



(10) 授权公告号 CN 110167968 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 28

(21) 申请号 201780057182.8

乔纳斯·赞特托

(22) 申请日 2017.09.15

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务
所(普通合伙) 11413

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110167968 A

专利代理师 王春伟 刘继富

(43) 申请公布日 2019.08.23

(51) Int.Cl.

C07K 16/32 (2006.01)

(30) 优先权数据

16188871.4 2016.09.15 EP

(56) 对比文件

CN 104271761 A, 2015.01.07

CN 1650011 A, 2005.08.03

CN 104093742 A, 2014.10.08

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.14

US 2014308287 A1, 2014.10.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/073328 2017.09.15

李真真等. 靶向HER3逆转EGFR抑制剂耐药机

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/050848 EN 2018.03.22

制的研究进展.《中国肿瘤》.2016, (第06期),

GARNER, A.等. An antibody that locks

HER3 in the inactive conformation

inhibits tumor growth driven by HER2 or

neuregulin.《CANCER RES.》.2013, 第73卷(第19
期), 6024-6035.

(73) 专利权人 斯图加特大学

地址 德国斯图加特

审查员 高雅

(72) 发明人 罗兰·康特曼 丽莎·施米特

迈克·赫特 奥利弗·塞弗特

莫尼洛拉·奥莱奥耶

迈克尔·于斯特

斯蒂芬·迪尤贝尔

权利要求书3页 说明书57页

序列表54页 附图32页

(54) 发明名称

针对HER3的抗原结合蛋白

(57) 摘要

本发明提供了特异性结合由人表皮生长因子受体3 (HER3) 的结构域III和结构域IV形成的构象表位的抗原结合蛋白、与该抗原结合蛋白竞争结合的抗原结合蛋白、以及包含这些的融合蛋白或缀合物。本发明还提供了包含编码所述抗原结合蛋白的序列的核酸分子, 包含核酸的载体, 以及包含抗原结合蛋白、融合蛋白、核酸或载体的细胞和药物。本发明还提供了抗原结合蛋白、融合蛋白或缀合物、核酸、载体、细胞或药物以用作药剂。本发明还提供了抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法, 其包括施用治疗有效量的抗原结合蛋白、融合蛋白或缀合物、核酸、载体、细胞或药物。

1. 一种抗原结合蛋白,其特异性结合由人表皮生长因子受体3 (HER3) 的结构域III和结构域IV形成的构象表位,所述抗原结合蛋白包含:

(a) 由根据SEQ ID NO:2的32位至37位氨基酸组成的CDRH1,由根据SEQ ID NO:2的52位至69位氨基酸组成的CDRH2,和由根据SEQ ID NO:2的102位至112位氨基酸组成的CDRH3,和

(b) 由根据SEQ ID NO:3的23位至33位氨基酸组成的CDRL1,由根据SEQ ID NO:3的49位至55位氨基酸组成的CDRL2,和由根据SEQ ID NO:3的88位至98位氨基酸组成的CDRL3。

2. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白,其中所述构象表位由根据SEQ ID NO:1的HER3结构域III的329位至531位氨基酸和根据SEQ ID NO:1的HER3结构域IV的532位至587位氨基酸形成。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述的抗原结合蛋白,其:

(a) 与表达HER3的细胞结合的 EC_{50} 值低于15nM;和/或

(b) 与单体HER3结合的 K_D 低于100nM的;和/或

(c) 抑制调蛋白诱导的HER3磷酸化HER3的 IC_{50} 值低于10nM。

4. 根据权利要求1至2中任一项所述的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白 (i) 抑制HER3与其配体的结合、(ii) 抑制受体活化和/或信号传导、(iii) 诱导HER3内化、(iv) 抑制细胞增殖、和/或 (v) 抑制肿瘤生长。

5. 根据权利要求1至2中任一项所述的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白是抗体或其抗原结合片段。

6. 根据权利要求1至2中任一项所述的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白是单特异性的、双特异性的或多特异性的。

7. 一种融合蛋白,其包含根据权利要求1至6中任一项所述的抗原结合蛋白,其还包含至少一种药理学活性部分。

8. 根据权利要求7所述的融合蛋白,其中药理学活性部分是肽。

9. 根据权利要求7所述的融合蛋白,其中药理学活性部分是多肽。

10. 根据权利要求7所述的融合蛋白,其中药理学活性部分是蛋白质。

11. 根据权利要求7所述的融合蛋白,其中药理学活性部分选自激素、生长因子、细胞因子、白介素、免疫刺激配体、凝血因子、溶栓剂、抗凝血剂和抗原结合分子。

12. 根据权利要求11所述的融合蛋白,其中抗原结合分子选自抗体或抗体片段。

13. 根据权利要求12所述的融合蛋白,其中抗原结合分子是选自以下的抗体:单结构域抗体(sdAb)、重链抗体的可变结构域、串联scFv、双抗体、三重体和支架蛋白。

14. 根据权利要求13所述的融合蛋白,其中双抗体选自双特异性T细胞衔接器(BITE)、单链双抗体和DART分子。

15. 根据权利要求12所述的融合蛋白,其中抗原结合分子是选自以下的抗体片段:Fab片段、Fab'片段或单链可变片段(scFv)。

16. 根据权利要求7至15中任一项所述的融合蛋白,其中抗原结合蛋白是单链Fv,所述单链Fv包含通过接头肽与轻链可变结构域连接的重链可变结构域,其中

(i) 重链可变结构域由根据SEQ ID NO:2的1位至123位氨基酸组成,

(ii) 轻链可变结构域由与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的氨基酸序列组成,和

(iii) 接头肽的序列为GGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:16)。

17. 根据权利要求7至15中任一项所述的融合蛋白,其中药理学活性部分包含单链TRAIL(scTRAIL)结构域。

18. 根据权利要求7至15中任一项所述的融合蛋白,其中抗原结合蛋白包含二聚化结构域。

19. 一种核酸,其编码根据权利要求1至6中任一项所述的抗原结合蛋白或根据权利要求7至18中任一项所述的融合蛋白。

20. 一种重组载体,其包含根据权利要求19所述的核酸。

21. 一种重组宿主细胞,其包含根据权利要求19所述的核酸或根据权利要求20所述的载体。

22. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至6中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求7至18中任一项所述的融合蛋白、根据权利要求19所述的核酸、或根据权利要求20所述的重组载体,并且还包含药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂、填充剂、黏合剂、润滑剂、助流剂、崩解剂、吸附剂和/或防腐剂中的一种或多种。

23. 根据权利要求1至6中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求7至18中任一项所述的融合蛋白、根据权利要求19所述的核酸、根据权利要求20所述的重组载体、根据权利要求21所述的重组宿主细胞、或根据权利要求22所述的药物组合物在制备用于抑制肿瘤生长或治疗癌症的药物中的用途。

24. 根据权利要求1至6中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求7至18中任一项所述的融合蛋白、根据权利要求19所述的核酸、根据权利要求20所述的重组载体、根据权利要求21所述的重组宿主细胞、或根据权利要求22所述的药物组合物在制备用于抑制肿瘤生长或治疗癌症的药物中的用途,其中将治疗有效量的根据权利要求1至6中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求7至18中任一项所述的融合蛋白、根据权利要求19所述的核酸、根据权利要求20所述的重组载体、根据权利要求21所述的重组宿主细胞、或根据权利要求22所述的药物组合物施用于有需要的患者。

25. 根据权利要求24所述的用途,其中有需要的患者是正处于肿瘤生长发展中或患有癌症的患者或存在肿瘤生长发展或癌症风险的患者。

26. 一种缀合物,其包含抗原结合蛋白,其中抗原结合蛋白特异性结合由人表皮生长因子受体3(HER3)的结构域III和结构域IV形成的构象表位,并且其中所述抗原结合蛋白包含:

(a) 由根据SEQ ID NO:2的32位至37位氨基酸组成的CDRH1,由根据SEQ ID NO:2的52位至69位氨基酸组成的CDRH2,和由根据SEQ ID NO:2的102位至112位氨基酸组成的CDRH3,和

(b) 由根据SEQ ID NO:3的23位至33位氨基酸组成的CDRL1,由根据SEQ ID NO:3的49位至55位氨基酸组成的CDRL2,和由根据SEQ ID NO:3的88位至98位氨基酸组成的CDRL3。

27. 根据权利要求26所述的缀合物,其中所述构象表位由根据SEQ ID NO:1的HER3结构域III的329位至531位氨基酸和根据SEQ ID NO:1的HER3结构域IV的532位至587位氨基酸形成。

28. 根据权利要求26或27所述的缀合物,其中所述抗原结合蛋白

(a) 与表达HER3的细胞结合的 EC_{50} 值低于15nM;和/或

(b) 与单体HER3结合的 K_D 低于100nM的;和/或

(c) 抑制调蛋白诱导的HER3磷酸化HER3的 IC_{50} 值低于10nM。

29. 根据权利要求26或27所述的缀合物, 其中所述抗原结合蛋白 (i) 抑制HER3与其配体的结合、(ii) 抑制受体活化和/或信号传导、(iii) 诱导HER3内化、(iv) 抑制细胞增殖、和/或(v) 抑制肿瘤生长。

30. 根据权利要求26或27所述的缀合物, 其中所述抗原结合蛋白是抗体或其抗原结合片段。

31. 根据权利要求26或27所述的缀合物, 其中所述抗原结合蛋白是单特异性的、双特异性的或多特异性的。

32. 根据权利要求31所述的缀合物, 其中所述抗原结合蛋白是双特异性的, 并且特异性结合第二细胞靶标, 所述第二细胞靶标选自CD3、EGFR、HER2、HER4、IGF-1R、HGFR、c-MET及其衍生物。

33. 根据权利要求32所述的缀合物, 其中第二细胞靶标是EGFR或HER2。

34. 根据权利要求26至33中任一项所述的缀合物在制备用于抑制肿瘤生长或治疗癌症的药物中的用途。

针对HER3的抗原结合蛋白

[0001] 本发明提供了特异性结合至由人表皮生长因子受体3 (HER3) 的结构域III和结构域IV形成的构象表位的抗原结合蛋白、与该抗原结合蛋白竞争结合的抗原结合蛋白、以及包含这些的融合蛋白或缀合物。本发明还提供了包含编码所述抗原结合蛋白的序列的核酸分子、包含核酸的载体、以及包含抗原结合蛋白、融合蛋白、核酸或载体的细胞和药物。本发明还提供抗原结合蛋白、融合蛋白或缀合物、核酸、载体、细胞或药物以用作药剂。本发明进一步提供抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法,其包括施用治疗有效量的抗原结合蛋白、融合蛋白或缀合物、核酸、载体、细胞或药物。

背景技术

[0002] ErbB家族成员的复杂信号传导网络在正常人体组织中受到严格调控。然而,受体过表达、突变导致的受体功能改变或配体异常刺激引起的ErbB家族成员失调通常与癌症的发展和传播有关。EGFR经常在结直肠癌、卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌和其他癌症类型中过表达,并且EGFR过表达与预后不良有关。HER2特别与人乳腺癌相关,其在人乳腺癌中被扩增和/或过表达高达30%。先前已经表明,HER3在约11%的结肠癌和胃癌中发生突变,其在HER2存在下促进致癌信号传导(Jaiswal等人,2013,Oncogenic ErbB3 mutations in human cancers.Cancer Cell 23,603-617)。此外,HER3由于其有效激活PI3K/Akt途径而获得了特别的关注,据报道该途径负责抗ErbB靶向治疗的耐药机制(Holbro等人,2003,The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit:ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 100:8933-8938)。HER4在癌症发展中的作用已经引起争议性讨论,但越来越多的研究表明HER4与肿瘤发生有关,特别是与获得性耐药的肿瘤发生有关(Canfield等人,2014,Receptor tyrosine kinase ErbB4 mediates acquired resistance to ErbB2 inhibitors in breast cancer cells.Cell Cycle 14:648-655)。

[0003] 已经在HER3中鉴定出致癌突变,例如在大约11%的结肠癌和胃癌(Jaiswal等人,2013)中鉴定出致癌突变。这些突变显示出以配体非依赖性方式使结肠上皮细胞和乳腺上皮细胞转化(Jaiswal等人,2013,Oncogenic ErbB3 mutations in human cancers.Cancer Cell 23,603-617)。细胞外区域的突变已定位于结构域I、结构域II和结构域III中,其中许多热点位于结构域II中(A232V、P262H/S、G284R、D297Y、G325R)、一个热点位于结构域I中(V104M)、一个热点位于结构域III中(T355A/I)(Gaborit等人2015,Emerging anti-cancer antibodies and combination therapies targeting HER3/ErbB3.Hum.Vaccin.Immunother.12:576-592)。

[0004] 可以使用抗体靶向ErbB家族成员。它们可以抑制配体结合和/或受体二聚化。此外,抗体可以通过受体交联诱导受体内化和降解(Friedman等人,2005,Synergistic down-regulation of receptor tyrosine kinases by combinations of mAbs: implications for cancer therapy.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:1915-1920; Roepstorff等人,2008,Endocytic downregulation of ErbB receptors:mechanisms and

relevance in cancer. *Histochem Cell Biol.* 129:563-578; Moody等人, 2015, receptor crosslinking: a general method to trigger internalization and lysosomal targeting of therapeutic receptor:ligand complexes. *Mol. Therapy* 23:1888-1898)。另外, 含有Fc部分的抗体可通过效应功能例如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒性 (CDC) 来介导癌细胞杀伤。抗体也可用作癌细胞的细胞毒性剂的递送系统。由于HER3作为异二聚化配偶体的新兴角色涉及促进肿瘤发生和治疗抗性的发展, HER3已成为抗体治疗的靶标。已经开发了针对HER3的各种抗体 (Gaborit等人2015, Emerging anti-cancer antibodies and combination therapies targeting HER3/ErbB3. *Hum. Vaccin. Immunother.* 12:576-592; Dey等人2015, A critical role of HER3 in HER2-amplified and non-amplified breast cancers: function of a kinase-dead RTK. *Am. J. Transl. Res.* 7:733-750; Aurisicchio等人2012, The promise of anti-ErbB3 monoclonals as new cancer therapeutics. *Oncotarget* 3, 744-758; Baselga&Swain 2009, Novel anticancer targets: revisiting ErbB2 and discovering ErbB3. *Nat. Rev. Cancer* 9:463-475; Gala&Chandariapaty 2014, Molecular pathways: HER3 targeted therapy. *Clin. Cancer Res.* 20:1410-1416; Kol等人2014, HER3, serious partner in crime: therapeutic approaches and potential biomarkers for effect of HER3-targeting. *Pharmacol. Ther.* 143:1-11; Zhang等人2016, HER3/ErbB3, an emerging cancer therapeutic target. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 48:39-48), 其中一些针对涉及配体结合的结构域I或结构域III, 另一些针对涉及受体二聚化的结构域II和/或结构域IV。一种抗体KTN3379被描述为在结构域II和结构域III之间结合, 将受体锁定在无活性构象中 (Lee等人, 2015, Inhibition of ErbB3 by a monoclonal antibody that locks the extracellular domain in an inactive configuration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 13225-13230)。

[0005] 然而, 由于这些抗体靶向的结构域可以包含一种或多种于一种致癌基因突变, 它们可以不对野生型HER3具有反应性而对致癌突变的HER3具有反应性, 该突变的HER3在不同于相应抗体靶向的位置突变。因此, 本领域需要一种与野生型和突变的HER3都具有反应性的拮抗分子。此外, 为了抑制配体非依赖性和配体依赖性HER3活化, 需要一种以抑制异二聚化以及抑制配体结合的方式结合HER3的拮抗分子。

[0006] 为了解决上述问题, 我们鉴定了人抗HER3 (ErbB3) 抗体3-43, 其识别由结构域III和结构域IV形成的HER3上的独特表位, 该表位在人和小鼠HER3之间是保守的。该抗体作为EC₅₀值低于0.1nM的IgG分子与表达HER3的肿瘤细胞结合, 有效抑制配体非依赖性和配体依赖性受体激活和下游信号传导, 并导致快速有效的受体内化和降解。

发明内容

[0007] 在第一方面, 本发明提供了一种抗原结合蛋白, 其特异性结合由人表皮生长因子受体3 (HER3) 的结构域III和结构域IV形成的构象表位。

[0008] 在第二方面, 本发明提供了一种抗原结合蛋白, 其与第一方面的抗原结合蛋白竞争。

[0009] 在第三方面, 本发明提供了一种融合蛋白或缀合物, 其包含第一方面或第二方面

的抗原结合蛋白。

[0010] 在第四方面,本发明提供了一种核酸分子,其包含编码第一方面或第二方面的抗原结合蛋白或第三方面的融合蛋白的序列。

[0011] 在第五方面,本发明提供了一种载体,其包含第四方面的核酸。

[0012] 在第六方面,本发明提供了一种细胞,其包含第一方面或第二方面的抗原结合蛋白、第三方面的融合蛋白、第四方面的核酸或第五方面的载体。

[0013] 在第七方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含第一方面或第二方面的抗原结合蛋白、第三方面的融合蛋白、第四方面的核酸或第五方面的载体。

[0014] 在第八方面,本发明提供了第一方面或第二方面的抗原结合蛋白、第三方面的融合蛋白或缀合物、第四方面的核酸、或第五方面的载体、第六方面的细胞、或第七方面的药物,以用作药剂。

[0015] 在第九方面,本发明提供了一种抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法,其包括施用治疗有效量的第一方面或第二方面的抗原结合蛋白、第三方面的融合蛋白或缀合物、第四方面的核酸、或第五方面的载体、第六方面的细胞、或第七方面的药物。

附图说明

[0016] 图1: IgG 3-43的生化表征和结合研究。A) 在还原(R) 和非还原(NR) 条件下的SDS-PAGE分析(考马斯染色)。B) IgG 3-43的HPLC尺寸排阻层析。C) 通过ELISA分析与HER3的结合。使用HER3的细胞外结构域的Fc融合蛋白作为抗原。数据表示为三次独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。D) 使用Attana系统进行石英晶体微量天平实验。将IgG 3-43固定在羧基芯片上,并测量表示通过组氨酸标记的HER3细胞外结构域的结合导致的重量增加或减少的频率变化。

[0017] 图2: 表位作图和与小鼠HER3的交叉反应。A) 表位作图: 将编码HER3细胞外结构域截短形式的序列与IgG1Fc-部分序列融合。将得到的构建体转染至HEK293细胞中并在HEK293细胞中表达并通过蛋白A亲和层析从上清液中纯化蛋白质。在ELISA测定中使用Fc融合蛋白作为抗原并用HRP缀合的抗Fab抗体检测IgG 3-43结合。B) 使用融合至人Fc区的人和小鼠HER3的细胞外区域进行3-43与人和小鼠HER3的交叉反应。用抗His标签抗体检测scFv 3-43与固定化HER3融合蛋白的结合。

[0018] 图3: IgG 3-43与表达HER3的肿瘤细胞系的结合。将各种肿瘤细胞系(如所示) 与不同浓度的IgG 3-43一起孵育并用PE标记的二抗检测结合的抗体。使用Miltenyi MACSquant分析细胞。根据 $n=1$ 至3个实验计算 EC_{50} 值。

[0019] 图4: IgG 3-43与HRG竞争结合至表达HER3的细胞。经由PE缀合的抗His抗体通过流式细胞术测量his标记的重组人调蛋白- $\beta 1$ 的结合。使用过量的IgG 3-43进行预孵育有效地使信号减少超过60%,而抗EGFR抗体西妥昔单抗没有显示出相同的效果。

[0020] 图5: IgG 3-43抑制HRG诱导的HER3和下游靶标的磷酸化。将指定的细胞接种在6孔板中并在实验当天达到半汇合。贴壁后,对细胞进行血清饥饿过夜,并用100nM IgG 3-43或对照(利妥昔单抗,Rituximab) IgG (A、B、C)、或不同浓度的IgG 3-43或IgG 3M6 (D、E) 孵育1小时。用50ng/mL人调蛋白- $\beta 1$ 刺激经IgG处理和未经IgG处理的细胞。随后,用含有蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液裂解细胞并使用指定抗体通过蛋白质印迹法分析细胞裂解物。

[0021] 图6: IgG 3-43内化到癌细胞中并导致细胞HER3水平降低。A) 将MCF-7细胞与100nM IgG 3-43一起孵育指定的时间,并通过蛋白质印迹法分析HER3水平。HER3信号迅速下降,其中在孵育5分钟后已经看到减少。B) 将Cy5标记的IgG 3-43与MCF-7细胞在37℃下孵育指定的时间。用伴刀豆球蛋白-A对细胞膜进行染色并用4%多聚甲醛固定细胞。用转盘式显微镜拍摄经处理细胞和对照细胞的照片。蓝色:Dapi核染色;绿色:伴刀豆球蛋白-A膜染色;紫色: Cy5标记的IgG 3-43。

[0022] 图7: IgG 3-43在体外降低HRG介导的癌细胞增殖。将NCI-N87 (A)、BT-474 (B) 和MCF-7 (C) 细胞以低密度接种于96孔板中,贴壁过夜,并在低(0.2%)血清浓度和存在10ng/mL调蛋白的情况下,与10μg IgG3-43或作为对照的利妥昔单抗一起孵育一周。D) 已知FaDu细胞以自分泌方式产生调蛋白并且在没有环境调蛋白的情况下经受相同的增殖测定。IgG 3-43的滴定即使在低纳摩尔浓度下也显示出有效的生长抑制作用。

[0023] 图8: IgG 3-43抑制SCID小鼠中皮下异种移植FaDu肿瘤模型的生长。当肿瘤达到约100mm³(每周2次注射,持续3周,见线)的大小时以指定剂量对小鼠进行处理。A) 存活的Kaplan-Mayer印迹。B) 第42天的肿瘤体积。C) 至F) 用PBS (C)、30μg IgG3-43 (D)、100μg IgG3-43 (E) 或300μg IgG3-43 (F) 处理的小鼠中个体肿瘤的生长。

[0024] 图9: scDb hu225x3-43-Fc的生化表征。A) scDb-Fc融合蛋白中可变区和恒定区的示意性排列。B) 西妥昔单抗(泳道1、4)、IgG 3-43(泳道2、5)和scDb hu225x3-43-Fc(泳道3、6)在还原(泳道1至3)和非还原(泳道4至6)条件下的SDS-PAGE分析(10%PAA,考马斯染色)。C) 二聚体scDb-Fc融合蛋白的示意性结构。D) 西妥昔单抗、IgG 3-43和scDb hu225x3-43-Fc的尺寸排阻层析。

[0025] 图10: scDb hu225x3-43-Fc的结合研究。A) 通过ELISA,与西妥昔单抗和IgG 3-43相比,分析scDb hu225x3-43-Fc与固定化受体ECD蛋白(0.2μg/孔)的结合。用HRP缀合的抗人IgG (Fc特异性) 抗体检测抗体。在450nm下测量光密度。数据表示为三次独立实验的平均值±标准差。B) 通过流式细胞术分析与FaDu细胞的结合。用PE缀合的抗人Fc抗体检测所有抗体。数据表示为三次独立实验的平均值±标准差。

[0026] 图11: MCF-7细胞中HER3信号传导的抑制。在37℃下用75nM亲本IgG分子或scDb-Fc分子处理细胞(在RPMI 1640、0.2%血清中生长)1小时以及37.5nM各亲本抗体组合处理细胞1小时。使用无关IgG1作为对照。在37℃下用调蛋白(50ng/mL)刺激细胞15分钟,然后在4℃下用含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液(50mM Tris pH 7.5、150mM NaCl、10mM NaF、20mM β-甘油磷酸盐、1mM EDTA、1%NP-40、1mM Na₃VO₄、0.5mM PMSF、0.25%DOC、0.1% SDS)裂解细胞。使用抗HER3抗体、抗磷酸化-HER3 (Tyr1289) 抗体、抗Akt抗体、抗磷酸化-Akt (Thr308) 抗体、抗Erk1/2抗体、抗磷酸化-Erk1/2 (Thr202/204) 抗体和抗α-微管蛋白抗体通过免疫印迹分析细胞裂解物。所示数据代表两次独立实验。

[0027] 图12: 不同ErbB过表达细胞系中受体磷酸化的抑制。在用调蛋白(50ng/mL)或EGF(50ng/mL)刺激15分钟之前,在37℃下用50nM西妥昔单抗、IgG 3-43或scDb hu225x3-43-Fc处理不同的细胞系(A、MCF-7; B、A-431; C、NCI-N87; D、SK-BR-3; E、FaDu; F、A549)1小时。使用含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液(50mM Tris pH 7.5、150mM NaCl、10mM NaF、20mM β-甘油磷酸盐、1mM EDTA、1%NP-40、1mM Na₃VO₄、0.5mM PMSF、0.25%DOC、0.1% SDS)裂解细胞,并且使用抗EGFR抗体、抗磷酸化-EGFR (Tyr1068) 抗体、抗HER3抗体、抗磷酸化-HER3

(Tyr1289) 抗体和抗 α -微管蛋白抗体通过免疫印迹分析细胞裂解物。

[0028] 图13:FaDu细胞中受体磷酸化的抑制。在用调蛋白(50ng/mL)刺激之前,在37℃下使用连续稀释的scDb hu225x3-43-Fc、和IgG 3-43与西妥昔单抗的组合处理细胞1小时。使用含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液(50mM Tris pH 7.5、150mM NaCl、10mM NaF、20mM β -甘油磷酸盐、1mM EDTA、1%NP-40、1mM Na_3VO_4 、0.5mM PMSF、0.25%DOC、0.1%SDS)裂解细胞并且使用抗HER3抗体、抗磷酸化-HER3(Tyr1289)抗体和抗 α -微管蛋白抗体通过免疫印迹分析细胞裂解物。相对于上样对照 α -微管蛋白,对磷酸化-HER3的水平进行定量,并相对于无抗体的对照进行归一化。所示数据代表至少两次独立实验,误差线代表平均值 $\pm$ 标准差。A、量化的数据。B、代表性图像。

[0029] 图14:scDb 2-35x3-43-Fc的生化表征。A)在还原(R)和非还原(NR)条件下的scDb 2-35x3-43-Fc的SDS-PAGE分析(10%PAA,考马斯染色)。B)scDb 2-35x3-43-Fc的尺寸排阻层析。

[0030] 图15:scDb 2-35x3-43-Fc的结合研究。通过ELISA,与IgG 2-35和IgG 3-43相比,分析scDb 2-35x3-43-Fc与固定化受体-ECD蛋白(0.2 μ g/孔)的结合。用HRP缀合的抗人IgG(Fc特异性)抗体检测抗体。在450nm下测量光密度。数据表示为三次独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。

[0031] 图16:scFv3-43-Fc-scTRAIL的生化表征。A)在还原(R)和非还原(NR)条件下的SDS-PAGE分析(10%PAA,考马斯染色)。B)scFv-3-43-Fc-scTRAIL的尺寸排阻层析。

[0032] 图17:scFv3-43-Fc-scTRAIL的结合研究。通过ELISA分析与HER3(A)和人TRAIL-R2(B)的结合。将HER3或人TRAIL-R2的细胞外结构域的Fc融合蛋白作为抗原。在450nm下测量光密度。通过流式细胞术分析与Co1o205(C)和HCT-116细胞(D)的结合。数据表示为至少三次独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。

[0033] 图18:与非靶向构建体相比的细胞死亡的诱导。与相应的非靶向融合蛋白Fc-scTRAIL相比,分析了scFv3-43-Fc-scTRAIL的细胞死亡的诱导。在用培养基或硼替佐米(650nM)预孵育以使细胞对TRAIL诱导的细胞凋亡敏感后研究对Co1o205的作用。为了确认scFv3-43-Fc-scTRAIL的靶向作用,另外在200倍摩尔过量的scFv3-43-Fc存在下进行实验。数据表示为三次独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。

[0034] 图19:scDb 3-43xCD3的生化表征、结合以及IL-2测定。A)scDb构建体中可变区和恒定区的示意性排列。B)scDb构建体的示意性结构。C)在(1)还原和(2)非还原条件下的scDb 3-43xCD3的SDS-PAGE分析(12%PAA,考马斯染色)。D)scDb 3-43xCD3的尺寸排阻层析。E)使用HER3的细胞外结构域的Fc融合蛋白作为抗原,通过ELISA分析scDb 3-43xCD3的结合。用HRP缀合的抗His抗体检测蛋白质。在450nm下测量光密度。F)和G)通过流式细胞术分析与表达HER3的MCF-7(F)以及与表达CD3的Jurkat细胞(G)的结合。用PE缀合的抗His抗体检测结合的蛋白质。H)通过与表达HER3的Co1o205细胞结合的scDb 3-43xCD3激活PBMC的IL-2释放。根据制造商提供的说明书(人IL-2试剂盒,R&D),通过ELISA测定上清液中IL-2的浓度。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。

[0035] 图20:三价双特异性scDb3-43xCD3-scFv3-43融合蛋白的生化表征和结合。A)scDb-scFv构建体中可变结构域的示意性排列和结构。B)在(1)还原和(2)非还原条件下的scDb3-43xCD3-scFv3-43的SDS-PAGE分析(10%PAA,考马斯染色)。C)scDb3-43xCD3-scFv3-

43的尺寸排阻层析。D) 使用HER3的细胞外结构域的Fc融合蛋白作为抗原,通过ELISA分析scDb3-43xCD3-scFv3-43的结合。用HRP缀合的抗His抗体检测蛋白质。将scDb3-43xCD3的结合作为(针对HER3的)单价对照。在450nm下测量光密度。E) 和F) 通过流式细胞术分析与表达HER3的MCF-7 (E) 和表达CD3的Jurkat细胞 (F) 的结合。用PE缀合的抗His抗体检测结合的蛋白质。数据表示为平均值±标准差。

[0036] 图21:靶向HER2和HER3的双特异性scDb 4D5x3-43-Fc的表征。A) 在(1) 还原和非还原(2) 条件下的scDb 4D5x3-43-Fc的SDS-PAGE分析(10%PAA,考马斯染色)。B) scDb 4D5x3-43-Fc的尺寸排阻层析。C) 使用HER2或HER3的细胞外结构域的His标记蛋白作为抗原,通过ELISA分析scDb4D5x3-43-Fc的结合。用HRP缀合的抗人Fc抗体检测结合的蛋白质。在450nm下测量光密度。D) 通过流式细胞术分析与表达HER2和HER3的FaDu细胞的结合。用PE缀合的抗人Fc抗体检测结合的蛋白质。数据表示为平均值±标准差。

[0037] 图22:IgG 3-43抑制SKBR3和BT474的配体非依赖性集落形成。A) 使用经IgG 3-43 (50nM) 孵育12天的SKBR3和BT474进行集落形成测定。包括未处理的细胞(对照组) 和用曲妥单抗(trastuzumab, Tras., 针对HER2) 处理的细胞作为进一步的对照。显示为三次重复。B) 如A) 中所述孵育的SKBR3和BT474细胞所形成集落的定量。

[0038] 图23:Db3-43xhu225-Ig的生化表征和结合。A) Db3-43xhu225-Ig融合蛋白的轻链和重链的示意图。B) Db3-43xhu225-Ig融合蛋白中结构域的示意性结构。C) 在(1) 还原和(2) 非还原条件下的Db3-43xhu225-Ig融合蛋白的SDS-PAGE分析(10%PAA;考马斯染色)(M:标志物)。D) Db3-43xhu225-Ig融合蛋白的尺寸排阻层析。E) 使用EGFR或HER3的细胞外结构域的His标记的融合蛋白作为抗原,通过ELISA分析双特异性四价Db3-43xhu225-Ig的结合。用HRP缀合的抗人Fc抗体检测结合的蛋白质。将肠胃外抗体(西妥昔单抗和3-43-IgG) 作为对照。在450nm下测量光密度。F) 使用EGFR细胞外结构域的Fc融合蛋白作为第一抗原,通过ELISA分析双特异性Db3-43xhu225-Ig融合蛋白的同时结合。将连续稀释的Db3-43xhu225-Ig加入孔中。最后,将第二抗原HER3-His加入孔中。使用HRP缀合的抗His抗体检测结合的HER3-His。在450nm下测量光密度。G) 通过流式细胞术分析Db3-43xhu225-Ig与细胞的结合。将不同的肿瘤细胞系(MCF-7、SKBR-3和FaDu) 与连续稀释的双特异性Db3-43xhu225-Ig或亲本单克隆抗体(西妥昔单抗和3-43-IgG) 一起孵育。通过PE标记的抗人Fc第二抗体检测结合的抗体。使用Miltenyi MACSquant分析细胞。

[0039] 图24:SWISS小鼠中Db3-43xhu225-Ig的药代动力学。在雌性SWISS小鼠(3只小鼠) 中测定Db3-43xhu225-Ig的药代动力学特征。将25μg蛋白质静脉内注射至尾静脉中。使用EGFR-Fc或HER3-Fc融合蛋白作为包被抗原,通过ELISA测定在指定时间间隔后收集的血清样品的浓度。使用HRP缀合的抗人Fab抗体检测结合的Db3-43xhu225-Ig分子。

[0040] 图25:靶向HER3的scFv3-43-Fc-scTRAIL融合蛋白。A) 通过流式细胞术分析黑素瘤细胞的HER3-表达并通过QIFIKIT进行定量。B) scFv3-43-Fc-scTRAIL多肽的示意性组成。C) 二聚体scFv-Fc-scTRAIL融合蛋白的示意性组成。D) 通过流式细胞术评估scFv3-43-Fc-scTRAIL融合蛋白与HER3阳性细胞系A375的结合。通过抗人IgG(γ链特异性)R-PE检测细胞结合蛋白。EC₅₀值用虚线表示。计算EC₅₀值相比于Fc-scTRAIL针对相应细胞系的EC₅₀值的显著性。E) 针对细胞系A375进行与scFv3-43-Fc(抑制剂)的竞争性抑制。在用蛋白质(10nM)处理细胞之前,用200x摩尔过量的抑制剂处理细胞。通过抗人TRAIL-PE检测细胞结合蛋白。

[0041] 图26:在硼替佐米(BZB)存在或不存在的条件下靶向HER3的scFv3-43-Fc-scTRAIL的细胞死亡诱导和细胞表面上HER3抗原密度的定量分析。对于细胞死亡诱导测定,将细胞与培养基或硼替佐米预孵育30分钟,然后用scFv3-43-Fc-scTRAIL的连续稀释液处理16小时。通过结晶紫染色分析细胞活力。为了进行统计分析,将scFv3-43-Fc-scTRAIL的 EC_{50} 值与Fc-scTRAIL进行比较。如果靶向效果显著,则 EC_{50} 值以虚线表示。使用QIFIKIT测定HER3的抗原密度。因此,用与细胞死亡诱导测定中所使用的相同的硼替佐米浓度处理细胞。通过使用非配对t检验进行统计学分析(双尾, $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$, $p>0.05$ 不显著)。

[0042] 图27:scFv3-43-Fc-scTRAIL和Fc-scTRAIL的体内活性、耐受性和PK。A)用0.2纳摩尔蛋白质(相当于0.4纳摩尔scTRAIL单位;静脉注射)或PBS对具有已建立的Co1o205肿瘤的NMRI裸鼠(每组6只小鼠)进行每周两次地处理,处理三周(第14天、第18天、第21天、第25天、第28天、第32天)。用虚线表示处理。B)在第47天通过单因素方差分析对不同处理组的肿瘤体积进行统计分析,然后进行Tukey事后检验(* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; 不显著, $P>0.05$)。在最后一次处理(第32天)之后4小时和24小时测定C) ALT活性和D) 分子的血清浓度。

[0043] 图28:scDbhu225x3-43-Fc的生化表征和结合。A) scDbhu225x3-43-Fc融合蛋白的示意图。B) scDbhu225x3-43-Fc融合蛋白中结构域的示意性结构。C) 在(1)还原和(2)非还原条件下的scDbhu225x3-43-Fc融合蛋白的SDS-PAGE分析(10%PAA;考马斯染色)(M:标志物)。D) scDbhu225x3-43-Fc融合蛋白的尺寸排阻层析。E) 使用EGFR或HER3的细胞外结构域的His标记的重组蛋白作为抗原,通过ELISA分析双特异性四价scDbhu225x3-43-Fc融合蛋白的结合。用HRP缀合的抗人Fc抗体检测结合的蛋白质。将亲本抗体(hu225-IgG和3-43-IgG)作为对照。在450nm下测量光密度。

[0044] 图29:FaDu细胞中的受体信号传导抑制。在用调蛋白(50ng/mL)在37℃下刺激15分钟之前,用50nM IgG hu225、IgG 3-43、IgG hu225和IgG 3-43的组合、scDbhu225x3-43-Fc(GGGGS)、或Db3-43xhu225-Ig处理细胞1小时。使用含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液(50mM Tris pH 7.5、150mM NaCl、10mM NaF、20mM β -甘油磷酸盐、1mM EDTA、1%NP-40、1mM Na_3VO_4 、0.5mM PMSF、0.25%DOC、0.1%SDS)裂解细胞,并使用抗EGFR抗体、抗磷酸化-EGFR(Tyr1068)抗体、抗磷酸化-HER2(Tyr1221/1222)抗体、抗HER3抗体、抗磷酸化-HER3(Tyr1289)抗体、抗Akt、抗磷酸化-Akt(Thr308)抗体、抗磷酸化-Erk(Thr202/Tyr204)抗体和抗 α -微管蛋白抗体通过免疫印迹分析细胞裂解物。 α 微管蛋白1、pHER3、EGFR、Akt和Erk在膜1上, α 微管蛋白2、HER3、pEGFR、pHER2、pAkt和pErk在膜2上。

[0045] 图30:使用scDbhu225x3-43-Fc或Db3-43xhu225-Ig进行的增殖测定。将SW620、HCT116和LoVo细胞用于2D(A)和3D(B)增殖测定。将以96孔板形式的2000个细胞/孔在含有10%FCS的RPMI培养基中培养24小时(对于3D培养:1:2基质胶(Matrigel):胶原蛋白混合物、RPMI或DMEM+10%FCS+2%基质胶)。然后,用饥饿培养基(含有0.2%FCS和1%P/S的RPMI培养基)替换培养基并在培养24小时后,在存在或不存在MEK抑制剂(AZD6244,司美替尼;未经HRG刺激的:对于SW620为5nM、对于HCT116为45nM、对于LoVo为35nM;经HRG刺激的:对于SW620为10nM、对于HCT116为300nM、对于LoVo为250nM)的情况下用不同抗体(西妥昔单抗、3-43-IgG:单独的50nM或各50nM的组合;scDbhu225x3-43-Fc、Db3-43xhu225-Ig:50nM)处理细胞。孵育1小时后,用调蛋白(6ng/孔)刺激细胞或保持未刺激。在接种细胞后第8天,使用

测量发光的CelltiterGlo 2.0试剂盒(A) (每孔混合了25 μ l CelltiterGlo2.0和25 μ l饥饿培养基)或CelltiterGlo 3D试剂盒(B) (每孔混合了25 μ l CelltiterGlo 3D和25 μ l饥饿培养基)分析盘。未处理细胞(无抗体、无AZD62244、无HRG)的发光设定为100%;平均值 $\pm$ 标准差,n=2。

[0046] 图31:scDb4D5x3-43-LL的生化特征和生物活性。A) scDb4D5x3-43-LL融合蛋白的示意图。B) scDb4D5x3-43-LL融合蛋白中结构域的示意性结构。C) 在(1)还原和(2)非还原条件下的scDb4D5x3-43-LL融合蛋白的SDS-PAGE分析(12%PAA;考马斯染色)(M:标志物)。D) scDb4D5x3-43-LL融合蛋白的尺寸排阻层析。E) 使用HER2或HER3的细胞外结构域的Fc融合蛋白作为抗原,通过ELISA分析双特异性二价scDb4D5x3-43-LL融合蛋白的结合。用HRP缀合的抗His抗体检测结合的蛋白质。将肠胃外抗体(曲妥珠单抗和3-43-IgG)作为对照。在450nm下测量光密度。

[0047] 图32:MCF-7细胞中的受体信号传导抑制。在用调蛋白(50ng/mL)在37 $^{\circ}$ C下刺激15分钟之前,用50nM曲妥珠单抗、IgG 3-43、曲妥珠单抗和IgG 3-43的组合、scDb 4D5x3-43-LL-Fc、或scDb 4D5x3-43-LL处理细胞1小时。使用含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液(50mM Tris pH 7.5、150mM NaCl、10mM NaF、20mM β -甘油磷酸盐、1mM EDTA、1%NP-40、1mM Na_3VO_4 、0.5mM PMSF、0.25%DOC、0.1%SDS)裂解细胞,并使用抗EGFR抗体、抗磷酸化-EGFR(Tyr1068)抗体、抗磷酸化-HER2(Tyr1221/1222)抗体、抗HER3抗体、抗磷酸化-HER3(Tyr1289)抗体、抗Akt抗体、抗磷酸化-Akt(Thr308)抗体、抗Erk抗体、抗磷酸化-Erk(Thr202/Tyr204)抗体和抗 α -微管蛋白抗体,通过免疫印迹分析细胞裂解物。 α 微管蛋白1、pHER3、HER2、Akt和Erk在膜1上, α 微管蛋白2、HER3、pHER2、pAkt和pErk在膜2上。

[0048] 图33:针对HER3和CD3的双特异性多价抗体的生化表征和生物活性。(A+B)双特异性二价(scDb3-43xhuU3)、三价(scDb3-43xhuU3-scFv3-43)、或四价(scFv3-43-scDb3-43xhuU3-scFv3-43)融合蛋白的示意图(A)和示意性结构(B)。(C+D)通过流式细胞术分析不同双特异性融合蛋白与CD3阳性细胞系Jurkat(C)和HER3阳性细胞系MCF-7(D)的结合。将连续稀释的双特异性抗体与细胞在4 $^{\circ}$ C孵育1小时。通过PE标记的抗人Fc第二抗体检测结合的抗体。使用Miltenyi MACSquant分析细胞。E)通过与表达HER3的MCF-7细胞结合的双特异性多价抗体激活PBMC的IL-2释放。24小时后,根据制造商提供的说明书(人IL-2试剂盒,R&D),通过ELISA测定上清液中IL-2的浓度。F)用作为靶细胞的MCF7滴定双特异性多价抗体,并一起孵育1小时,然后加入人PBMC。在孵育48小时后通过MTT测定来确定细胞活力。另外,用作为靶细胞的MCF7滴定双特异性多价抗体并一起孵育而不添加PBMC。在孵育48小时后通过MTT测定来确定细胞活力并将每种蛋白质用灰色符号和虚线表示。

[0049] 图34:突变的HER3-Fc融合蛋白的分析以及与3-43-IgG的结合分析。A)在还原条件下纯化的HER3-Fc突变体(1、T335A;2、T389I;3、M406K;4、R453H;5、Y464C;6、D492H;7、K498I)的SDS-PAGE分析。用考马斯蓝对凝胶进行染色。B)用辣根过氧化物酶缀合的抗人Fab抗体检测使用了100nM IgG 3-43的IgG 3-43与经固定的野生型HER3-Fc和HER3-Fc突变体的结合,并相对所获得的野生型HER3-Fc融合蛋白的信号进行归一化。不包括突变体Y464C,因为通过SEC分析显示出聚集体形成。包括针对人HER3的结构域I的3M6-IgG作为阳性对照。

[0050] 序列列表-自由文本信息

[0051] SEQ ID NO:1 Her3的氨基酸序列(Expasy输入号:P21860)

- [0052] SEQ ID NO:2 IgG 3-43的重链可变结构域的氨基酸序列
- [0053] SEQ ID NO:3 IgG 3-43的轻链可变结构域的氨基酸序列
- [0054] SEQ ID NO:4 IgG 3-43重链的氨基酸序列
- [0055] SEQ ID NO:5 IgG 3-43轻链的氨基酸序列
- [0056] SEQ ID NO:6 scFv 3-43的氨基酸序列
- [0057] SEQ ID NO:7 PelB前导序列-scFv 3-43-c-myc-his的氨基酸序列
- [0058] SEQ ID NO:8 IgK前导序列-scDb hu225x3-43-Fc的氨基酸序列
- [0059] SEQ ID NO:9 IgK前导序列-2-35x 3-43scDb-Fc的氨基酸序列
- [0060] SEQ ID NO:10 IgK前导序列-scDb 4D5x3-43-LL-Fc的氨基酸序列
- [0061] SEQ ID NO:11 IgK前导序列-FLAG-接头-scFv3-43-Fc-scTRAIL的氨基酸序列
- [0062] SEQ ID NO:12 IgK前导序列-scDb 3-43xCD3-His的氨基酸序列
- [0063] SEQ ID NO:13 IgK前导序列-scDb 3-43xCD3-scFv 3-43-His的氨基酸序列
- [0064] SEQ ID NO:14 肽接头1的氨基酸序列:GGGS
- [0065] SEQ ID NO:15 肽接头2的氨基酸序列:GGGSGGGGS
- [0066] SEQ ID NO:16 肽接头3的氨基酸序列:GGGSGGGSGGGGS
- [0067] SEQ ID NO:17 肽接头4的氨基酸序列:GSLGSGG
- [0068] SEQ ID NO:18 肽接头5的氨基酸序列:GGSGGGT
- [0069] SEQ ID NO:19 肽接头6的氨基酸序列:GGSGGGTGSGG
- [0070] SEQ ID NO:20 肽接头7的氨基酸序列:GGGSGGGTGSGG
- [0071] SEQ ID NO:21 肽接头8的氨基酸序列:GGGSGGRASGGGSGGGGS
- [0072] SEQ ID NO:22 肽接头9的氨基酸序列:GGSGGGS
- [0073] SEQ ID NO:23 肽接头10的氨基酸序列:EFTRG
- [0074] SEQ ID NO:24 肽接头11的氨基酸序列:AAA
- [0075] SEQ ID NO:25 FLAG标签的氨基酸序列
- [0076] SEQ ID NO:26 His标签的氨基酸序列
- [0077] SEQ ID NO:27 Myc标签的氨基酸序列
- [0078] SEQ ID NO:28 PelB前导序列的氨基酸序列
- [0079] SEQ ID NO:29 IgK前导序列的氨基酸序列
- [0080] SEQ ID NO:30 IL-2前导序列的氨基酸序列
- [0081] SEQ ID NO:31 V_H 3-43x V_L hu225- C_L 的氨基酸序列
- [0082] SEQ ID NO:32 V_H hu225x V_L hu3-43- C_H1 - C_H2 - C_H3 的氨基酸序列
- [0083] SEQ ID NO:33 scDbhu225x3-43-Fc的氨基酸序列 (GGGS)
- [0084] SEQ ID NO:34 scDb4D5x3-43-LL的氨基酸序列
- [0085] SEQ ID NO:35 scFv3-43-scDb3-43xhuU3-scFv3-43的氨基酸序列

