



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105163765 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 16

(21) 申请号 201480024657. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 10

A61K 51/10(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 49/16(2006. 01)

61/780, 286 2013. 03. 13 US

A61K 39/395(2006. 01)

C07K 16/28(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/022782 2014. 03. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/164553 EN 2014. 10. 09

(71) 申请人 伊麦吉纳博公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 大卫·T·霍 托弗·奥拉夫森

吉蒂·阿加希

克里斯蒂安·P·贝伦布鲁赫

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 张英 宫传芝

权利要求书2页 说明书38页

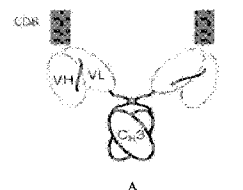
序列表24页 附图47页

(54) 发明名称

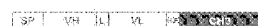
与 CD8 的抗原结合构建体

(57) 摘要

本发明描述了结合 CD8 的抗原结合构建体, 例如结合 CD8 的抗体, 包括抗体片段 (如 scFv、微抗体, 和 cys- 双价抗体)。本发明描述了使用方法。



B



C

SEQ ID NO: 24

1. 一种抗原结合构建体,其包括:
SEQ ID NO:3 或 6 的 HCDR1 的 HCDR1 ;
SEQ ID NO:3 或 6 的 HCDR1 的 HCDR2 ;
SEQ ID NO:3 或 6 的 HCDR1 的 HCDR3 ;
SEQ ID NO:9 的 LCDR1 的 LCDR1 ;
SEQ ID NO:9 的 LCDR1 的 LCDR2 ;以及
SEQ ID NO:9 的 LCDR1 的 LCDR3。
2. 根据权利要求 1 所述的抗原结合构建体,其中所述抗原结合构建体与 CD8 特异性地结合。
3. 根据权利要求 1 所述的抗原结合构建体,进一步包括可检测的标记物。
4. 根据权利要求 1 所述的抗原结合构建体,进一步包括治疗剂。
5. 根据权利要求 1 所述的抗原结合构建体,其中所述抗原结合构建体是双特异性的。
6. 根据权利要求 1 所述的抗原结合构建体,其中所述抗原结合构建体是单价 scFv。
7. 一种与 CD8 结合的人化 cys- 双价抗体,所述人化 cys- 双价抗体包括含有以下的多肽:
包括与可变轻链 (V_L) 域连接的可变重链 (V_H) 域的单链可变片段 (scFv) ;以及
C- 端半胱氨酸。
8. 根据权利要求 7 所述的人化 cys- 双价抗体,其中可变域从所述多肽的 N 端到 C 端的顺序是 V_L, V_H 。
9. 根据权利要求 7 所述的人化 cys- 双价抗体,其中可变域从所述多肽的 N 端到 C 端的顺序是 V_H, V_L 。
10. 根据权利要求 7 所述的人化 cys- 双价抗体,进一步包括可检测的分子。
11. 根据权利要求 7 所述的人化 cys- 双价抗体,其中所述人化 cys- 双价抗体包括:
SEQ ID NO:3 或 6 的 HCDR1 的 HCDR1 ;
SEQ ID NO:3 或 6 的 HCDR1 的 HCDR2 ;
SEQ ID NO:3 或 6 的 HCDR1 的 HCDR3 ;
SEQ ID NO:9 的 LCDR1 的 LCDR1 ;
SEQ ID NO:9 的 LCDR1 的 LCDR2 ;以及
SEQ ID NO:9 的 LCDR1 的 LCDR3。
12. 一种与 CD8 结合的人化微抗体,所述人化微抗体包括从 N 端到 C 端包括以下的多肽:
与 CD8 结合的单链可变片段 (scFv),所述 scFv 包括与可变轻链 (V_L) 域连接的可变重链 (V_H) 域;
包括人 IgG1 铰链区的铰链 - 延伸域 ;以及
人 IgG C_H3 序列。
13. 根据权利要求 12 所述的人化微抗体,进一步包括可检测的标记物。
14. 根据权利要求 12 所述的人化微抗体,其中所述人化微抗体包括:
SEQ ID NO:3 或 6 的 HCDR1 的 HCDR1 ;
SEQ ID NO:3 或 6 的 HCDR1 的 HCDR2 ;

SEQ ID NO:3 或 6 的 HCDR1 的 HCDR3 ;

SEQ ID NO:9 的 LCDR1 的 LCDR1 ;

SEQ ID NO:9 的 LCDR1 的 LCDR2 ;以及

SEQ ID NO:9 的 LCDR1 的 LCDR3。

15. 一种编码权利要求 1-14 中任一项的抗体的核酸。

16. 一种产生权利要求 1-14 中任一项的抗体的细胞系。

17. 一种试剂盒,包括:

权利要求 1-14 中任一项的其抗原结合构建体、权利要求 15 的核酸或者权利要求 16 的细胞系的细胞中的至少一种 ;以及

可检测的标记物。

18. 一种检测 CD8 存在或不存在的方法,所述方法包括:

将权利要求 1-14 中任一项的抗原结合构建体施加至样品 ;以及

检测所述抗原结合构建体的存在或不存在,由此检测 CD8 的存在或不存在。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述抗原结合构建体与可检测的标记物结合。

20. 根据权利要求 18 所述的方法,其中施加所述抗原结合构建体包括将所述抗原结合构建体给予受试者。

21. 根据权利要求 18 所述的方法,其中检测所述抗原结合构建体与 CD8 的结合或不存在结合包括正电发射断层显像或单光子发射计算机断层显像中的至少一种。

22. 根据权利要求 18 所述的方法,所述方法进一步包括将第二抗原结合构建体施加至样品,其中所述第二抗原结合构建体与所述抗原结合构建体特异性地结合。

23. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述抗原结合构建体与所述样品孵育不超过 20 小时。

24. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述抗原结合构建体与所述样品孵育不超过 6 小时。

25. 根据权利要求 18 所述的方法,其中将所述抗原结合构建体给予宿主,并且其中第一数量的其抗原结合构建体与 CD8 未结合,而第二数量的抗原结合构建体与 CD8 结合,其中在不超过 12 小时内消除至少约 80% 的所述第一数量的抗原结合构建体。

26. 一种将治疗剂靶向 CD8 的方法,所述方法包括给予受试者权利要求 1-14 中任一项的抗原结合构建体,其中所述抗原结合构建体与治疗剂结合。

与 CD8 的抗原结合构建体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2013 年 3 月 13 日提交的美国临时申请号 61/780,286 的权益,其通过引用以其全部内容并入。

[0003] 对序列表、表格或计算机程序列表的引用

[0004] 本申请与以电子格式的序列表一起提交。序列表提供为于 2014 年 2 月 28 日创建的名称为 SeqListIGNAB014W0.txt 的文件,其大小为 68,230 字节。在电子格式的序列表中的信息通过引用以其全部内容并入本文。

技术领域

[0005] 本文描述的实施方式总体涉及与 CD8 结合的抗原结合构建体,如抗体,包括抗体片段(如微抗体、cys- 双价抗体(cys-diabodies)、scFv),以及应用它们的方法。

背景技术

[0006] CD8(分化抗原簇 8)是跨膜糖蛋白,其是 T 细胞(其包括细胞毒性 T 细胞)亚类的特异性标记物。CD8 聚集体(assembly)为 CD8 α 和 CD8 β 亚基的异二聚体或为 CD8 α 同源二聚体。聚集的二聚 CD8 复合物作为与 T 细胞受体(TCR)一起的共受体来识别通过 MHC 类型 I 细胞的抗原提呈。CD8 在 T- 细胞发育和活化成熟 T- 细胞中发挥作用。T- 细胞定位的改变能反映免疫应答的进程并能随时间出现。

发明内容

[0007] 本文提供的一些实施方式涉及抗原结合构建体,如包括抗体片段的抗体,其包括 SEQ ID NO:3 或 6 中的 HCDR1 序列的 HCDR1(“重链互补决定区 1”);SEQ ID NO:3 或 6 中的 HCDR2 序列的 HCDR2(“重链互补决定区 2”);SEQ ID NO:3 或 6 中的 HCDR3 序列的 HCDR3(“重链互补决定区 3”);SEQ ID NO:9 中的 LCDR1 序列的 LCDR1(“轻链互补决定区 1”);SEQ ID NO:9 中的 LCDR2 序列的 LCDR2(“轻链互补决定区 2”);以及 SEQ ID NO:9 中的 LCDR3 序列的 LCDR3(“轻链互补决定区 3”)。在一些实施方式中,抗原结合构建体与 CD8 特异性地结合。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括如本文中描述的可检测的标记物。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括如本文中描述的治疗剂。

[0008] 本文中所提供的一些实施方式涉及与 CD8 结合的人化 cys- 双价抗体。人化 cys- 双价抗体可以包括含有以下的多肽:从 N 端到 C 端:包括与可变轻链(V_L)域(结构域, domain)连接的可变重链(V_H)域的单链可变片段(scFv);以及 C- 端半胱氨酸。

[0009] 本文中所提供的一些实施方式涉及与 CD8 结合的人化微抗体。人化微抗体可以包括含有以下的多肽:从 N 端到 C 端:包括与可变轻链(V_L)域连接的可变重链(V_H)域的单链可变片段(scFv);包括人 IgG1 或 IgG2 铰链区的铰链-延伸域(hinge-extension domain);以及人 IgG C μ 3 序列。在一些实施方式中,铰链延伸域包括天然(原始, native)IgG2 铰链序列,例如包括 SEQ ID NO:55 的 IgG2 铰链序列的铰链序列。在一些实施方式中,铰链延伸

域包括人工 IgG2 铰链序列,例如包括 SEQ ID NO:79 的铰链序列的铰链序列。

[0010] 本文中所提供的一些实施方式涉及编码如本文所描述的抗原结合构建体,例如 CD8 抗体或抗体片段的核酸。

[0011] 本文中所提供的一些实施方式涉及产生如本文所描述的抗原结合构建体,例如 CD8 抗体或抗体片段的细胞系。

[0012] 本文中所提供的一些实施方式涉及一种试剂盒。该试剂盒可以包括如本文所描述的抗原结合构建体,例如 CD8 抗原结合片段。在一些实施方式中,该试剂盒包括可检测的标记物。

[0013] 本文中所提供的一些实施方式涉及检测 CD8 存在或不存在的方法。该方法可以包括将如本文所描述的抗原结合构建体,例如 CD8 抗体结合构建体施加至样品。该方法可以包括检测抗原结合构建体与 CD8 的结合或不存在结合。在一些实施方式中,该方法在体内进行。在一些实施方式中,该方法在体外进行。在一些实施方式中,该方法的部分在体内进行,而该方法的部分在体外进行。

[0014] 本文中所提供的一些实施方式涉及将治疗剂靶向至 CD8 的方法。该方法可以包括给予受试者如本文所描述的抗原结合构建体,例如 CD8 抗体或抗体片段。在一些实施方式中,抗原结合构建体与治疗剂结合。

附图说明

[0015] 图 1A 图例说明微抗体与 CD8 二价结合的图解的一些实施方式。

[0016] 图 1B 图例说明微抗体的图解的一些实施方式。

[0017] 图 1C 提供 CD8 α 的实例。

[0018] 图 2A 图例说明鼠 OKT8 可变重链 (V_H) 区比对人抗体和人化 V_H 区 (huOKT8 构建体) 的一些实施方式。CDR 区的一些实施方式 (Chothia) 由所框区指示。

[0019] 图 2B 图例说明鼠 OKT8 可变轻链 (V_L) 区比对人化 V_L 区和 huOKT8 构建体的一些实施方式。CDR 区 (Chothia) 的一些实施方式由所框区指示。

[0020] 图 3A 图例说明显示与抗原二价结合的 cys- 双价抗体的图解的一些实施方式。

[0021] 图 3B 图例说明显示与抗原二价结合的 cys- 双价抗体的图解。

[0022] 图 4 图例说明嵌合 OKT8 微抗体 V_L - V_H 序列的一些实施方式。

[0023] 图 5 图例说明嵌合 OKT8 微抗体 V_H - V_L 序列的一些实施方式。

[0024] 图 6 图例说明人化 OKT8 微抗体 V_L - V_H 序列的一些实施方式。

[0025] 图 7 图例说明人化 OKT8 微抗体 V_H - V_L 序列的一些实施方式。

[0026] 图 8 图例说明人化 OKT8cys- 双价抗体 V_L -5- V_H 序列的一些实施方式。

[0027] 图 9 图例说明人化 OKT8cys- 双价抗体 V_H 5- V_L 序列的一些实施方式。

[0028] 图 10 图例说明人化 OKT8cys- 双价抗体 V_L -8- V_H 序列的一些实施方式。

[0029] 图 11 图例说明人化 OKT8cys- 双价抗体 V_H -8- V_L 序列的一些实施方式。

[0030] 图 12A 描绘 cys- 双价抗体的序列的一些实施方式。

[0031] 图 12B 描绘微抗体的序列的一些实施方式。

[0032] 图 12C 描绘 V_L 的序列的一些实施方式。

[0033] 图 12D 描绘 hu V_L 的序列的一些实施方式。

- [0034] 图 12E 描绘 V_H 的序列的一些实施方式。
- [0035] 图 12F 描绘 huV_H 的序列（来自版本 1 的版本“a”）的一些实施方式。
- [0036] 图 12G 描绘 huV_H 的序列（来自版本 1 的版本“b”）的一些实施方式。
- [0037] 图 12H 描绘 huV_H 的序列（来自版本 2 的版本“c”）的一些实施方式。
- [0038] 图 12I 描绘 huV_H 的序列（来自版本 2 的版本“c”）的一些实施方式。
- [0039] 图 13 图例说明 pcDNATM3.1/myc-His(-) 版本 A、B、C 的载体图。
- [0040] 图 14 图例说明检测目标存在或不存在的方法的一些实施方式。
- [0041] 图 15 图例说明嵌合和人化 OKT8 微抗体的蛋白印迹 (western blot) 分析。
- [0042] 图 16 是通过 ELISA 显示 IAb_Mb_CD8 变体与纯化的 rhCD8 结合的图。
- [0043] 图 17A- 图 17D 描绘来自 IAb_Mb_CD8 变体的流式细胞术分析的结果。
- [0044] 图 18A 和图 18B 是人化 OKT8 微抗体的蛋白印迹 (western blot) 凝胶的描绘图。
- [0045] 图 19 是通过 ELISA 显示 IAb_Mb_CD8 表达分析的图。
- [0046] 图 20 是通过 ELISA 描绘 IAb_Mb_CD8 变体 A 和 B 与 rhCD8 结合的图。
- [0047] 图 21 是通过 ELISA 描绘 IAb_Mb_CD8 变体 C 和 D 与 rhCD8 结合的图。
- [0048] 图 22A 和图 22B 是显示 IAb_Mb_CD8 变体 A 和 B 的流式细胞术分析的图。
- [0049] 图 23A 和图 23B 是显示 IAb_Mb_CD8 变体 C 和 D 的流式细胞术分析的图。
- [0050] 图 24 描绘 IAb_Cys-Dba_CD8 变体的蛋白印迹 (western blot) 分析的图像。
- [0051] 图 25 是通过 ELISA 描绘 IAb_Cys-Dba_CD8 变体与 rhCD8 的结合的图。
- [0052] 图 26A 和图 26B 显示 IAb_Cys-Dba_CD8 变体的流式细胞术分析。
- [0053] 图 27 是一系列描绘 IAb_Cys-Dba_CD8 变体的流式细胞术分析的图。
- [0054] 图 28 是描绘根据本文中的一些实施方式的 OKT8 构建体的流式细胞术分析的图。
- [0055] 图 29A 是描绘根据本文中的一些实施方式的 IAb M1b CD8 和 IAb M2b CD8 构建体的流式细胞术分析的图。
- [0056] 图 29B 是描绘根据本文中的一些实施方式的 IAb M1b CD8 和 IAb M2b CD8 构建体的流式细胞术分析的图。
- [0057] 图 29C 是描绘根据本文中的一些实施方式的 IAb M1b CD8 和 IAb M1b CD8-Df 构建体的流式细胞术分析的图。
- [0058] 图 29D 是描绘根据本文中的一些实施方式的 IAb M1b CD8 和 IAb M1b CD8-Df 构建体的流式细胞术分析的图。
- [0059] 图 29E 是描绘根据本文中的一些实施方式的 IAb M1b CD8、IAb_M1bCD8IgG2EH, 和 IAb M1b CD8IgG2NH 构建体的流式细胞术分析的图。
- [0060] 图 30A 是描绘根据本文中的一些实施方式的 IAb_CysDb3b_CD8 构建体的流式细胞术分析的图。
- [0061] 图 30B 是描绘根据本文中的一些实施方式的 IAb_CysDb3b_CD8 构建体的流式细胞术分析的图。
- [0062] 图 30C 是描绘根据本文中的一些实施方式的 IAb_CysDb3b_CD8 和 IAb_Cys-Db3b_CD8-Df 构建体的流式细胞术分析的图。
- [0063] 图 31 是一系列用根据本文中的一些实施方式的 ⁸⁹Zr-Df-IAb_Cys-Db3b_CD8 构建体标记的小鼠的 PET 图像。

[0064] 图 32A 是一系列用根据本文中的一些实施方式的 ^{89}Zr -Df-IAb_M1b_CD8 构建体标记的小鼠的冠面（冠状面，coronal）MIP PET/CT 的叠加图像。

[0065] 图 32B 是与描绘离体肿瘤的标记的图并列的表，该离体肿瘤用根据本文中的一些实施方式的 ^{89}Zr -Df-IAb_M1b_CD8 构建体标记。

[0066] 图 33 是一系列用根据本文中的一些实施方式的 ^{64}Cu -NODAGA-IAb_M1B_CD8IgG2EH(Cys) 构建体标记的小鼠的 MIP 图像。

具体实施方式

[0067] 本文所描述的是其与目标分子 CD8 结合的抗原结合构建体，包括抗体及其片段，如 cys- 双价抗体和微抗体。这样的抗原结合构建体可以用于检测目标分子（CD8 和 / 或 CD8+ 细胞，例如，T- 细胞的某些种类）的存在、定位和 / 或数量。这样的抗原结合构建体还能够用于将治疗剂靶向至表达目标分子的细胞。在一些实施方式中，提供用于利用抗原结合构建体（包括抗体，及构建体如 cys- 双价抗体和 / 或微抗体）检测目标分子（或“靶标”）存在或不存在的方法。在一些实施方式中，提供利用抗原结合构建体用于治疗目的的方法。

[0068] 定义及各种实施方式

[0069] “治疗”或“处理”疾病可以是指预防疾病（病症，condition）、减缓疾病发作和 / 或发展速度、减少疾病发展的风险、预防和 / 或延迟与疾病相关的症状、减少或结束与疾病相关的症状、产生疾病完全或部分的消退，或其一些的组合。术语“预防”不要求障碍或疾病的绝对禁止。

[0070] “治疗有效量”或“治疗有效剂量”是在受试者中产生需要的治疗效果的量，如预防、治疗目标疾病，延迟紊乱和 / 或症状的发作，和 / 或缓解与疾病相关的症状。该量将根据各种因素而变化，这些因素包括但不限于治疗化合物的特性（包括活性、药代动力学、药效动力学，以及生物利用度）、受试者的生理状态（包括年龄、性别、疾病类型和阶段、一般身体状况、对给予剂量的响应性，以及药物治疗类型）、制剂中药用载体或多种载体的性质，和 / 或给药途径。考虑本披露，在临床和药理学领域的技术人员将能够通过常规实验来确定治疗有效量，例如，通过监测受试者对所给予化合物的应答并据此调整剂量。对于另外的指导原则，见 Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21. sup. st Edition, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2005。

[0071] 术语“抗原结合构建体”包括各种各样的抗体，包括其结合片段。进一步包括的为包括 1、2、3、4、5 和 / 或 6 个 CDR 的构建体。在一些实施方式中，这些 CDR 能在常规抗体中在它们适当的框架区之间分散。在一些实施方式中，CDR 能被包含在重和 / 或轻链可变区内。在一些实施方式中，CDR 可以在重链和 / 或轻链内。在一些实施方式中，CDR 可以在单肽链内。在一些实施方式中，CDR 可以在共价连接在一起的二肽或多肽内。在一些实施方式中，它们可以通过二硫键共价连接在一起。在一些实施方式中，它们可以经连接分子或半体（部分，moiety）来连接。在一些实施方式中，抗原结合蛋白是非共价的，如二价抗体和单价 scFv。如非本文中另外表示，本文所描述的抗原结合构建体与提到的目标分子结合。术语“靶标”或“目标分子”表示 CD8 蛋白。CD8 蛋白的实例是本领域中已知的，并包括，例如

SEQ ID NO:24 的 CD8 蛋白,图 1C。

[0072] 术语“抗体”包括,但不限于,基因工程的或另外修饰的形式的免疫球蛋白,如胞内抗体、嵌合抗体、完全人抗体、人化抗体、抗体片段,和缀合抗体(例如,双特异性抗体、双价抗体、三价抗体、四价抗体等)。术语“抗体”包括 cys- 双价抗体和微抗体。因此,除非明确表示否则,本文中提供的关于“抗体”的每种或各种实施方式也设想为 cys- 双价抗体和/或微抗体实施方式。术语“抗体”包括免疫球蛋白家族的多肽或包括能可逆地非共价地以特异性方式结合相应抗原的免疫球蛋白片段的多肽。一种示例性抗体结构单元包括四聚物。在一些实施方式中,全长抗体可以由两个完全相同的多肽链对组成,每对有一个“轻”链和“重”链,通过二硫键连接。识别的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ , 和 mu 恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。对于全长链,轻链分类或为 κ 或 λ 。对于全长链,重链分类为 γ 、mu、 α 、 δ , 或 ϵ , 其进而分别定义免疫球蛋白类型 IgG、IgM、IgA、IgD, 和 IgE。每种链的 N- 端定义约 100 到 110 或更多氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。术语可变轻链 (V_L) 和可变重链 (V_H) 分别是指轻链和重链的这些区。如在本申请中所使用的,“抗体”包括抗体和其抗体片段的所有变体。因此,在该概念的范围内为全长抗体、嵌合抗体、人化抗体、单链抗体(scFv)、Fab、Fab', 以及这些片段的具有相同结合特异性的多聚形式(version)(如 $F(ab')_2$)。在一些实施方式中,抗体与期望的靶标特异性地结合。

[0073] “互补决定域”或“互补决定区”(“CDR”) 互换地是指 V_L 和 V_H 的高度可变区。CDR 是抗体链的靶蛋白结合位点,拥有对这些靶蛋白的特异性。在一些实施方式中,在各个 V_L 和/或 V_H 中有三个 CDR(CDR1-3, 从 N 端顺序编码), 构成约 15-20% 的可变域。CDR 结构上与靶蛋白的表位互补并因此直接负责结合的特异性。 V_L 或 V_H 剩余的延伸链,也称为框架区(FR), 在氨基酸序列中显示较少变化(Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W. H. Freeman & Co., New York, 2000)。

[0074] 可以利用本领域中各种熟知的定义确定 CDR 和框架区的位置, 如 Kabat (Wu, T. T., E. A. Kabat. 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J. Exp. Med. 132:211-250; Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H., Gottesman, K., and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242, Bethesda, MD)、Chothia (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:877-883 (1989); Chothia et al., J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol., 273:927-748 (1997))、ImMunoGeneTics 数据库 (IMGT) (见全球网 (worldwide web) 在 imgt.org/ 上)、Giudicelli, V., Duroux, P., Ginestoux, C., Folch, G., Jabado-Michaloud, J., Chaume, D. and Lefranc, M.-P. IMGT/LIGM-DB, the IMGT® comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences Nucl. Acids Res., 34, D781-D784 (2006), PMID:16381979; Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, G., IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003). PMID:12477501; Brochet, X., Lefranc, M.-P.

and Giudicelli, V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis Nucl. Acids Res, 36, W503-508 (2008); AbM (Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); 接触定义 (the contact definition) (MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996)), 和 / 或自动建模和分析工具 (the automatic modeling and analysis tool) Honegger A, Plückthun A. (全球网在 bioc.uzh.ch/antibody/Numbering/index.html)。

[0075] 术语“结合特异性决定簇 (binding specificity determinant)”或“BSD”互换地是指在互补决定区内用于确定抗体的结合特异性所必须的最小连续或非连续氨基酸序列。最小结合特异性决定簇可以在一个或多个 CDR 序列内。在一些实施方式中, 最小结合特异性决定簇处于 (即, 只决定于) 抗体的重链和轻链的 CDR3 序列的部分或全长内。在一些实施方式中, 重链可变区的 CDR3 是足够用于抗原结合构建体特异性的。

[0076] 如本文中所用的“抗体可变轻链”或“抗体可变重链”是指分别包含 V_L 或 V_H 的多肽。内源 V_L 由基因区段 V (可变) 和 J (连接) 编码, 而内源 V_H 由 V、D (多态性) 和 J 编码。 V_L 或 V_H 各自包括 CDR 以及框架区。在本申请中, 抗体可变轻链和 / 或抗体可变重链有时可以统称为“抗体链”。作为本领域技术人员将易于识别的, 这些术语包括包含突变的不破坏 V_L 或 V_H 的基本结构的抗体链。在一些实施方式中, 考虑全长重链和 / 或轻链。在一些实施方式中, 仅考虑存在重链和 / 或轻链的可变区。

[0077] 抗体可以作为完整的免疫球蛋白或许多由各种肽酶消化产生的片段存在。因此, 例如, 胃蛋白酶在铰链区中二硫键以下消化抗体来产生 $F(ab)'_2$, 为 Fab' 的二聚体, Fab' 自身是通过二硫键连接 V_H-C_H1 的轻链 (V_L-C_L)。 $F(ab)'_2$ 可以在温和条件下还原以破坏在铰链区中的二硫键, 由此将 $F(ab)'_2$ 二聚体转化成 Fab' 单体。 Fab' 单体是带有部分铰链区的 Fab (Paul, Fundamental Immunology 3d ed. (1993))。而以消化完整抗体方面定义各种抗体片段, 技术人员将理解这样的片段可以化学地或者通过利用重组 DNA 的方法从头合成。因此, 术语“抗体”, 如本文所使用的, 也包括或由修饰整个抗体所产生的或这些利用重组 DNA 方法从头合成的 (如单链 Fv) 或这些利用噬菌体展示库识别的抗体片段 (见, 如, McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990))。

[0078] 可以使用本领域中任何已知的技术来制备单克隆或多克隆抗体 (见, 如, Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96. Alan R. Liss, Inc. 1985; Advances in the production of human monoclonal antibodies Shixia Wang, Antibody Technology Journal 2011:11-4; J Cell Biochem. 2005 Oct 1; 96(2):305-13; Recombinant polyclonal antibodies for cancer therapy; Sharon J, Liebman MA, Williams BR; 和 Drug Discov Today. 2006 Jul, 11(13-14):655-60, Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics? , Haurum JS)。可以采用用于产生单链抗体的技术 (U.S. 专利号 4,946,778) 以产生本发明的抗体至多肽。而且, 可以使用转基因小鼠, 或其他生物体如哺乳类以表达全人单克隆抗体。可替换地, 可以使用噬菌体展示技术以识别与所选抗原高亲和力的结合体 (binders) (见, 例如, McCafferty et al., 同上; Marks et al., Biotechnolo

gy, 10:779-783, (1992))。

[0079] 用于人化或优化非人抗体的方法在本领域中是熟知的。通常,人化抗体具有引入进来自非人来源的抗体一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基经常是指为输入残基(import residues),其典型地取自输入可变域(import variable domain)。在一些实施方式中,可以采用术语“供体”和“受体”序列。人源化基本上可以按照 Winter 和合作者的方法通过用人抗体的相应序列取代啮齿动物的 CDR 或 CDR 序列来进行(见,如, Jones et al., Nature 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327(1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536(1988) 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992))。因此,这样的人化抗体是嵌合抗体(U.S. 专利号 4,816,567),其中基本上少于完整人可变区由来自非人类物种的相应序列代替。在实践中,人化抗体是其中一些互补决定区(“CDR”)残基和可能的一些框架(“FR”)残基由来自啮齿动物抗体中的相似位点的残基取代的人抗体。

[0080] “嵌合抗体”是抗体分子,其中恒定区或其部分被改变、替换或交换,以致抗原结合位点(可变区)与不同或改变的类别、效应功能和/或种类的恒定区,或赋予嵌合抗体新的性质的完全不同的分子如酶、毒素、激素、生长因子和药物连接;或(b)可变区或其部分,用具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。

[0081] 抗体进一步包括一种或多种与其他蛋白化学连接或表达为与其他蛋白的融合蛋白的免疫球蛋白链。在一些实施方式中,抗原结合构建体可以是单价 scFv 构建体。在一些实施方式中,抗原结合构建体可以是双特异性构建体。双特异性或双功能的抗体是具有两种不同重/轻链对和两种不同结合位点的人工杂交抗体。本发明的其他抗原-结合片段或抗体部分包括二价 scFv(双价抗体)、抗体分子识别两种不同表位的双特异性 scFv 抗体、单结合域(sdAb 或纳米抗体),和微抗体。

[0082] 术语“抗体片段”包括,但不限于一种或多种单独的或与其他分子结合的抗体的抗原结合片段,包括,但不限于 Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG(还原的 IgG)、scFv 片段(单价、三价等)、单域片段(纳米抗体)、多肽、微抗体、双价抗体以及 cys- 双价抗体。术语“scFv”是指单链 Fv(“片段可变”)抗体,其中连接常规两链抗体的重链和轻链的可变域以形成一个链。

[0083] 药用载体可以是涉及从一种组织、器官或身体的部分携带或运送感兴趣的化合物至其他组织、器官或身体的部分的药用物质、组合物或运载体。例如,载体可以是液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封物质,或其一些组合。载体的每种组分是“药用的”在于其与制剂中的其他成份相容。其还必须适于与可以遇到的任何组织、器官或身体的部分接触,意为其必须不带有毒性、刺激、过敏反应、免疫原性,或任何其他过分超出其治疗益处的并发症的风险。本文所描述的药学组合物可以通过适合的给药途径给予。给药途径可以是指本领域中已知的任何给药途径,包括但不限于气、肠内、鼻内、眼部、口服、胃肠道外、直肠内、经皮(如局部用乳霜或药膏、贴剂),或阴道的。“经皮”给药可以利用局部用乳霜或药膏或通过透皮贴剂的方式来完成。“胃肠道外”是指给药途径与注射相关,包括眼眶下的、输注、动脉内、囊内、心脏内、皮肤内、肌肉内、腹膜内、肺内、脊柱内、胸骨内、鞘内、子宫内、静脉内、蛛网膜下、被膜下、皮下、透粘膜的,或经气管壁的。在一些实施方式中,抗原结合构建体可以在干预或切除期间以局部给药在手术内递送。

[0084] 术语“CD8 依赖性障碍”包括有免疫组分（包括对癌症免疫疗法应答）的癌症、自身免疫性疾病、炎症疾病，和癌症，包括但不限于肺、卵巢、结直肠黑色素瘤等。

[0085] 微抗体是具有比全长抗体更小的分子量同时保持对抗原的二价结合性质的抗体形式。因为其较小的尺寸，微抗体具有从系统中更快的清除和当靶向肿瘤组织时增强的浸入。拥有强靶向结合快速清除的能力，微抗体用于诊断成像和递送细胞毒性 / 放射性负载是有优势的，因为延长的循环时间可导致不利的患者剂量或剂量学。

[0086] 短语“特异性地（或选择性地）结合”，当在描述抗原如蛋白与抗体或抗体衍生的结合物之间的相互作用的背景中时，是指在异质种群的蛋白和其他生物制品中，例如在生物制品，例如血液、血清、血浆或组织样品中确定抗原的存在的结合反应。因此，在指定的免疫分析条件下，在一些实施方式中，具有特定的结合特异性的抗体或结合物质与特定的抗原在至少两倍的背景中结合并且大体上不与样品中存在的其他抗原以显著量结合。与抗体或结合物质在这样的条件下特异性结合可能需要对抗体或物质对特定蛋白的特异性进行选择。可使用各种免疫测试形式以选择对特定蛋白有特异性免疫反应性的抗体。例如，固相 ELISA 免疫分析常规用于选择对蛋白的特异性免疫反应性的抗体（见，例如，Harlow&Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), 描述可以用于确定特异免疫反应性的免疫分析形式和条件）。典型地特异性或选择性结合反应将产生超过背景信号至少两倍的并且更典型地至少超过背景 10 到 100 倍的信号。

[0087] 术语“平衡解离常数 (K_D , M)”是指解离速率常数 (k_d , 时间⁻¹) 除以结合速率常数 (k_a , 时间⁻¹, M⁻¹)。可以利用本领域中已知的方法测定平衡解离常数。本发明的抗体通常将具有小于约 10^{-7} 或 10^{-8} M, 例如小于约 10^{-9} M 或 10^{-10} M 的平衡解离常数, 在一些实施方式中, 小于约 10^{-11} M、 10^{-12} M, 或 10^{-13} M。

[0088] 术语“单独的（分离的）”，当用于核酸或蛋白时，表示核酸或蛋白基本上不含以自然状态相联系的其他细胞组分。在一些实施方式中，其可以是干燥物或水溶液。可以利用分析化学技术如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法来测定纯度和同质性。为在制备物中存在的占优势种类的蛋白大体上是纯化的。尤其是，单独的基因是除了感兴趣的基因从位于基因侧翼并编码蛋白的开放阅读框分离的。术语“纯化的”表示在电泳凝胶中基本上产生一条带的核酸或蛋白。在一些实施方式中，这可以表示核酸或蛋白是至少 85% 纯的，更优选地至少 95% 纯的，并且最优选地至少 99% 纯的分子在体内条件下存在。

[0089] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指以或单链或双链形式的脱氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA) 及其聚合物。除非特意限定，该术语包括含有天然核苷酸的已知类似物的具有与参照核酸相似的结合性质并以与天然存在的核苷酸相似的方式代谢的核酸。除非另外指出，特定的核酸序列还意图包括其保守地修改的变体（例如，简并密码子替换）、等位基因、直系同源物、SNP，和互补序列以及明确指出的序列。特定地，简并密码子替换可以通过产生其中用混合碱基和 / 或脱氧肌苷残基替换一个或多个（或所有）密码子的第三位置的序列来实现 (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991) ; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985) ; 和 Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。

[0090] 本文中术语“多肽”、“肽”和“蛋白”互换使用以指的是氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物，也适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0091] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是这些由遗传密码所编码的,以及后来修改的这些氨基酸,如羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸,以及 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即 α -碳与氢、羧基、氨基和 R 基团连接,如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸、亚砷、甲硫氨酸甲基磺(methionine methyl sulfonium)。这样的类似物具有修改的 R 基团(例如,正亮氨酸)或修改的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸一样的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的常规化学结构不同的结构,但以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用的化合物。

[0092] “保守地修改的变体”适用于氨基酸和核酸序列两者。关于特定核酸序列,保守地修改的变体是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的这些核酸,或当核酸不编码氨基酸序列时是指基本上相同的序列。由于遗传密码的简并性,许多功能上相同的核酸编码任何给定的蛋白。例如,密码子 GCA、GCC、GCG 和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此,在由密码子指定丙氨酸的每一个位置,可以将此密码子改变成所描述的任何相应密码子而不改变编码的多肽。这样的核酸变体是“沉默变体”,其是保守地修改的变体中的一种。本文中编码多肽的每种核酸序列也描述了核酸的每种可能的沉默变体。技术人员将认识到可以修改核酸中的每个密码子(AUG 除外,其通常是甲硫氨酸的仅有密码子,和 TGG,其通常是色氨酸的仅有密码子)以产生功能上相同的分子。因此,核酸的编码多肽的每种沉默变体暗含在每种描述的序列中。

[0093] 关于氨基酸序列,技术人员将认识到对核酸、肽、多肽或蛋白序列个别的替换、删除或添加,其改变、增加或删除编码序列中的单个氨基酸或小百分比的氨基酸,是“保守地修改的变体”,其中改变产生用化学上相似的氨基酸替换氨基酸。提供功能上相似的氨基酸的保守替换表是本领域中熟知的。这样的保守地修改的变体另外是并且不排除本发明的多态变体、种间同系物,和等位基因。

[0094] 以下八组各个含有对于另一个的保守替换:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天(门)冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天(门)冬酰胺(N)、谷氨酸(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);以及 8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(见,例如,Creighton, Proteins(1984))。

[0095] 可以通过在比较窗口上面比较最佳对齐的序列来确定“序列相同的百分比”,其中对于最佳对齐的两条序列,在比较窗口中的多核苷酸序列的部分与不包括添加或删除的参照序列(例如,本发明的多肽)相比可能包含添加或删除(即,空缺(gap))。该百分比通过以下计算:确定均出现在两条序列中的相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数量以产生匹配位置的数量,由在比较窗口中的位置总数量除以匹配位置的数量并将结果乘以 100 来产生序列同一性的百分比。

[0096] 术语“相同的”或“同一性”百分比,在两条或多条核酸或多肽序列的背景中,是指两条或多条序列或子序列是相同的序列。当以最大一致性在比较窗口比较和对齐,或在利用下面的序列比较算法中的一种或通过手动对齐和目测来测量的指定区,如果两条序列具有特定百分比的氨基酸残基或核苷酸是相同的(例如,在一个指定的区域,或当不指定时,

在参照序列的整个序列,70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同),则两条序列是“基本上相同的”。本文中提供的一些实施方式提供分别与本文中例证的多肽或多核苷酸(例如,在图2A、图2B,或图4-11、图12C-图12I的任一图中例证的可变区;在图2A、图2B,或图12C到图12I的任一图中例证的CDR;在图2A、图2B,或图12C-图12I的任一图中例证的FR;以及在图12A-图12I或图4-图11的任一图中例证的核酸序列)基本上相同的多肽或多核苷酸。可选地,相同存在于至少约15、25或50个核苷酸长度的区中,或更优选地存在于100到500或1000或更多个核苷酸长度的区中,或存在于参照序列的全长中。关于氨基酸序列,相同或基本相同可以存在于至少5、10、15或20个氨基酸长度的区中,可选地至少约25、30、35、40、50、75或100个氨基酸长度,可选地至少约150、200或250个氨基酸长度,或存在于参照序列的全长中。关于更短的氨基酸序列,例如,20个或更少氨基酸的氨基酸序列,在一些实施方式中,根据本文中定义的保守替换,当一种或两种氨基酸残基被保守地替换时,存在基本相同。

