(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 118201960 B
(45)授权公告日 2025.05.16

(21)申请号 202180104172.1
(22)申请日 2021.11.19
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 118201960 A
(43)申请公布日 2024.06.14
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.05.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2021/131804 2021.11.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/087255 ZH 2023.05.25
(73)专利权人 武汉友芝友生物制药股份有限公司
地址 430075 湖北省武汉市东湖技术开发区高新大道666号光谷生物城C2-1
(72)发明人 方丽娟 张敬 华珊 周鹏飞
(74)专利代理机构 武汉派富知识产权代理事务所(普通合伙) 42305
专利代理师 赵丽
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 104592391 A,2015.05.06
CN 104592392 A,2015.05.06
CN 112142847 A,2020.12.29
审查员 刘珊
权利要求书3页 说明书23页
序列表43页 附图5页

(54)发明名称

双特异性抗体及其应用

(57)摘要

本发明提供了双特异性抗体及其应用,所述双特异性抗体包含特异性结合EpCAM的抗原结合结构域和特异性结合CD3的抗原结合结构域。

CN 118201960 B

1.双特异性抗体,其特征在于,由特异性结合EpCAM的轻链-重链对和特异性结合CD3的融合肽组成,其中

所述轻链-重链对由轻链和重链组成;所述轻链由轻链可变区和轻链恒定区组成,所述重链由重链可变区、CH1和第一Fc片段组成;所述第一Fc片段由铰链区,CH2和CH3a组成;所述轻链-重链对中特异性结合EpCAM的抗原结合结构域包含以下CDRs:

重链可变区中的CDRH1-H3和轻链可变区中包含的CDRL1-L3,其中CDRH1的序列如SEQ ID NO:35所示,CDRH2的序列如SEQ ID NO:36所示,CDRH3的序列如SEQ ID NO:37所示,CDRL1的序列如SEQ ID NO:32所示,CDRL2的序列如SEQ ID NO:33所示,CDRL3的序列如SEQ ID NO:34所示;

所述融合肽由特异性结合CD3的ScFv、连接肽和第二Fc片段组成;所述ScFv从N端至C端方向依次由重链可变区,连接肽和轻链可变区组成,所述第二Fc片段从N端至C端方向依次由铰链区,CH2和CH3b组成,所述轻链可变区的C端与所述第二Fc片段的铰链区通过连接肽连接;所述融合肽中特异性结合CD3的抗原结合结构域包含以下CDRs:

(1)重链可变区中的CDRH1-H3和轻链可变区中的CDRL1-L3,其中CDRH1的序列如SEQ ID NO:44所示,CDRH2的序列如SEQ ID NO:45所示,CDRH3的序列如SEQ ID NO:46所示;CDRL1的序列如SEQ ID NO:47所示,CDRL2的序列如SEQ ID NO:48所示,CDRL3的序列如SEQ ID NO:49所示;或

(2)重链可变区中的CDRH1-H3和轻链可变区中的CDRL1-L3,其中CDRH1的序列如SEQ ID NO:52所示,CDRH2的序列如SEQ ID NO:53所示,CDRH3的序列如SEQ ID NO:54所示,CDRL1的序列如SEQ ID NO:55所示,CDRL2的序列如SEQ ID NO:56所示,CDRL3的序列如SEQ ID NO:57所示。

2.权利要求1所述的双特异性抗体,其中所述特异性结合EpCAM的抗原结合结构域包含SEQ ID NO:14所示的重链可变区,和SEQ ID NO:13所示的轻链可变区;所述特异性结合CD3的抗原结合结构域包含:

(1)SEQ ID NO:50所示的重链可变区和SEQ ID NO:51所示的轻链可变区,或

(2)SEQ ID NO:58所示的重链可变区和SEQ ID NO:59所示的轻链可变区。

3.权利要求1所述的双特异性抗体,其中所述特异性结合EpCAM的抗原结合结构域包含SEQ ID NO:14所示的重链可变区,和SEQ ID NO:13所示的轻链可变区;所述特异性结合CD3的抗原结合结构域包含:

(1)SEQ ID NO:18所示的ScFv,或

(2)SEQ ID NO:19所示的ScFv。

4.权利要求1所述的双特异性抗体,所述第一Fc片段和第二Fc片段为人IgG Fc片段。

5.权利要求1所述的双特异性抗体,与野生型抗体比,所述第一Fc片段和/或第二Fc片段包含以下替换中的至少一种组合:

(1)一个CH3上的替换为T366W,另一CH3上的替换为Y407A;

(2)一个CH3上的替换为T366W,另一CH3上的替换为Y407V;

(3)一个CH3上的替换为T366Y,另一CH3上的替换为Y407A;

(4)一个CH3上的替换为T366Y,另一CH3上的替换为Y407V;

(5)一个CH3上的替换为T366W,另一CH3上的替换为T366S,L368A,Y407V;

(6)一个CH3上的替换为D356K,D399K,另一CH3上的替换为K392D,K409D;

(7)一个CH3上的替换为L368R,D399K,另一CH3上的替换为K392D,K409D;

(8)一个CH3上的替换为L368K,D399K,另一CH3上的替换为K392D,K409D;

(9)一个CH3上的替换为L368R,D399K,另一CH3上的替换为K409D;

(10)一个CH3上的替换为L368K,D399K,另一CH3上的替换为K409D;

(11)一个CH3上的替换为L368R,另一CH3上的替换为K409D;

(12)一个CH3上的替换为L368K,另一CH3上的替换为K409D;

(13)一个CH3上的替换为S354C,另一CH3上的替换为Y349C;

(14)其中一个CH3上的替换为H435R,Y436F。

6.权利要求1所述的双特异性抗体,其中:

(a)融合肽的CH3b和重链的CH3a具有形成杵-臼结构的替换对;

(b)融合肽的CH3b和重链的CH3a具有形成离子键的替换对;

(c)融合肽的CH3b和重链的CH3a具有形成二硫键的替换对;和/或

(d)融合肽的CH3b和重链的CH3a具有导致与蛋白A的结合能力下降的替换。

7.权利要求1所述的双特异性抗体,所述ScFv中的连接肽包括SEQ ID No:4的序列;所述轻链可变区的C端与所述第二Fc片段的铰链区之间的连接肽包括SEQ ID No:5的序列;所述CH1包括SEQ ID No:2的序列;和/或所述轻链恒定区包括选自SEQ ID Nos:1、60-65任一项的序列。

8.权利要求1所述的双特异性抗体,所述第一Fc片段和/或第二Fc片段包含SEQ ID No:3的序列的铰链区、选自SEQ ID Nos: 6、7、66-71任一项的序列的CH2。

9.权利要求1所述的双特异性抗体,CH3a和CH3b的序列选自以下各项组成的组:

(1)其中一个序列如SEQ ID NO:8所示,另一个序列如SEQ ID NO:11所示;

(2)其中一个序列如SEQ ID NO:9所示,另一个序列如SEQ ID NO:12所示;

(3)其中一个序列如SEQ ID NO:72所示,另一个序列如SEQ ID NO:74所示;

(4)其中一个序列如SEQ ID NO:9所示,另一个序列如SEQ ID NO:75所示;和

(5)其中一个序列如SEQ ID NO:73所示,另一个序列如SEQ ID NO:76所示。

10.权利要求1所述的双特异性抗体,所述双特异性抗体选自以下各项组成的组:

(1)其由融合肽,重链和轻链组成;其中融合肽由SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11组成;重链由SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8组成;轻链由SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1组成;

(2)其由融合肽,重链和轻链组成;其中融合肽由SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11组成;重链由SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8组成;轻链由SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1组成;

(3)其由融合肽,重链和轻链组成;其中融合肽由SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:12组成;重链由SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9组成;轻链由SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1组成;

(4)其由融合肽,重链和轻链组成;其中融合肽由SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:12组成;重链由SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9组成;轻链由SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1组成;

(5)其由融合肽,重链和轻链组成;其中融合肽由SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8组成;重链由SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11组成;轻链由SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1组成;

(6)其由融合肽,重链和轻链组成;其中融合肽由SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8组成;重链由SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11组成;轻链由SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1组成;

(7)其由融合肽,重链和轻链组成;其中融合肽由SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9组成;重链由SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:12组成;轻链由SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1组成;和

(8)其由融合肽,重链和轻链组成;其中融合肽由SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9组成;重链由SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:12组成;轻链由SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1组成。

11.核酸组合物,其包含:编码权利要求1-10任一项所述的双特异性抗体的核酸序列。

12.权利要求11所述的核酸组合物,包含:

(a)第一表达载体,所述第一表达载体包含编码权利要求1-3任一项中定义的特异性结合EpCAM的轻链-重链对的第一核酸;

(b)第二表达载体,所述第二表达载体包含编码权利要求1-3任一项中定义的特异性结合CD3的融合肽的第二核酸。

13.表达载体,其包含权利要求11或12的核酸组合物。

14.宿主细胞,其包含权利要求13的表达载体。

15.药物组合物,其包含权利要求1-10任一项所述的双特异性抗体,和药用载体,和任选地,治疗癌症和/或由癌症引起的恶性积液的药物,所述癌症为EpCAM阳性的肿瘤,所述EpCAM阳性的肿瘤为结直肠癌,胃癌,乳腺癌,卵巢癌,胰腺癌,肺癌。

16.权利要求15所述的药物组合物,其剂型包括胃肠给药剂型或胃肠外给药剂型。

17.权利要求15或16所述的药物组合物,其剂型为注射剂,包括静脉注射、静脉滴注、皮下注射、肌肉注射、瘤内注射、腔内注射、或颅内注射。

18.试剂盒,其包含权利要求1-10任一项所述的双特异性抗体、权利要求15-17任一项所述的药物组合物,和任选地,治疗癌症和/或由癌症引起的恶性积液的药物,所述癌症为EpCAM阳性的肿瘤,所述EpCAM阳性的肿瘤为结直肠癌,胃癌,乳腺癌,卵巢癌,胰腺癌,肺癌。

19.权利要求1-10任一项所述的双特异性抗体、权利要求15-17任一项所述的药物组合物在制备治疗癌症和/或由癌症引起的恶性积液的药物或试剂盒中的应用,所述癌症为EpCAM阳性的肿瘤,所述EpCAM阳性的肿瘤为结直肠癌,胃癌,乳腺癌,卵巢癌,胰腺癌,肺癌。

双特异性抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学的技术领域。具体地说,涉及抗EpCAM和CD3的双特异性抗体及应用。

背景技术

[0002] 双特异性抗体(bi-specific antibody,BsAb)又称双靶向抗体,可同时识别和结合两种不同的抗原或表位,并阻断两种不同的信号通路以发挥其作用。与识别单一抗原的单克隆抗体(monoclonal Ab,mAb)相比,双抗体有诸多优势:①可将特异性免疫效应细胞重定向到邻近的肿瘤细胞,以增强肿瘤杀伤,这是通过组合mAb治疗策略无法实现的;②通过两个不同的细胞表面抗原的相互作用增加结合特异性;③与组合疗法中单一抗体的药物开发相比,可降低开发成本、临床试验、法规审查的预算;④与联合疗法中单一抗体的药物相比,能够同时阻断在发病机理中发挥独特或重叠功能的两种不同途径。

[0003] 癌症和其他疾病均是由多因素导致的,在病原学上有许多信号通路,单一靶点的免疫治疗不能有效杀死靶向细胞。接受mAb治疗的患者可能会产生抗药性或对治疗无应答。因此,双抗体已成为癌症、炎症、病毒感染及自身免疫病等许多疾病治疗的主要选择。然而,双抗体在自然环境下不存在,需通过重组DNA、细胞融合或化学结合的技术来实现,其中重组DNA技术是目前制备BsAb使用最多的技术,但是仍然存在着BsAb表达困难、产量低、纯化难、稳定性差等诸多障碍,因此,构建新的双特异性抗体,使其能克服上述障碍,并建立相应的免疫杀伤动物模型,是非常有必要的。本发明提供了一种新型双特性抗体,并描述了对其药效学的研究方法及结果。

发明内容

[0004] 本发明开发了一种新的双特异性抗体,其特征在于包含特异性结合EpCAM的抗原结合结构域和特异性结合CD3的抗原结合结构域;以及其应用。

[0005] 具体地,本发明涉及以下几个方面:

[0006] 1.双特异性抗体,其特征在于包含特异性结合EpCAM的抗原结合结构域和特异性结合CD3的抗原结合结构域,

[0007] 其中所述特异性结合EpCAM的抗原结合结构域,选自以下各项组成的组:

[0008] 1)包含以下CDRs或其变体的特异性结合EpCAM的抗原结合结构域:

[0009] (i)SEQ ID NO:14所示的重链可变区中包含的CDRH1,CDRH2和CDRH3,和

[0010] (ii)SEQ ID NO:13所示的轻链可变区中包含的CDRL1,CDRL2和CDRL3,

[0011] 优选地,按照Kabat序列编号系统,CDRL1的序列如SEQ ID NO:32所示,CDRL2的序列如SEQ ID NO:33所示,CDRL3的序列如SEQ ID NO:34所示,CDRH1的序列如SEQ ID NO:35所示,CDRH2的序列如SEQ ID NO:36所示,CDRH3的序列如SEQ ID NO:37所示;或

[0012] 2)包含以下CDRs或其变体的特异性结合EpCAM的抗原结合结构域:

[0013] (i) SEQ ID NO:16所示的重链可变区中包含的CDRH1,CDRH2和CDRH3,和

[0014] (ii)SEQ ID NO:15所示的轻链可变区中包含的CDRL1,CDRL2和CDRL3,

[0015] 优选地,按照Kabat序列编号系统和CDR定义系统,CDRL1的序列如SEQ ID NO:38所示,CDRL2的序列如SEQ ID NO:39所示,CDRL3的序列如SEQ ID NO:40所示,CDRH1的序列如SEQ ID NO:41所示,CDRH2的序列如SEQ ID NO:42所示,和CDRH3的序列如SEQ ID NO:43;

[0016] 所述特异性结合CD3的抗原结合结构域,选自以下各项组成的组:

[0017] 1)包含以下CDRs或其变体的特异性结合CD3的抗原结合结构域:

[0018] SEQ ID NO:50所示的重链可变区中包含的CDRH1,CDRH2和CDRH3,以及SEQ ID NO:51所示的轻链可变区中包含的CDRL1,CDRL2和CDRL3,

[0019] 优选地,按照Kabat序列编号系统,CDRH1的序列如SEQ ID NO:44所示,CDRH2的序列如SEQ ID NO:45所示,和CDRH3的序列如SEQ ID NO:46,CDRL1的序列如SEQ ID NO:47所示,CDRL2的序列如SEQ ID NO:48所示,CDRL3的序列如SEQ ID NO:49所示;或

[0020] 2)包含以下CDRs或其变体的特异性结合CD3的抗原结合结构域:

[0021] SEQ ID NO:58所示的重链可变区中包含的CDRH1,CDRH2和CDRH3,以及SEQ ID NO:59所示的轻链可变区中包含的CDRL1,CDRL2和CDRL3,

[0022] 优选地,按照Kabat序列编号系统,CDRH1的序列如SEQ ID NO:52所示,CDRH2的序列如SEQ ID NO:53所示,和CDRH3的序列如SEQ ID NO:54,CDRL1的序列如SEQ ID NO:55所示,CDRL2的序列如SEQ ID NO:56所示,CDRL3的序列如SEQ ID NO:57所示;其中所述CDRs的变体与对应的CDRs分别具有3,2或1个氨基酸差异或分别具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。

[0023] 2.项目1所述的双特异性抗体,其中所述特异性结合EpCAM的抗原结合结构域包含以下重链可变区和轻链可变区(或其变体):

[0024] (i)SEQ ID NO:14所示的重链可变区,SEQ ID NO:13所示的轻链可变区;或者

[0025] (ii)SEQ ID NO:16所示的重链可变区,SEQ ID NO:15所示的轻链可变区;和

[0026] 其中所述特异性结合CD3的抗原结合结构域包含以下重链可变区和轻链可变区(或其变体):

[0027] (1)SEQ ID NO:50所示的重链可变区和SEQ ID NO:51所示的轻链可变区,或

[0028] (2)SEQ ID NO:58所示的重链可变区和SEQ ID NO:59所示的轻链可变区;

[0029] 优选地,其中特异性结合EpCAM的抗原结合结构域为Fab片段形式,特异性结合CD3的抗原结合结构域为ScFv形式,

[0030] 优选地,其中所述特异性结合EpCAM的抗原结合结构域包含以下重链可变区和轻链可变区(或其变体):

[0031] (i)SEQ ID NO:14所示的重链可变区,SEQ ID NO:13所示的轻链可变区;和

[0032] 其中所述特异性结合CD3的抗原结合结构域选自以下各项组成的组:

