



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105658235 B

(45)授权公告日 2020.09.11

(21)申请号 201480045719.5

(73)专利权人 宏观基因有限公司

(22)申请日 2014.08.20

地址 美国马里兰州

(65)同一申请的已公布的文献号

(72)发明人 保罗·A·摩尔 乔纳森·李
弗伦岑·志峰·陈
莱斯利·S·约翰逊 卡帕纳·沙
埃兹奥·泊韦尼

申请公布号 CN 105658235 A

(43)申请公布日 2016.06.08

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

(30)优先权数据

代理人 郝文博

13198859 2013.12.20 EP

61/869,528 2013.08.23 US

61/907,691 2013.11.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2016.02.18

A61K 39/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C12P 21/08(2006.01)

PCT/US2014/051793 2014.08.20

C07K 16/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

审查员 郭玉洁

W02015/026894 EN 2015.02.26

权利要求书5页 说明书39页

序列表53页 附图21页

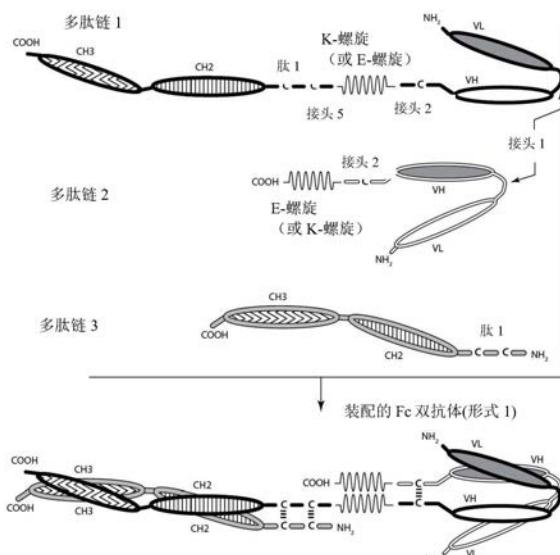
(54)发明名称

能够结合gpA33和CD3的双特异性单价双抗体及其用途

(57)摘要

本发明涉及双特异性单价双抗体，其包括两条多肽链并且其至少具有对CD3的表位特异的一个结合位点和对gpA33的表位特异的一个结合位点(即，“gpA33 x CD3双特异性单价双抗体”)。本发明也涉及双特异性单价双抗体，其包括免疫球蛋白Fc结构域(“双特异性单价Fc双抗体”)和由三条多肽链组成并且至少具有对gpA33的表位特异的一个结合位点和对CD3表位特异的一个结合位点(即，“gpA33 x CD3双特异性单价Fc双抗体”)。本发明的双特异性单价双抗体和双特异性单价Fc双抗体能够同时结合gpA33和CD3。本发明涉及包含这类双特异性单价双抗体或这类双特异性单价Fc双抗体的药学组合物。本发明另外涉及使用这类双抗体治疗癌症和其他疾病和病况的方法。

CN 105658235 B



1.一种双特异性单价双抗体,其中所述双特异性单价双抗体能够特异性结合gpA33的表位和结合CD3的表位,其中所述双特异性单价双抗体包括第一多肽链和第二多肽链,其中所述第一多肽链和第二多肽链彼此共价结合,和其中:

A.所述第一多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括:

i.结构域1,其包括亚结构域1A和亚结构域1B,所述亚结构域1A包括能够结合CD3且包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的单克隆抗体的VL结构域;所述亚结构域1B包括能够结合gpA33且包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的单克隆抗体的VH结构域;其中所述亚结构域1A和亚结构域1B彼此通过包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽接头被分开;

ii.结构域2,其中所述结构域2是包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋结构域或包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋结构域,其中所述结构域2和所述结构域1通过包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的肽接头被分开;

B.所述第二多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括:

i.结构域1,其包括亚结构域1A和亚结构域1B,所述亚结构域1A包括能够结合gpA33且包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的单克隆抗体的VL结构域,所述亚结构域1B包括能够结合CD3且包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的单克隆抗体的VH结构域,其中所述亚结构域1A和亚结构域1B彼此通过包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽接头被分开;

ii.结构域2,其中所述结构域2是包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋结构域或包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋结构域,其中所述结构域2和所述结构域1通过包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的肽接头被分开;和其中所述第一多肽链的所述结构域2和所述第二多肽链的所述结构域2不都是E-螺旋结构域且不都是K-螺旋结构域;

和其中:

(a)所述第一多肽链的所述VL结构域和所述第二多肽链的所述VH结构域形成能够特异性结合CD3的表位的抗原结合结构域;和

(b)所述第一多肽链的所述VH结构域和所述第二多肽链的所述VL结构域形成能够特异性结合gpA33的表位的抗原结合结构域。

2.根据权利要求1所述的双特异性单价双抗体,其中所述第一多肽链包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:34的白蛋白结合结构域,所述白蛋白结合结构域被布置在所述结构域2的C-末端,并且通过包含氨基酸序列SEQ ID NO:32的接头3与所述结构域2分开。

3.一种双特异性单价Fc双抗体,其中所述双特异性单价Fc双抗体能够特异性结合gpA33的表位和结合CD3的表位,并且具有IgG Fc结构域,其中所述双特异性单价Fc双抗体包括第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链,其中所述第一多肽链和第二多肽链彼此共价结合和所述第一多肽链和第三多肽链彼此共价结合,和其中:

A.所述第一多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括:

i.结构域1,其包括亚结构域1A和亚结构域1B,所述亚结构域1A包括能够结合gpA33且包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的单克隆抗体的VL结构域,所述亚结构域1B包括能够结合CD3且包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的单克隆抗体的VH结构域,其中所述亚结构域1A和亚结构域1B彼此通过包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽接头被分开;

ii.结构域2,其中所述结构域2是包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋结构域或包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋结构域,其中所述结构域2和所述结构域1通过包含氨基

酸序列SEQ ID NO:2的肽接头被分开;和

iii. 结构域3,其包括亚结构域3A和亚结构域3B,所述亚结构域3A包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的含半胱氨酸的肽,所述亚结构域3B包括具有IgG免疫球蛋白Fc结构域的CH2和CH3结构域的IgG Fc结构域的多肽部分;其中所述结构域3和结构域2彼此通过序列为GGG的间隔肽被分开;

B. 所述第二多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括:

i. 结构域1,其包括亚结构域1A和亚结构域1B,所述亚结构域1A包括能够结合CD3且包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的单克隆抗体的VL结构域,所述亚结构域1B包括能够结合gpA33且包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的单克隆抗体的VH结构域;其中所述亚结构域1A和亚结构域1B彼此通过包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽接头被分开;

ii. 结构域2,其中所述结构域2是包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋结构域或包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋结构域,其中所述结构域2和所述结构域1通过包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的肽接头被分开;和其中所述第一多肽链的所述结构域2和所述第二多肽链的所述结构域2不都是E-螺旋结构域且不都是K-螺旋结构域;和

C. 第三多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括结构域3,其包括:

(1) 亚结构域3A,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的含半胱氨酸的肽;和

(2) 亚结构域3B,其包括具有IgG免疫球蛋白Fc结构域的CH2和CH3结构域的IgG Fc结构域的多肽部分;

和其中:

(a) 所述第一多肽链和第三多肽链的所述IgG Fc结构域的所述多肽部分形成所述IgG Fc结构域;

(b) 所述第一多肽链的所述VL结构域和所述第二多肽链的所述VH结构域形成能够特异性结合gpA33的表位的抗原结合结构域;和

(c) 所述第一多肽链的所述VH结构域和所述第二多肽链的所述VL结构域形成能够特异性结合CD3的表位的抗原结合结构域。

4. 一种双特异性单价Fc双抗体,其中所述双特异性单价Fc双抗体能够特异性结合gpA33的表位和结合CD3的表位,并且具有IgG Fc结构域,其中所述双特异性单价Fc双抗体包括第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链,其中所述第一多肽链和第二多肽链彼此共价结合和所述第一多肽链和第三多肽链彼此共价结合,和其中:

A. 所述第一多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括:

i. 结构域3,其包括亚结构域3A和亚结构域3B,所述亚结构域3A包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的含半胱氨酸的肽,所述亚结构域3B包括具有IgG免疫球蛋白Fc结构域的CH2和CH3结构域的IgG Fc结构域的多肽部分;

ii. 结构域1,其包括亚结构域1A和亚结构域1B,所述亚结构域1A包括能够结合gpA33且包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的单克隆抗体的VL结构域,所述亚结构域1B包括能够结合CD3且包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的单克隆抗体的VH结构域,其中所述亚结构域1A和亚结构域1B通过包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽接头彼此被分开;

其中所述结构域1和结构域3彼此通过包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的间隔肽被分开;

iii. 结构域2,其中所述结构域2是包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋结构域或包

含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋结构域,其中所述结构域2和所述结构域1通过包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的肽接头被分开;和

B. 所述第二多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括:

i. 结构域1,其包括亚结构域1A和亚结构域1B,所述亚结构域1A包括能够结合CD3且包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的单克隆抗体的VL结构域;所述亚结构域1B包括能够结合gpA33且包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的单克隆抗体的VH结构域;其中所述亚结构域1A和亚结构域1B彼此通过包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽接头被分开;

ii. 结构域2,其中所述结构域2是包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋结构域或包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋结构域,其中所述结构域2和所述结构域1通过包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的肽接头被分开;和其中所述第一多肽链的所述结构域2和所述第二多肽链的所述结构域2不都是E-螺旋结构域且不都是K-螺旋结构域;和

C. 所述第三多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括结构域3,其包括:

(1) 亚结构域3A,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的含半胱氨酸的肽;和

(2) 亚结构域3B,其包括具有IgG免疫球蛋白Fc结构域的CH2和CH3结构域的IgG Fc结构域的多肽部分;

和其中:

(a) 所述第一多肽链和第三多肽链的所述IgG Fc结构域的所述多肽部分形成所述IgG Fc结构域;

(b) 所述第一多肽链的所述VL结构域和所述第二多肽链的所述VH结构域形成能够特异性结合gpA33的表位的抗原结合结构域;和

(c) 所述第一多肽链的所述VH结构域和所述第二多肽链的所述VL结构域形成能够特异性结合CD3的表位的抗原结合结构域。

5. 根据权利要求3-4中任一项所述的双特异性单价Fc双抗体,其中所述第一多肽链的所述亚结构域3B包括与所述第三多肽链的所述亚结构域3B不同的序列。

6. 根据权利要求5所述的双特异性单价Fc双抗体,其中所述第一多肽链的所述亚结构域3B包括氨基酸序列SEQ ID NO:40,和所述第三多肽链的所述亚结构域3B包括氨基酸序列SEQ ID NO:41。

7. 根据权利要求5所述的双特异性单价Fc双抗体,其中所述第一多肽链的所述亚结构域3B包括氨基酸序列SEQ ID NO:41,和所述第三多肽链的所述亚结构域3B包括氨基酸序列SEQ ID NO:40。

8. 根据权利要求3-4中任一项所述的双特异性单价Fc双抗体,其中所述第一多肽链的所述结构域3和/或所述第三多肽链的所述结构域3包括变体CH2-CH3序列,其显示与Fc γ 受体改变的结合。

9. 根据权利要求5所述的双特异性单价Fc双抗体,其中所述第一多肽链的所述结构域3和/或所述第三多肽链的所述结构域3包括变体CH2-CH3序列,其显示与Fc γ 受体改变的结合。

10. 根据权利要求6所述的双特异性单价Fc双抗体,其中所述第一多肽链的所述结构域3和/或所述第三多肽链的所述结构域3包括变体CH2-CH3序列,其显示与Fc γ 受体改变的结合。

11. 根据权利要求7所述的双特异性单价Fc双抗体，其中所述第一多肽链的所述结构域3和/或所述第三多肽链的所述结构域3包括变体CH2-CH3序列，其显示与Fc γ 受体改变的结合。

12. 根据权利要求1-2中任一项所述的双特异性单价双抗体或根据权利要求3-4中任一项所述的双特异性单价Fc双抗体，其中所述第一多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋，和所述第二多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋。

13. 根据权利要求5所述的双特异性单价Fc双抗体，其中所述第一多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋，和所述第二多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋。

14. 根据权利要求6所述的双特异性单价Fc双抗体，其中所述第一多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋，和所述第二多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋。

15. 根据权利要求7所述的双特异性单价Fc双抗体，其中所述第一多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋，和所述第二多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋。

16. 根据权利要求8所述的双特异性单价Fc双抗体，其中所述第一多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋，和所述第二多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋。

17. 根据权利要求1-2中任一项所述的双特异性单价双抗体或根据权利要求3-4中任一项所述的双特异性单价Fc双抗体，其中所述第一多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋，和所述第二多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋。

18. 根据权利要求5所述的双特异性单价Fc双抗体，其中所述第一多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋，和所述第二多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋。

19. 根据权利要求6所述的双特异性单价Fc双抗体，其中所述第一多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋，和所述第二多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋。

20. 根据权利要求7所述的双特异性单价Fc双抗体，其中所述第一多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋，和所述第二多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋。

21. 根据权利要求8所述的双特异性单价Fc双抗体，其中所述第一多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的K-螺旋，和所述第二多肽链的所述结构域2包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的E-螺旋。

22. 一种双特异性单价双抗体，其中所述双特异性单价双抗体能够特异性结合CD3的表位和结合gpA33的表位，其中所述双特异性单价双抗体包括：

(1) 第一多肽链，其包括氨基酸序列SEQ ID NO:28，和第二多肽链，其包括氨基酸序列SEQ ID NO:30；或

(2) 第一多肽链,其包括氨基酸序列SEQ ID NO:35,和第二多肽链,其包括氨基酸序列SEQ ID NO:30;

其中所述第一多肽链和所述第二多肽链通过二硫键彼此共价结合。

23.一种双特异性单价Fc双抗体,其中所述双特异性单价Fc双抗体能够特异性结合CD3的表位和结合gpA33的表位,并且具有IgG Fc结构域,其中所述双特异性单价Fc双抗体包括:

(1) 第一多肽链,其包括氨基酸序列SEQ ID NO:42,第二多肽链,其包括氨基酸序列SEQ ID NO:44,和第三多肽链,其包括氨基酸序列SEQ ID NO:46;或

(2) 第一多肽链,其包括氨基酸序列SEQ ID NO:48,第二多肽链,其包括氨基酸序列SEQ ID NO:28,和第三多肽链,其包括氨基酸序列SEQ ID NO:46;

其中所述第一多肽链和所述第二多肽链通过第一二硫键彼此共价结合,和所述第一多肽链和第三多肽链通过第二二硫键彼此共价结合。

24.一种药学组合物,其包括根据权利要求1-2、12、17或22任一项所述的双特异性单价双抗体或根据权利要求3-21或23任一项所述的双特异性单价Fc双抗体;和生理学上可接受的载体。

25.根据权利要求1-2、12、17或22任一项所述的双特异性单价双抗体或根据权利要求3-21或23任一项所述的双特异性单价Fc双抗体或根据权利要求24所述的药学组合物在制备用于治疗特征在于gpA33的表达的癌症的药物中的用途。

26.根据权利要求25所述的用途,其中所述癌症是结直肠癌、胃癌或胰腺癌。

27.根据权利要求25所述的用途,其中所述癌症是结肠癌。

28.一种细胞,其表达根据权利要求1-2、12、17或22中任一项所述的双特异性单价双抗体的多肽链或根据权利要求3-21或23中任一项所述的双特异性单价Fc双抗体的多肽链。

29.一种多核苷酸,其编码根据权利要求1-2、12、17或22中任一项所述的双特异性双抗体的所述第一多肽链和所述第二多肽链,或者编码根据权利要求3-21或23中任一项所述的双特异性Fc双抗体的所述第一多肽链和所述第二多肽链。

能够结合gpA33和CD3的双特异性单价双抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求美国专利申请号61/869,528(2013年8月23日提交;未决的)和61/907,691(2013年11月22日提交;未决的),和欧洲专利申请号13198859(2013年12月20日提交)的优先权,其每一篇通过参考以其整体并入本文。

[0003] 序列表的引用

[0004] 根据37C.F.R.1.821以及下面的条款,本申请包括一个或多个序列表,所述序列表以纸质或者计算机可读介质的形式公开,并且通过引用将所述纸质公开和计算机可读公开以其整体并入本文。

背景技术

技术领域

[0005] 本发明涉及包括两条多肽链并且具有对gpA33的表位特异的一个结合位点和对CD3表位特异的一个结合位点的双特异性单价双抗体(即,“gpA33x CD3双特异性单价双抗体”)。本发明也涉及包括免疫球蛋白Fc结构域(“双特异性单价Fc双抗体”)并且由三条多肽链组成以及具有对gpA33的表位特异的一个结合位点和对CD3表位特异的一个结合位点的双特异性单价双抗体(即,“gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体”)。本发明的双特异性单价双抗体和双特异性单价Fc双抗体能够同时结合gpA33和CD3。本发明涉及包含这种双特异性单价双抗体或这种双特异性单价Fc双抗体的药学组合物。本发明另外涉及使用这种双抗体治疗癌症和其他疾病和病况(condition)的方法。

[0006] 相关技术的描述

[0007] gpA33

[0008] 结直肠癌是西方世界最常见的恶性肿瘤之一并且是癌症死亡的主要原因(Silverberg,E.等(1989)“癌症统计(Cancer Statistics),1989,”CA Cancer J Clin.39(1):3-20)。结肠癌一种潜在有用的靶标是43kD跨膜糖蛋白A33(gpA33)((Heath,J.K.等(1997)“人A33抗原是跨膜糖蛋白和免疫球蛋白超家族的新成员(The Human A33Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily),”Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)94(2):469-474;Ritter,G.等(1997)“人A33抗原翻译后修饰的表征,人胃肠道上皮细胞新的棕榈酰化的表面糖蛋白(Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33Antigen,A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium)”Biochem.Biophys.Res.Commun.236(3):682-686)。通过饲养抗人胰腺癌衍生细胞系ASPC1的单克隆鼠抗体首次发现了gpA33。发现一种抗体(MAb A33)与43kDa的表面细胞蛋白质反应,所以称其为“gpA33”(Wong,N.A.等(2006)“EpCAM和gpA33是巴雷特化生的标记物(EpCAM and gpA33Are Markers Of Barrett's Metaplasia)”J.Clin.Pathol.59(3):260-263)。

[0009] gpA33是连接粘附分子家族的跨膜蛋白质;Abud,H.E.等(2000)“在发育期间在两个不同的位点表达鼠A33抗原,胚泡和肠道上皮细胞的ICM(The Murine A33Antigen Is Expressed At Two Distinct Sites During Development,The ICM Of The Blastocyst And The Intestinal Epithelium),”Mech.Dev.98(1-2):111-114;Barendswaard,E.C.等(1998)“将单克隆抗体A33快速和特异性靶向裸鼠中的结肠癌异种移植物(Rapid And Specific Targeting Of Monoclonal Antibody A33To A Colon Cancer Xenograft In Nude Mice)”Int.J.Oncol.12(1):45-53;Panjideh,H.等(2008)“用于结肠癌的重组体抗体-酶蛋白质的[131I]A33scFv::CDy的生物分布和效力(Biodistribution And Efficacy Of [131I]A33scFv::CDy,A Recombinant Antibody-Enzyme Protein For Colon Cancer),”Int.J.Oncol.32(4):925-930。尽管还没了解A33抗原的功能重要性,但是已经显示介导结肠炎动物模型中结肠粘膜修复并且在>95%的所有结直肠癌中均匀表达。在整个疾病阶段和组织学分化程度中A33表达是均匀的,并且抗原不可察觉地分泌或散落在血流中(Infante,J.R.等(2013)“患晚期结直肠癌的患者中抗A33全人单克隆抗体,KRN330的安全性、药物动力学和药代学(Safety,Pharmacokinetics And Pharmacodynamics Of The Anti-A33Fully-Human Monoclonal Antibody,KRN330,In Patients With Advanced Colorectal Cancer),”Eur.J.Cancer.49(6):1169-1175;Panjideh,H.等(2008)“用于结肠癌的重组体抗体-酶蛋白质的[131I]A33scFv::CDy的生物分布和效力(Biodistribution And Efficacy Of [131I]A33scFv::CDy,A Recombinant Antibody-Enzyme Protein For Colon Cancer),”Int.J.Oncol.32(4):925-930)。相反地,仅仅已经鉴定了少数非胃肠A33抗原表达的例子(Johnstone,C.N.等(2000)“肠道上皮细胞基底外侧表面的确定的标记物小鼠A33抗原的表征(Characterization Of Mouse A33Antigen,A Definitive Marker For Basolateral Surfaces Of Intestinal Epithelial Cells),”Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.279(3):G500-G510)。

[0010] 鉴于A33抗原高度限制的表达,研究人员已经研究了用抗体治疗A33相关癌症的可能性(Infante,J.R.等(2013)“患晚期结直肠癌的患者中抗A33全人单克隆抗体,KRN330的安全性、药物动力学和药代学(Safety,Pharmacokinetics And Pharmacodynamics Of The Anti-A33Fully-Human Monoclonal Antibody,KRN330,In Patients With Advanced Colorectal Cancer),”Eur.J.Cancer.49(6):1169-1175;Ackerman,M.E.等(2008)“A33抗原显示持久的表面表达(A33Antigen Displays Persistent Surface Expression)”Cancer Immunol.Immunother.57(7):1017-1027;Barendswaard,E.C.等(2001)“(125)I-和(131)I-标记的单克隆抗体A33在人结肠癌异种移植物中相对的治疗性效力(Relative Therapeutic Efficacy Of (125)I-And (131)I-Labeled Monoclonal Antibody A33In A Human Colon Cancer Xenograft)”J.Nucl.Med.42(8):1251-1256;Carrasquillo,J.A.等(2011)“结直肠癌的(124)I-huA33抗体PET((124)I-huA33Antibody PET Of Colorectal Cance)”J.Nucl.Med.52(8):1173-1180;Chong,G.等(2005)“131I-HuA33在患晚期结直肠癌的患者中的I期试验(Phase I Trial Of 131I-HuA33In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma),”Clin.Cancer Res.11(13):4818-4826;Deckert,P.M.等(2000)“靶向结肠癌异种移植物的聚乙二醇-修饰的人源化A33抗体的药物动力学和微分布(Pharmacokinetics And Microdistribution Of Polyethylene Glycol-Modified

Humanized A33Antibody Targeting Colon Cancer Xenografts)" Int.J.Cancer.87(3) : 382-390; Johnston,A.P.等(2012)“靶向癌症细胞:控制抗体-功能化胶囊的结合和内在化(Targeting Cancer Cells:Controlling The Binding And Internalization Of Antibody-Functionalized Capsules)" ACS Nano.6(8) :6667-6674; Koppe,M.J.等(2005)“放射免疫疗法和结直肠癌(Radioimmunotherapy And Colorectal Cancer)," Br.J.Surg.Mar;92(3) :264-276; Sakamoto,J.等(2006)“人源化单克隆抗体HuA33在患胃癌患者中的I期放射免疫定位试验(A Phase I Radioimmunolocalization Trial Of Humanized Monoclonal Antibody HuA33In Patients With Gastric Carcinoma)," Cancer Sci.97(11) :1248-1254; Scott,A.M.等(2005)“人源化单克隆抗体A33在患结直肠癌患者中的I期试验:生物分布、药物动力学和定量的肿瘤吸收(A Phase I Trial Of Humanized Monoclonal Antibody A33In Patients With Colorectal Carcinoma: Biodistribution, Pharmacokinetics, And Quantitative Tumor Uptake)" Clin.Cancer Res.11(13) :4810-4817; Tschmelitsch,J.等(1997)“放射免疫疗法(^{131}I -标记的单克隆抗体A33)与化疗(氟尿嘧啶)组合的增强的抗肿瘤活性(Enhanced Antitumor Activity Of Combination Radioimmunotherapy (^{131}I -Labeled Monoclonal Antibody A33) With Chemotherapy(Fluorouracil))" Cancer Res.57(11) :2181-2186)。而且,也已经评估了这种抗体的片段的潜在的治疗性作用(Coelho,V.等(2007)“结肠癌中抗体-定向的酶前药疗法的重组体融合蛋白A33scFv::CDy的设计、构建、和体外分析(Design, Construction, And In Vitro Analysis Of A33scFv::CDy, A Recombinant Fusion Protein For Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy In Colon Cancer)," Int.J.Oncol.31(4) :951-957)。

[0011] II.CD3

[0012] CD3是由四条不同链组成的T细胞共受体(Wucherpfennig,K.W.等(2010)“T-细胞受体的结构生物学:受体装配、配体鉴定和信号传导启动的观察(Structural Biology Of The T-Cell Receptor:Insights Into Receptor Assembly,Ligand Recognition,And Initiation Of Signaling)," Cold Spring Harb.Perspect.Biol.2(4) :a005140;1-14页); Chetty,R.等(1994)“CD3:结构、功能和作用免疫染色临床实践(CD3:Structure, Function And The Role Of Immunostaining In Clinical Practice)" J.Pathol.173: 303-307)。

[0013] 哺乳动物中,CD3复合物包含CD3 γ 链、CD3 δ 链和两条CD3 ϵ 链。这些链结合称为T细胞受体(TCR)的分子,以便在T淋巴细胞中产生活化信号。在没有CD3的情况下,TCR不能适当装配并且降解(Thomas,S.等(2010)来自治疗性T-细胞受体基因转移的分子免疫学教示(Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer)" , Immunology 129(2) :170-177)。发现CD3结合所有成熟T细胞的膜,并且实际上不结合其他细胞类型的膜(见,Janeway,C.A.等(2005)“免疫生物学:健康和疾病中的免疫系统(Immunobiology:The Immune System In Health And Disease)" 第六版Garland Science Publishing, NY, 214-216页; Sun,Z.J.等(2001)“CD3 ϵ : γ 异源二聚物胞外域片段的溶液结构揭示的有助于T细胞受体信号传导和装配的机制(Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of CD3 ϵ : γ Heterodimer)" Cell 105(7) :913-923; Kuhns,

M.S.等(2006)“TCR/CD3复合物形式和功能的解构(Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3Complex)”*Immunity*,2006年2月;24 (2) :133-139)。

[0014] III. 双特异性双抗体

[0015] 完整的未修饰的抗体(例如,IgG)结合抗原的表位的能力取决于免疫球蛋白轻链和重链上存在的可变结构域(即,分别为VL和VH结构域)。双抗体的设计基于单链Fv构造(scFv)(见,例如,Holliger等(1993)“‘双抗体’:小的二价和双特异性抗体片段(Diabodies’: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments)”*Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* 90:6444-6448;美国专利公开号2004/0058400(Hollinger等);US 2004/0220388(Mertens等);Alt等(1999)*FEBS Lett.* 454 (1-2) :90-94;Lu,D.等(2005)“针对表皮生长因子受体和胰岛素样生长因子受体的全人重组体IgG样双特异性抗体用于增强的抗肿瘤活性(A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity),”*J.Biol.Chem.* 280 (20) :19665-19672;WO 02/02781(Mertens等);Olafsen,T.等(2004)“共价二硫连接的抗CEA双抗体允许位点特异性结合和放射性标记用于肿瘤靶向应用(Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications),”*Protein Eng.Des Sel.* 17 (1) :21-27;Wu,A.等(2001)“嵌合抗CD20单链Fv-Fv融合蛋白的多聚化通过可变结构域交换介导(Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange),”*Protein Engineering* 14 (2) :1025-1033;Asano等(2004)“用于癌症免疫疗法的双抗体和其通过人Fc区域融合的功能增强(A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region)”摘要3P-683,*J.Biochem.* 76 (8) :992;Takemura,S.等(2000)“双抗体(小重组体双特异性抗体)使用重折叠系统的构建(Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System),”*Protein Eng.* 13 (8) :583-588;Baeuerle,P.A.等(2009)“用于癌症疗法的双特异性T-细胞结合抗体(Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy),”*Cancer Res.* 69 (12) :4941-4944)。

[0016] 抗体轻链和抗体重链的相互作用,尤其是其VL和VH结构域的相互作用形成抗体的一个表位结合位点。相反,scFv构建体包括单个多肽链中包含的抗体的VL和VH结构域,其中结构域由足够长度的灵活接头分开,以允许两个结构域自装配成功能性表位结合位点。在VL和VH结构域的自装配由于不足够长(小于约12个氨基酸残基)的接头而变得不可能的情况下,两个scFv构建体彼此相互作用以形成二价分子,其中一条链的VL结合另一条链的VH(在Marvin等(2005)“IgG样双特异性抗体的重组方法(Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies),”*Acta Pharmacol.Sin.* 26:649-658中被论述)。

[0017] 天然抗体仅仅能够结合一个表位种类(即,单特异性),虽然它们可结合该种类的多个拷贝(即,展示二价或多价)。现有技术已经指出了产生这样的双抗体的能力,所述双抗体与这类天然抗体的不同之处在于能够结合两个或更多个不同的表位种类(即,展示双特异性或多特异性,以及二价或多价)(见,例如,Holliger等(1993)“‘双抗体’:小的二价和双特异性抗体片段(‘Diabodies’: Small Bivalent And Bispecific Antibody

