(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115066275 A
(43)申请公布日 2022.09.16

(21)申请号 202080082634.X
(22)申请日 2020.09.25
(30)优先权数据
19199639.6 2019.09.25 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.24
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/077008 2020.09.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/058804 EN 2021.04.01
(71)申请人 斯图加特大学
地址 德国斯图加特
(72)发明人 罗兰·康特曼 奥利弗·塞弗特
(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务所(普通合伙) 11413
专利代理师 回振海 王庆艳
(51)Int.Cl.
A61P 35/00(2006.01)
C07K 16/32(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)

权利要求书3页 说明书54页
序列表89页 附图23页

(54)发明名称

包含修饰的EHD2结构域的结合模块

(57)摘要

本发明涉及包含两个多肽链的结合分子,其中肽链包含仅允许异二聚化的修饰的EHD2结构域,从而防止同二聚体,编码此类结合分子的核酸以及此类结合分子或编码此类结合分子的核酸在治疗中的用途。

CN 115066275 A

1.一种结合分子,其包含:

包含第一结合结构域(BD1)和第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)的第一多肽链,和

包含第二结合结构域(BD2)和第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)的第二多肽链,

其中EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同,并且各自选自(i)与SEQ ID NO:1具有至少70%氨基酸同一性且在14位不具有Cys的氨基酸序列,或(ii)与SEQ ID NO:1具有至少70%氨基酸同一性且在102位不具有Cys的氨基酸序列,

其中BD1和BD2一起形成抗原结合位点,并且其中EHD2-1和EHD2-2彼此共价结合。

2.根据权利要求1所述的结合分子,其中BD1和BD2彼此不同并且各自选自V_H和V_L或选自TCRα-链的可变区和TCRβ-链的可变区。

3.根据权利要求1至2中任一项所述的结合分子,其还包含第一Fc链。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的结合分子,其还包含第三结合结构域(BD3)和第四结合结构域(BD4),其中BD3和BD4一起形成抗原结合位点,优选地其中BD3和BD4彼此不同,且各自选自V_H和V_L或选自TCRα-链可变区和TCRβ-链可变区。

5.根据权利要求4或6所述的结合分子,其中结合分子还包含第三多肽链,优选地其中结合分子还包含第三多肽链和第四多肽链,更优选地还包含第二Fc链。

6.根据权利要求5所述的结合分子,其中包含BD3的第三多肽链还包含以下中的一个:

(i)C_H1结构域,

(ii)C_L结构域,

(iii)第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1),和

(iv)第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2),

且其中包含BD4的第四多肽链

在(i)的情况下还包含C_L结构域,

在(ii)的情况下还包含C_H1结构域,

在(iii)的情况下还包含第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2),和

在(iv)的情况下还包含第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1),

其中EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同,并且各自选自与SEQ ID NO:1具有至少70%氨基酸同一性且在14位不具有Cys的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1具有至少70%氨基酸同一性且在102位不具有Cys的氨基酸序列。

7.根据权利要求4至6中任一项所述的结合分子,其还包含第五结合结构域(BD5)和第六结合结构域(BD6),其中BD5和BD6一起形成抗原结合位点,优选地其中BD5和BD6彼此不同,且各自选自V_H和V_L或选自TCRα-链可变区和TCRβ-链可变区,更优选地其中结合分子还包含

连接至BD5的

(i)C_H1结构域,

(ii)C_L结构域,

(iii)第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1),或

(iv)第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2),

和

连接至BD6的

在(i)的情况下的C_L结构域，

在(ii)的情况下的C_H1结构域，

在(iii)的情况下的第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)，和

在(iv)的情况下的第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)，

其中EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同，并且各自选自与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性且在14位不具有Cys的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性且在102位不具有Cys的氨基酸序列。

8.根据权利要求6至7中任一项所述的结合分子，其还包含第七结合结构域(BD7)和第八结合结构域(BD8)，其中BD7和BD8一起形成抗原结合位点，优选地其中BD7和BD8彼此不同，且各自选自V_H和V_L或选自TCRα-链可变区和TCRβ-链可变区。

9.根据权利要求8所述的结合分子，其还包含：

连接至BD7的

(i)C_H1结构域，

(ii)C_L结构域，

(iii)第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)，或

(iv)第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)，

和

连接至BD8的

在(i)的情况下的C_L结构域，

在(ii)的情况下的C_H1结构域，

在(iii)的情况下的第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)，和

在(iv)的情况下的第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)，

其中EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同，并且各自选自与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性且在14位不具有Cys的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性且在102位不具有Cys的氨基酸序列。

10.根据前述权利要求中任一项所述的结合分子，其中没有修饰的EHD2结构域、修饰的EHD2结构域中的一个或多于一个携带一个N-聚糖。

11.根据前述权利要求中任一项所述的结合分子，

其中在SEQ ID NO:1的14位的Cys被选自Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn和Tyr，优选Ser的氨基酸置换；和/或

其中在SEQ ID NO:1的102位的Cys被选自Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn和Tyr，优选Ser的氨基酸置换。

12.根据前述权利要求中任一项所述的结合分子，其在修饰的EHD2结构域中的一个或多于一个的N39位还包含单氨基酸置换，优选地其中单氨基酸置换是N39Q。

13.一种核酸或核酸集合，其编码根据权利要求1至12中任一项所述的结合分子。

14.一种载体，其包含根据权利要求13所述的核酸或核酸集合。

15.一种宿主细胞，其包含根据权利要求14所述的载体。

16.一种药物组合物，其包含根据权利要求1至12中任一项所述的结合分子、根据权利要求13所述的核酸或核酸集合、根据权利要求14所述的载体或根据权利要求15所述的宿主

细胞和药学上可接受的载体。

包含修饰的EHD2结构域的结合模块

[0001] 本发明涉及包含两个多肽链的结合分子,其中多肽链包含仅允许异二聚化的修饰的EHD2结构域,从而防止同二聚体。本发明还涉及编码此类结合分子的核酸以及此类结合分子或编码此类结合分子的核酸在治疗中的用途。

背景技术

[0002] 具有至少两种不同特异性的抗体-所谓的双特异性抗体已经引起了对于广泛应用的越来越多的关注,包括诊断、成像、预防和治疗。除了重新靶向效应分子、细胞和遗传载体之外,还利用了双重靶向和预靶向策略、蛋白质自然功能的模拟、半衰期延长以及通过血脑屏障等生物屏障的传递(Labrijn等人,2019,Nat.Rev.Drug.Discov.18:585-608)。双特异性抗体已被评估为各种适应症,包括癌症、慢性炎症性疾病、自身免疫、神经退行性疾病、出血性病症和感染的潜在治疗方法。

[0003] 可根据形式和组成分类双特异性抗体(Brinkmann&Kontermann,2017,MAbs 9:182-212)。主要的区别是是否存在Fc区。不具有Fc的双特异性抗体将会缺少Fc介导的效应子功能,例如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、补体固定和FcRn介导的再循环,这是大多数γ免疫球蛋白半衰期长的原因。包含Fc区的双特异性抗体可进一步分为表现出类似于IgG分子结构的抗体和包含额外结合位点的抗体,即具有附加或修饰的Ig样结构的抗体。

[0004] 然而,由于抗原结合位点是由轻链和重链(VL、VH)的可变结构域构建的,因此二价双特异性的IgG或Ig样分子的生成是复杂的。在一个细胞中表达的两种抗体的重链和轻链的混杂配对理论上可以产生16种不同的组合(10种不同的分子),其中只有一种是双特异性,其余配对产生非功能性或单特异性分子。指导和强制正确组装正确的结合位点,即正确特异性的重链和轻链是生成双特异性抗体的挑战之一。在过去二十年中,为解决这些问题开发和确立了各种策略。

[0005] 产生两种抗体的细胞系的融合,例如生成杂交的杂交瘤(四源杂交瘤)允许两种不同抗体的重链和轻链的组合。由此产生的双特异性抗体因此包含第一抗体的重链和轻链和第二抗体的重链和轻链。重链恒定区和轻链恒定区可以是相同的同种型,也可以是不同的同种型。它们甚至可以是不同的物种,即用于生成三功能抗体(triomab)的策略。在这种形式中,小鼠杂交瘤与大鼠杂交瘤融合,从而产生双特异性不对称的杂交IgG分子。描述了轻链和其相应重链的优先配对。重要地是,由于减少的结合,异二聚体的Fc部分允许通过蛋白A层析的分级纯化,并且柱的洗脱已经在pH约为5.8时发生。此外,产生两种不同重链和轻链的细胞系可以通过遗传方式生成。这允许使用具有确定组成的重链和轻链,例如某些人同种型,以及突变序列的实施,但重链和轻链的随机配对仍然是这些方法的主要障碍之一。

[0006] 基因工程迫使重链异二聚化,解决了双特异性IgG形成的问题之一,如引入到C_H3结构域中的knobs-into-holes突变和静电引导突变(Krah等人,2017,N.Biotechnol.39:167-173)。然而,异二聚体的重链仍然可以与两个不同的轻链组装,导致了四种可能的组合:一种双特异性分子、一种非功能性组合和两种单特异性分子。因此,已经开发了方法以

允许同源的重链和轻链与Fc修饰的重链的正确配对。一种方法是在IgG分子的两个重链中使用共同轻链来形成功能性结合位点(Merchant等人,1998,Nat.Biotechnol.16:677-681)。然而,这需要利用相同的VL结构域来识别和分离抗原结合位点。

[0007] 或者,已经引入到一个结合位点的轻链和重链的Fd片段(V_H-C_H1片段)中的突变和修饰迫使重链和轻链正确配对(Krah等人,2017,N.Biotechnol.39:167-173)。这些策略包括修饰一个重链和一个轻链的C_H1和C_L结构域,在某些情况下还包括V_H和V_L区域。例如CrossMab技术,其中C_H1和C_L结构域在一条重链和一条轻链之间交换(Klein等人,2012,MAbs 4:653-663),引入C_H1和C_L结构域中的正交Fab突变(Lewis等人,2014,Nat.Biotechnol.32:191-198),或者添加V_H和V_L结构域(Golay等人,2016,J.Immunol.196:199-211;Froning等人,2017,Protein Sci.26:2021-2038;Bönisch等人,2017,Protein Eng.Des.Sel.,2017,30:685-696),以及Duetmab技术,其中C_H1和C_L之间的天然二硫键被除去,并被新的人工引入的二硫键置换(Mazor等人,2015,MAbs 7:461-469)。

[0008] 另一种方法是将一个重链和一个轻链的C_H1和C_L结构域置换为其他蛋白的结构相关结构域,例如来自T细胞受体(TCR)的C-α和C-β结构域(Wu等人,2015,MAbs 7:470-482)。或者,C_H1和C_L结构域被来自IgE的突变重链结构域2置换,其自然形成同二聚体。引入这种所谓的EFab模块的突变允许形成减少同二聚化并且允许异二聚体Fab样分子的形成的knob-into-hole样结构(Cooke等人,2018,MAbs 10:1248-1259)。然而,这些knob-into-hole突变的通常的问题是形成含有hole突变的结构域的同二聚体相互作用的可能性。在EFab形式中,这些hole突变存在于轻链中,因此具有形成轻链同二聚体的风险(Kuglstatter等人,2017,ProteinEng.Des.Sel.30:649-656)。此外,最终是由于这些突变域之间的界面中的无序区域,与野生型Fab片段和野生型EHD2Fab分子相比,观察到EFab的热稳定性降低和对蛋白水解裂解的敏感性增加(Cooke等人,2018,MAbs 10:1248-1259)。

[0009] 最近提出了生成异二聚化EHD2结构域的其它突变(WO 2017/011342 A1)。这里,描述了几种突变,他们可以被引入EHD2(EH2)结构域,或者,结构和功能相关的MHD2(MH2)域(Seifert等人,2014,Mol.Cancer Ther.13:101-111),以通过静电作用或疏水作用允许异二聚化。然而,所有简化以实践的实例都只使用了MH2衍生物。然而,在这些衍生物中,必须从野生型序列中修饰大量残基。

[0010] 本领域仍然需要将结合分子中的多肽同二聚体排除到令人满意的程度的二聚化结构域,从而提供轻链和重链配对问题,即多特异性、优选双特异性抗体轻链和重链的错配的解决方案。

发明内容

[0011] 本发明人发现包含第一修饰的EHD2结构域的第一多肽链与包含第二修饰的EHD2结构域的第二多肽链共表达基本上防止了同二聚体的形成,同时允许异二聚体的形成达到令人满意的程度,从而使修饰的结构域特别适用于大规模生产结合分子。

[0012] 因此,根据第一方面,本发明提供了包含第一多肽链和第二多肽链的结合分子,所述第一多肽链包含第一结合结构域(BD1)和第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1),所述第二多肽链包含第二结合结构域(BD2)和第二修饰EHD2结构域(EHD2-2),其中EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同,并且每个选自与SEQ ID NO:1具有至少70%氨基酸同一性且在14位

不具有Cys的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1具有至少70%氨基酸同一性且在102位不具有Cys的氨基酸序列,其中BD1和BD2一起形成抗原结合位点,其中EHD2-1和EHD2-2彼此共价结合。

[0013] 根据一个实施方案,修饰的EHD2结构域中的一个或两个还在N39位包含单氨基酸置换。

[0014] 根据其他的实施方案,BD1和BD2彼此不同并且各自选自可变重链(VH)和可变轻链(VL)或选自TCRα-链的可变区和TCRβ-链的可变区。

[0015] 根据又一个实施方案,结合分子还包含第一Fc链。

[0016] 根据其他的实施方案,结合分子还包含第三结合结构域(BD3)和第四结合结构域(BD4),其中BD3和BD4一起形成抗原结合位点。

[0017] 根据其他的实施方案,BD3和BD4彼此不同并且各自选自V_H和V_L,或选自TCRα-链的可变区和TCRβ-链的可变区。

[0018] 根据另一个实施方案,结合分子还包含第三多肽链。根据优选的实施方案,结合分子还包含第三多肽链和第四多肽链。

[0019] 根据又一个实施方案,结合分子还包含第二Fc链。

[0020] 根据一个实施方案,第一Fc链和第二Fc链彼此不同并且形成异二聚体Fc。

[0021] 根据其他的实施方案,结合分子是单特异性或双特异性的。

[0022] 根据又一个实施方案,包含BD3的第三多肽链还包含以下中的一种:

[0023] (i)C_H1结构域,

[0024] (ii)C_L结构域,

[0025] (iii)第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1),和

[0026] (iv)第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2),

[0027] 其中包含BD4的第四多肽链

[0028] 在(i)的情况下还包含C_L结构域,

[0029] 在(ii)的情况下还包含C_H1结构域,

[0030] 在(iii)的情况下还包含第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2),和

[0031] 在(iv)的情况下还包含第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1),

[0032] 其中EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同,并且各自选自与SEQ ID NO:1具有至少70%氨基酸同一性且在14位不具有Cys的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1具有至少70%氨基酸同一性且在102位不具有Cys的氨基酸序列。

[0033] 根据一个实施方案,第三多肽链或第四多肽链的修饰的EHD2结构域中的一个或两个还在N39位包含单氨基酸置换。

[0034] 根据其他的实施方案,结合分子还包含第五结合结构域(BD5)和第六结合结构域(BD6),其中BD5和BD6一起形成抗原结合位点。

[0035] 根据又一个实施方案,结合分子还包含

[0036] 连接至BD5的

[0037] (i)C_H1结构域,

[0038] (ii)C_L结构域,

[0039] (iii)第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1),或

[0040] (iv)第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)，

[0041] 和

[0042] 连接至BD6的

[0043] 在(i)的情况下的C_L结构域，

[0044] 在(ii)的情况下的C_H1结构域，

[0045] 在(iii)的情况下的第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)，和

[0046] 在(iv)的情况下的第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)，

[0047] 其中EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同，并且各自选自与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性且在14位不具有Cys的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性且在102位不具有Cys的氨基酸序列。

[0048] 根据一个实施方案，连接至BD5或BD6的修饰的EHD2结构域中的一个或两个还在N39位包含单氨基酸置换。

[0049] 根据另一个实施方案，BD5和BD6彼此不同并且各自选自V_H和V_L，或选自TCRα-链的可变区和TCRβ-链的可变区。

[0050] 根据又一个实施方案，连接至BD5或BD6的C_H1结构域、C_L结构域、EHD2-1或EHD2-2通过接头与BD1、BD2、BD3或BD4中的一个连接。

[0051] 根据一个实施方案，结合分子是单特异性、双特异性或三特异性的。

[0052] 根据其他的实施方案，结合分子还包含第七结合结构域(BD7)和第八结合结构域(BD8)，其中BD7和BD8一起形成抗原结合位点。

[0053] 根据一个实施方案，结合分子还包含

[0054] 连接至BD7的

[0055] (i)C_H1结构域，

[0056] (ii)C_L结构域，

[0057] (iii)第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)，或

[0058] (iv)第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)，

[0059] 和

[0060] 连接至BD8的

[0061] 在(i)的情况下的C_L结构域，

[0062] 在(ii)的情况下的C_H1结构域，

[0063] 在(iii)的情况下的第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)，和

[0064] 在(iv)的情况下的第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)，

[0065] 其中EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同，并且各自选自与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性且在14位不具有Cys的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性且在102位不具有Cys的氨基酸序列。

[0066] 根据又一个实施方案，连接至BD7或BD8的修饰的EHD2结构域中的一个或两个还在N39位包含单氨基酸置换。

[0067] 根据一个实施方案，BD7和BD8彼此不同并且各自选自V_H和V_L，或选自TCRα-链的可变区和TCRβ-链的可变区。

[0068] 根据其他的实施方案，连接至BD7或BD8的C_H1结构域、C_L结构域、EHD2-1或EHD2-2通

过接头与BD1、BD2、BD3或BD4中的一个连接，不与BD5或BD6连接。

[0069] 根据又一个实施方案，结合分子是单特异性、双特异性或三特异性的。

[0070] 根据一般的实施方案，没有修饰的EHD2、修饰的EHD2中的一个或多于一个携带一个N-聚糖。

[0071] 根据其他一般的实施方案，在SEQ ID NO:1的14位的Cys被选自Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn和Tyr(C14S、C14G、C14A、C14T、C14Q、C14N、C14Y)的氨基酸置换，优选被Ser(C14S)置换。

[0072] 根据其他一般的实施方案，在102位的Cys被选自Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn、Tyr(C102S、C102G、C102A、C102T、C102Q、C102N、C102Y)的氨基酸置换，优选被Ser(C102S)置换。

[0073] 根据其他一般的实施方案，在N39位的单氨基酸置换为N39Q。

[0074] 根据其他的实施方案，本发明提供了编码本发明结合分子的核酸或核酸集合。

[0075] 根据其他的实施方案，本发明提供了包含本发明的核酸或核酸集合的载体。

[0076] 根据其他的实施方案，本发明提供了包含本发明载体的宿主细胞。

[0077] 根据其他的实施方案，本发明提供了包含本发明的结合分子、核酸或核酸集合、载体或宿主细胞，以及药学上可接受的载体的药物组合物。

[0078] 从本发明的以下详细描述中，其他方面和实施方案将变得明显。

附图说明

[0079] 下面将描述本说明书中所包含的附图的内容。在这方面，也请参阅上面和/或下面对该发明的详细描述。

[0080] 图1:人野生型EHD2结构域的序列(A)和结构(B)，其中标记了链间二硫键(C14-C102)和链内二硫键(C28-C86)以及N-糖基化位点(N39)。

[0081] 图2:根据本发明的一个实施方案的结合分子的结构示意图。

[0082] 图3:使用hetEHD2结构域以生成不同价态和特异性的分子的抗体片段和Ig样分子的实例。

[0083] 图4:修饰的EHD2结构域(EHD2-1、EHD2-2)可以在两个结构域中携带N-聚糖，仅在一个结构域中携带N-聚糖，或者可以完全缺乏N-聚糖。

[0084] 图5:对HER3和MET特异性的双特异性二价eIgG分子的生物化学特征和结合。A两种双特异性二价eIgG抗体的重链和轻链的示意图。B两种eIgG抗体中结构域的示意图(聚糖为五边形;hetEHD2＝EHD2-1(＝EHD2(C14S,N39Q))和EHD2-2(＝EHD2(C102S)))。两种eIgG分子显示出不同hetEHD2结构域的不同糖基化。C在还原(R)条件下和非还原(NR)条件下双特异性二价eIgG抗体的SDS-PAGE分析(12％PAA;考马斯亮蓝染色)(M:标志物)。D IgG抗体的尺寸排阻色谱。E用HER3的胞外结构域融合蛋白(His标记)或MET(Fc融合蛋白)作为抗原，通过ELISA法分析双特异性二价eIgG抗体的结合。使用HER3-His作为抗原的HRP缀合的抗人Fc抗体和使用MET-Fc作为抗原的HRP缀合的抗人Fab抗体检测结合蛋白。在450nm检测光密度。均值±SD。

[0085] 图6:对于HER3和CD3特异性的双特异性二价eIgG分子的生物化学特征和结合。A双特异性二价eIgG抗体的两条重链和两条轻链的示意图。B eIgG抗体中结构域的示意图(聚糖为五边形;hetEHD2＝EHD2-1(＝EHD2(C14S,N39Q))和EHD2-2(＝EHD2(C102S)))。C在还原

(R)条件下和非还原(NR)条件下双特异性二价eIgG抗体的SDS-PAGE分析(10％PAA;考马斯亮蓝染色)(M:标志物)。D IgG抗体的尺寸排阻色谱。E用HER3的胞外结构域融合蛋白(His标记)或CD3(Fc融合蛋白)作为抗原,通过ELISA法分析双特异性二价eIgG抗体的结合。使用HER3-His作为抗原的HRP缀合的抗人Fc抗体和使用CD3-Fc作为抗原的HRP缀合的抗人Fab抗体检测结合蛋白。在450nm检测光密度。均值±SD。F使用表达HER3的LIM1215细胞和表达CD3的Jurkat细胞的双特异性eIgG抗体的流式细胞术。用PE标记的抗人Fc抗体检测结合的抗体。均值±SD。

[0086] 图7:在hetEHD2结构域的链A的C14位和链B的C102位具有不同残基的eFab分子。(A)表明在hetEHD2结构域的不同置换的eFab分子的组成。(B)在还原和非还原条件下不同eFab分子的SDS-PAGE分析。(C)在ELISA实验中不同的Fv3-43-hetEHD2融合蛋白与固定的抗原HER3-Fc的结合。用抗His检测抗体检测结合的Fv3-43-hetEHD2融合蛋白。均值±SD,n＝1。

[0087] 图8:使用不同的Fv3-43-EHD2分子的尺寸排除色谱图。在抗HER3eFab的链A的C14位和链B的C102位引入不同的残基(见图7),并使用Tosoh TSKgel SuperSW mAb HR柱通过HPLC通过尺寸排阻色谱分析纯化的蛋白质。

[0088] 图9:具有不同N-糖基化位点的Fc3-43-hetEHD2分子的分析。(A)具有不同N-糖基化位点的eFab分子的组成示意图。(B)在非还原条件下使用12％PAA凝胶的SDS-PAGE。(C)具有不同N-糖基化位点的不同Fv3-43-hetEHD2分子(100nM)的ELISA实验。HER3-Fc用作固定的抗原,用抗His检测抗体检测结合的分子。均值±SD,n＝1。

[0089] 图10:双特异性二价或三价eIg分子的示意图和生物化学表征。(A)Ig样eIg和eIg-Fab分子的分子组成和示意组装。hetEHD2结构域的一个中的N-聚糖显示为黑色六边形。(B)eIg分子在还原(R)和非还原(NR)条件下的SDS PAGE分析(12％PAA,3μg/线,考马斯蓝染色)。M,蛋白质标志物。(C)使用Tosoh TSKgel SuperSW mAb HR柱通过HPLC的尺寸排阻色谱。

[0090] 图11:eIg分子的结合特性。通过流式细胞术分析与表达HER3的LIM1215(A)、BT474(B)和表达CD3的Jurkat细胞(C)的结合。用PE标记的抗人Fc mAb检测结合的蛋白。均值±SD,n＝3。

[0091] 图12:eIg和eIg-Fab分子对PBMC的细胞毒性潜能的影响。靶细胞((A)LIM1215,(B)BT474细胞)与eIg和eIg-Fab分子的一系列稀释液一起孵育,然后以10:1的效应物:靶细胞比率(E:T)添加PBMC。孵育3天后,使用结晶紫染色来确定细胞活力。均值±SD,n＝3。

[0092] 图13:靶向HER3和FAP的eIg抗体的组成和生物化学分析。eIg分子的组成(A)和示意图(B)。HC,重链;LC,轻链。(C)eIg分子在还原(R)和非还原(NR)条件下的SDS PAGE分析(12％PAA,3μg/线,考马斯蓝染色)。M,蛋白质标志物。(D)使用Tosoh TSKgel SuperSW mAb HR柱通过HPLC的尺寸排阻色谱。(E)使用HER3-His和FAP-Flag分子作为固定抗原的eIg分子的ELISA检测。用抗人Fc检测抗体检测结合的eIg抗体。均值±SD,n＝1。

[0093] 图14:靶向HER3的eIg抗体的组成和生物化学分析。eIg分子的组成(A)和示意图(B)。HC,重链;LC,轻链。(C)eIg分子在还原(R)和非还原(NR)条件下的SDS PAGE分析(12％PAA,3μg/线,考马斯蓝染色)。M,蛋白质标志物。(D)使用HER3-His分子作为固定抗原的eIg分子的ELISA检测。用抗人Fc检测抗体检测结合的eIg抗体。均值±SD,n＝1。

[0094] 图15:靶向EGFR和HER3的eIg-Fab抗体的组成和生物化学分析。eIg-Fab分子的组成(A)和示意图(B)。HC,重链;LC,轻链。(C)eIg分子在还原(R)和非还原(NR)条件下的SDS PAGE分析(12%PAA,3μg/线,考马斯蓝染色)。M,蛋白质标志物。(D)使用Tosoh TSKgel SuperSW mAb HR柱通过HPLC的尺寸排阻色谱。(E)使用EGFR-His或HER3-His分子作为固定抗原的eIg-Fab分子的ELISA。用抗人Fc抗体检测结合的eIg抗体。用固定的EGFR-Fc抗原、eIg-Fab分子的滴定和作为第二抗原的HER3-His分析双功能结合。用抗His抗体检测结合的HER3-His。包括亲本抗体(IgGhu225和IgG3-43)作为对照。均值±SD,n=3。

[0095] 图16:靶向EGFR和HER3的Fab-eFab抗体的组成和生物化学分析。Fab-eFab分子的组成(A)和示意图(B)。HC,重链;LC,轻链。(C)Fab-eFab分子在还原(R)和非还原(NR)条件下的SDS PAGE分析(12%PAA,3μg/线,考马斯蓝染色)。M,蛋白质标志物。(D)使用Tosoh TSKgel SuperSW mAb HR柱通过HPLC的尺寸排阻色谱。(E)使用EGFR-His或HER3-His分子作为固定抗原的Fab-eFab分子的ELISA。用抗人Fab抗体检测结合的Fab-eFab抗体或亲本抗体。用固定的HER3-His抗原、Fab-eFab分子的滴定和作为第二抗原的EGFR-moFc分析双功能结合。用抗鼠Fc抗体检测结合的EGFR-moFc。包括亲本抗体(IgGhu225和IgG3-43)作为对照。均值±SD,n=1。

[0096] 图17:靶向FAP和鼠CD3的eIg抗体的组成和生物化学分析。eIg分子的组成(A)和示意图(B)。HC,重链;LC,轻链。(C)两种eIg分子在还原(R)和非还原(NR)条件下的SDS PAGE分析(12%PAA,3μg/线,考马斯蓝染色)。M,蛋白质标志物。(D)使用Tosoh TSKgel SuperSW mAb HR柱通过HPLC的尺寸排阻色谱。(E)使用表达FAP的HT1080-FAP或表达鼠CD3的鼠脾细胞对两种eIg分子进行流式细胞术分析。用PE缀合的抗人Fc抗体检测结合的eIg抗体。均值±SD,n=1。

[0097] 图18:eIg分子与人FcεRI的结合缺乏。通过ELISA分析各种eIg衍生物和IgG对照抗体与固定的FcεRI和靶抗原的结合。使用50nM的抗体分子并用HRP缀合的抗人Fab抗体进行检测,该抗体识别IgE中的Fab臂、eIg衍生物和IgG抗体。

[0098] 图19:靶向突刺蛋白的RBD的eIg抗体的组成和生物化学分析。eIg-Fab分子的组成(A)和示意图(B)。HC,重链;LC,轻链。(C)eIg-Fab分子在还原(R)和非还原(NR)条件下的SDS PAGE分析(12%PAA,3μg/线,考马斯蓝染色)。M,蛋白质标志物。(D)使用Tosoh TSKgel SuperSW mAb HR柱通过HPLC的尺寸排阻色谱。(E)使用RBD-His分子作为固定抗原的eIg-Fab分子的ELISA。用抗人Fc抗体检测结合的eIg-Fab抗体。均值±SD,n=1。

[0099] 序列表

[0100] SEQ ID NO:1

[0101] (wt人EHD2核心氨基酸序列;位置C14、N39和C102加下划线)

DFTPPTVKIL QSSCDGGGHF PPTIQLLCLV SGYTPGTINI TWLEDGQVMD

[0102] **VDLSTASTTQ EGELASTQSE LTLSQKHWLS DRTYTCQVTY QGHTFEDSTK KCADSN**

[0103] SEQ ID NO:2

[0104] (具有在14位的Cys的置换的修饰的EHD2氨基酸序列;X=除Cys外的任何氨基酸,优选Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn或Tyr,最优选Ser)

[0105] **DFTPPTVKIL QSSXDGGGHF PPTIQLLCLV SGYTPGTINI TWLEDGQVMD VDLSTASTTQ EGELASTQSE LTLSQKHWLS DRTYTCQVTY QGHTFEDSTK KCADSN**

[0106] SEQ ID NO:3

[0107] (具有在102位的Cys的置换的修饰的EHD2氨基酸序列;X＝除Cys外的任何氨基酸，优选Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn或Tyr，最优选Ser)

[0108] **DFTPPTVKIL QSSCDGGGHF PPTIQLLCLV SGYTPGTINI TWLEDGQVMD VDLSTASTTQ EGELASTQSE LTLSQKHWLS DRTYTCQVTY QGHTFEDSTK KXADSN**

[0109] SEQ ID NO:4

[0110] (在14位包含Ser的修饰的EHD2氨基酸序列)

[0111] **DFTPPTVKIL QSSSDGGGHF PPTIQLLCLV SGYTPGTINI TWLEDGQVMD VDLSTASTTQ EGELASTQSE LTLSQKHWLS DRTYTCQVTY QGHTFEDSTK KCADSN**

[0112] SEQ ID NO:5

[0113] (在14位包含Ser且在39位包含Gln的修饰的EHD2氨基酸序列)

[0114] **DFTPPTVKIL QSSSDGGGHF PPTIQLLCLV SGYTPGTIQI TWLEDGQVMD VDLSTASTTQ EGELASTQSE LTLSQKHWLS DRTYTCQVTY QGHTFEDSTK**

[0115] SEQ ID NO:6

[0116] (在102位包含Ser的修饰的EHD2氨基酸序列)

[0117] **DFTPPTVKIL QSSCDGGGHF PPTIQLLCLV SGYTPGTINI TWLEDGQVMD VDLSTASTTQ EGELASTQSE LTLSQKHWLS DRTYTCQVTY QGHTFEDSTK KSADSN**

[0118] SEQ ID NO:7

[0119] (在102位包含Ser且在39位包含Gln的修饰的EHD2氨基酸序列)

[0120] **DFTPPTVKIL QSSCDGGGHF PPTIQLLCLV SGYTPGTIQI TWLEDGQVMD VDLSTASTTQ EGELASTQSE LTLSQKHWLS DRTYTCQVTY QGHTFEDSTK KSADSN**

[0121] SEQ ID NO:8

[0122] (Igκ前导序列)

[0123] **METDTLLLWVLLLWVPGSTG**

[0124] SEQ ID NO:9

[0125] (V_L5D5-EHD2-1(N39Q))

[0126] **DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWA STRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKRT DFTPPTVKILQSSSDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTIQITWLEDGQVMDVDLSTASTT QEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN**

[0127] SEQ ID NO:10

[0128] (V_H5D5-EHD2-2-Fc_{hole})

[0129] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNS DTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQG TLVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVD LSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKSADSNGTD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0130] SEQ ID NO:11

[0131] (V_L5D5-EHD2-2)

[0132] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWA STRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKRT DFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTASTT QEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKSADSN

[0133] SEQ ID NO:12

[0134] (V_H5D5-EHD2-1(N39Q)-Fc_{hole})

[0135] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNS DTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQG TLVTVSSDFTPPTVKILQSSSDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTIQITWLEDGQVMDVD LSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSNGTD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0136] SEQ ID NO:13

[0137] (V_L3-43-$C_L\lambda$)

[0138] QAGLTQPPAVSVAPGQTASITCGRDNIGSRSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPAGI PERFSGSNYENTATLTISRVEAGDEADYYCQVWGITSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0139] SEQ ID NO:14

[0140] (V_H3-43-C_H1-Fc_{knob})

[0141] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0142] SEQ ID NO:15

[0143] ($V_L$huU3-EHD2-1(N39Q))

[0144] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIKRTDFTPPTVKI

[0145] LQSSSDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTIQITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN

[0146] SEQ ID NO:16

[0147] ($V_H$huU3-EHD2-2-Fc_{hole})

[0148] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYNGKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKSADSNGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0149] SEQ ID NO:17

[0150] (V_H5D5-EHD2-2-Linker-V_H3-43-C_H1)

[0151] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGTLVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKSADSNGTGGSGGGGSGGQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0152] SEQ ID NO:18

[0153] (V_H3-43-C_H1-Linker-V_H5D5-EHD2-2)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS

KWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWG

[0154] QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGTG

GSGGGGSGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLE

WVGMIDPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSY

[0155] VTPLDYWGQGTLVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITW

LEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDS

TKKSADSN

[0156] SEQ ID NO:19

[0157] (V_H3-43-C_H1-Linker-V_H5D5-EHD2-2-Fc_{hole})

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS

KWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWG

QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGTG

GSGGGGSGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLE

WVGMIDPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSY

[0158] VTPLDYWGQGTLVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITW

LEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDS

TKKSADSNGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH

EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK

VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY

TQKSLSLSPGK

[0159] SEQ ID NO:20

[0160] (V_H3-43-C_H1-Linker-V_H3-43-C_H1-Fc_{knob})

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS

KWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWG

QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGTG

[0161] GSGGGGSGGQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLE

WLGRTYYRSKWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQ

LGLDALDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT

VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD

KKVEPKSCGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH

EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK

VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE

[0162] WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY

TQKSLSLSPGK

[0163] SEQ ID NO:21

[0164] (V_H5D5-EHD2-2-Linker-V_H3-43-C_H1-Fc_{hole})

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNS

DTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQG

TLVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVD

LSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKSADSNGTG

GSGGGGSGGQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLE

WLGRTYYRSKWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQ

[0165] LGLDALDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT

VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD

KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED

PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS

NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE

SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ

KSLSLSPGK

[0166] SEQ ID NO:22

[0167] (V_H3-43-EHD2-2-Fc)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS

KWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWG

QGTMVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVM

DVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKSADSN

[0168] GTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA

PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE

NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

GK

[0169] SEQ ID NO:23

[0170] (V_L3-43-EHD2-1(N39Q))

QAGLTQPPAVSVAPGQTASITCGRDNIGSRSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPAGI

[0171] PERFSGSNYENTATLTISRVEAGDEADYYCQVWGITSDHVVFGGGTKLTVLGTDFTP

PTVKILQSSSDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTIQITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGE

LASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN

[0172] SEQ ID NO:24

[0173] ($V_H$hu225-C_H1-Linker-V_H3-43-EHD2-2-Fc)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGG
NTDYNTPFTSRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALTYYDYEFAYWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGSGG
GGSGGQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGR
TYYRSKWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDA

[0174] LDIWGQGTMVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLED
GQVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKK
SADSNGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

[0175] SEQ ID NO:25

[0176] ($V_L$hu225-C_Lk)

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQNNNWPTTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFP

[0177] PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0178] SEQ ID NO:26

[0179] (V_H3-43-EHD2-2-Linker-$V_H$hu225-C_H1-Fc)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS
KWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWG
QGTMVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVM
DVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKSADSN
GTGGSGGGGSGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGK
GLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALT

[0180] YYDYEFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0181] SEQ ID NO:27

[0182] (V_H3-43-EHD2-2(C102A)-His)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS
KWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWG

[0183] QGTMVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVM
DVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKK**A**ADSN
AAAHHHHHH

[0184] SEQ ID NO:28

[0185] (V_H3-43-EHD2-2(C102W)-His)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS
KWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWG

[0186] QGTMVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVM
DVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKK**W**ADS
NAAAHHHHHH

[0187] SEQ ID NO:29

[0188] (V_H3-43-EHD2-2(C102N)-His)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS
KWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWG

[0189] QGTMVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVM
DVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKK**N**ADSN
AAAHHHHHH

[0190] SEQ ID NO:30

[0191] (V_H3-43-EHD2-2(C102T)-His)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS
KWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWG

[0192] QGTMVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVM
DVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKK**T**ADSN
AAAHHHHHH

[0193] SEQ ID NO:31

[0194] (V_H3-43-EHD2-2(C102S)-His)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS
KWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWG

[0195] QGTMVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVM
DVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKK**S**ADSN
AAAHHHHHH

[0196] SEQ ID NO:32

[0197] (V_L3-43-EHD2-1(C14A,N39Q))

QAGLTQPPAVSVAPGQTASITCGRDNIGSRSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPAGI
PERFSGSNYENTATLTISRVEAGDEADYYCQVWGITSDHVVFGGGTKLTVLDFTPPT
[0198] VKILQSSADGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTIQITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGEL
ASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN

[0199] SEQ ID NO:33

[0200] (V_L3-43-EHD2-1(C14T,N39Q))

QAGLTQPPAVSVAPGQTASITCGRDNIGSRSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPAGI
PERFSGSNYENTATLTISRVEAGDEADYYCQVWGITSDHVVFGGGTKLTVLDFTPPT
[0201] VKILQSSTDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTIQITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGEL
ASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN

[0202] SEQ ID NO:34

[0203] (V_L3-43-EHD2-1(C14N,N39Q))

QAGLTQPPAVSVAPGQTASITCGRDNIGSRSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPAGI
PERFSGSNYENTATLTISRVEAGDEADYYCQVWGITSDHVVFGGGTKLTVLDFTPPT
[0204] VKILQSSNDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTIQITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGEL
ASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN

[0205] SEQ ID NO:35

[0206] (V_L3-43-EHD2-1(C14W,N39Q))

QAGLTQPPAVSVAPGQTASITCGRDNIGSRSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPAGI
PERFSGSNYENTATLTISRVEAGDEADYYCQVWGITSDHVVFGGGTKLTVLDFTPPT
[0207] VKILQSSWDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTIQITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGEL
ASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN

[0208] SEQ ID NO:36

[0209] (V_L3-43-EHD2-1(C14S,N39Q))

QAGLTQPPAVSVAPGQTASITCGRDNIGSRSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPAGI
PERFSGSNYENTATLTISRVEAGDEADYYCQVWGITSDHVVFGGGTKLTVLDFTPPT
[0210] VKILQSSSDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTIQITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGEL
ASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN

[0211] SEQ ID NO:37

[0212] (V_L3-43-EHD2-1(C14S))

[0213] QAGLTQPPAVSVAPGQTASITCGRDNIGSRSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPAGI
PERFSGSNYENTATLTISRVEAGDEADYYCQVWGITSDHVVFGGGTKLTVLDFTPPT

[0214] VKILQSSSDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGEL
ASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN

[0215] SEQ ID NO:38

[0216] (V_H3-43-EHD2-2(N39Q,C102S)-His)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS
KWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWG

[0217] QGTMVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTI**Q**ITWLEDGQVM
DVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKK**S**ADSN
AAAHHHHHH

[0218] SEQ ID NO:39

[0219] ($V_H$huU3-EHD2-2-Linker-V_H3-43-C_H1-Fc_{knob})
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYK
GVSTYNGKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDV
WGQGTLVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQV
MDVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKSADS
NGGSGGGGSGGQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRG
LEWLGRTYYRSKWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDG

[0220] QLGLDALDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCGTDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

[0221] SEQ ID NO:40

[0222] (V_H3-43-C_H1-Fc_{hole})
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS

[0223] KWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWG
QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGTD
KTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD

[0224] GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0225] SEQ ID NO:41

[0226] (V_H3-43-C_H1-Linker-$V_H$huU3-EHD2-2-Fc_{hole})

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS
KWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWG
QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGS
GGGGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSGYTMNWVRQAPGQGLEW
MGLINPYKGVSTYNGKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYG

[0227] DSDWYFDVWGQGTLVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINI
TWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFE
DSTKKSADSNGTDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

[0228] SEQ ID NO:42

[0229] ($V_H$hu36-EHD2-2-Fc_{hole})

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTENIIHWVRQAPGQGLEWMGWFHPGS
GSIKYNEKFKDRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHGGTGRGAMDYW
GQGTLVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVM
DVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKSADSN

[0230] GTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

[0231] SEQ ID NO:43

[0232] (VLhu36-EHD2-1(N39Q))

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTSAYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASN

[0233] LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSRELPYTFGQGTKLEIKRDFTPP
TVKILQSSSDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTIQITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGEL
ASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN

[0234] SEQ ID NO:44

[0235] ($V_H$hu225-C_H1-linker-V_H3-43-EHD2-2-His)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGG
NTDYNTPFTSRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALTYYDYEFAYWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGSGG

[0236] GGSGGQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGR
TYYRSKWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDA
LDIWGQGTMVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLED
GQVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKK
SADSNAAAHHHHHH

[0237] SEQ ID NO:45

[0238] ($V_L$hu36-$C_L\kappa$)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTSAYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASN
LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSRELPYTFGQGTKLEIKRRTVA

[0239] APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0240] SEQ ID NO:46

[0241] ($V_H$hu36-C_H1-Fc_{hole})

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTENIIHWVRQAPGQGLEWMGWFHPGS
GSIKYNEKFKDRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHGGTGRGAMDYW

[0242] GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGTD
KTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS

[0243] KAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0244] SEQ ID NO:47

[0245] (V_H2C11-EHD2-1(N39Q))

EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGMHWVRQAPGRGLESVAYITSSSINI
KYADAVKGRFTVSRDNAKNLLFLQMNILKSEDTAMYYCARFDWDKNYWGQGTMV

[0246] TVSSDFTPPTVKILQSSSDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTIQITWLEDGQVMDVDLST
ASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN

[0247] SEQ ID NO:48

[0248] (V_L2C11-EHD2-2-Fc_{knob})

[0249] DIQMTQSPSSLPASLGDRVTINCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTNKLADG VPSRFSGSGSGRDSSFTISSLESEDIGSYYCQQYYNYPWTFGPGTKLEIKDFTPPTVKIL QSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQ SELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKSADSNGTDKTHTCPPCPAPPVAGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0250] SEQ ID NO:49

[0251] (V_L2C11-EHD2-1(N39Q))

[0252] DIQMTQSPSSLPASLGDRVTINCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTNKLADG VPSRFSGSGSGRDSSFTISSLESEDIGSYYCQQYYNYPWTFGPGTKLEIKDFTPPTVKIL QSSSDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTIQITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQ SELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN

[0253] SEQ ID NO:50

[0254] (V_H2C11-EHD2-2-Fc_{knob})

[0255] EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGMHWVRQAPGRGLESVAYITSSSINI KYADAVKGRFTVSRDNAKNLLFLQMNILKSEDTAMYYCARFDWDKNYWGQGTMV TVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLST

[0256] ASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKSADSNGTDKTH TCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0257] SEQ ID NO:51

[0258] (V_LS309-C_Lκ)

[0259] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQTVSSTSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQHDTSLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0260] SEQ ID NO:52

[0261] (V_LP2B-2F6-EHD2-1(N39Q))

[0262] QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSKRP SGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNLVCGGGTKLTVLDFTP PTVKILQSSSDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTIQITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGE LASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN

[0263] SEQ ID NO:53

[0264] (V_HS309-C_H1-V_HP2B-2F6-EHD2-2-Fc)

[0265] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYN
GNTNYAQKFQGRVTMTTDTSTTTGYMELRRLRSDDTAVYYCARDYTRGAWFGESLI
GGFDNWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCGGSGGGGSGGQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSISSGYYWGWIRQPPG
KGLEWIGSIYHSGSTYYNPSLKTRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAVV
GIVVVPAAGRRAFDIWGQGTMVTVSSDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSG
YTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVT
YQGHTFEDSTKKSADSNDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG

具体实施方式

[0266] 在下文详细描述本发明之前，应理解本发明不限于本文所述的特定方法、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解，本文使用的术语仅出于描述特定实施例的目的，而不旨在限制本发明的范围，本发明的范围将仅由所附权利要求限制。除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领结构域普通技术人员通常理解的相同含义。

[0267] 优选地，本文使用的术语定义如“生物技术术语的多语言词汇表”中所述：(IUPAC Recommendations)″,Leuenberger,H.G.W,Nagel,B.and Klbl,H.eds.(1995),Helvetica Chimica Acta,CH-4010 Basel,Switzerland)。

[0268] 在整个说明书和所附的权利要求书中，除非上下文另有要求，否则“包含”以及其变体将被理解为暗示包含所陈述的整数或步骤或整数组或步骤，但不排除任何其他整数或步骤或整数组或步骤。在以下段落中，更详细地定义了本发明的不同方面。

[0269] 如此定义的每个方面可以与任何其他方面或多个方面组合，除非明确指出相反。

[0270] 特别地，指示为任选的、优选的或有利的任何特征可以与指示为任选的、优选的或有利的任何其他一个或多于一个特征组合。

[0271] 在本说明书的全文中引用了几个文件。本文引用的每个文件(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、说明书等)，无论是在上文还是在下文，都通过引用整体并入本文。本文中的任何内容均不应被解释为承认本发明无权因在先发明而早于此类公开。本文引用的一些文件的特点是“通过引用并入”。在这些并入参考文献的定义或教导与本说明书中引用的定义或教导之间发生冲突的情况下，本说明书的文本优先。

[0272] 下面将描述本发明的要素。这些要素以具体实施例列出；然而，应当理解，它们可以以任何方式和任何数量组合以创建附加实施方案。各种描述的实施例和优选的实施方案不应被解释为将本发明仅限于明确描述的实施方案。该描述应被理解为支持和涵盖将明确描述的实施方案与任何数量的公开和/或优选元素组合的实施方案。此外，除非上下文另有说明，否则本申请中所有描述的元素的任何排列和组合都应被视为由本申请的描述所公开。

[0273] 定义

[0274] 下文提供了本规范中常用术语的一些定义。在本规范的其余部分中，这些术语在每次使用中具有各自定义的含义和优选的含义。

[0275] 如本说明书和权利要求书所用,要素前不加数量词包括复数形式,除非另有说明。

[0276] 如本文所用,术语“结合分子”是指可特异性结合靶分子或靶表位的任何分子或分子部分。本发明的结合分子的结合特性可以来源于(a)抗体或其抗原结合片段;(b)寡核苷酸;(c)抗体样蛋白质;(d)T细胞受体或(e)肽模拟物。

[0277] 根据本发明的术语“结合”优选地涉及特定结合。“特异性结合”是指结合蛋白(如抗体)与靶点(如表位)的结合比与另一靶点的结合更强。与第二个靶点相比,如果结合蛋白以低于第二个靶点的解离常数(Kd)与第一个靶点结合,则其与第一个靶点的结合更强。优选地,结合蛋白特异性结合的靶点的解离常数(Kd)比结合蛋白未特异性结合靶点的解离常数(Kd)小1/10,优选小于1/20,优选小于1/50,甚至更优选小于1/100、1/200、1/500或1/1000。

[0278] 如本文所用,术语“Kd”(以“mol/L”计量,有时缩写为“M”)旨在指的是结合蛋白(例如抗体或其片段)和靶分子(例如抗原或其表位)之间特定相互作用的解离平衡常数。用于确定化合物的结合亲和力,即用于确定解离常数Kd的方法是本领结构域普通技术人员已知的并且可以例如选自本领结构域已知的以下方法:基于表面等离子激元共振(SPR)技术,优选使用Biacore平台、生物层干涉仪(BLI)、石英晶体微量天平(QCM)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、流式细胞仪、等温滴定量热法(ITC)、分析超速离心法、放射免疫分析法(RIA或IRMA)和增强化学发光(ECL)。在本申请的上下文中,“Kd”值通过表面等离子共振光谱(Biacore TM)或通过石英晶体微量天平(QCM)在室温(25℃)下确定。

[0279] 本文所使用的术语“结合结构域”指的是的具有与抗原特异性结合能力的氨基酸序列,并且可以衍生自,例如抗体或抗原结合片段和T细胞受体以及抗原结合片段。术语“结合结构域”中包含的实例包括但不限于Fab片段,由VL、VH结构域组成的单价片段;由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段、由V_H结构域或V_L结构域、VHH、纳米抗体、或者IgNAR的可变结构域组成的dAb片段(Ward等人,(1989)Nature 341:544-546);孤立互补决定区(CDR)以及两个或多于两个分离的CDR的组合,其可以任选地通过合成肽接头连接。术语“结合结构域”还指TCRα-链和TCRβ-链或TCRγ-链和TCRδ-链的可变结构域或区。

[0280] 如本文所用,术语“TCR”或“T细胞受体”表示在T细胞表面上发现的分子。TCR由两条独立的肽链组成,在大多数情况下,这些肽链在人类中由独立的T细胞受体α和β(TCRα和TCRβ)基因产生。这些链称为α-链和β-链。TCRα-链和TCRβ-链中的每一个都具有可变结构域和恒定结构域。每个可变结构域携带三个用于与抗原结合的CDR。TCRγ-链和TCRδ-链在人类中的含量较低,但也携带有可变结构域和恒定结构域,每个可变结构域都带有三个用于与抗原结合的CDR。

[0281] 如本文所用,术语“抗原”涉及包含被抗原结合结构域识别的表位的试剂。术语“抗原”特别包括蛋白质和肽。抗原优选是对应于或衍生自天然存在的抗原的产物。此类天然存在的抗原可以包括或可以源自过敏原、病毒、细菌、真菌、寄生虫和其他感染因子和病原体,或者抗原也可以是肿瘤抗原。根据本发明,抗原可对应于天然存在的产物,例如病毒蛋白或其部分,或肿瘤蛋白。

[0282] 本文所使用的术语“二聚化结构域”是指能够形成两条肽链或蛋白链的二聚体的结构域,其中至少一个二聚化结构域存在于第一链上且至少第二二聚化结构域存在于第二链上。二聚化结构域可以选自Fc区,异二聚化Fc区、CH1、CL、IgE和IgM(EHD2、MHD2)的第二个

重链恒定结构域(CH2)、修饰的EHD2、IgG、IgD、IgA、IgM的最后一个重链恒定结构域(CH3或CH4)或IgE及其异二聚化衍生物,以及T细胞受体的恒定结构域C-α和C-β。根据各自的二聚化结构域,二聚化结构域的C端和N端可以不同。如果二聚化结构域来源于天然存在的蛋白质,例如免疫球蛋白,如果在其C-端或N-端没有非天然存在的氨基酸,则二聚化结构域优选地直接连接到本发明意义上的可变结构域,即不使用肽接头连接。

[0283] 本发明上下文中使用的VH和VL结构域优选是抗体或免疫球蛋白衍生的。此类“抗体”或“免疫球蛋白”可以是具有“Y”形形式并由四个多肽链组成的天然或常规抗体;两条相同的重链和两条相同的轻链通过二硫键连接。每条链都由结构域组成。两条重链通过二硫键相互连接,每条重链通过二硫键连接到一条轻链。有两种类型的轻链,λ和k,以及决定抗体分子功能活性的五种主要重链类别(或同种型):IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每条链包含不同的序列域。轻链包括两个结构域或区,可变结构域(VL)和恒定结构域(CL)。重链包括四个结构域,一个可变结构域(VH)和三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3,统称为CH),或者在IgE和IgM的情况下,五个结构域,一个可变结构域(VH)和四个恒定结构域(CH1、CH2、CH3、CH4)。轻链(VL)和重链(VH)的可变区决定了对抗原的结合识别和特异性。轻(CL)链和重(CH)链的恒定区结构域赋予重要的生物学特性,例如抗体链结合、分泌、跨胎盘迁移、补体结合和与Fc受体(FcR)的结合。“Y”形抗体的“臂”包含可以与特定分子结合的位点,从而能够识别特定抗原。抗体的这个区域称为Fab(片段,抗原结合)区。它由抗体的每条重链和每条轻链的一个恒定结构域和一个可变结构域组成。Y的碱基在调节免疫细胞活性中起作用。该区称为Fc(片段,可结晶)区,由根据抗体的类别贡献两个或三个恒定结构域的两条重链组成。Fv片段是免疫球蛋白Fab区的N端部分,由一条轻链和一条重链的可变部分组成。抗体的特异性在于抗体结合位点和抗原决定簇之间的结构互补性。抗体结合位点由主要来自高变区或互补决定区(CDR)的残基组成。有时,来自非高变区或框架区(FR)的残基会影响整个结构域的结构,从而影响结合位点。互补决定区或CDR是指共同定义天然免疫球蛋白结合位点的天然Fv区的结合亲和力和特异性的氨基酸序列。免疫球蛋白的轻链和重链各自具有三个CDR,分别命名为CDR1-L、CDR2-L、CDR3-L和CDR1-H、CDR2-H、CDR3-H。因此,常规抗体抗原结合位点包括六个CDR,包括来自重链和轻链V区中的每一个的CDR组。

[0284] 可用于本发明的抗体及其抗原结合片段可以来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。优选地,抗体或片段来自人、黑猩猩、啮齿动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠或兔)、鸡、火鸡、猪、绵羊、山羊、骆驼、牛、马、驴、猫或狗来源。特别优选抗体是人或鼠源的。本发明的抗体还包括嵌合分子,其中来自一个物种(优选为人类)的抗体常数区与来自另一个物种(如小鼠)的抗原结合位点结合。此外,本发明的抗体包括人源化分子,其中源自非人类物种(例如来自小鼠)的抗体的抗原结合位点与人类来源的恒定区和框架区组合。

[0285] 如本文所例示的,抗体可以直接从表达抗体的杂交瘤中获得,或者可以在宿主细胞(例如,CHO细胞或淋巴细胞)中克隆和重组表达。宿主细胞的其他实例是微生物,如大肠杆菌和真菌,如酵母。或者,它们可以在非人类的转基因动物或植物中重新产生。

[0286] 如本文所用,术语“EHD2”和“EHD2结构域”是指IgE重链的第二恒定结构域(Seifert等人,2012,Protein Eng Des Sel.;25:603-12;and Seifert等人,2014,Mol Cancer Ther.;13:101-11)。同样,术语“修饰的EHD2结构域”是指EHD2结构域的一部分,与衍生它的原始EHD2序列相比,该序列已被修饰。修饰包括氨基酸缺失、置换和插入。修饰优

选包括一个或多于一个氨基酸置换，优选在相对于SEQ ID NO:1指示的位置处。根据本发明的置换是对位置14的Cys或位置102的Cys进行的。就SEQ ID NO:1而言，优选的置换分别包括C14S和C102S。如本文所用，术语“hetEHD2”表示两个修饰的EHD2结构域的异二聚体，即包含本文定义的EHD2-1和EHD2-2的二聚体。需要强调的是，尽管在一些实例中提到了特定的氨基酸序列，但本文使用的术语“EHD2-1”和“EHD2-2”并不指特定的氨基酸序列，而是主要用于强调第一个修饰的EHD2结构域和第二个EHD2结构域的氨基酸序列之间的差异。使用Lefranc等人，2005(Developmental and Comparative Immunology 29,185-203)中定义的氨基酸编号方案用于恒定免疫球蛋白结构域，SEQ ID NO:1中的C14对应于C11，SEQ ID NO:1中的C28对应于SEQ ID NO:1中的C23、SEQ ID NO:1中C86对应于C104，SEQ ID NO:1中的C102对应于C124，并且SEQ ID NO:1中的N39对应于N38。

[0287] 如本文所用，术语“单克隆抗体”是指具有单分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体显示出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。在一个实施方案中，单克隆抗体是由杂交瘤产生的，该杂交瘤包括从非人类动物(如小鼠)中获得的B细胞，融合到永生化细胞。

[0288] 如本文所用，术语“重组抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有抗体，例如(a)分离自转基因或转染色体的动物(例如小鼠)的抗体对于免疫球蛋白基因或由其制备的杂交瘤，(b)从转化以表达抗体的宿主细胞中分离的抗体，例如从转染瘤中，(c)从重组、组合抗体文库中分离的抗体，和(d)通过涉及将免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。

[0289] 因此适合于在本发明中使用的“抗体和抗原结合片段”包括但不限于多克隆的、单克隆的、单价的、双特异性、特异性异源偶联的、多特异性的、重组的、异源的、异源杂交的、嵌合的、人源化的(特别是CDR-移植的)、去免疫的或人抗体、Fab片段、Fab′片段、F(ab′)2片段、由Fab表达文库、Fd、Fv、二硫键连接的Fvs(dsFv)、单链抗体(例如scFv)、双抗或四抗产生的片段(Holliger P.等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90(14)，6444-6448)，纳米抗体(也被称为单区域抗体)、抗独特型(anti-Id)抗体(例如，包括本发明抗体的抗Id抗体)以及以上任何一种的表位结合片段。

[0290] 如本文所用，术语“双特异性”表示可以结合两种不同抗原或一种抗原内的两种不同表位的结合分子，例如抗体。同样，术语“三特异性”和“四特异性”分别表示可以结合三种和四种不同抗原或抗原内表位的结合分子。

[0291] 如本文所用，应用于物体的术语“自然发生的”是指物体可以在自然界中找到的事实。例如，存在于生物体(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列可以从自然来源中分离出来，并且在实验室中没有人为修改。

[0292] 如本文所用，术语“核酸适体”是指已通过重复多轮体外选择或SELEX(通过指数富集的配体系统进化)工程改造以结合靶分子的核酸分子(综述参见:Brody E.N.和Gold L.(2000)，适体作为治疗和诊断试剂。J.Biotechnol.74(1):5-13)。核酸适体可以为DNA分子或RNA分子。适体可以包含修饰，例如修饰的核苷酸，例如2′-氟置换的嘧啶。

[0293] 如本文所用，术语“抗体样蛋白质”是指已被工程改造(例如通过环的诱变)以特异性结合靶分子的蛋白质。通常，此类抗体样蛋白质包含至少一种在两端连接至蛋白质支架的可变肽。这种双重结构约束极大地增加了抗体样蛋白的结合亲和力至与抗体相当的水平。可变肽环的长度通常由10个到20个氨基酸组成。支架蛋白可以是任何具有良好溶解特

性的蛋白。优选地，支架蛋白是小球状蛋白。抗体样蛋白包括但不限于粘附体、抗白蛋白和设计的锚蛋白重复蛋白(综述参见:Binz H.K.等人(2005)Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains.Nat.Biotechnol.23(10):1257-1268)。抗体样蛋白可以来源于大型突变体库，例如，可以从大型噬菌体展示文库中筛选，并且可以类似于常规抗体进行分离。此外，抗体样结合蛋白可以通过球状蛋白中表面暴露残基的组合突变获得。抗体样蛋白有时被称为“肽适体”。

[0294] “序列一致性百分比”是通过在一个比较窗口上比较两个最优排列的序列来确定的，其中，相对于参考序列(不包含添加或删除)，比较窗口中的序列部分可以包含添加或删除(即间隙)，以实现两个序列的最佳对齐。百分比是通过确定两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数量来计算得到匹配位置的数量，将匹配位置的数量除以比较窗口中的位置总数并将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。

[0295] 术语“同一性”在本文的上下文中用于两个或多于两个核酸或多肽序列，是指两个或多于两个相同的序列或亚序列，即包含相同的核苷酸或氨基酸序列。如果序列具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基，则它们彼此具有“同一性”。根据本发明，当使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查在比较窗口或指定区域上进行比较和对齐以获得最大对应性时，至少70％的同一性包括对指定的序列有至少75％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、或者至少99％的同一性。这些定义还涉及测试序列的补充。因此，关于多肽和多核苷酸序列比较，在整个说明书中使用术语“至少70％的序列同一性”。该表达优选指与各自的参考多肽或各自的参考多核苷酸具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％，或至少99％的序列同一性。

[0296] 术语“序列比较”在本文中用于指代其中一个序列充当参考序列的过程，测试序列与该参考序列进行比较。当使用序列比较算法时，将测试序列和参考序列输入计算机，必要时指定子序列坐标，并指定序列算法程序参数。默认程序参数是常用的，也可以指定替代参数。然后，序列比较算法根据程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。在比较两个序列并且未指定要计算序列同一性百分比的参考序列的情况下，序列同一性将参考要比较的两个序列中较长的序列来计算，如果没有具体说明另有说明。如果标明了参考序列，如果没有特别说明，则序列同一性是根据SEQ ID所示的参考序列的全长确定的。

[0297] 在序列比对中，术语“比较窗口”是指与具有相同位置数的序列的连续位置的参考延伸相比较的序列的连续位置延伸。通常，连续位置的数量在约20个至100个连续位置、约25个至90个连续位置、约30个至80个连续位置、约40个至约70个连续位置、约50个至约60个连续位置。根据本发明，当与本发明的序列进行比较时，例如SEQ ID NO:1用于同一性百分比，优选SEQ ID NO的全长，如SEQ ID NO:1的106个氨基酸，如果参考序列长度相同或比本发明的SEQ ID NO长，则将其与参考序列进行比较。如果参考序列比本发明的SEQ ID NO短，则必须将参考序列的全长与本发明的SEQ ID NO的全长进行比较。

[0298] 序列比对的方法在本领域是公知的。用于比较的序列的最佳比对可以通过例如Smith和Waterman的局部同源算法(Adv.Appl.Math.2:482,1970)、Needleman和Wunsch的同

源比对算法(J.Mol.Biol.48:443,1970)、Pearson和Lipman的相似性搜索方法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444,1988)、这些算法的计算机化实现来进行(e.g.,GAP,BESTFIT,FASTA,and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,575 Science Dr.,Madison,Wis.),或通过手动对齐和目视检查(参见,例如,Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology(1995 supplement))。Altschul等人(Nuc.Acids Res.25:3389-402,1977),和Altschul等人(J.Mol.Biol.215:403-10,1990)分别描述了适合于确定序列同一性和相似性百分比的算法是BLAST和BLAST 2.0算法。用于执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心公开获得(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)。该算法首先通过识别查询序列中长度为W的字段来识别高分数序列对(HSP),当与数据库序列中相同长度的词对齐时,这些词匹配或满足某个正值阈值分数T。T被称为邻字段分数阈值(Altschul等人,同上)。这些最初的邻域字段命中就像种子一样,可以启动搜索,找到包含它们的更长的HSP。单词命中沿着每个序列在两个方向上扩展,只要可以增加累积对齐分数。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励分数;总是>0)和N(错配残基的罚分;总是<0)计算累积分数。对于氨基酸序列,打分矩阵用于计算累积分数。在以下情况下,字段命中在每个方向上的扩展将停止:累积对齐分数从其最大达到值下降了X数量;由于一个或多于一个负分数残基比对的累积,累积分数变为零或低于零;或到达任一序列的结尾。BLAST算法参数W、T、X决定了对准的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)默认使用11的字长(W)、10的期望值(E)、M=5、N=-4和两条链的比较。对于氨基酸序列,BLASTP程序默认使用3的字长,10的期望值(E),以及50的BLOSUM62打分矩阵(参见Henikoff and Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915,1989)对齐(B),10的期望值(E),M=5,N=-4,以及两条链的比较。BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见,例如,Karlin and Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-87,1993)。BLAST算法提供的一种相似性度量是最小和概率(P(N)),它提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果测试核酸与参考核酸比较中的最小总概率小于约0.2,通常小于约0.01,更通常小于约0.001,则认为核酸与参考序列相似。

[0299] 术语“核酸”和“核酸分子”在本文中同义使用并且被理解为脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸碱基或两者的单链或双链寡聚或多聚体。核苷酸单体由核碱基、五碳糖(例如但不限于核糖或2′-脱氧核糖)和一个至三个磷酸基团组成。通常,核酸通过单个核苷酸单体之间的磷酸二酯键形成。在本发明的上下文中,术语核酸包括但不限于核糖核酸(RNA)分子和脱氧核糖核酸(DNA)分子,还包括包含其他链的核酸的合成形式(例如,Nielsen等人(Science 254:1497-1500,1991)中描述的核酸肽)。通常,核酸是单链分子或双链分子,由天然存在的核苷酸组成。核酸单链的描述也定义了(至少部分地)互补链的序列。核酸可以是单链或双链的,或者可以包含双链和单链序列的部分。实例性的双链核酸分子可以具有3′或5′突出端,因此不需要或假定在其整个长度上完全是双链的。核酸可以通过生物、生化或化学合成方法或本领域已知的任何方法获得,包括但不限于RNA的扩增和逆转录方法。术语核酸包括染色体或染色体段、载体(例如,表达载体)、表达盒、裸DNA或RNA聚合物、引物、探针、cDNA、基因组DNA、重组DNA、cRNA、mRNA、tRNA、microRNA(miRNA)或小干扰RNA(siRNA)。核酸可以是例如单链、双链或三链并且不限于任何特定长度。除非另有说明,除明确指出的任何序列外,特定核酸序列包含或编码互补序列。

[0300] 如在本发明的上下文中提及的术语“C-末端”(也称为羧基-末端、羧基端、C-末端尾、C-末端或COOH-末端)是氨基酸链(蛋白质或多肽)的末端,由游离羧基(-COOH)终止。当蛋白质从信使RNA翻译时,它是从N端到C端产生的。术语“N-末端”(也称为氨基末端、NH2-末端、N-末端或胺-末端)是指蛋白质或多肽的起点,由带有游离胺基的氨基酸终止(-NH2)。写肽序列的惯例是把N端放在左边,从N端到C端写序列。

[0301] 本发明上下文中的术语“接头”或“肽接头”是指氨基酸序列,即多肽,其在本发明的工程化多肽中在空间上分隔两个部分。通常,这种肽接头由1个至100个,优选3个至50个,更优选5个至20个氨基酸组成。因此,这种肽接头的最小长度为至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、或30个氨基酸,肽接头的最大长度为至少100个、95个、90个、85个、80个、75个、70个、65个、60个、55个、50个、45个、40个、35个、34个、33个、32个、31个、30个、29个、28个、27个、26个、25个、24个、23个、22个、21个、20个、19个、18个、17个、16个或15个或小于15个氨基酸序列。肽接头也可以在连接在一起的两个部分之间提供灵活性。如果氨基酸小,这种灵活性通常会增加。因此,柔性肽接头包含增加含量的小氨基酸,特别是甘氨酸和/或丙氨酸,和/或亲水性氨基酸,例如丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。优选地,肽接头上大于20%、30%、40%、50%、60%或大于60%的氨基酸是小氨基酸。优选地肽接头具有序列GGGGS、[G4S]2、[G4S]3、[G2SG2]、[G2SG2]2、[G2SG2]3。技术人员可以容易地确定不利于或阻止一条多肽链内的链内相互作用的接头的合适长度。

[0302] 如本文所用,术语“基本相同”是指最多10%且包括10%,或最多15%且包括15%的公开值或数字的偏差。特别地,该术语包括1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%公开的值或数字的偏差。

[0303] 如本文所述,术语“Fc链”是指可以形成同二聚体或异二聚体的结构,并优选以增加或减少的亲和力与相应的效应分子结合,从而改变效应子功能,例如,ADCC、CMC或FcRn介导的再循环。文献(Presta等人,2008,Curr Opin Immunol.20:460-470)中描述了不同的人FcγRIIIa(CD16)IgG变体,例如,IgG1-DE(S239D、I332E)导致ADCC增加10倍,或IgG1-DEL(S239D、I332E、A330L)导致ADCC增加100倍。除了增加效应子功能外,文献中还描述了效应子功能降低的Fc部分。据报道,对于gG1-P329G LALA变体(L234A、L235A、P329G)几乎完全消除了与整个Fcγ受体家族的相互作用,导致了效应沉默分子(Schlothauer等人,2016,Protein Eng Des Sel.29;457-466)。此外,对于IgG-Δab变体(E233P、L234V、L235A、Δ236G、A327G、A330S、P331S)描述的与FcγRI的结合降低也导致效应子功能降低(Armour等人,1999;Eur J Immunol.29:2612-2624)(also described in Strohl等人.,2009;Curr Opin Biotechnol;20:685-691)。除了改变与免疫细胞(例如人FcγRIIIa)受体的结合外,还可以通过在Fc部分引入置换来改变与FcRn的结合。由于与FcRn分子的结合增加或减少,影响含Fc分子的半衰期,例如,IgG1-YTE(M252Y,S254T,T256E)导致蛋白的末端半衰期增加3倍至4倍,或IgG1-QL(T250Q,M428L)导致蛋白的末端半衰期增加2.5倍(Presto等人,2008;Strohl等人,2009)。

[0304] 术语“异二聚化Fc”或“异二聚化的Fc”涉及Fc部分的变体,其能够形成异二聚体。除了knob-into-hole技术之外,还有文献中描述的用于生成异二聚化的Fc部分的其他变体(Krah等人,2017,N.Biotechnol.39:167-173;Ha等人.,2016,Front Immuno.7:394;Mimoto

等人.,2016,Curr Pharm Biotechnol.17:1298-1314;Brinkmann&Kontermann,2017,MAbs 9:182-212)。“knob-into-hole”也称为“Knobs-into-Holes”技术是指CH3-CH3界面的突变以促进异多聚体的形成,并且已经在US 5731168和US 8216805描述,值得注意的是,两者均以引用方式并入本文。

[0305] 在本发明的上下文中使用的二聚化结构域C_H1和C_L基于免疫球蛋白并且可以衍生自免疫球蛋白分子的任何类别(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)或亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。

[0306] 如本文所用,术语“免疫效应细胞上的触发分子”是指与免疫系统的受体分子偶联的分子,例如模式识别受体(PRR)、Toll样受体(TLR)、杀伤激活受体和杀伤抑制剂受体(KAR和KIR)、补体受体、Fc受体、B细胞受体和T细胞受体。与这些受体的结合通过触发分子引起免疫系统的反应。免疫效应细胞上的触发分子的非限制性实例选自但不限于CD2、CD3、CD16、CD44、CD64、CD69、CD89、Mel14、Ly-6.2C、TCR-复合物、Vy9V52TCR、和NKG2D。

