

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580008594. X

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 4 月 18 日

[11] 公开号 CN 1950399A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

[22] 申请日 2005.2.16

[21] 申请号 200580008594. X

[30] 优先权

[32] 2004.2.16 [33] EP [31] 04003445.6

[86] 国际申请 PCT/EP2005/001573 2005.2.16

[87] 国际公布 WO2005/077982 英 2005.8.25

[85] 进入国家阶段日期 2006.9.18

[71] 申请人 麦克罗梅特股份公司

地址 德国慕尼黑

[72] 发明人 P·库弗 U·伦凯里 - 许茨

R·卢特比泽 B·科赫莱森

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 6 页 说明书 35 页 序列表 40 页
附图 15 页

[54] 发明名称

免疫原性较弱的结合分子

[57] 摘要

本发明提供双特异性的结合分子，其中所述分子包含至少两个结构域或由之组成，其中所述至少两个结构域之一与人 CD3 复合物结合/相互作用且所述结构域包含来自抗体的轻链氨基酸序列，其中所述氨基酸序列为含有特异氨基酸替换的具体鉴定的氨基酸序列，且另一结构域是或者包含至少另一抗原相互作用位点和/或至少另一效应物结构域。本发明还提供编码本发明双特异性结合分子的核酸分子，含有所述核酸分子的载体和用所述载体转化的宿主细胞。另外，本发明涉及产生本发明双特异性结合分子的方法和含有本发明双特异性结合分子、本发明核酸分子或本发明宿主细胞的组合物。

1. 双特异性结合分子, 其中所述分子包含至少两个结构域或由之组成:

(a) 其中所述至少两个结构域之一与人 CD3 复合物特异结合/相互作用, 其中所述结构域含有来自抗体的轻链氨基酸序列, 其中所述氨基酸序列为:

(i) SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列;

(ii) 对应于 SEQ ID NO: 1 的核酸序列编码的氨基酸序列;

(iii) 与如(ii)定义的核酸序列互补链在严格条件下杂交的核苷酸序列编码的氨基酸序列; 和

(v) 由于遗传密码简并性而与(ii)和(iii)任一的核苷酸序列简并的核酸序列编码的氨基酸序列;

条件是(i)到(iv)的氨基酸序列在轻链 CDR 区根据 Kabat 系统的位置 L24、L54 和 L96 上含有氨基酸替换, 和

(b) 其中另一结构域是或包含至少一个其他抗原相互作用位点和/或至少一个其他效应物结构域。

2. 根据权利要求 1 的双特异性结合分子, 其中与人 CD3 复合物结合/相互作用的结构域表征为在位置 L24 有丝氨酸, 位置 L54 有缬氨酸和位置 L96 有亮氨酸。

3. 根据权利要求 1 或 2 的双特异性结合分子, 其中所述轻链的 CDR 区包含 SEQ ID NO: 4、6 或 8 的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 3、5 或 7 的核酸序列编码的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

4. 根据权利要求 1 到 3 任一项的双特异性结合分子, 其中与人 CD3 复合物结合/相互作用的结构域为 scFv。

5. 根据权利要求 1 到 4 任一项的双特异性结合分子, 其中与人 CD3 复合物结合/相互作用的结构域含有 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 9 的核酸序列编码的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

6. 根据权利要求 1 到 5 任一项的双特异性结合分子, 其中与人 CD3

复合物结合/相互作用的结构域含有如 SEQ ID NO: 14 所述的或由 SEQ ID NO: 13 的核酸序列编码的氨基酸序列或由之组成。

7. 根据权利要求 1 到 6 任一项的双特异性结合分子, 其中所述另一结构域为至少一个特异于一个或多个细胞表面分子的其他抗原相互作用位点。

8. 根据权利要求 7 的双特异性结合分子, 其中所述一个或多个细胞表面分子为肿瘤特异的分子。

9. 根据权利要求 7 或 8 的双特异性结合分子, 其中所述另一结构域为另一 scFv。

10. 根据权利要求 7 到 9 任一项的双特异性结合分子, 其中所述另一结构域与选自下述的抗原特异结合/相互作用: EpCAM、CCR5、CD19、HER-2、HER-3、HER-4、EGFR、PSMA、CEA、MUC-1 (黏蛋白)、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5AC、MUC5B、MUC7、bhCG、Lewis-Y、CD20、CD33、CD30、神经节苷脂 GD3、9-O-乙酰基-GD3、GM2、Globo H、岩藻糖基 GM1、多聚 SA、GD2、Carboanhydrase IX (MN/CA IX)、CD44v6、Sonic Hedgehog (Shh)、Wue-1、浆细胞抗原、(膜结合) IgE、黑素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP)、CCR8、TNF- α 前体、STEAP、间皮素、A33 抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、Ly-6 桥粒芯糖蛋白 4、E-钙黏着蛋白新表位、胎儿乙酰胆碱受体、CD25、CA19-9 标记物、CA-125 标记物和 Muellierian 抑制物质(MIS) II 型受体、sTn (唾液酸化 Tn 抗原; TAG-72)、FAP (成纤维细胞活化抗原)、内皮唾液酸蛋白、EGFRvIII、L6、SAS、CD63、TF 抗原、Cora 抗原、CD7、CD22、Ig α 、Ig β 、gp100、MT-MMPs、F19 抗原和 CO-29。

11. 根据权利要求 10 的双特异性结合分子, 其中所述另一结构域包含选自以下的氨基酸序列或由之组成:

(a)对应 SEQ ID NO: 16 或 18 的氨基酸序列;

(b)由对应 SEQ ID NO: 15 或 17 的核酸序列编码的氨基酸序列;

(c)由与(b)定义的核酸序列的互补链在严格杂交条件下杂交的核酸序

列编码的氨基酸序列；和

(d)由因为遗传密码简并性与(b)和(c)任一核苷酸序列简并的核酸序列编码的氨基酸序列。

12. 根据权利要求 11 的双特异性结合分子，其中所述分子包含选自以下的氨基酸序列或由之组成：

(a)对应 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列；

(b)由对应 SEQ ID NO: 21 的核酸序列编码的氨基酸序列；

(c)由与 (b)定义的核酸序列的互补链在严格杂交条件下杂交的核酸序列编码的氨基酸序列；和

(d)由因为遗传密码简并性与(b)和(c)任一核苷酸序列简并的核酸序列编码的氨基酸序列。

13. 根据权利要求 10 的双特异性结合分子，其中所述另一结构域包含选自以下的氨基酸序列或由之组成：

(a)对应 SEQ ID NO: 22、24、26、28、30 或 32 的氨基酸序列；

(b)由对应 SEQ ID NO: 21、23、25、27、29 或 31 的核酸序列编码的氨基酸序列；

(c)由与(b)定义的核酸序列的互补链在严格杂交条件下杂交的核酸序列编码的氨基酸序列；和

(d)由因为遗传密码简并性与(b)和(c)任一核苷酸序列简并的核酸序列编码的氨基酸序列。

14. 根据权利要求 13 的双特异性结合分子，其中所述分子包含选自以下的氨基酸序列或由之组成：

(a) 对应 SEQ ID NO: 34 或 36 的氨基酸序列；

(b)由对应 SEQ ID NO: 33 或 35 的核酸序列编码的氨基酸序列；

(c)由与(b)定义的核酸序列在严格杂交条件下杂交的核酸序列编码的氨基酸序列；和

(d)由因为遗传密码简并性与(b)和(c)任一核苷酸序列简并的核酸序列编码的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 7 到 11 或 13 任一项的双特异性结合分子, 其中所述至少一个其他抗原相互作用位点被人源化。

16. 核酸序列, 其编码根据权利要求 1 到 15 任一项的双特异性结合分子。

17. 权利要求 16 的核酸分子, 其包含选自以下的核苷酸序列:

(a) 编码蛋白质成熟形式的核苷酸序列, 其中包含选自 SEQ ID NO: 20、34 或 36 的氨基酸序列;

(b) 包含或由选自 SEQ ID NO: 19、33、35 的 DNA 序列组成的核苷酸序列;

(c) 与 (b) 定义的核苷酸序列互补链在严格杂交条件下杂交的核苷酸序列;

(d) 编码下述蛋白质的核苷酸序列, 所述蛋白质通过替换、缺失和/或添加由 (a) 或 (b) 核苷酸序列编码的氨基酸序列的一个或多个氨基酸而衍生自由 (a) 或 (b) 的核苷酸序列编码的蛋白质;

(e) 编码下述蛋白质的核苷酸序列, 所述蛋白质具有与 (a) 或 (b) 核苷酸序列编码的氨基酸序列至少 60% 同一性的氨基酸序列;

(f) 由于遗传密码子简并性而与 (a) 到 (e) 任一核苷酸序列简并的核苷酸序列。

18. 含有根据权利要求 16 或 17 的核酸序列的载体。

19. 权利要求 18 的载体, 其还包含核酸序列, 所述核酸序列为与所述根据权利要求 16 或 17 的核酸序列有效连接的调节序列。

20. 权利要求 18 或 19 的载体, 其中载体为表达载体。

21. 用根据权利要求 18 到 20 任一项的载体载体转化或转染的宿主。

22. 用于产生根据权利要求 1 到 15 任一项的双特异性结合分子的方法, 所述方法包括在允许表达双特异性结合分子的条件培养权利要求 21 的宿主和从培养物回收产生的双特异性结合分子。

23. 组合物, 所述组合物含有根据权利要求 1 到 15 任一项的或由权利要求 22 的方法产生的双特异性结合分子、权利要求 16 或 17 的核酸分子、

权利要求 18 到 20 任一项的载体或权利要求 21 的宿主和任选的能够提供免疫效应物细胞激活信号的蛋白质化合物。

24. 权利要求 23 的组合物, 其为还含有合适载体、稳定剂和/或赋形剂制剂的药物组合物。

25. 权利要求 23 的组合物, 其是诊断组合物, 所述诊断组合物还包括用于检测增生疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫紊乱、自身免疫疾病、感染性疾病、病毒病、过敏反应、寄生反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病的手段和方法。

26. 根据权利要求 1 到 15 任一项的或由权利要求 22 的方法产生的双特异性结合分子、权利要求 16 或 17 的核酸分子、权利要求 18 到 20 任一项的载体或权利要求 21 的宿主用于制备药物组合物的用途, 所述药物组合物用于预防、治疗或改善增生疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫紊乱、自身免疫疾病、感染性疾病、病毒病、过敏反应、寄生反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病。

27. 用于在需要预防、治疗或改善下述疾病的受试者中预防、治疗或改善增生疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫紊乱、自身免疫疾病、感染性疾病、病毒病、过敏反应、寄生反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病的方法, 所述方法包括施用有效数量的根据权利要求 1 到 15 任一项的或由权利要求 22 的方法产生的双特异性结合分子、权利要求 16 或 17 的核酸分子、权利要求 18 到 20 任一项的载体或权利要求 21 的宿主的步骤。

28. 权利要求 27 的方法, 其中所述受试者为人。

29. 权利要求 27 或 28 的方法, 其还包括施用能够提供免疫效应物细胞激活信号的蛋白质化合物。

30. 权利要求 29 的方法, 其中所述蛋白质化合物与根据权利要求 1 到 15 任一项的或由权利要求 22 的方法产生的双特异性结合分子、权利要求 16 或 17 的核酸分子、权利要求 18 到 20 任一项的载体或权利要求 21 的宿主同时或非同时施用。

31. 包含根据权利要求 1 到 15 任一项的或由权利要求 22 的方法产生的

双特异性结合分子、权利要求 16 或 17 的核酸分子、权利要求 18 到 20 任一项的载体或权利要求 21 的宿主的试剂盒。

免疫原性较弱的结合分子

技术领域

本发明提供双特异性的结合分子，其中所述分子包含至少两个结构域或由之组成，其中所述至少两个结构域之一与人 CD3 复合物特异结合/相互作用且所述结构域包含来自抗体的轻链氨基酸序列，其中所述氨基酸序列为含有特异氨基酸替换的具体鉴定的氨基酸序列，且另一结构域是或含有至少一个其他抗原相互作用位点和/或至少一个其他效应物结构域。本发明还提供编码本发明双特异性结合分子的核酸分子，含有所述核酸分子的载体和用所述载体转化的宿主细胞。另外，本发明涉及产生本发明双特异性结合分子的方法和含有本发明双特异性结合分子、本发明核酸分子或本发明宿主细胞的组合物。

在本说明书全文中引用了若干文件。本文引用的每个文件（包括生产商说明书等）此处整体引入作为参考。

背景技术

由于基因工程的发展，已使用免疫疗法治疗大量重病，例如肿瘤疾病。然而，当用作人治疗方案的一部分时，来自非人源抗体的使用引起若干问题。

首先，非人源抗体可能引起“细胞因子释放综合症（CRS）”。CRS 是临床综合症，其在施用第一批抗 CD3 抗体药剂后观察到，其与许多抗 CD3 的抗体会促有丝分裂这一事实有关。在体外，抗 CD3 的促有丝分裂抗体诱导 T 细胞增殖和细胞因子产生。在体内，该促有丝分裂活性在第一次注射抗体后起初的数小时内引起细胞因子（包括许多来自 T 细胞的细胞因子）的大规模释放。CD3 特异抗体的促有丝分裂能力依赖于单核细胞/巨噬细胞，并涉及由这些细胞产生 IL-6 和 IL-1 β 。CRS 症状范围从经常报

道的温和“流感样”症状到较不经常报道的严重“休克样”反应（其可以包括心血管和中枢神经系统表现）。症状特别包括头疼、战栗、恶心/呕吐、腹泻、腹痛、不适和肌肉/关节疼痛、全身虚弱、心肺呼吸事件以及神经-精神事件。流体过剩的患者和显示没有流体过剩的患者中发生了严重的肺水肿(Chatenoud, 2003 Nat. Rev. Immunol. 3: 123-132)。

其次，鼠抗体被引起小型治疗窗带的人抗鼠抗体体液免疫应答(HAMA)识别(Schroff (1985) Cancer Res.45:879-885, Shawler (1985) J. Immunol. 135:1530-1535)。HAMA 通常在用鼠源治疗性抗体治疗的第二周产生，并通过封闭其与预期靶的结合而中和鼠抗体。HAMA 应答可依赖于鼠恒定(“Fc”)抗体区或/和鼠可变(“V”)区的性质。该宿主应答显著地改变抗体的药代动力学类型，引起抗体的快速清除并阻止重复剂量(Reff, 2002 Cancer Control 9: 152-166)。

已改良了四种基本的抗体策略以解决治疗抗体的免疫原性：嵌合、提供完整的人 V 区、去免疫和人源化。嵌合抗体基于恒定区为免疫原性提供重要组件，用人恒定区代替鼠恒定区。存在两种产生完整人 V 区的方法：从噬菌体文库中选择人抗体 V 区和产生自身免疫球蛋白基因被人免疫球蛋白基因代替的转基因小鼠。去免疫中，根据特定算法用具有减少的或没有免疫原性的免疫原性肽替换特异的免疫原性肽。

一般而言，人源化需要用相应的人序列取代可变区中非人抗体构架序列，例如 CDR 移植的情况。现有技术描述了若干人源化抗体的方法。这些方法之一为 CDR 移植进入外源构架，其中来自一个物种的 CDR 被移植进入人构架(EP 239400)。然而，这类人源化的抗体常有结合能力不足的问题(Riechmann, 1988, Nature 332:323-327)。这可通过修饰（通过向人构架引入额外突变）上述方法克服。使用这类方法的实例描述于 EP469167、EP 971959、EP 940468。人源化抗体的其他方法为通过噬菌体展示(US 5,565,322)人源化和通过表面重建(resurfacing)/贴面(veneering)人源化，其中鉴定抗体暴露于表面的氨基酸并用与人框架类似或相同的氨基酸将其替换（参阅例如 EP 519596, EP 592106）。

人 CD3 是指在 T 细胞中作为多分子 T 细胞复合物的部分表达的抗原，其由三个不同链组成：CD3- ϵ 、CD3- δ 和 CD3- γ 。CD3 在 T 细胞上的成簇（例如通过固定的抗 CD3 抗体）引起与 T 细胞受体衔接类似但不依赖于其克隆典型特异性的 T 细胞激活（参阅 WO 99/54440 或 Hoffman (1985) J. Immunol. 135:5-8）。

现有技术描述了特异识别 CD3 抗原的抗体，例如 Traunecker, EMBO J 10 (1991), 3655-9 和 Kipriyanov, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-772。最近，已经提出将抗 CD3 的抗体用于治疗多种疾病。如 EP 1 025 854 所公开的，这些抗体或抗体构建体作为 T 细胞消除剂或作为促有丝分裂剂作用。WO 00/05268 中公开了与人 CD3 抗原复合物特异结合的人/啮齿动物杂合抗体，并提出作为免疫抑制剂，例如用于治疗肾脏、败血症和心脏异体移植后的排斥事件。WO 03/04648 公开了抗 CD3 和卵巢癌抗原的双特异性抗体。此外，Kufer (1997) Cancer Immunol Immunother 45:193-7 涉及用于治疗最小残余癌的对 CD3 和 EpCAM 特异的双特异性抗体。

