M N S L R A G D T A V Y Y C G R G Y
ggctattatgtgtttgatcat tggggccaaggcaccctgggtgacogtgagcagc SEQ ID NO: 45
G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S SEQ ID NO: 46

```

图12F

huVH 版本 b (来自 VH 版本 1)

```

gaagtgcagctggttgaaagcggcgggcgccctggtgcagccggcgagcctgogcctg
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L
agctgogcgcgagc ggctttaacattaaagat acctatattcattttgtgcgcaggcg
S C A A S G F N I K D T Y I H F V R Q A
ccgggcaaaggcctggaatggattggc cgcattgatccggcgaaacgataacacc ctgtat
P G K G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gogagcaaatttcaggggcaaagcgaccattagcggggataaccagcaaaaacacccgtat
A S K F Q G K A T I S A D T S K N T A Y
ctgcagatgaacagcctgogcgcggaagataccggcggtgtattattgogggccgc ggctat
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C G R G Y
ggctattatgtgtttgatcat tggggccaggggcaccctggtgacogtgagcago SEQ ID NO: 47
G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S SEQ ID NO: 48

```

图12G

huVH 版本 c (来自 VH 版本 2)

```

caggtgcagctggttgacagcgggcggggaagtgaaaaaacggcgcgacccgtgaaaatt
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