具体实施方式

[0086] 在下面详细描述本发明之前,应理解本发明不限于本文所述的特定方法、方案和试剂,因为它们可以变化。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不意图限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求的限制。除非另外定义,否则本

文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0087] 优选地,本文使用的术语如“生物技术术语的多语言词汇表:(IUPAC建议)”(Leuenberger,H.G.W,Nagel,B.和Kölbl,H.编辑(1995),Helvetica Chimica Acta,CH-4010巴塞尔,瑞士)中所述定义。

[0088] 在本说明书的全文中引用了若干文献。无论上文或下文,本文引用的每篇文献(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、说明书、GenBank检索号序列提交工具等)均通过引用整体并入本文。本文中的任何内容均不应被解释为承认本发明无权凭借在先发明而先于此类公开内容。

[0089] 定义

[0090] 词语“包括”及其变体如“包含”和“含有”将被理解为暗含包括所述整数或步骤或者整数或步骤的组但不排除任何其他整数或步骤或者整数或步骤的组。

[0091] 如本说明书和所附权利要求书中所使用的,要素前无数量词包括复数指代,除非内容另有明确说明。

[0092] 浓度、量和其他数值数据可以以“范围”格式在本文中表达或呈现。应当理解的是,这种范围格式仅仅是为了方便和简洁而使用,因此应该被灵活地解释为不仅包括明确列举为范围限制的数值,而且还包括包含在该范围内的所有单独的数值或子范围,如同明确地叙述了每个数值和子范围。作为说明,“150mg至600mg”的数值范围应该解释为不仅包括明确列举的150mg至600mg的值,而且还包括在所示范围内的单个值和子范围。因此,包括在该数值范围内的是单个值例如150mg、160mg、170mg、180mg、190mg、.....580mg、590mg、600mg以及子范围例如150mg至200mg、150mg至250mg、250mg至300mg、350mg至600mg等。同样的原理适用于仅描述一个数值的范围。此外,无论范围的广度或所描述的特征如何,都应该应用这种解释。

[0093] 当与数值结合使用时,术语“约”意味着包括下限比指示的数值小5%且上限比指示的数值大5%的范围之内的数值。

[0094] 术语“核酸”和“核酸分子”在本文中同义使用,并且理解为脱氧核糖核苷酸碱基或核糖核苷酸碱基或两者的单链或双链寡聚物或聚合物。核苷酸单体由核碱基、五碳糖(例如但不限于核糖或2'-脱氧核糖)和一个至三个磷酸基团构成。通常,核酸通过各核苷酸单体之间的磷酸二酯键形成。在本发明的背景下,术语核酸包括但不限于核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)分子,但也包括包含其他键的合成形式的核酸(例如,如Nielsen等人(Science 254:1497-1500,1991)所述的肽核酸)。通常,核酸是单链分子或双链分子并且由天然存在的核苷酸构成。单链核酸的描述也定义了(至少部分地)互补链的序列。核酸可以是单链或双链的或可以包含双链序列和单链序列的部分。示例性的双链核酸分子可以具有3'或5'单链突出端,因此不需要或不用假设在其整个长度上完全是双链的。核酸可通过生物学、生物化学或化学合成方法或本领域已知的任何方法获得,包括但不限于扩增方法和RNA的逆转录。术语核酸包括染色体或染色体区段、载体(例如,表达载体)、表达盒、裸DNA或RNA聚合物、引物、探针、cDNA、基因组DNA、重组DNA、cRNA、mRNA、tRNA、微RNA(miRNA)或小于干扰RNA(siRNA)。核酸可以是例如单链的、双链的或三链的,且不限于任何特定长度。除非另有说明,否则除了任何明确指出的序列外,特定核酸序列还包含或编码互补序列。

[0095] 核酸可以被内切核酸酶或外切核酸酶降解,特别是可以被在细胞中发现的DNA酶

和RNA酶降解。因此,为了稳定核酸以防降解从而确保在长时间内在细胞中维持高浓度的核酸,对核酸进行修饰可能是有利的。通常,可以通过在核苷酸间引入一个或多个于一个磷基团或通过核苷酸间引入一个或多个于一个非磷基团来获得这种稳定化。因此,核酸可以由非天然存在的核苷酸和/或天然存在的核苷酸的修饰形式、和/或分子骨架的改变形式构成。核酸中经修饰的核苷酸间磷酸基团和/或非磷桥包括但不限于磷酸甲酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、二硫代磷酸酯和/或磷酸酯,而非磷核苷酸间类似物包括但不限于硅氧烷桥、碳酸酯桥、羧甲基酯、乙酰氨基酯桥和/或硫醚桥。核苷酸修饰的其他实例包括但不限于:分别允许连接或预防外切核酸酶降解/聚合酶延伸的5'或3'核苷酸的磷酸化;用于共价和近共价连接的氨基、硫醇、炔烃或生物素基修饰;荧光基团和淬灭剂;和经修饰的碱基例如脱氧肌苷(dI)、5-溴脱氧尿苷(5-溴-dU)、脱氧尿苷、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、反向dT、反向双脱氧-T、双脱氧胞苷(ddC 5-甲基脱氧胞苷(5-甲基dC))、锁核酸(LNA)、5-硝基吡啶、异-dC和异-dG碱基、2'-O-甲基RNA碱基、羟甲基dC、5-羟基丁炔-2'-脱氧尿苷、8-氮杂-7-去氮鸟嘌呤和氟修饰碱基。因此,核酸也可以是人工核酸,其包括但不限于聚酰胺或肽核酸(PNA)、吗啉基核酸和锁核酸(LNA)、以及乙二醇核酸(GNA)和苏糖核酸(TNA)。

[0096] 当核酸与另一个核酸序列处于功能关系时,则核酸被“可操作地连接”。例如,如果启动子或增强子影响序列的转录,则其与编码序列可操作地连接;或者如果核糖体结合位点被定位以便于翻译,则其与编码序列可操作地连接。

[0097] 在本发明的背景下,术语“寡核苷酸”是指长度为最多约50个核苷酸的核酸序列,例如,长度为2个至约50个核苷酸的核酸序列。

[0098] 当在本发明的背景下使用时,术语“多核苷酸”是指长度大于约50个核苷酸的核酸,例如,长度为51个或更多于51个核苷酸的核酸。

[0099] 寡核苷酸和多肽通过任何合适的方法制备,包括但不限于分离现有或天然序列、DNA复制或扩增、逆转录、克隆和适当序列的限制性消化;或通过直接化学合成的方法制备,如Narang等人的磷酸三酯法(Meth.Enzymol.68:90-99,1979);Brown等人的磷酸二酯法(Meth.Enzymol.68:109-151,1979);Beaucage等人的二乙基亚磷酰胺法(Tetrahedron Lett.22:1859-1862,1981);Matteucci等人的三酯法(J.Am.Chem.Soc.103:3185-3191,1981);自动化合成方法;或美国专利第4458066号的固体支持法,或本领域技术人员已知的其他方法。

[0100] 如本文所用,术语“载体”是指能够被引入细胞中或能够将包含于其中的蛋白质和/或核酸引入细胞中的蛋白质或多核苷酸或其混合物。载体的实例包括但不限于质粒、黏粒、噬菌体、病毒或人工染色体。特别地,载体用于转运目的基因产物,例如将外源DNA或异源DNA转运至合适的宿主细胞中。载体可以包含有助于载体在宿主细胞中的自主复制的“复制子”多核苷酸序列。外源DNA定义为异源DNA,其为宿主细胞中不天然存在的DNA,其例如复制载体分子、编码可选择的或可筛选的标记、或编码转基因。进入宿主细胞后,载体可以独立于宿主染色体DNA进行复制或与宿主染色体DNA同时复制,并且可以产生载体及其插入的DNA的若干拷贝。此外,载体还可含有必需的元件,该必需的元件允许将插入的DNA转录成mRNA分子或以其他方式将插入的DNA复制成多拷贝的RNA。载体可以进一步包含调节目的基因表达的“表达控制序列”。通常,表达控制序列是多肽或多核苷酸,例如但不限于启动子、增强子、沉默子、绝缘子或抑制子。在包含编码一种或更多于一种目的基因产物的多一种多

核苷酸的载体中,表达可以被一种或多于一种表达控制序列一起控制或分别控制。更具体地,载体上包含的每种多核苷酸可以被单个表达控制序列控制,或者载体上包含的所有多核苷酸可以被单个表达控制序列控制。包含单个载体上、由单个表达控制序列控制的多核苷酸可以形成开放阅读框。一些表达载体还含有与插入的DNA相邻的序列元件,该序列元件增加表达的mRNA的半衰期和/或允许mRNA翻译成蛋白质分子。因此可以快速合成由插入的DNA编码的许多mRNA和多肽分子。

[0101] 术语“氨基酸”通常是指包含经取代或未经取代的氨基、经取代或未经取代的羧基、和一个或多于一个侧链或基团、或任何这些基团的类似物的任何单体单元。示例性侧链包括例如巯基、硒基、磺酰基、烷基、芳基、酰基、酮基、叠氮基、羟基、胍、氰基、卤素、酰肼、烯基、炔基、醚、硼酸酯、硼酸盐、磷酸、膦酰基、膦、杂环、烯酮、亚胺、醛、酯、硫代酸、羟胺或这些基团的任意组合。其他代表性氨基酸包括但不限于包含可光活化交联剂的氨基酸、金属结合氨基酸、自旋标记氨基酸、荧光氨基酸、含金属氨基酸、具有新官能团的氨基酸、共价或非共价地与其他分子相互作用的氨基酸、光笼锁 (photocaged) 和/或光致异构化的氨基酸、放射性氨基酸、包含生物素或生物素类似物的氨基酸、糖基化氨基酸、其他碳水化合物修饰的氨基酸、包含聚乙二醇或聚醚的氨基酸、经重原子取代的氨基酸、可化学裂解的和/或可光解的氨基酸、碳连接的含糖氨基酸、氧化还原活性氨基酸、含氨基硫代酸的氨基酸和包含一个或多于一个毒性部分的氨基酸。如本文所用,术语“氨基酸”包括以下二十种天然或遗传编码的 α -氨基酸:丙氨酸 (Ala或A)、精氨酸 (Arg或R)、天冬酰胺 (Asn或N)、天冬氨酸 (Asp或D)、半胱氨酸 (Cys或C)、谷氨酰胺 (Gln或Q)、谷氨酸 (Glu或E)、甘氨酸 (Gly或G)、组氨酸 (His或H)、异亮氨酸 (Ile或I)、亮氨酸 (Leu或L)、赖氨酸 (Lys或K)、甲硫氨酸 (Met或M)、苯丙氨酸 (Phe或F)、脯氨酸 (Pro或P)、丝氨酸 (Ser或S)、苏氨酸 (Thr或T)、色氨酸 (Trp或W)、酪氨酸 (Tyr或Y)、和缬氨酸 (Val或V)。在“X”残基未定义的情况下,这些残基应定义为“任何氨基酸”。这些二十种天然氨基酸的结构示于例如Stryer等人, *Biochemistry*, 第五版, Freeman and Company (2002) 中。也可以遗传编码另外的氨基酸例如硒代半胱氨酸和吡咯赖氨酸 (Stadtman (1996) “Selenocysteine,” *Annu Rev Biochem.* 65:83至100和Ibba等人 (2002) “Genetic code: introducing pyrrolysine,” *Curr Biol.* 12(13):R464-R466)。术语“氨基酸”还包括非天然氨基酸、经修饰的氨基酸 (例如,具有修饰的侧链和/或骨架) 以及氨基酸类似物。参照例如, Zhang等人 (2004) “Selective incorporation of 5-hydroxytryptophan into proteins in mammalian cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (24):8882-8887; Anderson等人 (2004) “An expanded genetic code with a functional quadruplet codon” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (20):7566-7571; Ikeda等人 (2003) “Synthesis of a novel histidine analogue and its efficient incorporation into a protein in vivo,” *Protein Eng. Des. Sel.* 16 (9):699-706; Chin等人 (2003) “An Expanded Eukaryotic Genetic Code,” *Science* 301 (5635):964-967; James等人 (2001) “Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues,” *Protein Eng. Des. Sel.* 14 (12):983-991; Kohrer等人 (2001) “Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells: A general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98

(25):14310-14315;Bacher等人(2001)“Selection and Characterization of Escherichia coli Variants Capable of Growth on an Otherwise Toxic Tryptophan Analogue,”J.Bacteriol.183(18):5414-5425;Hamano-Takaku等人(2000)“A Mutant Escherichia coli Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine,”J.Biol.Chem.275(51):40324-40328;以及Budisa等人(2001)“Proteins with {beta}-(thienopyrrolyl)alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids,”Protein Sci.10(7):1281-1292。氨基酸可以融合成肽、多肽或蛋白质。

[0102] 在本发明的背景下,术语“肽”是指通过肽键连接的氨基酸的短聚合物。其与蛋白质具有相同的化学(肽)键,但通常长度较短。最短的肽是二肽,由通过单个肽键连接的两个氨基酸组成。还可以存在三肽、四肽、五肽等。通常,肽具有至多8个、10个、12个、15个、18个或20个氨基酸的长度。肽具有氨基末端和羧基末端,除非其是环肽。

[0103] 在本发明的背景下,术语“多肽”是指通过肽键键合在一起的单个线性氨基酸链,并通常包含至少约21个氨基酸。多肽可以是由多于一条链构成的蛋白质的一条链,或者如果蛋白质由一条链构成,则多肽可以是蛋白质本身。

[0104] 在本发明的背景下,蛋白质或多肽的“一级结构”是多肽链中的氨基酸序列。蛋白质中的“二级结构”是蛋白质局部区段的一般三维形式。然而,其没有描述被认为是三级结构的三维空间中的特定原子位置。在蛋白质中,二级结构由骨架酰胺基和羧基之间的氢键模式限定。蛋白质的“三级结构”是由原子坐标确定的蛋白质的三维结构。“四级结构”是多亚基复合物中多个折叠或卷曲的蛋白质或多肽分子分子的排列。

[0105] 这里使用的术语“折叠”或“蛋白质折叠”是指蛋白质呈现其三维形状或构象的过程,即通过非共价相互作用例如但不限于氢键、金属配位、疏水力、范德华力、 π - π 相互作用和/或静电作用,引导蛋白质形成特定的三维形状的过程。因此,术语“折叠蛋白质”是指三维形状的蛋白质,例如其二级结构、三级结构或四级结构。

[0106] 本文使用的术语“片段”是指天然存在的片段(例如剪接变体)以及人工构建的片段,特别是通过基因技术手段获得的片段。通常,与亲本多肽相比,片段在其N-末端和/或C-末端和/或内部,优选在其N-末端、在其N-末端和C-末端、或在其C-末端具有至多1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、160个、170个、180个、190个、200个、210个、220个、230个、240个、250个、260个、270个、280个、290个、或300个氨基酸的缺失。

[0107] “表位”,也称为抗原决定簇,是由免疫系统,特别由是抗体、B细胞或T细胞识别的大分子区段。这种表位是能够结合抗体或其抗原结合片段的大分子的部分或区段。在本文中,术语“结合”优选涉及特异性结合。在本发明的背景下,优选术语“表位”是指由免疫系统识别的蛋白质或多蛋白的区段。表位通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或糖侧链组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象表位和非构象表位的区别在于,在变性溶剂的存在下失去与前者的结合而不失去与后者的结合。

[0108] 如本文所用,“构象表位”是指由所述大分子的三维结构形成的线性大分子(例如多肽)的表位。在本申请的背景下,“构象表位”是“非连续表位”,即是由大分子的一级序列

(例如,多肽的氨基酸序列)中的至少两个分离区域形成的大分子(例如多肽)上的构象表位。换句话说,在本发明的上下文中,如果表位由与本发明的结合部分(例如抗体或其抗原结合片段)同时结合的一级序列中的至少两个分离区域组成,其中这至少两个分离区域被不与本发明的结合部分结合的一级序列中的另一个区域中断,则表位被认为是“构象表位”。特别地,这种“构象表位”存在于多肽上,并且一级序列中的两个分离区域是与本发明的结合部分(例如抗体或其抗原结合片段)结合的两个分离的氨基酸序列,其中这至少两个分离的氨基酸序列被不与本发明的结合部分结合的一级序列中的一个或多于一个氨基酸序列中断。特别地,导致中断的氨基酸序列是包含不与结合部分结合的两个或多于两个氨基酸的连续氨基酸序列。与本发明的结合部分结合的至少两个分离的氨基酸序列的长度没有特别限制。只要所述至少两个分离的氨基酸序列中的氨基酸总数大到足以实现结合部分和构象表位之间的特异性结合,则这种分离的氨基酸序列可以仅由一个氨基酸组成。

[0109] “互补位”是识别表位的抗体的一部分。在本发明的背景下,“互补位”是识别表位的如本文所述的结合部分(例如抗体或其抗原结合片段)的一部分。

[0110] 在本发明的背景下,“肽接头”是指在空间上将复合物的两个部分例如两个肽或两个蛋白质分开的氨基酸序列。通常,这种接头由1个至100个氨基酸组成,其最小长度为至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个氨基酸,其最大长度为至少100个、95个、90个、85个、80个、75、70个、65个、60个、55个、50个、45个、40个、35个、34个、33个、32个、31个、30个、29个、28个、27个、26个、25个、24个、23个、22个、21个、20个、19个、18个、17个、16个或15个氨基酸或少于15个氨基酸。所指出的根据本发明的肽接头的优选最小和最大长度可以组合,只要这种组合在数学上是有意义的,例如,这种接头可以由1个至15个、或12个至40个、或25个至75个、或1个至100个氨基酸组成。肽接头也可以提供在连接在一起的两个部分之间的柔性。如果氨基酸很小,通常会增加这种柔性。因此,柔性肽接头包含增加含量的小氨基酸,特别是甘氨酸和/或丙氨酸,和/或亲水氨基酸例如丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。优选地,肽接头的多于20%、30%、40%、50%、60%或更多于60%的氨基酸是小氨基酸。

[0111] 如本文所用,术语“变体”应理解为与通过长度或序列的一个或多于一个变化而衍生出变体的多肽或多核苷酸相比不同的多肽或多核苷酸。衍生出多肽或多核苷酸变体的多肽或多核苷酸也称为亲本多肽或亲本多核苷酸。术语“变体”包括亲本分子的“片段”或“衍生物”。通常,“片段”的长度或大小小于亲本分子,而“衍生物”的序列与亲本分子相比存在一个或多于一个差异。变体还包括经修饰的分子,例如但不限于翻译后修饰的蛋白质(例如糖基化的、生物素化的、磷酸化的、泛素化的、棕榈酰化的或蛋白水解切割的蛋白质)和经修饰的核酸,例如甲基化的DNA。术语“变体”还包括不同分子的混合物,例如但不限于RNA-DNA杂合体。通常,变体是人工构建的,优选通过基因技术手段构建,而亲本蛋白质或亲本多核苷酸是野生型蛋白质或野生型多核苷酸、或其共有序列。然而,天然存在的变体也应理解为包括在如本文所用的术语“变体”中。此外,可用于本发明的变体还可以衍生自亲本分子的同源物、直系同源物或旁系同源物,或衍生自人工构建的变体,条件是该变体表现出亲本分子的至少一种生物活性,即该变体具有功能活性。

[0112] 特别地,术语“肽变体”、“多肽变体”、“蛋白质变体”应理解为与通过氨基酸序列中

的一个或多个变化而衍生出变体的肽、多肽或蛋白质相比不同的肽、多肽或蛋白质。衍生出肽变体、多肽变体或蛋白质变体的肽、多肽或蛋白质也称为亲本肽、亲本多肽或亲本蛋白质。此外,可用于本发明的变体还可以衍生自亲本肽、亲本多肽或亲本蛋白质的同源物、直系同源物或旁系同源物,或衍生自人工构建的变体,条件是该变体表现出亲本肽、亲本多肽或亲本蛋白质的至少一种生物活性。氨基酸序列的变化可以是氨基酸置换、插入、缺失、N-末端截短或C-末端截短、或这些变化的任意组合,并且可以在一个或几个位点处发生。肽变体、多肽变体或蛋白质变体可以在氨基酸序列中呈现出总数为至多200(至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、或200)个的变化(即置换、插入、缺失、N-末端截短和/或C-末端截短)。氨基酸置换可以是保守的和/或非保守的。替代地或另外地,如本文所用的“变体”可以通过与衍生出变体的亲本肽、亲本多肽或亲本蛋白质的一定程度的序列同一性来表征。更确切地说,本发明背景下的肽变体、多肽变体或蛋白质变体表现出与其亲本肽、亲本多肽或亲本蛋白质的至少80%的序列同一性。肽变体、多肽变体或蛋白质变体的序列同一性覆盖20个、30个、40个、45个、50个、60个、70个、80个、90个、100个或多于100个氨基酸的连续段。

[0113] 通过在比较窗口内比较两个最佳比对序列来确定“序列同一性百分比”,其中比较窗口中的序列部分可以包括与参考序列(不包括添加或缺失)相比的添加或缺失(即空位),以用于两个序列的最佳比对。百分比的计算如下:确定相同核酸碱基或氨基酸残基在两个序列中出现的位置的数量来产生匹配位置的数量,将匹配位置的数量除以比较窗口中的位置总数,并将结果乘以100以得到序列同一性的百分比。

[0114] 在两个或多个核酸或多肽序列的背景下,术语“相同”是指两个或多个序列或子序列是相同的,即包括相同的核苷酸或氨基酸序列。当比较和比对通过使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查所测量的比较窗口或者指定区域内的最大对应性时,如果序列具有相同的特定百分比的核苷酸或氨基酸残基(例如,在特定区域具有至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性),则序列彼此是“基本相同的”。这些定义还涉及测试序列的互补序列。因此,关于多肽和多核苷酸序列比较,在整个说明书中使用术语“至少80%的序列同一性”。该表达优选指与相应参考多肽或相应参考多核苷酸的至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0115] 术语“序列比较”是指将一个序列作为参考序列与测试序列进行比较的过程。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,如果需要,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。通常使用默认程序参数,或者可以指定替代参数。然后,序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性或相似性百分比。在比较两个序列并且未指定参考序列(相比于该参考序列计算序列同一性百分比)的情况下,如果没有特别指出,则参考两个待比较序列中较长的序列来计算序列同一性。如果没有特别指出的

话,若指定参考序列,则基于SEQ ID指示的参考序列的全长确定序列同一性。

[0116] 在序列比对中,术语“比较窗口”是指序列的那些连续位置区段,其与具有相同位置数量的序列的连续位置参考段进行比较。所选择的连续位置的数量可以为10个至1000个,即可以包括20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个、550个、600个、650个、700个、750个、800个、850个、900个、950个或1000个连续位置。通常,连续位置的数量为约20个至约800个连续位置、约20个至约600个连续位置、约50个至约400个连续位置、约50个至约200个连续位置、约100个至约150个连续位置。

[0117] 用于比较的序列的比对方法是本领域熟知的。可以例如通过Smith和Waterman的局部同源性算法(Adv. Appl. Math. 2:482, 1970)、通过Needleman和Wunsch的同源性比对算法(J. Mol. Biol. 48:443, 1970)、通过Pearson和Lipman的相似性搜索方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988)、通过这些算法的计算机化实现(例如, Wisconsin遗传学软件包, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. 中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)、或通过手动比对和目视检查(参见,例如, Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology (1995补充))进行用于比较的序列的最佳比对。适用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul等人(Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977)和Altschul等人(J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)中。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公开获得。该算法涉及首先通过识别查询序列中长度为W的字串来识别高分序列对(HSP),该字串在与数据库序列中的相同长度的字串比对时,匹配或满足一些正阈值分数T。T被称为邻域字串得分阈值(Altschul等人,同上)。将这些最初的邻域字串命中作为种子以用于启动搜索以找到包含它们的更长的HSP。只要可以增加累积比对分数,字命中就沿着每个序列在两个方向上延伸。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励得分;总是 >0)和N(错配残基的罚分;总是 <0)计算累积得分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积分数。在以下情况下,停止每个方向上的字命中的延伸:累积比对分数从其最大获得值下降了量X;由于一个或多于一个负评分残基比对的累积,累积评分为零或低于零;或到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)使用字长(W)为11、期望值(E)为10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 以及两条链比较作为默认值。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用字长为3、期望值(E)为10,和BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989)比对(B)为50、期望值(E)为10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 、两条链比较作为默认值。BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计学分析(参见,例如, Karlin和Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5887, 1993)。BLAST算法提供的一种相似性度量是最小和概率(P(N)),其指示了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率。例如,如果测试核酸与参考核酸的比较中的最小和概率小于约0.2,通常小于约0.01,更通常小于约0.001,则认为核酸与参考序列相似。

[0118] 优选半保守和特别保守的氨基酸置换,其中氨基酸被化学相关的氨基酸置换。典型的置换发生在脂肪族氨基酸之间、具有脂肪族羟基侧链的氨基酸之间、具有酸性残基的

氨基酸之间、酰胺衍生物之间、具有碱性残基的氨基酸或具有芳香族残基的氨基酸之间。典型的半保守和保守置换是：

氨基酸	保守置换	半保守置换
A	G; S; T	N; V; C
C	A; V; L	M; I; F; G
D	E; N; Q	A; S; T; K; R; H
E	D; Q; N	A; S; T; K; R; H
F	W; Y; L; M; H	I; V; A
G	A	S; N; T; D; E; N; Q
H	Y; F; K; R	L; M; A
I	V; L; M; A	F; Y; W; G
K	R; H	D; E; N; Q; S; T; A
[0119] L	M; I; V; A	F; Y; W; H; C
M	L; I; V; A	F; Y; W; C;
N	Q	D; E; S; T; A; G; K; R
P	V; I	L; A; M; W; Y; S; T; C; F
Q	N	D; E; A; S; T; L; M; K; R
R	K; H	N; Q; S; T; D; E; A
S	A; T; G; N	D; E; R; K
T	A; S; G; N; V	D; E; R; K; I
V	A; L; I	M; T; C; N
W	F; Y; H	L; M; I; V; C
Y	F; W; H	L; M; I; V; C

[0120] 如果新的半胱氨酸保持为游离巯基,则由A、F、H、I、L、M、P、V、W或Y变为C是半保守的。此外,技术人员将理解,空间上位置要求高的甘氨酸不应被置换,并且不应将P引入具有 α -螺旋或 β -折叠结构的蛋白质部分中。

[0121] EGF受体家族包含四个成员:EGFR (erbB1, HER1)、ErbB2 (HER2)、ErbB3 (HER3) 和 ErbB4 (HER4)。受体由包含四个结构域(I至IV)的胞外区、跨膜区、和包含酪氨酸激酶结构域的胞内区、和含有酪氨酸残基的羧基末端尾部组成 (Baselga和Swain 2009, Novel anticancer targets: revisiting ErbB2 and discovering ErbB3. Nat. Rev. Cancer 9: 463-475)。细胞外结构域I和细胞外结构域III参与配体结合,结构域II和结构域IV参与受体二聚化。结构域II通过二聚化环(即所谓的二聚化臂)介导受体-受体接触 (Garrett等人, 2002, Combination of antibody that inhibits ligand-independent HER3 dimerization and a p110 alpha inhibitor potently blocks PI3K signaling and growth of HER2+breast cancers. Cancer Res. 73:6013-6023)。属于EGF配体家族的各种配体可与受体结合。EGF、转化生长因子- α (TGF- α) 和双调蛋白与EGFR/ErbB1特异性结合。 β -细胞素 (BTC)、肝素结合EGF (HB-EGF) 和表皮调节蛋白 (EPR) 显示出双重特异性,结合EGFR/ErbB1和ErbB4两者。神经调节蛋白 (NRG) 基于其结合ErbB3和ErbB4 (NRG-1和NRG-2) 或仅结合ErbB4 (NRG-3和NRG-4) 的能力形成两个亚组。没有配体与ErbB2结合,但ErbB2是所有其他ErbB受体的优选二聚化配偶体。ErbB3具有受损的激酶活性并且仅当其与ErbB受体家族的另一成员二聚化时才获得信号传导潜力。与ErbB受体结合的配体诱导大的构象变化,导致受体同源二聚体和异二聚体的形成以及内在激酶结构域的激活,从而导致胞质尾区内特定

酪氨酸残基的磷酸化。这些磷酸化残基充当细胞内信号传导分子的停靠位点。配体决定了酪氨酸残基被磷酸化,因此招募了信号传导分子。ErbB激活后可刺激的三种主要途径为:丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径、磷脂酰肌醇3-激酶 (PI3K) - AKT途径和Janus激酶 (JAK-STAT) 途径,以上途径均负责细胞代谢、生长和存活的调节 (Hervent和De Keulenaer,2012, Molecular mechanisms of cardiotoxicity induced by ErbB receptor inhibitor cancer therapeutics.Int.J.Mol.Sci.13:12268-12286)。

[0122] 标签(或标志或标记)是能够指示另一种物质或物质复合物的存在的任何种类的物质。标记可以是与待检测物质连接或被引入待检测物质中的物质。可检测标记用于分子生物学和生物技术中,以检测例如蛋白质、酶促反应的产物、第二信使、DNA、分子的相互作用等。合适的标签或标记的实例包括荧光团、发色团、放射性标记、金属胶体、酶、或化学发光或生物发光分子。在本发明的背景下,合适的标签优选是蛋白质标签,其肽序列被遗传移植到重组蛋白质中或重组蛋白质上。蛋白质标签可以例如包括亲和标签、增溶标签、色谱标签、表位标签或荧光标签。

[0123] 将“亲和标签”附加到蛋白质上,使得可以使用亲和技术从蛋白质的天然生物来源中纯化蛋白质。这些标签包括几丁质结合蛋白 (CBP)、麦芽糖结合蛋白 (MBP) 和谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)。聚 (His) 标签是广泛使用的与金属基质结合的蛋白质标签。

[0124] 使用“增溶标签”,特别是用于在分子伴侣缺陷物种中表达的重组蛋白,以帮助蛋白质的正确折叠并防止它们沉淀。这些标签包括硫氧还蛋白 (TRX) 和聚 (NANP)。一些亲和标签具有作为增溶剂的双重作用,例如MBP和GST。

[0125] “色谱标签”用于改变蛋白质的色谱性质,以在特定的分离技术中提供不同的分辨率。通常,这些标签由聚阴离子氨基酸组成,例如FLAG-标签。

[0126] “表位标签”是因其可以在许多不同物种中可靠地产生高亲和力抗体而被选择的短肽序列。这些标签通常来自病毒基因,这解释了它们的高免疫反应性。表位标签包括V5标签、Myc标签和HA标签。这些标签特别适用于蛋白质印迹法、免疫荧光和免疫沉淀实验,但它们也可用于抗体纯化。

[0127] “荧光标签”用于给出蛋白质的视觉读出。GFP及其变体是最常用的荧光标签。GFP的更高级应用包括将其用作折叠报告物(如果折叠则发出荧光,如果未折叠则为无色)。荧光团的其他实例包括荧光素、罗丹明和磺基吲哚菁染料Cy5。

[0128] 如本文所用,术语“抗原结合蛋白”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有与抗原免疫特异性结合的抗原结合位点的分子。抗原结合蛋白还包括通过包括例如噬菌体展示以特异性结合靶分子或靶表位的技术而筛选出的免疫球蛋白样蛋白。在评估抗原结合蛋白例如抗体或其免疫功能片段的结合和/或特异性时,当过量的抗体使与配体结合的结合配偶体的量减少至少约1%至20%、20%至30%、30%至40%、40%至50%、50%至60%、60%至70%、70%至80%、80%至85%、85%至90%、90%至95%、95%至97%、97%至98%、98%至99%或多于99%(例如,在体外竞争性结合试验中所测量的)时,抗体或片段可以基本上抑制配体与其结合配偶体的结合。中和能力可以用 IC_{50} 值或 EC_{50} 值来描述。

[0129] “ IC_{50} ”值是指物质的半数最大抑制浓度,因此是物质抑制特定生物功能或生物化学功能的有效性的度量。该值通常表示为摩尔浓度。可以通过构建剂量-反应曲线并检查所

检测物质在不同浓度下的抑制作用,在功能性拮抗试验中测定药物的 IC_{50} 。或者,可以进行竞争结合试验以确定 IC_{50} 值。通常,抑制性抗体表现出50nM至1pM的 IC_{50} 值,即50nM、10nM、1nM、900pM、800pM、700pM、600pM、500pM、400pM、300pM、200pM、100pM、50pM、1pM的 IC_{50} 值。

[0130] “ EC_{50} ”值是指物质的半数最大有效浓度,因此是所述物质在指定的暴露时间后诱导基线和最大值之间一半的响应的浓度量度。它通常用作衡量药物效力的度量。因此,分级剂量响应曲线的 EC_{50} 表示观察到其最大效应的50%时物质的浓度。量子剂量响应曲线的 EC_{50} 表示在指定的暴露持续时间后50%的群体表现出响应时化合物的浓度。通常,抑制性抗体表现出50nM至1pM的 EC_{50} 值,即50nM、10nM、1nM、900pM、800pM、700pM、600pM、500pM、400pM、300pM、200pM、100pM、50pM、1pM的 EC_{50} 值。

[0131] 根据本发明的术语“结合”优选指特异性结合。术语“结合亲和力”通常是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如靶标或抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指内在结合亲和力,其反映结合对的成员(例如,抗体和抗原)之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可由解离常数(K_d)表示。“特异性结合”是指结合部分(例如抗体)与靶标,例如相比于结合另一靶标具有特异性的表位更强地结合。如果结合部分与第一靶标结合时,其解离常数(K_d)低于针对第二靶标的解离常数,则与第二靶标相比,结合部分与第一靶标更强地结合。与结合部分特异性结合的靶标的解离常数(K_d)比与结合部分非特异性结合的靶标的解离常数(K_d)低10倍以上,优选20倍以上,更优选50倍以上,甚至更优选100倍以上、200倍以上、500倍以上或1000倍以上。

[0132] 因此,术语“ K_d ”(以“摩尔/L”计量,有时缩写为“M”)意指结合部分(例如抗体或其片段)与靶标分子(例如抗原或其表位)之间的特定相互作用的解离平衡常数。亲和力可以通过本领域已知的常规方法测量,包括但不限于基于表面等离子体共振的测定(例如BIAcore测定);石英晶体微量天平测定(如Attana测定);酶联免疫吸附试验(ELISA);和竞争试验(例如RIA)。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且往往易于解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持更长时间的结合。测量结合亲和力的各种方法是本领域已知的,其中任何方法都可用于本发明的目的。

[0133] 通常,抗体以足够的结合亲和力与其靶标结合,例如,其中 K_d 值为500nM至1pM,即500nM、450nM、400nM、350nM、300nM、250nM、200nM、150nM、100nM、50nM、10nM、1nM、900pM、800pM、700pM、600pM、500pM、400pM、300pM、200pM、100pM、50pM、或1pM。

[0134] 当术语“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如,中和抗原结合蛋白或中和抗体)的背景下时,其是指如通过其中被检测的抗原结合蛋白(例如,抗体或其免疫功能片段)阻止或抑制(例如,减少)参考抗原结合蛋白(例如,配体或参考抗体)与共同抗原的特异性结合的测定所确定的抗原结合蛋白之间的竞争。许多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争,这些测定例如为:固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见,例如,Stahli等人,1983, Methods in Enzymology.2:242-253);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见,例如, Kirkland等人,1986, J. Immunol.137:3614-3619);固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见,例如,Harlow和Lane,1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press);使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见,例如,Morel等人,1988,

Molec. Jmmunol. 25:7-15); 固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA (参见,例如,Cheung等人, 1990, Virology 176:546-552); 和直接标记的RIA (Moldenhauer等人, 1990, Scand. J Immunol. 32:77-82)。通常, 此类测定涉及使用与固体表面结合的纯化抗原或携带这些中的任一种的细胞、未标记的测试抗原结合蛋白和标记的参考抗原结合蛋白。通过在测试抗原结合蛋白存在的情况下确定与固体表面或细胞结合的标记的量来测量竞争性抑制。通常, 测试抗原结合蛋白过量存在。通过竞争测定而鉴定的抗原结合蛋白 (竞争性抗原结合蛋白) 包括结合到与参考抗原结合蛋白所结合的相同表位的抗原结合蛋白, 以及结合到与参考抗原结合蛋白所结合的表位足够接近的相邻表位而发生空间位阻的抗原结合蛋白。关于确定竞争性结合的方法的其他细节在本文的实施例中提供。通常, 当竞争性抗原结合蛋白过量存在时, 其会抑制 (例如, 降低) 参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合的至少40%至45%、45%至50%、50%至55%、55%至60%、60%至65%、65%至70%、70%至75%、或75%或多于75%。在一些情况下, 结合被抑制至少80%至85%、85%至90%、90%至95%、95%至97%、或97%或多于97%。

[0135] 本文使用的术语“免疫球蛋白 (Ig)”是指赋予免疫性的免疫球蛋白超家族的糖蛋白。“表面免疫球蛋白”通过其跨膜区附着于效应细胞的膜, 并且包括分子, 例如但不限于B细胞受体、T细胞受体、I类和II类主要组织相容性复合物 (MHC) 蛋白、 β -2微球蛋白 (β 2M)、CD3、CD4和CD8。

[0136] 通常, 本文使用的术语“抗体”是指分泌的免疫球蛋白, 其缺乏跨膜区, 因此可以释放到血流和体腔中。基于人抗体所具有的重链, 将它们分成不同的同种型。人Ig重链有五种类型, 用希腊字母表示为 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 。所存在的重链类型定义了抗体类别, 即这些链分别存在于IgA、IgD、IgE、IgG和IgM抗体中, 其各自发挥不同的作用, 并指导针对不同类型抗原的适当的免疫应答。不同的重链在大小和组成上有所不同; 并且可包含约450个氨基酸 (Janeway等人 (2001) Immunobiology, Garland Science)。IgA存在于黏膜区域, 例如肠道、呼吸道和泌尿生殖道、以及唾液、眼泪和母乳中, 并且防止病原体定植 (Underdown和Schiff (1986) Annu. Rev. Immunol. 4:389-417)。IgD主要作为未暴露于抗原的B细胞上的抗原受体起作用, 并且涉及激活嗜碱性粒细胞和肥大细胞以产生抗微生物因子 (Geisberger等人 (2006) Immunology 118:429-437; Chen等人 (2009) Nat. Immunol. 10:889-898)。IgE通过其与过敏原的结合, 引发肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放组胺而参与过敏反应。IgE还涉及防止寄生虫侵害 (Pier等人 (2004) Immunology, Infection, and Immunity, ASM Press)。IgG提供大多数针对入侵病原体的基于抗体的免疫, 并且是唯一能够穿过胎盘以给予胎儿被动免疫的抗体同种型 (Pier等人 (2004) Immunology, Infection, and Immunity, ASM Press)。在人类中有四种不同的IgG亚类 (IgG1、IgG2、IgG3和IgG4), 按其在血清中的丰度顺序命名, 其中IgG1丰度最高 (约66%), 随后是IgG2 (约23%)、IgG3 (约7%) 和IgG4 (约4%)。不同IgG类别的生物学特征由相应铰链区的结构决定。IgM以单体形式和具有极高亲合力的分泌五聚体形式在B细胞表面上表达。在产生足够的IgG之前, IgM在B细胞介导 (体液) 免疫早期参与消除病原体 (Geisberger等人 (2006) Immunology 118:429-437)。抗体不仅作为单体被发现, 而且还已知形成两个Ig单元的二聚体 (例如IgA)、四个Ig单元的四聚体 (例如硬骨鱼的IgM)、或五个Ig单元的五聚体 (例如哺乳动物IgM)。抗体通常由包括两条相同的重链和两条相同的轻链的四条多肽链构成, 其通过二硫键连接并类似于“Y”形大分子。每条链包含许多

免疫球蛋白结构域,其中一些是恒定结构域而另一些是可变结构域。免疫球蛋白结构域由排列成两片的7个至9个反平行链的2层夹层组成。通常,抗体的重链包括四个Ig结构域,其中三个是恒定(CH结构域:CH1、CH2、CH3)结构域,且其中一个是可变结构域(VH)。轻链通常包含一个恒定Ig结构域(CL)和一个可变Ig结构域(VL)。VH和VL区可以进一步细分为被称为互补决定区(CDR)的高变区,和穿插在CDR之间的被称为框架区(FR)的更保守区域。每个VH和VL由三个CDR和四个FR构成,按以下顺序从氨基末端排列至羧基末端:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,该宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。

[0137] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合片段”(或简称“结合部分”)是指保留特异性结合抗原的能力的抗体的一个或多于一个片段。已经显示,抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段实现。

[0138] 如本文所用,“人抗体”包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机诱变或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变所引入的突变)。本发明的人抗体包括分离自人免疫球蛋白文库的抗体或分离自具有一种或多种人免疫球蛋白转基因并且不表达内源免疫球蛋白的动物的抗体,例如Kucherlapati和Jakobovits的美国专利第5939598号中所述。

[0139] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指单分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体显示对特定表位的单一结合特异性和亲和力。在一个实施方案中,单克隆抗体由杂交瘤产生,杂交瘤包括从非人动物如小鼠获得并融合成永生化细胞的B细胞。

[0140] 如本文所用,术语“重组抗体”包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有抗体,例如(a)从针对免疫球蛋白基因进行转基因或转染色体的动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤分离的抗体,(b)从经转化以表达抗体的宿主细胞分离的抗体,例如从转染瘤分离的抗体,(c)从重组组合抗体文库中分离的抗体,和(d)通过涉及将免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。

[0141] 术语“嵌合抗体”是指其中重链和轻链的每个氨基酸序列的一部分与衍生自特定物种或属于特定类别的抗体中的相应序列同源,而链的其余区段与另一物种或类别中的相应序列同源的那些抗体。通常,轻链和重链的可变区模拟衍生自一种哺乳动物的抗体的可变区,而恒定部分与衍生自另一种哺乳动物的抗体序列同源。这种嵌合形式的一个明显优点是:可以使用来自非人宿主生物体的易获得的B细胞或杂交瘤方便地从目前已知的来源获得可变区,从而与来自例如人细胞制剂的恒定区相组合。在可变区具有易于制备且特异性不受来源影响的优点的同时,当注射抗体时,相比于非人来源的恒定区,人的恒定区也不太可能引起来自人类对象的免疫应答。但是,所述定义不限于该特定实例。

[0142] 术语“人源化抗体”是指具有抗原结合位点的分子,该分子基本上衍生自非人物种的免疫球蛋白,其中分子的剩余免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。抗原结合位点可以包含融合到恒定结构域上的完整可变结构域或仅包含移植到可变结构域中的适当框架区上的互补决定区(CDR)。抗原结合位点可以是野生型的或通过一个或一个氨基酸置换而被修饰,例如修饰为更接近人免疫球蛋白。一些形式的人源化抗体保留所

有CDR序列(例如包含来自小鼠抗体的所有六个CDR的人源化小鼠抗体)。其他形式具有一个或多个相对于原始抗体有所改变的CDR。

[0143] 将抗体人源化的不同方法是本领域技术人员已知的,如Almagro和Fransson,2008的综述所述,其内容通过引用整体并入本文。Almagro和Fransson的综述文章简要总结如下。Almagro和Fransson区分了合理方法和经验方法。合理方法的特征在于产生工程化抗体的少数变体并评估它们的结合性质或任何其他感兴趣的性质。如果设计的变体不能产生预期的结果,则启动新一轮的设计和结合评估。合理方法包括CDR移植、表面重修、超人源化、和人字串内容优化。相反,经验方法基于人源化变体的大型文库的产生以及使用富集技术或高通量筛选的最佳克隆选择。因此,经验方法依赖于能够搜索大量抗体变体的可靠选择和/或筛选系统。体外展示技术例如噬菌体展示和核糖体展示满足这些要求并且是技术人员所熟知的。经验方法包括FR库、引导选择、框架混编和人工程化。

[0144] “二价抗体”包含两个抗原结合位点。二价抗体可以是单特异性的或双特异性的。在二价抗体是单特异性的情况下,抗体的两个结合位点具有相同的抗原特异性。“双特异性”或“双功能”抗原结合蛋白或抗体分别是具有两个不同抗原结合位点的杂合抗原结合蛋白或抗体。双特异性抗原结合蛋白或抗体的两个结合位点结合位于相同或不同抗原上的两个不同表位。双特异性抗原结合蛋白和抗体属于多特异性抗原结合蛋白抗体的类别,并且可以通过多种方法产生,这些方法包括但不限于杂交瘤的融合、IgG或IgG片段如Fab'的化学连接、或通过遗传手段。参见,例如,Songsivilai和Lachmann,1990,Clin.Exp.Immunol.79:315-321;Kostelny等人,1992,J.Immunol.148:1547-1553;Kontermann,2014,MAbs 4:182-197。

[0145] “三功能抗体”是一种双特异性抗体,其包含靶向不同抗原的两个结合位点以及可与辅助细胞上的Fc受体结合的完整Fc部分(例如单核细胞/巨噬细胞、自然杀伤细胞、树突细胞或其他)。例如,三功能抗体可以包含靶向癌细胞表面上的表位的结合位点、可以靶向T细胞表面上的表位的第二结合位点(例如CD3)、和可以结合巨噬细胞表面上的Fc受体的Fc部分。因此,这种三功能抗体能够将T细胞和巨噬细胞与肿瘤细胞连接,从而破坏肿瘤细胞。

[0146] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的称为“Fab片段”(也称为“Fab部分”或“Fab区”)的抗原结合片段(其各自具有单个抗原结合位点)和残留的“Fe片段”(也称为“Fe部分”或“Fe区”),该“Fe片段”的名称反映了其易于结晶的能力。已经确定了人IgG Fe区的晶体结构(Deisenhofer(1981)Biochemistry 20:2361-2370)。在IgG、IgA和IgD同种型中,Fe区包含两个相同的蛋白质片段,其衍生自抗体的两条重链的CH2和CH3结构域;在IgM和IgE同种型中,Fe区在每条多肽链中含有三个重链恒定结构域(CH2至CH4)。此外,较小的免疫球蛋白分子天然存在或已经被人工构建。术语“Fab'片段”是指Fab片段另外包含Ig分子的铰链区,而“F(ab')₂片段”应理解为包括化学连接或通过二硫键连接的两个Fab'片段。同时,“单结构域抗体(sdAb)”(Desmyter等人(1996)Nat.Structure Biol.3:803-811)和“纳米抗体”仅包含单个VH结构域,“单链Fv(scFv)”片段包含通过短接头肽与轻链可变结构域连接的重链可变结构域(Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85,5879-5883)。可以通过连接两个scFv(scFvA-scFvB)来设计二价单链可变片段(di-scFv)。这可以通过产生具有两个VH和两个VL区的单个肽链,从而产生“串联scFv”(V_HA-V_LA-V_HB-V_LB)来完成。另一种可能性是产生具有接头的scFv,该接头足够短而使得两个可变区不能折叠在一起,从而迫使scFv二