[0033] (1)SEQ ID NO:18所示的ScFv或其变体,

[0034] (2)SEQ ID NO:19所示的ScFv或其变体,

[0035] 其中所述变体与所述对应的可变区或ScFv分别具有3,2或1个氨基酸差异或分别具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。

[0036] 3项目1或2所述的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体包含

[0037] (1)特异性结合EpCAM的轻链-重链对,所述轻链-重链对包含轻链和重链,或由其

组成;其中所述轻链包含轻链可变区和轻链恒定区(优选序列如SEQ ID NO:1、60-65任一所示),所述重链包含重链可变区、CH1(优选序列如SEQ ID NO:2所示)和第一Fc片段;优选地,所述第一Fc片段包含铰链区(优选序列如SEQ ID NO:3所示),CH2(优选序列如SEQ ID NO:6、7、66-71任一所示)和CH3a;

[0038] (2)特异性结合CD3的融合肽,所述融合肽包含特异性结合CD3的ScFv和第二Fc片段,或由其组成;优选地,所述ScFv从N端至C端方向依次包含重链可变区,连接肽(优选序列如SEQ ID NO:4所示)和轻链可变区,所述第二Fc片段从N端至C端方向依次包含铰链区(优选序列如SEQ ID NO:3所示),CH2(优选序列如SEQ ID NO:6、7、66-71任一所示)和CH3b,优选地所述轻链可变区的C端与所述第二Fc片段的铰链区通过连接肽(优选序列如SEQ ID NO:5所示)连接;

[0039] 优选地,所述第一Fc片段和第二Fc片段为人或者人源化的Fc片段,例如人IgG Fc片段,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5 Fc片段;

[0040] 优选地,与野生型抗体比,所述第一Fc片段和/或第二Fc片段包含一处或多处替换,该替换在该重链和融合肽之间形成杵-臼结构配对,例如一个CH3结构域上的T366被相对较大的氨基酸残基替换,如酪氨酸(Y)或色氨酸(W)替换,另一CH3结构域上的Y407被相对较小的氨基酸残基替换,如苏氨酸(T),丙氨酸(A)或缬氨酸(V),例如包含表6的一处或多处替换;

[0041] 优选地,所述第一Fc片段和/或第二Fc片段包含一处或多处替换,1)该替换在该重链和融合肽之间形成盐桥配对,例如一个CH3结构域含有一处或多处替换,经在生理条件下有正电荷的氨基酸残基替换,而另一CH3结构域包含一处或多处替换,经一个或多个在生理条件下具有负电荷的氨基酸残基替换,例如该带正电的氨基酸残基为精氨酸(R),组氨酸(H)或赖氨酸(K),例如该带负电荷的氨基酸残基可为天冬氨酸(D)或谷氨酸(E),例如被替换的氨基酸残基包括D356、L368、K392、D399和K409中的一个或多个,例如表7的一处或多处替换,2)该替换在该重链和融合肽之间形成二硫键,例如表8的替换,和/或3)该替换导致Fc与蛋白A之间的结合能力显著降低,例如一个CH3结构域上的H435和Y436分别被替换为精氨酸和苯丙氨酸,如表9所示;

[0042] 优选地,其中:

[0043] a)融合肽的CH3b和重链的CH3a具有形成杵-臼结构的替换对;

[0044] b)融合肽的CH3b和重链的CH3a具有形成离子键的替换对;

[0045] c)融合肽的CH3b和重链的CH3a具有形成二硫键的替换对;和/或

[0046] d)融合肽的CH3b和重链的CH3a具有导致与蛋白A的结合能力下降的替换;

[0047] 优选地,CH1包括SEQ ID No:2的序列;和/或CL包括选自SEQ ID Nos:1、60-65任一项的序列;

[0048] 优选地,所述第一Fc片段和/或第二Fc片段包含选自SEQ ID Nos:6、7、66-71任一项的序列的CH2和/或SEQ ID Nos:8、9、11、12、72-76任一项的序列的CH3;

[0049] 优选地,CH3a和CH3b的序列选自以下各项组成的组:

[0050] (1)其中一个序列如SEQ ID NO:8所示,另一个序列如SEQ ID NO:11所示;

[0051] (2)其中一个序列如SEQ ID NO:9所示,另一个序列如SEQ ID NO:12所示;

[0052] (3)其中一个序列如SEQ ID NO:72所示,另一个序列如SEQ ID NO:74所示;

[0053] (4)其中一个序列如SEQ ID NO:9所示,另一个序列如SEQ ID NO:75所示;

[0054] (5)其中一个序列如SEQ ID NO:73所示,另一个序列如SEQ ID NO:76所示;

[0055] 优选地,所述双特异性抗体选自以下各项组成的组:

[0056] (1)其包含融合肽,重链和轻链,或由其组成;其中融合肽包含SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11,或由其组成;重链包含SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8,或由其组成;轻链包含SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1,或由其组成;

[0057] (2)其包含融合肽,重链和轻链,或由其组成;其中融合肽包含SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11,或由其组成;重链包含SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8,或由其组成;轻链包含SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1,或由其组成;

[0058] (3)其包含融合肽,重链和轻链,或由其组成;其中融合肽包含SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11,或由其组成;重链包含SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8,或由其组成;轻链包含SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:1,或由其组成;

[0059] (4)其包含融合肽,重链和轻链,或由其组成;其中融合肽包含SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11,或由其组成;重链包含SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8,或由其组成;轻链包含SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:1,或由其组成;

[0060] (5)其包含融合肽,重链和轻链,或由其组成;其中融合肽包含SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:12,或由其组成;重链包含SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9,或由其组成;轻链包含SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1,或由其组成;

[0061] (6)其包含融合肽,重链和轻链,或由其组成;其中融合肽包含SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:12,或由其组成;重链包含SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9,或由其组成;轻链包含SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1,或由其组成;

[0062] (7)其包含融合肽,重链和轻链,或由其组成;其中融合肽包含SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8,或由其组成;重链包含SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11,或由其组成;轻链包含SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1,或由其组成;

[0063] (8)其包含融合肽,重链和轻链,或由其组成;其中融合肽包含SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8,或由其组成;重链包含SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11,或由其组成;轻链包含SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1,或由其组成;

[0064] (9)其包含融合肽,重链和轻链,或由其组成;其中融合肽包含SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8,或由其组成;重链包含SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11,或由其组成;轻链包含SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:1,或由其组成;

[0065] (10)其包含融合肽,重链和轻链,或由其组成;其中融合肽包含SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8,或由其组成;重链包含SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11,或由其组成;轻链包含SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:1,或由其组成;

[0066] (11)其包含融合肽,重链和轻链,或由其组成;其中融合肽包含SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9,或由其组成;重链包含SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:12,或由其组成;轻链包含SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1,或由其组成;

[0067] (12)其包含融合肽,重链和轻链,或由其组成;其中融合肽包含SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9,或由其组成;重链包含SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:12,或由其组成;轻链包含SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:1,或由其组成。

[0068] 4核酸组合物,其包含:编码项目1-3任一项所述的双特异性抗体的核酸序列,优选地,

[0069] 核酸组合物包含:

[0070] a)第一表达载体,所述第一表达载体包含编码项目1-3任一项中定义的特异性结合EpCAM的抗原结合结构域或轻链-重链对的第一核酸;

[0071] b)第二表达载体,所述第二表达载体包含编码项目1-3任一项中定义的特异性结合CD3的抗原结合结构域或融合肽的第二核酸。

[0072] 5.表达载体,其包含项目4的核酸组合物。

[0073] 6.宿主细胞,其包含项目5的表达载体。

[0074] 7.药物组合物,其包含项目1-3任一项所述的双特异性抗体,和药用载体,和任选地,治疗癌症(EpCAM阳性的肿瘤,例如结直肠癌,胃癌,乳腺癌,卵巢癌,肺癌(如非小细胞肺癌),前列腺癌,胰腺癌,肝癌,视网膜母细胞瘤,食管癌,肾癌,肾透明细胞瘤,皮肤鳞癌,皮肤基底细胞癌,肉瘤,鼻腔神经胶质瘤,颅咽管瘤,甲状腺癌,胆管细胞瘤,膀胱癌,头颈部肿瘤,子宫颈癌,或口腔癌等,)和/或恶性腹水、恶性积液、恶性胸水等的药物(如小分子药物或大分子药物),优选地,所述药物组合物的剂型包括胃肠给药剂型或胃肠外给药剂型;更优选地,所述药物组合物的剂型为注射剂,包括静脉注射、静脉滴注、皮下注射、局部注射、肌肉注射、瘤内注射、腹腔内注射、颅内注射、或腔内注射。

[0075] 8缀合物或融合蛋白,其包含项目1-3任一项的双特异性抗体,优选地,其包含与所述双特异性抗体缀合或融合的物质A,所述物质A选自治疗剂、药物前体、蛋白(例如酶)、病毒、脂质、生物反应调节剂(如免疫调节剂)、PEG、激素、寡核苷酸、诊断剂、细胞毒性剂,其可为药物或毒素,超声增强剂,非放射性标记物,可检测标记物,如化学发光物标记化合物(如鲁米诺、异鲁米诺、热性吖啶鎓酯、咪唑、吖啶鎓盐和草酸酯),或荧光发光金属(如152Eu,或镧系标记)。

[0076] 9试剂盒,其包含项目1-3任一项所述的双特异性抗体,和任选地,治疗癌症(EpCAM阳性的肿瘤,例如结直肠癌,胃癌,乳腺癌,卵巢癌,肺癌(如非小细胞肺癌),前列腺癌,胰腺癌,肝癌,视网膜母细胞瘤,食管癌,肾癌,肾透明细胞瘤,皮肤鳞癌,皮肤基底细胞癌,肉瘤,鼻腔神经胶质瘤,颅咽管瘤,甲状腺癌,胆管细胞瘤,膀胱癌,头颈部肿瘤,子宫颈癌,或口腔

癌等)和/或恶性腹水、恶性积液、恶性胸水等的药物(如小分子药物或大分子药物)。

[0077] 10.项目1-3任一项所述的双特异性抗体,用于治疗癌症,或在制备治疗癌症和/或恶性腹水、恶性积液、恶性胸水等的药物或试剂盒中的应用,所述癌症例如EpCAM阳性的肿瘤,例如结直肠癌,胃癌,乳腺癌,卵巢癌,肺癌(如非小细胞肺癌),前列腺癌,胰腺癌,肝癌,视网膜母细胞瘤,食管癌,肾癌,肾透明细胞瘤,皮肤鳞癌,皮肤基底细胞癌,肉瘤,鼻腔神经胶质瘤,颅咽管瘤,甲状腺癌,胆管细胞瘤,膀胱癌,头颈部肿瘤,子宫颈癌,或口腔癌。

[0078] 11.治疗癌症和/或恶性腹水、恶性积液、恶性胸水的方法,包含对受试者施用治疗有效量的项目1-3任一项所述的双特异性抗体,所述癌症EpCAM阳性的肿瘤,例如结直肠癌,胃癌,乳腺癌,卵巢癌,肺癌(如非小细胞肺癌),前列腺癌,胰腺癌,肝癌,视网膜母细胞瘤,食管癌,肾癌,肾透明细胞瘤,皮肤鳞癌,皮肤基底细胞癌,肉瘤,鼻腔神经胶质瘤,颅咽管瘤,甲状腺癌,胆管细胞瘤,膀胱癌,头颈部肿瘤,子宫颈癌,或口腔癌。

[0079] 应理解,在本发明范围内,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

[0080] 在本发明中涉及的术语具备本领域技术人员理解的常规含义。在本技术领域内使用和/或可接受的情况下,一个术语有两个或两个以上定义时,本文使用的术语的定义用于包括所有的含义。

[0081] 本领域普通技术人员可以理解,抗体的CDR区负责抗体对抗原的结合特异性。在已知抗体重链和轻链可变区序列的情况下,目前有几种确定抗体CDR区的方法,包括Kabat,IMGT,Chothia和AbM编号系统。然而,每种关于抗体或其变体的CDR的定义的应用都将在本文定义和使用的术语的范围内。如果给定该抗体的可变区氨基酸序列,则本领域技术人员通常可确定特定CDR,而不依赖于该序列自身之外的任何实验数据。

[0082] 本文使用的“抗体”或者“抗原结合片段”指特定识别并结合抗原的多肽或多肽复合体。术语“抗体”以广义使用,并且包括免疫球蛋白或抗体分子,所述抗体分子包括单克隆或多克隆的人、人源化、复合和嵌合抗体以及抗体片段。因此术语“抗体”包括含有特定分子的任何蛋白或肽,该特定分子含有至少一部分的免疫球蛋白分子,该免疫球蛋白分子具有结合至抗原的生物活性。此种情况的实例包括但不限于,重链或轻链或其配体结合部分的互补决定区(CDR),重链或轻链可变区,重链或轻链恒定区,框架(FR)区或其任何部分,或结合蛋白的至少一部分。在本发明中,抗体包括用本领域技术人员熟知技术所制备的鼠的、嵌合的、人源化的或者全人的抗体。重组抗体,例如嵌合的和人源化的单克隆抗体,包括人的和非人的部分,可以采用本领域熟知的DNA重组技术制备。本申请的免疫球蛋白分子或抗体分子可为任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、免疫球蛋白分子的任何类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0083] 术语“抗体片段”或“抗原结合片段”包括但不限于,F(ab′)2、F(ab)2、Fab′、Fab、Fv、Fd、dAb、Fab/c、互补决定区(CDR)片段、单链Fvs(ScFv)、二硫键稳定性Fv(Disulfide-stabilized Fv fragment,dsFv)、(dsFv)2、双特异性dsFv(dsFv-dsFv′)、双链抗体(Diabody)、二硫键稳定的双链抗体(ds-Diabody)、ScFv多聚体(如ScFv二聚体、ScFv三聚体)、由包含一个或多个CDR的抗体的一部分形成的多特异性抗体、纳米抗体、单域抗体(sdab)、结构域抗体、二价结构域抗体,或任何其他与抗原结合但不包含完整的抗体结构的

抗体片段。不管结构如何,抗原结合片段包括任何能够与亲本抗体或亲本抗体片段结合的相同抗原结合的多肽或多肽复合体。术语“抗体片段”包括适配体、适配体对映体(spiegelmers)和双体(diabodies)。术语“抗体片段”也包括任何合成的或基因改造的蛋白,它们与抗体一样可结合至特定的抗原以形成复合体。通常,抗体片段具有本发明抗体的至少约50个连续氨基酸,较佳地至少约50个连续氨基酸,更佳地至少约80个连续氨基酸,最佳地至少约100个连续氨基酸。

[0084] “单链可变片段”或“ScFv”指免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)的可变区域的融合蛋白。在某些方面,这些区域用10至约25个氨基酸的短接头肽连接。该接头可富含甘氨酸以具有柔性,也含有丝氨酸或苏氨酸以具有可溶性,且能将VH的N-末端连接至VL的C末端,反过来也一样。该蛋白质保留了原始的免疫球蛋白的特性,只是去除了恒定区并引入了接头。ScFv分子为本领域已知的,例如美国专利5,892,019中描述的那些。

[0085] 结合EpCAM和CD3的抗原结合结构域为Fab,或ScFv,或重链可变区(VH)-轻链可变区(VL)之间非共价配对(Fv)。任何上述的抗体或多肽还可包括额外的多肽,例如,抗体N端的信号肽,该信号肽用于指导分泌,或如本文所述的其他异源多肽,如用于纯化的6×His标签。本发明不仅包括完整的抗体,还包括具有免疫活性的抗体片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。本发明还提供了具有本发明抗体的其他蛋白质或融合表达产物。具体地,本发明包括具有含可变区的重链和轻链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物(即免疫偶联物及融合表达产物),只要该可变区与本发明抗体的重链和轻链的可变区相同或至少90%同源性,较佳地至少95%同源性,最佳地96%、97%、98%或99%以上同源性。因此,本发明包括那些具有带CDR的单克隆抗体轻链和重链可变区的分子,只要其CDR与本发明CDR具有90%以上(较佳地95%以上,最佳地96%、97%、98%或99%以上)的同源性。

[0086] 本发明还包括所述抗体的片段、变体、衍生物和类似物。本申请的抗体、抗原结合片段、它们的变体或衍生物,包括但不限于,多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体(如双特异性抗体、三特异性抗体等)、人抗体、动物源抗体、人源化的抗体、灵长类化的(primatized)抗体、或嵌合抗体、CDR嫁接和/或修饰的抗体、单链抗体(例如,ScFv)、双链抗体、抗原表位结合片段,例如,Fab、Fab′和F(ab′)2、Fd、Fv、单链Fv(ScFv)、单链抗体、二硫键连接的Fv(dsFv)、包含VL结构域或VH结构域的片段、由Fab表达库产生的片段、和抗独特型(idiotypic)(抗-Id)抗体。本发明的抗体片段、抗原结合片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列,或与6×His标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0087] 本发明抗体指具有人EpCAM和CD3结合活性的、包括上述CDR区的多肽。该术语还包括具有与本发明抗体相同功能的、包含上述CDR区的多肽的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于):一个或多个(通常为1-50个,较佳地1-30个,更佳地1-20个,最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以

