



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113166266 B

(45) 授权公告日 2025.06.24

(21) 申请号 201980040586.5

(22) 申请日 2019.06.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113166266 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(30) 优先权数据
62/686,481 2018.06.18 US
62/809,496 2019.02.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.16

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/037557 2019.06.17

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/246003 EN 2019.12.26

(73) 专利权人 上海倬妥生物科技有限公司
地址 201315 上海市浦东新区秀浦路2555
号E6幢11层

(72) 发明人 钟子洋 叶帆 马修·希格
黄嘉宁

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所(普通
合伙) 31219
专利代理师 余明伟 郭婧婧

(51) Int.Cl.
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

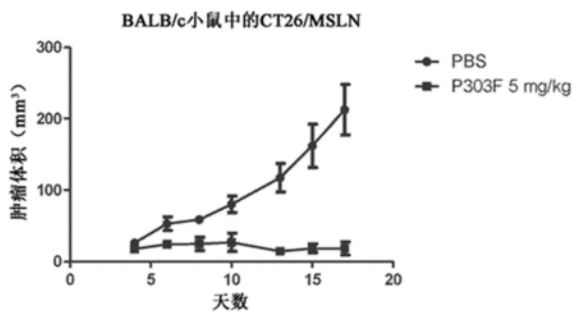
(56) 对比文件
CN 106467573 A, 2017.03.01
审查员 张范范

权利要求书1页 说明书170页
序列表(电子公布) 附图18页

(54) 发明名称
抗间皮素构建体及其用途

(57) 摘要

本申请涉及抗间皮素构建体(如抗间皮素抗体、包含所述抗间皮素构建体的细胞因子融合蛋白)、制备所述抗间皮素构建体的方法和使用所述构建体的方法(例如治疗疾病或病况的方法)。本申请还涉及一种用于治疗癌症的组合疗法,其包含施用抗间皮素药剂和细胞因子(如IL-21或IL-15)。组合疗法可进一步包含施用抗Her2药剂。



1. 一种抗间皮素 (抗MSLN) 抗体, 所述抗体包含抗MSLN重链可变区 (VH), 所述抗MSLN重链可变区包含:

1) 氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示的HC-CDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示的HC-CDR2和氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示的HC-CDR3;

或

2) 氨基酸序列如SEQ ID NO:36所示的HC-CDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO:37所示的HC-CDR2和氨基酸序列如SEQ ID NO:38所示的HC-CDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗MSLN抗体, 所述抗MSLN重链可变区 (VH) 具有SEQ ID NO:128和SEQ ID NO:291-295中的任一个所述的序列。

3. 根据权利要求1所述的抗MSLN抗体, 其中所述抗体是单结构域 (sdAb) 抗体。

4. 根据权利要求1所述的抗MSLN抗体, 其中所述抗体包含VHH结构域, 所述VHH结构域包含SEQ ID NO:128和SEQ ID NO:291-295中的任一个的氨基酸序列。

5. 根据权利要求3所述的抗MSLN抗体, 其中结合到所述间皮素的所述sdAb抗体是骆驼的、人的、部分人源化的或完全人源化的。

6. 一种编码根据权利要求1至5中任一项所述的抗MSLN抗体的多核苷酸。

7. 一种试剂盒, 其包含:

a) 根据权利要求1至5中任一项所述的抗MSLN抗体, 或根据权利要求6所述的多核苷酸, 和

b) 说明书。

8. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求1至5中任一项所述的抗MSLN抗体, 和药学上可接受的载体。

抗间皮素构建体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年6月18日提交的美国临时专利申请第62/686,481号和2019年2月22日提交的美国临时专利申请第62/809,496号的优先权。出于所有目的,这些申请的全部内容特此以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本申请涉及抗间皮素构建体(如抗间皮素抗体、包含抗间皮素构建体的细胞因子融合蛋白)和使用所述构建体的方法(例如治疗疾病的方法)。本申请还涉及用于治疗疾病(如癌症)的组合疗法。

背景技术

[0004] 间皮素是存在于腹膜、胸膜和心包体腔的间皮内衬的细胞表面上的糖蛋白。其最初从人类胰腺癌细胞系HPC-Y5纯化,被证明具有巨核细胞增强能力,因此得名巨型细胞增强因子(MPF)(Yamaguchi等人,(1994)《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》269:805-808)。间皮素cDNA可用由HPC-Y5细胞系制备的库克隆(Kojima等人,(1995)《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》270:21984-21990)。间皮素cDNA还可使用识别间皮瘤的单克隆抗体K1来克隆(Chang和Pastan(1996)《美国科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》93:136-40)。结构上,间皮素以60kDa前体多肽形式在细胞表面上表达,所述多肽以20蛋白水解方式处理成31kDa脱落组分(对应于MPF)和40kDa膜结合组分(Hassan等人,(2004)《临床癌症研究(Clin.Cancer.Res.)》10:3937-3942)。除在正常间皮细胞上表达之外,间皮素也在几类人类肿瘤中过度表达,包括所有间皮瘤、卵巢癌和胰腺癌以及一些胃癌、肺癌和子宫内膜癌。例如,间皮素在大约70%的所有卵巢癌、大约82%的乳头状浆液性腺癌、大约83%的所有胰腺癌和大约86%的所有导管胰腺癌上表达。

[0005] 间皮素与CA125(也称为MUC 16)特异性地相互作用,CA125是一种存在于肿瘤细胞表面上的粘蛋白样糖蛋白,此前已经被鉴别为卵巢癌抗原。此外,CA125与膜结合间皮素的结合介导异型细胞粘附,并且CA125与间皮素在晚期卵巢腺癌中共表达(Rump,A等人,(2004)《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》279:9190-9198)。间皮素在腹膜内衬中的表达与卵巢癌的转移形成的优选位点相关,间皮素-CA125的结合被认为促进卵巢肿瘤的腹膜转移(Gubbels,J.A等人(2006)《分子,癌症(Mol,Cancer)》5:50)。

[0006] 鉴于前述,用于调节间皮素活性的其他药剂是受关注的。

发明内容

[0007] 本申请提供包含抗体部分的经分离的抗间皮素(抗MSLN)构建体,所述抗体部分包含抗MSLN重链可变区(VH),所述抗MSLN重链可变区包含:a)重链互补决定区(HCCDR)1,所述重链互补决定区包含选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:

33、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:120; b) HC-CDR2, 其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118和SEQ ID NO:121; 和c) HC-CDR3, 其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:119和SEQ ID NO:122。

[0008] 本申请还提供包含抗体部分的经分离的抗间皮素(抗MSLN)构建体, 所述抗体部分包含抗MSLN重链可变区(VH), 所述抗MSLN重链可变区包含: 1) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HC-CDR3, 或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体; 2) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HC-CDR3, 或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体; 3) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HC-CDR3, 或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体; 4) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HC-CDR3, 或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体; 5) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HC-CDR3, 或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体; 6) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HC-CDR3, 或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体; 7) 包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HC-CDR3, 或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体; 8) 包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HC-CDR3, 或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体; 9) 包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HC-CDR3, 或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体; 10) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸

氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的HC-CDR3,或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体;29)包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HC-CDR3,或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体;30)包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列的HC-CDR3,或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体;31)包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列的HC-CDR3,或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体;32)包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列的HC-CDR3,或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体;33)包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的HC-CDR3,或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体;或34)包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列的HC-CDR3,或包含至多约5(如4、3、2、1)个氨基酸取代的其变体。

[0009] 在根据上文所描述的构建体中的任一个的一些实施例中,HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3分别包含抗MSLN-1、抗MSLN-2、抗MSLN-3、抗MSLN-4、抗MSLN-5、抗MSLN-6、抗MSLN-7、抗MSLN-8、抗MSLN-9、抗MSLN-10、抗MSLN-11、抗MSLN-12、抗MSLN-13、抗MSLN-14、抗MSLN-15、抗MSLN-16、抗MSLN-17、抗MSLN-18、抗MSLN-19、抗MSLN-20、抗MSLN-21、抗MSLN-22、抗MSLN-23、抗MSLN-24、抗MSLN-25、抗MSLN-26、抗MSLN-27、抗MSLN-28、抗MSLN-29、抗MSLN-30、抗MSLN-31、抗MSLN-32、抗MSLN-33和抗MSLN-34中的任一个的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,如表10中所示。

[0010] 本申请提供包含抗体部分的经分离的抗间皮素(抗MSLN)构建体,所述抗体部分包含抗MSLN重链可变区(VH),所述抗MSLN重链可变区包含:HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其分别包含VH链区内的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述VH链区具有SEQ ID NO:123-156和SEQ ID NO:285-301中的任一个中所述的序列。

[0011] 在根据上文所描述的构建体中的任一个的一些实施例中,抗体部分是单结构域(sdAb)部分。在一些实施例中,结合到白蛋白的sdAb部分是骆驼的、嵌合的、人的、部分人源化的或完全人源化的。

[0012] 在根据上文所描述的构建体中的任一个的一些实施例中,抗体部分包含SEQ ID NO:123-156和SEQ ID NO:285-301中的任一个的氨基酸序列,或其与SEQ ID NO:123-156和SEQ ID NO:285-301中的任一个具有至少约80%序列一致性的变体。

[0013] 在根据上文所描述的构建体中的任一个的一些实施例中,抗体部分包含VHH结构域或其变体,所述VHH结构域包含SEQ ID NO:123-156和SEQ ID NO:285-301中的任一个的氨基酸序列,所述变体在VHH结构域中包含至多约3(如3、2、1)个氨基酸取代。

[0014] 在根据上文所描述的构建体中的任一个的一些实施例中,抗体部分具有降低的岩藻糖基化。

[0015] 在根据上文所描述的构建体中的任一个的一些实施例中,构建体是进一步包含半衰期延长结构域的融合蛋白。在一些实施例中,半衰期延长结构域包含Fc结构域或白蛋白

结合结构域。

[0016] 在根据上文所描述的构建体中的任一个的一些实施例中,构建体是进一步包含细胞因子的融合蛋白。在一些实施例中,细胞因子是IL-21或IL-15。在一些实施例中,半衰期延长结构域包含Fc结构域或白蛋白结合结构域。在一些实施例中,构建体包含抗MSLN抗体部分与细胞因子之间的接头。在一些实施例中,所述接头包含SEQ ID NO:66-74、SEQ ID NO:267-282和SEQ ID NO:307-324中的任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,接头是不可裂解的。在一些实施例中,接头是可裂解的。

[0017] 在根据上文所描述的构建体中的任一个的一些实施例中,构建体是融合蛋白,其进一步包含a) 半衰期延长结构域;和b) 细胞因子。在一些实施例中,细胞因子是IL-21或IL-15。在一些实施例中,构建体包含抗MSLN抗体部分与细胞因子之间的接头。在一些实施例中,接头包含SEQ ID NO:66-74、267-282和307-324中的任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,接头是不可裂解的。在一些实施例中,接头是可裂解的。

[0018] 在一些实施例中,半衰期延长结构域融合到抗MSLN抗体部分的N端。在一些实施例中,半衰期延长结构域融合到抗MSLN抗体部分的C端。在一些实施例中,细胞因子融合到抗MSLN抗体部分的N端或半衰期延长结构域。在一些实施例中,细胞因子融合到抗MSLN抗体部分的C端或半衰期延长结构域。

[0019] 本申请还提供编码上文所描述的抗MSLN构建体中的任一个的多核苷酸。

[0020] 本申请还提供包含本文所描述的多核苷酸中的任一个的核酸构建体,其任选地进一步包含与所述多核苷酸可操作地连接的启动子。

[0021] 本申请还提供包含上文所描述的核酸构建体中的任一个的载体。

[0022] 本申请还提供包含上文所描述的多核苷酸、核酸构建体或载体中的任一个的宿主细胞。

[0023] 本申请还提供培养基,其包含本文所描述的抗MSLN构建体或宿主细胞中的任一个。

[0024] 本申请还提供试剂盒,其包含:a) 上文所描述的抗MSLN构建体、多核苷酸、核酸构建体、载体、宿主细胞或培养基中的任一个;和b) 说明书。

[0025] 本申请还提供药物组合物,其包含上文所描述的抗MSLN构建体中的任一个和药学上可接受的载体。

[0026] 本申请还提供治疗个体的疾病或病况的方法,其包含向个体施用上文所描述的抗MSLN构建体中的任一个。

[0027] 本申请还提供治疗个体的疾病或病况的方法,其包含施用抗MSLN构建体,所述抗MSLN构建体包含特异性结合到间皮素的抗MSLN抗体部分,其中所述抗MSLN抗体部分具有降低的岩藻糖基化。

[0028] 在根据上文所描述的方法中的任一种的一些实施例中,疾病或病况是癌症。在一些实施例中,癌症是间皮素阳性癌。在一些实施例中,癌症是实体癌。在一些实施例中,癌症选自自由以下组成的组:胃癌、肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、宫颈癌、间皮瘤和乳腺癌。在一些实施例中,癌症是胃癌或肺癌。

[0029] 在根据上文所描述的方法中的任一种的一些实施例中,所述方法进一步包含向个体施用第二药剂。在一些实施例中,第二药剂包含细胞因子。在一些实施例中,细胞因子是

IL-21或IL-15。在一些实施例中,IL-21或IL-15呈包含半衰期延长结构域的融合蛋白形式。在一些实施例中,IL-21包含在SEQ ID NO:1的C端处缺少1-11个氨基酸的IL-21变体。

[0030] 本申请还提供治疗个体中的间皮素阳性癌的方法,其包含向个体施用a) 抗间皮素药剂;b) 抗Her2药剂;和c) IL-21。在一些实施例中,IL-21或IL-15呈包含半衰期延长结构域的融合蛋白形式。在一些实施例中,IL-21包含在SEQ ID NO:1的C端处缺少1-11个氨基酸的IL-21变体。在一些实施例中,抗Her2药剂是赫赛汀(Herceptin)。在一些实施例中,抗间皮素药剂包含抗间皮素抗体部分,所述抗间皮素抗体部分包含抗MSLN重链可变区(VH),所述抗MSLN重链可变区包含:HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其分别包含VH链区内的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述VH链区具有SEQ ID NO:123-156和SEQ ID NO:285-301中的任一个中所述的序列。

[0031] 在根据上文所描述的方法中的任一种的一些实施例中,所述个体是人类。

附图说明

[0032] 图1描绘本文所提供的示例性IL-21融合蛋白。

[0033] 图2描绘示例性IL-21融合蛋白表达载体的装配,其中白蛋白结合分子是抗HSA抗体。

[0034] 图3描绘示例性IL-21融合蛋白表达载体的装配,其中白蛋白结合分子是结合到HSA的ABD。

[0035] 图4A-4B描绘抗MSLN抗体与人类或猴类间皮素(MSLN)的结合。

[0036] 图5A-5D描绘抗MSLN抗体-IgG1 Fc融合蛋白与癌细胞系NCI-H226、OVCAR3、NCI-N87和AsPC-1的细胞表面的剂量依赖性结合。

[0037] 图6A描绘在单独治疗NK细胞或与抗间皮素抗体MORAb-009、R2G12、R3C7或R3D5组合治疗NK细胞之后的剩余肿瘤细胞数目。图6B(NCI-H226)、图6C(OVCAR3)、图6D(NCI-N87)和图6E(AsPC-1)描绘抗MSLN抗体R2G12和R3C7针对四种人类癌细胞系的NK细胞介导的抗体依赖性的细胞毒性剂量反应曲线。

[0038] 图7描绘在单独治疗NK细胞或与抗间皮素抗体P303、P303F或MORAb-009组合治疗NK细胞之后的剩余肿瘤细胞数目。

[0039] 图8A-8C描绘在与抗间皮素抗体P303、P303F、P197和P197F组合治疗NK细胞48小时之后,N87细胞(图8A)、H226细胞(图8B)和CT26/MSLN细胞(图8C)的剩余细胞数目。

[0040] 图9A描绘在用抗间皮素抗体MORAb、P303F、P303、P197F或P197治疗之后,具有N87肿瘤的SCID小鼠的动物模型中肿瘤体积的变化。图9B描绘在用抗间皮素抗体P197治疗之后,患有N87肿瘤的NSG小鼠的动物模型中的肿瘤体积的变化。图9C描绘在用抗间皮素抗体P303F治疗之后,患有CT26/MSLN肿瘤的BALB/c小鼠的动物模型中的肿瘤体积变化。

[0041] 图10A描绘抗HSA抗体AWT-367(即,P367)和其人源化抗AWT-P494(即,P494)与人类、猴类或小鼠白蛋白的结合。图10B描绘AWT-P367或AWT-494与人类、猴类或小鼠白蛋白的结合的 K_D 。

[0042] 图11描绘在单独治疗NK细胞或与如图中所示的研究药物组合治疗NK细胞之后的N87细胞的剩余细胞数目。

[0043] 图12描绘单独治疗NK细胞或与a) 单独的赫赛汀、b) 单独的P303F、c) 赫赛汀和

P303F、或d) 赫赛汀、P303F和IL-21-抗HSA融合蛋白P394组合治疗NK细胞之后的N87细胞的剩余细胞数目。

[0044] 图13描绘在与a) P303F、b) P303F和重组人类IL-21(即, rh Σ L-21)、c) P303F和P480或d) P303F和重组人类IL-15(即, rh Σ L-15)组合治疗NK细胞之后的N87细胞的剩余细胞数目。

[0045] 图14描绘在与a) P303F、b) P303F和重组人类IL-21(即, rh Σ L-21)、c) P431/P435或d) P545/P435组合治疗NK细胞之后的N87细胞的剩余细胞数目。

[0046] 图15描绘在与a) P480、b) P597或c) rIL-15组合治疗NK细胞之后的N87细胞的剩余细胞数目(上图)和三种药物的IC₅₀(下图)。

[0047] 图16描绘在与a) 抗间皮素抗体P129(即R2G12)和P126(即人类IL-21-R2G12-IgG1融合)、b) P129和IL-21、c) P129和P107(人类IL-21-IgG1融合)、d) P129和P325(人类IL-21-R2D2融合)、或e) P129和P286/288(人类IL-21-R3C7-IgG1-R2G12)组合治疗NK细胞之后的H226细胞的剩余细胞数目。

