



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109153727 A

(43)申请公布日 2019.01.04

(21)申请号 201780027726.6

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

(22)申请日 2017.04.13

11256

## (30)优先权数据

62/323,432 2016.04.15 US

代理人 陈文平 黄海波

## (85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.11.02

## (51)Int.Cl.

C07K 16/46(2006.01)

## (86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2017/050463 2017.04.13

C12N 5/10(2006.01)

## (87)PCT国际申请的公布数据

W02017/177337 EN 2017.10.19

C07K 16/28(2006.01)

## (71)申请人 酵活有限公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

C07K 16/30(2006.01)

## (72)发明人 D·M·米尔斯

C12N 15/13(2006.01)

A61K 35/17(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书4页 说明书88页 附图4页

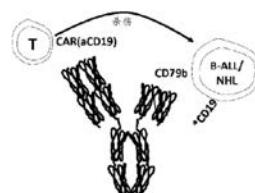
## (54)发明名称

靶向免疫治疗剂的多特异性抗原结合构建

体

## (57)摘要

描述了靶向免疫治疗剂的多特异性抗原结合构建体。所述多特异性抗原结合构建体包含结合免疫治疗剂(例如CAR-T细胞或双特异性T细胞衔接子)的第一抗原结合多肽构建体和结合肿瘤相关抗原的第二抗原结合多肽构建体。还描述了使用所述多特异性抗原结合构建体重新定向或增强所述免疫治疗剂与肿瘤细胞的结合的方法,以及治疗用所述免疫治疗剂治疗复发或失败的患者的方法。



形式	TAA结合因子
	scFv
	Fab
	scFv-scFv
	Fab-scFv
	Fab-Fab
	scFv

1. 一种使肿瘤细胞与免疫治疗剂的结合重新定向的方法,所述方法包括使所述免疫治疗剂与多特异性抗原结合构建体接触,所述多特异性抗原结合构建体包含结合所述免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述免疫治疗剂是:

i) 经工程化为表达结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞,或

ii) 能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂,

并且其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位不同。

2. 一种延长免疫治疗剂在正在经历或已经经历所述免疫治疗剂治疗的患者中的疗效的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的多特异性抗原结合构建体,所述多特异性抗原结合构建体包含结合所述免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述免疫治疗剂是:

i) 经工程化为表达结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞,或

ii) 能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂,

并且其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位不同。

3. 一种治疗正在经历或已经经历免疫治疗剂治疗的患者的癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的多特异性抗原结合构建体,所述多特异性抗原结合构建体包含结合所述免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述免疫治疗剂是:

i) 经工程化为表达结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞,或

ii) 能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂,

并且其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位不同。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述患者已经经历了使用所述免疫治疗剂的预先治疗。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述患者已经复发或未能对所述预先治疗产生反应。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中由于所述第二肿瘤相关抗原表位的表达减少或丧失,所述患者已经复发或未能对所述预先治疗产生反应。

7. 根据权利要求5所述的方法,其中由于所述第二肿瘤相关抗原表位的表达异质性,所述患者已经复发或未能对所述预先治疗产生反应。

8. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述患者正在经历使用所述免疫治疗剂的治疗并且所述多特异性抗原结合构建体作为所述免疫治疗剂的辅助治疗施用。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述免疫治疗剂是工程化T细胞或工程化NK细胞并且其中所述T细胞或NK细胞经进一步工程化为共同表达所述多特异性抗原结合构建体。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述免疫治疗剂是工程化T细胞或工程化NK细胞。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述工程化T细胞或工程化NK细胞经工程化为表

达包含所述抗原结合结构域的嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR)。

12. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述免疫治疗剂是能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述治疗剂是双特异性抗体。

14. 根据权利要求12所述的方法,其中所述治疗剂是双特异性T细胞衔接子 (BiTE)。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合多肽构建体结合所述免疫治疗剂的抗原结合结构域。

16. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合多肽构建体结合所述免疫治疗剂未参与抗原结合的区域。

17. 一种激活T细胞或NK细胞的方法,其包括使工程化为表达嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR) 的T细胞或NK细胞与多特异性抗原结合构建体接触,所述多特异性抗原结合构建体包含结合所述CAR或TCR的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述CAR或TCR包含结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述细胞为T细胞。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述T细胞经工程化为表达CAR。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位是同一抗原的表位。

21. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位是不同抗原的表位。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述第一肿瘤相关抗原表位与血液学癌症相关。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述第二肿瘤相关抗原表位与血液学癌症相关。

24. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述第一肿瘤相关抗原表位由恶性B细胞表达。

25. 根据权利要求1至21和24中任一项所述的方法,其中所述第二肿瘤相关抗原表位由恶性B细胞表达。

26. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述第一肿瘤相关抗原表位与实体瘤相关。

27. 根据权利要求1至21和26中任一项所述的方法,其中所述第二肿瘤相关抗原表位与实体瘤相关。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗原结合构建体还包含支架并且所述第一和第二抗原结合多肽构建体与所述支架连接。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述支架包含Fc。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述Fc包含第一Fc多肽和第二Fc多肽,其各自均含CH3序列。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述第一抗原结合多肽构建体与所述第一Fc多肽连接而所述第二抗原结合多肽构建体与所述第二Fc多肽连接。

32. 根据权利要求30或31所述的方法,其中所述Fc是在至少一个CH3序列中包含氨基酸修饰的异二聚Fc。

33. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法,其中所述第一和第二抗原结合多肽构建体通过接头接合。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的方法,其中所述第一和第二抗原结合多肽构建体各自独立地为Fab、scFv或单结构域抗体(sdAb)。

35. 根据权利要求1至34中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗原结合构建体还包含一个或多个附加抗原结合多肽构建体。

36. 一种多特异性抗原结合构建体,其包含:

结合免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体,和

结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,

其中所述免疫治疗剂是:

i) 经工程化为表达结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞,或

ii) 能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂,

并且其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位不同。

37. 根据权利要求36所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位是同一抗原的表位。

38. 根据权利要求36所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位是不同抗原的表位。

39. 根据权利要求36至38中任一项所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述多特异性抗原结合构建体与所述免疫治疗剂和所述第一肿瘤相关抗原表位的结合激活所述工程化T细胞或工程化NK细胞,或被所述治疗剂结合的T细胞。

40. 根据权利要求36至39中任一项所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述免疫治疗剂是工程化T细胞或工程化NK细胞。

41. 根据权利要求40所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述工程化T细胞或工程化NK细胞经工程化为表达包含所述抗原结合结构域的嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。

42. 根据权利要求36至39中任一项所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述免疫治疗剂是能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂。

43. 根据权利要求42所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述治疗剂为双特异性抗体。

44. 根据权利要求42所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述治疗剂为双特异性T细胞衔接子(BiTE)。

45. 根据权利要求36至44中任一项所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述第一抗原结合多肽构建体结合所述免疫治疗剂的抗原结合结构域。

46. 根据权利要求36至44中任一项所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述第一抗原结合多肽构建体结合所述免疫治疗剂未参与抗原结合的区域。

47. 根据权利要求36至46中任一项所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述多特异

性抗原结合构建体还包含支架并且所述第一和第二抗原结合多肽构建体与所述支架连接。

48. 根据权利要求47所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述支架为Fc。

49. 根据权利要求48所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述Fc包含第一Fc多肽和第二Fc多肽,其各自均含CH3序列。

50. 根据权利要求49所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述第一抗原结合多肽构建体与所述第一Fc多肽连接而所述第二抗原结合多肽构建体与所述第二Fc多肽连接。

51. 根据权利要求49或50所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述Fc是在至少一个CH3序列中包含氨基酸修饰的异二聚Fc。

52. 根据权利要求36至46中任一项所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述第一和第二抗原结合多肽构建体通过接头接合。

53. 根据权利要求36至52中任一项所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述第一和第二抗原结合多肽构建体各自独立地为Fab、scFv或单结构域抗体(sdAb)。

54. 根据权利要求36至53中任一项所述的多特异性抗原结合构建体,其中所述多特异性抗原结合构建体还包含一个或多个附加抗原结合多肽构建体。

55. 一种药物组合物,其包含根据权利要求36至53中任一项所述的多特异性抗原结合构建体,和药学上可接受的载体。

56. 编码根据权利要求36至53中任一项所述的多特异性抗原结合构建体的核酸。

57. 一种宿主细胞,其包含编码根据权利要求36至53中任一项所述的多特异性抗原结合构建体的核酸。

58. 根据权利要求36至53中任一项所述的多特异性抗原结合构建体在药剂生产中的用途。

59. 根据权利要求58所述的用途,其中所述药剂用于使肿瘤细胞与免疫治疗剂的结合重新定向。

60. 根据权利要求58所述的用途,其中所述药剂用于延长免疫治疗剂在正在经历或已经经历所述免疫治疗剂治疗的患者中的疗效。

61. 根据权利要求58所述的用途,其中所述药剂用于治疗正在经历或已经经历免疫治疗剂治疗的患者的癌症。

62. 根据权利要求58所述的用途,其中所述药剂用于激活经工程化为表达嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的T细胞或NK细胞。

## 靶向免疫治疗剂的多特异性抗原结合构建体

### [0001] 背景

[0002] 与传统抗癌化学治疗剂相比,免疫治疗剂显示出增强的克服肿瘤遗传抗性机制的能力和降低的健康组织毒性特征。具体而言,使免疫介导的肿瘤细胞溶解朝向肿瘤相关抗原(TAA)已经彻底改变了造血和实体组织肿瘤治疗方案,为许多患者提供了持久缓解。然而,出现了抗原定向的免疫疗法抗性机制,包括TAA下调,从而需要开发精细治疗选择。

[0003] 用表达工程化、TAA特异性、嵌合抗原受体(CAR)的T淋巴细胞进行的自体过继细胞疗法是复发/难治性B细胞急性淋巴母细胞性白血病(B-ALL)患者中特别有效的治疗方式,是目前对于许多肿瘤治疗适应症而言正在追求的。类似地,双特异性T细胞衔接子(BiTE)生物制剂通过将TCR CD3信号传导亚基与TAA共同衔接来促进靶向细胞毒性反应,并且被批准用于B-ALL治疗。虽然这些方法可以利用抗原特异性细胞毒性和长寿免疫记忆的适应性免疫潜力,但是相当大比例的BiTE和CAR-T治疗患者由于TAA阴性肿瘤变体长出而复发。

### [0004] 发明概述

[0005] 本文描述靶向免疫治疗剂的多特异性抗原结合构建体及其使用方法。本公开的某些方面涉及一种使肿瘤细胞与免疫治疗剂的结合重新定向的方法,所述方法包括使所述免疫治疗剂与多特异性抗原结合构建体接触,所述多特异性抗原结合构建体包含结合所述免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述免疫治疗剂是:i)经工程化为表达结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞,或ii)能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂,并且其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位不同。

[0006] 本公开的一些方面涉及一种延长免疫治疗剂在正在经历或已经经历所述免疫治疗剂治疗的患者中的疗效的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的多特异性抗原结合构建体,所述多特异性抗原结合构建体包含结合所述免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述免疫治疗剂是:i)经工程化为表达结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞,或ii)能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂,并且其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位不同。

[0007] 本公开的一些方面涉及一种治疗正在经历或已经经历免疫治疗剂治疗的患者的癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的多特异性抗原结合构建体,所述多特异性抗原结合构建体包含结合所述免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述免疫治疗剂是:i)经工程化为表达结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞,或ii)能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂,并且其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位不同。

[0008] 本公开的一些方面涉及一种激活T细胞或NK细胞的方法,其包括使工程化为表达嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的T细胞或NK细胞与多特异性抗原结合构建体接触,所述多特异性抗原结合构建体包含结合所述CAR或TCR的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述CAR或TCR包含结合第二肿瘤

相关抗原表位的抗原结合结构域。

[0009] 本公开的一些方面涉及一种多特异性抗原结合构建体,其包含:结合免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体,和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述免疫治疗剂是:i)经工程化为表达结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞,或ii)能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂,并且其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位不同。

[0010] 本公开的一些方面涉及编码如本文所描述的多特异性抗原结合构建体的核酸。一些方面涉及包含编码如本文所描述的多特异性抗原结合构建体的核酸的宿主细胞。

[0011] 本公开的一些方面涉及多特异性抗原结合构建体使肿瘤细胞与免疫治疗剂的结合重新定向的用途,所述多特异性抗原结合构建体包含结合免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述免疫治疗剂是:i)经工程化为表达结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞,或ii)能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂,并且其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位不同。

[0012] 本公开的一些方面涉及多特异性抗原结合构建体延长免疫治疗剂在正在经历或已经经历所述免疫治疗剂治疗的患者中的疗效的用途,所述多特异性抗原结合构建体包含结合免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述免疫治疗剂是:i)经工程化为表达结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞,或ii)能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂,并且其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位不同。

[0013] 本公开的一些方面涉及多特异性抗原结合构建体治疗正在经历或已经经历免疫治疗剂治疗的患者的癌症的用途,所述多特异性抗原结合构建体包含结合免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述免疫治疗剂是:i)经工程化为表达结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞,或ii)能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂,并且其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位不同。

[0014] 本公开的一些方面涉及多特异性抗原结合构建体激活工程化为表达嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的T细胞或NK细胞的用途,所述多特异性抗原结合构建体包含结合所述CAR或TCR的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述CAR或TCR包含结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域。

[0015] 本公开的一些方面涉及一种包含多特异性抗原结合构建体和药学上可接受的载体的药物组合物,所述多特异性抗原结合构建体包含结合免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述免疫治疗剂是:i)经工程化为表达结合第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞,或ii)能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂,并且其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位不同。

[0016] 本公开的一些方面涉及多特异性抗原结合构建体在药剂生产中的用途,所述多特异性抗原结合构建体包含结合免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体和结合第一肿瘤相关抗原表位的第二抗原结合多肽构建体,其中所述免疫治疗剂是:i)经工程化为表达结合

第二肿瘤相关抗原表位的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞,或ii)能够结合T细胞和第二肿瘤相关抗原表位的治疗剂,并且其中所述第一和第二肿瘤相关抗原表位不同。

[0017] 附图简述

[0018] 图1描绘(A)靶向作为肿瘤相关抗原的抗CD19CAR-T和CD79b的多特异性抗原结合构建体的一个实施方案的示意图,及(B)描述的多特异性抗原结合构建体的一些示例性形式。

[0019] 图2描绘抗FLAG x抗间皮素(MSLN)双特异性抗体和抗FMC63id x抗MSLN双特异性抗体与MSLN+A1847细胞结合,而不与对照RPMI8226细胞结合(A),以及抗FLAG x抗BCMA双特异性抗体和抗FMC63id x抗BCMA双特异性抗体与BCMA+RPMI8226细胞结合,而不与对照A1847细胞结合(B)。

[0020] 图3描绘抗FMC63id x抗间皮素和抗FMC63id x抗BCMA双特异性抗体与HEK293(A)或原代CAR-T细胞(B)中稳定表达的含FMC63的抗CD19CAR构建体选择性结合。

[0021] 图4显示(A)CD19-CAR-T细胞与CD 19+Raji细胞,而不是CD19阴性SKOV3细胞共同培养后被稳健激活,并且(B)抗FMC63id x抗间皮素双特异性抗体使CAR-T细胞重新定向并且在MSLN+SKOV3细胞的存在下加强激活,并且抗FMC63id x抗BCMA双特异性抗体使CAR-T细胞重新定向并且在BCMA+RPMI8226细胞的存在下加强激活。

[0022] 发明详述

[0023] 本文描述了靶向免疫治疗剂的多特异性抗原结合构建体。具体地,所述多特异性抗原结合构建体能够结合免疫治疗剂和至少一种肿瘤相关抗原。在某些实施方案中,所述多特异性抗原结合构建体包含结合免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体和结合肿瘤相关抗原的第二抗原结合多肽构建体。在一些实施方案中,所述免疫治疗剂可以是效应细胞,例如工程化为表达结合肿瘤相关抗原的抗原结合结构域的T细胞或NK细胞。在一些实施方案中,所述免疫治疗剂可以是能够结合T细胞和肿瘤相关抗原的治疗剂。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所靶向的肿瘤相关抗原与免疫治疗剂所靶向的肿瘤相关抗原不同。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所靶向的肿瘤相关抗原与免疫治疗剂所靶向的肿瘤相关抗原相同,但多特异性抗原结合构建体和免疫治疗剂结合所述肿瘤相关抗原上的不同表位。

[0024] 本文还描述了使用多特异性抗原结合构建体重新定向或增强所述免疫治疗剂与肿瘤细胞的结合的方法。按照这些方法,多特异性抗原结合构建体通过第一抗原结合多肽构建体结合免疫治疗剂,并且通过第二抗原结合多肽结合肿瘤细胞上的肿瘤相关抗原。第二抗原结合多肽结合与免疫治疗剂所靶向的肿瘤相关抗原不同的肿瘤相关抗原,或结合肿瘤相关抗原上与免疫治疗剂所靶向的表位不同的表位。因此,在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体使免疫治疗剂的结合从其同源肿瘤相关抗原或表位重新定向到第二抗原结合多肽构建体所靶向的肿瘤相关抗原或表位。在一些实施方案中,免疫治疗剂保持与肿瘤细胞上其同源肿瘤相关抗原或表位结合,并且还通过多特异性抗原结合构建体及其同源肿瘤相关抗原或表位结合肿瘤细胞。在这个实施方案中,因此可以增强肿瘤细胞与免疫治疗剂的结合。在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可以用作后续或辅助疗法。例如,对于正在经历或先前已经经历免疫治疗剂治疗并且存在免疫治疗剂靶肿瘤相关抗原表达丧失或减少风险的患者而言,对于可能通过替代机制变得对免疫治疗剂定向细胞溶解无

反应的患者,或对于在免疫治疗剂靶肿瘤相关抗原的表达上显示出显著异质性的患者而言。

[0025] 定义

[0026] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域中普通技术人员通常所理解的相同含义。

[0027] 如本文中所用,术语“约”是指给定值近似 $+/-10\%$ 的变化。应当理解,无论是否具体提及,此类变化总是包括在本文提供的任何给定值中。

[0028] 在提供值的范围的情况下,应当理解,除非上下文另有明确指示,否则介于该范围上限和下限之间的每个中间值,至下限单位的十分之一,均涵盖在该范围内,并且这些中间值中的每一个形成了本公开的实施方案。这些中间值还可以表示规定范围内包括的较小范围的上限和下限,并且此类较小范围中的每一个也形成了本公开的实施方案,以规定范围内明确排除的任何限值为条件。

[0029] 当在本文中结合术语“包含”使用时,使用词语“一”或“一个(种)”可以意指“一个”,但也与“一个或多个”、“至少一个”和“一个或一个以上”的含义一致。

[0030] 如本文中所用,术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”及其语法变型是包含性或开放式的,并且不排除附加的、未列举的要素和/或方法步骤。当在本文中连同组合物、用途或方法使用时,术语“基本上由……组成”表示可能存在附加要素和/或方法步骤,但是这些附加不会实质性影响所述组合物、方法或用途的作用方式。当在本文中连同组合物、用途或方法使用时,术语“由……组成”排除了另外的要素和/或方法步骤的存在。本文描述为包含某些要素和/或步骤的组合物、用途或方法也可以在某些实施方案中基本上由那些要素和/或步骤组成,而在其它实施方案中由那些要素和/或步骤组成,无论这些实施方案是否特别提到。

[0031] 考虑到就本文公开的任何方法、用途或组合物而论,可以实施本文所讨论的任何实施方案,反之亦然。

[0032] 多特异性抗原结合构建体

[0033] 本文描述了能够结合免疫治疗剂和至少一种肿瘤相关抗原的多特异性抗原结合构建体。在某些实施方案中,所述多特异性抗原结合构建体包含结合免疫治疗剂的第一抗原结合多肽构建体和结合肿瘤相关抗原的第二抗原结合多肽构建体。在一些实施方案中,所述多特异性抗原结合构建体可包含一个或多个各自结合肿瘤相关抗原的附加抗原结合多肽构建体。在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所包含的每个抗原结合多肽构建体特异性结合其靶抗原。

[0034] 术语“抗原结合构建体”是指能够结合抗原的试剂,例如多肽或多肽复合物。在一些方面中,抗原结合构建体可以是特异性结合目标靶抗原的多肽。抗原结合构建体可以是单体、二聚体、多聚体、蛋白质、肽、蛋白或蛋白复合物、抗体、抗体片段、Fab、scFv、单结构域抗体(sdAb)、VHH等。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可包括与支架连接的一个或多个抗原结合部分(例如Fab、scFv、VHH或sdAb)。下面描述了并且在实施例部分中提供了多特异性抗原结合构建体的实例。图1B中示出了多特异性抗原结合构建体的一些示例性、非限制性形式。

[0035] 在目前情况下,抗原结合构建体是多特异性抗原结合构建体。如本文中所用,术语

“多特异性抗原结合构建体”是具有两个或更多个各自具有独特结合特异性的抗原结合部分(例如抗原结合多肽构建体)的抗原结合构建体。在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个抗原结合部分(即为双特异性)。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含三个抗原结合部分(即为三特异性)。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含三个以上抗原结合部分,例如四个抗原结合部分。

[0036] 本公开的某些实施方案涉及双特异性抗原结合构建体。“双特异性抗原结合构建体”是指具有两个各自具有独特结合特异性的抗原结合部分(例如抗原结合多肽构建体)的抗原结合构建体。例如,双特异性抗原结合构建体可包含结合第一抗原上的表位的第一抗原结合部分和结合第二抗原上的表位的第二抗原结合部分,或双特异性抗原结合构建体可包含结合第一抗原上的表位的第一抗原结合部分和结合第一抗原上的不同表位的第二抗原结合部分。术语“双互补位(biparatopic)”可以用于指其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分结合同一抗原上的不同表位的双特异性抗原结合构建体。双互补位抗原结合构建体可通过两个表位结合单个抗原分子,或其可以各自通过不同表位结合两个单独抗原分子。

[0037] 在一些实施方案中,抗原结合构建体包含两个或更多个为抗原结合多肽构建体的抗原结合部分,每个抗原结合多肽构建体独立地为Fab、scFv或sdAb,任选地为骆驼来源(VHH)。

[0038] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体还包含支架和与支架可操作连接的抗原结合多肽构建体。如本文中所用,术语“可操作连接”意指所述组分处于容许其以预期方式作用的关系。

[0039] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可以是抗体或结合抗原的抗体片段。术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中互换用于指一个或多个免疫球蛋白基因或修饰形式的免疫球蛋白基因编码的多肽,该多肽特异性结合并识别分析物(例如抗原)。识别的免疫球蛋白基因包括 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 和 $\mu$ 恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为 $\kappa$ 或 $\lambda$ 。抗体或免疫球蛋白的“类别”是指其重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五大类抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的几种可进一步分为亚类(同种型),例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>和IgA<sub>2</sub>。对应于免疫球蛋白不同类别的重链恒定结构域分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。

[0040] 示例性免疫球蛋白(抗体)结构单元由两对多肽链组成,每一对具有一条“轻”链(约25kD)和一条“重”链(约50–70kD)。每条链的N端结构域限定主要负责抗原识别的约100至110个或更多个氨基酸的可变区。术语可变轻链(VL)和可变重链(VH)分别是指这些轻链和重链结构域。IgG1重链从N端到C端分别包含VH、CH1、CH2和CH3结构域。轻链从N端到C端包含VL和CL结构域。IgG1重链包含介于CH1和CH2结构域之间的铰链。在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含至少一个来自IgG、IgM、IgA、IgD或IgE的免疫球蛋白结构域。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含来自或源自基于免疫球蛋白的构建体例如双价抗体(diabody)或纳米抗体(nanobody)的一个或多个免疫球蛋白结构域。在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含至少一个来自重链抗体例如骆驼抗体的免疫球蛋白结构域。在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含至少一个来自哺乳动物抗体例如牛抗体、人抗体、骆驼抗体、小鼠抗体或任何嵌合抗体的免疫球蛋白结构域。

[0041] 如本文中所用的术语“高变区”(HVR)是指抗体可变结构域中在序列上是高变的和/或形成结构限定的环(“高变环”)的每个区域。通常,天然四价抗体包含六个HVR; VH中的三个(H1、H2、H3),和VL中的三个(L1、L2、L3)。HVR通常包含来自高变环和/或来自互补决定区(CDR)的氨基酸残基,后者具有最大序列可变性和/或参与抗原识别。除VH中的CDR1以外,CDR通常包含形成高变环的氨基酸残基。关于可变区中形成抗原结合区的部分,术语高变区(HVR)和互补决定区(CDR)在本文中可互换使用。Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,Sequences of Proteins of Immunological Interest(1983)和Chothia等,J Mol Biol,196:901-917(1987)已经描述了这种特定区域,其中所述定义包括相互比较时氨基酸残基的重叠或子集。然而,应用任一定义指CDR均旨在本文所定义和使用的术语范围内。

[0042] 抗原结合多肽构建体

[0043] 本文所述的多特异性抗原结合构建体包含两个或更多个抗原结合多肽构建体,其中一个结合(例如特异性结合)免疫治疗剂,并且其中一个或多个各自独立地结合(例如特异性结合)肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,一个或多个抗原结合多肽构建体是基于免疫球蛋白的构建体,例如抗体片段。在一些实施方案中,一个或多个抗原结合多肽构建体是基于非免疫球蛋白的抗体模拟形式,包括但不限于anticalin、fynomeric、affimer、alphabody、DARPin或avimer。

[0044] 在某些实施方案中,根据多特异性抗原结合构建体的预期应用,抗原结合多肽构建体可各自独立地为Fab、scFv或sdAb。

[0045] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所包含的抗原结合多肽构建体中的至少一个可以是Fab片段。“Fab片段”(也称为结合抗原的片段)含有轻链恒定结构域(CL)和重链第一恒定结构域(CH1)分别连同轻链和重链的可变结构域VL和VH。可变结构域包含参与抗原结合的CDR。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在重链CH1结构域C端添加了几个氨基酸残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所包含的抗原结合多肽构建体中的一个可以是Fab'片段。

[0046] 如本文中所用,术语“单链”是指包含通过肽键线性连接的氨基酸单体的分子。在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所包含的抗原结合多肽构建体中的一个或多个可以是单链Fab分子,即其中Fab轻链和Fab重链通过肽接头连接形成单一肽链的Fab分子。例如,在多特异性抗原结合构建体所包含的抗原结合多肽构建体为单链Fab分子的一些实施方案中,在单链Fab分子中Fab轻链的C端与Fab重链的N端连接。

[0047] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所包含的抗原结合多肽构建体中的至少一个可以是单链Fv(scFv)。“scFv”包括呈单一多肽链的抗体重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。scFv还可任选地包含介于VH和VL结构域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成所需结构以便抗原结合。在一些实施方案中,scFv可包括从其C端至VH的N端通过多肽接头连接的VL。可选地,scFv可包括通过其C端至VL的N端通过多肽链或接头连接的VH。对scFv的综述,参见Pluckthun在The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷中,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994)。

[0048] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所包含的抗原结合多肽构建体中的至少一个可以呈单结构域抗体(sdAb)形式。sdAb形式是指单个免疫球蛋白结构域。sdAb可

以是,例如骆驼来源的。骆驼抗体没有轻链并且其抗原结合位点由单个称为“VHH”的结构域组成。sdAb包含三个形成抗原结合位点的CDR/高变环:CDR1、CDR2和CDR3。sdAb相当稳定并且易于表达,例如具有抗体Fc链的融合物(参见,例如Harmsen和De Haard,Appl.Microbiol Biotechnol.77 (1):13-22 (2007))。

[0049] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所包含的结合肿瘤相关抗原的抗原结合多肽构建体中的至少一个可以是肿瘤相关抗原的天然配体或此类配体的功能片段。实例包括但不限于叶酸(FR $\alpha$ 的配体)、重组EGF(EGFR的配体)或Wnt5a(ROR1的配体)。

#### [0050] 形式

[0051] 本文所述的多特异性抗原结合构建体可以被视为具有包括两个或更多个抗原结合多肽构建体模块和任选支架模块的模块结构。本领域的技术人员将理解,这些模块可以各种方式组合以提供具有不同形式的多特异性抗原结合构建体。这些形式通常基于本领域已知的抗体形式(参见,例如Brinkmann和Kontermann,MABS,9 (2):182-212 (2017),及Müller和Kontermann,“Bispecific Antibodies”in Handbook of Therapeutic Antibodies,Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. (2014)的综述),并且包括以上描述的那些形式以及图1B所示的多特异性抗原结合构建体的示例性、非限制性形式。

[0052] 没有支架的多特异性抗原结合构建体通常包含两个或更多个通过一个或多个接头可操作连接的抗原结合多肽构建体。抗原结合多肽构建体可以呈scFv、Fab、sdAb形式或其组合。例如,使用scFv作为抗原结合多肽构建体,可以构建诸如串联scFv((scFv)<sub>2</sub>或taFv)或三体(3个scFv)等形式,其中scFv通过柔性接头连接在一起。scFv也可用于构建双价抗体、三价抗体和四价抗体(串联双价抗体或TandAb)形式,其分别包含2、3和4个通过短接头(通常长度为约5个氨基酸)连接的scFv。接头的长度受限导致scFv以头至尾的方式二聚化。在前述任何形式中,scFv可因包括结构域键二硫键而进一步稳定。例如,可以通过在每条链中(例如,在VH的位置44和VL的位置100)引入附加半胱氨酸残基,在VL和VH之间引入二硫键(参见,例如Fitzgerald等,Protein Engineering,10:1221-1225 (1997)),或者可以在两个VH之间引入二硫键以提供具有DART形式的构建体(参见,例如Johnson等,J Mol.Biol.,399:436-449 (2010))。

[0053] 类似地,包含两个或更多个通过合适接头连接在一起的sdAb,例如VH或VHH的形式,可用于多特异性抗原结合构建体。

[0054] 没有支架的多特异性抗原结合构建体形式的其它实例包括基于Fab片段的那些,例如Fab<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>和F(ab')<sub>3</sub>形式,其中所述Fab片段通过接头或IgG铰链区连接。

[0055] 抗原结合多肽构建体呈不同形式的组合也可用于产生替代性无支架形式。例如,scFv或sdAb可与Fab片段轻链和重链中的任一条或两条的C端融合,产生二价(Fab-scFV/sdAb)或三价(Fab-(scFv)<sub>2</sub>或Fab-(sdAb)<sub>2</sub>)构建体。类似地,一个或两个scFv或sdAb可以在F(ab')<sub>2</sub>或F(ab')<sub>3</sub>的铰链区融合产生三价或四价F(ab')<sub>2</sub>-scFv/sdAb构建体。

[0056] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个或更多个抗原结合多肽构建体和一个或多个接头,不包括支架。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个或更多个抗原结合多肽构建体和一个或多个接头,其中所述抗原结合多肽构建体为scFv、Fab、sdAb或其组合。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个或更多个抗原结合多肽构建体和一个或多个接头,其中所述抗原结合多肽构建体为scFv。

[0057] 可以通过将两个或更多个抗原结合多肽构建体与合适的支架连接来构建包含支架的多特异性抗原结合构建体。抗原结合多肽构建体可以呈上述形式中的一种或组合(例如scFv、Fab和/或sdAb)。下面更详细地描述了合适支架的实例并且包括但不限于免疫球蛋白Fc区、白蛋白、白蛋白类似物和衍生物、异二聚化肽(例如亮氨酸拉链,源自Jun和Fos的形成异二聚体的“拉链”肽,IgG CH1和CL结构域或barnase-barstar毒素)、细胞因子、趋化因子或生长因子。其它实例包括基于IBC Pharmaceuticals, Inc. 和Immunomedics开发的DOCK-AND-LOCK<sup>TM</sup> (DNL<sup>TM</sup>) 技术的多特异性抗原结合构建体(参见例如,Chang等,Clin Cancer Res 13:5586s-5591s (2007))。

[0058] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个或更多个抗原结合多肽构建体和支架。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个或更多个抗原结合多肽构建体和基于IgG Fc区、白蛋白或白蛋白类似物或衍生物的支架。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含基于Fc区的支架,Fc区可以是二聚或三聚Fc,包含第一Fc多肽和第二Fc多肽,其各自包含CH3序列和任选CH2序列。

[0059] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有第一和第二Fc多肽的Fc,及与第一Fc多肽可操作连接的第一抗原结合多肽构建体和与第二Fc多肽可操作连接的第二抗原结合多肽构建体。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有第一和第二Fc多肽的Fc,及用或不用接头与第一Fc多肽或第二Fc多肽的C端可操作连接的第一抗原结合多肽构建体。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有CH1和VH的重链多肽和含有CL和VL的轻链多肽,其中第一抗原结合多肽构建体用或不用接头与VL的N端、CL的C端或VH的N端可操作连接。

[0060] 本文还考虑了包含三个或更多个抗原结合多肽构建体的多特异性抗原结合构建体,包括呈“章鱼抗体”或“双可变结构域免疫球蛋白”(DVD)形式的多特异性抗原结合构建体(参见例如,美国专利申请公布第US2006/0025576号,及Wu等,Nature Biotechnology 25:1290-1297 (2007))。

[0061] 某些实施方案考虑到,多特异性抗原结合构建体还可包括“双重作用FAB”或“DAF”,其包含结合免疫治疗剂以及靶肿瘤相关抗原的抗原结合多肽构建体(例如,参见美国专利申请公布第US2008/0069820号)。

[0062] 支架

[0063] 在一些实施方案中,本文所述的多特异性抗原结合构建体包含支架。支架可以是肽、多肽、聚合物、纳米颗粒或其它化学实体。支架为多肽时,多特异性抗原结合构建体的每个抗原结合多肽构建体可与多肽支架的N端或C端连接。在某些实施方案中还考虑到了包含多肽支架,其中一个或多个抗原结合多肽构建体用或不用接头,经由氨基酸侧链与除了N端或C端以外的区域连接的多特异性抗原结合构建体。

[0064] 在支架为肽或多肽的实施方案中,抗原结合构建体可通过基因融合或化学偶联与支架连接。在支架为聚合物或纳米颗粒的一些实施方案中,抗原结合构建体通过化学偶联与支架连接。

[0065] 本领域已知许多蛋白质结构域包含两个不同抗原结合多肽的选择配对,并且可用于形成支架。实例为选择性配对在一起的亮氨酸拉链结构域例如Fos和Jun (Kostelnik等,J Immunol,148:1547-53 (1992);Wranik等,J.Biol.Chem.,287:43331-43339 (2012))。其它选