已经进行了一些人源化 CD3 结合抗体的尝试。US 5,929,212、US 5,859,205、WO 91/09968、WO 91/09967 和 Adair, 1994 Hum. Antibod. Hybridomas, 5:41-48 描述用于鼠抗人 CD3 单克隆抗体 OKT3 的人源化方法，其中将鼠（供体）CDR 移植进入人（受体）构架并向构架中引入供体氨基酸残基。US 6,407,213 和 WO 92/22653 描述了人源化的 UCHT1 抗体，其中按照达到可与鼠亲本抗体相比的抗原结合亲和力和生物性质的要求向共有的人可变结构域序列内容中引入最小数量的鼠 CDR 和 FR 残基。人源化的 CD3 抗体的其他实例为 EP 0626390 (OKT3)、US 5,885,573 (OKT3)、US 5,834,597 (OKT3)、US 5,585,097 (YTH 12.5)和 US2002131968 (YTH 12.5)。

然而，观察到以双特异性结合分子形式的来自 OKT3 的人源化抗体构建体降低了比活性，例如通过结合 CD3/与 CD3 相互作用诱导信号的能力。

发明内容

因此，本发明面临的技术问题在于提供用于供应高效抗体衍生化合物的手段和方法，所述化合物可以减少的副作用用于治疗人疾病。具体而言，副作用的减少是定向的，其中副作用由化合物的免疫原性诱导并引起化合物活性的降低。

通过提供权利要求中表征的实施方案解决所述技术问题。

因此，本发明涉及双特异性结合分子，其中所述分子包含至少两个结构域或由之组成，

(a) 其中所述至少两个结构域之一与人 CD3 复合物特异结合/相互作用，其中所述结构域含有来自抗体的轻链氨基酸序列，其中所述氨基酸序列为

(i) SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列；

(ii) 对应于 SEQ ID NO: 1 的核酸序列编码的氨基酸序列；

(iii) 与如(ii)定义的核酸序列互补链在严格条件下杂交的核苷酸序列编码的氨基酸序列；和

(iv) 由于遗传密码简并性而与(ii)和(iii)任一的核苷酸序列简并的核酸序列编码的氨基酸序列；

条件为(i)到(iv)的氨基酸序列在轻链 CDR 区根据 Kabat 系统的位置 L24、L54 和 L96 上含有氨基酸替换，且

(b) 其中另一结构域是或包含至少一个其他抗原相互作用位点和/或至少一个其他效应物结构域。

本发明上下文中使用术语“结合/相互作用”定义至少两个“抗原相互作用位点”的彼此结合/相互作用。根据本发明，术语“抗原相互作用位点”定义多肽的基序，所述基序显示与特异抗原或特异抗原组特异相互作用的能力。所述结合/相互作用还理解为定义“特异识别”。根据本发明，术语“特异识别”是指抗体分子能够与每个本文定义的人靶分子的至少两个氨基酸特异相互作用和/或结合。抗体可识别和/或结合相同靶分子的不同表位或与之相互

作用。所述术语涉及抗体分子的特异性，即其区分本文定义的人靶分子特异区的能力。抗原相互作用位点与其特异抗原间的特异相互作用可引发信号，例如由于诱导抗原构象的变化，抗原的寡聚化等。因此，抗原相互作用位点的氨基酸序列中的特定基序是它们一级、二级或三级结构的结果以及所述结构的二级修饰的结果。

本发明使用的术语“特异相互作用”理解为定义本发明的双特异性结合分子的 CD3 特异结构域不与或基本上不与类似结构的（多）肽交叉反应。可测试一组被研究的结合分子的交叉反应性，例如通过测定所述单链结合分子在常规条件（参阅例如 Harlow 和 Lane, 《Antibodies: A Laboratory Manual》, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 和 Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999）下与目的（多）肽以及大量或多或少（结构和/或功能）密切相关的（多）肽的结合。这些方法可特别包括用结构和/或功能密切相关的分子的结合研究、封闭研究和竞争研究。这些结合研究还包括 FACS 分析、表面等离子共振（SPR，例如用 BIAcore[®]）、分析型超速离心、等温滴定量热法、荧光各向异性、荧光光谱或通过放射标记的配体结合测定。因此，抗原相互作用位点与特定抗原的特异相互作用的实例可包括配体对其受体的特异性。所述定义特别包括配体的相互作用，所述配体与其特异受体结合后诱导信号。相应配体的实例包括细胞因子，所述细胞因子与其特异的细胞因子受体相互作用/结合。所述相互作用的另一实例（其也特别包含于所述定义）为抗原决定簇（表位）与抗体的抗原结合位点的相互作用。所述相互作用还表征为抗体的抗原结合位点与其他类似结构的表位没有或基本没有交叉反应性。

术语“结合/相互作用”的定义被理解为包括结合结构域与线性表位以及与构象表位的结合/相互作用，所述构象表位也指结构

表位或非连续表位。相应的表位的定义是本领域已知的。所述表位例如可以由人靶分子的两个区域组成或其部分。在本发明上下文中，构象表位定义为两个或更多分散在一级序列中的不连续氨基酸序列，所述氨基酸序列在多肽折叠为天然蛋白质时在分子表面聚拢(Sela, (1969) Science 166, 1365 and Laver, (1990) Cell 61, 553-6)。

术语“非连续表位”在本发明上下文中特别理解为定义非线性表位，所述非线性表位由来自多肽链上远离部分间的残基装配。当多肽链折叠为三维结构以构成构象/结构表位时，这些残基在表面聚拢。

还设计本发明的结合分子与构象表位的至少一个结合结构域结合/相互作用，所述构象表位含有人 CD3 复合物的至少两个区域和/或由之组成，或含有独立组件（如 CD3- ϵ , CD3- δ 和 CD3- γ ）和/或所述组件的组合（如 CD3- ϵ /CD3- δ 或 CD3- ϵ /CD3- γ ）或由之组成。此外，设计本文描述的所述构象/结构表位含有人 CD3 复合物单一组分的至少两个区域的独立部分/区域/片段，优选 CD3- ϵ 的至少两个部分/区域/片段，更优选 CD3- ϵ 的细胞外结构域。

如上文所定义，本发明双特异性结合分子的另一结构域与至少一个其他抗原相互作用位点和/或至少一个其他效应物结构域结合。术语“效应物结构域”在本发明上下文中表征本发明分子的结构域，所述结构域引发生物效应，例如诱导一级或二级刺激信号，诱导细胞毒效应（包括诱导凋亡的信号）或只具有与特定抗原相互作用位点结合/相互作用的能力。“细胞毒效应”还包含 T 细胞产生的细胞毒性。因此，本发明的双特异性结合分子由至少两个不同的特异性表征。

可通过本领域已知方法和本文公开并描述的方法实验测定特异性。这类方法包括（但不限于）Western 印迹、ELISA、RIA、ECL、IRMA 测试和肽扫描。

本文使用术语“CDR”是指“互补决定区”，其为本领域所公知。CDR是免疫球蛋白决定所述分子特异性并与特异配体接触的部分。CDR是分子变化最大的部分，并促成了这些分子的多样性。每个V结构域有三个CDR区：CDR1、CDR2和3。CDR-H表征可变重链的CDR区而CDR-L指可变轻链的CDR区。H表示可变重链而L表示可变轻链。来自Ig区域的CDR区可如Kabat (1991; 《Sequences of Proteins of Immunological Interest》，第五版, NIH 出版号 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services)、Chothia (1987; J. Mol. Biol. 196, 901-917)和 Chothia (1989; Nature, 342, 877-883)所述确定。

在本发明上下文中，“Kabat系统”是指用与根据Kabat(1991; 《Sequences of Proteins of Immunological Interest》，第五版, NIH 出版号 91-3242 U.S. Department of Health and Human services)和 Chothia (1987; J. Mol. Biol. 196, 901-917)一致的方法为残基编号的标准。该编号系统为技术人员广泛使用并基于序列可变性和可变结构域区域的三维结构环，所述三维结构环对抗原结合活性是重要的。轻链或重链的所有残基具有不同的Kabat位置，即Kabat编码系统适用于CDR以及构架。任何抗体的特异残基位置都可以根据Kabat编码。编码系统和抗体的特异残基的Kabat位置在<http://www.bioinf.org.uk/abs>标明。例如，本发明所述的位置L24根据Kabat系统是指轻链的残基24。因此，L54和L96根据Kabat系统是指抗体轻链的位置54和96。

根据Kabat鉴定VH和VL链的CDR区的规则在www.bioinf.org.uk/abs和表1中显示。

表1

重链(CDR-H区)和轻链(CDR-L区)中CDR的鉴定

A) CDR-H1	起始	约残基 26 (总是半胱氨酸后 4 个) [Chothia / AbM 定义]; Kabat 定义由更后 5 个残基开始
	之 前 的残基	总是半胱氨酸-XXX-XXX-XXX
	之 后 的残基	总是色氨酸。一般是色氨酸 - 缬氨酸, 也可以是色氨酸 - 异亮氨酸、色氨酸 - 丙氨酸
	长度	10 到 12 个残基[AbM 定义]; Chothia 定义不包括最后 4 个残基
B) CDR-H2	起始	总是 CDR-H1 末端 (Kabat / AbM 定义) 之后 15 个残基
	之 前 的残基	一般是亮氨酸 - 谷氨酸 - 色氨酸 - 异亮氨酸 - 甘氨酸, 但有许多变化
	之 后 的残基	赖氨酸/精氨酸 - 亮氨酸/异亮氨酸/缬氨酸/苯丙氨酸/苏氨酸/丙氨酸 - 苏氨酸/丝氨酸/异亮氨酸/丙氨酸
	长度	Kabat 定义为 16 到 19 个残基; AbM (和最近 Chothia) 定义早 7 个残基结束
CDR-H3	起始	总是在 CDR-H2 末端后 33 个残基 (总是半胱氨酸后 2 个残基)
	之 前 的残基	总是半胱氨酸 - XXX-XXX (一般是半胱氨酸 - 丙氨酸 - 精氨酸)
	之 后 的残基	总是色氨酸 - 甘氨酸 - XXX - 甘氨酸
	长度	3 到 25 个残基

CDR-L1	起始	大约残基 24
	之前 的残基	总是半胱氨酸
	之后 的残基	总是色氨酸。一般是色氨酸 - 酪氨酸 - 谷氨酰胺, 也可以是色氨酸 - 亮氨酸 - 谷氨酰胺、色氨酸 - 苯丙氨酸 - 谷氨酰胺、色氨酸 - 酪氨酸 - 亮氨酸
	长度	10 到 17 个残基
CDR-L2	起始	总是 L1 末端后 16 个残基
	之前 的残基	通常是异亮氨酸 - 酪氨酸, 也可以是缬氨酸 - 酪氨酸、异亮氨酸 - 赖氨酸、异亮氨酸 - 苯丙氨酸
	长度	总是 7 个残基 (除在该区中存在缺失的 NEW (7FAB))
	起始	总是 L1 末端后 16 个残基
CDR-L3	起始	总是 L2 末端后 33 个残基 (除在 CDR-L2 末端存在缺失的 NEW (7FAB))

	之前 的残基	总是半胱氨酸
	之后 的残基	总是苯丙氨酸 - 甘氨酸 - XXX - 甘氨酸
	长度	7 到 11 个残基

根据本发明，构架区涉及在免疫球蛋白和 T 细胞受体的 V 结构域（VH 或 VL 结构域）中的区域，所述区域为与抗原接触的高变互补决定区（CDR）提供蛋白质支架。每个 V 结构域中存在四个构架区，指定为 FR1、FR2、FR3 和 FR4。构架 1 包括从 V 结构域 N 末端到 CDR1 开始的区域，构架 2 涉及 CDR1 和 CDR2 之间的区域，构架 3 包括 CDR2 和 CDR3 之间的区域而构架 4 是指从 CDR3 末端到 V 结构域 C 端的区域；特别参阅 Janeway, 《Immunobiology, Garland Publishing》，2001，第五版。因此，构架区包括 VH 或 VL 结构域中除 CDR 区之外的所有区域。

本领域技术人员能够容易地从给定序列中推出构架区和 CDR；参阅 Kabat (1991) 《Sequences of Proteins of Immunological Interest》，第五版，NIH 出版号 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services, Chothia (1987). J. Mol. Biol. 196, 901-917 和 Chothia (1989) Nature, 342, 877-883。

根据本发明，“双特异性结合分子”是必然与人 CD3 复合物的一个结构域和/或其个别组件特异结合的（多）肽。本文使用术语“（多）肽”描述一组分子，其包括一组肽以及一组多肽。该组肽由多至 30 个氨基酸的分子组成，该组多肽由多于 30 个氨基酸组成的分子组成。最优选，所述“双特异性结合分子”选自抗体、抗体片段、抗体衍生物、特异结合的肽和特异结合的蛋白质。所述抗体片段为本领域公知并包括（但不仅限于）Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段等。抗体衍生物包括（但不仅限于）标记的抗体/抗体片段以及化学修饰的抗体分子/抗体片段。如下文将详述的，本发

明上下文中特别优选的抗体衍生物为 scFv。

本发明双特异性结合分子的一个结构域来自人源化的 CDR 移植的 CD3 抗体。本文上下文中对抗体和抗体构建体使用的术语“人源化的”可定义为用相应的人序列替换非人序列。这可通过将鼠 CDR 移植进入人构架或用相应位置上的单个人氨基酸替换构架中的单个鼠氨基酸来完成。本发明使用的术语“人源化”还包括引入其他突变以促进蛋白质的结合或细胞毒性活性。这些其他突变不必须是用人残基替换鼠残基。

替换氨基酸的方法，特别是用具体选定的氨基酸替换给定氨基酸序列上特定位置的氨基酸的方法为本领域技术人员公知，并代表标准实验室方法。这类方法的一个实例为引物诱变（Sambrook 等，1989）。

惊奇地发现，在如上所述双特异性结合分子的内容中，轻链 CDR 中包含额外氨基酸替换的人源化 CD3 特异抗体构建体具有细胞毒活性。这些分子有诱导靶细胞细胞死亡的能力。相反，当本领域描述的人源化 CD3 特异抗体构建体（例如 Adair, 1994 Hum. Antibod. Hybridomas, 5:41-48）在上文定义的双特异性结合分子中表达时，所述构建体显示显著受损的诱导靶细胞细胞死亡的能力。

具体而言，本发明双特异性分子显示对其特异表位的显著结合（参阅实施例 4，图 2）和高度细胞毒活性（参阅实施例 6，图 6）。本发明双特异性的人源化 CD3（其 CD3 结合部分的轻链 CDR 中存在替换）显示 50 pg/ml 的 EC50 值，而含有 Adair, 1994 Hum. Antibod. Hybridomas, 5:41-48 所述人源化 OKT3 的双特异性抗体构建体的 EC50 值为 195 pg/ml。由于细胞毒活性四倍的提高，本发明双特异性分子可有效地用于治疗行为。此外，提供具有高细胞毒活性的人源化双特异性分子显示在医药领域的主要优点，因为达到对患者的治疗效果需要少量本发明双特异性分子。因此治疗患者时，本发明双特异性分子提供现有技术抗体之上的重要优点，因为它们由于人源化而显示高细胞毒活性且同时免疫原性较弱。它们由此提供了医药领域的明确进展。

本发明的双特异性结合分子与本领域描述的人源化分子差异在于上述

轻链 CDR 中的三个氨基酸替换。

由于抗体与其特异抗原通过分子内力（其受 CDR 具体氨基酸序列影响）结合/相互作用，本领域技术人员没有替换 CDR 区氨基酸序列的氨基酸以提高抗体的生物活性。相反，技术人员保持了原始的鼠 CDR 序列。因此，本发明的双特异性结合分子具有如此高的细胞毒活性是令人惊奇的。

特别优选的与人 CD3 复合物结合/相互作用的结构域表征为在位置 L24 具有丝氨酸，位置 L54 具有缬氨酸和位置 L96 具有亮氨酸。位置 L24 是指如 Kabat (1991; 《Sequences of Proteins of Immunological Interest》，第五版，NIH 出版号 91-3242 U.S. Department of Health and Human services) 和 Chothia (1987; J. Mol. Biol. 196, 901-917) 和 <http://www.bioinf.org.uk/abs> 所述的轻链位置 24。类似的，位置 L54 和 L96 分别代表如 Kabat 和 Chothia 所述的轻链的残基 54 和 96。

本发明双特异性结合分子在一个实施方案中还表征为所述轻链 CDR 区含有 SEQ ID NO: 4、6 或 8 的氨基酸序列或由 SEQ ID NO: 3、5 或 7 的核酸序列编码的氨基酸序列。

