



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107849145 B

(45) 授权公告日 2021. 10. 26

(21) 申请号 201680043839.0	(51) Int.Cl.
(22) 申请日 2016.05.31	C07K 16/28 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 107849145 A	C07K 16/30 (2006.01)
(43) 申请公布日 2018.03.27	(56) 对比文件
(30) 优先权数据 62/180,462 2015.06.16 US	US 7951546 B2,2011.05.31
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2018.01.26	CN 1753912 A,2006.03.29
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2016/034992 2016.05.31	CN 104592391 A,2015.05.06
(87) PCT国际申请的公布数据 W02016/204966 EN 2016.12.22	CN 104640562 A,2015.05.20
(73) 专利权人 基因泰克公司 地址 美国加利福尼亚州	EP 2789630 A1,2014.10.15
(72) 发明人 C·V·李 M·S·丹尼斯 G·富	EP 1923072 A1,2008.05.21
(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494 代理人 岑晓东	Uwe Reusch等.A tetravalent bispecific TandAb (CD19/CD3),AFM11, efficiently recruits T cells for the potent lysis of CD19C tumor cells.《mAbs》.2015,第7卷(第3 期),第584-604页. Amelia M. Huehls等.Bispecific T cell engagers for cancer immunotherapy. 《Immunol Cell Biol》.2015,第93卷(第3期),第 290-296页.
	审查员 王奇
	权利要求书6页 说明书64页 序列表28页 附图3页

(54) 发明名称
抗CD3抗体及其使用方法

(57) 摘要
本发明提供抗分化簇3 (CD3) 抗体及其使用
方法。

1. 一种抗分化簇3 (CD3) 抗体, 其中所述抗CD3抗体包含结合结构域, 所述结合结构域包含以下六个高变区 (HVR):

- (a) HVR-H1, 其如氨基酸序列SEQ ID NO:1所示;
- (b) HVR-H2, 其如氨基酸序列SEQ ID NO:2所示;
- (c) HVR-H3, 其如氨基酸序列SEQ ID NO:3所示;
- (d) HVR-L1, 其如氨基酸序列SEQ ID NO:4所示;
- (e) HVR-L2, 其如氨基酸序列SEQ ID NO:5所示; 以及
- (f) HVR-L3, 其如氨基酸序列SEQ ID NO:6所示。

2. 如权利要求1所述的抗CD3抗体, 其中所述结合结构域包含 (a) 重链可变 (VH) 结构域, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少95%序列同一性的氨基酸序列; (b) 轻链可变 (VL) 结构域, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的氨基酸序列; 或 c) 如 (a) 中的VH结构域和如 (b) 中的VL结构域。

3. 如权利要求2所述的抗CD3抗体, 其中所述VH结构域包含所述氨基酸序列SEQ ID NO:7。

4. 如权利要求2所述的抗CD3抗体, 其中所述VL结构域包含所述氨基酸序列SEQ ID NO:8。

5. 一种抗CD3抗体, 其中所述抗CD3抗体包含结合结构域, 所述结合结构域包含 (a) VH结构域, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:7, 和 (b) VL结构域, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:8。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的抗CD3抗体, 其中所述抗CD3抗体以0.5nM或更低的 K_D 结合人CD3 ϵ 多肽。

7. 如权利要求6所述的抗CD3抗体, 其中所述抗CD3抗体以0.3nM或更低的 K_D 结合人CD3 ϵ 多肽。

8. 如权利要求7所述的抗CD3抗体, 其中所述抗CD3抗体以0.1nM或更低的 K_D 结合人CD3 ϵ 多肽。

9. 如权利要求1-5中任一项所述的抗CD3抗体, 其中所述抗CD3抗体在Fc区中包含降低效应子功能的取代突变。

10. 如权利要求9所述的抗CD3抗体, 其中所述取代突变是非糖基化位点突变。

11. 如权利要求10所述的抗CD3抗体, 其中所述非糖基化位点突变在依照EU编号的氨基酸残基N297、L234、L235和/或D265处。

12. 如权利要求11所述的抗CD3抗体, 其中所述非糖基化位点突变选自自由以下组成的组: N297G、N297A、L234A、L235A以及D265A。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的抗CD3抗体, 其中所述抗CD3抗体是单克隆抗体、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的抗CD3抗体, 其中所述抗CD3抗体是结合CD3的抗体片段。

15. 如权利要求14所述的抗CD3抗体, 其中所述抗体片段选自自由以下组成的组: Fab、Fab'-SH、Fv、scFv以及 (Fab')₂ 片段。

16. 如权利要求1-14中任一项所述的抗CD3抗体, 其中所述抗CD3抗体是全长抗体。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的抗CD3抗体, 其中所述抗CD3抗体是IgG抗体。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的抗CD3抗体,其中所述抗CD3抗体是单特异性抗体。
19. 如权利要求1-17中任一项所述的抗CD3抗体,其中所述抗CD3抗体是多特异性抗体。
20. 如权利要求19所述的抗CD3抗体,其中所述多特异性抗体是双特异性抗体。
21. 如权利要求20所述的抗CD3抗体,其中所述双特异性抗体包含结合到第二生物分子的第二结合结构域,其中所述第二生物分子是除免疫效应细胞之外的靶细胞上的细胞表面抗原。
22. 如权利要求21所述的抗CD3抗体,其中所述细胞表面抗原在所述靶细胞上以低拷贝数表达。
23. 如权利要求22所述的抗CD3抗体,其中所述细胞表面抗原以小于35,000个拷贝/靶细胞表达。
24. 如权利要求22或23所述的抗CD3抗体,其中所述细胞表面抗原以100个拷贝/靶细胞至30,000个拷贝/靶细胞表达。
25. 如权利要求21-24中任一项所述的抗CD3抗体,其中所述细胞表面抗原是肿瘤抗原。
26. 如权利要求25所述的抗CD3抗体,其中所述肿瘤抗原是Ly6G6D(淋巴细胞抗原6复合物基因座G61)。
27. 如权利要求26所述的抗CD3抗体,其中Ly6G6D以20,000个拷贝/靶细胞至30,000个拷贝/靶细胞表达。
28. 一种抗CD3抗体,其中所述抗CD3抗体是双特异性抗体,所述双特异性抗体结合到位于免疫效应细胞上的CD3和细胞表面抗原,所述细胞表面抗原以低拷贝数在除所述免疫效应细胞之外的靶细胞上表达,其中所述双特异性抗体包含抗CD3臂,所述抗CD3臂包含包含以下六种HVR的第一结合结构域:
- (a) HVR-H1,其如氨基酸序列SEQ ID NO:1所示;
 - (b) HVR-H2,其如氨基酸序列SEQ ID NO:2所示;
 - (c) HVR-H3,其如氨基酸序列SEQ ID NO:3所示;
 - (d) HVR-L1,其如氨基酸序列SEQ ID NO:4所示;
 - (e) HVR-L2,其如氨基酸序列SEQ ID NO:5所示;以及
 - (f) HVR-L3,其如氨基酸序列SEQ ID NO:6所示;以及
- 包含第二结合结构域的抗细胞表面抗原臂。
29. 如权利要求28所述的抗CD3抗体,其中所述细胞表面抗原是肿瘤抗原。
30. 如权利要求29所述的抗CD3抗体,其中所述肿瘤抗原是Ly6G6D。
31. 如权利要求1-30中任一项所述的抗CD3抗体,其中所述抗CD3抗体包含一个或多个重链恒定结构域,其中所述一个或多个重链恒定结构域选自第一CH1(CH1₁)结构域、第一CH2(CH2₁)结构域、第一CH3(CH3₁)结构域、第二CH1(CH1₂)结构域、第二CH2(CH2₂)结构域以及第二CH3(CH3₂)结构域。
32. 如权利要求31所述的抗CD3抗体,其中所述一个或多个重链恒定结构域中的至少一个与另一个重链恒定结构域配对。
33. 如权利要求32所述的抗CD3抗体,所述CH3₁和CH3₂结构域各自包含突起或空腔,并且其中所述CH3₁结构域中的所述突起或空腔分别可定位在所述CH3₂结构域中的所述空腔或突起中。

34. 如权利要求33所述的抗CD3抗体,其中所述CH₃₁和CH₃₂结构域在所述突起与空腔之间界面处相接。

35. 如权利要求31-34中任一项所述的抗CD3抗体,其中所述CH₂₁和CH₂₂结构域各自包含突起或空腔,并且其中所述CH₂₁结构域中的所述突起或空腔分别可定位在所述CH₂₂结构域中的所述空腔或突起中。

36. 如权利要求35所述的抗CD3抗体,其中所述CH₂₁和CH₂₂结构域在所述突起与空腔之间界面处相接。

37. 一种分离的核酸,其编码如权利要求1-36中任一项所述的抗CD3抗体。

38. 一种载体,其包含如权利要求37所述的分离的核酸。

39. 一种宿主细胞,其包含如权利要求38所述的载体。

40. 如权利要求39所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

41. 如权利要求40所述的宿主细胞,其中所述哺乳动物细胞是中国仓鼠细胞卵巢(CHO)细胞。

42. 如权利要求39所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是原核细胞。

43. 如权利要求42所述的宿主细胞,其中所述原核细胞是大肠杆菌。

44. 一种产生如权利要求1-36中任一项所述的抗CD3抗体的方法,所述方法包括在培养基中培养如权利要求39所述的宿主细胞。

45. 如权利要求44所述的方法,其中所述方法还包括从所述宿主细胞或所述培养基回收所述抗CD3抗体。

46. 一种免疫缀合物,其包含如权利要求1-36中任一项所述的抗CD3抗体和细胞毒性剂。

47. 一种组合物,其包含如权利要求1-36中任一项所述的抗CD3抗体。

48. 如权利要求47所述的组合物,其还包含药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

49. 如权利要求48所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

50. 如权利要求47-49中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含PD-1轴结合拮抗剂或另外的治疗剂。

51. 如权利要求1-36中任一项所述的抗CD3抗体,其用作药物。

52. 如权利要求1-36中任一项所述的抗CD3抗体的用途,其用于制造用于治疗细胞增殖性病症或自身免疫性病症或延迟所述病症的进展的药物。

53. 如权利要求1-36中任一项所述的抗CD3抗体的用途,其用于制造用于增强患有细胞增殖性病症或自身免疫性病症的受试者的免疫功能的药物。

54. 如权利要求52或53所述的用途,其中所述细胞增殖性病症是癌症。

55. 如权利要求54所述的用途,其中所述癌症选自由以下组成的组:食管癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、结肠直肠癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、B细胞淋巴瘤、B细胞白血病、多发性骨髓瘤、肾癌、前列腺癌、肝癌、头颈癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤、生发中心B细胞样(GCB)DLBCL、活化B细胞样(ABC)DLBCL、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴性白血病(CLL)、边缘区淋巴瘤(MZL)、小淋巴细胞性白血病(SLL)、淋巴浆细胞性白血病(LL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(WM)、中枢神经系统淋巴瘤(CNSL)、伯基特淋巴瘤(BL)、毛细胞白血病、不可分类的脾淋巴瘤/白

血病、重链病、浆细胞骨髓瘤、孤立性骨浆细胞瘤、髓外浆细胞瘤、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、CNS的原发性DLBCL、原发性腿型皮肤DLBCL、老年性EBV阳性DLBCL、慢性炎症相关性DLBCL、淋巴瘤样肉芽肿、原发性胸腺纵隔淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤和原发性渗出性淋巴瘤。

56. 如权利要求55所述的用途,其中所述B细胞淋巴瘤是脾弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、在HHV8相关的多中心卡斯尔曼病中出现的大B细胞淋巴瘤、具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特淋巴瘤中间的特征的不可分类的B细胞淋巴瘤或具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与经典霍奇金淋巴瘤中间的特征的不可分类的B细胞淋巴瘤。

57. 如权利要求55所述的用途,其中所述B细胞白血病是B细胞幼淋巴细胞白血病。

58. 如权利要求55所述的用途,其中所述滤泡淋巴瘤是儿童滤泡淋巴瘤。

59. 如权利要求55所述的用途,其中所述边缘区淋巴瘤是脾脏边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织的淋巴结外边缘区淋巴瘤(MALT淋巴瘤)或淋巴结边缘区淋巴瘤。

60. 如权利要求59所述的用途,其中所述淋巴结边缘区淋巴瘤是儿童淋巴结边缘区淋巴瘤。

61. 如权利要求55所述的用途,其中所述毛细胞白血病是毛细胞白血病变体。

62. 如权利要求55所述的用途,其中所述重链病是 α 重链病、 γ 重链病或 μ 重链病。

63. 如权利要求55所述的用途,其中所述癌症是食管癌。

64. 如权利要求54所述的用途,其中所述癌症为腺癌。

65. 如权利要求64所述的用途,其中所述腺癌是转移性腺癌。

66. 如权利要求64或65所述的用途,其中所述腺癌是结肠直肠腺癌、胃腺癌或胰腺癌。

67. 如权利要求52或53所述的用途,其中所述自身免疫性病症选自以下组成的组:类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮(SLE)、韦格纳氏病、炎性肠病、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、自身免疫性血小板减少症、多发性硬化、牛皮癣、IgA肾病变、IgM多发性神经病变、重症肌无力、血管炎、糖尿病、雷诺综合征、舍格伦综合征、肾小球性肾炎、视神经脊髓炎(NMO)以及IgG神经病变。

68. 如权利要求67所述的用途,其中所述类风湿性关节炎是青少年类风湿性关节炎。

69. 如权利要求52-68中任一项所述的用途,其中所述抗CD3抗体结合到(a)位于免疫效应细胞上的CD3分子和(b)位于除所述免疫效应细胞之外的靶细胞上的第二生物分子。

70. 如权利要求69所述的用途,其中所述抗CD3抗体在结合到(a)和(b)之后活化所述免疫效应细胞。

71. 如权利要求70所述的用途,其中所述活化免疫效应细胞能够在所述靶细胞上发挥细胞毒性作用和/或细胞凋亡作用。

72. 如权利要求52-71中任一项所述的用途,其中所述药物是为了以0.01mg/kg至10mg/kg的剂量向所述受试者施用而配制的。

73. 如权利要求72所述的用途,其中所述药物是为了以0.1mg/kg至10mg/kg的剂量向所述受试者施用而配制的。

74. 如权利要求73所述的用途,其中所述药物是为了以1mg/kg的剂量向所述受试者施用而配制的。

75. 如权利要求52-74中任一项所述的用途,其中所述药物还包括PD-1轴结合拮抗剂和/或另外的治疗剂。

76. 如权利要求52-75中任一项所述的用途,其中所述PD-1轴结合拮抗剂选自以下组成的组:PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

77. 如权利要求76所述的用途,其中所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-L1结合拮抗剂。

78. 如权利要求77所述的用途,其中所述PD-L1结合拮抗剂选自以下组成的组:MPDL3280A(阿特珠单抗)、MDX-1105、MEDI4736(德瓦鲁单抗)以及MSB0010718C(阿维单抗)。

79. 如权利要求76所述的用途,其中所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂。

80. 如权利要求79所述的用途,其中所述PD-1结合拮抗剂选自以下组成的组:MDX 1106(纳武单抗)、MK-3475(派姆单抗)、MEDI-0680(AMP-514)、PDR001、REGN2810以及BGB-108。

81. 如权利要求76所述的用途,其中所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-L2结合拮抗剂。

82. 如权利要求81所述的用途,其中所述PD-L2结合拮抗剂是抗体或免疫粘附素。

83. 如权利要求1-36中任一项所述的抗CD3抗体在制造用于治疗有需要的受试者中的细胞增殖性病症或自身免疫性病症或延迟所述病症的进展的药物中的用途,其中所述抗CD3抗体包含抗CD3臂和抗Ly6G6D臂,且其中所述药物是为了与PD-1轴结合拮抗剂组合施用而配制的。

84. 如权利要求1-36中任一项所述的抗CD3抗体在制造用于增强患有细胞增殖性病症或自身免疫性病症的受试者的免疫功能的药物中的用途,其中所述抗CD3抗体包含抗CD3臂和抗Ly6G6D臂,且其中所述药物是为了与PD-1轴结合拮抗剂组合施用而配制的。

85. 如权利要求83或84所述的用途,其中:

(a) 所述抗CD3臂包含第一结合结构域,所述第一结合结构域包含:

(i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的VH结构域,和

(ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:8的VL结构域;并且

(b) 所述PD-1轴结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。

86. 如权利要求83-85中任一项所述的用途,其中所述细胞增殖性病症是癌症。

87. 如权利要求86所述的用途,其中所述癌症是食管癌。

88. 如权利要求86所述的用途,其中所述癌症为腺癌。

89. 如权利要求88所述的用途,其中所述腺癌是转移性腺癌。

90. 如权利要求88或89所述的用途,其中所述腺癌是结肠直肠腺癌、胃腺癌或胰腺癌。

91. 如权利要求52-90中任一项所述的用途,其中所述药物是为了与糖皮质激素组合施用而配制的。

92. 如权利要求91所述的用途,其中所述糖皮质激素是地塞米松。

93. 如权利要求52-92中任一项所述的用途,其中所述药物是为了与利妥昔单抗组合施用而配制的。

94. 如权利要求52-92中任一项所述的用途,其其中所述药物是为了与奥奴珠单抗组合施用而配制的。

95. 如权利要求52-94中任一项所述的用途,其中所述药物是为了与抗体-药物缀合物(ADC)组合施用而配制的。

96. 如权利要求52-95中任一项所述的用途,其中所述药物是为了经皮下、静脉内、肌肉内、局部、口服、经皮、腹膜内、眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、心室内或鼻内施用而配制的。

97. 如权利要求96所述的用途,其中所述药物是为了皮下施用而配制的。

98. 如权利要求96所述的用途,其中所述药物是为了静脉内施用而配制的。

99. 如权利要求52-98中任一项所述的用途,其中所述受试者为人。

100. 一种试剂盒,其包含:

(a) 如权利要求47-50中任一项所述的组合物;和

(b) 包装插页,其包括用于使用所述组合物以治疗细胞增殖性病症或自身免疫性病症或延迟所述病症的进展的说明书。

抗CD3抗体及其使用方法

[0001] 序列表

[0002] 本申请含有已以ASCII格式电子版形式提交且特此以引用的方式整体并入的序列表。2016年5月31日创建的所述ASCII拷贝名为 50474-118W02_Sequence_Listing_5_31_16_ST25且大小为39,627字节。

发明领域

[0003] 本发明涉及抗分化簇3 (CD3) 抗体及其使用方法。

[0004] 背景

[0005] 细胞增殖性病症诸如癌症的特征在于细胞亚群不受控制地生长。它们是发达国家的主要死亡原因,并且是发展中国家的第二大死亡原因,其中每年诊断出1200多万新癌症病例并且每年发生700万癌症死亡。美国癌症协会 (American Cancer Society) 估计,在2015年,超过五十万美国人将死于癌症,几乎占全国每四名死亡人数中的一个。随着老年人口的增长,癌症的发病率同时上升,因为七十岁以后发生癌症的可能性多于两倍以上。因此,癌症护理代表了显著的且日益增长的社会负担。

[0006] 长期的癌症治疗方法包括化疗、放射疗法和去除实体瘤的手术。最近,开发了T细胞靶向治疗性抗体。这些治疗性抗体包括双特异性抗体,所述双特异性抗体能够同时结合T细胞上的细胞表面抗原和肿瘤细胞上的细胞表面抗原,从而使结合的T细胞有助于破坏肿瘤细胞。

[0007] 目前正在进行用于治疗癌症的临床试验的现有双特异性抗体受其短半衰期和/或变化的功效限制。因此,在用于癌症治疗的有效双特异性抗体的开发的领域存在未满足的需求。

[0008] 概述

[0009] 本发明涉及抗分化簇3 (CD3) 抗体及其使用方法。

[0010] 在一方面,本发明的特征在于抗CD3抗体,其中抗CD3抗体包含结合结构域,所述结合结构域包含以下六个高变区 (HVR): (a) HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5; 以及 (f) HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6。在一些实施方案中,结合结构域包含 (a) 重链可变 (VH) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7 具有至少95%序列同一性的氨基酸序列; (b) 轻链可变 (VL) 结构域,所述轻链可变 (VL) 结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或c) 如 (a) 中的VH结构域和如 (b) 中的VL结构域。在一些实施方案中,VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:7。在一些实施方案中,VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:8。在一些实施方案中,结合结构域包含 (a) 重链可变 (VH) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;和 (b) 轻链可变 (VL) 结构域,所述轻链可变 (VL) 结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一

些实施方案中, VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 7。在一些实施方案中, VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 8。在一些实施方案中, 抗CD3抗体结合具有0.7nM或更低的 K_D 的人CD3 ϵ 多肽(例如, 0.6nM或更低的 K_D , 例如, 0.5nM或更低的 K_D , 例如, 0.4nM或更低的 K_D , 例如, 0.3nM或更低的 K_D , 例如, 0.2nM或更低的 K_D , 例如, 0.1nM或更低的 K_D)。

[0011] 在一些实施方案中, 前述抗CD3抗体中的任一种可以是单克隆抗体、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中, 前述抗CD3抗体中的任一种可以是结合CD3的抗体片段。在一些实施方案中, 抗体片段选自由以下组成的组: Fab、Fab'-SH、Fv、scFv以及(Fab')₂片段。在其他实施方案中, 抗CD3抗体是全长抗体。在一些实施方案中, 抗CD3抗体是IgG抗体(例如, IgG1、IgG2或IgG3抗体)。在一些实施方案中, 抗CD3抗体是单特异性抗体。在一些实施方案中, 抗CD3抗体是双特异性T细胞接合器(BiTE®)抗体)。

[0012] 在一些实施方案中, 抗CD3抗体是多特异性抗体。在一些实施方案中, 多特异性抗体是双特异性抗体, 诸如Ly6G6D TDB抗体。在一些实施方案中, 双特异性抗体包含结合到第二生物分子的第二结合结构域, 其中第二生物分子是细胞表面抗原(例如, 除免疫效应细胞之外的靶细胞上的细胞表面抗原)。在一些实施方案中, 细胞表面抗原在靶细胞上以低拷贝数表达。例如, 细胞表面抗原可以以小于35,000个拷贝/靶细胞表达。在一些实施方案中, 低拷贝细胞表面抗原可以以约100个拷贝/靶细胞至约30,000个拷贝/靶细胞表达。

[0013] 在一些实施方案中, 细胞表面抗原是肿瘤抗原。在一些实施方案中, 肿瘤抗原选自由以下组成的组: Ly6G6D(淋巴细胞抗原6复合物基因座G61); Ly6-D、MEGT1); CD20; FcRH5(Fc受体样5); HER2; LYPD1; PMEL17(银同系物; SILV; D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100); Ly6E(淋巴细胞抗原6复合物基因座E; Ly67、RIG-E、SCA-2、TSA-1); CD19; CD33; CD22(B细胞受体CD22-B同种型); CD79a(CD79A、CD79a、免疫球蛋白相关 α ; BMPR1B(骨形态发生蛋白受体类型IB); CD79b(CD79B、CD79 β 、1Gb(免疫球蛋白相关 β); B29); EDAR(外胚层发育不良蛋白(Ectodysplasin)A受体); GFRA1(GDNF-Ra1); MRP4(多药耐药蛋白4); RET; STEAP1(前列腺六跨膜上皮抗原); TENB2(推定的跨膜蛋白聚糖); E16(LAT1、SLC7A5); 0772P(CA125、MUC16); MPF(MPF、MSLN、SMR、巨核细胞增强因子、间皮素); Napi2b(NAPI-2B、NPTIIB、SLC34A2、溶质载体家族34(磷酸钠)成员2、II型钠依赖性磷酸转运蛋白3b); Sema5b; PSCA hlg(2700050C12Rik、C530008016Rik、RIKEN cDNA 2700050C12、RIKEN cDNA 2700050C12基因); ETBR(内皮素B型受体); MSG783(RNF124、假定蛋白FLJ20315); STEAP2; TrpM4(BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、瞬时受体电位阳离子通道亚家族M成员4); CRIPTO(CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、畸胎瘤衍生的生长因子); CD21(CR2(补体受体2)或C3DR(C3d/埃-巴二氏病毒受体)或Hs.73792); FcRH2(IFGP4、IRTA4、SPAP1A(包含SH2结构域的磷酸酶锚定蛋白1a)、SPAP1B、SPAP1C); NCA; MDP; IL20R α ; 缩短素; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; BAFF-R(B细胞活化因子受体、BLyS受体3、BR3); CXCR5(伯基特淋巴瘤受体1; HLA-DOB(MHC II类分子的 β 亚基); P2X5(嘌呤能受体P2X配体门控离子通道5; CD72(B细胞分化抗原CD72、Lyb-2); LY64(淋巴细胞抗原64(RP105)、富含亮氨酸重复序列(LRR)家族的I型膜蛋白); FcRH1(Fc受体样蛋白1); IRTA2(免疫球蛋白超家族受体易位相关2); TMEFF1; TMEM46(shisa同源物2(非洲爪蟾); SHISA2); LGR5(富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5; GPR49、GPR67); LY6K(淋巴细胞抗原6复合物基因座K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226); GPR19(G蛋白偶联受体19; Mm 4787); GPR54(KISS1受体; KISS1R; GPR54; HOT7T175;

AXOR12); ASPHD1 (包含天冬氨酸 β -羟化酶结构域的1; LOC253982); 酪氨酸酶 (TYR;OCAIA;OCA1A;酪氨酸酶;SHEP3); TMEM118 (环指蛋白,跨膜蛋白2;RNFT2;FLJ14627); GPR172A (G蛋白偶联受体172A;GPCR41;FLJ11856;D15Erttd747e); GPC3 (磷脂酰肌醇聚糖3); CLL1 (C型凝集素样分子1); B7-H4 (B7x;B7S1); RNF43 (环指蛋白43); CD70; CXORF61 (染色体X开放阅读框61); HAVCR1; 表皮调节素; 双调蛋白; EGFR; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-G719A; EGFR-G719S; EGFR-G719C; EGFR-T790M; EGFR-S768I; 亲脂素; AIM-2; ALDH1A1; α -辅肌动蛋白-4; 甲胎蛋白; ARTC1; B-RAF; BAGE-1; BCLX (L); BCR-ABL 融合蛋白 (b3a2); β -链蛋白; BING-4; CALCA; CASP-5; CASP-8; CD45; Cdc27; CDK4; CDKN2A; CEA; CLPP; COA-1; CPSF; Cw6; 细胞周期蛋白D1; 细胞周期蛋白-A1; dek-can融合蛋白; DKK1; DR1; DR13; EFTUD2; 延伸因子2; ENAH (hMena); EpCAM; EphA3; ETV6-AML1融合蛋白; EZH2; FLT3-ITD; FN1; G250; MN; CAIX; GAGE-1; 2; 8; GAGE-3; 4; 5; 6; 7; 磷脂酰肌醇聚糖-3; GnTVf; gp100/ Pmel17; GPNMB; HERV-K-MEL; hsp70-2; IDO1; IGF2B3; IL13R α 2; 肠羧基酯酶; K-ras; 激肽释放酶4; KIF20A; KK-LC-1; KM-HN-1; LAGE-1; LDLR-岩藻糖转移酶AS融合蛋白; Lengsin; M-CSF; MAGE-A1; MAGE-A10; MAGE-A12; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-C1; MAGE-C2; 乳球蛋白-A; MART2; MCSP; mdm-2; ME1; Melan-A/MART-1; Meloe; MMP-2; MMP-7; MUC1; MUC5AC; 粘蛋白; MUM-1f; MUM-2; MUM-3; 肌球蛋白I类; N-ras; NA88-A; neo-PAP; NFYC; NY-BR-1; NY-ESO-1/ LAGE-2; OA1; OGT; OS-9; p53; PAP; PAX5; PBF; pml-RAR α 融合蛋白; PRAME; PRDX5; PSMA; PTPRK; RAB38/ NY-MEL-1; RAGE-1; RBAF600; RGS5; RhoC; RNF43; RU2AS; SAGE; 分离蛋白1; SIRT2; SNRPD1; SOX10; Sp17; SSX-2; SSX-4; STEAP1; 生存素; SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白; TAG-1; TAG-2; 端粒酶; TGF- β RII; TRAG-3; 磷酸丙糖异构酶; TRP-1/gp75; TRP-2; TRP2-INT2; 酪氨酸酶; VEGF; WT1; XAGE-1b/GAGED2a; 以及 SLC35D3。在一些实施方案中,肿瘤抗原选自自由以下组成的组: LY6G6D、CD20、FcRH5、HER2、LYPD1、PMEL17、LY6E、CD19、CD33、CD22、CD79A、CD79B、EDAR、GFRA1、MRP4、RET、Steap1以及TenB2。

[0014] 在一些实施方案中,肿瘤抗原是Ly6G6D,其可以约20,000个拷贝/靶细胞至约30,000个拷贝/靶细胞存在于靶细胞的细胞表面上。在一些实施方案中,拷贝数可通过Scatchard曲线图分析来确定。

[0015] 在相关方面,本发明的特征在于抗CD3抗体,其中抗CD3抗体是双特异性抗体,所述双特异性抗体结合到位于免疫效应细胞上的CD3和细胞表面抗原,所述细胞表面抗原以低拷贝数在除免疫效应细胞之外的靶细胞上表达,其中双特异性抗体包含抗CD3臂,所述抗CD3臂包含以下六种HVR的第一结合结构域: (a) HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5; 以及 (f) HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6; 和包含第二结合结构域的抗细胞表面抗原臂。在一些实施方案中,细胞表面抗原是肿瘤抗原。在一些实施方案中,肿瘤抗原Ly6G6D。

[0016] 在一些实施方案中,前述抗CD3抗体中的任一种可在Fc区中包含降低效应子功能的取代突变。在一些实施方案中,取代突变是非糖基化位点突变。在一些实施方案中,非糖基化位点突变在氨基酸残基 N297、L234、L235和/或D265 (EU编号) 处。在一些实施方案中,非糖基化位点突变选自自由以下组成的组: N297G、N297A、L234A、L235A 以及D265A。在一些

实施方案中,突变是N297G突变。在一些实施方案中,非糖基化位点突变减少抗CD3抗体效应子功能。

[0017] 在一些实施方案中,前述抗CD3抗体中的任一种可包含一个或多个重链恒定结构域,其中一个或多个重链恒定结构域选自第一CH1 (CH₁₁) 结构域、第一CH2 (CH₂₁) 结构域、第一CH3 (CH₃₁) 结构域、第二CH1 (CH₁₂) 结构域、第二CH2 (CH₂₂) 结构域以及第二CH3 (CH₃₂) 结构域。在一些实施方案中,一个或多个重链恒定结构域中的至少一个与另一个重链恒定结构域配对。在一些实施方案中,CH₃₁和CH₃₂结构域各自包含突起或空腔,并且其中CH₃₁结构域中的突起或空腔分别可定位在CH₃₂结构域中的空腔或突起中。在一些实施方案中,CH₃₁和CH₃₂结构域在所述突起与空腔之间界面处相接。在一些实施方案中,CH₂₁和CH₂₂结构域各自包含突起或空腔,并且其中CH₂₁结构域中的突起或空腔分别可定位在CH₂₂结构域中的空腔或突起中。在一些实施方案中,CH₂₁和CH₂₂结构域在所述突起与空腔之间界面处相接。

[0018] 在一些实施方案中,本发明的特征在于包含缀合到细胞毒性剂的前述抗CD3抗体中任一种的免疫缀合物。还提供了包含前述抗CD3抗体中的任一种的组合物。在一些实施方案中,组合物还包含药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。在一些实施方案中,组合物为药物组合物。在一些实施方案中,组合物还包含PD-1轴结合拮抗剂或另外的治疗剂。在另一方面,本发明的特征在于编码本文公开的抗CD3抗体中任一种的分离的核酸。在一些实施方案中,提供了包含编码抗CD3抗体的核酸的载体(例如,表达载体)(例如,用于表达抗CD3抗体的载体)。

[0019] 在另一个方面,本发明的特征在于包含前述核酸和/或载体的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞(例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)。在其他实施方案中,宿主细胞是原核细胞(例如,大肠杆菌(E.coli)细胞)。还提供了生产前述抗CD3抗体中的任一种的方法,所述方法包括培养产生抗CD3抗体的宿主细胞,并且从宿主细胞或培养基中回收抗CD3抗体。

[0020] 在一些方面,前述抗CD3抗体中的任一种可用作药物。在一些实施方案中,前述抗CD3抗体中的任何一种可用于治疗有需要的受试者中的细胞增殖性病症或自身免疫性病症或延迟所述病症的进展。在一些实施方案中,前述抗CD3抗体中的任一种可用于增强患有细胞增殖性病症或自身免疫性病症的受试者的免疫功能。

[0021] 在一些方面,本发明的特征在于前述抗CD3抗体中的任一种制造用于治疗细胞增殖性病症或自身免疫性病症或延迟所述病症的进展的药物中的用途。在一些方面,本发明的特征在于前述抗CD3抗体中的任一种制造用于增强患有细胞增殖性病症或自身免疫性病症的受试者的免疫功能的药物中的用途。

[0022] 本发明的另外方面是治疗有需要的受试者中的细胞增殖性病症或自身免疫性病症或延迟所述病症的进展的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的前述抗CD3抗体中的任一种。在另一方面,本发明的特征在于增强患有细胞增殖性病症或自身免疫性病症的受试者的免疫功能的方法,所述方法包括向受试者施用前述抗CD3抗体中的任一种。在一些实施方案中,抗CD3抗体结合到(a)位于免疫效应细胞上的CD3分子和(b)位于除免疫效应细胞之外的靶细胞上的第二生物分子。在一些实施方案中,抗CD3抗体在结合到(a)和(b)之后活化免疫效应细胞。在一些实施方案中,活化免疫效应细胞能够在靶细胞上发挥

细胞毒性作用和/或细胞凋亡作用。在一些实施方案中，抗CD3抗体以约0.01mg/kg至约10mg/kg的剂量向受试者施用。在一些实施方案中，抗CD3抗体以约0.1mg/kg至约10mg/kg的剂量向受试者施用。在一些实施方案中，抗CD3抗体以约1mg/kg的剂量向受试者施用。在一些实施方案中，经皮下、静脉内、肌肉内、局部、口服、经皮、腹膜内、眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、心室内或鼻内施用抗CD3抗体。在一些实施方案中，皮下施用抗CD3抗体。在一些实施方案中，静脉内施用抗CD3抗体。

