



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103842383 B

(45)授权公告日 2017. 11. 03

(21)申请号 201280033111.1

(22)申请日 2012.05.16

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103842383 A

(43)申请公布日 2014.06.04

(30)优先权数据

61/486,690 2011.05.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.01.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/038177 2012.05.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/158818 EN 2012.11.22

(73)专利权人 健能隆医药技术(上海)有限公司

地址 201203 上海市自由贸易试验区哈雷
路1101号307室

(72)发明人 周洪星

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

C07K 16/46(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

WO 94/09131 A1,1994.04.28,

WO 2007/042261 A2,2007.04.19,

WO 2009/068630 A1,2009.06.04,

CN 101687915 A,2010.03.31,

CN 101687915 A,2010.03.31,

审查员 李影

权利要求书5页 说明书61页

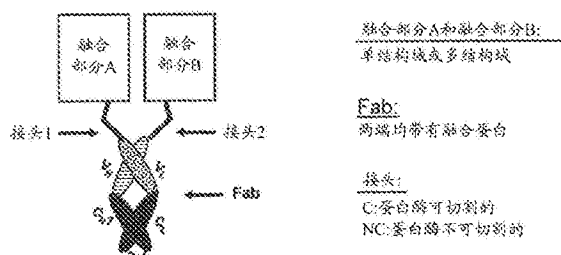
序列表114页 附图27页

(54)发明名称

多特异性FAB融合蛋白及其使用方法

(57)摘要

本公开总体上涉及包含抗体Fab片段的多特异性Fab融合蛋白(MSFP),所述抗体Fab片段以两个N端与融合部分(融合部分A或B)融合。包含所述Fab片段的MSFP表现出明显降低的所述Fab片段结合Fab靶标的能力。当所述MSFP通过所述融合部分与其靶标的结合而在细胞表面上成簇时,所述Fab与其靶标的结合被恢复。所述Fab与其靶标的减少的结合,特别是当所述靶标以其天然状态呈现在细胞表面上时,融合部分结合的缺失提供了诸如减少副作用的优点并允许所需的选择性和特异性的药理作用处于受控的方式。



1. 多特异性Fab融合蛋白,其包含:能与CD3 ϵ 的N端结合的Fab片段;与所述Fab片段中VL的N端连接的融合部分A;和与所述Fab片段中VH的N端连接的融合部分B;其中所述Fab片段能结合CD3 ϵ 的第1-27位氨基酸内的表位,其中融合部分A包含第一结合结构域且融合部分B包含第二结合结构域,所述第一结合结构域和所述第二结合结构域为抗体的抗原结合片段,且所述抗原结合片段为scFv;所述第一结合结构域能结合肿瘤抗原,所述第二结合结构域能结合肿瘤抗原,

且其中:

a. 所述Fab片段包含:

i. 包含分别如SEQ ID NO:26-28所示的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列的免疫球蛋白轻链可变区(VL),免疫球蛋白轻链恒定区(CL),如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的免疫球蛋白重链可变区(VH),以及免疫球蛋白重链恒定区1(CH1);或

ii. 包含分别如SEQ ID NO:23-25所示的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列的VH,CH1,如SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的VL,以及CL;

其中所述CL区和CH1区任选通过二硫键连接;

b. 所述融合部分A的C端与所述Fab片段的VL结构域的N末端共价连接;且

c. 所述融合部分B的C端与所述Fab片段的VH结构域的N末端共价连接;且

d. 第一接头位于所述融合部分A和所述Fab片段的VL结构域之间;并且

e. 第二接头位于所述融合部分B和所述Fab片段的VH结构域之间;

且所述第一接头和所述第二接头是长度为0-20个氨基酸的肽接头。

2. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其包含SEQ ID NO:96和SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述VH选自SEQ ID NO:34、38、42、46、50和54所示的任一氨基酸序列。

4. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其中VL选自SEQ ID NO:56、58、62、66和70所示的任一氨基酸序列。

5. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其包含选自SEQ ID NO:84、90、96和100的任一氨基酸序列;和选自SEQ ID NO:32、60、64、68和72的任一氨基酸序列。

6. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其包含选自SEQ ID NO:86、92、98和102的任一氨基酸序列;和选自SEQ ID NO:30、36、40、44、48和52的任一氨基酸序列。

7. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述融合部分A和所述融合部分B序列相同。

8. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述融合部分A和所述融合部分B包含不同的序列。

9. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述第一结合结构域和所述第二结合结构域能结合相同的细胞表面抗原。

10. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述第一结合结构域和所述第二结合结构域能结合不同的细胞表面抗原。

11. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述第一结合结构域和所述第二结合结构域能结合相同的表位。

12. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述第一结合结构域和所述第二结合结构域能结合不同的表位。

13. 如权利要求9所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述第一结合结构域和所述第二结合结构域能结合选自以下的靶标:Fc γ RIIB、CD28、CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LT β R、TLR、TRAIL受体1、TRAIL受体2、CD28、CEA、PSMA、BCMA、CAIX、cMet、EGFR1、Her2/neu、ErbB3、EpCAM、叶酸受体、Ephrine受体、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38和CD138。

14. 如权利要求13所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述第一结合结构域和所述第二结合结构域选自SEQ ID NO:78、88和94所示的任一氨基酸序列。

15. 如权利要求10所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述第一结合结构域和所述第二结合结构域能结合不同的靶标,所述靶标选自:Fc γ RIIB、CD28、CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LT β R、TLR、TRAIL受体1、TRAIL受体2、CD28、CEA、PSMA、BCMA、CAIX、cMet、EGFR1、Her2/neu、ErbB3、EpCAM、叶酸受体、Ephrine受体、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38和CD138。

16. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述抗原结合片段是人源化的。

17. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述抗原结合片段来源于小鼠、大鼠或兔的单克隆抗体。

18. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述抗原结合片段来源于全人抗体。

19. 如权利要求18所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述全人抗体产生自噬菌体展示、酵母展示或人抗体基因的转基因小鼠。

20. 如权利要求1所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述抗原结合片段:1) 包含分别如SEQ ID Nos:139-144所示的VH CDR和VL CDR;2) 包含分别如SEQ ID Nos:145-150所示的VH CDR和VL CDR;3) 包含SEQ ID Nos:78、88和94的任一氨基酸序列所示的scFv中存在的VH;4) 包含SEQ ID Nos:78、88和94的任一氨基酸序列所示的scFv中存在的VL;或5) 包含选自SEQ ID NO:78、88和94所示的任一氨基酸序列的ScFv。

21. 多特异性Fab融合蛋白,其包含:能与CD3 ϵ 的N端结合的Fab片段;与所述Fab片段中VL的N端连接的融合部分A;和与所述Fab片段中VH的N端连接的融合部分B;其中所述Fab片段能结合CD3 ϵ 的第1-27位氨基酸内的表位,其中融合部分A包含第一结合结构域,且其中融合部分B包含第二结合结构域,其中所述第一和第二结合结构域结合相同的细胞表面抗原,且其中所述第一和第二结合结构域包含抗体的抗原结合片段,所述抗原结合片段包含分别如SEQ ID NO:145-150所示的VH CDR 1-3和VL CDR 1-3,且其中:

a. 所述Fab片段包含:

i. 包含分别如SEQ ID NO:26-28所示的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列的免疫球蛋白轻链可变区(VL),以及免疫球蛋白轻链恒定区(CL),和

ii. 包含分别如SEQ ID NO:23-25所示的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列的免疫球蛋白重链可变区(VH),以及免疫球蛋白重链恒定区1(CH1);

其中所述CL区和CH1区任选通过二硫键连接;和

b. 所述融合部分A的C端与所述Fab片段的VL结构域的N末端共价连接;且

- c. 所述融合部分B的C端与所述Fab片段的VH结构域的N末端共价连接;且
 - d. 第一接头位于所述融合部分A和所述Fab片段的VL结构域之间;并且
 - e. 第二接头位于所述融合部分B和所述Fab片段的VH结构域之间;
- 且所述第一接头和所述第二接头是长度为0-20个氨基酸的肽接头。

22. 多特异性Fab融合蛋白,其包含:能与CD3 ϵ 的N端结合的Fab片段;与所述Fab片段中VL的N端连接的融合部分A;和与所述Fab片段中VH的N端连接的融合部分B;其中所述Fab片段能结合CD3 ϵ 的第1-27位氨基酸内的表位,其中融合部分A包含第一结合结构域,且其中融合部分B包含第二结合结构域,其中所述第一和第二结合结构域结合相同的细胞表面抗原,且其中所述第一和第二结合结构域为如SEQ ID NO:94所示的氨基酸序列

且其中:

- a. 所述Fab片段包含:
 - i. 包含分别如SEQ ID NO:26-28所示的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列的免疫球蛋白轻链可变区(VL),以及免疫球蛋白轻链恒定区(CL),和
 - ii. 包含分别如SEQ ID NO:23-25所示的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列的免疫球蛋白重链可变区(VH),以及免疫球蛋白重链恒定区1(CH1);其中所述CL区和CH1区任选通过二硫键连接;和
 - b. 所述融合部分A的C端与所述Fab片段的VL结构域的N末端共价连接;且
 - c. 所述融合部分B的C端与所述Fab片段的VH结构域的N末端共价连接;且
 - d. 第一接头位于所述融合部分A和所述Fab片段的VL结构域之间;并且
 - e. 第二接头位于所述融合部分B和所述Fab片段的VH结构域之间;
- 且所述第一接头和所述第二接头是长度为0-20个氨基酸的肽接头。

23. 如权利要求1,21或22所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述Fab片段与CD3的结合被所述融合部分A和融合部分B导致的空间位阻所抑制。

24. 如权利要求23所述的多特异性Fab融合蛋白,其中在不存在所述第一结合结构域和所述第二结合结构域与细胞表面抗原结合的情况下所述Fab片段与CD3的结合,与存在所述第一结合结构域和所述第二结合结构域与细胞表面抗原结合的情况下所述Fab片段与CD3的结合相比,降低了50%-90%。

25. 如权利要求23所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述Fab片段与CD3的结合与没有所述融合部分A和所述融合部分B的相同Fab片段的结合相比,减少了50%-90%。

26. 如权利要求1,21或22所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述免疫球蛋白重链恒定区类型选自 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

27. 如权利要求1,21或22所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述免疫球蛋白重链来源于IgG抗体。

28. 如权利要求27所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述IgG抗体的亚型选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

29. 如权利要求1,21或22所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述免疫球蛋白轻链VL和CL选自免疫球蛋白 κ 轻链和免疫球蛋白 λ 轻链。

30. 如权利要求1或21所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述融合部分A包含含有scFv抗原结合结构域的第一结合结构域。

31. 如权利要求1, 21或22所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述第一接头包含蛋白酶不可切割的序列。

32. 如权利要求1, 21或22所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述第二接头包含蛋白酶不可切割的序列

33. 如权利要求1, 21或22所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述第一接头包含蛋白酶可切割的序列。

34. 如权利要求1, 21或22所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述第二接头包含蛋白酶可切割的序列。

35. 如权利要求1, 21或22所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述第一接头和所述第二接头是可切割的。

36. 如权利要求21或22所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述第一接头和所述第二接头是可切割的, 且其中若所述第一接头被切割, 则所述Fab片段与所述CD3 ϵ 的结合是可检测到的。

37. 如权利要求21或22所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述第一接头和所述第二接头是可切割的, 且其中若所述第二接头被切割, 则所述Fab片段与所述CD3 ϵ 的结合是可检测到的。

38. 如权利要求21或22所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述第一接头和所述第二接头是可切割的, 且其中若所述第一接头和所述第二接头均被切割, 则所述Fab片段与所述CD3 ϵ 的结合是可检测到的。

39. 如权利要求35所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述第一接头和所述第二接头包含可被相同蛋白酶切割的蛋白酶可切割的序列。

40. 如权利要求35所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述第一接头和所述第二接头包含可被不同蛋白酶切割的蛋白酶可切割的序列。

41. 如权利要求33所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述蛋白酶可切割的序列包含丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶或基质金属蛋白酶 (MMP) 可切割的序列。

42. 如权利要求41所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述蛋白酶可切割的序列为MMP可切割的序列。

43. 如权利要求42所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述基质金属蛋白酶可切割的序列为基质金属蛋白酶-1 (MMP-1)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 或基质金属蛋白酶14 (MMP-14) 可切割的序列。

44. 如权利要求34所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述蛋白酶可切割的序列包含丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶或基质金属蛋白酶 (MMP) 可切割的序列。

45. 如权利要求44所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述蛋白酶可切割的序列为MMP可切割的序列。

46. 如权利要求45所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述基质金属蛋白酶可切割的序列为基质金属蛋白酶-1 (MMP-1)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 或基质金属蛋白酶14 (MMP-14) 可切割的序列。

47. 如权利要求1, 21或22所述的多特异性Fab融合蛋白, 其中所述第一接头和/或所述第二接头的长度为1-10个氨基酸。

48. 如权利要求47所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述第一接头和/或所述第二接头包含GlyArgAla。

49. 如权利要求47所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述第一接头和/或所述第二接头包含SEQ ID NO:133所示的氨基酸序列。

50. 如权利要求1,21或22所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述Fab是人源化的。

51. 如权利要求1,21或22所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述CL区和所述CH1区通过二硫键连接。

52. 如权利要求1,21或22所述的多特异性Fab融合蛋白,其中所述CL区包含杵状结构或臼状结构突变,并且所述CH1区包含对应的杵状结构或臼状结构突变得使所述CL区和CH1区是稳定相互作用的。

53. 分离的多核苷酸,其编码权利要求1,21或22所述中所述的多特异性Fab融合蛋白。

54. 表达载体,其包含权利要求53所述的分离的多核苷酸。

55. 分离的宿主细胞,其包含权利要求54所述的载体。

56. 表达多特异性Fab融合蛋白的方法,其包括在分离的多核苷酸表达所编码的多特异性Fab融合蛋白的条件下培养权利要求55所述的宿主细胞。

57. 药物组合物,其包含权利要求1,21或22所述中所述的多特异性Fab融合蛋白和药学上可接受的载体。

58. 权利要求57所述的药物组合物在制备用于治疗有需要的受试对象的癌症的药物中的用途,其中所述癌症与所述多特异性Fab融合蛋白可结合的抗原相关。

多特异性FAB融合蛋白及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2011年5月16日提交的美国临时申请第61/486,690号的优先权,所述申请全部内容在此通过引用并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 以文本格式代替纸质版提供本申请相关的序列表,并且在此通过引用并入本说明书。包含所述序列表的文本文件命名为FABN_001_02W0_ST25.txt。该文本文件为188KB,创建于2012年5月16日,并通过EFS-Web以电子方式提交。

[0005] 背景

技术领域

[0006] 本公开总体上涉及多特异性Fab融合蛋白(MSFP)。具体而言,本公开的MSFP包含抗体的Fab片段,其两个N端通过可切割或不可切割的接头与融合部分融合。MSFP的Fab片段与天然的细胞表面靶标抗原以及相同抗原的某些可溶形式特异性地结合。一种或两种融合部分与细胞表面上的靶标抗原特异性地结合。

[0007] 相关领域的描述

[0008] 常规的免疫球蛋白G(IgG)为包含两个相同的免疫球蛋白重链和两个相同的免疫球蛋白轻链的四聚体分子。IgG重链有位于N端的可变区接着是第一恒定区(CH1)、铰链区和两个另外的恒定区(CH2CH3)。IgG轻链由两个结构域组成:N端可变区和C端恒定区。重链可变区(VH)与轻链可变区(VL)相互作用构成了最小的抗原结合区,Fv。抗原结合区通过重链(CH1)的第一恒定区和轻链恒定区(CL)之间的相互作用并进一步通过两个恒定区之间的二硫键的形成(形成Fab片段)来稳定。CH2CH3结构域的同源二聚化(形成Fc)以及由此形成的铰链二硫键稳定了IgG的结构。因此,IgG有两个抗原结合性Fab臂,该Fab臂彼此以及与Fc结构域在方向上是相对灵活的。此外,结合区(其与抗原直接相互作用)位于N端而无需其它结构。不难想象,这种结构特点有利于抗体与抗原以最小的空间位阻干扰来相互作用。这种属性对于与细胞表面抗原的结合尤其重要,细胞表面抗原往往与复杂的细胞膜位置非常接近。

[0009] 近年来,已成功将全长单克隆抗体用于治疗癌症、自身免疫性疾病和炎性疾病以及其他的人类疾病(Nelson,Nat.review,Drug Discovery (2010) 9:767-74)。尽管天然存在五种不同类型的免疫球蛋白(IgA、IgD、IgG、IgM和IgE),由于有利的性质(包括高结合亲和力和高结合特异性、高生物利用度、循环中较长的血清半衰期、潜在的效应功能和工业规模的可生产性),IgG代表了用于人类治疗的最适形式。

[0010] 单克隆抗体(非缀合抗体或裸抗体)目前由全球药品监督管理部门批准用于肿瘤学背景的临床应用,其通常通过以下机制之一或其组合起作用:1)阻断细胞生长信号、2)阻断向癌细胞供应血液、3)直接介导细胞凋亡、4)引发免疫效应功能,诸如抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和补体依赖性细胞毒作用(CDC)、以及5)促进针对肿瘤的获得性免疫。

[0011] 单克隆抗体疗法已在临床上表现出生存益处。但是,在癌症患者中的总体反应率较低,并且与化疗相比存活益处较小(数月)。虽然未完全了解缺少强大的临床抗癌活性的根本原因,但研究表明,癌细胞往往迅速发展出补偿信号途径来逃避细胞死亡。此外,癌症干细胞(CSC),其被认为是有效的癌症起始细胞,细胞增殖较不活跃,因此它们倾向于更好地维持生长信号的缺乏。

[0012] 近年来,ADCC被证明在抗癌抗体的临床疗效中发挥重要作用。抗体的Fc结合Fc γ 受体,其中Fc γ 受体有多种形式:Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIa和Fc γ RIIIb。Fc结构域对Fc γ RIIIa有特别高的亲和力,所述Fc γ RIIIa表达于自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞上。Fc与Fc γ RIIIa的结合活化NK细胞,其随后破坏附近的癌细胞。

[0013] 经由蛋白改造(涉及CH2区中的多个氨基酸突变)或生产宿主细胞(CHO)系(经改造减少或消除Asn297聚糖结构中的岩藻糖化)产生的具有增强的活化Fc γ R结合性质的遗传改造的抗体,已在临床前研究中成功地测试具有改善的生物活性。包含增强的效应功能的IgG抗体目前在临床试验中,目的在于提高疗效。目前可用的临床数据表明这些抗体是非常有前景的。

[0014] 另一种抗癌的治疗方法是利用T细胞。T细胞通过巡视机体以寻找新出现的癌细胞并有效及时地清除它们而在一生中提供对癌症的防御性。在癌症治疗中利用T细胞免疫的成功的治疗方法包括:1)FDA批准使用的用于转移性黑色素瘤和转移性肾癌的Proleukin(重组IL-2);2)FDA批准使用的用于无症状的转移性激素抵抗性前列腺癌的**PROVENGE®**(Sipuleucel-T)。**PROVENGE®**是一种树突状细胞疫苗,其活化离体前列腺癌特异性的细胞毒性T细胞,接着将该细胞回输至患者体内;3)FDA批准使用的用于晚期黑色素瘤的易普利姆玛(抗CTLA-4抗体以通过抑制T细胞抑制性信号通路来活化T细胞)。

[0015] 由于T细胞不表达Fc γ 受体(Fc γ R),抗肿瘤抗体不能有效地直接活化细胞毒性T细胞。许多旨在活化T细胞用于肿瘤杀伤目的的有前景的方法之一是使用双特异性抗体(bsAb),以便直接将T细胞带至肿瘤细胞附近,导致T细胞的活化并杀伤肿瘤细胞。CD28和CD137(4-1BB)是用于双特异性靶向方法中的两种有效的T细胞共刺激受体。实例包括:CD28xNG2(Grosse-Hovest et al., Eur J Immunol 33:1334-40, 2003)、CD28xCD20(Otz et al., Leukemia 23:71-7, 2009)和4-1BBxCD20(Liu et al., J Immunother 33:500-9, 2010)。利用双特异性抗体,能够触发T活化的其他T细胞表面靶标也已被用于将其重靶向肿瘤细胞。过去已开发了多种双特异性抗体形式和多特异性抗体形式并在最近得到仔细的研究(Muller and Kontermann, Biodrugs 24:89-98, 2010; Chames and Baty, mAbs 1:539-47, 2009; Deyev and Lebedenko, BioEssays 30:904-918, 2008)。这些形式落入以下三大类:1)基于Fc异源二聚化或与重链或轻链共价融合的IgG样双特异性分子,包括四源杂交瘤技术(Staerz et al., PNAS 83:1453-7, 1986)、杵-臼技术(Nat Biotechnol. 16:677-81; J. Biol. Chem. 285:19637-46, 2010)、链交换改造结构域“SEED”技术(Davis et al., PEDS 23:195-202, 2010)、与IgG的重链或轻链的C端融合(Coloma and Morrison, Nat. Biotechnol. 15:159-63, 1997; Shen et al., J. Immunol. Methods 318:65-74, 2007; Orcutt et al., PEDS 23:221-8, 2010; Dong et al., J. Biol. Chem., 286:4703-17, 2011, Lazar et al., 专利申请, US20110054151)、与IgG的重链或轻链的N端融合(Shen, et al.,

J.Biol.Chem.281:10706-17,2006;Wu et al.,Nat.Biotechnol.25:1290-7,2007);2)Fc融合双特异性抗体(Mabry et al.,PEDS23:115-127,2010;Miller et al.,PEDS23:549-557,2010);3)通过融合或非共价连接的仅含有抗体可变区的分子,包括双价抗体(Db)(Holliger et al.,PNAS90:6444-8,1993)、二硫键连接的双价抗体(也被称作双亲和重靶向或DART)(Johnson et al.,J.Mol.Biol.399:436-49,2010)、单链双价抗体(scDb)(Alt, et al.,FEBS Letters454:90-4,1999)、串联双价抗体(tandAbs)(Kipriyanov,et al., J.Mol.Biol.293:41-56,1999)、串联单链Fv(taFv)(Mack,et al.,PNAS92:7021-5,1995);和4)基于Fab的融合分子,包括双价抗体和三价抗体(Schoonjans et al.,J.Immunol.165:7050-7,2000;Biotechnol SA的网页,http://www.biotechnol.com)、与单域抗体融合的Fab(专利申请US2010/0239582A1)和Fab' 2-融合蛋白(美国专利US5,959,083)。

[0016] 过去二十年里,在双特异性抗体领域的努力开始在临床上取得成果。在2009年,Cantomaxomab (**REMOVAB®**, 抗-CD3,抗-EpCAM三功能性抗体)被欧洲批准用于有症状的恶性腹水。然而,虽然双特异性抗体已被证明具有有效的肿瘤细胞杀伤潜力,严重的副作用,包括全身免疫激活、免疫原性(抗药物抗体反应)和这些分子保留的普遍较差的可生产性,已在很大程度上阻碍了此类药物的广泛应用。近年来被称为双特异性T细胞衔接器(engager)或BiTE的双特异性抗体的技术平台,应用抗CD19scFv-抗CD3scFv融合蛋白(Blinatumomab),因为其在临床前试验和临床试验中被证明有出色的效能而吸引了很多的关注(Bargou et al.,Science(2008)321:974-7)。具体而言,在给予blinatumomab的临床试验期间,非何杰金氏淋巴瘤患者表现出肿瘤退化,并且在某些情况下表现出完全缓解。然而,blinatumomab造成了严重的副作用,包括表现为语言能力丧失及迷失方向的中枢神经系统副作用。症状是短暂的,一旦停止给药是可逆的。据推测,通过该药物直接结合CD3(在T细胞上)导致T细胞部分活化和细胞再分布(专利申请,US2010/0150918A1)。一些再分布的T细胞粘附至大脑微脉管,部分活化内皮细胞并导致大脑中微脉管系统的增强的渗透性。在临床试验中观察到,副作用的发生率在具有较高B细胞:T细胞比的患者中比具有较低比的患者要低。还已报道在猴子中利用不同的CD3结合抗体片段可减轻或避免T细胞再分布。这些观察结果强烈的表明,抗体与CD3连同CD3上的结合表位的结合以及所获得的T细胞的部分活化可能是严重的大脑副作用的直接原因。

[0017] CD19xCD3双特异性scFv-scFv融合蛋白的另一个缺点是,由于其半衰期短且不兼容皮下给药,这种药物需要每日静脉输注(i.v.)给药。此外,scFv-scFv融合蛋白有聚集的倾向。因此,BiTE分子需要高度复杂的抗体工程技术并且使其稳定和可生产化是很困难的。

[0018] 结合表达Fc γ R或CD3的免疫细胞的抗体药物的抗肿瘤活性表现出理论上的临床证据。然而,目前的双特异性抗体形式的缺点对于这些药物以良好的有效性和安全性广泛应用于治疗癌症患者仍然是个挑战。因此,仍迫切需要在产品功效、稳定性、安全性和可生产性方面具有改善性能的新的双特异性分子设计。

[0019] 其它背景信息的参考文献包括:Coloma and Morrison,Nat.Biotechnol.15:159-63,1997;Kontermann,Acta Pharmacol.Sin.,26,1-9.2005;Marvin and Zhu;Acta Pharmacol.Sin.,26,649-658.2005;Shen et al.,J.Immunol.Methods,318:65-74,2007;Shen et al.JBC281:10706-10714,2006;Wu et al.,Nat.Biotechnol.,25,1290-1297,2007;Orcutt Prot PEDS23:221-8,2010;Mabry PEDS vol.23no.3第115-127页,2010;

Schoonjans The Journal of Immunology, 2000, 165: 7050-7057; Michaelson, mAbs 1: 2, 128-141; 2009; Robinson et al., British Journal of Cancer (2008) 99, 1415-1425。

[0020] 简述

[0021] 本公开的一个方面提供了多特异性Fab融合蛋白,其包含:能结合靶标抗原的Fab片段;与所述Fab片段中VL的N端偶联的第一融合部分;和/或与所述Fab片段中VH的N端偶联的第二融合部分。在所述多特异性Fab融合蛋白的一个实施方案中,所述Fab片段与Fab靶标抗原的结合与不存在第一和第二融合部分情况下相同Fab片段与Fab靶标的结合相比,减少了50%-90%。

[0022] 本公开的一个方面提供了多特异性Fab融合蛋白,其包含:a)能结合靶标抗原的Fab片段,其中所述Fab片段包含,i)免疫球蛋白轻链可变区(VL)和免疫球蛋白轻链恒定区(CL);和ii)免疫球蛋白重链可变区(VH)和免疫球蛋白重链恒定区1(CH1);其中所述CL区和CH1区任选通过二硫键连接;b)融合部分A,其中所述融合部分A的C端与所述VH结构域的N末端共价连接;或c)融合部分B,其中所述融合部分B的C端与所述VL结构域的N末端共价连接;或者b和c两者;d)任选地,位于所述融合部分A和所述VH结构域之间的第一接头;和e)任选地,位于所述融合部分B和所述VL结构域之间的第二接头。在MSFP的一个实施方案中,所述融合部分A包含结合结构域和/或所述融合部分B包含结合结构域。所述融合部分A和融合部分B序列可相同或者可包含不同的序列。

[0023] 在本公开的多特异性Fab融合蛋白的另一个实施方案中,所述融合部分A包含第一结合结构域而所述融合部分B包含第二结合结构域,其中所述第一结合结构域和第二结合结构域能结合相同的细胞表面抗原。在一个实施方案中,所述融合部分A包含第一结合结构域而所述融合部分B包含第二结合结构域,其中所述第一结合结构域和第二结合结构域能结合不同的细胞表面抗原。在某些实施方案中,所述融合部分A包含第一结合结构域而所述融合部分B包含第二结合结构域,其中所述第一结合结构域和第二结合结构域能结合相同的表位或不同的表位。

[0024] 在本公开的多特异性Fab融合蛋白的一个实施方案中,所述Fab片段能结合细胞表面靶标抗原。在一个具体的实施方案中,所述融合部分A包含结合结构域并且所述Fab片段能与所述结合结构域结合相同的细胞表面抗原。在另一个实施方案中,所述融合部分B包含结合结构域并且所述Fab片段能与所述结合结构域结合相同的细胞表面抗原。

[0025] 在本文所述的多特异性Fab融合蛋白的某些实施方案中,所述Fab片段与抗原的结合被所述融合部分A和融合部分B导致的空间位阻所抑制。在一些实施方案中,所述空间位阻导致不可检测到的所述Fab片段与所述抗原的结合。在其它实施方案中,所述Fab片段与其靶标的结合相对于不存在所述融合部分A和融合部分B情况下相同Fab片段与其靶标的结合,降低了50%-90%。

[0026] 在本文所述的多特异性Fab融合蛋白的一个实施方案中,所述第一接头和第二接头是可切割的。在其它实施方案中,若所述第一接头被切割,则可检测到所述Fab片段与所述抗原的结合。在另一个实施方案中,若所述第二接头被切割,则可检测到所述Fab片段与所述抗原的结合。在又一个实施方案中,若所述第一接头和第二接头两者均被切割,则可检测到所述Fab片段与所述抗原的结合。

[0027] 在本文所述的多特异性Fab融合蛋白的另一个实施方案中,所述免疫球蛋白重链

恒定区类型选自 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。在一个实施方案中,所述免疫球蛋白重链来源于IgG抗体,而在其它实施方案中,所述IgG抗体的亚型选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0028] 在本文所述的多特异性Fab融合蛋白的另一个实施方案中,所述免疫球蛋白轻链VL和CL选自免疫球蛋白 κ 轻链和免疫球蛋白 λ 轻链。

[0029] 在一个实施方案中,所述融合部分A包含含有scFv抗原结合结构域的第一结合结构域。在本文所述的多特异性Fab融合蛋白的一个实施方案中,所述融合蛋白不包含第一接头或第二接头。在这方面,在一些实施方案中,所述融合部分A缺失了1-3个C端的氨基酸残基;或者其中所述融合部分B缺失了1-3个C端的氨基酸残基;或者其中所述融合部分A和融合部分B两者均缺失了1-3个C端的氨基酸残基。在本文所述的MSFP的其它实施方案中,其中没有第一接头或第二接头,所述Fab VH的N末端可以缺失1-3个氨基酸残基;或者所述Fab VL的N末端可以缺失1-3个氨基酸残基;或者所述VH的N末端和所述VL的N末端两者均可以缺失1-3个氨基酸残基。在本文所述的MSFP的其它实施方案中,其中没有第一接头或第二接头,所述融合部分A和融合部分B两者均可以缺失1-3个C端的氨基酸残基;并且所述Fab VH的N末端和所述Fab VL的N末端两者均可以缺失1-3个氨基酸残基。而在其它实施方案中,本文所述的MSFP包含接头和缺失的任何组合。

[0030] 在本文所述的多特异性Fab融合蛋白或其同源二聚体的一个实施方案中,所述第一接头包含蛋白酶不可切割的序列和/或所述第二接头包含蛋白酶可切割的序列。在本文所述的多特异性Fab融合蛋白或包含相同多特异性Fab融合蛋白的同源二聚体的另一个实施方案中,所述第一接头包含蛋白酶可切割的序列和/或所述第二接头包含不可切割的序列。在某些实施方案中,所述第一接头和第二接头包含可被相同的蛋白酶切割的蛋白酶可切割的序列。在其它实施方案中,所述第一接头和第二接头包含可被不同蛋白酶切割的蛋白酶可切割的序列。在相关的实施方案中,所述蛋白酶可切割的序列包含丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶或基质金属蛋白酶(MMP)可切割的序列。在某些实施方案中,所述蛋白酶可切割序列为MMP可切割的序列。在这方面,所述基质金属蛋白酶可切割序列可为基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)或基质金属蛋白酶14(MMP-14)可切割的序列。

[0031] 在本文所述的多特异性Fab融合蛋白的另一个实施方案中,所述第一接头的长度为1-10个氨基酸或1-20个氨基酸。在一些实施方案中,所述第二接头包含蛋白酶不可切割的序列或包含蛋白酶可切割的序列。在这方面,所述蛋白酶可切割的序列可为丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶或基质金属蛋白酶(MMP)可切割的序列。在某些实施方案中,所述蛋白酶可切割序列为MMP可切割的序列,并且在这方面,可为选自以下的MMP可切割的序列:基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)或基质金属蛋白酶14(MMP-14)可切割的序列。在某些实施方案中,所述第二接头的长度为1-10个氨基酸或1-20个氨基酸。

[0032] 在本公开的另一个方面,所述多特异性Fab融合蛋白包含a)能结合靶标抗原的Fab片段,其中所述Fab片段包含,i)免疫球蛋白轻链可变区(VL)和免疫球蛋白轻链恒定区(CL);和ii)免疫球蛋白重链可变区(VH)和免疫球蛋白重链恒定区1(CH1);其中所述CL区和CH1区任选通过二硫键连接;b)融合部分A,其中所述融合部分A的C端与所述VH结构域的N末端共价连接;c)融合部分B,其中所述融合部分B的C端与所述VL结构域的N末端共价连接;d)

任选地,位于所述融合部分A和所述VH结构域之间的第一接头;和e) 任选地,位于所述融合部分B和所述VL结构域之间的第二接头;其中所述融合部分A包含结合结构域和/或所述融合部分B包含结合结构域,并且进一步地,所述结合结构域的任一个或两个能结合细胞表面抗原。在某些实施方案中,所述结合结构域(例如融合部分A或融合部分B的结合结构域)之一能结合人血清白蛋白。

[0033] 在本文所述的多特异性Fab融合蛋白的另一个实施方案中,所述Fab能结合选自以下的靶标抗原:Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIa、NKG2D、CD3、CD25、CD28、CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LT β R、TLR、TRAIL受体1、TRAIL受体2、EGFR、Her2/neu、ErbB3、CD25和CD28。在具体的实施方案中,所述Fab能结合CD3。在另一个实施方案中,所述Fab能结合T细胞受体。所述Fab可为人源化的。在某些实施方案中,所述人源化的Fab来源于OKT3、UCHT-1或SP34。在一个实施方案中,所述Fab来源于全人抗体,在一些实施方案中,其产生自噬菌体展示、酵母展示或人抗体基因的转基因小鼠。

[0034] 在本文所述的多特异性Fab融合蛋白的一个实施方案中,所述融合部分A包含第一结合结构域并且所述融合部分B包含第二结合结构域,其中所述第一和第二结合结构域能结合相同的细胞表面抗原,并且其中所述第一和第二结合结构域能结合选自以下的靶标:Fc γ RIIb、CD28、CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LT β R、TLR、TRAIL受体1、TRAIL受体2、CD28、CEA、PSMA、BCMA、CAIX、cMet、EGFR1、Her2/neu、ErbB3、EpCAM、叶酸受体、Ephrine受体、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38和CD138。

[0035] 在本文所述的多特异性Fab融合蛋白的又一个实施方案中,所述融合部分A包含第一结合结构域并且所述融合部分B包含第二结合结构域,其中所述第一和第二结合结构域能结合不同的细胞表面抗原,并且其中所述第一和第二结合结构域能结合不同的靶标,所述靶标选自:Fc γ RIIb、CD28、CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LT β R、TLR、TRAIL受体1、TRAIL受体2、CD28、CEA、PSMA、BCMA、CAIX、cMet、EGFR1、Her2/neu、ErbB3、EpCAM、叶酸受体、Ephrine受体、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38和CD138。

[0036] 在某些实施方案中,所述多特异性Fab融合蛋白的第一结合结构域和/或第二结合结构域为抗体的抗原结合片段。在这方面,所述抗原结合片段可以选自:scFv、CDR、Fv、免疫球蛋白VL结构域、免疫球蛋白VH结构域、免疫球蛋白VL结构域和VH结构域、Fab、骆驼科动物抗体VHH(camelid VHH)、dAb(结构域抗体)。在某些实施方案中,所述抗原结合片段是人源化的,并且在其它实施方案中,所述抗原结合片段来源于小鼠、大鼠或兔的单克隆抗体。在一些实施方案中,所述抗原结合片段来源于全人抗体,其可产生自噬菌体展示、酵母展示或人抗体基因的转基因小鼠。

[0037] 在其它实施方案中,本文所述的MSFP的第一和/或第二结合结构域选自:纤连蛋白3结构域(Fn3)、锚蛋白重复序列和Adnectin。

[0038] 在本文所述的多特异性Fab融合蛋白的一个实施方案中,所述第一接头和/或第二接头包含SEQ ID NO:133所示的氨基酸序列(PLGLAG)。

[0039] 本公开的一个方面提供了编码本文所述的多特异性Fab融合蛋白的分离的多核苷酸、包含所述分离的多核苷酸的表达载体以及包含此类载体的分离的宿主细胞。

[0040] 本公开的另一个方面提供了表达多特异性Fab融合蛋白的方法,其包括在编码本文所述的多特异性Fab融合蛋白的分离的多核苷酸表达所编码的多特异性Fab融合蛋白的

条件下,培养包含所述分离的多核苷酸的宿主细胞。

[0041] 本公开的另一个方面提供了包含本文所述的一种或多种多特异性Fab融合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0042] 本公开的另一个方面提供了治疗病症的方法,其包括向有此需要的受试对象给予有效量的包含本文所述的一种或多种多特异性Fab融合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物,其中所述病症与所述多特异性Fab融合蛋白可结合的抗原相关。

[0043] 在本文所述的多特异性Fab融合蛋白的另一个实施方案中,所述融合部分A和融合部分B并不二聚化。

[0044] 本公开的另一个方面提供了包含以下的多特异性Fab融合蛋白:能与CD3 ϵ 的N端结合的Fab片段;与所述Fab片段中VL的N端连接的融合部分A;或与所述Fab片段中VH的N端连接的融合部分B;或与所述Fab片段中VL的N端连接的融合部分A和与所述Fab片段中VH的N端连接的融合部分B两者。在一个实施方案中,所述Fab片段能结合CD3 ϵ 的第1-27位氨基酸之内的表位。在又一个实施方案中,所述Fab片段与非人灵长类CD3 ϵ 交叉反应。

[0045] 在本文公开的多特异性Fab融合蛋白的一个实施方案中,a.所述Fab片段包含:i.免疫球蛋白轻链可变区(VL)和免疫球蛋白轻链恒定区(CL),所述免疫球蛋白轻链可变区包含SEQ ID NO:26-28所示的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;和ii.免疫球蛋白重链可变区(VH)和免疫球蛋白重链恒定区1(CH1),所述免疫球蛋白重链可变区包含SEQ ID NO:23-25所示的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;其中所述CL区和CH1区任选通过二硫键连接;b.所述融合部分A的C端与所述VH结构域的N末端共价连接;或者c.所述融合部分B的C端与所述VL结构域的N末端共价连接;或者d.b和c两者;e.任选地,位于所述融合部分A和所述VH结构域之间的第一接头;以及f.任选地,位于所述融合部分B和所述VL结构域之间的第二接头。在一个实施方案中,VH选自SEQ ID NO:34、38、42、46、50和54所示氨基酸序列中的任一种。在另一个实施方案中,VL选自SEQ ID NO:56、58、62、66和70所示氨基酸序列中的任一种。在另一个实施方案中,所述融合部分A包含结合结构域和/或所述融合部分B包含结合结构域。在一个实施方案中,所述融合部分A和融合部分B序列相同。在又一个实施方案中,所述融合部分A和融合部分B包含不同的序列。在一个具体的实施方案中,所述融合部分A包含第一结合结构域并且所述融合部分B包含第二结合结构域,其中所述第一结合结构域和第二结合结构域能结合相同的细胞表面抗原。在某些实施方案中,所述融合部分A包含第一结合结构域并且所述融合部分B包含第二结合结构域,其中所述第一结合结构域和第二结合结构域能结合不同的细胞表面抗原。在其它实施方案中,所述融合部分A包含第一结合结构域并且所述融合部分B包含第二结合结构域,其中所述第一结合结构域和第二结合结构域能结合相同的表位。在另一个实施方案中,所述融合部分A包含第一结合结构域并且所述融合部分B包含第二结合结构域,其中所述第一结合结构域和第二结合结构域能结合不同的表位。

[0046] 在本文公开的多特异性Fab融合蛋白的一个实施方案中,所述Fab片段与CD3的结合被所述融合部分A和融合部分B导致的空间位阻所抑制。在这方面,在不存在所述第一结合结构域和第二结合结构域与所述细胞表面抗原结合的情况下,所述空间位阻导致不可检测到的所述Fab片段与CD3的结合。在另一个实施方案中,在不存在所述第一结合结构域和第二结合结构域与所述细胞表面抗原结合的情况下的所述Fab片段与CD3的结合,相对于存在所述第一结合结构域和第二结合结构域与所述细胞表面抗原的结合的情况下所述Fab片

段与CD3的结合,降低了50%-90%。在另一个实施方案中,所述Fab片段与CD3的结合相对于没有所述融合部分A和融合部分B的相同Fab片段的结合减少了50%-90%。

[0047] 在本文公开的多特异性Fab融合蛋白的另一个实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区类型选自 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。在一个实施方案中,所述免疫球蛋白重链来源于IgG抗体。在另外的实施方案中,所述IgG抗体的亚型选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在另一个实施方案中,所述免疫球蛋白轻链VL和CL选自免疫球蛋白 κ 轻链和免疫球蛋白 λ 轻链。

[0048] 在本文公开的多特异性Fab融合蛋白的一个实施方案中,所述融合部分A包含含有scFv抗原结合结构域的第一结合结构域。

[0049] 在所述多特异性Fab融合蛋白的另一个实施方案中,所述第一接头和第二接头的长度为1-20个氨基酸。在一个具体的实施方案中,所述第一接头和/或第二接头包含GlyArgAla。

[0050] 在本文公开的多特异性Fab融合蛋白的一个实施方案中,所述Fab是人源化的。

[0051] 在本文公开的多特异性Fab融合蛋白的又一个实施方案中,所述第一结合结构域和第二结合结构域能结合选自以下的靶标:Fc γ RIIb、CD28、CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LT β R、TLR、TRAIL受体1、TRAIL受体2、CD28、CEA、PSMA、BCMA、CAIX、cMet、EGFR1、Her2/neu、ErbB3、EpCAM、叶酸受体、Ephrine受体、TRAIL受体2、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38和CD138。在一个实施方案中,所述第一结合结构域和第二结合结构域选自SEQ ID NO:78、88和94所示的氨基酸序列中的任一种。

[0052] 在另一个实施方案中,所述第一结合结构域和第二结合结构域能结合不同的靶标,所述靶标选自:Fc γ RIIb、CD28、CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LT β R、TLR、TRAIL受体1、TRAIL受体2、CD28、CEA、PSMA、BCMA、CAIX、cMet、EGFR1、Her2/neu、ErbB3、EpCAM、叶酸受体、Ephrine受体、TRAIL受体2、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38和CD138。

[0053] 在一个实施方案中,所述第一结合结构域和/或第二结合结构域为抗体的抗原结合片段。在另一个实施方案中,所述抗原结合片段选自:scFv、CDR、Fv、免疫球蛋白VL结构域、免疫球蛋白VH结构域、免疫球蛋白VL结构域和VH结构域、Fab、骆驼科动物抗体VHH、dAb。在又一个实施方案中,所述抗原结合片段是人源化的。在其它实施方案中,所述抗原结合片段来源于小鼠、大鼠或兔的单克隆抗体,并且所述抗原结合片段也可来源于全人抗体。在这方面,所述全人抗体产生自噬菌体展示、酵母展示或人抗体基因的转基因小鼠。

[0054] 在一个实施方案中,所述抗原结合片段:1) 包含分别如SEQ ID NO:139-144所示的VHCDR和VLCDR;2) 包含分别如SEQ ID NO:145-150所示的VHCDR和VLCDR;3) 包含SEQ ID NO:78、88和94的任一氨基酸序列所示的scFv中存在的VH;4) 包含SEQ ID NO:78、88和94的任一氨基酸序列所示的scFv中存在的VL;或5) 包含选自SEQ ID NO:78、88和94所示的任一氨基酸序列的ScFv。

[0055] 在某些实施方案中,所述多特异性Fab融合蛋白的CL区包含杵状结构或臼状结构突变,并且所述CH1区包含对应的杵状结构或臼状结构突变得使所述CL区和CH1区稳定地相互作用。

[0056] 在另一个实施方案中,本文公开的多特异性Fab融合蛋白,包含选自SEQ ID NO:84、90、96和100的任一氨基酸序列;和选自SEQ ID NO:32、60、64、68和72的任一氨基酸序

列。在另一个实施方案中,本公开的多特异性Fab融合蛋白包含选自SEQ ID NO:86、92、98和102的任一氨基酸序列;和选自SEQ ID NO:30、36、40、44、48和52的任一氨基酸序列。在某些实施方案中,所述CL区和CH1区通过二硫键连接。

[0057] 本公开的另一个方面提供了编码本文所述的多特异性Fab融合蛋白中任一种的分离的多核苷酸,和包含所述分离的多核苷酸的表达载体。本公开还提供了包含此类载体的分离的宿主细胞。本公开还提供了在所述分离的多核苷酸表达所编码的多特异性Fab融合蛋白的条件下,通过培养所述宿主细胞来表达多特异性Fab融合蛋白的方法。

[0058] 本公开还提供了包含本文所述的多特异性Fab融合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0059] 本公开的另一个方面提供了治疗癌症的方法,其包括向患有癌症或疑似患有癌症的受试对象给予有效量的包含本文所述的多特异性Fab融合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物,其中所述癌症与所述多特异性Fab融合蛋白可结合的抗原相关。

[0060] 附图简述

[0061] 图1:描述了多特异性Fab融合蛋白(MSFP)的示意图。融合部分A和融合部分B、单域蛋白或多结构域蛋白,通过可被或不可被蛋白酶切割的接头序列与Fab片段的N末端共价融合。融合部分A和融合部分B可具有抗原特异性结合能力或不具有抗原特异性结合能力。

[0062] 图2:描述MSFP中融合部分的不同结构以及Fab与细胞表面靶标或靶标的可溶形式的结合亲和力的相对强度的示意图。图的下半部分显示了MSFP中融合部分的构象柔性。

[0063] 图3:说明了不同融合形式的Fab对可溶靶标和细胞表面靶标的结合性质的示意图。A. Fab的结构、Fab在N端之一带有单个融合部分的融合蛋白的结构、在Fab的两个N端均带有融合部分的Fab的融合蛋白的结构;B. 描述了全部三种Fab融合形式的能够结合其可溶靶标的Fab的示意图;C. 描述了没有融合和在Fab的N端带有单个融合部分的Fab结构域可结合其细胞表面上的靶标的示意图。然而,在重链和轻链两者的N端带有融合部分的Fab结构域由于空间位阻无法再结合其细胞表面上存在的靶标。

[0064] 图4:描述了MSFP结合T细胞的必要条件的示意图:A. 在重链和轻链两者的N端均带有抗肿瘤细胞表面靶标结合部分的MSFP可通过肿瘤相关抗原(TAA)结合肿瘤细胞但不结合T细胞上的CD3(因为大大降低的亲和力,参见图3C)。B. 当MSFP分子以低亲和力结合T细胞上的CD3时,可通过亲合力效应有效结合肿瘤细胞和T细胞。代表性MSFP分子通过TAA结合在肿瘤细胞上成簇,CD3结合臂将通过亲合力结合T细胞,从而桥联肿瘤细胞和T细胞。

[0065] 图5:描述了带有单个抗肿瘤细胞表面靶标部分的Fab融合蛋白(或来自Fab融合蛋白在重链和轻链两者的单臂切割产物)可结合肿瘤细胞和T细胞两者上的靶标,导致两种细胞类型桥联的示意图。

[0066] 图6:A,显示了两条单链Fv(scFv)结构域作为融合部分的Fabe的示意图。Fabe是指其中Fab结合靶标是免疫细胞表面效应分子的MSFP,所述免疫细胞表面效应分子例如T细胞上的CD3 ϵ 链或T细胞受体、NK细胞上的NKG2D、或NK细胞、单核细胞和巨噬细胞上的Fc γ 受体。两个scFv结构域可具有相同的特异性或不同的特异性,B,蛋白结构域和一级序列中的链间二硫键的示意图。CH和CL之间的链间二硫键是任选的。scFv的结构可为VH-VL或VL-VH并且scFv1和scFv2中的VH和VL结构可为相同或不同的。

[0067] 图7:A,显示了两条单链Fv(scFv)结构域作为融合部分的Fabe-albu的示意图。

Fab ϵ -albu是Fab ϵ 的特定类型,其中一种scFv对人白蛋白具有结合特异性并且第二种scFv对肿瘤细胞表面抗原(TAA)具有结合特异性;B,蛋白结构域和一级序列中链间二硫键的示意图。scFv的结构可为VH-VL或VL-VH并且scFv1和scFv2中的VH和VL结构可为相同或不同的。

[0068] 图8:小鼠抗人CD3抗体1F3和人源化1F3抗体,即hu-1F3的4-20%tris甘氨酸SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶分析)(Invitrogen)。凝胶用simplyblue试剂(Invitrogen)染色。“NR”是在非还原条件下,而“R”是在用5%的巯基乙醇的还原条件下。蛋白条带表明这两种抗体均具有完整的IgG、IgGHC和IgGLC的正常大小。

[0069] 图9:通过小鼠抗CD3抗体即mu-1F3和人源化抗CD3抗体即hu-1F3来检测还原和变性的重组CD3相关蛋白。将100ng所示抗原在4-20%tris甘氨酸凝胶上运行,并转移至硝酸纤维素膜上。1 μ g/ml生物素化mu-1F3IgG(A)和生物素化hu-1F3IgG用于与膜一起孵育,并随后与链霉亲和素/HRP孵育。检测是由ECL试剂进行。Fc(K-H)表示“杵状结构和臼状结构”异源二聚化的Fc突变体。CD3 ϵ AA1-27.Fc是与人Fc融合的CD3 ϵ N-端肽(参见SEQ ID NO:18)。对照肽具有与CD3 ϵ AA1-27相同的氨基酸组成但前16个氨基酸的序列顺序反向(参见SEQ ID NO:20)。小鼠抗CD3IgG能识别人及猕猴物种的变性CD3 ϵ 链以及人CD3 ϵ N端的第1-27位氨基酸。带有反向的前16个残基的氨基酸序列的肽并不被小鼠1F3IgG识别,表明阳性条带是特异性的。人源化1F3抗体即hu-1F3IgG,显示出非常相似的识别相同抗原组的模式,表明该抗体与母体小鼠1F3抗体具有相似的特异性和表位。

[0070] 图10:小鼠抗人CD3抗体即mu-1F3及其人源化版本hu-1F3对人PBMC的结合的流式细胞分析。FACS染色用生物素化的IgG,随后第二步用链霉亲和素-PE缀合物进行。mu-1F3和hu-1F3IgG产生了相似的细胞染色模式:对于T细胞而言为大的位移(2-3个log),人PBMC中的大部分细胞。已知小鼠Fc(在mu-1F3中)缺少人Fc γ 受体结合活性。因此,在低位移细胞群(0-1个log)中的轻微差异,很可能是由于hu-1F3IgG(人IgG2Fc)与PBMC制备物中的表达Fc γ 受体的细胞的低亲和力结合。FACS用FACS Calibur仪器(BD Bioscience)完成。