agctgcaaagtgcagc ggctttaacattaaagat acctatattcattttgtgcgcaggcg
S C K V S G F N I K D T Y I H F V Q Q A
ccgggcaaaggcctggaatggattggc cgcattgatccggcgaaacgataacacc ctgtat
P G K G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gogagcaaatttcaggggcaaagcgaccattacgggggataaccagcaaacgatacccggtat
A S K F Q G K A T I T A D T S T D T A Y
atggaactgagcagcctgogcgagcgagataccggcggtgtattattgogggccgc ggctat
M E L S S L R S G D T A V Y Y C G R G Y
ggctattatgtgtttgatcat tggggccaggggcaccctggtgacogtgagcago SEQ ID NO: 49
G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S SEQ ID NO: 50

```

图12H

huVH 版本 d (来自 VH 版本 2)

```

caggtgcagctggttgacagcgggcggggaagtgaaaaaacggcgcgacccgtgaaaatt
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
agctgcaaagtgcagc ggctttaacattaaagat acctatattcattttgtgcgcaggcg
S C K V S G F N I K D T Y I H F V Q Q A
ccgggcaaaggcctggaatggattggc cgcattgatccggcgaaacgataacacc ctgtat
P G K G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gogagcaaatttcaggggcaaagcgaccattacgggggataaccagcaaacgatacccggtat