Fragments),”Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)90:6444–6448;US2004/0058400(Hollinger等);US 2004/0220388(Mertens等);Alt等(1999)FEBS Lett.454(1–2):90–94;Lu,D.等(2005)“针对表皮生长因子受体和胰岛素样生长因子受体的全人重组体IgG样双特异性抗体用于增强的抗肿瘤活性(A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity),”J.Biol.Chem.280(20):19665–19672;WO 02/02781(Mertens等);Mertens,N.等,“新重组双特异性和三特异性抗体衍生物(New Recombinant Bi-and Trispecific Antibody Derivatives),”In:Novel Frontiers In The Production Of Compounds For Biomedical Use,A.VanBroekhoven等(Eds.),Kluwer Academic Publishers,Dordrecht,Netherlands(2001),页195–208;Wu,A.等(2001)“嵌合抗CD20单链Fv–Fv融合蛋白的多聚化通过可变结构域交换介导(Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20Single Chain Fv–Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange),”Protein Engineering 14(2):1025–1033;Asano等(2004)“用于癌症免疫疗法的双抗体和其通过人Fc区域融合的功能增强(A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region)”摘要3P-683,J.Biochem.76(8):992;Takemura,S.等(2000)“双抗体(小重组体双特异性抗体)使用重折叠系统的构建(Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody)Using A Refolding System),”Protein Eng.13(8):583–588;Baeuerle,P.A.等(2009)“用于癌症疗法的双特异性T-细胞结合抗体(Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy),”Cancer Res.69(12):4941–4944)。

[0018] 非单特异性双抗体的供应提供明显的优势:共连接和共定位表达不同表位的细胞的能力。双价双抗体因此具有广泛的应用,包括治疗和免疫诊断。双价使得在各种应用中设计和改造双抗体的具有很大的灵活性,提供对多聚抗原增强的亲和力、不同抗原的交联和依赖于存在两个靶抗原的引导靶向特异性细胞类型。由于它们的价增加、解离速率低和从循环中快速清除(对于~50kDa或低于~50kDa的小尺寸的双抗体),本领域已知的双抗体分子在肿瘤成像领域中也显示特定的应用(Fitzgerald等(1997)“通过毕赤酵母菌表达的二硫化稳定的双抗体改善的肿瘤靶向(Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris)”Protein Eng.10:1221)。尤其重要的是共连接不同的细胞,例如,使细胞毒性T细胞与肿瘤细胞交联(Staerz等(1985)“杂交抗体可靶向T细胞攻击的位点(Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells),”Nature 314:628–631,和Holliger等(1996)“双特异性双抗体介导的细胞毒素性T-细胞特异性杀死淋巴瘤细胞(Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody),”Protein Eng.9:299–305)。

[0019] 双抗体表位结合结构域也可导向任何免疫效应细胞的表面决定簇,所述效应细胞比如CD3、CD16、CD32或CD64,所述结合结构域在T淋巴细胞、天然杀伤(NK)细胞或其他单核细胞上表达。在许多研究中,也发现结合效应细胞决定簇,例如,Fc γ 受体(Fc γ R)的双抗体激活效应细胞(Holliger等(1996)“双特异性双抗体介导的细胞毒素T-细胞特异性杀死淋巴瘤细胞(Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody),”Protein Eng.9:299–305;Holliger等(1999)“抗CD3x抗CEA双特

异性双抗体和B7x抗CEA双特异性融合蛋白诱导的结肠癌中胚胎抗原(CEA)特异性T-细胞活化(Carcinoembryonic Antigen(CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins)"Cancer Res.59:2909-2916;WO 2006/113665;WO 2008/157379;WO 2010/080538;WO2012/018687;WO 2012/162068)。通常,效应细胞活化通过结合抗原的抗体经Fc-Fc γ R相互作用与效应细胞的结合而触发;因此,就此而言,本发明的双抗体分子可展示Ig样功能性,无论它们是否包括Fc结构域(例如,如本领域已知的或本文示例的任何效应器功能试验(例如,ADCC试验)所验证的)。通过交联肿瘤和效应细胞,双抗体不仅仅使效应细胞接近肿瘤细胞,而且导致有效的肿瘤杀伤(见例如,Cao等(2003)“疗法中的双特异性抗体缀合物(Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics),”Adv.Drug.Deliv.Rev.55:171-197)。

[0020]但是,上述优势是以高成本为代价的。形成此类非单特异性双抗体需要成功装配两个或更多个独特且不同的多肽(即,这种形成需要通过不同多肽链种类的异源二聚化形成双抗体)。该事实与通过相同多肽链的同源二聚化形成的单特异性双抗体形成对比。因为必须提供至少两条不同的多肽(即,两个多肽种类)以便形成非单特异性双抗体,和因为这种多肽的同源二聚化导致失活的分子(Takemura,S.等(2000)“双抗体(小重组体双特异性抗体)使用重折叠系统的构建(Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System),”Protein Eng.13 (8) :583-588),所以产生这种多肽必须以防止相同种类的多肽之间共价键合的方式完成(Takemura,S.等(2000)“双抗体(小重组体双特异性抗体)使用重折叠系统的构建(Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System),”Protein Eng.13 (8) :583-588)。所以,现有技术已经教导了这种多肽的非共价结合(见,例如,Olafsen等(2004)“共价二硫连接的抗CEA双抗体允许位点特异性结合和放射性标记用于肿瘤靶向应用(Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications),”Prot.Engr.Des.Sel.17:21-27;Asano等(2004)“用于癌症免疫疗法的双抗体和其通过人Fc区域融合的功能增强(A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region)”摘要3P-683,J.Biochem.76 (8) :992;Takemura,S.等(2000)“双抗体(小重组体双特异性抗体)使用重折叠系统的构建(Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System),”Protein Eng.13 (8) :583-588;Lu,D.等(2005)“针对表皮生长因子受体和胰岛素样生长因子受体的全人重组体IgG样双特异性抗体用于增强的抗肿瘤活性(A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity),”J.Biol.Chem.280 (20) :19665-19672)。

[0021]但是,现有技术已经认识到由非共价结合的多肽组成的双特异性单价双抗体不稳定并且容易解离成非功能单体(见,例如,Lu,D.等(2005)“针对表皮生长因子受体和胰岛素样生长因子受体的全人重组体IgG样双特异性抗体用于增强的抗肿瘤活性(A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor

Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity)," J.Biol.Chem. 280 (20) :19665-19672)。

[0022] 在面临该挑战的时候,现有技术已经成功开发了稳定的共价结合的异源二聚非单特异性双抗体(见,例如,WO 2006/113665、WO/2008/157379、WO 2010/080538、WO 2012/018687、WO/2012/162068、Johnson,S.等(2010)“用新型Fv基双-亲和性重定向蛋白质的效应细胞募集导产生有力的肿瘤细胞溶解和体内B-细胞损耗(Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion)," J.Molec.Biol.399 (3) :436-449;Veri, M.C.等(2010)“用新的双特异性抗体支架经募集Fc γ 受体IIb(CD32B)抑制功能治疗性控制B细胞活化(Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb(CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold)," Arthritis Rheum.62 (7) :1933-1943;Moore,P.A.等(2011)“双亲和性重定向分子的应用以实现最佳修饰的B-细胞淋巴瘤的T-细胞杀伤(Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma)"Blood 117 (17) :4542-4551;美国专利公开号2012/0294796和2013/0149236)。此类方法涉及将一个或多个半胱氨酸残基改造到每个采用的多肽种类中。例如,已经显示将半胱氨酸残基添加至这种构建体的C-末端允许在多肽链之间形成二硫键合,使所得异源二聚物稳定,而不干扰二价分子的结合特征。

[0023] 双抗体和其他免疫球蛋白被描述为意图对gpA33和CD3的每一个或二者都有特异性(见,例如,美国专利公开号2012/0014957、2012/0034160、2012/0087858、2012/0189541、2012/0195900、2012/0201746、2012/0237442、2012/0263722、2012/0258108和2012/0276608)。

[0024] 尽管这样的成功,但是稳定的功能性异源二聚非单特异性双抗体的产生可以通过仔细考虑和在多肽链中布置采用的结构域而得到进一步改善。因此,本发明涉及提供特异性多肽,其尤其被设计来经共价键合形成异源二聚双抗体和异源二聚Fc双抗体,所述双抗体能够同时结合gpA33和CD3。

[0025] 发明概述

[0026] 本发明涉及“gpA33x CD3双特异性单价双抗体”。在具体的实施方式中,本发明的双抗体进一步具有免疫球蛋白Fc区域的结构域(即,“Fc结构域”) (“gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体”) 或白蛋白结合结构域(“ABD”) (“具有ABD的gpA33x CD3双特异性单价双抗体”),以延长体内半衰期。本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体和本发明的gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体包括两条不同的多肽链,其彼此以异源二聚方式结合,以形成对gpA33的表位特异的一个结合位点和对CD3表位特异的一个结合位点。因此,本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体和gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体是单价的,在于它们仅仅能够结合一个拷贝的gpA33的表位和仅仅能够结合一个拷贝的CD3的表位,但是是双特异性的,在于单个双抗体能够同时结合gpA33的表位和CD3的表位。

[0027] 本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体由彼此共价结合——例如通过位于每条多肽链内的半胱氨酸残基的二硫键合——的两条多肽链(“第一”和“第二”多肽链)组成。本发明的gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体由三条多肽链(“第一”、“第二”和“第三”多肽

链)组成,其中第一和第二多肽链彼此共价结合以及第一和第三多肽链彼此共价结合。本发明的双特异性单价双抗体和双特异性单价Fc双抗体能够同时结合gpA33和CD3。本发明涉及这类gpA33x CD3双特异性单价双抗体和双特异性单价gpA33x CD3Fc双抗体,并且涉及包含这类双特异性单价双抗体或这类双特异性单价Fc双抗体的药学组合物。本发明另外涉及使用这类双抗体治疗癌症和其他疾病和病况的方法。

[0028] 具体地,本发明提供双特异性单价双抗体,其中双特异性单价双抗体能够特异性结合gpA33的表位和CD3的表位,其中双特异性单价双抗体包括第一多肽链和第二多肽链,其中第一和第二多肽链彼此共价结合,和其中:

[0029] A. 第一多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括:

[0030] i. 结构域1,其包括亚结构域(1A)和亚结构域(1B),所述亚结构域(1A)包括能够结合CD3的单克隆抗体的VL结构域(VLCD3) (SEQ ID NO:5);所述亚结构域(1B)包括能够结合gpA33的单克隆抗体的VH结构域(VHgpA33) (SEQ ID NO:27);其中亚结构域(1A)和(1B)彼此通过肽接头(SEQ ID NO:1)分开;

[0031] ii. 结构域2,其中结构域2是K-螺旋(coil)结构域(SEQ ID NO:4)或E-螺旋结构域(SEQ ID NO:3),其中结构域2通过肽接头(SEQ ID NO:2)与结构域1分开;

[0032] B. 第二多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括:

[0033] i. 结构域1,其包括亚结构域(1A)和亚结构域(1B),所述亚结构域(1A)包括能够结合gpA33的单克隆抗体的VL结构域(VLgpA33) (SEQ ID NO:26),所述亚结构域(1B)包括能够结合CD3的单克隆抗体的VH结构域(VHCD3) (SEQ ID NO:25),其中亚结构域(1A)和(1B)彼此通过肽接头(SEQ ID NO:1)分开;

[0034] ii. 结构域2,其中结构域2是E-螺旋结构域(SEQ ID NO:3)或K-螺旋结构域(SEQ ID NO:4),其中结构域2通过肽接头(SEQ ID NO:2)与结构域1分开;和其中第一多肽链的结构域2和第二多肽链的结构域2不都是E-螺旋结构域或不都是K-螺旋结构域;

[0035] 和其中:

[0036] (a) 第一多肽链的VL结构域和第二多肽链的VH结构域形成能够特异性结合CD3的表位的抗原结合结构域;和

[0037] (b) 第一多肽链的VH结构域和第二多肽链的VL结构域形成能够特异性结合gpA33的表位的抗原结合结构域。

[0038] 本发明另外考虑上述双特异性单价双抗体的实施方式,其中第一多肽链或第二多肽链包括白蛋白结合结构域(SEQ ID NO:34),其经接头3(SEQ ID NO:32)连接至结构域2的C-末端或连接至结构域1A的N-末端。

[0039] 本发明另外考虑双特异性单价Fc双抗体,其中双特异性单价Fc双抗体能够特异性结合gpA33的表位和CD3的表位,并且具有IgG Fc结构域,其中双特异性单价Fc双抗体包括第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链,其中第一和第二多肽链彼此共价结合以及第一和第三多肽链彼此共价结合,和其中:

[0040] A. 第一多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括:

[0041] i. 结构域1,其包括亚结构域(1A)和亚结构域(1B),所述亚结构域(1A)包括能够结合gpA33的单克隆抗体的VL结构域(VLgpA33) (SEQ ID NO:26),所述亚结构域(1B)包括能够结合CD3的单克隆抗体的VH结构域(VHCD3) (SEQ ID NO:25),其中亚结构域(1A)和(1B)彼此通

过肽接头 (SEQ ID NO:1) 分开；

[0042] ii. 结构域2, 其中结构域2是E-螺旋结构域 (SEQ ID NO:3) 或K-螺旋结构域 (SEQ ID NO:4), 其中结构域2通过肽接头 (SEQ ID NO:2) 与结构域1分开; 和

[0043] iii. 结构域3, 其包括亚结构域 (3A) 和亚结构域 (3B), 所述亚结构域 (3A) 包括含半胱氨酸的肽 (肽1) (SEQ ID NO:39), 所述亚结构域 (3B) 包括具有IgG免疫球蛋白Fc结构域的CH2和CH3结构域的IgG Fc结构域的多肽部分; 其中结构域3和2彼此由间隔肽 (接头5) (GGG) 分开;

[0044] B. 第二多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括:

[0045] i. 结构域1, 其包括亚结构域 (1A), 其包括能够结合CD3的单克隆抗体的VL结构域 (VL_{CD3}) (SEQ ID NO:5), 和亚结构域 (1B), 其包括能够结合gpA33的单克隆抗体的VH结构域 (VH_{gpA33}) (SEQ ID NO:27); 其中亚结构域 (1A) 和 (1B) 彼此通过肽接头 (SEQ ID NO:1) 分开;

[0046] ii. 结构域2, 其中结构域2是K-螺旋结构域 (SEQ ID NO:4) 或E-螺旋结构域 (SEQ ID NO:3), 其中结构域2通过肽接头 (SEQ ID NO:2) 与结构域1分开; 和其中第一多肽链的结构域2和第二多肽链的结构域2不都是E-螺旋结构域或不都是K-螺旋结构域; 和

[0047] C. 第三多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括, 结构域3, 其包括:

[0048] (1) 亚结构域 (3A), 其包括含半胱氨酸的肽 (肽1) (SEQ ID NO:39); 和

[0049] (2) 亚结构域 (3B), 其包括具有IgG免疫球蛋白Fc结构域的CH2和CH3结构域的IgG Fc结构域的多肽部分;

[0050] 和其中:

[0051] (a) 第一和第三多肽链的IgG Fc结构域的多肽部分形成IgG Fc结构域;

[0052] (b) 第一多肽链的VL结构域和第二多肽链的VH结构域形成能够特异性结合CD3的表位的抗原结合结构域; 和

[0053] (c) 第一多肽链的VH结构域和第二多肽链的VL结构域形成能够特异性结合gpA33的表位的抗原结合结构域。

[0054] 本发明另外考虑双特异性单价Fc双抗体, 其中双特异性单价Fc双抗体能够特异性结合gpA33的表位和CD3的表位, 并且具有IgG Fc结构域, 其中双特异性单价Fc双抗体包括第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链, 其中第一和第二多肽链彼此共价结合以及第一和第三多肽链彼此共价结合, 和其中:

[0055] A. 第一多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括:

[0056] i. 结构域3, 其包括亚结构域 (3A) 和亚结构域 (3B), 所述亚结构域 (3A) 包括含半胱氨酸的肽 (肽1) (SEQ ID NO:39), 所述亚结构域 (3B) 包括具有IgG免疫球蛋白Fc结构域的CH2和CH3结构域的IgG Fc结构域的多肽部分;

[0057] ii. 结构域1, 其包括亚结构域 (1A) 和亚结构域 (1B), 所述亚结构域 (1A) 包括能够结合gpA33的单克隆抗体的VL结构域 (VL_{gpA33}) (SEQ ID NO:26), 所述亚结构域 (1B) 包括能够结合CD3的单克隆抗体的VH结构域 (VH_{CD3}) (SEQ ID NO:25), 其中亚结构域 (1A) 和 (1B) 彼此通过肽接头 (SEQ ID NO:1) 分开;

[0058] 其中结构域1和3彼此通过间隔肽 (接头4) (SEQ ID NO:38) 分开;

[0059] iii. 结构域2, 其中结构域2是E-螺旋结构域 (SEQ ID NO:3) 或K-螺旋结构域 (SEQ ID NO:4), 其中结构域2通过肽接头 (SEQ ID NO:2) 与结构域1分开; 和

- [0060] B. 第二多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括：
- [0061] i. 结构域1, 其包括亚结构域(1A)和亚结构域(1B), 所述亚结构域(1A)包括能够结合CD3的单克隆抗体的VL结构域(VLCD3) (SEQ ID NO:5); 所述亚结构域(1B)包括能够结合gpA33的单克隆抗体的VH结构域(VH_{gpA33}) (SEQ ID NO:27); 其中亚结构域(1A)和(1B)彼此通过肽接头(SEQ ID NO:1)分开;
- [0062] ii. 结构域2, 其中结构域2是K-螺旋结构域(SEQ ID NO:4)或E-螺旋结构域(SEQ ID NO:3), 其中结构域2通过肽接头(SEQ ID NO:2)与结构域1分开; 和其中第一多肽链的结构域2和第二多肽链的结构域2不都是E-螺旋结构域或不都是K-螺旋结构域; 和
- [0063] C. 第三多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括结构域3, 其包括:
- [0064] (1) 亚结构域(3A), 其包括含半胱氨酸的肽(肽1) (SEQ ID NO:39); 和
- [0065] (2) 亚结构域(3B), 其包括具有IgG免疫球蛋白Fc结构域的CH2和CH3结构域的IgG Fc结构域的多肽部分;
- [0066] 和其中:
- [0067] (a) 第一和第三多肽链的IgG Fc结构域的多肽部分形成IgG Fc结构域;
- [0068] (b) 第一多肽链的VL结构域和第二多肽链的VH结构域形成能够特异性结合CD3的表位的抗原结合结构域; 和
- [0069] (c) 第一多肽链的VH结构域和第二多肽链的VL结构域形成能够特异性结合gpA33的表位的抗原结合结构域。
- [0070] 本发明进一步考虑任何上述双特异性单价Fc双抗体的实施方式, 其中第一多肽链的亚结构域(3B)包括与第三多肽链的亚结构域(3B)的序列不同的序列。
- [0071] 本发明进一步考虑这种上述双特异性单价Fc双抗体的实施方式, 其中第一多肽链的亚结构域(3B)具有氨基酸序列SEQ ID NO:40, 和第三多肽链的亚结构域(3B)具有氨基酸序列SEQ ID NO:41。
- [0072] 本发明进一步考虑这种上述双特异性单价Fc双抗体的实施方式, 其中第一多肽链的亚结构域(3B)具有氨基酸序列SEQ ID NO:41, 和第三多肽链的亚结构域(3B)具有氨基酸序列SEQ ID NO:40。
- [0073] 本发明进一步考虑这种上述双特异性单价Fc双抗体的实施方式, 其中第一多肽链的结构域3和/或第三多肽链的结构域3包括变体CH2-CH3序列, 其显示与Fc γ 受体改变的结合。
- [0074] 本发明进一步考虑任何上述双特异性单价双抗体或任何上述双特异性单价Fc双抗体的实施方式, 其中第一多肽链的结构域2包括E-螺旋(SEQ ID NO:3), 和第二多肽链的结构域2包括K-螺旋(SEQ ID NO:4)。
- [0075] 本发明进一步考虑任何上述双特异性单价双抗体或任何上述双特异性单价Fc双抗体的实施方式, 其中第一多肽链的结构域2包括K-螺旋(SEQ ID NO:4), 和第二多肽链的结构域2包括E-螺旋(SEQ ID NO:3)。
- [0076] 本发明进一步考虑双特异性单价双抗体, 其中双特异性单价双抗体能够特异性结合CD3的表位和gpA33的表位, 其中双特异性单价双抗体包括:
- [0077] (1) 第一多肽链, 其具有氨基酸序列为SEQ ID NO:28, 和第二多肽链, 其氨基酸序列为SEQ ID NO:30; 或

[0078] (2) 第一多肽链,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:35,和第二多肽链,其氨基酸序列SEQ ID NO:30;

[0079] 其中第一和第二多肽链通过二硫键彼此共价结合。

[0080] 本发明进一步考虑双特异性单价Fc双抗体,其中双特异性单价Fc双抗体能够特异性结合CD3的表位和gpA33的表位,并且具有IgG Fc结构域,其中双特异性单价Fc双抗体包括:

[0081] (1) 第一多肽链,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:42,第二多肽链,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:44,和第三多肽链,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:46;或

[0082] (2) 第一多肽链,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:48,第二多肽链,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:28,和第三多肽链,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:46;

[0083] 其中第一和第二多肽链通过第一二硫键彼此共价结合以及第一和第三多肽链通过第二二硫键彼此共价结合。

[0084] 本发明进一步考虑包括任何上述双特异性单价双抗体或任何上述双特异性单价Fc双抗体和生理学上可接受的载体的药学组合物。

[0085] 本发明进一步考虑上述药学组合物在治疗特征在于表达gpA33的癌症中的用途,尤其其中癌症是结直肠癌、结肠癌、胃癌或胰腺癌的这类用途。

[0086] 本发明进一步考虑表达任何上述双特异性单价双抗体或任何上述双特异性单价Fc双抗体的多肽链的细胞,以及编码这种表达的多肽的多核苷酸。

[0087] 本发明进一步考虑表达抗体或其多肽部分或其片段的细胞,其中抗体结合gpA33,和其中抗体或其多肽部分或其片段包括:

[0088] (1) 抗人gpA33抗体轻链的CDR1 (SEQ ID NO:14)、CDR2 (SEQ ID NO:15) 和CDR3 (SEQ ID NO:16);

[0089] (2) 抗人gpA33抗体重链的CDR1 (SEQ ID NO:18)、CDR2 (SEQ ID NO:19) 和CDR3 (SEQ ID NO:20);或

[0090] (3) (1) 和(2)二者。

[0091] 附图简述

[0092] 图1阐释本发明的双链gpA33x CD3双特异性单价双抗体的第一和第二多肽链的结构。

[0093] 图2A和2B阐释本发明的三链gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一、第二和第三多肽链的两种形式的结构(形式1,图2A;形式2,图2B)。

[0094] 图3表明本发明的双抗体能够同时结合CD3和gpA33。

[0095] 图4图解本发明的双抗体治疗癌症的能力。在存在gpA33x CD3双特异性单价双抗体(“DART-1”)和人PBMC (E:T=25:1) 或活化的人T细胞 (E:T=10:1) 的情况下孵育 (incubate) 结直肠或胰腺癌细胞,并且测量细胞毒性(图4A(结肠CSCL结直肠细胞),图4B(Colo205结直肠细胞),和图4C(ASPC-1胰腺癌细胞))。

[0096] 图5A-5F显示仅仅在存在癌症细胞(图5A-5C:CD8T细胞+colo205细胞(图5A)、CD8T细胞+ASPC-1细胞(图5B)、单独CD8T细胞(图5C);图5D-5F:CD4T细胞+colo205细胞(图5D)、CD4T细胞+ASPC-1细胞(图5E)、单独CD8T细胞(图5F)的情况下,在存在CD3双特异性单价双抗体(“DART-1”的情况下发生CD8T细胞的活化。

[0097] 图6A-6D表明gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-1和DART-2)针对SW948结直肠腺癌细胞(图6A)和colo205细胞(图6B)和Colo205-Luc细胞(图6C)介导等同的细胞毒性，并且没有双抗体介导gpA33-阴性癌症细胞系HCT116的细胞毒性(图6D)。

[0098] 图7A-7D表明gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2)、具有白蛋白结合结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(具有ABD的DART-2“w/ABD”)和具有免疫球蛋白IgG Fc结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(具有Fc的DART-2“w/Fc”)在存在人或食蟹猴PBMC的情况下促进癌症细胞的细胞毒性的能力。

[0099] 图8表明gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-1)体内减小鼠Colo205结肠癌模型中肿瘤体积的能力。

[0100] 图9A-9D显示在接收媒介(图9A)或gpA33x CD3双特异性单价双抗体之后两天(DART-1)(图9B)，和接收媒介(图9C)或DART-1之后12天(图9D)，植入(implant)Colo205细胞的NOD scid γ (NSG)小鼠的肿瘤成像数据。

[0101] 图10表明gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-1)体内减小鼠ASPC-1胰腺癌模型中肿瘤体积的能力。

[0102] 图11显示具有免疫球蛋白IgG Fc结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2w/Fc，形式1)介导体内结肠癌模型中肿瘤体积急剧下降的能力。

[0103] 图12显示具有免疫球蛋白IgG Fc结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2w/Fc，形式1)甚至在非常低的剂量下介导体内结肠癌模型中肿瘤体积减小的能力。

[0104] 图13显示gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2)和具有免疫球蛋白IgG Fc结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2w/Fc，形式1)双抗体在食蟹猴中的药代动力学。

[0105] 图14A-14B显示DART-2w/Fc形式1与固定的人和食蟹猴CD3结合的SPR分析。黑色虚线表示对在0、6.25、12.5、25、50或100nM的DART-2w/Fc浓度下获得的结合曲线的1:1Langmuir模型的整体拟合。数据是三个独立实验的代表。

[0106] 图15A-15B显示DART-2w/Fc形式1与捕获的人和食蟹猴gpA33结合的SPR分析。黑色虚线表示对以0、6.25、12.5、25、50或100nM的DART-2w/Fc形式1浓度获得的结合曲线的1:1Langmuir模型的整体拟合。数据是三个独立实验的代表。

[0107] 发明详述

[0108] 本发明涉及包括两条多肽链并且具有对gpA33的表位特异的一个结合位点和对CD3表位特异的一个结合位点的双特异性单价双抗体(即，“gpA33x CD3双特异性单价双抗体”)。本发明也涉及包括免疫球蛋白Fc结构域(“双特异性单价Fc双抗体”)并且由三条多肽链组成以及有对gpA33的表位特异的一个结合位点和对CD3表位特异的一个结合位点的双特异性单价双抗体(即，“gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体”)。本发明的双特异性单价双抗体和双特异性单价Fc双抗体能够同时结合gpA33和CD3。本发明涉及包含这类双特异性单价双抗体或这类双特异性单价Fc双抗体的药物组合物。本发明另外涉及使用这类双抗体治疗癌症和其他疾病和病况的方法。

[0109] 本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体由彼此结合以形成对gpA33的表位特异的一个结合位点和对CD3表位特异的一个结合位点两条多肽链组成。双抗体的各条多肽链彼此共价结合，例如通过位于每条多肽链内的半胱氨酸残基的二硫键合。每条多肽链包含

轻链可变结构域的抗原结合结构域、重链可变结构域的抗原结合结构域和异源二聚化结构域。间插接头肽(接头1)将轻链可变结构域的抗原结合结构域与重链可变结构域的抗原结合结构域分开。第一多肽链的轻链可变结构域的抗原结合结构域与第二多肽链的重链可变结构域的抗原结合结构域相互作用,以便形成对第一抗原(即, gpA33或CD3)特异的第一功能性抗原结合位点。同样地,第二多肽链的轻链可变结构域的抗原结合结构域与第一多肽链的重链可变结构域的抗原结合结构域相互作用,以便形成对第二抗原(即, gpA33或CD3,这取决于第一抗原的确定)特异的第二功能性抗原结合位点。因此,第一和第二多肽链的轻链可变结构域的抗原结合结构域和重链可变结构域的抗原结合结构域的选择是协调的,使得两条多肽链总共包括能够结合gpA33和CD3的轻链和重链可变结构域的抗原结合结构域。

[0110] 本发明的gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体由第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链组成。第一和第二多肽链彼此结合,以形成对gpA33的表位特异的一个结合位点和对CD3表位特异的一个结合位点。第一多肽链和第三多肽链彼此结合,以形成免疫球蛋白Fc结构域。双特异性单价Fc双抗体的第一和第二多肽链彼此共价结合,例如通过位于每条多肽链内的半胱氨酸残基的二硫键合。第一和第三多肽链彼此共价结合,例如通过位于每条多肽链内的半胱氨酸残基的二硫键合。第一和第二多肽链各包含轻链可变结构域的抗原结合结构域、重链可变结构域的抗原结合结构域和异源二聚化结构域。间插接头肽(接头1)将轻链可变结构域的抗原结合结构域与重链可变结构域的抗原结合结构域分开。第一多肽链的轻链可变结构域的抗原结合结构域与第二多肽链的重链可变结构域的抗原结合结构域相互作用,以便形成对第一抗原(即, gpA33或CD3)特异的第一功能性抗原结合位点。同样地,第二多肽链的轻链可变结构域的抗原结合结构域与第一多肽链的重链可变结构域的抗原结合结构域相互作用,以便形成对第二抗原(即, gpA33或CD3,这取决于第一抗原的确定)特异的第二功能性抗原结合位点。因此,第一和第二多肽链的轻链可变结构域的抗原结合结构域和重链可变结构域的抗原结合结构域的选择是协调的,使得两条多肽链总共包括能够结合gpA33和CD3的轻链和重链可变结构域的抗原结合结构域。第一和第三多肽链各包含含半胱氨酸的肽(肽1) SEQ ID NO:39和完整免疫球蛋白Fc结构域和含半胱氨酸的肽的一些或所有的CH2结构域和/或一些或所有的CH3结构域。一些或所有的CH2结构域和/或一些或所有的CH3结构域结合,以形成本发明的双特异性单价Fc双抗体的免疫球蛋白Fc结构域。本发明的双特异性单价Fc双抗体的第一和第三多肽链彼此共价结合,例如通过位于多肽链的含半胱氨酸的肽中的半胱氨酸残基的二硫键合。