内,较佳地为10个以内,更佳地为5个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括本发明抗体的活性片段和活性衍生物。该多肽的变异形式包括:同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧条件下能与本发明抗体的编码DNA杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗本发明抗体的抗血清获得的多肽或蛋白。

[0088] 本发明的抗体可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列,或与6His标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0089] "保守氨基酸替换"是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替换。具有类似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义,其包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸),酸性侧链(例如天冬氨酸,谷氨酸),不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸),非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸),β-支链的侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,免疫球蛋白多肽的非必需氨基酸残基优选被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基替换。在另一些实施方案中,一串氨基酸可被结构上类似的氨基酸串替换,后者在顺序上和/或侧链家族的组成上不同。

[0090] 在下表中提供了保守性氨基酸替换的非限制性实例,其中相似性得分为0或更高表示在这两个氨基酸之间有保守替换。

[0091]

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17

[0092]

Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

[0093] 在一些实施方案中,所述保守替换优选地是这样的替换,即,其中下列组(a)-(e)内的一个氨基酸被同组内的另一氨基酸残基替换:(a)小的脂肪族、非极性或弱极性的残基:Ala,Ser,Thr,Pro和Gly;(b)极性、带负电荷的残基及其(不带电荷的)酰胺:Asp,Asn,Glu和Gln;(c)极性、带正电荷的残基:His,Arg和Lys;(d)大的脂肪族、非极性残基:Met,Leu,Ile,Val和Cys;以及(e)芳族残基:Phe,Tyr和Trp。

[0094] 特别优选的保守替换如下:Ala替换成Gly或替换成Ser;Arg替换成Lys;Asn替换成

Gln或替换成His;Asp替换成Glu;Cys替换成Ser;Gln替换成Asn;Glu替换成Asp;Gly替换成Ala或替换成Pro;His替换成Asn或替换成Gln;Ile替换成Leu或替换成Val;Leu替换成Ile或替换成Val;Lys替换成Arg,替换成Gln或替换成Glu;Met替换成Leu,替换成Tyr或替换成Ile;Phe替换成Met,替换成Leu或替换成Tyr;Ser替换成Thr;Thr替换成Ser;Trp替换成Tyr;Tyr替换成Trp;和/或Phe替换成Val,替换成Ile或替换成Leu。

[0095] Fc氨基酸编号遵从Kabat编号。“Kabat编号”是指Kabat等描述的编号系统,其内容记载于美国卫生和公共服务部,“Sequence of Proteins of Immunological Interest”(1983)。具体的编号见下表:

[0096] 基于Kabat编号系统的Fc氨基酸编号

[0097]

216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F
242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267
L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S
268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293
H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E
294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319
E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y
320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371
P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397
F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V
398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423
L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F
424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	
S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K	-	

[0098] 其中,

[0099] 第221-227位氨基酸为铰链(hinge)结构域,

[0100] 第228-340位氨基酸为重链第二恒定区CH2结构域,

[0101] 第341-447位氨基酸为重链第三恒定区CH3结构域。

[0102] 可对抗体进行修改以提高异二聚体配对效率。比如,在某些方面,与野生型的抗体片段比较,该单价单元重链的Fc片段和/或该融合肽的Fc片段可包含一处或多处替换,这些替换之间形成杵-臼结构对。杵-臼构型在本领域中是已知的。参见,例如Ridgway等的“‘Knob-into-holes’engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization,”Protein Engineering 9(7):617-21(1996)。

[0103] 一方面,一个CH3结构域上的T366被相对较大的氨基酸残基替换,如酪氨酸(Y1或色氨酸(W)替换。然后,另一CH3结构域上的Y407可被相对较小的氨基酸残基替换,如苏氨酸(T),丙氨酸(A)或缬氨酸(V)。

[0104] 表6.Fc氨基酸替换的组合在单价单元和单链单元之间形成杵-臼结构对提高异二聚体配对效率

[0105]

组合序号	一个CH3上的替换	另一CH3上的替换
1	T366W	Y407A
2	T366W	Y407V
3	T366Y	Y407A

4	T366Y	Y407V
5	T366W	T366S,L368A,Y407V

[0106] 一方面,该CH3结构域之一含有一处或多处替换,经在生理条件下有正电荷的氨基酸残基替换,而另一CH3结构域包含一处或多处替换,经一个或多个在生理条件下具有负电荷的氨基酸残基替换。一方面,该带正电的氨基酸残基可为精氨酸(R),组氨酸(H)或赖氨酸(K)。另一方面,该带负电荷的氨基酸残基可为天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)。可被替换的氨基酸残基包括,但不限于,D356、L368、K392、D399和K409。

[0107] 表7.CH3氨基酸替换的组合在单价单元和单链单元之间形成离子键提高异二聚体配对效率

[0108]

组合序号	一个CH3上的替换	另一CH3上的替换
1	D356K D399K	K392D K409D
2	L368R D399K	K392D K409D
3	L368K D399K	K392D K409D
4	L368R D399K	K409D
5	L368K D399K	K409D
6	L368R	K409D
7	L368K	K409D

[0109] 一方面,一个CH3结构域上的S354被替换为半胱氨酸,另一CH3结构域上的Y349也被替换为半胱氨酸,两个被替换位置的残基形成了二硫键。

[0110] 表8.CH3氨基酸替换的组合在单价单元和单链单元之间形成二硫键提高异二聚体配对效率

[0111]

组合序号	一个CH3上的替换	另一CH3上的替换
1	S354C	Y349C

[0112] 一方面,一个CH3结构域上的H435和Y436分别被替换为精氨酸和苯丙氨酸,该替换导致Fc与蛋白A之间的结合能力显著降低,从而使异二聚体和同二聚体之间具有不同的蛋白A结合活性,在亲和层析过程中易于将两者分离。

[0113] 表9.一个CH3的氨基酸替换导致与蛋白A的结合能力下降

[0114]

组合序号	CH3上的替换
1	H435R,Y436F

[0115] 在本发明的一个优选例中,形成异二聚体的Fc的CH3氨基酸序列如下表所示:

[0116]

CH3a 氨基酸序列	SEQ ID NO:	CH3b 氨基酸序列	SEQ ID NO:
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	72	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	74
GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	9	GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	12
GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	9	GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	75
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	8	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCRVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLASKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	11
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	73	GQPREPQVYTLPPSRKELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	76
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	74	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	72
GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	12	GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	9
GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	75	GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	9
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCRVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLASKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	11	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	8
GQPREPQVYTLPPSRKELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	76	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	73

[0117] 本申请的一个实施例提供了一种异二聚体抗体,该抗体包含两个不同的抗原结合多肽单元。在某些方面,该异二聚体与其对应的同二聚体大小不同,可利用大小上的区别来促进分离异二聚体和同二聚体。

[0118] 在某些方面,如图1中,这两个抗原结合多肽单元之一包含类似于野生型抗体的轻链-重链对。在整个本申请中,该单元也称为“单价单元”。在某些方面,如图1中,其他抗原结合多肽单元包含单链可变片段(ScFv)。这样的ScFv可融合至抗体的恒定片段(Fc)的N端,称为融合肽。在本申请全文中此融合肽也被称为“单链单元”。

[0119] 任何上述的抗体或多肽还可包括额外的多肽,例如,如本文所述的编码的多肽,抗体恒定区的信号肽,该信号肽用于指导分泌,或如本文所述的其他异源多肽。本文所述的抗体可会被修改,以使得它们的氨基酸序列与天然存在的结合多肽不同,它们得自这些天然存在的结合多肽。例如,来自于指定的蛋白的多肽或氨基酸序列可与起始序列类似,例如,与起始序列具有一定百分比的同一性,例如,其可与起始序列有60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的同一性。此外,也可进行核苷酸或氨基酸替换,缺失,或插入以在“非必需”氨基酸区域进行保守替换或改变。例如,来自指定的蛋白质的多肽或氨基酸序列可与启动顺序相同,除了一个或多个独立的氨基酸的替换,插入,或缺失,例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个或更多独立的氨基酸替换,插入,或缺

失。在某些实施例中,来自指定的蛋白质的多肽或氨基酸序列相对于起始序列有1至5个、1至10个、1至15个或1至20个独立的氨基酸的替换,插入,或缺失。

[0120] 本文使用的术语“可检测的标签”指可直接或间接检测的化合物或组合物,该化合物或组合物直接或间接地结合至待检测的组合物(例如,多核苷酸或蛋白质,该蛋白如抗体)以获得“有标签的”组合物。该术语还包括,结合至该多核苷酸的序列,其通过插入序列的表达提供信号,如绿色荧光蛋白(GFP)等。该标签自身可被检测(例如放射性同位素标签或荧光标签)或者,在酶标签情况下,可催化底物化合物或组合物的化学改变,该改变可被检测。该标签可用于小规模检测或更适于高通量筛选。同样地,合适的标签包括但不限于放射性同位素、荧光染料、化学发光化合物、染料、和蛋白(包括酶)。该标签可仅被检测,也可被定量。仅被检测的反应通常包括仅能证实其存在的反应,其中可被定量的反应通常包括具有可定量的(例如可通过数字报告的)值例如强度、极化和/或其他性质的反应。在发光或荧光分析中,可检测的反应可直接使用与分析成分相关的实际上涉及结合的发光体或荧光基团,或间接使用与另一(例如报告分子或指示剂)成分连接的发光体或荧光基团。

[0121] 在一些实施方案中,本发明所述抗体可以结合治疗剂(如化疗药,如顺铂、卡铂)、药物前体、肽、蛋白、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药剂或PEG。本发明抗体可以连接至或融合至治疗剂上,该治疗剂可包括可检测标记物,如放射性标记物、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸、光活性治疗剂或诊断剂、细胞毒性剂,其可为药物或毒素,超声增强剂,非放射性标记物,它们的组合和其他这类本领域已知的成分。

[0122] 在某些实施例中,抗原结合多肽包含通常不与抗体结合的氨基酸序列或一个或多个基团。例如,本申请的单链Fv抗体片段可包含柔性接头序列,或可以被修改以添加的官能基团(例如,聚乙二醇(PEG)、药物、毒素或标记物)。本申请的抗体,其变体或衍生物包括被修改的衍生物,即,将任何类型的分子共价连接至抗体且该共价连接不会阻止抗体结合至抗原表位。此外,该抗体可以包含一种或多种非经典氨基酸酸。

[0123] 应注意非明确数量的实体限定应指一或多个(种)该实体;例如,“多功能抗体”应理解为表示一或多个(种)多功能抗体。同样地,非明确数量限定的、术语“一个或多个”和“至少一个”本文中可互换使用。

[0124] 本文使用的术语“治疗”是指治疗性治疗和预防或防治措施,其中对于受试者进行防止或减慢(减轻)不良的生理变化或疾病,如癌症的发展。有益的或所需的临床结果包括但不限于,减轻症状,降低疾病的程度、稳定(例如使其不恶化)疾病的状态,延迟或减缓疾病发展,改善或缓和疾病状态,并缓解(无论是部分或全部),无论可否被检测到。“治疗”也可指与不接受治疗时的预计生存期相比能延长生存期。那些需要治疗的状况包括那些已经具有病症或症状以及那些容易具有病症或症状或那些将对病症或症状进行预防的情况。

[0125] 所谓“受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”是指任何受试者,特别是哺乳动物受试者,它们需要进行诊断,预后或治疗。哺乳动物受试者包括人类,家养动物,农场动物,动物园,运动场,或宠物,如狗,猫,豚鼠,兔,大鼠、小鼠,老鼠,马,牛,奶牛,灵长类(例如,人、猴如食蟹猴,猕猴,狒狒,和黑猩猩等)等。

[0126] 本文所述的,本申请的抗原结合多肽、变体或衍生物可用于与癌症或传染病相关的某些治疗和诊断方法中。本申请还涉及基于抗体的治疗,此种治疗包括将本申请的双特异性抗体给予至患者,例如动物、哺乳动物和人,用于治疗本文描述的一种或多种疾病或状

况。本申请的治疗药物包括但不限于,本申请的抗体(包括如本文所述的它们的变体和衍生物)和核酸或编码本申请的抗体的多核苷酸(包括如本文所述的它们的变体和衍生物)。本申请的抗体也可以用于治疗,抑制或预防疾病,病症或状况,包括恶性的疾病,病症,或与这样的疾病或病症相关的状况,如免疫应答相关的疾病。在一些实施方案中,本发明的抗体可以用作免疫抑制剂。在一些实施方案中,本发明的抗体可以用于治疗自体免疫疾病。本申请的抗原结合多肽,其变体或衍生物用于抑制癌症的生长,发展和/或转移,特别是上面列出的或下面段落中列出的那些。

[0127] 可以用本申请的抗体或其变体或衍生物治疗,预防,诊断和/或预测的与增加细胞存活相关的其他疾病或状况,包括但不限于癌症或肿瘤,包括恶性肿瘤的发展和/或转移,以及相关疾病(如恶性腹水、恶性胸水、恶心积液),如EpCAM阳性的肿瘤。

[0128] 给予抗体、其变体或衍生物的方法包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。该抗体或组合物可以通过任何方便的途径给药,例如通过输注或大剂量注射,通过上皮或粘膜与皮肤内层(例如,口腔粘膜,直肠和肠粘膜等)吸收,并且可以与其他生物活性剂一起给药。因此,本申请的含抗体的药物组合物可被口服给药、直肠给药、非肠道给药、脑池内给药、阴道内给药、腹膜内给药、局部给药(如经粉剂、软膏、滴剂或透皮贴剂)、含服给药或作为口腔或鼻腔喷剂。本文使用的术语“非肠道”是指包括静脉内、肌内、腹膜内、胸骨内、皮下和关节内注射和输注的给药模式。给药可以是全身或局部给药。还可能需要的是将本申请的抗原结合多肽或组合物局部给药至需要治疗的区域,这可通过,例如但不限于,在手术过程中局部灌注,局部应用,例如与手术后伤口敷料结合,通过注射、通过导管、通过栓剂、或通过植入物实现,所述植入物为多孔的、无孔的、或凝胶状材料、包括膜或纤维。优选地,当给予本申请的蛋白质(包括抗体)时必须小心使用不吸收蛋白质的材料。

附图说明

[0129] 图1.YBODY抗体结构示意图。

[0130] 图2双特异性抗体介导的HCT116和Jurkat细胞结合作用检测。A:HCT116+Jurkat不加抗体的阴性对照流式图,其中Q1为CFSE染色的Jurkat细胞,Q2为共结合的Jurkat和HCT116细胞,Q3为PKH26染色的HCT116细胞,Q4为无染色细胞;B:HCT116+Jurkat+M701A 10μg/ml实验组流式图,各象限表征意义同前;C:不同抗体介导的HCT116和Jurkat细胞结合的浓度梯度曲线。

[0131] 图3.双特异性抗体的生物学活性检测(报告基因系统)。

[0132] 图4双特异性抗体介导的体外杀伤作用检测。A:M701A对B16-EpCAM的体外杀伤;B:M701A对B16的体外杀伤;C:M701A对HCT116的体外杀伤;D:M701A对OVCAR-3的体外杀伤;E:不同双特异性抗体对CHO-K1-huEpCAM的体外杀伤;F:不同双特异性抗体对HCT116的体外杀伤。

[0133] 图5.双特异性抗体在HCT116人源结肠癌模型中的体内药效。A:小鼠肿瘤体积的生长变化情况;B:小鼠体重变化情况。

[0134] 图6.双特异性抗体在OVCAR-3人源卵巢癌模型中的体内药效。A:小鼠肿瘤体积的生长变化情况;B:小鼠体重变化情况。

具体实施方式

[0135] 以下结合附图对本发明的方法和应用进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本发明的保护范围。

[0136] 实施例1:双特异性抗体的表达载体构建

[0137] 以EpCAM和CD3为靶点的双特异性抗体结构包括抗EpCAM结合区域和抗CD3结合区域,单价单元为抗EpCAM重链与轻链形成的配对,单链单元为抗CD3的ScFv-Fc形式,定义为YBODY结构(如图1),其中抗CD3的VL通过接头与绞链区和CH2连接。其中单价单元的重链Fc和单链单元(以人IgG重链Fc为骨架)的Fc进行氨基酸突变改造,使其各自不易形成同二聚体(homodimer),而易于形成异二聚体(heterodimer)。以已有质粒或合成基因片段为模版,通过PCR以及重叠PCR扩增双特异性抗体对应的各条链,并通过酶切连接或重组的方法,将各条抗体链克隆至pcDNA3.1载体(Invitrogen公司)中。抗体各条链的具体序列信息如表1和序列表所示。