择性配对分子对包括,例如barnase barstar对(Deyev等,Nat Biotechnol,21:1486-1492(2003))、DNA链对(Chaudri等,FEBS Letters,450(1-2):23-26(1999))和分离荧光蛋白对(国际专利公布第W02011/13504号)。

[0066] 蛋白支架的其它实例包括免疫球蛋白Fc区、白蛋白、白蛋白类似物和衍生物、毒素、细胞因子、趋化因子和生长因子。蛋白支架与抗原结合部分组合使用已经(例如)在Müller等,J Biol Chem,282:12650-12660(2007);McDonough等,Mol Cancer Ther,11:582-593(2012);Vallera等,Clin Cancer Res,11:3879-3888(2005);Song等,Biotech Appl Biochem,45:147-154(2006),及美国专利申请公布第US2009/0285816号中进行了描述。

[0067] 例如,已经证实使抗原结合部分例如scFv、双价抗体或单链双价抗体与白蛋白融合会改善抗原结合部分的血清半衰期(Müller等,同上)。抗原结合部分可以任选地经由接头融合在白蛋白的N端和/或C端。

[0068] 已经描述了呈杂多聚体形式的白蛋白衍生物,其包含两个通过使白蛋白分段而获得的转运蛋白多肽,使得转运蛋白多肽自我组装形成准天然白蛋白(参见国际专利公布第WO 2012/116453和WO 2014/012082号)。由于白蛋白分段,杂多聚体包括四个末端,因此可以任选地经由接头与多达四个不同的抗原结合部分融合。

[0069] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含蛋白支架。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含基于Fc区(如下所述)、白蛋白或白蛋白类似物或衍生物的蛋白支架。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含基于白蛋白(例如人血清白蛋白(HSA))或白蛋白类似物或衍生物的蛋白支架。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含基于如国际专利公布第WO 2012/116453和WO 2014/012082号中所述的白蛋白衍生物的蛋白支架。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个或更多个抗原结合多肽构建体,其呈scFv和基于如国际专利公布第WO 2012/116453和WO 2014/012082号中所述的白蛋白衍生物的蛋白支架的形式。

#### [0070] Fc区

[0071] 在某些实施方案中,本文所述的多特异性抗原结合构建体包含基于Fc区的支架。如本文中所用的术语“Fc区”、“Fc”或“Fc结构域”是指免疫球蛋白重链含有至少一部分恒定区的C端区域。该术语包括天然序列Fc区和变异Fc区。除非本文另有说明,否则Fc区或恒定区内氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)。二聚Fc的“Fc多肽”是指形成二聚Fc结构域的两个多肽之一,即包含能够稳定地自我缔合的免疫球蛋白重链C端恒定区的多肽。例如,二聚IgG Fc的Fc多肽包含IgG CH2和IgG CH3恒定结构域序列。

[0072] Fc结构域包含CH3结构域或CH3和CH2结构域。CH3结构域包含两个CH3序列,一个来自于二聚Fc的两个Fc多肽中的每一个。CH2结构域包含两个CH2序列,一个来自于二聚Fc的两个Fc多肽中的每一个。

[0073] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有一个或两个CH3序列的Fc。在一些实施方案中,Fc用或不用一个或多个接头与第一抗原结合多肽构建体和第二抗原结合多肽构建体耦合。在一些实施方案中,Fc基于人Fc。在一些实施方案中,Fc基于人IgG Fc,例如人IgG1Fc。在一些实施方案中,Fc为异二聚Fc。在一些实施方案中,Fc包含一个或两个

CH2序列。

[0074] 在一些实施方案中,Fc包含一个或两个CH3序列,其中至少一个包含一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,Fc包含一个或两个CH2序列,其中至少一个包含一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,Fc可由单个多肽组成。在一些实施方案中,Fc可由多个肽,例如两个多肽组成。

[0075] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含如国际专利公布第W0 2012/058768或国际专利公布第W0 2013/063702中所述的Fc。

[0076] 经修饰的CH3结构域

[0077] 在一些实施方案中,本文所述的多特异性抗原结合构建体包含含有经修饰的CH3结构域的异二聚Fc,其中经修饰的CH3结构域是非对称修饰的CH3结构域。异二聚Fc可包含两个重链恒定结构域多肽:第一Fc多肽和第二Fc多肽,其可互换使用,条件是Fc包含一个第一Fc多肽和一个第二Fc多肽。通常,第一Fc多肽包含第一CH3序列而第二Fc多肽包含第二CH3序列。

[0078] 包含以非对称方式引入的一个或多个氨基酸修饰的两个CH3序列通常在两个CH3序列二聚化时,产生异二聚Fc,而非同型二聚体。如本文中所用,“非对称氨基酸修饰”是指第一CH3序列上特定位置的氨基酸不同于第二CH3序列上相同位置的氨基酸的修饰。对于包含非对称氨基酸修饰的CH3序列,第一和第二CH3序列通常会优先配对形成异二聚体,而非同型二聚体。这些非对称氨基酸修饰可以是仅修饰每个序列上各自相同氨基酸位置的两个氨基酸中的一个,或对第一和第二CH3序列中的每一个上各自相同位置处,每个序列上的两个氨基酸的不同修饰的结果。异二聚Fc的第一和第二CH3序列可包含一个或一个以上非对称氨基酸修饰。

[0079] 表A提供了对应于全长人IgG1重链的氨基酸231至447的人IgG1Fc序列的氨基酸序列。CH3序列包含全长人IgG1重链的氨基酸341-447。

[0080] 通常,Fc包括能够二聚化的两个重链多肽序列(A和B)。在一些实施方案中,Fc的一个或两个多肽序列可包括以下一个或多个位置的修饰:L351、F405、Y407、T366、K392、T394、T350、S400和/或N390(使用EU编号)。

[0081] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有经修饰的CH3结构域的异二聚Fc,经修饰的CH3结构域具有第一多肽序列和第二多肽序列,第一多肽序列包含位置F405和Y407处的氨基酸修饰,并且还任选地包含位置L351处的氨基酸修饰,第二多肽序列包含位置T366和T394处的氨基酸修饰,并且还任选地包含位置K392处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,经修饰的CH3结构域的第一多肽序列包含位置F405和Y407处的氨基酸修饰,并且还任选地包含位置L351处的氨基酸修饰,并且经修饰的CH3结构域的第二多肽序列包含位置T366和T394处的氨基酸修饰,并且还任选地包含位置K392处的氨基酸修饰,并且位置F405处的氨基酸修饰为F405A、F405I、F405M、F405S、F405T或F405V;位置Y407处的氨基酸修饰为Y407I或Y407V;位置T366处的氨基酸修饰为T366I、T366L或T366M;位置T394处的氨基酸修饰为T394W;位置L351处的氨基酸修饰为L351Y,并且位置K392处的氨基酸修饰为K392F、K392L或K392M。

[0082] 在一些实施方案中,Fc的第一多肽序列包含位置F405和Y407处的氨基酸修饰,并且还任选地包含位置L351处的氨基酸修饰,Fc的第二多肽序列包含位置T366和T394处的氨

基酸修饰,并且还任选地包含位置K392处的氨基酸修饰,并且位置F405处的氨基酸修饰为F405A、F405I、F405M、F405S、F405T或F405V;位置Y407处的氨基酸修饰为Y407I或Y407V;位置T366处的氨基酸修饰为T366I、T366L或T366M;位置T394处的氨基酸修饰为T394W;位置L351处的氨基酸修饰为L351Y,并且位置K392处的氨基酸修饰为K392F、K392L或K392M,并且Fc的第一和第二多肽序列中的一个或两个还包含氨基酸修饰T350V。

[0083] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有经修饰的CH3结构域的异二聚Fc,经修饰的CH3结构域具有第一多肽序列和第二多肽序列,第一多肽序列包含位置F405和Y407处的氨基酸修饰,并且还任选地包含位置L351处的氨基酸修饰,第二多肽序列包含位置T366和T394处的氨基酸修饰,并且还任选地包含位置K392处的氨基酸修饰,并且第一多肽序列还包含位置S400或Q347中一处或两处的氨基酸修饰和/或第二多肽序列还包含位置K360或N390中一处或两处的氨基酸修饰,其中位置S400处的氨基酸修饰为S400E、S400D、S400R或S400K;位置Q347处的氨基酸修饰为Q347R、Q347E或Q347K;位置K360处的氨基酸修饰为K360D或K360E,并且位置N390处的氨基酸修饰为N390R、N390K或N390D。

[0084] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有经修饰的CH3结构域的异二聚Fc,经修饰的CH3结构域包含如表A所示变体1、变体2、变体3、变体4或变体5中任一个的修饰。

[0085] 表A: IgG1Fc序列

<b>人 IgG1 Fc 序列 231-447(EU 编号)</b>	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSSFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)
--	--

[0086]

<b>变体 IgG1 Fc 序列 (231-447)</b>	<b>链</b>	<b>突变</b>
<b>1</b>	A	L351Y_F405A_Y407V
	B	T366L_K392M_T394W
<b>2</b>	A	L351Y_F405A_Y407V
	B	T366_LK392L_T394W
<b>3</b>	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V

<b>4</b>	A	T350V_T366L_K392L_T394W
<b>5</b>	A	T350V_T366L_K392M_T394W
	B	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V
	B	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W

[0087]

[0088] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有经修饰的CH3结构域的异

二聚Fc,经修饰的CH3结构域具有第一CH3序列和第二CH3序列,第一CH3序列具有位置F405和Y407处的氨基酸修饰,第二CH3序列具有位置T394处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,异二聚Fc包含具有第一CH3序列和第二CH3序列的经修饰的CH3结构域,第一CH3序列具有选自L351Y、F405A和Y407V的一个或多个氨基酸修饰,第二CH3序列具有选自T366L、T366I、K392L、K392M和T394W的一个或多个氨基酸修饰。

[0089] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有经修饰的CH3结构域的异二聚Fc,经修饰的CH3结构域具有第一CH3序列和第二CH3序列,第一CH3序列具有位置L351、F405和Y407处的氨基酸修饰,第二CH3序列具有位置T366、K392和T394处的氨基酸修饰,并且第一或第二CH3序列之一还包含位置Q347处的氨基酸修饰,而另一个CH3序列还包含位置K360处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,异二聚Fc包含具有第一CH3序列和第二CH3序列的经修饰的CH3结构域,第一CH3序列具有位置L351、F405和Y407处的氨基酸修饰,第二CH3序列具有位置T366、K392和T394处的氨基酸修饰,并且第一或第二CH3序列之一还包含位置Q347处的氨基酸修饰,而另一个CH3序列还包含位置K360处的氨基酸修饰,并且所述CH3序列中的一个或两个还包含氨基酸修饰T350V。

[0090] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有经修饰的CH3结构域的异二聚Fc,经修饰的CH3结构域具有第一CH3序列和第二CH3序列,第一CH3序列具有位置L351、F405和Y407处的氨基酸修饰,第二CH3序列具有位置T366、K392和T394处的氨基酸修饰,并且所述第一或第二CH3序列之一还包含D399R或D399K的氨基酸修饰,而另一个CH3序列包含T411E、T411D、K409E、K409D、K392E和K392D中的一个或多个。在一些实施方案中,异二聚Fc包含具有第一CH3序列和第二CH3序列的经修饰的CH3结构域,第一CH3序列具有位置L351、F405和Y407处的氨基酸修饰,第二CH3序列具有位置T366、K392和T394处的氨基酸修饰,所述第一和第二CH3序列之一还包含D399R或D399K的氨基酸修饰,而另一个CH3序列包含T411E、T411D、K409E、K409D、K392E和K392D中的一个或多个,并且所述CH3序列中的一个或两个还包含氨基酸修饰T350V。

[0091] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有经修饰的CH3结构域的异二聚Fc,经修饰的CH3结构域具有第一CH3序列和第二CH3序列,第一CH3序列具有位置L351、F405和Y407处的氨基酸修饰,第二CH3序列具有位置T366、K392和T394处的氨基酸修饰,其中所述CH3序列中的一个或两个还包含T350V的氨基酸修饰。

[0092] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有经修饰的CH3结构域的异二聚Fc,经修饰的CH3结构域具有包含位置Y407处的氨基酸修饰的第一多肽序列和包含位置T366和K409处的氨基酸修饰的第二多肽序列。在一些实施方案中,经修饰的CH3结构域的第一多肽序列包含位置Y407处的氨基酸修饰,并且经修饰的CH3结构域的第二多肽序列包含位置T366和K409处的氨基酸修饰,并且位置Y407处的氨基酸修饰为Y407A、Y407I、Y407L或Y407V;位置T366处的氨基酸修饰为T366A、T366I、T366L、T366M或T366V,并且位置K409处的氨基酸修饰为K409F、K409I、K409S或K409W。

[0093] 在某些实施方案中,Fc所包含的所述一个或多个非对称氨基酸修饰可以促进异二聚Fc的形成,其中所述异二聚CH3结构域具有与野生型同型二聚CH3结构域同等的稳定性。在一些实施方案中,所述一个或多个非对称氨基酸修饰促进异二聚Fc结构域的形成,其中所述异二聚Fc结构域具有与野生型同型二聚Fc结构域同等的稳定性。

[0094] 在一些实施方案中,通过测量CH3结构域的解链温度( $T_m$ ),例如通过差示扫描量热法(DSC),评估CH3结构域的稳定性。在一些实施方案中,所述一个或多个非对称氨基酸修饰促进异二聚Fc结构域的形成,其中在差示扫描量热法研究中经由解链温度( $T_m$ )所观测到的那样,所述CH3结构域具有稳定性,所述解链温度( $T_m$ )在对于相对对称野生型同型二聚CH3结构域所观测到的约8°C,例如约7°C、约6°C、约5°C或约4°C以内。

[0095] 在一些实施方案中,异二聚Fc的CH3结构域的解链温度( $T_m$ )可为约68°C或更高,约70°C或更高,约72°C或更高,73°C或更高,约75°C或更高,约78°C或更高,约80°C或更高,约82°C或更高,或约84°C或更高。

[0096] 在一些实施方案中,与表达产物中的同型二聚Fc相比,可形成纯度为至少约75%的包含经修饰的CH3序列的异二聚Fc。在一些实施方案中,可形成纯度高于约80%,高于约85%,高于约90%,高于约95%或高于约97%的异二聚Fc。在一些实施方案中,所述Fc是在表达时形成的纯度高于约75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的异二聚体。

[0097] 本领域已知另外的用于修饰单体Fc多肽以促进异二聚Fc形成的方法并且包括,例如在国际专利公布第W0 96/027011号(结节入孔)中,在Gunasekaran等*J Biol Chem*,285,19637-46 (2010) (实现选择性异二聚化的静电设计)中,在Davis等*Prot Eng Des Sel*,23 (4):195-202 (2010) (链交换结构域技术(SEED))中,和在Labrijn等*Proc Natl Acad Sci USA*,110 (13):5145-50 (2013) (Fab臂交换)中描述的那些方法。

[0098] CH2结构域

[0099] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有CH2结构域的Fc。Fc的CH2结构域的实例为表A所示序列的氨基酸231-340。由结合抗体Fc的Fc受体(FcR)介导几种效应功能。

[0100] 术语“Fc受体”(“FcR”)用于描述结合抗体Fc区的受体。例如,FcR可以是天然序列人FcR。通常,FcR是结合IgG抗体的受体( $\gamma$ 受体)并且包括Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RII和Fc  $\gamma$  RIII亚类,包括这些受体的等位基因变体和替代剪接形式。Fc  $\gamma$  RII受体包括Fc  $\gamma$  RIIA(“活化受体”)和Fc  $\gamma$  RIIB(“抑制受体”),其具有主要在其胞质结构域上不同的相似氨基酸序列。其它同种型的免疫球蛋白也可以被某些FcR结合(参见例如,Janeway等,*Immuno Biology: the immune system in health and disease*,(Elsevier Science Ltd., NY) (1999年第4版))。术语“FcR”在某些实施方案中还包括新生儿受体,即FcRn,其负责母体IgG向胎儿的转移(Guyer等,*J. Immunol.*117:587 (1976) 和Kim等,*J. Immunol.*124:249 (1994))。

[0101] CH2结构域中的修饰可以影响FcR与Fc的结合。在本领域中已知Fc区的许多氨基酸修饰用于选择性改变Fc对不同Fc  $\gamma$ 受体的亲和性。在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所包含的Fc可包含一个或多个修饰以促进Fc-  $\gamma$ 受体的选择性结合。

[0102] 改变Fc与FcR结合的修饰的非限制性实例包括:S298A/E333A/K334A和S298A/E333A/K334A/K326A(Lu等,*J Immunol Methods*,365 (1-2):132-41 (2011));F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L和F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L(Stavenhagen等,*Cancer Res*,67 (18):8882-90 (2007) 和Nordstrom JL等,*Breast Cancer Res*,13 (6):R123 (2011));F243L(Stewart等,*Protein Eng Des Sel*,24 (9):671-8 (2011));S298A/E333A/K334A(Shields等,*J Biol Chem*,276 (9):6591-604 (2001));S239D/I332E/A330L和S239D/I332E(Lazar等,

Proc Natl Acad Sci USA, 103 (11) :4005-10 (2006) ; S239D/S267E和S267E/L328F (Chu等, Mol Immunol, 45 (15) :3926-33 (2008) )。其它实例包括S239D/D265S/S298A/I332E; S239E/S298A/K326A/A327H; G237F/S298A/A330L/I332; S239D/I332E/S298A; S239D/K326E/A330L/I332E/S298A; G236A/S239D/D270L/I332E; S239E/S267E/H268D; L234F/S267E/N325L; G237F/V266L/S267D和国际专利公布第WO 2011/120134号中描述的其它突变。

[0103] 在Therapeutic Antibody Engineering (Strohl和Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 37 9, 2012年10月, 第283页) 中描述了影响Fc与FcR结合的附加修饰。

[0104] 在国际专利公布第WO 2014/190441号中描述了包含影响FcR结合的非对称修饰的Fc区。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含包括CH2结构域的Fc,CH2结构域包含一个或多个非对称氨基酸修饰。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含包括CH2结构域的Fc,CH2结构域包含相对于不包括非对称修饰的抗原结合构建体,提供优良生物物理特性,例如稳定性和/或易于生产性的非对称修饰。

#### [0105] 附加修饰

[0106] 在一些实施方案中,包含Fc区的多特异性抗原结合构建体可包括改善其介导效应功能的能力的修饰。此类修饰在本领域中已知并且包括去岩藻糖基化,或工程化改造Fc对活化受体(主要为ADCC的Fc  $\gamma$  RIIIa)和对CDC的C1q的亲和力。

[0107] 产生在Fc糖基化位点(Asn 297, EU编号)几乎没有岩藻糖的抗体,而不改变氨基酸序列的方法在本领域中众所周知。例如, GlymaX®技术(ProBioGenAG) (参见von Horsten等, Glycobiology, 20 (12) :1607-18 (2010) ) 和美国专利第8,409,572号。在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可以去岩藻糖基化。在这种情况下,多特异性抗原结合构建体可以完全去岩藻糖基化(即其不含可检测到的岩藻糖)或其可以部分去岩藻糖基化,使得多特异性抗原结合构建体含有哺乳动物表达系统产生的类似构建体通常所检测到的岩藻糖的量的少于95%、少于85%、少于75%、少于65%、少于55%、少于45%、少于35%、少于25%、少于15%或少于5%。

[0108] 本领域中已知减少Fc  $\gamma$  R和/或补体结合和/或效应功能的Fc修饰并且包括上述那些。各种出版物描述了已经用于工程化改造具有降低或沉默化效应活性的抗体的策略(参见例如, Strohl, Curr Opin Biotech 20:685-691 (2009) , 及Strohl&Strohl, "Antibody Fc engineering for optimal antibody performance" In Therapeutic Antibody Engineering, Cambridge:Woodhead Publishing (2012) , 第225-249页)。这些策略包括通过糖基化修饰,使用IgG2/IgG4支架或在Fc的铰链或CH2区引入突变来降低效应功能(还参见, 美国专利公布第2011/0212087号、国际专利公布第WO 2006/105338号、美国专利公布第2012/0225058号、美国专利公布第2012/0251531号和Strop等, J.Mol.Biol. 420:204-219 (2012) )。

[0109] 减少Fc  $\gamma$  R或补体与Fc结合的已知氨基酸修饰的特定、非限制性实例包括表B中标识的那些。

[0110] 表B:减少Fc  $\gamma$  R或补体与Fc结合的修饰

公司	突变
[0111]	GSK N297A
	Ortho Biotech L234A/L235A
	Protein Design labs IgG2 V234A/G237A
	Wellcome Labs IgG4 L235A/G237A/E318A
[0112]	GSK IgG4 S228P/L236E
	Alexion IgG2/IgG4combo
	Merck IgG2 H268Q/V309L/A330S/A331S
	Bristol-Myers C220S/C226S/C229S/P238S
	Seattle Genetics C226S/C229S/E3233P/L235V/L235A
	Amgen 大肠杆菌产生, 非糖基化
	Medimmune L234F/L235E/P331S
	Trubion 铰链突变, 可能是 C226S/P230S

[0113] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有表B中标识的至少一个氨基酸修饰的Fc。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有L234、L235或D265中至少一个的氨基酸修饰的Fc。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有L234、L235和D265处的氨基酸修饰的Fc。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含含有氨基酸修饰L234A、L235A和D265S的Fc。

[0114] 接头

[0115] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个或更多个抗原结合多肽构建体和一个或多个接头。所述接头,例如可以起到接合抗原结合多肽构建体的两个结构域(例如scFv或双价抗体的VH和VL)的功能,或其可以起到将两个抗原结合多肽构建体(例如两个或更多个Fab或sdAb)接合在一起的功能,或其可以起到接合抗原结合多肽构建体与支架的功能。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可包含多个接头(即两个或更多个),例如包含与支架连接的一个或多个scFv的多特异性抗原结合构建体可包含接合scFv的VH和VL的接头和接合scFv与支架的接头。本领域中已知适当接头并且可由技术人员根据接头的预期用途容易地选择(参见例如,Müller和Kontermann,“Bispecific Antibodies”in Handbook of Therapeutic Antibodies,Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. (2014))。

[0116] 有用的接头包括甘氨酸-丝氨酸(GlySer)接头,其是本领域众所周知的并且包含按不同顺序组合的甘氨酸和丝氨酸单元。实例包括但不限于(GS)<sub>n</sub>、(GSGGS)<sub>n</sub>、(GGGS)<sub>n</sub>和(GGGGS)<sub>n</sub>,其中n是至少为1的整数,通常为介于1和约10之间,例如介于1和约8之间,介于1和约6之间,或介于1和约5之间的整数。

[0117] 其它有用的接头包括源自免疫球蛋白铰链序列的序列。接头可包含来自四类IgG中任一类的整个或部分铰链序列并且可任选地包括附加序列。例如,接头可包括一部分免疫球蛋白铰链序列和甘氨酸-丝氨酸序列。非限制性实例为包括IgG1铰链的大致前15个残基,接着是长度为约10个氨基酸的GlySer接头序列(例如上述那些)的接头。

[0118] 接头的长度将根据其应用而改变。适当的接头长度可易于由技术人员选择。例如,当接头用于连接scFv的VH和VL结构域时,接头长度通常介于约5个和约20个氨基酸之间,例

如长度介于约10个和约20个氨基酸之间,或长度介于约15个和约20个氨基酸之间。当接头用于连接双价抗体的VH和VL结构域时,接头应足够短以防止同一条链中这两个结构域缔合。例如,接头长度可介于约2个和约12个氨基酸之间,例如长度介于约3个和约10个氨基酸之间,或长度为约5个氨基酸。

[0119] 在一些实施方案中,当接头用于连接两个Fab片段时,可以选择接头使其保持F(ab')片段互补位的相对空间构象,并且能够形成与IgG核心铰链中的二硫键等效的共价键。在这种情况下,合适的接头包括IgG铰链区,例如来自IgG1、IgG2或IgG4的那些。也可以使用这些示例性接头的经修饰形式。例如,本领域中已知会改善IgG4铰链稳定性的修饰(参见例如,Labrijn等,Nature Biotechnology,27:767-771(2009))。

[0120] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含如本文所述,可操作连接抗原结合多肽构建体与支架的接头。在一些方面中,多特异性抗原结合构建体包含经一个或多个接头与所述一个或多个抗原结合多肽构建体耦合的Fc。在一些方面中,多特异性抗原结合构建体包含通过接头与每个抗原结合多肽构建体的重链耦合的Fc。

#### [0121] 免疫治疗剂

[0122] 本文所述的多特异性抗原结合构建体包含结合免疫治疗剂的抗原结合多肽构建体。免疫治疗剂可以是工程化为表达抗原结合结构域的效应细胞,例如T细胞或NK细胞,或免疫治疗剂可以是能够结合T细胞或肿瘤相关抗原的治疗剂,例如抗体或抗体片段。

[0123] 在某些实施方案中,免疫治疗剂是工程化T细胞或NK细胞。通常,T细胞或NK细胞所包含的抗原结合结构域是工程化受体的一部分。在一些实施方案中,工程化T细胞或NK细胞所包含的抗原结合结构域可以是,例如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR),例如转基因或重组TCR的一部分。根据这些实施方案,多特异性抗原结合构建体结合CAR或TCR的胞外部分。多特异性抗原结合构建体可以结合CAR或TCR的抗原结合结构域,或其可以结合CAR或TCR未参与抗原结合的胞外区。

[0124] 如本领域已知,CAR和TCR构建体可以设计为包括“标签”,其通常是被抗体特异性识别的短氨基酸序列。在一些实施方案中,免疫治疗剂是工程化为表达包括标签的CAR或TCR的T细胞或NK细胞。在此类实施方案的情况下,多特异性抗原结合构建体可以结合标签或其可以结合除标签以外的CAR或TCR区域。在免疫治疗剂是工程化为表达包括标签的CAR或TCR的T细胞或NK细胞的实施方案中,多特异性抗原结合构建体结合除标签以外的CAR或TCR区域。

[0125] 在一些实施方案中,免疫治疗剂是工程化为表达不包括标签的CAR或TCR的T细胞或NK细胞。在一些实施方案中,免疫治疗剂是工程化为表达不包括标签或任何异源肿瘤相关抗原或肿瘤相关抗原片段的CAR或TCR的T细胞或NK细胞。

[0126] 在某些实施方案中,免疫治疗剂是工程化为表达CAR的T细胞或NK细胞并且多特异性抗原结合构建体结合CAR的胞外部分。如本领域已知,CAR是包含呈单一蛋白质中非天然存在的组合的胞外结构域、跨膜结构域和胞质结构域的细胞表面受体。胞外结构域包含可以是抗体或抗体片段的抗原结合结构域。抗体或抗体片段可以是人抗体或片段、人源化抗体或片段或非人抗体或片段。通常,抗原结合结构域为抗体片段,例如Fab或scFv。最通常地,抗原结合结构域为scFv。胞外结构域通常还包含连接抗原结合结构域与跨膜结构域的间隔(或铰链)区。间隔区可源自免疫球蛋白,例如IgG1或IgG4,或其可以源自替代性细胞表

面蛋白,包括但不限于CD4、CD8或CD28。

[0127] CAR的跨膜结构域连接胞外结构域与胞质结构域。通常,跨膜结构域源自I型膜蛋白,例如CD3 $\zeta$ 、CD4、CD8或CD28。在一些情况下,可以通过氨基酸取代来修饰跨膜结构域以免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合以最小化与受体复合物其它成员的相互作用。跨膜结构域的其它实例包括源自T细胞受体、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD5、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154或ICOS的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链。

[0128] CAR的胞质结构域包含至少一个胞内信号传导结构域并且负责激活CAR已经置于其中的免疫细胞的至少一种正常效应功能。术语“效应功能”是指细胞的特化功能。T细胞的效应功能,例如,可以是细胞溶解活性或辅助活性,包括分泌细胞因子。因此。术语“胞内信号传导结构域”是指蛋白质转导效应功能信号并指导细胞执行特化功能的部分。CAR中常用的胞内信号传导结构域的实例包括共同作用以在抗原受体衔接后引发信号转导的TCR和辅助受体的胞质序列,以及这些序列的具有相同功能能力的衍生物和变体。

[0129] 已知通过单独的TCR产生的信号不足以完全激活T细胞并且还需要次级或共刺激信号。因此,可以说T细胞激活受两类不同的胞质信号传导序列介导:通过TCR引发抗原依赖性初级激活的那些(初级胞质信号传导序列)和以非抗原依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级胞质信号传导序列)。

[0130] 初级胞质信号传导序列以刺激方式或以抑制方式调控TCR复合物的初级激活。以刺激方式作用的初级胞质信号传导序列可含称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号传导基序。

[0131] CAR中可用的含初级胞质信号传导序列的ITAM的实例包括源自TCR $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。通常,CAR中的胞质结构域将包含源自CD3 $\zeta$ 的胞质信号传导序列。

[0132] CAR的胞质结构域可包含含有初级胞质信号传导序列本身或与一个或多个共刺激结构域组合的ITAM。共刺激结构域源自共刺激分子的胞内结构域。共刺激分子是淋巴细胞对抗原有效反应所需的,除抗原受体以外的细胞表面分子。此类分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB(CD 137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C和B7-H3。通常,CAR包含一个或多个源自4-1BB、CD28或OX40的共刺激结构域。第一代CAR,例如,仅包括CD3 $\zeta$ 来源的胞内信号传导结构域,而第二代CAR包括CD3 $\zeta$ 来源的胞内信号传导结构域,连同源自4-1BB或CD28的共刺激结构域。第三代CAR包括CD3 $\zeta$ 来源的胞内信号传导结构域,连同两个共刺激结构域,第一共刺激结构域源自4-1BB或CD28,而第二共刺激结构域源自4-1BB、CD28或OX40。

[0133] 表1提供了目前正在开发的CAR构建体的实例,及其组件结构域。

[0134] 表1:CAR构建体的实例

协会	scFv	铰链/跨膜结构域	胞质结构域
NCI	FMC63(抗 CD19)	CD28	CD28、CD3 $\zeta$
Baylor	FMC63(抗 CD19)	IgG-CD28	CD28、CD3 $\zeta$
City of Hope	FMC63(抗 CD $\wedge$ )	IgG4-Fc	CD28、CD3 $\zeta$
MD Anderson 癌症中心	FMC63(抗 CD19)	IgG4-Fc	CD28、CD3 $\zeta$
Fred Hutchinson	FMC63(抗 CD19)	IgG1-CD4	CD28、CD3 $\zeta$
Memorial Sloan Kettering 癌症中心	SJ25C1(抗 CD19)	CD28	CD28、CD3 $\zeta$
宾夕法尼亚大学	FMC63(抗 CD19)	CD8	4-1BB、CD3 $\zeta$
Fred Hutchinson	FMC63(抗 CD19)	IgG1-CD4	4-1BB、CD3 $\zeta$

[0135] [0136] \*改编自Batlevi等,Nature Reviews Clinical Oncology,13:25-40(2016)

[0137] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所靶向的免疫治疗剂是工程化为表达CAR的T细胞(CAR-T)。在一些实施方案中,免疫治疗剂为CAR-T并且多特异性抗原结合构建体的抗原结合多肽构建体结合CAR的抗原结合结构域。根据此类实施方案,抗原结合多肽构建体可包含抗独特型抗体或其抗原结合片段。CAR所靶向的抗原通常为细胞表面肿瘤相关抗原。

[0138] 如本文中所用,“肿瘤相关抗原”是指癌细胞表达的抗原。肿瘤相关抗原可以是或可以不是正常细胞表达的。当肿瘤相关抗原不是正常细胞表达时(即当其为肿瘤细胞所特有时),也可称为“肿瘤特异性抗原”。当肿瘤相关抗原不是肿瘤细胞所特有时,在未能诱导对抗原的免疫耐受性状态的条件下也在正常细胞上表达。在肿瘤上抗原的表达可以在使得免疫系统能够对抗原应答的条件下发生。肿瘤相关抗原可以是胎儿发育期间,免疫系统未成熟且无法应答时在正常细胞上表达的抗原,或其可以是通常以低水平存在,但在肿瘤细胞上以更高水平表达的抗原。临床最感兴趣的那些肿瘤相关抗原与相应正常组织相比差异性表达并且允许特异性T细胞或免疫球蛋白对肿瘤细胞的优先识别。

[0139] 目前处于临床开发中的CAR或工程化TCR所靶向的肿瘤相关抗原的实例包括NY-ESO(纽约食管鳞状细胞癌1)、MART-1(T细胞识别的黑素瘤抗原1,也称为Melan-A)、HPV(人乳头瘤病毒)E6、BCMA(B细胞成熟抗原)、CD123、CD133、CD171、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CEA(癌胚抗原)、EGFR(表皮生长因子受体)、EGFRvIII(表皮生长因子受体变体III)、EpCAM(上皮细胞粘附分子)、EphA2(A型肝配蛋白受体2)、二唾液酸神经节苷脂GD2、GPC3(磷脂酰基醇蛋白聚糖-3)、HER2、IL13Ra2(白细胞介素13受体亚基 $\alpha$ -2)、LeY(二岩藻糖基化2型血型相关抗原)、MAGE-A3(黑素瘤相关抗原3)、黑素瘤糖蛋白、间皮素、MUC1(粘蛋白1)、髓磷脂、NKG2D(自然杀伤细胞2D族)配体、PSMA(前列腺特异性膜抗原)和ROR1(I型受体酪氨酸激酶

样孤儿受体)。

[0140] 因此,在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含源自抗独特型抗体或其抗体片段的抗原结合多肽构建体,其中所述抗独特型抗体是NY-ESO-1、MART-1、HPV E6、BCMA、CD123、CD133、CD171、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CEA、EGFR、EGFR<sub>III</sub>、EpCAM、EphA2、二唾液酸神经节苷脂GD2、GPC3、HER2、IL13Ra2、LeY、MAGE-A3、黑素瘤糖蛋白、间皮素、MUC1、髓磷脂、NKG2D配体、PSMA或ROR1的抗独特型抗体。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含源自对抗CD19抗体有特异性的抗独特型抗体或所述抗独特型抗体的抗原结合片段的抗原结合多肽构建体。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含源自对抗间皮素抗体有特异性的抗独特型抗体或所述抗独特型抗体的抗原结合片段的抗原结合多肽构建体。