[0111] 可通过异源二聚化结构域驱动双特异性单价双抗体或双特异性单价Fc双抗体的第一和第二多肽链的异源二聚物的形成。这样的结构域包括一条多肽链上的GVEPKSC (SEQ ID NO:54) (或VEPKSC; SEQ ID NO:55) 和另一条多肽链上的GFNRGEC (SEQ ID NO:56) (或FNRGEC; SEQ ID NO:57) (US2007/0004909)。可选地,这样的结构域可被改造,以包含具有相反电荷的螺旋。一条多肽链的异源二聚化结构域包括具有至少六个、至少七个或至少八个带负电荷氨基酸的序列,而另一条多肽链的异源二聚化结构域包括具有至少六个、至少七个或至少八个带正电荷氨基酸的序列。例如,第一或第二异源二聚化结构域可包括的序列包括八个带正电荷的氨基酸和另一异源二聚化结构域可包括的序列包括八个带负电荷的氨基酸。带正电荷的氨基酸可以是赖氨酸、精氨酸、组氨酸等和/或带负电荷的氨基酸可以是谷氨酸、天冬氨酸等。带正电荷的氨基酸优选地是赖氨酸和/或带负电荷的氨基酸优选地

是谷氨酸。

[0112] 本发明的双特异性单价双抗体和双特异性单价Fc双抗体被改造,从而这样的第一和第二多肽链沿着它们的长度经半胱氨酸残基彼此共价键合。这样的半胱氨酸残基可引入至间插接头中,所述间插接头将多肽的VL和VH结构域分开。可选地,和更优选地,第二肽(接头2)被引入至每条多肽链,例如,在多肽链的氨基-末端或在异源二聚化结构域和轻链可变结构域或重链可变结构域的抗原结合结构域之间布置接头2的位置。

[0113] 如上指出,结直肠细胞表达gpA33。能够免疫特异性结合gpA33的抗体能够结合这样的细胞。CD3在T细胞上被表达。因此,能够免疫特异性结合gpA33和CD3二者的抗体能够将T细胞靶向结直肠癌细胞和表达gpA33的其他癌症细胞(例如,结肠癌细胞、胰腺癌细胞等),并且因此能够提供此类癌症改进的疗法。

[0114] I. 本发明优选的gpA33x CD3双特异性单价双抗体

[0115] A. gpA33x CD3双特异性单价双抗体

[0116] 本发明的一种实施方式涉及由第一多肽链和第二多肽链组成的gpA33x CD3双特异性单价双抗体,其序列允许多肽链彼此共价结合,以形成能够同时结合gpA33和CD3的共价结合的复合物。

[0117] 优选的gpA33x CD3双特异性单价双抗体的第一多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括N-末端、能够结合CD3或gpA33的单克隆抗体的VL结构域(即,VL_{CD3}或VL_{gpA33})、第一间插间隔肽(接头1)、能够结合gpA33(如果这种第一多肽链包含VL_{CD3})或CD3(如果这种第一多肽链包含VL_{gpA33})的单克隆抗体的VH结构域、含半胱氨酸的第二间插间隔肽(接头2)、促进异源二聚物的(heterodimer-promoting)结构域和C-末端(图1)。

[0118] 优选的gpA33x CD3双特异性单价双抗体的第二多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括N-末端、能够结合gpA33或CD3的单克隆抗体的VL结构域(即,VL_{gpA33}或VL_{CD3},这取决于双抗体的第一多肽链的VL结构域选择)、间插接头肽(接头1)、能够结合CD3(如果这种第二多肽链包含VL_{gpA33})或CD3(如果这种第二多肽链包含VL_{CD3})的单克隆抗体的VH结构域、含半胱氨酸的间隔肽(接头2)、促进异源二聚物的结构域和C-末端(图1)。

[0119] 优选的gpA33x CD3双特异性单价双抗体的第一多肽链的VL结构域与优选的gpA33x CD3双特异性单价双抗体的第二多肽链的VH结构域相互作用,以便形成对第一抗原(即,CD3或gpA33)特异的第一功能抗原结合位点。同样地,第二多肽链的VL结构域与第一多肽链的VH结构域相互作用,以便形成对第二抗原(即,gpA33或CD3,这取决于第一抗原的确定)特异的第二功能抗原结合位点。因此,第一和第二多肽链的VL和VH结构域的选择是协调的,使得优选的gpA33x CD3双特异性单价双抗体的两条多肽链总共包括能够结合gpA33和CD3的VL和VH结构域(即,它们包括VL_{CD3}/VH_{CD3}和VL_{gpA33}/VH_{gpA33})。

[0120] 最优选地,选择间插接头肽(接头1,其将这样的VL和VH结构域分开)的长度,以基本上或完全防止多肽链的VL和VH结构域彼此结合。因此第一多肽链的VL和VH结构域基本上或完全不能彼此结合。同样地,第二多肽链的VL和VH结构域基本上或完全不能彼此结合。优选的间插间隔肽(接头1)的序列为(SEQ ID NO:1):GGGSGGGG。

[0121] 含半胱氨酸的第二间插间隔肽(接头2)包含1、2、3或更多个半胱氨酸。优选的含半胱氨酸的间隔肽(接头2)具有的序列是SEQ ID NO:2:GGCGGG。

[0122] 第一和第二多肽的促进异源二聚物的结构域彼此不同并且设计为彼此结合,以便

促进第一和第二多肽链结合。因此,在优选的实施方式中,多肽链之一可被改造以包含促进异源二聚物的“E-螺旋”结构域(SEQ ID NO:3) :

[0123] EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

[0124] 其残基在pH 7形成负电荷,而两条多肽链的另一条可被改造以包含促进异源二聚物的“K-螺旋”结构域(SEQ ID NO:4) :

[0125] KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

[0126] 其残基在pH 7形成正电荷。这种带电结构域的存在促进第一和第二多肽之间的结合,并且因此促进异源二聚化。为哪条链提供哪种螺旋不重要,只要在第一和第二多肽链上采用的螺旋不同以便促进这样的链之间的异源二聚化即可。

[0127] 1.gpA33x CD3双特异性单价双抗体,“DART-1”

[0128] 在本文中命名为“DART-1”的、优选的gpA33x CD3双特异性单价双抗体的第一和第二多肽链包括具有下述序列的多肽结构域:

[0129] 结合CD3的抗体的VL结构域(VL_{CD3}) (SEQ ID NO:5) :

[0130] QAVVTQEPLSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLL
GGKAALTITGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTLTVLG

[0131] VL_{CD3}的抗原结合结构域包括CDR1,其具有序列:(SEQ ID NO:6) RSSTGAVTTSNYAN、CDR2,其具有序列(SEQ ID NO:7):GTNKRAP和CDR3,其具有序列(SEQ ID NO:8):ALWYSNLWV。

[0132] 结合CD3的抗体的VH结构域(VH_{CD3}) (SEQ ID NO:9) :

[0133] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSS

[0134] VH_{CD3}的抗原结合结构域包括:CDR1,其具有序列(SEQ ID NO:10):TYAMN、CDR2,其具有序列(SEQ ID NO:11) RIRSKYNNYATYYADSVKD和CDR3,其具有序列(SEQ ID NO:12):HGNFGNSYVSWFAY。

[0135] 结合gpA33的鼠抗体的VL结构域(VL_{gpA33}) (SEQ ID NO:13) :

[0136] QIVLTQSPAAMSASPGERVTMTCARSSISFMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGPVRFSGSGSGTS
YSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGSGTKLELK

[0137] VL_{gpA33}的抗原结合结构域包括CDR1,其具有序列(SEQ ID NO:14):SARSSISFMY、CDR2,其具有序列(SEQ ID NO:15):DTSNLAS和CDR3,其具有序列(SEQ ID NO:16):QQWSSYPLT。

[0138] 结合gpA33的鼠抗体的VH结构域(VH_{gpA33}) (SEQ ID NO:17) :

[0139] QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFSGSWMNVVKQRPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNGKFKD
KATLTADKSSTTAYMELSSLTSVDSAVYFCARIYGNNVYFDVWGAGTTVTVSS

[0140] VH_{gpA33}的抗原结合结构域包括CDR1,其具有序列(SEQ ID NO:18):GSWMN、CDR2,其具有序列(SEQ ID NO:19):RIYPGDGETNYNGKFKD和CDR3,其具有序列(SEQ ID NO:20):IYGNNVYFDV。

[0141] 第一间插间隔肽(接头1)具有序列(SEQ ID NO:1):GGGSGGGG。含半胱氨酸的间隔肽(接头2)具有的序列为SEQ ID NO:2:GGCGGG。

[0142] 第一多肽链的促进异源二聚物的结构域是“E-螺旋”结构域(SEQ ID NO:3)。第二多肽链的促进异源二聚物的结构域是“K-螺旋”结构域(SEQ ID NO:4)。

[0143] 因此,DART-1的第一多肽链具有序列(SEQ ID NO:21)：

[0144] QAVVTQEPLTVSPGGTVTLCRSSTGAVTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLL
GGKAALTITGAQAEDeadYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVGGGSGGGQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYT
FSGSWMNWKQRPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNGKFKDATALTADKSSTAYMELSSLTSVDSAVYFCARIYGNVY
FDVWGAGTTVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEK

[0145] 如将认识到的,SEQ ID NO:21的残基1-110是结合CD3的抗体的VL结构域(VL_{CD3})(SEQ ID NO:5);SEQ ID NO:21的残基111-118是第一间插间隔肽(接头1)(SEQ ID NO:1);SEQ ID NO:21的残基119-237是结合gpA33的鼠抗体的VH结构域(VH_{gpA33})(SEQ ID NO:17),SEQ ID NO:21的残基238-243是含半胱氨酸的间隔肽(接头2)(SEQ ID NO:2)和SEQ ID NO:21的残基244-271是促进异源二聚物的“E-螺旋”结构域(SEQ ID NO:3)。

[0146] 编码DART-1的第一多肽链的优选多核苷酸具有序列(SEQ ID NO:22)：

[0147] caggctgtggtgactcaggagcttcaactgaccgtgtccccaggcgaaactgtgaccctgacatgcag
atccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaattgggtgcagcagaagccaggacaggcaccaagggc
ctgatcggggtacaaaacaaaaggcctccctggaccctgcacggtttctggaaagtctgctggcgaaaggccg
ctctgactattaccgggacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggatagcaatctgtgggt
gttcgggggtggcacaaaactgactgtgctggaggtggatccggcgaggatggacaggtccagctgcagcag
tctggacctgagctggtaagcctggcctcagtgaagatttcctgcaagcttcaggctacacattcagtg
cttggatgaactgggtgaagcagaggcctggacagggtcttga gtggattggacggatctaccctggagatggag
aaactaactacaatgggaagtttaaggacaaggccacactgactgcagacaaatcatccaccacagc
ctcagcagcctgacctctgtggactctgcggctattctgtcaagaatctatgtaataacgttactcgat
gtctggcgcaggaccacggcgtaccgtgtctccggaggatgtggcggtggagaagtggccgactggagaaag
agttgctgcttggagaaggaggctgcacttgaaaaggaggctgcagccctggagaaaa

[0148] DART-1的第二多肽链具有序列(SEQ ID NO:23)：

[0149] QIVLTQSPAAMSASPGERVTMTCSARSSISFMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPRFSGSGSGTS
YSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGSGTKLELKRGGSGGGEVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNT
YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY
VSWFAYWGQGTLTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKE

[0150] 如将认识到的,SEQ ID NO:23的残基1-107是结合gpA33的鼠抗体的VL结构域(VL_{gpA33})(SEQ ID NO:13);SEQ ID NO:23的残基108-115是第一间插间隔肽(接头1)(SEQ ID NO:1);SEQ ID NO:23的残基116-240是结合CD3的抗体的VH结构域(VH_{CD3})(SEQ ID NO:9),SEQ ID NO:23的残基241-246是含半胱氨酸的间隔肽(接头2)(SEQ ID NO:2)和SEQ ID NO:23的残基247-274是促进异源二聚物的“K-螺旋”结构域(SEQ ID NO:4)。

[0151] 编码DART-1的第二多肽链的优选的多核苷酸具有序列(SEQ ID NO:24)：

[0152] caaattgttctcacccagtctccagcaatcatgtctgcacatccaggggagagggtaccatgacctg
cagtgcaggtaagtataagttcatgtactggattccctgtcgctcagtggcagtgggtctggacacttattctc
gacacatccaacctggcttctggaggatccctgtcgctcagtggcagtgggtctggacacttattctc
ttagccgaatggaggctgaagatgctgccacttattactgcccaggatggagtagttaccactcac
gttcggatggaccacggactggagctgaaacgggtggaggatccggcgaggcggagagggtc
cagctggatggactctccctgagactctcctgtcagccctctggattcacca
catacgttatga

atgggtccgccaggctccagggaaagggtggactgggttgcaaggatcaggccaactacaacaatttatgcaac
ctactatgccactctgtgaaggataggattaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaatg
aacagcctgaaaaccgaggacacggccgttattactgtgtgagacacggtaacttcggcaattttacgtgtctt
ggttgttattggggacagggacactggtgactgtgtcttcggaggatgtggcggtggaaaagtggccgcact
gaaggagaaagttgctttgaaagagaaggtcgccgcacttaaggaaaaggtcgccgcactgaaagag

[0153] 2.gpA33x CD3双特异性单价双抗体，“DART-2”

[0154] 在本文中命名为“DART-2”的、第二优选的gpA33x CD3双特异性单价双抗体的第一和第二多肽链包括具有下述序列的多肽结构域：

[0155] 结合CD3的抗体的VL结构域(VLCD3) (SEQ ID NO:5) :

[0156] QAVVTQEPLTVSPGGTVTLCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLL
GGKAALTITGAQAEDAYYCALWYSNLWVFGGGKLTVELG

[0157] VLCD3的抗原结合结构域包括CDR1,其具有序列: (SEQ ID NO:6) RSSTGAVTTSNYAN、
CDR2,其具有序列(SEQ ID NO:7) : GTNKRAP和CDR3,其具有序列(SEQ ID NO:8) : ALWYSNLWV

[0158] 结合CD3的抗体的VH结构域(VHCD3) (SEQ ID NO:25) :

[0159] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSS

[0160] VHCD3的抗原结合结构域包括CDR1,其具有序列(SEQ ID NO:10) : TYAMN、CDR2,其具
有序列(SEQ ID NO:11) : RIRSKYNNYATYYADSVKD和CDR3,其具有序列: (SEQ ID NO:12)
HGNFGNSYVSWFAY。

[0161] 上面讨论的结合人gpA33的鼠抗体被人源化,以提供优选的双抗体DART-2的VL和
VH结构域。这些人源化结构域如下:

[0162] 结合gpA33的人源化抗体的VL结构域(VL_{gpA33}) (SEQ ID NO:26) :

[0163] DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCSRSSISFMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLASGVPSRFSGSGTE
FTLTISLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIK

[0164] VL_{gpA33}的抗原结合结构域包括CDR1,其具有序列(SEQ ID NO:14) : SARSSISFMY、
CDR2,其具有序列(SEQ ID NO:15) : DTSNLAS和CDR3,其具有序列(SEQ ID NO:16) :
QQWSSYPLT。

[0165] 结合gpA33的人源化抗体的VH结构域(VH_{gpA33}) (SEQ ID NO:27) :

[0166] QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTGSMNWVRQAPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNGKFDRVT
ITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNNVYFDVWGQGTTVSS

[0167] VH_{gpA33}的抗原结合结构域包括CDR1,其具有序列(SEQ ID NO:18) : GSWMN、CDR2,其具
有序列(SEQ ID NO:19) : RIYPGDGETNYNGKFKD和CDR3,其具有序列(SEQ ID NO:20) :
IYGNVYFDV。

[0168] 第一间插间隔肽(接头1)具有序列(SEQ ID NO:1) : GGGSGGGG。含半胱氨酸的间隔
肽(接头2)具有的序列为SEQ ID NO:2:GCCGGG。

[0169] 第一多肽链的促进异源二聚物的结构域是“E-螺旋”结构域(SEQ ID NO:3)。第二
多肽链的促进异源二聚物的结构域是“K-螺旋”结构域(SEQ ID NO:4)。

[0170] 因此,DART-2的第一多肽链具有序列(SEQ ID NO:28) :

[0171] QAVVTQEPLTVSPGGTVTLCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLL

GGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT
FTGSWMNWVRQAPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNGKFKDRVТИАDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNNVY
FDVWGQGTTVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

[0172] 如将认识到的,SEQ ID NO:28的残基1-110是结合CD3的抗体的VL结构域(VLCD₃) (SEQ ID NO:5);SEQ ID NO:28的残基111-118是第一间插间隔肽(接头1) (SEQ ID NO:1);SEQ ID NO:28的残基119-237是结合gpA33的抗体的VH结构域(VH_{gpA33}) (SEQ ID NO:27),SEQ ID NO:28的残基238-243是含半胱氨酸的间隔肽(接头2) (SEQ ID NO:2) 和SEQ ID NO:28的残基244-271是促进异源二聚物的“E-螺旋”结构域(SEQ ID NO:3)。

[0173] 编码DART-2的第一多肽链的优选的多核苷酸具有序列(SEQ ID NO:29):

[0174] caggctgtggtgactcaggagcttcactgaccgtgtccccaggcgaaactgtgaccctgacatgcag
atccagcacaggcgactgaccacatctaactacgccaattgggtgcagcagaagccaggacaggcacaaggccc
ctgatcggggtacaaaacaaaaggctccctggacccctgcacggttctggaaagtctgctggcgaaaggccc
ctctgactattaccgggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggatagcaatctgtgggt
gttcgggggtggcacaaaactgactgtgctggaggtggatccggcgaggtggacaggtccagctggccag
agcggggccgaagtcaaaaaaccggagcaagcgtgaaggctcctgcaaagcatcaggctatacattacaggca
gctggatgaactgggtgaggcaggctccaggacaggactggagtgatcggcgcatctaccctggagacggcga
aactaactataatggaaagtctaaagaccgagtgaccatcacagccatagtctacttagtaccgcctacatggag
ctgagctccctgcggctgaagataccggcgctactattgcgctagaattacggaaacaatgtctatggac
tgtggggcagggacaactgtgactgtcctccggaggatgtggcggtggagaagtggccgactggagaaaga
gttgctgcttggagaaggaggctgcacttggaaaaggaggctgcagccctggagaaaa

[0175] DART-2的第二多肽链具有序列(SEQ ID NO:30)：

[0176] DIQLTQSPSFLSASVGDRVТИCSARSSI FMWYQQKPGKAPLLIYDTNSLASGVPSRFSGSGSGTE
FTLTISSEAEA DAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKEIKGGGSGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTY
AMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLTVSSGGCGGGKVAALKE KVAALKE KVAALKE KVAALKE

[0177] 如将认识到的,SEQ ID NO:30的残基1-106是结合gpA33的抗体的VL结构域(VL_{gpA33}) (SEQ ID NO:26);SEQ ID NO:30的残基107-114是第一间插间隔肽(接头1) (SEQ ID NO:1);SEQ ID NO:30的残基115-239是结合CD3的抗体的VH结构域(VH_{CD3}) (SEQ ID NO:25),SEQ ID NO:30的残基240-245是含半胱氨酸的间隔肽(接头2) (SEQ ID NO:2) 和SEQ ID NO:30的残基246-273是促进异源二聚物的“K-螺旋”结构域(SEQ ID NO:4)。

[0178] 编码DART-2的第二多肽链的优选的多核苷酸具有序列(SEQ ID NO:31):

[0179] gacattcagctgactcagccccctttctgtccgcattcgatccggatcgacttacttg
ctctgcttaggtcccaatcagttcatgtactggtatcagcagaaggccggcaaagcaccta
gacacaagcaacctggcctccgggtgccatctcggttcttgtccgtggatcaggaact
tttagctccctggaggctgaagatgccgtacctactattgccagcagtggagcag
ggggactaaactgaaatcaagggtggaggatccggcggcggaggcgagggtgc
tttgtccagcctggagggtccctgagactctccgtgcagcctctggattcac
gggtcccccaggctccaggaaagggctggagtgggtggaggatcagg
tccaaagtacaacaattatgcaaccta
ctatgccactctgtgaaggatgattcaccatcaagagatgatt
caactcactgtatctgcaaatgaac

agcctgaaaaccgaggacacggccgttattactgttgagacacggtaacttcggcaattttacgtgtcttgg
ttgcatttggggacagggacactggactgtgtcttccggaggatgtggcggtggaaaagtggccgactgaa
ggagaaagttgtcttggaaagagaaggtcgccgacttaaggaaaaggtcgccgtgaaagag

[0180] 3. 具有白蛋白结合结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(ABD) (“DART-2w/ABD”)

[0181] 在本发明的另一实施方式中, gpA33x CD3双特异性单价双抗体包括白蛋白结合结构域(“ABD”) (具有ABD的gpA33x CD3双特异性单价双抗体”。

[0182] 如WO 2012/018687中公开,为了改善双抗体分子的体内药物代谢动力学性质,可修饰分子,以在双抗体分子的一个或多个末端包含血清结合蛋白的多肽部分。最优先地,这种血清结合蛋白的多肽部分安置在双抗体分子的C-末端。为了该目的,尤其优选的血清结合蛋白的多肽部分是来自链球菌蛋白质G的白蛋白结合结构域(ABD)。链球菌属(*Streptococcus*)菌株G148的蛋白质G的白蛋白结合结构域3(ABD3)是尤其优选的。

[0183] 链球菌属菌株G148的蛋白质G的白蛋白结合结构域3(ABD3)由形成稳定三-螺旋束并且具有广泛白蛋白结合特异性的46个氨基酸残基组成(Johansson, M.U.等(2002)“细菌白蛋白结合组件的结构、特异性和相互作用的模式(Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules)”*J.Biol.Chem.* 277 (10) :8114-8120)。白蛋白是血浆中最丰富的蛋白质并且人中的半衰期为19天。白蛋白具有数个小分子结合位点,其允许它非共价结合其他蛋白质,从而延长它们的血清半衰期。

[0184] 因此,具有白蛋白结合结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体的第一多肽链或第二多肽链包含第三接头(接头3),其将这种多肽链的E-螺旋(或K-螺旋)与白蛋白结合结构域分开。这种接头3的优选的序列是GGGS (SEQ ID NO:32) 或GGGNS (SEQ ID NO:33)。优选的白蛋白结合结构域(ABD)具有氨基酸序列(SEQ ID NO:34) :

[0185] LAQAKEAAIRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP

[0186] 为了阐释本发明的该方面,修饰上述DART-2的第一多肽链,以包含白蛋白结合结构域,产生具有ABD的gpA33x CD3双特异性单价双抗体,本文命名为“DART-2w/ABD”。

[0187] 这种DART-2w/ABD的第一多肽链具有氨基酸序列(SEQ ID NO:35) :

[0188] QAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLL
GGKAALTITGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYT
FTGSWMNWRQAPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNGKFDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNVY
FDVWGQGTTTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVALEKGGS LAQAKEAAIRELDKYGVSDYYKNLI
DNAKSAEGVKALIDEILAALP

[0189] 如将认识到的,SEQ ID NO:35的残基1-271与DART-2的残基1-271相同,因此在N-末端至C-末端方向上提供结合CD3的抗体的VL结构域(VLCD3) (SEQ ID NO:5)、第一间插间隔肽(接头1) (SEQ ID NO:1)、结合gpA33的抗体的VH结构域(VH_{gpA33}) (SEQ ID NO:27)、含半胱氨酸的间隔肽(接头2) (SEQ ID NO:2)、促进异源二聚物的“E-螺旋”结构域(SEQ ID NO:3)和C-末端。接头3的残基272-275 (SEQ ID NO:32) 和残基276-321是白蛋白结合结构域(SEQ ID NO:34)。

[0190] 编码DART-2w/ABD的第一多肽链的优选的多核苷酸具有序列(SEQ ID NO:36) :

[0191] caggctgtggactcaggagccttactgaccgttccccaggcggactgtgaccctgacatgcag

atccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaattgggtgcagcagaagccaggacaggcaccaagggc
 ctgatcgaaaaactaaacaaaaggctccctggaccctgcacggtttcttgaagtctgctggcgaaaggccg
 ctctgactattaccggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgttgtatagcaatctgtgggt
 gttcgaaaaactgactgtgctggaggggtggatccggcgagggtggacaggtccagctggtccag
 agcggggccgaagtcaaaaaaccggagcaagcgtgaaggtctcctgcaaagcatcaggctatacatttacaggca
 gctggatgaactgggtgaggcaggctccaggacaggactggatcggcgcatctaccctggagacggcga
 aactaactataatggaaagttcaaaagaccgagtgaccatcacagccataagtctacttagtaccgcctacatggag
 ctgagctccctgcggctgaagataccgcgtctactattgcgctagaattacggaaacaatgtctatggac
 tgtggggcagggacaactgtgactgtctccggaggatgtggcggtggagaagtggccgcactggagaaaga
 ggttgctgcttggagaaggaggcgacttgaaaaggaggcgactggatccggagaaaggcggcggtctcg
 gcccaggcaaaagaggcagccatccgcgaactggataaatatggcgtagcgattattataagaacctgattgaca
 acgcaaaatccgcggaaaggcgtgaaagcactgattgatgaaattctggccgcctgcct

[0192] DART-2w/ABD的第二多肽链与上面讨论的DART-2的第二多肽链相同 (SEQ ID NO: 30)。

[0193] B. 具有IgG Fc结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体 (“DART-2w/Fc”)

[0194] 在进一步的实施方式中,本发明提供具有IgG Fc结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体。所以这种双抗体在本文被称为“gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体”。本发明Fc双抗体的Fc结构域可以是完整的Fc区域(例如,完整的IgG Fc区域)或仅仅是完整Fc区域的片段。尽管本发明的双特异性单价Fc双抗体的Fc结构域可具有结合一个或多个Fc受体(例如,Fc γ R(一个或多个))的能力,但更优选地这样的Fc结构域造成与Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a) 或Fc γ RIIIB (CD16b) 的结合降低(相对于野生型Fc区域展示的结合)或基本上消除这样的Fc结构域结合这类受体(一个或多个)的能力。本发明的双特异性单价Fc双抗体的Fc结构域可包括完整Fc区域的一些或所有的CH2结构域和/或一些或所有的CH3结构域,或可包括变体CH2和/或变体CH3序列(相对于完整Fc区域的CH2或CH3结构域,其可包括,例如,一个或多个插入和/或一个或多个缺失)。本发明的双特异性单价Fc双抗体的Fc结构域可包括非Fc多肽部分,或可包括非天然完整Fc区域的一部分,或可包括非天然存在方向的CH2和/或CH3结构域(比如,例如,两个CH2结构域或两个CH3结构域,或在N-末端至C-末端方向上,与CH2结构域连接的CH3结构域等)。

[0195] 在第一种实施方式中,标记为“形式1”并且显示在图2A中,示例性gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括N-末端、能够结合gpA33或CD3的单克隆抗体的VL结构域(即,VL_{gpA33}或VL_{CD3})、间插间隔肽(接头1)、能够结合gpA33(如果这种第一多肽链包含VL_{CD3})或CD3(如果这种第一多肽链包含VL_{gpA33})的单克隆抗体的VH结构域、含半胱氨酸的第二间插间隔肽(接头2)、促进异源二聚物的结构域、间隔肽(接头5)、含半胱氨酸的肽(肽1)、IgG Fc结构域(优选地,抗体Fc区域的所有或一部分CH2和CH3结构域)和C-末端。

[0196] 在第二种实施方式中,标记为“形式2”并且显示在图2B中,示例性gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括N-末端、含半胱氨酸的肽(肽1)、IgG Fc结构域(优选地,抗体Fc区域的所有或一部分CH2和CH3结构域)、间插间隔肽(接头4)、能够结合gpA33或CD3的单克隆抗体的VL结构域(即,VL_{gpA33}或VL_{CD3})、间插间隔肽

(接头1)、能够结合gpA33(如果这种第一多肽链包含VL_{CD3})或CD3(如果这种第一多肽链包含VL_{gpA33})的单克隆抗体的VH结构域、含半胱氨酸的第二间插间隔肽(接头2)、促进异源二聚物的结构域和C-末端。

[0197] 优选地，在每个实施方式中，第一多肽链的Fc结构域造成与Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a) 或 Fc γ RIIIB (CD16b) 的结合降低(相对于野生型Fc区域展示的结合)或基本上消除这种Fc结构域与这类受体(一个或多个)结合的能力。能够介导这种改变的结合的Fc变体和突变体形式是本领域熟知的并且包括在234和235位的氨基酸置换、在265位的置换或在297位的置换(见，例如，美国专利号5,624,821，其通过引用并入本文)。在优选的实施方式中，CH2和CH3结构域包括在234位用丙氨酸的置换和在235位用丙氨酸的置换。

[0198] 这种示例性gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体(形式1和形式2)的第二多肽链在从N-末端至C-末端方向上包括N-末端、能够结合gpA33或CD3的单克隆抗体的VL结构域(即，VL_{gpA33}或VL_{CD3}，这取决于双抗体的第一多肽链的VL结构域选择)、间插接头肽(接头1)、能够结合CD3(如果这种第二多肽链包含VL_{gpA33})或CD3(如果这种第二多肽链包含VL_{CD3})的单克隆抗体的VH结构域、含半胱氨酸的间隔肽(接头2)、促进异源二聚物的结构域(优选地K-螺旋结构域)和C-末端。

[0199] 示例性gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体(形式1和形式2)将另外包括第三多肽链，其在从N-末端至C-末端方向上包括N-末端、含半胱氨酸的肽(肽1)、具有与第一多肽链的Fc结构域的相同同种型的IgG Fc结构域(优选地，抗体Fc区域的所有或一部分CH2和CH3结构域)和C-末端。优选地，相对于示例性gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一多肽链而言，第三多肽链的Fc结构域将造成与Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a) 或 Fc γ RIIIB (CD16b) 的结合降低(相对于野生型Fc区域展示的结合)或将基本上消除这种Fc结构域结合这类受体(一个或多个)的能力，如上讨论。