本发明设计与人 CD3 复合物结合/相互作用的结构域为 scFv。

术语“scFV”（单链 Fv）为本领域所深入理解。在本发明上下文中优选 scFv，因为它们的小尺寸和重组产生这些抗体衍生物的可能性。

还设计与人 CD3 复合物结合/相互作用的本发明双特异性结合分子的结构域含有 SEQ ID NO: 10（本发明人源化的 CD3 结合分子的轻链）的氨基酸序列或由之组成，或由 SEQ ID NO: 9 的核酸序列编码。

优选本发明的结合分子为以下结合分子：其中与人 CD3 复合物结合/相互作用的结构域含有如 SEQ ID NO: 14 所述的或由 SEQ ID NO: 13 的核酸序列编码的氨基酸序列或由之组成。

本发明还设计双特异性结合分子为下述结合分子：其中所述另一结构域为至少一个特异于一个或多个细胞表面分子的其他抗原相互作用位点。

本文使用术语“细胞表面分子”表示出现在或/和附着于细胞表面的分子。所述细胞表面分子的实例为膜蛋白和跨膜蛋白（包括修饰的变体，例

如糖基化的变体)，附着于所述蛋白质或细胞表面或糖基化部分（例如糖脂）的分子。“附着”应理解为优选为了形成完整膜蛋白、GPI连接的（糖基磷脂酰肌醇连接的）蛋白质，蛋白质或非蛋白质部分与另一载体分子（例如糖部分或神经节苷脂部分）共价或非共价结合。优选所述细胞表面分子为肿瘤特异分子。肿瘤特异分子为肿瘤相关的细胞表面抗原，其只在肿瘤细胞中发现或与非恶性细胞相比在肿瘤细胞中过表达。肿瘤相关细胞表面抗原不仅可以在肿瘤细胞中表达，还可以在细胞/组织中表达，所述细胞/组织为对生存不必须的细胞/组织或可以由不表达肿瘤相关细胞表面抗原的干细胞补充。此外，肿瘤相关细胞表面抗原可在恶性细胞或非恶性细胞中表达，但是在恶性细胞中更容易受目的治疗试剂影响。过表达的肿瘤相关细胞表面抗原实例为 HER-2/neu、EGF 受体、HER-3 和 HER-4。肿瘤特异的肿瘤相关细胞表面抗原的实例为 EGFRV-III。出现在对生存非必须的细胞中的肿瘤相关细胞表面抗原实例为 PSMA。出现在补充的细胞中的肿瘤相关细胞表面抗原实例为 CD19、CD20 和 CD33。在恶性状态下比非恶性状态下更容易受影响的肿瘤相关细胞表面抗原实例为 EpCAM。

优选所述另一结构域（其至少为一个其他抗原相互作用位点）为包含多肽序列的来自抗体的区域，所述多肽序列对应于至少一个抗体可变区。更优选所述另一结构域为其他 scFv。本发明特别优选的分子形式提供双特异性单链抗体构建体形式的多肽构建体，其中来自抗体的区域包含一个 VH 区和一个 VL 区。VH 和 VL 区可以以任何顺序排列。

术语“双特异性单链抗体构建体”是指包含两个如下结构域的构建体：一个结构域由如上定义的能够与人 CD3/人 CD3 复合物特异相互作用/结合的（至少一个）可变轻链组成，而另一结构域由如上定义的能够与其他抗原特异相互作用/结合的（至少一个）可变区（或其部分）组成。可变区的一部分可以是至少一个 CDR（“互补决定区”），最优选至少 CDR3 区。优选所述单链抗体构建体中两个结构域/区域相互共价连接为单链。可直接（结构域 1 与 CD3 相互作用 - 结构域 2 与其他抗原相互作用或结构域 1 与

其他抗原相互作用 - 结构域 2 与 CD3 相互作用) 或通过额外的多肽接头序列(结构域 1 - 接头序列 - 结构域 2 或结构域 2 - 接头序列 - 结构域 1) 实现该连接。在使用接头的情况下, 接头优选长度和序列足够保证两个结构域可各自独立地保持它们不同的结合特异性。最优选并如附带的实施例中引证的, “双特异性单链抗体构建体” 为双特异性单链 Fv (bscFv)。双特异性单链分子的分子形式为本领域所公知并描述于例如 WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025; Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197; Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103; Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426。这类本发明双特异性单链抗体构建体的具体实例在本文下文中提供并在附带的实施例中说明。

根据本发明的双特异性结合分子, 其中所述另一结构域与选自以下的抗原特异结合/相互作用: EpCAM、CCR5、CD19、HER-2、HER-3、HER-4、EGFR、PSMA、CEA、MUC-1 (黏蛋白)、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5AC、MUC5B、MUC7、bhCG、Lewis-Y、CD20、CD33、CD30、神经节苷脂 GD3、9-O-乙酰基-GD3、GM2、Globo H、岩藻糖基 GM1、多聚 SA、GD2、Carboanhydrase IX (MN/CA IX)、CD44v6、Sonic Hedgehog (Shh)、Wue-1、浆细胞抗原、(膜结合) IgE、黑素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP)、CCR8、TNF- α 前体、STEAP、间皮素 (mesothelin)、A33 抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、Ly-6 桥粒芯糖蛋白 4、E-钙黏着蛋白新表位、胎儿乙酰胆碱受体、CD25、CA19-9 标记物、CA-125 标记物和 Muellerian 抑制物质(MIS) II 型受体、sTn (唾液酸化 Tn 抗原; TAG-72)、FAP (成纤维细胞活化抗原)、内皮唾液酸蛋白、EGFRvIII、L6、SAS、CD63、TF 抗原、Cora 抗原、CD7、CD22、Ig α 、Ig β 、gp100、MT-MMPs、F19 抗原和 CO-29。

根据本发明优选的实施方案, 所述另一结构域与 CD19 分子特异结合/相互作用。

特别设计与 CD3 和 CD19 分子特异结合/相互作用的本发明双特异性结合分子的特征在于所述另一结构域包含选自以下的氨基酸序列或由之组成:

- (a)对应 SEQ ID NO: 16 或 18 的氨基酸序列;
- (b)由对应 SEQ ID NO: 15 或 17 的核酸序列编码的氨基酸序列;
- (c)由与(b)定义的核酸序列的互补链在严格杂交条件下杂交的核酸序列编码的氨基酸序列; 和
- (d)由因为遗传密码子的简并性而与(b)和(c)任一的核苷酸序列简并的核酸序列编码的氨基酸序列。

更优选双特异性结合分子包含选自以下的氨基酸序列或由之组成:

- (a)对应 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列;
- (b)由对应 SEQ ID NO: 19 的核酸序列编码的氨基酸序列;
- (c)由与(b)定义的核酸序列的互补链在严格杂交条件下杂交的核酸序列编码的氨基酸序列; 和
- (d)由因为遗传密码子的简并性而与(b)和(c)任一的核苷酸序列简并的核酸序列编码的氨基酸序列。

所述双特异性结合分子优选双特异性 scFv 构建体, 其中一个 scFv 与 CD3 特异结合/相互作用而另一 scFv 与 CD19 特异结合/相互作用。

根据本发明优选的实施方案, 所述另一结构域与 EpCAM 分子特异结合/相互作用。

特别设计与 CD3 和 EpCAM 特异结合/相互作用的本发明双特异性结合分子的特征在于所述另一结构域包含选自以下的氨基酸序列或由之组成:

- (a)对应 SEQ ID NO: 22、24、26、28、30 或 32 的氨基酸序列;
- (b)由对应 SEQ ID NO: 21、23、25、27、29 或 31 的核酸序列编码的氨基酸序列;
- (c)由与下述(b)定义的核酸序列的互补链在严格杂交条件下杂交的核酸序列编码的氨基酸序列; 和

(d)由因为遗传密码子的简并性而与(b)和(c)任一核苷酸序列简并的核酸序列编码的氨基酸序列。

更优选双特异性结合分子包含选自以下的氨基酸序列或由之组成：

(a)对应 SEQ ID NO: 34 或 36 的氨基酸序列；

(b)由对应 SEQ ID NO: 33 或 35 的核酸序列编码的氨基酸序列

(c)由与(b)定义的核酸序列的互补链在严格杂交条件下杂交的核酸序列编码的氨基酸序列；和

(d)由因为遗传密码子的简并性而与(b)和(c)任一核苷酸序列简并的核酸序列编码的氨基酸序列。

所述双特异性结合分子优选双特异性 scFv 构建体，其中一个 scFv 与 CD3 特异结合/相互作用而另一 scFv 与 EpCAM 特异结合/相互作用。

还优选所述本发明双特异性结合分子的至少一个其他抗原相互作用位点被入源化。

在另一实施方案中，本发明包括编码上文定义的本发明双特异性结合分子的核酸序列。

优选所述核酸序列选自：

(a)编码下述蛋白质成熟形式的核苷酸序列，其中包含选自 SEQ ID NO: 20、34 或 36 的氨基酸序列；

(b)包含或由选自 SEQ ID NO: 19、33 或 35 的 DNA 序列组成的核苷酸序列；

(c)与(b)定义的核苷酸序列互补链在严格杂交条件下杂交的核苷酸序列；

(d)编码下述蛋白质的核苷酸序列，所述蛋白质通过替换、缺失和/或添加由(a)或(b)核苷酸序列编码的氨基酸序列的一个或多个氨基酸而衍生自由(a)或(b)的核苷酸序列编码的蛋白质；

(e)编码下述蛋白质的核苷酸序列，所述蛋白质含有与(a)或(b)核苷酸序列编码的氨基酸序列有至少 60%，优选 70%，更优选 80%，特别优选 90%，甚至更优选 95%和最优选 99%同一性的氨基酸序列；

(f)由于遗传密码子简并性而与(a)到(e)任一核苷酸序列简并的核苷酸序列。

本文使用术语“杂交”是指能够与所述核酸序列互补链或其部分杂交，或与所述核酸序列或其部分杂交的多核苷酸。因此，所述核酸序列可分别在 RNA 或 DNA 制品的 Northern 或 Southern 印迹分析中用作探针，或可在 PCR 分析中根据其各自的大小用作寡核苷酸引物。优选所述杂交多核苷酸含有至少 10 个，更优选至少 15 个核苷酸而要用作探针的本发明杂交多核苷酸优选含有至少 100 个，更优选至少 200 个或最优选至少 500 个核苷酸。

本领域众所周知如何用核酸分子进行杂交实验，即本领域技术人员知道根据本发明应使用何种杂交条件。这类杂交条件在标准教科书（例如 Sambrook 等，上述）或本领域技术人员已知的或如上所述的其他标准实验室手册中涉及。根据本发明优选的多核苷酸能够与本发明多核苷酸或其部分在严格杂交条件下杂交。

“严格杂交条件”是指在含有 50% 甲酰胺、5 × SSC (750 mM NaCl, 75 mM 柠檬酸钠)、50 mM 磷酸钠(pH 7.6)、5 × Denhardt 杂交溶液、10% 硫酸葡聚糖和 20 μg/ml 变性的、剪切的鲑精 DNA 的溶液中 42℃ 孵育过夜，然后在 0.1 × SSC 中在约 65℃ 洗涤滤膜。还考虑在低严格杂交条件下与本发明多核苷酸杂交的核酸分子。杂交和信号检测严格度的改变基本通过操作甲酰胺浓度（较低百分比的甲酰胺引起较低的严格度）、盐条件或温度完成。例如，较低严格条件包括在含有 6X SSPE (20X SSPE = 3M NaCl; 0.2M NaH₂PO₄; 0.02M EDTA, pH 7.4)、0.5% SDS、30% 甲酰胺、100 μg/ml 鲑精封闭 DNA 的溶液中 37℃ 孵育过夜，然后在 50℃ 用 1 X SSPE、0.1% SDS 洗涤。此外，为了达到更低严格度，在严格杂交后进行的洗涤可在更高盐浓度（如 5X SSC）下进行。值得注意的是上述条件的变化可通过包含和/或替换用于抑制杂交实验背景的代替封闭剂来实现。一般的封闭剂包括 Denhardt 试剂、BLOTTO、肝素、变性的鲑精 DNA 和市售专利制剂。由于兼容性的问题，具体封闭剂的使用可能需要修饰上述杂交条件。

所述核酸分子可以是例如 DNA、cDNA、RNA 或合成产生的 DNA 或 RNA 或重组产生的嵌合体核酸分子或其嵌合体混合物,所述嵌合体包含单独的这些多核苷酸或它们的组合。

本领域技术人员明白可向本发明核酸分子添加调节序列。例如,可以使用启动子、转录增强子和/或允许诱导本发明多肽表达的序列。适当的诱导系统为例如四环素调节的基因表达(如例如 Gossen 和 Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 5547-5551)和 Gossen 等(Trends Biotech. 12 (1994), 58-62)所述)或地塞米松诱导的基因表达系统(如 Crook (1989) EMBO J. 8, 513-519 所述)。

此外,为了其他目的,设计核酸分子可包含例如硫酯键和/或核苷酸类似物。所述修饰可用于使核酸分子免于受细胞中的核酸内切和/或外切酶作用而稳定。所述核酸分子可被含有嵌合基因的合适载体转录,所述嵌合基因允许所述核酸分子在细胞中转录。在该方面还应理解这类多核苷酸可用于“基因寻靶”或“基因治疗”途径。在另一实施方案中,标记所述核酸分子。用于检测核酸的方法(例如 Southern 和 Northern 印迹、PCR 或引物延伸)为本领域所公知。该实施方案可用于下述筛选方法,所述方法用于证实基因治疗方法中上述核酸分子的成功引入。

所述核酸分子可以是重组产生的嵌合核酸分子,其包含单独的或组合的任何上述核酸分子。优选核酸分子为载体的部分。

本发明因此还涉及含有本发明核酸分子的载体。

许多合适的载体为分子生物学领域的技术人员所公知,其选择应基于功能目的,并包括质粒、粘粒、病毒、噬菌体和基因工程中常规使用的其他载体。可使用本领域技术人员熟知的方法构建多种质粒和载体,参阅例如 Sambrook 等(上述引文中)和 Ausubel,《Current Protocols in Molecular Biology》,Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989), (1994) 描述的技术。另外,本发明多核苷酸和载体可重建入脂质体用于递送至靶细胞中。如下文更详细讨论的,使用克隆载体分离个体

DNA 序列。相关的序列可转移进入特定多肽表达所需的表达载体中。一般的克隆载体包括 pBluescript SK、pGEM、pUC9、pBR322 和 pGBT9。一般的表达载体包括 pTRE、pCAL-n-EK、pESP-1、pOP13CAT。

优选所述载体包含下述核酸序列，所述核酸序列是和所述编码本文定义的单链抗体构建体的核酸序列有效连接的调节序列。

这类调节序列（控制元件）为技术人员公知并可包括启动子、剪接盒、翻译起始密码子、用于向载体引入插入片段的翻译和插入位点。优选所述核酸分子与所述允许在真核或原核细胞中表达的控制序列有效连接。

设计所述载体为包含编码本发明双特异性结合分子的核酸分子的表达载体。

术语“调节序列”是指下述 DNA 序列，其对影响与它们连接的编码序列的表达是必须的。这类控制序列的性质根据宿主生物而不同。原核生物中，控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和终止子。在真核细胞中控制序列通常包括启动子、终止子和（在一些情况下）增强子、反式激活蛋白或转录因子。术语“控制序列”旨在（最小范围）包括所有其存在是表达所必须的组件，并可包括另外的有利组件。

术语“有效连接”是指并列，其中所述组件有允许它们按照应有方式作用的关系。与编码序列“有效连接”的控制序列以下述方式连接：编码序列的表达在与控制序列相容的条件下完成。控制序列为启动子的情况下，技术人员明白优选使用双链核酸。

因此，所述载体优选表达载体。“表达载体”是可用于转化选定的宿主并提供编码序列在选定宿主中表达的构建体。表达载体可以是例如克隆载体、二元载体或整合型载体。优选表达包括核酸分子转录为可翻译的 mRNA。本领域技术人员熟知保证原核和/或真核细胞中表达的调节元件。真核细胞的情况下，它们通常包括保证转录起始的启动子和可选的保证转录结束和转录物稳定的

多聚 A 信号。允许在原核宿主细胞中表达的可能调节元件包括例如大肠杆菌 (*E. coli*) P_L *lac*、*trp* 或 *tac* 启动子，而允许在真核宿主细胞中表达的调节元件实例为酵母中的 *AOX1* 或 *GAL1* 启动子或 CMV、SV40、RSV 启动子（劳斯氏肉瘤病毒）、CMV 增强子、SV40 增强子或哺乳动物和其他动物细胞中的珠蛋白内含子。

