(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119317447 A
(43)申请公布日 2025.01.14

(21)申请号 202380044842.4
(22)申请日 2023.04.11
(30)优先权数据
63/330,277 2022.04.12 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.12.03
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/065637 2023.04.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/201234 EN 2023.10.19
(71)申请人 米纳瓦生物技术公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 辛西娅·巴姆达德
贝努瓦·斯马格 S·莫
托马斯·全
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 王玉桂 武晶晶
(51)Int.Cl.
A61K 47/22(2006.01)
A61K 47/54(2006.01)
A61K 47/65(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

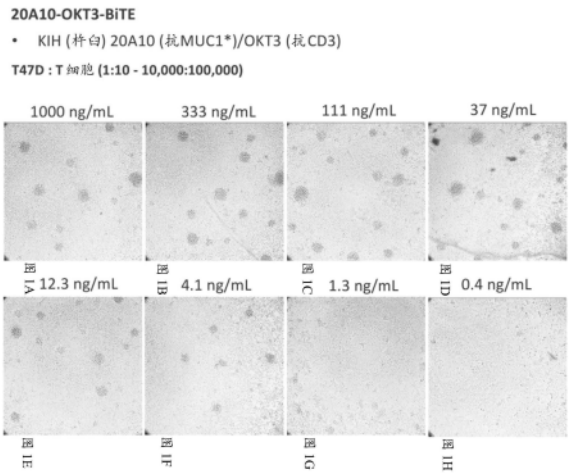
权利要求书6页 说明书106页
序列表（电子公布） 附图108页

(54)发明名称

抗可变MUC1*抗体及其用途

(57)摘要

本文描述了用于治疗剂的靶向递送的方法和组合物以及包含MUC1*的结合结构域和与CD3的结合结构域的多特异性抗体或抗体片段。本公开内容还提供了包含抗体的组合物和用于治疗疾病和病症如癌症的方法。



CN 119317447 A

1.一种式(I)的缀合物:

$[Ab]-[Z-L-R-X]_y$式(I),

其中:

X是衍生自能够抑制扑异构酶I的化合物或能够抑制微管蛋白形成的化合物的部分;

R是偶联部分;

L是具有结合至N末端的Z和结合至C端的R的二肽、三肽或四肽连接部分;

[Ab]是包含抗MUC1*结合结构域的抗体,所述抗MUC1*结合结构域包含三个重链(HC)互补决定区(CDR):MUC1*HC-CDR1、MUC1*HC-CDR2和MUC1*HC-CDR3;其中所述MUC1*结合结构域的所述MUC1*HC-CDR1、所述MUC1*HC-CDR2和所述MUC1*HC-CDR3包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列;

其中MUC1*结合结构域包含三个轻链(LC)互补决定区(CDR):MUC1*LC-CDR1、MUC1*LC-CDR2和MUC1*LC-CDR3;其中所述MUC1*结合结构域的所述MUC1*LC-CDR1、所述MUC1*LC-CDR2和所述MUC1*LC-CDR3包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列;

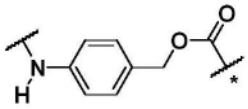
Z是能够与半胱氨酸残基的硫原子形成共价键的缀合部分;并且

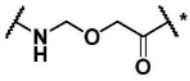
其中y是1至10的整数。

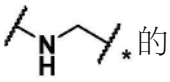
2.根据权利要求1所述的缀合物,其中L包括缬氨酸和瓜氨酸。

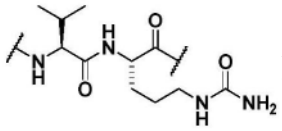
3.根据权利要求1所述的缀合物,其中L包括甘氨酸和苯丙氨酸。

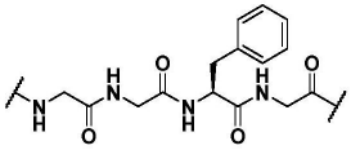
4.根据权利要求1所述的缀合物,其中R包括对氨基苄基。

5.根据权利要求1所述的缀合物,其中R包括包含结构  的部分,其中*表示所述X基团的附着点。

6.根据权利要求1所述的缀合物,其中R包括包含结构  的部分,其中*表示所述X基团的附着点。

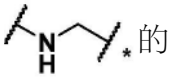
7.根据权利要求1所述的缀合物,其中R包括包含结构  的部分,其中*表示所述X基团的附着点。

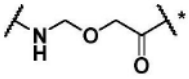
8.根据权利要求1所述的缀合物,其中L是包含结构  的二肽连接部分。

9.根据权利要求1所述的缀合物,其中L是包含结构  的四肽连接部分。

10.根据权利要求1所述的缀合物,其中X是MMAE或MMAF。

11.根据权利要求1所述的缀合物,其中X是依沙替康或Dxd。

12.根据权利要求1所述的缀合物,其中R包括包含结构  的部分,其中*表示所述X基团的附着点,并且其中X是Dxd。

13.根据权利要求1所述的缀合物,其中R包括包含结构  的部分,其中*表示所述X基团的附着点,并且其中X是依沙替康。

14.根据权利要求1所述的缀合物,其中所述抗体是同种型IgG1或IgG2。

15.根据权利要求1所述的缀合物,其中所述抗体是同种型IgG2b。

16.根据权利要求1所述的缀合物,其中所述抗MUC1*结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:38或44的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链。

17.根据权利要求1所述的缀合物,其中所述抗MUC1*结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:39或45的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变结构域。

18.根据权利要求1所述的缀合物,其中所述抗MUC1*结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:41或47的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链。

19.根据权利要求1所述的缀合物,其中所述抗MUC1*结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:42或48的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变结构域。

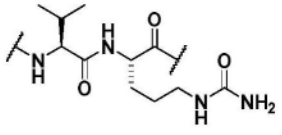
20.根据权利要求1所述的缀合物,其中所述抗MUC1*结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:129或130的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的单链可变片段(scFv)。

21.一种包括包含抗MUC1*结合结构域的抗体的抗体缀合物,其中所述抗体通过马来酰亚胺-半胱氨酸键缀合至有效载荷,其中所述有效载荷包括接头和细胞毒性化合物,其中所述细胞毒性化合物包括微管蛋白抑制剂或拓扑异构酶I抑制剂。

22.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述接头包含缬氨酸。

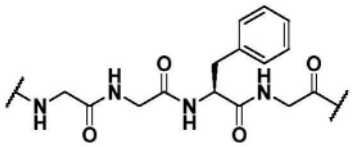
23.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述接头包含瓜氨酸。

24.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述接头包含缬氨酸和瓜氨酸。

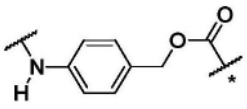
25.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述接头是包含结构  的二肽连接部分。

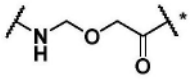
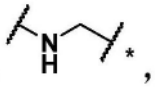
26.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述接头包含至少一个甘氨酸。

27.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述接头包含至少一个甘氨酸和苯丙氨酸。

28.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述接头包含结构  。

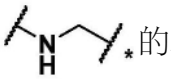
29.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述接头包含对氨基苄基。

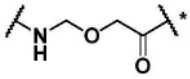
30.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述接头包含结构基团  ,其中*表示所述细胞毒性基团的附着点。

31.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述接头包含结构基团  或  ,其中*表示所述细胞毒性基团的附着点。

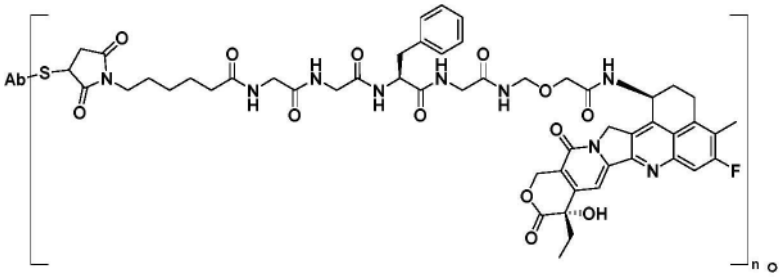
32.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述微管蛋白抑制剂是MMAE或MMAF。

33.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述拓扑异构酶I抑制剂是依沙替康或德鲁替康,或其衍生物。

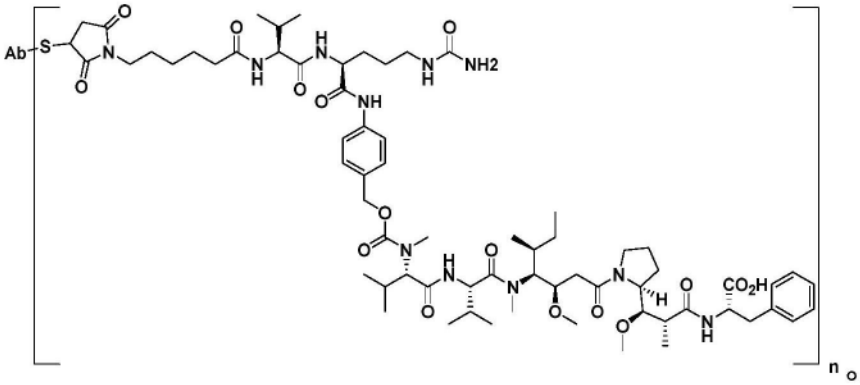
34.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述接头包括包含结构  的基团,其中*表示所述细胞毒性基团的附着点,并且其中所述拓扑异构酶I抑制剂是Dxd。

35.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述接头包括包含结构  的基团,其中*表示所述细胞毒性基团的附着点,并且其中所述拓扑异构酶I抑制剂是依沙替康。

36.根据权利要求21所述的抗体缀合物,包含下面提供的结构,其中n为1至10:



37.根据权利要求21所述的抗体缀合物,包含下面提供的结构,其中n为1至10:



38.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗体同种型是IgG1或IgG2。

39.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗体同种型是IgG2b。

40.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗体与至少两个有效载荷缀合。

41.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗体与至少三个有效载荷缀合。

42.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗体与至少四个有效载荷缀合。

43.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗体与至少五个有效载荷缀合。

44.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗体与至少六个有效载荷缀合。

45.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗体与至少七个有效载荷缀合。

46.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗体与至少八个有效载荷缀合。

47.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗MUC1*结合结构域包含三个轻链(LC)互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3;其中所述MUC1*结合结构域的所述LC-CDR1、所述LC-CDR2和所述LC-CDR3包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列;并且其中所述LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3中的至少一个包含0-2个氨基酸修饰。

48.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗MUC1*结合结构域包含三个重链(HC)互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3;其中所述MUC1*结合结构域的所述HC-CDR1、所述HC-CDR2和所述HC-CDR3包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列;并且其中所述HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3中的至少一个包含0-2个氨基酸修饰。

49.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗MUC1*结合结构域包括包含与表2中所规定的序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变结构域。

50.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗MUC1*结合结构域包括包含与表2中所规定的序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变结构域。

51.根据权利要求21所述的抗体缀合物,其中所述抗MUC1*结合结构域包括包含与表3中所规定的序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的单链可变片段(scFv)。

52.一种包含MUC1*结合结构域和CD3结合结构域的抗体,其中所述MUC1*结合结构域包含三个重链(HC)互补决定区(CDR):MUC1*HC-CDR1、MUC1*HC-CDR2和MUC1*HC-CDR3;其中所

述MUC1*HC-CDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述MUC1*HC-CDR2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且所述MUC1*HC-CDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;

其中所述MUC1*结合结构域包含三个轻链(LC)互补决定区(CDR):MUC1*LC-CDR1、MUC1*LC-CDR2和MUC1*LC-CDR3;其中所述MUC1*LC-CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,所述MUC1*LC-CDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,并且所述MUC1*LC-CDR3包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;

其中,所述CD3结合结构域包含三个重链(HC)互补决定区(CDR):CD3 HC-CDR1、CD3 HC-CDR2和CD3 HC-CDR3;其中所述CD3结合结构域的所述CD3 HC-CDR1、所述CD3 HC-CDR2和所述CD3 HC-CDR3包含选自表2中所规定的氨基酸序列;并且

其中,所述CD3结合结构域包含三个轻链(LC)互补决定区(CDR):CD3 LC-CDR1、CD3 LC-CDR2和CD3 LC-CDR3;其中所述CD3结合结构域的所述CD3 LC-CDR1、所述CD3 LC-CDR2和所述CD3 LC-CDR3包含选自表4中所规定的氨基酸序列。

53.根据权利要求52所述的抗体,其中所述抗体包含Fc结构域。

54.根据权利要求52所述的抗体,其中所述Fc结构域是异二聚Fc结构域。

55.根据权利要求52所述的抗体,其中所述异二聚Fc结构域包含杵链和臼链,形成杵臼(KiH)结构。

56.根据权利要求55所述的抗体,其中所述杵链包含与选自SEQ ID NO:121、122、123或124的序列具有至少约95%同一性的序列。

57.根据权利要求55所述的抗体,其中所述臼链包含与选自SEQ ID NO:125、126、127或128的序列具有至少约95%同一性的序列。

58.根据权利要求52所述的抗体,其中所述MUC1*结合结构域包括包含与选自表2的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变结构域。

59.根据权利要求52所述的抗体,其中所述MUC1*结合结构域包括包含与选自表2的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变结构域。

60.根据权利要求52所述的抗体,其中所述MUC1*结合结构域包括包含与选自表3的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的单链可变片段(scFv)。

61.根据权利要求52所述的抗体,其中所述CD3结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:26或31的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链。

62.根据权利要求52所述的抗体,其中所述CD3结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:29或35的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链。

63.根据权利要求52所述的抗体,其中所述CD3结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:131或132的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的单链可变

片段(scFv)。

64.根据权利要求52所述的抗体,包含与选自SEQ ID NO:50、52、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90、94、98、102、106、110或114的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。

65.一种治疗癌症的方法,包括向有需要的对象施用权利要求1-64中任一项所述的抗体或抗体缀合物。

66.根据权利要求65所述的方法,其中所述癌症表达MUC1*。

67.根据权利要求65所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、胰腺癌或肺癌。

抗可变MUC1*抗体及其用途

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年4月12日提交的美国临时申请63/330,277的权益,该申请的全部内容在此通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已以ASCII形式电子提交的序列表,并在此通过引用将其全部并入。所述ASCII副本创建于2023年4月4日,被命名为56699-751.601_SL.xml,并且大小为230千字节。

[0005] 援引并入

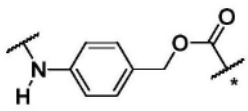
[0006] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均以引用的方式并入本文,其程度与每一份单独的出版物、专利或专利申请均被明确且单独地指明以引用的方式并入本文相同。如果以引用的方式并入的出版物和专利或专利申请与本说明书中的公开内容相矛盾,则本说明书旨在取代和/或优先于任何此类矛盾材料。

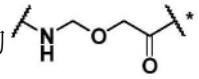
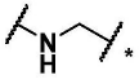
背景技术

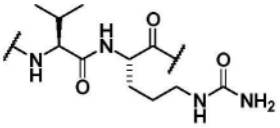
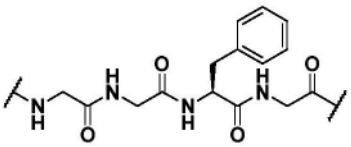
[0007] 本文提供了包含MUC1*结合结构域和CD3结合结构域的多特异性抗体。本文还提供了本文所描述的式的包含衍生自治疗剂(例如,拓扑异构酶I抑制剂、微管蛋白形成抑制剂)的一个或多个部分的抗体缀合物,并且其中缀合物还包含多肽,如结合目标靶的抗体(例如,靶向MUC1*的抗体)。所述多特异性抗体和抗体-药物缀合物可用于治疗疾病或病症,例如,增生性疾病例如癌症。本文还提供了使用这些多特异性抗体和抗体缀合物用于治疗疾病和病症的用途和方法。

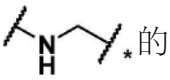
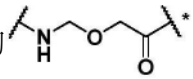
发明内容

[0008] 本文公开了一种式(I)的缀合物:[Ab]-[Z-L-R-X]$_y$式(I),其中:X是衍生自能够抑制拓扑异构酶I的化合物或能够抑制微管蛋白形成的化合物的部分;R是偶联部分;L是具有结合至N末端的Z和结合至C末端的R的二肽、三肽或四肽连接部分;[Ab]是包含抗MUC1*结合结构域的抗体,该抗MUC1*结合结构域包含三个重链(HC)互补决定区(CDR):MUC1*HC-CDR1、MUC1*HC-CDR2和MUC1*HC-CDR3;其中MUC1*结合结构域的MUC1*HC-CDR1、MUC1*HC-CDR2和MUC1*HC-CDR3包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列;其中MUC1*结合结构域包含三个轻链(LC)互补决定区(CDR):MUC1*LC-CDR1、MUC1*LC-CDR2和MUC1*LC-CDR3;其中MUC1*结合结构域的MUC1*LC-CDR1、MUC1*LC-CDR2和MUC1*LC-CDR3包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列;Z是能够与半胱氨酸残基的硫原子形成共价键的缀合部分;并且其中y是1至10的整数。

[0009] L可以包括缬氨酸和瓜氨酸。L可以包括甘氨酸和苯丙氨酸。R可以包括对氨基苄基。R可以包括包含结构  的部分,其中*表示X基团的附着点。R可以包括包

含结构  的部分,其中*表示X基团的附着点。R可以包括包含结构  的部分,其中*表示X基团的附着点。

[0010] L可以是包含结构  的二肽连接部分。L可以是包含结构  的四肽连接部分。

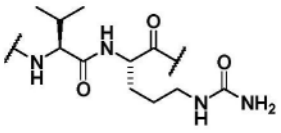
[0011] X可以是MMAE或MMAF。X可以是依沙替康或Dxd。R可以包括包含结构  的部分,其中*表示X基团的附着点,并且其中X是Dxd。R可以包括包含结构  的部分,其中*表示X基团的附着点,并且其中X是依沙替康。

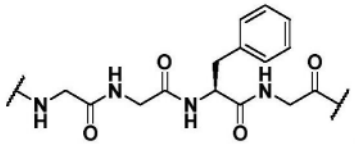
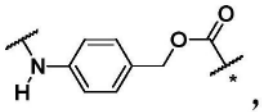
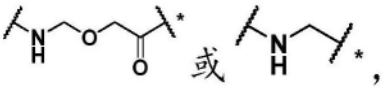
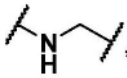
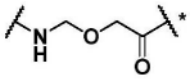
[0012] 抗体可以是同种型IgG1或IgG2。抗体可以是同种型IgG2b。

[0013] 抗MUC1*结合结构域可以包括包含与选自SEQ ID NO:38或44的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链。抗MUC1*结合结构域可以包括包含与选自SEQ ID NO:39或45的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变结构域。

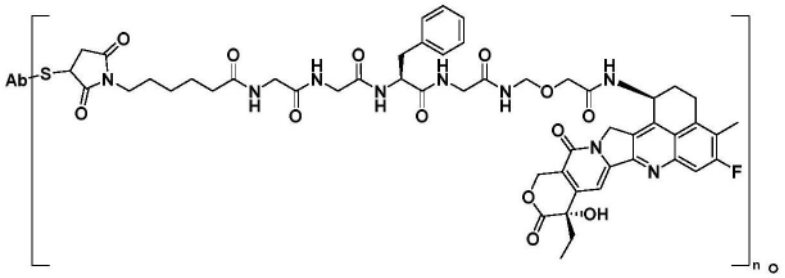
[0014] 抗MUC1*结合结构域可以包括包含与选自SEQ ID NO:41或47的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链。抗MUC1*结合结构域可以包括包含与选自SEQ ID NO:42或48的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变结构域。

[0015] 抗MUC1*结合结构域可以包括包含与选自SEQ ID NO:129或130的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的单链可变片段(scFv)。

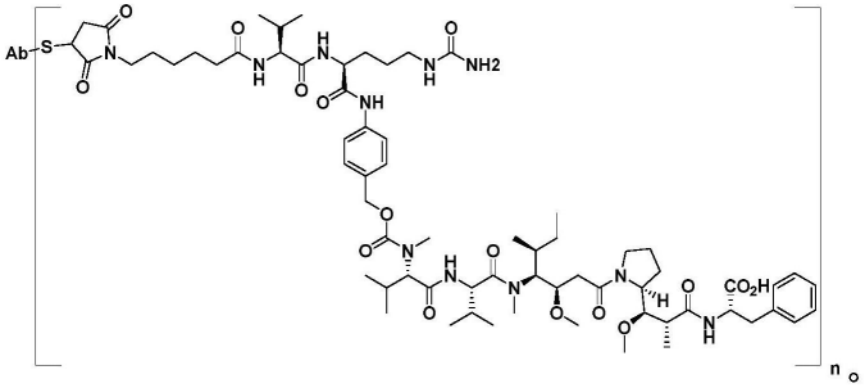
[0016] 本文公开了一种包括包含抗MUC1*结合结构域的抗体的抗体缀合物,其中抗体通过马来酰亚胺-半胱氨酸键缀合至有效载荷,其中有效载荷包括接头和细胞毒性化合物,其中细胞毒性化合物包括微管蛋白抑制剂或拓扑异构酶I抑制剂。接头可以包含缬氨酸。接头可以包含瓜氨酸。接头可以包含缬氨酸和瓜氨酸。接头可以是包含结构  的二肽连接部分。接头可以包含至少一个甘氨酸。接头可以包含至少

一个甘氨酸和苯丙氨酸。接头可以包含结构  接头可以包含对氨基苄基。接头可以包含结构基团  ，其中*表示细胞毒性基团的附着点。接头可以包含结构基团  ，其中*表示细胞毒性基团的附着点。微管蛋白抑制剂可以是MMAE或MMAF。拓扑异构酶I抑制剂可以是依沙替康或德鲁替康，或其衍生物。接头可以包括包含结构  的基团，其中*表示细胞毒性基团的附着点，并且其中拓扑异构酶I抑制剂是Dxd。接头可以包括包含结构  的基团，其中*表示细胞毒性基团的附着点，并且其中拓扑异构酶I抑制剂是依沙替康。

[0017] 抗体缀合物可以包含下面提供的结构，其中n为1至10：



[0018] 抗体缀合物可以包含下面提供的结构，其中n为1至10：



[0019] 抗体同种型可以是IgG1或IgG2。抗体同种型可以是IgG2b。抗体可以与至少两个有效载荷缀合。抗体可以与至少三个有效载荷缀合。抗体可以与至少四个有效载荷缀合。抗体可以与至少五个有效载荷缀合。抗体可以与至少六个有效载荷缀合。抗体可以与至少七个有效载荷缀合。抗体可以与至少八个有效载荷缀合。抗MUC1*结合结构域可以包含三个轻链(LC)互补决定区(CDR)：LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3；其中，MUC1*结合结构域的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3可以包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列；并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3中的至少一个可以包含0-2个氨基酸修饰。抗MUC1*结合结构域可以包含三个重链(HC)互补决定区(CDR)：HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3；其中MUC1*结合结构域的HC-

CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3可以包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列;并且其中HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3中的至少一个可以包含0-2个氨基酸修饰。抗MUC1*结合结构域可以包括包含与表2中所规定的序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的重链可变结构域。抗MUC1*结合结构域可以包括包含与表2中所规定的序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的轻链可变结构域。抗MUC1*结合结构域可以包括包含与表3中所规定序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、

[0021] 98％或99％同一性的序列的单链可变片段(scFv)。

[0022] 本文公开了一种包含MUC1*结合结构域和CD3结合结构域的抗体,其中MUC1*结合结构域可以包含三个重链(HC)互补决定区(CDR):MUC1*HC-CDR1、MUC1*HC-CDR2和MUC1*HC-CDR3;其中MUC1*HC-CDR1可以包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,MUC1*HC-CDR2可以包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且MUC1*HC-CDR3可以包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;其中,MUC1*结合结构域可以包含三个轻链(LC)互补决定区(CDR):MUC1*LC-CDR1、MUC1*LC-CDR2和MUC1*LC-CDR3;其中MUC1*LC-CDR1可以包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,MUC1*LC-CDR2可以包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,并且MUC1*LC-CDR3可以包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;其中CD3结合结构域可以包含三个重链(HC)互补决定区(CDR):CD3 HC-CDR1、CD3 HC-CDR2和CD3 HC-CDR3;其中CD3结合结构域的CD3 HC-CDR1、CD3 HC-CDR2和CD3 HC-CDR3可以包含选自表2中所规定的那些的氨基酸序列;并且其中CD3结合结构域可以包含三个轻链(LC)互补决定区(CDR):CD3 LC-CDR1、CD3 LC-CDR2和CD3 LC-CDR3;其中CD3结合结构域的CD3 LC-CDR1、CD3 LC-CDR2和CD3 LC-CDR3可以包含选自表4中所规定的氨基酸序列。

[0023] 抗体可以包含Fc结构域。Fc结构域可以是异二聚Fc结构域。异二聚Fc结构域可以包含杵链和臼链,形成杵臼(KiH)结构。杵链可以包含与选自SEQ ID NO:121、122、123或124的序列具有至少约95％同一性的序列。臼链可以包含与选自SEQ ID NO:125、126、127或128的序列具有至少约95％同一性的序列。MUC1*结合结构域可以包括包含与选自表2的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的重链可变结构域。MUC1*结合结构域可以包括包含与选自表2的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的轻链可变结构域。MUC1*结合结构域可以包括包含与选自表3的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、

[0024] 91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的单链可变片段(scFv)。CD3结合结构域可以包括包含与选自SEQ ID NO:26或31的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、

[0025] 83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的重链。CD3结合结构域可以包括包含与选自SEQ ID NO:29或35的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、

[0026] 97％、98％或99％同一性的序列的轻链。CD3结合结构域可以包括包含与选自SEQ ID NO:131或132的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的单链可变片段(scFv)。所述抗体可以包含与选自SEQ ID NO:50、52、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90、94、98、102、106、110或114的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。

[0027] 本文公开了一种治疗癌症的方法,包括向有需要的对象施用权利要求1-64中任一项所述的抗体。在一些实施方案中,癌症表达MUC1*。癌症可以是乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、胰腺癌或肺癌。

附图说明

[0028] 图1A-图1P显示了MUC1*阳性乳腺癌细胞T47D与向其中添加了不同浓度的双特异性抗体20A10-OKT3-BiTE的人T细胞一起培养的照片。20A10是一种人源化抗MUC1*抗体,并且OKT3是一种与人T细胞上存在的CD3结合的抗体。如图中可以看出的,双特异性抗体的添加介导T细胞和癌细胞的接合,这里表现为T细胞聚集,这是由T细胞CD3和癌细胞MUC1*之间的双特异性桥引导的活化的标志。在图1A中,双特异性抗体的浓度为1,000ng/mL。在图1B中,浓度为333ng/mL。在图1C中,浓度为111ng/mL。在图1D中,浓度为37ng/mL。在图1E中,浓度为12.3ng/mL。在图1F中,浓度为4.1ng/mL。在图1G中,浓度为1.3ng/mL。在图1H中,浓度为0.4ng/mL。在图1I中,浓度为0.15ng/mL。在图1J中,浓度为0.05ng/mL。图1K是对照孔,其中存在T细胞和癌细胞两者,但未添加双特异性抗体。图1L是对照孔,其中仅存在癌细胞。图1M显示了一幅描绘了LDH细胞毒性测定的工作原理的卡通图,其中A490的测量值越高,表示细胞杀伤越高。图1N显示了细胞杀伤作为20A10-OKT3(抗MUC1*/抗CD3双特异性抗体)浓度的函数的图表。图1O显示了T细胞分泌的分泌型干扰素-γ作为添加的抗MUC1*/抗CD3双特异性抗体的函数的图表,其中抗MUC1*抗体为20A10,并且抗CD3抗体为OKT3。图1P显示了T细胞分泌的分泌型TNF-α作为添加的抗MUC1*/抗CD3双特异性抗体的函数的图表,其中抗MUC1*抗体为20A10,并且抗CD3抗体为OKT3。

[0029] 图2A-图2P显示了MUC1*阳性乳腺癌细胞T47D与向其中添加了不同浓度的双特异性抗体20A10-12F6-BiTE的人T细胞一起培养的照片。20A10是人源化抗MUC1*抗体,并且12F6是与人T细胞上存在的CD3结合的抗体。从图中可以看出,双特异性抗体的添加介导T细胞和癌细胞的接合,这里表现为T细胞聚集,这是由T细胞CD3和癌细胞MUC1*之间的双特异性桥引导的活化的标志。在图2A中,双特异性抗体的浓度为1,000ng/mL。在图2B中,浓度为333ng/mL。在图2C中,浓度为111ng/mL。在图2D中,浓度为37ng/mL。在图2E中,浓度为12.3ng/mL。在图2F中,浓度为4.1ng/mL。在图2G中,浓度为1.3ng/mL。在图2H中,浓度为0.4ng/mL。在图2I中,浓度为0.15ng/mL。在图2J中,浓度为0.05ng/mL。图2K是对照孔,其中存在T细胞和癌细胞两者,但未添加双特异性抗体。图2L是对照孔,其中仅存在癌细胞。图2M显示了一幅描绘了LDH细胞毒性测定的工作原理的卡通图,其中A490的测量值越高,表示细胞杀伤越高。图2N显示了细胞杀伤作为20A10-OKT3(抗MUC1*/抗CD3双特异性抗体)浓度的函数的图表。图2O显示了T细胞分泌的分泌型干扰素-γ作为添加的抗MUC1*/抗CD3双特异

性抗体的函数的图表,其中抗MUC1*抗体为20A10,并且抗CD3抗体为12F6。图2P显示了T细胞分泌的分泌型TNF-α作为添加的抗MUC1*/抗CD3双特异性抗体的函数的图表,其中抗MUC1*抗体为20A10,并且抗CD3抗体为12F6。

[0030] 图3A-图3L显示了HCT-MUC1*转导的癌细胞与向其中添加了不同浓度的双特异性抗体20A10-OKT3-BiTE的人T细胞一起培养的照片。20A10是人源化抗MUC1*抗体,并且OKT3是与人T细胞上存在的CD3结合的抗体。从图中可以看出,双特异性抗体的添加介导T细胞和癌细胞的接合,这里表现为细胞聚集。在图3A中,双特异性抗体的浓度为1,000ng/mL。在图3B中,浓度为333ng/mL。在图3C中,浓度为111ng/mL。在图3D中,浓度为37ng/mL。在图3E中,浓度为12.3ng/mL。在图3F中,浓度为4.1ng/mL。在图3G中,浓度为1.3ng/mL。在图3H中,浓度为0.4ng/mL。在图3I中,浓度为0.15ng/mL。在图3J中,浓度为0.05ng/mL。图3K为对照孔,其中存在T细胞和癌细胞两者,但未添加双特异性抗体。图3L为对照孔,其中仅存在癌细胞。

[0031] 图4A-图4L显示了HCT-MUC1*转导的癌细胞与向其中添加了不同浓度的双特异性抗体20A10-12F6-BiTE的人T细胞一起培养的照片。20A10是人源化抗MUC1*抗体,并且12F6是与人T细胞上存在的CD3结合的抗体。从图中可以看出,双特异性抗体的添加介导T细胞和癌细胞的接合,这里看到的是细胞聚集。在图4A中,双特异性抗体的浓度为1,000ng/mL。在图4B中,浓度为333ng/mL。在图4C中,浓度为111ng/mL。在图4D中,浓度为37ng/mL。在图4E中,浓度为12.3ng/mL。在图4F中,浓度为4.1ng/mL。在图4G中,浓度为1.3ng/mL。在图4H中,浓度为0.4ng/mL。在图4I中,浓度为0.15ng/mL。在图4J中,浓度为0.05ng/mL。图4K为对照孔,其中存在T细胞和癌细胞两者,但未添加双特异性抗体。图4L为对照孔,其中已向癌细胞添加双特异性抗体,但没有T细胞存在。

[0032] 图5A-图5F显示了HCT-WT癌细胞的照片,该癌细胞对MUC1和MUC1*呈阴性。癌细胞已与MNC2-ADC孵育72小时。在此特定情况下,毒性MMAE(单甲基奥瑞他汀)与去糖基化的MNC2共价偶联,后者与MUC1*结合。从图中可以看出,添加MNC2-ADC不影响这些HCT、MUC1阴性细胞的活力。在图5A中,MNC2-ADC的浓度为100nM。在图5B中,MNC2-ADC的浓度为10nM。在图5C中,MNC2-ADC的浓度为0.1nM。在图5D中,MNC2-ADC的浓度为0.01nM。在图5E中,MNC2-ADC的浓度为0.001nM。在图5F中,MNC2-ADC的浓度为0nM。

[0033] 图6A-图6G显示了HCT-MUC1*癌细胞的照片。这些HCT细胞被转导以表达抗体MNC2的靶,即MUC1*。癌细胞已与MNC2-ADC孵育72小时。在此特定情况下,毒性MMAE(单甲基奥瑞他汀)与去糖基化的MNC2共价偶联,后者与MUC1*结合。如图所示,以此处测试的最高浓度100nM添加MNC2-ADC诱导细胞凝集,细胞凝集是细胞死亡的指标。在图6A中,MNC2-ADC的浓度为100nM。在图6B中,MNC2-ADC的浓度为10nM。在图6C中,MNC2-ADC的浓度为1.0nM。在图6D中,MNC2-ADC的浓度为0.1nM。在图6E中,MNC2-ADC的浓度为0.01nM。在图6F中,MNC2-ADC的浓度为0.001nM。在图6G中,MNC2-ADC的浓度为0nM。

[0034] 图7A-图7G显示了K562-WT细胞的照片,该细胞对MUC1和MUC1*呈阴性。该细胞已与MNC2-ADC孵育72小时。在此特定情况下,毒性MMAE(单甲基奥瑞他汀)与去糖基化的MNC2共价偶联,后者与MUC1*结合。从图中可以看出,添加MNC2-ADC不影响这些MUC1阴性细胞的活力。在图7A中,MNC2-ADC的浓度为100nM。在图7B中,MNC2-ADC的浓度为10nM。在图7C中,MNC2-ADC的浓度为1.0nM。在图7D中,MNC2-ADC的浓度为0.1nM。在图7E中,MNC2-ADC的浓度为0.01nM。在图7F中,MNC2-ADC的浓度为0.001。在图7G中,MNC2-ADC的浓度为0nM。

[0035] 图8A-图8G显示了K562-MUC1*细胞的照片。这些MUC1*阴性细胞被转导以表达MUC1*。该细胞已与MNC2-ADC孵育72小时。在此特定情况下,毒性MMAE(单甲基奥瑞他汀)与去糖基化的MNC2共价偶联,后者与MUC1*结合。从图中可以看出,以此处测试的较高浓度10nM和100nM添加MNC2-ADC诱导细胞凝集,细胞凝集是细胞死亡的指标。在图8A中,MNC2-ADC的浓度为100nM。在图8B中,MNC2-ADC的浓度为10nM。在图8C中,MNC2-ADC的浓度为1.0nM。在图8D中,MNC2-ADC的浓度为0.1nM。在图8E中,MNC2-ADC的浓度为0.01nM。在图8F中,MNC2-ADC的浓度为0.001nM。在图8G中,MNC2-ADC的浓度为0nM。

[0036] 图9A-图9B显示了细胞活力测定的图表,其中使用PrestoBlue来测量细胞死亡。该图表显示了作为MNC2-ADC浓度的函数的细胞活力,比较了MNC2-ADC对K562-WT细胞和K562-MUC1*细胞的作用。可以看出,浓度为10nM和100nM时,MNC2-ADC抗体仅诱导表达MUC1*的细胞死亡。图9B显示了作为MNC2-ADC浓度的函数的细胞活力,比较了MNC2-ADC对HCT-WT细胞和HCT-MUC1*细胞的作用。可以看出,浓度高时,MNC2-ADC抗体仅诱导表达MUC1*的细胞死亡。

[0037] 图10A-图10G显示了T47D-WT乳腺癌细胞的照片,该细胞既表达全长MUC1(MNC2不与其结合)又表达MUC1*(MNC2与其结合)。细胞已与MNC2-ADC孵育72小时。在此特定情况下,毒性MMAE(单甲基奥瑞他汀)与去糖基化的MNC2共价偶联,后者与MUC1*结合。在图10A中,MNC2-ADC的浓度为100nM。在图10B中,MNC2-ADC的浓度为10nM。在图10C中,MNC2-ADC的浓度为1.0nM。在图10D中,MNC2-ADC的浓度为0.1nM。在图10E中,MNC2-ADC的浓度为0.01nM。在图10F中,MNC2-ADC的浓度为0.001。在图10G中,MNC2-ADC的浓度为0nM。

[0038] 图11A-图11G显示了T47D-MUC1*细胞的照片,该细胞已被转导以表达更多的MUC1*。该细胞已与MNC2-ADC孵育72小时。在此特定情况下,毒性MMAE(单甲基奥瑞他汀)与去糖基化的MNC2共价偶联,后者与MUC1*结合。从图中可以看出,以此处测试的较高浓度10nM和100nM添加MNC2-ADC诱导细胞凝集,细胞凝集是细胞死亡的指标。在图11A中,MNC2-ADC的浓度为100nM。在图11B中,MNC2-ADC的浓度为10nM。在图11C中,MNC2-ADC的浓度为1.0nM。在图11D中,MNC2-ADC的浓度为0.1nM。在图11E中,MNC2-ADC的浓度为0.01nM。在图11F中,MNC2-ADC的浓度为0.001。在图11G中,MNC2-ADC的浓度为0nM。图12显示了细胞活力测定的图表,其中使用PrestoBlue检测死细胞。该图表显示了作为MNC2-ADC浓度的函数的细胞活力,比较了MNC2-ADC对T47D-WT细胞和T47D-MUC1*细胞的作用。可以看出,浓度为10nM和100nM时,MNC2-ADC抗体诱导表达MUC1*的细胞死亡。

[0039] 图12显示了细胞活力测定的图表,其中使用PrestoBlue来测量细胞死亡。该图表显示了作为MNC2-ADC浓度的函数的细胞活力,比较了MNC2-ADC对T47D-WT细胞和T47D-MUC1*细胞的作用。可以看出,浓度为10nM和100nM时,MNC2-ADC抗体诱导了表达MUC1*的细胞死亡。

[0040] 图13A-图13J显示了T47D-WT乳腺癌细胞的照片,该细胞既表达全长MUC1(MNC2不与其结合)又表达MUC1*(MNC2与其结合)。细胞已与MNC2-ADC孵育72小时。在此特定情况下,毒性MMAE(单甲基奥瑞他汀)与去糖基化的MNC2共价偶联,后者与MUC1*结合。可以看出,MNC2-ADC为最高浓度1000nM时,MNC2-ADC抗体诱导T47D-WT细胞死亡。在图13A中,MNC2-ADC的浓度为0nM。在图13B中,MNC2-ADC的浓度为0.1nM。在图13C中,MNC2-ADC的浓度为0.39nM。在图13D中,MNC2-ADC的浓度为1.0nM。在图13E中,MNC2-ADC的浓度为3.9nM。在图13F中,

MNC2-ADC的浓度为10nM。在图13G中,MNC2-ADC的浓度为39nM。在图13H中,MNC2-ADC的浓度为100nM。在图13I中,MNC2-ADC的浓度为393nM。在图13J中,MNC2-ADC的浓度为1000nM。

[0041] 图14A-图14J显示了已转导以表达更多MUC1*的T47D-MUC1*细胞的照片。该细胞已与MNC2-ADC孵育72小时。在此特定情况下,毒性MMAE(单甲基奥瑞他汀)与去糖基化的MNC2共价偶联,后者与MUC1*结合。如图所示,以此处测试的较高浓度10nM、39nM、100nM、393nM和1000nM添加MNC2-ADC诱导细胞凝集,细胞凝集是细胞死亡的指标。在图14A中,MNC2-ADC的浓度为0nM。在图14B中,MNC2-ADC的浓度为0.1nM。在图14C中,MNC2-ADC的浓度为0.39nM。在图14D中,MNC2-ADC的浓度为1.0nM。在图14E中,MNC2-ADC的浓度为3.9nM。在图14F中,MNC2-ADC的浓度为10nM。在图14G中,MNC2-ADC的浓度为39nM。在图14H中,MNC2-ADC的浓度为100nM。在图14I中,MNC2-ADC的浓度为393nM。在图14J中,MNC2-ADC的浓度为1000nM。

[0042] 图15A-图15B显示了细胞活力测定的图表,其中使用PrestoBlue来测量细胞死亡。该图表显示了作为MNC2-ADC浓度的函数的细胞活力,比较了MNC2-ADC对T47D-WT细胞和T47D-MUC1*细胞的作用。可以看出,MNC2-ADC为最高浓度1000nM时,MNC2-ADC抗体诱导T47D-WT细胞死亡,而浓度为10nM、39nM、100nM、393nM和1000nM时,T47D-MUC1*细胞被杀伤。

[0043] 图16A-图16F显示了在一定浓度范围内添加MNC2-ADC的癌细胞的放大照片。这里,与抗体缀合的毒素是MMAE。图16A显示了在500ng/mL至0.1ng/mL浓度范围内添加MNC2-ADC的乳腺癌细胞T47D野生型的照片。作为对照,未添加MNC2-ADC。照片是在将MNC2-ADC添加到癌细胞后72小时拍摄的。图16B显示了乳腺癌细胞T47D-MUC1*的照片,这意味着这些细胞稳定转染了比自然表达更多的MUC1*,其中MNC2-ADC的添加浓度范围为500ng/mL至0.1ng/mL。作为对照,未添加MNC2-ADC。照片是在将MNC2-ADC添加到癌细胞后72小时拍摄的。图16C显示了乳腺癌细胞T47D野生型的照片,其中MNC2-ADC的添加浓度范围为500ng/mL至0.1ng/mL。作为对照,未添加MNC2-ADC。在此情况下,16小时后去除MNC2-ADC并更换培养基。照片是在最初将MNC2-ADC添加到癌细胞后72小时拍摄的。图16D显示了乳腺癌细胞T47D-MUC1*的照片,这意味着这些细胞稳定转染了比自然表达的更多的MUC1*,其中MNC2-ADC的添加浓度范围为500ng/mL至0.1ng/mL。作为对照,未添加MNC2-ADC。在此情况下,16小时后去除MNC2-ADC并更换培养基。照片是在最初将MNC2-ADC添加到癌细胞后72小时拍摄的。图16E显示了添加1μM紫杉醇处理72小时的T47D-wt细胞的放大照片。图16F显示了添加1μM紫杉醇处理72小时的T47D-MUC1*细胞的放大照片。

[0044] 图17显示了癌细胞杀伤作为添加到细胞培养物培养基处理72小时或16小时的MNC2-ADC MMAE浓度的函数的图表。在后一种情况下,16小时后将培养基更换为不含MNC2-ADC的培养基,并允许实验持续到首次将MNC2-ADC添加到癌细胞后72小时。使用PrestoBlue测量细胞活力。细胞死亡根据添加到最终浓度为1μM的紫杉醇归一化,而72小时时的活细胞百分比根据0%活力归一化。

[0045] 图18A-图18F显示了在一定浓度范围内添加20A10-ADC的癌细胞的放大照片。这里,与抗体缀合的毒素是MMAE。图18A显示了在500ng/mL至0.1ng/mL浓度范围内添加20A10-ADC的乳腺癌细胞T47D野生型的照片。作为对照,未添加20A10-ADC。照片是在将20A10-ADC添加到癌细胞后72小时拍摄的。图18B显示了乳腺癌细胞T47D-MUC1*的照片,这意味着这些细胞稳定转染了比自然表达更多的MUC1*,其中20A10-ADC的添加浓度范围为500ng/mL至0.1ng/mL。作为对照,未添加20A10-ADC。照片是在将20A10-ADC添加到癌细胞后72小时拍摄

的。图18C显示了乳腺癌细胞T47D野生型的照片,其中20A10-ADC的添加浓度范围为500ng/mL至0.1ng/mL。作为对照,未添加20A10-ADC。在此情况下,16小时后去除20A10-ADC并更换培养基。照片是在最初将20A10-ADC添加到癌细胞后72小时拍摄的。图18D显示了乳腺癌细胞T47D-MUC1*的照片,这意味着这些细胞稳定转染了比自然表达更多的MUC1*,其中20A10-ADC的添加浓度范围为500ng/mL至0.1ng/mL。作为对照,未添加20A10-ADC。在此情况下,16小时后去除20A10-ADC并更换培养基。照片是在最初将20A10-ADC添加到癌细胞后72小时拍摄的。图18E显示了添加1μM紫杉醇处理72小时的T47D-wt细胞的放大照片。图18F显示了添加1μM紫杉醇处理72小时的T47D-MUC1*细胞的放大照片。

[0046] 图19显示了癌细胞杀伤作为添加到细胞培养物培养基处理72小时或16小时的20A10-ADC MMAE浓度的函数的图表。在后一种情况下,16小时后将培养基更换为不含20A10-ADC的培养基,并允许实验持续到首次将20A10-ADC添加到癌细胞后72小时。使用Presto Blue测量细胞活力。细胞死亡根据添加到最终浓度为1μM的紫杉醇归一化,而72小时时的活细胞百分比根据0%活力归一化。

[0047] 图20A-图20B显示了用于测量IC50的拟合数据图表以及表格形式的数据。图20A显示了由MNC2-ADC或20A10-ADC介导的癌细胞杀伤的IC50拟合数据图表,其中癌细胞为T47D-wt或T47D-MUC1*,并且其中ADC与靶癌细胞孵育16小时或72小时。图20B显示了列出每种细胞类型和孵育条件下每种ADC的IC50的表格。

[0048] 图21A-图21C显示了MN20A10-OKT3杵臼形式。图21A显示了MUC1*阳性乳腺癌细胞T47D与向其中添加了不同浓度的双特异性抗体20A10-OKT3-BiTE的人T细胞一起培养的照片。20A10是人源化抗MUC1*抗体,并且OKT3是与人T细胞上存在的CD3结合的抗体。从图中可以看出,双特异性抗体的添加介导T细胞和癌细胞的接合,这里表现为T细胞聚集,这是由T细胞CD3和癌细胞MUC1*之间的双特异性桥引导的活化的标志。图21B显示了T细胞分泌的分泌型干扰素-γ作为添加的抗MUC1*/抗CD3双特异性抗体的函数的图表,其中抗MUC1*抗体为20A10,并且抗CD3抗体为OKT3。图21C显示了细胞杀伤作为20A10-OKT3(抗MUC1*/抗CD3双特异性抗体)浓度的函数的图表。

[0049] 图22A-图22H显示了各种双特异性形式的MN20A10-OKT3或MN20A10-12F6。该图显示了不同形式的双特异性抗体对T47D-wt或T47D-MUC1*的杀伤曲线。图22B显示了在12F6-MN20A10双特异性存在下T细胞介导的癌细胞杀伤的图表。图22A是图22B中使用的12F6-MN20A10N双特异性形式的卡通图。图22D显示了在MN20A10-12F6 KiH双特异性存在下T细胞介导的癌细胞杀伤的图表。图22C是图22D中使用的KiH双特异性形式的卡通图。图22F显示了在OKT3-MN20A10双特异性存在下T细胞介导的癌细胞杀伤的图表。图22E是图22F中使用的OKT3-MN20A10双特异性形式的卡通图。图22H显示了在MN20A10-12F6化学偶联双特异性存在下T细胞介导的癌细胞杀伤的图表。图22G是图22H中使用的MN20A10-12F6双特异性形式的卡通图。

[0050] 图23显示了各种双特异性形式的MN20A10-OKT3或MN20A10-12F6的IC50。

[0051] 图24显示了各种双特异性形式的MN20A10-OKT3或MN20A10-12F6的IC50。

[0052] 图25A-图25B显示了用抗MUC1*抗体MNC2染色的人癌细胞的放大照片,其中细胞核用DAPI染成蓝色,并且MNC2抗体发出红色荧光。图25A显示了在时间零点时,抗体附着在细胞表面。图25B显示了在45分钟后,抗体已被内化并在整个细胞质中可见。抗体内化是ADC发

挥作用所必需的。

[0053] 图26显示了包括毒性有效载荷MMAE的化学实体的化学结构,该有效载荷可以与抗体缀合以形成抗体-药物-缀合物,也称为ADC。MC表示促进与抗体上的半胱氨酸偶联的马来酰亚胺基己酰基(MC)部分。VC表示缬氨酸-瓜氨酸(VC)部分,并且PAB表示对氨基苄基(PAB)部分,两者均有助于溶酶体酶组织蛋白酶B在癌细胞内进行酶促切割。MMAE表示单甲基奥瑞他汀E(MMAE)部分,该部分是通过阻断微管蛋白聚合来抑制细胞分裂的毒性有效载荷,微管蛋白是细胞内化和/或无毒性部分切割后的毒性有效载荷。

[0054] 图27显示了包括毒性有效载荷MMAF的化学实体的化学结构,该有效载荷可以与抗体缀合以形成抗体-药物-缀合物,也称为ADC。MC表示促进与抗体上的半胱氨酸偶联的马来酰亚胺基己酰基(MC)部分。表示缬氨酸-瓜氨酸(VC)部分,并且PAB表示对氨基苄基(PAB),这两者都有助于溶酶体酶组织蛋白酶B在癌细胞内对毒性有效载荷进行酶促切割。MMAF表示单甲基奥瑞他汀E(MMAF)部分,该部分是细胞内化和/或无毒性部分切割后的毒性有效载荷。MMAF有效载荷含有羧酸,使得在有效载荷从抗体上切割后难以(如果不是不可能的话)排出细胞膜。因此,MMAF仅在有效载荷内化后才能显示出有效的微管蛋白抑制。

[0055] 图28显示了依沙替康衍生物Dxd的化学结构,该衍生物被整合到称为德鲁替康的反应性构型中,该构型已准备好与抗体缀合。MC表示促进与抗体上的半胱氨酸偶联的马来酰亚胺基己酰基(MC)部分。GGFG表示提供柔性接头的甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸(GGFG)部分。偶联剂表示通过醚二酰胺偶联剂连接接头和有效载荷的偶联剂(HN-CH2-O-CH2-CO)部分。依沙替康表示在细胞内化和/或无毒性部分切割后作为毒性有效载荷的Dxd部分。

[0056] 图29显示了依沙替康衍生物的化学结构,该衍生物被整合到促进与抗体的缀合的不同的化学实体中。MC表示促进与抗体上的半胱氨酸偶联的马来酰亚胺基己酰基(MC)部分。VC表示缬氨酸-瓜氨酸(VC)部分,并且PAB表示对氨基苄基(PAB),这两者都有助于溶酶体酶组织蛋白酶B在癌细胞内对毒性有效载荷进行酶促切割。依沙替康表示依沙替康部分,即细胞内化和/或无毒性部分切割后的毒性有效载荷。

[0057] 图30显示了MNC2与MMAE偶联的疏水相互作用色谱(HIC)色谱图。IgG1抗体,如MNC2,最多有八(8)个半胱氨酸,这些半胱氨酸带有游离硫醇,可通过游离硫醇与毒素或原毒素缀合。因此,每个抗体最多可以附着八(8)种毒素或有效载荷。MNC2的HIC色谱图分析得出平均药物抗体比率(DAR)为4.10。

[0058] 图31显示了MNC2与MMAF偶联的疏水相互作用色谱(HIC)色谱图。MNC2-MMAF的平均DAR确定为3.65。

[0059] 图32A-图32B显示了MNC2与德鲁替康或依沙替康偶联的疏水相互作用色谱(HIC)色谱图。图32A 32B显示了MNC2与德鲁替康偶联的疏水相互作用色谱(HIC)色谱图。MNC2-德鲁替康的DAR确定为7.7。图32B显示了MNC2与依沙替康偶联的疏水相互作用色谱(HIC)色谱图。MNC2-依沙替康的DAR确定为8.2。

[0060] 图33显示了MN20A10与MMAE偶联的疏水相互作用色谱(HIC)色谱图。MN20A10-MMAE的平均DAR为2.96。

[0061] 图34显示了MN20A10与MMAF偶联的疏水相互作用色谱(HIC)色谱图。MN20A10-MMAF的平均DAR为3.79。

[0062] 图35显示了MN20A10与德鲁替康偶联的疏水相互作用色谱(HIC)色谱图。MN20A10-德鲁替康的平均DAR为4.6。

[0063] 图36A-图36D显示了流式细胞术测量MNC2在偶联MMAE之前和之后识别癌细胞的能力的图表。图36A显示了MNC2与MMAE缀合之前和缀合之后识别的T47D乳腺癌细胞的百分比。图36B显示了MNC2与MMAE缀合之后识别的T47D乳腺癌细胞的百分比。图36C显示了MNC2与MMAE缀合之前或之后识别的HCT-116、MUC1阴性细胞的百分比。图36D显示了MNC2与MMAE缀合之后识别的NCI-H1975肺癌细胞的百分比。

[0064] 图37A-图37D显示了流式细胞术测量MN20A10在偶联MMAE之前和之后识别癌细胞的能力的图表。图37A显示了MN20A10在与MMAE缀合之前和之后识别的T47D乳腺癌细胞的百分比。图37B显示了MN20A10在与MMAE缀合之后识别的T47D乳腺癌细胞的百分比。图37C显示了MN20A10在与MMAE缀合之前识别的HCT-116、MUC1阴性癌细胞的百分比。图37D显示了MN20A10在与MMAE缀合之后识别的NCI-H1975肺癌细胞的百分比。

[0065] 图38A-图38F显示了读板仪测定的图表,其中测量靶癌细胞的活力作为所添加的MNC2-ADC浓度的函数,其中活力使用PrestoBlue确定。允许实验进行72小时再进行测量。图38A显示了在添加MNC2-MMAE或MNC2-MMAF后T47D野生型乳腺癌细胞的活力。图38B显示了在添加MNC2-MMAE或MNC2-MMAF后,经过工程化以表达更多MUC1*的T47D乳腺癌细胞(称为T47D-MUC1*)的活力。图38C显示了在添加MNC2-MMAE或MNC2-MMAF后HPAF II野生型胰腺癌细胞的活力。图38D显示了在添加MNC2-MMAE或MNC2-MMAF后,经过工程化以表达更多MUC1*的HPAF II胰腺癌细胞(称为HPAF II-MUC1*)的活力。图38E显示了添加到表达低水平靶抗原MUC1*的乳腺癌细胞或胰腺细胞中的MNC2-MMAE或MNC2-MMAF的杀伤能力的计算IC50表。图38F显示了添加到表达高水平靶抗原MUC1*的乳腺癌细胞或胰腺细胞中的MNC2-MMAE或MNC2-MMAF的杀伤能力的计算IC50表。

[0066] 图39A-图39F显示了读板仪测定的图表,其中测量靶癌细胞的活力作为添加的MN20A10-ADC浓度的函数,其中活力使用PrestoBlue确定。允许实验进行72小时再进行测量。图39A显示了在添加MN20A10-MMAE或MN20A10-MMAF后T47D野生型乳腺癌细胞的活力。图39B显示了在添加MN20A10-MMAE或MN20A10-MMAF后,经过工程化以表达更多MUC1*的T47D乳腺癌细胞(称为T47D-MUC1*)的活力。图39C显示了在添加MN20A10-MMAE或MN20A10-MMAF后HPAF II野生型胰腺癌细胞的活力。图39D显示了在添加MN20A10-MMAE或MN20A10-MMAF后,经过工程化以表达更多MUC1*的HPAF II胰腺癌细胞(称为HPAF II-MUC1*)的活力。图39E显示了添加到表达低至中等水平靶抗原MUC1*的乳腺癌细胞或胰腺细胞中的MN20A10-MMAE或MN20A10-MMAF的杀伤能力的计算IC50表。图39F显示了添加到表达高水平靶抗原MUC1*的乳腺癌细胞或胰腺细胞中的MN20A10-MMAE或MN20A10-MMAF的杀伤能力的计算IC50表。

[0067] 图40A-图40C显示了读板仪测定的图表,其中测量靶癌细胞的活力作为添加的MNC2-ADC或MN20A10-ADC浓度的函数,其中活力使用PrestoBlue确定。分别允许MMAE或德鲁替康缀合物的实验进行72或120小时后再进行测量。图40A显示了在添加MNC2-MMAE、MNC2-德鲁替康、MN20A10-MMAE或MN20A10-德鲁替康后T47D野生型乳腺癌细胞的活力。图40B显示了在添加MNC2-MMAE、MNC2-德鲁替康、MN20A10-MMAE或MN20A10-德鲁替康后,经过工程化以表达更多MUC1*的T47D乳腺癌细胞(称为T47D-MUC1*)的活力。图40C显示了添加到表达中至低MUC1*的T47D乳腺癌细胞或高MUC1*T47D-MUC1*乳腺癌细胞中的MNC2-MMAE、MNC2-德鲁替

康、MN20A10-MMAE或MN20A10-德鲁替康的杀伤能力的计算IC50表。

[0068] 图41A-图41B显示了读板仪测定的图表,其中使用PrestoBlue测量靶癌细胞的活力作为添加的MNC2-ADC或MN20A10-ADC浓度的函数。允许实验进行72小时再进行测量。图41A显示了在添加MNC2-MMAE或MN20A10-MMAE后DU145野生型激素抵抗性前列腺癌细胞的活力。图41B显示了MNC2-MMAE和MN20A10-MMAE对这些前列腺癌细胞的杀伤能力的计算IC50表。

[0069] 图42A-图42B显示了读板仪测定的图表,其中使用PrestoBlue测量靶癌细胞的活力作为添加的MNC2-ADC或MN20A10-ADC浓度的函数。允许实验进行72小时再进行测量。图42A显示了在添加MNC2-MMAE或MN20A10-MMAE后NCI-H1975非小细胞肺癌细胞的活力。图42B显示了MNC2-MMAE和MN20A10-MMAE对这些肺癌细胞的杀伤能力的计算IC50表。

[0070] 图43A-图43C显示了读板仪测定的图表,其中在添加MNC2-MMAE或MN20A10-MMAE后测量了靶癌细胞的活力。允许实验进行72再进行测量。图43A显示了在添加MNC2-MMAE或MN20A10-MMAE后T47D野生型乳腺癌细胞的活力。图43B显示了在添加MNC2-MMAE或MN20A10-MMAE后,经过工程化以表达更多MUC1*的T47D乳腺癌细胞(称为T47D-MUC1*)的活力。

[0071] 图44A-图44B显示了读板仪测定的图表,其中比较了在用MN20A10-MMAE或IgG2b-MMAE(同种型对照抗体)处理后,表达MUC1*的癌细胞HCT-MUC1*与MUC1*阴性癌细胞HCT-116-wt的活力。允许实验进行72小时再进行流式细胞术测量。

[0072] 图45A-图45D显示了读板仪测定的图表,其中在添加未缀合的MN20A10或MN20A10-MMAE后测量了表达MUC1*的癌细胞的活力。图45A显示了MN20A10-MMAE对NCI H1975非小细胞肺癌细胞的杀伤作用。图45B显示了MN20A10-MMAE对DU145激素抵抗性前列腺癌细胞的杀伤作用。图45C显示了MN20A10-MMAE对野生型HPAF II胰腺癌细胞或经过工程化以表达更多MUC1*的HPAF II-MUC1*癌细胞的杀伤作用。图45D显示了IC50表。

[0073] 图46A-图46J显示了与MNC2-MMAE或MNC2-德鲁替康孵育的T47D-MUC1*乳腺癌细胞的放大照片。图46A以4x放大拍摄的照片显示了500nM的MNC2-MMAE在120小时后对乳腺癌细胞的杀伤作用。图46B以4x放大拍摄的照片显示了6.2nM的MNC2-MMAE在120小时后对乳腺癌细胞的杀伤作用。图46C以4x放大拍摄的照片显示了未经处理的T47D乳腺癌细胞作为对照。图46D显示了500nM的MNC2-德鲁替康在120小时后对乳腺癌细胞的杀伤作用。图46E显示了6.2nM的MNC2-德鲁替康在120小时后对乳腺癌细胞的杀伤作用。图46F显示了未经处理的T47D乳腺癌细胞作为对照。图46G以20x放大拍摄的照片显示了6.2nM的MNC2-MMAE在120小时后对乳腺癌细胞的杀伤作用。图46H以20x放大拍摄的照片显示了未经处理的乳腺癌细胞作为对照。图46I以20x放大拍摄的照片显示了6.2nM的MNC2-德鲁替康在120小时后对乳腺癌细胞的杀伤作用。图46J以20x放大拍摄的照片显示了未经处理的乳腺癌细胞作为对照。杀伤作用可以很容易地看出为细胞数目显著减少,细胞形态变化为圆整和细胞脱落。相反,对照孔显示了致密细胞的汇合单层,具有平坦扩散形态,没有死亡的漂浮细胞。

[0074] 图47A-图47D显示了与MNC2-MMAE或MNC2-德鲁替康孵育120小时后的DU145前列腺癌细胞以4x放大拍摄的照片。图47A放大照片显示了MNC2-MMAE在500nM下的杀伤作用。图47B放大照片显示了未经处理的细胞具有正常的形态和汇合度。图47C放大照片显示了MNC2-德鲁替康在500nM下的杀伤作用。图47D放大照片显示了未经处理的细胞具有正常形态和汇合。

[0075] 图48A-图48N显示了与MN20A10-MMAE或MN20A10-德鲁替康孵育的T47D-MUC1*乳腺癌细胞的放大照片。图48A以4x放大拍摄的照片显示了500nM的MN20A10-MMAE在120小时后对乳腺癌细胞的杀伤作用。图48B以4x放大拍摄的照片显示了56nM的MN20A10-MMAE在120小时后对乳腺癌细胞的杀伤作用。图48C以4x放大拍摄的照片显示了未经处理的T47D乳腺癌细胞作为对照。图48D显示了500nM的MN20A10-德鲁替康在120小时后对乳腺癌细胞的杀伤作用。图48E显示了56nM的MN20A10-德鲁替康在120小时后对乳腺癌细胞的杀伤作用。图48F显示了未经处理的T47D乳腺癌细胞作为对照。图48G以20x放大拍摄的照片显示了56nM的MN20A10-MMAE在120小时后对乳腺癌细胞的杀伤作用。图48H以20x放大拍摄的照片显示了未经处理的乳腺癌细胞作为对照。图48I以20x放大拍摄的照片显示了56nM的MN20A10-德鲁替康在120小时后对乳腺癌细胞的杀伤作用。图48J以20x放大拍摄的照片显示了未经处理的乳腺癌细胞作为对照。图48K以20x放大拍摄的照片显示了用500nM MN20A10-MMAE(DAR 5.8)处理的DU145前列腺癌细胞。经处理的细胞显示了圆整和死细胞。图48L以20x放大拍摄的照片显示了未经处理的对照DU145前列腺癌细胞。图48M以20x放大拍摄的照片显示了用500nM MN20A10-德鲁替康(DAR 4.6)处理的DU145前列腺癌细胞。经处理的细胞显示了圆整和死细胞。图48N以20x放大拍摄的照片显示了未经处理的对照DU145前列腺癌细胞。

[0076] 图49A-图49J显示了在xCELLigence仪器上进行的实时杀伤测定的轨迹。在该测定中,实时测量阻抗。当粘附的癌细胞被杀伤并从电极表面脱落时,阻抗(绝缘)降低。将T47D野生型乳腺癌细胞以每孔5,000个细胞涂布到多电极孔板上,并使其粘附和生长24小时,然后添加ADC。然后将MNC2-MMAE(DAR 4.1)、MN20A10-MMAE(DAR 5.8)、MNC2-MMAF(DAR 3.7)、MN20A10-MMAF(DAR 3.8)、MNC2-德鲁替康(DAR 7.2)或MN20A10-德鲁替康(DAR 4.6)添加到癌细胞中。图49A显示了添加MNC2-MMAE的最终浓度为500nM、167nM或2nM,并且实验读出是在ADC添加后40小时。添加紫杉醇和曲拉通作为阳性杀伤对照。图49B显示了添加MN20A10-MMAE的最终浓度为167nM、56nM或2nM,并且实验读出是在ADC添加后40小时。图49C显示了添加MNC2-MMAF的最终浓度为500nM、167nM或2nM,并且实验读出是在ADC添加后40小时。添加紫杉醇和曲拉通作为阳性杀伤对照。图49D显示了添加MN20A10-MMAF的最终浓度为500nM、167nM或2nM,并且实验读出是在ADC添加后40小时。图49E显示了添加MNC2-MMAE的最终浓度为500nM、167nM或2nM,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MNC2-MMAE浓度为167nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。图49F显示了添加MNC2-MMAF的最终浓度为500nM、167nM或2nM,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MNC2-MMAF浓度为167nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。49G显示了添加MNC2-德鲁替康的最终浓度为500nM、167nM或2nM,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,显著的肿瘤细胞杀伤发生晚于MNC2-MMAE或MNC2-MMAF,但在100小时时,在MNC2-德鲁替康浓度为167nM时达到大致相同的杀伤水平。图49H显示了在一系列浓度范围内添加的MN20A10-MMAE,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MN20A10-MMAE浓度为56nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。图49I显示了在一系列浓度范围内添加的MN20A10-MMAF,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MN20A10-MMAF浓度为167nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。49J显示了在一系列浓度范围内添加的MN20A10-德鲁替康,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,肿瘤细胞杀伤发生晚于MN20A10-MMAE或MN20A10-MMAF,但在120小时时,在MN20A10-德鲁替康浓度为167nM时出现显著的杀伤作用。

[0077] 图50A-图50J显示了在xCELLigence仪器上进行的实时杀伤测定的轨迹。在该测定中,实时测量阻抗。当粘附的癌细胞被杀伤并从电极表面脱落时,阻抗(绝缘)降低。经过工程化以表达更多的MUC1*的T47D-MUC1*乳腺癌细胞以每孔5,000个细胞涂布到多电极孔板上,并使其粘附和生长24小时,然后添加ADC。然后将MNC2-MMAE(DAR 4.1)、MN20A10-MMAE(DAR 5.8)、MNC2-MMAF(DAR 3.7)、MN20A10-MMAF(DAR 3.8)、MNC2-德鲁替康(DAR 7.2)或MN20A10-德鲁替康(DAR 4.6)添加到癌细胞中。图50A显示了添加MNC2-MMAE的最终浓度为19nM、6nM或0.69nM,并且实验读出是在ADC添加后40小时。可以看出,在19nM时基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。添加紫杉醇和曲拉通作为阳性杀伤对照。图50B显示了添加MN20A10-MMAE的最终浓度为19nM、6nM或2nM,并且实验读出是在ADC添加后40小时。可以看出,在19nM时基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。图50C显示了添加MNC2-MMA的最终浓度为6nM、2nM或0.69nM,并且实验读出是在ADC添加后40小时。可以看出,在6nM时基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。添加紫杉醇和曲拉通作为阳性杀伤对照。图50D显示了添加MN20A10-MMAF的最终浓度为56nM、19nM或2nM,并且实验读出是在ADC添加后40小时。可以看出,在56nM时基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。图50E显示了在一系列浓度范围内添加的MNC2-MMAE,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MNC2-MMAE浓度为6nM时,基本上所有T47D-MUC1*肿瘤细胞都被杀伤。图50F显示了在一系列浓度范围内添加的MNC2-MMAF,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MNC2-MMAF浓度为2nM时,基本上所有T47D-MUC1*肿瘤细胞都被杀伤。50G显示了在一系列浓度范围内添加的MNC2-德鲁替康,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,显著的T47D-MUC1*肿瘤细胞杀伤发生晚于MNC2-MMAE或MNC2-MMAF,但在120小时时,在MNC2-德鲁替康浓度为6nM达到大致相同的杀伤水平。图50H显示了在一系列浓度范围内添加的MN20A10-MMAE,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MN20A10-MMAE浓度为19nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。图50I显示了在一系列浓度范围内添加的MN20A10-MMAF,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MN20A10-MMAF浓度为19nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。50J显示了在一系列浓度范围内添加的MN20A10-德鲁替康,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,T47D-MUC1*肿瘤细胞杀伤发生晚于MN20A10-MMAE或MN20A10-MMAF,但在120小时时,在MN20A10-德鲁替康浓度为167nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。

[0078] 图51A-图51I显示了在xCELLigence仪器上进行的实时杀伤测定的轨迹。在该测定中,实时测量阻抗。当粘附的癌细胞被杀伤并从电极表面脱落时,阻抗(绝缘)降低。将NCI-H1975肺癌细胞以每孔5,000个细胞涂布到多电极孔板上,并使其粘附和生长24小时,然后添加ADC。然后将MNC2-MMAE(DAR 4.1)、MN20A10-MMAE(DAR 5.8)、MNC2-MMAF(DAR 3.7)、MN20A10-MMAF(DAR 3.8)、MNC2-德鲁替康(DAR 7.2)或MN20A10-德鲁替康(DAR 4.6)添加到癌细胞中。图51A显示了在一定浓度范围内添加的MNC2-MMAE,并且实验读出是在40小时。如所示,在167nM的浓度下基本上杀伤了所有肺肿瘤细胞。添加紫杉醇和曲拉通作为阳性杀伤对照。图51B显示了在一定浓度范围内添加的MN20A10-MMAE,并且实验读出是在40小时。如所示,在浓度为167nM时,基本上所有肺肿瘤细胞都被杀伤。图51C显示了在一定浓度范围内添加的MNC2-MMAF,并且实验读出是在40小时。如所示,在浓度为167nM时,基本上所有肺肿瘤细胞都被杀伤。添加紫杉醇和曲拉通作为阳性杀伤对照。图51D显示了在一定浓度范围内添加的MN20A10-MMAF,并且实验读出是在40小时。如所示,在浓度为167nM时,基本上所有肺

肿瘤细胞都被杀伤。图51E显示了在一定浓度范围内添加的MNC2-MMAE,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MNC2-MMAE浓度为167nM时,基本上所有肺肿瘤细胞均被杀伤。图51F显示了在一定浓度范围内添加的MNC2-MMAF,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MNC2-MMAF浓度为56nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。51G显示了在一定浓度范围内添加的MNC2-德鲁替康,并且实验读出是在ADC添加后120小时。图51H显示了在一定浓度范围内添加的MN20A10-MMAE,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MN20A10-MMAE浓度为56nM-19nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。图51I显示了在一定浓度范围内添加的MN20A10-MMAF,并且实验读出是在添加ADC后120小时。如所示,在MN20A10-MMAF浓度为56nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。

[0079] 图52A-图52I显示了在xCELLigence仪器上进行的实时杀伤测定的轨迹。在该测定中,实时测量阻抗。当粘附的癌细胞被杀伤并从电极表面脱落时,阻抗(绝缘)降低。将HPAF II野生型(WT)胰腺癌细胞以每孔5,000个细胞涂布到多电极孔板上,并使其粘附和生长24小时,然后添加ADC。然后将MNC2-MMAE(DAR 4.1)、MN20A10-MMAE(DAR 5.8)、MNC2-MMAF(DAR 3.7)、MN20A10-MMAF(DAR 3.8)、MNC2-德鲁替康(DAR 7.2)或MN20A10-德鲁替康(DAR 4.6)添加到癌细胞中。图52A显示了在一定浓度范围内添加的MNC2-MMAE,并且实验读出是在40小时。添加紫杉醇和曲拉通作为阳性杀伤对照。图52B显示了在一定浓度范围内添加的MN20A10-MMAE,并且实验读出是在40小时。图52C显示了在一定浓度范围内添加的MNC2-MMAF,并且实验读出是在40小时。添加紫杉醇和曲拉通作为阳性杀伤对照。图52D显示了在一定浓度范围内添加的MN20A10-MMAF,并且实验读出是在40小时。图52E显示了在一定浓度范围内添加的MNC2-MMAE,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MNC2-MMAE浓度为56nM时,基本上所有胰腺肿瘤细胞都被杀伤。图52F显示了在一定浓度范围内添加的MNC2-MMAF,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MNC2-MMAF浓度为56nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。52G显示了在一定浓度范围内添加的MNC2-德鲁替康,并且实验读出是在ADC添加后120小时。在120小时,在浓度为约56nM时,测量到显著的杀伤。图52H显示了在一定浓度范围内添加的MN20A10-MMAE,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MN20A10-MMAE浓度为56nM-19nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。图52I显示了在一定浓度范围内添加的MN20A10-MMAF,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MN20A10-MMAF浓度为56nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。

[0080] 图53A-图53I显示了在xCELLigence仪器上进行的实时杀伤测定的轨迹。在此测定中,实时测量阻抗。当粘附的癌细胞被杀伤并从电极表面脱落时,阻抗(绝缘)降低。将经过工程化以表达更多MUC1*的HPAF II-MUC1*胰腺癌细胞以每孔5,000个细胞涂布到多电极孔板上,并使其粘附和生长24小时,然后添加ADC。然后将MNC2-MMAE(DAR 4.1)、MN20A10-MMAE(DAR 5.8)、MNC2-MMAF(DAR 3.7)、MN20A10-MMAF(DAR 3.8)、MNC2-德鲁替康(DAR 7.2)或MN20A10-德鲁替康(DAR 4.6)添加到癌细胞中。图53A显示了在一定浓度范围内添加的MNC2-MMAE,并且实验读出是在40小时。添加紫杉醇和曲拉通作为阳性杀伤对照。图53B显示了在一定浓度范围内添加的MN20A10-MMAE,并且实验读出是在40小时。图53C显示了在一定浓度范围内添加的MNC2-MMAF,并且实验读出是在40小时。添加紫杉醇和曲拉通作为阳性杀伤对照。图53D显示了在一系列浓度下添加的MN20A10-MMAF,并且实验读出是在40小时。图53E显示了在一系列浓度下添加的MNC2-MMAE,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所

示,在MNC2-MMAE浓度为56nM时,基本上所有胰腺肿瘤细胞都被杀伤。图53F显示了在一系列浓度下添加的MNC2-MMAF,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MNC2-MMAF浓度为56nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。53G显示了在一系列浓度下添加的MNC2-德鲁替康,并且实验读出是在ADC添加后120小时。从图中可以看出,到120小时时,在浓度为167nM时,几乎所有胰腺癌细胞都被杀伤。图53H显示了在一定浓度范围内添加的MN20A10-MMAE,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MN20A10-MMAE浓度为56nM-19nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。图53I显示了在一定浓度范围内添加的MN20A10-MMAF,并且实验读出是在ADC添加后120小时。如所示,在MN20A10-MMAF浓度为56nM时,基本上所有肿瘤细胞都被杀伤。

[0081] 图54A-图54D显示了在xCELLigence仪器上进行的实时杀伤测定的轨迹。在该测定中,实时测量阻抗。当粘附的癌细胞被杀伤并从电极表面脱落时,阻抗(绝缘)降低。这里,将表达低至中等水平MUC1*的T47D-wt乳腺癌细胞以每孔5,000个细胞涂布到多电极96孔板上,并使其粘附和生长24小时,然后添加ADC。然后将MNC2-依沙替康(DAR 8.2)、MNC2-德鲁替康(DAR 4.0)、MNC2-MMAE(DAR 4.1)或50μM的游离依沙替康添加到癌细胞中。xCELLigence读出为0至120小时。图54A显示了以500nM的浓度添加的各种ADC。图54B显示了以167nM的浓度添加的各种ADC。图54C显示以56nM的浓度添加的各种ADC。图54D显示了以19nM的浓度添加的各种ADC。图54E显示了列出每个ADC轨迹颜色以及每个ADC的DAR的图例。从图中可以看出,MNC2-依沙替康在浓度低至56nM时有效杀伤靶癌细胞。

[0082] 图55A-图55D显示了在xCELLigence仪器上进行的实时杀伤测定的轨迹。在该测定中,实时测量阻抗。当粘附的癌细胞被杀伤并从电极表面脱落时,阻抗(绝缘)降低。这里,将经过工程化以表达高水平MUC1*的T47D-MUC1*乳腺癌细胞以每孔5,000个细胞涂布到多电极96孔板上,并使其粘附和生长24小时,然后添加ADC。然后将MNC2-依沙替康(DAR 8.2)、MNC2-德鲁替康(DAR 4.0)、MNC2-MMAE(DAR 4.1)或50μM的游离依沙替康添加到癌细胞中。xCELLigence读出为0到120小时。图55A显示了以19nM的浓度添加的各种ADC。图55B显示了以6.2nM的浓度添加的各种ADC。图55C显示了以2.1nM的浓度添加的各种ADC。图55D显示了以0.69nM的浓度添加的各种ADC。图55E显示了列出每个ADC轨迹颜色以及每个ADC的DAR的图例。从图中可以看出,MNC2-依沙替康和MNC2-德鲁替康在浓度低至6.2nM以及甚至低至2.1nM时有效杀伤表达高水平靶抗原的癌细胞。

[0083] 图56A-图56D显示了在xCELLigence仪器上进行的实时杀伤测定的轨迹。在该测定中,实时测量阻抗。当粘附的癌细胞被杀伤并从电极表面脱落时,阻抗(绝缘)降低。这里,将表达非常低水平MUC1*的NCI-H1975非小细胞肺癌细胞以每孔5,000个细胞涂布到多电极96孔板上,并使其粘附和生长24小时,然后添加ADC。然后将MNC2-依沙替康(DAR 8.2)、MNC2-德鲁替康(DAR 4.0)、MNC2-MMAE(DAR 4.1)或50μM的游离依沙替康添加到癌细胞中。xCELLigence读出为0至120小时。图56A显示了以500nM的浓度添加的各种ADC。图56B显示了以167nM的浓度添加的各种ADC。图56C显示了以56nM的浓度添加的各种ADC。图56D显示了以19nM的浓度添加的各种ADC。图56E显示了列出每个ADC轨迹颜色以及每个ADC的DAR的图例。从图中可以看出,MNC2-依沙替康在浓度低至167nM时有效杀伤表达非常低水平靶抗原的癌细胞。