A S K F Q G K A T I T A D T S T D T A Y
atggaactgagcagcctgogcgagcgagataccggcggtgtattattgogggccgc ggctat
M E L S S L R S E D T A V Y Y C G R G Y
ggctattatgtgtttgatcat tggggccaggggcaccctggtgacogtgagcago SEQ ID NO: 51
G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S SEQ ID NO: 52

```

图12I

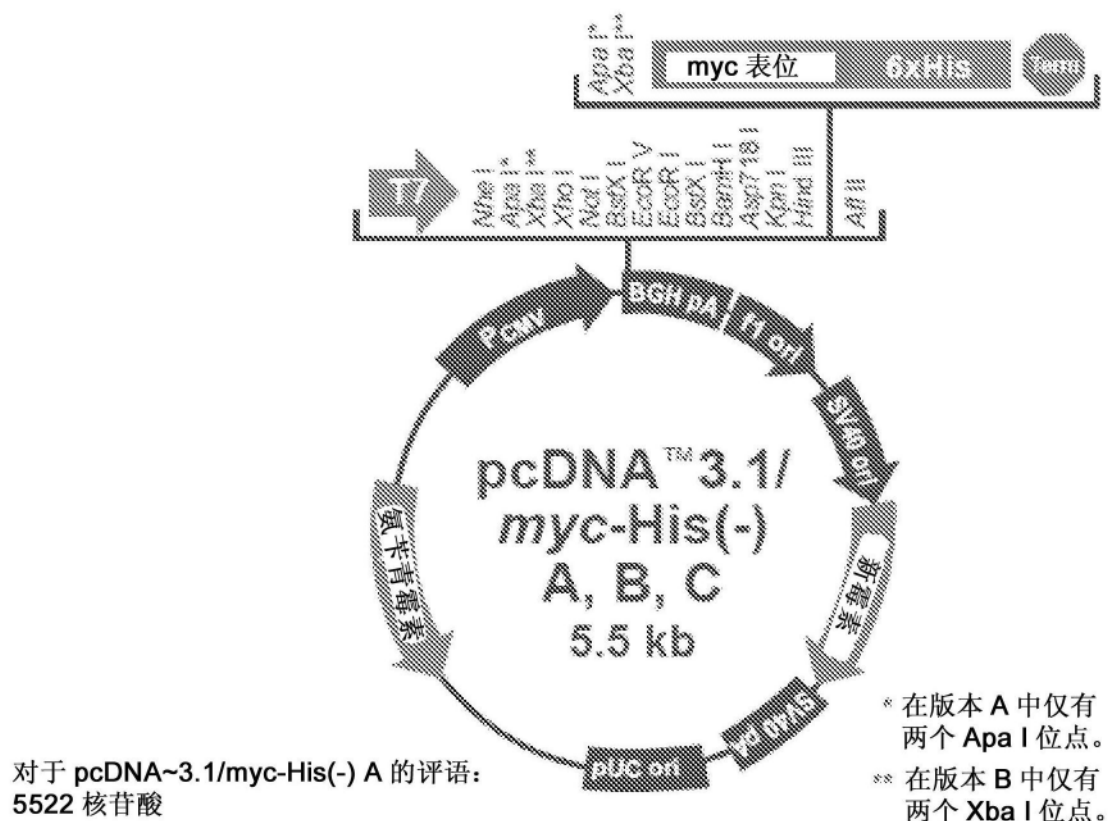


图13

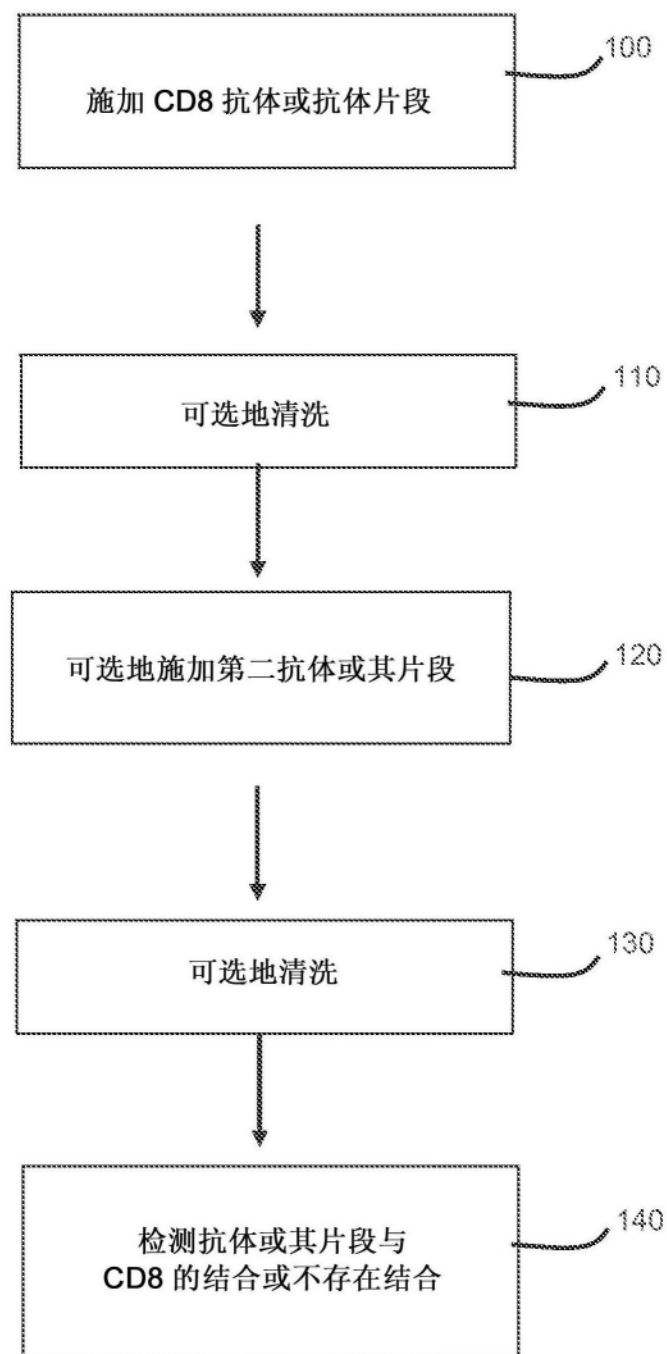


图14

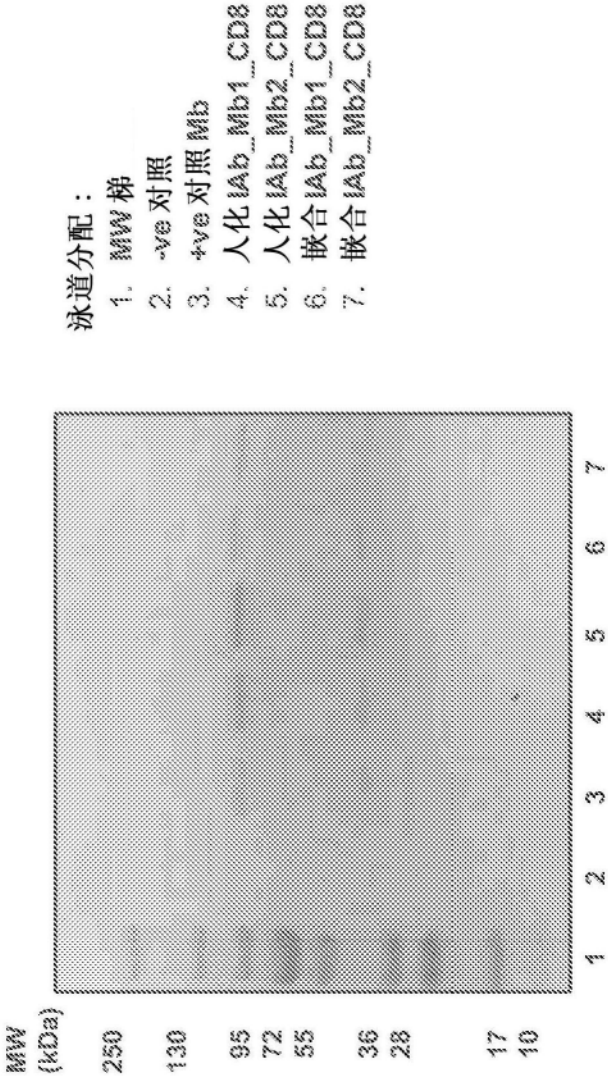


图15

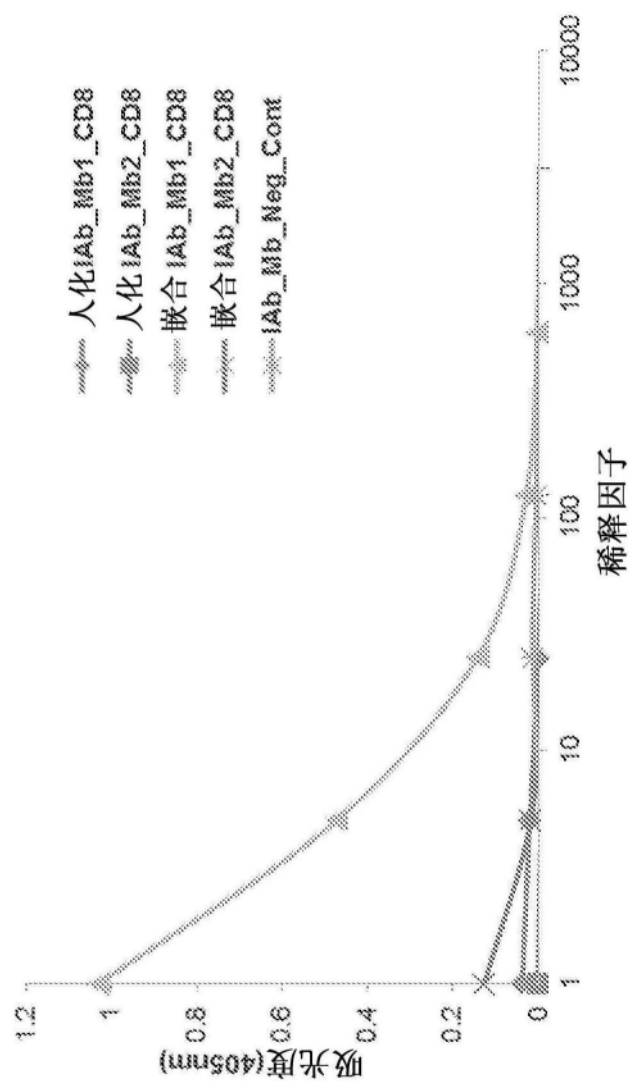


图16

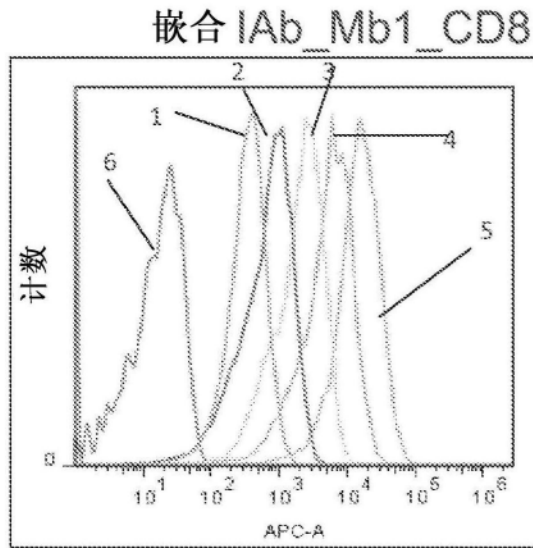


图 17A