聚化。通常使用长度为5个残基的接头以产生这些二聚体。该类型被称为“双抗体”。 V_H 和 V_L 结构域之间的更短的接头(一个或两个氨基酸)导致单特异性三聚体即所谓的“三抗体”的形成。通过分别表达为具有 V_HA-V_LB 和 V_HB-V_LA 或 V_LA-V_HB 和 V_LB-V_HA 排列的链来形成双特异性双抗体。单链双抗体(scDb)包含 V_HA-V_LB 和 V_HB-V_LA 片段,该 V_HA-V_LB 和 V_HB-V_LA 片段通过12个至20个氨基酸,优选14个氨基酸的接头肽(P)连接,即 $(V_HA-V_LB-P-V_HB-V_LA)$ 。“双特异性T细胞衔接器(BiTE)”是由不同抗体的两种scFv组成的融合蛋白,其中一种scFv通过CD3受体与T细胞结合,另一种通过肿瘤特异性分子与肿瘤细胞结合(Kufer等人(2004) Trends Biotechnol. 22:238-244)。双亲和重靶向分子(“DART”分子)是另外通过C-末端二硫桥稳定化的双抗体。二价单链可变片段可以与一个或多个同源或异源二聚化结构域连接,以产生四价分子、六价分子、八价分子、或甚至更高价的分子。根据通过一个或多个同源或异源二聚化结构域连接的单链可变片段的各自特异性,所得的二聚体蛋白质或多聚体蛋白质将具有两种、三种、四种或多于四种特异性。

[0147] 优选分离本文所述的抗体。如本文所用的“分离的抗体”意指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。此外,分离的抗体可以基本上不含其他细胞物质和/或化学物质。在本发明的一个实施方案中,“分离的”单克隆抗体的组合涉及具有不同特异性并在明确定义的组合物中组合的抗体。

[0148] 如本文所用,术语“抗体样蛋白”是指已被工程化(例如通过环的诱变)以特异性结合靶分子的蛋白质。通常,这种抗体样蛋白包含至少一个两端附接蛋白支架的可变肽环。这种双结构约束极大地增加了抗体样蛋白的结合亲和力达到与抗体的结合亲和力相当的水平。可变肽环的长度通常为10个至20个氨基酸。支架蛋白可以是具有良好溶解性的任何蛋白质。优选地,支架蛋白是小球状蛋白质。抗体样蛋白包括但不限于亲和体、anticalin和设计的锚蛋白重复蛋白(参考综述:Binz H.K.等人(2005) Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. Nat. Biotechnol. 23(10):1257-1268)。抗体样蛋白可以衍生自大型突变体文库,例如从大型噬菌体展示文库中淘选并且可以类似于常规抗体被分离。此外,可通过组合诱变球状蛋白质中表面暴露的残基来获得抗体样结合蛋白。抗体样蛋白质有时被称为“肽适配体”。

[0149] 如本文所用,“肽模拟物”是被设计用于模拟肽的小蛋白质样链。肽模拟物通常源于对现有肽的修饰以改变分子的性质。例如,它们可能源于用来改变分子稳定性或生物活性的修饰。这可以在根据现有肽开发药物样化合物中起作用。这些修饰涉及肽的改变,这些改变不会自然发生(例如改变骨架和掺入非天然氨基酸)。

[0150] 术语“靶标”是能够被抗原结合蛋白结合的分子或分子的一部分。在一些实施方案中,靶标可具有一个或多个表位。在一些实施方案中,靶标是抗原。在短语“抗原结合蛋白”中“抗原”的使用简单地表示包含抗原的蛋白质序列可以被抗体结合。在这种情况下,不要求蛋白质是外源的或其能够诱导免疫应答。

[0151] 术语“重组”是指通过重组方法刻意修饰的氨基酸序列或核苷酸序列。如本文所用的术语“重组核酸”是指在体外形成的核酸,并且任选地通过内切核酸酶进一步操作以形成通常不存在于自然界中的核酸分子。示例性的重组核酸包括线性形式的cDNA、以及通过将通常不连接的DNA分子连接起来而在体外形成的载体。应当理解,一旦制备重组核酸并将其导入宿主细胞中,其将会非重组地复制,即使用宿主细胞的体内细胞机制而不是体外操作

机制进行复制。因此,可以随后非重组地复制重组产生的核酸。“重组蛋白”是指使用重组技术例如通过表达如上所述的重组核酸而制备的蛋白质。本文所用的术语“重组载体”包括本领域技术人员已知的任何载体,其包括质粒载体、黏粒载体、噬菌体载体如 λ 噬菌体、病毒载体如腺病毒载体或杆状病毒载体、或人工染色体载体如细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)或P1人工染色体(PAC)。所述载体包括表达载体以及克隆载体。表达载体包含质粒以及病毒载体,并且通常含有期望的编码序列和在特定宿主生物体(例如,细菌、酵母、植物、昆虫或哺乳动物)中或在体外表达系统中表达可操作地连接的编码序列所必需的适当DNA序列。克隆载体通常用于改造和扩增一些期望的DNA片段并且可能缺乏表达期望的DNA片段所需的功能序列。

[0152] 术语“宿主细胞”是指携带载体(例如质粒或病毒)的细胞。这种宿主细胞可以是原核细胞(例如细菌细胞)或真核细胞(例如真菌细胞、植物细胞或动物细胞)。宿主细胞包括单细胞原核生物和真核生物(例如细菌、酵母和放线菌)以及来自在细胞培养物中生长的高等植物或动物的单细胞。如本文所用,“重组宿主细胞”是指包含编码目的多肽片段(即根据本发明的病毒PA亚基的片段或其变体)的多核苷酸的宿主细胞。该多核苷酸可以以下列形式存在于宿主细胞内:(i)本身自由分散、(ii)掺入重组载体中、或(iii)整合到宿主细胞基因组或线粒体DNA中。重组细胞可用于表达目的多核苷酸或用于扩增本发明的多核苷酸或重组载体。术语“重组宿主细胞”包括已经用本发明的多核苷酸或重组载体转化、转染或感染的原始细胞的后代。重组宿主细胞可以是细菌细胞例如大肠杆菌细胞、酵母细胞例如酿酒酵母或巴斯德毕赤酵母、植物细胞、昆虫细胞例如SF9细胞或High Five细胞、或哺乳动物细胞。哺乳动物细胞的优选实例是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、绿色非洲猴肾(COS)细胞、人胚肾(HEK293)细胞、HELA细胞等。

[0153] 术语“个体”、“对象”或“患者”在本文中可互换使用并且是指可受益于本发明的任何哺乳动物、爬行动物或鸟类。具体而言,个体选自实验室动物(例如小鼠、大鼠或兔)、家养动物(包括例如豚鼠、兔、马、驴、牛、绵羊、山羊、猪、鸡、鸭、骆驼、猫、狗、海龟、陆龟、蛇或蜥蜴)、或灵长类动物(包括黑猩猩、倭黑猩猩、大猩猩和人类)。特别地,“个体”是指人类。

[0154] 术语“疾病”和“病症”在本文中可互换使用,指的是异常状况,尤其是异常医学状况例如疾病或损伤,其中组织、器官或个体不再能够有效地发挥其功能。通常但非必要地,疾病与指示这种疾病存在的特定症状或体征相关。因此,这些症状或体征的存在可指示患有疾病的组织、器官或个体。这些症状或体征的改变可以指示这种疾病的进展。疾病进展的典型特征在于这些症状或体征的增加或减少,这可以表明疾病的“恶化”或“改善”。疾病“恶化”的特征在于组织、器官或生物体有效发挥其功能的能力降低,而疾病“改善”的特征通常在于组织、器官或个体有效发挥其功能的能力的增加。处于“发展出疾病的风险”中的组织、器官或个体处于健康状态但显示出疾病出现的可能性。通常,发展出疾病的风险与这种疾病的早期或微弱体征或症状相关。在这种情况下,仍可通过治疗预防疾病的发作。疾病的实例包括但不限于传染病、创伤性疾病、炎性疾病、皮肤病、内分泌疾病、肠道疾病、神经失调、关节疾病、遗传疾病、自身免疫疾病和各种类型的癌症。

[0155] “肿瘤”是指通过快速不受控制的细胞增殖而生长并且在引发新生长的刺激停止后继续生长的异常细胞群或组织群。肿瘤显示出部分或完全缺乏与正常组织的结构组织化和功能协调,并且通常形成明显的组织块,其可以是良性的或恶性的。

[0156] “转移”是指癌细胞从其原始部位扩散到身体的另一部位。转移的形成是非常复杂的过程,取决于恶性细胞从原发性肿瘤脱离、侵袭细胞外基质、穿透内皮基底膜进入体腔和血管、以及随后由血液运输后浸润靶器官。最后,靶部位处新肿瘤的生长依赖于血管生成。即使在移除原发性肿瘤之后也经常发生肿瘤转移,因为肿瘤细胞或组分可以保留并发展出转移潜力。在一个实施方案中,根据本发明的术语“转移”涉及“远隔转移”,该“远隔转移”涉及远离原发性肿瘤和局部淋巴结系统的转移。

[0157] 疾病或病症的“症状”是具有这种疾病或病症的组织、器官或生物体可察觉到的疾病或病症的影响,包括但不限于组织、器官或个体的疼痛、虚弱、压痛、紧张、僵硬和痉挛,以及特定指标如生物标志物或分子标志物的存在、缺失、增加、减少。本文使用的术语“疾病”和“病症”是指异常状况,尤其是异常医疗状况,例如疾病或损伤,其中组织、器官或个体不再能够有效地执行其功能。通常但非必要地,疾病或病症与指示这种疾病或病症存在的特定症状或体征相关。疾病或病症包括但不限于自身免疫疾病、过敏性疾病、癌症类型疾病、皮肤病、内分泌疾病、血液疾病和病症、眼疾病和病症、遗传病、炎性疾病、传染病、肠道疾病、神经失调、和精神疾病。示例性的癌症类型疾病包括但不限于基底细胞癌、膀胱癌、骨癌、脑肿瘤、乳腺癌、伯基特淋巴瘤、宫颈癌、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、食道癌、视网膜母细胞瘤、胃癌、胃肠道间质瘤、神经胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、卡波西肉瘤、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、口咽癌、卵巢癌、胰腺癌、胸膜肺母细胞瘤、前列腺癌、咽喉癌、甲状腺癌和尿道癌。

[0158] 如本文所用,“治疗”或“处理”疾病或病症是指实现以下一项或多于一项:(a)减轻病症的严重程度;(b)限制或防止所治疗病症的症状发展;(c)抑制所治疗疾病的症状恶化;(d)限制或防止先前患有该病症的个体的病症复发;和(e)限制或防止先前具有症状的个体的症状复发。因此,具有治疗效果的部分通过实现上述效果(a)至(e)中的一种或多于一种来治疗疾病或病症的症状。

[0159] 如本文所用,“预防”或“防止”疾病或病症是指防止此类疾病或病症在患者中发生。

[0160] “药学上可接受的”是指由联邦或州政府的管理机构批准或在美国药典或其他公认的药典中列出的用于动物,更特别是用于人类。

[0161] 本文使用的术语“药学活性部分”被理解为是指介导药物作用的大分子或复合物(即多肽、多核苷酸或其复合物)的一部分,该药物作用包括但不限于预防、治疗和/或诊断作用。药学活性部分通常包括生物和/或化学药物,例如配体、效应分子、半衰期延长模件和成像分子。术语“配体”指与另一种分子形成复合物以实现特定生物学功能的化学或生物物质。配体包括但不限于底物、抑制剂和活化剂,例如抗原结合分子、支架蛋白、天然配体、配体结合受体片段和适配体。术语“效应分子”通常是指与蛋白质结合从而改变该蛋白质活性的小分子、肽或多肽。它们包括但不限于细胞因子、趋化因子、免疫(共)刺激分子、免疫抑制分子、死亡配体、凋亡诱导蛋白、激酶、前药转化酶、RNA酶、激动性抗体或抗体片段、拮抗性抗体或抗体片段、毒素、生长因子、激素、凝血因子、血纤蛋白溶解蛋白、模拟这些的肽、以及这些分子的片段、融合蛋白或衍生物。“半衰期延长模件”延长半衰期,例如化学或生物物质的“血浆半衰期”或“血清半衰期”。成像分子是与特定靶分子结合,从而使该分子的位置可视化的那些分子。

[0162] 术语“药物”、“药剂”在本文中可互换使用,指用于鉴别、预防或治疗疾病或病症的

物质和/或物质的组合。

[0163] 术语“制剂”和“组合物”旨在包括以包封材料作为载剂的活性化合物的制剂,该载剂提供了空间,在该空间中,含有或不含有其他载剂的活性组分被载剂包围,因此该载剂与活性化合物相关联。

[0164] “化学药物”通常理解为是指有效预防、治疗或诊断病症或疾病的人工合成的化学化合物。

[0165] “生物制品”通常被理解为是指使用生物技术手段生产的医疗药物并用于预防、治疗和/或体内诊断目的。生物制品包括但不限于肽、多肽、蛋白质和核酸(例如DNA、RNA或其杂合体)。经批准的治疗性生物制品包括但不限于激素(例如胰岛素、hGH、FSH、胰高血糖素样肽1、甲状旁腺素、降钙素、促黄体素、胰高血糖素)、生长因子(例如促红细胞生成素、G-CSF/GM-CSF、IGF-1)、干扰素(如IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ)、白细胞介素(如IL-2、IL-11、IL-1Ra)、凝血因子(例如因子VIII、因子IX、因子VIIa、凝血酶)、溶栓剂和抗凝血剂(例如t-PA、水蛭素、活化蛋白C)、酶(如 α -葡萄糖苷酶、葡萄糖脑苷脂酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳糖苷酶、尿酸氧化酶、DNA酶)、抗原结合分子例如抗体和抗体片段(例如IgG、Fab)及其融合蛋白(例如TNFR2-Fc、TMP-Fc、CTLA-4-Fc、IL-1R-Fc、LFA-3-Fc、IL-2-DT)。

[0166] 术语“活性成分”是指药物组合物或制剂中具有生物活性的物质,即提供药学价值的物质。药物组合物可包含一种或多种活性成分,它们可彼此结合地或彼此独立地起作用。活性成分可以配制成中性形式或盐形式。药学上可接受的盐包括与游离氨基形成的那些,例如但不限于衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些;以及与游离羧基形成的那些,例如但不限于衍生自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些。

[0167] 如本文所用,术语“载剂”是指药学上无活性的物质,例如但不限于稀释剂、赋形剂、表面活性剂、稳定剂、生理缓冲溶液或与治疗性活性成分一起施用的载剂。这些药物载剂可以是液体或固体。液体载剂包括但不限于无菌液体,例如水和油中的盐溶液,包括但不限于石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。也可以将盐溶液和葡萄糖水溶液及甘油溶液用作液体载剂,特别是用于可注射溶液。当静脉内施用药物组合物时,盐溶液是优选的载剂。合适的药物载剂的实例描述于E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。

[0168] 合适的药物“赋形剂”包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。

[0169] “表面活性剂”包括阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂和非离子表面活性剂,例如但不限于脱氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠、Triton X-100、和聚山梨醇酯例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯65和聚山梨醇酯80。

[0170] “稳定剂”包括但不限于甘露醇、蔗糖、海藻糖、白蛋白以及蛋白酶和/或核酸酶拮抗剂。

[0171] “生理缓冲溶液”包括但不限于氯化钠溶液、除盐水、以及合适的有机或无机缓冲溶液,例如但不限于磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、tris缓冲液(三(羟甲基)氨基甲烷)、HEPES缓冲液([4(2-羟乙基)哌嗪并]乙磺酸)或MOPS缓冲剂(3-吗啉代-1-丙磺酸)。相应缓冲液的选择通常取决于期望的缓冲液摩尔浓度。磷酸盐缓冲液适用于例如注射和输注溶液。

[0172] 术语“佐剂”是指在细胞或体液水平上增强、刺激、激活、加强或调节对组合物活性成分的免疫应答的试剂,例如免疫佐剂刺激免疫系统对实际抗原的应答,但自身没有免疫作用。这类佐剂的实例包括但不限于无机佐剂(例如无机金属盐,例如磷酸铝或氢氧化铝)、有机佐剂(例如皂苷或角鲨烯)、基于油的佐剂(例如弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂)、细胞因子(例如IL-1 β 、IL-2、IL-7、IL-12、IL-18、GM-CSF和INF- γ)、颗粒佐剂(例如免疫刺激复合物(ISCMS)、脂质体或可生物降解的微球)、病毒微体、细菌佐剂(例如单磷酸脂质A或胞壁酰肽)、合成佐剂(例如非离子嵌段共聚物、胞壁酰肽类似物、或合成脂质A)、或合成多核苷酸佐剂(例如聚精氨酸或聚赖氨酸)。

[0173] “有效量”或“治疗有效量”是足以达到预期目的的治疗剂的量。给定治疗剂的有效量将随着例如药剂的性质、给药途径、接受治疗剂的动物的大小和种类、以及给药目的等因素而变化。每种个体情况下的有效量可以由技术人员根据本领域已建立的方法凭经验确定。

[0174] 实施方案

[0175] 在第一方面,本发明提供了一种抗原结合蛋白,其特异性结合由人表皮生长因子受体3(HER3)的结构域III和结构域IV形成的构象表位。短语“由结构域III和结构域IV形成的构象表位”是指结构域III的至少一个氨基酸和结构域IV的至少一个氨基酸被抗原结合蛋白结合。因此,这并不意味着结构域III和结构域IV的所有氨基酸都是构象表位的一部分,也并不意味着两个结构域中的氨基酸都被结合。通常,抗体的表位包含12个至20个氨基酸,因此在特定实施方案中,结构域III的1个至19个氨基酸和结构域IV的1个至19个氨基酸与抗原结合蛋白结合,优选结构域III的3个至17个氨基酸和结构域IV的3个至17个氨基酸与抗原结合蛋白结合。在每种情况下,优选的是,结合的表位包含12个至20个氨基酸。

[0176] 在实施方案中,构象表位由HER3的完整结构域III和完整结构域IV形成。在替代实施方案中,构象表位由HER3的完整结构域III和结构域IV的片段形成。在替代实施方案中,构象表位由HER3的结构域III的片段和完整结构域IV形成。在替代实施方案中,构象表位由HER3的结构域III的片段和结构域IV的片段形成。

[0177] 在特定实施方案中,结构域III由根据SEQ ID NO:1的HER3的329位至531位氨基酸组成。

[0178] 在特定实施方案中,结构域IV的片段包含根据SEQ ID NO:1的HER3的532位至587位氨基酸或由根据SEQ ID NO:1的HER3的532位至587位氨基酸组成。

[0179] 在特定实施方案中,结构域IV由根据SREQ ID NO:1的HER3的532位至643位氨基酸组成。

[0180] 因此,在特定实施方案中,本发明提供了一种抗原结合蛋白,其特异性结合由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位,其中结构域III由根据SEQ ID NO:1的HER3的329位至531位氨基酸组成,并且其中结构域IV的片段包含根据SEQ ID NO:1的HER3的532位至587位氨基酸或由根据SEQ ID NO:1的HER3的532位至587位氨基酸组成。

[0181] 在特定实施方案中,本发明提供了一种抗原结合蛋白,其特异性结合由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位,其中结构域III由根据SEQ ID NO:1的HER3的329位至531位氨基酸组成,并且其中结构域IV由根据SEQ ID NO:1的HER3的532位至643位氨基酸组成。

[0182] 在第二方面,本发明提供了一种抗原结合蛋白,其与本发明第一方面的抗原结合蛋白竞争结合HER3。

[0183] 在特定实施方案中,本发明提供了一种抗原结合蛋白,其与特异性结合由人表皮生长因子受体3(HER3)的结构域IV和结构域III形成的构象表位的抗原结合蛋白竞争。

[0184] 在实施方案中,构象表位由HER3的完整结构域III和完整结构域IV形成。在替代实施方案中,构象表位由HER3的完整结构域III和结构域IV的片段形成。在替代实施方案中,构象表位由HER3的结构域III的片段和完整结构域IV形成。在替代实施方案中,构象表位由HER3的结构域III的片段和结构域IV的片段形成。

[0185] 在特定实施方案中,结构域III由根据SEQ ID NO:1的HER3的329位至531位氨基酸组成。

[0186] 在特定实施方案中,结构域IV的片段包含根据SEQ ID NO:1的HER3的532位至587位氨基酸或由根据SEQ ID NO:1的HER3的532位至587位氨基酸组成。

[0187] 在特定实施方案中,结构域IV由根据SREQ ID NO:1的HER3的532位至643位氨基酸组成。

[0188] 因此,在特定实施方案中,本发明提供了一种抗原结合蛋白,其与特异性结合由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位的抗原结合蛋白竞争,其中结构域III由根据SEQ ID NO:1的HER3的329位至531位氨基酸组成,并且其中结构域IV的片段包含根据SEQ ID NO:1的HER3的532位至587位氨基酸或由根据SEQ ID NO:1的HER3的532位至587位氨基酸组成。

[0189] 在特定实施方案中,本发明提供了一种抗原结合蛋白,其与特异性结合由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位的抗原结合蛋白竞争,其中结构域III由根据SEQ ID NO:1的HER3的329位至531位氨基酸组成,并且其中结构域IV由根据SEQ ID NO:1的HER3的532位至643位氨基酸组成。

[0190] 在特定实施方案中,第二方面的抗原结合蛋白与第一方面的抗原结合蛋白竞争结合由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位。

[0191] 在特定实施方案中,第二方面的抗原结合蛋白通过表现出比第一方面的抗原结合蛋白更大的表位亲和力来竞争结合由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位。

[0192] 在另一实施方案中,第二方面的抗原结合蛋白通过在空间上阻碍第一方面的抗原结合蛋白的结合来竞争结合由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位。在实施方案中,第二方面的抗原结合蛋白通过结合相同的表位或通过结合相邻的表位使得第一方面的抗原结合蛋白不能结合由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位,从而在空间上阻碍第一方面的抗原结合蛋白的结合。

[0193] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白表现出以下特征中的一种或多种:

[0194] (a) 抗原结合蛋白与HER3结合的 EC_{50} 值低于15nM(特别是如通过流式细胞术对表达HER3的细胞进行分析所得到的)。特别地,抗原结合蛋白与HER3结合的 EC_{50} 值低于10nM、低于5nM、低于1nM、低于500pM、低于100pM、低于50pM或低于30pM。

[0195] (b) 抗原结合蛋白与单体HER3结合的 K_D 低于100nM(特别是如通过石英晶体微天平测量、表面等离子体共振、光学干涉测量(Octet)或竞争性ELISA分析所得到的)。特别地,抗

原结合蛋白与单体HER3结合的 K_D 值低于50nM、低于30nM、或低于20nM。

[0196] (c) 抗原结合蛋白抑制调蛋白诱导的HER3磷酸化的 IC_{50} 值低于10nM。特别地,抗原结合蛋白抑制调蛋白诱导的HER3磷酸化的 IC_{50} 值低于5nM、低于1nM、低于500pM、低于300pM、低于200pM或低于100pM。特别地,抗原结合蛋白抑制调蛋白诱导的HER3磷酸化的 IC_{50} 值为80nM。

[0197] 因此,在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白:

[0198] (a) 与HER3结合的 EC_{50} 值低于15nM(如通过流式细胞术分析对表达HER3的细胞进行分析所得到的),特别是 EC_{50} 值低于10nM、低于5nM、低于1nM、低于500pM、低于100pM、低于50pM、或低于30pM;和/或

[0199] (b) 与单体HER3结合的 K_D 值低于100nM(如通过石英晶体微量天平测量分析得到的),特别是 K_D 值低于50nM、低于30nM、或低于20nM;和/或

[0200] (c) 抑制调蛋白诱导的HER3磷酸化HER3的 IC_{50} 值低于10nM,特别是 IC_{50} 值低于5nM、低于1nM、低于500pM、低于300pM、低于200pM或低于100pM,特别是 IC_{50} 值为80pM。

[0201] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白抑制以下的一种或多种:

[0202] (i) HER3与其配体的结合;

[0203] (ii) 受体活化和/或信号传导;

[0204] (iii) 诱导HER3内化;

[0205] (iv) 抑制细胞增殖;和/或

[0206] (v) 抑制肿瘤生长。

[0207] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白选自:

[0208] a) 抗体或其抗原结合片段;

[0209] b) 抗体样蛋白;和

[0210] c) 肽模拟物。

[0211] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白是抗体,其选自多克隆抗体、单克隆抗体、单价抗体、双特异性抗体、异缀合抗体、多特异性抗体、去免疫化抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体(特别是人IgG1抗体)。

[0212] 在特定实施方案中,抗体的抗原结合片段选自Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fv片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、单结构域抗体、单链Fv(scFv)抗体和单结构域抗体(VH、VL、VHH、纳米抗体、VNAR)。

[0213] 在特定实施方案中,抗体样蛋白选自脂蛋白相关凝血抑制因子(LACI-D1); affilin,例如人 γ B晶体或人泛素;半胱氨酸蛋白酶抑制剂;来自嗜酸热硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)的Sac7D;脂转运蛋白和衍生自脂转运蛋白的anticalin;设计的锚蛋白重复结构域(DARPin);Fyn的SH3结构域;蛋白酶抑制剂的Kunitz结构域;单抗体(monobody),例如纤连蛋白的第10类III结构域;adnectin;半胱氨酸结微蛋白(cysteine knot miniprotein);atrimer;evibody,例如基于CTLA4的结合物;亲和体,例如来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白A的Z结构域的三螺旋束;Trans-body,例如人转铁蛋白;四连接素,例如单体或三聚体人C型凝集素结构域;微抗体,例如胰蛋白酶抑制剂II; affilin;狢狢重复蛋白质。

[0214] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白是单特异性的、双特异性的或多特异性的。在特定实施方案中,双特异性抗原结合蛋白或多特异性抗原结合蛋白特异性结合第二细胞靶标。在特定实施方案中,第二细胞靶标选自在免疫细胞表面上表达的蛋白质,优选CD3;在肿瘤细胞表面上表达的蛋白质,特别是生长受体的细胞外区域,特别是表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)、人表皮生长因子受体(HER4)、胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)、肝细胞生长因子受体(HGFR,c-MET)及其衍生物的细胞外区域,特别是EGFR或HER2的细胞外区域。

[0215] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白是三价的或四价的。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含效应结构域,特别是与Fc受体、新生儿Fc受体(FcRn)或补体系统结合的效应结构域。在特定实施方案中,Fc结构域是与Fc γ 受体结合的结构域,特别是与CD16、CD32和/或CD64结合的结构域。在特定实施方案中,Fc结构域是激活补体系统的结构域,特别是通过结合补体系统的C1q。

[0216] 在本发明的一个优选实施方案中,抗原结合蛋白是二价的。除非另有说明,否则以下抗原结合蛋白实施方案的构型按从左侧的N末端到右侧的C末端书写。进一步优选地,抗原结合蛋白是二价的和双特异性的。在进一步优选的实施方案中,二价和双特异性抗原结合蛋白是双抗体。双特异性双抗体包含两条链,每条链包含来自不同抗体的VH和VL结构域。两个可变结构域VH和VL优选通过3个至5个残基的短接头连接。

[0217] 双抗体可以是双链双抗体(Db)或单链双抗体(scDb)。对于双链双抗体,两条链可具有构型VHA-VLB和VHB-VLA或VLA-VHB和VLB-VHA,其中A和B代表两种不同的特异性。对于单链双抗体,第一链VHA-VLB或VLA-VHB和第二链VHB-VLA或VLB-VHA共价连接。优选地,第一链和第二链通过长度为10个至15个氨基酸的肽接头连接。优选地,双特异性双抗体是scDb。优选地,抗原结合蛋白具有构型(VHA-VLB-VHB-VLA)_{scDb}。在特别优选的实施方案中,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:34的氨基酸序列,或由SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:34的氨基酸序列组成。

[0218] 在进一步优选的实施方案中,抗原结合蛋白是双特异性Db或双特异性scDb,优选双特异性scDb,它们与一种或多种scFv连接,优选与一种或两种scFv连接。两种或多种scFv可以串联连接。scFv包含相同抗体的VH和VL结构域,该相同抗体的VH和VL结构域优选与约10个至25个氨基酸的肽接头连接。scFv可具有构型VH-VL或VL-VH。优选地,一种或多种scFv具有双特异性Db或双特异性scDb的一种或两种特异性。因此,scFv优选具有构型VHA-VLA或VLA-VHA或优选具有构型VHB-VLB或VLB-VHB。在进一步优选的实施方案中,一种或多种scFv可具有与双特异性Db或双特异性scDb的特异性不同的特异性。因此,一种或多种scFv可具有构型VHC-VLC或VLC-VHC、或构型VHD-VLD或VLD-VHD等。在优选的实施方案中,抗原结合蛋白是双特异性三价抗原结合蛋白。优选地,抗原结合蛋白具有构型(VHA-VLB-VHB-VLA)_{scDb}-(VHA-VLA)_{scFv}。在特别优选的实施方案中,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列或由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成。在优选的实施方案中,抗原结合蛋白是双特异性四价抗原结合蛋白。在优选的实施方案中,抗原结合蛋白具有构型(VHA-VLA)_{scFv}-(VHA-VLB-VHB-VLA)_{scDb}-(VHA-VLA)_{scFv}。在特别优选的实施方案中,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列或由SEQ ID NO:35的氨基酸序列组成。

[0219] 在进一步优选的实施方案中,抗原结合蛋白由两个双特异性Db或双特异性scDb构

成,优选由两个双特异性scDb构成,其各自与Fc区连接,其中Fc区充当同源二聚化结构域。在优选的实施方案中,抗原结合蛋白包含构型(VHA-VLB-VHB-VLA)_{scDb}-Fc的两个部分。这两个部分可以共价结合或非共价结合。在特别优选的实施方案中,抗原结合蛋白包含两个部分,其包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:33的氨基酸序列或由SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成。

[0220] 在双特异性抗原结合蛋白的另一个优选实施方案中,第二特异性的另外的VH结构域和VL结构域分别与轻链和重链连接,其中重链的Fc区充当二聚化结构域。不同特异性的两个VH结构域和两个VL结构域可以分别以各种组合与轻链和重链连接,从而产生不同的构型。在抗原结合蛋白的优选实施方案中,轻链具有构型VHA-VHB-CLk且重链具有构型VLA-VLB-CH1-CH2-CH3。一些构型允许VH和VL结构域的交叉配对。在优选的实施方案中,轻链具有构型VHA-VLB-CLk且重链具有构型VHB-VLA-CH1-CH2-CH3。在优选的实施方案中,轻链具有构型VLA-VLB-CLk且重链具有构型VHB-VHA-CH1-CH2-CH3。在特别优选的实施方案中,抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:31的链和SEQ ID NO:32的链。

[0221] 在上述实例中,字母“A”、“B”、“C”和“D”表示本发明的抗原结合蛋白的抗原特异性。本发明的每种抗原结合蛋白内的“A”、“B”、“C”和“D”中的至少一个特异性结合由人表皮生长因子受体3(HER3)的结构域III和结构域IV形成的构象表位。其他特异性可以相同或不同。优选的第二特异性和其他特异性概述如下。

[0222] Brinkmann U和Kontermann RE,MABS,2017,9(2),182-212中描述了双特异性抗体的其他实例并且其特别地并入本文。

[0223] 在特定实施方案中,本发明的抗原结合蛋白包含多聚化结构域。优选的实例是二聚化结构域、三聚化结构域或四聚化结构域。如果两个蛋白质链相互结合,则每个蛋白质链包含至少一个能够结合另一蛋白质中的至少一个二聚化结构域的二聚化结构域。因此,如果抗原结合蛋白包含三个蛋白质链,则每个蛋白质链包含至少一个能够与相应的其他三聚化结构域相互作用的三聚化结构域。在一个特定的实施方案中,二聚化结构域选自IgM(MHD2)或IgE(EHD2)的重链结构域2(CH₂)、免疫球蛋白Fc区、IgG或IgA的重链结构域3(CH₃)、IgM或IgE的重链结构域4(CH₄)、Fab、Fab2、亮氨酸拉链基序、芽孢杆菌RNA酶-barstar二聚体、微抗体和ZIP微抗体;三聚化结构域选自生腱蛋白C(TNC)、胶原XVIII的C末端非胶原结构域(NC1)的三聚化结构域、Fab3样分子和三双-微抗体(TriBi-minibody);或者四聚化结构域选自p53的四聚化结构域、一般对照蛋白4(GCN4)的四聚化结构域、VASP(血管扩张刺激磷蛋白)的四聚化结构域、串联双抗体和双-双抗体。在一些实施方案中,优选使用异源二聚化结构域,特别是如果要使用具有不同抗原特异性的两个蛋白质链。

[0224] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含ADCC改善的重链序列。

[0225] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含:

[0226] (a) 含有根据SEQ ID NO:2的32位至37位氨基酸的CDRH1及其含有一个氨基酸置换的变体;含有根据SEQ ID NO:2的52位至69位氨基酸的CDRH2及其含有一个氨基酸置换的变体;和含有根据SEQ ID NO:2的102位至112位氨基酸的CDRH3及其含有一个氨基酸置换的变体,和/或

[0227] (b) 含有根据SEQ ID NO:3的23位至33位氨基酸的CDRL1及其含有一个氨基酸置换

的变体;含有根据SEQ ID NO:3的49位至55位氨基酸的CDRL2及其含有一个氨基酸置换的变体;和含有根据SEQ ID NO:3的88位至98位氨基酸的CDR3L及其含有一个氨基酸置换的变体。

[0228] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含:

[0229] (a) 含有根据SEQ ID NO:2的1位至31位氨基酸的FRH1及其具有至少80%、优选90%、更优选至少95%序列同一性的变体;含有根据SEQ ID NO:2的38位至51位氨基酸的FRH2及其具有至少80%、优选90%、更优选至少95%序列同一性的变体;含有根据SEQ ID NO:2的70位至101位氨基酸的FRH3及其具有至少80%、优选90%、更优选至少95%序列同一性的变体;和含有根据SEQ ID NO:2的113位至123位氨基酸的FRH4及其具有至少80%、优选90%、更优选至少95%序列同一性的变体,和/或(b) 含有根据SEQ ID NO:3的1位至22位氨基酸的FRL1及其具有至少80%,优选90%,更优选至少95%序列同一性的变体;含有根据SEQ ID NO:3的34位至48位氨基酸的FRL2及其具有至少80%,优选90%,更优选至少95%序列同一性的变体;含有根据SEQ ID NO:3的56位至87位氨基酸的FRL3及其具有至少80%,优选90%,更优选至少95%序列同一性的变体;和含有根据SEQ ID NO:3的99位至109位氨基酸的FRL4及其具有至少80%,优选90%,更优选至少95%序列同一性的变体。

[0230] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含:

[0231] (a) 重链,其包含:由根据SEQ ID NO:2的32位至37位氨基酸组成的CDRH1及其含有一个氨基酸置换的变体;由根据SEQ ID NO:2的氨基酸52位至69位组成的CDRH2及其含有一个氨基酸置换的变体;和由根据SEQ ID NO:2的102位至112位氨基酸组成的CDRH3及其含有一个氨基酸置换的变体;由根据SEQ ID NO:2的1位至31位氨基酸组成的FRH1及其具有至少80%,优选90%,更优选至少95%序列同一性的变体;包含根据SEQ ID NO:2的38位至51位氨基酸的FRH2及其具有至少80%,优选90%,更优选至少95%序列同一性的变体;包含根据SEQ ID NO:2的70位至101位氨基酸的FRH3及其具有至少80%,优选90%,更优选至少95%序列同一性的变体;和包含根据SEQ ID NO:2的113位至123位氨基酸的FRH4及其具有至少80%,优选90%,更优选至少95%序列同一性的变体;

[0232] (b) 轻链,其包含:由根据SEQ ID NO:3的23位至33位氨基酸组成的CDRL1及其包含一个氨基酸置换的变体;包含根据SEQ ID NO:3的49位至55位氨基酸的CDRL2及其包含一个氨基酸置换的变体;和包含根据SEQ ID NO:3的88位至98位氨基酸的CDR3L及其包含一个氨基酸置换的变体;包含根据SEQ ID NO:3的1位至22位氨基酸的FRL1及其具有至少80%,优选90%,更优选至少95%序列同一性的变体;包含根据SEQ ID NO:3的34位至48位氨基酸的FRL2及其具有至少80%,优选90%,更优选至少95%序列同一性的变体;包含根据SEQ ID NO:3的56位至87位氨基酸的FR3L及其具有至少80%,优选90%,更优选至少95%序列同一性的变体;和包含根据SEQ ID NO:3的99位至109位氨基酸的FR4L及其具有至少80%,优选90%,更优选至少95%序列同一性的变体。

[0233] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含可变结构域,该可变结构域包含根据SEQ ID NO:2的1位至123位氨基酸的重链或其与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80%,优选90%,更优选至少95%同一性的变体。

[0234] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含可变结构域,该可变结构域包含根据SEQ ID NO:3的1位至109位氨基酸的轻链或其与SEQ ID NO:3的

氨基酸序列具有至少80%,优选90%,更优选至少95%同一性的变体。

[0235] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含可变结构域,该可变结构域包含根据SEQ ID NO:2的1位至123位氨基酸的重链和根据SEQ ID NO:3的1位至109位氨基酸的轻链或其与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80%,优选90%,更优选至少95%同一性的变体。

[0236] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含重链,该重链包含根据SEQ ID NO:4的1位至453位氨基酸或其与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少80%,优选90%,更优选至少95%同一性的变体,或由根据SEQ ID NO:4的1位至453位氨基酸或其与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少80%,优选90%,更优选至少95%同一性的变体组成。

[0237] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含轻链,该轻链包含根据SEQ ID NO:5的1位至215位氨基酸或其与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80%,优选90%,更优选至少95%同一性的变体,或由根据SEQ ID NO:5的1位至215位氨基酸或其与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80%,优选90%,更优选至少95%同一性的变体组成。

[0238] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含重链和轻链,该重链包含根据SEQ ID NO:4的1位至453位氨基酸或其与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少80%,优选90%,更优选至少95%同一性的变体,或由根据SEQ ID NO:4的1位至453位氨基酸或其与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少80%,优选90%,更优选至少95%同一性的变体组成;该轻链包含根据SEQ ID NO:5的1位至215位氨基酸或其与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80%,优选90%,更优选至少95%同一性的变体,或由根据SEQ ID NO:5的1位至215位氨基酸或其与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80%,优选90%,更优选至少95%同一性的变体组成。

[0239] 在特定实施方案中,抗原结合蛋白还包含接头,特别是肽接头。在特定实施方案中,肽接头的长度为5个至40个氨基酸(即1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个氨基酸),特别是5个至20个氨基酸(即1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个氨基酸),特别是8个至15个氨基酸(即8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个氨基酸)。

[0240] 特别优选的是柔性肽接头。柔性接头由氨基酸构成,而没有阻碍氨基酸链的旋转或弯曲的大的侧链。柔性接头优选包含G、S、T和A残基。在特定实施方案中,柔性接头肽的至少50%的氨基酸由选自G、S、T和A的氨基酸组成。在特定实施方案中,接头的至少60%、70%、80%、90%、95%或100%的氨基酸由选自G、S、T和A的氨基酸组成。本领域描述了大量的肽接头(Robinson和Sauer,1998;Völkel等人,2001;Kavoosi等人,2007;Watanabe等人,2011)。在特定的实施方案中,肽接头包括但不限于接头肽1:GGGGS(SEQ ID NO:14)、接头肽2:GGGSGGGGS(SEQ ID NO:15)、接头肽3:GGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:16)、接头肽4:GSLGGSGG(SEQ ID NO:17)、接头肽5:GGGSGGGT(SEQ ID NO:18)、接头肽6:GGGSGGGTGS(SEQ ID NO:19)、接头肽7:GGGSGGGTGSGG(SEQ ID NO:20)、接头肽8:GGGSGGRASGGGSGGGGS(SEQ

ID NO:21)、接头肽9:GGGSGGGS (SEQ ID NO:22)、接头肽10:EFTRG (SEQ ID NO:23)、和接头肽11:AAA (SEQ ID NO:24)、或其多聚体、其衍生物和其片段。

[0241] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含可变结构域,该可变结构域包含根据SEQ ID NO:2的1位至123位氨基酸的重链、根据SEQ ID NO:3的1位至109位氨基酸的轻链或其与氨基酸序列具有至少80%同一性的变体、和肽接头,特别是根据SEQ ID NO:16的肽接头。

[0242] 在特定实施方案中,肽接头位于可变结构域的重链和轻链之间。

[0243] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:6的scFv或由根据SEQ ID NO:6的scFv组成。

[0244] 在进一步优选的实施方案中,一个或多个接头包含一个或多个切割位点,即一个或多个序列区域,其中接头序列可以通过一个或多个肽键的分裂而被化学切割或酶促切割。酶促切割可以通过蛋白水解酶实现,该蛋白水解酶包括但不限于限制性内切核酸酶(例如I型、II型、III型、IV型或人工限制酶)和内切肽酶或外切肽酶或内切蛋白酶或外切蛋白酶(例如丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶)。在特别优选的实施方案中,一个或多个切割位点包含一个或多个内肽酶切割位点,即其中序列被内肽酶切割或可被内肽酶切割,该内切肽酶例如但不限于胰蛋白酶、胃蛋白酶、弹性蛋白酶、凝血酶、胶原蛋白酶、弗林蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、内肽酶V8、和/或组织蛋白酶。

[0245] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白还包含一种或多种标签。在特定实施方案中,一种或多种标签选自亲和标签、增溶标签、色谱标签、表位标签和荧光标签。在特定实施方案中,标签选自FLAG标签 (SEQ ID NO:25)、His标签 (SEQ ID NO:26)和Myc标签 (SEQ ID NO:27)。

[0246] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白还包含前导序列。在特定实施方案中,前导序列可以是用于细菌表达的PelB前导序列(特别是根据SEQ ID NO:28)、用于在哺乳动物细胞中表达的IgK前导序列(特别是根据SEQ ID NO:29)或IL-2前导序列 (SEQ ID NO:30)。

[0247] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:6的scFv、Myc标签和His标签。在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:7的23位至310位氨基酸或由根据SEQ ID NO:7的23位至310位氨基酸组成。

[0248] 在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:6的scFv、Myc标签、His标签以及前导序列,特别是PelB前导序列、IgGK前导序列或IL-2前导序列。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:7的1位至310位氨基酸或由根据SEQ ID NO:7的1位至310位氨基酸组成。

[0249] 在本发明第一方面或第二方面的实施方案中,抗原结合蛋白是针对由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位和EGFR的双特异性抗原结合蛋白。在特定实施方案中,抗原结合蛋白是单链双抗体,其中一个抗原结合位点针对如上文详细描述由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位,且第二抗原结合位点针对EGFR。在特定实施方案中,针对EGFR的第二抗原结合位点衍生自EGFR特异性人源化抗体hu225,即人源化形式的C225(西妥

昔单抗,爱必妥)。在进一步的实施方案中,抗原结合蛋白是三功能的并且还包含Fc结构域,特别是被Fc γ 受体识别的Fc结构域,Fc域受体特别是CD16、CD32和/或CD64。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:8的23位至738位氨基酸的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:8的23位至738位氨基酸的氨基酸序列组成。在进一步的实施方案中,抗原结合蛋白还包含前导序列,特别是IgK前导序列。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:8的1位至738位氨基酸的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:8的1位至738位氨基酸的氨基酸序列组成。

[0250] 在本发明第一方面或第二方面的实施方案中,抗原结合蛋白是针对由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位和HER2的双特异性抗原结合蛋白。在特定实施方案中,抗原结合蛋白是单链双抗体,其中一个抗原结合位点针对如上文详细描述由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位,且第二抗原结合位点针对HER2。在特定实施方案中,第二抗原结合位点来自HER2特异性抗体的2位至35位。在进一步的实施方案中,抗原结合蛋白是三功能的并且还包含Fc结构域,特别是被Fc γ 受体识别的Fc结构域,Fc域受体特别是CD16、CD32和/或CD64。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:9的23位至744位氨基酸的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:9的23位至744位氨基酸的氨基酸序列组成。在进一步的实施方案中,抗原结合蛋白还包含前导序列,特别是IgK前导序列。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:9的1位至744位氨基酸的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:9的1位至744位氨基酸的氨基酸序列组成。

[0251] 在本发明第一方面或第二方面的实施方案中,抗原结合蛋白包含针对由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位和HER2的双特异性抗原结合蛋白。在特定实施方案中,抗原结合蛋白是单链双抗体,其中一个抗原结合位点针对如上文详细描述由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位,且第二抗原结合位点针对HER2。在特定实施方案中,针对HER2的第二抗原结合位点衍生自HER2特异性抗体4D5(曲妥珠单抗,赫赛汀)。在进一步的实施方案中,抗原结合蛋白是三功能的并且还包含Fc结构域,特别是被Fc γ 受体识别的Fc结构域,Fc域受体特别是CD16、CD32和/或CD64。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:10的23位至477位氨基酸的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:10的23位至477位氨基酸的氨基酸序列组成。在进一步的实施方案中,抗原结合蛋白还包含前导序列,特别是IgK前导序列。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:10的1位至477位氨基酸的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:10的1位至477位氨基酸的氨基酸序列组成。

[0252] 在本发明第一方面或第二方面的实施方案中,抗原结合蛋白包含针对由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位的抗原结合位点,并且还包含单链TRAIL(scTRAIL)结构域。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含针对如上文详细描述由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位的抗原结合位点。在特定实施方案中,抗原结合蛋白还包含scFv的3位至43位氨基酸,特别是根据SEQ ID NO:6的scFv的3位至43位氨基酸。在特定实施方案中,抗原结合蛋白还包含Flag标签。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:11的23位至1020位氨基酸的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:11的23位至1020位氨基酸的氨基酸序列组成。在进一步的实施方案中,抗原结合蛋白还包含前导序列,特别是IgK前导序列。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:11的1位至1020位氨基酸的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:11的1位至1020位氨基酸的氨基酸序列组成。