[0084] 图57A-图57F显示了雌性NOD/SCID/GAMMA(NSG)小鼠的生物发光照片,这些小鼠植

入了90天雌激素团块,并且然后在右侧胁腹植入了1M人乳腺癌细胞,这些细胞要么是表达低至中等水平MUC1*的T47D野生型细胞,要么是经过工程化以表达更多MUC1*的T47D-MUC1*细胞。肿瘤植入后第7天,动物注射了5mg/kg的MNC2-MMAE(DAR 3.9),但第14天和第20天注射增加到10mg/kg。图57A显示了植入T47D-wt肿瘤细胞但模拟注射PBS的对照动物。图57B显示了植入T47D-wt细胞并且然后注射MNC2-MMAE的动物。图57C显示了植入T47D-MUC1*肿瘤细胞但模拟注射PBS的对照动物。图57D显示了植入T47D-MUC1*细胞并且然后注射MNC2-MMAE的动物。图57E显示了生物发光(辐射率光子/cm^2)的IVIS测量值作为植入T47D野生型乳腺癌细胞的小鼠的肿瘤植入后天数的函数的图表。图57F显示了生物发光(辐射率光子/cm^2)的IVIS测量值作为植入T47D-MUC1*乳腺癌细胞的小鼠的肿瘤植入后天数的函数的图表。

[0085] 图58A-图58F显示了雌性NOD/SCID/GAMMA(NSG)小鼠的生物发光照片,这些小鼠植入了90天雌激素团块,并且然后在右侧胁腹植入了1M人乳腺癌细胞,这些细胞要么是表达低至中等水平MUC1*的T47D野生型细胞,要么是经过工程化以表达更多MUC1*的T47D-MUC1*细胞。肿瘤植入后第7天,动物注射了5mg/kg的MN20A10-MMAE(DAR 3.0),但第14天和第20天注射增加到10mg/kg。图58A显示了植入T47D-wt肿瘤细胞但模拟注射PBS的对照动物。图58B显示了植入T47D-wt细胞并且然后注射MN20A10-MMAE的动物。图58C显示了植入T47D-MUC1*肿瘤细胞但模拟注射PBS的对照动物。图58D显示了植入T47D-MUC1*细胞并且然后注射MN20A10-MMAE的动物。图58E显示了生物发光(辐射率光子/cm^2)的IVIS测量值作为植入T47D野生型乳腺癌细胞的小鼠的肿瘤植入后天数的函数的图表。图58F显示了生物发光(辐射率光子/sec/cm^2)的IVIS测量值作为植入T47D-MUC1*乳腺癌细胞的小鼠的肿瘤植入后天数的函数的图表。

[0086] 图59A-图59C显示了雌性nu/nu小鼠的生物发光照片,这些小鼠右侧胁腹植入了1M人NCI-H1975非小细胞肺癌细胞,这些细胞表达低至中等水平的MUC1*。肿瘤植入后第7天,动物如所示注射了5mg/kg或10mg/kg的MNC2-MMAE。在生物发光照片中可以看出,在第19天和第27天将MNC2-MMAE(DAR 3.9)的剂量增加至10mg/kg增加了对肿瘤细胞的杀伤。图59A显示了植入NCI-H1975非小细胞肺癌细胞但模拟注射PBS的对照动物。图59B显示了植入NCI-H1975非小细胞肺癌细胞并且然后注射MNC2-MMAE的动物。图59C显示了生物发光(辐射率光子/sec/cm^2)的IVIS测量值作为肿瘤植入后天数的函数的图表。

[0087] 图60A-图60D显示了在IVIS仪器上拍摄的雌性nu/nu小鼠的生物发光照片,这些小鼠的右侧胁腹植入了1M人NCI-H1975非小细胞肺癌细胞,这些细胞表达低至中等水平的MUC1*。在肿瘤植入后第7天和第14天,动物注射了5mg/kg的MN20A10-MMAE(DAR 3.0)。在第19天,剂量增加到10mg/kg,并通过腹膜内(ip)注射施用。从照片和图表中可以看出,增加的剂量显著增加了对肿瘤细胞的杀伤。图60A显示了植入NCI-H1975非小细胞肺癌细胞但模拟注射PBS的对照动物。图60B显示了植入NCI-H1975非小细胞肺癌细胞并且然后注射MN20A10-MMAE的动物。图60C显示了在第26天从对照动物切除的肿瘤的照片和重量。图60D显示了生物发光(辐射率光子/sec/cm^2)的IVIS测量值作为肿瘤植入后天数的函数的图表。

[0088] 图61A-图61V显示了在IVIS仪器上拍摄的雌性nu/nu小鼠的生物发光照片,这些小鼠的右侧胁腹植入了0.5M人胰腺癌细胞,这些细胞要么是表达低至中等水平MUC1*的HPAF II野生型(wt)细胞,要么是经过工程化以表达更多MUC1*的HPAF II-MUC1*细胞。肿瘤植入

后第7天,动物注射了PBS作为对照或10mg/kg的MNC2-MMAE(DAR 4.1)。图61A显示了植入HPAF II-wt胰腺癌细胞但模拟注射PBS的对照动物的IVIS生物发光照片。图61B显示了植入HPAF II-wt胰腺癌细胞并且然后注射MNC2-MMAE的动物的IVIS生物发光照片。图61C显示了植入HPAF II-MUC1*胰腺癌细胞但模拟注射PBS的对照动物的IVIS生物发光照片。图61D显示了植入HPAF II-MUC1*胰腺癌细胞并且然后注射MNC2-MMAE的动物的IVIS生物发光照片。图61E显示了从由于肿瘤负荷过重而不得不被处死的HPAF II-wt对照动物中切除的肿瘤的照片。图61F显示了从由于肿瘤负荷过重而不得不被处死的HPAF II-MUC1*对照动物中切除的肿瘤的照片。图61G显示了对照和MNC2-MMAE治疗小鼠两者的生物发光(辐射率光子/sec/cm^2)的IVIS测量值作为肿瘤植入后天数的函数的叠加图表。由于仪器故障,第25天IVIS数据点被省略。图61H显示了在第25天肿瘤的卡尺测量值的条形图表。卡尺测量值消除了HPAF II-wt细胞系与HPAF II-MUC1*细胞系中荧光素酶表达水平的差异。图61I显示了植入HPAF II-wt胰腺癌细胞但模拟注射PBS的对照动物的第11天照片。图61J显示了植入HPAF II-wt胰腺癌细胞但模拟注射PBS的对照动物的第18天照片。图61K显示了植入HPAF II-wt胰腺癌细胞但模拟注射PBS的对照动物的第25天照片,显示右侧胁腹肿瘤越来越大。图61L显示了植入HPAF II-wt胰腺癌细胞然后注射MNC2-MMAE的动物的第11天照片。图61M显示了植入HPAF II-wt胰腺癌细胞然后注射MNC2-MMAE的动物的第18天照片。图61N显示了植入HPAF II-wt胰腺癌细胞然后注射MNC2-MMAE的动物的第25天照片,其中3只小鼠具有几乎看不见的小肿瘤。图61O显示了植入HPAF II-MUC1*胰腺癌细胞但模拟注射PBS的对照动物的第11天照片。图61P显示了植入HPAF II-MUC1*胰腺癌细胞但模拟注射PBS的对照动物的第18天照片。图61Q显示了植入HPAF II-MUC1*胰腺癌细胞但模拟注射PBS的对照动物的第25天照片,显示右侧胁腹有大肿瘤。图61R显示了植入HPAF II-MUC1*胰腺癌细胞并且然后注射MNC2-MMAE的动物的第11天照片。图61S显示了植入HPAF II-MUC1*胰腺癌细胞并且然后注射MNC2-MMAE的动物的第18天照片。图61T显示了植入HPAF II-MUC1*胰腺癌细胞并且然后注射MNC2-MMAE的动物的第25天照片,其中未看到或触摸到肿瘤。

[0089] 图62A-图62F显示了在IVIS仪器上拍摄的雌性nu/nu小鼠的生物发光照片,这些小鼠的右侧胁腹植入了0.5M人胰腺癌细胞HPAF II-MUC1*细胞,这些细胞经过工程化以表达更多的MUC1*。肿瘤植入后第7天,动物注射了PBS作为对照或10mg/kg的MNC2-MMAE(DAR 4.1)。从图中可以看出,到第66天时,治疗小鼠没有肿瘤或残留肿瘤斑点。由于HPAF II细胞系不能很好地表达荧光素酶,因此生物发光较弱。出于这个原因,我们还进行了卡尺测量,该测量记录了肿瘤的实际大小。图62A显示了植入HPAF II-MUC1*胰腺癌细胞但模拟注射PBS的对照动物的IVIS生物发光照片。图61B显示了植入HPAF II-MUC1*胰腺癌细胞然后注射10mg/kg的MNC2-MMAE的动物的IVIS生物发光照片。图62C显示了从由于肿瘤负荷过重而不得不被处死的HPAF II-MUC1*对照动物中切除的肿瘤的照片,相比之下MNC2-MMAE治疗组中只剩下肿瘤斑点或没有肿瘤。图62D显示了对照和MNC2-MMAE治疗小鼠两者的生物发光(辐射率光子/sec/cm^2)的IVIS测量值作为肿瘤植入后天数的函数的叠加图表。图62E显示了对照与治疗小鼠的Kaplan-Meier生存图。图62F显示了对照动物与治疗动物的卡尺测量值的条形图表。

[0090] 图63A-图63H显示了雌性NOD/SCID/GAMMA(NSG)小鼠的生物发光照片,这些小鼠植入了90天雌激素团块,并且然后在右侧植入了1M人乳腺癌细胞,这些细胞要么是表达低至

中等水平MUC1*的T47D野生型细胞,要么是经过工程化以表达更多MUC1*的T47D-MUC1*细胞。肿瘤植入后第6天,动物注射了10mg/kg的MNC2-德鲁替康(DAR 4.2),但对于T47D-wt治疗小鼠增加到20mg/kg。T47D-MUC1*治疗小鼠的治疗保持恒定在10mg/kg。图63A显示了植入T47D-wt肿瘤细胞但模拟注射PBS的对照动物。图63B显示了植入T47D-wt细胞并且然后注射MNC2-德鲁替康的动物。图63C显示了植入T47D-MUC1*肿瘤细胞但模拟注射PBS的对照动物。图63D显示了植入T47D-MUC1*细胞并且然后注射MNC2-德鲁替康的动物。图63E显示了生物发光(辐射率光子/cm^2)的IVIS测量值作为植入T47D野生型乳腺癌细胞的小鼠的肿瘤植入后天数的函数的图表。图63F显示了植入T47D-wt乳腺癌细胞的动物的每只小鼠每天的生物发光测量值的条形图表。图63G显示了生物发光(辐射率光子/sec/cm^2)的IVIS测量值作为植入T47D-MUC1*乳腺癌细胞的小鼠的肿瘤植入后天数的函数的图表。图63H显示了植入T47D-MUC1*乳腺癌细胞的动物每只小鼠每天的生物发光测量值的条形图表。

[0091] 图64A-图64T显示了第4天至第30天单个小鼠的IVIS发光测量值的线图表。NOD/SCOD/GAMMA小鼠植入T47D-wt乳腺癌细胞或表达更多MUC1*的T47D-MUC1*细胞。两组小鼠均用PBS模拟治疗或用MNC2-德鲁替康治疗。肿瘤植入后第6天,动物以10mg/kg注射MNC2-德鲁替康(DAR 4.2),但对于T47D-wt治疗小鼠增加到20mg/kg。T47D-MUC1*治疗小鼠的治疗保持恒定在10mg/kg。图64A显示了对照组中小鼠#1中T47D-wt肿瘤的生长。图64B显示了对照组中小鼠#2中T47D-wt肿瘤的生长。图64C显示了对照组中小鼠#3中T47D-wt肿瘤的生长。图64D显示了对照组中小鼠#4中T47D-wt肿瘤的生长。图64E显示了对照组中小鼠#5中T47D-wt肿瘤的生长。图64F显示了用MNC2-德鲁替康治疗的组的小鼠#1中T47D-wt肿瘤的生长。图64G显示了用MNC2-德鲁替康治疗的组的小鼠#2中T47D-wt肿瘤的生长。图64H显示了用MNC2-德鲁替康治疗的组的小鼠#3中T47D-wt肿瘤的生长。图64I显示了用MNC2-德鲁替康治疗的组的小鼠#4中T47D-wt肿瘤的生长。图64J显示了用MNC2-德鲁替康治疗的组的小鼠#5中T47D-wt肿瘤的生长。图64K显示了对照组中的小鼠#1中T47D-MUC1*肿瘤的生长。图64L显示了对照组中的小鼠#2中T47D-MUC1*肿瘤的生长。图64M显示了对照组中的小鼠#3中T47D-MUC1*肿瘤的生长。图64N显示了对照组中的小鼠#4中T47D-MUC1*肿瘤的生长。图64O显示了对照组中的小鼠#5中T47D-MUC1*肿瘤的生长。图64P显示了用MNC2-德鲁替康治疗的组的小鼠#1中T47D-MUC1*肿瘤的生长。图64Q显示了用MNC2-德鲁替康治疗的组的小鼠#2中T47D-MUC1*肿瘤的生长。图64R显示了用MNC2-德鲁替康治疗的组的小鼠#3中T47D-MUC1*肿瘤的生长。图64S显示了用MNC2-德鲁替康治疗的组的小鼠#4中T47D-MUC1*肿瘤的生长。图64T显示了用MNC2-德鲁替康治疗的组的小鼠#5中T47D-MUC1*肿瘤的生长。

[0092] 图65A-图65D显示了肿瘤细胞的图像。第0天细胞的染色显示了细胞表达的全长MUC1多于MUC1*,并且染色强度浅,表明MUC1*受体数目低,这表明是早期癌症。肿瘤植入后62天,其相当于人时间的大约7年,可以很容易地看到,晚期肿瘤中MUC1*表达(就表达程度和表达强度而言)已从低表达显著转变为高表达。相反,肿瘤连续切片的染色显示了全长MUC1的表达如所预期,因为它在表面表达后被切割为MUC1*。然而,染色强度并未增加,表明晚期肿瘤中绝大多数表达的MUC1已被切割为生长因子受体形式MUC1*。

具体实施方式

[0093] 本申请涉及抗MUC1*多特异性抗体和抗MUC1*抗体缀合物及其制备和使用方法。

MUC1跨膜蛋白的切割形式是一种生长因子受体,其驱动超过75%的所有人类癌症的生长。MUC1的切割形式MUC1*(发音为muk 1星)是一种生长因子受体。MUC1胞外结构域的大部分的切割和释放揭示了用于激活配体二聚NME1、NME6、NME7、NME7AB、NME7-X1或NME8的结合位点。它是癌症药物的理想靶,因为它在超过75%的所有癌症中异常表达,并且很可能在更高比例的转移性癌症中过度表达(Mahanta等人(2008)A Minimal Fragment of MUC1 Mediates Growth of Cancer Cells.PLoS ONE 3(4):e2054.doi:10.1371/journal.pone.0002054;Fessler等人(2009),"MUC1*is adeterminant of trastuzumab (Herceptin)resistance in breast cancer cells,"Breast Cancer Res Treat.118(1):113-124)。MUC1切割后,其大部分胞外结构域从细胞表面脱落。剩余部分MUC1*具有截短的胞外结构域,其包含大部分或全部主要生长因子受体序列PSMGFR(SEQ ID NO:133)。

[0094] 目前许多通过肠胃外方式施用于患者的药剂并非靶向,导致药剂全身递送到身体的细胞和组织,而这是不必要的,而且通常是不期望的。这可导致不良的药物副作用,并且通常会限制可以施用的药物(例如,化疗(抗癌)、细胞毒性、酶抑制剂药剂和抗病毒或抗菌药物)的剂量。

[0095] 主要目标是开发将治疗剂特异性地靶向细胞和组织的方法。这种治疗的好处包括避免因不当递送此类药剂到其他细胞和组织而产生的一般生理作用。本文的公开内容解决了过去的这些和其他限制和问题。

[0096] 特定术语

[0097] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与所要求保护的主题所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。除非另有说明,本文整个公开内容中提及的所有专利、专利申请、已公布的申请和出版物、GENBANK序列、网站和其他已公布的材料均以引用的方式全文并入。通常,细胞培养、细胞感染、抗体产生和分子生物学方法的规程是本领域常用的方法。这种标准技术可以在例如参考手册(例如Sambrook等人(2000)和Ausubel等人(1994))中找到。

[0098] 如本文所用,除非上下文另有明确规定,否则单数形式"一个"、"一种"和"该"包括复数指代物。在本申请中,除非另有明确说明,否则单数的使用包括复数。如本文所用,除非另有说明,否则"或"的使用表示"和/或"。此外,术语"包括(including)"以及其他形式(例如"包括(include)"、"包括(includes)"和"包括(included)")的使用不具有限制性。

[0099] 过渡术语"包含"与"包括"、"含有"或"特征在于"同义,是包容性的或开放式的,并且不排除额外的、未列举的元素或方法步骤。过渡短语"由……组成"排除权利要求中未指定的任何元素、步骤或成分。过渡短语"基本上由……组成"将权利要求的范围限制于指定的材料或步骤以及那些不会对所要求保护的发明的基本特征和新颖特征产生实质性影响的材料或步骤。

[0100] 如本文所用,范围和量可以表示为"约"特定值或范围。约还包括精确量。例如,"约1mg"表示"约1mg"以及还有"1mg"。术语"约"和"大约"通常包括预计在实验误差范围内的量。

[0101] 术语"个体"、"患者"或"对象"可互换使用。如本文所用,它们表示任何哺乳动物(即动物界:脊索动物门:脊椎动物门:哺乳纲内的任何目、科和属的物种)。在一些实施方案中,哺乳动物是人。这些术语均不要求或限于以医疗保健工作者(例如医生、注册护士、执业

护士、医师助理、护理员或临终关怀工作者)的监督(例如持续的或间歇的)为特征的情况。

[0102] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于天然存在的氨基酸聚合物以及其中一个或多个氨基酸残基是非天然存在的氨基酸(例如,氨基酸类似物)的氨基酸聚合物。这些术语涵盖任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白质(即抗原),其中氨基酸残基通过共价肽键连接。

[0103] 当本文提供氨基酸序列时,还考虑该序列的L-氨基酸、D-氨基酸或β氨基酸版本以及逆向、倒置和逆向倒置异构体。肽还包括其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物。此外,该术语适用于通过肽键或其他修饰的键连接的氨基酸(例如,其中肽键被α-酯、β-酯、硫代酰胺、膦酰胺、氨基甲酸酯、羟基化物等取代(参见例如Spatola,(1983)Chem.Biochem.Amino Acids and Proteins 7:267-357),其中酰胺被饱和胺取代(参见例如Skiles等人,美国专利号4,496,542,其通过引用并入本文,以及Kaltenbronn等人,(1990)第969-970页,Proc.11th American Peptide Symposium,ESCOM Science Publishers,The Netherlands,等等))。

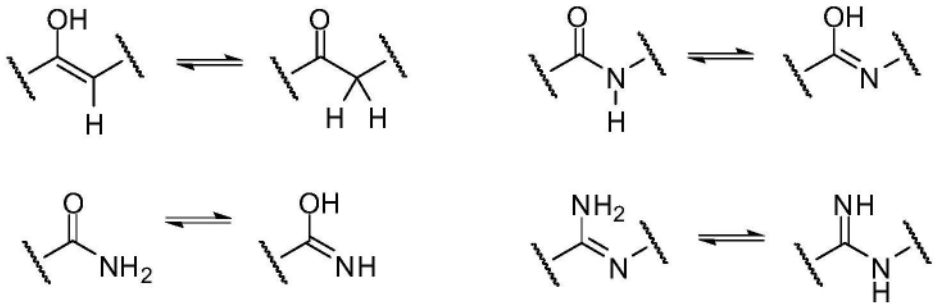
[0104] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及功能类似于天然存在的氨基酸的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及后来被修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸、γ-羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸分为疏水性氨基酸、极性氨基酸、非极性氨基酸和带电氨基酸。疏水性氨基酸包括小疏水性氨基酸和大疏水性氨基酸。小疏水性氨基酸可以是甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸及其类似物。大疏水性氨基酸可以是缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸及其类似物。极性氨基酸可以是丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、酪氨酸及其类似物。非极性氨基酸可以是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸及其类似物。带电氨基酸可以是赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、谷氨酸及其类似物。氨基酸类似物是指具有与天然氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即与氢、羧基、氨基和R基团结合的α碳,例如高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砜。此类类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但保留与天然氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构,但功能类似于天然氨基酸的化合物。氨基酸是D氨基酸或L氨基酸。

[0105] 如说明书和所附权利要求书中所用,除非另有说明,否则下列术语具有下文所述的含义。

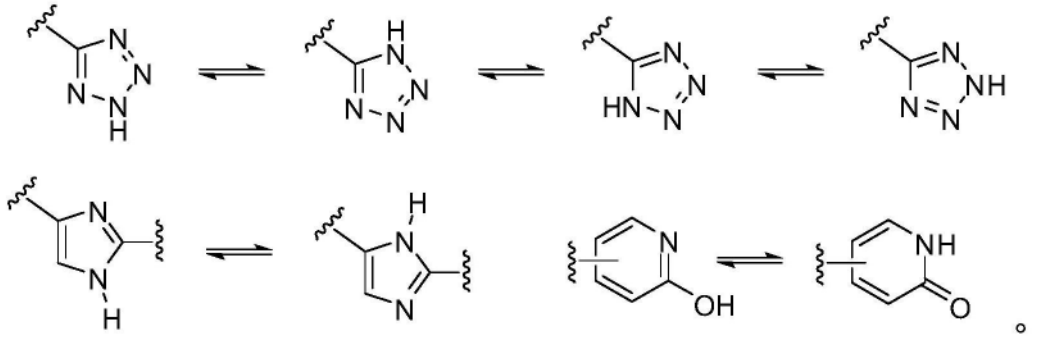
[0106] 在一些实施方案中,本文公开的化合物含有一个或多个不对称中心,因此产生对映体、非对映体和其他立体异构形式,这些形式在绝对立体化学方面定义为(R)或(S)。除非另有说明,否则本公开内容旨在涵盖本文公开的化合物的所有立体异构形式。当本文所述的化合物含有烯烃双键时,除非另有说明,否则本公开内容旨在包括E和Z几何异构体(例如,顺式或反式)。因此,本文提供的化合物可以是对映体纯的,也可以是立体异构体或非对映体混合物。本文提供的化合物可以包含手性中心。此类手性中心可以是(R)或(S)构型,也可以是它们的混合物。本文提供的化合物的手性中心可以在体内发生差向异构化。因此,本领域技术人员将认识到,对于在体内发生差向异构化的化合物,施用(R)形式的化合物与施用(S)形式的化合物是等效的。同样,所有可能的异构体及其外消旋和光学纯形式以及所有互变异构形式也旨在包括在内。术语“几何异构体”是指烯烃双键的E或Z几何异构体(例如

顺式或反式)。术语“位置异构体”是指围绕中心环的结构异构体,例如围绕苯环的邻位、间位和对位异构体。

[0107] “互变异构体”是指质子可以从分子的一个原子转移到同一分子的另一个原子的分子。在某些实施方案中,本文中呈现的化合物以互变异构体的形式存在。在可能发生互变异构的情况下,互变异构体的化学平衡将存在。互变异构体的确切比率取决于几个因素,包括物理状态、温度、溶剂和pH。互变异构平衡的一些实例包括:



[0108]



[0109] “药学上可接受的盐”包括酸加成盐和碱加成盐两者。本文所述化合物或缀合物中任一种的药学上可接受的盐旨在涵盖任何和所有药学上合适的盐形式。本文所述化合物的优选的药学上可接受的盐是药学上可接受的酸加成盐和药学上可接受的碱加成盐。

[0110] 如本文所用,术语“抗体”和“免疫球蛋白”是专业术语,并且可在本文中互换使用,是指具有特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。在某些实施方案中,本文所述的分离的抗体(例如,单克隆抗体)或其抗原结合片段特异性结合目标蛋白质。

[0111] 抗体可以包括,例如,单克隆抗体、重组产生的抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、合成抗体、包含两个重链和两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链/抗体重链对、具有两个轻链/重链对(例如,相同对)的抗体、胞内抗体、异缀合抗体、单结构域抗体、单价抗体、二价抗体(包括单特异性或双特异性二价抗体)、单链抗体或单链可变片段(scFv)、骆驼源化抗体、亲和体、Fab片段、F(ab')片段、$F(ab')_2$片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、抗独特型(抗Id)抗体(包括,例如,抗抗Id抗体)以及上述任何一种的表位结合片段。

[0112] 抗体可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2)或任何亚类(例如,IgG2a或IgG2b)的免疫球蛋白分子。在某些实施方案中,本文描述的抗体是IgG抗体(例如,人IgG),或其类别(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)或亚类。

[0113] 本文公开的抗体的CDR序列或本文公开的抗MUC1*或抗CD3结合结构域序列可以根据以下方式定义或确定:(i)Kabat编号系统(Kabat等人(197)Ann.NY Acad.Sci.190:382-391和Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest第五版,美国卫生和公众服务部(U.S.Department of Health and Human Services),NIH出版物编号91-3242);或(ii)Chothia编号方案,其在本文中被称为“Chothia CDR”(参见例如Chothia和Lesk,1987,J.Mol.Biol.,196:901-917;Al-Lazikani等人,1997,J.Mol.Biol.,273:927-948;Chothia等人,1992,J.Mol.Biol.,227:799-817;Tramontano A等人,1990,J.Mol.Biol.215(1):175-82;和美国专利号7,709,226);或(iii)ImMunoGeneTics(IMGT)编号系统,例如,如Lefranc,M.-P.,1999,The Immunologist,7:132-136和Lefranc,M.-P.等人,1999,Nucleic Acids Res.,27:209-212(“IMGT CDRs”)中所述;或(iv)MacCallum等人,1996,J.Mol.Biol.,262:732-745。另请参阅,例如,Martin,A.,“Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains,”载于Antibody Engineering,Kontermann和Diibel编辑,第31章,第422-439页,Springer-Verlag,Berlin(2001)。

[0114] 关于Kabat编号系统,抗体重链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置31至35,其可任选地包括一个或两个额外氨基酸,跟随在35(在Kabat编号方案中称为35A和35B)(CDR1)、氨基酸位置50至65(CDR2)和氨基酸位置95至102(CDR3)之后。使用Kabat编号系统,抗体轻链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置24至34(CDR1)、氨基酸位置50至56(CDR2)和氨基酸位置89至97(CDR3)。本领域技术人员众所周知,使用Kabat编号系统,抗体可变结构域的实际线性氨基酸序列可以由于FR和/或CDR的缩短或加长而包含更少或更多的氨基酸,因此氨基酸的Kabat编号不一定与其线性氨基酸编号相同。

[0115] 术语“嵌合”抗体是指重链和/或轻链的一部分衍生自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分衍生自不同来源或物种的抗体。

[0116] 术语“多特异性”是指抗体能够特异性地结合两个或更多个不同的抗原决定簇,例如两个结合位点,每个结合位点由一对与不同抗原结合的抗体重链可变结构域(VH)和抗体轻链可变结构域(VL)形成。

[0117] 本文使用的术语“人抗体”或“人源化抗体”旨在包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。人抗体在本领域中是众所周知的(van Dijk,M.A.,和van de Winkel,J.G.,Curr.Opin.Chem.Biol.5(2001)368-374)。在某些情况下,转基因动物(例如,小鼠)也会产生人抗体,这些动物在免疫后能够在没有内源性免疫球蛋白产生的情况下产生全套或精选的人抗体。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到此类种系突变小鼠中将导致在抗原攻击后产生人抗体(参见,例如,J Jakobovits,A.,等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90(1993)2551-2555;Jakobovits,A.,等人,Nature 362(1993)255-258;Bruggemann,M.,等人,Year Immunol.7(1993)33-40)。在其他情况下,人抗体也在噬菌体展示文库中产生(Hoogenboom,H.R.,和Winter,G.,J.Mol.Biol.227(1992)381-388;Marks,J.D.,等人,J.Mol.Biol.222(1991)581-597)。Cole等人和Boerner等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole,等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,第77页(1985);和Boerner,P.,等人,J.Immunol.147(1991)86-95)。

[0118] 如本文所用,“抗原”是包含抗体可特异性结合的表位的部分或分子。因此,抗原被抗体特异性结合。在特定实施方案中,本文所述抗体所结合的抗原是目标蛋白质,例如

MUC1*、CD3或其片段。

[0119] 如本文所用,术语“重链”在用于抗体时可指基于恒定结构域氨基酸序列的任何不同类型,例如阿尔法(α)、德尔塔(δ)、艾谱西隆(ε)、伽马(γ)和缪(μ),其分别产生IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类别的抗体,包括IgG亚类,例如IgG_1、IgG_2、IgG_3和IgG_4。

[0120] 如本文所用,术语“轻链”在用于抗体时可指基于恒定结构域氨基酸序列的任何不同类型,例如卡帕(κ)或兰姆达(λ)。轻链氨基酸序列是本领域众所周知的。在特定实施方案中,轻链是人轻链。

[0121] 如本文所用,有关序列的术语“氨基酸序列同一性百分比(%)”或“序列同一性”定义为在比对序列并引入空位(如果需要)以实现最大序列同一性百分比,并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分之后,与特定序列中的氨基酸残基相同的候选序列中的氨基酸残基的百分比。可以通过本领域技术范围内的各种方式实现用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对,例如,使用公开可获得的计算机软件,例如EMBOSS MATCHER、EMBOSS WATER、EMBOSS STRETCHER、EMBOSS NEEDLE、EMBOSS ALIGN、BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0122] 在使用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A与给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%(其可以替代性地表述为给定氨基酸序列A与给定氨基酸序列B具有或包含一定的氨基酸序列同一性%)的计算方法如下:100乘以分数X/Y,其中X是序列比对程序ALIGN-2在A和B的比对中被评为相同匹配的氨基酸残基数目,并且Y是B中的氨基酸残基总数目。可以理解,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A与B的氨基酸序列同一性%将不等于B与A的氨基酸序列同一性%。除非另有明确说明,否则本文使用的所有氨基酸序列同一性%值均按照上一段所述使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0123] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“整个抗体”在本文中可互换使用,以指抗体为其基本上完整的形式,而不是下文定义的抗体片段。这些术语特别指具有包含Fc区的重链的抗体。

[0124] “抗体片段”仅包含完整抗体的一部分,其中该部分保留了完整抗体中通常与该部分相关的至少一个、两个、三个以及多至大多数或所有功能。在一个方面,抗体片段包含完整抗体的抗原结合位点,并且因此保留了结合抗原的能力。

[0125] 如本文所用,“表位”是本领域已知的术语,并且指抗体可以特异性结合的抗原的局部区。表位可以是连续氨基酸的线性表位,也可以包含来自抗原的两个或多个不连续区的氨基酸。

[0126] 如本文所用,术语“结合”、“结合至”、“特异性结合”或“特异性结合至”在抗体结合的上下文中是指抗体结合至抗原(例如,表位),正如本领域技术人员所理解的结合那样。在特定实施方案中,特异性结合抗原的分子与抗原结合的亲和力(K_d)至少比分子与另一抗原结合时的K_d低2个对数、2.5个对数、3个对数、4个对数(亲和力更高)。在另一特定实施方案中,特异性结合抗原的分子不与其他蛋白质发生交叉反应。

[0127] “连接部分”或“接头”(例如,记为L)是具有两个反应末端的分子,一个用于通过缀合部分Y缀合至多肽(例如,抗体),另一个用于缀合至连接部分(记为SP)或当SP不存在时结合至T部分。接头的多肽缀合反应末端通常是能够通过多肽(例如,抗体)上的半胱氨酸硫醇

基团缀合至多肽(例如,抗体)的位点,因此通常是硫醇反应性基团,例如马来酰亚胺或二溴马来酰亚胺,或如本文所定义。

[0128] 如本文所用,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”或“缓解”或“改善”可互换使用。这些术语是指获得有益或期望结果(包括但不限于治疗益处和/或预防益处的方法)。“治疗益处”是指根除或改善所治疗的潜在病症。此外,治疗益处是通过根除或改善与潜在病症相关的一种或多种生理症状来实现的,从而观察到患者的改善,尽管患者仍然患有潜在病症。对于预防益处,在一些实施方案中,将组合物施用于有患上特定疾病风险的患者,或施用于报告疾病的一种或多种生理症状的患者,即使尚未做出该疾病的诊断。

[0129] MUC1*结合结构域

[0130] 在一些实施方案中,本文公开了包含抗MUC1*结合结构域的抗体。在一些实施方案中,MUC1*结合结构域包含抗体或其抗原结合片段或变体。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段或变体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段或变体是人抗体、鼠抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中,MUC1*结合结构域包含单价Fab、二价Fab’2、单链可变片段(scFv)或其功能片段或变体。在一些实施方案中,MUC1*结合结构域包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4结构域。在一些实施方案中,MUC1*结合结构域包含IgG1结构域。在一些实施方案中,MUC1*结合结构域包含IgG2结构域。在一些实施方案中,MUC1*结合结构域包含IgG3结构域。在一些实施方案中,MUC1*结合结构域包含IgG4结构域。

[0131] 在一些实施方案中,特异性结合MUC1*的抗体或其功能片段或功能变体包含抗MUC1*重链和抗MUC1*轻链。

[0132] 在一些实施方案中,抗MUC1*重链包含抗MUC1*重链可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*轻链包含抗MUC1*轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。

[0133] 在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG1重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG2重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG3重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG4重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。

[0134] 在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG1重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG2重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG3重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG4重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ轻链的可变结构域。

[0135] 在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG1重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG2重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含λ轻链的可变结构域。在

一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG3重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG4重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含λ轻链的可变结构域。

[0136] 在一些实施方案中,特异性结合MUC1*的抗体或其功能片段或功能变体包括单链可变片段(scFv)或抗原结合片段(Fab)。在一些实施方案中,特异性结合MUC1*的抗体或其功能片段或功能变体包括单链可变片段。在一些实施方案中,特异性结合MUC1*的抗体或其功能片段或功能变体包括抗原结合片段(Fab)。

[0137] 在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包括互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,并且其中抗MUC1*重链可变结构域的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包括根据以下的氨基酸序列:HC-CDR1:SEQ ID NO:1或4;HC-CDR2:SEQ ID NO:2或5;HC-CDR3:SEQ ID NO:3或6;并且其中CDR在HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3中的至少一个中包含0-2个氨基酸修饰(例如0或1个氨基酸修饰)。

[0138] 在一些实施方案中,抗MUC1*轻链可变结构域包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,并且其中抗MUC1*轻链可变结构域的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包括根据以下的氨基酸序列:LC-CDR1:SEQ ID NO:13或16;LC-CDR2:SEQ ID NO:14或17;LC-CDR3:SEQ ID NO:15或18;并且其中CDR在LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3中的至少一个中包含0-2个氨基酸修饰(例如0或1个氨基酸修饰)。

[0139] 在一些实施方案中,抗MUC1*重链包含与SEQ ID NO:38或44具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗MUC1*轻链包含与SEQ ID NO:41或47具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0140] 表1.MUC1*结合结构域CDR序列

[0141]

构建体	SEQ ID NO	MUC1* HC-CDR1	SEQ ID NO	MUC1* HC-CDR2	SEQ ID NO	MUC1* HC-CDR3
抗MUC1* 20A10	1	TYAMS	2	SIGRAGSTYYSDSVKG	3	GPIYNDYDEFAY
抗MUC1* MNC2	4	GYAMS	5	TISSGGTYIYYPDSVKG	6	LGGDNYYEYFDV
构建体	**SEQ ID NO**	**MUC1* LC-CDR1**	**SEQ ID NO**	**MUC1* LC-CDR2**	**SEQ ID NO**	**MUC1* LC-CDR3**
抗MUC1* 20A10	13	KSSQSVLYSSNQKNYLA	14	WASTRES	15	HQYLSSLT
抗MUC1* MNC2	16	RASKSVSTSGYSYMH	17	LASNLES	18	QHSRELPFT

[0142] 表2:抗MUC1*结合结构域的重链序列、重链可变结构域序列、轻链序列和轻链可变结构域序列的实例

[0143]

构建体	SEQ ID NO	序列
抗MUC1* MNC2 HC DNA	37	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagac tc tcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggct ccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatactac ccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtat ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacttgg g ggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgtctcc tccgcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctcc gagagcacagccgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggt g tcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcc tcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcacccag acctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttga g cgcaaatgttgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtc ttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacg tgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtgga c ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgt tc cgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaa g tgcaaggtctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaa a gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgacca ag aaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggag

[0144]

		tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactcc gacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatagtaa
抗MUC1* MNC2 HC 氨基酸	38	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
抗MUC1* MNC2 HC 可变结构域	39	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSS
抗MUC1* MNC2 LC DNA	40	gacattgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcgggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggtgcgtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag
抗MUC1* MNC2 LC 氨基酸	41	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
抗MUC1* MNC2 LC 可变结构域	42	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRT
抗MUC1* 20A10 HC DNA	43	CAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGCGGACTTGTGAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCACATACGCCATGAGCTGGATCAGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGgcgTCTATTGGCAGAGCCGGCAGCACCTACTACAGCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGAGGACCCATCTACAACGACTACGACGAGTTCGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG

[0145]

		CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTTCCCCGAGCCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCGGGTAAA
抗MUC1* 20A10 HC 氨基酸	44	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIRQ APGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
抗MUC1* 20A10 HC 可变结构域	45	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIRQ APGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQGTL VTVSS
抗MUC1* 20A10 LC DNA	46	Gaaattgtgctgacacagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaaagagccac actgagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaagaactacctgg cctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgggccagcacaa gagagagcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctgac cataagcagcctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccaccagtacctgagcag cctgacctttggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcggcgtacggtggctgcaccat ctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcct gctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggtgcgtggataacgccctcca atcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagc ctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctg cgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt gttag

[0146]

抗MUC1* 20A10 LC 氨基酸	47	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLA WYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCHQYLSSLTFGGGTKVEIKRRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
抗MUC1* 20A10 LC 可变结构域	48	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLA WYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCHQYLSSLTFGGGTKVEIKR

[0147] 表3:抗MUC1*单链可变片段(scFv)序列

[0148]

构建体	SEQ ID NO	序列
抗MUC1* 20A10 scFv	129	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIRQ APGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYWAS TRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQYLS SLTFGGGTKVEIKR
抗MUC1* MNC2 scFv	130	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQR ATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASN LESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRE LPFTFGGGTKVEIKRT

[0149] CD3结合结构域

[0150] 在一些实施方案中,本文公开了一种包含抗CD3结合结构域的抗体。在一些实施方案中,CD3结合结构域包含抗体或其抗原结合片段或变体。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段或变体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段或变体是人抗体、鼠抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中,CD3结合结构域包含单价Fab、二价Fab'2、单链可变片段(scFv)或其功能片段或变体。

[0151] 在一些实施方案中,CD3结合结构域包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4结构域。在一些实施方案中,CD3结合结构域包含IgG1结构域。在一些实施方案中,CD3结合结构域包含IgG2结构域。在一些实施方案中,CD3结合结构域包含IgG3结构域。在一些实施方案中,CD3结合结构域包含IgG4结构域。

[0152] 在一些实施方案中,特异性结合CD3的抗体或其功能片段或功能变体包含抗CD3重链和抗CD3轻链。

[0153] 在一些实施方案中,抗CD3重链包含抗CD3重链可变结构域。在一些实施方案中,抗CD3重链可变结构域包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链的可变结构域。在一些实施方案中,抗CD3轻链包含抗CD3轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗CD3轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗CD3重链可变结构域包含IgG1重链的可变结构域,并且抗CD3轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗CD3重链可变结构域包含IgG2重链的可变结构域,并且抗CD3轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗CD3重链可变结构域包含IgG3重链的可变结构域,并且抗CD3轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗CD3重链可变结构域包含

IgG4重链的可变结构域,并且抗CD3轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。

[0154] 在一些实施方案中,特异性结合CD3的抗体或其功能片段或功能变体包含单链可变片段(scFv)或抗原结合片段(Fab)。在一些实施方案中,特异性结合CD3的抗体或其功能片段或功能变体包含单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,特异性结合CD3的抗体或其功能片段或功能变体包括抗原结合片段(Fab)。

[0155] 在一些实施方案中,抗CD3重链可变结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,并且其中抗CD3重链可变结构域的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含根据以下的氨基酸序列:HC-CDR1:SEQ ID NO:7或10;HC-CDR2:SEQ ID NO:8或11;HC-CDR3:SEQ ID NO:9或12;并且其中CDR在HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3中的至少一个中包含0-2个氨基酸修饰(例如0或1个氨基酸修饰)。

[0156] 在一些实施方案中,抗CD3轻链可变结构域包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,并且其中抗CD3轻链可变结构域的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含根据以下的氨基酸序列:LC-CDR1:SEQ ID NO:19或22;LC-CDR2:SEQ ID NO:20或23;LC-CDR3:SEQ ID NO:21或24;并且其中CDR在LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3中的至少一个中包含0-2个氨基酸修饰(例如0或1个氨基酸修饰)。

[0157] 在一些实施方案中,抗CD3重链包含与SEQ ID NO:26或32具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0158]]在一些实施方案中,抗CD3重链包含与SEQ ID NO:30或33具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0159] 在一些实施方案中,抗CD3重链包含与表5的任何氨基酸序列具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0160] 在一些实施方案中,抗CD3轻链包含与表5的任何氨基酸序列具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0161] 表4:抗CD3 CDR

[0162]

构建体	SEQ ID NO	CD3 HC-CDR1	SEQ ID NO	CD3 HC-CDR2	SEQ ID NO	CD3 HC-CDR3
抗CD3 OKT3	7	RYTMH	8	YINPSRGYTNYNQKVKD	9	YYDDHY
抗CD3 12F6	10	SYTMH	11	YINPSSGYTKYNQKFKD	12	WQDYDVYFDY
构建体	**SEQ ID NO**	**CD3 LC-CDR1**	**SEQ ID NO**	**CD3 LC-CDR2**	**SEQ ID NO**	**CD3 LC-CDR3**
抗CD3 OKT3	19	SASSSVSYMN	20	DTSKLAS	21	QQWSSNPFT
抗CD3 12F6	22	RASSSVSYMH	23	YATSNLAS	24	QQWSSNPPT

[0163] 表5:抗CD3结合结构域的重链序列、重链可变结构域序列、轻链序列和轻链可变结构域序列的实例

[0164]

构建体	SEQ ID NO	序列
抗CD3 OKT3 HC DNA	25	caggttcaactggttcagagcggtggaggtgtggttcagcctggtcgtagcctgagact gagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagacagg cccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatataccaa ctacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtccacc gctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgcccg gtactacgacgaccattactgtctggattactggggtcagggaaccaccctgaccgttag

[0165]

		cagtgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacct ctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccggtga cggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttggg cacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaag aaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctga actcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgag gtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgc gggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcacca ggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac accctgccccatcccgggacgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg gagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctac agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccg tgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt aaatga
抗 CD3 OKT3 HC 氨基酸	26	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
抗 CD3 OKT3 HC 可变结构域	27	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSS
抗 CD3 OKT3 LC DNA	28	Cagatgacccagagcccttcttccttatctgccagcgtgggcgatagagtgaccatcac atgcagcgccagctcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaaagg ccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgccctctagattca gcggctctggctccggcaccgactacaccttacaattagctccctgcagcccgaggat atcgccacctactactgccagcagtggagcagcaacccttcacattcggccagggca caaagctgcaaatcaccagacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatc tgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatccca gagaggccaaagtacagtggtgcgtggataacgccctccaatcgggtaactcccagga gagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgac gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcag ggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag
抗 CD3 OKT3 LC 氨基酸	29	QMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPE DIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
抗 CD3 OKT3 LC 可变结构域	30	QMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPE DIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRR

[0166]

抗 CD3 12F6 HC DNA	31	caagtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccggc tgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggcag gcccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaacccttccagcggctacaccaa gtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagcacag cctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgcccgct ggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacagtgagca gcgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctg ggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccggtgacggt gtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtc ctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccca gacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttg agcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgg ggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggac ccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttca actggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagca gtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaa tggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaa ccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcc cgggacgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatccc agcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacc acgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggaca agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaca accactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga
抗 CD3 12F6 HC 氨基酸	32	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSKST AFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQGTPV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
抗 CD3 12F6 HC 可变结构域	33	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSKST AFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQGTPV TVSS
抗 CD3 12F6 LC DNA	34	gatatccagatgacacagagccccagctctctgtctgcttctgtgggcgacagagtgacca tgacctgtagagcctcctcaagcgtgtcctacatgcactggtaccagcaaacacctggcaa ggccccaaagccttggatctacgccacctctaatctggccagcggcgtgccttctagattc agcggcagcggatctggcaccgattacaccctgaccatcagcagcctgcagcccgagg atatcgccacatactactgccagcagtggagctccaatcctcctacctteggccagggcac caagctgcagatcacaagacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctg atgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagag aggccaaagtacagtggtgcgtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagt gtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctga gcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctg agctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag
抗 CD3 12F6 LC 氨基酸	35	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQT PGKAPKPWIYATSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLQITRRTVAAPSVFIF

[0167]

		PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
抗CD3 12F6 LC可变结构域	36	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQT PGKAPKPWIYATSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLQITRR

[0168] 表6:抗CD3单链可变片段(scFv)序列

[0169]

构建体	SEQ ID NO	序列
抗CD3 12F6 scFv	131	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTIS ADKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYF DYWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQS PSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKA PKPWIYATSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DIATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLQITR
抗CD3 OKT3 scFv	132	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTI STDKSKSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKA PKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR

[0170] 与MUC1*和CD3结合的抗体

[0171] 在一些实施方案中,特异性结合MUC1*的抗体或其功能片段或功能变体包含Fab,并且特异性结合CD3的抗体或其功能片段或功能变体包含scFv。

[0172] 在一些实施方案中,抗MUC1*重链包含与SEQ ID NO:38或44具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,并且抗MUC1*轻链包含与SEQ ID NO:41或47具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;并且scFv包含与SEQ ID NO:131或132具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0173] 在一些实施方案中,特异性结合MUC1*的抗体或其功能片段或功能变体包含scFv,并且特异性结合CD3的抗体或其功能片段或功能变体包含Fab。

[0174] 在一些实施方案中,抗CD3重链包含与SEQ ID NO:26、27、32或33具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,并且抗CD3轻链包含与SEQ ID NO:29、30、35或36具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;并且scFv包含与SEQ ID NO:129或130具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0175] 在一些实施方案中,抗体包含选自SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、13、14、15、16、17或18

中的任一个和其0-2个氨基酸修饰(例如0-1个氨基酸修饰)的抗MUC1*结合结构域的至少3个CDR;以及选自SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、19、20、21、22、23或24中的任一个和其0-2个氨基酸修饰(例如,0-1个氨基酸修饰)的抗CD3结合结构域的至少3个CDR。

[0176] 在一些实施方案中,特异性结合MUC1*的抗体或其功能片段或功能变体包含scFv,并且结合CD3的抗体或其功能片段或功能变体包含scFv。

[0177] 在一些实施方案中,抗MUC1*scFv包含与SEQ ID NO:129或130具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3 scFv包含与SEQ ID NO:131或132具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0178] 表7:与MUC1*和CD3结合的抗体的示例性序列

[0179]

构建体	SEQ ID NO	序列
抗 CD3 12F6 scFV-Fc DNA	49	caagtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccgg ctgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggc aggcccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaacccttccagcggctacac caagtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagc acagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgc ccgctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacag tgagcagcggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctga tatccagatgacacagagccccagctctctgtctgcttctgtgggcgacagagtgaccat gacctgtagagcctcctcaagcgtgtcctacatgcactggtaccagcaaacacctggca aggccccaaagccttggatctacgccacctctaatctggccagcggcgtgccttctagat tcagcggcagcggatctggcaccgattacaccctgaccatcagcagcctgcagcccga ggatatcgccacatactactgccagcagtggagctccaatcctcctaccttcggccagg gcaccaagctgcagatcacaagagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccc accgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaac ccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcg

[0180]

		tcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc aacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccc cgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccag gtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggga gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccga cggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc ctctccctgtctccgggtaaa
抗 CD3 12F6 scFV-Fc 氨基酸	50	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYATSNL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQWSS NPPTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
抗 CD3 OKT3 scFV Fc DNA	51	caggtgcaactggtgcagtccggcggaggcgtggtgcagcctggccggagcctgaga ctgagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagaca ggccccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatatacc aactacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtcca ccgctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgccc ggtactacgacgaccactactgtctggactactggggacagggaaccaccctgaccgt cagctctggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgata tccagatgacccagagccccttcttccttatctgccagcgtgggcgatagagtgaccatca catgcagcgccagctcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaaag gccccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgccctctagatt cagcggctctggctccggcaccgactacaccttacaattagctccctgcagcccgagg atatcgccacctactactgccagcagtggagcagcaacccccttcacattcggccagggc acaaagctgcaaatcaccagagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccacc gtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccca aggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgag ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataat gccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtc ctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcca acaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccc gagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagg tcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggag agcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac ggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc tctccctgtctccgggtaaa
抗 CD3 OKT3 scFV Fc 氨基酸	52	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSN PFTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV

[0181]

		DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
OKT3 scFV-Fc L1 hMN20A10N scFV DNA	53	caggtgcaactggtgcagtccggcggaggcgtggtgcagcctggccggagcctgaga ctgagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagaca ggccccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatatacc aactacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtcca ccgctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgccc ggtactacgacgaccactactgtctggactactggggacagggaaccaccctgaccgt cagctctggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgata tccagatgacccagagccccttcttccttatctgccagcgtgggcgatagagtgaccatca catgcagcgccagctcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaaag gccccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgccctctagatt cagcggctctggctccggcaccgactacaccttacaattagctccctgcagcccgagg atatcgccacctactactgccagcagtggagcagcaaccccttcacattcggccagggc acaaagctgcaaatcaccagagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccacc gtgcccagcacctgaactcctgggggacgtcagtcttcctcttccccccaaaacccca aggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgag ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataat gccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtc ctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcca acaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccc gagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagg tcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggag agcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac ggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc tctccctgtctccgggtaaaggcgggggtggcggttctggtggtggtggctctggagga ggaaccggtcaggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggat ctctgagactgagctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctgga tcagacaggccccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggca gcacctactacagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaa gaacagcctgtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactatt gtgccagaggacccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcac actggtcacagtttctagcggcggtggcggaagcggaggcggtggctccggtggcgg aggcagcgaaattgtgctgacacagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaaa gagccacactgagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaaga actacctggcctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgg gccagcacaagagagagcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcaccg atttcaccctgaccataagcagcctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccacc agtacctgagcagcctgacctttggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcggtgata a
OKT3 scFV-Fc L1 hMN20A10N scFV 氨基酸	54	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSN PFTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR

[0182]

		EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSGGGGSGGGTGQVQLV ESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIRQAPGK GLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQGTLVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS CKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYWAST RESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQYLS SLTFGGGTKVEIKR
OKT3 scFV-Fc L1 hMNC2 scFV DNA	55	caggtgcaactggtgcagtccggcggaggcgtggtgcagcctggccggagcctgaga ctgagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagaca ggcccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatatacc aactacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtcca ccgctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgccc ggtactacgacgaccactactgtctggactactggggacagggaaccaccctgaccgt cagctctggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgata tccagatgacccagagcccttcttcctatctgccagcgtgggcgatagagtgaccatca catgcagcgccagctcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaaag gcccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgccctctagatt cagcggctctggctccggcaccgactacaccttacaattagctccctgcagcccgagg atatcgccacctactactgccagcagtggagcagcaaccccttcacattcggccagggc acaaagctgcaaatcaccagagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccacc gtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacca aggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgag ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataat gccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtc ctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcca acaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccc gagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagg tcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggag agcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac ggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc tctccctgtctccgggtaaaggcgggggtggcggttctggtggtggtggctctggagga ggaaccggtgaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggg gtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgg gtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaa cctacatatactaccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgcc aagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtatta ctgtgcgagacttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggga ccacggtcaccgtctcctccggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtg gcggatccgacattgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacaga gggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatg cactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaat ctggagagcggggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccc tcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtaggga gctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaacttgataa
OKT3 scFV-Fc L1 hMNC2 scFV 氨基酸	56	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSN PFTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF

[0183]

		LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSGGGGSGGGTGEVQLV ESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPG KGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRA TITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL ESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRE LPFTFGGGTKVEIKRT**
OKT3 scFV-Fc L2 hMN20A10N scFV DNA	57	caggtgcaactggtgcagtccggcggaggcgtggtgcagcctggccggagcctgaga ctgagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagaca ggcccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatatacc aactacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtcca ccgctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgccc ggtactacgacgaccactactgtctggactactggggacagggaaccaccctgaccgt cagctctggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgata tccagatgacccagagccccttcttcctatctgccagcgtgggcgatagagtgaccatca catgcagcgccagctcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaaag gcccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgccctctagatt cagcggctctggctccggcaccgactacaccttacaattagctccctgcagcccgagg atatcgccacctactactgccagcagtggagcagcaaccccttcacattcggccagggc acaaagctgcaaatcaccagagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccacc gtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaaccca aggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgag ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataat gccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtc ctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcca acaaagccctcccagccccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccc gagaaccacaggtgtacaccctgccccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggt cagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggag agcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac ggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc tctccctgtctccgggtaaaggcggcgggggagcggtggtggcggtagcaccggtc aggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagactg agctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacaggc ccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctactac agcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcctgt acctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagagg acccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcacag tttctagcggcggtggcggaagcggaggcggtggctccggtggcggaggcagcgaa attgtgctgacacagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacact gagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggc ctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgggccagcacaa gagagagcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctg accataagcagcctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccaccagtacctgag cagcctgacctttggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcggtgataa
OKT3 scFV-Fc L2 hMN20A10N scFV 氨基酸	58	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ

[0184]

		GTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSN PFTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTGQVQLVESGG GLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIRQAPGKGLEW VASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQGTLVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSS QSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGI PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQYLSSLTFG GGTKVEIKR--
	OKT3 scFV-Fc L2 hMNC2 scFV DNA	59	caggtgcaactggtgcagtccggcggaggcgtggtgcagcctggccggagcctgaga ctgagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagaca ggccccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatatacc aactacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtcca ccgctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgccc ggtactacgacgaccactactgtctggactactggggacagggaaccaccctgaccgt cagctctggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgata tccagatgacccagagccctcttcctttatctgccagcgtgggcgatagagtgaccatca catgcagcgccagctcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaaag gccccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgccctctagatt cagcggctctggctccggcaccgactacacctttacaattagctccctgcagcccgagg atatcgccacctactactgccagcagtggagcagcaaccccttcacattcggccagggc acaaagctgcaaatcaccagagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccacc gtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccca aggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgag ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataat gccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtc ctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcca acaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccc gagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagg tcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggag agcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac ggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc tctccctgtctccgggtaaaggcggcgggggggagcggtggtggcggtagcaccggtg aggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagac tctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggc tccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatact accccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcacc gtctcctccggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgac attgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatc acctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatca gcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcg gggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaat cctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttca cattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaacttgataa

[0185]

OKT3 scFV-Fc L2 hMNC2 scFV 氨基酸	60	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSN PFTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTGEVQLVESGGG LVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEW VSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRA SKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVP ARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPFTF GGGTKVEIKRT**
hMN20A10N scFV-Fc L1 OKT3 scFV DNA	61	caggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagact gagctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacagg ccccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctacta cagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagag gacccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcaca gtttctagcggcggtggcggaagcggaggcggtggctccggtggcggaggcagcga aattgtgctgacacagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacac tgagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggc ctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgggccagcacaa gagagagcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctg accataagcagcctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccaccagtacctgag cagcctgacctttggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcgggagcccaaatcttgt gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcag tcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtca catgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtg gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacag cacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaagg agtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggga ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagc gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccac gcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaa gagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaca accactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaggcgggggtggcggttc tggtggtggtggctctggaggaggaaccggtcaggtgcaactggtgcagtccggcgg aggcgtggtgcagcctggccggagcctgagactgagctgcaaggcctccggctacac ctttacaagatacactatgcactgggtcagacaggccccctggcaagggcctggaatgga ttggctacatcaaccctagccggggatataccaactacaaccagaaagtgaaggacag attcaccatcagcacagataagtccaagtccaccgctttcctgcagatggactccctgcgt ccagaggacacagctgtgtactactgcgcccggtactacgacgaccactactgtctgga ctactggggacagggaaccaccctgaccgtcagctctggcggcggaggctccggcgg aggtggcagcggcggcggcggctctgatatccagatgacccagagccctctcttcctta ctgccagcgtgggcgatagagtgaccatcacatgcagcgccagctcttctgttagctaca tgaactggtaccagcaaacacctggaaaggcccctaaaagatggatctacgacaccag caagctggcctctggcgtgccctctagattcagcggctctggctccggcaccgactaca

[0186]

		cctttacaattagctccctgcagcccgaggatatcgccacctactactgccagcagtgga gcagcaaccccttcacattcggccagggcacaaagctgcaaatcaccagatgataa
hMN20A10N scFV-Fc L1 OKT3 scFV 氨基酸	62	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIY WASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCH QYLSSLTFGGGTKVEIKREPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSGGGGSGGGTG QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSN PFTFGQGTKLQITR—
hMNC2 scFV-Fc L1 OKT3 scFV DNA	63	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccagg ctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatac tacccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcacc gtctcctccggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgac attgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatc acctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatca gcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcg gggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaat cctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttca cattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgagcccaaatcttgtgacaaa aactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcc tcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgc gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacg gcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacg taccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagta caagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggagga gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgaca tcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctc ccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca ctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaggcgggggtggcggttctggt ggtggtggctctggaggaggaaccggtcaggtgcaactggtgcagtccggcggaggc gtggtgcagcctggccggagcctgagactgagctgcaaggcctccggctacaccttta caagatacactatgcactgggtcagacaggccccctggcaagggcctggaatggattgg ctacatcaaccctagccggggatataccaactacaaccagaaagtgaaggacagattca ccatcagcacagataagtccaagtccaccgctttcctgcagatggactccctgcgtccag aggacacagctgtgtactactgcgcccggtactacgacgaccactactgtctggactact ggggacagggaaccaccctgaccgtcagctctggcggcggaggctccggcggaggt

[0187]

		ggcagcggcggcggcggctctgatatccagatgacccagagcccttcttccttatctgc cagcgtgggcgatagagtgaccatcacatgcagcgccagctcttctgttagctacatgaa ctggtaccagcaaacacctggaaaggcccctaaaagatggatctacgacaccagcaag ctggcctctggcgtgccctctagattcagcggctctggctccggcaccgactacaccttt acaattagctccctgcagcccgaggatatcgccacctactactgccagcagtggagcag caaccccttcacattcggccagggcacaaagctgcaaatcaccagatgataa
hMNC2 scFV-Fc L1 OKT3 scFV 氨基酸	64	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGK GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSP GQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC QHSRELPFTFGGGTKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSGGGGSGGG TGQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTD KSKSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWG QGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSK LASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSS NPFTFGQGTKLQITR**
hMN20A10N scFv-Fc L2 OKT3 scFv DNA	65	caggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagact gagctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacagg ccccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctacta cagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagag gacccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcaca gtttctagcggcggtggcggaagcggaggcggtggctccggtggcggaggcagcga aattgtgctgacacagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacac tgagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggc ctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgggccagcacaa gagagagcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctg accataagcagcctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccaccagtacctgag cagcctgaccttggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcgggagcccaaatcttgt gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcag tcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtca catgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtg gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacag cacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaagg agtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggga ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagc gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccac gcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaa gagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaca accactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaggcggcgggggggagcg gtggtggcggtagcaccggtcaggtgcaactggtgcagtccggcggaggcgtggtgc agcctggccggagcctgagactgagctgcaaggcctccggctacacctttacaagata cactatgcactgggtcagacaggcccctggcaagggcctggaatggattggctacatca

[0188]

		accctagccggggatataccaactacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcag cacagataagtccaagtccaccgctttcctgcagatggactcccctgcgtccagaggaca cagctgtgtactactgcgcccggtactacgacgaccactactgtctggactactggggac agggaaccaccctgaccgtcagctctggcggcggaggctccggcggaggtggcagc ggcggcggcggctctgatatccagatgacccagagccctcttcttcttatctgccagcgtg ggcgatagagtgaccatcacatgcagcgccagctcttctgttagctacatgaactggtac cagcaaacacctggaaaggccccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcct ctggcgtgccctctagattcagcggctctggctccggcaccgactacacctttacaattag ctccctgcagcccgaggatatcgccacctactactgccagcagtggagcagcaacccc ttcacattcggccagggcacaaagctgcaaatcaccagatgataa
hMN20A10N scFv-Fc L2 OKT3 scFv 氨基酸	66	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIY WASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCH QYLSSLTFGGGTKVEIKREPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTGQVQL VQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKSTAF LQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLT VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQ GTKLQITR--
hMNC2 scFv-Fc L2 OKT3 scFv DNA	67	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccagg ctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatac tacccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcacc gtctcctccggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgac attgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatc acctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatca gcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcg gggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaat cctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttca cattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgagcccaaatcttgtgacaa aactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcc tcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgc gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacg gcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacg taccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagta caagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggagga gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgaca tcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctc ccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca

[0189]

		ctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaggcggcgggggagcggtgg tggcggtagcaccggtcaggtgcaactggtgcagtccggcggaggcgtggtgcagcc tggccggagcctgagactgagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacacta tgcactgggtcagacaggccccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccct agccggggatataccaactacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacag ataagtccaagtccaccgctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagct gtgtactactgcgcccggtactacgacgaccactactgtctggactactggggacaggg aaccaccctgaccgtcagctctggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcg gcggcggctctgatatccagatgacccagagcccttcttccttatctgccagcgtgggcg atagagtgaccatcacatgcagcgccagctcttctgttagctacatgaactggtaccagc aaacacctggaaaggccccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctgg cgtgccctctagattcagcggctctggctccggcaccgactacaccttttacaattagctcc ctgcagcccgaggatatcgccacctactactgccagcagtggagcagcaacccctttca cattcggccagggcacaaagctgcaaatcaccagatgataa
hMNC2 scFv-Fc L2 OKT3 scFv 氨基酸	68	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGK GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSP GQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC QHSRELPFTFGGGTKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTGQV QLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQ APGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKST AFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASG VPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITR**
hMN20A10N scFv-Fc L1 12F6 scFv DNA	69	caggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagact gagctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacagg ccccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctacta cagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagag gacccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcaca gtttctagcggcggtggcggaagcggaggcggtggctccggtggcggaggcagcga aattgtgctgacacagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacac tgagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggc ctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgggccagcacaa gagagagcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctg accataagcagcctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccaccagtacctgag cagcctgacctttggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcgggagcccaaatcttgt gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggacgtcag tcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtca catgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtg gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgcgggaggagcagtacaacag cacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaagg agtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccggga

[0190]

		ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagc gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccac gcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaa gagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaca accactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaggcgggggtggcggttc tggtggtggtggctctggaggaggaaccggtcaagtgcagctggtgcagtccggagg aggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccggctgagctgcaaggccagcggctatac attcaccagctacaccatgcactgggtgcggcaggccctggcaaaggcctggaatgg atcggctacatcaaccctccagcggctacaccaagtacaaccagaaattcaaggaccg gtttaccattagcgccgataagagcaagagcacagcctttctgcagatggacagcctga gaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgcccgctggcaggactacgacgtttatttc gactactggggccagggcaccctgtgacagtgagcagcggcggcggaggctccgg cggaggtggcagcggcggcggcggctctgatatccagatgacacagagccccagctc tctgtctgcttctgtgggcgacagagtgaccatgacctgtagagcctcctcaagcgtgtcc tacatgcactggtaccagcaaacacctggcaaggccccaaagccttggatctacgccac ctctaatctggccagcggcgtgccttctagattcagcggcagcggatctggcaccgatta caccctgaccatcagcagcctgcagcccgaggatatcgccacatactactgccagcagt ggagctccaatcctcctaccttcggccagggcaccaagctgcagatcacaagatgataa
hMN20A10N scFv-Fc L1 12F6 scFv 氨基酸	70	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIY WASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCH QYLSSLTFGGGTKVEIKREPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSGGGGSGGGTG QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYATSNL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQWSS NPPTFGQGTKLQITR—
hMNC2 scFv-Fc L1 12F6 scFv DNA	71	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccagg ctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatac taccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcacc gtctcctccggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgac attgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatc acctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatca gcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcg gggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaat cctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttca cattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgagcccaaatcttgtgacaa aactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcc tcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgc gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacg

[0191]

		gcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacg taccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagta caagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggagga gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgaca tcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctc ccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca ctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaggcgggggtggcggttctggt ggtggtggctctggaggaggaaccggtcaagtgcagctggtgcagtccggaggaggc gtcgtgcagcctggaagaagcctccggctgagctgcaaggccagcggctatacattca ccagctacaccatgcactgggtgcggcaggcccctggcaaaggcctggaatggatcg gctacatcaacccttccagcggctacaccaagtacaaccagaaattcaaggaccggttta ccattagcgccgataagagcaagagcacagcctttctgcagatggacagcctgagacc agaggacaccggcgtgtacttctgcgcccgctggcaggactacgacgtttatttcgacta ctggggccagggcaccctgtgacagtgagcagcggcggcggaggctccggcgga ggtggcagcggcggcggcggctctgatatccagatgacacagagccccagctctctgt ctgcttctgtgggcgacagagtgaccatgacctgtagagcctcctcaagcgtgtcctaca tgcactggtaccagcaaacacctggcaaggccccaaagccttggatctacgccacctct aatctggccagcggcgtgccttctagattcagcggcagcggatctggcaccgattacac cctgaccatcagcagcctgcagcccgaggatatcgccacatactactgccagcagtgg agctccaatcctcctaccttcggccagggcaccaagctgcagatcacaagatgataa
hMNC2 scFv-Fc L1 12F6 scFv 氨基酸	72	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGK GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSP GQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC QHSRELPFTFGGGTKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSGGGGSGGG TGQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISAD KSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYW GQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYAT SNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQ WSSNPPTFGQGTKLQITR**
hMN20A10N scFv-Fc L2 12F6 scFv DNA	73	caggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagact gagctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacagg ccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctacta cagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagag gacccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcaca gtttctagcggcggtggcggaagcggaggcggtggctccggtggcggaggcagcga aattgtgctgacacagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacac tgagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggc ctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgggccagcacaa gagagagcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctg accataagcagcctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccaccagtacctgag

		cagcctgacctttggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcgggagcccaaatcttgt gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcag tcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtca catgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtg gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgcgggaggagcagtacaacag cacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaagg agtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggga ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagc gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccac gcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaa gagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaca accactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaggcggcgggggagcg gtggtggcggtagcaccggtcaagtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgc agcctggaagaagcctccggctgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagcta caccatgcactgggtgcggcaggccccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatc aaccettccagcggctacaccaagtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagc gccgataagagcaagagcacagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggac accggcgtgtacttctgcgcccgctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggc cagggcaccccctgtgacagtgagcagcggcggcggaggctccggcggaggtggca gcggcggcggcggctctgatatccagatgacacagagccccagctctctgtctgcttct gtgggcgacagagtgaccatgacctgtagagcctcctcaagcgtgtcctacatgcactg gtaccagcaaacacctggcaaggccccaaagccttggatctacgccacctctaatctgg ccagcggcgtgccttctagattcagcggcagcggatctggcaccgattacaccctgacc atcagcagcctgcagcccgaggatatcgccacatactactgccagcagtggagctcca atcctcctaccttcggccagggcaccaagctgcagatcacaagatgataa
hMN20A10N scFv-Fc L2 12F6 scFv 氨基酸	74	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIY WASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCH QYLSSLTFGGGTKVEIKREPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTGQVQL VQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSKSTAF LQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQGTPVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVT MTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYATSNLASGV PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPPTF GQGTKLQITR--
hMNC2 scFv-Fc L2 12F6 scFV DNA	75	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccagg ctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatac tacccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcacc gtctcctccggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgac attgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatc

[0192]

[0193]

		acctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatca gcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcg gggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaat cctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttca cattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgagcccaaatcttgtgacaaa aactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcc tcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgc gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacg gcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacg taccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagta caagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggagga gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgaca tcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctc ccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca ctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaggcggcgggggagcggtgg tggcggtagcaccggtcaagtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcc tggaagaagcctccggctgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacacc atgcactgggtgcggcaggccccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaacc cttccagcggctacaccaagtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgcc gataagagcaagagcacagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacacc ggcgtgtacttctgcgcccgctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccag ggcaccctgtgacagtgagcagcggcggcggaggctccggcggaggtggcagcg gcggcggcggctctgatatccagatgacacagagccccagctctctgtctgcttctgtgg gcgacagagtgaccatgacctgtagagcctcctcaagcgtgtcctacatgcactggtac cagcaaacacctggcaaggccccaaagccttggatctacgccacctctaatctggccag cggcgtgccttctagattcagcggcagcggatctggcaccgattacaccctgaccatca gcagcctgcagccgaggatatcgccacatactactgccagcagtggagctccaatcct cctaccttcggccagggcaccaagctgcagatcacaagatgataa
hMNC2 scFv-Fc L2 12F6 scFV 氨基酸	76	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGK GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSP GQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC QHSRELPFTFGGGTKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTGQV QLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWVRQ APGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSKST AFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQGTP VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYATSNLAS GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPP TFGQGTKLQITR**
12F6 scFv-Fc L1 hMN20A10N scFv DNA	77	Caagtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccg gctgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcgg caggccccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaaccccttccagcggctaca ccaagtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagag

[0194]

		cacagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcg cccgctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccccctgtgaca gtgagcagcggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctg atatccagatgacacagagccccagctctctgtctgcttctgtgggcgacagagtgacca tgacctgtagagcctcctcaagcgtgtcctacatgcactggtaccagcaaacacctggca aggccccaaagccttggatctacgccacctctaatctggccagcggcgtgccttctagat tcagcggcagcggatctggcaccgattacaccctgaccatcagcagcctgcagcccga ggatatcgccacatactactgccagcagtggagctccaatcctcctaccttcggccagg gcaccaagctgcagatcacaagagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccc accgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaac ccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcg tcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc aacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccc cgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccag gtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggga gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccga cggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc ctctccctgtctccgggtaaaggcgggggtggcggttctggtggtggtggctctggagg aggaaccggtcaggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcgga tctctgagactgagctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctgg atcagacaggccccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggc agcacctactacagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgcca agaacagcctgtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactat tgtgccagaggacccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggca cactggtcacagtttctagcggcggtggcggaagcggaggcggtggctccggtggcg gaggcagcgaaattgtgctgacacagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaa agagccacactgagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaag aactacctggcctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgg gccagcacaagagagagcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcaccg atttcaccctgaccataagcagcctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccacc agtacctgagcagcctgaccttggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcggtgata a
12F6 scFv-Fc L1 hMN20A10N scFv 氨基酸	78	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYATSNL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQWSS NPPTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSGGGGSGGGTGQVQL VESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIRQAPG KGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYWAST RESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQYLS SLTFGGGTKVEIKR--

[0195]

12F6 scFV-Fc L1 hMNC2 scFV DNA	79	caagtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccgg ctgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggc aggcccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaacccttccagcggctacac caagtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagc acagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgc ccgctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacag tgagcagcggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctga tatccagatgacacagagccccagctctctgtctgcttctgtgggcgacagagtgaccat gacctgtagagcctcctcaagcgtgtcctacatgcactggtaccagcaaacacctggca aggccccaaagccttggatctacgccacctctaatctggccagcggcgtgccttctagat tcagcggcagcggatctggcaccgattacaccctgaccatcagcagcctgcagcccga ggatatcgccacatactactgccagcagtggagctccaatcctcctaccttcggccagg gcaccaagctgcagatcacaagagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccc accgtgcccagcacctgaactcctgggggacccgtcagtcttcctcttcccccaaaac ccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcg tcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc aacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccc cgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccag gtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggga gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccga cggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc ctctccctgtctccgggtaaaggcgggggtggcggttctggtggtggtggctctggagg aggaaccggtgaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggg ggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctg ggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcgg aacctacatatactaccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacg ccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtat tactgtgcgagacttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaaggg accacggtcaccgtctcctccggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggt ggcggatccgacattgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggaca gagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctac atgcactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatcc aatctggagagcggggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttca ccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagg gagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaacttgataa
12F6 scFV-Fc L1 hMNC2 scFV 氨基酸	80	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYATSNL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQWSS NPPTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSGGGGSGGGTGEVQL VESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAP GKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQR ATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLAS

[0196]

		NLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHS RELPFTFGGGTKVEIKRT**
12F6 scFv-Fc L2 hMN20A10N scFv DNA	81	caagtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccgg ctgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggc aggccccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaacccttccagcggctacac caagtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagc acagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgc ccgctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacag tgagcagcggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctga tatccagatgacacagagccccagctctctgtctgcttctgtgggcgacagagtgaccat gacctgtagagcctcctcaagcgtgtcctacatgcactggtaccagcaaacacctggca aggccccaaagccttggatctacgccacctctaatctggccagcggcgtgccttctagat tcagcggcagcggatctggcaccgattacaccctgaccatcagcagcctgcagcccga ggatatcgccacatactactgccagcagtggagctccaatcctcctaccttcggccagg gcaccaagctgcagatcacaagagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccc accgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaac ccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcg tcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc aacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccc cgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccag gtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggga gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccga cggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc ctctccctgtctccgggtaaaggcggcgggggagcggtggtggcggtagcaccggt caggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagact gagctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacagg ccccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctacta cagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagag gacccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcaca gtttctagcggcggtggcggaagcggaggcggtggctccggtggcggaggcagcga aattgtgctgacacagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacac tgagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggc ctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgggccagcacaa gagagagcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctg accataagcagcctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccaccagtacctgag cagcctgacctttggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcggtgataa
12F6 scFv-Fc L2 hMN20A10N scFv 氨基酸	82	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYATSNL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQWSS NPPTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTGQVQLVESG GGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIRQAPGKGLE

[0197]

		WVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKS SQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYWASTRESG IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQYLSSLTF GGGTKVEIKR--
12F6 scFv-Fc L2 hMNC2 scFv DNA	83	caagtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccgg ctgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggc aggccccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaaccctccagcggctacac caagtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagc acagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgc ccgctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacag tgagcagcggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctga tatccagatgacacagagccccagctctctgtctgcttctgtgggcgacagagtgaccat gacctgtagagcctcctcaagcgtgtcctacatgcactggtaccagcaaacacctggca aggccccaaagccttggatctacgccacctctaatctggccagcggcgtgccttctagat tcagcggcagcggatctggcaccgattacaccctgaccatcagcagcctgcagcccga ggatatcgccacatactactgccagcagtggagctccaatcctcctaccttcggccagg gcaccaagctgcagatcacaagagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccc accgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaac ccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcg tcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc aacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccc cgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccag gtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggа gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccga cggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc ctctccctgtctccgggtaaaggcggcgggggggagcggtggtggcggtagcaccggt gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccagg ctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatac tacccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcacc gtctcctccggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgac attgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatc acctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatca gcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcg gggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaat cctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttca cattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaacttgataa
12F6 scFv-Fc L2 hMNC2 scFv 氨基酸	84	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYATSNL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQWSS NPPTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

[0198]

		REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTGEVQLVESGG GLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLE WVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRA SKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVP ARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPFTF GGGTKVEIKRT**
人IgG1重链 OKT3 L1 hMN20A10N scFv DNA	85	caggttcaactggttcagagcggtggaggtgtggttcagcctggtcgtagcctgagact gagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagacagg ccccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatataccaa ctacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtccacc gctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgcccg gtactacgacgaccattactgtctggattactggggtcagggaaccaccctgaccgttag cagtgctagcaccaagggcccatcggtcttcccccctggcaccctcctccaagagcacct ctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccggtga cggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttggg cacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaag aaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctga actcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgag gtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgc gggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcacca ggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac accctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg gagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctac agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccg tgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt aaaggcgggggtggcggttctggtggtggtggctctggaggaggaaccggtcaggtg cagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagactgagctgt gccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacaggccctg gcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctactacagcga ctctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcctgtacctg cagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagaggaccca tctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcacagtttcta gcggcggtggcggaagcggaggcggtggctccggtggcggaggcagcgaaattgtg ctgacacagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacactgagct gcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggcctggta tcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgggccagcacaagagag agcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctgaccata agcagcctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccaccagtacctgagcagcct gacctttggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcggtgataa
人IgG1重链 OKT3 L1 hMN20A10N scFv 氨基酸	86	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD

[0199]

		VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSG GGGSGGGTGQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF STYAMSWIRQAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYD EFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSP ATLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKP GQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCHQYLSSLTFGGGTKVEIKR--
	人IgG1重链 OKT3 L1 hMNC2 scFv	87	caggttcaactggttcagagcggtggaggtgtggttcagcctggtcgtagcctgagact gagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagacagg ccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatataccaa ctacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtccacc gctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgcccg gtactacgacgaccattactgtctggattactggggtcagggaaccaccctgaccgttag cagtgctagcaccaagggcccatcggtcttcccccctggcaccctcctccaagagcacct ctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccggtga cggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttggg cacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaag aaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctga actcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgag gtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgc gggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcacca ggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac accctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg gagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctac agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccg tgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt aaaggcgggggtggcggttctggtggtggtggctctggaggaggaaccggtgaggtg cagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcct gtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccag ggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccc gactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatct gcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacttggg ggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgtctc ctccggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgacattgt gctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacct gcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatcagcag aaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcggggtc ccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtg gaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcg gcggagggaccaaggtggagatcaaacgaacttgataa
	人IgG1重链 OKT3 L1 hMNC2 scFv	88	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT

[0200]

		VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSG GGGSGGGTGEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNY YEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLT QSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQK PGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVE ANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRT**
人IgG1重链 OKT3 L2 hMN20A10N scFv	89	caggttcaactggttcagagcggtggaggtgtggttcagcctggtcgtagcctgagact gagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagacagg ccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatataccaa ctacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtccacc gctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgcccg gtactacgacgaccattactgtctggattactggggtcagggaaccaccctgaccgttag cagtgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacct ctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccggtga cggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttggg cacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaag aaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctga actcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgag gtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgc gggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcacca ggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac accctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg gagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctac agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccg tgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt aaaggcggcgggggggagcggtggtggcggtagcaccggtcaggtgcagctggttga atctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagactgagctgtgccgccagc ggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacaggccctggcaaaggcct ggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctactacagcgactctgtgaag ggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcctgtacctgcagatgaact ccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagaggacccatctacaacga ctacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcacagtttctagcggcggtg gcggaagcggaggcggtggctccggtggcggaggcagcgaaattgtgctgacacag agccccgccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacactgagctgcaagagca gccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggcctggtatcagcagaa gcccggccaagctcctcggctgctgatctattgggccagcacaagagagagcggcatc cctgccagattttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctgaccataagcagcctg gaacctgaggacttcgccgtgtattactgccaccagtacctgagcagcctgacctttggc ggaggcaccaaggtggaaatcaagcggtgataa
人IgG1重链 OKT3 L2 hMN20A10N scFv	90	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ

[0201]

		GTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGG GGSTGQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MSWIRQAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFA YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATL SLSPGERATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQA PRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCHQYLSSLTFGGGTKVEIKR--
人IgG1重链 OKT3 L2 hMNC2 scFv	91	caggttcaactggttcagagcggtggaggtgtggttcagcctggtcgtagcctgagact gagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagacagg ccccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatataccaa ctacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtccacc gctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgcccg gtactacgacgaccattactgtctggattactggggtcagggaaccaccctgaccgttag cagtgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacct ctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccggtga cggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttggg cacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaag aaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctga actcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgag gtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgc gggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcacca ggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac accctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg gagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctac agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccg tgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt aaaggcggcgggggagcggtggtggcggtagcaccggtgaggtgcagctggtgg agtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctct ggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggct ggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccccgactcagtgaa gggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaaca gcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacttgggggggataatta ctacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccggcggtg gcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgacattgtgctgacccagt ctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagt aagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatcagcagaaaccaggaca acctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcggggtcccagccaggtt cagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatga tactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggac caaggtggagatcaaacgaacttgataa

[0202]

人IgG1重链 OKT3 L2 hMNC2 scFv	92	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGG GGSTGEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYA MSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYF DVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAS LAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPP KLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTA NYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRT**
人IgG1重链 12F6 L1 hMN20A10N scFv	93	caagtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccgg ctgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggc aggccccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaaccctccagcggctacac caagtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagc acagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgc ccgctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacag tgagcagcgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagag cacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccg gtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctg tcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagct tgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga caagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcgggggtggcggttctggtggtggtggctctggaggaggaaccggtca ggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagactga gctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacaggcc cctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctactaca gcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcctgta cctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagagga cccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcacagt ttctagcggcggtggcggaagcggaggcggtggctccggtggcggaggcagcgaaa ttgtgctgacacagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacactg agctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggcct ggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgggccagcacaag agagagcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctgac cataagcagcctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccaccagtacctgagca gcctgacctttggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcggtgataa

[0203]

人IgG1重链 12F6 L1 hMN20A10N scFv	94	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSGGG GSGGGTGQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFST YAMSWIRQAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDE FAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPA TLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPG QAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCHQYLSSLTFGGGTKVEIKR--
人IgG1重链 12F6 L1 hMNC2 scFv	95	caagtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccgg ctgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggc aggccccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaaccctccagcggctacac caagtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagc acagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgc ccgctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacag tgagcagcgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagag cacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccg gtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctg tcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagct tgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga caagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcgggggtggcggttctggtggtggtggctctggaggaggaaccggtga ggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagact ctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggct ccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatacta ccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgt atctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagactt ggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgt ctcctccggcggtggaggatctggcggaggtggatccggcggtggcggatctgacatt gtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcac ctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatcagc agaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcggg

[0204]

		gtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcct gtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacatt cggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaacttgataa
人IgG1重链 12F6 L1 hMNC2 scFv	96	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSGGG GSGGGTGEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSG YAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYE YFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSP ASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQ PPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAND TANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRT**
人IgG1重链 12F6 L2 hMN20A10N scFv	97	caagtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccgg ctgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggc aggccccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaacccttccagcggctacac caagtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagc acagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgc ccgctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacag tgagcagcgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagag cacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccg gtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctg tcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagct tgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga caagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcggcgggggggagcggtggtggcggtagcaccggtcaggtgcagctg gttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagactgagctgtgccgc cagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacaggccctggcaaag gcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctactacagcgactctgtg aagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcctgtacctgcagatg aactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagaggacccatctacaa cgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcacagtttctagcggcg gtggcggaagcggaggcggtggctccggtggcggaggcagcgaaattgtgctgaca cagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacactgagctgcaaga

[0205]

		gcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggcctggtatcagca gaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgggccagcacaagagagagcgg catccctgccagattttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctgaccataagcag cctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccaccagtacctgagcagcctgacctt ggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcggtgataa
人IgG1重链 12F6 L2 hMN20A10N scFv	98	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGG STGQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMS WIRQAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLS PGERATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRL LIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCHQYLSSLTFGGGTKVEIKR--
人IgG1重链 12F6 L2 hMNC2 scFv	99	caagtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccgg ctgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggc aggccccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaacccttccagcggctacac caagtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagc acagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgc ccgctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacag tgagcagcgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagag cacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccg gtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctg tcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagct tgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga caagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcggcgggggggagcggtggtggcggtagcaccggtgaggtgcagctg gtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcag cctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaag gggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccccgactca gtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaat gaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacttgggggggat aattactacgaatacttcgatgtctgggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccggc

[0206]

		ggtggaggatctggcggaggtggatccggcggtggcggatctgacattgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcggggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaacttgataa
人IgG1重链 12F6 L2 hMNC2 scFv	100	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSTGEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRT**
人IgG1重链 hMN20A10N L1 OKT3 scFv	101	caggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagactgagctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacaggccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctactacagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcctgtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagaggacccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcacagtttctagcgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccccatcccgggacgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaggcgggggtggcggttctggtggtggtggctctggaggaggaaccggtcaggtgcaactggtgcagtccggcggaggcgtggtgcagcctggccggagcctgagactgagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagacaggccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatataccaactacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtccacc

[0207]

		gctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgcccg gtactacgacgaccactactgtctggactactggggacagggaaccaccctgaccgtca gctctggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgatatc cagatgacccagagcccttcttccttatctgccagcgtgggcgatagagtgaccatcaca tgcagcgccagctcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaaaggc ccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgccctctagattca gcggctctggctccggcaccgactacaccttacaattagctccctgcagcccgaggat atcgccacctactactgccagcagtggagcagcaacccctcacattcggccagggca caaagctgcaaatcaccagatgataa
人IgG1重链 hMN20A10N L1 OKT3 scFv	102	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSGGG GSGGGTGQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTR YTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRF TISTDKSKSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCL DYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIY DTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQ QWSSNPFTFGQGTKLQITR--
人IgG1重链 hMNC2 L1 OKT3 scFv	103	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccagg ctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatac tacccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcacc gtctcctccgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagag cacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccg gtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctg tcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagct tgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga caagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcgggggtggcggttctggtggtggtggctctggaggaggaaccggtca ggtgcaactggtgcagtccggcggaggcgtggtgcagcctggccggagcctgagact gagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagacagg

[0208]

		ccccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatataccaa ctacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtccacc gctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgcccg gtactacgacgaccactactgtctggactactggggacagggaaccaccctgaccgtca gctctggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgatatc cagatgacccagagccctctccttatctgccagcgtgggcgatagagtgaccatcaca tgcagccgccagctcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaaaggc ccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgccctctagattca gcggctctggctccggcaccgactacaccttacaattagctccctgcagcccgaggat atcgccacctactactgccagcagtggagcagcaacccctcacattcggccagggca caaagctgcaaatcaccagatgataa
人IgG1重链 hMNC2 L1 OKT3 scFv	104	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGK GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSG GGGSGGGTGQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYT FTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVK DRFTISTDKSKSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDH YCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKR WIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATY YCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR**
人IgG1重链 hMN20A10N L2 OKT3 scFv	105	caggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagact gagctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacagg ccccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctacta cagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagag gacccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcaca gtttctagcgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagc acctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccgg tgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgt cctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagctt gggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga caagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatcccgggacgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcggcgggggagcggtggtggcggtagcaccggtcaggtgcaactgg

[0209]

		tgcagtccggcggaggcgtggtgcagcctggccggagcctgagactgagctgcaagg cctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagacaggccccctggcaag ggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatataccaactacaaccagaa agtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtccaccgctttcctgcagat ggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgcccggtactacgacgac cactactgtctggactactggggacagggaaccaccctgaccgtcagctctggcggcg gaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgatatccagatgacccag agcccttcttcctttatctgccagcgtgggcgatagagtgaccatcacatgcagcgccagc tcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaaaggcccctaaaagatgg atctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgccctctagattcagcggctctggctcc ggcaccgactacacctttacaattagctccctgcagcccgaggatatcgccacctactac tgccagcagtggagcagcaacccccttcacattcggccagggcacaaagctgcaaatca ccagatgataa
人IgG1重链 hMN20A10N L2 OKT3 scFv	106	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGG STGQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTM HWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIST DKSKSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYW GQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTS KLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQW SSNPFTFGQGTKLQITR--
人IgG1重链 hMNC2 L2 OKT3 scFv	107	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccagg ctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatac taccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcacc gtctcctccgctagcaccaagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctccaagag cacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccg gtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctg tcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagct tgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga caagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg

[0210]

		ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcggcgggggagcggtggtggcggtagcaccggtcaggtgcaactgg tgcagtccggcggaggcgtggtgcagcctggccggagcctgagactgagctgcaagg cctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagacaggccccctggcaag ggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatataccaactacaaccagaa agtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtccaccgctttcctgcagat ggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgcccggtactacgacgac cactactgtctggactactggggacagggaaccaccctgaccgtcagctctggcggcg gaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgatatccagatgacccag agcccttcttcctttatctgccagcgtgggcgatagagtgaccatcacatgcagcgccagc tcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaaaggcccctaaaagatgg atctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgccctctagattcagcggctctggctcc ggcaccgactacacctttacaattagctccctgcagcccgaggatatcgccacctactac tgccagcagtggagcagcaacccccttcacattcggccagggcacaaagctgcaaatca ccagatgataa
人IgG1重链 hMNC2 L2 OKT3 scFv	108	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGK GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGG GGSTGQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYT MHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTI STDKSKSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLD YWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYD TSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQ WSSNPFTFGQGTKLQITR**
人IgG1重链 hMN20A10N L1 12F6 scFv	109	caggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagact gagctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacagg ccccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctacta cagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagag gacccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcaca gtttctagcgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagc acctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccgg tgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgt cctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagctt gggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga caagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatcccgggacgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca

[0211]

		gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcgggggtggcggttctggtggtggtggctctggaggaggaaccggtca agtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccggct gagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggcag gcccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaacccttccagcggctacacca agtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagcac agcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgccc gctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacagtg agcagcggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgata tccagatgacacagagccccagctctctgtctgcttctgtgggcgacagagtgaccatga cctgtagagcctcctcaagcgtgtcctacatgcactggtaccagcaaacacctggcaag gccccaaagccttggatctacgccacctctaatctggccagcggcgtgccttctagattc agcggcagcggatctggcaccgattacaccctgaccatcagcagcctgcagcccgag gatatcgccacatactactgccagcagtggagctccaatcctcctaccttcggccagggc accaagctgcagatcacaagatgataa
人IgG1重链 hMN20A10N L1 12F6 scFv	110	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSGGG GSGGGTGQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTS YTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRF TISADKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYF DYWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPW IYATSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYY CQQWSSNPPTFGQGTKLQITR--
人IgG1重链 hMNC2 L1 12F6 scFv	111	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccagg ctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatac taccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcacc gtctcctccgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagag cacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccg gtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctg tcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagct tgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga caagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag

[0212]

		gtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcgggggtggcggttctggtggtggtggctctggaggaggaaccggtca agtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccggct gagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggcag gccccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaaccctccagcggctacacca agtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagcac agcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgccc gctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacagtg agcagcggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgata tccagatgacacagagccccagctctctgtctgcttctgtgggcgacagagtgaccatga cctgtagagcctcctcaagcgtgtcctacatgcactggtaccagcaaacacctggcaag gccccaaagccttggatctacgccacctctaatctggccagcggcgtgccttctagattc agcggcagcggatctggcaccgattacaccctgaccatcagcagcctgcagcccgag gatatcgccacatactactgccagcagtggagctccaatcctcctaccttcggccagggc accaagctgcagatcacaagatgataa
人IgG1重链 hMNC2 L1 12F6 scFv	112	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGK GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSG GGGSGGGTGQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYT FTSYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFK DRFTISADKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYD VYFDYWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPK PWIYATSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIAT YYCQQWSSNPPTFGQGTKLQITR**
人IgG1重链 hMN20A10N L2 12F6 scFv	113	caggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagact gagctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacagg cccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctacta cagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagag gacccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcaca gtttctagcgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagc acctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccgg tgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgt cctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagctt gggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga caagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg

[0213]

		caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatcccgggacgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcggcgggggggagcggtggtggcggtagcaccggtcaagtgcagctgg tgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccggctgagctgcaagg ccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggcaggccctggcaa aggcctggaatggatcggctacatcaacccttccagcggctacaccaagtacaaccag aaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagcacagcctttctgca gatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgcccgctggcagga ctacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacagtgagcagcggcg gcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgatatccagatgaca cagagccccagctctctgtctgcttctgtgggcgacagagtgaccatgacctgtagagc ctcctcaagcgtgtcctacatgcactggtaccagcaaacacctggcaaggccccaaagc cttggatctacgccacctctaatctggccagcggcgtgccttctagattcagcggcagcg gatctggcaccgattacaccctgaccatcagcagcctgcagccgaggatatcgccac atactactgccagcagtggagctccaatcctcctaccttcggccagggcaccaagctgc agatcacaagatgataa
人IgG1重链 hMN20A10N L2 12F6 scFv	114	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGG STGQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISAD KSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYW GQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYAT SNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQ WSSNPPTFGQGTKLQITR--
人IgG1重链 hMNC2 L2 12F6 scFv	115	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccagg ctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatac tacccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcacc gtctcctccgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagag cacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagccg gtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctg tcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagct tgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgga caagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac ctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctc atgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc

[0214]

		ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc cagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc tctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaaggcggcgggggagcggtggtggcggtagcaccggtcaagtgcagctgg tgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccggctgagctgcaagg ccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggcaggccctggcaa aggcctggaatggatcggctacatcaacccttccagcggctacaccaagtacaaccag aaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagcacagcctttctgca gatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgcccgctggcagga ctacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacagtgagcagcggcg gcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgatatccagatgaca cagagccccagctctctgtctgcttctgtgggcgacagagtgaccatgacctgtagagc ctcctcaagcgtgtcctacatgcactggtaccagcaaacacctggcaaggccccaaagc cttggatctacgccacctctaatctggccagcggcgtgccttctagattcagcggcagcg gatctggcaccgattacaccctgaccatcagcagcctgcagcccgaggatatcgccac atactactgccagcagtggagctccaatcctcctaccttcggccagggcaccaagctgc agatcacaagatgataa
人IgG1重链 hMNC2 L2 12F6 scFv	116	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGK GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGG GGSTGQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYT MHWVRQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTIS ADKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDY WGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYA TSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQ WSSNPPTFGQGTKLQITR**
hMNC2 scFv-Fc KNOB	117	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccagg ctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatac tacccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcacc gtctcctccggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgac attgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatc acctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatca gcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcg gggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaat cctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttca

[0215]

		cattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgagcccaaatcttgtgacaa aactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggacccgtcagtcttcc tcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgc gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacg gcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacg taccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagta caagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggagga gatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgaca tcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctc ccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca ctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataa
hMNC2 scFv-Fc KNOB	118	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGK GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSP GQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC QHSRELPFTFGGGTKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK--
hMNC2 scFv-Fc KNOB-HIS	119	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccagg ctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatac tacccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcact gtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagac ttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcacc gtctcctccggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgac attgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatc acctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatca gcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcg gggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaat cctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttca cattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgagcccaaatcttgtgacaa aactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggacccgtcagtcttcc tcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgc gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacg gcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacg taccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagta caagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggagga gatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgaca tcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctc ccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca ctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaaccggtcatcatcaccatcacca ttgataa

[0216]

hMNC2 scFv-Fc KNOB-HIS	120	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVR QAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGK GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSP GQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC QHSRELPFTFGGGTKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGHHHHHH--
hMN20A10N scFv-Fc KNOB	121	caggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagact gagctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacagg ccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctacta cagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagag gacccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcaca gtttctagcggcggtggcggaagcggaggcggtggctccggtggcggaggcagcga aattgtgctgacacagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacac tgagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggc ctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgggccagcacaa gagagagcggcatccctgccagatttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctg accataagcagcctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccaccagtacctgag cagcctgacctttggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcgggagcccaaatcttgt gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcag tcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtca catgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtg gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacag cacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaagg agtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggga ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgcctggtcaaaggcttctatcccagcg acatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg cctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaa ccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataa
hMN20A10N scFv-Fc KNOB	122	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIY WASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCH QYLSSLTFGGGTKVEIKREPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK--
hMN20A10N scFv-Fc KNOB-HIS	123	caggtgcagctggttgaatctggcggcggacttgtgaagcctggcggatctctgagact gagctgtgccgccagcggcttcacctttagcacatacgccatgagctggatcagacagg

[0217]

		ccccctggcaaaggcctggaatgggtggcgtctattggcagagccggcagcacctacta cagcgactctgtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcct gtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactattgtgccagag gacccatctacaacgactacgacgagttcgcctattggggccagggcacactggtcaca gtttctagcggcggtggcggaagcggaggcggtggctccggtggcggaggcagcga aattgtgctgacacagagccccgccacactgtcactttctccaggcgaaagagccacac tgagctgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaaccagaagaactacctggc ctggtatcagcagaagcccggccaagctcctcggctgctgatctattgggccagcacaa gagagagcggcatccctgccagattttctggcagcggctctggcaccgatttcaccctg accataagcagcctggaacctgaggacttcgccgtgtattactgccaccagtacctgag cagcctgacctttggcggaggcaccaaggtggaaatcaagcgggagcccaaatcttgt gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggacccgtcag tcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtca catgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtg gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacag cacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaagg agtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggga ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgcctggtcaaaggcttctatcccagcg acatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg cctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaa ccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaaccggtcatcatcaccatca ccattgataa
hMN20A10N scFv-Fc KNOB-HIS	124	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWIR QAPGKGLEWVASIGRAGSTYYSDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPIYNDYDEFAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIY WASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCH QYLSSLTFGGGTKVEIKREPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGHHHHHH--
OKT3 scFv-Fc 臼-链霉亲和素标签	125	caggtgcaactggtgcagtccggcggaggcgtggtgcagcctggccggagcctgaga ctgagctgcaaggcctccggctacacctttacaagatacactatgcactgggtcagaca ggccctggcaagggcctggaatggattggctacatcaaccctagccggggatatacc aactacaaccagaaagtgaaggacagattcaccatcagcacagataagtccaagtcca ccgctttcctgcagatggactccctgcgtccagaggacacagctgtgtactactgcgccc ggtactacgacgaccactactgtctggactactggggacagggaaccaccctgaccgt cagctctggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctgata tccagatgacccagagccctcttcctcttatctgccagcgtgggcgatagagtgaccatca catgcagcgccagctcttctgttagctacatgaactggtaccagcaaacacctggaaag gcccctaaaagatggatctacgacaccagcaagctggcctctggcgtgccctctagatt cagcggctctggctccggcaccgactacaccttacaattagctccctgcagcccgagg atatcgccacctactactgccagcagtggagcagcaacccccttcacattcggccagggc acaaagctgcaaatcaccagagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccacc gtgcccagcacctgaactcctgggggacccgtcagtcttcctcttcccccaaaaccca aggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgag ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataat gccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtc

[0218]

		ctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcca acaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccc gagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagg tcagcctgagctgcgccgtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggga gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccga cggctccttcttcctcgtgagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc ctctccctgtctccgggtaaaaccggttggagccatcctcagttcgaaaagtgataa
OKT3 scFv-Fc 白-链霉亲和素标签	126	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKS KSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL ASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSN PFTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKTGWSHPQFEK--
12F6 scFv-Fc 白-链霉亲和素标签	127	caagtgcagctggtgcagtccggaggaggcgtcgtgcagcctggaagaagcctccgg ctgagctgcaaggccagcggctatacattcaccagctacaccatgcactgggtgcggc aggccccctggcaaaggcctggaatggatcggctacatcaacccttccagcggctacac caagtacaaccagaaattcaaggaccggtttaccattagcgccgataagagcaagagc acagcctttctgcagatggacagcctgagaccagaggacaccggcgtgtacttctgcgc ccgctggcaggactacgacgtttatttcgactactggggccagggcaccctgtgacag tgagcagcggcggcggaggctccggcggaggtggcagcggcggcggcggctctga tatccagatgacacagagccccagctctctgtctgcttctgtgggcgacagagtgaccat gacctgtagagcctcctcaagcgtgtcctacatgcactggtaccagcaaacacctggca aggccccaaagccttggatctacgccacctctaatctggccagcggcgtgccttctagat tcagcggcagcggatctggcaccgattacaccctgaccatcagcagcctgcagcccga ggatatcgccacatactactgccagcagtggagctccaatcctcctaccttcggccagg gcaccaagctgcagatcacaagagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccc accgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaac ccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcg tcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc aacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccc cgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccag gtcagcctgagctgcgccgtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggg agagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccg acggctccttcttcctcgtgagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggg gaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaaga gcctctccctgtctccgggtaaaaccggttggagccatcctcagttcgaaaagtgataa
12F6 scFv-Fc 白-链霉亲和素标签	128	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYTMHWV RQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSK STAFLQMDSLRPEDTGVYFCARWQDYDVYFDYWGQG TPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYATSNL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQWSS NPPTFGQGTKLQITREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV

[0219]

		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKTGWSHPQFEK--

[0220] 在一些实施方案中,抗体还包含可结晶片段(Fc)区。在一些实施方案中,Fc区包含IgG CH2结构域和IgG CH3结构域。在一些实施方案中,Fc区包含异二聚Fc区。在一些实施方案中,异二聚Fc区包含(例如人)IgG1、IgG2、IgG3或IgG4结构域。在一些实施方案中,异二聚Fc区包含(例如,人)IgG1结构域。在一些实施方案中,异二聚Fc区包含(例如,人)IgG2结构域。在一些实施方案中,异二聚Fc区包含(例如,人)IgG3结构域。在一些实施方案中,异二聚Fc区包含(例如,人)IgG4结构域。

[0221] 在一些实施方案中,异二聚Fc区,其中异二聚Fc区包含杵链和臼链,形成杵臼(KIH)结构(Spiess等人Molecular Immunology 67,95-106(2015))形式。在一些实施方案中,杵链包含(例如,人)IgG1、IgG2、IgG3或IgG4结构域。在一些实施方案中,杵链包含(例如,人)IgG1结构域。在一些实施方案中,杵链包含(例如,人)IgG2结构域。在一些实施方案中,杵链包含(例如,人)IgG3结构域。在一些实施方案中,杵链包含(例如,人)IgG4结构域。在一些实施方案中,臼链包含(例如人)IgG1、IgG2、IgG3或IgG4结构域。在一些实施方案中,臼链包含(例如,人)IgG1结构域。在一些实施方案中,臼链包含(例如,人)IgG2结构域。在一些实施方案中,臼链包含(例如,人)IgG3结构域。在一些实施方案中,臼链包含(例如,人)IgG4结构域。

[0222] 在一些实施方案中,靶细胞是癌细胞。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、胰腺癌或肺癌。

[0223] 在一些实施方案中,抗体与在表面表达MUC1*的癌细胞结合。

[0224] 作为本发明的抗体如何可以被整合到双特异性抗体中的一个实例,构建了一种使用杵臼(也称为KIH)(Spiess等人Molecular Immunology 67,95-106(2015))形式的双特异性抗体。在该实例中,抗体的第一臂是人源化抗MUC1*抗体20A10,也称为hu20A10,具有14616人框架区;抗体的第二臂是抗CD3抗体OKT3或12F6,它们都与人T细胞上的相同表位结合。所得的双特异性抗体在此称为20A10-OKT3-BiTE和20A10-12F6-BiTE。在功能展示中,将双特异性抗体以各种浓度添加到培养细胞中,其中存在人T细胞和MUC1*阳性癌细胞。在一种情况下,癌细胞是T47D乳腺癌细胞,并且在另一种情况下,MUC1*阴性系HCT-116结肠癌细胞已被转导以表达MUC1*,称为HCT-MUC1*。从图1A-图1L、图2A-图2L、图3A-图3L和图4A-图4L所示的照片中可以看出,添加任一双特异性抗体均介导T细胞和MUC1*阳性癌细胞的接合,这由双特异性剂量依赖性细胞聚集所证明。进行了两个对照实验。在一个对照中,未添加双特异性抗体。在另一个对照中,仅存在MUC1*癌细胞。未观察到聚集。在另一个对照中,将双特异性抗体添加到MUC1*阳性癌细胞中,但没有T细胞存在。此外,量化了癌细胞杀伤。使用LDH细胞毒性测定法测量了抗MUC1*靶向双特异性抗体的细胞毒性,其中20A10与肿瘤细胞表面上的MUC1*胞外结构域和称为OKT3的抗CD3抗体结合。显示了描述LDH细胞毒性测定法工作原理的卡通图(图1M),其中A490的测量值越高表示细胞杀伤越大。图1N显示了细胞杀伤作为20A10-OKT3(抗MUC1*/抗CD3双特异性抗体)浓度的函数的图表。从图表中可以

看出,20A10被整合到双特异性抗体中,其中第二臂是与T细胞上的CD3或其他表面分子结合的抗体或抗体片段,是MUC1*阳性肿瘤细胞的强效杀伤剂。除了分析靶癌细胞外,还分析了T细胞。众所周知,活化的CD8阳性细胞毒性T细胞在被活化并准备杀伤时会分泌干扰素-γ(IFN-g)。在ELISA测定中测量了T细胞向条件培养基中分泌的IFN-g(图10)。从图中可以看出,在12.3ng/mL的低双特异性浓度下,IFN-g达到半最大分泌。活化的T细胞还将TNF-α分泌到条件培养基中。TNF-a的ELISA测量也显示了在20A10-CD3双特异性抗体的极低浓度12.3ng/mL下的半最大分泌(图1P)。

[0225] 在另一个实例中,使用20A10构建抗MUC1*/抗CD3双特异性抗体,用于结合MUC1*阳性癌细胞的细胞外结构域,以及结合T细胞的抗CD3抗体12F6。从图2A-图2L中所示的照片中可以看出,添加任一双特异性抗体均介导T细胞和MUC1*阳性癌细胞的接合,这由双特异性剂量依赖性细胞聚集所证明。进行了两个对照实验。在一个对照中,未添加双特异性抗体。在另一个对照中,仅存在MUC1*癌细胞。未观察到聚集。在另一个对照中,将双特异性抗体添加到MUC1*阳性癌细胞中,但没有T细胞存在。此外,量化了癌细胞杀伤。使用LDH细胞毒性测定法测量了抗MUC1*靶向双特异性抗体的细胞毒性,其中20A10与肿瘤细胞表面上的MUC1*胞外结构域和称为12F6的抗CD3抗体结合。显示了描述LDH细胞毒性测定法工作原理的卡通图(图2M),其中A490的测量值越高表示细胞杀伤越大。图2N显示了细胞杀伤作为20A10-12F6(抗MUC1*/抗CD3双特异性抗体)浓度的函数的图表。从图表中可以看出,20A10被整合到双特异性抗体中,其中第二臂是与T细胞上的CD3或其他表面分子结合的抗体或抗体片段,是MUC1*阳性肿瘤细胞的强效杀伤剂。除了分析靶癌细胞外,还分析了T细胞。众所周知,活化的CD8阳性细胞毒性T细胞在被活化并准备杀伤时会分泌干扰素-γ(IFN-g)。在ELISA测定中测量了T细胞向条件培养基中分泌的IFN-g(图20)。从图中可以看出,在50ng/mL的低双特异性浓度下,IFN-g达到半最大分泌。活化的T细胞还将TNF-α分泌到条件培养基中。TNF-a的ELISA测量也显示了在20A10-CD3双特异性抗体的极低浓度200ng/mL下的半最大分泌(图2P)。20A10与OKT3配对与12F6相比,其功效差异表明,抗MUC1*/抗T细胞的效力受两种抗体各自亲和力和特异性的调节。

[0226] 在另一个实例中,抗MUC1*抗体20A10与抗CD3抗体片段配对,并测试其对MUC1*阴性系HCT-116结肠癌细胞的杀伤,该细胞已被转导以表达MUC1*,称为HCT-MUC1*。在一种情况下,用于结合T细胞的抗体片段是OKT3。在另一种情况下,抗CD3抗体是12F6。从图3A-图3L(OKT3)和图4A-图4L(12F6)的照片中可以看出,添加任一双特异性抗体介导T细胞和MUC1*阳性癌细胞的接合,这由双特异性剂量依赖性细胞聚集所证明。进行了两个对照实验。在一个对照中,没有添加双特异性抗体,但存在T细胞和MUC1*癌细胞两者。未观察到聚集。在另一个对照中,将双特异性抗体添加到MUC1*阳性癌细胞中,但没有T细胞存在。

[0227] 抗体-药物缀合物

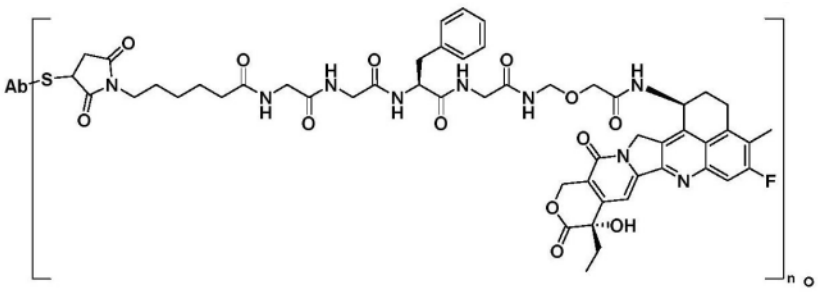
[0228] 抗体-药物缀合物(ADC)允许将治疗剂靶向递送至特定细胞和/或组织。在某些实施方案中,ADC包括能够抑制拓扑异构酶(例如,拓扑异构酶I(TopoI))或抑制微管蛋白产生的药剂(例如,治疗剂)。

[0229] 在另一个方面,本文提供了缀合物,例如,抗体-药物缀合物。ADC包括治疗剂(表示为X);连接部分(表示为L);偶联部分(表示为R);以及通过半胱氨酸的硫醇基团的亲核攻击

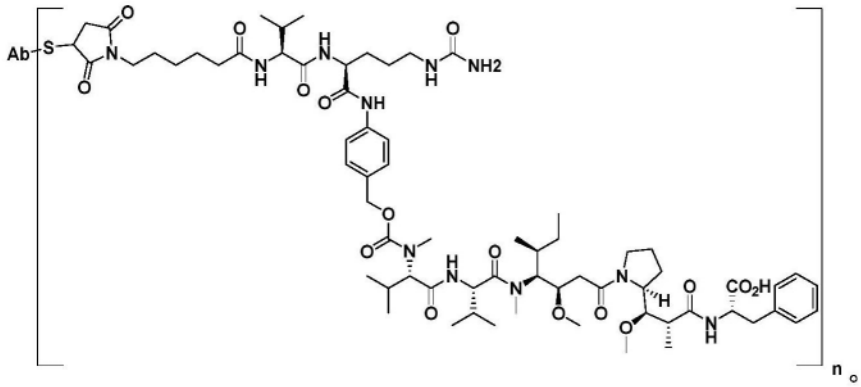
与抗体(表示为 Ab)的缀合部分(表示为Z)。在一些实施方案中,L接头的细胞内切割允许治疗剂X从 Ab 分离,从而促进治疗剂X被吸收或保留到细胞或组织保留中。

[0230] 在某些实施方案中,ADC包含式(I):[Ab]-[Z-L-R-X]$_y$,其中:X是衍生自能够抑制拓扑异构酶I的化合物或能够抑制微管蛋白形成的化合物的部分;R是偶联部分;L是具有结合至N末端的Z和结合至C末端的R的二肽、三肽或四肽连接部分;[Ab]是包含抗MUC1*结合结构域的抗体,该抗MUC1*结合结构域包含三个重链(HC)互补决定区(CDR):MUC1*HC-CDR1、MUC1*HC-CDR2和MUC1*HC-CDR3;其中MUC1*结合结构域的MUC1*HC-CDR1、MUC1*HC-CDR2和MUC1*HC-CDR3包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列;其中,MUC1*结合结构域包含三个轻链(LC)互补决定区(CDR):MUC1*LC-CDR1、MUC1*LC-CDR2和MUC1*LC-CDR3;其中,MUC1*结合结构域的MUC1*LC-CDR1、MUC1*LC-CDR2和MUC1*LC-CDR3包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列;Z是能够与半胱氨酸残基的硫原子形成共价键的缀合部分;并且其中y是1至10的整数。

[0231] ADC可以包含下面提供的结构,其中n为1至10:



ADC可以包含下面提供的结构,其中n为1至10:



[0232] ADC的功效部分地由药物与抗体的比率或DAR决定。基本上,附着在你的抗体上的毒素越多,细胞杀伤就越多。然而,将过多的毒素附着在抗体上会使抗体不稳定或在空间上阻碍抗体与靶抗原之间的相互作用。疏水相互作用色谱(HIC)是一种生物分析技术,用于确定抗体-药物-缀合物(ADC)的药物-抗体比率(DAR)。高压液相色谱(HPLC)系统上的HIC柱用于使用盐梯度缓冲剂分析和表征ADC。HIC根据蛋白质表面疏水性的差异来分离蛋白质,与抗体结合的药物越多,保留时间越长。图30-35显示了一批MNC2和一批MN20A10与几种毒性有效载荷缀合的HIC色谱图以及各自对应的计算出的DAR。

[0233] 在某些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR范围为1至20。在某些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR范围为1至15。在某些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR范围为1

至10。在某些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR范围为1至8。在某些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR范围为1至7。在某些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR范围为1至6。在某些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR范围为1至5。在某些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR范围为1至4。

[0234] 在某些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR为约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11或约12。在一些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR为约3.1、约3.2、约3.3、约3.4、约3.5、约3.6、约3.7、约3.8或约3.9。在一些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR为约7.1、约7.2、约7.3、约7.4、约7.5、约7.6、约7.7、约7.8、约7.9或约8.0。

[0235] 在一些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR为约1。在一些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR为约2。在一些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR为约3。在一些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR为约4。在一些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR为约3.8。在一些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR为约5。在一些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR为约6。在一些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR为约7。在一些实施方案中,本文提供的缀合物的DAR为约8。

[0236] 在某些实施方案中,在缀合反应期间,少于理论最大值的单元与多肽(例如抗体)缀合。

[0237] 在某些实施方案中,附着于单元的氨基酸位于抗体的重链中。在某些实施方案中,附着于单元的氨基酸位于抗体的轻链中。在某些实施方案中,附着于单元的氨基酸位于抗体的铰链区中。在某些实施方案中,附着于单元的氨基酸位于抗体的Fc区中。在某些实施方案中,附着于单元的氨基酸位于抗体的恒定区(例如,重链的CH1、CH2或CH3,或轻链的CH1)。在另外其它实施方案中,附着于单元或药物单元的氨基酸位于抗体的VH框架区中。在其它实施方案中,附着于单元的氨基酸位于抗体的VL框架区中。

[0238] 应当理解,本文所描述的缀合物的制备可产生具有一个或多个附着于多肽(即异质)例如抗体的单元分布的缀合物的混合物。可通过质谱法在混合物中识别单个缀合物分子并通过HPLC(例如疏水相互作用色谱,包括本领域已知的此类方法)分离。在某些实施方案中,可通过电泳或色谱从缀合混合物中分离具有单一DAR(加载)值的均质缀合物。

[0239] 本公开内容提供了包含针对与细胞毒素缀合的MUC1*的单克隆抗体或其抗原结合片段的抗体-药物缀合物(ADC)。本文所用的术语“抗体-药物缀合物”是指一种化合物,该化合物包含通过化学接头与细胞毒性剂(通常是具有高全身毒性的小分子药物)连接的单克隆抗体(mAb)。在一些实施方案中,ADC可包含经过化学修饰以包含接头的小分子细胞毒素。然后使用接头将细胞毒素与抗体或其抗原结合片段缀合。在与细胞表面上的靶抗原结合后,ADC被内化并运输到溶酶体,其中细胞毒素通过可切割接头的蛋白水解(例如,通过溶酶体中的组织蛋白酶B)或通过抗体的蛋白水解降解(如果通过不可切割的接头连接到细胞毒素)释放。然后,细胞毒素从溶酶体转运到细胞质或细胞核中,然后在那里其可以根据其作用机制与其靶标结合。

[0240] 本文所述的抗体-药物缀合物可以包括整个抗体或抗体片段。亲本抗体可以是鼠、兔、人、人源化、骆驼或其他物种。

[0241] ADC可以包括抗体的抗原结合片段。术语“抗体片段”、“抗原结合片段”、“抗体的功能片段”和“抗原结合部分”在本文中可互换使用,并且是指保留特异性结合抗原的能力的

抗体的一个或多个片段或部分(通常参见Holliger等人,Nat.Biotech.,23(9):1 126-1129(2005))。抗体片段可以包括例如一个或多个CDR、可变区(或其部分)、恒定区(或其部分)或其组合。抗体片段的实例包括但不限于,(i)Fab片段,其是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')2片段,其是包含通过铰链区处的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(iv)单链Fv(scFv),其是由Fv片段的两个结构域(即VL和VH)通过合成接头连接的单价分子,该合成接头使得两个结构域能够合成为单个多肽链(参见例如Bird等人,Science,242:423-426(1988);Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85:5879-5883(1988);和Osbourn等人,Nat.Biotechnol.,16:778(1998))和(v)双抗体,其是多肽链的二聚体,其中每个多肽链包含通过肽接头连接到VL的VH,该肽接头太短而不能使同一多肽链上的VH和VL之间配对,从而驱动不同VH-VL多肽链上的互补结构域之间配对以生成具有两个功能性抗原结合位点的二聚分子。

[0242] 术语“细胞毒素”和“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞破坏(细胞死亡)和/或发挥抗增殖作用的任何分子。应理解,ADC的细胞毒素或细胞毒性剂在本领域中也被称为ADC的“有效载荷”。本领域已知许多类别的细胞毒性剂在ADC分子中具有潜在效用,并且可用于本文描述的ADC。这些类别的细胞毒性剂包括例如抗微管剂(例如,奥瑞他汀和美登素生物碱(maytansinoid))、吡咯并苯二氮䓬(PBD)、RNA聚合酶II抑制剂(例如,鹅膏毒素)和DNA烷化剂(例如,吲哚并苯二氮䓬假二聚体)。可用于本文所述ADC中的特定细胞毒性剂的实例包括但不限于鹅膏蕈碱、奥瑞他汀、卡里奇霉素、柔红霉素、多柔比星、倍癌霉素、多拉司他汀、烯二炔、lexitropsins、紫杉烷、嘌呤霉素、美登素生物碱、长春花生物碱(vinca alkaloid)、微管蛋白抑素(tubulysin)和吡咯并苯二氮䓬类(PBD)。更具体地说,细胞毒性剂可以是例如AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB、奥瑞他汀E、紫杉醇、多西紫杉醇、CC-1065、SN-38、拓扑替康、吗啉代多柔比星、根霉菌素、氰基吗啉代多柔比星、多拉司他汀-10、棘霉素、考布他汀、查利车霉素(chalicheamicin)、美登素、DM1、DM4、长春花碱、甲氨蝶呤、纺锤菌素或其衍生物或类似物。

[0243] 奥瑞他汀代表一类高效抗有丝分裂剂,其在耐受性良好的剂量下表现出显著的临床前活性。可以与本文所述的ADC结合使用的奥瑞他汀的实例包括但不限于单甲基奥瑞他汀E(MMAE)和相关分子单甲基奥瑞他汀F(MMAF)。

[0244] 在一个实施方案中,细胞毒性剂可以是吡咯并苯二氮䓬(PBD)或PBD衍生物。PBD转运到细胞核中,在那里它交联DNA,阻止有丝分裂期间的复制,通过诱导单链断裂来损伤DNA,并随后导致细胞凋亡。一些PBD还具有识别和结合特定DNA序列的能力。

[0245] 本文所述的抗MUC1*单克隆抗体包含与其缀合的至少一种细胞毒素分子;然而,抗MUC1*单克隆抗体可以包含任何合适数量的与其缀合的细胞毒素分子(例如,1、2、3、4个或更多个细胞毒素分子)以实现期望的治疗作用。

[0246] 本公开内容还提供了包含上述抗体或抗体-药物缀合物和药学上可接受的(例如,生理学上可接受的)载剂的组合物。本领域已知的任何合适的载剂都可用于本发明的范围内。载剂的选择将部分地由组合物可以施用到的特定部位和用于施用组合物的特定方法决定。组合物任选地可以是无菌的。组合物可以根据例如在Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,Pa.

(2001)中描述的常规技术来生成。

[0247] 组合物优选包含有效治疗或预防表达MUC1*的癌症的量的抗体或抗体-药物缀合物。因此,本公开内容提供了一种杀伤MUC1*阳性细胞的方法,其包括使表达MUC1*的细胞与本文所述的抗体或抗体-药物缀合物或包含本文所述的抗体或ADC的组合物接触,由此抗体或抗体-药物缀合物与细胞上的MUC1*结合并杀伤细胞。

[0248] 本公开内容还提供了本文所述的抗体或ADC或包含抗体或ADC的组合物在制造用于治疗MUC1*阳性癌症的药物中的用途。

[0249] 如本文所示,MUC1*在多种癌症类型上表达。因此,本公开内容提供了一种杀伤此类癌细胞的方法,其包括使表达MUC1*的癌细胞与本文所述的抗体-药物缀合物或包含本文所述的ADC的组合物接触,由此抗体-药物缀合物与细胞上的MUC1*结合并杀伤细胞。

[0250] 本文所述的抗体-药物缀合物或包含抗体-药物缀合物的组合物可以离体、体内或体外(优选体内)与表达MUC1*的细胞群体接触。

[0251] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等是指获得所需的药理和/或生理作用。优选地,该作用是治疗性的,即,该作用部分或完全治愈疾病和/或由疾病引起的不良症状。为此,本发明的方法包括施用“治疗有效量”的抗体或ADC或包含抗体或ADC和药学上可接受的载剂的组合物。“治疗有效量”是指在剂量和必要的时间段内有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量可因个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体或ADC在个体中引起所需响应的能力等因素而异。例如,本发明的ADC的治疗有效量是与MUC1*阳性细胞上的MUC1*结合并破坏它们的量。

[0252] 或者,药理和/或生理作用可以是预防性的,即,该作用完全或部分预防疾病或其症状。在这方面,本发明的方法包括向易患表达MUC1*的癌症的哺乳动物施用“预防有效量”的ADC或包含ADC的组合物。“预防有效量”是指在剂量和必要的时间段内有效实现所需预防结果(例如,预防疾病发作)的量。

[0253] 可以通过定期评估接受治疗的患者来监测治疗或预防功效。在一个实施方案中,本文所述的ADC抑制或压制表达MUC1*的细胞增殖至少约10%(例如,至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%)。可以使用本领域已知的任何合适方法来测量细胞增殖,例如测量标记核苷(例如,3H-胸苷或溴脱氧尿苷Brd(U))整合到基因组DNA中(参见例如Madhavan,H.N.,J.Stem Cells Regen.Med.,3(1):12-14(2007))。

[0254] 可以使用标准施用技术(包括例如静脉内、腹膜内、皮下)将本文所述的抗体或ADC或包含抗体ADC的组合物施用给哺乳动物(例如人)。更优选地,通过静脉内注射将抗体或ADC或包含抗体或ADC的组合物施用给哺乳动物。

[0255] 本文所述的抗体或ADC或包含抗体或ADC的组合物可以与一种或多种额外的治疗剂一起施用,额外的治疗剂可以共同施用给哺乳动物。本文所用的术语“共同施用”是指施用一种或多种额外的治疗剂和本文所述的抗体或ADC或含有抗体或ADC的组合物,时间足够接近,使得抗体或ADC可以增强一种或多种额外的治疗剂的作用,反之亦然。在这方面,可以首先施用抗体或ADC或含有其的组合物,并且其次可以施用一种或多种额外的治疗剂,反之亦然。例如,可以与其他药剂(例如,作为佐剂)联合施用抗体或ADC或含有其的组合物,以治疗或预防MUC1*阳性癌症。在这方面,抗体或ADC或含有抗体或ADC的组合物可与至少一种其

他抗癌剂联合使用,至少一种其他抗癌剂包括例如本领域已知的任何合适的化疗剂、电离辐射、小分子抗癌剂、癌症疫苗、生物疗法(例如,其他单克隆抗体、癌症杀伤病毒、基因疗法和过继性T细胞转移)和/或手术。

[0256] 作为本发明的抗体如何被整合到ADC、抗体药物缀合物中以治疗MUC1*阳性癌症的一个实例,毒素被附着到抗MUC1*抗体MNC2上。在这个特定的实例中,毒素是MMAE、单甲基奥瑞他汀,尽管本领域技术人员已知有多种毒素和功能性接头可促进ADC定向杀伤靶细胞,尤其是癌细胞。在本实例中,MNC2被去糖基化,然后与促进MMAE共价附着的接头反应,本文中称为MNC2-ADC。将不同浓度的MNC2-ADC与靶细胞孵育不同时间段。然后对细胞进行拍照,并使用名为PrestoBlue™的细胞死亡指示剂(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)测量细胞活力。与HCT(其为MUC1和MUC1*阴性细胞系)孵育的MNC2-ADC在任何浓度下均未诱导细胞死亡(图5A-图5F)。然而,当HCT细胞被转导以表达MUC1*,生成HCT-MUC1*时,MNC2-ADC确实以剂量依赖性方式诱导细胞死亡(图6A-图6G)。图9B显示了测量的细胞活力损失的图表。类似地,MNC2-ADC没有在K562细胞中诱导细胞死亡,K562细胞是MUC1*阴性细胞(图7A-图7G)。同样,当细胞被转导以表达MUC1*,生成K562-MUC1*时,MNC2-ADC能够以浓度依赖性方式诱导细胞死亡(图8A-图8G)。图9A显示了测量的细胞活力损失的图表。

[0257] T47D细胞是一种天然存在的乳腺癌细胞系,其表达全长MUC1(MNC2不与其结合)以及MUC1*(MNC2与其结合)。T47D-MUC1*是一种细胞系,其中T47D细胞已被转导以表达甚至更多的MUC1*。将MNC2-ADC与T47D-WT细胞(图10A-图10G)或T47D-MUC1*细胞(图11A-图11G)一起孵育。从测量细胞活力的图表(图12)中可以看出,在此处测试的最高浓度下,只有T47D-MUC1*细胞被杀伤。进行了另一项实验,其中添加的MNC2-ADC浓度大大增加。在此情况下,T47D-WT细胞在1000nM时被MNC2-ADC杀伤(图13A-图13J),并且T47D-MUC1*细胞在10nM、39nM、100nM、393nM和在1000nM时被杀伤(图14A-图14J)。图15A显示了MNC2-ADC诱导的T47D和T47D-MUC1*细胞死亡的测量图表。这些实验仅作为一个实例显示。为了使ADC发挥作用,ADC与靶细胞的接合必须诱导受体内化,这组例子证明了这一点。附着在抗MUC1*抗体上的毒素可以是本领域技术人员已知的几种毒素之一。类似地,MNC2可以是人的或人源化的。

[0258] 然而,毒素偶联化学的优化大大改善了MNC2-ADC的结果。在下一个实验中,使用缬氨酸-瓜氨酸对氨基苄基氨基甲酸酯(VC-PAB)接头连接去糖基化抗体和毒素。接头一端单独与MMAE偶联,然后另一端与马来酰亚胺反应,然后在通过烷基化还原后与抗体偶联。MMAE通过阻断微管蛋白的聚合来抑制细胞分裂。在细胞外稳定的接头被组织蛋白酶B切割,ADC被内化,从而激活MMAE。这种优化的MNC2-ADC浓度范围为0.1ng/mL至500ng/mL,与T47D野生型(-WT)(图16A和图16C)或经转导以表达更多MUC1*的T47D细胞(T47D-MUC1*)(图16B和图16D)一起孵育。在一种情况下,MNC2-ADC与96孔板每孔5,000个靶MUC1*阳性细胞一起孵育72小时(图16A-图16B)。可替代地,MNC2-ADC仅与靶MUC1*阳性细胞一起孵育16小时,之后更换培养基,并且细胞继续培养另外54小时(图16C-图16D)。为了进行比较,将众所周知的癌症药物紫杉醇添加到T47D-wt或T47D-MUC1*细胞中持续72小时(图16E-图16F)。使用称为PrestoBlue™的细胞死亡指示剂(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)测量72小时共培养物的活力(图17)。从图中可以看出,抗原密度较高的细胞被杀伤得更快,而且MNC2-ADC浓度较低。在72小时孵育中,90%的高MUC1*细胞在MNC2-ADC浓度为100nM时被杀伤。

[0259] 作为本发明的抗体可以如何整合到ADC(抗体药物缀合物)中用于治疗MUC1*阳性

癌症的另一个实例,将毒素附着到另一种抗MUC1*抗体20A10上。与20A10-ADC共培养72小时后,对剩余癌细胞进行了放大照片拍摄(图18A-图18F)在此特定实例中,毒素是MMAE、单甲基奥瑞他汀,尽管本领域技术人员已知有多种毒素和功能性接头促进ADC定向靶细胞(尤其是癌细胞)杀伤。20A10被去糖基化,然后与促进MMAE共价附着的接头反应,本文称为20A10-ADC或20A10-MMAE。浓度范围从0.1ng/mL到500ng/mL的20A10-ADC与T47D野生型(-WT)(图18A和图18C)或经转导以表达更多MUC1*的T47D细胞(T47D-MUC1*)(图18B和图18D)一起孵育。在一种情况下,20A10-ADC与靶MUC1*阳性细胞一起孵育整个72小时测定(图18A-图18B)。可替代地,20A10-ADC仅与靶MUC1*阳性细胞一起孵育16小时,之后更换培养基,并且细胞继续培养另外54小时(图18C-图18D)。为了进行比较,将众所周知的癌症药物紫杉醇添加到T47D-wt或T47D-MUC1*细胞中持续72小时(图18E-图18F)。使用称为PrestoBlue™的细胞死亡指示剂(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)测量72小时共培养的活力(图19)。从图中可以看出,抗原密度越高,杀伤的癌细胞越多。即使孵育16小时,多于80%的高MUC1*细胞被杀伤,并且孵育72小时,100%在低于10nM的浓度下被杀伤。表达较低量MUC1*的细胞需要更高的20A10-ADC浓度和更长的孵育时间段以实现100%细胞杀伤。

[0260] 图20A的图表绘制了这些实验的IC50。数据也以表格形式显示在图20B中。

[0261] 这些实验展示了使用优化的偶联化学以及新的、改进的毒素和接头,抗MUC1*抗体可以成功地整合到许多ADC形式中。

[0262] 表征每种ADC的体外方法之一是测量抗体在毒素与抗体偶联之前和之后结合靶抗原的能力。抗体的特异性可因将多种毒素化学缀合到抗体的过程而受损。这种现象更多的是由于每种抗体的内在稳定性或不稳定性,而不是由于偶联过程的元素。在许多情况下,有效载荷通过结合到游离硫醇而与抗体偶联,游离硫醇是通过破坏或还原二硫键生成的。二硫键将两条重链结合在一起,并支持可变区的结构,可变区是抗体识别单元。一个重大的挑战是还原足够的二硫键以允许多种毒素附着,而不会破坏维持关键抗体结构的二硫键。出乎意料的是,MNC2是一种非常稳定、表现良好的抗体,它允许附着多种毒素而不会破坏抗体的结构或改变其识别靶抗原的能力。将有效载荷附着到抗体MN20A10时遇到的挑战涉及二硫键还原和毒素缀合的时机。大多数ADC偶联方案都要求迭代二硫键还原,然后测试游离硫醇的数目。如果这是一个延长的过程,游离硫醇可重新氧化,这可重建原始结构或可产生导致抗体靶特异性丧失的新结构。这种情况发生在尝试将毒素与抗体MN20A10(其为IgG2b同种型)缀合时。这个问题通过以下方式克服:1)凭经验确定还原MN20A10所需的摩尔当量数目;2)一次性添加该数目的还原当量;3)在升高的温度下添加偶联试剂,其中通过在水浴中进行反应可以减少达到所需温度的时间,并在反应期间通过间歇性摇动进一步加快反应时间。图36A-图36D显示了流式细胞术测量MNC2在偶联MMAE之前和之后识别乳腺癌细胞和肺癌细胞的能力的图表。图37A-图37D显示了流式细胞术测量MN20A10在偶联MMAE之前和之后识别乳腺癌细胞和肺癌细胞的能力的图表。与MN20A10相比,MNC2在偶联MMAE之后似乎识别癌细胞的能力较弱。鉴于在本实验中,MNC2-MMAE的药物抗体比率(DAR)高于20A10-MMAE的DAR,再加上MNC2-MMAE在动物中根除这些相同肿瘤的能力更强,几种毒素与MNC2抗体的附着可在空间上阻碍二抗的结合。

[0263] 研究人员试图实现的关键目标之一是开发一种抗癌疗法,该疗法可以识别并杀伤表达低水平靶抗原的早期癌细胞。从统计学上讲,如果癌症患者的癌症在非常早期得到治

疗,他们的存活机会更大。迄今为止,几乎没有任何靶向癌症疗法能够杀伤早期、低抗原表达的癌细胞。较新的靶向疗法通常只能在靶抗原的表达超过某个阈值时才能杀伤癌细胞。例如,乳腺癌药物赫赛汀只能在患者靶HER2的表达相对较高时才可使用。即便如此,接受赫赛汀治疗的患者中约20%会对赫赛汀产生耐药性,这通常会伴随对其他抗癌治疗的耐药性。现在人们认识到,肿瘤复发通常是由治疗无法杀伤的低抗原表达细胞引起的。如果靶抗原是生长因子受体,那么晚期肿瘤会表达更高水平的生长因子受体,但这些更高水平也会驱动肿瘤生长速度比表达较低水平生长因子受体的细胞更快。

[0264] 因此,尽管很少这样做,但针对表达低抗原的早期癌细胞和表达高水平的靶向抗原的晚期癌细胞来测试抗癌疗法是至关重要的。在图38A-图45D中,测试了MNC2-ADC和MN20A10-ADC杀伤多种癌症亚型的能力,其中肿瘤是低-中抗原表达癌细胞或高抗原表达癌细胞。令人惊讶的是,MNC2-ADC和MN20A10-ADC显示了杀伤低抗原表达癌细胞和高抗原表达细胞两者的显著能力。低表达癌细胞通过用被认为是可药用的高纳摩尔范围的ADC的MNC2-ADC或MN20A10-ADC治疗而杀伤。表达高水平MUC1*的癌细胞被个位数纳摩尔范围内的IC50杀伤。亚微摩尔水平的抗体被认为是可药用的。同样,由于MNC2和MN20A10具有高度的癌症特异性,因此该剂量范围将非常可耐受。ADC杀伤的体外测量通常低估了ADC的体内杀伤潜力。在体内,通常会观察到由于“旁观者”作用而导致的杀伤。即当肿瘤内细胞的杀伤触发宿主释放细胞因子、巨噬细胞等时,这些细胞因子、巨噬细胞等会大大增加杀伤。这些作用不会在体外发生。

[0265] 例如,测试了MNC2-MMAE、MNC2-MMAF、MN20A10-MMAE和MN20A10-MMAF在体外杀伤表达低水平MUC1*的T47D野生型乳腺癌细胞以及经过工程化以表达更多MUC1*的T47D-MUC1*细胞的能力。类似地,测试了抗MUC1*-ADC杀伤表达低水平MUC1*的HPAF II野生型胰腺癌细胞以及经过工程化以表达更多MUC1*的HPAF II-MUC1*细胞的能力(图38A-图38F)。在这些实验中,MNC2-MMAE和MNC2-MMAF的DAR相当,分别为4.1和3.7。MN20A10-MMAE和MN20A10-MMAF的DAR之间略有差距,分别为5.8和3.8,这反映在它们的杀伤效力中。从图中可以看出,当用被认为是可药用的亚微摩尔剂量的ADC处理时,两种野生型、低抗原表达细胞都会被杀伤。出乎意料的是,尽管MUC1*是生长因子受体,但表达的MUC1*越多,ADC介导的杀伤就越大。经过工程化以表达更多MUC1*的乳腺癌和胰腺癌细胞两者在极低的纳摩尔浓度下很容易被MNC2-MMAE、MNC2-MMAF、MN20A10-MMAE和MN20A10-MMAF杀伤。将MNC2-德鲁替康或MN20A10-德鲁替康对靶细胞的杀伤与MNC2-MMAE、MNC2-MMAF、MN20A10-MMAE和MN20A10-MMAF进行了比较(图40A-图40C)。在此体外测定中,所有五种抗MUC1*ADC似乎都具有相当的杀伤效力,尽管在此测定中无法确定旁观者细胞的杀伤。抗MUC1*-ADC还显示是MUC1*阳性前列腺癌细胞(图41A-41B)和非小细胞肺癌细胞(图42A-42B)的强效杀伤剂。

[0266] 在一组流式细胞术实验中,通过测量添加MUC1*-ADC后靶癌细胞的活力来确定MNC2-MMAE或MN20A10-MMAE的特异性杀伤作用。此处的靶细胞是T47D野生型乳腺癌细胞或经过工程化以表达更多MUC1*的T47D乳腺癌细胞,称为T47D-MUC1*。从图43中可以看出,MN20A10-MMAE和MNC2-MMAE两者均能有效杀伤野生型乳腺癌细胞和经过工程化以表达更多MUC1*的细胞。然而,对于两种MUC1*-ADC,当细胞过度表达靶抗原时,杀伤效力会更高。表达低水平MUC1*的癌细胞与早期癌症一致,而表达高水平MUC1*的细胞与晚期癌症一致。

[0267] 为了展示任何表达MUC1*的细胞都会被本文所述的MUC1*-ADC杀伤,我们工程化了

一种MUC1阴性结肠癌细胞系HCT-116,以表达MUC1*,例如HCT-MUC1*。在图44的细胞活力测定中可以看到,只有表达MUC1*的细胞被杀伤。在添加未缀合的MN20A10或MN20A10-MMAE后测量了表达MUC1*的癌细胞的活力。从图45中可以看出,MN20A10-MMAE有效杀伤非小细胞肺癌细胞、DU145激素抵抗性前列腺癌细胞和胰腺癌细胞。

[0268] 图46-图48显示了用MNC2-ADC或MN20A10-ADC处理后各种类型癌细胞的放大照片。杀伤作用可以很容易地看出为细胞数目显著减少,细胞形态从特征性的扁平、铺展形态变化为圆整形态和细胞脱落。相反,对照孔显示了致密细胞的汇合单层,具有正常的扁平铺展形态,并且没有死亡的漂浮细胞。图46A-图46C和图46G-图46F显示了用MNC2-MMAE处理的T47D-MUC1*乳腺癌细胞。图46D-图46F和图46G-图46J显示了用MNC2-德鲁替康处理的T47D-MUC1*乳腺癌细胞。图47A-图47B显示了用MNC2-MMAE处理的DU145激素抵抗性前列腺癌细胞。图47C-图47D显示了用MNC2-德鲁替康处理的DU145激素抵抗性前列腺癌细胞。图48A-图48B和图48G-图48H显示了用MN20A10-MMAE处理的T47D-MUC1*乳腺癌细胞。图48C-图48D和图48I-图48J显示了用MN20A10-德鲁替康处理的T47D-MUC1*乳腺癌细胞。图48K-图48L显示了用MN20A10-MMAE处理的DU145激素抵抗性前列腺癌细胞。图48M-图48N显示了用MN20A10-德鲁替康处理的DU145激素抵抗性前列腺癌细胞。可以直观看出,图46-图48中显示的抗MUC1*-ADC的杀伤作用与图38-图45中显示的流式细胞术测量的杀伤一致。

[0269] 还通过使用xCELLigence仪器实时监测杀伤,测定了MNC2-ADC和MN20A10-ADC杀伤表达低和高MUC1*的细胞两者的能力(图53-图56)。在xCelligence系统中,粘附的靶癌细胞被涂布到电极阵列96孔板上。粘附的细胞使电极绝缘并增加阻抗。粘附的癌细胞的数目与阻抗成正比。抗体和抗体-药物缀合物要小得多,并且对阻抗的贡献不显著。因此,阻抗增加反映癌细胞的生长,阻抗降低反映癌细胞的杀伤。

[0270] 乳腺癌细胞系T47D-wt表达低至低-中水平的MUC1*。胰腺癌细胞系HPAF II-wt表达甚至更低水平的MUC1*,并且肺癌细胞系NCI-H1975表达进一步更低水平的MUC1*。与MMAE、MMAF、德鲁替康或依沙替康缀合的MNC2和MN20A10两者均能有效杀伤低表达的T47D-wt乳腺癌细胞(图49和图54)、非小细胞肺癌细胞(图51和图56)和胰腺癌细胞(图52)。表达低水平MUC1*的癌细胞与早期癌细胞一致,并且被当以中纳摩尔剂量施用时的MNC2-ADC和MN20A10-ADC有效杀伤。从图54和图56中可以清楚看出,其中MNC2-依沙替康(DAR 8.2)与MNC2-德鲁替康(DAR 4.0)和MNC2-MMAE(DAR 4.1)进行了比较,MNC2-依沙替康显示出对表达低MUC1*的癌细胞更有效的杀伤,这可能是由于附着于其上的毒素数目较高。

[0271] 在下一组实验中,测试了MNC2-ADC和MN20A10-ADC杀伤表达高水平MUC1*的癌细胞的能力。预期是MUC1*水平越高,杀伤细胞就越困难,因为MUC1*是驱动这些细胞生长的生长因子受体。出乎意料的是,实验表明MUC1*表达越多,杀伤细胞就越容易。xCELLigence实时杀伤测定还用于比较与MMAE、MMAF、德鲁替康或依沙替康缀合的MNC2和MN20A10对表达更高水平的MUC1*的癌细胞的杀伤。乳腺癌细胞系T47D-MUC1*和HPAF II-MUC1*已被工程化以表达高水平的MUC1*,与晚期癌症一致。从图50、图53和图55中可以看出,表达高水平的MUC1*的癌细胞在非常低的纳摩尔剂量(6nM-19nM)下被完全杀伤。S

[0272] 除了体外测定外,还进行了体内实验,其中将与MMAE、MMAF、德鲁替康或依沙替康缀合的抗MUC1*抗体MNC2和MN20A10施用于已植入表达高或低MUC1*的乳腺癌、肺癌或胰腺肿瘤的测试小鼠。这些实验在实验18中有更详细的说明。在一个实例中,NOD/SCID/GAMMA小

鼠植入了T47D乳腺癌细胞,这些细胞要么是野生型,要么是经过工程化以表达更多的MUC1*。给动物施用三次MNC2-MMAE(DAR 3.85)的注射,初始剂量为5mg/kg,然后增加到10mg/kg。从图57中可以看出,小鼠携带的表达高水平MUC1*的肿瘤(与晚期癌症一致)在第26天被有效消除。小鼠植入的具有表达低MUC1*的细胞的肿瘤(与早期癌症一致)并未完全消除,但与对照组相比,肿瘤体积较小。相比之下(图58),给予相同剂量MN20A10-MMAE(DAR 2.96)的动物没有完全的肿瘤消除,可能是因为附着的毒素数目较少。向植入非小细胞肺癌肿瘤的动物给予相同剂量的MNC2-MMAE(图59)或MN20A10-MMAE(图60)。MNC2-MMAE(DAR 4.1)在消除植入高或低MUC1*表达的胰腺肿瘤的测试小鼠中的肿瘤方面非常有效(图61)。图62显示了图61中所示实验的更新。在66天后,用MNC2-MMAE治疗的动物自第18天起无肿瘤,无肿瘤复发。将MNC2-德鲁替康给予植入表达低或高水平MUC1*的人乳腺癌细胞的小鼠(图63和图64)。表达高MUC1*的肿瘤在第26天基本消除。与对照组相比,小鼠植入的表达低MUC1*的细胞大大减少,但可能需要更高的剂量或重复注射。

[0273] 在动物模型中,我们表明随着肿瘤进展到晚期,其MUC1*表达增加。图65A-图65D显示了肿瘤细胞的图像。第0天细胞的染色显示了细胞表达的全长MUC1多于MUC1*,并且染色强度较浅,表明MUC1*受体数目低,这表明是早期癌症。肿瘤植入后六十二(62)天,其相当于人时间的大约7年,可以很容易地看到,晚期肿瘤中MUC1*表达(就表达程度和表达强度而言)已从低表达显著转变为高表达。相反,肿瘤连续切片的染色显示了全长MUC1表达如所预期,因为它在表面表达后被切割为MUC1*。然而,染色强度并未增加,表明在晚期肿瘤中绝大多数表达的MUC1已被切割为生长因子受体形式MUC1*。

[0274] 抗体

[0275] 本领域技术人员将理解在此上下文中结合目标多肽的抗体(Ab)结合所指的“结合”。例如,抗体或包含此类Ab的本文所描述的缀合物可结合其他多肽或蛋白质,通常具有较低的亲和力,如通过例如免疫测定或本领域已知的其他测定所确定的。在特定实施方案中,特异性结合目标多肽的Ab或包含此类Ab的本文所描述的缀合物与目标多肽结合的亲和力至少为Ab或缀合物与另一多肽缀合时的亲和力的2个对数、2.5个对数、3个对数、4个对数或更大。在另一特定实施方案中,Ab或包含此类Ab的本文所描述的缀合物不特异性结合目标多肽以外的多肽。在特定实施方案中,Ab或包含Ab的本文所描述的缀合物与目标多肽特异性结合,亲和力(Kd)小于或等于20mM。在特定实施方案中,此类结合的亲和力(Kd)小于或等于约20mM、约10mM、约1mM、约100μM、约10μM、约1μM、约100nM、约10nM或约1nM。除非另有说明,否则“结合”、“结合至”、“特异性结合”或“特异性结合至”在此上下文中可互换使用。

[0276] 在一些实施方案中,靶细胞是癌细胞。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、胰腺癌或肺癌。

[0277] 在一些实施方案中,抗体结合至在表面上表达MUC1*的癌细胞。

[0278] 在某些实施方案中,抗体包含约10、约20、约30、约40、约50、约100、约150、约200、约250、约300、约350、约400、约450、约500、约550、约600、约650、约700、约750、约800、约850、约900或约950个氨基酸。

[0279] 在某些实施方案中,抗体包含约10-50、约50-100、约100-150、约150-200、约200-250、约250-300、约300-350、约350-400、约400-450、约450-500、约500-600、约600-700、约700-800、约800-900或约900-1000个氨基酸。

[0280] 在某些实施方案中,缀合物包含抗体Ab。在某些实施方案中,Ab是单克隆抗体。在某些实施方案中,Ab是人抗体。在某些实施方案中,Ab是人源化抗体。在某些实施方案中,Ab是嵌合抗体。在某些实施方案中,Ab是包含两条重链和两条轻链的全长抗体。在特定实施方案中,Ab是IgG抗体,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在某些实施方案中,Ab是单链抗体。在其它实施方案中,Ab是抗体的抗原结合片段,例如Fab片段。

[0281] 在特定实施方案中,Ab是IgG1抗体。在特定实施方案中,Ab是IgG2b抗体。

[0282] 在某些实施方案中,抗体特异性结合细胞表面蛋白质。在某些实施方案中,抗体特异性结合细胞表面受体。在某些实施方案中,抗体特异性结合细胞表面受体配体。

[0283] 在一些实施方案中,抗体或其功能片段或功能变体特异性结合MUC1*。在一些实施方案中,抗体包含抗MUC1*重链和抗MUC1*轻链。

[0284] 在一些实施方案中,抗MUC1*重链包含抗MUC1*重链可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*轻链包含抗MUC1*轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。

[0285] 在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG1重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG2重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG3重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG4重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ或λ轻链的可变结构域。

[0286] 在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG1重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG2重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG3重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG4重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含κ轻链的可变结构域。

[0287] 在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG1重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG2重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG3重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含λ轻链的可变结构域。在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含IgG4重链的可变结构域,并且抗MUC1*轻链可变结构域包含λ轻链的可变结构域。

[0288] 在一些实施方案中,特异性结合MUC1*的抗体或其功能片段或功能变体包含单链可变片段(scFv)或抗原结合片段(Fab)。在一些实施方案中,特异性结合MUC1*的抗体或其功能片段或功能变体包含单链可变片段。在一些实施方案中,特异性结合MUC1*的抗体或其功能片段或功能变体包含抗原结合片段(Fab)。

[0289] 在一些实施方案中,抗MUC1*重链可变结构域包含互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,并且其中抗MUC1*重链可变结构域的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含根据

以下的氨基酸序列:HC-CDR1:SEQ ID NO:1或4;HC-CDR2:SEQ ID NO:2或5;HC-CDR3:SEQ ID NO:3或6;并且其中CDR在HC-CDR1、HC-CDR2或HC-CDR3中的至少一个中包含0-2个氨基酸修饰(例如0或1个氨基酸修饰)。

[0290] 在一些实施方案中,抗MUC1*轻链可变结构域包含互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3,并且其中抗MUC1*轻链可变结构域的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含根据以下的氨基酸序列:LC-CDR1:SEQ ID NO:13或16;LC-CDR2:SEQ ID NO:14或17;LC-CDR3:SEQ ID NO:15或18;并且其中CDR在LC-CDR1、LC-CDR2或LC-CDR3中的至少一个中包含0-2个氨基酸修饰(例如0或1个氨基酸修饰)。

[0291] 在一些实施方案中,抗MUC1*重链包含与SEQ ID NO:38或44具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗MUC1*轻链包含与SEQ ID NO:41或47具有至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0292] 抗体药物缀合物(ADC)在抗体部分的可变区识别癌细胞外部表达的分子时起作用。抗体与靶抗原结合后,整个ADC被内化。抗体内化是ADC细胞杀伤功能的必要条件。通常,ADC的细胞内化会在生物化学上改变毒素,在某些情况下使其更有效,而在其他情况下,这种改变会将毒素困在细胞内以减少脱靶毒性。并非所有受体都会在配体结合后被内化,或者特别是在抗体结合后,这会使受体二聚化,从而使内化更加困难,甚至不可能。图25A-25D显示了在共聚焦显微镜上拍摄的照片,记录了抗MUC1*抗体(例如MNC2)在与MUC1*受体的细胞外结构域结合后被内化。

[0293] 有效载荷

[0294] 抗体药物缀合物(ADC)将抗体(例如单克隆抗体)的靶特异性与小分子药物(称为有效载荷或细胞毒性基团)的效力结合起来,将它们连接到保留两者特性的单个ADC分子中。与传统化疗药物相比,ADC的选择性和效力提高,导致安全性和功效更高,从而导致治疗窗口更宽。术语“有效载荷”和“细胞毒性基团”在本文中可互换使用。

[0295] 在一些实施方案中,有效载荷是拓扑异构酶抑制剂。在一些实施方案中,拓扑异构酶抑制剂是拓扑异构酶I抑制剂。在一些实施方案中,拓扑异构酶抑制剂是依沙替康或其衍生物。在一些实施方案中,拓扑异构酶抑制剂是德鲁替康或其衍生物。

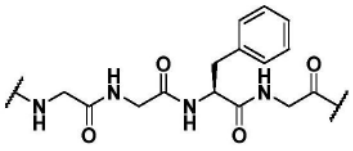
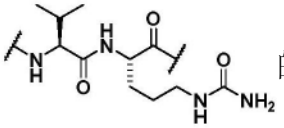
[0296] 在一些实施方案中,有效载荷是微管蛋白形成抑制剂。在一些实施方案中,微管蛋白形成抑制剂是单甲基奥瑞他汀E(MMAE)或单甲基奥瑞他汀F(MMAF)。

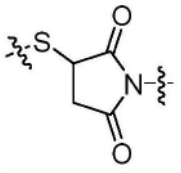
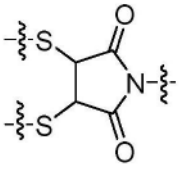
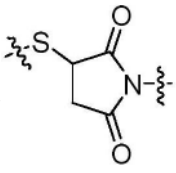
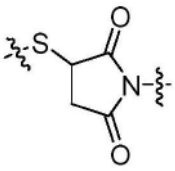
[0297] ADC形式中使用的一些较新的毒性有效载荷,例如德鲁替康,属于拓扑异构酶I抑制剂的依沙替康家族。ADC形式中使用的一种此类新的有效载荷偶联剂构型是德鲁替康,如图28所示。在这里,马来酰亚胺基己酰基(MC)部分有助于与抗体上的半胱氨酸偶联。马来酰亚胺基己酰基通过甘氨酸苯丙氨酸接头GGFG(一种连接到Dxd的偶联剂HN-CH2-)连接到毒性有效载荷Dxd。Dxd是一种拓扑异构酶I抑制剂,这是它抑制细胞分裂的机制。在图29所示的另一个实例中,依沙替康有效载荷通过对氨基苄基(PAB)部分附着至抗体,PAB部分连接到缬氨酸-瓜氨酸(VC)部分,而缬氨酸-瓜氨酸(VC)部分又连接到促进与抗体上的半胱氨酸偶联的马来酰亚胺基己酰基(MC)部分。

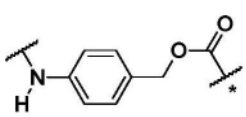
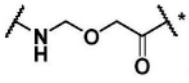
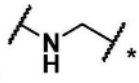
[0298] 依沙替康具有高水平的旁观者作用,这意味着它们可以杀伤邻近的细胞。靶向HER2+乳腺癌的新ADC德曲妥珠单抗(Enhertu)的临床试验受到严重且危及生命的副作用(例如肺炎)的困扰。据报道,多达16%的德曲妥珠单抗患者患有治疗引起的肺炎。然而,德曲妥珠单抗确实获得了FDA批准,因为据报道它将转移性乳腺癌患者的生存期延长了近两年。目前尚不完全清楚这些副作用是由于有效载荷还是靶HER2引起的,HER2也在正常肺和正常心脏上表达。回想一下,前两名接受HER2靶向CAR T细胞产品治疗的患者在输注后不久死亡。后续研究表明,死亡是由于使用对HER2具有极高亲和力的抗体造成的。最近,又有一名患者在接受不同的HER2靶向ADC治疗后死亡。这些结果强调了选择具有优异癌症选择性的抗体以避免这些危及生命的毒性的重要性。MNC2和MN20A10意外地具有极高的癌症特异性,并且在动物研究中没有引起毒性,其中每种抗体都被整合到几种ADC形式中。

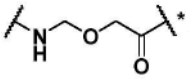
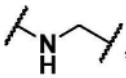
[0299] 接头