[0138] 表1.各抗体分子对应的氨基酸序列信息

[0139]

双抗编号	抗 EpCAM 轻链 SEQ ID NO		抗 EpCAM 重链 SEQ ID NO					抗 CD3 单链 SEQ ID NO				
	VL	CL	VH	CH1	Hinge	CH2	CH3a	ScFv	L2	Hinge	CH2	CH3b
M701	13		14			6	8	17			6	10
M701A	13		14			6	8	18			6	11
M701B	13		14			6	8	19			6	11

[0140]

M701C	13	1	14	2	3	6	8	20	5	3	6	11
M701D	13		14			6	8	21			6	11
M701E	13		14			6	8	22			6	11
M701F	13		14			6	8	23			6	11
M701G	13		14			6	8	24			6	11
M701H	15		16			6	8	18			6	11
M701I	15		16			6	8	19			6	11
M701J	13		14			7	9	18			7	12
M701K	13		14			7	9	19			7	12

[0141] 实施例2:双特异性抗体的表达与纯化

[0142] 按常规的质粒提取方法进行质粒的提取,并用于化学转染CHO-S细胞(来源于Gibco)。转染后的细胞在37℃、5%CO_2摇床中悬浮震荡培养7-10天。通过3000×g离心收获上清并用0.22μm滤膜过滤。通过蛋白A亲和层析获得初步纯化的双特异性抗体,通过在280nm处的UV吸光度以及相应的消光系数测定纯化的蛋白浓度,通过高性能尺寸排阻色谱法(HPLC-SEC)测试抗体纯度,并计算各蛋白对应的表达量。双特异性抗体分子表达量在40mg/L～91mg/L,初始纯度在45%-81%,M701A、M701B、M701C、M701D、M701E、M701F、M701G、M701H、M701I、M701J和M701K的表达量和起始初度均明显优于M701。接下来,通过阳离子交换层析对亲和样品进行精纯,最终获得HPLC-SEC纯度＞95%的双特异性抗体,各双特异性抗体的纯化回收率如表2。

[0143] 表2.双特异性抗体的表达量和起始HPLC-SEC纯度

[0144]

抗体编号	表达量	HPLC-SEC	纯化回收率
M701	47.2mg/L	45.91%	14%

M701A	90.8mg/L	81.12%	57%
M701B	84.1mg/L	78.53%	53%
M701C	54.4mg/L	64.54%	32%
M701D	65.8mg/L	58.63%	23%
M701E	49mg/L	55.76%	22%
M701F	52.4mg/L	66.32%	30%
M701G	41mg/L	70.76%	25%
M701H	73.3mg/L	72.03%	43%
M701I	80.6mg/L	73.21%	45%
M701J	87.7mg/L	78.21%	47%
M701K	81.3mg/L	74.50%	41%

[0145] 实施例3:双特异性抗体的的热稳定性检测

[0146] 将各双特异性抗体的精纯样品用缓冲液(25mM柠檬酸+50mM NaCl,pH60)稀释至05mg/ml,以100μL/管分装到1.5mL EP管中,放入40℃水浴中进行14天的热加速实验,并检测纯度和亲和力的变化情况。放入40℃水浴当天计为D0,第14天记为D14。

[0147] 采用氨基偶联方法分别将人EpCAM(SB,Cat:10694-H08H)和人CD3抗原(SB,Cat:CT038-H2508H)固定于CM5芯片上,抗原偶联量为1500RU,检测抗原端结合活性时,采用1×HBS-EP+buffer稀释样品至起始浓度,再2倍梯度稀释4个浓度,上机从低浓度至高浓度进行检测,结合流速30μL/min,结合时间120s,解离时间300s;采用pH1.5的Glycine溶液再生芯片,再生流速10μL/min,再生时间30s。检测结束后,采用软件Biacore T200 Evaluation Software以1:1Binding拟合方式对结果图谱进行数据拟合,得到解离平衡常数(KD)。

[0148] 结果如表3所示,M701A、M701B、M701H、M701I、M701J、M701K热加速第14天纯度下降小于5%,其中M701A、M701B、M701J、M701K纯度变化小于2%,且两端亲和力基本未变,说明M701A、M701B、M701J、M701K具有良好的热稳定性。

[0149] 表3.双特异性抗体热加速样品的纯度和亲和力检测

[0150]

抗体编号	HPLC-SEC%		EpCAM-Biacore (K_D, nM)		CD3-Biacore (K_D, nM)	
	D0	D14	D0	D14	D0	D14
M701	95.21%	25.11%	19.17	n.d.	25.44	n.d.
M701A	95.80%	95.78%	17.11	17.28	21.15	21.07
M701B	95.63%	94.26%	20.01	22.61	28.27	31.52
M701C	95.34%	85.10%	18.57	n.d.	37.20	n.d.
M701D	95.87%	86.78%	14.39	n.d.	51.73	n.d.
M701E	96.03%	89.33%	23.14	n.d.	31.46	n.d.
M701F	95.48%	84.48%	17.94	n.d.	61.34	n.d.
M701G	95.22%	80.22%	19.71	n.d.	18.80	n.d.
M701H	95.07%	90.72%	51.56	60.91	95.26	100.4
M701I	95.57%	91.27%	49.78	57.05	40.03	45.56
M701J	95.60%	95.23%	18.23	18.67	23.45	23.56
M701K	95.05%	94.56%	21.05	22.58	28.78	30.63

[0151] 说明:. d.表示未检测。

[0152] 实施例4:双特异性抗体EpCAM端细胞亲和力检测

[0153] 利用FACS方法,以人结肠癌细胞HCT116(中国科学院上海生命研究院)作为细胞膜表面表达人EpCAM的阳性细胞,检测抗体与细胞表面人EpCAM的亲和力。

[0154] 离心收集HCT116细胞,并重悬于缓冲液中(PBS+1%FBS),按照2×10^{5}个细胞/孔加入96孔板中,每孔50μL。后按照350×g离心5min后去除上清。将双抗用缓冲液稀释至1000nM,并倍比梯度稀释,而后按照50μL/孔加入96孔板中,重悬后避光孵育1h,离心后去上清,用缓冲液洗两次后再重悬于稀释好的PE标记抗人IgGFc抗体(Biolegend,409304)中,避光孵育30min,用缓冲液洗两次后再重悬于100μL缓冲液中,通过流式细胞仪(BD Accuri™ C6)上机检测。

[0155] 各双特异性抗体均与HCT116细胞有明显结合作用,其中M700为抗EpCAM端单抗对照(轻链SEQ ID NO:25和重链SEQ ID NO:26),具体EC50值如表4所示。

[0156] 表4.双特异性抗体与HCT116细胞的结合能力

[0157]

抗体编号	M700	M701	M701A	M701B	M701H	M701I	M701J	M701K
EC50(nM)	1.782	10.501	3.565	3.719	7.151	7.086	3.779	5.652

[0158] 实施例5:双特异性抗体CD3端亲和力检测(Biacore)

[0159] 采用氨基偶联方法将人CD3抗原(SB,Cat:CT038-H2508H)固定于CM5芯片上,抗原偶联量为1500RU,检测CD3抗原端结合活性时,采用1×HBS-EP+buffer稀释样品至起始浓度,再2倍梯度稀释4个浓度,上机从低浓度至高浓度进行检测,结合流速30μL/min,结合时间120s,解离时间300s;采用pH1.5的Glycine溶液再生芯片,再生流速10μL/min,再生时间30s。检测结束后,采用软件Biacore T200 Evaluation Software以1:1Binding拟合方式对结果图谱进行数据拟合,得到解离平衡常数(KD)。如表5所示,系列双特异性抗体均与人CD3抗原有结合作用。其中,M701A和M701B的抗EpCAM抗体可变区序列相同(SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14),抗CD3抗体可变区序列分别为SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19,对应亲和力分别为21.15nM和2827nM。但抗EpCAM抗体可变区序列变成另一种(SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16),抗CD3抗体可变区序列还是SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19,对应的双特异性抗体M701H和M701I的亲和力分别为95.26nM和40.03nM。这说明不同抗EpCAM抗体和不同抗CD3抗体组合形成双特异性抗体,亲和力的表现不具有规律。

[0160] 表5.Biacore检测各双特异性抗体与人CD3抗原结合能力

[0161]

抗体编号	M701	M701A	M701B	M701H	M701I	M701J	M701K
Kd(nM)	25.44	21.15	28.27	95.26	40.03	23.45	28.78

[0162] 实施例6:双特异性抗体介导的细胞桥接作用

[0163] EpCAM阳性细胞株HCT116用PKH26染色,CD3阳性细胞株Jurkat(中国科学院上海生命研究院)用CFSE染色,染色后的细胞以1:1比例(1×10^{5}个HCT116细胞:1×10^{5}个Jurkat细胞)并加入梯度稀释的待测抗体混合共孵育,其中M700为抗EpCAM单抗对照(轻链SEQ ID NO:25和重链SEQ ID NO:26),M100为抗CD3单抗对照(轻链SEQ ID NO:27和重链SEQ ID NO:28),Mco101为抗荧光素酶和抗CD3的双特异性抗体,作为双特异性抗体的CD3端同型对照(轻链SEQ ID NO:29、重链SEQ ID NO:30和单链SEQ ID NO:31,结构同图1)。共孵育1h,洗涤重悬后,流式细胞仪(BD Accuri™ C6)上机检测,CFSE和PKH26双阳性细胞的即为被抗体桥接的HCT116和Jurkat细胞。

[0164] 结果如图2所示,1:1的比例混合Jurkat和HCT116细胞,在加入hIgG、M700、M100、Mco101作用1h后,HCT116和Jurkat细胞没有被桥接;而加入M701A和M701B后,桥接的细胞占到PKH26阳性细胞总数的40%左右,M701A与M701B作用活性相当,双特异性抗体介导的细胞

相互作用与抗体浓度呈现正的量效关系。

[0165] 实施例7:双特异性抗体的生物学活性检测(报告基因法)

[0166] 利用Jurkat-CD3-NFAT-RE-Luc细胞(Promega)检测双特异性抗体的生物学活性。将含有编码人EpCAM基因(NCBI序列号:NM_002354.3)DNA的pLV-puro(Inovogen Tech.Co.,cat.No.VL3001)载体转染到CHO-K1细胞中,获得稳定表达人EpCAM的细胞株CHO-K1-huEpCAM,收集CHO-K1-huEpCAM作为靶细胞,并重悬于缓冲液中(PBS+1%FBS),按照4×10^4个细胞/孔加入全白96孔培养板中,并置于37℃,5%CO_2培养箱中过夜培养18~24小时,移除板中的培养基,每孔加入40μL抗体稀释液。取出Jurkat-CD3-NFAT-RE-Luc细胞即效应细胞,将细胞吹散,制备成单细胞悬液,按照效靶比E:T=1.5:1,在全白96孔培养板内,每孔加入40μL,即6×10^4个/孔铺板,将全白96孔培养板置于37℃,5%CO_2培养箱中培养6小时,每孔加入80μL Bio-Glo荧光素酶检测液,避光室温孵育15分钟,置于多功能读数仪中,采用化学发光读取发光值。

[0167] 结果如图3所示,在该报告基因评估体系中,双特异性抗体M701、M701A、M701B、M701H、M701I、M701J、M701K均表现出生物学活性,M701A、M701J、M701K活性强于M701。

[0168] 实施例8:双特异性抗体介导的体外杀伤作用检测

[0169] 用分离获得的PBMC作为效应细胞,以EpCAM表达细胞作为靶细胞检测双特异性抗体介导的体外杀伤作用。将含有编码人EpCAM基因(NCBI序列号:NM_002354.3)DNA的pLV-puro(Inovogen Tech.Co.,cat.No.VL3001)载体转染到小鼠黑色素瘤细胞B16细胞(中国科学院上海生命研究院)中,获得稳定表达人EpCAM的细胞株B16-EpCAM,其中B16作为不表达EpCAM的阴性细胞。其它EpCAM表达的靶细胞还包括人结肠癌细胞HCT116(中国科学院上海生命研究院)、人卵巢癌细胞OVCAR-3(CCTCC,中国典型培养物保藏中心)以及CHO-K1-huEpCAM。用胰酶将细胞消化成为单细胞悬液,300g离心5min收集细胞并用5μM羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂(5,6-carboxyfluorescein diacetate,succinimidyl ester,CFSE)将细胞染色(37℃,15min),完全培养基洗两次后于Vi-cell细胞计数仪上计数,后按照实验设计加入96孔板中,每孔2×10^4个细胞/100μL。按照50μL/孔加入相应浓度的抗体,将hPBMC于Cellometer细胞计数仪上计数后入96孔板中(每孔2×10^5个细胞/50μL,效靶比为10:1)。将细胞培养板置于细胞培养箱中培养72h,将细胞消化成单细胞悬液后加入终浓度为1μg/mL的溴化丙锭(Propidium iodide,PI)溶液,孵育10min后用流式细胞仪(BD Accuri™ C6)上机检测,并分析CFSE+PI+双阳性细胞占CFSE+阳性细胞百分比。

[0170] 如图4A和4B所示,M701A只对有EpCAM表达的B16-EpCAM细胞有杀伤作用,对无EpCAM表达的B16细胞无杀伤作用,而对照抗体Mco101对任何细胞都无杀伤作用,说明双特异性抗体作用具有靶向性。如图4C和4D所示,M701A对HCT116和OVCAR-3细胞均有明显杀伤作用,且强于对照Mco101。如图4E所示,双特异性抗体M701A、M701B、M701H、M701I均对CHO-K1-huEpCAM细胞均有明显杀伤作用,且M701A和M701B作用明显强于M701H和M701I。如图4F所示,双特异性抗体M701J、M701K均对HCT116细胞均有明显杀伤作用,杀伤的EC50均在7814-25.43ng/ml,且M701J杀伤水平与M701A无明显差异。上述双特异性抗体的杀伤活性均明显强于M701(M701的EC50为69.17ng/ml)。

[0171] 实施例9:双特异性抗体在HCT116人源结肠癌异位异种移植瘤模型中的体内药效

[0172] 按照培养条件培养足够量的HCT116细胞和效应细胞CIK(cytokine-induced

killer,细胞因子诱导的杀伤细胞,是将人外周血单个核细胞在体外用多种细胞因子共同培养一段时间后获得的一群异质细胞。由于该种细胞同时表达CD3+和CD56+两种膜蛋白分子,故又被称为NK细胞样T淋巴细胞),收集细胞并计数。每只小鼠右侧背部接种预先混合好的HCT116细胞(2×10^6细胞/只)和CIK(2×10^6细胞/只),接种体积0.1ml/只,建立人源结肠癌HCT116异种移植肿瘤模型。接种1h后开始给药治疗。实验分为测试药M701A2mg/kg组、M701A 1mg/kg组、M7011mg/kg组、单抗对照M700 2mg/kg组及溶媒对照组(生理盐水),每组8只小鼠。尾静脉注射给药,分别于接种后第0,2,4天给药,共给药三次。根据相对肿瘤抑制率及肿瘤完全消退率进行疗效评价,根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

[0173] 肿瘤大小计算公式:肿瘤体积(mm^3)=05×(肿瘤长径×肿瘤短径^2)。

[0174] 相对肿瘤抑制率TGI(%):TGI=1-T/C(%)。T和C分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的肿瘤体积(TV)。计算公式如下:$T/C\%=T_{TV}/C_{TV}\times100\%$($T_{TV}$:治疗组平均肿瘤体积;$C_{TV}$:溶媒对照组平均肿瘤体积)。

[0175] 肿瘤完全消退率(complete regression):定义为肿瘤在治疗过程中或治疗后肿瘤体积低于$63mm^3$。肿瘤完全消退率(%)=一组中达到完全消退的动物数/该组动物总数×100%。

[0176] 如图5A所示,测试药M701A(2mg/kg、1mg/kg)在治疗组中停药后第30天(即接种后第33天)时均表现出显著的抑瘤作用,相对肿瘤抑制率TGI(%)分别为100%和9382%。相对溶媒对照组统计学上均有显著性差异(p值均<0.001),两组中M701A(2mg/kg)组所有肿瘤达到完全消退标准。M701A在这两个剂量下药效均显著优于2mg/kg的M700(p值<0.001),相同剂量下M701A的药效明显优于M701(均为1mg/kg)。如图5B所示,治疗过程中均无动物体重下降,未见药物毒性表现。