[0307] 如本文所用,术语“药物组合物”是指用于识别、预防或治疗疾病或组织状态的物质和/或物质组合。将药物组合物配制成适合施用于患者以预防和/或治疗疾病。此外,药物组合物是指活性剂与惰性或活性载体的组合,使得该组合物适用于治疗用途。药物组合物可根据其化学和物理性质配制用于口服、肠胃外、局部、吸入、直肠、舌下、经皮、皮下或阴道施用途径。药物组合物包含固体、半固体、液体、经皮治疗系统(TTS)。固体组合物选自片剂、包衣片剂、粉剂、颗粒剂、丸剂、胶囊剂、泡腾片剂或经皮治疗系统。药物组合物还包括液体组合物,其选自本发明的溶液、糖浆、输液、提取物、静脉注射用溶液、输液用溶液或载体系统的溶液。可用于本发明上下文的半固体组合物包括乳液、悬浮液、乳膏、洗剂、凝胶剂、小滴、口含片和栓剂。

[0308] 术语“活性剂”是指药物组合物或制剂中具有生物活性即提供药用价值的物质。根据本发明,药物组合物至少包含根据本发明的结合分子作为活性剂。然而,药物组合物可以包含大于一种的活性剂,它们可以相互结合或相互独立地起作用。活性剂可配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括与游离氨基形成,例如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些,以及与游离羧基形成的那些,例如但不限于衍生自钠、钾、铵的那些、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些。

[0309] 本文使用的术语定义如″A multilingual glossary of biotechnological terms:(IUPAC Recommendations)″,H.G.W.Leuenberger,B.Nagel,and H.Kölbl,Eds.,(1995)Helvetica Chimica Acta,CH-4010Basel,Switzerland所描述的。

[0310] 除非另有说明,否则本发明的实施将采用生物化学、细胞生物学、免疫学和重组DNA技术的常规方法,这些方法在本领域的文献中进行了解释(cf.,e.g.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd Edition,J.Sambrook等人eds.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor 1989)。

[0311] 除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则本文所述的所有方法都可以以任何合适的顺序执行。本文提供的任何和所有实例或实例性语言(如,“例如”)的使用仅旨在更好地说明本发明,而不是对另外要求保护的本发明的范围构成限制。说明书中的任何语言都不应被解释为指示对本发明的实践必不可少的任何未要求保护的元素。

[0312] 具体实施方案

[0313] 在下面的不同方面对本发明进行了更详细的定义。如此定义的每个方面可以与任何其他方面或多个方面组合，除非明确指出相反。特别地，指示为优选的或有利的任何特征可以与指示为优选的或有利的任何其他一个或多于一个特征组合。

[0314] 在第一方面，本发明提供了包含第一多肽链和第二多肽链的结合分子，所述第一多肽链包含第一结合结构域(BD1)和第一修饰EHD2结构域(EHD2-1)；所述第二多肽链包含第二结合结构域(BD2)和第二修饰EHD2结构域(EHD2-2)。EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同。一个为与SEQ ID NO:1具有至少70％序列同一性且在14位没有Cys的氨基酸序列，另一个为与SEQ ID NO:1具有70％同一性并且在102位没有Cys的氨基酸序列。Cys优选被不同的氨基酸置换，优选选自Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn和Tyr，最优选被Ser置换。SEQ ID NO:1的14或102位Cys的置换防止在第一个修饰的EHD2结构域的氨基酸序列的第14位的氨基酸和第二个修饰的EHD2结构域的第102位的氨基酸之间形成二硫键。尽管如此，修饰的EHD2结构域仍然能够在彼此之间形成共价键并且优选地形成一个二硫键，从而充当结合结构域的二聚化结构域。在本发明的结合分子中，结合结构域BD1和BD2一起形成抗原结合位点，从而产生结合分子的结合特性和特征。

[0315] 因此，根据本发明，EHD2-1和EHD2-2彼此共价结合，优选通过二硫键结合。两个修饰的EHD2结构域(EHD2-1和EHD2-2)优选具有相同或至少基本相同的长度，即相同或基本相同数量的氨基酸。

[0316] 不希望受任何理论束缚，一个修饰的EHD2结构域中位置14的Cys置换和另一个修饰的EHD2结构域中位置102的Cys置换防止这两个位置之间形成二硫键。在天然EHD2结构域中，二硫键具有对称性，允许形成同二聚体。修饰的EHD2结构域之间一个二硫键的消耗导致不对称性，仅允许形成异二聚体。因此，通过使用Ser置换第一个修饰EHD2结构域第14位的Cys，并使用Ser置换另一个修饰EHD2结构域第102位的Cys，令人惊讶地发现，通过将第一结合结构域与第一条多肽链中的第一个修饰的EHD2结构域(携带C14置换)融合，并且将第二结合结构域与第二条多肽链中的第二个修饰的EDH2结构域(携带C102置换)融合，可以应用这种异二聚化的结构域产生异二聚化的结合分子。通过进一步将一个修饰的EHD2结构域与Fc区融合，可以产生具有不同特异性的双价、三价或四价分子。两个EHD2结构域中的单个氨基酸置换将突变数量保持在最低水平，这还保持了两个结构域之间的天然界面，同时通过定向或引导的二硫键迫使形成异二聚化。

[0317] 与现有技术相比，使用替代EHD2修饰(hetEHD2)的本发明结合分子具有以下一项或多于一项优点：

[0318] 异二聚体的热稳定性没有降低或至少在较小程度上降低，例如由动态光散射法或差示扫描量热法测定。

[0319] 异二聚体对蛋白水解降解的敏感性没有降低或至少在较小程度上降低。

[0320] 异二聚体的免疫原性没有增加或至少在较小程度上增加。

[0321] 使用修饰的EHD2结构域导致异二聚体的比例高于同二聚体。

[0322] 修饰的EHD2结构域不会干扰铰链区的半胱氨酸。

[0323] 注意，在一个EHD2结构域内产生二硫键的SEQ ID NO:1的C28位和C86位之间的结构域内二硫键优选保留在修饰的EHD2结构域(EHD2-1和EHD2-2)中。

[0324] 根据本发明的结合分子的基本结构示意性地描绘在图2中，结合结构域BD1连接到

EHD2-1并且结合结构域BD2连接到EHD2-2。两种修饰的EHD2结构域一起形成了异二聚化的EHD2作为hetEHD2。

[0325] 根据优选的实施方案，在14位的Cys优选地由选自Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn和Tyr(C14S、C14G、C14A、C14T、C14Q、C14N、C14Y)的氨基酸置换。在本发明最优选的实施方案中，SEQ ID NO:1的第14位的Cys被Ser(C14S)置换。

[0326] 根据其他的的实施方案，第102位的Cys优选地由选自Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn、Tyr(C102S、C102G、C102A、C102T、C102Q、C102N、C102Y)的氨基酸置换。在本发明最优选的实施方案中，SEQ ID NO:1的第102位的Cys被Ser(C102S)置换。尽管上述置换可以任何方式组合，最优选的一组突变是一个修饰的EHD2结构域中的C14S和另一个修饰的EHD2结构域中的C102S。因此，根据一个特别优选的实施方案，修饰的EHD2结构域(EHD2-1和EHD2-2)之一包含置换C14S，而修饰的EHD2结构域中的另一个包含置换C102S。

[0327] 应注意，虽然每个修饰的EHD2结构域(EHD2-1和EHD2-2)可以与SEQ ID NO:1具有至少70％的氨基酸同一性，但优选两个修饰的EHD2结构域的氨基酸序列是就氨基酸序列而言，基本相同，不考虑分别在第14位和第102位的特定置换。

[0328] 还应注意，在所有情况下与SEQ ID NO:1具有至少70％同一性的序列包含特定的置换，例如分别在C14位和C102位的置换。还优选的是，第28位和第86位的半胱氨酸残基被保留并且不发生任何突变，例如单个氨基酸置换。

[0329] 根据本发明优选的实施方案，修饰的EHD2结构域中的一个或两个还在N39位包含单氨基酸置换。在此位置Asn的优选的置换是Gln(N39Q)。

[0330] 根据其他的优选的实施例，结合模块BD1和BD2彼此不同并且各自选自V_H和V_L。或者，BD1和BD2彼此不同并且各自选自TCRα-链和TCRβ-链。

[0331] 本发明的结合分子还可以包含第一Fc链。Fc链可以具有增加或减少的效应子功能。第一Fc链优选与第一或第二多肽之一连接。

[0332] 根据本发明的一个优选实施方案，本发明的结合分子还包括第三结合结构域(BD3)和第四结合结构域(BD4)。结合结构域BD3和结合结构域BD4一起形成抗原结合位点。抗原结合位点可以与BD1和BD2形成的结合位点相同或不同。

[0333] 根据一个实施方案，BD3和BD4彼此不同并且各自选自V_H和V_L。或者，BD3和BD4彼此不同并且各自选自TCRα-链和TCRβ-链。

[0334] 第三结合结构域(BD3)可以位于与第一或第二结合结构域(BD1、BD2)相同的多肽上。同样，第四结合结构域(BD4)可以位于与第一或第二结合结构域(BD1、BD2)相同的多肽上，优选位于与第三结合结构域(BD3)不同的多肽上。

[0335] 根据其他的优选的实施方案，本发明的结合分子还包括第二Fc链。第二Fc链优选与第三或第四多肽之一连接。本发明结合分子中的Fc链允许BD1和BD2与BD3和BD4二聚化，产生二价结合分子。Fc链可以是同二聚化的Fc链或异二聚化的Fc链。根据优选的实施方案，第一Fc链和第二Fc链彼此不同并且形成异二聚化的Fc。

[0336] 根据优选的实施方案，本发明的包含BD3的结合分子的第三多肽链还包含选自C_H1结构域、C_L结构域、第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)和第二个修饰的EHD2域(EHD2-2)的二聚化结构域。因此，本发明结合分子的第四条多肽链包含选自C_L结构域、C_H1结构域、第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)和第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)的相应反结合结构域。换言

之，在BD3包含C_H1结构域的情况下，BD4包含C_L结构域。在BD3包含C_L结构域的情况下，BD4包含C_H1结构域。在BD3包含第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)的情况下，BD4包含第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)。在BD3包含第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)的情况下，BD4包含第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)。修饰的EHD2结构域如上所定义，即EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同。所述修饰的EHD2结构域之一(EHD2-1和EHD2-2)的氨基酸序列是与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性并且在第14位不具有Cys的氨基酸序列，并且所述修饰的EHD2结构域中的另一个(EHD2-1和EHD2-2)的氨基酸序列是与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性并且在第102位不具有Cys的氨基酸序列。如上面所定义的，位置上的Cys优选被不同的氨基酸置换，优选被选自Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn和Tyr、最优选Ser的氨基酸置换。

[0337] 因此，本发明包括单特异性或双特异性二价结合分子。

[0338] 这些结合分子包含包含BD1和BD2的第一多肽链和第二多肽链以及修饰的EHD2结构域EHD2-1和EHD2-2。此外，这些结合分子可以包含第三多肽链和第四多肽链，其包含：

[0339] (i)BD3-C_H1和BD4-C_L；

[0340] (ii)BD3-C_L和BD4-C_H1；

[0341] (iii)BD3-EHD2-1和BD4-EHD2-2;或

[0342] (iv)BD3-EHD2-2和BD4-EHD2-1。

[0343] 图3B和图3C示出了实施方案(i)和(ii)的非限制性实例。图3G示出了实施方案(iii)和(iv)的非限制性实例显，实例为二价单特异性结合分子。根据一个实例性实施方案，结合分子具有如SEQ ID NO:22+23所示的序列。

[0344] 对于双特异性结合分子的产生，Fe区优选是异二聚化的，这意味着第一多肽链和第二多肽链之一包含第一Fc链，第三多肽链和第四多肽链之一包含第二不同的Fc链，它们形成结合分子中的异二聚化的Fc区。图3B和图3C的顶行示出了这种包含异二聚化的Fc区的二价双特异性结合分子的非限制性实例。

[0345] 根据一个实施方案，如果第三多肽链和第四多肽链包含修饰的EHD2结构域，则修饰的EHD2结构域中的一个或两个还包含在N39位的单个氨基酸置换。天冬酰胺在此位置Asn的优选的置换是谷氨酰胺(N39Q)。

[0346] 根据本发明，其中四条不同的多肽链在一个细胞内表达，其使用异二聚化多肽链，其中一条链具有CH1结构域，另一条链包含第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)，与包含C_L结构域的多肽链和包含第二个修饰的EHD2结构域(EHD2-2)的多肽链共表达，观察到同源重链和轻链的正确组装，产生二价双特异性抗体，其保留对各自的完全抗原结合特异性抗原。

[0347] 或者，本发明的结合分子可以包括在三条多肽链上的四个结合结构域。根据各自的实施方案，两个结合结构域分别位于第一多肽链上，另外两个结合结构域分别位于第二和第三多肽链上。

[0348] 图3A示出了这种具有三条多肽链的二价结合分子的实例性实施方案，且可以具有以下多肽链：

[0349] (i)BD1-(任选的接头)-EHD2-2-接头-BD3-(任选的接头)-C_H1

[0350] (ii)BD2-(任选的接头)-EHD2-1

[0351] (iii)BD4-(任选的接头)-C_L

[0352] 如图3A左图所示，在细胞中共表达上述所有三个多肽链时，在所得的根据本发明的结合分子中，多肽链(ii)与(i)的EHD2-1结构域配对，并且多肽链(iii)与(i)的C_H1结构域配对。根据一个实例性实施方案，如图3A所示，结合分子具有如SEQ ID NO:9+13+17所示的序列。

[0353] 在另一实施方案中，根据本发明包含三个多肽链的结合分子可以具有以下多肽链：

[0354] (i)BD3-(任选的接头)-CH1-接头-BD1-(任选的接头)-EHD2-2

[0355] (ii)BD2-(任选的接头)-EHD2-1

[0356] (iii)BD4-(任选的接头)-CL

[0357] 接头为如上述所定义的肽接头。

[0358] 如图3A右图所示，在细胞中共表达上述所有三个多肽链时，在所得的根据本发明的结合分子中，多肽链(ii)与(i)的EHD2-1结构域配对，并且多肽链(iii)与(i)的C_H1结构域配对。根据一个实例性实施方案，结合分子具有如SEQ ID NO:9+13+18所示的序列。

[0359] 应当理解，四价结合分子内的二聚化结构域和结合结构域的顺序或排列和选择可以改变和适应个体需要，只要存在至少一对修饰的EHD2结构域，如本文所定义的，产生异二聚化的EHD2结构域。

[0360] 根据本发明的另一个实施方案，结合分子是二价的并且包含四个多肽链。仅为说明起见，图3B和3C描述了包含四个多肽链的此类三价结合分子的实例性实施方案。结合分子可以具有以下多肽链：

[0361] (i)BD1-(任选的接头)-EHD2-1-Fc

[0362] (ii)BD2-(任选的接头)-EHD2-2

[0363] (iii)BD3-(任选的接头)-C_H1-Fc

[0364] (iv)BD4-(任选的接头)-C_L。

[0365] 如图3B和图3C所示，四条多肽链在细胞中共同表达，根据本发明产生的结合分子包括多肽链(i)和(iii)作为“重链”和多肽链(ii)和(iv)作为相应的“轻链”，(ii)与(i)的EHD2-1结构域配对，(iv)与(iii)的C_H1结构域配对。根据一个实例性实施方案，如图3B所示，结合分子具有如SEQ ID NO:9+10+13+14所示的序列。

[0366] 根据本发明其他的实施方案，结合分子是三价的，因此还包括第五结合结构域(BD5)和第六结合结构域(BD6)。两个结合结构域BD5和结合结构域BD6一起形成抗原结合位点。

[0367] 根据本发明优选的实施方案，结合分子还包括连接BD5的C_H1结构域、C_L结构域、第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)或第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)。在本发明的实施方案中，BD6连接到选自C_L结构域、C_H1结构域、第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)和第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)的相应对应物。换言之，在BD5连接到C_H1结构域的情况下，BD6连接到C_L结构域。在BD5连接到C_L结构域的情况下，BD6连接到C_H1结构域。在BD5连接到第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)的情况下，BD6连接到第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)。在BD5连接到第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)的情况下，BD6连接到第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)。修饰的EHD2结构域如上所定义，即EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同。所述修饰的EHD2结构域之一(EHD2-1和EHD2-2)的氨基酸序列是与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性

并且在第14位不具有Cys的氨基酸序列，并且所述修饰的EHD2结构域中的另一个(EHD2-1和EHD2-2)的氨基酸序列是与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性并且在第102位不具有Cys的氨基酸序列。如上面所定义的，位置上的Cys优选被不同的氨基酸置换，优选被选自Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn和Tyr、最优选Ser的氨基酸置换。

[0368] 如本文所用，术语“连接到”意指两个多肽之间通过直接的肽键或通过如上定义的肽接头的连接。因此，根据一个实施方案，连接到BD5或BD6的C_H1结构域、C_L结构域、EHD2-1或EHD2-2通过接头与BD1、BD2、BD3或BD4之一连接。

[0369] 根据一个实施方案，连接到BD5或BD6的修饰的EHD2结构域中的一个或两个还在第N39位包含单氨基酸置换。天冬酰胺在此位置Asn的优选的置换是谷氨酰胺(N39Q)。

[0370] 根据优选的实施方案，BD5和BD6彼此不同并且各自选自V_H和V_L。或者，BD5和BD6彼此不同并且各自选自TCRα-链和TCRβ-链。

[0371] 根据本发明并包含三个结合位点即三价的结合分子，可以结合相同或不同的靶点，产生三价单特异性、双特异性或甚至三特异性结合分子。优选地，根据本发明的这些三价结合分子，连接到BD5或BD6的C_H1结构域、C_L结构域、EHD2-1或EHD2-2与BD1、BD2、BD3或BD4之一优选通过接头连接。需要强调的是，在这些三价分子中，可以使用一组或两组修饰的EHD2结构域来提供结合结构域的空间排列，从而形成抗原结合位点。

[0372] 根据本发明的三价结合分子因此可以包含基本上三个单元，每个单元形成一个抗原结合位点：

[0373] (i)包含BD1和BD2以及修饰的EHD2结构域EHD2-1和EHD2-2的第一多肽链和第二多肽链；

[0374] (ii)包含BD3和BD4以及修饰的EHD2结构域EHD2-1和EHD2-2或结构域C_H1和C_L的第三多肽链和第四多肽链;以及

[0375] (iii)连接到修饰的EHD2结构域EHD2-1和EHD2-2，或结构域C_H1和C_L的BD5和BD6。

[0376] 根据三价结合分子的优选实施方案，BD5和BD6中的一个与二聚化结构域EHD2-1、EHD2-2、C_H1和C_L中的一个结合形成其他的的第五多肽链的一部分。相应地，BD5和BD6之一的另一个连同与其连接的相应二聚化结构域(EHD2-1、EHD2-2、CH1和CL中的另一个)与BD1、BD2、BD3或BD4中的任一个偶连。

[0377] 仅为说明起见，图3D描述了包含五个多肽链的此类三价结合分子的实例性实施方案。结合分子可以具有以下多肽链：

[0378] (i)BD5-(任选的接头)-C_H1-接头-BD1-(任选的接头)-EHD2-1(任选的接头)-Fc

[0379] (ii)BD2-(任选的接头)-EHD2-2

[0380] (iii)BD3-(任选的接头)-C_H1-Fc

[0381] (iv)BD4-(任选的接头)-C_L

[0382] (v)BD6-(任选的接头)-C_L。

[0383] 如图3D所示，五条多肽链在细胞中共同表达，根据本发明产生的结合分子包括多肽链(i)和(iii)作为“重链”和多肽链(ii)和(iv)和(v)作为相应的“轻链”，(ii)与(i)的EHD2-1结构域配对，(iv)与(iii)的CH1结构域配对，且(v)与(i)的C_H1结构域配对。根据一个实例性实施方案，如图3D所示，结合分子具有如SEQ ID NO:9+13+14+19所示的序列。

[0384] 同样，可以根据个人需求制备其他构造。图3E中显示了另一个非限制性实施方案。

根据本发明的一个实施方案的这种结合分子还包含五个多肽链：

[0385] (i)BD1-(任选的接头)-EHD2-1-(任选的接头)-Fc

[0386] (ii)BD2-(任选的接头)-EHD2-2

[0387] (iii)BD5-(任选的接头)-C_H1-接头-BD3-(任选的接头)-C_H1(任选的接头)-Fc

[0388] (iv)BD4-(任选的接头)-C_L

[0389] (v)BD6-(任选的接头)-C_L。

[0390] 如图3E所示，以上五条多肽链在细胞中共同表达，根据本发明产生的结合分子包括多肽链(i)和(iii)作为“重链”和多肽链(ii)和(iv)和(v)作为相应的“轻链”，(ii)与(i)的EHD2-1结构域配对，(iv)与(iii)的C_H1结构域配对，且(v)与(iii)的C_H1结构域配对。根据一个实例性实施方案，如图3E所示，结合分子具有如SEQ ID NO:9+10+13+20所示的序列。

[0391] 图3F中显示了其他的非限制性实例。根据本发明的一个实施方案的这种结合分子还包含五个多肽链：

[0392] (i)BD1-(任选的接头)-EHD2-1-接头-BD3-(任选的接头)-C_H1(任选的接头)-Fc

[0393] (ii)BD2-(任选的接头)-EHD2-2

[0394] (iii)BD5-(任选的接头)-C_H1-(任选的接头)-Fc

[0395] (iv)BD4-(任选的接头)-C_L

[0396] (v)BD6-(任选的接头)-C_L。

[0397] 如图3F所示，以上五条多肽链在细胞中共同表达，根据本发明产生的结合分子包括多肽链(i)和(iii)作为“重链”和多肽链(ii)和(iv)和(v)作为相应的“轻链”，(ii)与(i)的EHD2-1结构域配对，(iv)与(iii)的C_H1结构域配对，且(v)与(iii)的C_H1结构域配对。根据一个实例性实施方案，如图3F所示，结合分子具有如SEQ ID NO:9+13+14+21所示的序列。

[0398] 需要强调的是，构造中的二聚化结构域和结合结构域的顺序或排列和选择可以改变和适应个体需要，只要至少有一对修改过的EHD2结构域，即本文定义的EHD2-1和EHD2-2。根据本发明的结合分子可以因此具有两对修饰的EHD2结构域。根据本发明的这种结合分子的实例不限于三价结合分子，还包括四价结合分子。

[0399] 根据本发明其他的实施方案，结合分子是三价的，因此还包括第七结合结构域7域(BD7)和第八结合结构域(BD8)。两个结合结构域BD7和结合结构域BD8一起形成抗原结合位点。

[0400] 根据本发明优选的实施方案，结合分子还包括连接BD7的C_H1结构域、C_L结构域、第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)或第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)。在本发明的实施方案中，BD8连接到选自C_L结构域、C_H1结构域、第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)和第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)的相应对应物。换言之，在BD7连接到C_H1结构域的情况下，BD8连接到C_L结构域。在BD7连接到C_L结构域的情况下，BD8连接到C_H1结构域。在BD7连接到第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)的情况下，BD8连接到第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)。在BD7连接到第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)的情况下，BD8连接到第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)。修饰的EHD2结构域如上所定义，即EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同。所述修饰的EHD2结构域之一(EHD2-1和EHD2-2)的氨基酸序列是与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性并且在第14位不具有Cys的氨基酸序列，并且所述修饰的EHD2结构域中的另一个(EHD2-1和EHD2-2)的氨基酸序列是与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性并且在第102位不具有

Cys的氨基酸序列。如上面所定义的，位置上的Cys优选被不同的氨基酸置换，优选被选自Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn和Tyr、最优选Ser的氨基酸置换。

[0401] 如本文所用，术语“连接到”意指两个多肽之间通过直接的肽键或通过如上定义的肽接头的连接。因此，根据一个实施方案，连接到BD7或BD8的C_H1结构域、C_L结构域、EHD2-1或EHD2-2通过接头与BD1、BD2、BD3、BD4、BD5或BD6之一连接。

[0402] 根据一个实施方案，连接到BD7或BD8的修饰的EHD2结构域中的一个或两个还在N39位包含单氨基酸置换。天冬酰胺在此位置Asn的优选的置换是谷氨酰胺(N39Q)。

[0403] 根据优选的实施方案，BD7和B86彼此不同并且各自选自V_H和V_L。或者，BD7和BD8彼此不同并且各自选自TCRα-链和TCRβ-链。

[0404] 根据本发明并包含四个结合位点即四价结合分子，可以结合相同或不同的靶点，产生四价单特异性、双特异性或甚至四特异性结合分子。优选地，根据本发明的这些四价结合分子，连接到BD7或BD8的C_H1结构域、C_L结构域、EHD2-1或EHD2-2与BD1、BD2、BD3、BD4、BD5或BD6之一优选通过接头连接。需要强调的是，在这些四价分子中，可以使用一组或两组修饰的EHD2结构域来提供结合结构域的空间排列，从而形成抗原结合位点。

[0405] 根据本发明的四价结合分子因此可以包含基本上四个单元，每个单元形成一个抗原结合位点：

[0406] (i)包含BD1和BD2以及修饰的EHD2结构域EHD2-1和EHD2-2的第一多肽链和第二多肽链；

[0407] (ii)包含BD3和BD4以及修饰的EHD2结构域EHD2-1和EHD2-2或结构域C_H1和C_L的第三多肽链和第四多肽链；

[0408] (iii)连接到修饰的EHD2结构域EHD2-1和EHD2-2，或结构域C_H1和C_L的BD5和BD6；和

[0409] (iv)连接到修饰的EHD2结构域EHD2-1和EHD2-2或结构域C_H1和C_L的BD7和BD8。

[0410] 根据四价结合分子的优选实施方案，BD7和BD8中的一个与二聚化结构域EHD2-1、EHD2-2、C_H1和C_L中的一个结合形成其他的的第六多肽链的一部分。相应地，BD7和BD8之一的另一个连同与其连接的相应二聚化结构域(EHD2-1、EHD2-2、C_H1和C_L中的另一个)与BD1、BD2、BD3、BD4、BD5或BD6中的任一个偶连。

[0411] 图3H和图3I示出了根据本发明的四价结合分子的非限制性实例。根据本发明的四价结合分子的非限制性实例可以包括六条多肽链。这种结合分子的非限制性实施方案可以具有以下多肽链：

[0412] (i)BD5-(任选的接头)-C_H1-接头-BD1-(任选的接头)-EHD2-1(任选的接头)-Fc

[0413] (ii)BD2-(任选的接头)-EHD2-2

[0414] (iii)BD7-(任选的接头)-C_H1-接头-BD3-(任选的接头)-EHD2-1(任选的接头)-Fc

[0415] (iv)BD4-(任选的接头)-EHD2-2

[0416] (v)BD6-(任选的接头)-C_L

[0417] (vi)BD8-(任选的接头)-C_L。

[0418] 如图3H所示，以上六条多肽链在细胞中共同表达，根据本发明产生的结合分子包括多肽链(i)和(iii)作为“重链”和多肽链(ii)和(iv)和(v)作为相应的“轻链”，(ii)与(i)的EHD2-1结构域配对，(iv)与(iii)的EHD2-1结构域配对，且(v)与(i)的C_H1结构域配对，和(vi)与(iii)的C_H1结构域配对。根据一个实例性实施方案，如图3H所示，结合分子具有如

SEQ ID NO:23+24+25所示的序列。

[0419] 如图3I示出了根据本发明的四价结合分子的其他的非限制性实例。这种结合分子的非限制性实施方案可以具有以下六条多肽链：

[0420] (i)BD1-(任选的接头)-EHD2-1-接头-BD5-(任选的接头)-C_H1(任选的接头)-Fc

[0421] (ii)BD2-(任选的接头)-EHD2-2

[0422] (iii)BD3-(任选的接头)-EHD2-1-接头-BD7-(任选的接头)-C_H1(任选的接头)-Fc

[0423] (iv)BD4-(任选的接头)-EHD2-2

[0424] (v)BD6-(任选的接头)-C_L

[0425] (vi)BD8-(任选的接头)-C_L。

[0426] 如图3I所示，以上六条多肽链在细胞中共同表达，根据本发明产生的结合分子包括多肽链(i)和(iii)作为“重链”和多肽链(ii)和(iv)和(v)作为相应的“轻链”，(ii)与(i)的EHD2-1结构域配对，(iv)与(iii)的C_H1结构域配对，且(vi)与(iii)的C_H1结构域配对。根据一个实例性实施方案，如图3I所示，结合分子具有如SEQ ID NO:23+25+26所示的序列。

[0427] 应当理解，如上文针对根据本发明的三价结合分子所阐述的那样，四价结合分子内的二聚化结构域和结合结构域的顺序或排列和选择可以改变和适应个体需要，只要存在至少两对如本文定义的修饰的EHD2结构域。

[0428] 根据本发明的一个实施方案，在本发明的结合分子中，一个或多于一个修饰的EHD2结构域携带一个N-聚糖。这可以例如通过在第N39位优选置换其他的氨基酸来实现。优选的氨基酸置换是在该位置用谷氨酰胺置换天冬酰胺(N39Q)。图4示意性和实例性地显示了修饰的EHD2结构域(EHD2-1、EHD2-2)在两个结构域(EHD2-1和EHD2-2)中携带N-聚糖，仅在一个结构域(EHD2-1或EHD2-2)，或完全缺乏N-聚糖。

[0429] 再次强调修饰的EHD2结构域中所需的Cys置换位于SEQ ID NO:1的第14位或第102位。相应第14位和第102位的Cys可以被任何氨基酸置换。对于第14位和第102位，置换的氨基酸可以相同或不同。根据优选的实施方案，第一修饰的EHD2结构域包含选自由C14S、C14G、C14A、C14T、C14Q、C14N、C14Y、优选C14S的置换。根据该实施方案，第二修饰的EHD2结构域包含选自由C102S、C102G、C102A、C102T、C102Q、C102N、C102Y、优选C102S的置换。

[0430] 根据本发明，本发明的结合分子可以结合的一种或多于一种抗原可以选自但不限于：ABCF1、ACVR1、ACVR1B、ACVR2、ACVR2B、ACVRL1、ADORA2A、聚集蛋白聚糖、AGR2、AICDA、AIF1、AIG1、AKAP1、AKAP2、ALK、AMH、AMHR2、ANGPT1、ANGPT2、ANGPTL3、ANGPTL4、ANPEP、APC、APOC1、AR、AXL、AZGP1(锌-a-糖蛋白)、B7.1、B7.2、BAD、BAFF、BAFF-R、BAG1、BAI1、BCL2、BCL6、BCMA、BDNF、BLNK、BLR1(MDR15)、BlyS、BMP1、BMP2、BMP3B(GDF10)、BMP4、BMP6、BMP8、BMPR1A、BMPR1BBMPR2、BPAG1(网蛋白)、BRCA1、B7-H3、C19orf10(IL27w)、C1s、C3、C4A、C5、C5R1、CA-125、CANT1、CASP1、CASP4、CAV1、CCBP2(D6/JAB61)、CCL1(1-309)、CCL11(嗜酸粒细胞趋化因子)、CCL13(MCP-4)、CCL15(MIP-1d)、CCL16(HCC-4)、CCL17(TARC)、CCL18(PARC)、CCL19(MIP-3b)、CCL2(MCP-1)、MCAF、CCL20CMJP-3a)、CCL21(MIP-2)、SLC、exodus-2、CCL22(MDC/STC-1)、CCL23(MPIF-1)、CCL24(MPIF-2/嗜酸粒细胞趋化因子-2)、CCL25(TECK)、CCL26(嗜酸粒细胞趋化因子-3)、CCL27(CTACK/ILC)、CCL28、CCL3(MIP-1a)、CCL4(MIP-1b)、CCL5(RANTES)、CCL7(MCP-3)、CCL8(mcp-2)、CCNA1、CCNA2、CCND1、CCNE1、CCNE2、CCR1(CKR1/HM145)、CCR2(mcp-1RB/RA)、CCR3(CKR3CMKBR3)、CCR4、CCR5(CMKBR5/ChemR13)、CCR6

(CMKBR6/CKR-L3STRL22/DRY6)、CCR7(CKR7EB11)、CCR8(CMKBR81/TER1/CKR-L1)、CCR9(GPR-9-6)、CCRL1(VSHK1)、CCRL2(L-CCR)、CD164、CD5、CD7、CD15、CD19、CD1G、CD11a、CD20、CD200、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD37、CD38、CD3E、CD3G、CD3Z、CD4、CD40、CD40L、CD41、CD4SRB、CD51、CD52、CD56、CD6、CD62L、CD70、CD72、CD73、CD74、CD79A、CD79B、CDB、CD80、CD81、CD83、CD86、CD105、CD117、CD123、CD125、CD137L、CD137、CD147、CD152、CD154、CD221、CD276、CD279、CD319、CDH1(钙黏附蛋白)、CDH10、CDH12、CDH13、CDH18、CDH19，CDH20、CDH5、CDH7、CDH8、CDH9、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK9、CDKN1A(p21Wap1/Cip1)、CDKNIB(p27Kipl)、CDKN1C、CDKN2A(p16INK4a)、CDKN2B、CDKN2C、CDKN3、CEA、CEACAM5、CEBPB、CER1、CFD、CHGA、CHGB、壳多糖酶、CHST10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、CLDN3、CLDN7(密封蛋白-7)、CLDN18.2、CLN3、CLU(簇集素)、cMET、CMKLR1、CMKOR1(RDC1)、CNR1、COL18A1、COL1A1、COL4A3、COL6A1、CR2、CRP、CSF1(M-CSF)、CSFR1、CSF2(GM-CSF)、CSF3(GCSF)、CTLA4、CTNNB1(b-联蛋白)、CTSB(组织蛋白酶B)、CX3CL1(SCYD1)、CX3CR1(V28)、CXCL1(GRO1)、CXCL10(IP-10)、CXCL11(I-TAC/IP-9)、CXCL12(SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、CXCL2(GRO2)、CXCL3(GRO3)、CXCL5(ENA-78/LIX)、CXCL6(GCP-2)、CXCL9(MIG)、CXCR3(GPR9/CKR-L2)、CXCR4、CXCR6(TYMSTR/STRL33/Bonzo)、CYB5、CYC1、CYSLTR1、DAB2IP、DES、DKFZp451J0118、DNCL1、DLL3、DPP4、DR3、DR4、DR5、DR6、E2F1、ECGF1、EDA1、EDA2、EDAR、EDA2R、EDG1、EpCAMEFNA1、EFNA3、EFNB2、EGF、EGFL7、EGFR、ELAC2、ENG、ENO1、ENO2、ENO3、EPHA3、EPHB4、EPO、ERBB2(Her-2)、EREG、ERK8、ESR1、ESR2、F3(TF)、F9orF9a、F10orF10a、FADD、FAP、FasL、FASN、FCER1A、FCER2、FCGR3A、FGF、FGF1(aFGF)、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF2(bFGF)、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3(int-2)、FGF4(HST)、FGF5、FGF6(HST-2)、FGF7(KGF)、FGF8、FGF9、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FIGF(VEGFD)、FIL1(EPSILON)、FIL1(ZETA)、FLJ12584、FLJ25530、FLRT1(纤连蛋白)、FLT1、叶酸受体1、FOS、FOSL1(FRA-1)、FY(DARC)、GABRP(GABAa)、GAGEB1、GAGEC1、GALNAC4S-GST、GATA3、白明胶酶B、GD2、GD3、GDF5、GDF8、GFI1、GGT1、GITR、GITRL、GM-CSF、GNAS1、GNRH1、GPNMB、GPR2(CCR10)、GPR31、GPR44、GPR81(FKSG80)、GRCC10(C10)、GRP、GSN(凝溶胶蛋白)、GSTP1、HAVCR2、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、HER2、HER3、HER4、HGF、H1F1A、HIP1、组胺和组胺受体、HLA-A、HLA-DRA、HM74、HMOX1、HMW-MAAHsp-90、HVEM、TNF-RHUMCYT2A、ICAM-1、ICEBERG、ICOSL、ID2、IFN-a、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNB1、IFNγ、IFNW1、IGBP1、IGF1、IGF1R、IGP1R、IGF2、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP6、IGHE、IL-1、IL10、IL10RA、IL10RB、IL11、IL11RA、IL-12、IL12A、IL12B、IL12RB1、IL12RB2、IL13、IL13RA1、IL13RA2、IL14、IL15、IL15RA、IL16、IL17、IL17B、IL17C、IL17R、IL18、IL18BP、IL18R1、IL18RAP、IL19、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、TL1F9、IL1HY1、IL1R1、IL1R2、ILLRAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RL1、IL1RL2IL1RN、IL2、IL24、IL20RA、IL21R、IL22、IL22R、IL22RA2、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3、IL30、IL3RA、IL4、IL4R、IL5、IL5RA、IL6、IL6R、IL6ST(糖蛋白130)、IL7、IL7R、IL8、IL8RA、IL8RB、IL8RB、IL9、IL9R、ILK、INHA、INHBA、INSL3、INSL4、整联蛋白αvβ3、整联蛋白β7、IRAK1、IRAK2、TGA1、ITGA2、ITGA3、ITGA6(a6整联蛋白)、ITGAV、JTGB3、ITGB4(b4整联蛋白)、JAG1、JAK1、JAK3、JUN、K6HF、KAI1、KDR、KIR2D、KITLG、KLF5(GCBoxBP)、KLF6、KLK10、KLK12、KLK13、KLK14、KLK15、KLK3、KLK4、KLK5、KLK6、KLK9、