[0071] 图11:mu-1F3和hu-1F3IgG对重组CD3 ϵ 相关蛋白的ELISA结合研究。将50 μ l的1 μ g/ml所示蛋白抗原包被于maxisorp ELISA板(每孔)上。加入生物素化的mu-1F3IgG和hu-1F3IgG(0.5 μ g/ml在4%奶粉TBS-0.05%Tween20中)来结合固定的抗原,并随后加入链霉亲和素/HRP缀合物。ABTS用于显色并在405nm处测得吸光度。对照肽Fc融合蛋白(参见SEQ ID NO:20)上的ELISA对于两种抗体均为阴性的(数据未示出)。结果表明母体小鼠抗体即mu-1F3及人源化版本即hu-1F3对不同抗原形式非常相似的结合模式,这表明该人源化抗体的特异性和表位被保留。

[0072] 图12:Fab形式中人源化1F3抗体识别Jurkat细胞上的CD3。将2 μ g/ml浓度的带His标签的Fab蛋白与Jurkat细胞孵育,并接着与小鼠抗his标签的抗体和抗小鼠-PE缀合物孵育。FACS在FACS Calibur仪器(BD Bioscience)上运行。

[0073] 图13:人源化抗CD3抗体与重组人CD3 ϵ / δ Fc(K-H)异源二聚体的ELISA结合(A图和B图);人源化抗CD3抗体与重组人CD3 ϵ N端第1-27位氨基酸的肽Fc融合蛋白的ELISA结合(C图和D图);人源化抗CD3抗体与重组猕猴CD3 ϵ / δ Fc(K+L)异源二聚体的ELISA结合(E图和F图)。人源化Fab蛋白在Fd的C端带有his6标签,并且与96孔板的固定抗原结合的Fab用缀合了HRP的抗his6标签小鼠抗体检测。ABTS用作底物并在405nm处测得吸光度。

[0074] 图14:利用FACS分析EpCAM x CD3Fab融合蛋白 (MSFP) 与表达人CD3的Jurkat细胞的结合。通过链霉亲和素-PE缀合物检测与Jurkat结合的生物素化Fab和Fab融合蛋白。OKT3Fab显示出与Jurkat上的CD3的结合,但与单独的LC或HC和LC两者融合的抗EpCAM scFv完全消除了OKT3Fab部分的CD3结合能力。人源化抗CD3抗体Fab即hu-1F3能结合Jurkat细胞上的CD3。与OKT3Fab融合蛋白不同,与hu-1F3LC的N端融合的抗EpCAM scFv保留了与hu-1F3Fab相似水平的结合活性;抗EpCAM scFv融合蛋白与hu-1F3Fab的LC和HC的同时融合显示出与Jurkat细胞上CD3的阳性结合但水平降低。

[0075] 图15:利用FACS分析EpCAM x CD3MSFP与人PBMC的结合。与Jurkat细胞结合的生物素化Fab和Fab融合蛋白用链霉亲和素-PE缀合物检测。A) 与表达CD3的PBMC (T细胞) 结合的OKT3Fab;与HC和LC两者融合的抗EpCAM scFv完全消除了OKT3Fab部分的CD3结合能力。B) 人源化抗CD3抗体Fab即hu-1F3.1能结合PBMC制备物中T细胞上的CD3。与OKT3Fab融合蛋白不同,抗EpCAM x hu-1F3.1Fab同时与Fab的LC和HC融合表现出与Jurkat细胞上CD3的阳性结合,但是该结合水平处于降低的水平。

[0076] 图16:显示了以下的ELISA结合测定:A) OKT3Fab和EpCAM1.1x OKT3双特异性Fab融合蛋白对重组猕猴CD3 ϵ / δ 异源二聚体Fc蛋白没有结合活性;B) OKT3Fab和双特异性融合蛋白对重组人CD3 ϵ N端肽(aa1-27.Fc融合蛋白)没有结合活性。Fab和Fab融合蛋白是生物素化的,并且与96孔板上固定的抗原结合的生物素化抗体利用链霉亲和素/HRP缀合物以及随后的ABTS底物来检测。

[0077] 图17:ELISA结合测定显示:hu-1F3Fab和EpCAM1.1x hu-1F3.1双特异性Fab融合蛋白 (MSFP;Fabe) 对以下具有阳性结合活性:A) 重组猕猴CD3 ϵ / δ Fc (K+H) 异源二聚体蛋白;和B) 重组人CD3 ϵ N端肽 (aa1-27.Fc融合蛋白)。Fab和Fab融合蛋白是生物素化的,并且与96孔板上固定的抗原结合的生物素化抗体利用链霉亲和素/HRP缀合物以及随后的ABTS底物来检测。

[0078] 图18:ELISA结合测定显示:hu-1F3Fab和EpCAM1.2x hu-1F3.1MSFP对以下具有阳性结合活性:A) 重组猕猴CD3 ϵ / δ Fc (K+H) 异源二聚体蛋白;和B) 重组人CD3 ϵ N端肽 (aa1-27.Fc融合蛋白)。Fab和Fab融合蛋白是生物素化的,并且与96孔板上固定的抗原结合的标记的融合蛋白利用链霉亲和素/HRP缀合物以及随后的ABTS底物来检测。

[0079] 图19:ELISA结合测定显示:hu-1F3Fab和EpCAM2.2x hu-1F3.1MSFP对以下具有阳性结合活性:A) 重组猕猴CD3 ϵ / δ Fc (K+H) 异源二聚体蛋白;和B) 重组人CD3 ϵ N端肽 (aa1-27.Fc融合蛋白)。Fab和Fab融合蛋白是生物素化的,并且与96孔板上固定的抗原结合的生物素标记的融合蛋白利用链霉亲和素/HRP缀合物以及随后的ABTS底物来检测。

[0080] 图20:通过FACS分析EpCAM x CD3MSFP与在细胞表面上稳定表达全长人EpCAM (hu-EpCAM-FL) 靶标的CHO细胞的结合。抗CD3Fab如所期望地对相同的CHO细胞没有结合。EpCAM x CD3MSFP对CHO细胞上表达的EpCAM表现出阳性结合。

[0081] 图21:基于FACS的测定以检测由EpCAM x CD3MSFP以肿瘤靶标依赖的方式重新定向的PBMC (T细胞) 介导的细胞杀伤活性。在该测定中,靶细胞 (在细胞表面上稳定表达人EpCAM-FL的CHO细胞 (A、B、D) 和对照细胞 (仅CHO, C) 在测定前用PKH-26荧光染料 (Sigma, 依照生产商的说明书) 标记。TO-PRO-3碘化物 (TP3, Invitrogen) 用于在细胞杀伤测定结束时确定死细胞。在该测定中,死的靶细胞从右上象限上的计数确定 (PKH-26阳性, TP3阳性), 而

活的靶细胞从左上象限确定 (PKH-26阳性, TP3阴性)。A) 用EpCAM2.2x CD3MSFP但无PBMC孵育 (持续20小时) 的表达EpCAM的CHO细胞有约1.4%的死细胞 (PKH-26标记的TP3阳性细胞); B) 用PBMC但无MSFP孵育 (持续20小时) 的表达EpCAM的CHO细胞在PKH-26标记的群中有约14%的死细胞 (PBMC的非特异性杀伤活性); C) 用PBMC和pCAM2.2x CD3MSFP孵育 (持续20小时) 的不表达EpCAM的CHO细胞有约14%的死细胞 (PBMC的非特异性杀伤活性); 以及D) 用PBMC和示例性EpCAM x CD3MSFP孵育 (持续20小时) 的表达EpCAM的CHO细胞有约64%的死细胞计数。EpCAM2.2x CD3MSFP的肿瘤细胞靶标依赖性的杀伤活性%为约50% (对比C和D或B和D)。

[0082] 图22: 利用图18所述的FACS测定来检测MSFP对表达EpCAM的CHO细胞的重新定向的T细胞杀伤活性。A) OKT3Fab及其MSFP缺少明显的重新定向的细胞裂解活性, 而hu-1F3.1Fab对靶细胞没有活性; B) EpCAM1.1x hu-1F3.1MSFP具有高水平活性, 并且该活性水平即使在60pM的MSFP中仍保持很高; C) 通过EpCAM1.2x hu-1F3.1MSFP检测剂量依赖性活性; 和D) 检测EpCAM2.2scFv与hu-1F3.1Fab单融合的剂量依赖细胞裂解活性。对于EpCAM2.2scFv和hu-1F3.1Fab的HC和LC两者的双融合而言, 观察到50%细胞群的最大杀伤, 并且当其浓度低至60pM时, 其活性水平仍保持很高 (约40%)。杀伤活性百分比通过从样品测定中死细胞百分比减去对照测定中的死细胞百分比 (EpCAM-CHO+PBMC+无MSFP) 来计算。

[0083] 图23: EpCAM2.2-(H+L)-hu-1F3.1MSFP的T细胞活化 (在PBMC中) 是肿瘤靶标依赖性的。A) 在存在不表达EpCAM的CHO的情况下, 用EpCAM2.2-(H+L)-hu-1F3.1 (30nM) 孵育的PBMC, 通过FACS分析CD69表达所测量的, 导致了基础水平的T细胞活化。B) 在存在不表达EpCAM的CHO的情况下, 用EpCAM2.2-(H+L)-hu-1F3.1 (30nM, 16小时) 孵育的PBMC, 通过FACS测定检测CD69表达所测量的, 导致了显著增加的T细胞活化。

[0084] 详述

[0085] 本公开涉及多特异性Fab融合蛋白 (MSFP)。具体而言, 本公开的MSFP包含能结合特定的目的靶标抗原 (例如CD3、T细胞受体、NKG2D或Fc γ R) 的Fab片段, 并具有一个或两个融合部分, 所述融合部分能结合一种另外的靶标抗原或在一些实施方案中, 能结合两种另外的靶标抗原 (例如血清白蛋白、肿瘤抗原或其它疾病相关抗原)。

[0086] 可预见的是癌症治疗的有效性, 包括原料药的药效、安全性、生产相关成本以及给药途径可通过开发具有以下大部分或全部属性的创新药物来大大提高:

[0087] 1. 使用二价的肿瘤相关抗原 (TAA) 结合分子相对于正常细胞增强的靶向肿瘤细胞的选择性。抗体与抗原相互作用的能量学通常通过术语亲和力和亲合力来表示。亲合力与亲和力不同, 亲和力是用于描述抗体结合结构域和抗原之间的单个位点相互作用强度的术语。因此, 亲合力是亲和力的组合协同强度。抗体与肿瘤细胞的结合依赖于内在的结合亲和力、抗体上存在的结合位点的数量 (效价) 和细胞上靶标抗原的密度 (Reynolds, Biochemistry18:264-9, 1979)。当使用单价抗体时, 所测量的结合强度与亲和力相关。当使用二价或多价抗体用于细胞结合时, 通常测量亲合力。较高的抗原浓度通常导致更高的亲合力。已知许多肿瘤细胞在肿瘤细胞表面过表达TAA。具有两个抗肿瘤靶标结合结构域的MSFP能够对过表达TAA的肿瘤细胞, 比对也表达相同靶标的正常组织细胞具有选择性更高的结合。基于亲合力原则, Adams等人成功证实利用二价抗HER2/neu抗体片段比使用相应单价版本的相同抗体片段在肿瘤块累积方面改善了3倍多 (Adams et al., Clin Cancer Res12:1599-1605, 2006)。就肿瘤靶向而言, 抗体的高亲和力通常会导致在肿瘤块周围积聚

而高亲和力效应导致抗体的更深地透入肿瘤中。

[0088] 2. 利用双特异性抗体相对于正常细胞增强的靶向肿瘤的选择性。双特异性试剂可出于其目的被改造以相对于正常细胞更有选择性地结合并杀伤肿瘤细胞并最终增加超过单特异性试剂的功效和安全性 (Chang et al., *Mol Cancer Ther* 1:553, 2002; Kipriyanov and Le Gall, *Curr Opin Drug Discov Devel* 7:233, 2004)。肿瘤细胞上需要存在两种抗原和每种抗原结合臂的适当亲和力的仔细设计是该方法的关键方面。例如, MM-111 为抗 Her2 和 Her3 的双特异性融合蛋白, 其旨在使用 her2 臂以将药物靶向癌细胞并使用抗 her3 臂以抑制 her3 受体的异源二聚体化和癌细胞中的信号转导 (Robinson et al., *British Journal of Cancer* 99, 1415-1425, 2008)。设计 MM-111 所考虑的重要方面包括: 1) 相对受限的组织表达模式和 Her2 的癌细胞过表达、2) Her3 的广泛组织表达和癌细胞生长和存活中 Her3 信号转导的至关重要性、3) 对 Her2 的高亲和力结合 (1.1nM) 和对 Her3 的低亲和力结合 (160nM)。在体外结合测定中, MM-111 被证实对 Her2/Her3 双阳性细胞的结合比对 Her2 单阳性细胞的结合高至 9.7 倍, 但在高至 1 μ M 的浓度时对 Her3 单阳性细胞没有可检测到的结合 (Robinson et al., *British Journal of Cancer* 99, 1415-1425, 2008)。

[0089] 因此, 本公开提供了这些优点和本文另外所述的其它优点。具体而言, 本公开的 MSFP 提供了明显的优点, 包括但不限于以下: 1) 当 Fab 结合融合部分时, MSFP 不结合初级 Fab 靶标或对初级 Fab 靶标具有降低的结合。例如, 当 Fab 结合融合部分 A 和融合部分 B 时, 特别是当所述融合部分不结合其靶标时, 包含抗 CD3 Fab 的 MSFP 不结合 CD3 或对 CD3 具有降低的结合。这降低了不需要的副作用 (例如, 在结合肿瘤细胞或表达 Fab 靶标抗原的其它细胞之前, T 细胞的不需要的一般活化)。2) 二价结合或双特异性结合增强了 MSFP 相对于正常细胞对肿瘤的选择性。3) MSFP 相对较大 (约 75-100KD), 从而避免了快速的肾清除率 (肾清除率的过滤阈值大小为 70KD), 但比普通抗体 (150KD) 小, 从而允许提高的肿瘤组织渗透性。5) 某些 MSFP 结合血清白蛋白的能力显著提高了循环半衰期。6) MSFP 结构往往比仅具有 scFv 的融合蛋白更稳定。

[0090] 在某些实施方案中, 本公开的 MSFP 就结合特定的靶标抗原 (例如, 肿瘤抗原) 而言是二价的并且是双特异性的, 因为其能经由融合部分结合靶标肿瘤抗原并经由 Fab 结合结构域结合第二靶标抗原 (例如, CD3、T 细胞受体、NKG2D 或 Fc γ R), 这通过激活例如, 针对表达特定靶标抗原的细胞的免疫系统来提高其功效。

[0091] 本公开的示例性 MSFP 包含抗 CD3 的 Fab。然而, 其他的 Fab 靶标是本文特别考虑的。关于抗-CD3 的 Fab, 迄今为止, 针对 TCR 复合物连同 T 细胞活化的蛋白分子, 还诱导 T 细胞信号导致细胞因子风暴, 这可导致严重的副作用, 或在不存在交联的情况下对细胞无效。本公开的 MSFP 提供了抑制 TCR (CD3) 结合和活化的优点, 除非 MSFP 首先结合次级靶标抗原 (例如肿瘤抗原), 从而活化 T 细胞。在不存在所需靶细胞 (例如, 肿瘤细胞靶标) 的情况下, 这极大降低了不需要的细胞因子风暴和不需要的 T 细胞活化。

[0092] 以下描述仅是为了说明本公开的各种实施方案。因此, 所讨论的具体修改并不旨在限制。本领域技术人员应显而易见的是在不背离本文呈现的主题的精神或范围的情况下, 可作出各种等同物、变化和修改, 并且应理解这些等同的实施方案应包括在本文中。

[0093] 除非明确指示相反, 否则本发明的实施将采用病毒学、免疫学、微生物学、分子生物学和本领域技术范围内的重组 DNA 技术的常规方法, 出于说明的目的其中有许多方法在

以下描述。此类技术在参见例如以下的文献中详细解释。Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, New York, N.Y. (2009); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley&Sons, 1995; Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001); Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I&II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames&S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames&S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) 和其它类似的参考文献。

[0094] 如本说明书和所附权利要求中所使用的, 除非上下文另外明确说明, 否则单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”包括复数形式。

[0095] 本说明书从始至终, 除非上下文另有要求, 否则词语“包含”、或其变化形式例如“包括”或“含有”将被理解为暗含所指出的成分或整数, 或成分或整数的组, 但不排除任何其他成分或整数或成分或整数的组。

[0096] 除非另外明确说明, 否则本说明书中的每个实施方案在细节上作必要修改后应适用于每个其他的实施方案。

[0097] 可使用重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如, 电穿孔、脂质转染)的标准技术。酶促反应和纯化技术可根据制造商的说明书进行, 或如本领域通常进行的或如本文所述的来进行。这些及相关技术和程序一般可根据本领域熟知的和本说明书所引用或讨论的多种一般参考文献和更具体的参考文献中所描述的常规方法来进行。除非提供具体定义, 否则与本文所述的分子生物学、分析化学、合成有机化学、以及医学和药物化学结合使用的术语及其实验室程序和技术, 为本领域熟知且常用的那些。可以使用重组技术、分子生物学、微生物学、化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者治疗的标准技术。

[0098] 本文所用的多肽的“C端”是指该多肽的最后一个氨基酸残基, 其贡献其胺基与其邻接氨基酸残基的羧基形成肽键。本文所用的多肽的“N端”是指该多肽的第一个氨基酸, 其贡献其羧基与其邻接氨基酸残基的胺基形成肽键。

[0099] 本文所用的术语“共价连接”是指通过一个或多个化学键的直接连接或通过一个或多个接头的间接连接。

[0100] 任何合适的化学键可用于产生直接连接, 包括但不限于, 诸如肽键和二硫键的共价键, 诸如氢键、疏水键、离子键和范德华键的非共价键。

[0101] “共价键”在本文是指共享一个或多个电子的两个原子之间的稳定结合。共价键的实例包括但不限于, 肽键和二硫键。本文所用“肽键”是指氨基酸的羧基和相邻氨基酸的胺基之间形成的共价键。本文所用“二硫键”是指两个硫原子之间形成的共价键。二硫键可通过两个硫醇基团的氧化来形成。在某些实施方案中, 共价连接是通过共价键直接连接。在某些实施方案中, 共价连接是通过肽键或二硫键直接连接。

[0102] 本文“非共价键”是指两个分子或两个化学基团之间不涉及电子共享的吸引相互作用。非共价键的实例包括但不限于氢键、疏水键、离子键和范德华键。本文“氢键”是指第一分子/基团的氢原子和第二分子/基团的负电性原子之间的吸引力。本文“疏水键”是指导

致疏水分子/基团或非极性分子/基团在水环境中聚集或结合在一起的力。本文“离子键”是指正离子和负离子之间的吸引。本文“范德华键”是指在电子分布中有瞬间随机波动的两个相邻的分子/基团之间非特异性的吸引力。在某些实施方案中,非共价连接是通过非共价键的直接连接。在某些实施方案中,非共价连接是通过氢键、疏水键、离子键或范德华键的直接连接。

[0103] 结合结构域(或其融合蛋白),若其以例如大于或等于约 $10^5 M^{-1}$ 的亲合力或 K_a (即以 $1/M$ 为单位的特定结合相互作用的平衡结合常数)结合或连结靶标分子,则其“特异性结合”靶标分子。在某些实施方案中,结合结构域(或其融合蛋白)以大于或等于约 $10^6 M^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、 $10^{12} M^{-1}$ 或 $10^{13} M^{-1}$ 的 K_a 结合靶标。“高亲合力”结合结构域(或其单链融合蛋白)是指具有至少 $10^7 M^{-1}$ 、至少 $10^8 M^{-1}$ 、至少 $10^9 M^{-1}$ 、至少 $10^{10} M^{-1}$ 、至少 $10^{11} M^{-1}$ 、至少 $10^{12} M^{-1}$ 、至少 $10^{13} M^{-1}$ 或更大的 K_a 的那些结合结构域。或者,亲合力可定义为以 M 的单位的特定结合相互作用的平衡解离常数(K_d)(例如, $10^{-5} M$ 至 $10^{-13} M$,或更小)。根据本公开,结合结构域多肽和融合蛋白的亲合力可以容易地利用常规技术来测定(参见例如,Scatchard et al. (1949) Ann.N.Y.Acad.Sci.51:660和美国专利第5283173号;第5468614号或等同物)。

[0104] 本文所用术语“衍生物”是指化合物(例如,蛋白)的化学或生物学修饰版本,其在结构上与母体化合物相似并且(实际上或理论上)可来源于该母体化合物。

[0105] 术语“空间位阻”是指由于其大小或空间排列产生的分子之间结合相互作用的阻碍或妨碍。

[0106] 术语“亲合力”是用来描述多键相互作用的组合强度的术语。亲合力与亲合力不同,亲合力是用于描述单键强度的术语。就抗体而言,亲合力是指其中多个抗原结合位点同时与靶标相互作用的抗体相互作用。单独来看,每个结合相互作用可很容易被破坏,然而,当多个结合相互作用同时存在时,单个位点的短暂解开并不允许分子扩散,而且该位点的结合很可能会被恢复。整体效应是抗原与抗体的协同的、强烈的结合。

[0107] 多特异性Fab融合蛋白

[0108] 本公开提供了包含Fab片段(例如基本结构 $NH_2-VL-CL-S-S-CH_1-VH-NH_2$)的多特异性Fab融合蛋白(MSFP,在附图中也被称作Fabe,其中Fab能结合免疫效应分子,例如CD3 ϵ 链、T细胞受体、NKG2D或Fc γ R),所述Fab融合蛋白具有在VL的N末端连接的第一融合部分和/或在VH的N末端连接的第二融合部分。在所述融合部分和VH、VL之间可以有接头,其任选为蛋白酶可切割的。该通式是基本结构,可以基于该基本结构建立以构建更复杂的同源二聚体多特异性Fab融合蛋白复合物,这取决于所用的融合部分,如以下进一步描述的。

[0109] 在本申请之前,对在Fab的重链和轻链两者的N端均具有融合部分的基于Fab的融合蛋白尚无描述。本领域技术人员应理解,此类融合蛋白会严重削弱Fab的结合亲合力并因此使其在几乎不可用。在MSFP中观察到在结合结构域与Fab的N端融合时,该降低结合的一般概念。例如,OKT3抗-CD3Fab的N端融合显著降低了与Fab靶标的结合并导致双特异性Fab融合蛋白的生物活性的几乎完全丧失。然而,出乎意料的是抗原结合结构域与hu-1F3.1(人源化抗-CD3Fab)的N端的融合,在一些情况下并不导致与Fab靶标的结合的显著丧失。在一些情况下,与细胞表面靶标结合的丧失比与可溶性蛋白靶标结合的丧失更显著。在一些其它的情况下,结合的丧失并不导致生物活性的丧失。与此相反,对T细胞上CD3具有较低结合亲和力的MSFP可能具有更高的生物活性。尽管这很出乎意料,但其强调了至少但不限于以

下两个因素的重要性:1) 通过与肿瘤细胞高结合(利用融合部分A和B的结合结构域), MSFP表现出高亲合力以克服Fab部分与T细胞结合的低亲和力,从而诱导杀伤;2) 因为OKT3Fab融合蛋白表现与抗CD3抗体,即1F3衍生的MSFP完全不同,所以其是高度抗体依赖性的,因而是表位依赖性的。本公开的MSFP用来源于与1F3识别的CD3 ϵ 表位结合的抗体及其人源化变体制成,其具有许多独特的特征并且这些特征可用于开发具有所需属性(在药物安全性、药效和可生产性方面)的人类治疗剂。如本文所述,该属性有利地用于本公开的MSFP以掩饰Fab结合直至MSFP处于适当的环境(例如,在肿瘤附近)中。

[0110] MSFP的特异性结构组分在以下部分更详细地描述。MSFP的功能将在以下标题为“多特异性Fab融合蛋白的功能”的部分更详细地描述。

[0111] Fab片段

[0112] 如上所示,本文公开的多特异性Fab融合蛋白在其核心包含Fab片段。正如本领域技术人员所理解的,Fab片段是抗体的抗原结合片段。Fab由免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的一个恒定区和一个可变区组成。重链恒定区和可变区与轻链恒定区和可变区异源二聚体化并且通常由重链和轻链恒定区之间的二硫键共价连接(参见例如,图1的示意图)。因此,就抗体而言,本文所用的“Fab”通常是指抗体的由单个轻链(可变区和恒定区)通过二硫键与单个重链的可变区和第一恒定区连接组成的一部分。

[0113] 如本领域技术人员应认识到的,重链和轻链之间的二硫键是优选的,但对于功能不是必需的(Orcutt, et al. (2010), PEDS, 23:221-228)。因此,在某些实施方案中,本发明的Fab片段可不包含二硫键。在这方面,重链和轻链可以以这样的方式进行改造,从而在无需二硫键的情况下稳定地相互作用。例如,在某些实施方案中,可改造重链或轻链以去除半胱氨酸残基,并且其中重链和轻链仍然稳定地相互作用并如Fab一样发挥功能。在一个实施方案中,进行突变以促进重链和轻链之间稳定的相互作用。例如,可用“杵入臼”遗传改造策略来促进Fab的重链和轻链之间的二聚化(参见例如1996Protein Engineering, 9:617-621)。利用该策略,“杵状结构”通过在相互作用结构域之间的界面处用较大的氨基酸侧链取代小的氨基酸侧链来产生。相应的“臼状结构”是通过在相互作用分子之间的界面处用小的侧链替代大的侧链来实现。因此,还考虑用于本文的是出于特定目的而设计变异Fab片段,例如在CH1和/或CL的恒定结构域中的氨基酸改变,以及二硫键的去除或用于纯化的标签的添加等。

[0114] 在另一个实施方案中,Fab片段中可变区和恒定区的结构可与天然Fab存在的结构不同。换句话说,在一个实施方案中,可变区和恒定区的方向在一条链中可为VH-CL而在另一条链中可为VL-CH1(Shaefer et al. (2011), PNAS, 108:111870-92)。此类修饰的Fab片段仍然能结合其特定的靶标抗原,并考虑用于本发明的MSFP中。因此,在这方面,组成Fab的可变区和恒定区被认为是模块化的。

[0115] 在某些实施方案中,本公开的Fab片段来源于单克隆抗体并且可来源于任何类型的抗体,包括IgA、IgM、IgD、IgG、IgE及其亚型,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。轻链结构域可来源于 κ 链或 λ 链。本文所用的Fab片段可通过重组制备。

[0116] 如本领域内所公知的,抗体为免疫球蛋白分子,其能通过位于免疫球蛋白分子可变区的至少一个表位识别位点特异性地结合靶标(例如碳水化合物、多核苷酸、脂质,多肽等)。本文所用的该术语不仅包括完整的多克隆抗体或单克隆抗体,还包括人源化抗体、嵌

合抗体以及包含所需特异性的抗原结合位点或片段(表位识别位点)的任何其它修饰结构的免疫球蛋白分子。

[0117] 本文所公开的Fab片段包含抗原结合部分,其由免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区(VH和VL)组成。更具体地,本文所用术语“抗原结合部分”是指包含免疫球蛋白重链和/或轻链的能结合目的靶标抗原(如CD3分子)的至少一个CDR的多肽片段。在这方面,本文所述的多特异性Fab融合蛋白中的抗原结合部分可包含母体抗体的VH和VL序列的能结合目的靶标抗原的1、2、3、4、5或所有6个CDR。在某些实施方案中,MSFP中Fab片段的抗原结合部分能结合CD3。

[0118] 在某些实施方案中,本文所述的MSFP的特异性VH和/或VL可用于筛选互补可变区的文库以确定具有所需性质(例如对目的靶标抗原的增加的亲和力)的VH/VL。此类方法描述于,例如Portolano et al.,*J.Immunol.* (1993) 150:880-887;Clarkson et al.,*Nature* (1991) 352:624-628中。

[0119] 其它方法也可用于混合并匹配CDR以鉴定具有期望结合活性的Fab(如结合CD3,或对于MSFP的融合部分中存在的其他结合结构域,为本文所述的其它目的靶标抗原)。例如:Klimka et al.,*British Journal of Cancer* (2000) 83:252-260,描述了利用小鼠VL文库和人VH文库的筛选过程,其从小鼠VH保留了CDR3和FR4。在获得抗体后,针对人VL文库筛选VH以获得结合抗原的抗体。Beiboer et al.,*J.Mol.Biol.* (2000) 296:833-849描述了利用完整的小鼠重链文库和人轻链文库的筛选过程。在获得抗体后,将一条VL与保留小鼠CDR3的人VH文库组合。获得能够结合抗原的抗体。Rader et al.,*PNAS* (1998) 95:8910-8915描述了与以上的Beiboer et al相似的过程。

[0120] 这些刚刚描述的技术本身是本领域已知的。但是技术人员能够利用此类技术,利用本领域的常规方法来获得本文所述的本公开的一些实施方案的抗体的抗原结合片段。

[0121] 本文还公开了用于获得特异性针对靶标抗原(例如CD3或本文其他地方所述的为融合部分结合结构域靶标的任何靶标抗原)的抗体的抗原结合结构域的方法,所述方法包括通过在本文所示的VH结构域的氨基酸序列中添加、缺失、替代或插入一个或多个氨基酸来提供VH结构域(其为本文所示的VH结构域的氨基酸序列变体),任选地将因而提供的VH结构域与一种或多种VL结构域组合,并测试所述VH结构域或一个或多个VH/VL组合以鉴定特定的结合成员或特异性针对目的靶标抗原(例如CD3)的抗体的抗原结合结构域,并任选地具有一种或多种所需性质。VL结构域可具有基本上如本文所示的氨基酸序列。在将本文公开的VL结构域的一种或多种序列变体与一种或多种VH结构域组合中可以采用类似的方法。

[0122] “特异性结合”或“优先结合”(本文中可互换使用)抗体或多肽的表位是本领域熟知的术语,并且测定这种特异性结合或优先结合的方法也为本领域所熟知。如果与其他细胞或物质相比,分子与特定的细胞或物质更频繁、更快速、更持久和/或更具亲和力地反应或结合,则称该分子表现出“特异性结合”或“优先结合”。如果抗体或其Fab或scFv与靶标的结合比其与其他物质的结合更具亲和力、亲合力、更快速和/或更持久,则该抗体其Fab或scFv“特异性结合”或“优先结合”靶标。例如,特异性结合或优先结合CD3表位的抗体为结合一种CD3表位比其结合其他CD3表位或非CD3表位更具亲和力、亲合力、更快速和/或更持久的抗体。通过阅读该定义还应理解,例如,特异性结合或优先结合第一靶标的抗体(或部分或表位)可以或不可以特异性结合或优先结合第二靶标。因此,“特异性结合”或“优先结合”并不一

定需要(虽然可包括)排他性结合。一般(但不必然是),提到结合意为优先结合。

[0123] 免疫结合通常是指发生在免疫球蛋白分子和抗原之间的非共价的相互作用类型,所述免疫球蛋白由于(例如,通过说明而非限制的方式)静电、离子、亲水性和/或疏水性吸引或排斥、空间力、氢键、范德华力和其他相互作用是特异性的。免疫结合相互作用的强度或亲和力可表示为相互作用的解离常数(K_d),其中越小 K_d 表示越大的亲和力。选定多肽的免疫结合特性可用本领域熟知的方法进行定量。一种此类方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中那些速率取决于复合物伴侣的浓度、相互作用的亲和力和在两个方向上同样影响速率的几何参数。因此,“结合速率常数”(K_{on})可通过计算浓度和实际的结合速率来确定,并且“解离速率常数”(K_{off})可通过实际的解离速率来确定。因此 K_{off}/K_{on} 之比等于解离常数 K_d 。一般参见Davies et al. (1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473。

[0124] 术语“抗原”是指分子或分子的一部分,其能被选择性结合剂(如Fab片段的抗原结合部分)结合,并且还能用于在动物体内产生能与该抗原的表位结合的抗体。抗原可具有一个或多个表位。

[0125] 术语“表位”包括任何决定簇,在某些实施方案中,为能够与免疫球蛋白或T细胞受体特异性结合的多肽决定簇。表位是能被抗体或其抗原结合片段结合的抗原区域。在某些实施方案中,表位决定簇包括分子的化学活性表面基团,例如氨基酸或者糖侧链、磷酸基或磺酰基,并且在某些实施方案中可具有特定的三维结构特性和/或特定的电荷特性。在某些实施方案中,当MSFP优先识别其在蛋白和/或大分子的复杂混合物中的靶标抗原时,其被认为能特异性地结合该抗原。当平衡解离常数 $\leq 10^{-5}$ 、 10^{-6} 或 10^{-7} M时,MSFP被认为能特异性地结合抗原。在一些实施方案中,平衡解离常数可以 $\leq 10^{-8}$ M或 $\leq 10^{-9}$ M。在其它一些实施方案中,平衡解离常数可以 $\leq 10^{-10}$ M或 $\leq 10^{-11}$ M。

[0126] 在某些实施方案中,本文所述的Fab片段的抗原结合片段分别包含间插在重链框架区(FR)组和轻链框架区(FR)组之间的重链CDR组和轻链CDR组,所述框架区(FR)组提供了对CDR的支撑并限定了CDR相对于彼此的空间关系。本文所述术语“CDR组”是指重链V区或轻链V区的三个高变区。从重链或轻链的N端开始,这些区域分别表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。因此抗原结合位点包含六个CDR,包含来自重链V区和轻链V区各自的CDR组。包含单个CDR(例如CDR1、CDR2或CDR3)的多肽在本文被称为“分子识别单元”。很多抗原抗体复合物的晶体分析已证明CDR的氨基酸残基与结合抗原形成广泛的接触,其中最广泛的抗原接触是与重链CDR3的接触。因此,分子识别单位主要负责抗原结合位点的特异性。

[0127] 本文所用术语“FR组”是指构架重链V区或轻链V区的CDR组的CDR的四条侧翼氨基酸序列。一些FR残基可接触结合的抗原;然而FR主要负责使V区折叠成抗原结合位点,尤其是直接邻近CDR的FR残基。在FR之内,某些氨基酸残基和某些结构特征是非常高度保守的。在这方面,所有V区序列均包含90个氨基酸残基左右的内部二硫环。当V区折叠成结合位点时,CDR表现为形成抗原结合表面的突出环基序。公认的是,有保守的FR结构区,其影响CDR环折叠成某些“经典”结构的形状——而与精确的CDR氨基酸序列无关。此外,已知某些FR残基参与了非共价的域间接触,其稳定了抗体重链和轻链之间的相互作用。

[0128] 免疫球蛋白可变区的结构和位置可通过参考Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 第4版. US Department of Health and Human

Services.1987及其更新(目前可在互联网(immuno.bme.nwu.edu)上获得)来确定。

[0129] “单克隆抗体”是指均一的抗体群,其中所述单克隆抗体由参与表位的选择性结合的氨基酸(天然存在的和非天然存在的)组成。单克隆抗体是高度特异性的,直接针对单一表位。术语“单克隆抗体”不仅包括完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体,还包括其片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其变体、包含抗原结合部分的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体、以及任何其它修饰结构的免疫球蛋白分子(其包含所需特异性和能结合表位的抗原结合片段(表位识别位点))。这并非意图限制抗体的来源或其制备的方式(例如通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等)。所述术语包括上述“抗体”定义范围内的完整免疫球蛋白及片段等。

[0130] 蛋白水解酶——木瓜蛋白酶优先切割IgG分子以产生几个片段,其中两个(F(ab)片段)各自均包含含有完整的抗原结合位点的共价异源二聚体。胃蛋白酶能够切割IgG分子以提供几个片段,包括含有两个抗原结合位点的F(ab')₂片段。本发明的某些实施方案使用的Fv片段可通过IgM的优先蛋白水解切割以及IgG或IgA免疫球蛋白分子的偶然发生来产生。然而,Fv片段更通常使用本领域中已知的重组技术得到。Fv片段包括非共价的V_H:V_L异源二聚体,其包含保留了天然抗体分子的大部分抗原识别能力和结合能力的抗原结合位点。Inbar et al. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2659-2662; Hochman et al. (1976) Biochem 15:2706-2710和Ehrlich et al. (1980) Biochem 19:4091-4096。

[0131] 在本公开的一个具体的实施方案中,Fab片段能结合CD3。“T细胞受体”(TCR)是T细胞表面上存在的分子,其与CD3一起,通常负责识别主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的抗原。在大部分T细胞中,其由二硫键连接的高度可变的(α)和(β)链的异二聚体组成。在其他的T细胞中,表达由可变γ链和(δ)链组成的另一种受体。TCR的每一条链是免疫球蛋白超家族的成员并且具有一个N端免疫球蛋白可变区、一个免疫球蛋白恒定区、一个跨膜区和位于C末端的短的胞质尾区。(参见Abbas and Lichtman, Cellular and Molecular Immunology (第五版), Editor: Saunders, Philadelphia, 2003; Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 第四版, Current Biology Publications, p148, 149, and 172, 1999)。本公开中使用的TCR可来自不同的动物物种,包括人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。

[0132] “抗-TCR Fab”或“抗-TCR Fabe”,是指能特异性结合TCR分子或其单独的链(例如TCR(α)链、TCR(β)链、TCRγ链或TCR(δ)链)之一的Fab或包含此类Fab的MSFP。在某些实施方案中,抗-TCR Fab能结合TCR(α)链、TCR(β)链或两者。

[0133] “CD3”在本领域已知为六条链的多蛋白复合物(参见Abbas and Lichtman, 2003; Janeway et al., p172 and 178, 1999)。在哺乳动物中,该复合物包含CD3(γ)链、CD3(δ)链、两条CD3(ε)链和CD3(ζ)链的同源二聚体。CD3(γ)链、CD3(δ)链和CD3(ε)链为包含单个免疫球蛋白结构域的免疫球蛋白超家族的高度相关的细胞表面蛋白。CD3(γ)链、CD3(δ)链和CD3(ε)链的跨膜区是带负电的,这是允许这些链与带正电的T细胞受体链结合的特征。CD3(γ)链、CD3(δ)链和CD3(ε)链的胞内尾各自均包含一个被称作基于免疫受体酪氨酸活化基序或ITAM的保守基序,而每条CD3(ζ)链均含有三个。不希望受到理论的限制,认为ITAM对TCR复合物的信号转导能力是很重要的。本公开所用的CD3可来自不同的动物物种,包括人、小鼠、大鼠或其他的哺乳动物。

[0134] 本文所用“抗-CD3Fab”，是指能特异性结合单独的CD3链（例如CD3（ γ ）链、CD3（ δ ）链或CD3（ ϵ ）链）或由两条或更多条单独的CD3链形成的复合物（例如一条以上CD3（ ϵ ）链的复合物、CD3（ γ ）链和CD3（ ϵ ）链的复合物、CD3（ δ ）链CD3（ ϵ ）链的复合物）的Fab。在某些实施方案中，抗CD3Fab能特异性结合CD3（ γ ）、CD3（ δ ）或CD3（ ϵ ）或其任何组合，在某些实施方案中，能特异性结合TCR（ ϵ ）。在一个实施方案中，抗CD3Fab能结合CD3 ϵ 的N端。在一个具体的实施方案中，抗CD3Fab能结合CD3 ϵ 的第1-27位氨基酸。

[0135] 本文所用“TCR复合物”是指CD3与TCR结合所形成的复合物。例如，TCR复合物可由一条CD3（ γ ）链、一条CD3（ δ ）链、两条CD3（ ϵ ）链、CD3（ ζ ）链的同源二聚体、一条TCR（ α ）链和一条TCR（ β ）链组成。或者，TCR复合物可由一条CD3（ γ ）链、一条CD3（ δ ）链、两条CD3（ ϵ ）链、CD3（ ζ ）链的同源二聚体、一条TCRY链和一条TCR（ δ ）链组成。

[0136] 本文所用“TCR复合物的组分”是指TCR链（即TCR（ α ）、TCR（ β ）、TCRY或TCR（ δ ））、CD3链（即CD3（ γ ）、CD3（ δ ）、CD3（ ϵ ）或CD3（ ζ ））、或由两条或更多条TCR链或CD3链形成的复合物（例如TCR（ α ）和TCR（ β ）的复合物、TCRY和TCR（ δ ）的复合物、CD3（ ϵ ）和CD3（ δ ）的复合物、CD3（ γ ）和CD3（ ϵ ）的复合物、或TCR（ α ）、TCR（ β ）、CD3（ γ ）、CD3（ δ ）、和两条CD3（ ϵ ）链的亚TCR复合物）。

[0137] 通过背景的方式，TCR复合物一般负责启动对与MHC分子结合的抗原的T细胞应答。认为肽：MHC配体与TCR和共受体（即，CD4或CD8）的结合将TCR复合物、共受体和CD45酪氨酸磷酸酶聚集在一起。这允许CD45去除抑制性磷酸基团，从而活化Lck和Fyn蛋白激酶。这些蛋白激酶的活化导致CD3（ ζ ）链上ITAM的磷酸化，其依次致使这些链能够结合胞内酪氨酸激酶ZAP-70。结合的ZAP-70通过磷酸化的后续活化触发3条信号通路，其中两条由PLC-（ γ ）的磷酸化和活化启动，然后其将磷脂酰肌醇磷酸盐（PIP）切割为二酰基甘油（DAG）和三磷酸肌醇（IP3）。通过DAG活化的蛋白激酶C导致转录因子NF κ B的活化。由于IP3作用而导致的胞内游离Ca²⁺的突然增加活化了胞质磷酸酶——钙调磷酸酶，其能使转录因子NFAT（活化T细胞的核因子）从细胞质易位至细胞核中。NFAT的全转录活性也需要AP-1家族转录因子的成员；Fos和Jun家族转录调节因子的成员的二聚体。

[0138] 由活化的ZAP-70启动的第三条信号通路为Ras的活化和MAP激酶级联的后续活化。这最终导致Fos蛋白的活化和由此AP-1转录因子的活化。NF κ B，NFAT和AP-1共同作用于T细胞染色体，启动新的基因转录，其导致T细胞的分化、增殖和效应作用。参见Janeway et al., p178, 1999。

[0139] 在某些实施方案中，Fab能特异性地结合单独的人CD3链（例如，人CD3（ γ ）链、人CD3（ δ ）链和人CD3（ ϵ ）链）或两种或两种以上单独的人CD3链的组合（例如，人CD3（ γ ）和人CD3（ ϵ ）的复合物或人CD3（ δ ）和人CD3（ ϵ ）的复合物）。在某些优选的实施方案中，Fab能特异性结合人CD3（ ϵ ）链。

[0140] 在某些其它实施方案中，本公开的Fab能特异性结合TCR（ α ）、TCR（ β ）、或由TCR（ α ）和TCR（ β ）形成的异二聚体。在某些实施方案中，Fab能特异性地结合人TCR（ α ）、人TCR（ β ）、或由人TCR（ α ）和人TCR（ β ）形成的异源二聚体中的一种或多种。

[0141] 在某些实施方案中，本公开的Fab能结合由一条或多条CD3链和一条或多条TCR链形成的复合物，例如由CD3（ γ ）链、CD3（ δ ）链、CD3（ ϵ ）链、TCR（ α ）链或TCR（ β ）链或以上的任何组合形成的复合物。在其它实施方案中，本公开的Fab能结合由一条CD3（ γ ）链、一条CD3（ δ ）

链、两条CD3(ϵ)链、一条TCR(α)链和一条TCR(β)链形成的复合物。在其它实施方案中,本公开的Fab能结合由一条或多条人CD3链和一条或多条人TCR链形成的复合物,例如由人CD3(γ)链、人CD3(δ)链、人CD3(ϵ)链、人TCR(α)链或人TCR(β)链或以上的任何组合形成的复合物。在某些实施方案中,本公开的Fab能结合由一条人CD3(γ)链、一条人CD3(δ)链、两条人CD3(ϵ)链、一条人TCR(α)链和一条人TCR(β)链形成的复合物。

[0142] 可如本文所述或通过本领域已知的多种方法来产生本公开的Fab(参见例如美国专利第6,291,161号;第6,291,158号)。Fab的来源包括来自不同物种的单克隆抗体核酸序列(其可以被转换为抗体、Fv、scFv或Fab,例如在噬菌体文库中),包括人、骆驼科动物抗体(来自骆驼、单峰骆驼或美洲驼;Hamers-Casterman et al. (1993) *Nature*, 363:446和Nguyen et al. (1998) *J. Mol. Biol.*, 275:413)、鲨鱼(Roux et al. (1998) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 95:11804)、鱼(Nguyen et al. (2002) *Immunogenetics*, 54:39)、啮齿动物、鸟类、或羊。

[0143] 与猴CD3有交叉反应性的抗人CD3抗体是特别理想的,例如SP34小鼠单克隆抗体,其能特异性结合变性形式的人CD3(免疫印迹或斑点印迹)和天然形式的人CD3(在T细胞上)(Pressano, S. *The EMBO J.* 4:337-344, 1985; Alarcon, B. *EMBO J.* 10:903-912, 1991)。SP34小鼠单克隆抗体还能结合单独转染了CD3 ϵ 的COS细胞以及CD3 ϵ / γ 或CD3 ϵ / δ 双重转染子(Salmeron A. et al., *J. Immunol.* 147:3047-52, 1991)。SP34抗体还与非人灵长类交叉反应(Yoshino N. et al., *Exp. Anim* 49:97-110, 2000; Conrad ML. et al., *Cytometry* 71A:925-33, 2007)。另外,当交联时,SP34活化T细胞(Yang et al., *J. Immunol.* 137:1097-1100, 1986)。与猴CD3的交叉反应性是很重要的,因为这允许直接利用临床候选物在非人灵长类中进行毒性研究,而不是在黑猩猩中进行或使用替代分子进行。因此,利用本公开的MSFP中此类交叉反应性抗-CD3Fab的毒性研究提供了更相关的安全评估。

[0144] 其它示例性抗CD3抗体包括Cris-7单克隆抗体(Reinherz, E.L. et al. (eds.), *Leukocyte typing II*, Springer Verlag, New York, (1986))、BC3单克隆抗体(Anasetti et al. (1990) *J. Exp. Med.* 172:1691)、OKT3(Ortho multicenter Transplant Study Group (1985) *N. Engl. J. Med.* 313:337)及以上的衍生物如OKT3ala-ala(Herold et al. (2003) *J. Clin. Invest.* 11:409)、维西珠单抗(Visilizumab)(Carpenter et al. (2002) *Blood* 99:2712)以及145-2C11单克隆抗体(Hirsch et al. (1988) *J. Immunol.* 140:3766)。考虑用于本文中的其它CD3结合分子包括UCHT-1(Beverley, PC and Callard, R.E. (1981) *Eur. J. Immunol.* 11:329-334)和W02004/106380;W02010/037838;W02008/119567;W02007/042261;W02010/0150918中描述的CD3结合分子。

[0145] 示例性抗TCR抗体是H57单克隆抗体(Lavasani et al. (2007) *Scandinavian Journal of Immunology* 65:39-47)。

[0146] 在某些实施方案中,Fab能结合其他细胞表面靶标,包括但不限于Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb、NKG2D、CD25、CD28、CD137、CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LT β R、TLR、TRAIL受体1、TRAIL受体2、EGFR、Her2/neu和ErbB3。

[0147] Fab片段的抗原结合片段的序列(例如,重链和轻链可变区序列)可在公共数据库获得,或利用传统的杂交瘤开发策略使用CD3链、TCR组分,或其它Fab结合靶标作为常规系统中的免疫原(例如,小鼠、HuMAb小鼠(R)、TC小鼠(TM)、KM-小鼠(R)、美洲驼、鸡、大鼠、仓

鼠、兔子等可用于开发本文所用的Fab)。如本领域技术人员应理解的,Fab片段可用本领域中已知的多种技术产生,包括抗体展示技术,例如噬菌体、酵母、核糖体和mRNA展示技术;B细胞培养技术如SLAM技术;或利用针对从经免疫动物受试对象或经免疫人受试对象中分离出来的B细胞或血浆B细胞的高通量基因测序技术。

[0148] 用于本公开的MSFP的示例性Fab包括VH、Fd、HC、VL和LC氨基酸序列,以及编码它们的多核苷酸,如SEQ ID NO:29-76中所示,包括其CDR,例如SEQ ID NO:23-28所示的那些。

[0149] 融合部分

[0150] 本文所述的MSFP的融合部分不仅为MSFP提供其它的结合特异性和/或功能属性(例如,增加的血清半衰期、活化ADCC或其它免疫活化级联),还产生了空间位阻以显著降低Fab与其靶标抗原的结合,除非另有打算(例如在存在肿瘤细胞的情况下),尤其是Fab与细胞表面上的靶标,特别是接近细胞膜并因此具有受限的可及性的Fab靶标抗原(尤其是CD3)的结合。这与其它Fab融合蛋白形成鲜明对比,例如TRIBODIES™,其在Fab片段的C端融合了另外的结合结构域(参见例如,Journal of Immunology,2000,165:7050-7057)。

[0151] 此外,在单个MSFP内,第一融合部分和第二融合部分并不意图二聚化。这将本公开的MSFP与其它已知的融合蛋白(例如W02008/024188和W02009/149185中所描述的那些)区别开来。‘188和‘185出版物中所描述的构建体区别在于具有VH1-VH2-CH1-铰链-CH2-CH3和VL1-VL2-CL的通用格式。在此构建体中,VH1和VL1二聚化以形成另外的抗原结合位点。这不同于本文所述的MSFP(例如图7B所示)的形式。在本公开的MSFP中,第一融合部分和第二融合部分不结合形成单一的抗原结合位点。如本文其他部分所述,MSFP的另一个明显特征在于,当MSFP不在诸如细胞表面靶标的靶标上成簇时,融合部分降低了Fab对其靶标的结合亲和力。反之,W02008/024188和W02009/149185中所描述的蛋白并不显示出对抗体结合靶标降低的结合亲和力。

[0152] 本公开的MSFP的融合部分可包含结合结构域、一个或多个功能结构域或其组合。如图1所示,在一个实施方案中,本公开的MSFP包含两个融合部分,如图1中融合部分A和融合部分B所示。所述融合部分在本文还可被称为第一融合部分和第二融合部分,或类似的语言以将一种与另一种区分开来。示例性融合部分包含SEQ ID NO:78、88和94中所示的氨基酸序列,由SEQ ID NO:77、87和93所示的多核苷酸编码,或其CDR、VH或VL(参见例如SEQ ID No:139-150)。

[0153] 在某些实施方案中,第一融合部分和第二融合部分是相同的。在其它实施方案中,两个融合部分包含相同的结合结构域,但在其他方面不同,可在具有或缺乏功能结构域方面有所不同。在其它实施方案中,第一融合部分包含能结合第一靶标抗原的第一结合结构域,而第二融合部分包含能结合第二靶标抗原的第二结合结构域。