[0200] 任选地，本发明间插间隔肽(接头4)优选地包括氨基酸序列(SEQ ID NO:37)：APSSS，和更优选地具有氨基酸序列(SEQ ID NO:38)：APSSSPME。

[0201] 第一和第三多肽链的含半胱氨酸的肽(肽1)可由相同氨基酸序列或不同氨基酸序列组成，并且包含1、2、3个或更多个半胱氨酸残基。尤其优选的肽1具有氨基酸序列(SEQ ID NO:39)：DKTHTCPPCP。

[0202] 间插间隔肽(接头1)优选地具有上述SEQ ID NO:1的序列。含半胱氨酸的第二间插间隔肽(接头2)优选地具有上述SEQ ID NO:2的序列。

[0203] gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一和第二多肽链的促进异源二聚物的结构域优选地是上述E-螺旋结构域(SEQ ID NO:3)和K-螺旋结构域(SEQ ID NO:4)，并且将被选择从而这种多肽链的一条具有E-螺旋结构域，而另一条具有K-螺旋结构域，如上所讨论。

[0204] 优选的间隔肽(接头5)具有序列GGG。

[0205] 第一和第三多肽的CH2和/或CH3结构域不必相同，并且有利地被修饰以促进两条多肽之间的复合。例如，可以将氨基酸置换(优选用包含形成‘突出物(knob)’的大侧基的氨基酸，例如色氨酸，进行的置换)引入CH2或CH3结构域中，从而使得空间干扰会防止与类似突变的结构域的相互作用，并且会迫使突变的结构域与这样的结构域配对：在所述结构域中，改造进了互补或适应性突变，即‘孔(hole)’，(例如用甘氨酸进行置换)。这类突变组可

以被改造进任何包含双特异性单价Fc双抗体分子的多肽对中，并且进一步改造进所述对的多肽链的任何部分中。偏爱异源二聚化而不喜欢同源二聚化的蛋白质工程的方法在本领域中是熟知的，特别是相对于免疫球蛋白样分子的改造而言，并且包括在本文中这种组的突变可被改造成任何对的多肽包括双特异性单价Fc双抗体分子，和此外，改造成所述的多肽链的任何部分。相比同二聚利于异源二聚化的蛋白质改造的方法是本领域熟知的，尤其就免疫球蛋白样分子的改造而言，并且包括在本文中（见例如，Ridgway等（1996）“抗体CH3结构域用于重链异源二聚化的‘突出物-进入-孔’改造（‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization）”Proteins Engr.9:617-621, Atwell等（1997）“使用噬菌体展示文库的来自重塑同源二聚物的结构域界面的稳定异源二聚物（Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library）”J. Mol. Biol. 270:26-35, 和Xie等（2005）“新形式的双特异性抗体：非常有效的异源二聚化、表达和肿瘤细胞溶解（A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis）”J. Immunol. Methods 296:95-101；其每一篇通过参考以其整体并入本文）。优选将‘突出物’改造到第一多肽链的CH2-CH3结构域中，并将‘孔’改造到第三多肽链的CH2-CH3结构域中。因此‘突出物’会有助于防止第一多肽链通过其CH2和/或CH3结构域同源二聚化。因为第三多肽链优选含有‘孔’置换，其会与第一多肽链异源二聚化以及与自身同源二聚化。通过将天然IgG Fc区域的Fc结构域修饰为含有修饰T366W，产生优选的突出物。通过将天然IgG Fc区域的Fc结构域修饰为含有修饰T366S、L368A以及Y407V，产生优选的孔为了帮助从包括第一、第二和第三多肽链的最终双特异性单价Fc双抗体纯化第三多肽链同源二聚物，第三多肽链的CH2和CH3结构域的蛋白A结合位点优选地经氨基酸置换在435位突变（H435R）。为了帮助从包括第一、第二和第三多肽链的最终双特异性单价Fc双抗体纯化第三多肽链同源二聚物，第三多肽链的CH2和CH3结构域的蛋白A结合位点优选地经氨基酸置换而被突变。因此，第三多肽链同源二聚物不会结合蛋白A，而双特异性单价Fc双抗体会保留其通过第一多肽链上的蛋白A结合位点结合蛋白A的能力。

[0206] 第一多肽链中存在的抗体Fc结构域的CH2和CH3结构域的优选序列是 (SEQ ID NO: 40) :

[0207] APEAAGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP PSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK

[0208] 第三多肽链中存在的抗体Fc结构域的CH2和CH3结构域的优选序列是 (SEQ ID NO: 41) :

[0209] APEAAGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYP PSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK

[0210] 1.DART-2w/Fc形式1

[0211] 在本文中命名为“DART-2w/Fc形式1”的、优选gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一、第二和第三多肽链包括具有下述序列的多肽结构域：

[0212] 这样的DART-2w/Fc形式1的第一多肽链具有氨基酸序列 (SEQ ID NO:42) :DIQLTQ

SPSFLSASVGDRVTITCSARSSISFMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLASGVPSRFSGSGTEFTLTISLEAEDAA
TYYCQQWSSYPLTFQGTKEIKGGGGGGEVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLE
WVGRIRSKNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTV
SSGGCGGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVLFPPPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0213] 如将认识到的,SEQ ID NO:42的残基1-106是结合gpA33的抗体的VL结构域(VL_{gpA33}) (SEQ ID NO:26); SEQ ID NO:42的残基107-114是第一间插间隔肽(接头1) (SEQ ID NO:1); SEQ ID NO:42的残基115-239是结合CD3的抗体的VH结构域(VH_{CD3}) (SEQ ID NO:25); SEQ ID NO:42的残基240-245是含半胱氨酸的间隔肽(接头2) (SEQ ID NO:2); SEQ ID NO:42的残基246-273是促进异源二聚物的“E-螺旋”结构域(SEQ ID NO:3); 残基274-276是间隔肽GGG(接头5); 残基277-286是肽1(SEQ ID NO:39), 残基277-503是抗体Fc结构域的CH2和CH3结构域的序列(SEQ ID NO:40)。

[0214] 编码DART-2w/Fc形式1的第一多肽链的优选的多核苷酸具有序列(SEQ ID NO:43):

[0215] gacattcagctgactcagtcggccatccgtcgagatcgagtgcatttttg
ctctgctaggcctcaatcagcttcatgtactggtatcagcagaagccggcaaagcacctaagctgctgatctac
gacacaagcaacctggcctccgggtgccatctcggtctggcagtggcaggaactgagttaccctgacaa
ttagctccctggaggctgaagatgccgtacctactattgccagcagtggcagctatcctctgacccctggaca
ggggactaaactggaaatcaagggtggaggatccggccggaggcggagggtcagctggtagtctggggaggc
ttggtccagcctggagggtccctgagacttcctgtgcagcctctggattcacccatcagcacatacgctatgaatt
gggtccggccaggctccaggaaagggtggtagtgggttggaaaggatcaggccaagtacaacaattatgcaaccta
ctatgccactctgtgaaggatagattcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaatac
agcctgaaaaccgaggacacggccgttattactgtgtgagacacggttaactcggcaatttacgtgtcttgg
ttgcttattggggacaggggacactggtagctgtgtcttccggaggatgtggcggtggagaagtggccgcactgga
gaaagaggttgccttgagaaggagggtcgactgtgaaagggtcgccgcggcggaggatcaggccaacttacgtgt
gacaaaactcacatggccaccgtgcccagcacctgaagccggggggaccgtcagtcttccctttccccca
aacccaaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtagtggacgtgagccacgaagaccc
tgaggtcaagttcaactggtagtggacggcgtggtaggtgcataatgccaagacaaggccggggaggagcagtc
aacagcacgtaccgtgtggtagcgtccctcaccgtcgtcaccaggactggctgaatggcaaggagttacaagtgc
aggctccaacaaaggccctcccgccatcgagaaaaccatctccaaaggccaaaggcagcccgagaaccaca
ggtgtacaccctgccccatccggaggagatgaccaagaaccagggtcagccgtggtagtggccctggtaaaggctt
tatcccgacatggccgtggtagtggtaggtgcataatggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccg
tggactccggacggcttcttcttacagcaagctaccgtggacaagaggcaggtggcagcagggaaacgtt
ctcatgtccgtgatgcattggtaggtgcacaaccactacacgcagaagaggcctccctgtctccggtaaa

[0216] 这样的DART-2w/Fc形式1的第二多肽链具有氨基酸序列(SEQ ID NO:44):

[0217] QAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCRSSTGAUTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLL
GGKAALTITGAQAEDAYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKSCKASGYT

FTGSWMNWVRQAPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNGKFKDRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNVY
FDVGQGTTVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKE

[0218] 如将认识到的,SEQ ID NO:44的残基1-110是结合CD3的抗体的VL结构域(VL_{CD3})(SEQ ID NO:5);SEQ ID NO:44的残基111-118是第一间插间隔肽(接头1)(SEQ ID NO:1);SEQ ID NO:44的残基119-237是结合gpA33的抗体的VH结构域(VH_{gpA33})(SEQ ID NO:27),SEQ ID NO:44的残基238-243是含半胱氨酸的间隔肽(接头2)(SEQ ID NO:2)和SEQ ID NO:44的残基244-271是促进异源二聚物的“K-螺旋”结构域(SEQ ID NO:4)。

[0219] 编码DART-2w/Fc形式1的第二多肽链的优选的多核苷酸具有序列(SEQ ID NO:45):

[0220] caggctgtggtgactcaggagcttactgaccgtgtccccaggcgaaactgtgaccctgacatgcag
atccagcacaggcgcatgtgaccacatctaactacgccaattgggtgcagcagaagccaggacaggcaccaagggc
ctgatcggggtacaaaacaaaaggctccctggaccctgcacggtttcttggaaagtctgctggcgaaaggccg
ctctgactattaccggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtgg
gttcggggtggcacaaaactgactgtgtggaggggtggatccggcgagggtggacaggccagctggccag
agcggggccgaagtcaaaaaaccggagcaagcgtgaaggctcctgcaaagcatcaggctatacattacaggca
gctggatgaactgggtgaggcaggctccaggacaggactggagttggatccggcgcatctaccctggagacggcga
aactaactataatggaaagttcaaaagaccgaggtaactgaccatcacagccgataagtctacttagtaccgc
ctgagctccctgcggctgaagataccgcgtctactattgcgctagaattacggaaacaatgtctatttgac
tgtggggcagggacaactgtgactgtctccctccggaggatgtggcggtggaaaagtggccgactgaaggagaa
agtgtctgcttggaaagagaaggtcgccgacttaaggaaaaggtcgccgacttgaaagag

[0221] 这样的DART-2w/Fc形式1的第三多肽链具有氨基酸序列(SEQ ID NO:46):DKTHTC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAQGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFPYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK

[0222] 如将认识到的,SEQ ID NO:46的残基1-10是肽1(SEQ ID NO:39)和残基11-227是抗体Fc结构域的CH2和CH3结构域(SEQ ID NO:41)。

[0223] 编码DART-2w/Fc形式1的第三多肽链的优选的多核苷酸具有序列(SEQ ID NO:47):

[0224] gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccacactgaagccgcgggggaccgtcagtcttcctctt
ccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggatcacatgcgtgggtggacgtgagccac
gaagaccctgaggtcaagttcaactggtaactggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcggagg
agcagtacaacacgcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctaatggcaaggagta
caagtgcaggtctccaacaaaggccctcccgccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccagccccga
gaaccacaggtgtacaccctgccccatccggaggagatgaccaagaaccaggcgtcagcctgagttgcgcagtca
aaggcttctatecccgacatgcgcgtggagttggagagcaatggcagccggagaacaactacaagaccacg
tcccgctggactccgacggctccttcttcgtcagcaagctcaccgtggacaagagcaggcgtggcagcagg
aacgtttctcatgctccgtatgcatgaggctctgcacaaccgtacacgcagaagagcctctccctgtctccgg
gtaaa

[0225] 2.DART-2w/Fc形式2

[0226] 在本文中命名为“DART-2w/Fc形式2”的、第二优选gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一、第二和第三多肽链包括具有下述序列的多肽结构域。除了其他不同之外，DART-2w/Fc形式1与DART-2w/Fc形式22的差异在于第一多肽链的CH2和CH3序列的布置；这些序列被布置在DART-2w/Fc形式1的VL和VH序列的C-末端，然而它们被布置在DART-2w/Fc形式2的VL和VH序列的N-末端。

[0227] 这样的DART-2w/Fc形式2的第一多肽链具有氨基酸序列 (SEQ ID NO:48) :

[0228] DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLW
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKAPSSSPMEDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCSARSSISFMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLASGVPSRFGSG
SGTEFTLTISSEADAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIKGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
FSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFG
NSYVSWFAYWGQGTLTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

[0229] 如将认识到的，SEQ ID NO:48的残基1-10是肽1 (SEQ ID NO:39) ; SEQ ID NO:48的残基11-227是抗体Fc结构域的CH2和CH3结构域的序列 (SEQ ID NO:40) ; SEQ ID NO:48的残基228-235是间插间隔肽(接头4) (SEQ ID NO:38) ; SEQ ID NO:48的残基236-341是结合gpA33的抗体的VL结构域 (VL_{gpA33}) (SEQ ID NO:26) ; SEQ ID NO:48的残基342-349是第一间插间隔肽(接头1) (SEQ ID NO:1) ; SEQ ID NO:48的残基350-474是结合CD3的抗体的VH结构域 (VH_{CD3}) (SEQ ID NO:25) ; SEQ ID NO:48的残基475-480是含半胱氨酸的间隔肽(接头2) (SEQ ID NO:2) ; 和SEQ ID NO:48的残基481-508是促进异源二聚物的“K-螺旋”结构域 (SEQ ID NO:4) 。

[0230] 这样的DART-2w/Fc形式2的第二多肽链具有DART-2的第一多肽链的氨基酸序列 (即，SEQ ID NO:28) (上述)。

[0231] 这样的DART-2w/Fc形式2的第三多肽链具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列 (上述)。

[0232] 药学组合物

[0233] 本发明的组合物包括可用于制造药物组合物(例如不纯的或非无菌的组合物)和药物组合物(即适合施用于受试者或患者的组合物)的散装(bulk)药物组合物，其可用来制备单位剂型。这样的组合物包括本文公开的预防或治疗有效量的gpA33x CD3双特异性单价双抗体或gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体和另外的治疗剂)和药学上可接受的载体。优选地，本发明的组合物包括本发明预防或治疗有效量的一种或多种分子和药学上可接受的载体。

[0234] 本发明也包括药学组合物，其包括这样的gpA33x CD3双特异性单价双抗体或gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体和对癌症相关的具体抗原特异的第二治疗性抗体(例如，癌症-抗原特异性单克隆抗体)，和药学上可接受的载体。

[0235] 在具体实施方式中，术语“药学上可接受的”表示获得联邦政府或州政府管理结构的许可或列于美国药典(U.S. Pharmacopeia)或其他通常获得认可的药典中，供用于动物，特别是用于人类。术语“载体”指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全)、赋形剂或媒介。这类药用载体可以是无菌液体，如水和油，包括石油、动物油、植物油或合成来源的油，如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时，水

是优选的载体。盐水溶液和含水右旋糖以及甘油溶液可以用作液体载体,特别是对于可注射溶液而言。合适的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、滑石粉(chalk)、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉(dried skim milk)、甘油、丙烯、1,2-乙二醇、水、乙醇等。若需要,组合物也可以含有小量湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可以采用溶液、悬浮剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释制剂等形式。

[0236] 通常,本发明组合物的成分被单独提供或以单位剂量的形式混合在一起,例如作为标明活性剂量的密封容器中的冻干粉或无水浓缩物,所述容器如安剖或袋(sachette)。当通过输注施用组合物时,其可以用含有无菌的药物级水或盐水的输注瓶分配。如果通过注射施用所述组合物,则可以提供一安剖注射用无菌水或盐水,以便可以在施用前混合所述组分。

[0237] 可以将本发明的组合物配制为中性或盐形式。药学上可接受的盐包括但不限于用阴离子形成的盐,所述阴离子例如来源于盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的阴离子,以及用阳离子形成的盐,所述阳离子例如来自氢氧化纳、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等。

[0238] 本发明也提供药物包装或试剂盒,其包括一个或多个容器,所述容器填充以这种公开的gpA33x CD3双特异性单价双抗体或gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体(单独或结合另外的治疗剂(一种或多种)和这样的药学上可接受的载体。另外,用于治疗疾病的一种或多种其他预防性或治疗性剂也可以包括于所述药物包装或试剂盒中。本发明还提供了药物包装或试剂盒,其包含一个或多个容器,所述容器填充以本发明药物组合物的一种或多种成分。任选地与这类容器关联的可以是采用管理药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形的布告(notice),所述布告反映了管理机构许可制造、使用或销售,供施用于人类。

[0239] 本发明提供可用于上述方法的试剂盒。在一种实施方式中,试剂盒包括本发明的一种或多种分子。在另一实施方式中,试剂盒在一个或多个容器中进一步包括用于治疗癌症的一种或多种其他预防剂或治疗剂。在另一实施方式中,试剂盒进一步包括结合与癌症相关的一种或多种抗原的一种或多种抗体。在某些实施方式中,其他预防剂或治疗剂是化疗剂。在其他实施方式中,预防剂或治疗剂是生物或激素治疗剂。

[0240] 本发明组合物的用途

[0241] 本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体或gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体具有治疗与gpA33的表达相关或特征在于gpA33的表达的任何疾病或病况的能力。因此,不受限制地,包括这样的分子的药学组合物可用于诊断或治疗结肠癌、结直肠癌和胰腺癌。

[0242] 施用方法

[0243] 通过向受试者施用有效量的本发明的药物组合物,可以提供所述本发明的组合物用来治疗、预防和改善与疾病、病症或感染相关的一种或多种症状。在优选的方面,这类组合物基本上是纯的(即基本上不含限制其效果或产生不期望的副作用的物质)。在具体实施方式中,受试者是动物,优选哺乳动物,如非灵长类(例如牛、马、猫科动物、犬科动物、啮齿动物等)或灵长类(例如,猴子,如食蟹猴、人等)。在优选的实施方式中,受试者是人。

[0244] 各种送递系统是已知的,并且可以用于施用本发明的组合物,例如封装于脂质体中、微粒、微胶囊、能表达抗体或融合蛋白的重组细胞、受体介导的内吞作用(见,例如,Wu等

(1987)“通过可溶性DNA载体系统的受体介导的体外基因转化(Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System)”J.Biol.Chem.262:4429-4432),构建核酸作为逆转录病毒或其他载体的一部分等。

[0245]施用本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体或gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体的方法包括、但不限于肠胃外施用(例如真皮内、肌肉内、腹腔内、静脉内以及皮下)、硬膜外以及粘膜(例如鼻内和口腔途径)。在具体实施方式中,肌肉内、静脉内或皮下施用本发明的分子。组合物可以通过任何方便途径施用,例如通过输注或大丸剂注射、通过上皮膜或粘膜与皮肤膜(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可以与其他生物活性剂一起施用。给药可以是全身的或局部的。另外,也可以应用肺给药,例如通过使用吸入器或喷雾器,并且与烟雾化剂一起配制。见,例如,美国专利号6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540和4,880,078;和PCT公开号WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346和WO 99/66903,其每一篇通过参考以其整体并入本文。

[0246]本发明也使得本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体或gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体被包装在密封容器中,比如指示这种分子的量的安瓿或袋中。在一种实施方式中,本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体或gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体作为冻干无菌粉或无水浓缩物提供于密封容器中,并且可以用例如水或盐水重构至施用于受试者的适当浓度。优选地,本发明的gpA33x CD3双抗体或gpA33x CD3Fc双抗体作为冻干无菌粉提供于密封容器中,其单位剂量为至少5 μ g、更优选地至少10 μ g、至少15 μ g、至少25 μ g、至少50 μ g、至少100 μ g、或至少200 μ g。

[0247]本发明冻干的gpA33x CD3双特异性单价双抗体或gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体应在它们的来源容器中储存在2和8°C之间,并且分子应在重构之后的12小时,优选地6小时,5小时,3小时,或1小时内施用。在可选的实施方式中,本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体或gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体以液体形式提供在指示分子、融合蛋白或缀合分子的数量和浓度的密封容器中。优选地,这样的液体形式的双特异性单价双抗体或双特异性单价Fc双抗体提供在密封容器中,其中分子存在的浓度为至少1 μ g/ml,更优选地至少2.5 μ g/ml,至少5 μ g/ml,至少10 μ g/ml,至少50 μ g/ml,或至少100 μ g/ml。

[0248]可通过标准临床技术测定本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体或gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体有效治疗、预防或改善与病症相关的一个或多个症状的量。剂型中采用的精确剂量也取决于施用的路径,和病况的严重性,并且应根据从业者的判断和每个患者的情况决定。有效的剂量可从源自体外或动物模型测试系统的剂量响应曲线推断。

[0249]对于本发明包括的gpA33x CD3双特异性单价双抗体或gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体,施用至患者的剂量通常至少约0.01 μ g/kg,至少约0.05 μ g/kg,至少约0.1 μ g/kg,至少约0.2 μ g/kg,至少约0.5 μ g/kg,至少约1 μ g/kg,至少约2 μ g/kg,至少约3 μ g/kg,至少约5 μ g/kg,至少约10 μ g/kg,至少约20 μ g/kg,至少约30 μ g/kg,至少约50 μ g/kg,至少约0.1mg/kg,至少约0.15mg/kg受试者的体重,或更多。

[0250]本发明双特异性单价双抗体或双特异性单价Fc双抗体的施用剂量和频率可通过修饰比如,例如脂质化而增强双特异性单价Fc双抗体的吸收和组织渗透来降低或改变。

[0251]在一种实施方式中,可计算施用至患者的本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体或gpA33x CD3Fc双特异性单价双抗体的剂量,以用作单一剂疗法。在另一实施方式中,本

发明的双特异性单价双抗体或双特异性单价Fc双抗体结合其他治疗性组合物使用，并且施用至患者的剂量小于当这种双特异性单价双抗体或双特异性单价Fc双抗体作为单个试剂疗法使用时的剂量。

[0252] 在具体的实施方式中，可期望局部施用本发明的药学组合物至需要治疗的区域；这可通过例如，但不限于下述实现局部注入、通过注射、或通过植入物，所述植入物是多孔的、非多孔的，或凝胶状材料，包括膜，比如硅橡胶膜，或纤维。优选地，当施用本发明的分子时，必须注意使用不吸收该分子的材料。

[0253] 在另一实施方式中，组合物可在泡，尤其脂质体中递送（见Langer (1990) “药物递送的新方法 (New Methods Of Drug Delivery) ,”Science 249:1527-1533) ; Treat等，在传染病和癌症疗法中的脂质体 (Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer) , Lopez-Berestein和Fidler (eds.) , Liss, New York, 353-365页 (1989) ; Lopez-Berestein, 同上, 317-327页; 通常参见同上) 。

[0254] 在仍另一实施方式中，可在控释或缓释系统中递送组合物。可以使用本领域技术人员已知的任何技术产生包括本发明的一种或多种分子的缓释制剂。见，例如，美国专利号 4,526,938、PCT公开WO 91/05548、PCT公开WO 96/20698; Ning等 (1996) “使用持续释放凝胶人结肠癌异种移植物的瘤内放射免疫疗法 (Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel)”Radiotherapy& Oncology 39:179-189, Song等 (1995) “长期循环乳液的抗体介导肺靶向 (Antibody Mediated Lung Targeting Of Long Circulating Emulsions) ,”PDA Journal of Pharmaceutical Science&Technology 50:372-397; Cleek等 (1997) “心血管应用的bFGF抗体的生物可降解的聚合载体 (Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application) ,”Pro. Int' l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854; 和Lam等 (1997) “用于局部递送的重组体人源化的单克隆抗体的微封装 (Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery) ,”Proc. Int' l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, 其每一篇通过参考以其整体并入本文。在一种实施方式中，泵可用于控释系统（见Langer, 上文; Sefton, (1987) “可植入泵 (Implantable Pumps) ,”CRC CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald等 (1980) “通过患有复发静脉血栓形成的走动患者可植入注入泵长期、连续的静脉内类肝素施用 (Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis) ,”Surgery 88:507-516; 和Saudek等 (1989) “用于胰岛素递送的可编程可植入药物系统的初步试验 (A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery) ,”N. Engl. J. Med. 321:574-579) 。在另一实施方式中，聚合材料可用于实现抗体的控释（见例如，控释的医学应用 (MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE) , Langer和Wise (eds.) , CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974) ; 受控的药物生物利用度、药物产品设计和性能 (CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE) , Smolen和Ball (eds.) , Wiley, New York (1984) ; Levy等 (1985) “通过局部控释二磷酸盐的生物人工心脏瓣膜的钙化的抑制 (Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local

Controlled-Release Diphosphonate),"Science 228:190-192;During等(1989)“来自聚合脑植入物的多巴胺的控释:体内表征(Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant:In Vivo Characterization),"Ann.Neurol.25:351-356;Howard等(1989)“具有损伤-诱导记忆缺陷的大鼠中的脑内药物递送(Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits),"J.Neurosurg.7(1):105-112;美国专利号5,679,377;美国专利号5,916,597;美国专利号5,912,015;美国专利号5,989,463;美国专利号5,128,326;PCT公开号W0 99/15154;和PCT公开号W0 99/20253)。缓释制剂所用的聚合物的实例包括但不限于聚(2-甲基丙烯酸羟乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、乙烯-乙烯基乙酸酯共聚物(poly(ethylene-co-vinyl acetate))、聚(甲基丙烯酸)、聚乙醇酸交酯(PLG)、聚酐、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚交酯(PLA)、丙交酯-乙交酯共聚物(PLGA)以及聚原酸酯(polyorthoeste)。在另一实施方式中,控释系统可接近治疗靶标(例如,肺)布置,因此仅仅需要全身剂量的一部分(见,例如,Goodson,控释的医学应用(MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE),上文,2卷,115-138页(1984))。在另一实施方式中,根据Dunn等(见U.S.5,945,155),使用可用作控释移植物的聚合物组合物。该特定方法基于聚合物系统中生物活性材料原位控释的治疗效果。移植通常发生于患者身体内需要治疗的任何地方。使用非聚合物持续递送系统,由此受试者身体内的非聚合物移植物被用作药物递送系统。一旦移植到身体中,移植物的有机溶剂会从组合物中消散、分散或渗漏到周围组织液中,并且非聚合物材料会逐渐凝结或沉淀,形成固体微孔基质(参见U.S.5,888,533)。

[0255] 控释系统在Langer(1990,“药物递送的新方法(New Methods Of Drug Delivery),"Science 249:1527-1533)的综述中有论述。可以使用本领域技术人员已知的任何技术来生产包含本发明的一种或多种治疗剂的缓释制剂。见,例如,美国专利号4,526,938;国际公开号W0 91/05548和W0 96/20698;Ning等(1996)“使用持续释放凝胶人结肠癌异种移植物的瘤内放射免疫疗法(Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel)"Radiotherapy&Oncology 39:179-189,Song等(1995)“长期循环乳液的抗体介导肺靶向(Antibody Mediated Lung Targeting Of Long Circulating Emulsions),"PDA Journal of Pharmaceutical Science&Technology 50:372-397;Cleek等(1997)“心血管应用的bFGF抗体的生物可降解的聚合载体(Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application),"Pro.Int'l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.24:853-854;和Lam等(1997)“用于局部递送的重组体人源化的单克隆抗体的微封装(Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery),"Proc.Int'l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.24:759-760,其每一篇通过参考以其整体并入本文。

[0256] 在本发明的组合物是编码本发明的双特异性单价双抗体或双特异性单价Fc双抗体的核酸的具体实施方式中,核酸可体内施用,以通过如下促进其编码的双特异性单价双抗体或双特异性单价Fc双抗体的表达:通过将其构建为适当的核酸表达载体的一部分并且施用它从而其成为细胞内的,例如,通过使用逆转录病毒载体(见美国专利号4,980,286),或通过直接注射,或通过使用微粒轰击(例如,基因枪;生物弹道技术(Biolistic),

Dupont),或用脂质或细胞-表面受体或转染试剂涂覆,或通过与已知进入核的同源框样肽一起施用(见例如,Joliot等(1991)“触角足同源框肽调节神经形态发生(Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis),”Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.) 88:1864-1868)等。可选地,可以将核酸引入细胞内并通过同源重组整合到宿主细胞DNA中,以进行表达。

[0257] 用治疗或预防有效量的本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体或gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体治疗受试者可包括单一治疗或,优选地,可包括一系列治疗。在优选的实施例中,用本发明的分子每周治疗受试者一次持续约1至10周,优选地2至8周,更优选地约3至7周,和甚至更优选地约4、5或6周。在其他实施方式中,本发明的药学组合物一天施用一次,一天两次,或一天三次。在其他实施方式中,药学组合物一周施用一次,一周两次,每两周一次,一个月一次,每六周一次,每两个月一次,一年两次或每年一次。应当认识到,用于治疗的分子的有效剂量可以随着具体治疗的过程增加或降低

[0258] 已经一般性描述了本发明,通过参考下述实施例本发明将更容易理解,通过示例的方式提供所述实施例并且不旨在限制本发明,除非另外说明。

[0259] 实施例1

[0260] 抗人gpA33单克隆抗体的特征

[0261] 使能够特异性结合人gpA33的鼠单克隆抗体嵌合和人源化。初始鼠抗体的VL和VH链分别具有SEQ ID NOs:13和17的序列。人源化抗体的VL和VH链分别具有SEQ ID NOs:26和27的序列。

[0262] VL_{gpA33}的抗原结合结构域包括CDR1,其具有序列(SEQ ID NO:14):SARSSISFMY、CDR2,其具有序列(SEQ ID NO:15):DTSNLAS和CDR3,其具有序列(SEQ ID NO:16):QQWSSYPLT。