除负责转录起始的元件外，这类调节元件还可在多核苷酸下游包含转录终止信号，例如 SV40 多聚 A 位点或 tk 多聚 A 位点。另外，根据使用的表达系统，可以向所述核酸序列的编码序列添加前导序列，所述前导序列能够将多肽定向至细胞区室或将其分泌进入培养基，并为本领域所熟知，还参阅例如附带的实施例 3。前导序列以适当的相位与翻译起始和终止序列装配，并优选前导序列能够指导翻译的蛋白质或其部分分泌进入周质空间或细胞外培养基。任选地，异源序列可编码含有赋予目的特征（例如稳定表达的重组产物或简化其纯化，如上）的 N 末端鉴定肽的融合蛋白。在本文中，合适的表达载体为本领域公知，例如 Okayama-Berg cDNA 表达载体 pcDV1 (Pharmacia)、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3 (Invitrogene)、pEF-DHFR、pEF-ADA 或 pEF-neo(Mack 等 PNAS (1995) 92, 7021-7025 和 Raum 等 Cancer Immunol Immunother (2001) 50(3), 141-150) 或 pSPORT1 (GIBCO BRL)。

优选表达控制序列为能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统，但也可以使用原核宿主的控制序列。载体整合进适当的宿主中后，将宿主保持在适合核苷酸序列高水平表达的条件下，并如所需随后收集并纯化本发明的双特异性结合分子，参阅例如附带的实施例。

可用来表达细胞周期相互作用蛋白质的另一表达系统为昆虫系统。在一个这类系统中，使用苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) 核型多角体病毒 (AcNPV) 作为在秋夜蛾 (*Spodoptera*

frugiperda)细胞中或粉纹夜蛾(*Trichoplusia*)幼虫中表达外源基因的载体。可将所述核酸分子的编码序列克隆进该病毒的非必须区(例如多角体蛋白基因)并置于多角体蛋白启动子控制之下。所述编码序列的成功插入将使得多角体蛋白基因失活并产生缺少外壳蛋白外壳的重组病毒。然后使用重组病毒感染秋夜蛾细胞或粉纹夜蛾幼虫,本发明蛋白在其中表达(Smith, J. Virol. 46 (1983), 584; Engelhard, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91 (1994), 3224-3227)。

其他调节元件可包括转录和翻译增强子。有利地,上述本发明载体包含选择性和/或 scorable 标记物。

用于选择转化的细胞和例如植物组织和植物的选择性标记基因为本领域技术人员熟知,并包含例如以抗代谢物抗性作为选择基础的赋予甲氨喋呤抗性的 dhfr (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 (1994), 143-149), 赋予氨基糖苷新霉素、卡那霉素和巴龙霉素抗性的 npt (Herrera-Estrella, EMBO J. 2 (1983), 987-995) 和赋予潮霉素抗性的 hygromycin (Marsh, Gene 32 (1984), 481-485)。已描述了其他的选择性基因,即允许细胞使用吲哚代替色氨酸的 trpB, 允许细胞使用组胺醇代替组氨酸(Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047)的 hisD, 允许细胞使用甘露糖的甘露糖-6-磷酸异构酶(WO 94/20627)和赋予鸟氨酸脱羧酶抑制剂、2-(二氟甲基)-DL-鸟氨酸、DFMO (McConlogue, 1987, 《Current Communications in Molecular Biology》, Cold Spring Harbor Laboratory 编辑)抗性的 ODC (ornithine decarboxylase)或来自土曲霉(*Aspergillus terreus*)的赋予杀稻瘟菌素 S 抗性的脱氨基酶(Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59 (1995), 2336-2338)。

有用的 scorable 标记物也为本领域技术人员公知并可商业获得。有利的是,所述标记物为编码荧光素酶(Giacomin, Pl. Sci. 116 (1996), 59-72; Scikantha, J. Bact. 178 (1996), 121)、绿色荧光蛋白(Gerdes, FEBS Lett. 389 (1996), 44-47)、或 β -葡糖醛酸酶(Jefferson,

EMBO J. 6 (1987), 3901-3907)的基因。该实施方案特别适用于简单快速筛选含有所述载体的细胞、组织和生物。

如上所述,为了纯化和基因治疗的目的,可单独或作为载体的一部分使用所述核酸分子,以在细胞中表达本发明双特异性结合分子。将含有编码上述任一本发明双特异性结合分子的 DNA 序列的核酸分子或载体引入细胞,所述细胞随后产生目的多肽。以通过离体或体内技术向细胞引入治疗基因为基础的基因疗法是最重要的基因转移应用之一。用于体外或体内基因疗法的合适的载体、方法或基因递送系统描述于文献并为本领域技术人员熟知,参阅例如 Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Verma, *Nature* 389 (1994), 239; Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Onodera, *Blood* 91 (1998), 30-36; Verma, *Gene Ther.* 5 (1998), 692-699; Nabel, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 811 (1997), 289-292; Verzeletti, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998), 2243-51; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957, US 5,580,859; US 5,589,466; or Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640。所述核酸分子和载体可设计为用于直接引入细胞或通过脂质体或病毒载体(例如腺病毒,逆转录病毒)引入细胞。优选所述细胞为生殖系细胞、胚胎细胞或卵细胞或由此派生的细胞,最优选所述细胞为干细胞。胚胎干细胞的实例可以为(特别是)如 Nagy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993), 8424-8428 所述的干细胞。

本发明还提供用本发明载体转化或转染的宿主。可通过向宿主中引入所述至少一个上述本发明载体或至少一个上述本发明核酸分子产生所述宿主。所述至少一个载体或至少一个核酸分子在宿主中的存在可介导编码上述单链抗体构建体的基因表达。

上述被引入宿主的本发明核酸分子或载体可以整合进宿主基因组或其可以保持在染色体之外。

宿主可以是任何原核或真核细胞。

术语“原核”旨在包括所有可以用 DNA 或 RNA 分子转化或转染以表达本发明蛋白质的细菌。原核宿主可包括革兰氏阴性菌以及革兰氏阳性菌，例如大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)、粘质沙雷菌(*Serratia marcescens*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。术语“真核”旨在包括酵母、高等植物、昆虫和优选哺乳动物细胞。取决于重组产生方法中使用的宿主，本发明多核苷酸编码的蛋白质可以是糖基化的或可以是非糖基化的。特别优选使用含有本发明多肽编码序列并遗传上融合了 N 末端 FLAG 标签和/或 C 末端 His 标签的质粒或病毒。优选所述 FLAG 标签长度为约 4 到 8 个氨基酸，最优选 8 个氨基酸。可使用本领域普通技术人员公知的任何技术将上述多核苷酸用于转化或转染宿主。此外，用于制备融合的、有效连接的基因并在例如哺乳动物细胞和细菌中表达它们的方法为本领域所公知 (Sambrook, 上述引文)。

优选所述宿主为细菌或昆虫、真菌、植物或动物细胞。

特别设想所述宿主可以是哺乳动物细胞。特别优选的宿主细胞包括 CHO 细胞、COS 细胞、骨髓瘤细胞系 (如 SP2/0 或 NS/0)。如附带的实施例中所演示的，特别优选 CHO 细胞作为宿主。

更优选所述宿主为人细胞或人细胞系，例如 per.c6 (Kroos, *Biotechnol. Prog.*, 2003, 19:163-168)。

因此在另一实施方案中，本发明涉及用于产生本发明双特异性结合分子的方法，包括在适合表达/允许表达双特异性结合分子的条件培养本发明细胞和/或宿主和从细胞或培养物/培养基中分离/回收双特异性结合分子。

转化的宿主可以在发酵罐中生长并根据本领域已知技术培养以达到最佳细胞生长。然后可从生长培养基、细胞裂解液或细胞膜级分中分离本发明多肽。可通过任何常规方法分离和纯化例如微生物表达的本发明多肽，

例如制备型层析分离和免疫分离，如涉及使用抗本发明多肽标签的单克隆或多克隆抗体的或如附带的实施例中所述的分离方法。

本领域已知用于宿主培养的允许表达的条件依赖于这类方法中使用的宿主系统和表达系统/载体。本领域已知为达到允许重组多肽表达的条件而需进行修饰的参数。因此，本领域技术人员可以无需更多的创造性投入而确定合适的条件。

表达后可根据本领域标准方法纯化本发明双特异性结合分子，所述方法包括硫酸铵沉淀、亲和层析柱、柱层析、凝胶电泳等，参阅 Scopes, 《Protein Purification》，Springer-Verlag, N.Y. (1982)。制药用途优选至少约 90%到 95%同质性的，更优选 98 到 99%或更高同质性的基本纯净的多肽。部分纯化或纯化至所需同质性后，可将本发明双特异性结合分子用于治疗（包括体外）或用于研发和实施测定操作。此外，用于从培养物中回收本发明双特异性结合分子的方法实例在附带的实施例中详细描述。

此外，本发明提供下述组合物，其含有本发明双特异性结合分子或用如上公开的方法产生的双特异性结合分子、本发明核酸分子、本发明载体或宿主。所述组合物还可任选地包含能够为免疫效应物细胞提供激活信号的蛋白质化合物。最优选所述组合物为还含有任选的适当的载体、稳定剂和/或赋形剂制剂的药物组合物。

就本发明观点来看，所述提供免疫效应物细胞激活信号的“蛋白质化合物”可以是例如 T 细胞激活信号。优选的蛋白质化合物的形式包括双特异性抗体和片段或其衍生物，例如双特异性 scFv。优选的，所述 T 细胞激活信号可经由 T 细胞受体（TCR）提供，更优选经由 TCR 的 CD3 分子提供。蛋白质化合物可包括（但不仅限于）CD3 特异的 scFv、T 细胞受体特异的 scFv 或超级抗原。超级抗原以不依赖于 MHC 的方式与 T 细胞受体可变区的某些亚家族直接结合，从而介导了初级 T 细胞激活信号。蛋白质化合物还可提供非 T 细胞免疫效应物细胞的激活信号。非 T 细胞的免疫效应物细胞包括（特别是）B 细胞和 NK 细胞。

根据本发明，术语“药物组合物”是指用于对患者（优选人患者）施

用的组合物。在优选的实施方案中，药物组合物包括用于肠胃外、经皮肤、腔内、动脉内、鞘内施用或通过直接注射进组织或肿瘤的组合物。特别设计所述药物组合物通过输注或注射施用给患者。可通过不同的路径施用适当的组合物，例如通过静脉、腹膜内、皮下、肌内、体表或皮内施用。本发明药物组合物可还包含可药用载体。合适的制药载体实例为本领域公知，并包括磷酸缓冲的盐溶液、水、乳剂（例如油/水乳浊液）、多种类型的湿润剂、无菌溶液等。含有这类载体的组合物可通过公知的常规方法配制。这些药物组合物可以以合适的剂量施用于受试者。给药方案应由主治医师和临床因素决定。如医学领域所公知的，用于任一患者的剂量依赖于许多因素，包括患者身材、体表面积、年龄、待施用的具体化合物、性别、施用时间和途径、一般健康和同时施用的其他药物。一般而言，药物组合物的常规给药方案应在每天 $1\ \mu\text{g}$ 到 $5\ \text{g}$ 单位的范围内。然而，连续输注的更优选剂量可以在每小时每千克体重 $0.01\ \mu\text{g}$ 到 $2\ \text{mg}$ ，优选 $0.01\ \mu\text{g}$ 到 $1\ \text{mg}$ ，更优选 $0.01\ \mu\text{g}$ 到 $100\ \mu\text{g}$ ，更优选 $0.01\ \mu\text{g}$ 到 $50\ \mu\text{g}$ 和最优选 $0.01\ \mu\text{g}$ 到 $10\ \mu\text{g}$ 单位的范围内。特别优选的剂量在下文中描述。可通过周期性的评估监控过程。剂量会变化但是静脉施用 DNA 的优选剂量为从约 10^6 到 10^{12} 拷贝 DNA 分子。本发明组合物可局部或全身性施用。施用通常是肠胃外的（例如静脉内），DNA 也可直接施用于靶位点，例如通过生物射弹递送至内部或外部靶位点或通过导管递送至动脉中的位点。用于肠胃外施用的制剂包括无菌水或非水溶液、悬浊液和乳浊液。非水溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油（如橄榄油）和可注射有机酯类（如油酸乙酯）。水性载体包括水、醇/水溶液、乳浊液或悬浊液，包括盐水和缓冲的培养基。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格溶液或不挥发油。静脉载体包括流体和营养补充物、电解质补充物（例如以林格葡萄糖为基础的那些）等。还可存在防腐剂和其他添加剂，例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。另外，本发明药物组合物可包含蛋白质载体，如例如血清白蛋白或免疫球蛋白，优选人源的。依赖于本发明药物组合物预期的用途，还可以设计该药物组合物包含除蛋白质 CD3 结合分子或核酸

分子或编码相同产物的载体（如本发明所述）外的生物活性试剂。这类试剂可以是本领域已知的作用于胃肠系统的药物、作为细胞生长抑制剂作用的药物、预防高尿酸血的药物、抑制免疫反应的药物（例如皮质激素）、作用于循环系统的药物和/或如 T 细胞共刺激分子或细胞因子的试剂。

本发明组合物施用的可能适应症为肿瘤疾病、癌症，特别是上皮癌（例如乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、头与颈癌、非黑色素沉着皮肤癌）、生殖泌尿道癌症（例如卵巢癌、子宫内膜癌、宫颈癌）和肾癌、肺癌、胃癌、小肠癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、食道癌、唾液腺癌和甲状腺癌以及其他肿瘤疾病例如血液肿瘤、黑素瘤、神经胶质瘤、肉瘤（例如骨肉瘤）。本发明组合物施用的其他适应症为增生疾病、炎症性疾病、免疫紊乱、自身免疫性疾病、感染性疾病、病毒病、过敏反应、寄生反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病。

如上所述的本发明组合物还可以是诊断组合物，所述诊断组合物还包括任选的用于检测增生疾病、肿瘤疾病、炎症性疾病、免疫紊乱、自身免疫疾病、感染性疾病、病毒病、过敏反应、寄生反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病的手段和方法。

本发明双特异性结合分子还适用于免疫测定，在所述免疫测定中可以使用液相或结合在固相载体上的双特异性结合分子。可以使用本发明多肽用于例如诊断目的的免疫测定实例为直接或间接方式的竞争或非竞争性免疫测定。这类免疫测定的实例为酶联免疫吸附法（ELISA）、酶免疫测定（EIA）、放射性免疫测定法（RIA）、夹层（免疫测定）、斑点印迹和 Western 印迹测定法。其他可用于在例如诊断测定中检测双特异性结合分子的测定法为基于 FACS 的测定、细胞毒素测定（ Cr^{51} ，荧光释放）或染料释放测定。

本发明双特异性结合分子可与许多不同的载体结合并用于分离与所述多肽特异结合的细胞。公知的载体实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙稀、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸盐、葡聚糖、尼龙、直链淀粉、天然和变性的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁石。就本发明而言，载体的性质可以是可

溶或不可溶的（例如珠子）。

所述诊断组合物可装在一个或多个容器内，所述容器任选的含有实施医药或科学目所需的缓冲液、储藏液和/或保持试剂或材料。此外，本发明诊断组合物的部分可单独包装在管或瓶中或共同包装在容器或多容器单元中。

本领域普通技术人员已知许多不同的标签和标记的方法。可用于本发明的标签类型实例包括酶、放射性同位素、胶体金属、荧光化合物、化学发光化合物和生物发光化合物。

在本发明最优选的实施方案中，设计了本发明的双特异性结合分子或由本发明方法产生的结合分子、本发明载体或宿主用于制备药物组合物的用途。所述药物组合物可用于预防、治疗或改善增生疾病、肿瘤疾病、炎症性疾病、免疫紊乱、自身免疫疾病、感染性疾病、病毒病、过敏反应、寄生反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病。

本发明还涉及用于预防、治疗或改善增生疾病、肿瘤疾病、炎症性疾病、免疫紊乱、自身免疫疾病、感染性疾病、病毒病、过敏反应、寄生反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病的方法，包括向需要这类预防、治疗或改善的受试者施用有效数量的本发明双特异性结合分子或由本发明方法产生的结合分子、本发明载体或宿主。优选的受试者为人。

还设计治疗方法包括施用有效数量的能够提供免疫效应物细胞激活信号的蛋白质化合物。优选所述蛋白质化合物与本发明双特异性结合分子或由本发明方法产生的双特异性结合分子、本发明核酸分子、载体或宿主同时或非同时施用。

最后，本发明提供含有本发明双特异性结合分子或由本发明方法产生的双特异性结合分子，本发明核酸分子、载体或宿主的试剂盒。

所述试剂盒特别适用于制备本发明药物组合物并（特别是）可由适用于注射或输注的容器组成。本发明试剂盒还可有利地包含任选的实施医药或科学目的缓冲液、储藏液和/或保持试剂或材料。此外，本发明试剂盒的各部分可单独包装在管或瓶中或共同包装在容器或多容器单元中。本发明