[0253] 在本发明第一方面或第二方面的实施方案中,抗原结合蛋白包含针对由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位和CD3的双特异性抗原结合位点。在特定实施方案中,抗原结合蛋白是单链双抗体,其中一个抗原结合位点针对如上文详细描述由HER3的结构域III和结构域IV形成的构象表位,且第二抗原结合位点针对CD3。在特定实施方案中,针对CD3的第二抗原结合位点衍生自CD3特异性人源化形式的UCHT1。在特定实施方案中,抗原结合蛋白还包含His标签。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:12的23位至515位氨基酸的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:12的23位至515位氨基酸的氨基酸序列组成。在进一步的实施方案中,抗原结合蛋白还包含前导序列,特别是IgK前导序列。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:12的1位至515位氨基酸的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:12的1位至515位氨基酸的氨基酸序列组成。

[0254] 在特定实施方案中,抗原结合蛋白还包含scFv的3位至43位氨基酸,特别是根据SEQ ID NO:6的scFv的3位至43位氨基酸。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:13的23位至776位氨基酸的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:13的23位至776位氨基酸的氨基酸序列组成。在进一步的实施方案中,抗原结合蛋白还包含前导序列,特别是IgK前导序列。在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含根据SEQ ID NO:13的1位至776位氨基酸的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:13的1位至776位氨基酸的氨基酸序列组成。

[0255] 在特定实施方案中,抗原结合蛋白包含选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7的23位至310位氨基酸、SEQ ID NO:8的23位至738位氨基酸、SEQ ID NO:9的23位至724位氨基酸、SEQ ID NO:10的23位至744位氨基酸、SEQ ID NO:11的23位至1020位氨基酸、SEQ ID NO:12的23位至515位氨基酸和SEQ ID NO:13的23位至776位氨基酸的氨基酸序列或由选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7的23位至310位氨基酸、SEQ ID NO:8的23位至738位氨基酸、SEQ ID NO:9的23位至724位氨基酸、SEQ ID NO:10的23位至744位氨基酸、SEQ ID NO:11的23位至1020位氨基酸、SEQ ID NO:12的23位至515位氨基酸和SEQ ID NO:13的23位至776位氨基酸的氨基酸序列组成。

[0256] 在特定的实施方案中,抗原结合蛋白包含选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13的氨基酸序列或由选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成。

[0257] 本领域技术人员将理解的是,特别是CDR、高变区和可变区的序列可以被修饰而不丧失结合HER3的能力。例如,CDR区将与本文指定的区域相同或高度同源。对于“高度同源”,预期可在CDR中进行1个至5个,优选1个至4个,例如1个至3个或1个或2个置换、缺失或添加。另外,可以修饰高变区和可变区,使得它们与本文具体公开的区域显示出高度的同源性。

[0258] 此外,根据本发明,可能需要修饰本文所述的氨基酸序列,特别是人重链恒定区的氨基酸序列,以使序列适应期望的同种异型,例如存在于高加索种群的同种异型。

[0259] 本发明还包含抗体,其中抗体的Fc区已被改变,以改变抗体的功能或药代动力学特性。这种改变可导致C1q结合和CDC的减少或增加、或Fc γ R结合和ADCC的减少或增加。例如,可以在重链恒定区的一个或多于一个氨基酸残基中进行置换,从而引起效应分子功能的改变,同时保留与经修饰的抗体相比的结合抗原的能力,参见美国专利第5624821号和美国专利第5648260号。

[0260] 可以通过修饰Ig恒定结构域或Ig样恒定结构域的补救受体表位,使得分子不包含完整的CH2结构域或完整的Ig Fc区来改善抗体的体内半衰期,参见美国专利第6121022号和美国专利第6194551号。此外,可以通过在Fc区进行突变,例如通过在第252位用苏氨酸置换亮氨酸、在第254位用苏氨酸置换丝氨酸、或是在第256位用苏氨酸置换苯丙氨酸来进一步增加体内半衰期,参见美国专利第6277375号。

[0261] 此外,可以修饰抗体的糖基化模式以改变抗体的效应分子功能。例如,可以在转染瘤中表达抗体,该转染瘤不添加通常与Fc区的第297位Asn连接的岩藻糖单元,以增强Fc区对Fc-受体的亲和力,这转而将导致在NK细胞存在下抗体的ADCC增加,参考Shield等人(2002) JBC, 277:26733。此外,可以进行半乳糖基化修饰以改变CDC。

[0262] 因此,在本发明第一方面或第二方面的特定实施方案中,变体显示出与给定氨基酸序列至少85%的序列同一性。在特定实施方案中,变体显示出与给定氨基酸序列至少90%、95%或98%的序列同一性。

[0263] 在第三方面,本发明提供了一种融合蛋白,其包含如上详细描述的本发明第一方面和/或第二方面的抗原结合蛋白并且还包含至少一个药学活性部分。

[0264] 在特定实施方案中,至少一个药学活性部分是化学药物或生物学部分。在其中至少一个药学活性部分是生物学部分的实施方案中,优选这种生物学部分是肽、多肽、蛋白质和/或核酸(例如DNA、RNA或其杂合体)。在特定实施方案中,这种生物学部分选自激素(例如胰岛素、hGH、FSH、胰高血糖素样肽1、甲状旁腺素、降钙素、促黄体素、胰高血糖素);生长因子(例如促红细胞生成素、血小板生成素、G-CSF/GM-CSF、IGF-1);细胞因子(例如TNF、TRAIL、FasL、TGF- β),例如干扰素(例如IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ)和白细胞介素(例如IL-2、IL-11、IL-1Ra);共刺激和免疫刺激配体(例如4-1BBL、CD40L、CD27L、OX40L、GITRL、LIGHT);凝血因子(例如因子VIII、因子IX、因子VIIa、凝血酶);溶栓剂和抗凝血剂(例如t-PA、水蛭素、活化蛋白C);酶(例如 α -葡萄糖苷酶、葡萄糖脑苷脂酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳糖苷酶、尿酸氧化酶、DNA酶);抗原结合分子,例如抗体和抗体片段(例如IgG、Fab、Fc);及其融合蛋白(例如TNFR2-Fc、TMP-Fc、CTLA-4-Fc、IL-1R-Fc、LFA-3-Fc、IL-2-DT)。

[0265] 在特定实施方案中,至少一个药学活性部分选自配体、效应分子、半衰期延长模件和成像分子。

[0266] 在特定实施方案中,配体是与另一分子形成复合物以实现特定生物学功能的任何化学或生物学物质,例如底物、抑制剂和活化剂。特别地,配体包括但不限于抗原结合分子、支架蛋白、天然配体(例如EGF、VEGF、PDGF、FGF、EPO、TPO、TGF- β 、TNF、TRAIL)、配体结合受体片段(例如TNFR1、TNFR2、VEGFR、CTLA-4、LFA-3、BR3、CD95R、IL-1R、FGFR1)和适配体(例如抗凝血酶、抗FIXa、抗C3b、抗VEGF、抗CD40L)。支架蛋白是关键信号传导途径的调节剂,包括但不限于KSR、MEKK1、BCL-10、MAPK、AHNAK-1、HOMER、Pellino、NLRP、DLG1、亲棘蛋白、植物FLU调节蛋白。

[0267] 在特定实施方案中,抗原结合分子选自抗体片段、Fab片段(不包括来自IgM或IgE的那些)、Fab'片段(不包括来自IgM或IgE的那些)、重链抗体、单结构域抗体(sdAb)、重链抗体的可变结构域、VHH、纳米抗体、单链可变片段(scFv)、串联scFv、双特异性T细胞衔接器(BITE)、双抗体、单链双抗体、DART分子、三重体、纳米抗体、替代性支架蛋白(例如DARPin、Anticalin、Affibody分子、微抗体、单抗体、Fynomer、Adnetin、四连接素、Kunitz结构域、

Affilin、Avimer) 和它们的融合蛋白。优选地, 抗原结合分子与药学上相关的抗原结合, 即与适合于预防、诊断和/或治疗疾病、或者疾病或病症的症状的抗原结合。在优选的实施方案中, 该疾病是癌症类型疾病。优选地, 抗原结合分子识别肿瘤相关抗原, 例如但不限于 EGFR、HER2、HER4、癌胚抗原 (CEA)、甲胎蛋白 (AFP)、CA-125、上皮肿瘤抗原 (ETA)、酪氨酸酶、黑色素瘤相关抗原 (MAGE)、ras 和 p53 的异常产物、雌激素受体、5- α -还原酶、前列腺素-内过氧化物合酶 2、VEGFR、整合素受体家族、成纤维细胞活化蛋白、半乳糖凝集素、EpCAM、CEA、CD44、CD44v、CD2、CD5、CD7、CD19、CD20、CD21、CD22、CD24、CD25、CD30、CD33、CD38、CD40、CD52、CD56、CD71、CD72、CD73、CD105、CD117、CD123、密封蛋白、c-Met、PDGFR、IGF1-R、HMW-MAA、TAG-72、GD2、GD3、GM2、叶酸受体、Le^y、MUC-1、MUC-2、PSMA、PSCA 和 uPAR。在优选的实施方案中, 设想抗原结合分子不是来自 IgM 或 IgE 的 Fab 或 Fc 片段。

[0268] 在特定实施方案中, 抗原结合分子是 scFv, 优选抗 HER2 scFv 或抗 EGFR scFv。

[0269] 在特定实施方案中, 效应分子, 即与蛋白质结合从而改变该蛋白质活性的小分子、肽或多肽, 包括但不限于细胞因子、趋化因子、免疫 (共) 刺激分子、免疫抑制分子、死亡配体、凋亡诱导蛋白、酶 (例如激酶)、前药转化酶、RNA 酶、激动性抗体或抗体片段、拮抗性抗体或抗体片段、毒素、生长因子、激素、凝血因子、血纤蛋白溶解蛋白、模拟这些的肽、以及这些分子的片段、融合蛋白或衍生物。

[0270] 在特定实施方案中, 细胞因子是白细胞介素和/或干扰素。白细胞介素 (IL) 包括但不限于白细胞介素-1、白细胞介素-2、白细胞介素-3、白细胞介素-4、白细胞介素-5、白细胞介素-6、白细胞介素-7、白细胞介素-8、白细胞介素-9、白细胞介素-10、白细胞介素-11、白细胞介素-12、白细胞介素-13、白细胞介素-14、白细胞介素-15、白细胞介素-16、白细胞介素-17、白细胞介素-18、白细胞介素-19、白细胞介素-20、白细胞介素-21、白细胞介素-22、白细胞介素-23、白细胞介素-24、白细胞介素-25、白细胞介素-26、白细胞介素-27、白细胞介素-28、白细胞介素-29、白细胞介素-30、白细胞介素-31、白细胞介素-32、白细胞介素-33、白细胞介素-34 和白细胞介素-35。干扰素 (IFN) 包括但不限于 I 型干扰素 (例如 IFN- α 、IFN- β 和 IFN- ω)、II 型干扰素 (例如 IFN- γ) 和 III 型干扰素。特别包括干扰素 A1、干扰素 A2、干扰素 A4、干扰素 A5、干扰素 A6、干扰素 A7、干扰素 A8、干扰素 A10、干扰素 A13、干扰素 A14、干扰素 A16、干扰素 A17、干扰素 A21、干扰素 B1、TNF、TRAIL、和 FasL。

[0271] 在特定实施方案中, 趋化因子包括但不限于 CC 趋化因子、CXC 趋化因子、C 趋化因子和 CX3C 趋化因子。特别地, 趋化因子包括但不限于 CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、XCL1、XCL2 和 CX3CL1。

[0272] 在特定实施方案中, 免疫 (共) 刺激蛋白包括但不限于 B7.1、B7.2、4-1BBL、LIGHT、ICOSL、GITRL、CD40L、OX40L 和 CD70。

[0273] 免疫抑制蛋白可选自 IL1-Ra、IL-10、CTLA-4、PD-L1 和 PD-L2。毒素可选自假单胞菌外毒素 A、白喉毒素和蓖麻毒素。

[0274] 在特定实施方案中, 凋亡诱导蛋白可以选自 Bid、Bik、Puma、和 Bim, 且促凋亡细胞因子 (死亡配体) 例如但不限于 TNF、scTNF、TRAIL、scTRAIL 和 FasL。在特定实施方案中, 细胞

因子是TNF。在其他实施方案中,细胞因子是TRAIL或scTRAIL。

[0275] 在特定实施方案中,酶可选自氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、连接酶。激酶包括但不限于AGC激酶例如PKA、PKC和PKG,CaM激酶例如钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(例如DAPK2),CK1例如1型酪蛋白激酶,CMGC例如CDK、MAPK、GSK3和CLK激酶,STE例如酵母Sterile 7激酶、Sterile 11激酶和Sterile 20激酶的同源物,酪氨酸激酶(TK),酪氨酸激酶样激酶组(TKL),受体相关酪氨酸激酶,MAP激酶和组氨酸激酶。

[0276] 前药转化酶可以选自酯酶,例如但不限于乙酰酯酶、硫酸酯水解酶、磷酸单酯水解酶、磷酸二酯水解酶、三磷酸单酯水解酶、硫酸酯水解酶(硫酸酯酶)、二磷酸单酯水解酶、和磷酸三酯水解酶;磷酸酶,例如但不限于酪氨酸特异性磷酸酶、丝氨酸/苏氨酸特异性磷酸酶、双特异性磷酸酶、组氨酸磷酸酶和脂质磷酸酶;还原酶,例如但不限于5- α 还原酶、二氢叶酸还原酶、HMG-CoA还原酶、高铁血红蛋白还原酶、核糖核苷酸还原酶、硫氧还蛋白还原酶、大肠杆菌硝基还原酶、亚甲基四氢叶酸还原酶;以及羧肽酶G2、胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶、胸苷激酶。

[0277] RNA酶包括内切核糖核酸酶,特别是选自RNA酶A、RNA酶H、RNA酶I、RNA酶III、RNA酶L、RNA酶P、RNA酶PhyM、RNA酶T1、RNA酶T2、RNA酶U2、RNA酶V1和RNA酶V;以及外切核糖核酸酶,例如但不限于多核苷酸磷酸化酶(PNP酶)、RNA酶PH、RNA酶II、RNA酶R、RNA酶D、RNA酶T、寡核糖核酸酶外切核糖核酸酶I和外切核糖核酸酶II。

[0278] 激动性抗体或抗体片段包括在组织、器官或个体中起作用,例如但不限于受体信号传导、基因表达、蛋白质合成、和蛋白质降解的那些,例如针对TRAIL受体、抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子家族受体(GITR)和CD40。激动性抗体或抗体片段通过结合受体分子的活性位点或变构位点起作用,从而引发特异性反应。

[0279] 拮抗性抗体或抗体片段包括阻断激动剂作用的那些。通常,拮抗性抗体或抗体片段通过结合受体分子的活性位点或变构位点起作用,或与通常不参与受体活性调节的独特结合位点相互作用,例如抗CTLA-4、抗TNFR1、抗VEGFR、抗PDGFR、抗EGFR、抗Her2。通常,拮抗性抗体或抗体片段在结构明确的结合位点与激动剂竞争,或以激动剂不能发挥其通常由于其结合而发挥的作用的方式来改变激动剂的结合位点。

[0280] 在特定实施方案中,生长因子可以选自肾上腺髓质素(AM)、血管生成素(Ang)、自分泌运动因子、骨形态发生蛋白(BMP)、脑源性神经营养因子(BDNF)、表皮生长因子(EGF)、促红细胞生成素(EPO)、成纤维细胞生长因子(FGF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、生长分化因子-9(GDF9)、肝细胞生长因子(HGF)、肝癌衍生生长因子(HDGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、迁移刺激因子肌肉生长抑制素(GDF-8)、神经生长因子(NGF)及其他神经营养因子、血小板衍生生长因子(PDGF)、血小板生成素(TPO)、转化生长因子 α (TGF- α)、转化生长因子 β (TGF- β)、血管内皮生长因子(VEGF)、Wnt信号传导通路和胎盘生长因子(P1GF)。

[0281] 在特定实施方案中,凝血因子可选自凝血酶、凝血因子V、凝血因子VII、凝血因子VIII、凝血因子IX、凝血因子X、凝血因子XI、凝血因子XII和凝血因子XIII、及其活性片段。

[0282] 在特定实施方案中,血纤蛋白溶解蛋白可以选自纤溶酶、尿激酶、纤溶酶原、 α 2-抗纤溶酶、组织纤溶酶原激活物(t-PA)和纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)。

[0283] 模拟肽和模拟蛋白包括模拟其他肽或蛋白质,特别是上下文中提到的肽或蛋白质的活性的肽和蛋白质,特别是血小板生成素模拟肽,促红细胞生成素模拟肽。

[0284] 在进一步的实施方案中,半衰期延长模件是改变半衰期如本发明多肽的“血浆半衰期”或“血清半衰期”的化学物质或生物物质。特别地,半衰期延长模块选自免疫球蛋白结合结构域(IgBD)、白蛋白、白蛋白结合结构域(ABD)、肽、小分子、脂肪酸、抗体片段、单结构域抗体、VHH、支架蛋白、以及显现出表达对长时间循环的血浆蛋白的亲力的天然配体,其中任一种是任选的PEG化多肽、HES化多肽、聚唾液酸化多肽、N-糖基化多肽、O-糖基化多肽或PEG模拟多肽。优选地,IgBD可以结合Ig分子的任何结构域,即结合Ig分子的可变结构域VH或VL和/或结合Ig分子的恒定结构域CH1、CH2、CH3、CH4和/或CL。IGBD包括但不限于衍生自以下蛋白的结构域:金黄色葡萄球菌蛋白A(SpA)、链球菌(streptococcal)蛋白G(SpG)、来自大消化链球菌(peptostreptococcus magnus)的蛋白L(PpL)、来自大肠杆菌(Escherichia coli)的蛋白Eib,来自葡萄球菌(Staphylococcus)的蛋白Sbi和链球菌蛋白MAG、MIG、H、M和ZAG。

[0285] 在进一步的实施方案中,成像分子是与特定靶分子结合从而使该分子的位置可视化的那些分子。特别地,成像分子选自生物发光试剂、化学发光试剂、荧光成像试剂、光敏剂、螯合剂和放射性部分。

[0286] 成像分子包括生物发光试剂、化学发光试剂和荧光成像试剂,例如但不限于来自Renilla reniformis和/或Metridia Longa的萤光素酶、过氧草酸酯、聚次甲基(例如花青染料,例如Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7)、方酸衍生物、酞菁、卟啉衍生物、和BODIPY类似物(BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TR、BODIPY TMR、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665)、以及荧光蛋白例如但不限于GFP、EGFP、CFP、BFP、YFP、DsRED(Chudakov等人(2010)Physiol.Rev.90:1103-1163)。

[0287] 螯合剂能够通过螯合作用结合至少一种金属离子,例如但不限于钙离子、镁离子、铁离子、铝离子、锌离子、铜离子、砷离子、铅离子、铊离子和汞离子。这些螯合剂可以包括乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二胺四乙酸(钙二钠)(CaNa₂-EDTA)、二巯基丙醇(BAL)、二巯基丁二酸(DMSA)、二巯基丙烷磺酸盐(DMPS)、铁蛋白、去铁胺和去铁斯若、去铁酮(1,2-二甲基-3-羟基-4-吡啶酮)、DOTA、DTPA、DADT、DADS、DO3A、N2S2MAMA、三酰胺硫醇、膦酸盐/酯、有机钆络合物、青霉胺和四环素家族的抗生素药物。

[0288] 在特定实施方案中,放射性部分包括放射性核素。放射性部分可以是F原子、Br原子、Mn原子、Co原子、Ga原子、As原子、Zr原子、P原子、C原子、S原子、H原子、I原子、In原子、Lu原子、Cu原子、Rh原子、Bi原子、At原子、Y原子、Re原子、Ac原子、Tc原子、或Hg原子的同位素。放射性部分对本发明的多肽进行标记,从而允许例如在人体中进行放射性地检测,使其不仅可用于诊断方法(放射免疫检测:RAID)也适用于治疗应用(放射免疫疗法:RAIT)。

[0289] 光敏剂是在被特定波长的光激发后能够发光或形成自由基和单线态氧的化学化合物。光敏剂用于例如光动力治疗。在优选的实施方案中,光敏剂包括但不限于卟啉家族、德卟啉(texaphyrin)家族、二氢卟吩(chlorin)家族和酞菁家族的化合物,特别包括HpD、ALA、M-ALA、维替泊芬(Vertiporfin)、Lutexaphyrin、替莫卟吩(Temoporfin)、他拉泊芬(Talaporfin)、HPPH、酞菁和萘酞菁。

[0290] 在第四方面,本发明提供了一种核酸分子,其包含编码本发明第一方面或第二方

面的抗原结合蛋白和/或本发明第三方面的融合蛋白的序列。在特定实施方案中,这类核酸分子包括DNA和/或RNA分子。

[0291] 在第五方面,本发明提供了包含本发明第四方面的核酸分子的载体。在特定实施方案中,载体选自质粒、黏粒、噬菌体、病毒和/或人工染色体。

[0292] 在第六方面,本发明提供了一种重组宿主细胞,其包含本发明第一方面或第二方面的抗原结合蛋白、本发明第三方面的融合蛋白、本发明第四方面的核酸、和/或本发明第五方面的载体。在特定实施方案中,宿主细胞是HEK293细胞、CHO细胞、BHK细胞或PerC6细胞。

[0293] 在第七方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含本发明第一方面或第二方面的抗原结合蛋白、本发明第三方面的融合蛋白、本发明第四方面的核酸、和/或本发明第五方面的载体,且还包含一种或多种药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂、填充剂、黏合剂、润滑剂、助流剂、崩解剂、吸附剂和/或防腐剂。

[0294] 在特定实施方案中,第七方面的组合物含有治疗有效量的活性成分,即本发明第一方面或第二方面的抗原结合蛋白、本发明第三方面的融合蛋白、本发明第四方面的核酸、和/或本发明第五方面的载体,其优选以纯化形式与适量的载剂和/或赋形剂一起,以提供适当地施用于患者的形式。制剂应适合施用方式。

[0295] 药物组合物可以采取溶液、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、散剂、缓释制剂等形式。药物组合物可以配制成具有传统的黏合剂和载剂如甘油三酯的栓剂。

[0296] 为了制备本发明的药物组合物,药学上可接受的载剂可以是固体或液体。固体形式的组合物包括散剂、片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂、扁囊剂、栓剂和可分散的颗粒剂。固体赋形剂可以是一种或多种物质,其也可以用作稀释剂、调味剂、黏合剂、防腐剂、片剂崩解剂或包封材料。在散剂中,赋形剂优选是细碎的固体,其与本发明的细碎的抑制剂混合。在片剂中,活性成分与具有必要结合性能的载剂以合适的比例混合,并压制成所需的形状和大小。合适的赋形剂是碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂等。为了制备栓剂,首先熔化低熔点蜡例如脂肪酸甘油酯或可可脂的混合物,并通过搅拌将活性组分均匀地分散在其中。然后将熔化的均匀混合物倒入适当大小的模具中,使其冷却,从而固化。片剂、散剂、胶囊剂、丸剂、扁囊剂和锭剂可用作适于经口给药的固体剂型。

[0297] 液体形式的组合物包括溶液、混悬剂和乳剂,例如水、盐水溶液、葡萄糖水溶液、甘油溶液或水/丙二醇溶液。对于肠胃外注射(例如静脉内输液、动脉内输液、骨内输液、肌肉注射、皮下注射、腹膜内注射、皮内注射和鞘内注射),液体制剂可以配制成溶液,例如用聚乙二醇水溶液配制成溶液。当静脉内施用药物组合物时,盐溶液是优选的载剂。

[0298] 在特定实施方案中,药物组合物是单位剂型。在这种形式中,组合物可以细分为含有适量活性组分的单位剂量。单位剂型可以是包装的组合物,包装含有离散量的组合物,例如包装的片剂、胶囊剂、和小瓶或安瓿中的散剂。此外,单位剂型可以是胶囊剂、注射小瓶、片剂、扁囊剂或锭剂本身,或者其可以是包装形式的任何这些的适当数量。

[0299] 如果需要,组合物还可含有少量的润湿剂或乳化剂、或pH缓冲剂。

[0300] 此外,这类药物组合物还可包含其他药学活性物质,例如但不限于佐剂和/或其他活性成分。本发明背景下的佐剂包括但不限于无机佐剂、有机佐剂、基于油的佐剂、细胞因

子、微粒佐剂、病毒微体、细菌佐剂、合成佐剂或合成的多核苷酸佐剂。

[0301] 在第八方面,本发明提供了本发明第一方面或第二方面的抗原结合蛋白、本发明第三方面的融合蛋白、本发明第四方面的核酸、本发明第五方面的载体、或本发明第七方面的药物组合物,其用于医疗用途。在特定实施方案中,在医疗中的用途是用于预防、治疗或诊断病症或疾病,特别是用于预防、治疗或诊断增殖性病症或疾病。

[0302] 在特定实施方案中,本发明第一方面或第二方面的抗原结合蛋白、本发明第三方面的融合蛋白、本发明第四方面的核酸、本发明第五方面的载体、或本发明第七方面的药物组合物用于抑制肿瘤生长或治疗癌症。

[0303] 增殖性疾病或病症包括但不限于基底细胞癌、膀胱癌、骨癌、脑肿瘤、乳腺癌、伯基特淋巴瘤、宫颈癌、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、食道癌、视网膜母细胞瘤、胃癌、胃肠道间质瘤、神经胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、卡波西肉瘤、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、口咽癌、卵巢癌、胰腺癌、胸膜肺母细胞瘤、前列腺癌、咽喉癌、甲状腺癌和尿道癌。

[0304] 在第九方面,本发明提供了一种抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法,其包括将治疗有效量的本发明第一方面或第二方面的抗原结合蛋白、本发明第三方面的融合蛋白、本发明第四方面的核酸、本发明第五方面的载体、或本发明第七方面的药物组合物施用于有需要的患者。

[0305] 在本发明的任何方面的实践中,如上所述的药物组合物或结合部分(例如抗体或其抗原结合片段)可以通过本领域建立的任何途径施用于患者,该途径在患者中提供足够水平的结合部分。其可以全身施用或局部施用。这种施用可以是肠胃外、经黏膜,例如经口、经鼻、经直肠、阴道内、舌下、黏膜下、经皮或通过吸入施用。优选地,施用是肠胃外施用,例如通过静脉内注射或腹膜内注射,还包括但不限于动脉内施用、肌肉施用、皮内施用和皮下施用。如果局部施用本发明的药物组合物,可将其直接注射至待治疗的器官或组织中,例如直接注射至患有肿瘤的器官。

[0306] 适于经口施用的药物组合物可以作为胶囊剂或片剂提供;作为散剂或颗粒剂提供;作为溶液、糖浆剂或混悬剂(在水性液体或非水性液体中)提供;作为可食用泡沫剂提供;或作为乳剂提供。片剂或硬明胶胶囊剂可包含乳糖、淀粉或其衍生物、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁、硬脂酸或其盐。软明胶胶囊剂可包含植物油、蜡、脂肪、半固体或液体多元醇等。溶液和糖浆剂可包含水、多元醇和糖。

[0307] 旨在用于经口施用的活性剂可以用在胃肠道中延缓活性剂崩解和/或吸收的材料包覆或与该材料混合(例如,可以使用单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯)。因此,可以在数小时内实现活性剂的持续释放,并且如果需要,可以保护活性剂免于在胃内降解。可配制用于经口施用的药物组合物,以促进活性剂由于特定的pH或酶条件而在特定胃肠位置释放。

[0308] 适于经皮施用的药物组合物可以作为离散的贴剂提供,该贴剂旨在与接收者的表皮保持长时间的紧密接触。适于局部施用的药物组合物可以作为软膏剂、霜剂、混悬剂、洗剂、散剂、溶液、糊剂、凝胶剂、喷雾剂、气溶胶或油提供。对于皮肤、口腔、眼睛或其他外部组织的局部施用,优选使用局部软膏剂或霜剂。当配制成软膏剂时,活性成分可与石蜡软膏基质或水混溶性软膏基质一起使用。或者,可以将活性成分配制成具有水包油基质或油包水基质的霜剂。适于对眼睛局部施用的药物组合物包括滴眼剂。在这些组合物中,活性成分可以溶解或悬浮在合适的载剂中,例如水性溶剂中。适于在口腔中局部施用的药物组合物包

括锭剂、片剂和漱口药。

[0309] 适于经鼻施用的药物组合物可包含固体载剂,例如散剂(优选具有20微米至500微米的粒度)。散剂可以以鼻吸的方式施用,即从靠近鼻的散剂容器中通过鼻快速吸入。或者,用于经鼻施用的组合物可包含液体载剂,例如鼻喷雾剂或滴鼻剂。这些组合物可包含活性成分的水溶液或油溶液。可以以特别适合的装置提供用于通过吸入而施用的组合物,该特别适合的装置包括但不限于加压气溶胶、喷雾器或吹药器,其可以构造成提供预定剂量的活性成分。在优选的实施方案中,本发明的药物组合物经鼻腔施用至肺部。

[0310] 适于直肠施用的药物组合物可以作为栓剂或灌肠剂提供。适于阴道施用的药物组合物可以作为阴道栓剂、棉塞、霜剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾制剂提供。

[0311] 适于胃肠外施用的药物组合物包括水性无菌可注射溶液或混悬剂和非水性无菌可注射溶液或混悬剂,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质,以使组合物与预期接受者的血液基本上等渗。可存在于此类组合物中的其他组分包括例如水、乙醇、多元醇、甘油和植物油。适于肠胃外施用的组合物在即刻使用前可以存在于单位剂量容器或多剂量容器中,例如密封的安瓿和小瓶,并且可以以仅需要添加无菌液体载剂如注射用无菌盐水溶液的冷冻干燥(冻干)条件储存。临时注射溶液和混悬剂可由无菌散剂、颗粒剂和片剂制备。

[0312] 在一个优选的实施方案中,组合物按照常规方法配制成适合于对人类静脉内施用的药物组合物。通常,用于静脉内施用的组合物是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物还可包含增溶剂和局部麻醉剂例如利多卡因,以缓解注射部位的疼痛。通常,成分单独提供或以单位剂量形式混合在一起提供,例如在密封容器如标明活性剂的量的安瓿或袋中作为干燥的冻干粉末或无水浓缩物提供。当组合物通过输注施用,可以用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶分配。当通过注射施用组合物时,可以提供无菌盐水的安瓿,以使得可以在施用前混合成分。

[0313] 在另一个实施方案中,例如,可以在控释系统中递送化学吸引的抑制剂。例如,抑制剂可以使用静脉内输液、可植入的渗透泵、经皮贴剂、脂质体或其他施用方式施用。在一个实施方案中,可以使用泵(参考Sefton(1987)CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201; Buchwald等人(1980)Surgery 88:507;Saudek等人(1989)N.Eng.J.Med.321:574)。在另一个实施方案中,化合物可以以囊泡,特别是以脂质体递送(参照Langer(1990)Science 249:1527至1533;Treat等人(1989)in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer,Lopez-Berestein和Fidler(编辑),Liss,N.Y.,353-365;WO 91/04014;U.S.4704355)。在另一个实施方案中,可以使用聚合物材料(参照Medical Applications of Controlled Release(1974)Langer and Wise(编辑),CRC Press:Boca Raton,Fla.; Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance,(1984)Smolen和Ball(编辑),Wiley:N.Y.;Ranger和Peppas(1993)J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.23:61;还参照Levy等人(1985)Science 228:190;During等人(1989)Ann.Neurol.25:351;Howard等人(1989)J.Neurosurg.71:105)。

[0314] 在另一个实施方案中,控释系统可以置于治疗靶标附近,即靶细胞、靶组织或靶器官附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参照,例如,Goodson(1984)Medical Applications of Controlled Release,第2卷中的115-138)。其他控释系统在Langer(1990,Science 249:1527-1533)的综述中进行了讨论。

[0315] 在一个具体的实施方案中,可能需要将本发明的药物组合物局部施用至需要治疗的区域;这可以通过例如但不限于以下的方式来实现:手术期间的局部输注、局部施用(例如,与手术后伤口敷料联合施用)、通过注射、通过导管方式、通过栓剂方式或通过植入物方式,所述植入物是多孔材料、无孔材料或凝胶材料,包括膜,例如硅橡胶膜或纤维。

[0316] 优选的有效剂量的选择将由技术人员基于考虑本领域普通技术人员已知的若干因素来确定。这些因素包括药物组合物的特定形式例如多肽或载体,以及其药代动力学参数例如生物利用度、新陈代谢、半衰期等,这些参数将在通常用于获得药物化合物的监管批准的常规开发程序中建立。考虑剂量的其他因素包括待预防和/或待治疗的病况或疾病、或正常个体中想要获得的益处、患者的体重、给药途径、是急性施用还是慢性施用、伴随的药物、和众所周知的影响所施用药剂功效的其他因素。因此,精确剂量应根据从业者的判断和每个患者的情况决定,例如,取决于个体患者的状况和免疫状态、以及标准临床技术。

[0317] 以下实施例仅用于说明本发明,不应解释为以任何方式限制所附权利要求所指出的本发明的范围。

[0318] 实施例

[0319] 实施例1:抗HER3抗体3-43的结合和表位特异性

[0320] 克隆包含针对真核表达优化的3位至43位可变结构域序列的完全人IgG1分子(IgG 3-43),并将该IgG 3-43在适合HEK 293-6E细胞的悬浮培养物中表达。通过蛋白A亲和层析从瞬时转染的细胞的上清液中纯化蛋白质。SDS-PAGE分析和分子排阻层析证实了蛋白质的完整性。纯化的IgG 3-43的SDS-PAGE分析显示出非还原条件下的具有完整IgG分子量(约150kDa)的单条带和非还原条件下对应于重链(50kDa)和轻链(25kDa)的两条带(图1A)。分子排阻层析证实了IgG 3-43的纯度(图1B)。使用包含人HER3的细胞外结构域(27位至599位氨基酸)的固定化HER3-Fc融合体在ELISA中分析IgG 3-43的抗原结合。将HER3-Fc融合蛋白以PBS中3 μ g/mL的浓度包被在聚苯乙烯微量滴定板上。用PBS、2%脱脂奶粉(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与MPBS中连续稀释的IgG 3-43一起孵育。洗涤后,用HRP缀合的抗人Fc抗体和TMB检测结合的抗体,且用H₂O₂作为底物。IgG 3-43显示出对HER3的特异性浓度依赖性结合的EC₅₀值在亚纳摩尔范围(0.4nM $\pm$ 0.2nM)内(图1C)。使用Attana 200细胞仪器通过石英晶体微量天平测量来确定IgG 3-43对单体受体HER3的亲和力。通过胺偶联将IgG 3-43以导致约90Hz的频率变化的密度固定在低非特异性结合羧基芯片的表面上。测量在25 $^{\circ}$ C下进行,且流速为25 μ l/分钟的pH7.4的PBST(0.1%吐温)。用3M MgCl₂进行结合的再形成共两次,持续15秒。在每秒的测量之后,进行缓冲液注射以确定基线,随后从相邻测量值中减去该基线。可溶性的His标记的HER3以随机顺序在PBST中以2倍连续稀释进行注射,且浓度为2.5nM至20nM(图1D)。测定的K_d值为11nM(表1)。

[0321] 实施例2:抗HER3抗体3-43的表位作图和交叉反应性

[0322] 为了定位抗体的表位,克隆了人HER3细胞外结构域的全长形式(20位至643位氨基酸)和截短形式(DII-DIV 208位至643位氨基酸、DIII-DIV 329位至643位氨基酸、DIV 532位至643位氨基酸),并且其在经转染的HEK293细胞中作为Fc融合蛋白产生。在非还原和还原条件下蛋白A层析纯化的融合蛋白的SDS-PAGE证实了融合蛋白的正确大小和二聚体装配。在非还原条件下的ELISA和免疫印迹实验中评估了IgG 3-43与不同结构域缺失的HER3融合蛋白结合的能力(总结于图2A)。对于ELISA,将HER3-Fc融合蛋白以PBS中10 μ g/mL的浓

度包被在聚苯乙烯微量滴定板上。用PBS、2%脱脂奶粉(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与MPBS中连续稀释的IgG 3-43一起孵育。洗涤后,用HRP缀合的抗人Fab抗体和TMB检测结合的抗体,且用 H_2O_2 作为底物。检测到与全长HER3-Fc融合蛋白(20位至643位氨基酸)以及DII至DIV(氨基酸208位至643位)Fc融合蛋白和DIII至DIV(329位至643位氨基酸)Fc融合蛋白的结合但未检测到与DIV-Fc(532位至643位氨基酸)的结合。该发现表明IgG 3-43的表位位于HER3的结构域III中。包含DIII的一部分和整个DIV(359位至643位氨基酸、395位至643位氨基酸、458位至643位氨基酸)的片段显示出未结合,这表明整个DIII结构域是抗体结合所必需的。令人惊讶的是,当测试含有DI至DIII(20位至531位氨基酸;缺乏DIV)或DI至DII以及DIII的短部分(20位至358位氨基酸)的Fc融合蛋白时,未观察到结合。该发现表明DIV也是抗体结合所必需的。包含DI至DIII加上DIV的部分(20位至587位、20位至550位氨基酸)的测试片段显示出3-43与20位至587位氨基酸结合但不与20位至550位氨基酸结合,这表明表位存在于至少328位至587位氨基酸中并且需要至少328位至587位氨基酸。使用由329位至587位氨基酸构成的片段证实了这一点,该片段在ELISA中显示出结合。相反,由359位至587位氨基酸或329位至550位氨基酸构成的片段显示没有结合,因此证实了表位存在于329位至587位氨基酸中并且需要329位至587位氨基酸。

[0323] IgG 3-43在免疫印迹实验中未能检测到变性且还原的HER3-Fc融合蛋白,而在变性但未还原的片段中观察到结合,这表明针对IgG 3-43的表位对还原敏感,即通过二硫化物稳定。此外,我们在ELISA中分析了与人和小鼠HER3-Fc融合蛋白的结合(图2B)。检测到与两种HER3-Fc融合蛋白的结合,这证明IgG 3-43与HER3交叉反应,因此IgG 3-43的表位在这两个物种中是保守的。

[0324] 实施例3:抗HER3抗体3-43与表达HER3的肿瘤细胞系的结合

[0325] 用表达HER3的MCF-7细胞、FaDu细胞、BT474细胞、A431细胞、NCI-N87细胞和A549细胞进行流式细胞术研究(图3)。在37℃下对细胞进行短暂的胰蛋白酶消化。用含FCS的培养基使胰蛋白酶失活并通过离心除去胰蛋白酶,且每个探针接种200000个细胞。然后,将细胞与不同浓度的IgG 3-43在4℃下孵育至少1小时。用PBA(2%(体积/体积)FCS、0.02%(重量/体积) NaN_3 ,在1×PBS中)洗涤两次。将来自小鼠的PE标记的抗人Fc抗体孵育另一小时以使结合的抗体分子可视化。在两个进一步的洗涤步骤之后,用MACSQuant®分析仪10测量荧光,并使用FlowJo软件计算相对于未染色细胞的中位荧光强度。这些实验证明IgG 3-43与细胞受体的结合具有令人惊讶的26pM至74pM的低 EC_{50} 值。

[0326] 实施例4: IgG 3-43抑制调蛋白配体结合

[0327] 将重组his标记的人HRG-β1与MCF-7细胞一起孵育,并通过PE缀合的抗his抗体检测结合的蛋白。用过量的IgG 3-43(3μM)预孵育显著地降低了细胞的荧光强度,从而表明阻断HRG结合,而用西妥昔单抗作为阴性对照的预孵育不具有相同的效果(图4)。

[0328] 实施例5:通过抗HER3抗体3-43抑制调蛋白诱导的HER3磷酸化和信号转导

[0329] 进一步分析IgG 3-43阻止HRG诱导的HER3磷酸化的能力。将半汇合的细胞与IgG 3-43一起孵育1小时,然后用HRG(50ng/mL)刺激15分钟。细胞裂解物的蛋白免疫印迹分析揭示了在不同细胞系(MCF-7、BT-474、NCI-N87、A431、A549、FaDu)中,HER3磷酸化的有效阻断以及HRG诱导的Erk和Akt磷酸化的抑制(图5)。IgG 3-43的滴定进一步揭示了在低皮摩尔范围内阻断HRG诱导的HER3磷酸化的 IC_{50} 值。使用Fusion Solo S软件(Vilber)分析条带的密

度,并使用加载微管蛋白的对照的相对值来计算 IC_{50} 值。对于MCF-7细胞,确定 IC_{50} 值为80pM。与针对MCF-7细胞的包含与seribantumab相同的可变结构域的抗HER3 IgG 3M6的比较显示出IgG 3-43的优异活性。在此,3M6抑制HER3磷酸化的 IC_{50} 值为270pM。

[0330] 实施例6:由抗HER3 IgG 3-43诱导的HER3内化

[0331] 分别通过蛋白免疫印迹法和免疫荧光显微镜分析IgG 3-43孵育后的细胞HER3表达水平和IgG定位。对于蛋白免疫印迹法分析,在两天前将MCF-7细胞接种在6孔板中,以在实验当天达到半汇合。将细胞血清饥饿一夜并将其与100nM IgG 3-43一起孵育指定的时间。通过蛋白免疫印迹法分析HER3水平。使用Fusion Solo S软件(Vilber)分析条带的密度。通过将加载微管蛋白的对照相对化来校正加载差异的值,并将其归一化为未处理探针的相对值。IgG 3-43迅速导致了MCF-7细胞中HER3水平的降低(图6)。此外,Cy5标记的IgG 3-43快速内化至MCF-7细胞中,如共聚焦显微镜所示(未显示)。一小时后,可检测到IgG 3-43的显著细胞内积累。

[0332] 实施例7:抗HER3 IgG 3-43抑制细胞增殖

[0333] 进一步评估IgG 3-43在体外减少肿瘤细胞增殖的能力。为了监测这种效应,将各种人癌细胞系(MCF-7、BT-474、NCI-N87、FaDu)以低密度接种于96孔板中,使其贴壁一夜,然后在低血清浓度下与IgG 3-43或作为对照的其他抗体一起孵育。孵育1周后测定增殖。对于所有四种细胞系,观察到了相较于对照抗体其增殖减少(图7)。对于FaDu,在这些条件下测定的 IC_{50} 值为273pM。

[0334] 实施例8: IgG 3-43有效抑制SCID小鼠中的皮下异种移植FaDu肿瘤的生长

[0335] 在SCID小鼠的皮下FaDu异种移植模型中测试IgG 3-43的抗肿瘤活性。将 5×10^6 个细胞注射到小鼠的两侧腹部,当肿瘤达到约80mm³的体积时(肿瘤细胞接种后第14天)开始处理。小鼠接受每周两次的静脉内注射,剂量为30μg、100μg和300μg,持续3周,将PBS作为阴性对照。观察到IgG 3-43的所有三个给药方案具有增加的存活率(仅两个较高浓度的中位存活率增加)和显著的肿瘤生长抑制的抗肿瘤效果(图8)。

[0336] 实施例9:靶向EGFR和HER3的双特异性单链双抗体-Fc融合蛋白诱导EGFR和HER3活化的有效抑制

[0337] 我们以单链双抗体-Fc形式产生靶向EGFR和HER3的双特异性抗体(图9A、图9C),该双特异性抗体包含hu225的抗体部分(人源化形式的C225(西妥昔单抗,爱必妥))和3-43。在HEK293-6E悬浮细胞中产生scDb-Fc融合蛋白,并通过蛋白A亲和纯化从细胞培养上清液中对其进行纯化。scDb hu225x3-43-Fc的SDS-PAGE分析揭示了表观分子量在还原条件下为约82kDa且在非还原条件下为200kDa的单条带,这对应于构建体的单体和二聚体装配(图9B)。相比之下,西妥昔单抗和IgG 3-43在呈现重链和轻链的还原条件下显示出两条带。通过尺寸排阻层析确认纯度(图9C)。通过ELISA和流式细胞术分别评估scDb-Fc对其抗原和对表达ErbB受体的细胞的结合活性。ELISA分析显示,亲本抗体与EGFR和HER3的细胞外结构域(ECD)的结合活性保留在scDb-Fc形式中(参照图10A)。scDb-Fc分子和亲本抗体与相应的抗原结合的亚纳摩尔范围内的 EC_{50} 值相似(表3)。流式细胞术分析显示,西妥昔单抗和scDb hu225x3-43-Fc结合FaDu细胞的 EC_{50} 值为0.2nM,而IgG 3-43结合FaDu细胞的 EC_{50} 值为0.006nM(图10B)。

[0338] 接下来,进行MCF-7细胞中的信号传导抑制测定以确定用scDb hu225x3-43-Fc处

理是否抑制受体活化(图11)。调蛋白诱导HER3磷酸化和下游效应分子Akt和Erk1/2的活化。用IgG 3-43预处理以及IgG 3-43与西妥昔单抗的组合有效地阻断HER3磷酸化和Akt和Erk1/2的活化,并且HER3被降解。用scDb hu225x3-43-Fc处理也显示出对HER3信号传导的显著抑制并导致了HER3降解。还在其他过表达ErbB的细胞系(A-431、A549、FaDu、NCI-N87、SK-BR-3)中进行信号传导抑制测定并且另外评估了用EGF刺激的EGFR的抑制(图12A至图12F)。双特异性scDb hu225x3-43-Fc以及西妥昔单抗与IgG 3-43的组合在所有细胞系中抑制EGF存在下的EGFR磷酸化和调蛋白存在下的HER3磷酸化。为了进一步研究scDb-Fc和亲本抗体之间HER3信号传导抑制的可能差异,在调蛋白存在下在FaDu细胞中用连续稀释的抗体进行信号传导抑制测定(参照图13)。scDb-Fc抑制HER3磷酸化的 IC_{50} 值为0.008nM,而IgG 3-43和西妥昔单抗的组合阻断HER3磷酸化的 IC_{50} 值为0.081nM,这表明相较于单特异性亲本抗体的组合,双特异性抗体对HER3磷酸化具有优异的抑制活性。