[0097] 对于序列比较,通常将一个序列作为参照序列,其与测试序列相比较。当利用序列比较算法时,将测试和参照序列输入电脑,如果需要的话,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或可以指定备选的参数。然后序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参照序列的序列同一性百分比。

[0098] “比较窗口”,如本文所用的,包括涉及选自由20到600,通常约50到约200,更通常地约100到约150所组成的组的连续位置的任一数量的片段,其中序列可以与连续位置的相同数量的参照序列在两序列最佳对齐后相比较。对齐序列用于比较的方法在本领域中是熟知的。用于比较的最佳序列对齐可以,例如,按照Smith和Waterman(1970)Adv. Appl. Math. 2:482c的局部同源性算法、Needleman和Wunsch(1970)J. Mol. Biol. 48:443的同源性对齐算法、搜索Pearson和Lipman(1988)Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444的相似性方法检索、这些算法的计算机实现(Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.),或通过手动对齐和目测(见,例如, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology(1995增补))来进行。

[0099] 两种适用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法为BLAST和BLAST 2.0算法,其分别在Altschul et al. (1977)Nuc. Acids Res. 25:3389-3402和Altschul et al. (1990)J. Mol. Biol. 215:403-410中描述。用于进行BLAST分析的软件通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)是公开可用的。该算法包括通过在查询序列中识别长度W的短字段来首先识别高记分序列对(high scoring sequence pairs, HSP),其当与在数据库序列中的相同长度的字段对齐时,或者匹配或者满足一些正值阈值分数T。T是指邻近字段分数阈值(Altschul et al., 同上)。这些初始邻近字段匹配记录(neighborhood word hit)作用于启动搜索的种子以找到含有它们的更长的HSP。字段匹配记录沿各个序列的两个方向延伸,只要可以增加累积的比对(对齐)分数。对于核苷酸序列,利用参数M(匹配残基对的奖励分数;总是>0)和N(错配残基对的罚分;总数<0)计算累积的分数。对于核酸序列,使用打分矩阵来计算累积的分数。当:累积的比对分数从其最大达到值下降数量X;由于累积的一个或多个负打分残基比对,累积分数降到0或更低;或到达任一序列的终点时,停止在各方向中的字段匹配记录延伸。BLAST算

法参数 W、T, 和 X 决定比对的灵敏度和速度。BLASTN 程序 (对于核苷酸序列) 使用默认字长 (W) 11、期望值 (E) 10、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 以及两条链的比较。对于氨基酸序列, BLASTP 程序使用默认字长 3, 和期望值 (E) 10, 和 BLOSUM62 打分矩阵 (见 Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) 比对 (B) 50, 期望值 (E) 10、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 以及两条链的比较。

[0100] BLAST 算法还进行两条序列之间的相似性统计分析 (见, 例如, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787)。由 BLAST 算法提供的一种相似性测定为最小概率之和 ($P(N)$), 其提供两核苷酸或氨基酸序列之间的匹配可能将会出现的可能性指示。例如, 如果在测试核酸与参照核酸的比较中最小概率之和小于约 0.2, 更优选地小于约 0.01, 并最优选地小于约 0.001, 认为核酸与参照核酸相似。

[0101] 如下面描述的, 两核酸序列或多核苷酸基本上相同的指示为由第一核酸编码的多肽与抗由第二核酸编码的多肽的抗体是免疫交叉反应性的。因此, 在一些实施方式中, 多肽典型地基本上与第二多肽相同, 例如, 其中两肽仅通过保守替换而不同。如下面所描述的, 两核酸序列是基本上相同的其他指示为两分子或其互补在严格条件下相互杂交。两核酸序列是基本上相同的其他指示还为可以使用相同引物以扩增序列。

[0102] 术语“受试者”、“患者”和“个体”可互换地是指被检查和 / 或治疗的实体。这可以包括, 例如, 哺乳动物, 例如, 人或非人灵长类哺乳动物。哺乳动物还可以是实验室哺乳动物, 例如鼠、大鼠、兔子、仓鼠。在一些实施方式中, 哺乳动物可以是农业哺乳动物 (例如, 马、羊、牛、猪、骆驼) 或家养哺乳动物 (如, 犬、猫)。

[0103] 术语“治疗上可接受的量”或“治疗有效剂量”可互换地是指足够产生需要的治疗效果的量。在一些实施方式中, 治疗上可接受的量不诱发或引起不期望的副作用。治疗上可接受的量可以通过首先给予低剂量, 然后递增地增加剂量直到达到期望的效果。

[0104] 术语“共同给予”是指在个体的血液中或将测试的样品中给予两种活性物质。共同给予的活性物质可以是同时地或按顺序地递送。

[0105] 抗原结合构建体 (包括抗体和结合片段)

[0106] 本文中描述了与目标结合的抗原结合构建体。抗原结合构建体是包括免疫球蛋白或免疫球蛋白相关分子的一种或多种部分的分子, 其与靶分子特异性地结合或与靶分子是免疫反应性的。

[0107] 在一些实施方式中, 抗原结合构建体允许检测其为在 T 细胞的子集的表面上发现的特异性生物标记物的人 CD8, 用于免疫系统的诊断成像。CD8 成像允许在体内检测 T- 细胞定位。T- 细胞定位的改变能反映免疫应答的进程并能随时间出现, 作为各种治疗处理或甚至疾病状态的结果。

[0108] 在一些实施方式中, 这有利于成像 T- 细胞定位用于免疫治疗。过继性免疫治疗是将患者自身 T- 细胞在体外操作并重新导入患者的治疗形式。对于该治疗形式, T- 细胞成像有利于确定治疗状态。

[0109] 另外, CD8 在激活下游信号通路中发挥作用, 对于激活起到清除病毒病原体并提供对肿瘤的免疫性的作用的细胞毒性 T 细胞是重要的。CD8 阳性 T 细胞可以识别存在于抗原呈递细胞的 MHC I 蛋白内的短肽。在一些实施方式中, 指向 CD8 的工程片段能够增强通过 T 细胞受体的信号并增强受试者清除病毒病原和对肿瘤抗原的应答的能力。因此, 在一些实

施方式中,本文中提供的抗原结合构建体可以是激动剂并能活化 CD8 目标。在一些实施方式中,提供激动剂 scFv、微抗体、cys- 双价抗体,和 / 或抗体。在一些实施方式中,激动剂抗原结合构建体包括本文中提供的一种或多种 CDR、重链可变区,或轻链可变区。在一些实施方式中,激动剂可以激活用于激活细胞毒性 T 细胞的通过 CD8 的下游信号通路,细胞毒性 T 细胞起到清除病毒病原体并提供对肿瘤的免疫性的作用。

[0110] 在一些情况中,利用全长抗体用于成像不是优选的,因为它们通常在给予后由于全长抗体长的血清半衰期需要预定多于 1 周的成像时间。

[0111] 用于成像免疫细胞的亚型的其他基于目标的方法涉及小分子。例如,用于内源性免疫系统诊断成像的一种方法涉及使用小分子示踪剂,其检测在细胞中的代谢途径的变化如 ^{18}F - 氟乙酸盐 (酯) (^{18}F)FAC)。因为这样的示踪剂检测在代谢途径中的变化,它们靶向具有提高的代谢活动的细胞群,其主要包括激活的 T- 细胞。该方法的限制性在于其仅检测活化的 T- 细胞亚类,然而用 CD8 抗体片段成像将检测表达 CD8 的 T- 细胞的全部种群,因为目标在活化的和休眠的 CD8 细胞上均表达。

[0112] 通过蛋白质工程将 OKT8 抗体的可变区重新编排成各种备选的抗原结合构建体。微抗体形式是各个单体具有与人 IgG1C_H3 域连接的单链可变片段 (scFv) 的同源二聚体 (见图 1A 和图 1B)。在一些实施方式中,scFv 由可变重 (V_H) 和轻 (V_L) 域组成并由 18 个氨基酸的富含 GlySer 的连接子连接。在一些实施方式中,scFv 与人 IgG1C_H3 域通过后面是 10 个氨基酸 GlySer 连接子的人 IgG1 上部 and 核心铰链区 (15 个残基) 拴定 (tethered)。由于 C_H3 域之间的联合以及在铰链区内形成二硫键,微抗体 (V_H-V_L-C_H3) 作为稳定的二聚体存在。为了允许分泌微抗体,在可变重域的 N- 端融合信号序列。在一些实施方式中,GlySer 残基允许柔性。在一些实施方式中,可以加入谷氨酸和 / 或赖氨酸残基以增强可溶性。

[0113] 设计制备嵌合 OKT8 微抗体的两种变体,其在可变区 (V_H至 V_L和 V_L至 V_H) 方向上不同。每种抗体 V 域含有形成内部二硫键的两个半胱氨酸。鼠 OKT8V_H具有在框架 3 (FR3) 中的外部半胱氨酸,其可以干扰蛋白的表达,因为其可以导致聚集并因此滞留在内质网 (ER) 中。用丝氨酸替换在框架 (鼠 V_H的 C84S) 中的外部半胱氨酸制备嵌合微抗体。在一些实施方式中,可以调整本文中提供的任何实施方式以包括 C84S 调整 (adjustment)。表 0.1、0.2,和 0.3 提供本文中提供的各种抗原结合构建体的设置的实现实施方式的总结。

[0114] 表 0.1 微抗体

[0115]

1	2	3	4	5	6
名称	前导	区域 1	连接子	区域 2	其余
嵌合 IAb_Mb1_C D8	前导 SEQ ID NO:34	鼠 VL SEQ ID NO: 40	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	鼠 V _H SEQ ID NO: 44	IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38
嵌合 IAb_Mb2_C D8	前导 SEQ ID NO:34	鼠 VH SEQ ID NO: 44	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	鼠 V _L SEQ ID NO: 40	IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38

[0116]

人 化 IAb_Mb1_C D8	前导 SEQ ID NO:34	huV _L SEQ ID NO: 9	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _H (2 nd) SEQ ID NO: 6	IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38
人 化 IAb_Mb2_C D8	前导 SEQ ID NO:34	huV _H (2 nd) SEQ ID NO: 6	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _L SEQ ID NO: 9	IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38

[0117] 表 0.2 亲和力成熟的微抗体

[0118]

1	2	3	4	5	6
名称	前导	区域 1	连接子	区域 2	其余
IAb_Mb1 a_CD8	前导 SEQ ID NO:34	huV _L SEQ ID NO: 42	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _H (版本 a) SEQ ID NO: 46	IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_Mb2 a_CD8	前导 SEQ ID NO:34	huV _H (版本 a) SEQ ID NO: 46	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _L SEQ ID NO: 42	IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_Mb1 b_CD8	前导 SEQ ID NO:34	huV _L SEQ ID NO: 42	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _H (版本 b) SEQ ID NO: 48	IgG1 铰链/连接子 -C _H 3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_M1b _CD8 IgG2 NH	前导 SEQ ID NO:34	huV _L SEQ ID NO: 42	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _H (版本 b) SEQ ID NO: 48	IgG2 天然铰链 SEQ ID NO: 55, IgG2 CH3 域, SEQ ID NO: 80
IAb_M1b _CD8 IgG2 EH	前导 SEQ ID NO:34	huV _L SEQ ID NO: 42	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _H (版本 b) SEQ ID NO: 48	IgG2 铰链-延伸 SEQ ID NO: 79, IgG2 CH3 域, SEQ ID NO: 80
IAb_Mb2 b_CD8	前导 SEQ ID NO:34	huV _H (版本 b) SEQ ID NO: 48	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _L SEQ ID NO: 42	IgG1 铰链/连接子 -CH3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_Mb1 c_CD8	前导 SEQ ID NO:34	huV _L SEQ ID NO: 42	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _H (版本 c) SEQ ID NO: 50	IgG1 铰链/连接子 -CH3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_Mb2 c_CD8	前导 SEQ ID NO: 34	huV _H (版本 c) SEQ ID NO: 50	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _L SEQ ID NO: 42	IgG1 铰链/连接子 -CH3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_Mb1 d_CD8	前导 SEQ ID NO: 34	huV _L SEQ ID NO: 42	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _H (版本 d) SEQ ID NO: 52	IgG1 铰链/连接子 -CH3 域 SEQ ID NO: 38
IAb_Mb2 d_CD8	前导 SEQ ID NO: 34	huV _H (版本 d) SEQ ID NO: 52	18 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 36	huV _L SEQ ID NO: 42	IgG1 铰链/连接子 -CH3 域 SEQ ID NO: 38

[0119] 表 0.3 Cys- 双价抗体

[0120]

1	2	3	4	5	6
名称	前导	区域 1	连接子	区域 2	其余
IAb_Cys-Db	前导	huVL	5 氨基酸连接子	huVH (版本 b)	Cys 尾部

[0121]

1b_CD8	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 32
IAb_Cys-Db 2b_CD8	前导 SEQ ID NO: 26	huVH (版本 b) SEQ ID NO: 48	5 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 28	huVL SEQ ID NO: 42	Cys 尾部 SEQ ID NO: 32
IAb_Cys-Db 3b_CD8	前导 SEQ ID NO: 26	huVL SEQ ID NO: 42	8 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 30	huVH (版本 b) SEQ ID NO: 48	Cys 尾部 SEQ ID NO: 32
IAb_Cys-Db 4b_CD8	前导 SEQ ID NO: 26	huVH (版本 b) SEQ ID NO: 48	8 氨基酸连接子 SEQ ID NO: 30	huVL SEQ ID NO: 42	Cys 尾部 SEQ ID NO: 32

[0122] 在表 0.1、0.2, 和 0.3 中描绘的是可以用于微抗体 (表 0.1 和 0.2) 和 cys- 双价抗体 (表 0.3) 的单体的序列设置。表的每一行表示单体构建体的序列, 从左到右表示 N- 端到 C 端。在一些实施方式中, 所显示的每种单体构建体的序列直接与彼此连接。因此, 在一些实施方式中, 构建体可以包括在表 0.1、表 0.2, 或表 0.3 的单行上的任何构建体。在一些实施方式中, 构建体可以包括在表 0.1、表 0.2, 或表 0.3 中的任何组合。在一些实施方式中, 例如, 在第一行第 2 列的第一个条目可以与第一行第 3 列到第一行第 4 列、到第一行第 5 列、到第一行第 6 列进行组合。在一些实施方式中, 第 3 列和第 6 列彼此可以交换。在一些实施方式中, 在第一行第 2 列的第一个条目可以与第一行第 3 列到第二行第 4 列、到第二行第 5 列、到第二行第 6 列进行组合。因此, 表格代表所有可能的组合, 均在单行和跨各行 (并有列交换) 中。

[0123] 在一些实施方式中, 抗原结合构建体包括在 SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50 或 52 中的 HCDR1 的重链 CDR1 (HCDR1); 在 SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50 或 52 中的 HCDR2 的重链 CDR2 (HCDR2); 在 SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50 或 52 中的 HCDR3 的重链 CDR3 (HCDR3); 在 SEQ ID NO:9 或 42 中的 LCDR1 的轻链 CDR1 (LCDR1); 在 SEQ ID NO:9 或 42 中的 LCDR2 的轻链 CDR2 (LCDR2); 和 / 或在 SEQ ID NO:9 或 42 中的 LCDR3 的轻链 CDR3 (LCDR3)。在一些实施方式中, 抗原结合构建体包括在 SEQ ID NO:48 中的 HCDR1 的 HCDR1、在 SEQ ID NO:48 中的 HCDR2 的 HCDR2、在 SEQ ID NO:48 中的 HCDR3 的 HCDR3、在 SEQ ID NO:42 中的 LCDR1 的 LCDR1、在 SEQ ID NO:42 中的 LCDR2 的 LCDR2, 和在 SEQ ID NO:42 中的 LCDR3 的 LCDR3。

[0124] 在一些实施方式中, 抗原结合构建体包括 6、5、4、3、2, 或 1 种上面的 CDR (CDR 的一些实施方式在图 2A、图 2B、图 12C- 图 12I 中显示)。在一些实施方式中, 抗原结合构建体包括 HCDR3。在一些实施方式中, 抗原结合构建体与目标分子特异性地结合。在一些实施方式中, 抗原结合构建体与一种或多种具有本文中提供的 CDR 的抗体竞争结合。在一些实施方式中, 抗原结合构建体包括至少 3 种本文中提到的重链 CDR。在一些实施方式中, 抗原结合构建体包括重链 CDR3。在一些实施方式中, 抗原结合构建体进一步包括本文中所提供的任一种重链 CDR2。

[0125] 在一些实施方式中,抗原结合构建体是人的或人化的。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括至少一种人框架区,或具有与人框架区至少约 80% 序列同一性,例如至少约 80%、85%、90%、93%、95%、97%,或 99% 的同一性的框架区。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括在 SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50,或 52 中的 HFR1 的重链 FR1(HFR1);在 SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50,或 52 中的 HFR2 的重链 FR2(HFR2);在 SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50,或 52 中的 HFR3 的重链 FR3(HFR3);在 SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50,或 52 中的 HFR4 的重链 FR4(HFR4);在 SEQ ID NO:9 或 42 中的 LFR1 的轻链 FR1(LFR1);在 SEQ ID NO:9 或 42 中的 LFR2 的轻链 FR2(LFR2);在 SEQ ID NO:9 或 42 中的 LFR3 的轻链 FR3(LFR3);和在 SEQ ID NO:9 或 42 中的 LFR4 的轻链 FR4(LFR4)。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括在 SEQ ID NO:48 中的 HFR1 的重链 FR1(HFR1);在 SEQ ID NO:48 中的 HFR2 的重链 FR2(HFR2);在 SEQ ID NO:48 中的 HFR3 的重链 FR3(HFR3);在 SEQ ID NO:48 中的 HFR4 的重链 FR4(HFR4);在 SEQ ID NO:42 中的 LFR1 的轻链 FR1(LFR1);在 SEQ ID NO:42 中的 LFR2 的轻链 FR2(LFR2);在 SEQ ID NO:42 中的 LFR3 的轻链 FR3(LFR3);和在 SEQ ID NO:42 中的 LFR4 的轻链 FR4(LFR4)。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括 8、7、6、5、4、3、2,或 1 种所列的 FR。

[0126] 在一些实施方式中,抗原结合构建体包括可检测的标记物。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括治疗剂。

[0127] 在一些实施方式中,抗原结合构建体是二价的。二价抗原结合构建体可以包括至少第一抗原结合域,例如第一 scFv,以及至少第二抗原结合域,例如第二 scFv。在一些实施方式中,二价抗原结合构建体是包括至少两个单体的多聚体,例如至少 2、3、4、5、6、7,或 8 个单体,其各自具有抗原结合域。在一些实施方式中,抗原结合构建体是微抗体。在一些实施方式中,抗原结合构建体是双价抗体,包括,例如,cys- 双价抗体。scFv,和 / 或微抗体和 / 或 cys- 双价抗体可以包括任何本文中提供的 CDR 和重链可变区和 / 或轻链可变区实施方式(例如,在图 2A、图 2B,和图 12C- 图 12I 中所提供的 CDR 序列)。在一些实施方式中,抗原结合构建体是单价 scFv。在一些实施方式中,提供的单价 scFv 包括:在图 2A,图 12E- 图 12I,或 SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50 或 52 的 HCDR1 中的 HCDR1;在图 2A,图 12E- 图 12I,或 SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50 或 52 的 HCDR2 中的 HCDR2;在图 2A,图 12E- 图 12I,或 SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50 或 52 的 HCDR3 中的 HCDR3;在图 2B、图 12C、图 12D、SEQ ID NO:9 或 42 的 LCDR1 中的 LCDR1;在图 2B、图 12C、图 12D、SEQ ID NO:9 或 42 的 LCDR2 中的 LCDR2,和在图 2B、图 12C、图 12D、SEQ ID NO:9 或 42 的 LCDR3 中的 LCDR3。在一些实施方式中,提供的单价 scFv 包括:在 SEQ ID NO:48 的 HCDR1 中的 HCDR1、在 SEQ ID NO:48 的 HCDR2 中的 HCDR2、在 SEQ ID NO:48 的 HCDR3 中的 HCDR3、在 SEQ ID NO:42 的 LCDR1 中的 LCDR1、在 SEQ ID NO:42 的 LCDR2 中的 LCDR2,以及在 SEQ ID NO:42 的 LCDR3 中的 LCDR3。在一些实施方式中,如在图 12D 中显示的,根据 Chothia 定义 CDR。

[0128] 在一些实施方式中,单价 scFv 包括在图 2A,图 4- 图 11,图 12C- 图 12I,或 SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50 或 52 中的重链可变区的重链可变区。在一些实施方式中,单价 scFv 包括在图 2B、图 4- 图 11、图 12C、图 12D, SEQ ID NO:9、42 或 40 中的轻链可变区的轻链可变区。在一些实施方式中,单价 scFv 包括在图 2A、图 4- 图 11、图 12C- 图 12I,或 SEQ ID NO:3、6、44、46、48、50 或 52 中的重链可变区的重链可变区和在图 2B、图 4- 图 11、图 12C、图

12D, SEQ ID NO:9、42 或 40 中的轻链可变区的轻链可变区。在一些实施方式中,单价 scFv 包括在 SEQ ID NO:48 中的重链可变区的重链可变区和在 SEQ ID NO:42 中的轻链可变区的轻链可变区。

[0129] 在一些实施方式中,抗原结合构建体是双特异性的。双特异性抗体可以包括至少第一结合域,例如与第一表位特异性结合的 scFv,以及至少第二结合域,例如与第二表位特异性结合的 scFv。因此,双特异性抗原结合构建体可以结合两种或多种表位。在一些实施方式中,第一表位和第二表位是相同抗原的部分,而双特异性抗原结合构建体可以因此与相同抗原的两个表位结合。在一些实施方式中,第一表位是第一抗原的部分,且第二表位是第二抗原的部分,而双特异性抗原结合构建体可以因此与两个不同抗原结合。在一些实施方式中,抗原结合构建体同时与两个表位结合。

[0130] 在一些实施方式中,抗原结合构建体具有在 SEQ ID NO:3、6、16、18、20、22、44、46、48、50 或 52 中的重链可变区的重链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与 SEQ ID NO:3 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或 99% 同一性的序列的重链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与 SEQ ID NO:6 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或 99% 同一性的序列的重链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与 SEQ ID NO:44 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或 99% 同一性的序列的重链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与 SEQ ID NO:46 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或 99% 同一性的序列的重链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与 SEQ ID NO:48 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或 99% 同一性的序列的重链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与 SEQ ID NO:50 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或 99% 同一性的序列的重链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与 SEQ ID NO:52 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或 99% 同一性的序列的重链可变区。

[0131] 在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括 SEQ ID NO:9、16、18、20、22、40,或 42 的轻链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与 SEQ ID NO:9 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或 99% 同一性的序列的轻链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与 SEQ ID NO:40 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或 99% 同一性的序列的轻链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与 SEQ ID NO:42 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或 99% 同一性的序列的轻链可变区。在一些实施方式中,抗原结合构建体是人抗原结合构建体并具有重链可变区、轻链可变区,或至少与上面提到的重链和 /

或轻链可变序列至少相同的重链和轻链。在一些实施方式中,抗原结合构建体具有包括与 SEQ ID NO:48 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或 99% 同一性的序列的重链可变区,和包括与 SEQ ID NO:42 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或 99% 同一性的序列的轻链可变区。

[0132] 本文中提供的一些实施方式包括与本文中提供的一种或多种抗原结合构建体竞争结合目标分子的抗原结合构建体。在一些实施方式中,竞争性抗原结合构建体在与参照抗原结合构建体一样的目标分子上的表位结合。在一些实施方式中,参照抗原结合构建体与目标分子的第一表位结合,而竞争性抗原结合构建体与目标分子的第二表位结合,但干扰参照抗原结合构建体与目标分子的结合,例如通过空间上封阻参照抗原结合构建体,或通过引起目标分子的构形改变。在一些实施方式中,第一表位与第二表位重叠。在一些实施方式中,表 0.1 和 / 或表 0.2 的列 3 和 5 可以交换。在一些实施方式中,本文中提供的任何重链可变区可以与本文中的任何轻链可变区结合用于 scFv、微抗体,和 / 或双价抗体。在一些实施方式中,表 0.1、0.2, 和 0.3 中的任何重链和 / 或轻链可变区 (列 3 和 5) 可以彼此交换与其他轻链或重链可变区交换,以产生抗原结合构建体 (如 scFv、cys- 双价抗体、微抗体,或抗体)。

[0133] 在一些实施方式中,微抗体和 cys- 双价抗体形式具有用于诊断成像和某些治疗应用的有利药代动力学性质同时保留亲本抗体的高结合亲和力和特异性。与用全长亲本抗体成像相比,这些片段的药代动力学是更期望的,因为它们能够靶向抗原,然后快速清除系统用于快速高对比度成像。在一些实施方式中,对于微抗体和 cys- 双价抗体较短的血清半衰期允许成像在注射微抗体后约 8-48 小时和注射 cys- 双价抗体后 2-24 小时的范围的时间发生。快速血清清除与较好的组织渗透一起可以允许同天成像,在临床中关于患者医护管理提供显著的优势。

[0134] 另外, cys- 双价抗体形式以 C- 端半胱氨酸尾部为特征。这两个巯基 (温和还原后) 为功能性半体的位点特异性结合提供了对策,如不干扰 cys- 双价抗体的结合活性的放射性示踪剂。

[0135] 与目标分子结合的双价抗体

[0136] 在一些实施方式中,抗原结合构建体可以是双价抗体。双价抗体可以包括含有与在第一多肽链上的轻链可变域 (V_L) 连接的重 (V_H) 链可变域的第一多肽链。在一些实施方式中,轻和重可变链域可以通过连接子连接。连接子可以是适合的长度以减少在第一多肽链和包括与在第二多肽链上的重链可变域 V_H 连接的轻链可变域 (V_L) 的第二多肽链上的通过连接子连接的两个域之间的配对可能性,连接子对于允许在第二多肽链上的两个域之间显著的配对来说太短。

[0137] 在一些实施方式中,连接子的适合长度促使第一和第二多肽链的互补域之间的链配对,并能促进具有两个功能性抗原结合位点的二聚分子聚集。因此,在一些实施方式中,双价抗体是二价的。在一些实施方式中,双价抗体可以是半胱氨酸连接的双价抗体 (Cys-Db)。与两个抗原位点结合的 Cys-Db 图解在图 3A 和图 3B 中说明。

[0138] 在一些实施方式中,连接子可以是肽。在一些实施方式中,连接子可以是促进这样的,例如 1 到 20 个氨基酸,如 5 和 10 个氨基酸长度的组配的任何适合长度。如本文中进一

步描述的,一些 cys- 双价抗体可以包括其为 5 到 8 个氨基酸长度的肽连接子。在一些实施方式中,连接子不需要是由氨基酸制成,或不需要是仅由氨基酸制成,并可以包括,例如,修改的氨基酸(见,例如, Increased Resistance of Peptides to Serum Proteases by Modification of their Amino Groups, Rossella Galati, Alessandra Verdina, Giuliana Falasca, Alberto Chersi, (2003) Z. Naturforsch, 58c, 558 - 561)。在一些实施方式中,连接子可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19, 或 20 个氨基酸长度。在一些实施方式中,连接子可以是 2-30 埃长度,例如 2.5 到 27 埃。

[0139] 在一些实施方式中,抗原结合构建体包括人化 cys- 双价抗体。人化 cys- 双价抗体可以包括含有与可变轻 (V_L) 域连接的可变重 (V_H) 域,和 C 端半胱氨酸的单链可变片段 (scFv)。在一些实施方式中,人化 cys- 双价抗体是同源二聚体。在一些实施方式中,人化双价抗体是异源二聚体。在一些实施方式中,提供各自具有半胱氨酸残基的个体单体。

[0140] 在一些实施方式中,人化 cys- 双价抗体的 scFv 具有 V_H - V_L 方向或 V_L - V_H 方向。如本文中所使用的, V_H - V_L (其也可以称为“ V_HV_L ”) 方向意为 scFv 的可变重域 (V_H) 是可变轻域 (V_L) 的上游,而 V_L - V_H 方向意为 scFv 的 V_L 是 V_H 的上游。如本文中所使用的,“上游”意为接近氨基酸的 N- 端或接近核苷酸序列的 5' 端。

[0141] 抗体可变区可以通过如本文中描述的连接子连接。在一些实施方式中,连接子是如本文中描述的 GlySer 连接子。

[0142] 在一些实施方式中, cys- 双价抗体包括可检测的标记物。

[0143] 在一些实施方式中, cys- 双价抗体包括单体对。各单体可以包括多肽。在一些实施方式中,单体的多肽是相同的(例如, cys- 双价抗体可以是同源二聚体)。在一些实施方式中,单体的多肽是不同的(cys- 双价抗体可以是异源二聚体)。

[0144] 在一些实施方式中,单体的多肽包括 SEQ ID NO:12 (见图 8)。在一些实施方式中,单体的多肽包括具有与 SEQ ID NO:12 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%, 或 99% 同一性的序列 (cys- 双价抗体 (V_L -5- V_H))。

[0145] 在一些实施方式中,单体的多肽包括 SEQ ID NO:13 (见图 9)。在一些实施方式中,单体的多肽包括具有与 SEQ ID NO:13 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93、94、95%、96%、97%、98%, 或 99% 同一性的序列 (cys- 双价抗体 (V_H -5- V_L))。

[0146] 在一些实施方式中,单体的多肽包括 SEQ ID NO:14 (V_L -8- V_H) (见图 10)。在一些实施方式中,单体的多肽包括具有与 SEQ ID NO:14 有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93、94、95%、96%、97%、98%、99%, 或 100% 同一性的序列。

[0147] 在一些实施方式中,单体的多肽包括 SEQ ID NO:15 (人化 OKT8cys- 双价抗体 (V_H -8- V_L)) (见图 11)。在一些实施方式中,单体的多肽包括具有与 SEQ ID NO:15 至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93、94、95%、96%、97%、98%、99%, 或 100% 同一性的序列。

[0148] 在一些实施方式中,单体的多肽包括任何如在表 0.3 示出的组合的部分,包括具有与在表 0.3 中所列单体有至少约 80% 同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、

89%、90%、91%、92%、93、94、95%、96%、97%、98%、99%，或 100% 同一性的序列的单体的多肽。

[0149] 在一些实施方式中，半胱氨酸彼此交叉连接。在一些实施方式中，半胱氨酸是还原的，并因此，这些形成尾部的半胱氨酸彼此之间不形成二硫键。在一些实施方式中，一个或多个“形成尾部的”半胱氨酸与一种或多种可检测标记物如荧光探针形成共价键。

[0150] 作为本领域技术人员将理解的，当本公开一般提及“cys- 双价抗体”时，可以采用可替换设置以实现相同或类似的结果。在一些实施方式中，可以采用任何共价键可修改的半体代替一个或多个半胱氨酸。例如，这可以包括 GlySer 连接子、GlyLeu 连接子，和 / 或在短标签后的插入的半胱氨酸。在一些实施方式中，可以经盘旋的卷或亮氨酸拉链建立连接。在一些实施方式中，“尾部”自身可以在其末端包括功能基团，以至于其能够在每个多肽的末端与期望的残基和 / 或位置选择性地结合，代替二硫键本身。在一些实施方式中，不是尾部提供两多肽链之间的空间，共价可修改的半体可以与重链或轻链多肽的末端直接连接，但两共价可修改的半体可以通过连接子连接。

[0151] 在一些实施方式中，提供了与目标分子结合的嵌合 cys- 双价抗体。在一些实施方式中，嵌合 cys- 双价抗体包括 V_L-V_H 形式的单体，并包括 SEQ ID NO:12 或 14 的序列，或具有与此至少约 80% 同一性，例如与此至少约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%，或 99% 同一性的序列。在一些实施方式中，嵌合 cys- 双价抗体包括 V_H-V_L 形式的单体，并包括 SEQ ID NO:13 或 15 的序列，或具有与此至少约 80% 同一性，例如与此至少约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%，或 99% 同一性的序列。

[0152] 在一些实施方式中，本文中提供的任何构建体（包括提出作为 cys- 双价抗体实施方式的这些设置），可以作为 scFv 实施方式提供。在这样的实施方式中，构建体可以仍包括在尾部上的半胱氨酸，但仅仅不是交联的。在其他实施方式中，构建体根本不需要具有在尾部的半胱氨酸或尾部。

[0153] 连接子和 / 或尾部选择

[0154] 在一些实施方式中，对于单个抗体，重链和轻链可变域可以以不同方式关联。为此，使用不同连接子长度允许构象柔性和活动范围以保证二硫键的形成。

[0155] 在一些实施方式中，两个连接子长度可以大约在（并包括）约 1 到 50 个氨基酸，例如 2 到 15、2 到 14、3 到 13、4 到 10，或 5 个氨基酸到 8 个氨基酸。在一些实施方式中，在双价抗体对内的每个连接子可以是相同长度。在一些实施方式中，在该对内的每个连接子可以是不同的长度。在一些实施方式中，可以使用连接子长度对的任何组合，只要它们允许和 / 或促进期望的组合。在一些实施方式中，可以使用修改的氨基酸。

[0156] 图 8- 图 11 提供四种 Cys-Db 变体， V_H-5-V_L 、 V_H-8-V_L 、 V_L-5-V_H ，和 VL8VH（见图 8-11，和表 0.3）。产生和测试所有四种变体的表达和结合允许每种新 Cys-Db 的蛋白产生的期望形式的识别。评估一系列变体可以帮助确信产生高质量、稳定的蛋白，其中二硫键是有效的。因此，工程设计 Cys-Db 可以包括利用两种不同连接子长度，而不是一种 - 如在微抗体，以及可变区的两种方向 V_H-V_L 和 V_L-V_H 中。

[0157] 在一些实施方式中，连接子是 GlySer 连接子。GlySer 连接子可以是富含 Gly 和 / 或 Ser 残基的多肽。在一些实施方式中，GlySer 连接子的至少约 40% 的氨基酸残基是 Gly、Ser，或 Gly 和 Ser 的组合，如至少约 40%、50%、60%、70%、80%，或 90%。在一些实施方

式中, GlySer 连接子为至少约 2 个氨基酸长, 例如至少约 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35, 或 40 个氨基酸长。在一些实施方式中, 连接子包括 SEQ ID NO: 28、30, 和 / 或 36 中的至少一种。

[0158] 在一些实施方式中, 在双价抗体的 C- 端添加半胱氨酸。该半胱氨酸可以允许双价抗体复合物形成共价的半胱氨酸键并提供用于功能性半体如放射线示踪剂的位点特异性连接的可用硫残基的选择。在一些实施方式中, 改变抗体自身的末端以包含半胱氨酸。在一些实施方式中, 在 C- 端添加尾部序列, 例如 (Gly-Gly-Cys)。在一些实施方式中, 半胱氨酸尾部序列允许 cys- 双价抗体的两个单体彼此形成二硫键。在一些实施方式中, 半胱氨酸尾部序列允许 cys- 双价抗体与可检测的半体如可检测的标记物和 / 或治疗剂形成二硫键。半胱氨酸尾部的巯基可以在与期望的功能半体例如可检测的标记物和 / 或治疗剂的位点特异性结合之前经历温和的还原。在一些实施方式中, 尾部为至少约 1 个氨基酸长, 例如至少约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35, 或 40 个氨基酸长。在一些实施方式中, 尾部包括 SEQ ID NO: 32 中的至少一个。在一些实施方式中, 尾部是 3 到 8 个氨基酸长度。在一些实施方式中, 尾部可以和 / 或包括盘绕的卷和 / 亮氨酸拉链。如上面提到的, 在一些实施方式中, 半胱氨酸位于 C- 端; 然而, 这要求半胱氨酸位于成为最后的 C- 端氨基酸。反而, 这表示半胱氨酸可以是位于蛋白的 C- 端的任何残基的部分。

[0159] 在一些实施方式中, 两 C- 端之间的连接选择可以通过半胱氨酸实现, 用于直接和 / 或间接的交联。

[0160] 与目标分子结合的微抗体

[0161] 如本文中所描述的“微抗体”包括同源二聚体, 其中各单体是与人 IgG1C_H3 域通过连接子如铰链序列连接的单链可变片段 (scFv)。在一些实施方式中, 铰链序列是如在图 12B、SEQ ID NO: 53-60 所示的 IgG1 或 IgG2 铰链序列。在一些实施方式中, CH3 序列包括如在图 12B、SEQ ID NO: 37-38 和 80-81 中所示的 IgG1C_H3, 或 IgG2C_H3 序列。

[0162] 在一些实施方式中, 铰链序列是人工铰链序列。在一些实施方式中, 铰链序列可以是来自四种分类的一种或多种 IgG 铰链。人工铰链序列可包括人 IgG1 或 IgG2 铰链和 GlySer 连接子的部分 (当该部分与和 Vh 和 V1 区连接的通用连接子序列区分时, 也称为“延伸”)。

[0163] 在一些实施方式中, 人工铰链序列包括大约首先人 IgG1 铰链的 14 或 15 个残基, 随后是延伸序列。在一些实施方式中, 延伸可以是任何那些本文中所提供的。在一些实施方式中, 延伸可以是 6、7、8、9, 或 10 个氨基酸长度的 GlySer 延伸序列。在一些实施方式中, 人工铰链序列包括大约首先 IgG1 铰链的 15 个残基, 随后是约 10 个氨基酸长度的 GlySer 延伸序列。在一些实施方式中, C_H3 域之间的关联使得微抗体作为稳定二聚体存在。

[0164] 在一些实施方式中, 铰链序列包括人 IgG2 铰链序列。在一些实施方式中, 铰链序列包括 IgG2 铰链序列。在一些实施方式中, 铰链序列包括天然 hIgG2IgG2 铰链序列 (“NH”)。可以用于与本文中的实施方式连接的示例性天然铰链序列在图 12B、SEQ ID NO: 55 中显示。在一些实施方式中, 本文中所提供的任何和所有的构建体可以与 hIgG2 铰链区一起使用。

[0165] 在一些实施方式中, 铰链序列包括 SEQ ID NO: 55 的天然人 IgG2 序列。在一些实施方式中, 铰链序列包括人工 IgG2 铰链序列。在一些实施方式中, 天然人 IgG2 序列包括人