[0154] 在某些实施方案中,第一融合部分和第二融合部分每种均包含结合结构域,并且这些结合结构域可以分别被称为第一结合结构域和第二结合结构域。在某些实施方案中,第一结合结构域与第二结合结构域能结合相同的靶标。在这方面,在某些实施方案中,第一结合结构域与第二结合结构域在靶标共享至少一种相似性的层面来说能结合相同的靶标,所述相似性例如但不限于,靶标均包含相同的蛋白、多核苷酸或脂质;靶标是相同的蛋白,尽管可以是不同的剪接形式;或者在某些实施方案中,靶标具有相同的氨基酸序列,尽管可以具有不同的修饰,例如糖基化。在某些实施方案中,第一结合结构域与第二结合结构域能

结合相同的靶标,但是是在相同靶标的不同表位上。在某些实施方案中,第一结合结构域与第二结合结构域能结合不同的靶标。

[0155] 在另一个实施方案中,第一融合部分包含第一结合结构域而第二融合部分包含第二结合结构域,其中所述第一结合结构域和所述第二结合结构域能结合相同的靶标分子但是是不同的形式(例如,第一结合结构域是能结合细胞表面受体的scFv而第二结合结构域为所述受体的配体;或类似地,第一结合结构域是能结合配体的scFv,而第二结合结构域是所述配体的受体的胞外结构域)。

[0156] 结合结构域

[0157] 如上所述,在某些实施方案中,第一融合部分和/或第二融合部分包含结合结构域。本公开的“结合结构域”或“结合区”,例如,可以是具有特异性识别并结合生物分子(例如,细胞表面受体或肿瘤蛋白或其组分)能力的任何蛋白、多肽、寡肽或肽。结合结构域包括任何针对目的生物分子的天然存在的、合成的、半合成的、或重组产生的结合伴侣。例如如本文进一步所述,结合结构域可为抗体轻链和重链可变区的区域,或轻链和重链可变区的区域可以以任一方向(例如,VL-VH或VH-VL)一同连接在一条链中。用于鉴定本公开的能特异性结合特定靶标的结合结构域的多种测定是已知的,包括免疫印迹、ELISA、流式细胞术、或表面等离子共振分析(例如,使用BIAcore™分析)。

[0158] 示例性的结合结构域将在以下进一步地描述。在某些实施方案中,靶标分子可为细胞表面表达的蛋白,如受体或肿瘤抗原。在另一个实施方案中,被本文所用的结合结构域结合的靶标分子是可溶性抗原如细胞因子、白蛋白或其它血清蛋白。示例性的结合结构域包括免疫球蛋白抗原结合结构域,如scFv、scTCR、受体的胞外结构域、细胞表面分子/受体的配体或其受体结合结构域,以及肿瘤结合蛋白。在某些实施方案中,抗原结合结构域可为scFv、VH、VL、结构域抗体变体(dAB)、骆驼科动物抗体(VHH)、纤连蛋白3结构域变体、锚蛋白重复序列变体和来源于其他蛋白支架的其他抗原特异性结合结构域。

[0159] 因此,在某些实施方案中,结合结构域包含抗体来源的结合结构域,但可为非抗体来源的结合结构域。抗体来源的结合结构域可为抗体片段或一种或多种抗体片段的遗传改造的产物,所述片段参与与抗原的结合。实例包括但不限于,互补决定区(CDR)、可变区(Fv)、重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)、重链、轻链、单链可变区(scFv)、Fab、单域骆驼抗体(骆驼科VHH)和单域抗体(dAB)。

[0160] 正如本领域技术人员应理解和本文其它地方所描述的,完整的抗体包含两条重链和两条轻链。每条重链由可变区以及第一恒定区、第二恒定区和第三恒定区组成,而每条轻链由可变区和恒定区组成。哺乳动物重链分为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ,而哺乳动物轻链分为 λ 或 κ 。包含 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链的免疫球蛋白分为免疫球蛋白(Ig)A、IgD、IgE、IgG和IgM。完整的抗体形成“Y”形。Y的茎由结合在一起的两条重链的第二恒定区和第三恒定区(并且对于IgE和IgM,是第四恒定区)组成,并且二硫键(链间)在铰链内形成。重链 γ 、 α 和 δ 具有由三个串联(排成一行)Ig结构域组成的恒定区和用于增加柔性的铰链区。重链 μ 和 ϵ 具有由四个免疫球蛋白结构域组成的恒定区。第二恒定区和第三恒定区分别被称为“CH2结构域”和“CH3结构域”。Y的每个臂包括单一重链的可变区和第一恒定区,其与单一轻链的可变区和恒定区结合。轻链和重链的可变区负责抗原结合。

[0161] 与抗体有关的“互补决定区”或“CDR”指的是在抗体的重链或轻链可变区中的高变

环。CDR可与抗原结构相互作用并在很大程度上决定与抗原的结合(尽管已知一些构架区参与结合)。重链可变区和轻链可变区各自均包含3个CDR。CDR可通过常规方法来限定或鉴定,如通过Kabat et al的序列(Wu, TT and Kabat, E.A., J Exp Med. 132(2):211-50, (1970); Borden, P. and Kabat E.A., PNAS, 84:2440-2443 (1987); Kabat, E.A. et al, Sequences of proteins of immunological interest, Published by DIANE Publishing, 1992), 或通过Chothia et al的结构(Chothia, C. and Lesk, A.M., J Mol. Biol., 196(4):901-917 (1987), Chothia, C. et al, Nature, 342:877-883 (1989))。

[0162] 与抗体有关的“重链可变区”或“VH”是指重链的片段,其包含间插在称为框架区的侧翼节段之间的三个CDR,框架区比CDR更加保守并形成支架以支撑CDR。

[0163] 与抗体有关的“轻链可变区”或“VL”是指包含间插在框架区之间的三个CDR的轻链片段。

[0164] 与抗体有关的“Fv”是指抗体的携带完整抗原结合位点的最小片段。Fv片段由与单一重链的可变区结合的单一轻链的可变区组成。

[0165] 与抗体有关的“单链Fv抗体”或“scFv”是指改造的抗体,其由彼此直接连接或经由肽接头序列连接的轻链可变区和重链可变区组成。

[0166] 如本文所用的“单域骆驼抗体”或“骆驼科动物VHH”是指重链抗体的已知最小的抗原结合单元(Koch-Nolte, et al, FASEB J., 21:3490-3498 (2007))。“重链抗体”或“骆驼科动物抗体”是指包含两个VH结构域但无轻链的抗体(Riechmann L. et al, J. Immunol. Methods 231:25-38 (1999); W094/04678; W094/25591; 美国专利第6,005,079号)。

[0167] “单域抗体”或“dAb”指由抗体重链的可变区(VH结构域),或抗体轻链的可变区(VL结构域)组成的抗体片段(Holt, L., et al, Trends in Biotechnology, 21(11):484-490)。

[0168] 本文所用术语“二硫键”是指重链片段和轻链片段通过一个或多个二硫键的结合。一个或多个二硫键可在两个片段之间通过连接两个片段中的硫醇基团而形成。在某些实施方案中,一个或多个二硫键可分别在重链片段和轻链片段的一个或多个半胱氨酸之间形成。

[0169] “可变区连接序列”是这样的氨基酸序列,其将重链可变区与轻链可变区连接并提供了与两个亚结合结构域的相互作用兼容的隔离功能,使得所得多肽保留了与包含相同轻链和重链可变区的抗体一样的对相同靶标分子的特异性结合亲和力。在某些实施方案中,用于连接结合结构域与免疫球蛋白CH2区多肽或CH3区多肽的铰链可用作可变区连接序列(参见本文其他地方对铰链的进一步讨论)。

[0170] 在某些实施方案中,结合结构域包含非抗体组分。能结合抗原的非抗体组分可为能识别并结合目的靶标抗原的任何合适的蛋白结构域或组分,诸如例如,参与蛋白-蛋白相互作用、蛋白-脂质相互作用、蛋白-多核苷酸相互作用、蛋白-糖相互作用或配体结合的蛋白结构域。合适的非抗体组分的实例包括但不限于,纤连蛋白3结构域(Fn3)、锚蛋白重复序列和Adnectin。

[0171] 本公开的结合结构域的替代来源包括编码随机肽文库的序列或编码替代性非抗体支架环区中工程化多样性的氨基酸的序列,所述替代性非抗体支架如纤维蛋白原结构域(参见例如,Weisel et al. (1985) Science 230:1388)、Kunitz结构域(参见例如,美国专利

第6,423,498号)、脂质运载蛋白结构域(参见例如,W02006/095164)、V样结构域(参见例如,美国专利申请公开号2007/0065431)、C-型凝集素结构域(Zelensky和Gready (2005) FEBS J. 272:6179)或FCAB(TM)(参见例如,PCT专利申请公开号W02007/098934,W02006/072620)等。

[0172] 在某些实施方案中,结合结构域包含Fn3结构域。本文所用“纤连蛋白3结构域”或“Fn3”是指纤连蛋白中参与结合生物分子的自主折叠单元(Calaycay, J. et al, J. Biol. Chem., 260 (22):12136-41 (1985); Koide, A. et al, J. Mol. Biol., 284 (4):1141-1151 (1998); Bloom, L. et al, Drug Discovery Today, 14 (19-20):949-955 (2009))。Fn3结构域可存在于多种蛋白中并且发现Fn3结构域的不同重复序列含有生物分子(如DNA和蛋白)的结合位点。

[0173] 在某些实施方案中,结合结构域包含adnectin。本文所用“Adnectin”是指基于Fn3结构域的遗传改造蛋白(Koide, A. et al, Methods Mol. Biol., 352:95-109 (2007))。Adnectin中的Fn3结构域包含模仿了抗体可变区的三个CDR的三个环,并且可被遗传改造用于特异性结合不同的靶标分子。

[0174] 在某些实施方案中,结合结构域包含锚蛋白重复序列。本文所用“锚蛋白重复序列”是指含有红细胞锚蛋白中存在的33个氨基酸残基的重复序列的蛋白组分(Davis, L. H. et al, J. Biol. Chem., 266 (17):11163-11169 (1991))。已知锚蛋白重复序列为具有不同功能的大量蛋白中出现的最常见的蛋白-蛋白相互作用结构中的一种。

[0175] 如图中所示,scFv是特别有代表性的结合结构域。用作融合部分的结合结构域的scFv可结合多种靶标分子的任何一种,所述靶标分子包括但不限于Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb、CD28、CD137、CTLA-4、FAS、成纤维细胞生长因子受体1(FGFR1)、FGFR2、FGFR3、FGFR4、糖皮质激素诱导的TNFR相关(GITR)蛋白、淋巴毒素- β 受体(LTBR)、Toll样受体(TLR)、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体受体1(TRAIL受体1)和TRAIL受体2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)蛋白、前列腺干细胞抗原(PSCA)蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA;也被称为人肿瘤坏死因子受体超家族成员17(TNFRSF17)和CD269)、肿瘤相关蛋白碳酸酐酶IX(CAIX)、肝细胞生长因子受体(HGFR)、表皮生长因子受体1(EGFR1)、人表皮生长因子受体2(Her2/neu;Erb2)、ErbB3、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、叶酸受体、肝配蛋白受体、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38和CD138。

[0176] 在某些实施方案中,结合结构域能结合肿瘤抗原。示例性肿瘤抗原靶标分子包括但不限于,p53、cMet、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、BAGE、DAM-6、DAM-10、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-8、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、NA88-A、NY-ESO-1、BRCA1、BRCA2、MART-1、MC1R、Gp100、PSA、PSM、酪氨酸酶、威姆氏瘤抗原(WT1)、TRP-1、TRP-2、ART-4、CAMEL、CEA、Cyp-B、Her2/neu、hTERT、hTRT、iCE、MUC1、MUC2、PRAME、P15、RU1、RU2、SART-1、SART-3、WT1、AFP、 β -连环蛋白/m、半胱天冬酶-8/m、CEA、CDK-4/m、ELF2M、GnT-V、G250、HSP70-2M、HST-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、Myosin/m、RAGE、SART-2、TRP-2/INT2、707-AP、膜联蛋白II、CDC27/m、TPI/mber-ab1、ETV6/AML、LDLR/FUT、Pml/RAR α 和TEL/AML1。这些和其他的肿瘤蛋白对于本领域技术人员而言是已知的。

[0177] 可用于本公开MSFP的融合部分的其他结合结构域包括能结合细胞表面受体的配体。示例性配体包括但不限于,针对以下细胞表面受体的配体:如CD28、CD137、CTLA-4、FAS、

成纤维细胞生长因子受体1 (FGFR1)、FGFR2、FGFR3、FGFR4、糖皮质激素诱导的TNFR相关(GITR)蛋白、淋巴毒素-β受体(LTBR)、Toll样受体(TLR)、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体受体1 (TRAIL受体1)和TRAIL受体2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)的蛋白、前列腺干细胞抗原(PSMA)蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA,也称为人肿瘤坏死因子受体超家族成员17(TNFRSF17)和CD269)、肿瘤相关蛋白碳酸酐酶IX(CAIX)、肝细胞生长因子受体(HGFR)、表皮生长因子受体1(EGFR1)、人表皮生长因子受体2(Her2/neu;ERB2)、ErbB3、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、叶酸受体、肝配蛋白受体、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38和CD138。

[0178] 在一个实施方案中,结合结构域能结合血清白蛋白。结合人血清白蛋白提供将蛋白药物的半衰期($t_{1/2}$)延长至数天或更长时间的潜能。本领域已知血清白蛋白结合或与血清白蛋白融合可显著延长治疗性分子的半衰期。在某些实施方案中,能结合人血清白蛋白的结合结构域能够与非人灵长类直向同源物交叉反应,从而允许在与人体内治疗更相关的临床前动物毒理学研究中评估药物的半衰期。

[0179] 在某些实施方案中,结合结构域能特异性地结合与疾病病症相关的抗原靶标。所述疾病病症可包括生理病症、病理病症和整容病症。示例性病症的实例包括但不限于,癌症、炎性疾病、异体移植、I型糖尿病、II型糖尿病和多发性硬化症。

[0180] 在某些实施方案中,抗原靶标与病症负相关。在某些实施方案中,抗原靶标由包含结合结构域的MSFP的结合可灭活或拮抗抗原靶标的生物学功能,从而改善病症。在某些实施方案中,抗原靶标由包含结合结构域的MSFP的结合将激活或拮抗抗原靶标的生物学功能,从而改善病症。因此本文描述的MSFP可为融合部分靶标抗原的激动剂或拮抗剂分子。

[0181] 示例性结合结构域提供于SEQ ID NO:78、88、94(氨基酸)和SEQ ID NO:77、87、93(多核苷酸)中并包括其CDR、VH和VL(参见例如SEQ ID NO:139-150)。

[0182] 因此,本文所述的结合结构域能特异性地结合任何合适的抗原靶标。如前所述,合适的抗原靶标的实例包括但不限于,TNF受体(Shen H.M.et al,FASEB J.20(10):1589-98(2006))、cMet(Bottaro,D.P.et al,Science,251(4995):802-804(1991))、CD3(Chetty R.et al,J Pathol.,173(4):303-7(1994))、CD40(Chatzigeorgiou A.et al,Biofactors.,35(6):474-83(2009))、DR3(Meylan F.et al,Immunity.,29(1):79-89(2008))、FcγR(Torkildsen O.et al,Acta Neurol Scand Suppl.183:61-3(2006))、NKG2D(Obeidy P.et al,Int J Biochem Cell Biol.,41(12):2364-7(2009))或以上的任何衍生物。

[0183] 在某些实施方案中,结合结构域能特异性结合单一靶标抗原。在另一个实施方案中,结合结构域与一种以上的抗原靶标是交叉反应的。本文所用“交叉反应性”是指结合结构域能特异性地结合一种以上的抗原靶标。在某些实施方案中,第一结合结构域和/或第二结合结构域可以与完全不同的抗原靶标(例如,丙型肝炎病毒核心蛋白和宿主来源的GOR蛋白)具有交叉反应性。在某些实施方案中,第一结合结构域和/或第二结合结构域可以与来自不同物种的抗原靶标(例如,来自人、小鼠或非人灵长类的蛋白的抗原)具有交叉反应性。

[0184] 融合部分A、融合部分B和Fab之间的接合处

[0185] 在某些实施方案中,融合部分A和/或融合部分B与Fab的VH或VL的N端直接连接(即,之间没有添加额外的氨基酸)。在其它实施方案中,融合部分A和/或融合部分B利用接

头连接至Fab的VH或VL的N端(具有如下所述的另外的氨基酸)。在一些实施方案中,可能需要从给定融合部分A和/或融合部分B的C端去除数个氨基酸(例如1-3个氨基酸或1-10个氨基酸;例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸),这取决于Fab靶标和细胞表面上Fab靶标的周围空间(细胞表面上Fab靶标的可及性)。

[0186] 在其它实施方案中,可能需要从Fab的重链和/或轻链的N端去除数个氨基酸(例如1-3个氨基酸或1-10个氨基酸;例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)。在其它实施方案中,可能需要从融合部分的C端去除数个氨基酸(例如1-3个氨基酸或1-10个氨基酸;例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸),并同时从Fab链的N端去除数个氨基酸(例如1-3个氨基酸或1-10个氨基酸;例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)。融合部分A、融合部分B和Fab片段之间接合处的长度和序列可以相同或不同。

[0187] 融合部分和Fab片段之间的接合处可根据需要使用缺失和接头的组合。如本领域技术人员应理解的,Fab和融合部分之间的接合处可因此进行调整,并利用本领域已知和本文所述的方法来测试所需的功能(例如,结合亲和力)。

[0188] 接头

[0189] 本公开的MSFP还可包含位于Fab片段的VH和VL以及融合部分A和B之间的接头(参见例如,图1)。示例性接头包含序列GlyArgAla。

[0190] 在一个实施方案中,融合部分和Fab VH或VL之间的接头长度为1-10个氨基酸。在其它实施方案中,融合部分和Fab VH或VL之间的接头长度为1-20个氨基酸或20个氨基酸。在这方面,接头的长度可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸。在其它实施方案中,接头的长度可以为21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。

[0191] 在某些实施方案中,适用于本文所述的MSFP的连头为柔性接头。合适的接头能够被容易地选择并可以为适合的不同长度的任何一种,例如1个氨基酸(例如Gly)-20个氨基酸、2个氨基酸-15个氨基酸、3个氨基酸-12个氨基酸、包括4个氨基酸-10个氨基酸、5个氨基酸-9个氨基酸、6个氨基酸-8个氨基酸、或7个氨基酸-8个氨基酸,并且可以为1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0192] 示例性的柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如,(GS)_n、(GS₂GS)_n(SEQ ID NO:125)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:126),其中n是至少1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物以及本领域已知的其它柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,并且因此可能能够作为组分之间的中性接头。甘氨酸明显比丙氨酸接近更多的phi-psi空间,而且比具有较长侧链的残基更少受限(参见Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992))。示例性柔性接头包括但不限于Gly-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:127)、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly(SEQ ID NO:128)、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:129)、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:130)、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:131)、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly(SEQ ID NO:132)等。本领域普通技术人员将认识到MSFP的设计可包括全部或部分柔性的接头,使得所述接头可包含柔性接头以及赋予更少柔性结构以提供所需的MSFP结构的一个或多个部分。

[0193] 在某些实施方案中,Fab和融合部分之间的接头为稳定接头(不被蛋白酶切割,特别是MMP)。在某些实施方案中,接头为肽接头。在某些实施方案中,MSFP包含稳定的肽接头,

并且所述肽接头的N端共价连接至融合部分的C端,并且所述肽接头的C端共价连接至抗原结合结构域的N端。

[0194] 在一个实施方案中,接头为可切割的接头。具体而言,Fab的VH或VL和融合部分之间的接头包含蛋白酶底物切割序列,例如MMP底物切割序列。熟知的底物肽序列PLGLAG (SEQ ID NO:133) 可被大多数MMP切割。可以被MMP切割的底物序列已被广泛研究。例如,PLGLAG (SEQ ID NO:133) 的序列可被大多数MMP切割。蛋白酶底物切割序列是指可被蛋白酶处理切割的肽序列。MMP底物序列是指可通过与MMP孵育来切割的肽序列。PLGLAG (SEQ ID NO:133) 是常用的MMP底物切割序列(参见例如Jiang,PNAS (2004) 101:17867-72;Olson,PNAS (2010) 107:4311-6)。在另一个实施方案中,蛋白酶切割位点被MMP-2、MMP-9或其组合识别。在其它实施方案中,蛋白酶位点包含选自GPLGMLSQ (SEQ ID NO:134) 和GPLGLWAQ (SEQ ID NO:135) 的序列。稳定的接头或蛋白酶不可切割的接头是指不属于已知的蛋白酶底物序列并因此在与蛋白酶孵育后不会导致明显的切割产物形成的接头肽序列。

[0195] 在一些实施方案中,接头的切割底物(或切割序列)可包含能够作为蛋白酶(通常是胞外蛋白酶)的底物的氨基酸序列。在其它实施方案中,切割序列包含能够形成二硫键的半胱氨酸-半胱氨酸对,其可通过还原剂的作用被切割。在其它实施方案中,切割序列包含能够在光解作用后被切割的底物。

[0196] 切割底物定位在接头中使得当所述切割底物被切割剂切割(例如接头的切割底物被蛋白酶切割和/或半胱氨酸-半胱氨酸二硫键通过暴露于还原剂的还原而断裂)或由光诱导的光解作用切割时,在存在靶标的情况下,产生具有本文所述的多种功能特性的切割产物。

[0197] 接头的切割底物可根据共定位于患病组织的蛋白酶来选择,或根据表达融合部分的结合结构域的目的靶标抗原的细胞表面进行选择。目的靶标与蛋白酶共定位的多种不同的条件是已知的,其中所述蛋白酶的底物是本领域已知的。在癌症的实例中,靶标组织可为癌变组织,特别是实体瘤的癌变组织。文献中已有报道,在多种癌症(例如实体瘤)中具有升高水平的底物已知的蛋白酶。参见例如,La Rocca et al, (2004) British J. of Cancer 90 (7):1414-1421。疾病的非限制性实例包括:所有类型的癌症(乳腺癌、肺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、头颈癌、胰腺癌等)、类风湿关节炎、克罗恩病、黑色素瘤、SLE、心血管损伤、局部缺血等。此外,抗血管生成的靶标,例如VEGF是已知的。据此,如果选择本公开MSFP的融合部分的结合结构域,使其能够结合肿瘤抗原,则接头的合适的底物切割序列应为这样的序列,其包含可被存在于癌治疗部位的蛋白酶(特别是与非癌组织相比在癌治疗部位水平升高的蛋白酶)切割的肽底物。在一个示例性实施方案中,MSFP的结合结构域能结合例如Her2,并且切割底物序列可为基质金属蛋白酶(MMP)底物,并由此可被MMP切割。在其它实施方案中,MSFP中融合部分的结合结构域能结合目的靶标,并且存在于接头中的切割底物可以为,例如,豆类蛋白、纤溶酶、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、组织蛋白酶、半胱天冬酶、人中性粒细胞弹性蛋白酶、 β -分泌酶、uPA或PSA。在其它实施方案中,切割底物由癌症以外的疾病(如多发性硬化或类风湿关节炎)中的其它疾病特异性的蛋白酶切割。

[0198] 未修饰或未切割的接头可允许Fab片段与融合部分连接。当接头被切割时,可产生如本文进一步描述,例如图中的具有多种功能的多种切割产物。

[0199] MSFP的接头(例如,Fab的VH和第一融合部分之间的接头以及Fab的VL和第二融合

部分之间的接头)可包含相同的切割底物或可包含不同的切割底物,例如,第一接头可包含第一切割底物并且第二接头可包含第二切割底物。第一切割底物和第二切割底物可以为相同酶的不同底物(例如对酶表现出不同的结合亲和力),或为不同酶的不同底物,或者第一切割底物可以为酶底物而第二切割底物可为光解底物,或者在第一切割底物可以为酶底物而第二切割底物可为还原底物等。

[0200] 对于酶的特异性切割,形成酶和切割底物之间的接触。当包含通过第一和第二接头(具有切割底物)与第一融合部分和第二融合部分偶联的Fab的MSFP,在存在足够的酶活性的情况下时,所述切割底物可被切割。足够的酶活性可以指酶与具有切割底物的接头接触并实现切割的能力。可很容易设想的是酶可以在MSFP的附近但由于其他细胞因子或酶的蛋白修饰而不能切割。

[0201] 示例性底物可包括但不限于可被以下的酶或蛋白酶中的一种或多种切割的底物:ADAM10;半胱天冬酶8、组织蛋白酶S、MMP8、ADAM12、半胱天冬酶9、FAP、MMP9、ADAM17、半胱天冬酶10、颗粒酶B、MMP-13、ADAMTS、半胱天冬酶11、Guanidinobenzoate (GB)、MMP14、ADAMTS5、半胱天冬酶12、Hepsin、MT-SP1、BACE、半胱天冬酶13、人中性粒细胞弹性蛋白酶脑啡肽酶(HNE)、半胱天冬酶、半胱天冬酶14、豆荚蛋白、NS3/4A、半胱天冬酶1、组织蛋白酶、蛋白裂解酶2、纤溶酶、半胱天冬酶2、组织蛋白酶A、Mepirin、PSA、半胱天冬酶3、组织蛋白酶B、MMP1、PSMA、半胱天冬酶4、组织蛋白酶D、MMP2、TACE、半胱天冬酶5组织蛋白酶E、MMP3、TMPRSS3/4、半胱天冬酶6、组织蛋白酶K、MMP7、uPA、半胱天冬酶7、MT1-MMP。

[0202] 在另一个实施方案中,切割底物可包含半胱氨酸对的二硫键,其因此可被还原剂切割,所述还原剂诸如例如,但不限于细胞还原剂如谷胱甘肽(GSH)、硫氧还蛋白、NADPH、黄素类、抗坏血酸盐等,可大量存在于实体瘤组织中或实体瘤周围。

[0203] 用于本文可切割接头中的其他合适的蛋白酶切割位点为本领域已知或者可利用诸如Turk et al., 2001 Nature Biotechnology 19, 661-667描述的那些方法来鉴定。

[0204] 在某些实施方案中,接头可为肽接头、含硫醇残基的肽接头(例如半胱氨酸残基)、聚合物接头或化学接头。在某些实施方案中,MSFP包含接头,其中所述接头的一端与融合部分的C-端共价连接,而所述接头的另一端与Fab片段的VH或VL的N端共价连接。

[0205] 接合氨基酸

[0206] 在某些实施方案中,在MSFP的两个结构域之间(例如在结合结构域和接头多肽之间)可有一个或几个氨基酸残基,例如由融合蛋白的构建设计产生的氨基酸残基(例如在编码单链多肽的核酸分子的构建过程中,由利用限制酶位点产生的氨基酸残基)。如本文所述,此类氨基酸残基可被称为“接合氨基酸”或“接合氨基酸残基”或“肽间隔基”。

[0207] 在某些示例性实施方案中,肽间隔基为1-5个氨基酸、5-10个氨基酸、5-25个氨基酸、5-50个氨基酸、10-25个氨基酸、10-50个氨基酸、10-100个氨基酸,或任何中间范围的氨基酸。在其他示例性实施方案中,肽间隔基包含长度约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50或更多个氨基酸。

[0208] 此类接合氨基酸连接MSFP的任何结构域。在某些实施方案中,接合氨基酸是如本文定义的铰链或铰链的一部分。在某些实施方案中,用于连接重链可变区至轻链可变区的可变区连接序列可用作肽间隔基。

[0209] 在一个示例性实施方案中,肽间隔基序列包含例如Gly、Asn和Ser残基。其它接近

中性的氨基酸(例如Thr和Ala)也可包括在间隔基序列中。

[0210] 可有效地用作间隔基的其它氨基酸序列包括Maratea et al., Gene40:3946 (1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA83:82588262 (1986); 美国专利第4,935,233号和美国专利第4,751,180号中公开的那些。

[0211] 其它的示例性间隔基可包括例如Glu-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Glu-Ser-Lys-Val-Asp (SEQ ID NO:136) (Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070) 和Lys-Glu-Ser-Gly-Ser-Val-Ser-Ser-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Phe-Arg-Ser-Leu-Asp (SEQ ID NO:137) (Bird et al., 1988, Science242:423-426)。

[0212] 在一些实施方案中,当第一和第二多肽具有可用于分隔功能结构域并防止空间位阻的非必需N端氨基酸区时,不需要间隔基序列。本公开的MSFP的两个编码序列或结构域可无需任何接合氨基酸而直接融合或通过使用柔性多接头来融合,所述柔性多接头例如由重复1-3次的五聚体Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:138) 组成。此类间隔基已通过插入VH和VL之间被用于构建单链抗体(scFv) (Bird et al., 1988, Science242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5979-5883)。

[0213] 肽间隔基,在某些实施方案中,被设计成使两个 β -折叠之间的正确相互作用形成单链抗体的可变区。

[0214] 任何合适的接头可用于产生间接连接,例如但不限于肽接头、聚合物接头和化学接头。在某些实施方案中,共价接头是通过肽接头的间接连接。

[0215] 应当注意的是,在单个MSFP内,第一融合部分和第二融合部分没有二聚化。这将本公开的MSFP与其它已知的融合蛋白(如W02008/024188和W02009/149185中描述的那些)区分开来。这些构建体的差异在于具有VH1-VH2-CH1-铰链-CH2-CH3和VL1-VL2-CL的通用格式。在该构建体中,VH1和VL1二聚化以形成额外的抗原结合位点。在本公开的MSFP中,第一融合部分和第二融合部分不结合形成单一的抗原结合位点。如本文其他部分所述,该MSFP的另一个区别特征在于当所述MSFP不成簇时所述融合部分降低了Fab与其靶标的结合亲和力。与此相反,在W02008/024188和W02009/149185中描述的蛋白没有表现出对抗体结合靶标降低的结合亲和力。

[0216] 本公开的示例性MSFP包含选自以下的氨基酸序列中的任一个:SEQ ID NO:84、90、96和100;以及选自以下氨基酸序列中的任一个:SEQ ID NO:32、60、64、68和72。本公开的另外示例性MSFP包含选自以下的氨基酸序列中的任一个:SEQ ID NO:86、92、98和102;以及选自以下氨基酸序列中的任一个:SEQ ID NO:30、36、40、44、48和52。

[0217] 多特异性Fab融合蛋白的功能

[0218] 本公开的MSFP起提高药物稳定性、特异性、选择性、药效以及给药的安全性和便利性的作用。在某些实施方案中,所述Fab,当在其N端没有融合融合部分的情况下表达时,能结合其可溶重组形式的靶标抗原(通常为受体蛋白的细胞外结构域,例如T细胞受体组分如CD3)以及细胞表面上的靶标抗原。在某些实施方案中,所述Fab抗原结合片段,当在其重链和轻链两者的N端融合融合部分并以单体形式(非聚集形式或非多聚体形式)表达时,在不存在融合部分结合结构域结合靶标抗原的情况下,处于药物的药理浓度(治疗患者的多肽浓度)时,对其呈现在细胞表面上的特异性抗原不结合或具有降低的结合或与单独的Fab

具有相似水平的结合。在不存在融合部分结合结构域结合靶标抗原的情况下,对细胞表面抗原缺少结合或具有极大降低的结合可通过抗原结合位点周围设计的空间位阻产生的显著降低的亲合力来解释。

[0219] 在不存在融合部分结合结构域结合靶标抗原的情况下,对细胞表面抗原缺少结合或具有极大降低的结合,可视为作为人类治疗剂的MSFP所需要的。重要的是注意到,单独的MSFP(在没有肿瘤靶细胞的情况下)对例如T细胞无结合或显著降低的结合可,1)显著提高非所需的系统性T细胞活化,因此显著改善药物安全概况,2)显著提高给药的皮下途径的可行性,以及3)显著增加血液循环中高药物浓度的药物耐受性。

[0220] 重要的是注意到,抗体(诸如OKT3或UCHT-1)通过构象性表位对T细胞的结合可以转导部分信号,导致非所需的T细胞活化(引起细胞因子风暴)或T细胞无能(导致T细胞无法杀死肿瘤细胞)。在不存在CD3交联的情况下,Mu-1F3、hu-1F3及其变体与CD3线性表位的结合可预想地不太可能诱导T细胞信号转导。该性质对于减少利用OKT3和UCHT-1样抗体时发生的系统副作用可能是有利的。

[0221] 同样重要的是要注意,一旦MSFP中的融合部分被蛋白酶切割,其起作用以便去除Fab抗原结合位点周围的空间位阻,使得其能够以高亲和力结合其(Fab)靶标,特别是细胞表面上表达的靶标抗原。因此,在接头中的切割底物序列处切割以后(从而释放融合部分),MSFP被转换成肿瘤细胞和T细胞之间更有效的交联剂。

[0222] 此外,重要的是注意到,一旦融合部分结合结构域与其靶标抗原结合,MSFP分子在肿瘤细胞表面变得高度集中以产生针对T细胞上的Fab靶标(如CD3)的基于高亲和力的结合。因此,只有在存在融合部分的情况下,结合才是Fab抗原结合片段能够结合其靶标从而使MSFP充当肿瘤细胞和T细胞之间的交联剂。

[0223] 本公开的MSFP的性质允许循环中相对高剂量的MSFP而无没有不想要的副作用(例如,循环时,MSFP不结合Fab片段靶标抗原(例如,CD3)。这也允许减少的给药频率并通过浓度梯度驱动的扩散促进组织渗透。

[0224] 本公开的MSFP的性质还允许皮下给药的潜能,其可提高对靶标的可及性。此外,尽管在某些实施方案中,MSFP在无需蛋白酶处理的情况下就允许交联,但在某些具体的实施方案中,在蛋白酶处理后结合活性和肿瘤杀伤效力急剧增加。

[0225] 在一个实施方案中,由VH和VL形成的抗原结合结构域(Fv)通过CH1和CL异源二聚体结构域稳定,并通过二硫键进一步稳定,或通过CH1和CL之间的其它稳定相互作用(例如,杵状结构/臼状结构相互作用)。

[0226] 在一个实施方案中,MSFP中的Fab在空间上受到其N端的融合部分的阻碍,使得与Fab靶标抗原(特别是涉及细胞表面靶标抗原时)的结合以统计学显著的方式降低(即,相对于本领域技术人员已知的合适对照,例如与在其N端(VH和VL两者)不带有融合部分的形式相同Fab相比)。在另一个实施方案中,MSFP中的Fab在空间上受到其N端的融合部分的阻碍,使得与期望抗原(特别是涉及细胞表面靶标抗原时)的结合相对于在其N端(VH和VL两者)不带有融合部分的形式相同Fab减少了至少1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9、1/10、1/11、1/12、1/13、1/14、1/15、1/20、1/30、1/100或1/1000或1/10000。

[0227] 在某些实施方案中,融合蛋白形式的Fab抗原结合结构域对Fab细胞表面靶标抗原的亲合力在500nm以下。在其它实施方案中,融合蛋白形式(即MSFP)中Fab抗原结合结构域

的亲和力,处于人体内使用的治疗剂的浓度范围时,如使用FACS或其他结合测定法(例如,细胞结合ELISA)所测量的,证明无显著可检测的结合。在一个实施方案中,不到1%的Fab靶细胞群(例如,CD3⁺细胞)被治疗浓度的Fab融合蛋白结合(这是在不存在表达融合部分结合结构域的靶标抗原的细胞的情况下)。在一个实施方案中,不到5%的Fab靶细胞群被治疗浓度的MSFP结合。在另一个实施方案中,不到10%的Fab靶细胞群被治疗浓度的MSFP结合。

[0228] 肿瘤组织中存在的升高水平的蛋白酶,尤其是MMP,将在接头的MMP底物切割位点产生切割产物。由于接头的蛋白酶底物序列的切割导致Fab抗原结合区的空间位阻的解除,对所述Fab细胞表面靶标的结合将完全恢复或至少部分恢复。所述恢复的结合可利用FACS技术、基于细胞的ELISA或本领域技术人员已知的其他细胞结合技术来证实。

[0229] 术语“显著降低的亲和力”是指相对于Fab的VH和VL的N端不含融合部分时的结合,Fab抗原结合结构域的结合降低至少30%。降低的百分比可为例如但不限于30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、或约99%或更高。检测结合的方法对于本领域技术人员是已知的并且可利用FACS、细胞结合ELISA或使用放射性同位素标记抗体的细胞结合来进行。

[0230] 如本文所述,本公开的MSFP中使用的示例性Fab是抗CD3的Fab。在这方面,MSFP起作用使得当融合部分结合结构域结合肿瘤细胞抗原时,Fab能够结合T细胞的CD3,从而重新定向T细胞并活化它们以杀死肿瘤细胞。在另一个实施方案中,MSFP(在本文也被称为Fabe,其中Fab片段能结合免疫效应蛋白或免疫分子,如CD3)当经由融合部分结合结构域结合肿瘤抗原而在肿瘤细胞表面成簇时,可表现出亲合力效应。因此,在空间上受阻碍的Fab对免疫细胞的明显结合可由于亲合力而提高。因此,Fabe/MSFP变得能够桥联免疫细胞和肿瘤细胞,从而介导抗肿瘤活性。

[0231] 在某些实施方案中,Fab与其靶标抗原或者融合部分结合剂与其靶标抗原的分别的结合不会导致靶标活化。然而,当同时结合时,Fab抗原靶标和融合部分结合结构域的抗原靶标可产生信号转导。例如,MSFP可结合Fab抗原靶标(例如,CD3)和融合部分结合结构域的抗原靶标(其为肿瘤表面抗原)。当MSFP分别与CD3或肿瘤表面抗原结合时,T细胞不会被活化,然而,当CD3和肿瘤表面抗原同时被MSFP结合并且当结合的复合物的多个拷贝被锚定在肿瘤细胞表面并在肿瘤细胞表面上成簇时,携带肿瘤表面抗原的癌细胞附近的T细胞被活化,并且因此显著增强了T细胞的局部肿瘤杀伤效率并避免了由于细胞因子风暴产生的副作用。

[0232] 在某些实施方案中,Fab抗原靶标和融合部分结合结构域的抗原靶标的组合可为CD3和肿瘤表面抗原,所述组合可增强T细胞的肿瘤杀伤作用。在某些实施方案中,Fab抗原靶标和融合部分抗原靶标的组合可为Fc γ R和肿瘤表面抗原,所述组合可诱导表达Fc γ R的免疫细胞杀死肿瘤细胞。在某些实施方案中,Fab抗原靶标和融合部分抗原靶标的组合可为NKG2D与肿瘤细胞表面抗原,所述组合可诱导自然杀伤(NK)细胞以杀死肿瘤细胞。

[0233] 在某些实施方案中,第一融合部分和第二融合部分包含能结合第一靶标抗原和第二靶标抗原的结合结构域。以这种方式,MSFP能结合三种不同的靶标抗原(即,Fab靶标外加两种不同的融合部分靶标)。因此,在某些实施方案中,Fab抗原靶标选自CD3、TCR、Fc γ R和NKG2D,并且第一融合部分和第二融合部分的第一结合结构域和第二结合结构域为优先表达在癌细胞上的两种不同的抗原。此类具有三种不同的靶标抗原的MSFP,可增强对肿瘤细胞的靶向特异性并防止对正常细胞的杀伤作用,所述正常细胞可表达融合部分结合结构域

的靶标抗原的一种或可表达低水平的融合部分结合结构域的靶标抗原的两种。

[0234] 因此,在一个示例性实施方案中,本公开的MSFP包含Fab抗原结合片段,其能结合TCR或其组分(如CD3多肽)。如以上所指出的,本公开的MSFP不结合Fab靶标抗原,除非当融合部分结合结构域结合其靶标抗原或在接头切割事件以后。

[0235] 因此,在某些实施方案中,在不存在融合部分结合结构域与靶标抗原结合的情况下,本公开的MSFP不活化或最低限度地活化T细胞。若与在存在表达融合部分结合结构域的靶标抗原的细胞(例如,适当的肿瘤细胞/细胞系)的情况下的T细胞活化相比,MSFP并不导致活化T细胞的百分比的统计学显著的增加(如在至少一种体外或体内测定中所测量的),则所述MSFP“不活化T细胞或最低限度地活化T细胞或极少地活化T细胞”。此类测定是本领域已知的,并且包括但不限于,增殖测定、CTL铬释放试验(参见例如,Lavie et al., (2000) *International Immunology* 12 (4):479-486)、ELISPOT测定、胞内细胞因子染色测定,以及例如Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, New York, N.Y. (2009)中所描述的其它测定。在某些实施方案中,T细胞的活化利用体外触发的T细胞活化测定来测量。还参见本文实施例中所所述的测定。

[0236] 因此,在相关方面,本公开提供了用于检测包含Fab的MSFP诱导的T细胞活化的方法,所述Fab能特异性地结合TCR复合物或其组分,所述方法包括:(a)提供抗原或丝裂原触发的T细胞,(b)用包含能特异性结合TCR复合物或其组分的Fab的MSFP处理步骤(a)的触发的T细胞和(c)检测已在步骤(b)中处理的触发的T细胞的活化。

[0237] 本文所用术语“丝裂原”是指诱导不同特异性或克隆起源的淋巴细胞有丝分裂的化学物质。可用于触发T细胞的示例性丝裂原包括:植物血凝素(PHA)、伴刀豆球蛋白A(ConA)、脂多糖(LPS)、美洲商陆丝裂原(PWM)和豆蔻酸-佛波醇-乙酸酯(PMA)。负载了抗原的珠子或PBMC也可用于触发T细胞。

[0238] 在用于检测本文所提供的T细胞活化的方法的某些实施方案中,包含能特异性结合TCR复合物或其组分的Fab的MSFP包含一个或多个融合部分,所述融合部分含有能结合肿瘤抗原的一个或多个结合结构域。

[0239] T细胞的活化可通过测量本领域已知的活化标志物如CD25、CD40配体和CD69的表达来检测。活化的T细胞还可通过细胞增殖测定如CFSE标记和胸苷吸收分析来检测(Adams (1969) *Exp. Cell Res.* 56:55)。可通过例如铬释放测定或使用荧光染料(如TP3)的基于FACS的分析来检测T细胞效应功能(例如细胞杀伤)。在相关方面,T细胞的活化和细胞裂解活性可通过T细胞和肿瘤细胞之间的裂解突触的形成来测量。可在细胞裂解突触中检测效应分子(例如颗粒酶和穿孔素)。

[0240] 在另一个相关方面,T细胞的活化可通过细胞因子的释放来测量。用于检测由包含Fab(其能特异性结合TCR复合物或其组分)的MSFP诱导的细胞因子释放的方法,可包括:(a)提供触发的T细胞、(b)用包含能特异性结合TCR复合物或其组分的Fab的MSFP处理步骤(a)的触发的T细胞,和(c)检测已在步骤(b)中处理的触发的T细胞的细胞因子释放。在具体的实施方案中,在存在或不存在表达靶标肿瘤抗原的合适的癌细胞或细胞系的情况下进行实验,所述靶标肿瘤抗原能被MSFP的第一融合部分和/或第二融合部分中存在的结合结构域所结合。

[0241] 在用于检测本文提供的细胞因子释放的方法的某些实施方案中,包含能特异性结

合TCR复合物或其组分的Fab的MSFP为还包含融合部分的MSFP,所述融合部分包含能结合肿瘤靶标抗原的结合结构域。

[0242] 在其它优选的实施方案中,本公开的MSFP并不诱导细胞因子风暴或并不诱导足以诱导毒副作用的细胞因子释放。若在不存在次级靶细胞(表达能被融合部分的结合结构域结合的抗原的肿瘤细胞)或合适的接头切割试剂(例如蛋白酶)的情况下,MSFP并不引起至少一种细胞因子(包括IFN γ)的量的统计学显著的增加,则该MSFP“并不诱导细胞因子风暴”(也被称作“诱导无法检测到的、极少的或最低限度的细胞因子释放”或“不诱导细胞因子释放或诱导最低限度的可检测到的细胞因子释放”)。在本领域已知或本文提供的至少一种体内或体外测定中,与存在合适的次级靶细胞或接头切割试剂的情况下从处理的细胞中的释放相比,在没有次级靶细胞(例如合适的癌细胞系)或合适的接头切割试剂的情况下从处理的细胞中释放,在某些实施方案中,至少两种细胞因子包括IFN γ 和TNF α 或IL-6和TNF α ;在一个实施方案中,三种细胞因子包括IL-6、IFN γ 和TNF α ;在另一个实施方案中,四种细胞因子包括IL-2、IL-6、IFN γ 和TNF α ;以及在另一个实施方案中,至少五种细胞因子包括IL-2、IL-6、IL-10、IFN γ 和TNF α 。在临床上,细胞因子释放综合征的特点是发热、寒战、皮疹、恶心、有时呼吸困难和心动过速,这与某些细胞因子的最大释放是平行的,例如IFN γ 、以及IL-2、IL-6和TNF α 。可在体外或体内测试释放的细胞因子包括G-CSF、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IL-17、IP-10、KC、MCP1、IFN γ 和TNF α ;在另一个实施方案中包括IL-2、IL-6、IL-10、IFN γ 和TNF α 。

[0243] 在其它实施方案中,本公开的MSFP导致细胞如T细胞内钙流的增加。若在存在合适的次级靶细胞(例如,癌细胞)或接头切割试剂的情况下用于活化T细胞,与不存在合适的次级靶细胞或接头切割试剂的情况下处理的细胞相比,MSFP导致处理细胞的钙流的统计学显著的、快速的增加(优选在处理的300秒内、更优选在处理的200秒内、最优选在处理的100秒内)(如在本领域已知或本文提供的体外测定中所测量的),则该MSFP导致“钙增加”。

[0244] 在其它实施方案中,本公开的MSFP诱导了TCR信号转导途径中的分子的磷酸化。“TCR信号转导途径”是指经由肽:MHC配体与TCR及其共受体(CD4或CD8)的结合所启动的信号转导途径。“TCR信号转导途径中的分子”是指直接参与TCR信号转导途径的分子,例如其磷酸化状态(例如,无论该分子是否被磷酸化),其与另一种分子的结合亲和力或其酶活性,在响应于肽:MHC配体与TCR及其共受体的结合的信号中已发生改变分子。TCR信号转导途径中的示例性分子包括:TCR复合物或其组分(例如,CD3 ζ 链)、ZAP-70、Fyn、Lck、磷脂酶C- γ 、蛋白激酶C、转录因子NF κ B、钙调磷酸酶、转录因子NFAT、鸟嘌呤核苷酸交换因子(GEF)、RAS、MAP激酶激酶激酶(MAPKKK)、MAP激酶激酶(MAPKK)、MAP激酶(ERK1/2)和Fos。

[0245] 若在本领域已知的体外或体内测定或受体信号转导测定中,本公开的MSFP仅在存在合适的次级靶标抗原或表达此类抗原的细胞(例如表达能被融合部分的结合结构域结合的肿瘤抗原的癌细胞)或接头切割试剂的情况下,导致TCR信号转导途径中的分子(如CD3 ζ 链、ZAP-70和ERK1/2)的磷酸化的统计学显著的增加,则该MSFP“诱导TCR信号转导途径中的分子的磷酸化”。来自本领域中已知的大多数受体信号转导测定的结果利用免疫组织化学方法(例如蛋白印迹或荧光显微术)来确定。

[0246] 类似地,本公开的MSFP诱导次级靶细胞的杀伤,如表达融合部分结合结构域的靶标抗原的肿瘤细胞被T细胞杀伤。此类细胞杀伤可利用多种本领域已知的测定(包括铬释放

测定)来测量。

[0247] 本公开的MSFP的特异性和功能可通过以下来测试:将MSFP与合适的测试样品接触,并且在某些实施方案中,用合适的蛋白酶处理MSFP,并测定切割产物,所述蛋白酶被认为对接头的切割识别位点是特异的。蛋白酶可以是例如,从癌细胞分离的,或其可通过重组制备,例如按照Darket (J.Biol.Chem.254:2307-2312 (1988)) 的方案。切割产物可以例如根据大小、抗原性或活性来鉴定。MSFP的毒性可通过使MSFP及其切割产物经历体外细胞毒性、增殖、结合或本领域技术人员已知的其他适当的测定来进行研究。切割产物的毒性可使用核糖体失活测定 (Westby et al., Bioconjugate Chem.3:377-382 (1992)) 来确定。切割产物对蛋白合成的影响可在利用部分确定的无细胞系统的体外翻译的标准测定中来测量,所述部分确定的无细胞系统由例如作为核糖体来源的网织红细胞裂解物和各种必要的辅因子(如mRNA模板和氨基酸)组成。在混合物中使用放射性同位素标记的氨基酸可对掺入三氯乙酸可沉淀的蛋白质中的游离氨基酸前体进行定量。可方便地使用兔网织红细胞裂解物 (O'Hare, FEBS Lett.273:200-204 (1990))。

[0248] 本发明的MSFP破坏癌细胞和/或活化T细胞的能力可容易地利用癌细胞系、T细胞系或分离的PBMC或T细胞在体外进行测试。本公开的MSFP的效应可通过例如癌细胞的选择性裂解所证明的进行确定。另外,蛋白酶的特异性可通过单独使用本公开的MSFP或在存在蛋白酶特异性抑制剂的情况下比较细胞增殖的抑制情况来进行测试。此类蛋白酶抑制剂可包括MMP-2/MMP-9抑制剂GM1489、GM6001和GL-I至GI-IV。

[0249] 毒性还可基于细胞活力来测定,例如将暴露于MSFP的正常细胞培养物和癌细胞培养物的活力进行比较。细胞活力可通过已知技术,如台盼蓝排除测定来进行评估。毒性也可根据细胞裂解来测定,例如将暴露于MSFP的正常细胞培养物和癌细胞培养物的活力进行比较。细胞裂解可通过已知技术,如铬 (Cr) 释放测定或死细胞指示剂染料 (碘化丙啶、TO-PRO-3碘化物) 来进行评估。

[0250] 多肽

[0251] 本公开提供了MSFP多肽及其片段。示例性多肽和编码它们的多核苷酸,都提供于SEQ ID NO:23-102和109-150中。术语“多肽”、“蛋白”、“肽”和“糖蛋白”可互换使用并意指不限于任何特定长度的氨基酸聚合物。该术语并不排除修饰,如十四烷基化、硫酸化、糖基化、磷酸化和信号序列的添加或缺失。术语“多肽”或“蛋白”是指氨基酸的一条或多条链,其中每条链包含通过肽键共价连接的氨基酸,并且其中所述多肽或蛋白可包含非共价连接的和/或通过肽键共价连接的多条链,具有天然蛋白(即由天然存在的细胞,尤其是非重组的细胞产生的蛋白)的序列、或遗传改造的细胞或重组细胞产生的蛋白的序列,并且包含具有天然蛋白的氨基酸序列的分子,或具有天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、添加、和/或取代的分子。术语“多肽”和“蛋白”特别地涵盖本公开的MSFP及其二聚物,或具有如本文公开的MSFP的一个或多个氨基酸的缺失、添加、和/或取代的序列。因此,“多肽”或“蛋白”可包括氨基酸链的一条链(称为“单体”)或氨基酸链的多条链(称为“多聚体”)。

[0252] 本文提到的术语“分离的蛋白”表示这样的个体蛋白:(1) 不含在自然界中通常与其一起存在的至少一些其它蛋白、(2) 基本上不含来自相同来源,例如来自相同物种的其它蛋白、(3) 来自不同物种的细胞表达、(4) 从至少约50%的多核苷酸、脂质、碳水化合物或在自然界中与其相关的其它物质分离出来、(5) 与自然界中“分离的蛋白”相关的蛋白的一部