的试剂盒可有利地用于（特别是）实施本发明的方法并可用于本文提及的多种应用（例如用作研究工具或医药工具）。优选按照本领域技术人员已知的标准方法制造试剂盒。

本发明的描述和实施例公开并包含了这些实施方案和其他的实施方案。其他涉及本发明将使用的任何抗体、方法、用途和化合物的文献可从公共图书馆和数据库使用例如电子设备查到。例如，可使用国际互联网上例如在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html> 下可获得的公共数据库"Medline"。其他数据库和地址如 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>、<http://www.infobiogen.fr/>、http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html、<http://www.tigr.org/> 为本领域技术人员已知并也可使用例如 <http://www.lycos.com> 或 <http://www.google.com> 获得。

附图说明：

图 1

A) 人源化的抗 CD3 抗体轻链和重链的核苷酸和氨基酸序列(SEQ ID NO:9-12); B) 双特异性抗 CD19 x 人抗 CD3 抗体的核苷酸和氨基酸序列(SEQ ID NO:19、20); C) 双特异性抗 EpCAM (5-10) x 人抗 CD3 抗体的核苷酸和氨基酸序列(SEQ ID NO:35、36); D) 双特异性抗 EpCAM (3-1) x 人抗 CD3 抗体的核苷酸和氨基酸序列 (SEQ ID NO:33、34),

图 2

FACS 分析不同构建体与 CD3 和 CD19 或 EpCAM 的结合亲和力。

用 CD3 阳性的 Jurkat 细胞进行 CD3 结合的 FACS 分析。A) 双特异性抗 CD19 x 人抗 CD3 抗体构建体(SEQ ID NO: 20)与 CD19 的结合用 CD19 阳性的 Nalm6 细胞显示; B) 双特异性抗 EpCAM (3-1) x 人抗 CD3 抗体构建体(SEQ ID NO: 34)与 EpCAM 的结合用 EpCAM 阳性的 KatoIII 细胞显示; C) 双特异性抗 EpCAM (5-10) x 人抗 CD3 抗体构建体(SEQ ID NO: 36)与 EpCAM 的结合用 EpCAM 阳性的 KatoIII 细胞显示。向右的偏移显示结合。

图 3:

含有双特异性抗 CD19 x 人抗 CD3 抗体的蛋白质级分从锌螯合 Fractogel®柱上的洗脱模式。

来自 50-530 ml 保留时间的 280 nm 处的高吸光度是由于柱流出液中未结合的蛋白质。617.44 ml 处峰的箭头指出使用的或进一步纯化的含有人源化双特异性构建体的蛋白质级分。

图 4:

Sephadex S200®凝胶过滤柱的蛋白质洗脱模式

含有针对抗 CD19 x 人抗 CD3 双特异性抗体的 82.42 ml 处的蛋白质峰对应约 52 kD 的分子量。从 40-120 ml 滞留时间收集级分。

图 5:

A) SDS-PAGE 分析双特异性抗 CD19 x 人抗 CD3 抗体蛋白质级分。

泳道 M: 分子量标记物, 泳道 1: 细胞培养物上清液; 泳道 2: IMAC 洗脱液; 泳道 3: 凝胶过滤聚集峰; 泳道 4: 纯化的双特异性抗体抗 CD19 x 人抗 CD3;

B) Western 印迹分析纯化的双特异性抗 CD19 x 人抗 CD3 抗体。泳道 M: 分子量标记物, 泳道 1: 细胞培养物上清液; 泳道 2: IMAC 洗脱液; 泳道 3: 凝胶过滤聚集峰; 泳道 4: 从凝胶过滤获得的纯化的双特异性抗体抗 CD19 x 人抗 CD3。

图 6

双特异性抗 CD19x 人抗 CD3 抗体(SEQ ID NO: 20)的细胞毒性测定。

以 1:10 的 E:T 比例使用 NALM-6 细胞作为靶细胞以及 CD4 阳性的 CB15 T 细胞作为效应物细胞。

参考以下生物学的实施例描述本发明, 所述实施例只用作说明而不曲解为限制本发明的范围。

实施例 1.

特异于 CD3 抗原的人源化抗体的产生

参考 Kabat, EA, 等, 《Sequences of Proteins of Immunological

Interest》，第 5 版，第 3 卷，Bethesda, MD: National Institutes of Health. National Center for Biotechnology Information, 1991;2597. NIH 出版号 91-3242CD3 确定 CD3 特异的抗体 OKT3 的 CDR 的位置。

选择用于接受移植的 CDR 的人构架区分别为接受重链的 KOL 和接受轻链的 REI。这些蛋白质的结构已被结晶学解出(REI: Palm(1975) Hoppe Seylers Z Physiol Chem 356, 167-191, KOL: Schmidt (1983) Hoppe Seylers Z Physiol Chem 364, 713-747.)。

根据 Adair 1994 Hum. Antibod. Hybridomas, 5:41-48, 向人可变区构架中引入大量额外的鼠残基。这些被改变的残基对维持原有抗原特异性是重要的。向轻链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 中引入额外的突变。表 2 显示人源化 OKT 的 CDR 序列和本发明的改进的人源化 CD3。图 1A 显示改进的人源化 CD3 结合分子的序列(SEQ ID No: 9-12)。

表 2. CD3 特异抗体 OKT3 的轻链 CDR。

抗 CD3 的 CDR	人 源 化 的 OKT3 的氨基酸序 列	人源化 CD3 的氨基酸 序列
L1	SASSSVSYMN	RASSSVSYMN (SEQ ID No:4)
L2	DTSKLAS	DTSKVAS (SEQ ID No:6)
L3	QQWSSNPFT	QQWSSNPLT (SEQ ID No:8)

实施例 2

具有人源化抗 CD3 部分的双特异性单链抗体的构建

实施例 2.1

具有人源化抗 CD3 部分的双特异性单链抗 CD19 x 抗 CD3 抗体的构

建

通过基因合成获得编码产生的人源化抗体的 scFv 的 DNA，并将其与 CD19 特异的 scFv 基因融合以获得双特异性单链抗体（图 1B, SEQ ID NO:19、20）。用限制性酶 EcoRI 和 SalI 将双特异性单链抗体亚克隆至哺乳动物表达载体 pEF-DHFR。

实施例 2.2

具有人源化抗 CD3 部分的双特异性单链抗 EpCAM x 抗 CD3 抗体的构建

除实施例 1.1 中所述双特异性构建体之外，构建两个其他的有不同肿瘤特异性的双特异性单链抗体。用两个选定的 EpCAM 抗体 5-10 和 3-1 代替双特异性抗 CD19 x 抗 CD3 的 CD19 特异性。因此获得两个 EpCAM 特异的双特异性单链抗体构建体抗 EpCAM (5-10) x 人抗 CD3 (SEQ ID NO:35、36)和抗 EpCAM (3-1) x 人抗 CD3 (SEQ ID NO:33、34)。

实施例 3

具有人源化抗 CD3 部分的双特异性单链抗体的表达

如 Mack, M.等(1995) Proc Natl Acad Sci USA 92, 7021-7025 所述通过稳定转染进 DHFR 缺陷的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞表达抗 CD19 x 人抗 CD3 和抗 EpCAM x 人抗 CD3 构建体(SEQ ID NO 19、20、33、34、35、36)。表达载体的转染在用磷酸钙处理细胞后进行 (Sambrook 等, 1989)。

实施例 4

FACS 分析具有人源化抗 CD3 部分的单链双特异性抗体的结合活性
为了测试关于结合能力的功能性，进行 FACS 分析。

实施例 4.1

流式细胞结合分子抗 CD19 x 人抗 CD3 双特异性抗体

使用 CD19 阳性 Nalm 6 细胞 (人 B 细胞前体白血病) 和 CD3 阳性 Jurkat 细胞 (人 T 细胞白血病)。200,000 Nalm 6 细胞和 200,000 Jurkat 细胞与 50 μ l 用抗 CD19 x 人抗 CD3 特异多肽转染的 CHO 细胞的纯细胞培养物上清液在冰上孵育 30 分钟。用 PBS 洗涤细胞两次。然后使用鼠 Penta His 抗体 (用含 2%FCS 的 50 μ l PBS 1:20 稀释, Qiagen), 之后洗涤并使

用含 2%FCS 的 50 μ l PBS 1:100 稀释的藻红蛋白缀合的 Fc γ 特异抗体 (Dianova), 通过构建体 C 端组氨酸标签检测其结合, (图 2A, 粗线)。使用新鲜细胞培养基而不是细胞培养物上清液作为阴性对照 (图 2, 细线)。

在 FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) 上通过流式细胞术分析细胞。如《Current Protocols in Immunology》(Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach 和 Strober, Wiley-Interscience, 2002) 所述进行荧光强度的 FACS 染色和测量。如现有技术所述将双特异性结合分子的结合活性与相应的有人源化 OKT3 部分的对照双特异性抗体相比较。

如图 2 所示, 抗 CD19 x 人 OKT3 和抗 CD19x 人抗 CD3 (改进的人 OKT3) 均与 CD19 和 CD3 良好结合。

实施例 4.2

抗 EpCAM x 人抗 CD3 双特异性抗体的流式细胞结合分析

为了测试 EpCAM 特异的双特异性抗体的结合能力, 在具有以下修改的情况下重复实施例 4.1 所述的测定: 使用 EpCAM 阳性 Kato III (胃癌细胞系, ATCC HTB-103) 细胞代替 Nalm 6 细胞并使用用 EpCAM 双特异性抗体转染的 CHO 细胞的上清液。图 2B 和 2C 显示 EpCAM 结合测定的结果。使用如现有技术描述的有人源化 OKT3 的相应双特异性抗体作为对照。

如图 2B 和 2C 所示, 含有本发明人源化抗 CD3 (SEQ ID NO: 34、36) 的双特异性构建体显示比有人源化 OKT3 的构建体更好的结合。

实施例 5.

纯化有改进的人源化抗 CD3 部分的双特异性构建体

为了纯化双特异性单链构建体, 将用抗 CD19 x 人抗 CD3 稳定转染的 CHO 细胞在有 HiClone[®] CHO 修饰的 DMEM 培养基(HiQ)的摇瓶中培养 7 天后收获。通过离心去除细胞并将含有表达的蛋白质的上清液保存在 -20°C。

层析仪使用 Äkta FPLC System[®] (Pharmacia) 和 Unicorn Software。所有的化学品均为研究级别并购自 Sigma (Deisenhofen,

Germany)或 Merck (Darmstadt, Germany)。人源化双特异性单链构建体蛋白质用两步纯化方法分离，所述方法包括固定的金属亲和层析 (IMAC) 和凝胶过滤。

使用根据生产商方案用 ZnCl_2 装载的 Fractogel column[®] (Pharmacia) 进行 IMAC (固定金属层析)。用缓冲液 A2 (20 mM 磷酸钠, pH 7.5, 0.4 M NaCl) 平衡柱并将细胞培养物上清液(500ml)以 3 ml/min 的流速上柱。用缓冲液 A2 洗涤柱以去除未结合的样品。使用 2 步梯度的缓冲液 B2 (20 mM 磷酸钠 pH 7.5、0.4 M NaCl、0.5 M 咪唑) 洗脱结合的蛋白质，步骤 1: 10 倍柱床体积的 20% 缓冲液 B2；步骤 2: 10 倍柱床体积的 100% 缓冲液 B2。合并 100% 步骤洗脱的蛋白质级分用于进一步纯化。(图 3)

在用 PBS (Gibco) 平衡的 Sephadex S200 HiPrep column[®] (Pharmacia) 上进行凝胶过滤层析。将洗脱的蛋白质样品 (留出速率 1ml/min) 进行 SDS-PAGE 和 Western 印迹进行检测。柱预先标好刻度用于分子量确定 (分子量标记物试剂盒, Sigma MW GF-200)。(图 4)

使用蛋白质测定染料 (Micro BCA, Pierce) 和 IgG (Biorad) 作为标准蛋白质确定纯化的构建体的蛋白质浓度。表 2 显示蛋白质的产量。所有的构建体应从细胞培养物上清液中纯化。获得了抗 CD19 x 人抗 CD3 (16 $\mu\text{g/ml}$) 和抗 CD19 x 人 OKT3 (13,6 $\mu\text{g/ml}$) 的相当的纯化蛋白质产量。

纯化的产物在 PBS 凝胶过滤的天然条件测定下具有 52 kDa 的分子量。

在 4-12% Bis Tris 凝胶 (Invitrogen) 上进行纯化的双特异性蛋白质的 SDS-PAGE。样品制备和应用根据生产商方案。用 MultiMark protein standard[®] (Invitrogen) 确定分子量。用胶体考马斯 (Invitrogen 方案) 染色的凝胶显示 52 kDa 的条带。分离的蛋白质的纯度显示 >95%。

根据生产商方案使用 Optitran BA-S83 membrane[®] 和 Invitrogen Blot Module[®] 进行 Western 印迹。使用的抗体为 Penta His (Quiagen) 和山羊抗小鼠碱性磷酸酶 (AP) (Sigma)，染色液为

BCIP/NBT (Sigma)。由 Western 印迹检测人源化的双特异性蛋白质,所述 Western 印迹显示对应于考马斯染色的 SDS 凝胶(图 5A)中纯化的双特异性蛋白质的 52kD 条带(图 5B)。

实施例 6.

具有人源化抗 CD3 部分的双特异性抗体的生物活性

为了证明构建的双特异性抗体的高细胞毒活性,进行以下测定。

实施例 6.1

抗 CD19 x 人抗 CD3 双特异性抗体(SEQ ID NO: 20)

用 10 μ M 钙荧光素 AM (分子探针)在细胞培养基中将靶 NALM-6 细胞(1.5×10^7)在 37°C 标记 30 分钟。用细胞培养基洗涤两次后,计数细胞并与 CD4 阳性的 CB15 T 细胞混和。产生的效应物靶细胞混合物每毫升含有 2×10^5 Nalm6 细胞和 2×10^6 CB15 细胞(1:10 的 E:T 比例)。用 RPMI/10% FCS 将抗体稀释至要求的浓度。向细胞悬液中添加 50 μ l 该溶液并在 37°C/5% CO₂ 中孵育 2 小时。细胞毒性反应后,用荧光读数器定量孵育的培养基中释放的染料,并与不含有细胞毒性化合物的阴性对照反应的荧光信号以及作为阳性对照反应测定的总裂解细胞(1%皂苷 10 分钟)的荧光信号相比较。基于这些读数,根据以下公式计算相对细胞毒性(specific cytotoxicity): [荧光(样品) - 荧光(对照)] : [荧光(全部裂解) - 荧光(对照)] $\times 100$ 。

如 Prism 软件(GraphPad Software Inc., San Diego, USA)测定的, S 形剂量应答曲线一般具有 >0.97 的 R² 值。使用由分析程序计算的 EC50 值比较生物活性。图 6 显示有人源化 CD3 部分的针对 CD19 和 CD3 的双特异性抗体的细胞毒性。使用现有技术描述的相应的有人源化 OKT3 的双特异性抗体作为对照。

与 Adair 所述的人源化 OKT3 (EC50 值 195 pg/ml) 相比双特异性人源化的改进的 CD3 (人抗 CD3) (SEQ ID NO: 20) 双特异性形式具有显著提高的细胞毒活性 (EC50 值 50 pg/ml)。因此, 这些结果正明了改进的与本发明 CD3 结合的人源化抗体的主要优点。由于双特异性形式中改进的人

源化 CD3 的细胞毒活性四倍的提高，该分子用于治疗应用高度有利。基于更强的细胞毒活性，与现有技术的分子相比治疗需要更低数量的蛋白质。因此治疗患者时，本发明双特异性分子提供超越现有技术抗体的重要优点，因为它们由于人源化而显示高细胞毒活性且同时免疫原性较弱。它们由此提供了医药领域的明确进展。

<110> 麦克罗梅特股份公司

<120> 免疫原性较弱的结合分子

<130> H3150 PCT

<160> 36

<170> PatentIn 版本 3.1

<210> 1

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明: OKT3 light chain"

<400> 1

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgca gtgcaagttc aagcgtaagc tacatgaatt ggtatcagca gacaccaggg 120
aaagccccta agagatggat ctatgacaca tccaaattgg cttctggggg cccatcaagg 180
ttcagtggca gtggatctgg gacagattac actttcacca tcagcagtct gcaacctgaa 240
gatattgcaa cttactactg tcaacagtgg agtagtaacc cttttacttt tggccagggg 300
accaagctgc agatcacc 318

<210> 2
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /note="人工序列说明: OKT3 VL"
<400> 2

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
100 105

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：人 CD3 CDRL1"

<400> 3
agagcaagtt caagcgtaag ctacatgaat 30

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：人 CD3 CDRL1"