工铰链-延伸(EH)序列。在一些实施方式中,人工铰链-延伸序列包括 SEQ ID NO:79。在一些实施方式中,人工铰链序列包括大约首先 12 到 15 个残基,例如人 IgG2 铰链序列的 12 个残基,随后是约 6、7、8、9、10、11,或 12 个氨基酸长度的 GlySer 延伸序列。可以用于与本文中的实施方式连接的示例性人工铰链序列在图 12B、SEQ ID NO:79 中显示。在一些实施方式中,在微抗体中可以采用任何上面提到的铰链区选择(例如,表 0.1 或 0.2)。在一些实施方式中,在表 0.1 或 0.2 中提到的任何铰链区可以用 IgG2 铰链区替换。在一些实施方式中,在表 0.1 或 0.2 中提到的任何构建体,和/或在图中描绘的任何构建体可以用来自人 IgG2 或 IgG2 的部分或所有铰链区替换描绘的铰链区。

[0166] 在一些实施方式中,微抗体 scFv 序列可以包括 CDR 和/或 FR,和或与本文中描述的双价抗体序列(例如,如在图 2A、2B、4、5、6、7、8、9、10、11,和图 12C-图 12I,以及表 0.1 和 0.2 中找到的)相似或相同的可变区序列。在一些实施方式中,微抗体 scFv 具有与本文中描述的 cys-双价抗体的 scFv 相同的序列(CDR、多种 CDR、全套 6 种 CDRs、重链可变区、轻链可变区、重链和轻链可变区等)。

[0167] 在一些实施方式中,微抗体具有与在 SEQ ID NO:3、6、9、16、18、20、22、34、36、38、53-60、40、42、44、46、48、50 和 52 中的序列,和/或在表 0.1 和/或 0.2 中设置的序列有至少约 80%同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93、94、95%、96%、97%、98%,或 99%同一性的序列。

[0168] 在一些实施方式中,微抗体具有与在 SEQ ID NO:3、6、9、16、18、20、22、40、42、44、46、48、50 和 52 中的序列有至少约 80%同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93、94、95%、96%、97%、98%,或 99%的同一性的可变链区。

[0169] scFv 具有 $V_H V_L$ 或 $V_L V_H$ 方向。在一些实施方式中, V_H 和 V_L 通过氨基酸连接子序列彼此连接。氨基酸连接子可以是如本文中描述的连接子。在一些实施方式中,连接子是富含 GlySer 的并且大约 15-20 个氨基酸长度。在另一个实施方式中,连接子是富含 GlySer 的并且大约 18 个氨基酸长度。在一些实施方式中,连接子长度在(并包括)约 1 到 50 个氨基酸,例如,2 到 30、3 到 20、4 到 15,或 5 个氨基酸到 8 个氨基酸之间变化。在一些实施方式中,微抗体 scFv 具有与本文中描述的 cys-双价抗体有至少约 80%同一性,例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93、94、95%、96%、97%、98%,或 99%同一性的序列。scFv 可以具有 $V_H V_L$ 或 $V_L V_H$ 方向。

[0170] 在一些实施方式中,微抗体的各单体从 N-端到 C-端包括以下要素(元件,element):(a) 包括与 V_L 域连接的 V_H 域并与目标分子连接的 scFv 序列;(b) 包括人 IgG1 铰链区的铰链-延伸域;以及(c) 人 IgG C_H3 序列。在一些实施方式中,微抗体的各单体从 N-端到 C-端包括以下要素:(a) 包括与 V_L 域连接的 V_H 域并与目标分子连接的 scFv 序列;(b) 包括如本文描述的 IgG2 铰链区的铰链-延伸域;以及(c) 人 IgG C_H3 序列。在一些实施方式中,微抗体的各单体包括 IgG2、IgG3,或 IgG4 C_H3 。在一些实施方式中,微抗体的各单体可以包括 IgA 或 IgD 的 CH3 域和/或 IgM 和/或 IgE 的 CH4 域。在一些实施方式中,微抗体由可以通过如本文所描述的细胞、细胞系或其他适合的表达系统表达的核酸编码。因此,可以将信号序列融合到 scFv 的 N-端以保证当在细胞或细胞系中表达时微抗体的分泌。

[0171] 在一些实施方式中,scFv、微抗体、cys-双价抗体和/或抗体包括在图 2A 和/或图 2B 中显示的并用星号标记的人化序列中的一个或多个残基。在一些实施方式中,当用星号

在图 2A 或图 2B 中标记的一个或多个残基存在时 ; 可以改变其余的残基。例如, 序列可以与其余部分的序列有百分之 80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或更高的同一性。在一些实施方式中, 人和 / 或人化抗原结合构建体将包括一个或多个在图 2A 中用信号标记的残基, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46, 或 47 个。在一些实施方式中, 抗原结合构建体包括一个或多个在图 2A 中加下划线的残基。在一些实施方式中, 抗原结合构建体包括一个或多个在图 2A 中未加下划线的残基。在一些实施方式中, 抗原结合构建体包括一个或多个在图 2A 中加下划线的残基以及加框的 CDR 部分, 而其他残基可以允许变化。在一些实施方式中, 抗原结合构建体。

[0172] 可替换地, 和 / 或另外, 抗原结合构建体可以包括含有一个或多个在图 2A 或图 2B 中用信号标记的残基, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19, 或 20。在一些实施方式中, 抗原结合构建体包括一个或多个在图 2A 或图 2B 中未加下划线的残基。在一些实施方式中, 抗原结合构建体包括一个或多个在图 2A 或图 2B 中加下划线的残基以及加框的 CDR 部分, 而其他残基可以允许变化。在一些实施方式中, CDR 残基是保留的并且用星号标记的残基是保留的, 但一个或多个其他残基允许改变。

[0173] 在一些实施方式中, 提供与目标分子结合的嵌合微抗体。在一些实施方式中, 嵌合微抗体包括以 V_L - V_H 形式的单体, 并包括 SEQ ID NO: 16 或 20 的序列, 或具有与此至少约 80% 同一性, 例如与此至少约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%, 或 99% 同一性的序列。在一些实施方式中, 嵌合微抗体包括以 V_H - V_L 形式的单体, 并包括 SEQ ID NO: 18 或 22 的序列, 或具有与此至少约 80% 同一性, 例如与此至少约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%, 或 99% 同一性的序列。

[0174] 在一些实施方式中, 单体的多肽包括任何如在表 0.1 和 0.2 中展示的组合部分, 包括具有与在表 0.1 和 0.2 中所列的单体有至少约 80% 同一性, 例如至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93、94、95%、96%、97%、98%、99%, 或 100% 同一性的序列的单体的多肽。

[0175] 核酸

[0176] 在一些实施方式中, 抗原结合构建体的多肽可以由核酸编码并在体内或体外表达, 或是这些可以化学合成的肽。因此, 在一些实施方式中, 提供编码抗原结合构建体的核酸。在一些实施方式中, 核酸编码 cys- 双价抗体或微抗体的一部分或单体。在一些实施方式中, 核酸编码两种或多种单体, 例如, 至少 2 种单体。编码多单体的核酸可以包括在至少两种单体之间的核酸切割位点、可以编码两种或多种单体之间的转录或翻译起始位点, 和 / 或可以编码在两种或多种单体之间的蛋白水解目标位点。

[0177] 在一些实施方式中, 表达载体包含编码如本文所描述的抗原结合构建体的核酸。在一些实施方式中, 表达载体包括 pcDNA3.1TM/myc-His(-) 版本 A 载体用于哺乳动物表达 (Invitrogen, Inc.), 或其变体 (见图 13)。pcDNA3.1 表达载体以用于哺乳动物表达的 CCMV 启动子和哺乳动物 (新霉素) 和细菌 (氨苄青霉素) 两者的选择标记物 (见图 10) 为特征。在一些实施方式中, 表达载体包括质粒。在一些实施方式中, 载体包括病毒性载体, 例如逆转录病毒或腺病毒载体。在一些实施方式中, 载体包括粘粒、YAC, 或 BAC。

[0178] 在一些实施方式中, 编码至少一种微抗体单体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 17、

19、21、23、39、41、43、45、47、49、51，或具有与其至少约 80 % 同一性，例如约 80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93、94、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 或更高同一性的序列中的至少一种。

[0179] 在一些实施方式中，编码至少一种 cys- 双价抗体单体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:77、78、10、11、39、41、43、45、47、49、51，或具有与其至少约 80 % 同一性，例如至少约 80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93、94、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 或更高同一性的序列中的至少一种。

[0180] 细胞系

[0181] 在一些实施方式中，提供了表达至少一种本文中描述的抗原构建体的细胞系。在一些实施方式中，哺乳动物细胞系（如，CHO-K1 细胞系）是以产生如本文中所描述的微抗体、cys- 双价抗体或其他抗体的表达系统。在一些实施方式中，本文中所描述的微抗体、cys- 双价抗体，和其他抗体，或抗体片段是非糖基化的，并且不要求哺乳动物表达系统，正因如此，不需要翻译后修饰。因此，在一些实施方式中，使用一种或多种宽种类的哺乳动物或非哺乳动物表达系统以产生本文所以披露的抗原结合构建体（例如，抗 -CD8 微抗体和 cys- 双价抗体），包括但不限于哺乳动物表达系统（例如，CHO-K1 细胞）、细菌表达系统（如，大肠杆菌、枯草芽孢杆菌）、酵母表达系统（如毕赤酵母、酿酒酵母）或任何其他的已知表达系统。其他系统可以包括昆虫细胞和 / 或植物细胞。

[0182] 抗原结合构建体修改

[0183] 在一些实施方式中，抗原结合构建体包括至少一种修改。示例性修改包括，但不限于，通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、由已知的保护 / 封闭基团衍生化、蛋白酶切割，以及与细胞配体或其他蛋白连接进行修改的抗原结合构建体。可以由已知技术进行任何众多的化学修改，包括，但不限于，特异性化学切割、乙酰化、甲酰化和衣霉素的代谢合成。在一些实施方式中，衍生物可以包含一种或多种非天然氨基酸。

[0184] 在一些实施方式中，抗原结合构建体与其他物质结合以形成抗 - 目标结合物。本文中描述的结合物可以通过用脂肪类、糖类，蛋白或其他原子或分子连接抗原结合构建体的已知方法来制备。在一些实施方式中，结合物通过利用合适的连接或键的位点特异性结合而形成。位点特异性结合更可能来保持抗原结合构建体的结合活性。物质可以经二硫键形成结合或附在还原的抗原结合构建体的铰链区。例如，在 scFv 片段的 C- 端引入半胱氨酸残基，例如可以在本文中描述的 cys- 双价抗体中引入的这些，允许位点特异的反应性巯基与宽种类的抗原在远离抗原结合位点的位点结合。用于形成结合物的其他连接或键可以包括，但不限于，共价键、非共价键、硫键、腙键、胍键、酯键、酰胺键，以及氨基酸连接、亚氨基连接、缩氨基硫脲 (thiosemicabazone) 连接、缩氨基脲 (emicarbazone) 连接、肟键和碳 - 碳连接。

[0185] 可检测的标记物

[0186] 在一些实施方式中，修改的抗原结合构建体与可检测的标记物连接。如本文所使用的，“可检测的标记物”包括有利于诊断、检测或可视化目标分子、细胞、组织、器官等的位置和 / 或数量的原子、分子，或化合物。根据本文描述的实施方式可以使用的可检测标记物包括，但不限于，放射性物质（例如，放射性同位素、放射性核素、放射性标记物或放射性示踪剂）、染料、造影剂、荧光化合物或分子、生物性发光化合物或分子、酶类或加强剂（如

顺磁离子)。另外,一些纳米颗粒,例如量子点和金属纳米颗粒(下面所描述的)可以是适应于作为检测剂的。在一些实施方式中,可检测标记物是吖啶菁绿(靛菁绿,IndoCyanine Green, ICG)。

[0187] 根据本文描述的实施方式可以用作可检测标记物的示例性放射性物质包括,但不限于, ^{18}F 、 ^{18}F -FAC、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{45}Ti 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{75}Sc 、 ^{77}As 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{94}Tc 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{154}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{175}Lu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 和 ^{225}Ac 。可以用作可检测标记物的示例性顺磁离子包括,但不限于,过渡金属和镧系金属离子(例如,具有原子数量 6 到 9、21-29、42、43、44,或 57-71 的金属)。这些金属包括 Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb 和 Lu 的离子。

[0188] 当可检测标记物是放射性金属或顺磁离子时,在一些实施方式中,标记物可以与具有长尾部的反应剂反应,该反应剂的长尾部有一个或多个附在长尾部上的与这些离子结合的螯合基团。长尾部可以是聚合剂如多聚赖氨酸、多糖,或其他衍生的或可衍生的具有可与用于结合离子的螯合基团结合的侧基的链。根据本文描述的实施方式可使用的螯合基团的实例包括,但不限于,乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙烯三胺五乙酸(DTAP)、DOTA、NOTA、NOGADA、NETA、去铁胺(DfO)、波菲利、聚胺类、冠醚类、双-缩氨基硫脲类、聚脲类等基团。螯合剂可以与抗原结合构建体通过基团连接,该基团允许以最低的免疫反应性损失和最小的聚集和/或内部交联与分子形成键。当一起使用本文描述的抗原构建体和载体时,相同的螯合剂,当与非放射性金属,如锰、铁和钆复合时,有利于 MRI。大环螯合剂如 NOTA、NOGADA、DOTA,和 TETA 与多种金属和放射性金属,分别包括但不限于放射性核素镱、钆和铜一起使用。可以使用其他环形螯合剂如大环聚醚类,其对稳定结合放射性核素感兴趣如对于 RAIT 的镭-223。在某些实施方式中,可使用螯合性半体以将 PET 成像剂,如铝- ^{18}F 复合物,附加至目标分子用于 PET 分析。

[0189] 可以用作根据本公开的实施方式的示例性造影剂包括,但不限于,钡、泛影酸盐、乙碘油、枸橼酸镱、碘卡酸、碘酸胺酸、碘达胺、胆影酸、碘氧胺酸、碘古酰胺(iogulamide)、碘酯六醇(iohexyl)、碘异酞醇、碘番酸、碘普西酸、碘西法酸、碘丝酸、碘硃葡胺、碘西美酸(iosemetic acid)、碘肽硫、碘替酸、碘酞酸、碘曲西酸、碘克沙酸、羟泛影酸、胺碘苯丙酸、葡甲胺、甲泛葡胺、甲泛影酸盐、丙碘酮、氧化亚铈,或其组合。

[0190] 可以用作根据本公开的实施方式的示例性生物性发光和荧光化合物或分子以及染料包括,但不限于,荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、OREGON GREENTM、罗丹明、德克萨斯红、四甲基罗丹明异硫氰酸(tetrarhodimine isothiocynate, TRITC)、Cy3、Cy5 等)、荧光标记物(例如,绿色荧光蛋白(GFP)、藻红蛋白等)、自动淬灭的通过肿瘤相关的蛋白酶激活的荧光化合物、酶类(例如,荧光素酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、纳米颗粒、生物素、地高辛或其组合。

[0191] 可以用作根据本公开的实施方式的示例性酶类包括,但不限于,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酸酶或 β -内酰胺酶。这些酶类可以与发色体、荧光化合物或发光化合物(luminogenic compound)组合以产生可检测的信号。

[0192] 在一些实施方式中,抗原结合构建体与纳米颗粒连接。术语“纳米颗粒”是指其大小以纳米测量的微小颗粒,例如具有至少一个维度小于约 100nm 的颗粒。纳米颗粒可以用作可检测物质,因为它们足够小以致分散可见光而不是吸收可见光。例如,金纳米粒子具有明显的可见光消失特性并在溶液中出现深红色到黑色。结果,包含与纳米颗粒连接的抗原结合构建体的组合物可以用于在受试者中 T- 细胞的体内成像。在尺寸范围的小末端,纳米颗粒经常是指簇。已经形成金属、电介质,或半导体纳米颗粒,以及杂交结构(例如,核-壳纳米颗粒)。纳米微球、纳米棒,以及纳米杯仅是已经开发的一些形状。半导体量子点和纳米晶体是纳米颗粒的其他类型的实例。这样的纳米级颗粒,当与抗原结合构建体连接时,可以用作用于如本文所描述的在体内检测 T- 细胞的成像剂。

[0193] 治疗剂

[0194] 在一些实施方式中,抗原结合构建体与治疗剂连接。如本文中所使用的“治疗剂”是有益于治疗癌症、炎症、其他疾病障碍,或其他抑制免疫应答,例如器官移植中的免疫抑制的原子、分子,或化合物。治疗剂的实例包括,但不限于,药物、化疗剂、治疗性抗体或抗体片段、毒素类、放射性同位素、酶类(例如,将前药在抗原结合构建体结合位点切割成细胞毒剂的酶类)、核酶类、激素类、免疫调节剂、反义寡核苷酸、螯合剂、硼化合物类、感光剂和染料,和纳米颗粒。

[0195] 化疗剂性质上通常是细胞毒性的或抑制细胞的,并可包括烷化剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂激素治疗、靶向治疗剂和免疫治疗剂。在一些实施方式中,可以用作根据本公开的实施方案的可检测标记物的化疗剂包括,但不限于,13-顺-维甲酸、2-氯代脱氧腺苷、5-阿扎胞苷、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、放线菌素-D、阿霉素、阿地白介素、阿仑单抗、阿利维 A 酸、全反式维甲酸、 α -干扰素、六甲蜜胺、氨甲喋呤、氨磷汀、阿那格雷、阿那曲唑、阿糖胞苷、三氧化二砷、安吡啶、氨基喜树碱、氨鲁米特、天冬酰胺酶、氮胞苷、卡介苗(BCG)、苯达莫司汀、贝伐单抗、贝沙罗汀、比卡鲁胺、硼替佐米、博莱霉素、白消安、甲酰四氢叶酸钙、嗜橙菌因子、卡培他滨、卡奈替尼、卡铂、卡莫司汀、西妥昔单抗、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、可的松、环磷酰胺、阿糖胞苷、阿法达贝泊汀、达沙替尼、柔红霉素、地西他滨、地尼白介素、地塞米松、氟美松、右丙亚胺、更生霉素、道诺霉素、氮烯咪胺、多西他赛、多柔比星、去氧氟尿苷、恩尿嘧啶、表柔比星、阿法依泊汀、厄洛替尼、依维莫司、依西美坦、雌莫司汀、依托泊苷、非格司亭、氟甲睾酮、氟维司群、夫拉平度、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟他胺、吉非替尼、吉西他滨、吉妥单抗奥唑米星、戈舍瑞林、粒细胞集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、六甲蜜胺、氢化可的松羟基脲、替伊莫单抗、 α -干扰素、白细胞介素-2、白细胞介素-11、异维 A 酸、伊沙匹隆、伊达比星、甲磺酸伊马替尼、异环磷酰胺、伊立替康、拉帕替尼、来那度胺、来曲唑、亚叶酸、亮丙瑞林、脂质体 Ara-C、洛莫司汀、氮芥、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、甲基强的松龙、丝裂霉素 C、米托坦、米托蒽醌、奈拉滨、尼鲁米特、奥曲肽、奥普瑞白介素、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸二钠、培美曲塞、帕尼单抗、PEG 干扰素、培门冬酶、聚乙二醇非格司亭、PEG-L-天冬酰胺酶、喷司他丁、普卡霉素、强的松龙、强的松、甲基苄肼、雷洛昔芬、利妥昔单抗、咯咪珀咯、雷替曲唑、沙帕他滨(sapacitabine)、沙格司亭、赛特铂、索拉非尼、舒尼替尼、司莫司汀、链脲菌素、他莫昔芬、替加氟、替加氟-尿嘧啶、替西罗莫司、替莫唑胺、替尼泊苷、沙利度胺、巯鸟嘌呤、噻替哌、拓扑替康、托瑞米芬、托西莫单抗、曲妥珠单抗、维甲酸、

三甲氧蝶呤 (trimitrexate)、氨柔比星、长春新碱、长春碱、硫酸长春新碱、长春瑞滨、伏立诺他,或唑来膦酸。

[0196] 可以用作根据本公开的实施方式的可检测标记物的毒素包括,但不限于,蓖麻毒素、相思子毒素、核糖核酸酶 (RNase)、DNase I (脱氧核糖核酸酶 I)、金黄色葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、铜绿假单胞菌外毒素,和假单胞菌内毒素。

[0197] 在一些实施方式中,使用纳米颗粒用作治疗应用中的药物载体,其当与抗原结合构建体连接时,递送化学治疗剂、激素治疗剂、放射治疗剂、毒素,或任何在本领域中已知的其他细胞毒剂或抗癌剂至在细胞表面上过表达目标的癌细胞。

[0198] 本文中描述的任何抗原结合构建体可进一步与一种或多种另外的治疗剂、可检测标记物、纳米颗粒、载体,或其组合连接。例如,抗原结合构建体可用碘 131 进行放射性标记并与脂质载体连接,以致抗 CD8- 脂质结合物形成胶束。此胶束可以插入一种或多种治疗剂或可检测标记物。可替换地,另外,抗原结合构建体可用碘 131 进行放射性标记 (例如酪氨酸残基) 并与药物连接 (例如,在赖氨酸残基的 ϵ 氨基上),而载体可并入另外的治疗剂或可检测标记物。

[0199] 试剂盒

[0200] 在一些实施方式中,提供了试剂盒。在一些实施方式中,试剂盒包括如本文中描述的抗原结合构建体。在一些实施方式中,试剂盒包括编码如本文中描述的抗原结合构建体的核酸。在一些实施方式中,试剂盒包括产生如本文中描述的抗原结合构建体的细胞系。在一些实施方式中,试剂盒包括如本文中描述的可检测标记物。在一些实施方式中,试剂盒包括如本文中描述的治疗剂。在一些实施方式中,试剂盒包括缓冲剂。在一些实施方式中,试剂盒包括阳性对照,例如 CD8、CD8+ 细胞,或其片段。在一些实施方式中,试剂盒包括阴性对照,例如基本上没有 CD8 的表面或溶液。在一些实施方式中,试剂盒包括包装。在一些实施方式中,试剂盒包括使用说明。

[0201] 检测目标分子存在或不存在的方法

[0202] 抗原结合构建体可以用于在体内和 / 或体外检测目标分子的存在或不存在。因此,一些实施方式包括检测目标分子存在或不存在的方法。该方法可以包括将抗原结合构建体施加至样品。该方法可以包括检测抗原结合构建体与目标分子, CD8 的结合或不存在结合。

[0203] 图 14 图例说明检测 CD8 存在或不存在的方法的一些实施方式。将理解的是在图 14 中显示的步骤可以以任何序列进行,和 / 或可选地重复和 / 或消除,并且可以可选地将另外的步骤添加至该方法中。如本文描述的抗原结合构建体可以施加至样品 100。可以进行可选的清洗 110。可选地,可以将第二抗原结合构建体施加至样品 120。可以进行可选的清洗 130。可以检测抗原结合构建体与目标分子的结合或不存在结合 140。

[0204] 在一些实施方式中,将如本文描述的抗原结合构建体在体内施加至样品。可以将抗原结合构建体给予至受试者。在一些实施方式中,受试者是人。在一些实施方式中,受试者是非人哺乳动物,例如大鼠、鼠、豚鼠、仓鼠、兔、狗、猫、牛、马、山羊、绵羊、驴、猪、猴,或猿。在一些实施方式中,将抗原结合构建体输注进受试者。在一些实施方式中,输注是静脉内的。在一些实施方式中,输注是腹膜内的。在一些实施方式中,将抗原结合构建体局部外

用地或局部地（如在介入或手术中应用的情况中）施加至受试者。在一些实施方式中，可以将含有抗原结合构建体的胶囊施加至受试者，例如口服地或腹腔内地。在一些实施方式中，选择抗原结合构建体以减少受试者的免疫原性应答的风险。例如，对于人类受试者，如本文所描述的，可以将抗原结合构建体人化。在一些实施方式中，在体内施加抗原结合构建体后，将样品或部分样品从宿主中移去。在一些实施方式中，将抗原结合构建体在体内施加，如本文所描述的在体内培养一段时间，并移取样品用于体外分析，例如在体外检测本文所描述的抗原结合构建体与目标分子的结合或其的不存在结合。

[0205] 在一些实施方式中，将抗原结合构建体在体外施加至样品。在一些实施方式中，样品是从受试者中新鲜获得，例如活检。在一些实施方式中，样品在从受试者获得后进行培养。在一些实施方式中，样品是固定的。在一些实施方式中，样品包括全器官和 / 或组织。在一些实施方式中，样品包括一种或多种全细胞。在一些实施方式中样品来自细胞提取物，例如裂解物。在一些实施方式中，将在溶液中的抗原结合构建体添加至样品中的溶液。在一些实施方式中，将在溶液中的抗原结合构建体添加至不含溶液的样品，例如冻干样品，因此重构样品。在一些实施方式中，将冻干的抗原结合构建体添加至含有溶液的样品，因此重构抗原结合构建体。

[0206] 在一些实施方式中，将抗原结合构建体可选地与样品培养。抗原结合构建体可以培养不超过约 10 天的时间，例如不超过约 10 天、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 天，或不超过约 23 小时，例如不超过约 23 小时、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.75、0.5、0.25 或 0.1 小时，包括任何两种所列值之间的范围。在一些实施方式中，培养是在给予抗原结合构建体的受试者内。一些实施方式中，培养是在孵育器内。一些实施方式中，孵育器保持在固定的温度，例如约 21℃、室温、25℃、29℃、34℃、37℃，或 40℃。

[0207] 一些实施方式中，可选地将未与目标结合的抗原结合构建体从样品中移去。一些实施方式中，样品是清洗了的。清洗样品可以包括去除含有未结合抗原结合构建体的溶液，并加入不含有抗原结合构建体的溶液，例如缓冲溶液。一些实施方式中，清洗体外样品，例如通过抽吸、吸取、泵送或排出含有未结合抗原结合构建体的溶液，并加入不含有抗原结合构建体的溶液。一些实施方式中，清洗体内样品，例如通过给予受试者不含有抗原结合构建体的溶液，或通过清洗局部给予抗原结合构建体的位点。在一些实施方式中，进行至少两次清洗，例如至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20 次。一些实施方式中，在清洗或多次清洗后，至少约 50% 的未结合抗体从样品中移除，例如至少约 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或更高。

[0208] 一些实施方式中，未结合抗原结合构建体从样品中消除。在将抗原结合构建体施加至样品后，与目标结合的抗原结合构建体和未与目标结合的抗原结合构建体达到平衡，以至于在施加抗原结合构建体后的一些时间，与目标结合的抗原结合构建体的量基本上没有增加。在该时间后，至少部分的与目标未结合的抗原结合构建体的量可以被消除。在一些实施方式中，未结合的抗原结合构建体通过给予了抗体或片段的受试者的代谢或其他身体过程消除。在一些实施方式中，未结合的抗原结合构建体通过另外的破坏或不稳定未结合的抗原结合构建体的物质消除，例如蛋白酶或中和抗体。在一些实施方式中，在施加抗原结合构建体 1 天后，至少约 30% 的所施加的抗原结合构建体已经被消除，例如至少约 30%、40%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%，或 99.9%。在一些实施

方式中,在施加抗原结合构建体 2 天后,至少约 40% 的所施加的抗原结合构建体已经被消除,例如至少约 40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%,或 99.9%。

[0209] 在一些实施方式中,检测目标,CD8 的存在或不存在。目标的存在或不存在可以基于在样品中在抗原结合构建体的存在或不存在来检测。在从样品中去除和 / 或消除抗原结合构建体后,例如通过清洗和 / 或代谢消除,保留在样品中的抗原结合构建体可以指示目标的存在,而在样品中没有抗原结合构建体可以指示目标的不存在。在一些实施方式中,抗原结合构建体配置为致其偏向经肾脏消除。在一些实施方式中,抗原结合构建体配置为致其偏向经肝脏消除。在一些实施方式中,可以配置包括至少部分的如本文所描述的 hIgG2 或 IgG2 铰链和 / 或 C_H3 区的抗原结合构建体,以致其基本经肝脏清除。在一些实施方式中,可以配置包括至少部分的如本文所描述的 IgG2 铰链和 / 或 C_H3 区的抗原结合构建体,以致其基本经肝脏清除,但基本上不经肾脏清除。在一些实施方式中,经肝脏消除的抗原结合构建体与经肾脏清除的抗原结合构建体的比例为至少约 2:1,例如约 2:1、3:1、3.5:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、100:1,或 200:1,包括任何所列值之间的范围。在一些实施方式中,抗原结合构建体在消除期间保持为二聚体,以便具有增加经肝脏而不是经肾脏消除的可能性的分子量。在一些实施方式中,抗原结合构建体维持大于约 60kDa 的肾阈值的原子质量,例如约 65kDa、70kDa、80kDa、90kDa、100kDa、120kDa、150kDa,或 200kDa,包括任何所列值之间的范围。

[0210] 在一些实施方式中,抗原结合构建体包括如本文所描述的可检测标记物。因此,可以通过检测可检测标记物来推测抗原结合构建体。

[0211] 在一些实施方式中,使用第二抗原结合构建体用于检测抗原结合构建体。第二抗原结合构建体可以与抗原结合构建体特异性地结合。例如,第二抗原结合构建体可以包括抗宿主类型的抗体或抗抗原结合构建体自身的多克隆或单克隆抗体、双价抗体、微抗体等。第二抗原结合构建体可以与如本文中描述的可检测标记物连接。可以将第二抗原结合构建体施加至样品。在一些实施方式中,将第二抗原结合构建体以与抗原结合构建体基本上相同的方式施加至样品。例如,如果将抗原结合构建体输入受试者,则也可以将第二抗原结合构建体输入受试者。

[0212] 在一些实施方式中,抗原结合构建体的结合或不存在结合经以下中至少一种进行检测:正电发射断层显像(正电子放射断层造影术,positron emission tomography,PET)、单光子发射计算机断层显像(SPECT)、核磁共振成像(NMR),或检测的荧光发射。PET 可以包括,但不限于微 PET 成像。在一些实施方式中,抗原结合构建体的结合或不存在结合经两种或多种成像形式检测。在一些实施方式中,可以经近红外(NIR)和 / 或切伦科夫辐射(Cerenkov)进行检测。

[0213] 将治疗剂靶向细胞的方法

[0214] 可以使用抗原结合构建体将治疗分子,例如细胞毒素靶向目标阳性细胞,如表达 CD8 的细胞。因此,一些实施方式包括将治疗剂靶向目标阳性细胞的方法。该方法可以包括将如本文描述的抗原结合构建体给予至受试者。受试者可以是有需要的受试者,例如需要消除或中和至少一些目标阳性细胞的受试者。在一些实施方式中,抗原结合构建体包括至少一种如本文所描述的治疗剂。在一些实施方式中,治疗剂可以经共价键,例如二硫键与抗

原结合构建体直接连接。在一些实施方式中,受试者可以从将 CD8 阳性细胞定位至其他细胞或试剂中受益。

[0215] 可选地,在给予包括至少一种治疗剂的抗原结合构建体之前和 / 或之后,目标阳性细胞的数量和 / 或位置是确定的。例如,在给予之前确定目标阳性细胞的数量和 / 或位置可以指示患者是否可能从中和和 / 或消除目标阳性细胞中受益。在给予之后确定目标阳性细胞的数量和 / 或位置可以指示目标阳性细胞是否在患者中消除。

[0216] 另外的实施方式

[0217] 一些实施方式包括检测其为在 T 细胞的子集的表面上发现的特异性生物标记物的人 CD8,用于免疫系统的诊断成像。目标分子成像允许在体内检测 T- 细胞定位。T- 细胞定位的改变能反映免疫应答的进程并能随时间出现,作为各种治疗处理或甚至疾病状态的结果。例如,成像 T- 细胞定位可以有利于免疫治疗。过继性免疫治疗是将患者自身 T- 细胞在体外操作并重新导入患者的治疗形式。对于该治疗形式,T- 细胞成像可以有利于监测和 / 或确定治疗状态。因此,在一些实施方式中,监测目标分子的定位可以有利于分析药物开发中的作用机理、效果和 / 或安全性和 / 或可以有助于疾病的临床管理。

[0218] 在一些实施方式中,已经将与目标特异性结合的抗原结合构建体的 CDR,例如抗体 OKT8,调整成微抗体和 cys- 双价抗体设置。已经将鼠抗体的 CDR 接枝在人微抗体和 cys- 双价抗体框架上,因此产生嵌合微抗体。抗体 V 域通常含有形成内部二硫键的两个半胱氨酸。OKT8V_H具有在框架 3 (FR3) 中的外部半胱氨酸,其可以干扰蛋白的表达,因为其可以导致聚集并因此在内质网中滞留。因此,一些实施方式包括由用丝氨酸替换框架中的外部半胱氨酸制作的微抗体 (见,例如,SEQ ID:16、18、20,和 22)。

[0219] 在一些实施方式中,提供将 CD8+ 细胞靶向至第一抗原的方法。该方法可以包括将双特异性抗原结合构建体施加至样品。双特异性抗原结合构建体可以包括如本文描述的 CD8 抗原结合构建体。双特异性抗体可以包括与第一抗原结合的抗原结合构建体,例如微抗体或 cys- 双价抗体的 1、2、3、4、5 或 6 个 CDR,scFv,或单体。在一些实施方式中,双特异性抗体包括本文所描述的抗原结合构建体的 1、2 或 3 个 HCDR,和 / 或本文所描述的抗原结合构建体的 1、2 或 3 个 LCDR。在一些实施方式中,双特异性抗原结合构建体包括如本文描述的抗原结合构建体的 scFv。在一些实施方式中,双特异性抗原结合构建体包括如本文描述的 V_H或 V_L序列。在一些实施方式中,双特异性抗原结合构建体包括如本文描述的单微抗体或 cys- 双价抗体单体。在一些实施方式中,将双特异性抗原结合构建体在体内施加至样品,例如受试者的器官或组织。在一些实施方式中,将双特异性抗原结合构建体施加至体外样品。不被任何一种原理所限制,在一些实施方式中,双特异性抗原结合构建体与目标在目标阳性细胞上结合,并与第一抗原 (其可以区别于 CD8) 在第一细胞上结合,并因此带来目标阳性细胞与第一细胞的接近。例如,可以带来 CD8+T 细胞与癌细胞的接近,并能促进对该癌细胞的免疫应答。

[0220] 在一些实施方式中,抗 -CD8 抗原结合构建体可以是特异性靶向人 CD8+T- 细胞的成像剂。在一些实施方式中,抗 -CD8 片段可以直接连接并检测表达 CD8 的 T- 细胞的特定亚类的定位。在一些实施方式中,能够交联 CD8 的工程片段可以通过 T 细胞受体加强信号,并能够加强受试者清除病毒病原体并对肿瘤抗原和疫苗应答的能力。

[0221] 在一些实施方式中,微抗体和 cys- 双价抗体形式具有期望的药代动力学特征,用

于诊断成像同时保持亲本抗体的高结合亲和力和特异性。与用与用全长亲本抗体成像相比,这些片段清除更快;它们还能够靶向抗原用于快速高对比度成像。相同的有利药代动力学性质有利于靶向免疫应答,允许更多的受控制的 T 细胞刺激并防止过度刺激的不期望效果(例如,细胞因子风暴)。在临床前模型中,对于微抗体和 cys- 双价抗体较短的血清半衰期允许在注射微抗体后约 16-20 小时和注射 cys- 双价抗体后约 2-6 小时时最佳成像。同天成像在临床中关于患者医护管理提供显著的优势。

[0222] 另外, cys- 双价抗体的抗体形式以 C- 端半胱氨酸尾部为特征。这两个巯基(温和还原后)为功能性半体的位点特异性结合提供了对策,如不干扰 cys- 双价抗体的结合活性的放射性示踪剂。

[0223] 在一些实施方式中,这些抗原结合构建体可以是诊断成像剂(在用适合的放射性同位素如碘-124、Cu-64 或 Zr-89(用于 PET 成像)或荧光团(用于荧光成像)标记后)。作为临床成像剂,这些 CD8 抗原结合构建体可以帮助监测治疗并作为患者选择工具。

[0224] 在一些实施方式中,抗原结合构建体可以用于需要对 CD8 高特异性和高-亲和力结合的应用中。除诊断成像之外,这些片段将用于不同目的,这取决于带有的不同功能性基团。

[0225] 带有适合的红外线的或荧光的染料,这些构建体可以用作用于图像导向的术中手术的靶向剂。

[0226] 在一些实施方式中,除了对片段带有的功能性基团的修改,通过使用双特异性片段(其中该片段能与 2 种不同抗原结合),将 CD8+ 细胞与第二抗原带到一起是可能的。双特异性全长抗体已经用于癌症免疫治疗以带来免疫系统的针对肿瘤细胞的细胞毒性细胞。因此,这样的实施方式还考虑适合的抗原结合构建体。

[0227] 在一些实施方式中,本文提供了在体外和体内均能结合并特异性靶向人 CD8 α 的工程 scFv、微抗体,和 cys- 双价抗体抗体片段。

[0228] 实施例 1:CD8 抗体和抗体片段的人化

[0229] OKT8 抗体的鼠可变区通过将鼠互补决定区(CDR)接合到人框架上来进行人化。针对人 V 胚系数据库运行鼠 V 基因。检查带有最高序列同源性的人 V 基因的功能性残基和对抗原结合环(CDR)结构的相似性。然后将鼠的 OKT8 的 V_L和 V_H CDR 合并入人受体可变区框架,替换人 CDR。显示了相应鼠、人胚系,和人化序列对于重链可变区(图 2A)和轻链可变区(图 2B)的比对。在这些图中,CDR 被框出且星号指示彼此不同的残基。所选择的鼠残基,已知在环结构中的功能,被保留在人框架中。

[0230] 实施例 2:CD8 微抗体的表达

[0231] 将 OKT8 微抗体结构(如在表 0.1 中概括的序列组合)瞬时转染入 CHO-K1 细胞以验证表达。转染在 6-孔板中利用脂质体转染试剂(Invitrogen)进行。在于 CO₂孵育器中在 37°C 培养 72 小时后,收获上清液并过滤以去除任何细胞。

[0232] 在来自瞬时转染的上清液上进行蛋白印迹分析以确认抗体片段的表达。包括来自空载体转染的上清液作为阴性对照,而来自无关微抗体转染的上清液作为阳性对照。在非还原条件下,微抗体跑在预期的 80-90kDa 分子量处(图 15)。在大约 40kDa 处还检测到代表单体形式的小带。这些结果确认嵌合的并人化的微抗体的适宜表达。