[0177] 在相同的肿瘤模型中,M701B,M701J和M701K在相同剂量下均表现出跟M701A类似的抑瘤效果,且体重均无下降。

[0178] 实施例10:双特异性抗体在OVCAR-3人源卵巢癌异位异种移植瘤模型中的体内药效

[0179] 按照培养条件培养足够量的OVCAR-3细胞和效应细胞CIK,收集细胞并计数。每只小鼠右侧背部接种预先混合好的OVCAR-3细胞(1×10^7细胞/只)和CIK(1×10^7细胞/只),接种体积0.2ml/只,Matrigel胶含量为50%(0.1ml/鼠),建立人源卵巢癌OVCAR-3异位移植肿瘤模型。接种后1h给药治疗,实验分为测试药M701A(5mg/kg)、CD3端同型对照Mco101(5mg/kg),单抗对照M700(5mg/kg)组及溶媒对照组(生理盐水),每组8只小鼠。尾静脉注射给药,分别于接种后第0,2,4天给药,共给药三次。根据相对肿瘤抑制率(TGI)及肿瘤完全消退率进行疗效评价,根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

[0180] 如图6A所示,测试药M701A(5mg/kg)在治疗组中停药后第44天(即接种后第48天)时表现出显著的抑瘤作用,相对肿瘤抑制率TGI(%)为98.97%。相对溶媒对照组统计学上均有显著性差异(p值均<0.001),M701A(5mg/kg)组肿瘤完全消退率为875%,该组药效显著优于5mg/kg的M700(TGI=70.42%)(p值<0.001)和5mg/kg的Mco101(TGI=68.87%)(p值<0.001)。如图6B所示,治疗过程中均无动物体重下降,未见药物毒性表现。

[0181] 在相同的肿瘤模型中,M701B,M701J和M701K在相同剂量下均表现出跟M701A类似的抑瘤效果,且体重均无下降。

[0182] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0183] 序列表

[0184]

名称	氨基酸序列
轻链恒定区 CL SEQ ID NO：1	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
轻链恒定区 CL SEQ ID NO:60	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
轻链恒定区 CL SEQ ID NO:61	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
轻链恒定区 CL SEQ ID NO:62	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPAKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
轻链恒定区 CL SEQ ID NO:63	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS
轻链恒定区 CL SEQ ID NO:64	GQPKAAPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADSSPAKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
轻链恒定区 CL SEQ ID NO:65	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
重链恒定区 CH1 SEQ ID NO：2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
绞链区 Hinge SEQ ID NO：3	EPKSCDKTHTCPPCP
连接肽 1(L1) SEQ ID NO：4	GGGGSGGGGSGGGGS
连接肽 2(L2) SEQ ID NO：5	GAAA
重链恒定区 CH2 SEQ ID NO：6	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
重链恒定区 CH2 SEQ ID NO：7	APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEAPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
重链恒定区 CH2 SEQ ID NO:66	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK
重链恒定区 CH2 SEQ ID NO:67	APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK
重链恒定区 CH2 SEQ ID NO:68	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
重链恒定区 CH2 SEQ ID NO:69	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
重链恒定区 CH2 SEQ ID NO:70	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
重链恒定区 CH2 SEQ ID NO:71	APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
重链恒定区 CH3 SEQ ID NO：8	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSD LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
重链恒定区 CH3 SEQ ID NO：9	GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
重链恒定区 CH3 SEQ ID NO：10	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
重链恒定区 CH3 SEQ ID NO：11	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLASK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
重链恒定区 CH3 SEQ ID NO：12	GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
重链恒定区 CH3 SEQ ID NO：72	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0185]

重链恒定区 CH3 SEQ ID NO：73	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVL DSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
重链恒定区 CH3 SEQ ID NO：74	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
重链恒定区 CH3 SEQ ID NO：75	GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
重链恒定区 CH3 SEQ ID NO：76	GQPREPQVYTLPPSRKELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL KSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
抗-EpCAM VL(1)	ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFT GSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIK（SEQ ID NO：13）（下划线为 CDR） CDRL1：KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO:32) CDRL2：WASTRES (SEQ ID NO:33) CDRL3：QNDYSYPLT(SEQ ID NO:34)
抗-EpCAM VH(1)	EVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGTTVTVSS（SEQ ID NO：14）（下划线为 CDR） CDRH1：GYAFTNYWLG (SEQ ID NO:35) CDRH2：DIFPGSGNIHYNEKFKG (SEQ ID NO:36) CDRH3：LRNWDEPMDY (SEQ ID NO:37)
抗-EpCAM VL(2)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLIIYGASTTASGIPARFSASGSGT DFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPAYTFGQGTKLEIK（SEQ ID NO：15）（下划线为 CDR） CDRL1：RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:38) CDRL2：GASTTAS (SEQ ID NO:39) CDRL3：QQYNNWPPAYT (SEQ ID NO:40)
抗-EpCAM VH(2)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVT ITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLLWNYWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO：16）（下划线为 CDR） CDRH1：SYAIS (SEQ ID NO:41) CDRH2：GIIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO:42) CDRH3：GLLWNY (SEQ ID NO:43)
抗-CD3 ScFv(1)	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKAT LTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVL TQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLT ISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR（SEQ ID NO：17）（下划线为CDR）
抗-CD3 ScFv(2)	DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKAT LTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQL TQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLT ISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK（SEQ ID NO：18）（下划线为 CDR） CDRH1：GYTFTRYTMH (SEQ ID NO:44) CDRH2：YINPSRGYTNYNQKFKD (SEQ ID NO: 45) CDRH3：YYDDHYCLDY (SEQ ID NO:46) CDRL1：RASSSVSYMN (SEQ ID NO:47) CDRL2：DTSKVASG (SEQ ID NO:48) CDRL3：QQWSSNPLT (SEQ ID NO:49) VH： DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKAT LTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:50) VL： DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTS YSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:51)
抗-CD3 ScFv(3)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR

[0186]

	FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKVEIK(SEQ ID NO：19)(下划线为 CDR) CDRH1：GFTFSTYAMN (SEQ ID NO:52) CDRH2：RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 53) CDRH3：HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:54) CDRL1：RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:55) CDRL2：GTNKRAP (SEQ ID NO:56) CDRL3：ALWYSNLWV (SEQ ID NO:57) VH: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:58) VL: QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:59)
抗-CD3 ScFv(4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFT ISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFT ISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKVEIKR（SEQ ID NO：20）(下划线为 CDR)
抗-CD3 ScFv(5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFPMAWVRQAPGKGLEWVSTISTSGGRTYYRDSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFRQYSGGFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQL TQPNSVSTSLGSTVKLSCTLSSGNIENNYVHWYQLYEGRSPTTMIYDDDKRPDGVPDRFSGSIDRSSNS AFLTIHNVAIEDEAIYFCHSYVSSFNVFGGGTKLTVLRQP（SEQ ID NO：21）(下划线为 CDR)
抗-CD3 ScFv(6)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKKYYVDSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLT QSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIKR（SEQ ID NO：22）(下划线为 CDR)
抗-CD3 ScFv(7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKAT LTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKVEIKR（SEQ ID NO：23）(下划线为 CDR)
抗-CD3 ScFv(8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFT ISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIK（SEQ ID NO：24）(下划线为 CDR)

[0187]

对照抗体名称	氨基酸序列
M700 单抗	轻链(SEQ ID NO：25) ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSG TDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 重链(SEQ ID NO：26) EVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTAD KSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
M100 单抗	轻链(SEQ ID NO：27) DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0188]

	重链(SEQ ID NO：28) DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDK SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
Mco101	轻链(SEQ ID NO：29) DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 重链(SEQ ID NO：30) EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISR DDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK 单链(SEQ ID NO：31) DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDK SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAIMSAS PGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQ QWSSNPLTFGAGTKLELKGAAAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLASKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0001] SEQUENCE LISTING
[0002] <110> 武汉友芝友生物制药股份有限公司
[0003] <120> 双特异性抗体及其应用
[0004] <130> IP210557
[0005] <160> 76
[0006] <170> PatentIn version 3.5
[0007] <210> 1
[0008] <211> 107
[0009] <212> PRT
[0010] <213> ˙
[0011] <220>
[0012] <223> 丕 CL İ
[0013] <400> 1
[0014] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[0015] 1 5 10 15
[0016] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[0017] 20 25 30
[0018] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[0019] 35 40 45
[0020] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0021] 50 55 60
[0022] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[0023] 65 70 75 80
[0024] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[0025] 85 90 95
[0026] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0027] 100 105
[0028] <210> 2
[0029] <211> 98
[0030] <212> PRT
[0031] <213> ˙
[0032] <220>
[0033] <223> 丕 CH1 İ
[0034] <400> 2
[0035] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
[0036] 1 5 10 15
[0037] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[0038] 20 25 30

[0039] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

[0040] 35 40 45

[0041] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

[0042] 50 55 60

[0043] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

[0044] 65 70 75 80

[0045] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

[0046] 85 90 95

[0047] Lys Val

[0048] <210> 3

[0049] <211> 15

[0050] <212> PRT

[0051] <213> ˙

[0052] <220>

[0053] <223> İ

[0054] <400> 3

[0055] Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

[0056] 1 5 10 15

[0057] <210> 4

[0058] <211> 15

[0059] <212> PRT

[0060] <213> ˙

[0061] <220>

[0062] <223> 1 İ

[0063] <400> 4

[0064] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[0065] 1 5 10 15

[0066] <210> 5

[0067] <211> 4

[0068] <212> PRT

[0069] <213> ˙

[0070] <220>

[0071] <223> 2 İ

[0072] <400> 5

[0073] Gly Ala Ala Ala

[0074] 1

[0075] <210> 6

[0076] <211> 110

[0077] <212> PRT

[0078] <213> ˙

[0079] <220>

[0080] <223> 丕 CH2 İ

[0081] <400> 6

[0082] Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

[0083] 1 5 10 15

[0084] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

[0085] 20 25 30

[0086] Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

[0087] 35 40 45

[0088] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

[0089] 50 55 60

[0090] Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

[0091] 65 70 75 80

[0092] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

[0093] 85 90 95

[0094] Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

[0095] 100 105 110

[0096] <210> 7

[0097] <211> 109

[0098] <212> PRT

[0099] <213> ˙

[0100] <220>

[0101] <223> 丕 CH2 İ

[0102] <400> 7

[0103] Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

[0104] 1 5 10 15

[0105] Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

[0106] 20 25 30

[0107] Val Asp Val Ser His Glu Ala Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

[0108] 35 40 45

[0109] Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

[0110] 50 55 60

[0111] Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln

[0112] 65 70 75 80

[0113] Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly

[0114] 85 90 95

[0115] Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys

[0116] 100 105

[0117] <210> 8

[0118] <211> 107

[0119] <212> PRT

[0120] <213> ˙

[0121] <220>

[0122] <223> 丕 CH3 İ

[0123] <400> 8

[0124] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

[0125] 1 5 10 15

[0126] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe

[0127] 20 25 30

[0128] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

[0129] 35 40 45

[0130] Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

[0131] 50 55 60

[0132] Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

[0133] 65 70 75 80

[0134] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

[0135] 85 90 95

[0136] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0137] 100 105

[0138] <210> 9

[0139] <211> 107

[0140] <212> PRT

[0141] <213> ˙

[0142] <220>

[0143] <223> 丕 CH3 İ

[0144] <400> 9

[0145] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp

[0146] 1 5 10 15

[0147] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe

[0148] 20 25 30

[0149] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

[0150] 35 40 45

[0151] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

[0152] 50 55 60

[0153] Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

[0154] 65 70 75 80

[0155] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

[0156] 85 90 95

[0157] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0158] 100 105

[0159] <210> 10

[0160] <211> 107

[0161] <212> PRT

[0162] <213> ˙

[0163] <220>

[0164] <223> 丕 CH3 İ

[0165] <400> 10

[0166] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

[0167] 1 5 10 15

[0168] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

[0169] 20 25 30

[0170] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

[0171] 35 40 45

[0172] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

[0173] 50 55 60

[0174] Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

[0175] 65 70 75 80

[0176] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

[0177] 85 90 95

[0178] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0179] 100 105

[0180] <210> 11

[0181] <211> 107

[0182] <212> PRT

[0183] <213> ˙

[0184] <220>

[0185] <223> 丕 CH3 jİ

[0186] <400> 11

[0187] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

[0188] 1 5 10 15

[0189] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Arg Val Lys Gly Phe

[0190] 20 25 30

[0191] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

[0192] 35 40 45

[0193] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe

[0194] 50 55 60

[0195] Phe Leu Ala Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
[0196] 65 70 75 80
[0197] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
[0198] 85 90 95
[0199] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0200] 100 105
[0201] <210> 12
[0202] <211> 107
[0203] <212> PRT
[0204] <213> ˙
[0205] <220>
[0206] <223> 丕 CH3 İ
[0207] <400> 12
[0208] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
[0209] 1 5 10 15
[0210] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
[0211] 20 25 30
[0212] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
[0213] 35 40 45
[0214] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
[0215] 50 55 60
[0216] Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
[0217] 65 70 75 80
[0218] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
[0219] 85 90 95
[0220] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0221] 100 105
[0222] <210> 13
[0223] <211> 113
[0224] <212> PRT
[0225] <213> ˙
[0226] <220>
[0227] <223> -EpCAM ɱ İ
[0228] <400> 13
[0229] Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
[0230] 1 5 10 15
[0231] Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[0232] 20 25 30
[0233] Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

[0234] 35 40 45

[0235] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

[0236] 50 55 60

[0237] Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

[0238] 65 70 75 80

[0239] Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

[0240] 85 90 95

[0241] Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile

[0242] 100 105 110

[0243] Lys

[0244] <210> 14

[0245] <211> 120

[0246] <212> PRT

[0247] <213> ˙

[0248] <220>

[0249] <223> -EpCAM ɱ İ

[0250] <400> 14

[0251] Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

[0252] 1 5 10 15

[0253] Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn

[0254] 20 25 30

[0255] Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp

[0256] 35 40 45

[0257] Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys

[0258] 50 55 60

[0259] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[0260] 65 70 75 80

[0261] Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe

[0262] 85 90 95

[0263] Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

[0264] 100 105 110

[0265] Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

[0266] 115 120

[0267] <210> 15

[0268] <211> 109

[0269] <212> PRT

[0270] <213> ˙

[0271] <220>

[0272] <223> -EpCAM ɱ İ

[0273] <400> 15

[0274] Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

[0275] 1 5 10 15

[0276] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

[0277] 20 25 30

[0278] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Ile Ile

[0279] 35 40 45

[0280] Tyr Gly Ala Ser Thr Thr Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala

[0281] 50 55 60

[0282] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

[0283] 65 70 75 80

[0284] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro

[0285] 85 90 95

[0286] Ala Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0287] 100 105

[0288] <210> 16

[0289] <211> 115

[0290] <212> PRT

[0291] <213> ˙

[0292] <220>

[0293] <223> -EpCAM ŋ İ

[0294] <400> 16

[0295] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

[0296] 1 5 10 15

[0297] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

[0298] 20 25 30

[0299] Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0300] 35 40 45

[0301] Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

[0302] 50 55 60

[0303] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

[0304] 65 70 75 80

[0305] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0306] 85 90 95

[0307] Ala Arg Gly Leu Leu Trp Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