[0023] 在一些实施方案中，所述方法还包括向受试者施用PD-1轴结合拮抗剂或另外的治疗剂。在一些实施方案中，在施用抗CD3抗体之前或之后施用另外的治疗剂。在一些实施方案中，另外的治疗剂与抗CD3抗体同时施用。在一些实施方案中，所述PD-1轴结合拮抗剂选自以下组成的组：PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

[0024] 在一些实施方案中，所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂。在一些实施方案中，PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、低聚肽或减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与PD-L1和/或PD-L2的相互作用所产生的信号转导的其他分子。在一些实施方案中，所述PD-1结合拮抗剂为抗PD-1抗体。在具体实施方案中，PD-1结合拮抗剂是MDX-1106(纳武单抗)。在另一个具体实施方案中，PD-1结合拮抗剂是MK-3475(派姆单抗)。在另一个具体实施方案中，PD-1结合拮抗剂是CT-011(皮地利珠单抗)。在另一个具体实施方案中，PD-1结合拮抗剂是AMP-224。在另一个具体实施方案中，PD-1结合拮抗剂是MED1-0680。在另一个具体实施方案中，PD-1结合拮抗剂是PDR001。在另一个具体实施方案中，PD-1结合拮抗剂是REGN2810。在另一个具体实施方案中，PD-1结合拮抗剂是BGB-108。

[0025] 在其他实施方案中，PD-1轴结合拮抗剂是PD-L1结合拮抗剂。在一些实施方案中，PD-L1结合拮抗剂是抗PD-L1抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、低聚肽或减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与其结合配偶体中的一个或多个诸如PD-1、B7-1的相互作用所产生的信号转导的其他分子。在一些实施方案中，所述PD-L1结合拮抗剂为抗PD-L1抗体。在再一具体实施方案中，抗PD-L1抗体是MPDL3280A(阿特珠单抗)。在具体实施方案中，抗PD-L1抗体是YW243.55.S70。在另一个具体实施方案中，抗PD-L1抗体是MDX-1105。在另一个具体实施方案中，抗PD-L1抗体是MSB0015718C。在再一具体实施方案中，抗PD-L1抗体是MEDI4736。

[0026] 在其他实施方案中，PD-1轴结合拮抗剂是PD-L2结合拮抗剂。在一些实施方案中，PD-L2结合拮抗剂是抗PD-L2抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、低聚肽或减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L2与其结合配体中的一个或多个诸如PD-1的相互作用所产生的信号转导的其他分子。在一些实施方案中，PD-L2结合拮抗剂是抗PD-L2抗体。在一些实施方案中，所述PD-L2结合拮抗剂为免疫粘附素。

[0027] 在一些方面，本发明的特征在于治疗有需要的受试者中的细胞增殖性病症或自身免疫性病症或延迟所述病症的进展的方法，所述方法包括向受试者施用抗CD3抗体和PD-1轴结合拮抗剂，其中抗CD3抗体包含抗CD3臂和抗Ly6G6D臂。在一些方面，本发明的特征在于增强患有细胞增殖性病症或自身免疫性病症的受试者的免疫功能的方法，所述方法包括向受试者施用抗CD3抗体和PD-1轴结合拮抗剂，其中抗CD3抗体包含抗CD3臂和抗Ly6G6D臂(即，Ly6G6D TDB 抗体)。在一些实施方案中，抗CD3臂包含第一结合结构域，所述

第一结合结构域包含(i) VH结构域,所述VH结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:7,和(ii) VL结构域,所述VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:8。在一些实施方案中,所述方法包括向受试者施用抗CD3 抗体,其中抗CD3抗体包含(i) 抗CD3臂,抗CD3臂具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的VH结构域和包含氨基酸序列SEQ ID NO:8 的VL结构域,和(ii) 抗Ly6G6D臂(即,Ly6G6D TDB抗体)和PD-1 轴结合拮抗剂,即抗PD-L1抗体。

[0028] 在其他实施方案中,抗CD3抗体(例如,Ly6G6D TDB)(同时,作为单种或多种(例如,1、2、3、4、5或6或更多种)组合物(例如,制剂))与一种或多种(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11种)另外的治疗剂共同施用,所述另外的治疗剂选自:FOLFOX(奥沙利铂(ELOXATINTM)与5-氟尿嘧啶和亚叶酸组合)、卡培他滨(XELODA®)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、CapeOx(XELOX;卡培他滨和奥沙利铂)、甲酰四氢叶酸(亚叶酸)、贝伐单抗(AVASTIN®)、西妥昔单抗(ERBITUX®)、帕尼单抗(VECTIBIX®)、瑞格菲尼(STIVARGA®)、伊立替康(CPT-11; CAMPTOSAR®)以及FLOX(5-氟尿嘧啶和奥沙利铂)。在其他实施方案中,抗CD3抗体(例如,Ly6G6D TDB)在一种或多种另外的治疗剂之前施用,诸如以下中的任一、二、三、四、五、六、七、八、九、十或全部十一种:FOLFOX(奥沙利铂(ELOXATINTM)与5-氟尿嘧啶和亚叶酸组合)、卡培他滨(XELODA®)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、CapeOx(XELOX;卡培他滨和奥沙利铂)、甲酰四氢叶酸(亚叶酸)、贝伐单抗(AVASTIN®)、西妥昔单抗(ERBITUX®)、帕尼单抗(VECTIBIX®)、瑞格菲尼(STIVARGA®)、伊立替康(CPT-11; CAMPTOSAR®)以及FLOX(5-氟尿嘧啶和奥沙利铂)。在其他实施方案中,抗CD3抗体(例如,Ly6G6D TDB)在一种或多种另外的治疗剂之后施用,诸如以下中的任一、二、三、四、五、六、七、八、九、十或全部十一种:FOLFOX(奥沙利铂(ELOXATINTM)与5-氟尿嘧啶和亚叶酸组合)、卡培他滨(XELODA®)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、CapeOx(XELOX;卡培他滨和奥沙利铂)、甲酰四氢叶酸(亚叶酸)、贝伐单抗(AVASTIN®)、西妥昔单抗(ERBITUX®)、帕尼单抗(VECTIBIX®)、瑞格菲尼(STIVARGA®)、伊立替康(CPT-11; CAMPTOSAR®)以及FLOX(5-氟尿嘧啶和奥沙利铂)。

[0029] 在一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用糖皮质激素。在一些实施方案中,糖皮质激素选自由以下组成的组:地塞米松、氢化可的松、可的松、泼尼松龙、泼尼松、甲泼尼松、曲安西龙、帕拉米松、倍他米松、氟氢可的松及其药学上可接受的酯、盐和复合物。在一些实施方案中,糖皮质激素是地塞米松。在一些实施方案中,糖皮质激素是地塞米松的药学上可接受的酯、盐或复合物。

[0030] 在一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用利妥昔单抗。在一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用奥奴珠单抗(obinutuzumab)。在一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用抗体-药物缀合物(ADC)。

[0031] 在前述用途或方法的任一种中,细胞增殖性病症可以是癌症。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:食管癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、结肠直肠癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、B细胞淋巴瘤、B细胞白血病、多发性骨髓瘤、肾癌、前列腺癌、

肝癌、头颈癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤、生发中心B细胞样 (GCB) DLBCL、活化B细胞样 (ABC) DLBCL、滤泡性淋巴瘤 (FL)、套细胞淋巴瘤 (MCL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性淋巴性白血病 (CLL)、边缘区淋巴瘤 (MZL)、小淋巴细胞性白血病 (SLL)、淋巴浆细胞性白血病 (LL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (WM)、中枢神经系统淋巴瘤 (CNSL)、伯基特淋巴瘤 (BL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、脾脏边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、不可分类的脾淋巴瘤/白血病、脾弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、毛细胞白血病变体、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病、 α 重链病、 γ 重链病、 μ 重链病、浆细胞骨髓瘤、孤立性骨浆细胞瘤、髓外浆细胞瘤、粘膜相关淋巴组织的淋巴结外边缘区淋巴瘤 (MALT淋巴瘤)、淋巴结边缘区淋巴瘤、儿童淋巴结边缘区淋巴瘤、儿童滤泡淋巴瘤、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、CNS的原发性DLBCL、原发性腿型皮肤DLBCL、老年性EBV阳性DLBCL、慢性炎症相关性DLBCL、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阳性大B细胞淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、在HHV8相关的多中心卡斯尔曼病 (Castleman disease) 中出现的大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤:B细胞淋巴瘤,不可分类,具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特淋巴瘤中间的特征和B细胞淋巴瘤,不可分类,具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与经典霍奇金淋巴瘤中间的特征。

[0032] 在一些实施方案中,癌症为食道癌。在一些实施方案中,癌症是 腺癌,例如,转移性腺癌 (例如,结肠直肠腺癌、胃腺癌或胰腺癌)。

[0033] 在前述用途或方法的任一种中,自身免疫性疾病可选自由以下组 成的组:类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮 (SLE)、韦格纳氏病、炎症肠病、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、血 栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、自身免疫性血小板减少症、多发性硬化、牛皮癣、IgA肾病变、IgM多发性神经病变、重症肌无力、血管 炎、糖尿病、雷诺综合征、舍格伦综合征、肾小球性肾炎、视神经脊 髓炎 (NM0) 以及IgG神经病变。

[0034] 在另一方面,本发明的特点在于一种试剂盒,所述试剂盒包含: (a) 组合物,其包含前述抗CD3抗体中的任一种,和 (b) 包装插页, 其包括用于向受试者施用所述组合物以治疗细胞增殖性疾病或延迟 所述病症的进展的说明书。

[0035] 在前述用途或方法的任一种中,所述受试者可以是人。

[0036] 附图简述

[0037] 图1A示出了抗CD3抗体38E4v11的轻链可变结构域 (VL) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)。HVR-L1 (SEQ ID NO:4)、HVR-L2 (SEQ ID NO:5) 和HVR-L3 (SEQ ID NO:6) 序列由所示框界定。

[0038] 图1B示出了抗CD3抗体38E4v11的重链可变结构域 (VH) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)。HVR-H1 (SEQ ID NO:1)、HVR-H2 (SEQ ID NO:2) 和HVR-H3 (SEQ ID NO:3) 序列由所示框界定。

[0039] 图2是示出了在体外靶细胞杀伤测定中杀死的Ly6G6D转染的 293靶细胞的百分比作为具有不同抗CD3臂的三种不同的Ly6G6D TDB:Ly6G6D (38E4v11) TDB、Ly6G6D (40G5c) TDB和Ly6G6D (38E4v1) TDB的Ly6G6D TDB抗体浓度的函数的图。

[0040] 图3A是示出了CD69+CD25+活化的CD8+T细胞的百分比作为 三种不同的Ly6G6D TDB (Ly6G6D (38E4v11) TDB、Ly6G6D (40G5c) TDB和Ly6G6D (38E4v1) TDB) 的Ly6G6D TDB浓度的函数的图,如 通过流式细胞术所评估。效应细胞:靶细胞比=5:1。

[0041] 图3B是示出了CD69+CD25+活化的CD4+T细胞的百分比作为 三种不同的Ly6G6D TDB (Ly6G6D (38E4v11) TDB、Ly6G6D (40G5c) TDB和Ly6G6D (38E4v1) TDB) 的Ly6G6D TDB浓度的函数的图,如 通过流式细胞术所评估。效应细胞:靶细胞比=5:1。

具体实施方式

[0042] I. 定义

[0043] 如本文所用的术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知道的 相应值的通常误差范围。本文中对“约”某一个值或参数的提及包括 (以及描述) 针对所述值或参数本身的实施方案。

[0044] 用于本文中目的的“受体人框架”是包含衍生自人免疫球蛋白框架或人共有框架的轻链可变结构域(VL) 框架或重链可变结构域(VH) 框架的氨基酸序列的框架,如下文所定义。“衍生自”人免疫球蛋白 框架或人共有框架的受体人框架可以包含其相同的氨基酸序列,或者其可以含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,氨基酸变化的 数目为10或更小、9或更小、8或更小、7或更小、6或更小、5或 更小、4或更小、3或更小、或2或更小。在一些实施方案中,VL受 体人框架在序列上与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0045] “亲和力”是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如抗体和抗原)之间的1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的 亲和力可通常由解离常数(K_D)表示。亲和力可通过本领域中已知的 常用方法(包括本文所述的)加以测量。测量结合亲和力的具体说明性和示例性实施方案在下文中描述。

[0046] “亲和力成熟的”抗体是指与在一个或多个高变区(HVR)中不具有 一个或多个改变的亲本抗体相比,具有此类改变的抗体,此类改变 会导致抗体对抗原的亲和力得到改善。

[0047] 术语“抗CD3抗体”和“CD3的抗体”是指能够以足够的亲和力结合CD3的抗体,使得所述抗体可用作靶向CD3中的诊断剂和/或治疗 剂。在一个实施方案中,抗CD3抗体结合无关的非CD3蛋白质的程度小于抗体与CD3的结合的约10%,如例如通过放射免疫测定(RIA)所测量。在某些实施方案中,结合到CD3的抗体的解离常数(K_D)为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如, 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。在某些实施方案中,抗CD3抗体结合CD3中在来自不同物种的CD3中保守的表位。

[0048] 术语“抗体”在本文中是以最广泛意义使用且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要其展现所需抗原结合活性即可。

[0049] “抗体片段”是指非完整抗体的分子,其包含结合完整抗体结合到的抗原的完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0050] “结合结构域”是指特异性结合靶表位、抗原、配体或受体的化合物或分子的一部

分。结合结构域包括但不限于抗体(例如单克隆、多克隆、重组、人源化以及嵌合抗体)、抗体片段或其部分(例如, Fab 片段、Fab'₂、scFv 抗体、SMIP、结构域抗体、双抗体、微抗体、scFv-Fc、亲和体、纳米抗体以及抗体的 VH 和/或 VL 结构域)、受体、配体、适体和具有确定的结合配偶体的其他分子。

[0051] “化疗剂”是用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的实例包括烷基化剂, 诸如噻替哌和环磷酰胺(CYTOXAN®); 烷基磺酸盐, 诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡; 氮丙啶诸如苯并多巴、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)以及尿烷亚胺(uredopa); 乙撑亚胺和甲基蜜胺, 包括六甲蜜胺、三乙撑密胺、三乙撑磷酰胺、三乙撑硫代磷酰胺以及三羟甲蜜胺; 聚乙酰胺(特别是布拉它辛和布拉它辛酮); δ -9-四氢大麻酚(屈大麻酚, MARINOL®); β -拉帕醌; 拉帕醇; 秋水仙碱; 桦木酸; 喜树碱(包括合成类似物托泊替康(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊立替康, CAMPTOSAR®)、乙酰喜树碱、莨菪亭以及9-氨基喜树碱); 苔藓虫素; 卡利他汀; CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物); 鬼臼毒素(podophyllotoxin); 鬼臼酸(podophyllinic acid); 替尼泊昔(teniposide); 隐藻素类(cryptophycins)(特别是隐藻素1和隐藻素8); 多拉司他汀(dolastatin); 多卡米新(包括合成的类似物、KW-2189和CB1-TM1); 艾榴素; 水鬼蕉碱; 甬枝珊瑚醇(sarcodictyin); 海绵抑制素(spongistatin); 氮芥(nitrogen mustard)诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺(chlorophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、松龙苯芥(prednimustine)、三芥环磷酰胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard); 亚硝基脲类(nitrosourea)诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福泰氮芥(fotemustine)、罗氮芥(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)以及雷莫司汀(ranimustine); 抗生素诸如烯二炔类(enediyne)抗生素(例如, 加利车霉素(calicheamicin), 特别是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II (参见例如, Nicolaou 等人, Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))); CDP323, 口服 α -4 整合素抑制剂; 达内霉素(dynemicin), 包括达内霉素A; 埃斯波霉素(esperamicin); 以及新制癌菌素(neocarzinostatin)生色团和相关色素蛋白烯二炔类抗生素生色团)、阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycins)、放线菌素(cactinomycin)、卡柔比星(carubicin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycins)、更生霉素(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸(6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、多柔比星(doxorubicin)(包括 ADRIAMYCIN®、吗啉代-多柔比星(morpholino-doxorubicin)、氰基吗啉代-多柔比星(cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯啉-多柔比星(2-pyrrolino-doxorubicin)、多柔比星HCL 脂质体注射剂(DOXIL®)、脂质体多柔比星TLC D-99(MYOCET®)、聚乙二醇化脂质体多柔比星(CAELYX®)以及脱氧多柔比星(deoxydoxorubicin))、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、马塞罗霉素

(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)诸如 丝裂霉素C、麦考酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(porfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物诸如甲氨喋呤(methotrexate)、吉西他滨(gemcitabine)(**GEMZAR®**)、替加氟(tegafur)(**UFTORAL®**)、卡培他滨(**XELODA®**)、埃博霉素(epothilone)以及5-氟尿嘧啶(5-FU);考布他汀(combretastatin);叶酸类似物诸如二甲叶酸(denopterin)、甲氨喋呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯嘌呤(6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine);雄激素类诸如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺药(anti-adrenals)诸如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补偿剂诸如亚叶酸(frolic acid);醋葡萄糖内酯(aceglutone);醛磷酸糖苷(aldephosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);安吡啶(amsacrine);贝斯布尔(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛(demecolcine);地吡酮(diaziquone);依氟鸟氨酸(elformithine);依利醋铵(elliptinium acetate);埃博霉素;乙环氧啉(etoglucid);硝酸镓(gallium nitrate);羟基脲(hydroxyurea);香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidainine);美登木素生物碱类(maytansinoid)诸如美登素(maytansine)和柄型菌素(ansamitocins);米托胍脲(mitoguanzone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidanmol);尼曲吡啶(nitracrine);喷司他丁(pentostatin);蛋氨酸(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);2-乙基酰肼(2-ethylhydrazide);丙卡巴肼(procarbazine);**PSK®**多糖复合物(JHS Natural Products(JHS Natural Products,Eugene,OR);雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西佐喃(sizofuran);锗螺胺(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(te nuazonic acid);三乙撑亚胺苯醌(triaziquone);2,2',2'-三氯三乙胺(2,2',2'-trichlorotriethylamine);单端孢霉烯族化合物(trichothecenes)(特别是T-2毒素、疣孢菌素A(verrucurin A)、杆孢菌素A(roridin A)以及蛇形菌素(anguidine);乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine)(**ELDISI NE®**, **FILDESIN®**);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);盖托新(gacytosine);阿糖胞苷(arabinoside)("Ara-C");噻替哌;紫杉烷类化合物(taxoid),例如,紫杉醇(**TAXOL®**, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、紫杉醇的白蛋白工程改造的纳米颗粒制剂

(ABRAXANETM);和多西他赛(**TAXOTERE®**, Rhone- Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥(chlorambucil); 6-硫鸟嘌呤(6-thioguanine); 巯嘌呤(mercaptopurine); 甲氨喋呤; 铂类似物诸如顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin) (例如**ELOXATIN®**)和卡铂(carboplatin); 长春花碱(vincas), 其防止微管蛋白聚合形成微管, 包括长春碱(**VELBAN®**)、长春新碱(**ONCOVIN®**)、长春地辛(**ELDISINE®**、**FILDESIN®**)以及长春瑞滨(**NAVELBINE®**); 依托泊苷(VP-16); 异环磷酰胺(ifosfamide); 米托蒽醌(mitoxantrone); 甲酰四氢叶酸; 诺安托(novantrone); 依达曲沙(edatrexate); 道诺霉素(daunomycin); 氨基喋呤(aminopterin); 伊班膦酸盐(ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸(difluoromethylornithine) (DMFO); 维甲类 诸如视黄酸, 包括贝沙罗汀(bexarotene) (**TARGRETIN®**); 二膦酸盐类(bisphosphonates) (例如**BONEFOS®**或**OSTAC®**)、依替膦酸钠(etidronate) **DIDROCAL®**、NE-58095、唑来膦酸/唑来膦酸盐(zoledronic acid/zoledronate) (**ZOMETA®**)、阿伦膦酸盐(alendronate) (**FOSAMAX®**)、帕米膦酸盐(pamidronate) (**AREDIA®**)、替鲁膦酸盐(tiludronate) (**SKEL ID®**)或利塞膦酸盐(risedronate) (**ACTONEL®**); 以及曲沙他滨(troxacin) (1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是抑制涉及异常细胞增殖的信号途径中的基因表达的反义寡核苷酸, 例如像PKC- α 、Raf、H-Ras以及表皮生长因子受体(EGF-R) (例如, 厄洛替尼(erlotinib) (TarcevaTM)); 疫苗, 诸如**THERATOPE®**疫苗和基因疗法疫苗, 例如**ALLOVECTIN®**疫苗、**LEUVECTIN®**疫苗和**VAXID®**疫苗; 拓扑异构酶1抑制剂(例如, **LURTOTECAN®**); rmRH (例如, **ABARELIX®**); BAY439006 (索拉非尼(sorafenib); Bayer); SU-11248 (舒尼替尼(sunitinib), **SUTENT®**, Pfizer); 哌立福辛(perifosine), COX-2抑制剂(如塞来考昔(celecoxib)或艾托考昔(etoricoxib))、蛋白体抑制剂(例如, PS341); 硼替佐米(bortezomib) (**VELCADE®**); CCI-779; 体匹法尼(tipifarnib) (R11577); 索拉非尼(sorafenib), ABT510; Bcl-2 抑制剂, 诸如奥利默森钠(oblimersen sodium) (**GENASENSE®**); 匹杉琼(pixantrone); EGFR抑制剂; 酪氨酸激酶抑制剂; 丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂, 诸如雷帕霉素(rapamycin) (西罗莫司(sirolimus), **RAPAMUNE®**); 法尼基转移酶抑制剂, 诸如洛那法尼(lonafarnib) (SCH66366, **SARASARTM**) 以及任何上述的药学上可接受的、酸或衍生物; 以及两种或更多种上述的组合, 诸如CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙组合疗法的缩写) 和FOLFOX (奥沙利铂(**ELOXATINTM**) 联合5-FU和亚叶酸的治疗方案的缩写); 以及两种或更多种上述的组合。

[0052] 如本文定义的化疗剂包括用来调节、减少、阻断或抑制可促进癌生长的激素作用的“抗激素剂”或“内分泌治疗剂”。它们自身可以是激素, 包括但不限于: 抗雌激素类和选择性雌激素受体调控物类 (SERM), 包括例如他莫昔芬(tamoxifen) (包括**NOLVADEX®**他莫昔芬)、雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔

芬(trioxifene)、那洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)和FARESTON.cndot托瑞米芬(toremifene);抑制在肾上腺中调节雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂,例如像4(5)-咪唑、氨鲁米特(aminoglutethimide)、MEGASE®醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、福美坦(formestane)、法偈唑(fadrozole)、RIVISOR®伏罗唑(vorozole)、FEMARA®来曲唑(letrozole)以及ARIMIDEX®阿那曲唑(anastrozole);和抗雄激素类,诸如氟他米特(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡米特(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)以及戈舍瑞林(goserelin);以及曲沙他滨(troxacitabine)(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,特别是那些抑制牵涉异常细胞增殖的信号传导途径中的基因表达的反义寡核苷酸,例如像PKC- α 、Raf和H-Ras;核酶,诸如VEGF表达抑制剂(例如ANGIOZYME®核酶)和HER2表达抑制剂;疫苗,诸如基因疗法疫苗,例如ALLOVECTIN®疫苗,LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗;PROLEUKIN®rIL-2;LURTOTECAN®拓扑异构酶1抑制剂;ABARELIX®rmRH;长春瑞滨(Vinorelbine)以及埃斯波霉素(Esperamicins)(参见美国专利号4,675,187)以及任何上述的药学上可接受的盐、酸或衍生物;以及两种或更多种上述的组合。

[0053] 术语“嵌合”抗体是指重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分来源于不同来源或物种的抗体。

[0054] 除非另有指示,如本文中所用,术语“分化簇3”或“CD3”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然CD3,所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如人)和啮齿类(例如小鼠和大鼠),包括例如CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 α 以及CD3 β 链。所述术语涵盖“全长”,未加工的CD3(例如,未加工的或未修饰的CD3 ϵ 或CD3 γ)以及由细胞中的加工产生的任何形式的CD3。所述术语还涵盖天然存在的CD3的变体,包括例如剪接变体或等位基因变体。CD3包括例如长度为207个氨基酸的人CD3 ϵ 蛋白(NCBI参考序列号NP_000724)和长度为182氨基酸的人CD3 γ 蛋白(NCBI参考序列号NP_000064)。

[0055] 抗体的“类别”是指其重链所具有的恒定域或恒定区的类型。存在五种主要的抗体类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些抗体中的若干种还可分成亚类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0056] 应理解,本文中描述的本发明的方面和实施方案包括由方面和实施方案包括、由方面和实施方案组成和主要由方面和实施方案组成。

[0057] 如本文所用的术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括但不限于放射性同位素(例如,At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和Lu的放射性同位素);化学治疗剂或药物(例如甲胺蝶呤(methotrexate)、阿德力霉素(adriamycin)、长春花生物碱(长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide))、阿霉素、美法仑(melphalan)、丝裂霉素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道诺霉素(daunorubicin)或其他插入剂);生长抑制剂;酶及其片段,诸如溶核酶;抗生素;毒素,诸如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体;以及以下公开的各种抗肿瘤剂或抗癌

剂。

[0058] “病症”是将受益于治疗的任何病状,包括但不限于慢性和急性 病症或疾病,包括使哺乳动物易患所考虑的病症的那些病理病状。

[0059] 术语“细胞增殖性病症”和“增殖病症”是指与一定程度的异常细 胞增殖相关的病症。在一个实施方案中,细胞增殖性病症是癌症。在一个实施方案中,细胞增殖性病症是肿瘤。

[0060] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中的生理学病状,其特征通常在于细胞生长不受调控。癌症的实例包括但不限于腺癌(例如,结肠直肠腺癌、胃腺癌或胰腺癌),其可以是转移性腺癌(例如,转移性结肠直肠腺癌、转移性胃腺癌或转移性胰腺癌)、恶性肿瘤、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤以及白血病或淋巴恶性肿瘤。这种癌症的更多的特殊实例包括但不限于食管癌、小肠癌、大肠癌、鳞状上皮细胞癌(例如,上皮鳞状上皮细胞癌)、肺癌,包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞状癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃或胃癌(包括胃肠癌和胃肠道间质癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、泌尿道癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾的或肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、黑素瘤、浅表扩散性黑素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、肢端黑素瘤、结节性黑素瘤、多发性骨髓瘤和B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡非霍奇金氏淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞性(SL)NHL、中级/滤泡性NHL、中级弥漫性NHL、高级成免疫细胞性NHL、高级成淋巴细胞性NHL、高级小无核裂细胞性NHL、贮积病(bulky disease) NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤以及小淋巴细胞性(SL) NHL;慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞性白血病、慢性成髓细胞性白血病和移植后淋巴增殖性病症(PTLD),以及与癍痣病(phakomatoses)、水肿(诸如与脑瘤有关的)、梅格斯(Meigs)氏综合征有关的异常血管增殖、脑以及头和颈癌以及相关转移。在某些实施方案中,适合于通过本发明的抗体来治疗的癌症包括腺癌(例如,结肠直肠腺癌、胃腺癌或胰腺癌),其可以是转移性腺癌(例如,转移性结肠直肠腺癌、转移性胃腺癌或转移性胰腺癌)、食管癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、结肠直肠癌、乳腺癌、结肠直肠癌、直肠癌、非小细胞肺癌、胶质母细胞瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波西(Kaposi)肉瘤、类癌、头颈癌、卵巢癌、间皮瘤以及多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,癌症选自:腺癌(例如,结肠直肠腺癌、胃腺癌或胰腺癌),其可以是转移性腺癌(例如,转移性结肠直肠腺癌、转移性胃腺癌或转移性胰腺癌)、食管癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、小细胞肺癌、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌(CRC)以及肝细胞癌。然而,在一些实施方案中,癌症选自:腺癌(例如,结肠直肠腺癌、胃腺癌或胰腺癌)、食管癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、非小细胞肺癌、结肠直肠癌、胶质母细胞瘤和乳腺癌,包括这些癌症的转移性形式。在其他实施方案中,癌症选自一类成熟的B细胞癌症,不包括Hodgkin淋巴瘤,但包括生发中心B细胞样(GCB) DLBCL、活化B细胞样(ABC) DLBCL、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴性白血病(CLL)、边缘区淋巴瘤(MZL)、小淋巴细胞性白血病(SLL)、淋巴浆细胞性白血病(LL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(WM)、中枢神经系统淋巴瘤(CNSL)、伯基特淋巴瘤(BL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、脾脏边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、不可分类的脾淋巴瘤/白血病、脾弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、毛细胞白血病变体、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病、 α 重链病、 γ 重链病、 μ 重链病、浆细

胞骨髓瘤、孤立性骨浆细胞瘤、髓外浆细胞瘤、粘膜相关淋组织的淋巴结外边缘区淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、淋巴结边缘区淋巴瘤、儿童淋巴结边缘区淋巴瘤、儿童滤泡淋巴瘤、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、CNS的原发性DLBCL、原发性腿型皮肤DLBCL、老年性EBV阳性DLBCL、慢性炎症相关性DLBCL、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阳性大B细胞淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、在HHV8相关的多中心卡斯尔曼病(Castleman disease)中出现的大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤:B细胞淋巴瘤,不可分类,具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特淋巴瘤中间的特征和B细胞淋巴瘤,不可分类,具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与经典霍奇金淋巴瘤中间的特征。

[0061] 如本文所用的“肿瘤”是指所有赘生性细胞生长和增殖(无论恶性 或良性)以及所有癌前和癌性细胞和组织。如本文所提及的,术语“癌 症”、“癌性”、“细胞增殖性病症”、“增值性病症”以及“肿瘤”不是相互 排斥的。

[0062] 如本文所用,术语“肿瘤抗原”可理解为存在于肿瘤细胞上的那些 抗原。这些抗原可在细胞表面上呈现胞外部分,其通常与分子的跨膜 和细胞质部分结合。这些抗原有时只能由肿瘤细胞呈递,而不能由正 常细胞呈递。与正常细胞相比,肿瘤抗原可仅在肿瘤细胞上表达,或 可能代表肿瘤特异性突变。在这种情况下,它们被称为肿瘤特异性抗 原。更常见的是由肿瘤细胞和正常细胞呈递的肿瘤抗原,并且它们被 称为肿瘤相关抗原。与正常细胞相比,这些肿瘤相关抗原可被过表达,或由于与正常组织相比,肿瘤组织结构较不紧凑,因此可以与肿瘤细 胞中的抗体结合。肿瘤抗原可表现出不一致的表达,或可在某些类型的肿瘤细胞上以低拷贝数表达。在靶向肿瘤抗原在肿瘤细胞上以低拷 贝数表达(即,弱表达)的情况下,可能期望使用本发明的TDB抗体,所述TDB抗体具有针对CD3的高亲和力和臂或位于免疫效应细胞上的 另一种分子。在一方面,肿瘤抗原选自下表1中列出的那些。

[0063] “效应子功能”是指可归因于抗体的Fc区的那些生物活性,其随 抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体 依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞 毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;以及B细胞活化。

[0064] 化合物的“有效量”,例如本发明的抗CD3抗体或其组合物(例如 ,药物组合物),至少是实现期望的治疗或预防结果所需的最小量, 诸如特定病症的可测量的改善或预防(例如,细胞增殖性病症,例如 ,癌症)。本文中的有效量可以根据以下因素而变化,如患者的疾病 病况、年龄、性别和体重以及抗体在个体体内引发所需反应的能力 。有效量还是其中治疗有益作用超过治疗的任何毒性或有害作用的 量。对于预防性用途,有利或所需的结果包括诸如以下的结果:消 除或减少风险、减轻严重性或延缓疾病(包括所述疾病的生物化学的 、组织学的和/或行为的症状、在所述疾病发展期间存在的所述疾病 的并发症和中间病理表型)的发作。对于治疗性用途,有利或所需的 结果包括诸如以下的临床结果:减少由疾病引起的一种或多种症状 、提高患有疾病的患者的生命质量、减少治疗疾病所需的其他药 物的剂量、诸如通过靶向来增强另一种药物的效果、延缓疾病进展和/ 或延长存活。在癌症或肿瘤的情况下,药物的治疗有效量可具有以 下功效:减少癌细胞的数量;减小肿瘤的尺寸;抑制(即,在某种程 度上减慢或期望地阻止)癌细胞对周边器官的浸润;抑制(即,在 某种 程度上减慢并期望地阻止)肿瘤转移;在某种程度上抑制肿瘤生长; 和/或在某种程

度上减轻与病症相关的一种或多种症状。有效量可以在一次或多次施用中施用。出于本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效量是足以直接地或间接地完成预防性或治疗性处理的量。在临床背景中所理解的是,与另一种药物、化合物或药物组合物结合,药物、化合物或药物组合物的有效量可以或可以不实现。因此,可认为“有效量”处于施用一种或多种治疗剂的背景中,并且如果与一种或多种其他药剂结合可实现或实现了理想结果,那么可认为单个药剂是以有效量给出的。

[0065] 本文的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的含有恒定区的至少一部分的C端区。所述术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区自Cys226或Pro230延伸至重链的羧基末端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可存在或可不存在。除非本文另有规定,Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。

[0066] “框架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基以外的可变域残基。可变域的FR通常由四个FR域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常按以下顺序出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0067] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用来表示具有与天然抗体结构基本上类似的结构或具有含有如本文定义的Fc区的重链的抗体。

[0068] 当在本文中使用时,“生长抑制剂”是指在体外或体内抑制细胞的生长的化合物或组合物。在一个实施方案中,生长抑制剂是防止或减少表达抗体结合的抗原的细胞的增殖的生长抑制抗体。在另一个实施方案中,生长抑制剂可为显著降低处于S期的细胞的百分比的生长抑制剂。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期进展(在不同于S期的地方)的药剂,诸如诱导G1停滞和M期停滞的药剂。经典的M期阻断剂包括长春花碱(长春新碱和长春碱)、紫杉烷和拓扑异构酶II抑制剂,诸如多柔比星、表柔比星、柔红霉素、依托泊苷以及博来霉素。那些阻滞G1的药剂也扩散到S期阻滞,例如,DNA烷基化剂诸如他莫昔芬、泼尼松、达卡巴嗪、氮芥、顺铂、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶以及ara-C。更多的信息可见于Murakami等人的Mendelsohn和Israel,编,The Molecular Basis of Cancer,第1章,标题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”(W.B.Saunders, Philadelphia, 1995),例如,p.13。紫杉烷(紫杉醇和多西他赛)是来源于紫杉树的抗癌药。来源于欧洲紫杉的多西他赛(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)是紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)的半合成类似物。紫杉醇和多西他赛促进由微管蛋白二聚体组装微管并通过防止解聚来稳定微管,这导致细胞中有丝分裂的抑制。