[0233] 实施例 3 结合

[0234] 嵌合微抗体变体 1 通过 ELISA 证明对 CD8 的最高结合, 而人化变体没有显示对 CD8 的任何显著结合 (图 16)。虽然人化变体的 SPR 分析显示与可溶 CD8 结合, 但观察到了与嵌合微抗体和亲本 OKT8 抗体相比亲和力的数倍丧失。用重组人 CD8 抗原覆盖 96 孔板并用从瞬时转染获得的上清液孵育。结合是用辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的山羊抗 - 人 IgG (Fc- 特异性的) 和显色底物 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 在 405nm 处测定吸光度来检测的。稀释以每次三份进行。数据显示为相对吸光度的均值。

[0235] 图 17A- 图 17D 显示 IAb_Mb_CD8 变体的流式细胞术分析的结果。所有直方图显示别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 信号对计数。将来自变体的转染的上清液在不同稀释度用 CD8+ 细胞孵育。清洗细胞并随后用第二抗 - 人 IgG (Fc- 特异性的) APC 结合抗体染色。每点染色 1×10^5 个细胞并用 10,000 事件 / 点进行分析。

[0236] 嵌合并人化的微抗体显示与 CD8+ 细胞浓度依赖性地结合 (图 17A- 图 17D)。虽然人化微抗体比嵌合的表达更好, 但嵌合微抗体通过流式细胞术显示更强的信号, 证明嵌合微抗体具有更强的结合亲和力。

[0237] 实施例 4—抗原结合构建体的成熟

[0238] 为了提高人化抗体片段的结合亲和力, 两种人化 V_H 区是进一步亲和力成熟的。对于 1st 版本 V_H , 亲和力成熟产生亚 - 版本 a 和 b。对于 2nd 版本 V_H , 亲和力成熟产生亚 - 版本 c 和 d。图 12F- 图 12I 显示产生的抗体可变轻 (V_L) 基因和可变重 (V_H) 基因。显示了带有氨基酸序列的 DNA。利用 Chothia 定义框住 CDR。

[0239] 将亲和力成熟的人化 OKT8V 基因工程设计成区别在于在 scFv 中的 V 基因的方向的两种微抗体变体; V_L - V_H 方向指为号码 1) 而 V_H - V_L 方向指为号码 2)。特定序列组合在表 0.2 中概括。

[0240] 实施例 5 :CD8 微抗体的表达

[0241] 将上面的 IAb_Mb_CD8 表达构建体瞬时转染入 CHO-K1 细胞。通过蛋白印迹分析在来自转染的上清液以确认微抗体的适宜表达。包括来自空载体转染的上清液作为阴性对照, 而无关微抗体的纯化蛋白作为阳性对照。表达了所有变体, 其由在预期的对于组合的微抗体复合物 (约 95kDa) 的分子量处的带所证明 (图 18A 和图 18B)。出现在约 45kDa 的带代表单体。在 SDS-PAGE 上跑来自瞬时转染子的转染上清液并转到 PVDF 膜上。该膜用碱性磷酸酶 (AP) 结合的抗 - 人 IgG (Fc- 特异性的) 抗体标记并通过用 AP 底物 BCIP/NBT 孵育来显影。这是多项实验的代表性印迹。

[0242] 进行定量 ELISA 以测定来自在 CHO-K1 细胞中瞬时转染的 IAb_Mb_CD8 的表达水平。IAb_Mb_CD8 微抗体变体在约 0.5-1.9 μ g/ml 之间的范围内表达, 其范围的较高端与先前表达的参照微抗体相当 (图 19)。使用山羊抗 - 人 IgG (Fc- 特异性的) 用于捕获微抗体并使用 AP- 结合的山羊抗 - 人 IgG (Fc- 特异性的) 用于检测。使用纯化的不相关同型对照微抗体蛋白作为标准品。将 IAb_Mb_CD8 上清液连续稀释以找到符合标准曲线的线性范围的稀释点。

[0243] 实施例 6 :微抗体的功能性活性

[0244] 为了证明 IAb_Mb_CD8 微抗体变体的功能性活性, 通过 ELISA 测试来自瞬时转染的上清液对于与纯化的重组人 CD8 蛋白的结合。基于在图 19 中出现的定量 ELISA, 标准化变体 IAb_Mb1b_CD8、IAb_Mb2b_CD8, 和 IAb_Mb1a_CD8 的浓度以匹配 IAb_MB2a_CD8 (0.5 μ g/

m1) 的浓度。然后将样品连续稀释以通过一系列的浓度评定结合。还包括亲本 OKT8 抗体作为用于分析的阳性对照 (数据未显示)。所有微抗体变体显示与可溶重组人 CD8 (rhCD8) 的浓度依赖性结合。

[0245] 图 20 表明 IAb_Mb1a_CD8 具有与抗原结合的最高水平的结合,随后是 IAb_Mb1b_CD8。用 rhCD8 抗原覆盖 96 孔板并用从瞬时转染获得的上清液孵育。结合用 HRP 结合的山羊抗-人 (Fc-特异性的) IgG 和 TMB 底物来检测。在 405nm 测定吸光度。稀释以每次三份进行。数据显示为相对吸光度的均值。

[0246] 图 21 表明变体 1c 具有结合的最高水平的结合,随后是变体 1c。用 rhCD8 抗原覆盖 96 孔板并用从瞬时转染获得的上清液孵育。用 HRP 结合的山羊抗-人 (Fc-特异性的) IgG 和 TMB 底物来检测结合。在 405nm 测定吸光度。稀释以每次三份进行。数据显示为相对吸光度的均值。

[0247] 实施例 7 :与细胞的人 CD8 结合

[0248] 利用流式细胞术评估 IAb_Mb_CD8 变体对于与细胞的人 CD8 的结合。测试来自瞬时转染的上清液对于与 PC3-CD8 细胞的结合 (PC3 细胞用人 CD8 稳定转染) (图 22A 和图 22B 以及图 23A 和图 23B)。标准化微抗体上清液用于流式细胞术试验。包括使用亲本 OKT8 作为用于结合的阳性对照 (数据未显示)。PC3 细胞用作阴性对照并确认微抗体变体没有结合 (数据未显示)。IAb_Mb1b_CD8 显示四种微抗体变体中最大的平均荧光强度 (MFI)。

[0249] 关于在图 22A 和图 22B 中显示的结果,所有直方图显示 APC 信号对计数。来自变体的转染的上清液与 PC3-CD8 细胞一起孵育。清洗细胞并随后用 APC-结合的抗-人 IgG (Fc-特异性的) 抗体染色。每点染色 1×10^5 个细胞且分析以 10,000 事件 / 点进行。

[0250] 关于在图 23A 和图 23B 中显示的结果,所有直方图显示 APC 信号对计数。来自变体的转染的上清液与 PC3-CD8 细胞一起孵育。清洗细胞并随后用 APC-结合的抗-人 IgG (Fc-特异性的) 抗体染色。每点染色 1×10^5 个细胞且分析以 10,000 事件 / 点进行。

[0251] 结果表明构建体仍与细胞的人 CD8 结合。

[0252] 实施例 8 :SPR 分析

[0253] 使用表面等离子共振 (SPR) 用于确定对于所有 IAb_Mb_CD8 变体与重组人 CD8 的结合亲和力 (表 8.0)。利用抗-人 IgG (Fc-特异性的) 抗体将在上清液中的微抗体蛋白捕获到 BIAcore 芯片上。标准化在芯片上捕获的微抗体的量,以使得在变体之间结合亲和力的直接比较作为以排列亲和力的动态“勘察 (scouting)”实验。rhCD8 蛋白经过捕获的微抗体蛋白以测定结合。所有变体显示对 CD8 蛋白的强结合,这与亲本 OKT8mAb 相似。

[0254] 表 8.0

[0255]

配体	分析物	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	平衡常数 K _D	K _A (1/M)	K _D (M)
OKT8 mAb	hCD8	5.6×10^5	1.0×10^{-3}	50 nM	5.5×10^8	1.8×10^{-9}
IAb_Mb1b_CD8	hCD8	6.4×10^5	1.2×10^{-3}	50 nM	5.4×10^8	1.9×10^{-9}
IAb_Mb2b_CD8	hCD8	5.4×10^5	2.1×10^{-3}	50 nM	2.6×10^8	3.9×10^{-9}
IAb_Mb1a_CD8	hCD8	6.5×10^5	1.2×10^{-3}	50 nM	5.3×10^8	1.9×10^{-9}
IAb_Mb2a_CD8	hCD8	4.8×10^5	2.2×10^{-3}	50 nM	2.2×10^8	4.6×10^{-9}
IAb_Mb1d_CD8	hCD8	7.0×10^5	2.0×10^{-3}	50 nM	3.4×10^8	2.9×10^{-9}
IAb_Mb2d_CD8	hCD8	5.4×10^5	2.9×10^{-3}	50 nM	1.8×10^8	5.5×10^{-9}
IAb_Mb1c_CD8	hCD8	7.0×10^5	1.8×10^{-3}	50 nM	4.0×10^8	2.5×10^{-9}
IAb_Mb2c_CD8	hCD8	7.2×10^5	3.2×10^{-3}	50 nM	2.2×10^8	4.5×10^{-9}

[0256] 表 8.0 总结了对于 IAb_Mb_CD8 变体与重组 hCD8 结合的结合常数 (k_a)、解离常数 (k_d)，和 K_D 常数。利用抗-人 Fc 特异性 IgG 抗体在 BIAcore 芯片上捕获变体。

[0257] 在一些实施方式中，提供在纳摩尔级范围内（例如 1 至 2、2 至 10、10 至 100，或 100 至 1,000nM）结合的抗原结合构建体并包括微抗体、cys- 双价抗体，和 scFv 设置（例如）。

[0258] 实施例 9 :CD8 Cys- 双价抗体的表达

[0259] 将如在表 0.3 (人化版本 b) 中概括的 cys- 双价抗体瞬时转染入 CHO-K1 细胞以验证表达。转染在 6-孔板中利用脂质体转染试剂进行。在于 CO₂ 孵育器中在 37°C 培养 72 小时后，收获上清液并过滤以去除任何细胞。

[0260] 利用在来自瞬时转染的上清液进行蛋白印迹分析以确认抗体片段的表达。包括来自空载体转染的上清液作为阴性对照，而来自无关 cys- 双价抗体转染的上清液作为阳性对照。在非还原条件下，所有人化 OKT8cys- 双价抗体的四种变体跑在大约 55KDa 的适当分子量处（图 24）。在大约 25kDa 处还检测到代表单体形式的小带。这些结果确认人化 OKT8Cys- 双价抗体的适宜表达。对于蛋白印迹，在瞬时转染入 CHO-K1 细胞后收集上清液。通过 SDS-PAGE 在非还原条件下电泳转染上清液并转到 PVDF 膜上。该膜用 HAP 结合的抗-His 抗体标记并用 HAP 底物 TMB 显影。

[0261] 实施例 10 :对于 CD8 Cys- 双价抗体的结合

[0262] 通过 ELISA 测试来自 IAb_Cys-Dbb_CD8 变体的瞬时转染的上清液对于与重组人 CD8 (rhCD8) 蛋白的结合。将样品连续稀释以在与 CD8 孵育之前通过浓度范围评定结合。用 rhCD8 抗原覆盖 96 孔板。瞬时转染不同 cys- 双价抗体变体后，用上清液孵育覆盖的板，然后用 HAP 结合的抗-His 抗体孵育。利用 TMB 和在 405nm 测定的吸光度来检测信号。

[0263] 所有四种变体均显示出与 rhCD8 蛋白的浓度依赖性结合（图 25）。包括在分析中的来自阴性对照 cys- 双价抗体的转染上清液未显示与 CD8 的任何结合（图 25）。

[0264] 利用流式细胞术进一步测试所有四种 IAb_Cys-Dbb_CD8 变体对于与细胞的人 CD8 的结合。测试来自瞬时转染的上清液对于与 PC3-CD8 的结合（图 26A 和图 26B）。亲本 OKT8 被包括为对于结合的阳性对照（数据未显示）。PC3 细胞被包括为阴性对照并确认该细胞与 cys- 双价抗体变体没有特异性结合（数据未显示）。IAb_Cys-Db1b_CD8 和 IAb_Cys-Db3b_CD8 证明与另外两种变体相比较高的平均荧光强度 (MFI)。在图 26A 和图 26B 中的所有直

方图显示 APC 信号对计数。评估来自变体转染的上清液对于与 PC3-CD8 细胞的结合。随后将细胞用 APC- 结合的抗 -His 抗体染色。每点以 1×10^5 个细胞和 10,000 事件 / 点进行分析。

[0265] 评估 IAb_Cys-Dbb_CD8 变体对于其与表达内源性 CD8 的 HPB-ALL 细胞的结合的能力。所有 IAb_Cys-Db 1b 和 3b 变体与 HPB-ALL 细胞结合 (图 27)。亲本 OKT8 被包括为对于结合的阳性对照,而 PC3 细胞被包括为阴性细胞系。在不表达 CD8 的 PC3 细胞上没有见到通过 cys- 双价抗体变体的结合 (数据未显示)。评估来自变体转染的上清液对于与表达内源性 CD8 的 HPB-ALL 细胞的结合。随后将细胞用 APC- 结合的抗 -His 抗体染色。所有直方图显示 APC 信号对比计数。每点以 1×10^5 个细胞和 10,000 事件 / 点进行分析。

[0266] 实施例 11:体内检测 CD8

[0267] 表 0.3 的人化 CD8cys- 双价抗体与相关螯合剂经 C- 端半胱氨酸在 cys- 双价抗体上结合,并随后用同位素 In111 放射性标记 (或替换地, Zr-89 或 Cu-64)。选择性地,可以在将相关螯合剂附在赖氨酸残基后放射性标记或直接用碘放射性标记 cys- 双价抗体。

[0268] 将 cys- 双价抗体静脉输注到健康人类受试者中。将 cys- 双价抗体在输注后在人类受试者中培养 10 分钟。在培养的同天,经 PET 扫描或外部闪烁系统检测 cys- 双价抗体的定位。

[0269] Cys- 双价抗体的定位是用于确定 CD8 在受试者中的定位。

[0270] 实施例 12:体内检测 CD8

[0271] 表 0.2 的微抗体与相关螯合剂经赖氨酸残基在微抗体上结合,并随后用同位素 In111 放射性标记 (或替换地, Zr-89 或 Cu-64)。选择性地,可以通过直接用碘放射性标记经酪氨酸残基来放射性标记微抗体。

[0272] 将微抗体静脉输注到健康人类受试者中。将微抗体在输注后在人类受试者中培养 10 分钟。在培养的同天,经 PET 扫描或外部闪烁系统检测微抗体的定位。

[0273] Cys- 双价抗体的定位是用于确定 CD8 在受试者中的定位。

[0274] 实施例 13:体内检测 CD8

[0275] 提供其为 SEQ ID NO:22 的单体的二聚体的人化 CD8 微抗体。将微抗体静脉输注到健康人类受试者中。将微抗体在输注后在人类受试者中培养 1 小时。提供第二抗体,其为与 CD8 微抗体特异性结合并结合 33P 的人化 cys- 双价抗体。在培养的同天,将第二抗体输注到健康人类受试者中。将第二抗体培养 1 小时。经 PET 成像,经在第二抗体上的标记物检测微抗体的定位。

[0276] 微抗体的定位是用于确定 CD8 在受试者中的定位。

[0277] 实施例 14:利用 cys- 双价抗体的治疗处理

[0278] 提供其为表 0.3 的单体的二聚体的 CD8cys- 双价抗体。将 Cys- 双价抗体以足以与受试者中足够水平的 CD8 结合的量静脉输注到患有 CD8 相关障碍的受试者中,以提供 CD8 相关障碍的症状的减轻。Cys- 双价抗体与钇 90 结合。

[0279] 实施例 15:利用微抗体的治疗处理

[0280] 提供表 0.2 的 CD8 微抗体。将微抗体注射到用针对传染性疾病的抗原接种的或用肿瘤相关抗原接种的患者中。CD8 定向片段加强免疫应答并增强表达 CD8 的 T 细胞的细胞毒性活性。

[0281] 实施例 16 :利用 cys- 双价抗体的治疗处理

[0282] 提供其为表 0.3 的单体的二聚体的 CD8cys- 双价抗体。将 Cys- 双价抗体以足以与受试者中足够水平的 CD8 结合的量静脉输注到患有 CD8 相关障碍的受试者中, 以提供 CD8 相关障碍的症状的减轻。Cys- 双价抗体与 Lu177Tx 结合。CD8Cys- 双价抗体与表达 CD8 的细胞和 Lu177Tx 结合引起杀死细胞。

[0283] 实施例 17 :在 HPB-ALL 细胞上与 CD8 结合的 OKT8mAb 的流式细胞术分析

[0284] 进行在 HPB-ALL 细胞上与细胞表面人 CD8 结合的 OKT8mAb 构建体的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的抗体染色、清洗, 然后用第二抗 - 鼠 -IgG (Fc- 特异性的) APC- 结合的抗体染色。以 10,000 事件 / 点进行分析, 各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图 28 中显示。该图表代表平均荧光强度 (MFI) 对浓度 (nM) 的对数。误差线代表标准误差。数据指示 0.22nM 的 EC_{50} 。

[0285] 实施例 18A :在 HPB-ALL 细胞上与 CD8 结合的微抗体的流式细胞术分析

[0286] 进行在 HPB-ALL 细胞上与细胞表面人 CD8 结合的微抗体的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的微抗体染色、清洗, 然后用第二抗 - 人 IgG (Fc- 特异性的) APC- 结合的抗体染色。以 10,000 事件 / 点进行分析, 各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图 29A 中显示。该图表代表标准化的平均荧光强度 (MFI) 对浓度 (nM) 的对数。误差线代表标准误差。数据指示 0.15nM 和 0.19nM 的 EC_{50} 。

[0287] 实施例 18B :在 CD8+ 细胞上与 CD8 结合的微抗体的流式细胞术分析

[0288] 进行在原代人 CD8+T 细胞上与细胞表面人 CD8 结合的微抗体的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的微抗体染色、清洗, 然后用第二抗 - 人 IgG (Fc- 特异性的) APC- 结合的抗体染色。以 10,000 事件 / 点进行分析, 各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图 29B 中显示。该图表代表标准化的平均荧光强度 (MFI) 对浓度 (nM) 的对数。误差线代表标准误差。数据指示 0.1nM 和 0.26nM 的 EC_{50} 。

[0289] 实施例 18C :在 HPB-ALL 细胞上与 CD8 结合的 Df 标记的和未标记的微抗体的流式细胞术分析

[0290] 进行在 HPB-ALL 细胞上与细胞表面人 CD8 结合的微抗体 (+/- 赖氨酸与去铁胺 (Df) 结合) 的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的微抗体染色、清洗, 然后用第二抗 - 人 IgG (Fc- 特异性的) APC- 结合的抗体染色。以 10,000 事件 / 点进行分析, 各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图 29C 中显示。该图表代表平均荧光强度 (MFI) 对浓度 (nM) 的对数。误差线代表标准误差。数据指示 0.13nM 和 0.12nM 的 EC_{50} 。

[0291] 实施例 18D :在 PC3 细胞上与 CD8 结合的 Df 标记的和未标记的微抗体的流式细胞术分析

[0292] 进行与过表达 CD8 的 PC3 细胞结合的微抗体 (+/- 赖氨酸与去铁胺结合) 的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的微抗体染色、清洗, 然后用第二抗 - 人 IgG (Fc- 特异性的) APC- 结合的抗体染色。以 10,000 事件 / 点进行分析, 各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图 29D 中显示。该图表代表平均荧光强度 (MFI) 对浓度 (nM) 的对数。误差线代表标准误差。数据指示 0.64nM 和 0.83nM 的 EC_{50} 。

[0293] 实施例 18E :在 PC3 细胞上与 CD8 结合的 Df 标记的和未标记的微抗体的流式细胞术分析

[0294] 进行在 HPB-ALL 细胞上与细胞表面人 CD8 结合的 IgG2 微抗体的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的微抗体染色、清洗,然后用第二抗-人 IgG(Fc-特异性的)APC-结合的抗体染色。以 10,000 事件/点进行分析,各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图 29E 中显示。该图表代表标准化的平标均荧光强度 (MFI) 对浓度 (nM) 的对数。误差线代表标准误差。数据指示 0.1nM、0.13nM 和 0.08nM 的 EC_{50} 。

[0295] 实施例 19A :在 HPB-ALL 细胞上与 CD8 结合的 cys- 双价抗体的流式细胞术分析

[0296] 进行在 HPB-ALL 细胞上与细胞表面人 CD8 结合的 cys- 双价抗体的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的 cys- 双价抗体染色、清洗、用与生物素结合的第二蛋白 L 染色、清洗,然后用第三链霉亲和素-APC 染色。以 10,000 事件/点进行分析,各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图 30A 中显示。该图表代表平标均荧光强度 (MFI) 对浓度 (nM) 的对数。误差线代表标准误差。数据指示 0.04nM 的 EC_{50} 。

[0297] 实施例 19B :在 CD8+ 细胞上与 CD8 结合的 cys- 双价抗体的流式细胞术分析

[0298] 进行在原代人 CD8+T 细胞上与细胞表面人 CD8 结合的 cys- 双价抗体的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的 cys- 双价抗体染色、清洗、用与生物素结合的第二蛋白 L 染色、清洗,然后用第三链霉亲和素-APC 染色。以 10,000 事件/点进行分析,各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图 30B 中显示。该图表代表平标均荧光强度 (MFI) 对浓度 (nM) 的对数。误差线代表标准误差。数据指示 0.02nM 的 EC_{50} 。

[0299] 实施例 19C :在 HPB-ALL 细胞上与 CD8 结合的 Df 标记的和未标记的 cys- 双价抗体的流式细胞术分析

[0300] 进行在 HPB-ALL 细胞上与细胞表面人 CD8 结合的 cys- 双价抗体 (+/-C-端半胱氨酸与去铁胺结合) 的流式细胞术分析。将细胞分别与不同浓度的 cys- 双价抗体染色、清洗、用与生物素结合的第二蛋白 L 染色、清洗,然后用第三链霉亲和素-APC 染色。以 10,000 事件/点进行分析,各浓度一式三份。这些结果以图表格式在图 30C 中显示。该图表代表平标均荧光强度 (MFI) 对浓度 (nM) 的对数。误差线代表标准误差。数据指示 0.04nM 和 0.06nM 的 EC_{50} 。

[0301] 实施例 20 :构建体通过流式细胞术的特性

[0302] 下面所示的表 9 总结了来自实例 18A-18E 和 19A-19C 的微抗体和 cys- 双价抗体构建体的特性结果。

[0303] 表 9

[0304]

构建体名称	结合的细胞 (EC50)	SPR
OKT8	0.33 nM HPB-ALL	KD 1.8 nM
IAb_M1b_CD8	0.1 nM HPB-ALL 0.1 nM huCD8+ 0.6 nM CD8-PC3	KD 1.9 nM
IAb_M2b_CD8	0.19 nM HPB-ALL 0.26 nM huCD8+	KD 3.6 nM
IAb_M1b_CD8 IgG2 NH	0.08 nM HPB-ALL	N/A
IAb_M1b_CD8 IgG2 EH	0.13 nM HPB-ALL	N/A
IAb_Cys-Db3b_CD8	0.04 nM HPB-ALL 0.02 nM huCD8+	N/A

[0305] 实施例 21 : 成像表达人 CD8 的肿瘤移植瘤, 有 ^{89}Zr -Df-IAb Cys-Db3b CD8 的人 CD8 肿瘤移植瘤

[0306] 研究了八 (8) 只雌性 SCID 小鼠。在右肩区, 将 5×10^6 PC3-hCD8 细胞植入四 (4) 只小鼠, 而将 PC3 (hCD8 阴性) 细胞植入另外四 (4) 只小鼠。用 ^{89}Zr -Df-IAb_Cys-Db3b_CD8 (C-端半胱氨酸残基与 Df 结合) i. v. 注射小鼠。在 4h、6h 和 24h 时通过 PET (10 分钟静态扫描) 成像六 (6) 只小鼠 (4 只有阳性肿瘤和 2 只有阴性肿瘤)。一只小鼠还经受 0-2h 的动态扫描。在 24 小时时的最后一次扫描后进行体内分布。

[0307] 所获得的图像在图 31 中描绘。图 31 描绘了在右肩区 (见箭头) 带有 PC3-hCD8 移植瘤的同一 SCID 小鼠在 4、6 和 24 小时冠面和横断面 PET 图像。将小鼠 i. v. 注射大约 $120 \mu\text{Ci}$ 的 ^{89}Zr -Df-IAb_Cys-Db3b_CD8 (比活度为 $4.96 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)。不被原理所限制, Cys-Db 清楚地在 6h 时描绘了肿瘤并经预期的肾清除。在 24 小时时, 平均阳性比阴性肿瘤 (PC3-hCD8 比 PC3) 比例为约 1.6 倍。平均阳性肿瘤比血液比例为 16.0 (阴性比血液 9.5)。

[0308] 实施例 22 : 成像表达人 CD8 的肿瘤移植瘤, 有 ^{89}Zr -Df-IAb M1b CD8A 的人 CD8 肿瘤移植瘤

[0309] 研究了八 (8) 只雌性 SCID 小鼠。在右肩区, 将 5×10^6 PC3-hCD8 细胞植入四 (4) 只小鼠, 而将 PC3 (hCD8 阴性) 细胞植入另外四 (4) 只小鼠。用 ^{89}Zr -Df-IAb_M1b_CD8 (cys) - 具有 IgG1 铰链 - 延伸和带有 Df 与在铰链区的半胱氨酸残基结合的 C_H3 的微抗体 i. v. 注射小鼠。将六 (6) 只小鼠 (4 只有阳性肿瘤和 2 只有阴性肿瘤) 在 4h、24h 和 48h 时通过 PET (10 分钟静态扫描) 成像并随后进行 10min CT 扫描用于解剖参考。一 (1) 只小鼠还经受 0-2h 的动态扫描。在 48 小时时的最后一次扫描后进行体内分布。

[0310] 所获得的图像在图 32A 中描绘。图 32A 描绘了在右肩区 (见箭头) 带有 PC3-hCD8 移植瘤的同一 SCID 小鼠在 2、4 和 24 小时冠面冠面 MIP PET/CT 叠加图像。将小鼠 i. v. 注射大约 $116 \mu\text{Ci}$ 的 ^{89}Zr -Df-IAb_M1b_CD8 (cys) (比活度为 $5.16 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)。在 4 和 24 小时时观察到一些瘤摄取。大部分活性经肾清除, 其在 48 小时时具有比肝高 4-5 倍的摄取。不被原理所限制, 高肾摄取表明 Mb 在与 Df 结合后瓦解以至于以 40kDa (低于 60kDa 的肾阈值的大小) 的单体 (半个分子) 存在而并不是 80kDa 的二聚体。在 48h, 收获肿瘤和器官并计算放射性。阳性肿瘤中的摄取显著高于在阴性肿瘤中的那些 ($P = 0.02933$)。阳性肿瘤比

血液比例为 11.0 (阴性比血液 5.6)。

[0311] 将离体肿瘤在 48 小时单独成像。如在图 32B 中显示的, 尽管主要是单体, 存在 Mb 下, 与阴性肿瘤 (-) 中的那些相比, 较高活性保留在阳性肿瘤 (+) 中。如由上面所讨论的结果表明的, 显然微抗体构建体在在铰链区的各半存在多于 3 个半胱氨酸时能具有另外的优点。

[0312] 实施例 23 : 成像表达人 CD8 T 细胞, 有 ^{64}Cu -NODAGA-IAb M1b CD8IgG2 EH 的细胞

[0313] 研究了六只雌性 NOD Scid Gamma (NSG) 小鼠。将 20×10^6 新鲜人外周血单核细胞 (PBMC ; 98% 活力) 通过注射入侧尾静脉移植到三只小鼠中。该处理带来在脾中与所用供者无关的均一地高移植。在 3-4 周后, 用 ^{64}Cu -NODAGA-IAb_M1b_CD8IgG2EH (Cys) - 具有 IgG2 铰链 - 延伸和有 NODAGA 与在铰链区中的半胱氨酸残基结合的 $\text{C}_{\text{H}}3$ 域的 Mb i. v. 注射所有小鼠。将所有六只小鼠在 4h 成像。每组中的一只小鼠在 7 小时成像。在 7 小时进行体内分布。

[0314] 所获得的图像在图 33 中描绘。图 33 描绘了两只 NSG 小鼠 (一只 PBMC 移植的而另一只不是) 在 4 和 7 小时扫描的 MIP 图像。将大约 $84 \mu\text{Ci}$ 的 ^{64}Cu -NODAGA-IAb_M1b_CD8IgG2EH (cys) (比活度为 $7.41 \mu\text{Ci} / \mu\text{g}$) 给入每只小鼠。在 PBMC 移植的鼠中观察到在脾 (Sp) 和可能地在腋淋巴结 (LN) 中的高摄取。在 NSG 鼠中, Mb 主要经过肝 (Li) 清除。不被原理所限制, 预期肝清除是 80kDa 的片段。在阴性对照鼠中, 保持高的血液活性并且活性向肝和肾 (Ki) 均分布。在 7h, 在 PBMC 移植的 NSG 小鼠中的体内分布显示 : 与对照的相比, 在脾中 2.1 倍更高的摄取, 在肾中 4.0 倍较低的活性, 在肝中 1.7 倍较高的活性和在血液中 3.1 倍较低的活性。

[0315] 在本申请中, 单数的使用可以包括复数, 除非或另外特意说明否则, 作为将被本领域技术人员所理解的, 根据本披露, 单数仅是功能性实施例。因此, 例如, “一”可以表示不只一种, 并且 “一种实施方式” 可以表示适用于多种实施方式的描述。

[0316] 通过引用并入

[0317] 本文中所引用的所有参考, 包括专利、专利申请、文章、课本, 以及类似的, 及其中所引用的, 到它们没有准备好的程度, 由此通过参考以其全部并入本文。在一种或多种并入的文献和相似的资料与本申请不同或相矛盾的情况中 ; 包括但不限于所定义的术语、术语使用、所描述的技术, 或类似的, 本申请控制。

[0318] 等价物

[0319] 前面的描述和实例详述了某些实施方式。将理解的是, 然而, 无论前述的是如何详细地出现在文中, 可以许多方式实践本发明, 而本发明应该依照所附权利要求和其任何等价物来解释。

[0001]

序列表

<110> 伊麦吉纳博公司 (Imaginab, Inc.)
 大卫·T·霍 (Ho, David T.)
 托弗·奥拉夫森 (Olafsen, Tove)
 吉蒂·阿加希 (Agahi, Giti)
 克里斯蒂安·P·贝伦布鲁赫 (Behrenbruch, Christian P.)

<120> 与CD8的抗原结合构建体
 参考序列表、表格, 或计算机程序
 列表

<130> IGNAB.014W0

<150> 61/780286

<151> 2013-03-13

<160> 81

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 1

```

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

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

```

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

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

[0002]

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 3

```

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

```

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 115

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

```

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

```

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

[0003]

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 6

```

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

```

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 7

```

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

```

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 9

[0004]

```

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

```

<210> 10

<211> 768

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 10

```

atggagaccg atacactgct gctgtgggtg ctgctgctct gggtccttgg cagcacagga 60
gacatccaga tgacacagag ccttagctcc ctgagcgctt ccgtgggaga tagggtgacc 120
atcacatgcc ggacctccag gtccatctcc cagtacctgg ccttgtacca gcagaagccc 180
ggcaagggtc ccaagctgct catctatagc ggcagcacc ctcagagcgg agtgccttcc 240
cggttttccg gatecggctc eggcacagac ttaccctga ccatctccag cctgcagcct 300
gaggatgtcg caacctacta ctgccaacag cacaacgaga acccctgac cttcggcggc 360
ggaaccaagg tcgagatcaa gggaggagcg tccggaggag gaggccaaat gcagctggtc 420
caatccggcg ccgaagttaa aaagcccgcg gccaccgtga agatcagctg caaggtgtcc 480
ggcttcaaca tcaaggacac ctatatccac tgggtccagc aagcccccgg aaaaggcctg 540
gagtggatgg gacggattga ccccgcacac gacaacacac tctatgcttc caagttccag 600
ggcaggggtg caatcaccgc cgacaccagc accgacacag cttatatgga gctgtcctcc 660
ctccggctcg aggataccgc cgtctactac tgcgcaggg gctacggcta ctacgtgttt 720
gaccactggg gccagggcac cctggtgaca gtgtccagcg gaggetgc 768

```

<210> 11

<211> 768

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 11

```

atggagaccg acaccctgct gctctgggtc ctctgctgtt gggtccttgg cagcacagga 60
caggtgcaac tgggtcagag cggcgccgag gtcaagaac cttggcgccac cgtgaagatc 120
agctgcaagg tgtecggttt caacatcaag gacacctaca tccactgggt ccaaccaagc 180
cccgaaagg gcttgaatg gatggcgagg attgaccccg ccaacgacaa caccctctat 240
gccagcaagt tccagggcag ggtcaccate accgcccaga ccagcaccga caccgectac 300
atggagctga gcagcctgcg gagggaagac accgcgtgt actaetgccc caggggctac 360
ggctactacg tcttcgacca ttggggacag ggcaccctcg tgacagtgtc cagcggngga 420
ggatccggcg gaggaggaga tatccagatg acccagagcc cttccagcct gtccgttcc 480
giggagatc gggtagccat caatgcugg acctccaggt ccatttccca gtacctggcc 540
tggtaccaac agaagccccg caaggtgccc aagctgctga tctacagcgg cagcacactg 600
caatccggcg tcccttcccg gtittccgga tccggatccg gcaccgaatt caccctgacc 660
atcagctccc tgcnaaccga ggacgtggcc acctactact gtcagcagca caacgagaa 720
ccccacact ttggcgccgg aaccaaggtc gagatcaagg gcggetgc 768

```

<210> 12

<211> 253

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 12

```

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 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20     25     30

```

[0005]

```

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

```

<210> 13
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

```

<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 Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
           20           25           30
Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn
           35           40           45
Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly
           50           55           60
Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr
           65           70           75           80
Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
           85           90           95
Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
           100          105          110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp
           115          120          125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Asp
           130          135          140
Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
           145          150          155          160
Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr Leu
           165          170          175
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
           180          185          190
Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
           195          200          205
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
           210          215          220
Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu Thr
           225          230          235          240
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Cys
           245          250

```

<210> 14
 <211> 256

[0006]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 14
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 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser
35 40 45
Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro
50 55 60
Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn
100 105 110
Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
130 135 140
Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser
145 150 155 160
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro
165 170 175
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn
180 185 190
Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
195 200 205
Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
210 215 220
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe
225 230 235 240
Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
245 250 255

<210> 15
<211> 256
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 15
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 Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
20 25 30
Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn
35 40 45
Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60
Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
85 90 95
Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
100 105 110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp
115 120 125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
145 150 155 160
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser
165 170 175
Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu
180 185 190
Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

[0007]

```

          195          200          205
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
210          215          220
Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn
225          230          235          240
Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Cys
          245          250          255

```

<210> 16
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

```

<400> 16
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 Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala
20          25          30
Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser
35          40          45
Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn
50          55          60
Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser
65          70          75          80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85          90          95
Gly Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn
100          105          110
Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly
115          120          125
Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130          135          140
Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
145          150          155          160
Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
165          170          175
Thr Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp
180          185          190
Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys
195          200          205
Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala
210          215          220
Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
225          230          235          240
Cys Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
245          250          255
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
260          265          270
Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
275          280          285
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
290          295          300
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
305          310          315          320
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
325          330          335
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
340          345          350
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
355          360          365
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
370          375          380
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385          390

```

<210> 17
 <211> 1185
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0008]

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 17

```

atggagacag acaccctgct cctgtgggtg ctgctectct gggteccctgg atccaccggc 60
gatgtccaga tcaaccaang ccccgcttct ctggctgctt cccctggaga gacaateacc 120
atcaattgcc ggaccagccg gagcatttcc cagtacctcg cctggtagca ggaanaagcct 180
ggcaagacca acaagctgct gatctactcc ggctccacac tccagagcgg cattccctcc 240
aggatttagc gatccggatc cggaaccgac ttcacaetca ccatctccgg cctggagccc 300
gaggacttcg ccatgtaita ttgccagcag cacaatgaga aacctctgac ctccggcctc 360
ggcaccgaagc tggagctgaa aggtccacc agcggaggcg gatccggagg aggaagcggc 420
ggcggaggct cctccgaagt gcagctgcaa cagagcggcg ccgaactggg gaagcctgga 480
gcttccgtga aactcagctg taccgccage ggcttcaaca tcaaggatac ctacatccac 540
ttgtgctggc aaaggcctga gcaggcctg gaattgatcg gcaggatcga ccccgccaac 600
gacaacaccc tctacgcctc caagttccaa ggcaaggcca caatcacgcg tgatacaagc 660
tcaaacaccg cctacatgca cctcagctcc ctgaccagcg gagacaccgc cgtgtactac 720
tgcggagcggg gatacggcta ctatgtgttc gacctctggg gccaaaggcag cacactcacc 780
gtgtctctcc agcccaagtc ctgcgacaag acacacacct gtcccccttg tggaggagga 840
tctctccggg gcgctccggc cggacagcct agggagcccc aggtgtacac actgccctcc 900
tccagggaagc aactcaccac gaaccagggt tccctgacct gccttggtgaa gggattctac 960
cccagcgaca tgcctgtgga gtgggagctc aacggccaac ccgagaacaa ttacaagacc 1020
accccccttg tgctcgattc cgaaggctcc ttcttctgt actccaagct caccgtggac 1080
aagtcctcgt ggcaacaggc caatgtgttc tctgcagcg tcatgcacga ggccttgcac 1140
aacactaca cccagaaatc cctcagctcc tccctggaa aatga 1185

```

<210> 18

<211> 394

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 18

```

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 Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val
20     25     30
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn
35     40     45
Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly
50     55     60
Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr
65     70     75     80
Ala Ser Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser
85     90     95
Asn Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala
100    105    110
Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp
115    120    125
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly
130    135    140
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Asp Val Gln Ile
145    150    155    160
Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile Thr
165    170    175
Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr
180    185    190
Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser
195    200    205
Thr Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
210    215    220
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
225    230    235    240
Met Tyr Tyr Cys Gln His Asn Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala
245    250    255
Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
260    265    270
Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
275    280    285
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
290    295    300
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
305    310    315    320
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