分不结合(通过共价或非共价相互作用)、(6)与自然界中不相关的多肽可操作地结合(通过共价或非共价相互作用)或(7)不存在于自然界中。此类分离的蛋白可通过基因组DNA、cDNA、mRNA或其它RNA编码,或可为合成来源或以上的任何组合。在某些实施方案中,分离的蛋白基本不含会干扰其应用(治疗、诊断、预防、研究或其他)的天然环境中存在的蛋白或多肽或其它污染物。

[0253] 术语“多肽片段”是指可为单体或多聚体的多肽,其具有天然存在的或重组产生的多肽的氨基端缺失、羧基端缺失、和/或内部缺失或取代。在某些实施方案中,多肽片段可包含长度为至少5-约500个氨基酸的氨基酸链。应理解的是在某些实施方案中,片段长度为至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、150、200、250、300、350、400或450个氨基酸。特别有用的多肽片段包括功能结构域,包括抗体的抗原结合结构域或抗体的片段。就抗CD3或其他抗体而言,有用的片段包括但不限于:CDR区、特别是重链或轻链的CDR3区;重链或轻链的可变区;抗体链的一部分或其仅包含两个CDR的可变区等。

[0254] 多肽可在蛋白的N-端包含信号(或前导)序列,其在共翻译或翻译后指导蛋白的转移。多肽也可与接头或其他序列进行框内融合或缀合以便于多肽(例如,聚组氨酸)的合成、纯化或鉴定,或者增强多肽与固相支持物的结合。

[0255] 考虑本文所述的MSFP的氨基酸序列修饰。例如,提高MSFP的结合亲和力和/或其它生物特性可能是可取的。例如,MSFP的氨基酸序列变体,或其结合结构域或其Fab可通过将合适的核苷酸变化引入编码所述MSFP或其结构域的多核苷酸中来制备,或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如,MSFP氨基酸序列中残基的缺失和/或插入和/或取代。可进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终的MSFP,前提是最终构建体具有所需特性,诸如通过结合结构域或Fab特异性地结合目的靶标抗原。氨基酸变化还可改变MSFP的翻译后加工,诸如改变糖基化位点的数目或位置。针对本发明多肽的上述任何变异和修饰都可包括在本发明的抗体中。

[0256] 本公开提供了本文公开的MSFP的变体。在某些实施方案中,此类变体MSFP包含其变体结合结构域或Fab片段,或抗原结合片段或其CDR(其能至少约50%、至少约70%、并且在某些实施方案中,至少约90%地结合目的靶标),以及给定的参考序列或野生型序列,包括本文具体示出的任何这样的序列。在进一步的实施方案中,此类变体以比本文所示的参考序列或野生型序列更高的亲和力结合靶标抗原(例如,在量上至少约105%、106%、107%、108%、109%,或110%的结合)以及本文具体示出的参考序列。

[0257] 在某些实施方案中,本公开提供了本文所公开的MSFP的变体,其中此类变体包含已对VH和VL之间的二硫键进行修饰的Fab。如本领域技术人员所公认的,在某些实施方案中,本发明的MSFP中使用的Fab片段可不包含二硫键。在这方面,可以这样的方式改造重链和轻链,以便在无需二硫键的情况下稳定地相互作用。例如,在某些实施方案中,可改造重链或轻链以去除半胱氨酸残基,并且其中重链和轻链仍稳定地相互作用并作为Fab起作用。在一个实施方案中,进行突变以促进重链和轻链之间稳定的相互作用。例如,“杵入臼”遗传改造策略可用于促进Fab的重链和轻链之间的二聚化(参见例如,1996Protein Engineering,9:617-621)。因此,还考虑用于本文的是设计用于特定的目的,例如,去除二

硫键、添加纯化标签等的变体Fab片段

[0258] 在具体实施方案中,个体MSFP可具有:与本文所述的MSFP至少80%一致、至少95%一致、至少90%一致、至少95%一致或至少98%一致或99%一致的氨基酸序列。

[0259] 代表性多肽的三维结构的确定可通过常规方法来进行,使得用选定的天然或非天然的氨基酸进行一个或多个氨基酸的取代、添加、缺失或插入实际上可被建模,用于确定如此得到的结构变体是否保留本公开种类的空间填充特性的目的。参见例如,Donate et al.,1994Prot.Sci.3:2378;Bradley et al.,Science309:1868-1871(2005);Schueler-Furman et al.,Science310:638(2005);Dietz et al.,Proc.Nat.Acad.Sci.USA103:1244(2006);Dodson et al.,Nature450:176(2007);Qian et al.,Nature450:259(2007);Raman et al.Science327:1014-1018(2010)。可用于这些和相关的实施方案的计算机算法的一些另外的非限制性实例,包括VMD,其为使用3D图像和内置脚本显示、绘制、以及分析大生物分子系统的分子可视化程序(参见Theoretical and Computational Biophysics Group,University of Illinois at Urbana-Champagne的网页,ks.uiuc.edu/Research/vmd/)。许多其他的计算机程序为本领域已知并且是技术人员可利的,其允许从能量最小化构象的空间填充模型(范德华半径)确定原子尺寸;GRID,其目的是确定针对不同化学基团的高亲和性区域,从而提高结合;Monte Carlo搜索,其计算数学比对;以及CHARMM(Brooks et al.(1983)J.Comput.Chem.4:187-217)和AMBER(Weiner et al(1981)J.Comput.Chem.106:765),其评估力场计算和分析(还参见Eisenfield et al.(1991)Am.J.Physiol.261:C376-386;Lybrand(1991)J.Pharm.Belg.46:49-54;Froimowitz(1990)Biotechniques8:640-644;Burbam et al.(1990)Proteins7:99-111;Pedersen(1985)Environ.Health Perspect.61:185-190和Kini et al.(1991)J.Biomol.Struct.Dyn.9:475-488)。各种适合计算的计算机程序也是可商购的,例如来自Schrödinger(Munich, Germany)。

[0260] 编码多特异性Fab融合蛋白的多核苷酸/载体/宿主细胞/以及制备多特异性Fab融合蛋白的方法

[0261] 在某些实施方案中,本公开进一步提供了编码本文所述的多肽MSFP的分离的核酸。示例性多核苷酸、以及由其编码的多肽及其片段提供于SEQ ID NO:23-102和109-150中。核酸包括DNA和RNA。这些实施方案及相关实施方案可包括编码本文所述的MSFP的多核苷酸。本文所用术语“分离的多核苷酸”应意指基因组多核苷酸、cDNA多核苷酸、或合成来源的多核苷酸或其某种组合,由于其来源,所述“分离的多核苷酸”(1)与自然界中分离的多核苷酸相关的多核苷酸的全部或一部分不结合,(2)与其在自然界中不连接的多核苷酸连接,或(3)在自然界中没有作为较大序列的一部分而存在。

[0262] 术语“可操作地连接”意指所述术语所适用的组分处于允许它们在合适的条件下发挥其固有功能的关系当中。例如,“可操作地连接”至蛋白编码序列上的转录控制序列与其连接以致能在与所述控制序列的转录活性相容的条件下,完成所述蛋白编码序列的表达。

[0263] 本文所用术语“控制序列”是指可影响与之连接或可操作地连接的编码序列的表达、加工或细胞内定位的多核苷酸序列。此类控制序列的特性可取决于宿主生物体。在具体的实施方案中,原核生物的转录控制序列可包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。

在其它具体的实施方案中,真核生物的转录控制序列可以包括含有一个或多个转录因子识别位点的启动子、转录增强子序列、转录终止序列和聚腺苷酸化序列。在某些实施方案中,“控制序列”可包括前导序列和/或融合伴侣序列。

[0264] 本文提及的术语“多核苷酸”意指单链或双链的核酸聚合物。在某些实施方案中,多核苷酸包含的核苷酸可为核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或任一类型的修饰形式的核苷酸。所述修饰包括碱基修饰如溴尿苷(bromouridine)、核糖修饰如阿拉伯糖苷和2',3'-二脱氧核糖及核苷酸间连接的修饰如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺基硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate)、苯胺基磷酸酯(phosphoraniladate)和氨基磷酸酯。术语“多核苷酸”明确包括单链和双链形式的DNA。

[0265] 术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。术语“修饰的核苷酸”包括具有修饰或取代的糖基等的核苷酸。术语“寡核苷酸连接”包括诸如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺基硫代磷酸酯、苯胺基磷酸酯、氨基磷酸酯等的寡核苷酸连接。参见例如LaPlanche et al.,1986,Nucl.Acids Res.,14:9081;Stec et al.,1984,J.Am.Chem.Soc.,106:6077;Stein et al.,1988,Nucl.Acids Res.,16:3209;Zon et al.,1991,Anti-Cancer Drug Design,6:539;Zon et al.,1991,OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES:A PRACTICAL APPROACH,第87-108页(F.Eckstein编辑),Oxford University Press,Oxford England;Stec et al.,美国专利第5,151,510号;Uhlmann and Peyman,1990,Chemical Reviews,90:543,其全部内容通过引用并入本文中用于所有目的。寡核苷酸可包括可检测标记物以便能检测寡核苷酸或其杂交。

[0266] 在其它相关的实施方案中,多核苷酸变体可与编码本文所述的MSFP或其结构域的多核苷酸序列有实质大量的一致性。例如,多核苷酸可以是这样的多核苷酸:利用本文所述的方法(例如利用如下所述的标准参数的BLAST分析,如下文所述),其可为相对于与参考多核苷酸序列(例如编码本文所述的MSFP或其结构域的序列)相比包含至少70%序列一致性、优选至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列一致性的多核苷酸。本领域技术人员应认识到,通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等可适当地调整这些值,以确定由两条核苷酸序列编码的蛋白的相应的一致性。

[0267] 通常,多核苷酸变体将包含一个或多个取代、添加、缺失和/或插入,优选地使得结合结构域的结合亲和力、或Fab的结合亲和力、或由所述变体多核苷酸编码的MSFP的功能相对于由本文具体示出的多核苷酸序列编码的未经修饰的参考蛋白基本不减少。

[0268] 在某些其它相关的实施方案中,多核苷酸片段可包含与编码本文所述的MSFP或其结构域的序列相同或互补的不同长度的连续的序列区段或由以上区段组成。例如,提供的多核苷酸包含编码本文公开的MSFP或其结构域(如其结合结构域或Fab抗原结合片段)的序列的至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、200、300、400、500或1000或更多连续的核苷酸以及之间所有中间长度的连续的核苷酸,或者由以上连续的核苷酸组成。容易理解的是在本上下文中“中间长度”意指引用值之间的任何长度,例如50、51、52、53等;100、101、102、103等;150、151、152、153等;包括200-500;500-1,000等的所有整数。本文所述的多核苷酸序列可在一端或两端通过添加天然序列中不存在的核苷酸来延伸。该添加的序列可由编码本文所述的MSFP或其结构域

的多核苷酸的任一端或编码本文所述的MSFP或其结构域的多核苷酸的两端的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸组成。

[0269] 在另一个实施方案中,提供了能够在中至高严紧条件下与编码本文提供的MSFP或其结构域(例如其结合结构域或Fab抗原结合片段)的多核苷酸序列、或其片段、或其互补序列杂交的多核苷酸。杂交技术为分子生物学领域众所周知的。为了阐述的目的,用于测试本文提供的多核苷酸与其它多核苷酸杂交的合适的中度严紧条件包括:在5X SSC,0.5%SDS,1.0mM EDTA (pH8.0)的溶液中预洗涤;在50℃-60℃,5X SSC中杂交过夜;随后在65℃下用含0.1%SDS的2X SSC、0.5X SSC和0.2X SSC各自洗涤20分钟,洗涤两次。本领域技术人员应理解,可很容易操作杂交的严紧性,例如通过改变杂交溶液的盐浓度和/或进行杂交的温度。例如,在另一个实施方案中,合适的高严紧杂交条件包括上述那些,除了将杂交的温度升高至例如60℃-65℃或65℃-70℃。

[0270] 在某些实施方案中,上述的多核苷酸,例如多核苷酸变体、片段和杂交序列,能编码MSFP或其结构域,例如结合结构域或Fab,例如能结合CD3的Fab或能结合肿瘤抗原靶标的结合结构域。在其它实施方案中,此类多核苷酸编码能至少约50%、至少约70%,并且在某些实施方案中,至少约90%地结合CD3和/或肿瘤抗原的MSFP以及本文具体示出的MSFP序列。在其它实施方案中,此类多核苷酸编码MSFP或其结构域(其例如相比本文所示的MSFP或其结构域以更大的亲和力结合CD3和/或靶标抗原(例如其在量上至少约105%、106%、107%、108%、109%或110%的结合)),以及本文具体示出的MSFP序列或其结构域。

[0271] 如本文其它地方所述,代表性多肽(例如本文提供的变体MSFP,例如具有本文提供的结合结构域和Fab的MSFP)的三维结构的确定可通过常规方法来进行,使得用选定的天然或非天然的氨基酸进行一个或多个氨基酸的取代、添加、缺失或插入实际上可被建模,用于确定如此得到的结构变体是否保留本公开种类的空间填充特性的目的。本领域技术人员已知很多用于确定例如抗体或其抗原结合片段之内合适的氨基酸取代(或编码氨基酸序列的合适的多核苷酸),以致例如保持亲和力或达到更好的亲和力的计算机程序。

[0272] 本文所述的多核苷酸或其片段,不管编码序列本身的长度如何,都可以与其它DNA序列(例如启动子、聚腺苷酸化信号、额外的限制性酶位点、多克隆位点、其他编码片段等)组合,使得其总长度可变化很大。因此可预期的是,可应用几乎任何长度的核酸片段,其总长度优选受方便制备和在预期的重组DNA方案中使用的限制。例如,考虑可用长度为约10000、约5000、约3000、约2000、约1000、约500、约200、约100、约50个碱基对等(包括所有中间长度)的示例性多核苷酸片段。

[0273] 当比较多核苷酸序列时,如果两个序列中的核苷酸序列在如下文所述进行最大对应比对时是相同的,则可以认为所述两个序列是“一致的”。通常通过在比较窗中比较序列来进行两个序列间的比较,从而鉴定和比较序列相似性的局部区域。本文所用的“比较窗”是指至少约20个连续位置、通常30-约75个、40-约50个连续位置的区段,其中在将序列与具有相同数量连续位置的参照序列最佳比对后,可以将所述序列与参照序列进行比较。

[0274] 可以使用Lasergene生物信息学软件套装中的Megalign程序(DNASTAR, Inc., Madison, WI),使用缺省参数,进行用于比较的序列的最佳比对。该程序包括以下参考文献中描述的数种比对方案:Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in Proteins-Matrices for detecting distant relationships; In Dayhoff, M.O. (ed.)

Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol.5, Suppl.3, pp.345-358; Hein J., Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp.626-645 (1990); Methods in Enzymology vol.183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., CABIOS5:151-153 (1989); Myers, E.W. and Muller W., CABIOS4:11-17 (1988); Robinson, E.D., Comb.Theor11:105 (1971); Santou, N.Nes, M.Mol.Biol.Evol.4:406-425 (1987); Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., Numerical Taxonomy-the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., Proc.Nat'l Acad., Sci.USA80:726-730 (1983)。

[0275] 可选择地, 可以通过以下来进行用于比较的序列的最佳比对: Smith and Waterman, Add.APL.Math2:482 (1981) 的局部一致性算法、Needleman and Wunsch, J.Mol.Biol.48:443 (1970) 的一致性比对算法、Pearson and Lipman, Proc.Nat'l Acad.Sci.USA85:2444 (1988) 的相似性方法搜索、这些算法的计算机执行 (Wisconsin遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI)、或检查。

[0276] 适于确定序列一致性和序列相似性百分比的算法的一个优选实例是BLAST和BLAST2.0算法, 其分别描述于Altschul et al., Nucl.Acids Res.25:3389-3402 (1977) 和 Altschul et al., J.Mol.Biol.215:403-410 (1990) 中。例如, 可以按照本文所述的参数使用BLAST和BLAST2.0, 从而确定两个或更多个多核苷酸之间的序列一致性百分比。通过美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 可以公开获得进行BLAST分析的软件。在一个示例性实例中, 对于核苷酸序列, 可以利用参数M (一对匹配残基的奖励分; 总是 >0) 和N (错配残基的罚分; 总是 <0) 计算累积评分。在以下情况时停止每个方向的字符命中延伸: 当累积比对评分从其最大达到的值下降量X时; 由于一个或多个负评分残基比对的累积而使累积评分达到0或低于0时; 或达到任一序列的末端时。BLAST算法参数W、T和X决定了所述比对的灵敏度和速度。BLASTN程序 (对于核苷酸序列) 使用以下作为缺省值: 字长 (W) 为11, 期望 (E) 为10, BLOSUM62评分矩阵 (参见Henikoff and Henikoff, Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10915 (1989)) 比对, (B) 为50, 期望 (E) 为10, M=5, N=-4, 以及两条链的比较。

[0277] 在某些实施方案中, 通过在至少20个位置的比较窗中比较两个最佳比对的序列来确定“序列一致性百分比”, 其中, 与用于两个序列最佳比对的参照序列 (其不包含添加或缺失) 相比, 比较窗中的多核苷酸序列的一部分可以包含20%或更少的、通常为5%-15%、或10%-12%的添加或缺失 (即, 空位)。通过以下来计算百分比: 确定两个序列中都存在的相同很酸碱基的位置数量来产生配对位置数, 将配对位置数除以参照序列中 (即窗的大小) 的位置总数, 并且将结果乘以100以产生序列一致性的百分比。

[0278] 本领域技术人员应理解的是, 由于遗传密码的简并性, 有多种编码本文所述的MSFP的核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些与编码MSFP (例如能结合CD3或肿瘤靶标抗原的MSFP) 的天然或原始多核苷酸序列的核苷酸序列具有最小的序列一致性。然而, 由于密码子使用的差异性而不同的多核苷酸明确被本公开涵盖。在某些实施方案中, 已为哺乳动物表达而进行密码子优化的序列是特别考虑的。

[0279] 因此,在本发明的另一个实施方案中,诱变方法,例如位点特异性诱变技术,可用于制备本文所述的MSFP的变体和/或衍生物。通过该方法,多肽序列中的特定修饰可通过对编码它们的基础多核苷酸的诱变来完成。这些技术提供了制备并测试序列变体的直接方法,例如,通过将一个或多个核苷酸序列变化引入多核苷酸中,来体现一种或多种之前的考虑。

[0280] 位点特异性诱变允许通过以下产生突变体:使用编码所需突变的DNA序列的特异性寡核苷酸序列以及足够数量的邻近核苷酸,以提供足够大小和序列复杂性的引物序列,从而在被跨越的缺失接合处的两侧形成稳定的双螺旋。可以在所选的多核苷酸序列中应用突变以提高、改变、减少、修饰或以其它方式改变多核苷酸本身的性质、和/或改变编码多肽的性质、活性、组成、稳定性或一级序列。

[0281] 在某些实施方案中,本发明人考虑编码本文公开的MSFP或其结构域的多核苷酸序列的突变,以改变所编码的多肽的一种或多种性质(例如其结合结构域或Fab抗原结合片段的结合亲和力),或特定Fc区的功能、或Fc区对特定Fc γ R的亲和力。位点特异性诱变技术是本领域公知的,并且广泛用于产生多肽和多核苷酸的变体。例如,位点特异性诱变常常用于改变DNA分子的特定部分。在此类实施方案中,应用通常包含长度为约14-约25个核苷酸左右的引物,其在待改变的序列接合处的两侧具有约5-约10个残基。

[0282] 正如本领域技术人员所理解的,位点特异性诱变技术一般是采用以单链和双链两种形式存在的噬菌体载体。用于定点诱变的典型载体包括诸如M13噬菌体的载体。这些噬菌体容易购买并且其应用对于本领域技术人员而言是众所周知的。双链质粒也常规地应用于定点诱变中,其省去了将目的基因从质粒转移至噬菌体的步骤。

[0283] 通常,在此的定点诱变是通过首先获得单链载体或双链载体的融解来的两条链来进行,所述载体在其序列中包含编码所需肽的DNA序列。制备,通常是通过合成方法,具有所需突变序列的寡核苷酸引物。然后使该引物与单链载体退火,并受DNA聚合酶如大肠杆菌聚合酶I Klenow片段的作用,以便完成带有突变的链的合成。由此,就形成了异源双螺旋,其中一条链编码原始的未突变序列而第二条链带有所需的突变。然后用该异源双螺旋载体转化合适的细胞,如大肠杆菌细胞,并选择出包含重组载体(其具有突变的序列结构)的克隆。

[0284] 利用定点诱变来制备编码所选肽的DNA区段的序列变体,提供了产生可能有用的物种的一种方法,而这并不意图受限,因为还有其它途径可以获得肽以及编码它们的DNA序列的序列变体,例如,可用诱变剂如羟胺对编码所需肽序列的重组载体进行处理以获得序列变体。关于这些方法和方案的具体细节参见Maloy et al.,1994;Segal,1976;Prokop and Bajpai,1991;Kuby,1994;和Maniatis et al.,1982的教导,每一篇都在此并入本文中,用于该目的。

[0285] 本文所用术语“寡核苷酸定向诱变程序”是指模板依赖的过程和载体介导的增殖,其导致特定的核酸分子浓度的提高(相对于其初始浓度而言),或导致可检测信号(例如扩增)的浓度的提高。本文所用术语“寡核苷酸定向诱变程序”意指涉及引物分子的模板依赖性延伸的过程。术语模板依赖的过程是指RNA或DNA分子的核酸合成,其中核酸的新合成链的序列是通过公知的碱基互补配对原则来指导的(参照例如,Watson,1987)。通常,载体介导的方法学涉及将核酸片段引入DNA载体或RNA载体、载体的克隆扩增、以及经过扩增的核酸片段的回收。此类方法学的实例由美国专利第4,237,224号提供,其全部内容在此具体并

入本文中。

[0286] 在用于产生多肽变体的另一个方法中,可应用如美国专利第5,837,458号中所述的循环的序列重组(recursive sequence recombination)。在该方法中,进行重组的迭代循环和筛选或选择以“进化”具有例如增加的结合亲和力的单独的多核苷酸变体。某些实施方案还提供了质粒、载体、转录盒或表达盒形式的构建体,其包含本文所述的至少一种多核苷酸。

[0287] 在某些实施方案中,将分离的多核苷酸插入载体中。本文所用术语“载体”是指编码蛋白的多核苷酸可共价插入其中以引起蛋白表达和/或多核苷酸克隆的媒介。可利用本领域已知的任何合适的方法将分离的多核苷酸插入载体中,例如但不限于,可使用合适的限制性酶来消化载体,并接着将其与具有匹配的限制性末端的分离的多核苷酸连接。

[0288] 合适的载体的实例包括但不限于:质粒、噬菌粒、柯斯质粒、人工染色体如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC)、噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体以及动物病毒。用作载体的动物病毒种类的实例包括但不限于:逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。

[0289] 对于多肽的表达,可将载体引入宿主细胞中以允许多肽在宿主细胞中表达。表达载体可包含用于控制表达的多种元件,包括但不限于启动子序列、转录起始序列、增强子序列、可选择标志物和信号序列。本领域技术人员可视情况选择这些元件。例如,可选择启动子序列以促进载体中多核苷酸的转录。合适的启动子序列包括但不限于T7启动子、T3启动子、SP6启动子、 β -肌动蛋白启动子、EF1a启动子、CMV启动子和SV40启动子。可选择增强子序列以增强多核苷酸的转录。可以选择可选择标志物以便允许将插入载体的宿主细胞从未插入所述载体的宿主细胞中选择出来,例如可选择标志物可为赋予抗生素抗性的基因。可选择信号序列以便允许所表达的多肽被运输至宿主细胞之外。

[0290] 载体还可包含帮助其进入细胞的物质,包括但不限于病毒颗粒、脂质体或蛋白衣壳。

[0291] 对于多核苷酸的克隆,可将载体引入宿主细胞(分离的宿主细胞)中以允许载体自身复制并由此扩增包含在其中的多核苷酸拷贝。克隆载体可包含序列组分,一般包括但不限于:复制起点、启动子序列、转录起始序列、增强子序列和可选择标志物。本领域技术人员可视情况选择这些元件。例如,可选择复制起点以促进载体在宿主细胞中的自主复制。

[0292] 在某些实施方案中,本公开提供了包含本文提供的载体的分离的宿主细胞。包含载体的宿主细胞可用于所述载体中包含的多核苷酸的表达或克隆。

[0293] 合适的宿主细胞可包括但不限于原核细胞、真菌细胞、酵母细胞或高等真核细胞例如哺乳动物细胞。

[0294] 用于该目的合适的原核细胞包括但不限于:真细菌类,诸如革兰氏阴性生物体或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科,诸如埃希氏菌属(*Escherichia*)例如大肠杆菌(*E.coli*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、变形菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、和志贺氏菌属(*Shigella*)、以及芽孢杆菌属(*Bacilli*)诸如枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)和地衣芽

孢杆菌 (*B.licheniformis*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 诸如铜绿假单胞菌 (*P.aeruginosa*)、和链霉菌属 (*Streptomyces*)。

[0295] 本领域已建立抗体和抗原结合片段在原核细胞如大肠杆菌中的表达。对于综述, 参见例如 Pluckthun, A. *Bio/Technology* 9:545-551 (1991)。培养的真核细胞的表达也被本领域技术人员用作产生抗体或其抗原结合片段的选择, 参见最近的综述, 例如 Ref, M.E. (1993) *Curr.Opinion Biotech.* 4:573-576; Trill J.J. et al. (1995) *Curr.Opinion Biotech* 6:553-560。

[0296] 用于该目的的合适的真菌细胞包括但不限于丝状真菌和酵母。真菌细胞的示例性实例包括酿酒酵母、普通面包酵母、裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*) 宿主诸如例如乳酸克鲁维酵母 (*K.lactis*)、脆弱克鲁维酵母 (*K.fragilis*, ATCC12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K.bulgaricus*, ATCC16,045)、威克克鲁维酵母 (*K.wickerhamii*, ATCC24,178)、瓦提克鲁维酵母 (*K.waltii*, ATCC56,500)、果蝇克鲁维酵母菌 (*K.drosophilum*, ATCC36,906)、耐热克鲁维酵母 (*K.thermotolerans*) 和马克斯克鲁维酵母 (*K.marxianus*)；耶氏酵母属 (*Yarrowia*, EP402,226)；毕赤酵母 (*Pichia pastoris*, EP183,070)；假丝酵母属 (*Candida*)；里氏木霉 (*Trichoderma reesei*, EP244,234)；粗脉孢菌 (*Neurospora crassa*)；许旺酵母属 (*Schwanniomyces*) 诸如西方许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*)；和丝状真菌, 诸如例如脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉菌属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主, 诸如沟巢曲霉 (*A.nidulans*) 和黑曲霉 (*A.niger*)。

[0297] 高等真核细胞, 特别是来源于多细胞生物体的那些可用于本文提供的糖基化多肽的表达。合适的高等真核细胞包括但不限于无脊椎动物细胞和昆虫细胞, 以及脊椎动物细胞。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已鉴定出来自以下宿主的大量杆状病毒株和变体以及相应寄主性昆虫宿主细胞: 例如草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇)、和家蚕 (*Bombyx mori*)。多种用于转染的病毒株可公开获得, 例如, 苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV 的 K-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 株, 并且这些病毒可依照本发明用作本文中的病毒, 尤其是用于草地贪夜蛾细胞的转染。棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、西红柿和烟草的植物细胞培养物亦可用作宿主。脊椎动物细胞的实例包括, 哺乳动物宿主细胞系, 如通过 SV40 转化的猴肾 CV1 细胞系 (COS-7, ATCC CRL1651)；人胚肾细胞系 (293 或亚克隆用于在悬浮培养物中生长的 293 细胞, Graham et al., *J.Gen Virol.* 36:59 (1977))；幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL10)；中国仓鼠卵巢细胞/—DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:4216 (1980))；小鼠塞尔托利细胞 (TM4, Mather, *Biol.Reprod.* 23:243-251 (1980))；猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL70)；非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRK-1587)；人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL2)；犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL34)；布法罗大鼠肝细胞 (BRL3A, ATCC CRL1442)；人肺细胞 (W138, ATCC CCL75)；人肝细胞 (Hep G2, HB8065)；小鼠乳腺肿瘤 (MMT060562, ATCC CCL51)；TRI 细胞 (Mather et al., *Annals N.Y.Acad.Sci.* 383:44-68 (1982))；MRC5 细胞；FS4 细胞；和人肝癌细胞系 (Hep G2)。

[0298] 可利用本领域已知的任何合适方法将载体引入宿主细胞中, 所述方法包括但不限于: DEAE-葡聚糖介导的递送、磷酸钙沉淀法、阳离子脂质介导的递送、脂质体介导的转染、

电穿孔法、微粒轰击、受体介导的基因递送、由聚赖氨酸, 组蛋白, 壳聚糖, 和肽介导的递送。用于目的载体表达的细胞转染和转化的标准方法为本领域已知。

[0299] 在某些实施方案中, 宿主细胞包含编码第一多肽的第一载体和编码第二多肽的第二载体。在某些实施方案中, 所述第一载体和所述第二载体可为相同或不同的。在某些实施方案中, 所述第一多肽和所述第二多肽可为相同或不同的。

[0300] 在某些实施方案中, 所述第一载体和所述第二载体可被同时引入或不同时引入。在某些实施方案中, 可将所述第一载体和所述第二载体一同引入宿主细胞中。在某些实施方案中, 可先将所述第一载体引入宿主细胞中, 并接着引入所述第二载体。在某些实施方案中, 可将所述第一载体引入宿主细胞中, 并接着建立表达所述第一多肽的稳定细胞系, 再接着将所述第二载体引入所述稳定的细胞系中。

[0301] 在某些实施方案中, 宿主细胞包含编码第一多肽和第二多肽的载体。在某些实施方案中, 所述第一多肽和所述第二多肽可为相同或不同的。

[0302] 在某些实施方案中, 本公开提供了表达本文提供的多肽的方法, 所述方法包括在表达载体中插入的多核苷酸的条件下, 培养包含所述载体的宿主细胞。

[0303] 多核苷酸表达的合适的条件可包括但不限于: 合适的培养基、培养基中宿主细胞的合适的密度、存在必要的营养物质、存在补充因子、合适的温度和湿度以及不存在微生物污染物。本领域技术人员可视情况选择用于表达目的的合适的条件。

[0304] 在某些实施方案中, 宿主细胞中表达的多肽可形成二聚体, 并由此产生本文提供的MSFP二聚体或多肽复合体。在某些实施方案中, 宿主细胞中表达的多肽可形成同源二聚体的多肽复合体。在某些实施方案中, 如果宿主细胞中表达第一多肽和第二多肽, 则所述第一多肽和所述第二多肽可形式异源二聚体的多肽复合体。

[0305] 在某些实施方案中, 多肽复合体可在宿主细胞中形成。例如, 二聚体可在相关酶和/或辅因子的帮助下在宿主细胞中形成。在某些实施方案中, 多肽复合体可分泌至细胞外。在某些实施方案中, 所述第一多肽和第二多肽可分泌至细胞外并在宿主细胞外形成二聚体。

[0306] 在某些实施方案中, 所述第一多肽和第二多肽可分别表达并允许在合适的条件下二聚化。例如, 可将所述第一多肽和第二多肽在合适的缓冲液中组合并允许第一蛋白单体和第二蛋白单体通过合适的相互作用例如疏水相互作用来二聚化。对于另一个实例, 可将所述第一多肽和第二多肽在包含酶和/或辅因子的合适的缓冲液中组合, 所述酶和/或辅因子可促进所述第一多肽和第二多肽的二聚化。对于另一个实例, 可将所述第一多肽和第二多肽在合适的媒介中组合并允许其在存在合适的试剂和/或催化剂的情况下彼此相互作用。

[0307] 可利用任何合适的方法来收集所表达的多肽和/或多肽复合体。多肽和/或多肽复合体可在细胞内、在细胞周质间隙中表达, 或分泌至细胞外进入培养基中。如果多肽和/或多肽复合体在细胞内表达, 可裂解包含所述多肽和/或所述多肽复合体的宿主细胞, 并可通过离心或超滤去除不想要的碎片来从裂解物中分离所述多肽和/或所述多肽复合体。若所述多肽和/或所述多肽复合体分泌至大肠杆菌的细胞周质间隙, 可在存在诸如醋酸钠 (PH3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的试剂的情况下在约30分钟内将胞浆解冻, 并通过离心除去细胞碎片 (Carter et al., BioTechnology10:163-167 (1992))。若所述多肽和/或所

述多肽复合体分泌至培养基中,可利用市售的蛋白浓缩过滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤装置)收集并浓缩细胞培养物的上清液。在收集和浓缩步骤中可包含蛋白酶抑制剂和/或抗生素以抑制蛋白降解和/或污染微生物的生长。

[0308] 可通过合适的方法来进一步纯化所表达的多肽和/或多肽复合体,所述方法例如包括但不限于:亲和层析法、羟基磷灰石层析法、尺寸排阻层析法、凝胶电泳、透析、在离子交换柱上的离子交换分离法、乙醇沉淀、反相HPLC、硅胶色谱法、肝素琼脂糖色谱法、阴离子或阳离子交换树脂的层析(例如聚天冬氨酸柱)、色谱聚焦法、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀法(参见综述Bonner,P.L.,Protein purification,Taylor&Francis,2007出版;Janson,J.C.,et al,Protein purification:principles,high resolution methods and applications,Wiley-VCH,1998出版)。

[0309] 在某些实施方案中,所述多肽和/或多肽二聚体可通过亲和层析法来纯化。在某些实施方案中,蛋白A层析或蛋白A/G(蛋白A和蛋白G的融合蛋白)层析可用于纯化包含来源于抗体CH2结构域和/或CH3结构域的组分的多肽和/或多肽复合体(Lindmark et al., J.Immunol.Meth.62:1-13(1983));Zettlitt,K.A.,Antibody Engineering,Part V,531-535,2010)。在某些实施方案中,蛋白G层析可用于纯化包含IgG γ 3重链的多肽和/或多肽复合体(Guss et al.,EMBO J.5:15671575(1986))。在某些实施方案中,蛋白L层析可用于纯化包含 κ 轻链的多肽和/或多肽复合体(Sudhir,P.,Antigen engineering protocols,Chapter26,Humana Press,1995出版;Nilson,B.H.K.et al,J.Biol.Chem.,267,2234-2239(1992))。亲和配体连接的基质最常见的是琼脂糖,但可使用其它基质。相比琼脂糖能实现的,机械稳定的基质诸如可控多孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯具有更快的流速和更短的处理时间。如果抗体包含CH3结构域,Bakerbond ABX树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)可用于纯化。

[0310] 在任何初步纯化步骤之后,包含目的抗体和污染物的混合物可采用pH在约2.5-4.5的洗脱缓冲液,进行低pH疏水相互作用层析,优选在低盐浓度(例如约0-0.25M盐)下进行。

[0311] 药物组合物及使用方法

[0312] 本公开提供了包含本文所述的MSFP的组合物及此类组合物在多种治疗设施中的给药。

[0313] 呈纯的形式或处于合适的药物组合物中的本文所述的MSFP的给药,可经由任何可接受的药剂给药方式来进行,用于提供相似的功效。所述药物组合物可通过将MSFP或包含MSFP的组合物与合适的生理上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合,并可配制成呈固体、半固体、液体或气体形式的制剂,例如片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒体、软膏剂、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球和气溶胶。此外,所述组合物中可存在但非必需存在其它的药物活性成分(包括本文其它地方所述的其它抗癌剂)和/或合适的赋形剂例如盐、缓冲剂和稳定剂。给药可通过多种不同的途径(包括口服、肠胃外、鼻内、静脉内、皮内、皮下或局部)来实现。优选的给药方式视治疗或预防的病症的性质而定。给药后,减少、抑制、预防或延迟癌症进程和/或癌症转移的量被认为是有效的。

[0314] 在某些实施方案中,施用量足以导致肿瘤消退,如通过活肿瘤量的统计学显著的下降(例如,肿瘤块减少至少50%)所示,或通过改变(例如,具有统计学显著性的降低)扫描

尺寸所示。在其它实施方案中,施用量足以导致临床医师已知的疾病症状的临床相关的减少。

[0315] 精确的剂量和治疗持续时间是所治疗的疾病的函数,并且可以利用已知的试验方案或通过在本领域中已知的模型系统中测试组合物并从其推断凭经验来确定。也可以进行受控的临床试验。剂量也可以随待缓解的疾病的严重程度而变化。通常配制和给予药物组合物以发挥治疗上有用的效果,同时尽量减少不希望的副作用。所述组合物可以给予一次,或可以被分成许多较小的剂量在一定时间间隔给药。对于任何特定受试对象,具体的剂量方案可根据个体需要随着时间的推移进行调整。

[0316] 含MSFP的组合物可单独给予或与其它已知的癌症治疗,例如放射疗法、化学疗法、移植、免疫疗法、激素疗法、光动力学疗法等联用。所述组合物还可与抗生素联用。

[0317] 因此,给予这些及相关药物组合物的典型途径包括但不限于:口服、局部、透皮、吸入、肠胃外、舌下、口腔、直肠、阴道和鼻内。本文所用术语肠胃外包括皮下注射、静脉内、肌肉内、胸骨内注射或输注技术。依照本发明的某些实施方案的药物组合物如此配制以便在将所述组合物给予患者后,允许其中包含的活性成分为生物可利用的。将给予受试对象或患者的组合物可采用一个或多个剂量单位的形式,例如,其中片剂可为单个剂量单位,而呈气溶胶形式的本文所述的MSFP的容器可容纳多个剂量单位。制备此类剂型的实际方法为本领域技术人员已知或对本领域技术人员而言是显而易见的;例如参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20th Edition(Philadelphia College of Pharmacy and Science,2000)。待给予的组合物,在任何情况下应包含有效量的本公开的MSFP,用于依照本文的教导治疗目的疾病或目的病症。

[0318] 药物组合物可呈固体或液体形式,在一个实施方案中,载体为颗粒,从而使组合物例如呈片剂或粉剂形式。载体可为液体,组合物是例如,口服油、可注射液或气溶胶,其可在例如吸入给药中使用。当预期用于口服给药时,药物组合物优选呈固体或液体形式,其中半固体、半液体、悬浮液和凝胶形式均包括在本文考虑的诸如固体或液体的形式之内。

[0319] 作为用于口服给药的固体组合物,所述药物组合物可配制为粉剂、颗粒剂、压缩片剂、丸剂、胶囊剂、咀嚼胶、薄片等。此类固体组合物通常包含一种或多种惰性稀释剂或可食用载体。另外,可存在一种或多种以下物质:粘合剂如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂如淀粉、乳糖或糊精;崩解剂如藻酸、藻酸钠、羟乙酸钠、玉米淀粉等;润滑剂如硬脂酸镁或Sterotex;助流剂如胶体二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;调味剂如薄荷、水杨酸甲酯或橙调味剂以及着色剂。当药物组合物呈胶囊形式如明胶胶囊时,除以上类型的特质之外其可包含,液态载体如聚乙二醇或油。

[0320] 药物组合物可呈液体形式,例如酏剂、糖浆、溶液、乳液或悬浮液。作为两个实例,液体可用于口服给药或通过注射递送。当预期用于口服给药时,优选的组合物除包含本发明的化合物之外,还包含甜味剂、防腐剂、染料/着色剂和增味剂中的一种或多种。在预期通过注射给药的组合物中,可以包含表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、缓冲液、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0321] 液体药物组合物,无论其是溶液、悬浮液还是其它类似的形式,均可包含一种或多种以下佐剂:无菌稀释剂例如注射用水、盐溶液、优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、不挥发性油如可用作溶剂或悬浮介质的合成的单甘油酯或二甘油酯、聚乙二醇、甘油、丙二

醇或其它溶剂;抗菌剂如苄醇或羟苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调整渗透压的试剂,如氯化钠或葡萄糖。肠胃外制剂可封装于安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。生理盐水是优选的佐剂。可注射药物组合物优选是无菌的。

[0322] 旨在肠胃外给药或口服给药的液体药物组合物应包含这样的量的本文公开的MSFP,该量使得将获得合适的剂量。通常,该量为组合物的至少0.01%。当预期用于口服给药时,该量可为组合物重量的0.1-约70%。某些口服药物组合物包含约4%-约75%的MSFP。在某些实施方案中,制备本发明的药物组合物和制剂致使稀释之前肠胃外剂量单位包含0.01-10%重量比的MSFP。

[0323] 药物组合物可旨在局部给药,在该情况下载体可适合地包括溶液、乳液、软膏或凝胶基质。所述基质例如,可包括以下的一种或多种:凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油,稀释剂如水和醇,以及乳化剂和稳定剂。用于局部给药的药物组合物中可存在增稠剂。若预期用于透皮给药,所述组合物可包含透皮贴剂或离子电渗装置。所述药物组合物可预期用于直肠给药,例如呈栓剂的形式,其将在直肠中融化并释放药物。用于直肠给药的组合物可包含油脂性基质作为合适的无刺激性赋形剂。此类基质包括但不限于:羊毛脂、可可脂和聚乙二醇。

[0324] 药物组合物可包含修改固体或液体剂量单位的物理形式的多种物质。例如,组合物可包含在活性成分周围形成涂层外壳的物质。形成涂层外壳的物质通常是惰性的,并且可选自例如,糖、虫胶和其它的肠溶包衣剂。或者,所述活性成分可包封于明胶胶囊中。呈固体或液体形式的药物组合物可包含能结合本发明的抗体并从而有助于化合物的递送的药剂。可以有这种能力的合适的药剂包括其他的单克隆抗体或多克隆抗体,一种或多种蛋白或脂质体。所述药物组合物可基本上由可作为气溶胶给药的剂量单位组成。术语气溶胶用于表示从胶体性质的系统至由加压包组成的系统的各种系统。递送可以通过液化或压缩气体或通过适当的能分配活性成分的泵系统。气溶胶可以以单相、双相或三相系统递送以递送活性成分。气溶胶的递送包括必要的容器、活化剂、阀、子容器等,其可一同形成试剂盒。本领域技术人员无需过多的实验就可确定优选的气溶胶。

[0325] 药物组合物可通过在制药领域中熟知的方法来制备。例如,旨在通过注射给药的药物组合物可通过以下来制备:将包含本文所述的MSFP的组合物和任选的盐、缓冲剂和/或稳定剂中的一种或多种,以及无菌蒸馏水组合以形成溶液。可加入表面活性剂以促进均匀的溶液或悬浮液的形成。表面活性剂为与MSFP组合物非共价地相互作用,以促进含水递送系统中MSFP组合物的溶解或均匀悬浮的化合物。

[0326] 可以以治疗有效量给予组合物,所述治疗有效量应取决于多种因素,包括应用的特定化合物(例如MSFP)的活性;化合物的代谢稳定性和作用时间;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别及饮食、给药方式和给药时间;排泄速率;药物组合;特定疾病或病症的严重程度;以及受试对象进行治疗的情况。一般而言,治疗有效日剂量(对于70kg的哺乳动物)为约0.001mg/kg(即0.07mg)-约100mg/kg(即7.0g);优选的治疗有效剂量(对于70kg的哺乳动物)为约0.01mg/kg(即0.7mg)-约50mg/kg(即3.5g),更优选的治疗有效剂量(对于70kg的哺乳动物)为约1mg/kg(即70mg)-约25mg/kg(即1.75g)。

[0327] 包含本公开的MSFP的组合物也可与一种或多种其它治疗剂同时给药、在其之前或

之后给药。这样的组合疗法可包括含有本发明的化合物和一种或多种另外的活性药剂的单一药物剂型的给药,以及包含本发明的MSFP的组合物和以其各自独立的药物剂型的每种活性药剂的给药。例如,本文所述的MSFP及其他活性药剂可以以单一口服剂量组合物(如片剂或胶囊剂)一同给予患者,或以单独的口服剂剂型给予每种药剂。类似地,本文所述的MSFP及其他活性药剂可以以单一肠胃外给药组合物(例如盐溶液或其他生理上可接受的溶液)一同给予患者,或者以单独的肠胃外剂型给予每种药剂。如果使用单独的剂型,包含MSFP的组合物及一种或多种另外的活性药剂可基本在同一时间(即同时)给药,或在错开的时间(即,相继和以任何顺序)单独给药;联合治疗应理解为包含所有这些方案。

[0328] 因此,在某些实施方案中,还应考虑的是本公开的MSFP组合物与一种或多种其它治疗剂的联合给药。此类治疗剂可在本领域中被公认为是用于本文所述的特定疾病状态(例如癌症、炎症疾病、异体移植、I型糖尿病和多发性硬化症)的标准治疗。所考虑的示例性的治疗剂包括细胞因子、生长因子、类固醇、NSAID、DWARD、抗炎剂、化疗剂、放疗剂、或其它活性剂和辅助剂。

[0329] 在某些实施方案中,本文公开的MSFP可与多种化疗剂联合给药。化疗剂的实例包括烷化剂类,诸如噻替哌(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide) (CYTOXANTM);烷基磺酸酯类,诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类,诸如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylemelamines),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷西先胺(triethylenethiophosphoramidate)和三轻甲蜜胺(trimethylmelamine);氮芥类,诸如氯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlomaphazine)、环磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamineoxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆留醇(phenesterine)、松龙苯芥(prednimustine)、曲磷胺(trofesfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);硝基脲类,诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lmustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine);抗生素类,诸如阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、氨茴霉素(authramycin)、氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、加利车霉素(calicheamicin)、carabycin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、依达比星(idambicin)、麻西罗霉素(marcellmycin)、丝裂霉素(mitomycin)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(porfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲霉素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物类,诸如甲氨喋呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸(denopterin)、甲

氨噪呤、蝶酰三谷氨酸(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)、5-FU;雄激素类,诸如卡普睾酮(calusterone)、丙酸甲雄烷酮(dromostanolone propionate)、表硫雄醇(epitio stanol)、美雄烧(mepitio stanol)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺类,诸如氨鲁米特(aminoglutethimide)、曼托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,诸如亚叶酸;醋葡内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基酮戊酸(aminolevulinic acid);安吡啶(amsacrine);bestrabucil;比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);defofamine;地美可辛(demecolcine);地吡醌(diaziquone);依洛尼塞(efornithine);依利醋铵(elliptinium acetate);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;轻脉;香燕多糖(Ientinan);氯尼达明(lnidamine);米托胍脲(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);二胺硝吡啶(nitracrine);喷司他丁(pentostatin);蛋氨酸芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基胍;甲基苄胍(procarbazine);PSK.RTM;雷佐生(razoxane);西佐喃(sizofiran);锗螺胺(spirogermanium);细格孢氮杂酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷(arabinoside) ("Ara-C");环磷酰胺(cyclophosphamide);噻替哌;紫杉醇(taxoid),例如帕立他塞(paclitaxel) (TAXOL®), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 和多西他塞(doxetaxel) (TAXOTERE®, Rhoe-Poulenc Rorer, Antony, France);苯丁酸氮芥(chlorambucil);吉西他滨(gemcitabine);6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨喋呤;铂类似物,诸如顺铂和卡铂;长春碱(vinblastine)、铂(platinum);依托泊苷(etoposide) (VP-16);异环磷酰胺(ifosfamide);丝裂霉素C(mitomycinC);米托蒽醌(mitoxantrone);长春新碱(vincristine);长春瑞宾(vinorelbine);诺维本(navelbine);诺安托(novantrone);替尼泊苷(teniposide);柔红霉素(daunomycin);氨基蝶呤;希罗达(xelodd);伊班膦酸盐(ibandronate);CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄酸;埃斯波霉素(esperamicins);卡培他滨(capecitabine)及上述任何物质的药学可接受的盐、酸或衍生物。在此治疗剂中还包括作用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,诸如抗雌激素类,包括例如他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、芳香酶抑制4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛西芬(keoxifene)、奥那司酮(onapristone)、和托瑞米芬(toremifene) (Fareston);和抗雄激素类,诸如氟他米特(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)、和戈舍瑞林(goserelin)及上述任何物质的药学可接受的盐、酸或衍生物。

[0330] 多种其它治疗剂可与本文所述的MSFP一同使用。在一个实施方案中,所述MSFP与抗炎剂一起给药。抗炎剂或抗炎药包括但不限于,类固醇和糖皮质激素(包括倍他米松、布地奈德、地塞米松、醋酸氢化可的松、氢化可的松、氢化可的松、甲泼尼龙、泼尼松龙、泼尼

松、曲安西龙)、非甾体抗炎药(NSAIDS),包括阿司匹林、布洛芬、萘普生、甲氨蝶呤、柳氮磺胺吡啶、来氟米特、抗TNF药物、环磷酰胺和麦考酚酸。

[0331] 包含本文所述的MSFP的组合物可给予患有本文所述的疾病的个体,所述疾病包括但不限于癌症和自身免疫性疾病和炎症性疾病。为了在体内用于治疗人类疾病,通常在给药前将本文所述的MSFP掺入药物组合物。药物组合物包含本文所述的一种或多种MSFP以及本文其它地方所述的生理上可接受的载体或赋形剂。为了制备药物组合物,将有效量的一种或多种MSFP与本领域技术人员已知的适于特定给药方式的任何药物载体或赋形剂混合。药物载体可以是液体、半液体或固体。用于肠胃外、皮内、皮下或局部应用的溶液或悬浮液可包含,例如无菌稀释剂(例如水)、盐溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗微生物剂(如苄醇、甲基对羟基苯甲酸酯、苯酚或甲酚、汞、氯丁醇、甲基和丙基对羟基苯甲酸酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苄索氯铵);抗氧化剂(如抗坏血酸和亚硫酸氢钠、甲硫氨酸、硫代硫酸钠、铂、过氧化氢酶、柠檬酸、半胱氨酸、硫代甘油、巯基乙酸、硫代山梨醇、丁基羟基茴香醚、丁基羟基甲苯,和/或没食子酸丙酯)和螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA));缓冲剂(如乙酸盐,柠檬酸盐和磷酸盐)。若静脉内给药,合适的载体包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)以及含增稠剂和增溶剂例如葡萄糖、聚乙二醇、聚丙二醇及其混合物的溶液。

[0332] 包含本文描述的MSFP的组合物可用保护MSFP免受体内快速清除的载体(如缓释制剂或包衣)制备。此类载体包括:控释制剂,例如但不限于,植入物和微囊化递送系统,以及生物可降解的、生物相容的聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、聚原酸酯、聚乳酸和本领域技术人员已知的其他物质。

[0333] 本发明的MSFP可用于治疗多种癌症。例如,本发明的一个实施方案提供了用于治疗癌症的方法,包括给予癌症患者治疗有效量的本文所述的MSFP:所述癌症包括但不限于以下的癌症的治疗:黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、白血病、浆细胞瘤、肉瘤、神经胶质瘤、胸腺瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肾细胞癌、子宫癌、胰腺癌、食道癌、脑癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、睾丸癌、胃癌、食道癌、多发性骨髓瘤、肝细胞瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性髓性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)或其它癌症。在给药后以统计学上显著的方式抑制、预防或延迟癌症进程和/或癌症转移的量(即相对于本领域技术人员已知的合适对照)被认为是有效的。