[0300] 在某些实施方案中,接头-L-包含碳原子、氮原子、硫原子、氧原子及其组合中的一个或多个。在某些实施方案中,接头-L-包含一个或多个氨基酸。在某些实施方案中,接头-L-包含醚键、硫醚键、胺键、酰胺键、碳-碳键、碳-氮键、碳-氧键、碳-硫键及其组合中的一种或多种。在某些实施方案中,接头-L-包含线性结构。在某些实施方案中,接头-L-包含二肽、三肽或四肽连接部分。

[0301] 接头可以包含至少一个甘氨酸。接头可以包含至少一个甘氨酸和苯丙氨酸。接头可以包含结构  。接头可以包含缬氨酸。接头可以包含瓜氨酸。接头可以包含缬氨酸和瓜氨酸。接头可以是具有结构  的二肽连接部分。

[0302] 在某些实施方案中,Z是能够与多肽的氨基酸形成共价键的缀合部分。Z可以与接头的N末端结合。Z可以包括马来酰亚胺。在特定实施方案中,氨基酸是半胱氨酸。在某些实施方案中,Z是  或  。在某些实施方案中,Z是  。在某些实施方案中,Z是  。

[0303] 接头可以包含偶联部分R。在某些实施方案中,R是能够将有效载荷结合到接头的C末端的偶联部分。R可以包含具有结构  的部分,其中*表示有效载荷的附着点。R可以包含结构基团  或  ,其中*表示有效载荷的附着点。R可以包

含具有结构  的基团,其中*表示有效载荷(例如,细胞毒性基团)的附着点。R可以包含具有结构  的基团,其中*表示有效载荷的附着点。

[0304] 图26显示了有效载荷单甲基奥瑞他汀E(MMAE)的化学结构,以及方便的接头分子和反应性分子,以促进有效载荷与抗体的化学偶联。在此情况下,MMAE通过对氨基苄基(PAB)部分连接到抗体,PAB部分连接到缬氨酸-瓜氨酸(VC)部分,而缬氨酸-瓜氨酸(VC)部分又连接到促进与抗体上的半胱氨酸偶联的马来酰亚胺基己酰基(MC)部分。一旦ADC被内化,组织蛋白酶B就会从抗体上酶促切割有效载荷,这由PAB和VC共同促进。有效载荷单甲基奥瑞他汀E(MMAE)通过阻断微管蛋白的聚合来抑制细胞分裂。

[0305] 单甲基奥瑞他汀F,称为MMAF,是另一种毒性有效载荷的实例,它通过阻断微管蛋白的聚合来抑制细胞分裂。在图27所示的实例中,有效载荷MMAF通过对氨基苄基(PAB)部分连接到抗体,PAB部分连接到缬氨酸-瓜氨酸(VC)部分,而缬氨酸-瓜氨酸(VC)部分又连接到促进与抗体上的半胱氨酸偶联的马来酰亚胺基己酰基(MC)部分。一旦ADC被内化,组织蛋白酶B就会从抗体上酶促切割有效载荷。与MMAE不同,MMAF含有羧酸,使得有效载荷从抗体上切割后难以排出细胞。

[0306] ADC形式中使用的一些较新的毒性有效载荷,例如德鲁替康,属于拓扑异构酶I抑制剂的依沙替康家族。ADC形式中使用的一种此类新的有效载荷偶联剂构型是德鲁替康,如图28A-图28E所示。在这里,马来酰亚胺基己酰基(MC)部分有助于与抗体上的半胱氨酸偶联。马来酰亚胺基己酰基通过甘氨酸苯丙氨酸接头GGFG(一种连接到Dxd的偶联剂HN-CH2-)连接到毒性有效载荷Dxd。Dxd是一种拓扑异构酶I抑制剂,这是它抑制细胞分裂的机制。在图29A-图29E所示的另一个实例中,我们通过对氨基苄基(PAB)部分将依沙替康有效载荷附着至我们的抗体,PAB部分连接到缬氨酸-瓜氨酸(VC)部分,而缬氨酸-瓜氨酸(VC)部分又连接到促进与抗体上的半胱氨酸偶联的马来酰亚胺基己酰基(MC)部分。

[0307] 药物组合物

[0308] 在另一个方面,本文提供了包含本文公开的缀合物(例如,ADC)和多特异性抗体的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物包含式(I)的缀合物和药学上可接受的载剂。在一些实施方案中,药物组合物包含本文公开的多特异性抗体和药学上可接受的载剂。

[0309] 本文的药物组合物使用一种或多种生理学上可接受的载剂配制,载剂包括赋形剂和助剂,其有助于将活性剂加工成药学使用的制备品。适当的制剂取决于所选择的施用途径。

[0310] 在某些实施方案中,本文公开的药物组合物还包含药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载剂。在一些实施方案中,药物组合物包括其他药用或药物剂、载剂、佐剂,例如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、溶解促进剂、用于调节渗透压的盐和/或缓冲剂。

[0311] 在某些实施方案中,本文公开的药物组合物通过任何合适的施用途径施用于对象,包括但不限于肠胃外(静脉内、皮下、腹膜内、肌内、血管内、鞘内、玻璃体内、输注或局部)施用。

[0312] 适合于肌内、皮下、肿瘤周围或静脉内注射的制剂包括生理学上可接受的无菌水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳剂,以及用于重构成无菌可注射溶液或分散液的无菌

粉末。合适的水性和非水性载剂、稀释剂、溶剂或媒介物的实例包括水、乙醇、多元醇(丙二醇、聚乙二醇、甘油、克雷莫佛(cremophor)等)、它们的合适混合物、植物油(例如橄榄油)和可注射有机酯,例如油酸乙酯。流动性的维持是例如通过使用诸如卵磷脂的涂覆、通过在分散液的情况下维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂来实现的。适合于皮下注射的制剂还包含可选的添加剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。

[0313] 对于静脉注射,活性剂可选地配制在水溶液中,优选在生理学相容的缓冲剂(例如汉克氏溶液、林格氏溶液或生理盐水缓冲剂)中。

[0314] 肠胃外注射可选地包括推注或连续输注。注射用制剂可选地以单位剂量形式存在,例如在安瓿瓶或多剂量容器中,并添加防腐剂。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物为适合肠胃外注射的形式,作为油性或水性媒介物中的无菌悬浮液、溶液或乳剂,并且含有配制剂,例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。用于肠胃外施用的药物制剂包括水溶性形式的活性剂的水溶液。此外,悬浮液可选地制备为适当的油性注射悬浮液。

[0315] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物为适合单次施用精确剂量的单位剂量形式。在单位剂量形式中,制剂被分成含有适当量本文公开的活性剂的单位剂量。在一些实施方案中,单位剂量为包含离散量制剂的包装形式。非限制性实例是包装的片剂或胶囊,以及西林瓶或安瓿中的粉末。在一些实施方案中,水性悬浮液组合物包装在单剂量不可重新封闭的容器中。可替代地,使用多剂量可重新封闭的容器,在此情况下,通常在组合物中包含防腐剂。仅举例来说,用于肠胃外注射的制剂以单位剂量形式(包括但不限于安瓿)或在多剂量容器(具有添加的防腐剂)中呈现。

[0316] 实施例

[0317] 实施例1.抗MUC1*内化实验

[0318] 证实了MNC2内化(图25A-图25B)。

[0319] 8孔腔室载玻片(Nunc™Lab-Tek™IIChamber Slide™系统Thermo货号#154534PK或Ibidi™8孔μ-载玻片ibiTreat:#1.5聚合物盖玻片,组织培养物处理,灭菌)涂覆有胶原蛋白(Sigma#C3867),其中每孔加入300μL胶原蛋白并在4℃孵育过夜,用PBS清洗一次,然后用水清洗一次,然后在生物安全罩中风干。在罩下干燥孔。

[0320] 将T47D乳腺癌细胞以每孔30,000-50,000个细胞接种于10%RPMI中并培养48小时或直至~70%汇合。去除培养基并在2% RPMI中使细胞血清饥饿24小时。用冰冷PBS清洗细胞。

[0321] 将抗体在冷PBS加2% FBS中稀释至最终浓度为300ug/mL。将200ul抗体溶液加入每个孔中,在摇动平台摇床中以速度6在4℃黑暗条件下孵育2小时。然后用冷PBS清洗细胞三次。

[0322] 将10ug/mL的抗鼠Alexa 488抗体或抗人Alexa 555抗体在含有2%FBS的PBS中按1:200稀释,并在4℃黑暗条件下振荡孵育1小时。用冷PBS清洗细胞三次。

[0323] 为了内化,添加温热的10% RPMI+75nM深红色溶酶体荧光探针(lysotracker deep red)(1/13,333),并在37℃的CO_2培养箱中孵育2小时。用冷PBS清洗细胞三次。

[0324] 在室温下用新鲜的4%甲醛(PBS中)固定细胞15分钟,然后用冷PBS清洗三次。加入1ug/mL的赫斯特(Hoescht)染料33342(PBS中),并在室温下孵育10分钟,之后去除培养基,无需清洗步骤。对于Nunc™Lab-Tek™,将盖玻片(编号1.5)用封片剂(Prolong Diamond抗淬

灭剂)封固在腔室载玻片上,避免气泡。然后将载玻片在室温下于水平表面上存放24小时。在黑暗中于4℃长期存储。对于Ibidi载玻片,添加Ibidi封片剂。

[0325] 在共聚焦显微镜上拍照。

[0326] 实施例2.MNC2-ADC或MN20A10-ADC(抗体-药物-缀合物)小规模(3mg)制备的一般描述

[0327] 在pH 8.0硼酸盐缓冲剂中用过量的二硫苏糖醇(DTT)还原未缀合的MNC2(IgG1抗体)或MN20A10(IgG2b抗体)的溶液。在37℃还原2小时后,使用Ellman硫醇测试法测试等分试样中存在的游离硫醇量。根据抗体同种型,游离硫醇的数目会有所不同。如果使用Ellman试剂分析游离硫醇表明游离硫醇数目不足,则添加更多DTT并在37℃再孵育一段时间。重复游离硫醇确定和添加更多还原剂的过程,直到获得足够数目的游离硫醇。MN20A10需要的还原剂比MNC2多,并且还原时间比MNC2长。然后将还原抗体放入pH 6.0的2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)缓冲剂中,并且用11摩尔当量的马来酰亚胺连接的毒性剂将游离半胱氨酸烷基化约1小时。粗ADC随后通过脱盐柱纯化以去除低分子量污染物,例如过量毒性剂、DMSO和其他小分子量污染物。药物-抗体比率(DAR)是根据毒素UV吸光度@248nm(或德鲁替康的情况下为370nm)与抗体吸光度@280nm的比率计算得出的。按照文献方法(Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate.Hamblett,K.J.,Senter,P.D.,Chace,D.F.,Sun,M.M.C.,Lenox,J.,Cerveny,C.G.,Kissler,K.M.,Bernhardt,S.X.,Kopcha,A.K.,Zabinski,R.F.,Meyer,D.L.,和Francisco,J.A.Clin Cancer Res.20040ct 15;10(20):7063-70.DOI:10.1158/1078-0432.CCR-04-0789),通过疏水相互作用色谱-高效液相色谱完成对偶联物的分析,以确定药物-抗体比率(DAR),即[药物:mAb]摩尔比率。

[0328] 按照此规程生成MNC2-MMAE、MNC2-MMAF、MNC2-德鲁替康、MNC2-依沙替康、MN20A10-MMAE、MN20A10-MMAF、MN20A10-德鲁替康和MN20A10-依沙替康的小规模制备。

[0329] 实施例3:MNC2-德鲁替康的小规模(3mg)制备生成的详细实施例

[0330] IgG1 MNC2抗体(3.00mg,1.578ml,1.9mg/ml,20nM)从-80℃解冻,置于37℃水浴中1分钟。通过nanodrop使用消光系数14,000L/g-cm测定小鼠IgG1抗体的蛋白质浓度。使用离心过滤器(Amicon Ultra 0.5mL 50,000mw截留(货号#UFC505024)(14,000x g,在4℃持续8分钟)浓缩抗体溶液,以获得等于或小于100μL的体积。然后通过浓缩至<100μL并重新悬浮在约300μL新鲜缓冲剂中将缓冲剂交换为pH 8.0硼酸盐缓冲剂(25mM四硼酸钠、25mM NaCl、1mM EDTA)。此过程重复共3次。将浓缩的抗体(~100uL)转移到0.5mL螺旋盖离心管中,并用pH 8.0硼酸盐缓冲剂(25mM四硼酸钠、25mM氯化钠、1mM EDTA)加至300μL,以制备10mg/mL抗体溶液。

[0331] 通过称量DTT(5mg,32.4mmol)并将其溶解在5mL的pH 8.0硼酸盐缓冲剂(25mM四硼酸钠、25mM氯化钠、1mM EDTA)中,制备二硫苏糖醇(DTT)(6.48mM)溶液。将DTT溶液(6.48mM,30.9uL,200nmol,10当量)添加到抗体溶液中,并将管在37℃水浴中加热2小时。每15分钟定期涡旋温热反应混合物。2小时后,取出反应混合物的等分试样(6uL)进行Ellman硫醇分析,该分析显示了每个抗体有7.68个游离硫醇,而IgG1总共可能有8个硫醇。

[0332] 将抗体还原混合物在冰浴中冷却至4℃,并将溶液转移至离心过滤器(Amicon Ultra 0.5mL 50,000mw截留),并将缓冲剂3次切换为pH 6.0MES缓冲剂(50mM)。[14,000x

g,在4C持续8分钟)。用pH 6.0MES缓冲剂(50mM)将浓缩的还原抗体稀释至640μL。

[0333] 德鲁替康(10mg/mL,9.7mM)在DMSO中的储备溶液通过称量1.80mg,1.74μMole并将其溶解在DMSO(180uL)中来制备。制备德鲁替康(2mM,110.2uL,220nmole)在50% DMSO/pH 6.0MES缓冲剂(50mM)中的溶液,通过用DMSO(32.3uL)稀释德鲁替康溶液(22.8uL,10mg/mL在DMSO中),并且然后用50mM MES pH6.0(50mM,55.1uL)进一步稀释,以制备2mM德鲁替康在50%DMSO/50%pH 6.0MES缓冲剂(50mM)中的溶液。将德鲁替康溶液(110.1uL,50% DMSO/50%pH 6.0MES缓冲剂,2mM,73.4nmole,11当量)添加到含有640μL还原抗体的管中。将反应在室温下在垂直旋转器上缓慢混合1小时,并通过疏水相互作用色谱(HIC)HPLC监测,该监测表示是否有未反应的抗体残留。将痕量未反应抗体的保留时间与反应产物进行比较,以确定是否残留未反应的抗体,并且如果是,则允许反应继续。对于小规模,时间通常为1-2小时。大规模制备可需要允许反应在8-12小时内进行。

[0334] 约1小时后,将反应在脱盐柱(Cytiva PD miditrap g-25介质,货号#28918008)上纯化。将柱顶部打开,并丢弃填料缓冲剂。将柱底部打开,并用Gibco PBS pH 7.4(参考货号#10010-023)(3x 5mL)通过重力流穿对柱进行调节。将抗体溶液(750uL)加载到柱上,并使其完全进入树脂床,然后加入PBS(250uL)。然后用pH 7.4PBS(1.25mL)从柱中洗脱纯化的ADC。Nanodrop蛋白质浓度确定显示1.25mL的PBS中抗体为1.76mg/mL,或从初始3.0mg未缀合抗体中回收2.2mg(产率为73%)缀合抗体。通过UV-VIS光谱法在370nm和280nm处分析纯化的ADC,给出药物-抗体比率(DAR)为6.7。

[0335] 实施例4:MN20A10-德鲁替康

[0336] MN20A10-德鲁替康以类似方式制备,但使用20当量的DTT,其给出每个抗体4.77个游离硫醇。与德鲁替康偶联后,纯化的ADC通过UV-VIS光谱法在370nm和280nm处测得的DAR为4.60。

[0337] 实施例5:MNC2-MC-VC-PAB-MMAE

[0338] MNC2-MC-VC-PAB-MMAE以类似方式制备,但使用5当量的DTT,其给出每个抗体6.12个游离硫醇。与MC-VC-PAB-MMAE偶联后,纯化的ADC通过HIC-HPLC测得的DAR为4.39,并且通过UV-VIS光谱法在248nm和280nm处测得的DAR为5.12。

[0339] 实施例6:MNC2-MC-VC-PAB-MMAF

[0340] MNC2-MC-VC-PAB-MMAF以类似方式制备,但使用5当量的DTT,其给出每个抗体4.53个游离硫醇。与MC-VC-PAB-MMAF偶联后,纯化的ADC通过HIC-HPLC测得的DAR为3.65。

[0341] 实施例7:MNC2-MC-VC-PAB-依沙替康

[0342] MNC2-MC-VC-PAB-依沙替康以类似方式制备,但使用10当量的DTT,其给出每个抗体6.20个游离硫醇。与MC-VC-PAB-依沙替康偶联后,纯化的ADC通过UV-VIS光谱法在370和280nm处测得的DAR为8.40。

[0343] 实施例8:MN20A10-MC-VC-PAB-MMAE

[0344] MN20A10-MC-VC-PAB-MMAE以类似方式制备,但使用7.5当量的DTT,其给出每个抗体4.08个游离硫醇。与MC-VC-PAB-MMAE偶联后,纯化的ADC通过HIC-HPLC测得的DAR为3.81,通过UV-VIS光谱法在248和280nm处测得的DAR为4.11。

[0345] 实施例9:MN20A10-MC-VC-PAB-MMAF

[0346] MN20A10-MC-VC-PAB-MMAF以类似方式制备,但使用15当量的DTT,其给出每个抗体

3.87个游离硫醇。与MC-VC-PAB-MMAF偶联后,纯化的ADC通过HIC-HPLC测得的DAR为3.79。

[0347] 实施例10大规模(30mg)制备MNC2-ADC或MN20A10-ADC抗体-药物-缀合物。

[0348] 以与小规模ADC制备类似的方式,在pH 8.0硼酸盐缓冲剂中用过量的二硫苏糖醇(DTT)还原未缀合的抗体溶液。还原2小时后,使用Ellman硫醇测试法测试等分试样中存在的游离硫醇的量。然后将还原的抗体放入pH 6.0MES缓冲剂中,并将游离半胱氨酸用11摩尔当量的马来酰亚胺连接毒性剂烷基化过夜。然后通过脱盐柱纯化粗ADC。

[0349] IgG1 MNC2抗体(15.7mL的1.92mg/mL,30.1mg,200nmole)的等分试样从-80℃解冻,置于37℃水浴中1分钟。合并体积,并使用小鼠IgG1抗体设置(关闭背景减法)通过nanodrop确定浓度。30mg抗体在16.17mL中,为1.9mg/mL,200nmol。使用3个离心过滤器(Amicon Ultra 4mL 30,000mw截留(引用货号#UFC803024))浓缩溶液,并且将缓冲剂更换为pH 8.0硼酸盐缓冲剂(25mM四硼酸钠、25mM NaCl、1mM EDTA),在具有水平转子的Eppendorf5804R离心机中以4000g持续15-25分钟旋转3次。将浓缩抗体转移到5mL螺旋盖管中,并用pH 8.0硼酸盐缓冲剂(25mM四硼酸钠、25mM氯化钠、1mM EDTA)加至3mL,以制成10mg/mL抗体溶液。

[0350] 通过称量DTT(5mg)并将其溶解在pH 8.0硼酸盐缓冲剂(5mL)(25mM四硼酸钠、25mM氯化钠、1mM EDTA)中,制备DTT溶液(6.48mM)。将DTT溶液(6.48mM、617uL、4000nmole、20当量)添加到抗体溶液中,并将管在37℃在摇床培养箱中加热2小时。2小时后,取出反应混合物的等分试样(6uL)进行Ellman硫醇分析。对这些结果的分析显示了每摩尔抗体有7.12摩尔游离硫醇。

[0351] 以类似的方式,在3小时期间用总共20当量的DTT还原MN20A10,并进行多次游离硫醇测试。

[0352] 然后将还原抗体管在冰浴中冷却至4C,将溶液等量转移到3个离心过滤器(Amicon Ultra 4mL 30,000至mw截留(引用货号#UFC803024)),并且将缓冲剂交换为pH 6.0MES(50mM)缓冲剂,在Eppendorf 5804R离心机中以4000g持续15-25分钟旋转三次。将浓缩物转移到15mL falcon管中,并用缓冲剂冲洗浓缩器两次,用pH6.0MES(50mM)缓冲剂使最终体积达到6400μL。

[0353] 通过称量德鲁替康(3.4mg,3.29μMol)并将其溶解在DMSO(340uL)中,制备德鲁替康(10mg/mL,9.67mM)在DMSO中的储备溶液。制备1100μL的2mM德鲁替康在50% DMSO/pH 6.0MES(50mM)中的溶液,通过用DMSO(322.5uL)稀释DMSO储备德鲁替康溶液(227.5μL的9.67mM,2.22μMole),并且然后用pH 6.0MES(50mM,550uL)进一步稀释,以制成1100μL的在50% DMSO/50%pH 6.0MES(50mM)中的2.068mg/mL(2mM)德鲁替康。将德鲁替康溶液(2mM,1000uL,2200nmole,11当量)添加到含有6400μL还原抗体的管中。将反应物在垂直旋转器上在室温混合18小时,并在1小时后和第二天通过HIC HPLC监测。

[0354] 18小时后,将反应物在脱盐柱(Cytiva Sephadex G-25介质货号#17003301)上纯化。Sephadex g-25中级凝胶(10.13g)在圆底烧瓶中的Gibco PBS pH 7.4(Gibco货号#10010-023,50mL)中在室温膨胀3小时。将25g Teledyne Isco Redi-Sep样品加载盒(Isco货号#693873240)附着到环形支架上,并通过底部注入PBS以启动盒。树脂膨胀3小时后,用氩气/真空对烧瓶进行真空脱气3次。然后将膨胀的树脂倒入柱中,并打开底部以让PBS洗脱。用PBS清洗圆底烧瓶以将所有树脂转移到盒中。将废液容器放在柱下方。用Gibco PBS

pH7.4(引用货号#10010-023)3x 50mL通过重力流穿对柱进行调节。将过滤器放在盒顶部,并向下推柱填料工具,注意仅稍微压缩凝胶。柱高约为74mm。将抗体溶液(7500uL)加载到柱上,并使其完全进入树脂床。将PBS(2500uL)添加到柱中。将一个新的50mL falcon管放在柱下方,并用PBS pH 7.4(14mL)洗脱纯化的ADC。为了提高柱效率,使1mL级分通过柱,直到总共50mL通过柱。用nanodrop分析收集到的溶液,以显示17.5mL PBS中的抗体浓度为1mg/mL,或17.5mg抗体,来自未缀合MNC2的产率为58%。

[0355] 实施例11:MNC2-MMAE

[0356] MNC2-MMAE以类似方式制备,但使用10当量的DTT,其给出每个抗体6.32个游离硫醇。与MC-VC-PAB-MMAE偶联后,纯化的ADC通过HIC-HPLC测得的DAR为4.10,并且通过UV-VIS光谱法在248nm和280nm处测得的DAR为5.20。

[0357] 实施例12:MN20A10-MMAE

[0358] MN20A10-MMAE以类似方式制备,但使用20当量的DTT,其给出每个抗体3.67个游离硫醇。与MC-VC-PAB-MMAE偶联后,纯化的ADC通过HIC-HPLC测得的DAR为2.96,并且通过UV-VIS光谱法在248nm和280nm处测得的DAR为3.57。

[0359] 表8:ADC DAR

[0360]

实施例	ADC	DAR 通过 HIC HPLC	DAR 通过	当量 DTT	游离硫醇
2	MNC2-	-	6.7 (370/280	10	7.68
3	MN20A10-	-	4.6 (370/280	20	4.77
4	MNC2-MC-	4.39	5.12 (248/280	5	6.12
5	MNC2-MC-	3.65	-	5	4.53
6	MNC2-MC-	-	8.40 (370/280	10	6.2
7	MN20A10-	3.81	4.11 (370/280	7.5	4.08
8	MN20A10-	3.79	-	15	3.87
9	MNC2-	-	4.5 (370/280	20	7.12
10	MNC2-MC-	4.10	5.20 (248/280	10	6.32
11	MN20A10-	2.96	3.57 (248/280	20	3.67

[0361] 一般而言,与MNC2抗体相比,MN20A10需要出乎意料地大量的还原剂(DTT)以获得相同数目的游离硫醇。

[0362] MN20A10需要20当量的DTT以获得3.67-4.2个游离硫醇(实施例11和3)。

[0363] 使用20当量的DTT扩大MN20A10规模,产生的游离硫醇(3.67)比小规模(4.2)更少。

[0364] 实施例7和8展示了与还原MN20A10相关的挑战。

[0365] 在实施例7中,7.5当量的DTT给出4.08个游离硫醇,而在实施例8中,使用甚至更多(15当量)来产生相似或更低的还原(3.87个游离硫醇)。

[0366] 相比之下,MNC2仅需要5当量的DTT以得到4.5-6.1个游离硫醇(实施例5和4)。

[0367] 在MNC2-德鲁替康(3mg和30mg)上使用20当量的DTT以迫使反应达到尽可能高的DAR。(实施例2和9)。

[0368] 用10当量的DTT还原MNC2-MC-VC-PAB-Exactacan(实施例6),以将结果与实施例2

直接进行比较。

[0369] 实施例13:Ellman硫醇测试用于确定ADC还原中游离硫醇的数目

[0370] 制备40mL 2mM Ellman试剂溶液,将31.7mg Ellman试剂(5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸,ThermoScientific货号#22582)和164mg乙酸钠溶解在40mL水中。将Ellman溶液储存在4C。

[0371] 脱盐还原抗体等分试样:取两个旋转柱(Zeba旋转脱盐柱引用货号#89882),并折断底部且松开盖子。将它们放入旋转离心管。在微型离心机(Spectrafuge 24D)中以1.5x g持续1分钟旋转以去除缓冲剂。丢弃洗脱的缓冲剂。通过添加400μL缓冲剂(pH 8.0硼酸盐缓冲剂,由25mM四硼酸钠、25mM NaCl、1mM EDTA组成)调节5分钟,然后以1.5x g离心1分钟来调节柱。在旋转之间丢弃洗脱液。重复调节和离心。

[0372] 制备Ellman试剂:要制备1mL的Ellman试剂,将850μL水移液到管中。添加100μL的1M Tris-HCl pH 8.0,然后添加50μL上述制备的Ellman储备液。添加70μL到两个新离心管(Protein LoBind Tube,Eppendorf货号#022431102)的底部,其中一个标记为样品,另一个标记为对照。调节柱后,将它们移到标记为样品和对照的干净新离心管中。

[0373] 样品和对照制备:稀释后硫醇的最终浓度应在10-50μM范围内。抗体还原反应以10mg/mL或66.7uM进行。稀释是5x稀释,其使浓度达到13.3μM。根据过去的数据,当对照为~0.03时,读数~0.24mAu将对应于每个抗体~4个硫醇。如果添加更多当量的还原剂,新浓度应反映在下一个硫醇测试中。

[0374] 在恰好于运行测试之前准备对照溶液。对照应具有与无抗体存在的反应相同的DTT或TCEP浓度。将24μL硼酸盐缓冲剂(或适当的缓冲剂)移液到标有样品制备和对照制备的两个管中。向每个管中分别加入6μL还原抗体溶液和6μL对照溶液。将每个管中的30μL缓慢加载到具有脱盐柱的相应管中。尽量将液体分配到脱盐树脂的中间而不接触侧面。以1.5g旋转试管2分钟,并在412nm的分光光度计上分析100μL比色皿中的流穿物。

[0375] 硫醇测试中的抗体浓度是通过使用C1 x V1=MNC2 x V2来计算的。其中C1是初始浓度(66.7μM),V1是从样品中取出的6μL,并且V2是它稀释到的30μL。解出MNC2给出硫醇测定中抗体的浓度,其为13.34μM。在412nm处的吸光度用于确定样品中游离硫醇的浓度。首先,从样品中减去对照的吸光度。然后将减去对照的吸光度代入比尔定律A=ebc,其中A是吸光度,e是抗体的摩尔吸收率,b是比色皿的路径长度,并且c是摩尔浓度。Ellman试剂的摩尔吸收率为14,150L/mol-cm。比色皿的路径长度为1cm。计算样品中游离硫醇的摩尔浓度。

[0376] 一旦确定了浓度,从通过色谱柱的30μL到70μL的Ellman试剂的稀释倍数为3.333。将稀释倍数调整后的硫醇浓度除以抗体浓度,以计算出每个抗体的游离硫醇数目。

[0377] 实施例14:通过UV确定药物-抗体比率(DAR)

[0378] 为了估计DAR,在石英比色皿中测量ADC在248nm和280nm处的UV吸光度比率(R)。R=(吸光度@248nm)/(吸光度@280nm)。

[0379] 将R值代入以下公式,并且计算出DAR:DAR=(21x R-9)/(1.615-0.1425x R)。

[0380] 实施例15:通过HIC-HPLC确定药物-抗体比率(DAR)

[0381] 可用于估计ADC的DAR的另一种方法是使用HIC-HPLC分析。简而言之,将ADC和未缀合抗体的样品注入HPLC。在不同保留时间观察到的峰对应于不同的药物-抗体比率。在电子表格中分析HPLC保留时间和峰面积,其中峰最初任意设置为DAR对于IgG1为1-8和对于IgG2

为1-10。峰之间的时间与分析人员试图将这些峰拟合为与抗体结合的特定药物数目相对应的整数结合使用。由于每个DAR存在几种不同的ADC,因此该过程十分复杂。例如,对于DAR为1有8个可能的ACD(马来酰亚胺结合位点)。通常,不同DAR之间的保留时间差异大于具有相同DAR的一组ACD内的保留时间差异。分析人员为每个峰设置DAR后,将峰面积相加,并计算每个DAR峰面积的贡献。然后根据所有峰确定样品的平均DAR。

[0382] 药物抗体比率(DAR)和药物荷载分布通过疏水相互作用色谱和反相高效液相色谱测得,Jun Ouyan,Methods Mol.Biol.2013;1045:275-83。

[0383] 实施例16.通过xCELLigence测定法测量MNC2-ADC或MN20A10-ADC对靶细胞的杀伤

[0384] 为了评估对靶癌细胞(包括乳腺癌细胞(T47D)、非小细胞肺癌细胞(NCI-H1975)和胰腺癌细胞(HPAF II))的实时杀伤,在xCELLigence RTCA MP仪器(Agilent)上进行测定。将靶癌细胞以5000个细胞/孔(100μL的50,000个细胞/mL储备液)的密度接种到多电极孔板上,并在37℃/5%CO2培养箱中孵育24小时。将mAb MNC2 ADC或mAb MN20A10-ADC在相应的生长培养基中制备成2X溶液,并将每种浓度的100μL添加到靶细胞中。作为阳性对照(100%细胞杀伤),用1%曲拉通或1μM紫杉醇代替ADC处理细胞。在37℃/5%CO2培养箱中孵育40-120小时后评估细胞杀伤。在该测定中,实时测量阻抗。当粘附癌细胞被杀伤并从电极表面脱落时,阻抗(绝缘)降低。

[0385] 还通过使用xCELLigence仪器实时监测杀伤,测定了MNC2-ADC和MN20A10-ADC杀伤表达低和高MUC1*的细胞两者的能力。在xCelligence系统中,粘附的靶癌细胞被涂布到电极阵列96孔板上。粘附的细胞使电极绝缘并增加阻抗。粘附的癌细胞的数目与阻抗成正比。抗体和抗体-药物缀合物要小得多,并且对阻抗的贡献不显著。因此,阻抗增加反映癌细胞的生长,并且阻抗降低反映癌细胞的杀伤。

[0386] 乳腺癌细胞系T47D-wt表达低至低-中水平的MUC1*。胰腺癌细胞系HPAF II-wt表达甚至更低水平的MUC1*,并且肺癌细胞系NCI-H1975表达进一步更低水平的MUC1*。从图24、图26和图27中可以看出,这些表达低水平MUC1*的癌细胞(与早期癌细胞一致)被MNC2-ADC和MN20A10-ADC在以中等纳摩尔剂量施用时有效杀伤。乳腺癌细胞系T47D-MUC1*和HPAF II-MUC1*已被工程化以表达高水平的MUC1*,与晚期癌症一致。从图25和图28中可以看出,表达高水平MUC1*的癌细胞在非常低的纳摩尔剂量下被完全杀伤。图49A-图49D显示了MNC2-MMAE、MN20A10-MMAE、MNC2-MMAF和MN20A10-MMAF对表达低至中等水平MUC1*的T47D乳腺癌细胞的杀伤效力。从图中可以看出,抗MUC1*抗体MNC2和MN20A10两者在40小时时间框内以500nM的浓度给药时均有效杀伤靶细胞。从图49E-49J中可以看出,120小时后,在低至167nM的浓度下观察到有效的杀伤。事实上,MN20A10-MMAE在56nM时显示出有效的杀伤。这里与MNC2-德鲁替康和MN20A10-德鲁替康的比较显示在相同浓度167nM下的杀伤与MNC2-MMAE、MNC2-MMAF、MN20A10-MMAE和MN20A10-MMAF相当。

[0387] 在下一组实验中,测试了MNC2-ADC和MN20A10-ADC杀伤表达高水平MUC1*的癌细胞的能力。预期是MUC1*水平越高,杀伤细胞就越困难,因为MUC1*是驱动这些细胞生长的生长因子受体。出乎意料的是,实验表明MUC1*表达越多,杀伤细胞就越容易。图50A-50D显示了经过工程化以表达高水平MUC1*(表明是晚期癌症)的T47D乳腺癌细胞被MNC2-MMAE、MNC2-MMAF和MN20A10-MMAE在浓度低至19nM以及甚至低至6nM时有效杀伤。如图N25E-N25J所示,当允许实验进行120小时时,MNC2-MMAE、MNC2-MMAF和MNC2-德鲁替康的浓度低至6nM时可见

表达高水平MUC1*的癌细胞的几乎完全杀伤。对于MN20A10,所能附着的MMAF和德鲁替康的数目较少,在19nM至167nM之间的较高浓度下可见癌细胞杀伤。

[0388] 与表达低水平MUC1*的乳腺癌细胞类似,表达甚至更低水平MUC1*的NCI-H1975非小细胞肺癌细胞在用MNC2-MMAE、MNC2-MMAF、MNC2-德鲁替康、MN20A10-MMAE或MN20A10-MMAF处理时,在40小时时进入停滞状态,但在120小时时被杀伤(图51A-图51I)。MUC1*表达水平较低但高于H1975肺癌细胞的HPAF II-wt胰腺癌细胞在40小时时被MNC2-MMAE、MNC2-MMAF、MN20A10-MMAE和MN20A10-MMAF以167nM至500nM的浓度杀伤,在120小时后提高至被以56nM的浓度杀伤(图52A-图52I)。但是,如果胰腺细胞经过工程化以表达高水平的MUC1*,MNC2-ADC和MN20A10-ADC在杀伤癌细胞方面更有效。约40小时后,浓度在167nM和56nM之间时可见癌细胞的几乎完全杀伤,而120小时后,浓度在19nM和56nM之间时实现癌细胞的几乎完全杀伤(图53A-图53I)。

[0389] 然后,毒素依沙替康通过包含马来酰亚胺基己酰基、缬氨酸-瓜氨酸和对氨基苄基的接头与MNC2缀合,如图N4E-N4H所示。此外,缀合是在含有丙二醇MES pH 6.0缓冲剂的溶液中进行的。

[0390] 如图65A-65D所示,植入动物体内的肿瘤细胞在肿瘤从早期发展到晚期时,MUC1*表达大大增加。植入的肿瘤细胞是T47D-wt乳腺癌细胞,这是衍生自几十年前去世的乳腺癌患者的细胞系。ATCC提供的细胞系已扩增数千倍甚至数百万倍。基本上所有T47D细胞都是相同的。第0天细胞的染色显示了细胞表达的全长MUC1多于MUC1*,并且染色强度较浅,表明MUC1*受体数目低,这表明是早期癌症。肿瘤植入后六十二(62)天,其相当于人时间的大约7年,可以很容易地看到,晚期肿瘤中MUC1*表达(就表达程度和表达强度而言)已从低表达显著转变为高表达。相反,肿瘤连续切片的染色显示了全长MUC1的表达如所预期,因为它在表面表达后被切割为MUC1*。然而,染色强度并未增加,表明在晚期肿瘤中绝大多数表达的MUC1已被切割为生长因子受体形式MUC1*。

[0391] 正如癌症临床医生和病理学家所知,患者体内形成的肿瘤不像细胞系那样是单一克隆的同质群体。实际肿瘤在某种程度上是异质的,因为它们由低抗原表达细胞和高抗原表达细胞组成。然而,同样众所周知的是,早期癌症的特征是大多数细胞是低表达细胞,而晚期癌症的特征是大多数细胞是高表达细胞。

[0392] 实施例17通过PrestoBlue活/死细胞测定法测量MNC2-ADC或MN20A10-ADC对靶细胞的杀伤

[0393] 测量mAb MNC2-ADC和mAb MN20A10-ADC对靶癌细胞(包括T47D乳腺癌细胞NCI-H1975非小细胞肺癌细胞和HPAFII胰腺癌细胞)的杀伤活性的另一种方法是使用PrestoBlue活/死细胞测定法(ThermoFisher)。将靶癌细胞以5000个细胞/孔(100μL的50,000个细胞/mL储备液)的密度接种在黑壁、透明底部的96孔组织培养板中,并在37℃/5% CO_2培养箱中孵育过夜。将MNC2 ADC和MN20A10 ADC制备为相应癌细胞生长培养基中的2X溶液,并将每种浓度的100μL加入靶癌细胞中。作为阳性对照(100%杀伤),用1μM紫杉醇代替ADC处理癌细胞。在37℃/5% CO_2培养箱中孵育72小时-120小时后,使用PrestoBlue HS测定法(ThermoFisher)通过荧光测量细胞活力。简而言之,孵育期后,添加20μL的PrestoBlue HS溶液。孵育30-90min后,使用Tecan读板仪记录荧光(Ex 560nm/Em 590nm)。通过PrestoBlue HS染色确定活力百分比,并将其根据1μM紫杉醇处理的细胞归一化。

[0394] 将归一化荧光值输入到图表程序Sigma Plot中,数据绘制为MNC2-ADC或MN20A10-ADC浓度与归一化荧光信号的关系,并使用四参数希尔公式拟合曲线:f＝y0+a*xˆb/(cˆb+xˆb)

[0395] IC50值是根据MNC2-ADC和MN20A10-ADC对靶癌细胞的杀伤能力的拟合数据计算得出的,并且以nM报告。

[0396] 为了直观地评估靶细胞杀伤或癌细胞形态的变化,在所示MNC2-ADC或MN20A10-ADC浓度下孵育120小时后,在Olympus IX-71显微镜上以4x或20倍x放大拍摄靶癌细胞(包括T47D乳腺癌细胞、NCI-H1975非小细胞肺癌细胞和HPAFII胰腺癌细胞)的明场图像。

[0397] 图46A-图48N显示了用MNC2-ADC或MN20A10-ADC处理后各种类型癌细胞的放大照片。杀伤作用可以很容易地看出为细胞数目显著减少,细胞形态从特征性的扁平、铺展形态变化为圆整形态和细胞脱落。相反,对照孔显示了致密细胞的汇合单层,具有正常的扁平铺展形态,并且没有死亡的漂浮细胞。图46A-图46C和图46G-图46F显示了用MNC2-MMAE处理的T47D-MUC1*乳腺癌细胞。图46D-图46F和图46G-图46J显示了用MNC2-德鲁替康处理的T47D-MUC1*乳腺癌细胞。图47A-图47B显示了用MNC2-MMAE处理的DU145激素抵抗性前列腺癌细胞。图47C-图47D显示了用MNC2-德鲁替康处理的DU145激素抵抗性前列腺癌细胞。图48A-图48B和图48G-图48H显示了用MN20A10-MMAE处理的T47D-MUC1*乳腺癌细胞。图48C-图48D和图48I-图48J显示了用MN20A10-德鲁替康处理的T47D-MUC1*乳腺癌细胞。图48K-图48L显示了用MN20A10-MMAE处理的DU145激素抵抗性前列腺癌细胞。图48M-图48N显示了用MN20A10-德鲁替康处理的DU145激素抵抗性前列腺癌细胞。可以直观看出,图46A-图48N中显示的抗MUC1*-ADC的杀伤作用与图38A-图45D中显示的流式细胞术测量的杀伤一致。

[0398] 实施例18.动物研究:体内测量MNC2-ADC或MN20A10-ADC对靶细胞的杀伤

[0399] 进行体内实验以测量MNC2-ADC或MN20A10-ADC对异种移植靶癌细胞的杀伤。

[0400] 对于乳腺癌异种移植,先前植入了90天释放雌激素团块(Innovative Research Laboratories)的雌性NOD/SCID小鼠(体重18-22g,6-8周龄,Charles River Laboratories),在异氟烷麻醉下(ISOTHESIA,250ml(HENRY SCHEN,NDC:11695-6776-2))皮下注射一百万个表达中至高水平MUC1*(ATCC)的荧光素酶-mCherry阳性T47D乳腺癌细胞,使用带可拆卸针头的BD 26G胰岛素注射器(Fisher货号:329652)或BD 28G Lo-Dose U-100胰岛素注射器(Fisher货号:329461)。

[0401] 对于肺癌异种移植或胰腺癌异种移植,雌性NU/NU小鼠(体重18-22g,6-8周龄,Charles River Laboratories)在异氟烷麻醉(ISOTHESIA,250ml(HENRY SCHEN,NDC:11695-6776-2))下皮下注射一百万个荧光素酶-mCherry阳性NCI-H1975非小细胞肺癌细胞(ATCC)或一百万个荧光素酶-mCherry阳性HPAFII胰腺癌细胞(ATCC),该细胞表达低至中等水平的MUC1*。

[0402] 异种移植4-6天后,小鼠腹膜内注射150ul、30mg/mL D-荧光素(XenoLight™ D-荧光素钾盐;PerkinElmer P/N 122799)到颈背中,然后置于异氟烷麻醉下,之后使用Xenogen IVIS-Spectrum系统(Perkin Elmer)进行生物发光图像采集。进行组选择以均匀分布异种移植小鼠,以确保模拟治疗组和ADC治疗组具有相同的初始肿瘤大小。

[0403] 异种移植后第5-7天,小鼠腹膜内注射磷酸盐缓冲盐水(PBS)或5-10mg/kg MNC2-ADC或5-10mg/kg MN20A10-ADC。此后,小鼠每周注射一次,总共注射四次MNC2-ADC或

MN20A10-ADC。

[0404] 生物发光成像每周进行一次,以非侵入性实时测量肿瘤生长。数据以图表方式表示为辐射率(光子/sec),作为肿瘤植入后天数的函数。

[0405] 在一些肿瘤生长测量中,对小鼠的肿瘤进行了卡尺测量。由两个独立的观察者测量每个异种移植肿瘤x/y平面中两个最长的垂直轴,精确到0.1mm。假设深度等于垂直轴中最短的轴,定义为y。测量在小鼠清醒时使用数字游标卡尺进行,并根据以下公式进行计算:异种移植体积=$xy^2/2$。

[0406] 遵循安乐死的人道标准,其中:肿瘤负荷达到或超过直径20mm(符合IACUC政策),肿瘤溃烂,或肿瘤位置干扰正常行走、进食/饮水/或排泄;身体状况评分为2或体重减轻>15%(与异种移植前体重相比)。

[0407] 还进行了体内实验,以评估MNC2-ADC和MN20A10-ADC在植入几种不同类型的人癌症的免疫受损小鼠中的杀伤效力,这些癌症中一些表达低水平的MUC1*,并且另一些表达高水平的MUC1*。在所有情况下,人癌细胞系已被工程化以表达mCherry和荧光素酶,以便通过生物发光测量肿瘤。为了光学测量肿瘤体积,将荧光素酶底物荧光素注射到动物体内,并在注射荧光素后10分钟内在IVIS仪器上拍摄生物发光。荧光素酶的表达水平各不相同,在某些情况下差异很大,这使得比较不同细胞系之间的肿瘤大小变得具有挑战性。在这些情况下,还对肿瘤进行了卡尺测量,以允许比较细胞系之间的肿瘤大小。此外,在这些情况下,还拍摄了动物的照片,以便可以直观地比较细胞系之间的肿瘤大小。

[0408] 在一个实验中,将MNC2-MMAE施用于携带90天雌激素释放团块的雌性NOD/SCID/GAMMA(NSG)小鼠,然后植入1M T47D-wt乳腺癌细胞,这些细胞表达低至中等水平的MUC1*,表明是早期癌症,或植入1M T47D-MUC1*细胞,这些细胞经过工程化以表达高水平MUC1*,表明是晚期癌症。在第一次注射剂量为5mg/kg的MNC2-MMAE之前,允许肿瘤植入七(7)天。在第14天和第20天,剂量增加到10mg/kg。首先,将T47D-wt肿瘤植入小鼠,这些肿瘤表达低水平的MUC1*。将图57A中的对照小鼠与图57B中的MNC2-MMAE治疗小鼠进行比较,可以很容易地看出,治疗小鼠以非常小的肿瘤负荷存活直到第56天实验结束时。相反,未经治疗的对照小鼠的肿瘤继续生长,直到第56天由于肿瘤负荷过大而不得不被处死。接下来,检查了植入表达高水平的MUC1*的T47D-MUC1*肿瘤的小鼠。将植入T47D-wt的对照动物(图57A和图57E)与植入T47D-MUC1*的动物(图57C和图57F)的生物发光进行比较,T47D-MUC1*细胞系表达的荧光素酶略少于T47D-wt细胞系。然而,对肿瘤的目视检查显示两种细胞系的肿瘤大小相当。携带T47D-MUC1*肿瘤的动物按照与携带T47D-wt肿瘤的动物相同的时间表进行MNC2-MMAE给药。但是,从图57D可以清楚地看出,MNC2-MMAE治疗的动物从第34天到第56天实验结束时都没有肿瘤,实验结束是因为对照小鼠肿瘤负荷过重并且必须处死。平行进行相同实验,但动物接受MN20A10-MMAE给药(图58A-58F)。MN20A10-MMAE结果与MNC2-MMAE结果的趋势相同,但MNC2-MMAE比MN20A10更有效。这种差异的一个可能解释是附着在MNC2抗体(DAR 3.85)和MN20A10(DAR 2.96)上的毒素数目不同。

[0409] 在另一项实验中,雌性nu/nu小鼠植入1M人NCI-H1975非小细胞肺癌细胞,这些细胞表达低至中等水平的MUC1*,表明是早期癌症。在肿瘤植入后第7天和第14天,给动物注射5mg/kg的MNC2-MMAE。在第19天,剂量增加到10mg/kg。生物发光照片清楚地显示了在第19天和第27天将MNC2-MMAE的剂量增加到10mg/kg增加了对肿瘤细胞的杀伤(图59A-图59C)。可

以通过比较对照组和治疗组中处死动物的肿瘤重量来了解MNC2-MMAE治疗的功效。对照组动物在植入后第20天必须处死,因为肿瘤大小危及生命,其中肿瘤重量为0.82、0.3、0.49、0.41和0.5克。相比之下,治疗组在第54天需要处死的动物重量为0.28和0.4克。治疗组中的两只小鼠在第67天仍无肿瘤,此时实验被任意终止。平行进行的实验结果显示了相同趋势,其中动物接受MN20A10-MMAE治疗(图60A-60D),尽管MN20A10-MMAE的作用不如MNC2-MMAE显著,这可能是因为MN20A10-MMAE的DAR较低。然而,治疗克制了肿瘤生长,这可以从生物发光照片中看出,从第26天必须处死的对照动物中切除的肿瘤重量中也可以看出。肿瘤重量范围从2.2克到0.65克。图60D的图表显示了在第19天剂量增加到10mg/kg后,肿瘤体积急剧下降。数据表明,如果开始时剂量较高,肿瘤生长会更显著地减少。

[0410] 在另一项实验中,将MNC2-MMAE施用于雌性nu/nu(NSG)小鼠,这些小鼠植入了0.5M HPAF II-wt胰腺癌细胞,这些细胞表达低至中等水平的MUC1*,表明是早期癌症,或植入了0.5M HPAF II-MUC1*胰腺癌细胞,这些细胞经过工程化以表达高水平MUC1*,表明是晚期癌症。允许肿瘤植入五(5)天,然后在第5天、第12天和第19天以10mg/kg的剂量注射三(3)次MNC2-MMAE。首先,测试植入了HPAF II-wt肿瘤的小鼠,这些肿瘤表达低水平的MUC1*。将图61A中的对照小鼠与图61B中的MNC2-MMAE治疗小鼠进行比较,可以很容易地看到在第18天治疗小鼠的肿瘤比对照小鼠小。IVIS仪器在第25天出现故障,导致对照动物的读数人为降低。为此,在第25天也进行了卡尺测量。从图61H中可以看出,用卡尺测量的平均肿瘤体积在对照动物和植入了HPAF II-wt肿瘤的治疗动物之间有很大差异。

[0411] 接下来,测试植入了表达高水平的MUC1*的T47D-MUC1*肿瘤的小鼠。比较植入T47D-wt的对照动物(图57A和图57E)与植入T47D-MUC1*的动物(图57C和图57F)的生物发光,T47D-MUC1*系表达的荧光素酶略少于T47D-wt细胞系。然而,对肿瘤的目视检查显示两种细胞系之间的肿瘤大小相当。携带T47D-MUC1*肿瘤的动物按照与携带T47D-wt肿瘤的动物相同的时间表进行MNC2-MMAE给药。然而,查看图57D可以清楚地看出,MNC2-MMAE治疗的动物从第34天到第56天实验结束时都没有肿瘤,实验结束是因为对照小鼠的肿瘤负荷过重并且必须处死。

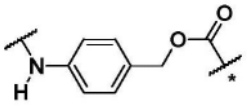
[0412] 实施方案

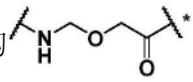
[0413] 实施方案1。一种式(I)的缀合物:[Ab]-[Z-L-R-X]$_y$式(I),其中:X是衍生自能够抑制拓扑异构酶I的化合物或能够抑制微管蛋白形成的化合物的部分;R是偶联部分;L是具有结合至N末端的Z和结合至C末端的R的二肽、三肽或四肽连接部分;[Ab]是包含抗MUC1*结合结构域的抗体,该抗MUC1*结合结构域包含三个重链(HC)互补决定区(CDR):MUC1*HC-CDR1、MUC1*HC-CDR2和MUC1*HC-CDR3;其中MUC1*结合结构域的MUC1*HC-CDR1、MUC1*HC-CDR2和MUC1*HC-CDR3包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列;其中MUC1*结合结构域包含三个轻链(LC)互补决定区(CDR):MUC1*LC-CDR1、MUC1*LC-CDR2和MUC1*LC-CDR3;其中MUC1*结合结构域的MUC1*LC-CDR1、MUC1*LC-CDR2和MUC1*LC-CDR3包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列;Z是能够与半胱氨酸残基的硫原子形成共价键的缀合部分;并且其中y是1至10的整数。

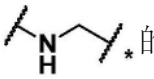
[0414] 实施方案2。实施方案1的缀合物,其中L包括缬氨酸和瓜氨酸。

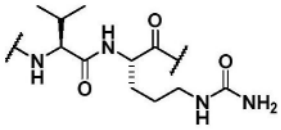
[0415] 实施方案3。实施方案1的缀合物,其中L包括甘氨酸和苯丙氨酸。

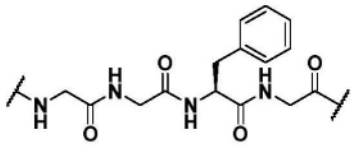
[0416] 实施方案4。实施方案1的缀合物,其中R包括对氨基苄基。

[0417] 实施方案5。实施方案1的缀合物,其中R包括包含结构  的部分,其中*表示X基团的附着点。

[0418] 实施方案6。实施方案1的缀合物,其中R包括包含结构  的部分,其中*表示X基团的附着点。

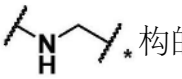
[0419] 实施方案7。实施方案1的缀合物,其中R包括包含结构  的部分,其中*表示X基团的附着点

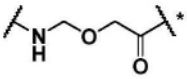
[0420] 实施方案8。实施方案1的缀合物,其中L是包含结构  的二肽连接部分。

[0421] 实施方案9。实施方案1的缀合物,其中L是包含结构  的四肽连接部分。

[0422] 实施方案10。实施方案1的缀合物,其中X是MMAE或MMAF。

[0423] 实施方案11。实施方案1的缀合物,其中X是依沙替康或Dxd

[0424] 实施方案12。实施方案1的缀合物,其中R包含具有结  构的部分,其中*表示X基团的附着点,并且其中X为Dxd。

[0425] 实施方案13。实施方案1的缀合物,其中R包括包含结构  的部分,其中*表示X基团的附着点,并且其中X是依沙替康。

[0426] 实施方案14。实施方案1的缀合物,其中抗体是同种型IgG1或IgG2。

[0427] 实施方案15。实施方案1的缀合物,其中抗体是同种型IgG2b。

[0428] 实施方案16。实施方案1的缀合物,其中抗MUC1*结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:38或44的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链。

[0429] 实施方案17。实施方案1的缀合物,其中抗MUC1*结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:39或45的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变结构域。

[0430] 实施方案18。实施方案1的缀合物,其中抗MUC1*结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:41或47的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻

链。

[0431] 实施方案19。实施方案1的缀合物,其中抗MUC1*结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:42或48的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的序列的轻链可变结构域。

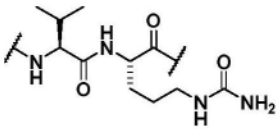
[0432] 实施方案20。实施方案1的缀合物,其中抗MUC1*结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:129或130的氨基酸序列具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的单链可变片段(scFv)。

[0433] 实施方案21。一种包括包含抗MUC1*结合结构域的抗体的抗体缀合物,其中抗体通过马来酰亚胺-半胱氨酸键缀合至有效载荷,其中有效载荷包括接头和细胞毒性化合物,其中细胞毒性化合物包括微管蛋白抑制剂或拓扑异构酶I抑制剂。

[0434] 实施方案22。实施方案21的抗体缀合物,其中接头包含缬氨酸。

[0435] 实施方案23。实施方案21的抗体缀合物,其中接头包含瓜氨酸。

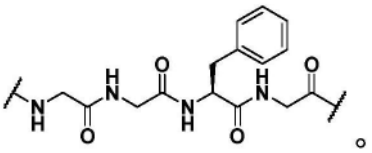
[0436] 实施方案24。实施方案21的抗体缀合物,其中接头包含缬氨酸和瓜氨酸。

[0437] 实施方案25。实施方案21的抗体缀合物,其中接头是包含结构 

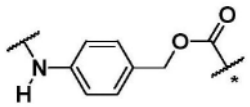
的二肽连接部分。

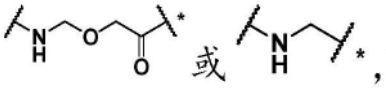
[0438] 实施方案26。实施方案21的抗体缀合物,其中接头包含至少一个甘氨酸。

[0439] 实施方案27。实施方案21的抗体缀合物,其中接头包含至少一个甘氨酸和苯丙氨酸。

[0440] 实施方案28。实施方案21的抗体缀合物,其中接头包含结构  。

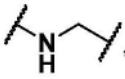
[0441] 实施方案29。实施方案21的抗体缀合物,其中接头包含对氨基苄基。

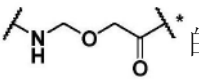
[0442] 实施方案30。实施方案21的抗体缀合物,其中接头包含结构基团  ,其中*表示细胞毒性基团的附着点。

[0443] 实施方案31。实施方案21的抗体缀合物,其中接头包含结构基团  ,其中*表示细胞毒性基团的附着点。

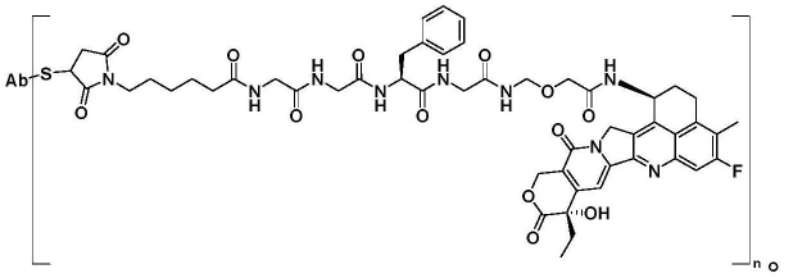
[0444] 实施方案32。实施方案21的抗体缀合物,其中微管蛋白抑制剂是MMAE或MMAF。

[0445] 实施方案33。实施方案21的抗体缀合物,其中拓扑异构酶I抑制剂是依沙替康或德鲁替康,或其衍生物。

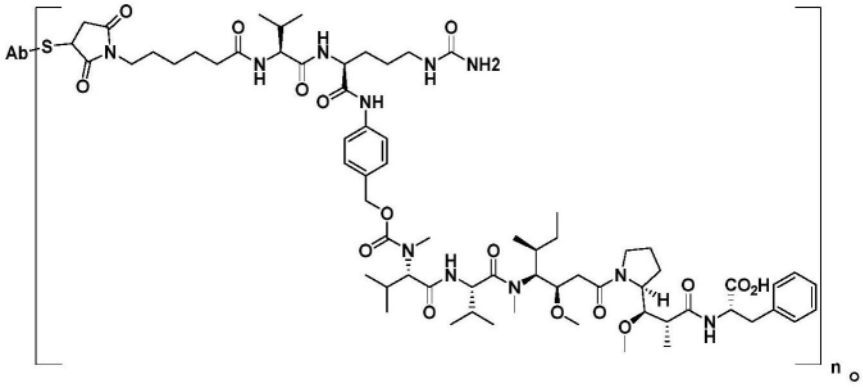
[0446] 实施方案34。实施方案21的抗体缀合物,其中接头包括包含结构  的基团,其中*表示细胞毒性基团的附着点,并且其中拓扑异构酶I抑制剂是Dxd。

[0447] 实施方案35。实施方案21的抗体缀合物,其中接头包括包含结构  的基团,其中*表示细胞毒性基团的附着点,并且其中拓扑异构酶I抑制剂是依沙替康。

[0448] 实施方案36。实施方案21的抗体缀合物,包含下面提供的结构,其中n为1至10:



[0449] 实施方案37。实施方案21的抗体缀合物,包含下面提供的结构,其中n为1至10:



[0450] 实施方案38。实施方案21的抗体缀合物,其中抗体同种型是IgG1或IgG2。

[0451] 实施方案39。实施方案21的抗体缀合物,其中抗体同种型是IgG2b。

[0452] 实施方案40。实施方案21的抗体缀合物,其中抗体与至少两个有效载荷缀合。

[0453] 实施方案41。实施方案21的抗体缀合物,其中抗体与至少三个有效载荷缀合。

[0454] 实施方案42。实施方案21的抗体缀合物,其中抗体与至少四个有效载荷缀合。

[0455] 实施方案43。实施方案21的抗体缀合物,其中抗体与至少五个有效载荷缀合。

[0456] 实施方案44。实施方案21的抗体缀合物,其中抗体与至少六个有效载荷缀合。

[0457] 实施方案45。实施方案21的抗体缀合物,其中抗体与至少七个有效载荷缀合。

[0458] 实施方案46。实施方案21的抗体缀合物,其中抗体与至少八个有效载荷缀合。

[0459] 实施方案47。实施方案21的抗体缀合物,其中抗MUC1*结合结构域包含三个轻链(LC)互补决定区(CDR):LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3;其中MUC1*结合结构域的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列;并且其中LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3中的至少一个包含0-2个氨基酸修饰。

[0460] 实施方案48。实施方案21的抗体缀合物,其中抗MUC1*结合结构域包含三个重链(HC)互补决定区(CDR):HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3;其中MUC1*结合结构域的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3包含选自表1中所规定的那些的氨基酸序列;并且其中HC-CDR1、HC-CDR2和

HC-CDR3中的至少一个包含0-2个氨基酸修饰。

[0461] 实施方案49。实施方案21的抗体缀合物,其中抗MUC1*结合结构域包括包含与表2中所规定的序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的重链可变结构域。

[0462] 实施方案50。实施方案21的抗体缀合物,其中抗MUC1*结合结构域包括包含与表2中所规定的序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的轻链可变结构域。

[0463] 实施方案51。实施方案21的抗体缀合物,其中抗MUC1*结合结构域包括包含与表3中所规定的序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的单链可变片段(scFv)。

[0464] 实施方案52。一种包含MUC1*结合结构域和CD3结合结构域的抗体,其中MUC1*结合结构域包含三个重链(HC)互补决定区(CDR):MUC1*HC-CDR1、MUC1*HC-CDR2和MUC1*HC-CDR3;其中MUC1*HC-CDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,MUC1*HC-CDR2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且MUC1*HC-CDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;其中MUC1*结合结构域包含三个轻链(LC)互补决定区(CDR):MUC1*LC-CDR1、MUC1*LC-CDR2和MUC1*LC-CDR3;其中MUC1*LC-CDR1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,MUC1*LC-CDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,并且MUC1*LC-CDR3包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;其中,该CD3结合结构域包含三个重链(HC)互补决定区(CDR):CD3 HC-CDR1、CD3 HC-CDR2和CD3 HC-CDR3;其中,该CD3结合结构域的CD3 HC-CDR1、CD3 HC-CDR2和CD3 HC-CDR3包含选自表2中所规定的氨基酸序列;并且其中,该CD3结合结构域包含三个轻链(LC)互补决定区(CDR):CD3 LC-CDR1、CD3 LC-CDR2和CD3LC-CDR3;其中该CD3结合结构域的CD3 LC-CDR1、CD3 LC-CDR2和CD3 LC-CDR3包含选自表4中所规定的氨基酸序列。

[0465] 实施方案53。实施方案52的抗体,其中抗体包含Fc结构域。

[0466] 实施方案54。实施方案52的抗体,其中Fc结构域是异二聚Fc结构域。

[0467] 实施方案55。实施方案52的抗体,其中异二聚Fc结构域包含杵链和臼链,形成杵臼(KiH)结构。

[0468] 实施方案56。实施方案55的抗体,其中杵链包含与选自SEQ ID NO:121、122、123或124的序列具有至少约95％同一性的序列。

[0469] 实施方案57。实施方案55的抗体,其中臼链包含与选自SEQ ID NO:125、126、127或128的序列具有至少约95％同一性的序列。

[0470] 实施方案58。实施方案52的抗体,其中MUC1*结合结构域包括包含与选自表2的氨基酸序列的序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的重链可变结构域。

[0471] 实施方案59。实施方案52的抗体,其中MUC1*结合结构域包括包含与选自表2的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、

91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的轻链可变结构域。

[0472] 实施方案60。实施方案52的抗体，其中MUC1*结合结构域包括包含与选自表3的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的单链可变片段(scFv)。

[0473] 实施方案61。实施方案52的抗体，其中CD3结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:26或31的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的重链。

[0474] 实施方案62.实施方案52的抗体，其中CD3结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:29或35的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的轻链。

[0475] 实施方案63。实施方案52的抗体，其中CD3结合结构域包括包含与选自SEQ ID NO:131或132的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列的单链可变片段(scFv)。

[0476] 实施方案64。实施方案52的抗体，包含与选自SEQ ID NO:50、52、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90、94、98、102、106、110或114的氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。

[0477] 实施方案65。一种治疗癌症的方法，包括向有需要的对象施用实施方案1-64中任一项的抗体或抗体缀合物。

[0478] 实施方案66。实施方案65的方法，其中癌症表达MUC1*。

[0479] 实施方案67。实施方案65的方法，其中癌症是乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、胰腺癌或肺癌。

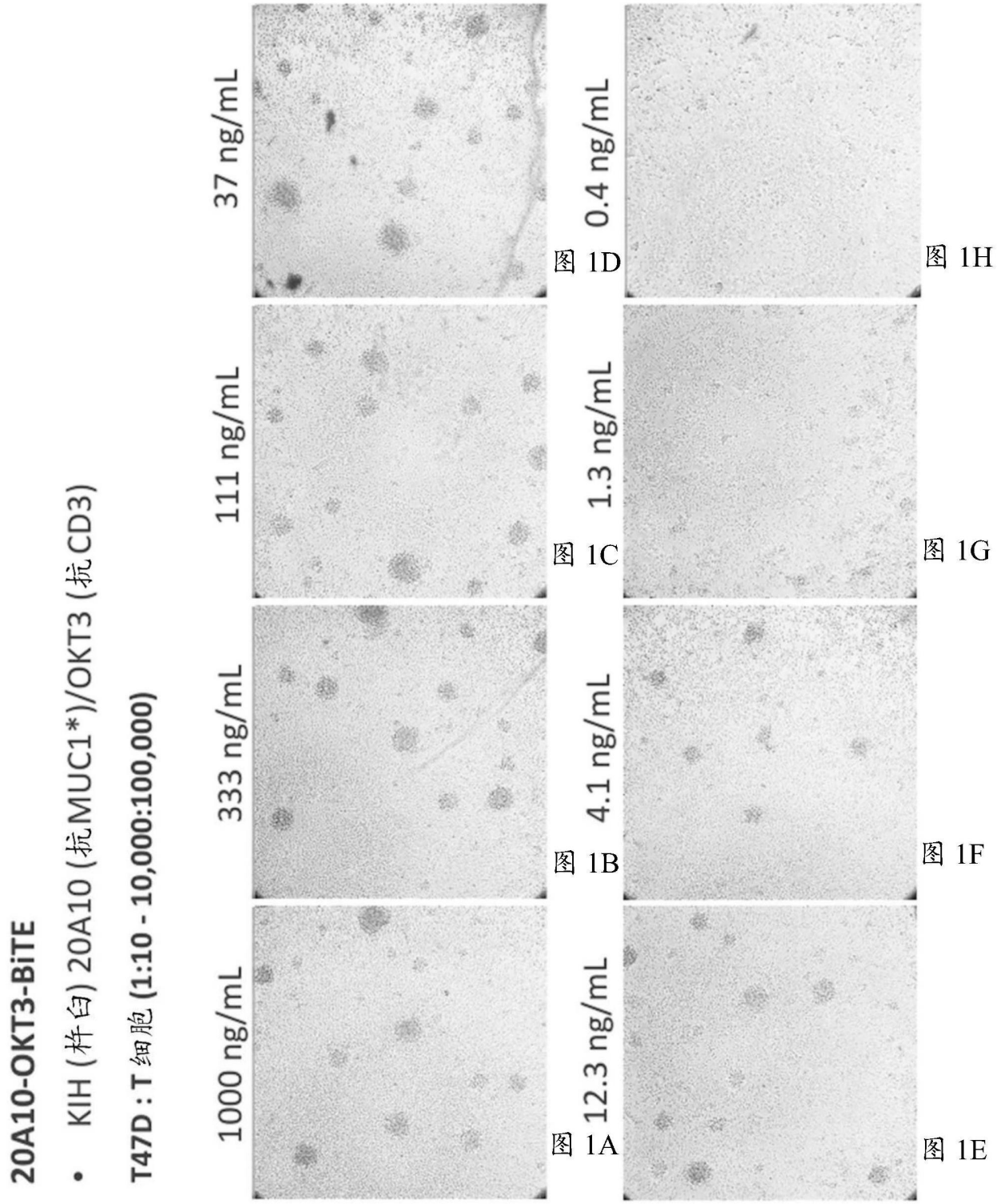


图 1A 图 1B 图 1C 图 1D

图 1E 图 1F 图 1G 图 1H



图 1I

图 1J

图 1K

图 1L

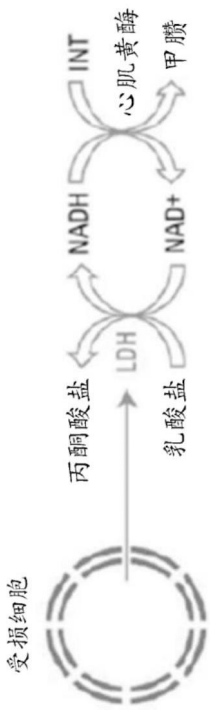


图1M

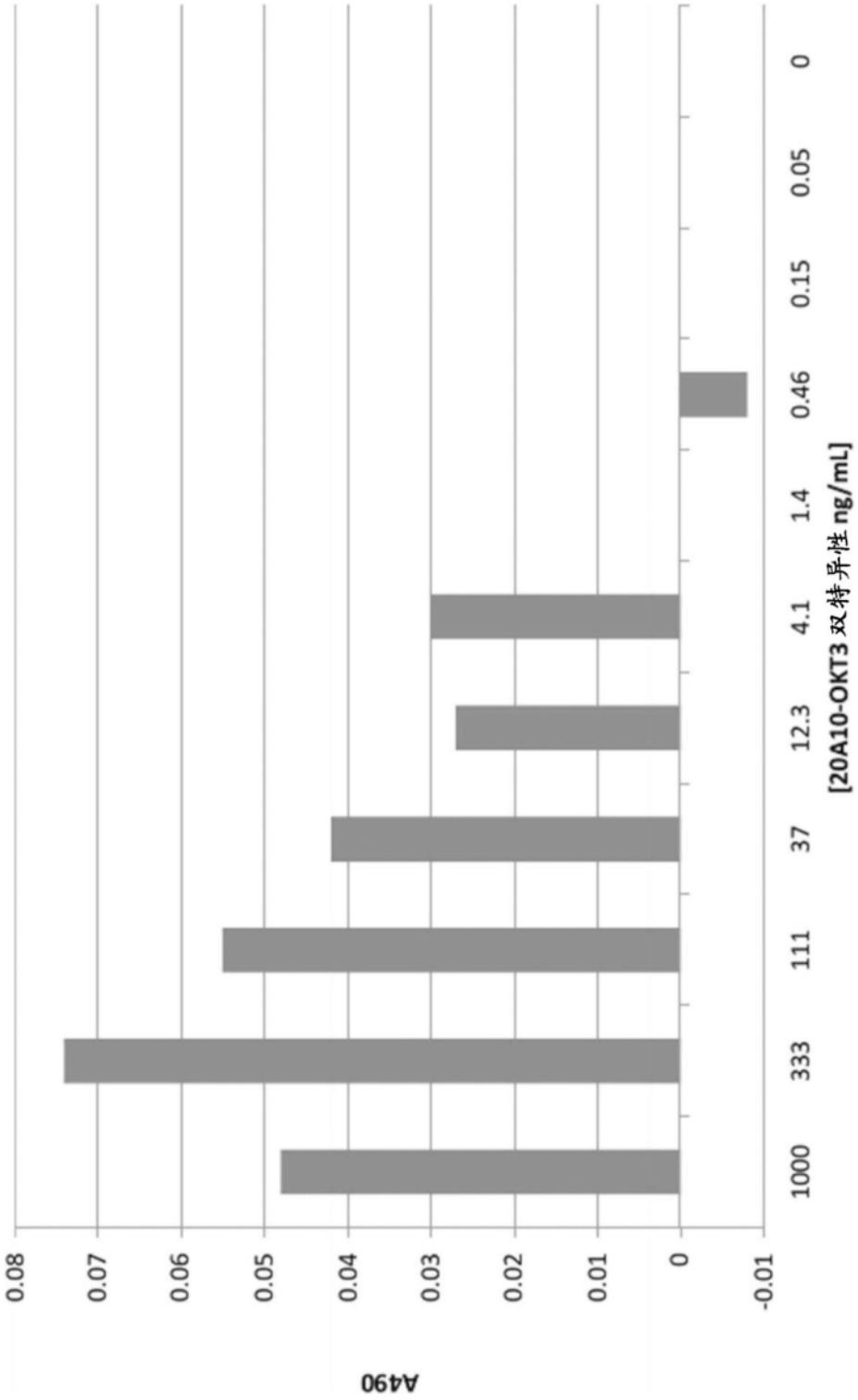

A490
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
-0.01
1000
333
111
37
12.3
4.1
1.4
0.46
0.15
0.05
0
[20A10-OKT3 双特异性 ng/mL]

图1N

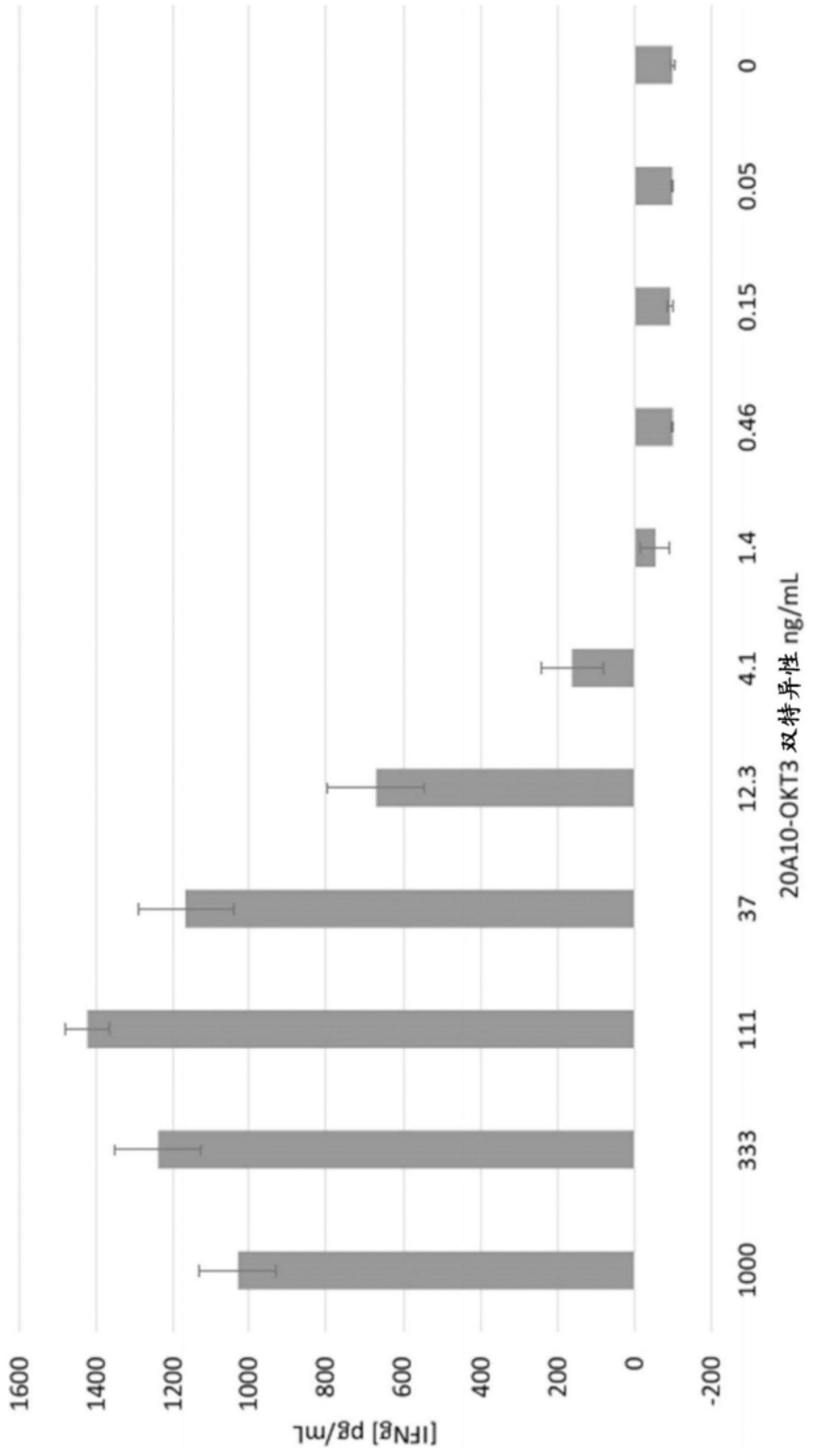

1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
[IFNg] pg/mL
1000
333
111
37
12.3
4.1
1.4
0.46
0.15
0.05
0
20A10-OKT3 双特异性 ng/mL