[0141] 本领域中已知许多抗独特型抗体。例如,国际专利申请公布第W02014/190273号和Jena等PLOS One,8:3e57838 (2013) 描述了识别抗CD19scFv FMC63的抗独特型抗体 (mAb克隆号136.20.1),其用于当前开发的许多CAR构建体中。表5中提供了mAb克隆号136.20.1的VH和VL的序列(分别为SEQ ID NO:1和2)。

[0142] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含源自对抗CD19抗体有特异性的抗独特型抗体或所述抗独特型抗体的抗原结合片段的抗原结合多肽构建体,所述抗独特型抗体可具有一个或多个与mAb克隆号136.20.1相同的CDR(即VH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3中的一个或多个或全部,使用Kabat定义、Chothia定义或Kabat和Chothia定义组合)。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含源自对抗CD19抗体有特异性的抗独特型抗体或所述抗独特型抗体的抗原结合片段的抗原结合多肽构建体,所述抗独特型抗体可具有一个或多个(例如两个)来自mAb克隆号136.20.1的可变区。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含源自对抗CD19抗体有特异性的抗独特型抗体或所述抗独特型抗体的抗原结合片段的抗原结合多肽构建体,所述抗独特型抗体结合与mAb克隆号136.20.1相同的表位。

[0143] 抗独特型抗体的其它实例包括可从AbD Serotec®商购获得的那些,国际专利公布第W0 2013/188864号中描述的对抗CD22抗体有特异性的抗独特型抗体,国际专利公布第W0 97/34636号中描述的对抗CEA抗体有特异性的抗独特型抗体,美国专利第5,935,821号中描述的对抗GD2抗体有特异性的抗独特型抗体,及Jakka等Anticancer Research,33:10, 4189-420 (2013) 中描述的对抗NY-ESO-1抗体有特异性的抗独特型抗体。也可以从AbD Serotec®获得定制抗独特型抗体。

[0144] 可选地,可以根据Jena等PLOS One,8:3e57838 (2013) 中描述的方法制备靶向CD19或其它肿瘤相关抗原的CAR的抗独特型抗体,并用于构建抗独特型抗原结合多肽构建体。

[0145] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含结合未参与抗原结合的CAR胞外区的抗原结合多肽构建体。例如,在某些实施方案中,抗原结合多肽构建体可结合CAR的铰链区。在一些实施方案中,铰链区可以是scFv-CD28或scFv-CD8接点,其包含可以被抗原结合多肽构建体靶向的新表位(neo-epitope)。在一些实施方案中,铰链区可包含可以被抗原结合多肽构建体靶向的突变(结合Fc的无效) IgG CH2/3。在一些实施方案中,铰链区可包含如Liu等(Nature Biotechnology,34,430-434 (2016)) 描述的,可以被抗原结合多肽构建体靶向的间隔区例如Strep-标签II。

[0146] 结合CAR分子铰链区的抗CAR抗体的实例是国际专利申请公布第W02014/190273号中描述的2D3抗体,其结合IgG4CH2-CH3铰链区。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含结合IgG4CH2-CH3铰链区的抗原结合多肽构建体。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含结合IgG4CH2-CH3铰链区并且具有一个或多个与2D3相同的CDR(即VH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3中的一个或多个或全部),或具有如W0 2014/190273号中描述的2D3的一个或多个(例如两个)可变区的抗原结合多肽构建体。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含结合IgG4CH2-CH3铰链区并且结合与如W0 2014/190273号中描述的2D3相同的表位的抗原结合多肽构建体。

[0147] 在某些实施方案中,免疫治疗剂是表达工程化TCR的工程化T细胞或NK细胞并且多特异性抗原结合构建体结合TCR的胞外部分。

[0148] 天然TCR包含两条不同的蛋白链,即 $\alpha$ 和 $\beta$ 链。TCR $\alpha/\beta$ 对在T细胞表面上与CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\sigma$ 和CD3 $\epsilon$ 呈复合物表达。在工程化TCR中,TCR的天然 $\alpha$ 和 $\beta$ 链经修饰为诱导对肿瘤相关抗原提高的或新的特异性。因为工程化TCR保持了 $\alpha$ 和 $\beta$ 链的大部分天然序列,所以如本文所述的多特异性抗原结合构建体包含靶向工程化TCR免疫治疗剂的抗原结合多肽构建体时,该抗原结合多肽构建体通常会靶向TCR的抗原结合结构域。例如,在免疫治疗剂是包含工程化TCR的T细胞或NK细胞的某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体的抗原结合多肽构建体可源自如上所述的抗独特性抗体或其片段。

[0149] 在一些实施方案中还考虑了结合工程化TCR的非抗原结合区的抗原结合多肽构建体,例如,其中工程化TCR包括抗原结合多肽构建体可以靶向的非抗原结合结构域中的一个或多个非天然序列。在一些实施方案中,抗原结合多肽构建体靶向工程化TCR V $\alpha$ 或V $\beta$ 区。在此类实施方案中,抗原结合多肽构建体也可以结合天然TCR,与内源TCR库中也存在工程化TCR V区结构域一样,但频率极低。

[0150] 因为TCR结合MHC背景下呈递的抗原,所以工程化TCR可以靶向胞内肿瘤相关抗原。胞内肿瘤相关抗原的实例包括但不限于源自NY-ESO-1、MART-1、WT-1、HPV E6或HPV E7的肽。因此,在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含源自抗TCR独特型抗体或此类抗TCR独特型抗体的抗原结合片段的抗原结合多肽构建体,其中TCR特异性结合含有源自例如NY-ESO、MART-1、WT-1、HPV-E6或HPV-E7的肽的MHC复合物。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含源自抗TCR独特型(或克隆型)抗体或此类抗TCR独特型/克隆型抗体的抗原结合片段的抗原结合多肽构建体,其中TCR特异性结合含有源自例如NY-ESO、MART-1或HPV-E6的肽的MHC复合物。抗TCR独特型/克隆型抗体在本领域中众所周知并且包括但不限于6B11(Montoya等,Immunology,122(1):1-14(2007))和KJI-26(Haskins等,JExp Med,157(4):1149-69(1983))。

[0151] 在某些实施方案中,免疫治疗剂可以是能够结合T细胞和肿瘤相关抗原的治疗剂,例如抗体或抗体片段。依据这些实施方案,治疗剂通常包含至少两个抗原结合结构域,其中一个结合T细胞的胞外部分,而另一个结合肿瘤相关抗原。此类治疗剂的实例包括例如双特异性T细胞衔接子(BiTE),例如靶向CD3和CD19的博纳吐单抗(blinatumomab)和靶向CD3和EpCAM的索利托单抗(solitomab),及其它“T细胞衔接”抗体或抗体片段。依据这些实施方案,多特异性抗原结合构建体的抗原结合多肽构建体通常结合治疗剂的抗原结合结构域。例如,在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体的抗原结合多肽构建体可源自如上所

述的抗独特型抗体或其片段。在一些实施方案中，抗原结合多肽构建体源自对抗CD19抗体或抗EpCAM抗体有特异性的抗独特型抗体，或抗独特型抗体的抗原结合片段。此类抗独特型抗体的实例包括上述那些。

[0152] 本文所述多特异性抗原结合构建体所包含的靶向免疫治疗剂的抗原结合多肽构建体可以呈各种已知形式中的任一种，包括例如Fab形式、scFv形式或sdAb形式。在某些实施方案中，靶向免疫治疗剂的抗原结合多肽构建体可以呈Fab或scFv形式。在一些实施方案中，靶向免疫治疗剂的抗原结合多肽构建体可以呈如上所述的基于非免疫球蛋白的抗体模拟物形式。

### [0153] 肿瘤相关抗原

[0154] 本文所述的多特异性抗原结合构建体包含至少一个结合肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗原结合多肽构建体。在某些实施方案中，多特异性抗原结合构建体包含两个或更多个TAA结合多肽构建体。当多特异性抗原结合构建体包含两个或更多个TAA结合多肽构建体时，每个TAA结合多肽构建体可以结合不同TAA，或两个或更多个TAA结合多肽构建体可以结合相同TAA上的不同表位。以上定义了TAA并且包括仅由肿瘤细胞表达的抗原(肿瘤特异性抗原)，以及肿瘤细胞和正常细胞上表达的，但正常细胞上通常水平较低的抗原。

[0155] 选择作为本文所述的多特异性抗原结合构建体的TAA将依赖于多特异性抗原结合构建体的预期用途。如上所述，多特异性抗原结合构建体结合靶向TAA的免疫治疗剂，并且本身也结合TAA。多特异性抗原结合构建体结合的TAA表位与免疫治疗剂结合的TAA表位不同。因此，多特异性抗原结合构建体和免疫治疗剂均可靶向相同TAA，但结合抗原分子上的不同表位，或其可以靶向不同的TAA。在某些实施方案中，多特异性抗原结合构建体和免疫治疗剂靶向不同的TAA。多特异性抗原结合构建体和免疫治疗剂靶向的TAA不同时，通常不同抗原将与相同类型的癌症相关。然而，在某些实施方案中还考虑了靶向与不同类型的癌症相关的TAA。

[0156] 多特异性抗原结合构建体所靶向的TAA的实例包括但不限于17-1A-抗原、甲胎蛋白 (AFP)、 $\alpha$ -辅肌动蛋白-4、A3、A33抗体特异性抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、bcl-2、bcl-6、BCMA、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、碳酸酐酶IX (CAIX)、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD123、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CD171、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CEA、CEACAM5、CEACAM6、补体因子(例如C3、C3a、C3b、C5a和C5)、结肠特异性抗原-p (CSAp)、c-Met、CTLA-4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、DAM、Dickkopf相关蛋白 (DKK)、ED-B纤连蛋白、EGFR、EGFRvIII、EGP-1 (TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、EphA2、EphA3、成纤维细胞活化蛋白 (FAP)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、F1t-1、F1t-3、叶酸结合蛋白、叶酸受体、G250抗原、神经节苷脂(例如GC2、GD3和GM2)、GAGE、GD2、gp100、GPC3、GRO-13、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 及其亚基、HER2、HER3、HMGB-1、低氧诱导因子 (HIF-1)、HIF-1a、HSP70-2M、HST-2、Ia、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN-X、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL13Ra2、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、ILGF、ILGF-1R、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、IGF-1R、整联蛋白 $\alpha$ V $\beta$ 3、整联蛋白 $\alpha$ 5 $\beta$ 1、KC4抗原、杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR)、Kras、

KS-1抗原、KS1-4、LDR/FUT、Le<sup>γ</sup>、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、mCRP、MCP-1、黑素瘤糖蛋白、间皮素、MIP-1A、MIP-1B、MIF、粘蛋白(例如MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2和MUM-3)、NCA66、NCA95、NCA90、NY-ESO-1、PAM4抗原、胰腺癌粘蛋白、PD-1、PD-L1、PD-1受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、RS5、RANTES、SAGE、5100、存活蛋白、存活蛋白-2B、T101、TAC、TAG-72、肌腱蛋白、Thomson-Friedenreich抗原、Tn抗原、TNF-α、肿瘤坏死抗原、TRAG-3、TRAIL受体、VEGF、VEGFR和WT-1(参见例如,Sensi等,Clin Cancer Res,12:5023-32(2006);Parmiani等,J Immunol,178:1975-79(2007);Novellino等,Cancer Immunol Immunother,54:187-207(2005))。

[0157] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所靶向的TAA是血液学癌症相关的抗原。此类抗原的实例包括但不限于BCMA、C5、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD38、CD40、CD45、CD52、CD56、CD66、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD138、CTLA-4、CXCR4、DKK、EphA3、GM2、HLA-DR $\beta$ 、整联蛋白 $\alpha$ V $\beta$ 3、IGF-R1、IL6、KIR、PD-1、PD-L1、TRAILR1、TRAILR2、转铁蛋白受体和VEGF。在一些实施方案中,TAA是恶性肿瘤B细胞表达的抗原,例如CD19、CD20、CD22、CD25、CD38、CD40、CD45、CD74、CD80、CTLA-4、IGF-R1、IL6、PD-1、TRAILR2或VEGF。

[0158] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所靶向的TAA是与实体瘤相关的抗原。此类抗原的实例包括但不限于CAIX、钙粘素、CEA、c-MET、CTLA-4、EGFR家族成员、EpCAM、EphA3、FAP、叶酸结合蛋白、FR- $\alpha$ 、神经节苷脂(例如GC2、GD3和GM2)、HER2、HER3、IGF-1R、整联蛋白 $\alpha$ V $\beta$ 3、整联蛋白 $\alpha$ 5 $\beta$ 1、Le $\gamma$ 、Liv1、间皮素、粘蛋白、NaPi2b、PD-1、PD-L1、PD-1受体、pgA33、PSMA、RANKL、ROR1、TAG-72、肌腱蛋白、TRAILR1、TRAILR2、VEGF、VEGFR及以上所列的其它抗原。

[0159] 多特异性抗原结合构建体所包含的TAA结合多肽构建体可以呈各种已知形式中的任一种,包括例如Fab形式、scFv形式或sdAb形式。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所包含的TAA结合多肽构建体可以是TAA的天然配体或天然配体的功能片段。在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含一个以上TAA结合多肽构建体。在此类实施方案中,TAA结合多肽构建体可以连接在一起,例如呈图1B所示的Fab-Fab、scFv-scFv或Fab-scFv。还考虑到其它形式,例如,多特异性抗原结合构建体包含Fc和两个或更多个各自靶向TAA的抗原结合多肽构建体,其中所述抗原结合多肽构建体与Fc的不同部分连接。在某些实施方案中,所述一个或多个TAA结合多肽构建体可以呈Fab或scFv形式,或其组合。

[0160] 在某些实施方案中,抗原结合多肽构建体可以源自针对TAA的已知抗体或其抗体的结合结构域或片段。结合结构域类型的实例包括Fab片段、scFv和sdAb。此外,如果已知抗TAA抗体或结合结构域的抗原结合部分为Fab,则Fab可以转化为scFv。同样,如果已知抗TAA抗体或结合结构域的抗原结合部分为scFv,则scFv可以转化为Fab。抗原结合结构域类型之间的转化方法是本领域已知的(参见,例如Zhou等,Mol Cancer Ther,11:1167-1476(2012)中描述的将scFv转化为Fab形式的方法)。

[0161] 商业上针对TAA的已知抗体可从许多已知来源获得。例如,可从美国模式培养物保藏所(ATCC,Manassas,Va.)获得各种分泌抗体的杂交瘤系。ATCC已经保存了许多针对不同TAA的抗体和/或已经公开了可变区序列并且可用于某些实施方案中制备多特异性抗原结合构建体。技术人员将认识到可通过简单搜索ATCC、NCBI和/或USPTO数据库获得针对不同

TAA的分泌抗体的杂交瘤的抗体序列。

[0162] 可用于制备本文所述的多特异性抗原结合构建体的特定TAA靶向抗体包括但不限于LL1(抗CD74)、LL2或RFB4(抗CD22)、维妥珠单抗(veltuzumab)(hA20、抗CD20)、利妥昔单抗(rituxumab)(抗CD20)、奥比妥珠单抗(obinutuzumab)(GA101,抗CD20)、达雷木单抗(daratumumab)(抗CD38)、兰伯丽珠单抗(lambrolizumab)(抗PD-1受体)、纳武单抗(nivolumab)(抗PD-1受体)、伊匹单抗(ipilimumab)(抗CTLA-4)、RS7(抗TROP-2)、PAM4或KC4(两者均为抗粘蛋白)、MN-14(抗CEA)、MN-15或MN-3(抗CEACAM6)、Mu-9(抗结肠特异性抗原-p)、Immuno 31(抗甲胎蛋白)、R1(抗IGF-1R)、A19(抗CD19)、TAG-72(例如CC49)、Tn、J591或HuJ591(抗PSMA)、AB-PG1-XG1-026(抗PSMA二聚体)、D2/B(抗PSMA)、G250(抗碳酸酐酶IX)、L243(抗HLA-DR)阿伦单抗(alemtuzumab)(抗CD52)、贝伐单抗(bevacizumab)(抗VEGF)、西妥昔单抗(cetuximab)(抗EGFR)、吉妥珠单抗(gemtuzumab)(抗CD33)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)(抗CD20)、帕尼单抗(panitumumab)(抗EGFR)、托西莫单抗(tositumomab)(抗CD20)、PAM4(亦称为克立瓦妥珠单抗(clivatuzumab)、抗粘蛋白)、曲妥珠单抗(trastuzumab)(抗HER2)、帕妥珠单抗(pertuzumab)(抗HER2)、泊拉妥珠单抗(polatuzumab)(抗CD79b)和anetumab(抗间皮素)。

[0163] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体所包含的TAA结合多肽构建体源自已知抗体的人源化或嵌合形式。

[0164] 非人(例如啮齿动物)抗体的“人源化”形式是含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。对于大部分而言,人源化抗体为人免疫球蛋白(受者抗体),其中来自于受者高变区的残基被来自于非人物种(供者抗体)例如小鼠、大鼠、兔子或非人灵长类动物高变区的具有所需特异性、亲和力和容量的残基置换。在一些情况下,人免疫球蛋白的骨架区(FR)残基被相应的非人类残基置换。此外,人源化抗体可包含在受者抗体或供者抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体性能。一般而言,人源化抗体将包含至少一个且通常两个可变结构域的大体上全部,其中高变区全部或大体上全部与非人免疫球蛋白的高变区相对应并且FR全部或大体上全部是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还可任选包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的至少一部分。更多详情,参见Jones等,Nature,321:522-525(1986);Riechmann等,Nature,332:323-329(1988);及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596(1992)。

[0165] 可选地,也可通过标准技术产生特异性目标靶TAA的抗体并用作制备多特异性抗原结合构建体的TAA结合多肽构建体的基础。

[0166] 制备多特异性抗原结合构建体的方法

[0167] 可以使用本领域已知的标准重组方法生成多特异性抗原结合构建体(参见,例如美国专利第4,816,567号和“Antibodies:A Laboratory Manual,”第2版,Greenfield编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York,2014)。

[0168] 通常,为了重组生成多特异性抗原结合构建体,分离编码多特异性抗原结合构建体的核酸并插入一个或多个载体中以在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸可以使用常规程序容易地分离和测序(例如使用能够特异性结合编码多特异性抗原结合构建体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。

[0169] 用于编码抗原结合构建体的载体的克隆或表达的合适宿主细胞包括本文所述的

原核或真核细胞。

[0170] “重组宿主细胞”或“宿主细胞”是指包括外源性多核苷酸的细胞,与用于插入的方法无关,例如,直接摄取、转导、f交配或本领域已知产生重组宿主细胞的其它方法。外源性多核苷酸可以保持作为非整合载体,例如质粒或可选地,可以整合到宿主基因组中。

[0171] 如本文中所用,术语“真核生物”是指属于真核生物系统发生域的生物体,例如动物(包括但不限于哺乳动物、昆虫、爬行动物和鸟类)、纤毛虫类、植物((包括但不限于单子叶植物、双子叶植物和藻类)、真菌、酵母、鞭毛虫、微孢子虫、原生生物等)。

[0172] 如本文中所用,术语“原核生物”是指原核生物体。例如,非真核生物体可以属于真细菌(包括但不限于大肠杆菌(*Escherichia coli*)、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)等)系统发生域,或古细菌(包括但不限于詹氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)、嗜热自养甲烷杆菌(*Methanobacterium thermoautotrophicum*)、嗜盐菌属(*Halobacterium*) (例如嗜盐富饶菌(*Haloferax volcanii*)和盐杆菌属种NRC-1)、超嗜热古菌(*Archaeoglobus fulgidus*)、强烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)、极端嗜热古菌(*Pyrococcus horikoshii*)、嗜热泉生古细菌(*Aeuryopyrum pernix*)等)系统发生域。

[0173] 例如,在细菌中,尤其是在不需要糖基化和Fc效应功能时,产生多特异性抗原结合构建体。细菌中抗原结合构建体片段和多肽的表达,参见例如,美国专利第5,648,237、5,789,199和5,840,523号。(还参见Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003),第245-254页,其描述了大肠杆菌中抗体片段的表达)。表达后,可从细菌细胞浆状物的可溶性成分中分离出抗原结合构建体并且可以进一步纯化。

[0174] 除原核生物外,真核微生物例如丝状真菌或酵母是编码多特异性抗原结合构建体的载体的合适克隆宿主或表达宿主,包括其糖基化途径已经“人源化”的真菌和酵母菌株,导致产生具有部分或完全人类糖基化模式的抗原结合构建体。参见Gemgross, Nat.Biotech.22:1409-1414 (2004), 和Li等,Nat.Biotech.24:210-215 (2006)。

[0175] 用于表达糖基化抗原结合构建体的合适宿主细胞也源自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多可以连同昆虫细胞一起使用,特别是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞的杆状病毒菌株。

[0176] 植物细胞培养物也可用作宿主。参见,例如美国专利第5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429号(描述了用于在转基因植物中产生抗原结合构建体的PLANTIBODIES<sup>TM</sup>技术)。

[0177] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适应于悬浮生长的哺乳动物细胞系可能有用。有用的哺乳动物宿主细胞系的其它实例为SV40 (COS-7) 转化的猴肾CV1系;人胚肾细胞(例如Graham等,J.Gen Virol.,36:59 (1977) 中描述的293或293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞尔托利细胞(例如Mather,BiolReprod,23:243-251 (1980) 中描述的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT060562);TRI细

胞(例如,如Mather等,Annals N.Y.Acad Sci,383:44-68(1982)中所述);MRC 5细胞;和FS4细胞。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR<sup>-</sup>CHO细胞(Urlaub等,Proc Natl Acad Sci USA,77:4216(1980));和骨髓瘤细胞系,例如Y0、NS0和Sp2/0。对于适于抗原结合构建体生成的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如,Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编辑,Humana Press,Totowa,N.J.),第255-268页(2003)。

[0178] 在一些实施方案中,在稳定的哺乳动物细胞中通过下述方法生成本文所述的多特异性抗原结合构建体,所述方法包括按预定比率,用编码多特异性抗原结合构建体的核酸转染至少一种稳定的哺乳动物细胞,并且使所述核酸在至少一种哺乳动物细胞内表达。在一些实施方案中,在瞬时转染实验中确定核酸的预定比率以确定在表达产物中产生最高百分比的多特异性抗原结合构建体的输入核酸的相对比率。

[0179] 在一些实施方案中,在稳定的哺乳动物细胞中生成多特异性抗原结合构建体的方法中,稳定的哺乳动物细胞的表达产物包含与单体重链或轻链多肽或其它抗体相比,较大百分比的所需多特异性抗原结合构建体。在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体糖基化。

[0180] 在一些实施方案中,在稳定的哺乳动物细胞中生成多特异性抗原结合构建体的方法中,所述方法还包括鉴定和纯化所需多特异性抗原结合构建体。在一些实施方案中,鉴定是通过液相色谱法和质谱分析法中的一种或两种。

[0181] 若需要,可以在表达之后纯化或分离多特异性抗原结合构建体。可以本领域技术人员已知的各种方式分离或纯化蛋白质。标准纯化方法包括色谱技术,包括在大气压或高压下使用诸如FPLC和HPLC等系统进行的离子交换、疏水相互作用、亲和、分级或凝胶过滤及反相色谱法。纯化方法还包括电泳、免疫、沉淀、透析和色谱聚焦技术。超滤和透析过滤,连同蛋白质浓缩也有用。正如本领域已知的,各种天然蛋白质结合Fc和抗体,并且这些蛋白质可用于纯化抗原结合构建体。例如,细菌蛋白A和G结合Fc区。同样,细菌蛋白L结合一些抗体的Fab区。常常由特定融合伴侣使得纯化成为可能。例如,可以使用谷胱甘肽树脂(如果采用GST融合)、Ni<sup>+2</sup>亲和色谱法(如果采用His-标签)或固定化抗flag抗体(如果采用flag-标签)纯化抗体。合适纯化技术的通用指南,参见例如,Protein Purification:Principles and Practice,第3版,Scopes,Springer-Verlag, NY(1994)。必需的纯化程度将根据抗原结合构建体的用途而改变。在一些情况下,可能不需要纯化。

[0182] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可以使用阴离子交换色谱法纯化,包括但不限于Q-琼脂糖、DEAE琼脂糖、poros HQ、poros DEAE、Toyopearl Q、Toyopearl QAE、Toyopearl DEAE、Resource/Source Q和DEAE、Fractogel Q或DEAE柱,或其等效物或等同物上进行的色谱法。

[0183] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可以使用阳离子交换色谱法纯化,包括但不限于SP-琼脂糖、CM琼脂糖、poros HS、poros CM、Toyopearl SP、Toyopearl CM、Resource/Source S或CM,或Fractogel S或CM柱,或其等效物或等同物上进行的色谱法。

[0184] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体大体上是纯的。术语“大体上是纯的”(或“大体上纯化”)是指本文所述的构建体或其变体可大体上或基本上不含在其自然发生环境(即天然细胞或宿主细胞)中所发现的那样,在重组生成的构建体的情况下,通常伴

随蛋白质或与之相互作用的组分。在某些实施方案中,大体上不含细胞物质的构建体包括具有少于约30%、少于约25%、少于约20%、少于约15%、少于约10%、少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%或少于约1% (按干重计) 的污染蛋白的蛋白制剂。由宿主细胞重组生成构建体时,某些实施方案中蛋白质以细胞干重的约30%、约25%、约20%、约15%、约10%、约5%、约4%、约3%、约2%或约1%或更少存在。由宿主细胞重组生成构建体时,某些实施方案中,蛋白质以约5g/L、约4g/L、约3g/L、约2g/L、约1g/L、约750mg/L、约500mg/L、约250mg/L、约100mg/L、约50mg/L、约10mg/L或约1mg/L或更少存在于培养基中。

[0185] 在某些实施方案中,适用于如本文所述的包含异二聚Fc的多特异性抗原结合构建体的术语“大体上纯化”意指正如通过适当方法,例如SDS/PAGE分析、RP-HPLC、尺寸排阻色谱法(SEC)和毛细管电泳所测定的,异二聚Fc的纯度水平为至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%,具体地,纯度水平为至少约75%、80%、85%,并且更具体地,纯度水平为至少约90%,纯度水平为至少约95%,纯度水平为至少约99%或更高。

[0186] 多特异性抗原结合构建体也可以使用本领域已知的技术化学合成(参见例如,Creighton, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y (1983), 和Hunkapiller等, Nature, 310:105-111 (1984))。例如,可以通过使用肽合成仪合成与多肽片段对应的多肽。此外,若需要,可以将非经典氨基酸或化学氨基酸类似物作为取代或添加引入到多肽序列中。非经典氨基酸包括但不限于常见氨基酸的D-异构体、2,4-二氨基丁酸、 $\alpha$ -氨基异丁酸、4氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、g-Abu、e-Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、半胱氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、氟氨基酸、设计氨基酸例如 $\alpha$ -甲基氨基酸、Ca-甲基氨基酸、Na-甲基氨基酸和一般氨基酸类似物。

[0187] 本公开的某些实施方案涉及编码本文所述的多特异性抗原结合构建体的分离核酸。此类核酸可以编码包含多特异性抗原结合构建体的VL的氨基酸序列和/或包含多特异性抗原结合构建体的VH的氨基酸序列(例如,抗原结合构建体的轻链和/或重链)。

[0188] 某些实施方案涉及包含编码本文所述的多特异性抗原结合构建体的核酸的载体(例如表达载体)。可由单个载体包含所述核酸或者可由一个以上载体包含所述核酸。在一些实施方案中,多顺反子载体包含所述核酸。

[0189] 某些实施方案涉及包含此类核酸或一个或多个包含所述核酸的载体的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞包含含有核酸的载体(例如已经转化),所述核酸编码包含抗原结合多肽构建体的VL的氨基酸序列和包含抗原结合多肽构建体的VH的氨基酸序列。在一些实施方案中,宿主细胞包含第一载体和第二载体(例如已经转化),第一载体包含编码包含抗原结合多肽构建体的VL的氨基酸序列的核酸并且第二载体包含编码包含抗原结合多肽构建体的VH的氨基酸序列的核酸。在一些实施方案中,宿主细胞为真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,或人胚肾(HEK)细胞或淋巴样细胞(例如Y0、NS0、Sp20细胞)。

[0190] 某些实施方案涉及制备多特异性抗原结合构建体的方法,其包括在适于多特异性抗原结合构建体表达的条件下培养已经向其中引入了编码多特异性抗原结合构建体的核酸的宿主细胞,并且任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收多特异性抗原结合构建体。

[0191] 本公开的某些实施方案涉及如本文所述的多特异性抗原结合构建体和CAR或工程化TCR在T细胞或NK细胞中的共表达。在T细胞中共表达CAR和抗体的方法是本领域已知的(参见例如,国际专利公布第WO 2014/011988号)。

[0192] 因此,一些实施方案涉及包含编码CAR或工程化TCR的核酸,和编码多特异性抗原结合构建体的核酸的工程化T细胞或NK细胞。一些实施方案涉及在T细胞或NK细胞中共表达如本文所述的多特异性抗原结合构建体和CAR或工程化TCR的方法,其包括将编码CAR或工程化TCR的核酸和编码多特异性抗原结合构建体的核酸引入细胞中,并且在适于CAR或工程化TCR和多特异性抗原结合构建体表达的条件下培养所述细胞。在某些实施方案中,编码CAR或工程化TCR的核酸和编码多特异性抗原结合构建体的核酸均呈载体形式。

[0193] 翻译后修饰

[0194] 在某些实施方案中,本文所述的多特异性抗原结合构建体可在翻译期间或之后进行差异性修饰。

[0195] 如本文中所用,术语“修饰”是指对指定多肽产生的任何变化,例如多肽长度、氨基酸序列、化学结构的变化,多肽的共翻译修饰或翻译后修饰。

[0196] 术语“翻译后修饰”是指天然或非天然氨基酸在并入多肽链之后,对此类氨基酸发生的任何修饰。仅举例而言,该术语涵盖共翻译体内修饰、共翻译体外修饰(例如在无细胞翻译系统中)、翻译后体内修饰和翻译后体外修饰。

[0197] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可包含诸如以下修饰:糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化,通过已知保护/阻断基团衍生化,蛋白质裂解或与抗体分子或抗原结合构建体或其它细胞配体的连接,或这些修饰的组合。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可通过已知技术化学修饰,包括但不限于通过溴化氰、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶、V8蛋白酶或NaBH<sub>4</sub>进行特异性化学裂解;乙酰化;甲酰化;氧化;还原或在衣霉素存在下代谢合成。

[0198] 抗原结合构建体另外的任选翻译后修饰包括例如N连接或O连接碳水化合物链,加工N端或C端,化学部分与氨基酸骨架附连,化学修饰N连接或O连接碳水化合物链以及N端甲硫氨酸残基由于原核宿主细胞表达而添加或缺失。本文所述的多特异性抗原结合构建体可任选经可检测标记,例如酶、荧光、同位素或亲和标记修饰以允许检测和分离蛋白质。合适的酶标记的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光物质的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光物质的实例包括鲁米诺(luminol);生物发光物质的实例包括萤光素酶、萤光素或水母发光蛋白;及合适的放射性物质的实例包括碘、碳、硫、氚、铟、锝、镓、钯、钼、锝或氟。

[0199] 在一些实施方案中,本文所述的多特异性抗原结合构建体可以附连至与射电金属离子结合的大环螯合剂。

[0200] 在通过自然过程(例如翻译后加工)或通过化学修饰技术修饰多特异性抗原结合构建体的那些实施方案中,相同类型的修饰可任选地以相同或不同程度存在于指定多肽中的几个位点。修饰包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、核黄素共价附连、血红素部分共价附连、核苷酸或核苷酸衍生物共价附连、脂质或脂质衍生物共价附连、磷脂酰肌醇共价

附连、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、形成共价交联、形成半胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 $\gamma$ -羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、十四烷基化、氧化、聚乙二醇化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转运RNA介导的向蛋白质添加氨基酸(例如精氨酸化)和泛素化(参见例如,Proteins-Structure and Molecular Properties,第2版,T.E.Creighton,W.H.Freeman and Company,New York(1993);Post-Translational Covalent Modification of Proteins,B.C.Johnson编辑,Academic Press,New York,第1-12页(1983);Seifter等,Meth.Enzymol.182:626-646(1990);Rattan等,Ann.N.Y.Acad.Sci.663:48-62(1992))。

[0201] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可附连于固体支撑物,固体支撑物可能对被本文所述蛋白质结合的,或结合本文所述蛋白质或与本文所述蛋白质结合的多肽的免疫测定或纯化特别有用。此类固体支撑物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙(nylon)、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0202] 测试多特异性抗原结合构建体

[0203] 可以使用标准测定法和本领域已知的方案测试多特异性抗原结合构建体结合靶免疫治疗剂和肿瘤相关抗原的能力。此类测定法和方案包括,例如基于ELISA的测定法和表面等离子体共振(SPR)技术。表达靶CAR或重组TCR的细胞可商购(例如,来自ProMab Biotechnologies Inc.,Richmond,CA,或来自Creative Biolabs,Shirley,NY)或者可以通过标准技术制备(参见例如,Yam等,Mol.Ther.5:479(2002);和国际专利公布第WO 2015/095895号)。表达各种靶肿瘤相关抗原的细胞系也可商购获得。

[0204] 另外可以测试多特异性抗原结合构建体使靶免疫治疗剂重新定向至表达靶肿瘤相关抗原的肿瘤细胞的能力。例如,免疫治疗剂包含工程化T细胞或NK细胞时,可以在体外使用本领域已知的标准测定法评估T细胞或NK细胞接触多特异性抗原结合构建体之后的功能反应。实施例中提供了一些示例性测定法并且在下面有描述。

[0205] 例如,在多特异性抗原结合构建体存在或不存在的情况下,孵育工程化细胞与肿瘤相关抗原表达细胞和对照细胞之后,评估工程化T细胞或NK细胞的细胞因子释放。孵育共同培养的细胞适当时间后,可以收集上清液并且,例如通过多重细胞因子免疫测定(Luminex®)或ELISA测定IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和/或IL-2的水平。T细胞或NK细胞的细胞因子释放是细胞活化的指标并且本领域已知与细胞毒性相关(参见例如,Kochenderfer等,J Immunother,32(7):689-702(2009);Lanitis等,Molec Ther,20(3):633-643(2012)和Mardiros等,Blood,122(18):3138-3148(2013))。