KRT1、KRT19(角蛋白19)、KRT2A、KRTHB6(毛发特有的II型角蛋白)、LAMA5、LEP(瘦蛋白)、LEY、LIGHT、Lingo-p75、Lingo-Troy、LIV-1、LPS、LTA(TNF-b)、LTB、LTB4R(GPR16)、LTB4R2、LTBR、MACMARCKS、MAGorOmgp、MAP2K7(c-Jun)、MCAM、MCSP、MDK、MET、MER、MIB1、中期因子、MIF、MIP-2、MKI67(Ki-67)、MMP2、MMP9、MSLN、MS4A1、MSMB、MT3(金属硫蛋白-III)、MTSS1、MUC1(黏蛋白)、MUC2、MYC、MYD88、肌生成抑制蛋白、NCA-2、NCK2、连接蛋白-4、神经蛋白聚糖、NFKB1、NFKB2、NGFB(NGF)、NGFR、NgRLingo、NOGO-A、NgR-Nogo66(Nogo)、NgR-p75、NgR-Troy、NME1(NM23A)、NOTCH-1、NOX5、NPPB、NR0B1、NR0B2、NR1D1、NR1D2、NR1H2、NR1H3、NR1H4、NR1I2、NR1I3、NR2C1、NR2C2、NR2E1、NR2E3、NR2F1、NR2F2、NR2F6、NR3C1、NR3C2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、NR5A1、NR5A2、NR6A1、NRP1、NRP2、NT3、NT4、NT5E、NTN4、ODZ1、OPRD1、OX40、OX40L、P2RX7、PAP、PART1、PATE、PAWR、PCA3、PCDC1、PCNA、PCSK9、PD1、PD-L1、PDGFA、PDGFB、PDGR、igfPECAM1、PF4(CXCL4)、PGF、PGR、磷酸肌酸蛋白多糖、PIAS2、PIK3CG、PLAU(uPA)、uPAR、PLG、PLXDC1、PPBP(CXCL7)、PPID、PR1、PRKCQ、PRKD1、PRL、PROC、PROK2、PSAP、PSCA、PSMA、PTAFR、PTEN、PTGS2(COX-2)、PTN、PTK7、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、RAC2(p21Rac2)、RANK、RANKL、RARB、RELT、RET、RGS1、RGS13、RGS3、RNF110(ZNF144)、ROBO2、RON、ROR1、ROR2、RYK、S100A2、SCGB1D2(亲脂素B)、SCGB2A1(乳腺球蛋白2)、SCGB2A2(乳腺球蛋白1)、SCYE1(内皮单核细胞因子)、SDF2、SERPINA1、SERPINA3、SERPINB5(乳腺丝抑蛋白)、SERPINE1(PAI-1)、SERPINF1、SHBG、SLA2、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、SLIT2、SPAK、SPP1、SPRR1B(Spr1)、SOST、ST6GAL1、STAB1、STAT6、STEAP、STEAP2、TAC1、TAG-72、微管蛋白、TB4R2、TBX21、TCP10、TDGF1、TEK、TGFA、TGFB1、TGPB1I1、TGFB2、TGFB3、TGFBI、TGFBR1、TGFBR2、TGFBR3、TH1L、THBS1(凝血活酶-1)、THBS2、THBS4、THPO、TIE(Tie-1)、TIE-1、TIE-2、TIMP3、组织因子、TLR10、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TNF、TNF-a、TNF-b、TNFAIP2(B94)、TNFAIP3、TNFRSF11A、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSP21、TNFRSF5、TNFRSF6(Fas)、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF11(TRANCE)、TNFSF12(APO3L)、TNFSF13(April)、TNPSF13B、TNFSF14(HVEM-L)、TNFSF15(VEGI)、TNFSF18、TNFSF4(OX40配体)、TNFSF5(CD40配体)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27ligand)、TNFSF8(CD30配体)、TNFSF9(4-1BB配体)、TNF-R1、TNF-R2、TOLLIP、Toll-样受体、TOP2A(拓扑异构酶Iia)、TP53、TPM1、TPM2、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5、TRAF6、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4、TREM1、TREM2、TRPC6、TROY、TSLP、TWEAK、TYRO3、TYRP1、VAP-1、VEGF、VEGFB、VEGFC、多能蛋白聚糖、VHLC5、波形蛋白、VLA-4、VWF、XCL1(淋巴细胞趋化蛋白)、XCL2(SCM-1b)、XCR1(GPR5/CCXCR1)、YY1和ZFPM2。

[0431] 根据优选的实施方案,本发明的结合分子结合到免疫效应细胞上的触发分子,如T细胞上的CD3,作为T细胞受体(TCR)的一部分(Brinkmann&Kontermann,2017,mAbs 9:182-212)。根据本发明,免疫效应细胞上的触发分子的非限制性实例选自但不限于CD2、CD3、CD16、CD44、CD64、CD69、CD89、Mel14、Ly-6.2C、TCR-复合物、Vy9V52TCR或NKG2D。

[0432] 根据其他的实施方案,本发明的结合分子与MET(5D5)结合(Jin等人,2008,Cancer Res.68,4360-4368)。

[0433] 根据本发明的二价、三价或四价结合分子的最优选的实施方案与HER3的一个、两个或三个结合位点结合,以及与CD3各自剩余的一个、两个或三个结合位点结合。实施例2提供了与HER3和CD3结合的优选双特异性和二价结合分子的实例。

[0434] 根据本发明的二价、三价或四价结合分子的其他最优选的实施方案与HER3的一个、两个或三个结合位点结合，以及与MET各自剩余的一个、两个或三个结合位点结合。甚至更优选地，如下文实施例1中所示例的本发明的结合分子与MET和HER3是双特异性和二价结合的。

[0435] 本发明的结合分子还可包含肽前导序列；一种或多于一种有助于纯化的分子，优选六组氨酰-标签或FLAG-标签；和/或一种或多于一种共刺激分子。

[0436] 在本发明的结合分子用于细胞-细胞募集的实施方案中，例如，如果将免疫效应细胞(如T细胞或巨噬细胞)募集到肿瘤细胞，则优选结合分子的两个配价与肿瘤细胞结合，而剩余的一或两个配价与免疫效应细胞结合。这种方法一方面提供与肿瘤细胞的高亲和力结合，并防止免疫效应细胞激活，这可能是由于免疫效应细胞上靶点的二价结合所致。

[0437] 根据本发明，修饰的EHD2结构域具有与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性的氨基酸序列。优选地，与SEQ ID NO:1的偏差是保守置换。更优选地，这些置换不包括将一个或多于一个氨基酸残基置换为半胱氨酸。引入的突变优选不引起链间二硫键的形成，即第一修饰的EHD2结构域和第二修饰的EHD2结构域之间的额外二硫键。例如，可以根据所涉及的氨基酸残基在极性、电荷、大小、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性等方面的相似性进行“保守置换”。氨基酸可分为以下六类标准氨基酸：

[0438] (1)疏水的:Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0439] (2)中性亲水的:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0440] (3)酸性的:Asp、Glu；

[0441] (4)碱性的:His、Lys、Arg；

[0442] (5)影响链取向的残基:Gly、Pro；和

[0443] (6)芳香的:Trp、Tyr、Phe。

[0444] 如本文所用，“保守置换”定义为氨基酸被上面所示的六个标准氨基酸组的同一组中列出的另一氨基酸交换。例如，谷氨酸对天冬氨酸的交换在如此修饰的多肽中保留了一个负电荷。此外，甘氨酸和脯氨酸可以根据它们破坏α-螺旋的能力相互置换。上述六组中的一些优选的保守置换是以下子组中的交换:(i)Ala、Val、Leu和Ile；(ii)Ser和Thr；(ii)Asn和Gln；(iv)Lys和Arg；以及(v)Tyr和Phe。鉴于已知的遗传密码以及重组和合成DNA技术，本领域的技术人员可以容易地构建编码保守氨基酸变体的DNA。

[0445] 如本文所用，“非保守置换”或“非保守氨基酸交换”定义为氨基酸被六个标准氨基酸组(1)至(6)中不同组中列出的另一氨基酸交换。

[0446] 根据本发明的特别优选的分子包括：

[0447] (1)具有轻链V_L3-43-$C_L\lambda$(SEQ ID NO:13)和重链V_H3-43-C_H1-Fc_{knob}(SEQ ID NO:14)的恒定部分，与(i)HC1-LC2中的组合导致eIgG1(重链:V_H5D5-EHD2-1(N39Q)-Fc_{hole}(SEQ ID NO:12)，轻链:V_L5D5-EHD2-2(SEQ ID NO:11))，或(ii)HC2-LC1产生eIgG2(重链:V_H5D5-EHD2-2-Fc_{hole}(SEQ ID NO:10)，轻链:V_L5D5-EHD2-1(N39Q)(SEQ ID NO:9))组合；

[0448] (2)轻链V_L3-43-$C_L\lambda$(SEQ ID NO:13)和重链V_H3-43-C_H1-Fc_{knob}(SEQ ID NO:14)与eIgG(重链:$V_H$huU3-EHD2-2-Fc_{hole}(SEQ ID NO:16)，轻链:$V_L$huU3-EHD2-1(N39Q)(SEQ ID NO:15))；

[0449] (3)SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15所指定的轻链和SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、

SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:41所指定的重链；

[0450] (4)轻链V_L3-43-$C_L\lambda$(SEQ ID NO:13)与重链V_H3-43-C_H1-Fc_{knob}(SEQ ID NO:14)配对，且轻链$V_L$hu36-EHD2-1(N39Q)(SEQ ID NO:43)与重链$V_H$hu36-EHD2-2-Fc_{hole}(SEQ ID NO:42)配对，

[0451] (5)轻链V_L3-43-EHD2-1(N39Q)(SEQ ID NO:23)和重链V_H3-43-EHD2-2-Fc(SEQ ID NO:22)；

[0452] (6)轻链V_L3-43-EHD2-1(N39Q)(SEQ ID NO:23)和$V_L$hu225-$C_L\kappa$(SEQ ID NO:25)，和重链$V_H$hu225-C_H1-V_H3-43-EHD2-2-Fc(SEQ ID NO:24)；

[0453] (7)轻链V_L3-43-EHD2-1(N39Q)(SEQ ID NO:23)和$V_L$hu225-$C_L\kappa$(SEQ ID NO:25)，和重链$V_H$hu225-C_H1-V_H3-43-EHD2-2(SEQ ID NO:44)；

[0454] (8)包含轻链$V_L$hu36-CLκ(SEQ ID NO:45)和重链$V_H$hu36-C_H1-Fc(hole)(SEQ ID NO:46)的第一分子，具有CD3靶向臂和轻链V_H2C11-EHD2-1(N39Q)(SEQ ID NO:47)和重V_L2C11-EHD2-2-Fc(knob)(SEQ ID NO:48)，以及包含轻链V_L2C11-EHD2-1(N39Q)(SEQ ID NO:49)NO:49)和重链V_H2C11-EHD2-2-Fc(knob)(SEQ ID NO:50)的第二分子；

[0455] (9)轻链V_LS309-CLκ(SEQ ID NO:51)和V_LP2B-2F6-EHD2-1(N39Q)(SEQ ID NO:52)，和重链V_HS309-C_H1-V_HP2B-2F6-EHD2-2-Fc(SEQ ID NO:53)。

[0456] 根据本发明的最优选的分子包括：

[0457] (i)SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16；

[0458] (ii)SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:20；

[0459] (iii)SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40；

[0460] (iv)SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:41；

[0461] (v)SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25。

[0462] 根据本发明的其他优选的分子包括以上(1)至(9)和(i)至(v)所确定的分子，其具有与以上(1)至(9)和(i)至(v)的确定的序列至少90％的序列同一性。优选与以上(1)至(9)和(i)至(v)的确定的序列具有91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性。应当理解，序列同一性可以指分别在以上每项(1)至(9)和(i)至(v)下确定的单个序列中的一个、两个、三个或四个。优选地，与以上在(1)至(9)和(i)至(v)中确定的序列具有至少90％或大于90％的序列同一性的这些分子还保持与衍生自包含上述(1)至(9)和(i)至(v)序列的各自的分子各自的基本相同或保持相同的生物学功能。优选地，本文所用的术语“生物学功能”指的是结合特异性和/或亲和力。维持基本相同的生物学功能是指意味着结合特异性和/或亲和性至少为各自分子的50％，各自的分子包括由上述(1)至(9)和(i)至(v)确定并由其衍生的序列，优选地结合特异性和/或亲和力至少为60％、70％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％。对于技术人员来说确定结合和/或亲和力是公知的并且可以例如通过表面等离子体激元共振技术和/或体外释放试验检测。

[0463] 本领域技术人员将理解，根据本发明的分子可以携带或可以不携带组氨酸标签(His-标签、6xHis标签等)或在一个或多于一个多肽上如实例所述的类似的添加或标记，以便于容易地纯化。本领域技术人员容易理解，此类附加结构对本文所述的分子功能特性没有特定影响。

[0464] 根据另一方面，本发明提供编码根据本发明的结合分子的核酸或核酸集合。核酸可以被核酸内切酶或核酸外切酶降解，特别是可以在细胞中发现的DNase和RNase。因此，修饰本发明的核酸以使其稳定以防降解可能是有利的，从而确保在细胞中长时间保持高浓度的核酸。通常，可以通过引入一个或多于一个核苷酸间磷基团或通过引入一个或多于一个非磷核苷酸间来获得这种稳定。因此，核酸可以由非天然存在的核苷酸和/或天然存在的核苷酸的修饰和/或分子骨架的变化组成。核酸中修饰的核苷酸间磷酸基团和/或非磷桥包括但不限于膦酸甲酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、二硫代磷酸酯和/或磷酸酯，而非磷核苷酸间类似物包括但不限于硅氧烷桥、碳酸酯桥、羧甲基酯、乙酰胺桥和/或硫醚桥。核酸中修饰的核苷酸间磷酸基团和/或非磷桥包括但不限于：5′核苷酸或3′核苷酸的磷酸化，分别用于连接或防止外切酶降解/聚合酶扩展；用于共价和近共价连接的氨基、硫醇、炔烃或生物素修饰；荧光团和猝灭剂；修饰的碱基例如去羟肌苷(dI)、5-溴脱氧尿苷、脱氧尿苷、2-氨基嘌呤、2,6，二氨基嘌呤、反向dT、反向双脱氧-T、双脱氧胞苷(ddC 5-甲基脱氧胞苷(5-甲基dC)、锁核酸(LNA's)、5-硝基吲哚、Iso-dC和-dG碱、2‘-O-甲基RNA基、羟甲基dC、5-羟基丁基-2′脱氧尿苷、8-硫唑嘌呤-7-脱氮鸟嘌呤核苷氟修饰的碱基。因此，核酸也可以是人工核酸，包括但不限于聚酰胺或肽核酸(PNA)、吗啉和锁核酸(LNA)，以及乙二醇核酸(GNA)和苏糖核酸(TNA)。

[0465] 应当理解，在根据本发明的结合分子的任何上述基本排列和实施方案中，存在可用于连接其他的功能性的多肽链的游离N-末端和/或C-末端基团。或者或另外地，官能团，特别是药物活性部分和/或成像分子可以偶联至多肽链内氨基酸的侧链，例如Lys、Arg、Glu或Asp。

[0466] 常见的表达系统包括大肠杆菌宿主细胞和质粒载体、昆虫宿主细胞和杆状病毒载体，以及哺乳动物宿主细胞和载体。宿主细胞的其他实例包括但不限于原核细胞(例如细菌)和真核细胞(例如酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞等)。具体实例包括大肠杆菌、克鲁维酵母或酵母菌、哺乳动物细胞系(例如，Vero细胞、CHO细胞、3T3细胞、COS细胞等)以及原代或已建立的哺乳动物细胞培养物(例如，由成淋巴细胞、成纤维细胞、胚胎细胞、上皮细胞、神经细胞、脂肪细胞等产生)。实例还包括小鼠SP2/0-Ag14细胞(ATCC CRL1581)、小鼠P3X63-Ag8.653细胞ATCC CRL1580)、二氢叶酸还原酶基因(以下称为“DHFR基因”)有缺陷的CHO细胞(Urlaub G等人；1980)、大鼠YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20细胞(ATCC CRL1662，以下称为“YB2/0细胞”)、HEK293细胞等。优选地宿主细胞为HEK293-6E细胞(Durocher等人，2002，Nucl.Acids Res.30(2)e9)或CHO细胞。

[0467] 因此，根据其他的方面，本发明提供了包含本发明的核酸或核酸集合的载体。用于在宿主细胞中表达核酸的合适载体是本领域公知的。

[0468] 本发明还涉及产生表达根据本发明的结合分子的重组宿主细胞的方法，所述方法包括或组成为以下步骤：(i)将上述核酸或核酸集合或载体在体外或离体下引入感受态宿主细胞，(ii)体外或离体培养获得的重组宿主细胞，和(iii)，任选地，选择表达和/或分泌所述结合分子的细胞。

[0469] 因此，本发明提供了包含本发明载体的宿主细胞。

[0470] 根据其他的实施方案，本发明提供包含本发明的结合分子、核酸或核酸集合、载体或宿主细胞的药物组合物作为活性分子，以及药学上可接受的载体和/或合适的赋形剂。药

物组合物还可以包含一种或多于一种其他活性剂。药物组合物优选选自固体、液体、半固体或经皮治疗系统。设想本发明的药物组合物包含本发明第一方面的一种或多于一种复合物。

[0471] 在其他方面，本发明涉及本发明的结合分子、核酸或核酸集合、载体、宿主细胞或药物组合物，其用于医学。

[0472] 本发明的结合分子、核酸或核酸集合、载体、宿主细胞或药物组合物特别适用于治疗癌症。

[0473] 本发明特别适于以下项目：

[0474] 项目1、一种结合分子，其包含：

[0475] 包含第一结合结构域(BD1)和第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)的第一多肽链，和

[0476] 包含第二结合结构域(BD2)和第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)的第二多肽链，

[0477] 其中氨基酸序列EHD2-1和EHD2-2彼此不同，并且每个选自(i)与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性且在14位不具有Cys的氨基酸序列，或(ii)与与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性且在102位不具有Cys的氨基酸序列。

[0478] 其中BD1和BD2一起形成抗原结合位点，EHD2-1和EHD2-2彼此共价结合。

[0479] 项目2、根据项目1所述的结合分子，其中修饰的EHD2结构域中的一个或两个还在N39位包含单氨基酸置换。

[0480] 项目3、根据项目1至2中任一项所述的结合分子，其中BD1和BD2彼此不同并且各自选自V_H和V_L或选自TCRα-链的可变区和TCRβ-链的可变区。

[0481] 项目4、根据项目1至3中任一项所述的结合分子，其还包含第一Fc链。

[0482] 项目5、根据项目1至4中任一项所述的结合分子，其还包含第三结合结构域(BD3)和第四结合结构域(BD4)，其中BD3和BD4一起形成抗原结合位点。

[0483] 项目6、根据项目5所述的结合分子，其中BD3和BD4彼此不同并且各自选自V_H和V_L或选自TCRα-链的可变区和TCRβ-链的可变区。

[0484] 项目7、根据项目5或6所述的结合分子，其中结合分子还包含第三多肽链，优选地其中结合分子还包含第三多肽链和第四多肽链。

[0485] 项目8、根据项目5至7中任一项所述的结合分子，其还包含第二Fc链。

[0486] 项目9、根据项目8所述的结合分子，其中第一Fc链和第二Fc链彼此不同并且形成异二聚体的Fc。

[0487] 项目10、根据项目5至9中任一项所述的结合分子，其为单特异性或双特异性的。

[0488] 项目11、根据项目5至10中任一项所述的结合分子，其中包含BD3的第三多肽链还包含以下中的一个：

[0489] (i)C_H1结构域，

[0490] (ii)C_L结构域，

[0491] (iii)第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)，和

[0492] (iv)第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)，

[0493] 且其中包含BD4的第四多肽链

[0494] 在(i)的情况下还包含C_L结构域，

[0495] 在(ii)的情况下还包含C_H1结构域，

[0496] 在(iii)的情况下还包含第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2),和

[0497] 在(iv)的情况下还包含第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1),

[0498] 其中氨基酸序列EHD2-1和EHD2-2彼此不同,并且每个选自与SEQ ID NO:1具有至少70%氨基酸同一性且在14位不具有Cys的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1具有70%氨基酸同一性且在102位不具有Cys的氨基酸序列。

[0499] 项目12、根据项目11所述的结合分子,其中第三多肽链或第四多肽链的修饰的EHD2结构域中的一个或两个还在N39位包含单氨基酸置换。

[0500] 项目13、根据项目5至12中任一项所述的结合分子,其还包含第五结合结构域(BD5)和第六结合结构域(BD6),其中BD5和BD6一起形成抗原结合位点。

[0501] 项目14、根据项目13所述的结合分子,其还包含:

[0502] 连接至BD5的

[0503] (i)C_H1结构域,

[0504] (ii)C_L结构域,

[0505] (iii)第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1),或

[0506] (iv)第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2),

[0507] 和

[0508] 连接中BD6的

[0509] 在(i)的情况下的C_L结构域,

[0510] 在(ii)的情况下的C_H1结构域,

[0511] 在(iii)的情况下的第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2),和

[0512] 在(iv)的情况下的第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1),

[0513] 其中EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同,并且每个选自与SEQ ID NO:1具有至少70%氨基酸同一性且在14位不具有Cys的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1具有70%氨基酸同一性且在102位不具有Cys的氨基酸序列。

[0514] 项目15、根据项目14所述的结合分子,其中连接至BD5或BD6的修饰的EHD2结构域中的一个或两个还在N39位包含单氨基酸置换。

[0515] 项目16、根据项目14或15所述的结合分子,其中BD5和BD6彼此不同并且各自选自V_H和V_L或选自TCRα-链的可变区和TCRβ-链的可变区。

[0516] 项目17、根据项目14至16中任一项所述的结合分子,其中连接至BD5或BD6的C_H1结构域、C_L结构域、EHD2-1或EHD2-2通过接头与BD1、BD2、BD3或BD4中的一个连接。

[0517] 项目18、根据项目11至17中任一项所述的结合分子,其为单特异性、双特异性或三特异性的。

[0518] 项目19、根据项目11至18中任一项所述的结合分子,其还包含第七结合结构域(BD7)和第八结合结构域(BD8),其中BD7和BD8一起形成抗原结合位点。

[0519] 项目20、根据项目19所述的结合分子,其还包含:

[0520] 连接至BD7的

[0521] (i)C_H1结构域,

[0522] (ii)C_L结构域,

[0523] (iii)第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1),或

[0524] (iv)第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)，

[0525] 和

[0526] 连接至BD8的

[0527] 在(i)的情况下的C_L结构域，

[0528] 在(ii)的情况下的C_H1结构域，

[0529] 在(iii)的情况下的第二修饰的EHD2结构域(EHD2-2)，和

[0530] 在(iv)的情况下的第一修饰的EHD2结构域(EHD2-1)，

[0531] 其中EHD2-1和EHD2-2的氨基酸序列彼此不同，并且每个选自与SEQ ID NO:1具有至少70％氨基酸同一性且在14位不具有Cys的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:1具有70％氨基酸同一性且在102位不具有Cys的氨基酸序列。

[0532] 项目21、根据项目20所述的结合分子，其中连接至BD7或BD8的修饰的EHD2结构域中的一个或两个还在N39位包含单氨基酸置换。

[0533] 项目22、根据项目21所述的结合分子，其中BD7和BD8彼此不同并且各自选自V_H和V_L或选自TCRα-链的可变区和TCRβ-链的可变区。

[0534] 项目23、根据项目20至22中任一项所述的结合分子，其中连接至BD7或BD8的C_H1结构域、C_L结构域、EHD2-1或EHD2-2通过接头与BD1、BD2、BD3或BD4中的一个连接，不与BD5或BD6连接。

[0535] 项目24、根据项目19至23中任一项所述的结合分子，其为单特异性、双特异性或三特异性或四特异性的。

[0536] 项目25、根据前述项目中任一项所述的结合分子，其中没有修饰的EHD2结构域、修饰的EHD2结构域中的一个或多于一个携带一个N-聚糖。

[0537] 项目26、根据前述项目中任一项所述的结合分子，其中在SEQ ID NO:1的第14位的Cys被选自Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn和Tyr，优选Ser的氨基酸置换。

[0538] 项目27、根据前述项目中任一项所述的结合分子，其中在SEQ ID NO:1的第102位的Cys被选自Ser、Gly、Ala、Thr、Gln、Asn和Tyr，优选Ser的氨基酸置换。

[0539] 项目28、根据前述项目中任一项所述的结合分子，其中N39位的单氨基酸置换为N39Q。

[0540] 项目29、一种编码根据项目1至28中任一项所述的结合分子的核酸或核酸集合。

[0541] 项目30、一种载体，其包含项目29所述的核酸或核酸集合。

[0542] 项目31、一种宿主细胞，其包含根据项目30所述的载体。

[0543] 项目32、一种药物组合物，其包含根据项目1至28中任一项所述的结合分子、根据项目29所述的核酸或核酸集合、根据项目30所述的载体、根据项目31所述的宿主细胞和药学上可接受的载体。

[0544] 项目33、一种结合分子，其包含SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。

[0545] 项目34、一种结合分子，其包含SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:20。

[0546] 项目35、一种结合分子，其包含SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40。

[0547] 项目36、一种结合分子，其包含SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:41。

[0548] 项目37、一种结合分子，其包含SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25。

[0549] 项目38、一种编码根据项目33至37中任一项所述的结合分子的核酸或核酸集合。

[0550] 项目39、一种载体，其包含项目38所述的核酸或核酸集合。

[0551] 项目40、一种宿主细胞，其包含根据项目39所述的载体。

[0552] 项目41、一种药物组合物，其包含根据项目33至37中任一项所述的结合分子、根据项目38所述的核酸或核酸集合、根据项目39所述的载体、根据项目40所述的宿主细胞和药学上可接受的载体。

[0553] 项目42、根据项目33至37中任一项所述的结合分子、根据项目38所述的核酸或核酸集合、根据项目39所述的载体、根据项目40所述的宿主细胞或根据项目41所述的药物组合物，其用于医学，优选用于治疗癌症。

[0554] 项目43、一种治疗方法，其包括向有需要的患者施用治疗有效量的根据项目33至37中任一项所述的结合分子、根据项目38所述的核酸或核酸集合、根据项目39所述的载体、根据项目40所述的宿主细胞，或根据项目41所述的药物组合物。

[0555] 项目44、一种治疗癌症的方法，其包括向有需要的患者施用治疗有效量的根据项目33至37中任一项所述的结合分子、根据项目38所述的核酸或核酸集合、根据项目39所述的载体、根据项目40所述的宿主细胞，或根据项目41所述的药物组合物。

[0556] 项目45、根据项目1至28中任一项所述的结合分子、根据项目29所述的核酸或核酸集合、根据项目30所述的载体、根据项目31所述的宿主细胞或根据项目32所述的药物组合物，其用于医学，优选用于治疗癌症。

[0557] 项目46、一种治疗方法，其包括向有需要的患者施用治疗有效量的根据项目1至28中任一项所述的结合分子、根据项目29所述的核酸或核酸集合、根据项目30所述的载体、根据项目31所述的宿主细胞，或根据项目32所述的药物组合物。

[0558] 项目44、一种治疗癌症的方法，其包括向有需要的患者施用治疗有效量的根据项目1至28中任一项所述的结合分子、根据项目29所述的核酸或核酸集合、根据项目30所述的载体、根据项目31所述的宿主细胞，或根据项目32所述的药物组合物。

[0559] 实施例

[0560] 实施例1:双特异性二价抗cMETx抗HER3 eIgG

[0561] 通过将对于HER3(3-43)(Schmitt等人，2017，mAbs 9,831-843)特异性的Fv结构域与IgG1的C_H1/C_L异二聚体、对于MET(5D5)(Jin等人，2008，Cancer Res.68,4360-4368)特异性的Fv结构域、IgE的修饰的C_H2结构域(hetEHD2)，以及异二聚体化的Fc部分组合来生成双特异性二价eIgG分子(knob-into-hole技术)。因此，双特异性分子由四条不同的多肽链组成。不同抗体的恒定部分由轻链$V_L3-43-C_L\lambda$(SEQ ID NO:13)和重链$V_H3-43-C_H1-Fc_{knob}$(SEQ ID NO:14)组成。第二部分由产生eIgG1的HC1-LC2(重链:$V_H5D5-EHD2-1(N39Q)-Fc_{hole}$(SEQ ID NO:12)；轻链:$V_L5D5-EHD2-2$(SEQ ID NO:11))或产生eIgG2的HC2-LC1(重链:$V_H5D5-EHD2-2-Fc_{hole}$(SEQ ID NO:10)；轻链:$V_L5D5-EHD2-1(N39Q)$(SEQ ID NO:9))的EHD2构型组成。双特异性二价eIgG分子表现出一个针对HER3的抗原结合位点和一个针对MET的结合位点。图5A示出了各个多肽链的示意图，图5B示出了产生的结合分子的示意图。

[0562] 使用聚乙烯亚胺作为转染试剂，在共施用编码重链和轻链的四种质粒后，在瞬时转染的HEK293-6E细胞中表达双特异性二价eIgG分子。使用蛋白A亲和层析纯化分泌到细胞培养物上清液中的蛋白。SDS-PAGE分析显示在还原条件下的4个主要条带：两条约55kDa的条带最有可能对应于抗体的两条重链，两条约25kDa的条带最有可能对应于抗体的两条轻链。此外，对于eIgG1还观察到一条约30kDa的轻微条带，其最有可能对应于含有EHD2-2(V_L5D5-EHD2-2)的轻链的糖基化形式，对于eIgG2还观察到一条约65kDa的轻微条带，其最有可能对应于含有EHD2-2(V_H5D5-EHD2-2-Fc_{hole})的重链的糖基化形式。在非还原条件下，观察到一条约200kDa的主要条带，其最有可能对应于由四种不同多肽链组成的完整抗体(图5C)。通过尺寸排阻色谱法证实了两种双特异性二价eIgG分子的纯度、完整性和均一性(图5D)。通过ELISA确定两种eIgG分子与HER3(aa21-643)和MET(aa25-787)的细胞外结构域(ECD)的结合。以在PBS中稀释的2μg/ml的浓度将带His标签的HER3蛋白和MET Fc融合蛋白涂覆到聚苯乙烯微量滴定板上。用2％脱脂牛奶的PBS(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与一系列稀释的双特异性eIgG抗体一起孵育。洗涤后，使用HER3-His抗原的HRP缀合的抗人Fc抗体和使用MET-Fc抗原的HRP缀合的抗人Fab抗体检测结合的抗体，且TMB、H_2O_2作为底物。两种双特异性二价eIgG抗体均显示与HER3-His和MET-Fc的浓度依赖性的结合，EC_{50}值在纳摩尔范围内(对于eIgG1和eIgG2，对于HER3分别为1.0nM和1.4nM；对于MET分别为3.8nM和5.4nM)(图5E)。这些实验证实了两种双特异性二价eIgG抗体与两种抗原HER3和MET的结合在预期范围内(Schmitt等人，2017，mAbs 9，831-843)。

[0563] 实施例2：双特异性二价抗CD3x抗HER3 eIgG

[0564] 通过将对于HER3(3-43)(Schmitt等人，2017，mAbs 9，831-843)特异性的Fv结构域与IgG1的C_H1/C_L异二聚体、对于CD3(huU3)特异性的Fv结构域、IgE的修饰C_H2结构域(hetEHD2)和异二聚体化的Fc部分组合生成双特异性二价eIgG分子(knob-into-hole技术)。CD3结合位点由抗CD3mAb UCHT1的人源化版本组成。因此，双特异性分子由四种不同的多肽链组成。不同抗体的第一部分由轻链VL3-43-CLλ(SEQ ID NO:13)和重链VH3-43-C_H1-Fc_{knob}(SEQ ID NO:14)组成。第二部分由产生了eIgG的HC2-LC1(重链：$V_H$huU3-EHD2-2-Fc_{hole}(SEQ ID NO:16)；轻链：$V_L$huU3-EHD2-1(N39Q)(SEQ ID NO:15))的EHD2构型组成。双特异性二价eIgG分子表现出一个针对HER3的抗原结合位点和一个针对CD3的结合位点。图6A示出了各个多肽链的示意图，图6B示出了产生的结合分子的示意图。

[0565] 使用聚乙烯亚胺作为转染试剂，在共施用编码重链和轻链的四种质粒后，在瞬时转染的HEK293-6E细胞中表达双特异性二价eIgG分子。使用蛋白A亲和层析纯化分泌到细胞培养物上清液中的蛋白。SDS-PAGE分析显示在还原条件下的2个主要条带：一条约50kDa的条带对应于V_H3-43-C_H1-Fc_{knob}重链，一条约25kDa的条带对应于抗体的两条轻链。此外，在约60kDa和65kDa处观察到两条轻微的条带，对应于含有EHD2-2(VHhuU3-EHD2-2-Fchole)的重链(的非糖基化和糖基化形式)。在非还原条件下，观察到一条约200kDa的主要条带，其对应于由四种不同多肽链组成的完整抗体(图6C)。通过尺寸排阻色谱法证实了双特异性二价eIgG分子的纯度、完整性和均一性(图6D)。通过ELISA测定eIgG分子与HER3(aa21-643)和CD3的细胞外结构域(ECD)的结合。以在PBS中稀释的2μg/ml的浓度将带His标签的HER3蛋白和CD3-Fc融合蛋白涂覆到聚苯乙烯微量滴定板上。用2％脱脂牛奶的PBS(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与一系列稀释的双特异性eIgG抗体一起孵育。洗涤后，使用HER3-His抗