图10

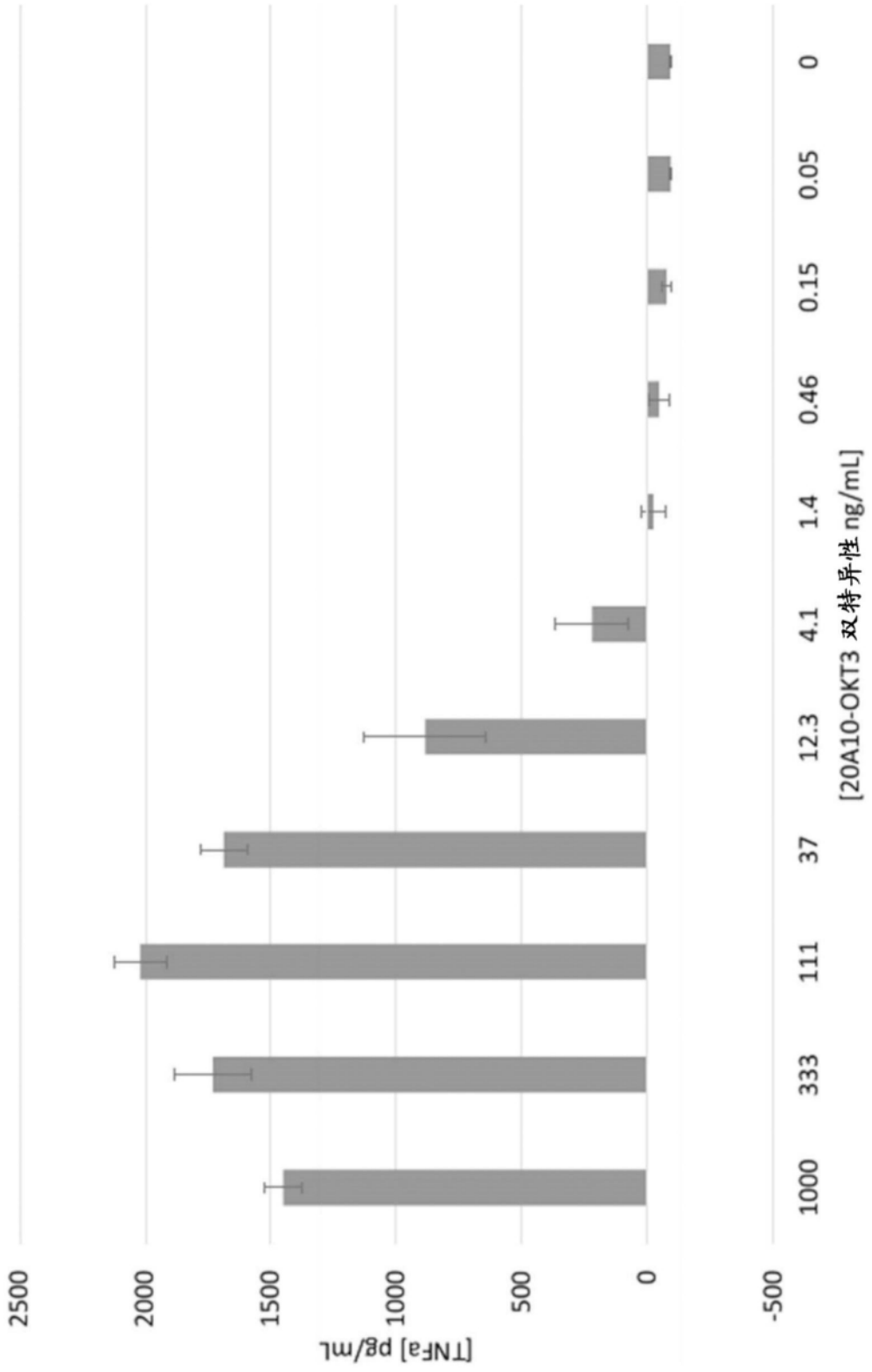

2500
2000
1500
1000
500
0
-500
[TNFa] pg/mL
1000
333
111
37
12.3
4.1
1.4
0.46
0.15
0.05
0
[20A10-OKT3 双特异性 ng/mL]

图1P

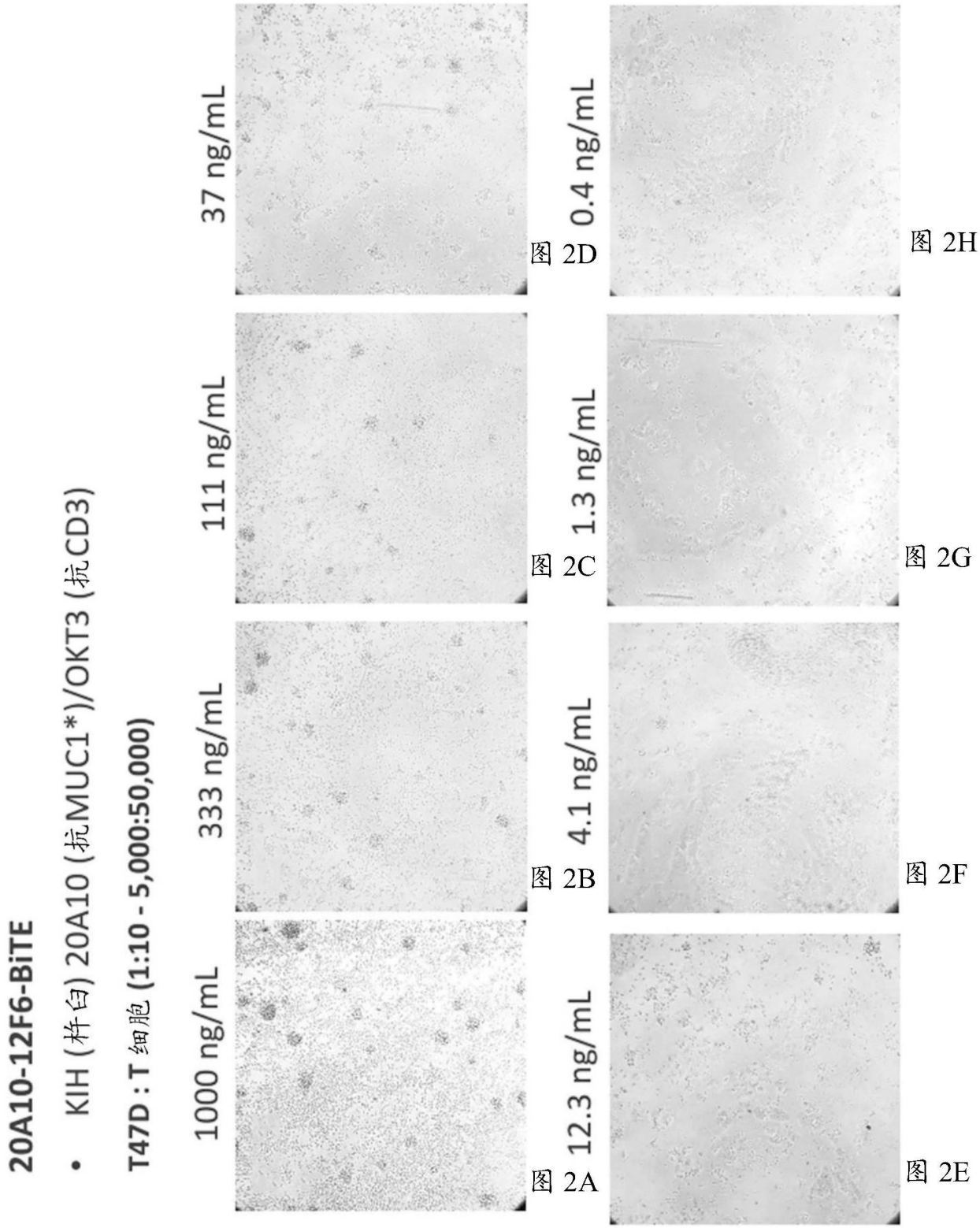


图 2A 图 2B 图 2C 图 2D 图 2E 图 2F 图 2G 图 2H

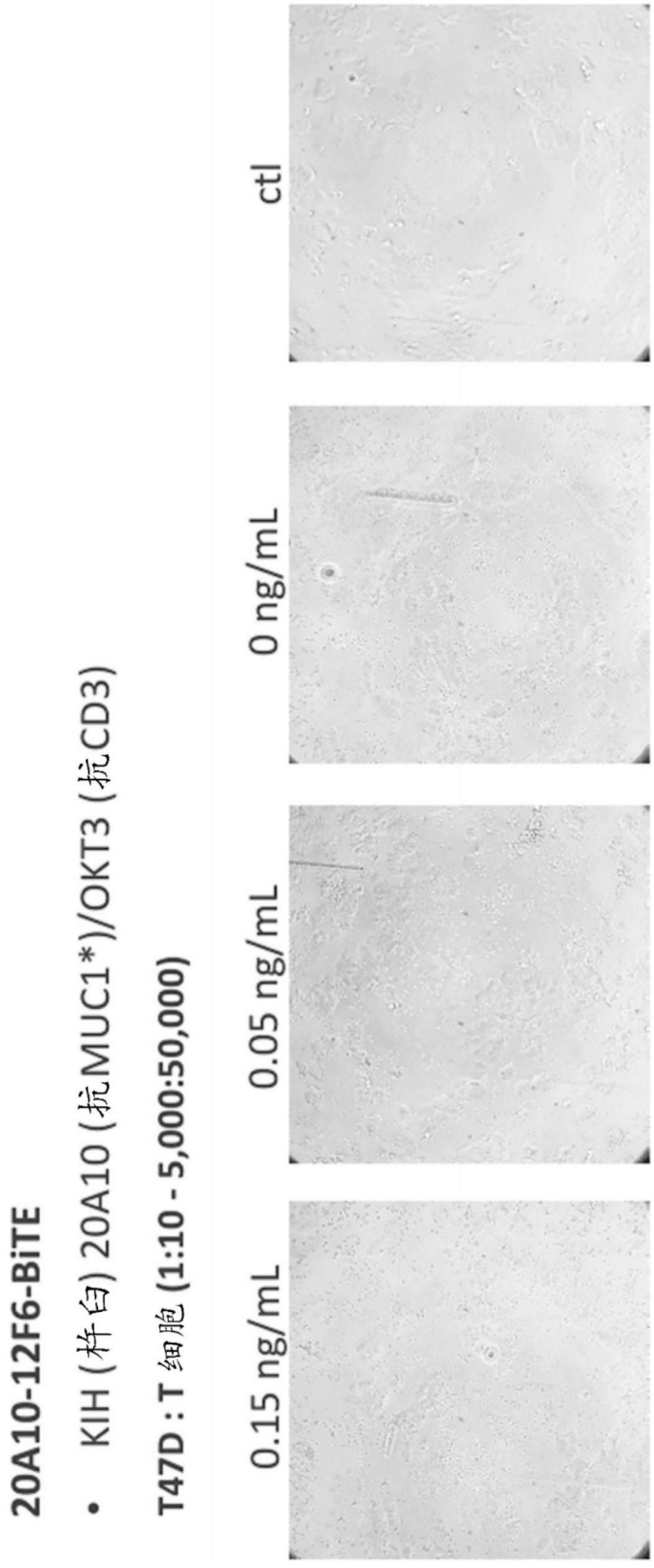


图 2I

图 2J

图 2K

图 2L

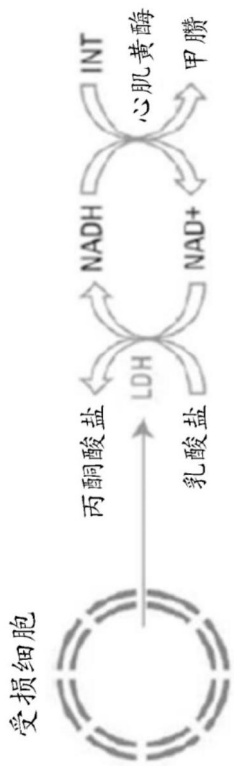


图2M

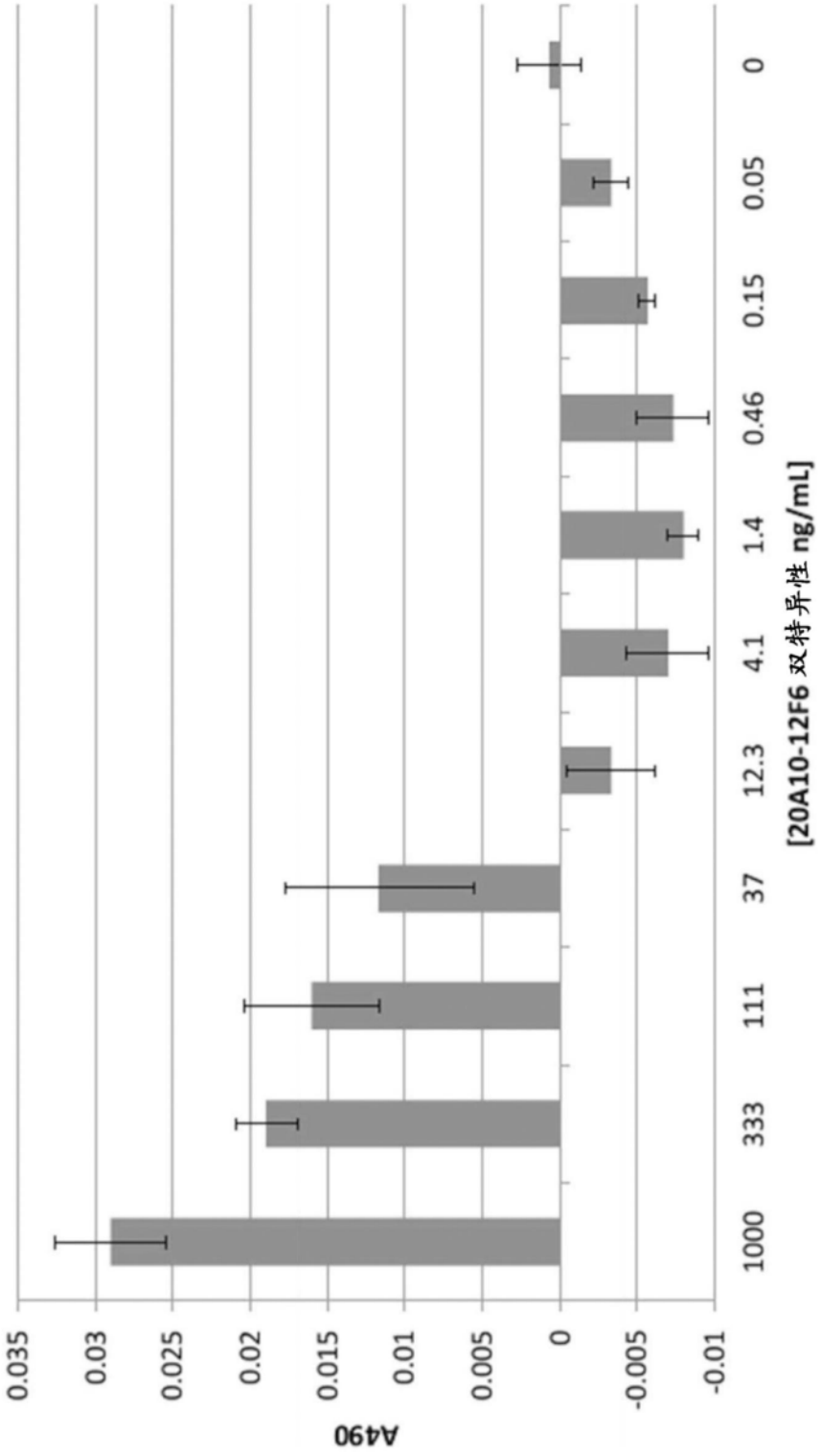

A490
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
-0.005
-0.01
1000
333
111
37
12.3
4.1
1.4
0.46
0.15
0.05
0
[20A10-12F6 双特异性 ng/mL]

图2N

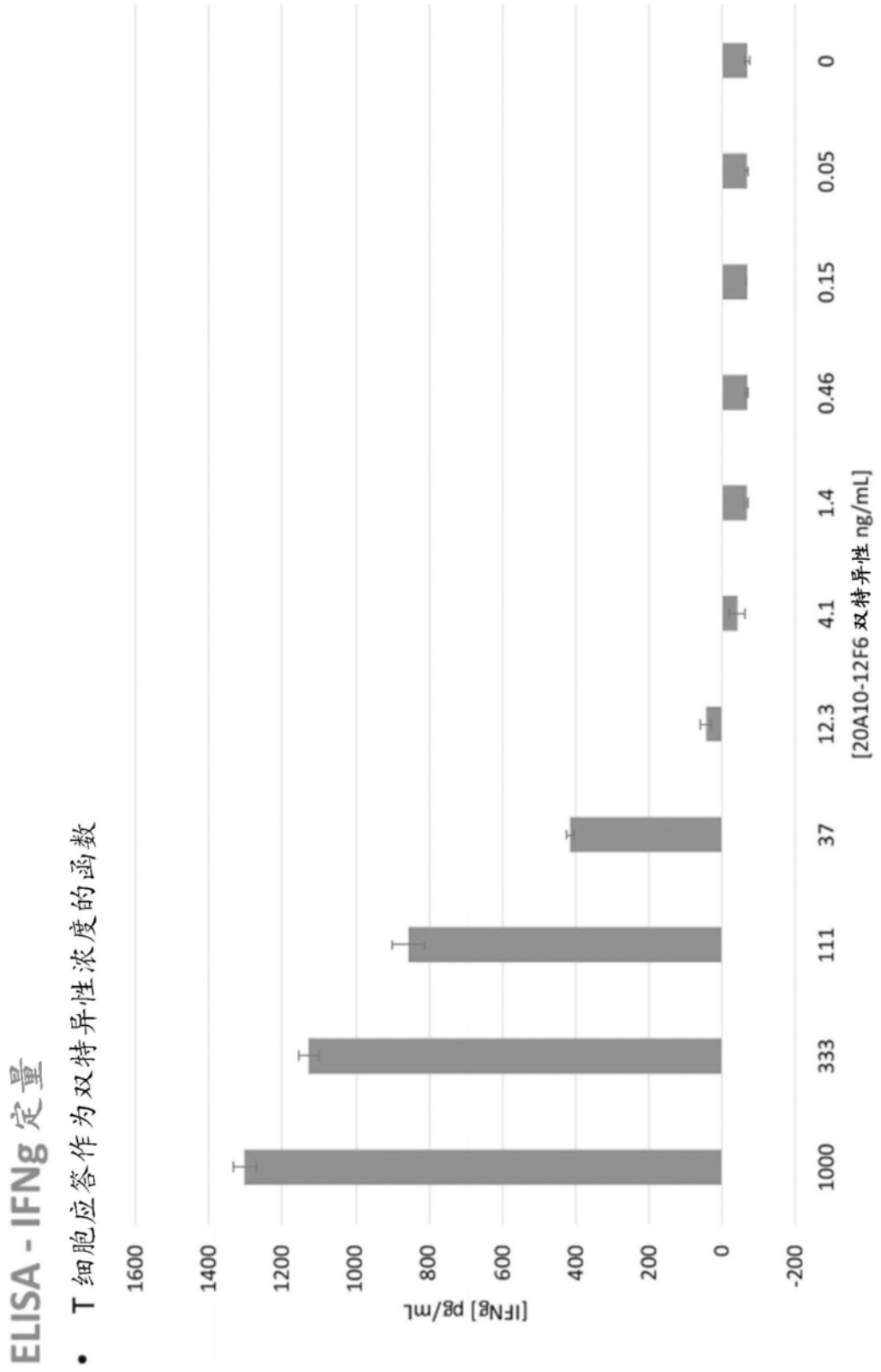

ELISA - IFNg 定量
• T 细胞应答作为双特异性浓度的函数
[IFNg] pg/mL
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
1000
333
111
37
12.3
4.1
1.4
0.46
0.15
0.05
0
[20A10-12F6 双特异性 ng/mL]

图20

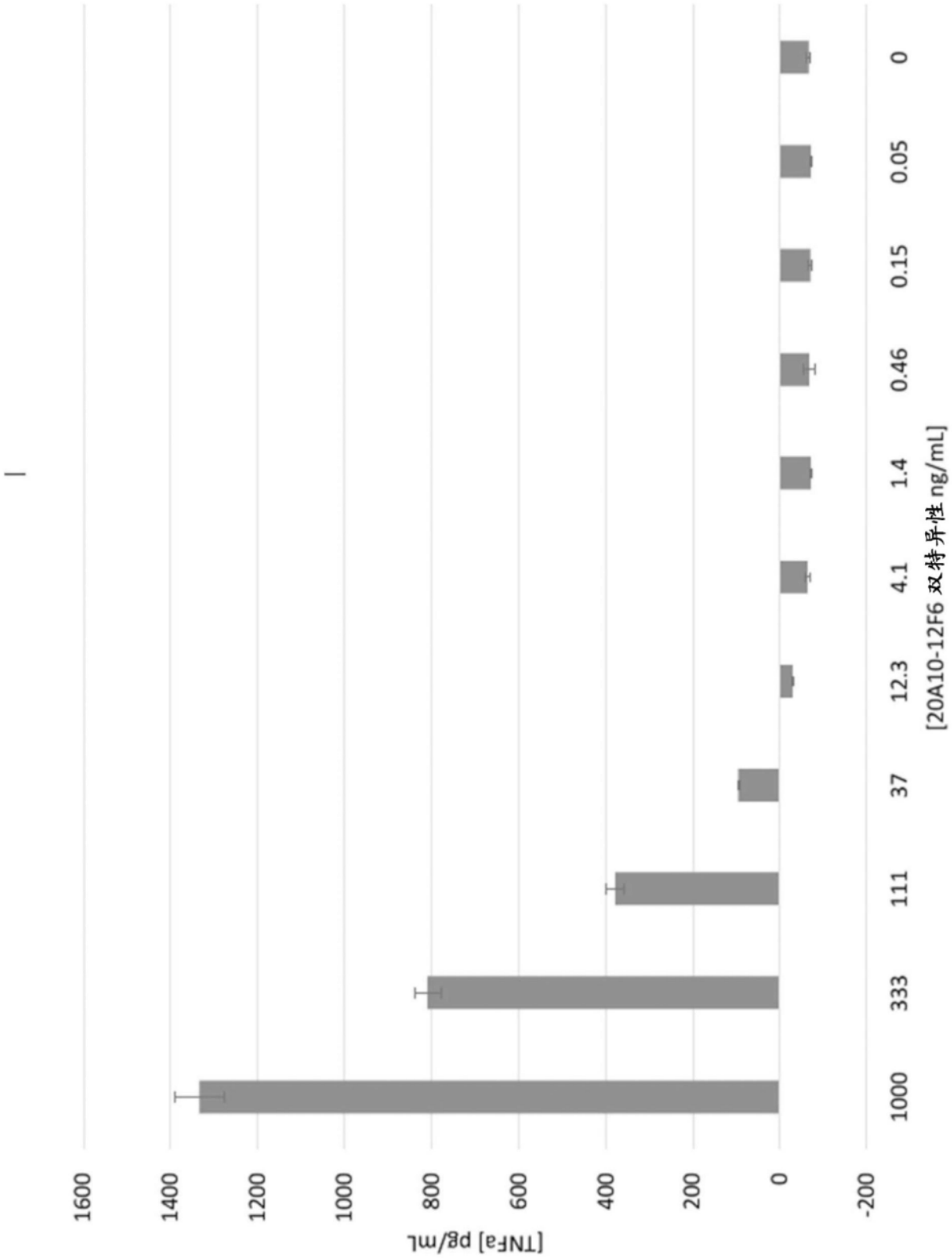

[TNFa] pg/mL
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
1000
333
111
37
12.3
4.1
1.4
0.46
0.15
0.05
0
[20A10-12F6 双特异性 ng/mL]

图2P

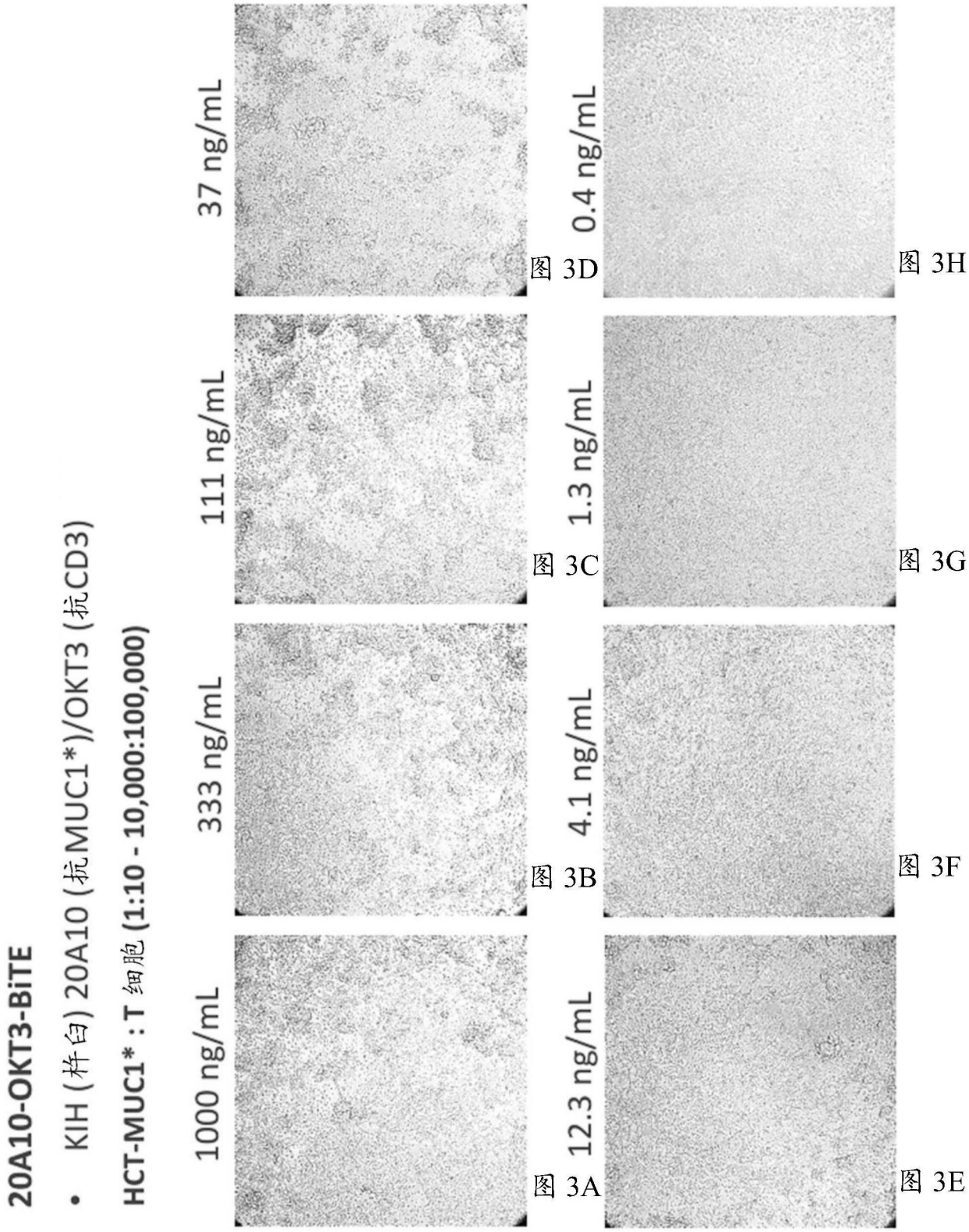


图 3A 图 3B 图 3C 图 3D 图 3E 图 3F 图 3G 图 3H

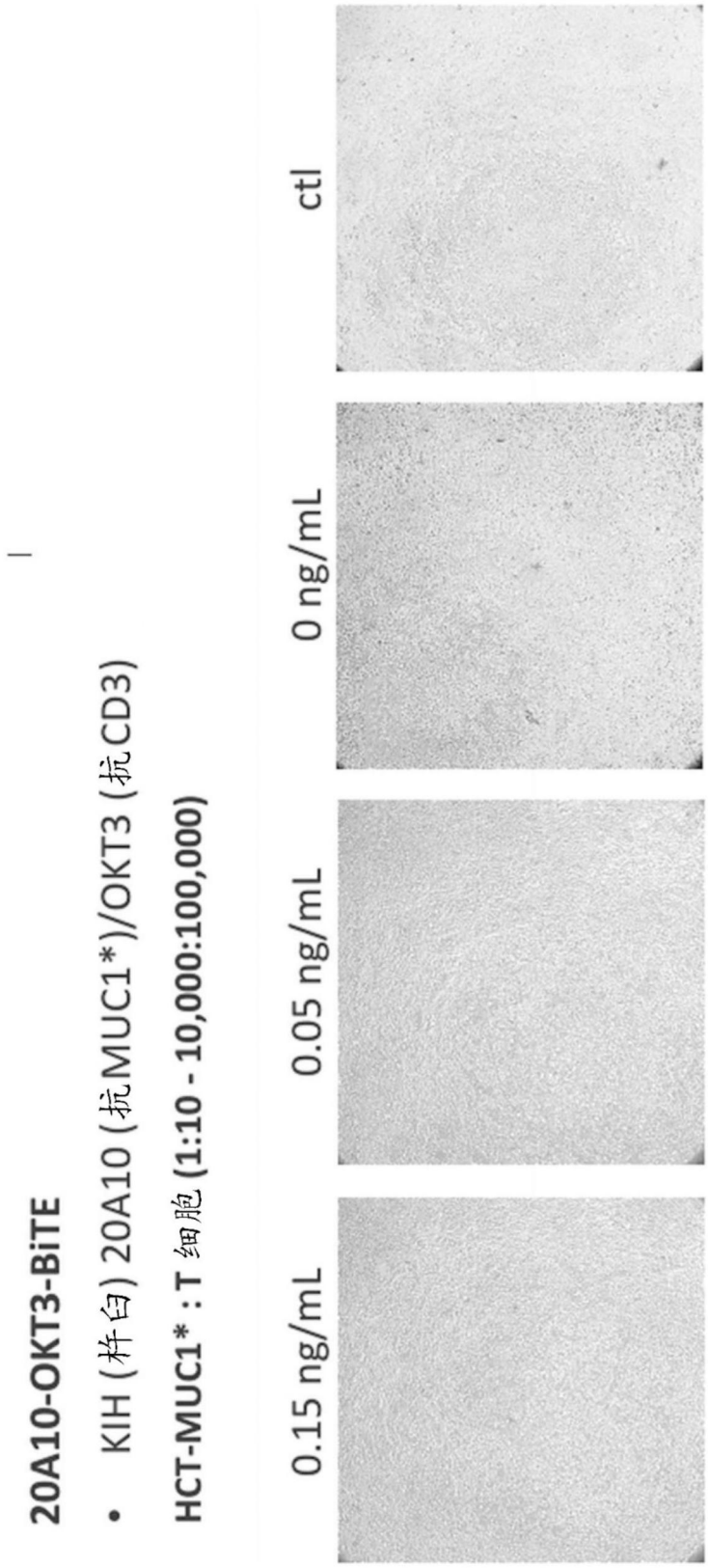


图 3I 图 3J 图 3K 图 3L

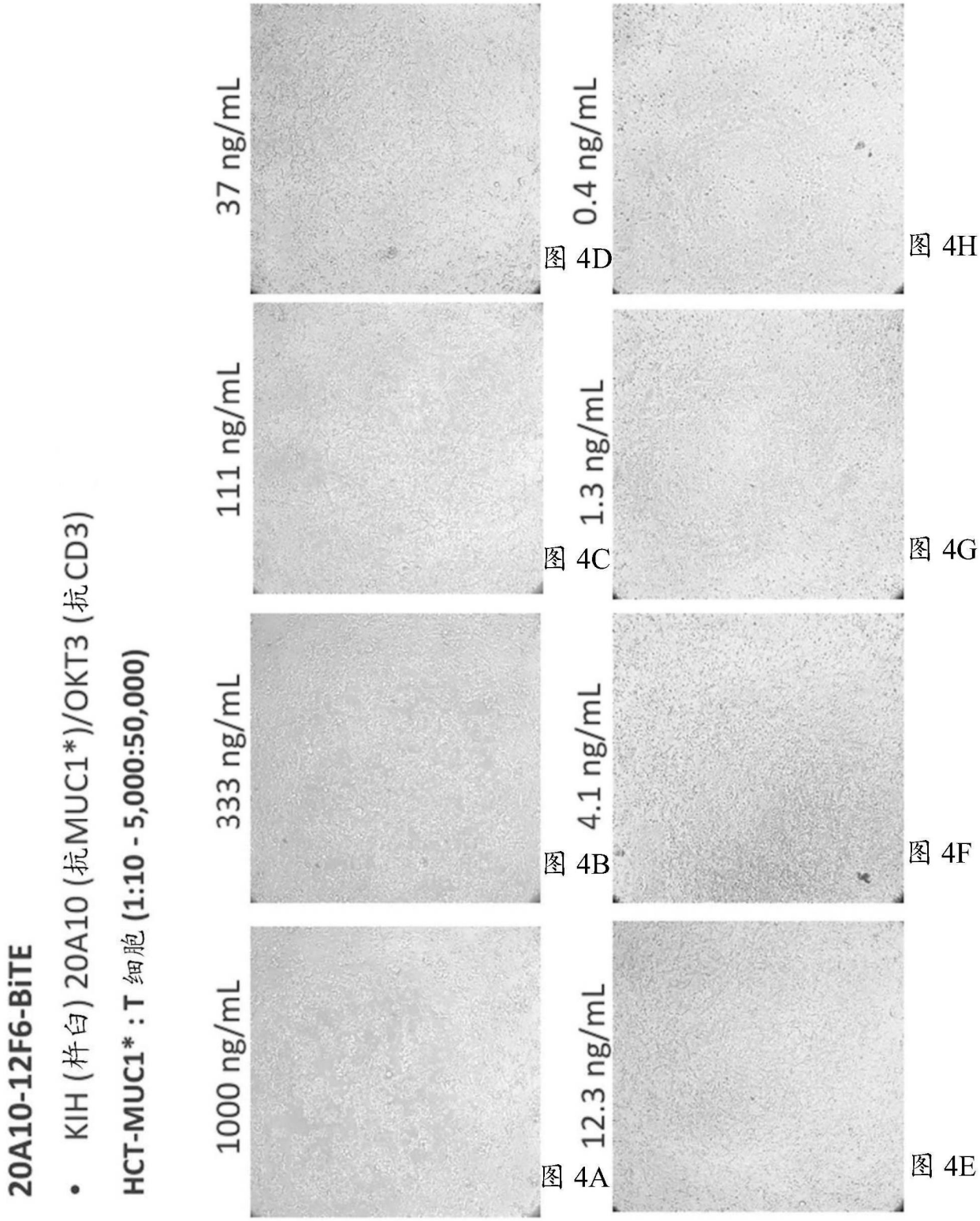


图 4A 图 4B 图 4C 图 4D 图 4E 图 4F 图 4G 图 4H

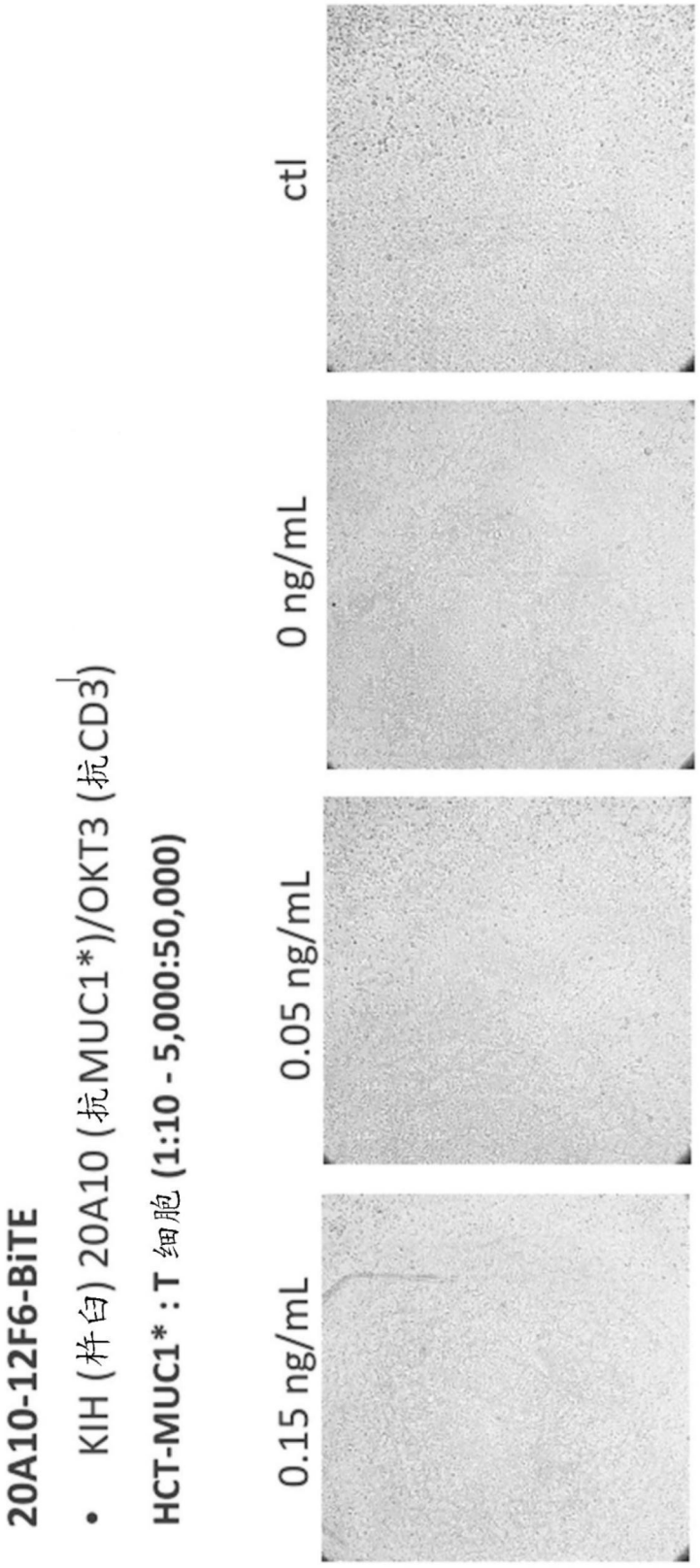


图 4I

图 4J

图 4K

图 4L

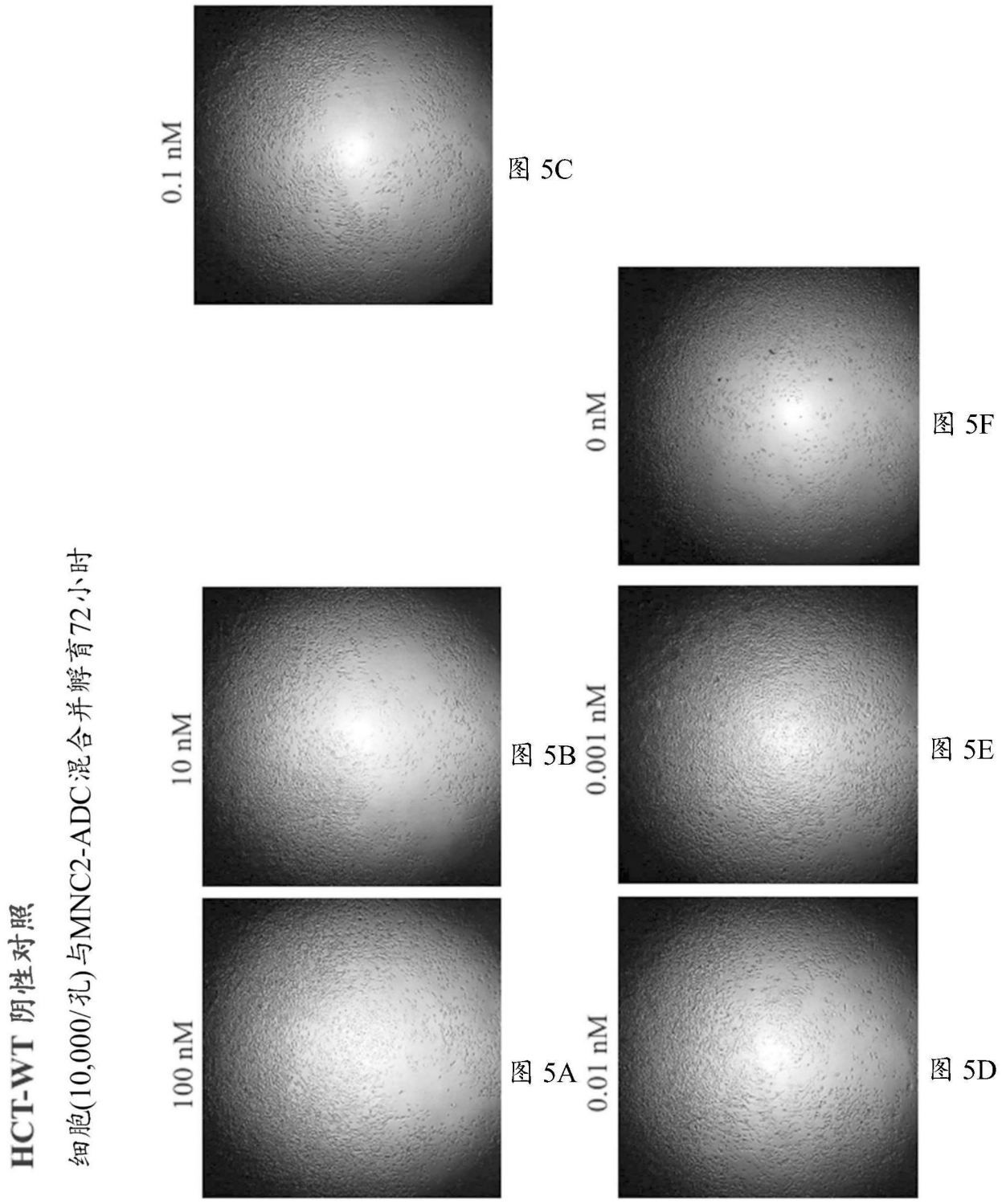
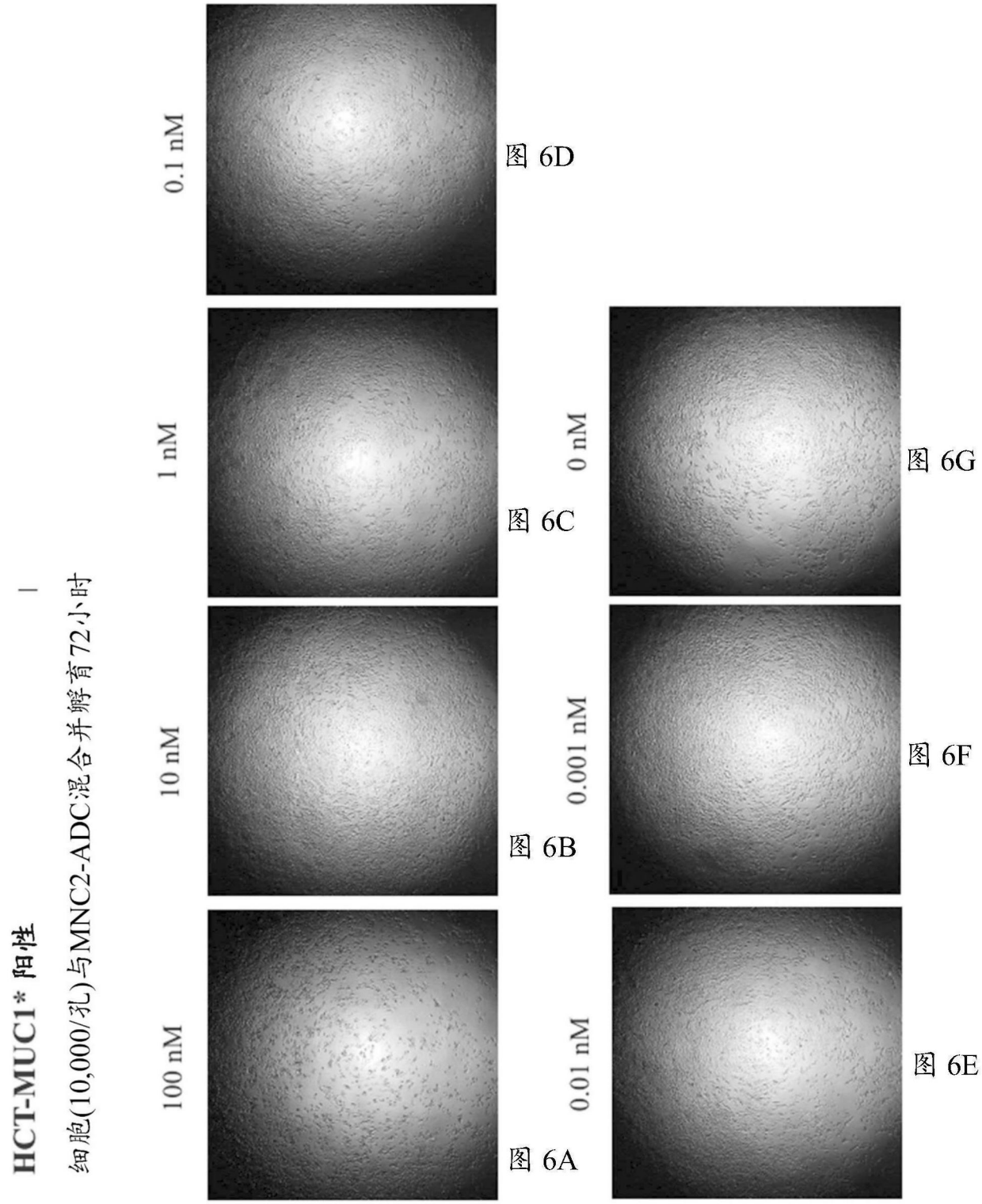
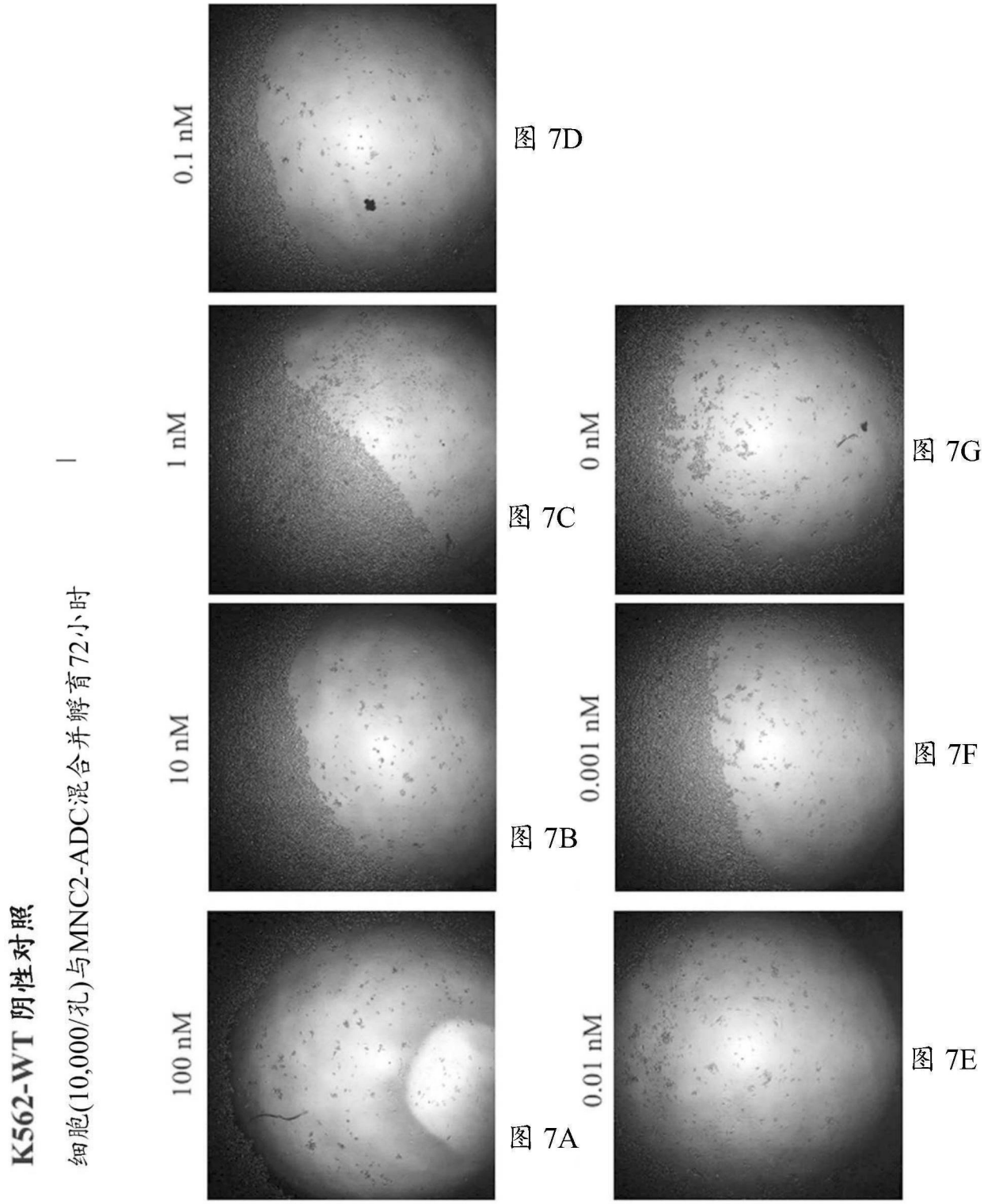
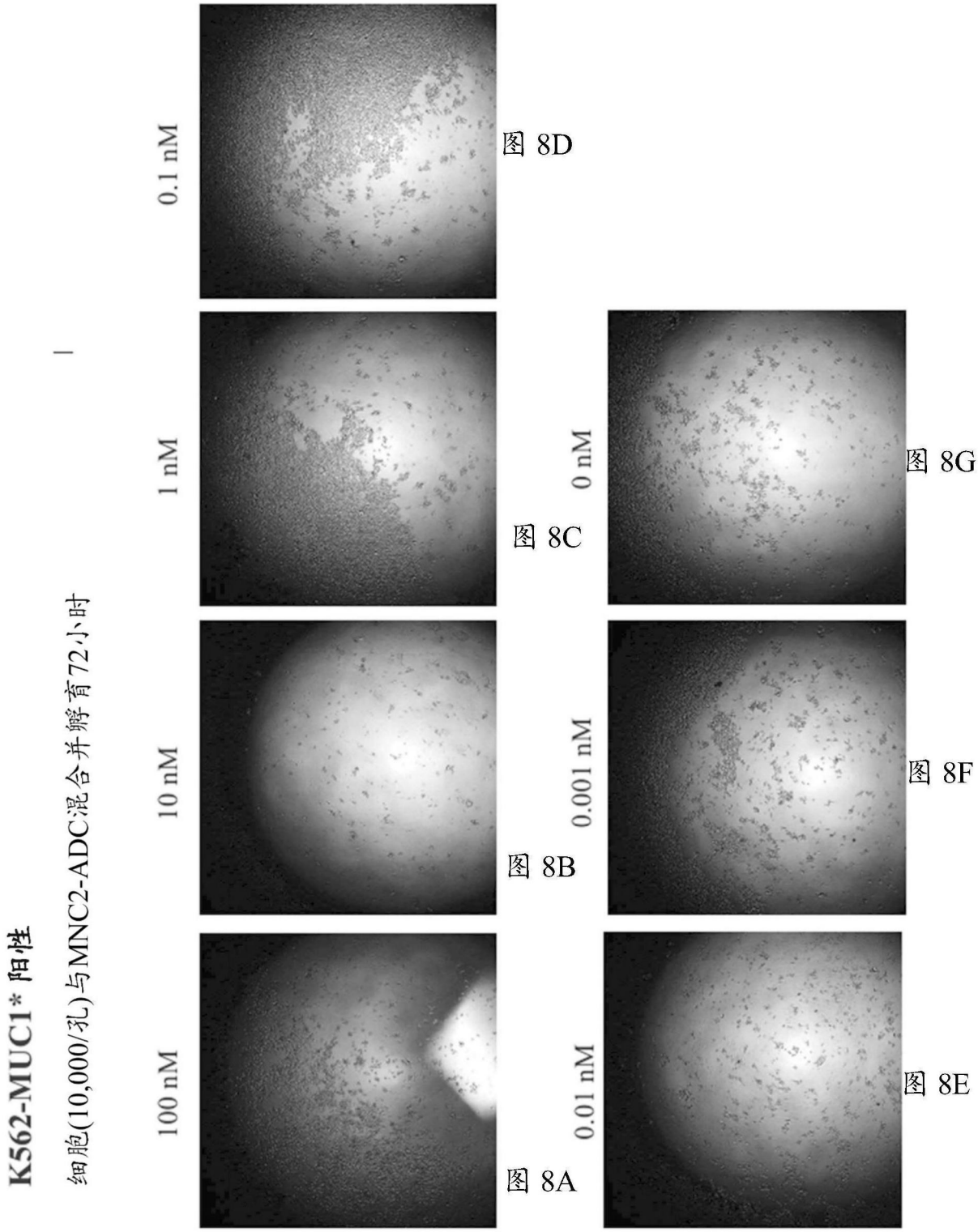


图 5A 图 5B 图 5C 图 5D 图 5E 图 5F


HCT-MUC1* 阳性
细胞(10,000/孔)与MNC2-ADC混合并孵育72小时
100 nM
10 nM
1 nM
0.1 nM
0.01 nM
0.001 nM
0 nM
图 6A
图 6B
图 6C
图 6D
图 6E
图 6F
图 6G


K562-WT 阴性对照
细胞(10,000/孔)与MNC2-ADC混合并孵育72小时
100 nM
10 nM
1 nM
0.1 nM
0.01 nM
0.001 nM
0 nM
图 7A
图 7B
图 7C
图 7D
图 7E
图 7F
图 7G


K562-MUC1* 阳性
细胞(10,000/孔)与MNC2-ADC混合并孵育72小时
100 nM
10 nM
1 nM
0.1 nM
0.01 nM
0.001 nM
0 nM
图 8A
图 8B
图 8C
图 8D
图 8E
图 8F
图 8G

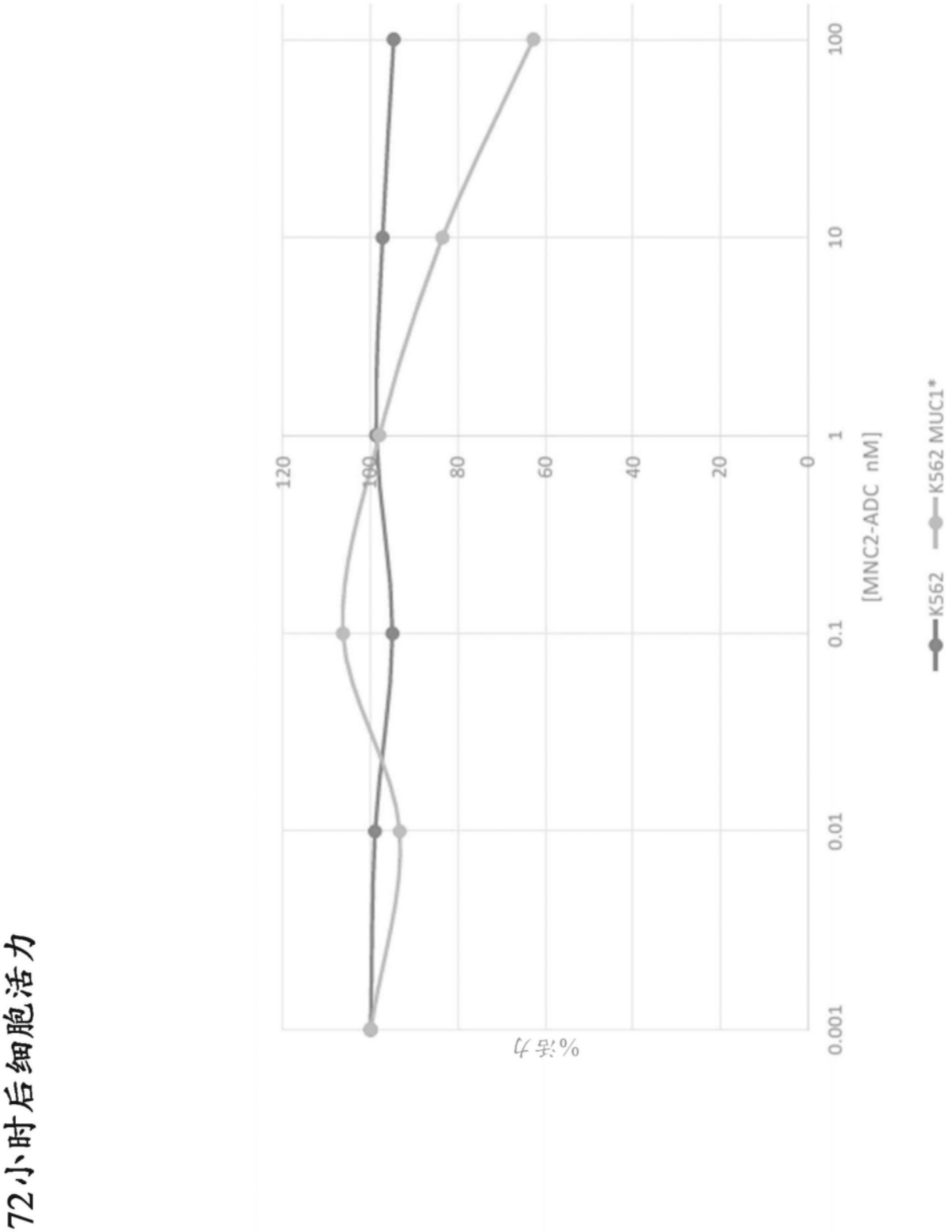

72小时后细胞活力
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[MNC2-ADC nM]
K562
K562 MUC1*

图9A

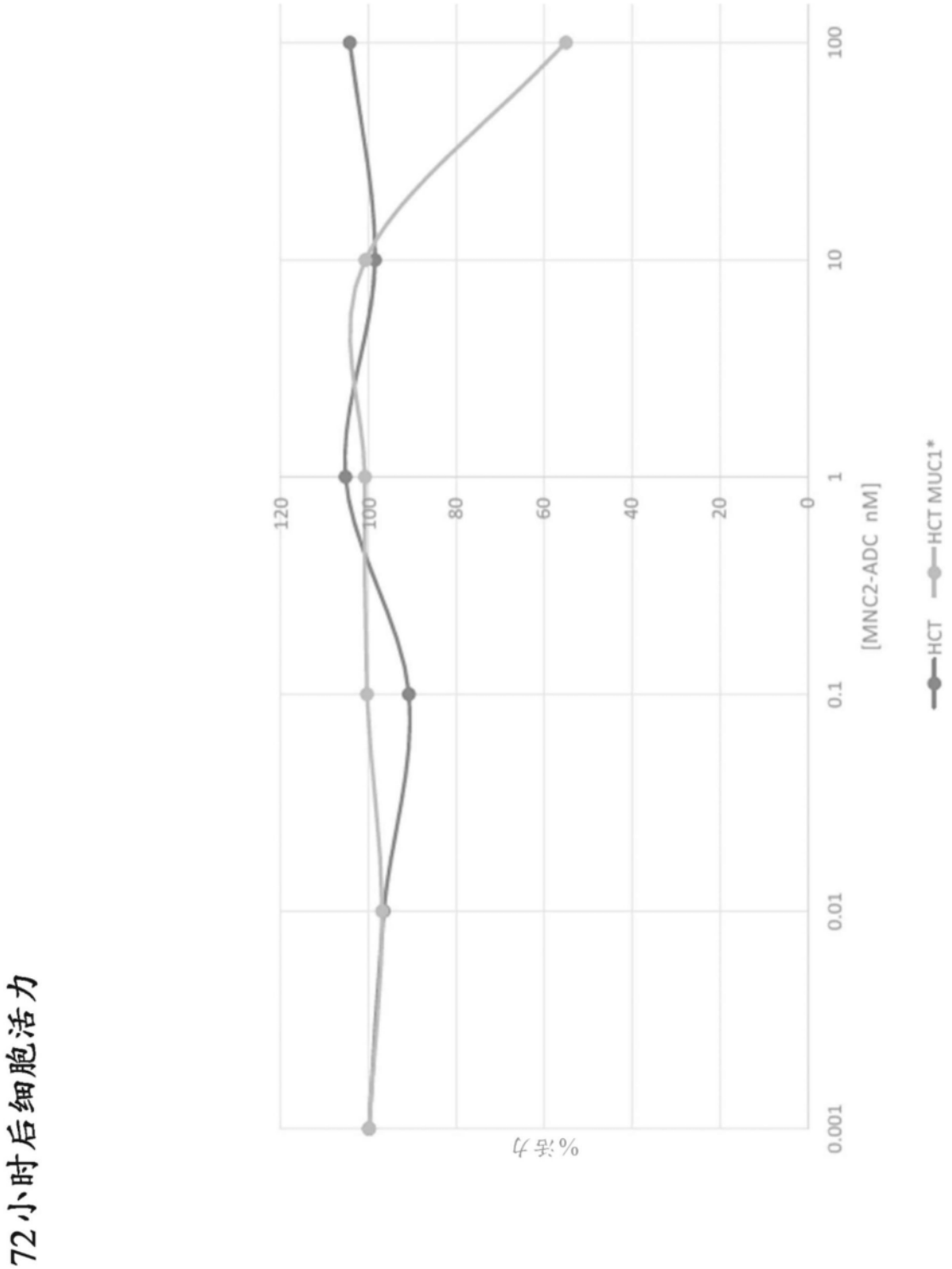

72小时后细胞活力
%活力
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[MNC2-ADC nM]
HCT
HCT MUC1*

图9B

T47D-wt乳腺癌细胞系表达全长MUC1(抗体不识别)和MUC1*(靶)两者

细胞(10,000/孔)与MNC2-ADC混合并孵育72小时

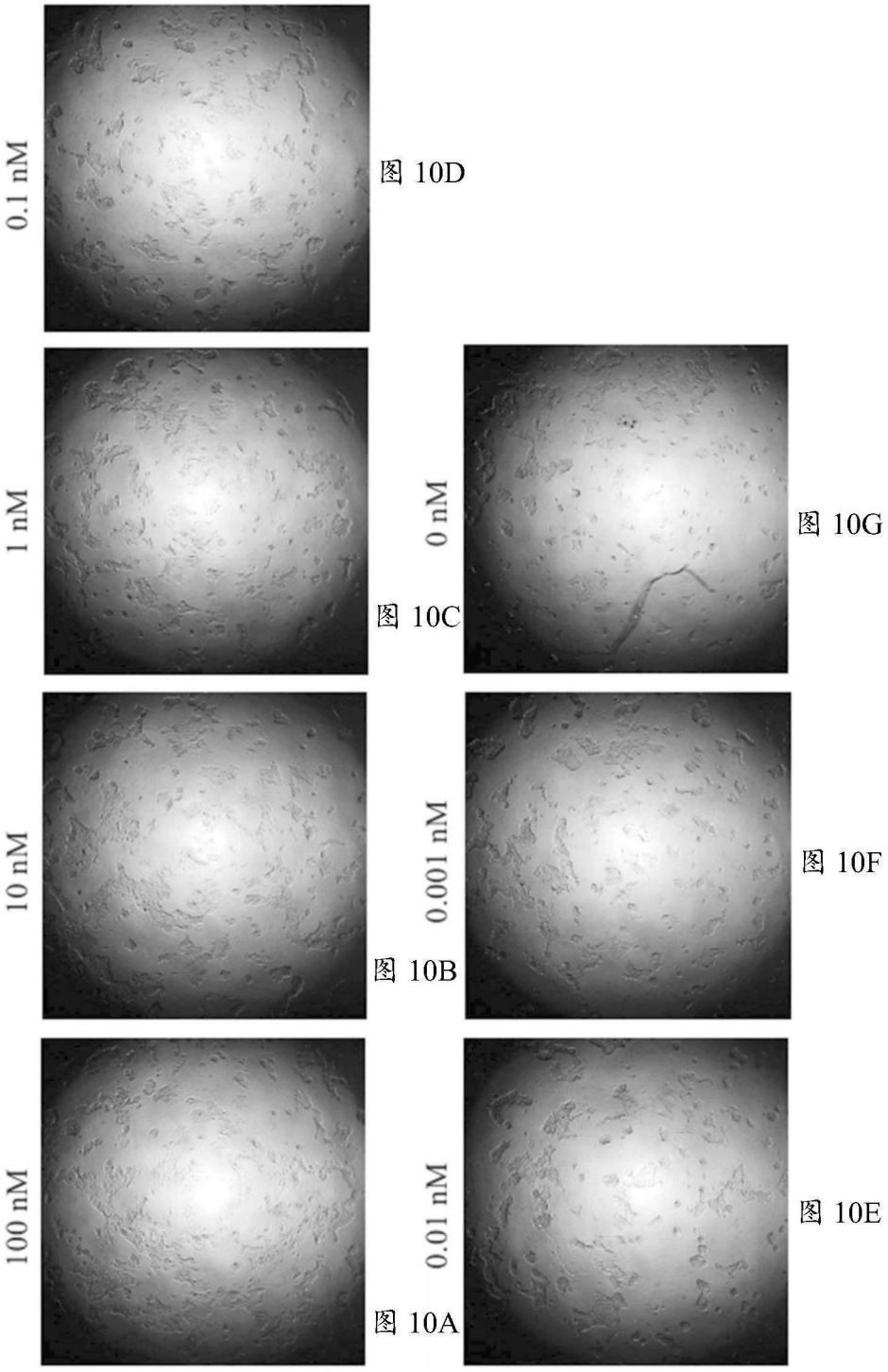
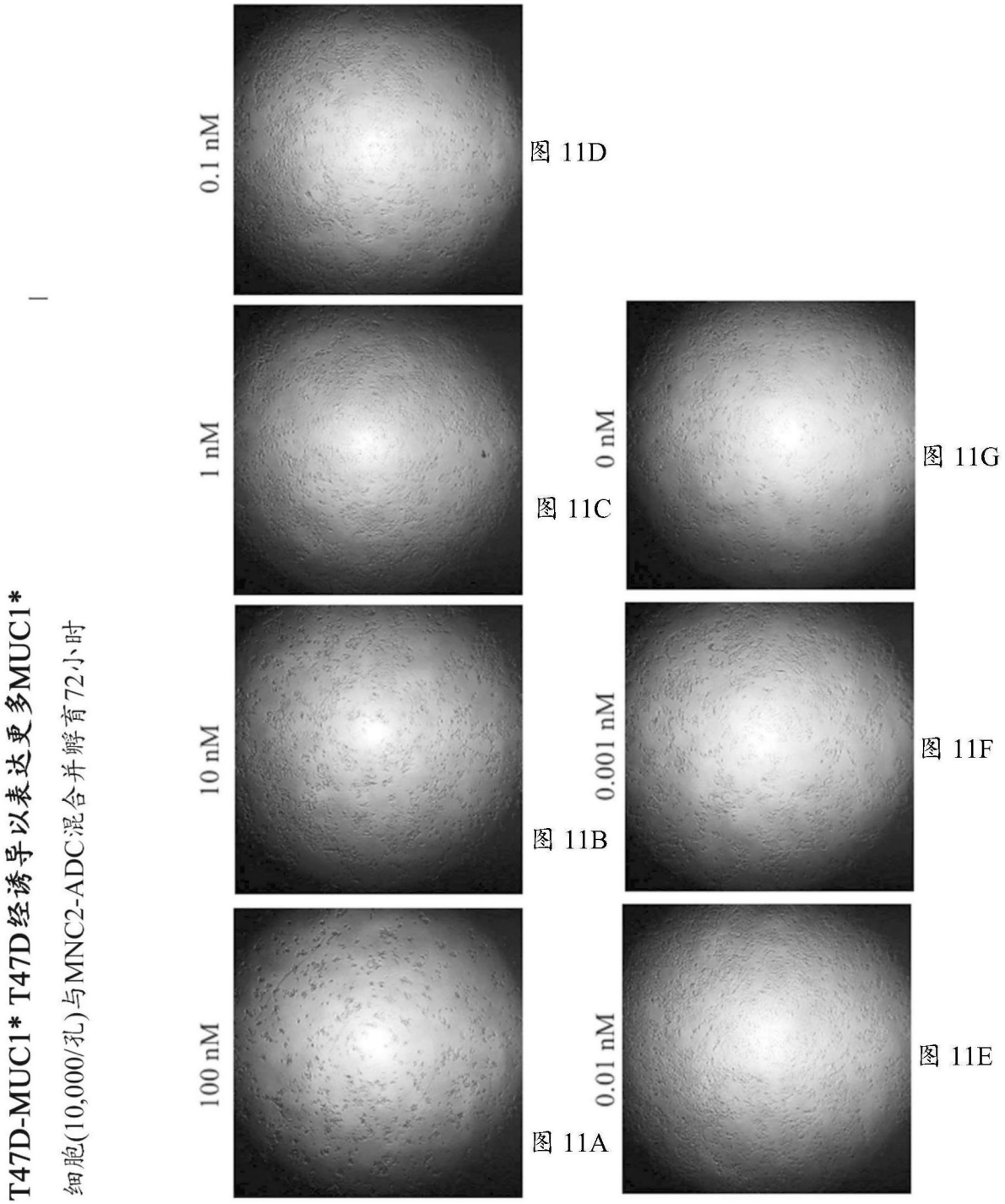


图 10A 图 10B 图 10C 图 10D 图 10E 图 10F 图 10G


T47D-MUC1* T47D经诱导以表达更多MUC1*
细胞(10,000/孔)与MNC2-ADC混合并孵育72小时
100 nM
图 11A
10 nM
图 11B
1 nM
图 11C
0.1 nM
图 11D
0.01 nM
图 11E
0.001 nM
图 11F
0 nM
图 11G

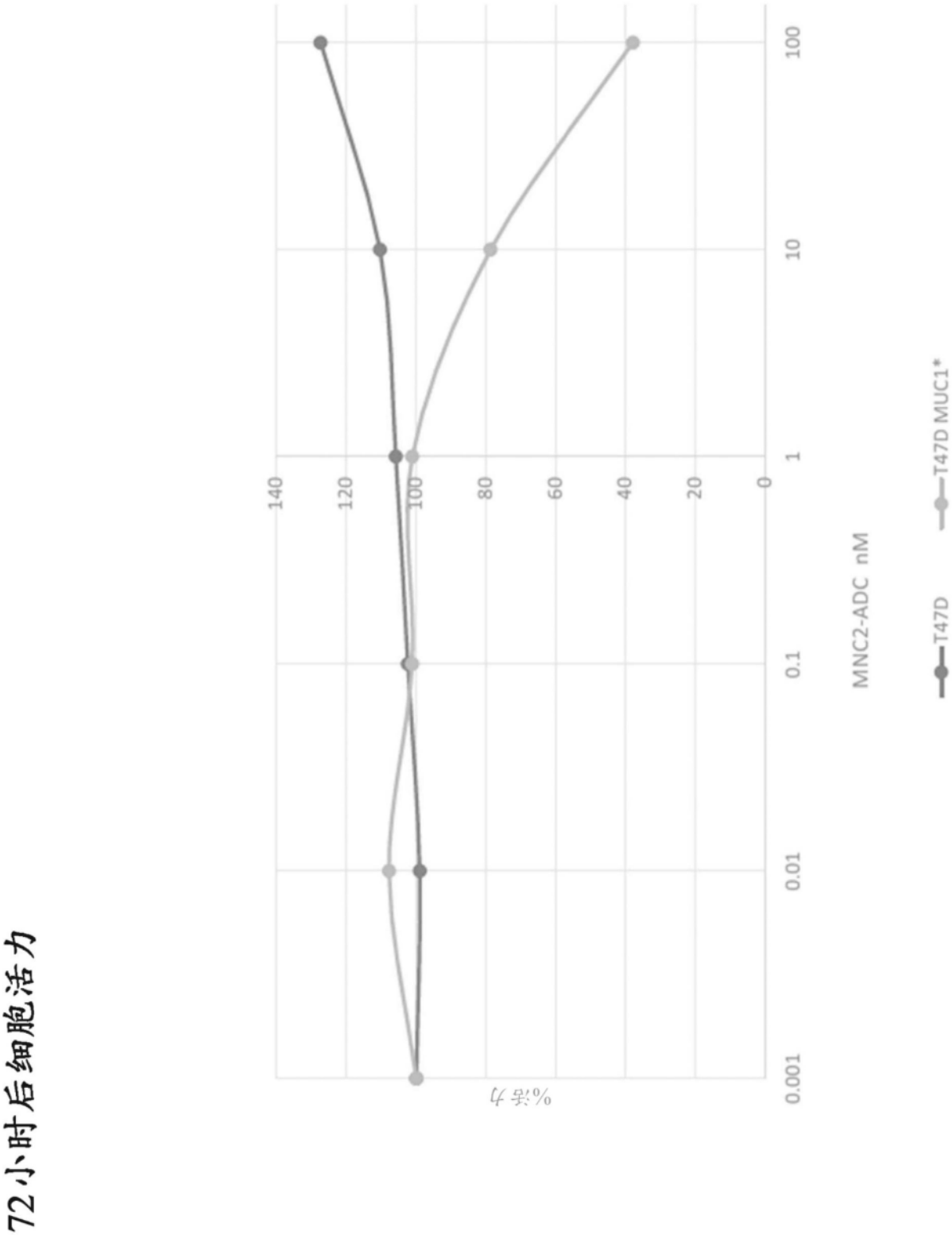
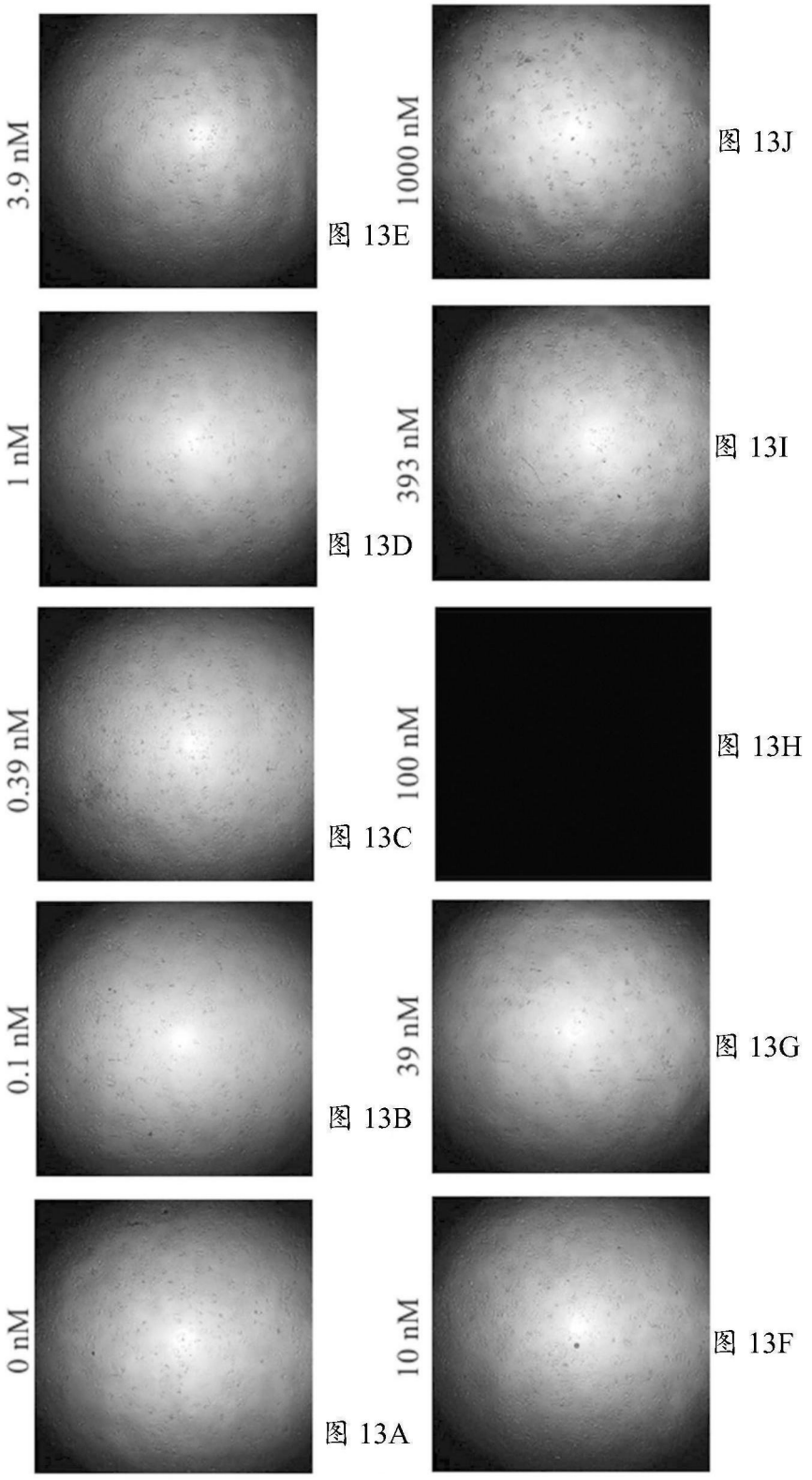

72小时后细胞活力
%活力
140
120
100
80
60
40
20
0
100
10
1
0.1
0.01
0.001
MNC2-ADC nM
T47D
T47D MUC1*