[0069] 术语“HER2阳性”癌症包括HER2水平高于正常水平的癌细胞。HER2阳性癌症的实例包括HER2阳性乳腺癌和HER2阳性胃癌。任选地,HER2阳性癌症具有2+或3+的免疫组织化学(IHC)分数和/或原位杂交(ISH)扩增比率 ≥ 2.0 。

[0070] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用且是指其中已引入外源性核酸的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括初级转化细胞和源于其的子代而不考虑传代数。后代在核酸含量上可能不与亲本细胞完全相同,但可能含有突变。在本文中包括具有如在原始转化细胞中筛选或选择的相同功能或生物活性的突变后代。

[0071] “人抗体”为具有某一氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于由人或人细胞产生或来源于利用人抗体组库或其他人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域中已知的各种技术产生人抗体,包括噬菌体展示文库。Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)。还可得的用于制备人单克隆抗体的是以下文献中记载的方法: Cole等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner等, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991)。还可参见 van Dijk和van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5:368-74 (2001)。可通过给已经修饰以应答抗原性攻击而生成这种抗体但其内源基因座已经失能的转基因动物(例如经过免疫的异种小鼠(xenomice))施用抗原来制备人抗体(参见例如美国专利6,075,181和6,150,584,关于 XENOMOUSE™技术)。还可参见例如, Li等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006), 关于经过人B细胞杂交瘤技术生成的人抗体。

[0072] “人共有框架”为代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常存在的氨基酸残基的框架。一般说来,人免疫球蛋白VL或VH序列选自可变域序列的亚组。一般说来,序列亚组为如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 第1-3卷中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,亚组为如Kabat等(上文)中的亚组κI。在一个实施方案中,对于VH,亚组为如Kabat等(上文)中的亚组III。

[0073] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含至少一个且通常两个可变域的基本上全部,其中全部或基本上全部HVR(例如CDR)对应于非人抗体的HVR,且全部或基本上全部FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可包含衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已进行人源化的抗体。

[0074] 如本文所用的术语“高变区”或“HVR”是指在序列(“互补决定区”或“CDR”)方面高度可变和/或形成结构确定环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触”)的抗体可变域的区中的每个。一般说来,抗体包含六个HVR:三个在VH中(H1、H2、H3),且三个在VL中(L1、L2、L3)。本文中的示例性HVR包括:

[0075] (a) 存在于氨基酸残基26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) 和96-101 (H3) 处的高变环(Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

[0076] (b) 存在于氨基酸残基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2) 和95-102 (H3) 处的CDR (Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991));

[0077] (c) 存在于氨基酸残基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2) 和93-101 (H3) 处的抗原接触(MacCallum等 *J. Mol. Biol.* 262:732-745, (1996)); 以及

[0078] (d) (a)、(b) 和/或(c) 的组合,包括HVR氨基酸残基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3) 和94-102 (H3)。

[0079] 除非另外指示,否则HVR残基和可变域中的其他残基(例如FR残基)在本文中是根据Kabat等(上文)加以编号。

[0080] “免疫缀合物”为缀合至一个或多个异源分子(包括但不限于细胞毒性剂)的抗体。

[0081] “受试者”或“个体”为哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如奶牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类(例如人和非人灵长类,诸如猴)、兔以及啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,“受试者”或“个体”为人。

[0082] “分离抗体”为已与天然环境的组分分离的抗体。在一些实施方案中,将抗体纯化至纯度大于95%或99%,如通过例如电泳(例如 SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如离子交换或逆相HPLC)所测定。对于评估抗体纯度的方法的评述,参见例如 Flatman等人,J.Chromatogr.B 848:79-87 (2007)。

[0083] “分离的核酸”是指已与天然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中所含有的核酸分子,但核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。

[0084] “编码抗CD3抗体的分离的核酸”是指一个或多个编码抗体重链和轻链(或其片段)的核酸分子,包括在单个载体或单独载体中的所述核酸分子和存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的所述核酸分子。

[0085] 除非另外指出,如本文中所使用的术语“Ly6G6D”或“淋巴细胞抗原6复合物基因座G61,”是指来自于任何脊椎动物来源的任何天然 Ly6G6D,包括哺乳动物,诸如灵长类动物(例如人)及啮齿动物(例如小鼠和大鼠),并且涵盖“全长”未加工的Ly6G6D以及Ly6G6D的由在细胞中进行加工而产生的任何形式。所述术语还涵盖天然存在的 Ly6G6D的变体,包括例如剪接变体或等位基因变体。Ly6G6D也被称为G6D、Ly6-D、C6orf23、巨核细胞增强基因转录物1(MEGT1)和NG25,并且公开于美国专利号7,951,546中,其通过引用整体并入本文,作为TAT201,具有氨基酸序列SEQ ID NO:92和核苷酸序列DNA234441,SEQ ID NO:36。Ly6G6D包括例如长度为133个氨基酸的人Ly6G6D蛋白(NCBI参考序列号NP_067079.2)。

[0086] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上均质抗体的群体获得的抗体,即除可能的变体抗体(例如含有天然存在的突变或在制造单克隆抗体制剂的期间产生的突变,这些变体通常以少量存在)之外,构成所述群体的个别抗体相同和/或结合相同表位。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,单克隆抗体制剂的每个单克隆抗体是针对抗原上的单一决定簇的。因此,修饰语“单克隆”指示如从基本上均质抗体群体获得的抗体的特性,且不应解释为需要通过任何特定方法来制造抗体。例如,待根据本发明使用的单克隆抗体可通过各种技术制备,所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法以及利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,此类方法以及用于制备单克隆抗体的其他示例性方法在本文中进行描述。

[0087] “裸抗体”是指未与异源部分(例如,细胞毒性部分)或放射性标记物缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

[0088] “天然抗体”是指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由二硫键键合的两条相同的轻链和两条相同的重链组成。从N末端至C末端,每条重链具有可变区(VH),也称为可变重结构域或重链可变结构域,其后是三个恒定结构域(CH1,CH2和CH3)。类似地,从N末端至C末端,每条轻链具

有可变区 (VL), 也称为可变轻结构域或轻链可变结构域, 之后是恒定轻 (CL) 结构域。抗体的轻链可基于其恒定域的氨基酸序列指定为称为 κ 及 λ 的两种类型中的一种。

[0089] 术语“包装插页 (package insert)”用于指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明, 其包含关于适应症、用法、剂量、施用、联合治疗、禁忌症和/或关于使用这种治疗产品的警告的信息。

[0090] 术语“PD-1轴结合拮抗剂”是指抑制PD-1轴结合配偶体与其结合配偶体中的一种或多种相互作用的分子, 以便除去由PD-1信号轴上的信号传导所产生的T细胞功能失调—结果是恢复或增强T细胞功能 (例如, 增殖、细胞因子产生、靶细胞杀伤)。如本文所用, PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

[0091] 术语“PD-1结合拮抗剂”是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与其结合配偶体中的一种或多种 (诸如PD-L1、PD-L2) 的相互作用所产生的信号转导的分子。在一些实施方案中, PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其结合配偶体中的一个或多个的结合的分子。在具体实施方案中, PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。例如, PD-1结合拮抗剂包括抗PD-1抗体及其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽以及减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与PD-L1和/或PD-L2的相互作用所产生的信号转导的其他分子。在一个实施方案中, PD-1结合拮抗剂减少通过或经由诸如表达于通过PD-1介导的信号传导的T淋巴细胞上的细胞表面蛋白介导的阴性共刺激信号, 以便使功能障碍T细胞的功能障碍减轻 (例如增强对抗原识别的效应子反应)。在一些实施方案中, 所述PD-1结合拮抗剂为抗PD-1抗体。在具体实施方案中, PD-1结合拮抗剂是MDX-1106 (纳武单抗)。在另一个具体实施方案中, PD-1结合拮抗剂是MK-3475 (派姆单抗)。在另一个具体实施方案中, PD-1结合拮抗剂是CT-011 (皮地利珠单抗)。在另一个具体实施方案中, PD-1结合拮抗剂是AMP-224。在另一个具体实施方案中, PD-1结合拮抗剂是MED1-0680。在另一个具体实施方案中, PD-1结合拮抗剂是PDR001。在另一个具体实施方案中, PD-1结合拮抗剂是REGN2810。在另一个具体实施方案中, PD-1结合拮抗剂是BGB-108。

[0092] 术语“PD-L1结合拮抗剂”是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与其结合配偶体中的一种或多种 (诸如PD-1、B7-1) 的相互作用所产生的信号转导的分子。在一些实施方案中, PD-L1结合拮抗剂是抑制PD-L1与其结合配偶体的结合的分子。在具体实施方案中, PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和/或B7-1的结合。在一些实施方案中, PD-L1结合拮抗剂包括抗PD-L1抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、低聚肽以及减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与其结合配偶体中的一个或多个诸如PD-1、B7-1的相互作用所产生的信号转导的其他分子。在一个实施方案中, PD-L1结合拮抗剂减少通过或经由诸如表达于通过PD-L1介导的信号传导的T淋巴细胞上的细胞表面蛋白介导的阴性共刺激信号, 以便使功能障碍T细胞的功能障碍减轻 (例如增强对抗原识别的效应子反应)。在一些实施方案中, PD-L1结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。在再一具体实施方案中, 抗PD-L1抗体是MPDL3280A (阿特珠单抗)。在具体实施方案中, 抗PD-L1抗体是YW243.55.S70。在另一个具体实施方案中, 抗PD-L1抗体是MDX-1105。在另一个具体实施方案中, 抗PD-L1抗体是MSB0015718C。在再一具体实施方案中, 抗PD-L1抗体是MEDI4736。

[0093] 术语“PD-L2结合拮抗剂”是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L2与其结合配偶体中的一种或多种 (诸如PD-1) 的相互作用所产生的信号转导的分子。在一些实施方案

中,PD-L2结合拮抗剂是抑制 PD-L2与其结合配偶体中的一个或多个的结合的分子。在具体实施方案,PD-L2结合拮抗剂抑制PD-L2与PD-1的结合。在一些实施方案 中,PD-L2拮抗剂包括抗PD-L2抗体、其抗原结合片段、免疫粘附 素、融合蛋白、低聚肽以及减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L2 与其结合配偶体中的一个或多个诸如PD-1的相互作用所产生的信号转导的其他分子。在一个实施方案中,PD-L2结合拮抗剂减少通过或 经由诸如表达于通过PD-L2介导的信号传导的T淋巴细胞上的细胞 表面蛋白介导的阴性共刺激信号,以便使功能障碍T细胞的功能障碍 减轻(例如增强对抗原识别的效应子反应)。在一些实施方案中,PD-L2 结合拮抗剂是免疫粘附素。

[0094] 除非另有指示,如本文中所用,术语“蛋白质”是指来自任何脊 椎动物来源的任何天然蛋白质,所述脊椎动物来源包括哺乳动物如 灵长类(例如人)和啮齿类(例如小鼠和大鼠)。该术语涵盖“全长”,未 加工的蛋白质以及由细胞中的加工产生的任何形式的蛋白质。所述 术语还涵盖天然存在的蛋白质的变体,例如剪接变体或等位基因变 体。根据本发明的蛋白质包括例如表1中列出的任何蛋白质。

[0095] 关于参照多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为在比 对序列并且必要时引入间隙以实现最大序列同一性百分比,并且不 考虑任何保守性取代作为序列同一性的一部分之后,候选序列中与 参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于测 定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以属于本领域中的技能 的多种方式实现,所述方式例如使用可公开获得的计算机软件,诸 如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领 域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列 的全长上实现最大对准所需的任何算法。然而,出于本文目的,使 用序列比较计算机程序ALIGN-2产生氨基酸序列同一性%值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech 公司创造,且原始码已与 用户文件一起在美国版权办公室(U.S.Copyright Office, Washington D.C.,20559)备案,其中其在美国版权登记号TXU510087下登记。ALIGN-2程序 可公开从Genentech公司(South San Francisco, California)获得,或可从源代码编译。ALIGN-2程序应编译用于 UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D)上。所有序列比较参数皆由 ALIGN-2程序设置且不改变。

[0096] 在ALIGN-2用于氨基酸序列比较的情形下,给定氨基酸序列A 对于、与或相对于给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%(其可替 代地措词为给定氨基酸序列A具有或包含对于、与或相对于给定氨 基酸序列B的某一氨基酸序列同一性%)如下计算:

[0097] $100 \times \text{分数} X/Y$

[0098] 其中X为在对A与B进行程序比对时由序列比对程序ALIGN-2 评分为相同匹配的氨基酸残基数目,且其中Y为B中的氨基酸残基 总数。应了解,在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度 的情况下,A与B的氨基酸序列同一性%将不等于B与A的氨基酸 序列同一性%。除非另外特定陈述,否则本文中所使用的所有氨基 酸序列同一性%值使用ALIGN-2计算机程序如前一段落中所描述而 获得。

[0099] 术语“药物制剂”是指以下制剂:其呈允许其中所含的活性成分 的生物活性有效的形式,且不含对将施用制剂的受试者具有不可接 受毒性的另外组分。

[0100] “药学上可接受的载剂”是指药物制剂中除活性成分以外的对受 试者无毒的成分。药学上可接受的载剂包括但不限于缓冲剂、赋形 剂、稳定剂或防腐剂。

[0101] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变化形式,诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指企图改变所治疗个体的天然病程,且可为实现防治或在临床病变过程中进行的临床介入。合乎需要的治疗效果包括但不限于防止疾病发生或复发性、减轻症状、减弱疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低疾病进展速率、改善或缓解疾病状态以及缓和或改善预后。在一些实施方案中,本发明的抗体用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0102] 如本文中所使用,“延迟”病症或疾病的“进展”意指延缓、阻碍、减缓、延迟、稳定和/或推迟疾病或病症(例如,细胞增殖性病症,例如癌症)的发展。取决于疾病史和/或治疗的个体,这种延缓可以有不同的时间长度。如本领域技术人员所显而易见,充分或显著延迟实际上可涵盖预防,因为个体未发展所述疾病。例如,可延迟晚期癌症,诸如转移的发展。

[0103] “降低”或“抑制”意指引起总体上降低例如20%或更多、50%或更多,或75%、85%、90%、95%或更多的能力。在某些实施方案中,降低或抑制是指抗体Fc区介导的抗体的效应子功能,这种效应子功能具体地包括补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。

[0104] 术语“可变区”或“可变域”是指抗体重链或轻链中参与使抗体与抗原结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变域(分别为VH和VL)通常具有类似结构,其中各域包含四个保守框架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见,例如,Kindt等,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007)。)单个VH或VL结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可使用来自结合所述抗原的抗体的VH或VL结构域来分离以分别筛选互补VL或VH结构域的文库。参见例如,Portolano等人,J.Immunol. 150:880-887 (1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628 (1991)。

[0105] 如本文所用的术语“载体”是指能够使其所连接的另一种核酸增殖的核酸分子。所述术语包括呈自我复制核酸结构的载体,以及并入其已引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与它们可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0106] 如本文中所使用,“施用”意指给予受试者一定剂量的化合物(例如本发明的抗CD3抗体或编码本发明的抗CD3抗体的核酸)或组合物(例如药物组合物,例如包括本发明的抗CD3抗体的药物组合物)的方法。用于本文描述的方法中的组合物可通过例如:肌肉内、静脉内、皮内、经皮、动脉内、腹膜内、损伤内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鼻内、玻璃体内、阴道内、直肠内、局部、肿瘤内、经腹膜、皮下、结膜下、囊内、经粘膜、心包内、脐内、眼内、口服、局部(topically)、局部(locally)、通过吸入、通过注射、通过输注、通过连续输注、通过直接沐浴靶细胞的局部灌注、通过导管、通过灌洗、以乳膏形式或以脂质组合物形式。施用方法可以根据各种因素(例如,所施用的化合物或组合物以及所治疗的病状、疾病或病症的严重性)而变化。

[0107] II. 组合物和方法

[0108] 在一方面,本发明部分基于抗CD3抗体。在某些实施方案中,抗CD3抗体为多特异性(例如,双特异性)并且除CD3或其片段以外也结合第二生物分子(例如,细胞表面抗原,例如,肿瘤抗原)。本发明的抗体可用于例如用于治疗患有细胞增殖性病症(例如,癌症)或

自身免疫性病症的受试者中的所述病症或延迟所述病症的进展或用于增强患有所述病症的受试者的免疫功能。

[0109] A.亲和力改善的抗CD3抗体

[0110] 在一方面,本发明提供了结合CD3的分离抗体(例如,CD3 ϵ 和/或CD3 γ)。在一些情况中,抗CD3抗体结合到人CD3多肽或食蟹猴(食蟹猴)CD3多肽。在一些情况中,人CD3多肽或食蟹猴CD3多肽分别是人CD3 ϵ 多肽(SEQ ID NO:73)或食蟹猴CD3 ϵ 多肽(SEQ ID NO:74)。在一些情况中,人CD3多肽或食蟹猴CD3多肽分别是人CD3 γ 多肽(SEQ ID NO:75)或食蟹猴CD3 γ 多肽(SEQ ID NO:76)。在一些情况中,抗CD3抗体结合到由人CD3 ϵ 的氨基酸1-26(SEQ ID NO:77)或1-27(SEQ ID NO:78)组成的CD3的片段(例如,人CD3 ϵ)内的表位。

[0111] 在一些情况中,CD3结合结构域结合到选自Gln1、Asp2、Asn4、Glu6以及Met7的人CD3 ϵ 的氨基酸组成的表位。在一个具体实施方案中,CD3结合结构域结合到特别地包括Glu6的表位。在某些其他实施方案中,CD3结合结构域被设置成不结合到包括人CD3 ϵ 氨基酸Glu5的表位。在某些其他实施方案中,CD3结合结构域被设置成不结合到包括人CD3 ϵ 氨基酸Gly3和Glu5的表位。

[0112] CD3表位可由结合表位的肽片段的CD3结合结构域测定。可选地,CD3表位可通过丙氨酸扫描诱变来测定。在一个实施方案中,CD3结合结构域与突变CD3的结合减少20%、30%、50%、80%或更多指示丙氨酸扫描诱变测定中的突变CD3的氨基酸残基为所述CD3结合结构的表位残基。可选地,CD3表位可通过质谱测定。在一些实施方案中,表位通过结晶学(例如结晶学方法)来测定。在一些实施方案中,如通过结晶学测定的CD3表位使用CD3的氨基酸Q1-M7来测定。在一些实施方案中,如通过结晶学测定的CD3表位使用CD3的氨基酸QDGNEEMGGITQTPYK(SEQ ID NO:79)Q1-M7来测定。

[0113] 在一些实施方案中,如通过结晶学测定的CD3表位可通过以下方式进行:将溶解于0.15M NaCl、25mM Tris pH 7.5(10mg/ml)中的抗CD3抗体Fab与2倍摩尔过量(1mg)的CD3 ϵ 肽组合,并且以座滴气相扩散形式初步筛选沉淀物的稀疏矩阵。可由与包含70%v/v甲基乙二醇和0.1M HEPES缓冲液pH 7.5的储备溶液的1:1混合物生长经过优化的晶体。所述储备液可用作低温保护剂。可通过突然浸入液氮中将晶体转移至极冷温度。

[0114] 可使用MAR300CCD检测器在先进光子源光束22ID下收集晶体的衍射数据。可使用程序HKL2000对所记录的衍射进行积分并且定标。

[0115] 所述结构可使用程序Phaser通过分子取代(MR)方法进行定相。例如,MR检索模型为来源于HGFA/Fab复合物晶体结构的Fab亚基(PDB编码:2R0L)。基于Fo-Fc谱图将CD3 ϵ 肽建入所述结构中。随后可使用最大概率目标函数、各向异性个别B因子精修方法和TLS精修方法,用程序REFMAC5及PHENIX对所述结构进行精修,以达成收敛。

[0116] 在一些情况中,本发明提供抗CD3抗体,其具有包含至少HVR-L3序列TQSFILRT(SEQ ID NO:6)和选自以下的1、2、3、4或5个的HVR的结合结构域:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:2;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4;以及(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5。

[0117] 在一些情况中,本发明提供抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的HVR的结合结构域:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1;(b)HVR-H2,其包含氨

氨基酸序列SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:5;以及 (f) HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6。在一些情况中,抗CD3抗体可具有VH结构域和/或VL结构域,所述VH结构域包含与序列SEQ ID NO:7具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或序列SEQ ID NO:7,所述VL结构域包含与序列SEQ ID NO:8具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或序列SEQ ID NO:8。在特定情况中,抗CD3抗体可以是3E4v11 或其衍生物或克隆相关物。

[0118] 在一些情况中,抗CD3抗体可包含分别包含序列SEQ ID NO: 9-12的重链框架区FR-H1、FR-H2、FR-H3以及FR-H4中的至少一个(例如,1、2、3或4个),和/或分别包含序列SEQ ID NO:13-16的轻链框架区FR-L1、FR-L2、FR-L3以及FR-L4中的至少一个(例如,1、2、3或4个)。

[0119] 在任何以上实施方案中,抗CD3抗体是人源化的。在一个实施方案中,抗CD3抗体包含如任何以上实施方案中的HVR,并且进一步包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0120] 在另一方面,提供抗CD3抗体,其中所述抗体包含如以上提供的任何实施方案中的VH、和如以上提供的任何实施方案中的VL,其中可变结构域序列中的一者或两者包括翻译后修饰。

[0121] 在另一方面,本发明提供一种与本文提供的抗CD3抗体结合相同表位的抗体。例如,在某些实施方案中,提供一种与包含VH序列 SEQ ID NO:7和VL序列SEQ ID NO:8的抗CD3抗体结合相同表位的抗体。在某些实施方案中,提供结合到由人CD3 ϵ 的氨基酸1-26 (SEQ ID NO:77) 或1-27 (SEQ ID NO:78) 组成的CD3的片段(例如,人 CD3 ϵ)内的表位的抗体。

[0122] 在本发明的另一方面,根据任何以上实施方案的抗CD3抗体为单克隆抗体。在其他实施方案中,抗CD3抗体是嵌合或人抗体。在一个实施方案中,抗CD3抗体是抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体为全长抗体,例如完整IgG抗体(例如,完整IgG1抗体)或如本文所定义的其他抗体类别或同种型。

[0123] 在另一方面,根据任何以上实施方案的抗CD3抗体可并有单一或呈组合形式的如下章节1-8中所述的任何特征。

[0124] 1. 抗体亲和力

[0125] 在某些实施方案中,本文提供的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ 的解离常数(Kd)(例如 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。

[0126] 在一个实施方案中,通过放射性标记的抗原结合测定(RIA)测量Kd。在一个实施方案中,用Fab形式的目标抗体及其抗原进行RIA。例如,通过在滴定系列的未标记抗原的存在下用最小浓度的(¹²⁵I)标记的抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被的平板捕获结合的抗原来测量Fab对抗原的溶液结合亲和力(参见,例如,Chen等人,J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999))。为建立测定条件,将MICROTITER[®]多孔板(Thermo Scientific)用含5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 捕获抗Fab抗体(Cappel Labs)的50mM碳酸钠(pH 9.6)包被过夜,并且随后在室温(大约

23℃) 下用 含2% (w/v) 牛血清白蛋白的PBS阻断2至5小时。在非吸附板 (Nunc #269620) 中, 将100pM或26pM [^{125}I] - 抗原与目标Fab的连续稀释液 混合 (例如与Presta等人, Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)) 中对抗 VEGF抗体Fab-12的评估一致)。然后将目标Fab孵育过夜; 然而, 孵育可持续较长时间 (例如约65小时) 以确保达到平衡。此后, 将混合物转移到捕获板上, 在室温下孵育 (例如, 1小时)。然后除去溶液, 并用在PBS中的0.1% 聚山梨酯20 (TWEEN-20[®]) 洗涤板8次。当板 已干燥时, 每孔添加150 μl /闪烁体 (MICROSCINT-20[™]; Packard), 且在TOPCOUNT [™] γ 计数器 (Packard) 上对板持续10分钟计数。选择 产生小于或等于最大结合的20%的各Fab的浓度以用于竞争性结合 测定中。

[0127] 根据另一个实施方案, 使用BIACORE[®]表面等离子共振测定 来测量K_d。例如, 在25℃用固定化抗原CM5芯片以约10反应单位 (RU) 进行使用BIACORE[®]-2000 或 BIACORE [®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 的测定。在一个实施方案中, 根据供应商的说明书, 用N-乙基-N' - (3-二甲基氨基丙基) - 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和N-羟基 琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片 (CM5, BIAcore, Inc.)。用10mM乙酸钠, pH 4.8将抗原稀释至5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\sim 0.2\mu\text{M}$), 之后以5 $\mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速注射以达到约10个反应单位 (RU) 的偶联蛋白。在注射抗原之后, 注射1M乙醇胺以阻断未反应的基 团。对于动力学测量, 在25℃下在流速约25 $\mu\text{l}/\text{min}$ 下注射Fab于含 0.05% 聚山梨醇酯20 (TWEEN-20[™]) 表面活性剂的PBS (PBST) 中的两 倍连续稀释液 (0.78nM至500nM)。使用简单的一对一朗缪尔结合模型 (BIACORE[®]评估软件版本3.2) 通过同时拟合缔合和解离传感图计 算缔合速率 ($k_{\text{缔合}}$ 或 k_a) 和解离速率 ($k_{\text{解离}}$ 或 k_d)。平衡解离常数 (K_D) 被计 算为比率 $k_{\text{解离}}/k_{\text{缔合}}$ 。参见, 例如 Chen等, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)。如果根据以上表面等离子体共振测定的缔合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 则可通过使用荧光淬灭技术来测定缔合速率, 所述荧光 淬灭技术测量在如在分光计 (诸如停流配备分光光度计 (Aviv Instruments) 或具有搅拌比色皿的8000系列SLM-AMINCO [™] 分光光 度计 (ThermoSpectronic)) 中测量的递增浓度的抗原存在下, 在25℃下 于PBS (pH 7.2) 中的20nM抗抗原抗体 (Fab形式) 的荧光发射强度 (激 发=295nm; 发射=340nm, 16nm带通) 的增加或降低。

[0128] 2. 抗体片段

[0129] 在某些实施方案中, 本文中提供的抗体是抗体片段。抗体片段 包括但不限于Fab、Fab'、Fab' -SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段以及下 述其他片段。对于某些抗体片段的评述, 参见Hudson等人Nat. Med. 9:129-134 (2003)。关于scFv片段的综述, 参见例如, Pluckthün, 于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenburg和Moore编, (Springer-Verlag, New York), 第269-315页 (1994); 也参见WO 93/16185; 和美国专利号 5,571,894和5,587,458。对于包含补救受体结合表位残基并且具有增加的体内半衰期的 Fab 和F(ab')₂片段的讨论, 参见美国专利号5,869,046。

[0130] 双抗体是可为二价或双特异性的具有两个抗原结合位点的抗体 片段。参见, 例如, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson等人, Nat. Med. 9:129-134 (2003); 以及Hollinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)。三体抗体及四体抗体也描述于 Hudson等人, Nat. Med. 9:129-134 (2003)。

[0131] 单结构域抗体是包含抗体的全部或一部分重链可变域或全部或 一部分轻链可变

域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体 是人单结构域抗体 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见例如美国专利号6,248,516B1)。

[0132] 抗体片段可通过各种技术制备,包括但不限于蛋白水解消化完整抗体以及如本文所述,通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生。

[0133] 3. 嵌合和人源化抗体

[0134] 在某些实施方案中,本文提供的抗体为嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如,美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)中。在一个实施例中,嵌合抗体 包含非人可变区(例如来源于小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类诸如猴的可变区)和人恒定区。在又一个实施例中,嵌合抗体为“类别 转换”抗体,其中类别或亚类与亲本抗体的类别或亚类相比已经改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0135] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,非人抗体 被人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般说来,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中例如HVR(或其部分)来源于非人抗体,并且FR(或其部分)来源于 人抗体序列。人源化抗体任选还将包含至少一部分人恒定区。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如 HVR残基所来源的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0136] 人源化抗体及制备它们的方法可参见例如,Almagro和Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008),并且进一步描述于例如,Riechmann等人,Nature 332:323-329 (1988);Queen等人,Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989);美国专利号5,821,337, 7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,Methods 36:25-34 (2005) (描述特异性决定区 (SDR) 移植);Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (描述“表面重整”);Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60 (2005) (描述“FR改组”);以及Osborn等人,Methods 36:61-68 (2005)和Klimka等人,Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (描述 针对FR改组的“指导选择”法)。

[0137] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”法选择的框架区(参见,例如,Sims等人,J. Immunol. 151:2296 (1993)); 衍生自特定轻链或重链可变区亚群的人抗体的共有序列的框架区(参见例如,Carter等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992);以及Presta等人,J. Immunol., 151:2623 (1993));人成熟(体细胞突变) 框架区或人生殖系框架区(参见例如,Almagro和Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008));以及来源于筛选FR库的框架区(参见例如,Baca等人,J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997)和Rosok 等人,J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996))。

[0138] 4. 人抗体

[0139] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是人抗体。可以使用本领域中已知的各种技术产生人抗体。人抗体一般描述于van Dijk和 van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001)以及Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)。

[0140] 可以通过向转基因动物施用免疫原制备人抗体,所述转基因动物已经被修饰以反应抗原性攻击产生完整的人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有全部或部分的人免疫球蛋白基因座,其取代内源免疫球蛋白基因座,或者存在于染色体外或随

机整合到动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座通常已经失活。对于从转基因动物获得人抗体的方法的评述,参见 Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125 (2005)。还参见例如描述 XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述 HuMAB®技术的美国专利号5,770,429;描述K-M MOUSE®技术的美国专利号7,041,870和描述VELOCIMOUSE®技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900)。可以进一步修饰来自此类动物产生的完整抗体的人可变区,例如通过与不同的人恒定区组合进行。

[0141] 也可以通过基于杂交瘤的方法制备人抗体。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤(heteromyeloma)细胞系。(参见例如Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984);Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);以及 Boerner等人,J. Immunol.,147:86(1991)。通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体也描述于Li等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)。另外的方法包括例如在美国专利号7,189,826(描述了从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268(2006)(描述了人-人杂交瘤)中描述的那些方法。人杂交瘤技术(三源杂交瘤技术)也描述于Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20(3):927-937(2005)和Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91(2005)中。

[0142] 还可以通过分离选自人衍生的噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来产生人抗体。然后,可将此类可变结构域序列与期望的人恒定结构域组合。下文描述了从抗体文库中选择人抗体的技术。

[0143] 5.文库衍生的抗体

[0144] 可以通过对组合文库筛选具有期望的一种或多种活性的抗体来分离本发明的抗体。例如,本领域中已知用于产生噬菌体展示文库并对此类文库筛选具有期望的结合特性的抗体的多种方法。这种方法可查阅例如,Hoogenboom等人,Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人编,Human Press,Totowa,NJ,2001)并且进一步描述于例如,McCafferty等人,Nature 348:552-554;Clackson等人,Nature 352:624-628(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Marks和Bradbury,Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo编,Human Press,Totowa,NJ,2003);Sidhu等人,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);以及Lee等人,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)。

[0145] 在某些噬菌体展示方法中,通过聚合酶链式反应(PCR)分别克隆VH和VL基因的组库,并随机重组在噬菌体文库中,然后可针对抗原结合噬菌体筛选所述噬菌体文库,如Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)中描述。噬菌体通常展示作为单链Fv(scFv)片段或作为Fab片段的抗体片段。来自经免疫的来源的文库提供对免疫原的高亲和力和抗体,而不需要构建杂交瘤。或者,可克隆(例如从人克隆)天然组库以提供单一来源的针对广泛范围的非自体抗原以及自体抗原的抗体而不进行任何免疫,如Griffiths等人,EMBO J,12:725-734(1993)所述。最后,天然文库也可以通过以下方式合成制备:从干

细胞克隆未重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物以编码高度可变的CDR3区并在体外实现重排,如由Hoogenboom和J.Mol. Biol.,227:381-388(1992)描述。描述人抗体噬菌体库的专利公布包括例如:美国专利号5,750,373,和美国专利公布号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936以及2009/0002360。

[0146] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段被认为是本文的人抗体或人抗体片段。

[0147] 6. 多特异性抗体

[0148] 在上述方面中的任一个中,本文中所提供的抗CD3抗体为多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异性抗体为对至少两个不同位点具有结合特异性的抗体(例如,单克隆抗体)。在某些实施方案中,双特异性抗体可结合CD3(例如,CD3 ϵ 或CD3 γ)的两个不同表位。在某些实施方案中,结合特异性中的一个针对CD3(例如,CD3 ϵ 或CD3 γ)并且另一个是针对任何其他抗原(例如第二生物分子,例如细胞表面抗原,例如肿瘤抗原)。因此,双特异性抗CD3抗体可对CD3和第二生物分子(诸如表1中所列出的和本文以及美国公布号2010/0111856中所描述的第二生物分子(例如肿瘤抗原))具有结合特异性。

[0149] 表1. 本发明的双特异性抗CD3抗体的肿瘤抗原靶

[0150]	Ly6G6D	CD79a	ETBR	IL13R α 2	M-CSF	P2X5	SSX-2
	0772P	CD79b	ETV6-A ML1 融合 蛋白	IL20R α	MCSP	p53	SSX-4

[0151]