[0339] 实施例10:衍生自抗体2-35和3-43的靶向HER2和HER3的双特异性单链双抗体-Fc融合蛋白

[0340] 我们以单链双抗体-Fc形式构建了靶向HER2和HER3的双特异性抗体,该双特异性抗体含有抗体2-35和3-43的抗体部分。2-35部分还通过噬菌体展示进行了鉴定,并且对HER2的细胞外结构域具有特异性。在HEK293-6E悬浮细胞中产生scDb-Fc融合蛋白,并通过蛋白A亲和纯化从细胞培养上清液中对其进行纯化。scDb 2-35x3-43-Fc的SDS-PAGE分析揭示了表观分子量在还原条件下为约82kDa且在非还原条件下为200kDa的单条带(参照图14A)。通过尺寸排阻层析确认纯度(参照图14B)。通过ELISA测定scDb-Fc与亲本抗体IgG 2-35和IgG 3-43相比的与HER2和HER3的细胞外结构域的结合。ELISA分析显示,亲本抗体与HER2和HER3的ECD蛋白的结合活性保留在scDb-Fc形式中(参照图15)。scDb 2-35x3-43-Fc和IgG 2-35与HER2-ECD结合的 EC_{50} 值为约1.5nM,而双特异性抗体与HER3-ECD结合的 EC_{50} 值为0.24nM且IgG 3-43与HER3-ECD结合的 EC_{50} 值为0.33nM。MCF-7细胞中的信号传导抑制测定显示,IgG2-35仅略降低了HER3磷酸化,这可能是由于HER3与HER2的异二聚化受到抑制(参照图11)。双特异性抗体形式的2-35和3-43部分的组合显示出对HER3信号传导的有效抑制。这些结果证明scDb 2-35x3-43-Fc可能是阻断代偿性信号传导轴并因此防止肿瘤逃逸的进一步候选物。

[0341] 实施例11:抗HER3 scTRAIL融合蛋白介导靶标依赖性细胞毒性

[0342] TNF相关的凋亡诱导配体(TRAIL)由于其对癌细胞的选择性毒性而被认为是有希望的效应分子。将单链形式的TRAIL与人IgG1 Fc部分的C末端融合(Fc-scTRAIL)以诱导二聚体装配,这极大地增加了抗肿瘤效果。为了进一步改善生物活性,将scFv 3-43与Fc部分的N末端融合以产生scFv3-43-Fc-scTRAIL。融合蛋白在稳定转染的HEK293细胞中产生,并通过抗FLAG亲和层析从上清液中纯化。SDS-PAGE分析和尺寸排阻层析证实了蛋白质的纯度和完整性(参照图16)。

[0343] 通过ELISA以及通过使用完整的Colo205和HCT-116细胞的流式细胞术评估新的scFv3-43-Fc-scTRAIL融合蛋白结合相应的靶抗原和人TRAIL-R2的能力。使用相应细胞外结构域的Fc融合蛋白在ELISA中分析抗原和TRAIL受体结合。ScFv3-43-Fc-scTRAIL显示出对HER3的特异性浓度依赖性结合的 EC_{50} 值在亚纳摩尔范围内(参照图17A,表4)。进一步的ELISA研究揭示与人TRAIL-R2有效结合的 EC_{50} 值为2.84nM(参照图M2B,表M1)。因此,与

scFv3-43的融合不会阻碍TRAIL-R2结合。通过用表达抗原和表达TRAIL受体的Colo205和HCT-116细胞的流式细胞术研究证实了ELISA结果(参照图17C、图17D)。这些数据显示,scFv3-43-Fc-scTRAIL具有与纯化的且细胞表面表达的HER3和TRAIL-R2结合相关的完整功能。

[0344] 使用Colo205细胞分析scFv3-43-Fc-scTRAIL的细胞死亡诱导,并与非靶向Fc-scTRAIL进行比较。在处理前一天,将Colo205细胞以50000个/孔接种在96孔板中。用敏化剂硼替佐米(650nM)或培养基预处理细胞30分钟后,将细胞与连续稀释的融合蛋白一起孵育16小时。通过结晶紫染色分析细胞死亡。ScFv3-43-Fc-scTRAIL显示出对Colo205的显著的细胞死亡诱导,这种诱导可以在硼替佐米存在下进一步增强(参照图18)。与非靶向Fc-scTRAIL的比较揭示了在硼替佐米不存在和存在的情况下scFv3-43-Fc-scTRAIL的更好效果(参照图18,表5)。为了证实这种优越性能是由scFv3-43靶向部分引起的,重复进行以下实验:将相应的阻断抗体scFv3-43-Fc(200倍摩尔过量)加入到预处理的细胞中。在阻断抗体存在的情况下,scFv3-43-Fc-scTRAIL的效果降低至非靶向Fc-scTRAIL的效果水平(参照图18,表5)。这证实了3-43抗体部分对靶向细胞毒性融合蛋白的适用性,从而改善抗肿瘤作用。

[0345] 实施例12:用于T细胞重靶向的抗HER3x抗CD3双特异性抗体

[0346] 通过将抗HER33-43的结合位点与人源化形式的抗人CD3抗体UCHT1组合产生双特异性scDb分子。因此,scDb 3-43xCD3展示出针对HER3的一个结合位点和针对CD3的一个结合位点(图19A和图19B)。scDb 3-43xCD3在HEK293细胞中产生并通过IMAC进行纯化。scDb 3-43xCD3的SDS-PAGE分析揭示了表观分子量在还原条件下为约55kDa和在非还原条件下为50kDa的单条带(图19C)。尺寸排阻层析证实了蛋白质的纯度和完整性,且表观分子量约为50kDa(流体动力学半径:2.96nm)(图19D)。

[0347] 通过ELISA和流式细胞术评估新型scDb构建体的结合。

[0348] 使用包含人HER3的细胞外结构域(27位至599位氨基酸)的固定化HER3-Fc融合体在ELISA中分析scDb 3-43xCD3的抗原结合。将HER3-Fc融合蛋白以PBS中2 μ g/mL的浓度包被在聚苯乙烯微量滴定板上。用PBS、2%脱脂奶粉(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与在MPBS中连续稀释的scBS 3-43xCD3一起孵育。洗涤后,用HRP缀合的抗His抗体和TMB检测结合的抗体,且用H₂O₂作为底物。ScDb 3-43xCD3显示出对HER3的特异性浓度依赖性结合的EC₅₀值在较低的纳摩尔范围(3.3nM)内(图19E)。

[0349] 用表达HER3的MCF-7(图19F)和表达CD3的Jurkat(图19G)进行流式细胞术研究。对于贴壁MCF-7,将细胞在37℃下进行短暂的胰蛋白酶消化,并用含有FCS的培养基使胰蛋白酶失活并通过离心除去胰蛋白酶。对于MCF-7和Jurkat两者,每孔接种100000个细胞,并通过滴加PBA(2%(体积/体积)FCS、0.02%(重量/体积)NaN₃,在1×PBS中)中的scDb 3-43xCD3在4℃下孵育1小时。用PBA洗涤两次。使用PE缀合的抗His抗体在4℃下孵育另一小时来检测结合的蛋白质。洗涤后,用MACSQuant®分析仪10测量荧光。使用MACSQuant软件计算(相对于未染色细胞的)相对中位荧光强度。观察到两个抗原结合位点在较低纳摩尔范围内的相似结合活性,其中针对MCF-7的EC₅₀值为1.1nM且针对Jurkat的EC₅₀值为3.1nM(图19F和图19G)。

[0350] 使用表达HER3的Colo205细胞和PBMC在IL-2释放测定中分析T细胞的活化。在处理

前一天,在96孔板中每孔接种20000个Colo205细胞。除去培养基并用滴加了cDb 3-43xCD3的新鲜培养基替换。在室温下孵育1小时后,每孔加入200000个PBMC并在37℃下再孵育24小时。收集上清液,根据制造商提供的说明,通过ELISA(人IL-2试剂盒,R&D)测定IL-2的浓度。ScDb 3-43xCD3显示出在亚纳摩尔范围内对IL-2的剂量依赖性释放(T细胞活化)的 EC_{50} 值为0.3nM(图19H)。

[0351] 实施例13:用于T细胞重靶向的三价双特异性抗HER3x抗CD3双特异性抗体

[0352] 通过将HER3(3-43)和CD3(人源化形式的UCHT1)具有特异性的scDb分子与抗HER3特异性scFv(3-43)组合,产生三价双特异性scDb3-43xCD3-scFv343(scDb-scFv)分子。因此,scDb-scFv展示出针对HER3的两个结合位点和针对CD3的一个结合位点(图20A)。scDb-scFv在HEK293E细胞中产生并通过IMAC进行纯化。scDb-scFv的SDS-PAGE分析揭示了表观分子量在还原条件下为约80kDa和在非还原条件下为75kDa的单条带(图20B)。尺寸排阻层析证实了蛋白质的纯度和完整性,且表观分子量为约62kDa(流体动力学半径:3.83nm)(图20C)。

[0353] 使用包含人HER3的细胞外结构域(27位至599位氨基酸)的固定化HER3-Fc融合体在ELISA中分析scDb-scFv的抗原结合。将HER3-Fc融合蛋白以PBS中2 μ g/mL的浓度包被在聚苯乙烯微量滴定板上。用PBS、2%脱脂奶粉(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后用连续稀释的scDb-scFv孵育板并将MPBS中的二价双特异性scDb3-43xCD3作为对照。洗涤后,用HRP缀合的抗His抗体和TMB检测结合的抗体,且用H₂O₂作为底物。ScDb-scFv显示出与HER3的特异性浓度依赖性结合的 EC_{50} 值在亚纳摩尔范围内(0.81nM),而scDb3-43xCD3显示出 EC_{50} 值在低纳摩尔范围(4.87nM)内(图20D)。

[0354] 用表达HER3的MCF-7(图20E)和表达CD3的Jurkat(图20F)进行流式细胞术研究。对于贴壁MCF-7,将细胞在37℃下进行短暂的胰蛋白酶消化,并用含有FCS的培养基使胰蛋白酶失活并通过离心除去胰蛋白酶。对于MCF-7和Jurkat两者,每孔接种100000个细胞,并通过滴加PBA(2%(体积/体积)FCS、0.02%(重量/体积)NaN₃,在1 $\times$ PBS中)中的scDb-scFv在4℃下孵育1小时。用PBA洗涤两次。使用PE缀合的抗His抗体在4℃下再孵育一小时来检测结合的蛋白质。洗涤后,用MACSQuant®分析仪10测量荧光。使用MACSQuant软件计算(相对于未染色细胞的)相对中位荧光强度。观察到与MCF-7细胞结合的皮摩尔范围内的 EC_{50} 值为31.6pM,与整个IgG3-43分子的结合特性相当,并且与Jurkat细胞结合的纳摩尔范围内的 EC_{50} 值为13.2nM(图20E和图20F)。

[0355] 实施例14:衍生自抗体4D5和3-43的靶向HER2和HER3的双特异性单链双抗体-Fc融合蛋白

[0356] 我们以单链双抗体-Fc形式产生靶向HER2和HER3的双特异性抗体(图21),该双特异性抗体包含4D5(曲妥珠单抗,赫赛汀)和3-43的抗体部分。在HEK293-6E悬浮细胞中产生scDb-Fc融合蛋白,并通过蛋白A亲和纯化以及随后的FPLC SEC从细胞培养上清液中对其进行纯化。scDb4D5x3-43-Fc的SDS-PAGE分析揭示了表观分子量在还原条件下为约85kDa且在非还原条件下为200kDa的单条带,这对应于构建体的单体和二聚体多肽链(图21A)。通过尺寸排阻层析确认纯度和完整性,其中表观分子量为约175kDa(图21B)。使用包含人HER2或HER3的细胞外结构域的固定化HER2-His或HER3-His在ELISA中分析scDb 4D5x3-43-Fc的抗原结合。将抗原以PBS中2 μ g/mL的浓度包被在聚苯乙烯微量滴定板上。用PBS、2%脱脂奶粉

(MPBS) 封闭剩余的结合位点。然后将板与MPBS中连续稀释的scDb-Fc融合蛋白一起孵育。洗涤后,用HRP缀合的抗人Fc抗体和TMB检测结合的抗体,且用 H_2O_2 作为底物。ELISA分析揭示了scDb 4D5x3-43-Fc融合蛋白的纳摩尔范围内的结合,其中针对HER2-His的 EC_{50} 值为2.5nM且针对HER3-His的 EC_{50} 值为1.9nM(参照图21C)。

[0357] 用表达HER2和HER3的FaDu细胞进行流式细胞术研究(图21D)。将FaDu细胞在37℃下进行短暂的胰蛋白酶消化,并用含有FCS的培养基使胰蛋白酶失活并通过离心除去胰蛋白酶。每孔接种100000个细胞,并通过滴加PBA(2%(体积/体积)FCS、0.02%(重量/体积) NaN_3 ,在1×PBS中)中的scDb-Fc在4℃下孵育1小时。用PBA洗涤两次。使用PE缀合的抗人Fc抗体在4℃下再孵育一小时来检测结合的蛋白质。洗涤后,用MACSQuant®分析仪10测量荧光。使用MACSQuant软件计算(相对于未染色细胞的)相对中位荧光强度。观察到与FaDu细胞结合的在纳摩尔范围内的 EC_{50} 值为2.9nM,与从ELISA分析获得的结合特性相当。

[0358] 实施例15:用IgG 3-43孵育抑制SKBR3和BT474肿瘤细胞的配体非依赖性集落形成

[0359] SKBR3和BT474表达高水平的HER2,因此可以以配体非依赖性方式增殖。分析这两种细胞系的IgG 3-43抑制集落形成(作为细胞增殖的标志)的潜力(图22)。将细胞(每孔1000个细胞)接种到12孔板中的RPMI培养基中。第二天,将细胞与抗体(IgG 3-43或曲妥珠单抗)以50nM的浓度在含有2%FCS的RPMI培养基中一起孵育。7天后,除去培养基并加入含有相同浓度的抗体的新培养基。在第12天,在室温下用Histofix将细胞固定10分钟,并用结晶紫将细胞染色10分钟(图22A)。将未处理的细胞(对照组)作为阴性对照。所有孵育均进行三次。将针对HER2的曲妥珠单抗作为阳性对照。对于两种细胞系,观察到IgG 3-43和曲妥珠单抗对集落形成的有效抑制(图22B)。这些发现表明即,使在没有调蛋白的情况下HER3也与HER2形成足以进行信号传导的异二聚体,这可以被IgG 3-43抑制。

[0360] 实施例16:靶向EGFR(hu225)和HER3(3-43)的双特异性四价双抗体-Ig融合蛋白(Db-Ig)

[0361] 通过将EGFR具有特异性的Db分子(hu225;人源化形式的C225(西妥昔单抗,爱必妥))和对HER3具有特异性的分子(3-43)与IgG抗体的恒定结构域组合来产生四价双特异性Db3-43xhu225-Ig分子。因此,Db3-43xhu225-Ig分子由两种不同的多肽 $V_H3-43xV_Lhu225-C_L$ (轻链,SEQ ID NO:31)和 $V_Hhu225xV_Lhu3-43-C_H1-C_H2-C_H3$ (重链,SEQ ID NO:32)组成(图图23A)。双特异性Db3-43xhu225-Ig展示出针对EGFR的两个抗原结合位点和针对HER3的两个抗原结合位点(图图23B)。在使用聚乙烯亚胺作为转染试剂同时施用编码轻链或重链的两种质粒后,在瞬时转染的HEK293-6E细胞中表达Db3-43xhu225-Ig。使用CHI-Captureselect亲和层析来纯化分泌到细胞培养上清液中的蛋白质。SDS-PAGE分析揭示了在还原条件下在约65kDa处和35kDa处对应于重链和轻链的两条带,以及在非还原条件下在约220kDa处对应于双特异性Db-Ig分子的一条主带(图图23C)。通过尺寸排阻层析证实Db3-43xhu225-Ig分子的纯度、完整性和同质性(图图23D)。通过ELISA测定Db3-43xhu225-Ig和单特异性亲本抗体(西妥昔单抗(抗EGFR)和3-43-IgG(抗HER3))与EGFR的细胞外结构域(ECD)(20位至643位氨基酸)和HER3的细胞外结构域(27位至599位氨基酸)的结合。将His标记的EGFR或HER3融合蛋白以在PBS中稀释的2μg/mL的浓度包被在聚苯乙烯微量滴定板上。用PBS、2%脱脂奶粉(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与连续稀释的双特异性Db3-43xhu225-Ig或单特异性亲本抗体一起孵育。洗涤后,用HRP缀合的抗人Fc抗体和TMB检测结合的抗体,且用 H_2O_2 作

为底物。ELISA分析揭示,亲本抗体与EGFR和HER3的细胞外结构域的结合活性保留在Db-Ig形式中。双特异性四价Db3-43xhu225-Ig显示出与EGFR和HER3的浓度依赖性结合的在亚纳摩尔范围内的 EC_{50} 值(针对EGFR的 EC_{50} 值为0.19nM;针对HER3的 EC_{50} 值为0.26nM)(图图23E)。亲本抗体与其相应抗原的结合具有相似的 EC_{50} 值(表6)。通过第二结合ELISA分析证实了同时结合两种抗原EGFR和HER3。将EGFR-Fc融合蛋白作为第一抗原以PBS中2 μ g/mL的浓度包被在聚苯乙烯微量滴定板上。用PBS、2%脱脂奶粉(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与MPBS中连续稀释的双特异性Db3-43xhu225-Ig一起孵育。洗涤后,向板中加入第二抗原HER3-His(HER3(C末端与六组氨酰基标签融合的细胞外结构域的27位至599位氨基酸;在MPBS中稀释至300nM))。洗涤后,用HRP缀合的抗His标签抗体和TMB检测结合的HER3-His(第二抗原),且用 H_2O_2 作为底物。第二抗原以浓度依赖性方式与双特异性Db3-43xhu225-Ig结合,其 EC_{50} 值在亚纳摩尔范围内(0.85nM)(图图23F),类似于Db3-43xhu225-Ig与包被的HER3-Fc的结合。因此,该结果证明了Db-Ig分子内两个抗原结合位点的无限制可及性。

[0362] 此外,通过流式细胞术分析Db3-43xhu225-Ig和亲本单克隆抗体(西妥昔单抗和3-43-IgG)与表达EGFR和/或HER3的细胞(MCF-7、SKBR-3和FaDu)的结合研究(图23G)。用PBS洗涤贴壁细胞,并在37℃下进行短暂地胰蛋白酶消化。用含有FCS的培养基使胰蛋白酶失活并通过离心(500 $\times$ g,5分钟)除去胰蛋白酶。每孔接种100000个细胞,并用在PBA(含有2%(体积/体积)FCS、0.02%(重量/体积)NaN₃的PBS)中连续稀释的Db3-43xhu225-Ig或稀释的亲本单克隆抗体在4℃下孵育1小时。使用PBA洗涤细胞两次。使用PE标记的抗人Fc二抗检测结合的抗体,将该抗人Fc二抗在4℃下再孵育一小时。洗涤后,用Milltenyi **MACSQuant**®分析仪10测量中位荧光强度(MFI)。通过**MACSQuant**®软件和Excel计算(相对于未染色细胞的)相对MFI。对于HER3阳性MCF-7细胞系,双特异性Db3-43xhu225-Ig在亚纳摩尔范围内结合的 EC_{50} 值为0.054nM。由于亲本抗HER3 3-43-IgG以相似的 EC_{50} 值(0.021nM)结合,因此亲本抗HER3抗体的结合活性保留在Db-Ig形式中。对于抗EGFR抗体西妥昔单抗,未观察到与MCF-7细胞的结合。关于在相似范围内表达EGFR和HER3的细胞系SKBR-3,双特异性Db3-43xhu225-Ig分子结合的 EC_{50} 值为0.047nM,类似于两种亲本抗体西妥昔单抗(0.031nM)和3-43-IgG(0.022nM)的结合。关于结合FaDu Db3-43xhu225-Ig,其 EC_{50} 值为0.14nM。由于亲本抗EGFR抗体西妥昔单抗以相似的 EC_{50} 值(0.13nM)与细胞结合,因此亲本抗体西妥昔单抗的结合活性也保留在Db-Ig形式中。由于FaDu细胞表达非常高水平的EGFR和相对低水平的HER3,Db3-43xhu225-Ig最可能优先通过hu225部分结合至细胞。然而,亲本抗HER3 3-43-IgG也以相对低的荧光信号并以0.003nM的 EC_{50} 值结合至细胞(图23G,表1)。

[0363] 在SWISS小鼠中分析双特异性四价Db3-43xhu225-Ig分子的药代动力学特征。将25 μ g蛋白质在100 μ l无菌PBS中稀释并将其静脉内注射到尾部。在不同时间点(3分钟、30分钟、1小时、2小时、6小时、1天、3天和7天)之后,从尾部取血样并在冰上孵育10分钟。将凝结的血液离心(16000 $\times$ g,20分钟,4℃)并将血清样品储存在-20℃。通过ELISA测定蛋白质血清浓度。将EGFR-Fc或HER3-Fc融合蛋白以PBS中稀释的2 μ g/mL的浓度包被在聚苯乙烯微量滴定板上。用PBS、2%脱脂奶粉(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与用MPBS稀释的血清孵育。洗涤后,用HRP缀合的抗人Fab抗体和TMB检测结合的抗体,且用 H_2O_2 作为底物根据纯化的融合蛋白的标准曲线得到Db3-43xhu225-Ig分子的血清浓度(图24)。没有观察到使用EGFR-Fc或HER3-Fc融合蛋白作为包被抗原的Db3-43xhu225-Ig血清浓度的差异。双特异性Db3-

43xhu225-Ig分子的初始半衰期为约2.7小时且终末半衰期为87小时至92小时。

[0364] 实施例17:抗HER3 scFv-Fc-scTRAIL融合蛋白在体外介导针对各种黑色素瘤细胞系的靶标依赖性细胞毒性

[0365] 通过流式细胞术筛选一组用于HER3表达的黑色素瘤细胞系,HER3表达使用QIFIKIT (Dako) 进行定量(图25A)。所分析的大多数黑色素瘤细胞系显示出不同程度的HER3表达。选择具有中度HER3表达的A375用于分析抗HER3 scFv-Fc-scTRAIL融合蛋白的结合(参照实施例11;图25B、图25C)。通过流式细胞术分析scFv3-43-Fc-scTRAIL与HER3阳性细胞系A375的结合。观察到scFv3-43-Fc-scTRAIL的浓度依赖性结合,其 EC_{50} 值为 1.19 ± 0.31 nM(图25D)。用scFv3-43-Fc融合蛋白对scFv3-43-Fc-scTRAIL进行竞争性抑制,以验证靶向形式的改善的结合是由3-43结合结构域产生的(图25E)。因此,用200倍摩尔过量的scFv3-43-Fc(抑制剂)阻断scFv3-43-Fc-scTRAIL的结合结构域。在抑制剂存在的情况下,scFv3-43-Fc-scTRAIL的结合降低至非靶向蛋白的水平,而Fc-scTRAIL本身的结合不受影响。该结果证实,TRAIL融合蛋白的靶向部分(scFv3-43)增加了与HER3阳性细胞的结合。

[0366] 然后在体外分析抗HER3 scFv-Fc-scTRAIL融合蛋白在硼替佐米存在或不存在的条件下对不同黑色素瘤细胞系的杀伤作用(图26)。在处理前一天,将30000个至60000个细胞/孔接种在96孔板中。为了与硼替佐米联合处理,将细胞用硼替佐米以250ng/mL(650nM)进行预处理,其中A375除外,A375用50ng/mL硼替佐米预处理30分钟。然后将细胞与连续稀释的融合蛋白一起孵育16小时。通过结晶紫染色分析细胞活力。

[0367] 在没有硼替佐米的情况下,scFv3-43-Fc-scTRAIL显示出对W793(EC_{50} 值为4.25pM)、MW1366(EC_{50} 值为48.2pM)和WM35(EC_{50} 值为4.96pM)的强烈细胞死亡诱导,并且显示出对A375、MelJuso和MeWo的部分细胞死亡诱导(未达到50%杀伤)(见图26)。相比之下,硼替佐米的加入使所有测试的黑色素瘤细胞系敏化,从而显示杀伤作用的 EC_{50} 值为0.17pM至4.63pM(图26)。与非靶向Fc-scTRAIL相比,在硼替佐米不存在或存在的情况下 EC_{50} 值均降低(表7)。另外,使用QIFIKIT (Dako) 通过流式细胞术在不存在或存在硼替佐米的情况下分析用于细胞活力测定的黑色素瘤细胞的HER3表达。用硼替佐米处理对黑色素瘤细胞的HER3表达没有影响或仅有边际效应(图26)。

[0368] 实施例18:抗HER3 scFv-Fc-scTRAIL融合蛋白显示出有效的抗肿瘤活性,并且在体内Co1o205异种移植肿瘤模型中具有良好的耐受性。

[0369] 评估scFv3-43-Fc-scTRAIL融合蛋白(参照实施例11)在携带肿瘤的小鼠中的抗肿瘤活性、安全性和药代动力学特征。将 3×10^6 个Co1o205细胞(在100 μ l DPBS中)皮下注射至雌性NMRI裸鼠的左腹和右腹中。通过用卡尺测量肿瘤的长度(a)和宽度(b)来监测肿瘤生长,以计算肿瘤体积($V = a \times b^2 / 2$)。当肿瘤达到约100mm³的大小时开始处理。静脉注射融合蛋白(在150 μ l DPBS中)。对照动物分别接受150 μ l DPBS注射。用0.2纳摩尔蛋白质(0.4纳摩尔scTRAIL单位)每周两次处理小鼠(9周龄或11周龄,每组6只小鼠),处理三周(第14天、第18天、第21天、第25天、第28天、第32天)。在最后一次处理后4小时和24小时采集血样以分析蛋白质浓度和ALT水平。

[0370] 观察到用scFv3-43-Fc-scTRAIL和非靶向Fc-scTRAIL处理的完全肿瘤缓解。对于经scFv3-43-Fc-scTRAIL处理的动物,在几乎100天的监测期内,肿瘤缓解是稳定的,并且在实验结束时仅检测到Fc-scTRAIL的边缘再生(图27A、图27B)。对于TRAIL融合蛋白处理组,

没有观察到肝脏的毒性作用,因为在最后一次处理后4小时和24小时的血清中的ALT活性与未处理组或PBS处理组相似(图27C)。在最后一次处理后4小时和24小时测定蛋白质的血清浓度(图27D)。在scFv3-43-Fc-scTRAIL和Fc-scTRAIL之间未观察到差异。

[0371] 实施例19:含有G₄S接头的靶向EGFR和HER3的双特异性单链双抗体-Fc融合蛋白

[0372] 将连接V_L3-43与V_H3-43的靶向EGFR和HER3的双特异性单链双抗体-Fc融合蛋白的接头L2从序列GGGGSGGRASGGGS (SEQ ID NO:21) 改变为GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:16) (图28A、图28B)。在HEK293-6E悬浮细胞中产生经修饰的scDb-Fc融合蛋白,并通过蛋白A亲和层析和快速蛋白液相色谱从细胞培养上清液中对其进行纯化。纯化的scDbhu225x3-43-Fc的SDS-PAGE分析揭示了表观分子量在还原条件下为约82kDa且在非还原条件下为200kDa的单条带,其对应于分子的单体和二聚体装配(图28C)。通过尺寸排阻层析确认纯度(图28D)。通过ELISA来评估与亲本抗体(hu225-IgG和3-43-IgG)相比,scDb-Fc与EGFR(20位至643位氨基酸)和HER3(27位至599位氨基酸)的His标记的细胞外结构域的结合。将EGFR-His或HER3-His融合蛋白以PBS中稀释的2μg/mL的浓度包被在聚苯乙烯微量滴定板上。用PBS、2%脱脂奶粉(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与连续稀释的双特异性scDb-Fc或单特异性亲本抗体一起孵育。洗涤后,用HRP缀合的抗人Fc抗体和TMB检测结合的抗体,且用H₂O₂作为底物。ELISA分析揭示,亲本抗体与EGFR和HER3的细胞外结构域(ECD)的结合活性保留在经修饰的scDb-Fc形式中(参照图28E)。scDb-Fc分子与EGFR结合的EC₅₀值为0.16nM且与HER3结合的EC₅₀值为0.20nM,而亲本抗体以亚纳米范围内的相似EC₅₀值结合至其相应的抗原(hu225-IgG:0.20nM;3-43-IgG:0.54nM)。

[0373] 实施例20:靶向EGFR和HER3的双特异性双抗体-Ig(Db-Ig)和双特异性单链双抗体-Fc融合蛋白的比较

[0374] 针对两种不同形式的靶向EGFR和HER3的双特异性四价抗体,即单链双抗体-Fc(scDb-Fc)(见实施例19)和双抗体-Ig(Db-Ig)(实施例16),分析其对EGFR、HER2、HER3、Akt和Erk的抑制活性。使用FaDu细胞进行信号抑制测定。用50nM亲本抗体(单独或组合(每种抗体50nM))、双特异性抗体(scDbhu225x3-43-Fc(GGGGS)SEQ ID NO:33,Db3-43xhu225-Ig)处理细胞1小时,然后在37℃下用调蛋白(50ng/mL)刺激15分钟。使用含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液(50mM Tris pH7.5、150mM NaCl、10mM NaF、20mM β-甘油磷酸盐、1mM EDTA、1%NP-40、1mM Na₃VO₄、0.5mM PMSF、0.25%DOC、0.1%SDS)裂解细胞并通过免疫印迹法分析裂解物。在没有调蛋白刺激的情况下,HER2和HER3的磷酸化受到双特异性抗体以及3-43-IgG的抑制,而在调蛋白存在的情况下,与3-43-IgG相比,两种双特异性抗体更有效地抑制了受体磷酸化。此外,双特异性抗体在不存在和存在调蛋白的情况下有效抑制Akt和Erk的磷酸化(图29)。

[0375] 接下来,使用两种不同的双特异性抗体形式或者单独或组合的亲本抗体(hu225-IgG和3-43-IgG)在结肠癌细胞系(SW620、HCT116和LoVo)中进行增殖测定。细胞在2D或3D培养物中生长。以2000个细胞/孔接种在96孔板中(对于3D培养:1:2的基质胶:胶原蛋白混合物、RPMI或DMEM+10%FCS+2%基质胶)。24小时后,弃去培养基并加入饥饿培养基(RPMI或DMEM+0.2%FCS+1%P/S)。再孵育24小时后,在用或不用MEK抑制剂(AZD6244,司美替尼)和/或抗体(50nM,组合:每种50nM)的情况下处理细胞。1小时后,用HRG(6ng/孔)刺激细胞或使细胞保持未刺激。在接种细胞后第8天,用CelltiterGlo 3D试剂盒(每孔中将25μl饥饿培养

基与25 μ l CelltiterGlo2.0混合)进行测定,并用板读数器(tecan infinite)测量发光。对于SW620细胞和HCT116细胞,仅观察到所有抗体增殖的边缘差异。然而,当在调蛋白存在的情况下与MEK抑制剂组合处理细胞时,与其他抗体相比,双特异性抗体显示出降低的增殖效应。对于未经HRG刺激的LoVo细胞,在存在或不存在MEK抑制剂的情况下,在3D培养中观察到双特异性抗体和hu225-IgG二者或两种亲本抗体的组合的显著降低的增殖效应。在HRG刺激后,在存在或不存在MEK抑制剂的情况下,只有双特异性抗体能够有效地降低细胞的增殖。

[0376] 实施例21:靶向HER2和HER3的双特异性二价单链双抗体(scDb)

[0377] 通过将抗HER3-43的结合位点与人源化抗HER2抗体4D5(曲妥珠单抗)的结合位点组合从而产生双特异性scDb分子。scDb4D5x3-43-LL展示出针对HER3的一个结合位点和针对HER2的一个结合位点(图31A和图31B)。连接V_L3-43和V_H3-43的接头(L2)由20个氨基酸(GGGGSGGRASGGGSGGGGS, SEQ ID NO:21)组成。在HEK293E悬浮细胞中产生scDb4D5x3-43-LL(SEQ ID NO:34)并通过IMAC和快速蛋白质液相色谱(FPLC)对其进行纯化。纯化的scDb4D5x3-43-LL的SDS-PAGE分析揭示了表观分子量分别在还原条件下为约53kDa和在非还原条件下为50kDa的单条带(图31C)。尺寸排阻层析证实了蛋白质的纯度和完整性(图31D)。

[0378] 使用包含人HER2的细胞外结构域(ECD)(23位至652位氨基酸)或HER3的细胞外结构域(27位至599位氨基酸)的固定化HER2-Fc或HER3-Fc融合蛋白通过ELISA评估scDb4D5x3-43-LL相比于亲本抗体(曲妥珠单抗和3-43IgG)的结合。将ECD-Fc融合蛋白以PBS中的2 μ g/mL包被在聚苯乙烯微量滴定板上。用PBS、2%脱脂奶粉(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与MPBS中连续稀释的scDb4D5x3-43-LL或亲本抗体一起孵育。洗涤后,在scDb4D5x3-43-LL的情况下用HRP缀合的抗His抗体或用HRP缀合的抗人Fab抗体和TMB检测结合的抗体,且用H₂O₂作为底物。scDb4D5x3-43-LL显示出与HER2和HER3的浓度依赖性结合的EC₅₀值在低纳摩尔范围内(HER2:1.54nM;HER3:0.93nM)(图31E)。亲本抗体显示与相应抗原的结合(曲妥珠单抗与HER2结合:0.80nM;3-43-IgG与HER3结合:0.27nM),因此,保留了scDb4D5x3-43-LL蛋白的结合。

[0379] 在MCF-7细胞中进行信号抑制测定,以确定与亲本抗体相比,用双特异性scDb4D5x3-43-LL分子处理(单独处理或组合处理)是否抑制HER2、HER3、Akt和Erk的受体活化。此外,在该实验中还使用双特异性四价scDb4D5x3-43-Fc融合蛋白来确定受体磷酸化。用50nM亲本抗体(单独或组合(每种抗体50nM))或双特异性scDb4D5x3-43-LL处理细胞1小时,然后在37°C下用调蛋白(50ng/mL)刺激15分钟。使用含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液(50mM Tris pH7.5、150mM NaCl、10mM NaF、20mM β -甘油磷酸盐、1mM EDTA、1%NP-40、1mM Na₃VO₄、0.5mMMSF、0.25%DOC、0.1%SDS)裂解细胞并通过免疫印迹法分析裂解物。对于未经HRG刺激的细胞,仅双特异性二价scDb4D5x3-43-LL分子显示出降低HER2、Akt和Erk的磷酸化,而对于亲本抗体,无论单独还是组合处理均观察到Akt的活化。此外,检测到双特异性四价scDb4D5x3-43-Fc融合蛋白的Erk活化(图32)。在经HRG刺激的细胞中观察到类似的结果。同样,只有双特异性二价scDb4D5x3-43分子显示出有效降低HER2、HER3、Akt和Erk的磷酸化。

[0380] 实施例22:用于T细胞重靶向的具有不同效价的抗HER3x抗CD3双特异性抗体

[0381] 产生双特异性抗体,其一方面以单价与人CD3(人源化形式的UCHT1)结合,另一方

面以单价与HER3结合(scDb3-43xhuU3,还参照实施例12)、或以二价与HER3结合(scDb3-43xhuU3-scFv3-43,还参照实施例13)、或以三价与HER3结合(scFv3-43-scDb3-43xhuU3-scFv3-43)(SEQ ID NO:35,图33A、图33B)。双特异性多价抗体在HEK293E细胞中产生并通过IMAC纯化。通过快速蛋白质液相色谱法进一步纯化三价(scDb3-43xhuU3-scFv3-43)和四价(scFv3-43-scDb3-43xhuU3-scFv3-43)抗体,从而得到抗体的一个同质群体。

[0382] 使用表达CD3的Jurkat细胞(图33C)和表达HER3的MCF-7细胞(图33D)通过流式细胞术分析双特异性抗体的结合。对于贴壁MCF-7,将细胞在37℃下进行短暂的胰蛋白酶消化,用含有FCS的培养基使胰蛋白酶失活并通过离心除去胰蛋白酶。对于两种细胞系Jurkat和MCF-7,每孔接种100000个细胞,通过滴加PBA(2%(体积/体积)FCS、0.02%(重量/体积)NaN₃,在1×PBS中)中的不同双特异性多价抗体在4℃下孵育1小时。用PBA洗涤两次。使用PE缀合的抗His抗体在4℃下再孵育一小时来检测结合的蛋白质。洗涤后,用MACSQuant®分析仪10测量荧光。使用MACSQuant软件计算(相对于未染色细胞的)相对中位荧光强度。对于所有三种抗体,观察到以浓度依赖性方式与CD3阳性Jurkat细胞结合,产生纳摩尔范围内的相似EC₅₀值(scDb3-43xhuU3:2.4nM;scDb3-43xhuU3-scFv3-43:4.2nM;scFv3-43-scDb3-43xhuU3-scFv3-43:5.2nM)。还观察到以浓度依赖性方式与MCF-7细胞的结合,然而,双特异性抗体的结合取决于HER3结合的效价。测定单价HER3-结合物(scDb3-43xhuU3)的EC₅₀值为1.1nM,而二价和三价HER3-结合物显示出在皮摩尔范围内的结合,其中scDb3-43xhuU3-scFv3-43结合的EC₅₀值为31.4pM,scFv3-43-scDb3-43xhuU3-scFv3-43结合的EC₅₀值为17.3pM。

[0383] 使用表达HER3的MCF-7细胞和人PBMC在IL-2释放测定中分析T细胞的活化。在处理前一天,在96孔板中每孔接种20000个MCF-7细胞。除去培养基并用滴加了不同双特异性抗体的新鲜培养基替换。在室温下孵育1小时后,每孔加入200000个PBMC并在37℃下再孵育24小时。收集上清液,根据制造商提供的说明,通过ELISA(人IL-2试剂盒,R&D)测定IL-2的浓度。所有三种双特异性抗体均显示出亚纳摩尔范围内的IL-2的剂量依赖性释放(T细胞活化),其中EC₅₀值为0.48nM(scDb3-43xhuU3)、0.29nM(scDb3-43xhuU3-scFv3-43)和0.22nM(scFv3-43-scDb3-43xhuU3-scFv3-43)(图33E)。

[0384] 使用表达HER-3的MCF-7细胞和人PBMC分析不同双特异性抗体对靶细胞的杀伤作用。在处理前一天,在96孔板中每孔接种20000个MCF-7细胞。除去培养基并用滴加了不同双特异性多价抗体的新鲜培养基替换。在室温下孵育1小时后,每孔加入200000个PBMC并在37℃下再孵育48小时。通过MTT测定法测量细胞活力。所有三种双特异性抗体均显示出皮摩尔范围内的对MCF-7细胞的剂量依赖性杀伤作用,其中EC₅₀值为84pM(scDb3-43xhuU3)、34pM(scDb3-43xhuU3-scFv3-43)和32pM(scFv3-43-scDb3-43xhuU3-scFv3-43)(图33F;黑线)。在不存在PBMC的情况下,未观察到MCF-7细胞的细胞活力降低(图33F;灰线)。

[0385] 实施例23:IgG 3-43与在结构域III和结构域IV中突变的HER3-Fc融合蛋白结合

[0386] 通过Q5®位点定向诱变试剂盒(NEB)克隆结构域III和结构域IV中的HER3体细胞突变。除一个热点突变(T335A)外,结构域III和结构域IV中的六个其他突变(T389I、M406K、R453H、Y464C、D492H、K498I)表达为HER3-Fc融合蛋白,其在瞬时转染的HEK 293-6E细胞中产生并通过蛋白A层析纯化。SDS-PAGE分析证实了蛋白质的纯度,并且显示出在还原条件下约140kDa的单条带(图34A)。在ELISA中分析3-43-IgG与不同突变的HER3-Fc融合蛋白的结

合能力,并与野生型(非突变的)HER3-Fc融合蛋白的结合进行比较。将不同的HER3-Fc融合蛋白以PBS中稀释的 $2\mu\text{g/mL}$ 的浓度包被在聚苯乙烯微量滴定板上。用PBS、2%脱脂奶粉(MPBS)封闭剩余的结合位点。然后将板与连续稀释的抗HER3抗体3-43-IgG和3M6-IgG一起孵育。洗涤后,用HRP缀合的抗人Fab抗体和TMB检测结合的抗体,且用 H_2O_2 作为底物。IgG 3-43显示出与包括热点突变T335A在内的所有测试突变结合。将与HER3的结构域I结合的IgG 3M6作为阳性对照,并在100nM处显示出与野生型HER3-Fc所观察到的信号相似的结合。虽然IgG 3-43能够结合HER3的所有突变形式,但对于一些突变体,在采用固定化HER3-Fc突变体的ELISA中观察到降低的饱和结合(图34B),但对于所有HER3突变体, EC_{50} 值处于相似范围内(0.1nM至0.3nM)。

[0387] 表:

[0388] 表1:单价和二价亲和力。使用Attana系统测量KD。

	分析物	B _{最大} (信号)	k _a (1/(M*s))	k _d (1/s)	KD (nM)	BI (信号)	Chi2 (信号^2)
[0389]	HER3-his	63.55	622000	0.00696	11.2	0	0.45
	HER3-Fc	237.32	468000	0.000103	0.22	0	0.14

[0390] 表2: IgG 3-43的细胞结合特性。通过流式细胞术评估与指定细胞结合的 EC_{50} 值

	细胞系	EC_{50} 值 (pM)
	MCF-7	37
	FaDu	30
[0391]	BT474	74
	A431	45
	NCI-N87	27
	A549	53

[0392] 表3: scDb hu225x3-43-Fc的结合特性。通过ELISA测定与EGFR-ECD和HER3-ECD蛋白结合的 EC_{50} 值[nM二聚体]。通过流式细胞术评估与FaDu细胞结合的 EC_{50} 值[nM二聚体]。

	构建体	EGFR-ECD	ELISA HER3-ECD	FACS FaDu
[0393]	西妥昔单抗	0.18	-	0.2
	IgG 3-43	-	0.33	0.30
	scDb hu225x3-43-Fc	0.2	0.24	0.23

[0394] 表4: scFv3-43-Fc-scTRAIL的结合特性。通过ELISA测定与HER3和人TRAIL-R2结合的 EC_{50} 值[nM单体]。将HER3或人TRAIL-R2的细胞外结构域的Fc融合蛋白作为抗原。

	构建体	HER3	TRAIL-R2
[0395]	scFv3-43-Fc-scTRAIL	0.33	2.84

[0396] 表5: scFv3-43-Fc-scTRAIL诱导的细胞死亡。在不存在和存在阻断抗体(200倍摩尔过量)的情况下,在不存在和存在硼替佐米(650nM)的情况下测定Co10205的细胞死亡诱导的 EC_{50} 值[nM单体]。将scFv3-43-Fc-scTRAIL的作用与非靶向Fc-scTRAIL融合蛋白进行比较。

	构建体	EC ₅₀ 值 (pM)		EC ₅₀ 值 (pM)	
		无阻断抗体		有阻断抗体	
		无 BZB	650 nM BZB	无 BZB	650 nM BZB
[0397]	ScFv3-43-Fc-scTRAIL	31.0	6.7	217.5	32.6
	Fc-scTRAIL	97.6	21.4	129.5	34.2

[0398] 表6:Db3-43xhu225-Ig的结合特性。通过ELISA测定与EGFR和HER3融合蛋白的细胞外结构域(ECD)结合的EC₅₀值[nM]。通过流式细胞术评估与MCF-7、SKBR-3和FaDu细胞结合的EC₅₀值[nM]。

	构建体	ELISA		流式细胞术		
		EGFR-ECD	HER3-ECD	MCF-7	SKBR-3	FaDu
[0399]	Db3-43xhu225-Ig	0.19	0.26	0.054	0.047	0.14
	西妥昔单抗	0.23	-	-	0.031	0.13
	3-43-IgG	-	0.23	0.021	0.022	0.003

[0400] 表7:在存在或不存在硼替佐米(BZB)的情况下scFv3-43-Fc-scTRAIL和Fc-scTRAIL的细胞死亡诱导测定的EC₅₀值。在用单独的蛋白质处理或与硼替佐米组合处理细胞16小时后测定EC₅₀[pM]。-表示细胞死亡率小于50%;平均值±SD

	scFv3-43-Fc-scTRAIL		Fc-scTRAIL*		
	- BZB	+ BZB	- BZB	+ BZB	
[0401]	WM793	4.25 ± 2.40	0.39 ± 0.18	22.0 ± 1.75	2.87 ± 1.51
	WM1366	48.2 ± 7.29	3.58 ± 1.40	20.1 ± 4.77	4.84 ± 1.00
	WM35	4.96 ± 1.81	0.17 ± 0.17	691 ± 342	0.64 ± 0.11
	A375	-	0.72 ± 0.41	5003 ± 4376	1.06 ± 0.32
	Mel-Juso	-	1.00 ± 0.04	-	4.10 ± 1.60
	MeWo	-	4.63 ± 2.89	-	4.88 ± 0.87

序列表

<110> 斯图加特大学
 <120> 针对HER3的抗原结合蛋白
 <130> 762-7 PCT
 <150> EP16 188 871.4
 <151> 2016-09-15
 <160> 35
 <170> PatentIn版本3.5
 <210> 1
 <211> 1342
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 1

Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu
1 5 10 15

[0001] Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr
20 25 30

Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr
35 40 45

Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu
50 55 60

Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile
65 70 75 80

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

Leu Pro Leu Pro Asn Leu Arg Val Val Arg Gly Thr Gln Val Tyr Asp
100 105 110

Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser
115 120 125

His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser
130 135 140

Gly Gly Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr
145 150 155 160

Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val
165 170 175

Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly
180 185 190

Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr
195 200 205

Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn
210 215 220

Gln Cys Cys His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp
225 230 235 240

Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val
245 250 255

[0002]

Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu
260 265 270

Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala
275 280 285

Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala
290 295 300

Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys
305 310 315 320

Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys Ala Cys Glu Gly Thr Gly Ser
325 330 335

Gly Ser Arg Phe Gln Thr Val Asp Ser Ser Asn Ile Asp Gly Phe Val
340 345 350

Asn Cys Thr Lys Ile Leu Gly Asn Leu Asp Phe Leu Ile Thr Gly Leu
355 360 365

	Asn	Gly	Asp	Pro	Trp	His	Lys	Ile	Pro	Ala	Leu	Asp	Pro	Glu	Lys	Leu	
	370						375					380					
	Asn	Val	Phe	Arg	Thr	Val	Arg	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Asn	Ile	Gln	
	385					390					395					400	
	Ser	Trp	Pro	Pro	His	Met	His	Asn	Phe	Ser	Val	Phe	Ser	Asn	Leu	Thr	
					405					410					415		
	Thr	Ile	Gly	Gly	Arg	Ser	Leu	Tyr	Asn	Arg	Gly	Phe	Ser	Leu	Leu	Ile	
				420					425					430			
	Met	Lys	Asn	Leu	Asn	Val	Thr	Ser	Leu	Gly	Phe	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	
			435					440					445				
	Ile	Ser	Ala	Gly	Arg	Ile	Tyr	Ile	Ser	Ala	Asn	Arg	Gln	Leu	Cys	Tyr	
	450					455						460					
	His	His	Ser	Leu	Asn	Trp	Thr	Lys	Val	Leu	Arg	Gly	Pro	Thr	Glu	Glu	
	465					470					475					480	
[0003]	Arg	Leu	Asp	Ile	Lys	His	Asn	Arg	Pro	Arg	Arg	Asp	Cys	Val	Ala	Glu	
					485					490					495		
	Gly	Lys	Val	Cys	Asp	Pro	Leu	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	
				500					505					510			
	Gly	Pro	Gly	Gln	Cys	Leu	Ser	Cys	Arg	Asn	Tyr	Ser	Arg	Gly	Gly	Val	
			515					520					525				
	Cys	Val	Thr	His	Cys	Asn	Phe	Leu	Asn	Gly	Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Ala	
	530						535					540					
	His	Glu	Ala	Glu	Cys	Phe	Ser	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Met	Glu	
	545					550					555					560	
	Gly	Thr	Ala	Thr	Cys	Asn	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Cys	Ala	Gln	Cys	
					565					570					575		
	Ala	His	Phe	Arg	Asp	Gly	Pro	His	Cys	Val	Ser	Ser	Cys	Pro	His	Gly	
				580					585					590			
	Val	Leu	Gly	Ala	Lys	Gly	Pro	Ile	Tyr	Lys	Tyr	Pro	Asp	Val	Gln	Asn	