图12

T47D-wt乳腺癌细胞系表达全长MUC1(抗体不识别)和MUC1*(靶)两者

细胞(10,000/孔)与MNC2-ADC混合并孵育72小时



T47D-MUC1* T47D经诱导以表达更多MUC1*

细胞(10,000/孔)与MNC2-ADC混合并孵育72小时

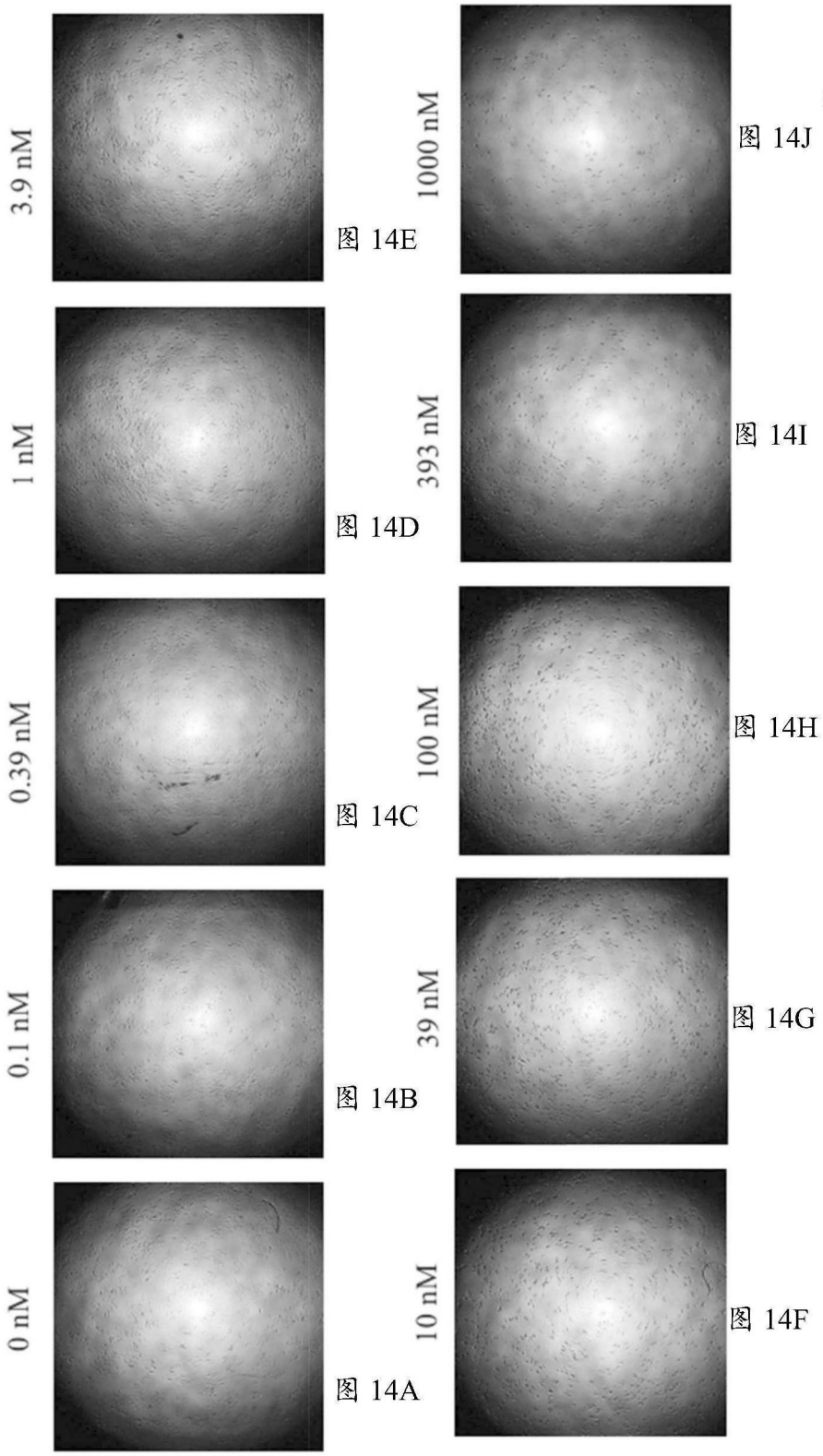


图 14A 图 14B 图 14C 图 14D 图 14E 图 14F 图 14G 图 14H 图 14I 图 14J

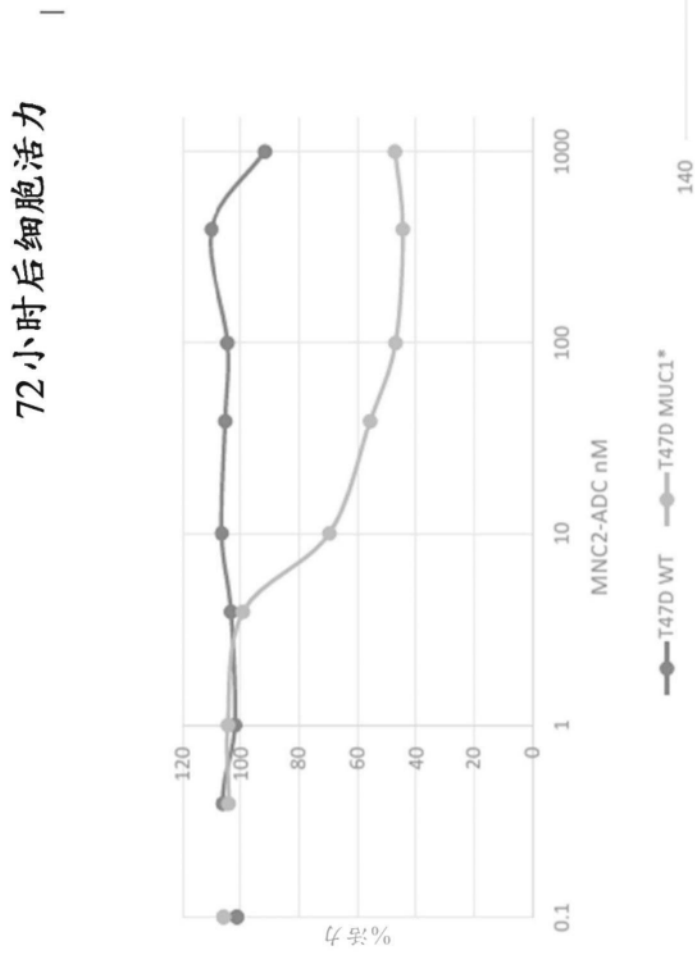

72小时后细胞活力
120
100
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
0.1
MNC2-ADC nM
T47D WT
T47D MUC1*

图 15A

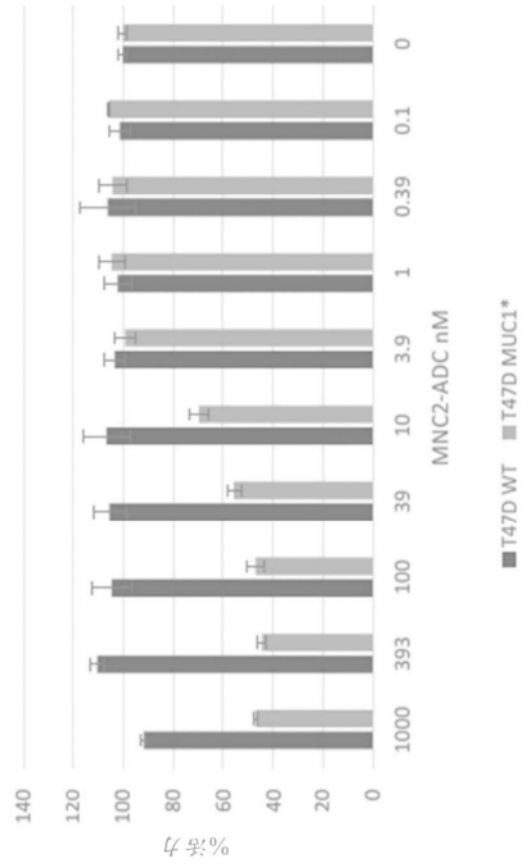

140
120
100
80
60
40
20
0
0
0.1
0.39
1
3.9
10
39
100
393
1000
MNC2-ADC nM
T47D WT
T47D MUC1*

图 15B

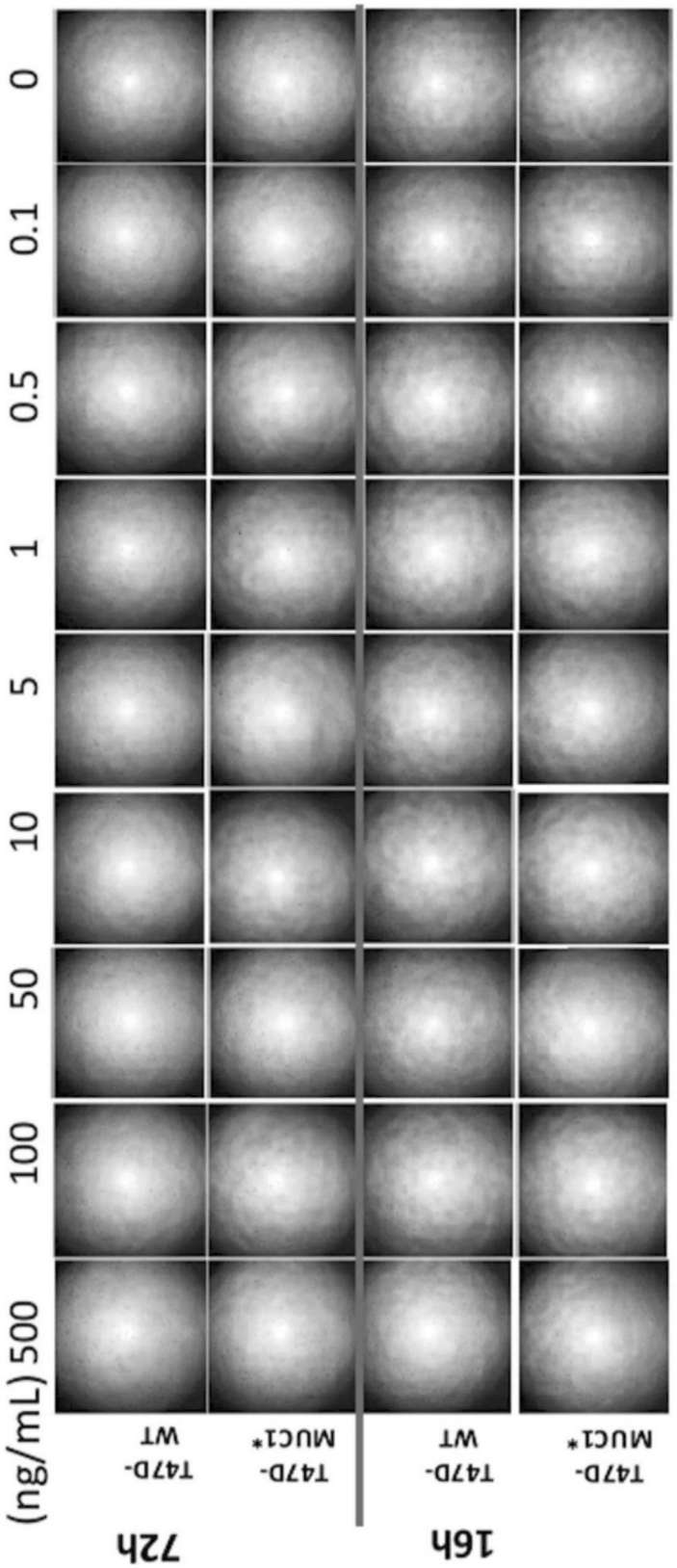


图 16A 图 16B 图 16C 图 16D

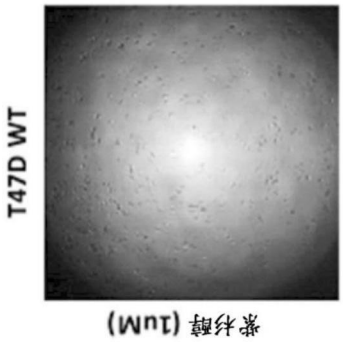


图16E

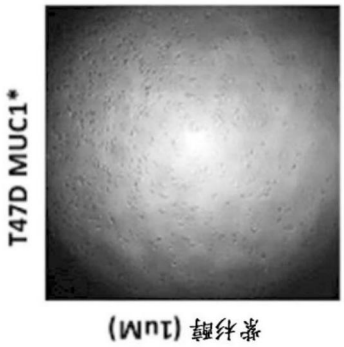


图16F

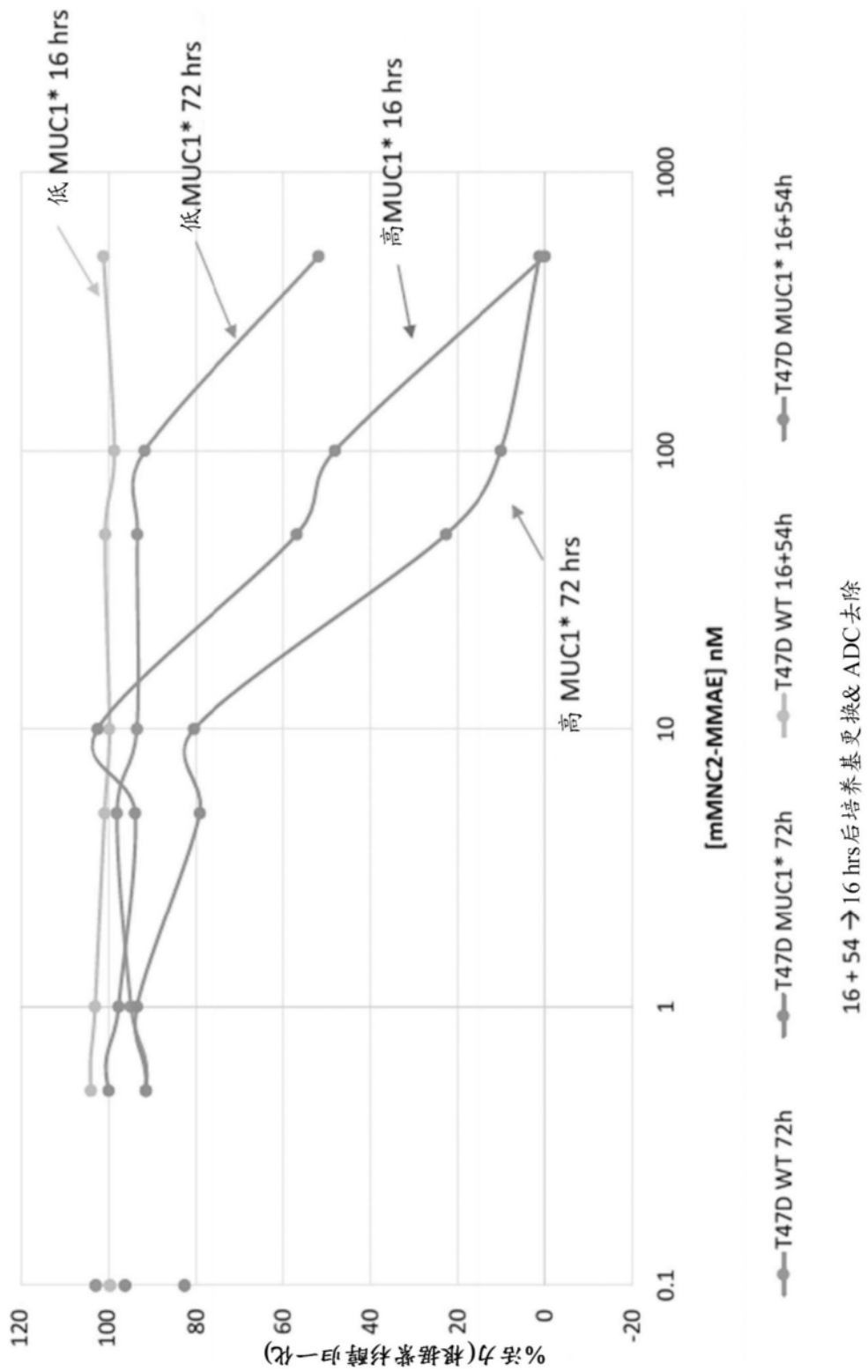

低 MUC1* 16 hrs
低MUC1* 72 hrs
高MUC1* 16 hrs
高 MUC1* 72 hrs
%活力(根据荧光酶归一化)
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.1
1
10
100
1000
[mMNC2-MMAE] nM
T47D WT 72h
T47D MUC1* 72h
T47D WT 16+54h
T47D MUC1* 16+54h
16 + 54 → 16 hrs后培养基更换& ADC去除

图17

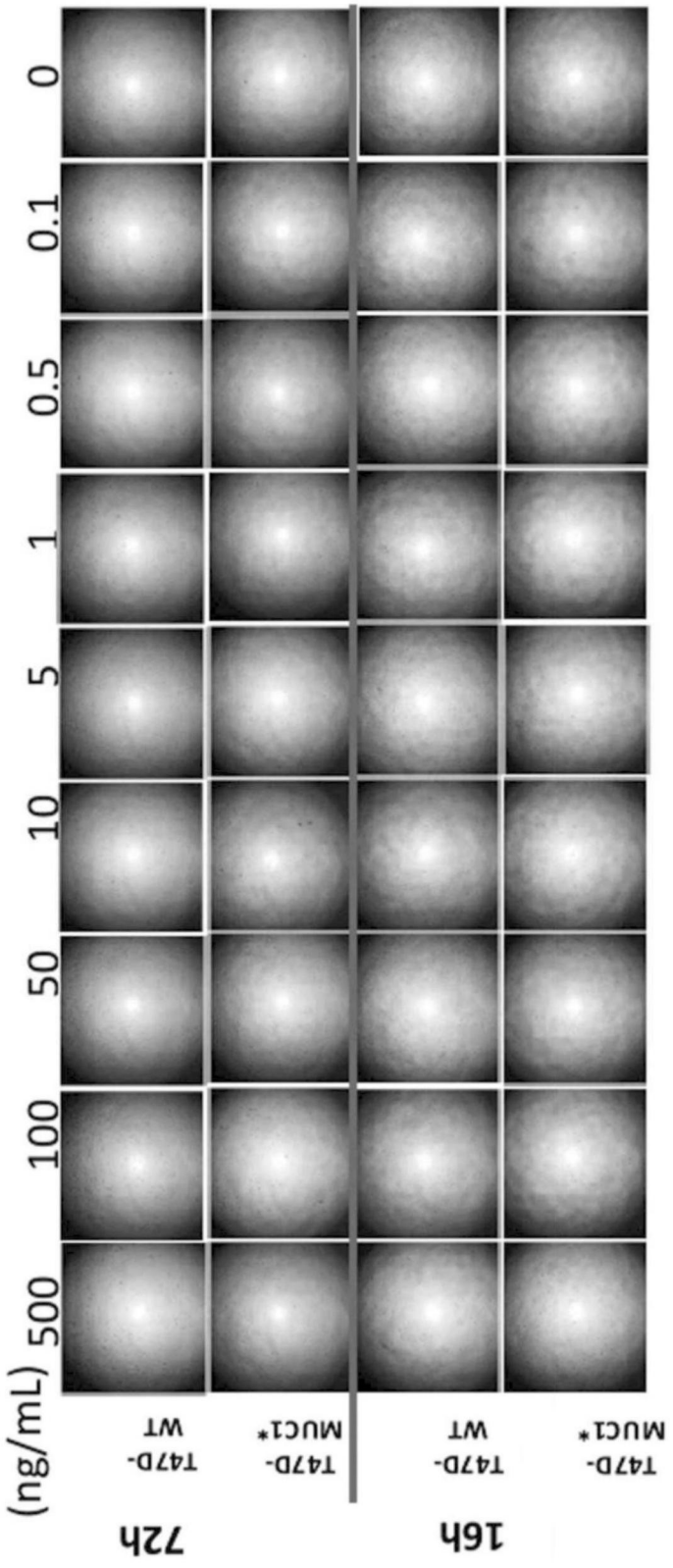


图 18A 图 18B 图 18C 图 18D

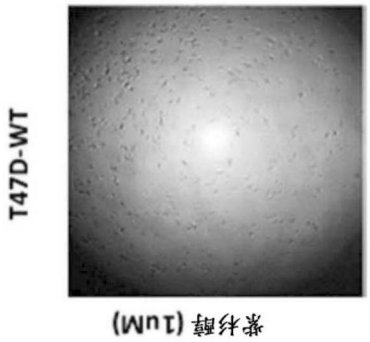


图18E

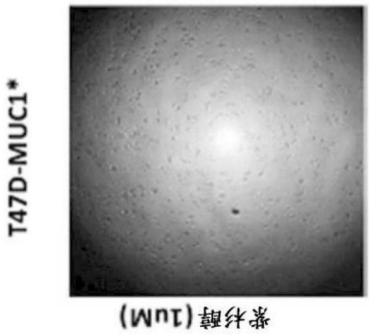


图18F

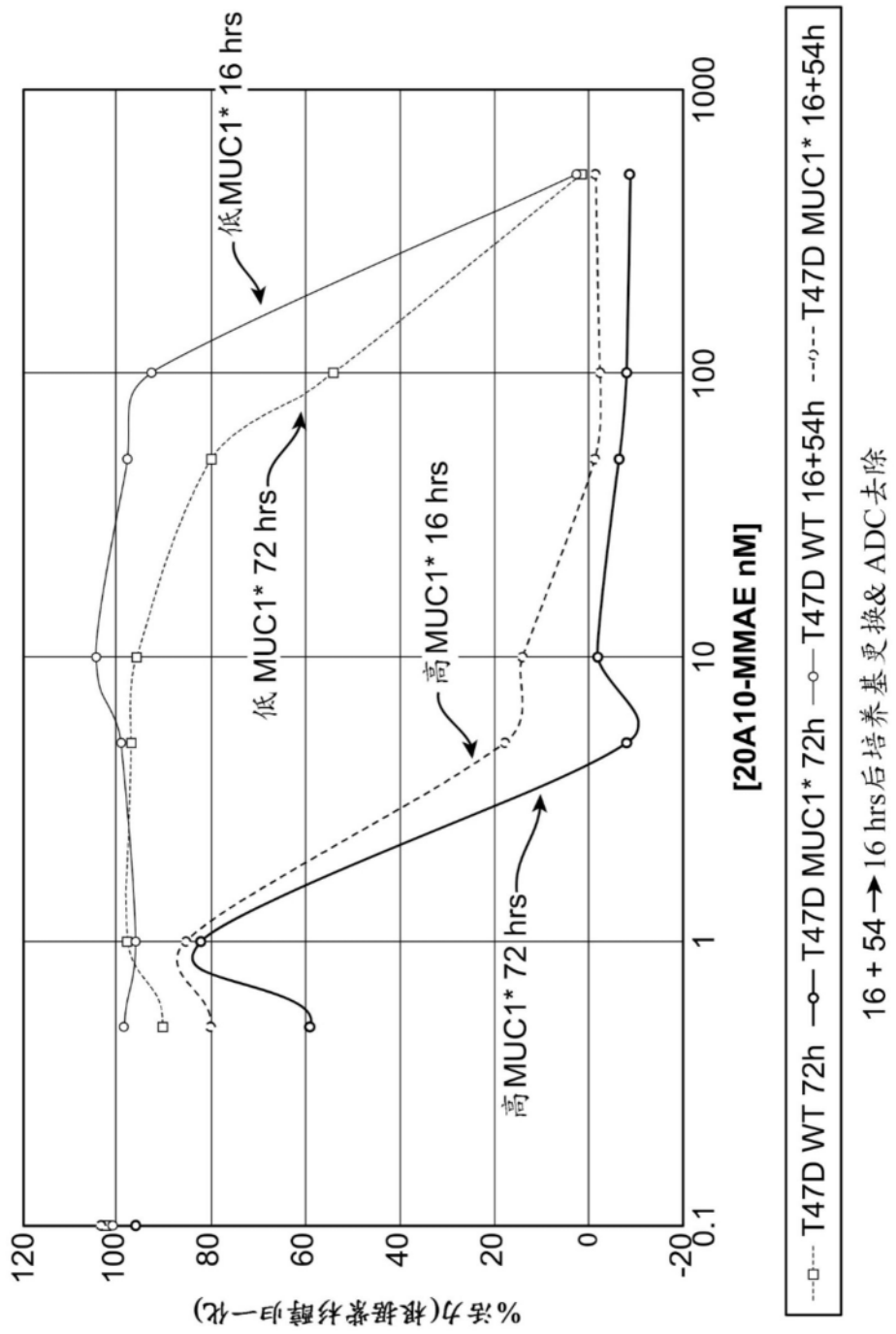

低MUC1* 16 hrs
低 MUC1* 72 hrs
高MUC1* 16 hrs
高MUC1* 72 hrs
% 活力(根据紫杉醇归一化)
[20A10-MMAE nM]
T47D WT 72h
T47D MUC1* 72h
T47D WT 16+54h
T47D MUC1* 16+54h
16 + 54 → 16 hrs后培养基更换& ADC去除

图19

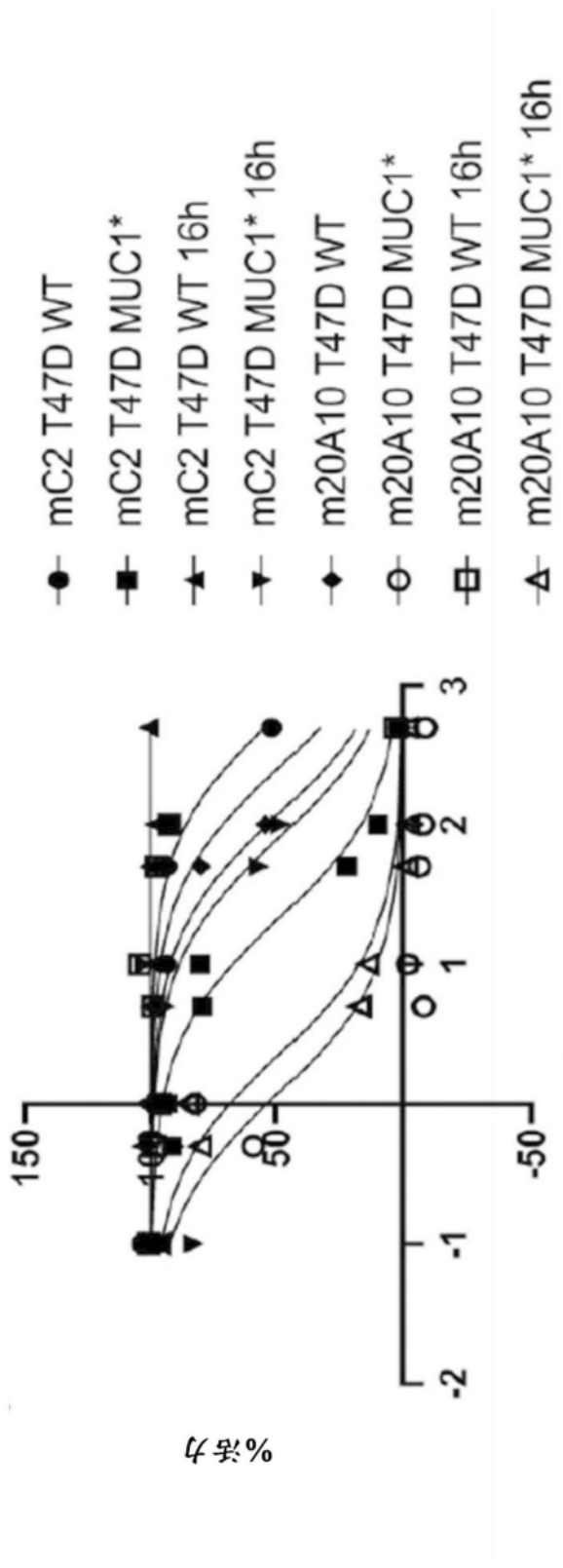


图 20A

1h	mC2 T47D WT	mC2 T47D MUC1*	mC2 T47D WT 16h	mC2 T47D MUC1* 16h	m20A10 T47D WT	m20A10 T47D MUC1*	m20A10 T47D WT 16h	m20A10 T47D MUC1* 16h
IC50 (nM)	599.8	20.54	ND	77.03	115.1	1.16	247.5	2.168
R 平方	0.8993	0.9716	-0.2981	0.9206	0.9384	0.86	0.7932	0.9611

图 20B

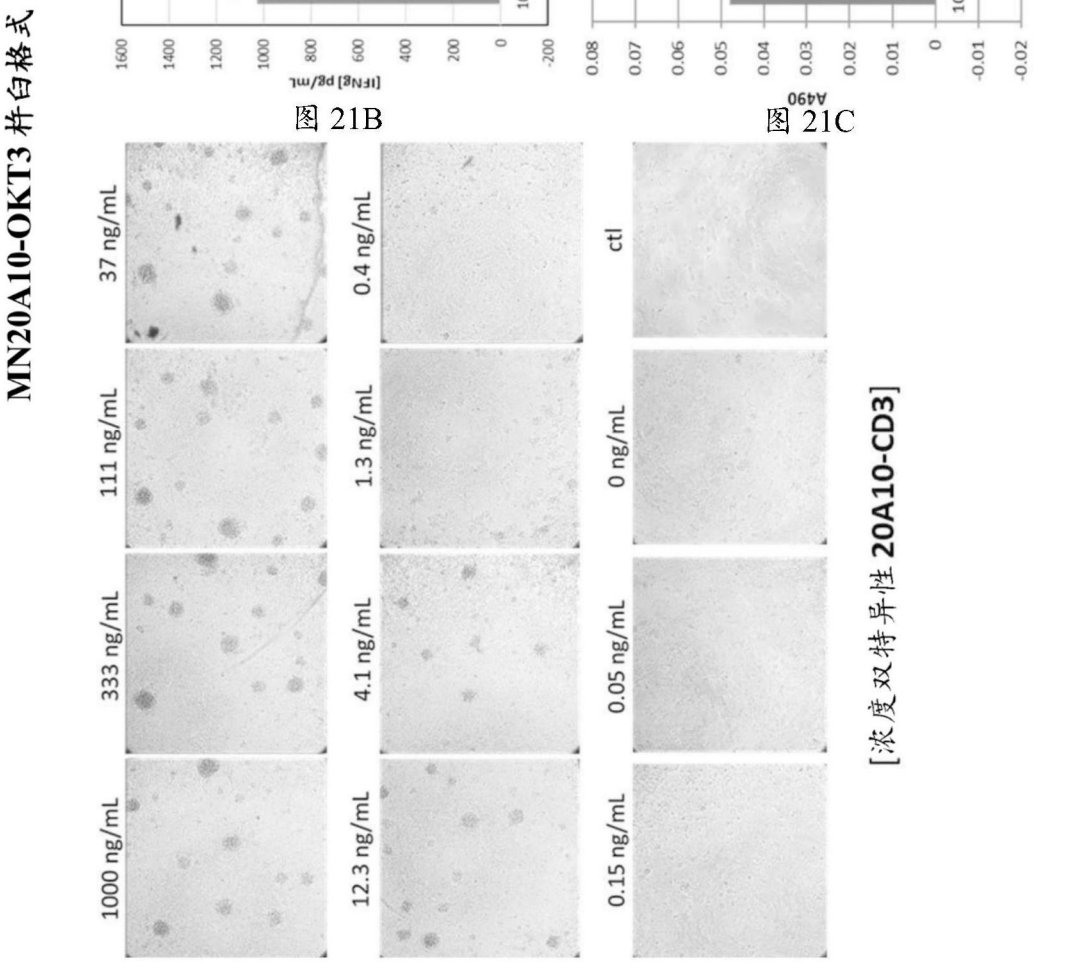


图 21A

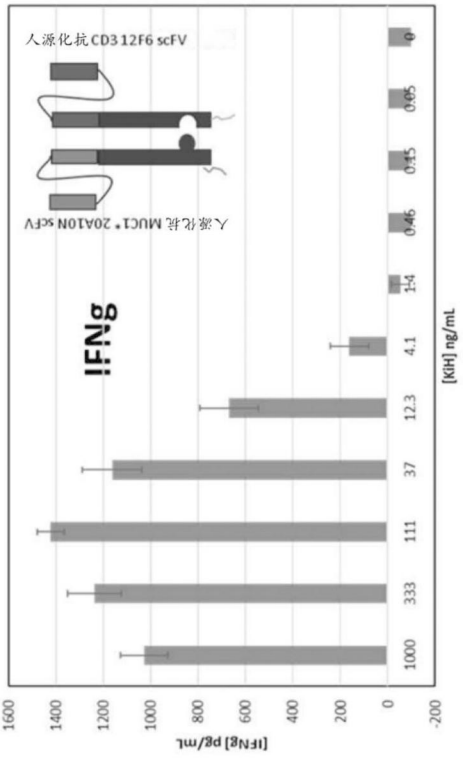


图 21B

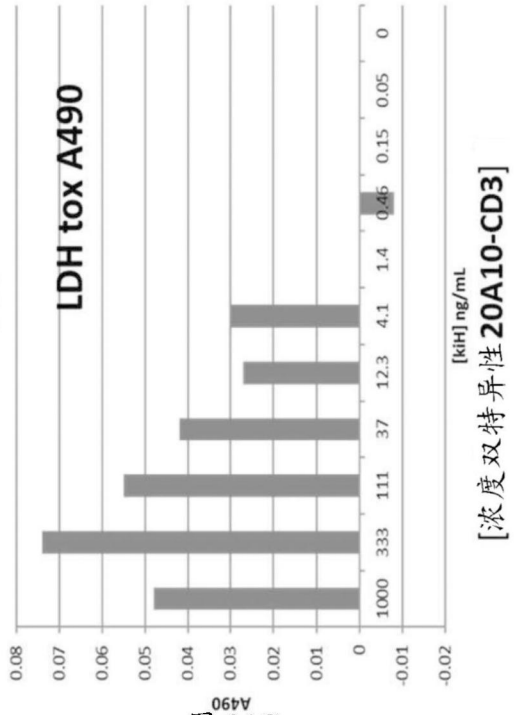


图 21C



图 22D



图 22C

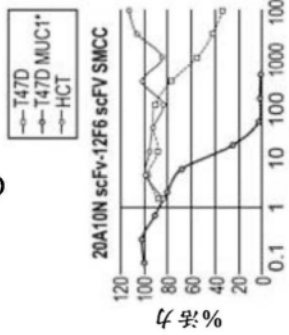


图 22H

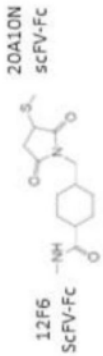


图 22G

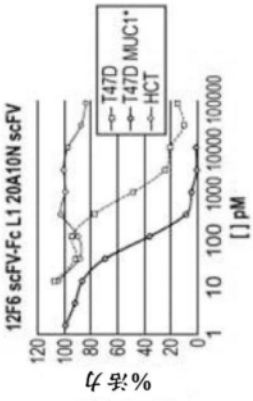


图 22B

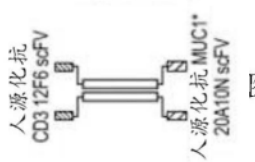


图 22A

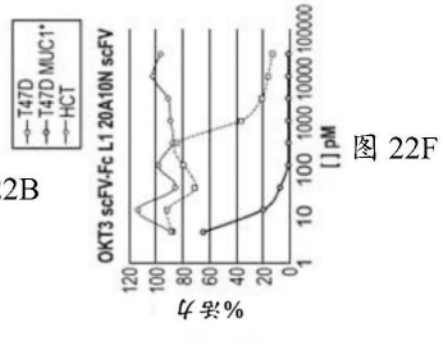


图 22F

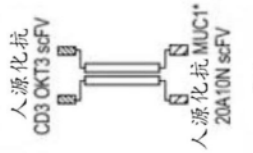


图 22E

多种双特异性格式的IC50 MN20A10-OKT3或MN20A10-12F6

T47D	IC50 pM		T47D-MUC1*	IC50 pM
OKT3 IgG1 L1 MUC1* scFV	3.7		OKT3 IgG1 L1 MUC1* scFV	1.6
12F6 IgG1 L1 MUC1* scFV	710		OKT3 scFV-Fc L1 MUC1* scFV	5.4
12F6 scFV-Fc L1 MUC1* scFV	773		MUC1* scFV-Fc/12F6 scFV-Fc SMCC	8.3
OKT3 scFV-Fc L1 MUC1* scFV	873		12F6 IgG1 L1 MUC1* scFV	25.6
MUC1* scFV-Fc/12F6 scFV-Fc SMCC	1983		12F6 scFV-Fc L1 MUC1* scFV	76.5
KiH MUC1* scFV-Fc杵-His/12F6 scFv-Fc白链霉亲和素	4231		KiH MUC1* scFV-Fc杵-His/12F6 scFv-Fc白链霉亲和素	678

图23

多种双特异性格式的IC50 MN20A10-OKT3或MN20A10-12F6

抗MUC1*双特异性T细胞接合剂：多种格式

MN20A10杀伤MUC1*阳性癌细胞；用抗CD3抗体OKT3 & 12F6说明

		T47D	T47D-MUC1*	HCT	HCT MUC1*
KiH 20A10N/12F6	IC50 (pM)	1636	583	/	769
	R 平方	0.95	0.96	/	0.94
20A10N/12F6 SMCC	IC50 (pM)	1983	8.3	/	9.5
	R 平方	0.83	0.98	/	0.91
20A10N 全/12F6 SMCC	IC50 (pM)	/	6.95	/	7.3
	R 平方	/	0.96	/	0.95
KiH 20A10N-His/12F6	IC50 (pM)	4231	678	/	707
	R 平方	0.81	0.97	/	0.79
OKT3-L1-20A10N	IC50 (pM)	873	5.4	/	21.4
	R 平方	0.85	0.94	/	0.74
20A10N-L1-OKT3	IC50 (pM)	11307	30.8	/	127.5
	R 平方	0.65	0.98	/	0.86
20A10N-L2-OKT3	IC50 (pM)	17091	24	/	152.4
	R 平方	0.41	0.98	/	0.91

图24

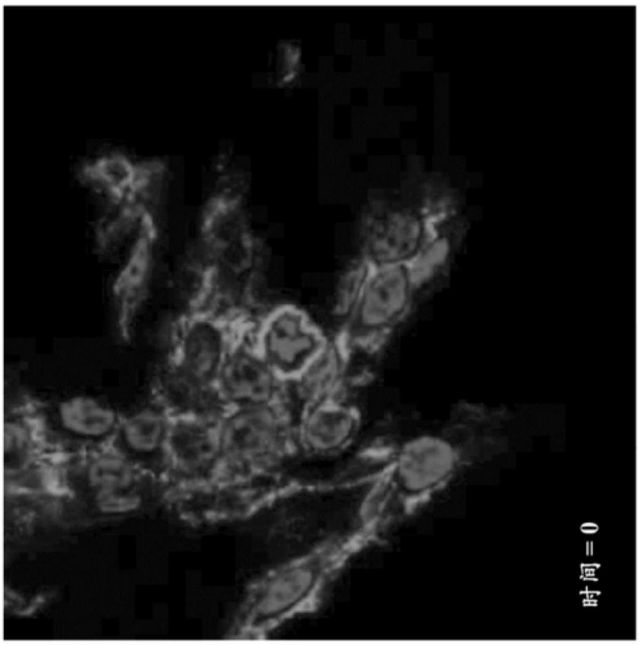


图25A

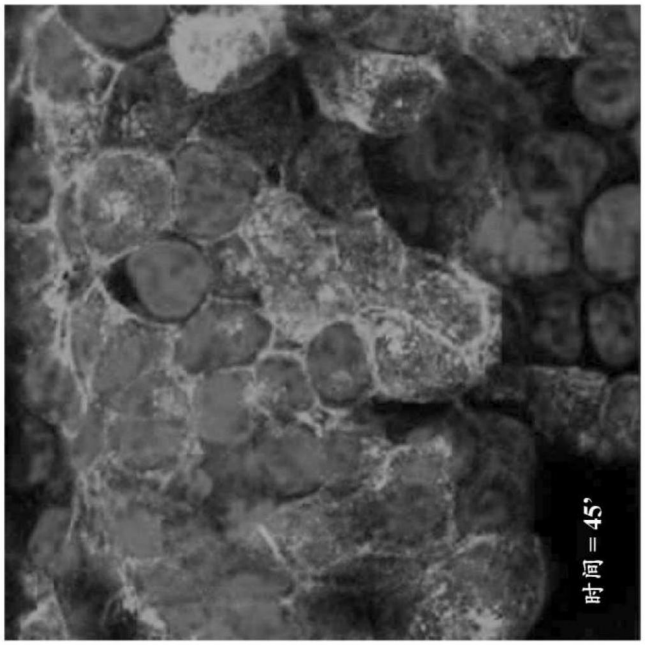


图25B

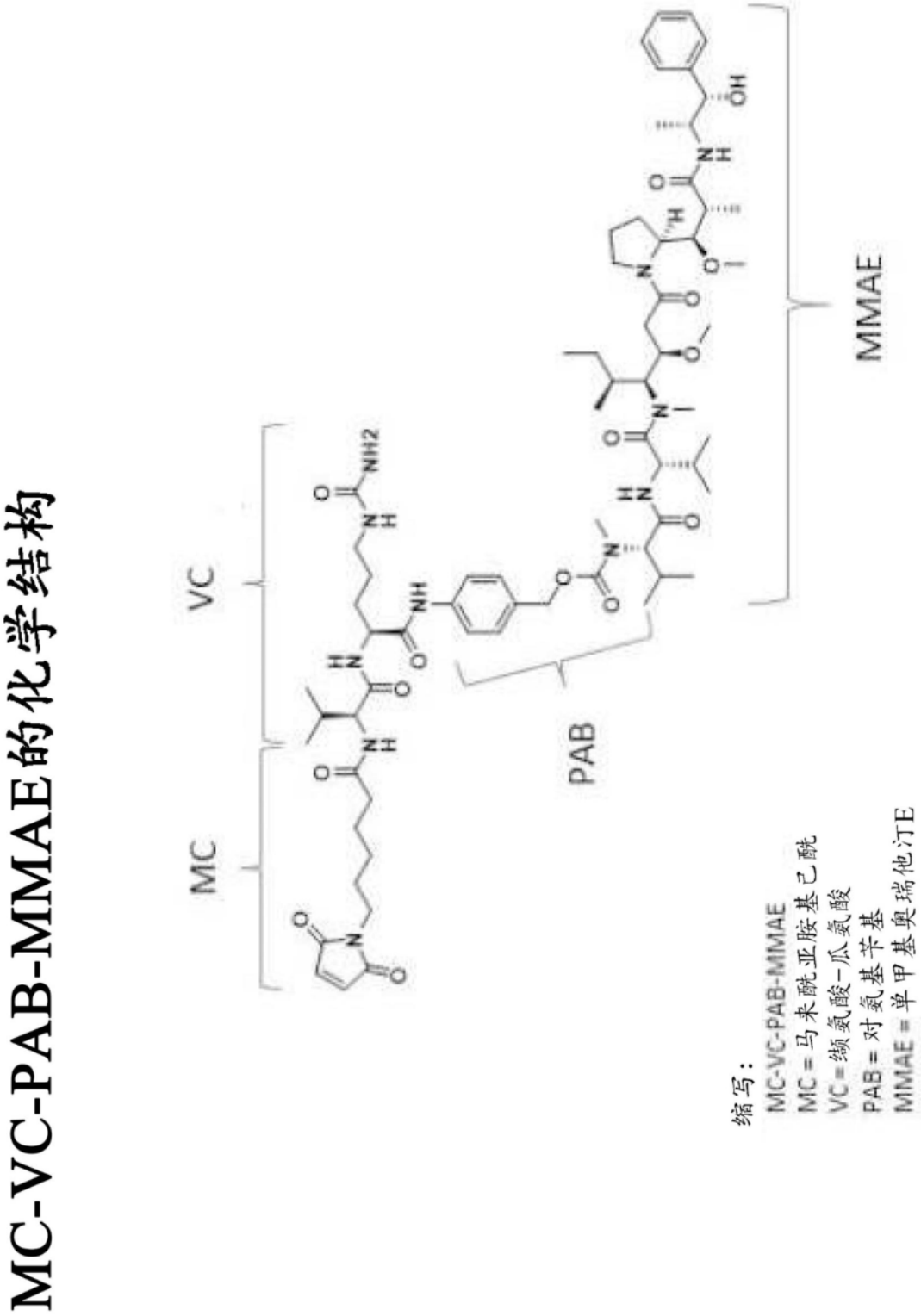

MC-VC-PAB-MMAE的化学结构
MC
VC
PAB
MMAE
缩写：
MC-VC-PAB-MMAE
MC = 马来酰亚胺基己酰
VC = 缬氨酸-瓜氨酸
PAB = 对氨基苄基
MMAE = 单甲基奥瑞他汀E

图26

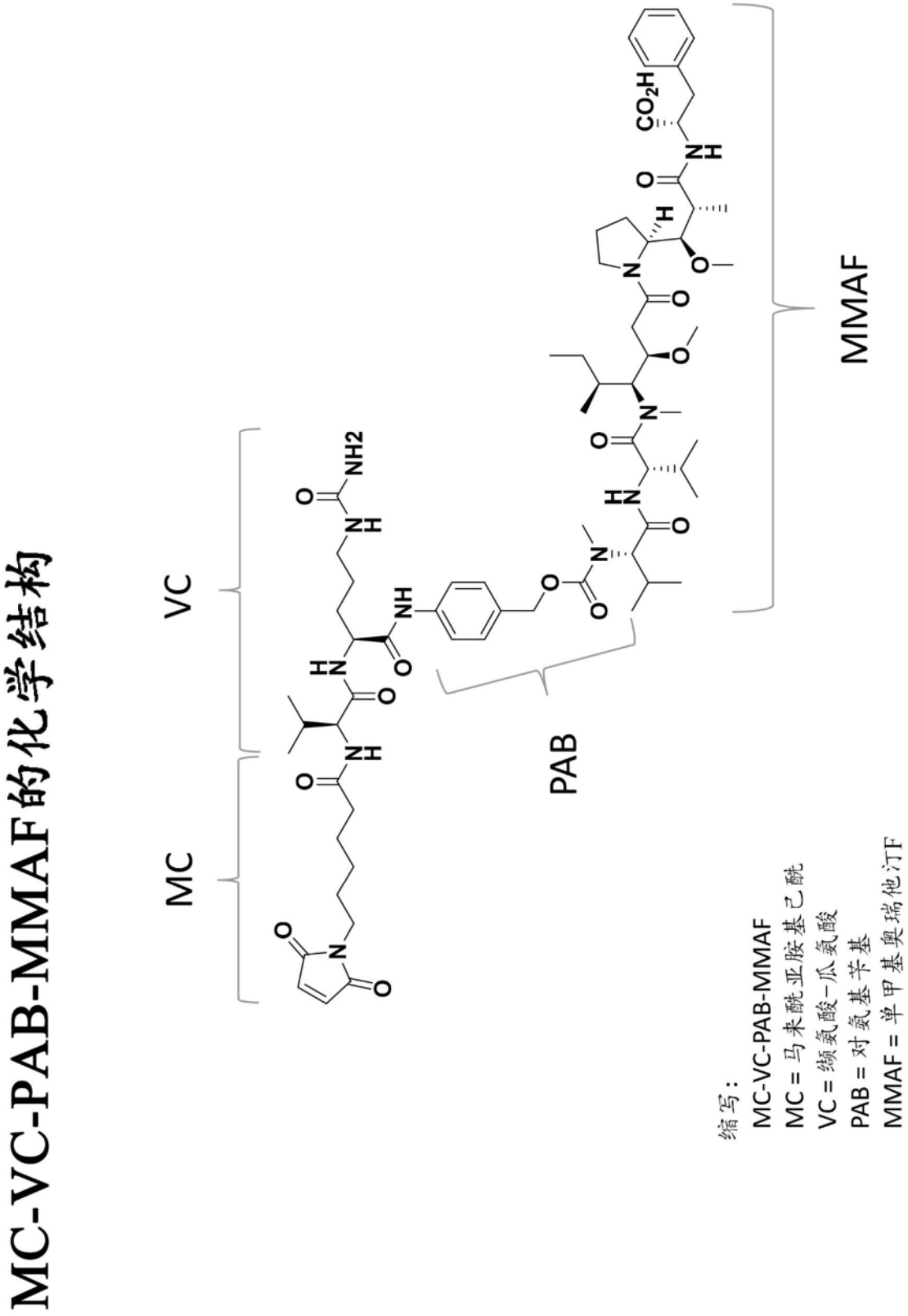

MC-VC-PAB-MMAF的化学结构
MC
VC
PAB
MMAF
缩写：
MC-VC-PAB-MMAF
MC = 马来酰亚胺基己酰
VC = 缬氨酸-瓜氨酸
PAB = 对氨基苄基
MMAF = 单甲基奥瑞他汀F

图27

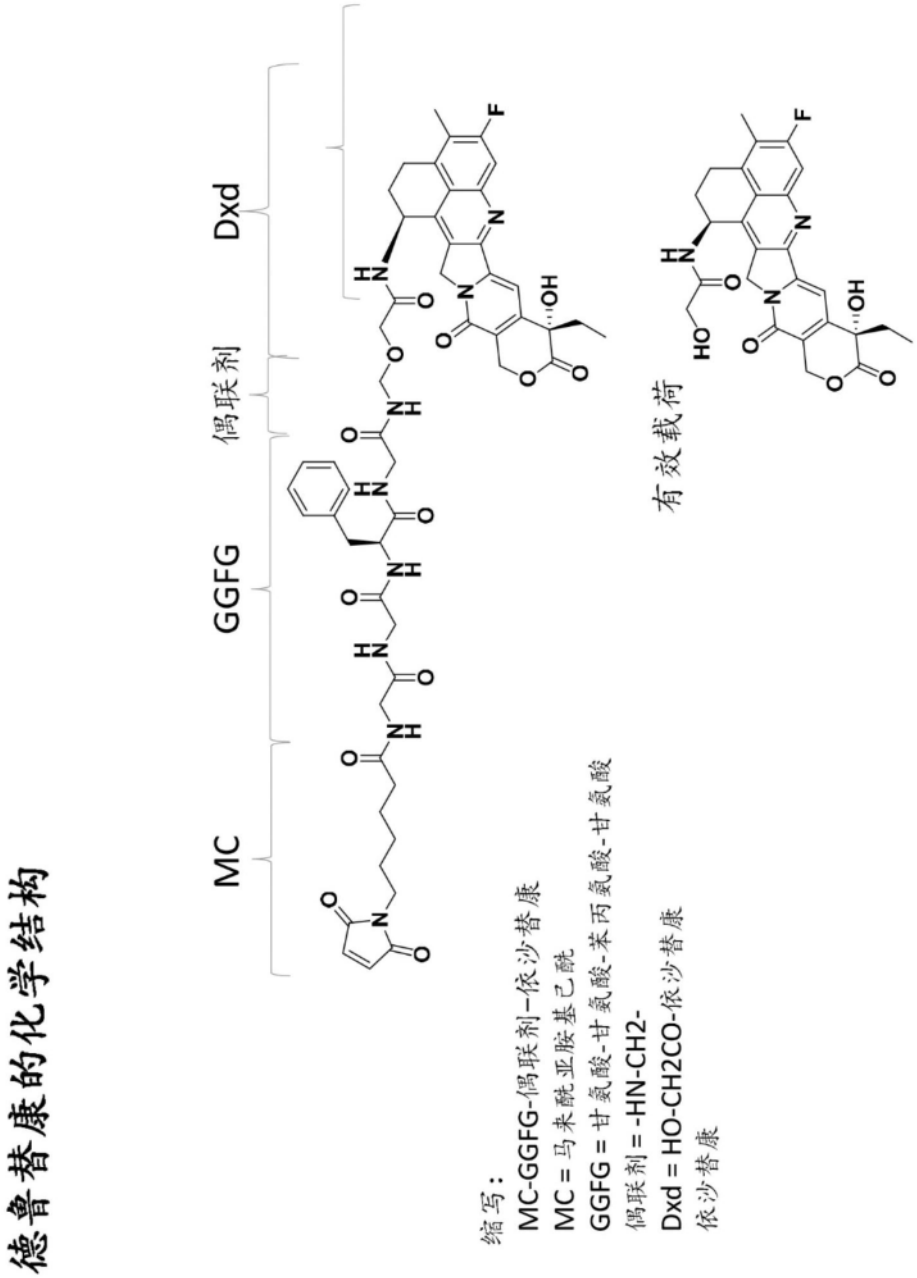

德鲁替康的化学结构
MC
GGFG
偶联剂
Dxd
有效载荷
缩写：
MC-GGFG-偶联剂-依沙替康
MC = 马来酰亚胺基己酰
GGFG = 甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸
偶联剂 = -HN-CH2-
Dxd = HO-CH2CO-依沙替康
依沙替康

图28

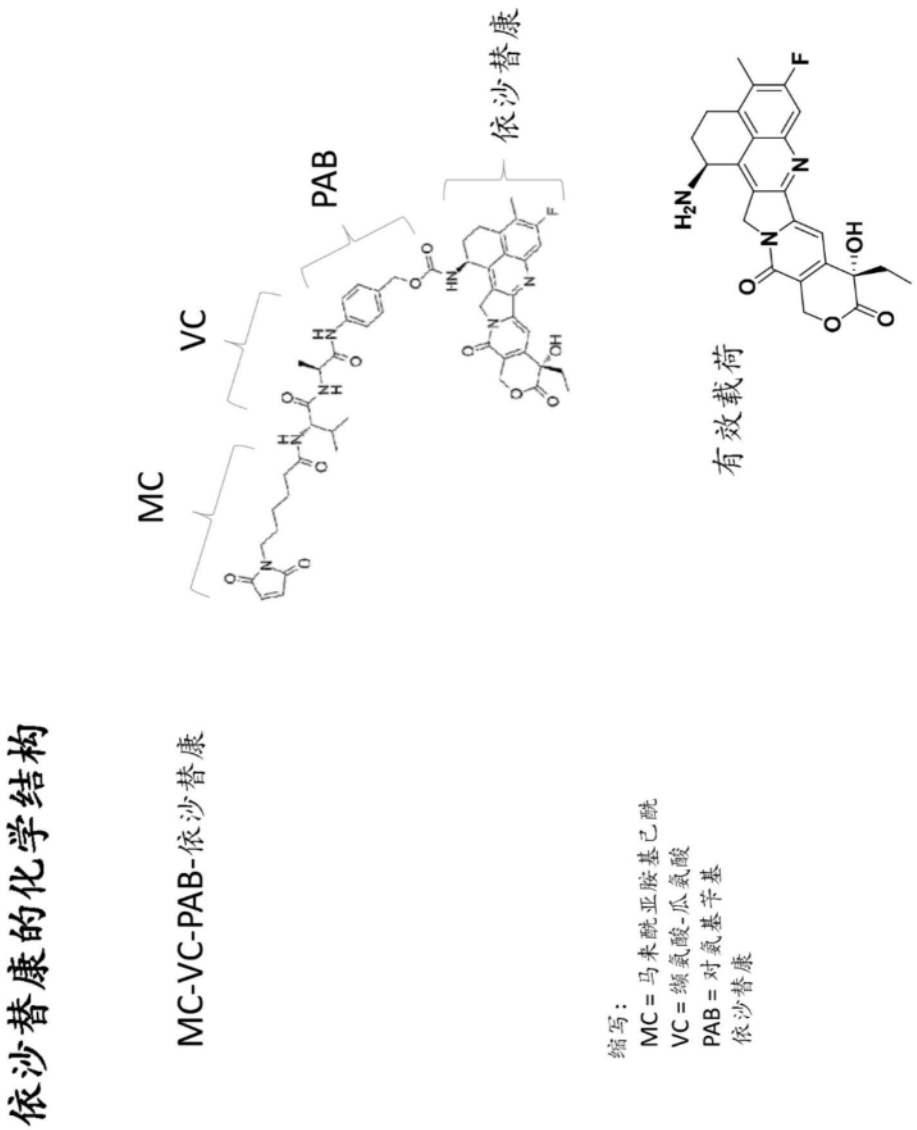

依沙替康的化学结构
MC-VC-PAB-依沙替康
MC
VC
PAB
依沙替康
有效载荷
缩写：
MC = 马来酰亚胺基己酰
VC = 缬氨酸-瓜氨酸
PAB = 对氨基苄基
依沙替康

图29

MNC2-MMAE：HIC色谱图

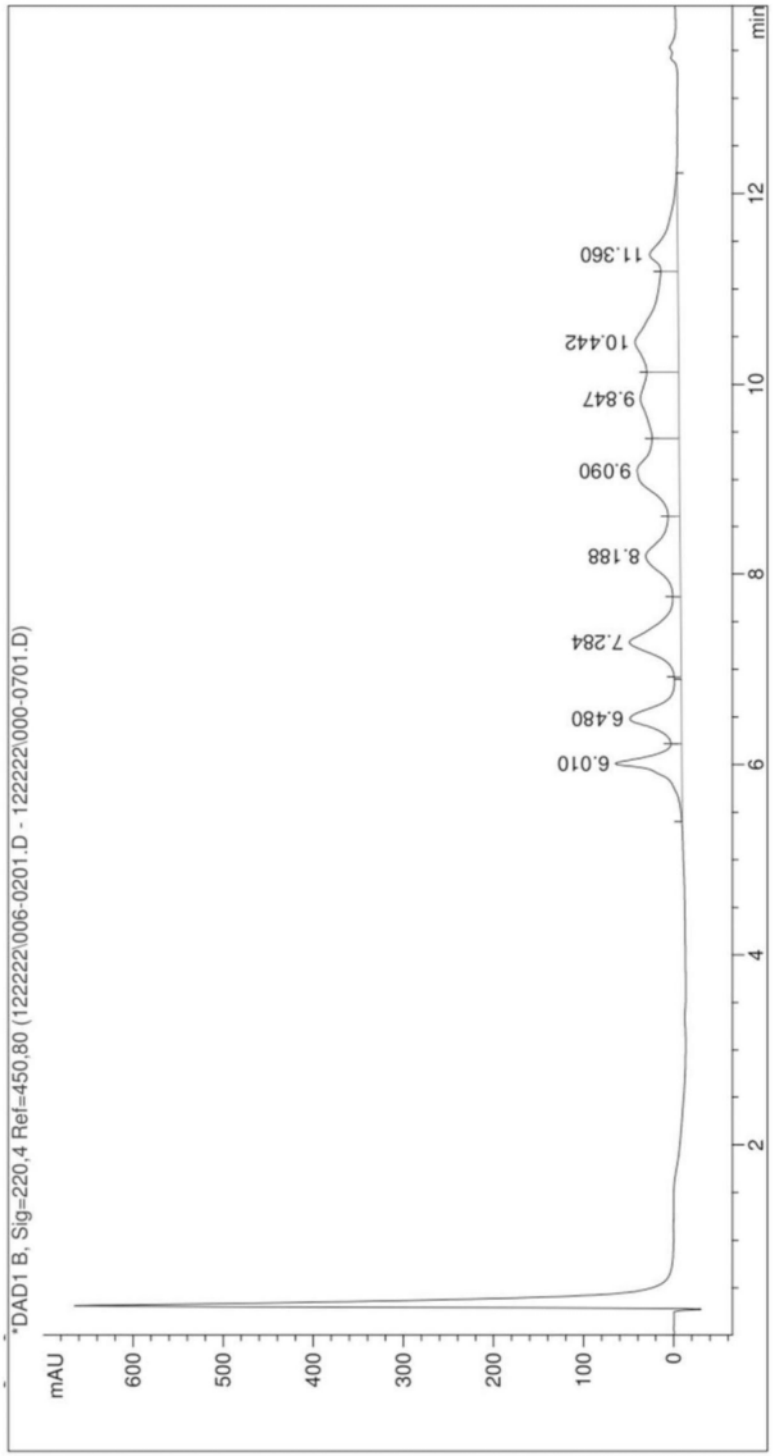


图30

MNC2-MMAF HIC色谱图

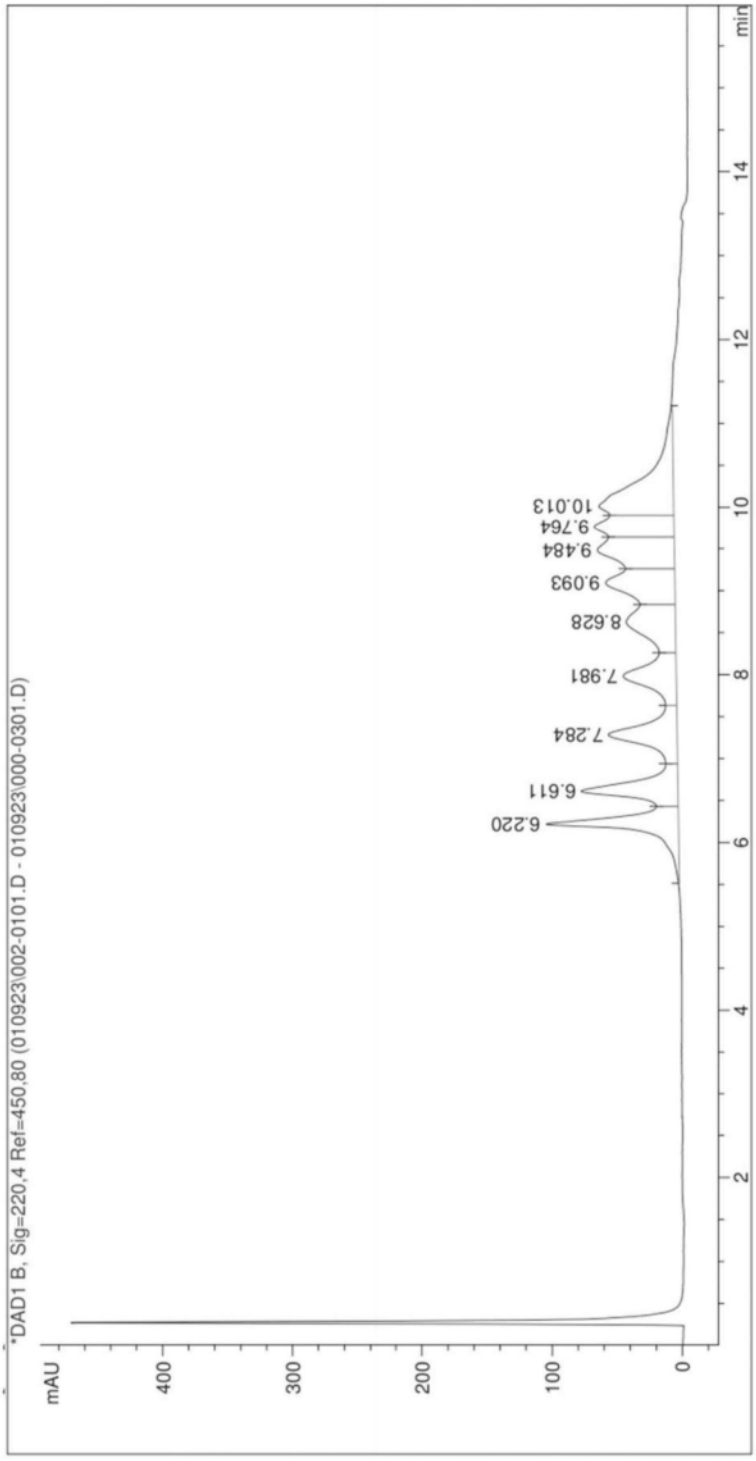


图31

MNC2-德鲁替康HIC色谱图

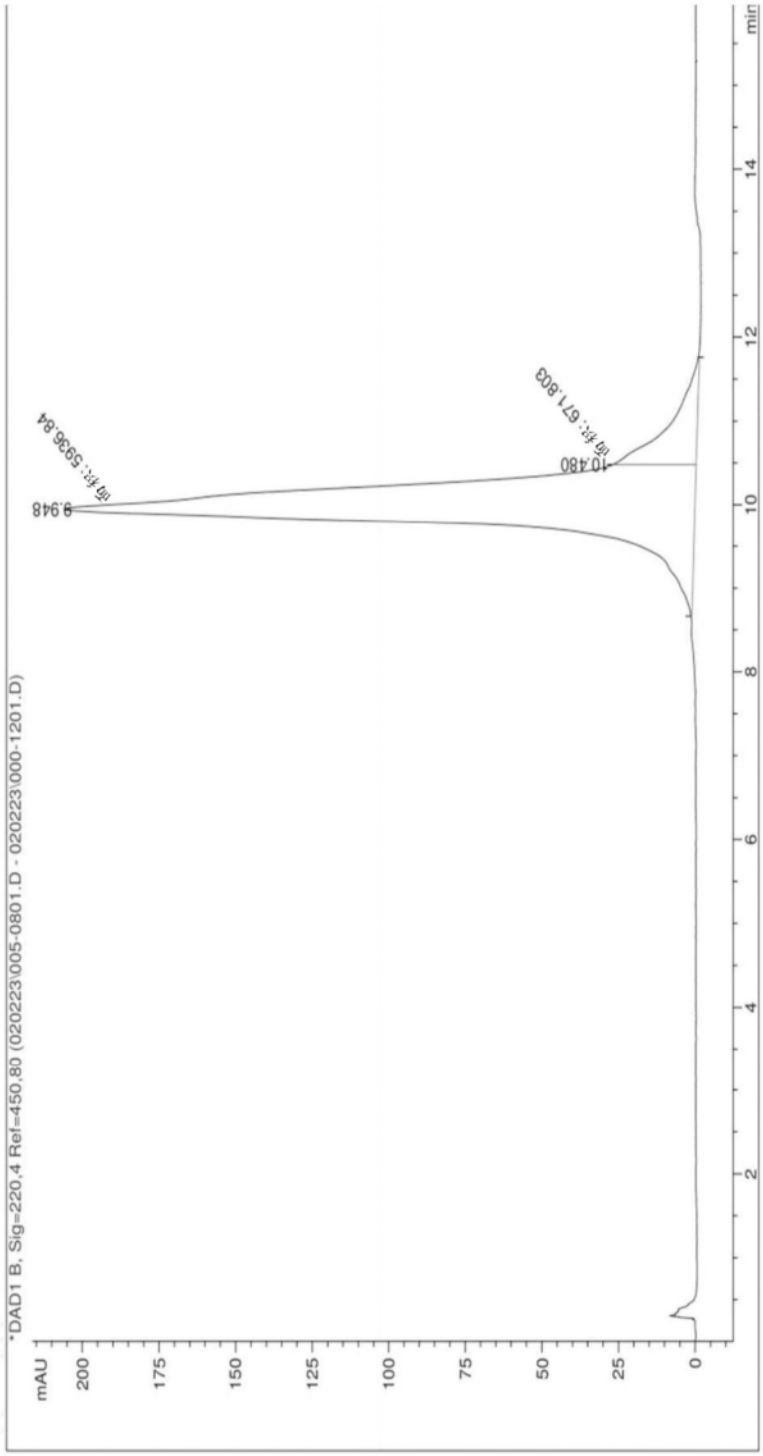


图32A

MNC2-MC-VC-PAB-依沙替康HIC色谱图

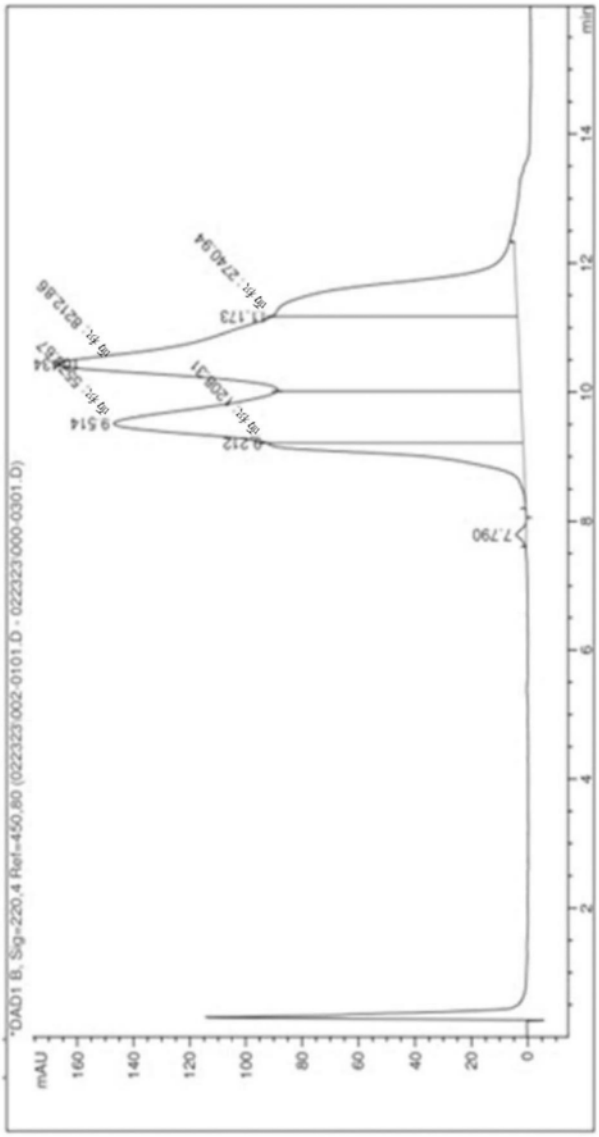


图32B

MN20A10-MMAE：HIC色谱图

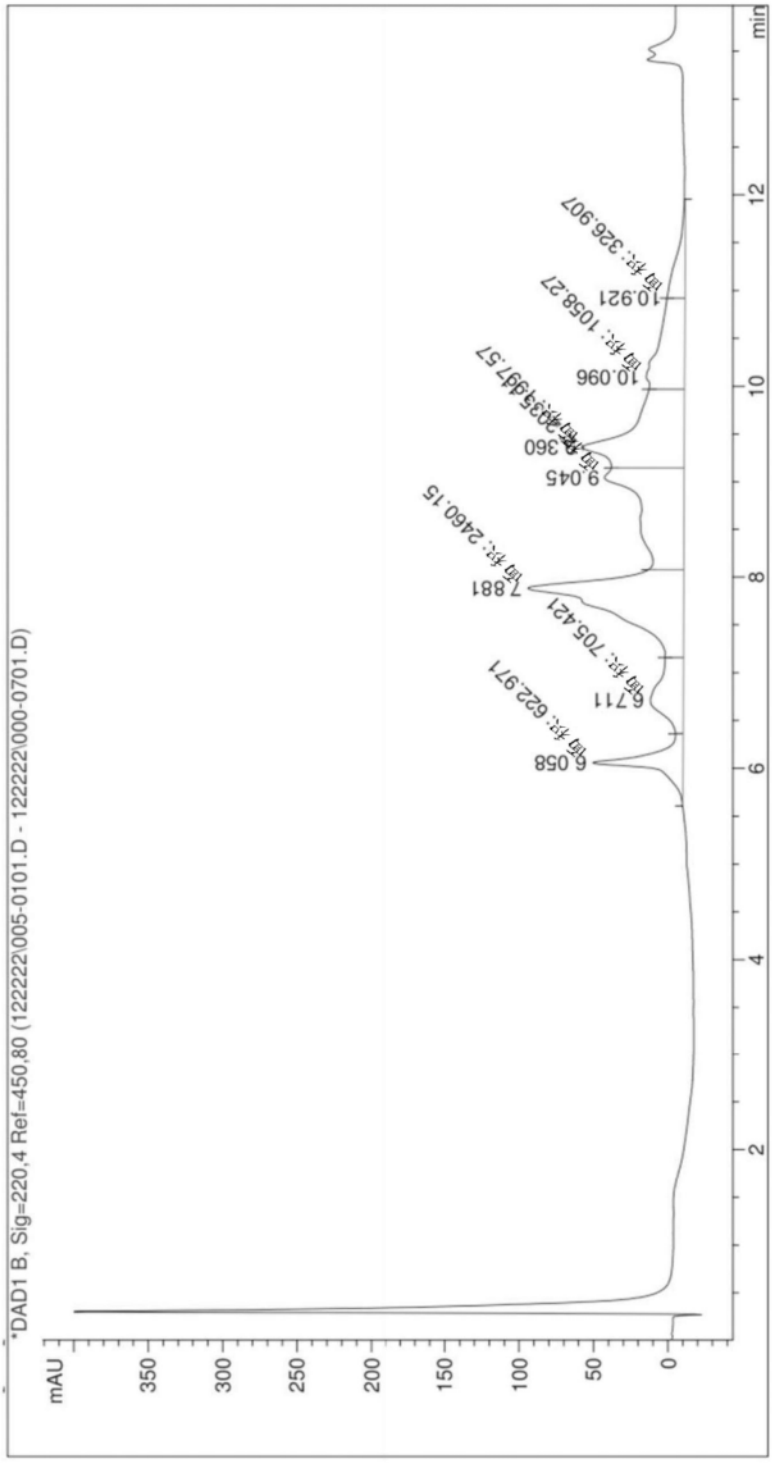


图33

MN20A10-MMAF HIC色谱图

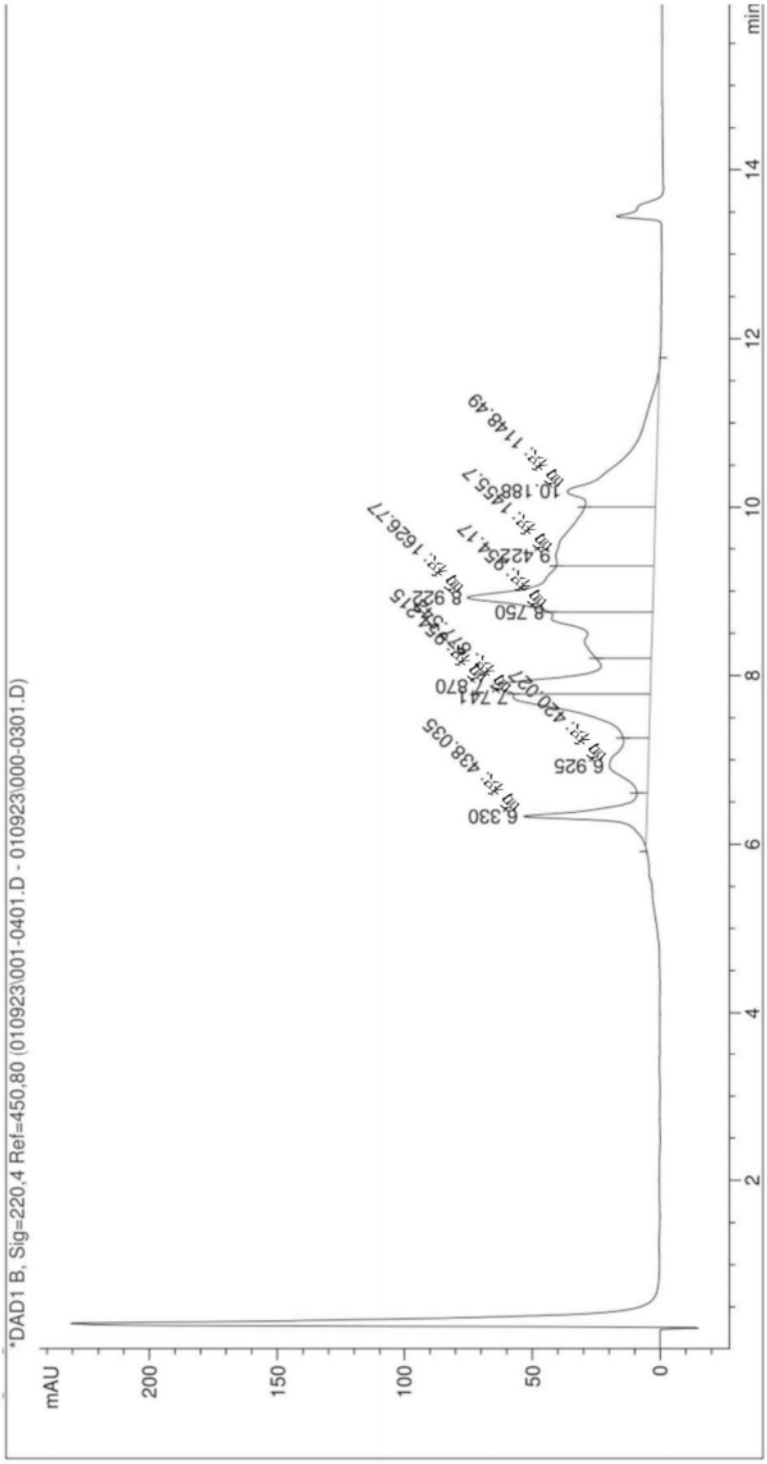


图34

MN20A10-德鲁替康HIC色谱图

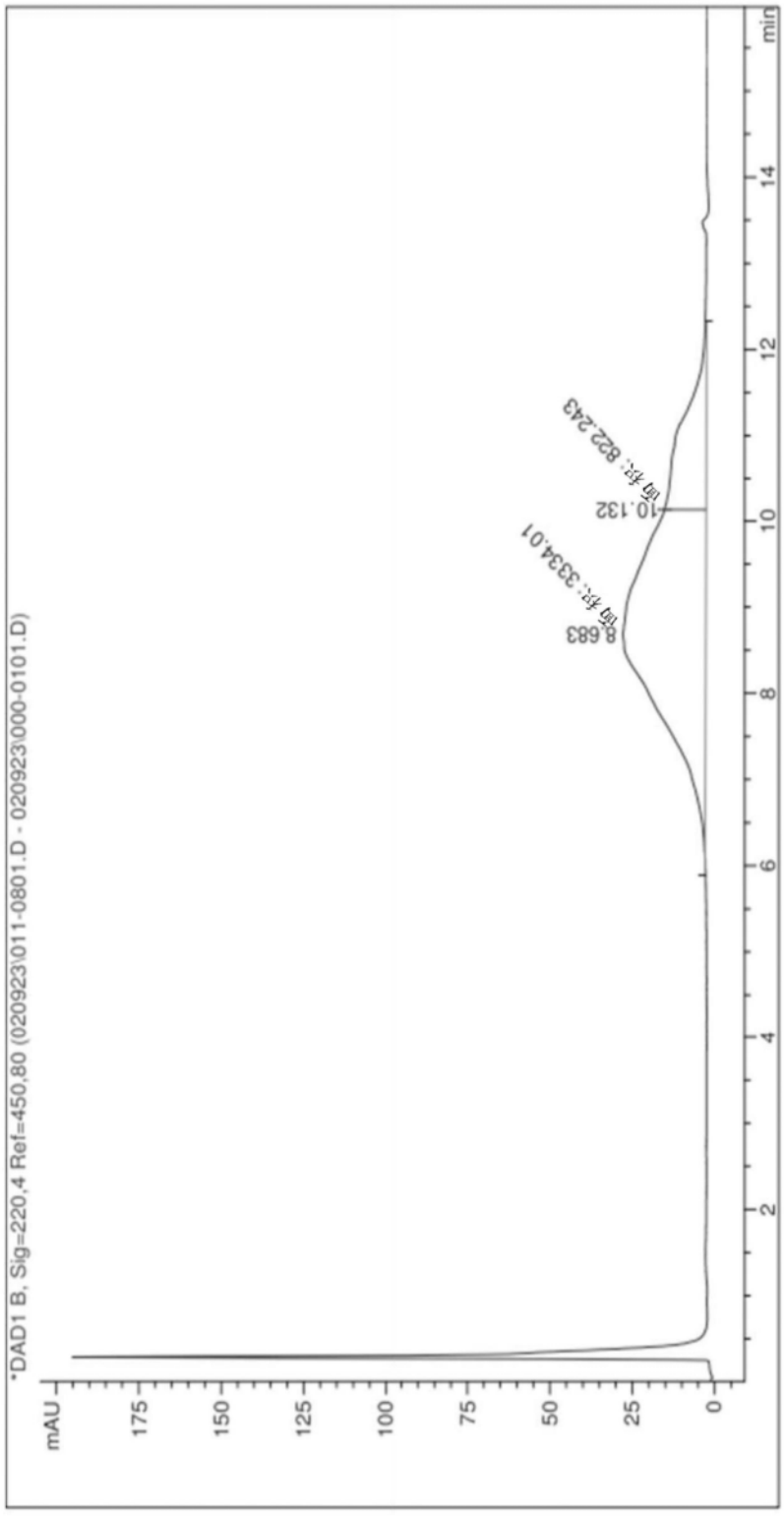


图35

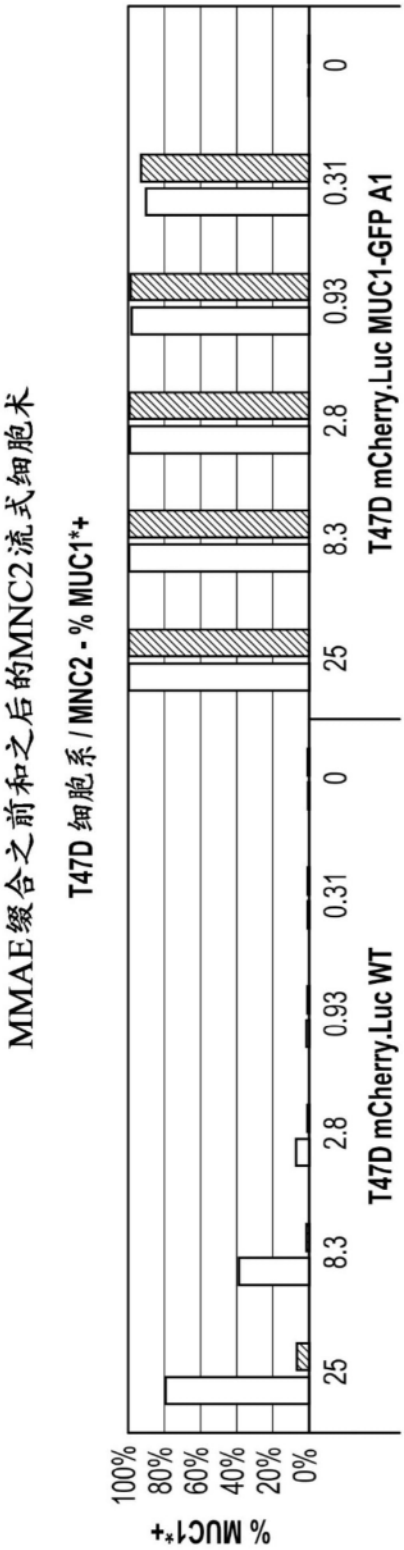

MMAE缀合之前和之后的MNC2流式细胞术
T47D 细胞系 / MNC2 - % MUC1*+
% MUC1*+
100%
80%
60%
40%
20%
0%
T47D mCherry.Luc WT
25
8.3
2.8
0.93
0.31
0
T47D mCherry.Luc MUC1-GFP A1
25
8.3
2.8
0.93
0.31
0
mC2 未缀合
mC2-MMAE 大规模