[0334] 另一个实施方案提供了用于预防癌症转移的方法,包括给予癌症患者治疗有效量的本文所述的MSFP(例如在给药后以统计学上显著的方式(即相对于本领域技术人员已知的合适对照)抑制、预防或延迟癌症转移的量):所述癌症包括但不限于黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、白血病、浆细胞瘤、肉瘤、神经胶质瘤、胸腺瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肾细胞癌、子宫癌、胰腺癌、食道癌、脑癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、睾丸癌、胃癌、食道癌、多发性骨髓瘤、肝细胞瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性髓性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)或其它癌症。

[0335] 另一个实施方案提供了用于预防癌症的方法,包括给予癌症患者治疗有效量的本文所述的MSFP:所述癌症包括但不限于黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、白血病、浆细胞瘤、肉瘤、神经胶质瘤、胸腺瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肾细胞癌、子宫癌、胰腺癌、食道癌、脑癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、睾丸癌、胃癌、食道癌、多发性骨髓瘤、肝细胞瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性髓性白血病(CML)、慢性淋巴细

胞白血病 (CLL) 或其它癌症。

[0336] 另一个实施方案提供了用于治疗、抑制以下疾病的进程或用于预防以下疾病的方法,包括给予患有这些疾病中的一种或多种的患者治疗有效量的本文所述的MSFP:黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、白血病、浆细胞瘤、肉瘤、神经胶质瘤、胸腺瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肾细胞癌、子宫癌、胰腺癌、食道癌、脑癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、睾丸癌、胃癌、食道癌、多发性骨髓瘤、肝细胞瘤、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、急性髓性白血病 (AML)、慢性髓性白血病 (CML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 或其它癌症。

[0337] 在一个方面,本公开提供了指导T细胞活化的方法,所述方法包括给予有所需要的患者有效量的MSFP,所述MSFP包含能特异性结合TCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 或以上的组合的Fab以及融合部分,所述融合部分包含能特异性结合不同靶标(例如肿瘤特异性抗原或在需要T细胞活化的部位或细胞处所选的其它抗原)的结合结构域。

实施例

[0338] 实施例1:人源化抗CD3抗体的产生

[0339] 通过以下步骤从已建立的抗-CD3杂交瘤中克隆出重链和轻链抗体基因:1) 从杂交瘤细胞中提取出总RNA,2) 杂交瘤总RNA的逆转录(RT)和3) 利用特异性抗体基因引物对HC和LC进行PCR扩增。RT PCR用M-MuLV逆转录酶(New England Biolabs)与寡-dT₁₆引物在37°C下进行2小时。抗体重链和轻链基因用以下引物对从寡-dT₁₆引发的第一链cDNA PCR扩增出来:HC5':GAG ACA GAATTC GCCACC ATG GTG TTG GGG CTG AAG TG (SEQ ID NO:103),HC3':GAG ACA GCGGCCGC CTA TTT ACC AGG GGA GCG AGA C (SEQ ID NO:104)和LC5':GAG ACA GAATTC GCCACC ATG GCC TGG ATT TCA CTT ATA C (SEQ ID NO:105),LC3':GAG ACA GCGGCCGC TCA GGA ACA GTC AGC ACG GGA C (SEQ ID NO:106)。5'引物被设计成与抗体分泌信号退火,并且3'引物被设计成与小鼠抗体恒定区的3'端退火。洗涤PCR产物并用EcoRI和NotI进行限制性消化,并接着将其克隆至pcDNA3.3载体上用于DNA序列测定和IgG在293F瞬时哺乳动物系统中的重组表达。克隆的抗CD3抗体被称为1F3。1F3VHCDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列提供于SEQ ID NO:23-25中。1F3VLCDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列提供于SEQ ID NO:26-28中。

[0340] 常规CDR移植技术用于1F3小鼠抗体的人源化。具体而言,将小鼠1F3的氨基酸序列与人种系序列(VBASE2, www.vbase2.org)进行比对。小鼠1F3VH与人种系区段子类3(VH3)有最佳匹配。两个代表性的种系区段,即VH3-23和VH3-73被选择作为移植小鼠1F3CDR的受体。VH3-23已知是人抗体中存在的最常见的V结构域,并且其有相对高的稳定性。VH3-73具有最相似的HCDR2序列,表明相似的HCDR2结构和构象。对于VL,最佳匹配的人种系VL λ 7A被选择作为小鼠1F3轻链CDR的受体。通过gblock技术(整合DNA技术)合成用于初始人源化构建体的基因。初始人源化构建体中氨基酸的其它变异用基于寡核苷酸的定点诱变(Stratagene)来生成。

[0341] 下表1总结了所产生的各种重链可变区和轻链可变区的核苷酸序列和氨基酸序列。

[0342] 表1:1F3和变体序列

[0343]

构建体名称	核苷酸 SEQ ID	氨基酸 SEQ ID
	NO	NO
mu-1F3 VHCDR1		23
mu-1F3 VHCDR2		24
mu-1F3 VHCDR3		25
mu-1F3 VLCDR1		26
mu-1F3 VLCDR2		27

[0344]

构建体名称	核苷酸 SEQ ID NO	氨基酸 SEQ ID NO
mu-1F3 VLCDR3		28
hu-1F3-IgGHC	29	30
hu-1F3LC	31	32
hu-1F3-1VH	33	34
hu-1F3-1Fd	35	36
hu-1F3-2VH	37	38
hu-1F3-2Fd	39	40
hu-1F3-3VH	41	42
hu-1F3-3Fd	43	44
hu-1F3-4VH	45	46
hu-1F3-4Fd	47	48
hu-1F3-5VH	49	50
hu-1F3-5Fd	51	52
hu-1F3-11VH	53	54
hu-1F3-1VL	55	56
hu-1F3-2VL	57	58
hu-1F3-2LC	59	60
hu-1F3-3VL	61	62
hu-1F3-3LC	63	64
hu-1F3-4VL	65	66
hu-1F3-4LC	67	68
hu-1F3-5VL	69	70
hu-1F3-5LC	71	72
OKT3Fd	73	74
OKT3LC	75	76

[0345] 如下表2总结了利用不同的人源化1F3VL和VH对产生的多种人源化抗体/Fab。

[0346] 表2: hu-1F3IgG和Fab变体

[0347]

人源化 VH	人源化 VL	
	hu-1F3-1VL	hu-1F3-2VL
hu-1F3-1VH	hu-1F3.1, hu-1F3 IgG	hu-1F3.6
hu-1F3-2VH	hu-1F3.2	hu-1F3.7
hu-1F3-3VH	hu-1F3.3	hu-1F3.8
hu-1F3-4VH	hu-1F3.4	hu-1F3.9
hu-1F3-5VH	hu-1F3.5	hu-1F3.10
hu-1F3-11VH		

[0348] 实施例2:肿瘤抗原EPCAM蛋白的产生

[0349] 人和猕猴EpCAM(上皮细胞粘附分子)的胞外结构域对应的基因用含限制性位点的引物(SEQ ID NO:107:N-端引物:GCGTAT CCATGG ATG GCG CCC CCG CAG GTC,SEQ ID NO:108;C-端引物:GCGTAT GCGGCCGC TTT TAG ACC CTG CAT TGA G),用Phusion聚合酶(New England Biolabs)(98℃,1分钟;98℃,15秒;50℃,20秒和72℃,20秒的30个循环;72℃,5分钟)从人和猴cDNA文库中PCR扩增出来。洗涤后的PCR产物(Fermentas life sciences)被限制性消化(NcoI和NotI)并克隆至pcDNA3.3载体的人Fc基因的N端。人EpCAM的ECD and 全长多核苷酸序列提供于SEQ ID NO:1和5中;编码的氨基酸序列提供于SEQ ID NO:2和6中。猕猴EpCAM的ECD and 全长多核苷酸序列提供于SEQ ID NO:3和7中;编码的氨基酸序列提供于SEQ ID NO:4和8中。还产生了人和猕猴的CD3εECD.Fc杆状结构突变体序列并分别提供于SEQ ID NOs:9和11(多核苷酸)以及10和12(氨基酸)中。产生了人和猕猴CD3εECD.Fc臼状结构突变体序列,并分别提供在SEQ ID NOs:13和15(多核苷酸)以及SEQ ID NOs:14和16(氨基酸)中。正如本领域已知的,所述杆状结构突变和全突变可用于形成异源二聚化(参见例如 Ridgeway et al.(1996),protein Engineering9:617-621)。

[0350] 实施例3:用人ScFv噬菌体展示生成抗EpCAM的抗体

[0351] 一般方案参见噬菌体展示技术-实验室手册(Eds Carlos F.Barbas III;Dennis R.Burton;Jamie K.Scott;Gregg J.Silverman,2001Cold Spring Harbor Laboratory Press)。天然人scFv噬菌体展示文库用于EpCAM特异性抗体的分离(Viva Biotech, Shanghai,China)。应用以下步骤用于第一轮噬菌体选择:1)将50μL人天然ScFv文库用500μl 13%脱脂干奶粉/PBS(MPBS)封闭;2)将奶粉封闭的噬菌体用预包被了5μg/ml Fc的免疫管在室温下孵育30分钟,重复2次;3)以500μg/ml的终浓度将Fc蛋白加入以上倒空的噬菌体中并在室温下孵育以进一步捕获展示抗-Fc ScFv的噬菌体;4)将以上噬菌体溶液与包被了huEpCAM.Fc的免疫管(用5μg/ml的浓度包被并用MPBS封闭)在室温下孵育1小时;5)将管用PBST(含0.1%Tween-20的PBS)洗涤3次并接着用PBS洗涤3次;6)将结合的噬菌体用500μl新鲜制备的100mM三乙胺溶液在室温下洗脱10分钟;7)将洗脱下来的噬菌体用于感染5ml中对数期TG1细胞,在37℃下静置30分钟,并在200rpm下振荡30分钟;8)将再次感染了洗脱的噬

菌体的TG1细胞在30℃下,在补充了4%葡萄糖和100μg/ml氨苄青霉素的2xYT琼脂大方形Nunc板上生长过夜;9)将生长过夜的TG1细胞从平板上刮下并接种于25ml的2xYT培养基(添加了100μg/ml氨苄青霉素和2%葡萄糖并在37℃下生长至OD600);10)将辅助噬菌体K07加入TG1培养物中以挽救噬菌体(在37℃下30分钟静置,30分钟振荡);11)将超感染的TG1细胞轻轻沉淀并重新悬浮于补充了100μg/ml氨苄青霉素和100μg/ml卡那霉素的2xYT培养基中,在37℃下振荡过夜;12)将过夜培养物离心并将1/5体积的20%PEG8000加入含噬菌体的澄清上清液中并在室温下孵育30分钟;13)将沉淀的噬菌体在50ml锥形管中以3000rpm离心沉淀,持续20分钟;14)沉淀噬菌体重新悬浮于PBS缓冲液中并准备用于下一轮的选择。

[0352] 第2轮选择在cynoEpCAM.Fc上用上述相同的步骤完成。将从第2轮选择洗脱的噬菌体再次引入TG1细胞中并在2×YT(100μg/ml的氨苄青霉素和2%葡萄糖)平板上涂板用于产生单菌落。将单个菌落挑入96孔板中,并进行两个板作为样品的样板。用上述类似的步骤并调整为更小的体积来培养96孔板中的单克隆噬菌体。清除的噬菌体上清液(通过将96孔板在3000rpm下离心5分钟来清除)用于人和猕猴EpCAM.Fc抗原的ELISA结合测定,使用以下步骤:1)将噬菌体溶液以1:5稀释于5%MPBS中,在室温温育1小时;2)将噬菌体MPBS溶液转移至预包被了人EpCAM.Fc或猕猴EpCAM.Fc并用MPBS封闭的96孔Maxisorp板;3)将平板在室温下孵育1小时并接着用PBST洗涤3次;4)将100μl的1/1000稀释的抗M13/HRP缀合物加入平板中并在室温下孵育1小时;5)用PBST洗涤3次,之后将100μl TMB过氧化物酶底物溶液加入平板中并在避光条件下孵育20分钟;6)将50μl 0.25M硫酸加入平板上的各孔中以终止底物显色;7)在酶标仪上于450nm处读取吸光度。EpCAM阳性结合物是用来自样板的大肠杆菌储存液测序的DNA。

[0353] 实施例4:全人抗EPCAM抗体的优化

[0354] 用gblock技术(整合DNA技术)合成了抗EpCAM抗体的VH基因和VL基因。V基因gblock与那些分离形式的噬菌体展示技术相同或包含被设计用于提高V基因产物的表达和/或稳定性的突变。突变的设计主要是基于与最佳匹配的种系序列或种系的共有序列(VBASE2www.vbase2.org)的序列比较或者通过检查同源V结构域结构。VH和VL gblock利用PCR方法组装成scFv形式。例如,EpCAM1.1包含EpCAM1.0中“HVI”至“QSV”的VL残基1-3(Kabat编号,Kabat et al.(1991),sequences of proteins of immunological interest,5th edition)的氨基酸改变。后者根据人种系序列(VBASE2,www.vbase2.org)是常见的。相对于EpCAM1.1,EpCAM1.2包含在VH的第1、5、6位和在VL的第39位的突变。相对于母体克隆,EpCAM2.2包含在VH的第5、6、13、40、76、77、81、82位和在VL的第2、8、39、58位的多个突变(Kabat编号)。抗EpCAM抗体核苷酸和氨基酸序列总结于下表3中。

[0355] 表3:抗EpCAM抗体构建

[0356]

构建体名称	核苷酸 SEQ ID NO	氨基酸 SEQ ID NO
EpCAM1.1scFv	77	78
EpCAM1.1-OKT3Fd	79	80
EpCAM1.1-OKT3LC	81	82
EpCAM1.1-hu-1F3.1Fd	83	84
EpCAM1.1-hu-1F3.1LC	85	86
EpCAM1.2scFv	87	88
EpCAM1.2-hu-1F3Fd	89	90
EpCAM1.2-hu-1F3.1LC	91	92
EpCAM2.2scFv	93	94
EpCAM2.2-hu-1F3Fd	95	96
EpCAM2.2-hu-1F3.1LC	97	98
EpCAM2.2-Δ-hu-1F3.1Fd*	99	100
EpCAM2.2-Δ-hu-1F3.1LC*	101	102
EpCAM1.1 VHCDR1		139
EpCAM1.1 VHCDR2		140
EpCAM1.1 VHCDR3		141
EpCAM1.1 VLCDR1		142
EpCAM1.1 VLCDR2		143
EpCAM1.1 VLCDR3		144
EpCAM1.2 VHCDR1		139
EpCAM1.2 VHCDR2		140
EpCAM1.2 VHCDR3		141
EpCAM1.2 VLCDR1		142
EpCAM1.2 VLCDR2		143

[0357]

构建体名称	核苷酸 SEQ ID NO	氨基酸 SEQ ID NO
EpCAM1.2 VLCDR3		144
EpCAM2.2 VHCDR1		145
EpCAM2.2 VHCDR2		146
EpCAM2.2 VHCDR3		147
EpCAM2.2 VLCDR1		148
EpCAM2.2 VLCDR2		149
EpCAM2.2 VLCDR3		150

[0358] * Δ 表示无接头

[0359] 利用如以下总结的抗EpCAM和hu-1F3.1构建体来产生多种MSFP蛋白。以下总结的scFv是指抗-EpCAM的scFv。将His-标签与各Fab的Fd链的C端连接并且其没有在图解中显示。

- [0360] • scFv-D (H) -hu-1F3.1Fab
- [0361] -scFv-hu-1F3.1VH-CH1
- [0362] -hu-1F3.1-LC
- [0363] scFv- (H) -hu-1F3.1Fab
- [0364] -scFv-GlyArgAla-hu-1F3.1VH-CH1
- [0365] -hu-1F3.1-LC
- [0366] scFv-D (L) -hu-1F3.1Fab
- [0367] -hu-1F3.1VH-CH1
- [0368] -scFv-hu-1F3.1-LC
- [0369] scFv- (L) -hu-1F3.1Fab
- [0370] -hu-1F3.1VH-CH1
- [0371] -scFv-GlyArgAla-hu-1F3.1-LC
- [0372] scFv-D (H+L) -hu-1F3.1Fab
- [0373] -scFv-hu-1F3.1VH-CH1
- [0374] -scFvhu-1F3.1-LC
- [0375] scFv- (H+L) -hu-1F3.1Fab
- [0376] -scFv-GlyArgAla-hu-1F3.1VH-CH1
- [0377] -scFv-GlyArgAla-hu-1F3.1-LC

[0378] 实施例5: 重组IgG、Fc融合蛋白、Fab和Fab融合蛋白的表达和纯化

[0379] 在采用pcDNA和HEK293F悬浮细胞 (Invitrogen) 的瞬时哺乳动物表达系统中表达Fab融合蛋白。将表达构建体转染至HEK293F细胞 (Invitrogen) 中, 加入含预制DNA和25kD的聚乙烯亚胺 (PEI) 复合物 (DNA与线性25kD PEI为1:3的重量比) 的1/10细胞培养物体积的F-

17合成培养基 (Invitrogen)。转染后24小时,为在振荡的5%湿度的CO₂培养箱中生长的转染细胞提供25ml的20%TN1 (Organotechnie SA, France)。通常在转染5天后收获培养上清液,并用蛋白A (用于人IgG和Fc蛋白)、蛋白G (用于小鼠IgG) 或HisTrap柱 (带his标签的Fab和带his标签的Fab融合蛋白) (GE Healthcare) 的亲合层析来纯化蛋白。在用10KD分子量截留旋管来进行缓冲液交换之后,将蛋白贮存于4℃的PBS缓冲液中。蛋白通常用4-20%的SDS-PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳, NOVEX微型凝胶) 根据非还原和/或还原条件下 (5%巯基乙醇) 来进行分析。

[0380] 实施例6: 小鼠1F3和人源化1F3IgG以及CD3 ϵ 结合Fab相关的蛋白

[0381] 免疫印迹、ELISA和流式细胞术分析用于研究小鼠和人1F3抗体与Fab的结合。具体而言,在含5%巯基乙醇的SDS-PAGE样品缓冲液中制备以下四种蛋白样品 (样品1. 人CD3 ϵ / δ .Fc (K-H); 2. 猕猴CD3 ϵ / δ .Fc (K-H); 3). 人CD3 ϵ AA1-27.Fc, 和4) 对照肽Fc融合蛋白 (CD3 ϵ AA1-27.Fc的前16个残基的反向氨基酸序列。Fc (K-H) 表示“杵-臼”Fc突变体 (Ridgeway et al. (1996), protein Engineering9:617-621)。将每种样品的100ng蛋白上样于4-20%tris-甘氨酸凝胶 (NOVEX) 各泳道中,并将样品在1xSDS运行缓冲液 (25mM Tris, 192mM甘氨酸, 0.1%SDS, pH8.3) 中在125V下运行1小时。用NOVEX转移单元,将蛋白条带在含20%甲醇的1xSDS运行缓冲液中,转移至硝酸纤维素 (NC) 膜上。NC膜用含5%干奶粉的TBS-T封闭,之后用1 μ g/ml生物素化的小鼠1F3IgG或与生物素化的1F3IgG在室温下孵育1小时。在经过3次每次5分钟的洗涤之后,将膜用1:3000稀释的链霉亲和素-HRP缀合物孵育1小时。在经过3次每次10分钟的洗涤之后,将膜用ECL试剂显色并将信号暴露于柯达胶片。

[0382] 如图9所示,小鼠1F3IgG和人源化版本的1F3以非常类似的方式识别该组抗原。具体而言,1) 小鼠1F3和hu-1F3IgG两者均能结合变性的人CD3 ϵ / δ 和猕猴CD3 ϵ / δ ; 2) 两种抗体均能结合变性的包含对应于CD3 ϵ (SEQ ID NO:18) 的N端氨基酸1-27的肽序列的Fc融合蛋白; 以及3) 小鼠1F3和hu-1F3IgG均不结合带有对照肽 (SEQ ID NO:20) 的Fc融合蛋白。来自该实验的结果有力地表明,1F3是对是特异性的并且表位位于 ϵ 亚基的N端部分之内。流式细胞术分析还表明,人和小鼠1F3抗体在人PBMC上具有相似的结合模式 (参见图10)。值得注意的是,观察到低荧光细胞群中MFI的小位移。众所周知的是相对于人Fc,小鼠Fc对人Fc γ 受体的结合大大降低。因此,图10所示的结果表明hu-1F3IgG中的人Fc结合PBMC制备物中该免疫细胞群 (非T细胞) 上的Fc γ 受体并造成了小MFI位移。

[0383] 将Maxisorp板用于ELISA结合测定。在4℃下将50 μ l含1 μ g/ml抗原的50mM NaHCO₃用于包被该板过夜,然后用200 μ l 5%干奶粉/TBS-0.05% tween20 (MTBS-T) /孔孵育板。通常将抗体稀释于5%MTBS-T中,转移至包被了抗原的板并在室温下轻轻振荡温育1小时。结合的抗体通过链霉亲和素-HRP (用于检测生物素化的抗体) 或抗his标签-HRP缀合物 (对带his标签的抗体) 来检测。含ABTS溶液的50mM柠檬酸盐缓冲液与利用酶标仪 (Biotek) 的OD405测量用来检测。

[0384] 图11显示了生物素化小鼠抗CD3抗体1F3和生物素化的hu-1F3IgG的结合活性。这两种抗体证明了对人CD3 ϵ / δ “杵-臼 (knob and hole)”Fc异源二聚体 (Ridgeway et al. (1996), protein Engineering9:617-621)、猕猴CD3 ϵ / δ “杵-臼”Fc异源二聚体和人CD3 ϵ N端肽 (AA1-27) Fc融合蛋白的阳性结合的非常相似的模式。

[0385] 图13显示了与图11中所述的同一组抗原的结合,其通过用抗his标签/HRP缀合物

和ABTS底物检测了10种代表性的人源化Fab蛋白。观察到hu-1F3.1、hu-1F3.2、hu-1F3.3和hu-1F3.5至hu-1F3.10Fab的剂量依赖性结合。hu-1F3.4Fab结合是非常低的,即使在测试的浓度范围(5-8,000pM)内。注意到相比IgG,Fab与所有三种抗原结合的略低的亲和力(图11)。Fab的单价结合可解释与hu-1F3全长IgG的结合相比较低的结合亲和力(图11)。

[0386] 测试了10种代表性人源化Fab蛋白中的5种(hu-1F3.1-hu-1F3.5)能结合表达CD3的Jurkat人T细胞系。如图12所示,人源化1F3的Fab能结合Jurkat细胞。

[0387] 实施例7:EPCAM X CD3 ϵ 双特异性Fab融合蛋白的表征

[0388] 流式细胞术分析和ELISA用于表征EpCAM X CD3Fab融合蛋白。详细的材料和方法在本实施例的结尾处进行了描述。

[0389] 如图14所示,利用FACS,EpCAM X CD3Fab融合蛋白(MSFP)结合表达人CD3的Jurkat细胞。在该实验中,与Jurkat细胞结合的生物素化的Fab和Fab融合蛋白通过链霉亲和素-PE缀合物进行检测。OKT3Fab显示了对Jurkat细胞上CD3的结合,但抗EpCAM scFv与单独的LC或HC和LC两者的融合完全消除了OKT3Fab部分的CD3结合能力。人源化抗CD3抗体Fab即hu-1F3能结合Jurkat细胞上的CD3。与OKT3Fab融合蛋白相反,与hu-1F3LC N端融合的抗EpCAM scFv保留了与hu-1F3Fab相似水平的结合活性。抗EpCAM scFv与hu-1F3Fab的LC和HC的同时融合也显示出了对Jurkat细胞上CD3的阳性结合,虽然处于降低的水平。

[0390] 图15显示了如FACS所示的EpCAM x CD3MSFP与人PBMC的结合。与Jurkat细胞结合的生物素化的Fab和Fab融合蛋白通过链霉亲和素-PE缀合物来检测。图A显示了与表达CD3的PBMC(T细胞)结合的OKT3Fab;抗EpCAM scFv与HC和LC二者融合完全消除了OKT3Fab部分的CD3结合能力。图B显示了人源化抗CD3抗体Fab即hu-1F3.1能结合PBMC制备物中T细胞上的CD3;与OKT3Fab融合蛋白不同,与Fab的LC和HC同时融合的抗EpCAM x hu-1F3.1Fab显示出对Jurkat细胞上CD3的阳性结合并且结合水平处于降低的水平。

[0391] 如图16所示,ELISA结合测定表明:OKT3Fab和EpCAM1.1x OKT3双特异性Fab融合蛋白对重组猕猴CD3 ϵ / δ 异源二聚体Fc蛋白没有结合活性;以及OKT3Fab和双特异性融合蛋白对重组人CD3 ϵ N端肽(aa1-27.Fc融合蛋白)没有结合活性。预期的是OKT3并不结合猴CD3或人CD3 ϵ 的N端。Fab和Fab融合蛋白是生物素化的,并且与96孔板上固定的抗原结合的生物素化抗体利用链霉亲和素-HRP缀合物以及随后的ABTS底物来检测。

[0392] 图17显示了ELISA结合的结果,其表明hu-1F3Fab和EpCAM1.1x HU-1F3.1双特异性Fab融合蛋白(MSFP;Fabe)能结合重组猕猴CD3 ϵ / δ 异源二聚体Fc蛋白(图A)和重组人CD3 ϵ N端肽(aa1-27.Fc融合蛋白)(图B)。Fab和Fab融合蛋白是生物素化的,并且与96孔板上固定的抗原结合的生物素化抗体利用链霉亲和素-HRP缀合物以及随后的ABTS底物来检测。

[0393] 如图18所示,ELISA结合测定表明hu-1F3Fab和EpCAM1.1x HU-1F3.1MSFP能结合重组猕猴CD3 ϵ / δ 异源二聚体Fc蛋白(图A)和重组人CD3 ϵ N端肽(aa1-27.Fc融合蛋白)(图B)。Fab和Fab融合蛋白是生物素化的,并且与96孔板上固定的抗原结合的标记的融合蛋白利用链霉亲和素-HRP缀合物以及随后的ABTS底物来检测。

[0394] 如图19所示,ELISA结合测定表明hu-1F3Fab和EpCAM1.1x HU-1F3.1MSFP能结合重组猕猴CD3 ϵ / δ 异源二聚体Fc蛋白(图A)和重组人CD3 ϵ N端肽(aa1-27.Fc融合蛋白)(图B)。Fab和Fab融合蛋白是生物素化的,并且与96孔板上固定的抗原结合的生物素标记的融合蛋白利用链霉亲和素-HRP缀合物以及随后的ABTS底物来检测。

[0395] 如图20所示,流式细胞术分析显示EpCAM x CD3MSFP能结合在细胞表面上稳定表达全长人EpCAM靶标的CHO细胞。抗CD3Fab与相同的CHO细胞没有显现出结合。

[0396] 材料与方法:流式细胞术分析(荧光激活细胞分选;FACS)用于表征基于IF3的Fab融合蛋白(在此也被称为Fabe;Fab融合蛋白也通常被称为MSFP)的细胞结合。一般而言,在4℃下将细胞于1%BSA/PBS中封闭1小时,并将稀释于1%BSA/PBS中的目的抗体添加至封闭的细胞,在4℃下孵育1小时。用1%BSA/PBS洗涤一次后,染色步骤视可用的抗体或荧光抗体缀合物而有所不同。在某些情况下,使用直接的荧光缀合物。在其它情况下,抗亲和标签抗体(二抗)用于与细胞孵育随后使用缀合有特定荧光团的抗种类抗体。在一些其他的实验中,带有荧光缀合物的抗体(或其它亲和试剂如链霉亲和素)直接用作二抗(第二试剂)。在图10、14、16、17、20A和20B中,用生物素化的抗体孵育细胞,而在图12、15、18、19以及20C和20D中,用带his6标签的抗体孵育细胞并随后用抗his标签的抗体并通过抗小鼠-PE缀合物进行最终的检测。

[0397] 实施例8:EpCAM X CD3双特异性Fab融合蛋白重新定向T细胞介导的细胞杀伤活性

[0398] 细胞杀伤测定用于测试pCAM X CD3双特异性Fab融合蛋白重新定向T细胞介导的杀死靶细胞的能力。

[0399] 如图21所示,基于FACS的测定(在实施例结尾处详细描述)证明了EpCAM x CD3双特异性Fab融合蛋白以肿瘤靶标依赖方式重新定向T细胞介导的靶细胞杀伤活性。在该测定中,靶细胞(在细胞表面上稳定表达人EpCAM-FL的CHO细胞(图21,图A、B、D)和对照细胞(仅CHO,图21图C)在测定前用PKH-26荧光染料标记。TP3(Invitrogen)用于在测定完成时确定死细胞。在该测定中,死的靶细胞从右上象限的计数确定,而活的靶细胞从左上象限确定。未用PBMC和双特异性抗体孵育(持续20小时)的表达EpCAM的细胞显示出PKH-26标记的群中有约1.4%的死细胞(TP3阳性)(图21,A组);用PBMC但无双特异性抗体孵育(持续20小时)的表达EpCAM的CHO细胞显示出在PKH-26标记的群中有约14%的死细胞(图21,B组);用PBMC和双特异性抗体孵育(持续20小时)的不表达EpCAM的CHO细胞有约14%的死细胞(图21图C);以及用PBMC和示例性的双特异性Fab融合蛋白孵育(持续20小时)的表达EpCAM的CHO细胞有约64%死细胞计数(图21图D)。

[0400] 图22绘出了以上的图21的图D所述的多种浓度的EpCAM X CD3双特异性Fab融合蛋白的杀伤数据。OKT3Fab和融合蛋白缺乏明显的重新定向的细胞裂解活性(图22,A组);EpCAM1.1x hu-1F3.1MSFP具有高水平活性,并且该活性水平即使在60pM融合蛋白浓度时仍保持很高,而hu-1F3.1Fab对靶细胞没有活性(图22,图B);通过EpCAM1.2x hu-1F3.1MSFP检测剂量依赖性活性(图22,图C);以及检测EpCAM2.2scFv与hu-1F3.1Fab单融合的剂量依赖性细胞裂解活性(图22,图D)。对于EpCAM2.2scFv和hu-1F3.1Fab的HC和LC两者的双融合而言,观察到50%细胞群的最大杀伤,并且当其浓度低至60pM时,其活性水平仍保持很高(约40%)。杀伤活性百分比通过从样品测定中死细胞百分比减去对照测定中的死细胞百分比(EpCAM-CHO+PBMC)来计算。

[0401] 图23显示了EpCAM2.2-(H+L)-hu-1F3.1MSFP的T细胞活化是肿瘤靶向依赖性的。图A)在存在不表达EpCAM的CHO的情况下,用EpCAM2.2-(H+L)-hu-1F3.1(30nM)孵育的PBMC,通过FACS测定检测CD69表达所测量的,导致了基础水平的T细胞活化。图B)在存在不表达EpCAM的CHO的情况下,用EpCAM2.2-(H+L)-hu-1F3.1(30nM,16小时)孵育的PBMC,通过FACS

测定检测CD69表达所测量的,导致了显著增加的T细胞活化。

[0402] 材料与方法:在测定前将靶细胞用PKH-26 (Sigma) 染料 (Sigma) (在FL2中检测信号) 标记,并通过加入TO-PRO-3 (TP3) 染料 (Invitrogen) (在FL4中检测信号) 来鉴定测定中被杀死的靶细胞。靶细胞的PKH-26标记依照生产商的说明书来进行。具体而言,将用无血清完全培养基洗涤的 2×10^6 个靶细胞重新悬浮于0.5ml的稀释液C (在产品试剂盒中提供) 中。将2 μ l的1mM PKH-26染料也稀释于0.5ml的稀释液C中。接着将稀释的染料加入靶细胞制备物中并在室温下孵育5分钟。将2ml胎牛血清加入混合物中并孵育2分钟以终止标记反应。将标记的细胞用完全培养基洗涤三次并重新悬浮于完全培养基中备用。对标记的细胞进行计数并检查活力。对于细胞杀伤测定,取100 μ l含靶细胞和PBMC混合物的完全培养基加入FACS管中,接着加入100 μ l含抗体溶液的完全细胞培养基并在CO₂培养箱中孵育20小时。在测定结束时,在FACScalibur流式细胞仪上进行FACS测定之前取5 μ l 10 μ m TO-PRO-3 (TP3) 加入细胞中。PKH-26标记的细胞位于2-3rd log区域 (FL2)。FL2信号大于log20的细胞被认为是靶细胞。FL4信号 (TP3) 大于log30的细胞被认为是死细胞。杀死的靶细胞从右上象限进行计数而活的靶细胞从左上象限进行计数 (参见图21)。每种样品共收集共5000个靶细胞事件。细胞裂解活性,细胞裂解活性通过以下计算:将样品测定的死细胞计数 (表达EpCAM的靶细胞+PBMC+抗体药物) 减去对照测定中的死细胞计数 (表达EpCAM的靶细胞+PBMC) 并除以5000的总靶细胞计数。细胞裂解活性的百分比通过将以上活性乘以100计算而来。

[0403] 综上所述,上述实施例表明,本公开的包含1F3抗CD3Fab的MSFP,仅在存在合适的肿瘤靶细胞 (例如,表达EpCAM的细胞) 的情况下起重新定向T细胞杀伤的作用。令人惊喜的是,抗EpCAM-OKT3Fab融合蛋白不能结合表达CD3的Jurkat T细胞。这表明由1F3Fab识别的CD3 ϵ 表位对于1F3Fab融合蛋白的功能是重要的。以上实施例中所述的数据支持了本公开的MSFP在多种治疗设施中的用途,包括通过T细胞的募集来治疗多种癌症。

[0404] 可组合上述的多种实施方案以提供另外的实施方案。本说明书中提及的和/或申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物都通过引入并入本文中。若需要采用各个专利、申请和出版物的概念来提供进一步的实施方案,可对本实施方案的方面进行修改。

[0405] 鉴于上述详细描述,可对所述实施方案作出这些改变和别的改变。在一般情况下,在以下的权利要求中,所用术语不应当被解释为将权利要求限制到本说明书和权利要求中公开的具体实施方案,而应当被解释为包括所有可能的实施方案以及这些权利要求所赋予的等同项的全部范围。因此,权利要求不受本公开的限制。

序列表

<110>	法比翁医药有限公司	
	Zhou, Hongxing	
<120>	多特异性FAB融合蛋白及其使用方法	
<130>	FABN-001/02W0	
<150>	US 61/486,690	
<151>	2011-05-16	
<160>	150	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	1503	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	1	
	atggcgeccc cgcaggtcct cgcgttcggg cttctgcttg ccgcggcgac ggcgactttt	60
	gccgcagctc aggaagaatg tgtctgtgaa aactacaagc tgcccgtaaa ctgctttgtg	120
	aataataatc gtcaatgcca gtgtacttca gttgggtgcac aaaatactgt catttgctca	180
[0001]	aagctggetg ccaaatgttt ggtgatgaag gcagaaatga atggctcaaa acttgggaga	240
	agagcaaaac ctgaaggggc cctccagaac aatgatgggc tttatgatcc tgactgcgat	300
	gagagcgggc tctttaaggc caagcagtgc aacggcacct ccatgtgctg gtgtgtgaac	360
	actgctgggg tcagaagaac agacaaggac actgaaataa cctgctctga gcgagtgaga	420
	acctactgga tcatcatiga actaaaacac aaagcaagag aaaaacctta tgatagtaaa	480
	agtttgegga ctgcacttca gaaggagatc acaacgcgtt atcaactgga tccaaaattt	540
	atcacgagta ttttgtatga gaataatgtt atcactattg atctggttca aaattcttet	600
	caaaaaacte agaattgatgt ggacataget gatgtggett attattttga aaaagatgtt	660
	aaaggtgaat ccttgtttca ttctaagaaa atggacctga cagtaaattg ggaacaactg	720
	gatctggate ctgggtcaaac tttaatattat tatgttgatg aaaaagcacc tgaattctca	780
	atgcagggtc taaaageggc cgcagagccc aaatcttgtg aaaaaactca cacatgceca	840
	ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc	900
	aaggacaccc tcatgatctc ceggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc	960
	cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	1020
	aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtctctacc	1080

```

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gactacaagt gcaaggtctc caacaaagcc    1140
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag    1200
gtgtacaccc tgcctccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc    1260
ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc    1320
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggaactccg acggtctctt ctctctctat    1380
agcaagctca ccgtggacaa gaggcaggtg cagcagggga acgtctctc atgtctcgtg    1440
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaaa    1500
tga                                                                    1503

```

<210> 2
 <211> 479
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

```

Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr Lys Leu Ala Val Asn
1              5              10              15

```

[0002]

```

Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val Gly Ala
20              25              30

```

```

Gln Asn Thr Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met
35              40              45

```

```

Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu
50              55              60

```

```

Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Glu
65              70              75              80

```

```

Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr Ser Met Cys Trp
85              90              95

```

```

Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile
100             105             110

```

```

Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys
115             120             125

```

	His	Lys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Lys	Ser	Leu	Arg	Thr	Ala	
	130						135					140					
	Leu	Gln	Lys	Glu	Ile	Thr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Leu	Asp	Pro	Lys	Phe	Ile	
	145					150					155					160	
	Thr	Ser	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asn	Asn	Val	Ile	Thr	Ile	Asp	Leu	Val	Gln	
					165					170					175		
	Asn	Ser	Ser	Gln	Lys	Thr	Gln	Asn	Asp	Val	Asp	Ile	Ala	Asp	Val	Ala	
				180					185					190			
	Tyr	Tyr	Phe	Glu	Lys	Asp	Val	Lys	Gly	Glu	Ser	Leu	Phe	His	Ser	Lys	
			195					200					205				
	Lys	Met	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Gly	Glu	Gln	Leu	Asp	Leu	Asp	Pro	Gly	
	210						215					220					
	Gln	Thr	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Val	Asp	Glu	Lys	Ala	Pro	Glu	Phe	Ser	Met	
	225					230					235					240	
[0003]	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	
					245					250					255		
	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
				260					265					270			
	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
			275					280					285				
	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	
	290						295					300					
	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
	305					310					315					320	
	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
					325					330					335		
	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
				340					345					350			
	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	

	355	360	365
	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
	370	375	380
	Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
	385	390	395 400
	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
	405	410	415
	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
	420	425	430
	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
	435	440	445
	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
	450	455	460
[0004]	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	465	470	475
<210>	3		
<211>	1503		
<212>	DNA		
<213>	食蟹猕猴(Macaca fascicularis)		
<400>	3		
	atggcgcccc cgcaggtcct cgcgttcggg cttctgcttg cggcggcgac tgcgagtttt	60	
	gccgcagctc agaaagaatg tgtctgtgaa aactacaagc tggccgtaaa ctgctttttg	120	
	aatgacaatg gtcaatgcca gtgtacttcg attggtgcac aaaatactgt cctttgetca	180	
	aagctggctg ccaaagtgtt ggtgatgaag gcagaaatga acggtcaaa acttgggaga	240	
	agagcgaaac ctgaaggggc tctccagaac aatgatggcc tttaacgatcc tgactgcgat	300	
	gagagcgggc tctttaaggc caagcagtgc aacggcacct ccacgtgctg gtgtgtgaac	360	
	actgctgggg tcagaagaac tgacaaggac actgaaataa cctgctctga gcgagtgaga	420	
	acctactgga tcatcattga attaaaacac aaagcaagag aaaaacetta tgatgttcaa	480	
	agtttgcgga ctgcacttga ggaggcgatc aaaacgcgtt atcaactgga tccaaaattt	540	
	atcacaaata ttttgtatga ggataatggt atcaactattg atctggttca aaattcttct	600	

	cagaaaactc agaatgatgt ggacatagct gatgtggctt attatittga aaaagatgtt	660
	aaaggtgaat cettgtttca ttctaagaaa atggacctga gagtaaatgg ggaacaactg	720
	gatctggatc ctgggtcaaac tttaatttat tatgtcgatg aaaaagcacc tgaattctca	780
	atgcagggtc taaaagcggc cgcagagccc aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc	840
	ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc	900
	aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc	960
	cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	1020
	aagacaaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc	1080
	gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc	1140
	ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag	1200
	gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc	1260
	ctgggtcaaa gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg	1320
	gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactcgg acggctcctt ctctctctat	1380
	agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg	1440
[0005]	atgcatgagg ctctgcacaa ceactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	1500
	tga	1503

<210> 4
 <211> 479
 <212> PRT
 <213> 食蟹猕猴

<400> 4

Ala Ala Gln Lys Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr Lys Leu Ala Val Asn
 1 5 10 15

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

Gln Asn Thr Val Leu Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met
 35 40 45

Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu
 50 55 60

Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Glu

65	70	75	80
Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr Cys Trp	85	90	95
Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile	100	105	110
Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys	115	120	125
His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Val Gln Ser Leu Arg Thr Ala	130	135	140
Leu Glu Glu Ala Ile Lys Thr Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile	145	150	155
Thr Asn Ile Leu Tyr Glu Asp Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln	165	170	175
Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp Val Ala	180	185	190
Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu Phe His Ser Lys	195	200	205
Lys Met Asp Leu Arg Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly	210	215	220
Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met	225	230	235
Gln Gly Leu Lys Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His	245	250	255
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val	260	265	270
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	275	280	285
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu	290	295	300

[0006]

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

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
325 330 335

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

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

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

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
385 390 395 400

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

[0007]

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
420 425 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
435 440 445

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

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

<210> 5
<211> 945
<212> DNA
<213> 智人

<400> 5
atggcgcccc cgcaggctct cgcgttcggg cttctgcttg ccgcggcgac ggcgactttt 60
gccgcagctc aggaagaatg tgtctgtgaa aactacaagc tgcccgtaaa ctgctttgtg 120
aataataatc gtcaatgccg gtgtacttca gttggtgcac aaaatactgt catttgctca 180

```

aagctggctg ccaaattgtt ggtgatgaag gcagaaatga atggctcaaa acttgggaga      240
agagcaaaac ctgaaggggc cctccagaac aatgatgggc tttatgatcc tgaactgcgat      300
gagagcgggc tctttaaggc caagcagtgc aacggcacct ccatgtgctg gtgtgtgaac      360
actgctgggg tcagaagaac agacaaggac actgaaataa cctgctctga gcgagtgaga      420
acctactgga tcatcattga actaaaacac aaagcaagag aaaaacctta tgatagtaaa      480
agtttgcgga ctgcacttca gaaggagatc acaacgcgtt atcaactgga tccaaaattt      540
atcacgagta ttttgtatga gaataatggt atcaactattg atctggttca aaattcttct      600
caaaaaacte agaattgatg ggacatagct gatgtggctt attattttga aaaagatgtt      660
aaaggtgaat ccttgtttca ttctaagaaa atggacctga cagtaaatgg ggaacaactg      720
gatctggatc ctggctcaaac ttttaatttat tatgttgatg aaaaagcacc tgaattctca      780
atgcagggtc taaaagctgg tgttattgct gttattgtgg ttgtggtgat agcagttgtt      840
gctggaattg ttgtgctggt tatttccaga aagaagagaa tggcaaagta tgagaaggcc      900
gagatcaagg agatgggtga gatgcatagg gaactcaatg cataa                      945

```

[0008]

<210> 6
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6

Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr Lys Leu Ala Val Asn
 1 5 10 15

Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val Gly Ala
 20 25 30

Gln Asn Thr Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met
 35 40 45

Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu
 50 55 60

Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Glu
 65 70 75 80

Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr Ser Met Cys Trp
 85 90 95

Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile
100 105 110

Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys
115 120 125

His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys Ser Leu Arg Thr Ala
130 135 140

Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile
145 150 155 160

Thr Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln
165 170 175

Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp Val Ala
180 185 190

Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu Phe His Ser Lys
195 200 205

[0009]

Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly
210 215 220

Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met
225 230 235 240

Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile Ala Val Ile Val Val Val Val Ile
245 250 255

Ala Val Val Ala Gly Ile Val Val Leu Val Ile Ser Arg Lys Lys Arg
260 265 270

Met Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Glu Ile Lys Glu Met Gly Glu Met His
275 280 285

Arg Glu Leu Asn Ala
290

<210> 7
<211> 945
<212> DNA

<213> 食蟹猕猴

<400> 7

atggcgcccc cgcaggtcct cgcgttcggg cttctgcttg cggeggcgac tgcgagtttt 60
 gccgcagctc agaaagaatg tgtctgtgaa aactacaagc tggecgtaaa ctgttttttg 120
 aatgacaatg gtcaatgcca gtgtacttcg attggtgcac aaaatactgt cctttgctca 180
 aagctggetg ccaaagtgtt ggigatgaag gcagaaatga acggetcaaa acttgggaga 240
 agagcgaaac ctgaaggggc tctccagaac aatgatggcc ttacgatcc tgactgcgat 300
 gagagcgggc tctttaaggc caagcagtgc aacggcacct ccacgtctg gtgtgtgaac 360
 actgctgggg tcagaagaac tgacaaggac actgaaataa cctgctctga gcgagtga 420
 acctactgga tcactattga attaaaacac aaagcaagag aaaaacctta tgatgttcaa 480
 agtttgcgga ctgcacttga ggagcgatc aaaacgcgtt atcaactgga tccaaaattt 540
 atcacaaata ttttgtatga ggataatgtt atcactatig atctggttca aaattcttct 600
 cagaaaactc agaattgatg ggacatagct gatgtggctt attattttga aaaagatgtt 660
 aaaggtgaat ccttgtttca ttctaagaaa atggacctga gagtaaatgg ggaacaactg 720
 gatctggatc ctgggtcaaac tttaatttat tatgtcgatg aaaaagcacc tgaattctca 780
 atgcagggtc taaaagctgg tgttattgct gttattgtgg ttgtggtgat agcagttggt 840
 gctggaattg ttgtgtggt tatttcaga aagaagagaa tggcaaagta tgagaaggee 900
 gagatcaagg agatgggtga gatgcatagg gaactcaatg cataa 945

[0010]

<210> 8

<211> 293

<212> PRT

<213> 食蟹猕猴

<400> 8

Ala Ala Gln Lys Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr Lys Leu Ala Val Asn 1 5 10 15
 Cys Phe Leu Asn Asp Asn Gly Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ile Gly Ala 20 25 30
 Gln Asn Thr Val Leu Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met 35 40 45
 Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu 50 55 60

Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Glu
65 70 75 80

Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr Cys Trp
85 90 95

Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile
100 105 110

Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys
115 120 125

His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Val Gln Ser Leu Arg Thr Ala
130 135 140

Leu Glu Glu Ala Ile Lys Thr Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile
145 150 155 160

Thr Asn Ile Leu Tyr Glu Asp Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln
165 170 175

[0011]

Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp Val Ala
180 185 190

Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu Phe His Ser Lys
195 200 205

Lys Met Asp Leu Arg Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly
210 215 220

Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met
225 230 235 240

Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile Ala Val Ile Val Val Val Val Ile
245 250 255

Ala Val Val Ala Gly Ile Val Val Leu Val Ile Ser Arg Lys Lys Arg
260 265 270

Met Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Glu Ile Lys Glu Met Gly Glu Met His
275 280 285

Arg Glu Leu Asn Ala
290

<210> 9
<211> 999
<212> DNA
<213> 智人

<400> 9
caagatggta atgaagaaat gggtaggtatt acacagacac catataaagt ctccatctct 60
ggaaccacag taatattgac atgccctcag tatcctggat ctgaaatact atggcaacac 120
aatgataaaa acataggcgg tgatgaggat gataaaaaca taggcagtga tgaggatcac 180
ctgtcaetga aggaattttc agaattggag caaagtgggtt attatgtctg ctaccccaga 240
ggaagcaaac cagaagatgc gaacttttat ctctacctga ggcaagagt ggcgcccgca 300
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcccaaccgt gcccaagacc tgaactctg 360
gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccgg 420
acctctgagg tcacatgegt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtaagttc 480
[0012] aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 540
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctacaccgtc tgcaccagga ctggctgaat 600
ggcaaggagt acaagtgeaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccac cgagaaaacc 660
atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg 720
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg tggtagcctg tcaaaggett ctatcccagc 780
gacatgcgag tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 840
cccgtgctgg actccgaagg ctctttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 900
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac 960
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 999

<210> 10
<211> 332
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
1 5 10 15

	Val	Ser	Ile	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Ile	Leu	Thr	Cys	Pro	Gln	Tyr	Pro	
				20					25					30			
	Gly	Ser	Glu	Ile	Leu	Trp	Gln	His	Asn	Asp	Lys	Asn	Ile	Gly	Gly	Asp	
			35				40						45				
	Glu	Asp	Asp	Lys	Asn	Ile	Gly	Ser	Asp	Glu	Asp	His	Leu	Ser	Leu	Lys	
		50					55					60					
	Glu	Phe	Ser	Glu	Leu	Glu	Gln	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Val	Cys	Tyr	Pro	Arg	
	65					70				75						80	
	Gly	Ser	Lys	Pro	Glu	Asp	Ala	Asn	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Arg	Ala	Arg	
				85						90				95			
	Val	Ala	Ala	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	
				100					105					110			
	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	
			115					120					125				
[0013]	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
		130					135					140					
	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	
	145					150					155					160	
	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	
				165						170					175		
	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	
				180					185					190			
	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	
			195					200					205				
	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	
		210					215					220					
	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
	225					230					235					240	
	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	

	245	250	255
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			
	260	265	270
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser			
	275	280	285
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln			
	290	295	300
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His			
	305	310	315
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	325	330	

<210> 11
 <211> 972
 <212> DNA
 <213> 食蟹猕猴

[0014]

<400> 11
 caagatggta atgaagaaat gggtagtatt acacagacac cataatcaagt ctccatctct 60
 ggaaccacag taatactgac atgctctcag catcttggat ctgaagcaca atggcaaacac 120
 aatggtaaaa acaaagaaga ttctggggat cggtctgttc tgccggaatt ttcagaaatg 180
 gagcaaagtg gttattatgt ctgctacccc agaggaagca atccagagga cgcgagccat 240
 catctctacc tgaaggcaag agtggcggee gcagagccca aatcttctga caaaactcac 300
 acatgcccac cgtgcccage acctgaacte ctggggggac cgtcagtcct cctcttccce 360
 ccaaaacce aaggacacct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtgggtg 420
 gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 480
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 540
 gtctcaccg tcttgacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 600
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 660
 gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 720
 ctgtggtgcc tggtaaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 780
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 840

ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 900
 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 960
 cegggtaaat ga 972

<210> 12
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> 食蟹猕猴

<400> 12

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Gln
 1 5 10 15

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

Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser
 35 40 45

[0015] Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly
 50 55 60

Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His
 65 70 75 80

His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Ser
 85 90 95

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 100 105 110

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 115 120 125

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 130 135 140

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 145 150 155 160

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
180 185 190

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
195 200 205

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
210 215 220

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
225 230 235 240

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
245 250 255

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
260 265 270

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
275 280 285

[0016]