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：人 CD3 CDRL2"

<400> 5
gacacatcca aagtggcttc t 21

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：人 CD3 CDRL2"

<400> 6

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
1 5

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：人 CD3 CDRL3"

<400> 7

caacagtgga gtagtaaccc tctcact

27

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：人 CD3 CDRL3"

<400> 8

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 9

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：人 CD3 VL"

<400> 9

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgca gagcaagttc aagcgtaagc tacatgaatt ggtatcagca gacaccaggg 120

aaagccccta agagatggat ctatgacaca tccaaagtgg cttctggggc cccatcaagg 180

ttcagtggca gtggatctgg gacagattac actttcacca tcagcagtct gcaacctgaa 240

gatattgcaa ctactactg tcaacagtgg agtagtaacc ctctcacttt tggccagggg 300

accaagctgc agatcacc 318

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：人 CD3 VL"

<400> 10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
100 105

<210> 11

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明: 人 CD3 VH"

<400> 11
 caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtaagt cttctggata caccttcact aggtatacga tgcactgggt cgcagcaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg gattggatac ataaatccta gccgtggtta tactaattat 180
 aatcagaagg tgaaggaccg attcaccatc tccagagaca actccaagaa cacggccttt 240
 ctgcaaatgg acagcctgag acccgaggac acgggtgtgt atttctgtgc gagatattat 300
 gatgatcatt actgccttga ctactggggc cagggcaccc cggtcaccgt ctctca 357

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明: 人 CD3 VH"

<400> 12

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 729

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：人 CD3 VH-VL"

<400> 13

caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tcctgtaagt cttctggata caccttcact aggtatacga tgcactgggt ccgccaggct	120
ccaggaagg ggctggagtg gattggatac ataaatccta gccgtggta tactaattat	180
aatcagaagg tgaaggaccg attcaccatc tccagagaca actccaagaa cacggccttt	240

ctgcaaatgg acagcctgag acccgaggac acgggtgtgt atttctgtgc gagatattat 300
gatgatcatt actgccttga ctattggggc cagggcaccc cggtcaccgt ctccctcagtc 360
gaaggtggaa gtggaggttc tgggtggaagt ggaggttcag gtggagtgga cgacatccag 420
atgaccagct ctccatcctc cctgtctgca tctgtaggag acagagtcac catcacttgc 480
agagcaagtt caagcgtaag ctacatgaat tggatatcagc agacaccagg gaaagcccct 540
aagagatgga tctatgacac atccaaagtg gcttctgggg tcccatcaag gttcagtggc 600
agtggatctg ggacagatta cactttcacc atcagcagtc tgcaacctga agatattgca 660
acttactact gtcaacagtg gagtagtaac cctctcactt ttggccaggg gaccaagctg 720
cagatcacc 729

- <210> 14
- <211> 243
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <221> 来源
- <223> /note="人工序列说明：人 CD3 VH-VL"

<400> 14

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
130 135 140

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

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
195 200 205

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

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Gln Ile Thr

<210> 15

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明: CD19 VH"

<400> 15

caggtgcagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60
tcttgcaagg ctcttggtta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttggcctg gagatggtga tactaactac 180
aatggaaagt tcaagggtta agccactctg actgcagacg aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctagc atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagacgggag 300
actacgacgg taggccgtta ttactatget atggactact ggggcccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct cc 372

<210> 16

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明: CD19 VH"

<400> 16

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明: CD19 VL"

<400> 17

gataccagc tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggga gagggccacc 60
atctcctgca aggcagcca aagtgttgat tatgatggg atagttattt gaactggtac 120
caacagattc caggacagcc acccaaactc ctcatctatg atgcatcaa tctagtttct 180
gggatccac ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggaga aggtggatgc tgcaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg 300
acgttcgggtg gagggaccaa gctcgagatc aaa 333

<210> 18

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明: CD19 VL"

<400> 18

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

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

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19

<211> 1494

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：抗 CD19 x 人抗 CD3"

<400> 19

gatatccagc tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggga gagggccacc	60
atctcctgca aggccagcca aagtgtgat tatgatgtg atagttattt gaactggtag	120
caacagattc caggacagcc acccaaactc ctcatctatg atgcatccaa tctagtttct	180
gggatccac ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	240
cctgtggaga aggtggatgc tgcaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg	300
acgttcggtg gagggaccaa gctcgagatc aaaggtggtg gtggttctgg cggcggcggc	360
tccggtggtg gtggttctca ggtgcagctg cagcagctct gggtgagct ggtgaggcct	420
gggtcctcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggctatg cattcagtag ctactggatg	480
aactgggtga agcagaggcc tggacagggt cttgagtga ttggacagat ttggcctgga	540
gatggtgata ctaactacaa tggaaagttc aagggtaaag ccactctgac tgcagacgaa	600
tcctccagca cagcctacat gcaactcagc agcctagcat ctgaggactc tgcggtctat	660
ttctgtgcaa gacgggagac tacgacggta ggccgttatt actatgctat ggactactgg	720
ggccaaggga ccacggtcac cgtctctctc ggaggtggtg gctcccaggt gcagctggtg	780
cagtctgggg gaggcgtggt ccagcctggg aggtccctga gactctctg taagtcttct	840
ggatacacct tcactaggta tacgatgcac tgggtccgcc aggtccagg gaaggggctg	900
gagtggattg gatacataaa tcctagccgt ggttatacta attataatca gaaggtgaag	960
gaccgattca ccactccag agacaactcc aagaacacgg cttttctgca aatggacagc	1020
ctgagaccgg aggacacggg tgtgtatttc tgtgcgagat attatgatga tcattactgc	1080
cttgactatt gggggcaggg caccgccgtc accgtctcct cagtcgaagg tggaagtga	1140

```

ggttctggtg gaagtggagg ttcaggtgga gtggacgaca tccagatgac ccagtctcca 1200
tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga gtcaccatca cttgcagagc aagttcaagc 1260
gtaagctaca tgaattggta tcagcagaca ccagggaaag cccctaagag atggatctat 1320
gacacatcca aagtggcttc tggggtecca tcaaggttca gtggcagtgg atctgggaca 1380
gattacactt tcaccatcag cagtctgcaa cctgaagata ttgcaactta ctactgtcaa 1440
cagtggagta gtaaccctct cacttttggc caggggacca agctgcagat cacc 1494

```

<210> 20

<211> 498

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明: 抗 CD19 x 人抗 CD3"

<400> 20

```

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

```

```

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

```

```

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
    35           40           45

```

```

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

```

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

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
115 120 125

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val
130 135 140

Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met
145 150 155 160

Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln
165 170 175

Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly
180 185 190

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
195 200 205

Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
210 215 220

Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
245 250 255

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser
260 265 270

Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr
275 280 285

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
290 295 300

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys
305 310 315 320

Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu
325 330 335

Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala
340 345 350

Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
355 360 365

Pro Val Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
370 375 380

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
385 390 395 400

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
405 410 415

Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly
420 425 430

Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly
435 440 445

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe
450 455 460

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
465 470 475 480

Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln
485 490 495

Ile Thr

<210> 21

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明: 5-10 VH"

<400> 21

gaggtgcagc tgctcgagca gtctggagct gagctggtaa ggcctgggac ttcagtgaag 60

atatacctgca aggccttctgg atagccttc actaactact ggctaggttg ggtaaagcag 120
aggcctggac atggacttga gtggattgga gatattttcc ctggaagtgg taatatccac 180
tacaatgaga agttcaaggg caaagccaca ctgactgcag acaaatcttc gagcacagcc 240
tatatgcagc tcagtagcct gacatttgag gactctgctg tctatttctg tgcaagactg 300
aggaactggg acgagcctat ggactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctcc 360

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：5-10 VH"

<400> 22

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

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

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

Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys
50 55 60

64

<210> 24

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：5-10 VL"

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 25

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：3-1 VH"

<400> 25

gaggtgcagc tgctcgagca gtctggagct gagctggtga aacctggggc ctcagtgaag	60
atatcctgca aggccttctgg atacgccttc actaactact ggctaggttg ggtaaagcag	120
aggcctggac atggacttga gtggattgga gatcttttcc ctggaagtgg taatactcac	180
tacaatgaga gggtcagggg caaagccaca ctgactgcag acaaatcctc gagcacagcc	240
tttatgcagc tcagtagcct gacatctgag gactctgctg tctatttctg tgcaagattg	300
aggaactggg acgaggctat ggactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctcc	360

<210> 26

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：3-1 VH"

<400> 26

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

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

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

Ile Gly Asp Leu Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr His Tyr Asn Glu Arg
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：3-1 VL"

<400> 27

gagctcgtca tgaccagtc tccatcttat cttgctgcat ctccctggaga aaccattact	60
attaattgca gggcaagtaa gagcattagc aaatathtag cctggatatca agagaaacct	120
gggaaaacta ataagcttct tatctactct ggatccactt tgcaatctgg aattccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tggtagatc ttcactctca ccatcagtag cctggagcct	240
gaagattttg caatgtatta ctgtcaacag cataatgaat atccgtacac gttcggaggg	300
gggaccaagc ttgagatcaa a	321

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：3-1 VL"

<400> 28

Glu	Leu	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Tyr	Leu	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5				10					15		

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 29

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明: 4-7 VH"

<400> 29

gaggtgcagc tgctcgagca gtctggagct gagctggcga ggcctggggc ttcagtgaag 60

ctgtcctgca aggccttctgg ctacaccttc acaaactatg gtttaagctg ggtgaagcag 120
aggcctggac aggtccttga gtggattgga gaggtttatc ctagaattgg taatgcttac 180
tacaatgaga agttcaaggg caaggccaca ctgactgcag acaaatcctc cagcacagcg 240
tccatggagc tccgcagcct gacctctgag gactctgcgg tctatttctg tgcaagacgg 300
ggatcctacg atactaacta cgactgggtac ttcgatgtct ggggcccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct cc 372

- <210> 30
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <221> 来源

<223> /note="人工序列说明：4-7 VH"

- <400> 30

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

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

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

Ile Gly Glu Val Tyr Pro Arg Ile Gly Asn Ala Tyr Tyr Asn Glu Lys
50 55 60

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

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

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

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 31

<211> 336

<212> DNA

〈213〉 人工序列

<220>

〈221〉 来源

<223> /note="人工序列说明: 4-7 VL"

<400> 31

gagctcgtga tgacccagac tccactetcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatctt acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattttctgct ctcaaagtac acatgttccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagcttgag atcaaa

336

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：4-7 VL"

<400> 32

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 33

<211> 1470

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明：抗 EpCAM（3-1）x 人抗 CD3"

<400> 33

gagctcgtca tgaccagtc tccatcttat cttgctgcat ctctggaga aaccattact 60
attaattgca gggcaagtaa gagcattagc aaatatttag cctggatatca agagaaacct 120
gggaaaacta ataagcttct tatctactct ggatccactt tgcaatctgg aattccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggtagagat ttcactctca ccatcagtag cctggagcct 240
gaagattttg caatgtatta ctgtcaacag cataatgaat atccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc ttgagatcaa aggtggtggt ggttctggcg gcggcggctc cgggtggtggt 360
ggttctgagg tgcagctgct cgagcagtct ggagctgagc tggtgaaacc tggggcctca 420
gtgaagatat cctgcaaggc ttctggatac gccttacta actactggct aggttgggta 480
aagcagaggc ctggacatgg acttgagtgg attggagatc ttttcctgg aagtggtaat 540
actactaca atgagaggtt caggggcaaa gccacactga ctgcagaaa atcctcgagc 600
acagccttta tgcagctcag tagcctgaca tctgaggact ctgctgtcta tttctgtgca 660
agattgagga actgggacga ggctatggac tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 720

tcctccggag gtggtggatc ccaggtgcag ctggtgcagt ctgggggagg cgtggtccag	780
cctgggaggt ccctgagact ctctgtaag tcttctggat acaccttcac taggtatacg	840
atgcactggg tccgccaggc tccaggaag gggctggagt ggattggata cataaatcct	900
agccgtggtt atactaatta taatcagaag gtgaaggacc gattcaccat ctccagagac	960
aactccaaga acacggcctt tctgcaaatg gacagcctga gacccgagga cacgggtgtg	1020
tatttctgtg cgagatatta tgatgatcat tactgccttg actattgggg ccagggcacc	1080
ccggtcaccg tctcctcagt cgaagggtga agtggagggt ctggtggaag tggaggttca	1140
ggtggagtgg acgacatcca gatgaccag tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga	1200
gacagagtca ccatcacttg cagagcaagt tcaagcgtaa gctacatgaa ttggtatcag	1260
cagacaccag ggaaagcccc taagagatgg atctatgaca catccaaagt ggcttctggg	1320
gtcccatcaa ggttcagtgg cagtggatct gggacagatt acactttcac catcagcagt	1380
ctgcaacctg aagatattgc aacttactac tgtcaacagt ggagtagtaa ccctctcact	1440
tttggccagg ggaccaagct gcagatcacc	1470

<210> 34

<211> 490

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明: 抗 EpCAM (3-1) x 人抗 CD3"

<400> 34

Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
115 120 125

Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser
130 135 140

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val
145 150 155 160

Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Leu Phe Pro
165 170 175

Gly Ser Gly Asn Thr His Tyr Asn Glu Arg Phe Arg Gly Lys Ala Thr
180 185 190

Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe Met Gln Leu Ser Ser
195 200 205

Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Arg Asn
210 215 220

Trp Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
225 230 235 240

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ser Ser
260 265 270

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
275 280 285

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
290 295 300

Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
305 310 315 320

Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
325 330 335

Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys
340 345 350

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Val Glu
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp
370 375 380

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
385 390 395 400

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
405 410 415

Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
420 425 430

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
435 440 445

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
450 455 460

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
465 470 475 480

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
485 490

<210> 35

<211> 1488

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明: 抗 EpCAM (5-10) x 人抗 CD3"

<400> 35

gagctcgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact	60
atgagctgca agtccagtea gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc	120
tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg	180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc	240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat	300
ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctt gagatcaaag gtggtggtgg ttctggcggc	360
ggcggtctcg gtggtggtgg ttctgaggtg cagctgctcg agcagctctg agctgagctg	420
gtaaggcctg ggacttcagt gaagatatcc tgcaaggctt ctggatacgc cttcactaac	480
tactggctag gttgggtaaa gcagaggcct ggacatggac ttgagtggat tggagatatt	540
ttccctggaa gtggtaatat ccactacaat gagaagttca agggcaaagc cacactgact	600
gcagacaaat cttcgagcac agcctatatg cagctcagta gcctgacatt tgaggactct	660
gctgtctatt tctgtgcaag actgaggaac tgggacgagc ctatggacta ctggggccaa	720
gggaccacgg tcaccgtctc ctccggagggt ggtggctccc aggtgcagct ggtgcagtct	780
gggggaggcg tggtcagcc tgggaggtec ctgagactct cctgtaagtc ttctggatac	840
accttacta ggtatacgat gcactgggtc cgccaggctc cagggaaggg gctggagtgg	900
attggataca taaatcctag ccgtggttat actaattata atcagaaggt gaaggaccga	960
ttcaccatct ccagagacaa ctccaagaac acggccttcc tgcaaatgga cagcctgaga	1020
cccaggagca cgggtgtgta tttctgtgcg agatattatg atgatcatta ctgccttgac	1080

tattggggcc agggcacccc ggtcacgctc tcctcagtcg aaggtggaag tggaggttct 1140
 ggtggaagtg gaggttcagg tggagtggac gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc 1200
 ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc atcacttgca gagcaagttc aagcgtaagc 1260
 tacatgaatt ggtatcagca gacaccaggg aaagccccta agagatggat ctatgacaca 1320
 tccaaagtgg cttctggggg cccatcaagg ttcagtggca gtggatctgg gacagattac 1380
 actttcacca tcagcagtct gcaacctgaa gatattgcaa cttactactg tcaacagtgg 1440
 agtagtaacc ctctcacttt tggccagggg accaagctgc agatcacc 1488

<210> 36

<211> 496

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列说明: 抗 EpCAM (5-10) x 人抗 CD3"

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
130 135 140

Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn
145 150 155 160

Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp
165 170 175

Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys
180 185 190

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
195 200 205

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
210 215 220

Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
225 230 235 240

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
245 250 255

Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg
260 265 270

Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His
275 280 285

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
290 295 300

Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys Asp Arg
305 310 315 320

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met
325 330 335

Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr
340 345 350

Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val
355 360 365

Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
370 375 380

Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
385 390 395 400

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
405 410 415

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala
420 425 430

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro
435 440 445

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile
450 455 460

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
465 470 475 480

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
485 490 495

人抗CD3 VL nt

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGACACAGAGTCACCCATCA
CTTGACAGCAAGTTCAAGCGTAAGCTACATGAATTGGTATCAGCAGACACACAGGAAAGCCCC
TAAGAGATGGATCTATGACACATCCAAAGTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTACACTTTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATATTGCAACTTACT
ACTGTCAACAGTGGAGTAGTAACCTCTCACTTTTGGCCAGGGACCAAGCTGCAGATCACC