原的HRP-缀合的抗人Fc抗体和使用CD3-Fc抗原的HRP-缀合的抗人Fab抗体检测结合的抗体，且TMB、H_2O_2作为底物。双特异性二价eIgG抗体显示出与HER3-His和CD3-Fc的浓度依赖性的结合，对于HER3的EC_{50}值为2.1nM(图6E)。这些实验证实了双特异性二价eIgG抗体与两种抗原HER3和CD3的结合。通过流式细胞术分析双特异性二价eIgG抗体与表达HER3的(LIM1215)细胞和表达CD3的(Jurkat)细胞的结合。用PBS洗涤粘附的LIM1215细胞并在37℃下短暂胰蛋白酶化。胰蛋白酶用含有FCS的培养基淬灭并通过离心(500xg，5分钟)除去。在不使用胰蛋白酶的情况下使用悬浮Jurkat细胞。每孔接种100000个细胞，并与在PBA(含有2％(v/v)FCS、0.02％(w/v)NaN_3的PBS)中一系列稀释的双特异性eIgG抗体在4℃下孵育1小时。使用PBA将细胞洗涤两次。使用PE标记的抗人Fc二抗检测结合的抗体，将其在4℃下再孵育一小时。洗涤后，使用MilltenyiMACSQuant®Analyzer10测量中值荧光强度(MFI)。通过MACSQuant®软件和Excel计算相对MFI(相对于未染色的细胞)。eIgG抗体以浓度依赖性方式与细胞结合，使用LIM1215的EC_{50}值为0.4nM，使用Jurkat细胞的EC_{50}值为11.9nM(图6F)。

[0566] 实施例3：用于生成异二聚体的hetEHD2结构域的蛋白质工程化

[0567] 链A上的C14位和链B上的C102位被不同的残基(A、T、N、S、W)置换，以评估它们对功能性异二聚体的eFab分子(hetE-Fab)形成的影响。作为模型，使用了由与两个hetEHD2结构域融合的IgG 3-43(抗HER3靶向)的可变结构域组成的hetE-Fab(图1A)。使用Q5®定点诱变试剂盒(NEB)通过定点诱变生成分子。在确认不同残基的正确置换后，用两种质粒的不同组合(图7A和表1)共转染HEK293-6E细胞，并使用Ni-NTA树脂通过亲和层析从细胞培养物上清液中纯化蛋白质，因为所有分子都在VH-hetEHD2链上含有His标签。使用NanoDrop ND-1000在280nM光度下测定分子浓度，并计算所用上清液体积的产率。

[0568] 表1：在链A的C14位和链B的C102位具有不同残基的不同Fv3-43-hetEHD2(eFab)分子列表。产生了具有不同组合的分子，分析了ELISA中用作固定抗原的有关产量和与HER3的结合(EC50值)。SEQ ID NO列于表中。

[0569]

eFab	Fd (V_H3-43-hetEHD2-2-His)				轻链 (V_L3-43-hetEHD2-1)				产量	HER3 结合
分子	C14	N39	C102	SEQ ID NO	C14	N39	C102	SEQ ID NO	[mg/L]	[nM]
1	C	N	A	27	A	Q	C	32	1.6	12.1
2	C	N	W	28	T	Q	C	33	9.5	7.3
3	C	N	N	29	A	Q	C	32	8.3	4.8
4	C	N	T	30	N	Q	C	34	12.1	3.0
5	C	N	A	27	W	Q	C	35	0.9	11.0
6	C	N	N	29	T	Q	C	33	12.7	4.1
7	C	N	T	30	W	Q	C	35	12.3	7.1
8	C	N	T	30	T	Q	C	33	6.8	6.2
9	C	N	S	31	S	Q	C	36	1.6	3.7

[0570] 可以产生所有eFab组合，尽管产量不同(表1)。在还原和非还原条件下还通过SDS-PAGE分析了蛋白质(图7B)。还原条件证实存在两条不同的链，对于VH-hetEHD2-2片段(在hetEHD2结构域中携带N-聚糖)的预期大小约为27kDa，对于非糖基化轻链，预期大小约为23kDa。非还原条件证实了分子的二聚体组装和二硫键。最后，在ELISA中，用不同的eFab分子确定与Fc部分融合的HER3(aa21-643)的固定的胞外结构域(ECD)的结合(图7C)。将HER3-Fc融合蛋白以在PBS中稀释的2μg/ml的浓度固定在聚苯乙烯微滴板上。用2％脱脂牛奶的PBS(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与一系列稀释的不同eIgG分子一起孵育。洗涤后，用HRP-缀合的抗His抗体检测结合的eFab分子。以TMB和H_2O_2为底物。所有eFab分子显示出与HER3-Fc融合蛋白的浓度依赖性的结合，EC_{50}值在纳摩尔范围内(表1)。

[0571] 总之，数据显示了功能性eFab分子可以通过将不同的置换组合引入hetEHD2结构

域(链A中的Cys14位和链B中的Cys102位)生成,例如使用丙氨酸、天冬酰胺、苏氨酸或色氨酸,从而除去C14和C102之间的原始共价二硫键中一个。不同的残基组合可以在不影响异二聚体形成和抗原结合的情况下被引入,该发现表明在这些位置上存在意想不到的可塑性。有趣的是,一些置换,例如一条链中的天冬酰胺(N)和另一条链中的丙氨酸(A)或苏氨酸(T)导致eFab在生产力和抗原结合方面略优于其他eFab。

[0572] 在第二个实验中,分析了新的eFab分子中的四个(C14A,N39Q:N39,C102A;C14A,N39Q:N39,C102N;C14N,N39Q:N39,C102T;C14T,N39Q:N39,C102N)和最初使用的eFab(C14S,N39Q:N39,C102S)。同样,在共转染的HEK293-6E悬浮细胞中产生分子,并使用Ni-NTA亲和纯化进行纯化。通过尺寸排阻色谱分析分子的完整性。在此,所有分子都观察到大小正确的单峰,表明所有变体的异二聚体的正确形成(图8)。

[0573] 实施例4:具有不同的糖基化的不同hetEHD2分子

[0574] 基于EHD2异二聚体形成的新设计,两条链(链A:C14S;链B:C102S)上的丝氨酸置换用于研究hetEHD2结构域的不同N-糖基化对功能性异二聚体表达和形成的影响。自然地,EHD2结构域在N39位带有N-聚糖。使用靶向HER3的eFab,生成了在两个EHD2结构域(C14S,N39(SEQ ID NO:37):N39,C102S(SEQ ID NO:31))上具有N-聚糖的eFab(eFab1)、只有一个糖基化EHD2部分(eFab2:C14S,N39Q(SEQ ID NO:36):N39,C102S(SEQ ID NO:31);eFab3:C14S,N39(SEQ ID NO:37):N39Q,C102S(SEQ ID NO:38))的两个eFab以及在EHD2(C14S,N39Q(SEQ ID NO:36):N39Q,C102S(SEQ ID NO:38))中不具有任何N-糖基化的一个分子(eFab4)。图9A示出了所得分子的示意图。V_H-hetEHD2链还包含用于纯化和检测的His标签。在使用聚乙烯亚胺为转染试剂,将编码V_H-hetEHD2-2链和VL-hetEHD2-1链的两个质粒瞬时共转染后,在HEK293-6E细胞中表达单价eFab分子。使用NiNTA亲和层析纯化分泌到细胞培养物上清液中的蛋白。在非还原条件下,在SDS-PAGE分析中,观察到一条约50kDa的主要条带,其对应于由两个不同的多肽链组成的完整的eFab分子(图9B)。

[0575] 通过ELISA测定不同的Fab分子与HER3的细胞外结构域(ECD)的结合(图9C)。将HER3-Fc融合蛋白以在PBS中稀释的2μg/ml的浓度涂覆在聚苯乙烯微滴板上。用2%脱脂牛奶的PBS(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将孔板与100nM的不同Fab分子一起孵育。洗涤后,使用HER3-Fc作为固定的抗原,用HRP缀合的抗His抗体检测结合的分子。以TMB和H_2O_2为底物。所有四种不同的Fab分子显示出与HER3-Fc的相似结合(图9C)。这些实验证实了使用hetEHD2部分的不同糖基化的衍生物形成功能性异二聚体。

[0576] 实施例5:靶向HER3和CD3的双特异性三价eIg-Fab分子

[0577] 为了生成双特异性三价eIg-Fab分子,即Fab片段与eIg分子的融合,使用了以下不同的组合:i)衍生自抗体3-43(抗-HER3;Schmitt等人,2017,mAbs,9:831-843)的两个Fab结构域,即对于与IgG1的C_H1/C_L异二聚体融合的HER3特异性的Fv结构域,ii)对于与IgE的修饰的CH2结构域(hetEHD2)融合的CD3特异性的一个Fab结构域,以及iii)异二聚体Fc部分(knob-into-hole技术)(图4)。CD3结合位点衍生自抗CD3mAb UCHT1的人源化版本。双特异性三价eIg-Fab分子由四种不同的多肽链组成,四种不同的多肽链具有不同的HER3和CD3结合位点的排列(详见图4)。因此,双特异性三价eIg-Fab分子表现出两个对于HER3的抗原结合位点和一个对于CD3的结合位点。实施例2中描述了具有一个对于HER3的结合位点和一个对于CD3的结合位点的双特异性二价eIg分子(eIg1)的分子结构。表2示出了轻链和重链的

序列。

[0578] 表2:用于生成eIg分子的不同多肽链。通过使用两条轻链和两条重链生成了不同的双特异性eIg和eIg-Fab分子。图10显示了不同分子的用途。

[0579]

eIg分子的链	SEQ ID NO
轻链1 – LC1	13
轻链2 – LC2	15
重链1 – HC1	14

[0580]

重链 2 – HC2	16
重链 3 – HC3	20
重链 4 – HC4	39
重链 5 – HC5	40
重链 6 – HC6	41

[0581] 使用聚乙烯亚胺(PEI;线性,25kDa,Sigma-Aldrich,764604)作为转染试剂,在瞬时转染的HEK293-6E细胞中产生双特异性二价或三价eIg分子。转染96小时后收集上清液,用蛋白A亲和层析纯化蛋白。在SDS-PAGE分析中证实了蛋白质纯度(图10B),其中所有双特异性三价eIg-Fab分子在还原条件下显示出三个主要条带:一条约77kDa的条带,分别对应于重链V_H3-43-C_H1-接头-$V_H$huU3-EHD2-Fc_{hole}、$V_H$huU3-EHD2-1接头-V_H3-43-C_H1-Fc_{knob}或V_H3-43-C_H1-接头-V_H3-43-C_H1-Fc_{knob},约55kDa的第二条带分别代表V_H3-43-C_H1-Fc_{knob}、VH3-43-CH1-Fchole或$V_L$huU3-EHD2-1(N39Q),以及约26kDa的第三条带,对应于两条不同轻链(V_L3-43-$C_L\lambda$和$V_L$huU3-EHD2-1(N39Q))。对于二价双特异性eIg分子,观察到在约55kDa和26kDa的两条条带,分别对应于重链V_H3-43-C_H1-Fc_{knob}和$V_H$huU3-EHD2-Fc_{hole}以及轻链$V_L$huU3-EHD2-1(N39Q)和V_L3-43-$C_L\lambda$。在非还原条件下,观察到所有eIg-Fab分子高于180kDa的一条主要条带,其对应于完整抗体。用Waters 2695 HPLC和TSKgel SuperSW mAb HR柱(TosohBioscience)以0.5ml/min的流速和0.1M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4,0.1M Na_2SO_4,pH6.7作为流动相,通过尺寸排阻色谱确定双特异性二价和三价eIg分子的纯度、完整性和均一性。在此,所有蛋白被洗脱为一个主峰,其对应于正确组装的分子(图10C)。

[0582] 通过流式细胞术确定eIg-Fab分子与表现出不同HER3水平的癌细胞系(LIM1215:19877个HER3/细胞;BT474:11244个HER/细胞)和表达CD3的细胞系(Jurkat)的结合(图11)。用PBS洗涤粘附的细胞并在37℃下短暂胰蛋白酶化。胰蛋白酶用含有FCS的培养基淬灭并通过离心(500xg,5分钟)除去。将$1x10^5$个靶细胞与在PBA(含有2%(v/v)FCS、0.02%(w/v)NaN_3的PBS)中稀释的eIg或eIg-Fab分子的一系列稀释液在4℃下孵育1小时。使用PE缀合的抗人Fc抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)检测结合蛋白。通过**MACSQuant®** Analyzer 10(Miltenyi Biotec)测量荧光,并使用FlowJo(Tree Star)分析数据。相对平均荧光强度(MFI)计算如下:相对MFI=$((MFI_{样品}-(MFI_{检测}-MFI_{细胞}))/MFI_{细胞})$。在两种表达HER3的癌细胞系上,与双特异性二价eIg1相比,双特异性三价eIg-Fab分子显示出更好的结合。双特异性三价eIg-Fab分子的EC_{50}值在低纳摩尔范围内,而双特异性二价eIg1分子显示出最多弱50倍的结合(图11A、图11B)(表3)。在表达CD3的人细胞系Jurkat上,eIg1(SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16)和eIg-Fab4(SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、

SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:41)显示出相似的结合,其中EC_{50}值分别为5.1±2.2nM和5.9±0.5nM,而eIg-Fab2(SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:20)和eIg-Fab3(SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40)显示出更强的结合,其中EC50分别为0.2±0.08nM和1.1±0.5nM(表3)。因此,与二价双特异性eIg相比,三价双特异性eIg对于HER3的更高价态导致对表达HER3的癌细胞的更高结合能力。相反,三价双特异性eIg分子与表达CD3的Jurkat细胞的不同结合表明eIg-Fab分子内CD3结合位点的位置对CD3结合的影响。

[0583] 表3:通过流式细胞术分析的eIg分子的细胞结合。使用表达HER3的细胞(LIM1215和BT474)和表达CD3的Jurkat细胞与一系列稀释的eIg分子的组合来检测EC_{50}值(nM)。均值±SD,n=3。

[0584]

		EC_{50} [nM]			
细胞系	HER3表达	eIg1	eIg-Fab2	eIg-Fab3	eIg-Fab4
LIM1215	19 877 HER3/细胞	4.0 ± 2.2	1.3 ± 0.9	0.4 ± 0.3	0.21 ±0.2
BT474	11 244 HER3/细胞	4.8 ± 2.9	1.7 ± 0.7	0.2 ± 0.4	0.6 ± 0.5
Jurkat	-	5.1 ± 2.2	0.2 ± 0.08	1.1 ± 0.5	5.9 ± 0.5

[0585] 使用具有不同抗原表达(LIM1215:19,877 HER3/cell;BT474:11,244 HER/cell)的HER3阳性细胞系测定PBMC对由双特异性二价和三价eIg分子介导的靶细胞的细胞毒性作用。靶细胞($2x10^4$个细胞/孔)与双特异性二价或三价eIg或eIg-Fab抗体在室温下孵育15分钟,然后添PBMC(E:T比率为10:1)。在37℃下孵育三天后,丢弃上清液,用结晶紫染色活靶细胞。洗涤和干燥后,将剩余的染料溶解在甲醇中(50μl/孔),并使用Tecan spark(Tecan)在550nM下测量光密度。eIg分子能够以浓度依赖性方式重定向未受刺激的PBMC以裂解表达HER3的癌细胞(图12)。eIg抗体的细胞毒性活性通过效力(细胞杀伤中的EC_{50}值)评估(表4)。

[0586] 在两种细胞系LIM1215和BT474上,观察到双特异性三价eIg-Fab4的效力最高,其中EC_{50}值分别为0.1±0.09nM和0.2±0.1nM。对于双特异性三价分子eIg-Fab3,观察到效力约为1/4。观察到双特异性二价eIg分子eIg1的效力进一步降低,EC_{50}值为5.8±2.9nM(LIM1215)和3.8±0.6nM(BT474)。对于eIg-Fab2,观察到非常低的细胞杀伤效力。总之,这些实验表明,与二价双特异性eIg相比,三价双特异性eIg-Fab可以通过T细胞重新靶向介导增加的细胞毒性,即由于额外的靶结合位点。然而,实验还表明,效力受分子组成,即eIg-Fab分子内HER3和CD3结合位点的位置的影响。

[0587] 表4:eIg和eIg-Fab分子对不同肿瘤细胞系的细胞毒性活性。使用表达HER3的肿瘤细胞和一系列稀释的eIg和eIg-Fab分子确定EC_{50}值(nM)。均值±SD,n.d.=未确定。

[0588]

		EC_{50} [nM]			
细胞系	细胞系	eIg1	eIg-Fab2	eIg-Fab3	eIg-Fab4
LIM1215	19 877 HER3/细胞	5.8 ± 2.9	未确定	0.4 ± 0.3	0.1 ± 0.1
BT-474	11 244 HER3/细胞	3.8 ± 0.6	未确定	0.5 ± 0.5	0.2 ± 0.1

[0589] 实施例6:靶向HER3和FAP的二价双特异性eIg分子

[0590] 基于来自治疗性抗体的不同可变结构域,通过以下步骤生成双特异性二价eIg分

子:i)将对于HER3(抗体3-43;Schmitt等人,2017,mAbs 9,831-843)特异性的Fv结构域与IgG1的C_H1/C_L异二聚体组合,ii)将对于成纤维细胞活化蛋白(FAP;hu36;Fabre等人,2020,Clin.Cancer Res.26,3420-3430)特异性的Fv结构域与IgE的修饰的C_H2结构域(hetEHD2)组合,并将其融合到iii)异二聚化Fc部分(knob-into-hole技术)。因此,双特异性分子由四种不同的多肽链组成:与重链V_H3-43-C_H1-Fc_{knob}(SEQ ID NO:14)配对的轻链V_L3-43-$C_L\lambda$(SEQ ID NO:13),和与重链VHhu36-EHD2-2-Fchole(SEQ ID NO:42)配对的轻链$V_L$hu36-EHD2-1(N39Q)(SEQ ID NO:43)。双特异性二价eIg分子表现出一个针对HER3的抗原结合位点和一个针对FAP的结合位点。图13A示出了各个多肽链的示意图,图13B示出了产生的抗体分子的示意图。

[0591] 使用聚乙烯亚胺作为转染试剂,在共施用编码重链和轻链的四种质粒后,在瞬时转染的HEK293-6E细胞中表达双特异性二价eIg分子。使用蛋白A亲和层析纯化分泌到细胞培养物上清液中的蛋白。SDS-PAGE分析显示在还原条件下的4个主要条带:两条约55kDa的条带对应于抗体的两条重链,两条约23kDa的条带对应于抗体的两条轻链。在非还原条件下,观察到一条约200kDa的主要条带,其对应于由四种不同多肽链组成的完整抗体(图13C)。通过尺寸排阻色谱法证实了eIg分子的纯度、完整性和均一性(图13D)。通过ELISA测定eIg分子与HER3(aa21-643)和FAP(aa 32-728)的细胞外结构域(ECD)的结合。以在PBS中稀释的2μg/ml的浓度将His标记的HER3蛋白和Flag标记的FAP蛋白涂覆到聚苯乙烯微量滴定板上。用2%脱脂牛奶的PBS(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与一系列稀释的双特异性eIg抗体一起孵育。洗涤后,使用HER3-His或FAP-Flag作为固定抗原,用HRP缀合的抗人Fc抗体检测结合的抗体。以TMB和H_2O_2为底物。eIg抗体显示与HER3-His和FAP-Flag的浓度依赖性结合,其中EC_{50}值在纳摩尔范围内(对于HER3为3.4nM;对于FAP为7.6nM)(图13E)。这些实验证实了eIg抗体与两种抗原HER3和FAP的结合。

[0592] 实施例7:靶向HER3的二价单特异性eIg分子

[0593] 通过将抗HER3抗体(3-43)(Schmitt等人,2017,mAbs 9,831-843)的可变结构域与还与同二聚化的Fc区融合的IgE修饰的C_H2结构域(hetEHD2)组合生成抗HER3二价eIg分子。因此,该分子由两条多肽链组成:轻链V_L3-43-EHD2-1(SEQ ID NO:23)和重链V_H3-43-EHD2-2-Fc(SEQ ID NO:22)。单特异性二价eIg分子表现出两个相同的HER3抗原结合位点。图14A示出了各个多肽链的示意图,图14B示出了产生的抗体分子的示意图。

[0594] 使用聚乙烯亚胺作为转染试剂,在共施用编码重链和轻链的两种质粒后,在瞬时转染的HEK293-6E细胞中表达单特异性二价eIg分子。使用蛋白A亲和层析纯化分泌到细胞培养物上清液中的蛋白。SDS-PAGE分析显示在还原条件下的2个主要条带:一条约55kDa的条带对应于抗体的重链,一条约25kDa的条带对应于抗体的轻链(图14C)。通过ELISA测定eIg分子与HER3(aa21-643)的细胞外结构域(ECD)的结合。将His标记的HER3蛋白以在PBS中稀释的2μg/ml的浓度涂覆在聚苯乙烯微滴板上。用2%脱脂牛奶的PBS(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与一系列稀释的单特异性eIg抗体一起孵育。洗涤后,用HRP缀合的抗人Fc抗体检测结合抗体。以TMB和H_2O_2为底物。单特异性二价的eIg抗体显示与HER3-His的浓度依赖性结合,其中EC_{50}值在纳摩尔范围内(HER3为1.4nM)(图14D)。亲本抗体IgG 3-43与固定的HER3具有相似的结合。该实验证实了单特异性二价eIg抗体与作为固定抗原的HER3的结合。总之,成功地生成了具有针对相同表位的两个抗原结合位点的单特异性二价eIg分子。

[0595] 实施例8:靶向HER3和EGFR的四价双特异性eIg分子

[0596] 通过将抗EGFR抗体(hu225;Seifert等人,2014,Mol Cancer Ther 13,101-111)的可变结构域与IgG1的C_H1/C_L异二聚体结合,将抗HER3(3-43;Schmitt等人,2017,mAbs 9,831-843)的可变结构域与还与同二聚化Fc部分组合的IgE的修饰的C_H2结构域(hetEHD2)组合。因此,四价双特异性分子由三条不同的多肽链组成:轻链V_L3-43-EHD2-1(SEQ ID NO:23)和$V_L$hu225-$C_L\kappa$(SEQ ID NO:25),和重链$V_H$hu225-C_H1-V_H3-43-EHD2-2-Fc(SEQ ID NO:24)。重链上的两个Fab部分被包含10个氨基酸的接头$(GGSGG)_2$分开。双特异性四价eIg分子表现出两个针对EGFR的抗原结合位点和两个针对HER3的结合位点。图15A示出了各个多肽链的示意图,图15B示出了产生的结合分子的示意图。

[0597] 使用聚乙烯亚胺作为转染试剂,在共施用编码重链和轻链的三种质粒后,在瞬时转染的HEK293-6E细胞中表达双特异性四价eIg-Fab分子。使用蛋白A亲和层析纯化分泌到细胞培养物上清液中的蛋白。SDS-PAGE分析显示在还原条件下的3个主要条带:一条约80kDa的条带,其对应于抗体的重链,两条约26kDa的条带,其对应于抗体的两条轻链(图15C)。在非还原条件下,观察到一条约250kDa的主要条带,其对应于由三种不同多肽链组成的完整抗体。通过尺寸排阻色谱法证实了双特异性四价eIg-Fab分子的纯度、完整性和均一性(图15D)。

[0598] 通过ELISA测定该四价eIg-Fab分子与EGFR(aa 20-643)和HER3(aa 21-643)细胞外结构域的结合(图15E)。将His标记的EGFR或HER3蛋白以在PBS中稀释的2μg/ml的浓度固定在聚苯乙烯微滴板上。用2%脱脂牛奶的PBS(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与一系列稀释的双特异性eIg-Fab抗体一起孵育。洗涤后,用HRP缀合的抗人Fc抗体检测结合抗体。以TMB和H_2O_2为底物。双特异性四价抗体显示与EGFR-His的HER3-His的浓度依赖性结合,其中EC_{50}值在纳摩尔范围内(对于EGFR为0.39±0.25nM;对于HER3为3.3±2.7nM)(图15E)(表5)。用一系列稀释的双特异性eIg-Fab分子和随后用HER3-His蛋白孵育的固定的EGFR-Fc证明了两种抗原的同时结合。通过HRP缀合的抗His检测抗体检测结合的HER3-His。观察到浓度依赖性结合,其中EC_{50}值约为0.23±0.01nM。总之,数据证明了使用eIg平台技术生成了具有2+2个结合位点的双特异性四价eIg分子。

[0599] 表5:通过ELISA法分析抗体与EGFR和HER3的结合。使用EGFR-His、HER3-His或EGFR-Fc和HER3-His作为抗原和抗体的一系列稀释液来确定EC_{50}值(nM)。均值±SD,n.d.=未确定。

[0600]

	EGFR-His	HER3-His	EGFR-Fc + HER3-His
IgG hu225	0.17 ± 0.005 nM	未确定	未确定
IgG 3-43	未确定	0.18 ± 0.05 nM	未确定
eIg EGFRxHER3	0.39 ± 0.25 nM	3.3 ± 2.7 nM	0.23 ± 0.01 nM

[0601] 实施例9:靶向HER3和EGFR的二价双特异性Fab-eFab分子

[0602] 通过将抗EGFR抗体(hu225;Seifert等人,2014,Mol Cancer Ther 13,101-111)的可变结构域与IgG1的C_H1/C_L异二聚体组合,将抗HER3(3-43;Schmitt等人,2017,mAbs 9,831-843)的可变结构域与IgE的修饰的C_H2结构域(hetEHD2)组合来生成双特异性二价Fab-eFab分子,即缺少Fc区的分子。因此,Fab-eFab分子由轻链V_L3-43-EHD2-1(SEQ ID NO:23)

和$V_L$hu225-$C_L\kappa$(SEQ ID NO:25),和"重链"$V_H$hu225-C_H1-V_H3-43-EHD2-2(SEQ ID NO:44)组成。双特异性二价Fab-eFab分子表现出一个针对EGFR的抗原结合位点和一个针对HER3的结合位点。重链在C端含有His标签,用于分子的纯化和检测。两个Fab/eFab部分被包含10个氨基酸的接头$(GGSGG)_2$分开。图16A示出了各个多肽链的示意图,图16B示出了产生的抗体分子的示意图。通过尺寸排阻色谱法证实了Fab-eFab分子的纯度、完整性和均一性(图16C)。

[0603] 通过ELISA分析Fab-eFab分子与EGFR(aa 20-643)和HER3(aa 21-643)的细胞外结构域的结合。以在PBS中稀释的2μg/ml的浓度将带His标签的EGFR和HER3蛋白涂覆到聚苯乙烯微量滴定板上。用2%脱脂牛奶的PBS(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后用双特异性Fab-eFab抗体或亲本抗体的一系列稀释液培养板(IgG hu225,IgG 3-43)。洗涤后,使用两种固定抗原,用HRP缀合的抗人Fab抗体检测结合的抗体。以TMB和H_2O_2为底物。Fab-eFab抗体显示与EGFR-His的HER3-His的浓度依赖性结合,其中EC_{50}值在纳摩尔范围内(对于EGFR为6.5nM;对于HER3为3.9nM)(图16D)(表6)。由于每个分子中有两个抗原结合位点,亲本抗体对固定的抗原表现出更高的结合能力。使用固定的HER3-His与一系列稀释的Fab-eFab分子孵育,然后将EGFR-moFc蛋白作为第二可溶性抗原,证明了与两种抗原的同时结合。通过HRP缀合的抗鼠Fc检测抗体检测结合的第二抗原。观察到浓度依赖性结合,其中EC_{50}值约为1.4nM。这些实验证实了双特异性二价Fab-eFab抗体与EGFR和HER3的结合。

[0604] 表6:通过ELISA法分析抗体与EGFR和HER3的结合。使用EGFR-His、HER3-His或HER3-His和EGFR-moFc作为抗原和抗体的一系列稀释液组合来确定EC_{50}值(nM)。均值±SD,n=1,n.d.=未确定,-=未执行测试。

[0605]

	EGFR-His	HER3-His	HER3-His + EGFR-moFc
IgG hu225	0.14 nM	未确定	-
IgG 3-43	未确定	0.12 nM	-
eIg EGFRxHER3	6.5 nM	3.9 nM	1.4 nM

[0606] 实施例10:靶向FAP和小鼠CD3-结合小鼠CD3的可变结构域的不同组成的二价双特异性eIg分子

[0607] 通过将抗成纤维细胞活化蛋白(FAP)抗体(hu36;Fabre等人,2020,Clin Cancer Res.26,3420-3430)的可变结构域与IgG1的C_H1/C_L异二聚体组合,将抗小鼠CD3的可变结构域(2C11;Leo等人,1987,Proc Natl Acad USA 84,1374-1378)与还与异二聚化Fc部分融合的IgE的修饰的C_H2结构域(hetEHD2)组合(knob-into-hole技术)生成双特异性二价eIg分子。图17示出了多肽链的组成。因此,eIg分子的第一部分由具有轻链$V_L$hu36-CLκ(SEQ ID NO:45)和重链$V_H$hu36-C_H1-Fc(hole)(SEQ ID NO:46)的靶向FAP的臂组成。分子I还由具有轻链V_H2C11-EHD2-1(SEQ ID NO:47)和重链V_L2C11-EHD2-2-Fc(knob)(SEQ ID NO:48)的靶向小鼠CD3的臂组成。第二分子由轻链V_L2C11-EHD2-1(SEQ ID NO:49)和重链V_H2C11-EHD2-2-Fc(knob)(SEQ ID NO:50)组成。图17B示出了产生分子的示意图。通过尺寸排阻色谱法证实了两种eIg分子的纯度、完整性和均一性(图17C)。

[0608] 通过流式细胞术分析两种双特异性eIg抗体与表达FAP的HT1080-FAP细胞和小鼠脾细胞(表达小鼠CD3)的结合。用PBS洗涤粘附的HT1080-FAP细胞并在37℃下短暂胰蛋白酶化。胰蛋白酶用含有FCS的培养基淬灭并通过离心(500xg,5分钟)除去。从脾脏中收获鼠免

疫细胞，提取脾脏，通过细胞过滤器将脾脏捣碎制备均匀的细胞悬液。通过离心(250xg，7分钟)收集细胞后，除去红细胞并将脾细胞重悬于培养基中。将100000个HT1080-FAP细胞或200000个鼠脾细胞与在PBA(含有2％(v/v)FCS、0.02％(w/v)NaN3的PBS)中稀释的双特异性eIg抗体的一系列稀释液在4℃下孵育1小时。使用PBA将细胞洗涤两次。使用PE标记的抗人Fc二抗检测结合的抗体，将其在4℃下再孵育一小时。洗涤后，使用Milltenyi**MACSQuant®** Analyzer 10测量中值荧光强度(MFI)。通过Flow Jo(Tree star)和Excel计算相对MFI(相对于未染色细胞)。eIg分子以浓度依赖性方式与细胞结合。eIg分子I和II分别以2.9nM和2.7nM的EC_{50}值结合HT1080-FAP细胞和以7.3nM和24.2nM结合鼠脾细胞(图17D)(表7)。

[0609] 表7:通过流式细胞术分析抗体的细胞结合。使用表达FAP的HT1080-FAP或表达鼠CD3的鼠脾细胞作为靶细胞与抗体的一系列稀释液组合来确定EC_{50}值(nM)。均值±SD，n＝1。

[0610]

	HT1080-FAP	鼠脾细胞
eIg FAPxmoCD3 I	**2.9 nM**	**7.3 nM**
eIg FAPxmoCD3 II	**2.7 nM**	**24.2 nM**

[0611] 实施例11:eIg分子与Fcε-受体I缺少结合

[0612] 在eIg技术中，源自人IgE的修饰的C_H2结构域用作异二聚化模块。研究了包含抗体分子的hetEHD2是否缺乏与高亲和力IgE受体FcεRI的结合。FcεRI作为包含FcRI胞外区的Fc融合蛋白生成。在ELISA实验(图18)中，纯化的FcεRI作为固定的抗原与不同的eIg衍生物孵育，不同的eIg衍生物包括对HER3和CD3特异性的eIg(实施例5)、对EGFR和HER3特异性的四价双特异性eIg-Fab(实施例10)和对EGFR和HER3特异性的二价双特异性Fab-eFab(实施例9)。作为对照，EGFR和HER3用作其他的固定的抗原以确定抗体和这些受体的结合。以在PBS中稀释的2μg/ml的浓度将FcεRI、EGFR和HER3涂覆到聚苯乙烯微量滴定板上。用2％脱脂牛奶的PBS(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与50nM的eIg或eIg-Fab和Fab-eFab分子一起孵育，以研究与不同的固定受体的结合。此外，在该实验中加入了人IgE以证实与Fcε受体的结合。洗涤后，用抗人Fab抗体检测结合的抗体。以TMB和H_2O_2为底物。IgE特异性结合FcεRI。三种eIg衍生物未显示与FcεRI的任何结合，但强烈识别其各自的靶抗原，即eIg HER3xCD3与HER3结合，以及eIg-Fab EGFRxHER3和Fab-eFab EGFRxHER3与EGFR和HER3结合。衍生HER3结合位点的对照抗体IgG3-43与HER3结合，而衍生EGFR结合位点的IgG hu225与EGFR结合。未观察到这两种对照IgG抗体与FcεRI的结合(图18)。因此，该实验证明eIg分子缺乏与由肥大细胞和嗜碱性细胞表达的IgE受体FcεRI的结合。因此，可以排除包含分子的EHD2或hetEHD2通过与FcεRI结合导致这些免疫细胞的活化。

[0613] 实施例12:靶向SARS-CoV-2刺突蛋白的双特异性eIg分子

[0614] 生成了双特异性eIg-Fab分子，用于双重靶向SARS-CoV-2病毒刺突蛋白的不同表位。对于这种方法，使用了已发表的与病毒刺突蛋白RBD结构域结合的抗体:P2B-2F6 P2B-2F6(Ju等人，2020，Nature 584，115-119)和S309(Pinto等人，2020，Nature 583，290-295)。S309的可变结构域与IgG1的C_H1/C_L异二聚体组合，P2B-2F6的可变结构域与hetEHD2结构域组合，进一步组合同二聚化Fc部分，以生成对称的四价双特异性eIg-Fab分子。抗体由轻链V_LS309-CLκ(SEQ ID NO:51)和V_LP2B-2F6-EHD2-1(SEQ ID NO:52)和重链V_HS309-C_H1-V_HP2B-2F6-EHD2-2-Fc(SEQ ID NO:53)组成。图19A示出了各个多肽链的示意图，图19B示出了产生的抗体分子的示意图。

[0615] 使用聚乙烯亚胺作为转染试剂，在共施用编码重链和轻链的三种质粒后，在瞬时转染的HEK293-6E细胞中表达双特异性四价eIg-Fab分子。使用蛋白A亲和层析纯化分泌到细胞培养物上清液中的蛋白。SDS-PAGE分析显示在还原条件下的3个主要条带：一条约85kDa的条带对应于抗体的重链，两条约26kDa的条带对应于抗体的两条轻链(图19C)。在非还原条件下，观察到一条约250kDa的主要条带，其对应于由三种不同多肽链组成的完整抗体。通过尺寸排阻色谱法证实了双特异性四价eIg-Fab分子的纯度、完整性和均一性(图19D)。