[0048] 图17描绘在与a) P197和P390;或b) P197和P394组合治疗NK细胞之后的N87细胞的剩余细胞数目。

[0049] 图18描绘在用a) 25 μ g的P394、b) 100 μ g的P303F、c) 100 μ g的P303F和25 μ g的P394、或d) 100 μ g的P303F和5 μ g的P394治疗之后,患有N87肿瘤的NSG小鼠的动物模型中的肿瘤体积变化。

[0050] 图19描绘在用100 μ g的P303F单独治疗或与a) 25 μ g的P390、b) 5 μ g的P390或c) 2.5 μ g的rmIL-21组合治疗之后,患有N87肿瘤的SCID小鼠的动物模型中的肿瘤体积变化。

具体实施方式

[0051] 本发明提供包含IL-21或其变体的新融合蛋白。本文提供的融合蛋白包含IL-21或其变体、白蛋白结合分子和结合到抗原(例如癌症抗原)的结合分子,其中IL-21或其变体经由第一接头连接到白蛋白结合分子,并且其中白蛋白结合分子经由第二接头连接到结合分子。图1说明本文所提供的示例性融合蛋白。

[0052] 本文所公开的融合蛋白提供许多优点。例如,在一些实施例中,结合到本发明融合蛋白中的癌症抗原(例如实体肿瘤癌症抗原,如MSLN)的结合分子能够将IL-21局部递送到癌症附近,产生较低的脱靶毒性并且增加功效。

[0053] 本发明的融合蛋白由于其三级结构和整体构型设计而提供了某些优点。例如,在一些实施例中,通过将具有MMP敏感接头的IL-21放置在靶向癌症抗原的结合分子和ABD(或抗HSA)之后,IL-21与IL-21R的相互作用被暂时阻断,因为其相互作用需要其N端(在三级结构中接近C端)。当其结合到癌症抗原时,IL-21从融合蛋白释放,已知癌细胞分泌各种MMP,这将使IL-21与ABD或抗白蛋白抗体之间的接头裂解。MMP敏感接头确保通常具有较高MMP活性的癌症对活性IL-21具有较高暴露。因此,可以避免IL-21的不必要的毒性和副作用。此外,在此类实施例中,通过阻止外周免疫细胞上IL-21与IL-21R α 之间的相互作用,可以提高IL-21融合蛋白的癌症递送效率。

[0054] 在某些实施例中,与不具有白蛋白结合分子的融合蛋白相比,本文所提供的融合蛋白中白蛋白结合分子的存在可增加循环半衰期,导致在更长时间段内癌症的较高药物暴

露。

[0055] 在某些实施例中,本文所提供的融合蛋白中使用具有相对较小分子量的sdAb,这可帮助增加融合蛋白的癌症穿透力,使其更适合于治疗某些癌症,例如实体肿瘤癌症。

[0056] 本申请提供包含抗MSLN抗体部分的抗间皮素构建体,所述抗MSLN抗体部分包含特异性结合到抗间皮素的单结构域抗体。在一些实施例中,抗间皮素构建体(如单结构域抗MSLN抗体)呈现有利效果(如杀死肿瘤细胞,如治疗个体中的肿瘤)。在一些实施例中,抗MSLN构建体是单结构域抗MSLN抗体。在一些实施例中,抗MSLN构建体是包含抗MSLN抗体部分和第二结构域的融合蛋白。在一些实施例中,第二结构域是半衰期延长结构域。在一些实施例中,第二结构域是细胞因子。在一些实施例中,抗MSLN构建体包含融合蛋白,所述融合蛋白包含a)如本文所描述的抗MSLN抗体部分、b)第二结构域(如半衰期延长结构域),和c)第三结构域(如细胞因子)。

[0057] 本申请进一步提供治疗疾病或病况(如癌症)的方法,所述方法通过向个体施用如本文所描述的任一种抗间皮素构建体构建体来进行。在一些实施例中,所述方法进一步包含施用第二药剂,如细胞因子。

[0058] 本申请进一步提供治疗疾病(如癌症,如间皮素阳性癌,如胃癌)的方法,所述方法包含施用a)抗间皮素构建体(如本文所描述的抗MSLN构建体中的任一种)、b)细胞因子(如IL-21);c)抗Her2药剂。在一些实施例中,如以上方法中所描述的组合疗法展现协同作用。

[0059] 此外,本发明提供靶向癌症抗原(例如MSLN)的新颖抗体,其作为本文所提供的融合蛋白的一部分时,可有效地将IL-21递送至癌症。

[0060] 在某些实施例中,通过使多个抗体靶向本文所提供的IL-21融合蛋白中的一种或多种癌症抗原来提供优点。举例来说,在一些实施例中,使两个sdAb各自靶向癌症抗原(例如MSLN)的不同结构域增加癌细胞结合的亲合力。

[0061] 上文所提及的和其它特性使本文所提供的融合蛋白成为癌症治疗的有利候选物。

[0062] 定义

[0063] 本文所描述或参考的技术和过程包括所属领域技术人员使用常规方法通常容易理解和/或通常采用的那些技术和过程,如,例如,广泛使用的方法,其描述于Sambrook等人,《分子克隆:实验手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》(第3版.2001);《现代分子生物学方案(Current Protocols in Molecular Biology)》(Ausubel等人编.,2003);《治疗性单克隆抗体:从实验台到临床(Therapeutic Monoclonal Antibodies:From Bench to Clinic)》(An编.2009);《单克隆抗体:方法和方案(Monoclonal Antibodies:Methods and Protocols)》(Albitar编.2010);和《抗体工程(Antibody Engineering)》第1卷和第2卷(Kontermann和Dübel编.,第2版.2010)。

[0064] 除非本文另外定义,否则在本说明书中所使用的技术和科学术语具有所属领域普通技术人员通常理解的含义。出于解释本说明书的目的,以下术语的描述将适用并且每当适当时,以单数形式使用的术语也将包括复数形式,并且反之亦然。在阐述的术语的任何描述与以引用的方式并入本文中的任何文献冲突的情况下,以下文阐述的术语的描述为准。

[0065] 术语“结合分子”是指一种蛋白质,其包含结合到靶标或抗原的部分(例如一个或多个结合区,如CDR)和任选地允许结合部分采用促进结合蛋白与多肽、片段或表位结合的构象的架构或框架部分(例如一个或多个架构或框架区)。在本发明的情形下,结合分子被

称为特异性地结合或选择性地结合到抗原,例如当解离常数(K_D) $\leq 10^{-6}$ M时。在一些实施例中,结合分子可以约 10^{-6} M到约 10^{-12} M的 K_D 特异性结合到抗原。在某些实施例中,当 $K_D \leq 10^{-7}$ M或 $K_D \leq 10^{-8}$ M时,结合分子可以高亲和力特异性结合到抗原。在一个实施例中,结合分子可以 1×10^{-8} M到 10×10^{-8} M的 K_D 特异性结合到经纯化的人类抗原,如通过OCTET[®]所测量。在一个实施例中,结合分子可以 1×10^{-9} M到 10×10^{-9} M的 K_D 特异性结合到经纯化的人类抗原,如通过OCTET[®]所测量。在又一实施例中,结合分子以 0.1×10^{-9} M到 10×10^{-9} M的 K_D 特异性结合到在细胞上表达的人类抗原。在某些实施例中,结合分子以约 0.1×10^{-9} M、约 0.5×10^{-9} M、约 1×10^{-9} M、约 5×10^{-9} M、约 10×10^{-9} M或其任何范围或间隔特异性结合到在细胞上表达的人类抗原。术语“结合分子”包括来源于抗体的抗体和分子。如本文所使用,术语“结合分子”包括与亲本完整抗体相比,对抗原具有相对较低亲和力的抗体片段(例如,单结构域抗体)。

[0066] 如下所述,术语“抗体”、“免疫球蛋白”或“Ig”在本文中可互换地使用,并且以最广泛意义使用,并且确切地说,涵盖例如单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂、中和抗体、全长或完整单克隆抗体)、具有多表位或单表位特异性的抗体组合物、多克隆或单价抗体、多价抗体、由至少两个完整抗体、单链抗体和其片段形成的多特异性抗体(例如,双特异性抗体,只要其展现所需生物活性)。抗体可以是人的、人源化的、嵌合的和/或亲和力成熟的,以及来自其它物种的抗体,例如小鼠的和兔的等。术语“抗体”意图包括能够结合到特定分子抗原并且由两对相同的多肽链组成的多肽的免疫球蛋白类别内的B细胞的多肽产物,其中每一对多肽链具有一个重链(约50-70kDa)和一个轻链(约25kDa),每个链的每个氨基端部分包括约100到约130或更多个氨基酸的可变区,并且每个链的每个羧基端部分包括恒定区。参见例如《抗体工程(Antibody Engineering)》(Borrebaeck编.,第2版,1995);和Kuby,《免疫学(Immunology)》(第3版,1997)。在具体实施例中,特定分子抗原可由本文所提供的抗体(包括多肽或表位)结合。抗体还包括(但不限于)以上各者中的任一个的合成抗体、重组产生的抗体、骆驼源化抗体或其人源化变体、内抗体、抗独特型(抗Id)抗体和功能片段(例如抗原结合片段),其是指保留衍生片段的抗体的一些或全部结合活性的抗体重链或轻链多肽的一部分。功能片段(例如,抗原结合片段)的非限制性实例包括单链Fv(scFv)(例如,包括单特异性、双特异性等)、Fab片段、F(ab')片段、F(ab)₂片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、Fd片段、Fv片段、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体和微型抗体。确切地说,本文所提供的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,例如抗原结合结构域或含有结合到抗原的抗原结合位点(例如抗体的一个或多个CDR)的分子。此类抗体片段可以见于例如Harlow和Lane,《抗体:实验手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》(1989);《分子生物学和生物技术:全面桌面参考(Mol.Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference)》(Myers编.,1995);Huston等人.,1993,《细胞生物物理学(Cell Biophysics)》22:189-224;Plückthun和Skerra,1989,《酶学方法(Meth.Enzymol.)》178:497-515;和Day,《高级免疫化学(Advanced Immunochemistry)》(第2版,1990)。本文所提供的抗体可以是免疫球蛋白分子的任何类别(例如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或任何子类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。抗体可以是激动性抗体或拮抗性抗体。

[0067] “抗原”是抗体可以选择性结合的结构。靶抗原可以是多肽、碳水化合物、核酸、脂质、半抗原或其它天然存在或合成化合物。在一些实施例中,靶抗原是多肽。在某些实施例

中,抗原与细胞相关,例如存在于细胞上或细胞中,例如癌细胞(例如实体肿瘤癌细胞)。

[0068] “完整”抗体是包含抗原结合位点以及CL和至少重链恒定区CH1、CH2和CH3的抗体。恒定区可包括人类恒定区或其氨基酸序列变体。在某些实施例中,完整抗体具有一个或多个效应功能。

[0069] 术语“抗原结合片段”、“抗原结合结构域”、“抗原结合区”和类似术语是指结合分子的部分,其包含与抗原相互作用并且赋予结合剂其对抗原的特异性和亲和力(例如CDR)的氨基酸残基。如本文所使用的“抗原结合片段”包括“抗体片段”,其包含完整抗体的一部分,如完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的实例包括(但不限于)Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双功能抗体和双-双功能抗体(参见例如Holliger等人,1993,《美国科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.)》90:6444-48;Lu等人,2005,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》280:19665-72;Hudson等人,2003,《自然医学(Nat.Med.)》9:129-34;WO 93/11161;和美国专利第5,837,242号和第6,492,123号);单链抗体分子(参见例如美国专利第4,946,778号;第5,260,203号;第5,482,858号;和第5,476,786号);双重可变结构域抗体(参见例如美国专利第7,612,181号);单一可变结构域抗体(sdAb)(参见例如Woolven等人,1999,《免疫遗传学(Immunogenetics)》50:98-101;和Streltsov等人,2004,《美国科学院院报(Proc Natl Acad Sci USA)》101:12444-49);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0070] 如本文所使用的“单结构域抗体”或“sdAb”是指其互补决定区是单结构域多肽的一部分的抗体。实例包括(但不限于)重链抗体、天然不含轻链的抗体、来源于常规4链抗体的单结构域抗体、工程化抗体和除来源于抗体之外的单结构域架构。单结构域抗体可以是所属领域中的任何单结构域抗体,或未来的任何单结构域抗体。单结构域抗体可来源于任何物种,包括(但不限于)小鼠、人、骆驼、大羊驼、山羊、兔和牛。根据本发明的一个方面,如本文所使用的单结构域抗体是被称为不含轻链的重链抗体的单结构域抗体。此类单结构域抗体例如公开于WO 9404678中。为了清楚起见,在某些情况下,来源于天然不含轻链的重链抗体的此可变结构域在本文中被称作VHH或纳米抗体,以区分其与四种链免疫球蛋白的常规VH。此类VHH分子可以来源于骆驼科物种中(例如在骆驼、单峰驼、羊驼和原驼中)产生的抗体。除骆驼科动物以外的其它物种可产生天然不含轻链的重链抗体;此类VHH在本发明的范围内。在一些实施例中,本文所提供的单结构域抗体具有FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的结构。

[0071] 术语“结合(binds/binding)”是指分子之间的相互作用,包括例如以形成复合物。相互作用可以是例如非共价相互作用,包括氢键、离子键、疏水相互作用和/或范德华力相互作用(van der Waals interaction)。复合物还可以包括两个或两个以上的分子通过共价键或非共价键、相互作用或力结合在一起。抗体上的单个抗原结合位点与靶分子(例如抗原)的单一表位之间的总非共价相互作用强度是抗体或功能片段对所述表位的亲和力。结合分子(例如抗体)与单价抗原的解离速率(k_{off})与缔合速率(k_{on})的比率(k_{off}/k_{on})是解离常数 K_D ,其与亲和力成反比。 K_D 值越低,抗体的亲和力越高。 K_D 的值对于抗体和抗原的不同复合物是不同的,取决于 k_{on} 和 k_{off} 两者。本文所提供的抗体的解离常数 K_D 可以使用本文所提供的任何方法或所属领域的技术人员所熟知的任何其它方法确定。一个结合位点的亲和力并不总是反映抗体和抗原之间相互作用的真实强度。当含有多个重复抗原决定簇(如多价抗原)的复杂抗原与含有多个结合位点的抗体接触时,抗体与抗原在一个位点的相互作用将

增加在第二位点发生反应的概率。多价抗体与抗原之间的此类多重相互作用的强度称为亲合力。

[0072] 与本文所描述的结合分子有关的术语如“结合到”、“特异性结合到”和类似术语在本文中也可互换地使用,是指特异性结合到抗原(如多肽)的抗原结合结构域的结合分子。结合到或特异性结合到抗原的结合分子或抗原结合结构域可与相关抗原交叉反应。在某些实施例中,结合到或特异性结合到抗原的结合分子或抗原结合结构域不与其它抗原交叉反应。结合到或特异性结合到抗原的结合分子或抗原结合结构域可以例如通过免疫分析、Octet®、Biacore®或所属领域的技术人员已知的其它技术来鉴别。在一些实施例中,当结合分子或抗原结合结构域以高于任何交叉反应性抗原的亲合力结合到抗原时(如使用实验技术(如放射免疫分析(RIA)和酶联免疫吸附分析(ELISA))所确定的),结合分子或抗原结合结构域结合到或特异性结合到抗原。通常,特异性或选择性反应将为至少两倍背景信号或噪声且可能超过10倍背景。参见例如《基础免疫学(Fundamental Immunology)》332-36(Paul编.,第2版,1989)关于结合特异性的论述。在某些实施例中,例如通过荧光激活细胞分选术(FACS)分析或RIA所确定,结合分子或抗原结合结构域与“非靶”蛋白质的结合程度小于结合分子或抗原结合结构域与其特定靶抗原的结合程度的约10%。关于如“特异性结合”、“特异性结合到”或“对...具有特异性”等术语意指可测量地不同于非特异性相互作用的结合。特异性结合可通过将分子的结合与对照分子的结合相比较来测量,所述对照分子通常是不具有结合活性的类似结构的分子。例如,可以通过与类似于靶(例如过量的未标记靶)的对照分子竞争来确定特异性结合。在此情况下,如果标记的靶与探针的结合被过量的未标记靶竞争性抑制,则表示特异性结合。结合到抗原的结合分子或抗原结合结构域包括能够以足够亲和力结合抗原使得结合分子可用作例如靶向抗原的诊断fd片段药剂的结合分子或抗原结合结构域。在某些实施例中,结合到抗原的结合分子或抗原结合结构域的解离常数(K_D)小于或等于1000nM、800nM、500nM、250nM、100nM、50nM、10nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM或0.1nM。在某些实施例中,结合分子或抗原结合结构域结合到在来自不同物种(例如在人类与猕猴物种之间)的抗原中保守的抗原表位。

[0073] “结合亲和力”通常是指分子的单个结合位点(例如结合蛋白,如抗体)与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如本文所使用的“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体与抗原)之间的1:1相互作用的内在结合亲和力。结合分子X对其结合配偶体Y的亲和力一般可以用解离常数(K_D)表示。亲和力可以通过所属领域中已知的常见方法,包括本文所描述的那些方法来测量。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且倾向于容易解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持更长时间的结合。测量结合亲和力的多种方法是所属领域中已知的,其中的任一种可以出于本发明的目的而使用。具体说明性实施例包括以下各者。在一个实施例中,可通过所属领域中已知的分析,例如通过结合分析测量“ K_D ”或“ K_D 值”。 K_D 可在RIA中测量,例如用所关注的抗体和其抗原的Fab形式进行(Chen等人,1999,《分子生物学(J.Mol Biol)》293:865-81)。 K_D 或 K_D 值还可通过使用生物层干涉测量法(BLI)或表面等离子共振(SPR)分析,通过使用例如Octet®Red96系统的Octet®,或通过使用例如Biacore®TM-2000或Biacore®TM-3000的Biacore®来测量。“结合速率”或“缔合的速率”或“缔合速率”或“ k_{on} ”也可使用与上文所描