[0308] 100 105 110

[0309] Val Ser Ser

[0310] 115

[0311] <210> 17

[0312] <211> 241

[0313] <212> PRT

[0314] <213> ˙

[0315] <220>

[0316] <223> -CD3 ScFv İ

[0317] <400> 17

[0318] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

[0319] 1 5 10 15

[0320] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

[0321] 20 25 30

[0322] Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

[0323] 35 40 45

[0324] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

[0325] 50 55 60

[0326] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0327] 65 70 75 80

[0328] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[0329] 85 90 95

[0330] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[0331] 100 105 110

[0332] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[0333] 115 120 125

[0334] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile

[0335] 130 135 140

[0336] Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser

[0337] 145 150 155 160

[0338] Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser

[0339] 165 170 175

[0340] Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro

[0341] 180 185 190

[0342] Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

[0343] 195 200 205

[0344] Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

[0345] 210 215 220

[0346] Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn

[0347] 225 230 235 240

[0348] Arg

[0349] <210> 18

[0350] <211> 240

[0351] <212> PRT

[0352] <213> ˙

[0353] <220>

[0354] <223> -CD3 ScFv İ

[0355] <400> 18

[0356] Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

[0357] 1 5 10 15

[0358] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

[0359] 20 25 30

[0360] Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

[0361] 35 40 45

[0362] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

[0363] 50 55 60

[0364] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0365] 65 70 75 80

[0366] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[0367] 85 90 95

[0368] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[0369] 100 105 110

[0370] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[0371] 115 120 125

[0372] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile

[0373] 130 135 140

[0374] Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

[0375] 145 150 155 160

[0376] Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser

[0377] 165 170 175

[0378] Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro

[0379] 180 185 190

[0380] Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

[0381] 195 200 205

[0382] Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

[0383] 210 215 220

[0384] Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

[0385] 225 230 235 240

[0386] <210> 19

[0387] <211> 249

[0388] <212> PRT

[0389] <213> ˙

[0390] <220>

[0391] <223> -CD3 ScFv İ

[0392] <400> 19

[0393] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

[0394] 1 5 10 15

[0395] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

[0396] 20 25 30

[0397] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0398] 35 40 45

[0399] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[0400] 50 55 60

[0401] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

[0402] 65 70 75 80

[0403] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

[0404] 85 90 95

[0405] Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[0406] 100 105 110

[0407] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

[0408] 115 120 125

[0409] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val

[0410] 130 135 140

[0411] Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu

[0412] 145 150 155 160

[0413] Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

[0414] 165 170 175

[0415] Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly

[0416] 180 185 190

[0417] Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu

[0418] 195 200 205

[0419] Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp

[0420] 210 215 220

[0421] Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe

[0422] 225 230 235 240

[0423] Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0424] 245

[0425] <210> 20

[0426] <211> 241

[0427] <212> PRT

[0428] <213> ‘

[0429] <220>

[0430] <223> -CD3 ScFv İ

[0431] <400> 20

[0432] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0433] 1 5 10 15

[0434] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

[0435] 20 25 30

[0436] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

[0437] 35 40 45

[0438] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val

[0439] 50 55 60

[0440] Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe

[0441] 65 70 75 80

[0442] Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys

[0443] 85 90 95

[0444] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[0445] 100 105 110

[0446] Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[0447] 115 120 125

[0448] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

[0449] 130 135 140

[0450] Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser

[0451] 145 150 155 160

[0452] Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala

[0453] 165 170 175

[0454] Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro

[0455] 180 185 190

[0456] Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile

[0457] 195 200 205

[0458] Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

[0459] 210 215 220

[0460] Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0461] 225 230 235 240

[0462] Arg

[0463] <210> 21

[0464] <211> 247

[0465] <212> PRT

[0466] <213> ˙

[0467] <220>

[0468] <223> -CD3 ScFv İ

[0469] <400> 21

[0470] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0471] 1 5 10 15

[0472] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

[0473] 20 25 30

[0474] Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0475] 35 40 45

[0476] Ser Thr Ile Ser Thr Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

[0477] 50 55 60

[0478] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0479] 65 70 75 80

[0480] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0481] 85 90 95

[0482] Ala Lys Phe Arg Gln Tyr Ser Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[0483] 100 105 110

[0484] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[0485] 115 120 125

[0486] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Pro Asn Ser Val

[0487] 130 135 140

[0488] Ser Thr Ser Leu Gly Ser Thr Val Lys Leu Ser Cys Thr Leu Ser Ser

[0489] 145 150 155 160

[0490] Gly Asn Ile Glu Asn Asn Tyr Val His Trp Tyr Gln Leu Tyr Glu Gly

[0491] 165 170 175

[0492] Arg Ser Pro Thr Thr Met Ile Tyr Asp Asp Asp Lys Arg Pro Asp Gly

[0493] 180 185 190

[0494] Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Arg Ser Ser Asn Ser Ala

[0495] 195 200 205

[0496] Phe Leu Thr Ile His Asn Val Ala Ile Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe

[0497] 210 215 220

[0498] Cys His Ser Tyr Val Ser Ser Phe Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys

[0499] 225 230 235 240

[0500] Leu Thr Val Leu Arg Gln Pro

[0501] 245

[0502] <210> 22

[0503] <211> 242

[0504] <212> PRT

[0505] <213> ˙

[0506] <220>

[0507] <223> -CD3 ScFv İ

[0508] <400> 22

[0509] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

[0510] 1 5 10 15

[0511] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Gly Tyr

[0512] 20 25 30

[0513] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0514] 35 40 45

[0515] Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

[0516] 50 55 60

[0517] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0518] 65 70 75 80

[0519] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0520] 85 90 95

[0521] Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr

[0522] 100 105 110

[0523] Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[0524] 115 120 125

[0525] Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

[0526] 130 135 140

[0527] Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln

[0528] 145 150 155 160

[0529] Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

[0530] 165 170 175

[0531] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro

[0532] 180 185 190

[0533] Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

[0534] 195 200 205

[0535] Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg

[0536] 210 215 220

[0537] Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

[0538] 225 230 235 240

[0539] Lys Arg

[0540] <210> 23

[0541] <211> 242

[0542] <212> PRT

[0543] <213> ˙

[0544] <220>

[0545] <223> -CD3 ScFv İ

[0546] <400> 23

[0547] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[0548] 1 5 10 15

[0549] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr

[0550] 20 25 30

[0551] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0552] 35 40 45

[0553] Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn Gln Lys Leu

[0554] 50 55 60

[0555] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

[0556] 65 70 75 80

[0557] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0558] 85 90 95

[0559] Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

[0560] 100 105 110

[0561] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

[0562] 115 120 125

[0563] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser

[0564] 130 135 140

[0565] Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala

[0566] 145 150 155 160

[0567] Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

[0568] 165 170 175

[0569] Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val

[0570] 180 185 190

[0571] Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

[0572] 195 200 205

[0573] Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

[0574] 210 215 220

[0575] Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

[0576] 225 230 235 240

[0577] Lys Arg

[0578] <210> 24

[0579] <211> 244

[0580] <212> PRT

[0581] <213> ‘

[0582] <220>

[0583] <223> -CD3 ScFv İ

[0584] <400> 24

[0585] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0586] 1 5 10 15
[0587] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
[0588] 20 25 30
[0589] Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0590] 35 40 45
[0591] Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
[0592] 50 55 60
[0593] Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
[0594] 65 70 75 80
[0595] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0596] 85 90 95
[0597] Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
[0598] 100 105 110
[0599] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[0600] 115 120 125
[0601] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
[0602] 130 135 140
[0603] Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
[0604] 145 150 155 160
[0605] Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
[0606] 165 170 175
[0607] Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu
[0608] 180 185 190
[0609] Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
[0610] 195 200 205
[0611] Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
[0612] 210 215 220
[0613] Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
[0614] 225 230 235 240
[0615] Val Glu Ile Lys
[0616] <210> 25
[0617] <211> 220
[0618] <212> PRT
[0619] <213> ˙
[0620] <220>
[0621] <223> M700
[0622] <400> 25
[0623] Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly

[0624] 1 5 10 15
[0625] Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[0626] 20 25 30
[0627] Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0628] 35 40 45
[0629] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0630] 50 55 60
[0631] Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0632] 65 70 75 80
[0633] Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
[0634] 85 90 95
[0635] Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0636] 100 105 110
[0637] Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
[0638] 115 120 125
[0639] Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
[0640] 130 135 140
[0641] Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
[0642] 145 150 155 160
[0643] Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
[0644] 165 170 175
[0645] Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
[0646] 180 185 190
[0647] Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
[0648] 195 200 205
[0649] Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0650] 210 215 220
[0651] <210> 26
[0652] <211> 450
[0653] <212> PRT
[0654] <213> ˙
[0655] <220>
[0656] <223> M700
[0657] <400> 26
[0658] Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
[0659] 1 5 10 15
[0660] Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn
[0661] 20 25 30
[0662] Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp

[0663] 35 40 45

[0664] Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys

[0665] 50 55 60

[0666] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[0667] 65 70 75 80

[0668] Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe

[0669] 85 90 95

[0670] Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

[0671] 100 105 110

[0672] Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

[0673] 115 120 125

[0674] Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

[0675] 130 135 140

[0676] Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

[0677] 145 150 155 160

[0678] Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

[0679] 165 170 175

[0680] Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

[0681] 180 185 190

[0682] Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

[0683] 195 200 205

[0684] Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

[0685] 210 215 220

[0686] Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

[0687] 225 230 235 240

[0688] Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

[0689] 245 250 255

[0690] Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

[0691] 260 265 270

[0692] Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

[0693] 275 280 285

[0694] Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

[0695] 290 295 300

[0696] Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

[0697] 305 310 315 320

[0698] Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

[0699] 325 330 335

[0700] Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

[0701] 340 345 350

[0702] Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
[0703] 355 360 365
[0704] Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
[0705] 370 375 380
[0706] Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
[0707] 385 390 395 400
[0708] Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
[0709] 405 410 415
[0710] Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
[0711] 420 425 430
[0712] Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
[0713] 435 440 445
[0714] Gly Lys
[0715] 450
[0716] <210> 27
[0717] <211> 213
[0718] <212> PRT
[0719] <213> ˙
[0720] <220>
[0721] <223> M100
[0722] <400> 27
[0723] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
[0724] 1 5 10 15
[0725] Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0726] 20 25 30
[0727] Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
[0728] 35 40 45
[0729] Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
[0730] 50 55 60
[0731] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
[0732] 65 70 75 80
[0733] Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
[0734] 85 90 95
[0735] Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
[0736] 100 105 110
[0737] Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
[0738] 115 120 125
[0739] Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
[0740] 130 135 140

[0741] Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
[0742] 145 150 155 160
[0743] Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
[0744] 165 170 175
[0745] Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
[0746] 180 185 190
[0747] Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
[0748] 195 200 205
[0749] Asn Arg Gly Glu Cys
[0750] 210
[0751] <210> 28
[0752] <211> 449
[0753] <212> PRT
[0754] <213> ˙
[0755] <220>
[0756] <223> M100
[0757] <400> 28
[0758] Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
[0759] 1 5 10 15
[0760] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
[0761] 20 25 30
[0762] Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0763] 35 40 45
[0764] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
[0765] 50 55 60
[0766] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0767] 65 70 75 80
[0768] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0769] 85 90 95
[0770] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0771] 100 105 110
[0772] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
[0773] 115 120 125
[0774] Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
[0775] 130 135 140
[0776] Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
[0777] 145 150 155 160
[0778] Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
[0779] 165 170 175

[0780] Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
[0781] 180 185 190
[0782] Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
[0783] 195 200 205
[0784] Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
[0785] 210 215 220
[0786] Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
[0787] 225 230 235 240
[0788] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[0789] 245 250 255
[0790] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
[0791] 260 265 270
[0792] Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[0793] 275 280 285
[0794] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[0795] 290 295 300
[0796] Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[0797] 305 310 315 320
[0798] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
[0799] 325 330 335
[0800] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[0801] 340 345 350
[0802] Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[0803] 355 360 365
[0804] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[0805] 370 375 380
[0806] Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[0807] 385 390 395 400
[0808] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
[0809] 405 410 415
[0810] Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[0811] 420 425 430
[0812] Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0813] 435 440 445
[0814] Lys
[0815] <210> 29
[0816] <211> 219
[0817] <212> PRT
[0818] <213> ˙

[0819] <220>

[0820] <223> Mco101

[0821] <400> 29

[0822] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

[0823] 1 5 10 15

[0824] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

[0825] 20 25 30

[0826] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

[0827] 35 40 45

[0828] Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

[0829] 50 55 60

[0830] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

[0831] 65 70 75 80

[0832] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

[0833] 85 90 95

[0834] Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0835] 100 105 110

[0836] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

[0837] 115 120 125

[0838] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

[0839] 130 135 140

[0840] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

[0841] 145 150 155 160

[0842] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

[0843] 165 170 175

[0844] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

[0845] 180 185 190

[0846] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

[0847] 195 200 205

[0848] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0849] 210 215

[0850] <210> 30

[0851] <211> 448

[0852] <212> PRT

[0853] <213> ˙

[0854] <220>

[0855] <223> Mco101

[0856] <400> 30

[0857] Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

[0858] 1 5 10 15

[0859] Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

[0860] 20 25 30

[0861] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0862] 35 40 45

[0863] Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp

[0864] 50 55 60

[0865] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser

[0866] 65 70 75 80

[0867] Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr

[0868] 85 90 95

[0869] Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

[0870] 100 105 110

[0871] Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

[0872] 115 120 125

[0873] Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

[0874] 130 135 140

[0875] Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

[0876] 145 150 155 160

[0877] Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

[0878] 165 170 175

[0879] Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

[0880] 180 185 190

[0881] Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

[0882] 195 200 205

[0883] Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

[0884] 210 215 220

[0885] His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

[0886] 225 230 235 240

[0887] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

[0888] 245 250 255

[0889] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

[0890] 260 265 270

[0891] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

[0892] 275 280 285

[0893] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

[0894] 290 295 300

[0895] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

[0896] 305 310 315 320

[0897] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[0898] 325 330 335
[0899] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0900] 340 345 350
[0901] Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
[0902] 355 360 365
[0903] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0904] 370 375 380
[0905] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[0906] 385 390 395 400
[0907] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0908] 405 410 415
[0909] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[0910] 420 425 430
[0911] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0912] 435 440 445
[0913] <210> 31
[0914] <211> 476
[0915] <212> PRT
[0916] <213> ˙
[0917] <220>
[0918] <223> Mco101 ĵ
[0919] <400> 31
[0920] Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
[0921] 1 5 10 15
[0922] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
[0923] 20 25 30
[0924] Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0925] 35 40 45
[0926] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
[0927] 50 55 60
[0928] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0929] 65 70 75 80
[0930] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0931] 85 90 95
[0932] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0933] 100 105 110
[0934] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[0935] 115 120 125

[0936] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
[0937] 130 135 140
[0938] Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
[0939] 145 150 155 160
[0940] Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
[0941] 165 170 175
[0942] Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro
[0943] 180 185 190
[0944] Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
[0945] 195 200 205
[0946] Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
[0947] 210 215 220
[0948] Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0949] 225 230 235 240
[0950] Gly Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
[0951] 245 250 255
[0952] Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
[0953] 260 265 270
[0954] Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
[0955] 275 280 285
[0956] Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
[0957] 290 295 300
[0958] Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
[0959] 305 310 315 320
[0960] Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
[0961] 325 330 335
[0962] Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
[0963] 340 345 350
[0964] Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
[0965] 355 360 365
[0966] Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
[0967] 370 375 380
[0968] Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Arg Val Lys Gly
[0969] 385 390 395 400
[0970] Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
[0971] 405 410 415
[0972] Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser
[0973] 420 425 430
[0974] Phe Phe Leu Ala Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

[0975] 435 440 445

[0976] Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

[0977] 450 455 460

[0978] Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0979] 465 470 475

[0980] <210> 32

[0981] <211> 17

[0982] <212> PRT

[0983] <213> ˙

[0984] <220>

[0985] <223> -EpCAM ŋ CDRL1

[0986] <400> 32

[0987] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

[0988] 1 5 10 15

[0989] Thr

[0990] <210> 33

[0991] <211> 7

[0992] <212> PRT

[0993] <213> ˙

[0994] <220>

[0995] <223> -EpCAM ŋ CDRL2

[0996] <400> 33

[0997] Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

[0998] 1 5

[0999] <210> 34

[1000] <211> 9

[1001] <212> PRT

[1002] <213> ˙

[1003] <220>

[1004] <223> -EpCAM ŋ CDRL3

[1005] <400> 34

[1006] Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr

[1007] 1 5

[1008] <210> 35

[1009] <211> 10

[1010] <212> PRT

[1011] <213> ˙

[1012] <220>

[1013] <223> -EpCAM ŋ CDRH1

[1014] <400> 35
[1015] Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly
[1016] 1 5 10
[1017] <210> 36
[1018] <211> 17
[1019] <212> PRT
[1020] <213> ˙
[1021] <220>
[1022] <223> -EpCAM ɱ CDRH2
[1023] <400> 36
[1024] Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[1025] 1 5 10 15
[1026] Gly
[1027] <210> 37
[1028] <211> 10
[1029] <212> PRT
[1030] <213> ˙
[1031] <220>
[1032] <223> -EpCAM ɱ CDRH3
[1033] <400> 37
[1034] Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr
[1035] 1 5 10
[1036] <210> 38
[1037] <211> 11
[1038] <212> PRT
[1039] <213> ˙
[1040] <220>
[1041] <223> -EpCAM ɱ CDRL1
[1042] <400> 38
[1043] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
[1044] 1 5 10
[1045] <210> 39
[1046] <211> 7
[1047] <212> PRT
[1048] <213> ˙
[1049] <220>
[1050] <223> -EpCAM ɱ CDRL2
[1051] <400> 39
[1052] Gly Ala Ser Thr Thr Ala Ser