[0616] 通过ELISA测定该eIg-Fab分子与刺突蛋白的RBD结构域的结合。将His标记的RBD蛋白以在PBS中稀释的2μg/ml的浓度涂覆在聚苯乙烯微滴板上。用2％脱脂牛奶的PBS(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与一系列稀释的双特异性eIg-Fab抗体一起孵育。洗涤后，用HRP缀合的抗人Fc抗体检测结合的抗体。以TMB和H_2O_2为底物。双特异性四价eIg-Fab抗体显示与RBD-His抗原的浓度依赖性结合，其中EC_{50}值在纳摩尔范围内(1.0nM)(图19E)。这些实验证实了双特异性四价eIg-Fab抗体与RBD的结合。

序列表

<110> 斯图加特大学

<120> 包含修饰的EHD2结构域的结合模块

<130> 762-16 PCT

<150> EP19199639.6
<151> 2019-09-25

<160> 53

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly
1 5 10 15

Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly
20 25 30

[0001]

Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val
35 40 45

Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu
50 55 60

Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser
65 70 75 80

Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu
85 90 95

Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn
100 105

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

<220>
<223> 修饰的EHD2 C14X

<220>
<221> misc_特征
<222> (14)..(14)
<223> Xaa可以是天然存在的氨基酸序列

<400> 2

Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Xaa Asp Gly
1 5 10 15

Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly
20 25 30

Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val
35 40 45

Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu
50 55 60

Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser
65 70 75 80

[0002]

Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu
85 90 95

Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn
100 105

<210> 3
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的EHD2 C102X

<220>
<221> misc_特征
<222> (102)..(102)
<223> Xaa可以是天然存在的氨基酸序列

<400> 3

Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly
1 5 10 15

Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly
20 25 30

Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val
35 40 45

Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu
50 55 60

Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser
65 70 75 80

Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu
85 90 95

Asp Ser Thr Lys Lys Xaa Ala Asp Ser Asn
100 105

[0003]

<210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的EHD2 C14S

<400> 4

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

Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly
20 25 30

Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val
35 40 45

Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu
50 55 60

Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser
65 70 75 80

Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu
85 90 95

Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn
100 105

<210> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的EHD2 C14S N39Q

<400> 5

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

Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly
20 25 30

Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val
35 40 45

[0004] Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu
50 55 60

Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser
65 70 75 80

Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu
85 90 95

Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn
100 105

<210> 6
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的EHD2 C102S

<400> 6

Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly
1 5 10 15

Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly
20 25 30

Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val
35 40 45

Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu
50 55 60

Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser
65 70 75 80

Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu
85 90 95

Asp Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp Ser Asn
100 105

[0005]

<210> 7
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的EHD2 N39Q C102S

<400> 7

Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly
1 5 10 15

Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly
20 25 30

Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val
35 40 45

Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu
50 55 60

Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser
65 70 75 80

Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu
85 90 95

Asp Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp Ser Asn
100 105

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Igkappa前导

<400> 8

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 9
<211> 221
<212> PRT
<213> 人工序列

[0006]

<220>
<223> VL5D5-EHD2-1 (N39Q)

<400> 9

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 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

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

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

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

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser
115 120 125

Ser Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu
130 135 140

Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp
145 150 155 160

Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu
165 170 175

Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His
180 185 190

Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His
195 200 205

[0007]

Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn
210 215 220

<210> 10
<211> 454
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH5D5-EHD2-2-Fchole

<400> 10

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile
115 120 125

Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln
130 135 140

Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr
145 150 155 160

Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser
165 170 175

[0008]

Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu
180 185 190

Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr
195 200 205

Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp Ser
210 215 220

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

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

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

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

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

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

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

Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

[0009]

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 11
<211> 221
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL5D5-EHD2-2

<400> 11

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 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

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

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

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

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser
115 120 125

[0010]

Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu
130 135 140

Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp
145 150 155 160

Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu
165 170 175

Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His
180 185 190

Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His
195 200 205

Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp Ser Asn
210 215 220

<210> 12
<211> 454
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH5D5-EHD2-1(N39Q)-Fchole

<400> 12

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
50 55 60

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

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

[0011]

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile
115 120 125

Leu Gln Ser Ser Ser Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln
130 135 140

Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Gln Ile Thr
145 150 155 160

Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser
165 170 175

Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu
180 185 190

Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr
195 200 205

Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser
210 215 220

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

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

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

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

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

[0012]

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

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

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

Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 13
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL3-43-CLkappa

<400> 13

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
[0013] 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 14
<211> 455
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43-CH1-Fcknob

<400> 14

[0014]

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

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

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

[0015]

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

[0016]

<210> 15
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VLhuU3-EHD2-1(N39Q)

<400> 15

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Asp Phe Thr
100 105 110

Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Ser Asp Gly Gly Gly His
115 120 125

Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro
130 135 140

Gly Thr Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val
145 150 155 160

Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr
165 170 175

Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr
180 185 190

[0017]

Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr
195 200 205

Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn
210 215

<210> 16
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VHhuU3-EHD2-2-Fchole

<400> 16

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

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

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro Thr
115 120 125

Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro
130 135 140

[0018] Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile
145 150 155 160

Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser
165 170 175

Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu
180 185 190

Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys
195 200 205

Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Ser
210 215 220

Ala Asp Ser Asn Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
225 230 235 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
245 250 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
260 265 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
325 330 335

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

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
370 375 380

[0019]

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
405 410 415

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 17
<211> 463
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH5D5-EHD2-2-接头-VH3-43-CH1

<400> 17

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

[0020]

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile
115 120 125

Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln
130 135 140

Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr
145 150 155 160

Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser
165 170 175

Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu
180 185 190

Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr
195 200 205

Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp Ser
210 215 220

Asn Gly Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln
225 230 235 240

Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser
245 250 255

Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Arg Ala Ala
260 265 270

Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly
275 280 285

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

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

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
325 330 335

[0021]

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln
340 345 350

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
355 360 365

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
370 375 380

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
385 390 395 400

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
405 410 415

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
420 425 430

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
435 440 445

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
450 455 460

<210> 18
<211> 463
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43-CH1-接头-VH5D5-EHD2-2

<400> 18

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
[0022] 50 55 60

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Gly Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Glu Val
225 230 235 240

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

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu
260 265 270

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Met
275 280 285

[0023]

Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys Asp
290 295 300

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

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
325 330 335

Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
340 345 350

Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln
355 360 365

Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu
370 375 380

Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu
385 390 395 400

Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr
405 410 415

Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln
420 425 430

Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln
435 440 445

Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp Ser Asn
450 455 460

<210> 19
<211> 692
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43-CH1-接头-VH5D5-EHD2-2-Fchole

<400> 19

[0024]

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

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

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Gly Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Glu Val
225 230 235 240

[0025]

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

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu
260 265 270

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Met
275 280 285

Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys Asp
290 295 300

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

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
325 330 335

Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
340 345 350

Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln
355 360 365

Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu
370 375 380

Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu
385 390 395 400

Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr
405 410 415

Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln
420 425 430

Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln
435 440 445

Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp Ser Asn Gly
450 455 460

[0026]

Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
465 470 475 480

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
485 490 495

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
500 505 510

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
515 520 525

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
530 535 540

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
545 550 555 560

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
565 570 575

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
580 585 590

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
595 600 605

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
610 615 620

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
625 630 635 640

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
645 650 655

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
660 665 670

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
675 680 685

[0027]

Ser Pro Gly Lys
690

<210> 20
<211> 693
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43-CH1-接头-VH3-43-CH1-Fcknob

<400> 20

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

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

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

[0028]

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

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

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

Ser Cys Gly Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val
225 230 235 240

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
245 250 255

Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Arg Ala
260 265 270

Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu
275 280 285

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

Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Pro Lys Asn Gln Phe
305 310 315 320

Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
325 330 335

Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly
340 345 350

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
355 360 365

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
370 375 380

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
385 390 395 400

[0029] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
405 410 415

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
420 425 430

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
435 440 445

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
450 455 460

Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
465 470 475 480

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
485 490 495

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
500 505 510

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

515 520 525

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
530 535 540

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
545 550 555 560

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
565 570 575

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
580 585 590

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
595 600 605

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
610 615 620

[0030] Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
625 630 635 640

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
645 650 655

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
660 665 670

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
675 680 685

Leu Ser Pro Gly Lys
690

<210> 21
<211> 690
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH5D5-EHD2-2-接头-VH3-43-CH1-Fchole

<400> 21

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

[0031] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile
115 120 125

Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln
130 135 140

Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr
145 150 155 160

Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser
165 170 175

Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu
180 185 190

Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr
195 200 205

Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp Ser
210 215 220

Asn Gly Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln

225 230 235 240

Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser
245 250 255

Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Arg Ala Ala
260 265 270

Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly
275 280 285

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

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

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
325 330 335

[0032] Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln
340 345 350

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
355 360 365

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
370 375 380

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
385 390 395 400

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
405 410 415

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
420 425 430

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
435 440 445

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
450 455 460

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
465 470 475 480

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
485 490 495

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
500 505 510

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
515 520 525

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
530 535 540

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
545 550 555 560

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
565 570 575

[0033]

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
580 585 590

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
595 600 605

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
610 615 620

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
625 630 635 640

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
645 650 655

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
660 665 670

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
675 680 685

Gly Lys
690

<210> 22
<211> 458
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43-EHD2-2-Fc

<400> 22

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
[0034] 50 55 60

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro
115 120 125

Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro
130 135 140

Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr
145 150 155 160

Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
165 170 175

Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser
180 185 190

Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr
195 200 205

Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys
210 215 220

Ser Ala Asp Ser Asn Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
260 265 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285

[0035]

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 23
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL3-43-EHD2-1

<400> 23

[0036]

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

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

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Thr Asp Phe
100 105 110

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

His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr
130 135 140

Pro Gly Thr Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp
145 150 155 160

Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser
165 170 175

Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser
195 200 205

Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn
210 215

<210> 24
<211> 690
<212> PRT
[0037] <213> 人工序列

<220>
<223> VHhu225-CH1-接头-VH3-43-EHD2-2-Fc

<400> 24

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

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

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

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

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

85 90 95

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

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

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

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

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

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

[0038] Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
225 230 235 240

Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile
245 250 255

Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg
260 265 270

Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg
275 280 285

Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Gln Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr
290 295 300

Ile Asn Pro Asp Thr Pro Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser
305 310 315 320

Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln
325 330 335

Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
340 345 350

Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser
355 360 365

Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu
370 375 380

Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp
385 390 395 400

Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu
405 410 415

Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His
420 425 430

[0039]

Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His
435 440 445

Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp Ser Asn Gly Thr Asp
450 455 460

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
465 470 475 480

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
485 490 495

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
500 505 510

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
515 520 525

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
530 535 540

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
545 550 555 560

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
565 570 575

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
580 585 590

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
595 600 605

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
610 615 620

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
625 630 635 640

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
645 650 655

[0040]

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
660 665 670

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
675 680 685

Gly Lys
690

<210> 25
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VLhu225-CLk

<400> 25

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

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

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

[0041]

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 26
<211> 690
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43-EHD2-2-接头-VHhu225-CH1-Fc

<400> 26

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

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

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

[0042]

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro
115 120 125

Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro
130 135 140

Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr
145 150 155 160

Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
165 170 175

Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser
180 185 190

Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr
195 200 205

Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys
210 215 220

Ser Ala Asp Ser Asn Gly Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
225 230 235 240

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn
260 265 270

Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
275 280 285

Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe
290 295 300

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
325 330 335

[0043]

Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
340 345 350

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
355 360 365

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
370 375 380

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
385 390 395 400

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
405 410 415

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
420 425 430

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
435 440 445

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
450 455 460

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
465 470 475 480

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
485 490 495

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
500 505 510

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
515 520 525

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
530 535 540

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
545 550 555 560

[0044]

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
565 570 575

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
580 585 590

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
595 600 605

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
610 615 620

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
625 630 635 640

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
645 650 655

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
660 665 670

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
675 680 685

Gly Lys
690

<210> 27
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43-EHD2-2(C102A)-His

<400> 27

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
[0045] 35 40 45

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

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro
115 120 125

Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro
130 135 140

Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr
145 150 155 160

Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
165 170 175

Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser
180 185 190

Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr
195 200 205

Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys
210 215 220

Ala Ala Asp Ser Asn Ala Ala Ala His His His His His His
225 230 235

<210> 28
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43-EHD2-2(C102W)-His

[0046] <400> 28

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

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

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro
115 120 125

Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro
130 135 140

Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr
145 150 155 160

Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
165 170 175

Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser
180 185 190

Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr
195 200 205

Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys
210 215 220

[0047]

Trp Ala Asp Ser Asn Ala Ala Ala His His His His His His
225 230 235

<210> 29
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43-EHD2-2(C102N)-His

<400> 29

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala

50 55 60

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro
115 120 125

Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro
130 135 140

Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr
145 150 155 160

[0048] Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
165 170 175

Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser
180 185 190

Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr
195 200 205

Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys
210 215 220

Asn Ala Asp Ser Asn Ala Ala Ala His His His His His His
225 230 235

<210> 30
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43-EHD2-2(C102T)-His

<400> 30

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

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

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

[0049] Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro
115 120 125

Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro
130 135 140

Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr
145 150 155 160

Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
165 170 175

Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser
180 185 190

Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr
195 200 205

Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys
210 215 220

Thr Ala Asp Ser Asn Ala Ala Ala His His His His His His

225 230 235

<210> 31
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43-EHD2-2(C102S)-His

<400> 31

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

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

[0050]

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro
115 120 125

Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro
130 135 140

Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr
145 150 155 160

Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
165 170 175

Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser
180 185 190

Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr
195 200 205

Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys
210 215 220

Ser Ala Asp Ser Asn Ala Ala Ala His His His His His His
225 230 235

<210> 32
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL3-43-EHD2-1(C14A, N39Q)

<400> 32

[0051]

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

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

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Asp Phe Thr Pro
100 105 110

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

Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly
130 135 140

Thr Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp
145 150 155 160

Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln
165 170 175

Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr
180 185 190

Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys
195 200 205

Lys Cys Ala Asp Ser Asn
210

[0052]

<210> 33
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL3-43-EHD2-1(C14T, N39Q)

<400> 33

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

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

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Asp Phe Thr Pro
100 105 110

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

Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly
130 135 140

Thr Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp
145 150 155 160

Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln
165 170 175

Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr
180 185 190

Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys
195 200 205

[0053]

Lys Cys Ala Asp Ser Asn
210

<210> 34
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL3-43-EHD2-1(C14N, N39Q)

<400> 34

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

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

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Asp Phe Thr Pro
100 105 110

Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Asn Asp Gly Gly Gly His Phe
115 120 125

Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly
130 135 140

Thr Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp
145 150 155 160

[0054] Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln
165 170 175

Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr
180 185 190

Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys
195 200 205

Lys Cys Ala Asp Ser Asn
210

<210> 35
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL3-43-EHD2-1(C14W, N39Q)

<400> 35

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

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

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Asp Phe Thr Pro
100 105 110

Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Trp Asp Gly Gly Gly His Phe
115 120 125

[0055]

Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly
130 135 140

Thr Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp
145 150 155 160

Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln
165 170 175

Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr
180 185 190

Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys
195 200 205

Lys Cys Ala Asp Ser Asn
210

<210> 36
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL3-43-EHD2-1(C14S, N39Q)

<400> 36

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

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

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp His
85 90 95

[0056]

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Asp Phe Thr Pro
100 105 110

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

Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly
130 135 140

Thr Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp
145 150 155 160

Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln
165 170 175

Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr
180 185 190

Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys
195 200 205

Lys Cys Ala Asp Ser Asn
210

<210> 37
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL3-43-EHD2-1(C14S)

<400> 37

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

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

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[0057] 50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Asp Phe Thr Pro
100 105 110

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

Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly
130 135 140

Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp
145 150 155 160

Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln
165 170 175

Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr
180 185 190

Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys
195 200 205

Lys Cys Ala Asp Ser Asn
210

<210> 38
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43-EHD2-2(N39Q, C102S)-His

<400> 38

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
[0058] 20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

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

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro
115 120 125

Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro
130 135 140

Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr
145 150 155 160

Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
165 170 175

Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser
180 185 190

Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr
195 200 205

Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys
210 215 220

Ser Ala Asp Ser Asn Ala Ala Ala His His His His His His
225 230 235

<210> 39
<211> 692
<212> PRT
[0059] <213> 人工序列

<220>
<223> VHhuU3-EHD2-2-接头-VH3-43-CH1-Fcknob

<400> 39

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

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

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

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

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro Thr
115 120 125

Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro
130 135 140

Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile
145 150 155 160

Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser
165 170 175

Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu
180 185 190

[0060] Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys
195 200 205

Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Ser
210 215 220

Ala Asp Ser Asn Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val
225 230 235 240

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
245 250 255

Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Arg Ala
260 265 270

Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu
275 280 285

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

Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Pro Lys Asn Gln Phe
305 310 315 320

Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
325 330 335

Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly
340 345 350

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
355 360 365

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
370 375 380

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
385 390 395 400

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
405 410 415

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
420 425 430

[0061]

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
435 440 445

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
450 455 460

Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
465 470 475 480

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
485 490 495

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
500 505 510

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
515 520 525

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
530 535 540

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
545 550 555 560

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
565 570 575

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
580 585 590

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
595 600 605

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
610 615 620

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
625 630 635 640

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
645 650 655

[0062]

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
660 665 670

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
675 680 685

Ser Pro Gly Lys
690

<210> 40
<211> 454
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43-CH1-Fchole

<400> 40

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

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

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

[0063]

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

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

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

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

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

Ser Cys Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

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

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

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
325 330 335

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

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

[0064]

Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 41
<211> 692
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH3-43- CH1-接头-VHhuU3-EHD2-2- Fchole

<400> 41

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

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

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

[0065]

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu
225 230 235 240

Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val
245 250 255

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Gly Tyr Thr Met Asn Trp
260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Leu Ile Asn
275 280 285

Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asp Arg Val
290 295 300

Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
305 310 315 320

[0066]

Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly
325 330 335

Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
340 345 350

Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu
355 360 365

Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu
370 375 380

Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp
385 390 395 400

Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr
405 410 415

Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser
420 425 430

Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr
435 440 445

Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp Ser Asn
450 455 460

Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
465 470 475 480

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
485 490 495

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
500 505 510

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
515 520 525

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
530 535 540

[0067] Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
545 550 555 560

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
565 570 575

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
580 585 590

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
595 600 605

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
610 615 620

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
625 630 635 640

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
645 650 655

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

660 665 670

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
675 680 685

Ser Pro Gly Lys
690

<210> 42
<211> 455
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VHhu36-EHD2-2-Fchole

<400> 42

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

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

[0068]

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

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

Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile
130 135 140

Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile
145 150 155 160

Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala
165 170 175

Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr
180 185 190

Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val
195 200 205

Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp
210 215 220

Ser Asn Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

[0069] Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 43
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

[0070]

<220>
<223> VLhu36-EHD2-1

<400> 43

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 Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Ala Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

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

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

Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val
145 150 155 160

Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu
165 170 175

Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser
180 185 190

Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu
195 200 205

[0071] Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn
210 215

<210> 44
<211> 470
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VHhu225-CH1-接头-VH3-43-EHD2-2-His

<400> 44

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

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

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

[0072]

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

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

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
225 230 235 240

Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile
245 250 255

Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg
260 265 270

Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg
275 280 285

Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Gln Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr
290 295 300

Ile Asn Pro Asp Thr Pro Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser
305 310 315 320

Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln
325 330 335

Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
340 345 350

Val Ser Ser Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser
355 360 365

Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu
370 375 380

Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp
385 390 395 400

[0073] Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu
405 410 415

Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His
420 425 430

Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His
435 440 445

Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp Ser Asn Ala Ala Ala
450 455 460

His His His His His His
465 470

<210> 45
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VLhu36-CLk

<400> 45

```
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 Lys Ser Val Ser Thr Ser
            20                  25                  30

Ala Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
        35                  40                  45

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
                85                  90                  95

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

[0074]

```
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165                 170                 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 46
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VHhu36-CH1-Fchole

<400> 46

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

[0075]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
225 230 235 240

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

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

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

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

[0076]

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
325 330 335

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

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

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

Pro Gly Lys
450

<210> 47
<211> 222
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH2C11-EHD2-1

<400> 47

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
[0077] 20 25 30

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys
130 135 140

Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu
145 150 155 160

Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys
180 185 190

His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly
195 200 205

His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn
210 215 220

<210> 48
<211> 441
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL2C11-EHD2-2-Fcknob

[0078] <400> 48

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp
85 90 95

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

Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro
115 120 125

Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr
130 135 140

Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
145 150 155 160

Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser
165 170 175

Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr
180 185 190

Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys
195 200 205

Ser Ala Asp Ser Asn Gly Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
210 215 220

[0079]

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
225 230 235 240

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

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
290 295 300

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

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

[0080]

<210> 49
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL2C11-EHD2-1

<400> 49

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp
85 90 95

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

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

Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr
130 135 140

Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
145 150 155 160

Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser
165 170 175

Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr
180 185 190

[0081]

Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys
195 200 205

Cys Ala Asp Ser Asn
210

<210> 50
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH2C11-EHD2-2-Fcknob

<400> 50

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

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

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Ser Val

35 40 45

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

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

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

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

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

Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys
130 135 140

[0082] Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu
145 150 155 160

Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys
180 185 190

His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly
195 200 205

His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp Ser Asn Gly Thr
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
325 330 335

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

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

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

[0083]

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 51
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VLS309-CLk

<400> 51

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Ser Ser Thr
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[0084] 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 52
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VLP2B-2F6-EHD2-1

<400> 52

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
[0085] 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser
85 90 95

Asn Asn Leu Val Cys Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Asp Phe
100 105 110

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

His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr
130 135 140

Pro Gly Thr Ile Gln Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp
145 150 155 160

Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser
165 170 175

Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg

180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser
195 200 205

Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn
210 215

<210> 53
<211> 699
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VHS309-CH1-VHP2B-2F6-EHD2-2-Fc

<400> 53

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

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

[0086]

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

Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr Thr Gly Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Tyr Thr Arg Gly Ala Trp Phe Gly Glu Ser Leu Ile Gly
100 105 110

Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

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

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

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

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
180 185 190

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
195 200 205

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
210 215 220

Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
245 250 255

[0087] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
260 265 270

Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
275 280 285

Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
290 295 300

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
325 330 335

Ala Arg Ala Val Val Gly Ile Val Val Val Pro Ala Ala Gly Arg Arg
340 345 350

Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Asp
355 360 365

Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly

370 375 380

Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400

Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met
405 410 415

Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala
420 425 430

Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp
435 440 445

Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp
450 455 460

Ser Thr Lys Lys Ser Ala Asp Ser Asn Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
465 470 475 480

[0088] Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
485 490 495

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
500 505 510

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
515 520 525

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
530 535 540

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
545 550 555 560

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
565 570 575

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
580 585 590

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
595 600 605

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
610 615 620

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
625 630 635 640

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
645 650 655

[0089]

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
660 665 670

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
675 680 685

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

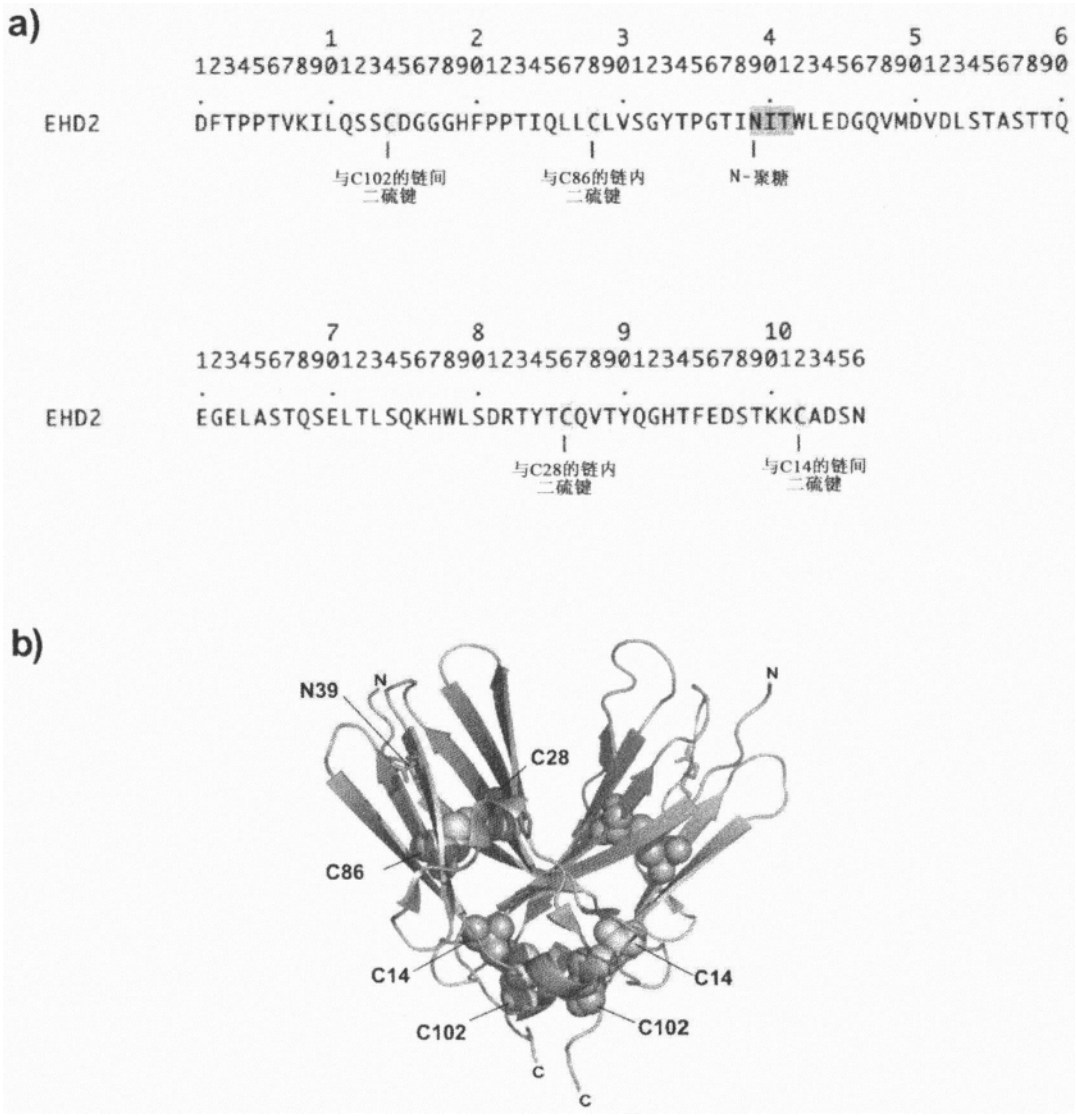

a)
1 2 3 4 5 6
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
EHD2 DFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTASTTQ
与C102的链间二硫键
与C86的链内二硫键
N-聚糖
7 8 9 10
12345678901234567890123456789012345678901234567890123456
EHD2 EGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSN
与C28的链内二硫键
与C14的链间二硫键
b)
N39
N
C28
C86
C14
C102
C
N
C14
C102
C

图1

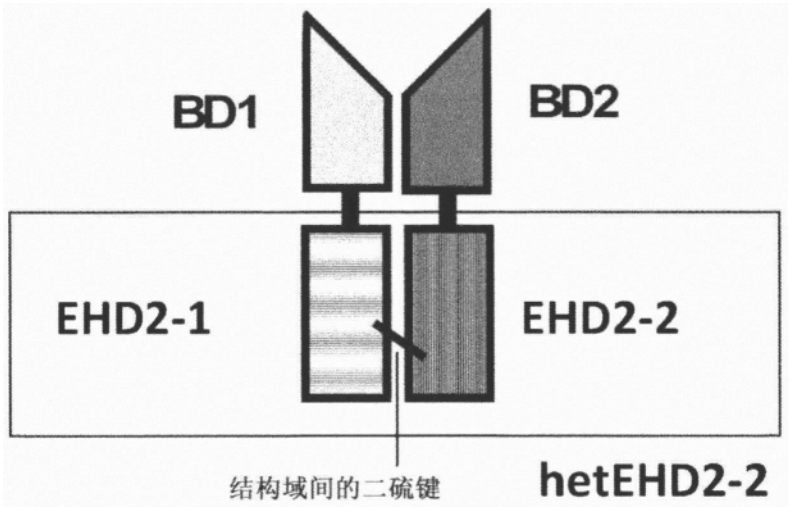

BD1
BD2
EHD2-1
EHD2-2
结构域间的二硫键
hetEHD2-2

图2

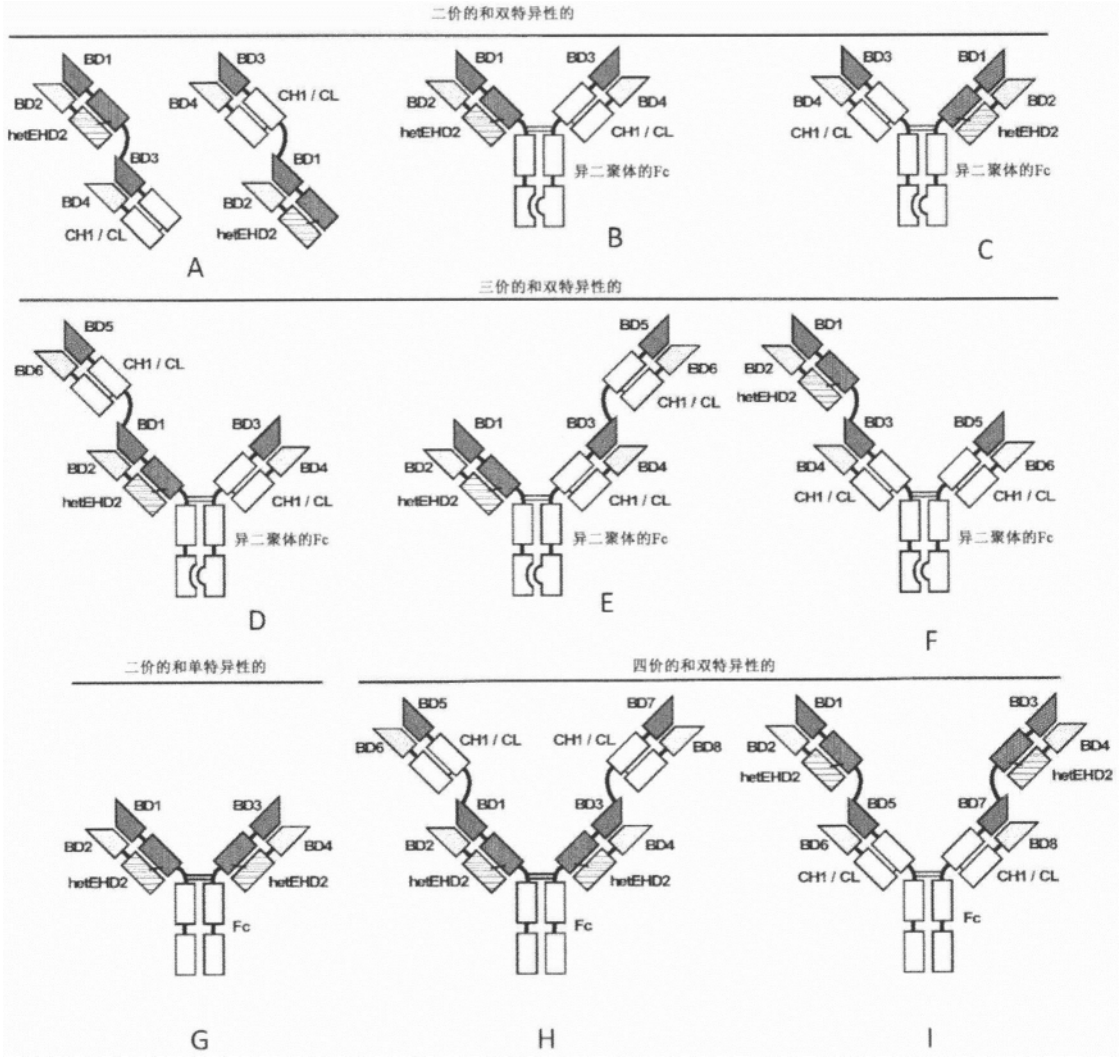

二价的和双特异性的
三价的和双特异性的
二价的和单特异性的
四价的和双特异性的
BD1
BD2
BD3
BD4
BD5
BD6
BD7
BD8
hetEHD2
CH1 / CL
异二聚体的Fc
Fc
A
B
C
D
E
F
G
H
I

图3

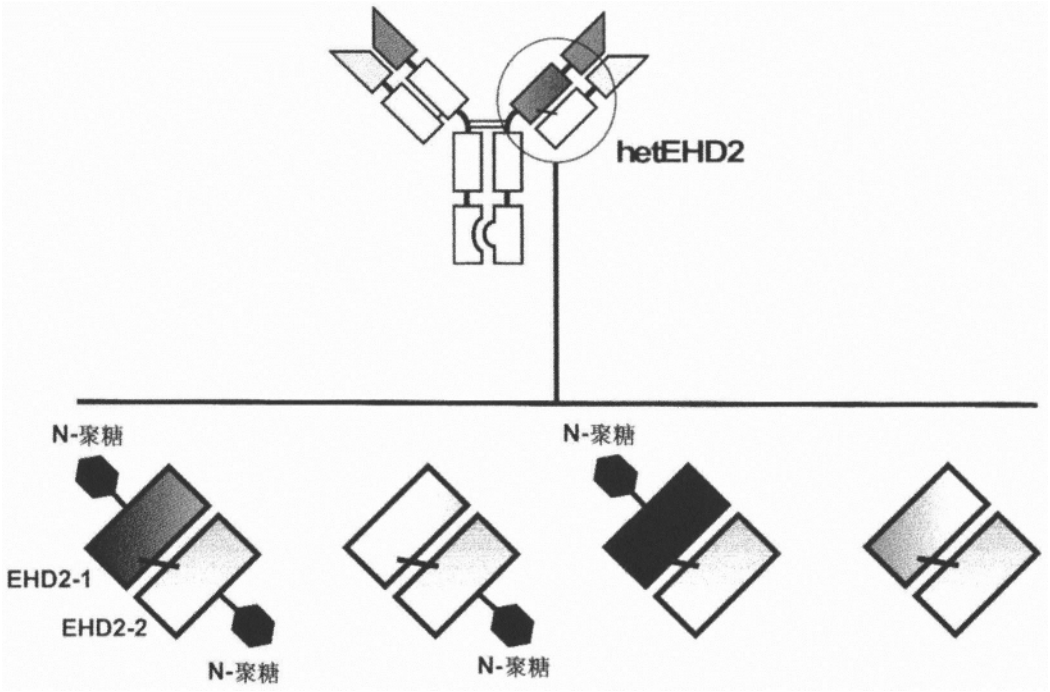


图4

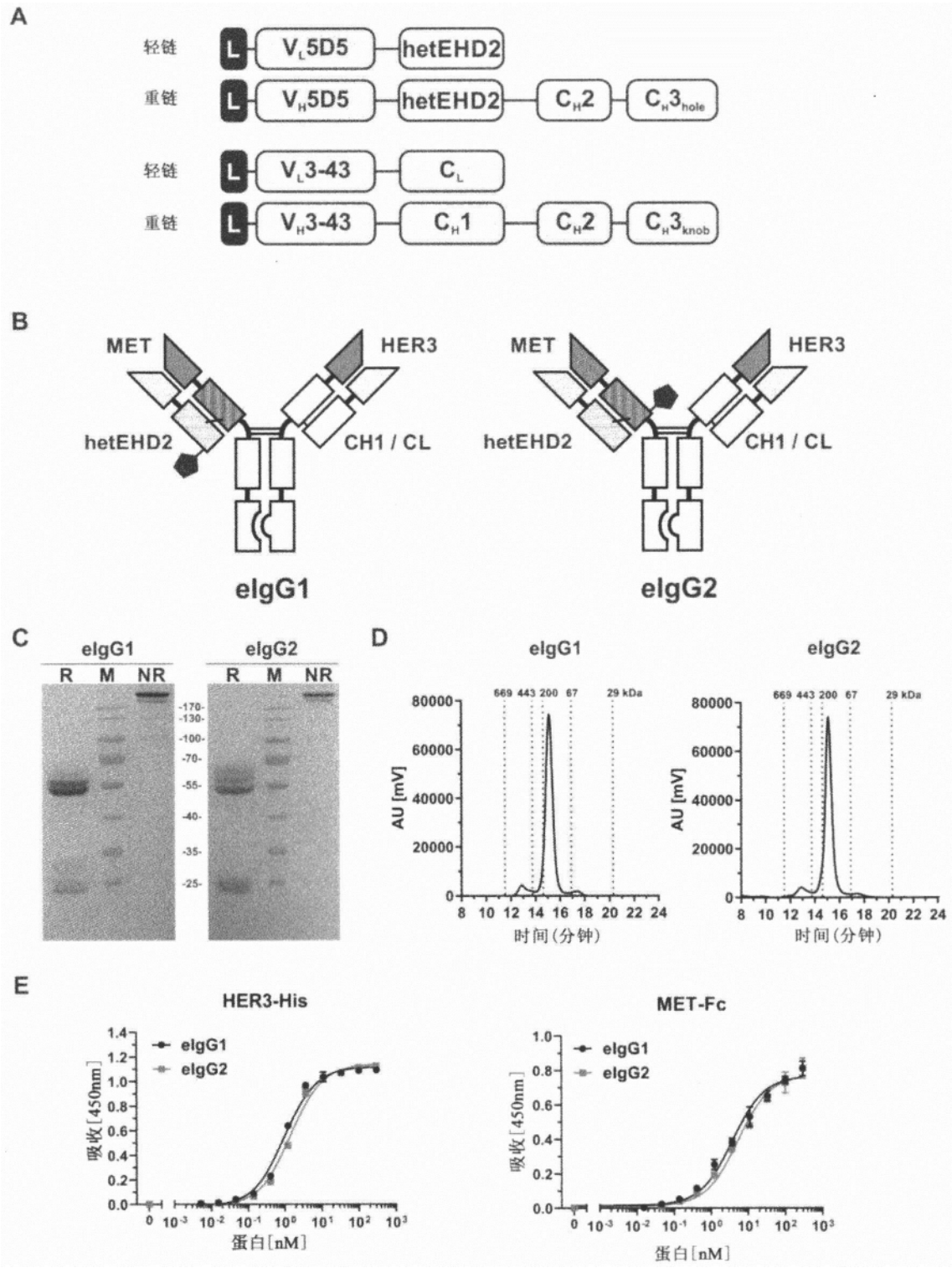

A
轻链
L
VL5D5
hetEHD2
重链
L
VH5D5
hetEHD2
CH2
CH3hole
轻链
L
VL3-43
CL
重链
L
VH3-43
CH1
CH2
CH3knob
B
MET
HER3
hetEHD2
CH1 / CL
eIgG1
MET
HER3
hetEHD2
CH1 / CL
eIgG2
C
eIgG1
eIgG2
R M NR
R M NR
-170-
-130-
-100-
-70-
-55-
-40-
-35-
-25-
D
eIgG1
eIgG2
669 443 200 67 29 kDa
AU [mV]
时间(分钟)
E
HER3-His
MET-Fc
eIgG1
eIgG2
吸收[450nm]
蛋白[nM]