图 36B

图 36A

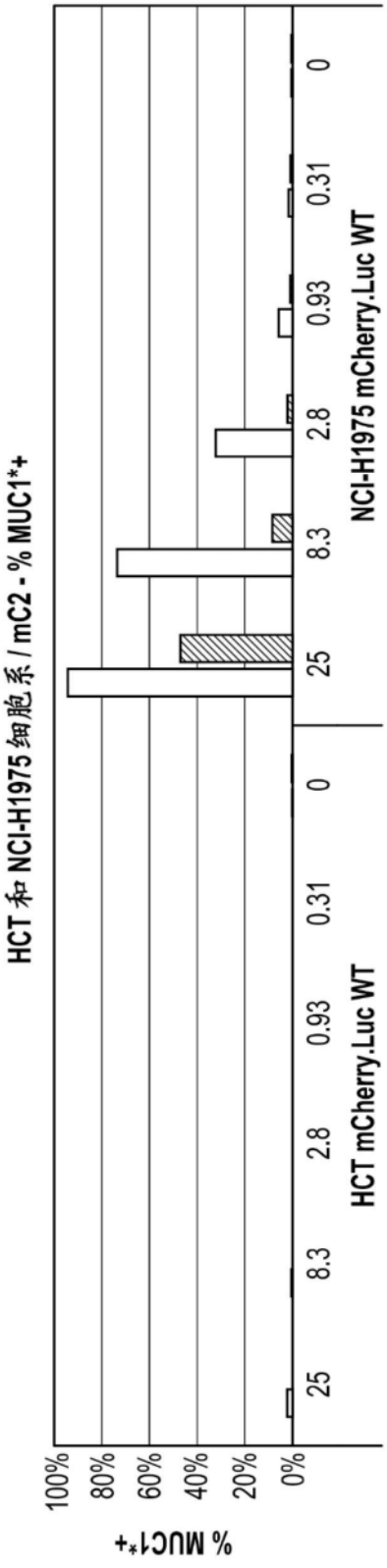

HCT 和 NCI-H1975 细胞系 / mC2 - % MUC1*+
% MUC1*+
100%
80%
60%
40%
20%
0%
HCT mCherry.Luc WT
25
8.3
2.8
0.93
0.31
0
NCI-H1975 mCherry.Luc WT
mC2 未缀合
mC2-MMAE 大规模

图 36D

图 36C

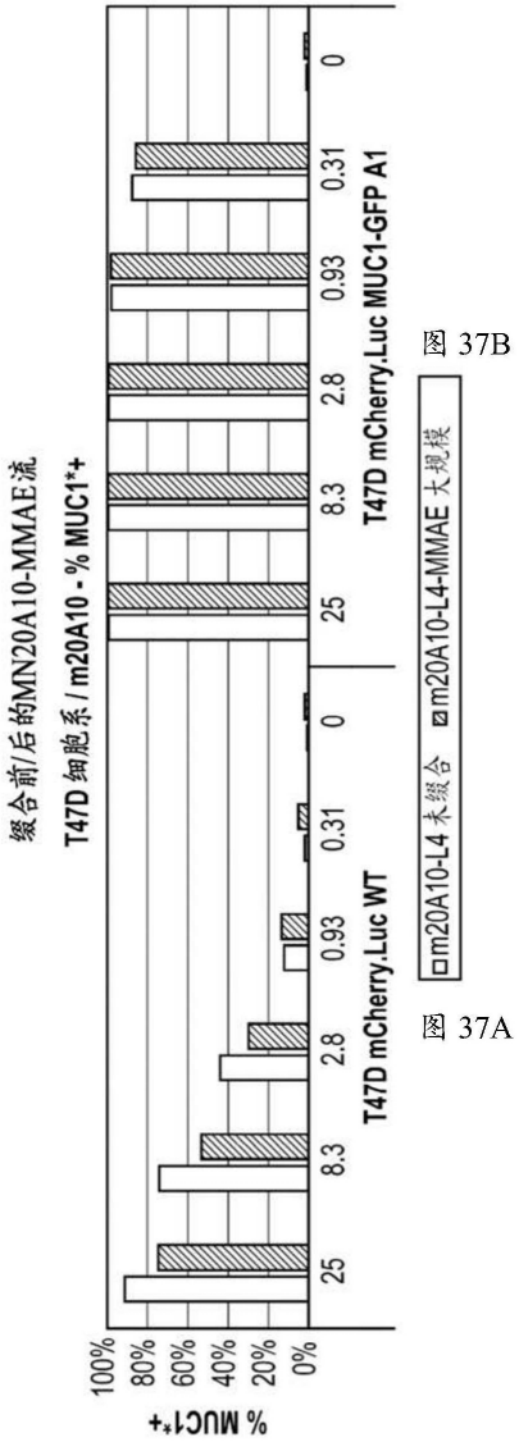

缀合前/后的MN20A10-MMAE流
T47D 细胞系 / m20A10 - % MUC1*+
% MUC1*+
100%
80%
60%
40%
20%
0%
25
8.3
2.8
0.93
0.31
0
T47D mCherry.Luc WT
T47D mCherry.Luc MUC1-GFP A1
m20A10-L4 未缀合
m20A10-L4-MMAE 大规模

图 37B

图 37A

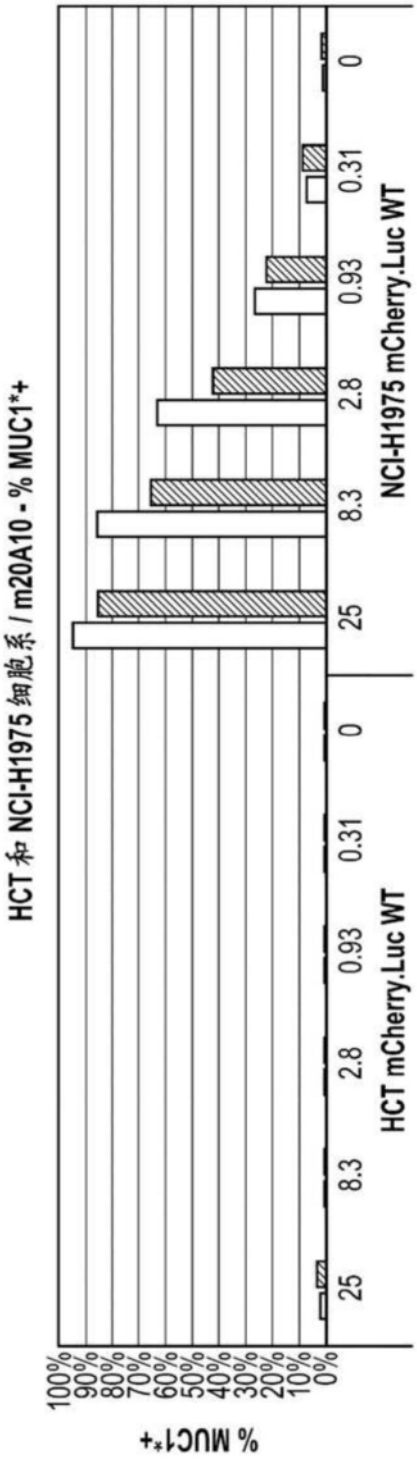

HCT 和 NCI-H1975 细胞系 / m20A10 - % MUC1*+
% MUC1*+
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
25
8.3
2.8
0.93
0.31
0
HCT mCherry.Luc WT
NCI-H1975 mCherry.Luc WT
m20A10-L4 未缀合
m20A10-L4-MMAE 大规模

图 37D

图 37C

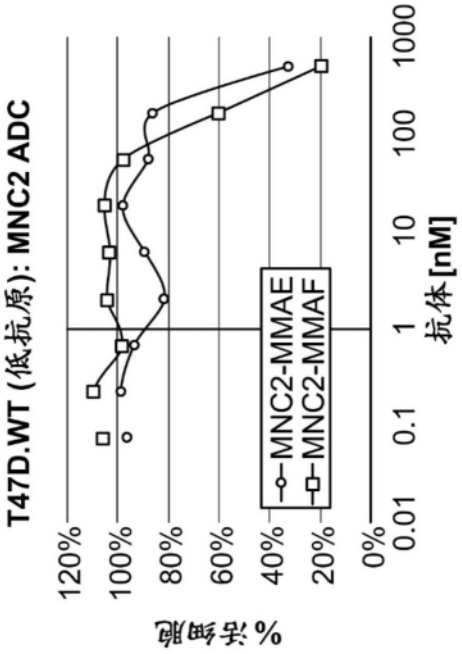

T47D.WT (低抗原): MNC2 ADC
% 活细胞
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体 [nM]
MNC2-MMAE
MNC2-MMAF

图38A

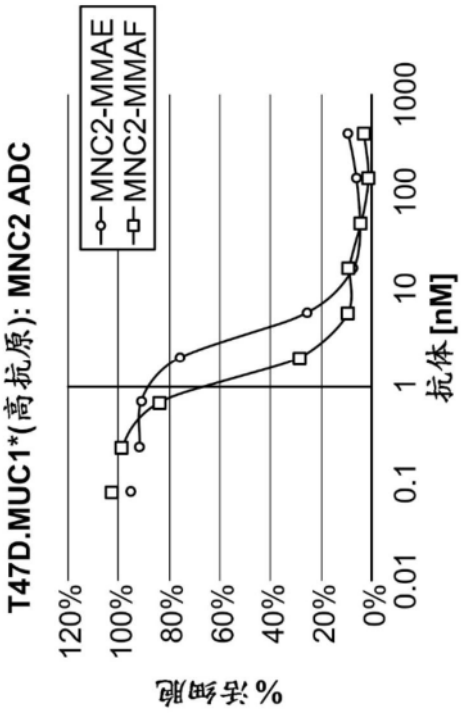

T47D.MUC1*(高抗原): MNC2 ADC
% 活细胞
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体 [nM]
MNC2-MMAE
MNC2-MMAF

图38B

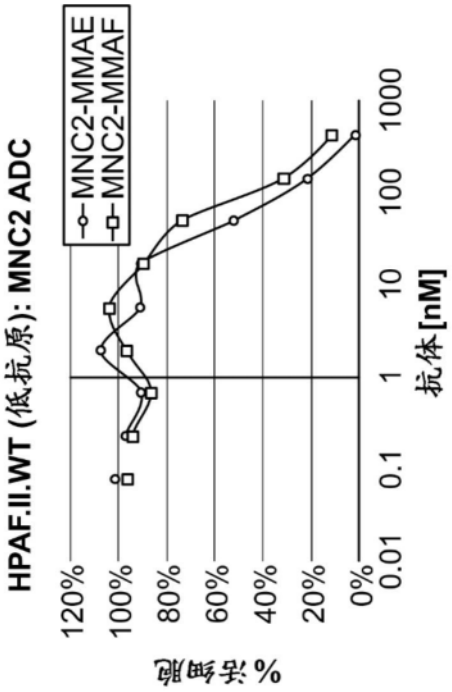

HPAF.II.WT (低抗原): MNC2 ADC
MNC2-MMAE
MNC2-MMAF
% 活细胞
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体[nM]

图38C

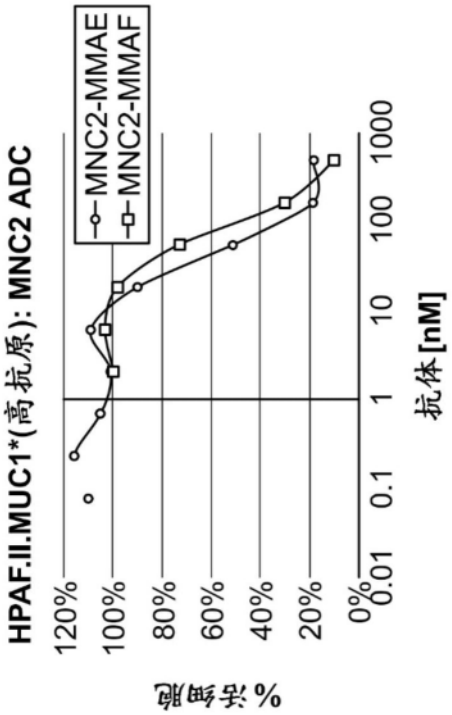

HPAF.II.MUC1*(高抗原): MNC2 ADC
MNC2-MMAE
MNC2-MMAF
% 活细胞
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体[nM]

图38D

	DAR	IC50 nM	R^2
T47D WT_MNC2-MMAE	4.1	>150	0.93
T47D WT_MNC2-MMAF	3.7	>150	0.99
HPAF-II WT_MNC2-MMAE	4.1	66.62	0.981
HPAF-II WT_MNC2-MMAF	3.7	100.31	0.980

图38E

	DAR	IC50 nM	R^2
T47D MUC1*_MNC2-MMAE	4.1	3.62	0.999
T47D MUC1*_MNC2-MMAF	3.7	1.28	0.998
HPAF-II MUC1*_MNC2-MMAE	4.1	41.58	0.988
HPAF-II MUC1*_MNC2-MMAF	3.7	89.61	0.998

图38F

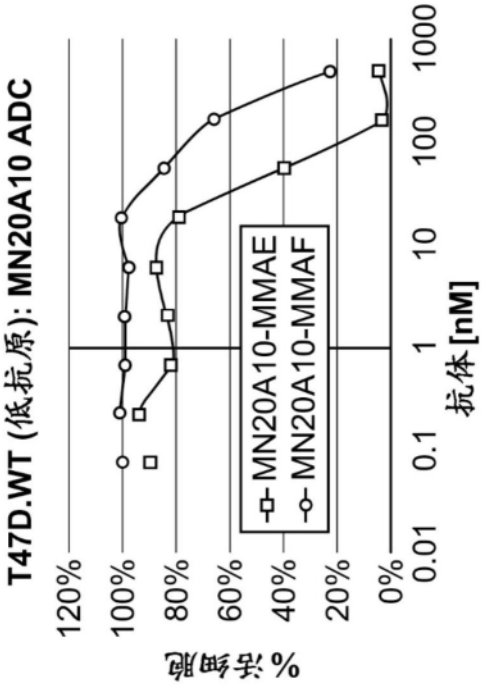

T47D.WT (低抗原): MN20A10 ADC
% 活细胞
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体[nM]
MN20A10-MMAE
MN20A10-MMAF

图39A

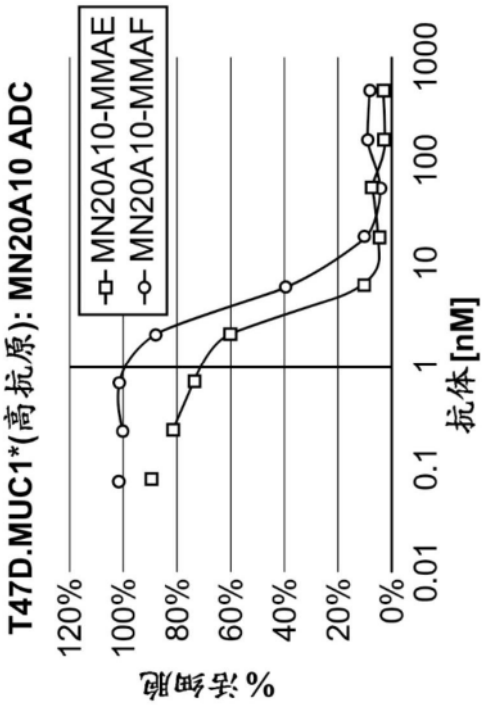

T47D.MUC1*(高抗原): MN20A10 ADC
% 活细胞
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体[nM]
MN20A10-MMAE
MN20A10-MMAF

图39B

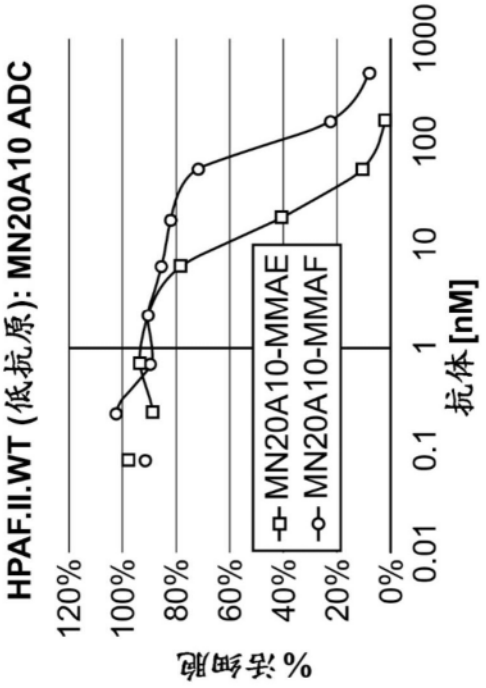

HPAF.II.WT (低抗原): MN20A10 ADC
% 活细胞
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体 [nM]
MN20A10-MMAE
MN20A10-MMAF

图39C

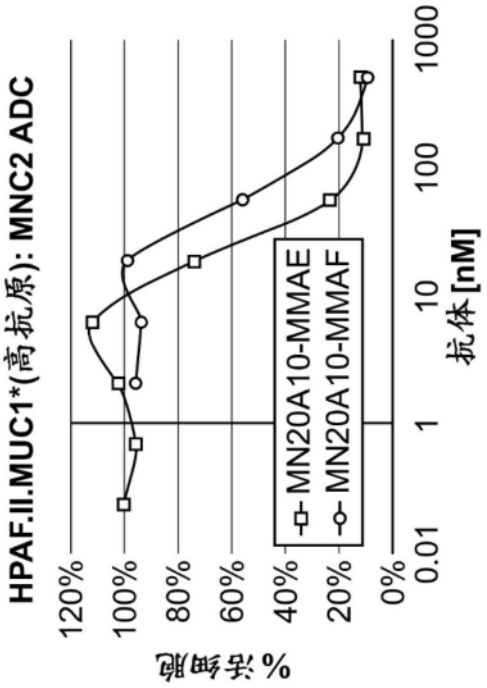

HPAF.II.MUC1*(高抗原): MNC2 ADC
% 活细胞
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0.01
1
10
100
1000
抗体 [nM]
MN20A10-MMAE
MN20A10-MMAF

图39D

	DAR	IC50 nM	R^2
T47D WT_MN20A10-MMAE	5.8	50.88	0.99
T47D WT_MN20A10-MMAF	3.8	>150	0.99
HPAF-II WT_MN20A10-MMAE	5.8	17.32	0.997
HPAF-II WT_MN20A10-MMAF	3.8	93.49	0.976

图39E

	DAR	IC50 nM	R^2
T47D MUC1*_MN20A10-MMAE	5.8	2.81	0.991
T47D MUC1*_MN20A10-MMAF	3.8	4.62	0.999
HPAF-II MUC1*_MN20A10-MMAE	5.8	25.25	0.99
HPAF-II MUC1*_MN20A10-MMAF	3.8	58.35	0.99

图39F

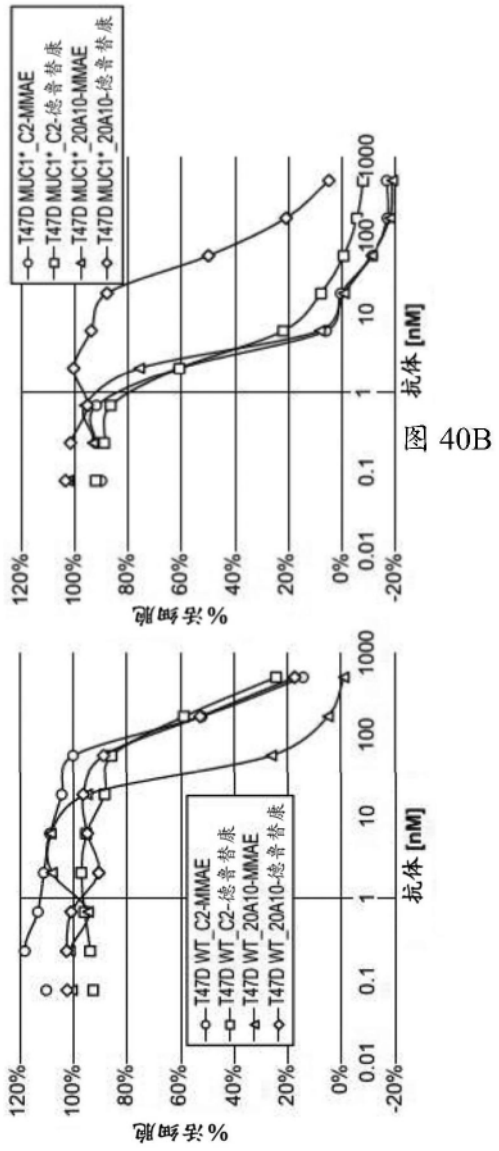

T47D MUC1*_C2-MMAE
T47D MUC1*_C2-德鲁替康
T47D MUC1*_20A10-MMAE
T47D MUC1*_20A10-德鲁替康
T47D WT_C2-MMAE
T47D WT_C2-德鲁替康
T47D WT_20A10-MMAE
T47D WT_20A10-德鲁替康
% 活细胞
抗体 [nM]
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
0.01
0.1
1
10
100
1000

图 40B

图 40A

	DAR	IC50 nM	R^2
T47D WT_MNC2-MMAE	4.1	149.17	0.9911
T47D WT_MNC2-德鲁替康	7.2	239.12	0.9934
T47D WT_MN20A10-MMAE	5.8	39.52	0.9913
T47D WT_MN20A10-德鲁替康	4.6	166.79	0.9834
T47D MUC1*_MNC2-MMAE	4.1	3.09	0.9915
T47D MUC1*_MNC2-德鲁替康	7.2	5.27	0.9976
T47D MUC1*_MN20A10-MMAE	5.8	3.57	0.9909
T47D MUC1*_MN20A10-德鲁替康	4.6	57.12	0.9943

图40C

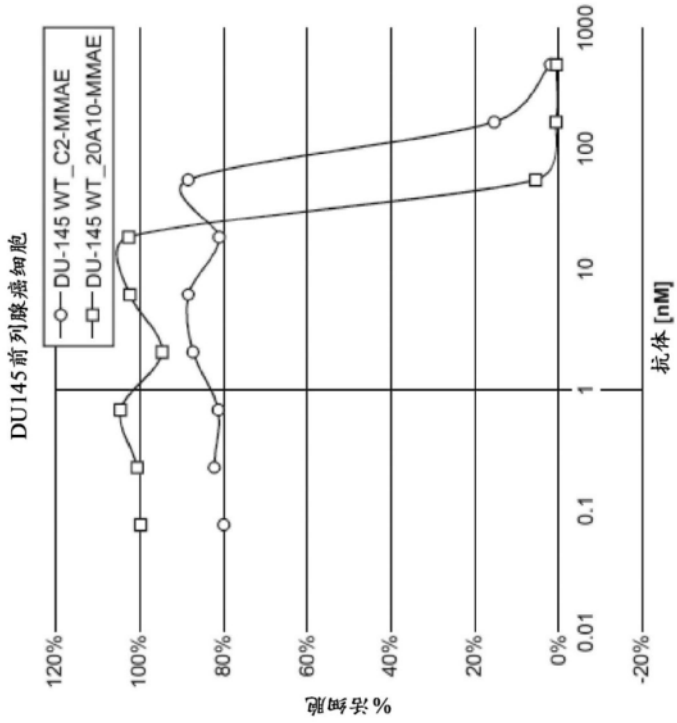


图41A

	DAR	IC50 nM	R^2
DU-145 WT_C2-MMAE	4.1	86.82	0.9930
DU-145 WT_20A10-MMAE	5.8	36.47	0.9975

图41B

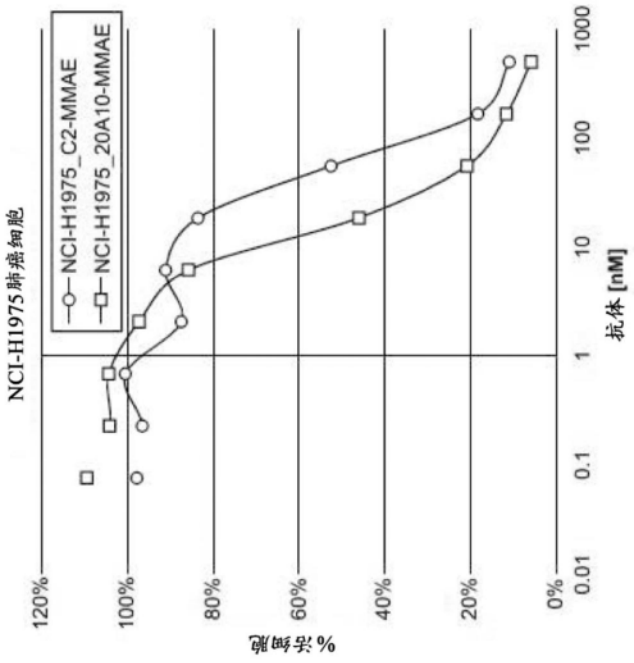
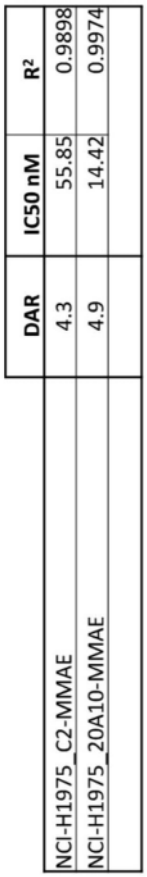


图42A



	DAR	IC50 nM	R^2
NCI-H1975_C2-MMAE	4.3	55.85	0.9898
NCI-H1975_20A10-MMAE	4.9	14.42	0.9974

图42B

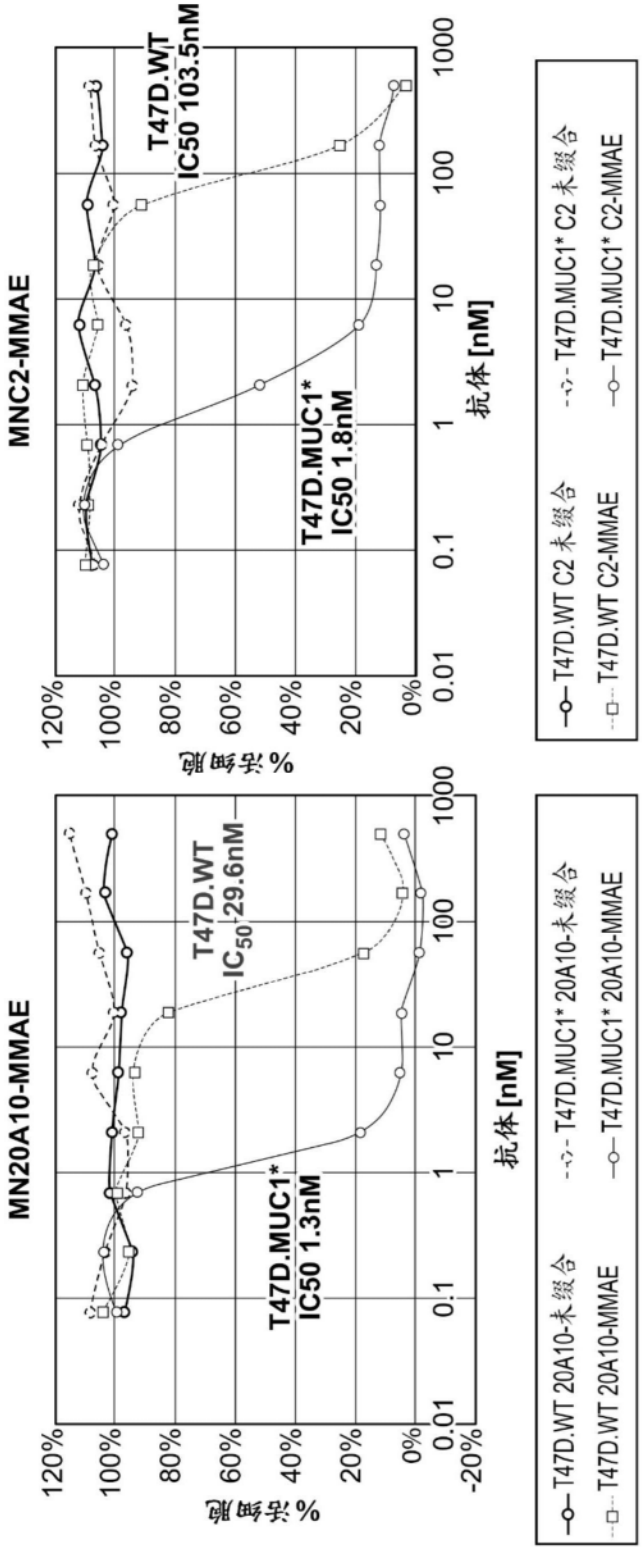


图 43A

图 43B

	DAR	IC50 nM	R^2
T47D WT_MN20A10-MMAE	5.2	29.6	
T47D-MUC1*_MN20A10-MMAE	5.2	1.3	
T47D WT_MNC2-MMAE	4.3	103.5	
T47D-MUC1* MNC2-MMAE	4.3	1.8	

图 43C

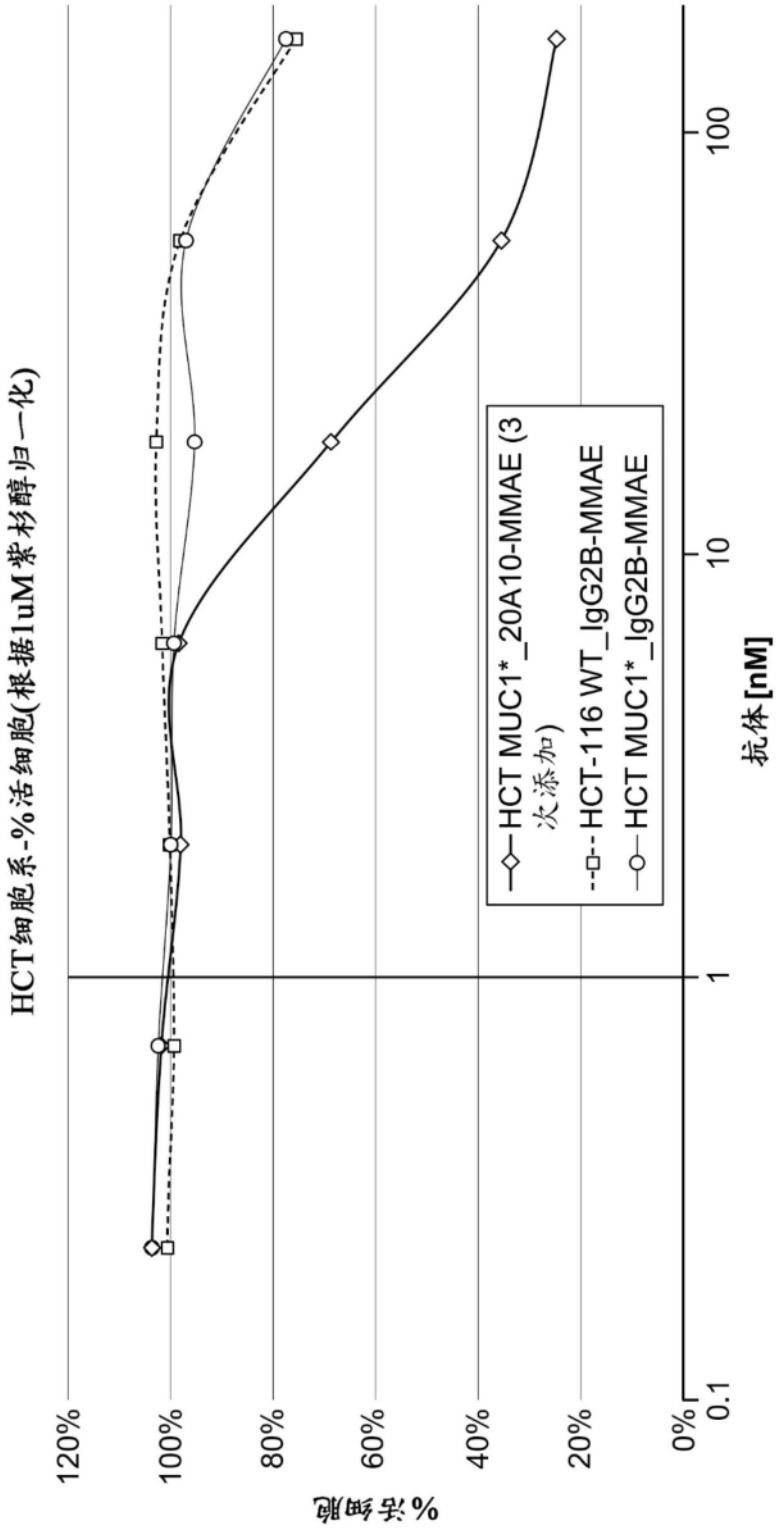

HCT细胞系-%活细胞(根据1uM紫杉醇归一化)
% 活细胞
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0.1
1
10
100
抗体 [nM]
HCT MUC1*_20A10-MMAE (3次添加)
HCT-116 WT_IgG2B-MMAE
HCT MUC1*_IgG2B-MMAE

图44A

	DAR
HCT-MUC1*_MN20A10-MMAE	3.8
HCT-MUC1*_IgG2b-MMAE	4.8
HCT-116_IgG2b-MMAE	4.8

图44B

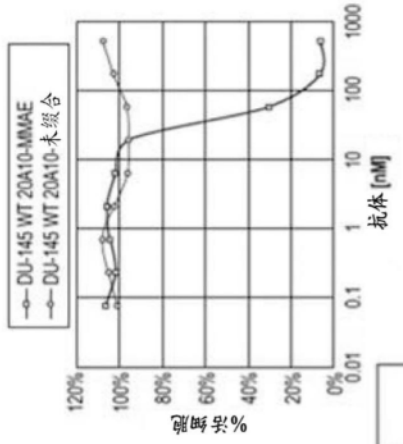


图 45B

	DAR	IC50 nM	R^2
NCI-H1975_MN20A10-MMAE	5.2	14.97	0.99
NCI-H1975_MN20A10-未缀合	NA	>150	
DU-145 WT_MN20A10-MMAE	5.2	39.23	0.99
DU-145 WT_MN20A10-未缀合	NA	>150	
HPAF-II WT_MN20A10-MMAE	4.3	14.97	0.99
HPAF-II WT_MN20A10-未缀合	NA	>150	
HPAF-II MUC1*_MN20A10-MMAE	5.2	6.4	0.99
HPAF-II MUC1*_MN20A10-未缀合	NA	>150	

图 45D

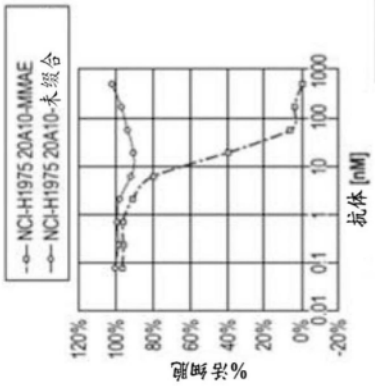


图 45A

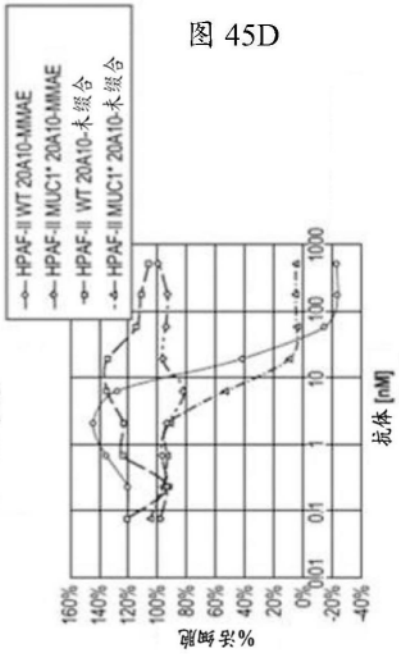
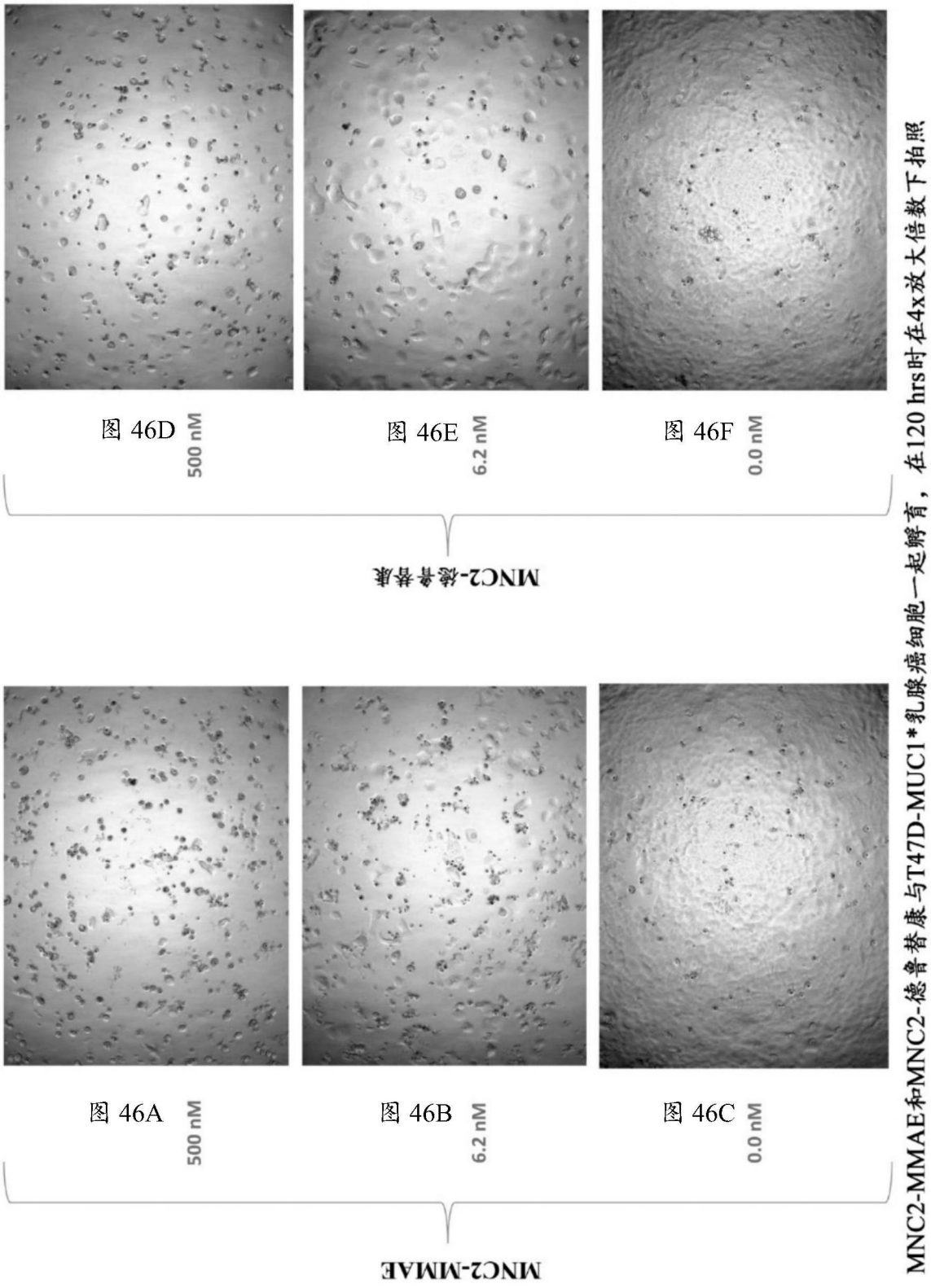


图 45C


MNC2-MMAE和MNC2-德鲁替康与T47D-MUC1*乳腺癌细胞一起孵育，在120 hrs时在4x放大倍数下拍照
MNC2-MMAE
MNC2-德鲁替康
图 46A
500 nM
图 46B
6.2 nM
图 46C
0.0 nM
图 46D
500 nM
图 46E
6.2 nM
图 46F
0.0 nM

MNC2-MMAE和MNC2-德鲁替康与T47D-MUC1*乳腺癌细胞一起孵育，在120 hrs时在20x放大倍数下

MNC2-MMAE和MNC2-德鲁替康与DU145前列腺癌细胞一起孵育

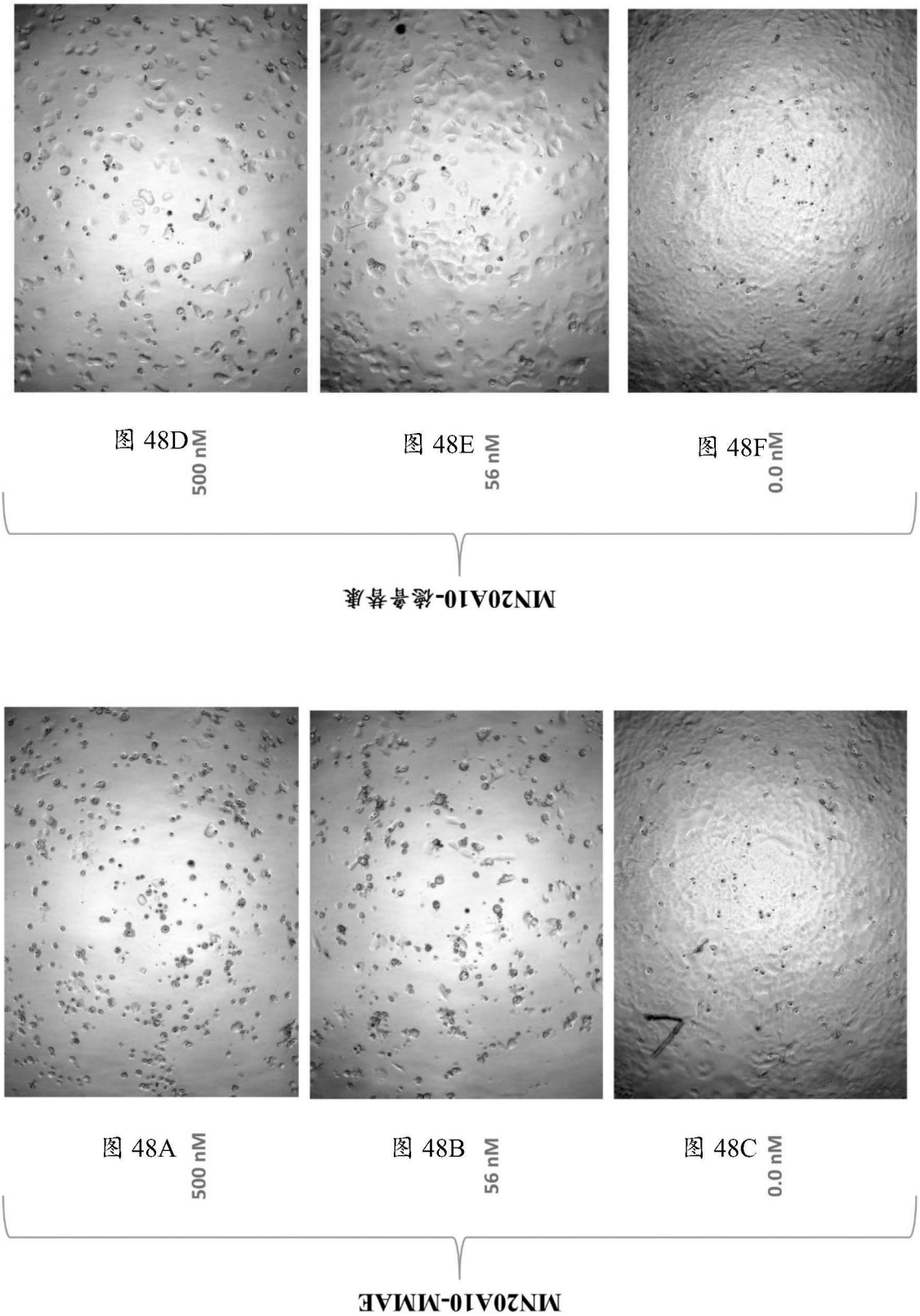


图 48A 图 48B 图 48C

图 48D 图 48E 图 48F

图 48I 56 nM

图 48J 0.0 nM

MN20A10-德鲁替康

图 48G 56 nM

图 48H 0.0 nM

MN20A10-MMAE

MN20A10-MMAE和MN20A10-德鲁替康与T47D-MUC1*乳腺癌细胞一起孵育

MN20A10-MMAE和MN20A10-德鲁替康与DU145前列腺癌细胞一起孵育，在120 hr时在4x放大倍数下

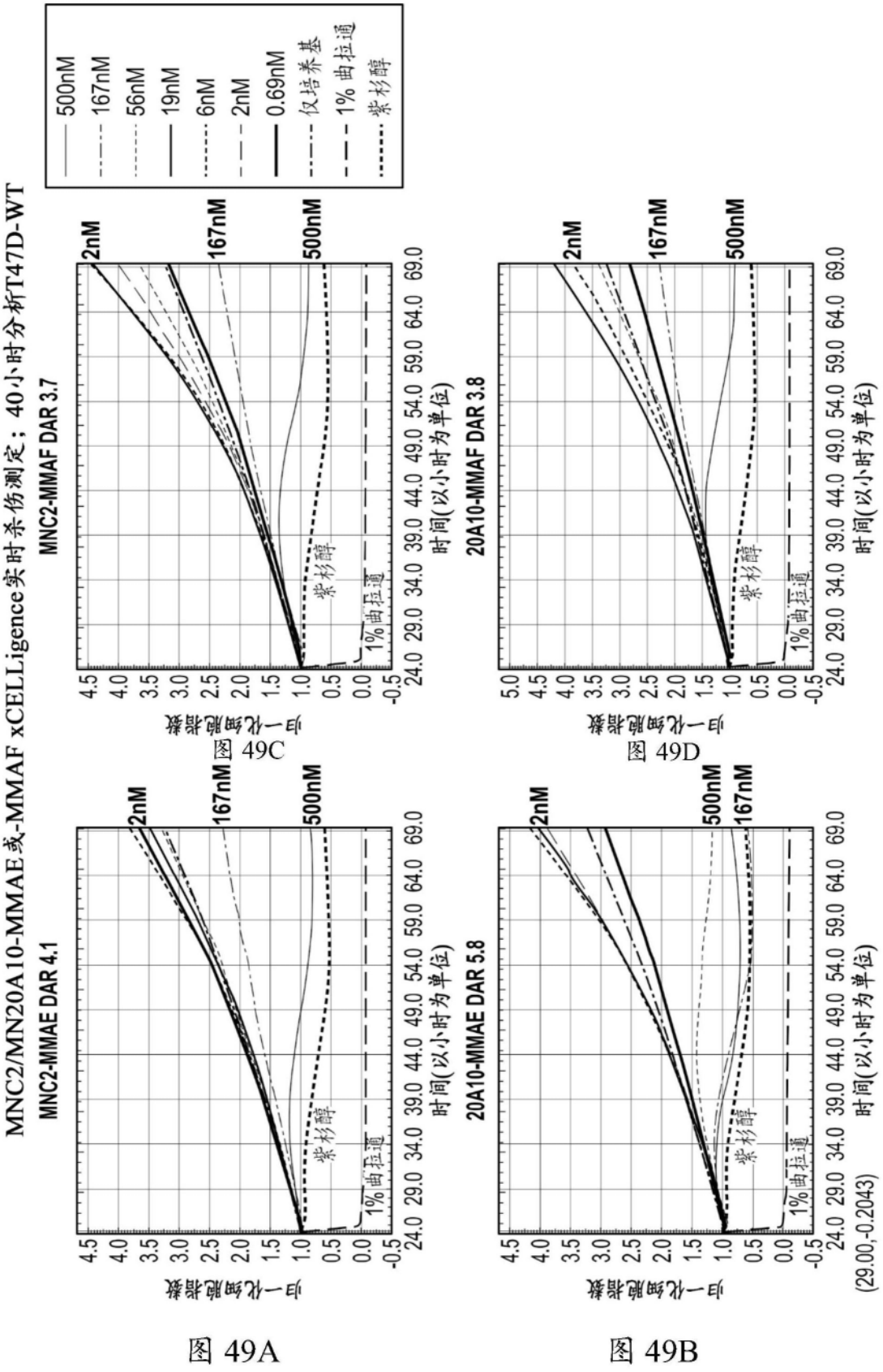


图 49A 图 49B

图 49C 图 49D

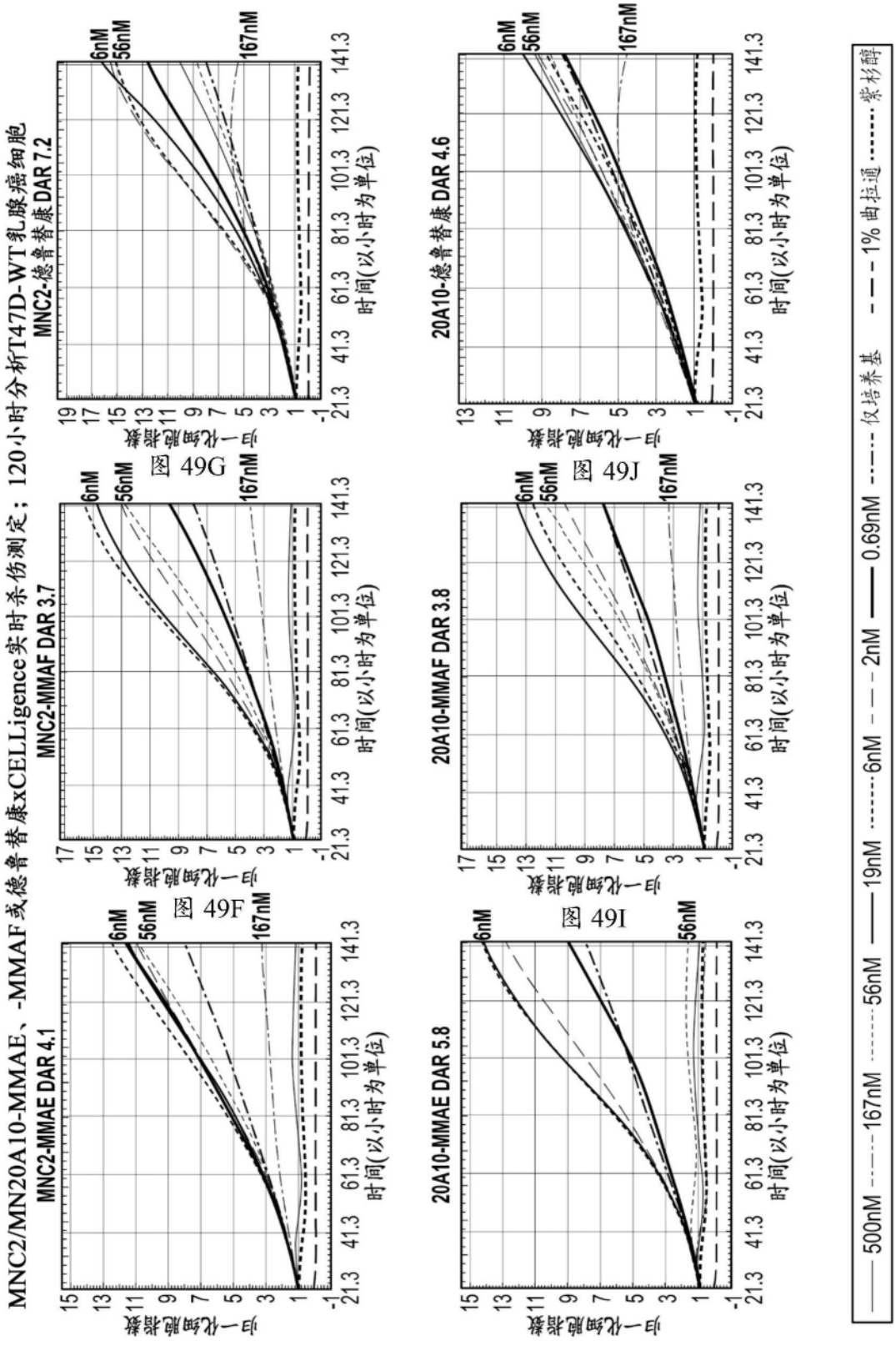


图 49E 图 49F 图 49G 图 49H 图 49I 图 49J

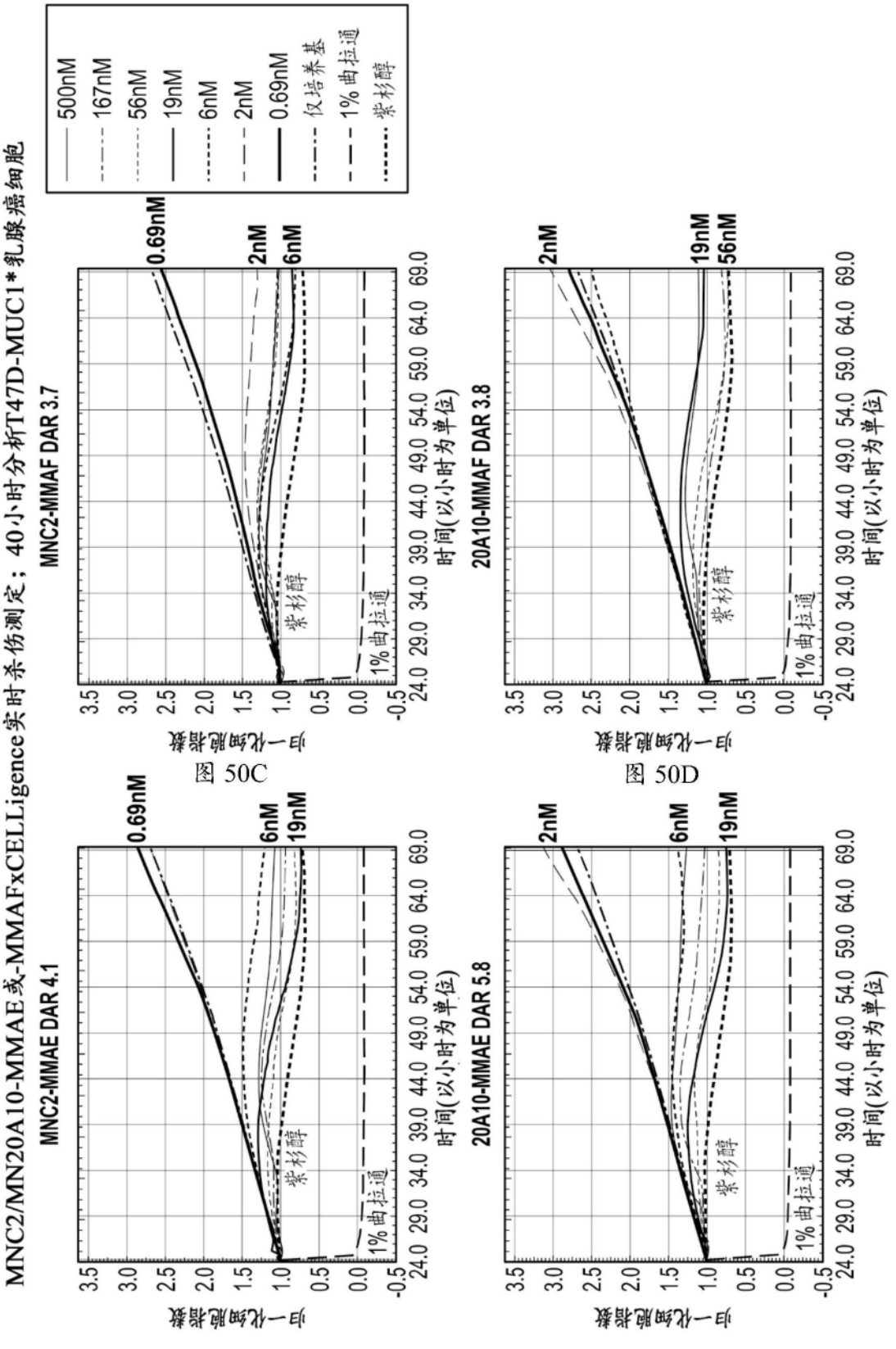
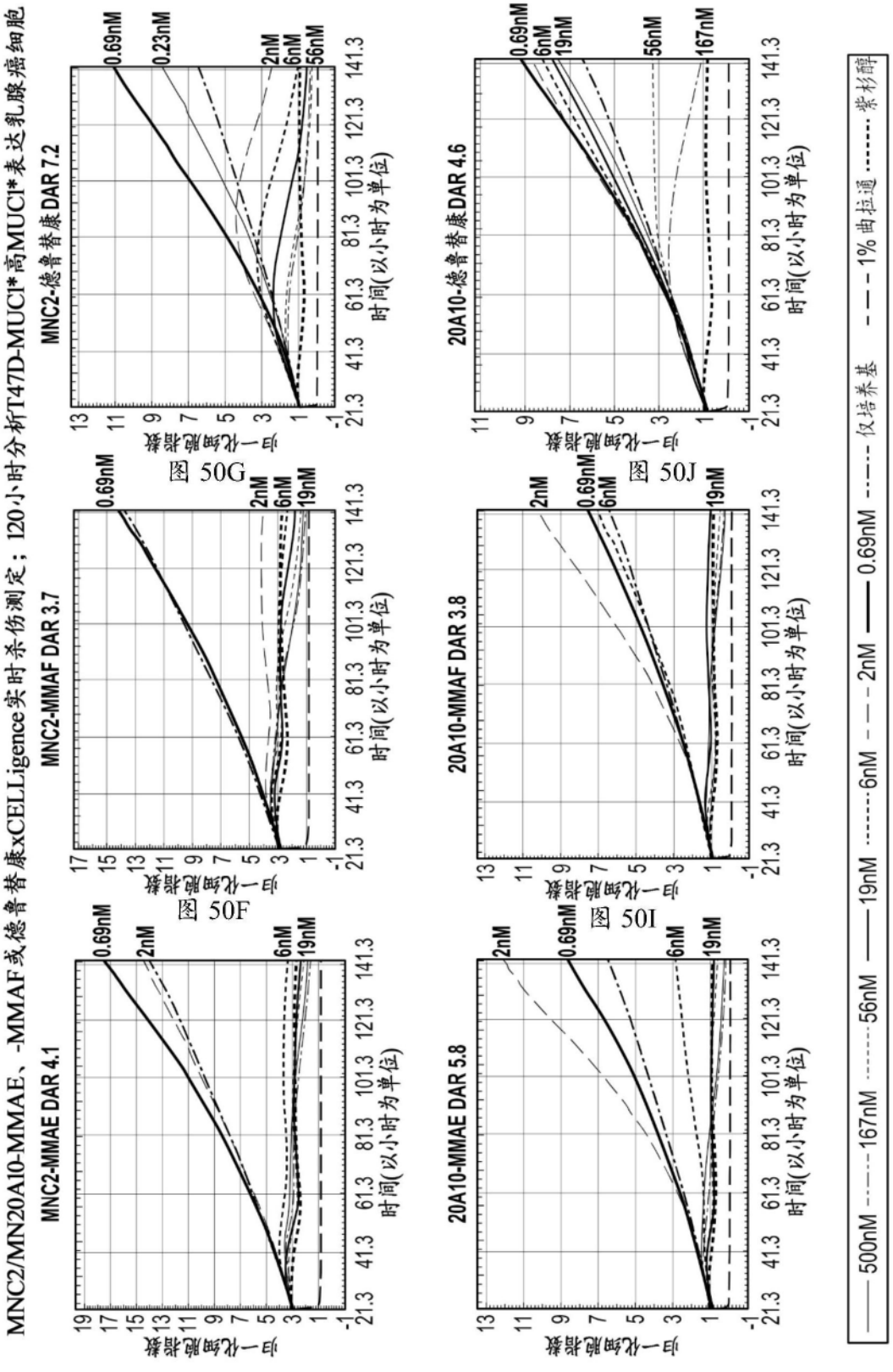


图 50A

图 50B

图 50C

图 50D


MNC2/MN20A10-MMAE、-MMAF或德鲁替康xCELLigence实时杀伤测定；120小时分析T47D-MUC1*高MUC1*表达乳腺癌细胞
MNC2-MMAE DAR 4.1
MNC2-MMAF DAR 3.7
MNC2-德鲁替康 DAR 7.2
20A10-MMAE DAR 5.8
20A10-MMAF DAR 3.8
20A10-德鲁替康 DAR 4.6
归一化细胞指数
时间(以小时为单位)
0.69nM
2nM
6nM
19nM
56nM
167nM
0.23nM
500nM
仅培养基
1% 曲拉通
紫杉醇
图 50E
图 50F
图 50G
图 50H
图 50I
图 50J