[0206] 也可以任选地,例如通过在不同浓度的多特异性抗原结合构建体存在或不存在的情况下,孵育工程化T细胞或NK细胞与靶肿瘤细胞,评估T细胞或NK细胞的溶细胞活性。孵育后,通过各种技术监测靶肿瘤细胞的溶解,所述技术例如流式细胞术、 $^{51}\text{Cr}$ 释放、荧光测定法或动力学活力平台(例如Xcelligence(Acea))。

[0207] 也可以与表达靶肿瘤相关抗原和多特异性抗原结合构建体的两种细胞一起孵育之后,评估工程化T细胞或NK细胞的增殖。例如,工程化T细胞或NK细胞可以标记有适当标记,例如羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE),并且可以通过流式细胞术评估T细胞或NK细胞的增殖。

[0208] 也可通过标准技术评价多特异性抗原结合构建体的体内效应。例如,通过在工程

化细胞过继转移和向人源异种移植 (PDX) 肿瘤模型动物受试者施用多特异性抗原结合构建体之后监测肿瘤。各种PDX肿瘤模型可商购获得并且可由技术人员基于所采用的靶肿瘤相关抗原容易地选择适当模型。可在肿瘤移植后向动物施用工程化T细胞或NK细胞, 然后在适当时间段后施用多特异性抗原结合构建体。多特异性抗原结合构建体可经静脉 (i.v.)、腹膜内 (i.p.) 或皮下 (s.c.) 施用。给药方案和量不同, 但可由技术人员容易地确定。示例性剂量为10mg/kg, 每周一次。可通过标准程序监测肿瘤生长。例如, 使用了标记的肿瘤细胞时, 可通过适当成像技术监测肿瘤生长。对于实体瘤而言, 也可用卡尺测量肿瘤尺寸。

[0209] 可以通过先用治疗剂预处理T细胞以允许所述试剂衔接T细胞, 然后使细胞与多特异性抗原结合构建体接触, 测试多特异性抗原结合构建体重新定向免疫治疗剂的能力, 所述免疫治疗剂是能够结合T细胞和肿瘤相关抗原的治疗剂, 例如双特异性T细胞衔接子 (BiTE)。然后使用如上所述的相同方法测定T细胞的细胞毒性、细胞因子释放和增殖。

[0210] 药物组合物

[0211] 某些实施方案涉及包含本文所述的多特异性抗原结合构建体和药学上可接受的载体。

[0212] 术语“药学上可接受的”意指经联邦或国家政府监管机构批准或列入《美国药典》或其它公认药典中用于动物并且更特别是用于人类中。

[0213] 术语“载体”是指与之一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂、媒介物或其组合。此类药物载体可以是无菌液体, 例如水或油, 包括石油、动物、植物或合成来源的那些, 例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。在一些方面中, 载体是自然界中未发现的人造载体。当药物组合物经静脉施用时, 可将水用作载体。盐溶液及葡萄糖和甘油水溶液也可用作液体载体, 特别是对于注射液而言。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。若需要, 所述组合物还可含少量润湿剂或乳化剂, 或pH缓冲剂。E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中描述了合适的药物载体的实例。

[0214] 药物组合物可以呈溶液、混悬液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释制剂等形式。可用传统粘合剂和载体例如甘油三酯将组合物配制成栓剂。口服制剂可包括标准载体例如药物级甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0215] 药物组合物将含有治疗有效量的多特异性抗原结合构建体, 连同适量载体以便提供向患者恰当施用的形式。所述制剂应适合施用模式。

[0216] 在某些实施方案中, 根据常规程序将包含多特异性抗原结合构建体的组合物配制成适于向人类静脉施用的药物组合物。通常, 用于静脉施用的组合物是无菌等渗含水缓冲液中的溶液。必要时, 所述组合物还可包括增溶剂和局部麻醉剂例如利多卡因 (lignocaine) 以减轻注射部位的疼痛。通常, 所述成分单独提供或呈单位剂型混合在一起, 例如在指示了活性剂的量的密闭容器如安瓿、小袋中呈冻干粉或无水浓缩物。要通过输注施用组合物时, 可以用装有药物级无菌水或盐水的输液瓶分配组合物。通过注射施用组合物时, 可以提供一安瓿的无菌注射用水或盐水, 以便可以在施用之前混合所述成分。

[0217] 在某些实施方案中, 将本文所述的组合物配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括与阴离子, 例如源自盐酸、磷酸、乙酸、草酸酒石酸的那些阴离子形成的盐, 和与阳离子, 例如源自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因

(procaine) 等的那些阳离子形成的盐。

[0218] 使用多特异性抗原结合构建体的方法

[0219] 本文所述的多特异性抗原结合构建体可用于重新定向靶免疫治疗剂,使其结合与其同源抗原或表位不同的肿瘤细胞抗原或表位。在这种情况下,多特异性抗原结合构建体所包含的靶向肿瘤相关抗原的抗原结合结构域提供了免疫治疗剂所包含的抗原结合结构域的替代抗原结合结构域。在一些实施方案中,靶肿瘤细胞可能丧失、突变、翻译后修饰或下调免疫治疗剂所靶向的肿瘤相关抗原的表达,并且多特异性抗原结合构建体因此提供了替代抗原结合结构域,免疫治疗剂可以通过其结合肿瘤细胞。替代抗原结合结构域可结合靶肿瘤细胞上的不同肿瘤相关抗原,或其可以结合相同肿瘤相关抗原上的不同表位。

[0220] 因此,某些实施方案涉及使肿瘤相关抗原特异性免疫治疗剂朝替代性肿瘤抗原重新定向的方法。在一些实施方案中,此类重新定向可以帮助克服肿瘤细胞中涉及抗原下调和/或肿瘤细胞异质性的常见治疗抗性。

[0221] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可用于增强靶免疫治疗剂结合肿瘤细胞的能力。在这种情况下,多特异性抗原结合构建体提供了结合靶肿瘤细胞上的肿瘤相关抗原的附加抗原结合结构域。附加抗原结合结构域可以结合靶肿瘤细胞上的不同肿瘤相关抗原,或其可以结合相同肿瘤相关抗原上的不同表位。

[0222] 某些实施方案涉及使用多特异性抗原结合构建体延长免疫治疗剂疗效的方法。某些实施方案涉及使用多特异性抗原结合构建体提高免疫治疗剂疗效的方法。例如,在一些实施方案中,可以向目前正在经历用免疫治疗剂治疗的患者施用多特异性抗原结合构建体,以便增加免疫治疗剂治疗有效的可能性。将受益于此类治疗的患者将包括,例如显示出低水平的免疫治疗剂靶肿瘤相关抗原,或其中存在免疫治疗剂靶肿瘤相关抗原的表达丧失、改变或降低风险,或在免疫治疗剂靶肿瘤相关抗原的表达上显示出显著异质性的患者。在这种情况下,多特异性抗原结合构建体可同时与免疫治疗剂一起施用或其可以在继施用免疫治疗剂后施用。多特异性抗原结合构建体的此类后继施用意指免疫治疗剂和多特异性抗原结合构建体的施用间隔限定时间段,该时间段可以较短(例如大约几分钟或几小时)或是长期的(例如大约几天或几周)。

[0223] 在一些实施方案中,可以向先前已经接受了免疫治疗剂治疗和例如由于免疫治疗剂靶肿瘤相关抗原的表达水平低或表达丧失而复发或未能对治疗产生反应的患者施用多特异性抗原结合构建体。在此类实施方案中,预计通过施用多特异性抗原结合构建体使免疫治疗剂重新定向会引发或重新引发免疫治疗剂的疗效。

[0224] 某些实施方案涉及治疗正在经历或已经经历免疫治疗剂治疗的患者的癌症的方法,其包括向患者施用多特异性抗原结合构建体。在一些实施方案中,所述患者已经接受了使用所述免疫治疗剂的预先治疗。在此类实施方案中,所述患者已经复发或用免疫治疗剂预先治疗失败。

[0225] 在一些实施方案中,可以通过评估免疫治疗剂所靶向的肿瘤相关抗原的表达和/或评估表明预先免疫疗法持续性的适当生物标志物的存在来鉴定很可能对用多特异性抗原结合构建体治疗产生反应的患者。适当生物标志物的评估可包括,例如直接检测T细胞或NK细胞上的CAR或转基因TCR,检测增加的活化记忆T细胞,或检测药效学标志,例如B细胞靶向免疫疗法中的低健康B细胞数。免疫治疗剂所靶向的肿瘤相关抗原的赘生性细胞表达减

少并且具有预先免疫疗法持续性证据的患者很可能对用多特异性抗原结合构建体治疗产生反应。

[0226] 许多当前免疫疗法用于血液学癌症的治疗。因此,在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可用于治疗血液学癌症的方法中。血液学癌症的实例包括但不限于急性白血病,例如B细胞急性淋巴性白血病(BALL)、T细胞急性淋巴性白血病(TALL)、小淋巴细胞性白血病(SLL)、急性淋巴性白血病(ALL)或急性骨髓性白血病(AML);慢性白血病,例如慢性骨髓性白血病(CML)或慢性淋巴细胞性白血病(CLL);套细胞淋巴瘤(MCL)、B细胞幼淋巴细胞性白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)(例如富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、中枢神经系统的原发性DLCBL、原发性皮肤DLBCL型,或老年人EBV+DLBCL)、慢性炎症相关的DLBCL、滤泡性淋巴瘤、小儿滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴组织增生病、MALT淋巴瘤(粘膜相关淋巴组织的结外边缘区淋巴瘤)、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、霍奇金淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突细胞肿瘤、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)、脾边缘区淋巴瘤、脾淋巴瘤/白血病(例如无法分类的)、脾弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、变异型毛细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤(一种重链疾病(例如 $\alpha$ 重链疾病,  $\gamma$ 重链疾病,或 $\mu$ 重链疾病))、浆细胞骨髓瘤,孤立性骨浆细胞瘤、髓外浆细胞瘤、结节性边缘区淋巴瘤、小儿结节性边缘区淋巴瘤、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK+大B细胞淋巴瘤、HHV8相关多中心卡斯特莱曼病(HHV8-associated multicentric Castleman disease)中发生的大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、B细胞淋巴瘤或无法分类的血癌(例如,具有介于DLBCL和伯基特淋巴瘤之间或介于DLBCL和经典型霍奇金淋巴瘤之间的中间特征)。

[0227] 免疫疗法也越来越多地用于实体瘤的治疗。因此,在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可用于治疗实体瘤的方法中。常见实体瘤的实例包括但不限于脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌和子宫癌,以及非小细胞肺癌和结直肠癌。各种形式的淋巴瘤也可导致实体瘤的形成,因此常常也被视为实体瘤。

[0228] 某些实施方案涉及使用结合CAR或TCR和肿瘤相关抗原的多特异性抗原结合构建体激活工程化为表达CAR或TCR的T细胞或NK细胞的方法。激活T细胞或NK细胞可导致细胞因子例如IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 和/或IL-2的释放,和/或对表达肿瘤相关抗原的细胞的细胞毒性。所述方法可在体外、离体或在体内进行。

#### [0229] 施用

[0230] 各种施用模式适于向患者施用多特异性抗原结合构建体,例如雾化吸入、注射、摄取、输液、植入或移植。多特异性抗原结合构建体的适当施用模式和途径可由技术从业者,考虑待治疗的病状和患者来确定。在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可经皮下、皮内、瘤内、结节内、髓内、肌内、静脉内(i.v.)或腹膜内向患者施用。通常,在癌症治疗中,例如通过向患者血流中快速浓注或连续输注,向患者全身施用治疗化合物。

[0231] 在多特异性抗原结合构建体将要在具有CAR或工程化TCR的T细胞或NK细胞中共表达的某些实施方案中,在向患者施用所述细胞之前在体外进行以下至少一项:i)细胞扩增, ii)向细胞内引入编码CAR或TCR的核酸和编码多特异性抗原结合构建体的核酸,和/或 iii)

冷冻保存所述细胞。此类离体程序在本领域中众所周知。简单地说,通过标准体外转导或转染技术对分离的T细胞或NK细胞进行遗传修饰以引入表达CAR或TCR和多特异性抗原结合构建体的载体。通常,从待治疗的患者分离所述细胞(即,所述细胞是自体同源的)。然而,某些实施方案考虑使用相对于患者而言是同种异体的、同种同基因的或异种的细胞。

[0232] 使用本领域已知的标准方法离体扩增经修饰的细胞(参见,例如美国专利第5,199,942号描述的扩增造血干细胞和祖细胞的程序)。通常,T细胞离体培养和扩增包括收集PBMC,并且任选地从受试者中纯化T细胞。使用促有丝分裂刺激和任选地分化刺激的组合,例如抗CD3/CD28珠粒与外源性细胞因子如IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21来扩增T细胞(Singh等,Cancer Res,71(10):3516-27(2011))。在一些情况下,从哺乳动物的外周血收获物或骨髓移植植物中分离CD34+造血干细胞和祖细胞,并且如美国专利第5,199,942号中所述,在包含适当细胞生长因子的培养基中离体扩增此类细胞。其它因子例如Flt3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体可任选地用于培养和扩增细胞。

[0233] 然后通过合适的途径,例如通过皮内注射、皮下注射、静脉注射或直接向肿瘤或淋巴结注射,向患者施用经修饰和扩增的细胞。

[0234] 要向患者施用的以上治疗的剂量将随所治病状的确切性质和患者而改变。可以根据本领域公认的实践来进行人类施用剂量的缩放。

#### [0235] 试剂盒和制品

[0236] 本文还涵盖了包含一个或多个多特异性抗原结合构建体的试剂盒和包含一个或多个编码多特异性抗原结合构建体的多核苷酸的试剂盒。在试剂盒包含一个或多个多核苷酸的某些实施方案中,可以呈可用于转化宿主细胞的载体形式提供所述多核苷酸。

[0237] 试剂盒的单独组分将包装在独立容器中,并且与此类容器相关联的可以是管理药品或生物制品的生产、使用或销售的政府机构规定形式的通知,该通知反映了该机构对生产、使用或销售的批准。试剂盒可任选地含有概述多特异性抗原结合构建体或多核苷酸的使用方法或施用方案的说明书或指示。

[0238] 当试剂盒的一种或多种组分作为溶液,例如水溶液或无菌水溶液提供时,容器装置本身可以是吸入器、注射器、移液管、滴管或其它类似装置,溶液可以从中施用给受试者或施加至试剂盒的其它组分并与之混合。

[0239] 试剂盒的组分也可以呈干燥或冻干形式提供并且试剂盒可另外含有用于冻干组分复水的合适溶剂。不论容器数量或类型如何,本文所述的试剂盒还可包括用于帮助向患者施用组合物的仪器。此类仪器可以是吸入器、鼻喷雾装置、注射器、移液管、镊子、测量勺、滴管或类似的医学上批准的递送运载工具。

[0240] 某些实施方案涉及含有如本文所述可用于患者治疗的物质的制品。所述制品包括容器和容器上或与容器相关联的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、静脉输液袋等。容器可以由多种材料形成,例如玻璃或塑料。所述容器容纳包含多特异性抗原结合构建体的组合物,所述组合物是单独的或与另一种有效治疗患者的组合物组合,并且所述容器可具有无菌接入口(例如所述容器可以是静脉输液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。标签或包装说明书表明该组合物用于治疗所选择的病状。在一些实施方案中,所述制品可包含(a)其中含有组合物的第一容器,其中所述组合物包含本文所述的多特异性抗原结合构建体;(b)其中含有组合物的第二容器,其中第二容器中的组合物

包含另外的细胞毒性剂或其它治疗剂。在此类实施方案中,所述制品还可包括包装说明书,其表明该组合物可以用于治疗特定病状。可选地或另外,所述制品还可包括第二(或第三)容器,其包含药学上可接受的缓冲液,例如抑菌性注射用水(BWF1)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)和葡萄糖溶液。所述制品还可任选地包括从商业和用户角度来看合乎需要的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0241] 多肽和多核苷酸

[0242] 如本文所述,多特异性抗原结合构建体包含至少一个多肽。某些实施方案涉及编码本文所述的此类多肽的多核苷酸。

[0243] 本文所述的多特异性抗原结合构建体、多肽和多核苷酸通常是分离的。如本文中所用,“分离的”意指试剂(例如多肽或多核苷酸)已经被鉴定并且从其细胞培养自然环境的组分中分开和/或回收。其自然环境的污染组分是会干扰抗原结合构建体的诊断或治疗用途的物质,并且可包括酶、激素和其它蛋白或非蛋白溶质。分离的还指试剂已经,例如通过人为干预经合成生成。

[0244] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换用于指氨基酸残基的聚合物。即,针对多肽的描述同样适用于对肽的描述和对蛋白质的描述,并且反之亦然。所述术语适用于自然存在的氨基酸聚合物以及其中一个或多个氨基酸残基是非自然编码的氨基酸的氨基酸聚合物。如本文中所用,所述术语涵盖任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白,其中氨基酸残基通过共价肽键连接。

[0245] 术语“氨基酸”是指自然存在和非自然存在的氨基酸,以及以类似于自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。自然编码的氨基酸是20种常见氨基酸(丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)及吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸。氨基酸类似物是具有与自然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即与氢结合的碳、羧基、氨基和“R”基团)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸甲基锍。此类类似物具有经修饰的R基团(例如,正亮氨酸)或经修饰的肽骨架,但保持与自然存在的氨基酸相同的基本化学结构。对氨基酸的提及包括(例如)自然存在的蛋白性L-氨基酸;D-氨基酸,经化学修饰的氨基酸例如氨基酸变体和衍生物;自然存在的非蛋白性氨基酸例如β-丙氨酸、鸟氨酸等,及具有本领域已知是氨基酸特有的性质的化学合成化合物。非自然存在的氨基酸的实例包括但不限于α-甲基氨基酸(例如α-甲基丙氨酸)、D-氨基酸、组氨酸类氨基酸(例如2-氨基-组氨酸、β-羟基-组氨酸、高组氨酸)、侧链上具有额外亚甲基的氨基酸(“高”氨基酸)和侧链中的羧酸官能团被磺酸基团置换的氨基酸(例如半胱氨酸)。向本文所述的抗原结合构建体中并入非自然氨基酸,包括合成的非天然氨基酸、经取代的氨基酸或一个或多个D-氨基酸在许多不同方面是有利的。含D-氨基酸的肽等,与含L-氨基酸的对应物相比,在体外或体内表现出增加的稳定性。因此,构建并入D-氨基酸的肽等,在期望或需要更高的细胞内稳定性时可能特别有用。D-肽,例如,通常对内源性肽酶和蛋白酶具有抗性,从而在需要此类肽时,提供了改善的分子生物利用率和延长的体内寿命。另外,对于主要组织相容性复合物II类限制性呈递给T辅助细胞,D-肽不能被有效加工,因此不太可能在整个生物体中诱导体液免疫反应。

[0246] 本文可以用其通常已知的三字母符号或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的

单字母符号来指氨基酸。同样,可以用其通常接受的单字母代码来指核苷酸。

[0247] 本文还包括编码多特异性抗原结合构建体的多肽的多核苷酸。术语“多核苷酸”或“核苷酸序列”旨在表示两个或更多个核苷酸分子的连续延伸。核苷酸序列可以是基因组、cDNA、RNA、半合成或合成来源,或其任何组合,并且可以包括单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸、脱氧核糖核苷、核糖核苷或核糖核苷酸及其聚合物。除非特别限制,否则该术语涵盖含有天然核苷酸已知类似物的多核苷酸,其具有与参考多核苷酸相似的结合特性并以与自然存在的核苷酸相似的方式代谢。除非另有特别限制,否则该术语还指寡核苷酸类似物,包括PNA(肽核酸)和反义技术中使用的DNA类似物(硫代磷酸酯、氨基磷酸酯等)。除非另有说明,否则特定核苷酸序列还隐含地涵盖其经保守性修饰的变体(包括但不限于简并密码子取代)和互补序列以及明确指出的序列。具体地,简并密码子取代可以通过产生其中一个或多个选定(或所有)密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);Rossolini等,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0248] “经保守性修饰的变体”适用于氨基酸和核苷酸序列。关于特定核苷酸序列,“经保守性修饰的变体”是指那些编码同样或基本上同样的氨基酸序列的核苷酸序列,或者当核苷酸序列不编码氨基酸序列时,是指基本上同一序列。由于遗传密码的简并性,大量功能同样的核酸编码任何指定蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU全部编码氨基酸丙氨酸。因此,在密码子指定丙氨酸的每个位置,密码子可以改变为所述的任何相应密码子而不改变编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”,其是保守性修饰变异的一种。本领域普通技术人员将认识到核苷酸序列中的每个密码子(除了AUG,其通常是甲硫氨酸的唯一密码子,和TGG,其通常是色氨酸的唯一密码子)均可修饰以产生功能同样的分子。因此,每个所述序列中隐含编码多肽的核苷酸序列的每个沉默变异。

[0249] 关于氨基酸序列,本领域普通技术人员将认识到改变、添加或删除编码序列中的单个氨基酸或一小部分氨基酸的核酸、肽、多肽或蛋白质序列单个取代、缺失或添加是“经保守性修饰的变体”,其中所述改变导致氨基酸的缺失、氨基酸的添加,或氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。

[0250] 提供功能相似的氨基酸的保守性取代表是本领域普通技术人员已知的。以下八类各自含有彼此保守取代的氨基酸:1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(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);和[0139]8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见例如,Creighton,Proteins:Structures and Molecular Properties(WH Freeman&Co.;第2版(1993年12月))。

[0251] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“同样”是指两个或更多个相同的序列或子序列。当在比较窗口或指定区域上比较和比对以获得最大对应性时,使用以下序列比较算法之一(或本领域普通技术人员可用的其它算法)或通过手动比对和目视检查所测量,如果序列具有一定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即,在指定区域上具有约60%同一性、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%同一性),则序列是“基本上同样的”。该定义还指测试序列的互补序列。同一性可存在于长度至少约50个氨基酸或核苷酸的区域上,或长度为75-100个氨基酸或核苷酸的区域上,或者在未指定的情况下

下,存在于整个多核苷酸或多肽序列上。编码本文所述多肽的多核苷酸,包括来自除人以外的物种的同源物,可通过包括以下步骤的方法获得:在严格杂交条件下用具有本文所述多核苷酸序列或其片段的标记探针筛选文库,并且分离含有所述多核苷酸序列的全长cDNA和基因组克隆物。此类杂交技术是本领域技术人员众所周知的。

[0252] 对于序列比较,通常一个序列充当参考序列,与测试序列进行比较。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机,如果需要,则指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或者也可以指定替代参数。然后,序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0253] 如本文中所用,“比较窗口”包括对选自20个至600个,通常为约50个至约200个,更通常为约100个至约150个的连续位置数量的任何一个的区段的参考,其中在两个序列最佳比对之后,可以将序列与相同数量的连续位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域普通技术人员已知的。可以进行用于比较的序列的最佳比对,包括但不限于通过Smith和Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c的局部同源性算法,通过Needleman和Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443的同源性比对算法,通过Pearson和Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444的相似性搜索方法,通过计算机化实现这些算法(例如,威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group, 575Science Dr., Madison, Wis.),或通过手动比对和目视检查(参加例如,Ausubel等, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995年增刊))。

[0254] 适于测定序列同一性百分比和序列相似性的算法的一个实例是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别在Altschul等, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1997) 和Altschul等, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990) 中有描述。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心的网站公开获得。BLAST算法参数W、T和X决定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列而言)默认使用字长(W)为11,期望值(E)或10,M=5,N=-4以及两条链的比较作为值。对于氨基酸序列而言,BLASTP程序默认使用字长为3,期望值(E)为10,以及BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1992))比对(B)为50,期望值(E)为10,M=5,N=-4,以及两条链的比较。通常在“低复杂度”滤波器关闭的情况下执行BLAST算法。

[0255] BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计学分析(参见例如,Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993))。BLAST算法所提供的一种相似性度量是最小总和概率(P(N)),其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指标。例如,如果在测试核酸与参考核酸的比较中最小总和概率小于约0.2,或小于约0.01,或小于约0.001,则认为核酸与参考序列相似。

[0256] 在一些方面中,多特异性抗原结合构建体包含与本文公开的表格或登录号中阐述的相关氨基酸序列或其片段至少80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同样的氨基酸序列。在一些方面中,分离的多特异性抗原结合构建体包含与本文公开的表格或登录号中阐述的相关核苷酸序列或其片段至少80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同样的多核苷酸编码的氨基酸序列。

[0257] 为了更好地理解本文所述的发明,阐述了以下实施例。应当理解,这些实施例旨在描述本发明的说明性实施方案,而非旨在以任何方式限制本发明的范围。

## 实施例

- [0258] 实施例1: 双特异性抗体变体
- [0259] 制备呈以下形式的双特异性抗原结合构建体:
- [0260] a) 杂交抗体形式, 其中一个抗原结合结构域为scFv而另一个为Fab。这些双特异性抗原结合构建体还包含IgG1异二聚Fc, 其具有驱动两个组件Fc多肽HetFcA和HetFcB异二聚缔合的CH3结构域氨基酸取代。
- [0261] HetFcA包含氨基酸取代: T350V/L351Y/F405A/Y407V
- [0262] HetFcB包含氨基酸取代: T350V/T366L/K392L/T394W
- [0263] 根据如Kabat中关于EU抗体编号的EU索引鉴定Fc区中的氨基酸残基 (Edelman等, Proc Natl Acad Sci USA, 63:78-85 (1969))。杂交抗体形式构建体包括3条多肽链: 与结合第一靶标的scFv融合的第一Fc多肽, 与VH-CH1结构域融合的第二Fc多肽, 和轻链, 其中VH-CH1结构域和轻链形成结合第二靶标的Fab区。
- [0264] b) 串联scFv形式, 其中结合第一靶标的第1VL-VH序列通过基于GlySer的间隔区连接到结合第二靶标的第2VL-VH序列。串联ScFv构建体也含6xHis-标签。
- [0265] 这样制备的双特异性抗原结合构建体在表C中有描述。“抗FMC63id”是抗CD19scFv (参见, Immunology and Cell Biology (1991) 69:411-422, 和国际专利公布第WO 2014/190273号)。“FLAG”是众所周知的氨基酸基序“DYKDDDDK” (Hopp等, Bio/Technology, 6 (10): 1204-10 (1988)), 其在本文所述的一些示例性构建体中用作阴性对照臂。BCMA和间皮素为肿瘤相关抗原 (TAA)。scFv和Fab序列由表4中鉴定的已知抗体的序列产生 (参见实施例7)。表6中提供了表C所列每种变体的氨基酸和核苷酸序列。提供了串联scFv序列, 无6xHis标签。

- [0266] 表C: 双特异性抗原结合构建体

	变体 #	形式	特异性	链 A	链 B	链 C
[0267]	16442	杂交	FLAG-CD 19	抗 FLAGVH-CH-HetFcA	抗 CD 19scFv-HetFcB	抗 FLAGVL-IgKC
	16443	杂交	FLAG-间皮素	抗 FLAGVH-CH-HetFcA	抗间皮素 scFv-HetFcB	抗 FLAGVL-IgKC

[0268]	16444	杂交	FMC63id-CD79b	抗 FMC63idVH-CH-HetFcA	抗 CD79bscFv-He tFcB	抗 FMC63idV L-IgKC
	16445	杂交	FMC63id-BCMA	抗 FMC63idVH-CH-HetFcA	抗 BCMAscFv-HetFcB	抗 FMC63idV L-IgKC
	16446	杂交	FMC63id-间皮素	抗 FMC63idVH-CH-HetFcA	抗间皮素 scFv-HetFcB	抗 FMC63idV L-IgKC
	16447	杂交	FLAG-CD79b	抗 FLAGVH-CH-HetFcA	抗 CD79bscFv-He tFcB	抗 FLAGVL-IgKC
	16448	杂交	FLAG-BCMA	抗 FLAGVH-CH-HetFcA	抗 BCMAscFv-HetFcB	抗 FLAGVL-IgKC
	16449	串联 scFv	间皮素-FLAG	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-VL	--	--
	16450	串联 scFv	FMC63id-CD79b	抗 FMC63idVL-VH-抗 CD79bVH-VL	--	--
	16451	串联 scFv	FMC63id-BCMA	抗 FMC63idVL-VH-抗 BCMAVH-VL	--	--
	16452	串联 scFv	FMC63id-间皮素	抗 FMC63idVL-VH-抗间皮素 VH-VL	--	--
	16453	串联 scFv	CD19-FLAG	抗 CD19VL-VH-抗 FLAGVH-VL	--	--
	16454	串联 scFv	CD79b-FMC63id	抗 CD79bVL-VH-抗 FMC63idVH-VL	--	--

[0269]	16455	串联 scFv	BCMA-F MC63id	抗 BCMAVL-VH -抗 FMC63idVH- VL	--	--
	16456	串联 scFv	间皮素 -FMC63id	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH- VL	--	--
	16457	串联 scFv	FLAG-CD 19	抗 FLAGVL-VH- 抗 CD19VH-VL	--	--
	16458	串联 scFv	FLAG-CD 79b	抗 FLAGVL-VH- 抗 CD79bVH-VL	--	--
	16459	串联 scFv	FLAG-BC MA	抗 FLAGVL-VH- 抗 BCMAVH-VL	--	--
	16460	串联 scFv	FLAG-间 皮素	抗 FLAGVL-VH- 抗间皮素 VH-VL	--	--
	16461	串联 scFv	CD79b-FL AG	抗 CD79bVL-VH -抗 FLAGVH-VL	--	--
	16462	串联 scFv	BCMA-FL AG	抗 BCMAVL-VH -抗 FLAGVH-VL	--	--

[0270] 实施例2:双特异性抗体生成

[0271] 如下制备实施例1中描述的命名为变体#16443 (FLAG-间皮素)、16445 (FMC63id-BCMA)、16446 (FMC63id-间皮素) 和16448 (FLAG-BCMA) 的双特异性抗原结合构建体。

[0272] 使用为了人类/哺乳动物表达而优化的密码子,通过基因合成构建编码抗体重链和轻链的基因。按照实施例7概述的一般程序克隆并表达双特异性抗体。通过蛋白A亲和色谱法,接着通过尺寸排阻色谱法分离异二聚物质,达到>90%的纯度。通过非还原SDS-PAGE

和SEC检验,所有制剂具有<5%的多聚体物质。

[0273] 实施例3:双特异性抗体与肿瘤细胞的结合

[0274] 方法

[0275] 在含10%FBS的RPMI-1640培养基中培养Raji细胞(ATCC CCL-86)和RPMI8226细胞(ATCC CCL-155)。在含10%FBS的DMEM中培养A1847细胞。离心三个细胞系中的每一个并且按5百万个细胞/ml悬浮在冷FACS缓冲液(PBS+2mM EDTA pH 7.4+0.5% BSA)中。用PBS将测试抗体稀释至0.3mg/ml。然后用PBS将抗体连续稀释至0.1mg/ml、30ug/ml、10ug/ml、3ug/ml、1ug/ml和0.3ug/ml。将10微升稀释抗体与冰上96孔板中的90ul细胞混合,并将板在冰上孵育30分钟。然后将板离心,通过倾析去除上清液,并且使细胞团块悬浮在200ul冷FACS缓冲液中。将板再次离心,通过倾析去除上清液,并且使细胞悬浮在100ul含1ug的Alexa Fluor 488缀合山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)和0.1ug的7-氨基放线菌素D(7-AAD)的冷FACS缓冲液中。将板在冰上孵育30分钟,然后同上进行冲洗并且使细胞悬浮在200ul含1%多聚甲醛的冷FACS缓冲液中。将板在4℃下孵育过夜并于第二天用BD LSR Fortessa X20流式细胞仪获取细胞。用FlowJo软件(FlowJo, LLC, Ashland, OR)分析数据。首先通过前向光散射相对于7-AAD染色对细胞进行绘图,然后对活细胞(7-AAD-阴性)进行门控并绘图作为Alexa Fluor 488染色的直方图。然后记录平均荧光并将其粘贴到Prism软件(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)中,用该软件绘制平均荧光相对于抗体浓度的图。

[0276] 结果

[0277] 如图2所示,双特异性间皮素(MSLN)定向构建体(v16443和v16446)与MSLN+A1847细胞结合,而不与对照RPMI8226细胞结合。类似地,双特异性BCMA定向构建体(v16448和v16445)与BCMA+RPMI8226细胞结合,而不与对照A1847细胞结合。

[0278] 实施例4:双特异性抗体与表达CAR的T细胞的结合

[0279] 方法

[0280] 由ProMab Biotechnologies, Inc., Richmond, CA.生成经工程化为表达对CD19有特异性的FLAG标记的第二代CAR(含细胞外抗CD19(FMC63) scFv、FLAG、CD28“铰链”和跨膜结构域,接着是细胞内CD28和CD3- $\zeta$ 信号传导结构域)的人T细胞。简言之,在Ficoll上使用密度沉积,从健康个体的外周血分离PBMC,并冷冻保存PBMC。通过用CAR编码载体和第三代包装构建体共转染HEK293细胞而产生含CAR序列的慢病毒粒子。通过超速离心从培养基中收集慢病毒粒子,通过qRT-PCR滴定并冷冻。解冻PBMC并且在含5%人AB血清、涂有CD3/CD28抗体的磁珠和IL-2的AIM-V®培养基中培养过夜。第二天在5ug/ml DEAE-葡聚糖的存在下,以5:1的感染复数用慢病毒制剂转导细胞。在接下来两周的培养中,每2-3天对细胞进行计数并添加附加培养基以保持细胞密度介于0.5至3百万个/ml。在培养第9天,使用对FLAG有特异性的抗体,通过流式细胞术评价CAR表达。

[0281] 为测量结合CAR-T细胞的抗体,离心CAR-T细胞制剂或稳定表达CD19CAR的HEK293细胞并按250万个细胞/ml使其悬浮在冷FACS缓冲液中。将测试抗体于PBS中稀释达到0.4mg/ml,然后于PBS中连续稀释达到120ug/ml和40ug/ml。将25微升抗体与冰上96孔板中的75ul细胞混合,一式三份,并且将板于冰上孵育30分钟。然后将板离心,通过倾析去除上清液,并且使细胞团块悬浮在200ul冷FACS缓冲液中。将板再次离心,通过倾析去除上清液,