[1053] 1 5

[1054] <210> 40

[1055] <211> 11

[1056] <212> PRT

[1057] <213> ˙

[1058] <220>

[1059] <223> -EpCAM ɱ CDRL3

[1060] <400> 40

[1061] Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro Ala Tyr Thr

[1062] 1 5 10

[1063] <210> 41

[1064] <211> 5

[1065] <212> PRT

[1066] <213> ˙

[1067] <220>

[1068] <223> -EpCAM ɱ CDRH1

[1069] <400> 41

[1070] Ser Tyr Ala Ile Ser

[1071] 1 5

[1072] <210> 42

[1073] <211> 17

[1074] <212> PRT

[1075] <213> ˙

[1076] <220>

[1077] <223> -EpCAM ɱ CDRH2

[1078] <400> 42

[1079] Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

[1080] 1 5 10 15

[1081] Gly

[1082] <210> 43

[1083] <211> 6

[1084] <212> PRT

[1085] <213> ˙

[1086] <220>

[1087] <223> -EpCAM ɱ CDRH3

[1088] <400> 43

[1089] Gly Leu Leu Trp Asn Tyr

[1090] 1 5

[1091] <210> 44

[1092] <211> 10
[1093] <212> PRT
[1094] <213> ˙
[1095] <220>
[1096] <223> -CD3 ScFv CDRH1
[1097] <400> 44
[1098] Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His
[1099] 1 5 10
[1100] <210> 45
[1101] <211> 17
[1102] <212> PRT
[1103] <213> ˙
[1104] <220>
[1105] <223> -CD3 ScFv CDRH2
[1106] <400> 45
[1107] Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[1108] 1 5 10 15
[1109] Asp
[1110] <210> 46
[1111] <211> 10
[1112] <212> PRT
[1113] <213> ˙
[1114] <220>
[1115] <223> -CD3 ScFv CDRH3
[1116] <400> 46
[1117] Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
[1118] 1 5 10
[1119] <210> 47
[1120] <211> 10
[1121] <212> PRT
[1122] <213> ˙
[1123] <220>
[1124] <223> -CD3 ScFv CDRL1
[1125] <400> 47
[1126] Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
[1127] 1 5 10
[1128] <210> 48
[1129] <211> 8
[1130] <212> PRT

[1131] <213> ˙

[1132] <220>

[1133] <223> -CD3 ScFv CDRL2

[1134] <400> 48

[1135] Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly

[1136] 1 5

[1137] <210> 49

[1138] <211> 9

[1139] <212> PRT

[1140] <213> ˙

[1141] <220>

[1142] <223> -CD3 ScFv CDRL3

[1143] <400> 49

[1144] Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

[1145] 1 5

[1146] <210> 50

[1147] <211> 119

[1148] <212> PRT

[1149] <213> ˙

[1150] <220>

[1151] <223> -CD3 ScFv ɱ

[1152] <400> 50

[1153] Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

[1154] 1 5 10 15

[1155] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

[1156] 20 25 30

[1157] Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

[1158] 35 40 45

[1159] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

[1160] 50 55 60

[1161] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[1162] 65 70 75 80

[1163] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[1164] 85 90 95

[1165] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[1166] 100 105 110

[1167] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[1168] 115

[1169] <210> 51

[1170] <211> 106
[1171] <212> PRT
[1172] <213> ˙
[1173] <220>
[1174] <223> -CD3 ScFv ɱ
[1175] <400> 51
[1176] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
[1177] 1 5 10 15
[1178] Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[1179] 20 25 30
[1180] Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
[1181] 35 40 45
[1182] Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
[1183] 50 55 60
[1184] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
[1185] 65 70 75 80
[1186] Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
[1187] 85 90 95
[1188] Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[1189] 100 105
[1190] <210> 52
[1191] <211> 10
[1192] <212> PRT
[1193] <213> ˙
[1194] <220>
[1195] <223> -CD3 ScFv CDRH1
[1196] <400> 52
[1197] Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn
[1198] 1 5 10
[1199] <210> 53
[1200] <211> 19
[1201] <212> PRT
[1202] <213> ˙
[1203] <220>
[1204] <223> -CD3 ScFv CDRH2
[1205] <400> 53
[1206] Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
[1207] 1 5 10 15
[1208] Val Lys Asp

[1209] <210> 54
[1210] <211> 14
[1211] <212> PRT
[1212] <213> ˙
[1213] <220>
[1214] <223> -CD3 ScFv CDRH3
[1215] <400> 54
[1216] His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
[1217] 1 5 10
[1218] <210> 55
[1219] <211> 14
[1220] <212> PRT
[1221] <213> ˙
[1222] <220>
[1223] <223> -CD3 ScFv CDRL1
[1224] <400> 55
[1225] Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
[1226] 1 5 10
[1227] <210> 56
[1228] <211> 7
[1229] <212> PRT
[1230] <213> ˙
[1231] <220>
[1232] <223> -CD3 ScFv CDRL2
[1233] <400> 56
[1234] Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
[1235] 1 5
[1236] <210> 57
[1237] <211> 9
[1238] <212> PRT
[1239] <213> ˙
[1240] <220>
[1241] <223> -CD3 ScFv CDRL3
[1242] <400> 57
[1243] Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
[1244] 1 5
[1245] <210> 58
[1246] <211> 125
[1247] <212> PRT

[1248] <213> ˙

[1249] <220>

[1250] <223> -CD3 ScFv ŋ

[1251] <400> 58

[1252] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

[1253] 1 5 10 15

[1254] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

[1255] 20 25 30

[1256] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[1257] 35 40 45

[1258] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

[1259] 50 55 60

[1260] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

[1261] 65 70 75 80

[1262] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

[1263] 85 90 95

[1264] Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

[1265] 100 105 110

[1266] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[1267] 115 120 125

[1268] <210> 59

[1269] <211> 109

[1270] <212> PRT

[1271] <213> ˙

[1272] <220>

[1273] <223> -CD3 ScFv

[1274] <400> 59

[1275] Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

[1276] 1 5 10 15

[1277] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

[1278] 20 25 30

[1279] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly

[1280] 35 40 45

[1281] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

[1282] 50 55 60

[1283] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val

[1284] 65 70 75 80

[1285] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

[1286] 85 90 95

[1287] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[1288] 100 105
[1289] <210> 60
[1290] <211> 106
[1291] <212> PRT
[1292] <213> ˙
[1293] <220>
[1294] <223> 丕 CL İ
[1295] <400> 60
[1296] Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
[1297] 1 5 10 15
[1298] Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
[1299] 20 25 30
[1300] Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
[1301] 35 40 45
[1302] Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
[1303] 50 55 60
[1304] Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
[1305] 65 70 75 80
[1306] Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
[1307] 85 90 95
[1308] Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[1309] 100 105
[1310] <210> 61
[1311] <211> 106
[1312] <212> PRT
[1313] <213> ˙
[1314] <220>
[1315] <223> 丕 CL İ
[1316] <400> 61
[1317] Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
[1318] 1 5 10 15
[1319] Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
[1320] 20 25 30
[1321] Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
[1322] 35 40 45
[1323] Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
[1324] 50 55 60
[1325] Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

[1326] 65 70 75 80
[1327] Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
[1328] 85 90 95
[1329] Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[1330] 100 105
[1331] <210> 62
[1332] <211> 106
[1333] <212> PRT
[1334] <213> ˙
[1335] <220>
[1336] <223> 丕 CL İ
[1337] <400> 62
[1338] Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
[1339] 1 5 10 15
[1340] Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
[1341] 20 25 30
[1342] Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
[1343] 35 40 45
[1344] Ala Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
[1345] 50 55 60
[1346] Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
[1347] 65 70 75 80
[1348] Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
[1349] 85 90 95
[1350] Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[1351] 100 105
[1352] <210> 63
[1353] <211> 106
[1354] <212> PRT
[1355] <213> ˙
[1356] <220>
[1357] <223> 丕 CL İ
[1358] <400> 63
[1359] Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
[1360] 1 5 10 15
[1361] Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
[1362] 20 25 30
[1363] Phe Tyr Pro Gly Ala Val Lys Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
[1364] 35 40 45

[1365] Val Asn Thr Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
[1366] 50 55 60
[1367] Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
[1368] 65 70 75 80
[1369] Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
[1370] 85 90 95
[1371] Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
[1372] 100 105
[1373] <210> 64
[1374] <211> 106
[1375] <212> PRT
[1376] <213> ˙
[1377] <220>
[1378] <223> 丕 CL İ
[1379] <400> 64
[1380] Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
[1381] 1 5 10 15
[1382] Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
[1383] 20 25 30
[1384] Phe Tyr Pro Gly Ala Val Lys Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
[1385] 35 40 45
[1386] Ala Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
[1387] 50 55 60
[1388] Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
[1389] 65 70 75 80
[1390] Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
[1391] 85 90 95
[1392] Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[1393] 100 105
[1394] <210> 65
[1395] <211> 106
[1396] <212> PRT
[1397] <213> ˙
[1398] <220>
[1399] <223> 丕 CL İ
[1400] <400> 65
[1401] Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
[1402] 1 5 10 15
[1403] Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp

[1404] 20 25 30
[1405] Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
[1406] 35 40 45
[1407] Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
[1408] 50 55 60
[1409] Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
[1410] 65 70 75 80
[1411] Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
[1412] 85 90 95
[1413] Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[1414] 100 105
[1415] <210> 66
[1416] <211> 110
[1417] <212> PRT
[1418] <213> ˙
[1419] <220>
[1420] <223> 丕 CH2 İ
[1421] <400> 66
[1422] Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
[1423] 1 5 10 15
[1424] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
[1425] 20 25 30
[1426] Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
[1427] 35 40 45
[1428] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[1429] 50 55 60
[1430] Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[1431] 65 70 75 80
[1432] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[1433] 85 90 95
[1434] Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
[1435] 100 105 110
[1436] <210> 67
[1437] <211> 110
[1438] <212> PRT
[1439] <213> ˙
[1440] <220>
[1441] <223> 丕 CH2 İ
[1442] <400> 67

[1443] Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
[1444] 1 5 10 15
[1445] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
[1446] 20 25 30
[1447] Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
[1448] 35 40 45
[1449] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[1450] 50 55 60
[1451] Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[1452] 65 70 75 80
[1453] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[1454] 85 90 95
[1455] Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
[1456] 100 105 110
[1457] <210> 68
[1458] <211> 110
[1459] <212> PRT
[1460] <213> ˙
[1461] <220>
[1462] <223> 丕 CH2 İ
[1463] <400> 68
[1464] Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
[1465] 1 5 10 15
[1466] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
[1467] 20 25 30
[1468] Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
[1469] 35 40 45
[1470] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[1471] 50 55 60
[1472] Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[1473] 65 70 75 80
[1474] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[1475] 85 90 95
[1476] Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
[1477] 100 105 110
[1478] <210> 69
[1479] <211> 110
[1480] <212> PRT
[1481] <213> ˙

[1482] <220>

[1483] <223> 丕 CH2 İ

[1484] <400> 69

[1485] Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

[1486] 1 5 10 15

[1487] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

[1488] 20 25 30

[1489] Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

[1490] 35 40 45

[1491] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

[1492] 50 55 60

[1493] Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

[1494] 65 70 75 80

[1495] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

[1496] 85 90 95

[1497] Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

[1498] 100 105 110

[1499] <210> 70

[1500] <211> 110

[1501] <212> PRT

[1502] <213> ‘

[1503] <220>

[1504] <223> 丕 CH2 İ

[1505] <400> 70

[1506] Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

[1507] 1 5 10 15

[1508] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

[1509] 20 25 30

[1510] Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

[1511] 35 40 45

[1512] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

[1513] 50 55 60

[1514] Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

[1515] 65 70 75 80

[1516] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

[1517] 85 90 95

[1518] Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

[1519] 100 105 110

[1520] <210> 71

[1521] <211> 109
[1522] <212> PRT
[1523] <213> ˙
[1524] <220>
[1525] <223> 丕 CH2 İ
[1526] <400> 71
[1527] Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
[1528] 1 5 10 15
[1529] Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
[1530] 20 25 30
[1531] Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
[1532] 35 40 45
[1533] Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
[1534] 50 55 60
[1535] Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
[1536] 65 70 75 80
[1537] Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
[1538] 85 90 95
[1539] Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
[1540] 100 105
[1541] <210> 72
[1542] <211> 107
[1543] <212> PRT
[1544] <213> ˙
[1545] <220>
[1546] <223> 丕 CH3 İ
[1547] <400> 72
[1548] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
[1549] 1 5 10 15
[1550] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
[1551] 20 25 30
[1552] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
[1553] 35 40 45
[1554] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
[1555] 50 55 60
[1556] Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
[1557] 65 70 75 80
[1558] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
[1559] 85 90 95

[1560] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1561] 100 105
[1562] <210> 73
[1563] <211> 107
[1564] <212> PRT
[1565] <213> ˙
[1566] <220>
[1567] <223> 丕 CH3 İ
[1568] <400> 73
[1569] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
[1570] 1 5 10 15
[1571] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
[1572] 20 25 30
[1573] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
[1574] 35 40 45
[1575] Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
[1576] 50 55 60
[1577] Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
[1578] 65 70 75 80
[1579] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
[1580] 85 90 95
[1581] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1582] 100 105
[1583] <210> 74
[1584] <211> 107
[1585] <212> PRT
[1586] <213> ˙
[1587] <220>
[1588] <223> 丕 CH3 İ
[1589] <400> 74
[1590] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
[1591] 1 5 10 15
[1592] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
[1593] 20 25 30
[1594] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
[1595] 35 40 45
[1596] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
[1597] 50 55 60
[1598] Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

[1599] 65 70 75 80
[1600] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
[1601] 85 90 95
[1602] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1603] 100 105
[1604] <210> 75
[1605] <211> 107
[1606] <212> PRT
[1607] <213> ˙
[1608] <220>
[1609] <223> 丕 CH3 İ
[1610] <400> 75
[1611] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
[1612] 1 5 10 15
[1613] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
[1614] 20 25 30
[1615] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
[1616] 35 40 45
[1617] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
[1618] 50 55 60
[1619] Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
[1620] 65 70 75 80
[1621] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
[1622] 85 90 95
[1623] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1624] 100 105
[1625] <210> 76
[1626] <211> 107
[1627] <212> PRT
[1628] <213> ˙
[1629] <220>
[1630] <223> 丕 CH3 İ
[1631] <400> 76
[1632] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys
[1633] 1 5 10 15
[1634] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
[1635] 20 25 30
[1636] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
[1637] 35 40 45

[1638] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe

[1639] 50 55 60

[1640] Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

[1641] 65 70 75 80

[1642] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

[1643] 85 90 95

[1644] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[1645] 100 105

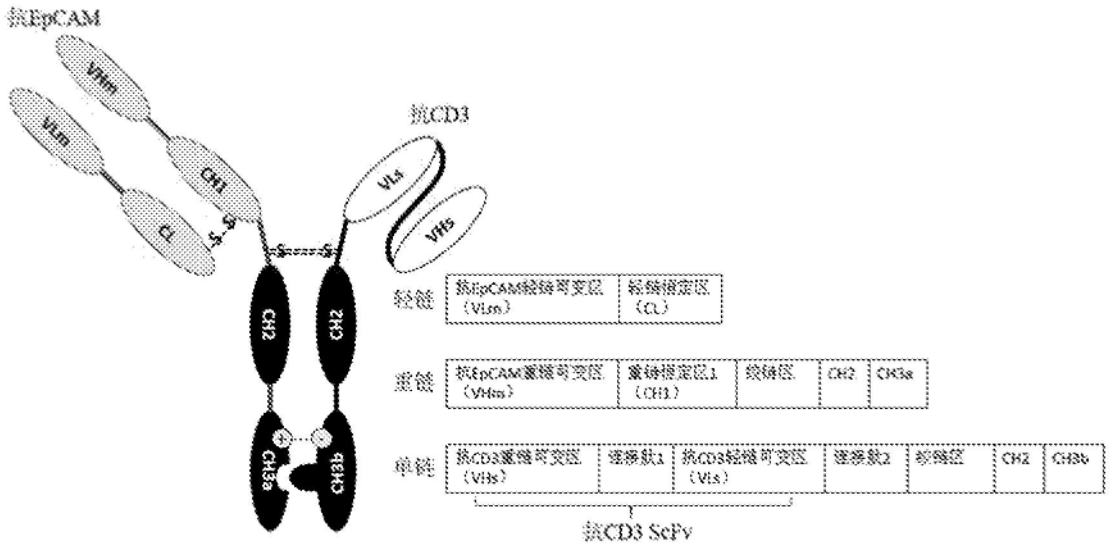

抗EpCAM
VHm
VLm
CH1
CL
S-S
S
S
抗CD3
VLs
VHs
CH2
CH2
CH3a
CH3b
轻链
抗EpCAM轻链可变区（VLm）
轻链恒定区（CL）
重链
抗EpCAM重链可变区（VHm）
重链恒定区1（CH1）
铰链区
CH2
CH3a
单链
抗CD3重链可变区（VHs）
连接肽1
抗CD3轻链可变区（VLs）
连接肽2
标签区
CH2
CH3b
抗CD3 ScFv