人抗CD3 VL AA

DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKVASGVPSRFSGS
GSGTDYFTISSLQPEDIAITYCQQWSSNPLTFGQGTKLQIT

人抗CD3 VH nt

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCTTGAGACTCTCCT
GTAAGTCTTCTGGATACACCTTCACCTAGGTATACGATGCACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
GGGCTGGAGTGGATTGGATACATAAATCCTAGCCGTGTTACTAATTATAATCAGAAAGGTG
AAGGACCGATTCAACCATCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACACAGGCCCTTCTGCAATGGACAGCC
TGAGACCCGAGGACACGGGTGTGTATTTCTGTGCCGAGATATTATGATGATCATTACTGCCCTTGA
CTACTGGGCGCAGGCACCCCGGTACCGTCTCTCA

图 1A

人抗**CD3 VH AA**

QVQLVQSGGVPGRSLRLSCKSSGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKV
KDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGPVTVSS

图 1A (续)

TGTACACTCCGATATCCAGCTGACCCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCAT
CTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTGAACTGGTACCACAGATTCCAGG
ACAGCACCCAAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCACCCAGGTTAGTGGCAG
TGGGTCTGGACAGACTTCACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGAGGTGATGCTGCAACCTATCACTGTCA
GCAAAGTACTGAGGATCCGTGGACGTTCCGTGGAGGACCAAGCTCGAGATCAAAGGTGGTGGTCTCTGG
CGCGCGGCTCCGGTGGTGGTCTCAGGTGCAGCTCGAGCAGTCTGGGCTGAGCTGGTGAGGCCCTGG
GTCCCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTTCAGTAGCTACTGGATGAAGTGGGTGAAGCA
GAGGCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAA
GTTCAAGGTAAGCCACTCTGACTGCAGACGAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTAGC
ATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTAT
GGACTACTGGGCGCAAGGACCCACGGTCAACCGTCTCCTCGAGGTGGTGGTCCAGGTGCAGCTGGTGCA
GTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGTCCCTGAGACTCTCCTGTAAAGTCTTCTGGATACACCTTCAC
TAGGTATACGATGCATGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGATTGGATACATAAATCCTAG
CCGTGGTTACTAATAATCAAGAGGTGAAGGACCGATTACCATCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACAC
GGCCTTCTGCAAAATGGACAGCCTGAGACCCGAGACACGGGTGTGTATTCTGTGCGAGATATTATGATGA
TCATTACTGCCCTTGACTATTGGGGCCAGGGCACCCCGTCAACCGTCTCCTCAGTCCGAAGGTGGAGTGGAGG
TTCTGGTGGAGTGGAGGTTCAAGGTGGAGTGGACGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC
ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGAGCAAGTTCAAGCGTAAGCTACATGAATTGGTATCAGCA
GACACAGGGAAGCCCTAAGAGATGGATCTATGACACATCCAAAGTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTT
CAGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTACACTTTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATATTGCAACTTA
CTACTGTCAACAGTGGAGTAGTAACCCCTCTCACTTTTGGCCAGGGACCAAGCTGCAGATCACC

图 1B

DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSG
TDFTLNHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWTFGGKLEIKGGGGGGGQVQLQQSGAELVRPGSSV
KISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGQLEWIGQIWPGDGDTNNGKFKGKATLTADESSSTAYMQSSLASED
SAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQTTTVSSGGGQVQLVQSGGQVQPGRSLRLSCKSSGYTFTRYT
MHWVRQAPGKLEWIGYINPSRGYTNYNQVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYC
LDYWGQGPVTVSSVEGGSGGSGGVDDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMWNWYQQTPG
KAPKRWIYDTSKVASGVPSRFSGSGGTDYFTTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPLTFGQGTKLQIT

图 1B (续)

TGTACACTCCGAGCTCGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGACAGCAGGAGAGAAAGGTCACATAT
GAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAAATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAAGCAGAA
ACCAGGCAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACTGGCATCCACTAGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAC
AGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTA
CTGTCAGAATGATTATAGTTATCCGCTCACGTTCCGTTGCTGGACCAAGCTTGAGATCAAAAGGTGGTGGTGG
TTCTGGCGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
AAGGCTGGGACTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGATACGCCCTTCACCTAACTACTGGCTAGGTTG
GGTAAAGCAGAGGCCCTGGACATGGACTTGAGTGGATTGGAGATATTTCCCTGGAAGTGGTAAATATCCACTA
CAATGAGAAAGTTCAAGGGCAAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCTTCGAGCACAGCCTATATGCAGCTCAG
TAGCCTGACATTTGAGGACTCTGTCTATTTCTGTGCAAGACTGAGGAACTGGGACGAGCCTATGGACTA
CTGGGCCAAGGACCACGGTCACCGTCTCCTCCGAGGTGGTGGTCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
GGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTAAGTCTTCTGGATACACCTTCACCTAGGTA
TACGATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGATTGGATACATAAAATCCTAGCCGTGG
TTATACCTAATTATAATCAGAAGGTGAAGGACCGATTACCATCTCCAGAGACAACCTCCAAAGAACACGGCCCTT
TCTGCAAATGGACAGCCTGAGACCCGAGGACACGGGTGTGTATTTCTGTGCGAGATATATGATGATCATTA
CTGCCTTGACTATTGGGCCAGGGCACCCCGGTACCGTCTCCTCAGTCGAAGGTGGAAGTGAGGTTCTGG
TGGAAGTGGAGGTTCAAGTGGAGTGGAGACGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCCTGCTGCTGCACTGT
AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGAGCAAGTTCAAGCGTAAGCTACATGAATTGGTATCAGCAGACACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGAGATGGATCTATGACACATCCAAAGTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGG
CAGTGGATCTGGGACAGATTACACTTTTACCCTCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATATTTGCAACTTACTACTG
TCAACAGTGGAGTAGTAACCTCTCACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGCAGATCACC

图 1C

ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPPDRFTGSG
SGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGGGGSGGGSEVQLLEQSGAEIVRPG
TSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPQGHLEWIGDIFPGSGNIHYNKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT
FEDSAVYFCARLLRNWDEPMDYWQGTTVTVSSGGGSQVLVQSGGGVVQPGRSRLSLCKSSGYTFTTRYTMH
WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNKNTAFLOMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLD
YWQQGTPVTVSSVEGGSGGGGGVDDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMNWYQQTPGKA
PKRWIYDTSKVASGVPSPRFSGGSGTDYFTTISLQPEDIATYYCCQQWSSNPLTFGGQTKLQIT

图 1C (续)

GAGCTCGTCATGACCCAGTCTCCATCTTATCTTGTGCATCTCCTGGAGAAACCATTAATAATTGCAGG
 GCAAGTAAGAGCATTAGCAAAATATTAGCCTGGTATCAAGAGAAACCTGGGAAAACATAAAGCTTCTTATC
 TACTCTGGATCCACTTTGCAATCTGGAATTCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGTGTACAGATTTTCACT
 CTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAGCATATAATGAATATCCGTAC
 ACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTTGAGATCAAAAGTCTGCTGGTGGTTCTGGCGGGCGGCTCCGGTGGTGGT
 GGTTCTGAGGTGCAGCTGCTCGAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC
 TGCAAGGCTTCTGGATACGCCTTCACTAACTACTGGCTAGGTTGGGTAAGCAGAGGCCCTGGACATGGACTT
 GAGTGGATTGGAGATCTTTTCCCTGGAAGTGGTAATACTCACTACAATGAGAGGTTCAAGGGCAAGCCACA
 CTGACTGCAGACAAAATCCTCGAGCACAGCCTTTATGCAGCTCAGTAGCCTGACATCTGAGGACTCTGTGTCTC
 TATTTCTGTGCAAGATTGAGGAACTGGACGAGGCTATGGAATACTGGGCAAGGACCAACGGTCAACCGTC
 TCCTCCGGAGGTGGTGGATCCCAGGTGCAGCTGGTGCACTCTGGGGAGGCGTGTCTCAGCCTGGGAGGTCC
 CTGAGACTCTCCTGTAAGTCTTCTGGATACACCTTCACTAGGTATACGATGCACCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 GGAAGGGCTGGAGTGGATTGGATACATAAATCCTAGCCTGGTTACTAATAATATCAAGAGGTGAAG
 GACCGATTCAACCATCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACACGGCCTTCTGCAAAATGGACAGCCTGAGACCCGAG
 GACACGGGTGTGTAATTTCTGTGCGAGATATTATGATGATCATTACTGCCCTTGACTATTGGGGCCAGGGCACC
 CCGGTACCGTCTCCTCAGTCGAAGGTGGAAGTGGAGGTTCTGGTGAAGTGGAGGTTCAAGGTGGAGTGGAC
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGCAGA
 GCAAGTTCAGCGTAAGCTACATGAATTGGTATCAGCAGACACCAAGGAAAGCCCTAAGAGATGGATCTAT
 GACACATCCAAGTGGCTTCTGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTTTC
 ACCATCAGCAGTCTGCCAACCTGAAGATATTGCCAACTTACTACTGTCAACAGTGGAGTAGTAACCCCTCTCACT
 TTGCGCCAGGGGACCAAGCTGCAGATCACC

图 1D

ELVMTQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGTDF
LTISSEPEDEFAMYYCQQHNEYPYTFGGGKLEIKGGGGGGGGSEVQLLEQSGAELVKPGASVKIS
CKASGYAFTNYWLGWVKQRPQGHGLEWIGDLFPGSGNTHYNERFRGKATLTADKSSSTAFMQLSLTSEDSAV
YFCARLRNWDAMDYWGQGTTVTVSSGGGSQVQLVQSGGVVQPGRSLRLSCKSSGYTFTTRYTMHWVRQAP
GKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVIYFCARYDDHYCLDYWGQGT
PVTVSSVEGGSGGGSGGVDDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIY
DTSKVASGVPSRFSGSGGTDTFTISSLPEDIAITYYCQQWSSNPLTFGGQTKLQIT

图 1D (续)