并且使细胞悬浮在100ul含1ug的Alexa Fluor 488缀合山羊抗人IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 和0.1ug的7-AAD的冷FACS缓冲液中。将板在冰上孵育30分钟,然后同上进行冲洗并且使细胞悬浮在200ul含1%多聚甲醛的冷FACS缓冲液中。将板在4°C下孵育过夜并于第二天用BD FACSCalibur™流式细胞仪 (BD Biosciences, San Jose, CA) 获取细胞。用FlowJo软件 (FlowJo, LLC, Ashland, OR) 分析数据。首先通过前向光散射相对于7-AAD染色对细胞进行绘图,然后对活细胞 (7-AAD-阴性) 进行门控并通过Alexa Fluor 488染色相对于虚拟通道绘图。

#### [0282] 结果

[0283] 如图3所示,含有抗FMC63独特型的双特异性构建体 (v16446和v16445) 与HEK293或原代CAR-T细胞上稳定表达的含FMC63的抗CD19CAR构建体选择性结合。

[0284] 虽然该实施例中使用的CAR构建体含有胞外FLAG序列,未观测到包括抗FLAG结构域的变体结合FLAG。这可能是由于构象限制,因为FLAG标签位于CAR构建体的scFv和CD28铰链之间,这种结合的缺乏允许将这些变体的抗FLAG结构域用作阴性对照结合结构域。

#### [0285] 实施例5:双特异性抗体对CAR-T细胞功能的调节

#### [0286] 方法

[0287] 将抗体于PBS中稀释达到0.4mg/ml,然后于RPMI-1640培养基中连续稀释达到120ug/ml和40ug/ml。将CD19CAR-T细胞 (参见实施例4) 离心并按2百万个细胞/ml悬浮在RPMI-1640培养基中。将Raji、RPMI8226和SKOV3靶细胞离心并按20万个细胞/ml悬浮在RPMI-1640培养基中。将50微升靶细胞与96孔板中的50ul CAR-T细胞和100ul抗体混合,一式三份。将板培养6或18小时,并通过离心使细胞团块化。将上清液转移至新的96孔板并冷冻。通过夹心ELISA量化上清液IFN- $\gamma$ 水平。

#### [0288] 结果

[0289] 如图4所示,CD19-CAR-T细胞与CD19+Raji细胞,而不是CD19阴性SKOV3细胞共同培养后被稳健激活。然而,抗FMC63id x MSLN构建体 (v16446) 使CAR-T细胞重新定向并且在MSLN+SKOV3细胞的存在下加强稳健激活。类似地,在抗FMC63id x BCMA构建体 (v16445) 的存在下,在共同培养开始后6小时,CD19-CAR-T细胞反应重新定向至表达BCMA的RPMI8226靶细胞。在共同培养开始后18小时,单独的RPMI8226细胞诱导中度CD19-CAR-T细胞活化,与RPMI8226细胞子集上的低水平CD19表达一致 (参见,Matsui等,Blood,103 (6) :2332-2336 (2004)),这可以通过添加抗FMC63id x BCMA而不是对照构建体来进一步增强。

[0290] 实施例3-5中描述的发现表明,虽然动力学性质可能在靶标和/或细胞类型之间不同,但衔接CAR的多特异性抗原结合构建体可以用于将TAA特异性工程化细胞重新定向至替代抗原,并增强由低水平同源靶标表达诱导的中度细胞活化。CAR构建体被设计为模拟天然TCR/CD3信号 (但具有增加的共刺激潜力)。因此,这些发现支持使用针对TCR (使用抗TCR独特型、V区或其它类似结合结构域) 和TAA的多特异性抗原结合构建体来重新定向工程化或内源性TCR介导的对替代TAA靶标的T细胞反应。

[0291] 虽然这些实施例中使用的多特异性抗原结合构建体呈双特异性抗体形式,但本领域使用各种生物学平台良好确定了通过CD3x TAA结合进行的T细胞衔接,因此这些发现支持使用替代支架形式 (BiTE、DART等,如本文所述) 的多特异性抗原结合构建体用于将T细胞重新定向至替代TAA。

- [0292] 实施例6:对双特异性抗体变体的描述
- [0293] 制备呈以下示例性形式的双特异性抗原结合构建体:
- [0294] a)如实施例1a)所述的杂交抗体形式。
- [0295] b)全尺寸抗体(FSA)形式,其中两个抗原结合结构域均为Fab。这些双特异性抗原结合构建体还包含实施例1中所述的异二聚Fc。全尺寸抗体形式构建体包括4条多肽链:与第一VH-CH1结构域融合的第一Fc多肽,和第一轻链,其中第一VH-CH1结构域和第一轻链形成结合第一靶标的Fab区;及与第二VH-CH1结构域融合的第二Fc多肽,和第二轻链,其中第二VH-CH1结构域和轻链形成结合第二靶标的Fab区。
- [0296] c)串联scFv形式,其中结合一个靶标的一个VL-VH序列通过(GGGGS)<sub>5</sub>间隔区连接到结合第二靶标的第二VL-VH序列。
- [0297] 表2中提供了要制备成上述杂交和FSA形式的双特异性抗原结合构建体的描述。表3中提供了要制备的串联scFv构建体的描述。“FMC63”为抗CD19 scFv(参见实施例1,“FMC63id”)。
- [0298] 表2:杂交和FSA形式的双特异性抗体
- [0299]

	FCA		FcB		
变体	靶标	互补位形式	靶标	互补位形式	抗体形式
1	FMC63	Fab	CD79b	scFv	杂交
2	FMC63	Fab	BCMA	scFv	杂交
3	FMC63	Fab	间皮素	scFv	杂交
4	FMC63	Fab	CD79b	Fab	全尺寸
5	FMC63	Fab	BCMA	Fab	全尺寸
6	FMC63	Fab	间皮素	Fab	全尺寸

[0300] 表3:双特异性串联scFv构建体

[0301]

变体	靶标1	靶标2
7	FMC63	CD79b
8	FMC63	BCMA
9	FMC63	间皮素

- [0302] 实施例7:双特异性抗体生成
- [0303] 如下制备实施例6中描述的双特异性抗原结合构建体。
- [0304] 使用为了人类/哺乳动物表达而优化的密码子,通过基因合成构建编码抗体重链和轻链的基因。scFv和Fab序列由表4中鉴定的已知抗体的序列产生。表5中提供了序列。
- [0305] 表4:抗体序列参考

靶标	抗体	参考	序列
FMC63	U. Texas 抗 FMC63(抗 CD19) 独特型克隆物 136.20.1	WO 2014/190273	VH (SEQ IDNO:1) VL (SEQ ID NO:2)
CD79b	泊拉妥珠单抗(人源化抗 CD79b)	IMGT/mAb-DB ID 458	重链 (SEQ ID NO:3) 轻链 (SEQ ID NO:4)
BCMA	抗 BCMA (ADC, 人抗体); 2A1(Ab-1)	WO 2014/089335	重链 (SEQ ID NO:7) 轻链 (SEQ ID NO:8)
间皮素	Anetumab (抗间皮素)	IMGT/mAb-DB ID 471	重链 (SEQ ID NO:5) 轻链 (SEQ ID NO:6)

[0306] [0306] 对于包括scFv的构建体,根据Kabat编号系统,在位置VH 44和VL 100引入介于scFv的VH和VL之间的二硫化物连接(参见Reiter等,Nat Biotechnol,14:1239-1245(1996))。

[0307] [0307] 将最终基因产物亚克隆至哺乳动物表达载体中并且在CHO细胞(或其功能等效物)中表达(Durocher等,Nucl Acids Res,30:E9(2002))。

[0308] [0308] 在指数生长期转染CHO细胞。为了确定形成异二聚体的最佳浓度范围,按允许异二聚体形成的FcA、轻链(LC)和FcB的不同DNA比率转染DNA。几天后收集经转染的细胞培养基,4000rpm离心并使用0.45微米过滤器澄清。

[0309] [0309] 通过确定的方法从培养基中纯化双特异性抗原结合构建体。例如,将澄清培养基装载至MabSelect SuRe (GEHealthcare)蛋白A柱上并用pH 7.2的PBS缓冲液洗涤,用pH 3.6的柠檬酸盐缓冲液洗脱,并用pH 11的TRIS中和汇集成分。最后使用Econo-Pac 10DG柱(Bio-Rad)为蛋白质脱盐。在一些情况下,通过蛋白L色谱法或凝胶过滤进一步纯化蛋白质。

[0310] [0310] 实施例8:双特异性抗原结合构建体介导靶细胞被体外CD19特异性CAR-T细胞选择性溶解的能力

[0311] [0311] 如下所述,评估实施例6中描述的双特异性抗原结合构建体介导靶细胞被CD19特异性CAR-T细胞溶解的能力。表达各种CAR的基因工程化人T细胞可商购获得。例如,包含scFv FMC63的CD19特异性CAR-T细胞可从ProMab Biotechnologies Inc.,Richmond,CA.获得。

[0312] [0312] 在不同浓度的实施例6中描述的双特异性抗体存在或不存在时,按多个比率(最佳大约20:1)孵育表达CD19特异性CAR的T细胞和靶细胞,一式三份。靶细胞包括:亲本或对照HeLa细胞,通过众所周知的方法工程化为稳定表达CD19、CD79b、BCMA或间皮素的HeLa细胞。靶细胞还可包括表达内源性CD19、CD79b、BCMA和/或间皮素的细胞系(例如Raji、Ramos、RPMI8226和A1847)或原发性肿瘤样品。孵育后,通过流式细胞术、<sup>51</sup>Cr释放、荧光测定法或动

力学活力平台(例如Xcelligence (Acea))监测靶细胞的溶解。

[0314] 来自不同测定平台的靶细胞溶解值(实验溶解值)是事件/时间周期(流式细胞术)、<sup>51</sup>Cr释放计数、相对发光单位或相对荧光单位。为了测量自发溶解,孵育靶细胞,无效应细胞(CAR-T细胞),并且在用细胞毒性洗涤剂孵育靶细胞之后测定最大溶解值。

[0315] 按以下计算特定溶解百分比:

[0316]  $[(\text{实验溶解值}-\text{自发溶解值}) / (\text{最大溶解值}-\text{自发溶解值})] \times 100$ 。

[0317] 结果

[0318] 预计表达CD19特异性CAR的T细胞能够有效溶解表达CD19的靶细胞(HeLa-CD19或Raji),但不溶解CD19阴性靶细胞类型(HeLa、HeLa-CD79b、HeLa-BCMA、RPMI8226(CD19-低/阴性)、HeLa-间皮素或A1847)。类似地,间皮素特异性CAR能够溶解表达间皮素的靶细胞(HeLa-间皮素或A1847),但不溶解间皮素阴性靶细胞类型(HeLa或HeLa-CD19)。这些结果定义了同源CAR驱动的选择性性质。

[0319] 在用与CAR表位和替代TAA相互作用的多特异性结合分子孵育CAR-T细胞之后,同源CAR驱动的选择性性质改变。用靶向CAR scFv独特型和TAA的双特异性抗体孵育表达CD19特异性CAR的T细胞可以重新定向对替代TAA的细胞毒性反应。例如:

[0320] a) 在变体3、6或9(抗CD19scFv独特型/间皮素)的存在下,CD19特异性CAR-T群体溶解HeLa-间皮素或A1847靶细胞;

[0321] b) 在变体1、4或7(抗CD19scFv独特型/CD79b)的存在下,CD19特异性CAR-T群体溶解HeLa-CD79b靶细胞;

[0322] c) 在变体2、5或8(抗CD19scFv独特型/BCMA)的存在下,CD19特异性CAR-T群体以增加的功效溶解HeLa-BCMA或RPMI8226靶细胞。

[0323] 实施例9:在体外靶细胞和CD19特异性CAR-T细胞共同培养中双特异性抗原结合构建体刺激细胞因子生成的能力

[0324] 在双特异性抗原结合分子存在或不存在时,CAR表达细胞与抗原表达细胞或对照靶细胞一起孵育后,评估细胞因子释放。靶细胞与实施例7中描述的那些相同。按最佳效应子:靶标(E:T)比率(大约2:1),将CD19特异性CAR-T细胞与靶细胞一起共同培养。孵育共同培养的细胞约24小时,并收集上清液以使用多重细胞因子免疫测定(Luminex®)或ELISA测量IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 或IL-2。

[0325] 结果

[0326] 预计表达CD19特异性CAR的T细胞与靶向CAR scFv独特型和TAA的双特异性抗体一起孵育会重新定向对替代TAA的细胞因子生成反应。例如:

[0327] a) 在变体3、6或9(抗CD19scFv独特型/间皮素)的存在下,CD19特异性CAR-T群体响应于HeLa-间皮素或A1847靶细胞生成IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-2;

[0328] b) 在变体1、4或7(抗CD19scFv独特型/CD79b)的存在下,CD19特异性CAR-T群体响应于HeLa-CD79b靶细胞生成IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-2;

[0329] c) 在变体2、5或8(抗CD19scFv独特型/BCMA)的存在下,CD19特异性CAR-T群体响应于HeLa-BCMA或RPMI8226靶细胞更有效地生成IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-2。

[0330] 实施例10:在靶细胞存在下双特异性抗原结合构建体刺激CD19特异性CAR-T细胞增殖的能力

[0331] 通过流式细胞术评估CD19特异性CAR-T细胞在与CD19表达靶细胞一起孵育之后的增殖。用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记CD19特异性CAR-T细胞,洗涤并且与靶细胞一起在含血清而无外源性细胞因子的培养基中孵育72小时。靶细胞与实施例7中描述的那些相同。正如通过流式细胞术评估的那样,用CFSE稀释度指示活T细胞的分裂。

[0332] 结果

[0333] 预计表达CD19特异性CAR的T细胞与靶向CAR scFv独特型和TAA的双特异性抗体一起孵育会重新定向对替代TAA的增殖反应。例如:

[0334] a) 在变体3、6或9(抗CD19scFv独特型/间皮素)的存在下,CD19特异性CAR-T群体响应于HeLa-间皮素或A1847靶细胞增殖;

[0335] b) 在变体1、4或7(抗CD19scFv独特型/CD79b)的存在下,CD19特异性CAR-T群体响应于HeLa-CD79b靶细胞增殖;

[0336] c) 在变体2、5或8(抗CD19scFv独特型/BCMA)的存在下,CD19特异性CAR-T群体响应于HeLa-BCMA或RPMI8226靶细胞有效增殖。

[0337] 实施例11:双特异性抗原结合构建体使CD19特异性CAR-T细胞重新定向至体内替代TAA的能力

[0338] 通过在CAR-T细胞过继转移和如下所述,施用双特异性抗原结合构建体之后监测肿瘤生长来评估患者来源的异种移植(PDX)肿瘤模型中双特异性抗原结合构建体使CD19特异性CAR-T细胞重新定向至体内替代TAA的能力。为促进这些研究,通过CRISPR/Cas9介导的基因编辑(例如,使用可从GenScript, Piscataway, NJ获得的服务)或重复循环的流式细胞低CD19群体分选、有限稀释和子细胞系扩增而产生CD19阴性Raji变体(19negRaji)。

[0339] 为多组六至八周龄的雌性NOD.Cg.Prkdc<sup>scid</sup>IL2rg<sup>tm/Wi</sup>/SzJ(NSG)小鼠静脉(i.v.)注射以下的一种:

[0340] a) 经萤火虫荧光素酶转染的Raji淋巴瘤肿瘤细胞;

[0341] b) 经萤火虫荧光素酶转染的CD19阴性Raji(19negRaji)淋巴瘤肿瘤细胞;

[0342] c) 经萤火虫荧光素酶转染的RPMI-8226多发性骨髓瘤细胞(CD 19-阴性/低、BCMA阳性)肿瘤细胞。

[0343] 适于向小鼠施用的细胞数量为,例如 $0.5 \times 10^6$ 个细胞。允许肿瘤移植进行约6天并使用生物发光成像检验。

[0344] 第7天,小鼠接受单次静脉(i.v.)注射次优剂量的(示例性剂量为 $1 \times 10^6$ 个)CD19特异性CAR-T细胞。

[0345] 在CAR-T细胞移植后的不同天数(通常在第7天),经静脉、腹膜内或皮下施用实施例1中描述的双特异性抗体。给药方案和量不同,但示例性研究施用10mg/kg,每周一次。

[0346] 在肿瘤细胞移植后的不同时间点,通常在第4、7、14、21、27、34和41天,通过生物发光成像来监测小鼠的肿瘤生长。

[0347] 为了进行生物发光成像,小鼠接受腹膜内(i.p.)注射于PBS中的萤光素底物(CaliperLife Sciences, Hopkinton, MA)(示例性剂量为约15 $\mu$ g/g体重)。麻醉小鼠并且基本上如同国际专利公布第WO 2015/095895号的实施例7中所述那样进行成像并测定平均辐射率(p/s/cm/sr)。

[0348] 结果

[0349] 预计对照小鼠肿瘤在非靶细胞定向CAR-T细胞过继转移后,在研究过程中会继续生长,而预计CD19特异性CAR-T细胞与扩增的、非转导T细胞群体相比会减少CD19<sup>+</sup>肿瘤生长。具体地:

[0350] -预计小鼠中19negRaji和RPMI-8226多发性骨髓瘤肿瘤在施用CD19特异性CAR-T细胞之后会正常生长

[0351] -预计施用CD19特异性CAR-T细胞会减少Raji肿瘤生长

[0352] 与体外结果类似,预计在施用结合CAR表位和替代TAA的双特异性抗原结合构建体后,CD19特异性CAR-T细胞会减少小鼠的CD19阴性肿瘤生长。具体地:

[0353] -预计施用变体1、4或7(抗CAR/CD79b)会使CD19特异性CAR-T细胞能够控制19negRaji和RPMI-8226肿瘤;

[0354] -还预计在变体2、5或8(抗CAR/BCMA)的存在下,RPMI-8226肿瘤生长也会被CD19特异性CAR-T群体减少。

[0355] 本说明书中引用的所有专利、专利申请、出版物和数据库条目的公开内容特此明确地通过引用整体并入,其程度如同明确地单独指出每个此类单独的专利、专利申请、出版物和数据库条目通过引用并入一样。

[0356] 对于本领域技术人员而言显而易见的本文所述具体实施方案的修改旨在包括在以下权利要求的范围内。

[0357] 表5:序列

SEQ ID NO:	描述	序列
[0358]	1 德州大学抗 FMC63(抗 CD 19)独特型克隆物 136.20.1; VH 结构域	LKPREVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRWMSWVRQAPKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMN
	2 德州大学抗 FMC63(抗 CD 19)独特型克隆物 136.20.1; VL 结构域	QMSKVRSEDTALYYCARRYDAMDYWQGQTSVTVSSAKTTA PSVYPLAPVCVGDTTGSVTLGCLVKASQ
	3 泊拉妥珠单抗(人源化抗 CD79b); 重链; (VH=残基 1-117, CH1=残基 118-215, ,CH2=残基 231-340, CH3=残基 341-445)	ASDIVLTQSPASLAvgQRATISCRASESVDDYGISFMNWQFQ QKPGQPPKLLIYAAPNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEE DDTAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTG
	4 泊拉妥珠单抗(人源化抗 CD79b); 轻链; (VL=残基 1-111, CL=残基 112-218)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYIEWVRQAPKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI KAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NPFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	5 Anetumab(抗间皮素); 重链; (VH=残基 1-120, , CH1=残基 121-218, CH2=残基 234-343, CH3=残基 344-448)	DIQLTQSPSSLASVGDRVITTCASQVDYEGDSFLNWYQQK PGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSRGSGSGTDFLTISLQPEDF ATYYCQSQSEDPLTFGQGKTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
	6 Anetumab(抗间皮素); 轻链; (VL=残基 3-111, CL= 残基 112-217)	QVELVQSGAEVVKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQAPKGLEWMGIIDPGDSRTRYSPSFQGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARGQLYGGTYMDGWGQGTLVTVSSASTKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI KTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	7 抗 BCMA(ADC, 人抗体) 2A1(Ab-1); 重链	DIALTQPSAVSGSPGQSIITISCTGTSSDGGYNSVSWYQQHPGK APKLMIYGVNRRPSGSVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDAD YYCQSYDIESATPVFGGGTQLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKG DSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	8 抗 BCMA(ADC, 人抗体)2A1(Ab-1); 轻链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGDYALSWFRQAPKGLEWVGVSRSKAYGGT TDYAA SVKGRFTISRDDSK STAYLQMN SLKTEDTAVYYCASSG YGGSGWTPFDYWGQGTL VTVSSA STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTV SWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSQLGTQTY ICNVN HKPSN TKPSNTK V DKKVEPKSCDKT HTCPPCP APEELLGGPSV FLFPPK PKDTL MISRTPEV TCVV VDV SHEDPEV FKFN WY VDG VE V HNA K TKP REEQ YNT YR V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S G F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S P G K

[0359] 表6:序列

[0360]

SEQ ID NO.	描述	序列部分(位置)	序列
10	抗 FLAGVL-Ig KC	全	DVLMTQAPLTLPVSLGDQASISCRSSQAIHVANGNTYLEWYL QKPGQSPALLIYKVANRFSGPDRFSGSQGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
11	抗 FLAGVL-Ig KC	全	GATGTGCTGATGACCCAGGGCCCCCTGACACTGCCTGTGA GCCTGGGCAGCCAGGCCCTATCAGCTGCAGGAGCTCCCA GGCATCGTGCACGCCAACCTACCTACCTGGAGTGG TATCTCAGAAGCCAGGACAGTCCCCGCCCTGCTGATCT ACAAGGTGGCCAACCGGGTCTCTGGCGTCCCCACAGATT TTCCGGCTCTGGCAGCGGCACCGATTCACACTGAAGATCT CCCGGGTGGAGGCAGAGGATCTGGCGTGTACTATTGTT TCAGGGAGCACCGCACCACACCTTCGGGGAGGAACCT AAACTGAAATCAAGAGGACCGTCGCGGCCAGTGTCT TCATTTTCCCCCTAGCGACAAAGCTGAAGTCTGGGACA GCCAGTGTGGTCTGCTGCTGAACAACTTCTACCCCTAGAGA GGCTAAAGTGCAGTGGAGGTGATAACGCACTGCAGTCC GGAAATTCTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAG ATAGCACCTATTCCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAA GGCGACTACGAGAAGCATAAAAGTGTATGCTTGTGAAGTC ACCCACCAGGGCTGAGTCACCAGTCACAAATCATTCA ACAGAGGGAGGTGC
12	抗 FLAGVL-Ig KC	VL(D1-K112)	DVLMTQAPLTLPVSLGDQASISCRSSQAIHVANGNTYLEWYL QKPGQSPALLIYKVANRFSGPDRFSGSQGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTKLEIK
13	抗 FLAGVL-Ig KC	L1(Q27-Y37)	QAIHVANGNTY
14	抗 FLAGVL-Ig KC	L3(F94-T102)	FQGAHAPY
15	抗 FLAGVL-Ig KC	L2(K55-A57)	KVA
16	抗 FLAGVL-Ig KC	CL(R113-C219)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	抗 FMC63idV L-IgKC	全	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASES VDDYGISFMNWFQQK PGQPKLIIYAAPNQGSGVPARFSGSGTDFSLNIHPMEEDD TAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTGRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
18	抗 FMC63idV L-IgKC	全	GATATTGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCAGCCTGGCGTGTCC CTTGGGCCAGAGGCCACAATCTCTTGACAGGCCAGCGAG TCCGTGGACGATTACGGCATCTCTTCTGAACACTGGTTCTGA GCAGAAGCCAGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTATGCC GCCCCAAATCAGGGCAGCGGAGTGCAGCACGGTTCTCG GCAGCGGCTCCGGCACCAGCTTTCTCTGAACATCCACCCCC ATGGAGGAGGACGATAACGCCATGACTTCTGTCAGCAGA GCAAGGATGTGAGATGGAGACACCCAGGCAGGGGACCGAGA CAGGAAGAACCGTGGCGCGCCAGTGTCTTCATTTTCCC CCTAGCGACGAACAGCTGAAGTCTGGACAGCCAGTGTGG TCTGTCTGCTGAACAACCTCTACCCCTAGAGAGGCTAAAGTG CAGTGGAAAGGTCGATAACGCACTGCAGTCCGGAAATTCTC AGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAGATAGCACCTA TTCCCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGGCGACTAC GAGAACATAAAAGTGTATGCTTGTGAAGTCACCCACCAGG GGCTGAGTTACCAAGTCACAAATCATTCAACAGAGGGAGTGC

[0361]	19	抗 FMC63idV L-IgKC	VL(D1- G109)	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVDDYGISFMNWFQQK PGQPPKLLIYAAPNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDD TAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTG
	20	抗 FMC63idV L-IgKC	L1(E27- F36)	ESVDDYGISF
	21	抗 FMC63idV L-IgKC	L3(Q93- A104)	QQSKDVRWRHQA
	22	抗 FMC63idV L-IgKC	L2(A54- P56)	AAP
	23	抗 FMC63idV L-IgKC	CL(R110 -C216)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[0361]	24	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	全	DVLMTQAPLTLPVSLGDQASISCRSSQAIHVANGNTYLEWYL QKPGQSPALLIYKVANRFSGVPDFRSQSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTKLEIKGGGGGGGGGGGGGG SEVQLQQSGGELAKPGASVKSCKSSGYTFTAYAIHWAKQA AGAGLEWIGYIAPAAGAAAYNAAFKGKATLAADKSSSTAYM AAAALTSEDSAVYYCARAAAAGADYWGQGTTLTVSSGGGG SEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPR KGLEWLGVWIGSETTYYNSALKSLRIIKDNSKSQVFLKMNS LQTDITAIYYCAKHYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSVEGG SGGSGGSGGGVDDIQMTQTSSLASLGDRVТИSCRASQDI SKYLNWYQQPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSTDY SLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTLEIT
	25	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	全	GATGTGCTGATGACCCAGGGCCCCACTGACACTGCCGTGT CCCTGGGGCACCAGGCCATCTCTTGGAGCTCCAG GCAATCGTCACGCAAACGGCAATACCTATCTGGAGTGGT ACCTGCAGAACGCTGGCAGTCCCAGCCCTGCTGATCTAT AAGGTGGCCAACCGGTTCAAGCGGAGTGCCTGACCGGTTCA GCGGCTCCGGCTCTGGAACCGATTTCACACTGAAGATCTCC AGAGTGGAGGCCGAGGAATCTGGCGTGTACTATTGTTCC AGGGAGCCCACGCACCATACACCTTGGCGGAGGAACAAA GCTGGAGATCAAGGGAGGGAGGCAGCGGGAGGAGG CTCCGGCGGCCGGCTCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGAGC GGAGGAGAGCTGGCAAGCCAGGGCCAGCGTGAAGATG TCCGTGAAAGCTAGCGGTATACTTACAGCTACGCCAT CCACTGGGCAAAGCAGGCCGGGGCAGGGCTGGAGTG GATCGGATATATCGCCCCCGCCGGAGCCGCCCTAC AATGCCCTTAAGGGCAAGGCCACCCCTGGCGCCGACA AGTCCTCTAGCACAGCATATGGCCGCCGCCCTGAC CAGCGAGGACTCTGCCGTGTACTATTGCGCAAGGGCGCC GCCGCCGGAGCCGATTACTGGGGCAGGGCACCACACTGA CCGTGTCTCTGGAGGAGGCAGCGAGGTGAAGCTGCA GGAGTCCGGACCAGGCCCTGGCCCTAGCCAGTCCCTG TCTGTGACCTGTACAGTGAGCGGCCGTGCCCCGATTA CGCGCTGCTGGATCACAGACGCCCTAGAAAGGGCTG GAGTGGCTGGCGTGTACCTGGGGCAGCGAGACAACATACT ATAACTCTGCCCTGAAGAGCAGACTGACCATCATCAAGGA CAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTGAAGATGAATAGCCTG CAGACCGACCGATAACGCCATCTACTATTGCGCAAGCACT ACTATTACGGCGCTTATGCCATGGACTATTGGGCCAG GGCACCAGCGTACAGTGAGCTCCGGAGGGAGGCTG GAGGCAGCGGAGGCTCCGGAGGCTTGGAGGAGTGGACG ATATCCAGATGACACAGACCATCTAGCCTGTCTGCCAG CCTGGCGACAGGGTGACCATCTCCCTGCAGGGCCTCTCAG GATATCAGCAAGTATCTGAATTGGTACCAAGCAGAAGCCAG ACGGCACCGTGAAGCTGATCTACCAACACATCCAGGCT GCACTCTGGAGTGCAAGCCGCTTCTCCGGCTTGGCAGC GGCACCGACTATTCCCTGACAATCTAACCTGGAGCAGG AGGATATGCCACCTACTTTGTCAAGCAGGGCAATACACT GCCATACACCTTCGGGGAGGAACAAACTGAAATCACC

26	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	VL(D1- K112)	DVLMTQAPLTLPVSLGDQASISCRSSQAIHVANGNTYLEWYL QKPGQSPALLIYKVANRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTLEIK
27	抗 FLAGVL- VH- 抗 CD19VH-V L	L1(Q27- Y37)	QAIHVANGNTY
28	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	L3(F94- T102)	FQGAHAPYT
29	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	L2(K55- A57)	KVA
30	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	VH(E12 8-S244)	EVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYTFTAYAIHWAKQAA GAGLEWIGYIAPAAGAAAYNAAFKGKATLAADKSSSTAYMA AAALTSEDSA VYYCARAAAAGADYWGQGTTLVSS
31	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	H1(G153 -A160)	GYTFTAYA
32	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	H3(A224 -Y233)	ARAAAAGADY
33	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	H2(I178- A185)	IAPAAGAA
34	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	VH(E25 0-S369)	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS
35	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	H1(G275 -G282)	GVSLPDYG
36	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	H3(A345 -Y358)	AKHYYYGGSYAMDY

[0362]

[0363]	37	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	H2(I300-T306)	IWGSETT
	38	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	VL(D38-8-T494)	DIQMTQTSSLASALGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSQGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPYTFGGGTKEIT
	39	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	L1(Q414-Y419)	QDISKY
	40	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	L3(Q476-T484)	QQGNTLPYT
	41	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD19VH-V L	L2(H437-S439)	HTS
	42	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH-VL	全	DVLMTQAPLTLPVSLGDQASISCRSSQAIHVANGNTYLEWYL QKPGQSPALLIYKVANRFSGVPDFRSQSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTKEIKGGGGGGGGGGGGGG SEVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYTFTAYAIHWAKQA AGAGLEWIGYIAPAAGAAAYNAAFKGKATLAADKSSSTAYM AAAALTSEDSAVYYCARAAAAGADYWGQGTTLVSSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAP GKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSVEGGSGG SGGSGGSGGVDDIQLTQSPSSLASVGDRVTITCKASQSVDYE GDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSQGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIK

[0364]

43	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	全	GATGTGCTGATGACCCAGGCCCCCTGACACTGCCTGTGA GCCTGGGCGATCAGGCCTCTATCAGCTGCAGGAGCTCCA GGCCATCGTGCACGCCAACGGCAATACCTACCTGGAGTGG TATCTGCAGAACGCCAGGGCTCTCCGCCCTGCTGATCTA CAAGGTGGCCAACAGGTTCTCCGCCCTGCTGACCGCTTT CCGGCTCTGGCAGCGGCCACCGATTACACTGAAGATCAG CCCGTGGAGGGCAGAGGACCTGGCGTGTACTATTGCTTC CAGGGAGCCCACGCCCATATACCTTGGCGGCCACAA AGCTGGAGATCAAGGGAGGGAGGAGGCAGCGCCGGAGGAG GCTCCGGAGGGCGGCGCTTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTC CGGAGGAGAGCTGGCCAAGCCAGGGCCAGCGTGAAGAT GAGCTGTAAGTCTAGCGCTACACCTTACAGCCTATGCC ATCCACTGGGCAAAGCAGGCCGGGGCAGGGCTGGAGT GGATCGGATACTCGCCCCCGCCGGAGGCCGCCCTA TAATGCCGCTTAAGGGCAAGGCCACCCCTGGCGCCGAT AAGTCCTCTAGCACAGCATACATGCCGCCGCCCTGA CCAGCGAGGATAGCGCCGTACTATTGCGCAAGGGCCGC CGCCGCCGGAGCCGACTATTGGGCCAGGGCACCAACTG ACAGTGTCTCTGGCGGCCGGCAGCAGGTGCAGCTGG TGGAGTCGGAGGAGGCCGGTGTGCAGCCTGGAGGCTCCCT GAGGCTGCTTGTGCAGCAGCGGCTACACCTTAGCTCCT ATTGGATCGAGTGGGTGCGCCAGGCCGGCAAGGGCCT GGAGTGGATCGGAGAGATCTGCCTGGAGGAGGCAGATA AACTACAATGAGATCTCAAGGGCAGAGCCACCTTCCG CCGACACCTCTAAGAACACAGCCTATCTGCAGATGAATAG CCTGCGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTATTGACACGG AGAGTGCCAATCAGACTGGACTACTGGGCCAGGGCACCC TGGTGACAGTGTCTAGCGTGGAGGGAGGCTCCGGAGGCTC TGGAGGCAAGGGCTCCGGAGGCTGGACGATATCCAG CTGACCCAGAGCCCACCTCTGTCCGCCCTGTGGCGA CCGGGTGACCATCACCTGTAAAGGCCAGCCAGTCCGTGGAC TACGAGGGCATTCTCTGAACTGGTATCAGCAGAAC CTGGCAAGGCCAAAGCTGTGATCACGCAGCCAGCAA TCTGGAGTCGGAGTGCCTAGATTCTGGCAGCGGCT CCGGCACAGACTTACCCGTACAATCAGCTCCCTGCAGCCC GAGGATTTCGCCACCTACTATTGTCAGCAGAGCAACGAGG ACCCTGTGACATTGGACAGGGACTAAGGTGAAATCAA G
44	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	VL(D1- K112)	DVLMTQAPLTLVSLGDQASISCRSSQAIHVANGNTYLEWYL QKPGQSPALLIYKVANRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTKLEIK
45	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	L1(Q27- Y37)	QAIHVANGNTY
46	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	L3(F94- T102)	FQGAHAPYT
47	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	L2(K55- A57)	KVA
48	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	VH(E12 8-S244)	EVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYIFTAYAIHWAKQAA GAGLEWIGYIAPAAGAAAYNAAFKGKATLAADKSSSTAYMA AAALTSEDSAVYYCARAAAAGADYWGQGTTLVSS