图1

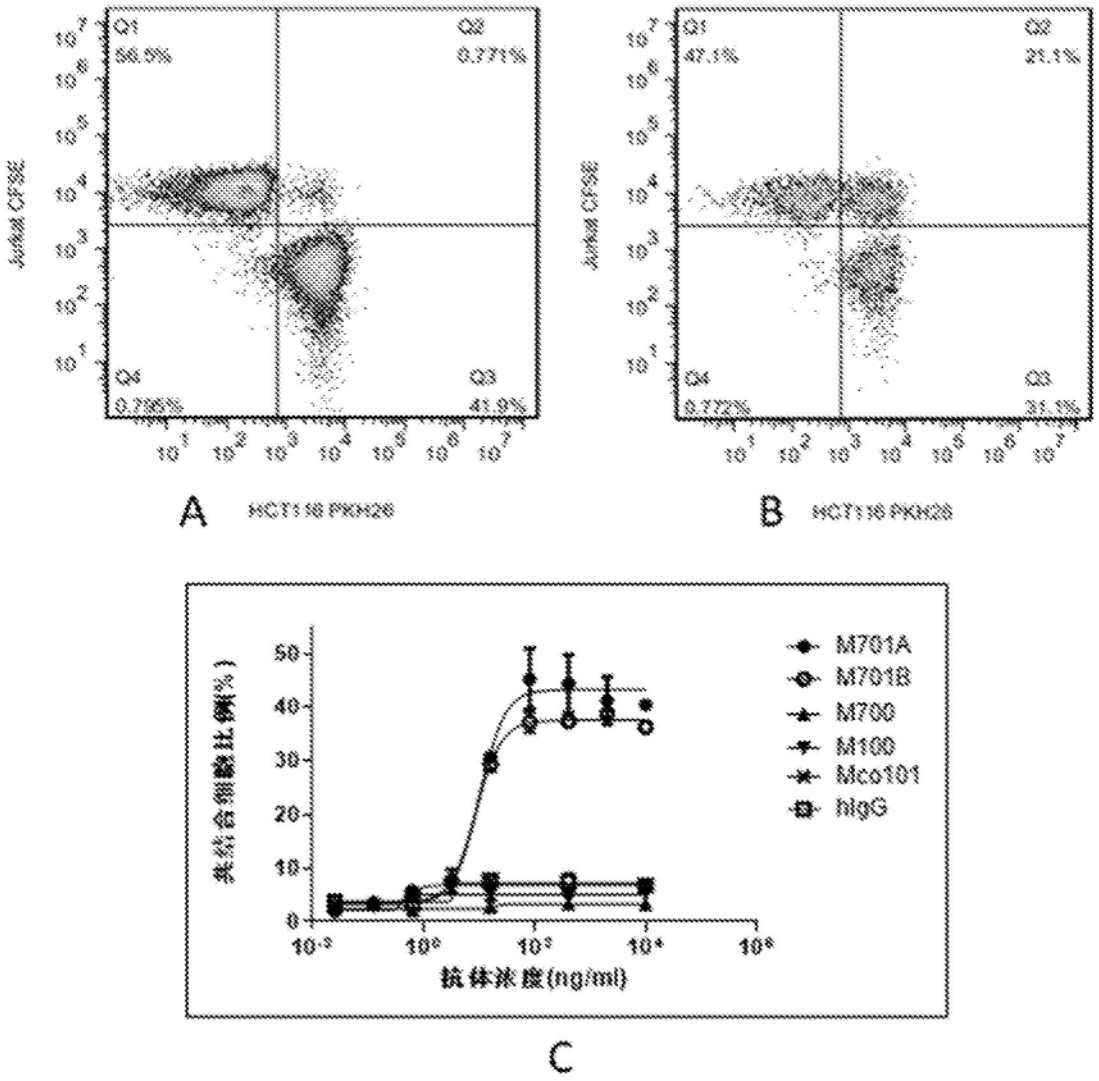

Q1
56.0%
Q2
0.771%
Q4
0.786%
Q3
41.9%
Jurkat CFSE
A
HCT116 PKH26
Q1
47.1%
Q2
21.1%
Q4
0.772%
Q3
31.1%
B
HCT116 PKH26
M701A
M701B
M700
M100
Mco101
hIgG
抗体浓度(ng/ml)
C

图2

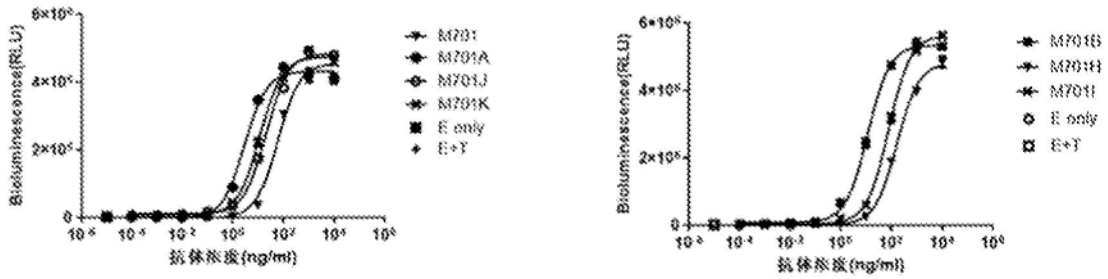
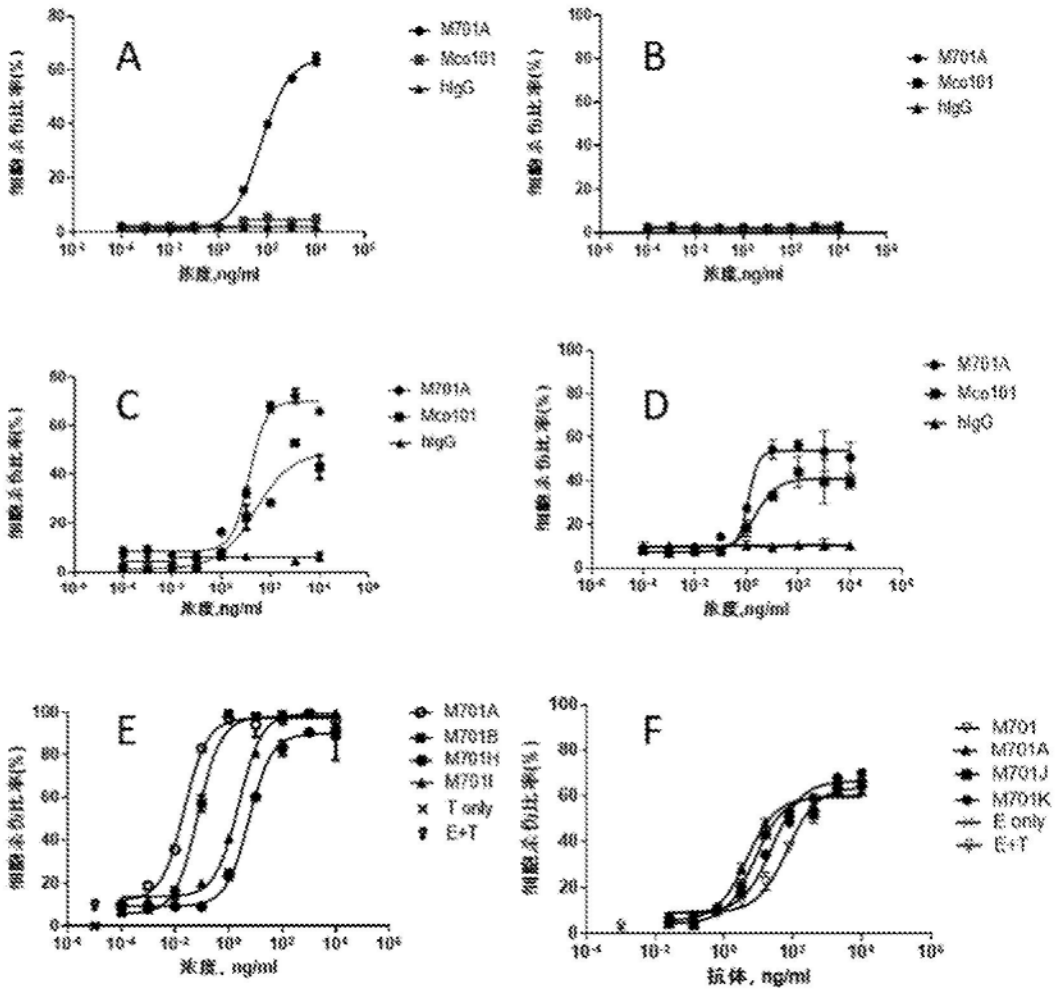

Bioluminescence(RLU)
M701
M701A
M701J
M701K
E only
E+T
抗体浓度(ng/ml)
M701G
M701H
M701I
E only
E+T
抗体浓度(ng/ml)

图3



	M701A	M701B	M701H	M701I
EC50	0.02315	0.07447	5.657	2.343

	M701	M701A	M701J	M701K
EC50	69.17	4.561	7.814	25.43

图4

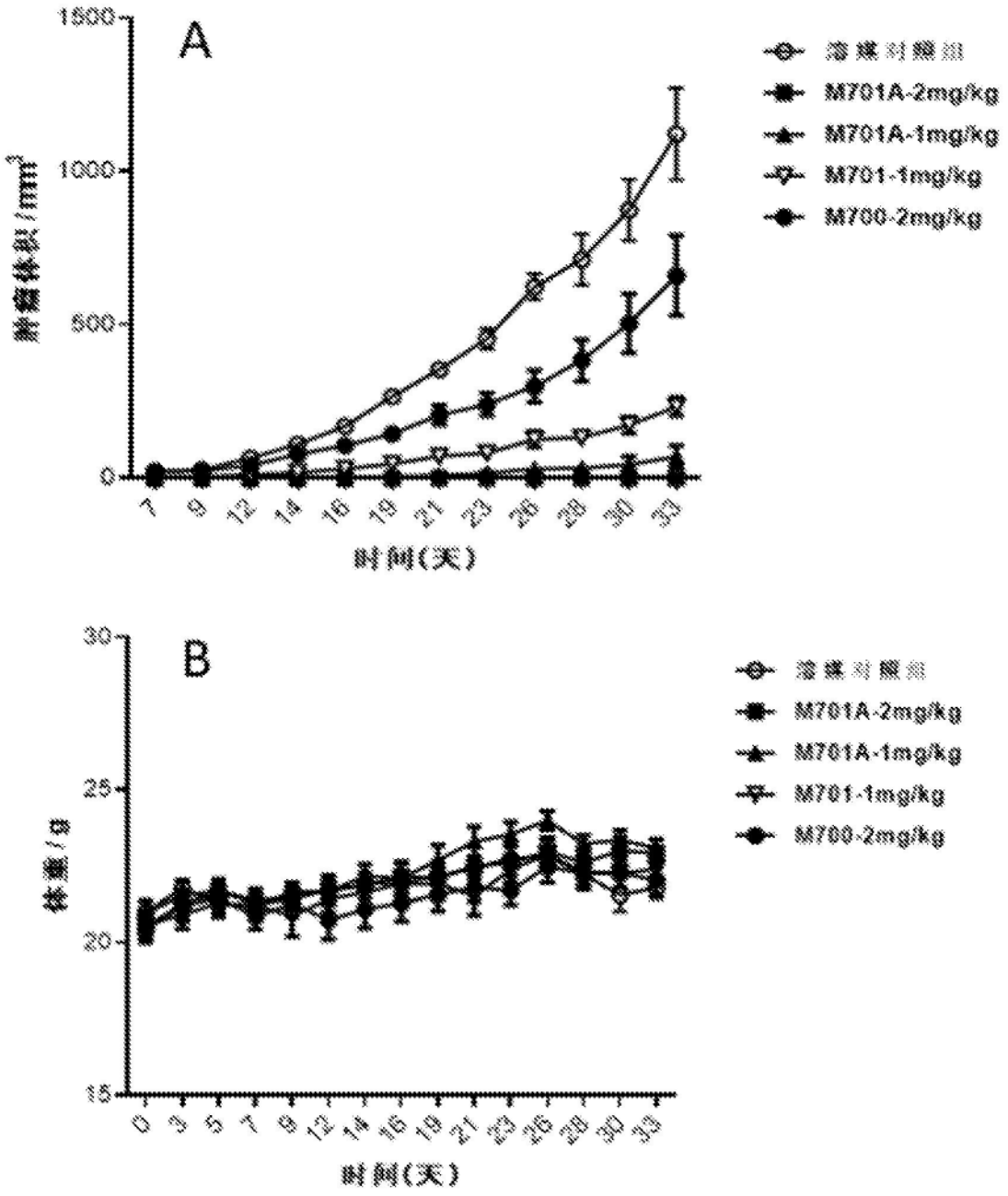

A
1500
1000
500
0
肿瘤体积/mm³
1 9 12 15 16 19 21 23 25 28 30 33
时间(天)
溶媒对照组
M701A-2mg/kg
M701A-1mg/kg
M701-1mg/kg
M700-2mg/kg
B
30
25
20
15
体重/g
0 3 5 7 9 12 14 16 19 21 23 25 28 30 33
时间(天)
溶媒对照组
M701A-2mg/kg
M701A-1mg/kg
M701-1mg/kg
M700-2mg/kg

图5

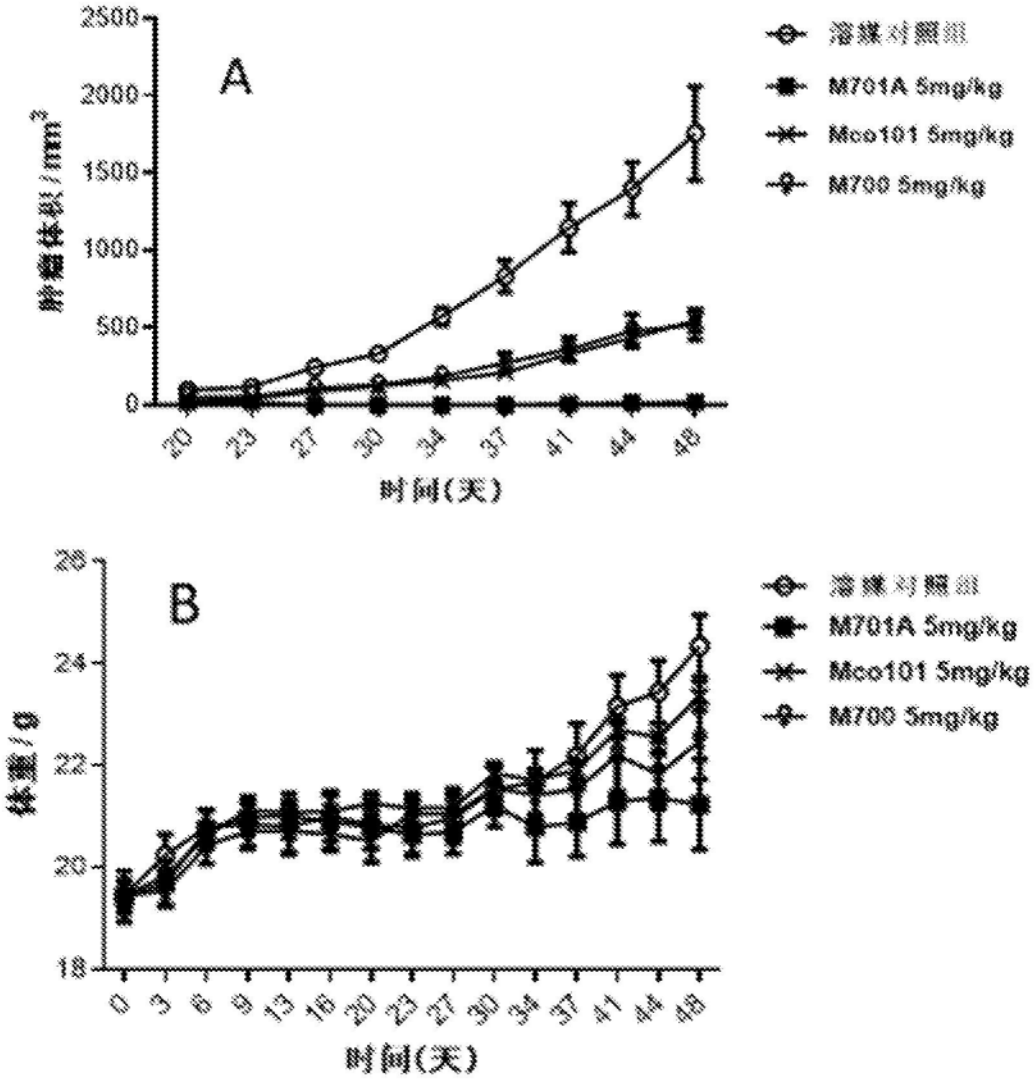

A
2500
2000
1500
1000
500
0
溶媒对照组
M701A 5mg/kg
Mco101 5mg/kg
M700 5mg/kg
时间(天)
B
28
24
22
20
18
溶媒对照组
M701A 5mg/kg
Mco101 5mg/kg
M700 5mg/kg
时间(天)

图6