述的相同的生物层干涉测量法 (BLI) 或表面等离子共振 (SPR) 技术, 使用例如 Octet®Red96、Biacore®TM-2000 或 Biacore®TM-3000 系统来确定。

[0074] 在某些实施例中, 结合分子或抗原结合结构域可包含“嵌合”序列, 其中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体类别或子类别的抗体中的对应序列相同或同源, 而链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体类别或子类别的抗体以及此类抗体的片段中的对应序列相同或同源, 只要其展现所需生物活性。(参见美国专利第4,816,567号; 和Morrison等人, 1984,《美国科学院院报 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.)》81:6851-55)。

[0075] 在某些实施例中, 结合分子或抗原结合结构域可包含“人源化”形式的非人类(例如鼠类)抗体的部分, 其为包括人类免疫球蛋白(例如受体抗体)的嵌合抗体, 其中天然CDR残基被来自非人类物种(例如供体抗体), 如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物的相应CDR的残基替换, 所述残基具有所需特异性、亲和力和能力。在一些情况下, 人类免疫球蛋白的一个或多个FR区残基被相应非人类残基替换。此外, 人源化抗体可以包含在受体抗体或在供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步优化抗体性能。人源化抗体重链或轻链可以包含基本上所有的至少一个或多个可变区, 其中所有或基本上所有的CDR对应于非人类免疫球蛋白的CDR, 并且所有或基本上所有的FR是人类免疫球蛋白序列的FR。在某些实施例中, 人源化抗体将包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分, 通常是人类免疫球蛋白的至少一部分。对于进一步细节, 参见Jones等人, 1986,《自然 (Nature)》321:522-25; Riechmann等人, 1988,《自然 (Nature)》332:323-29; Presta, 1992,《结构生物学新见 (Curr.Op.Struct.Biol.)》2:593-96; Carter等人, 1992,《美国科学院院报 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》89:4285-89; 美国专利第6,800,738; 6,719,971; 6,639,055; 6,407,213; 和6,054,297。

[0076] 在某些实施例中, 结合分子或抗原结合结构域可以包含“完全人类抗体”或“人类抗体”的部分, 其中所述术语在本文中可互换地使用并且是指包含人类可变区和例如人类恒定区的抗体。在具体实施例中, 所述术语是指包含人类来源的可变区和恒定区的抗体。在某些实施例中, “完全人类”抗体还可以涵盖结合多肽并且由核酸序列编码的抗体, 所述核酸序列是人类种系免疫球蛋白核酸序列天然存在的体细胞变体。术语“完全人类抗体”包括具有可变和恒定区的抗体, 所述可变和恒定区对应于如Kabat等人(参见Rabat等人(1991)《免疫学相关的蛋白质序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest)》, 第五版, 美国卫生与人力资源服务部, NIH公开第91-3242号)所描述的人类种系免疫球蛋白序列。“人类抗体”是具有氨基酸序列的抗体, 其氨基酸序列对应于由人类产生的抗体和/或由任一制备人类抗体的技术生产的抗体的氨基酸序列。人类抗体之此定义尤其排除包含非人类抗原结合残基的人源化抗体。人类抗体可以使用所属领域中已知的各种技术产生, 包括噬菌体展示文库 (Hoogenboom和Winter, 1991,《分子生物学杂志 (J.Mol.Biol)》227:381; Marks等人, 1991,《分子生物学杂志 (J.Mol.Biol)》222:581) 和酵母展示文库 (Chao等人, 2006,《自然实验手册 (Nature Protocols)》1:755-68)。还可是用于制备人类单克隆抗体的方法, 如描述于Cole等人,《单克隆抗体和癌症疗法 (Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)》77(1985); Boerner等人, 1991,《免疫学杂志 (J.Immunol.)》147(1):86-95; 和van Dijk和van de Winkel, 2001,《药理学时评 (Curr.Opin.Pharmacol.)》5:368-74。人类抗体

可通过将抗原注入转基因动物(如小鼠)来制备,该转基因动物已被修饰以产生此类抗体以应对抗原挑战,但其内源性基因座已被禁用(参见例如Jakobovits,1995,《现代生物技术观点(Curr.Opin.Biotechnol.)》6(5):561-66;Brüggemann和Taussing,1997,《现代生物技术观点(Curr.Opin.Biotechnol.)》8(4):455-58;和美国专利关于XENOMOUSE™技术的第6,075,181号和第6,150,584号)。还参见例如Li等人,2006,《美国科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》103:3557-62,关于经由人类B细胞杂交瘤技术产生的人类抗体。

[0077] 在某些具体实施例中,结合分子或抗原结合结构域可以包含“重组人类抗体”的部分,其中所述短语包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的人类抗体,如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体、从重组组合人类抗体库分离的抗体、从人类免疫球蛋白基因的转基因的和/或转染色体的动物(例如,小鼠或母牛)分离的抗体(参见例如Taylor,L.D.等人(1992)《核酸研究(Nucl.Acids Res.)》20:6287-6295)或通过涉及将人类免疫球蛋白基因序列剪接到其它DNA序列的任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人类抗体可以具有来源于人类种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区(参见Kabat,E.A.等人(1991)《免疫学相关的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,第五版,美国卫生与人力资源服务部,NIH公开第91-3242号)。然而,在某些实施例中,对此类重组人类抗体进行体外诱变(或,当使用人类Ig序列的转基因动物时,进行体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是衍生自人类生殖系VH和VL序列并与之相关的序列,其可能并非天然存在于体内的人类抗体种系库中。

[0078] 在某些实施例中,结合分子或抗原结合结构域可以包含“单克隆抗体”的一部分,其中如本文所使用的术语是指从基本上均质的抗体群体中获得的抗体,例如,包含所述群体的个别抗体是相同的,除了可能少量存在的可能天然存在的突变以外,并且每个单克隆抗体将通常识别抗原上的单一表位。在具体实施例中,如本文所使用的“单克隆抗体”是由单一杂交瘤或其它细胞产生的抗体。术语“单克隆”不限于用于制备抗体的任何特定方法。例如,适用于本发明的单克隆抗体可通过Kohler等人,1975,《自然(Nature)》256:495初次描述的杂交瘤方法制备,或可使用细菌或真核动物或植物细胞中的重组DNA方法制备(参见例如美国专利第4,816,567号)。“单克隆抗体”也可以使用例如Clackson等人,1991,《自然(Nature)》352:624-28和Marks等人,1991,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol)》222:581-97中描述的技术从噬菌体抗体库中分离。用于制备由此表达的克隆细胞系和单克隆抗体的其它方法在所属领域中是熟知的。参见例如《简短分子生物学方案(Short Protocols in Molecular Biology)》(Ausubel等人编,第5版.2002)。

[0079] 典型的4-链抗体单元是由两个相同轻(L)链和两个相同重(H)链组成的异四聚体糖蛋白。就IgG而言,4-链单元通常是约150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键连接到H链,而两条H链由一个或多个二硫键彼此连接,这取决于H链同型。每条H链和L链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条H链在N端具有一个可变结构域(VH),随后对于 α 和 γ 链中的每一个具有三个恒定结构域(CH)并且对于 μ 和 ϵ 同型具有四个CH结构域。每条L链在N端具有一个可变结构域(VL),随后在其另一端具有一个恒定结构域(CL)。VL与VH比对并且CL与重链的第一恒定结构域(CH1)比对。相信特定的氨基酸残基在轻链可变结构域与重链可变结构域之间形成了界面。VH与VL成对一起形成单一抗原结合位点。对于不同类别的抗体的结构

和特性,参见例如《基础临床免疫学(Basic and Clinical Immunology)》71(Stites等人编,第8版.1994);和《免疫生物学(Immunobiology)》(Janeway等人编,第5版.2001)。

[0080] 术语“Fab”或“Fab区”是指结合到抗原的抗体区。常规IgG通常包含两个Fab区,其各自位于Y形IgG结构的两个臂中的一个上。每个Fab区通常由重链和轻链中的每一个的一个可变区和一个恒定区组成。更确切地说,Fab区中的重链的可变区和恒定区是VH和CH1区,并且Fab区中的轻链的可变区和恒定区是VL和CL区。根据本发明,Fab区中的VH、CH1、VL和CL可以以各种方式排列以赋予抗原结合能力。例如,VH和CH1区可以在一个多肽上,并且VL和CL区可以在单独的多肽上,类似于常规IgG的Fab区。或者,VH、CH1、VL和CL区可以都在相同多肽上,并按不同的顺序排列,下面将详细介绍。

[0081] 术语“可变区”、“可变结构域”、“V区”或“V结构域”是指抗体的轻链或重链的一部分,其通常位于轻链或重链的氨基端,并且长度在重链中为约120至130个氨基酸且在轻链中为约100至110个氨基酸,并用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。重链的可变区可被称为“VH”。轻链的可变区可被称为“VL”。术语“可变”是指各抗体中可变区的某些区段的序列广泛不同的事实。V区介导抗原结合并且定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性在整个可变区的110-氨基酸的跨度上并非均匀分布。相反,V区由具有约15-30个氨基酸的称为框架区的较少可变(例如,相对不变)延伸组成,所述框架区由称为“高变区”的具有较高可变性(例如,极端变化性)的较短区分隔开,所述较短区各自为约9-12个氨基酸长。重链和轻链的可变区各自包含四个FR,主要采用 β 折叠构型,通过三个高变区连接,所述高变区形成连接 β 折叠结构的环,且在一些情况下形成 β 折叠结构的一部分。每条链中的高变区通过FR紧密接近地保持在一起,并且与来自另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见例如Kabat等人,《免疫学相关的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》(第5版.1991))。恒定区不直接参与将抗体结合到抗原,但展现各种效应功能,如抗体参与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。不同抗体的可变区域在序列上有很大差异。在具体实施例中,可变区是人类可变区。

[0082] 术语“根据Kabat的可变区残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”和其变化形式是指用于Kabat等人(同上)的抗体的编译的重链可变区或轻链可变区的编号系统。使用此编号系统,肽的实际线性氨基酸序列可含有较少或额外的氨基酸,对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入。例如,重链可变结构域可包括残基52之后的单一氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)和残基82之后的三个插入残基(例如根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。通过将抗体序列中的同源与“标准”Kabat编号序列比对,可以确定给定抗体的残基的Kabat编号。当提及可变结构域中的残基(大约轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时,通常使用Kabat编号系统(例如,Kabat等人,同上)。当提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号系统”或“EU索引”(例如,在Kabat等人(同上)中报告的EU索引)。“如在Kabat中的EU索引”是指人类IgG 1EU抗体的残基编号。其它编号系统已经例如通过AbM、Chothia、Contact、IMGT和AHon描述。

[0083] 当用于提及抗体时,术语“重链”是指约50-70kDa的多肽链,其中氨基端部分包括约120到130或更多个氨基酸的可变区,并且羧基端部分包括恒定区。恒定区可以是基于重链恒定区的氨基酸序列的五个不同类型(例如,同型)中的一个,称为alpha(α)、delta(δ)、

epsilon(ϵ)、gamma(γ)和mu(μ)。不同重链的大小不同: α 、 δ 和 γ 含有大约450个氨基酸,而 μ 和 ϵ 含有大约550个氨基酸。当与轻链组合时,这些不同类型的重链分别产生五个熟知的抗体类别(例如,同型),IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,包括四个IgG子类别,即IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0084] 当用于提及抗体时,术语“轻链”是指约25kDa的多肽链,其中氨基端部分包括约100到约110或更多个氨基酸的可变区,并且羧基端部分包括恒定区。轻链的近似长度为211到217个氨基酸。基于恒定结构域的氨基酸序列存在两种不同的类型,称为kappa(κ)或lambda(λ)。

[0085] 如本文所使用,术语“高变区”、“HVR”、“互补决定区”和“CDR”可互换地使用。“CDR”是指免疫球蛋白(Ig或抗体)VH β -片框架的非框架区内的三个高变区(H1、H2或H3)中的一个,或抗体VL β -片框架的非框架区内的三个高变区(L1、L2或L3)中的一个。因此,CDR是散布在框架区序列内的可变区序列。

[0086] CDR区对于所属领域的技术人员是熟知的且已由熟知的编号系统定义。例如,Kabat互补决定区(CDR)是基于序列可变性并且是最常使用的(参见例如Kabat等人,同上)。Chothia实际上是指结构环的位置(参见例如Chothia和Lesk,1987,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol)》196:901-17)。当使用Kabat编号惯例编号时,Chothia CDR-H1环的末端在H32与H34之间变化,这取决于环的长度(这是因为Kabat编号方案将插入放在H35A和H35B;如果35A和35B都不存在,那么环末端在32;如果仅存在35A,那么环末端在33;如果35A和35B都存在,那么环末端在34)。AbM高变区表示Kabat CDR与Chothia结构环之间的折中,并且由牛津分子(Oxford Molecular's)的AbM抗体建模软件使用(参见例如《抗体工程(Antibody Engineering)》第2卷(Kontermann和Dübel编,第2版.2010))。“接触(contact)”高变区是基于对可用复杂晶体结构的分析。已经开发和广泛采用的另一通用编号系统是ImmunoGeneTics(IMG) Information System[®](Lafranc等人,2003,《发育与比较免疫学(Dev.Comp.Immunol.)》27(1):55-77)。IMG是专用于人类和其它脊椎动物的免疫球蛋白(IG)、T细胞受体(TCR)和主要组织相容性复合物(MHC)的综合信息系统。本文中,CDR是根据氨基酸序列和轻链或重链内的位置两者来提及的。由于CDR在免疫球蛋白可变结构域内的“位置”在物种间是保守的,且存在于环状结构中,因此通过使用编号系统,根据结构特征对可变结构域序列进行排序,CDR和框架残基很容易被识别出来。此信息可以用于将来自一种物种的免疫球蛋白的CDR残基接枝和替换到来自通常人类抗体的受体框架中。已由Honegger和Plückthun,2001,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol)》开发额外编号系统(AHon)309:657-70。编号系统之间的对应,包括例如Kabat编号和IMG独特编号系统,是所属领域的技术人员所熟知的(参见例如,Kabat,同上;Chothia和Lesk,同上;Martin,同上;Lefranc等人,同上)。下文标注来自这些高变区或CDR中的每一个的残基。

[0087] 表1

	Kabat	AbM	Chothia	Contact	IMGT
CDR L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36	L27--L38
CDR L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55	L56--L65
CDR L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96	L105-L117
[0088] CDR H1	H31--H35B (Kabat 编号)	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B	H27--H38
CDR H1	H31--H35 (Chothia 编号)	H26--H35	H26--H32	H30--H35	
CDR H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58	H56--H65
CDR H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101	H105-H117

[0089] 给定CDR的边界可能因鉴别方案而不同。因此,除非另外说明,否则给定抗体或其区的术语“CDR”和“互补决定区”,如可变区以及抗体或其区的个别CDR(例如“CDR-H1、CDR-H2)应理解为包涵如上文所描述的已知方案中的任一个所定义的互补决定区。在一些情况下,指定特定一个或多个CDR的鉴别方案,如由Kabat、Chothia或Contact方法所定义的CDR。在其它情况下,给定CDR的特定氨基酸序列。

[0090] 高变区可包含如以下的“延伸的高变区”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3)以及VH中的26-35或26-35A(H1)、50-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。

[0091] 术语“恒定区”或“恒定结构域”是指不直接参与将抗体结合到抗原但展现各种效应功能(如与Fc受体的相互作用)的轻链和重链的羧基端部分。该术语是指具有相对于免疫球蛋白的其它部分(可变区,其含有抗原结合位点)更保守的氨基酸序列的免疫球蛋白分子的部分。恒定区可含有重链的CH1、CH2和CH3区和轻链的CL区。

[0092] 术语“框架”或“FR”是指侧接CDR的那些可变区残基。FR残基存在于例如嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、结构域抗体、双功能抗体、线性抗体和双特异性抗体中。FR残基是除高变区残基或CDR残基之外的那些可变结构域残基。

[0093] 本文中的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C端区,包括例如原生序列Fc区、重组Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的界限可有所变化,但通常将人类IgG重链Fc区定义为从Cys226位置或从Pro230处的氨基酸残基延伸到其羧基端。可将Fc区的C端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)例如在抗体的生产或纯化期间或通过以重组方式工程改造编码抗体重链的核酸来去除。因此,完整抗体的组合物可包含去除所有K447残基的抗体群体、不去除K447残基的抗体群体和具有与不具有K447残基的抗体的混合物的抗体群体。“功能Fc区”具有原生序列Fc区的“效应功能”。示例性“效应功能”包括C1q结合;CDC;Fc受体结合;ADCC;噬菌作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调等。此类效应功能通常需要Fc区与结合区或结合结构域(例如抗体可变区或结构域)组合,并且可以使用所属领域的技术人员已知的各种分析来评估。“变体Fc区”包含由于至少一种氨基酸修饰(例如取代、添加或缺失)而不同于原生序列Fc区的氨基酸序列的氨基酸序列。在某些实施例中,与原生序列Fc区或与亲本多肽的Fc区相比,变体Fc区具有至少一个氨基酸取代,例如约1到约10个氨基酸取代,或在原生序列Fc区中或在亲本多肽的Fc区中约1到约5个氨基酸取代。本文中的变体Fc区可以与原生序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%同源性,或与其具有至少约90%同源性,例如与其具有至少约95%同源性。

[0094] 如本文所使用,“表位”是所属领域中的术语并且是指结合分子(例如抗体)可以特异性结合到的抗原的局部区。表位可以是线性表位或构象、非线性或不连续表位。在多肽抗原的情况下,例如,表位可以是多肽的连续氨基酸(“线性”表位)或表位可以包含来自多肽的两个或更多个非连续区的氨基酸(“构象”、“非线性”或“不连续”表位)。所属领域的技术人员应了解,一般来说,线性表位可取决于或不取决于二级、三级或四级结构。例如,在一些实施例中,结合分子结合到氨基酸的群组,而不管其是否折叠成天然三维蛋白质结构。在其它实施例中,结合分子需要构成表位的氨基酸残基展现特定构象(例如弯曲、扭曲、转角或折叠)以便识别和结合表位。