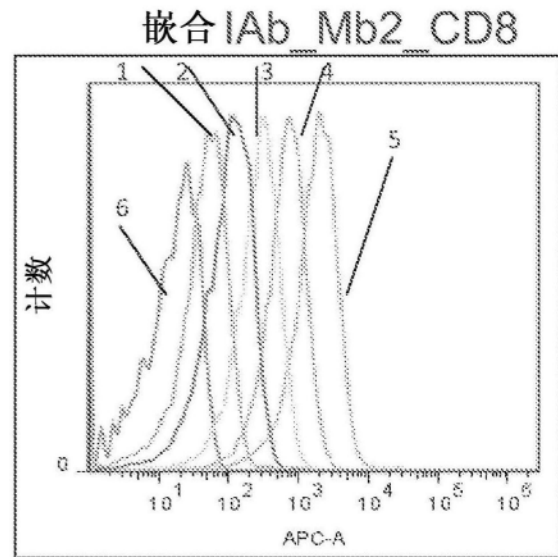


图 17B

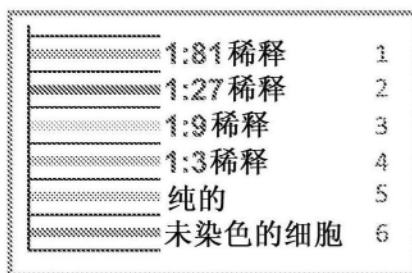
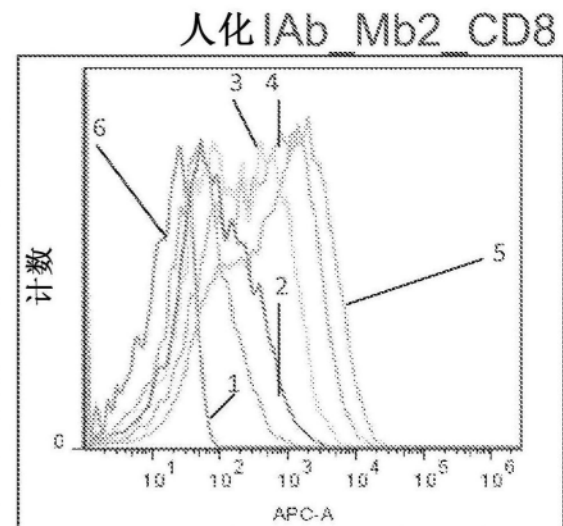
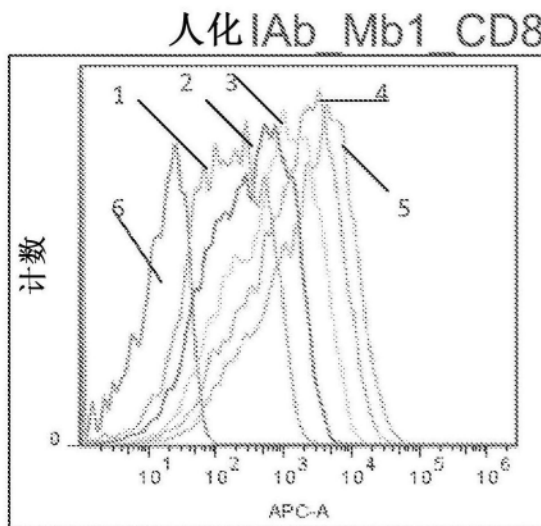


图 17D

图 17C

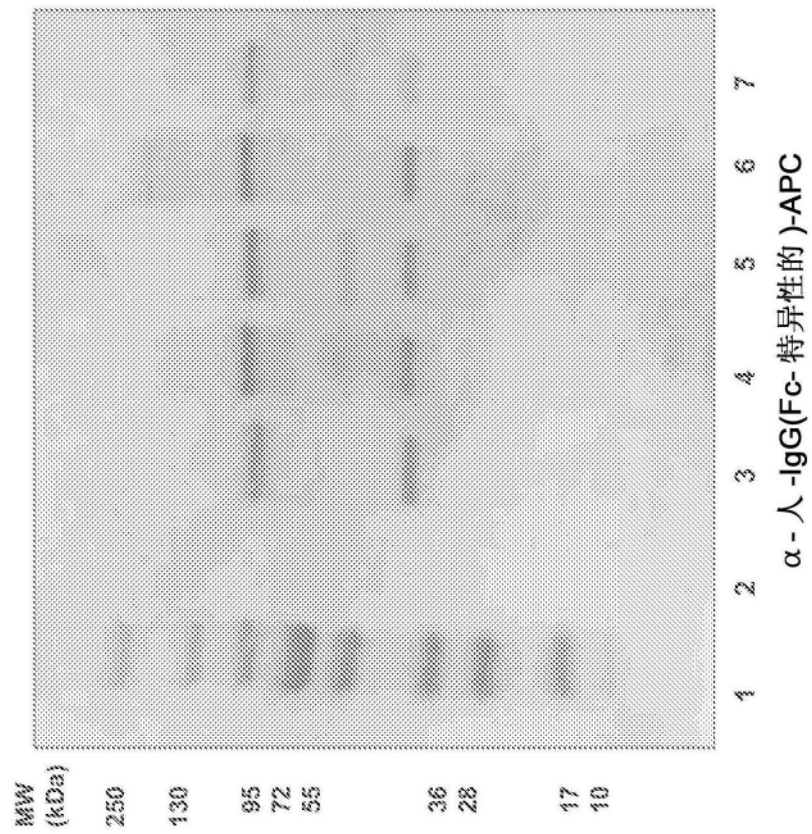


图18A

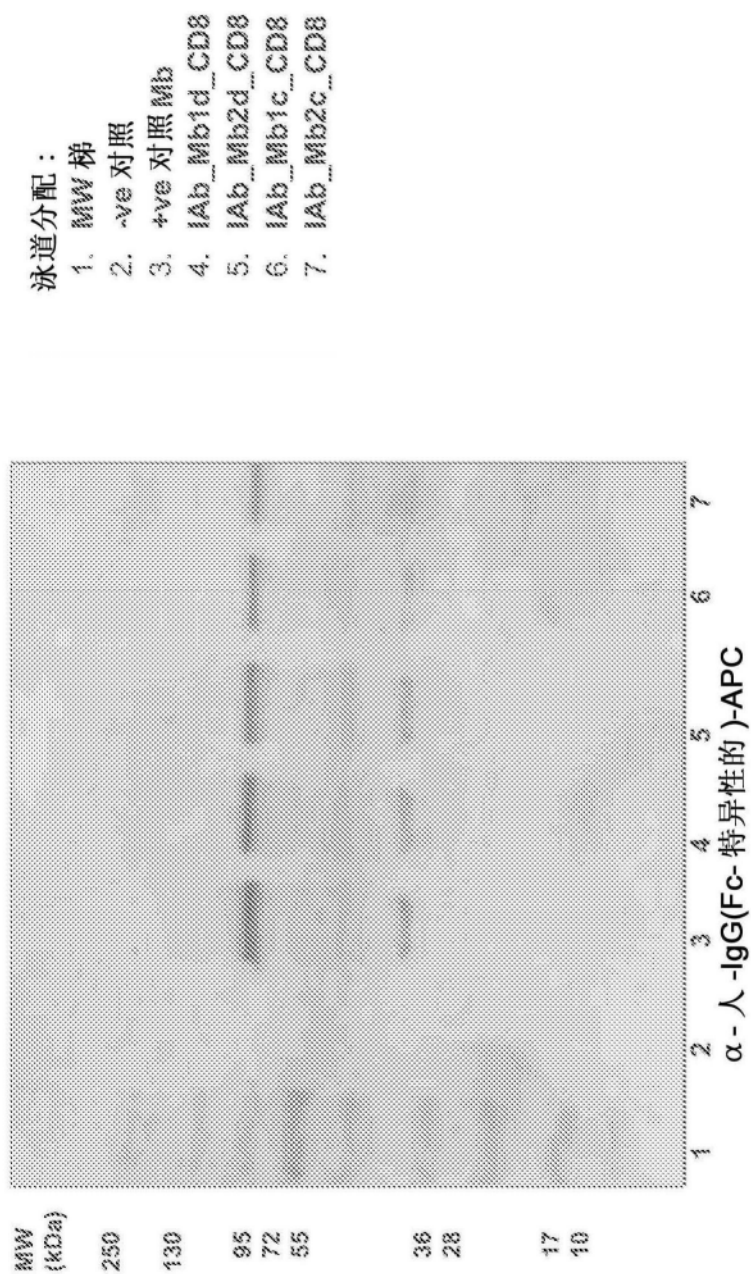


图18B

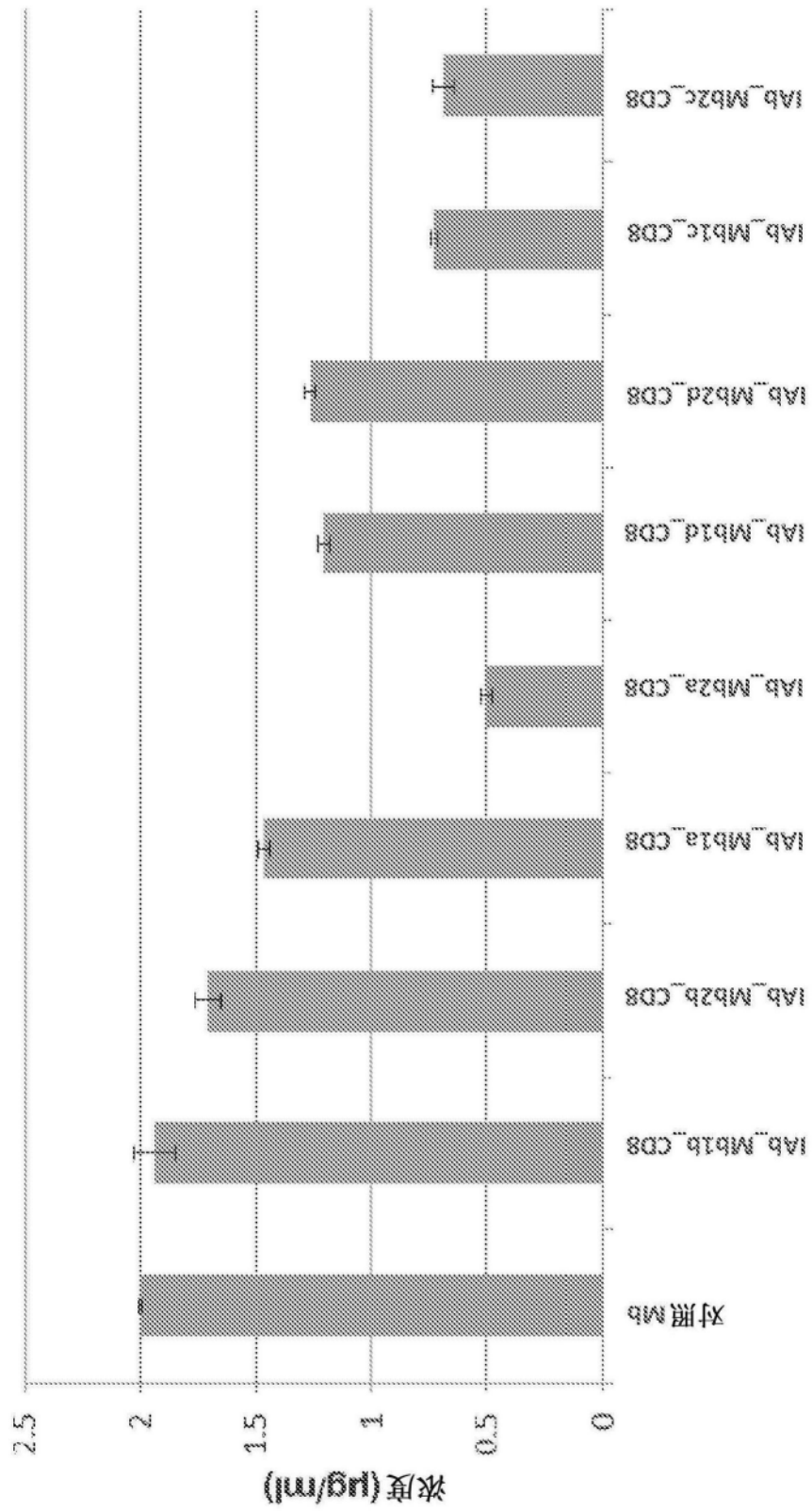


图19

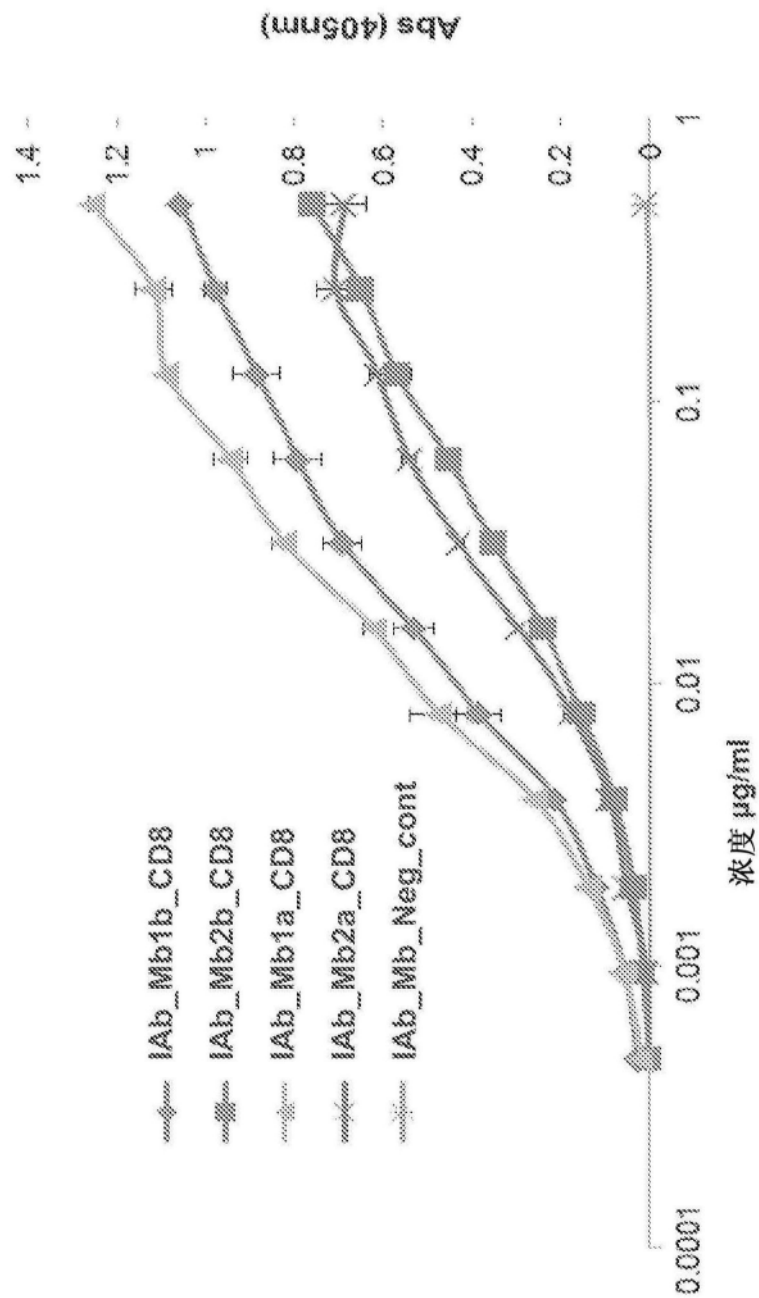


图20

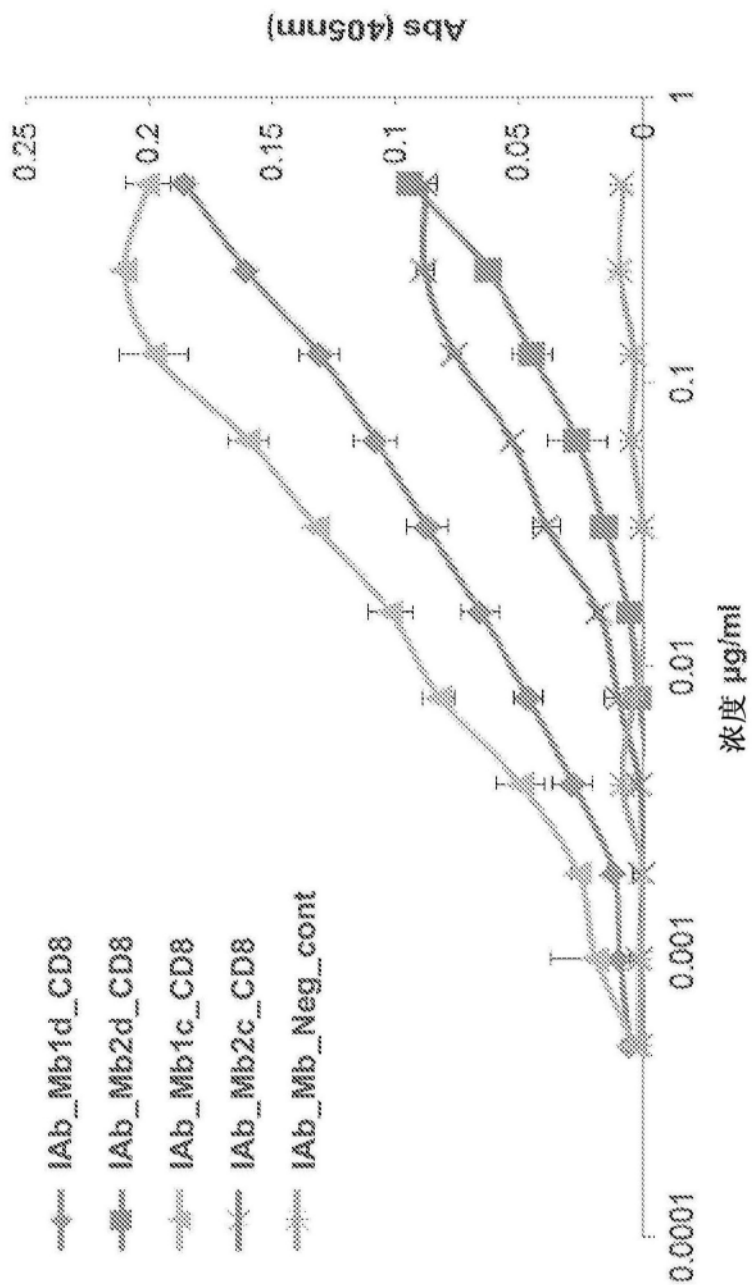


图21

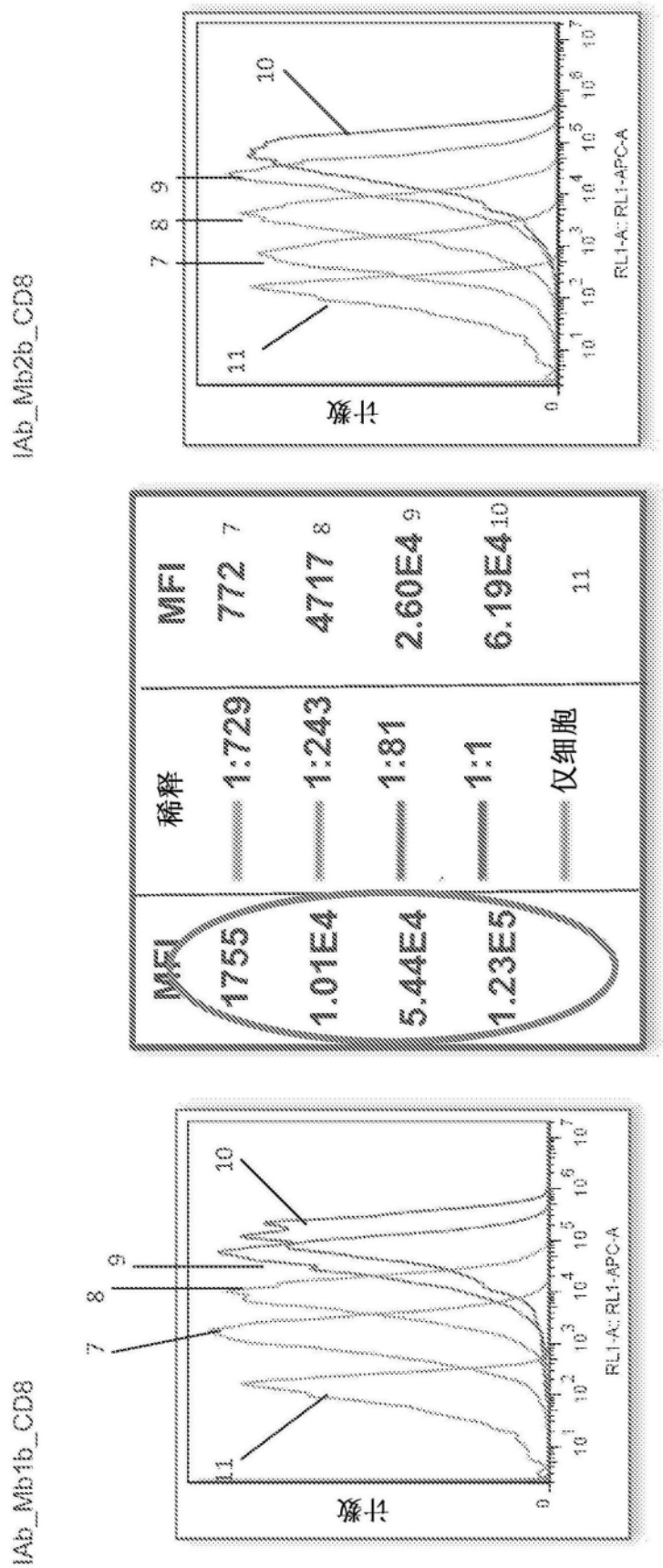


图22A

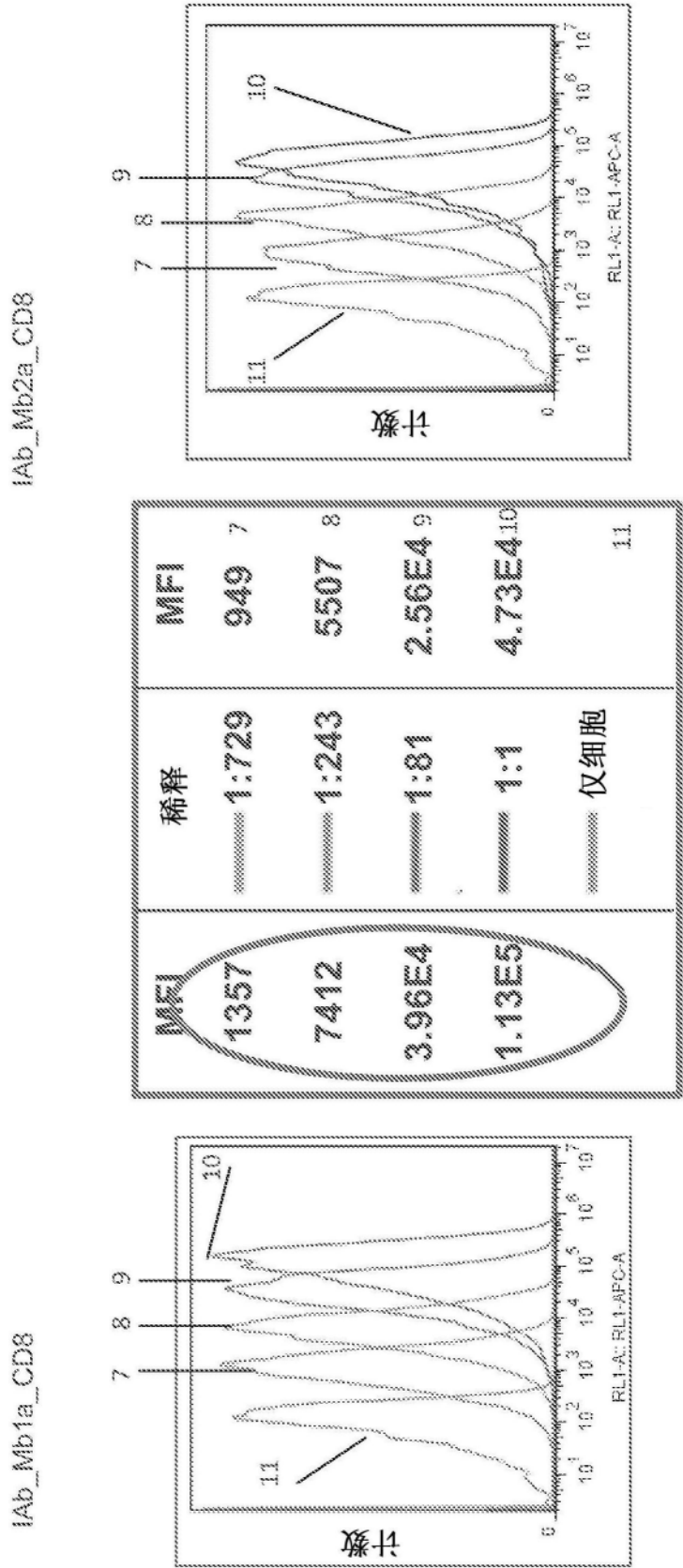