[0365]

49	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	H1(G153 -A160)	GYTF TAYA
50	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	H3(A224 -Y233)	ARAAAAGADY
51	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	H2(I178- A185)	IAPAAGAA
52	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	VH(E25 0-S366)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPG KGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLTVSS
53	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	H1(G275 -W282)	GYTFSSYW
54	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	H3(T346 -Y355)	TRRVPIRLDY
55	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	H2(I300- T307)	ILPGGGDT
56	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	VL(D38 5-K495)	DIQLTQSPSSLASAVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIK
57	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	L1(Q411 -F420)	QSVDYEGDSF
58	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	L3(Q477 -T485)	QQSNEDPLT
59	抗 FLAGVL-V H- 抗 CD79bVH- VL	L2(A438 -S440)	AAS

60	抗 FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	全	DVLMTQAPLTLPVSLGDQASISCRSSQAI VHANGNTYLEWYL QKPGQSPALLIYK VANRFSGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGGGG SEVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYTFTA YAIHWAKQA AGAGLEWIGYIAPAAGAAA YNAAFKGKATLAADKSSSTAYM AAAALTSEDAVYYCARAAAAGADYWGQGTTTVSSGGGG SEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGDYALSWFRQAP GKGLEWVGVRSKAYGGTDXAASVKGRTFISRDDSKSTAY LQMSLKTEDTAVYYCASSGYSSGWTPFDYWGQGTLTVSS VEGGSGGSGGGSGGVDQSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGS SSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLI NYHQRPSGVPDFRSGSKS GSSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTV L
61	抗 FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	全	GATGTGCTGATGACCCAGGCCCACTGACACTGCCGTGT CCCTGGCGACCAAGCCTCTATCAGCTGCAGGAGCTCCA GCCCATCGTCACGCCAACGGCAATACCTACCTGGAGTGG TATCTGCAGAACGCTGCCAGAGCCCAGCCCTGCTGATCT ACAAGGTGCCAACAGGTTCTCCGGAGTGCCAGACCGCTT TTCCGGCTCTGGCAGCGGCCACCGATTCACACTGAAGATCT CCCGCGTGGAGGCAGAGGATCTGGCGTGTACTATTGCTT CCAGGGAGCCCACGCCCTTATACCTTGGCGCGGCACA AAGCTGGAGATCAAGGGCGCGGGCTCTGGAGGAGGA GGCAGCGGGAGGAGGAGGCTCCGAGGTGCAGCTGCAGCAG AGCGCGGGAGCTGCCAAGCCAGGGCCAGCGTGAAG ATGTCCTGTAAGTCTAGCGGCTACACCTTACAGCCTATGC CATCCACTGGCAAAGCAGGCCCGGGCAGGGCTGGA GTGGATCGGATACATGCCCGCCGCCGGAGCCGCC TATAATGCCCTTAAGGGCAAGGCCACCCCTGGCCCG ACAAGTCCTCTAGCACAGCATACTGGCCCGCC GACCAGCGAGGACTCCGCCGTGTACTATTGCGCAAGGGCC GCCGCCGCCAGCCGATTATTGGGCCAGGGCAC TGACAGTGTCTCTGGAGGAGGAGCTGAGGTGCAGCT GGTGGAGAGCGGAGGAGGCCTGGTAAGCCTGGAGGCTCT CTGAGACTGAGCTGTGCCGCCTCCGGCTCACCTTGGCA CTACGCCCTGTCCTGGTCAGGCAGGCCAGGC CTGGAGTGGGTGGCGTGTCCCCTCTAAGGCATA GCACCAAGATTATGCCGCCTCCGTGAAGGGCGGTTAC AATCTCTAGAGACGATAGCAAGTCCACCGCCTACCTGCAG ATGAACAGCCTGAAGACCGAGGACACAGCCGTACTATT GCGCCAGCTCCGGCTACTCTAGCGGCTGGACACCTTTGAT TACTGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTCTGTGG AGGGAGGCTGGAGGCAGCGGAGGCTCCGGCTCTGG AGGAGTGGACCAGTCCGTGCTGACCCAGCCACCTCTGCC AGCGGAACCCCAGGCCAGCGGGTGACAATCTCTGTCTG GCAGCTCTCTAACATCGGCTCTAACACAGTGAATTGGTAC CAGCAGCTGCCAGGAACCGCCCTAACAGTGTGATCTCA ATTATCACCAGCGGCAAGCGGAGTGCAGATCGGTTCA CGGCTCCAAGTCTGGCAGCTCCGCCTCTGGCATCAGCG GCCGCAGTCCGAGGACGAGGAGCAGATTACTATTGCGC CTGGGACGATAGCCTGAATGGGTGGGTCTCGGGGGAGGG ACAAAACGTACTGTGCTG
62	抗 FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	VL(D1- K112)	DVLMTQAPLTLPVSLGDQASISCRSSQAI VHANGNTYLEWYL QKPGQSPALLIYK VANRFSGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTKLEIK
63	抗 FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	L1(Q27- Y37)	QAI VHANGNTY
64	抗	L3(F94-)	FQGAHAPY

[0366]

[0367]

	FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	T102)	
65	抗 FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	L2(K55- A57)	KVA
66	抗 FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	VH(E12 8-S244)	EVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYTFTAYAIHWAKQAA GAGLEWIGYIAPAAGAAAYNAAFKGKATLAADKSSSTAYMA AAALTSEDSAVYYCARAAAAGADYWGQGTLTVSS
67	抗 FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	H1(G153 -A160)	GYTFTAYA
68	抗 FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	H3(A224 -Y233)	ARAAAAGADY
69	抗 FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	H2(I178- A185)	IAPAAGAA
70	抗 FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	VH(E25 0-S372)	EVQLVESGGGLVKPGGLRLSCAASGFTFGDYALSWFRQAPG KGLEWVGVSRSKAYGGTTDYAASVKGRFTISRDDSKSTAYL QMNSLKTEDTAVYYCASSGYSSGWTDFYWGQGTLTVSS
71	抗 FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	H1(G275 -A282)	GFTFGDYA
72	抗 FLAGVL- VH- 抗 BCMAVH- VL	H3(A348 -Y361)	ASSGYSSGWTDFY
73	抗 FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	H2(S300 -T309)	SRSKAYGGTT
74	抗 FLAGVL-V H- 抗 BCMAVH- VL	VL(Q39 1-L500)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNTVNWYQQLPGT APKLLIFNYHQRPSGVPDFSGSKGSSASLAISGLQSEDEAD YYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL
75	抗	L1(S416-	SSNIGSNT

[0368]

	FLAGVL-V H-抗 BCMAVH-VL	T423)	
76	抗 FLAGVL-V H-抗 BCMAVH-VL	L3(A480 -V490)	AAWDDSLNGWV
77	抗 FLAGVL-V H-抗 BCMAVH-VL	L2(N441 -H443)	NYH
78	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	全	DVLMTQAPLTLPVSLGDQASISCRSSQAIHVANGNTYLEWYL QKPGQSPALLIYKVANRFSGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTKEIKGGGGSGGGGGGGGG SEVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYTIFTAYAIHWAKQA AGAGLEWIGYIAPAAGAAAAYNAAFKGKATLAAADKSSSTAYM AAAALTSEDSA VYYCARAAAAGADYWGQGTTLVSSGGGG SQVELVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSITSYWIGWVRQAP GKGLEWMGIIDPGDSRTYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYYCARGQLYGGTYMDGWGQGTLTVVSSVEGG SGGSGGSGGGVDDIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIG GYNVSWSYQQHPGKAPKLMIVGVNNRPSGVSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAEDEADYYCSSYDIESATPVFGGGTKLTVL
79	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	全	GATGTCCTGATGACCCAGGCCCGCTGACACTGCCTGTGA GCCTGGCGACCAAGGCCCTATCAGCTGCAGGAGCTCCA GCCCATCGTCACGCCAACGGCAATACCTACCTGGAGTGG TATCTGCAGAACGCCAGGACAGTCCCCGCCCTGCTGATCT ACAAGGTGCCAACAGGTTCTCTGGAGTGCCAGACCCT TTCCGGCTCTGGCAGCGCACCGATTACACTGAAGATC AGCCCGTGGAGGCAGAGGATCTGGCGTGTACTATTGCT TCCAGGGAGCCCACGCACCTTACACCTTGGCGGAGGAAC AAAGCTGGAGATCAAGGGCGGCGGCTCTGGAGGAGG AGGCAGCGCGGAGGAGGCTCCGAGGTGCAGCTGCAGCA GTCCGGCGGCAGCTGGCCAAGCCAGGGCCAGCGTGA GATGTCCTGTAAGTCTAGCGGCTACACCTCACAGCCTATG CCATCCACTGGCAAAGCAGGCCGCCGGCAGGGCTGG

			GTGGATCGGATACATGCCCGGCCGGAGCCGCCGCC TATAATGCCGCTTAAAGGCAGGGCACCCCTGGCGCCG ACAAGTCCTCTAGCACAGCATACATGGCGGCCGCC GACCAGCGAGGACTCTGCGGTGACTATTGCGCAAGAGCC GCCGCCGCCGGAGCGATTATTGGGGACAGGGCACACAC TGACCGTGTCCCTGGAGGGAGGGCTCAGGTGGAGCT GGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCCTGGCGAGTC TCTGAAGATCAGCTGTAAGGGCAGCGGCTACTCCTTCACA TCTTATTGGATGGGTGCGGCAGGGCCAGGCAAGG GCCTGGAGTGGATGGCATCGACCCAGGCATAGCCG GACCAGATACTCCCCCTTTTCAGGGCAGGGTACAATCT CCGCCACAAGAGCATCTCACCGCCTATCTGCAGTGGAG CTCCCTGAAGGCCAGCGATACAGCCATGTACTATTGCGCC AGAGGCCAGCTGTACGGAGGAACCTATATGGACGGATGGG GACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTAGCGTGGAGGGAGG CAGCGGAGGCTCCGGAGGCTCTGGAGGCAGCGGAGGAGT GGACGATATCGCCCTGACACAGCCGCCTGTGAGCGGC TCCCCTGGACAGTCCATCACCATCTCTGTACCGGCACATC CTCTGATATCGCGGCTACAACCTCTGTGAGCTGGTATCAGC AGCACCCCTGGCAAGGCCCAAAGCTGATGATCTACGGCGT GAACAATCGCCTCCGGCTGCTAACAGATTTCGGCT CTAAGAGCGCAATACCGCAGCCTGACAATCTCCGGCT GCAGGCAGAGGACGAGGAGATTACTATTGTAGCTCTAT GATATCGAGTCCGCCACTCCTGTCTTGGCGGGGCACTAA ACTGACTGTCTG
[0369]	80	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	VL(D1- K112)
	81	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	L1(Q27- Y37)
	82	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	L3(F94- T102)
	83	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	L2(K55- A57)
	84	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	VH(E12 8-S244)
	85	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	H1(G153 -A160)
	86	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	H3(A224 -Y233)
	87	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	H2(I178- A185)

[0370]

88	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	VH(Q25 0-S369)	QVELVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQAPG KGLEWMGIIDPGDSRTRYSPSFQQVTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYCYCARGQLYGGTYMDGWGQGTLTVSS
89	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	H1(G275 -W282)	GYSFTSYW
90	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	H3(A346 -G358)	ARGQLYGGTYMDG
91	10632	H2(I300- T307)	IDPGDSRT
92	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	VL(D38 8-L498)	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNSWYQQHPGK APKLMYGVNNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCSSYDIESATPVFGGGTKLTVL
93	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	L1(S413- S421)	SSDIGGYNS
94	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	L3(S478- V488)	SSYDIESATPV
95	抗 FLAGVL-V H-抗间皮素 VH-VL	L2(G439 -N441)	GVN
96	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	全	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASES VDDYGISFMNWFQQK PGQPPKLLIYAAPNQSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDD TAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTGGGGSGGGGGGGSE VKL VESGGGL VQPGGSLKLSCAASGFDFSR YWMSWVRQAPG KGLEWIGEINLDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMSK VRSEDTALYYCARRYDAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSEVQL VESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYTFSSYIEWVRQAPGKGLE WIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLTVSSVEGGSGGGSG GSGGVDDIQLTQSPSSL SASVGDRVITCKASQSVDYEGDSFL NWYQQKPGKAPKLLIYAAASNLESGVPSRFSFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFQGQGTK VEIK

[0371]

97	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	全	GATATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGCTCCCTGGCGTGTCTCTGGGCCAGAGCTGGACGATTACGGCATCAGCTCATGAACACTGGTTCA GCAGAAGCCTGGCCAGCCCCCTAACAGCTGCTGATCTATGCC GCCCTAATCAGGGCAGCGGAGTGCAGCCAGGCTCTG GCAGCGGCTCCGAACCGATTTCCCTGAACATCCACCC ATGGAGGAGGACGATAACAGCCATGTACTTCTGCCAGCAGA GCAAGGACGTGCGGTGGAGACACCAGGCCGGGGACCA CCGGAGGAGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCTGGCG GCCGCAGCGAGGTGAAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAG GCCGGTGCAGCCAGGAGGAGCCTGAAGCTGTCCGTG AGCCTCTGGCTTCGATTTCCTCGTATTGGATGTCTGG TGAGACAGGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGC AGATCAACCTGGACAGTCCACATCAATTACACACCC CCTGAAGGACAAGTTCATCATCTAGGGATAACGCCAAG AATACCCCTGTATCTGCAGATGAGCAAGGTGCGCTCCGAGG ACACAGCCCTGTA GGATTATTGGGCCAGGGCACCAGCGTGA GGAGGAGGCGGCAGCGAGGTG GGCAGGCTGGTCCAGCCAGGAGGCTCTGAGGCTGAGCT GTGCCGCCTCCGGTACACCTTTCTCTTATGGATCGAG TGGGTGCGCCAGGCCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGATCG GAGAGATCCTGCCTGGAGGAGGCGATA GACACTGGACTACTGGGCCAGGGCACCC AGCTCCGTGGAGGGAGGCTCTGGAGGAGCAGCTGACCC GAGGCTCTGGAGGAGTGGACGATATCCAGCTGACCC TCCCTCTAGCCTGCTGCCAGCGTGGACTACGAGGGCGA TCACCTGTAAAGGCCCTCCAGTCTG TTCCTCTGA CCCAGCTGCTGATCTACGCCGCC CGTGCCTAGCAGATT TTTACCC CACACTAT TTGTCAGCAGAGCAAT TTGGTGGAGGCTCTGACA TTCGGACAGGGA DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVDDYGISFMNWFQQK PGQPPKLLIYAAPNQGSGVPARFSGSGTDFSLNIHPMEEDD TAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTG
98	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	VL(D1- G109)	
99	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	L1(E27- F36)	ESVDDYGISF
100	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	L3(Q93- A104)	QQSKDVRWRHQA
101	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	L2(A54- P56)	AAP
102	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	VH(E12 5-S240)	EVKL VESGGGL VQPGGSLKLSCAASGFDFSRWMSWVRQAP GKGLEWIGEINLDSSTINYPSLKDIFIISRDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYYCARRYDAMDYWGQGTSVTVSS

[0372]	VL		
	103	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	H1(G150 -W157) GFDFSRYW
	104	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	H3(A221 -Y229) ARRYDAMDY
	105	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	H2(I175- I182) INLDSSTI
	106	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	VH(E24 6-S362) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPG KGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLTVSS
	107	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	H1(G271 -W278) GYTFSSYW
	108	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	H3(T342 -Y351) TRRVPIRLDY
	109	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	H2(I296- T303) ILPGGGDT
	110	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	VL(D38 1-K491) DIQLTQSPSSLASAVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSQSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIK
	111	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	L1(Q407 -F416) QSVDYEGDSF
	112	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH- VL	L3(Q473 -T481) QQSNEDPLT
	113	抗 FMC63idV L-VH- 抗 CD79bVH-	L2(A434 -S436) AAS

	VL		
114	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMAVH- VL	全	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASES VDDYGISFMNWFQQK PGQPPKLLIYAAPNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDD TAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTGGGGSGGGSGGGSE VKL VESGGGL VQPGGSLKLS CAASGFD FSRYWMSWVRQAPG KGLEWIGEINLDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMSK VRSEDTALYYCARRYDAMDYWGQGTSVTVSSGGGSEVQL VESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGDYALSWFRQAPGKLE WVGVSRSKA YGGTTDYAASVKGRTISRDDS KSTAYLQMSN LKTEDTA VYYCASSGYSSGWT PFDYWGQGTLTVVSSVEGGS GGSGGSGGSGG VDQS VL TQPPSASGTPGQ RV TISCGSSSNIG SNTVNWYQQLPGTAPKLLI FNYHQRPSGV PDRFSGSKSGSSA SLAISGLQSEDEADYYCAA WDSLNGWVFGGT KLT V
115	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMAVH- VL	全	GATATTGTGCTGACCCAGTCCCCAGCCTCTCTGGCCGTGTC CCTGGGCCAGAGGGCCACAATCTTGCCTCGCCAGCGAG TCCGTGGACGATTACGGCATCAGCTTCACTGAAC TGGTTCA GCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTATGCC GCCCAAATCAGGGCTCCGGAGTCCC GCCCCGGTTCTG GCAGCGGCTCCGGCACCGACTTTCTCTGAACATCCACCC ATGGAGGAGGACGATA CAGCCATG TACTCTGCCAGCAGT CCAAGGACGTGAGGTGGCGGAC CAGGCCGGGAC CAGA CCGGAGGAGGAGGAGG CAGCGGAGGAGGAGGCTCGCG GCCGCGGCTCTGAGGTGAAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAG GCCGCGGCTGGAGGCTCCCTGAAGCTGTCTTGCC GCCAGCGGCTTCGACTTTAGCGG TACTGGATGTCTGGT GAGACAGGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCGA GATCAACCTGGATAGCTCCACCATCAATTACACACCAAGC CTGAAGGACAAGTTATCATCTCCAGGGATAACGCCAAGA ATACCCCTGTATCTGCAGATGTCCAAGGTGCGCTCTGAGGAT ACAGCCCTGTACTATTGCGCCCGGAGATACGACGCCATGG ATTATTGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGTCTAGCGG AGGAGGAGGCTCTGAGGTGCA GCTGGTCGAATCCGGCGA GCCGCTGGTGAAGCCAGGAGG CAGCCTGCGGCTGTCTG CCGCTCTGGCTTCACCTTGGCAGACTACGCCCTGAGCTGG TTCAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAAATGGGTGGCG TGTCTAGAAGCAAGGCCCTACGGCGG CACCACAGATTATGC CGCCTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCAGAGACGGAT TCCAAGTCTACAGCCTATCTGCAGATGAAC TCCCTGAAGA CCGAGGACACAGCGTGTACTATTGCGCCTCCCTGGCTAC AGCTCCGGCTGGACCCCTTTCGATTACTGGGGACAGGGCA CCCTGGTGAAGGTGTCTAGCGTGGAGGGAGGCAGCGGAGG CTCCGGAGGCTCTGGCGG CAGCGGAGGAGTGGACCAGAGC GTGCTGACACAGCCACCAAGCGCCTCCGAACCCAGGAC AGAGGGTGACAATCTTG TAGCGGCTCTAGCAACAT CGGCTCCAACACCGTGAATTGGTAC CAGCAGCTGCCCTGGC ACAGCCCCAAAGCTGCTGATCTCAATTATCACCAAGAGGC CCAGCGGAGTGCCTGATCGCTTCCGGCTCAAGAGCGG CTCCTCTGCCAGCCTGGCACTCCGGCCTGCA GTCTGAGG ACGAGGCCGATTACTATTGCGCCCTGGGACGATAGCCT GAATGGCTGGGTCTTGGGGGGGGACTAAACTGACTGTG CTG
116	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMAVH- VL	VL(D1- G109)	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASES VDDYGISFMNWFQQK PGQPPKLLIYAAPNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDD TAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTG
117	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMA VH-VL	L1(E27- F36)	ESVDDYGISF

[0373]

118	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMAVH- VL	L3(Q93- A104)	QQSKDVRWRHQA
119	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMAVH- VL	L2(A54- P56)	AAP
120	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMAVH- VL	VH(E12 5-S240)	EVKL VESGGGL VQPGGSLKLSCHAASGFDFSRWMSWVRQAP KGKLEWIGEINLDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMS KVRSEDTAL YYCARRYDAMDYWGGQGTSVTVSS
121	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMAVH- VL	H1(G150 -W157)	GFDFSRW
122	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMAVH- VL	H3(A221 -Y229)	ARRYDAMDY
123	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMAVH- VL	H2(I175- I182)	INLDSSTI
124	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMAVH- VL	VH(E24 6-S368)	EVQL VESGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFGDYALSWFRQAPG KGKLEWVGVSRSKAYGGTTDYAASVKGRFTISRDDSKSTAYL QMNSLKTEDTAVYYCASSGYSSGWTWQGQTLTVSS
125	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMAVH- VL	H1(G271 -A278)	GFTFGDYA
126	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMAVH- VL	H3(A344 -Y357)	ASSGYSSGWTWFDY
127	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMAVH- VL	H2(S296 -T305)	SRSKAYGGTT
128	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMA VH-VL	VL(Q38 7-L496)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNTVNWYQQLPGT APKLLIFNYHQRPSGVPDFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEAD YYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL

[0374]

129	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMA VH-VL	L1(S412-T419)	SSNIGSNT
130	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMA VH- VL	L3(A476 -V486)	AAWDDSLNGWV
134	抗 FMC63idV L-VH- 抗 BCMA VH- VL	L2(N437 -H439)	NYH
135	抗 FMC63idV L-VH- 抗 间 皮 素 VH-VL	全	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASES VDDYGISFMNWFQQK PGQPPKLLIYAAPNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDD TAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTGGGGSGGGSGGGSE VKL VESGGGL VQPGGSL KLS CAASGFDFSR YWMSWVRQAPG KGLEWIGEINL DSS TINYPSL KDKFIISRDNAKNTL YLQMSK VRSEDTAL YYCARRYDAMDYWGQQGTSVTVSSGGGSQVEL VQSGAEVKKPGESLKISCKGSGSYFTSYWI GWVRQAPGKLE WMGIIDPGDSRTRYSPSFQQV TISADKSISTAYLQWSSLKAS DTAMYYCARGQL YGGTYMDGWGQGTL VTVSSVEGGSGGS GGSGGSGGVDDIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNS VSWYQQHPGKAPKLMIYGVNNRPSGVSNRFSGSKSGNTASL TISGLQAEDADYYCSSYDIESATPVFGGTKLTVL
136	抗 FMC63idV L-VH- 抗 间 皮 素 VH-VL	全	GACATTGTGCTGACCCAGTCTCCAGGCCAGCCTGGCCGTGTC CCTGGGCCAGAGGGCCACAATCTTGC CGCCAGCGAG TCCGTGGACGATTACGGCATCAGCTTCA TGA ACTGGTTCA GCAGAAGCCCGCCAGCCCCCTAACGCTGCTGATCTATGCC GCCCTAATCAGGGCAGCGGAGTGCCAGCCC GTCTCTG GCAGCGGCTCCGGCACCGACTTTCCCTGAACATCCACCC ATGGAGGAGGACGATA CAGCCATGTACTTCTGCCAGCAGA GCAAGGACGTGAGGTGGCGGCACCAGGCCGGGAGCAGA CCGGAGGAGGAGGAGGCAGCGGAGGAGGAGGCTCCGGCG GCCGGCGCTGAGGTGAAGCTGGAGTCCGGAGGAGG CCTGGTGCAGCCAGGAGGCTCCCTGAAGCTGTCTGTGCC GCCAGCGGCTTCGACTTTAGCCGGTACTGGATGTCTGGGT GAGACAGGCCCTGGCAAGGGCTGGAGTGGATCGGCGA GATCAACCTGGATAGCTCCACCATCAATTACACACCAAGC CTGAAGGACAAGTTATCATCTCCGGATAACGCCAAGA

[0375]

[0376]

			ATACCCCTGTATCTGCAGATGTCCAAGGTGAGATCTGAGGA TACAGCCCTGTACTATTGCGCCCGGAGATAACGACGCCATG GATTATTGGGCCAGGGCACCAGCGTGCACAGTGTCTAGCG GAGGAGGAGGCTCTCAGGTGGAGCTGGTGCAGAGCGGAG CCGAGGTGAAGAAGCCCGCGAGAGCCTGAAGATCTCCTG TAAGGGCTCCGCTACTCTTCACCAAGCTATTGGATCGGAT GGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCTGGATGGATGG GCATCATCGACCCAGGCATTCTGGACAGATACTCTCCC AGCTTCAGGGCCAGGTGACCATCTCCGCGACAAGTCCA TCTCTACAGCCTATCTGCAGTGGTCTCTGAAGGCCTCC GATACCGCCATGTACTATTGCCAGAGGCCAGCTGTACG GCGGCACATATGGACGGATGGGACAGGGCACCCCTGGT GACAGTGGAGCTCCGTGGAGGGAGGGCTCCGGAGGGCTCTGGA GGCAGCGGGCCCTCCGGAGGAGTGGACGATATGCCCTGA CCCAGCCGCCAGCGTGTCCGGCTCCTGCCAGTCTATC ACAATCAGCTGTACCGCACATCTAGCGATATCGCGGCT ACAATAGCGTGTCTGGTATCAGCAGCACCCAGGCAAGGC CCCCAAGCTGATGATCTACGGCGTGAACAATAGGCCCTCT GGCGTGAGCAACCGCTTCTGGCAGCAAGTCCGGCAATA CCCGCTCCCTGACAATCTCTGGCTGCAGGCAGAGGACGA GGCAGATTACTATTGTTCTCTTATGACATCGAGAGGC CACCCGTTGGAGGGAAACCAAACGTACCGTGCTG
137	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	VL(D1- G109)	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASES VDDYGISFMNWFQQK PGQPKLLIYAAPNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHP MEEDDTAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTG
138	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	L1(E27- F36)	ESVDDYGISF
139	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	L3(Q93- A104)	QQSKDVRWRHQA
140	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	L2(A54- P56)	AAP
141	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	VH(E12 5-S240)	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSR YWMWSVRQAPGKGLEWIGEINLDSSTINYTP SLDKFIISRDNAKNTLYLQMSKVRSE DTALYYCARRYDAMDYWGQGTSVTVSS
142	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	H1(G150 -W157)	GFDFSR Y
143	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	H3(A221 -Y229)	ARRYDAMDY
144	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	H2(I175- I182)	INLDSSTI

[0377]	145	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	VH(Q24 6-S365)	QVELVQSGAEVKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQAPG KGLEWMGIIDPGDSRTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYCYCARGQLYGGTYMDGWGQGTLTVSS
	146	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	H1(G271 -W278)	GYSFTSYW
	147	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	H3(A342 -G354)	ARGQLYGGTYMDG
	148	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	H2(I296- T303)	IDPGDSRT
	149	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	VL(D38 4-L494)	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNSVSWYQQHPGK APKLMIFYGVNNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCSSYDIESATPVFGGKLTQLV
	150	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	L1(S409- S417)	SSDIGGYNS
	151	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	L3(S474- V484)	SSYDIESATPV
	152	抗 FMC63idVL -VH-抗间皮 素 VH-VL	L2(G435 -N437)	GVN
	153	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	全	DIQMTQTSSLASLGDRVTISCRASQDISKYNWYQQKPDG TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGGGGGGGSEVKLQE SGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPRKGLEWL GVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNNSKSQVFLKMNSLQTDDT AIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSEVQLQ QSGGELAKPGASVKMSCKSSGYTFTAIAIHAKQAAGAGLE WIGYIAPAAGAAAYNAAFKGKATLAADKSSSTAYMAAAALT SEDSAVYYCARAAAAGADYWGQGTTLTVSSVEGGSGGSGG SGGGGVDDVLMQTQAPLTPVSLGDQASISCRSSQAIHVHANG NTYLEWLQKPGQSPALLIYKVANRFSGVPDFRSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTLEIK

[0378]

154	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	全	GATATTCAAGATGACACAGACCACAAGCTCCCTGTCCGCCT CTCTGGGCGACAGGGTGACCATCAGCTGCAGGGCCTCCA GGATATCTCTAAAGTATCTGAACCTGTACAGCAGAAGCCA GACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACACACAAGCAGGC TGCACCTCGGAGTGCCATCTCGCTTCAGCGGTCCGGCTCT GGAACCGACTACAGCCTGACAATCTCCAACCTGGAGCAGG AGGATATCGCACCTATTCTGCCAGCAGGGCAATACCC GCCCTACACATTGGCGCGGACCCAAGCTGGAGATCACA GGAGGAGGAGGCAGCGCGGAGGAGGCTCCGGCGGC GGCTCTGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCCGGACCAGGCCTGG TGGCCCTAGCCAGTCCCTGTCTGTGACCTGTACAGTGTCC GGCGTGTCTGCTGATTACGGCGTGTCTGGATCAGACA GCCCTAGAAAGGGCTGGAGTGGCTGGCGTGTGATCTGG GGCAGCGAGACAACATACTATAACTCTGCCCTGAAGAGCA GGCTGACCACATCATCAAGGACAACAGCAAGTCCAGGTGTT TCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACCGACGATACAGCCATC TACTATTGCGCAAGCACTACTATTACGGCGCTCTTATGC CATGGATTACTGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTGTCT AGCGGAGGAGGAGGCAGCGAGGTGAGCTGAGCAGTCC GGCGCGAGCTGCCAAGCCTGGGCCAGCGTGAGATGT CTTGAAGTCTCTGGCTATACCTTCACAGCCTACGCCATC CACTGGGCAAAGCAGGCCGCCGGCAGGGCTGGAGTGG ATCGGATATATCGCCCCCGCCGCCGGAGGCCGCCCTACA ATGCCGCTTTAAGGCCAAGGCCACCCCTGGCCGCCGACAA GAGCTCCTACAGCATATATGGCCGCCGCCCTGACC AGCGAGGACTCCGCCGTGTTACTTGCGCAAGGGCCGCG CCGCCGGAGGCCACTATTGGGCCAGGGCACCACACTGAC AGTGAGCTCCGTGGAGGGAGGCTTGGAGGCAGCGGAGG CTCCGGCGGCTCTGGCGCGTGGACGATGTGCTGATGACC CAGGCCCCACTGACACTGCCCCTGTCCTGGCGACCAGG CCTCTATCAGCTGTCGGCTAGCCAGGCCATCGTCACGCC AACGGCAATACCTATCTGGAGTGGTACCTGAGAAGCCTG GCCAGTCCCAGCCCTGCTGATCTACAAGGTGGCAATCG GTTCAAGCGCGTGTGCCCCGACAGATTTCGGCTCTGGCAGC GGCACCGATTTCACACTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCC AGGATCTGGCGTGTATTACTGTTTCAGGGAGCCCACGCC CCCTACACCTTCGGGGAGGAACCTAAACTGGAAATCAAG
155	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	VL(D1-T 107)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISK YLNWYQQKPDG TVKLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQQNTLPYTFGGGTKEIT
156	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	L1(Q27- Y32)	QDISKY
157	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	L3(Q89- T97)	QQGNTLPYT
158	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	L2(H50- S52)	HTS
159	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V	VH(E12 3-S242)	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS

	L		
[0379]	160	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	H1(G148 -G155) GVSLPDYG
	161	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	H3(A218 -Y231) AKHYYYGGSYAMDY
	162	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	H2(I173- T179) IWGSETT
	163	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	VH(E24 8-S364) EVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYTFTA YAIHWAKQAA GAGLEWIGYIAPAAGAAA YNAAFKGKATLAADKSSSTA YMA AAALTSEDSAVYYCARAAAAGADYWGQGTTLVSS
	164	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	H1(G273 -A280) GYTFTAYA
	165	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	H3(A344 -Y353) ARAAAAGADY
	166	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	H2(I298- A305) IAPAAGAA
	167	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	VL(D38 3-K494) DVLMTQAPLTLPVSLGDQASISCRSSQAI VHANGNTYLEWYL QKPGQSPALLIYKVANRFSGVPDFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTKLEIK
	168	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	L1(Q409 -Y419) QAI VHANGNTY
	169	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	L3(F476- T484) FQGAHAPY
	170	抗 CD19VL-V H-抗 FLAGVH-V L	L2(K437 -A439) KVA