[0095] 有关本文中鉴别的多肽和抗体序列的“氨基酸序列一致性百分比(%)”或“同源性”定义为在将任何保守取代视为序列一致性的一部分的序列比对之后,候选序列中与比较多肽中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为确定氨基酸序列一致性百分比而进行的比对可以以所属领域的技术内的各种方式实现,例如使用公开可供使用的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign (DNASTAR) 或MUSCLE软件。所属领域的技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较的序列全长内实现最大比对所需的任何算法。然而,出于本文的目的,使用序列比较计算机程序MUSCLE产生氨基酸序列一致性值%(Edgar,R.C.《核酸研究(Nucleic Acids Research)》32(5):1792-1797,2004;Edgar,R.C.,《BMC生物信息学(BMC Bioinformatics)》5(1):113,2004)。

[0096] 如本文所使用,术语“细胞因子”应理解为意指能够针对哺乳动物中的预选细胞类型(例如癌细胞或病毒感染细胞)刺激或诱导细胞杀伤免疫反应的任何蛋白质或肽、其类似物或功能片段。因此,预期可以将多种细胞因子并入本申请中。适用的细胞因子包括例如肿瘤坏死因子(TNF)、白介素(IL)、淋巴因子(LL)、集落刺激因子(CSF)、干扰素(IFN)、包括能够刺激或诱导这种细胞杀伤免疫反应的物种变异及其截断的类似物。适用的肿瘤坏死因子包括例如TNF α 。适用的淋巴因子包括例如LT。适用的集落刺激因子包括例如GM-CSF和M-CSF。适用的白介素包括例如IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-22和IL-33。适用的干扰素包括例如IFN- α 、IFN- α 和IFN- γ 。术语“细胞因子”还理解为涵盖野生型细胞因子(如IL-21、IL-7、IL-15等)的任何变体,其包含修饰并维持其任何所需功能的至少一个重要部分(例如至少约50%)。

[0097] 术语“多肽”和“肽”和“蛋白质”在本文中可互换地使用,并且是指任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可以是直链或支链的,其可包含经修饰的氨基酸,并且其可间杂有非氨基酸。所述术语还涵盖经自然或干预改性的氨基酸聚合物;例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作或修饰。所述定义内还包括例如含有氨基酸的一种或多种类似物的多肽,包括(但不限于)非天然氨基酸,以及所属领域中已知的其它修饰。应理解,因为本发明的多肽可基于抗体或免疫球蛋白超家族的其它成员,所以在某些实施例中,“多肽”可以作为单链或作为两个或更多个相关链出现。

[0098] 术语“载体”是指用于携带或包括核酸序列(包括例如编码如本文所描述的结合分子(例如抗体)的核酸序列)以便将核酸序列引入到宿主细胞中的物质。适用于使用的载体包括例如表达载体、质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体和人工染色体,其可以包括可操作以稳定合并到宿主细胞的染色体中的选择序列或标记。另外,载体可以包括一种或多种可选标记基因和适当的表达控制序列。可以包括的可选标记基因例如提供对抗生素或毒素的

抗性、补体营养缺陷型不足或提供不在培养基中的关键养分。表达控制序列可以包括所属领域中熟知的组成型和诱导型启动子、转录强化子、转录终止子等。当两种或更多种核酸分子待共表达(例如抗体重链和轻链,或抗体VH和VL)时,两种核酸分子可以(例如)插入到单一表达载体中或在单独的表达载体中。对于单一载体表达,编码核酸可以可操作地连接到一个共同表达控制序列或连接到不同表达控制序列,如一个诱导型启动子和一个组成型启动子。可以使用所属领域中熟知的方法证实将核酸分子引入到宿主细胞中。此类方法包括例如核酸分析,如mRNA的Northern印迹或聚合酶链反应(PCR)扩增、用于表达基因产物的免疫印迹或测试所引入核酸序列或其对应基因产物的表达的其它合适的分析方法。所属领域的技术人员应理解,核酸分子的表达量足以产生所需产物,并且应进一步理解,可以使用所属领域中熟知的方法优化表达水平以获得足够表达。

[0099] 如本文所使用的术语“宿主”是指动物,如哺乳动物(例如人类)。

[0100] 如本文所使用的术语“宿主细胞”是指可使用核酸分子转染的特定受试者细胞和此类细胞的后代或潜在后代。由于突变或环境影响,此类细胞的后代可能与使用核酸分子转染的亲本细胞不相同,所述突变或环境影响可能发生在核酸分子的产生或合并到宿主细胞基因组中。

[0101] “分离的”抗体(或构建体)是已从其生产环境(例如天然或重组)的组分中鉴别、分离和/或回收的抗体。优选地,分离的多肽不与其生产环境中的所有其它组分相关。其生产环境的污染物组分(如由重组转染细胞产生的)是将通常干涉针对抗体的研究、诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶解物。在优选实施例中,多肽将被纯化:(1)到大于95重量%的抗体,如通过例如劳里法(Lowry method)确定,并且在一些实施例中,到大于99重量%;(2)到足以通过使用旋转杯测序仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)到通过SDS-PAGE在非还原或还原条件下使用考马斯蓝(Coomassie Blue)或优选银染法(silver stain)的均匀性。分离的抗体(或构建体)包括在重组细胞内的原位抗体,因为在抗体天然环境中的至少一种组分将不存在。然而,通常,将通过至少一个纯化步骤制备经分离的多肽、抗体或构建体。

[0102] “分离的核酸”是核酸,例如RNA、DNA或混合核酸,其基本上与其它基因组DNA序列以及天然伴随原生序列的蛋白质或复合物(如核糖体和聚合酶)分离。“分离的”核酸分子是与存在于核酸分子的天然来源中的其它核酸分子分离的核酸分子。此外,“分离的”核酸分子,如cDNA分子,当通过重组技术产生时可以基本上不含其它细胞物质或培养基,或当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学物质。在具体实施例中,分离或纯化一种或多种编码如本文所描述的抗体的核酸分子。该术语包括从其自然发生的环境中去掉的核酸序列,并包括重组或克隆的DNA分离物和由异源系统化学合成的类似物或生物合成的类似物。。基本上纯的分子可包括分子的分离形式。

[0103] 如本文中可互换地使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物,或可以通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应并入到聚合物中的任何底物。多核苷酸可包含经修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸和其类似物。如本文所使用,“寡核苷酸”是指通常(但不一定)长度小于约200个核苷酸的短、单链、合成多核苷酸。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并不相互排斥。上文关于多核苷酸的描述同样且完全适用于寡核苷酸。产生

本发明的结合分子的细胞可包括亲本杂交瘤细胞,以及细菌和真核宿主细胞,其中编码抗体的核酸已经引入到所述细胞中。除非另外说明,否则本文所公开的任何单链多核苷酸序列的左手端为5'端;双链多核苷酸序列的左手方向被称作5'方向。添加5'到3'的新生RNA转录物的方向被称作转录方向;在DNA链上具有与RNA转录物5'到RNA转录物5'端的序列相同的序列的序列区称为“上游序列”;在DNA链上具有与RNA转录物3'到RNA转录物3'端的序列相同的序列的序列区称为“下游序列”。

[0104] 如本文中所示使用,术语“药学上可接受的”意指得到联邦监管机构或州政府批准,或《美国药典(United States Pharmacopedia)》、《欧洲药典(European Pharmacopedia)》或其它公认的药典中列出适用于动物,并且更确切地说适用于人类。

[0105] “赋形剂”意指药学上可接受的物质、组合物或媒剂,如液体或固体填充剂、稀释剂、溶剂或囊封物质。赋形剂包括例如囊封物质或添加剂,如吸收促进剂、抗氧化剂、粘合剂、缓冲剂、载剂、涂布剂、着色剂、稀释剂、崩解剂、乳化剂、增量剂、填充剂、调味剂、保湿剂、润滑剂、香料、防腐剂、推进剂、释放剂、灭菌剂、甜味剂、增溶剂、湿润剂和其混合物。术语“赋形剂”还可以指稀释剂、佐剂(例如弗朗德佐剂(Freunds' adjuvant)(完全或不完整)或媒剂。

[0106] 在一些实施例中,赋形剂是药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂的实例包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(例如少于约10个氨基酸残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露醇、山梨醇;盐-成型抗衡离子,如钠;和/或非离子表面活性剂,如TWEENTM、聚乙二醇(PEG)和PLURONICSTM。药学上可接受的赋形剂的其它实例描述于Remington和Gennaro,《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》(第18版.1990)。

[0107] 在一个实施例中,每个组分在与药物制剂的其它成分相容的意义上是“药学上可接受的”,并且适合用于与人类和动物的组织或器官接触且无过度毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或其它问题或并发症,与合理的效益/风险比相称。参见例如利平科特威廉姆斯和维尔金斯出版社:费城,PA,2005;《药物赋形剂手册(Handbook of Pharmaceutical Excipients)》,第6版;Rowe等人编;医药出版社和美国医药协会(Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association):2009;《药物添加剂手册(Handbook of Pharmaceutical Additives)》,第3版;Ash和Ash编;高尔出版公司(Gower Publishing Company):2007;《药物预调配物和调配物(Pharmaceutical Preformulation and Formulation)》,第2版;Gibson编;CRC出版社有限责任公司(CRC Press LLC):Boca Raton, FL,2009。在一些实施例中,药学上可接受的赋形剂在其所采用的剂量和浓度上对暴露于的细胞或哺乳动物无毒性。在一些实施例中,药学上可接受的赋形剂是水性的pH缓冲溶液。

[0108] 在一些实施例中,赋形剂是无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当组合物(例如药物组合物)经静脉内施用,水是示例性赋形剂。还可以采用盐水溶液和右旋葡萄糖水溶液和甘油溶液作为液体赋形剂,特别是用于可注射溶液。赋形剂可以包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、无水脱脂奶、甘油、丙二醇、乙

二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物还可以含有少量的湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。组合物可以采用溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、缓释制剂等形式。包括制剂的口服组合物可以包括标准赋形剂,如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0109] 包括药物化合物的组合物可含有例如呈分离或纯化形式的结合分子(例如抗体)以及适合量的赋形剂。

[0110] 如本文所使用的术语“有效量”或“治疗有效量”是指本文所提供的足以产生所需结果的结合分子(例如抗体)或药物组合物的量。

[0111] 术语“受试者”和“患者”可互换地使用。如本文所使用,在某些实施例中,受试者是哺乳动物,如非灵长类动物(例如母牛、猪、马、猫、犬、大鼠等)或灵长类动物(例如猴类和人类)。在具体实施例中,受试者是人类。在一个实施例中,受试者是被诊断患有病况或病症的哺乳动物,例如人类。在另一实施例中,受试者是处于罹患病况或病症的风险下的哺乳动物,例如人类。

[0112] “施用(Administer/administration)”是指当物质存在于体外时将其注射或以其它方式物理递送到患者的行为,如通过粘膜、皮内、静脉内、肌肉递送和/或本文所描述或所属领域已知的任何其它物理递送方法。

[0113] 如本文所使用,术语“治疗(treat/treatment/treating)”是指由施用一种或多种疗法引起的疾病或病况的进程、严重程度和/或持续时间的减缓或改善。治疗可通过评估与潜在病症相关的一种或多种症状是否已降低、缓解和/或减轻来确定,使得尽管患者可能仍然患有潜在病症,但在患者中观察到改善。术语“治疗”包括控制和改善疾病。术语“控制(manage/managing/management)”是指受试者从一种不一定引起疾病治愈的疗法中获得的有益效果。

[0114] 术语“预防(prevent/preventing/prevention)”是指减少疾病、病症、病况或相关一种或多种症状(例如癌症)发作(或复发)的可能性。

[0115] 术语“癌症”或“癌细胞”在本文中用于指代在具有区分其与正常组织或组织细胞的特征的赘瘤中发现的组织或细胞。在此类特征中包括(但不限于):间变程度、形状不规则、细胞轮廓异常、核大小、细胞核或细胞质结构的改变、其它表现型改变、指示癌性或癌前状态的细胞蛋白质的存在、有丝分裂次数增加和转移的能力。关于“癌症”的词包括癌、肉瘤、肿瘤、上皮瘤、白血病、淋巴瘤、息肉和坐骨神经瘤、转化瘤等。

[0116] 术语“约”和“大约”意指在给定值或范围的20%内、15%内、10%内、9%内、8%内、7%内、6%内、5%内、4%内、3%内、2%内、1%内或小于给定值或范围内。

[0117] 如在本发明和权利要求中所使用的,除非上下文另外明确指示,否则单数形式的“一个/种(a/an)”和“所述(the)”包括复数形式。

[0118] 应理解,不管在何处以术语“包含”在本文中描述实施例,还提供关于“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的另外类似实施例。还应理解,不管在何处以短语“主要由……组成”在本文中描述实施例,还提供关于“由……组成”描述的另外类似实施例。

[0119] 在短语如“A和B之间”或“A-B之间”中使用的术语“之间”是指包括A和B两者的范围。

[0120] 在本文短语如“A和/或B”中使用的术语“和/或”意图包括A和B两者;A或B;A(单

独) ;和B(单独)。同样地,在短语如“A、B和/或C”中使用的术语“和/或”意图涵盖以下实施例中的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0121] IL-21融合蛋白

[0122] IL-21和其变体

[0123] 本文所提供的IL-21融合蛋白中的IL-21蛋白质可以是具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的人类野生型IL-21蛋白质(参见下文)。

```

          10          20          30          40          50          60
    QGQDRHMIRM RQLIDIVDQL KNYVNDLVPE FLPAPEDVET NCEWSAFSCF QKAQLKSANT

[0124]          70          80          90          100          110          120
    GNNERIINVSV IKKLRKPPS TNAGRRQKHR LTCPSCDSYE KKPPKEFLER FKSLIQKMIH

          130
    QHLSSRTHGS EDS (SEQ ID NO.: 1)
  
```

[0125] 在一些实施例中,IL-21变体可以在本文所提供的IL-21融合蛋白中。变异可以是编码IL-21多肽的一个或多个密码子的取代、缺失或插入,与人类野生型IL-21蛋白质相比,其导致氨基酸序列的改变。氨基酸取代可以用具有类似结构和/或化学特性的另一氨基酸替换一个氨基酸的结果,如用丝氨酸替换亮氨酸,例如保守氨基酸替换。所属领域的技术人员已知的标准技术可以用于在编码本文所提供的分子的核苷酸序列中引入突变,包括例如定点诱变和导致氨基酸取代的PCR介导的诱变。插入或缺失可任选地在约1到10个氨基酸范围内。在某些实施例中,相对于原始分子,取代、缺失或插入包括少于25个氨基酸取代、少于20个氨基酸取代、少于15个氨基酸取代、少于10个氨基酸取代、少于5个氨基酸取代、少于4个氨基酸取代、少于3个氨基酸取代或少于2个氨基酸取代。在具体实施例中,取代是在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处进行的保守氨基酸取代。所允许的变异可以通过系统地进行序列中氨基酸的插入、缺失或取代并且测试由全长或成熟原生序列展现的所得变体的活性来确定。

[0126] 氨基酸序列插入包括在从一个残基到多个残基的长度范围内的氨基和/或羧基端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内部插入。

[0127] “保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有带有相似电荷的侧链的氨基酸残基取代的氨基酸取代。所属领域中已定义具有带有相似电荷的侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(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)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β 支链侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及具有芳香族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。或者,可以沿着全部或部分编码序列随机引入突变,如通过饱和诱变,并筛选所得突变体的生物活性((例如结合到IL-21受体或IL-21R)以鉴别保留活性的突变体。诱变后,可以表达经编码的蛋白质,并可以确定蛋白质的活性。

[0128] 可进行保守(例如,在具有类似特性和/或侧链的氨基酸基因内)取代,以便维持或不显著改变IL-21蛋白质的特性。氨基酸可根据其侧链的特性中的相似性来分组(参见例如

Lehninger,《生物化学(Biochemistry)》73-75(第2版.1975)): (1) 非极性:Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M); (2) 不带电荷的极性:Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q); (3) 酸性:Asp(D)、Glu(E); 和(4) 碱性:Lys(K)、Arg(R)、His(H)。

[0129] 或者,可基于共同侧链特性将天然存在的残基分组:(1) 疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2) 中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3) 酸性:Asp、Glu;(4) 碱性:His、Lys、Arg;(5) 影响链定向的残基:Gly、Pro;和(6) 芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0130] 因此,在一个实施例中,本文所提供的IL-21变体包含与本文所描述的具有SEQ ID NO:1的IL-21的氨基酸序列至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相同的氨基酸序列。

[0131] 变异可以使用所属领域中已知的方法来进行,如寡核苷酸介导的(定点)诱变、丙氨酸筛选和PCR诱变。定点诱变(参见例如Carter,1986,《生物化学杂志(Biochem J.)》237:1-7;和Zoller等人,1982,《核酸研究(Nucl.Acids Res.)》10:6487-500)、盒式诱变(参见例如Wells等人,1985,《基因(Gene)》34:315-23)或其它已知技术可以对克隆DNA进行以产生多肽。

[0132] 在一些实施例中,IL-21变体在C端处缺少S124与S133之间的一个或多个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在C端处缺少S124与S133之间的任何一个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在C端处缺少S124与S133之间的任何两个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在C端处缺少S124与S133之间的任何三个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在C端处缺少S124与S133之间的任何四个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在C端处缺少S124与S133之间的任何五个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在C端处缺少S124与S133之间的任何六个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在C端处缺少S124与S133之间的任何七个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在C端处缺少S124与S133之间的任何八个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在C端处缺少S124与S133之间的任何九个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在C端处缺少S124与S133之间的任何十个氨基酸。

[0133] 在一些实施例中,IL-21变体在SEQ ID NO:1的C端处缺少11个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在SEQ ID NO:1的C端处缺少10个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在SEQ ID NO:1的C端处缺少9个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在SEQ ID NO:1的C端处缺少8个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在SEQ ID NO:1的C端处缺少7个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在SEQ ID NO:1的C端处缺少6个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在SEQ ID NO:1的C端处缺少5个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在SEQ ID NO:1的C端处缺少4个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在SEQ ID NO:1的C端处缺少3个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在SEQ ID NO:1的C端处缺少2个氨基酸。在一些实施例中,IL-21变体在SEQ ID NO:1的C端处缺少1个氨基酸。