```

[0009]

```

          325          330          335
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
          340          345          350
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
          355          360          365
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
          370          375          380
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          385          390

```

<210> 19
 <211> 1185
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

```

<400> 19
atggagaccg acacactcct gctctgggtg ctctctgtgt gggtgccctg cagcacagga 60
gaagtgcagc tgcagcagtc cggcgccgaa ctctgcaaac ccggagccctc cgtcaaaactg 120
tcttgcacag ccagcggttt caacatcaag gacacctaca tccatttcgt gcggcaaaagg 180
cctgaacagg gactcgagtg gatcggcagg atcgaccccg ccaacgacaa taccctctac 240
gctctcaagt tccagggaan ggccaccatt accgcgcgac cctccagcaa caccgcctac 300
atgaacctca gctccctgac atcggcgac accgcgggtt actactgagg caggggctac 360
ggctactacg tgtttgacca ctggggccag ggaacaaccc tgaccgtgtc cagcggctcc 420
acctccggag gcggaagcgg cggaggatcc ggaggaggag gctctctcga cgtgcaaatc 480
aaccagtcct ctgcttctct ggccgctagc cctggcgaga caatcacaa caattgtcgg 540
accagccggt ccatctccca gtatctggcc tggtaaccag agaagcccg caagacaaac 600
aagctgtctc tctacagcgg cagcaccttc caatccggca tcccttcccg gtttagcggc 660
tccgatcccg gaaccgactt taccctgacc atcagcggcc tggaaaccga ggatttcgcc 720
atgtactact gccagcagca caacgagaat cccctgacct ttggagccgg cacaagaatc 780
gagctgaagg agcccaagag ctgcgacaaa acccacacct gtcctcttg cggaggagga 840
tctctccgcg gcggaagcgg aggcacaacc agggagcccc aggtctacac cctgcctcct 900
agccgggacg aactgacaaa gaaccaggig tccctgacct gctcgtctca gggtctctac 960
ccttccgaca tcgctgtcga gtgggaagc aacggccagc ccgagaacaa ttacaagacc 1020
acaccccccg tctggacag cgtatggcagc ttcttctctt acitcaagct gaecgtggac 1080
aagagccggt ggcaacaagg caacgtgttc tccctgcagc tcatgcatga ggccctgcac 1140
aatcactaca cccagaagag cctgagccctc tcccccgga agtga 1185

```

<210> 20
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

```

<400> 20
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 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser
35 40 45
Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro
50 55 60
Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn
100 105 110
Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
115 120 125
Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140
Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
145 150 155 160
Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
165 170 175
Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
180 185 190
Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys

```

[0010]

```

195      200      205
Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala
210      215      220
Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
225      230      235      240
Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
245      250      255
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
260      265      270
Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
275      280      285
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
290      295      300
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
305      310      315      320
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
325      330      335
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
340      345      350
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
355      360      365
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
370      375      380
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385      390

```

<210> 21
 <211> 1185
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

```

<400> 21
atggagacag acaccctcct gctgtgggtc ctgctgctgt gggcgcttgg cagcacagga 60
gacatccaaa tgaccacgtc ccctagcagc ctcagcgttt ccgtcggaga cagggtcacc 120
atcacatgca ggacctccag gtccatcagc cagtatctgg cctggatca gcagaaaccc 180
ggcaagggtgc ctaagctgct gatctacagc ggcagcacac tccagagcgg agtgcccagc 240
cggttttccg gaagcggatc cggaaccgac ttacacctga ccatttcag cctgcaacct 300
gaagacgtgg ccacctacta ctgtcagcag cacaacgaga accccctcac cticggcgga 360
ggcaccaaag tccagatcaa ggccagcacc agcggaggag gaagcggcgg aggtcccga 420
ggaggaggct cctcccaagt gcagctcgtc caaagcggcg ctgagggtga aaagcccggc 480
gccacagtca aaatctcctg caaggtcagc ggttcaaca tcaaggatac ctacatccac 540
tgggtgcaac aggcccccgg caaaggactc gaatggatgg gccggatcga ccctgctaac 600
gacaacacac tctacgcttc caagttccag ggcagggtga ccataccgcg cgatacctcc 660
accgacacag cctacatgga gctgagcagc ctgagggtccg aggacaccgc cgtctattac 720
tgcgcccggg gatacggcta ctacgtgttt gaccattggg gacagggaac actcgtgacc 780
gtgagctccg agcccaagag ctgcgacaag acccacacat gtctctcttg cggaggaggc 840
agctccggag gcggatccgg cggacaacct agggagcccc aggtctatac cctgcccccc 900
agcagggaag agctgacaaa gaaccaggte tccctgacct gccgggtgaa aggatcttac 960
cccagcgaca tcgtgtgaga atgggagtc cnaagccagc ccgagaaena ctacaagaca 1020
acccccccg lgcggatc cgacggcagc ttcttccctt actccaagct gacgtcgac 1080
aagtcagggt ggcagcaggg caacgtgttt tctgtctccg tgatgcatga ggccctgcac 1140
aaccactaca ccagaagtc cctgagcctc agccctggca agtga 1185

```

<210> 22
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

```

<400> 22
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 Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
20      25      30
Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn
35      40      45
Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50      55      60
Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr

```

[0011]

```

65      70      75      80
Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
      85      90      95
Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
      100      105      110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp
      115      120      125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly
      130      135      140
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Gln Met
      145      150      155      160
Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
      165      170      175
Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr
      180      185      190
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser
      195      200      205
Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
      210      215      220
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala
      225      230      235      240
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly
      245      250      255
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
      260      265      270
Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
      275      280      285
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
      290      295      300
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      305      310      315      320
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      325      330      335
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      340      345      350
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      355      360      365
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      370      375      380
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      385      390

```

<210> 23

<211> 1185

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 23

```

atggagaccg atacactgct gctctgggtg ctgctgctgt gggcgccctg aagcaccgga 60
cagggtgcaac tgggccagtc cggcgccgag gtgaaaaagc ctggcgccac cgtcaagatc 120
tccgtgaagg tgagcggctt caacatcaag gacacctaca tccactgggt gcagcaggct 180
cccggaagg gactggagt gatgggcagg atcgacctg ccaatgacaa caacctctac 240
gccagcaagt tccaaggacg ggtgaccatc acagccgaca cctccacga cacagccat 300
atggaagetct ccagcctgag gtcgaggagc accgccgtgt actactgtgc caggggatac 360
ggctattacg tgttcgacca ctggggacag ggcacctgg tgaccgtgag cagcggaagc 420
accagcgggc gaggcagcgg aggcggaagc ggcggcggcg gatccctcga caticagatg 480
acccaatecc cctccagcct gtccgctage gtgggagaca gggtgacaat cacatgtcgg 540
acctccaggt ccatcagcca atatctcgcc tggatcage agnagcccg canggtgccc 600
aagctcctga tetacagcgg ctccaccctc caaagcggag tgccttcccg gtttagcgga 660
agcggcagcg gcacagactt tacctgaca atcagctccc tgcaacctga ggacgtgcc 720
acatactact gccagcagca caacgagaa cctctcact ttggcggcgg caccaaagt 780
gagatcaagg agcccaaatc ctgcgacaag acacacacct gcccccttg tggaggagcg 840
agetccggcg gcggcagcgg cggacaaccc cgggaacctc aggtgtatac actccccct 900
tccagggatg agctgaccac gaaccaagtc tccctgacct gtctggtgaa aggtctctac 960
cctccgaca tctctgtcga gtgggagagc aacggccage ccgaaaacaa ctataagacc 1020
acccccccg tctctgattc cgaatggcagc ttcttctgt actccaagct cacagtcgac 1080
aagagccggt ggcaacaggg caacgtcttc tectgtagcg tcatgcacga ggcctccac 1140
aaccactaca cccagaagtc cctctccctg agccccgga aatga 1185

```

<210> 24

<211> 235

[0012]

<212> PRT
<213> 智人

<400> 24
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr
20 25 30
Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser
35 40 45
Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala
50 55 60
Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala
65 70 75 80
Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp
85 90 95
Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr
100 105 110
Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe
115 120 125
Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
130 135 140
Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
145 150 155 160
Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
165 170 175
Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
180 185 190
Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His
195 200 205
Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser
210 215 220
Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
225 230 235

<210> 25
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 25
atggaaaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctct gggtcccagg ctccaccggt 60

<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 26
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly
20

<210> 27
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 27
agtgggtggag gaggc 15

<210> 28

[0013]

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 28
Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 29
ggcggaggga gtggcggagg cgac 24

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 30
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 31
ggcggctgc 9

<210> 32
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 32
Gly Gly Cys
1

<210> 33
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 33
atggaaccg acacctgct gtgtgggtg ctgctgctct gggtcccagg ctccaccgt 60

<210> 34
<211> 20
<212> PRT

[0014]

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<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
20

<210> 35

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 35

gactccacat ccggcggagg ctctgacggt ggatctggcg gaggcggctc atcc 54

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 36

Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Ser Ser

<210> 37

<211> 393

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 37

gagcctaagt cctgcgacaa gaccacacac tgccccctt gcggcggagg aagcagcggg 60
ggcggatccg gtggctagcc tgggagcct cagggttaca cccggctcc ctcccggaac 120
gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtea aggcttcta ccttccgat 180
atcgccgtgg agtgggagtc caacggccag cctgagaaca actacaagac caccctctct 240
gtgtggact ccgacggctc ctcttctctg tactccaagc tcacagtga taagtcccg 300
tggeagcagg gcaacgtgtt ctctctctcc gtgatgcac aggccttgca caaccactat 360
accagaagt cctgtccct gtctcttgcc aag 393

<210> 38

<211> 131

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 38

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly
1 5 10 15
Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
20 25 30
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
35 40 45
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
50 55 60
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
65 70 75 80
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

[0015]

```

      85      90      95
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
      100      105      110
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
      115      120      125
Pro Gly Lys
      130

```

<210> 39
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 鼠

```

<400> 39
gatgtccaga taaaccagtc tccatctttt ctgtctgcgt ctcttgaga aaccattact 60
ataaatigca ggacaagtag gagtattagt caatatttag cctggatca agagaaacct 120
gggaaaaacta ataagettct tatctactct ggatccacte tgcaatctgg aattccatca 180
aggttcagtg gcagtggaat tggtagagat ttcactctca ccatcagtg cctggagcct 240
gaagattttg caatgtatta ctgtcaacag cataatgaaa acccgctcac gtccggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa g                                     321

```

<210> 40
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 鼠

```

<400> 40
Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1      5      10      15
Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
      20      25      30
Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
      35      40      45
Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Pro
      65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
      85      90      95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
      100      105

```

<210> 41
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

```

<400> 41
gacgtccaga faaccagtc tccatctctc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcaattgca ggacaagtag gagtattagt caatatttag cctggatca gcagaaacca 120
gggaaagtgc ctaagctctt gatctattct ggatccacte tgcaatctgg agtcccatct 180
cggttcagtg gcagtggaat tggtagagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaacag cataatgaaa acccgctcac gtccggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a                                     321

```

<210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

```

<400> 42
Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
      20      25      30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
      35      40      45

```

[0016]

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 43
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 鼠

<400> 43
 gaggtccagc tgcagcagtc tggggcagag ctgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
 tctgcacag cttctggcct caacattaaa gacacctata tacacttcgt gaggcagagg 120
 cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgacctg cgaatgataa tactttatat 180
 gcctcaaaat tccagggcaa ggccactata acagcagaca catcatccaa cacagcctac 240
 atgcacctct gcagcctgac atctggggac actgacctct attactgtgg tagagggtat 300
 ggttactacg tatitgacca ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 44
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 鼠

<400> 44
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 45
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 45
 gaagtgcagc tgggtgaaag cggcggcggc ctgggtgcagc cgggcggcag cctgcgcctg 60
 agctgcgcgg cgagcggcct taacattaaa gatacctata ttcattttgt gcgcagggcg 120
 ccgggcaaaag gcctggaatg gattggccgc attgacctgg cgaacgataa cacctgtat 180
 gcgagcaaat ttcagggcaa agcgcaccatt agcgcggata ccagcaaaaa caccgcgtat 240
 ctgcagatga acagcctgcg cgcgggagat accgcgtgt attattgcgg cgcggctat 300
 ggetattatg tgtttgatca ttggggccag ggcaccttgg tgacctgag cagc 354

<210> 46
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 46
 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 Asn Ile Lys Asp Thr

[0017]

```

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

```

<210> 47
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

```

<400> 47
gaagtgcagc tgggtggaag cgggcgccgc ctggtgcagc cgggcgccgc cctgcgctg 60
agctgcgcgg cgagcggcct taacattaaa gatacctata ttcattttgt gcgccaggcg 120
ccgggcaaaag gccctggaatg gattggccgc attgatccgg cgaacgataa caccctgtat 180
gcgagcaaat ttcaggggcaa agcgaccatt agcgccgata ccagcaaaaa caccgcgtat 240
ctgcagatga acagcctgcg cgcggaagat accgcggtgt attattgcgg ccgcggctat 300
ggctattatg tgtttgatca ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354

```

<210> 48
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

```

<400> 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20      25      30
Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35      40      45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
50      55      60
Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100     105     110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 49
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

```

<400> 49
cagggtgcagc tgggtgcagag cgggcgccgaa gtgaaaaaac cgggcgccgac cgtgaaaatt 60
agctgcaaaag tgagcggcct taacattaaa gatacctata ttcattttgt gcagcaggcg 120
ccgggcaaaag gcttggaaatg gattggccgc attgatccgg cgaacgataa caccctgtat 180
gcgagcaaat ttcaggggcaa agcgaccatt accgcggata ccagcaccga taccgcgtat 240
atggaactga gcagcctgcg cagcggagat accgcggtgt attattgcgg ccgcggctat 300
ggctattatg tgtttgatea ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354

```

<210> 50

[0018]

<211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 50
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Phe Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 51
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 51
 caggtgcagc tgggtcagag cggcgcgga gtaaaaaac cggcgcgac cgtgaaaatt 60
 agctgcaaa tgagcggctt taacattaaa gatacctata ttcattttgt gcagcaggcg 120
 ccgggcaaa ggcctggaatg gattggccgc attgatccgg cgaacgataa caccctgtat 180
 gcgagcaaat ttcaggcgaa agcgaccatt acccgggata ccagcacga taccgcgtat 240
 atggaactga gcagcctgcg cagcgaagat acccggtgt attattgcgg ccgcggctat 300
 ggctattatg tgtttgatca ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354

<210> 52
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 52
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Phe Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 53
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

[0019]

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 53

```

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1           5           10           15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
                20

```

<210> 54

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 54

```

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Gly
 1           5           10           15
Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
                20           25

```

<210> 55

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 55

```

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 1           5           10           15
Ala Gly Pro

```

<210> 56

<211> 70

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 56

```

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
 1           5           10           15
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
                20           25           30
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
                35           40           45
Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro
                50           55           60
Glu Leu Leu Gly Gly Pro
65           70

```

<210> 57

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 57

```

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
 1           5           10           15
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
                20           25

```

[0020]

<210> 58	
<211> 23	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗原结合构建体或其片段	
<400> 58	
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro	
20	
<210> 59	
<211> 20	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗原结合构建体或其片段	
<400> 59	
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe	
1 5 10 15	
Leu Gly Gly Pro	
20	
<210> 60	
<211> 20	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗原结合构建体或其片段	
<400> 60	
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe	
1 5 10 15	
Leu Gly Gly Pro	
20	
<210> 61	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 限制位点	
<400> 61	
tctagagcgc ccacc	15
<210> 62	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 限制位点	
<400> 62	
tctagagcgc ccacc	15
<210> 63	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 限制位点	

[0021]

<400> 63 aagctt	6
<210> 64 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 限制位点	
<400> 64 aagctt	6
<210> 65 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 限制位点	
<400> 65 tctagagcgg ccacc	15
<210> 66 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 限制位点	
<400> 66 aagctt	6
<210> 67 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 限制位点	
<400> 67 tctagagcgg ccacc	15
<210> 68 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 限制位点	
<400> 68 aagctt	6
<210> 69 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 限制位点	
<400> 69 tctagagcgg ccacc	15
<210> 70 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	

[0022]

<223> 限制位点	
<400> 70	
aagctt	6
<210> 71	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 限制位点	
<400> 71	
tctagagccg ccacc	15
<210> 72	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 限制位点	
<400> 72	
aagctt	6
<210> 73	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 限制位点	
<400> 73	
tctagagccg ccacc	15
<210> 74	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 限制位点	
<400> 74	
aagctt	6
<210> 75	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 限制位点	
<400> 75	
tctagagccg ccacc	15
<210> 76	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 限制位点	
<400> 76	
aagctt	6
<210> 77	
<211> 759	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0023]

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 77

```

atggagaccg atacaetget gctgigggtg ctgctgetct gggtccctgg cagcacagga 60
gacatccaga tgacacagag ccctagctcc ctgagcgctt ccgtgggaga tagggtgacc 120
atcacatgcc ggacctccag gtccatctcc cagtacctgg cctggtaacca gcagaagccc 180
ggcaaggtgc ccaagetget catctatage ggcagcacc tgcagagcgg agtgccttcc 240
cggttttccg gatccggctc cggcacagac tttaacctga ccattctccag cctgcagcct 300
gaggatgtcg ccaectacta ctgccaacag cacaacgaga acccctgac ctccggcgcc 360
ggaaccaagg tccagatcaa gtccggagga ggaggccaag tgcagctggt ccaatccggc 420
gccgaagtga aaaagcccg cgccaccgtg aagatcagct gcaaggtgtc cggcttcaac 480
atcaaggaca cctatatcca ctgggtccag caagccccc gaaaaggcct ggagtggatg 540
ggacggattg accccgccaa cgacaacaca ctctatgcct ccaagtcca gggcagggtg 600
acaatcacgg ccgacaccag caccgacaca gcttatatgg agctgtcctc cctccggtcc 660
gaggataccg ccgtctacta ctgcgccagg ggtacggct actacgtgtt tgaccactgg 720
ggccagggca ccctggtgac agtgtccagc ggaggtctgc 759

```

<210> 78

<211> 759

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 78

```

atggagaccg acaccctget gctcigggtc ctccctgctgt gggtgcctgg cagcacagga 60
caggtgcacac tgggtcagag cggcgccgag gtcaagaaac ctggcgccac cgtgaagatc 120
agctgcaagg tgtccggctt caacatcaag gacacctaca tccactgggt ctaacaagcc 180
cccgaanaag gcctggaatg gatgggccgg attgacccc ccaacgacaa caccctctat 240
gccagcaagt tccagggcag ggtcaccatc accgcgcaca ccagcaccga caccgcctac 300
atggagctga gcagcctgcg gagegaagac accgcctgt actactgcgc caggggctac 360
ggtactactag tcttgcacca ttggggacag ggcaccctcg tgacagtgtc cagctccggc 420
ggaggaggag atatccagat gaccagagc ccttcagcc tgtccgttc cgtgggagat 480
cgggtgacca tcacatgcag gacctccagg tccatctccc agtaectggc ctggtaccaa 540
cagaagcccg gcaaggtgcc caagctgetg atctacagcg gcagcacact gcaatccggc 600
gtcccttccc ggttttccgg atccggatcc ggcaaccgact tcaccctgac catcagctcc 660
ctgcaaccgg aggacgtggc cactactac tgtcagcage acaacgagaa cccctcacc 720
tttggcgccg gaaccaaggt cgagatcaag ggcggctgc 759

```

<210> 79

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 79

```

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gly Gly Ser
  1             5             10             15
Ser Gly Gly Gly Ser Gly
                20

```

<210> 80

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合构建体或其片段

<400> 80

```

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

```

[0024]

<400> 81																	
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp		
1				5					10					15			
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe		
			20					25					30				
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu		
		35					40					45					
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe		
		50				55					60						
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly		
65					70					75					80		
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr		
				85					90					95			
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
			100					105									

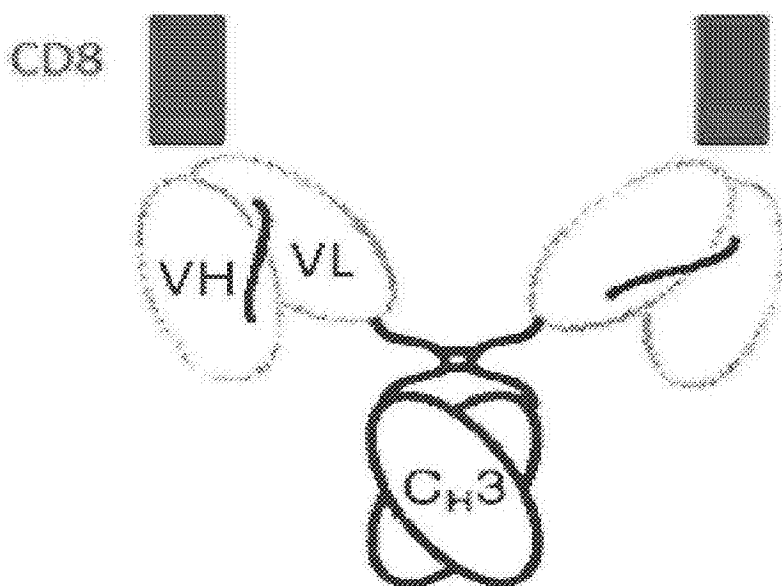


图 1A

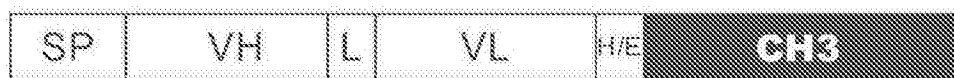


图 1B

```

      10      20      30      40      50      60
MALPVTALLL PLALLLHAAR PSQFEVSGPLD RTWNLGETVE LKQVLLSNF TSGCSWLPQP
      70      80      90     100     110     120
RGAAASPTFL LYLSQNKPKA AEGLDTORFS GKRLGDTFVL TLSDFERRENE GYYPCSALSN
     130     140     150     160     170     180
SIMYFSHEVP VELPAKPTTT PAPRPPTPAP TIASQPLSLR PEACRPAAGG AVHTRGLDFA
     190     200     210     220     230
CDIYIWAFPLA GTCGVLLLEL VITLYCNHRN RRRVCKCFRP VVKSGUKPSL SARYV
SEQ ID NO: 24

```

图 1C

人化 VH (1st 版本):

mu0KT8	EVQLQQSGAEIWKPGASVKLSCTAS	GENIKD	TYIHVVRQRPQGLEWIG	RIDPANDNT	LY
	** ** *		* * *	* * *	*
4D5v8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GENIKD	TYIHVVRQAPPKGLEWVA	RIYPTNGYT	RY
hu0KT8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GENIKD	TYIHVVRQAPPKGLEWVA	RIDPANDNT	LY

mu0KT8	ASKFOGKATITADISSNTAYMHLLQSLTSGETAVYYCGR	GYG---	YVVFQH	WGQGITLVSS	SEQ ID NO: 1
	**** *		** ** *	**	
4D5v8	ADGVKGRFTIGADTSKNTAYLQWNSLRADTAVYYCGR	WGSGGELAMDY	WGQGITLVSS		SEQ ID NO: 2
hu0KT8	ASKFOGKATISADTSKNTAYLQWNSLRADTAVYYCGR	GYG---	YVVFQH	WGQGITLVSS	SEQ ID NO: 3

人化 VH (2nd 版本):

mu0NT8	QVQLQQSGAEIWKPGASVKLSCTAS	GENIKD	TYIHVVRQRPQGLEWIG	RIDPANDNT	LY
	* * *		* * *	** ** *	*
人	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVS	GYTFED	TYIMHWQQAPGKGLEWNG	LYDPEDGET	LY
hu0KT8	QVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVS	GENIKD	TYIHVVRQAPGKGLEWNG	RIDPANDNT	LY

mu0KT8	ASKFOGKATITADISSNTAYMHLLQSLTSGETAVYYCGR	GYGYVVFH	WGQGITLVSS	SEQ ID NO: 4	
	** ** *		**		
人	AENFQGRVTITADISTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT	A---	EYVFQH	WGQGITLVSS	SEQ ID NO: 5
hu0KT8	ASKFOGKATITADISTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	GYGYVVFH	WGQGITLVSS	SEQ ID NO: 6	

图 2A

人化 VL:		LCDR1		LCDR2	
huOKT8	DVQINDSPSELAA ⁺ SGEITITNC	KTSNSLSQYLA	WYQERPGKINKLLLY	SGSTLQS	GVPS
	* * *	* * *	*	**	*
人	DIQMTQSPFSGLSASVGDRVTTIC	RAQDGLSNVLA	WYQKPGKVPKLLLY	AASTLQS	GVPS
huOKT8	DVQINDSPSELAA ⁺ SGEITITNC	KTSNSLSQYLA	WYQKPGKVPKLLLY	SGSTLQS	GVPS
		LCDR3		SEQ ID NO: 7	
huOKT8	RFSSSGSGTDFTHITSGLEPHDVAITYC	QCHNENPLI	FGAGTKIELA		
	* * *	* * *	*		
人	RFSGSGSGTDFTHITSGLEPHDVAITYC	QKYNAPLI	FGSGTKVELK	SEQ ID NO: 8	
huOKT8	RFSGSGSGTDFTHITSGLEPHDVAITYC	QCHNENPLI	FGSGTKVELK	SEQ ID NO: 9	

图 2B



图 3B

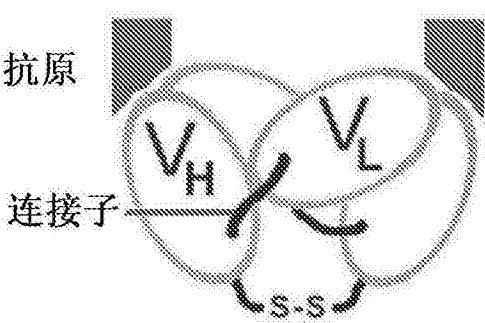


图 3A

Tcttggagccggccggc SEQ ID NO: 61
 KbaI Kozak
 1 M E T D T L E L W Y E L E W V P G S T G
 1 A T G G A G A C A G A C A C C T G T C T G T G G T G C T C T C T T G G G T C C T G G A T C C A C C G C C
信号肽
 21 D V Q I N Q S F S F L A A S P G E T I T
 61 C A T G T C C A G A T C A A C C A A G C C C A G C T T T C T C G C T G C C C T G C A C A C A A T C A C
 VZ
 41 I N C P T S R S I S Q Y L A W Y Q E K P
 121 A T C A A T G C C G G A C A G C C G A G C A T T T C C A G T A C T T C C C T G G T A C A G S A A A G C C T
 61 G E T N K L L I Y S G S T L Q S S I E S
 181 G C C A A G A C C A A C A A G C T G C T G A T C T A C T C C G C C T C C A C A C T C C A G C C G C C A T T C C T C C
 91 R F S G S G S G T D P T L T E S G L E P
 241 A G G T T A C C G A T C C G A T C C G A A C C G A C T T C A C A C T C A C C A T C C C C C T G G A G C C C
 101 E D E A M Y Y C Q Q E N E N E L T F G A
 301 G A G A C T T C G C A T G T A T T A T T C C C A G C A G C A C A T C A C A C C C C T A C C T T C C G C C T
 121 G T K L E L K C S T S G G C S G G C S G
 361 G C C A C C A A C T G T A G C T G A A A G C T C C C A C A G C C A G C C G A T C C G S A G A G A G C C
连接子
 141 G G G S S E V Q L Q Q S G A E L V K P G
 421 G G C G A G G C T C T C C G A A G T G C A G C T G C A A C A G A G C C G C C G A A C T G C T G A A G C C T G A
 VN
 161 A S V K L S C T A S G E N I R D T Y I N
 481 C C T T C C T G A A A C T C A C C T G T A C C C C A G C C C T T C A C A T C A A G S A T A C C T A C A T C C A C
 181 F V P Q P P E Q G L E W I G P T D P A N
 541 T T C C T G C G C C A A A G C C T G A G C A G C C C T G A A T G C A T C C G C A G A T C C A C C C C G C A A C
 201 D N T L Y A S K E Q Q K A T I T A D T S
 601 G A C A A C A C C C T C T A C G C C T C C A A G T C C A A G C C A A G C C C A C A A T C A C C C T G A T A C A G C
 221 S N T A Y M H E S S L T S G D T A V Y Y
 661 T C C A A C A C C C C T A C A T G C A C C T C A G C T C C C T G A C C A G C C G A G A C A C C G C C C T A C T A C
 241 C G K G Y G Y Y V F D H W G Q G T T L T
 721 T C C G A C C G C G A T A C G C T A C T A T G T T G A C C A C T G G G C C A A G C C A C C A C T C A C C
 261 Q S S E P K S E D K P H P C P P C G G G
 781 G T C T C T C C A A C C C A A G T C C T C C A C A A A C A C A C C T G T C C C C C T T G G A G A G C A
铰链 / 延伸
 281 S S G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P
 841 T C T C C G A G C C G C C C C G G G A C A G C C T A G G A G C C C C A G S T G A C A C A C T C C C C C T
 CH3
 501 S P D R L T K N Q V S L T C L Q K G F Y
 901 T C C R G G A C G A A C T C A T C A A G A C C A G C T G T C C T G A C C T G C C T G G T A A G G G A T T C T A C
 321 P S D I A V E W E S N G Q E E N R Y K T
 961 C C C A G C C A C A T C C C C C T G A C T C G A C T C C A A C C C C A A C C C A G A A C A T T A C A G A C C
 341 T P P V L D S D G S F P L Y S K L T V D
 1021 A C C C C C C C T C T C C T C C A T T C C A C C C C C C T C T T C T T C T A C T C C A A C T C A C C C T G A C
 361 K S R W Q Q G N V F S C S V M E E A L N
 1081 A A G T C C G G T G C C A C A G G C C A T G T G T T C T C T C C A G C C T C A T G C A C A G G C C T G C A T
 381 N R Y T Q K S I S I S P G R - SEQ ID NO: 16
 1141 A A C C A C T A C A C C C A A A T C C C T C A G C C T C T C C C C T G A A A T G A SEQ ID NO: 17
 agactt SEQ ID NO: 64 _KIR2IT1

图 4

TCTAGAGCCGCCACC SEQ ID NO: 62
 KbaI Kozak
 1 M E T D T L L L W V L L L W V F G S T G
 1 ATGCAGACCCACACACCTCTGCTCTGGGTGCTTCTCTGTGTGGTGGCTGGCAGCACAGGA
 信号肽
 21 E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V N L
 61 GAAGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGCGCCGAACTCTCTCAAACCCGGAGCCCTCCCTCAAACCTG
 VN
 41 S C T A S G F N I E D T Y I H F V R Q R
 121 TCCTGCACAGCCAGCGGCTTCAACATCAAGTACACCTACATCCATTTCTGTGCGGCAAAAGG
 61 P E Q Q L E W I G R I D P A N D N T L Y
 181 CCTGAACACGGACTCGAGTCGATCGGCAGGATCGAACCCTGCTAACCAACAATACCTCTAC
 81 A S K F Q G Z A T I P A D T S S N T A Y
 241 GCCTCCAACTTCCAGGCAAGGCCACCATTAACGGCGACACATCCAGCAACACCGGCTAC
 101 M H L S S L T S G D T A V Y Y C G R G Y
 301 ATGCACCTCAGCTCCCTGACATCCGGCGACACCGCGCTGTACTACTCGCGCAGGGGCTAC
 121 C Y Y V F D H W G Q G T T L T V S S G S
 361 GGCTACTACCTGTGTTGACCACTGGGCGCAGGGAACAACCTGACCGTGTCCAGCGGCTCC
 连接子
 141 T S G G G S G G G S G G G S S D V Q I
 421 ACCTCCGGAGGCGGAAGCGCGAGGATCCGAGGAGGAGGCTCCTCCAGCTGCAAAATC
 VL
 161 N Q S P S F L A A S P G E F I T I N C R
 481 AACCAGTCCCTAGCTTCTCTGGCGCTAGCCCTGGCGAGACAAATCAATCAATTGTCCG
 181 T S R S I S Q Y L A W Y Q E K P G K T N
 541 ACCAGCGGCTCCATCTCCAGTATCTGGCTGTGTTACAGGAGAAAGCCCGGCAAGACAAAC
 261 K L L I Y S G S T L Q S G I P S R F S G
 601 AAGCTGCTCATCTACAGCGCGACACCTTCAATCCGGCATCCCTTCCCGGTTAGCGGG
 221 S G S G T D F T L T I S G L E P E D F A
 661 TCCGATCCGGAACCGACTTTACCTGACCATCAGCGGCTGGAAACCGAGGATTTCGGC
 241 M Y Y C Q Q E N E N F L T F Q A G T K L
 721 ATGTACTACTCCAGCAGCACAACGAGAAATCCCTGACCTTTCAGCGCGCACAAGCTC
 261 E L K E P K S C D K T H T C F P C G G G
 781 GAGCTGAAGGACCCCAAGAGCTCCGACAAAACCCACACCTGTCCCCCTTCCCGAGGAGGA
 铰链 / 延伸
 281 S S G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P
 841 TCCTCCGCGGCGGAAGCGGAGGACAACTCAGGAGCCCTAGGTCTACACCTGCTCTCT
 CH3
 301 S R D E L F K N Q V S L T C L V K G F Y
 901 ACCCGGACGAAGTACAAAGAACCAGGTGTCTCTGACCTGTCTCGTCAAGGGCTTCTAC
 321 P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T
 961 CCTTCCGACATCCCGTCCAGTGGGAAAGCAACGCCAGCCCGAGACAAATTACAAGACC
 341 T P P V L D E D G S F F L Y S K L T V D
 1021 ACACCCCGCTCTGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTCTACTCCAAGCTGACCGTGGAC
 361 K S R W Q Q C N V F S C S V M H E A L H
 1081 AAGAGCGGTGGCAACAAGGCAACGTGTTCTCTCTGAGCGTCATGATGAGGCGCTGCAC
 381 N H Y T Q E S L S L S P G K - SEQ ID NO: 18
 1141 AATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTCTCCCCCGCAAGTGA SEQ ID NO: 19
 AAGCTT SEQ ID NO: 63 HindIII 终止

图 5

Tcttagagccggccacc SEQ ID NO: 65

XbaI Kozak

1 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
 1 ATCCAGACAGACACCTCTCTGCTGTGTGGTCTCTGCTCTGTGGTGGCTTGGCAGCACAGGA
 信号肽
 21 L I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 61 GACATCCAAATGACCCAGTCCCTTACAGGCTCAGCGCTTCCGGTCCAGACAGGGTCACC
 VL
 41 I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q N P
 121 ATCAGATGCAGGACCTCCAGGTCCATCAGCCAGTATCTGGCTCTGGTATCAGCAGAAACCC
 61 C K V P F L L I Y S G S T L Q S G V F S
 181 GGCAAGGTGCTCAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCACACTCCAGAGCCGAGTCCCCAGC
 81 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 241 CGGTTTTCTCGAAGCGGATCCCGAACCAGCTTCACCTGACCAITTCAGGCTGCCAACCT
 101 E D V A T Y Y C Q Q H N E N F L T F G G
 301 GAAGACGTGGCCACCTACTACTGTTCAGCAGCACAACGAGAACCCCTCAGCTTGGCCGA
 121 G T X V E I K G S T S G G G S G G G S G
 361 GGCACCAAGTCCGAGATCAAGCGCAGCACCCGCGAGGAGGAGCGCCGAGGCTCCCGA
 连接子
 141 G G G S S Q V Q L V Q S G A E V K K F G
 421 GGAGGAGGCTCTCTCCCAAGTGCAGCTCTGTCCAAAGCGGCTGAGGTGAAAAGCCCCGC
 VH
 161 A T V K I S C K V S G F N I K D T Y I H
 481 GCCACAGTCAAAATCTCTGCAAGGTTCAGCGGCTTCAACATCAAGGATACCTACATCCAG
 181 W V Q Q A F G K G L E W M G R I D P A H
 541 TGGGTGCAACAGGCCCCCGGCAAGGACTCGAAATGGATGGGCGGATCCAGCTTCTAAAC
 201 D N T L Y A S K F Q G R V F I T A D T S
 601 GACAACACACTCTACGCTCTCAAGTTCCAGGCGAGGGTGACCAATCACCGCCGATACCTCC
 221 T D T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y
 661 ACCGACACACCTTACATGAGCTGAGCAGCTGAGGTCCGAGCAGACCCCCGTCATTTAC
 241 C A R G Y G Y Y V F D H W G Q G T L V T
 721 TCGGCCCCGGGATACGCTTACTAGCTTTTGACCATTTGGGACAGGGAACACTTCTGACG
 261 V S S E P K S C D K T H T C F P C G G G
 781 GTGAGCTCCGAGCCCAAGAGCTGGGACAAGACCCACACATGTCTCTCTTCCGAGGAGGG
 铰链 / 延伸
 281 S S G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P
 841 AGCTCCGGAGGCGGATCCGGCGGACAACTAGGGAGCCCCAGGTCTATACCTTGGCCCCC
 CH3
 301 S R D E L F K N Q V S L T C L V K G F Y
 901 ACCAGGTAAGACCTGACAAAGAACAGGTCTCTCTGACCTGCTTGGTGAAGGATTCTAC
 321 P S D I A V E W E S N G Q F E N N Y K T
 961 CCCAGGCAATCCCTGTCTGAATGGCAGTCCAAACGGCCAGCCGAGAACCACTACAAGACA
 341 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D
 1021 ACCGCCCCCTGCTCTGGATTCGACGGCAGCTTCTTCTCTACTTCAAGCTGACCTTCGAC
 361 K S R W Q Q E N V F S C G V M H E A L H
 1081 AAGTCCAGGTGGCAGCAGGSCAACGGTGTTCCTGTCTCGTGATGATCAGGCGCTTCGAC
 381 N H Y T Q K S L S L S P G K - SEQ ID NO: 20
 1141 AACCAGTACACCCAGAGTCCCTGAGCCTCAGCCCTGGCAAGTGA SEQ ID NO: 21
 终止

aagctt SEQ ID NO: 66. HindIII

图 6

图 7

Tctagagccgcccacc SEQ ID NO: 69

XbaI Kozak

```

1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAGACCGATACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTCCCTGGCAGCACAGGA
信号肽
21  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
61  GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCTCCCTGAGCGCTTCCTGGGAGATAGGGTGAAC
VE
41  I T C R T S E S I S Q Y L A W Y Q Q K P
121  ATCACATGCCGGACCTCCAGGTCCATCTCCCACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCC

61  G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
181  GGCAAGGTGCCCAAGCTGCTCATCTATAGCGGCAGCACCCCTGCAGAGCGGAGTGCCTTCC

81  R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
241  CGTTTTTCGGATCCGGGTCCGGGCACAGACTTTACCCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCT

101  E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
301  GAGGATGTCCGCACCTACTACTGCGCAACAGCACAACGAGAACCCCTGACCTTCGGCGGC

121  G T K V E I K S G G G G Q V Q L V Q S G
361  GGAACCAAGSTCGAGATCAAGTCCGGAGGAGGAGGCCAAGTGCAGCTGGTCCAATCCGGC
连接子
141  A E V K K P G A T V K I S C K V S G F N
421  GCGAAGTCAAAAAGCCCGGCGCCACCGTGAAGATCAGCTGCAAGGTGTCCCGCTTCAAC

161  I K D T Y I H W V Q Q A P G K G L E W M
481  ATCAAGGACACCTATATCCACTGGGTCCAGCAAGCCCCCGAAAAAGGCTGGAGTGGATG

181  G R I D P A N D N T L Y A S K F Q G R V
541  GGACGGATTGACCCCGCCAACGACAACACACTCTATGCCTCCAAGTCCAGGGCAGGGTG

201  T I T A D T S T D T A Y M E L S S L R S
601  ACAATCACCGCGACACACAGCACCGACACAGCTTATATGGAGCTGTCTCTCCCTCCGGTCC

221  E D T A V Y Y C A R S Y G Y Y V F D H W
661  GAGGATACCGCGTCTACTACTGCGCCAGGGGCTACGGCTACTACGTGTTTGACCACTGG

241  G Q G T L V T V S S G G C SEQ ID NO: 12
721  GGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCCAGCGGAGGCTGC SEQ ID NO: 77
Cys

```

aagctt SEQ ID NO: 70

HindIII

图 8

Tctagagccgcgccacc seq ID NO: 71

XbaI Kozak

```

1  M E T D T I L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTCTGGGTCTCTGCTGTGGGTGCCTGGCAGCACAGGA
信号肽
21  Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
61  CAGGTGCAACTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTCAAGAAACCTGGCGCCACCGTGAAGATC
VH
41  S C K V S G F N I K D T Y I H W V Q Q A
121  AGCTGCAAGGTGTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCACTGGSTCCAACAAGCC

61  P G K G L E W M G R I D P A N D N T L Y
181  CCCGGAAGGGCCCTGGAATGGATGGGCGGATTGACCCCGCCAACGACAAACACCCCTCTAT

81  A S K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y
241  GCCAGCAAGTTCAGGGCAGGGTCACCATCAACGCGGACACCAGCACCGACACCGGCTAC

101  M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y
301  ATGGAGCTGAGCAGCCTGCGGAGCGAAGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCAGGGGCTAC

121  G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S S G
361  GGCTACTACGTCTTCGACCATTGGGGACAGGGCACCCCTCTGTGACAGTGTCCAGCTCCGGC

连接子
141  G G G D I Q M T Q S P S S L S A S V G D
421  GGAGGAGGAGATATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGAGAT
VL
161  R V T I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q
481  CUGGTGACCATCACATGCAGGACCTCCAGGTCCATCTCCAGTACCTGGCCTGCTACCAA

181  Q K P G K V P K L L I Y S G S T L Q S G
541  CAGAAGCCCGCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGGCAGCACACTGCAATCCGGC

201  V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S
601  GTCCCTTCCCGGTTTTCCGGATCCGGATCCGGCACCGACTTCACCGTGACCATCAGCTCC

221  L Q P E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T
661  CTCCAACCCGAGGACGTCCGCACCTACTACTGTCAGCAGCACACCGAGAACCCCTCACC

241  F G G G T E V E I K G G C SEQ ID NO: 13
721  TTTGGCGGCGGAACCAAGGTCCAGATCAAGGGCGGCTCC SEQ ID NO: 78

```

Cys

aagctt seq ID NO: 72

HindIII

图 9

Tctagagcggccacc SEQ ID NO: 73

XbaI Kozak

```

1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAGACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTCCCTGGCAGCACAGGA
   信号肽
21  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
61  GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCTCCCTGAGCGCTTCCGTGGGAGATAGGGTGACC
   VL
41  I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
121  ATCACATGCCCGGACCTCCAGGTCCATCTCCCACTACCTGGGCTGGTACCAGCAGAAGCCC

61  G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
181  GGCAAGGTGCCCCAAGGTGCTCATCTATAGCGGGCAGCACCTTGCAAGCGGAGTGCTTCC

81  R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
241  CGGTTTTCCGGATCCGGCTCCGGCACAGACTTTACCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCT

181  E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
301  GAGGATGTCCCACTTACTACTGCCAACAGCACAAAGAGAACCCCTGACCTTCGGCGGC

121  G T K V E I K G G G S G G G G Q V Q L V
361  GGAACCAAGGTCGAGATCAAGGGAGGAGGCTDCGGAGGAGGAGGCCAAGTGACAGTGGTC
   连接子                               VH
141  Q S G A E V K K P G A T V K I S C K V S
421  CAATCCGGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCCGGCGCCACCCTGAAGATCAGCTGCAAGGTGTCC

161  G E N I K D T Y I H W V Q Q A P G K G L
481  GGCITCAACATCAAGGACACTTATATCCACTGGGTCCAGCAAGCCCCCGGAAAPAGGCCTG

131  E W M G R I D P A N D N T L Y A S K F Q
541  GAGTGGATGGGACGGATTGACCCCGCCAAAGACAAACAACTCTATGCTCCAGTTCAG

201  G R V T I T A D T S T D T A Y M E L S S
601  GGCAGGGTGACCAATCACCAGCCGACACCAGCACCAGACACAGCTTATATGGAGCTGTCTCC

221  L R S E D T A V Y Y C A R G Y G Y Y V F
661  CTCCGTCCGAGGATACCGCTGTCTACTACTGCGGCAGGGGCTACGGCTACTACGGTTT

241  D H W G Q G T L V T V S S G G C      SEQ ID NO: 14
721  GACCACTGGGGTCAGGGCACTCTGGTGACAGTGTCCAGCGGAGGCTGC      SEQ ID NO: 10
   CYS

```

aagctt SEQ ID NO: 74

HindIII

图 10

Totagagccgcgcacc SEQ ID NO: 75

XbaI Kozak

```

1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTCTGGGTCCCTGCTGTGGGTGCCTGGCAGCACAGGA
   信号肽
21  Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
61  CAGGTGCAACTGCTGTGCAGACCGGCGCCGAGGTCAAGAAACCTGGCGCCACCGTGAAGATC
   VH
41  S C K V S G F N I K D T Y I H W V Q Q A
121  AGCTGCAAGGTGTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTCCAACAAGCC

61  P G K G L E W M G R I D P A N D N T L Y
181  CCGGAAATGGCCTGGAAATGGATGGCCCGGATTGACCCCGCAACGACAAACACCCCTCTAT

81  A S K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y
241  GCCAGCAAGTTCAGGGCAGGGTCACCATCACCGCCGACACCAGCACCSACACCCGCTAC

101  M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y
301  ATGGAGCTGAGCAGCTGCGGAGCGAAGACACCGCGCTGTACTACTGCGCCAGGGGGCTAC

121  G Y Y V F D H W G Q S T L V T V S S G G
361  GGCTACTACGTCTTCGACCATTTGGGACAGGGCACCCCTGCTGACAGTGTCCAGCGGAGGA
   连接器
141  G S G G G G D I Q M T Q S P S S L S A S
421  GUATCCGCGCGAGGAGGAGATATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCAGCCCTGTCCGCTTCC
   VL
161  V G D R V T I T C R T S P S I S Q Y L A
481  GTGGGAGATCGGCTTGACCATCACATGCAGGACCTCCAGGTCCATCTCCAGTACCTGGCC

181  W Y Q Q K P G K V P K L L I Y S G S T L
541  TGGTACCAACAGAAAGCCCGCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGGCAGCACACTG

201  Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
601  CAAATCCGCGCTCCCTTCCCGGTTTTCCGGATCCGGATCCGGCACCGACTTCACCCCTGACC

221  I S S L Q P E D V A T Y Y C Q Q H N E N
661  ATCAGCTCCCTGCAACCCGAGGACGTGGGCACTTACTACTGTTCAGCAGCACACAGAGAAC

241  P L T F G G G T K V E I K G G C      SEQ ID NO: 15
721  CCGCTCACCTTTGGCGCGGAACCAAGGTGAGATCAAGGGCGGCTGC      SEQ ID NO: 11
   CYS

```

aagcctt SEQ ID NO: 76

HindIII

图 11

Cys- 双价抗体

前导序列:

atggaaaccgacacccctgctgctgtgggtgctgctgctctgggtcccaggctccacccggt SEQ ID NO: 25
 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G SEQ ID NO: 26

五氨基酸连接子:

agtgggtggaggaggc SEQ ID NO: 27
 S G G G G SEQ ID NO: 28

八氨基酸连接子:

ggcggagggtgagtgaggcggcggc SEQ ID NO: 29
 G G G S G G G G SEQ ID NO: 30

半胱氨酸尾部:

ggcggctgc SEQ ID NO: 31
 G G C SEQ ID NO: 32

图 12A

微抗体

前导序列:

atggaaaccgacacccctgctgctgtgggtgctgctgctctgggtcccaggctccacccggt SEQ ID NO: 33
 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G SEQ ID NO: 34

十八氨基酸连接子:

ggctccacatccggcggaggctctggcgggtggatctggcggaggcggctccatcc SEQ ID NO: 35
 G S T S G G G S G G S G G G S S SEQ ID NO: 36

IgG1 铰链 / 连接子 -CH3 域:

gagcctaagtcctgctgacaaagaccacacccctgtccccccttgccggcggagggaagcagcgga
 E P K S C D K T H T C P P C G G S S G
 ggccgatccgggtggccagctcggagagcctcaggtgtacacccctgctccctcccgagac
 G G S G G Q P R E P Q V Y T L F P S R D
 gagctgaccaaagaaccaggtgtccctgacctgtctgtgtcaagggtttctaccctccgat
 E L T E N Q V S L T C L V K G F Y P S D
 atgcgcgtggagtggtggagtcacacggccagccctgagaacaaactacaagaccacccctcct
 I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
 gtgctggactccgacgggtccctctctcctgtactccaagctccacagtggtataagtcccgg
 V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R
 tggcagcagggcgaactgtttctcctgtcctgtgatgaacgagggcctgcacaacacactat
 W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y
 acccagaagtcctctgtccctgtctcctggcaag SEQ ID NO: 37
 T Q K S L S L S P G K SEQ ID NO: 38

图 12B

铰链区:

IgG 铰链区及变体的氨基酸序列

	上部	中部	下部 / 延伸
IgG1 (SEQ ID NO: 53)	EPKSCDKTAT	CPPCP	APPELLGGP
IgG1v1(SEQ ID NO: 54)	EPKSCDKTHT	CPPCP	GGGSGGGSG
IgG2.NH(SEQ ID NO: 55)	ERK	CCVECPPCP	APPVA-GP
IgG3 (SEQ ID NO: 56)	ELKTPLGDTTHT	CPRCP{EPKSCDTTPPCPRCP}X3	APPELLGGP
IgG3v1(SEQ ID NO: 57)	ELKTPLGDTTHT	CPRCP	APPELLGGP
IgG3v2(SEQ ID NO: 58)	EPKSCDTPPP	CPRCP	APPELLGGP
IgG4 (SEQ ID NO: 59)	ESKYGPP	CPSCP	APPELLGGP
IgG4v1(SEQ ID NO: 60)	ESKYGPP	CPPCP	APPELLGGP
IgG2.EH(SEQ ID NO: 79)	ERK	CCVECPPCP	GGGSGGGSG

CH3 域:

hIgG2 CH3 对 hIgG1 CH3 的比对 (氨基酸序列):

```
hIgG2 CH3      GQPREPQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS
hIgG1 CH3      GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
*****.*.*:*****

hIgG2 CH3      DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 80)
hIgG1 CH3      DGSFFLYSKLTVDKSPWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK- (SEQ ID NO: 81)
*****
```

图 12B 续

鼠 VL

```

gatgtccagataaaccagttctccatctttttctgtgcgtctctctggagaaaccattact
D V Q I N Q S P S F L A A S P G E T I T
ataaattgc aggacaagtaggagtagtattagtcgaatatttagcc ttggtatcaagagaaaacct
I N C R T S R S I S Q Y L A W Y Q E K P
gggaaaactaataagctttcttattctac tctggatccactctgcaatct ggaattccatca
G K T N K L L I Y S G S T L Q S G T F S
aggttcagtggtcagtggtatctgggtacagatttcaactctcaccatcagtggtcctggagcct
R F S G S G S G T D F T L T I S G L E P
gaagattttgcaattgtattactgt caacagcataatgaaaaccogctcacg ttccggtgct
E D F A M Y Y C Q Q H N E N P L T F G A
gggaccaagctggagctgaag SEQ ID NO: 39
G T K L E L K SEQ ID NO: 40

```

图 12C

huVL

```

gaagtcacagataaaccagttctccatctctctgtctgcattctgtaggagacagagtcacc
D V Q I T Q S P S S L S A S V G D R V T
atcaattgc aggacaagtaggagtagtattagtcgaatatttagcc ttggtatcagcagaaaacca
I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
gggaaagtctctaagctctctgatctat tctggatccactctgcaatct ggagtcaccatct
G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
cggttcagtggtcagtggtatctgggtacagatttcaactctcaccatcagcagcctgcagcct
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
gaagatggttgcaacttattactgt caacagcataatgaaaaccogctcacg ttccggcgga
E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
gggaccaaggtggagatcaaa SEQ ID NO: 41
G T K V E I K SEQ ID NO: 42

```

图 12D

鼠 VL

```

gaggtccagctgcagcagctctggggcagagccttggtgaagccaggggcctcagtcaggctg
E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L
tctgcacagcttct ggcttcaacattaaagac acctatatacacttcgtgaggcagagg
S C T A S G F N I K D T Y I H F V R Q R
cctgaacaggggcctggagtggtattgga aggattgatcctgcgaatgataaatact ttatat
P E Q G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gcctcaaaagttccagggcgaaggccactataacagcagacacatcatccaaacacagcctac
A S K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y
atgcacctctgcagcctgcacatctctggggacaactgccgtctattactgtgtgtaga ggcttat
M H L C S L T S G D T A V Y Y C G R G Y
ggcttactaagctattttgaccac tggggccaaaggcaaccactctcacagctctctca SEQ ID NO: 43
G Y Y V F D H W G Q G T T L T V S S SEQ ID NO: 44

```

图 12E

huVH 版本 a (来自 VH 版本 1)

```

gaagtgcagctggttgaaagcggcgggcgggccttggtgcagccggcgggcagcctgcgcctg
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L
agctgcgcggcgagc ggcttttaacattaaagat acctataattcatttttgctgcgcagggc
S C A A S G F N I K D T Y I H F V R Q A
ccgggcaaaaggccttggaatggattggc cgcattgatccggcgaaacgataaacacc ctgtat
P G K G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gcgagcaaatttcaggggcaaaagcgaaccattagcgcgggataccagcaaaaaaaccccgctat
A S K F Q G K A T I S A D T S K N T A Y
ctgcagatgaacagcctgcgcgcggggagataccgcgggtgtattattgcgggcgc ggcttat
L Q M N S L K A G D T A V Y Y C G R G Y
ggctattatgtgtttgatcat tggggccagggcaacccttggtgaacgtgagcagc SEQ ID NO: 45
G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S SEQ ID NO: 46

```

图 12F

huVH 版本 b (来自 VH 版本 1)

```

gaagtgcagctggtggaaagggggggggcctggtgcagccggggcggcagcctggcggctg
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L
agctgcggggcgagc ggctttaacattaaagat acctatatttcattttgtgcggcaggcg
S C A A S G F N I K D T Y I H F V R Q A
cggggcaaaaggcctggaaaggattggc cgcattgatccggcgaaacgataaacacc ctgtat
P G K G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gcgagcaaatcttcaggggcaaaagcgaccattagcgggataccagcaaaaacacacggcgtat
A S K F Q G K A T I S A D T S K N T A Y
ctgcagatgaacagcctgcgcgcgggaagataccgcgggtgtattattgcgggcgcg ggctat
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C G R G Y
ggctattatgtgtttgatcat tggggccaggggcaacctggtgacccgtgagcagc SEQ ID NO: 47
G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S SEQ ID NO: 48

```

图 12G

huVH 版本 c (来自 VH 版本 2)

```

caggtgcagctggtgcagagcgggcggggaagtgaaaaaacggggcgcgacccgtgaaaatt
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
agctgcaaaagtgagc ggctttaacattaaagat acctatatttcattttgtgcagcaggcg
S C K V S G F N I K D T Y I H F V Q Q A
cggggcaaaaggcctggaaaggattggc cgcattgatccggcgaaacgataaacacc ctgtat
P G K G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gcgagcaaatcttcaggggcaaaagcgaccattacggcgataccagcaaacgataaccggtat
A S K F Q G K A T I T A D T S T D T A Y
atggaaactgagcagcctgcgcagcggagataccgcgggtgtattattgcgggcgcg ggctat
M E L S S L R S G D T A V Y Y C G R G Y
ggctattatgtgtttgatcat tggggccaggggcaacctggtgacccgtgagcagc SEQ ID NO: 49
G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S SEQ ID NO: 50

```

图 12H

huVH 版本 d (来自 VH 版本 2)