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
290 295 300

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
305 310 315 320

Pro Gly Lys

<210> 13

<211> 921

<212> DNA

<213> 智人

<400> 13

ttcaagatac ctatagagga acttgaggac agagtgtttg tgaattgcaa taccagcatc 60

acatgggtag agggaaacggt gggaacaetg ctctcagaca ttacaagact ggacctggga 120

aaacgcatec tggaccacg aggaatatat aggtgtaatg ggacagatat atacaaggac 180

aaagaateta ccgtgcaagt tcattataga atggcgcccg cagagcccaa atcttctgac 240

aaaactcaca catgccacc gtgccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 300

```

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc      360
gtgggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc      420
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt      480
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggtctga atggcaagga gtacaagtgc      540
aaggtctcca acaaagecct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg      600
cagcccccag aaccacaggt gtacaccctg ccccatcccc gggaggagat gaccaagaac      660
caggtcagcc tgagctgcgc agtcaaaggc ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg      720
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgctgt ggactccgac      780
ggctccttct tcctcgtcag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      840
gtctttctcat gctccgtgat gcattgaggt ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      900
tcctgtcttc cgggtaaatg a                                          921

```

<210> 14
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> 智人

[0017]

<400> 14

```

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys
1           5           10           15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser
          20           25           30

Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
          35           40           45

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr
          50           55           60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Ser Asp
65           70           75           80

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
          85           90           95

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
          100          105          110

```

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
115 120 125

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
130 135 140

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
145 150 155 160

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
165 170 175

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
180 185 190

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
195 200 205

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
210 215 220

[0018]

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
225 230 235 240

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
245 250 255

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
260 265 270

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
275 280 285

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
290 295 300

Gly Lys
305

<210> 15
<211> 921
<212> DNA
<213> 食蟹猕猴

<400> 15	
tccaagatac ctgtagagga acttgaggac agagtgtttg tgaaatgcaa taccagcgtc	60
acatgggtag agggaaacgtt gggaacactg ctcacaaata atacaagact ggacctggga	120
aaacgcatcc tggacccacg aggaatatat aggtgtaatg ggacagatat atacaaggac	180
aaagaatctg ctgtgcaagt tcattatcga atggcggccg cagagcccaa atcttctgac	240
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc	300
ctcttceccc caaaacecaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	360
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	420
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	480
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggtcga atggcaagga gtacaagtgc	540
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccctctccaa agccaaaggg	600
cagcccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	660
caggtcagcc tgagctgcgc agtcaaaggc ttctatecca ggcacatgc cgtggagtgg	720
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcctgtgtt ggactccgac	780
[0019] ggctctttct tctctgtcag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggc gcagggaac	840
gtctttctcat gctcgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	900
tccctgtctc cgggtaaatg a	921

<210> 16
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> 食蟹猕猴

<400> 16

Phe Lys Ile Pro Val Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Lys Cys
 1 5 10 15

Asn Thr Ser Val Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Thr
 20 25 30

Asn Asn Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
 35 40 45

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Ala
 50 55 60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Ser Asp
65 70 75 80

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
85 90 95

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
100 105 110

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
115 120 125

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
130 135 140

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
145 150 155 160

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
165 170 175

[0020]

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
180 185 190

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
195 200 205

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
210 215 220

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
225 230 235 240

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
245 250 255

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
260 265 270

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
275 280 285

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 290 295 300

Gly Lys
 305

<210> 17
 <211> 804
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 17
 caagatggta atgaagaaat ggggtggtatt acacagacac catataaaagt ctccatctct 60
 ggaaccacag taatatigac aggcgggtggt gggagcgagg ccgcagagcc caaatcttgt 120
 gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac tectgggggg accgtcagtc 180
 ttctctcttc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 240
 tgctgtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtea agttcaactg gtacgtggac 300
 ggctgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac 360
 cgtgtgtgta gcgtctctac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 420
 [0021] tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 480
 gggcagccccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 540
 aaccaggtea gcctgacctg cctggtcaaa ggtttctatc ccagcgacat cgcctgtggag 600
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc 660
 gacggtctct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 720
 aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 780
 ctctccctgt ctccgggtaa atga 804

<210> 18
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 18

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
 1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
35 40 45

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
50 55 60

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
65 70 75 80

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
85 90 95

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
100 105 110

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
115 120 125

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
130 135 140

[0022]

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
145 150 155 160

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
165 170 175

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
180 185 190

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
195 200 205

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
210 215 220

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
225 230 235 240

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
245 250 255

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260 265

<210> 19
<211> 804
<212> DNA
<213> 智人

<400> 19
aaatatccaa cacagacaat tgggtggtatg gaagaaaatg gtgatcaagt ctccatctct 60
ggaaccacag taatattgac aggcggtggt gggagcgcgg ccgcagagcc caaatcttgt 120
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tectgggggg accgtcagtc 180
ttctctcttc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 240
tgcggtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 300
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 360
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 420
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 480
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 540
[0023] aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 600
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc 660
gaaggetcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 720
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 780
ctctccctgt ctccgggtaa atga 804

<210> 20
<211> 267
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

Lys Tyr Pro Thr Gln Thr Ile Gly Gly Met Glu Glu Asn Gly Asp Gln
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
35 40 45

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
50 55 60

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
65 70 75 80

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
85 90 95

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
100 105 110

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
115 120 125

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
130 135 140

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
145 150 155 160

[0024]

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
165 170 175

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
180 185 190

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
195 200 205

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
210 215 220

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
225 230 235 240

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
245 250 255

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260 265

<210> 21

<400> 21
000

<210> 22

<400> 22
000

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 23

Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 24

<211> 19

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 24

[0025]

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 25

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 26

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 27

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
 1 5

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 28

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
 1 5

<210> 29
 <211> 1650
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0026]

<220>
 <223> 编码人源化IF3-IgGNC抗体序列的cDNA

<400> 29
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgeag cctctggatt cacctttage acctacgcca tgaactgggt ccgccagget 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca 180
 tattatgccg attcagtgaa agaccggttc accatctcca gagacgattc caagaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacaagg ccgtatatta ctgtgcgaga 300
 catgggaact tcggtaatag ctacgtttcc tggtttgctt actggggcca agggacaatg 360
 gtcaccgtct ctteagctag caccaagggc ccacgggtct tccccctggt gccctgctcc 420
 aggagcacct ccgagagcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480
 ccggtgacgg tgtegtggaa ctcaggcgt ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct 540
 gtctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctcagcaac 600
 ttggcacec agacctacac ctgcaacgta gatcacaagg ccagcaaacac caaggtggac 660
 aagacagttg ctagcaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggegcctg ctcaggagc 720
 acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 780

	acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta	840
	cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc	900
	accagacct acacctgeaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca	960
	gttgagegea aatgttgtgt cgagtgccea cegtgcacag caccacctgt ggaggaccg	1020
	tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gacctctgag	1080
	gtcacgtgag tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac	1140
	gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc	1200
	acgttccgtg tggtcagegt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	1260
	tacaagtgea aggtctccaa caaaggcctc ccagccccc tggagaaaac catctccaaa	1320
	accaaagggc agccccgaga accacagggtg tacacctgc cccatcccg ggaggagatg	1380
	accaagaacc aggteagcct gacctgcctg gtcaaaggt tetaccccag cgacatcgcc	1440
	gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg	1500
	gactcgaag getcttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	1560
	caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1620
[0027]	aagagcctet ccctgtctcc gggtaaatga	1650

<210> 30

<211> 549

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化IF3-IgGHC抗体序列;

<400> 30

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

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

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

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

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

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

[0028]

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

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

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

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
225 230 235 240

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
245 250 255

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
260 265 270

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
275 280 285

	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr
	290						295					300				
	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr
	305					310					315					320
	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro
					325					330					335	
	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
				340					345					350		
	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
		355						360					365			
	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
	370						375					380				
	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser
	385					390					395					400
[0029]	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu
					405					410					415	
	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala
				420					425					430		
	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
		435						440					445			
	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
	450						455					460				
	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
	465					470					475					480
	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
					485					490					495	
	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
				500					505					510		
	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser

	515	520	525	
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser			
	530	535	540	
	Leu Ser Pro Gly Lys			
	545			
	<210> 31			
	<211> 648			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 编码人源化IF3-1LC抗体序列的cDNA;			
	<400> 31			
	caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgigtccc caggagggac agtcactctc		60	
	acctgteget caagtactgg ggetgttaca actagtaact atgecaactg ggtccagcag		120	
	aaacctggac aagcaccag gggctctgatt ggtggtacca acaagcgagc tccaggtacc		180	
	cctgeccggt tctcaggctc cctccttggg ggcaaagetg cctgacact gtcaggtgtg		240	
[0030]	cagcctgagg acgaggctga gtattactgc gctctatggt acagcaacct ctgggtgttc		300	
	ggcggagggg ccaagetgac cgtcctagge caaccgaaag cggcgcctc ggtaactctg		360	
	ttcccgcctt cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt		420	
	gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg		480	
	ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtaacgcgc cagcagctat		540	
	ctgagcctga cgcttgagca gtggaagtc cacagaagct acagctgcca ggtaacgc		600	
	gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gtccatag		648	
	<210> 32			
	<211> 215			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 人源化IF3-1LC抗体序列;			
	<400> 32			
	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly			
	1 5 10 15			

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

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

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65 70 75 80

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

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

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

[0031]

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

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

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

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

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

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 33

<211> 375

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码人源化IF3-1VH抗体序列的cDNA;

<400> 33

```

gaggtgcagc tggtaggagc tgggggagge ttggtacagc ctggggggte cctgagacac      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttage acctacgcca tgaactgggt cegccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca      180
tattatgceg attcagtga agaccgggtc accatctcca gagacgatte caagaacacg      240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacaagg cegtatatta ctgtgcgaga      300
catgggaact tcgtaatag ctacgtttcc tggtttgctt actggggcca agggacaatg      360
gtcaccgtct ctcca

```

<210> 34

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化IF3-1VH抗体序列;

[0032] <400> 34

```

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

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
          50           55           60

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

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

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
          100          105          110

```

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

<210> 35
<211> 708
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化 IF3-1Fd 抗体序列的 cDNA;

<400> 35
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccitttagc acctacgcc tgaactgggt ccgccagget 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca 180
tattatgccg attcagtga agaccgggtc accatctcca gagacgattc caagaacacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaga 300
catgggaact tcgtaatag ctacgtttcc tggtttgctt actggggcca agggacaatg 360
gtcacctctc ctteagctag caecaagggc ccatcggtct tccccctggc gccctgctcc 420
aggagcacct ccgagagcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480
[0033] ceggtgacgg tgctgtggaa ctcaggcgtc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct 540
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagegtgg tgacctgcc ctcagcaac 600
ttcggaaccc agacctacac ctgcaacgta gatcacaagg ccagcaacac caaggtggac 660
aagacagttg gtggcggggg ctcccatcat catcatcatc atcattag 708

<210> 36
<211> 235
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化 IF3-1Fd 抗体序列;

<400> 36

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

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

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

	35	40	45
	Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp 50 55 60		
	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr 65 70 75 80		
	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr 85 90 95		
	Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe 100 105 110		
	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 115 120 125		
	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser 130 135 140		
[0034]	Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 145 150 155 160		
	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 165 170 175		
	Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 180 185 190		
	Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys 195 200 205		
	Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Gly 210 215 220		
	Gly Gly Gly Ser His His His His His His 225 230 235		
	<210> 37		
	<211> 375		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		

<223> 编码人源化IF3-2VH抗体序列的cDNA;

<400> 37
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tctgtgacag cctctggatt cacccttaac acctacgcca tgaactgggt cegccagget 120
ccagggaagg ggetggagtg ggtctcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca 180
tattatgccg attcagtga agaccgggtc accatctcca gagacgattc caagaacacg 240
ctgtatctgc aatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaga 300
catgggaact tcgtaatag ctacgtttcc tggtttgctt actggggcca agggacaatg 360
gtcaccgtct ctcca 375

<210> 38

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化IF3-2VH抗体序列;

<400> 38

[0035] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

103

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

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

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

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

[0037]

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser His His His His His His His
225 230 235

<210> 41
<211> 375
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化IF3-3VH抗体序列的cDNA;

<400> 41
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccctttage acctacgeca tgaactgggt ccgccagget 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggctgcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca 180
 tattatgccg attcagtga agaccgggtc accatctcca gagacgattc caagaacacg 240
 ctgtatctgc aatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaga 300
 catgggaact tcggtaatag ctacgtttcc tggtttgett actggggcca agggacaatg 360
 gtcaccgtct ctcca 375

<210> 42
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化IF3-3VH抗体序列;

<400> 42

[0038]

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

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

<210> 43
 <211> 708
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码人源化IF3-3Fd抗体序列的cDNA;

<400> 43
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc acctacgcca tgaactgggt cegccagget 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggctgcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca 180
 tattatgceg attcagtgaag agaccgggtc accatctcca gagacgattc caagaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaga 300
 catgggaact tcggtaatag ctacgtttcc tggtttgett actggggcca agggacaatg 360
 gtcaccgtct ctteagctag caccaagggc ccatcggtct tcccccctggc gccctgctcc 420
 aggagcacct ccgagagcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa 480
 ccggtgacgg tgctgtgga ctcaggcgt ctgaccageg gctgacacac ctteccagct 540
 [0039] gtctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcaac 600
 ttggcacc ccagactacac ctgcaacgta gatcacaagg ccagcaacac caaggtggac 660
 aagacagttg gtggcggggg ctcccatcat catcatcatc atcattag 708

<210> 44
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化IF3-3Fd抗体序列;

<400> 44

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

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

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

Ala	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp
50						55					60				
Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr
65					70					75					80
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
				85					90					95	
Tyr	Cys	Ala	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe
			100					105					110		
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
		115					120					125			
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser
	130						135				140				
Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
145					150					155					160

[0040]

Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
				165					170					175	
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
			180					185					190		
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys
		195					200					205			
Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Gly
	210					215					220				
Gly	Gly	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His
225					230						235				

<210> 45

<211> 375

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码人源化1F3-4VH抗体序列的cDNA;

<400> 45
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagaetc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccctttage acctacgcca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggctgcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca 180
 tattatgcgc attcagtga agaccgggtc accatctcca gagacgattc caagaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgtgaga 300
 catgggaact tcggtaatag ctaegtcttc tggtttgctt actggggcca agggacaatg 360
 gtcaccgtct ctcca 375

<210> 46
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化IF3-4VH抗体序列;

<400> 46

[0041]

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 47
 <211> 708
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码人源化IF3-4Fd抗体序列的cDNA;

<400> 47
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagaactc 60
 tectgtgcag cctctggatt cacctttage acctacgcca tgaactgggt cegccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggctgcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca 180
 tattatgccg attcagtga agaccgggtc accatctcca gagacgattc caagaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgtgaga 300
 catgggaact tcggtaatag ctacgtttcc tggtttgett actggggcca agggacaatg 360
 gtcaccgtct ctccagctag caccaagggc ccacgtgtct tccccctggc gccctgctcc 420
 aggagcacct ccgagagcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa 480
 ccggtgacgg tgtcgtggaa ctacggcgt ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccagct 540
 [0042] gtctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcaac 600
 ttccgcaccc agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggiggac 660
 aagacagttg gtggcggggg ctcccatcat catcatcacc atcattag 708

<210> 48
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化IF3-4Fd抗体序列;

<400> 48

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

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

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

	Ala	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp
	50						55					60				
	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr
	65					70				75					80	
	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
					85					90					95	
	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe
				100					105					110		
	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
			115					120					125			
	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser
		130					135					140				
	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
	145					150					155					160
[0043]	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
					165					170					175	
	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
				180					185					190		
	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys
			195					200					205			
	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Gly
		210					215					220				
	Gly	Gly	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	His	His				
	225					230						235				
	<210>	49														
	<211>	375														
	<212>	DNA														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	编码人源化IF3-5VH抗体序列的cDNA;														
	<400>	49														

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggagc ttggtacagc ctgggggggct cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccittaac acctacgcca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggctgcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca 180
 tattatgccg attcagtga agaccgggtc accatctcca gagacgattc caagaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgtgaga 300
 catgggaact teggtaatag ctacgtttcc tggtttgctt actggggcca agggacaatg 360
 gtcaccgtct ctcca 375

<210> 50
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化IF3-5VH抗体序列;

<400> 50

[0044]

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

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

<210> 51
 <211> 708
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码人源化IF3-5Fd抗体序列的cDNA;

<400> 51
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggagge ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccittaac acctacgcca tgaactgggt ccgccagget 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtcgcacgc ataagaagta aatataataa ttatgcaaca 180
 tattatgccg attcagtgaa agaccggttc accatctcca gagacgattc caagaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatata ctgtgtgaga 300
 catgggaact tcggtaatag ctacgtttcc tggtttgcctt actggggcca agggacaatg 360
 gtcaccgtct cttcagctag caccaaggge ccatcggtct tccccctggc gccctgctcc 420
 aggagcacct ccgagagcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480
 ccggtgacgg tgctgtggaa ctcaggcgt ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct 540
 gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcaac 600
 ttcggcaccc agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660
 aagacagttg gtggcggggg ctcccatcat catcatcatc atcattag 708

[0045]

<210> 52
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化IF3-5Fd抗体序列;

<400> 52

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50	55	60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr 65 70 75 80		
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr 85 90 95		
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe 100 105 110		
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 115 120 125		
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser 130 135 140		
Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 145 150 155 160		
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His [0046] 165 170 175		
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 180 185 190		
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys 195 200 205		
Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Gly 210 215 220		
Gly Gly Gly Ser His His His His His His His 225 230 235		
<210> 53 <211> 375 <212> DNA <213> 人工序列		
<220> <223> 编码人源化IF3-11VH抗体序列的cDNA;		
<400> 53 gaggtgcagc tggtggagag cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggcag cctgaagetg 60		

```

agctgcccgc ccagcggctt caccctcagc acctacgcca tgaactgggt gcggcaggcc 120
ageggcaagg gcctggagtg ggtgggcccgg atccggagca agtacaacaa ctacgccacc 180
tactacgccc acagcgtgaa ggaccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240
gcctacctgc agatgaacag cctgaagacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccggg 300
caeggcaact tcggcaacag ctacgtgagc tggttcgctt actggggcca gggcaccctg 360
gtgaccgtga gcagc 375

```

<210> 54
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化IF3-11VH抗体序列:

<400> 54

```

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

```

[0047]

```

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

```

```

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Tyr Cys Thr Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100          105          110

```

```

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120          125

```

<210> 55

<211> 327
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 编码人源化IF3-1VL抗体序列的cDNA;

 <400> 55
 caggctgtgg tgactcagga gccctcaetg actgtgtecc caggagggac agteactetc 60
 acctgtcget caagtactgg ggetgttaca actagtaact atgccaactg ggtccagcag 120
 aaacctggac aagcaccacag ggtcttgatt ggtggtacca acaagcgagc tccaggtacc 180
 cctgcccggt tctcaggetc cctccttggg ggcaaagctg cctgacact gtcagggtgtg 240
 cagcctgagg aegaggetga gtattactgc gctctatggt acagcaacct ctgggtgttc 300
 ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 56
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化IF3-1VL抗体序列;

[0048]

<400> 56

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

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

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65 70 75 80

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 57
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 编码人源化IF3-2VL抗体序列的cDNA;

 <400> 57
 caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggac agtcactctc 60
 acctgtcget caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg gticcagcag 120
 aaacctggac aagcaccag gggctctgatt ggtggtacca acaagcgagc tccagtcacc 180
 cctgcccggt tctcaggctc cctccttggg ggcaaagctg cctgacact gtcagggtgtg 240
 cagectgagg acgaggetga gtattactgc getctatggt acagcaacct ctgggtgttc 300
 ggcgaggga ccaagctgac cgtecta 327

<210> 58
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0049]

<220>
 <223> 人源化IF3-2VL抗体序列;

 <400> 58

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

 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

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

 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
 65 70 75 80

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 59
<211> 648
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化IF3-2LC抗体序列的cDNA;

<400> 59
caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactctc 60
acctgteget caagtactgg ggetgttaca actagtaact atgccaactg gttccagcag 120
aaacctggac aagcaccag gggctctgatt ggtggtacca acaagegagc tccagtcacc 180
cctgccccgt tctcaggetc cctccttggg ggcaaagctg cctgacact gtcagggtgtg 240
cagcctgagg acgaggetga gtattactgc gctctatggt acagcaacct ctgggtgttc 300
ggcggaggga ccaagctgac cgtcctagge caacegaaag cgcgccctc ggtcactctg 360
ttccccccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactgggtgtg tctcataagt 420
[0050] gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 480
ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctat 540
ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtec cacagaagct acagctgccg ggtcacgcat 600
gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcatag 648

<210> 60
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化IF3-2LC抗体序列;

<400> 60

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

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

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65 70 75 80

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

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

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

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

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

[0051]

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

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

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

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 61

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码人源化IF3-3VL抗体序列的cDNA;

<400> 61

caggctgtgg tgaetcagga gccctcaetg actgtgtccc caggaggac agtcactetc

60

acctgteget caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg ggtccagcag 120
 aaacctggac aagcaccag gggtctgatt ggtggtacca acaagcgagc tccatggacc 180
 cctgcccggg tctcagctc cctccttggg ggcaaagctg cctgacact gtcaggtgtg 240
 cagcctgagg acgaggtga gtattactgc gctctatggt acagcaacct ctgggtgttc 300
 ggcgaggaga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 62
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化IF3-3VL抗体序列;

<400> 62

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

[0052]

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

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
 65 70 75 80

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 63
 <211> 649
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码人源化IF3-3LC抗体序列的cDNA;

<400> 63
 caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactetc 60
 acctgtcget caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg ggiccagcag 120
 aaacctggac aagcaccag gggcttgatt ggtggtacca acaagcgagc tccatggacc 180
 cctgccccgt tctcaggetc cctccttggg ggcaaagetg ccctgacact gtcaggtgtg 240
 cagcctgagg acgaggctga gtattactgc gctctatggt acageaacct ctgggtgttc 300
 ggccggaggga ccaagctgac cgtcctagge caaccgaaag cggcgccctc ggtcactctg 360
 ttccccccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 420
 gactttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 480
 ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtacggggc cagcagctat 540
 ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtec cacagaaget acagctgcca ggtcacgeat 600
 gaagggagca ccgtggagaa agacagtggc ccctacagaa tgttcatag 649

<210> 64
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0053]

<220>
 <223> 人源化IF3-3LC抗体序列;

<400> 64

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

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

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

[0054]

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 65

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码人源化IF3-4VL抗体序列的cDNA;

<400> 65

caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactctc 60

acctgtcget caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg gttccagcag 120

aaacctggac aagcaccacag gggctctgatt ggtggtacca acaagcgagc tccatggacc 180

cctgcccgggt tctcaggtc cctccttggg ggcaaagctg cctgacact gtcagggtgtg 240

cagcctgagg acgaggctga gtattactgc gctctatggt acagcaacct ctgggtgttc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 66

<211> 109

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化IF3-4VL抗体序列;

<400> 66

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

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

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65 70 75 80

[0055]

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 67
<211> 648
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化IF3-4LC抗体序列的cDNA;

<400> 67

caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactctc 60

acctgtcgct caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg gtccagcag 120

aaacctggac aagcaccag gggtctgatt ggtgtgacca acaagcgagc tccatggacc 180

cctgcccgggt tctcaggctc cctccttggg ggcaaagctg cctgacact gtcagggtgtg 240

cagcctgagg acgaggetga gtattactgc gctctatggt acagcaacct ctgggtgttc 300

ggcggagggga ccaagctgac cgtcctaggc caaccgaaag cggegccttc ggtcactctg 360

```

ttccccccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca caetggtgtg tctcataagt      420
gactttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg      480
ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctat      540
ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtec cacagaagct acagctgcca ggtaacgcat      600
gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcatag      648

```

<210> 68

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化IF3-4LC抗体序列:

<400> 68

```

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

```

```

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
                20              25              30

```

[0056]

```

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

```

```

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50              55              60

```

```

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65              70              75              80

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

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

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

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

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 69
<211> 327
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化IF3-5VL抗体序列的cDNA;

[0057] <400> 69
caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggac agtcactctc 60
acctgtcgct caagtactgg ggetgttaca actagtaact atgccaaactg gtaccagcag 120
aaacctggac aagcaccacag gggctctgatt ggtggtacca acaagcgagc tccatggacc 180
cctgcccggg tctcaggctc cctccttggg ggcaaagctg ccctgacact gtcagggtgtg 240
cagcctgagg acgaggetga gtattactgc gctctatggt acageaacct ctgggtgttc 300
ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 70
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化IF3-5VL抗体序列;

<400> 70

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

	20		25		30
Asn Tyr Ala Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly					
	35		40		45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe					
	50		55		60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val					
	65		70		75
					80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn					
		85		90	95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu					
	100		105		

<210> 71
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0058]

<220>
 <223> 编码人源化IF3-5LC抗体序列的cDNA;

<400> 71
 caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactetc 60
 acctgteget caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg gtaccagcag 120
 aaacctggac aagcaccacag gggctctgatt ggtggtacca acaagecagc tecatggacc 180
 cctgcccggt tctcaggctc cctccttggg ggcaaagetg cctgacact gtcagggtgtg 240
 cagcctgagg acgaggctga gtattactgc gctctatggt acagcaacct ctgggtgttc 300
 ggccgaggga ccaagctgac cgtccttaggc caaccgaaag cggegccctc ggtaactctg 360
 ttccegccct cctctgagga gttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 420
 gaattctaac cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtaaggcg 480
 ggagtggaga ccaccacacc ctccaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctat 540
 ctgagcctga cgctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgccg ggtcacgcat 600
 gaaggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcatag 648

<210> 72
 <211> 215

<212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化IF3-5LC抗体序列;

<400> 72

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

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

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
 65 70 75 80

[0059] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr

127

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

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

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

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

[0061]

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

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

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

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Gly Gly Gly Gly Ser His His
210 215 220

His His His His His
225

<210> 75
<211> 642
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码OKT3LC单克隆抗体序列的cDNA;

<400> 75

```

caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc      60
atgacctgca gtgccagetc aagtgttaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcagge      120
acctccccc aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cctgtctcac      180
ttcaggggca gtgggtctgg gaacctcttac tctctcaca teagcggcat ggaggtgaa      240
gatgtgccca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg      300
acaaagtigg aaataaaccc tacggtgget gcaccatctg tcttcattct cccgccatct      360
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc      420
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag      480
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg      540
agcaaagcag actaegagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg      600
agctcgcccg tcacaaagag ctccaacagg ggagagtgtt ag                        642

```

[0062]

<210> 76

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OKT3LC单克隆抗体序列

<400> 76

```

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20          25          30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65          70          75          80

```

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

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

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

[0063]

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 77
<211> 738
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码EpCAM1.1单链可变片段融合蛋白的cDNA

<400> 77
caggtacagc tgcagcagtc agggggaggc ttggtccagc ctgggggagc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctetggatt cacccttagt aattattgga tgagctgggt ccgccaggt 120
ccagggaagg ggetggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaattctat 180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaagac atggctgtct attactgtgc gagagtgggg 300

```

ggggcgtggg agctaggcta ctggggccag ggaacctg tcactgtctc ggccggtggc 360
ggtggcagcg gcggtggtgg gtccggtggc ggcggtctg gcgcgcagtc tgtactgact 420
caaccgccct cagtgtctgg ggccccaggg cagagggtca ccattctctg cactgggagc 480
agctccaaca tcgggtctta ttatggtgtg cactggtacc agcagattcc aggaacagcc 540
cccaaactec tcattatttc tgacactaat cgacctcag gggtccctga ccgattctct 600
ggctccaagt ctggcacctc ggctccctg gccatcactg ggctccaggc tgaggatgag 660
getgattatt actgccagtc gtagacagc agcctgagtg gccgggtgtt cggcggaggg 720
accaagtca ccgtctca 738

```

<210> 78
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> EpCAM1.1单链可变片段融合蛋白

<400> 78

[0064]

```

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
          50           55           60

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

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

Ala Arg Val Gly Gly Ala Trp Glu Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

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

```

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser
130 135 140

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

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Gly Val His Trp Tyr Gln Gln Ile
165 170 175

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asp Thr Asn Arg Pro
180 185 190

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala
195 200 205

Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

[0065]

Thr Lys Val Thr Val Leu
245

<210> 79

<211> 1485

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码EpCAM1.1 - OKT3Fd融合构建体的cDNA

<400> 79

caggtacagc tgcagcagtc agggggaggc ttggtccagc ctgggggagc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacccttagt aattattgga tgagctgggt ccgccagget 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaattctat 180

gtggactctg tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaagac atggtgtctt attactgtgc gagagtgggg 300

ggggcgtggg agctaggcta ctggggccag ggaaccctgg tcactgtctc ggccggtggc 360

ggtggcagcg gcggtggtgg gtccggtggc ggcggatctg gcgcgcagtc tgtactgact 420

caaccgcect cagtgtctgg ggccccaggg cagagggtca ccctctctg cactggggagc	480
agctccaaca tgggtcttta ttatggtgtg cactggtaac agcagattcc aggaacagcc	540
cccaaaectc tcctctatc tgacactaat cgacctcag gggteccetga ccgattctct	600
ggctccaagt ctggcacctc ggcctccctg gccatcaactg ggetccaggc tgaggatgag	660
gctgattatt actgccagtc gtatgacagc agcctgagtg gccgggtgtt cggcggaggg	720
accaaggtca ccgtccatagg gcgcgcccag gtacagctgc agcagtcagg gggagggctt	780
gtccagcctg ggggatccct gagactctcc tgtgcagcct ctggattcac ctttagtaat	840
tattggatga gctgggtccg ccaggctcca gggaaggggc tggagtgggt ggccaacata	900
aagcaagatg gaagtgagaa attctatgtg gactctgtga agggccgatt caccatctcc	960
agagacaacg ccaagaactc actgtatctg caaatgaaca gcctgagagc cgaagacatg	1020
gctgtctatt actgtgcgag agtggggggg gcgtgggagc taggctactg gggccaggga	1080
acctgggtca ctgtctcggc cgggtggcgtt ggcagcggcg gtgggtgggc cgggtggcggc	1140
ggatctggcg cgcagtcigt actgactcaa ccgcctcag tgtctggggc ccaggggcag	1200
agggtcacca tctctgcac tgggagcagc tccaacatcg ggtcttatta tgggtgcac	1260
[0066] tgggtaccagc agattccagg aacagccccc aaactctca tctattctga cactaatcga	1320
ccctcagggg tccctgaccg attctctggc tccaagtctg gcacctcggc ctccctggcc	1380
atcactgggc tccaggtga gcatgaggt gattattact gccagtcgta tgacagcagc	1440
ctgagtggcc ggggtgttcg cggagggacc aaggtcaccc tccta	1485

<210> 80
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> EpCAM1.1 - OKT3Fd融合构建体

<400> 80

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

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

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

Ala	Asn	Ile	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Phe	Tyr	Val	Asp	Ser	Val
50						55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Met	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Val	Gly	Gly	Ala	Trp	Glu	Leu	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
		115					120					125			
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser
	130					135					140				
Val	Ser	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser
145					150					155					160
Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ile
				165					170					175	
Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Thr	Asn	Arg	Pro
			180					185					190		
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala
		195					200					205			
Ser	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr
	210					215					220				
Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Ser	Leu	Ser	Gly	Arg	Val	Phe	Gly	Gly	Gly
225					230					235					240
Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Arg	Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser
				245					250					255	
Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys
			260					265						270	

[0067]

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

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

Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
305 310 315 320

Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
325 330 335

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
340 345 350

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

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
370 375 380

[0068]

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
420 425 430

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
435 440 445

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
450 455 460

Thr Val Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His His
465 470 475

<210> 81

<211> 1389

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码EpCAM1.1 - OKT3LC融合构建体的cDNA

<400> 81

caggtacagc tgcagcagtc agggggagge ttggtccagc ctgggggagc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctetggatt cacccttagt aattattgga tgagctgggt ccgccagget	120
ccaggaagg ggctggagt ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaattctat	180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaagac atggetgtct attactgtgc gagagtgggg	300
ggggcgtggg agctaggeta ctggggccag ggaacctggt tcaactgtct ggccggtggc	360
ggtggcagcg gcggtggtgg gtccggtggc ggccggtctg gcgcgcagtc tgtaactgact	420
caaccgccct cagtgtctgg ggccccaggg cagagggtca ccatctcttg cactgggagc	480
agetccaaca tcgggtctta ttatggtgtg caetgggtacc agcagattcc aggaacagcc	540
ccaaaactcc tcatctattc tgacaactaa cgacctcag ggttccctga ccgattctct	600
ggctccaagt ctggcacctc ggcctccctg gccatcactg ggtccaggc tgaggatgag	660
gttgattatt actgccagtc gtatgacagc agcctgagtg gccgggtgtt cggcggaggg	720
[0069] accaaggtca ccgtctagg gcgcgccccaa atgtttctca ccagttctcc agcaatcatg	780
tctgcatctc caggggagaa ggtaaccatg acctgcagtg ccagctcaag tgtaagttac	840
atgaactggg accagcagaa gtcaggcacc tcccccaaaa gatggattta tgacacatcc	900
aaactggctt ctggagtcct tgctcacttc aggggcagtg ggtctgggac ctcttactct	960
ctcacaaatc gcggcatgga ggtggaagat gctgccactt attactgcca gcagtggagt	1020
agtaaccatc tcaegtccgg ctgggggaca aagtgggaaa taaaccgtac ggtggctgca	1080
ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgctctgtt	1140
gtgtgctgct tgaataactt ctatcccaga gaggccaaaag tacagtggaa ggtggataac	1200
gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc	1260
tacagcctca gcagcaccct gacgtgagc aaageagact acgagaaaca caaagtctac	1320
gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca caaagagctt caacagggga	1380
gagtgttag	1389

<210> 82

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EpCAM1.1 - OKT3LC融合构建体

<400> 82

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

[0070] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Gly Ala Trp Glu Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser
130 135 140

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

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Gly Val His Trp Tyr Gln Gln Ile
165 170 175

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asp Thr Asn Arg Pro
180 185 190

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala
195 200 205

Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Arg Ala Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser
245 250 255

Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
260 265 270

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
275 280 285

Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
290 295 300

Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
305 310 315 320

[0071]

Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
325 330 335

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
340 345 350

Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
355 360 365

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
370 375 380

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
385 390 395 400

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

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
420 425 430

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
435 440 445

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
450 455 460

<210> 83
<211> 1329
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码EpCAM1.1 - 人源化1F3.1Fd融合构建体的cDNA

<400> 83
caggtacagc tgcagcagtc agggggaggc ttgggtccagc ctgggggagc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt aattattgga tgagctgggt ccgccagget 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaattctat 180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaagac atggctgtct attactgtgc gagagtgggg 300
[0072] ggggcgtggg agctaggcta ctggggccag ggaaccctgg tcaactgtct ggccgggtggc 360
gggtggcagc gcggtggtgg gtccgggtggc ggccgatctg gcgcgcagtc tgtactgact 420
caaccgccct cagtgtctgg ggcgccaggg cagagggtca ccattctctg cactgggagc 480
agctccaaca tcgggtctta ttatggtgtg cactgggtacc agcagattcc aggaacagcc 540
ccaaaactcc tcattctatc tgacactaat cgaccctcag gggtccctga ccgattctct 600
ggctccaagt cggggcgccg cgaggtgcag ctgggtggagt ctgggggagg cttggtacag 660
cctgggggggt cctgagact ctctgtgca gcctctggat tcaccttag caccatcgcc 720
atgaactggg tccgccaggc tccagggaag gggctggagt gggctctcag cataagaagt 780
aaatataata attatgcaac atattatgcc gattcagtga aagaccggtt caccatctcc 840
agagacgatt ccaagaacac gctgtatctg caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg 900
gccgtatatt actgtgcgag acatgggaac ttcggtaata gctacgttct ctggtttgct 960
tactggggcc aagggacaat ggtcaccgtc tcttcagcta gcaccaaggg cccatcggtc 1020
ttccccctgg cgcctgctc caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggtgcctg 1080
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc 1140
ggcgtgcaca ctttcccagc tgtctacag tctcaggac tctactccct cagcagcgtg 1200

gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 1260
 cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt ggtggcgggg gctcccatca teatcatcat 1320
 catcattag 1329

<210> 84
 <211> 484
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> EpCAM1.1 - 人源化1F3.1Fd融合构建体

<400> 84

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

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

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

[0073]

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Val Gly Gly Ala Trp Glu Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser
 130 135 140

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

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Gly Val His Trp Tyr Gln Gln Ile
165 170 175

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asp Thr Asn Arg Pro
180 185 190

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala
195 200 205

Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
245 250 255

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

[0074]

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
275 280 285

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

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

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

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn
340 345 350

Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
355 360 365

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
370 375 380

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
385 390 395 400

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
405 410 415

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
420 425 430

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
435 440 445

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
450 455 460

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Gly Gly Gly Gly Ser His His His
465 470 475 480

His His His His

[0075]

<210> 85
<211> 1395
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码EpCAM1.1 - 人源化1F3. ILC融合构建体的cDNA

<400> 85
caggtaacgc tgcagcagtc agggggaggc ttggtccagc ctgggggatc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccttagt aattattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaattctat 180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agecgaagac atggetgtct attactgtgc gagagtgggg 300
ggggcgtggg agctaggcta ctggggccag ggaaccctgg tcactgtctc ggccggtggc 360
gggtggcagcg gcggtggtgg gtcgggtgga ggcggatctg gcgcgcagtc tgtactgact 420
caaccgcct cagtgtcttg ggccccaggg cagagggtca ccatctctg cactgggagc 480
agctccaaca tcgggtctta ttatggtgtg cactgggtacc agcagattcc aggaacagcc 540
cccaaactcc tcactatctc tgacactaat cgaccctcag ggttcctga ccgattctct 600

```

ggctccaagt ctggcacctc ggctccctg gccatcactg ggctccagc tgaggatgag      660
gctgattatt actgccagtc gtatgacagc agcctgagtg gccgggtgtt cggcggaggg      720
accaaggtca ccgtctagg gcgcgccag gctgtggiga ctgaggagcc ctactgact      780
gtgtccccag gagggacagt cactctcacc tgtcgetcaa gtactggggc tgttacaact      840
agtaactatg ccaactgggt ccagcagaaa cctggacaag caccagggg tctgattggt      900
ggtaccaaca agcgagctcc aggtacccct gcccggttct caggetccct cettgggggc      960
aaagetgecc tgacactgtc aggtgtgcag cctgaggacg aggtgagta ttactgect     1020
ctatggtaca gcaacctctg ggtgttcggc ggagggacca agctgaccgt cctaggccaa     1080
ccgaaagcgg cgcctcggt cactctgttc ccgcctect ctgaggagct tcaagccaac     1140
aaggccacac tgggtgtgtc cataagtga ctttaaccgg gagcctgac agtggcctgg     1200
aaggcagata gcagcccggt caagcgggga gtggagacca ccacaccctc caaacaaga     1260
aacaacaagt acgeggccag cagctatctg agcctgacgc ctgagcagtg gaagtcceac     1320
agaagctaca gctgccaggt cagcatgaa gggagcacgc tggagaagac agtggccct     1380
acagaatggt catag                                           1395

```

[0076]

<210> 86
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> EpCAM1.1 - 人源化1F3.1LC融合构建体
 <400> 86

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Val Gly Gly Ala Trp Glu Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser
130 135 140

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

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Gly Val His Trp Tyr Gln Gln Ile
165 170 175

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asp Thr Asn Arg Pro
180 185 190

[0077]

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala
195 200 205

Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Arg Ala Gln Ala Val Val Thr Gln Glu
245 250 255

Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg
260 265 270

Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
275 280 285

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys
290 295 300

Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly
305 310 315 320

Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu
325 330 335

Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly
340 345 350

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr
355 360 365

Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu
370 375 380

Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp
385 390 395 400

Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro
405 410 415

[0078]

Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu
420 425 430

Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr
435 440 445

His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
450 455 460

<210> 87

<211> 738

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码EpCAM1.2单链可变片段融合蛋白的cDNA

<400> 87

gaggtgcagc tgggtggagtc aggggggaggc ttggtccagc ctggggggatc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccitttagt aattattgga tgagctgggt ccgccagget 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaattctat 180

gtggactctg tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240

```

ctgcaaatga acagcctgag agccgaagac atggetgtct attactgtgc gagagtgggg      300
ggggcgtggg agctaggcta ctggggccag ggaaccctgg tcaactgtct ggccggtggc      360
ggtggcagcg gcggtggtgg gtccggtggc ggcggatctg gcgcgcagtc tgtactgact      420
caaccgccct cagtgtctgg ggccccaggg cagagggtca ccactctctg cactgggagc      480
agetccaaca tcgggtctta ttatggtgtg cactggtaac agcagcttcc aggaacagcc      540
cccaaactcc tcactatctc tgacaactaa cgaccctcag ggtccctga ccgattctct      600
ggctccaagt ctggcacctc ggcctccctg gccatcaact ggctccaggc tgaggatgag      660
getgattatt actgccagtc gtatgacagc agcctgagtg gccgggtgtt cggcggaggg      720
accaagetga ccgtctca                                     738

```

<210> 88
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> EpCAM1.2单链可变片段融合蛋白

[0079] <400> 88

```

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
50           55           60