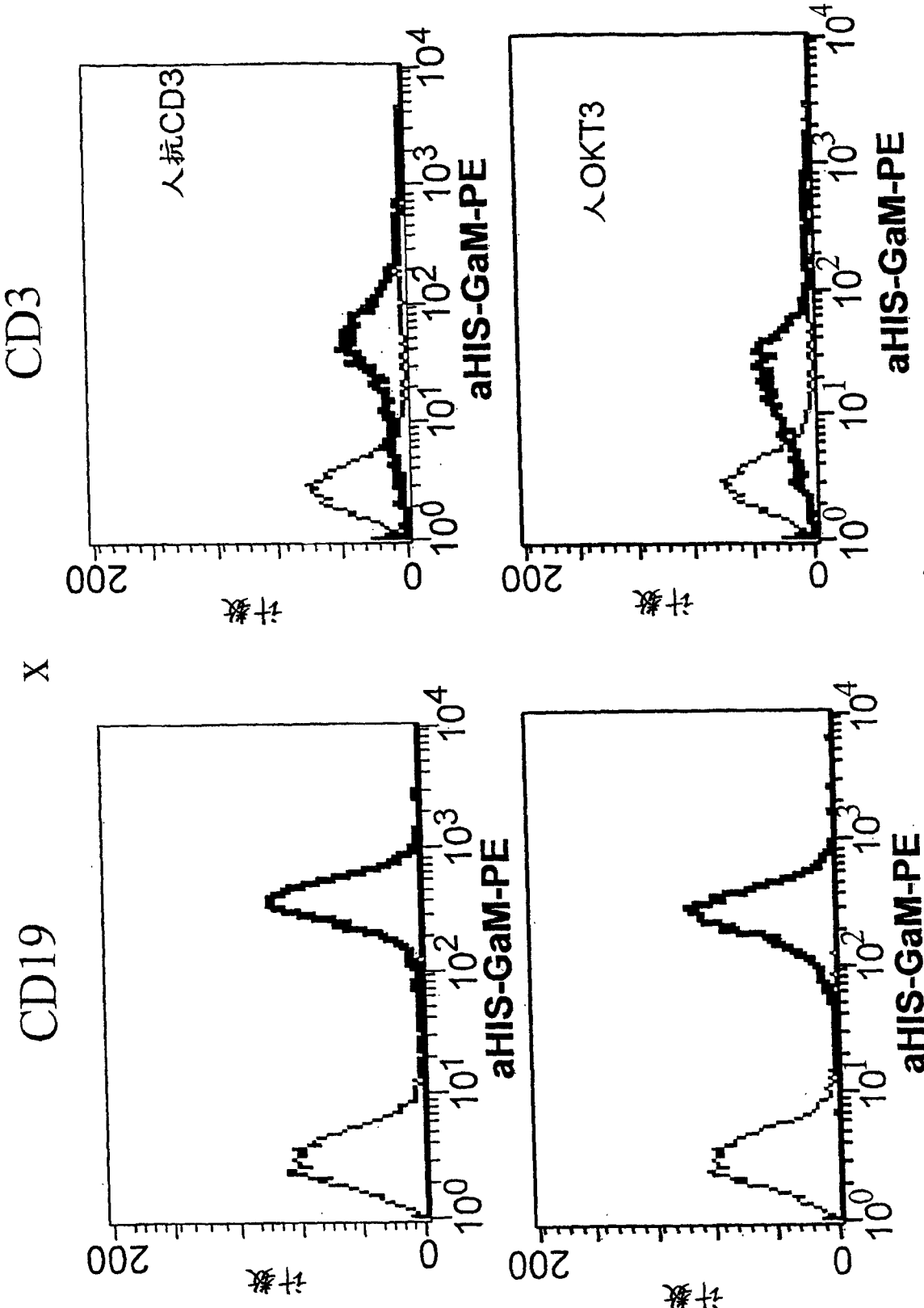


图 2A

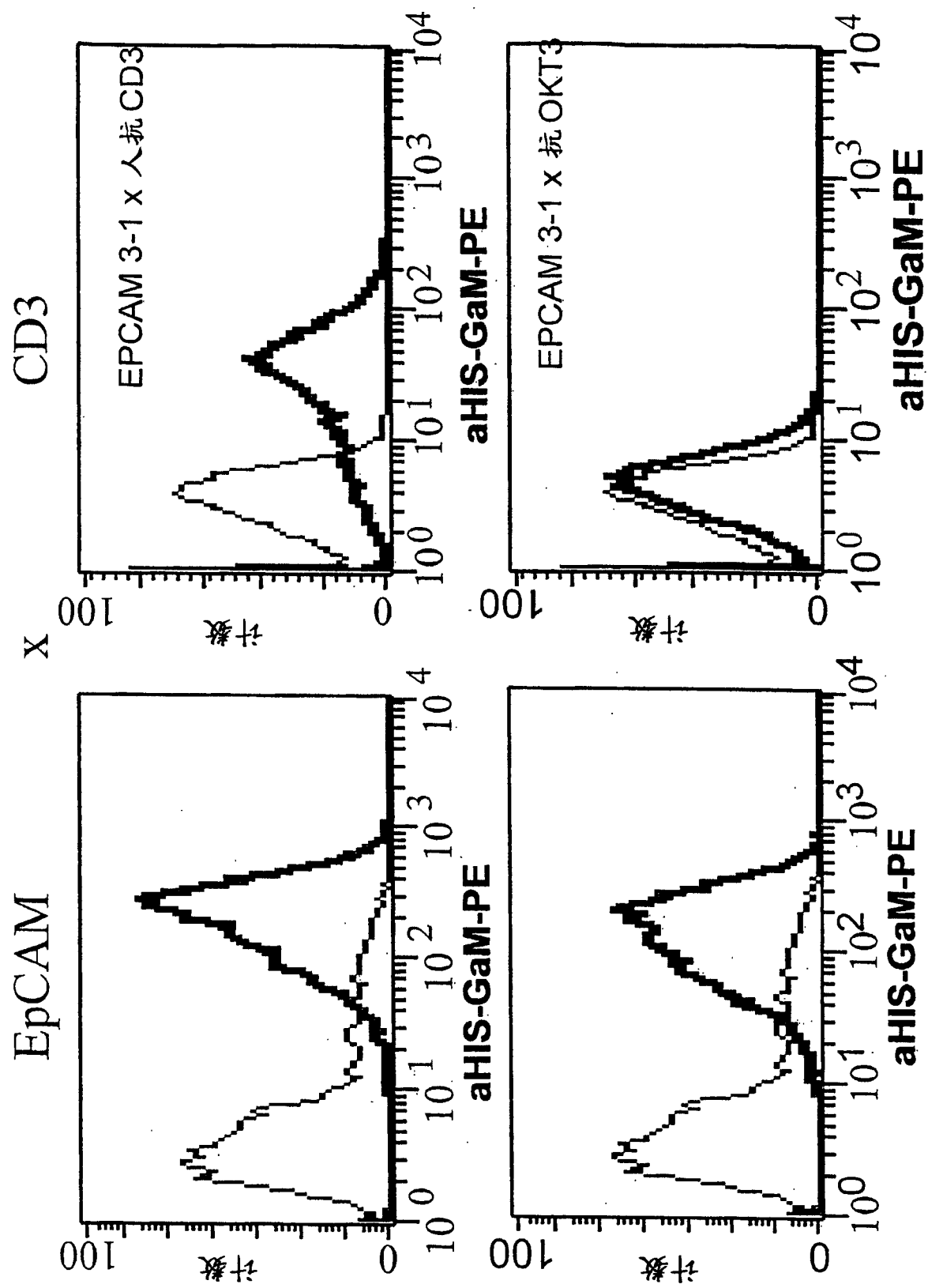


图 2B

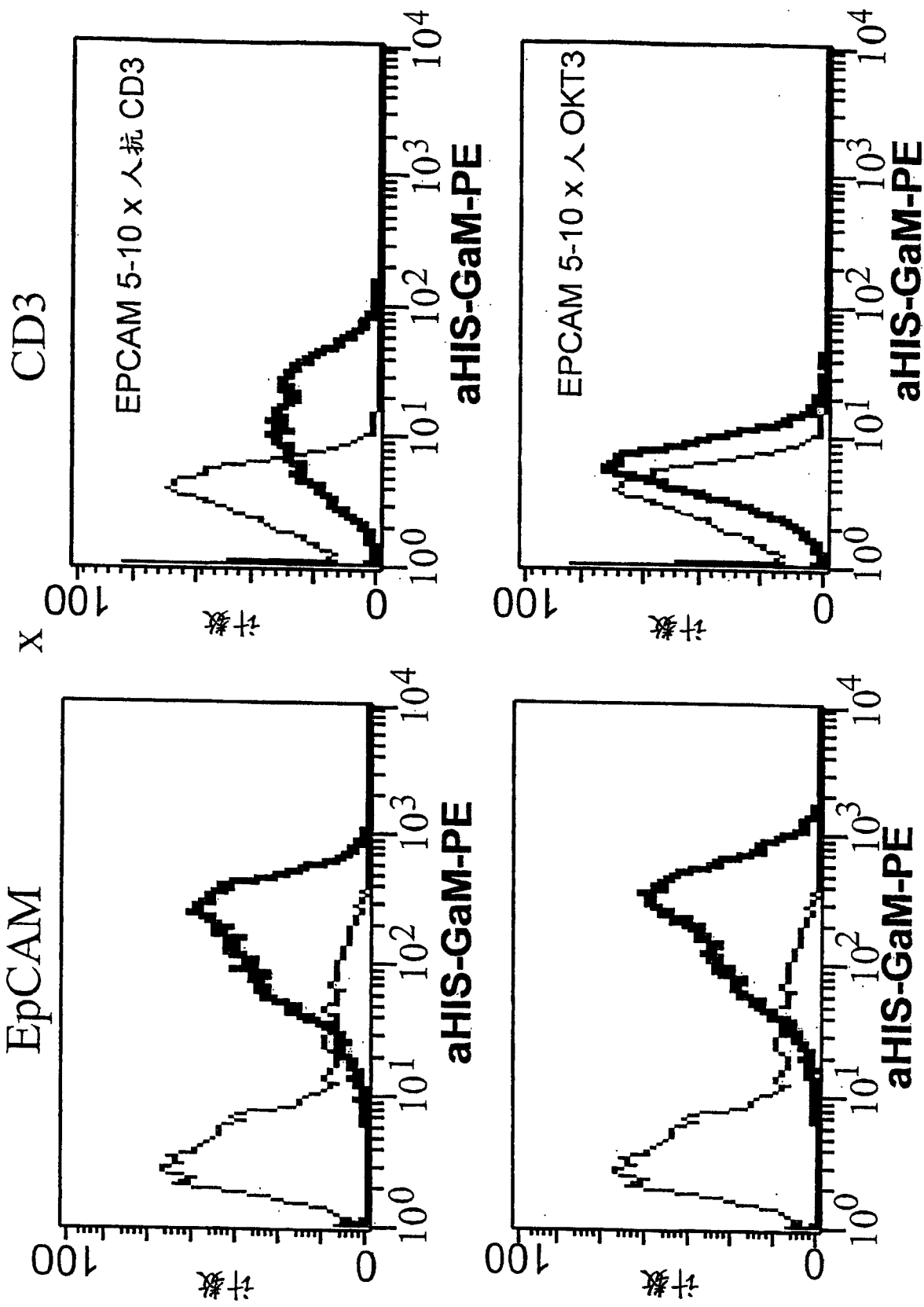


图 2C

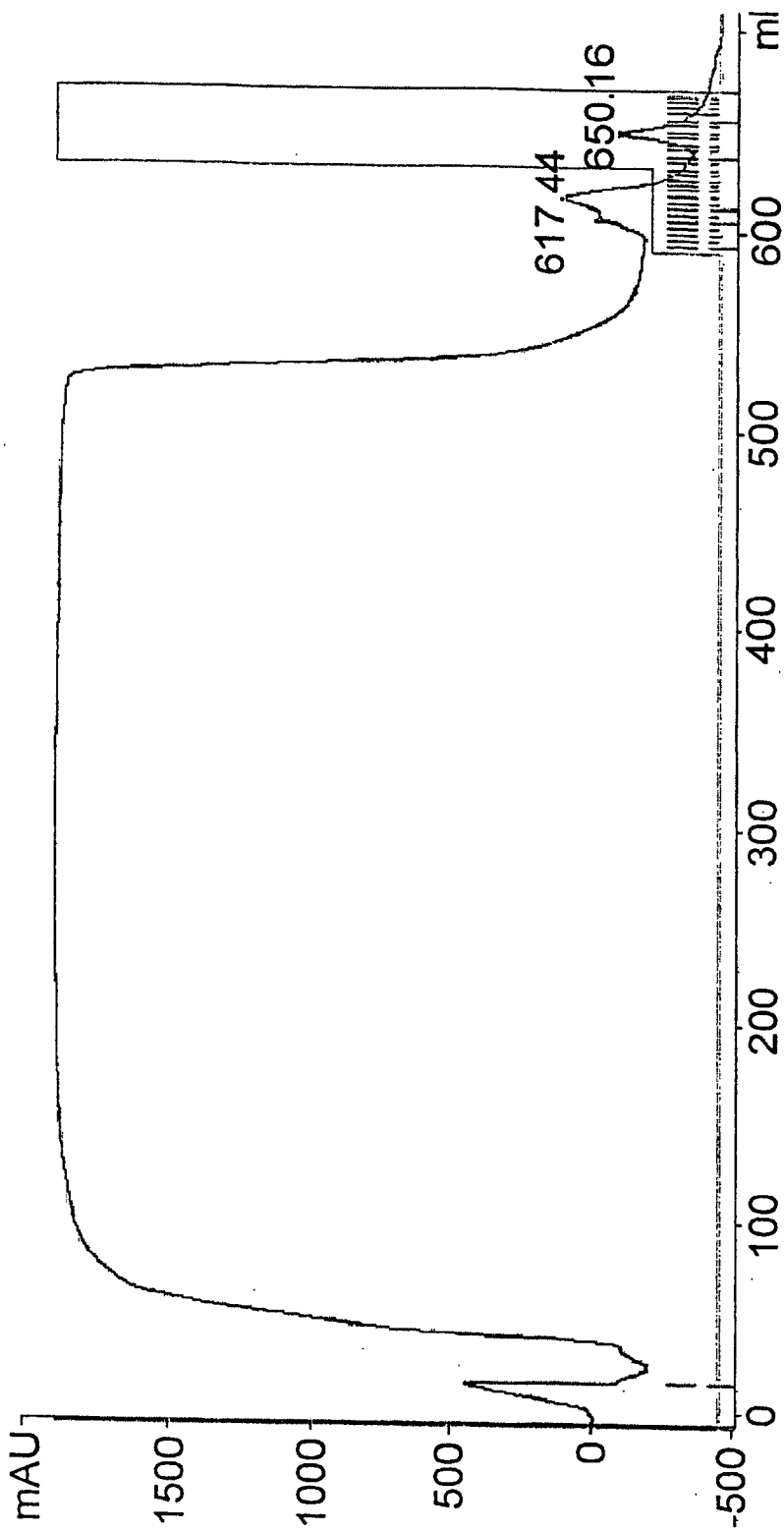


图 3

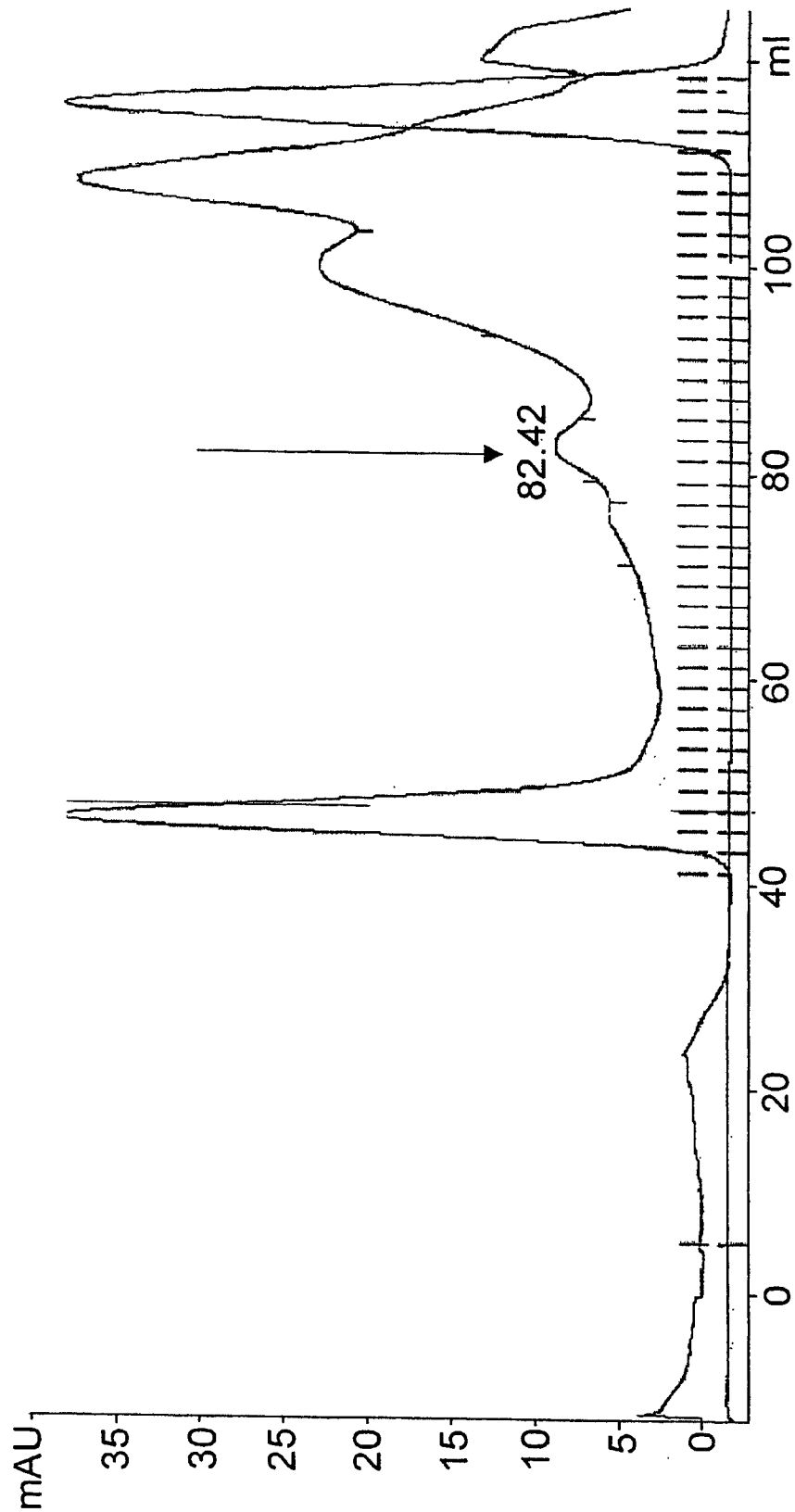


图 4

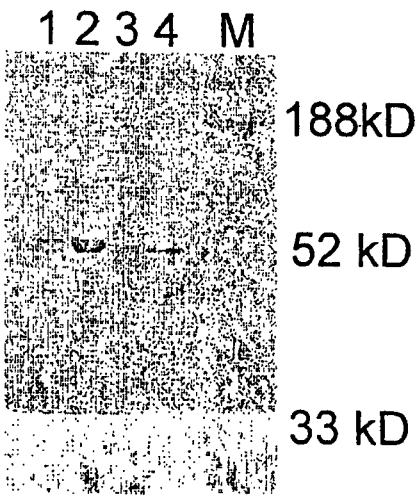
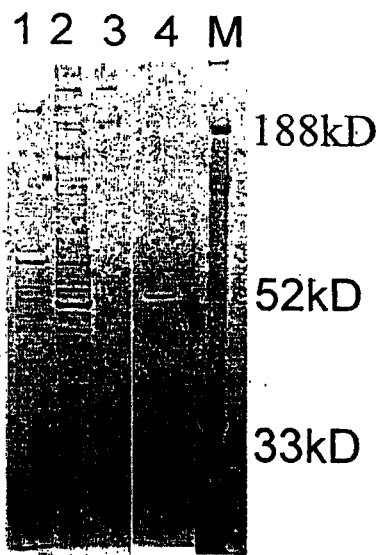


图 5

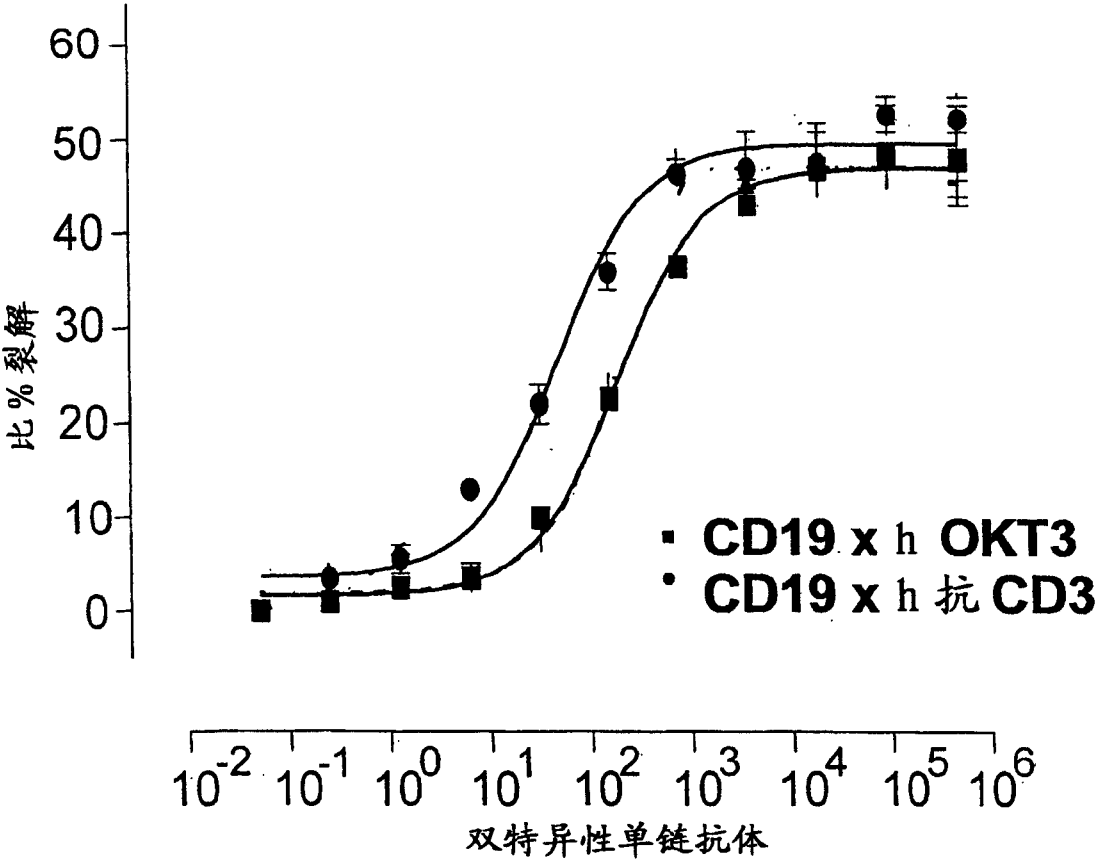


图 6