	595						600								605				
	Glu	Cys	Arg	Pro	Cys	His	Glu	Asn	Cys	Thr	Gln	Gly	Cys	Lys	Gly	Pro			
	610						615					620							
	Glu	Leu	Gln	Asp	Cys	Leu	Gly	Gln	Thr	Leu	Val	Leu	Ile	Gly	Lys	Thr			
	625					630					635					640			
	His	Leu	Thr	Met	Ala	Leu	Thr	Val	Ile	Ala	Gly	Leu	Val	Val	Ile	Phe			
					645					650					655				
	Met	Met	Leu	Gly	Gly	Thr	Phe	Leu	Tyr	Trp	Arg	Gly	Arg	Arg	Ile	Gln			
				660					665					670					
	Asn	Lys	Arg	Ala	Met	Arg	Arg	Tyr	Leu	Glu	Arg	Gly	Glu	Ser	Ile	Glu			
			675					680					685						
	Pro	Leu	Asp	Pro	Ser	Glu	Lys	Ala	Asn	Lys	Val	Leu	Ala	Arg	Ile	Phe			
			690				695					700							
[0004]	Lys	Glu	Thr	Glu	Leu	Arg	Lys	Leu	Lys	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Val	Phe			
	705					710					715				720				
	Gly	Thr	Val	His	Lys	Gly	Val	Trp	Ile	Pro	Glu	Gly	Glu	Ser	Ile	Lys			
					725					730					735				
	Ile	Pro	Val	Cys	Ile	Lys	Val	Ile	Glu	Asp	Lys	Ser	Gly	Arg	Gln	Ser			
				740					745					750					
	Phe	Gln	Ala	Val	Thr	Asp	His	Met	Leu	Ala	Ile	Gly	Ser	Leu	Asp	His			
			755					760					765						
	Ala	His	Ile	Val	Arg	Leu	Leu	Gly	Leu	Cys	Pro	Gly	Ser	Ser	Leu	Gln			
			770				775					780							
	Leu	Val	Thr	Gln	Tyr	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Asp	His	Val	Arg			
	785					790					795					800			
	Gln	His	Arg	Gly	Ala	Leu	Gly	Pro	Gln	Leu	Leu	Leu	Asn	Trp	Gly	Val			
					805					810					815				
	Gln	Ile	Ala	Lys	Gly	Met	Tyr	Tyr	Leu	Glu	Glu	His	Gly	Met	Val	His			
				820					825					830					

Arg Asn Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Lys Ser Pro Ser Gln Val
835 840 845

Gln Val Ala Asp Phe Gly Val Ala Asp Leu Leu Pro Pro Asp Asp Lys
850 855 860

Gln Leu Leu Tyr Ser Glu Ala Lys Thr Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu
865 870 875 880

Glu Ser Ile His Phe Gly Lys Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser
885 890 895

Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Glu Pro Tyr
900 905 910

Ala Gly Leu Arg Leu Ala Glu Val Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu
915 920 925

Arg Leu Ala Gln Pro Gln Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val Met
930 935 940

[0005]

Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Glu Asn Ile Arg Pro Thr Phe Lys Glu
945 950 955 960

Leu Ala Asn Glu Phe Thr Arg Met Ala Arg Asp Pro Pro Arg Tyr Leu
965 970 975

Val Ile Lys Arg Glu Ser Gly Pro Gly Ile Ala Pro Gly Pro Glu Pro
980 985 990

His Gly Leu Thr Asn Lys Lys Leu Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro Glu
995 1000 1005

Leu Asp Leu Asp Leu Asp Leu Glu Ala Glu Glu Asp Asn Leu Ala
1010 1015 1020

Thr Thr Thr Leu Gly Ser Ala Leu Ser Leu Pro Val Gly Thr Leu
1025 1030 1035

Asn Arg Pro Arg Gly Ser Gln Ser Leu Leu Ser Pro Ser Ser Gly
1040 1045 1050

Tyr 1055	Met	Pro	Met	Asn	Gln	Gly 1060	Asn	Leu	Gly	Glu	Ser 1065	Cys	Gln	Glu
Ser 1070	Ala	Val	Ser	Gly	Ser	Ser 1075	Glu	Arg	Cys	Pro	Arg 1080	Pro	Val	Ser
Leu 1085	His	Pro	Met	Pro	Arg	Gly 1090	Cys	Leu	Ala	Ser	Glu 1095	Ser	Ser	Glu
Gly 1100	His	Val	Thr	Gly	Ser	Glu 1105	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu 1110	Lys	Val	Ser
Met 1115	Cys	Arg	Ser	Arg	Ser	Arg 1120	Ser	Arg	Ser	Pro	Arg 1125	Pro	Arg	Gly
Asp 1130	Ser	Ala	Tyr	His	Ser	Gln 1135	Arg	His	Ser	Leu	Leu 1140	Thr	Pro	Val
Thr 1145	Pro	Leu	Ser	Pro	Pro	Gly 1150	Leu	Glu	Glu	Glu	Asp 1155	Val	Asn	Gly
Tyr 1160	Val	Met	Pro	Asp	Thr	His 1165	Leu	Lys	Gly	Thr	Pro 1170	Ser	Ser	Arg
Glu 1175	Gly	Thr	Leu	Ser	Ser	Val 1180	Gly	Leu	Ser	Ser	Val 1185	Leu	Gly	Thr
Glu 1190	Glu	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu 1195	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Met 1200	Asn	Arg	Arg
Arg 1205	Arg	His	Ser	Pro	Pro	His 1210	Pro	Pro	Arg	Pro	Ser 1215	Ser	Leu	Glu
Glu 1220	Leu	Gly	Tyr	Glu	Tyr	Met 1225	Asp	Val	Gly	Ser	Asp 1230	Leu	Ser	Ala
Ser 1235	Leu	Gly	Ser	Thr	Gln	Ser 1240	Cys	Pro	Leu	His	Pro 1245	Val	Pro	Ile
Met 1250	Pro	Thr	Ala	Gly	Thr	Thr 1255	Pro	Asp	Glu	Asp	Tyr 1260	Glu	Tyr	Met

[0006]

Asn Arg Gln Arg Asp Gly Gly Gly Pro Gly Gly Asp Tyr Ala Ala
1265 1270 1275

Met Gly Ala Cys Pro Ala Ser Glu Gln Gly Tyr Glu Glu Met Arg
1280 1285 1290

Ala Phe Gln Gly Pro Gly His Gln Ala Pro His Val His Tyr Ala
1295 1300 1305

Arg Leu Lys Thr Leu Arg Ser Leu Glu Ala Thr Asp Ser Ala Phe
1310 1315 1320

Asp Asn Pro Asp Tyr Trp His Ser Arg Leu Phe Pro Lys Ala Asn
1325 1330 1335

Ala Gln Arg Thr
1340

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

[0007] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 3位至43位的可变结构域重链

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 3位至43位的可变结构域轻链

<400> 3

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

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

[0008] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 4
<211> 473
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> IgK前导序列 - IgG 3-43 HC

<400> 4

	Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro
	1				5					10					15	
	Gly	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val
				20					25					30		
	Lys	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser
			35					40					45			
	Val	Ser	Ser	Asn	Arg	Ala	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Ser
	50						55					60				
	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr
	65					70					75					80
	Asn	Asp	Tyr	Ala	Gln	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ile	Asn	Pro	Asp
				85						90					95	
	Thr	Pro	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Pro	Glu
				100					105						110	
[0009]	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Asp
			115					120					125			
	Ala	Leu	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala
	130						135					140				
	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser
	145					150					155					160
	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe
					165					170					175	
	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly
				180					185					190		
	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu
			195					200					205			
	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr
	210						215					220				
	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys

	225				230					235					240	
	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
					245					250					255	
	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
				260					265					270		
	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
			275					280					285			
	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
	290						295					300				
	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
	305				310						315					320
	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
				325						330					335	
[0010]	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
				340					345					350		
	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
			355					360					365			
	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu
	370						375					380				
	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
	385				390						395					400
	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
				405						410					415	
	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
				420					425					430		
	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
			435					440					445			
	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
	450						455					460				

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 5
<211> 235
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> IgK前导序列 - IgG 3-43 LC

<400> 5

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

Gly Ser Thr Gly Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ala Val Ser Val
20 25 30

Ala Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Gly Arg Asp Asn Ile Gly
35 40 45

[0011] Ser Arg Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
50 55 60

Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile
100 105 110

Thr Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
115 120 125

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

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser
145 150 155 160

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser

	165	170	175
	Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn 180 185 190		
	Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp 195 200 205		
	Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr 210 215 220		
	Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser 225 230 235		
	<210> 6		
	<211> 247		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> scFv 3-43		
[0012]	<400> 6		
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln 1 5 10 15		
	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn 20 25 30		
	Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu 35 40 45		
	Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala 50 55 60		
	Gln Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Pro Lys Asn 65 70 75 80		
	Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val 85 90 95		
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile 100 105 110		

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Gly Leu Thr Gln
130 135 140

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

Gly Arg Asp Asn Ile Gly Ser Arg Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175

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

Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Glu Asn Thr Ala
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
210 215 220

[0013]

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

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
245

<210> 7
<211> 310
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PelB前导序列 - scFv 3-43 - c-myc - his

<400> 7

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly
20 25 30

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

Asp Ser Val Ser Ser Asn Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser
50 55 60

Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys
65 70 75 80

Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Gln Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn
85 90 95

Pro Asp Thr Pro Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr
100 105 110

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly
115 120 125

Leu Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
130 135 140

Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu
145 150 155 160

[0014]

Ala Arg Val Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ala Val Ser Val Ala
165 170 175

Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Gly Arg Asp Asn Ile Gly Ser
180 185 190

Arg Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
195 200 205

Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe
210 215 220

Ser Gly Ser Asn Tyr Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val
225 230 235 240

Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr
245 250 255

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

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Ala
275 280 285

Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
290 295 300

His His His His His His
305 310

<210> 8
<211> 738
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> IgK前导序列 - scDb hu225x3-43-Fc

<400> 8

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

[0015] Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
35 40 45

Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Pro Phe Thr Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ala Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 145 150 155 160
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Gly Arg Asp Asn Ile Gly Ser Arg Ser Val
 165 170 175
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 180 185 190
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 195 200 205
 Asn Tyr Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 210 215 220
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp His
 225 230 235 240
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
 245 250 255
 [0016]
 Ser Gly Gly Arg Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln
 260 265 270
 Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr
 275 280 285
 Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Arg Ala Ala Trp Asn
 290 295 300
 Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Gln Ser Leu Lys Ser
 325 330 335
 Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Pro Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln
 340 345 350
 Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 355 360 365

	Asp	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	Leu	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
	370						375					380				
	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr
	385					390					395					400
	Gln	Ser	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile
					405					410					415	
	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His	Trp	Tyr	Gln
				420					425					430		
	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu
			435					440					445			
	Ser	Ile	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr
	450						455					460				
	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr
	465					470					475					480
[0017]	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly
				485						490					495	
	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Asp
				500					505					510		
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
			515					520					525			
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
	530						535					540				
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
	545					550					555					560
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
					565					570					575	
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
				580					585					590		
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys

	595	600	605	
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys Ala Leu	Pro Ala Pro Ile Glu	
	610	615	620	
	Lys Thr Ile Ser Lys Ala	Lys Gly Gln Pro Arg	Glu Pro Gln Val Tyr	
	625	630	635	640
	Thr Leu Pro Pro Ser Arg	Asp Glu Leu Thr Lys	Asn Gln Val Ser Leu	
		645	650	655
	Thr Cys Leu Val Lys Gly	Phe Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu Trp	
		660	665	670
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro	Glu Asn Asn Tyr Lys	Thr Thr Pro Pro Val	
		675	680	685
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser	Phe Phe Leu Tyr Ser	Lys Leu Thr Val Asp	
		690	695	700
[0018]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln	Gly Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met His	
	705	710	715	720
	Glu Ala Leu His Asn His	Tyr Thr Gln Lys Ser	Leu Ser Leu Ser Pro	
		725	730	735
	Gly Lys			
	<210> 9			
	<211> 744			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
	<220>			
	<223> IgK前导序列 2-35 x 3-43 scDb-Fc			
	<400> 9			
	Met Glu Thr Asp Thr Leu	Leu Leu Trp Val Leu	Leu Leu Trp Val Pro	
	1	5	10	15
	Gly Ser Thr Gly Gln Met	Gln Leu Val Gln Ser	Gly Ala Glu Val Lys	
		20	25	30

	Lys	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	
			35					40					45				
	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	
		50					55					60					
	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	
	65					70					75					80	
	Ser	Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	
					85					90					95		
	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	
				100					105					110			
	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Leu	Gly	Arg	Ser	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Asn	Tyr	
			115					120					125				
	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	
		130					135					140					
[0019]	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Gly	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ala	Val	Ser	Val	
	145					150					155					160	
	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Gly	Arg	Asp	Asn	Ile	Gly	
					165					170					175		
	Ser	Arg	Ser	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	
				180					185					190			
	Leu	Val	Val	Tyr	Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ala	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	
			195					200					205				
	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Tyr	Glu	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	
		210					215					220					
	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Gly	Ile	
	225					230					235					240	
	Thr	Ser	Asp	His	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	
					245					250					255		
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Arg	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	

	260							265					270				
	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Thr	
			275					280					285				
	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Ser	Asn	Arg	
		290					295					300					
	Ala	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	
	305					310					315					320	
	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr	Asn	Asp	Tyr	Ala	Gln	
					325					330					335		
	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ile	Asn	Pro	Asp	Thr	Pro	Lys	Asn	Gln	
				340					345					350			
	Phe	Ser	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	
			355					360					365				
[0020]	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	Leu	Asp	Ile	Trp	
		370					375					380					
	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	
	385					390					395					400	
	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Phe	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	
					405					410					415		
	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Leu	Ser	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	
				420					425					430			
	Tyr	Pro	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Thr	Ser	Gly	Gln	Pro	Pro	Arg	Thr	Leu	
			435					440					445				
	Ile	Tyr	Ser	Thr	Asp	Thr	Arg	Ser	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
		450					455					460					
	Gly	Ser	Ile	Leu	Gly	Asp	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	
	465					470					475					480	
	Ala	Asp	Asp	Glu	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Met	Leu	Tyr	Met	Gly	Ser	Gly	
					485					490					495		

Ile Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Val Leu Ala Ala Ala
500 505 510

Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
515 520 525

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
530 535 540

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
545 550 555 560

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
565 570 575

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
580 585 590

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
595 600 605

[0021]

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
610 615 620

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
625 630 635 640

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
645 650 655

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
660 665 670

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
675 680 685

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
690 695 700

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
705 710 715 720

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
725 730 735

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
740

<210> 10
<211> 744
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> IgK前导序列 - scDb 4D5x3-43-LL-Fc

<400> 10

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

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
20 25 30

[0022] Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn
35 40 45

Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

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

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ala Val Ser Val Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Gly Arg Asp Asn Ile Gly Ser Arg Ser
 165 170 175
 Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val
 180 185 190
 Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
 195 200 205
 Ser Asn Tyr Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala
 210 215 220
 Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp
 225 230 235 240
 His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 245 250 255
 Gly Ser Gly Gly Arg Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 260 265 270
 [0023]
 Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 275 280 285
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser
 290 295 300
 Asn Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu
 305 310 315 320
 Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr
 325 330 335
 Ala Gln Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Pro Lys
 340 345 350
 Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala
 355 360 365
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp
 370 375 380

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
385 390 395 400

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
405 410 415

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr
420 425 430

Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
435 440 445

Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
450 455 460

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
465 470 475 480

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro
485 490 495

[0024]

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
500 505 510

Gly Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
515 520 525

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
530 535 540

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
545 550 555 560

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
565 570 575

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
580 585 590

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
595 600 605

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
610 615 620

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
625 630 635 640

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
645 650 655

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
660 665 670

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
675 680 685

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
690 695 700

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
705 710 715 720

[0025] Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
725 730 735

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
740

<210> 11

<211> 1020

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IgK前导序列 - FLAG - 接头 - scFv3-43-Fc-scTRAIL

<400> 11

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

Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Gly Gly
20 25 30

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

Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Val
50						55					60				
Ser	Ser	Asn	Arg	Ala	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Ser	Arg
65					70					75					80
Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr	Asn
				85					90					95	
Asp	Tyr	Ala	Gln	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ile	Asn	Pro	Asp	Thr
			100					105					110		
Pro	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Pro	Glu	Asp
		115					120					125			
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala
	130					135					140				
Leu	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly
145					150					155					160
[0026]															
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Gly
				165					170					175	
Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser
			180					185					190		
Ile	Thr	Cys	Gly	Arg	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser	Arg	Ser	Val	His	Trp	Tyr
		195					200					205			
Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr	Asp	Asp	Ser
	210					215					220				
Asp	Arg	Pro	Ala	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Tyr	Glu
225					230					235					240
Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala
				245					250					255	
Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Gly	Ile	Thr	Ser	Asp	His	Val	Val	Phe
			260					265					270		

	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	
			275					280					285				
	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
		290					295					300					
	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
	305					310					315					320	
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
					325					330					335		
	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
				340					345					350			
	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
			355					360						365			
	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
		370					375					380					
[0027]	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
	385					390					395					400	
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
					405					410					415		
	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
				420					425					430			
	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
				435				440					445				
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
		450					455					460					
	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
	465					470					475					480	
	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
					485					490					495		
	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	

	500	505	510	
	Ser Pro Gly Gln Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Pro 515 520 525			
	Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr 530 535 540			
	Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile 545 550 555 560			
	Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu 565 570 575			
	His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr 580 585 590			
	Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn 595 600 605			
[0028]	Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser 610 615 620			
	Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp 625 630 635 640			
	Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile 645 650 655			
	Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu 660 665 670			
	His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu 675 680 685			
	Val Gly Gly Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg 690 695 700			
	Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala 705 710 715 720			
	Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser 725 730 735			

Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu
740 745 750

Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu
755 760 765

Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile
770 775 780

Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala
785 790 795 800

Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile
805 810 815

Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val
820 825 830

Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe
835 840 845

[0029]

Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His
850 855 860

Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser
865 870 875 880

Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser
885 890 895

Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu
900 905 910

Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr
915 920 925

Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln
930 935 940

Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu
945 950 955 960

Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr
965 970 975

Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn
980 985 990

Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp
995 1000 1005

His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
1010 1015 1020

<210> 12

<211> 515

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IgK前导序列 - scDb 3-43xCD3 - His

<400> 12

[0030] Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser
35 40 45

Val Ser Ser Asn Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser
50 55 60

Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr
65 70 75 80

Asn Asp Tyr Ala Gln Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp
85 90 95

Thr Pro Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu
100 105 110

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

Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
145 150 155 160

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
165 170 175

Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
180 185 190

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
195 200 205

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
210 215 220

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn
225 230 235 240

[0031]

Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
260 265 270

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser
275 280 285

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Gly Tyr Thr
290 295 300

Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
305 310 315 320

Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
325 330 335

Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
340 345 350

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
355 360 365

Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
370 375 380

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala
385 390 395 400

Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ala Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala
405 410 415

Ser Ile Thr Cys Gly Arg Asp Asn Ile Gly Ser Arg Ser Val His Trp
420 425 430

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp
435 440 445

Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Tyr
450 455 460

[0032]

Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu
465 470 475 480

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp His Val Val
485 490 495

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala Ala His His His
500 505 510

His His His
515

<210> 13
<211> 776
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> IgK前导序列 - scDb 3-43xCD3-scFv 3-43 - His

<400> 13

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

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val
 20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Asn Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser
 50 55 60

Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr
 65 70 75 80

Asn Asp Tyr Ala Gln Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp
 85 90 95

Thr Pro Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu
 100 105 110

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

[0033]

Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 145 150 155 160

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
 165 170 175

Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 180 185 190

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 195 200 205

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
 210 215 220

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn
 225 230 235 240

Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
260 265 270

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser
275 280 285

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Gly Tyr Thr
290 295 300

Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
305 310 315 320

Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
325 330 335

Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
340 345 350

[0034]

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
355 360 365

Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
370 375 380

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala
385 390 395 400

Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ala Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala
405 410 415

Ser Ile Thr Cys Gly Arg Asp Asn Ile Gly Ser Arg Ser Val His Trp
420 425 430

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp
435 440 445

Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Tyr
450 455 460

	Glu	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu
	465					470					475					480
	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Gly	Ile	Thr	Ser	Asp	His	Val	Val
					485					490					495	
	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser
				500					505					510		
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser
			515					520					525			
	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala
		530					535					540				
	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Ser	Asn	Arg	Ala	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile
	545					550					555					560
	Arg	Gln	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr
					565					570					575	
[0035]	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr	Asn	Asp	Tyr	Ala	Gln	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile
				580					585					590		
	Thr	Ile	Asn	Pro	Asp	Thr	Pro	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Gln	Leu	Asn
			595					600					605			
	Ser	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly
		610					615					620				
	Gln	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	Leu	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val
	625					630					635					640
	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
					645					650					655	
	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Gly	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala
				660					665					670		
	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Gly	Arg	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser
			675					680					685			
	Arg	Ser	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu

690

695

700

Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe
705 710 715 720

Ser Gly Ser Asn Tyr Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val
725 730 735

Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr
740 745 750

Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
755 760 765

Ser Leu His His His His His His
770 775

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0036]

<220>
<223> 肽接头 1

<400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 肽接头 2

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

- <223> 肽接头 3
- <400> 16
- Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
- <210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
<223> 肽接头 4
- <400> 17
- Gly Ser Leu Gly Gly Ser Gly Gly
1 5
- <210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0037] <220>
<223> 肽接头 5
- <400> 18
- Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr
1 5
- <210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
<223> 肽接头 6
- <400> 19
- Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Ser
1 5 10
- <210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
<223> 肽接头 7

<400> 20

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 肽接头 8

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Arg Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

[0038] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 肽接头 9

<400> 22

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 肽接头 10

<400> 23

Glu Phe Thr Arg Gly
1 5

<210> 24

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 肽接头 11

<400> 24

Ala Ala Ala
1

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FLAG-标签

<400> 25

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0039]

<220>
<223> His-标签

<400> 26

His His His His His His
1 5

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Myc-标签

<400> 27

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 28
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PelB前导序列

<400> 28

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala
20

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IgK前导序列

<400> 29

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

[0040] Gly Ser Thr Gly
20

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IL-2前导序列

<400> 30

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser
20

<210> 31

<211> 342

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> VH3-43xVLhu225-CL

<400> 31

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

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

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

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

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

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

[0041] Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile
100 105 110

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

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
145 150 155 160

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
165 170 175

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
180 185 190

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
195 200 205

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
210 215 220

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
245 250 255

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
260 265 270

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
275 280 285

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
290 295 300

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
305 310 315 320

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
325 330 335

[0042]

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
340

<210> 32

<211> 561

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> VHhu225xVLhu3-43-CH1-CH2-CH3

<400> 32

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

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

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

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

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

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Thr Gln Pro Pro Ala Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile
130 135 140

Thr Cys Gly Arg Asp Asn Ile Gly Ser Arg Ser Val His Trp Tyr Gln
145 150 155 160

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp
165 170 175

[0043]

Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Glu Asn
180 185 190

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp
195 200 205

Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp His Val Val Phe Gly
210 215 220

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
245 250 255

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
260 265 270

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
275 280 285

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 290 295 300

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 305 310 315 320

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 325 330 335

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 340 345 350

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 370 375 380

[0044] Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 385 390 395 400

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 405 410 415

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 435 440 445

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 450 455 460

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 465 470 475 480

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 485 490 495

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 500 505 510

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
515 520 525

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
530 535 540

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
545 550 555 560

Lys

<210> 33
<211> 738
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> scDbhu225x3-43-Fc(GGGGS)

<400> 33

[0045] Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
35 40 45

Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Pro Phe Thr Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ala Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
145 150 155 160

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Gly Arg Asp Asn Ile Gly Ser Arg Ser Val
165 170 175

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
180 185 190

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
195 200 205

Asn Tyr Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
210 215 220

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp His
225 230 235 240

[0046]

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
245 250 255

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

Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr
275 280 285

Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Arg Ala Ala Trp Asn
290 295 300

Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr
305 310 315 320

Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Gln Ser Leu Lys Ser
325 330 335

Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Pro Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln
340 345 350

	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			355					360					365			
	Asp	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	Leu	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
	370						375					380				
	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr
	385					390					395					400
	Gln	Ser	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile
					405					410					415	
	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His	Trp	Tyr	Gln
				420					425					430		
	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu
			435					440					445			
	Ser	Ile	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr
	450						455					460				
[0047]	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr
	465					470					475					480
	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly
					485					490					495	
	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Asp
				500					505					510		
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
			515					520					525			
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
		530					535					540				
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
	545					550					555					560
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
					565					570					575	
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg

	580	585	590	
	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
	595	600	605	
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	610	615	620	
	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
	625	630	635	640
	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
		645	650	655
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
		660	665	670
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
		675	680	685
[0048]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	690	695	700	
	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	705	710	715	720
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
		725	730	735
	Gly Lys			
	<210> 34			
	<211> 519			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
	<220>			
	<223> scDb4D5x3-43-LL			
	<400> 34			
	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro			
	1	5	10	15

	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	
				20					25					30			
	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	
			35					40					45				
	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Tyr	Ile	His	Trp	
		50					55					60					
	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Arg	Ile	Tyr	
	65					70					75					80	
	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	
					85					90					95		
	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	
				100					105					110			
	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Trp	Gly	
			115					120					125				
[0049]	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
		130					135					140					
	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Gly	Leu	Thr	Gln	Pro	
	145					150					155					160	
	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Gly	
					165					170					175		
	Arg	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser	Arg	Ser	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	
				180					185					190			
	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr	Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ala	
			195					200					205				
	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Tyr	Glu	Asn	Thr	Ala	Thr	
		210					215					220					
	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	
	225					230					235					240	
	Gln	Val	Trp	Gly	Ile	Thr	Ser	Asp	His	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	

	245							250							255						
	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Arg	Ala	Ser	Gly					
				260					265					270							
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser					
			275					280					285								
	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala					
		290					295					300									
	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Ser	Asn	Arg	Ala	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile					
	305					310					315					320					
	Arg	Gln	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr					
					325					330					335						
	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr	Asn	Asp	Tyr	Ala	Gln	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile					
				340					345					350							
[0050]	Thr	Ile	Asn	Pro	Asp	Thr	Pro	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Gln	Leu	Asn					
			355					360					365								
	Ser	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly					
		370					375					380									
	Gln	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	Leu	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val					
	385					390					395					400					
	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser					
					405					410					415						
	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys					
				420					425					430							
	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys					
			435					440					445								
	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr					
		450					455					460									
	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe					
	465					470					475					480					

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
485 490 495

Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
500 505 510

Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala
515

<210> 35
<211> 770
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> scFv3-43-scDb3-43xhuU3-scFv3-43

<400> 35

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

[0051] Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser
35 40 45

Val Ser Ser Asn Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser
50 55 60

Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr
65 70 75 80

Asn Asp Tyr Ala Gln Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp
85 90 95

Thr Pro Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu
100 105 110

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

Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly

	130	135	140	
	Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser	145	150	155 160
	Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp	165	170	175
	Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	180	185	190
	Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser	195	200	205
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser	210	215	220
	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn	225	230	235 240
[0052]	Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	245	250	255
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln	260	265	270
	Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser	275	280	285
	Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Gly Tyr Thr	290	295	300
	Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly	305	310	315 320
	Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gly Lys Phe Lys	325	330	335
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met	340	345	350
	Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	355	360	365

Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
370 375 380

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala
385 390 395 400

Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ala Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala
405 410 415

Ser Ile Thr Cys Gly Arg Asp Asn Ile Gly Ser Arg Ser Val His Trp
420 425 430

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp
435 440 445

Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Tyr
450 455 460

Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu
465 470 475 480

[0053]

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr Ser Asp His Val Val
485 490 495

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly Gly Ser
500 505 510

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
515 520 525

Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala
530 535 540

Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile
545 550 555 560

Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr
565 570 575

Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Gln Ser Leu Lys Ser Arg Ile
580 585 590

Thr Ile Asn Pro Asp Thr Pro Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn
595 600 605

Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly
610 615 620

Gln Leu Gly Leu Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
625 630 635 640

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
645 650 655

Gly Gly Ser Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ala Val Ser Val Ala
660 665 670

Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Gly Arg Asp Asn Ile Gly Ser
675 680 685

[0054]

Arg Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
690 695 700

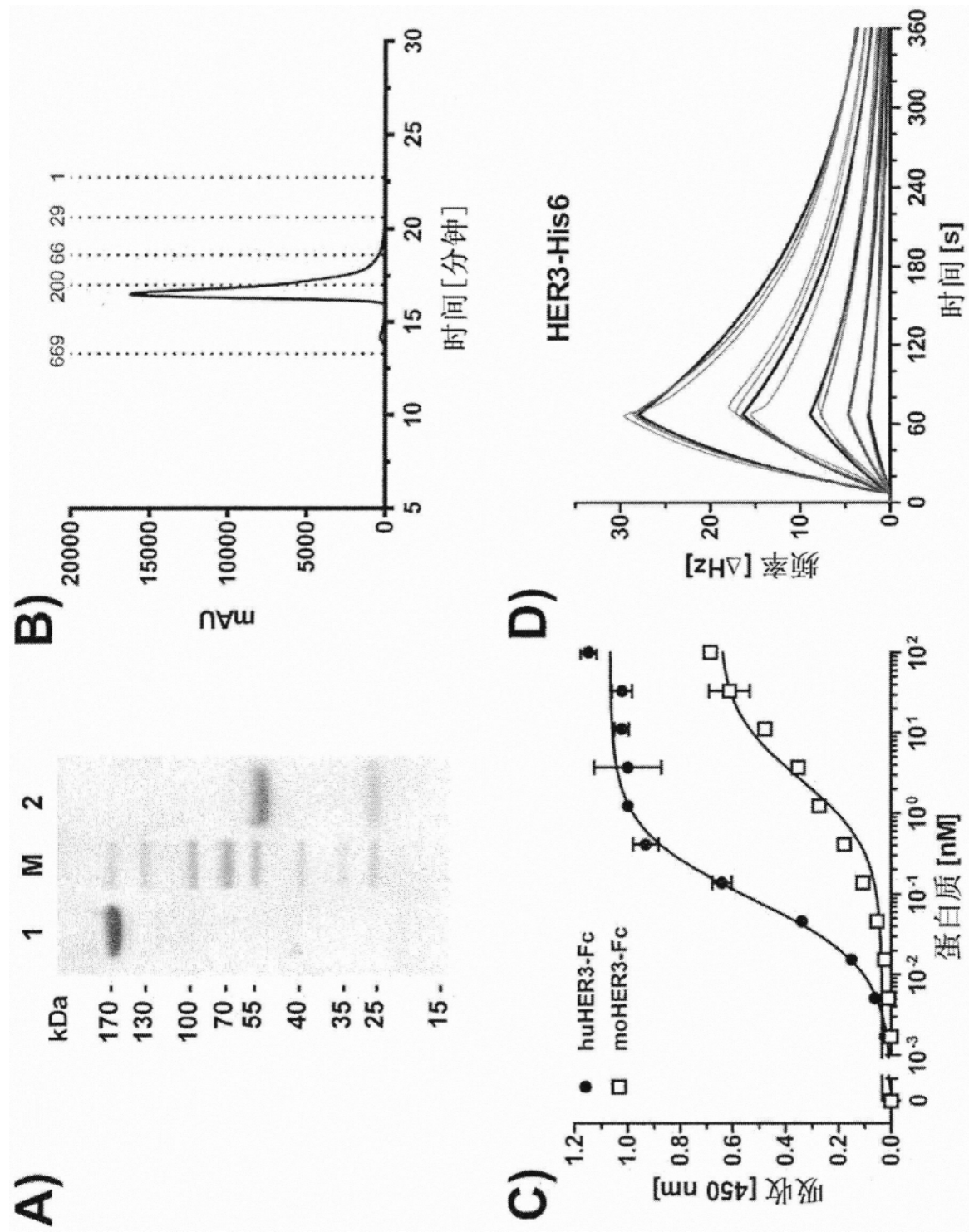
Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe
705 710 715 720

Ser Gly Ser Asn Tyr Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val
725 730 735

Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ile Thr
740 745 750

Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
755 760 765

Ser Leu
770



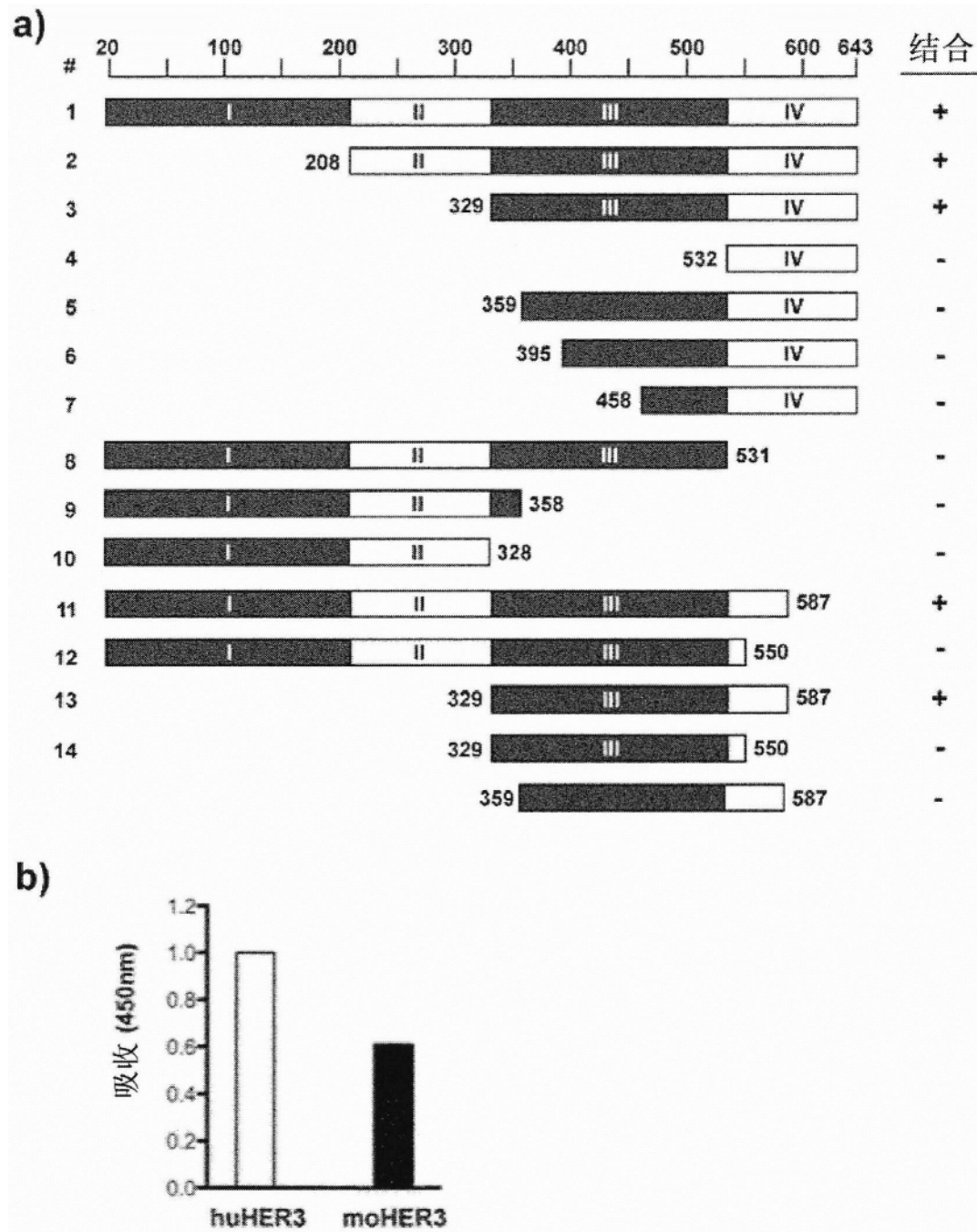


图2

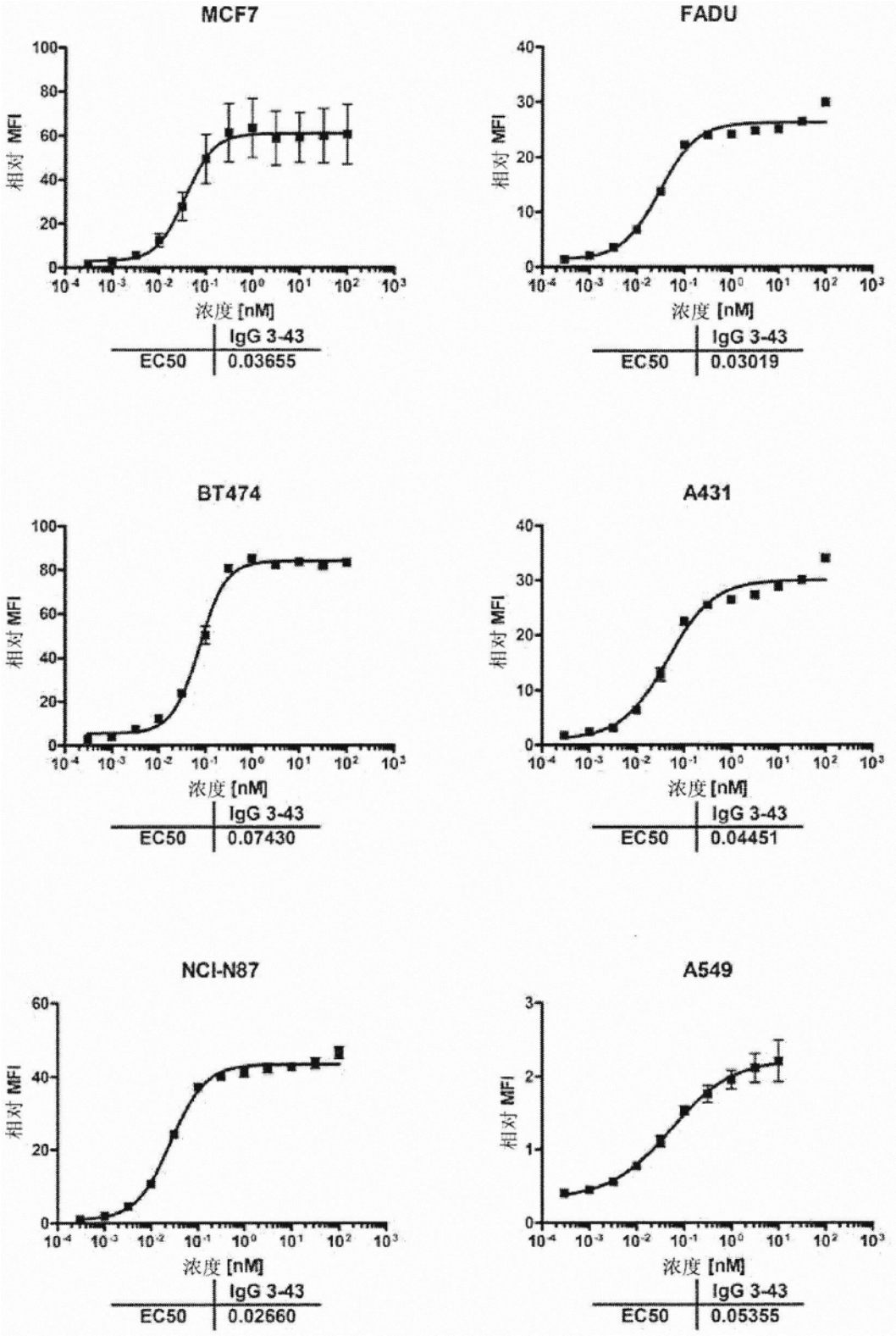


图3

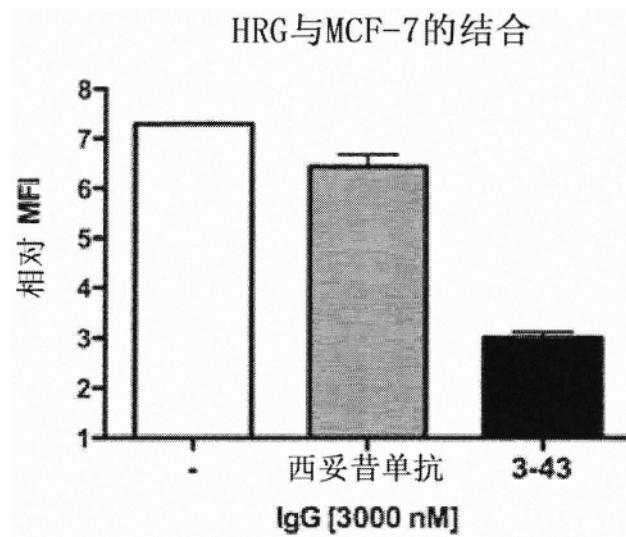


图4

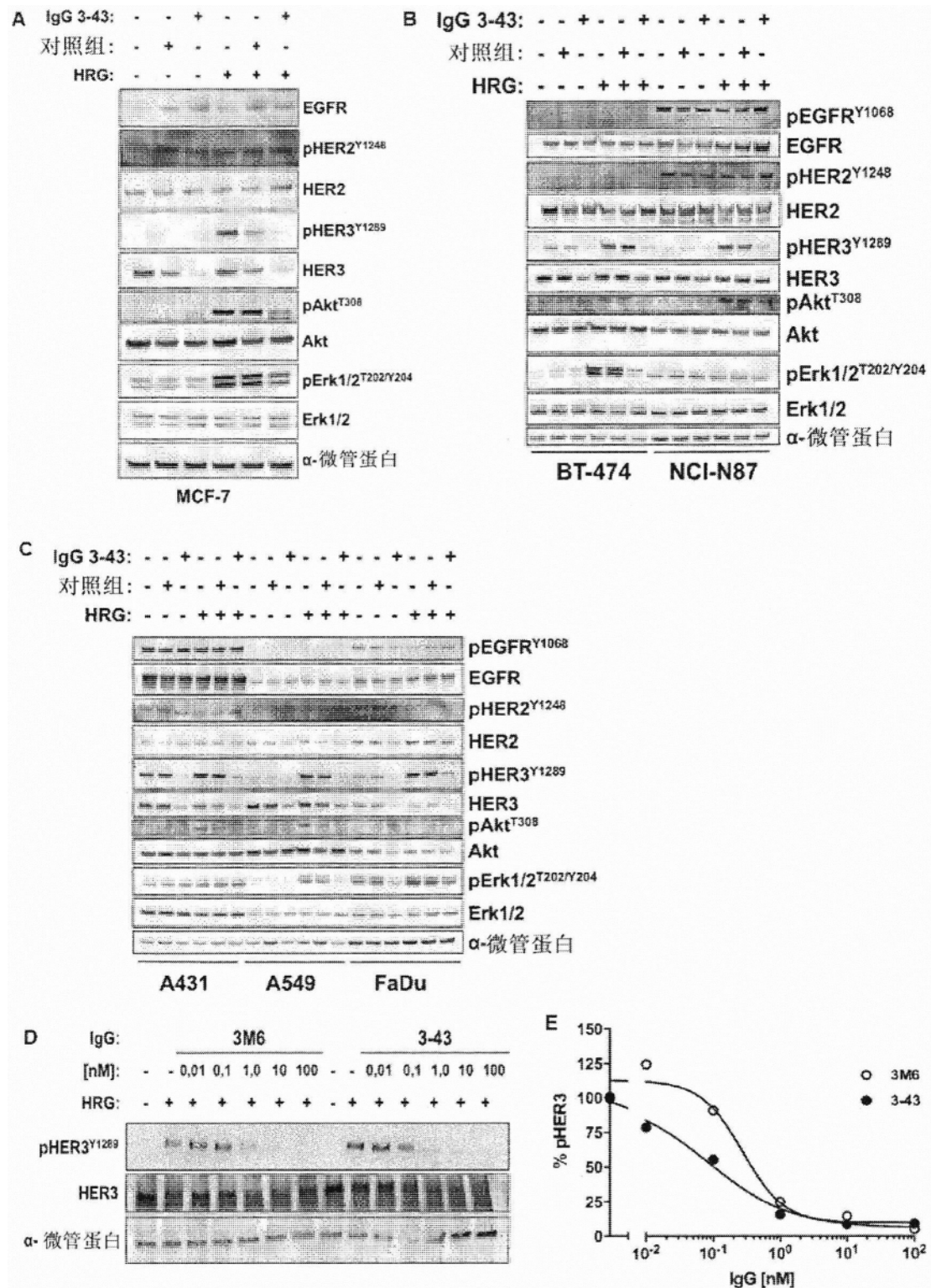


图5

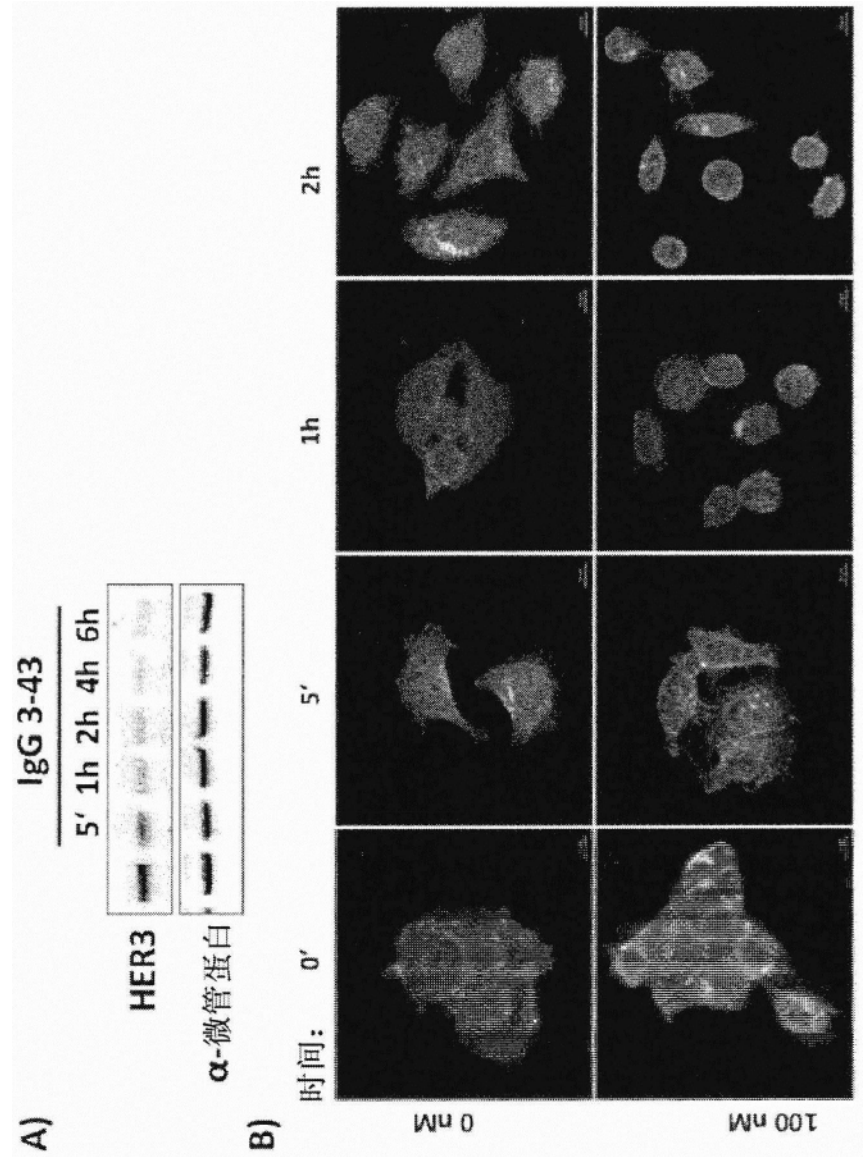


图6

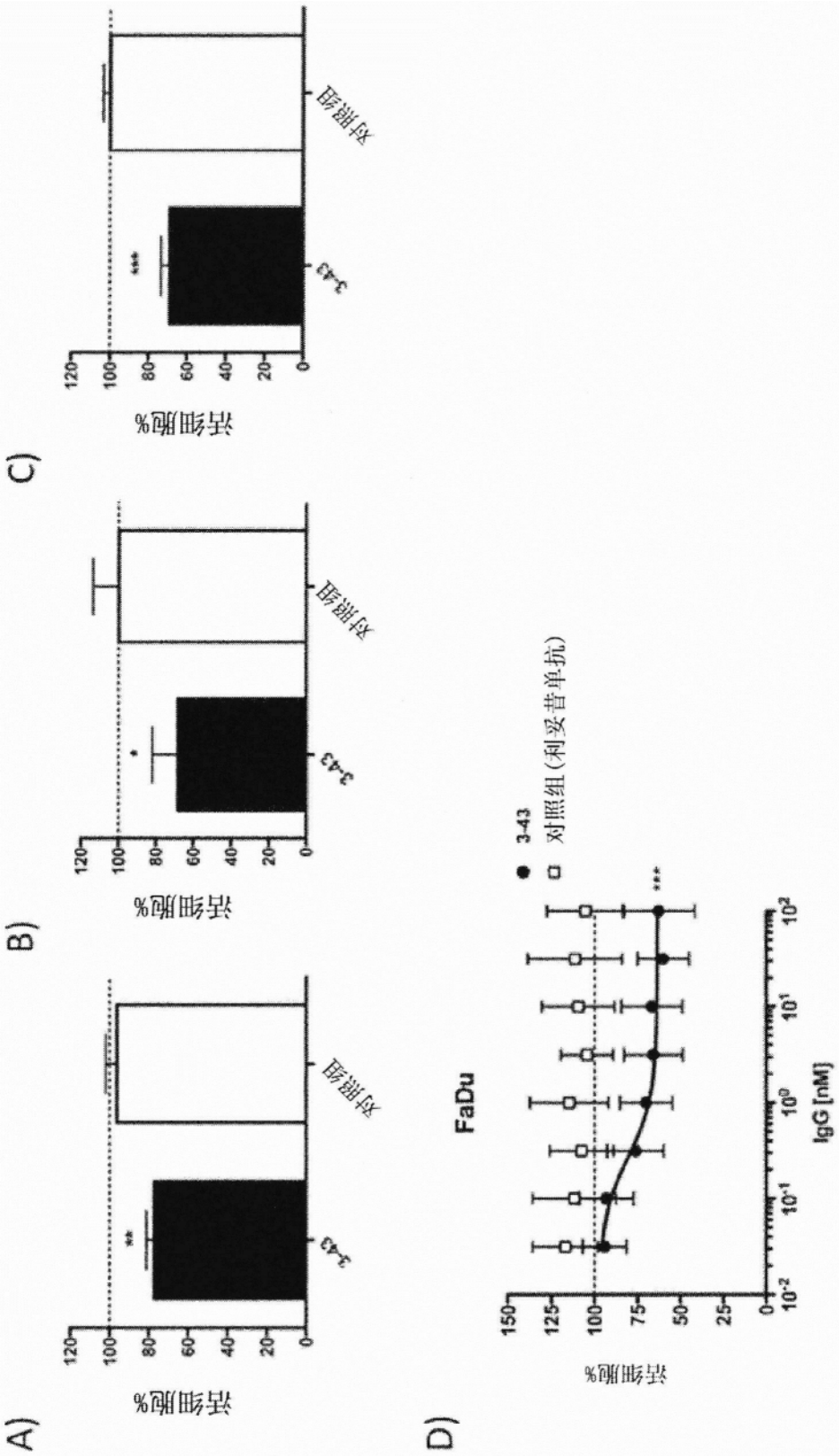


图7

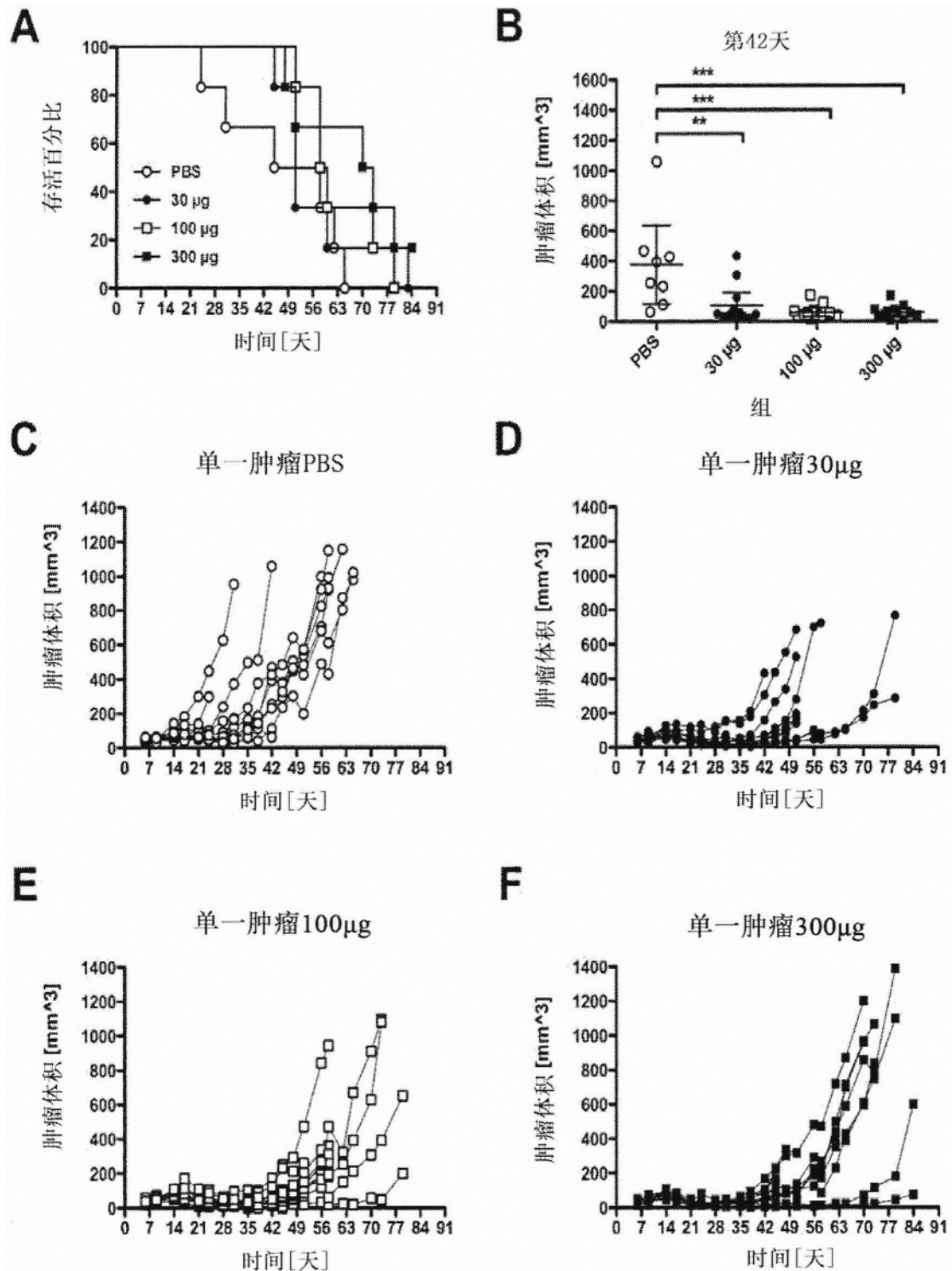


图8

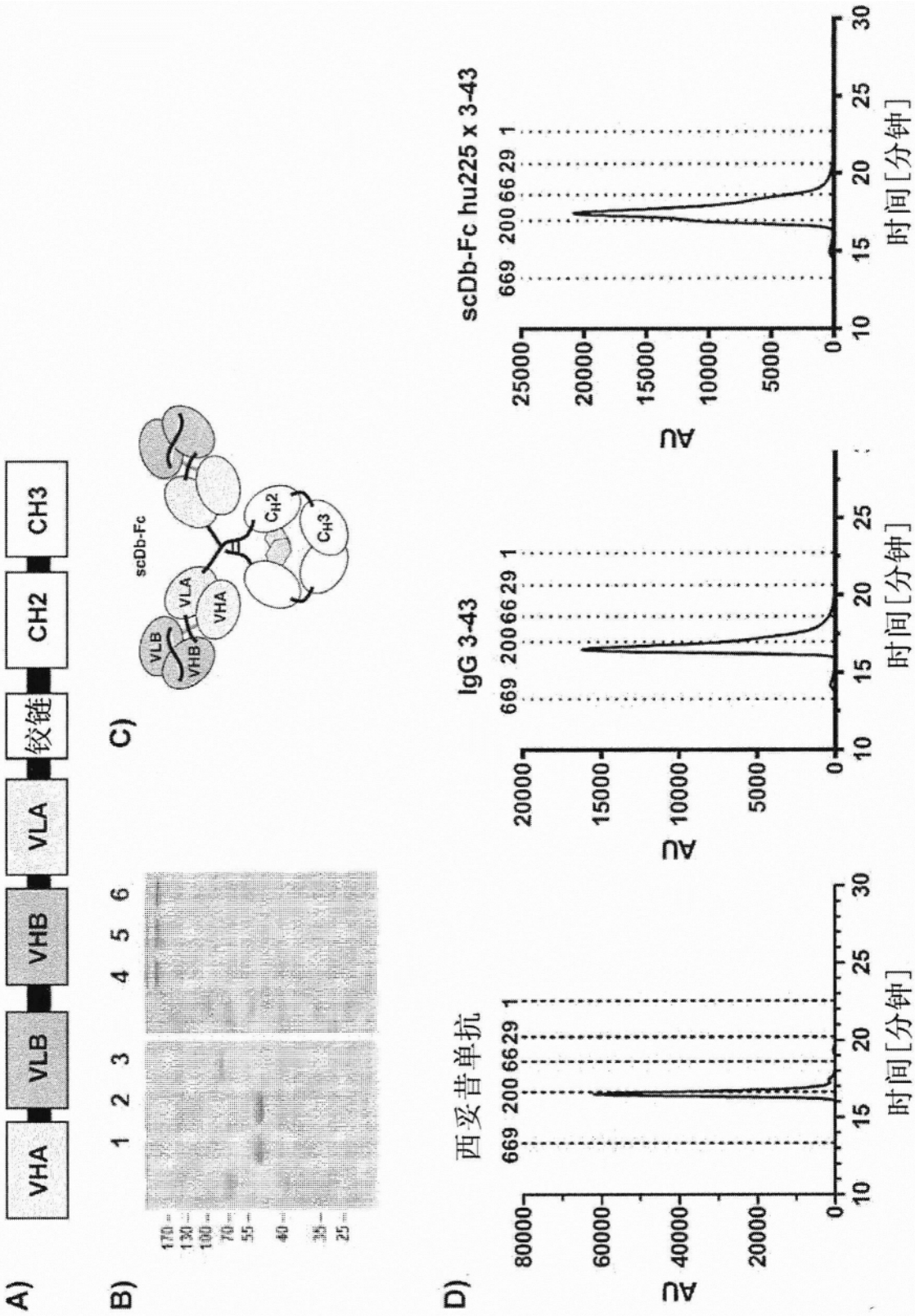


图9

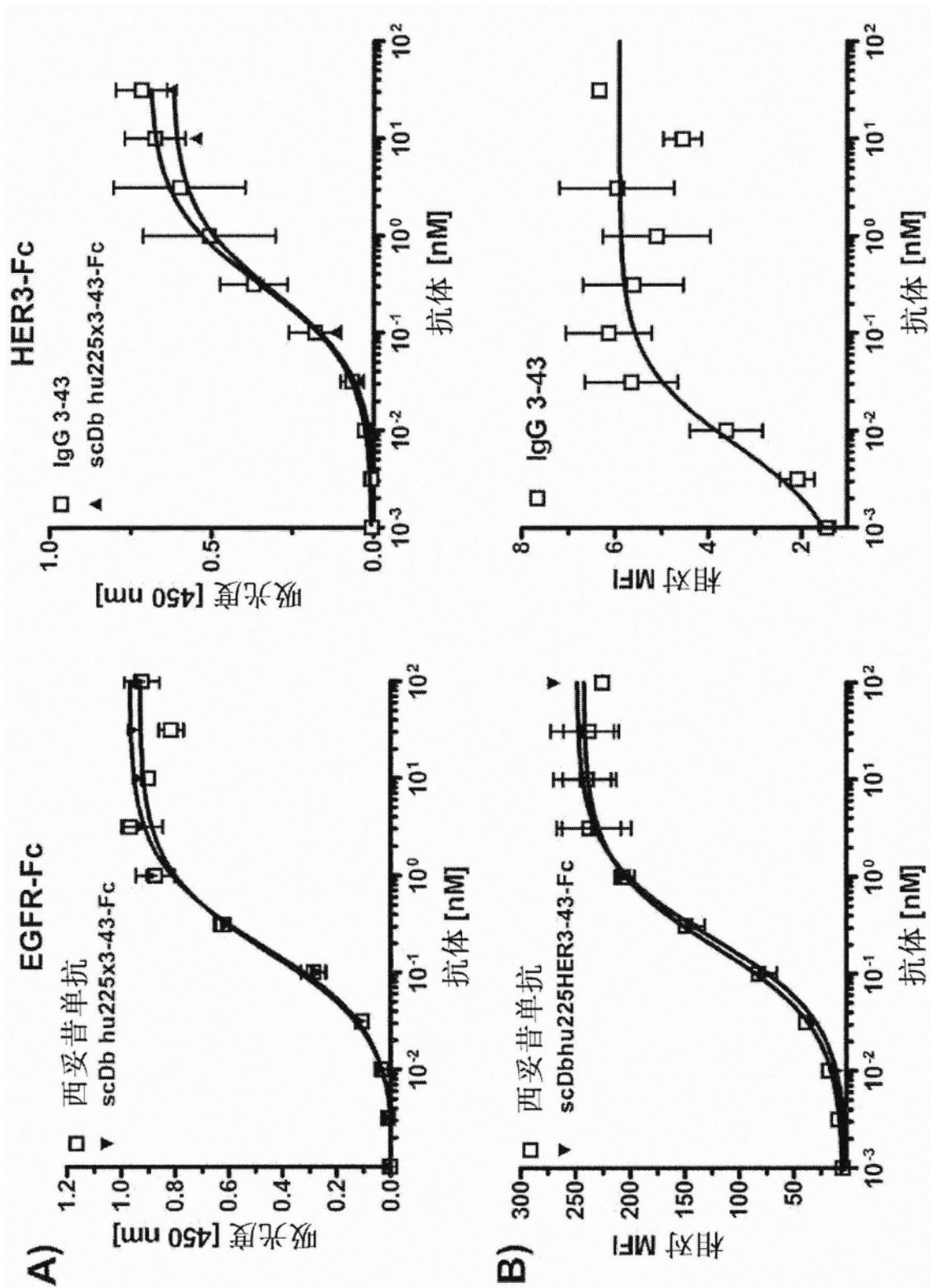


图10

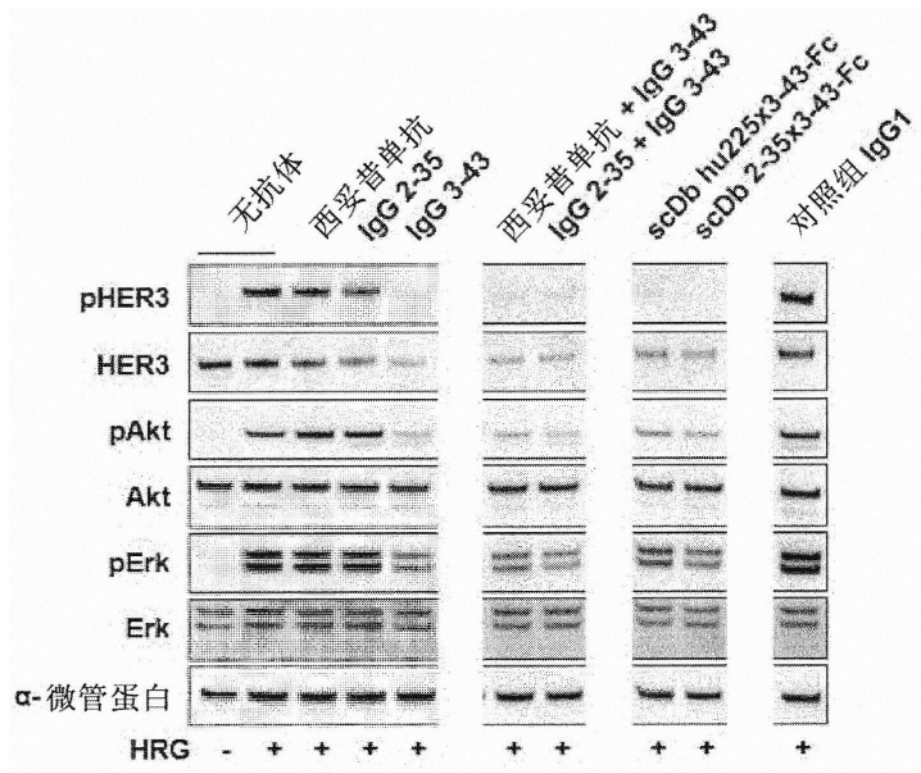


图11

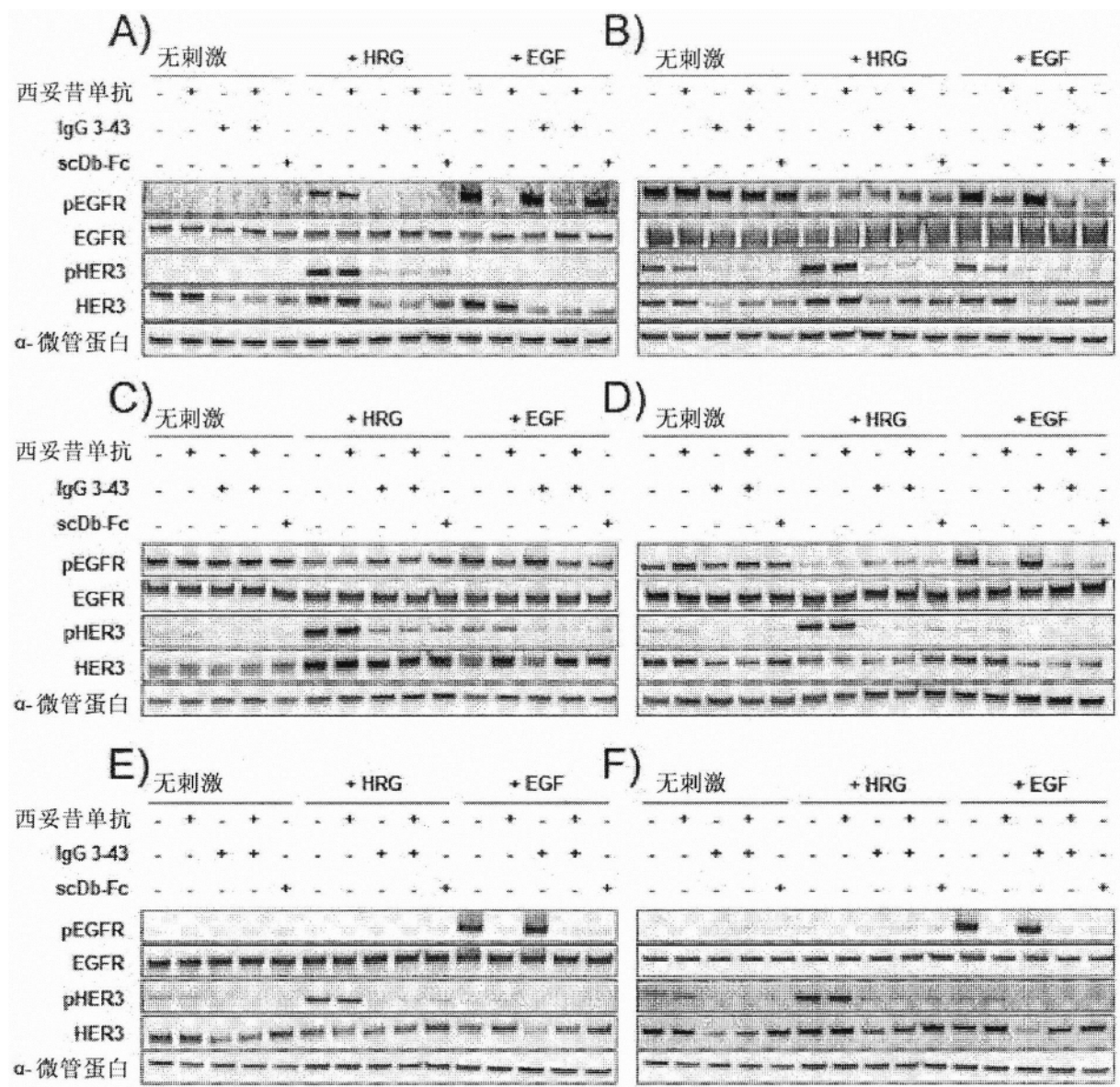


图12

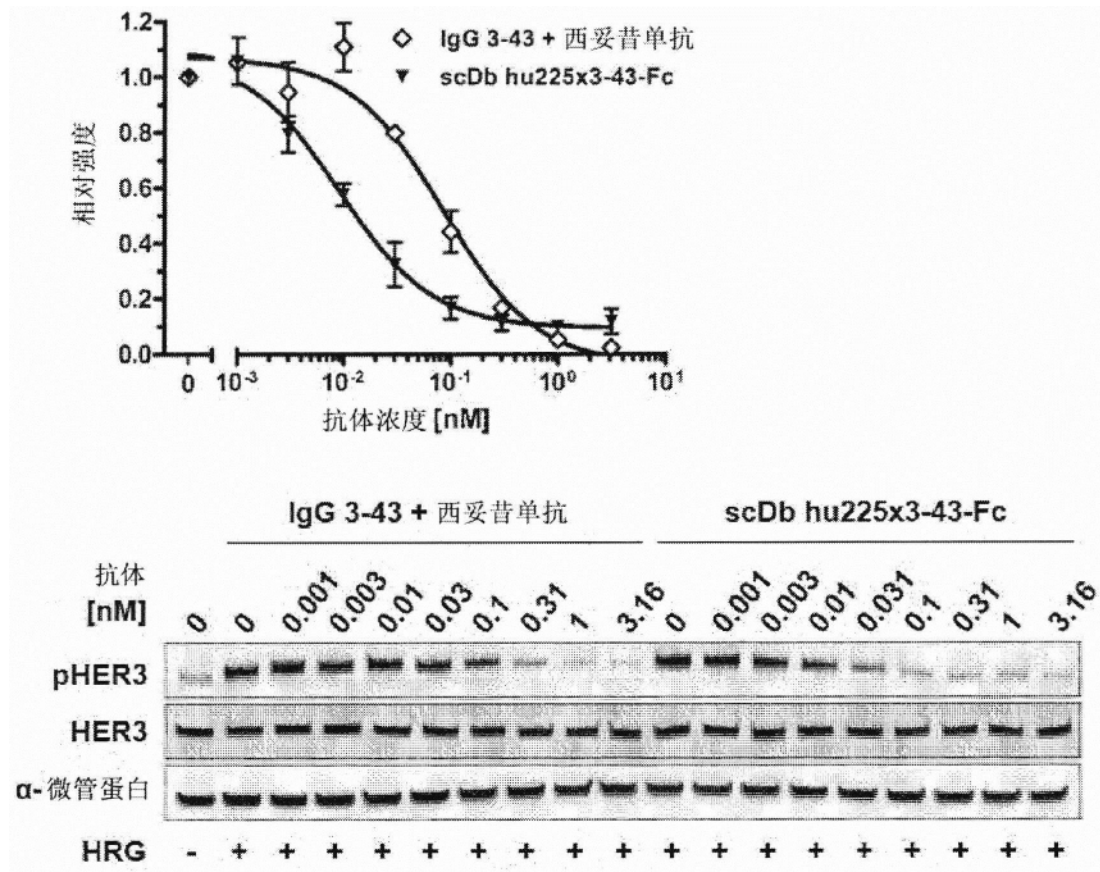


图13

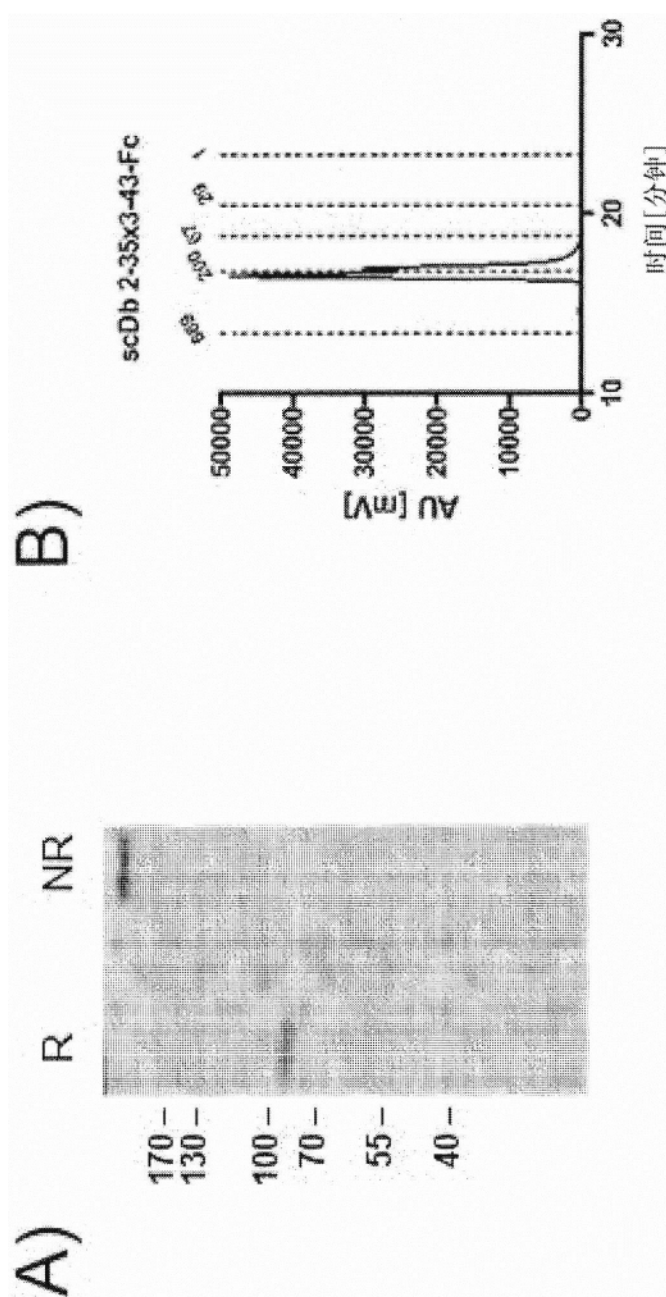


图14

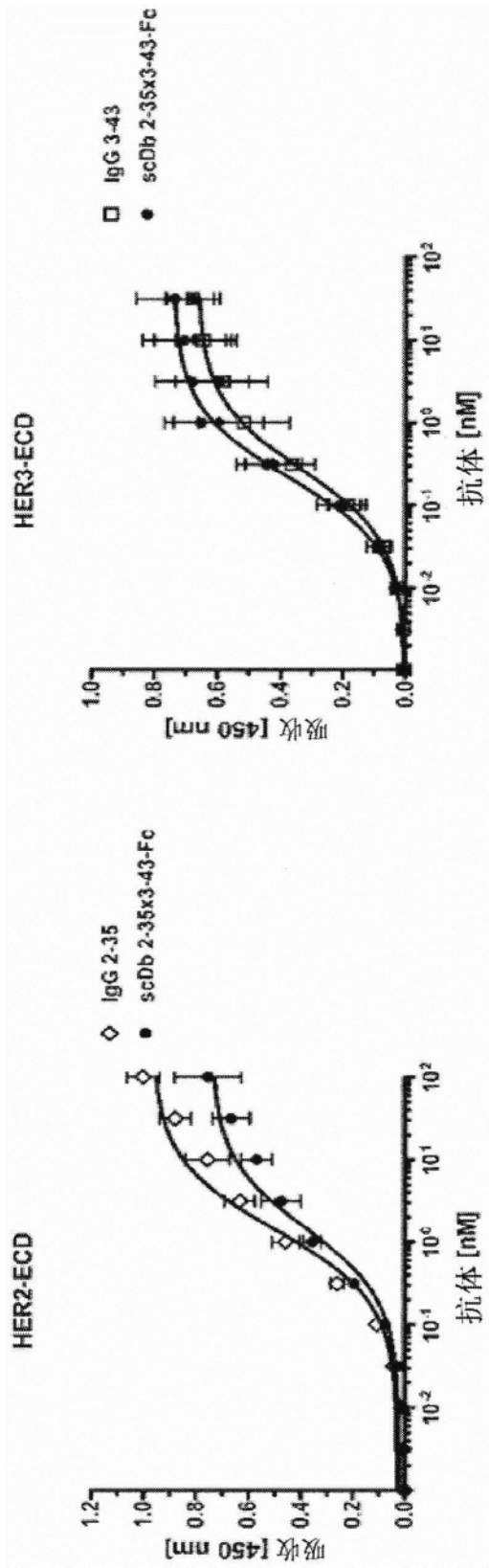


图15

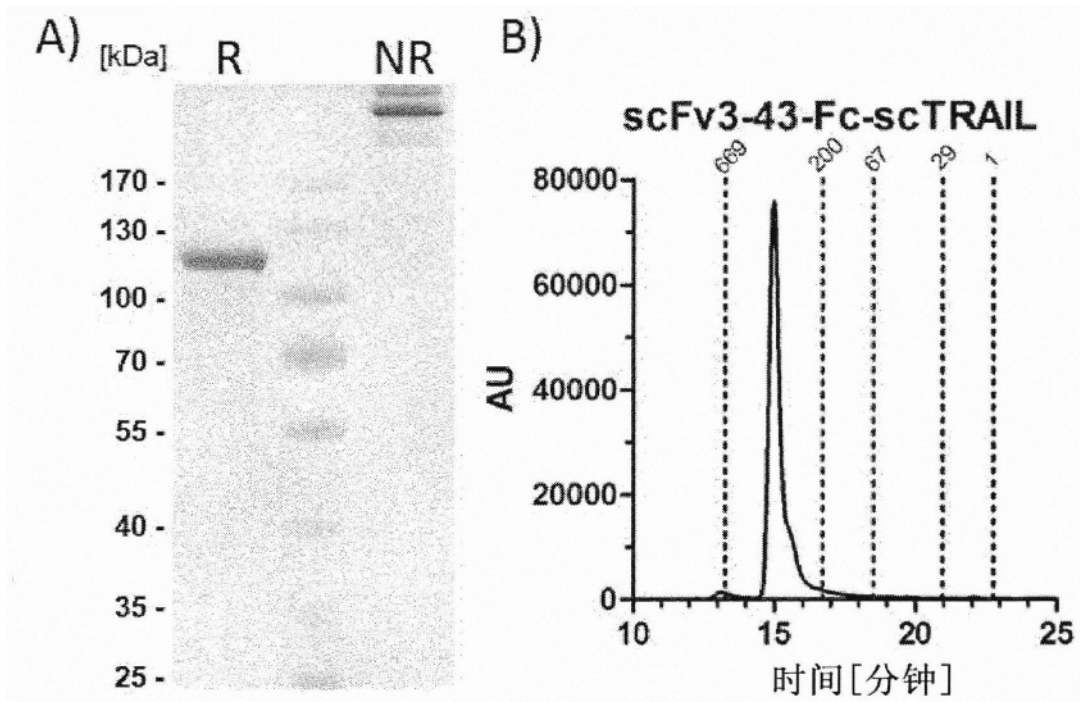