[0134] 在具体实施例中,本文所提供的IL-21变体具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列,其在C端处缺少10个氨基酸并且表示SEQ ID NO:1的Q1到L123的序列。

[0135] 白蛋白结合分子

[0136] 白蛋白(例如人类血清白蛋白或HSA)已用于增加生物药物的血清半衰期。参见丹

尼斯等人,《生物化学杂志(The Journal of Biological Chemistry)》,2002,277(38):35035-35043;Adams等人,《MABS》,2016,8(7):1336-1346。例如,已利用人类血清白蛋白(HSA)。HSA是血液中最充裕的蛋白质,并且广泛分布于组织中且具有非急性功能。其具有19天的半衰期。因此,在一些实施例中,在其它优点中,白蛋白(例如HSA)可以在本文中用于增加本文所提供的融合蛋白的半衰期。白蛋白可以以数种方式使用。一种示例性方法是在本文所提供的融合蛋白中,以遗传方式或化学方式直接包括白蛋白结构域(例如HSA)。另一示例性方法是使用白蛋白结合结构域(ABD)或抗白蛋白抗体。

[0137] 在一些实施例中,本文所提供的融合蛋白包含白蛋白结合分子。在一些实施例中,本文所提供的白蛋白结合分子是白蛋白结合结构域(ABD)。在一些实施例中,ABD可以结合到人类血清白蛋白(HSA)。在其它实施例中,ABD可以结合到小鼠血清白蛋白(MSA)。

[0138] 在一些实施例中,ABD以1-1000nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中,ABD以1-900nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中,ABD以1-800nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中,ABD以1-700nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中,ABD以1-600nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中,ABD以1-500nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中,ABD以1-400nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中,ABD以1-300nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中,ABD以1-200nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中,ABD以1-100nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中,ABD以1-50nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中,ABD以1-25nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中,ABD以0.1-1nM之间的 K_D 结合到HSA。在其它实施例中,ABD以10-800nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中,ABD以20-500nM之间的 K_D 结合到HSA。在其它实施例中,ABD以50-300nM之间的 K_D 结合到HSA。在其它实施例中,ABD以100-200nM之间的 K_D 结合到HSA。

[0139] 在一些具体实施例中,ABD具有LAELAKVLNRELDKYGVSDYYKLNINNAKTVEGVKALIDEIL AALP(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,其结合到HSA的 K_D 是约1.2nM。

[0140] 在一些实施例中,优选与SEQ ID NO:3的ABD相比对HSA具有相对较低亲和力的ABD。因此,在本发明中包括对HSA具有较低亲和力的SEQ ID NO:3的变体。

[0141] 变异可以是编码SEQ ID NO:3的ABD多肽的一个或多个密码子的取代、缺失或插入,其导致氨基酸序列的变化。氨基酸取代可以用具有类似或不同结构和/或化学特性的另一个氨基酸替换一个氨基酸的结果。所属领域的技术人员已知的标准技术可以用于在编码本文所提供的分子的核苷酸序列中引入突变,包括例如定点诱变和导致氨基酸取代的PCR介导的诱变。插入或缺失可任选地在约1到15个氨基酸范围内。在某些实施例中,相对于SEQ ID NO:3的原始分子,取代、缺失或插入包括少于25个氨基酸取代、少于20个氨基酸取代、少于15个氨基酸取代、少于10个氨基酸取代、少于5个氨基酸取代、少于4个氨基酸取代、少于3个氨基酸取代或少于2个氨基酸取代。可通过在序列中系统地进行氨基酸的插入、缺失或取代并且测试所得变体的活性来确定所允许的变异,并且在一些实施例中,选择对HSA具有较低亲和力的变体。在以下实例1中的表7中示例某些此类变体。

[0142] 在一些具体实施例中,ABD具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在其它具体实施例中,ABD具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在其它具体实施例中,ABD具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在其它具体实施例中,ABD具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在其它具体实施例中,ABD具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在其它具体实施例中,ABD具有SEQ ID NO:9的氨基酸序

列。在其它具体实施例中,ABD具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在其它具体实施例中,ABD具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0143] 根据本发明,白蛋白结合分子还可以是抗白蛋白抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,抗白蛋白抗体或其抗原结合片段是抗HSA抗体或其抗原结合片段。

[0144] HSA的几个同种型在以下表2中列出(参见UniProtKB-P02768 (ALBU_HUMAN))

[0145] 表2

[0146]	<p>同种型 1</p> <p>MKVVTFISLL FLFSSAYSRG VFRDDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKALVLIA FAQYLQQCPF EDHVKLVNEV TEFKTCVAD ESAENCCKSL HTLFGDKLCT VATLRETYGE MADCCAKQEP ERNECFQHK DDNPPLPRLV RPEVDVMCTA FHDNEETFLK KYLYEIARRH PYFYAPPELLF FAKRYKAAFT ECCQAADKAA CLLPKLDELRL DEGKASSAKQ RLKASLQKF GERAFKAWAV ARLSQRFPKA EFAEVSKLVT DLTQVHTECC HGDLLCADD RADLAKYICE NQDSISSKLLK ECCEKPLLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVC KNYAEAKDVF LGMFLYFYAR RHPDYSVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDE FKPLVEEPQN LIKQNCLEFE QLGEYKFNAL LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDYLSVV LNQLCVLHEK TPVSDRVTKC CTESLVNRRP CFSALEVDET YVPKEFNAET FTFHADICTL SEKERQIKKQ TALVELVKHK PKATKEQLKA VMDDFAAFVE KCKKADDKET CFAEEGKLLV AASQAALGL (SEQ ID NO: 260)</p>
[0147]	<p>同种型 2</p> <p>MKVVTFISLL FLFSSAYSRG VFRDDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKAWAVAR LSQRFPKAEF AEVSKLVTDL TKVHTECCHG DLLECADDRA DLAKYICENQ DSISSKLLKEC CEKPLLEKSH CIAEVENDM PADLPSLAAD FVESKDVCKN YAEAKDVFLG MFLYFYARRH PDYSVLLLR LAKTYETTLE KCCAAADPHE CYAKVFDEFK PLVEEPQNLI KQNCLEFEQL GEYKFNALL VRYTKKVPQV STPTLVEVSR NLGKVGSKCC KHPEAKRMPC AEDYLSVVLN QLCVLHEKTP VSDRVTKCCT ESLVNRPCF SALEVDETYV PKEFNAETFT FHADICTLSE KERQIKKQTA LVELVKHKPK ATKEQLKAVM DDFAAFVEKC CKADDKETCF AEEGKLLVAA SQAALGL (SEQ ID NO: 261)</p> <p>同种型 3</p> <p>MKVVTFISLL FLFSSAYSRG VFRDDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKALVLIA FAQYLQQCPF EDHVKLVNEV TEFKTCVAD ESAENCCKSL HTLFGDKLCT VATLRETYGE MADCCAKQEP ERNECFQHK DDNPPLPRLV RPEVDVMCTA FHDNEETFLK KYLYETTLEK CCAAADPHEC YAKVFDEFKP LVEEPQNLIK QNCLEFEQLG EYKFNALLV RYTKKVPQVS TPTLVEVSRN LGKVGSKCKC HPEAKRMPCA EDYLSVVLNQ LCVLHEKTPV SDRVTKCCTE SLVNRPCFS ALEVDETYVP KEFNAETFTF HADICTLSEK ERQIKKQTAL VELVKHKPKA TKEQLKAVMD DFAAFVEKCC KADDKETCFA EEGKLLVAAS QAALGL (SEQ ID NO: 262)</p>

[0148] 本文所提供的抗HSA抗体可以结合到这些同种型或其片段中的任一个。在一些实施例中,本文所提供的抗HSA抗体结合到SEQ ID NO:260或其片段。在一些实施例中,本文所提供的抗HSA抗体结合到SEQ ID NO:261或其片段。在其它实施例中,本文所提供的抗HSA抗体结合到SEQ ID NO:262或其片段。

[0149] 本文所提供的抗HSA抗体可以是(但不限于)合成抗体、单克隆抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、内抗体、单链Fv(scFv)(例如包括单特异性、双特异性等)、骆驼化抗体或其人源化形式、Fab片段、F(ab')片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、抗独特型(抗Id)抗体和以上各者中的任一个的表位结合片段。

[0150] 确切地说,本文所提供的抗HSA抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有免疫特异性结合到HSA的抗原结合位点的分子。本文所提供的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或子类别。在具体实施例中,本文所提供的抗HSA抗体是IgG抗体,如IgG1抗体。

[0151] 本发明还包括抗体的变体和衍生物,其包括保留特异性结合到HSA的表位的能力的抗体片段。示例性片段包括Fab片段(含有抗原结合结构域并且包含轻链和通过二硫键桥接的重链的一部分的抗体片段);Fab' (含有单一抗原结合结构域的抗体片段,所述抗原结合结构域包含Fab和通过铰链区的重链的额外部分);F(ab')₂ (在重链的铰链区中通过链间二硫键接合的两个Fab' 分子;Fab' 分子可以被引导到相同或不同表位);双特异性Fab(具有两个抗原结合结构域的Fab分子,其中的每一个可被引导到不同表位);包含可变区的单链Fab链,也称为sFv(通过10-25个氨基酸链连接在一起的抗体的单一轻链和重链的可变的抗原结合决定区);二硫键连接的Fv或dsFv(通过二硫键连接在一起的抗体的单一轻链和重链的可变的抗原结合决定区);骆驼化的VH(抗体的单一重链的可变的抗原结合决定区,其中VH界面处的一些氨基酸是在天然存在的骆驼抗体的重链中发现的那些氨基酸);双特异性sFv(具有两个抗原结合结构域的sFv或dsFv分子,其中的每一个可被引导到不同表位);双功能抗体(当第一sFv的VH结构域与第二sFv的VL结构域装配并且第一sFv的VL结构域与第二sFv的VH结构域装配时形成的二聚化sFv;双功能抗体的两个抗原结合区可被引导到相同或不同表位);和三功能抗体(三聚化sFv,其以类似于双功能抗体的方式形成,但其中在单一复合物中产生三个抗原结合结构域;三个抗原结合结构域可被引导到相同或不同表位)。抗体的衍生物还包括抗体组合位点的一个或多个CDR序列。当存在两个或更多个CDR序列时,CDR序列可在架构上连接在一起。在某些实施例中,本文所提供的抗HSA抗体包含单链Fv("scFv")。scFv是包含抗体的VH和VL结构域的抗体片段,其中这些结构域存在于单一多肽链中。一般来说,scFv多肽还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,使scFv能够形成抗原结合的所需结构。关于scFv的综述,参见Pluckthun,《单克隆抗体的药理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies)》,第113卷,Rosenburg和Moore编,施普林格出版社(Springer-Verlag),纽约(New York),第269-315页(1994)。

[0152] 在某些情形下,使用抗HSA抗体片段而非整个抗体存在优点。较小尺寸的片段允许快速清除,并且可能导致更好地进入细胞、组织或器官。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人,2003,《自然医学(Nature Med)》9:129-34。

[0153] 已经开发了用于生产抗体片段的各种技术。传统地,这些片段经由完整抗体的蛋白水解消化来衍生(参见例如Morimoto等人,1992,《生物化学杂志(J. Biochem. Biophys)》、《生物物理学方法(Biophys. Methods)》24:107-17;和Brennan等人,1985,《科学(Science)》229:81-83)。然而,这些片段现在可以通过重组宿主细胞而直接产生。Fab、Fv和scFv抗体片段都可以在大肠杆菌或酵母细胞中表达和分泌,因此允许容易地生产大量的这些片段。抗体片段可以从上文所论述的抗体噬菌体库分离。或者,Fab'-SH片段可以直接从大肠杆菌回收且经化学耦合以形成F(ab')₂片段(Carter等人,1992,《生物/技术(Bio/Technology)》10:163-67)。根据另一方法,F(ab')₂片段可以直接从重组宿主细胞培养物分离。美国专利第5,869,046号中描述了体内半衰期增加的Fab和F(ab')₂片段,其中包括补救受体结合表位

残基。用于生产抗体片段的其它技术对于熟练技术人员是显而易见的。在某些实施例中,抗体是单链Fv片段(scFv)(参见例如W0 93/16185;美国专利第5,571,894号和第5,587,458号)。Fv和scFv具有不含恒定区的完整组合位点;因此,其可适合于在体内使用期间减少的非特异性结合。scFv融合蛋白可经构建以产生在scFv的氨基或羧基端处的效应蛋白融合(参见例如Borrebaeck编,同上)。抗体片段还可以是例如如上文所引用的参考文献中所描述的“线性抗体”。此类线性抗体可以是单特异性或多特异性的,如双特异性的。在具体实施例中,抗体片段是单结构域抗体。

[0154] 本文所提供的抗HSA抗体可来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物(例如人类、鼠类、驴、绵羊、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡)。在某些实施例中,本文所提供的抗体是人类或人源化单克隆抗体。如本文所使用,“人类”抗体包括具有人类免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体并且包括从人类免疫球蛋白库或从表达来自人类基因的抗体的小鼠分离的抗体。

[0155] 在某些实施例中,抗HSA抗体是完全人类抗体,如免疫特异性结合到癌症抗原的完全人类抗体。此类完全人类抗体将优于完全小鼠(或其它完全或部分非人类物种抗体)、人源化抗体或嵌合抗体,以最大限度地减少不必要的副作用的发展(如当施用于受试者时针对非完全人类抗体的免疫反应)的发展。

[0156] 本文所提供的抗HSA抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性或更多特异性的。多特异性抗体可对多肽的不同表位具有特异性或可对多肽以及异源表位两者具有特异性,所述异源表位如异源多肽或固体支撑物质。在一些实施例中,本文所提供的抗体对多肽的给定表位是单特异性的,并且不免疫特异性地结合到其它表位。

[0157] 本文所提供的抗HSA抗体可以是单克隆抗体或来源于单克隆抗体。单克隆抗体可使用Kohler等人,1975,《自然(Nature)》256:495-97初次描述的杂交瘤方法制备,或可通过重组DNA方法制备(参见例如美国专利第4,816,567号)。

[0158] 在杂交瘤方法中,如上文所描述对小鼠或其它适当宿主动物(如仓鼠)进行免疫以引发产生或能够产生将特异性结合到用于免疫的蛋白质的抗体的淋巴细胞。或者,可在体外免疫淋巴细胞。在免疫接种之后,将淋巴细胞分离,使用合适的融合剂(如聚乙二醇)将淋巴细胞与骨髓瘤细胞系融合,以形成杂交瘤细胞(Goding,《单克隆抗体:原理和实践(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice)》59-103(1986))。

[0159] 将如此制备的杂交瘤细胞接种并且生长于合适的培养基中,在某些实施例中,所述培养基含有抑制非融合亲本骨髓瘤细胞(也称为融合配偶体)的生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),那么杂交瘤的选择性培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶(HAT培养基),这些物质防止HGPRT缺陷型细胞的生长。

[0160] 示例性融合配偶体骨髓瘤细胞是指那些能够有效融合,能够支持所选抗体产生细胞稳定高水平产生抗体,并且对针对未融合亲本细胞的选择性培养基敏感的细胞。示例性骨髓瘤细胞系是鼠类骨髓瘤系,如SP-2和衍生物,例如可购自美国模式培养物保藏所(马纳萨斯(Manassas),VA)的X63-Ag8-653细胞,和来源于可购自索尔克细胞分配中心研究所(Salk Institute Cell Distribution Center)(圣地亚哥(San Diego),CA)的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的那些细胞。人类骨髓瘤和小鼠-人类异源骨髓瘤细胞系也被描述用于生产人类单克隆抗体(Kozbor,1984,《免疫学(Immunol)》133:3001-05;和Brodeur等人,《单克

隆抗体生产技术和应用(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications)》51-63(1987))。

[0161] 对杂交瘤细胞生长的培养基中检测针对抗原的单克隆抗体的产生。通过免疫沉淀或通过体外结合分析(如RIA或ELISA)确定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。单克隆抗体的结合亲和力可以例如通过Munson等人,1980,《生物化学分析(Anal.Biochem.》107:220-39中所描述的斯卡查德分析(Scatchard analysis)来确定。

[0162] 一旦鉴别出能够产生所需特异性、亲和力和/或活性的抗HSA抗体的杂交瘤细胞,就可通过限制稀释程序亚克隆克隆体,并通过标准方法(Goding,同上)生长。出于此目的合适的培养基包括例如DMEM或RPMI-1640培养基。此外,杂交瘤细胞可在动物体内生长为腹水肿瘤,例如通过将细胞腹膜内注射到小鼠中。

[0163] 由亚克隆分泌的单克隆抗体通过常规抗体纯化程序适当地从培养基、腹水流体或血清分离,所述常规抗体纯化程序例如亲和力色谱(例如使用蛋白质A或蛋白质G-琼脂糖)或离子交换色谱、羧基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析等。

[0164] 编码单克隆抗体的DNA可以使用常规程序(例如通过使用能够特异性结合到编码鼠类抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序。杂交瘤细胞可以充当此类DNA的来源。一旦分离,就可以将DNA放入表达载体中,然后将其转染到不会另外产生抗体蛋白质的宿主细胞,如大肠杆菌细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞中,以在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。关于编码抗体的DNA的细菌中的重组表达的综述文章包括Skerra等人,1993,《免疫学新观点(Curr.Opinion in Immunol.》5:256-62和Plückthun,1992,《免疫学综述(Immunol.Revs.》130:151-88。