图5

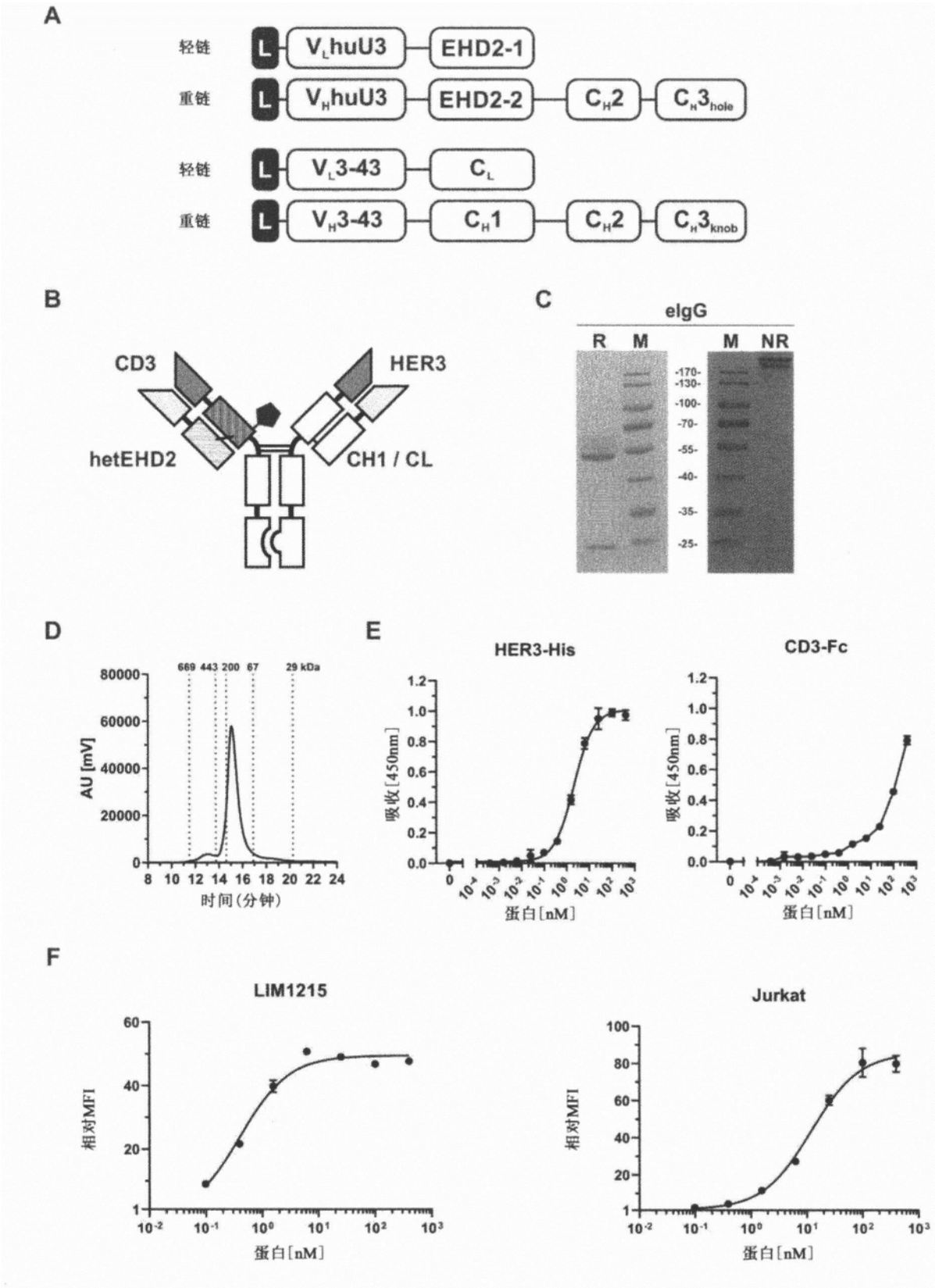

A
轻链
L
VLhuU3
EHD2-1
重链
L
VHhuU3
EHD2-2
CH2
CH3hole
轻链
L
VL3-43
CL
重链
L
VH3-43
CH1
CH2
CH3knob
B
CD3
HER3
hetEHD2
CH1 / CL
C
eIgG
R
M
M
NR
-170-
-130-
-100-
-70-
-55-
-40-
-35-
-25-
D
669 443 200 67 29 kDa
AU [mV]
时间(分钟)
E
HER3-His
CD3-Fc
吸收[450nm]
蛋白[nM]
F
LIM1215
Jurkat
相对MFI
蛋白[nM]

图6

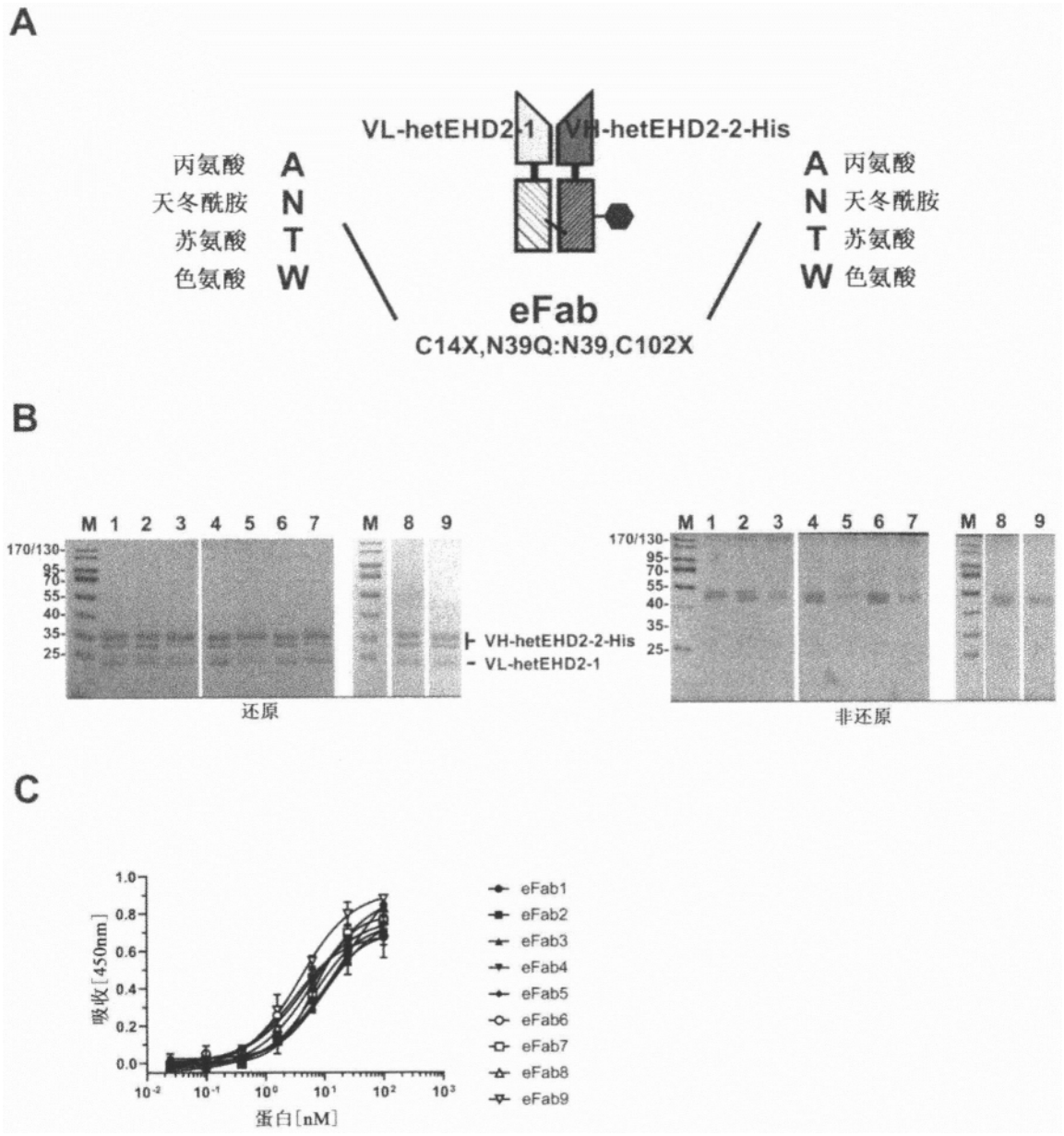

A
VL-hetEHD2-1
VH-hetEHD2-2-His
丙氨酸 A
天冬酰胺 N
苏氨酸 T
色氨酸 W
A 丙氨酸
N 天冬酰胺
T 苏氨酸
W 色氨酸
eFab
C14X,N39Q:N39,C102X
B
M 1 2 3 4 5 6 7 M 8 9
170/130-
95-
70-
55-
40-
35-
25-
VH-hetEHD2-2-His
VL-hetEHD2-1
还原
非还原
C
吸收[450nm]
蛋白[nM]
eFab1
eFab2
eFab3
eFab4
eFab5
eFab6
eFab7
eFab8
eFab9

图7

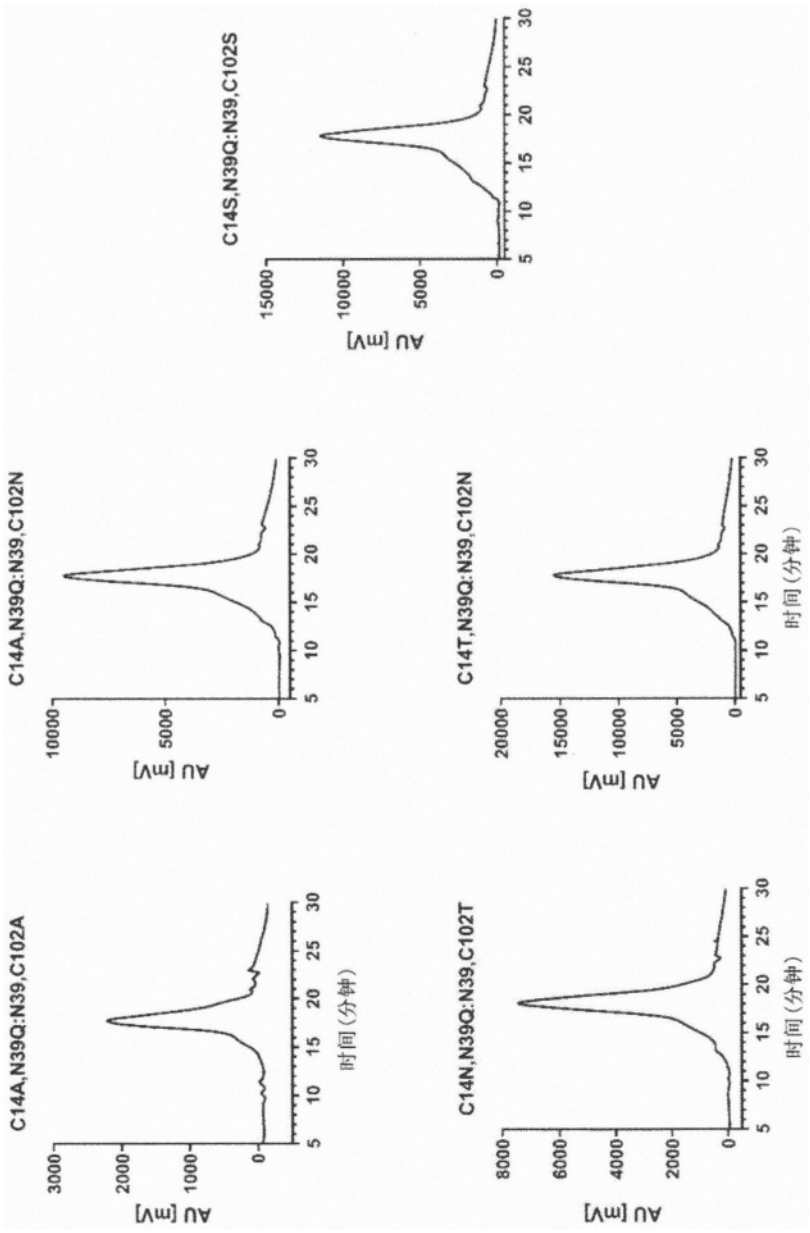

C14S,N39Q:N39,C102S
C14A,N39Q:N39,C102N
C14T,N39Q:N39,C102N
C14A,N39Q:N39,C102A
C14N,N39Q:N39,C102T
AU [mV]
时间(分钟)

图8

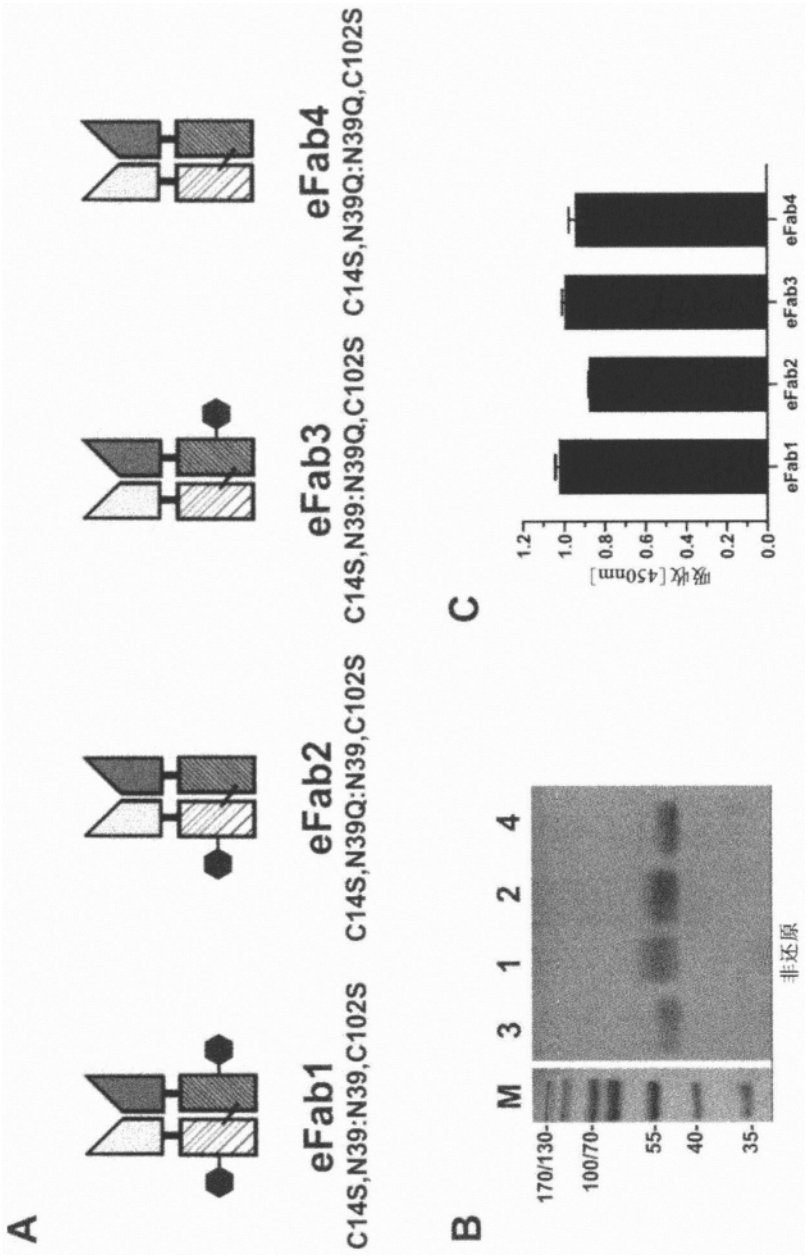

A
eFab1
C14S,N39:N39,C102S
eFab2
C14S,N39Q:N39,C102S
eFab3
C14S,N39:N39Q,C102S
eFab4
C14S,N39Q:N39Q,C102S
B
M
3
1
2
4
170/130-
100/70-
55-
40-
35-
非还原
C
吸收[450nm]
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
eFab1
eFab2
eFab3
eFab4

图9

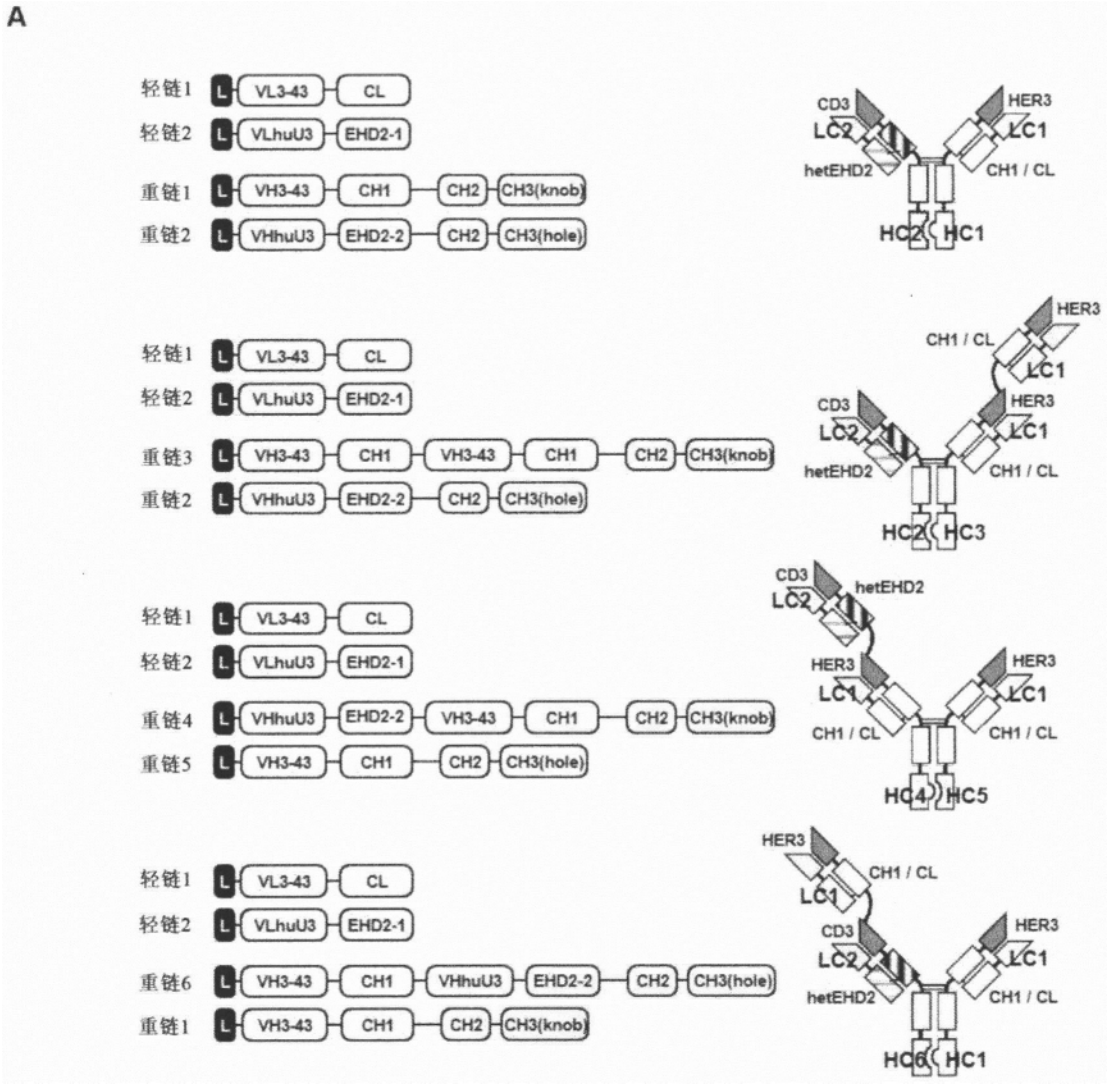

A
轻链1
VL3-43
CL
轻链2
VLhuU3
EHD2-1
重链1
VH3-43
CH1
CH2
CH3(knob)
重链2
VHhuU3
EHD2-2
CH2
CH3(hole)
CD3
HER3
LC2
LC1
hetEHD2
CH1 / CL
HC2
HC1
重链3
VH3-43
CH1
VH3-43
CH1
CH2
CH3(knob)
HC3
重链4
VHhuU3
EHD2-2
VH3-43
CH1
CH2
CH3(knob)
重链5
VH3-43
CH1
CH2
CH3(hole)
HC4
HC5
重链6
VH3-43
CH1
VHhuU3
EHD2-2
CH2
CH3(hole)
重链1
VH3-43
CH1
CH2
CH3(knob)
HC6
HC1

图10

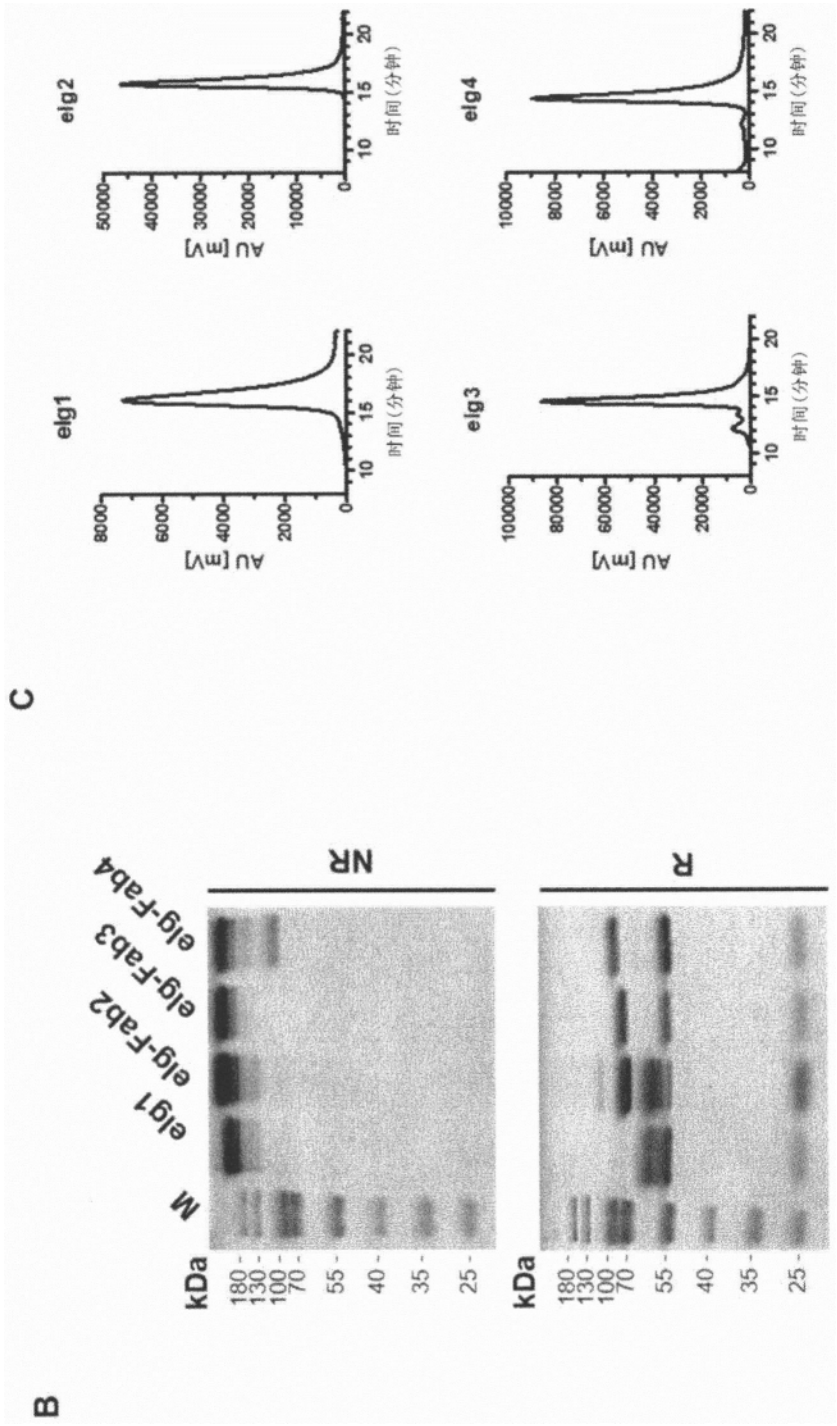

B
NR
R
M
elg1
elg-Fab2
elg-Fab3
elg-Fab4
kDa
180
130
100
70
55
40
35
25
C
elg1
elg2
elg3
elg4
AU [mV]
时间 (分钟)

图10续

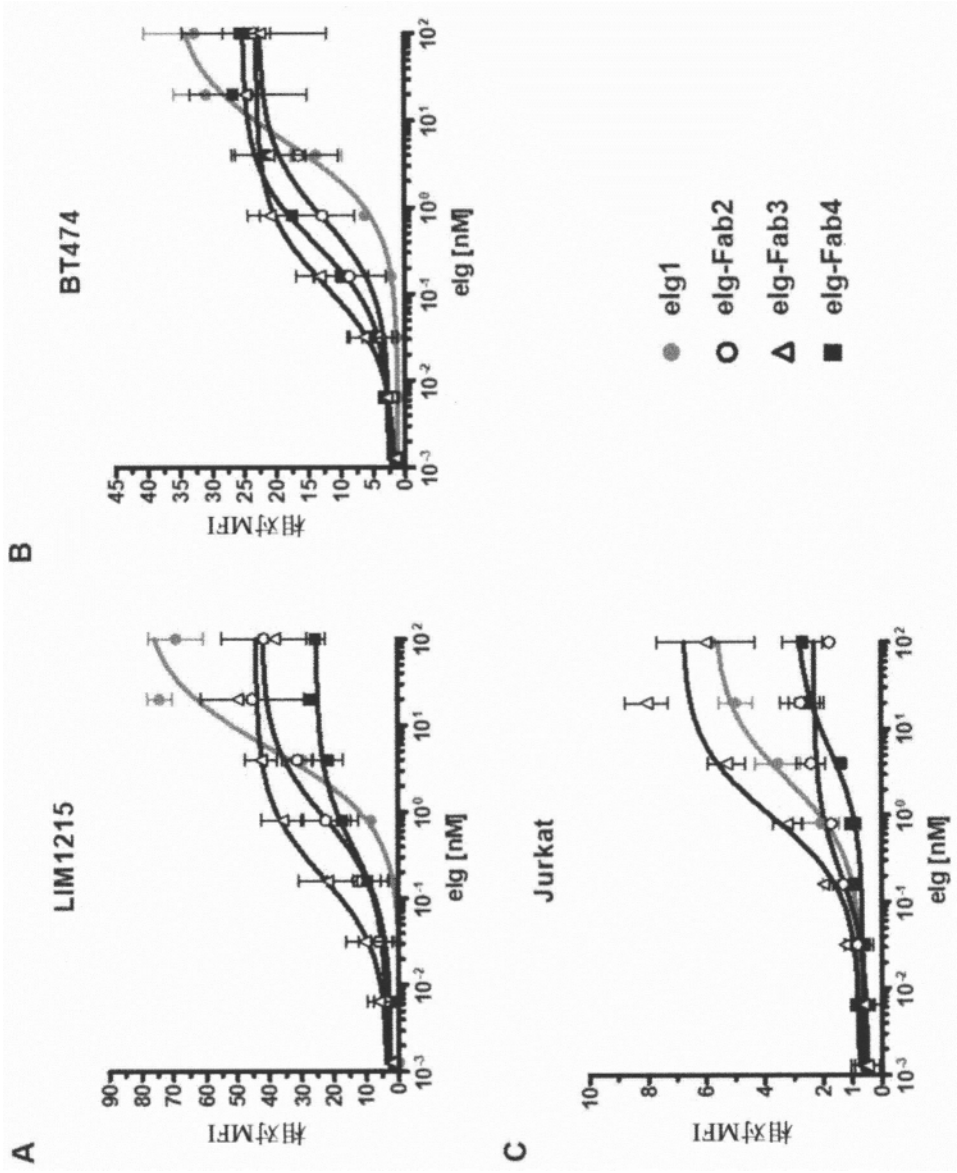

A
LIM1215
相对MFI
elg [nM]
B
BT474
相对MFI
elg [nM]
C
Jurkat
相对MFI
elg [nM]
elg1
elg-Fab2
elg-Fab3
elg-Fab4

图11

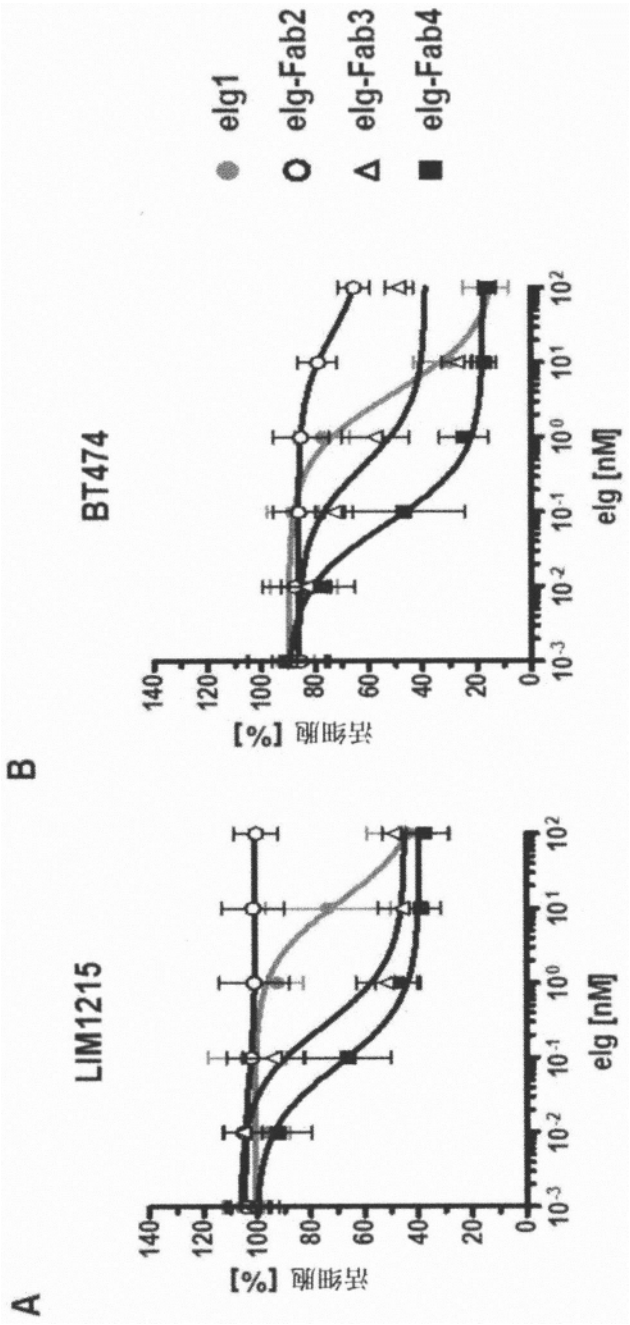

A
LIM1215
B
BT474
elg1
elg-Fab2
elg-Fab3
elg-Fab4
活细胞 [%]
elg [nM]
0
20
40
60
80
100
120
140
10-3
10-2
10-1
100
101
102