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

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

Ala Arg Val Gly Gly Ala Trp Glu Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100          105          110

```

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser
130 135 140

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

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Gly Val His Trp Tyr Gln Gln Leu
165 170 175

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asp Thr Asn Arg Pro
180 185 190

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala
195 200 205

Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
210 215 220

[0080]

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Leu Thr Val Leu
245

<210> 89

<211> 1455

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码EpCAM1.2 - 人源化1F3. 1Fd融合构建体的cDNA

<400> 89

gaggtgcagc tgggtggagtc agggggaggc ttggtccagc ctgggggagc cctgagactc 60

tctgtgcag cctctggatt cacccttagt aattattgga tgagctgggt cccagagct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaattctat 180

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tcagagaca acgccaagaa ctactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaagac atggtctgtc attactgtgc gagagtgggg 300

ggggcgtggg agctaggcta ctggggccag ggaacctgg tcactgtctc ggccggtggc 360

	ggtggcagcg gcggtggtgg gtccggtggc ggcggatctg gcgcgcagtc tgtactgact	420
	caaccgccct cagtgtcttg ggccccaggc cagagggtca ccatctcttg cactgggagc	480
	agctccaaca tcgggtctta ttatggtgtg cactggtacc agcagcttcc aggaacagcc	540
	cccaaactcc tcattctatt tgacactaat cgaccctcag gggteccatga ccgattctct	600
	ggetccaagt ctggcacctc ggctcccttg gccatcactg ggetccagge tgaggatgag	660
	gctgattatt actgccagtc gtatgacagc agcctgagtg gccgggtgtt cggcggaggg	720
	accaagctga ccgtccatagg gcgcgcagag gtgcagctgg tggagtcttg gggaggett	780
	gtacagcctg gggggtccct gagactctcc tgtgcagcct ctggattcac ctttagcacc	840
	tacgccatga actgggtccg ccaggctcca gggaaggggc tggagtgggt ctcacgcata	900
	agaagtaaat ataataatta tgcaacatat tatgccgatt cagtgaagaa ccggttcacc	960
	atctccagag acgattccaa gaacacgtg tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag	1020
	gacacggccg tatattactg tgcgagacat gggaacttcg gtaatagcta cgtttctctg	1080
	tttgcttaet ggggccaaagg gacaatggtc accgtctctt cagctagcac caagggccca	1140
[0081]	teggctctcc ccctggcgcc ctgctccagg agcacctccg agagcacagc ggcctgggc	1200
	tgectggtca aggactactt ccccgaaacc gtgacggtgt cgtggaactc aggcgtctg	1260
	accagcggcg tgcacacctt ccagctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc	1320
	agcgtggtga ccgtgccctc cagcaacttc ggcacccaga cctacacctg caacgtagat	1380
	cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag acagttggtg gcgggggctc ccatcatcat	1440
	catcatcatc attag	1455

<210> 90

<211> 484

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EpCAM1.2 - 人源化IF3.1Fd融合构建体

<400> 90

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Gly Gly Ala Trp Glu Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser
130 135 140

[0082]

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

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Gly Val His Trp Tyr Gln Gln Leu
165 170 175

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asp Thr Asn Arg Pro
180 185 190

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala
195 200 205

Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Met Thr Val Leu Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
245 250 255

	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	
				260					265						270		
	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	
			275					280					285				
	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	
		290					295					300					
	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	
	305					310					315					320	
	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	
				325						330					335		
	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	His	Gly	Asn	
			340					345						350			
	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
		355						360					365				
[0083]	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
		370					375					380					
	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
	385					390					395					400	
	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
				405						410					415		
	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
			420					425						430			
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
		435					440						445				
	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	
		450				455						460					
	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	His	His	His	
	465				470						475					480	
	His	His	His	His													

<210> 91
 <211> 1395
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码EpCAM1.2 - 人源化1F3.1LC融合构建体的cDNA

<400> 91
 gaggtgcagc tggtaggagtc agggggaggc ttgggtccagc ctgggggagc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt aattattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaattctat 180
 gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaagac atggctgtct attactgtgc gagagtgggg 300
 ggggcgtggg agctaggcta ctggggccag ggaacctgg tcaactgtct ggccgggtgac 360
 ggtggcagcg gcggtggtg gtccggtggc ggccgactct gcgcgcagtc tgtactgact 420
 caaccgccct cagtgtctgg ggccccaggc cagagggtca ccatctcctg cactgggagc 480
 [0084] agctccaaca tcgggtctta ttatggtgtg cactgggtacc agcagcttcc aggaacagcc 540
 cccaaactcc tcattctatc tgacactaat cgacctcag gggctccctga ccgattctct 600
 ggctccaagt ctggcaactc ggctctcctg gccatcactg ggctccagcc tgaggatgag 660
 gctgattatt actgccagtc gtatgacagc agcctgagtg gcggggtgtt cggcggaggc 720
 accaagctga ccgtcctagg gcgcgccag gctgtggtga ctcaggagcc ctcactgact 780
 gtgtccccag gagggacagt cactctcacc tgctgctcaa gtactgggga tgttacaact 840
 agtaactatg ccaactgggt ccagcagaaa cctggacaag caeccagggg tctgatttgt 900
 ggtaccaaca agcagctcc aggtaccctt gcccggttct cagctccct ccttgggggc 960
 aaagctgccc tgacactgtc aggtgtgcag cctgaggacg aggtgagta ttactgcct 1020
 ctatggtaca gcaacctctg ggtgttcggc ggagggacca agctgaccgt cctaggccaa 1080
 ccgaaagcgg cgcctcggt cactctgttc ccgcctcct ctgaggagct tcaagccaac 1140
 aaggccacac tgggtgtgtc cataagtac ttctaccgg gagccgtgac agtggcctgg 1200
 aaggcagata gcagccccgt caaggcggga gtggagacca ccacaccctc caaacaagc 1260
 aacaacaagt acgcggccag cagctatctg agcctgacgc ctgagcagtg gaagtccac 1320

agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa gggagcaccg tggagaagac agtgcccct 1380
acagaatgtt catag 1395

<210> 92
<211> 464
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EpCAM1.2 - 人源化1F3. ILC融合构建体
<400> 92

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

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

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

[0085] Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Gly Gly Ala Trp Glu Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser
130 135 140

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

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Gly Val His Trp Tyr Gln Gln Leu
165 170 175

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asp Thr Asn Arg Pro
180 185 190

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala
195 200 205

Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Arg Ala Gln Ala Val Val Thr Gln Glu
245 250 255

Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg
260 265 270

Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
275 280 285

[0086]

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys
290 295 300

Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly
305 310 315 320

Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu
325 330 335

Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly
340 345 350

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr
355 360 365

Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu
370 375 380

Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp
385 390 395 400

Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro
405 410 415

Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu
420 425 430

Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr
435 440 445

His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
450 455 460

<210> 93

<211> 723

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码EpCAM2.2单链可变片段融合蛋白的cDNA

<400> 93

[0087] cagggtccagc tgcaggaaag cgggccagga ctggtgaagc ctagecgagac actgacaactg 60
acttgttagcg tgagcggggg aagcattagc ggctactatt ggtcctggat cagacagccc 120
cctggcatgg ggctggagtg gattgggagc gtgcaccatt caggaagcac ctctacaac 180
ccatccctga agagccgggt gactatcagt gtcgacacct caaagaacca gttctctctg 240
aaactgaata gtgtgacagc cgtgacact gctgtctact attgcgcacg gtacagaggc 300
agcggccttg attattgggg gcagggaacc ctggtgacag tcagctccgg cggaggaggc 360
agcggaggag gagggctcgg aggcggggga tctcagagtg tctgacaca gccaccatca 420
gtcagcgcag cccctggcca gaaagtgact atctctgtt ctggcgactc tagtaacatt 480
gggaaaaatt acgtctcttg gtatcagcag ctgcctggaa cagcccaaaa gctgctgac 540
tatgagaaca atgaaaggcc ctctggcgtg cctgateget ttagtggatc aaaaagcggc 600
actagcgcca ccttgggcct taccgggctg cagacaggcg acgaagccga ttactattgc 660
gctgcttggg ataccagtct gagtgcctgg gtcttcgggg gggaacaaa ggtcaccgtg 720
ctg 723

<210> 94

<211> 241

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EpCAM2.2单链可变片段融合蛋白

<400> 94

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Met Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

[0088]

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

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

Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala
130 135 140

Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ser Asn Ile
145 150 155 160

Gly Lys Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro
165 170 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Asn Asn Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp
180 185 190

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr
195 200 205

Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp
 210 215 220

Thr Ser Leu Ser Ala Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val
 225 230 235 240

Leu

<210> 95
 <211> 1440
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码EpCAM2.2 - 人源化1F3.1Fd融合构建体的cDNA

<400> 95
 caggtccagc tgcaggaaag cgggccagga ctggtgaage ctagecgagac actgacactg 60
 acttgtagcg tgagcggggg aagcattage ggctactatt ggtcctggat cagacagecc 120
 cctggcatgg ggctggagtg gattggggagc gtgcaccatt caggaagcac ctcttacaac 180
 [0089] ccatccctga agagccgggt gactatcagt gtgcacacct caaagaacca gttctctctg 240
 aaactgaata gtgtgacagc cgctgacact gctgtctact attgcgcacg gtacagaggc 300
 agcggcctgg attattgggg gcagggaacc ctggtgacag tcagctccgg cggaggaggc 360
 agcggaggag gagggtccgg aggcggggga tctcagagtg tgctgacaca gccaccatca 420
 gtcagegcag cccctggcca gaaagtgact atctcctgtt ctggcgactc tagtaacatt 480
 gggaaaaatt acgtctcttg gtatcagcag ctgcctggaa cagecccaaa gctgctgata 540
 tatgagaaca atgaaaggec ctctggcgtg cctgatecgt ttagtggate aaaaageggc 600
 actagcgcca ccttgggeat taccgggctg cagacaggcg acgaagccga ttactattgc 660
 gctgcttggg ataccagtct gactgctcgg gtcttcgggg gggaacaaa ggtcaccgtg 720
 ctggggcgcg ccgaggtgca gctggtggag tctgggggag gcttgggtaca gcctgggggg 780
 tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcaccttta gcacctacgc catgaactgg 840
 gtccgccagg ctccaggga ggggctggag tgggtctcac gcataagaag taaatataat 900
 aattatgeaa catattatgc cgattcagt aaagaccggt tcaccatctc cagagacgat 960
 tccaagaaca cgtgttatct gcaaatgaac agcctgagag ccgaggacac ggccgtatat 1020
 tactgtgcga gacatgggaa cttcggtaat agctacgttt cctggtttgc ttactggggc 1080

caagggacaa tggtcacagt ctcttcagct agcaccaagg gcccatcggt ctccccctg 1140
 gggccctgct ccaggagcac ctccgagagc acagcggccc tgggctgcct ggtaaggac 1200
 tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac 1260
 accttcccag ctgtcctaca gtctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg 1320
 ccttccagea acttcggcac ccagacctac acctgcaacg tagatcaca gccagcaac 1380
 accaaggtgg acaagacagt tgggtggcggg ggctcccatc atcatcatca tcatcattag 1440

<210> 96
 <211> 479
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> EpCAM2.2 - 人源化1F3.1Fd融合构建体
 <400> 96

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

[0090] Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Met Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

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

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

Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala

	130	135	140	
	Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ser Asn Ile 145	150	155	160
	Gly Lys Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro 165	170	175	
	Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Asn Asn Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp 180	185	190	
	Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr 195	200	205	
	Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp 210	215	220	
	Thr Ser Leu Ser Ala Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val 225	230	235	240
[0091]	Leu Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val 245	250	255	
	Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr 260	265	270	
	Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly 275	280	285	
	Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr 290	295	300	
	Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp 305	310	315	320
	Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp 325	330	335	
	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr 340	345	350	
	Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser 355	360	365	

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

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

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

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
420 425 430

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln
435 440 445

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
450 455 460

Lys Thr Val Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His His
465 470 475

[0092]

<210> 97
<211> 1380
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码EpCAM2.2 - 人源化1F3.1LC融合构建体的cDNA

<400> 97
caggtccagc tgcaggaaag cgggccagga ctggtgaagc ctagecgagac actgacactg 60
acttgtageg tgageggggg aagcattage ggctactatt ggtcctggat cagacagccc 120
cctggcatgg ggctggagtg gattgggagc gtgcaccatt caggaagcac ctctacaac 180
ccatccetga agagecgggt gactatcagt gtcgacacct caaagaacca gttctctctg 240
aaactgaata gtgtgacagc cgtgacact gctgtctact attgcgcag gtacagaggc 300
agcggcctgg attattgggg gcagggaacc ctggtgacag tcagctccgg cggaggaggc 360
agcggaggag gaggtccgg aggcggggga tctcagagtg tgctgacaca gccaccatca 420
gtcagegcag cccctggcca gaaagtgact atctctgtt ctggcgactc tagtaacatt 480
gggaaaaatt acgtctcttg gtatcagcag ctgcctggaa cagcccaaa gctgctgac 540

[0093]

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

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

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

Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala
130 135 140

Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ser Asn Ile
145 150 155 160

Gly Lys Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro
165 170 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Asn Asn Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp
180 185 190

[0094]

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr
195 200 205

Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp
210 215 220

Thr Ser Leu Ser Ala Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val
225 230 235 240

Leu Gly Arg Ala Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val
245 250 255

Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala
260 265 270

Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln
275 280 285

Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr
290 295 300

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr
305 310 315 320

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

Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
340 345 350

Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser
355 360 365

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser
370 375 380

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser
385 390 395 400

Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn
405 410 415

[0095]

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp
420 425 430

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr
435 440 445

Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
450 455

<210> 99

<211> 1431

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码EpCAM2.2 - δ 人源化1F3.1Fd融合构建体的cDNA

<400> 99

cagggtccagc tgcaggaaag cgggccagga ctggtgaagc ctagegagac actgacaactg 60

acttgtagcg tgagcggggg aagcattagc ggctactatt ggtcctggat cagacagccc 120

cctggcatgg ggctggagtg gattgggagc gtgcaccatt caggaagcac ctctacaac 180