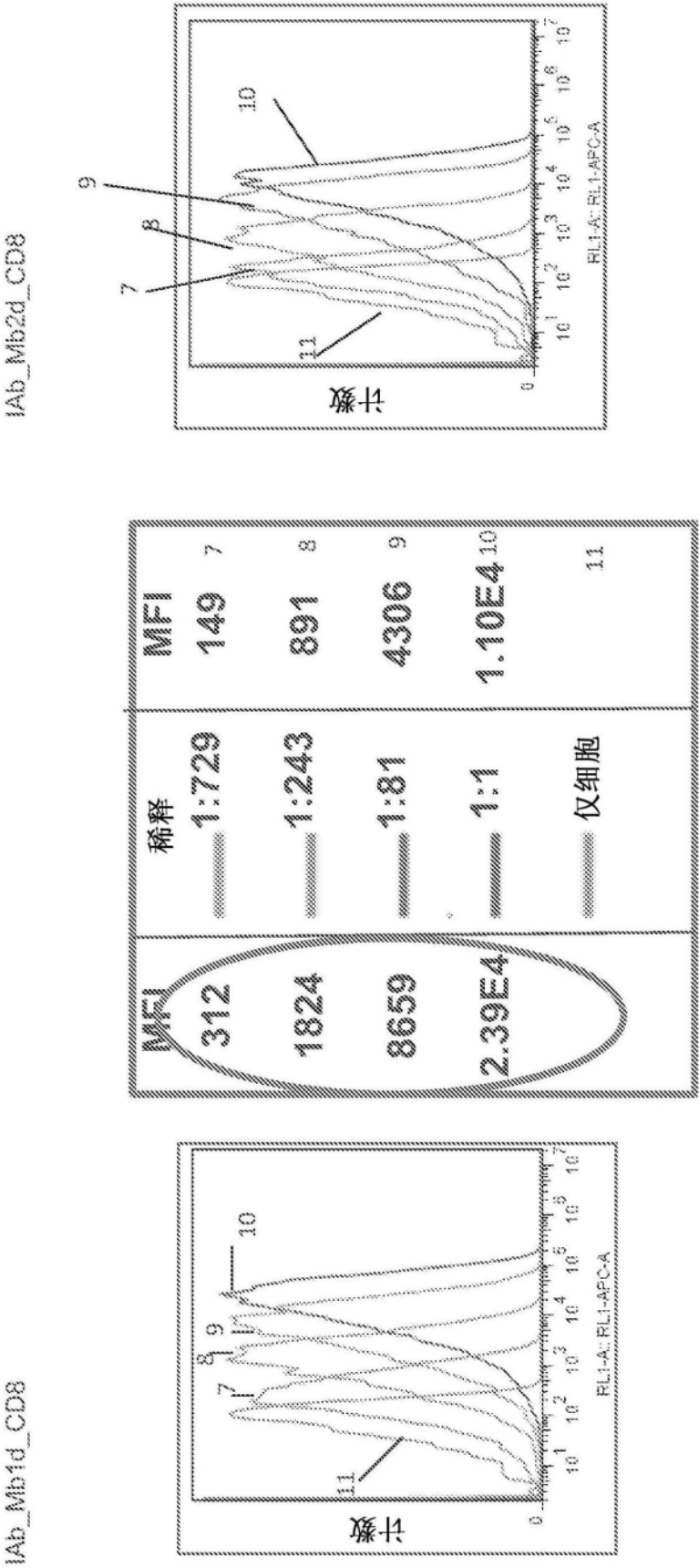


图22B



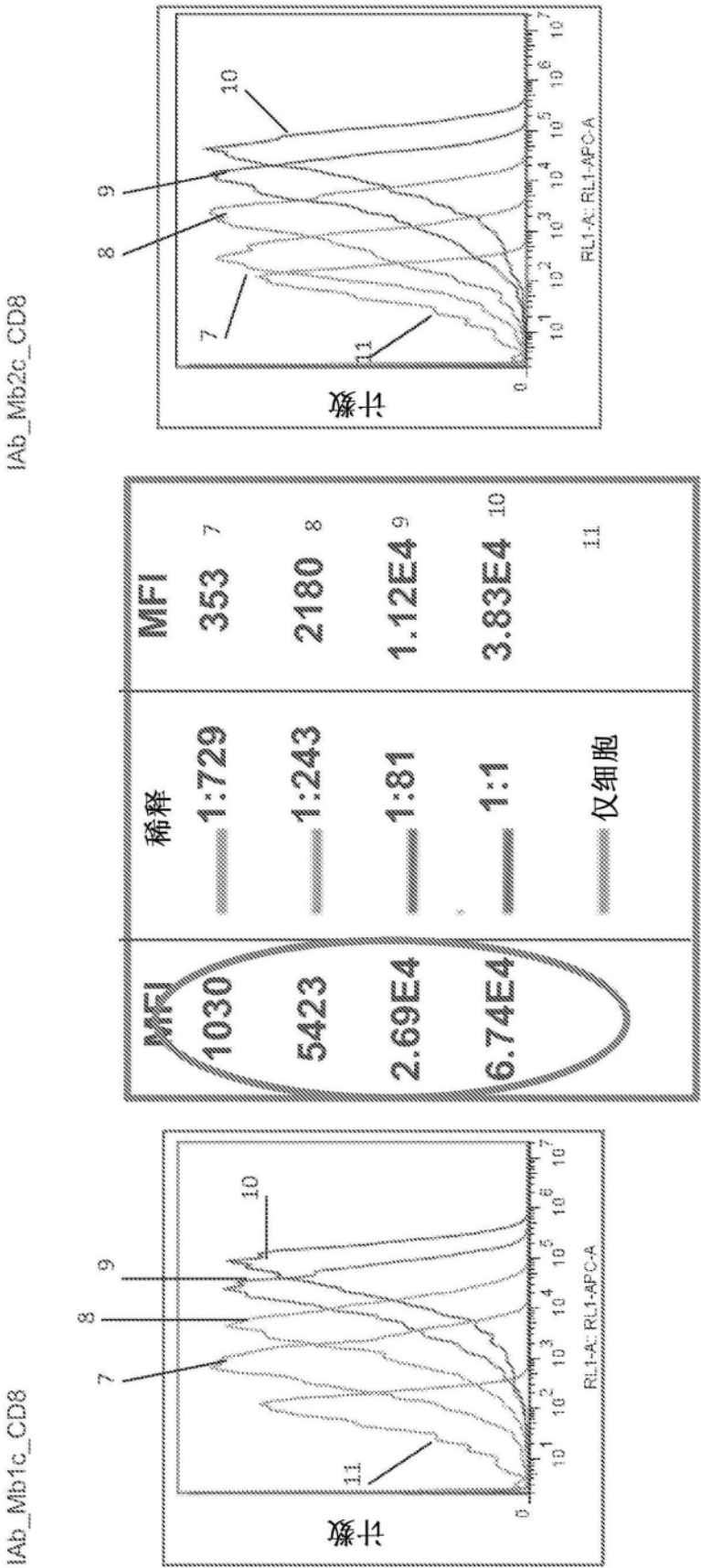


图23B

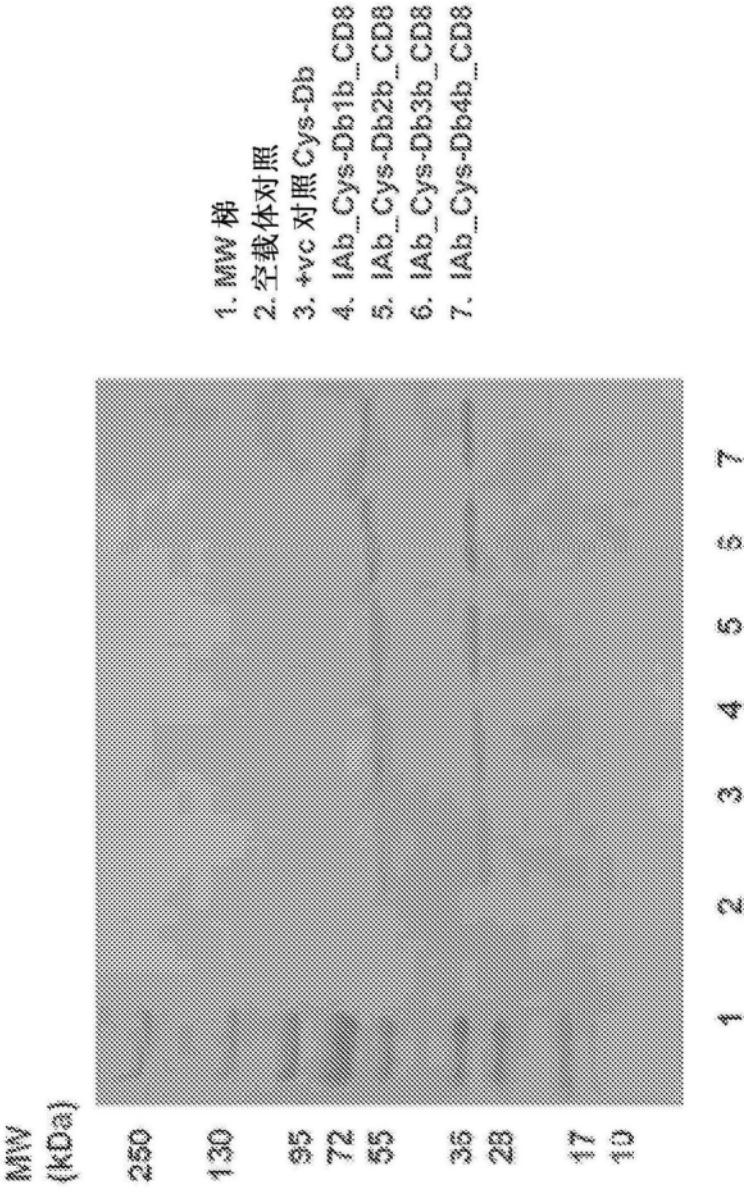


图24

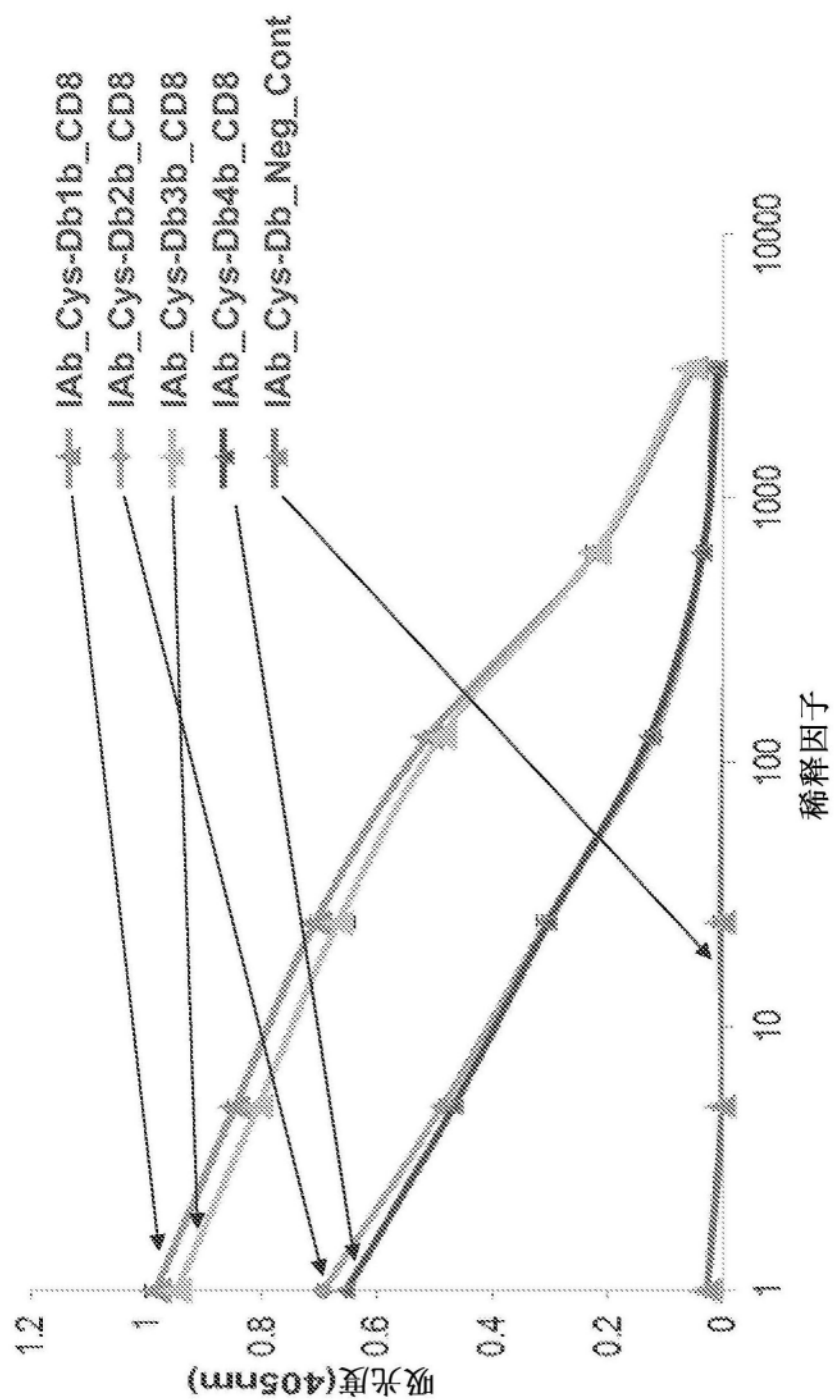


图25

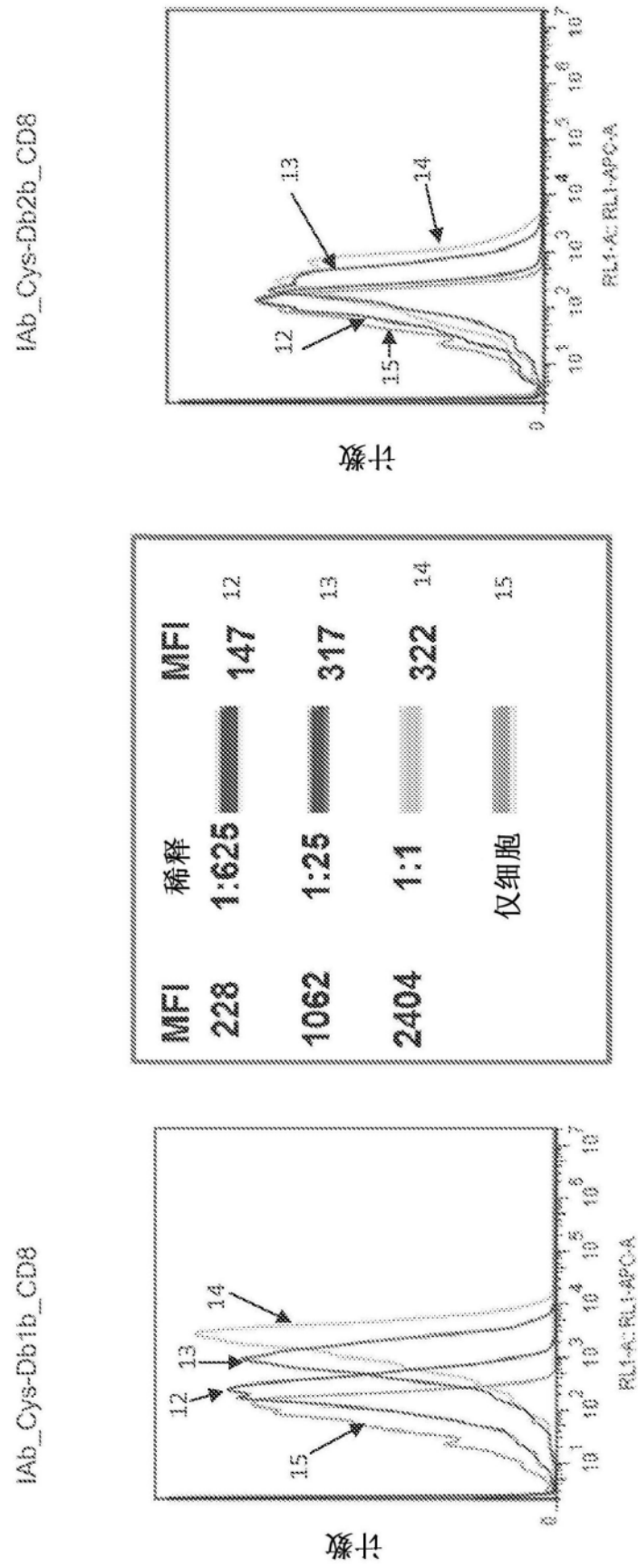


图26A

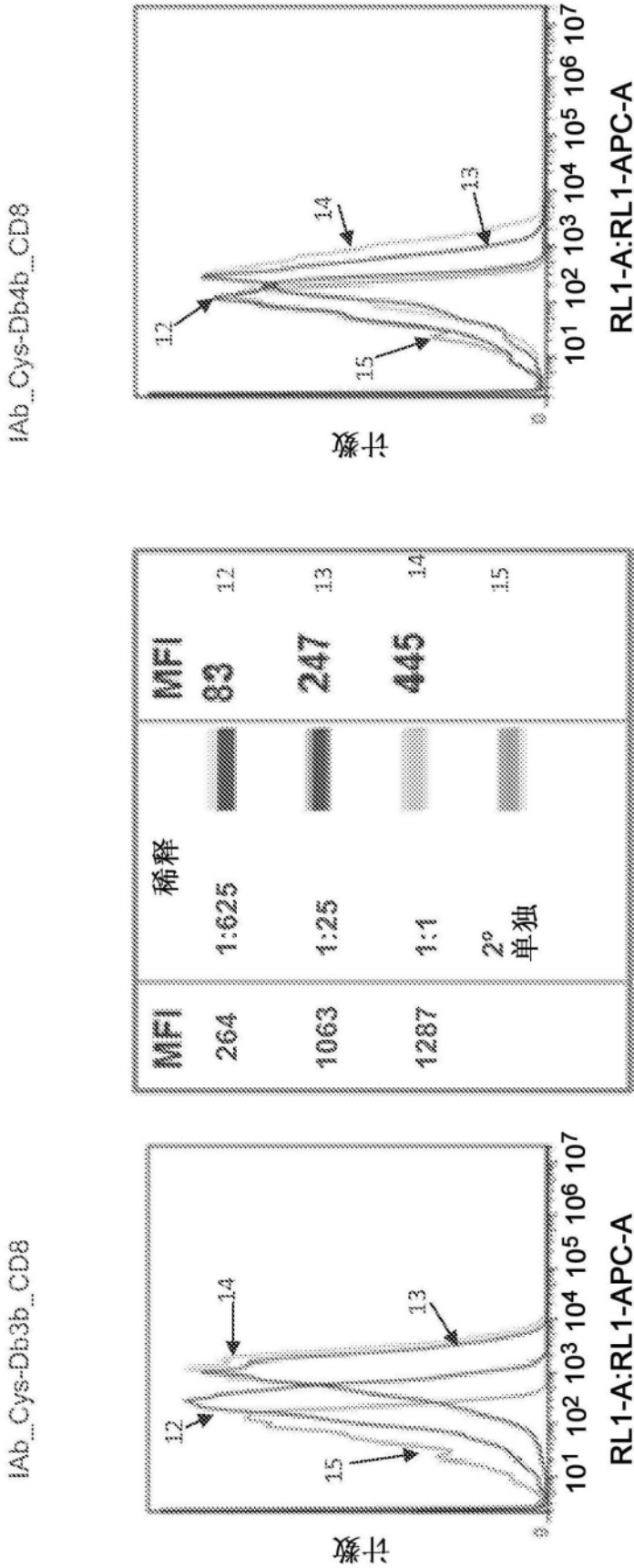


图26B

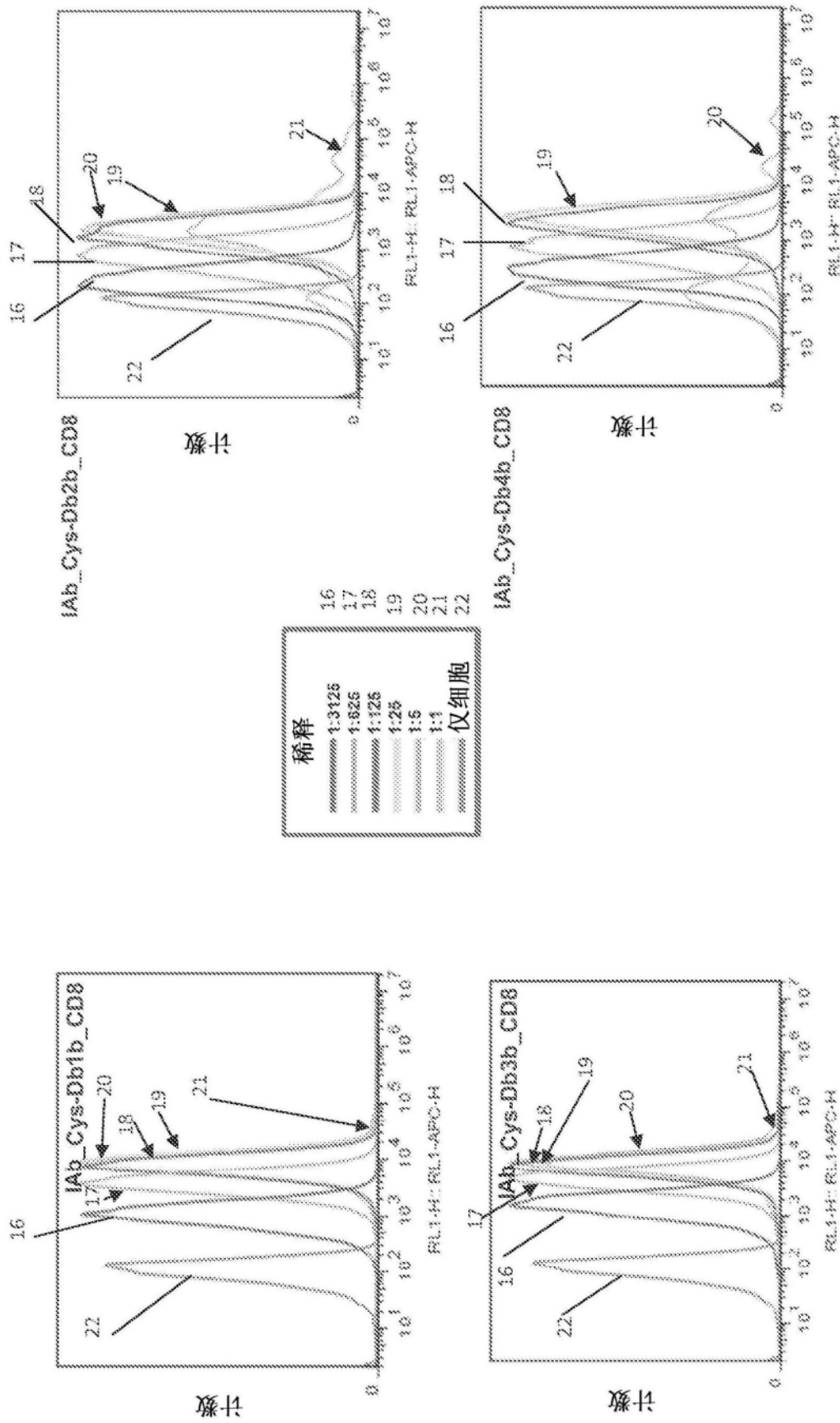


图27

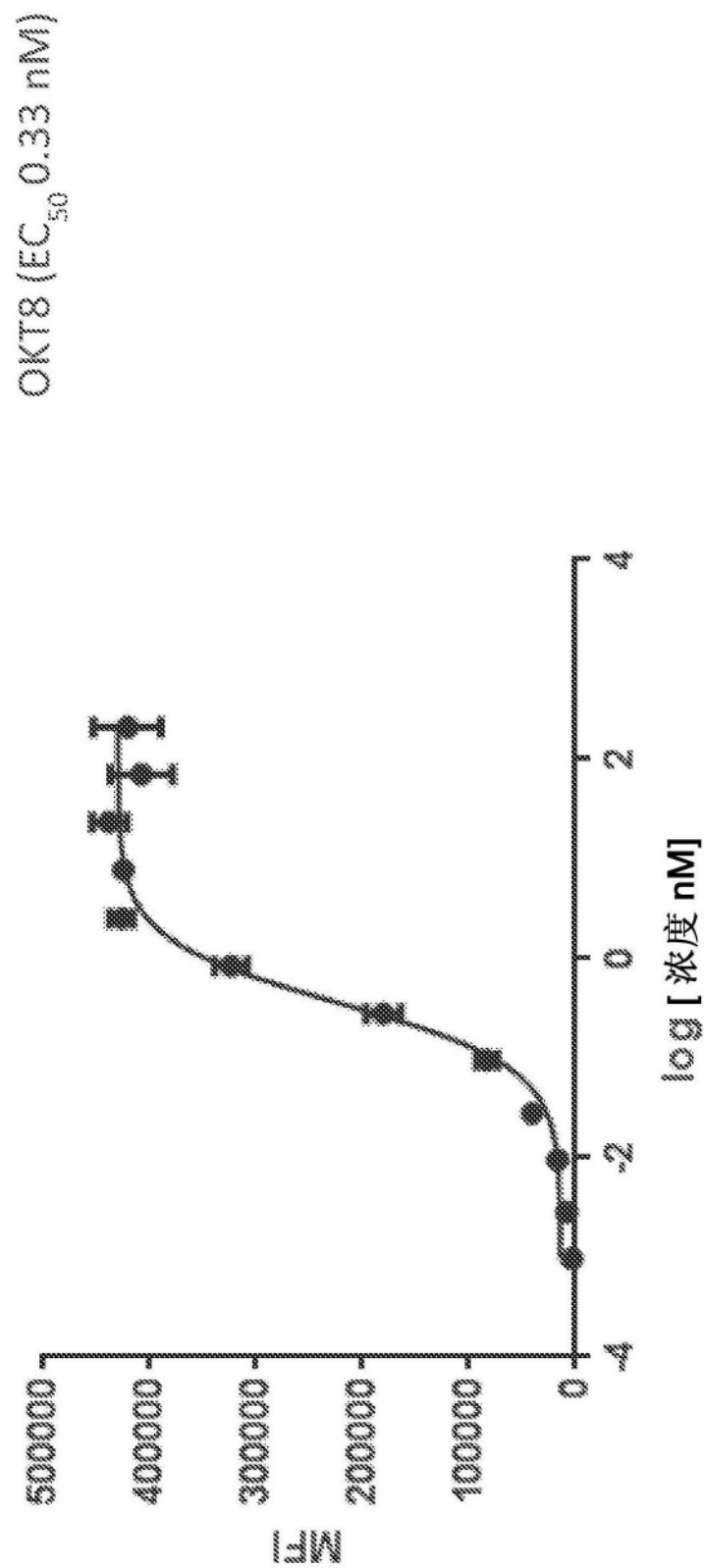


图28

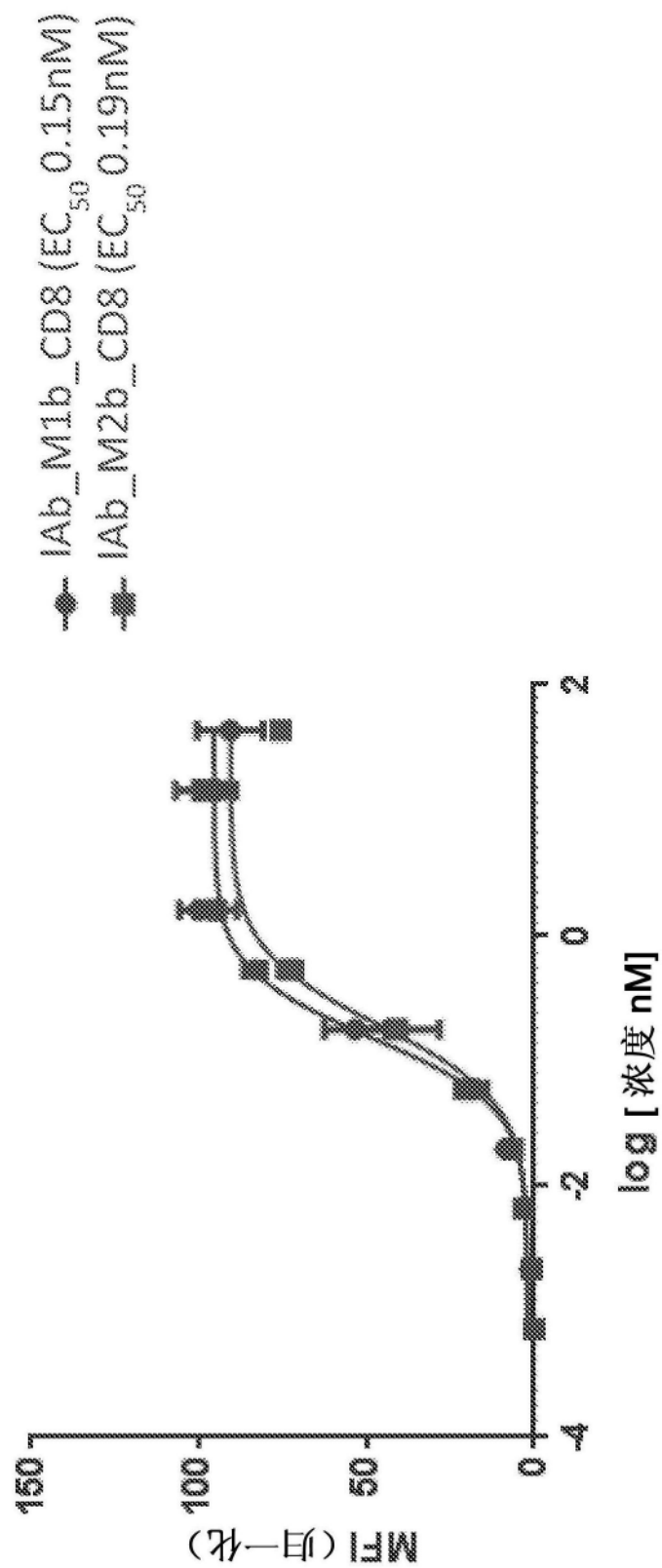


图29A

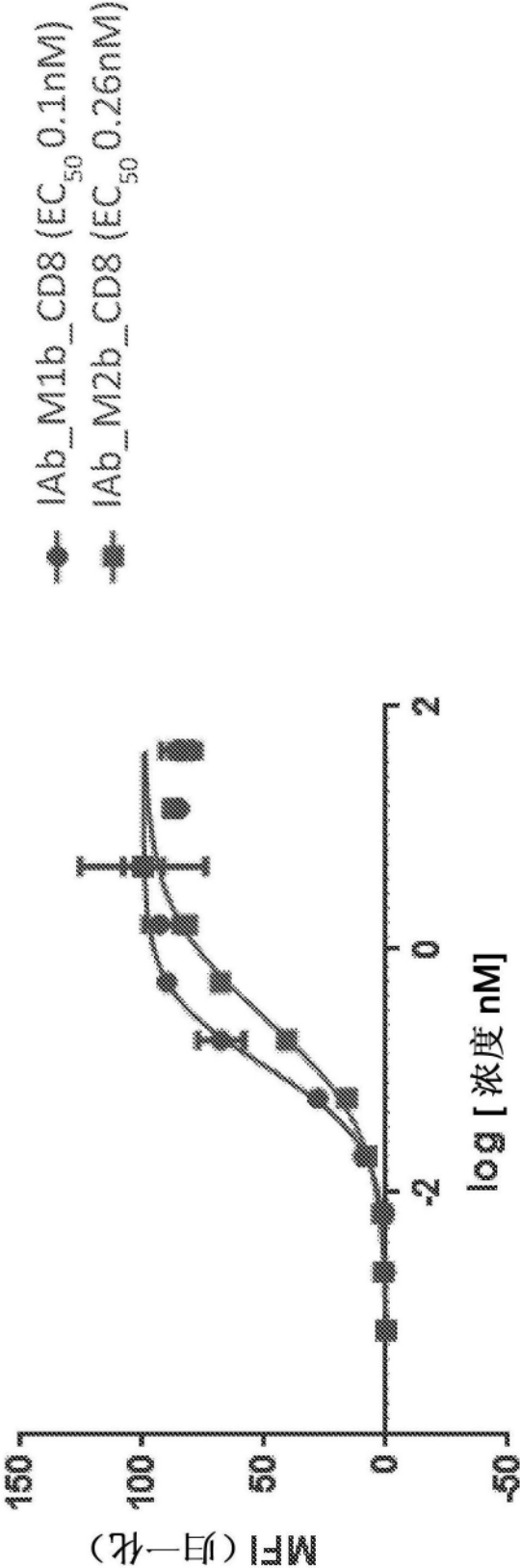


图29B

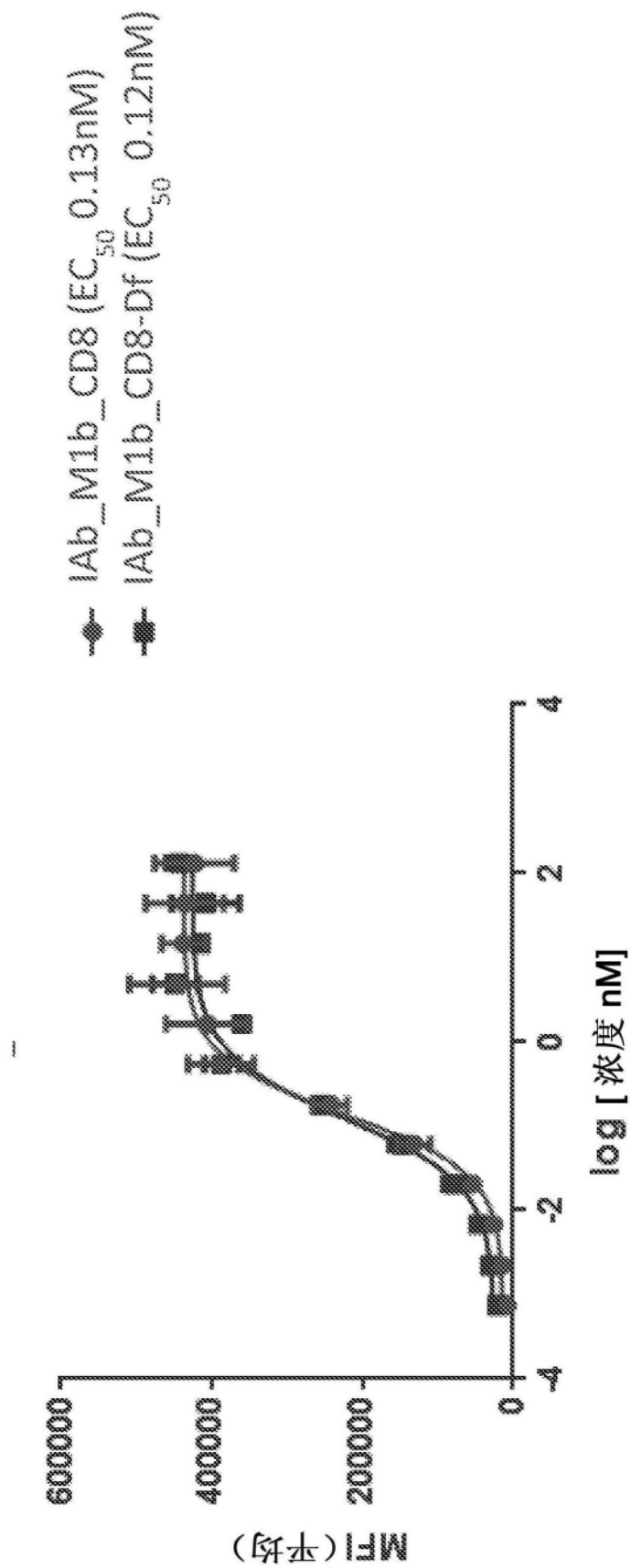


图29C