图12

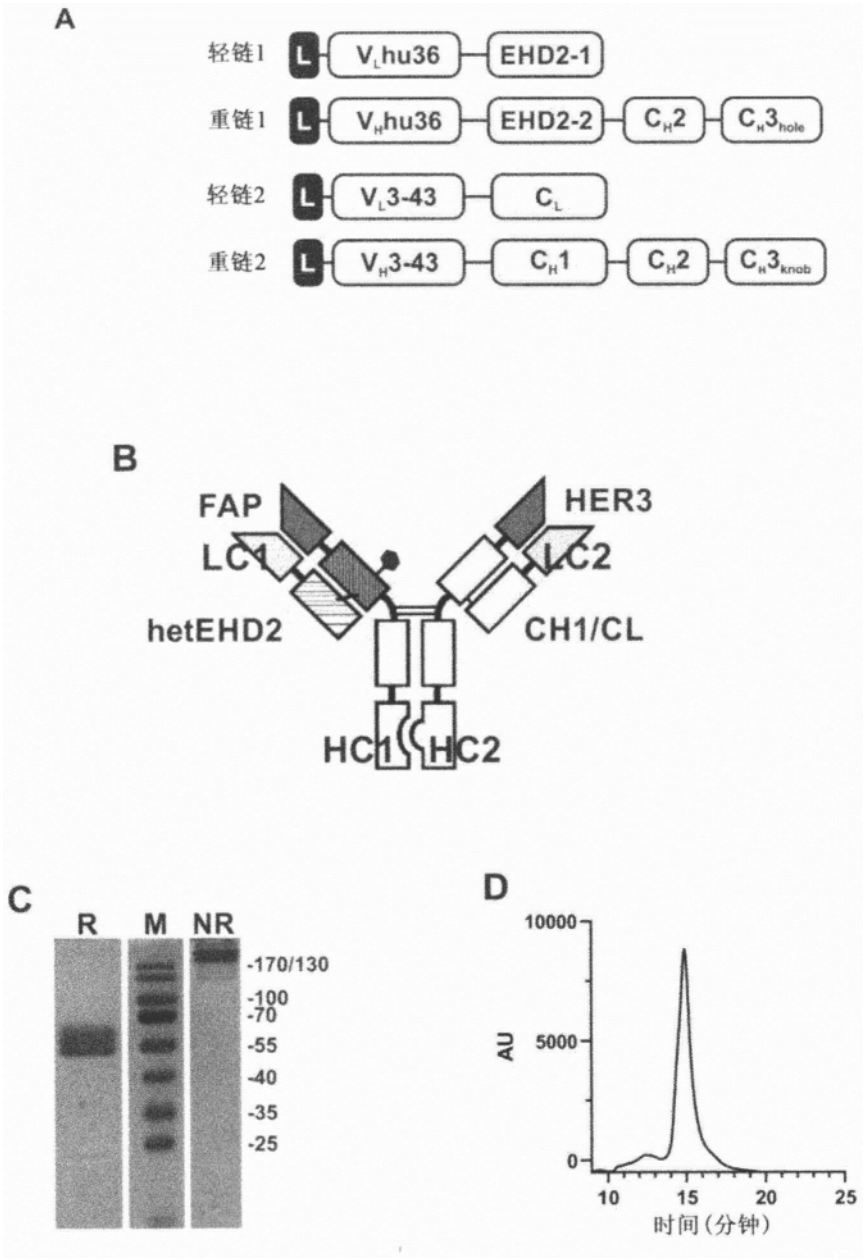

A
轻链1
L
VLhu36
EHD2-1
重链1
L
VHhu36
EHD2-2
CH2
CH3hole
轻链2
L
VL3-43
CL
重链2
L
VH3-43
CH1
CH2
CH3knob
B
FAP
HER3
LC1
LC2
hetEHD2
CH1/CL
HC1
HC2
C
R
M
NR
-170/130
-100
-70
-55
-40
-35
-25
D
10000
5000
0
AU
10
15
20
25
时间(分钟)

图13

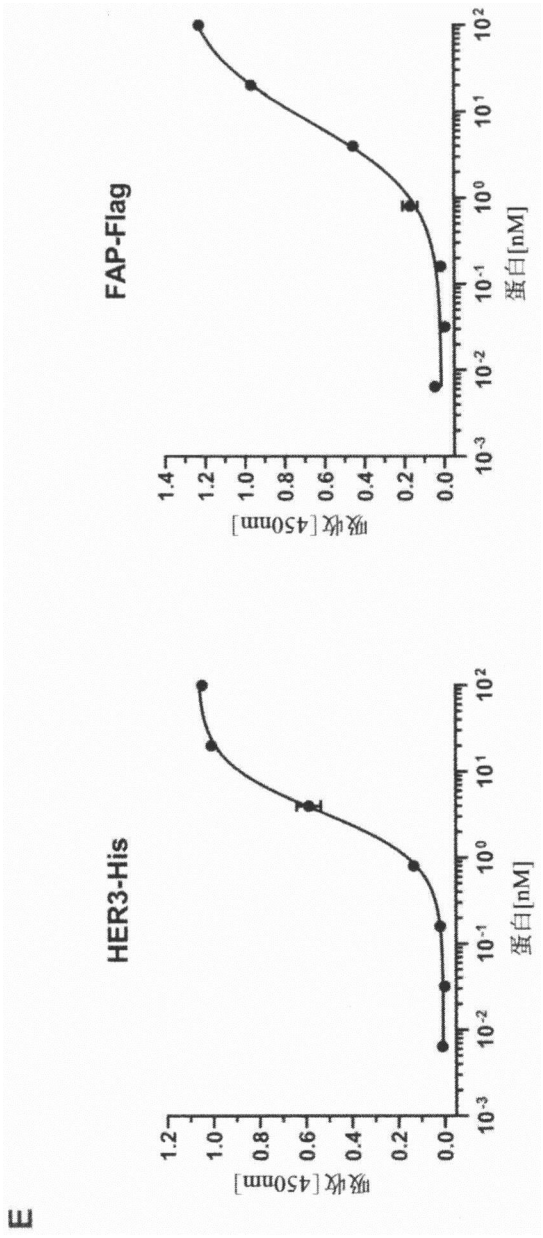

E
HER3-His
FAP-Flag
吸收[450nm]
蛋白[nM]
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
10-3
10-2
10-1
100
101
102

图13续

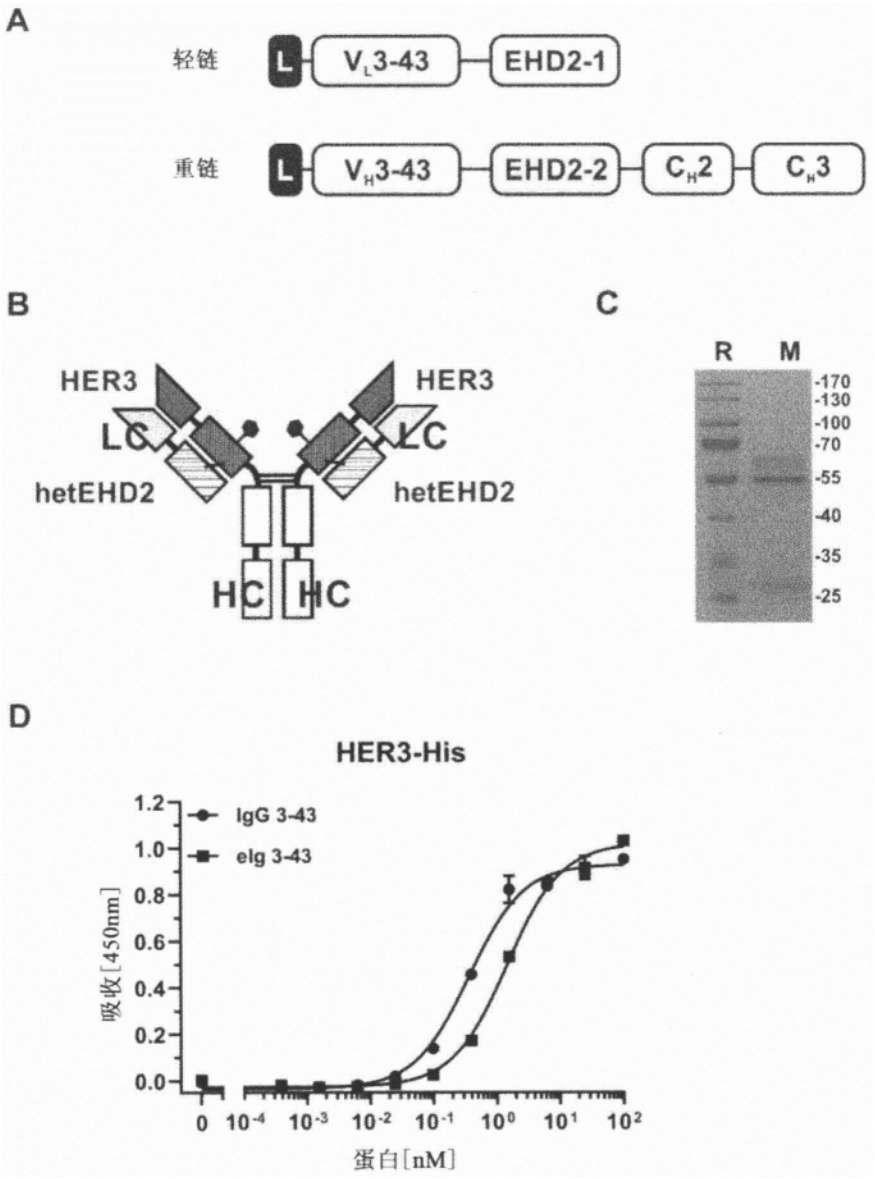

A
轻链
L
V_L3-43
EHD2-1
重链
L
V_H3-43
EHD2-2
C_H2
C_H3
B
HER3
HER3
LC
LC
hetEHD2
hetEHD2
HC
HC
C
R
M
-170
-130
-100
-70
-55
-40
-35
-25
D
HER3-His
IgG 3-43
eIg 3-43
吸收[450nm]
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
蛋白[nM]

图14

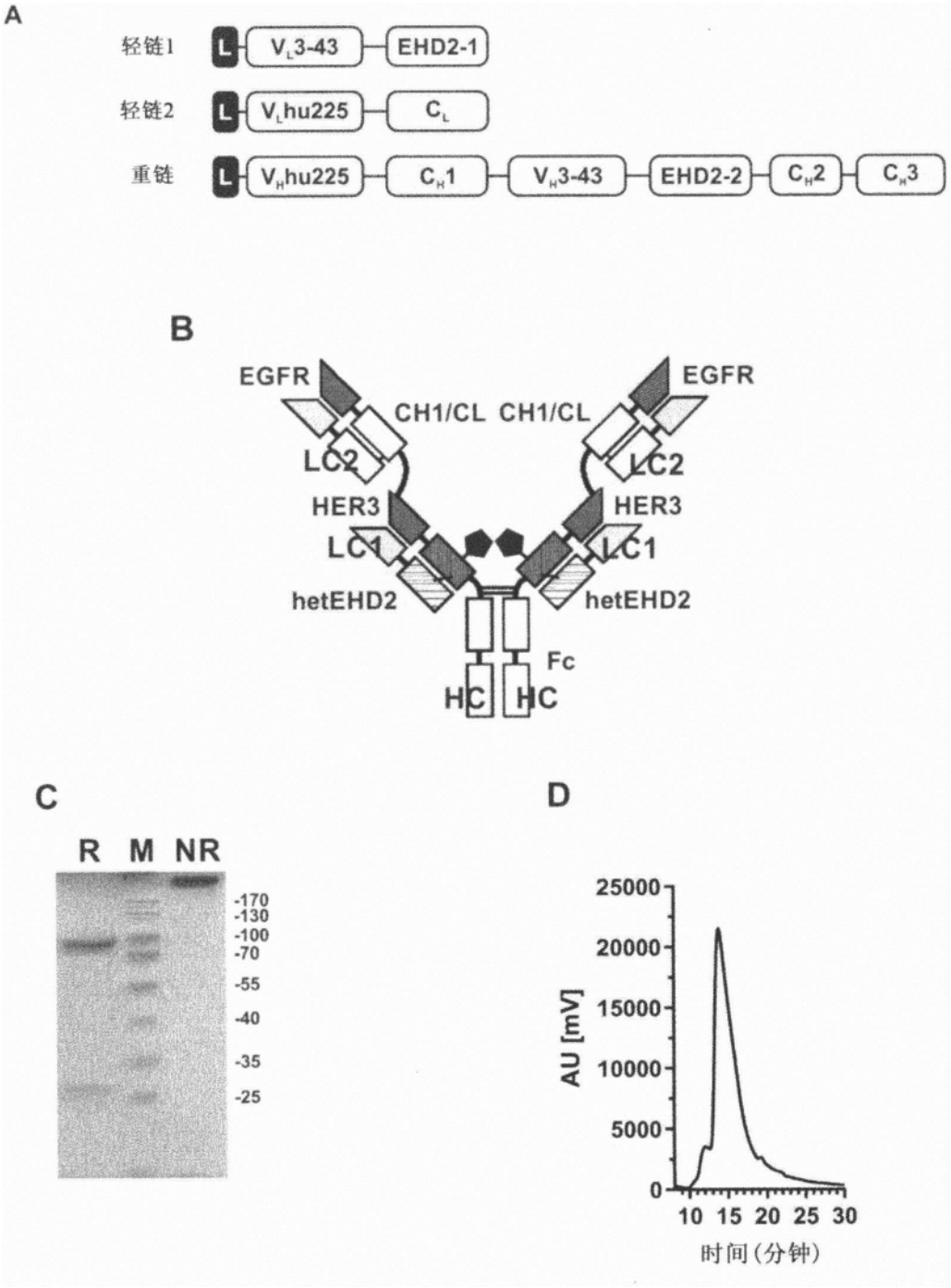

A
轻链1
L
VL3-43
EHD2-1
轻链2
L
VLhu225
CL
重链
L
VHhu225
CH1
VH3-43
EHD2-2
CH2
CH3
B
EGFR
EGFR
CH1/CL CH1/CL
LC2
LC2
HER3
HER3
LC1
LC1
hetEHD2
hetEHD2
Fc
HC
HC
C
R M NR
-170
-130
-100
-70
-55
-40
-35
-25
D
25000
20000
15000
10000
5000
0
AU [mV]
10 15 20 25 30
时间(分钟)

图15

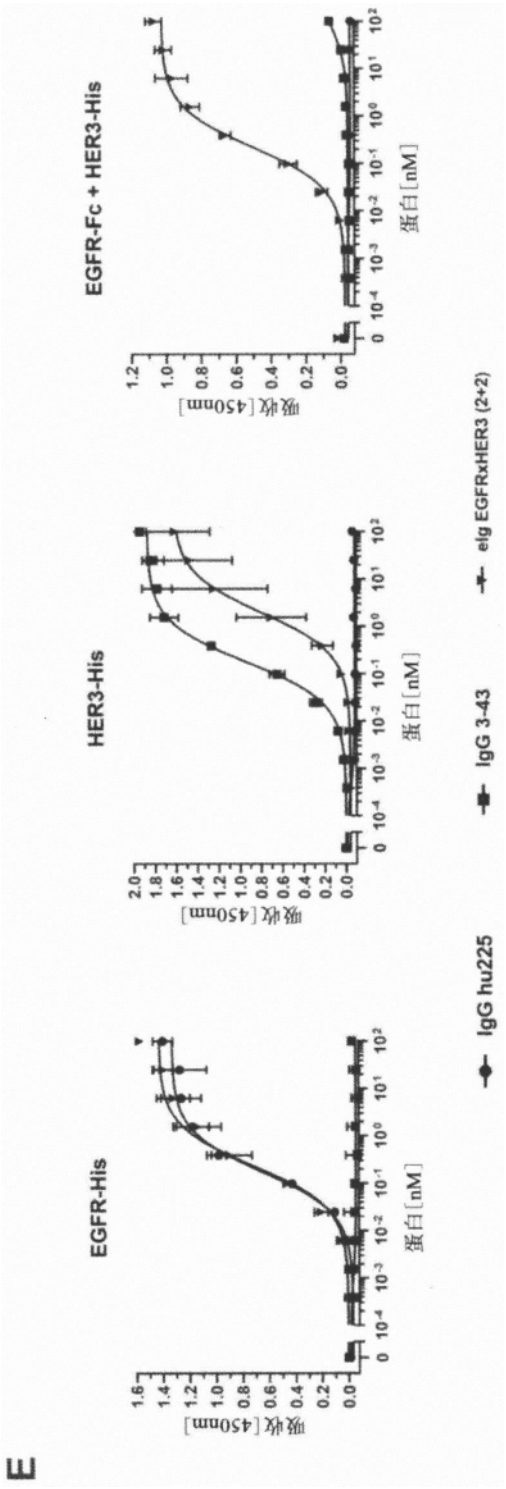

E
EGFR-His
HER3-His
EGFR-Fc + HER3-His
吸收[450nm]
蛋白[nM]
IgG hu225
IgG 3-43
elg EGFRxHER3 (2+2)

图15续

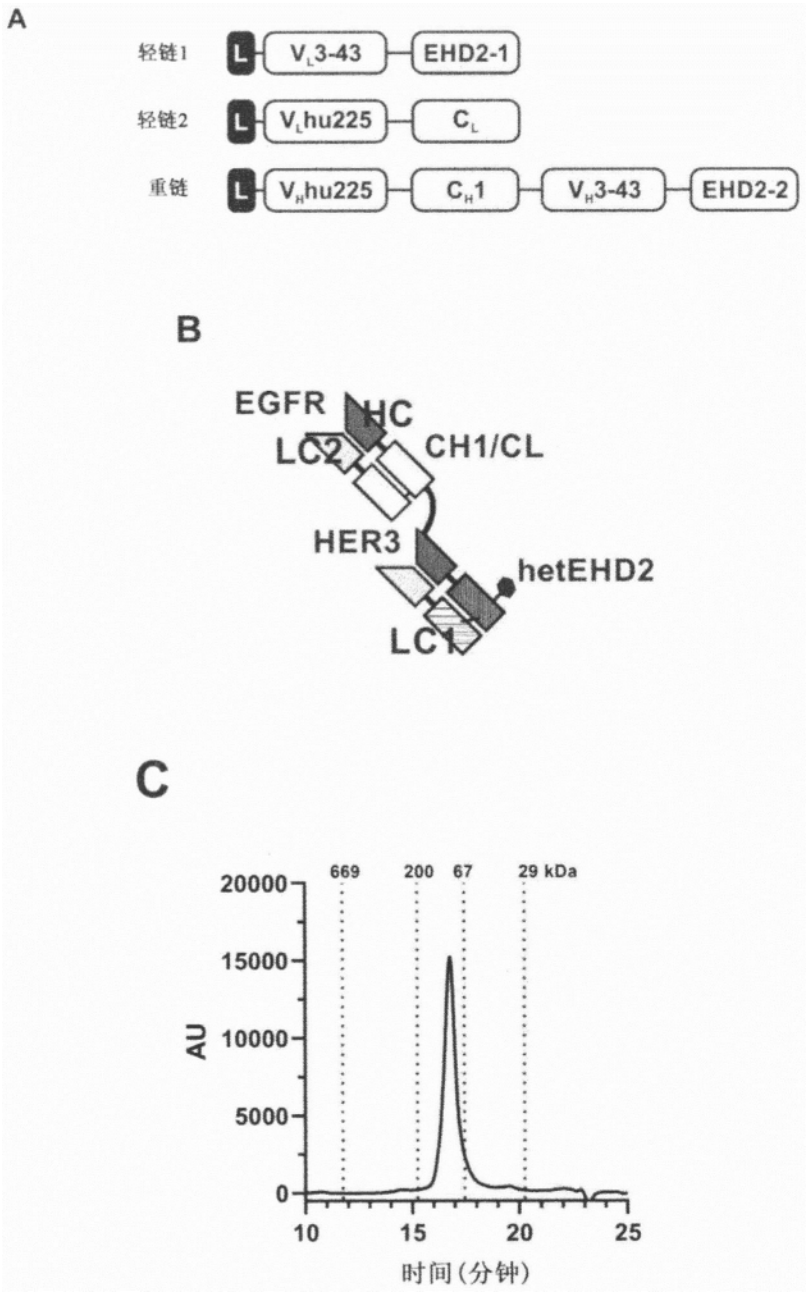

A
轻链1
L
VL3-43
EHD2-1
轻链2
L
VLhu225
CL
重链
L
VHhu225
CH1
VH3-43
EHD2-2
B
EGFR
HC
LC2
CH1/CL
HER3
hetEHD2
LC1
C
669
200
67
29 kDa
20000
15000
10000
5000
0
AU
10
15
20
25
时间(分钟)

图16

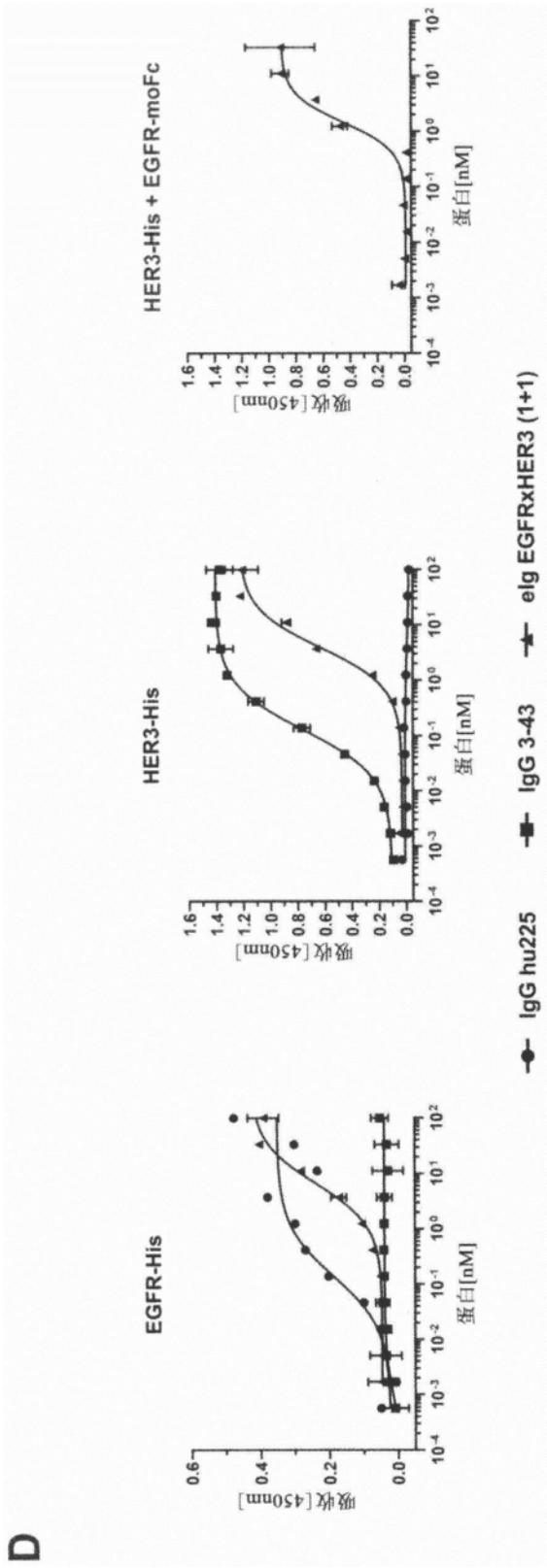

D
EGFR-His
HER3-His
HER3-His + EGFR-moFc
吸收[450nm]
蛋白[nM]
IgG hu225
IgG 3-43
elg EGFRxHER3 (1+1)

图16续

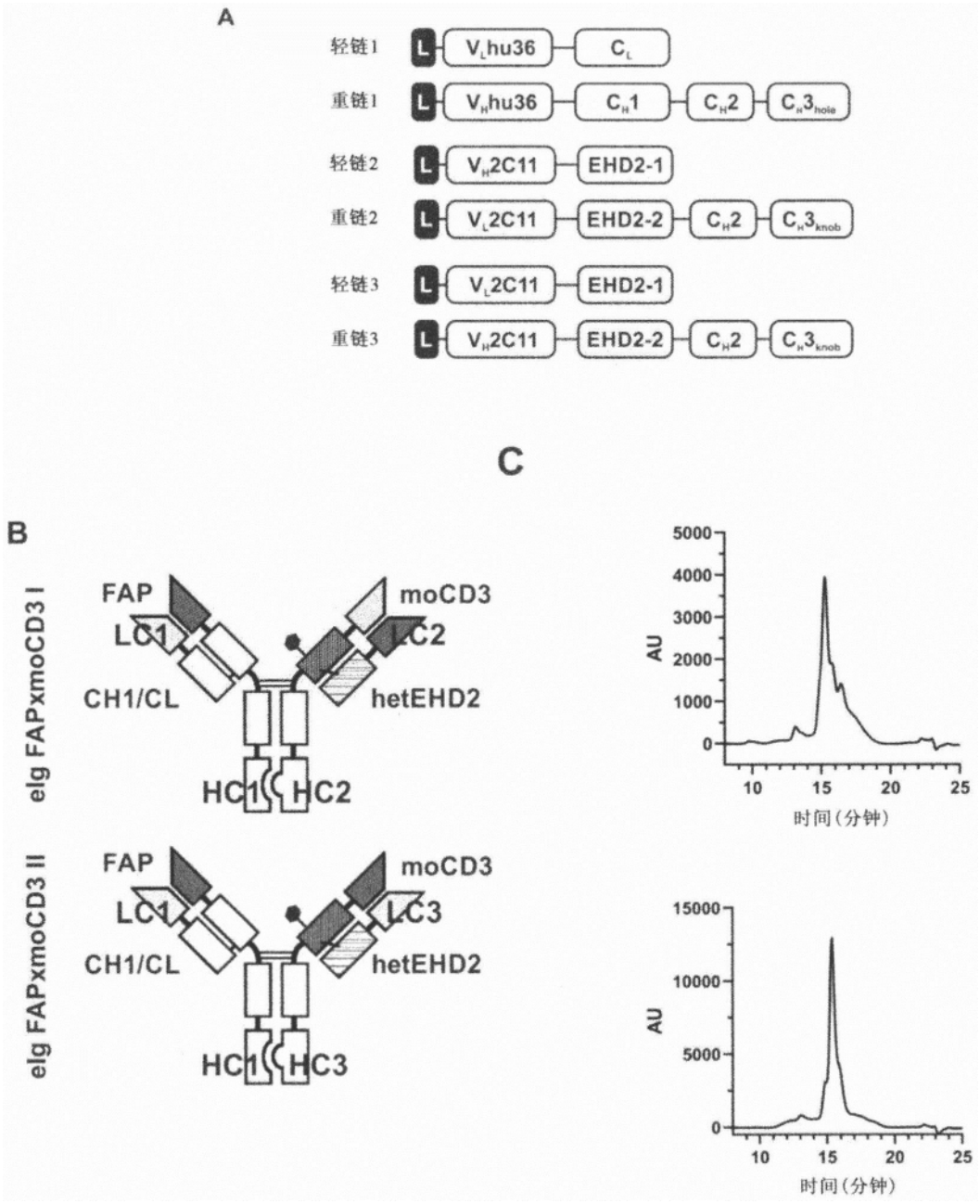

A
轻链1
L
VLhu36
CL
重链1
L
VHhu36
CH1
CH2
CH3hole
轻链2
L
VH2C11
EHD2-1
重链2
L
VL2C11
EHD2-2
CH2
CH3knob
轻链3
L
VL2C11
EHD2-1
重链3
L
VH2C11
EHD2-2
CH2
CH3knob
C
B
elg FAPxmoCD3 I
FAP
moCD3
LC1
LC2
CH1/CL
hetEHD2
HC1
HC2
elg FAPxmoCD3 II
FAP
moCD3
LC1
LC3
CH1/CL
hetEHD2
HC1
HC3
AU
时间(分钟)
AU
时间(分钟)

图17

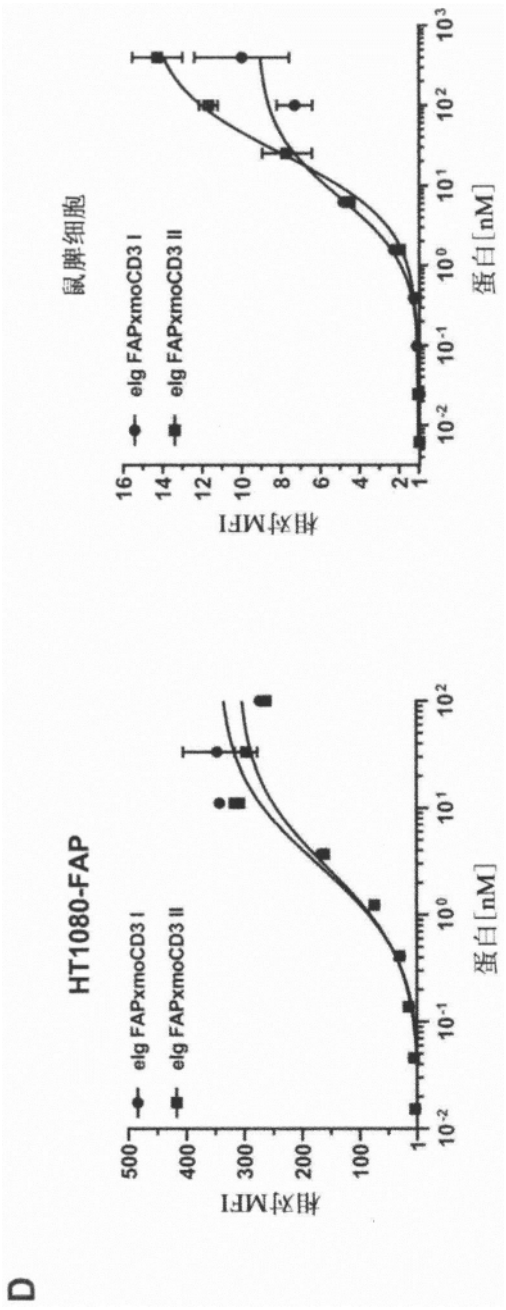

D
HT1080-FAP
鼠脾细胞
elg FAPxmoCD3 I
elg FAPxmoCD3 II
相对MFI
蛋白[nM]

图17续

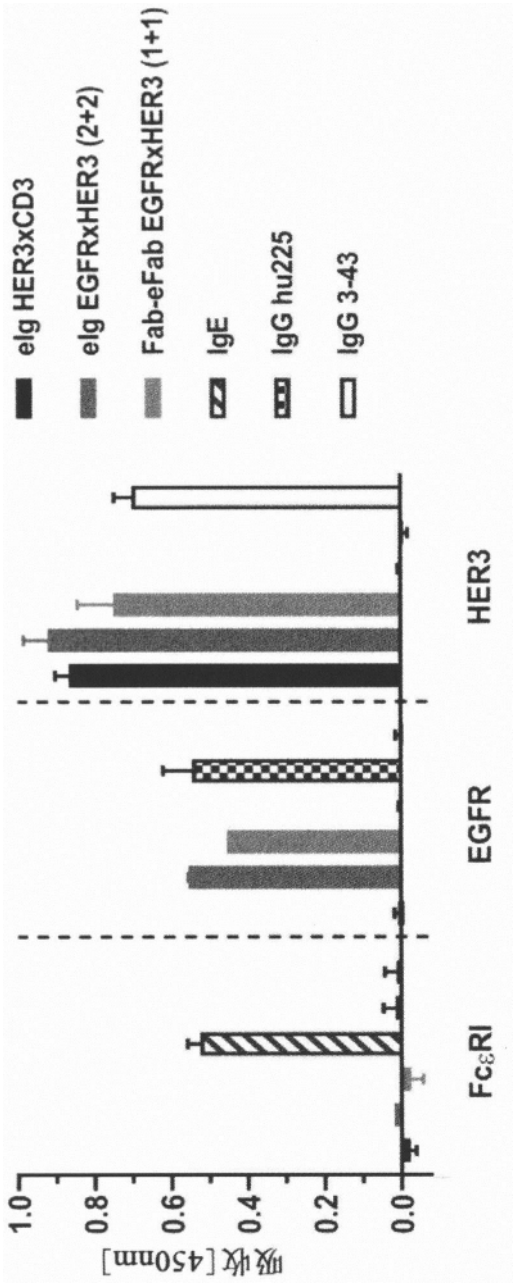

elg HER3xCD3
elg EGFRxHER3 (2+2)
Fab-eFab EGFRxHER3 (1+1)
IgE
IgG hu225
IgG 3-43
HER3
EGFR
FcεRI
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
吸收 [450nm]

图18

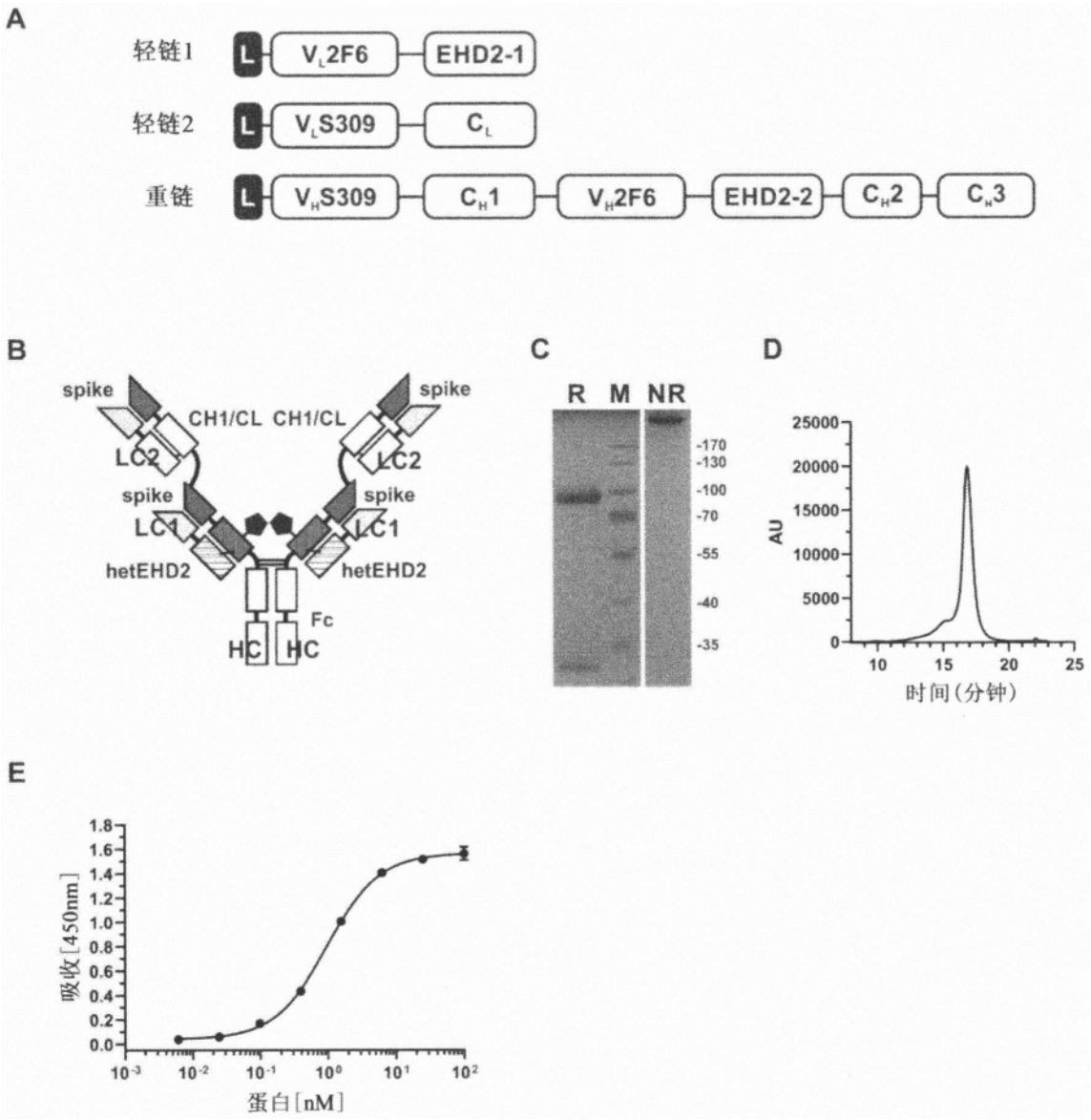

A
轻链1
L
V_L2F6
EHD2-1
轻链2
L
V_LS309
C_L
重链
L
V_HS309
C_H1
V_H2F6
EHD2-2
C_H2
C_H3
B
spike
CH1/CL CH1/CL
spike
LC2
LC2
spike
spike
LC1
LC1
hetEHD2
hetEHD2
Fc
HC
HC
C
R M NR
-170
-130
-100
-70
-55
-40
-35
D
AU
25000
20000
15000
10000
5000
0
10 15 20 25
时间(分钟)
E
吸收[450nm]
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
10^-3 10^-2 10^-1 10^0 10^1 10^2
蛋白[nM]

图19