ccatccctga agagccgggt gactatcagt gtcgacacct caaagaacca gttctctctg 240

	aaactgaata gtgtgacagc cgctgacact gctgtctact attgcgcacg gtacagagge	300
	ageggcctgg attattgggg gcaggggaacc ctgggtgacag tcagctccgg cggaggagge	360
	agcggaggag gagggtccgg aggcggggga tctcagagtg tgctgacaca gccaccatca	420
	gtcagcgcag cccctggcca gaaagtgact atctcctgtt ctggcgactc tagtaacatt	480
	gggaaaaatt acgtctcttg gtatcagcag ctgcctggaa cagcccaaaa getgctgate	540
	tatgagaaca atgaaaggcc ctctggcgtg cctgatcgct ttagtggate aaaaagcgge	600
	actagcgcca cctggggcat taccgggctg cagacaggcg acgaagccga ttactattgc	660
	gctgcttggg ataccagtct gagtgcctcg gtcttcgggg ggggaacaaa ggtaaccgtg	720
	ctggaggtgc agctgggtga gtctggggga ggcttggtac agcctggggg gtccctgaga	780
	ctctcctgig cagcctctgg attcaccttt agcacctacg ccatgaactg ggtecgccag	840
	gctccaggga aggggctgga gtgggtctca cgcataagaa gtaaataata taattatgca	900
	acatattatg cegattcagt gaaagaccgg ttaccatct ccagagacga ttccaagaac	960
	acgctgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaggaca cgccgtata ttactgtgag	1020
	agacatggga actteggtaa tagctacgtt tcttggttg ctactgggg ccaaggga	1080
[0096]	atggtaaccg tctcttcagc tagcaccaag ggccatcgg tcttccccct ggccgctgc	1140
	tccaggagca cctccgagag cacagcgccc ctgggctgcc tggteaagga ctacttcccc	1200
	gaaccggtga cgggtgctg gaactcagge getctgacca ggcgctgca cacttccca	1260
	getgtctac agtctcagg actctactcc ctacagcagc tggtgaccgt gccctccagc	1320
	aacttcggca ccagaccta cactgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg	1380
	gacaagacag ttggtggcgg gggctcccat catcatcatc atcatcatta g	1431

<210> 100

<211> 476

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EpCAM2.2 - δ 人源化1F3.1Fd融合构建体

<400> 100

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

Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Gly	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	20	25	30
	Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Met Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45		
	Gly Ser Val His His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys 50 55 60		
	Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu 65 70 75 80		
	Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 85 90 95		
	Arg Tyr Arg Gly Ser Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val 100 105 110		
	Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 115 120 125		
[0097]	Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala 130 135 140		
	Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ser Asn Ile 145 150 155 160		
	Gly Lys Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro 165 170 175		
	Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Asn Asn Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp 180 185 190		
	Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr 195 200 205		
	Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp 210 215 220		
	Thr Ser Leu Ser Ala Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val 225 230 235 240		
	Leu Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly 245 250 255		

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

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

Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala
290 295 300

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp
340 345 350

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
355 360 365

[0098]

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
370 375 380

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

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

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
420 425 430

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
435 440 445

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

Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His His
465 470 475

<210> 101
 <211> 1371
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码EpCAM2.2 - δ 人源化1F3.1LC融合构建体的cDNA

<400> 101
 caggtccagc tgcaggaaag cgggccagga ctggtgaagc ctagecagac actgacactg 60
 acttgtagcg tgagcggggg aagcattagc ggctactatt ggctctggat cagacagccc 120
 cctggcatgg ggctggagtg gattgggagc gtgcaccatt caggaagcac ctctacaac 180
 ccatccctga agagccgggt gactatcagt gtgcacacct caaagaacca gttctctctg 240
 aaactgaata gtgtgacagc cgtgacact gctgtctact attgagcagc gtacagaggc 300
 agcggccttg attattgggg gcagggaacc ctggtgacag tcagctccgg cggaggaggc 360
 agcggaggag gagggctcgg aggcggggga tctcagagtg tgctgacaca gccaccatca 420
 gtcagcgcag cccctggcca gaaagtgact atctctgtt ctggcgactc tagtaacatt 480
 gggaaaaatt acgtctcttg gtatcagcag ctgcctggaa cagecccaaa gctgctgac 540
 [0099] tatgagaaca atgaaaggcc ctctggcgtg cctgateget ttagtgatc aaaaagcggc 600
 actagcgcga ccttgggcat taccgggctg cagacaggcg acgaagccga ttactattgc 660
 gctgcttggg ataccagtct gactgctcgg gtcttcgggg ggggaacaaa ggtaaccgtg 720
 ctgcaggctg tggtagctca ggagccctca ctgactgtgt cccagaggag gacagtcact 780
 ctacacctgc gctcaagtac tggggctgtt acaactagta actatgcaa ctgggtccag 840
 cagaaacctg gacaagcacc caggggtctg attggtggt ccaacaagcg agctccaggt 900
 acccctgecc gggtctcagg ctccctcctt gggggcaaag ctgccctgac actgtcaggt 960
 gtgcagcctg aggaagaggc tgagtattac tgcgtctat ggtacagcaa cctctgggtg 1020
 ttggcgagag ggaccaagct gaccgtccta ggccaaccga aageggcgcc ctgggtcact 1080
 ctgttccgc cctcctctga ggagcttcaa gccacaagg ccacactggt gtgtctcata 1140
 agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag 1200
 gcgggagtg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc 1260
 tatctgagcc tgacgctga gcagtggaag tccacagaa gctacagctg ccaggtcacg 1320
 catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gccctacag aatgttcata g 1371

<210> 102
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> EpCAM2.2 - δ 人源化1F3.1LC融合构建体

<400> 102

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Met Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

[0100] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

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

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

Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala
 130 135 140

Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ser Asn Ile
 145 150 155 160

Gly Lys Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro
 165 170 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Asn Asn Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp
 180 185 190

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr
195 200 205

Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp
210 215 220

Thr Ser Leu Ser Ala Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val
225 230 235 240

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

Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
260 265 270

Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
275 280 285

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg
290 295 300

[0101]

Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly
305 310 315 320

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

Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
340 345 350

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
355 360 365

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
370 375 380

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
385 390 395 400

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
405 410 415

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
420 425 430

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
435 440 445

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
450 455

<210> 103
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 103
gagacagaat tcgccaccat ggtgttgggg ctgaagtg 38

<210> 104
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

[0102]

<220>
<223> 引物

<400> 104
gagacagcgg ccgcctatit accaggggag cgagac 36

<210> 105
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 105
gagacagaat tcgccaccat ggcttggatt tcacttatac 40

<210> 106
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 106

		gagacagcgg ccgctcagga acagtcagca cgggac	36
	<210>	107	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	107	
		gcgtatccat ggatggcgcc cccgcaggtc	30
	<210>	108	
	<211>	33	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	108	
		gcgtatgcgg ccgcttttag accctgcatt gag	33
[0103]	<210>	109	
	<211>	10	
	<212>	PRT	
	<213>	智人	
	<400>	109	
		Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr	
		1 5 10	
	<210>	110	
	<211>	7	
	<212>	PRT	
	<213>	智人	
	<400>	110	
		Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu	
		1 5	
	<210>	111	
	<211>	12	
	<212>	PRT	
	<213>	智人	
	<400>	111	
		Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr	

	1	5	10
	<210>	112	
	<211>	10	
	<212>	PRT	
	<213>	智人	
	<400>	112	
	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro		
	1	5	10
	<210>	113	
	<211>	7	
	<212>	PRT	
	<213>	智人	
	<400>	113	
	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro		
	1	5	
[0104]	<210>	114	
	<211>	5	
	<212>	PRT	
	<213>	智人	
	<400>	114	
	Cys Pro Pro Cys Pro		
	1	5	
	<210>	115	
	<211>	5	
	<212>	PRT	
	<213>	智人	
	<400>	115	
	Cys Pro Arg Cys Pro		
	1	5	
	<210>	116	
	<211>	5	
	<212>	PRT	
	<213>	智人	
	<400>	116	
	Cys Pro Ser Cys Pro		
	1	5	

<210> 117
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 117

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
 1 5 10 15

Pro

<210> 118
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 118

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 1 5 10 15

[0105]

<210> 119
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 119

Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala Gln Pro Gln
 1 5 10 15

Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg
 20 25 30

Asn Thr

<210> 120
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 120

Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln
 1 5 10 15

Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro
20

<210> 121
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 121

Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro
1 5 10 15

Ser Pro Ser

<210> 122
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<400> 122

[0106] Val Pro Pro Pro Pro Pro
1 5

<210> 123
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 123

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

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

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

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

Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys
65 70 75 80

His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly
85 90 95

His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala
100 105

<210> 124
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 124

Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg
1 5 10 15

Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala
20 25 30

Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly
35 40 45

[0107] Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala
50 55 60

Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp
85 90 95

His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro
100 105 110

<210> 125
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 甘氨酸-丝氨酸聚合物柔性接头

<400> 125

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 126
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 甘氨酸-丝氨酸聚合物柔性接头

<400> 126

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 127
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性的甘氨酸-丝氨酸聚合物柔性接头

<400> 127

Gly Gly Ser Gly
1

[0108] <210> 128
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性的甘氨酸-丝氨酸聚合物柔性接头

<400> 128

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 129
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性的甘氨酸-丝氨酸聚合物柔性接头

<400> 129

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 130

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性的甘氨酸-丝氨酸聚合物柔性接头

<400> 130

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 131
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性的甘氨酸-丝氨酸聚合物柔性接头

<400> 131

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

[0109]

<210> 132
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性的甘氨酸-丝氨酸聚合物柔性接头

<400> 132

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 133
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蛋白酶底物切割序列

<400> 133

Pro Leu Gly Leu Ala Gly
1 5

<210> 134
<211> 8

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蛋白酶底物切割序列

<400> 134

Gly Pro Leu Gly Met Leu Ser Gln
1 5

<210> 135
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蛋白酶底物切割序列

<400> 135

Gly Pro Leu Gly Leu Trp Ala Gln
1 5

[0110]

<210> 136
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蛋白酶底物切割序列

<400> 136

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp
1 5 10

<210> 137
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蛋白酶底物切割序列

<400> 137

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

Leu Asp

<210> 138
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蛋白酶底物切割序列

<400> 138

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 139
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EpCAM1.1和EpCAM1.2 scFv可变重链CDR1

<400> 139

Asn Tyr Trp Met Ser
1 5

[0111]

<210> 140
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EpCAM1.1和EpCAM1.2 scFv可变重链CDR2

<400> 140

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Phe Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 141
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EpCAM1.1和EpCAM1.2 scFv可变重链CDR3

<400> 141

Val Gly Gly Ala Trp Glu Leu Gly Tyr
1 5

<210> 142
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EpCAM1.1和EpCAM1.2 scFv可变轻链CDR1

<400> 142

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Gly Val His
1 5 10

<210> 143
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EpCAM1.1和EpCAM1.2 scFv可变轻链CDR2

<400> 143

[0112] Ser Asp Thr Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 144
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EpCAM1.1和EpCAM1.2 scFv可变轻链CDR3

<400> 144

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Arg Val
1 5 10

<210> 145
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EpCAM2.2 scFv可变重链CDR1

<400> 145

Gly Tyr Tyr Trp Ser

	1	5	
	<210>	146	
	<211>	16	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	EpCAM2.2 scFv可变重链CDR2	
	<400>	146	
	Ser Val His His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser		
	1 5 10 15		
	<210>	147	
	<211>	8	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	EpCAM2.2 scFv可变重链CDR3	
	<400>	147	
[0113]	Tyr Arg Gly Ser Gly Leu Asp Tyr		
	1 5		
	<210>	148	
	<211>	13	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	EpCAM2.2 scFv可变轻链CDR1	
	<400>	148	
	Ser Gly Asp Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser		
	1 5 10		
	<210>	149	
	<211>	7	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	EpCAM2.2 scFv可变轻链CDR2	
	<400>	149	
	Glu Asn Asn Glu Arg Pro Ser		
	1 5		

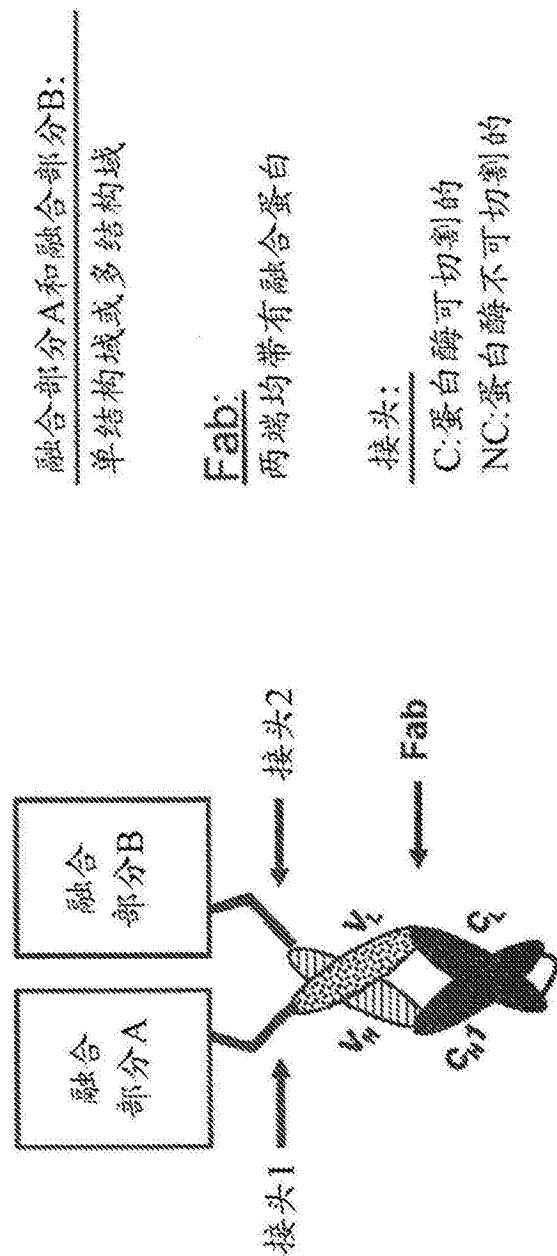


图1

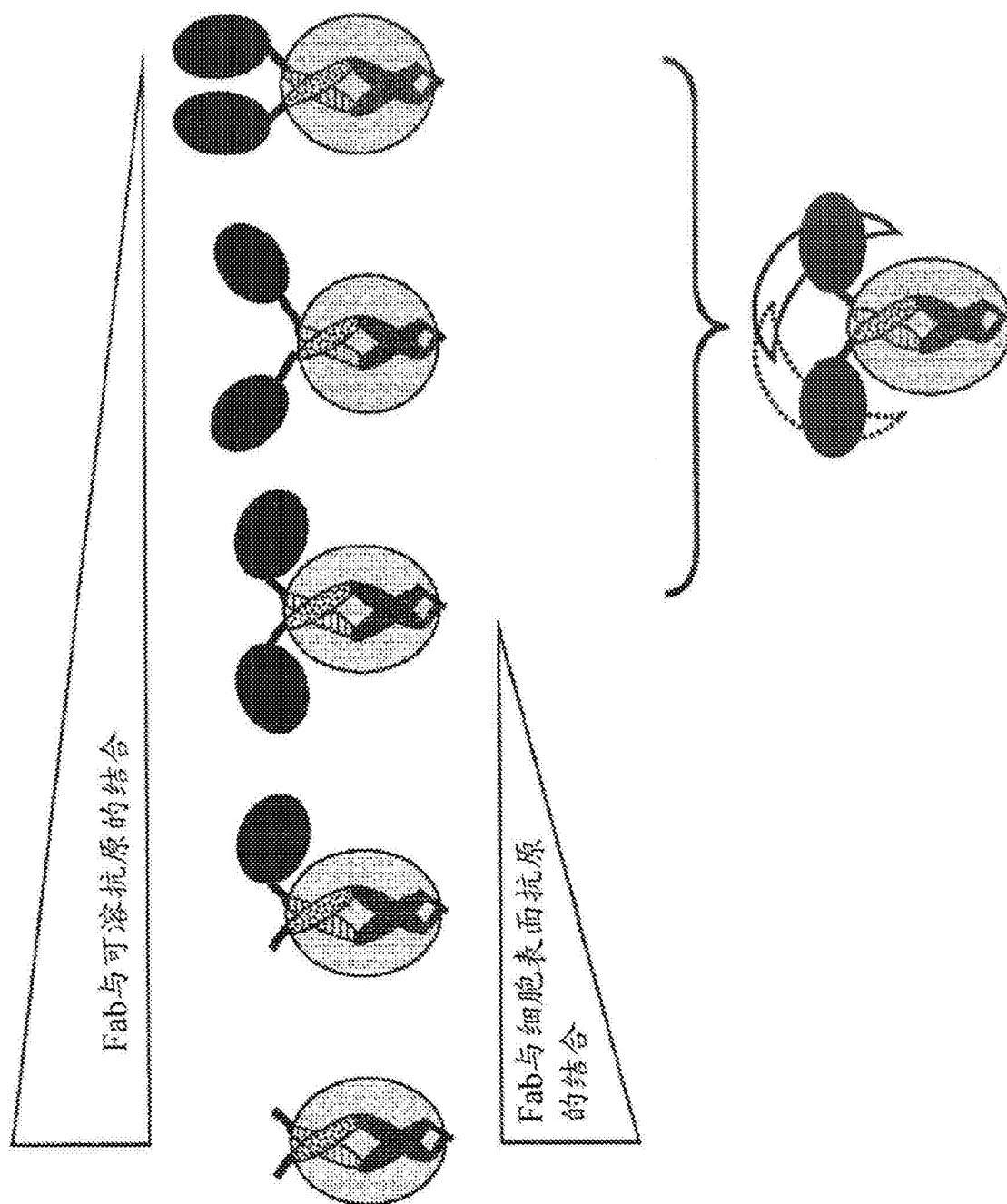


图2

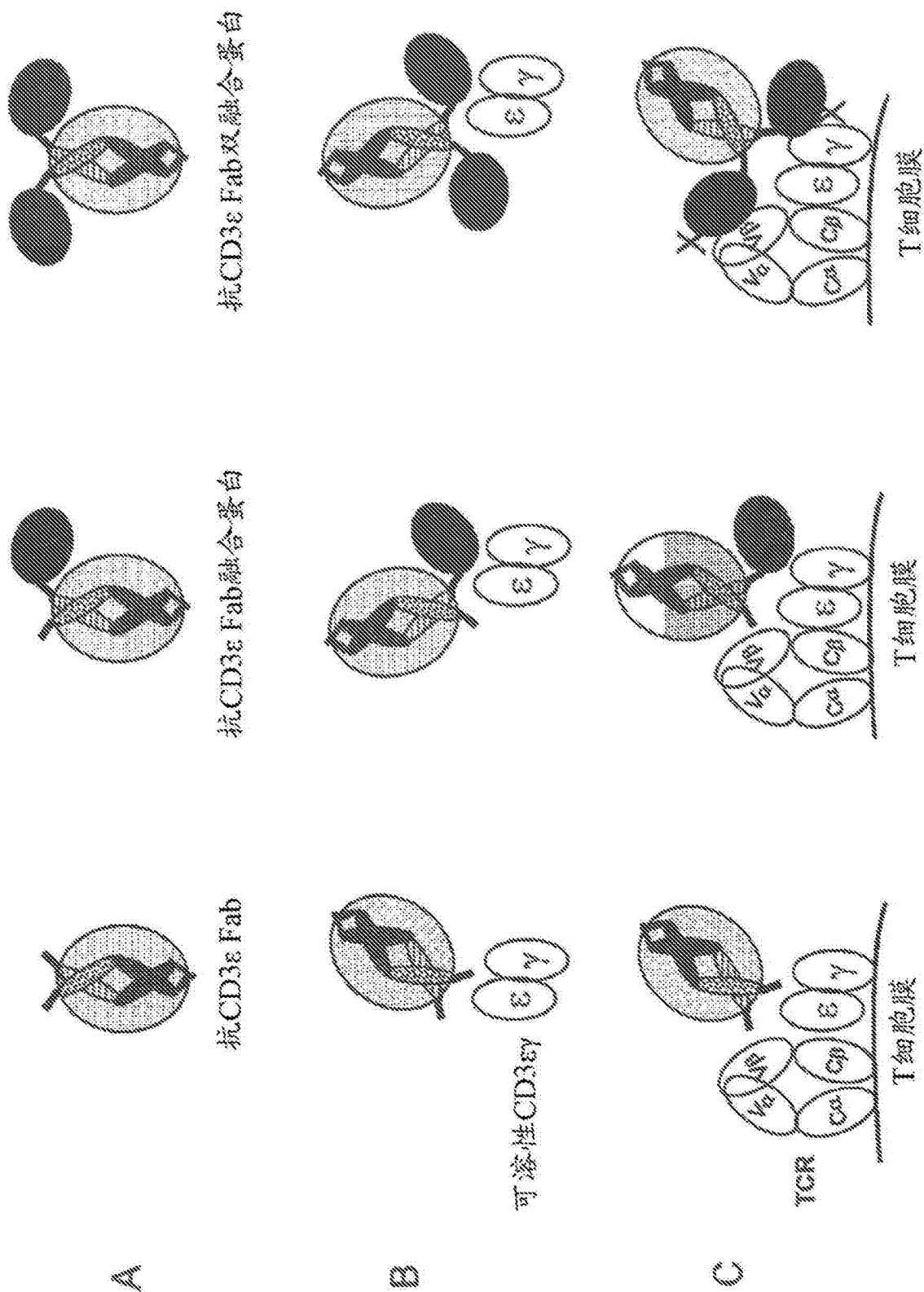


图3

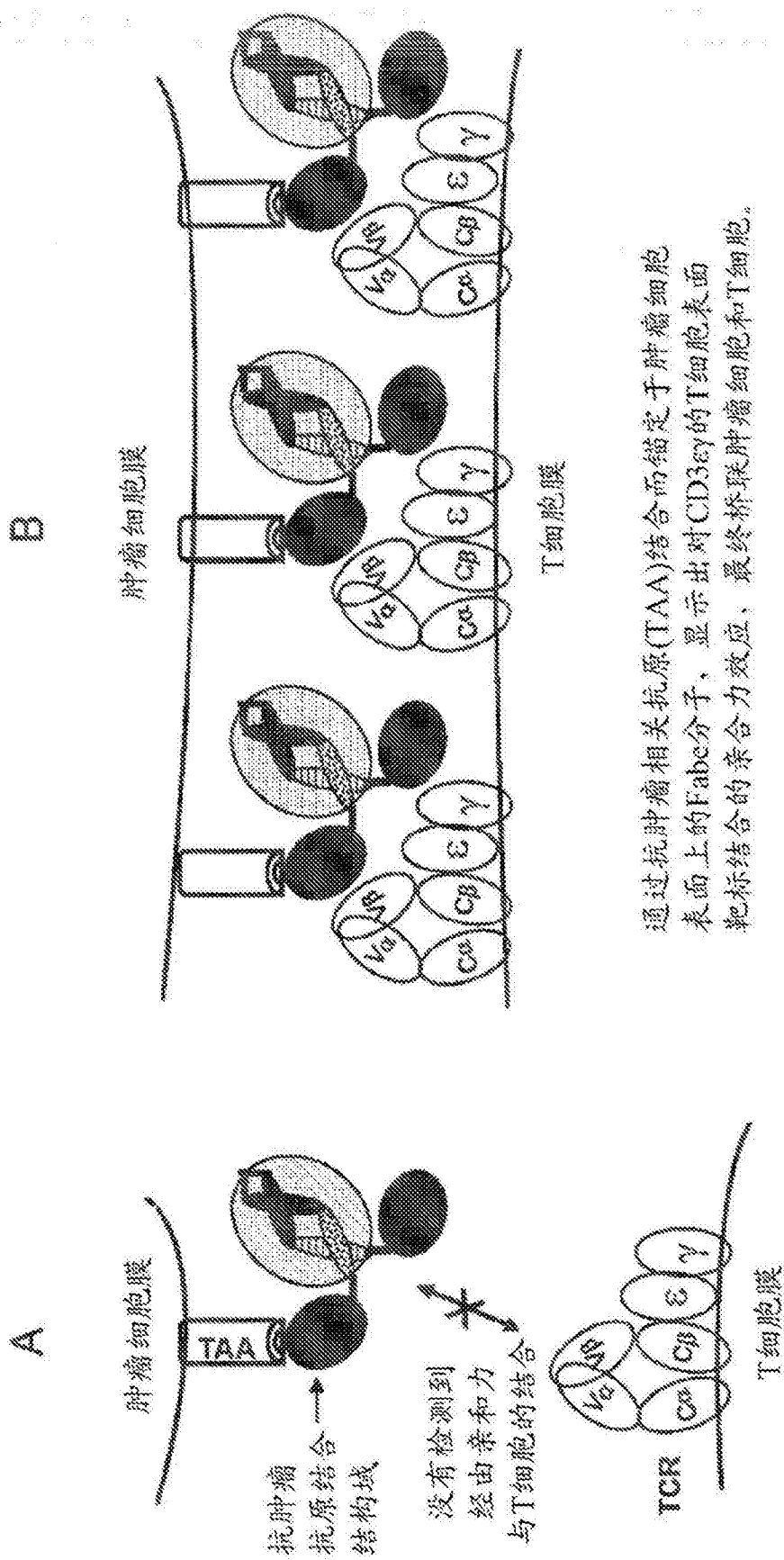


图4

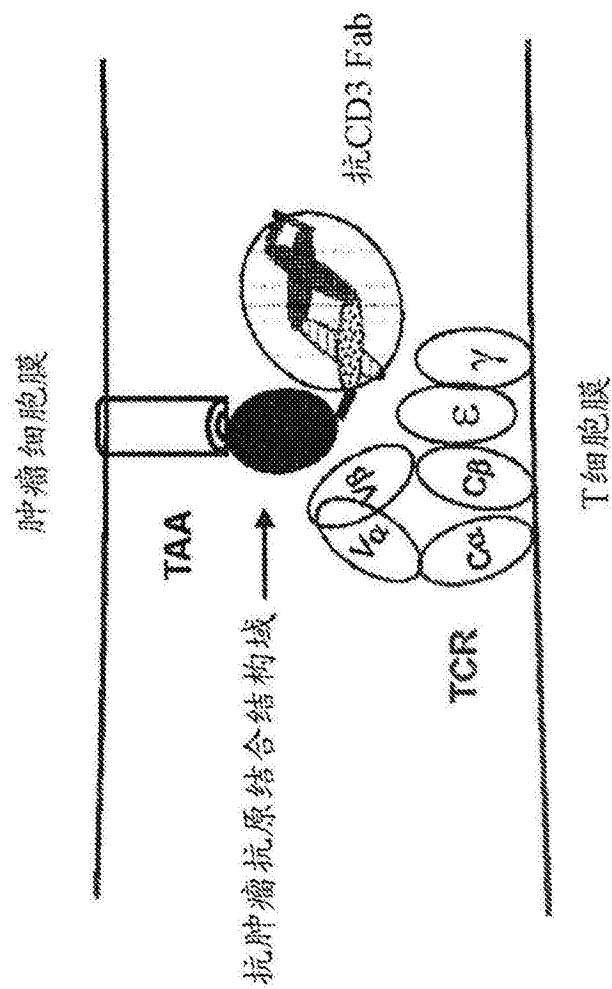


图5

Fab融合蛋白结合表面肿瘤相关抗原(TAA)和T细胞表面靶标,例如CD3εγ,导致肿瘤细胞和T细胞的桥联。

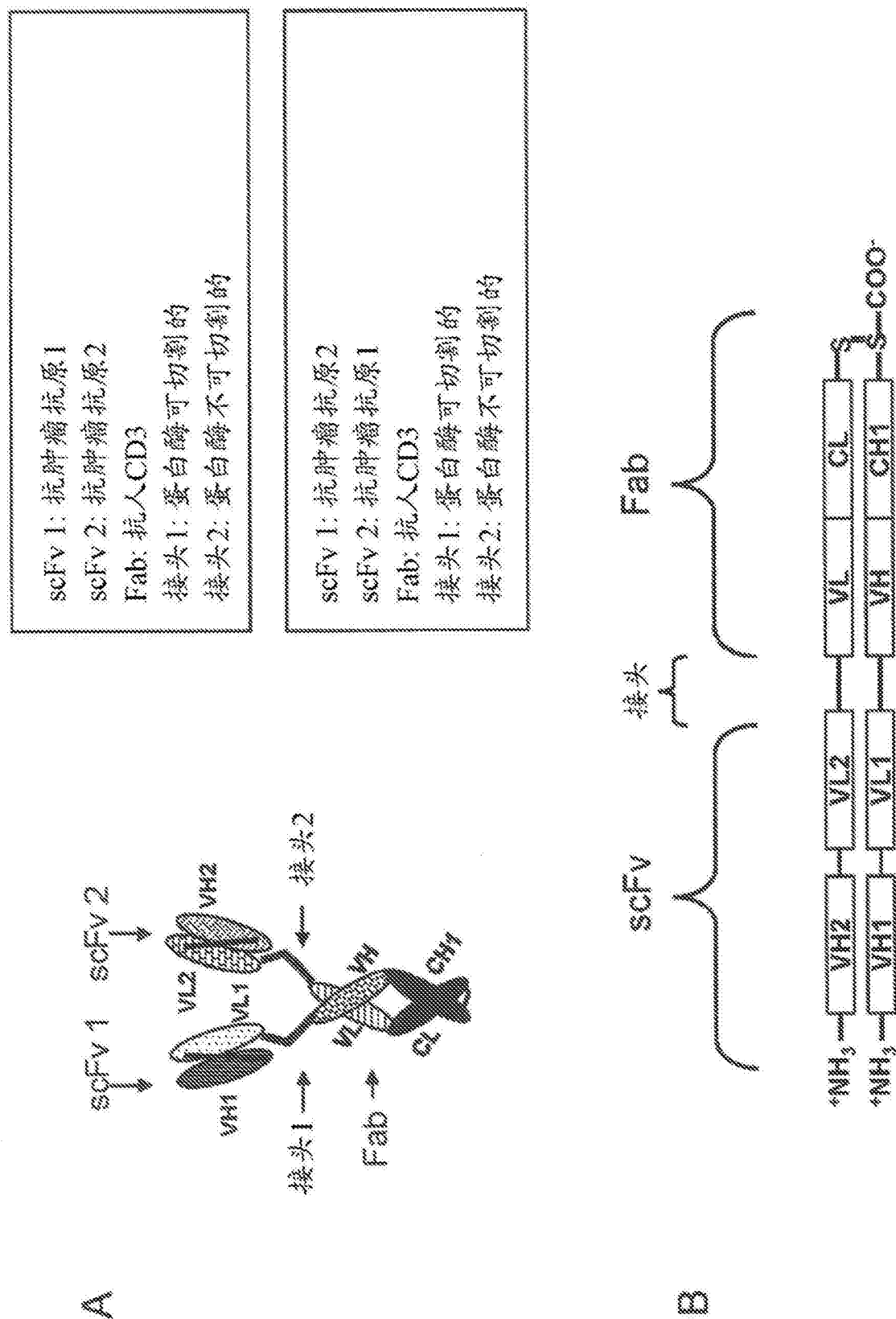


图6

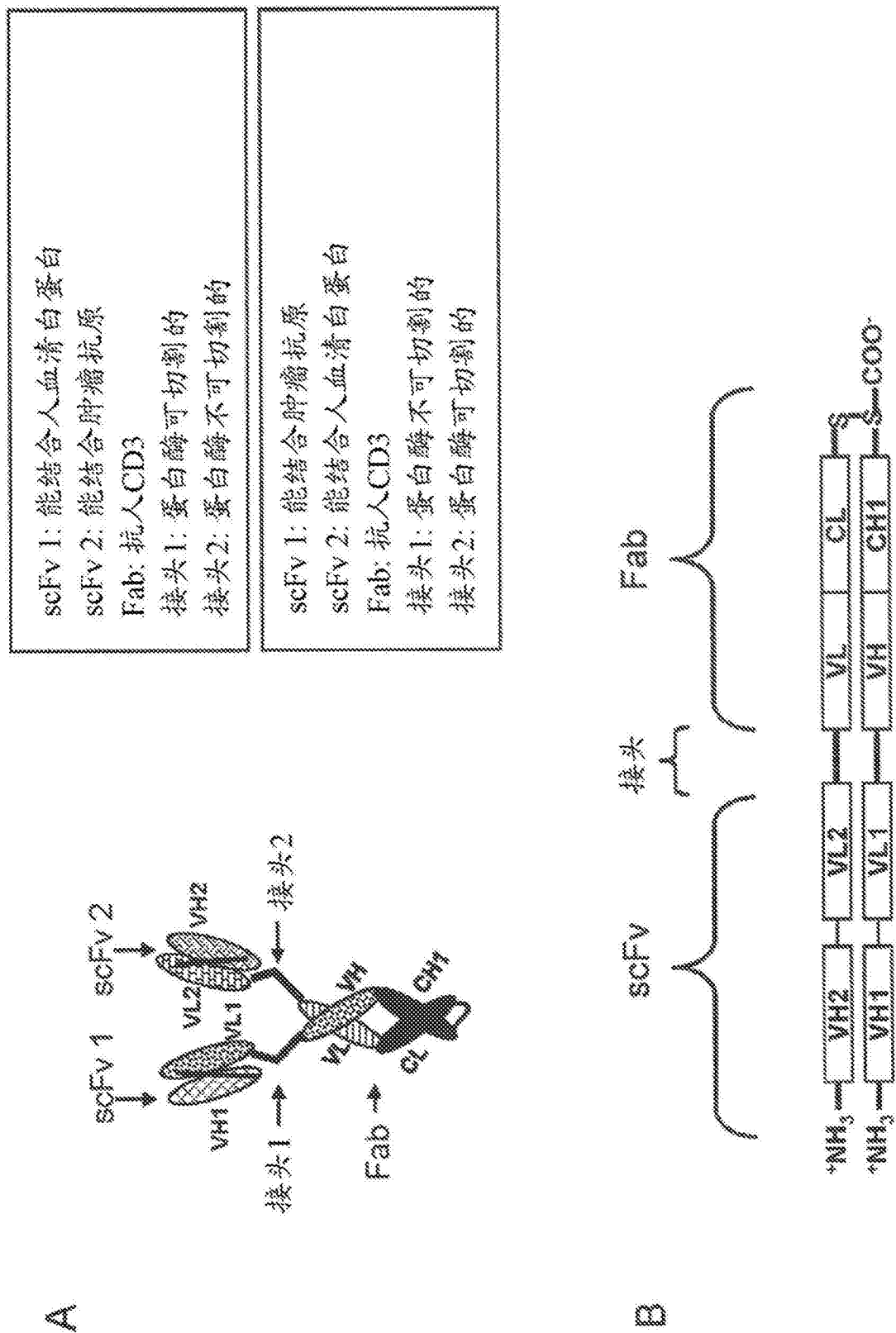


图7

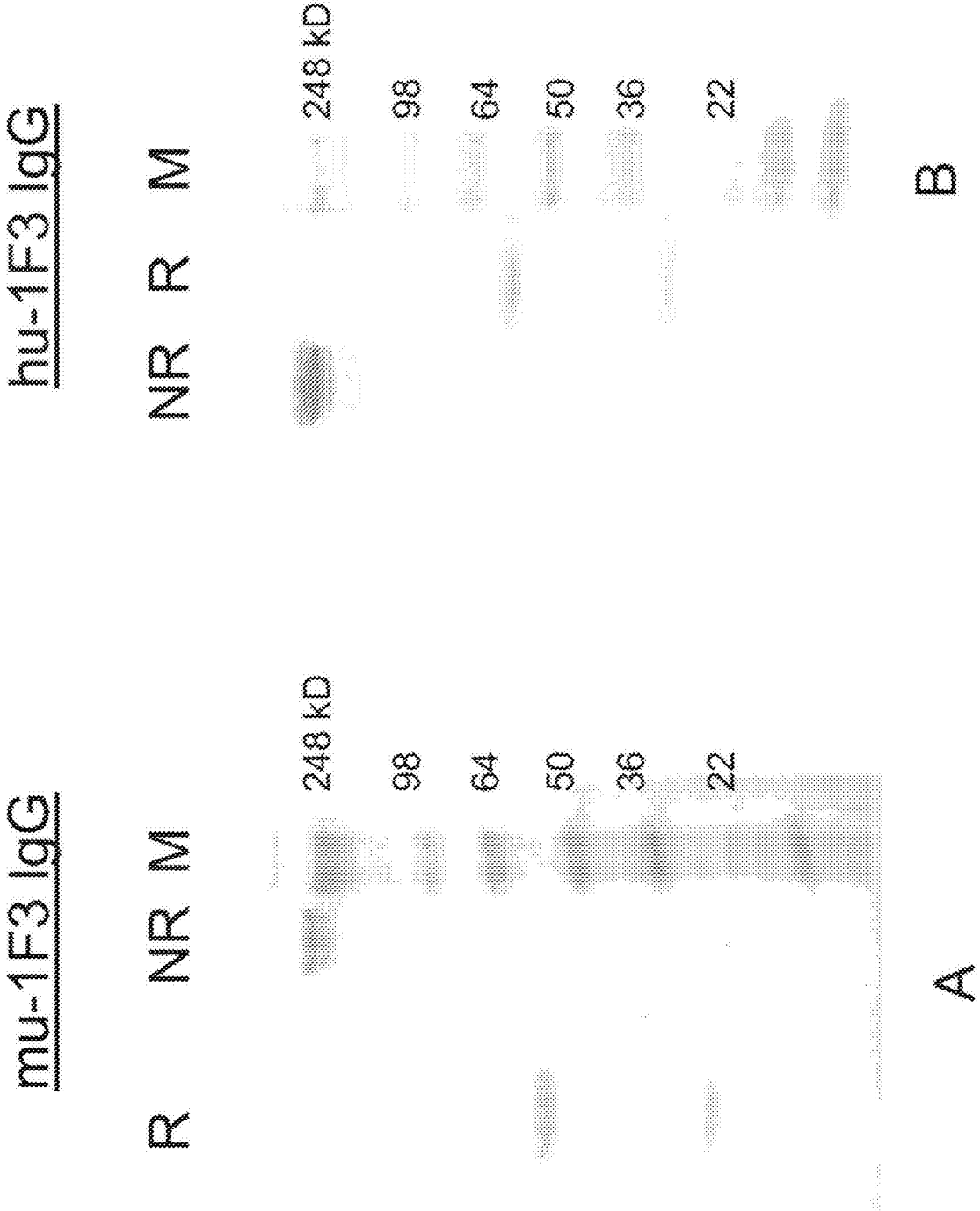


图8

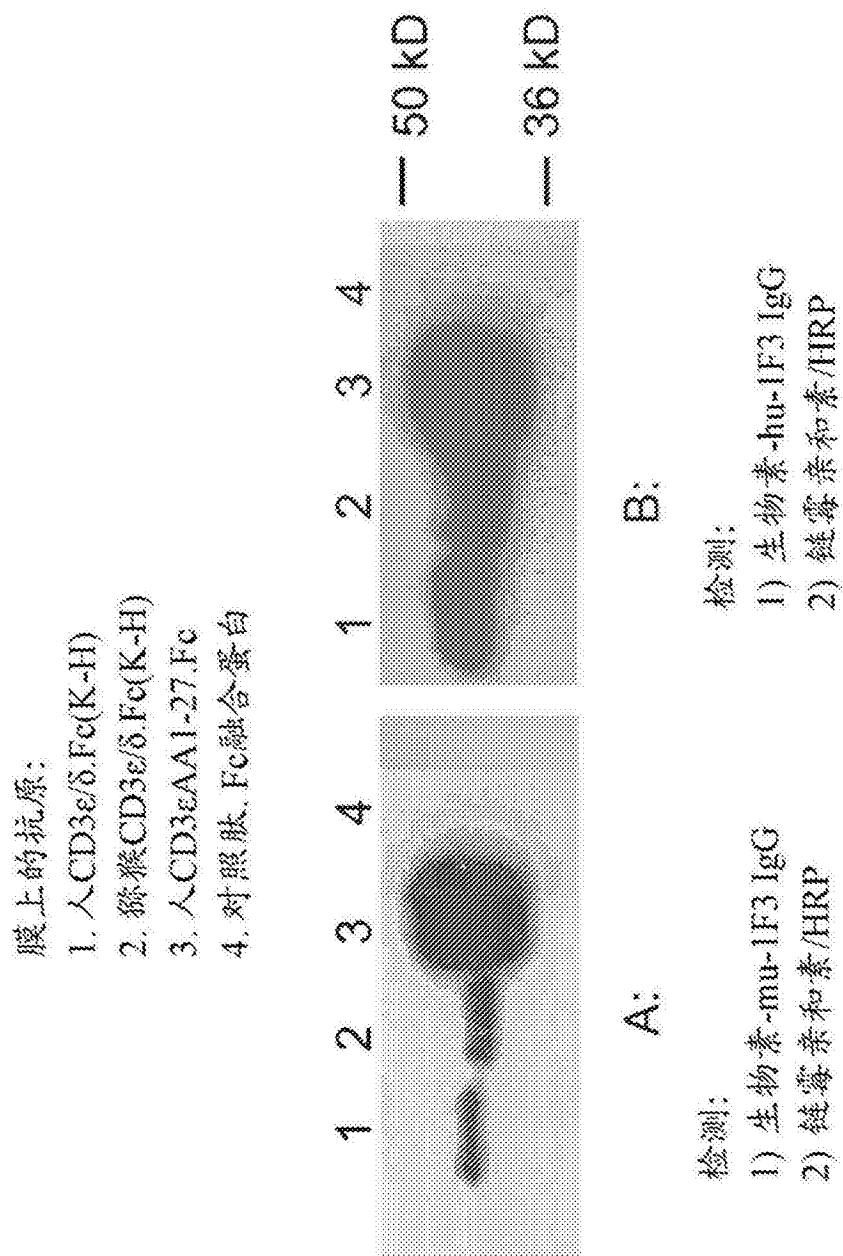


图9

小鼠抗人CD3抗体即mu-1F3及其人源化构建体即hu-1F3，
通过FACS对人PBMC显示出相似的结合模式。

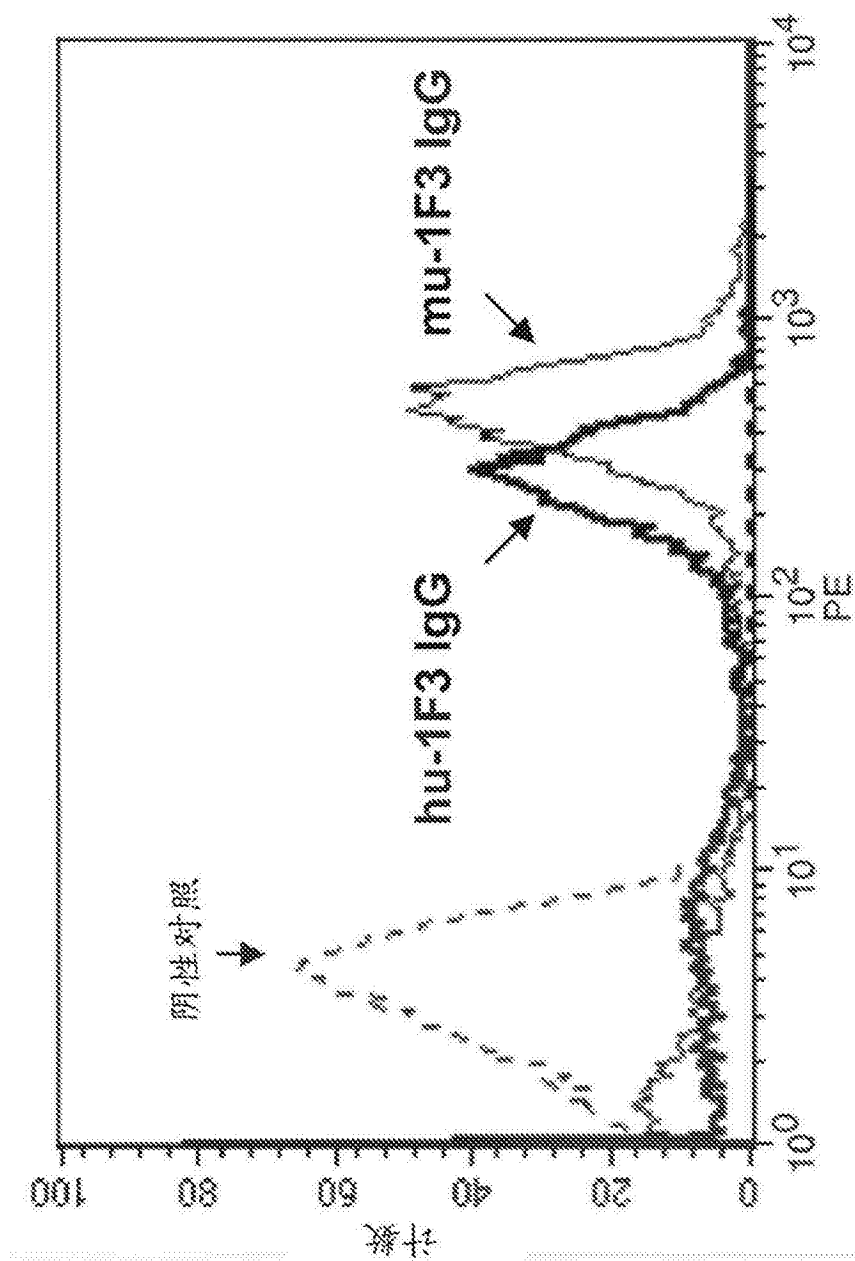


图10

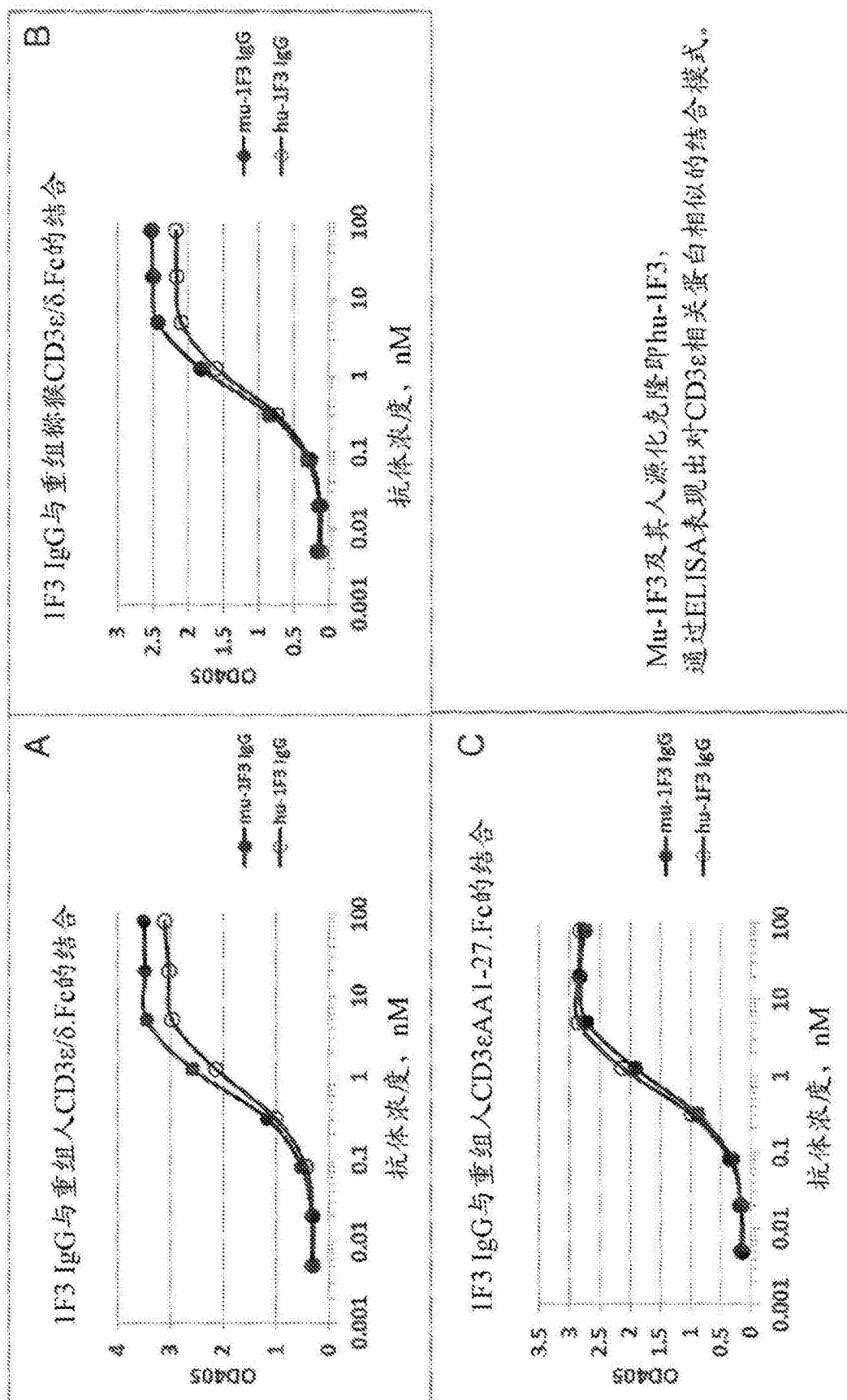


图11

通过FACS检测人源化1F3 Fab对Jurkat细胞
(表达CD3的人T细胞系)的结合

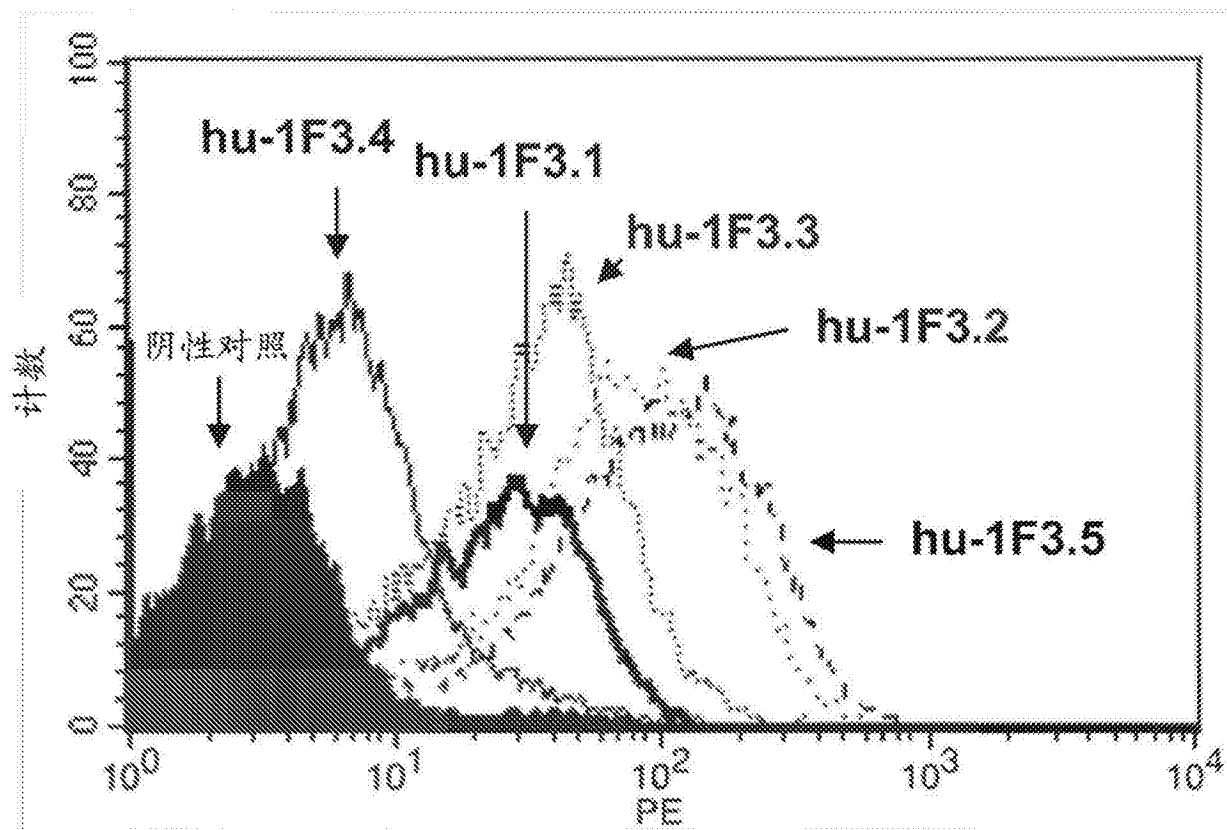


图12

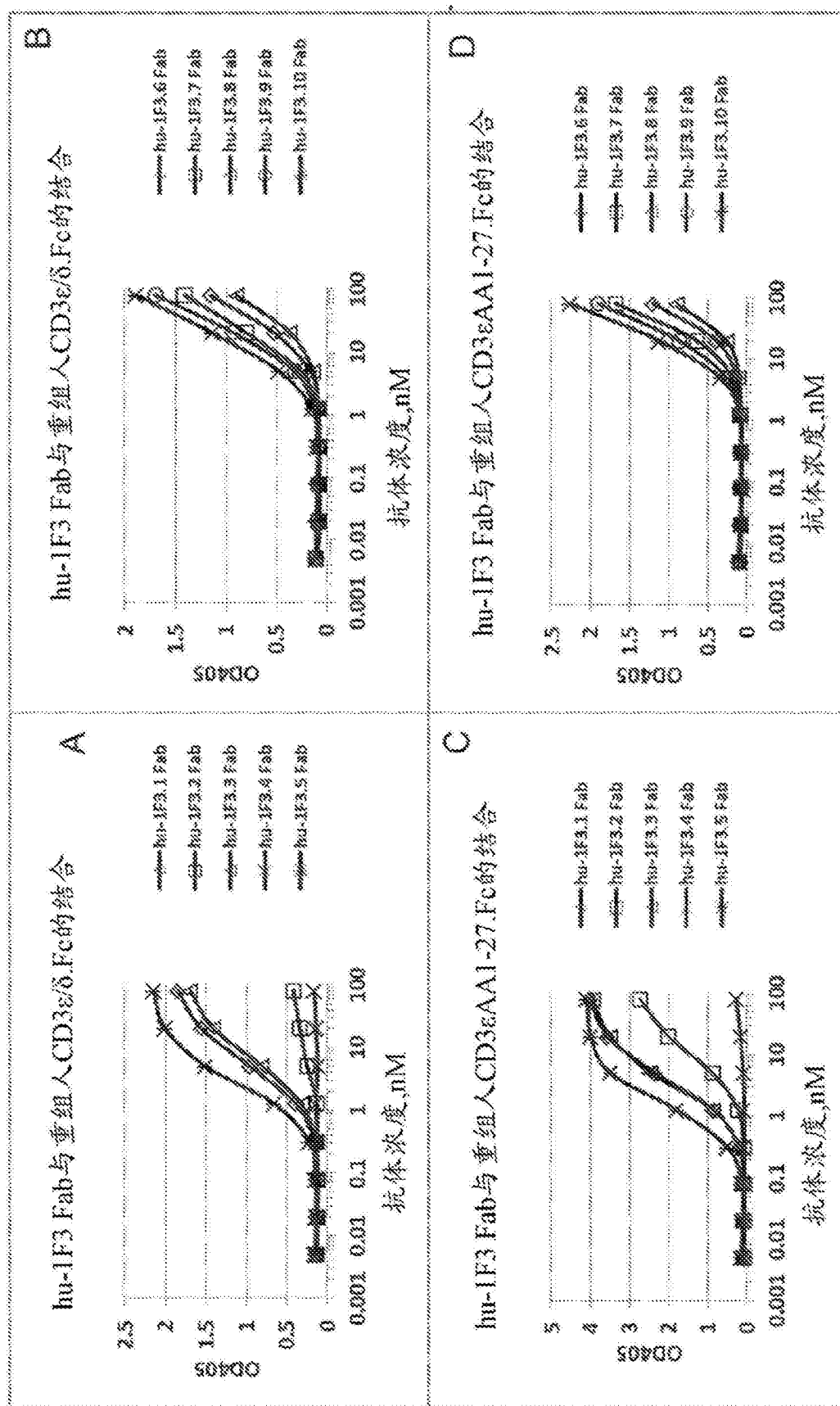


图13

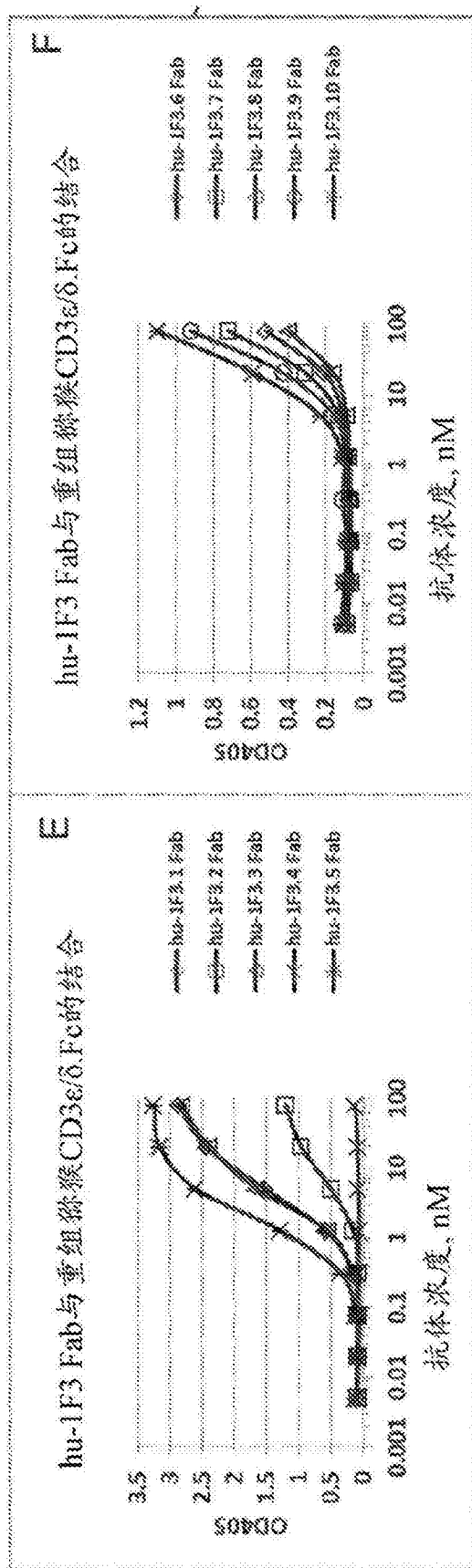


图13(续)

EpCAM xCD3 MSFP与Jurkat细胞的结合

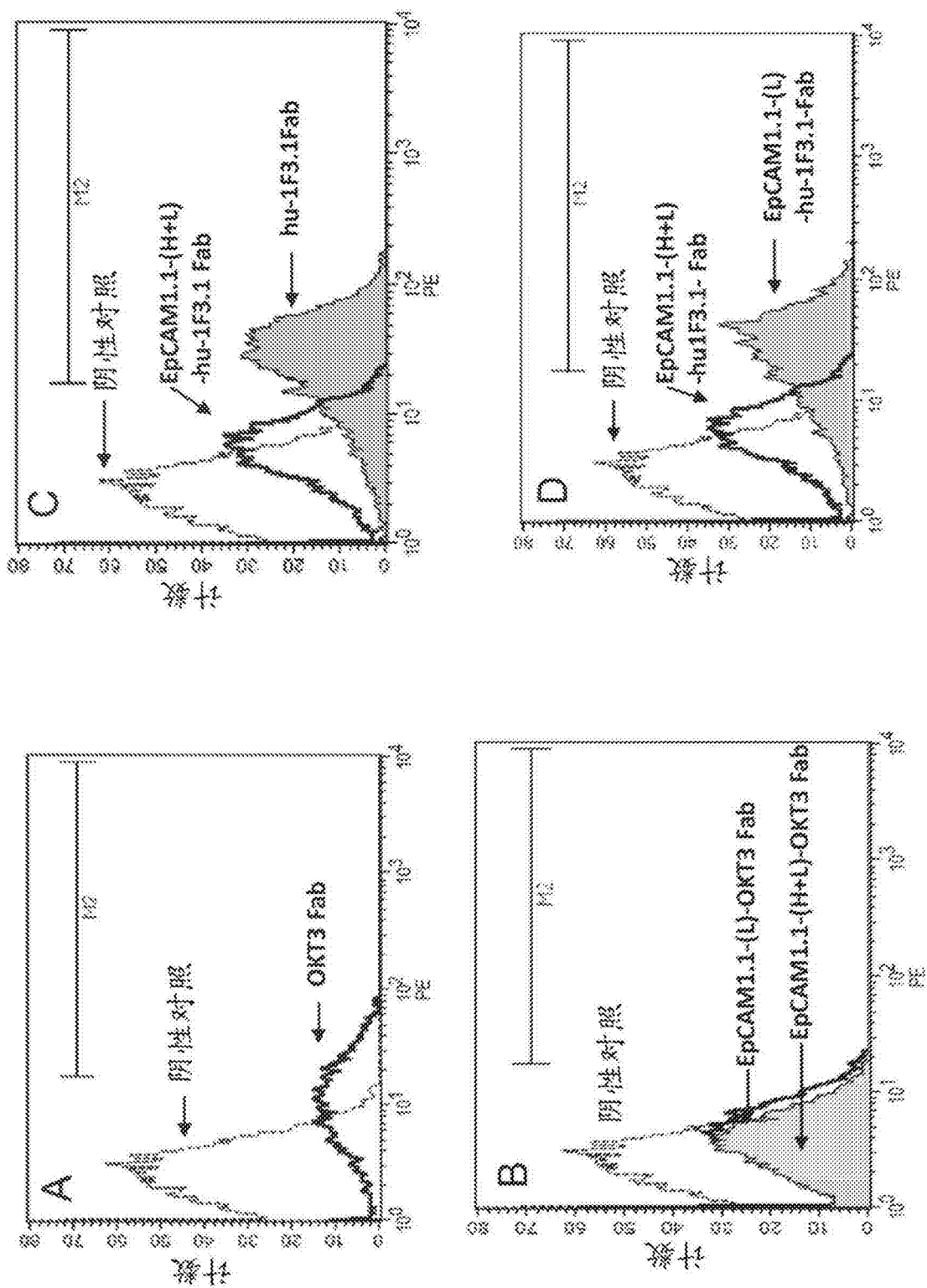


图14

EpCAM xCD3 MSFP与人PBMC的结合

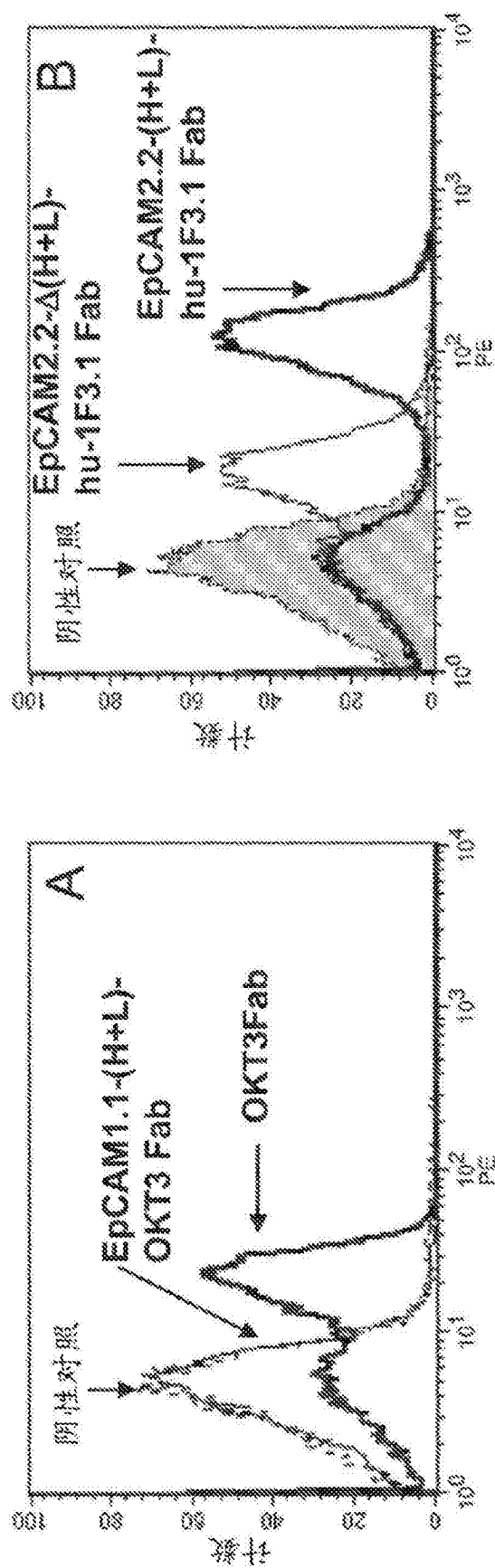


图15

EpCAM1.1 x OKT3 MSFP与可溶性CD3相关蛋白的结合

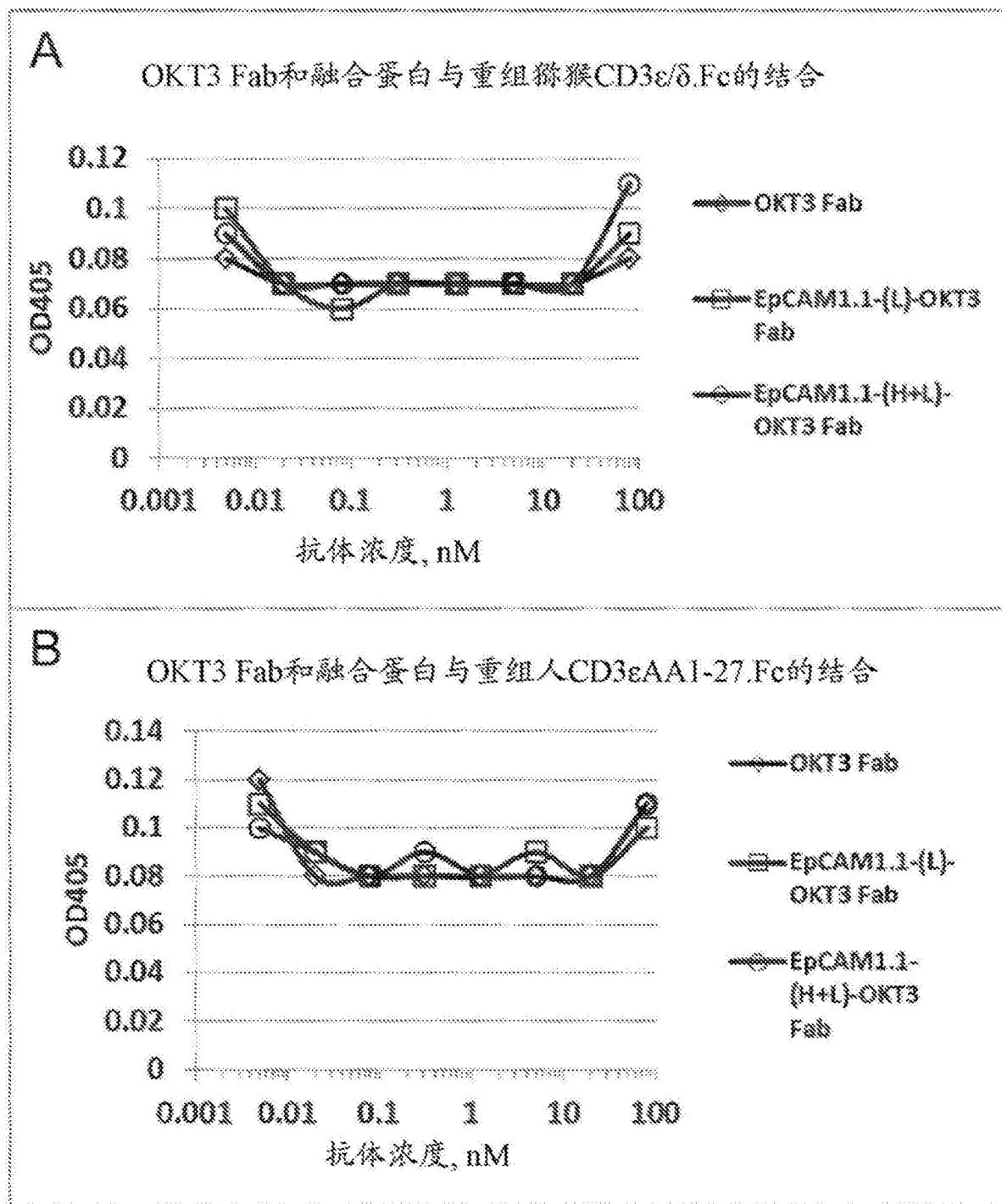


图16

EpCAM1.1 x hu-1F3.1 MSFP与可溶性CD3相关蛋白的结合

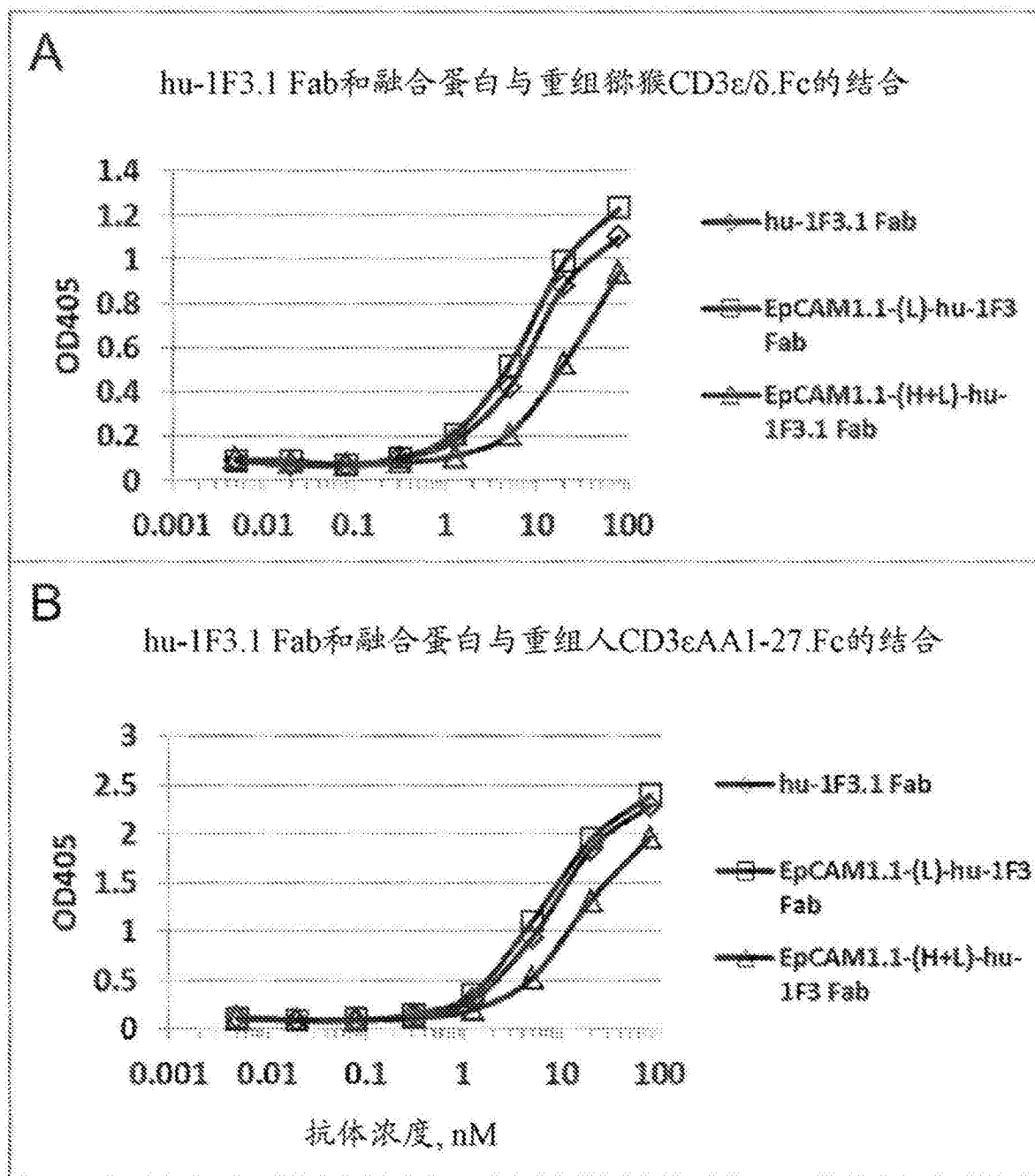


图17

EpCAM1.2 x hu-1F3.1 MSFP与可溶性CD3相关蛋白的结合

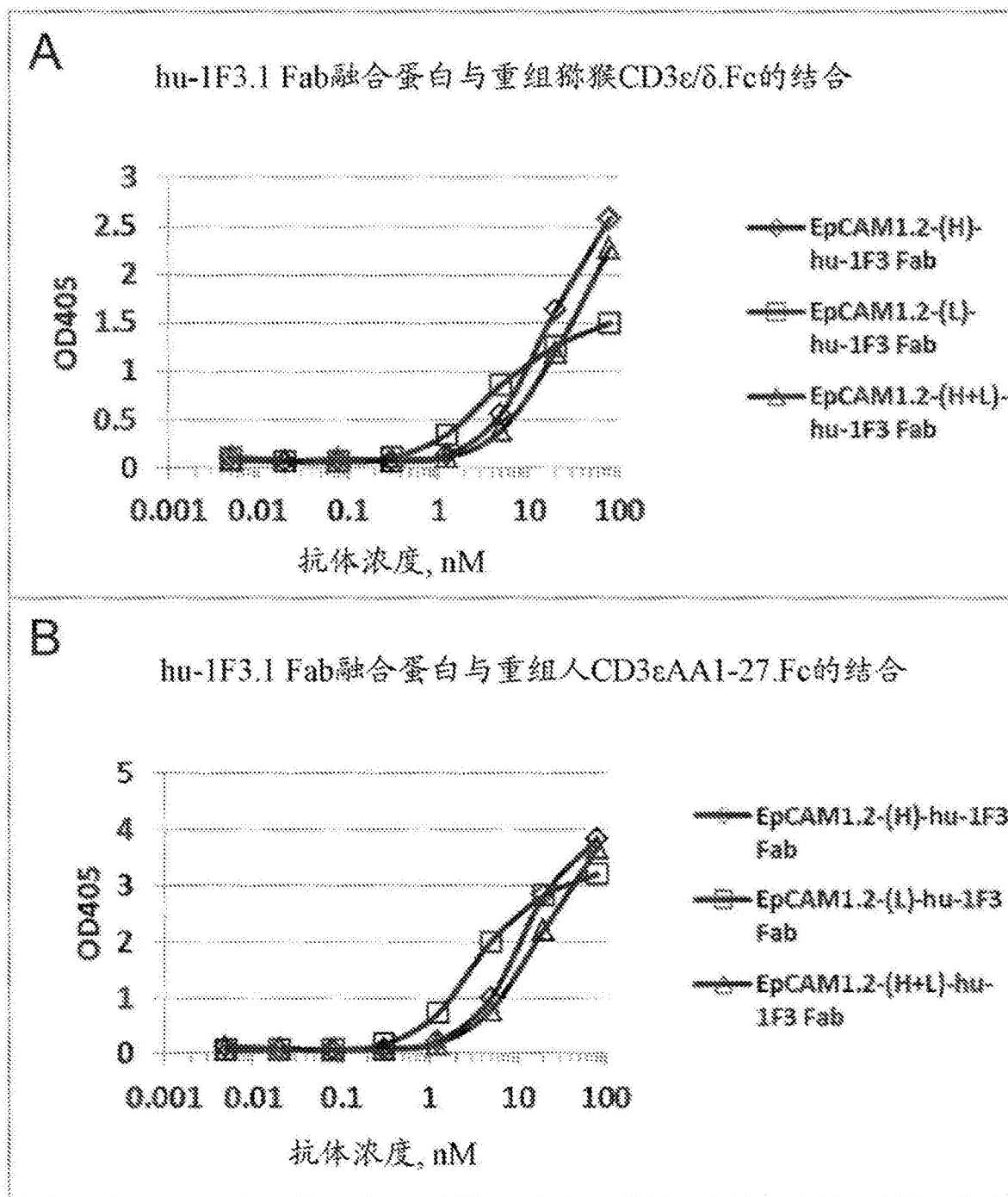


图18

EpCAM2.2 x hu-1F3.1 MSFP与可溶性CD3相关蛋白的结合

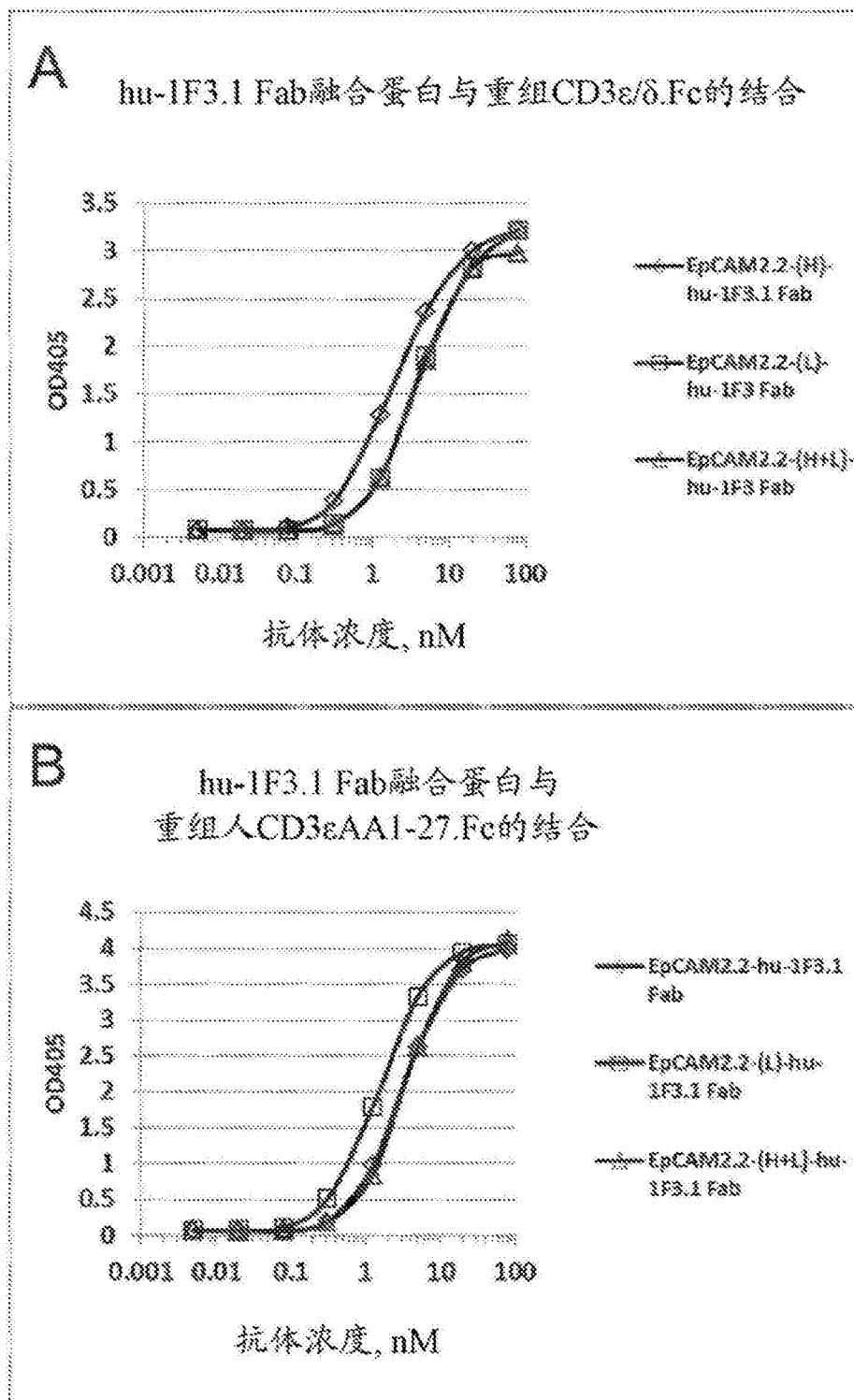


图19

EpCAM x CD3 MSFP蛋白与表达EpCAM的CHO细胞的结合

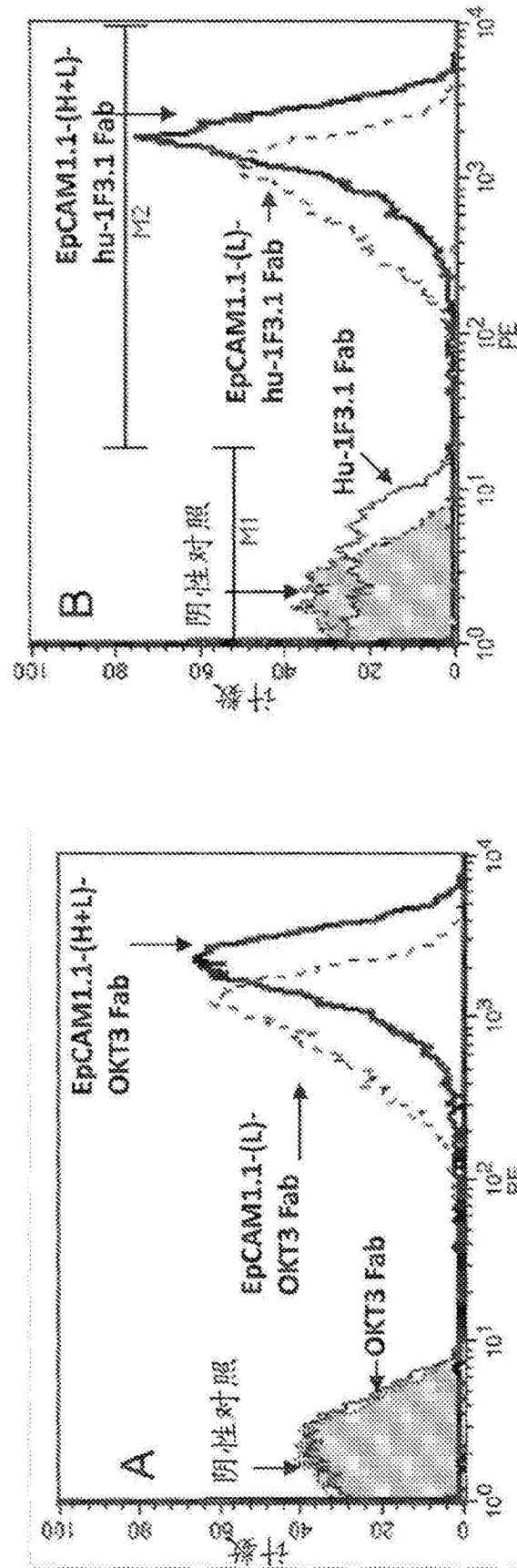


图20

EpCAM x CD3 MSFP蛋白与表达EpCAM的CHO细胞的结合

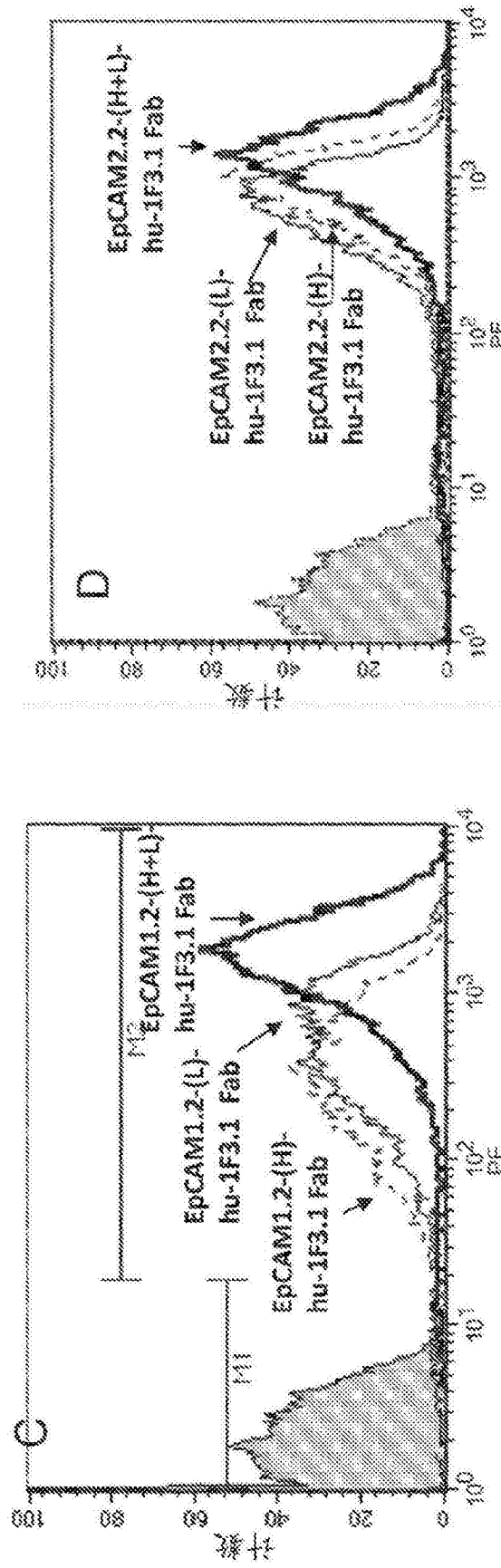


图20 (续)

基于FACS分析的细胞毒性生物测定

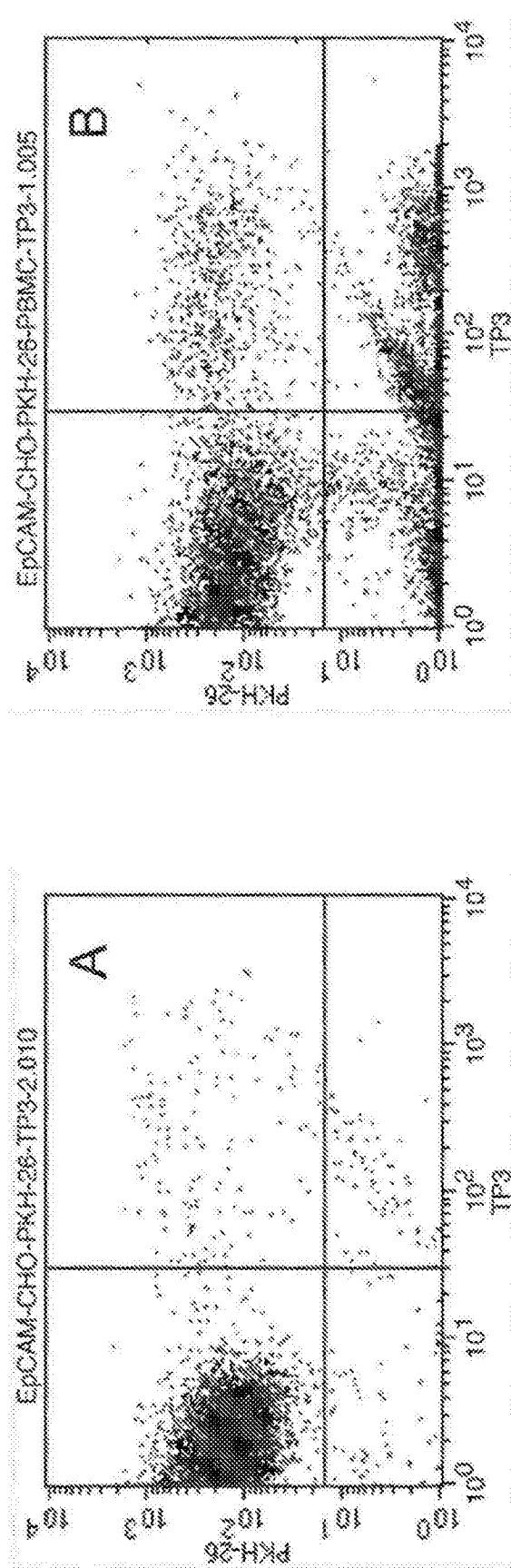


图21

基于FACS分析的细胞毒性生物测定

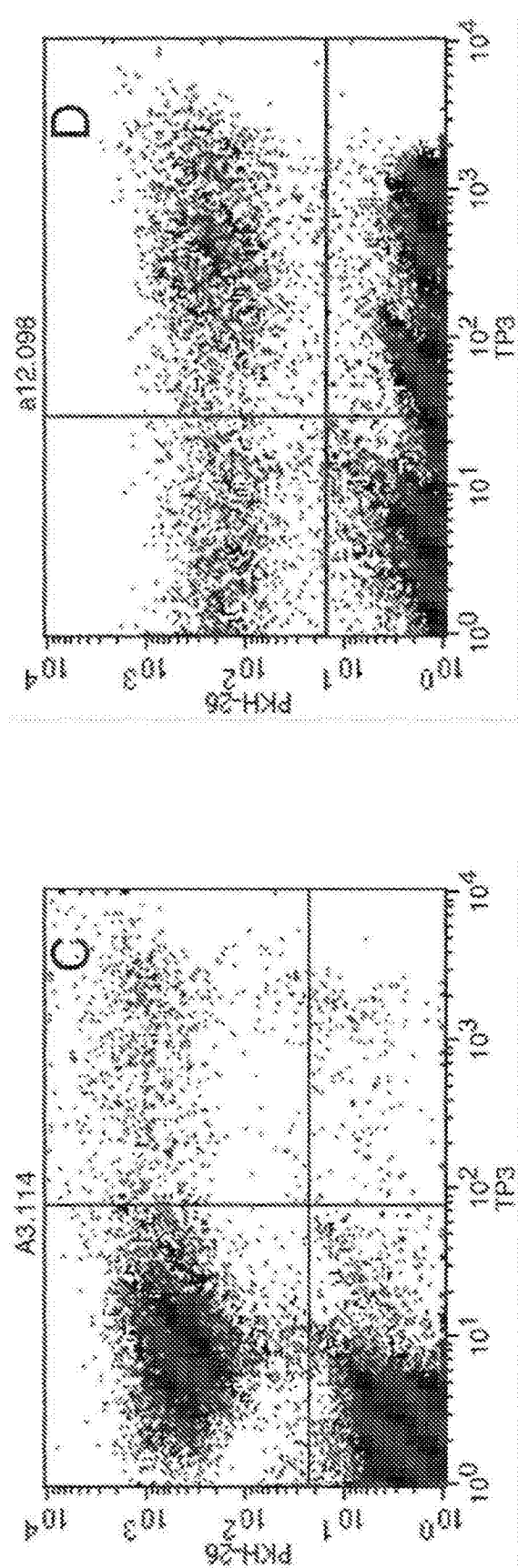


图21 (续)

EpCAM-CD3 MSFP对表达人EpCAM的CHO细胞的重新定向的裂解

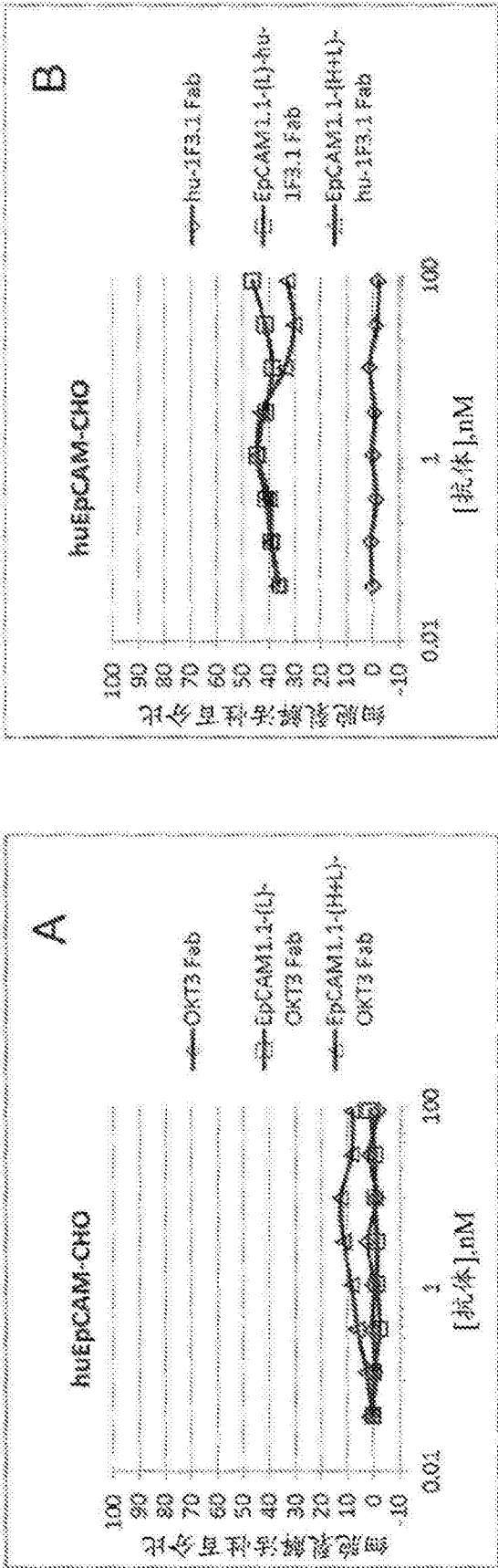


图22

EpCAM-CD3 MSFP对表达人EpCAM的CHO细胞的重新定向的裂解

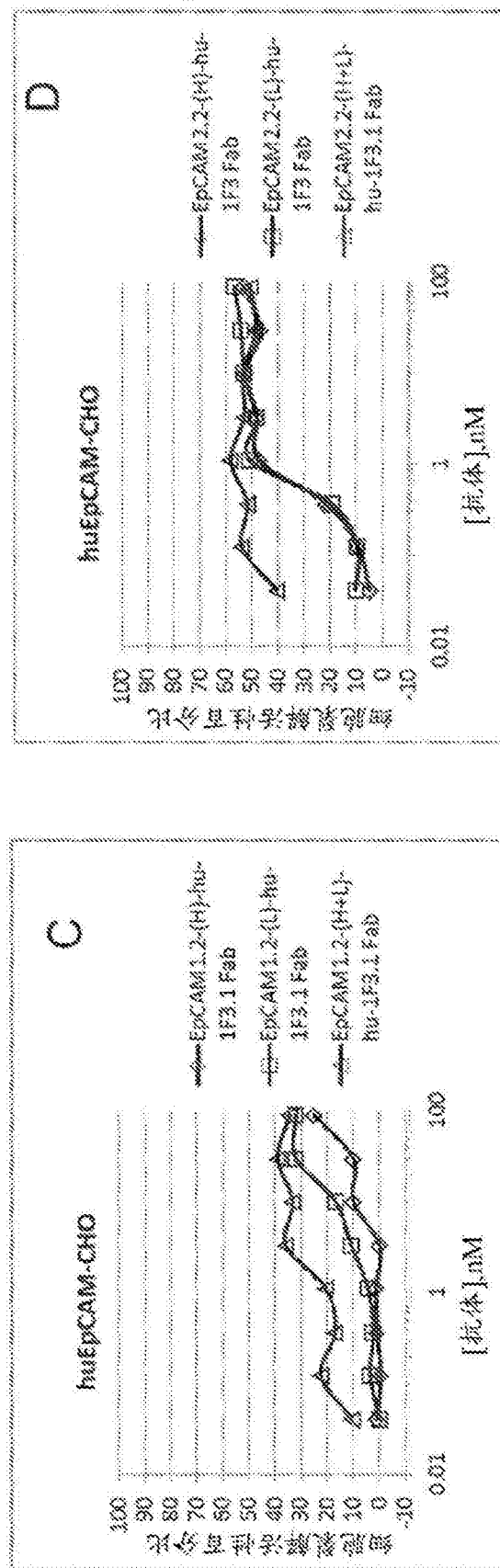
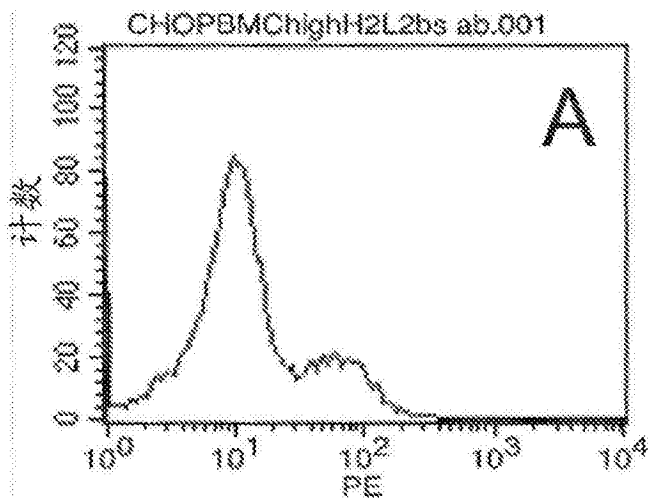


图22(续)

EpCAM2.2 x hu-1F3.1 MSFP以肿瘤靶标依赖方式活化T细胞

抗CD69-PE

CHO细胞
PBMCs
30 nm抗体



EpCAM-CHO
PBMCs
30 nm抗体

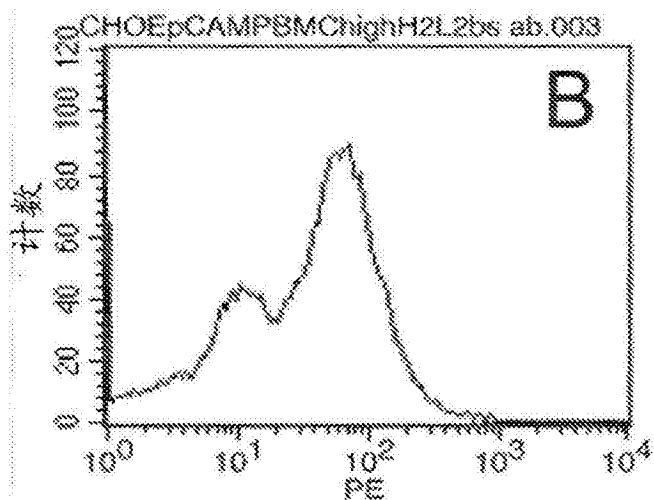


图23