[0263] VH_{gpA33}的抗原结合结构域包括CDR1,其具有序列(SEQ ID NO:18):GSWMN、CDR2,其具有序列(SEQ ID NO:19):RIYPGDGETNYNGKFKD和CDR3,其具有序列(SEQ ID NO:20):IYGNNVYFDV。

[0264] 表1显示这样的改变对结合动力学的影响。

表 1				
	抗体	KD	ka	kd
[0265]	鼠 mAb 1	2.3 nM	3.3 × 10 ⁵	7.5 × 10 ⁻⁴
	嵌合 mAb 1	2.4 nM	5.8 × 10 ⁵	1.4 × 10 ⁻³
	人源化 mAb 1	3.4 nM	5.6 × 10 ⁵	1.9 × 10 ⁻³

[0266] 数据指示导抗体VL和VH结构域人源化的修饰基本上不影响gpA33结合动力学。

[0267] 实施例2

[0268] gpA33x CD3双特异性单价双抗体和Fc双抗体以及对照双抗体的构建

[0269] 表2包含表达和纯化的优选的gpA33x CD3双抗体和gpA33x CD3Fc双抗体多肽链序列的列表。发现双抗体能够同时结合gpA33和CD3,如通过示例性gpA33x CD3双特异性单价双抗体、DART-1和DART-2,和通过示例性gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体(DART-2w/Fc)检测这种同时结合所判断的。另外,产生对照双特异性单价双抗体(“对照DART”),其对CD3

和FITC是双特异性单价的，并且发现能够同时结合CD3和FITC。

表 2		
	双抗体	置换多肽(在 N-末端至 C-末端 方向上)
[0270]	gpA33 x CD3 双特异性单价双抗体 (DART-1)	SEQ ID NO:21 SEQ ID NO:23
	gpA33 x CD3 双特异性单价双抗体 (DART-2)	SEQ ID NO:28 SEQ ID NO:30
	具有白蛋白结合结构域的 gpA33 x CD3 双特异性单价双抗体(DART-2 w/ABD)包 括用于延长体内半衰期的白蛋白结合结 构域(ABD)	SEQ ID NO:35 SEQ ID NO:30
[0271]	具有 IgG Fc 结构域形式 1 的 gpA33 x CD3 双特异性单价双抗体(DART-2 w/Fc 形式 1) 包括用于延长体内半衰期的 Fc 结构域	SEQ ID NO:42 SEQ ID NO:44 SEQ ID NO:46
	具有 IgG Fc 结构域形式 2 的 gpA33 x CD3 双特异性单价双抗体(DART-2 w/Fc 形式 2) 包括用于延长体内半衰期的 Fc 结构域	SEQ ID NO:48 SEQ ID NO:28 SEQ ID NO:46

[0272] gpA33x CD3双特异性单价双抗体是由两条多肽链(每条叙述的序列的一条链)组成的异源二聚物，并且gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体是由三条多肽链(每条叙述的氨基酸序列的一条链)组成的异源三聚物。形成双特异性单价双抗体的方法提供在W0 2006/113665、W0 2008/157379、W0 2010/080538、W0 2012/018687、W0 2012/162068和W0 2012/162067中。

[0273] 发现对照CD3x FITC双特异性单价双抗体能够同时结合CD3和结合FITC。发现上述gpA33x CD3双特异性单价双抗体和gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体能够同时结合gpA33和CD3。为了证明这种同时结合，在存在已经固定至固体支持物的可溶性CD3片段的情况下孵育gpA33x CD3双特异性单价双抗体DART-1。通过固定的抗体另外结合gpA33的能力分析结合的检测。结果确认上述gpA33x CD3双特异性单价双抗体和gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体介导同时结合gpA33和CD3的能力(图3)。

[0274] 实施例3

[0275] gpA33x CD3双特异性单价双抗体对癌症细胞是细胞毒性的

[0276] 通过在存在gpA33x CD3双特异性单价DART-1和人PBMC (E:T=25:1) 或活化的人T细胞 (E:T=10:1) 的情况下孵育结直肠或胰腺癌细胞，阐释本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体治疗癌症的能力。gpA33x CD3双特异性单价双抗体DART-1以亚ng/mL (sub-ng/

mL) 至约1ng/mL范围实现50%最大活性(EC50)需要的浓度显示有效的重定向杀伤能力。相反,当采用gpA33-阴性癌症细胞系(例如,HCT116)时,没有观察到细胞毒性。研究的结果显示在图4A(结直肠癌干样细胞(stem-like cell)(结肠CSCL细胞)、图4B(Colo205结直肠细胞)和图4C(ASPC-1胰腺癌细胞)中。结果总结在表3。

表 3			
[0277]	靶细胞系 gpA33 x CD3 双特 异性单价双抗体	效应器:靶(E:T)	观察到的最大% 杀伤
[0278]	结肠 CSLC	0.9015	25:1
	Colo205	0.5853	10:1
	ASPC-1	1.142	10:1

[0279] 实施例4

[0280] 在存在gpA33x CD3双特异性单价双抗体的情况下T细胞活化

[0281] 为了进一步证明本发明的双抗体治疗癌症的能力,在存在或没有癌症细胞(colo205或ASPC-1)的情况下,将静息人T细胞与gpA33x CD3双特异性单价DART-1一起孵育。为了表征gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-1)介导的重定向杀伤过程期间的T细胞活化,来自重定向杀伤试验的T细胞针对T细胞活化标记物CD25被染色,并且通过FACS被分析。CD25在CD8(图5A-5B)和CD4(图5D-5E)T细胞中以剂量依赖性方式被上调,表明重定向杀伤过程中gpA33x CD3双特异性单价双抗体诱导T细胞活化。相反地,在没有靶细胞的情况下没有CD8(图5C)或CD4(图5F)T细胞的活化,指示gp-A33x CD3双抗体在没有靶细胞的情况下不激活T细胞。同样地,当与靶细胞和对照双特异性单价双抗体(对照DART)一起孵育时,CD8或CD4T细胞不被激活(分别为图5A-5B,和图5D-5F),表明需要用gpA33x CD3双特异性单价双抗体交联T细胞和靶细胞。

[0282] 实施例5

[0283] 具有鼠抗人gpA33可变结构域序列的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-1)和具有人源化抗人gpA33可变结构域序列的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2)的等价性(equivalency)

[0284] 如上讨论, gpA33x CD3双特异性单价双抗体DART-1包含鼠单克隆抗体的VL_{gpA33}和VH_{gpA33}结构域,而gpA33x CD3双特异性单价双抗体DART-2包含相同鼠抗体的人源化VL_{gpA33}和人源化VH_{gpA33}结构域。为了证明人源化VL_{gpA33}和VH_{gpA33}结构域促进T细胞靶向表达gpA33的癌症细胞的能力,在存在静息T细胞(LDH试验;E:T=10:1)的情况下在存在DART-1、DART-1或对照双特异性单价双抗体(对照DART)的情况下孵育表达gpA33的癌症细胞。该分析的结果(图6A-6D中显示)表明DART-1和DART-2介导对SW948结直肠腺癌细胞(图6A)和colo205细胞(图6B)等同的细胞毒性。DART-1和DART-2都介导表达荧光素酶的Colo205细胞系的细胞毒性,如通过降低的发光所测量的(图6C),所述Colo205细胞系用萤火虫荧光素酶基因(luc2)稳定转染(Colo205-Luc)。DART-1或DART-2都不介导gpA33-阴性癌症细胞系、HCT116的细胞毒性(图6D)。如表4中所显示,DART-1和DART-2展示对抗多种肿瘤细胞系的类似等同

的生物活性。

表 4					
效应器/靶		LDH 试验		荧光素酶试验	
供体 T 细胞	肿瘤细胞 系	gpA33xCD 3 DART-2	gpA33xCD 3 DART 1	gpA33xCD 3 DART-2	gpA33xCD 3 DART 1
[0285]	D54677	SW948	0.79	1.34	
	D54677	Colo205	1.17	2.52	
	D51031	Colo205-L uc	2.29	3.53	2.53 4.55
	D41440	Colo205	2.29	3.37	
	D41440	Colo205-L uc	2.80	4.26	2.57 3.26

[0286] 实施例6

[0287] gpA33x CD3双特异性单价双抗体、具有白蛋白结合结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体和具有IgG Fc结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体与食蟹猴的PBMCs的交叉反应性

[0288] 如上所显示, gpA33x CD3双特异性单价双抗体DART-2的人源化VL_{gpA33}和人源化VH_{gpA33}结构域在存在人T细胞的情况下介导表达gpA33的癌症细胞的细胞毒性。出人意料地发现本发明的gpA33x CD3双特异性单价双抗体的VL_{CD3}和VH_{CD3}结构域也能够结合食蟹猴T细胞的CD3并且重定向这些细胞,以杀伤表达gpA33的细胞。

[0289] 如图7A-7D中所显示,发现gpA33x CD3双特异性单价DART-2双抗体、具有白蛋白结合结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2w/ABD) 和具有IgG Fc结构域的gpA33x CD3双特异性单价DART-2双抗体(DART-2w/Fc) 在存在人或食蟹猴PBMC的情况下能够促进癌症细胞的细胞毒性。图7A-7B显示三种双抗体介导与人PBMC一起孵育的Colo205-Luc细胞的细胞毒性的能力,如通过LDH试验(图7A) 或荧光素酶(图7B) 所测量的。图7C-7D显示三种双抗体介导与食蟹猴PBMC一起孵育的Colo205-Luc细胞的细胞毒性的相应能力,如通过LDH试验(图7A) 或荧光素酶(图7B) 所测量的。

[0290] 如表5中所显示, gpA33x CD3双特异性单价双抗体DART-2和具有白蛋白结合结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2w/ABD) 显示相当的CTL活性。双特异性单价双抗体显示与人和食蟹猴(cyno) PBMC效应细胞一致的活性。

表 5					
[0291]	DART	EC50 – CTL 活性(ng/mL) Colo205 靶细胞			
		LDH 试验		荧光素酶试验	
		人 PBMC	Cyno PBMC	人 PBMC	Cyno PBMC
	gpA33 x CD3 双特异性单价双抗体(DART-2)	4.09	3.81	2.73	1.55
	具有白蛋白结合结构域的 gpA33 x CD3 双特异性双抗体 (DART-2 w/ABD)	5.52	4.63	3.07	1.63

[0292] 实施例7

[0293] 鼠结肠肿瘤模型中 gpA33x CD3 双抗体的体内反应性

[0294] 为了表明本发明的 gpA33x CD3 双抗体提供癌症治疗的体内能力, 将 colo205 细胞与活化的 T 细胞共植入到免疫缺陷 NSG (NOD scid γ) 小鼠中 (Agliano, A. 等 (2008) “与其他 NOD/Scid 相关菌株相比, NOD/Ltsz-Scid/IL-2R γ Null 小鼠中注入的人急性白血病细胞产生更快速和更高效的疾病 (Human Acute Leukemia Cells Injected In NOD/Ltsz-Scid/IL-2Rγ Null Mice Generate A Faster And More Efficient Disease Compared To Other NOD/Scid-Related Strains)” Int.J.Cancer 123 (9):2222-2227; Sanchez, P.V. 等 (2009) “急性髓系白血病的刚健的异源移植模型 (A Robust Xenotransplantation Model For Acute Myeloid Leukemia)” Leukemia 23 (11):2109-2117; Racki, W.J. 等 (2010) “人皮肤移植和同种异体移植排斥的 NOD-Scid IL2r γ (Null) 小鼠模型 (NOD-Scid IL2rgamma (Null) Mouse Model Of Human Skin Transplantation And Allograft Rejection)” Transplantation 89 (5):527-536; Choi, B. 等 (2011) “白消安条件化的人源化 NOD/SCID/IL-2R γ (Null) (NSG) 小鼠中的人 B 细胞发育和抗体产生 (Human B Cell Development And Antibody Production In Humanized NOD/SCID/IL-2R γ (Null) (NSG) Mice Conditioned By Busulfan)” J.Clin.Immunol. 31 (2):253-264; Sartelet, H. 等 (2012) “使用 NOD/SCID/I12rg Null (NSG) 小鼠转移的成神经细胞瘤的新异种移植模型的描述 (Description Of A New Xenograft Model Of Metastatic Neuroblastoma Using NOD/SCID/I12rg Null (NSG) Mice)” In Vivo 26 (1):19-29; Spranger, S. 等 (2012) “NOD/scid IL-2Rg (null) 小鼠: 评估基于人树突细胞疫苗体内策略的临床前模型系统 (NOD/scid IL-2Rg (null) Mice: A Preclinical Model System To Evaluate Human Dendritic Cell-Based Vaccine Strategies in vivo)” J.Transl.Med. 10:30; von Bonin, M. 等 (2013) “共移植的 T 细胞的体内扩展对肿瘤再启动 NSG 小鼠中人急性髓系白血病活性的影响 (in vivo Expansion Of Co-Transplanted T Cells Impacts On Tumor Re-Initiating Activity Of Human Acute

Myeloid Leukemia In NSG Mice)" PLoS One.8 (4) :e60680)。

[0295] 在植入开始时,每天一次将gpA33x CD3双特异性单价双抗体DART-1IV施用至小鼠,共4天(QDx4)。发现在接收媒介对照的小鼠中Colo205肿瘤体积增加(图8)。但是,发现接收DART-1的动物表现较低或没有Colo205肿瘤体积(图8)。

[0296] 植入Colo205细胞的NSG小鼠的成像显示接收媒介(图9A)或gpA33x CD3双特异性单价双抗体DART-1(图9B)的小鼠在处理第2天具有明显的肿瘤。但是,接收gpA33x CD3双特异性单价双抗体DART-1的小鼠在处理第12天具有显著降低的肿瘤体积(图9D)。在处理的第12天,接收媒介的小鼠显示增加的肿瘤体积(图9C)。

[0297] 作为本发明gpA33x CD3双抗体提供癌症治疗的体内能力的进一步证据,使用ASPC-1胰腺肿瘤细胞和活化的人T细胞(E:T=1:1)进行上述肿瘤模型。植入开始时每天一次IV施用gpA33x CD3双特异性单价双抗体DART-1、对照双特异性单价双抗体(对照DART)、或媒介,共9天(QDx9)。发现接收媒介对照的小鼠中ASPC-1肿瘤体积增加(图10)。但是,发现接收DART-1的动物以剂量依赖性方式展示更低的肿瘤体积(图10)。

[0298] 实施例8

[0299] 具有IgG Fc结构域形式1的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2w/Fc形式1)的效力测定

[0300] 为了测定具有IgG Fc结构域形式1的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2w/Fc形式1)的效力,用各种剂量水平的上述DART-2w/Fc形式1输注(使用渗透泵)小鼠共7天。泵植入后48h(即,在存在稳态循环水平的DART-2w/Fc形式1的情况下),将Colo205肿瘤细胞和T细胞的混合物皮下植入至小鼠中,并且监测肿瘤生长的程度。表6总结了研究的设计方案;每个组包含8只雌性小鼠。

[0301]

表 6				
组	处理	剂量 (mg/kg)	途径/计划	细胞植入
1	媒介	0	IV/QDx5	COLO205 (5E6)

表 6				
组	处理	剂量 (mg/kg)	途径/计划	细胞植入
[0302]	2 gpA33xCD3 双特异性单价双抗体, 其具有 IgG Fc 结构域 (DART-2 w/Fc 形式 1)	3.1	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-细胞(5E6)
	3 DART-2 w/Fc 形式 1	1.5	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-细胞(5E6)
	4 DART-2 w/Fc 形式 1	0.75	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-细胞(5E6)
	5 DART-2 w/Fc 形式 1	0.375	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-细胞(5E6)
	6 DART-2 w/Fc 形式 1	0.5	IV/QDx5	COLO205 (5E6) hT-细胞(5E6)

[0303] 该研究的结果显示在图11中,并且指示以所有测试的剂量施用上述具有IgG Fc结构域的gpA33xCD3双特异性单价双抗体(DART-2w/Fc形式1)介导肿瘤体积急剧下降。

[0304] 鉴于上面研究中获得的肿瘤体积的急剧下降,进行进一步的研究,以评估在更低剂量下的效力。表7总结了该进一步研究的设计方案;每组包含8只雌性小鼠。

表 7				
组	处理	剂量 (mg/kg)	途径/计划	细胞植入
[0305]	1 媒介	0	IV/QDx5	COLO205 (5E6)
	2 gpA33xCD3 双特异性单价双抗体具有 IgG Fc 结构域	0.2	IP/CIF	COLO205 (5E6)

表 7				
组	处理	剂量 (mg/kg)	途径/计划	细胞植入
[0306]	(DART-2 w/Fc 形式 1)			hT-细胞(5E6)
	3 DART-2 w/Fc 形式 1	0.04	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-细胞(5E6)
	4 DART-2 w/Fc 形式 1	0.008	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-细胞(5E6)
	5 DART-2 w/Fc 形式 1	0.0016	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-细胞(5E6)
6	DART-2 w/Fc 形式 1	0.5	IV/QDx5	COLO205 (5E6) hT-细胞(5E6)

[0307] 该进一步研究的结果显示在图12中。在图12中,每个符号表示接收指示剂量的上述具有IgG Fc结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2w/Fc形式1)或媒介的动物。数据显示在所有测试剂量下的效力。

[0308] 实施例9

[0309] gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2)和具有IgG Fc结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2w/Fc)在食蟹猴中的药物代谢动力学曲线

[0310] 本发明的双抗体的VL_{CD3}和VH_{CD3}结构域结合食蟹猴CD3的能力允许使用这种动物测量本发明的双抗体的体内药物动力学。

[0311] 为了测量这种药物动力学,将上述gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2)或具有IgG Fc结构域的gpA33x CD3双特异性单价双抗体(DART-2w/Fc形式1)注入食蟹猴(10μg/kg/天)并且监测在循环中保留的这样的分子的浓度。图13显示该研究的结果,并且指示DART-2和DART-2w/Fc形式1展示第一级(first-order)消除动力学。

[0312] 实施例10

[0313] gpA33x CD3双特异性单价Fc双抗体(DART-1w/Fc形式1)结合人和食蟹猴CD3和gpA33的SPR分析

[0314] 通过SPR在BIAcore 3000生物传感器(GE,Healthcare)上分析结合可溶性形式人和食蟹猴CD3受体的gpA33x CD3双特异性Fc双抗体(DART-2w/Fc形式1)。根据制造商推荐的程序,将受体固定在CM5传感器芯片上。简言之,通过注射包含0.2M N-乙基-N-(3二乙氨基-

丙基) 碳二亚胺和0.05M N-羟基-琥珀酰亚胺的溶液活化传感器芯片表面上的羧基基团。然后将可溶性CD3受体(1 μ g/ml)注射到在10mM钠-乙酸酯,pH 5.0中的活化的CM5表面上,流速为5 μ L/min,随后注射1M乙醇胺用于钝化。

[0315] 该分析中采用的可溶性形式的食蟹猴和人CD3在哺乳动物的细胞中表达为CD3 ϵ /CD3 δ 异源二聚物,通过它们的C-末端带相反电荷的促进异源二聚物的E-螺旋和K-螺旋序列而得到稳定。可溶性食蟹猴CD3 ϵ 包含食蟹猴CD3 ϵ 的前118个氨基酸残基,在羧基末端是V35等位基因(FN18+),然后是上述E-螺旋结构域(SEQ ID NO:3)。食蟹猴CD3 ϵ 的V35等位基因(FN18+)的氨基酸序列是(SEQ ID NO:49):

[0316]	MQSGTRWRVL	GLCLLSIGVW	GQDGNEEMGS	ITQTPYQVSI	SGTTVILTCS
	QHLGSEAQWQ	HNGKNKEDSG	DRLFLPEFSE	MEQSGYYVCY	PRGSNPEDAS
	HHLYLKARVC	ENCMEMDVMA	VATIVIVDIC	ITLGLLLLVY	YWSKNRKAKA
	KPVTRGAGAG	GRQRGQNKER	PPPVPNPDYE	PIRGQQDLY	SGLNQRRI

[0317] 可溶性食蟹猴CD3 δ 包含食蟹猴CD3 δ 的前101个氨基酸残基,随后是在羧基末端的上述K-螺旋结构域(SEQ ID NO:4)。食蟹猴CD3 δ 的氨基酸序列是(SEQ ID NO:50):

[0318]	MEHSTFLSGL	VLATLLSQVS	PKIIPVEELE	DRVVFVKCNTS	VTWVEGTVG
	LLTNNTNTRLDL	GKRILDPRGI	YRCNGTDIYK	DKESAVQVHY	RMCQNCVELD
	PATLAGIIIVT	DVIATLLLAL	GVFCFAGHET	GRLSGAADTQ	ALLRNDQVYQ
	PLRDRDDAQY	SRLGGNWARN K			

[0319] 两个蛋白质在哺乳类的CHO-S细胞中共表达并且使用偶合至SEPHAROSE®的抗E/K-螺旋mAb纯化。

[0320] 可溶性人CD3 ϵ 包含具有C119S和C122S的人CD3 ϵ 的残基1-127,随后是在羧基末端的上述E-螺旋结构域(SEQ ID NO:3)。人CD3 ϵ 的氨基酸序列是(SEQ ID NO:51):

[0321]	MQSGTHWRVL	GLCLLSVGW	GQDGNEEMGG	ITQTPYKVSI	SGTTVILTCP
	QYPGSEILWQ	HNDKNIGGDE	DDKNIGSDED	HLSLKEFSEL	EQSGYYVCYP
	RGSKPEDANF	YLYLRARVCE	NCMEMDVMSV	ATIVIVDICI	TGGLLLLVYY
	WSKNRKAKAK	PVTRGAGAGG	RQRGQNKERP	PPVPNPDYEP	IRKGQRDLYS

[0322] GLNQRRI

[0323] 可溶性人CD3 δ 包含人CD3 δ 的残基1-101,随后是在羧基末端的上述K-螺旋结构域(SEQ ID NO:4)。两个蛋白质在哺乳动物的CHO-S细胞中共表达并且使用抗E/K-螺旋亲和柱纯化。人CD3 δ 的氨基酸序列是(SEQ ID NO:52):

[0324]	FKIPIEELE	DRVVFNCNTS	ITWVEGTVG	LLSDITRLDL	GKRILDPRGI
	YRCNGTDIYK	DKESTVQVHY	RMCQSCVELD	PATVAGIIIVT	DVIATLLLAL
	GVFCFAGHET	GRLSGAADTQ	ALLRNDQVYQ	PLRDRDDAQY	SHLGGNWARN K

[0325] 可溶性人gpA33包含在羧基末端具有(SEQ ID NO:53)HHHHHH("6His")重复序列的人gpA33的残基1-235。可溶性食蟹猴gpA33包含食蟹猴gpA33的残基1-314, Met 1至Gln 314, 其中在羧基末端具有6个His重复序列。蛋白质在哺乳动物CHO-S细胞中表达并且使用Ni SEPHAROSE®纯化。

[0326] 在包含10mM HEPES, pH 7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA和0.005% P20表面活性剂的HBS-EP缓冲液中进行结合实验。以0、6.25、12.5、25、50和100nM的浓度分析DART-2w/Fc形式

1的结合(重复一次),以30 μ L/min的流速注射120sec。

[0327] 通过脉冲注射10mM甘氨酸,pH 1.5,进行固定的受体表面的再生。通过在没有固定蛋白的处理表面上注射每种DART-2w/Fc的稀释物获得参考曲线。作为空白减去在零浓度的结合曲线。通过将结合曲线整体拟合至Langmuir 1:1结合模型测定KD值(BIA评估TM(BIAevaluationTM)软件v4.1)。

[0328] 结合人和食蟹猴CD3和gpA33的gpA33x CD3双特异性Fc双抗体(DART-2w/Fc形式1)的SPR分析表明来自两个不同物种的分子的基本上的相似性(图14A-14B;图15A-15B)。表8提供平衡解离常数(KDs),其通过将DART-2w/Fc相互作用的亲和性和动力学常数整体拟合至1:1Langmuir模型来计算。人和食蟹猴CD3的DART-2w/Fc形式1的KD值在23和26nM分别几乎一致,尽管在两个抗原之间最大结合响应方面存在一些差异。直接固定在表面上的、具有不同氨基酸序列的抗原的随机定向可导致表面上可用结合位点的不同密度。DART-2w/Fc形式1与人和猴子gpA33的相互作用的KD值分别是2.2nM和12nM(表8)。亲和性的差异是DART-2w/Fc形式1与食蟹猴gpA33相互作用的结合速率常数的相对小的下降和解离速率常数的增加的结果(表8)。数据是三个独立实验,每个实验重复一次,的平均值(SD=标准偏差;h,人;cyno,食蟹猴)。

[0329]

表 8

DART-2 W/Fc 形式 1 与来自不同物种的抗原的结合的平衡解离常数(KD)

[0330]

抗原	k _a (\pm SD) (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (\pm SD) (s ⁻¹)	K _D (\pm SD) (nM)
hCD3 ϵ/δ	1.5 (\pm 0.1) \times 10 ⁵	3.5 (\pm 0.06) \times 10 ⁻³	23 \pm 2.0
cynoCD3 ϵ/δ	1.3 (\pm 0.02) \times 10 ⁵	3.4 (\pm 0.02) \times 10 ⁻³	26 \pm 0.6
hgpA33-His	4.2 (\pm 0.3) \times 10 ⁵	9.0 (\pm 0.5) \times 10 ⁻⁴	2.2 \pm 0.2
cynogpA33-His	2.3 (\pm 0.2) \times 10 ⁵	2.8 (\pm 0.1) \times 10 ⁻³	12 \pm 1.0

[0331] 本说明书提到的所有出版物和专利通过参考并入本文,如同好像具体和单独指出每个单个出版物或专利申请通过参考以其整体并入的程度。尽管已经结合其具体实施方式描述了本发明,但是应当理解,其能够被进一步修饰并且本申请旨在覆盖根据本发明原理的本发明的任何变型、用途或改变,并且包括与本公开的偏离,只要在本发明所属领域的已知或习惯实践内并且如可应用至本文之前所阐释的本质特征。

序列表

<110> 宏观基因股份有限公司

P·A·摩尔

李志恒

陈志芬

L·S·强生

K·尚

E·波维尼

<120> 能够结合 gpA33 和 CD3 的双特异性单价双抗体及其用途

<130> 1301.0112PCT

<150> US 61/869,528

<151> 2013-08-23

<150> US 61/907,691

<151> 2013-11-22

<150> EP 13198859

<151> 2013-12-20

[0001]

<160> 57

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头 1 多肽

<400> 1

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头 2 多肽

<400> 2

Gly Gly Cys Gly Gly Gly

1 5

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> E-螺旋结构域

<400> 3

[0002]

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

20 25

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> K-螺旋结构域

<400> 4

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 5
<211> 110
<212> PRT
<213> 小白鼠 (Mus musculus)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(110)
<223> 鼠抗-CD3 抗体的轻链可变结构域

<400> 5

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

[0003] 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 Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

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

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

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> 小白鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(14)
<223> 鼠抗-CD3 抗体的轻链可变结构域的 CDR1

<400> 6

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

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 小白鼠

[0004]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> 鼠抗-CD3 抗体的轻链可变结构域的 CDR2

<400> 7

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 小白鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)

<223> 鼠抗-CD3 抗体的轻链可变结构域的 CDR3

<400> 8

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 9

<211> 125

<212> PRT

<213> 小白鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(125)

<223> 鼠抗-CD3 抗体的重链可变结构域

<400> 9

[0005] 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 Ser

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr 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 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小白鼠

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(5)
 <223> 鼠抗-CD3 抗体的重链可变结构域的 CDR1

<400> 10

[0006] Thr Tyr Ala Met Asn
 1 5

<210> 11
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 小白鼠

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(19)
 <223> 鼠抗-CD3 抗体的重链可变结构域的 CDR2

<400> 11

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

Val Lys Asp

<210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> 小白鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(14)
<223> 鼠抗-CD3 抗体的重链可变结构域的 CDR3

<400> 12

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

[0007] <210> 13
<211> 106
<212> PRT
<213> 小白鼠

<220>
<221> misc_feature
<223> 鼠抗-gpA33 抗体的轻链可变结构域

<400> 13

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小白鼠

[0008]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 <223>鼠抗-gpA33 抗体的轻链可变结构域的 CDR1

<400> 14

Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met Tyr
 1 5 10

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小白鼠

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(7)
 <223> 鼠抗-gpA33 抗体的轻链可变结构域的 CDR2

<400> 15

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 小白鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> 鼠抗-gpA33 抗体的轻链可变结构域的 CDR3

<400> 16

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr

[0009] 1 5

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> 小白鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(119)

<223> 鼠抗-gpA33 抗体的重链可变结构域

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Gly Ser

20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

[0010]

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> 小白鼠

<220>

<221> misc_feature

<223>鼠抗-gpA33 抗体的重链可变结构域的 CDR1

<400> 18

Gly Ser Trp Met Asn

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> 小白鼠

<220>

<221> misc_feature

<223> 鼠抗-gpA33 抗体的重链可变结构域的 CDR2

<400> 19

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> 小白鼠

[0011]

<220>

<221> misc_feature

<223> 鼠抗-gpA33 抗体的重链可变结构域的 CDR3

<400> 20

Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 21

<211> 271

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DART-1 的第一多肽链

<400> 21

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 Ile Thr Gly Ala		
65	70	75
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn		
85	90	95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly		
[0012] 100	105	110
Gly Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu		
115	120	125
Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly		
130	135	140
Tyr Thr Phe Ser Gly Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly		
145	150	155
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr		
165	170	175
Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys		
180	185	190

Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp
195 200 205

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe
210 215 220

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
225 230 235 240

Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
245 250 255

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
260 265 270

[0013] <210> 22
<211> 813
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 DART-1 的第一多肽链的核酸分子

<400> 22
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcgaaac tgtgaccctg 60

acatgcagat ccagcacacagg cgcaagtgacc acatctaact acgccaattt ggtgcagcag 120

aagccaggac aggcaccaag gggcctgatec ggggttacaa acaaaagggc tccttgacc 180

cctgcacgg tttctggaag tctgctggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240

caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtttc 300

gggggtggca caaaaactgac tgtgctggga ggtgggtggat ccggcgagg tggacaggtc 360

cagctgcagc agtctggacc tgagctgggt aagcctgggg cctcagtgaa gatttctgc 420

aaagcttcag gctacacatt cagtggctt tggatgaact gggtaagca gaggcctgga	480
cagggtctt ggtggattttt acggatctac cctggagatg gagaaactaa ctacaatggg	540
aagtttaagg acaaggccac actgactgca gacaaatcat ccaccacagc ctacatggag	600
ctcagcagcc tgaccttgt ggactctgcgt gtctatttct gtgcaagaat ctatggtaat	660
aacgtttact tcgatgtctg gggcgccagg accacggtaa ccgtgtttc cgaggatgt	720
ggcggtggag aagtggccgc actggagaaa gaggttgctg ctttggagaa ggaggtcgct	780
gcacttgaaa aggaggtcgc agccctggag aaa	813

<210> 23

<211> 274

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0014] <223> DART-1 的第二多肽链

<400> 23

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met		
20	25	30

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

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

[0015] Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
180 185 190

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
210 215 220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
 260 265 270

Lys Glu

<210> 24

<211> 822

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 DART-1 的第二多肽链的核酸分子

<400> 24

caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaggggtcacc 60

atgacctgca gtgccaggc aagtataagt ttcatgtact ggtaccagca gaagccagga 120

[0016] tcctccccca gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctttat tctctcacaa tcagccaat ggaggctgaa 240

gatgctgcc a cttattactg ccagcagtgg agtagttacc cactcacggtt cggttctggg 300

accaagctgg agctgaaacg gggtgagga tccggcggag gcggagaggt gcagctgg 360

gagtctgggg gaggcttgtt ccagcctgg a ggtccctga gactctcctg tgca gctct 420

ggattcacct tcaacacata cgctatgaat tgggtccgccc aggctccagg gaaggggctg 480

gagtgggttg caaggatcag gtccaaagtac aacaattatg caacctacta tgccgactct 540

gtgaaggata gattcaccat ctcaagagat gattcaaaga actcactgta tctgcaa atg 600

aacagcctga aaaccgagga cacggccgtg tattactgtg tgagacacgg taacttcggc 660

aattcttacg tgtcttggtt tgcttattgg ggacagggga cactgggtgac tgtgtcttcc 720

ggaggatgtg gcggtgaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag 780

aagggtcgccg cacttaagga aaagggtcgca gccctgaaag ag 822

<210> 25
<211> 125
<212> PRT
<213> 小白鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(125)
<223> 抗-CD3 抗体的重链可变结构域

<400> 25

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

[0017] 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

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 Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr 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 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 26
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化抗-gpA33 抗体的轻链可变结构域

<400> 26

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

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

[0018]

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

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

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu
 65 70 75 80

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

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

<210> 27

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗-gpA33 抗体的重链可变结构域

<400> 27

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

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

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

[0019] Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28

<211> 271

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DART-2 的第一多肽链

<400> 28

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

[0020]

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

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

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

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

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Gly Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

145	150	155	160
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr			
165	170	175	
Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys			
180	185	190	
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp			
195	200	205	
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe			
210	215	220	
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys			
225	230	235	240
[0021]			
Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu			
245	250	255	
Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys			
260	265	270	
<210> 29			
<211> 813			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 编码 DART-2 的第一多肽链的核酸分子			
<400> 29			
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcgaaac tgtgaccctg			60
acatgcagat ccagcacagg cgcaagtgacc acatctaact acgccaaattg ggtgcagcag			120

aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc ggggttacaa acaaaaggc tccctggacc	180
cctgcacggt tttctggaag tctgctggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca	240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgttgt atagcaatct gtgggtttc	300
gggggtggca caaaaactgac tgtgctggta ggtggtggtt ccggcggagg tggacaggc	360
cagctggtcc agagcggggc cgaagtcaaa aaacccggag caagcgtgaa ggtctcctgc	420
aaagcatcag gctatacatt tacaggcagc tggatgaact gggtgaggca ggctccagga	480
cagggactgg agtggatcg gcgcatactac cctggagacg gcgaaactaa ctataatgg	540
aagttcaaag accgagtgac catcacagcc gataagtcta ctagtaccgc ctacatggag	600
ctgagctccc tgcggtctga agataccgcc gtctactatt gcgctagaat ttacggaaac	660
aatgtctatt ttgacgtgtg gggcaggga acaactgtga ctgtctcc tcggaggatgt	720
ggcggtggag aagtggccgc actggagaaa gaggttgctg ctttggagaa ggaggtcgct	780
[0022] gcacttgaaa aggaggtcgc agccctggag aaa	813

<210> 30

<211> 273

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DART-2 的第二多肽链

<400> 30

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1															

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Arg	Ser	Ser	Ile	Ser	Phe	Met
20															

Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

35	40	45
----	----	----

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

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu	65	70	75	80
---	----	----	----	----

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

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

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

[0023]

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser	130	135	140
---	-----	-----	-----

Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu	145	150	155	160
---	-----	-----	-----	-----

Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr	165	170	175
---	-----	-----	-----

Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys	180	185	190
---	-----	-----	-----

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

Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser		
---	--	--

210

215

220

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala
 245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
 260 265 270

Glu

<210> 31

<211> 819

[0024] <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 DART-2 的第二多肽链的核酸分子

<400> 31

gacattcagc tgactcagtc cccctcttt ctgtccgcat ccgtcgaggata tcgagtgcact 60

attacttgct ctgcttaggtc ctcaatcagc ttcatgtact ggtatcagca gaagccggc 120

aaagcaccta agctgctgat ctacgacaca agcaacctgg cctccgggtt gccatctcg 180

ttctctggca gtgggtcagg aactgagttt accctgacaa ttagctccct ggaggctgaa 240

gatgccgcta cctactattt ccagcagttgg agcagctatc ctctgaccctt cggacagg 300

actaaactgg aaatcaaggg tggaggatcc ggcggcggag gcgaggtgca gctgggtggag 360

tctggggag gcttggtcca gcctggaggg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgg 420

ttcaccttca gcacatacgc tatgaattgg gtccggccagg ctccaggaa ggggctggag 480

tgggttggaa ggatcaggc caagtacaac aattatcaa cctactatgc cgactctgtg	540
aaggatagat tcaccatctc aagagatgat tcaaagaact cactgttatct gcaaatgaac	600
agcctgaaaa ccgaggacac ggccgtgtat tactgtgtga gacacggtaa cttcgcaat	660
tcttacgtgt ctgggttgc ttattggga caggggacac tggtgactgt gtcttccgga	720
ggatgtggcg gtggaaaagt gccgcactg aaggagaaag ttgctgctt gaaagagaag	780
gtcgccgcac ttaaggaaaa ggtcgcagcc ctgaaagag	819

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头 3 多肽

[0025] <400> 32

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头 3 多肽

<400> 33

Gly Gly Gly Asn Ser
1 5

<210> 34

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 白蛋白结合结构域

<400> 34

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Ile Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
 20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

<210> 35

[0026] <211> 321

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DART-2 w/ABD 的第一多肽链

<400> 35

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 Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

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

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

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

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 130 135 140

[0027] Tyr Thr Phe Thr Gly Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr
 165 170 175

Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys
 180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe
 210 215 220

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

Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
 245 250 255

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly
 260 265 270

Gly Gly Ser Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Ile Arg Glu Leu Asp
 275 280 285

Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys
 290 295 300

Ser Ala Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu
 305 310 315 320

Pro

[0028]

<210> 36

<211> 963

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 DART-2 w/ABD 的第一多肽链的核酸分子

<400> 36

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcgaaac tgtgaccctg 60

acatgcagat ccagcacagg cgcaatgtacc acatctaact acgccaattt ggtgcacgac 120

aagccaggac aggccaccaag gggcctgatc ggggttacaa acaaaaaggc tccctggacc 180

cctgcacgggt tttctggaaag tctgctggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240

caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggat atagcaatct gtgggtgttc 300

gggggtggca caaaaactgac tgtgctggaa ggggttgat ccggcgagg tggacaggc 360

cagctggtcc agagcggggc cgaagtcaaa aaacccggag caagcgtgaa ggtctcctgc	420
aaagcatcag gctatacatt tacaggcagc tggatgaact gggtgaggca ggctccagga	480
cagggactgg agtggatcgg gcgcatactac cctggagacg gcgaaactaa ctataatgga	540
aagttcaaag accgagtgac catcacagcc gataagtcta ctgtaccgc ctacatggag	600
ctgagctccc tgccgtctga agataccgcc gtctactatt gcgctagaat ttacggaaac	660
aatgtctatt ttgacgtgtg gggcaggaa acaactgtga ctgtctcctc cgaggatgt	720
ggcggtggag aagtggccgc actggagaaa gaggttgctg ctttggagaa ggaggtcgct	780
gcacttgaaa aggaggtcgc agccctggag aaaggcggcg ggtctctggc ccaggcaaaa	840
gaggcagcca tccgcgaact ggataaatat ggcgtgagcg attattataa gaacctgatt	900
gacaacgcaa aatccgcgga aggctgaaa gcactgattt atgaaattct ggcccccctg	960
cct	963

[0029]

<210> 37
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 接头 4 多肽

<400> 37

Ala Pro Ser Ser Ser
 1 5

<210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 接头 4 多肽

<400> 38

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu

1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽 1

<400> 39

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

[0030]

<210> 40

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 第一 DART 多肽链的修饰的 Fc 结构域的 CH2 和 CH3 结构域

<400> 40

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
50	55	60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
65	70	75
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
85	90	95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
100	105	110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		
115	120	125
[0031] Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
130	135	140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
145	150	155
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
165	170	175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val		
180	185	190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
195	200	205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
210	215	

<210> 41
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 第三 DART 多肽链的修饰的 Fc 结构域的 CH2 和 CH3 结构域

<400> 41

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

[0032]

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

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

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

[0033]

<210> 42

<211> 503

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DART-2 w/Fc 形式 1 构建体的第一多肽链

<400> 42

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

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

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

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu		
65	70	75
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr		
85	90	95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Gly		
100	105	110
Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro		
115	120	125
[0034] Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser		
130	135	140
Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
145	150	155
Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr		
165	170	175
Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys		
180	185	190
Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala		
195	200	205
Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser		
210	215	220

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala
245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
260 265 270

Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
275 280 285

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
290 295 300

[0035] Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
340 345 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 435 440 445

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 485 490 495

[0036]

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 43

<211> 1509

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 DART-2 w/Fc 形式 1 构建体的第一多肽链的核酸分子

<400> 43

gacattcagc tgactcagtc cccctttt ctgtccgcat ccgtcgaga tcgagtgact 60

attacttgct ctgcttaggtc ctcaatcagc ttcatgtact ggtatcagca gaagccggc 120

aaaggcaccta agctgctgat ctacgacaca agcaacctgg cctccgggt gccatctcg 180

ttctctggca gtgggtcagg aactgagttt accctgacaa ttagctccct ggaggctgaa 240

gatgccgcta cctactattg ccagcagtgg agcagctatc ctctgaccc ttggacagggg	300
actaaaactgg aaatcaaggg tggaggatcc ggccggcgag gcgaggtgca gctggtggag	360
tctggggag gcttggtcca gcctggaggg tccctgagac ttcctgtgc agcctctgga	420
ttcacccca gcacatacgc tatgaattgg gtccgccagg ctccaggaa gggctggag	480
tgggtggaa ggatcaggc caagtacaac aattatgcaa cctactatgc cgactctgt	540
aaggatagat tcaccatctc aagagatgtat tcaaagaact cactgtatct gcaaataaac	600
agcctgaaaa ccgaggacac ggccgtgtat tactgtgtga gacacggtaa cttcggaat	660
tcttacgtgt ctgggttgc ttattggga cagggacac tggtgactgt gtctccgga	720
ggatgtggcg gtggagaagt ggccgcactg gagaaagagg ttgctgcctt ggagaaggag	780
gtcgctgcac ttgaaaagga ggtgcagcc ctggagaaag gcggcgggaa caaaactcac	840
acatgccac cgtgccac acctgaagcc gcggggggac cgtcagtctt cctttcccc [0037]	900
ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtgggtgt	960
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggt	1020
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc	1080
gtcctcaccc tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtgc caaggtctcc	1140
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga	1200
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc	1260
ctgtggtgcc tggtaaaagg ctttatccc agcgacatcg ccgtggagtgc ggagagcaat	1320
ggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctccgtgc tggactccga cggctccttc	1380
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcagggaa cgtttctca	1440
tgctccgtga tgcataggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccgtct	1500
ccggtaaa	1509

<210> 44
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DART-2 w/Fc 形式 1 构建体的第二多肽链

<400> 44

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

[0038]

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 Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

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

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

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

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Gly Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr
 165 170 175

Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys
 180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 195 200 205

[0039] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe
 210 215 220

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

Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
 245 250 255

Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 260 265 270

<210> 45

<211> 813

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 DART-2 w/Fc 形式 1 构建体的第二多肽链的核酸分子

<400>	45														
caggctgtgg	tgactcagga	gccttcactg	accgtgtccc	caggcgaaac	tgtgaccctg	60									
acatgcagat	ccagcacagg	cgcagtgacc	acatctaact	acgccaattt	ggtgcagcag	120									
aagccaggac	aggcaccaag	gggcctgate	gggggtacaa	acaaaaggc	tccctggacc	180									
cctgcacgg	tttcttggaa	tctgctggc	ggaaaggccg	ctctgactat	taccggggca	240									
caggccgagg	acgaagccga	ttactattgt	gctctgttgt	atagcaatct	gtgggtgttc	300									
gggggtggca	caaaactgac	tgtgctggg	gggggtggat	ccggcggagg	tggacaggtc	360									
cagctggtcc	agagcggggc	cgaagtcaaa	aaacccggag	caagcgtgaa	ggtctctgc	420									
aaagcatcag	gctatacatt	tacaggcagc	tggatgaact	gggtgaggca	ggctccagga	480									
cagggactgg	agtggatcgg	gcccacatctac	cctggagacg	gcgaaactaa	ctataatgg	540									
aagttcaaag	accgagtgac	catcacagcc	gataagtcta	ctagtaccgc	ctacatggag	600									
[0040]	ctgagctccc	tgcggctctga	agataccgcc	gtctactatt	gcgctagaat	ttacggaaac	660								
aatgtctatt	ttgacgtgt	ggggcaggga	acaactgtga	ctgtctcc	cggaggatgt	720									
ggcggtgaa	aagtggccgc	actgaaggag	aaagttgt	ctttgaaaga	gaagggtcgcc	780									
gcacttaagg	aaaaggtcgc	agccctgaaa	gag			813									
<210>	46														
<211>	227														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	DART-2 w/Fc 形式 1 构建体的第三多肽链														
<400>	46														
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly
1															

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

[0041] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 47

<211> 681

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 DART-2 w/Fc 形式 1 构建体的第三多肽链的核酸分子

<400> 47

[0042]	gacaaaactc acacatgcc accgtgccc gcacctaag ccgcggggg accgtcagtc	60
	ttcctttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
	tgcgtggtag tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttaactg gtacgtggac	180
	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	240
	cgtgtggta gcgtcctcac cgccctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300
	tgcaaggctt ccaacaaagc cctccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaa	360
	ggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccggagga gatgaccaag	420
	aaccaggta gcctgagttg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480
	tggagagca atggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc	540
	gacggcttct tcttctcgat cagcaagctc accgtggaca agagcaggta gcagcagggg	600
	aacgttcttcatgctccgtatgcatgag gctctgcaca accgctacac gcagaagagc	660
	ctctccctgt ctccggtaa a	681

<210> 48
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DART-2 w/Fc 形式 2 构建体的第一多肽链

<400> 48

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 [0043] 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
130															
Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145															
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
165															
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
180															
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
195															
[0044]	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
	210														
Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Met	Glu	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr
225															
Gln	Ser	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile
245															
Thr	Cys	Ser	Ala	Arg	Ser	Ser	Ile	Ser	Phe	Met	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln
260															
Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu
275															
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu
290															
	295														

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
 305 310 315 320

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 325 330 335

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln
 340 345 350

Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 355 360 365

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn
 370 375 380

[0045] Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile
 385 390 395 400

Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 405 410 415

Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 420 425 430

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

Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp
 450 455 460

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
 465 470 475 480

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
 485 490 495

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 500 505

<210> 49
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(198)
 <223> CD3 ε 的 V35 等位基因(FN18+)

<400> 49

[0046] Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr
 20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45

Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys
 50 55 60

Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu
 65 70 75 80

Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro
 85 90 95

Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn
 100 105 110

Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp
 115 120 125

Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
 130 135 140

Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
 145 150 155 160

Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
 165 170 175

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly
 [0047] 180 185 190

Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 195

<210> 50
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(171)
 <223> CD3 δ

<400> 50

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Val Glu Glu Leu Glu Asp Arg			
20	25	30	
Val Phe Val Lys Cys Asn Thr Ser Val Thr Trp Val Glu Gly Thr Val			
35	40	45	
Gly Thr Leu Leu Thr Asn Asn Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile			
50	55	60	
Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys			
65	70	75	80
Asp Lys Glu Ser Ala Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys			
85	90	95	
Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Leu Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val			
[0048] 100	105	110	
Ile Ala Thr Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His			
115	120	125	
Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg			
130	135	140	
Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr			
145	150	155	160
Ser Arg Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys			
165	170		
<210> 51			
<211> 207			

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(207)

<223> CD3 ε

<400> 51

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

[0049]

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu

130	135	140
-----	-----	-----

Leu	Leu	Leu	Val	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Lys	Asn	Arg	Lys	Ala	Lys	Ala	Lys
145															

Pro	Val	Thr	Arg	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Arg	Gln	Arg	Gly	Gln	Asn
165														

Lys	Glu	Arg	Pro	Pro	Pro	Val	Pro	Asn	Pro	Asp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Arg
180															

Lys	Gly	Gln	Arg	Asp	Leu	Tyr	Ser	Gly	Leu	Asn	Gln	Arg	Arg	Ile
195														

[0050]
 <210> 52
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>	<221> MISC_FEATURE	<222> (1)..(150)	<223> CD3 δ
-------	--------------------	------------------	-------------

<400> 52			
----------	--	--	--

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

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

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

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 Cys Gln Ser Cys Val Glu Leu Asp Pro
 65 70 75 80

Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val Ile Ala Thr Leu Leu
 85 90 95

Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His Glu Thr Gly Arg Leu
 100 105 110

Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr
 115 120 125

Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly
 [0051] 130 135 140

Asn Trp Ala Arg Asn Lys
 145 150

<210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 6His 肽

<400> 53

His His His His His His
 1 5

<210> 54
 <211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 异源二聚化结构域

<400> 54

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 55

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 异源二聚化结构域

<400> 55

[0052]

Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 异源二聚化结构域

<400> 56

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1 5

<210> 57

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 异源二聚化结构域

[0053] <400> 57

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1 5

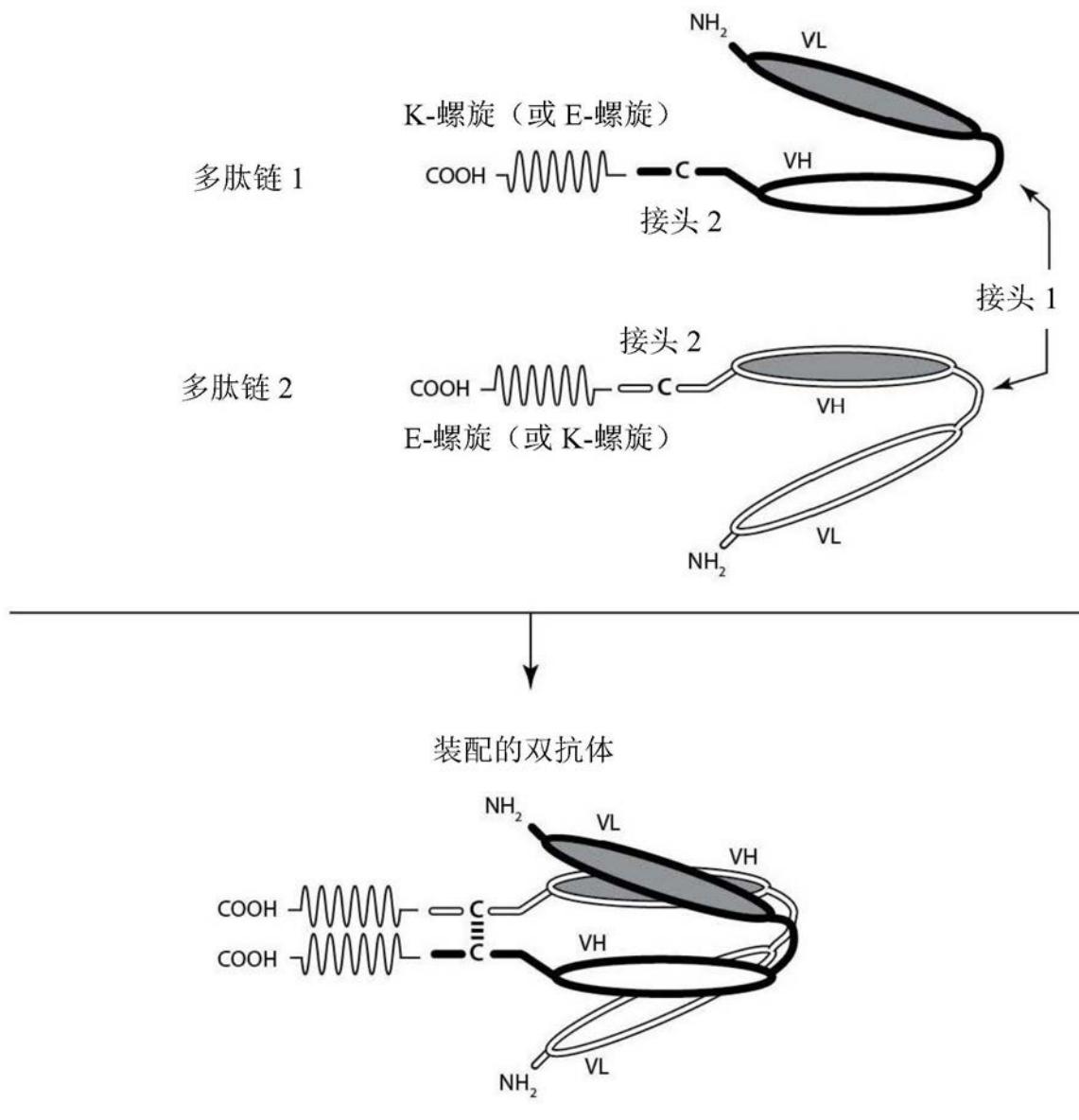


图1

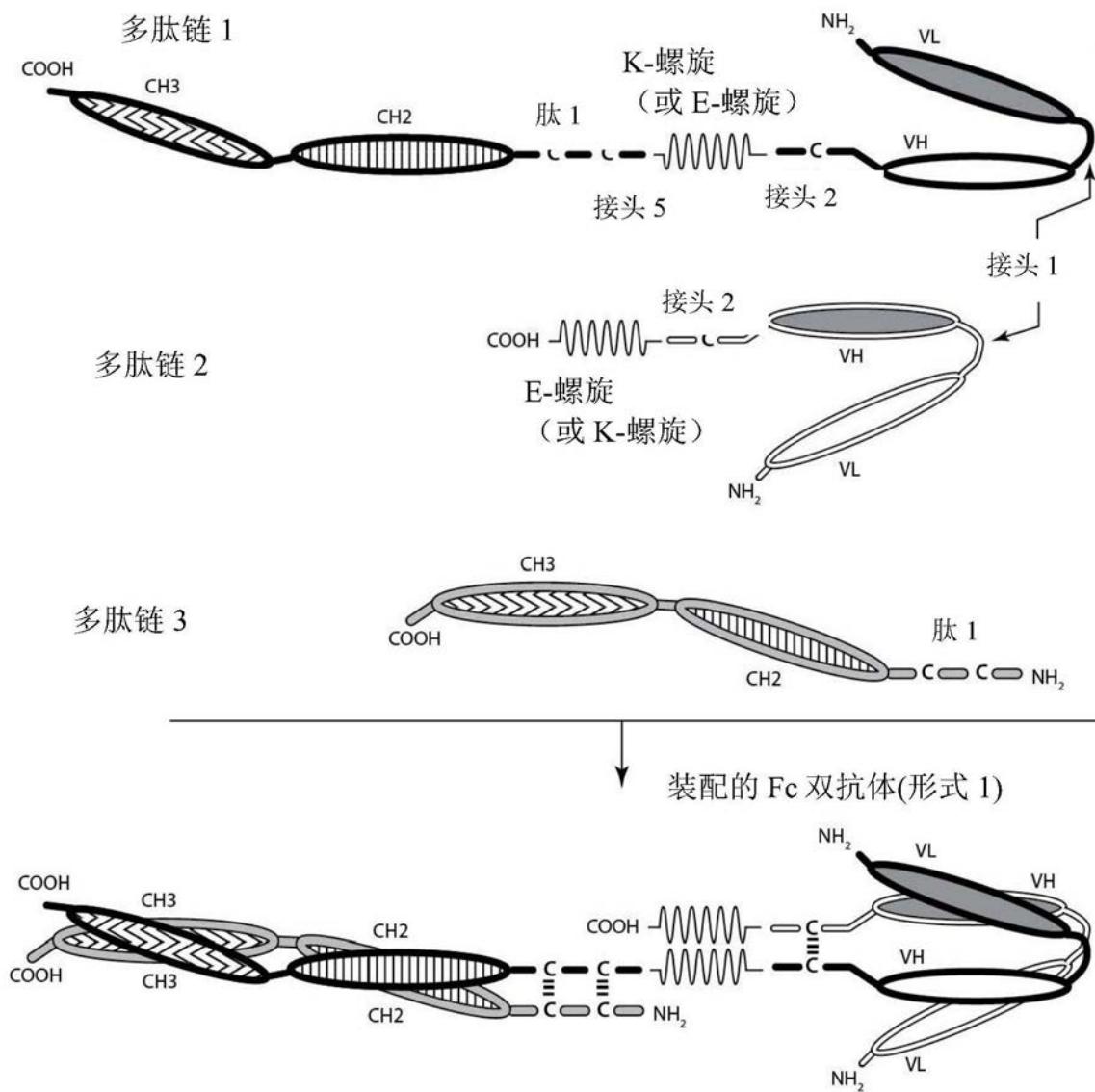


图2A

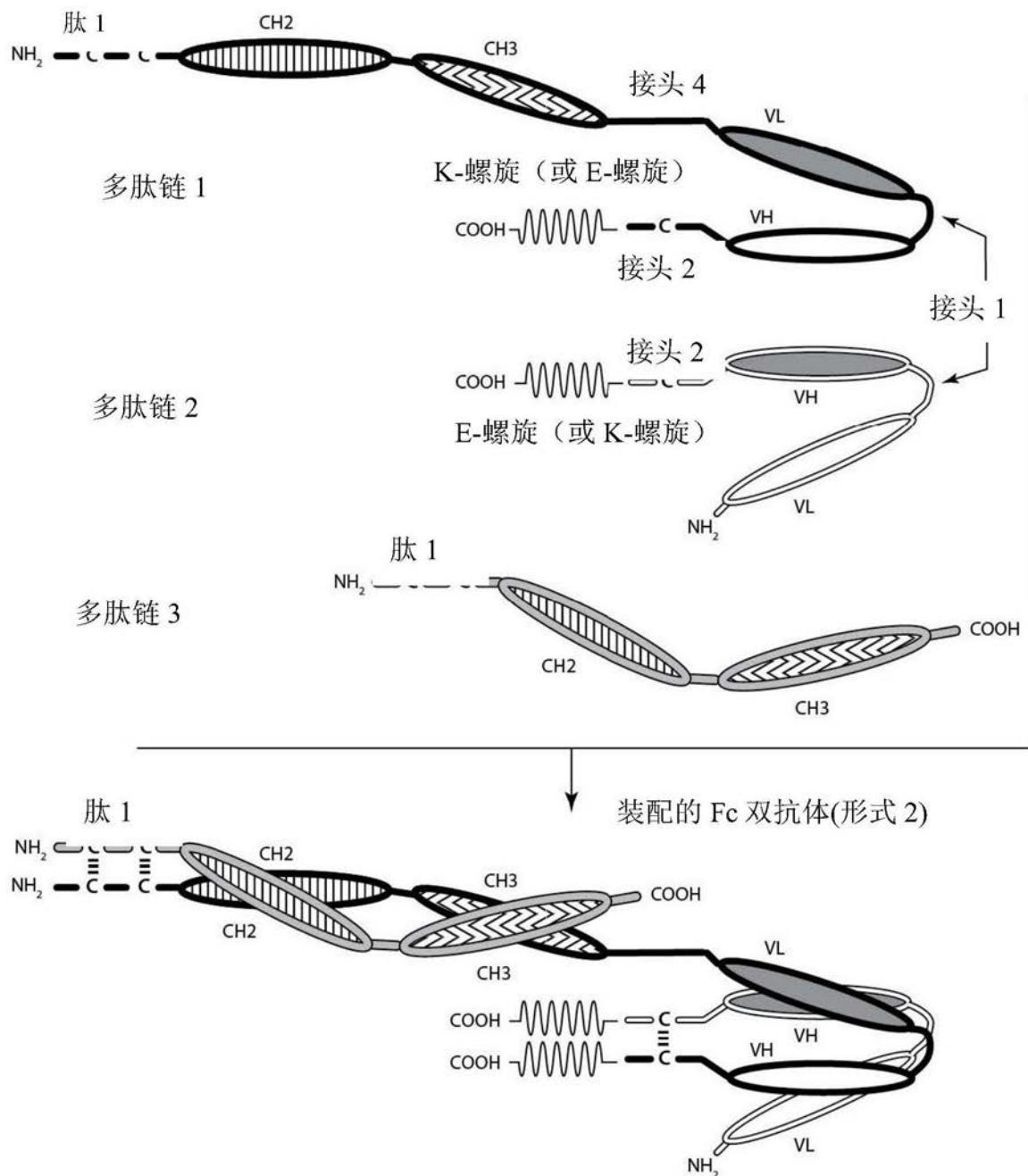


图2B

shCD3 捕获 /gpA33 检测

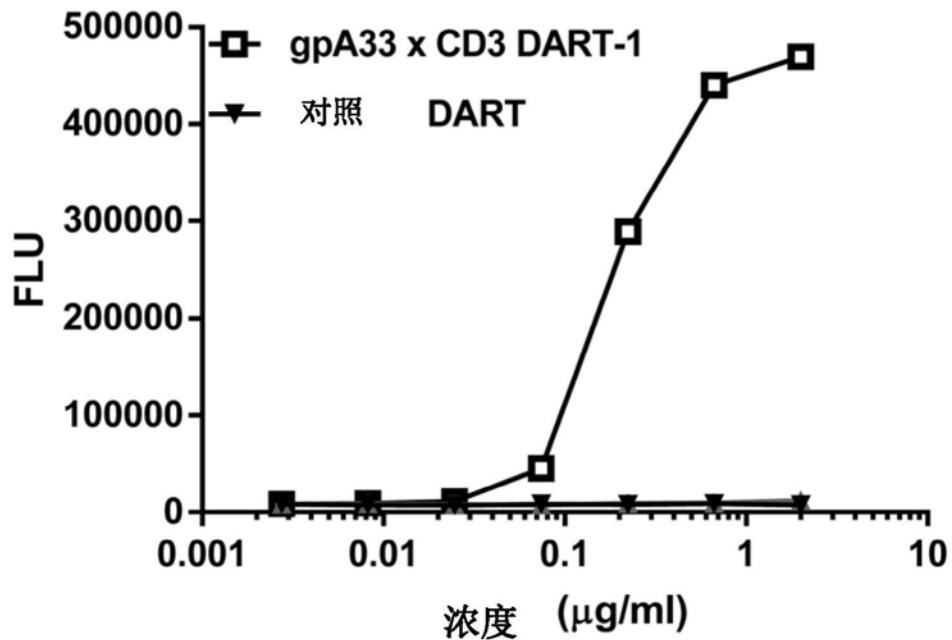


图3

结肠 CSLC 人 PBMC - E:T = 25:1

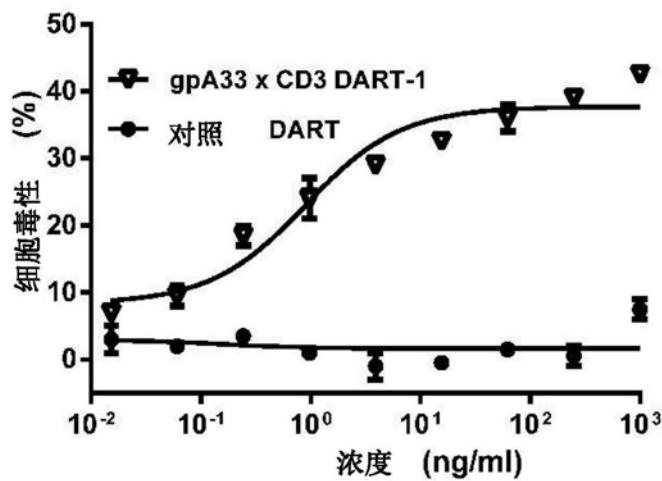
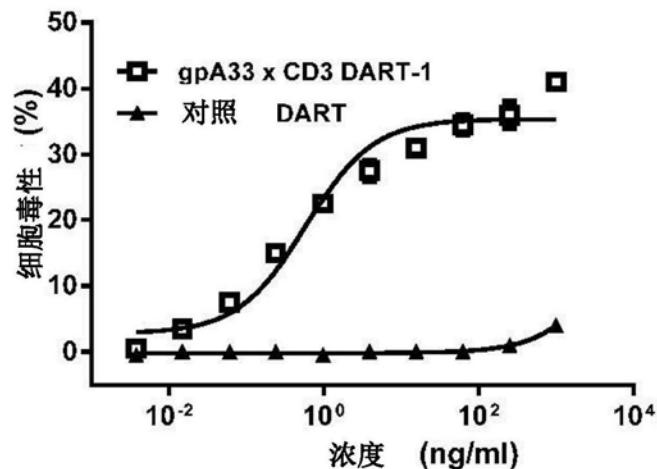
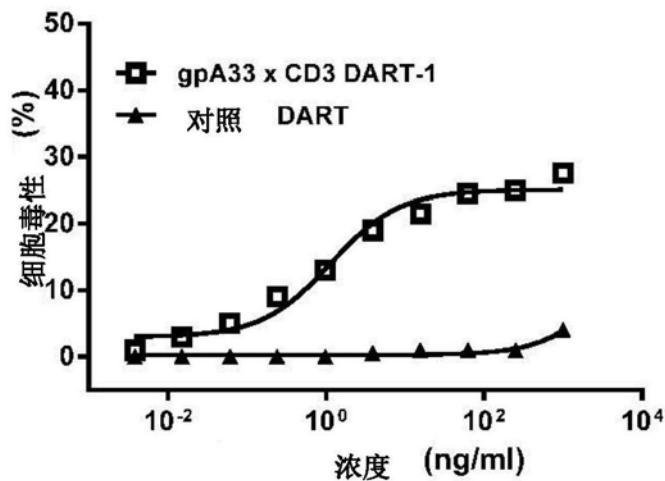