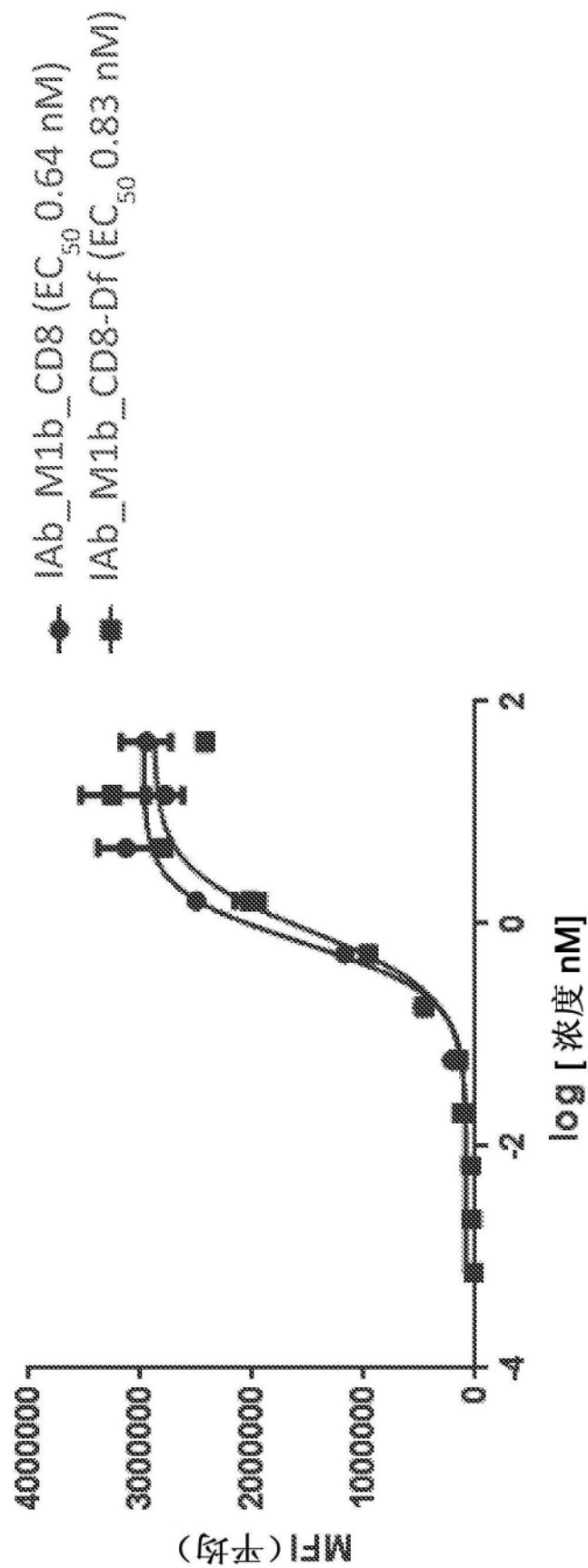


图29D

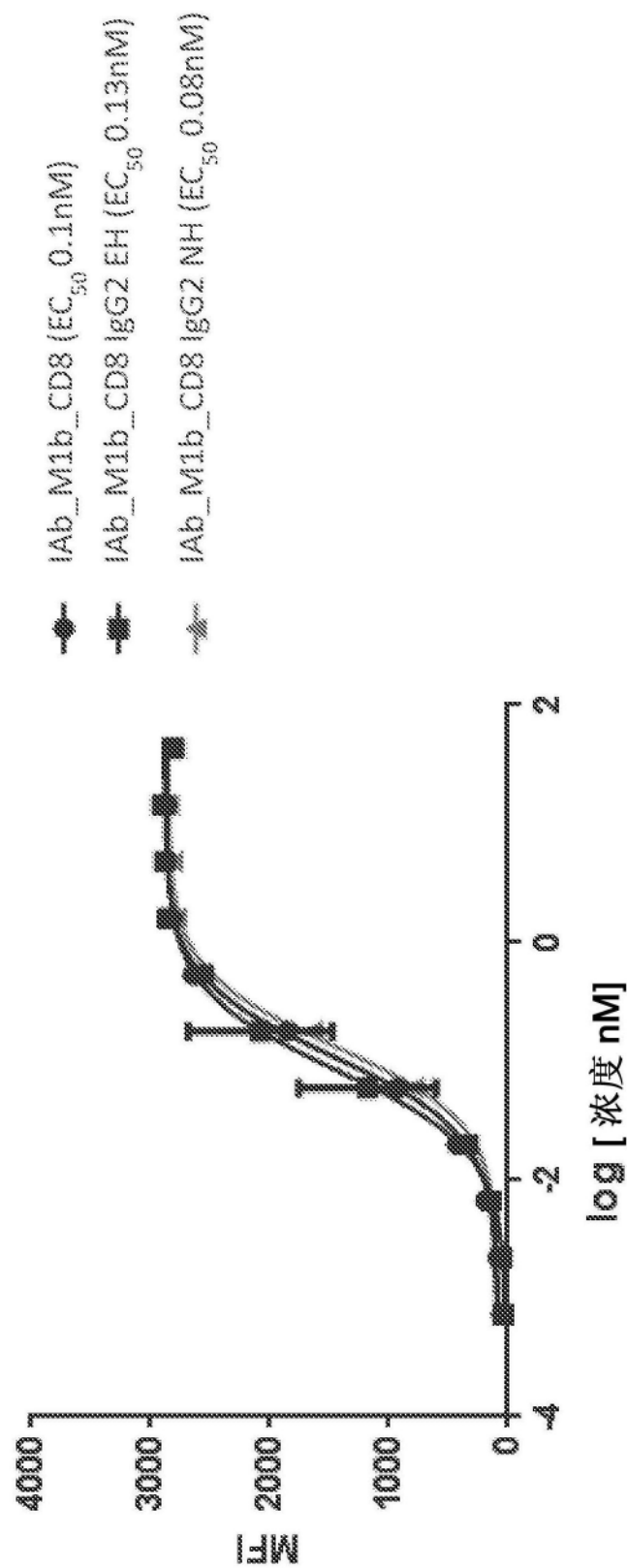


图29E

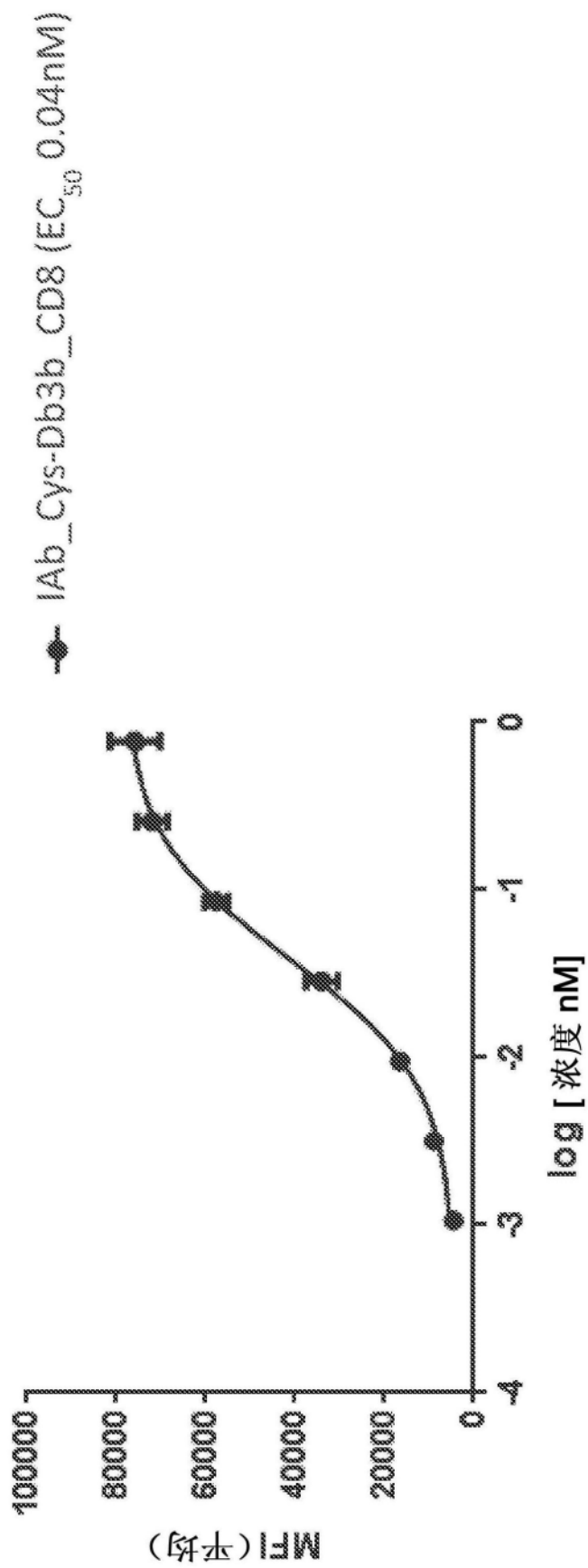


图30A

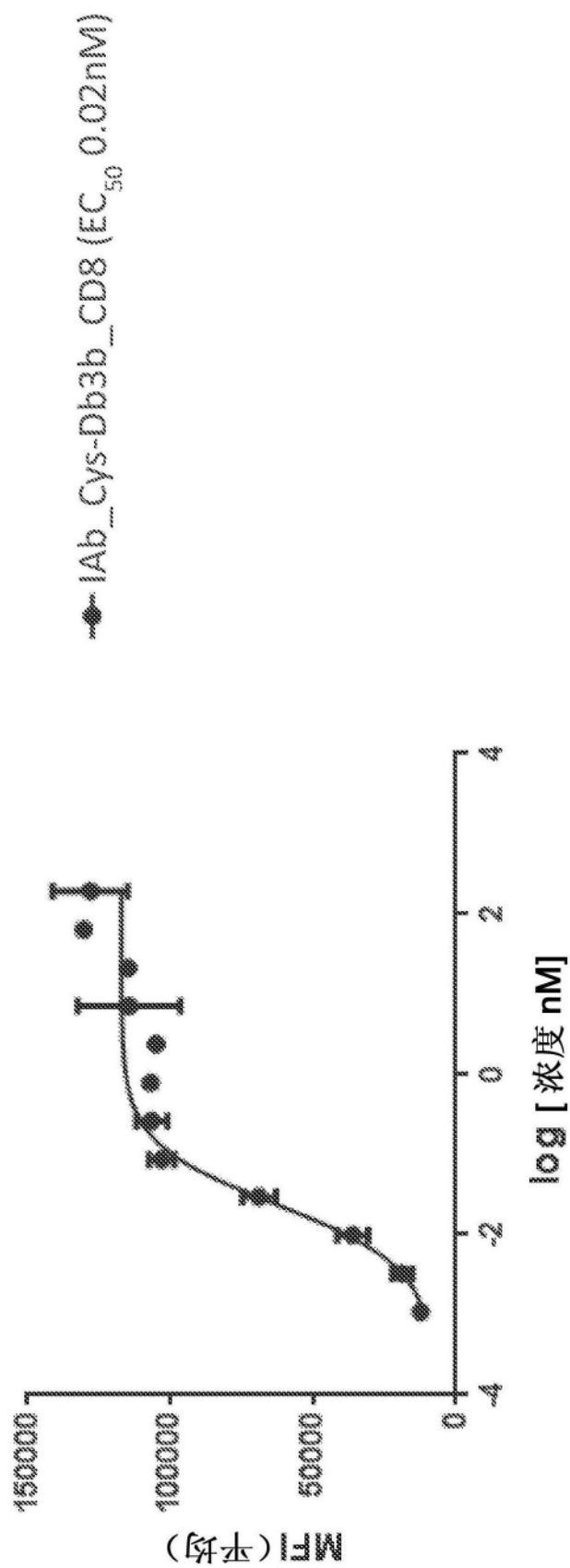


图30B

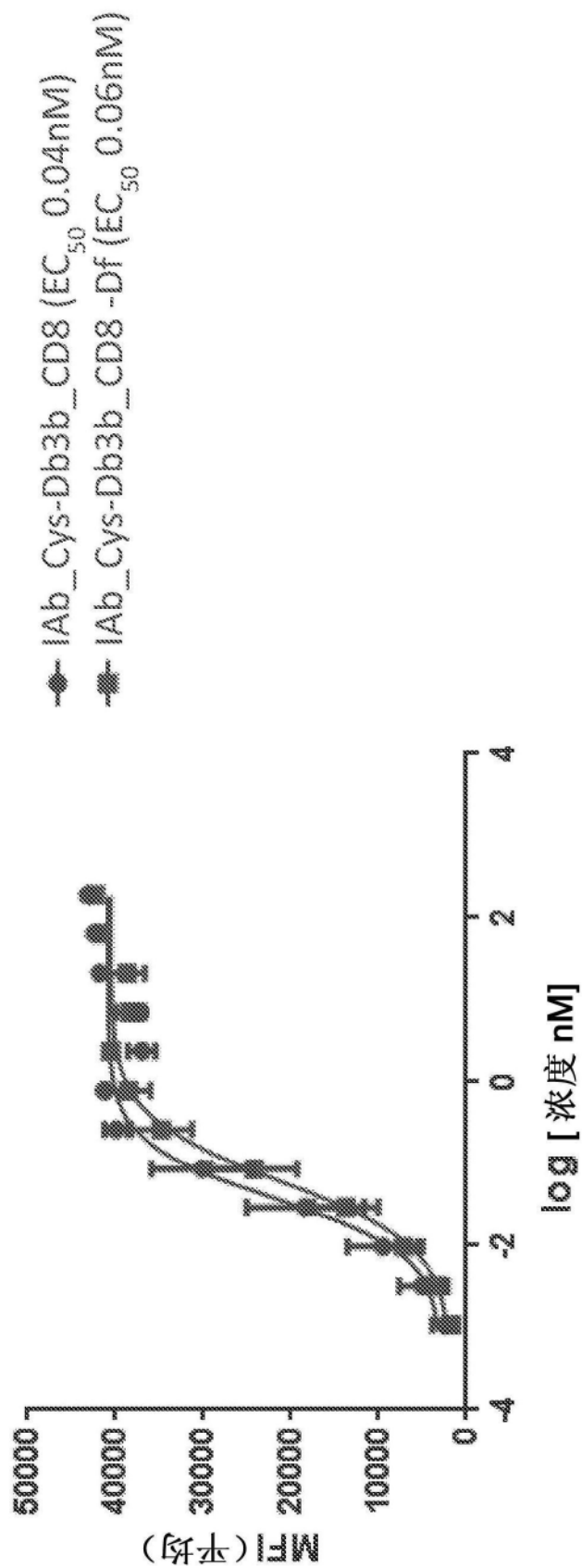


图30C

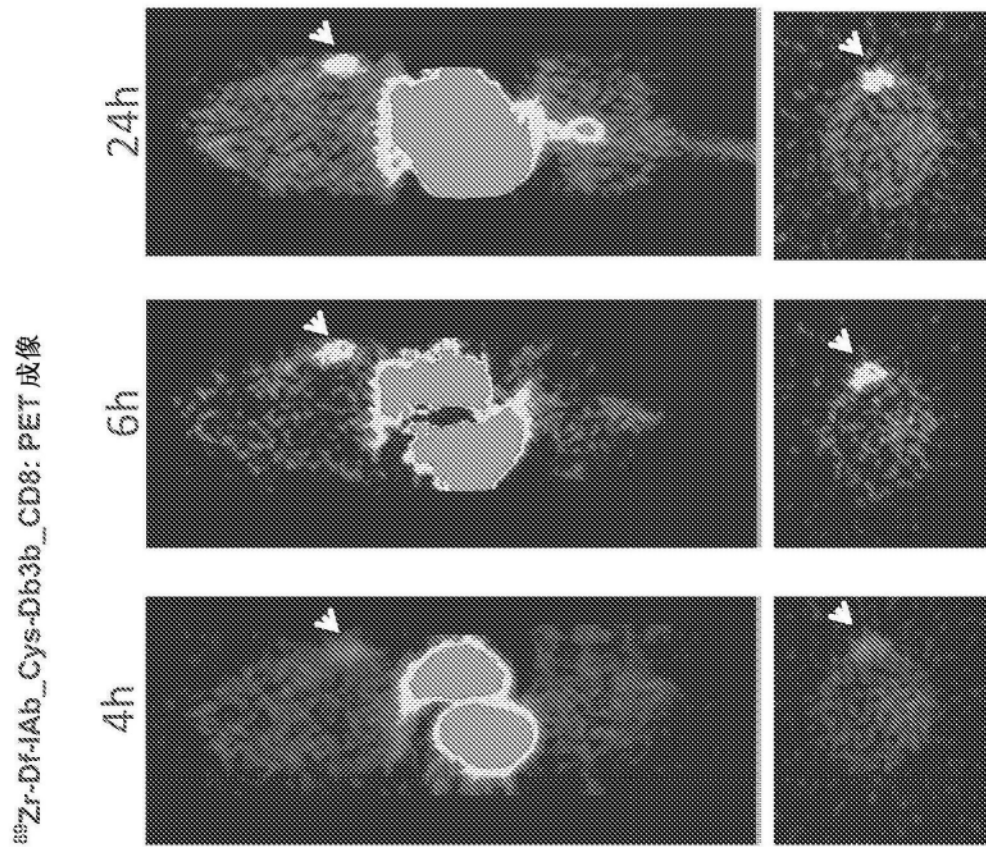


图31

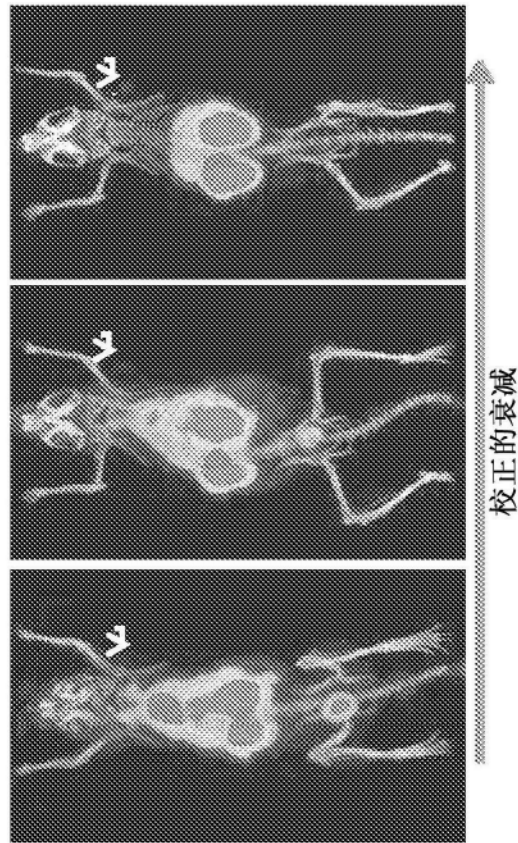


图32A

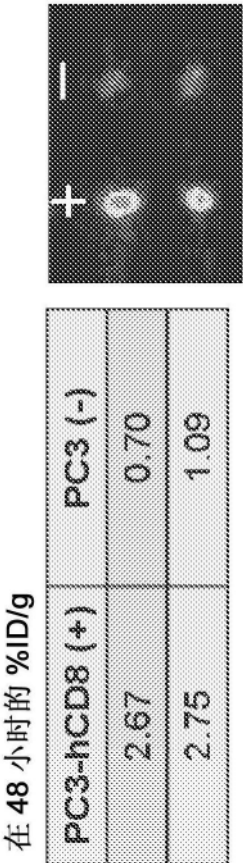
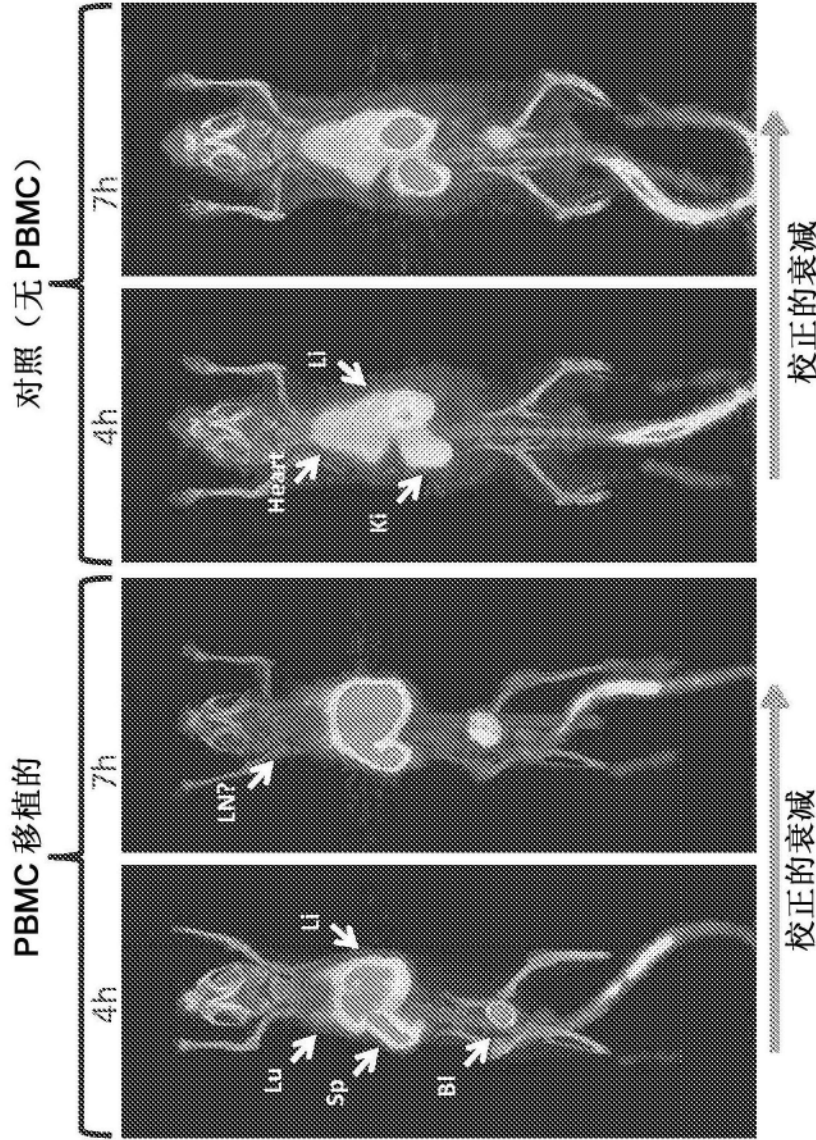


图32B



在 7h, 在 PBMC 移植的 NSG 小鼠中的体内分布显示:
在脾中 2.1 倍更高的摄取,
在肾中 4.0 倍较低的活性,
在肝中 1.7 倍较高的活性, 和
在血液中 3.1 倍较低的活性, 与对照的相比

图33