```

caggtgcagctggtgcagagcgggcggggaagtgaaaaaacggggcgcgacccgtgaaaatt
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
agctgcaaaagtgagc ggctttaacattaaagat acctatatttcattttgtgcagcaggcg
S C K V S G F N I K D T Y I H F V Q Q A
cggggcaaaaggcctggaaaggattggc cgcattgatccggcgaaacgataaacacc ctgtat
P G K G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gcgagcaaatcttcaggggcaaaagcgaccattacggcgataccagcaaacgataaccggtat
A S K F Q G K A T I T A D T S T D T A Y
atggaaactgagcagcctgcgcagcggagataccgcgggtgtattattgcgggcgcg ggctat
M E L S S L R S E D T A V Y Y C G R G Y
ggctattatgtgtttgatcat tggggccaggggcaacctggtgacccgtgagcagc SEQ ID NO: 51
G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S SEQ ID NO: 52

```

图 12I

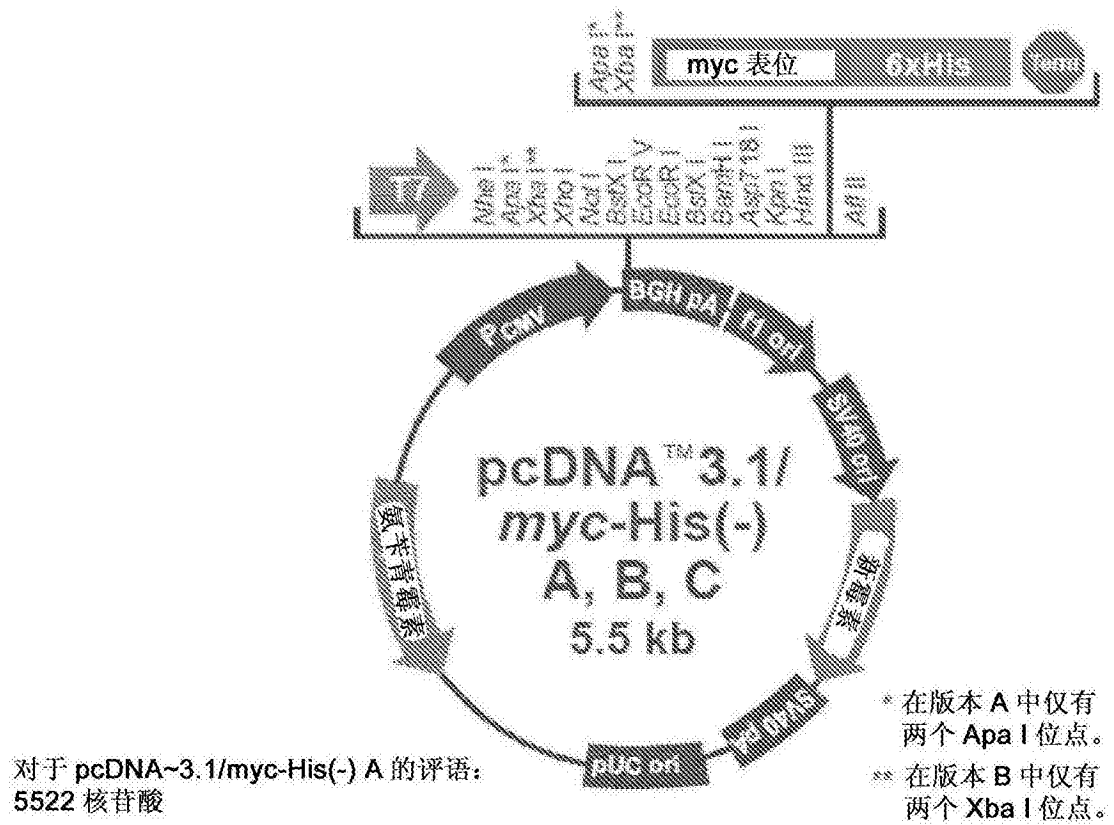


图 13

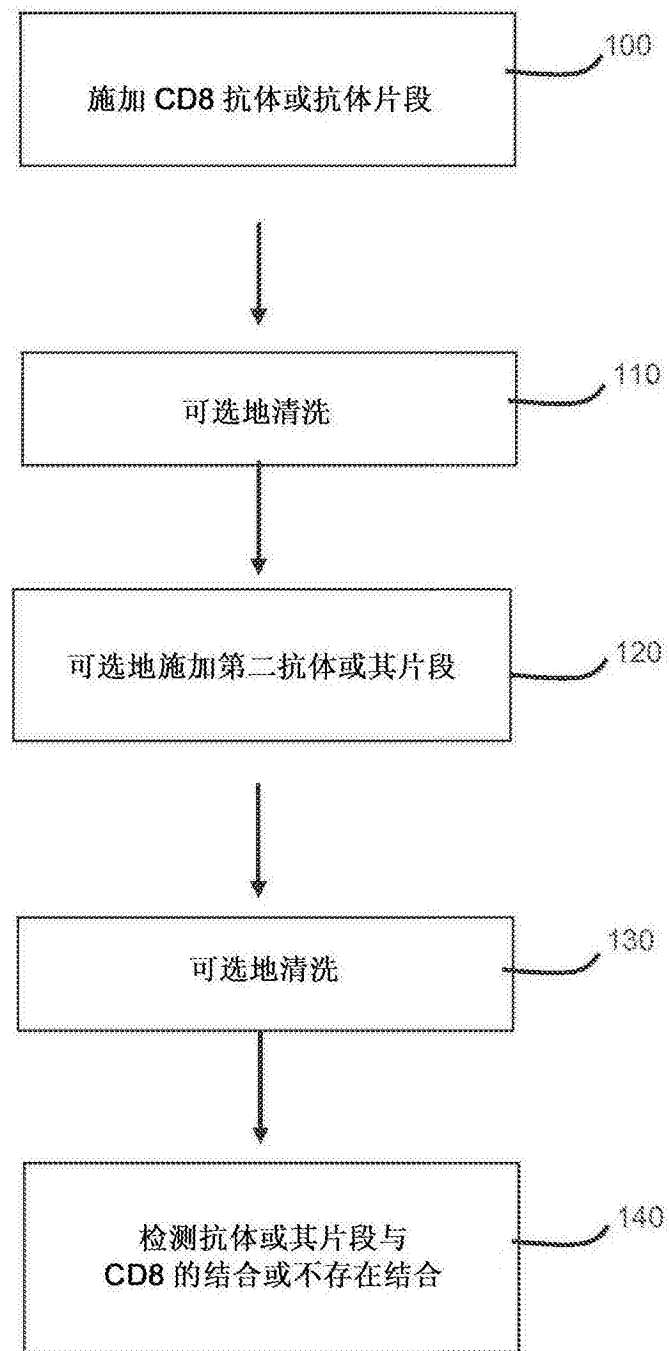


图 14

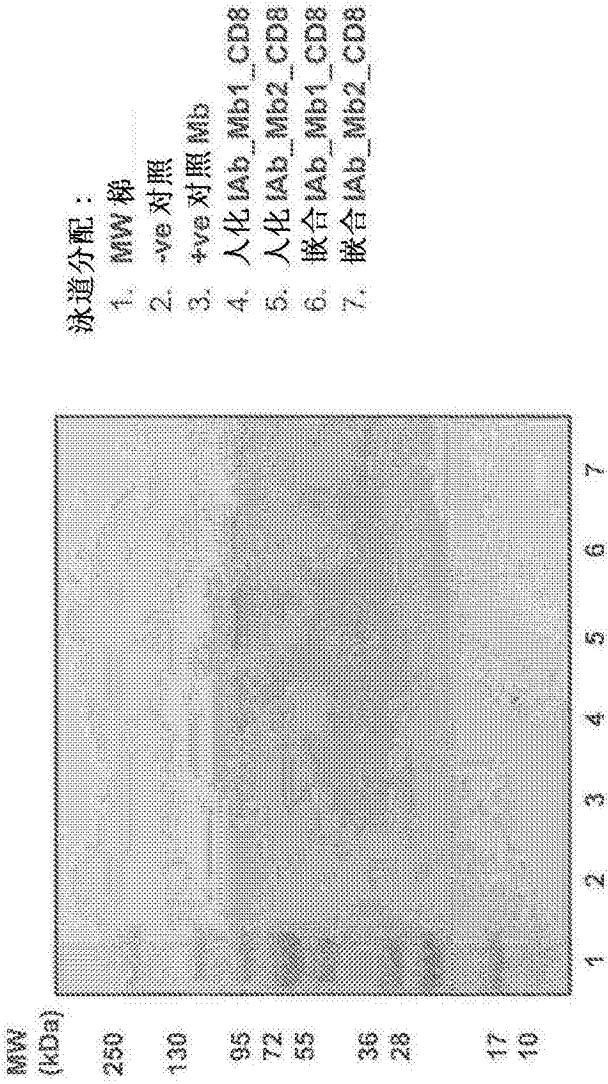


图 15

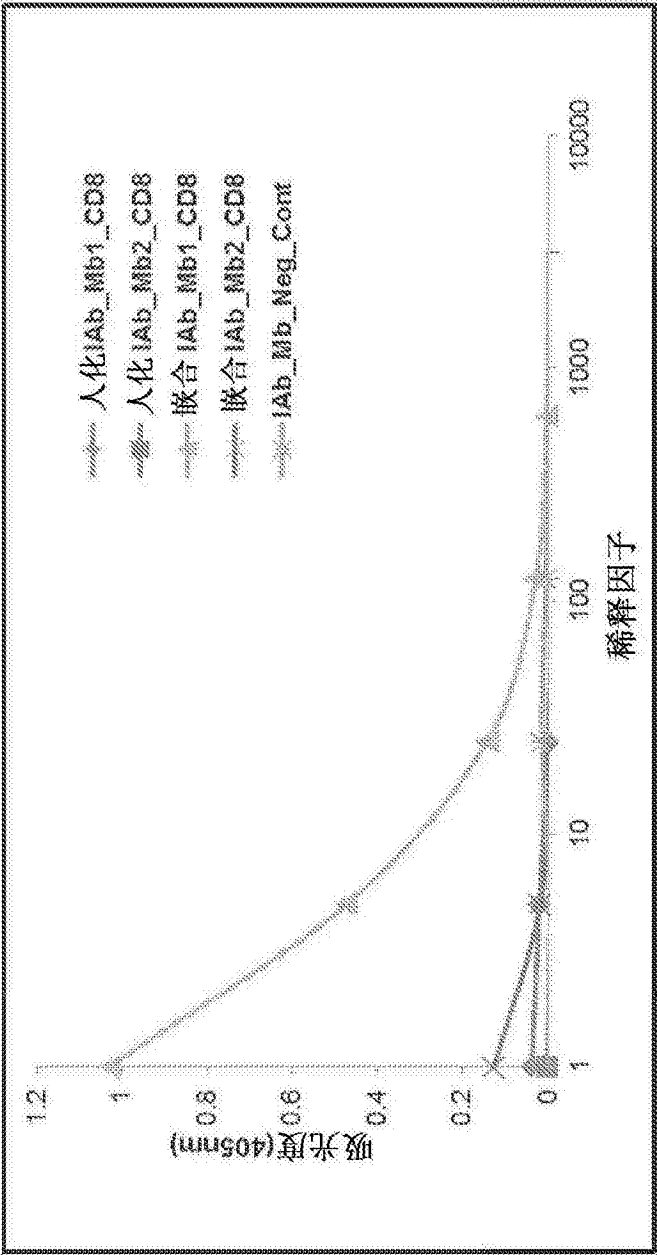


图 16

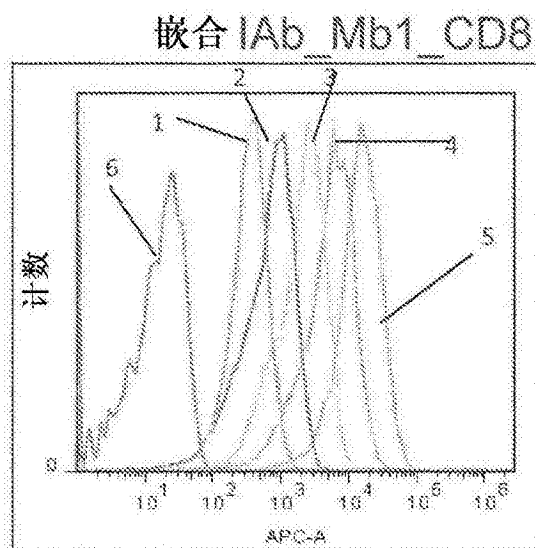


图 17A

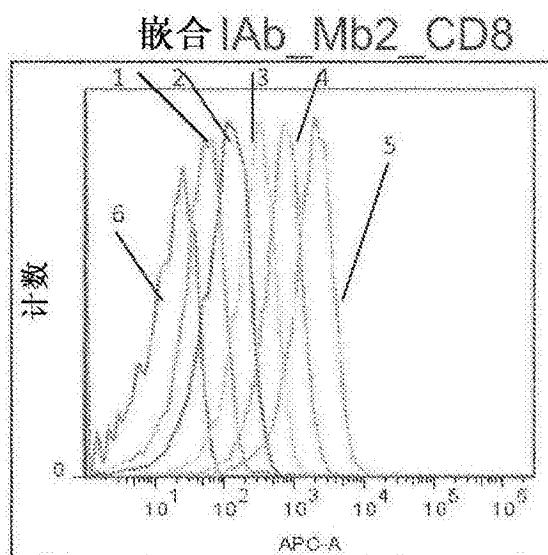


图 17B

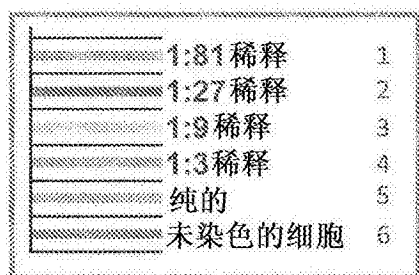
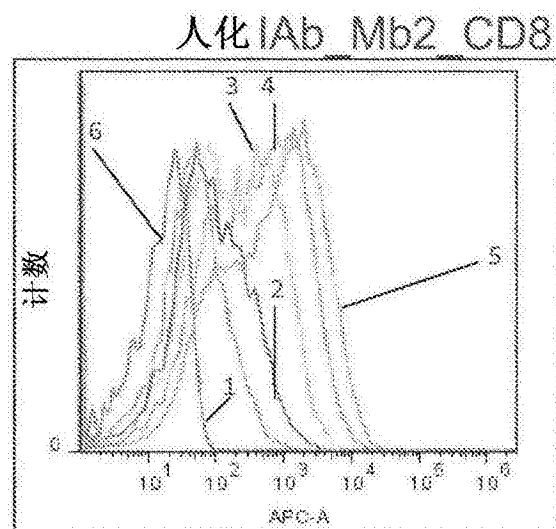
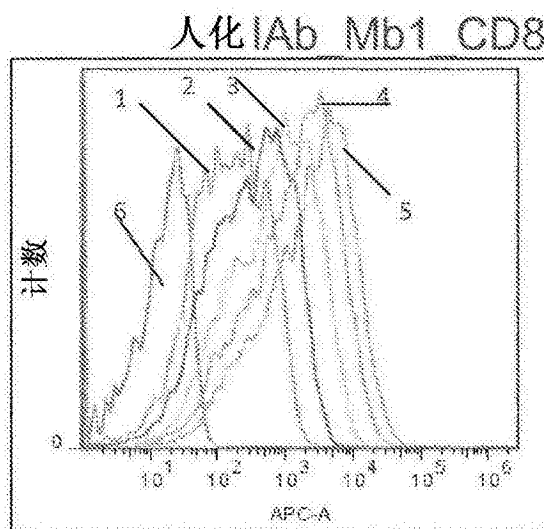


图 17D

图 17C

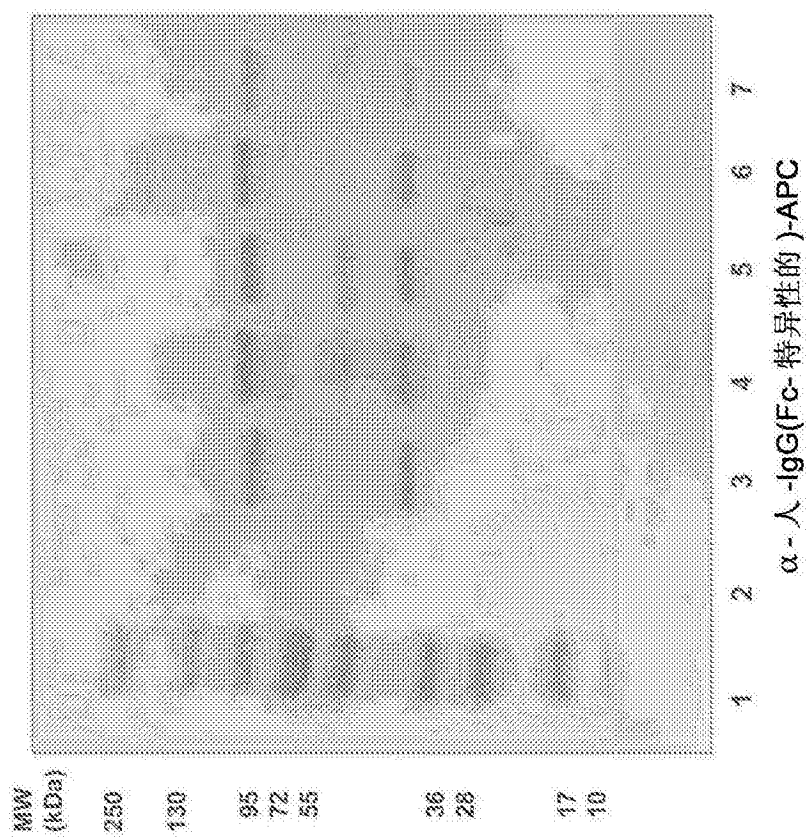


图 18A

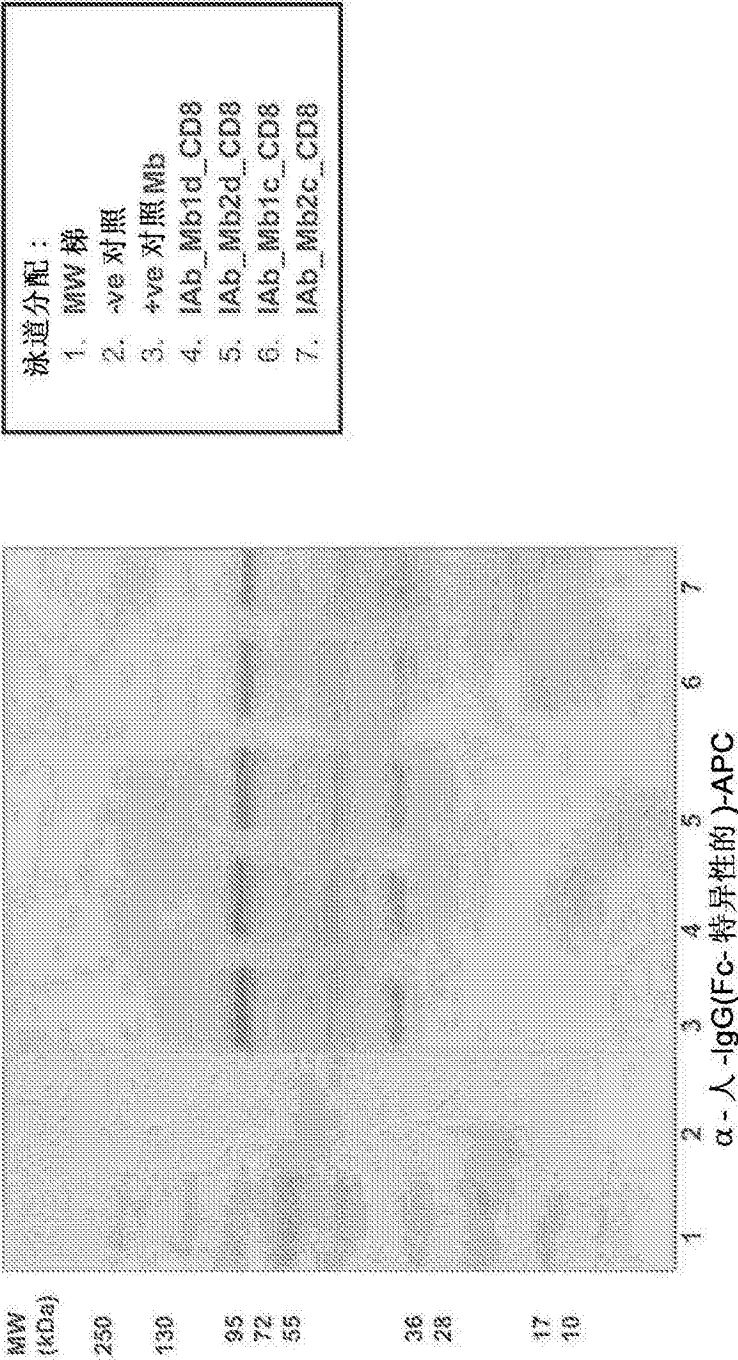


图 18B

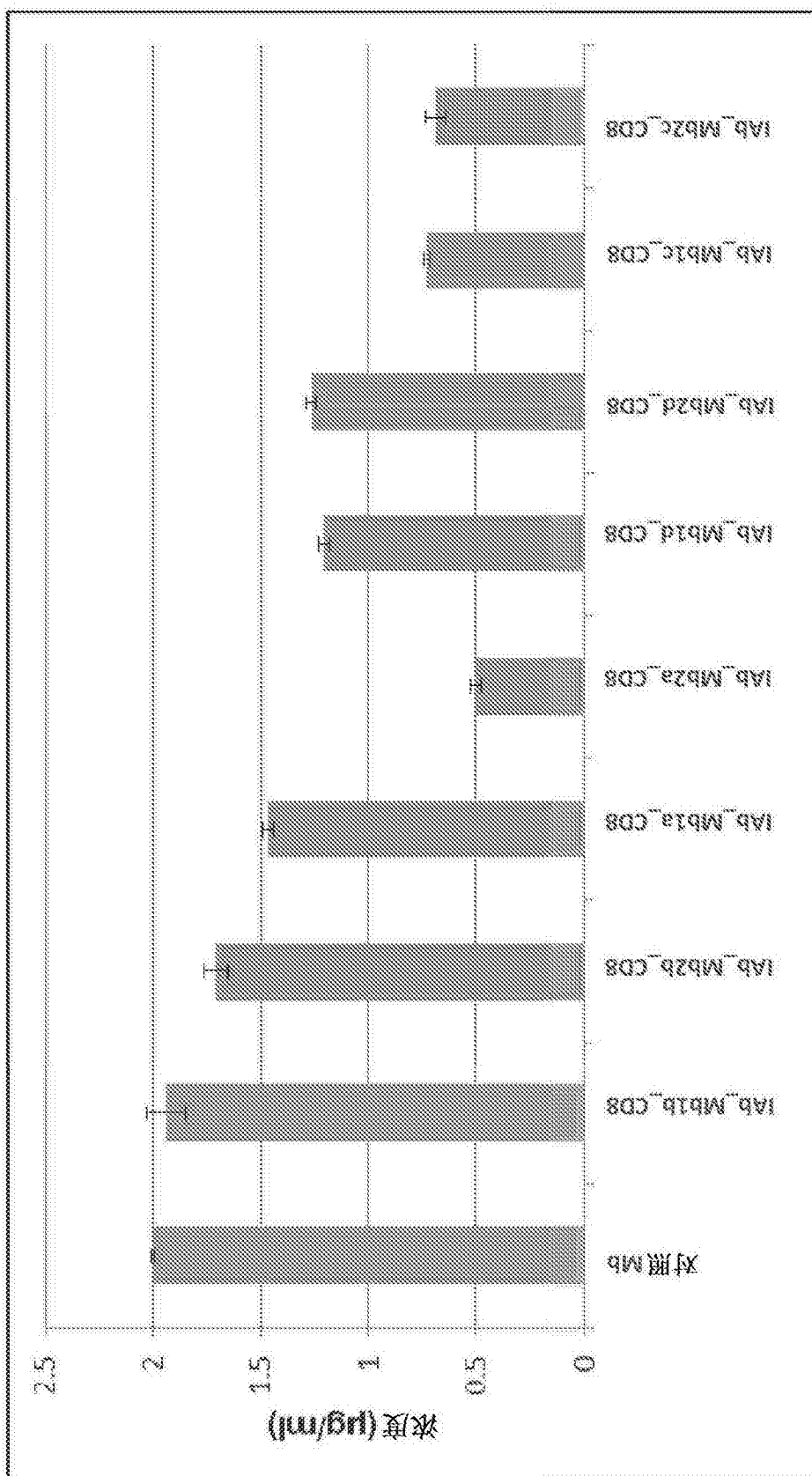


图 19