[0165] 在另一实施例中,单克隆抗体或抗体片段可以从使用例如《抗体噬菌体展示:方法和方案(Antibody Phage Display:Methods and Protocols)》(O'Brien和Aitken编,2002)中描述的技术产生的抗体噬菌体库分离。在噬菌体展示方法中,功能抗体结构域显示在噬菌体颗粒表面,该颗粒携带编码它们的多核苷酸序列。可以用于制备本文所描述的抗体的噬菌体展示方法的实例包括Brinkman等人,1995,《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》182:41-50;Ames等人,1995,《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》184:177-186;Kettleborough等人,1994,《欧洲免疫学杂志(Eur.J.Immunol.》24:952-958;Persic等人,1997,《基因(Gene)》187:9-18;Burton等人,1994,《免疫学进展(Advances in Immunology)》57:191-280;PCT申请第PCT/GB91/01134号;国际公开第W0 90/02809号、第W0 91/10737号、第W0 92/01047号、第W0 92/18619号、第W0 93/11236号、第W0 95/15982号、第W0 95/20401号和第W097/13844号;和美国专利第5,698,426号、第5,223,409号、第5,403,484号、第5,580,717号、第5,427,908号、第5,750,753号、第5,821,047号、第5,571,698号、第5,427,908号、第5,516,637号、第5,780,225号、第5,658,727号、第5,733,743号和第5,969,108号。

[0166] 原则上,通过筛选含有噬菌体的噬菌体库来选择合成抗体克隆,所述噬菌体库展示融合到噬菌体外壳蛋白的抗体可变区(Fv)的各种片段。此类噬菌体库针对所需抗原筛选。将能够结合到所需抗原的表达Fv片段的克隆体吸附到抗原,从而与文库中未结合的克隆分离。随后从抗原洗脱结合克隆体,并且可以通过额外的抗原吸附/洗脱循环进一步富集。

[0167] 可变结构域可以在噬菌体上功能性地展示,或作为单链Fv(scFv)片段,其中VH和VL经由短的柔性肽共价连接,或作为Fab片段,其中它们各自融合到恒定结构域并且非共价相互作用,如例如在Winter等人,1994,《免疫学综述年鉴(Ann.Rev.Immunol.)》12:433-55中所描述的。

[0168] 可以通过PCR分别克隆VH和VL基因的库,并且随机地在噬菌体库中重组,然后可以如Winter等人在上文中所描述的搜索抗原结合克隆体。来自免疫来源的库提供对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。或者,可以克隆原生库,以在无任何免疫接种的情况下将人类抗体的单一来源提供到广泛范围的非自身和自身抗原,如Griffiths等人,1993,《欧洲分子生物学杂志(EMBO J)》12:725-34中所描述的。最后,也可以通过克隆来自干细胞的未重新排列的V-基因片段来合成制备原生库,并且使用含有随机序列的PCR引物来编码高度可变CDR3区并且实现体外重新排列,如例如通过Hoogenboom和Winter,1992,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol)》227:381-88中所描述。

[0169] 库的筛选可以通过所属领域中已知的各种技术实现。例如,HSA多肽或其片段可以用于涂布吸附板的孔,在附着于吸附板或用于细胞分选的宿主细胞上表达,缀合到生物素以用抗生物素蛋白链菌素涂布的珠粒捕获,或用于淘选展示库的任何其它方法。可以通过使用如Bass等人,1990,《蛋白质(Proteins)》8:309-14和WO 92/09690中所描述的长洗涤和单价噬菌体展示,以及如Marks等人,1992,《生物技术(Biotechnol)》10:779-83中所描述的低抗原涂布密度的方法来促进具有缓慢解离动力学(例如良好结合亲和力)的抗体的选择。

[0170] 抗体可以通过设计合适的抗原筛选程序来获得,以选择目的噬菌体的克隆,接着使用VH和/或VL序列(例如,Fv序列)或来自VH和VL序列、如在Kabat等人,同上中所描述的来自目的噬菌体克隆和合适的恒定区(例如,Fc)序列的各种CDR序列来构建全长抗体克隆。

[0171] 本文所描述的抗HSA抗体还可以例如包括嵌合抗体。嵌合抗体是一种分子,其中抗体的不同部分来自不同的免疫球蛋白分子。例如,嵌合抗体可以含有融合到人类抗体的恒定区的小鼠或大鼠单克隆抗体的可变区。用于产生嵌合抗体的方法是所属领域已知的。参见例如Morrison,1985,《科学(Science)》229:1202;Oi等人,1986,《生物技术(BioTechniques)》4:214;Gillies等人,1989,《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》125:191-202;和美国专利第5,807,715号、第4,816,567号、第4,816,397号和第6,331,415号。

[0172] 使用如本文所描述的那些技术产生的抗HSA抗体或抗原结合片段可以使用标准、熟知的技术来分离。例如,抗体或抗原结合片段可以合适地通过常规免疫球蛋白纯化程序(如例如蛋白质A-琼脂糖、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和力色谱)从例如培养基、腹水流体、血清、细胞裂解物、合成反应物质等分离。如本文所使用,“分离的”或“纯化的”抗体基本上不含来自衍生抗体的细胞或组织来源的细胞物质或其它蛋白质,或经化学合成时基本上不含化学前体或其它化学物质。

[0173] 在一些更具体实施例中,抗白蛋白抗体或其抗原结合片段是结合到HSA的sdAb。在一些实施例中,sdAb是V_H单结构域抗体。

[0174] 在一些实施例中,sdAb以1-1000nM之间的K_D结合到HSA。在一些实施例中,sdAb以1-900nM之间的K_D结合到HSA。在一些实施例中,sdAb以1-800nM之间的K_D结合到HSA。在一些实施例中,sdAb以1-700nM之间的K_D结合到HSA。在一些实施例中,sdAb以1-600nM之间的K_D结

合到HSA。在一些实施例中, sdAb以1-500nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中, sdAb以1-400nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中, sdAb以1-300nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中, sdAb以1-200nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中, sdAb以1-100nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中, sdAb以1-50nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中, sdAb以1-25nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中, sdAb以0.1-1nM之间的 K_D 结合到HSA。在其它实施例中, sdAb以10-800nM之间的 K_D 结合到HSA。在一些实施例中, sdAb以20-500nM之间的 K_D 结合到HSA。在其它实施例中, sdAb以50-300nM之间的 K_D 结合到HSA。在其它实施例中, sdAb以100-200nM之间的 K_D 结合到HSA。

[0175] 癌症抗原结合分子

[0176] 在一些实施例中, 结合到本文所提供的融合蛋白中的抗原的结合分子可以结合到癌症抗原, 并且由此有助于将IL-21或其变体引导或递送到癌细胞, 例如实体肿瘤癌细胞。

[0177] 在一些实施例中, 结合分子是结合到在癌细胞上表达的抗原的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中, 癌细胞是实体肿瘤癌细胞。

[0178] 在一些实施例中, 本文所提供的抗体或其抗原结合片段可以免疫特异性地结合到在癌细胞上表达的抗原的多肽、多肽片段或表位。在一个实施例中, 抗体结合到人类癌症抗原。在一些实施例中, 本文所提供的抗体或其抗原结合片段结合到癌症抗原的胞外结构域(ECD)。在某些实施例中, 抗体结合到癌症抗原的ECD中的表位。在一些实施例中, 癌症抗原在实体肿瘤癌细胞上表达。

[0179] 结合到本文所提供的癌症抗原的抗体可以是(但不限于)以上各者中的任一个的合成抗体、单克隆抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、内抗体、单链Fv(scFv)(例如包括单特异性、双特异性等)、骆驼化抗体或其人源化变体、Fab片段、F(ab')片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、抗独特型(抗Id)抗体和表位结合片段。

[0180] 确切地说, 本文所提供的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分, 即含有免疫特异性结合到癌症抗原(例如实体肿瘤癌症抗原)的抗原结合位点的分子。本文所提供的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如, IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或子类别。在具体实施例中, 本文所提供的抗体是IgG抗体, 如IgG1抗体。

[0181] 本发明还包括抗体的变体和衍生物, 其包括保留特异性结合到癌症抗原的表位的能力的抗体片段。示例性片段包括Fab片段; Fab'; F(ab')₂; 双特异性Fab; 单链Fab链, 其包含可变区, 也称为sFv; 二硫键连接的Fv或dsFv; 骆驼化的VH; 双特异性sFv; 双功能抗体; 和三功能抗体。抗体的衍生物还包括抗体组合位点的一个或多个CDR序列。当存在两个或更多个CDR序列时, CDR序列可在架构上连接在一起。在某些实施例中, 本文所提供的抗体包含单链Fv("scFv")。已经开发出用于生产抗体片段的各种技术, 如以上部分中简短地描述。

[0182] 在一些实施例中, 结合到癌症抗原的单一可变结构域抗体(sdAb)是优选的。某些类型的生物体, 具有高亲和力的单一V样结构域的骆驼和软骨鱼, 所述V样结构域作为其免疫系统的一部分安装在Fc等效结构域结构上。(Woolven等人, 1999, 《免疫遗传学(Immunogenetics)》50:98-101; 和Streltsov等人, 2004, 《美国科学院院报(Proc Natl Acad Sci USA)》101:12444-49)。V样结构域(在骆驼中称为VhH且在鲨鱼中称为V-NAR)通常

显示长环状表面,允许穿透目标抗原的空腔。其还通过遮蔽疏水性表面贴片来稳定分离的VH结构域。

[0183] 这些VhH和V-NAR结构域已用于工程改造sdAb。已使用噬菌体库和其它方法的选择设计人类V结构域变体,所述方法产生稳定、高结合VL-和VH-衍生的结构域。在具体实施例中,结合到癌症抗原的抗体是sdAb。在一个实施例中,sdAb是V_HH单结构域抗体。

[0184] 本文所提供的抗体可来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物(例如人类、鼠类、驴、绵羊、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡)。在某些实施例中,本文所提供的抗体是人类或人源化单克隆抗体。如本文所使用,“人类”抗体包括具有人类免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体并且包括从人类免疫球蛋白库或从表达来自人类基因的抗体的小鼠分离的抗体。

[0185] 在某些实施例中,抗体是完全人类抗体,如免疫特异性结合癌症抗原的完全人类抗体。此类完全人类抗体将优于完全小鼠(或其它完全或部分非人类物种抗体)、人源化抗体或嵌合抗体以最小化不必要的副作用(如当施用于受试者时针对非完全人类抗体的免疫反应)的发展。

[0186] 本文所提供的抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性或更多特异性的。多特异性抗体可对多肽的不同表位具有特异性或可对多肽以及异源表位两者具有特异性,所述异源表位如异源多肽或固体支撑物质。在一些实施例中,本文所提供的抗体对多肽的给定表位是单特异性的,并且不免疫特异性地结合到其它表位。

[0187] 结合到本文所提供的癌症抗原的抗体可以是单克隆抗体或来源于单克隆抗体。单克隆抗体可使用Kohler等人,1975,《自然(Nature)》256:495-97初次描述的杂交瘤方法制备,或可通过重组DNA方法制备(参见例如美国专利第4,816,567号)。单克隆抗体的生产在以上部分中简短地描述。

[0188] 本文所描述的抗体还可以例如包括嵌合抗体。使用如本文所描述的那些技术产生的抗体或抗原结合片段可以使用标准、熟知的技术来分离。

[0189] 在某些实施例中,本文所提供的IL-21融合蛋白中的抗原结合分子包含通过接头连接的多个抗体,每个抗体(例如,sdAb)结合到抗原。在一些实施例中,抗原结合分子包含两种抗体或其片段。在一些实施例中,抗原结合分子包含两个sdAb。在一些实施例中,抗原结合分子包含各自结合到抗原的不同表位的两个sdAb。

[0190] 在一些更具体实施例中,抗原结合分子包含各自结合到MSLN的不同表位的两个sdAb。例如,在一些实施例中,靶向MSLN的氨基酸296到氨基酸359(N端)的一个sdAb和靶向MSLN的氨基酸538到氨基酸622(C端)的一个sdAb用于本文所提供的IL-21融合蛋白中。可以通过使一种或多种抗体靶向IL-21融合蛋白中的癌症抗原的特异性功能结构域来提供某些优点。用sdAb靶向MSLN的N端破坏了MSLN-MUC16相互作用并且减少了癌细胞转移。用sdAb靶向MSLN的C端减少了MSLN从癌细胞表面的脱落。

[0191] 在一些实施例中,癌症抗原是间皮素(MSLN)。在一些实施例中,结合分子是结合到MSLN(如本文所描述的这些)的sdAb。

[0192] 抗间皮素(抗MSLN)构建体

[0193] 本申请提供特异性地结合到间皮素的抗间皮素构建体。抗间皮素构建包含抗MSLN重链可变区(VH)的抗体部分。在一些实施例中,抗MSLN VH结合到包含SEQ ID NO:283的序列的抗原。在一些实施例中,抗MSLN VH结合到包含SEQ ID NO:284的序列的抗原。

[0194] 在一些实施例中,抗间皮素构建体包含抗MSLN抗体部分,所述抗MSLN抗体部分包含如本文所描述的单结构域抗间皮素抗体。

[0195] 在一些实施例中,本文所描述的抗MSLN构建体以a) 抗MSLN抗体部分、b) 第二结构域的顺序从N端到C端包含。在一些实施例中,本文所描述的抗MSLN构建体以a) 第二结构域、b) 抗MSLN抗体部分的顺序从N端到C端包含。

[0196] 在一些实施例中,本文所描述的抗MSLN构建体以a) 抗MSLN抗体部分、b) 第二结构域、c) 第三结构域的顺序从N端到C端包含。在一些实施例中,本文所描述的抗MSLN构建体以a) 第二结构域、b) 抗MSLN抗体部分、c) 第三结构域的顺序从N端到C端包含。在一些实施例中,本文所描述的抗MSLN构建体以a) 第二结构域、b) 第三结构域、c) 抗MSLN抗体部分的顺序从N端到C端包含。

[0197] 在一些实施例中,第二结构域或第三结构域是半衰期延长结构域。在一些实施例中,第二结构域或第三结构域是细胞因子。

[0198] 在一些实施例中,构建体是融合蛋白,其进一步包含半衰期延长结构域(如Fc结构域或白蛋白结合结构域)。在一些实施例中,构建体是进一步包含细胞因子(如IL-21、IL-15)的融合蛋白。在一些实施例中,构建体是融合蛋白,其进一步包含a) 半衰期延长结构域;和b) 细胞因子。本文中描述了示例性融合蛋白。

[0199] 在一些实施例中,半衰期延长结构域融合到抗MSLN抗体部分的N端或C端。在一些实施例中,细胞因子融合到抗MSLN抗体部分的N端或半衰期延长结构域。在一些实施例中,半衰期延长结构域融合到细胞因子的N端或C端。

[0200] 在一些实施例中,构建体包含抗MSLN抗体部分与第二结构域或第三结构域(如细胞因子)之间的接头。示例性接头描述于本文中。在一些实施例中,接头包含SEQ ID NO:66-74和SEQ ID NO:267-282中的任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,接头是不可裂解的。在一些实施例中,接头是可裂解的。

[0201] 在一些实施例中,抗MSLN构建体包含SEQ ID NO:123-156和SEQ ID NO:285-331中的任一个的氨基酸序列,或其与SEQ ID NO:123-156和SEQ ID NO:285-331中的任一个具有至少约80%(如约85%、90%、95%、98%或99%)序列一致性的变体。

[0202] 结合到间皮素(MSLN)的单结构域抗体

[0203] 本发明提供特异性结合到间皮素的单结构域抗体。在一些实施例中,本文所提供的sdAb结合到人类MSLN。人类MSLN的几个同种型在以下表3中列出(参见UniProtKB-Q13421(MSLN_HUMAN))。SEQ ID NO:264的同种型2是主要人类MSLN同种型。

[0204] 表3

[0205]

同种型 1	<p> MALPTARPLL GSCGTPALGS LLFLLFSLGW VQPSRTLAGE TGQEAAPLDG VLANPPNISS LSPRQLLGF CAEVSGLSTE RVRELAVALA QKNVKLSTEQ LRCLAHRLSE PPEDLDALPL DLLLFLNPDA FSGPQACTRF FSRITKANVD LLPRGAPERQ RLLPAALACW GVRGSLLESEA DVRALGGLAC DLPGRFVAES AEVLLPRLVS CPGPLDQDQQ EAARAALQGG GPPYGPPSTW SVSTMDALRG LLPVLGQPII RSIPQGIVAA WRQRSSRDPS WRQPRTLIR PRFRREVEKT ACPSGKKARE IDESLIFYKK WELEACVDAA LLATQMDRVN AIPFTYEQLD VLKHKLDELY PQGYPESVIQ HLGYLFLKMS PEDIRKWNVT SLETLKALLE VNKGHEMSPQ APRRPLPQVA TLIDRFVKGR GQLDKDTLDT LTAFYPGYLC SLSPEELSSV PPSSIWAVRP QDLDTCDPRQ LDVLYPKARL AFQNMNGSEY FVKIQSFLGG APTEDLKALS QQNVSMDLAT FMKLRTDAVL PLTVAEVQKL LGPHVEGLKA EERHRPVRDW ILRQRQDDLD TLGLGLQGGI PNGYLVLDLS MQEALSGTPC LLGPGPVLTV LALLASTLA (SEQ ID NO: 263) </p>
-------	--

[0206]