	L		
171	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	全	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRSGSGSGTDFLTISLQPED FATYYCQQSNEDPLTFGQGTK VEIKGGGSGGGGGGGSE VQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYIEWVRQAPG KGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYVYCTRRVPIRLDYWGQGTLTVVSSGGGSEVQ LQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYTFTAYAIHWAKQAAGAG LEWIGIYIAPAAGAAAYNAAFKGKATLAADKSSSTAYMAAAA LTSEDSA VYYCARAAAAGADYWGQGTTLT VVSSVEGGSGGSG GSQGGGVDDVLMTQAPLTLVSLGDQASISCRSSQAIVHAN GNTYLEWYLQKPGQSPALLIYK VANRFSGPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTKEIK
172	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	全	GATATTCACTGACCCAGAGCCCCAAGCTCCCTGTCTGCCA GCGTGGCGATCGGGTACCATCACATGCAAGGGCTCCCA GTCTGTGGACTACGAGGGCGATTCTCTGAACGGTATC AGCAGAACGCCGGCAAGGCCCTAACGCTGCTGATCTACGC CGCCTCTAACCTGGAGAGCGGGCTGCCTCAGATTACGC GGCTCCGGCTCTGGCACAGACTTACCCGACAATCTCTAG CCTGCAGCCAGAGGATTGCCACCTACTATTGCCAGCAG AGCAACGAGGACCCCTGACCTTGGCCAGGGCACAAAGG TGGAGATCAAGGGAGGAGGAGGAGCAGCGCGAGGAGGCT CCGGCGCGCGCTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGG AGGAGGGCTGGTGCAGCCTGGAGGCTCTGAGGCTGAGC TGTGCAGCCTCCGGCTACACCTTTCTCTTATTGGATCGA GTGGGTGCGCCAGGCCCCCGCAAGGGCTGGAGTGGATC GGAGAGATCTGCCTGGAGGAGGAGGAGCAGCTGGTGGAGT AGATCTTCAGGGCGGGCCACCTTCTGCCACACAG CAAGAACACAGCCTATCTGCAGATGAATAGCCTGCC GAGGATACCGCCGTGTACTATTGCACACGGAGAGTGCCTA TCAGACTGGACTACTGGGCCAGGGCACCCCTGGTACAGT GAGCTCCGGAGGAGGAGGAGCAGCAGGTGCAGCTGCAGCA GTCCGGCGCGAGCTGGCCAAGCCAGGGCCAGCGTGAA GATGTCTTGTAAGTCTAGCGGCTACACCTTCACAGCCTATG CCATCCACTGGCAAAGCAGGCCGGGGCAGGGCTGG GTGGATCGGATACATGCCCGCCGGCGCCGGAGGCCGCC TATAACGCCCTTAAGGGCAAGGCCACCCCTGGCCGCC ACAAGTCTCTAGCACAGCATACATGCCGCCGCC GACCAGCGAGGATAGGCCGTGTACTATTGCCAAGGGCC GCCGCCGCCAGGCCACTATTGGGCCAGGGCACACAC TGACAGTGTCTCTGTGGAGGGAGGCTCCGGAGGCTGG AGGCAGCGAGGCTCCGGAGGCGTGGACGATGTGCTGATG ACCCAGGCCCCACTGACACTGCCGTGAGCCTGGCGATC AGGCCAGCATCTCTGTAGGAGCTCCAGGCCATGTGCA CGCCAACGGCAATACCTACCTGGAGTGGTATCTGCAGAAG CCTGGCCAGTCTCCAGGCCGTGTACTACAAGGTGGCCA ATAGGTTCTCCGGAGTGCCAGACCCCTTTCTGGCAGGGC TCCGGCACCGATTTCAACTGAAGATCAGCCCGTGGAGG CAGAGGACCTGGCGTGTACTATTGTTTCAGGGAGGCCA CGCCCCCTACACCTTGGGGAGGAACAAACTGGAAATC AAG
173	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	VL(D1- K111)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRSGSGSGTDFLTISLQPED FATYYCQQSNEDPLTFGQGTK VEIK
174	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	L1(Q27- F36)	QSVDYEGDSF
175	抗 CD79bVL-V	L3(Q93- T101)	QQSNEDPLT

[0380]

[0381]

	H-抗 FLAGVH-V L		
176	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	L2(A54-S56)	AAS
177	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	VH(E12-7-S243)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPG KGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYC TRRVPIRLDYWGQGTLTVSS
178	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	H1(G152-W159)	GYTFSSYW
179	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	H3(T223-Y232)	TRRVPIRLDY
180	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	H2(I177-T184)	ILPGGGDT
181	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	VH(E24-9-S365)	EVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYTFTAYAIHWAKQAA GAGLEWIGIYIAPAAGAAAYNAAFKGKATLAADKSSSTAYMA AAALTSEDSA VYYCARAAAAGADYWGQGTTLVSS
182	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	H1(G274-A281)	GYTFTAYA
183	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	H3(A345-Y354)	ARAAAAGADY
184	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	H2(I299-A306)	IAPAAGAA
185	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	VL(D38-4-K495)	DVLMTQAPLTPVSLGDQASISCRSSQAI VHANGNTYLEWYL QKPGQSPALLIYKVANRFSGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGT KLEIK
186	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	L1(Q410-Y420)	QAI VHANGNTY

[0382]

	H-抗 FLAGVH-V L		
187	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	L3(F477-T485)	FQGAHAPYT
188	抗 CD79bVL-V H-抗 FLAGVH-V L	L2(K438-A440)	KVA
189	抗 BCMAVL-V H-抗 FLAGVH-V L	全	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGT APKLLIFNYHQRPSGVPDFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEAD YYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVGGGSGGGGGGGSE VQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGDYALSWFRQAPG KGLEWVGVSRSKAYGGTDXAASVKGRTISRDDSKSTAYL QMNSLKTEDTAVYYCASSGYSSGWTDFDYWGQGTLVTVSSG GGGSEVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYTFTAYAIHWA KQAAAGAGLEWIGYIAPAAAGAAAYNAAFKGKATLAADKSSST AYMAAAALTSEDSAVYYCARAAAAGADYWGQGTTLVSSV EGGSGGSGGGSGGSGVDDVLMTQAPLTPVSLGDQASISCRS SQAIVHANGNTYLEWYLQKPGQSPALLIYKVANRFSGPDRF SGSGSGTDFTLKRISRVEAEDLGVYYCFQGAHAPYTFFGGTKEIK
190	抗 BCMAVL-V H-抗 FLAGVH-V L	全	CAGAGTGTGCTGACCCAGCCACCTCTGCCAGCGGAACCC CTGGACAGAGGGTGACAATCTCTGCTCTGGCAGCTCCT AACATCGGCTCTAACACAGTGAATTGGTACCAAGCAGCTGC CAGGAACCGCCCCCAAGCTGCTGATCTTCAATTATCACCA GAGGCCTAGCGGAGTGCAGACCGCTTAGCGGCTCCAAG TCTGGCAGCTCCGCCAGCCTGGCCATCTCCGGCTGCAGTC TGAGGACGAGGCCGATTACTATTGCGCCGCCTGGGACGAT TCCCTGAACGGATGGGTGTCGGAGGAGGAACCAAGCTGA CACTGCTGGGCGGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGAGCAGCG GCGGAGGAGGCTCCGAGGTGCAAGCTGGTGGAGTCCGGCGG CGGCCTGGTGAAGCCTGGAGGCAGCTGCCTGTCCCTGT GCAGCCTCTGGCTTCACATTGGCACTACGCCCTGAGCTG GTTCAAGGCAGGCCAACGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGC GTGAGCCGCTCCAAGGCATACGGAGGAACCACAGATTATG CCGCCTCCGTGAAGGGCCGTTACCATCTAGAGACGA TTCTAAGAGCACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAG ACCGAGGACACAGCGTGTACTATTGCGCCTCTAGCGGCT ACTCCTCTGGCTGGACCCCTTGATTATTGGGGCCAGGCG ACCCCTGGTGAAGCTGAGCTCCGGAGGAGGAGGCTCTGAGG TGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGGAGGAGCTGGCCAAGGCTG GGCCAGCGGTGAAGATGCTCTGAAGTCTAGCGGCTACAC CTTCACAGCCTATGCCATCCACTGGCAAAGCAGGCCGCC GGGGCAGGGCTGGAGTGGATGGATACATGCCCGGCC CCGGAGGCCGCGCTATAATGCCCTTAAGGGCAAGGC CACCTGGCCGCCGATAAGTCCCTCTAGCACAGCATACTG GCCGCCGCCGCGCTGACCAGCGAGGACTCCGCCGTGTACT ATTGCGCAAGGGCCGCCGCCGCCGAGCCGACTACTGGGG CCAGGGCACACACTGACAGTGTCCCTGTGGAGGGAGGC TCTGGAGGCAGCGGAGGCTCCGCCGCTCTGGCGCGTGG ACGATGTGCTGATGACCCAGGCCAGGCCCCCTGACACTGCCGT GAGCCTGGGCGACCAGGCCATCTCTGTGGAGCTCCC AGGCCATCGTCACGCCAACGGCAATACCTACTGGAGTG GTATCTGCAGAAGCCAGACAGAGGCCAGGCCCTGCTGATC TACAAGGTGGCAATCGTTCTCGGAGTGCAGACCGGT TCAGCGGCTCCGGCTTGGCACCGATTACACTGAAGATC AGCAGAGTGGAGGCCAGGGATCTGGCGTGTACTATTGTT TTCAGGGAGGCCACGCCCATACACCTCGGGGGCGGGAC CAAACCTGGAAATCAAG

[0383]

191	抗 BCMA VL-VH-抗 FLAGVH-V L	VL(Q1-L 110)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNTVNWYQQLPGT APKLLIFNYHQRPSGVPDFSGSKGSSASLAISGLQSEDEAD YYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL
192	抗 BCMA VL-VH-抗 FLAGVH-V L	L1(S26- T33)	SSNIGSNT
193	抗 BCMA VL-VH-抗 FLAGVH-V L	L3(A90- V100)	AAWDDSLNGWV
194	抗 BCMA VL-VH-抗 FLAGVH-V L	L2(N51- H53)	NYH
195	抗 BCMA VL-VH-抗 FLAGVH-V L	VH (E1 26-S248)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGDYALSWFRQAPG KGLEWVGVSRSKAYGGTDYAAASVKGRFTISRDDSKSTAYL QMNSLKTEDTAVYYCASSGYSSGWTDFYWGQGTLTVSS
196	抗 BCMA VL-VH-抗 FLAGVH-V L	H1(G151 -A158)	GFTFGDYA
197	抗 BCMA VL-VH-抗 FLAGVH-V L	H3(A224 -Y237)	ASSGYSSGWTDFY
198	抗 BCMA VL-VH-抗 FLAGVH-V L	H2(S176 -T185)	SRSKAYGGTT
199	抗 BCMA VL-VH-抗 FLAGVH-V L	VH(E25 4-S370)	EVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYTFTAYAIHWAKQAA GAGLEWIGYIAPAAGAAAYNAAFKGKATLAADKSSSTAYMA AAALTSEDSAVYYCARAAAAGADYWGQGTTLVSS
200	抗 BCMAVL-V H-抗 FLAGVH-V L	H1(G279 -A286)	GYTFTAYA
201	抗 BCMAVL-V H-抗 FLAGVH-V L	H3(A350 -Y359)	ARAAAAGADY
202	抗 BCMAVL-V H-抗 FLAGVH-V L	H2(I304- A311)	IAPAAGAA
203	抗 BCMAVL-V H-抗	VL(D38 9-K500)	DVLMTQAPLTpvSLGDQASISCRSSQAIvHANGNTYLEWYL QKPGQSPALLIYKVANRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTKLEIK

[0384]

	FLAGVH-V L		
204	抗 BCMAVL-V H-抗 FLAGVH-V L	L1(Q415 -Y425)	QAI VHANGNTY
205	抗 BCMAVL-V H-抗 FLAGVH-V L	L3(F482- T490)	FQGAHAPYT
206	抗 BCMAVL-V H-抗 FLAGVH-V L	L2(K443 -A445)	KVA
207	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	全	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNSVSWYQQHPGK APKLMIYGVNNRPGVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCSSYDIESATPVFGGKTKLTVGGGGSGGGSGGGSQ VELVQSGAEVKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQAPGK GLEWMGHIIDPGDSRTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCARGQLYGGTYMDGWGQGTLTVSSGGGGS EVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYTFTAYAIHWAKQAA GAGLEWIGYIAPAAGAAAYNAAFKGKATLAADKSSSTAYMA AAALTSEDSA VYYCARAAAAGADYWGQGTTLVSSVEGGS GGSGGGSGGGVDDVLMTQAPLTLPVSLGDQASISCRSSQAI VHANGNTYLEWYLQKPGQSPALLIYKVANRFSGVPDRFGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTKLEIK
208	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	全	GATATTGCACTGACACAGCCCGCCTCTGTGAGCGGGCTCCCC TGGACAGAGACATACCATCTCCTGCACCGGACAAGCTCC GACATCGGCGGCTACAACCTCTGTGAGCTGGTATCAGCAGC ACCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGATGATCTACGGCGTGAA CAATAGGCCATCCGGCGTCTAACCGCTTCTCCGGCTCTA AGAGCGGCAATACCGCCTCTGACAATCAGCGGCCTGCA

[0385]			GGCAGAGGACGAGGCAGATTACTATTGCTCTAGCTACGAT ATCGAGAGGCCACCCCGTGTGGAGGAGGAACCAAGC TGACAGTGCTGGCGGCCGGCTCTGGAGGAGGCA GCGCGGAGGAGGCTCCAGGTGGAGCTGGCAGTCCGG AGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCAGTCCCTGAAGATCTCT TGTAAGGCAGCGCTACTCCTCACATCTATTGGATCGG ATGGGTGCGCAGGCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGATG GGCATCATCGACCCAGGCATAGCCGGACCAGATACTCCC CCTCTTTCAAGGGCAGGTGACCATCTCGCCGACAAGAG CATCTCCACAGCCTATCTGCACTGGTCCCTCTGAAGGCCA GCGATACAGCCATGTACTATTGCGCCAGAGGCCAGCTGA CGGAGGAACCTATATGGACGGATGGGGACAGGGCACCCCTG GTGACAGTGAGCTCCGGAGGAGGAGGCTCTGAGGTGCAGC TGCAGCAGAGCGGAGGAGAGCTGCCAAGCCAGGGCCA GCGTAAGATGTCTGTAAGTCAAGCGCTACACCTTCAC AGCCTATGCCATCCACTGGGCAAAGCAGGCCGGGCA GGGCTGGAGTGGATCGGATACATGCCCGCCGCGGAG CCGCCGCTATAACGCCGCTTAAAGGCAAGGCCACCC GCCGCCGATAAGCTCTAGCACAGCATACTGCCGCC GCCGCCCTGACCAGCGAGGACTCCGCGTGTACTATTGCG CAAGAGCCGCCGCCGGAGCCGATTATTGGGGACAGGG CACACACTGACAGTGCTCTGTGGAGGGAGGCTCTGA GGCAGCGGAGGCTCCGGCGCTCTGGCGCGTGGACGATG TGCTGATGACCCAGGCCACTGACACTGCCGTGAGGCT GGGCGACCAGGCCCTATCAGCTGTAGGAGGCTCCAGGCC ATCGTGCACGCCAACGCAATAACCTACCTGGAGTGGTATC TGCAGAAGCCTGCCAGTCCCCAGCCCTGCTGATCTACAA GGTGGCCAATCGGTTCTCTGGCGCTGACAGATTTCCG GCTCTGGCAGCGGCACCGATTCACACTGAAGATCTCCG CGTGGAGGCAGAGGACTGGCGTGTACTATTGTTTCAG GGAGCCCACGCCCTACACCTGGGGGGGCAACAAAC TGGAAATCAAG	
	209	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	VL(D1-L 111)	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNSVS WYQQHPGK APKLMYGVNNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEA DYCCSSYDIESATPVFGGGTKLTVL
	210	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	L1(S26- S34)	SSDIGGYNS
	211	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	L3(S91- V101)	SSYDIESATPV
	212	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	L2(G52- N54)	GVN
	213	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	VH(Q12 7-S246)	QVELVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIG WVRQAPG KGLEWMGIIDPGDSRTRYSPSFQQVTISADKS ISTAYLQWSS LKASDTAMYCAR GQLYGGTYMDG WGQGTLTVSS
	214	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	H1(G152 -W159)	GYSF TSY W
	215	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	H3(A223 -G235)	ARGQLYGGTYMDG

[0386]

216	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	H2(I177-T184)	IDPGDSRT
217	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	VH(E25 2-S368)	EVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYTFTAYAIHWAKQAA GAGLEWIGIYIAPAAGAAAYNAAFKGKATLAADKSSSTAYMA AAALTSEDSAVYYCARAAAAGADYWGQGTTLVSS
218	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	H1(G277 -A284)	GYTFTAYA
219	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	H3(A348 -Y357)	ARAAAAGADY
220	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	H2(I302-A309)	IAPAAGAA
221	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	VL(D38 7-K498)	DVLMTQAPLTLPVSLGDQASISCRSSQAIHVANGNTYLEWYL QKPGQSPALLIYKVANRFSGPDRFSGSGSGTDFTLKRVEA EDLGVYYCFQGAHAPYTFGGGTKLEIK
222	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	L1(Q413 -Y423)	QAIHVANGNTY
223	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	L3(F480-T488)	FQGAHAPYT
224	抗间皮素 VL-VH-抗 FLAGVH-V L	L2(K441 -A443)	KVA
225	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	全	DIQLTQSPSSLASAVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQSNEDPLTFGQGTKEIKGGGGGGGGGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPG KGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYVYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSGGGGSEVK LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRWMSWVRQAPGKG LEWIGEINLDSSTINYTPSLDKFIISRDNAKNTLYLQMSKVR EDTALYYCARRYDAMDYWGQGTSVTVSSVEGGSGGGSG GSGGVDDIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVDDYGISFM NWFQQKPGQPKLLIYAAPNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIH PMEEEDDTAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTG

[0387]

226	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	全	GATATTCACTGACCCAGTCTCCTAGCTCCCTGAGCGCCTC CGTGGCGATAGGGTACCATCACATGCAAGGCCTCTAG AGCGTGGACTACGAGGGGAGTCCCTCTGAACGGTATC AGCAGAACGCCAGGCAAGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGC AGCCAGCAACTCTGGAGTCCGGAGTCCCATCTCGCTTCTCCG GCTCTGGCAGCGGAACCGACTTACCCCTGACAATCTCTAGC CTGCAGCCAGAGGAGGAGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGCTC TGGCGCGGGCGCAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGC GGCGGCTGGTGAGCCGGCAGCCTGCGGAGGCTGTCCT GTGCCGCTCTGGCTACACCTTCTTATTGGATCGAG TGGGTGAGACAGGCCCCCGCAAGGGCTGGAGTGGATCG GAGAGATCCTGCCTGGAGGAGGAGGATACCAACTACAATGA GATCTTCAAGGAAAGGGCACCTCAGCGCCGACACCTCC AAGAACACAGCCTATCTGAGATGAATAGCCTGAGGGCCG AGGATACCGCCGTGACTATTGACACGGAGAGTCCAAT CAGGCTGGACTACTGGGACAGGGCACCTGGTACAGTG AGCTCCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGCTGGAG TCCGGAGGAGGAGGCTGGTGAGCCTGGAGGCTCTGAAGC TGAGCTGTGCCGCTCCGGCTTCGATTTTCCAGGTATTGG ATGTCTTGGGTGCGCAGGGCCAGGCTGGCAAGGGCTGGAAAT GGATCGGCAGAGATCAACCTGGACTCTAGCACCATA CACACCATCTCTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCCGGGAT AACGCCAAGAATAACCTGTATCTGAGATGTCTAAGGTGA GAAGCGAGGATACAGCCTGTACTATTGCGCCAGGCGCTA CGACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCGCGTGACA GTGTCTCTGTGGAGGGAGGAGGAGGCTCCGGAGGCT CTGGAGGCAGCGGAGGAGTGGACGATATGTGCTGACCCA GTCCCCAGCCTCTGGCGTGTCCCTGGCCAGCGGGCCA CAATCTTGTAGAGCCTCGAGTCTGTGGACGATTACGGC ATCTCCTTCATGAACTGGTTTCAGCAGAAAGCCGGCCAGCC CCCTAAGCTGCTGATCTATGCCGCCCTAATCAGGGCAGC GGAGTGCCAGGCCAGGTTAGCGGGCTCCGGCTTGGAAACCG ACTTTCCCTGAATATCCACCCATGGAGGAGGAGCAGATAC AGGATGTACTTTGTCAAGCAGAGCAAGGACGTGAGGTGG AGACATCAGGCAGGCAGGAGACAGGA
227	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	VL(D1- K111)	DIQLTQSPSSLASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSQGTDFTLTISLQPED FATYYCQQSNEDPLTFGQGTKEIK
228	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	L1(Q27- F36)	QSVDYEGDSF
229	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	L3(Q93- T101)	QQSNEDPLT
230	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	L2(A54- S56)	AAS
231	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	VH(E12 7-S243)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWI EVWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSAD TSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQQLTVVSS

[0388]

232	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	H1(G152 -W159)	GYTFSSYW
233	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	H3(T223 -Y232)	TRRVPIRLDY
234	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	H2(I177 -T184)	ILPGGGDT
235	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	VH(E24 9-S364)	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRWMSWVRQAP GKGLEWIGEINLDSSTINYTPSLDKFIISRDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYYCARRYDAMDYWGQGTSVTVSS
236	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	H1(G274 -W281)	GFDFSRW
237	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	H3(A345 -Y353)	ARRYDAMDY
238	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	H2(I299- I306)	INLDSSTI
239	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	VL(D38 3-G491)	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASES VDDYGISFMNWFQQK PGQPPKLLIYAAPNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDD TAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTG
240	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	L1(E409 -F418)	ESVDDYGISF
241	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	L3(Q475 -A486)	QQSKDVRWRHQA
242	抗 CD79bVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	L2(A436 -P438)	AAP

243	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	全	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNTVNWYQQLPGT APKLLIFNYHQRPSGVPDFRSGSKSGSSASLAISGLQSEDEAD YYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSE VQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGDYALSWFRQAPG KGLEWVGVSRSKAYGTTDYAASVKGRFTISRDSKSTAYL QMNSLKTEDTAVYYCASSGYSSGWTDFDYWGQQLTVVSSG GGSEVKLVESGGLVQPGGSLKSCAASGFDFSRYWMSWV RQAPGKLEWIGEINLDSSTINYTPSLDKFII SRDNAKNTL YL QMSKVRSEDTALYYCARRYDAMDYWQGQTSVTVSSVEGGS GGSGGSGGSGGVDDIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVD DYGISFMNWQFQQKPGQPKLLIYA PNPQGSGVPARFSGSGSG TDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTG
244	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	全	CAGAGCGTGTGACCCAGCCACCTAGCGCCTCCGGAAACCC CAGGCCAGGGGTGACAATCTCTTGACGGCAGCTCCTC TAACATCGGCTCCAACACCGTGAATTGGTACCCAGCAGCTG CCTGGCACAGCCCCAAAGCTGCTGATCTCAATTATACCA GAGGCCAGCGGAGTGCCTGACCGCTTTCCGGCTCAAG AGCGCAGCTCCGCCTCCCTGGCCATCTGGCCTGCAGA GCGAGGACGAGGCCGATTACTATTGCGCCGCTGGGACGA TTCCCTGAACGGATGGGTGTTGGAGGAGGAACCAAGCTG ACAGTGCTGGCGGGAGGAGGCAGCGGAGGAGGAGGCTCC GGCGCGGGCGGCTCTGAGGTGAGCTGGTGAATCCGGAG GAGGCCTGGTGAAGCCAGGAGGCTCCCTGCCTGTCTTG TGCGGCCAGCGGCTTCACCTTGGCAGTACGCCCTGAGCT GGTCAAGGCAGGCCCTGGCAAGGCCTGGAGTGGGTGGG CGTGTCCCCTCTAAGGCATACGGAGGCACACAGATTAT GCCGCCTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCCGGGAGC ATAGCAAGTCCACAGCCTATCTGCAGATGAATAGCCTGAA GACCGAGGACACAGCGTGTACTATTGCGCCTAGCGGC TACTCCTCTGGCTGGACCCCATTGATTATTGGGCCAGGG CACCCCTGGTGAAGTGTAGCTCCGGAGGAGGAGGCTGTAG GTGAAGCTGGGGAGAGCGGAGGAGGAGGCTGGCAGCCA GGAGGCTCCCTGAAGCTGCCTGCGCCAGCGGCTTC ACTTAGCCGTACTGGATGTCTGGTAGAGACAGGCC TGGCAAGGGCCTGGAATGGATCGCGAGATCAACCTGGAT TCTAGCACCATCAATTACACACCAAGCCTGAAGGACAAGT TTATCATCTCCGGGATAACGCCAAGAATACCCGTATCTG CAGATGTCCAAGGTGAGATCTGAGGACACAGCCCTGTACT ATTGCGCCCCGGAGATACAGCGCATCAGCTTCAACTGGGCC GGGACCTCCGTGACAGTGTCTCTGAGGAGGCTCC GGAGGCTCTGGAGGGAGCGGGCGGCTCCGGCGGCTGGAGC ATATCGTGTGACCCAGTCTCTGCCAGCCTGGCGTGTCT CTGGGCCAGAGGCCACAATCAGCTGAGAGCCTCTGAGA GCGTGGACGATTACGGCATCAGCTTCAACTGGTTCA GCGAAGCCAGGCCAGGCCACCAAGCTGTGATCTGCC GCCCAAAATCAGGGCTCCGGAGTGCCGCCGGTCTCCG GCTCTGGCAGCGGCACCGATTCTGAACATCCACCC ATGGAGGAGGAGCATA CAGCCATGTA CTTGTAGCAGA GCAAGGACGTGCGCTGGAGAGACATCAGGCAGGAGACAGA CAGGA
245	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	VL(Q1-L 110)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNTVNWYQQLPGT APKLLIFNYHQRPSGVPDFRSGSKSGSSASLAISGLQSEDEAD YYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL
246	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	L1(S26- T33)	SSNIGSNT
247	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	L3(A90- V100)	AAWDDSLNGWV

[0389]

248	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	L2(N51- H53)	NYH
249	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	VH(E12 6-S248)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFIFGDYALSWFRQAPG KGLEWVGVSRSKAYGGTTDYAASVKGRFTISRDKSTAYL QMNSLKTEDTAVYYCASSGYSSGWTDFDYWGQGTLTVSS
250	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	H1(G151 -A158)	GFTFGDYA
251	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	H3(A224 -Y237)	ASSGYSSGWTDFDY
252	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	H2(S176 -T185)	SRSKAYGGTT
253	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	VH(E25 4-S369)	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRWMSWVRQAP GKGLEWIGEINLDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYYCARRYDAMDYWGGQGTSVTVSS
254	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	H1(G279 -W286)	GFDFSRW
255	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	H3(A350 -Y358)	ARRYDAMDY
256	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	H2(I304- I311)	INLDSSTI
257	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	VL(D38 8-G496)	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVDDYGISFMNWFQQK PGQPPKLLIYAAPNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDD TAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTG
258	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	L1(E414 -F423)	ESVDDYGISF

[0390]

259	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	L3(Q480 -A491)	QQSKDVRWRHQA
260	抗 BCMAVL-V H-抗 FMC63idVH -VL	L2(A441 -P443)	AAP
261	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	全	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNSVSWYQQHPGK APKLMIFYGVNNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCSSYDIESATPVFGGKTLTVLGGGGGGGGGGGGGGSQ VELVQSGAEVKPGESLKIISCKGSGYSFTSYWIGWVRQAPGK GLEWMGIIDPGDSRTRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCARGQLYGGTYMDGWGQGTLTVVSSGGGG EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDTSRYWMSWVRQAP GKGLEWIGEINLDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYYCARRYDAMDYWGGQTSVTSSVEGGSGGS GGGGGGGVDDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDDY GISFMNWFQQKPGQPKLLIYAPNQGSGVPARFSGSGSGTD FSLNIHPMEEDDTAMYFCQSKDVRWRHQAQDQTG
262	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	全	GACATCGCACTGACCCAGCCTGCCAGCGTGTCCGGCTCTCC AGGACAGTCCATCACAACTCTTGACCCGGCACAGCTCC GACATCGGCGGCTACAACAGCGTGTCTGGTATCAGCAGC ACCCAGGCAAGGCCCCAAGCTGTATGATCTACGGCGTGAA CAATAGGCCTCTGGCGTGAGCAACCGCTTCTGGCAGC AAGTCCGGCAATACCGCCAGCCTGACAATCTCCGGCCTGC AGGCAGAGGACGAGGCAGATTACTATTGCTCTAGCTATGA TATCGAGAGGCCACCCAGTGTGGAGGAGGAACCAAG CTGACAGTGTGGCGGAGGAGGCAGCGGAGGAGGAGGC TCCGGCGGCCGGCTCTCAGGTGAGCTGGTGAGTCAGTCCG GAGCCGAGGGTAAGAACGCCGGCAGCTCTGAAGATCAG CTGTAAGGGCTCCGGCTACTCTTCACCAAGCTATTGGATCG GATGGGTGCGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGAT GGGCATCATCGACCCAGGCATTCTAGGACCCGCTACTCT CCCAGCTTCAGGCCAGGTGACCATCTCCGCCGACAAGT CCATCTCTACAGCCTATCTGCAGTGGCTCTCTGAAGGCC AGCGATACGCCATGTACTATTGCGCCAGAGGCCAGCTGT ACGGCGGCACATATATGGACGGATGGGACAGGGCACCC GGTGACAGTGTGGAGGAGGAGGAGGCTGTGAGGTGAA GCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGCTGGTGCAGCCAGGAGG CTCCCTGAAGCTGTCTTGCGGCCAGCGGCTTCGACTTTA GCCGGTACTGGATGTCTGGTGAAGACAGGCCCTGGCAA GGGCTCTGGAAATGGATCGCGAGATAACCTGGATTCTAGC ACCATCAATTACACACCATCCCTGAAGGACAAGTTCATCA TCTCTAGGGATAACGCCAAGAATACCCGTATCTGCAGAT GTCCAAGGTGCGCTCTGAGGATACAGCCGTACTATTGC GCCCGGAGATAACGACGCCATGGATTATTGGGCCAGGGCA CCAGCGTGACAGTGTCTCTGTGGAGGGAGGCTCCGGAGG CTCTGGAGGCAGCGCGGCTCCGGCGCGTGGACGATATC GTGCTGACCCAGTCTCCAGCCAGCCTGGCGTGAGCCTGG GCCAGAGGCCACAATCTCTGTAGAGCCAGCGAGTCCGT GGACGATTACGCCATCTCTCATGAACCTGGTTTACAGCAGA AGCCCGGCCAGCCCCCTAAAGCTGTGATCTATGCCGCC AATCAGGGCAGCGGAGTGTCTGCCGGTTCTGGCAGCG GCTCCGGCACCGACTTTCCCTGAATATCCACCCATGGAG GAGGACGATAACGCCATGTACTTTGTCAAGCAGAGCAAGG ACGTGCGGTGGAGGCATCAGGCAGGGGACCAAGACAGGA
263	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	VL(D1-L 111)	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNSVSWYQQHPGK APKLMIFYGVNNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCSSYDIESATPVFGGKTLTVL
264	抗间皮素 VL-VH-抗	L1(S26- S34)	SSDIGGYNS

[0391]

[0392]

	FMC63idVH -VL		
265	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	L3(S91- V101)	SSYDIESATPV
266	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	L2(G52- N54)	GVN
267	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	VH(Q12 7-S246)	QVELVQSGAEVKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQAPG KGLEWMGIIDPGDSRTRYSPSFQQVTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYCARQLYGGTYMDGWGQGTLTVSS
268	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	H1(G152 -W159)	GYSFTSYW
269	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	H3(A223 -G235)	ARGQLYGGTYMDG
270	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	H2(I177- T184)	IDPGDSRT
271	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	VH(E25 2-S367)	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRWMSWVRQAP GKGLEWIGEINLDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYYCARRYDAMDYWGQGTSVTVSS
272	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	H1(G277 -W284)	GFDFSRW
273	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	H3(A348 -Y356)	ARRYDAMDY
274	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	H2(I302- I309)	INLDSSTI
275	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	VL(D38 6-G494)	DIVLTQSPASLAWSLGQRATISCRASESVDDYGISFMNWFQQK PGQPPKLLIYAAPNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDD TAMYFCQQSKDVRWRHQAGDQTG
276	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	L1(E412 -F421)	ESVDDYGISF
277	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	L3(Q478 -A489)	QQSKDVRWRHQA

278	抗间皮素 VL-VH-抗 FMC63idVH -VL	L2(A439 -P441)	AAP
279	抗 CD79bscFv- HetFcB	全	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPG KGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSVEGGSGGS GGSGGGSGGVDDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVYEG DSFLNWYQQKPGKAPKLLIYASNLESGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSNEPDLTFGQGTKEIKAEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVV VSVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQREP QVYVLPPSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGPE NNYLTVPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSPG
280	抗 CD79bscFv- HetFcB	全	GAGGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGGAGGCCTGGTCAGC CAGGAGGCTCCCTGCGGCTGTCTGGCAGCCAGCGGATA CACCTCAGCTCTATTGGATCGAGTGGGTGAGACAGGCC CCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGAGAGATCCTGCCAG GAGGAGGCATAACACTACAATGAGATCTCAAGGGCCG GGCCACATTTCGCGCACACCTCTAAAGAACACAGCCTATC TGCAGATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGA CTATTGCACACGGAGAGTGCCAATCAGGCTGGACTACTGG GGACAGGGCACCCCTGGTACAGTGTCTAGCGTGGAGGGAG GCAGCGGAGGCTCCGGAGGCTGGAGGCAGCGGAGGAG TGGACGATATCCAGCTGACCCAGAGCCCTCCTCTGTCT GCCAGCGTGGCGATAGGGTGACCATCACCTGTAAGGCCT CCCAGTCTGTGACTACGAGGGCGATTCTTCTGAACTGG TATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCT ATGCAGCAGCAATCTGGAGTCGGAGTGCCATCTCGCTT CAGCGGCTCCGGCTGGAAACGGACTTACCCCTGACAATC AGCTCCCTGCAAGCCTGAGGATTTGCCACATACTATTGCA GCAGTCCAACGAGGACCCACTGACCTTGGCCAGGGACA AAGGTGGAATCAAAGCAGCAGAGCCAAGTCATCCGAT AAGACCCATACTGTCCCCCTTGCCCGCGCCAGAGGCAG CAGGAGGACCAAGCGTGTCTGTTCCACCAAGGCCAA AGACACCCCTGATGATTAGCGAACCCCTGAAGTCACATGC GTGGTCGTGTCCTGTCTACAGGAGGCCAGAACGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGATGGCGTCAGGTGCATAATGCCAA GACAAAACCCGGAGGAACAGTACAACAGCACCTATAG AGTCGTGTCCTGTCTGACAGTGTGACCCAGGATTGGCTG AACGGCAAGGAATATAAGTCAAAGTGTCCAATAAGGCC TGCCCGCTCCTATCGAGAAAACCATTTCTAAGGCAAAGG CCAGCCTCGCAACCACAGGTCTACGTGTCGCCATCCC GGGACGAGCTGACAAAGAACAGGCTCTGCTGTGCGCT GGTGAAGGCTTCTATCCATCAGATATTGCTGTGGAGTGG GAAAGCAATGGGAGCCCGAGAACAAATTACCTGACTTGGC CCCCCTGTCGGACTCTGATGGAGTTCTTCTGTATTCT AAGCTGACCGTGGATAAAAGTAGGTGGCAGCAGGGAAAT GTCTTAGTTGTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCATAACCA CTACACCCAGAAAAGCCTGTCCTGCCCCCGGA
281	抗 CD79bscFv- HetFcB	VH(E1-S 117)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPG KGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS
282	抗 CD79bscFv- HetFcB	H1(G26- W33)	GYTFSSYW
283	抗 CD79bscFv- HetFcB	H3(T97- Y106)	TRRVPIRLDY
284	抗 CD79bscFv- HetFcB	H2(I51-T 58)	ILPGGGDT