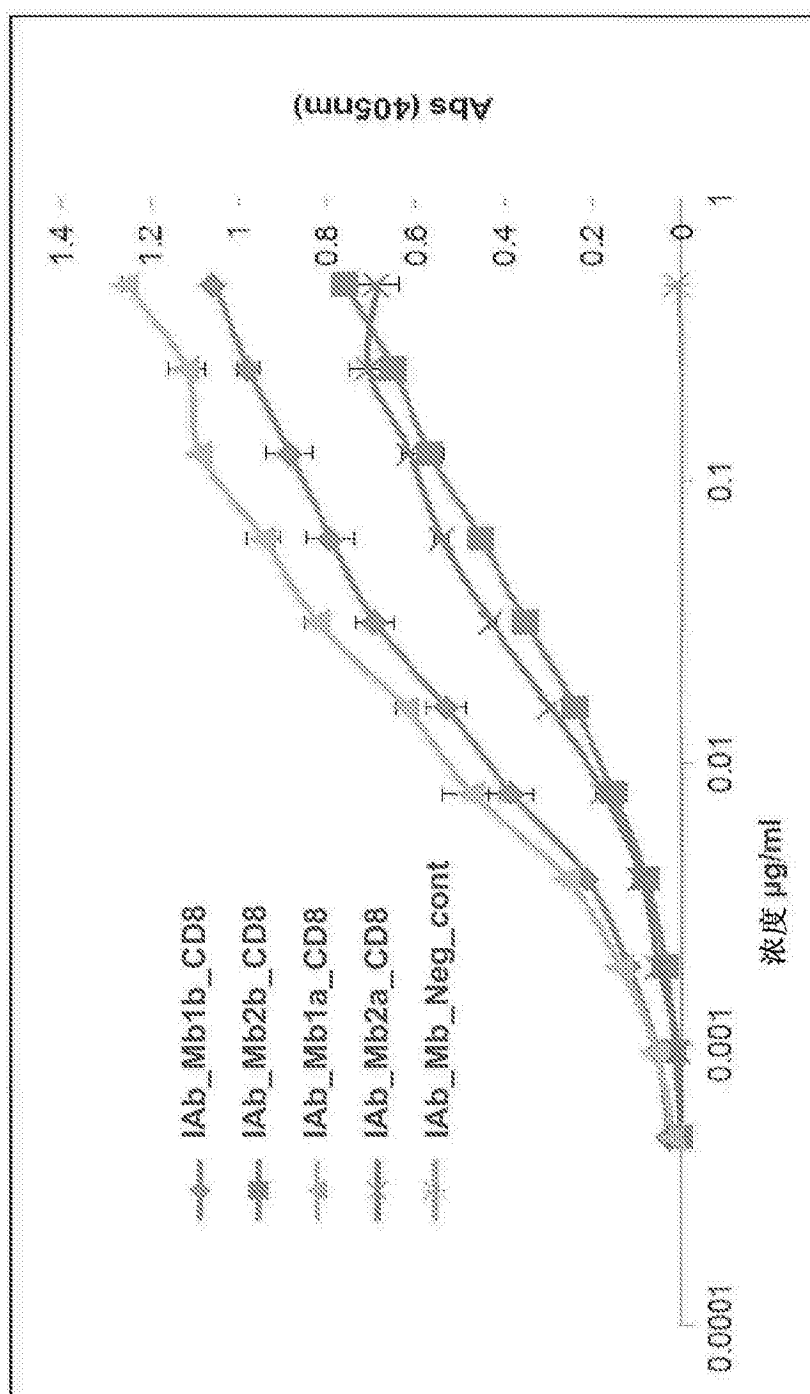


图 20

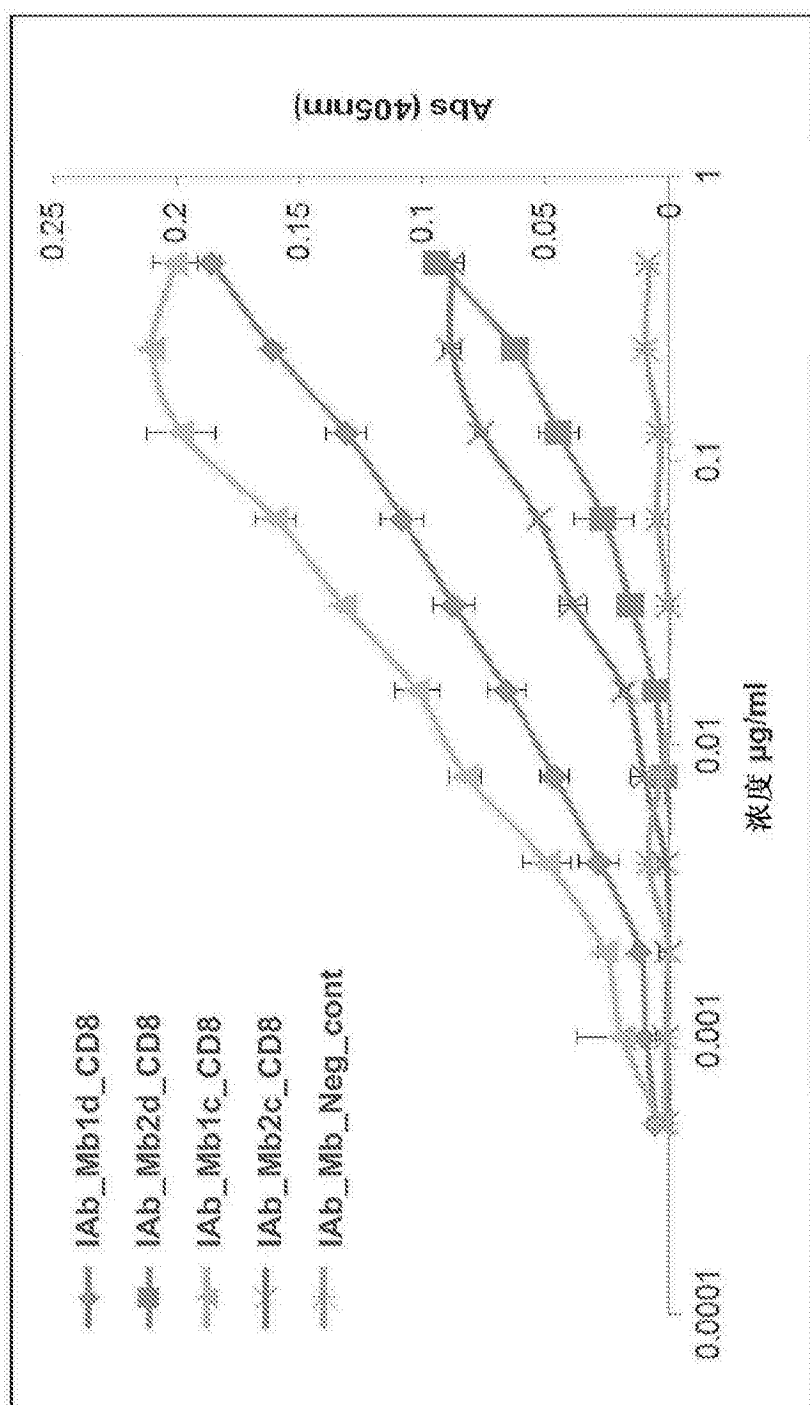


图 21

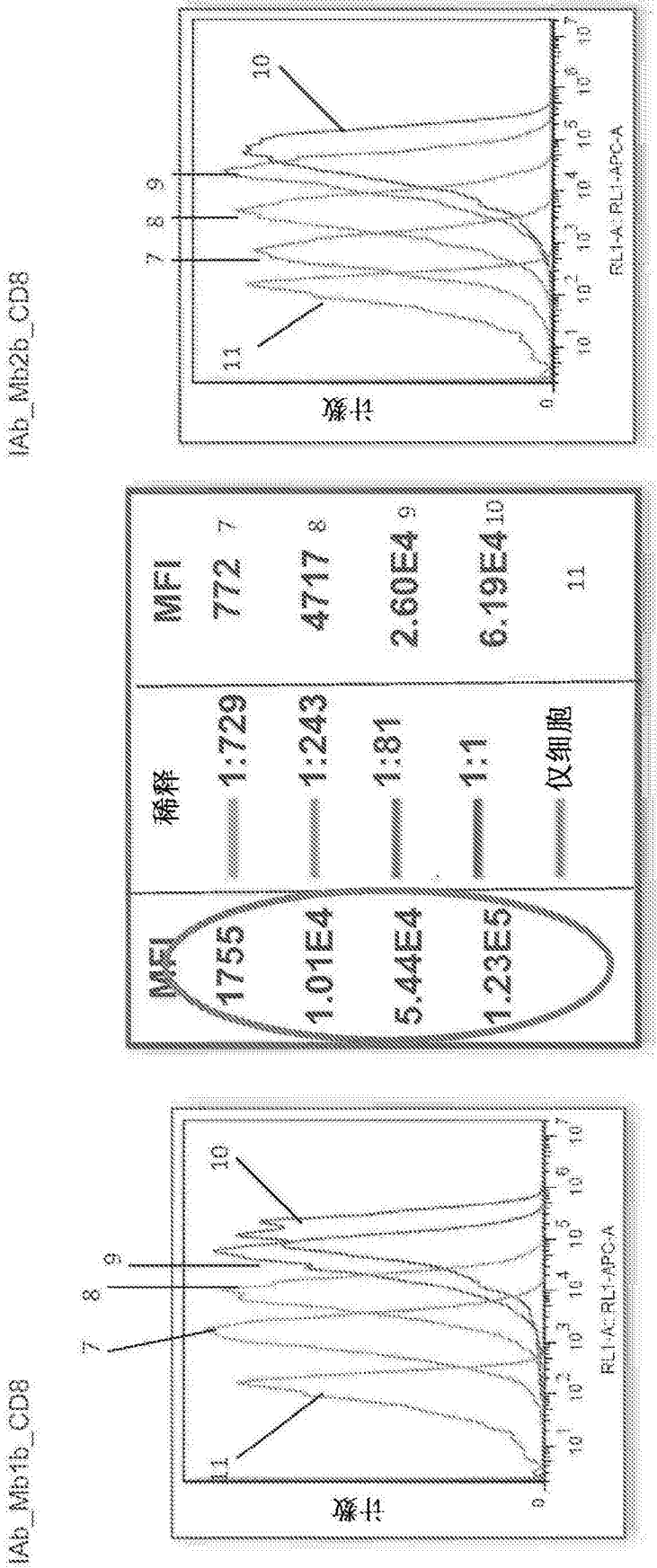


图 22A

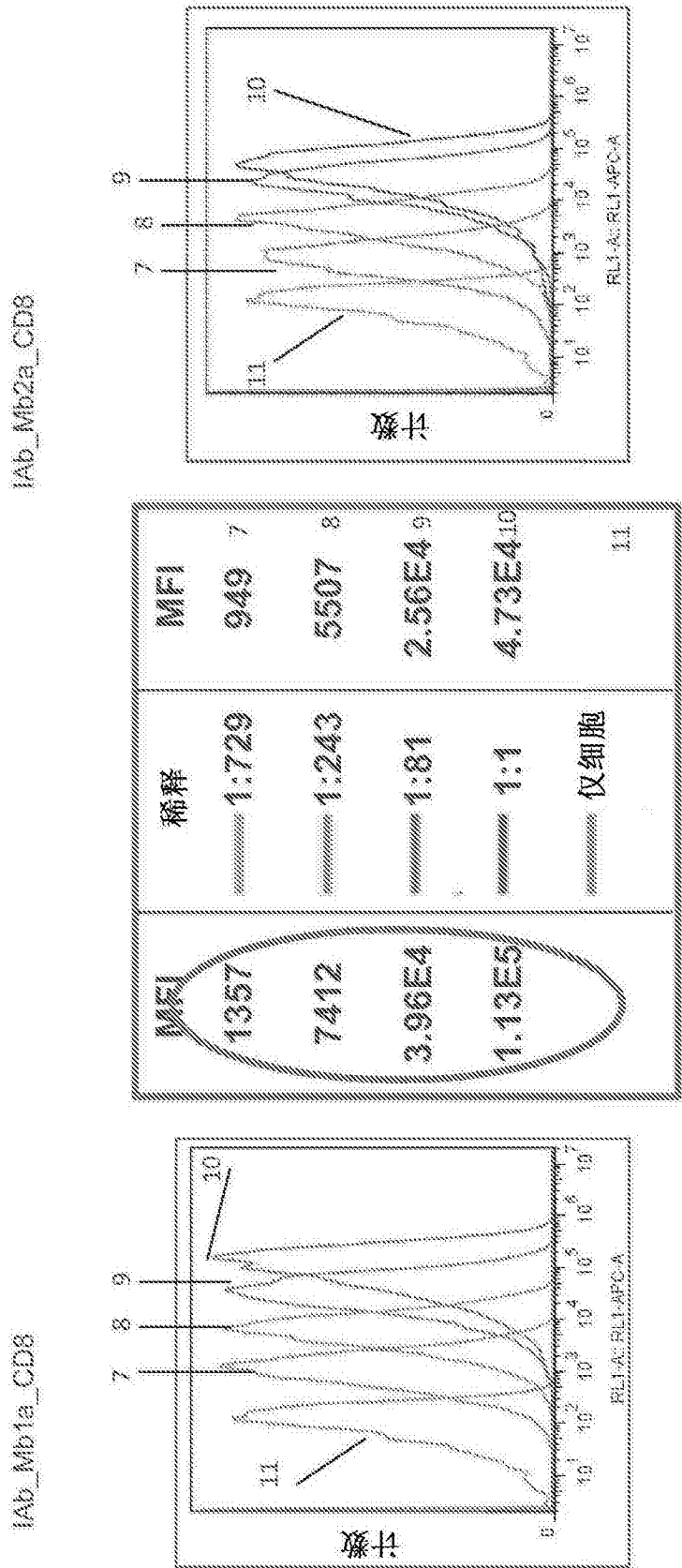


图 22B

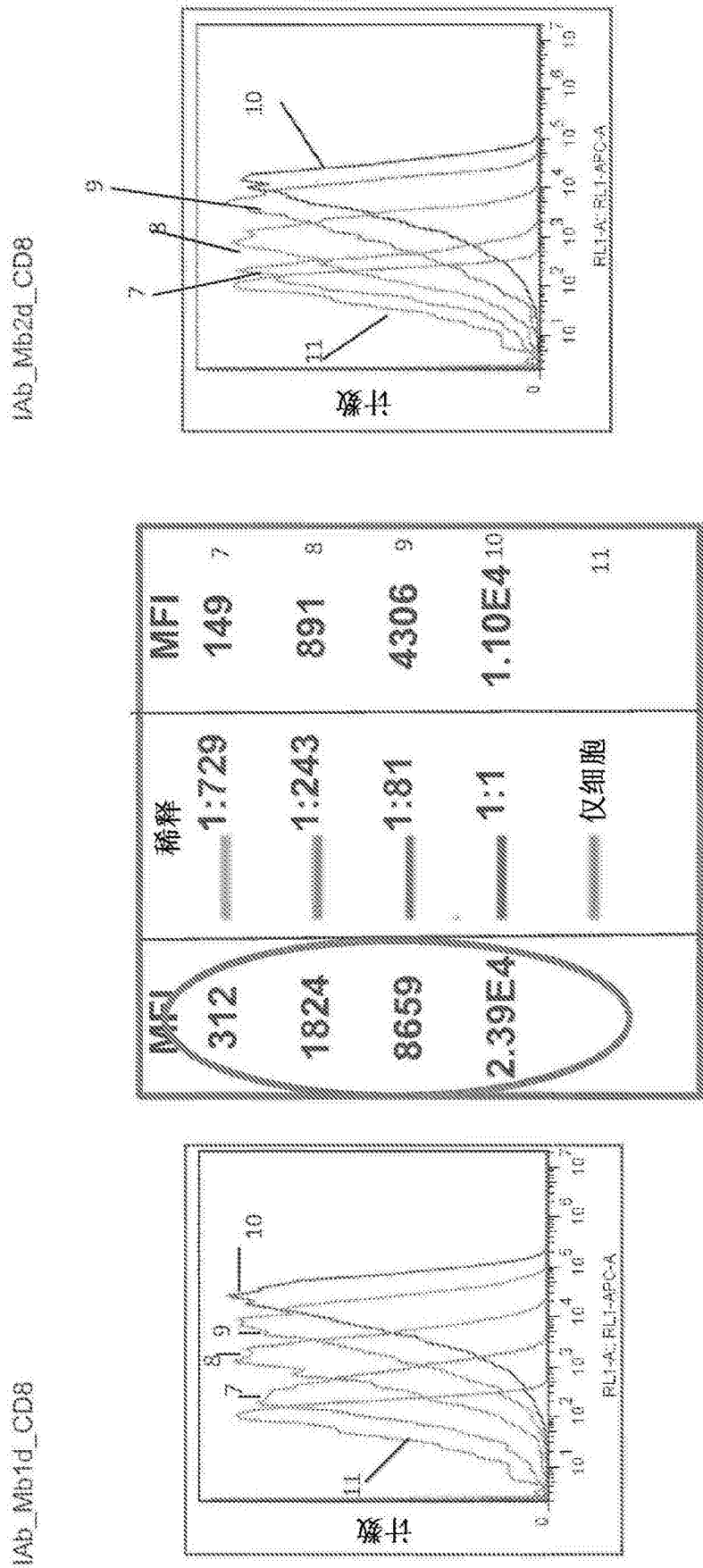


图 23A

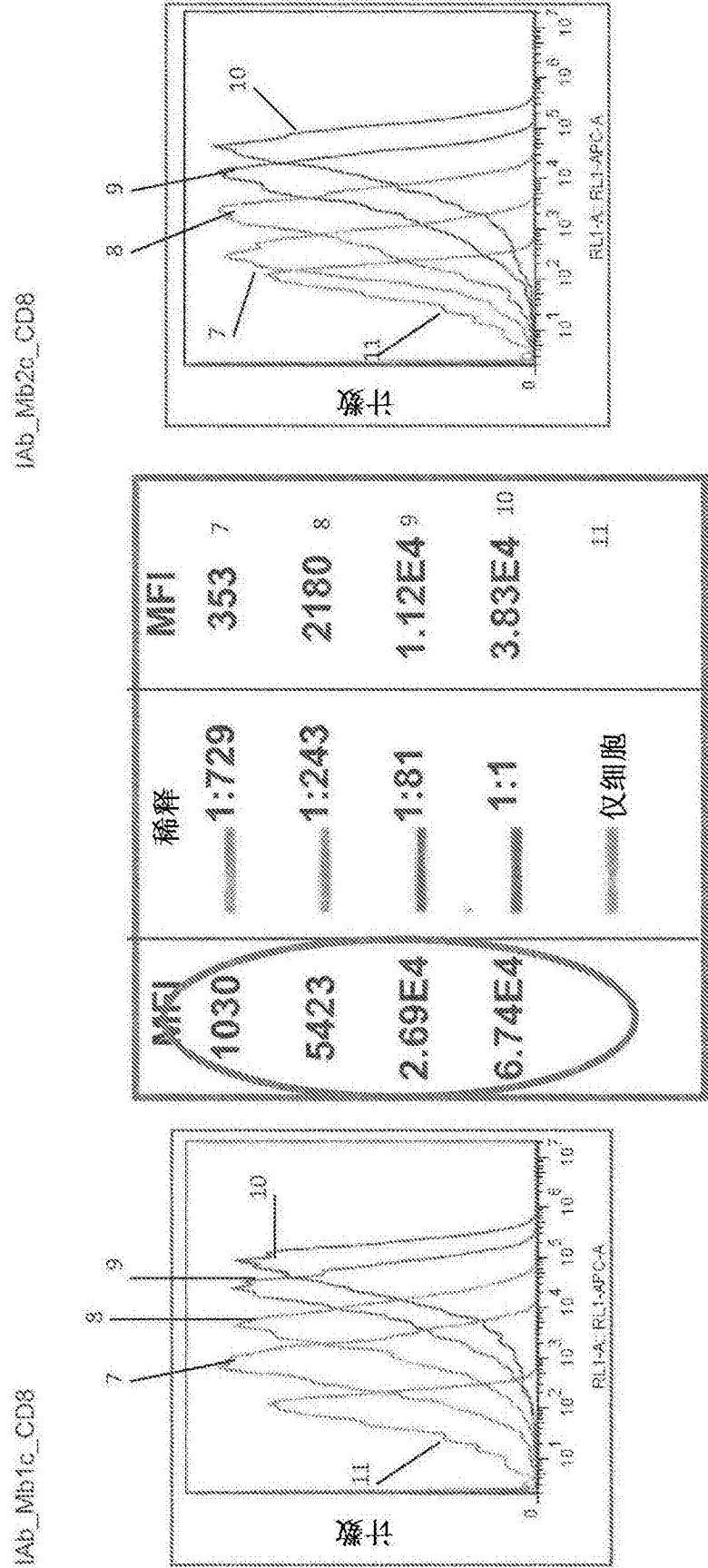


图 23B

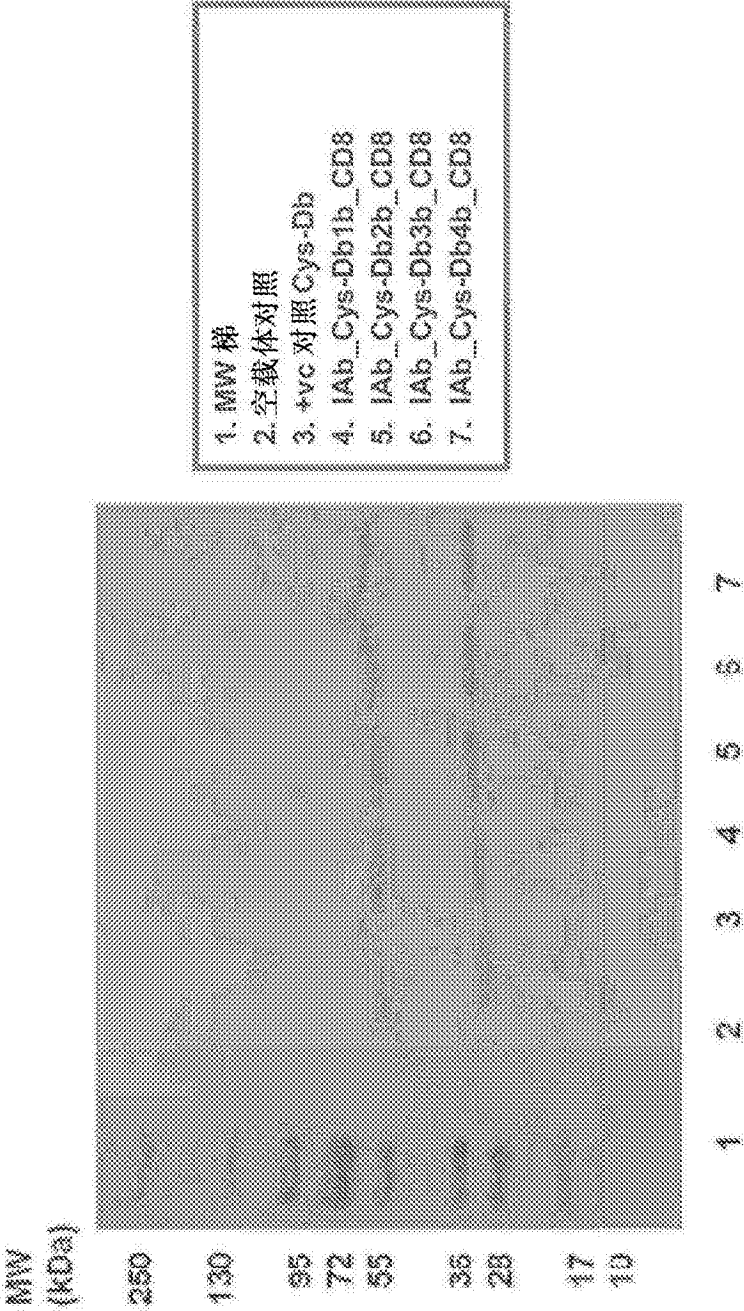


图 24

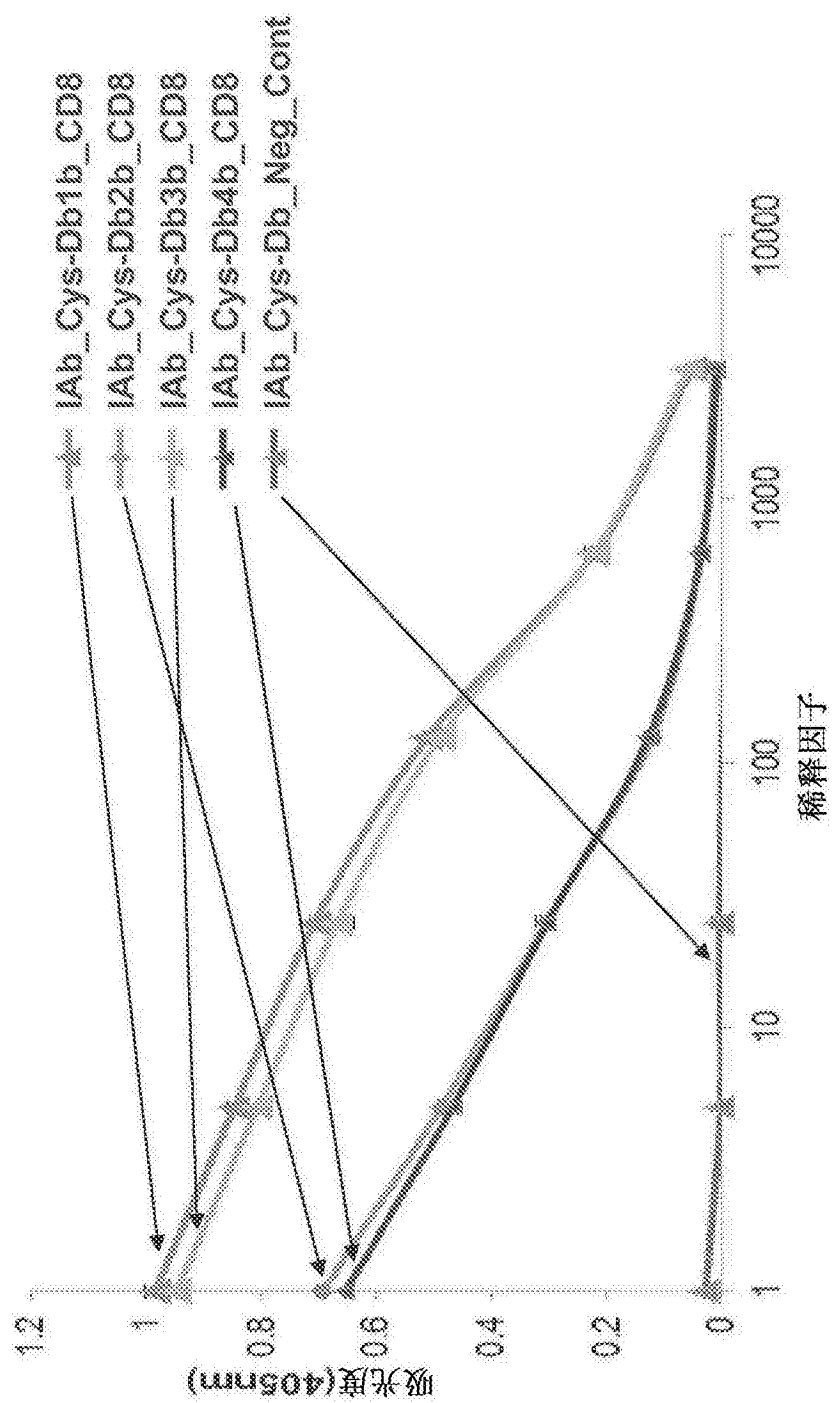


图 25

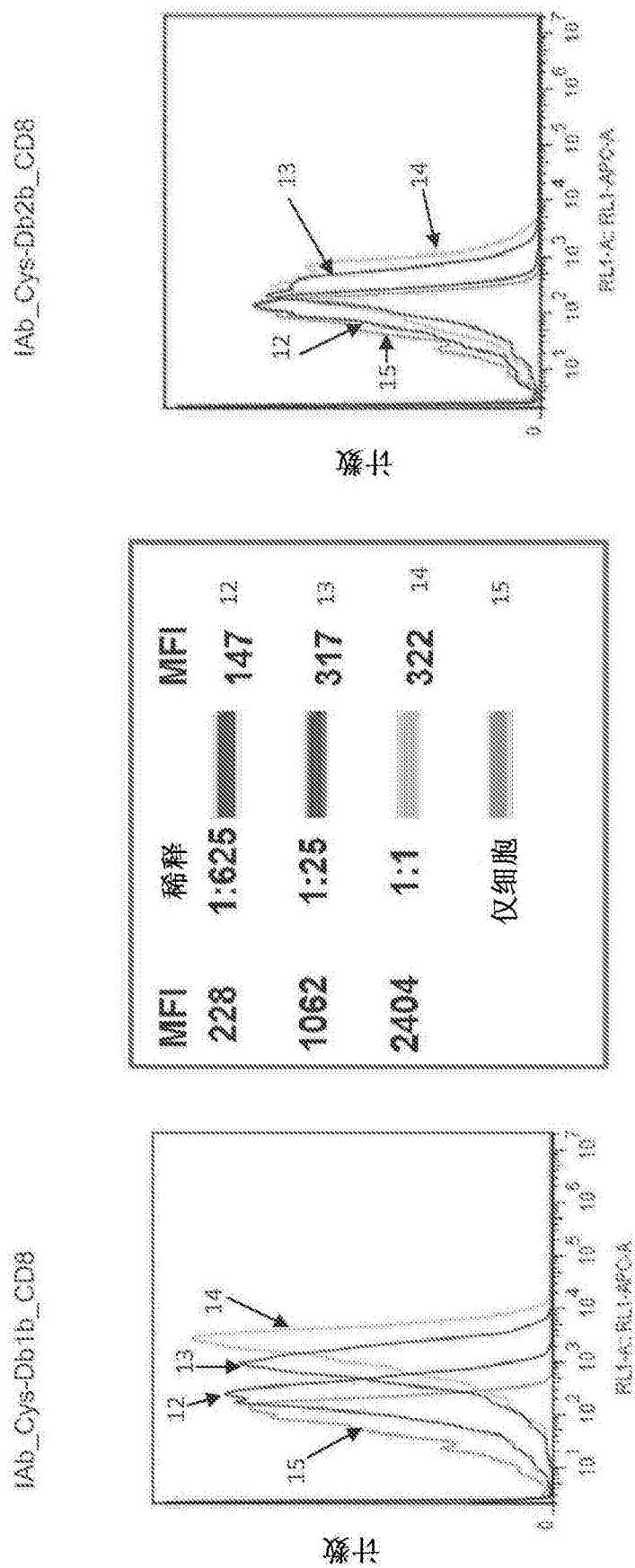


图 26A

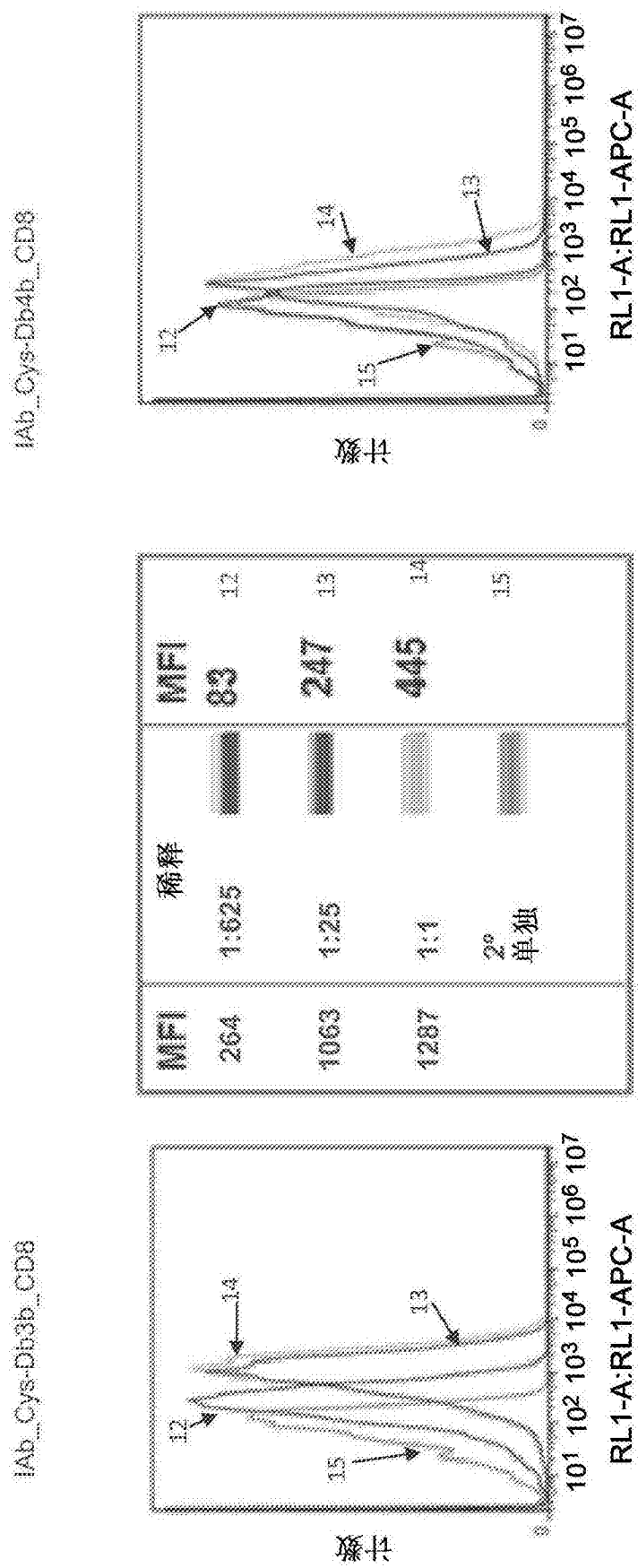


图 26B

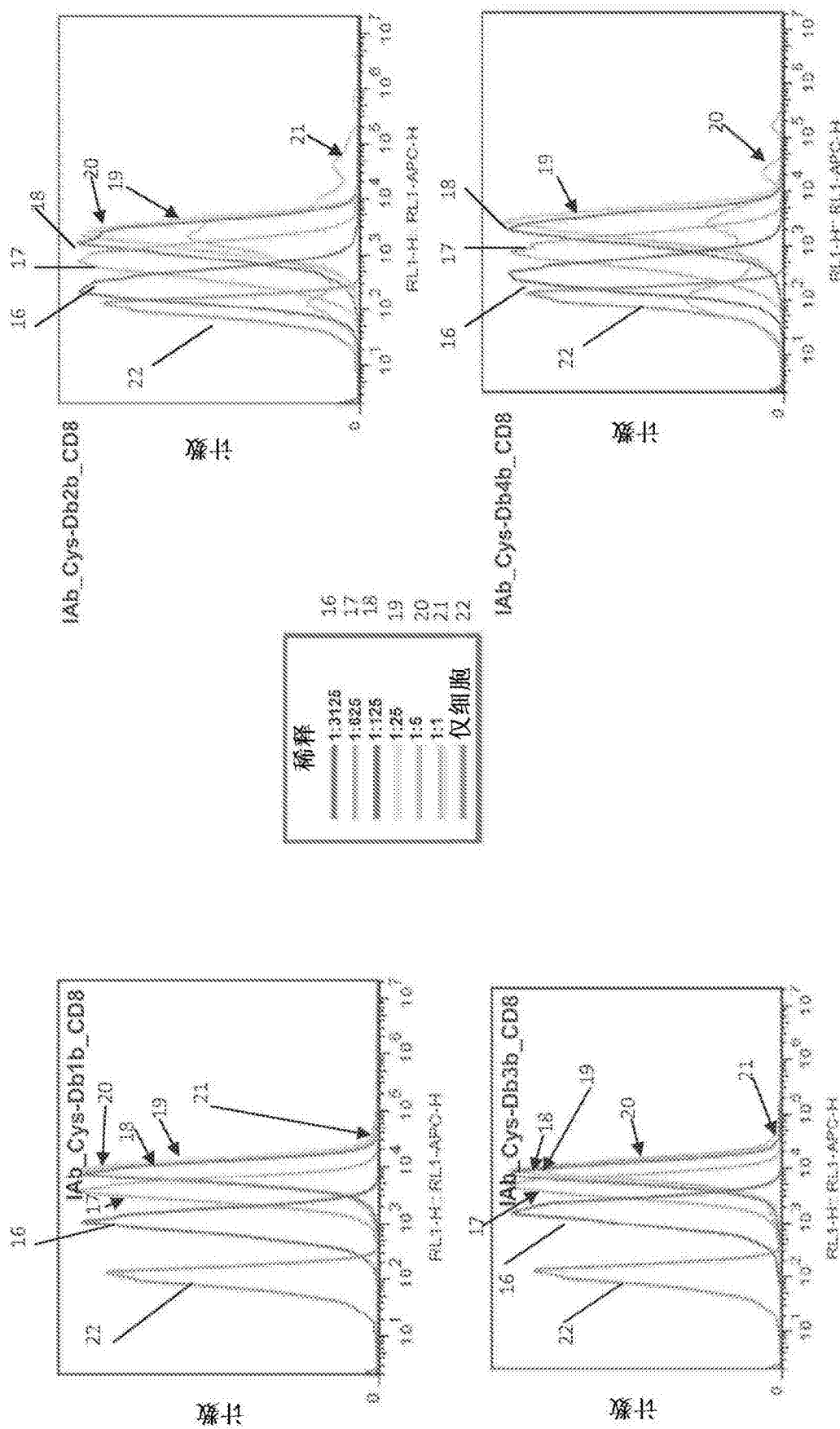


图 27

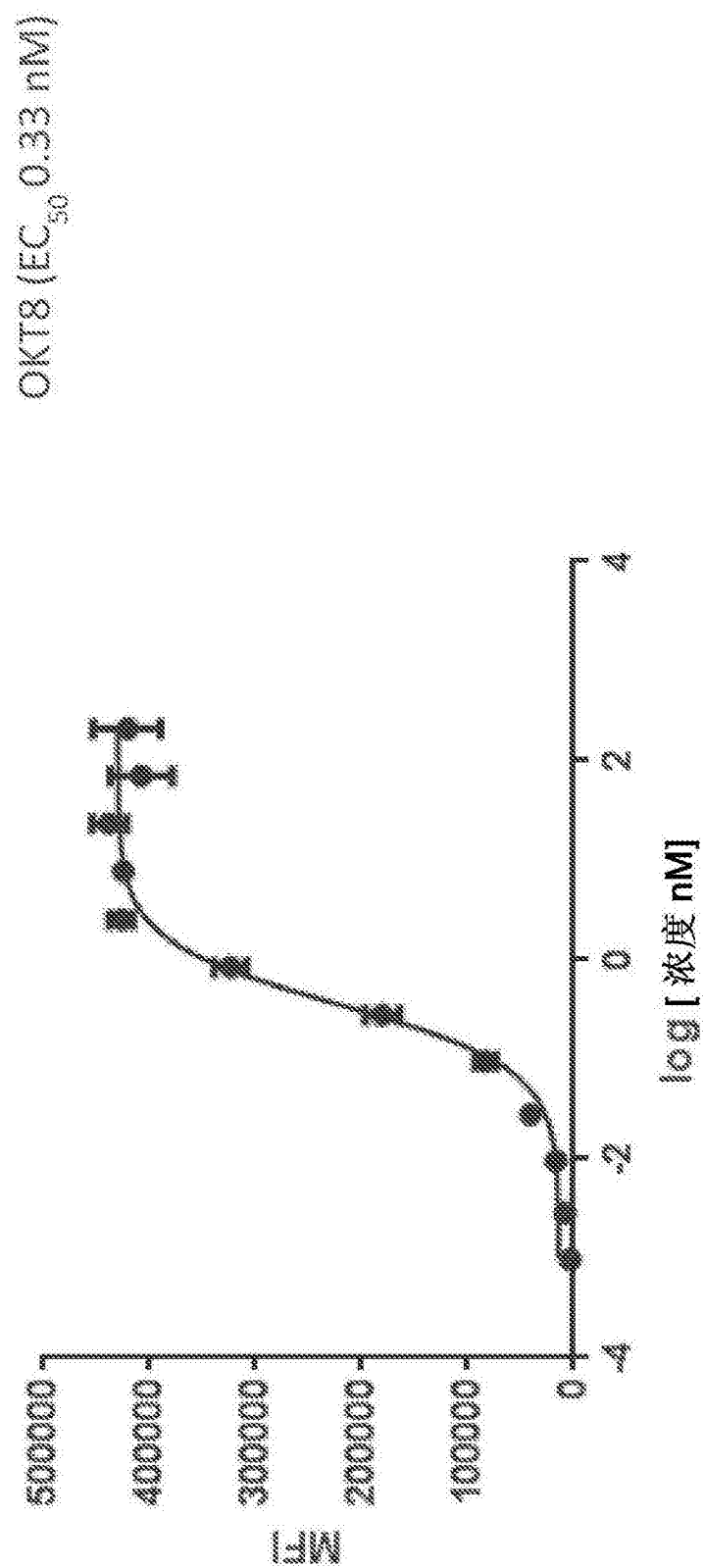


图 28

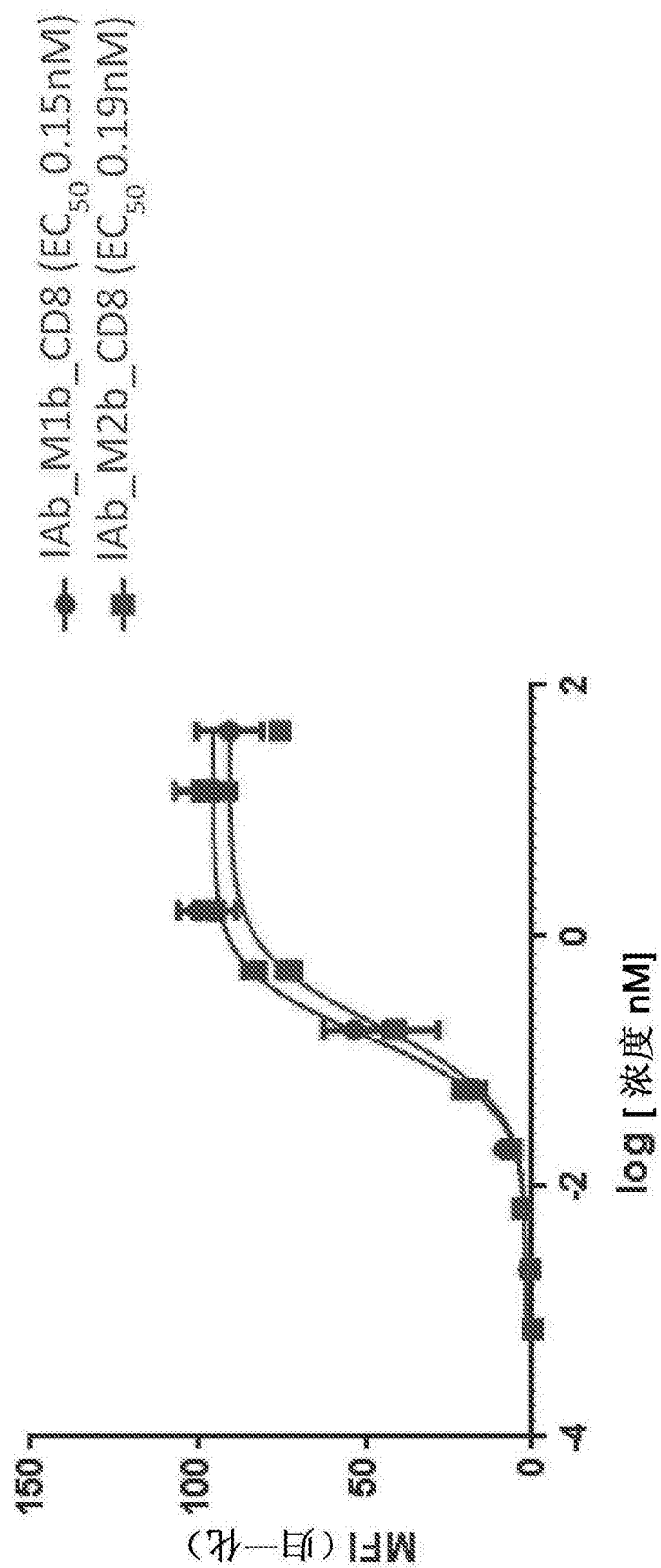


图 29A

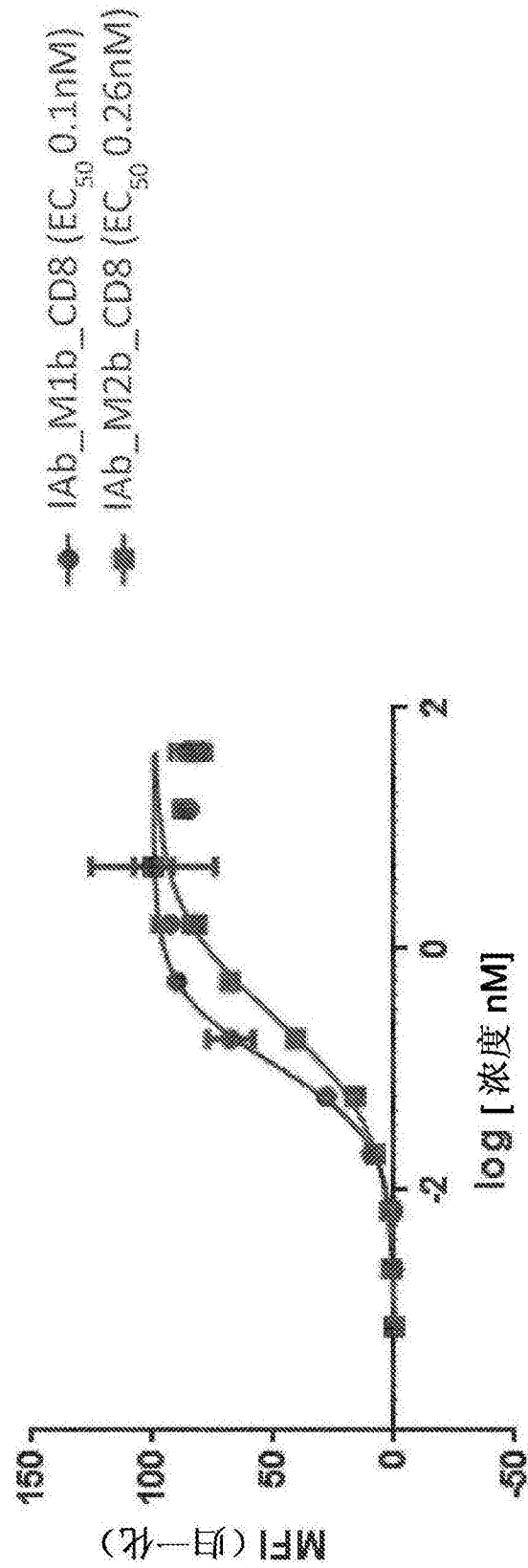


图 29B

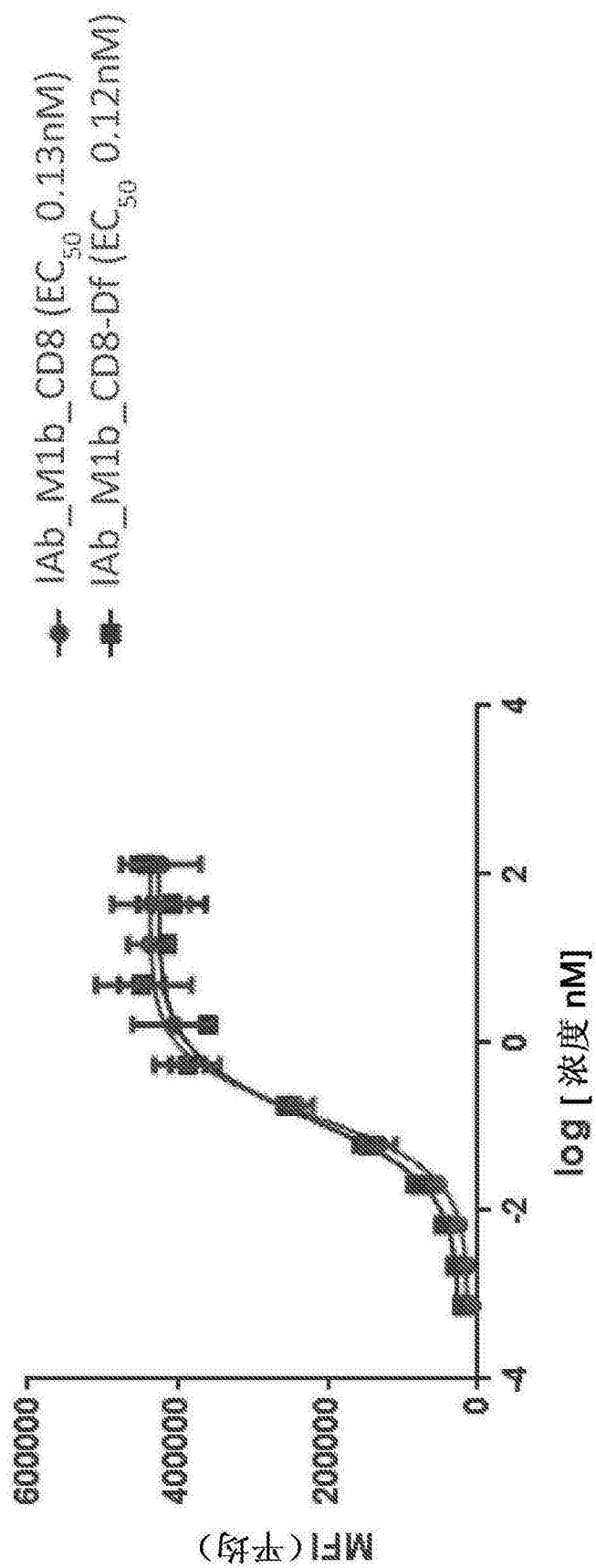


图 29C

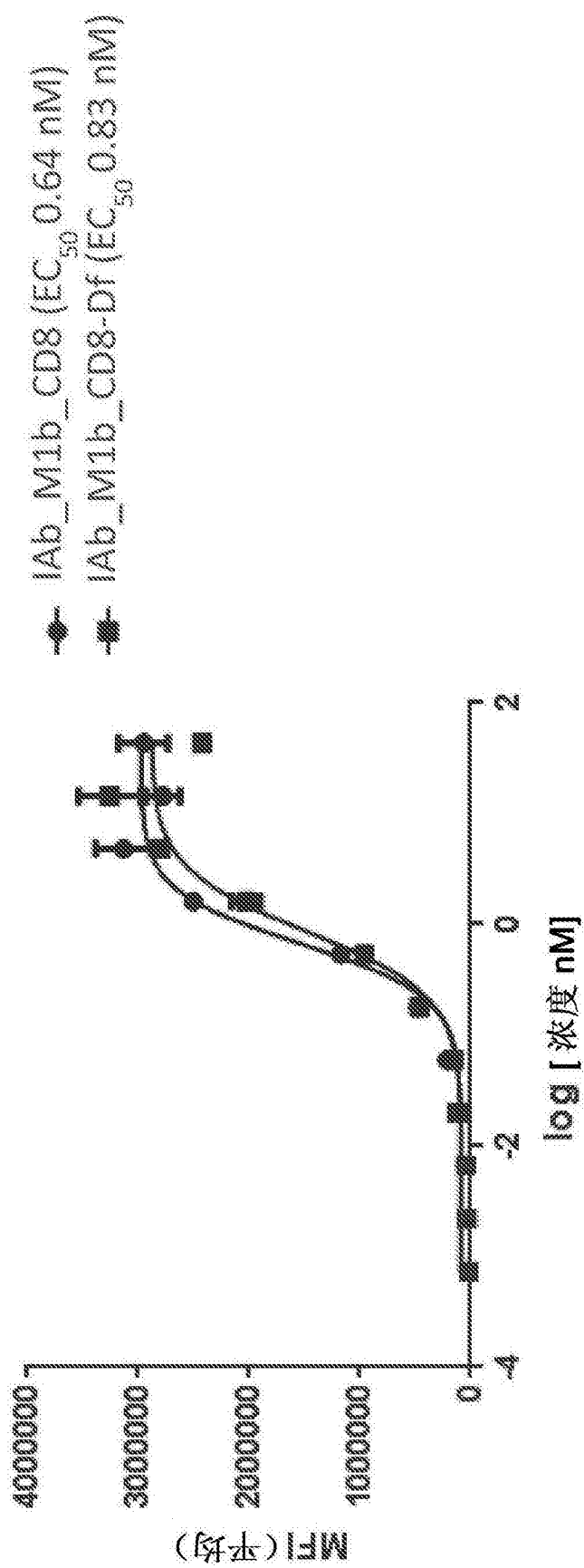


图 29D

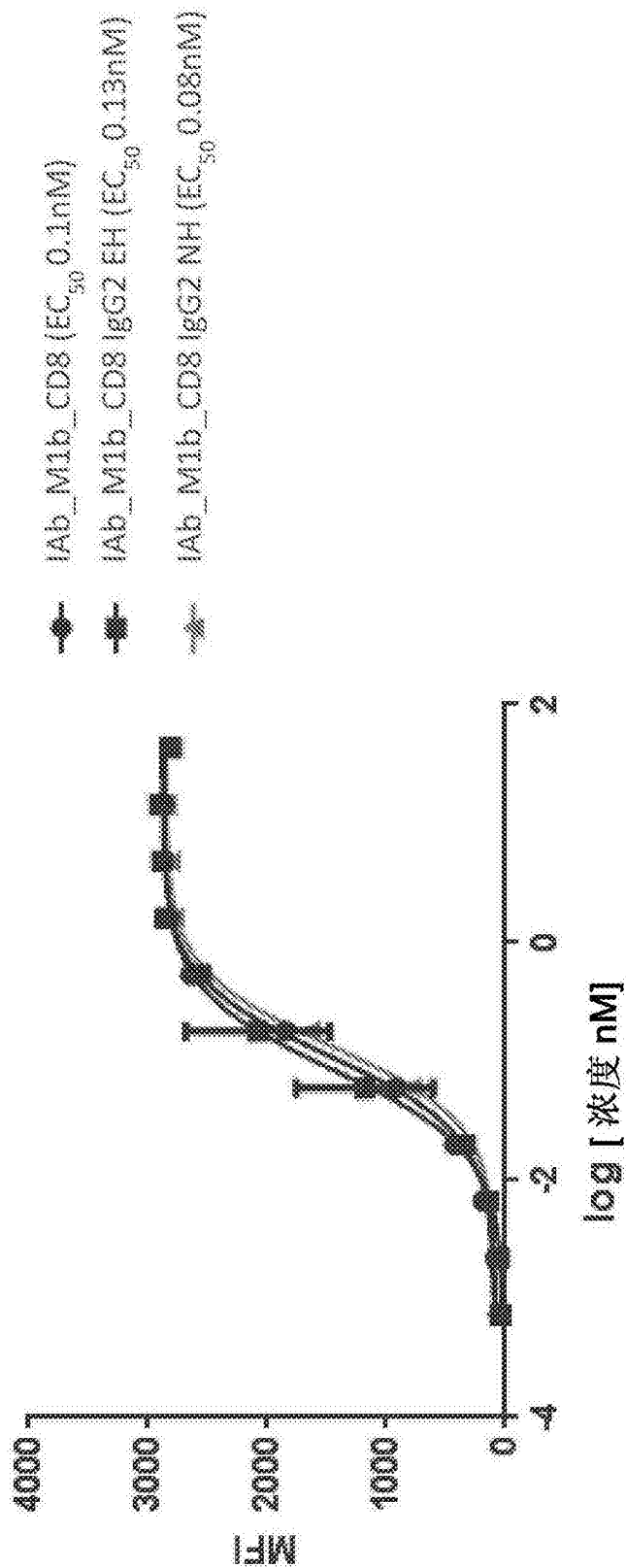


图 29E

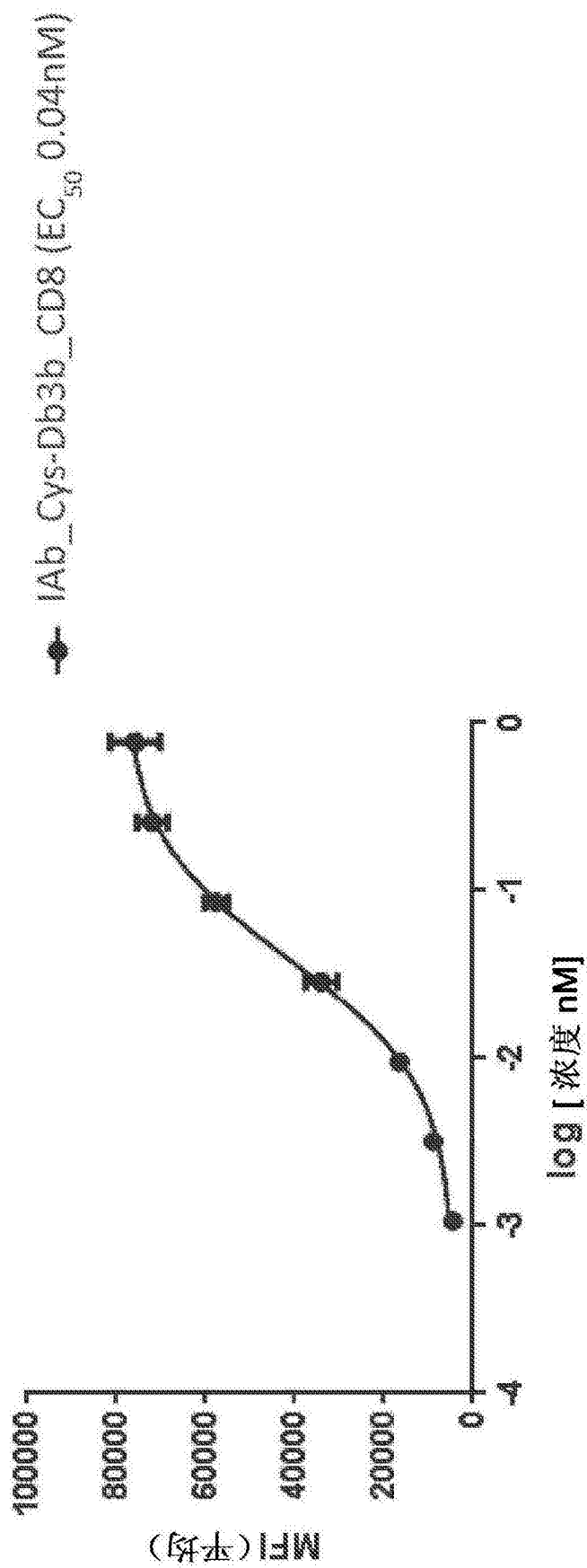


图 30A

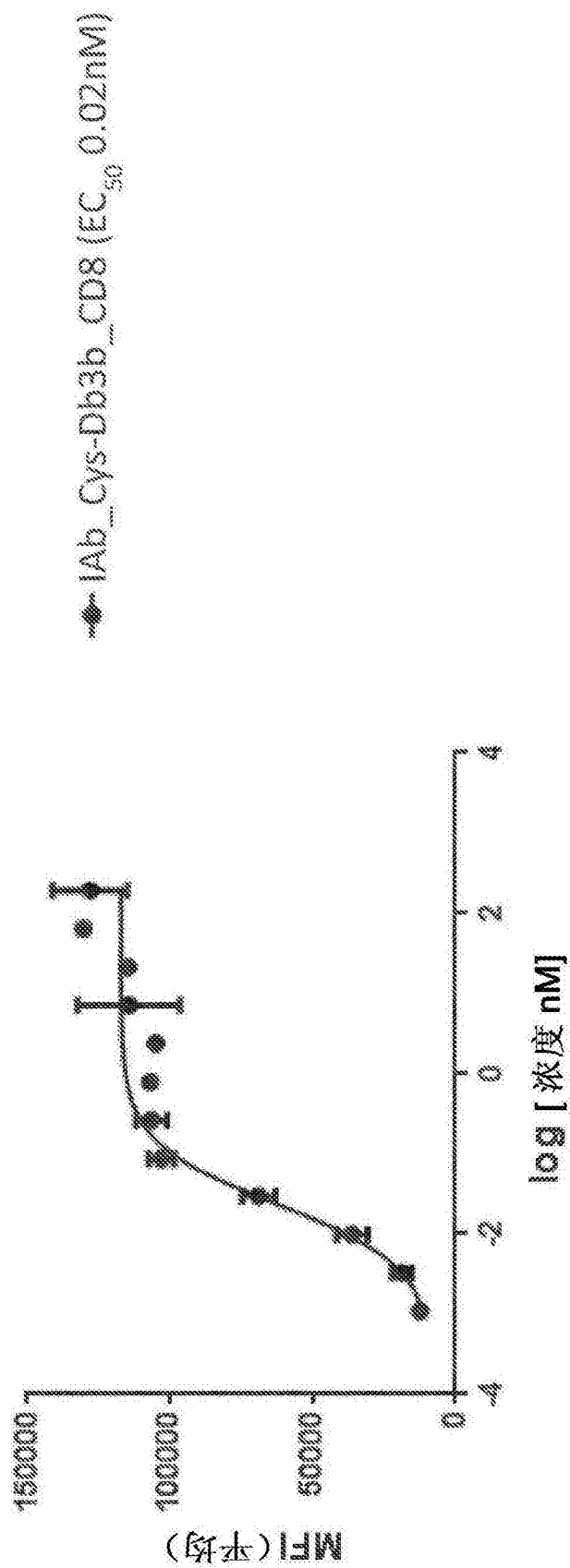


图 30B

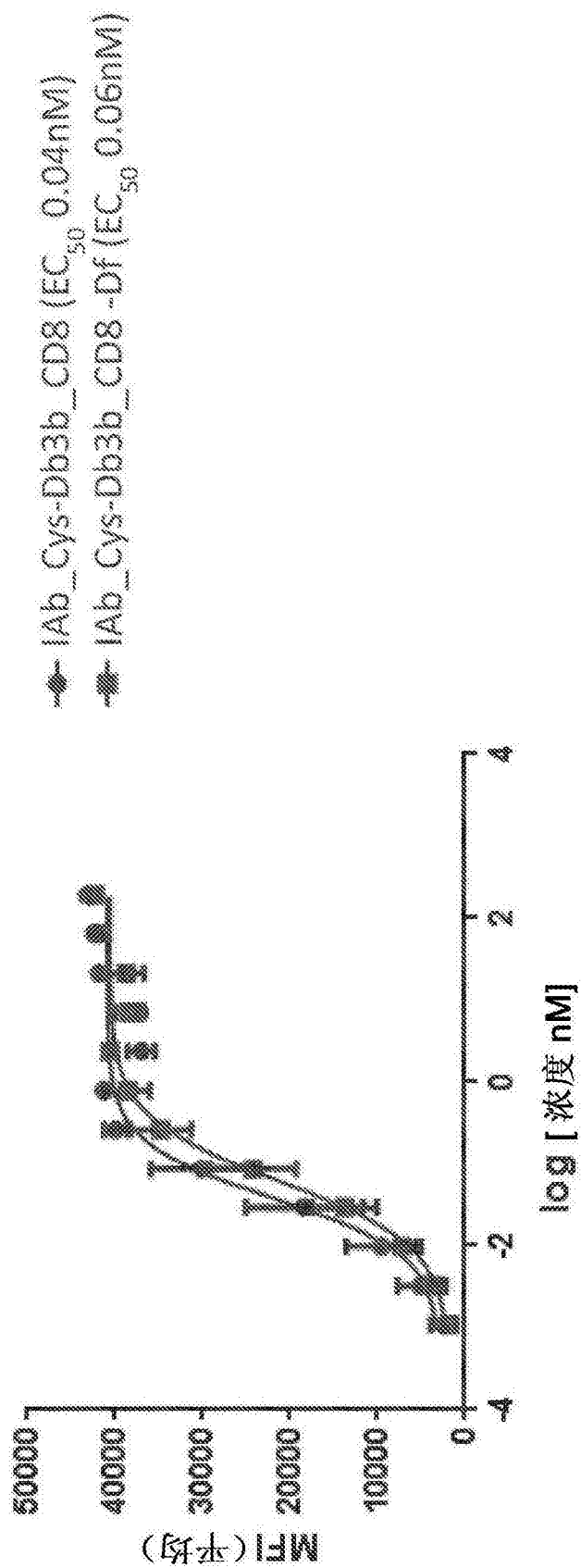


图 30C

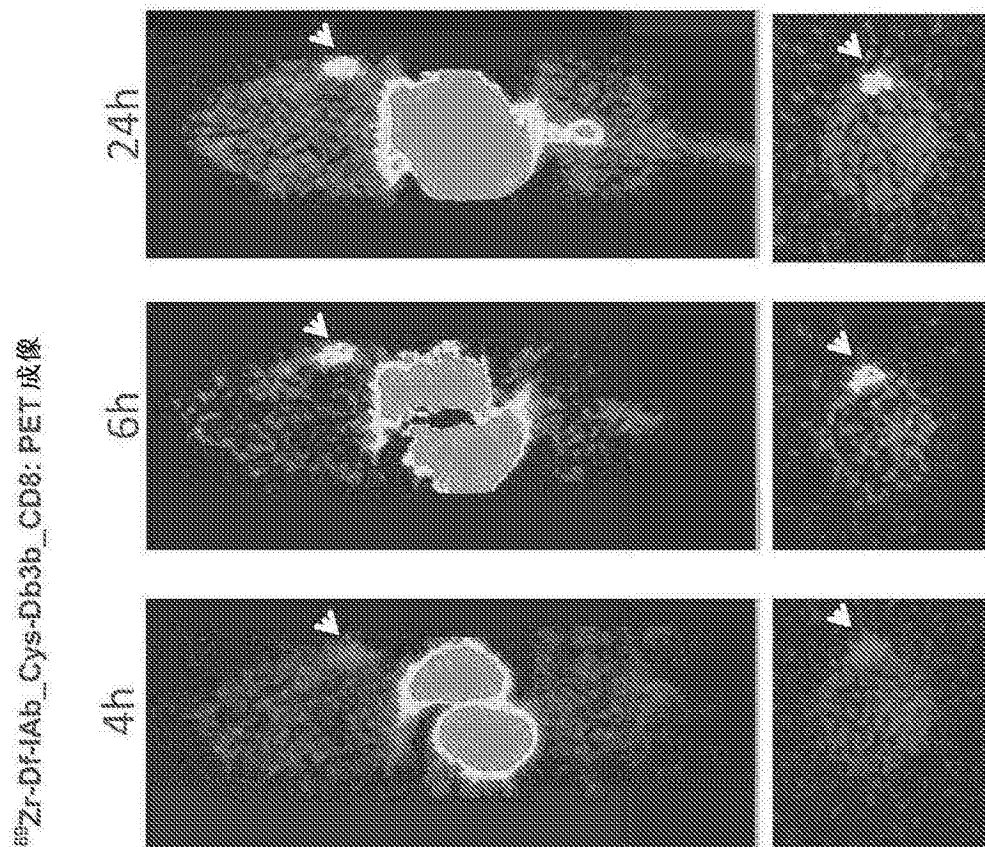


图 31

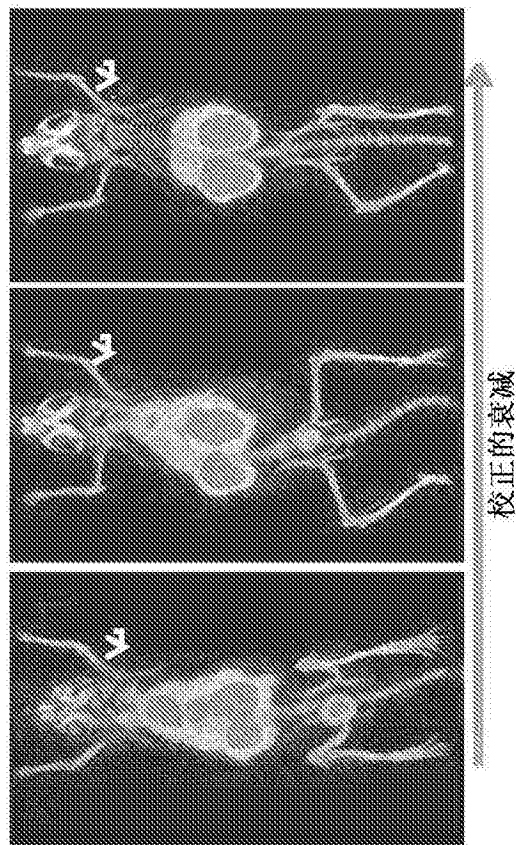


图 32A

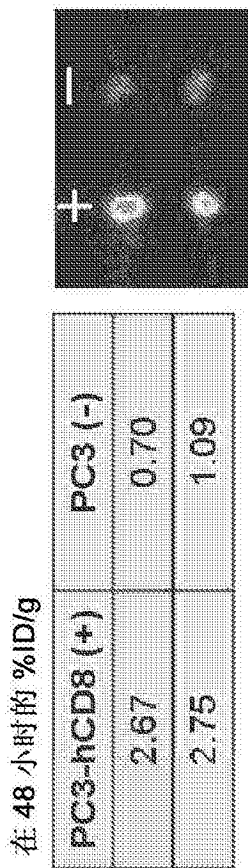
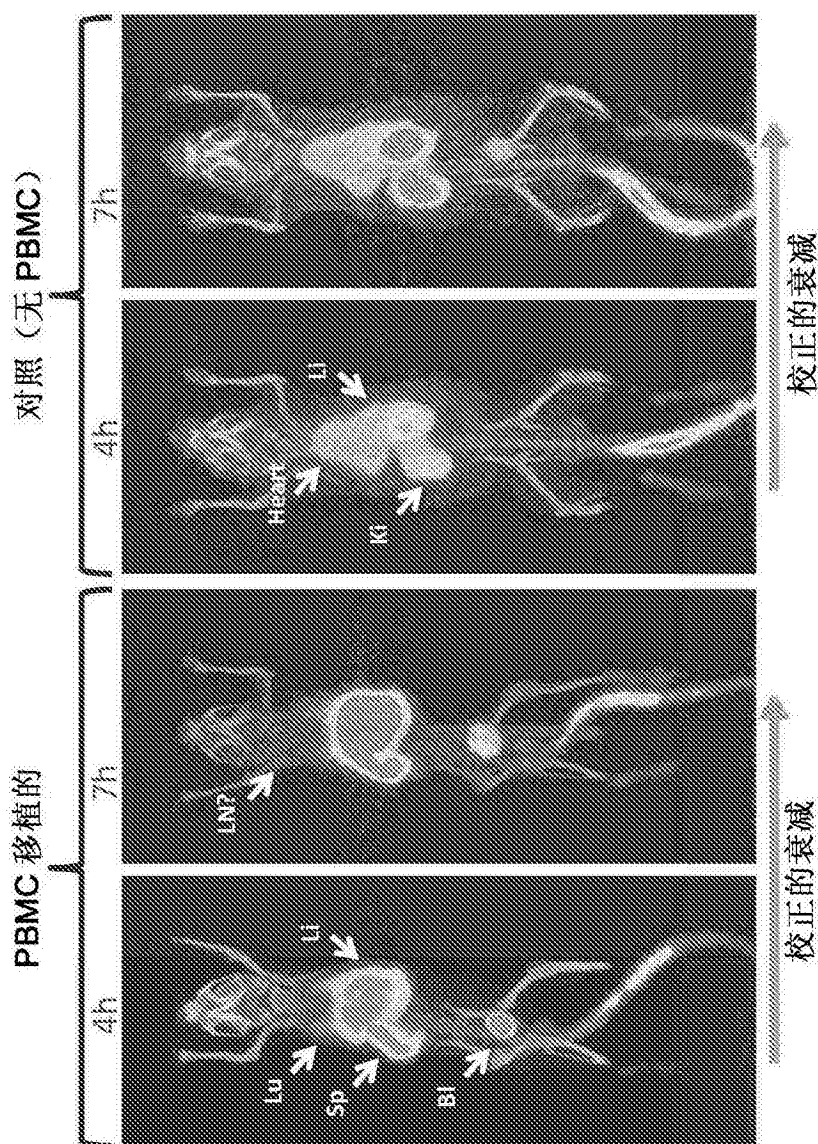


图 32B



在 7h, 在 PBMC 移植的 NSG 小鼠中的体内分布显示:

在脾中 2.1 倍更高的摄取,

在肾中 4.0 倍较低的活性,

在肝中 1.7 倍较高的活性, 和

在血液中 3.1 倍较低的活性, 与对照的相比

图 33