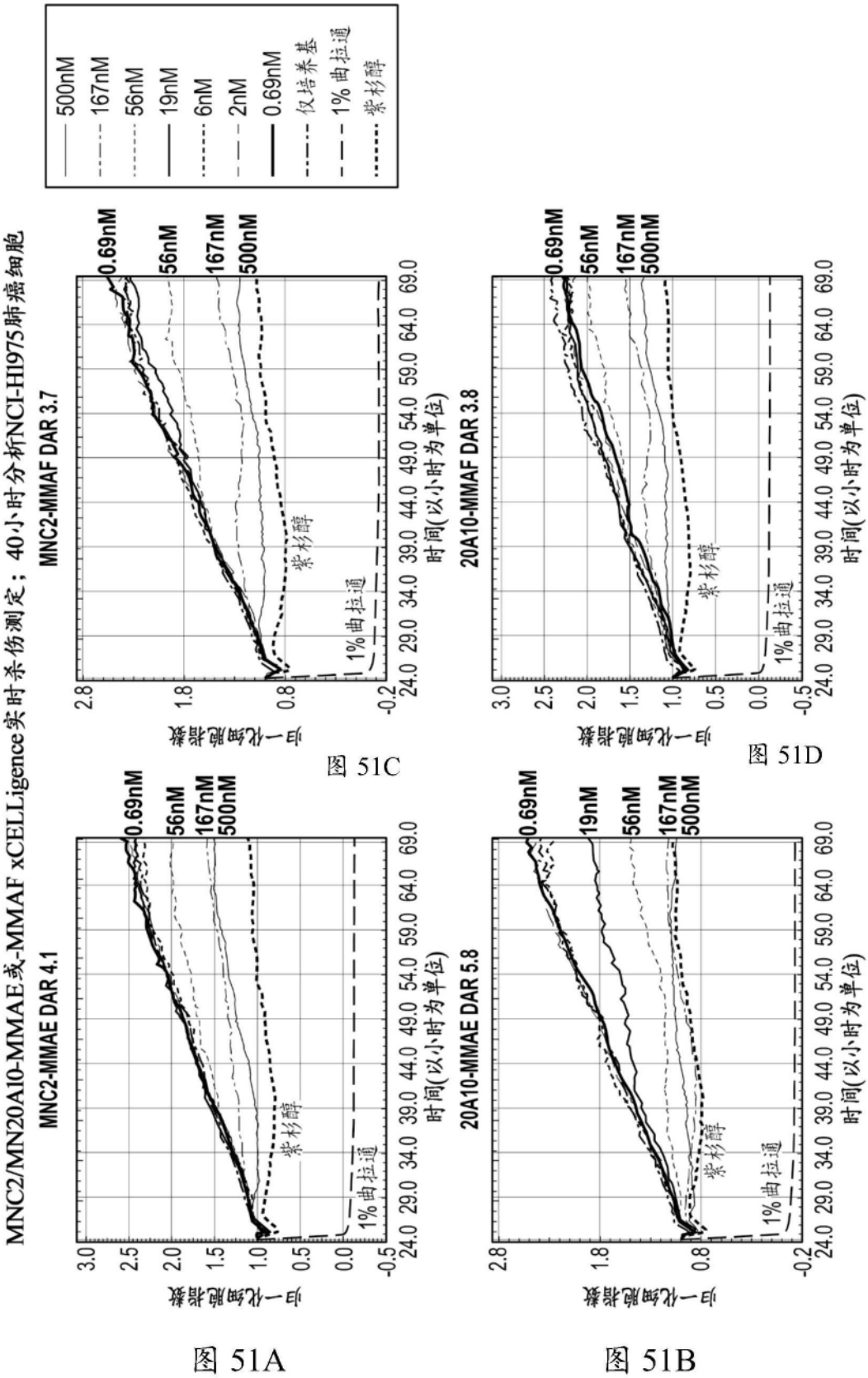


图 51A

图 51B

图 51C

图 51D

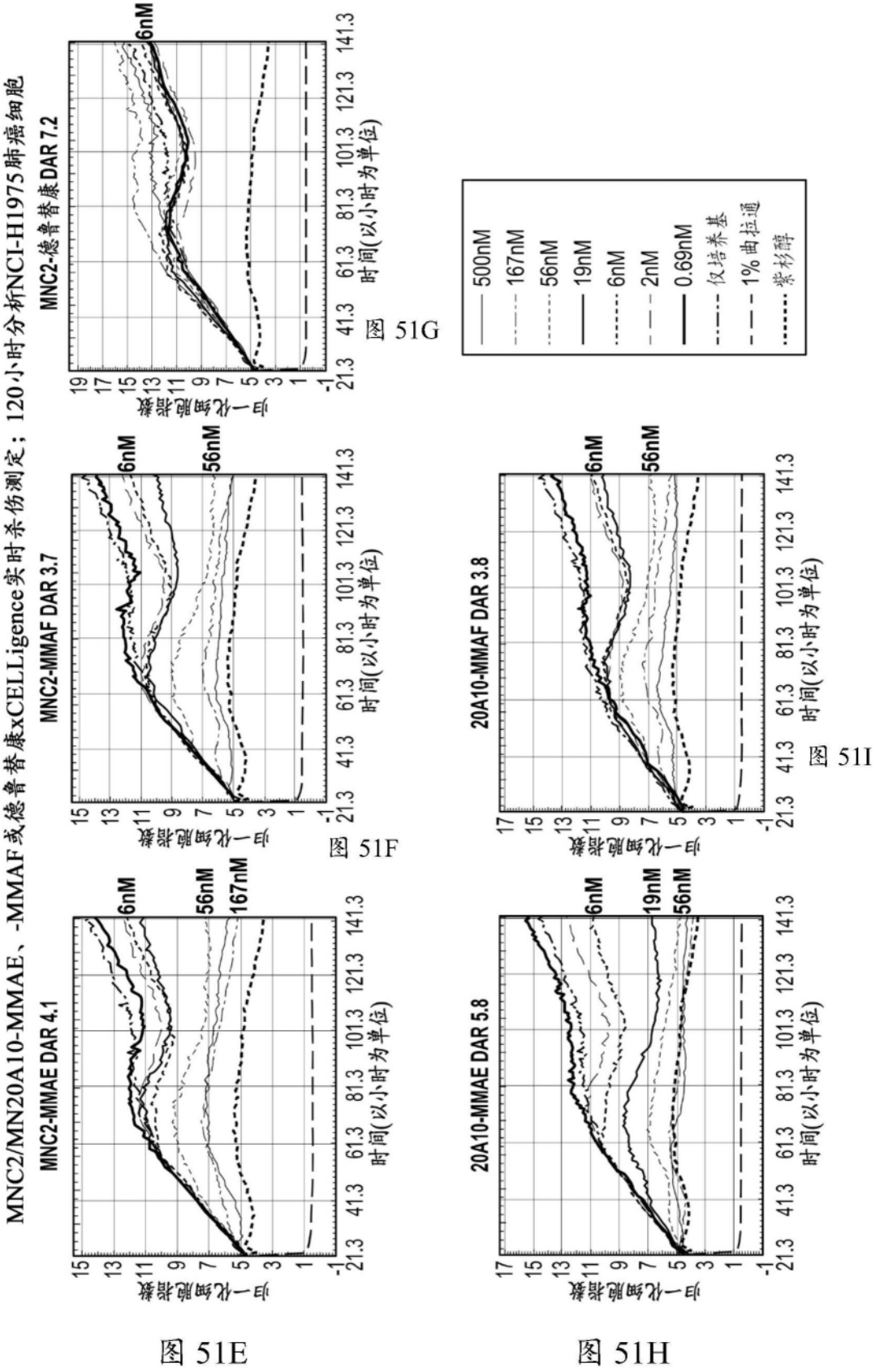


图 51E 图 51F 图 51G

图 51H 图 51I

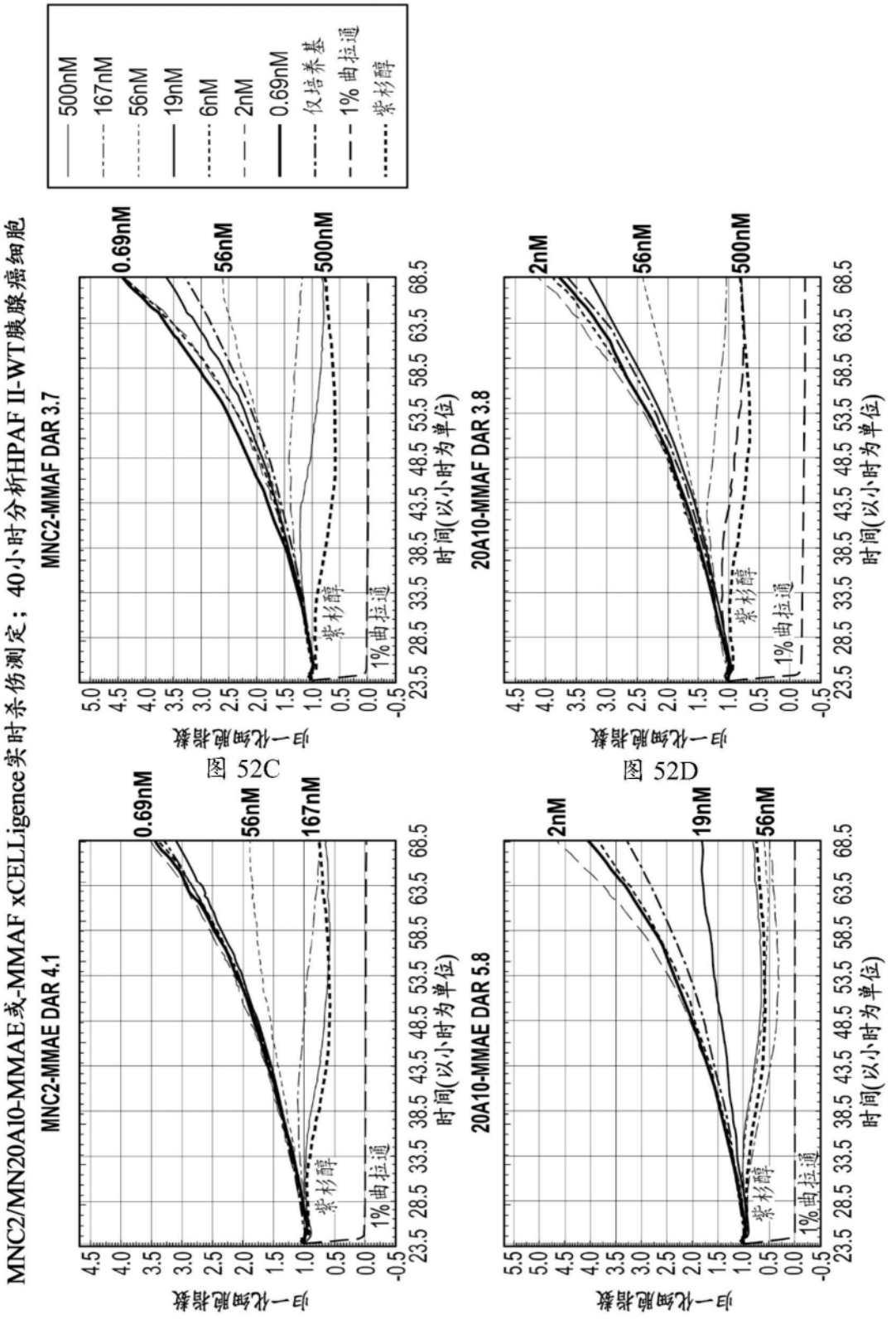


图 52A 图 52B

图 52C 图 52D

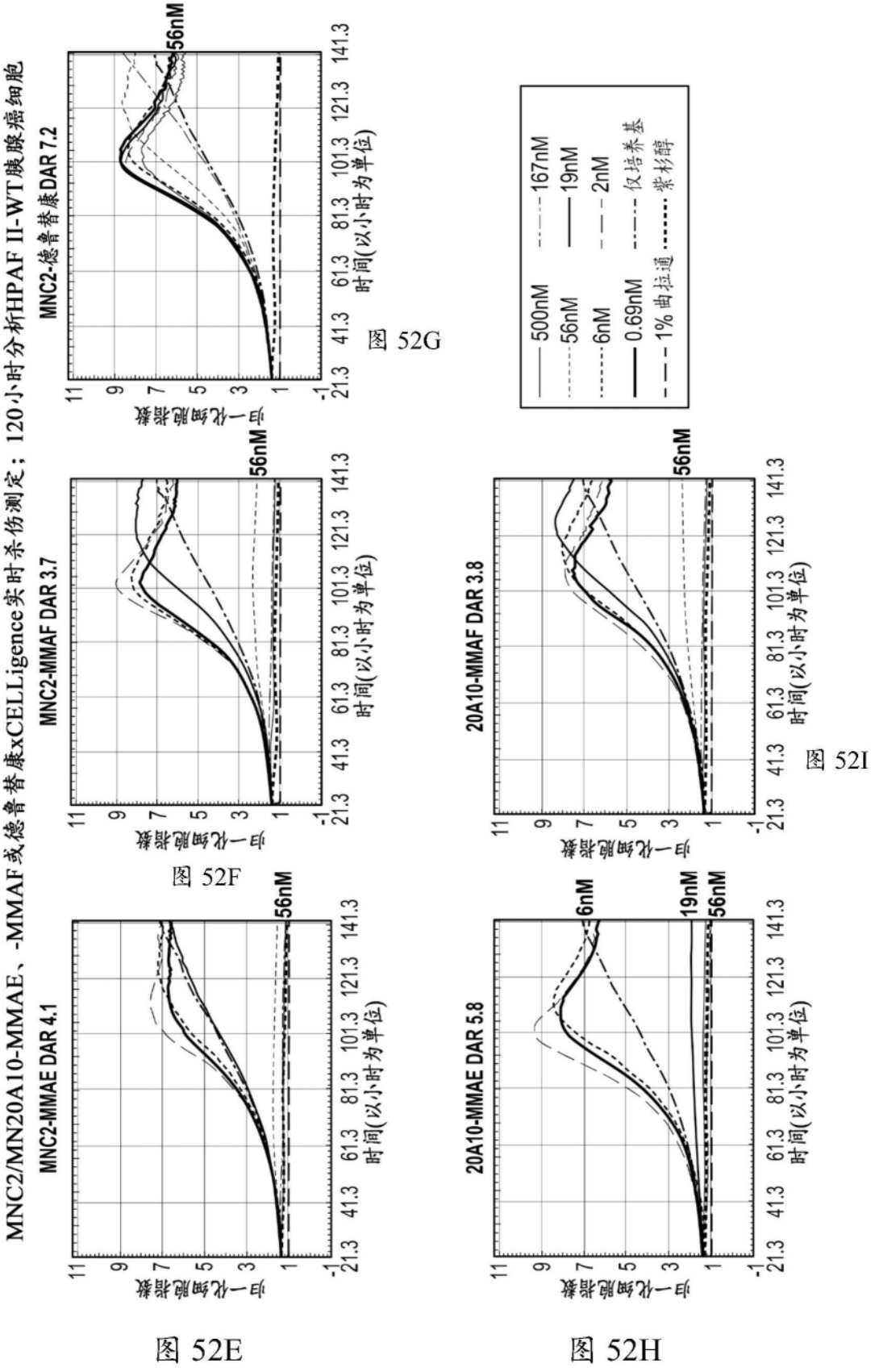


图 52E 图 52F 图 52G 图 52H 图 52I

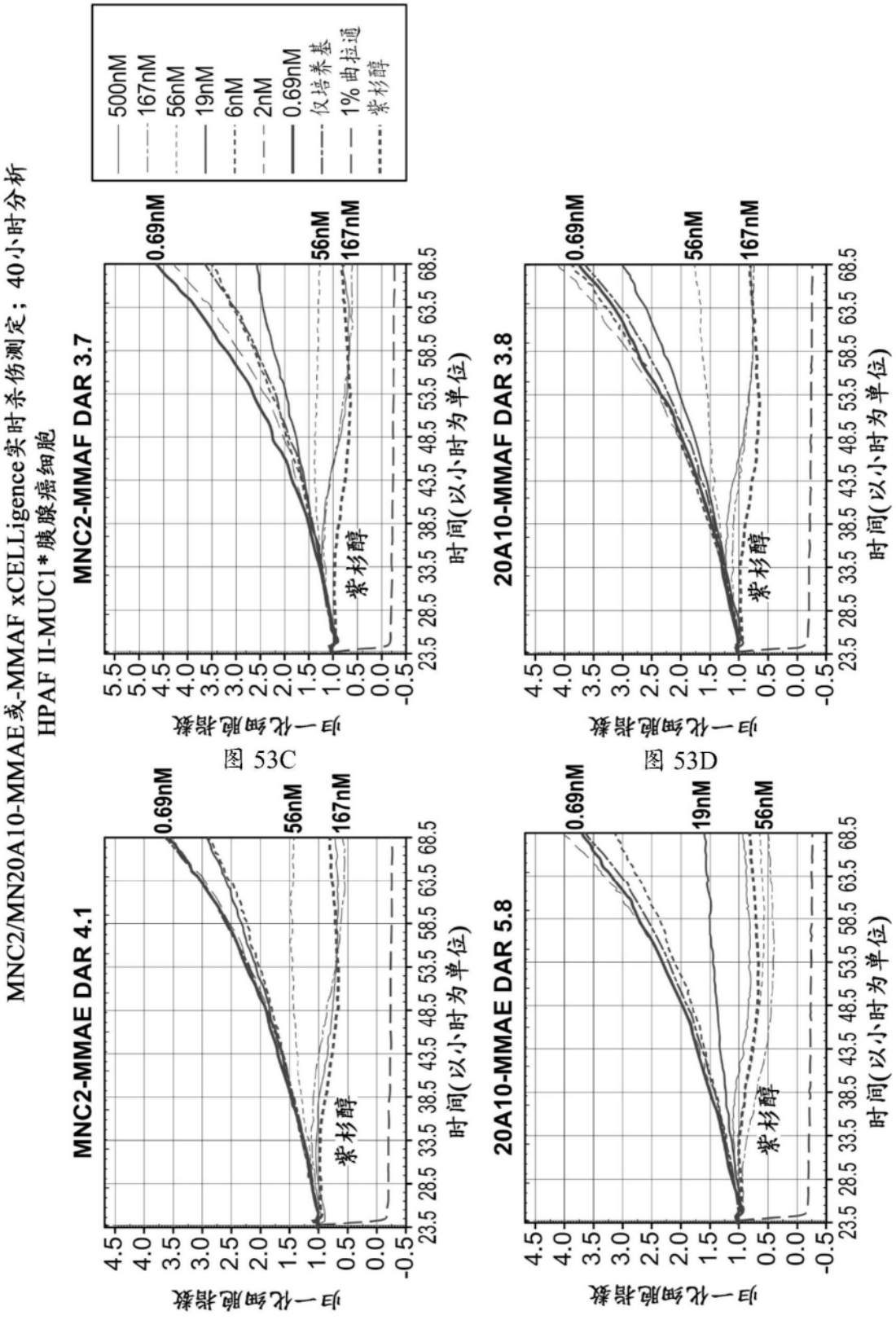


图 53A 图 53B

图 53C 图 53D

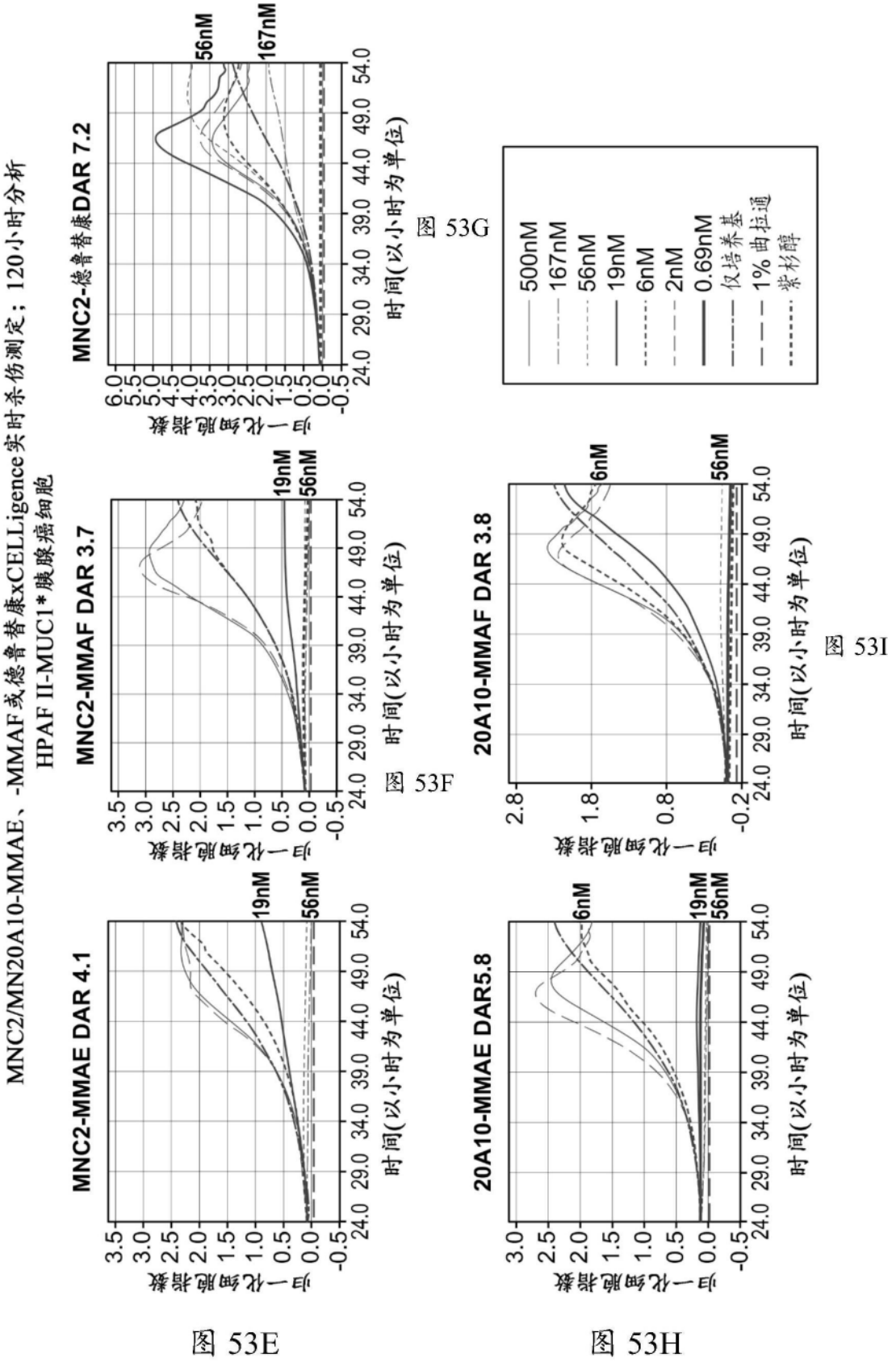


图 53E 图 53F 图 53G 图 53H 图 53I

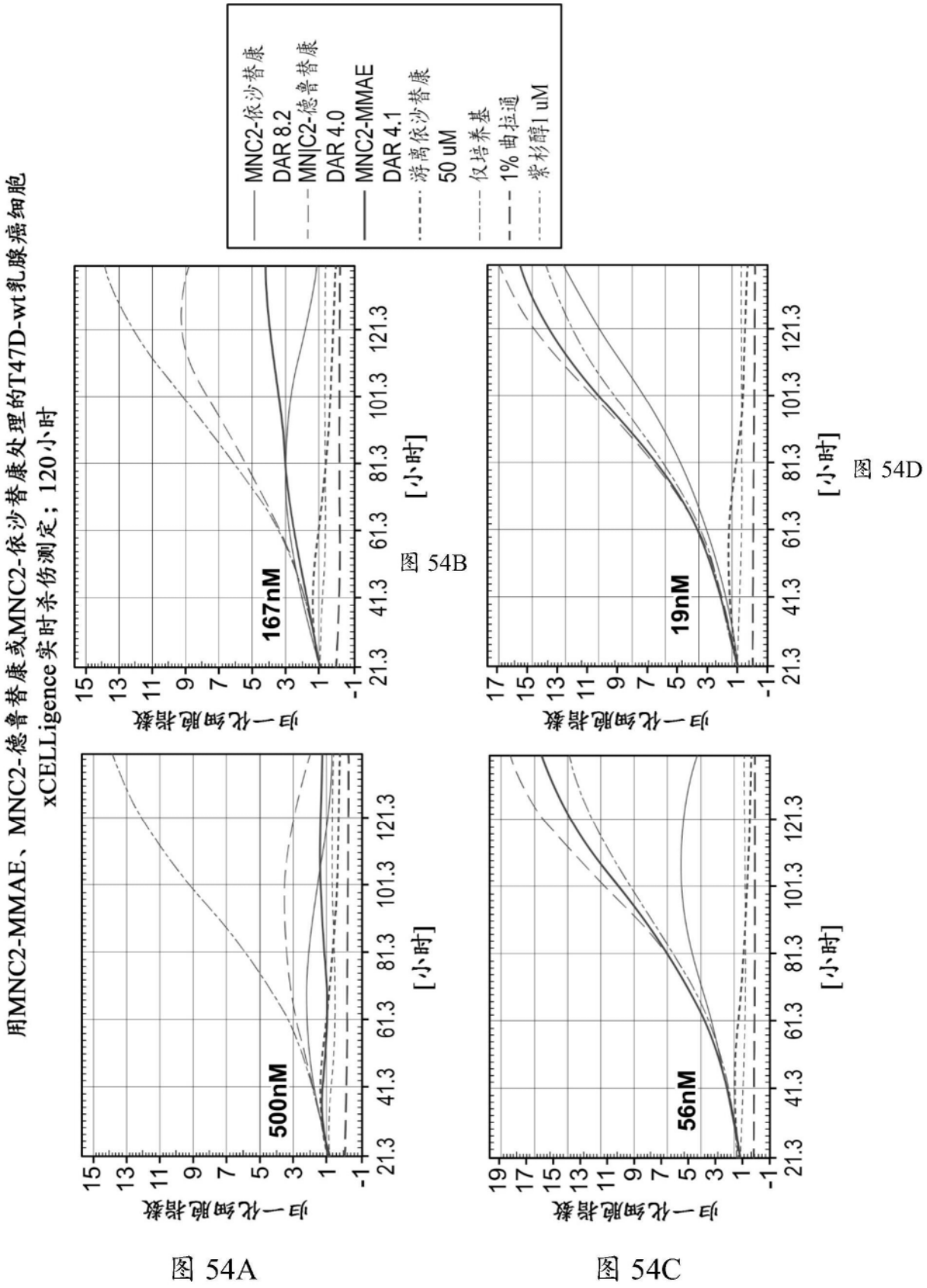


图 54A 图 54B 图 54C 图 54D

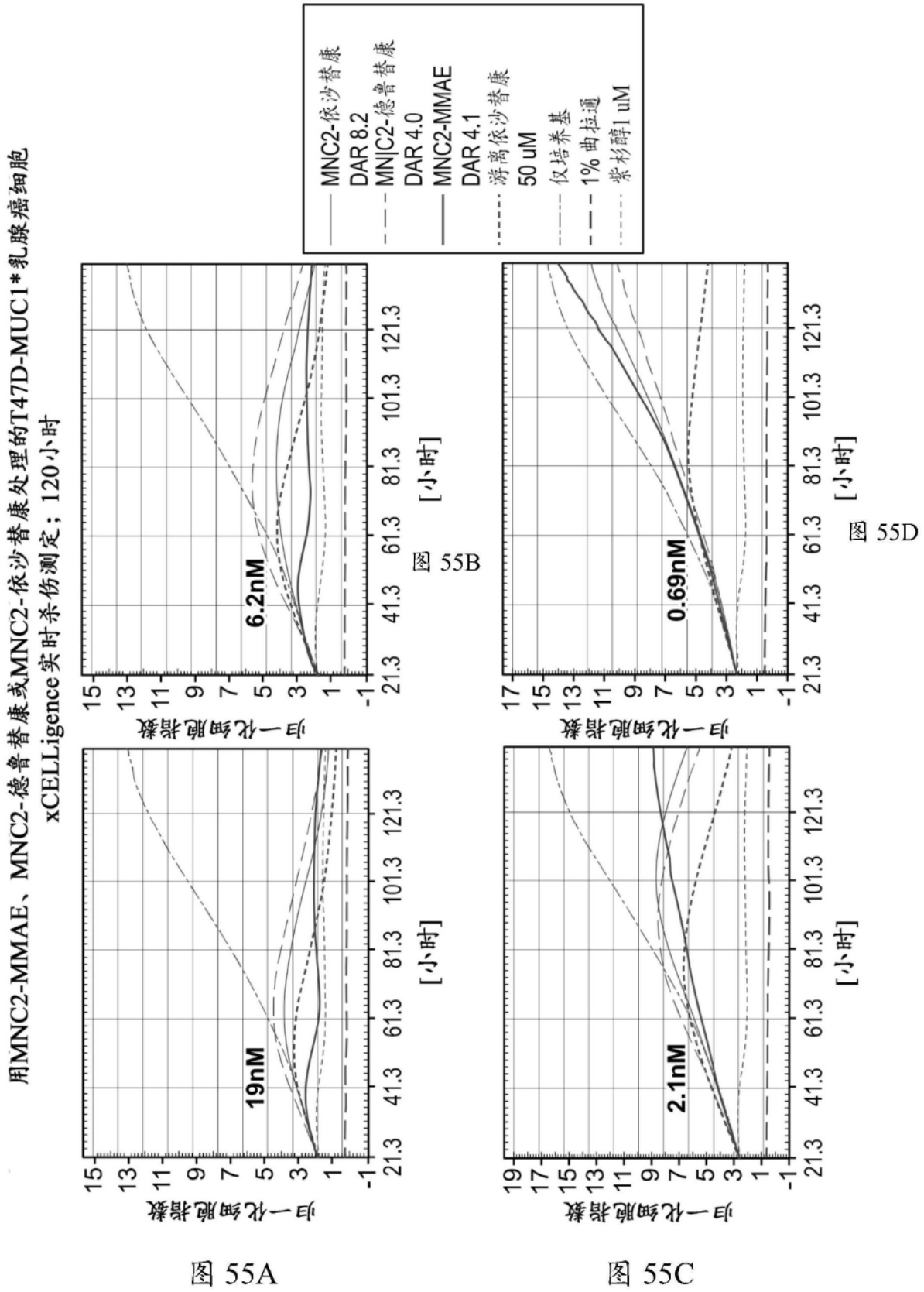


图 55A 图 55B 图 55C 图 55D

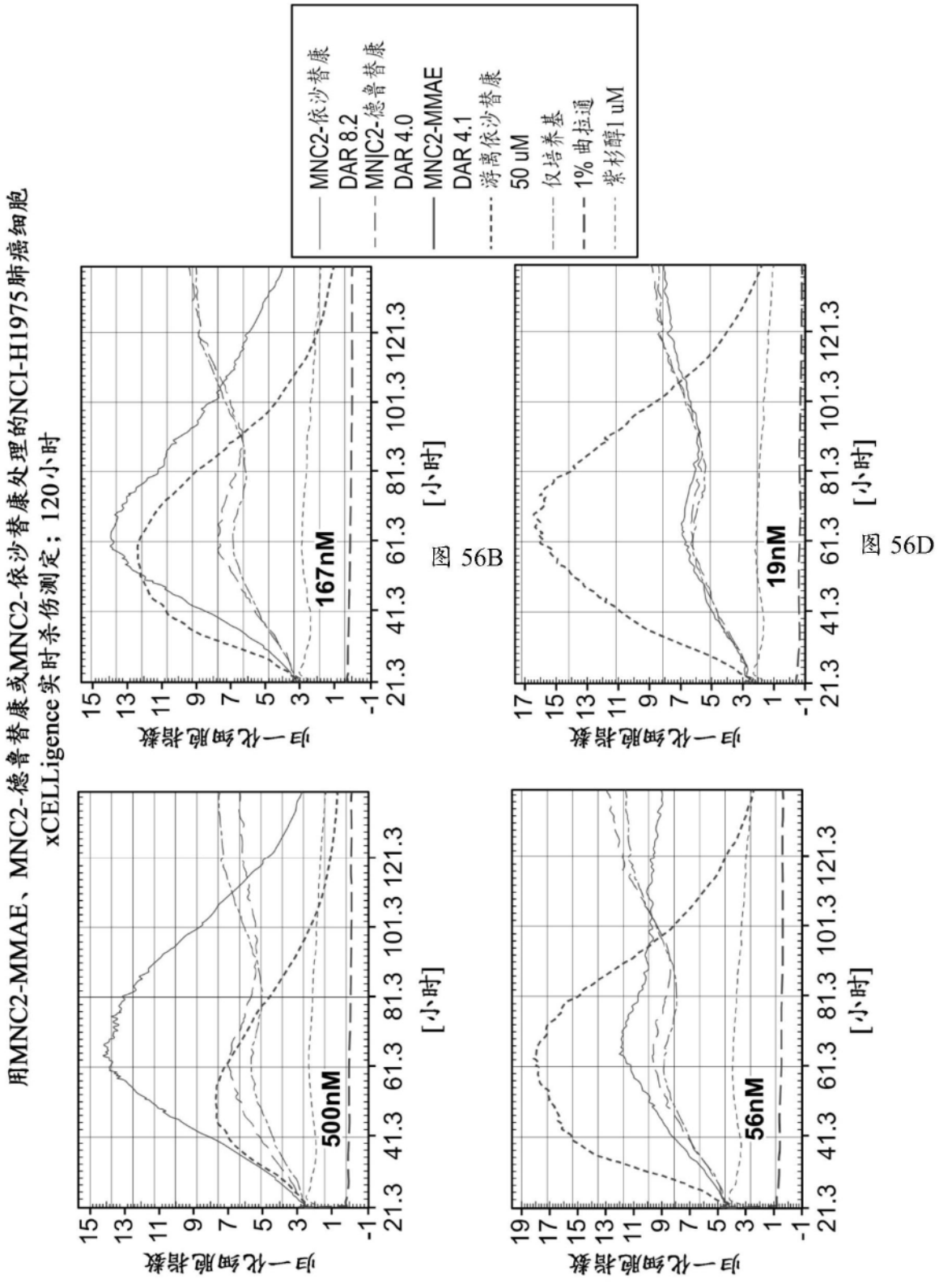


图 56A 图 56B 图 56C 图 56D

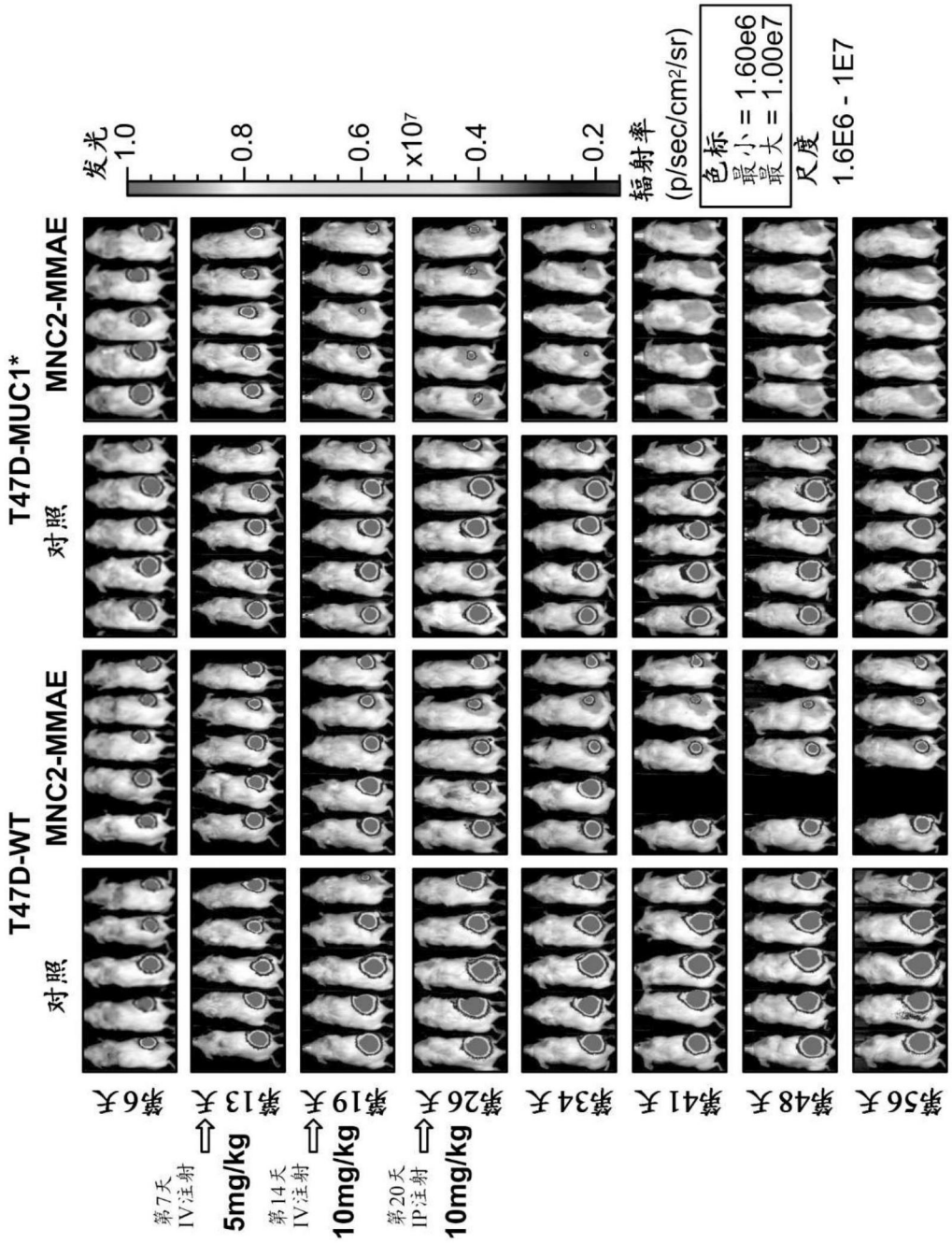


图 57A

MNC2-MMAE T47D 与 T47D-MUC1*

图 57B

图 57C

图 57D

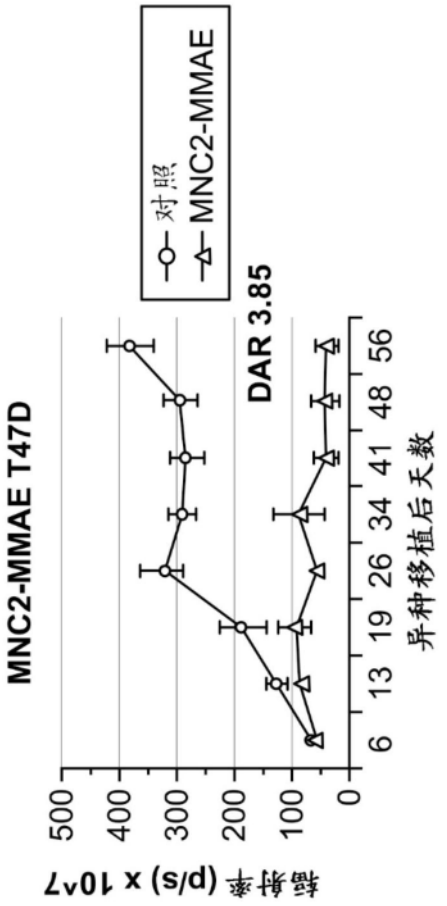

MNC2-MMAE T47D
DAR 3.85
对照
MNC2-MMAE
辐射率 (p/s) x 10^7
500
400
300
200
100
0
6 13 19 26 34 41 48 56
异种移植后天数

图57E

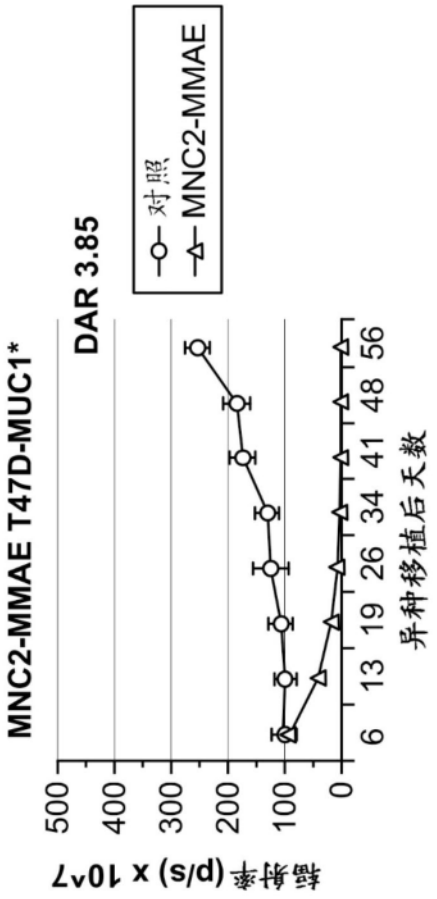

MNC2-MMAE T47D-MUC1*
DAR 3.85
对照
MNC2-MMAE
辐射率 (p/s) x 10^7
500
400
300
200
100
0
6 13 19 26 34 41 48 56
异种移植后天数

图57F

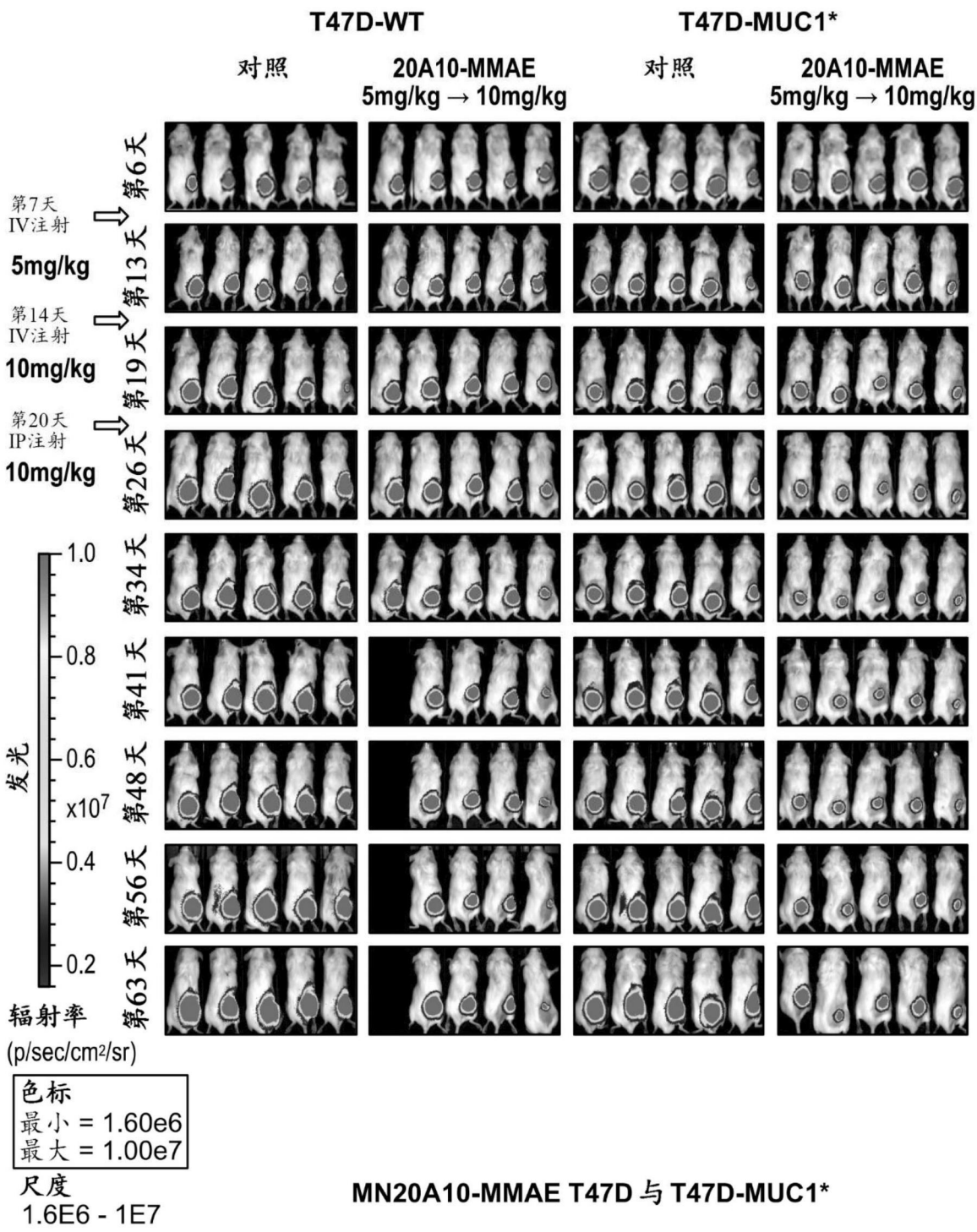


图 58A 图 58B 图 58C 图 58D

MN20A10-MMAE 动物数据

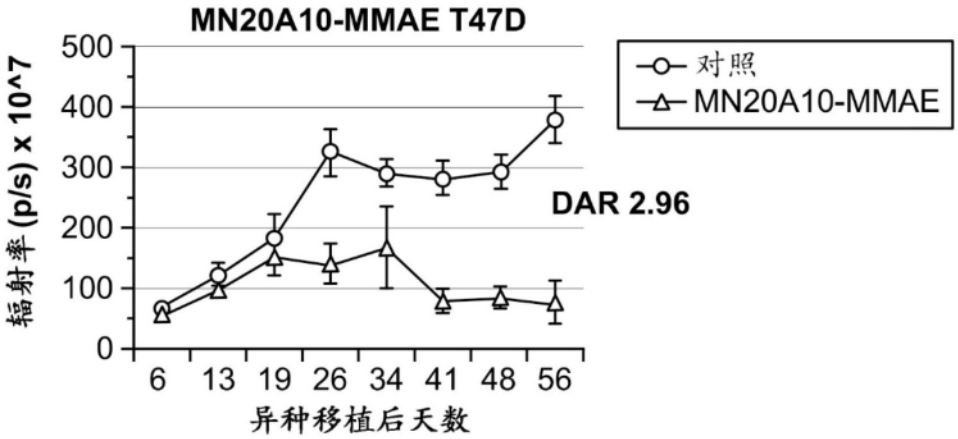


图58E

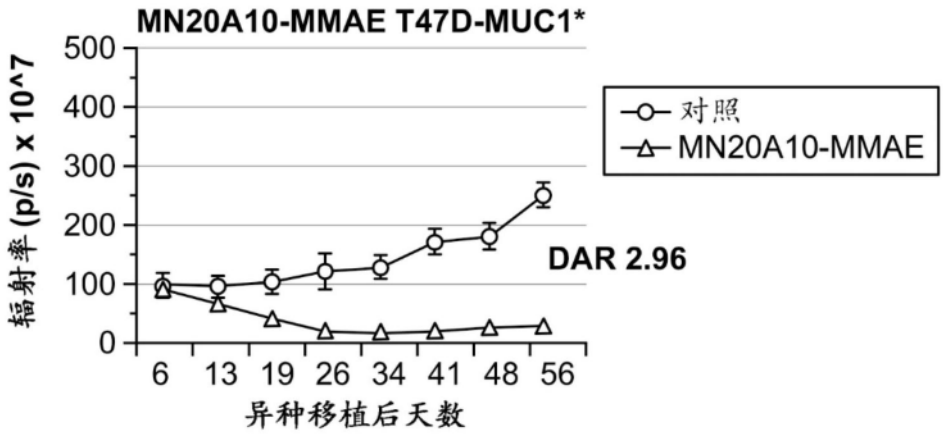


图58F

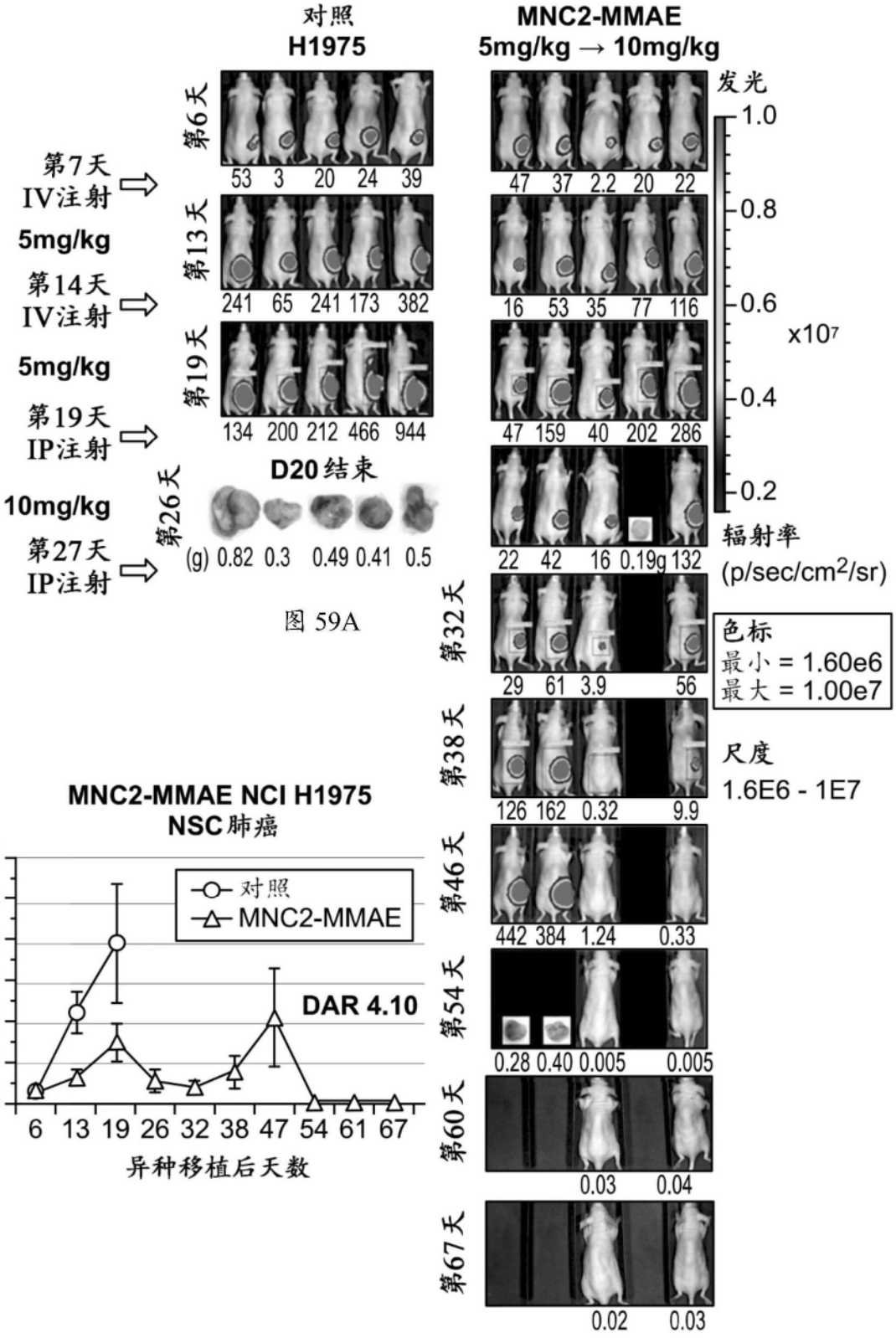


图 59A

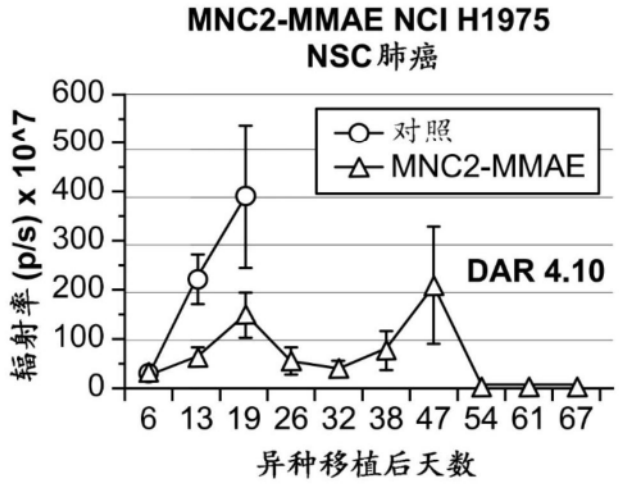


图 59C

图 59B

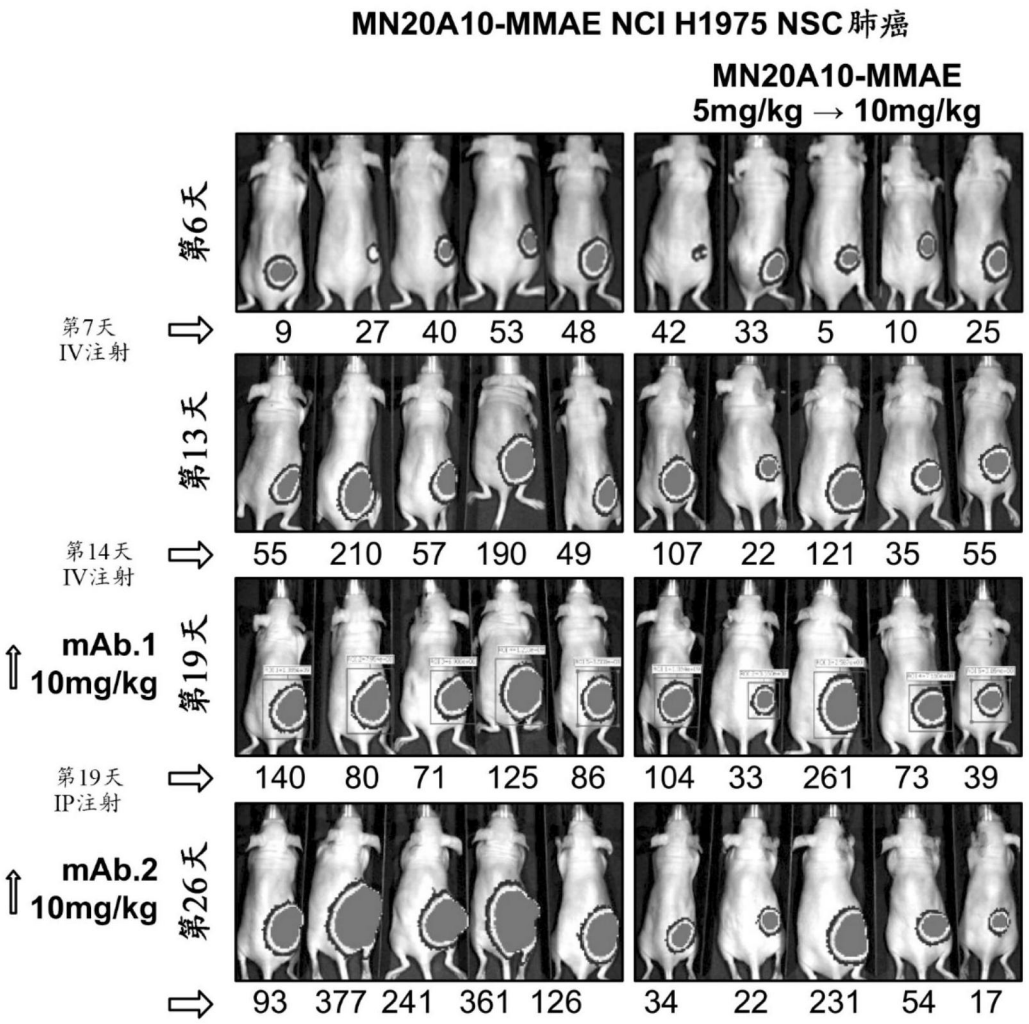


图 60A 图 60B

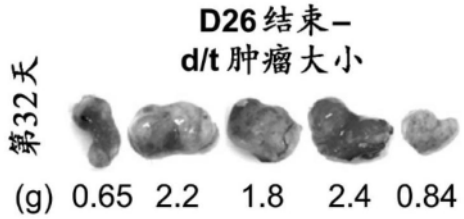


图60C

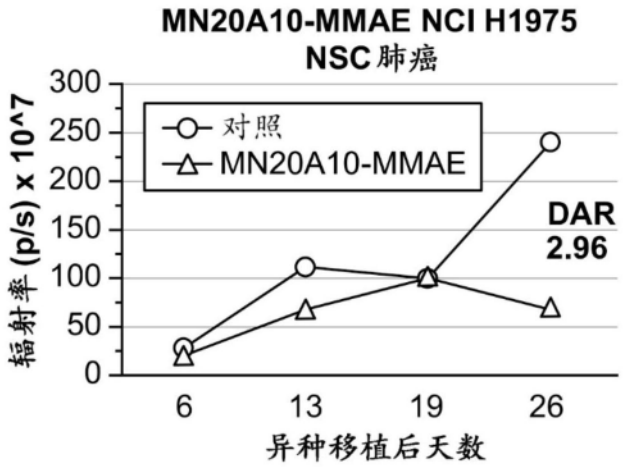

MN20A10-MMAE NCI H1975
NSC肺癌
辐射率 (p/s) x 10^7
300
250
200
150
100
50
0
对照
MN20A10-MMAE
DAR
2.96
6
13
19
26
异种移植后天数

图60D

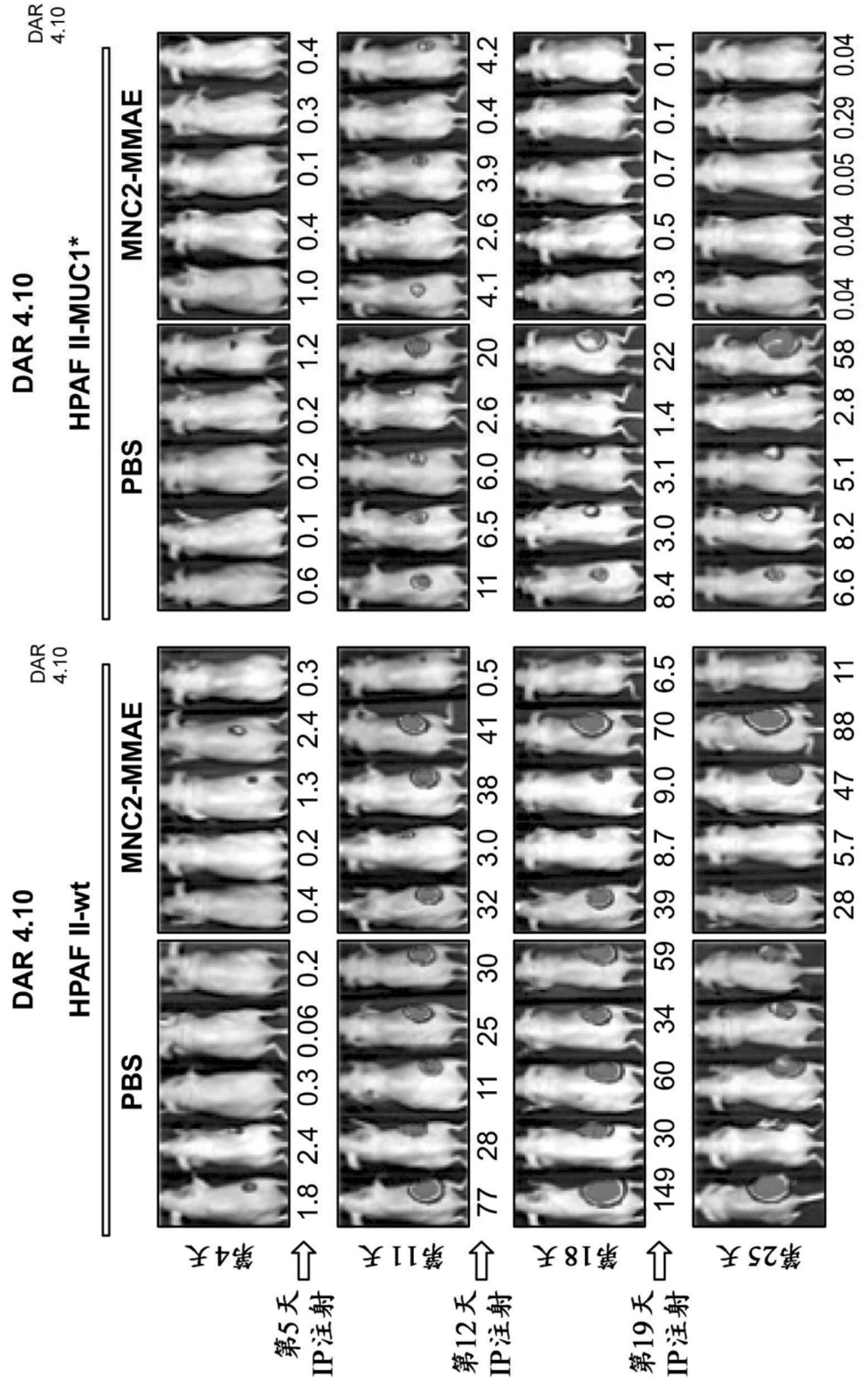


图 61A

图 61B

图 61C

图 61D



图61E



图61F

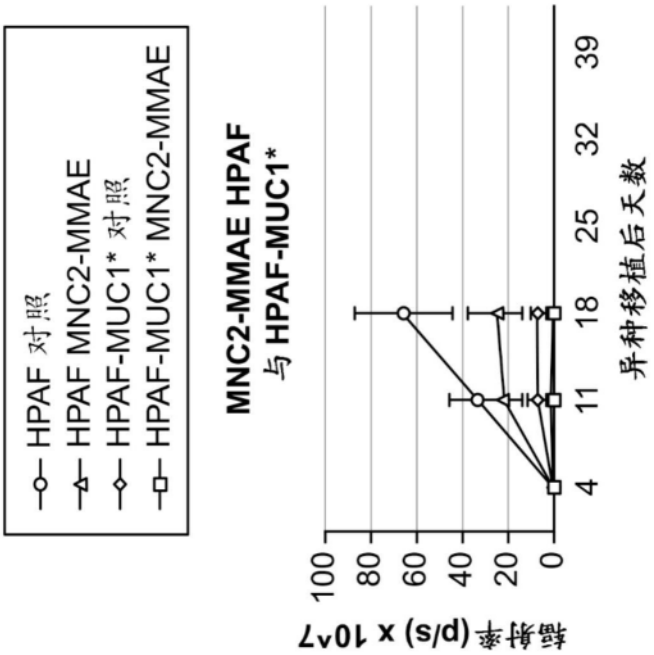


图61G

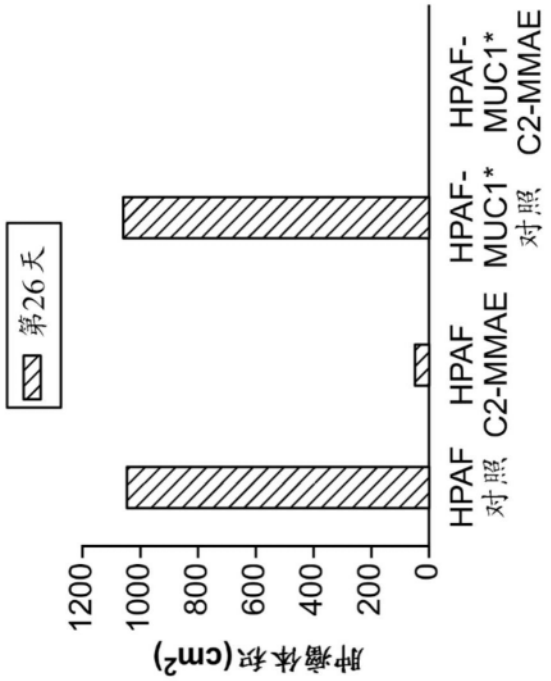


图61H

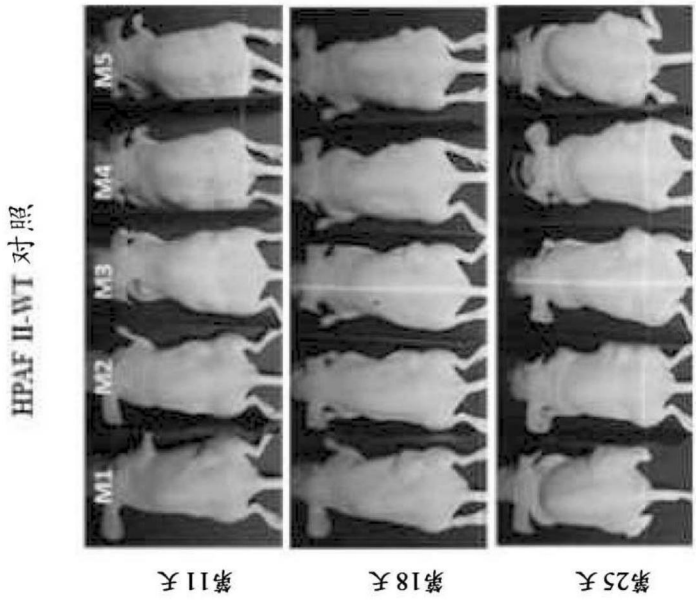


图 61I 图 61J 图 61K

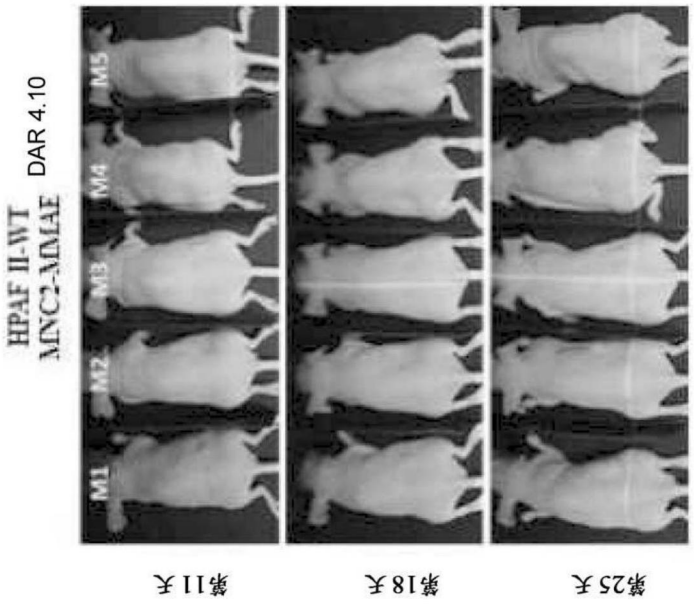


图 61L 图 61M 图 61N

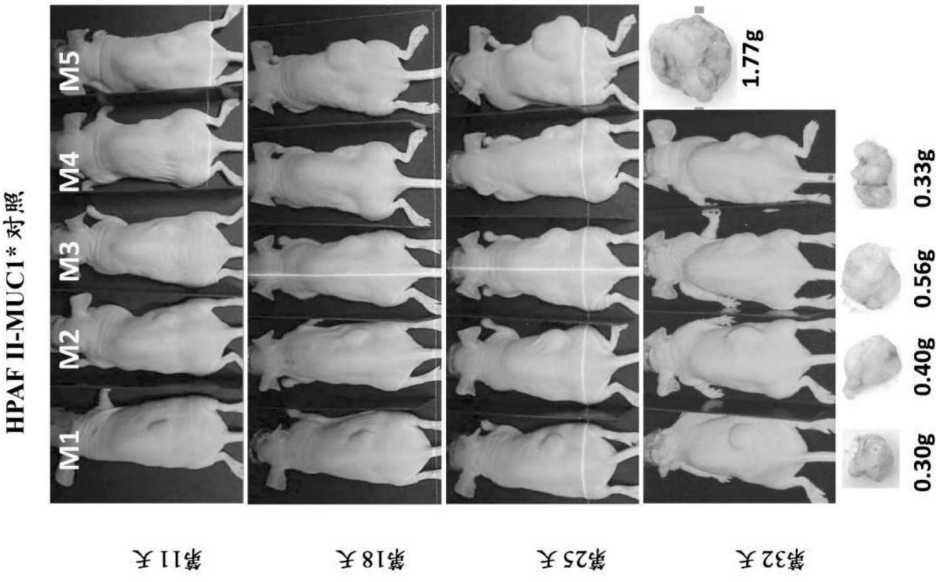


图 61O 图 61P 图 61Q 图 61R

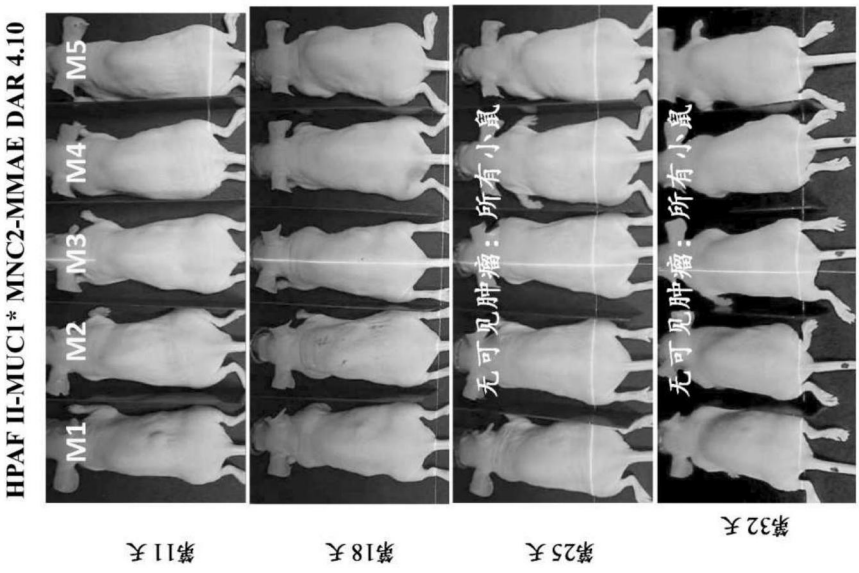


图 61S 图 61T 图 61U 图 61V

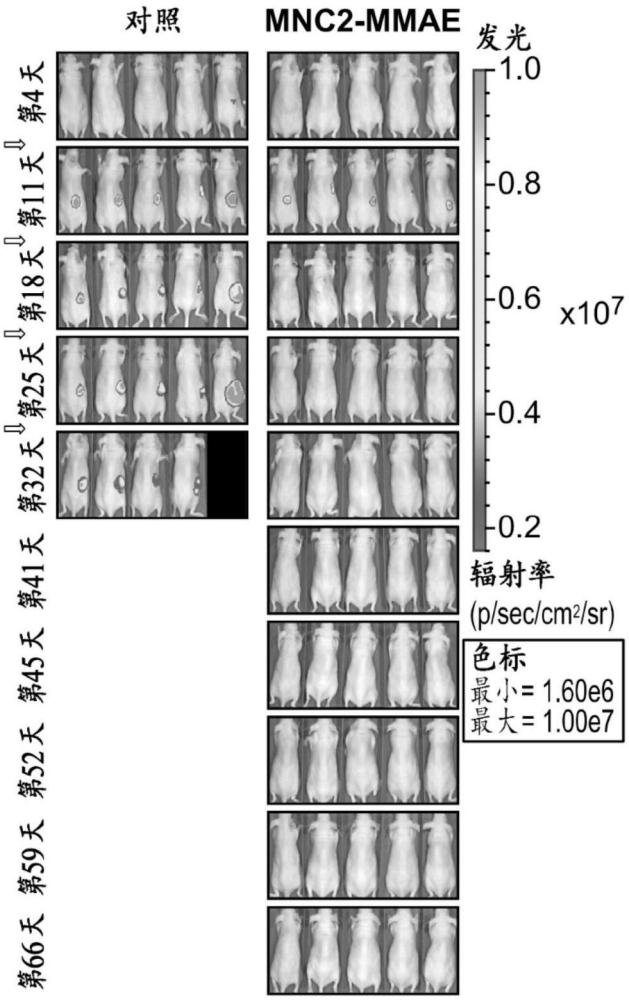


图 62A 图 62B

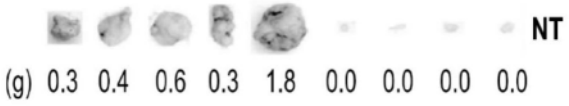


图62C

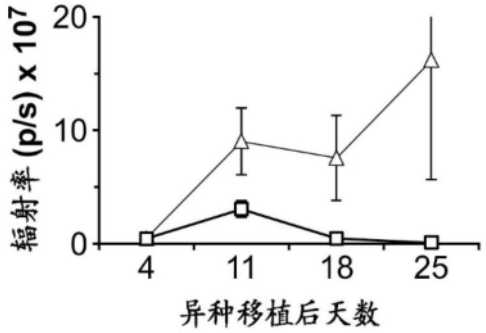


图62D

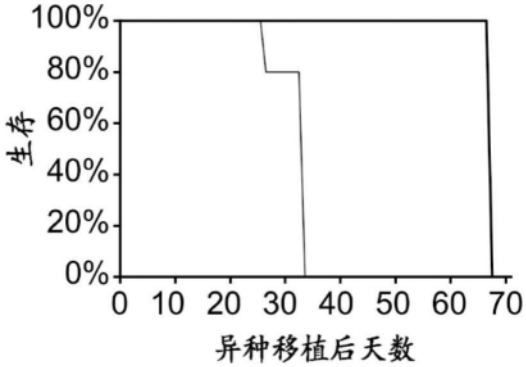


图62E

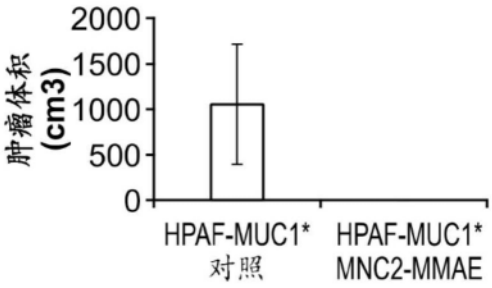


图62F

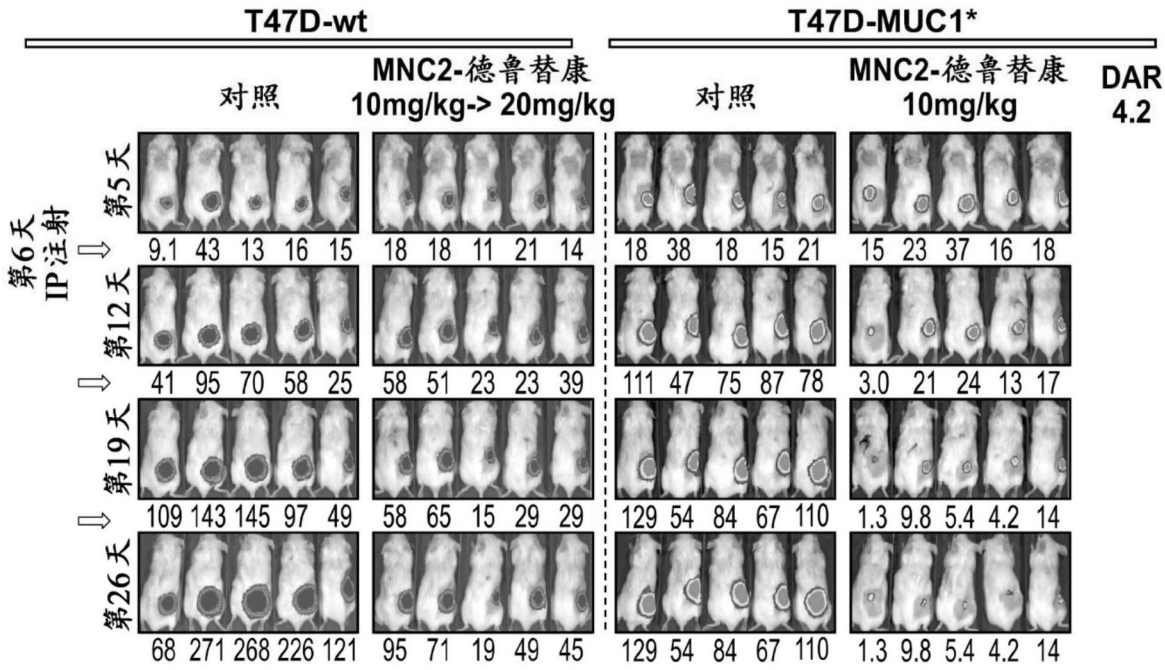


图 63A 图 63B 图 63C 图 63D

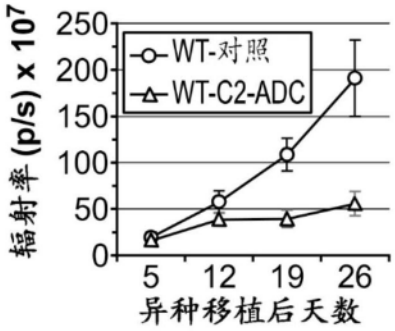


图63E

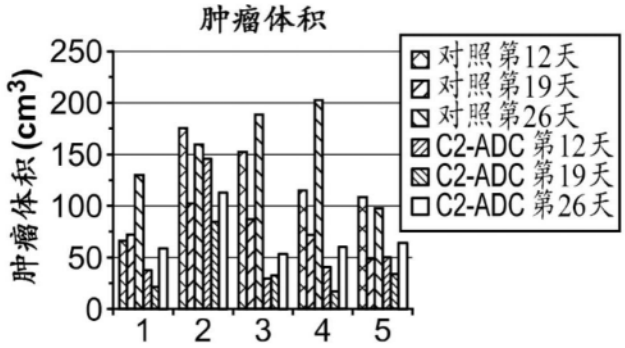


图63F

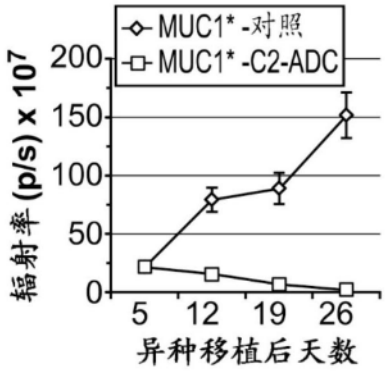

MUC1* -对照
MUC1* -C2-ADC
辐射率 (p/s) x 10^7
200
150
100
50
0
5
12
19
26
异种移植后天数

图63G

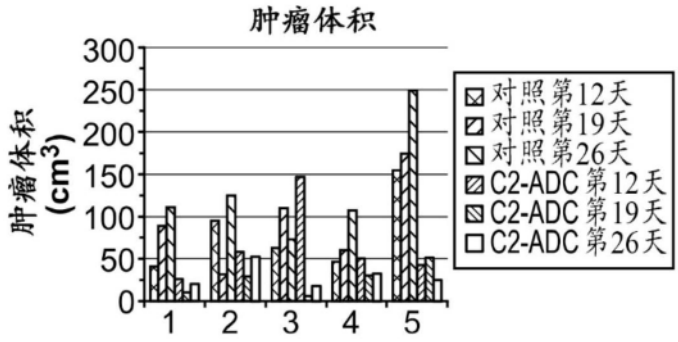

肿瘤体积
肿瘤体积 (cm^3)
300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
对照第12天
对照第19天
对照第26天
C2-ADC 第12天
C2-ADC 第19天
C2-ADC 第26天

图63H

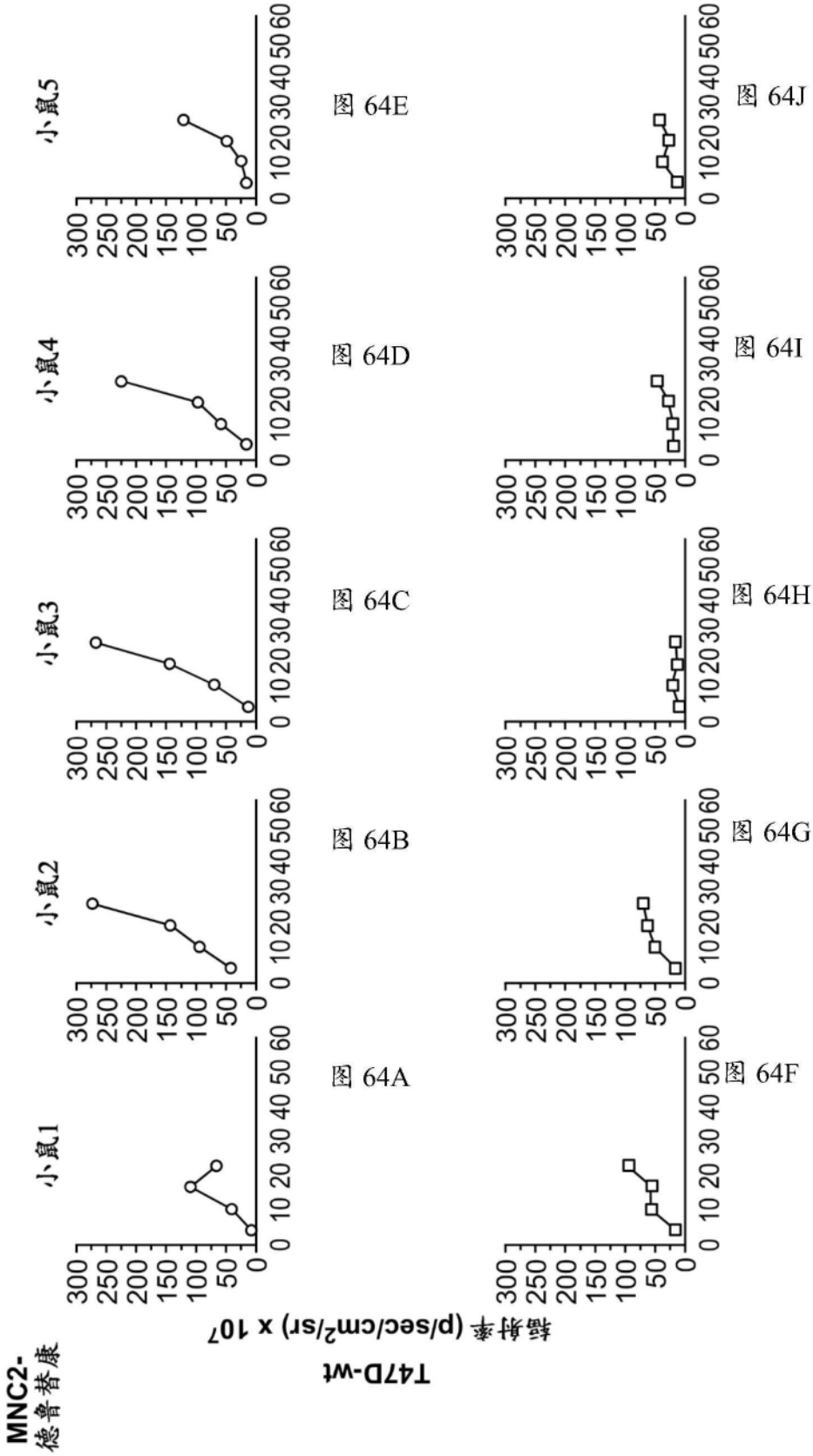


图 64A 图 64B 图 64C 图 64D 图 64E

图 64F 图 64G 图 64H 图 64I 图 64J

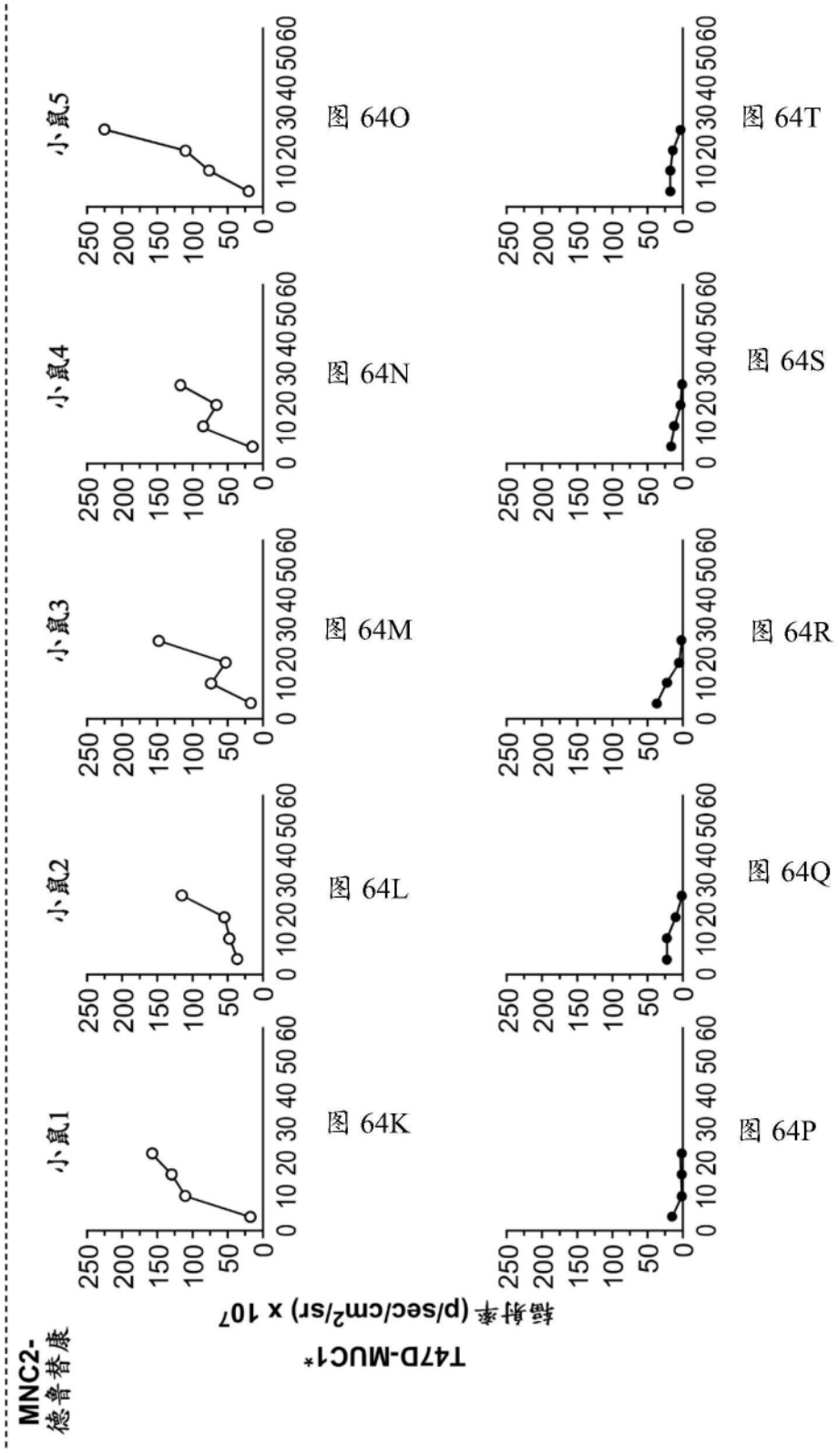


图 64K 图 64L 图 64M 图 64N 图 64O

图 64P 图 64Q 图 64R 图 64S 图 64T

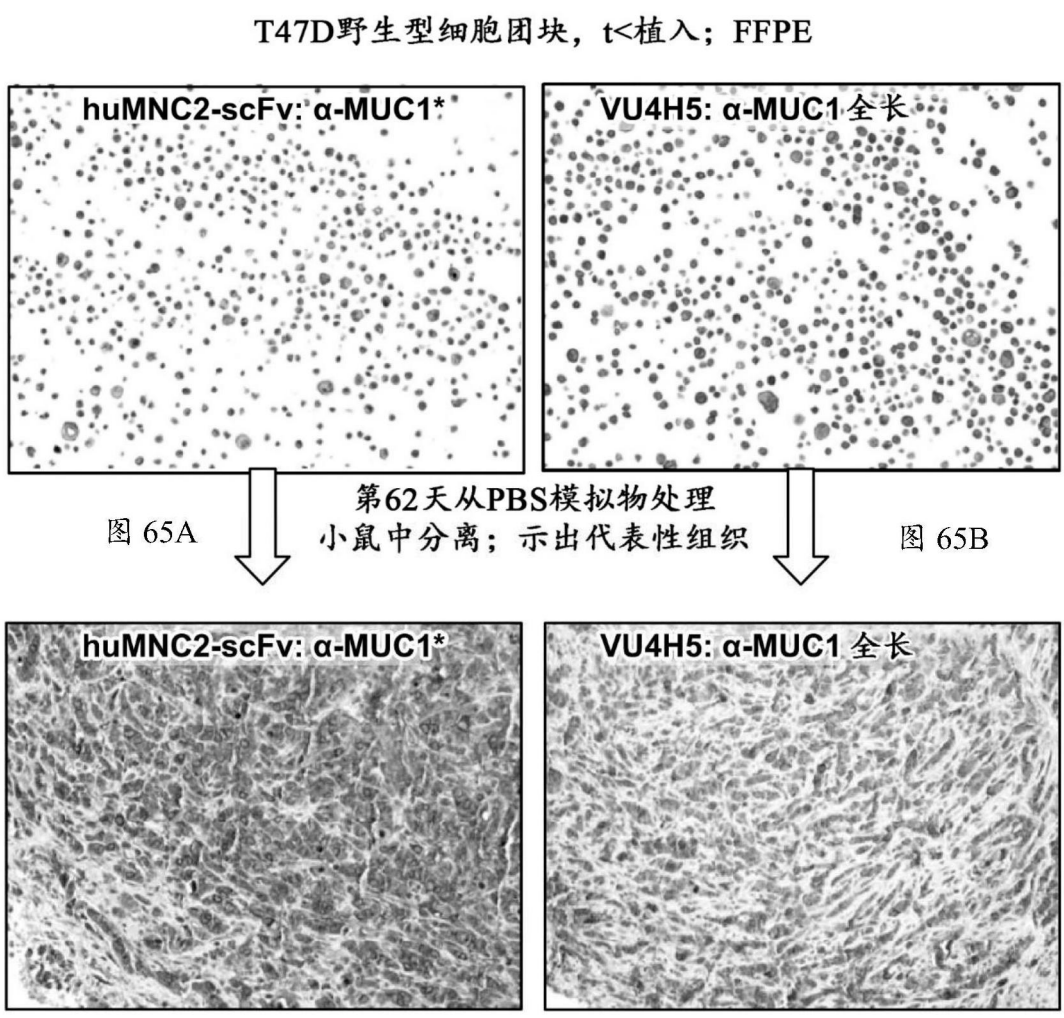


图 65A 图 65B

图 65C 图 65D