同种型 2- 主要形式	MALPTARPLL GSCGTPALGS LLFLLFSLGW VQPSRTLAGE TGQEAAPLDG VLANPPNISS LSPRQLLGF CAEVSGLSTE RVRELAVALA QKNVKLSTEQ LRCLAHRLSE PPEDLDALPL DLLLFLNPDA FSGPQACTRF FSRITKANVD LLPRGAPERQ RLLPAALACW GVRGSSLSEA DVRALGGLAC DLPGRFVAES AEVLLPRLVS CPGPLDQDQQ EAARAALQGG GPPYGPPSTW SVSTMDALRG LLPVLGQPII RSIPQGIVAA WRQRSSRDPS WRQPRTLIR PRFRREVEKT ACPSGKKARE IDESLIFYKK WELEACVDAA LLATQMDRVN AIPFTYEQLD VLKHKLDELY PQGYPESVIQ HLGYLFLKMS PEDIRKWNVT SLETLKALLE VNKGHEMSPQ VATLIDRFVK GRGQLDKDTL DTLTAFYPGY LCSLSPEELS SVPSSIWAV RPQDLTCDP RQLDVLYPKA RLAQNMNGS EYFVKIQSFL GGAPTEDLKA LSQQNVSM DL ATFMKLRTDA VLPLTVAEVQ KLLGPHVEGL KAEERHRPVR DWILRQRQDD LDTLGLGLQG GIPNGYLVLD LSMQEALSGT PCLLPGPVLT VLALLLAST LA (SEQ ID NO: 264)
同种型 3	MALPTARPLL GSCGTPALGS LLFLLFSLGW VQPSRTLAGE TGQEAAPLDG VLANPPNISS LSPRQLLGF CAEVSGLSTE RVRELAVALA QKNVKLSTEQ LRCLAHRLSE PPEDLDALPL DLLLFLNPDA FSGPQACTRF FSRITKANVD LLPRGAPERQ RLLPAALACW GVRGSSLSEA DVRALGGLAC DLPGRFVAES AEVLLPRLVS CPGPLDQDQQ EAARAALQGG GPPYGPPSTW SVSTMDALRG LLPVLGQPII RSIPQGIVAA WRQRSSRDPS WRQPRTLIR PRFRREVEKT ACPSGKKARE IDESLIFYKK WELEACVDAA LLATQMDRVN AIPFTYEQLD VLKHKLDELY PQGYPESVIQ HLGYLFLKMS PEDIRKWNVT SLETLKALLE VNKGHEMSPQ VATLIDRFVK GRGQLDKDTL DTLTAFYPGY LCSLSPEELS SVPSSIWAV RPQDLTCDP RQLDVLYPKA RLAQNMNGS EYFVKIQSFL GGAPTEDLKA LSQQNVSM DL ATFMKLRTDA VLPLTVAEVQ KLLGPHVEGL KAEERHRPVR DWILRQRQDD LDTLGLGLQG GIPNGYLVLD LSVQGGRRGGQ ARAGGRAGGV EVGALSHPSL CRGPLGDALP PRTWTCSHRP GTAPSLHPGL RAPLPC (SEQ ID NO: 265)
同种型 4	MALPTARPLL GSCGTPALGS LLFLLFSLGW VQPSRTLAGE TGQEAAPLDG LANPPNISS SPRQLLGFPC AEVSGLSTER VRELAVALAQ KNVKLSTEQ RCLAHRLSEP PEDLDALPLD LLLFLNPDAF SGPQACTRFF SRITKANVDL LPRGAPERQR LPAALACWG VRGSSLSEAD VRALGGLACD LPGRFVAESA EVLLPRLVSC PGPLDQDQQE AARAALQGGG PPYGPPSTWS VSTMDALRGL LPVLGQPIIR SIPQGIVAAW RQRSSRDPSW RQPRTLIRP RFRREVEKTA CPSGKKAREI DESLIFYKKW ELEACVDAAL LATQMDRVNA IPFTYEQLDV LKHKLDELYP QGYPESVIQH LGYLFLKMS EDIRKWNVTS LETLKALLEV NKGHEMSPQV ATLIDRFVKG RGQLDKDTLD TLTAFYPGYL CSLSPEELSS VPPSSIWAVR PQDLTCDPR QLDVLYPKAR LAFQNMNGSE YFVKIQSFLG GAPTEDLKAL SQQNVSM DL A TFMKLRTDAV LPLTVAEVQK LLGPHVEGLK AEERHRPVRD WILRQRQDDL DTLGLGLQGG IPNGYLVLDL SMQEALSGTP CLLPGPVLT VLALLLASTL A (SEQ ID NO: 266)

[0207] 本文所提供的抗MSLN抗体(例如sdAb)可以结合到上表中列出的同种型或其任何片段中的任一个。在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN抗体结合到SEQ ID NO:263或其片段。在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN抗体结合到SEQ ID NO:264或其片段。在其它实

施例中,本文所提供的抗MSLN抗体结合到SEQ ID NO:265或其片段。在其它实施例中,本文所提供的抗MSLN抗体结合到SEQ ID NO:266或其片段。在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN抗体结合到SEQ ID NO:283。在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN抗体结合到SEQ ID NO:284。

[0208] 因此,在一个方面中,本文提供结合到间皮素(MSLN)的单结构域抗体(sdAb),其包含以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,CDR序列选自如下表4和表10。

[0209] 更确切地说,本文提供结合到间皮素(MSLN)的单结构域抗体(sdAb),其包含以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中:(i) CDR1具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:120;(ii) CDR2具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118和SEQ ID NO:121;和/或(iii) CDR3具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:119和SEQ ID NO:122。

[0210] 在一些实施例中,本文提供一种结合到间皮素(抗-MSLN sdAb)的单结构域抗体,其包含VH,所述VH包含如表9中阐述的抗体抗MSLN-1、抗MSLN-2、抗MSLN-3、抗MSLN-4、抗MSLN-5、抗MSLN-6、抗MSLN-7、抗MSLN-8、抗MSLN-9、抗MSLN-10、抗MSLN-11、抗MSLN-12、抗MSLN-13、抗MSLN-14、抗MSLN-15、抗MSLN-16、抗MSLN-17、抗MSLN-18、抗MSLN-19、抗MSLN-20、抗MSLN-21、抗MSLN-22、抗MSLN-23、抗MSLN-24、抗MSLN-25、抗MSLN-26、抗MSLN-27、抗MSLN-28、抗MSLN-29、抗MSLN-30、抗MSLN-31、抗MSLN-32、抗MSLN-33和抗MSLN-34中的任一个的CDR1、CDR2和CDR3。

[0211] 在一些实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:12,CDR2具有SEQ ID NO:13,且CDR3具有SEQ ID NO:14。

[0212] 在一些实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:15,CDR2具有SEQ ID NO:16,且CDR3具有SEQ ID NO:17。

[0213] 在一些实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:18,CDR2具有SEQ ID NO:19,且CDR3具有

SEQ ID NO:20。

[0214] 在一些实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:21,CDR2具有SEQ ID NO:22,且CDR3具有SEQ ID NO:23。

[0215] 在一些实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:24,CDR2具有SEQ ID NO:25,且CDR3具有SEQ ID NO:26。

[0216] 在一些实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:27,CDR2具有SEQ ID NO:28,且CDR3具有SEQ ID NO:29。

[0217] 在一些实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:30,CDR2具有SEQ ID NO:31,且CDR3具有SEQ ID NO:32。

[0218] 在一些实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:33,CDR2具有SEQ ID NO:34,且CDR3具有SEQ ID NO:35。

[0219] 在一些实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:36,CDR2具有SEQ ID NO:37,且CDR3具有SEQ ID NO:38。

[0220] 在其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:39,CDR2具有SEQ ID NO:40,且CDR3具有SEQ ID NO:41。

[0221] 在其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:42,CDR2具有SEQ ID NO:43,且CDR3具有SEQ ID NO:44。

[0222] 在其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:45,CDR2具有SEQ ID NO:46,且CDR3具有SEQ ID NO:47。

[0223] 在其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:48,CDR2具有SEQ ID NO:49,且CDR3具有SEQ ID NO:50。

[0224] 在其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:51,CDR2具有SEQ ID NO:52,且CDR3具有SEQ ID NO:53。

[0225] 在其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:54,CDR2具有SEQ ID NO:55,且CDR3具有SEQ ID NO:56。

[0226] 在其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:57,CDR2具有SEQ ID NO:58,且CDR3具有SEQ ID NO:59。

[0227] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:60,CDR2具有SEQ ID NO:61,且CDR3具有SEQ ID NO:62。

[0228] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:63,CDR2具有SEQ ID NO:64,且CDR3具有SEQ ID NO:65。

[0229] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:75,CDR2具有SEQ ID NO:76,且CDR3具有SEQ ID NO:77。

[0230] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:78,CDR2具有SEQ ID NO:79,且CDR3具有SEQ ID NO:80。

[0231] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:81,CDR2具有SEQ ID NO:82,,且CDR3具有SEQ ID NO:83。

[0232] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:84,CDR2具有SEQ ID NO:85,且CDR3具有SEQ ID NO:86。

[0233] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:87,CDR2具有SEQ ID NO:88,且CDR3具有SEQ ID NO:89。

[0234] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:90,CDR2具有SEQ ID NO:91,且CDR3具有SEQ ID NO:92。

[0235] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:93,CDR2具有SEQ ID NO:94,且CDR3具有SEQ ID NO:95。

[0236] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:96,CDR2具有SEQ ID NO:97,且CDR3具有SEQ ID NO:98。

[0237] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:99,CDR2具有SEQ ID NO:100,且CDR3具有SEQ ID NO:101。

[0238] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:102,CDR2具有SEQ ID NO:103,且CDR3具有SEQ ID NO:104。

[0239] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:105,CDR2具有SEQ ID NO:106,且CDR3具有SEQ ID NO:107。

[0240] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:108,CDR2具有SEQ ID NO:109,且CDR3具有SEQ ID NO:110。

[0241] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:111,CDR2具有SEQ ID NO:112,且CDR3具有SEQ ID NO:113。

[0242] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:114,CDR2具有SEQ ID NO:115,且CDR3具有SEQ ID NO:116。

[0243] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:117,CDR2具有SEQ ID NO:118,且CDR3具有SEQ ID NO:119。

[0244] 在另外其它实施例中,CDR1具有SEQ ID NO:120,CDR2具有SEQ ID NO:121,且CDR3具有SEQ ID NO:122。

[0245] 表4

[0246]

区	序列
---	----

[0247]

CDR1	GGTASSYT (SEQ ID NO: 12) GRTFSGS (SEQ ID NO: 15) GSISSIRH (SEQ ID NO: 18) GLTFSSRA (SEQ ID NO: 21) GLTFTSHT (SEQ ID NO: 24) GRTLESYV (SEQ ID NO: 27) GRALSSYA (SEQ ID NO: 30) GRAFSGYT (SEQ ID NO: 33) GITFPVNA (SEQ ID NO: 36) GFTFDNKQ (SEQ ID NO: 39) GRTNSTVA (SEQ ID NO: 42) GPTYTTET (SEQ ID NO: 45) GRTFSPYT (SEQ ID NO: 48) GRSFSTYR (SEQ ID NO: 51) GRMFSSYA (SEQ ID NO: 54) GRRVRTAA (SEQ ID NO: 57) GRTISNYA (SEQ ID NO: 60) GISDISS (SEQ ID NO: 63) GHTFSVYA (SEQ ID NO: 75) GRTASSYV (SEQ ID NO: 78) GRTETTYN (SEQ ID NO: 81) GRTFSHYA (SEQ ID NO: 84) GRTWSTYP (SEQ ID NO: 87) GRTDSTGI (SEQ ID NO: 90) GRSFNTYA (SEQ ID NO: 93) GRTISNYA (SEQ ID NO: 96) GSLSSINT (SEQ ID NO: 99) ERTYSRYA (SEQ ID NO: 102) GRTFSSVS (SEQ ID NO: 105) GRTFGSYT (SEQ ID NO: 108) GGTFIRYA (SEQ ID NO: 111) GRTARSYN (SEQ ID NO: 114) GRILADTP (SEQ ID NO: 117) GRILADTP (SEQ ID NO: 120)
------	---

[0248]

CDR2	ILWSGNTT (SEQ ID NO: 13) FNWDGSS (SEQ ID NO: 16) VSNDGSA (SEQ ID NO: 19) IIHSGDYT (SEQ ID NO: 22) ISWSGGNT (SEQ ID NO: 25) INWSSGRL (SEQ ID NO: 28) ITWNGGRT (SEQ ID NO: 31) MTWSGDRT (SEQ ID NO: 34) ISAGGTT (SEQ ID NO: 37) ISISDGAT (SEQ ID NO: 40) IVWSNGYS (SEQ ID NO: 43) IRWRGAHT (SEQ ID NO: 46) ITWKSGST (SEQ ID NO: 49) ITASGSWT (SEQ ID NO: 52) ISYNGGAT (SEQ ID NO: 55) ITWRGGER (SEQ ID NO: 58) INWNGGGI (SEQ ID NO: 61) IGSGGNT (SEQ ID NO: 64) INWGDGLT (SEQ ID NO: 76) VSRSGVST (SEQ ID NO: 79) ISRGATIT (SEQ ID NO: 82) ITESPDST (SEQ ID NO: 85) IRWTTGST (SEQ ID NO: 88) IRWSNNYA (SEQ ID NO: 91) ITWSGAST (SEQ ID NO: 94) VSWTGHGT (SEQ ID NO: 97) ISSSGST (SEQ ID NO: 100) ISWSGT (SEQ ID NO: 103) ADWSGTT (SEQ ID NO: 106) ISRSGGST (SEQ ID NO: 109) ISQTGGST (SEQ ID NO: 112) IISPRGT (SEQ ID NO: 115) ITSGGTT (SEQ ID NO: 118) ITSGGTT (SEQ ID NO: 121)
------	---

[0249]	<p>CDR3</p> <p>GGARWGTAEVSNYAY (SEQ ID NO: 14) AGYYHTGGPLLRDNEYRY (SEQ ID NO: 17) NADTWGWPGADY (SEQ ID NO: 20) AADSVNKRGAASSYVRTTEYDY (SEQ ID NO: 23) AADRSSFYSYGGSSRVKVEGEYNY (SEQ ID NO: 26) AAGRY (SEQ ID NO: 29) AADPRGDVYHRDKYNI (SEQ ID NO: 32) ATKLGTYYNSHDLRRPDY (SEQ ID NO: 35) YLQRRIGMLRDY (SEQ ID NO: 38) ATNPTQIMIGTMRCDES (SEQ ID NO: 41) ALDIRDSEITVQQKY (SEQ ID NO: 44) AASRSFDYPRREDEYRY (SEQ ID NO: 47) ASTSFAYGLTNSNKYNY (SEQ ID NO: 50) AAAEILTAITSSDYDY (SEQ ID NO: 53) AARGGHWYSIHDPNFRA (SEQ ID NO: 56) AAGPWYTNHDTSQGYNY (SEQ ID NO: 59) AAQRAGTWTY (SEQ ID NO: 62) NAAQRIGAGPIVL (SEQ ID NO: 65) AARQRREGWDY (SEQ ID NO: 77) AADGKNFSNRWWSRDEYKY (SEQ ID NO: 80) AASFTNLAVVARDYYY (SEQ ID NO: 83) AAARSTLRWPFRRGQGYDYDY (SEQ ID NO: 86) NAEVRAWYNRRKADY (SEQ ID NO: 89) AAGTGWGFSISDYN (SEQ ID NO: 92) AASSQYGAASAPTAYLY (SEQ ID NO: 95) AADGKNFSNRWWSRDEYKY (SEQ ID NO: 98) AAGKGSTWYNGAYK (SEQ ID NO: 101) AYGYYSGAANYRDLASSTYRY (SEQ ID NO: 104) AASDPRRSAYKY (SEQ ID NO: 107) AASNTGGRASASYKY (SEQ ID NO: 110) AVSTVQSKRMLMYGY (SEQ ID NO: 113) AATTSSTYYSKTYAY (SEQ ID NO: 116) AANAEGSGSRY (SEQ ID NO: 119) KVMYHAGS (SEQ ID NO: 122)</p>
--------	---

[0250] 在一些实施例中,本文提供一种结合到间皮素(抗-MSLN sdAb)的单结构域抗体,其包含来自如表9中阐述的抗体抗MSLN-1、抗MSLN-2、抗MSLN-3、抗MSLN-4、抗MSLN-5、抗MSLN-6、抗MSLN-7、抗MSLN-8、抗MSLN-9、抗MSLN-10、抗MSLN-11、抗MSLN-12、抗MSLN-13、抗MSLN-14、抗MSLN-15、抗MSLN-16、抗MSLN-17、抗MSLN-18、抗MSLN-19、抗MSLN-20、抗MSLN-21、抗MSLN-22、抗MSLN-23、抗MSLN-24、抗MSLN-25、抗MSLN-26、抗MSLN-27、抗MSLN-28、抗MSLN-29、抗MSLN-30、抗MSLN-31、抗MSLN-32、抗MSLN-33和抗MSLN-34中的任一个的一个或多个CDR区。

[0251] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-1的CDR区。

[0252] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:123中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:123中所阐述的CDR2的氨基酸序列的

CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:123中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:123中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:123中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:123中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:123中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。如上文所描述,CDR区对于所属领域的技术人员是熟知的且已由熟知的编号系统定义。来自这些高变区或CDR中的每一个的残基在以上表1中标注。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0253] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:12的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:13的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:14的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:12的CDR1和SEQ ID NO:13的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:12的CDR1和SEQ ID NO:14的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:13的CDR2和SEQ ID NO:14的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:12的CDR1、SEQ ID NO:13的CDR2和SEQ ID NO:14的CDR3。

[0254] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-2的CDR区。

[0255] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:124中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:124中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:124中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:124中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:124中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:124中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:124中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0256] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:15的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:16的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:17的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:15的CDR1和SEQ ID NO:16的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:15的CDR1和SEQ ID NO:17的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:16的CDR2和SEQ ID NO:17的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:15的CDR1、SEQ ID NO:16的CDR2和SEQ ID NO:17的CDR3。

[0257] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-3的CDR区。

[0258] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:125中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:125中所阐述的CDR2的氨基酸序列的

CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:125中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:125中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:125中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:125中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:125中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0259] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:18的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:19的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:20的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:18的CDR1和SEQ ID NO:19的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:18的CDR1和SEQ ID NO:20的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:19的CDR2和SEQ ID NO:20的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:18的CDR1、SEQ ID NO:19的CDR2和SEQ ID NO:20的CDR3。

[0260] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-4的CDR区。

[0261] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:126中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:126中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:126中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:126中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:126中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:126中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:126中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0262] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:21的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:22的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:23的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:21的CDR1和SEQ ID NO:22的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:21的CDR1和SEQ ID NO:23的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:22的CDR2和SEQ ID NO:23的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:21的CDR1、SEQ ID NO:22的CDR2和SEQ ID NO:23的CDR3。

[0263] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-5的CDR区。

[0264] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:127中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:127中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:127中所阐述的CDR3的氨基酸序列的

CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:127中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:127中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:127中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:127中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0265] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:24的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:25的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:26的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:24的CDR1和SEQ ID NO:25的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:24的CDR1和SEQ ID NO:26的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:25的CDR2和SEQ ID NO:26的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:24的CDR1、SEQ ID NO:25的CDR2和SEQ ID NO:26的CDR3。