亲脂素	Cdc27	EZH2	肠羧基酯酶	mdm-2	PAP	STEAP1
AIM-2	CDK4	FcRH1	IRTA2	MDP	PAX 5	STEAP1
ALDH 1A1	CDKN2 A	FcRH2	激肽释放酶 4	ME1	PBF	STEAP2
α -辅肌动蛋白-4	CEA	FcRH5	KIF20A	Melan-A / MART-1	PME L17	生存素
甲胎蛋白	CLL1	FLT3-ITD	KK-LC-1	Meloe	pml-RAR α 融合蛋白	SYT-SS X1 或 -SSX2 融合蛋白
双调蛋白	CLPP	FN1	KM-HN-1	MMP-2	PRA ME	TAG-1
ARTC1	COA-1	G250 / MN / CAIX	K-ras	MMP-7	PRD X5	TAG-2
ASLG6 59	CPSF	GAGE-1, 2,8	LAGE-1	MPF	PSC A	端粒酶
ASPH D1	CRIPTO	GAGE-3, 4,5,6,7	LDLR-岩藻糖转移酶 AS 融合蛋白	MRP4	PSC A hlg	TENB2
B7-H4	Cw6	GDNF-Ra 1	Lengsin	MSG78 3	PSM A	TGF- β RI I
BAFF-R	CXCR5	GEDA	LGR5	MUC1	PTP RK	TMEFF1
BAGE-1	CXORF6 1	GFRA1	LY64	MUC5A C	RAB 38 / NY-MEL -1	TMEM1 18
BCLX (L)	细胞周期蛋白 D1	磷脂酰肌醇聚糖-3	Ly6E	粘蛋白	RAG E-1	TMEM4 6
BCR-ABL 融合蛋白 (b3a2)	细胞周期蛋白 -A1	GnTVf	CD20	MUM-1 f	RBA F600	TRAG-3
β -链蛋白	dek-can 融合蛋白	gp100 / Pmel17	LY6K	MUM-2	RET	磷酸丙糖异构酶
BING-4	DKK1	GPC3	LYPD1	MUM-3	RGS 5	TRP-1 / gp75

[0152]

B-RAF	DR1	GPNMB	MAGE-A1	I 类肌球蛋白	RhoC	TRP-2
缩短素	DR13	GPR172A	MAGE-A10	NA88-A	RNF43	TRP2-IN T2
CALCA	E16	GPR19	MAGE-A12	Napi2b	RNF43	TrpM4
CASP-5	EDAR	GPR54	MAGE-A2	NCA	RU2AS	酪氨酸酶
CASP-8	EFTUD2	HAVCR1	MAGE-A3	neo-PAP	SAGE	酪氨酸酶
CD19	延伸因子2	HER2	MAGE-A4	NFYC	分离蛋白 (secrenin) 1	VEGF
CD21	ENAH (h Mena)	HER-2 / neu	MAGE-A6	N-ras	Sema5b	WT1
CD22	EpCAM	HERV-K-MEL	MAGE-A9	NY-BR-1	SIRT2	XAGE-1 b/GAGE D2a
CD33	EphA3	HLA-DOB	MAGE-C1	NY-ESO-1/LAGE-2	SLC35D3	EGFR-T790M;
CD45	EphB2R	hsp70-2	MAGE-C2	OA1	SNRPD1	BMPR1B
CD70	表皮调节素	IDO1	乳球蛋白-A	OGT	SOX10	
CD72	EGFR	IGF2B3	MART2	OS-9	Sp17	
EGFR-G719A	EGFR-G719C;	EGFR-G719S;	EGFR-L858R	EGFR-S768I	EGFR-L861Q	

[0153] 双特异性抗CD3抗体 (例如上述抗CD3抗体中的任一种) 可对 CD3及第二生物分子诸如由MHC呈现的细胞表面上的人白细胞抗原 (HLA) -肽复合物具有结合特异性。双特异性抗CD3抗体 (例如上述抗 CD3抗体中的任一种) 可对CD3及第二生物分子诸如HLA-肽复合物的肽具有结合特异性, 选自由以下组成的组: Ly6G6D (淋巴细胞抗原6复合物基因座G6D; Ly6-D、MEGT; NP_067079.2); 0772P (CA125, MUC16; Genbank登记号AF36148); 亲脂素 (围脂素-2、脂肪分化相关蛋白、ADRP、ADFP、MGC10598; NCBI参考序列: NP_001113.2); AIM-2 (黑素瘤2中不存在, PYHIN4, 干扰素-诱导蛋白AIM2; NCBI参考序列: NP_004824.1); ALDH1A1 (醛脱氢酶1 家族成员A1、ALDH1、PUMB1、视黄醛脱氢酶1、ALDC、ALDH-E1、ALHDII、RALDH 1、EC 1.2.1.36、ALDH11、HEL-9、HEL-S-53e、HEL12、RALDH1、乙醛脱氢酶1、醛脱氢酶1、可溶性醛脱氢酶、肝细胞溶质抗原、1类ALDH、附睾管腔蛋白12、附睾管腔蛋白9、附睾分泌精液结合蛋白Li 53e、视黄醛脱氢酶1、RalDH1、醛脱氢酶家族1成员A1、醛脱氢酶、细胞溶质、EC 1.2.1; NCBI参考序列: NP_000680.2); α -辅肌动蛋白-4 (ACTN4、辅肌动蛋白、 α 4、FSGS1、局灶性节段性肾小球硬化症1、非肌肉 α -辅肌动蛋白4、F肌动蛋白交联蛋白、FSGS、辅肌动蛋

白-4、辅肌动蛋白 α 4同种型、 α -辅肌动蛋白-4;NCBI参考序列:NP_004915.2);甲胎蛋白(AFP、HPAFP、FETA、 α -1-胎蛋白、 α -胎儿球蛋白、 α -1-胎蛋白、 α -胎儿球蛋白、HP;GenBank: AAB58754.1);双调蛋白(AREG、SDGF、施万细胞瘤衍生生长因子、结肠直肠细胞衍生生长因子、AR、CRDGF;GenBank:AAA51781.1);ARTC1(ART1、ADP-核糖基转移酶1、单(ADP-核糖基)转移酶1、ADP-核糖基转移酶C2和C3毒素样蛋白1、ART2、CD296、RT6、ADP-核糖基转移酶2、GPI-连接NAD(P)(+)-精氨酸ADP-核糖基转移酶1、EC 2.4.2.31、CD296抗原;NP);ASLG659;ASPHD1(包含天冬氨酸 β -羟化酶结构域的蛋白1、包含天冬氨酸 β -羟化酶结构域的蛋白1、EC 1.14.11.-、EC 1.14.11;GenBank:AAI44153.1);B7-H4(VTCN1、包含V-Set结构域的T细胞活化抑制剂1、B7H4、B7超家族成员1、免疫共刺激蛋白B7-H4、B7h.5、T细胞共刺激分子B7x、B7S1、B7X、VCTN1、H4、B7家族成员、PR01291、B7家族成员、H4、T细胞共刺激分子B7x、包含V-Set结构域的T细胞活化抑制剂1、蛋白B7S1;GenBank:AAZ17406.1);BAFFR(TNFRSF13C、肿瘤坏死因子受体超家族成员13C、BAFFR、B细胞-活化因子受体、BAFF受体、BLyS受体3、CVID4、BROMIX、CD268、B细胞-活化因子受体、氟非那嗪(prolixin)、肿瘤坏死因子受体超家族成员13C、BR3、CD268抗原;NCBI参考序列:NP_443177.1);BAGE-1;BCLX(L);BCR-ABL融合蛋白(b3a2); β -链蛋白(CTNNB1、链蛋白(钙黏蛋白相关蛋白)、 β 1、88kDa、CTNNB、MRD19、链蛋白(钙黏蛋白相关蛋白)、 β 1(88kD)、犰狳蛋白、链蛋白 β -1;GenBank:CAA61107.1);BING-4(WDR46、WD重复结构域46、C6orf11、BING4、包含WD重复的蛋白BING4、染色体6开放阅读框11、FP221、UTP7、包含WD重复的蛋白46;NP);BMPRI1B(1B型骨形成蛋白受体,Genbank登记号NM_00120;NP);B-RAF(缩短素(BCAN、BEHAB、Genbank登记号AF22905);缩短素(BCAN、硫酸软骨素蛋白聚糖7、脑富集透明质酸结合蛋白、BEHAB、CSPG7、缩短素蛋白聚糖、缩短素核心蛋白、硫酸软骨素蛋白聚糖BEHAB;GenBank:AAH27971.1);CALCA(降钙素相关多肽 α 、CALC1、降钙素1、降钙素、 α 型CGRP、降钙素基因相关肽I、CGRP-I、CGRP、CGRP1、CT、KC、降钙素/降钙素相关的多肽 α 、钙抑肽;NP);CASP-5(CASP5、半胱天冬酶5、细胞凋亡相关的半胱氨酸肽酶、半胱天冬酶5、细胞凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶、蛋白酶ICH-3、蛋白酶TY、ICE(rel)-III、ICE(rel)III、ICEREL-III、ICH-3、半胱天冬酶-5、TY蛋白酶、EC 3.4.22.58、ICH3、EC 3.4.22;NP);CASP-8;CD19(CD19-B-淋巴细胞抗原CD19同种型2前体、B4、CVID3[智人]、NCBI参考序列:NP_001761.3);CD20(CD20-B-淋巴细胞抗原CD20跨膜4-结构域亚家族A成员1、B1、Bp35、CD20、CVID5、LEU-16、MS4A2、S7;NCBI参考序列:NP_690605.1);CD21(CD21(CR2(补体受体或C3DR(C3d/EB病毒受体)或Hs.73792Genbank登记号M2600);(CD22(B细胞受体CD22-B同种型、BL-CAM、Lyb-8、Lyb8、SIGLEC-2、FLJ22814、Genbank登记号AK02646);CD22;CD33(CD33Molecule、CD33抗原(Gp67)、唾液酸结合Ig样凝集素3、唾液酸结合Ig样凝集素3、SIGLEC3、gp67、SIGLEC-3、骨髓细胞表面抗原CD33、p67、Siglec-3、CD33抗原;GenBank:AAH28152.1);CD45;CD70(CD70-肿瘤坏死因子(配体)超家族成员7;表面抗原CD70;Ki-24抗原;CD27配体;CD27-L;肿瘤坏死因子配体超家族成员7;智人物种的NCBI参考序列:NP_001243.1);CD72(CD72(B细胞分化抗原CD72, Lyb-; 359aa, pI:8.66, MW:40225, TM:1[P]基因染色体:9p13.3, Genbank登记号NP_001773.);CD79a(CD79a(CD79A、CD79a、免疫球蛋白相关的 α 、B细胞特异性蛋白,其共价相互作用于Ig β (CD79B)并与IgM分子在表面上形成复合物,转导涉及B细胞分化的信号), pI:4.84, MW:25028TM:2[P]基因染色体:19q13.2、Genbank登记号NP_

001774.1); CD79b (CD79b (CD79B、CD79b、IGb (免疫球蛋白 相关 β)、B29、Genbank登记号NM_000626或1103867); Cdc27 (细胞分裂周期27、D0S1430E、D17S978E、分裂后期促进复合亚基3、分裂后期促进复合亚基3、ANAPC3、APC3、CDC27Hs、H-NUC、CDC27同系物、细胞分裂周期27同系物(酿酒酵母)、HNUC、NUC2、分裂后期促进复合蛋白3、细胞分裂周期27同系物、细胞分裂周期蛋白27同系物、Nuc2同系物; GenBank:AAH11656.1); CDK4 (细胞周期蛋白依赖性激酶4、细胞分裂蛋白激酶4、PSK-J3、EC 2.7.11.22、CMM3、EC 2.7.11; NCBI参考序列:NP_000066.1); CDKN2A (细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A、MLM、CDKN2、MTS1、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A (黑素瘤、P16, 抑制 CDK4)、细胞周期蛋白依赖性激酶4抑制剂A、多肿瘤抑制剂1、CDK4I、MTS-1、CMM2、P16、ARF、INK4、INK4A、P14、P14ARF、P16-INK4A、P16INK4、P16INK4A、P19、P19ARF、TP16、CDK4抑制剂P16-INK4、细胞周期负调节蛋白 β 、p14ARF、p16-INK4、p16-INK4a、p16INK4A、p19ARF; NP); CEA; CLL1 (CLL-1 (CLEC12A、MICL和DCAL, 编码C型凝集素/C型凝集素样结构域 (CTL/CTLD) 超家族的成员。此家族成员具有共同的蛋白折叠并且具有多样性功能, 诸如细胞粘附、细胞-细胞信号传导、糖蛋白 转换及在炎症及免疫反应中的作用。由此基因编码的蛋白质为粒细胞及单核细胞功能的负性调节剂。已描述此基因的若干种交替剪接 转录变体, 但一些这些变体的全长性质尚未确定。此基因与染色体12p13上的天然杀手基因复合区中的其他CTL/CTLD超家族成员紧密 连接 (Drickamer K Curr. Opin. Struct. Biol. 9): 585-90; van Rhenen A, 等人, Blood 110): 2659-66; Chen CH 等人, Blood 107): 1459-67; Marshall AS 等人, Eur. J. Immunol. 36): 2159-69; Bakker AB 等人, Cancer Res. 64: 8443-50; Marshall AS 等人, J. Biol. Chem. 279 : 14792-80。已证明 CLL-1为II型跨膜受体, 其包含单一C型凝集素 样结构域 (预计其不结合钙或糖)、杆区、跨膜结构域及含有ITIM基 元的短细胞质尾; CLPP (酪蛋白线粒体基质肽酶蛋白水解亚基、内切肽酶Clp、EC 3.4.21.92、PRLTS3、ATP依赖性蛋白酶ClpAP (大肠 杆菌 (E. Coli))、ClpP (酪蛋白蛋白酶、ATP依赖性蛋白水解亚基, 大肠杆菌) 同系物、ClpP酪蛋白肽酶、ATP依赖性蛋白水解亚基同系物 (大肠杆菌)、ClpP酪蛋白蛋白酶、ATP依赖性蛋白水解亚基同系物 (大肠杆菌)、人蛋白水解亚基、ATP依赖性蛋白酶ClpAP、蛋白水解 亚基、人ClpP酪蛋白肽酶ATP依赖性、蛋白水解亚基、ClpP酪蛋白 肽酶、ATP依赖性、蛋白水解亚基同系物、ClpP酪蛋白蛋白酶、ATP依赖性、蛋白水解亚基同系物、推定ATP依赖性Clp蛋白酶蛋白水解亚基线粒体; NP); COA-1; CPSF; CRIPTO (CRIPTO (CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、畸胎瘤衍生的生长因子、Genbank登记号NP_003203或NM_00321); Cw6; CXCR5CXCR5 (伯基特淋巴瘤受体1, 由CXCL13趋化因子活化、在淋巴细胞迁移及 体液防卫方面发挥功能、在HIV-2感染并且可能在患有AIDS、淋巴瘤、骨髓瘤以及白血病中起作用的G蛋白偶联受体); 372aa、pI: 8.54MW: 41959TM: 7[P] 基因染色体: 11q23.3、Genbank登记号 NP_001707.); CXORF61CXORF61-染色体X开放阅读框61[智人]、NCBI参考序列: NP_001017978.1); 细胞周期蛋白D1 (CCND1、BCL1、PRAD1、D11S287E、B细胞CLL/淋巴瘤1、B细胞淋巴瘤1 蛋白、BCL-1致癌基因、PRAD1致癌基因、细胞周期蛋白D1 (PRAD1: 甲状旁腺腺瘤病1)、G1/S-特异性细胞周期蛋白D1、甲状旁腺腺瘤病1、U21B31、G1/S-特异性细胞周期蛋白-D1、BCL-1; NCBI参考序列: NP_444284.1); 细胞周期蛋白-A1 (CCNA1、CT146、细胞周期蛋白A1; GenBank: AAH36346.1); dek-can融合蛋白; DKK1 (Dickkopf WNT信号传导路径抑制剂1、SK、hDkk-1、Dickkopf (光滑爪蟾) 同系物1、Dickkopf 1同系物 (光滑爪蟾)、DKK-1、Dickkopf 1同系物、Dickkopf相

关蛋白-1、Dickkopf-1样、Dickkopf样蛋白1、Dickkopf相关蛋白1、Dickkopf-1、Dkk-1; GenBank:AAQ89364.1);DR1(转录下调蛋白1,TBP结合(负性辅因子2)、负性辅因子2-β、TATA结合蛋白相关的磷蛋白、NC2、NC2-β、蛋白Dr1、NC2-β、转录下调蛋白1;NCBI参考序列:NP_001929.1);DR13(主要组织相容性复合物,II类,DRβ1、HLA-DR1B、DRw10、DW2.2/DR2.2、SS1、DRB1、HLA-DRB、HLA II类组织相容性抗原、DR-1β链、人白细胞抗原DRB1、淋巴细胞抗原DRB1、MHC II类抗原、MHC II类HLA-DRβ1链、MHC II类HLA-DR-β细胞表面糖蛋白、MHC II类HLA-DRw10-β、DR-1、DR-12、DR-13、DR-14、DR-16、DR-4、DR-5、DR-7、DR-8、DR-9、DR1、DR12、DR13、DR14、DR16、DR4、DR5、DR7、DR8、DR9、DRw11、DRw8、HLA-DRB2、Clone P2-β-3、MHC II类抗原DRB1*1、MHC II类抗原DRB1*10、MHC II类抗原DRB1*11、MHC II类抗原DRB1*12、MHC II类抗原DRB1*13、MHC II类抗原DRB1*14、MHC II类抗原DRB1*15、MHC II类抗原DRB1*16、MHC II类抗原DRB1*3、MHC II类抗原DRB1*4、MHC II类抗原DRB1*7、MHC II类抗原DRB1*8、MHC II类抗原DRB1*9;NP);E16(E16(LAT1、SLC7A5、Genbank登记号NM_00348);EDAR(EDAR-肿瘤坏死因子受体超家族成员EDAR前体、EDA-A1受体;无毛同系物;外胚层发育不良蛋白-A受体;外胚层发育不良受体;无汗性外胚层发育不良蛋白受体1、DL;ECTD10A;ECTD10B;ED1R;ED3;ED5;EDA-A1R;EDA1R;EDA3;HRM1[智人];NCBI参考序列:NP_071731.1);EFTUD2(包含延伸因子Tu GTP结合结构域2、包含延伸因子Tu GTP-结合结构域蛋白2、hSNU114、SNU114同系物、U5SnRNP-特异性蛋白、116KDa、MFDGA、KIAA0031、116KD、U5SnRNP特异性蛋白、116KDa U5小核核糖核蛋白组分、MFDG、SNRNP116、Snrp116、Snu114、U5-116KD、SNRP116、U5-116KDa;GenBank:AAH02360.1);EGFR(上皮生长因子受体、ERBB、原癌基因C-ErbB-1,受体酪氨酸-蛋白激酶 ErbB-1、ERBB1、HER1、EC 2.7.10.1、上皮生长因子受体(鸟类红血球母细胞白血病病毒(V-Erb-B)致癌基因同系物)、红血球母细胞白血病病毒(V-Erb-B)致癌基因同系物(鸟类)、PIG61、鸟类红血球母细胞白血病病毒(V-Erb-B)致癌基因同系物、细胞生长抑制蛋白40、细胞增殖诱导蛋白61、mENA、EC 2.7.10; GenBank:AAH94761.1);EGFR-G719A;EGFR-G719C;EGFR-G719S;EGFR-L858R;EGFR-L861Q;EGFR-S768I;EGFR-T790M;延伸因子2(EEF2、真核生物翻译延伸因子2、EF2、多肽基-TRNA移位酶、EF-2、SCA26、EEF-2;NCBI参考序列:NP_001952.1);ENAH(hMena)(启动同系物(果蝇),MENA,哺乳动物启动、ENA、NDPP1、蛋白启动同系物;GenBank:AAH95481.1)-仅针对“ENAH”而非“ENAH(hMena)”的结果;EpCAM(上皮细胞粘附分子,M4S1,MIC18,肿瘤相关钙信号转导蛋白1,TACSTD1,TROP1,腺癌相关的抗原,细胞表面糖蛋白Trop-1、上皮糖蛋白314、主要胃肠肿瘤相关蛋白GA733-2,EGP314,KSA,DIAR5,HNPCC8,由单克隆抗体AUA1鉴定的抗原,EGP-2,EGP40,ESA,KS1/4,MK-1,人上皮糖蛋白-2,膜组分,染色体4,表面标记物(35kD糖蛋白),EGP,Ep-CAM,GA733-2,M1S2,CD326抗原,上皮细胞表面抗原,hEGP314,KS1/4抗原,ACSTD1;GenBank:AAH14785.1);EphA3(EPH受体A3,ETK1,ETK,TYRO4,HEK,Eph样酪氨酸激酶1,酪氨酸-蛋白激酶受体ETK1,EK4,EPH样激酶4,EC 2.7.10.1,EPhA3,HEK4,Ephrin A型受体3,人胚激酶1,TYRO4蛋白酪氨酸激酶,hEK4,人胚激酶,酪氨酸-蛋白激酶TYRO4,EC 2.7.10;GenBank:AAH63282.1);EphB2R;表皮调节素(EREG、ER、促表皮调节素;GenBank:AAI36405.1);ETBR(EDNRB,内皮素受体B型,HSCR2,HSCR,内皮素受体非选择性型,ET-B,ET-BR,ETRB,ABCDS,WS4A,ETB,内皮素B受体;NP);ETV6-AML1融合蛋白;EZH2(同系物增强子2(果蝇),赖氨酸N-甲基转移酶6,ENX-1,KMT6EC 2.1.1.43,EZH1,WVS,Zeste增

强子(果蝇)同系物2, ENX1, EZH2b, KMT6A, WVS2, 组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶 EZH2, Zeste 同系物增强子2, EC 2.1.1; GenBank: AAH10858.1); FcRH1 (FCRL1, Fc受体样1, FCRH1, Fc受体同系物1, FcR样蛋白1, 免疫受体易位相关的蛋白5, IFGP1, IRTA5, hIFGP1, IFGP 家族蛋白1, CD307a, Fc受体样蛋白1, 免疫球蛋白超家族Fc受体, Gp42, FcRL1, CD307a抗原; GenBank: AAH33690.1); FcRH2 (FCRL2, Fc受体样2, SPAP1, 包含SH2结构域磷酸酶锚定蛋白1, Fc受体同系物2, FcR样蛋白2, 免疫球蛋白受体易位相关的蛋白4, FCRH2, IFGP4, IRTA4, IFGP家族蛋白4, SPAP1A, SPAP1B, SPAP1C, CD307b, Fc受体样蛋白2, 免疫受体易位相关的蛋白4, 免疫球蛋白超家族Fc受体, Gp42, 包含SH2结构域磷酸酶锚定蛋白1, FcRL2, CD307b抗原; GenBank: AAQ88497.1); FcRH5 (FCRL5, Fc受体样5, IRTA2, Fc受体同系物5, FcR样蛋白5, 免疫受体易位相关的蛋白2, BXMAS1, FCRH5, CD307, CD307e, PR0820, Fc受体样蛋白5, 免疫球蛋白超家族受体易位相关蛋白2 (IRTA2), FcRL5, CD307e抗原; GenBank: AAI01070.1); FLT3-ITD; FN1 (纤粘蛋白1, 冷不溶球蛋白, FN, 迁移刺激因子, CIG, FNZ, GFND2, LETS, ED-B, FINC, GFND, MSF, 纤粘蛋白; GenBank: AAI43764.1); G250 (MN, CAIX, 碳酸酐酶IX, 碳酸脱水酶, RCC相关的蛋白G250, 碳酸酐酶IX, 膜抗原MN, 肾细胞癌相关的抗原G250, CA-IX, P54/58N, pMW1, RCC相关的抗原G250, 碳酸酐酶9; NP); -针对“G250”而非“G250/MN/CAIX”的其他结果; GAGE-1, 2, 8; GAGE-3, 4, 5, 6, 7; GDNF-Ra1 (GDNF家族受体 α 1; GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR- α 1; GFR- α -; U95847; BC014962; NM_145793 NM_005264); GEDA (Genbank登记号AY26076); GFRA1-GDNF家族受体 α -1; GDNF受体 α -1; GDNFR- α -1; GFR- α -1; RET配体1; TGF- β 相关的神经营养因子受体1[智人]; ProtKB/Swiss-Prot: P56159.2; 磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3, 磷脂酰肌醇聚糖3, SDYS, 磷脂酰肌醇聚糖蛋白聚糖3, 肠蛋白OCI-5, GTR2-2, MXR7, SGBS1, DGSX, OCI-5.SGB, SGBS, 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖, 分泌磷脂酰肌醇聚糖-3, OCI5; GenBank: AAH35972.1); GnTVf; gp100 (PMEL, 前黑色素小体蛋白, SILV, D12S53E, PMEL17, SIL, 黑素细胞蛋白Pmel 17, 黑素细胞谱系特异性抗原GP100, 黑素瘤相关的ME20抗原, 银基因座蛋白同系物, ME20-M, ME20M, P1, P100, 银(小鼠同系物)样银同系物(小鼠), ME20, SI, 黑素细胞蛋白Mel 17, 黑素细胞蛋白PMEL, 黑素体基质蛋白17, 银, 小鼠, 同系物的; GenBank: AAC60634.1); GPC; GPNMB (糖蛋白(跨膜)Nmb, 糖蛋白NMB, 糖蛋白Nmb样蛋白, 骨激活素, 跨膜糖蛋白HGFIN, HGFIN, NMB, 跨膜糖蛋白, 跨膜糖蛋白NMB; GenBank: AAH32783.1); GPR172A (G蛋白偶联的受体172A; GPCR41; FLJ11856; D15Erttd747e); NP_078807.1; NM_024531.3); GPR19 (G蛋白偶联的受体19; Mm. 478; NP_006134.1; NM_006143.2); GPR54 (KISS1受体; KISS1R; GPR54; H0T7T175; AXOR1; NP_115940.2; NM_032551.4); HAVCR1 (甲型肝炎病毒细胞受体1, T细胞免疫球蛋白粘蛋白家族成员1, 肾损伤分子1, KIM-1, KIM1, TIM, TIM-1, TIM1, TIMD-1, TIMD1, T细胞免疫球蛋白粘蛋白受体1, T细胞膜蛋白1, HAVCR, HAVCR-1, T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域蛋白1, HAVcr-1, T细胞免疫球蛋白和包含粘蛋白结构域的G蛋白1; GenBank: AAH13325.1); HER2 (ERBB2, V-Erb-B2鸟类红血球母细胞白血病病毒致癌基因同系物2, NGL, NEU, 神经/胶质母细胞瘤衍生的致癌基因同系物, 转移性淋巴结基因19蛋白, 原-致癌基因C-ErbB-2, 原-致癌基因Neu, 酪氨酸激酶型细胞表面受体HER2, MLN 19, p185erbB2, EC 2.7.10.1, V-Erb-B2鸟类红血球母细胞白血病病毒致癌基因同系物2 (神经/胶质母细胞瘤衍生的致癌基因同系物), CD340, HER-2, HER-2/neu, TKR1, C-Erb B2/Neu蛋白, 赫斯达汀, 成神经细胞

瘤/胶质母细胞瘤衍生的致癌基因同系物,受体酪氨酸-蛋白激酶ErbB-2,V-Erb-B2红血球母细胞白血病病毒致癌基因同系物2,神经/胶质母细胞瘤衍生的致癌基因同系物,MLN19,CD340抗原,EC 2.7.10;NP);HER-2/neu-以上的别名;HERV-K-MEL;MHC II类分子的HLA-DOB(结合肽并且将它们呈递到CD4+T淋巴细胞的(Ia抗原)的 β 亚基);273aa,pI:6.56,MW:30820.TM:1[P]基因染色体:6p21.3,Genbank登记号NP_002111);hsp70-2(HSPA2,热休克70kDa蛋白2,热休克70kD蛋白2,HSP70-3,热休克相关的70KDa蛋白2,热休克70KDa蛋白2;GenBank:AAD21815.1);IDO1(吡啶胺2,3-二氧酶1,IDO,INDO,吡啶胺-吡咯2,3-二氧酶,IDO-1,吡啶胺-吡咯2,3二氧酶,吡啶胺2,3二氧酶,吡啶2,3二氧酶,EC 1.13.11.52;NCBI参考序列:NP_002155.1);IGF2B3;IL13R α 2(IL13RA2,白细胞介素13受体, α 2,癌症/睾丸抗原19,白细胞介素-13结合蛋白,IL-13R- α -2,IL-13RA2,IL-13受体亚基 α -2,IL-13R亚基 α -2,CD213A2,CT19,IL-13R,IL13BP,白细胞介素13结合蛋白,白细胞介素13受体 α 2链,白细胞介素-13受体亚基 α -2,IL13R,CD213a2抗原;NP);IL20R α ;肠羧基酯酶;IRTA2(FcRH5的别名);激肽释放酶4(KLK4,激肽释放酶相关的肽酶4,PRSS17,EMSP1,粘基质丝氨酸蛋白酶1,激肽释放酶样蛋白1,丝氨酸蛋白酶17,KLK-L1,PSTS,AI2A1,激肽释放酶4(前列腺,粘基质,前列腺),ARM1,EMSP,雄性激素调节的消息1,粘基质丝氨酸蛋白酶1,激肽释放酶,激肽释放酶-4,前列腺,EC 3.4.21.-,前列腺,EC 3.4.21;GenBank:AAX30051.1);KIF20A(驱动蛋白家族成员20A,RAB6KIFL,RAB6相互作用,驱动蛋白样(Rab驱动蛋白6),有丝分裂a;LAGE-1;LDLR-岩藻糖转移酶AS融合蛋白;Lengsin(LGSN,Lengsin,具有谷氨酰胺合成酶结构域的晶状体蛋白,GLULD1,包含谷氨酸酯-氨连接酶结构域的蛋白1,LGS,包含谷氨酸酯-氨连接酶(谷氨酰胺合成酶)结构域1,包含谷氨酸酯-氨连接酶(谷氨酰胺合酶)结构域1,晶状体谷氨酰胺合酶样;GenBank:AAF61255.1);LGR5(包含富亮氨酸重复序列的G蛋白偶联的受体5;GPR49,GPR6;NP_003658.1;NM_003667.2;LY64(淋巴细胞抗原64(RP10,富亮氨酸重复序列(LRR)家族的I型膜蛋白,调节B细胞活化和细胞凋亡,功能损失与患有全身性红斑狼疮的患者中的疾病活性增加相关);661aa,pI:6.20,MW:74147TM:1[P]基因染色体:5q12,Genbank登记号NP_005573.;Ly6E(淋巴细胞抗原6复合物基因座E;Ly67,RIG-E,SCA-2,TSA-;NP_002337.1;NM_002346.2);LY6K(淋巴细胞抗原6复合物基因座K;LY6K;HSJ001348;FLJ3522;NP_059997.3;NM_017527.3);包含LyPD1-LY6/PLAUR结构域1,PHTS[智人],GenBank:AAH17318.1);MAGE-A1(黑素瘤抗原家族A,1(抗原MZ2-E的直接表达,MAGE1,黑素瘤抗原家族A1,MAGEA1,黑素瘤抗原MAGE-1,黑素瘤相关的抗原1,黑素瘤相关的抗原MZ2-E,抗原MZ2-E,癌症/睾丸抗原1.1,CT1.1,MAGE-1抗原,癌症/睾丸抗原家族1,成员1,癌症/睾丸抗原家族1,成员1,MAGE1A;NCBI参考序列:NP_004979.3);MAGE-A10(MAGEA10,黑素瘤抗原家族A,10,MAGE10,MAGE-10抗原,黑素瘤相关的抗原10,癌症/睾丸抗原1.10,CT1.10,癌症/睾丸抗原家族1,成员10,癌症/睾丸抗原家族1,成员10;NCBI参考序列:NP_001238757.1);MAGE-A12(MAGEA12,黑素瘤抗原家族A,12,MAGE12,癌症/睾丸抗原1.12,CT1.12,MAGE12F抗原,癌症/睾丸抗原家族1,成员12,癌症/睾丸抗原家族1,成员12,黑素瘤相关的抗原12,MAGE-12抗原;NCBI参考序列:NP_001159859.1);MAGE-A2(MAGEA2,黑素瘤抗原家族A,2,MAGE2,癌症/睾丸抗原1.2,CT1.2,MAGEA2A,MAGE-2抗原,癌症/睾丸抗原家族1成员2,癌症/睾丸抗原家族1成员2,黑素瘤抗原2,黑素瘤相关的抗原2;NCBI参考序