图16

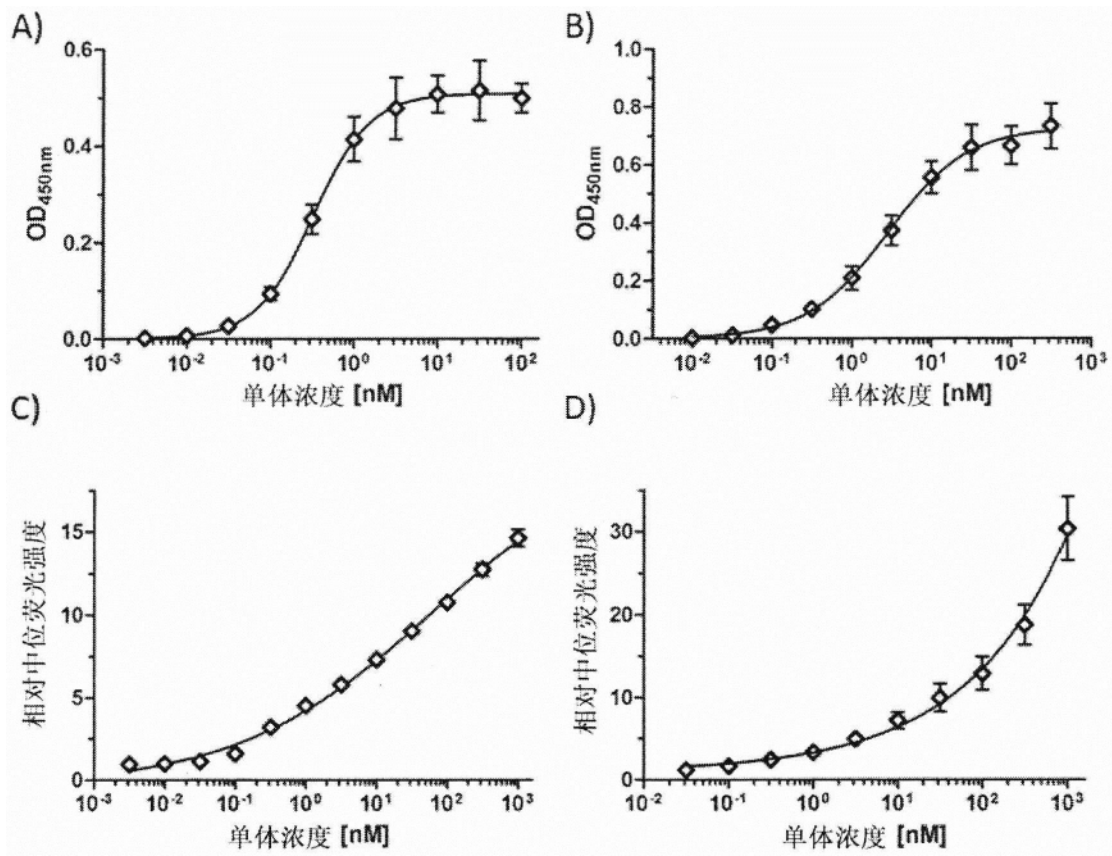


图17

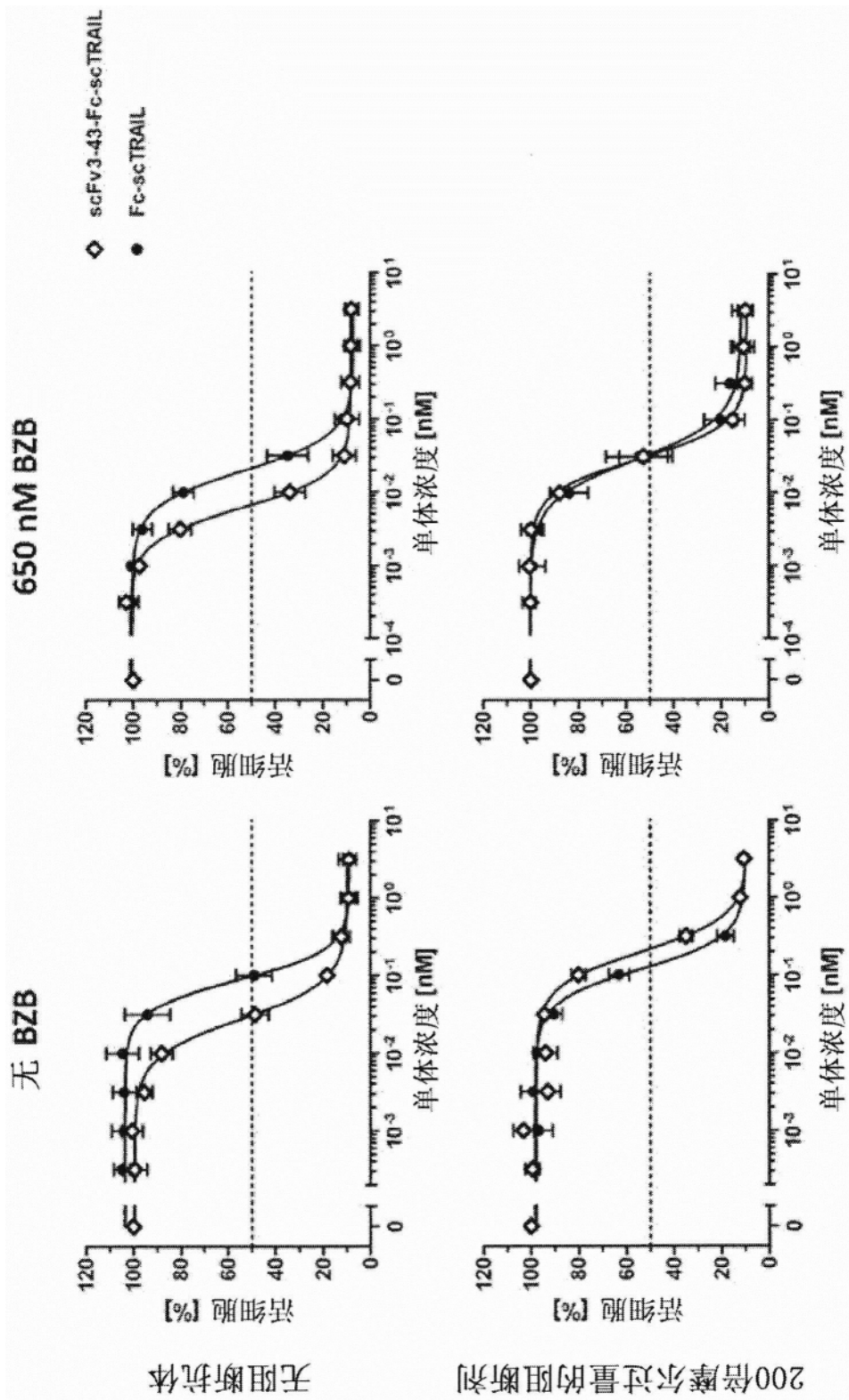


图18

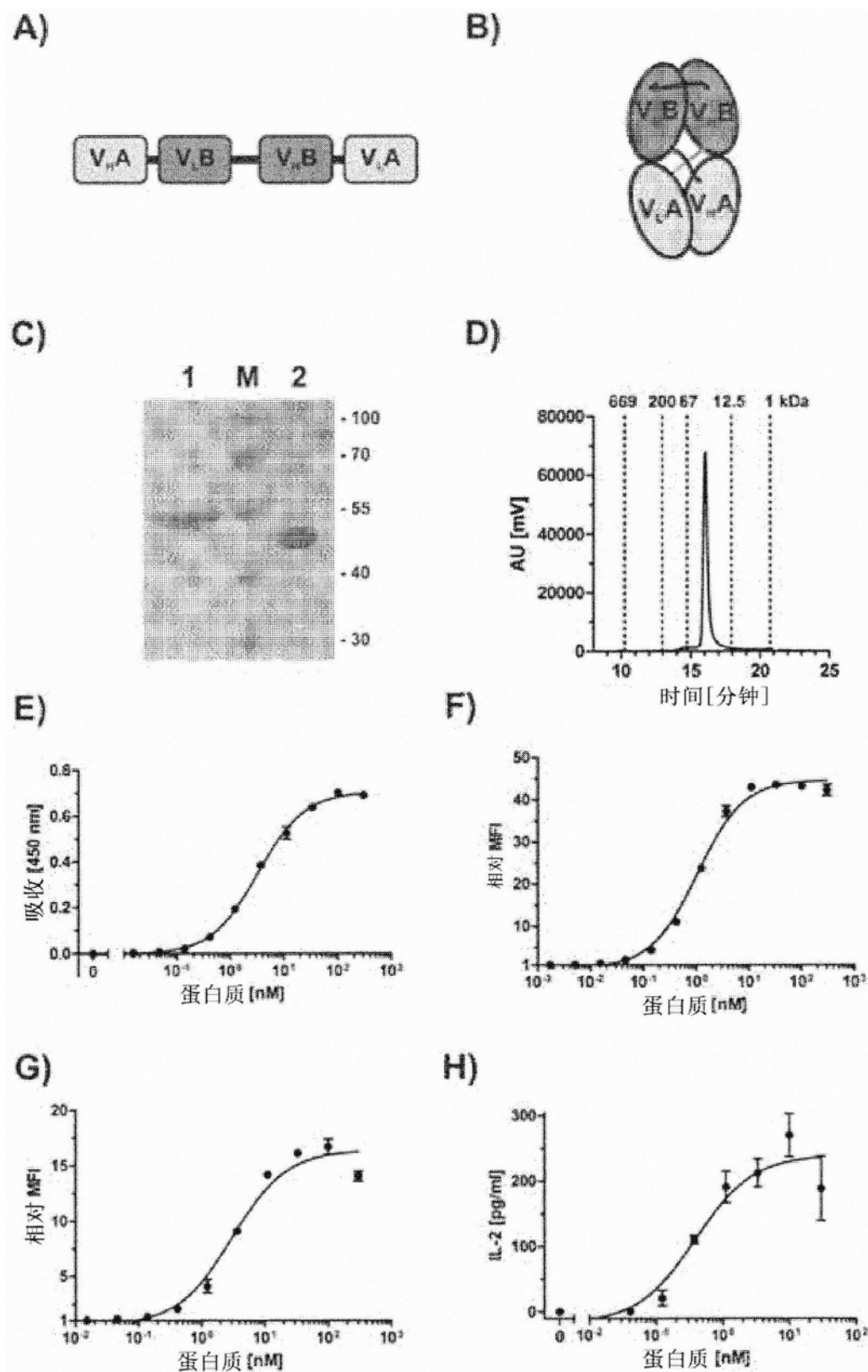


图19

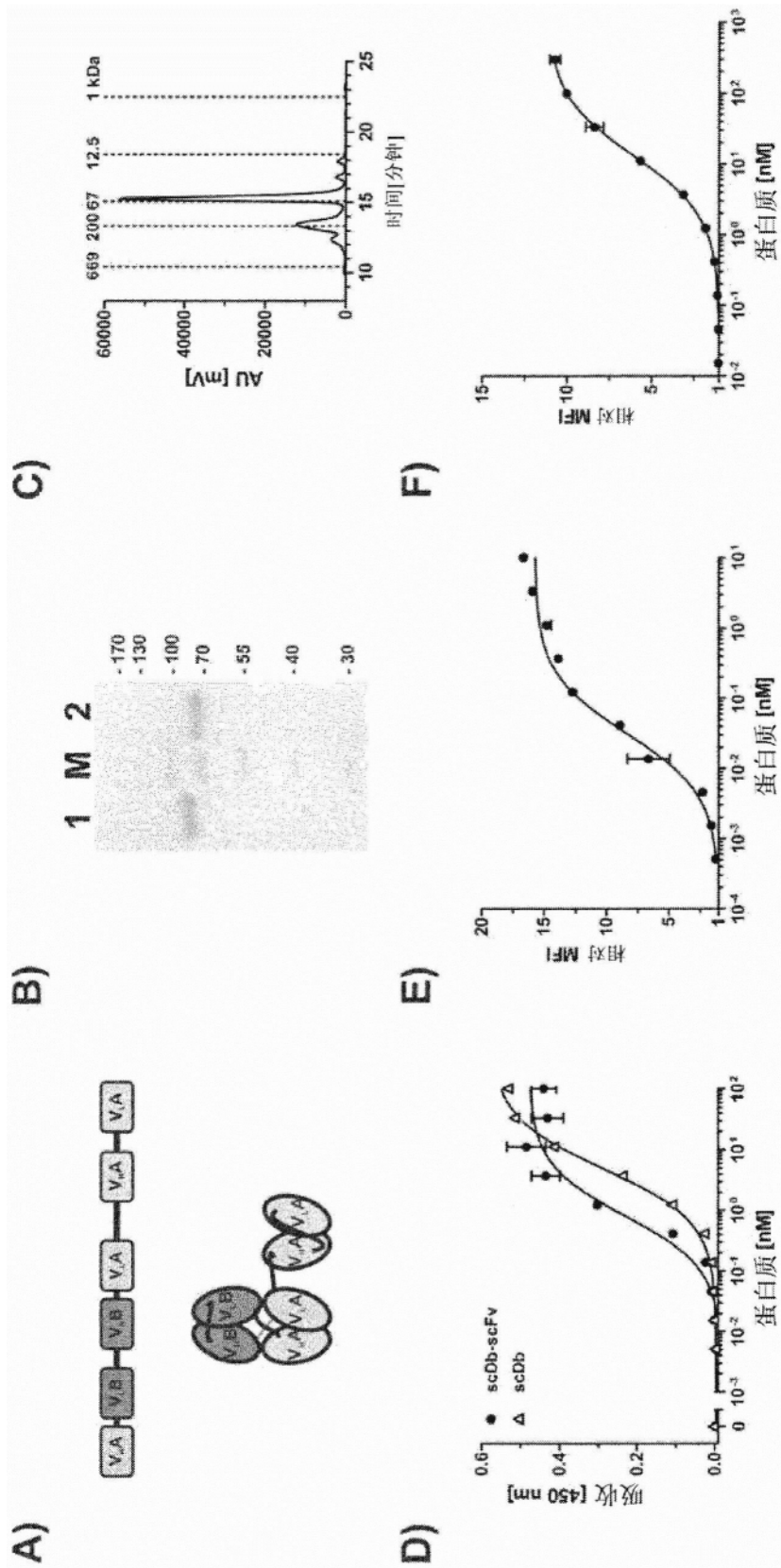


图20

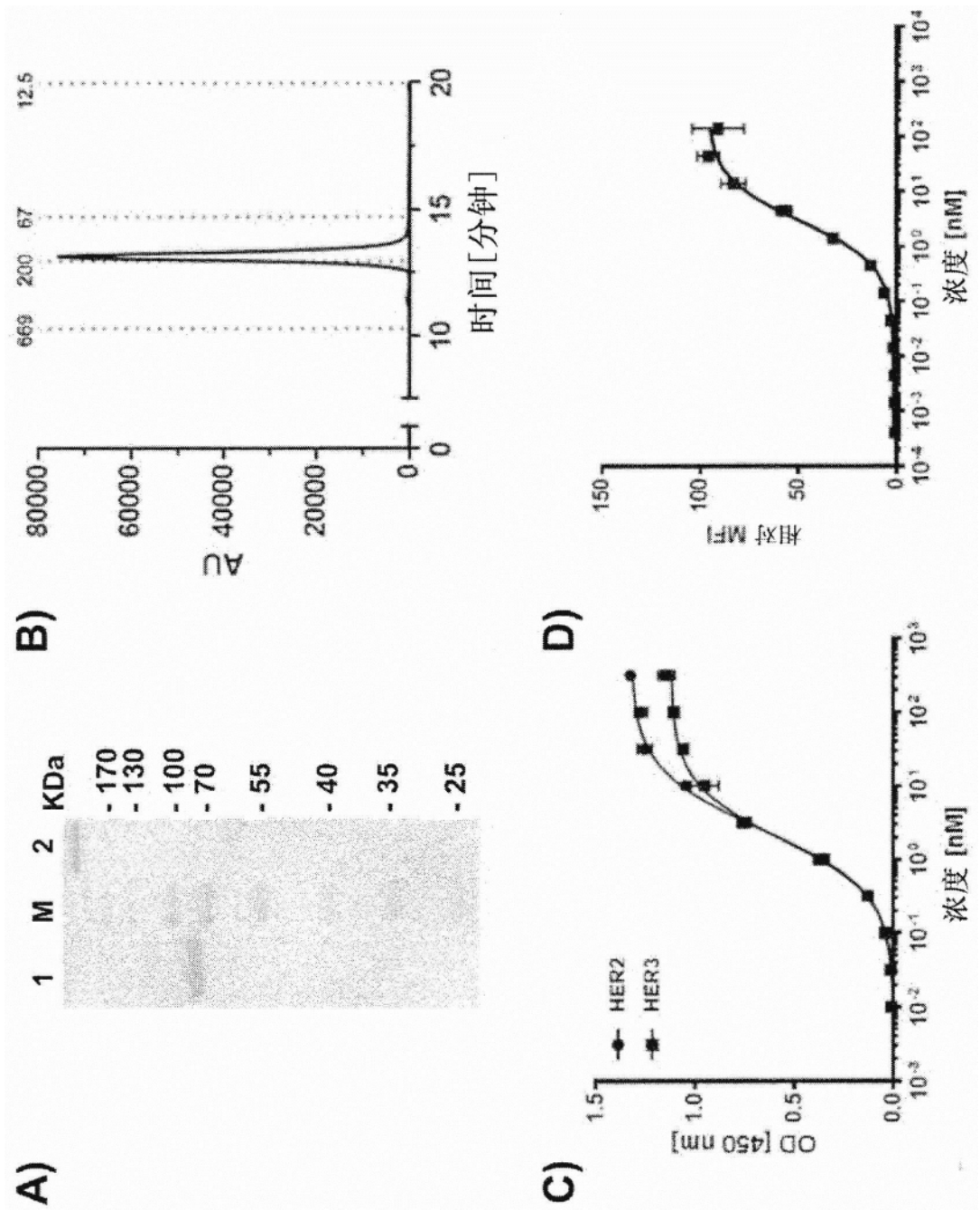


图21

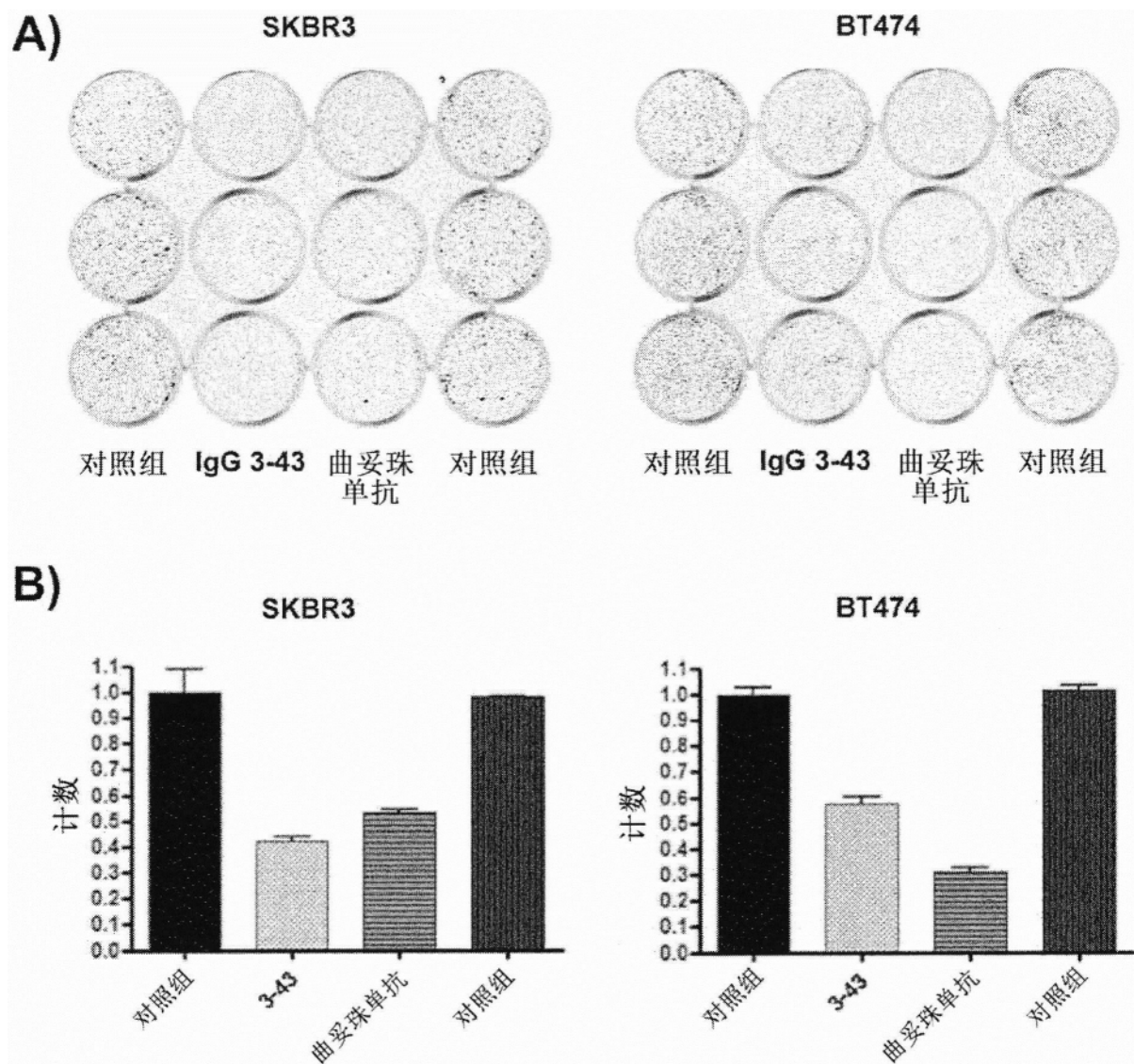


图22

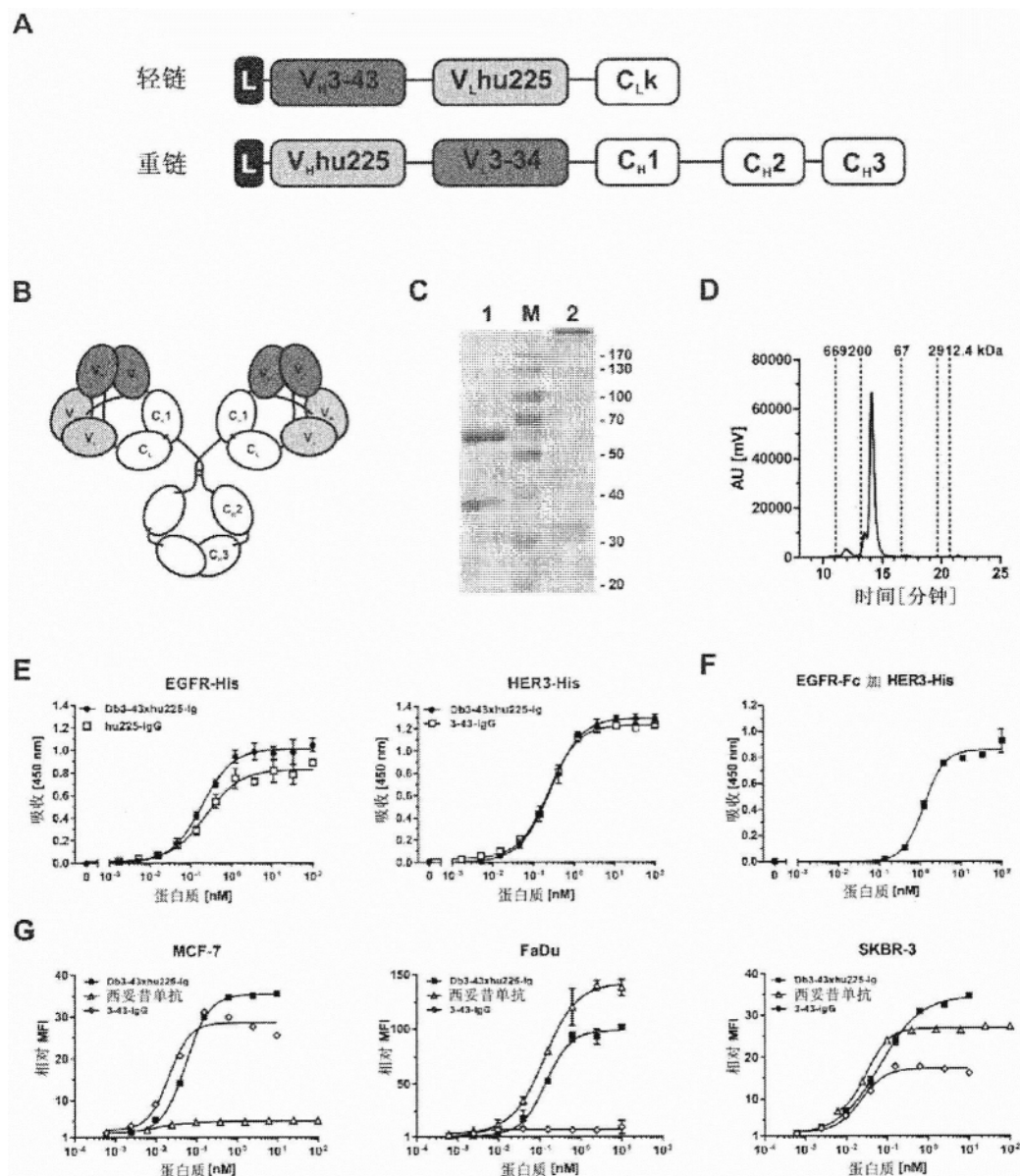


图23

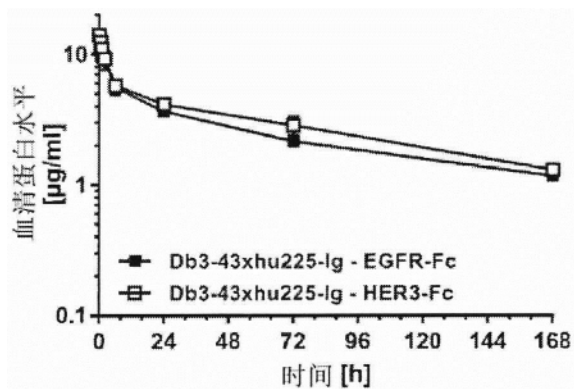


图24

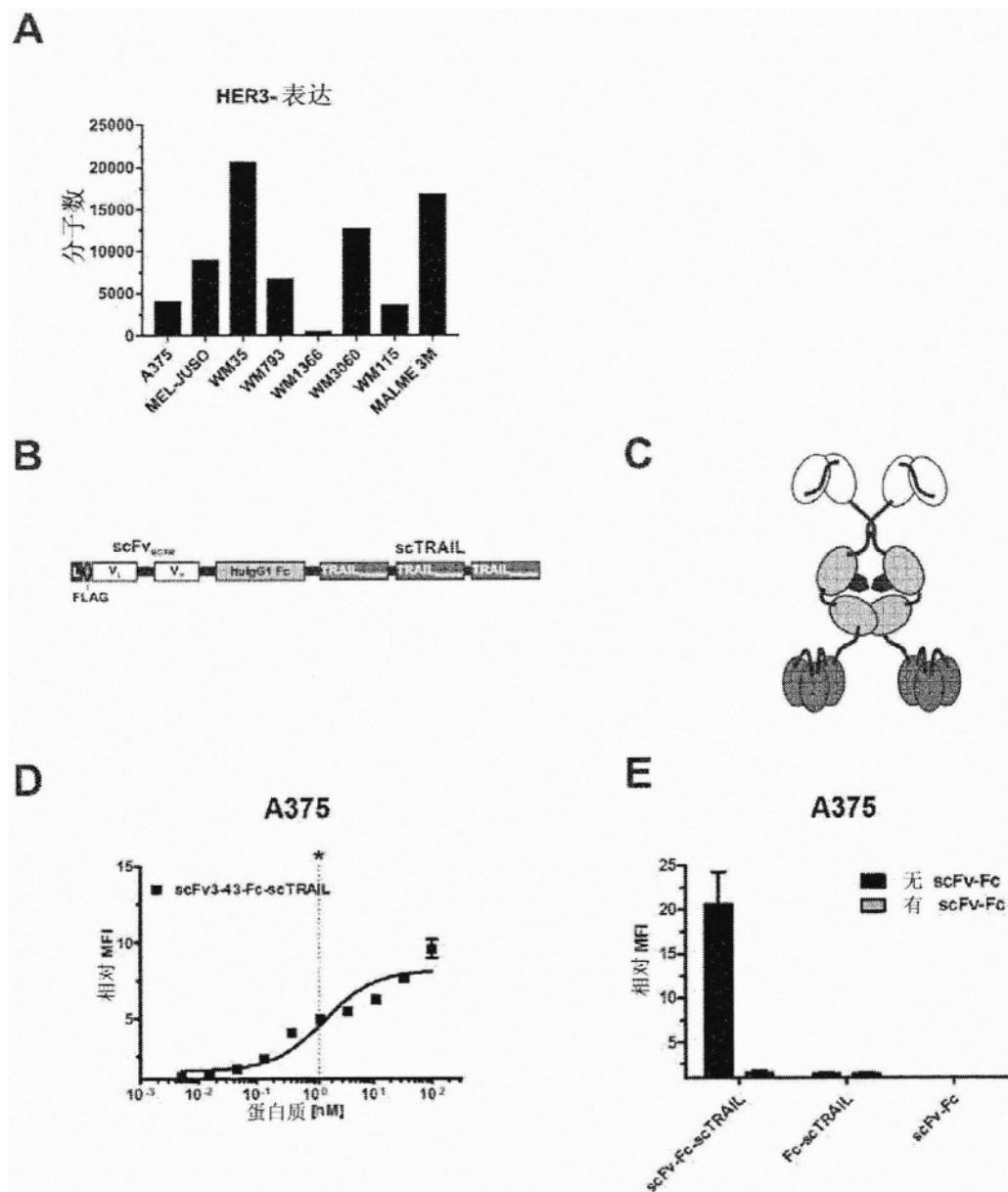


图25

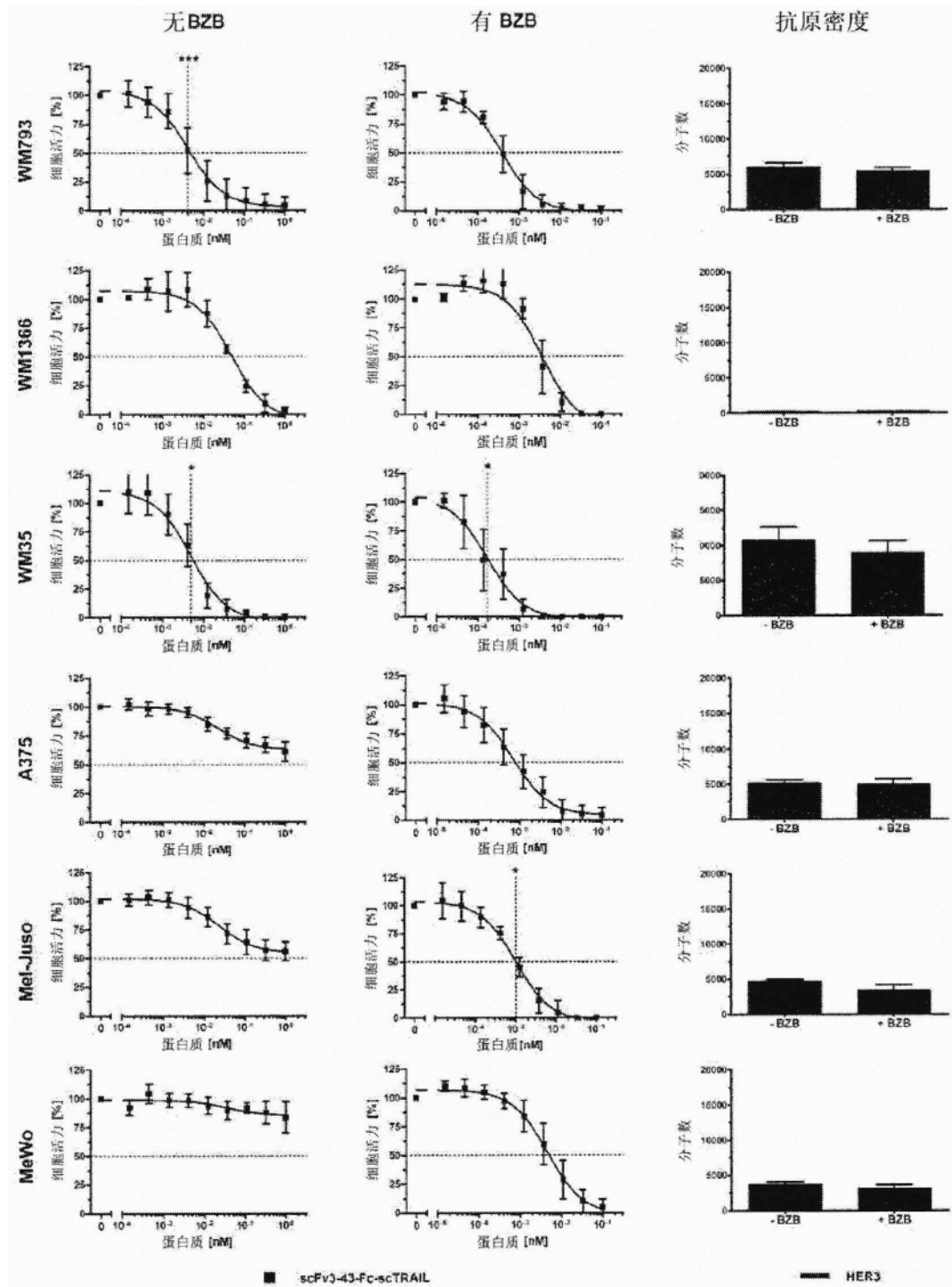


图26

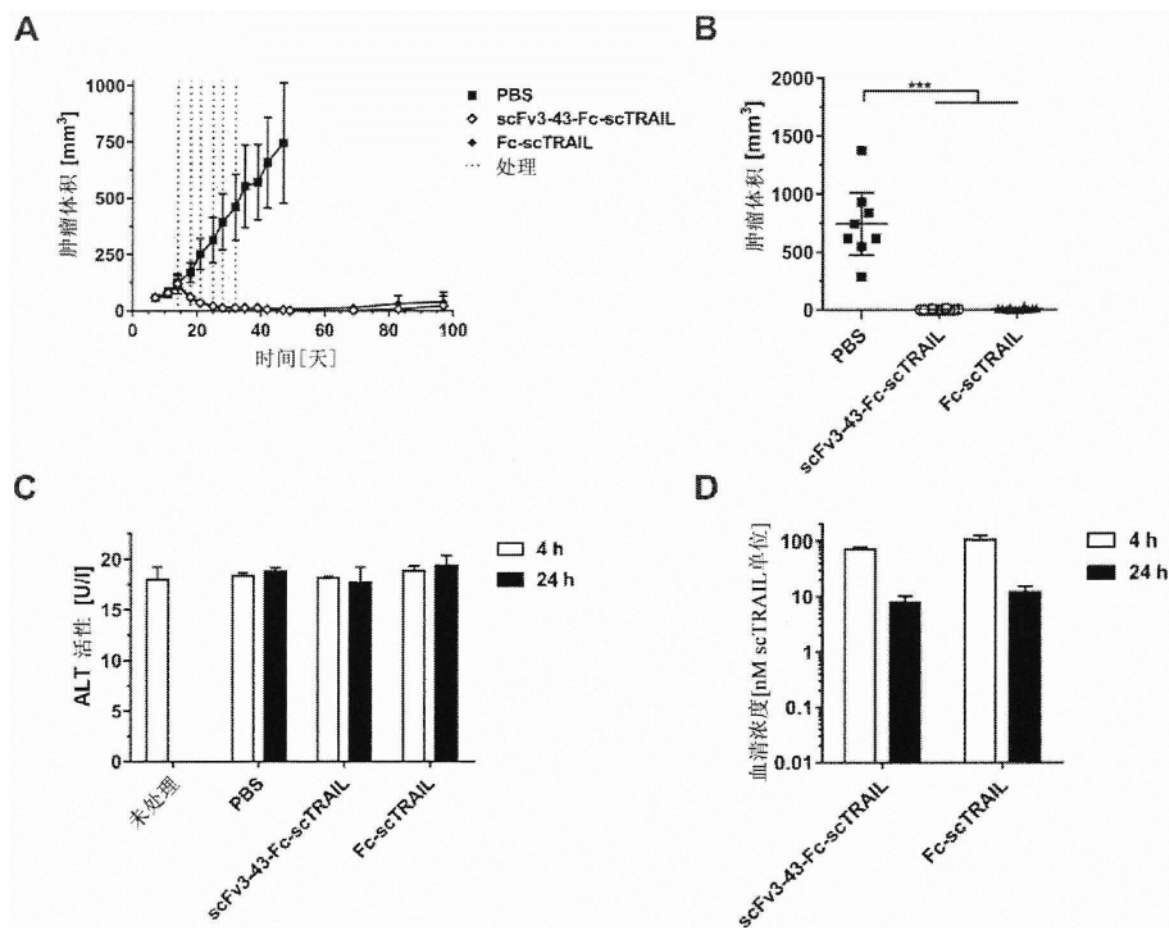


图27

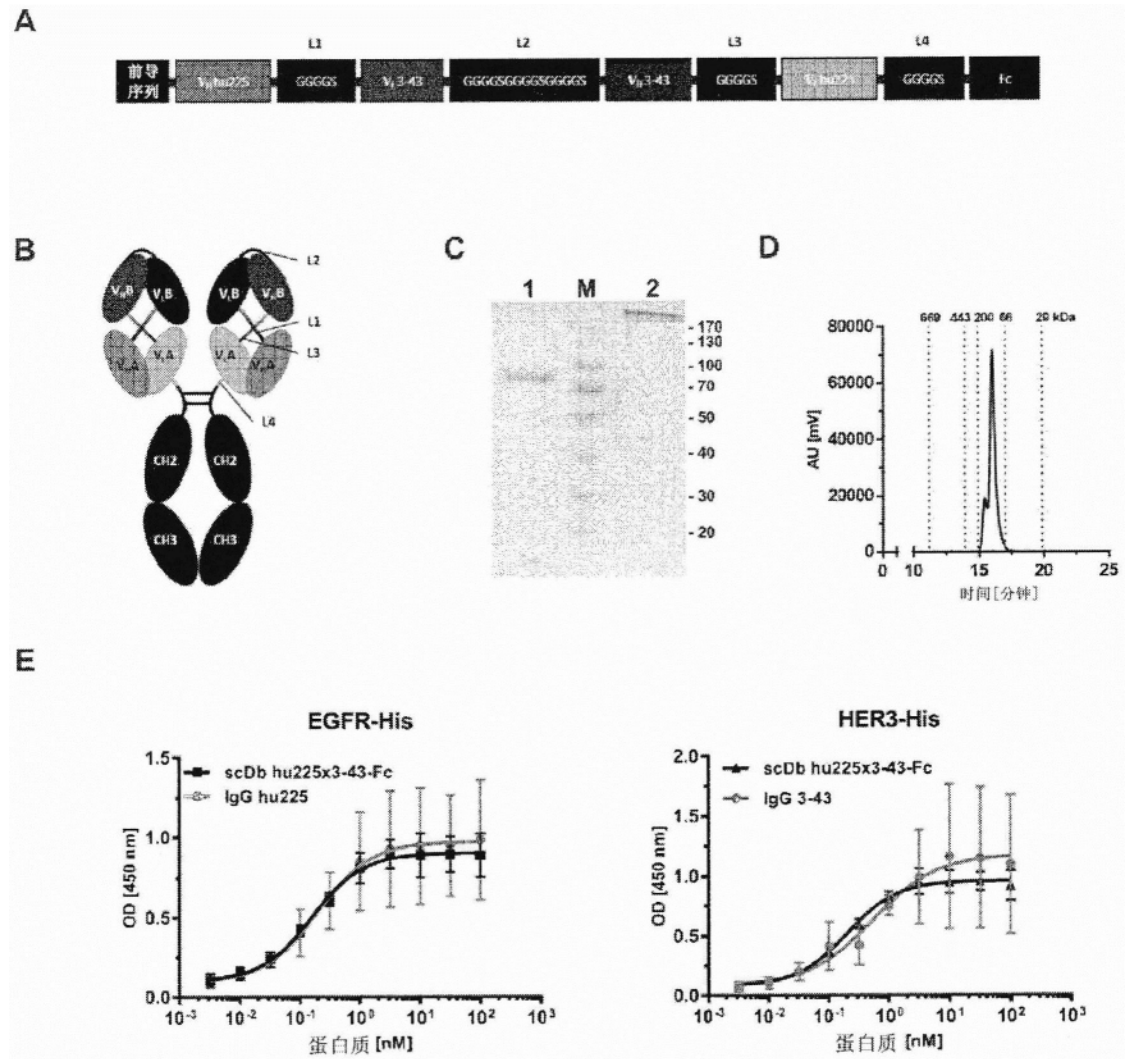


图28

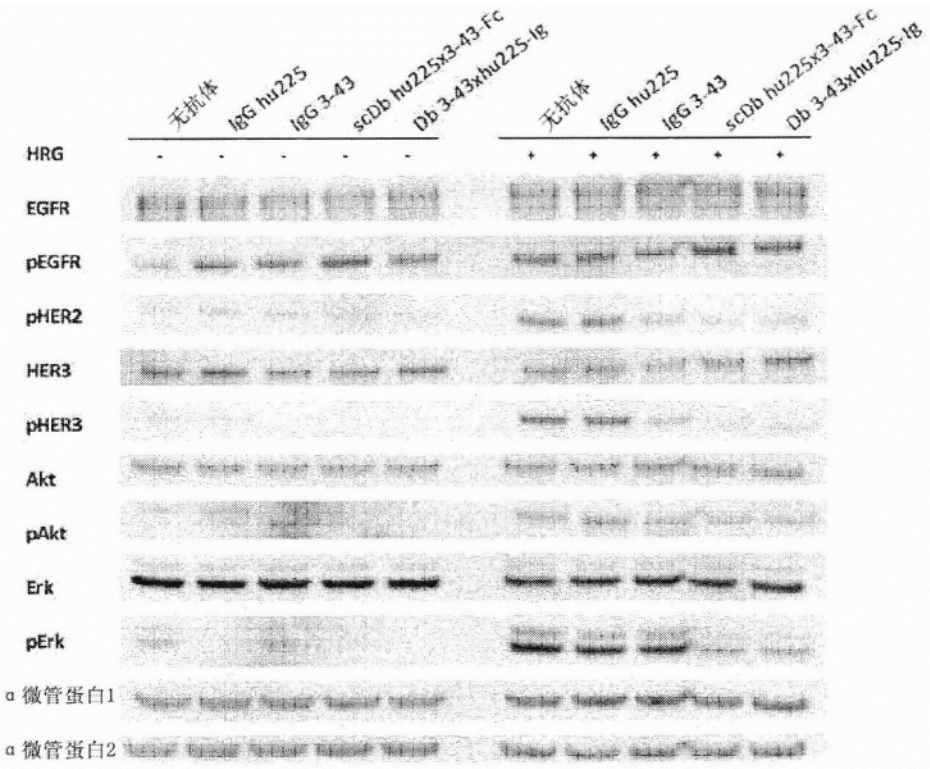


图29

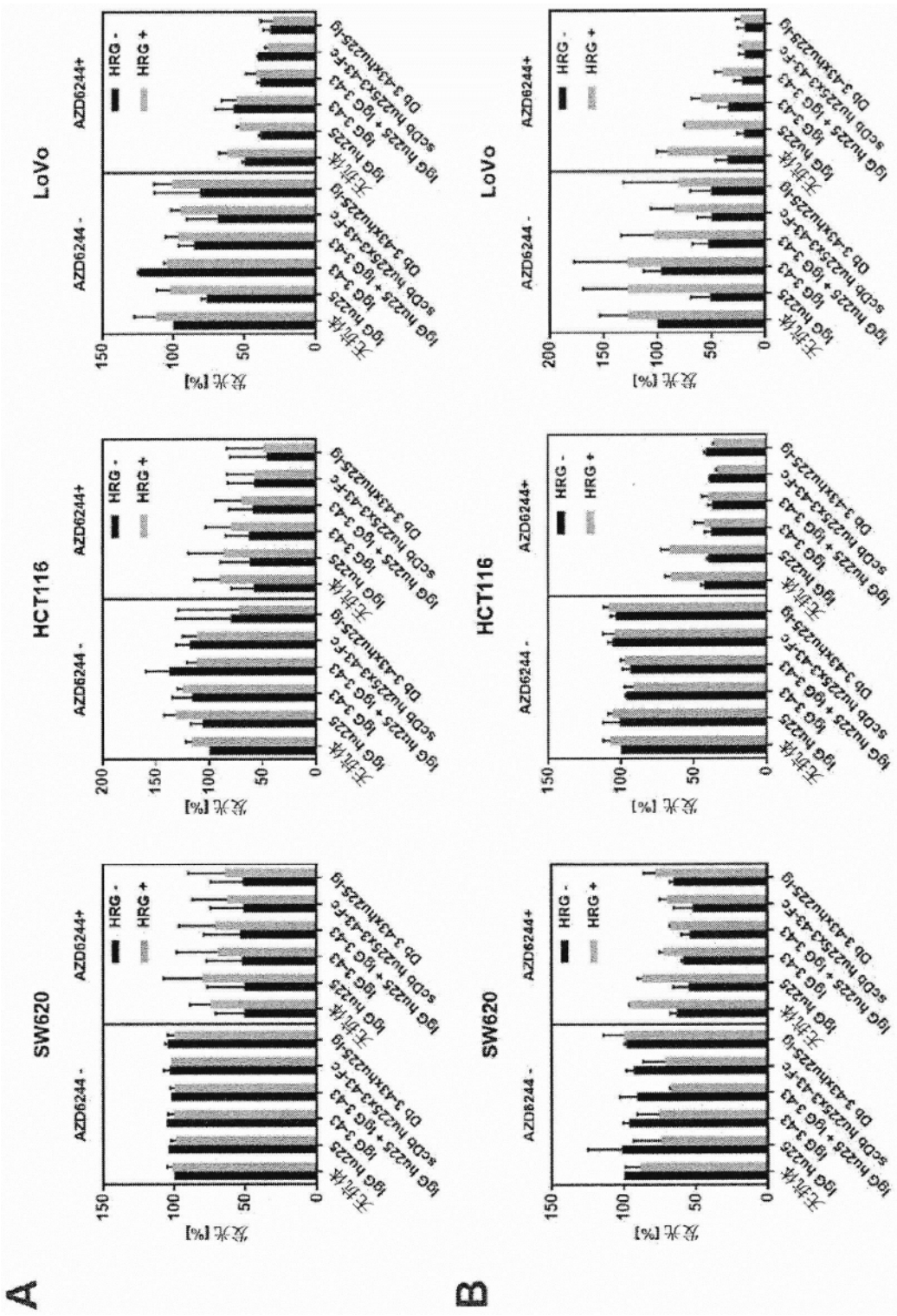


图30

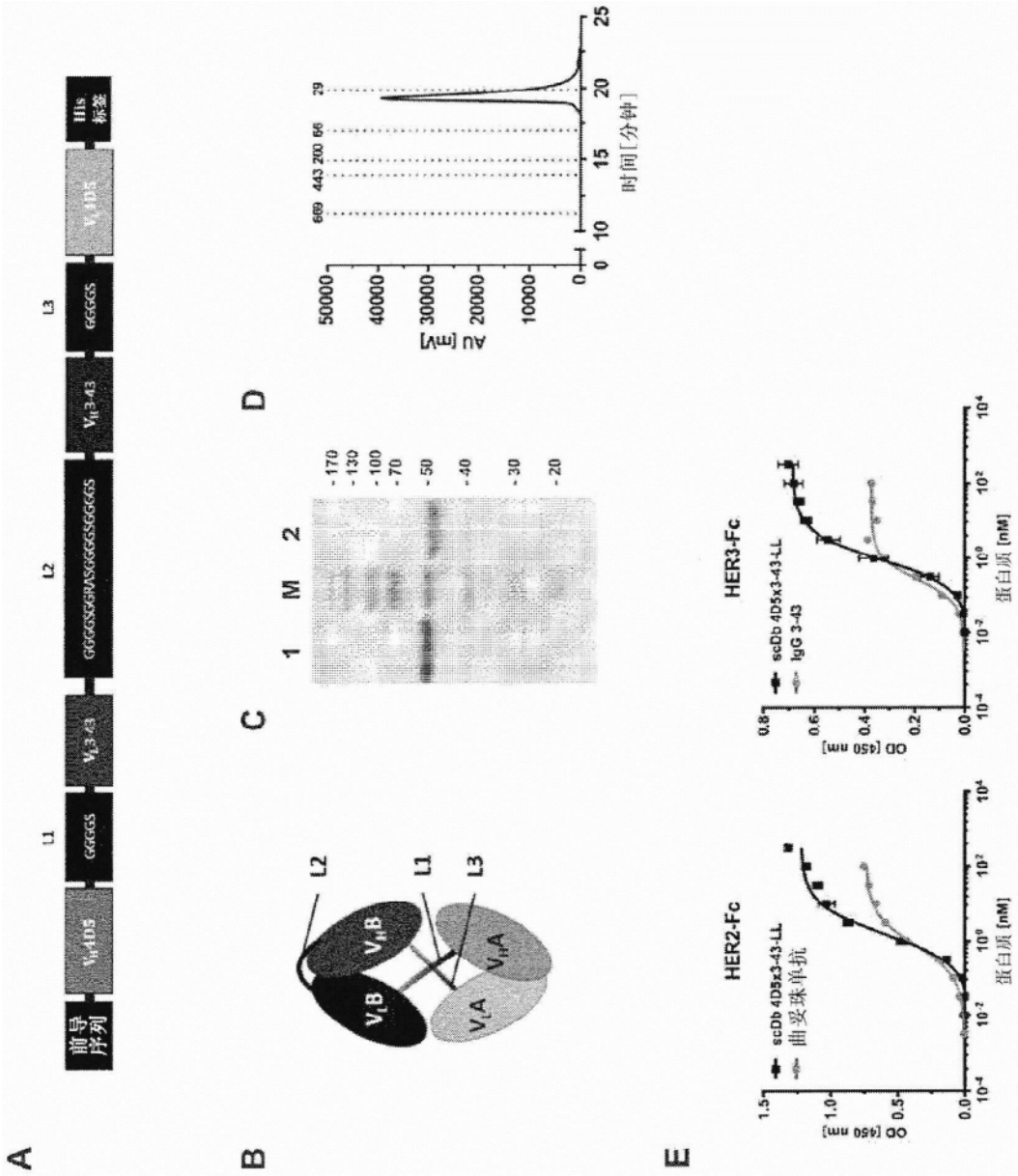


图31

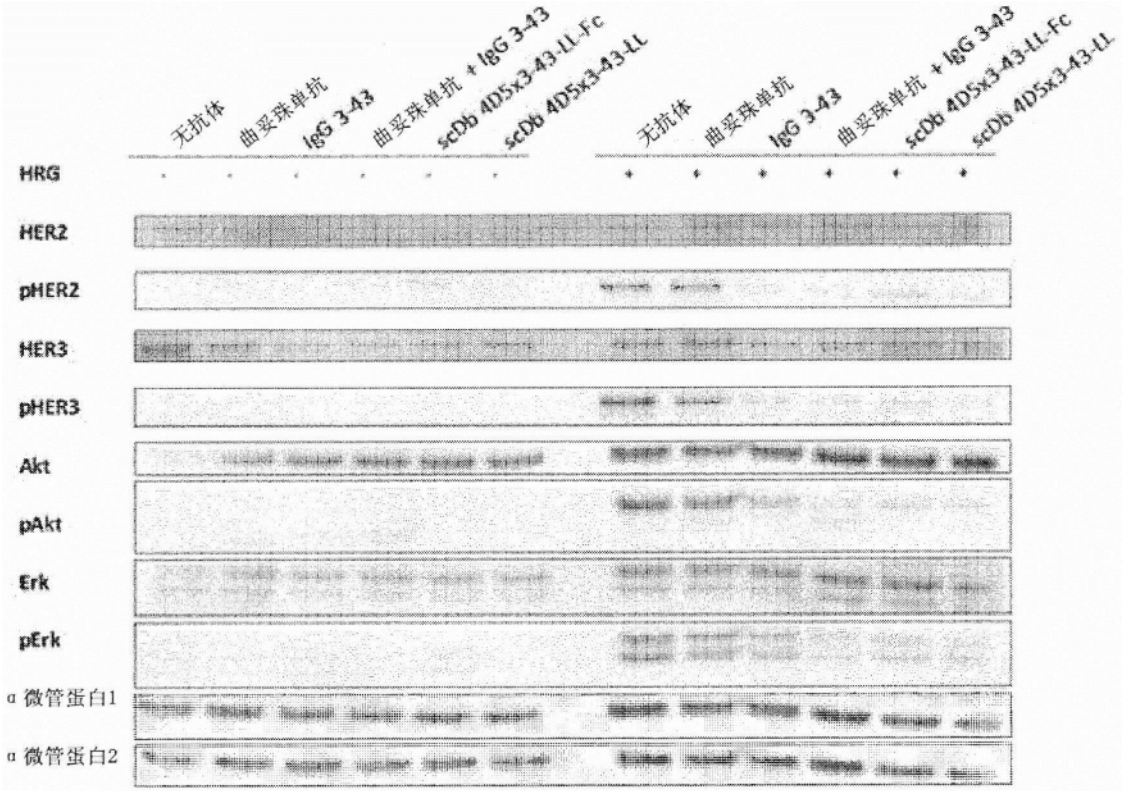


图32

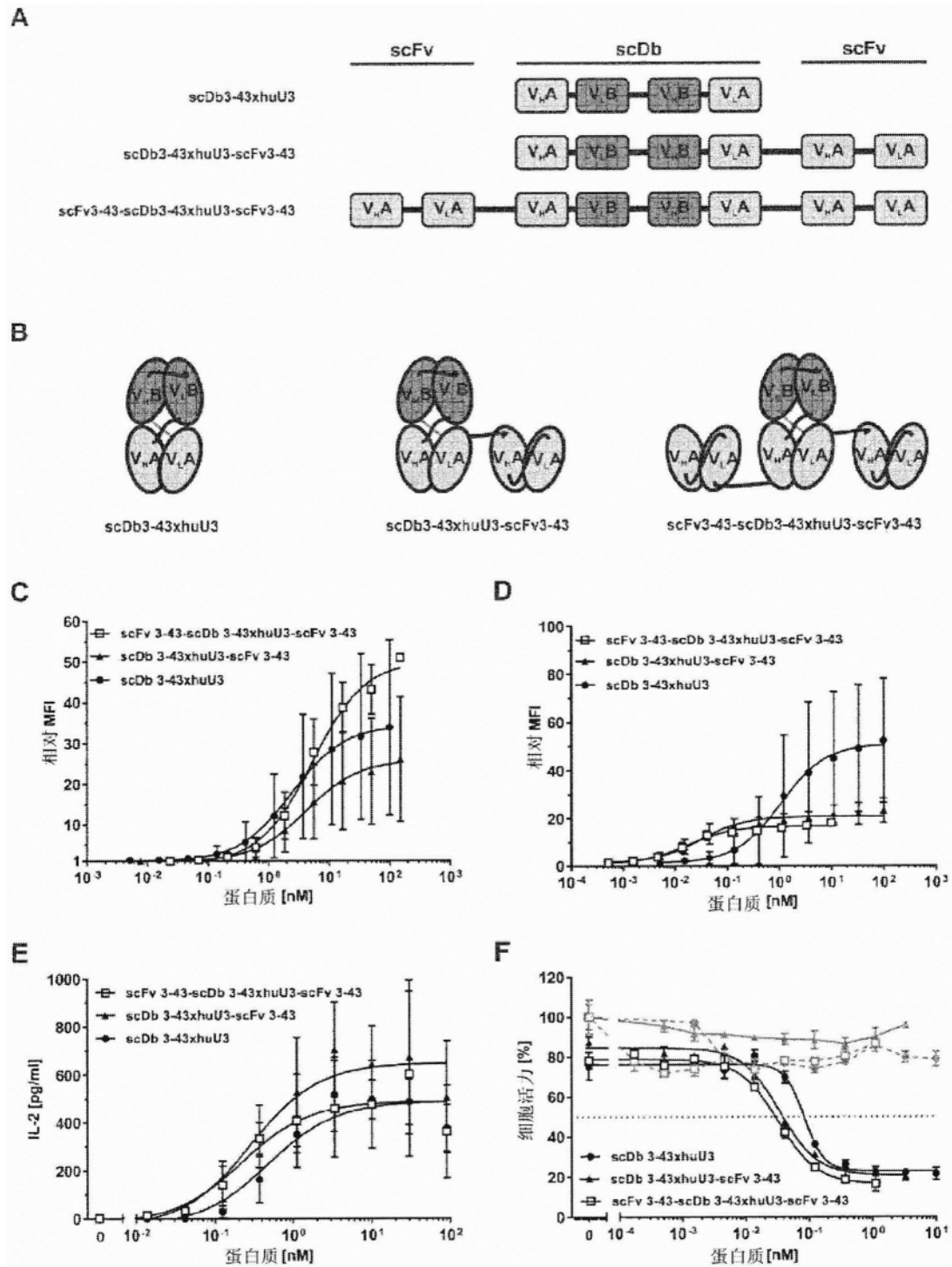


图33

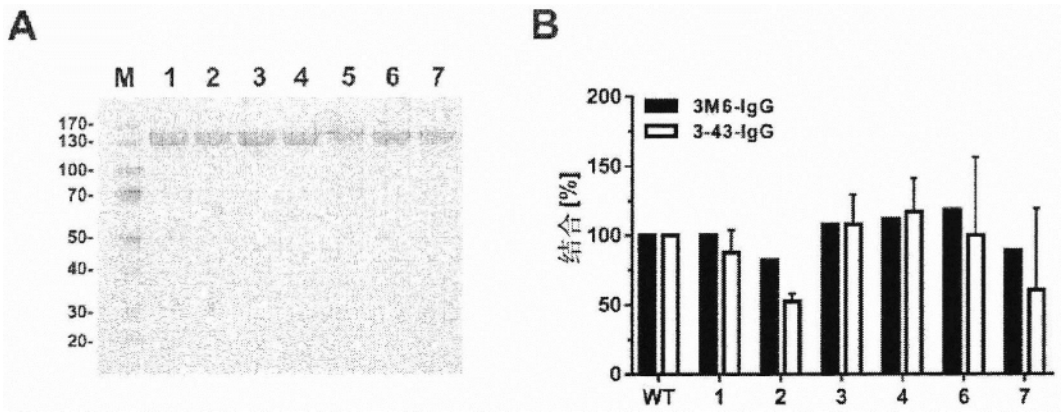


图34