[0393]

[0394]	285	抗 CD79bscFv- HetFcB	VL(D13 6-K246)	DIQLTQSPSSLASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISSSLQPED FATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIK
	286	抗 CD79bscFv- HetFcB	L1(Q162 -F171)	QSVDYEGDSF
	287	抗 CD79bscFv- HetFcB	L3(Q228 -T236)	QQSNEDPLT
	288	抗 CD79bscFv- HetFcB	L2(A189 -S191)	AAS
	289	抗 CD79bscFv- HetFcB	CH2(A2 64-K373 )	APEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVSVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
	290	抗 CD79bscFv- HetFcB	CH3(G3 74-G479 )	GQPREPVQVYVLPPSRDELTKNQVSSLCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	291	抗 BCMAFcV- HetFcB	全	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGDYALSWFRQAPG KGLEWVGVSRSKAYGGTIDYAAVKGRFTISRDLSKSTAYL QMNSLKTEDTAVYYCASSGYSSGWTPTFDYWGQGTLVTVSSV EGGSGGGSGGGSGGVQDQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSS SNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIFNYHQRPSGVPDFSGSKSG SSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL AAEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTP EVTCVVSVSHEPVEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK GQPREPVQVYVLPPSRDELTKNQVSSLCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0395]

292	抗 BCMAFcV- HetFcB	全	GAGGTCCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGCCTGGTGAAG CCAGGAGGCTCTGTAGGCTGAGCTGCGAGCCTCCGGCT TCACCTTGGCACTACGCCCTGTCTGGTCAAGCAGGCC CCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGTGGCGTGTAGAAGCA AGGCCTACGGCGGCACACAGATTATGCCGCTCTGTGAA GGGCCGTTTACCATCAGCAGAGACGATTCCAAGTCTACA GCCTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAGACCGAGGACACAG CCGTGTACTATTGCGCCAGCTCCGGTACTCTAGCGGCTGG ACCCCATTCGATTATTGGGCCAGGGCACCCCTGGTACAG TGTCTCTGTGGAGGGAGGCTCCGGAGGCTGGAGGCAG CGCGGCTCCGGAGGAGTGGACCAAGTCCGTGCTGACACAG CCACCTAGCGCCTCCGGAACCCCAGGACAGAGAGTACAA TCTCTGTAGCGGCAGCTCTAACATCGGCTCCAACACC GTGAATTGGTACCAAGCAGCTGCCAGGCACAGCCCCAAGC TGCTGATCTCAATTATCACCAGAGCCTCTGGCGTGCCA GATCGCTTCCGGCTAAAGAGCGCAGCTCCGCTCT GGCATCAGCGGCTGCAGTCCGAGGACGAGGCAGATTAC TATTGTGCCGCTGGAGCATAGCTGAATGGCTGGTGT TGGCGCGGACCAAGCTGACTGTCTGGCTGCTGAACCA AAATCATCCGATAAGACCCACACTTCCCACCCCTGGCG CGCCAGAGGCAGCAGGAGGACCAAGCGTGTCTGGT ACCCAAGCCCAAAGACACCCCTGATGATTAGCGAACCCCT GAAGTCACATCGTGGTGTCTGCTCACGAGGACC CAGAAGTCAGTTCACTGGTACGTGGATGGCGTCAAGG GCATAATGCCAAGACAAAACCCGGGAGGAACAGTACAA CAGCACCTATAGAGTCGTGTCCGTCTGACAGTGTGACC AGGATTGGCTAACGGCAAGGAATATAAGTCAAAGTGT CAATAAGGCCCTGCCGCTCTATCGAGAAAACCATTCTA AGGCAAAAGGCAGCCTCGCGAACCCACAGGTCTACGTGCT GCCATCCATCCCGGACGAGCTGACAAAGAACCCAGGTCT CTGCTGTGCCGTGGTAAAGGCTCTATCCATCAGATATTG TGTGGAGTGGAAAGCAATGGCAGCCGAGAACAAATTAC CTGACTGGCCCTGTGCTGGACTCTGATGGGAGTTCT TCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGATAAAAGTAGGTGGCAG CAGGGAAATGTCTTAGTTGTTCAAGTGTGATGCATGAAGCC GCATAACCACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGTCCCC GGA
293	抗 BCMAFcV- HetFcB	VH(E1-S 123)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGDYALSWFRQAPG KGLEWVGVSRSKAYGGTTDYAASVKGRFTISRDDSKSTAYL QMNSLKTEDTAVYYCASSGYSSGWTPFDYWGQGTLVTVSS
294	抗 BCMAFcV- HetFcB	H1(G26- A33)	GFTFGDYA
295	抗 BCMAFcV- HetFcB	H3(A99- Y112)	ASSGYSSGWTPFDY
296	抗 BCMAFcV- HetFcB	H2(S51- T60)	SRSKAYGGTT
297	抗 BCMAFcV- HetFcB	VL(Q14 2-L251)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNTVNWYQQLPGT APKLLIFNYHQRPSGVPDFRSGSKGSSASLAISGLQSEDEAD YYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL
298	抗 BCMAFcV- HetFcB	L1(S167- T174)	SSNIGSNT
299	抗 BCMAFcV- HetFcB	L3(A231 -V241)	AAWDDSLNGWV
300	抗 BCMAFcV- HetFcB	L2(N192 -H194)	NYH

301	抗 BCMAscFv- HetFcB	CH2(A2 69-K378 )	APEAAGGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVSVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
302	抗 BCMAscFv- HetFcB	CH3(G3 79-G484 )	GQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSSLCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
303	抗间皮素 scFv-HetFcB	全	QVELVQSGAEVKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQAPG KGLEWMGIIDPGDSRTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYCARGQLYGGTYMDGWGQGTIVTVSSVEGGS GGSGGSGSGVDDIALTQAVSGSPGQSITISCTGTSSDIGG YNSVSWYQQHPGKAPKLMYGVNNRPGVSNRFGSKSGNT ASLTISGLQAEDEADYYCSSYDIESATPVFGGTKLTVLAAEP KSSDKTHTCPCPAPEAAGGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPETC VVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQP REPQVYVLPPSRDELTKNQVSSLCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
304	抗间皮素 scFv-HetFcB	全	CAGGTGAGCTGGTGCAGTCGGAGGCCAGGTGAAGAAC CCGGCGAGTCTCTGAAGATCAGCTGAAGGGCTCTGGCTA CAGCTTCACCTCTATTGGATCGGATGGGATGGCATCATGACCCCTG GCGATTCTCGGACCAGATACTCTCCAAGCTTCAGGCTTCAAGG GGTGACCATCAGCGCCACAAGTCCATCTACAGCCTAT CTGCAGTGGAGCTCCCTGAAGGCCAGCGATACGCCATGT ACTATTGCGCAGGGGCCAGCTGTACGGAGGAACATATAT GGACGGATGGGACAGGGCACCTGGTACAGTGTCTAGC GTGGAGGGAGGCTCTGGAGGCAGCGGAGGCTCCGGAGGC TCTGGAGGAGTGGACGATATGCCCTGACCCAGCCAGCCA GCGTGTCCGGCTCTCCGCCAGTCCATACAATCTCTTG ACCGGCACATCCTCTGATATCGGCCGCTACAACAGCGTGT CCTGGTATCAGCAGCACCCGGCAAGGCCCTAAAGCTGAT GATCTACGGCGTGAACAATAGGCAAGCGCGTGTCAAAC CGCTCTCTGCAGCAAGTCCGCATAACGCCAGCCTGA CAATCTCCGGCTGCAGCGCAGGCCAGGAGGAGGAGG TTGTAGCTCTATGACATCGAGTCCGCCACCCCGTGT GAGGAGGCACAAAGCTGACAGTCTGGCTGCTGAACCAA ATCATCGATAAGACCCATACCTGCCCTGCCCCGGCGC CAGAGGCAGCAGGAGGACCAAGCGTGTCCCTGACAGTGT CAACGCTGAAAGCCAAAGACCCCTGATGATTAGCGAAC GTACACATGCGTGGTGTGTCCGTCTCACGAGGACCCAG AAAGTCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGTGG TAATGCCAAGACAAAACCCGGGAGGAACAGTACAACAG CACCTATAGAGTCGTGTCCGTCTGACAGTGT GATTGGCTGAACGGCAAGGAATAAGTCAAAGTGTCCA ATAAGGCCCTGCCGCTCTATCGAGAAAACCATTTCTAA GGCAAAAGGCCAGCCTCGCAACCACAGGTCTACGTGCTG CCTCCATCCGGGACGAGCTGACAAAGAACCCAGGTCTCTC TGCCTGCTGGTAAAGGCTTCTATCCATCAGATATTGCT GTGGAGTGGGAAAGCAATGGCAGCCGAGAACAAATTAC CTGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGGAGTTCTT TCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGATAAAAGTAGGTGGCAG CAGGGAAATGTCTTAGTTGTTCAAGTGT GCATAACCACATACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGTCCCC GGA
305	抗间皮素 scFv-HetFcB	VH(Q1- S120)	QVELVQSGAEVKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQAPG KGLEWMGIIDPGDSRTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYCARGQLYGGTYMDGWGQGTIVTVSS
306	抗间皮素 scFv-HetFcB	H1(G26- W33)	GYSFTSYW
307	抗间皮素 scFv-HetFcB	H3(A97- G109)	ARGQLYGGTYMDG
308	抗间皮素 scFv-HetFcB	H2(I51 -T 58)	IDPGDSRT

[0396]

309	抗间皮素 scFv-HetFcB	VL(D13 9-L249)	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNSVSWYQQHPGK APKLMIYGVNNRPSGVSNRSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCSSYDIESATPVFGGGTKLTVL
310	抗间皮素 scFv-HetFcB	L1(S164- S172)	SSDIGGYNS
311	抗间皮素 scFv-HetFcB	L3(S229- V239)	SSYDIESATPV
312	抗间皮素 scFv-HetFcB	L2(G190- -N192)	GVN
313	抗间皮素 scFv-FetFcB	CH2(A2 67-K376 )	APEAAGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
314	抗间皮素 scFv-FetFcB	CH3(G3 77-G482 )	GQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSQLCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSPG
315	抗 FLAGVH-C H-HetFcA	全	EVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYIFTAYAIHWAKQAA GAGLEWIGYIAPAAGAAAAYNAFKGKATLAADKSSSTAYMA AAALTSEDSAVYYCARAAAAGADYWGQGTTLVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWNNGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSLGTQTYICNVNHPNSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVFKNWYVDGVEVHNNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRW QQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSPG
316	抗 FLAGVH-C H-HetFcA	全	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCGGAGGAGAGCTGGCCAAGC CAGGGGCCAGCGTGAAGATGTCCTGCAAGAGCTCCGGCTA CACCTTACAGCCTATGCCATCCACTGGCAAAGCAGGCC GCCGGAGCTGGCCTGGAGTGGATCGGATACATCGCACCCG CCGCGGAGCCGCCCTATAACGCCCTTAAGGGCAA GGCCACCCCTGGCCGCCGACAAGTCTAGCTCCACAGCATA ATGGCCGCCGCCGCTGACCAGCGAGGATAGCGCCGTGT ACTATTGTGCCAGGGCAGCAGCAGCAGGAGGCCACTACTG GGGGCAGGGGACTACTCTGACTGTGAGCTCCGCTAGCACC AAGGGACCTTCGTGTTCCACTGGCACCAAGCTCCAAGT CTACAAGCGGAGGAACCCGCCCTGGGATGTCGGTAA GGATTACTTCCCAGAGCCGTGACCGTGTCTGGAACAGC GGGGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCGTGCG TGCAGTCTAGCGGCTGTATTCCCTGCTCTGTGGTCACA GTGCCAAGCTCCCTCTGGCACACAGACCTACATCTGCA ACGTGAATCACAGCCATCCAATCCAAGGTGACAAGAA GGTGGAGCCAAGTCTTGATAAGACACACACCTGGCCA CCTGTCCGGGCCAGAGGCAGCAGGAGGACCAAGCGTGT TCCCTTCCACCCAAGCTAAGGACACACTGATGATCTCC AGGACACCAAGGGTGAACCTGCGTGGTGTCCGTGTCTC ACGAGGACCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGG CGTGGAGGTGACAATGCCAAGACCAAGGCCAGGGAGGA GCAGTATAACTACATACCGCGTGGTGAACCGTGTGCG GTGCTGACCAAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTGAGCAATAAGGCCCTGCCGCCCTATCGAGAA GACCATCTCCAAGGCCAAGGCCAGCCTCGGAACACAG GTGTACCTGACCCCTCATAGAGACGAGCTGACAAGAA ACCAGGTGAGCCGTGACCTGTGGTGAAGGGCTTTATCCC AGCGATATGCCGTGGAGTGGAGTCCAATGCCAGCGT AGAACAAATTACAAGACAACCCCTGTGCTGGACTCGA TGGCTTTGCCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGT CTCGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGACCGTGGACAAGT GCACGAGGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCACTG TCACTGTCCCCAGGC
317	抗 FLAGVH-C H-HetFcA	VH(E1-S 117)	EVQLQQSGGELAKPGASVKMSCKSSGYIFTAYAIHWAKQAA GAGLEWIGYIAPAAGAAAAYNAFKGKATLAADKSSSTAYMA AAALTSEDSAVYYCARAAAAGADYWGQGTTLVSS
318	抗 FLAGVH-C	H1(G26- A33)	GYTFTAYA

[0397]

	H-HetFcA		
319	抗 FLAGVH-C H-HetFcA	H3(A97- Y106)	ARAAAAGADY
320	抗 FLAGVH-C H-HetFcA	H2(I51- A58)	IAPAAGAA
321	抗 FLAGVH-C H-HetFcA	CH1(A1 18-V215 )	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNS GALTSGVHTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKV
322	抗 FLAGVH-C H-HetFcA	CH2(A2 31-K340 )	APEAAGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVSVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
323	抗 FLAGVH-C H-HetFcA	CH3(G3 41-G446 )	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
324	抗 FMC63idVH -CH-HetFcA	全	EVKLVEGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRWMSWVRQAP GKGLEWIGEINLDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYYCARRYDAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHIKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVSVSVDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI KAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
[0398]	抗 FMC63idVH -CH-HetFcA	全	GAGGTCAAGCTGGTGGAGCTGGAGGGAGGCCCTGGTCAGC CAGGAGGCTCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCTCCGGCTT CGACTTTCCCGTACTGGATGTCTGGGTGAGACAGGGCCC CCGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGGAGATCAACCTGG TAGCTCCACCATCAATTACACACACTAGCCTGAAGGACAAG TTCATCATCTCCAGGGATAACGCCAAGAACATACCTGTATCT GCAGATGTCTAAGGTGCGGAGCGAGGACACAGCCCTGTAC TATTGTGACCGAGATACGATGCTATGGATTATTGGGGC AGGAAACCTCAGTCACCGTCTCTGCTAGCACCAAGGG ACCTCCGTGTCCCCTGGGATGTCTGGTAAGGATTA GCGGAGGAACCCGCCCTGGGATGTCTGGTAAGGATTA CTTCCCAGAGCCCGTGACCGTGTCTGGGACACAGGCAA CTGACCAAGCGAGTGACACCTTCTGCGGTGCTGCAGTC TAGCGGCCTGTATTCCCTGTCCCTCTGTTGTCAGTGCAA GCTCTCTCTGGGACACAGACATCTGCAACGTGAAT CACAAAGCCATCCAATACCAAGGTCGACAAGAAGGTGGAGC CCAAGTCTGTGATAAGACACACACTGCCACCTTGTCCG GCCAGAGGGCAGCAGGAGGACCAAGCGTGTCCCTGTT CACCAAGCCTAAGGACACACTGATGATCTCCAGGACACC AGAGGTGACCTCGCTGGTGTCCGTGTCAGGAC CCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGG TGACAATGCCAAGACCAAGGCCAGGGAGGAGCAGTATA ACTCTACATACCGCGTGGTGAGCGTGTGACCGTGTGCA CCAGGATTGGCTGAACGGAAGGAGTACAAGTCAAGGTG AGCAATAAGGCCCTGCCGCCCTATCGAGAAGACCATCT CCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAACACAGGTGTACGT GTACCCCTCCATCTAGAGACGAGCTGACAAAGAACCGAGGTG AGCCTGACCTGTCTGGTAAGGGCTTTATCCCAGCGATAT CGCCGTGGAGTGGAGTCCAAATGGCAGCCTGAGAACAAAT TACAAGACAACCCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGCTTT CGCCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCTCGGTGG CAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGTTCCGTGATGACGAGG CACTGCACAATCACTACACCCAGAACAGTCACTGCACTGTCC CCAGGC
326	抗 FMC63idVH -CH-HetFcA	VH(E1-S 116)	EVKLVEGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRWMSWVRQAP GKGLEWIGEINLDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYYCARRYDAMDYWGQGTSVTVSS

[0399]	327	抗 FMC63idVH -CH-HetFcA	H1(G26- W33)	GFDFSRYW
	328	抗 FMC63idVH -CH-HetFcA	H3(A97- Y105)	ARRYDAMDY
	329	抗 FMC63idVH -CH-HetFcA	H2(I51-I 58)	INLDSSTI
	330	抗 FMC63idVH -CH-HetFcA	CH1(A1 17-V214)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNS GALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKV
	331	抗 FMC63idVH -CH-HetFcA	CH2(A2 30-K339)	APEAAGGGSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
	332	抗 FMC63idVH -CH-HetFcA	CH3(G3 40-G445)	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	333	抗 CD19scFv-H etFcB	全	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSVEGGS GGSGGSGGSGGVDDIQMTQTTSSLASLGDRVTRISCRASQDIS KYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITAAEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGGGSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVS VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YVLPPSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG

[0400]

334	抗 CD19scFv-H etFcB	全	GAGGTCAAGCTGCAGGAGAGCGGACCAGGCCTGGTGGCCC CCTCCAGTCTCTGAGCGTACGGCTGTCTGGATCAGACAGCCCC CTAGAAAGGCCTGGAGTGGCTGGCGTGTCTGGGCTC CGAGACAACTACTATAACTCTGCCCTGAAGAGCAGACTG ACCATCATCAAGGACAACCTCAAGTCTCAGGTGTTCCCTGA AGATGAACACGCTGCAGACGACGATACAGCCATCTACTA TTGTGCCAAGCACTACTATTACGGCGCAGCTATGCCATG GATTACTGGGCCAGGGCACCTCCGTACAGTGAGCTCCG TGGAGGGAGGCTCCGGAGGCTCTGGAGGCAGCGGCGGCTC CGCGCGCTGGACGATATCCAGATGACCCAGACACATCT AGCCTGAGGCCCTCCCTGGCGACAGGTGACAATCTCT GCCGCGCTCTCAGGATATCAGCAAGTATCTGAATTGGTA CCAGCAGAACCTGATGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTAT CACACATCCGGCTGACTCTGGCGTCCAAGCAGGTTTC TGGCAGCGGCTCCGAAACCGACTACTCCCTGACAATCTCT AACCTGGAGCAGGAGGATATGCCACCTATTCTGTCA AGGGCAATACCCCTGCCTACACATTGGCGGCGGACAAA GCTGGAATACCCGAGCAGAACCCAAATCTCCGATAAA ACTCACACTGGCCCCCTGCCCCGGCCAGAGGCAGCAG GAGGACCAAGCGTCTTCGTTCCACCCAGGAAAGCCAAAGA CACCTGATGATTAGCCGAAACCCCTGAAAGTCACATGCGTG GTCGTGTCCGTGTCACGAGGACCCAGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTCAGGTGCTAATGCCAAGAC AAAACCCGGAGGAACAGTACAACAGCACCTATAGAGTC GTGTCGTCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACG GCAAGGAATATAAGTCAAAGTGTCAATAAGGCCCTGCC CGCTCCTATCGAGAAAACCATTCTAAGGCAAAAGGCCAG CCTCGCAACCACAGGCTACGTGTCGCTCCATCCGG ACGAGCTGACAAAGAACCGAGGTCTCTGCTGTGCGCTGG GAAAGGCTCTATCCCATCAGATATTGCTGTGGAGTGGAA AGCAATGGGAGCCGAGAACAAATTACCTGACTTGGCCCC CTGTGCTGGACTCTGATGGAGTTCTTCTGATTCTAAG CTGACCGTGGATAAAAGTAGGTGGCAGCAGGGAAATGTCT TTAGTTGTTCACTGATGCTGATGAAGCCCTGCTAACCAC ACCCAGAAAAGCCTGTCCTGTCCCCCGGA
335	抗 CD19scFv-H etFcB	VH(E1-S 120)	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSEYYNSALKSRLTIKDNKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS
336	抗 CD19scFv-H etFcB	H1(G26- G33)	GVSLPDYGV
337	抗 CD19scFv-H etFcB	H3(A96- Y109)	AKHYYGGSYAMDY
338	抗 CD19scFv-H etFcB	H2(I51-T 57)	IWGSETT
339	抗 CD19scFv-H etFcB	VL(D13 9-T245)	DIQMTQTSSLASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCOOGNTLPYTFGGGTKLEIT
340	抗 CD19scFv-H etFcB	L1(Q165 -Y170)	QDISKY
341	抗 CD19scFv-H etFcB	L3(Q227 -T235)	QQGNTLPYT
342	抗 CD19scFv-H etFcB	L2(H188 -S190)	HTS

[0401]

343	抗 CD19scFv-H etFcB	CH2(A2 63-K372 )	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
344	抗 CD19scFv-H etFcB	CH3(G3 73-G478 )	GQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSSLCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

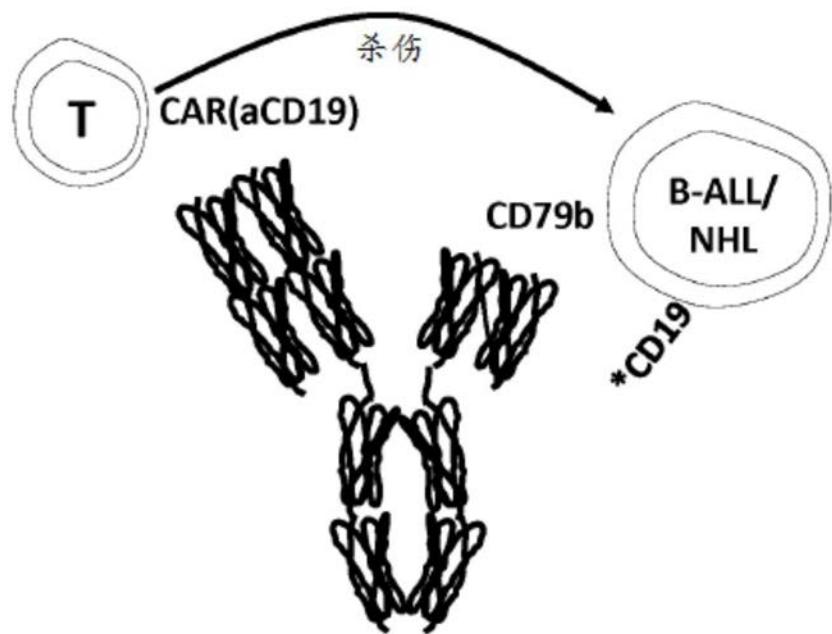


图1A

形式	TAA 结合因子	scFv	Fab	scFv-scFv	Fab-scFv	Fab-Fab	scFv

图1B

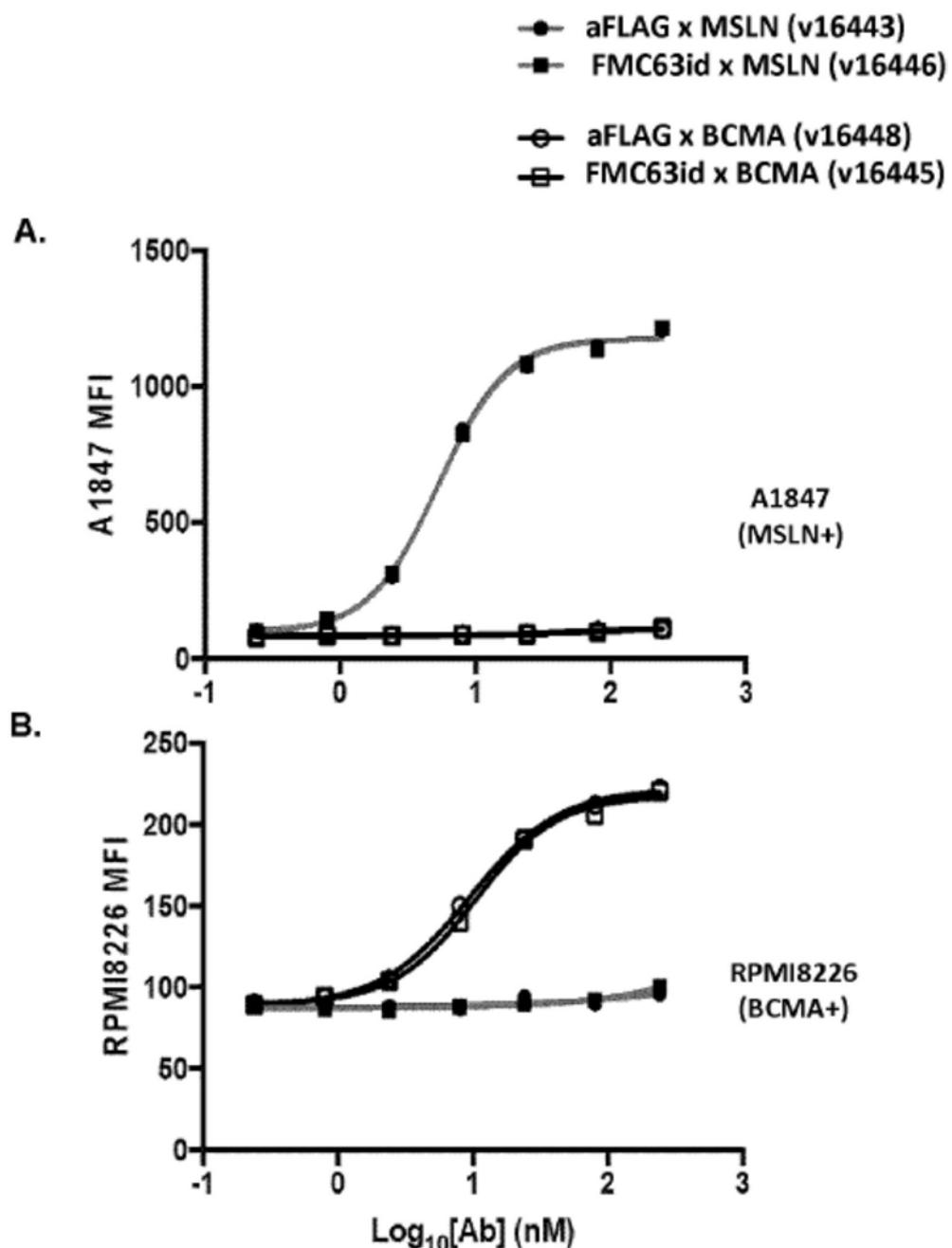


图2

I. aFLAG x MSLN (v16443)  
II. FMC63id x MSLN (v16446)

III. aFLAG x BCMA (v16448)  
IV. FMC63id x BCMA (v16445)

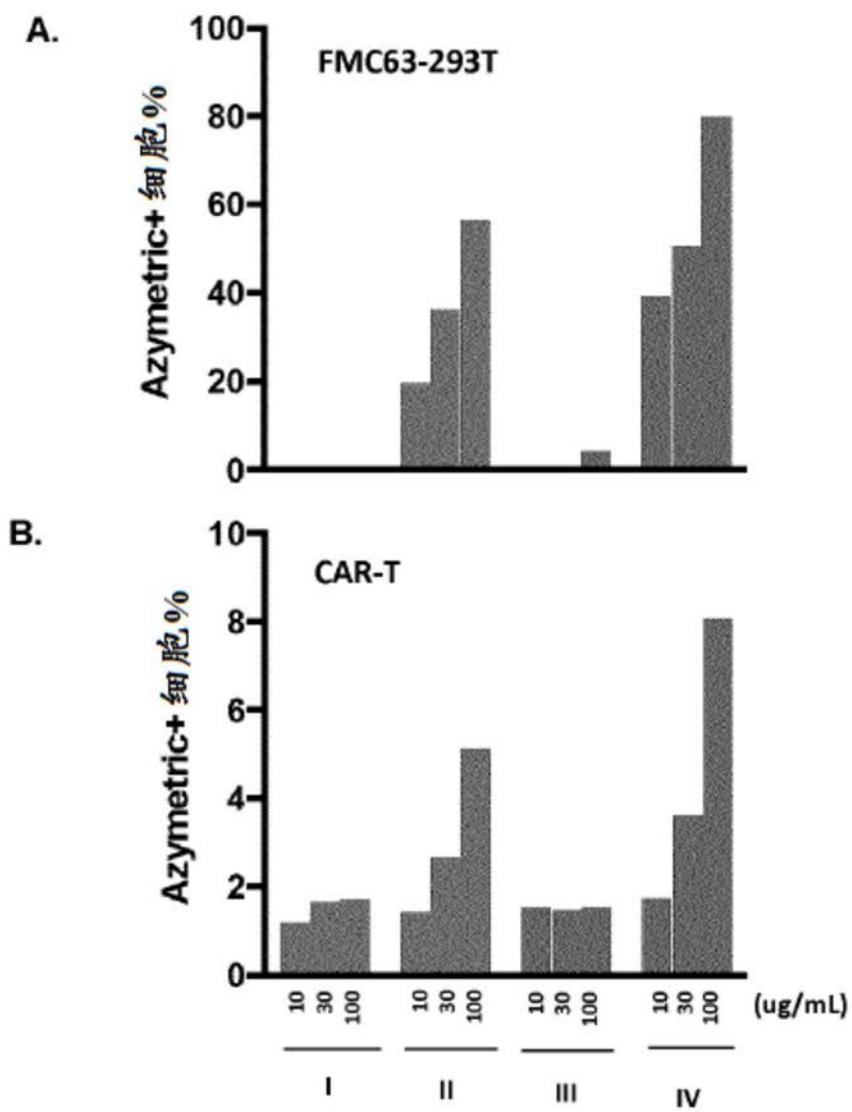


图3

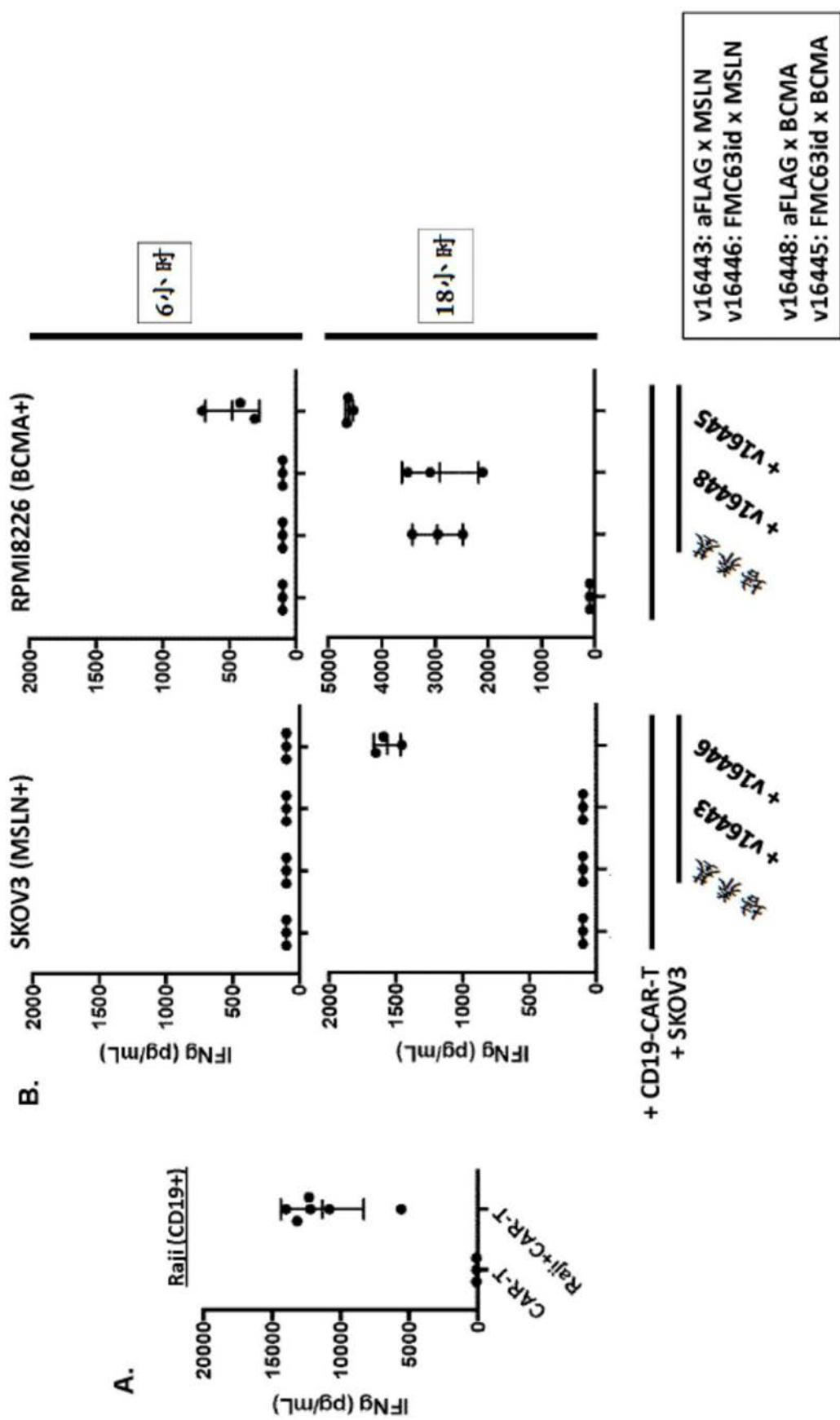


图4