图4A

Colo205 结直肠癌
活化的 T 细胞 - E:T=10:1



ASPC-1 - 胰腺癌
活化的 T 细胞 - E:T=10:1



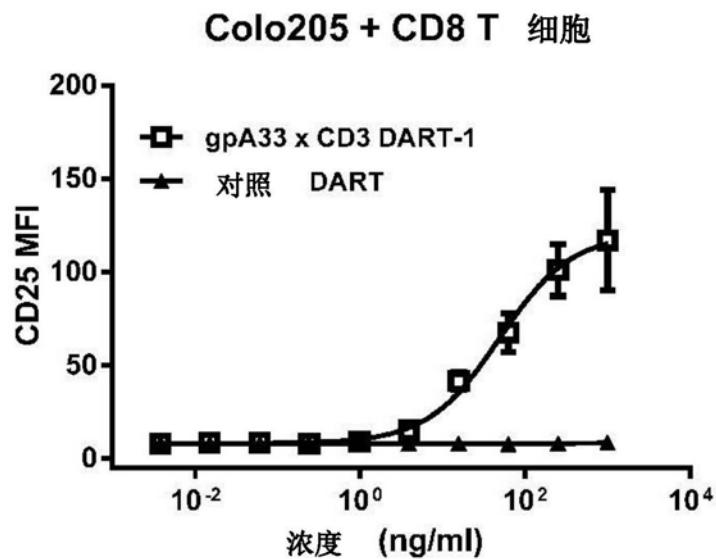


图5A

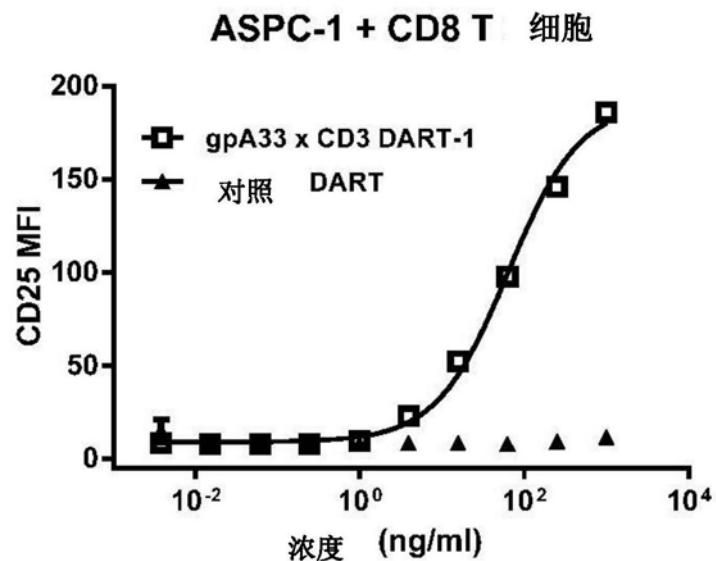


图5B

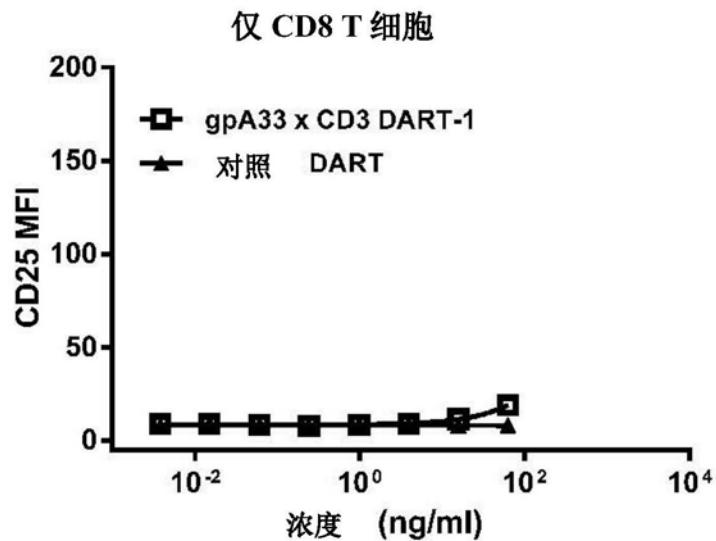


图5C

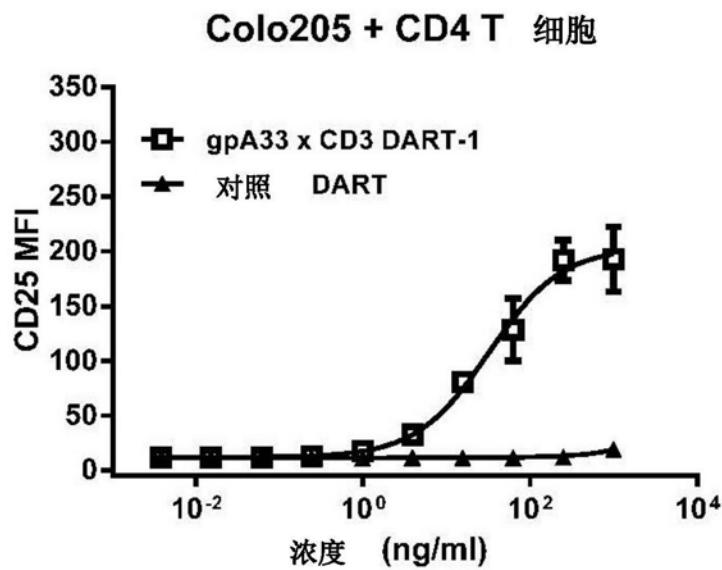


图5D

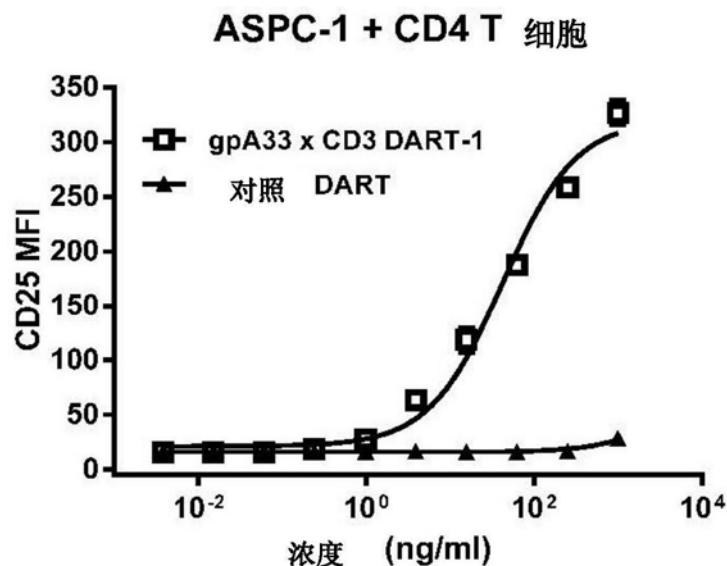


图5E

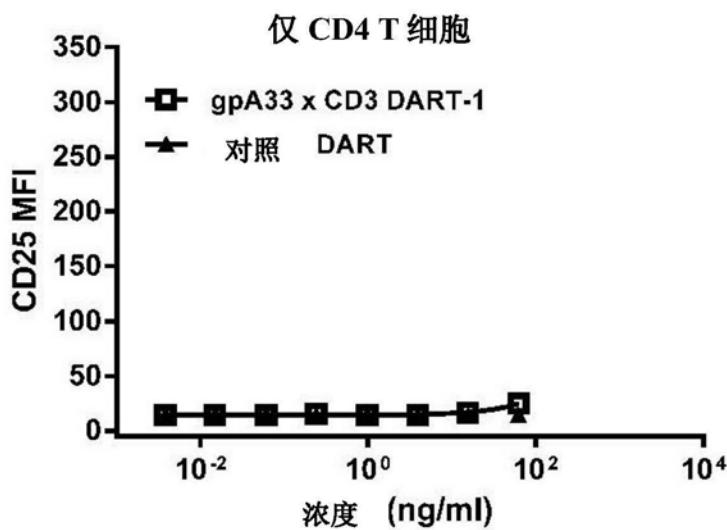


图5F

**SW948 + 静息 T 细胞
(LDH) E:T=10:1**

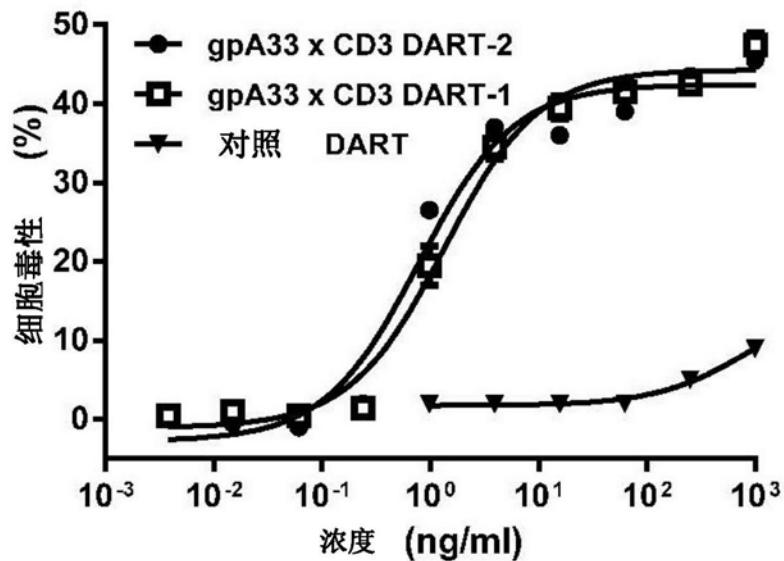


图6A

**Colo205 + 静息 T 细胞
(LDH) E:T=10:1**

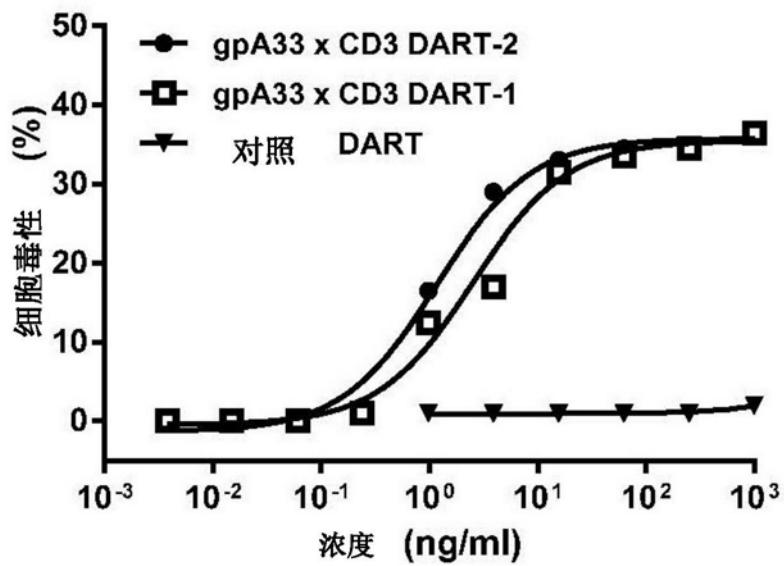


图6B

**Colo205-Luc + 静息 T 细胞
(LUM) E:T=10:1**

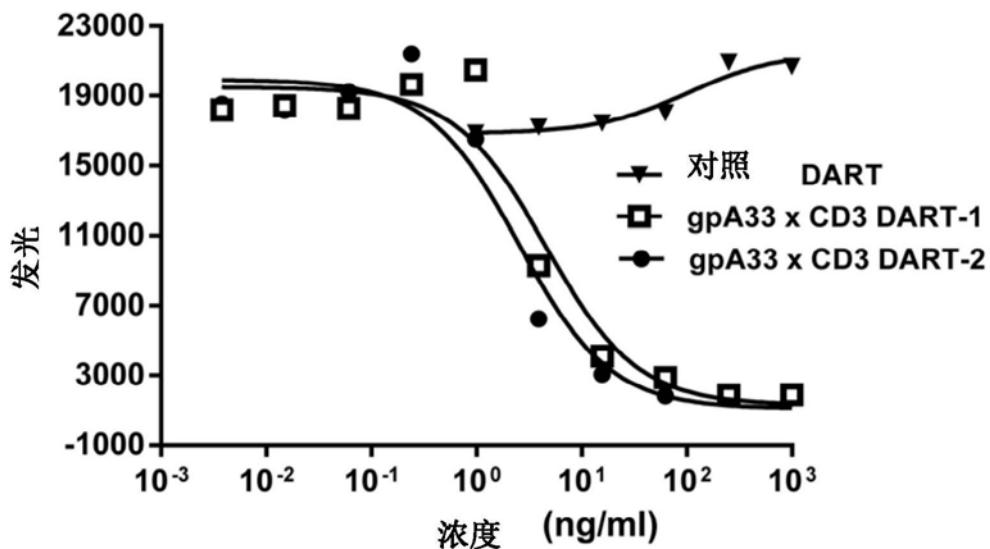


图6C

**HCT116 (A33-ve) + 静息 T 细胞
(LDH) E:T=10:1**

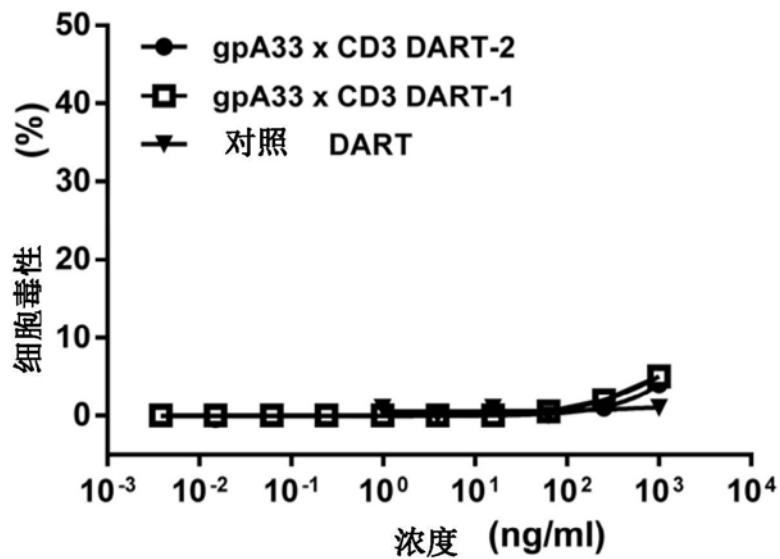


图6D

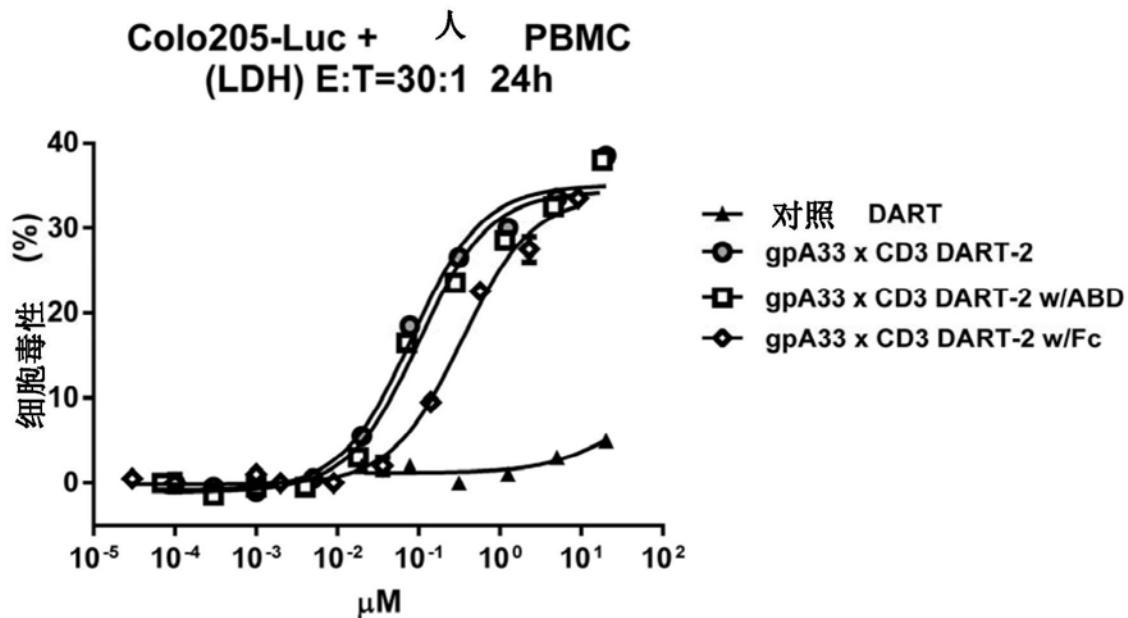


图7A

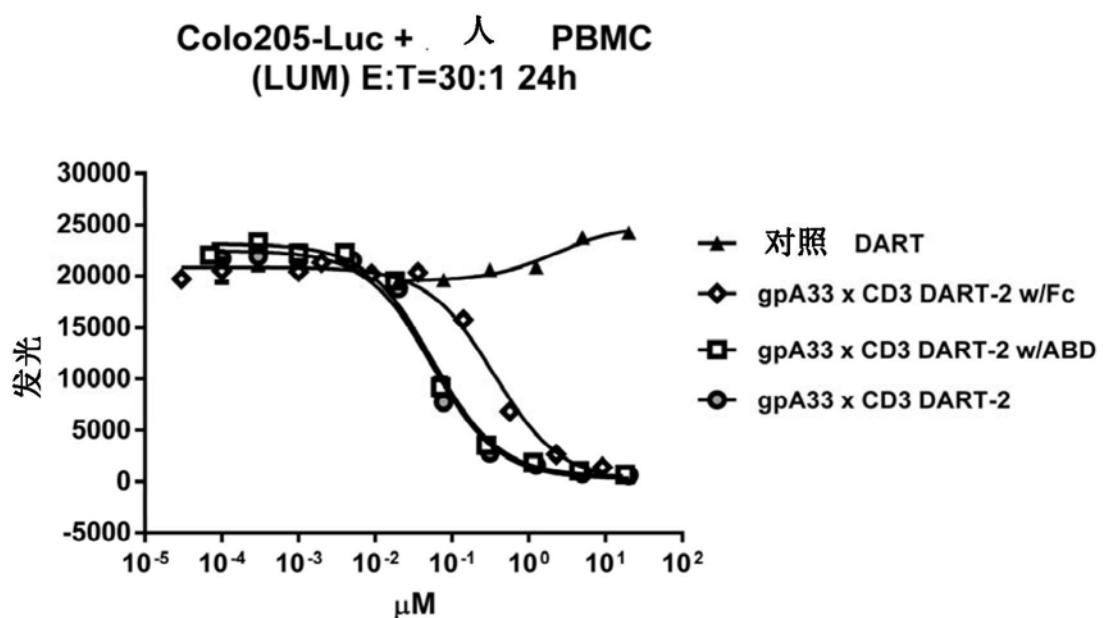


图7B

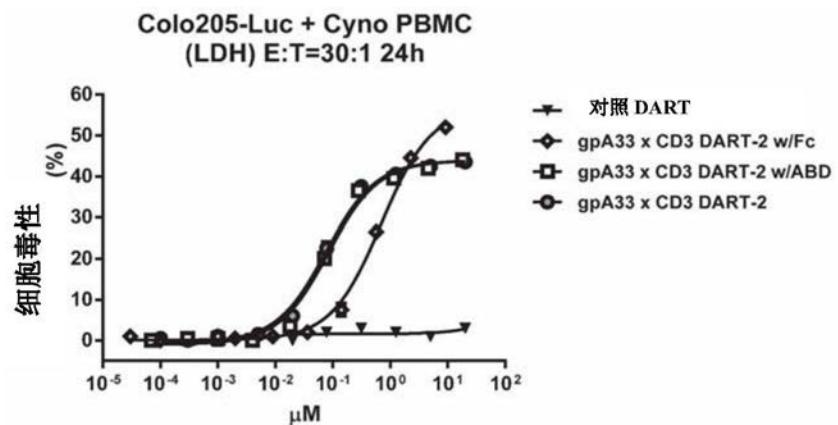


图7C

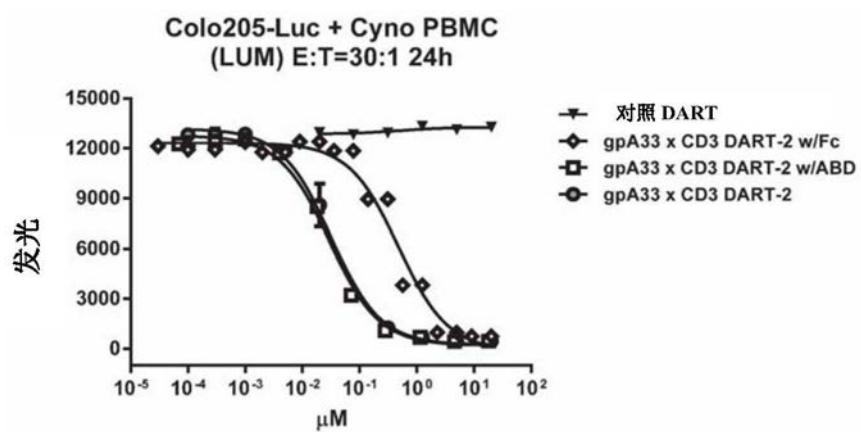


图7D

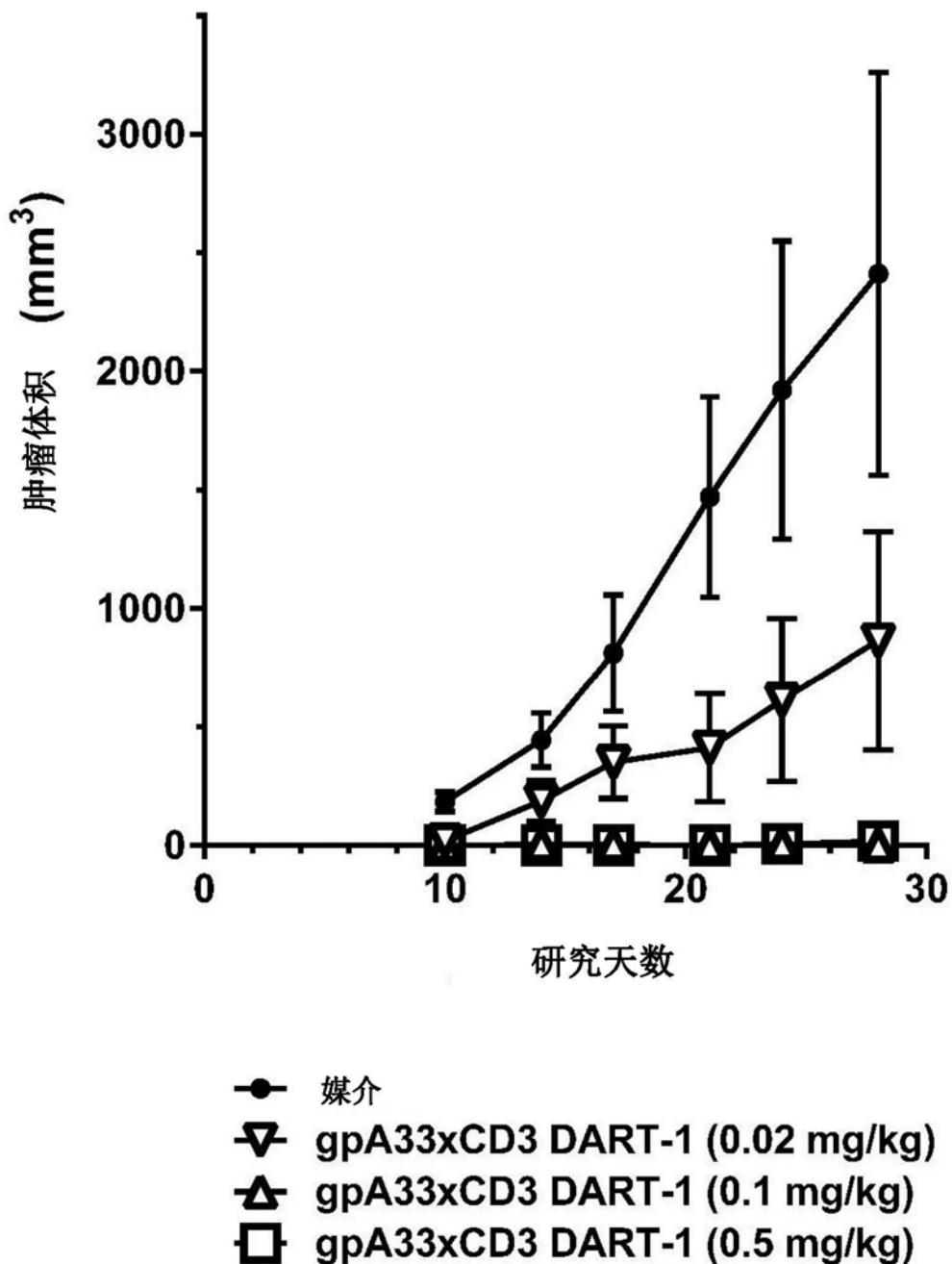


图8

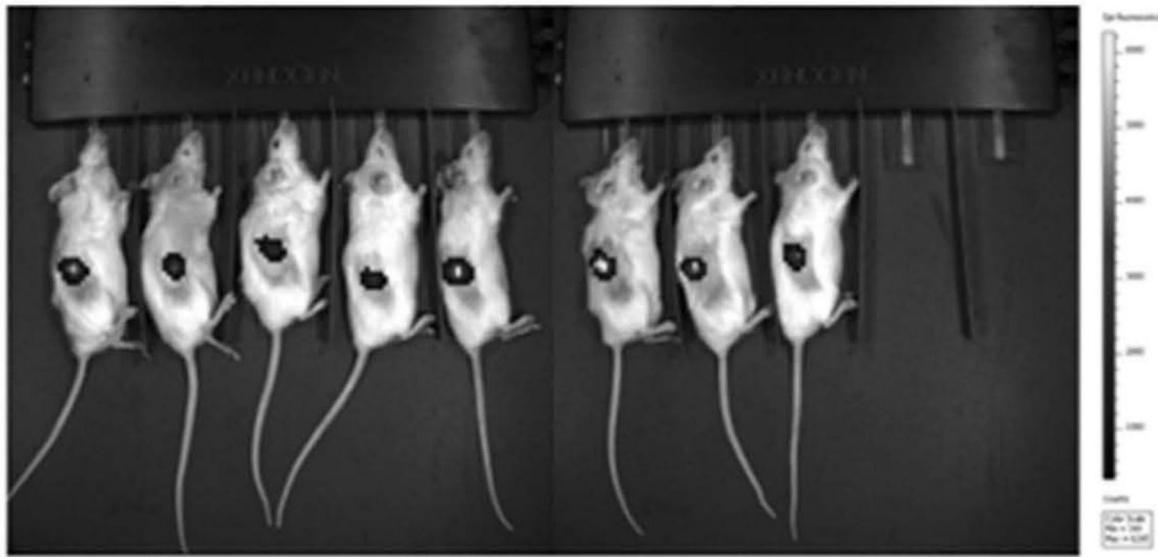
第 2 天成像数据（媒介）：

图9A

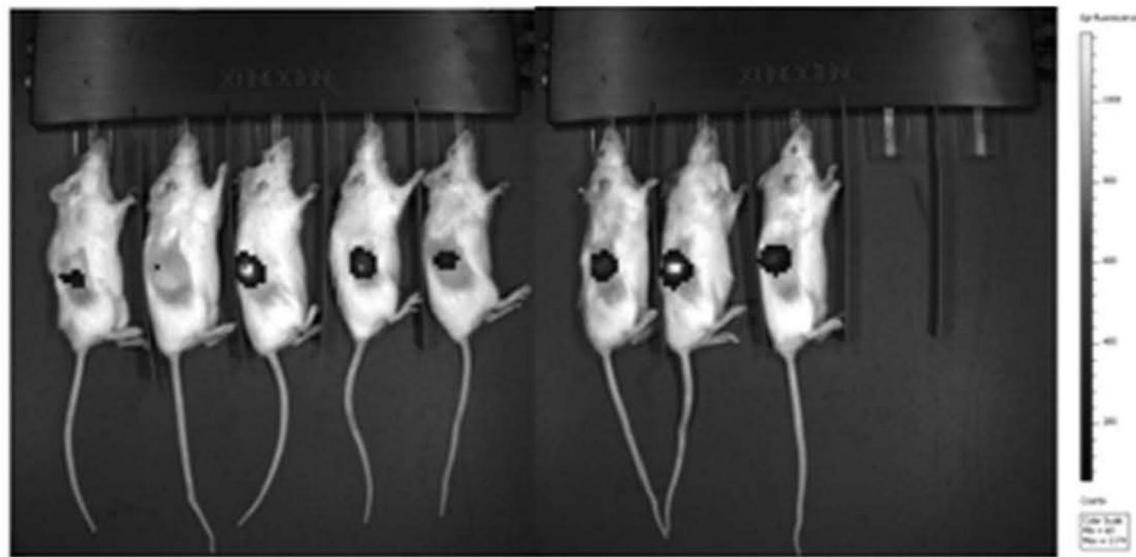
**第 2 天成像数据 (gpA33 x CD3 DART-1
(0.5 mg/kg)):**

图9B

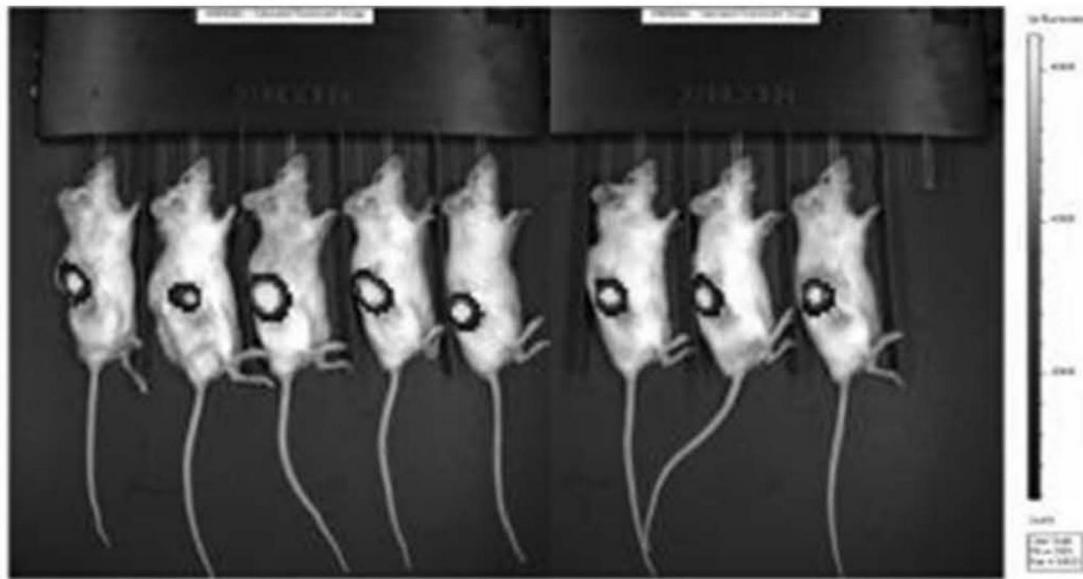
第 12 天成像数据（媒介）：

图9C

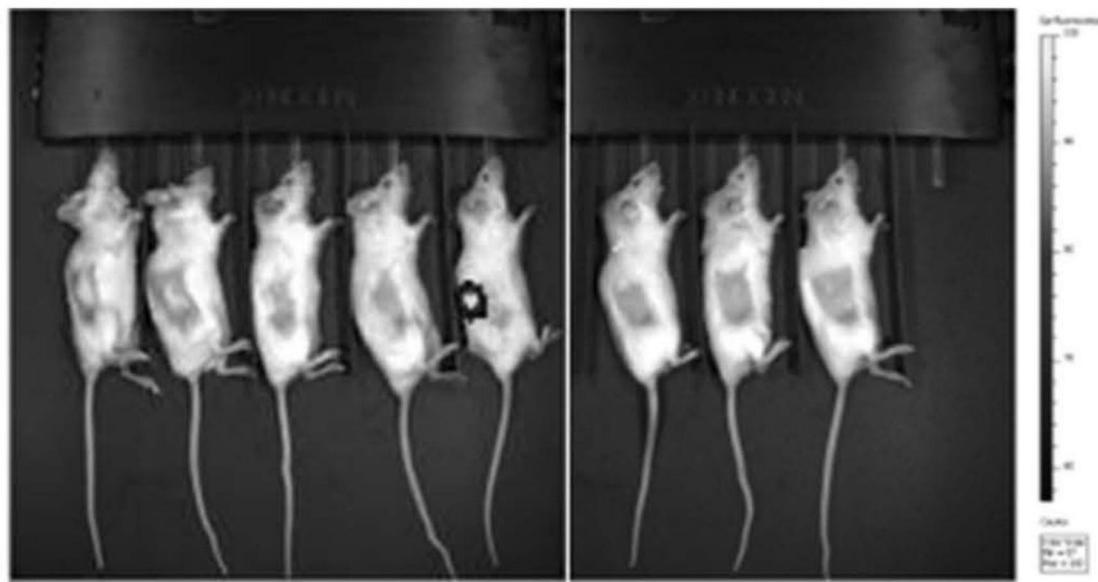
**第 12 天成像数据 (gpA33 x CD3 DART-1
(0.5 mg/kg)):**

图9D

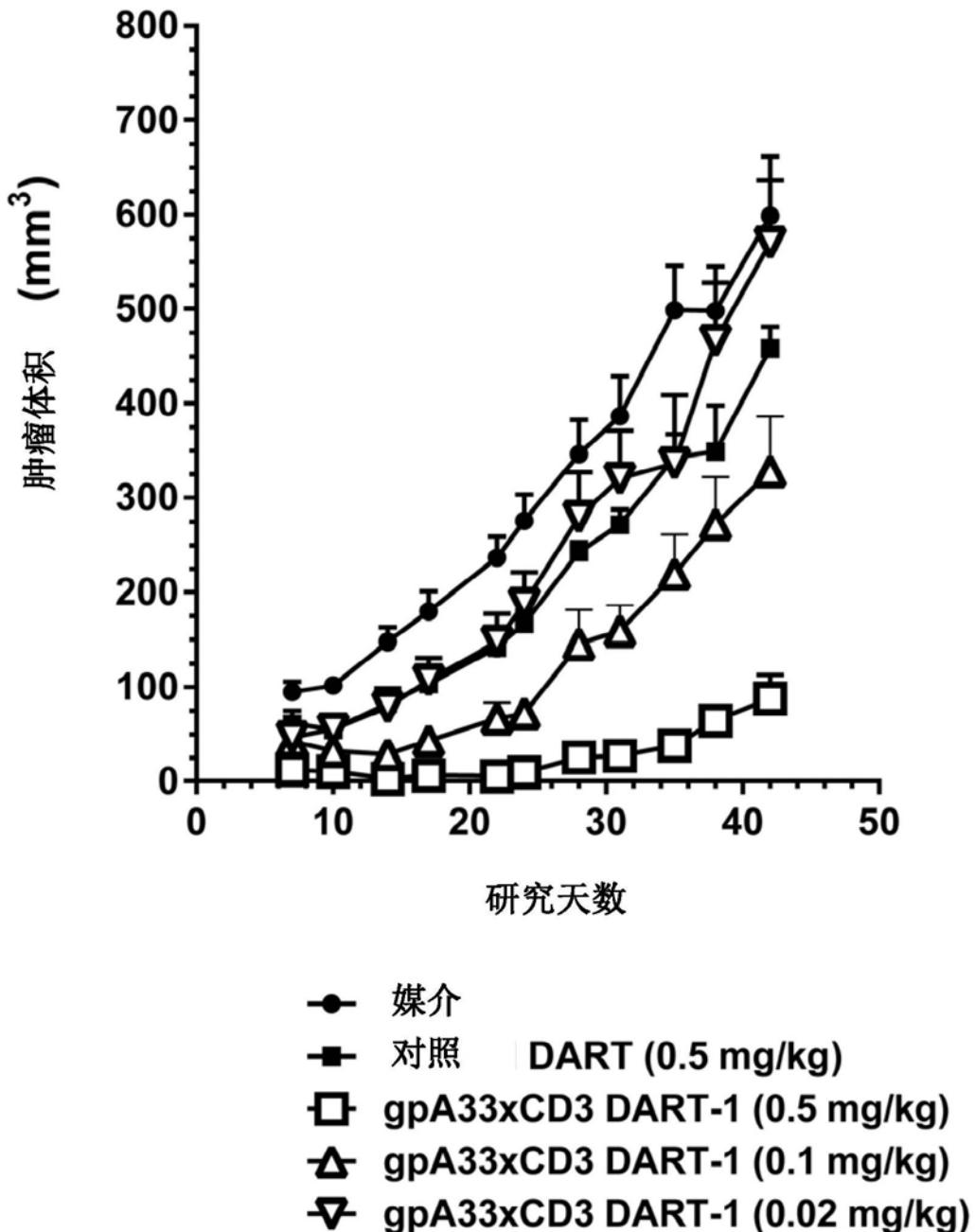


图10

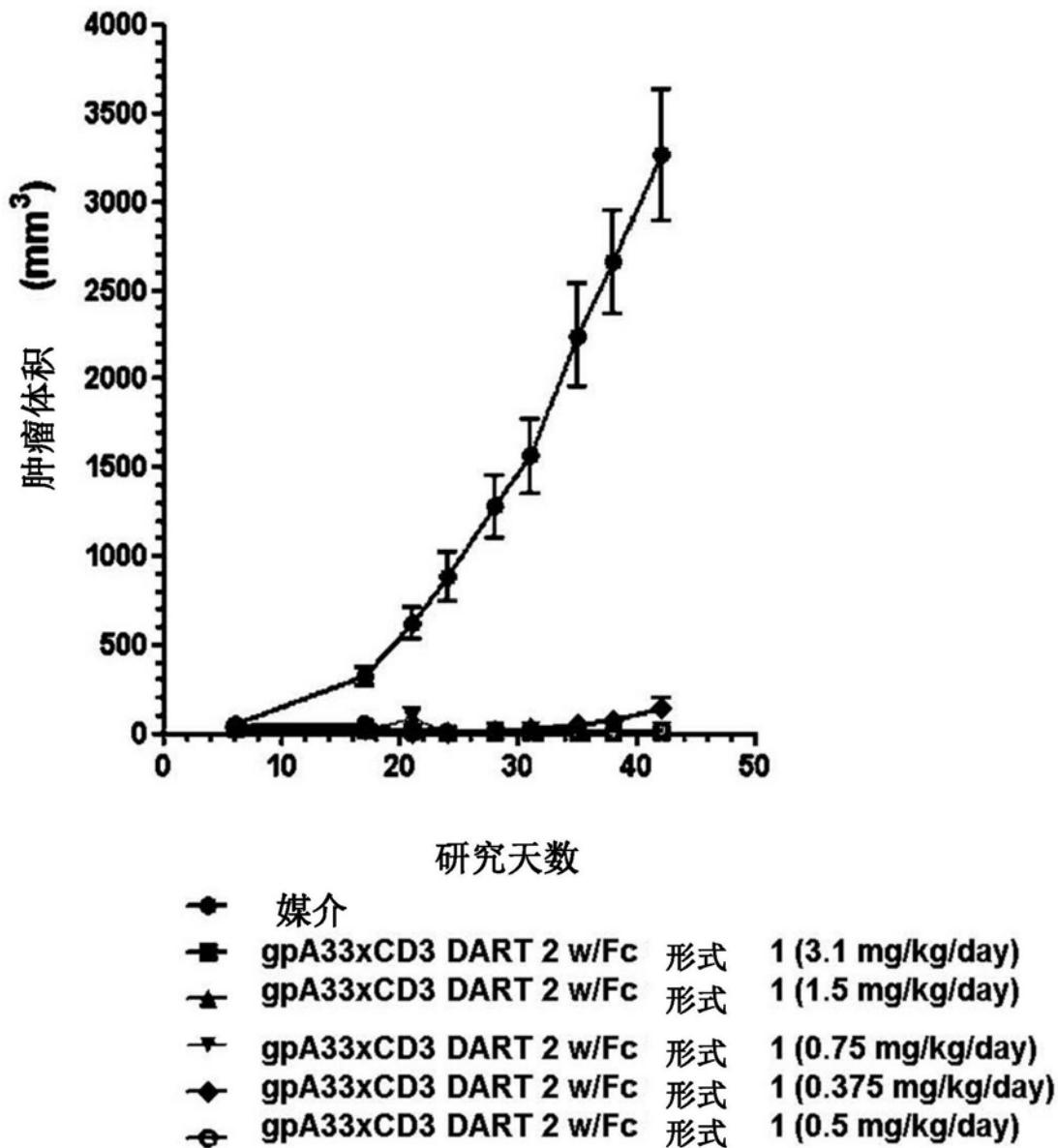


图11

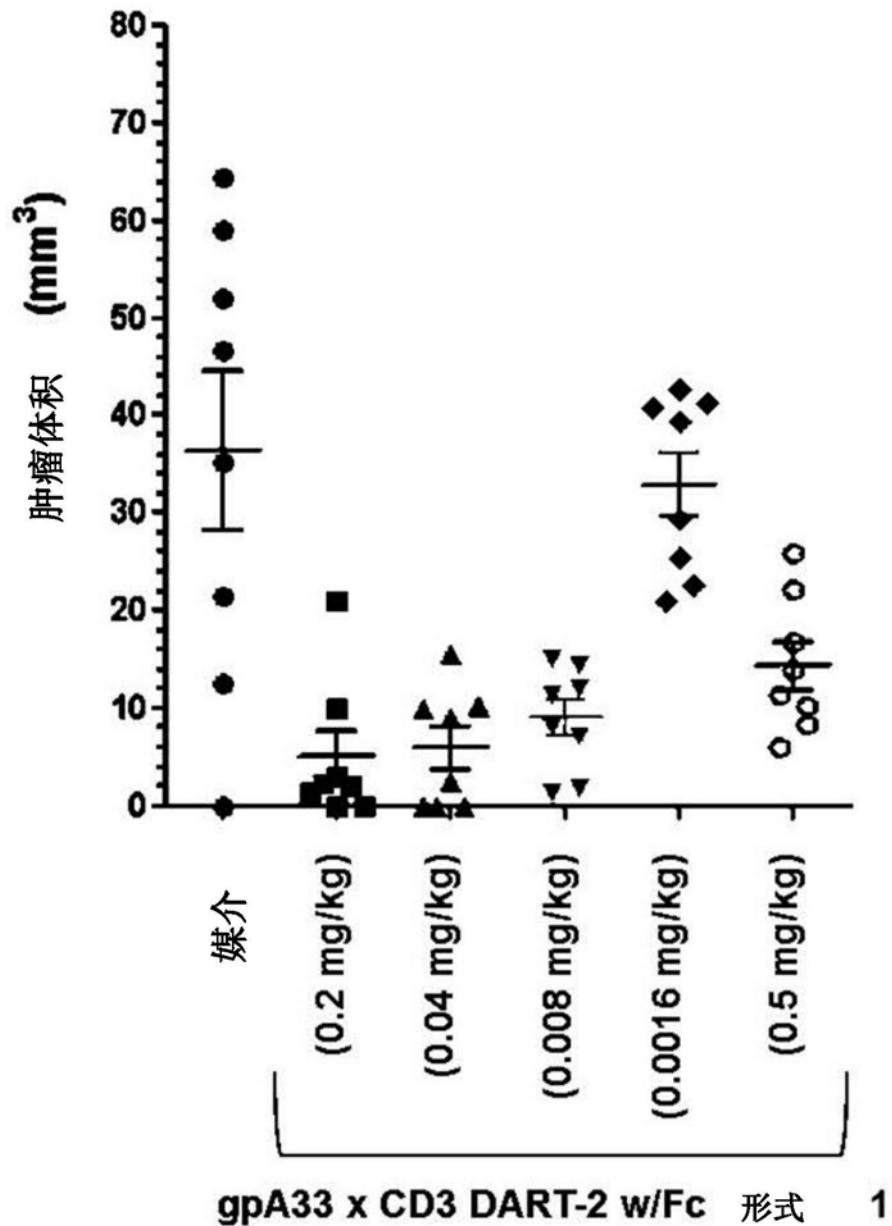


图12

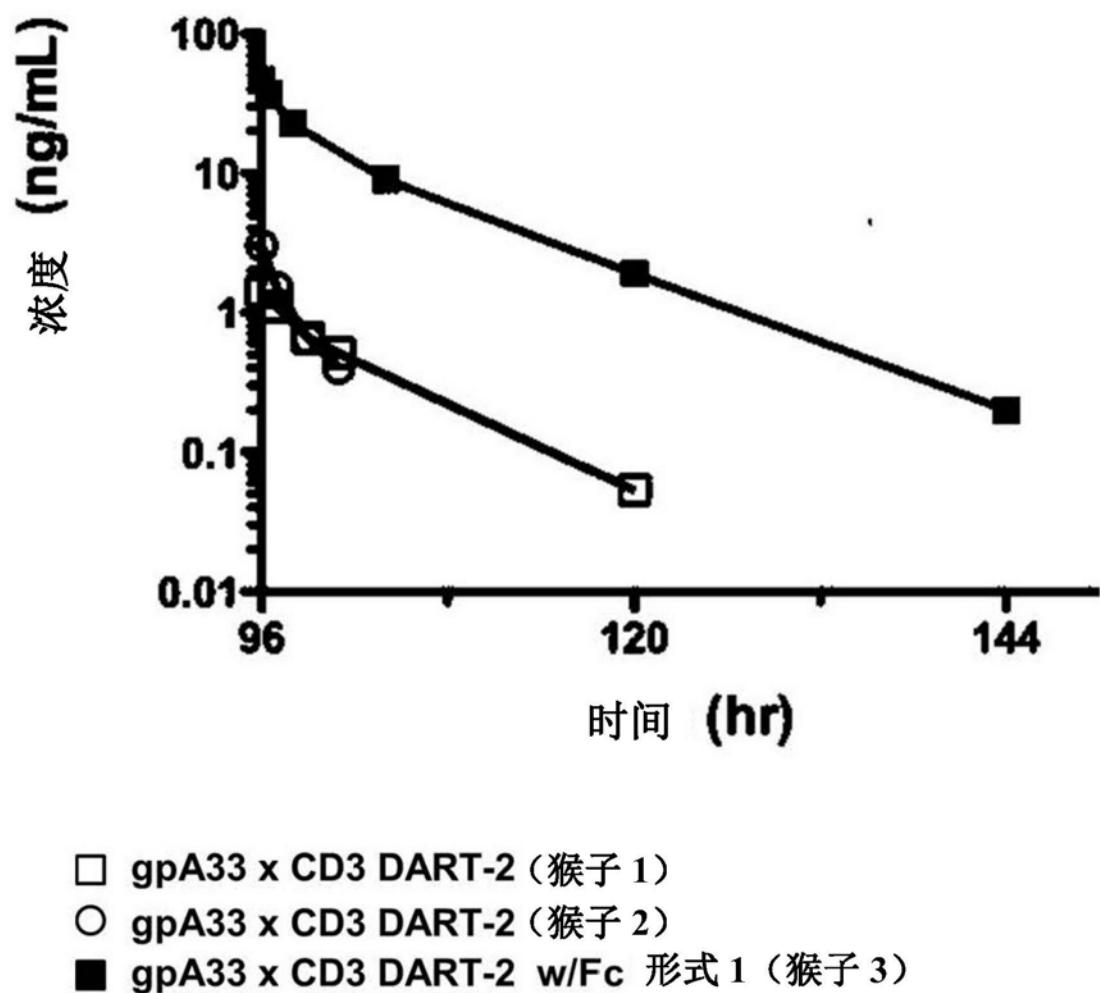
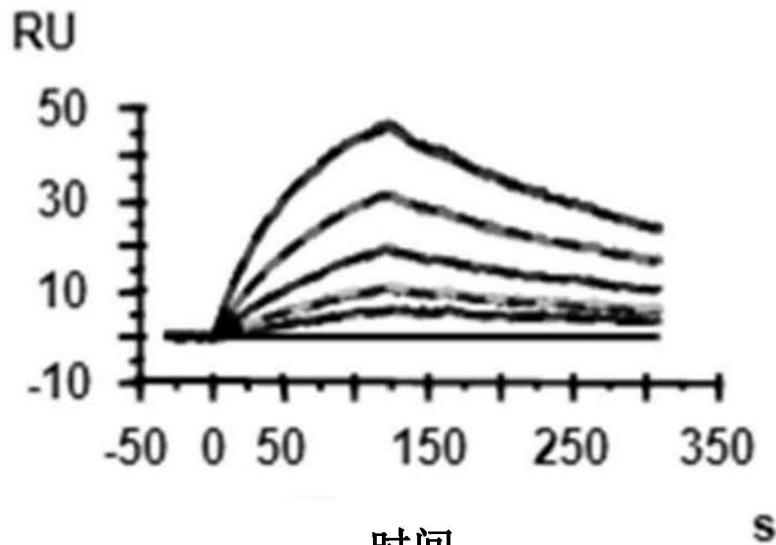
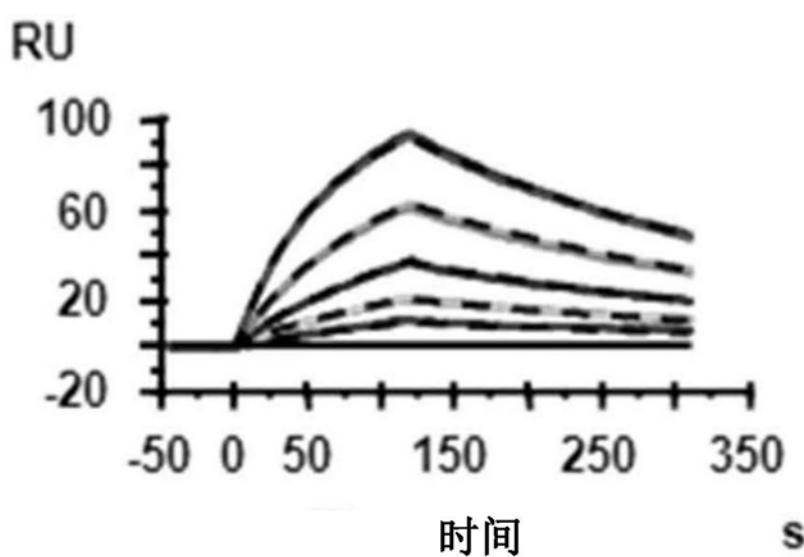


图13



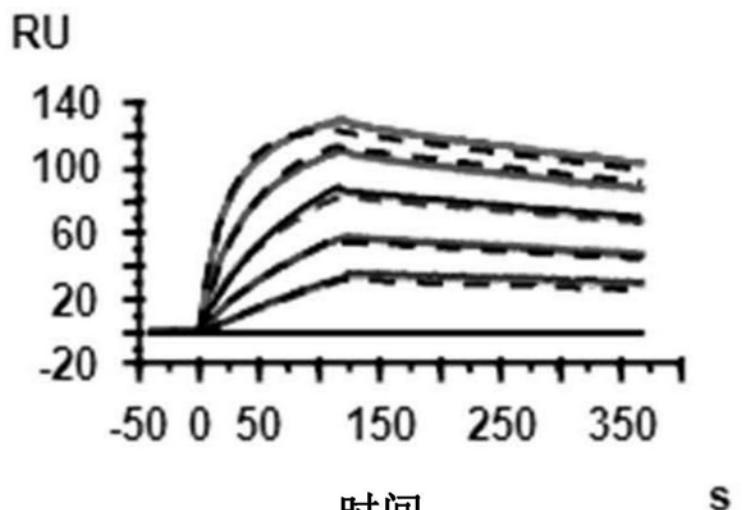
人 CD3 的 DART-2 w/Fc 形式 1 结合

图14A



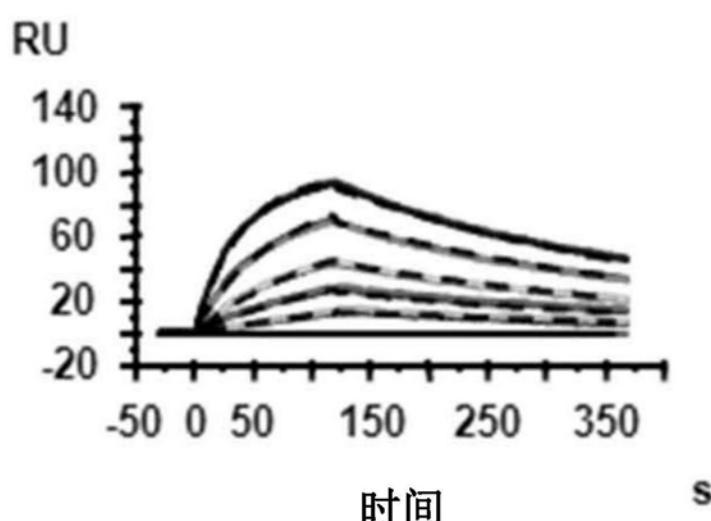
食蟹猴 CD3 的 DART-2 w/Fc 形式 1 结合

图14B



人 gpA33 的 DART-2 w/Fc 形式 1 结合

图15A



食蟹猴 gpA33 的 DART-2 w/Fc 形式 1 结合

图15B