列:NP_001269434.1);MAGE-A3(MAGEA3,黑素瘤抗原家族A,3,MAGE3,MAGE-3抗原,抗原MZ2-D,黑素瘤相关的抗原3,癌症/睾丸抗原1.3,CT1.3,癌症/睾丸抗原家族1,成员3,HIP8,HYPD,MAGEA6,癌症/睾丸抗原家族1,成员3;NCBI参考序列:NP_005353.1);MAGE-A4(MAGEA4,黑素瘤抗原家族A,4,MAGE4,黑素瘤相关的抗原4,癌症/睾丸抗原1.4,CT1.4,MAGE-4抗原,MAGE-41抗原,MAGE-X2抗原,MAGE4A,MAGE4B,癌症/睾丸抗原家族1,成员4,MAGE-41,MAGE-X2,癌症/睾丸抗原家族1,成员4;NCBI参考序列:NP_001011550.1);MAGE-A6(MAGEA6,黑素瘤抗原家族A,6,MAGE6,MAGE-6抗原,黑素瘤相关的抗原6,癌症/睾丸抗原1.6,CT1.6,MAGE3B抗原,癌症/睾丸抗原家族1,黑素瘤抗原家族A6,成员6,MAGE-3b,MAGE3B,癌症/睾丸抗原家族1,成员6;NCBI参考序列:NP_787064.1);MAGE-A9(MAGEA9,黑素瘤抗原家族A,9,MAGE9,MAGE-9抗原,黑素瘤相关的抗原9,癌症/睾丸抗原1.9,CT1.9,癌症/睾丸抗原家族1,成员9,癌症/睾丸抗原家族1,成员9,MAGEA9A;NCBI参考序列:NP_005356.1);MAGE-C1(MAGEC1,黑素瘤抗原家族C,1,癌症/睾丸抗原7.1,CT7.1,MAGE-C1抗原,癌症/睾丸抗原家族7,成员1,CT7,癌症/睾丸抗原家族7,成员1,黑素瘤相关的抗原C1;NCBI参考序列:NP_005453.2);MAGE-C2(MAGEC2,黑素瘤抗原家族C,2,MAGEE1,癌症/睾丸抗原10,CT10,HCA587,黑素瘤抗原,家族E,1,癌症/睾丸特异性肝细胞癌相关的抗原587,MAGE-C2抗原,MAGE-E1抗原,肝细胞癌抗原587,黑素瘤相关的抗原C2;NCBI参考序列:NP_057333.1);乳球蛋白-A(SCGB2A2,食管鳞癌分泌素,家族2A成员2,MGB1,乳球蛋白1,UGB2,乳球蛋白A,乳球蛋白-A,乳球蛋白-1,乳腺珠蛋白家族2A成员2;NP);MART2(HHAT,刺猬酰基转移酶,SKI1,T细胞识别的黑素瘤抗原2,瘦刺猬蛋白1,Skn,T细胞识别的黑素瘤抗原2,蛋白-半胱氨酸N-棕榈酰基转移酶HHAT,EC 2.3.1.-;GenBank:AAH39071.1);M-CSF(CSF1,群落刺激因子1(巨噬细胞),MCSF,CSF-1,拉莫斯汀(lanimostim),巨噬细胞群落刺激因子因子1,拉莫斯汀;GenBank:AAH21117.1);MCSP(SMCP,精液线粒体相关的富半胱氨酸的蛋白,MCS,线粒体胶囊状蛋白,HSMCSGEN1,精液线粒体相关的富半胱氨酸蛋白;NCBI参考序列:NP_109588.2);XAGE-1b/GAGED2a;WT1(Wilms肿瘤1,WAGR,GUD,WIT-2,WT33,EWS的氨基末端域结构域,NPHS4,WT1的DNA-结合结构域的最后三个锌指,AWT1,Wilms肿瘤蛋白,EWS-WT1;GenBank:AAB33443.1);VEGF;酪氨酸酶(TYR;OCA1A;OCA1A;酪氨酸酶;SHEP;NP_000363.1;NM_000372.4;GenBank:AAB60319.1);TrpM4(BR22450,FLJ20041,TRPM4,TRPM4B,瞬时受体电位阳离子通道亚家族M成员4,Genbank登记号NM_01763);TRP2-INT2;TRP-2;TRP-1/gp75(酪氨酸酶相关的蛋白1,5,6-二羟吡啶-2-羧酸氧化酶,CAS2,CATB,TYRP,OCA3,接触酶素B,b-蛋白,糖蛋白75,EC 1.14.18.,黑素瘤抗原Gp75,TYRP1,TRP,TYRRP,TRP1,SHEP11,DHICA氧化酶,EC 1.14.18,GP75,EC 1.14.18.1;磷酸丙糖异构酶(磷酸丙糖异构酶1,TPID,磷酸丙糖异构酶,HEL-S-49,TIM,附睾分泌蛋白Li49,TPI,磷酸丙糖异构酶,EC 5.3.1.1;TRAG-3(CSAG家族成员2,癌症/睾丸抗原家族24,CSAG3B成员2,CSAG家族成员3B,癌症/睾丸抗原家族24成员2,癌症/睾丸抗原24.2,软骨肉瘤相关的基因2/3蛋白,紫杉酚抗性的相关的基因3蛋白,软骨肉瘤相关的基因2/3蛋白-Like,CT24.2,紫杉酚抗性相关的基因3,TRAG-3,CSAG3A,TRAG3);TMEM46(shisa同系物2(光滑爪蟾);SHISA;NP_001007539.1;NM_001007538.1;TMEM118(环指蛋白,跨膜蛋白2;RNFT2;FLJ1462;NP_001103373.1;NM_001109903.1;TMEFF1(具有EGF样的跨膜蛋白和两个卵泡抑素样结构域1;肿瘤抑素-H7365;C9orf2;C9ORF2;U19878;X83961;NM_080655;NM_

003692;TGF- β R11 (TGFB2,转化生长因子, β 受体II (70/80kDa),TGFB-R11,MFS2,tBR-II,TGFR-2,TGF- β 受体IIB型,TGF-B11型受体,TGF- β 受体2型,EC 2.7.11.30,转化生长因子 β 受体IIC型,AAT3,tBR-II,转化生长因子, β 受体II (70-80kD),TGF- β 受体II型、FAA3,转化生长因子- β 受体II型,LDS1B,HNPCC6,LDS2B,LDS2,RIIC,EC 2.7.11,TAAD2;TENB2 (TMEFF2,肿瘤抑素,TPEF,HPP1,TR,推定跨膜蛋白聚糖,与EGF/生长因子的神经调节蛋白家族和卵泡抑素相关);374aa,NCBI登记号:AAD55776,AAF91397,AAG49451,NCBI参考序列:NP_057276;NCBI基因:23671;OMIM:605734;SwissProt Q9UIK5;Genbank登记号AF179274;AY358907,CAF85723,CQ782436;TAG-2;TAG-1 (接触蛋白2 (轴突),TAG-1,AXT,轴突糖蛋白-1细胞粘附分子,TAX,接触蛋白2 (瞬时表达),TAX1,接触蛋白-2,轴突糖蛋白TAG-1,瞬时表达的轴突糖蛋白,瞬时轴突糖蛋白,轴突糖蛋白-1,TAX-1,TAG1,FAME5;PRF:444868);SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白;生存素;STEAP2 (HGNC_8639,IPCA-1,PCANAP1,STAMP1,STEAP2,STMP,前列腺癌相关的基因1,前列腺癌相关的蛋白1,前列腺六跨膜上皮抗原2,六跨膜前列腺蛋白,Genbank登记号AF45513;STEAP1 (前列腺六跨膜上皮抗原,Genbank登记号NM_01244;SSX-4;SSX-2 (SSX2,滑液肉瘤,X断点2,X断点2,SSX,X断点2B,癌症/睾丸抗原5.2,X-染色体-相关的2,肿瘤抗原HOM-MEL-40,CT5.2,HD21,癌症/睾丸抗原家族5,HOM-MEL-40,同种型B,癌症/睾丸抗原家族5成员2a成员2a,蛋白SSX2,肉瘤,肉瘤,滑液,X-染色体相关的2,滑液,滑液肉瘤,X断点2B,滑液肉瘤,SSX2A;Sp17;SOX10 (SRY (性别决定区Y)-盒10,小鼠,PCWH,DOM,WS4,WS2E,WS4C,显性巨结肠,小鼠,其人同系物,显性巨结肠,SRY相关的HMG-盒基因10,其人同系物,转录因子SOX-10;GenBank:CAG30470.1);SNRPD1 (小核核糖核蛋白D1,小核核糖核蛋白D1,多肽16kDa,多肽 (16kD),SNRPD,HsT2456,Sm-D1,SMD1,Sm-D自身抗原,小核核糖核蛋白D1多肽16kDa假基因,SnRNP核蛋白D1,小核核糖核蛋白Sm D1;SLC35D3 (溶质载体家族35,成员D3,FRCL1,边缘连接样蛋白1,bA55K22.3,Frc,边缘样1,溶质载体家族35成员D3;NCBI GenBank:NC_000006.11NC_018917.2 NT_025741.16);SIRT2 (长寿蛋白2,NAD依赖性脱乙酰基酶长寿蛋白-2,SIRL2,静默交配型信息调节蛋白2,调节蛋白SIR2同系物2,Sir2相关的蛋白型2,SIR2样蛋白2,长寿蛋白型2,长寿蛋白 (静默交配型信息调节蛋白2同系物)2 (酿酒酵母),长寿蛋白-2,长寿蛋白 (静默交配型信息调节蛋白2,酿酒酵母,同系物)2,EC 3.5.1.,SIR2;GenBank:AAK51133.1);Sema 5b (FLJ10372,KIAA1445,Mm.42015,SEMA5B,SEMA5B、脑信号蛋白 (Semaphorin) 5b Hlog、sema域、七凝血栓蛋白重复 (1型和1型样的)、跨膜域 (TM) 和短胞质域、(脑信号蛋白) 5B);Genbank登记号AB04087;分离蛋白1 (SCRN1,SES1,KIAA0193,secerin-1;GenBank:EAL24458.1);SAGE (SAGE1,肉瘤抗原1,癌症/睾丸抗原14,CT14,推定肿瘤抗原;NCBI参考序列:NP_061136.2);RU2AS (KAAG1,肾相关抗原1,RU2AS,RU2反义基因蛋白,肾相关的抗原1;GenBank:AAF23613.1);RNF43-E3泛激素-蛋白连接酶RNF43前体 [智人],RNF124;URCC;NCBI参考序列:NP_060233.3;RhoC (RGS5 (G-蛋白信号传导因子5,MSTP032,G-蛋白信号传导因子5,MSTP092,MST092,MSTP106,MST106,MSTP129,MST129;GenBank:AAB84001.1);RET (ret原-致癌基因;MEN2A;HSCR1;MEN2B;MTC1;PTC;CDHF12;Hs.168114;RET51;RET-ELE;NP_066124.1;NM_020975.4);RBAF600 (UBR4,泛激素蛋白连接酶E3组分,N-细胞识别素4,锌指,UBR1型1,ZUBR1,E3泛激素-蛋白连接酶UBR4,RBAF600,600KDa眼癌蛋白相关因子,锌指UBR1型蛋白1,EC 6.3.2.,N-细胞识别素-4,KIAA0462,

p600, EC 6.3.2, KIAA1307; GenBank: AAL83880.1); RAGE-1 (MOK, MOK蛋白激酶, 肾肿瘤抗原, RAGE, MAPK/MAK/MRK重叠激酶, 肾肿瘤抗原1, 肾细胞癌抗原, RAGE-1, EC 2.7.11.22, RAGE1; UniProtKB/Swiss-Prot: Q9UQ07.1); RAB38/NY-MEL-1 (RAB38, NY-MEL-1, RAB38, 成员RAS致癌基因家族, 黑素瘤抗原 NY-MEL-1, Rab相关GTP结合蛋白, Ras相关蛋白Rab-38, rrGTPbp; GenBank: AAH15808.1); PTPRK (DJ480J14.2.1 (蛋白酪氨酸磷酸酶, 受体型, K R-PTP- κ , 蛋白酪氨酸磷酸酶 κ , 蛋白酪氨酸磷酸酶 κ), 蛋白酪氨酸磷酸酶, 受体型, K, 蛋白-酪氨酸磷酸酶 κ , 蛋白-酪氨酸磷酸酶, 受体型, κ , R-PTP- κ , 受体型酪氨酸-蛋白磷酸酶 κ , EC 3.1.3.48, PTPK; GenBank: AAI44514.1); PSMA; PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008016Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12基因, Genbank登记号AY358628); PSCA (前列腺干细胞抗原前体, Genbank登记号AJ29743; PRDX5 (过氧化物还原蛋白5, EC 1.11.1.15, TPx型VI, B166, 抗氧化物酶 B166, HEL-S-55, 肝组织2D-Page Spot 71B, PMP20, 过氧化物酶病抗氧化物酶, PRDX6, 硫氧还蛋白过氧化物酶PMP20, PRXV, AOEB166, 附睾分泌蛋白Li 55, Alu共阻遏因子1, 过氧化物还原蛋白-5, 线粒体, 过氧化物还原蛋白V, prx-V, 硫氧还蛋白还原酶, Prx-V, ACR1, Alu共阻遏因子, PLP; GenBank: CAG33484.1); PRAME (黑素瘤中的优先表达抗原, 黑素瘤的优先表达抗原, MAPE, OIP-4, OIPA, CT130, 癌症/睾丸抗原130, 优先表达于肿瘤中的黑素瘤抗原, Opa-相互作用蛋白蛋白4, Opa-相互作用蛋白蛋白OIP4; GenBank: CAG30435.1); pm1-RAR α 融合蛋白; PMEL17 (银同系物; SILV; D12S53E; PMEL17; SI; SIL); ME20; gp10 BC001414; BT007202; M32295; M77348; NM_006928; PBF (ZNF395, 锌指蛋白395, PRF-1, 亨廷顿病调节因子, HD基因调节区结合蛋白, 区结合蛋白2, 蛋白2, 乳头状瘤病毒调节因子1, HD调节因子2, 乳头状瘤病毒调节因子, PRF1, HDBP-2, Si-1-8-14, HDBP2, 亨廷顿病基因调节区结合蛋白2, HDRF-2, 乳头状瘤病毒调节因子PRF-1, PBF; GenBank: AAH01237.1); PAX5 (配对盒5, 配对盒同源异型基因5, BSAP, 配对盒蛋白Pax-5, B细胞系特异性活化因子, 配对结构域基因5, 配对盒基因5 (B细胞系特异性活化因子蛋白), B细胞特异性转录因子, 配对盒基因5 (B细胞系特异性活化因子); PAP (REG3A, 再生胰岛衍生3 α , INGAP, PAP-H, 肝肠胰蛋白, PBBCGF, 人前胰岛肽, REG-III, 胰腺炎相关的蛋白1, Reg3, Reg III- α , 肝癌-肠-胰, 再生胰岛衍生蛋白III- α , 胰腺 β 细胞生长因子, HIP, PAP同源蛋白, HIP/PAP, 增殖诱导的蛋白34, PAP1, 增殖诱导的蛋白42, REG-3- α , 再生胰岛衍生蛋白3- α , 胰腺炎相关的蛋白; GenBank: AAH36776.1); p53 (TP53, 肿瘤蛋白P53, TPR53, P53, 细胞肿瘤抗原P53, 抗原NY-CO-13, 突变肿瘤蛋白53, 磷蛋白P53, P53肿瘤抑制子, BCC7, 转化相关的蛋白53, LFS1, 肿瘤蛋白53, Li-Fraumeni综合征, 肿瘤抑制子P53; P2X5 (嘌呤能受体P2X配体门控离子通道5, 由细胞外ATP门控的离子通道, 可能参与突触传导及神经生成, 缺乏可有助于特发性逼尿肌不稳定的病理生理学); 422aa), pI: 7.63, MW: 47206TM: 1 [P] 基因染色体: 17p13.3, Genbank登记号NP_002552.; 0GT (O-连接的N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 转移酶, O-GlcNAc转移酶P110亚基, O-连接的N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 转移酶 (UDP-N-乙酰氨基葡萄糖: 多肽-N-乙酰基葡萄糖氨基转移酶, UDP-N-乙酰氨基葡萄糖--肽N-乙酰基葡萄糖氨基转移酶110KDa亚基, UDP-N-乙酰氨基葡萄糖: 多肽-N-乙酰基葡萄糖氨基转移酶, 尿苷二磷酸-N-乙酰氨基葡萄糖: 多肽 β -N-乙酰基葡萄糖氨基转移酶, O-GlcNAc转移酶亚基P110, EC 2.4.1.255, O连接的N-乙酰氨基葡萄糖转移酶110KDa亚基, EC 2.4.1, HRNT1, EC 2.4.1.186, O-GLCNAC; GenBank: AAH38180.1); OA1 (骨关节炎QTL 1, OASD;

GenBank:CAA88742.1); NY-ESO-1/LAGE-2(癌症/睾丸抗原1B,CTAG1B,NY-ESO-1, LAGE-2, ESO1,CTAG1,CTAG,LAGE2B,癌症/睾丸抗原1,自 体免疫癌症/睾丸抗原NY-ESO-1,癌症抗原3,癌症/睾丸抗原6.1, 纽约食道鳞状细胞癌1,L抗原家族成员2,LAGE2,CT6.1, LAGE2A; GenBank:AAI30365.1);NY-BR-1(ANKRD30A,锚定蛋白重复结构域30A,乳腺癌抗原NY-BR-1,血清学界定的乳腺癌抗原NY-BR-1,包含锚定蛋白重复结构域的蛋白30A;NCBI参考序列:NP_443723.2);N-ras(NRAS,成神经细胞瘤RAS病毒(V-Ras)致癌 基因同系物,NRAS1,转化蛋白N-Ras,GTPase NRas,ALPS4, N-Ras蛋白部分4,NS6,致癌基因同系物,HRAS1;GenBank:AAH05219.1);NFYC(核转录因子Y, γ , HAP5,HSM,核转录因子Y亚基C,反式活化因子HSM-1/2,CCAAT结合因子亚基C, NF-YC,CCAAT转录结合因子亚基 γ ,CAAT Box DNA结合蛋白亚基C,组蛋白H1转录因子大亚基2A,CBFC,核转录因子Y亚基 γ ,CBF-C,反式活化因子HSM-1,H1TF2A,转录因子NF-Y,C亚基;新-PAP(PAPOLG,聚(A)聚合酶 γ ,新-聚(A)聚合酶,核聚(A)聚合酶 γ ,多核苷酸腺苷酰转移酶 γ ,SRP RNA 3'腺苷化酶/Pap2, PAP- γ ,新-PAP,SRP RNA3'-腺苷化酶,PAP2,EC 2.7.7.19,PAPG; NCBI参考序列:NP_075045.2);NCA(CEACAM6, Genbank登记号 M1872);Napi3b(NAPI-3B,NPTIIb,SLC34A2、溶质载体家族34(磷酸钠)成员2、II型钠依赖性磷酸转运蛋白3b,Genbank登记号 NM_00642);肌球蛋白I类;MUM-3;MUM-2(TRAPPC1,运输蛋白粒子复合物1,BET5,BET5同系物,MUM2,黑素瘤扩散突变2,多发性骨髓瘤蛋白2,运输蛋白粒子复合物亚基1;MUM-1f;粘蛋白(MUC1,粘蛋白1,细胞表面相关,PEMT,PUM,CA15-3, MCKD1,ADMCKD,髓质囊性肾病1(常染色体显性),ADMCKD1,粘蛋白1,跨膜,CD227,乳腺癌相关的抗原DF3,MAM6,癌症抗原15-3,MCD,恶性肿瘤相关的粘蛋白,MCKD,间质肺部疾病-6,MUC-1/SEC,花生反应性尿粘蛋白,MUC1/ZD,肿瘤相关上皮膜抗原,DF3抗原,肿瘤相关粘蛋白,episialin,EMA,H23抗原, H23AG,粘蛋白-1,KL-6,肿瘤相关的上皮粘蛋白,MUC-1, Episialin,PEM,CD227抗原;UniProtKB/Swiss-Prot:P15941.3);MUC5AC(粘蛋白5AC,寡聚黏液/凝胶形成,气管支气管粘蛋白, MUC5,TBM,粘蛋白5,亚型A和C,气管支气管/胃,leB,胃粘蛋白,粘蛋白5AC,寡聚黏液/凝胶形成假基因,Lewis B血型抗原,LeB,主要气道糖蛋白,MUC-5AC,粘蛋白-5亚型AC,气管支气管;MUC1(粘蛋白1,细胞表面相关,PEMT,PUM,CA15-3, MCKD1,ADMCKD,髓质囊性肾病1(常染色体显性),ADMCKD1,粘蛋白1,跨膜,CD227,乳腺癌相关的抗原DF3,MAM6,癌症抗原15-3,MCD,恶性肿瘤相关的粘蛋白,MCKD,间质肺部疾病-6,MUC-1/SEC,花生反应性尿粘蛋白,MUC-1/X,多形上皮粘蛋白,MUC1/ZD,肿瘤相关上皮膜抗原,DF3抗原,肿瘤相关粘蛋白,episialin,EMA,h23抗原, H23AG,粘蛋白-1,KL-6,肿瘤相关上皮粘蛋白,MUC-1,Episialin,PEM,CD227抗原;MSG783(RNF124,假定蛋白FLJ20315,Genbank登记号NM_01776;MRP4-多药物抗性相关的蛋白4同种型3,MOAT-B;MOATB[智人]; NCBI参考序列:NP_001288758.1;MPF(MPF,MSLN,SMR,巨核细胞促进因子,间皮素,Genbank登记号NM_00582;MMP-7(MMP7,间质酶,MPSL1,基质蛋白,基质金属蛋白酶7(间质酶,子宫),子宫间质酶,基质金属蛋白酶-7,EC 3.4.24.23,Pump-1蛋白酶,基质蛋白,子宫金属蛋白酶,PUMP1,MMP-7,EC 3.4.24, PUMP-1;GenBank:AAC37543.1);MMP-2(MMP2,基质金属蛋白酶2(白明胶酶A,72kDa白明胶酶,72kDa IV型胶原酶),MONA, CLG4A,基质金属蛋白酶2(白明胶酶A,72kDa白明胶酶,72kDa IV型胶原酶),CLG4,72kDa白明胶酶,72kDaIV型胶原酶),基质金属蛋白酶-2,MMP-II,72KDa白明胶酶,胶原酶IV型-A,MMP-2,基质金属蛋白酶-II,TBE-1,中性粒细胞白明胶酶,EC 3.4.24.24,EC

3.4.24; GenBank: AAH02576.1); 以及 Meloe。

[0154] 例如, 在一些情况中, 抗CD3抗体, 其具有包含至少HVR-L3 序列TQSFILRT (SEQ ID NO:6) 和选自以下的1、2、3、4或5个 HVR的第一结合结构域: (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4; 以及(e) HVR-L2, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 5, 可具有结合Ly6G6D的第二结合结构域。在一些情况中, 结合 CD3的第一结合结构域包含分别包含序列SEQ ID NO:9-12的重链框架区FR-H1、FR-H2、FR-H3以及FR-H4中的至少一个(例如, 1、2、3或4个), 和/或分别包含序列SEQ ID NO:13-16的轻链框架区FR-L1、FR-L2、FR-L3以及FR-L4中的至少一个(例如, 1、2、3或4个)。在一些情况中, 结合CD3的第一结合结构域可例如包含VL 结构域, 所述VL结构域包含与序列SEQ ID NO:8具有至少90%序列同一性(例如, 至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或序列SEQ ID NO:8。在一些情况中, 结合CD3的第一结合结构域可例如包含(a) VL结构域和(b) VH结构域, 所述VL结构域包含与序列SEQ ID NO:8具有至少90%序列同一性(例如, 至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或序列SEQ ID NO:8, 所述 VH结构域包含与序列SEQ ID NO:7具有至少90%序列同一性(例如, 至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或序列SEQ ID NO:7, 诸如本文描述的抗 CD3抗体38E4v11所具有的结构域。

[0155] 在其他情况中, 抗CD3抗体, 其具有包含至少1、2、3、4、5 或6个选自以下的HVR的第一结合结构域: (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5; 以及(f) HVR-L3, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 6, 诸如38E4v11, 可具有结合除免疫效应细胞之外的靶细胞上的细胞表面抗原(例如, 肿瘤抗原)的第二结合结构域。

[0156] 在一些情况中, 细胞表面抗原可在靶细胞上以低拷贝数表达。例如, 在一些情况中, 细胞表面抗原可以以小于35,000个拷贝/靶细胞表达或存在。在一些实施方案中, 低拷贝数细胞表面抗原以在100 个拷贝/靶细胞与35,000个拷贝/靶细胞之间; 在100个拷贝/靶细胞与 30,000个拷贝/靶细胞之间; 在100个拷贝/靶细胞与25,000个拷贝/靶细胞之间; 在100个拷贝/靶细胞与20,000个拷贝/靶细胞之间; 在 100个拷贝/靶细胞与15,000个拷贝/靶细胞之间; 在100个拷贝/靶细胞与10,000个拷贝/靶细胞之间; 在100个拷贝/靶细胞与5,000个拷贝/靶细胞之间; 在100个拷贝/靶细胞与2,000个拷贝/靶细胞之间; 在100个拷贝/靶细胞与1,000个拷贝/靶细胞之间; 或在100个拷贝/靶细胞与500个拷贝/靶细胞之间存在。细胞表面抗原的拷贝数可例如使用标准Scatchard曲线图测定。

[0157] 在一些情况中, 抗CD3抗体, 其具有包含至少1、2、3、4、5 或6个选自以下的HVR的第一结合结构域: (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5; 以及(f) HVR-L3, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 6, 诸如38E4v11, 可具有结合Ly6G6D的第二结合结构域。取决于 靶细胞, Ly6G6D可以低拷贝数表达或存在于靶细胞上, 例如, 约 20,000个拷贝/靶细胞至约30,

000个拷贝/靶细胞(例如,在约20,000个拷贝/靶细胞至约25,000个拷贝/靶细胞或在约25,000个拷贝/靶细胞至约30,000个拷贝/靶细胞)。可使用标准Scatchard曲线图测定Ly6G6D的拷贝数。在一些情况中,结合CD3的第一结合结构域包含分别包含序列SEQ ID NO:9-12的重链框架区FR-H1、FR-H2、FR-H3以及FR-H4中的至少一个(例如,1、2、3或4个),和/或分别包含序列SEQ ID NO:13-16的轻链框架区FR-L1、FR-L2、FR-L3以及FR-L4中的至少一个(例如,1、2、3或4个)。在一些情况中,结合CD3的第一结合结构域可例如包含VL结构域,所述VL结构域包含与序列SEQ ID NO:8具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或序列SEQ ID NO:8。在一些情况中,结合CD3的第一结合结构域可例如包含(a) VL结构域和(b) VH结构域,所述VL结构域包含与序列SEQ ID NO:8具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或序列SEQ ID NO:8,所述VH结构域包含与序列SEQ ID NO:7具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或序列SEQ ID NO:7,诸如本文描述的抗CD3抗体38E4v11所具有的结构域。

[0158] 在其他情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域:(a) HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1;(b) HVR-H2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:2;(c) HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3;(d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4;(e) HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f) HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合CD20的第二结合结构域。结合CD20的第二结合结构域可例如包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的高变区(HVR):(a) HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:17;(b) HVR-H2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:18;(c) HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:19;(d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:20;(e) HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:21;以及(f) HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:22,诸如抗CD20抗体2H7.v16所具有的结构域(描述于美国专利号7,799,900中)。在一些情况中,结合CD20的第二结合结构域包含分别包含序列SEQ ID NO:23-26的重链框架区FR-H1、FR-H2、FR-H3以及FR-H4中的至少一个(例如,1、2、3或4个),和/或分别包含序列SEQ ID NO:27-30的轻链框架区FR-L1、FR-L2、FR-L3以及FR-L4中的至少一个(例如,1、2、3或4个)。在一些情况中,结合CD20的第二结合结构域可例如包含(a) VH结构域,其包含与序列SEQ ID NO:31具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或序列SEQ ID NO:31;(b) VL结构域,其包含与序列SEQ ID NO:32具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或序列SEQ ID NO:32;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域,诸如抗CD20抗体2H7.v16所具有的结构域(如美国专利号7,799,900中所述)。

[0159] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域:(a) HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1;(b) HVR-H2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:2;(c) HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3;(d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4;(e) HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f) HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合FcRH5的第二结合结构域。结合

FcRH5的第二结合结构域可例如包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的高变区(HVR): (a) HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:33; (b) HVR-H2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:34; (c) HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:35; (d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:36; (e) HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:37;以及(f) HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:38,诸如抗FcRH5抗体1G7所具有的结构域。在一些情况中,结合FcRH5的第二结合结构域包含分别包含序列SEQ ID NO:39-42的重链框架区FR-H1、FR-H2、FR-H3以及FR-H4中的至少一个(例如,1、2、3或4个),和/或分别包含序列SEQ ID NO:43-46的轻链框架区FR-L1、FR-L2、FR-L3以及FR-L4中的至少一个(例如,1、2、3或4个)。在一些情况中,结合FcRH5的第二结合结构域可例如包含(a) VH结构域,其包含与序列SEQ ID NO:47具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或序列SEQ ID NO:47; (b) VL结构域,其包含与序列SEQ ID NO:48具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或序列SEQ ID NO:48;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0160] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域: (a) HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f) HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合PMEL17的第二结合结构域。

[0161] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域: (a) HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f) HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合LY6E的第二结合结构域。

[0162] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域: (a) HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f) HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合CD19的第二结合结构域。

[0163] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域: (a) HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f) HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合CD33的第二结合结构域。

[0164] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域: (a) HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f) HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合CD22的第二结合结构域。

[0165] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5 或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域:(a)HVR-H1,其 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3;(d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f)HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合CD79A的第二结合结构域。

[0166] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5 或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域:(a)HVR-H1,其 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3;(d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f)HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合CD79B的第二结合结构域。

[0167] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5 或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域:(a)HVR-H1,其 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3;(d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f)HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合EDAR的第二结合结构域。

[0168] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5 或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域:(a)HVR-H1,其 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3;(d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f)HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合GFRA1的第二结合结构域。

[0169] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5 或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域:(a)HVR-H1,其 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3;(d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f)HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合MRP4的第二结合结构域。

[0170] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5 或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域:(a)HVR-H1,其 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3;(d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f)HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合RET的第二结合结构域。结合RET的第二结合结构域可例如包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的高变区(HVR):(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:49;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:50;(c)HVR-H3,其 包含氨基酸序列SEQ ID NO:51;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:52;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:53;以及(f)HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:54,诸如抗RET抗体41205.v6所具有的结构域。在一些情况中,结合RET的第二结合 结构域可例如包含(a)VH结构域,其包含与序列SEQ ID NO:55具有 至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或序列SEQ ID NO:55;(b)VL结构域,其包含与序列SEQ ID NO:56具有至少90% 序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸

序列或序列SEQ ID NO:56;或 (c) 如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0171] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5 或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域:(a)HVR-H1,其 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3;(d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f)HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合Steap1的第二结合结构域。

[0172] 在一些情况中,抗CD3抗体,其具有包含至少1、2、3、4、5 或6个选自以下的高变区(HVR)的第一结合结构域:(a)HVR-H1,其 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3;(d) HVR-L1,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:5;以及(f)HVR-L3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:6,诸如38E4v11,可具有结合TenB2的第二结合结构域。

[0173] 在一些实施方案中,双特异性抗体也可用于将细胞毒性剂定位 于表达肿瘤抗原的细胞中,诸如表1中所列出的肿瘤抗原(例如, Ly6G6D、CD20、FcRH5、HER2、LYPD1、PMEL17、LY6E、CD19、CD33、CD22、CD79A、CD79B、EDAR、GFRA1、MRP4 、RET、Steap1或TenB2)。双特异性抗体也可制备成全长抗体或抗 体片段。

[0174] 用于制造多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的 两个免疫球蛋白重链-轻链配对的重组共表达(参见Milstein和Cuello, Nature 305:537(1983)),WO 93/08829,以及Traunecker等人,EMBO J.10:3655(1991)),以及“旋钮入孔洞(knob-in-hole)”工程改造(参见 例如,美国专利号5,731,168)。多特异性抗体的“旋钮入孔洞”工程改 造可用于产生包含旋钮的第一臂和包含所述第一臂的旋钮可结合的 孔洞的第二臂。在一个实施方案中,本发明的多特异性抗体的旋钮 可为抗CD3臂。可选地,在一个实施方案中,本发明的多特异性抗 体的旋钮可为抗靶/抗原臂。在一个实施方案中,本发明的多特异性 抗体的孔洞可为抗CD3臂。可选地,在一个实施方案中,本发明的 多特异性抗体的孔洞可为抗靶/抗原臂。也可使用免疫球蛋白转换(也 称为Fab结构域交换或CrossMab形式)技术对多特异性抗体进行工程 改造(参见例如W02009/080253;Schaefer等人, Proc.Natl.Acad.Sci. USA,108:11187-11192(2011))。也可通过以下技术制造多特异性抗体 :对用于制造抗体Fc异源二聚分子的静电转向效应进行工程改造 (W0 2009/089004A1);交联两个或更多个抗体或片段(参见例如,美 国专利号4,676,980,和Brennan等人,Science,229:81(1985));使用 亮氨酸拉链产生双特异性抗体(参见例如,Kostelny 等人,J. Immunol.,148(5):1547-1553(1992));使用“双抗体”技术制造双特异 性抗体片段(参见例如,Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:6444-6448(1993));以及使用单链Fv(sFv)二聚物(参见例如, Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994));以及如例 如,Tutt等人. J.Immunol.147:60(1991)中所描述制备三特异性抗体。

[0175] 本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化 抗体,包括“章鱼抗体”(参见例如US 2006/0025576A1)。

[0176] 抗体或其片段也包括“双重作用性FAb”或“DAF”,其包含结合 CD3以及另一不同抗原(例如,第二生物分子)的抗原结合位点(参见 例如,US2008/0069820)。

[0177] 7.抗体变体

[0178] 在某些实施方案中,涵盖本发明的抗CD3抗体的氨基酸序列变 体(例如,本发明的

结合CD3和第二生物分子(例如细胞表面抗原,例如肿瘤抗原)的双特异性抗CD3抗体,例如具有高亲和力(例如,38E4v11)),诸如本发明的TDB抗体或变体)。例如,可能需要改善抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。可以通过将合适的修饰引入编码抗体的核苷酸序列中,或者通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如抗体的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。可对缺失、插入和取代进行任何组合以获得最终构建体,其限制条件为最终构建体具有所需特征,例如抗原结合性。

[0179] a.取代、插入和缺失变体

[0180] 在某些实施方案中,提供具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。用于取代性诱变的目标位点包括HVR和FR。保守性取代展示于表2中的标题“优选取代”下。更实质性变化提供于表2中的标题“示例性取代”下,且如以下关于氨基酸侧链类别进一步描述。氨基酸取代可引入目标抗体和经筛选所需活性(例如,保留的/改善的抗原结合性、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC)的产物中。

[0181] 表2. 示例性和优选的氨基酸取代

[0182]

原始残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu

[0183]	原始残基	示例性取代	优选取代
	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Val; Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0184] 可根据共同的侧链特性来将氨基酸分组：

[0185] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0186] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0187] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0188] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0189] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0190] (6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

[0191] 非保守性取代将需要将这些类别中的一类的成员更换成另一类别。

[0192] 一类取代变体牵涉取代亲本抗体（例如人源化或人抗体）的一个或多个高变区残基。一般说来，选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体将在某些生物特性方面具有改变（例如改善）（例如亲和力增加、免疫原性降低）和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物特性。示例性取代变体为亲和力成熟抗体，其可例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术（诸如本文描述的那些技术）便利地产生。简而言之，使一个或多个HVR残基突变，并且使变体抗体展示在噬菌体上并针对特定生物活性（例如结合亲和力）进行筛选。

[0193] 可在HVR中进行改变（例如取代），例如以改善抗体亲和力。此类改变可在HVR“热点”，即，由在体细胞成熟过程中以高频率发生突变的密码子所编码的残基（参见例如，Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)）和/或接触抗原的残基中进行，并且测试所得变异VH或VL的结合亲和力。通过构建二级文库并自其进行再选择来实现亲和力成熟已例如描述于Hoogenboom等人Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等人编，人Press, Totowa, NJ, (2001)。）中。在亲和力成熟的一些实施方案中，通过多种方法（例如易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变）中的任一种将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后创建二级文库。然后筛选文库以鉴别具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一方法涉及HVR定向方法，其中使若干HVR残基（例如一次4-6个残基）随机化。可例如使用丙氨酸扫描诱变或模型化来特异性地鉴别抗原结合中涉及的HVR残基。特别地，通常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0194] 在某些实施方案中，取代、插入或缺失可发生在一个或多个HVR内，只要这些改变

基本上不降低抗体结合抗原的能力即可。例如,可在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守性改变(例如如本文所提供的保守性取代)。例如,此类变化可以在HVR中的抗原接触残基外部。在以上提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,各HVR未被改变或含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0195] 一种可用于鉴定抗体中可以作为诱变靶的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如由Cunningham和Wells (1989) Science, 244:1081-1085所描述。在此方法中,鉴定残基或靶残基的组(例如,带电荷的残基诸如arg、asp、his、lys和glu),并用中性或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或聚丙氨酸)置换以测定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可在对初始取代显示功能敏感性的氨基酸位置上引入进一步取代。可选地或另外,抗原-抗体复合物的晶体结构用来鉴别抗体与抗原之间的接触点。此类接触残基和相邻残基可作为取代的候选物而被靶向或消除。可筛选变体以确定其是否含有所需特性。

[0196] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的范围内的氨基末端和/或羧基末端融合,以及具有单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N端或C端与酶(例如对于ADEPT)或延长抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

[0197] b.糖基化变体

[0198] 在某些实施方案中,可改变本发明的抗CD3抗体(例如,本发明的结合CD3和第二生物分子(例如细胞表面抗原,例如肿瘤抗原)的双特异性抗CD3抗体,优选具有高亲和力(例如,38E4v11),诸如本发明的TDB抗体或其变体)以增加或减少抗体糖基化的程度。对本发明的抗CD3抗体添加糖基化位点或使抗体缺失糖基化位点可通过改变氨基酸序列以使得产生或除去一个或多个糖基化位点来便利地实现。

[0199] 当抗体包含Fc区时,可改变与其连接的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含一般通过N-键连接到Fc区的CH2域的Asn297的分支双触角寡糖。参见例如,Wright等人.TIBTECH 15:26-32 (1997)。寡糖可包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及连接到双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可对本发明的抗体中的寡糖进行修饰以产生具有某些改善特性的抗体变体。

[0200] 在一个实施方案中,提供具有缺乏(直接或间接)连接到Fc区上的岩藻糖的碳水化合物结构的抗CD3抗体变体。例如,此类抗体中的岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。如通过MALDI-TOF质谱测定法测量的,通过相对于连接于Asn297的所有糖结构(例如,复合的、杂合的和高甘露糖的结构)的总和,计算Asn297处糖链内岩藻糖的平均量来确定岩藻糖的量,例如如描述于WO 2008/077546。Asn297是指位于Fc区中大致位置297(Fc区残基的EU编号)上的天冬酰胺残基;然而,Asn297也可由于抗体中的微小序列变化而位于位置297的上游或下游约±3个氨基酸处,即在位置294与300之间。此类岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。参见例如美国专利公布号US 2003/0157108号(Presta, L.);US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺乏型”抗体变体相关的公布文献的实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;

WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki等人. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki等人. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括缺乏蛋白质岩藻糖基化的Lec13CHO细胞 (Ripka等人. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); 美国专利申请号US 2003/0157108A1, Presta, L; 以及WO 2004/056312A1, Adams等人, 尤其在实施例11), 以及基因敲除细胞系, 诸如 α -1,6-岩藻糖转移酶 基因、FUT8、基因敲除CHO细胞 (参见例如, Yamane-Ohnuki等人. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004); Kanda, Y. 等人, Biotechnol. Bioeng., 94 (4):680-688 (2006); 以及WO2003/085107)。

[0201] 进一步提供具有二等分寡糖的抗CD3抗体变体, 例如其中连接到抗体的Fc区的双触角寡糖是由GlcNAc二等分。此类抗体变体可具有降低的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人); 美国专利号 6,602,684 (Umana等人); 及US 2005/0123546 (Umana等人)。还提供在连接到Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可具有改善的CDC功能。这类抗体变体例如描述于WO 1997/30087 (Patel等人); WO 1998/58964 (Raju, S.); 及WO 1999/22764 (Raju, S.) 中。

[0202] c. Fc区变体

[0203] 在某些实施方案中, 一个或多个氨基酸序列修饰可引入到本发明的抗CD3抗体的Fc区 (例如, 本发明的结合CD3和第二生物分子 (例如细胞表面抗原, 例如肿瘤抗原) 的双特异性抗CD3抗体, 优选具有高亲和力 (例如, 3E4v11), 诸如本发明的TDB抗体或其变体), 从而产生Fc区变体 (参见例如US 2012/0251531)。Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置包含氨基酸修饰 (例如, 取代) 的人Fc区序列 (例如, 人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区)。

[0204] 在某些实施方案中, 本发明涵盖具有一些而非所有效应子功能的抗CD3抗体变体, 所述效应子功能使所述抗体变体成为抗体的体内半衰期较为重要但某些效应子功能 (诸如补体和ADCC) 不必要或有 害的应用所需要的候选物。可进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的降低/减少。例如, 可以进行Fc受体 (FcR) 结合测定以确保抗体缺乏Fc γ R结合 (因此有可能缺乏ADCC活性), 但是保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII, 而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。FcR在造血细胞上的表达概述于Ravetch和Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991) 第464页上的表3中。评估目标分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例描述于在美国专利号5,500,362 (参见例如, Hellstrom, I.等人. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) 和 Hellstrom, I等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (参见Bruggemann, M.等人, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987))。可替代地, 可采用非放射性测定方法 (参见例如用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定 (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA); 以及CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定 (Promega, Madison, WI)。用于此类测定的有效效应细胞包括外周血液单核细胞 (PBMC) 和自然杀伤 (NK) 细胞。或者或另外, 可以在体内评估目标分子的ADCC活性, 例如在动物模型中, 诸如公开于Clynes等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) 的动物模型中。还可进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q并且因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合 ELISA。为评估补体活化, 可以进行CDC

测定(参见例如 Gazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S 等人, Blood. 101:1045-1052 (2003); 和 Cragg, M.S. 和 M.J. Glennie Blood. 103:2738-2743 (2004))。也可以使用本领域中已知的方法来实施 FcRn 结合和体内清除/半衰期测定(参见例如 Petkova, S.B. 等人, Int'l Immunol. 18 (12):1759-1769 (2006))。

[0205] 具有降低的效应功能的抗体包括具有 Fc 区残基 238、265、269、270、297、327 和 329 中的一个或多个的取代的那些抗体(美国专利号 6,737,056 和 8,219,149)。此类 Fc 突变体包括在氨基酸位置 265、269、270、297 和 327 中的两个或更多个处具有取代的 Fc 突变体,包括残基 265 和 297 取代成丙氨酸的所谓“DANA”Fc 突变体(美国专利号 7,332,581 和 8,219,149)。

[0206] 在某些实施方案中,抗体中的野生型人 Fc 区的位置 329 上的脯氨酸经过甘氨酸或精氨酸或大到足以破坏在 Fc 的脯氨酸 329 与 FcγRIII 的色氨酸残基 Trp 87 及 Trp 110 之间所形成的 Fc/Fcγ 受体界面内的脯氨酸夹层的氨基酸残基取代(Sondermann 等人, Nature. 406, 267-273, 2000)。在某些实施方案中,所述抗体包含至少一个另外的氨基酸取代。在一个实施方案中,另外的氨基酸取代为 S228P、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D 或 P331S,并且在另一实施方案中,至少一个另外的氨基酸取代为人 IgG1Fc 区的人 L234A 和 L235A 或人 IgG4Fc 区的 S228P 和 L235E(参见例如, US 2012/0251531),并且在另一实施方案中,至少一个另外的氨基酸取代为人 IgG1Fc 区的 L234A 和 L235A 以及 P329G。

[0207] 与 FcR 的结合改善或削弱的某些抗体变体已有描述。(参见例如 美国专利号 6,737,056; WO 2004/056312, 及 Shields 等人, J. Biol. Chem. 9 (2):6591-6604 (2001))。

[0208] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有一个或多个改善的 ADCC 的氨基酸取代(例如在 Fc 区的位置 298、333 和/或 334 (EU 残基编号) 处的取代)的 Fc 区。

[0209] 在一些实施方案中,在 Fc 区中进行导致 C1q 结合和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 改变(即改善或削弱)的改变,例如如美国专利号 6,194,551、WO 99/51642 以及 Idusogie 等 J. Immunol. 164:4178-4184, 2000 中所描述。

[0210] 半衰期延长且与负责将母体 IgG 转移至胎儿的新生儿 Fc 受体 (FcRn) (Guyer 等人, J. Immunol. 117:587 (1976) 及 Kim 等人, J. Immunol. 24:249 (1994)) 的结合改善的抗体描述于 US2005/0014934A1 (Hinton 等人) 中。那些抗体包含其中具有改善 Fc 区与 FcRn 的结合的一个或多个取代的 Fc 区。此类 Fc 变体包括在 Fc 区残基 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434 中的一处或多处具有取代,例如, Fc 区残基 434 的取代的那些(美国专利号 7,371,826)。

[0211] 还参见 Duncan 和 Winter, Nature 322:738-40 (1988); 美国专利号 5,648,260; 美国专利号 5,624,821; 及 WO 94/29351, 其涉及 Fc 区变体的其他实例。

[0212] 在一些方面,抗 CD3 抗体(例如,双特异性抗 CD3 抗体)包含含有 N297G 突变的 Fc 区。在一些实施方案中,包含 N297G 突变的抗 CD3 抗体包含含有第一结合结构域的抗 CD3 臂,所述第一结合结构域包含以下 6 个 HVR: (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 4; (e) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 5; 以及 (f) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 6; 和抗 Ly6G6D 臂。

[0213] 在一些实施方案中,包含 N297G 突变的抗 CD3 抗体包含含有第一结合结构域的抗

CD3臂和抗Ly6G6D臂,所述第一结合结构域包含(a) VH结构域,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:7,和(b) VL结构域,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:8。

[0214] 在一些实施方案中,包含N297G突变的抗CD3抗体包含一个或多个重链恒定结构域,其中一个或多个重链恒定结构域选自第一CH1(CH₁)结构域、第一CH2(CH₂)结构域、第一CH3(CH₃)结构域、第二CH1(CH₁)结构域、第二CH2(CH₂)结构域以及第二CH3(CH₃)结构域。在一些情况中,一个或多个重链恒定结构域中的至少一个与另一个重链恒定结构域配对。在一些情况中,CH₃₁和CH₃₂结构域各自包含突起或空腔,并且其中CH₃₁结构域中的突起或空腔分别可定位在CH₃₂结构域中的空腔或突起中。在一些情况中,CH₃₁和CH₃₂结构域在所述突起与空腔之间界面处相接。在一些情况中,CH₂₁和CH₂₂结构域各自包含突起或空腔,并且其中CH₂₁结构域中的突起或空腔分别可定位在CH₂₂结构域中的空腔或突起中。在其他情况中,CH₂₁和CH₂₂结构域在所述突起与空腔之间界面处相接。在一些情况中,抗CD3抗体是IgG1抗体。

[0215] 在其他实施方案中,包含N297G突变的抗CD3抗体包含含有第一结合结构域的抗CD3臂和抗Ly6G6D臂,所述第一结合结构域包含(a) VH结构域,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:7,和(b) VL结构域,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:8,其中(a)抗CD3臂包含T366S、L368A、Y407V以及N297G取代突变,以及(b)抗Ly6G6D臂包含T366W和N297G取代突变。

[0216] d.经半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0217] 在某些实施方案中,可能需要产生半胱氨酸工程改造的抗体,例如“巯基单抗(thioMAb)”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定实施方案中,取代的残基存在于抗体的可及位点处。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基由此定位在抗体的可及位点处且可用于使抗体缀合至其他部分(诸如药物部分或接头-药物部分)以产生如本文进一步所述的免疫缀合物。在某些实施方案中,以下残基中的任一个或多个可被半胱氨酸取代:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);以及重链Fc区的S400(EU编号)。可如例如美国专利号7,521,541中所述来生成半胱氨酸工程改造的抗体。

[0218] e.抗体衍生物

[0219] 在某些实施方案中,本文提供的本发明的抗CD3抗体(例如,本发明的结合CD3和第二生物分子(例如细胞表面抗原,例如肿瘤抗原)的双特异性抗CD3抗体,优选具有高亲和力(例如,3E4v11),诸如本发明的TDB抗体或其变体)可被进一步修饰包含本领域中已知且容易获得的另外的非蛋白质类部分。适于使抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、右旋糖酐、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、和右旋糖酐或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性可具有制造优势。所述聚合物可具有任何分子量,并且可为分支或未分支的。连接到抗体上的聚合物数目可以变化,而且如果连接了超过一个聚合物,那么它们可以是相同或不同的分子。一般说来,用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可基于包括但不限于有待改善的抗体的特定特性或功能、抗体衍生物是否将在限定条件下用于疗法中等考虑因素加以确定。

[0220] 在另一个实施方案中,提供抗体与可通过暴露于辐射而选择性加热的非蛋白质

部分的缀合物。在一个实施方案中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605 (2005))。辐射可具有任何波长,并且包括但不限于不损害普通细胞但会将非蛋白质部分加热至杀死邻近于抗体-非蛋白质部分的细胞的温度的波长。

[0221] 7.掩蔽抗体变体

[0222] 在某些实施方案中,本文所述的抗CD3抗体中的任一种(例如,双特异性抗CD3抗体,例如,Ly6G6D TDB抗体)可包括多肽掩蔽物,其中多肽掩蔽物包含SEQ ID NO:78的至少氨基酸残基1-3的氨基酸序列的掩蔽部分(MM)(例如,包含含有SEQ ID NO:78的氨基酸残基1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、1-11、1-12、1-13、1-14、1-15、1-16、1-17、1-18、1-19、1-20、1-21、1-22、1-23、1-24、1-25、1-26或1-27的MM的多肽掩蔽物)或其N端环化谷氨酰胺衍生物(例如,包含含有5-氧代吡咯烷-2-羧酸(PCA)的MM的多肽掩蔽物)。例如,在一些实施方案中,MM包含SEQ ID NO:78的至少前三个氨基酸残基,不同之处在于位置1处的残基是N端环化谷氨酰胺(PCA)残基,而不是谷氨酰胺残基(例如,MM包含氨基酸序列PCA-D-G)。在一些实施方案中,抗CD3抗体包含至少一个抗CD3臂(例如,抗CD3臂,其包含38E4v11的重链可变(VH)结构域和轻链可变(VL)结构域),并且多肽掩蔽物连合到抗CD3臂(例如,通过抗CD3臂的VH结构域或VL结构域)。在一些实施方案中,MM在C端处延伸达SEQ ID NO:78的剩余序列的全部或一部分。例如,在一些实施方案中,MM包含SEQ ID NO:78的至少氨基酸残基1-5的氨基酸序列或其N端环化谷氨酰胺衍生物(例如,包含含有SEQ ID NO:1的至少前五个氨基酸残基的MM的多肽掩蔽物,不同之处在于位置1的残基是PCA而不是谷氨酰胺)。在其他实施方案中,MM包含SEQ ID NO:78的至少氨基酸残基1-6的氨基酸序列或其N端环化谷氨酰胺衍生物(例如,包含含有SEQ ID NO:78的至少前六个氨基酸残基的MM的多肽掩蔽物,不同之处在于位置1的残基是PCA而不是谷氨酰胺)。在一些实施方案中,抗CD3抗体和MM彼此相对在N端至C端方向上定位,如(MM)-(抗CD3抗体)。在一些情况中,MM通过非天然CD3多肽序列(诸如可裂解部分(CM)和/或接头部分(LM))在一个末端(即C末端)直接或间接延伸。

[0223] 如上所述,掩蔽的抗CD3抗体(例如掩蔽的双特异性抗CD3抗体,例如掩蔽的Ly6G6D TDB抗体)可包含具有MM和可裂解部分(CM)两者的多肽掩蔽物。在一些实施方案中,CM包含能够被酶诸如蛋白酶裂解的氨基酸序列。在其他实施方案中,CM提供可通过还原裂解的半胱氨酸-半胱氨酸二硫键。在另外的实施方案中,CM提供在酸性pH环境的存在下裂解的酸不稳定接头。在其他实施方案中,CM提供可通过光解活化的光解底物。

[0224] 因此,包含具有CM的多肽掩蔽物的掩蔽的抗CD3抗体(例如掩蔽的Ly6G6D TDB抗体)可以裂解状态或未裂解状态存在。如本文所用,术语裂解状态是指例如通过蛋白酶、CM的半胱氨酸-半胱氨酸二硫键的还原和/或光活化进行的CM修饰之后的抗CD3抗体的状态。如本文所用的术语未裂解状态是指在不存在例如通过蛋白酶进行的CM裂解的情况下、在不存在CM的半胱氨酸-半胱氨酸二硫键的还原的情况下、在不存在酸性pH环境的情况下(例如,在中性或碱性pH环境中)和/或在不存在光的情况下的抗CD3抗体的状态。将对普通技术人员显而易见的是,在一些实施方案中,裂解的抗CD3抗体可由于通过例如蛋白酶进行的CM的裂解而引起至少MM的释放而缺少MM。因此,当掩蔽抗CD3抗体处于未裂解状态时,掩蔽抗CD3抗体将显示减少对CD3的结合,这是因为抗体的结合结构域被有效掩蔽

而避开CD3靶分子。在裂解状态中,抗CD3抗体将显示比处于未裂解状态的抗体所显示的对于CD3的更高的亲和力,这是因为抗体的结合结构域不再被多肽掩蔽物的MM抑制。

[0225] 当CM能够通过酶(例如,蛋白酶)裂解并且掩蔽抗CD3抗体是TDB时,酶可基于与TDB的所需靶共同定位在组织中的蛋白酶来选择。感兴趣的靶与蛋白酶共同定位的各种不同的情形是已知的,其中蛋白酶的底物在本领域中是已知的。在癌症的实例中,靶组织可以是癌组织,具体地是实体瘤的癌组织。在多种癌症(诸如实体瘤)中具有已知底物的蛋白酶的增加水平在本领域中是已知的(参见,例如,La Rocca等人British J.of Cancer.90(7):1414-1421,2004和Lopez-Otin等人Nat Rev Cancer.7:800-808,2007)。示例性CM可包含但不限于可通过在WO 2010/081173、WO 2009/025846、WO 2010/096838中指定的酶中的一种或多种(例如,蛋白酶)和/或在表3中列出的以下酶中的一种或多种裂解的底物。

[0226] 表3. 示例性酶

[0227]

血浆酶	豆荚蛋白门冬酰内切肽酶	跨膜蛋白酶	丝氨酸(TMPRSS-3/4)
基质金属蛋白酶(MMP)-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7
MMP-8	MMP-9	MMP-12	MMP-13
MMP-14	膜1型基质金属蛋白酶(MT1-MMP)	组织蛋白酶A	组织蛋白酶B
组织蛋白酶D	组织蛋白酶E	组织蛋白酶F	组织蛋白酶H
组织蛋白酶K	组织蛋白酶K	组织蛋白酶L	组织蛋白酶L2
组织蛋白酶O	组织蛋白酶S	半胱天冬酶1	半胱天冬酶2
半胱天冬酶3	半胱天冬酶4	半胱天冬酶5	半胱天冬酶6
半胱天冬酶7	半胱天冬酶8	半胱天冬酶9	半胱天冬酶10
半胱天冬酶11	半胱天冬酶12	半胱天冬酶13	半胱天冬酶14
人中性粒细胞弹性蛋白酶	尿激酶/尿激酶型纤溶酶原活化剂(uPA)	解聚素和金属	ADAM12

[0228]

		蛋白酶 (ADAM) 10	
ADAM17	具有血小板反应蛋白 基序的 ADAM (ADAMTS)	ADAMT S5	β 分泌酶(BACE)
成纤维细胞活化 蛋白酶(FAP)	粒酶 A	粒酶 B	胍基苯甲酸酶
子宫硫酸多糖 (Gepsin)	蛋白裂解酶	蛋白裂 解酶 2	穿膜肽酶
脑啡肽酶	前列腺特异性膜抗原 (PSMA)	肿瘤坏 死因子- 转换酶 (TACE)	激肽释放酶相关肽酶 (KLK)3
KLK5	KLK7	KLK11	丙型肝炎病毒的 NS3/4 蛋白酶 (HCV-NS3/4)
组织纤溶酶原激 活蛋白(tPA)	钙蛋白酶	钙蛋白 酶 2	谷氨酸酯羧肽酶 II
血浆激肽释放酶	AMSH 样蛋白酶	AMSH	γ -分泌酶组分
抗纤溶酶裂解酶 (APCE)	Decysin 1	细胞凋 亡相关 半胱氨 酸肽酶	N-乙酰化的 α 连接的 酸性二肽酶样 1
凝血酶			

[0229] 可选地或另外地,掩蔽的抗CD3抗体可包含含有半胱氨酸对的二硫键的CM,所述CM因此可通过还原剂裂解。这些还原剂包括但不限于细胞还原剂诸如谷胱甘肽(GSH)、硫氧还蛋白、NADPH、黄素、抗坏血酸等,所述还原剂可大量存在于实体瘤或其周围。

[0230] 在其他实施方案中,掩蔽的抗CD3抗体可包含CM,所述CM包含在酸性pH环境存在下可裂解的酸不稳定接头(例如脘、亚氨基、酯或酰氨基),如PCT公开号WO 2006/108052中所述,其通过引用整体并入本文。这包括但不限于可存在于细胞的溶酶体中或肿瘤微环境中的酸性pH环境。

[0231] CM可在N端到C端方向上相对于抗CD3抗体和MM定位,如(MM)-(CM)-(抗CD3抗体)。

[0232] 在其他实施方案中,掩蔽的抗CD3抗体(例如掩蔽的Ly6G6D TDB抗体)可以在其多肽掩蔽物内包括一个或多个(例如2或3个或更多个)不同的CM。

[0233] 如上所述,掩蔽的抗CD3抗体(例如掩蔽的Ly6G6D TDB抗体)可包含具有MM和接头部分(LM)两者或者全部三个部分(即,MM、LM和CM)的多肽掩蔽物。适用于本文所述的多肽掩蔽物的LM通常是提供柔性和/或长度以促进或调节抗CD3抗体与CD3的结合的抑制程度的LM。这种LM也可被称为柔性接头。可容易地选择合适的LM并且可具有不同的合适长度,诸如从1个氨基酸(例如一个甘氨酸(G)或一个丝氨酸(S)残基)到30个氨基酸(例如,包含GS重复序列的LM)。LM的长度优选地大于一个氨基酸(例如,长度为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基

酸)。在一些情况中,LM的长度可在5个至24个氨基酸之间,诸如长度在5个至15个氨基酸之间。LM可具有高的G和/或S含量(即富含G/S的LM)并且可包括GS重复序列。例如,LM可包括甘氨酸聚合物 $(G)_n$ 、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ 和 $(GGGS)_n$,其中n是至少为1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头组合。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对无结构的,并且因此可以能够用作中性LM,其间接或直接将多肽掩蔽物的MM组分接合到抗CD3抗体。与甚至丙氨酸相比,甘氨酸进入的phi-psi空间显著更多,并且比具有较长侧链的残基受限小得多(参见例如, Scheraga. Rev. Computational Chem. 11173-142, 1992)。示例性柔性接头包括但不限于 Gly-Gly-Ser-Gly、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly等。普通技术人员将认识到,多肽掩蔽物的设计可包括完全或部分柔性的LM。例如,LM可包括柔性部分以及一个或多个赋予较少柔性结构的部分,以产生展现期望的CD3结合抑制程度的掩蔽的抗CD3抗体,其可以使用例如测定诸如下面详细描述噬菌体结合ELISA来评估。

[0234] 当多肽掩蔽物不包括CM时,LM可在N端到C端方向上相对于抗CD3抗体和MM定位,如(MM)-(LM)-(抗CD3抗体)。当多肽掩蔽物包括CM时,LM可在N端到C端方向上相对于抗CD3抗体、MM和CM定位,如(MM)-(LM)-(CM)-(抗CD3抗体)或(MM)-(CM)-(LM)-(抗CD3抗体)。

[0235] 在其他实施方案中,掩蔽的抗CD3抗体(例如掩蔽的Ly6G6D TDB抗体)可以在其多肽掩蔽物内包括一个或多个(例如2或3个或更多个)不同的CM。

[0236] B. 重组方法和组合物

[0237] 本发明的抗CD3抗体(例如,本发明的结合CD3和第二生物分子(例如细胞表面抗原,例如肿瘤抗原的双特异性抗CD3抗体,优选具有高亲和力(例如,38E4v11)),诸如本发明的TDB抗体或其变体)可使用重组方法和组合物产生,例如如美国专利号4,816,567中所述。在一个实施方案中,提供编码本文所述的抗CD3抗体的分离的核酸。此类核酸可编码包含抗体的VL的氨基酸序列和/或包含抗体的VH的氨基酸序列(例如抗体的轻链和/或重链)。在又一个实施方案中,提供一种或多种包含此类核酸的载体(例如表达载体)。在又一个实施方案中,提供包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施方案中,宿主细胞包含(例如已用以下转化):(1)包含编码包含抗体的VL的氨基酸序列和包含抗体的VH的氨基酸序列的核酸的载体,或(2)包含编码包含抗体的VL的氨基酸序列的核酸的第一载体和包含编码包含抗体的VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,宿主细胞是真核的,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供制备抗CD3抗体的方法,其中所述方法包括在适于表达所述抗体的条件下培养如以上提供的包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞,和任选地自所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。

[0238] 对于重组产生抗CD3抗体,分离编码例如如上所述的抗体的核酸并且将其插入一个或多个载体中以进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。此类核酸可易于使用常规程序(例如通过使用能够特异性结合编码抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)进行分离和测序。

[0239] 适于克隆或表达抗体编码载体的宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例

如,抗体可在细菌中产生,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(还参见Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷(B.K.C.Lo编, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第245-254页,描述抗体片段在大肠杆菌中的表达。)在表达之后,抗体可从细菌细胞糊状物分离于可溶性部分中并且可进一步纯化。

[0240] 除原核生物之外,诸如丝状真菌或酵母的真核微生物也为适于抗体编码性载体的克隆或表达宿主,包括糖基化路径已被“人源化”,从而产生具有部分或完全人糖基化形态的抗体的真菌和酵母菌株。参见Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), 和Li等人, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)。

[0241] 适于表达糖基化抗体的宿主细胞还来源于多细胞生物体(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。已鉴别可与昆虫细胞联合使用,尤其是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞的众多杆状病毒株。

[0242] 也可以利用植物细胞培养物作为宿主。参见例如美国专利号 5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(其描述了用于在转基因植物中生成抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0243] 也可以使用脊椎动物细胞作为宿主。例如,可使用适于悬浮生长的哺乳动物细胞系。可用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是经过SV40转化的猴类肾CV1系(COS-7);人胚肾系(293或293细胞,如例如,Graham等人, *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)中所述);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞托利细胞(TM4细胞,如例如,Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)中所述);猴类肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬类肾细胞(MDCK;布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳房肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如例如,Mather等人, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)中所述;MRC 5细胞;以及FS4细胞。其他可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⁻CHO细胞(Urlaub等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980));和骨髓瘤细胞系,诸如Y0、NS0和Sp2/0。对于适于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的评述,参见例如Yazaki和Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷(B.K.C.Lo编, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268页(2003)。

[0244] C. 测定

[0245] 本文提供的本发明的抗CD3抗体(例如,结合CD3和第二生物分子(例如细胞表面抗原,例如肿瘤抗原)的本发明双特异性抗CD3抗体,优选具有高亲和力(例如,38E4v11),诸如本发明的TDB抗体或其变体)可通过本领域中已知的各种测定来鉴别、筛选或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

[0246] 1. 结合测定和其他测定

[0247] 在一个方面,对本发明的抗CD3抗体测试其抗原结合活性,例如通过已知的方法诸如ELISA、蛋白质印迹等来进行。

[0248] 在另一方面,可使用竞争测定来鉴别与本发明的抗CD3抗体竞争结合CD3的抗体。

[0249] 在示例性竞争测定中,将固定的CD3在包含结合CD3的第一标记抗体和测试其与第一抗体竞争结合CD3的能力的第二未标记抗体的溶液中孵育。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,在包含第一标记抗体而不含第二未标记抗体的溶液中孵育固定的

CD3。在容许第一抗体结合CD3的条件下孵育之后,移除过量未结合抗体,并且测量与固定的CD3缔合的标记的量。如果相对于对照样品,与固定的CD3缔合的标记的量在测试样品中基本上降低,则指示第二抗体与第一抗体竞争结合CD3。参见例如,Harlow和Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

[0250] 2. 活性测定

[0251] 在一个方面,提供了用于鉴定具有生物活性的其抗CD3抗体的测定。生物活性可包括例如体内、体外或离体结合CD3 (例如T细胞表面上的CD3) 或其肽片段。在本发明的多特异性 (例如,双特异性) 抗CD3抗体 (例如具有一个抗CD3臂 (例如38E4v11) 及一个识别第二生物分子 (例如细胞表面抗原,例如肿瘤抗原) 的臂的TDB抗体) 的情况下,生物活性也可包括例如效应细胞活化 (例如T细胞 (例如CD8⁺ 和/或CD4⁺T细胞) 活化)、效应细胞群体扩增 (即,T细胞计数增加)、靶细胞群体减少 (即,在其细胞表面上表达第二生物分子的细胞群体减少) 和/或靶细胞杀伤。提供了在体内和/或体外具有此类生物活性的抗体。在某些实施方案中,对本发明的抗体测试此类生物活性,如本文以下实施例2详述。

[0252] 此外,可在含有10%FBS,补充有GlutaMax、青霉素&链霉素的RPMI培养基中洗涤细胞,并且将约20万个悬浮细胞添加至96孔U形底平板中。可在37°C下在湿润标准细胞培养孵育器中在补充有10%FBS的RPMI1640中培养细胞。在BJAB细胞杀伤测定中,可将20,000个BJAB细胞与效应细胞 (作为huPBMC或经纯化T细胞) 一起以根据每个分析所指示的比率在各种浓度的TDB抗体存在下孵育24小时。在内源B细胞杀伤测定中,可将200,000个huPBMC与各种浓度的TDB抗体一起孵育24小时。

[0253] 在培养之后,可用FACS缓冲液 (含0.5%BSA、0.05%叠氮化钠的PBS) 洗涤细胞。接着可在FACS缓冲液中对细胞进行染色,使用FACS缓冲液洗涤并且悬浮于100μl的包含1μg/ml碘化丙锭的FACS缓冲液中。可在FACSCalibur流式细胞仪上收集数据且使用FlowJo加以分析。可通过FACS门控出活B细胞作为PI-CD19⁺或PI-CD20⁺ B细胞,并且利用添加至反应混合物中作为内部计数对照的FITC珠粒获得绝对细胞计数。可基于未经TDB处理的对照计算细胞杀伤百分比 (%)。可使用抗CD69-FITC和抗CD25-PE,通过CD69和CD25表面表达来检测活化T细胞。

[0254] D. 免疫缀合物

[0255] 本发明还提供了免疫缀合物,其包含与一种或多种细胞毒性剂,诸如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素 (例如,蛋白质毒素、细菌、真菌、植物、或动物起源的酶活性毒素、或其片段) 或放射性同位素缀合的本文的抗CD3抗体。

[0256] 在一个实施方案中,免疫缀合物为抗体-药物缀合物 (ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,包括但不限于美登素 (参见美国专利号5,208,020、5,416,064和欧洲专利号0 425 235B1); 奥利司他汀,诸如单甲基奥利司他汀药物部分DE和DF (MMAE和MMAF) (参见美国专利号5,635,483和5,780,588,和7,498,298); 多拉司他汀; 加利车霉素或其衍生物 (参见美国专利号5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001以及5,877,296; Hinman等人, *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); 和Lode等人, *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); 蒽环类,诸如道诺霉素或阿霉素 (参见Kratz等人, *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey等人, *Bioorganic&Med. Chem. Letters*

16:358-362 (2006); Torgov等人, Bioconj.Chem.16:717-721 (2005); Nagy等人, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik等人, Bioorg.&Med. Chem.Letters 12:1529-1532 (2002); King等人, J.Med. Chem.45:4336-4343 (2002); 以及美国专利号6,630,579; 甲氨蝶呤; 长春地辛; 紫杉烷类, 诸如多烯紫杉醇、紫杉醇、拉洛他赛、替司他赛和奥他赛; 单端孢霉毒素(trichothecene); 以及CC1065。

[0257] 在另一个实施方案中, 免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的如本文中所述的抗CD3抗体, 所述酶活性毒素包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、莨菪根毒素A链、 α -帚曲霉素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、香石竹(*dianthin*)蛋白、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*momordica charantia*)抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制剂、白树毒素(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯(tricothecenes)。

[0258] 在另一个实施方案中, 免疫缀合物包含与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的如本文中所描述的抗CD3抗体。各种放射性同位素可用于产生放射性缀合物。实例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和Lu的放射性同位素。在使用放射性缀合物进行检测时, 它可以包含供闪烁法研究用的放射性原子(例如 tc99m 或 I123)或供核磁共振(NMR)成像(又称为磁共振成像, mri)用的自旋标记物, 诸如再一次的碘-123、碘-131、镅-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0259] 可以使用多种双功能蛋白质偶联剂来生成抗体和细胞毒性剂的缀合物, 诸如N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如, 可如 Vitetta等, Science 238:1098 (1987)中所述制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见 W094/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒性药物的“可裂解接头”。例如, 可使用酸不稳定接头、肽酶敏感性接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫化物接头(Chari等, Cancer Res.52:127-131 (1992); 美国专利号5,208,020)。

[0260] 本文中的免疫缀合物或ADC明确涵盖, 但不限于用交联试剂制备的此类缀合物, 所述交联试剂包括但不限于BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC和磺基-SMPB, 及SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砵)苯甲酸酯), 所述交联试剂可商购获得(例如, 来自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。

[0261] E. 用于诊断和检测的方法和组合物

[0262] 在某些实施方案中, 本发明的抗CD3抗体(例如, 本发明的结合CD3和第二生物分子(例如细胞表面抗原, 例如肿瘤抗原)的双特异性抗CD3抗体, 优选具有高亲和力(例如,

38E4v11), 诸如本发明的 TDB 抗体或其变体) 中的任一种可用于检测生物样品中 CD3 的存在。如本文所用的术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些实施方案中, 生物样品包含细胞或组织。

[0263] 在一个实施方案中, 提供一种用于诊断或检测方法中的抗 CD3 抗体。在另一方面, 提供一种检测生物样品中 CD3 的存在的方法。在某些实施方案中, 所述方法包括使生物样品与如本文所述的抗 CD3 抗体在容许所述抗 CD3 抗体结合 CD3 的条件下接触, 和检测在所述抗 CD3 抗体与 CD3 之间是否形成复合物。此类方法可以是体外或体内方法。

[0264] 在某些实施方案中, 提供标记的抗 CD3 抗体。标记物包括但不限于直接检测的标记物或部分 (诸如荧光、发色、电子致密、化学发光和放射性标记物)、及例如经由酶反应或分子相互作用间接检测的部分, 诸如酶或配体。示例性标记包括但不限于放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I 、荧光团 (诸如稀土螯合物或荧光素及其衍生物)、若丹明 (rhodamine) 及其衍生物、丹酰基、伞形酮 (umbelliferone)、荧光素酶 (例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶 (美国专利号 4,737,456))、荧光素 (luciferin)、2,3-二氢酞嗪二酮、辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶 (例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、与采用过氧化氢以氧化染料前体的酶 (诸如 HRP、乳过氧化物酶 (lactoperoxidase) 或微过氧化物酶 (microperoxidase)) 偶联的杂环氧化酶 (诸如尿酸酶 (uricase) 和黄嘌呤氧化酶)、生物素/抗生物素蛋白、自旋标记、噬菌体标记、稳定自由基等。

[0265] F. 药物制剂

[0266] 本发明的抗 CD3 抗体 (例如, 本发明的结合 CD3 和第二生物分子 (例如细胞表面抗原, 例如肿瘤抗原) 的双特异性抗 CD3 抗体, 优选具有高亲和力 (例如, 38E4v11), 诸如本发明的 TDB 抗体或其变体) 的药物制剂通过将具有所需纯度的抗体与一种或多种任选的药学上可接受的载体 (Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版, Osol, A. 编 (1980)) 混合呈冻干制剂或水溶液形式来制备。一般地, 药学上可接受的载体在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的, 而且包括但不限于缓冲剂, 诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂 (诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵; 氯化六烷基季铵; 苯扎氯铵; 苄索氯铵; 酚、丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯, 诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯; 儿茶酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量 (少于约 10 个残基) 多肽; 蛋白质, 诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 诸如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖和其他碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂, 诸如 EDTA; 糖类, 诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇; 成盐抗衡离子, 诸如钠; 金属复合物 (例如 Zn-蛋白质复合物); 和/或非离子表面活性剂, 诸如聚乙二醇 (PEG)。本文中的示例性的药学上可接受的载体进一步包括间质药物分散剂诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白 (sHASEGP), 例如人可溶性 PH-20 透明质酸酶糖蛋白, 诸如 rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。某些示例性 sHASEGP (包括 rHuPH20) 及使用方法描述于美国专利公布号 2005/0260186 及 2006/0104968 中。在一方面, 将 sHASEGP 与一种或多种另外的糖胺聚糖酶诸如软骨素酶组合。

[0267] 示例性的冻干抗体制剂描述于美国专利号 6,267,958。水性抗体制剂包括美国专

利号6,171,586及W02006/044908中所述的那些制剂,后述制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0268] 本文中的制剂还可含有超过一种所治疗具体适应症所必需的活性成分,优选活性互补且彼此没有不利影响的那些活性成分。例如,可能需要进一步提供另外的治疗剂(例如化学治疗剂、细胞毒性剂、生长抑制剂和/或抗激素剂,诸如上文中所述的那些)。此类活性成分适于以有效用于所需目的的量而组合存在。

[0269] 活性成分可包埋于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如分别在胶态药物递送系统中(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)或在粗乳状液中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。此类技术公开于 Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)中。

[0270] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的适合实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,所述基质呈成形物品例如膜、或微胶囊的形式。

[0271] 用于体内施用的制剂一般是无菌的。无菌性可容易地实现,例如通过经由无菌滤膜过滤。

[0272] G. 治疗方法和组合物

[0273] 本发明的抗CD3抗体(例如,本发明的结合CD3和第二生物分子(例如细胞表面抗原,例如肿瘤抗原)的双特异性抗CD3抗体,优选地具有高亲和力(例如,38E4v11))中任一种可用于治疗方法中。本发明的高亲和力抗CD3抗体例如38E4v11,当与靶向臂配对时发现特别的用途,所述靶向臂结合在肿瘤细胞上以低拷贝数表达的细胞表面抗原。在一些实施方案中,低拷贝数细胞表面抗原是Ly6G6D。

[0274] 在一方面,提供了用作药物的抗CD3抗体。在另外的方面,提供了用于治疗或延迟细胞增殖性病症(例如癌症,例如食管癌或腺癌)或自身免疫性病症(例如关节炎)的进展的抗CD3抗体。在某些实施方案中,提供了用于治疗方法中的抗CD3抗体。在某些实施方案中,本发明提供用于治疗患有细胞增殖性病症或自身免疫性病症的个体的方法中的抗CD3抗体,所述方法包括向所述个体施用有效量的所述抗CD3抗体。在一个此类实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如如下所述。在另外的实施方案中,本发明提供抗CD3抗体,其用于增强患有细胞增殖性病症或自身免疫性病症的个体的免疫功能。在某些实施方案中,本发明提供抗CD3抗体,其用于增强患有细胞增殖性病症或自身免疫性病症的个体的免疫功能的方法中,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗CD3抗体以活化效应细胞(例如T细胞,例如CD8+和/或CD4+T细胞),扩增(增加)效应细胞群体,降低靶细胞(例如,表达由本发明的抗CD3抗体(诸如本发明的双特异性TDB抗体)识别的第二生物分子的细胞)群体和/或杀死靶细胞(例如,靶肿瘤细胞)。根据任何上述实施方案的“个体”可以是人。

[0275] 在另一方面,本发明提供抗CD3抗体用于制造或制备药物的用途。在一个实施方案中,药物是用于治疗细胞增殖性病症(例如癌症,例如食管癌或腺癌)或自身免疫性病症(例如,关节炎)。在另一个实施方案中,所述药物用于治疗细胞增殖性病症或自身免疫性病症的方法中,所述方法包括向患有细胞增殖性病症或自身免疫性病症的个体施用有效量的所述药物。在一个此类实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如如下所述。在另外的实施方案中,所述药物是用于活化效应细胞(例如T

细胞,例如CD8+和/或CD4+T细胞),扩增(增加)效应细胞群体,降低靶细胞(例如,表达由本发明的抗CD3抗体(诸如本发明的双特异性TDB抗体)识别的第二生物分子的细胞)群体和/或杀死个体中的靶细胞(例如,靶肿瘤细胞)。在另外的实施方案中,所述药物是用于增强患有细胞增殖性病症或自身免疫性病症的个体的免疫功能的方法中,所述方法包括向所述个体施用有效量的药物以活化效应细胞(例如T细胞,例如CD8+和/或CD4+T细胞),扩增(增加)效应细胞群体,降低靶细胞(例如,表达由本发明的抗CD3抗体(诸如本发明的双特异性TDB抗体)识别的第二生物分子的细胞)群体和/或杀死靶细胞(例如,靶肿瘤细胞)。根据任何上述实施方案的“个体”可以是人。

[0276] 在另外的方面,本发明提供用于治疗细胞增殖性病症(例如癌症,例如食管癌或腺癌)或自身免疫性病症(例如,关节炎)的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向患有这种细胞增殖性病症或自身免疫性病症的个体施用有效量的抗CD3抗体。在一个此类实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如如下所述。根据任何上述实施方案的“个体”可以是人。

[0277] 在另外的方面,本发明提供用于在患有细胞增殖性病症或自身免疫性病症的个体中增强患有细胞增殖性病症或自身免疫性病症的个体的免疫功能的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向个体施用有效量的抗CD3抗体以活化效应细胞(例如T细胞,例如CD8+和/或CD4+T细胞),扩增(增加)效应细胞群体,降低靶细胞(例如,表达由本发明的抗CD3抗体(诸如本发明的双特异性TDB抗体)识别的第二生物分子的细胞)群体和/或杀死靶细胞(例如,靶肿瘤细胞)。在一个实施方案中,“个体”是人。

[0278] 在另外的方面中,本发明提供一种通过施用本发明的有效量的抗CD3抗体,诸如本发明的双特异性TDB抗体,诸如抗Ly6G6D靶向TDB,诸如具有亲和力成熟的(例如,高亲和力)抗CD3臂诸如38E4v11和抗Ly6G6D臂的Ly6G6D TDB,用于治疗食管癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、结肠直肠癌或腺癌(例如,结肠直肠癌、胃腺癌或胰腺癌)的方法,所述腺癌可以是转移性腺癌(例如,转移性结肠直肠癌、转移性胃腺癌或转移性胰腺癌)。在其他实施方案中,Ly6G6D TDB与一种或多种另外的治疗剂共同施用(同时,作为单个或多个组合物(例如,制剂),所述治疗剂诸如以下中的任一、二、三、四、五、六、七、八、九、十或全部十一种:FOLFOX(奥沙利铂(ELOXATINTM)与5-氟尿嘧啶和亚叶酸组合)、卡培他滨(XELODA®)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、Cape0x(XELOX;卡培他滨和奥沙利铂)、甲酰四氢叶酸(亚叶酸)、贝伐单抗(AVASTIN®)、西妥昔单抗(ERBITUX®)、帕尼单抗(VECTIBIX®)、瑞格菲尼(STIVARGA®)、伊立替康(CPT-11; CAMPTOSAR®)以及FLOX(5-氟尿嘧啶和奥沙利铂)。在其他实施方案中,Ly6G6D TDB在一个或多个另外的治疗剂之前施用,诸如以下中的任一、二、三、四、五、六、七、八、九、十或全部十一种:FOLFOX(奥沙利铂(ELOXATINTM)与5-氟尿嘧啶和亚叶酸组合)、卡培他滨(XELODA®)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、Cape0x(XELOX;卡培他滨和奥沙利铂)、甲酰四氢叶酸(亚叶酸)、贝伐单抗(AVASTIN®)、西妥昔单抗(ERBITUX®)、帕尼单抗(VECTIBIX®)、瑞格菲尼(STIVARGA®)、伊立替康(CPT-11; CAMPTOSAR®)以及FLOX(5-氟尿嘧啶和奥沙利铂)。在其他实施方案中,Ly6G6D TDB在一种或多种另外的治疗剂之后施用,诸如以下中的任一、二、三、四、五、六、七、八、

九、十或全部十一种：FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATINTM) 与5-氟尿嘧啶和亚叶酸组合)、卡培他滨(XELODA®)、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、CapeOx (XELOX; 卡培他滨和奥沙利铂)、甲酰四氢叶酸 (亚叶酸)、贝伐单抗 (AVASTIN®)、西妥昔单抗 (ERBITUX®)、帕尼单抗 (VECTIBIX®)、瑞格菲尼 (STIVARGA®)、伊立替康 (CPT-11; CAMPTOSAR®) 以及FLOX (5-氟尿嘧啶和奥沙利铂)。

[0279] 在另一个方面中,本发明提供一种通过施用本发明的有效量的抗CD3抗体 (诸如本发明的双特异性TDB抗体,诸如抗B细胞靶向TDB,诸如具有抗CD3臂和抗CD20臂的CD20-TDB) 用于治疗血液学癌症 (诸如B细胞癌 (例如,成熟的B细胞淋巴瘤)) 的方法。在实施方案的另外的方面,成熟的B细胞淋巴瘤是非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL)。在实施方案的另外方面中,NHL选自包括以下的组:生发中心B细胞样 (GCB) DLBCL、活化B细胞样 (ABC) DLBCL、滤泡性淋巴瘤 (FL)、套细胞淋巴瘤 (MCL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性淋巴性白血病 (CLL)、边缘区淋巴瘤 (MZL)、小淋巴细胞性白血病 (SLL)、淋巴浆细胞性白血病 (LL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (WM)、中枢神经系统淋巴瘤 (CNSL)、伯基特淋巴瘤 (BL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、脾脏边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、不可分类的脾淋巴瘤/白血病、脾弥漫性红髓小B细胞淋巴瘤、毛细胞白血病变体、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病、 α 重链病、 γ 重链病、 μ 重链病、浆细胞骨髓瘤、孤立性骨浆细胞瘤、髓外浆细胞瘤、粘膜相关淋巴组织的淋巴结外边缘区淋巴瘤 (MALT淋巴瘤)、淋巴结边缘区淋巴瘤、儿童淋巴结边缘区淋巴瘤、儿童滤泡淋巴瘤、原发性皮肤滤泡中心淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、CNS的原发性DLBCL、原发性腿型皮肤DLBCL、老年性EBV阳性DLBCL、慢性炎症相关性DLBCL、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阳性大B细胞淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、在HHV8相关的多中心卡斯尔曼病中出现的大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤:B细胞淋巴瘤,不可分类,具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与伯基特淋巴瘤中间的特征和B细胞淋巴瘤,不可分类,具有介于弥漫性大B细胞淋巴瘤与经典霍奇金淋巴瘤中间的特征。在本发明的优选的实施方案中,所述方法包括治疗癌症,所述癌症包括生发中心B细胞样 (GCB) DLBCL、活化B细胞样 (ABC) DLBCL、滤泡性淋巴瘤 (FL)、套细胞淋巴瘤 (MCL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性淋巴性白血病 (CLL)、边缘区淋巴瘤 (MZL)、小淋巴细胞性白血病 (SLL)、淋巴浆细胞性白血病 (LL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (WM)、中枢神经系统淋巴瘤 (CNSL),或伯基特淋巴瘤 (BL)。

[0280] 另一方面,本发明提供包含本文提供的任何抗CD3抗体的药物制剂,其是例如用于任何以上治疗方法中。在一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的任何抗CD3抗体及药学上可接受的载体。在另一实施方案中,药物制剂包含本文提供的任何抗CD3抗体及至少一种例如如下所述的另外的治疗剂。

[0281] 本发明的抗体可单独或与其他药剂组合用于疗法中。举例来说,本发明的抗体可与至少一种另外的治疗剂共同施用。在某些实施方案中,另外的治疗剂是化疗剂、生长抑制剂、细胞毒性剂、放射疗法中使用的药剂、抗血管新生剂、细胞凋亡剂、抗微管蛋白剂或其他药剂,诸如上皮生长因子受体 (EGFR) 拮抗剂 (例如,酪氨酸激酶抑制剂)、HER1/EGFR抑制剂 (例如,厄洛替尼 (TarcevaTM)、血小板衍生的生长因子抑制剂 (例如,GleevecTM (甲磺酸伊马替尼))、COX-2抑制剂 (例如,塞来昔布)、干扰素、细胞因子,除本发明的抗CD3抗体

之外的抗体,诸如结合到以下靶中的一个或多个的抗体: ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR- β 、BlyS、APRIL、BCMA、VEGF 或 VEGF 受体、TRAIL/Apo2、PD-1、PD-L1、PD-L2 或另一个生物活性或有机化学剂。

[0282] 在一些实施方案中,本发明提供一种方法,其中另外的治疗剂是糖皮质激素。在一个实施方案中,糖皮质激素是地塞米松。

[0283] 上述的此类组合疗法包括组合施用(其中两种或多种治疗剂包括在相同或分开的制剂中)和分开施用,在分开施用的情况下,本发明抗体的施用可以在施用另外的一种或多种治疗剂之前,同时和/或之后。在一个实施方案中,抗CD3抗体的施用和另外的治疗剂的施用彼此的约一个月内,或约一周、两周或三周内,或约一天、两天、三天、四天、五天或六天内进行。本发明的抗CD3抗体(例如,本发明的结合CD3和第二生物分子(例如细胞表面抗原,例如肿瘤抗原)的双特异性抗CD3抗体,诸如本发明的TDB抗体或其变体)可与放射疗法组合使用。

[0284] 可以通过任何合适的手段,包括胃肠外、肺内和鼻内及病灶内(若期望用于局部治疗的话)施用来施用本发明的抗体(和/或任何另外的治疗剂)。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。在一些实施方案中,抗体是通过皮下施用进行施用。在一些实施方案中,通过皮下注射施用的抗CD3抗体在患者中展现出比通过静脉内注射施用的相同抗CD3抗体更低的毒性反应。部分地根据施用是否为短暂的或长期的,给药可通过任何适合的途径进行,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射。本文涵盖各种给药时间表,包括但不限于单次施用或各种时间点内的多次施用、推注施用和脉冲输注。

[0285] 本发明的抗体将以符合良好的医学实践的方式配制、确定剂量及施用。在此情形下的考虑因素包括所治疗的特定病症、所治疗的特定哺乳动物、单个患者的临床病状、病症的病因、药剂递送部位、施用方法、施用时间表和医学从业者已知的其他因素。抗体无需但可任选地与一种或多种目前用于预防或治疗所述病症的药剂一起配制。上述其他药剂的有效量取决于配方中所存在的抗体的量、所治疗病症的类型以及其他上述讨论的因素。这些药剂通常以如本文所述的相同剂量以及用如本文所述的施用途径,或以本文所述的剂量的约1%至99%,或以凭经验/临床上确定为适当的任何剂量且通过凭经验/临床上确定为适当的任何途径加以使用。

[0286] 对于预防或治疗疾病,本发明的抗体(当单独或与一种或多种其他另外的治疗剂组合使用时)的合适剂量将取决于所要治疗的疾病的类型、抗体的种类、疾病的严重性和病程、所施用抗体的预防或治疗目的、之前的治疗、患者的临床史和对抗体的应答以及主治医师的决策。抗体适合一次或经由一系列治疗对患者施用。

[0287] 如作为一般提议,无论是否通过一次或多次施用进行,向人施用的抗CD3抗体的治疗有效量将处于约0.01mg/kg至约100mg/kg患者体重的范围内。在一些实施方案中,例如每日施用的所用的抗体为约0.01mg/kg至约45mg/kg、约0.01mg/kg至约40mg/kg、约0.01mg/kg至约35mg/kg、约0.01mg/kg至约30mg/kg、约0.01mg/kg至约25mg/kg、约0.01mg/kg至约20mg/kg、约0.01mg/kg至约15mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.01mg/kg至约5mg/kg,或约0.01mg/kg至约1mg/kg。在一个实施方案中,在21天周期的第1天,本文描述的抗CD3抗体以约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、约1000mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg或约1400mg的剂量向人施用。剂量可作

为单个剂量或作为多个剂量(例如2或3个剂量)施用,诸如输注。对于几天或更长时间的重复施用,取决于病情,治疗应通常持续直至出现疾病症状得到期望的抑制为止。抗体的一个示例性剂量将在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围内。因此,可以向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或其任何组合)的一个或多个剂量。这类剂量可间歇施用,例如每周或每三周(例如以使患者接受约两剂至约二十剂,或例如约六剂抗CD3抗体)。可施用初始的较高负荷剂量,随后施用一次或多次较低剂量。此疗法的进展易于通过常规技术和测定来监测。

[0288] 在一些实施方案中,所述方法还可包括另外的疗法。另外的疗法可以是放射疗法、手术、化疗、基因疗法、DNA疗法、病毒疗法、RNA疗法、免疫疗法、骨髓移植、纳米疗法、单克隆抗体疗法或前述的组合。另外的疗法可以是辅助疗法或新辅助疗法的形式。在一些实施方案中,另外的疗法是施用小分子酶抑制剂或抗转移剂。在一些实施方案中,另外的疗法是施用副作用限制剂(例如旨在减轻治疗副作用的发生和/或严重程度的药剂,诸如抗恶心剂等)。在一些实施方案中,另外的疗法是放射疗法。在一些实施方案中,另外的疗法是手术。在一些实施方案中,另外的疗法是放射疗法和手术的组合。在一些实施方案中,另外的疗法是 γ 照射。在一些实施方案中,另外的疗法可以是单独施用上述治疗剂中的一个或多个。

[0289] H. 制品

[0290] 在本发明的另一方面,提供了一种含有可用于治疗、预防和/或诊断上文所描述的病症的材料的制品。制品包含容器和容器上或与容器相关的标签或包装插页。适合的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可由多种材料(诸如玻璃或塑料)形成。容器容纳单独或与另一种有效治疗、预防和/或诊断病症的组合物组合的组合物,并且可以具有无菌进入端口(例如,容器可以是具有可由皮下注射针穿过的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是本发明的抗体。标签或包装插页指示使用组合物来治疗选择的病症。此外,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发明的抗体;及(b)其中含有组合物的第二容器,其中所述组合物包含另一细胞毒性剂或另外的治疗剂。在本发明的此实施方案中的制品还可包括指示可以使用组合物来治疗特定的病症的包装插页。可选地或另外,制品可以进一步包括第二(或第三)容器,其包含药学上可接受的缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏(Ringer's)溶液和右旋糖溶液。它可以进一步包括从商业和用户观点看期望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0291] III. 实施例

[0292] 以下是本发明的方法和组合物的实例。应理解,鉴于上文提供的一般性描述,可以实践各种其他实施方案。

[0293] 实施例1. 亲和力成熟的抗CD3抗体的生成

[0294] NNK文库构建和淘选

[0295] 为了进一步改进人源化抗CD3抗体38E4v1(分别具有SEQ ID NO:57-62的HVR-H1至HVR-H3和HVR-L1至HVR-L3以及SEQ ID NO:63和64的VH和VL序列)的亲和力,从具有轻链HVR残基(即,HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3)或重链HVR残基(即,HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3)的单价Fab噬菌体展示的呈Fab-amber形式的变体38E4v1构建噬菌体文库,所述HVR残基使用NNK

简并密码子(使用32个密码子编码全部20个氨基酸)随机化(参见例如,Brenner等人 .Proc.Natl.Acad.Sci.USA89(12):5381-5383,1992)。文库设计为允许在三个轻链或重链HVR中的每一个中存在一个NNK突变。将得到的文库DNA电穿孔到大肠杆菌XL1细胞中,从而产生大约 10^9 个转化体。

[0296] 将噬菌体文库在含有1%BSA和0.05%Tween的PBS中孵育30分钟,然后施加到CD3 ϵ 固定化平板上进行第一轮淘选。在接下来的两轮中,将降低浓度的生物素酰化的CD3 ϵ 抗原与1000x非生物素酰化的CD3 ϵ 作为超级阻断缓冲液中的竞争者一起使用来增加选择的严格性。准备第三轮淘选的噬菌体用于深度测序分析。

[0297] 38E4v1亲和力成熟文库的深度测序

[0298] 对于深度测序,从携带来自初始噬菌体文库和第三轮选择中的噬菌粒载体的大肠杆菌XL-1细胞分离噬菌粒双链DNA。使用纯化的DNA作为模板,使用PHUSION®DNA聚合酶(New England Biolabs)用于进行VL和VH区的有限循环的基于PCR的扩增。PCR产物通过琼脂糖凝胶提取和清洁(Qiagen凝胶提取试剂盒)来纯化。使用洗脱的扩增子DNA作为用标准Illumina文库制备方法使用TRUSEQ™ DNA样品制备试剂盒(Illumina)进行深度测序文库制备的基础。将衔接子连接的文库进行单个循环的PCR并在IlluminaMISEQ®上使用配对末端测序法进行测序,其中插入物大小为200bp或300bp(视情况)以覆盖扩增子的整个长度。

[0299] 38E4v1亲和力成熟文库的深度测序分析

[0300] 使用统计编程语言R(参见例如,R Core Team,R:A language and environment for statistical computing,2013)和ShortRead软件包(参见Morgan等人 .Bioinformatics 25(19):2607-2608)分析测序数据。对鉴定的HVR序列进行质量控制。检查每个HVR序列的正确长度,并且允许仅携带多达一个NNK突变并且无非NNK突变。位置权重矩阵是通过计算每个随机位置的所有突变的频率而生成的。如先前所述(Fowler等人 .Nature Methods 7(9):741-746,2010),通过将分选样品中给定位置的给定突变的频率除以未分选样品中非常相同突变的频率,计算每个突变的富集比率。选择具有高富集比的轻链和重链文库的单个突变来合成以克隆到具有Flag标签的哺乳动物Fab表达构建体中。将具有重链和轻链两者的质粒转染到293T细胞中进行30ml表达,并且使用抗Flag柱纯化Fab。

[0301] 由BIACORE®SPR测定Fab亲和力

[0302] 使用BIACORE®T200仪器通过SPR测量所选Fab变体对CD3 ϵ 的结合亲和力。简而言之,根据供应商的说明,用1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)和N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)试剂活化S系列传感器芯片CM5,并且将10mM乙酸钠中的5 μ g/ml CD3 ϵ (pH4.0)偶联以获得100个反应单位(RU),除了针对FC1(作为参考)。然后将未反应的组用1M乙醇胺阻断。接着,注射从低(0.02 nM)到高(20nM)的HBS-P缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,0.005%表面活性剂P20)中的Fab的三倍系列稀释液(流速:30 μ l/min)。通过从空白流动池中减去RU来校正Fab上的结合应答。记录传感图并在经过BIACORE®T200评估软件(2.0版)评估之前进行参考和缓冲液减除。使用简单的一对一Langmuir结合模型计算缔合速率(k_a)和解离速率(k_d)。平衡解离常数(K_D)计算为 k_d/k_a 。

的比率。测定具有图1所示的重链和轻链可变结构域序列的高亲和力抗CD3Fab 38E4v11的结合亲和力和动力学。与其亲本相比,38E4v11对CD3的结合亲和力和动力学显示超过10倍增加(即,与38E4v1相比,KD降低大于10 倍)(表4)。

[0303] 表4.38E4v11相对于38E4v1结合亲和力和动力学

[0304]	样品	k_a (1/M•s)	k_d (1/s)	K_D (nM)
	38E4v11	5×10^7	1.6×10^{-3}	0.032
	38E4v1 (亲本 Fab)	8.15×10^6	3.17×10^{-3}	0.389

[0305] 实施例2. 示例性Ly6G6D/CD3TDB (Ly6G6D TDB) 的生成和表征

[0306] 鉴于38E4v11朝向CD3的高亲和性,我们测试在T细胞靶向治疗抗体(也被称作“T细胞依赖性双特异性”(TDB)抗体)的背景下测试了其用途。TDB抗体能够同时结合T细胞上的细胞表面抗原(例如, CD3)和肿瘤细胞上的细胞表面抗原,从而使结合的T细胞有助于破坏肿瘤细胞。然而,针对肿瘤细胞表面上的低拷贝数细胞表面抗原靶的TDB抗体可能表现出降低的功效。因此,具有针对T细胞上的细胞表面抗原诸如CD3的高亲和力臂的TDB抗体对于与针对低拷贝数靶的臂配对特别有用。

[0307] 为了在这样的背景下测试高亲和力38E4v11的用途,我们生成 Ly6G6D TDB抗体,其具有针对CD3的一个高亲和力臂(38E4v11)和 针对细胞表面抗原Ly6G6D的一个臂,其通常意低拷贝数表达或在某些肿瘤的表面上表达不一致(参见例如美国专利号7,951,546,其通过 引用整体并入本文)。Ly6G6D TDB作为人IgG1以旋钮入孔洞形式以 全长抗体产生(Atwell等人.J.Mol.Biol.270:26-35,1997)。在大肠杆菌或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中表达半抗体,通过蛋白A-亲和层析纯化,并且如前所述体外退火适当的半抗体对(Spiess等人.Nat. Biotechnol.2013)。如果在CHO细胞中进行TDB抗体生成,则抗体包括例如在残基N297(例如,N297G)处的非糖基化突变,使得TDB抗体是无效应变体并且不能启动抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。退火后,通过疏水相互作用色谱(HIC)纯化Ly6G6D TDB,并且通过分析性凝胶过滤、质谱和聚丙烯酰胺凝胶电泳进行表征。通过这些方法,生成具有38E4v11作为其抗CD3臂的Ly6G6D TDB,其在本文中被称作Ly6G6D(38E4v11) TDB。另外,还分别生成本文中称为Ly6G6D(40G5c) TDB和Ly6G6D(38E4v1) TDB的两种其他 Ly6G6D TDB(其共享相同的抗Ly6G6D臂但具有抗CD3臂40G5c(分别具有SEQ ID NO:65-70的HVR-H1至HVR-H3和HVR-L1至 HVR-L3以及SEQ ID NO:71和72的VH和VL序列)或抗CD3臂 38E4v1(如上描述))。

[0308] 然后在体外细胞毒性测定和T细胞活化测定中测试三种Ly6G6D TDB (Ly6G6D(38E4v11) TDB、Ly6G6D(40G5c) TDB和Ly6G6D (38E4v1) TDB)。对于细胞杀伤测定,首先用细胞染色染料羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记过表达人Ly6G6D抗原(293-Ly6G6D)的15,000个293细胞,并且在各种浓度的Ly6G6D TDB抗体存在下,以5:1的效应细胞:靶细胞比率,将75,000人PBMC用作效应细胞 孵育24小时。在每个测定结束时,通过FACS将活293细胞作为 PI-CFSE+细胞门控出,并且通过流式细胞术获得绝对细胞计数。基于 非TDB处理对照计算细胞杀伤百分比。与Ly6G6D(40G5c) TDB和 Ly6G6D(38E4v1) TDB相比,Ly6G6D(38E4v11) TDB在较低浓度下 显示增强的细胞杀伤(图2)。

[0309] 当在体外T细胞活化测定中测试其活化T细胞的细胞毒性作用 的能力时,三种TDB再次显示出不同的功效。在T细胞活化测定中,将293-Ly6G6D细胞与人PBMC孵育24小时,所述人PBMC是在各种浓度的Ly6G6D TDB抗体的存在下,如上所述通过Ficoll1隔离从健康供体的全血中分离PBMC。通过流式细胞仪分析,通过CD69和 CD25表面表达检测活化的CD8+和CD4+T细胞。与其他测试的 Ly6G6D TDB,特别是Ly6G6D (40G5c) TDB相比,Ly6G6D (38E4v11) TDB在CD8+T细胞活化(图3A)和CD4+T细胞活化(图3B)中显示出 增强的功效,其针对CD3具有相对地低51nM的结合亲和力。

[0310] 其他实施方案

[0311] 尽管上述本发明已出于清楚理解的目的通过说明和实例方式详细描述,但描述和实施例不应解释为限制本发明的范围。本文引用的 所有专利和科学文献的公开内容皆以全文引用的方式明确并入本文。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 基因泰克公司 (Genentech, Inc.)
- [0003] <120> 抗CD3抗体及其使用方法
- [0004] <130> 50474-118W02
- [0005] <150> US 62/180,462
- [0006] <151> 2015-06-16
- [0007] <160> 79
- [0008] <170> PatentIn 版本 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 5
- [0011] <212> PRT
- [0012] <213> 人工序列
- [0013] <220>
- [0014] <223> 合成构建体
- [0015] <400> 1
- [0016] Ser Tyr Tyr Ile His
- [0017] 1 5
- [0018] <210> 2
- [0019] <211> 17
- [0020] <212> PRT
- [0021] <213> 人工序列
- [0022] <220>
- [0023] <223> 合成构建体
- [0024] <400> 2
- [0025] Trp Ile Tyr Pro Glu Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
- [0026] 1 5 10 15
- [0027] Asp
- [0028] <210> 3
- [0029] <211> 10
- [0030] <212> PRT
- [0031] <213> 人工序列
- [0032] <220>
- [0033] <223> 合成构建体
- [0034] <400> 3
- [0035] Asp Gly Tyr Ser Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr
- [0036] 1 5 10
- [0037] <210> 4
- [0038] <211> 17

[0039]	<212>	PRT
[0040]	<213>	人工序列
[0041]	<220>	
[0042]	<223>	合成构建体
[0043]	<400>	4
[0044]	Lys	Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
[0045]	1	5 10 15
[0046]	Ala	
[0047]	<210>	5
[0048]	<211>	7
[0049]	<212>	PRT
[0050]	<213>	人工序列
[0051]	<220>	
[0052]	<223>	合成构建体
[0053]	<400>	5
[0054]	Trp	Thr Ser Thr Arg Lys Ser
[0055]	1	5
[0056]	<210>	6
[0057]	<211>	8
[0058]	<212>	PRT
[0059]	<213>	人工序列
[0060]	<220>	
[0061]	<223>	合成构建体
[0062]	<400>	6
[0063]	Thr	Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr
[0064]	1	5
[0065]	<210>	7
[0066]	<211>	119
[0067]	<212>	PRT
[0068]	<213>	人工序列
[0069]	<220>	
[0070]	<223>	合成构建体
[0071]	<400>	7
[0072]	Glu	Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0073]	1	5 10 15
[0074]	Ser	Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
[0075]		20 25 30
[0076]	Tyr	Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0077]		35 40 45

[0078]	Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[0079]	50 55 60
[0080]	Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0081]	65 70 75 80
[0082]	Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0083]	85 90 95
[0084]	Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0085]	100 105 110
[0086]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0087]	115
[0088]	<210> 8
[0089]	<211> 112
[0090]	<212> PRT
[0091]	<213> 人工序列
[0092]	<220>
[0093]	<223> 合成构建体
[0094]	<400> 8
[0095]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0096]	1 5 10 15
[0097]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[0098]	20 25 30
[0099]	Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0100]	35 40 45
[0101]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
[0102]	50 55 60
[0103]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0104]	65 70 75 80
[0105]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Gln
[0106]	85 90 95
[0107]	Ser Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0108]	100 105 110
[0109]	<210> 9
[0110]	<211> 30
[0111]	<212> PRT
[0112]	<213> 人工序列
[0113]	<220>
[0114]	<223> 合成构建体
[0115]	<400> 9
[0116]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[0117]	1	5	10	15
[0118]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr			
[0119]	20	25	30	
[0120]	<210> 10			
[0121]	<211> 14			
[0122]	<212> PRT			
[0123]	<213> 人工序列			
[0124]	<220>			
[0125]	<223> 合成构建体			
[0126]	<400> 10			
[0127]	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly			
[0128]	1	5	10	
[0129]	<210> 11			
[0130]	<211> 32			
[0131]	<212> PRT			
[0132]	<213> 人工序列			
[0133]	<220>			
[0134]	<223> 合成构建体			
[0135]	<400> 11			
[0136]	Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu			
[0137]	1	5	10	15
[0138]	Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg			
[0139]	20	25	30	
[0140]	<210> 12			
[0141]	<211> 11			
[0142]	<212> PRT			
[0143]	<213> 人工序列			
[0144]	<220>			
[0145]	<223> 合成构建体			
[0146]	<400> 12			
[0147]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0148]	1	5	10	
[0149]	<210> 13			
[0150]	<211> 23			
[0151]	<212> PRT			
[0152]	<213> 人工序列			
[0153]	<220>			
[0154]	<223> 合成构建体			
[0155]	<400> 13			

[0156]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0157]	1 5 10 15
[0158]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
[0159]	20
[0160]	<210> 14
[0161]	<211> 15
[0162]	<212> PRT
[0163]	<213> 人工序列
[0164]	<220>
[0165]	<223> 合成构建体
[0166]	<400> 14
[0167]	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
[0168]	1 5 10 15
[0169]	<210> 15
[0170]	<211> 32
[0171]	<212> PRT
[0172]	<213> 人工序列
[0173]	<220>
[0174]	<223> 合成构建体
[0175]	<400> 15
[0176]	Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
[0177]	1 5 10 15
[0178]	Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
[0179]	20 25 30
[0180]	<210> 16
[0181]	<211> 10
[0182]	<212> PRT
[0183]	<213> 人工序列
[0184]	<220>
[0185]	<223> 合成构建体
[0186]	<400> 16
[0187]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0188]	1 5 10
[0189]	<210> 17
[0190]	<211> 10
[0191]	<212> PRT
[0192]	<213> 人工序列
[0193]	<220>
[0194]	<223> 合成构建体

[0195]	<400> 17
[0196]	Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
[0197]	1 5 10
[0198]	<210> 18
[0199]	<211> 17
[0200]	<212> PRT
[0201]	<213> 人工序列
[0202]	<220>
[0203]	<223> 合成构建体
[0204]	<400> 18
[0205]	Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[0206]	1 5 10 15
[0207]	Gly
[0208]	<210> 19
[0209]	<211> 13
[0210]	<212> PRT
[0211]	<213> 人工序列
[0212]	<220>
[0213]	<223> 合成构建体
[0214]	<400> 19
[0215]	Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
[0216]	1 5 10
[0217]	<210> 20
[0218]	<211> 10
[0219]	<212> PRT
[0220]	<213> 人工序列
[0221]	<220>
[0222]	<223> 合成构建体
[0223]	<400> 20
[0224]	Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
[0225]	1 5 10
[0226]	<210> 21
[0227]	<211> 7
[0228]	<212> PRT
[0229]	<213> 人工序列
[0230]	<220>
[0231]	<223> 合成构建体
[0232]	<400> 21
[0233]	Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser

[illegible]

[0273]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
[0274]	20 25 30
[0275]	<210> 26
[0276]	<211> 11
[0277]	<212> PRT
[0278]	<213> 人工序列
[0279]	<220>
[0280]	<223> 合成构建体
[0281]	<400> 26
[0282]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0283]	1 5 10
[0284]	<210> 27
[0285]	<211> 23
[0286]	<212> PRT
[0287]	<213> 人工序列
[0288]	<220>
[0289]	<223> 合成构建体
[0290]	<400> 27
[0291]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0292]	1 5 10 15
[0293]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
[0294]	20
[0295]	<210> 28
[0296]	<211> 15
[0297]	<212> PRT
[0298]	<213> 人工序列
[0299]	<220>
[0300]	<223> 合成构建体
[0301]	<400> 28
[0302]	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
[0303]	1 5 10 15
[0304]	<210> 29
[0305]	<211> 32
[0306]	<212> PRT
[0307]	<213> 人工序列
[0308]	<220>
[0309]	<223> 合成构建体
[0310]	<400> 29
[0311]	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

[0312]	1	5	10	15
[0313]	Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys			
[0314]	20	25	30	
[0315]	<210> 30			
[0316]	<211> 10			
[0317]	<212> PRT			
[0318]	<213> 人工序列			
[0319]	<220>			
[0320]	<223> 合成构建体			
[0321]	<400> 30			
[0322]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[0323]	1	5	10	
[0324]	<210> 31			
[0325]	<211> 122			
[0326]	<212> PRT			
[0327]	<213> 人工序列			
[0328]	<220>			
[0329]	<223> 合成构建体			
[0330]	<400> 31			
[0331]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0332]	1	5	10	15
[0333]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
[0334]	20	25	30	
[0335]	Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0336]	35	40	45	
[0337]	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe			
[0338]	50	55	60	
[0339]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[0340]	65	70	75	80
[0341]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0342]	85	90	95	
[0343]	Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp			
[0344]	100	105	110	
[0345]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0346]	115	120		
[0347]	<210> 32			
[0348]	<211> 106			
[0349]	<212> PRT			
[0350]	<213> 人工序列			

[0351]	<220>
[0352]	<223> 合成构建体
[0353]	<400> 32
[0354]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0355]	1 5 10 15
[0356]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0357]	20 25 30
[0358]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
[0359]	35 40 45
[0360]	Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
[0361]	50 55 60
[0362]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
[0363]	65 70 75 80
[0364]	Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
[0365]	85 90 95
[0366]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0367]	100 105
[0368]	<210> 33
[0369]	<211> 5
[0370]	<212> PRT
[0371]	<213> 人工序列
[0372]	<220>
[0373]	<223> 合成构建体
[0374]	<400> 33
[0375]	Arg Phe Gly Val His
[0376]	1 5
[0377]	<210> 34
[0378]	<211> 16
[0379]	<212> PRT
[0380]	<213> 人工序列
[0381]	<220>
[0382]	<223> 合成构建体
[0383]	<400> 34
[0384]	Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Ser
[0385]	1 5 10 15
[0386]	<210> 35
[0387]	<211> 12
[0388]	<212> PRT
[0389]	<213> 人工序列

[0390] <220>
[0391] <223> 合成构建体
[0392] <400> 35
[0393] His Tyr Tyr Gly Ser Ser Asp Tyr Ala Leu Asp Asn
[0394] 1 5 10
[0395] <210> 36
[0396] <211> 11
[0397] <212> PRT
[0398] <213> 人工序列
[0399] <220>
[0400] <223> 合成构建体
[0401] <400> 36
[0402] Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Asn Ile Val Val
[0403] 1 5 10
[0404] <210> 37
[0405] <211> 7
[0406] <212> PRT
[0407] <213> 人工序列
[0408] <220>
[0409] <223> 合成构建体
[0410] <400> 37
[0411] Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
[0412] 1 5
[0413] <210> 38
[0414] <211> 9
[0415] <212> PRT
[0416] <213> 人工序列
[0417] <220>
[0418] <223> 合成构建体
[0419] <400> 38
[0420] Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
[0421] 1 5
[0422] <210> 39
[0423] <211> 30
[0424] <212> PRT
[0425] <213> 人工序列
[0426] <220>
[0427] <223> 合成构建体
[0428] <400> 39

[0429]	Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
[0430]	1 5 10 15
[0431]	Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
[0432]	20 25 30
[0433]	<210> 40
[0434]	<211> 14
[0435]	<212> PRT
[0436]	<213> 人工序列
[0437]	<220>
[0438]	<223> 合成构建体
[0439]	<400> 40
[0440]	Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
[0441]	1 5 10
[0442]	<210> 41
[0443]	<211> 32
[0444]	<212> PRT
[0445]	<213> 人工序列
[0446]	<220>
[0447]	<223> 合成构建体
[0448]	<400> 41
[0449]	Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys
[0450]	1 5 10 15
[0451]	Leu Asn Ser Leu Lys Val Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ser Asn
[0452]	20 25 30
[0453]	<210> 42
[0454]	<211> 11
[0455]	<212> PRT
[0456]	<213> 人工序列
[0457]	<220>
[0458]	<223> 合成构建体
[0459]	<400> 42
[0460]	Trp Gly Gln Gly Ile Ser Val Thr Val Ser Ser
[0461]	1 5 10
[0462]	<210> 43
[0463]	<211> 23
[0464]	<212> PRT
[0465]	<213> 人工序列
[0466]	<220>
[0467]	<223> 合成构建体

[0468]	<400> 43
[0469]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val Gly
[0470]	1 5 10 15
[0471]	Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys
[0472]	20
[0473]	<210> 44
[0474]	<211> 15
[0475]	<212> PRT
[0476]	<213> 人工序列
[0477]	<220>
[0478]	<223> 合成构建体
[0479]	<400> 44
[0480]	Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile Tyr
[0481]	1 5 10 15
[0482]	<210> 45
[0483]	<211> 32
[0484]	<212> PRT
[0485]	<213> 人工序列
[0486]	<220>
[0487]	<223> 合成构建体
[0488]	<400> 45
[0489]	Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
[0490]	1 5 10 15
[0491]	Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys
[0492]	20 25 30
[0493]	<210> 46
[0494]	<211> 10
[0495]	<212> PRT
[0496]	<213> 人工序列
[0497]	<220>
[0498]	<223> 合成构建体
[0499]	<400> 46
[0500]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0501]	1 5 10
[0502]	<210> 47
[0503]	<211> 120
[0504]	<212> PRT
[0505]	<213> 人工序列
[0506]	<220>

[0507]	<223> 合成构建体															
[0508]	<400> 47															
[0509]	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln
[0510]	1				5					10					15	
[0511]	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Arg	Phe
[0512]					20					25					30	
[0513]	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu
[0514]					35					40					45	
[0515]	Gly	Val	Ile	Trp	Arg	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ala	Ala	Phe	Met
[0516]			50					55					60			
[0517]	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe
[0518]	65						70				75					80
[0519]	Lys	Leu	Asn	Ser	Leu	Lys	Val	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ser
[0520]						85					90					95
[0521]	Asn	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Asp	Tyr	Ala	Leu	Asp	Asn	Trp	Gly	Gln
[0522]						100				105					110	
[0523]	Gly	Ile	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
[0524]						115					120					
[0525]	<210> 48															
[0526]	<211> 107															
[0527]	<212> PRT															
[0528]	<213> 人工序列															
[0529]	<220>															
[0530]	<223> 合成构建体															
[0531]	<400> 48															
[0532]	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	His	Lys	Ile	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly
[0533]	1					5					10				15	
[0534]	Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Asn	Ile
[0535]						20					25				30	
[0536]	Val	Val	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Asn	Leu	Leu	Ile
[0537]						35					40				45	
[0538]	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
[0539]			50					55					60			
[0540]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala
[0541]	65						70				75					80
[0542]	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ser	Ser	Pro	Tyr
[0543]							85				90					95
[0544]	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
[0545]							100				105					

[0585]	<213>	人工序列
[0586]	<220>	
[0587]	<223>	合成构建体
[0588]	<400>	53
[0589]	Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser	
[0590]	1	5
[0591]	<210>	54
[0592]	<211>	9
[0593]	<212>	PRT
[0594]	<213>	人工序列
[0595]	<220>	
[0596]	<223>	合成构建体
[0597]	<400>	54
[0598]	Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp Thr	
[0599]	1	5
[0600]	<210>	55
[0601]	<211>	471
[0602]	<212>	PRT
[0603]	<213>	人工序列
[0604]	<220>	
[0605]	<223>	合成构建体
[0606]	<400>	55
[0607]	Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser	
[0608]	1	5 10 15
[0609]	Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro	
[0610]	20 25 30	
[0611]	Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser	
[0612]	35 40 45	
[0613]	Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro	
[0614]	50 55 60	
[0615]	Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Gly	
[0616]	65 70 75 80	
[0617]	Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp	
[0618]	85 90 95	
[0619]	Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala	
[0620]	100 105 110	
[0621]	Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Trp Ala Phe	
[0622]	115 120 125	
[0623]	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	

[0624]	130	135	140
[0625]	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser		
[0626]	145	150	155
[0627]	Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu		
[0628]	165	170	175
[0629]	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His		
[0630]	180	185	190
[0631]	Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser		
[0632]	195	200	205
[0633]	Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
[0634]	210	215	220
[0635]	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu		
[0636]	225	230	235
[0637]	Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
[0638]	245	250	255
[0639]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
[0640]	260	265	270
[0641]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
[0642]	275	280	285
[0643]	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
[0644]	290	295	300
[0645]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
[0646]	305	310	315
[0647]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
[0648]	325	330	335
[0649]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
[0650]	340	345	350
[0651]	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
[0652]	355	360	365
[0653]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		
[0654]	370	375	380
[0655]	Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
[0656]	385	390	395
[0657]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
[0658]	405	410	415
[0659]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
[0660]	420	425	430
[0661]	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
[0662]	435	440	445

[0663]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0664]	450 455 460
[0665]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0666]	465 470
[0667]	<210> 56
[0668]	<211> 237
[0669]	<212> PRT
[0670]	<213> 人工序列
[0671]	<220>
[0672]	<223> 合成构建体
[0673]	<400> 56
[0674]	Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
[0675]	1 5 10 15
[0676]	Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
[0677]	20 25 30
[0678]	Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
[0679]	35 40 45
[0680]	Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
[0681]	50 55 60
[0682]	Lys Ala Asn Lys Leu Leu Ile Ser Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly
[0683]	65 70 75 80
[0684]	Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
[0685]	85 90 95
[0686]	Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
[0687]	100 105 110
[0688]	Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
[0689]	115 120 125
[0690]	Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
[0691]	130 135 140
[0692]	Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
[0693]	145 150 155 160
[0694]	Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
[0695]	165 170 175
[0696]	Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
[0697]	180 185 190
[0698]	Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
[0699]	195 200 205
[0700]	Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
[0701]	210 215 220

[0702]	Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0703]	225 230 235
[0704]	<210> 57
[0705]	<211> 5
[0706]	<212> PRT
[0707]	<213> 人工序列
[0708]	<220>
[0709]	<223> 合成构建体
[0710]	<400> 57
[0711]	Ser Tyr Tyr Ile His
[0712]	1 5
[0713]	<210> 58
[0714]	<211> 17
[0715]	<212> PRT
[0716]	<213> 人工序列
[0717]	<220>
[0718]	<223> 合成构建体
[0719]	<400> 58
[0720]	Trp Ile Tyr Pro Glu Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[0721]	1 5 10 15
[0722]	Asp
[0723]	<210> 59
[0724]	<211> 10
[0725]	<212> PRT
[0726]	<213> 人工序列
[0727]	<220>
[0728]	<223> 合成构建体
[0729]	<400> 59
[0730]	Asp Gly Tyr Ser Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr
[0731]	1 5 10
[0732]	<210> 60
[0733]	<211> 17
[0734]	<212> PRT
[0735]	<213> 人工序列
[0736]	<220>
[0737]	<223> 合成构建体
[0738]	<400> 60
[0739]	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
[0740]	1 5 10 15

91

[0780]	100	105	110
[0781]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0782]	115		
[0783]	<210> 64		
[0784]	<211> 112		
[0785]	<212> PRT		
[0786]	<213> 人工序列		
[0787]	<220>		
[0788]	<223> 合成构建体		
[0789]	<400> 64		
[0790]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
[0791]	1 5 10 15		
[0792]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser		
[0793]	20 25 30		
[0794]	Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
[0795]	35 40 45		
[0796]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val		
[0797]	50 55 60		
[0798]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[0799]	65 70 75 80		
[0800]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln		
[0801]	85 90 95		
[0802]	Ser Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0803]	100 105 110		
[0804]	<210> 65		
[0805]	<211> 5		
[0806]	<212> PRT		
[0807]	<213> 人工序列		
[0808]	<220>		
[0809]	<223> 合成构建体		
[0810]	<400> 65		
[0811]	Asn Tyr Tyr Ile His		
[0812]	1 5		
[0813]	<210> 66		
[0814]	<211> 17		
[0815]	<212> PRT		
[0816]	<213> 人工序列		
[0817]	<220>		
[0818]	<223> 合成构建体		

[0819]	<400> 66
[0820]	Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[0821]	1 5 10 15
[0822]	Gly
[0823]	<210> 67
[0824]	<211> 10
[0825]	<212> PRT
[0826]	<213> 人工序列
[0827]	<220>
[0828]	<223> 合成构建体
[0829]	<400> 67
[0830]	Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr
[0831]	1 5 10
[0832]	<210> 68
[0833]	<211> 17
[0834]	<212> PRT
[0835]	<213> 人工序列
[0836]	<220>
[0837]	<223> 合成构建体
[0838]	<400> 68
[0839]	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
[0840]	1 5 10 15
[0841]	Ala
[0842]	<210> 69
[0843]	<211> 7
[0844]	<212> PRT
[0845]	<213> 人工序列
[0846]	<220>
[0847]	<223> 合成构建体
[0848]	<400> 69
[0849]	Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
[0850]	1 5
[0851]	<210> 70
[0852]	<211> 8
[0853]	<212> PRT
[0854]	<213> 人工序列
[0855]	<220>
[0856]	<223> 合成构建体
[0857]	<400> 70

[0858]	Thr Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr
[0859]	1 5
[0860]	<210> 71
[0861]	<211> 119
[0862]	<212> PRT
[0863]	<213> 人工序列
[0864]	<220>
[0865]	<223> 合成构建体
[0866]	<400> 71
[0867]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0868]	1 5 10 15
[0869]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[0870]	20 25 30
[0871]	Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0872]	35 40 45
[0873]	Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[0874]	50 55 60
[0875]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0876]	65 70 75 80
[0877]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0878]	85 90 95
[0879]	Ala Arg Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0880]	100 105 110
[0881]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
[0882]	115
[0883]	<210> 72
[0884]	<211> 112
[0885]	<212> PRT
[0886]	<213> 人工序列
[0887]	<220>
[0888]	<223> 合成构建体
[0889]	<400> 72
[0890]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
[0891]	1 5 10 15
[0892]	Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[0893]	20 25 30
[0894]	Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0895]	35 40 45
[0896]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

[0897]	50	55	60
[0898]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[0899]	65	70	75
[0900]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Gln		80
[0901]		85	90
[0902]	Ser Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		95
[0903]		100	105
[0904]	<210> 73		110
[0905]	<211> 207		
[0906]	<212> PRT		
[0907]	<213> 智人		
[0908]	<400> 73		
[0909]	Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser		
[0910]	1	5	10
[0911]	Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr		15
[0912]		20	25
[0913]	Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr		30
[0914]		35	40
[0915]	Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys		45
[0916]	50	55	60
[0917]	Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp		
[0918]	65	70	75
[0919]	His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr		80
[0920]		85	90
[0921]	Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu		95
[0922]		100	105
[0923]	Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met		110
[0924]		115	120
[0925]	Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu		125
[0926]	130	135	140
[0927]	Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys		
[0928]	145	150	155
[0929]	Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn		160
[0930]		165	170
[0931]	Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg		175
[0932]		180	185
[0933]	Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile		190
[0934]		195	200
[0935]	<210> 74		205

[0936]	<211>	198
[0937]	<212>	PRT
[0938]	<213>	食蟹猴
[0939]	<400>	74
[0940]	Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser	
[0941]	1	5 10 15
[0942]	Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr	
[0943]	20	25 30
[0944]	Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr	
[0945]	35	40 45
[0946]	Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys	
[0947]	50	55 60
[0948]	Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu	
[0949]	65	70 75 80
[0950]	Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro	
[0951]	85	90 95
[0952]	Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn	
[0953]	100	105 110
[0954]	Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp	
[0955]	115	120 125
[0956]	Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys	
[0957]	130	135 140
[0958]	Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly	
[0959]	145	150 155 160
[0960]	Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn	
[0961]	165	170 175
[0962]	Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly	
[0963]	180	185 190
[0964]	Leu Asn Gln Arg Arg Ile	
[0965]	195	
[0966]	<210>	75
[0967]	<211>	182
[0968]	<212>	PRT
[0969]	<213>	智人
[0970]	<400>	75
[0971]	Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu	
[0972]	1	5 10 15
[0973]	Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys	
[0974]	20	25 30

[0975]	Val	Tyr	Asp	Tyr	Gln	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Leu	Leu	Thr	Cys	Asp	Ala
[0976]			35					40						45		
[0977]	Glu	Ala	Lys	Asn	Ile	Thr	Trp	Phe	Lys	Asp	Gly	Lys	Met	Ile	Gly	Phe
[0978]			50					55						60		
[0979]	Leu	Thr	Glu	Asp	Lys	Lys	Lys	Trp	Asn	Leu	Gly	Ser	Asn	Ala	Lys	Asp
[0980]	65						70					75				80
[0981]	Pro	Arg	Gly	Met	Tyr	Gln	Cys	Lys	Gly	Ser	Gln	Asn	Lys	Ser	Lys	Pro
[0982]					85					90						95
[0983]	Leu	Gln	Val	Tyr	Tyr	Arg	Met	Cys	Gln	Asn	Cys	Ile	Glu	Leu	Asn	Ala
[0984]					100					105						110
[0985]	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Phe	Leu	Phe	Ala	Glu	Ile	Val	Ser	Ile	Phe	Val
[0986]					115					120						125
[0987]	Leu	Ala	Val	Gly	Val	Tyr	Phe	Ile	Ala	Gly	Gln	Asp	Gly	Val	Arg	Gln
[0988]					130					135						140
[0989]	Ser	Arg	Ala	Ser	Asp	Lys	Gln	Thr	Leu	Leu	Pro	Asn	Asp	Gln	Leu	Tyr
[0990]	145					150						155				160
[0991]	Gln	Pro	Leu	Lys	Asp	Arg	Glu	Asp	Asp	Gln	Tyr	Ser	His	Leu	Gln	Gly
[0992]					165					170						175
[0993]	Asn	Gln	Leu	Arg	Arg	Asn										
[0994]					180											
[0995]	<210> 76															
[0996]	<211> 181															
[0997]	<212> PRT															
[0998]	<213> 食蟹猴															
[0999]	<400> 76															
[1000]	Met	Val	Gln	Gly	Lys	Gly	Leu	Thr	Gly	Phe	Ile	Leu	Ala	Ile	Ile	Leu
[1001]	1				5					10					15	
[1002]	Leu	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Gln	Ser	Phe	Glu	Glu	Asn	Arg	Lys	Leu	Asn
[1003]					20					25					30	
[1004]	Val	Tyr	Asn	Gln	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Leu	Leu	Thr	Cys	His	Val	Lys
[1005]					35					40				45		
[1006]	Asn	Thr	Asn	Ile	Thr	Trp	Phe	Lys	Glu	Gly	Lys	Met	Ile	Asp	Ile	Leu
[1007]					50					55				60		
[1008]	Thr	Ala	His	Lys	Asn	Lys	Trp	Asn	Leu	Gly	Ser	Asn	Thr	Lys	Asp	Pro
[1009]	65						70					75				80
[1010]	Arg	Gly	Val	Tyr	Gln	Cys	Lys	Gly	Ser	Lys	Asp	Lys	Ser	Lys	Thr	Leu
[1011]					85					90						95
[1012]	Gln	Val	Tyr	Tyr	Arg	Met	Cys	Gln	Asn	Cys	Ile	Glu	Leu	Asn	Ala	Ala
[1013]					100					105						110

[1014]	Thr	Ile	Leu	Gly	Phe	Val	Phe	Ala	Glu	Ile	Ile	Ser	Ile	Phe	Phe	Leu
[1015]			115					120					125			
[1016]	Ala	Val	Gly	Val	Tyr	Phe	Ile	Ala	Gly	Gln	Asp	Gly	Val	Arg	Gln	Ser
[1017]			130					135					140			
[1018]	Arg	Ala	Ser	Asp	Lys	Gln	Thr	Leu	Leu	Pro	Asn	Asp	Gln	Leu	Tyr	Gln
[1019]	145					150					155					160
[1020]	Pro	Leu	Lys	Asp	Arg	Glu	Asp	Asp	Gln	Tyr	Ser	His	Leu	Gln	Gly	Asn
[1021]					165					170						175
[1022]	Gln	Leu	Arg	Met	Asn											
[1023]					180											
[1024]	<210>	77														
[1025]	<211>	27														
[1026]	<212>	PRT														
[1027]	<213>	人工序列														
[1028]	<220>															
[1029]	<223>	合成构建体														
[1030]	<400>	77														
[1031]	Gln	Asp	Gly	Asn	Glu	Glu	Met	Gly	Gly	Ile	Thr	Gln	Thr	Pro	Tyr	Lys
[1032]	1				5					10					15	
[1033]	Val	Ser	Ile	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Ile	Leu	Thr					
[1034]					20					25						
[1035]	<210>	78														
[1036]	<211>	28														
[1037]	<212>	PRT														
[1038]	<213>	人工序列														
[1039]	<220>															
[1040]	<223>	合成构建体														
[1041]	<400>	78														
[1042]	Gln	Asp	Gly	Asn	Glu	Glu	Met	Gly	Gly	Ile	Thr	Gln	Thr	Pro	Tyr	Lys
[1043]	1				5					10					15	
[1044]	Val	Ser	Ile	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Ile	Leu	Thr	Cys				
[1045]					20					25						
[1046]	<210>	79														
[1047]	<211>	16														
[1048]	<212>	PRT														
[1049]	<213>	人工序列														
[1050]	<220>															
[1051]	<223>	合成构建体														
[1052]	<400>	79														

[1053]	Gln	Asp	Gly	Asn	Glu	Glu	Met	Gly	Gly	Ile	Thr	Gln	Thr	Pro	Tyr	Lys
[1054]	1				5					10					15	

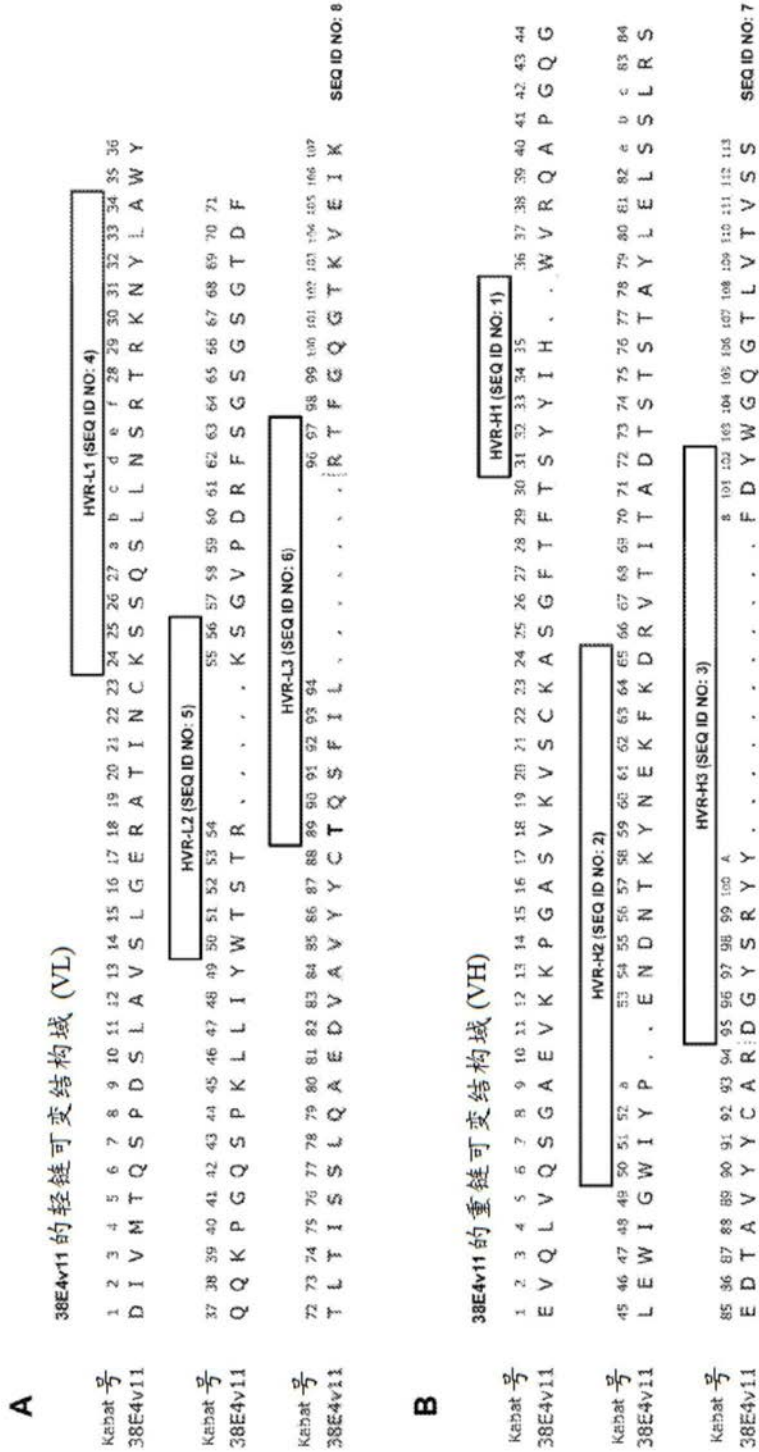


图1A-1B

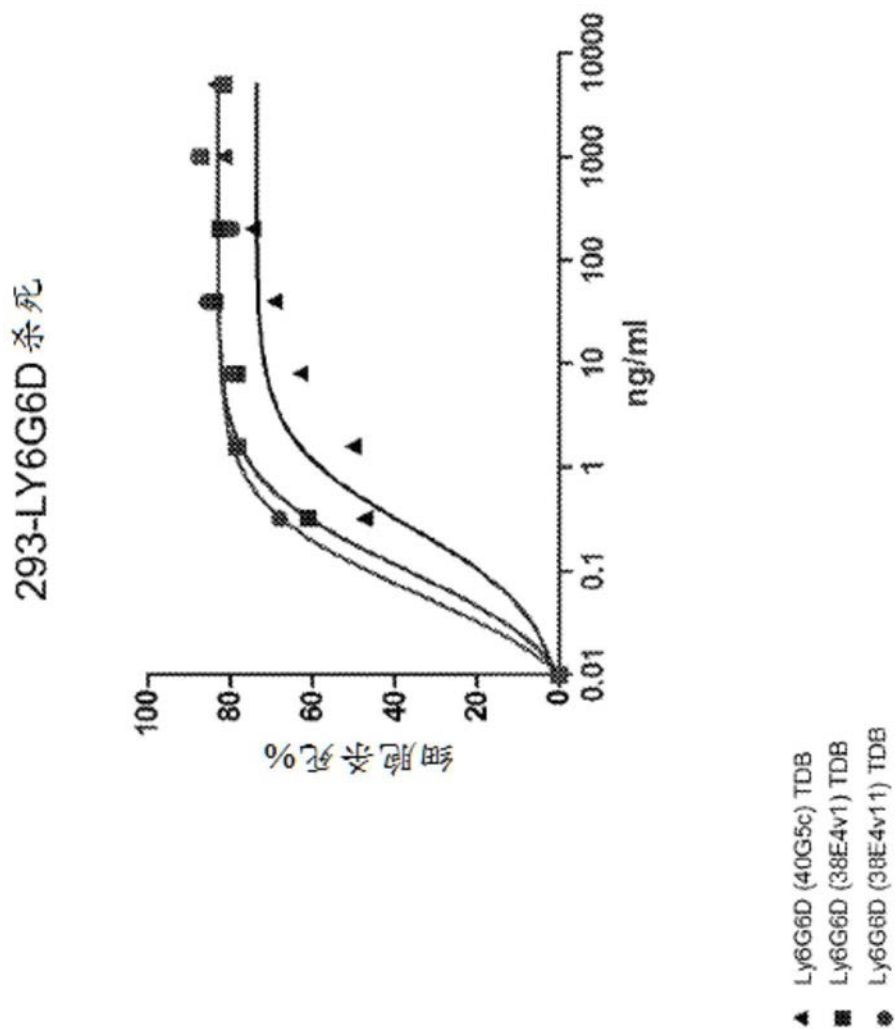


图2

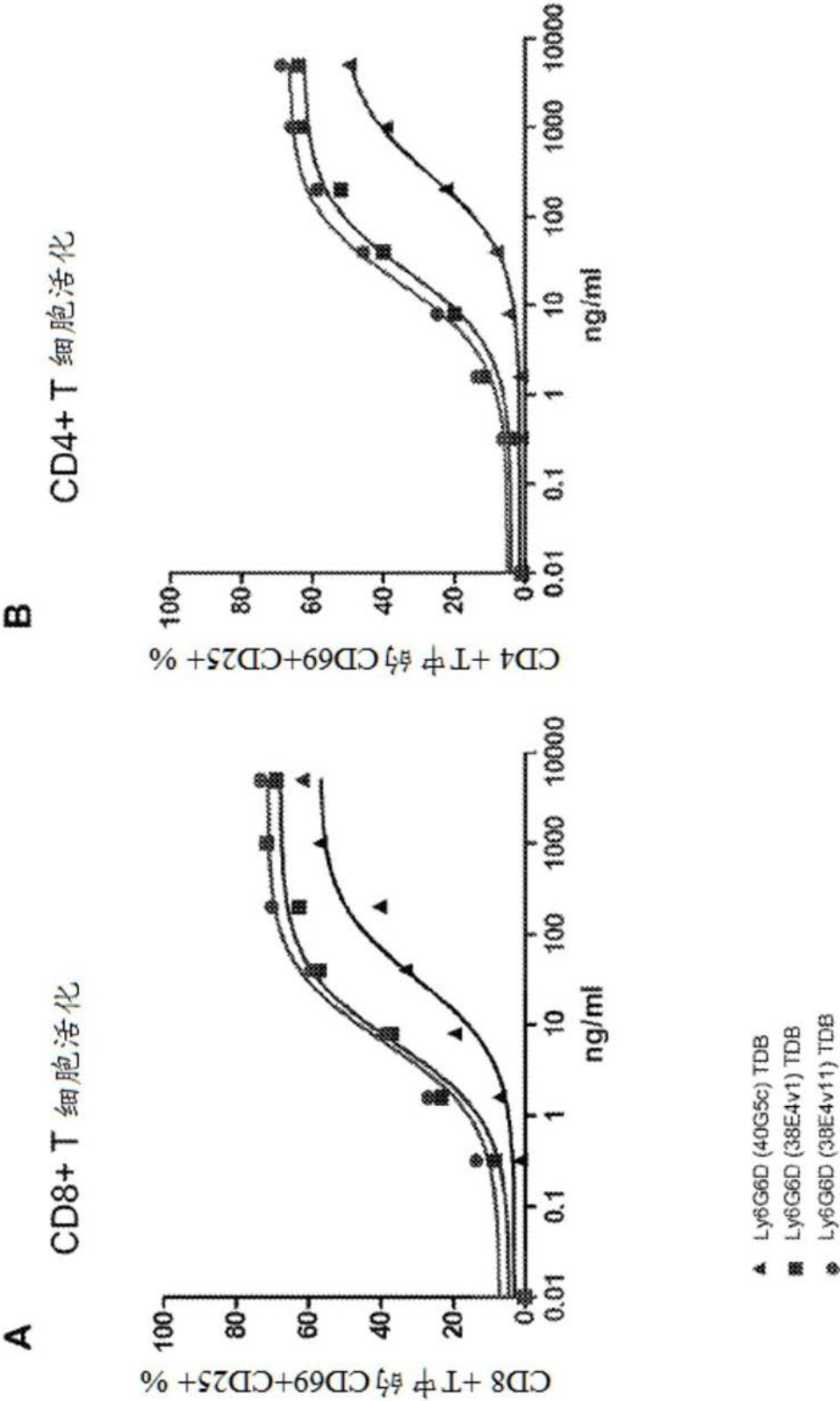


图3A-B