[0266] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-6的CDR区。

[0267] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:128中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:128中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:128中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:128中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:128中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:128中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:128中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0268] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:27的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:28的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:29的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:27的CDR1和SEQ ID NO:28的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:27的CDR1和SEQ ID NO:29的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:28的CDR2和SEQ ID NO:29的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:27的CDR1、SEQ ID NO:28的CDR2和SEQ ID NO:29的CDR3。

[0269] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-7的CDR区。

[0270] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:129中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:129中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:129中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:129中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序

列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:129中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:129中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:129中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0271] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:30的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:31的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:32的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:30的CDR1和SEQ ID NO:31的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:30的CDR1和SEQ ID NO:32的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:31的CDR2和SEQ ID NO:32的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:30的CDR1、SEQ ID NO:31的CDR2和SEQ ID NO:32的CDR3。

[0272] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-8的CDR区。

[0273] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:130中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:130中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:130中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:130中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:130中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:130中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:130中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0274] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:33的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:34的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:35的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:33的CDR1和SEQ ID NO:34的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:33的CDR1和SEQ ID NO:35的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:34的CDR2和SEQ ID NO:35的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:33的CDR1、SEQ ID NO:34的CDR2和SEQ ID NO:35的CDR3。

[0275] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-9的CDR区。

[0276] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:131中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:131中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:131中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:131中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:131中所阐述的CDR1和CDR3

的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:131中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:131中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0277] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:36的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:37的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:38的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:36的CDR1和SEQ ID NO:37的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:36的CDR1和SEQ ID NO:38的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:37的CDR2和SEQ ID NO:38的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:36的CDR1、SEQ ID NO:37的CDR2和SEQ ID NO:38的CDR3。

[0278] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-10的CDR区。

[0279] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:132中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:132中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:132中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:132中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:132中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:132中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:132中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0280] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:39的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:40的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:41的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:39的CDR1和SEQ ID NO:40的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:39的CDR1和SEQ ID NO:41的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:40的CDR2和SEQ ID NO:41的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:39的CDR1、SEQ ID NO:40的CDR2和SEQ ID NO:41的CDR3。

[0281] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-11的CDR区。

[0282] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:133中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:133中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:133中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:133中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:133中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:133中所阐述的

CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:133中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0283] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:42的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:43的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:44的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:42的CDR1和SEQ ID NO:43的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:42的CDR1和SEQ ID NO:44的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:43的CDR2和SEQ ID NO:44的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:42的CDR1、SEQ ID NO:43的CDR2和SEQ ID NO:44的CDR3。

[0284] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-12的CDR区。

[0285] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:134中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:134中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:134中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:134中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:134中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:134中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:134中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0286] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:45的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:46的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:47的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:45的CDR1和SEQ ID NO:46的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:45的CDR1和SEQ ID NO:47的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:46的CDR2和SEQ ID NO:47的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:45的CDR1、SEQ ID NO:46的CDR2和SEQ ID NO:47的CDR3。

[0287] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-13的CDR区。

[0288] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:135中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:135中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:135中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:135中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:135中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:135中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:135

中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0289] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:48的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:49的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:50的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:48的CDR1和SEQ ID NO:49的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:48的CDR1和SEQ ID NO:50的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:49的CDR2和SEQ ID NO:50的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:48的CDR1、SEQ ID NO:49的CDR2和SEQ ID NO:50的CDR3。

[0290] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-14的CDR区。

[0291] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:136中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:136中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:136中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:136中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:136中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:136中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:136中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0292] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:51的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:52的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:53的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:51的CDR1和SEQ ID NO:52的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:51的CDR1和SEQ ID NO:53的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:52的CDR2和SEQ ID NO:53的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:51的CDR1、SEQ ID NO:52的CDR2和SEQ ID NO:53的CDR3。

[0293] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-15的CDR区。

[0294] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:137中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:137中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:137中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:137中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:137中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:137中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:137中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的

编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0295] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:54的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:55的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:56的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:54的CDR1和SEQ ID NO:55的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:54的CDR1和SEQ ID NO:56的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:55的CDR2和SEQ ID NO:56的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:54的CDR1、SEQ ID NO:55的CDR2和SEQ ID NO:56的CDR3。

[0296] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-16的CDR区。

[0297] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:138中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:138中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:138中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:138中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:138中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:138中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:138中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0298] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:57的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:58的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:59的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:57的CDR1和SEQ ID NO:58的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:57的CDR1和SEQ ID NO:59的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:58的CDR2和SEQ ID NO:59的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:57的CDR1、SEQ ID NO:58的CDR2和SEQ ID NO:59的CDR3。

[0299] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-17的CDR区。

[0300] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:139中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:139中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:139中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:139中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:139中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:139中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:139中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在

其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0301] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:60的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:61的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:62的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:60的CDR1和SEQ ID NO:61的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:60的CDR1和SEQ ID NO:62的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:61的CDR2和SEQ ID NO:62的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:60的CDR1、SEQ ID NO:61的CDR2和SEQ ID NO:62的CDR3。

[0302] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-18的CDR区。

[0303] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:140中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:140中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:140中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:140中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:140中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:140中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:140中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0304] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:63的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:64的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:65的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:63的CDR1和SEQ ID NO:64的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:63的CDR1和SEQ ID NO:65的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:64的CDR2和SEQ ID NO:65的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:63的CDR1、SEQ ID NO:64的CDR2和SEQ ID NO:65的CDR3。

[0305] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-19的CDR区。

[0306] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:141中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:141中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:141中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:141中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:141中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:141中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:141中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施

例中,CDR根据IMGT编号。

[0307] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:75的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:76的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:77的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:75的CDR1和SEQ ID NO:76的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:75的CDR1和SEQ ID NO:77的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:76的CDR2和SEQ ID NO:77的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:75的CDR1、SEQ ID NO:76的CDR2和SEQ ID NO:77的CDR3。

[0308] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-20的CDR区。

[0309] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:142中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:142中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:142中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:142中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:142中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:142中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:142中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0310] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:78的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:79的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:80的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:78的CDR1和SEQ ID NO:79的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:78的CDR1和SEQ ID NO:80的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:79的CDR2和SEQ ID NO:80的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:78的CDR1、SEQ ID NO:79的CDR2和SEQ ID NO:80的CDR3。

[0311] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-21的CDR区。

[0312] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:143中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:143中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:143中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:143中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:143中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:143中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:143中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0313] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:81的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:82的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:83的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:81的CDR1和SEQ ID NO:82的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:81的CDR1和SEQ ID NO:83的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:82的CDR2和SEQ ID NO:83的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:81的CDR1、SEQ ID NO:82的CDR2和SEQ ID NO:83的CDR3。

[0314] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-22的CDR区。

[0315] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:144中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:144中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:144中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:144中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:144中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:144中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:144中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0316] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:84的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:85的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:86的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:84的CDR1和SEQ ID NO:85的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:84的CDR1和SEQ ID NO:86的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:85的CDR2和SEQ ID NO:86的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:84的CDR1、SEQ ID NO:85的CDR2和SEQ ID NO:86的CDR3。

[0317] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-23的CDR区。

[0318] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:145中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:145中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:145中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:145中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:145中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:145中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:145中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0319] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:87的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ

ID NO:88的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:89的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:87的CDR1和SEQ ID NO:88的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:87的CDR1和SEQ ID NO:89的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:88的CDR2和SEQ ID NO:89的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:87的CDR1、SEQ ID NO:88的CDR2和SEQ ID NO:89的CDR3。

[0320] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-24的CDR区。

[0321] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:146中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:146中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:146中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:146中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:146中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:146中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:146中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0322] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:90的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:91的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:92的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:90的CDR1和SEQ ID NO:91的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:90的CDR1和SEQ ID NO:92的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:91的CDR2和SEQ ID NO:92的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:90的CDR1、SEQ ID NO:91的CDR2和SEQ ID NO:92的CDR3。

[0323] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-25的CDR区。

[0324] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:147中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:147中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:147中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:147中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:147中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:147中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:147中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0325] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:93的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:94的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:95的CDR3。在一些实施例中,sdAb

具有SEQ ID NO:93的CDR1和SEQ ID NO:94的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:93的CDR1和SEQ ID NO:95的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:94的CDR2和SEQ ID NO:95的CDR3。在具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:93的CDR1、SEQ ID NO:94的CDR2和SEQ ID NO:95的CDR3。

[0326] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-26的CDR区。

[0327] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:148中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:148中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:148中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:148中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:148中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:148中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:148中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0328] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:96的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:97的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:98的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:96的CDR1和SEQ ID NO:97的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:96的CDR1和SEQ ID NO:98的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:97的CDR2和SEQ ID NO:98的CDR3。在一个具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:96的CDR1、SEQ ID NO:97的CDR2和SEQ ID NO:98的CDR3。

[0329] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-27的CDR区。

[0330] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:149中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:149中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:149中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:149中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:149中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:149中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:149中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0331] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:99的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:100的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:101的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:99的CDR1和SEQ ID NO:100的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID

NO:99的CDR1和SEQ ID NO:101的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:100的CDR2和SEQ ID NO:101的CDR3。在一个具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:99的CDR1、SEQ ID NO:100的CDR2和SEQ ID NO:101的CDR3。

[0332] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-28的CDR区。

[0333] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:150中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:150中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:150中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:150中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:150中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:150中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:150中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0334] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:102的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:103的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:104的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:102的CDR1和SEQ ID NO:103的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:102的CDR1和SEQ ID NO:104的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:103的CDR2和SEQ ID NO:104的CDR3。在一个具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:102的CDR1、SEQ ID NO:103的CDR2和SEQ ID NO:104的CDR3。

[0335] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-29的CDR区。

[0336] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:151中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:151中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:151中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:151中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:151中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:151中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:151中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0337] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:105的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:106的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:107的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:105的CDR1和SEQ ID NO:106的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:105的CDR1和SEQ ID NO:107的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:106的

CDR2和SEQ ID NO:107的CDR3。在一个具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:105的CDR1、SEQ ID NO:106的CDR2和SEQ ID NO:107的CDR3。

[0338] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-30的CDR区。

[0339] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:152中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:152中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:152中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:152中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:152中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:152中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:152中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0340] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:108的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:109的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:110的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:108的CDR1和SEQ ID NO:109的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:108的CDR1和SEQ ID NO:110的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:109的CDR2和SEQ ID NO:110的CDR3。在一个具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:108的CDR1、SEQ ID NO:109的CDR2和SEQ ID NO:110的CDR3。

[0341] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-31的CDR区。

[0342] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:153中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:153中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:153中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:153中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:153中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:153中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:153中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0343] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:111的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:112的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:113的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:111的CDR1和SEQ ID NO:112的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:111的CDR1和SEQ ID NO:113的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:112的CDR2和SEQ ID NO:113的CDR3。在一个具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:111的CDR1、SEQ

ID NO:112的CDR2和SEQ ID NO:113的CDR3。

[0344] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-32的CDR区。

[0345] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:154中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:154中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:154中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:154中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:154中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:154中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:154中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0346] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:114的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:115的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:116的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:114的CDR1和SEQ ID NO:115的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:114的CDR1和SEQ ID NO:116的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:115的CDR2和SEQ ID NO:116的CDR3。在一个具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:114的CDR1、SEQ ID NO:115的CDR2和SEQ ID NO:116的CDR3。

[0347] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-33的CDR区。

[0348] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:155中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:155中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:155中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:155中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:155中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:155中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:155中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0349] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:117的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:118的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:119的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:117的CDR1和SEQ ID NO:118的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:117的CDR1和SEQ ID NO:119的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:118的CDR2和SEQ ID NO:119的CDR3。在一个具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:117的CDR1、SEQ ID NO:118的CDR2和SEQ ID NO:119的CDR3。

[0350] 在一些实施例中,本文所提供的抗MSLN sdAb具有一个或多个来自抗MSLN-34的CDR区。

[0351] 在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:156中所阐述的CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:156中所阐述的CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:156中所阐述的CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:156中所阐述的CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:156中所阐述的CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:156中所阐述的CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施例中,sdAb具有含有如SEQ ID NO:156中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统确定。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其它实施例中,CDR根据Chothia编号。在其它实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。

[0352] 在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:120的CDR1。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:121的CDR2。在其它实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:122的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:120的CDR1和SEQ ID NO:121的CDR2。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:120的CDR1和SEQ ID NO:122的CDR3。在一些实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:121的CDR2和SEQ ID NO:122的CDR3。在一个具体实施例中,sdAb具有SEQ ID NO:120的CDR1、SEQ ID NO:121的CDR2和SEQ ID NO:122的CDR3。

[0353] 在结合到本文所提供的MSLN的各种sdAb的一些实施例中,所述sdAb进一步包含以下抗体的一个或多个FR序列:抗MSLN-1、抗MSLN-2、抗MSLN-3、抗MSLN-4、抗MSLN-5、抗MSLN-6、抗MSLN-7、抗MSLN-8、抗MSLN-9、抗MSLN-10、抗MSLN-11、抗MSLN-12、抗MSLN-13、抗MSLN-14、抗MSLN-15、抗MSLN-16、抗MSLN-17、抗MSLN-18、抗MSLN-19、抗MSLN-20、抗MSLN-21、抗MSLN-22、抗MSLN-23、抗MSLN-24、抗MSLN-25、抗MSLN-26、抗MSLN-27、抗MSLN-28、抗MSLN-29、抗MSLN-30、抗MSLN-31、抗MSLN-32、抗MSLN-33和抗MSLN-34,如表9中所阐述。

[0354] 在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:123中所阐述的FR1的氨基酸序列的FR1。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:123中所阐述的FR2的氨基酸序列的FR2。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:123中所阐述的FR3的氨基酸序列的FR3。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:123中所阐述的FR4的氨基酸序列的FR4。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:123中所阐述的FR1和FR2的氨基酸序列的FR1和FR2。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:123中所阐述的FR1和FR3的氨基酸序列的FR1和FR3。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:123中所阐述的FR1和FR4的氨基酸序列的FR1和FR4。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:123中所阐述的FR2和FR3的氨基酸序列的FR2和FR3。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:123中所阐述的FR2和FR4的氨基酸序列的FR2和FR4。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:123中所阐述的FR3和FR4的氨基酸序列的FR3和FR4。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:123中所阐述的FR1、FR2和FR3的氨基酸序列的FR1、FR2和FR3。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID

文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:156中所阐述的FR3和FR4的氨基酸序列的FR3和FR4。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:156中所阐述的FR1、FR2和FR3的氨基酸序列的FR1、FR2和FR3。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:156中所阐述的FR1、FR2和FR4的氨基酸序列的FR1、FR2和FR4。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:156中所阐述的FR1、FR3和FR4的氨基酸序列的FR1、FR3和FR4。在一些实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:156中所阐述的FR2、FR3和FR4的氨基酸序列的FR2、FR3和FR4。在一个具体实施例中,本文所提供的sdAb包含具有如SEQ ID NO:156中所阐述的FR1、FR2、FR3和FR4的氨基酸序列的FR1、FR2、FR3和FR4。

[0388] 在一些实施例中,本文所提供的sdAb是包含表11中的一个或多个人源化FR序列的人源化sdAb。下文提供本文所提供的人源化sdAb的更详细的描述。

[0389] 本文所述的框架区基于CDR编号系统的边界来确定。换句话说,如果CDR通过例如,Kabat、IMGT或Chothia确定,那么框架区是以从N端到C端的形式在可变区中围绕CDR的氨基酸残基:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。例如,FR1被定义为N端到CDR1氨基酸残基的氨基酸残基,其如由例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统所定义;FR2被定义为CDR1和CDR2氨基酸残基之间的氨基酸残基,其如由例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统所定义;FR3被定义为CDR2和CDR3氨基酸残基之间的氨基酸残基,其如由例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统所定义;以及FR4被定义为C端到CDR3氨基酸残基的氨基酸残基,其如由例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统所定义。

[0390] 在某些更具体的实施例中,sdAb在以下实例中包含如表9中所阐述的VH(或VHH)序列。

[0391] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列。

[0392] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列。

[0393] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列。

[0394] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:126的氨基酸序列。

[0395] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列。

[0396] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列。

[0397] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列。

[0398] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列。

[0399] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列。

[0400] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列。

[0401] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列。

[0402] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列。

[0403] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列。

[0404] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列。

[0405] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列。

[0406] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

[0407] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列。

[0408] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列。

- [0409] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列。
- [0410] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列。
- [0411] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列。
- [0412] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:153的氨基酸序列。
- [0413] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列。
- [0414] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:155的氨基酸序列。
- [0415] 在一些实施例中,sdAb包含SEQ ID NO:156的氨基酸序列。
- [0416] 在一些实施例中,sdAb以0.01-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,sdAb以0.1-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,sdAb以1-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中,sdAb以1-90nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中,sdAb以1-80nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中,sdAb以1-70nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,sdAb以1-60nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,sdAb以1-50nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,sdAb以1-40nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,sdAb以1-30nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,sdAb以1-20nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,sdAb以1-10nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,sdAb以0.1-1nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,sdAb以0.01-1nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,sdAb以0.01-0.1nM之间的 K_D 结合到MSLN。
- [0417] 在一些实施例中,结合到癌症抗原的结合分子包含各自结合到在癌细胞上表达的抗原的两种抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,癌细胞是实体肿瘤癌细胞。在一些实施例中,两种抗体或其抗原结合片段是两个sdAb。在一些实施例中,所述两个sdAb是 V_H 单结构域抗体。在一些实施例中,所述两个sdAb各自结合到MSLN的两个不同表位。在一些实施例中,一个表位在MSLN的N端上并且另一个表位在MSLN的C端上。
- [0418] 在一些实施例中,两个sdAb中的每一者以0.01-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,两个sdAb中的每一者以0.1-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,两个sdAb中的每一者以1-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,两个sdAb中的每一者以1-90nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,两个sdAb中的每一者以1-80nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,两个sdAb中的每一者以1-70nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,两个sdAb中的每一者以1-60nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中,两个sdAb中的每一者以1-50nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中,两个sdAb中的每一者以1-40nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中,两个sdAb中的每一者以1-30nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中,两个sdAb中的每一者以1-20nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中,两个sdAb中的每一者以1-10nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中,两个sdAb中的每一者以0.1-1nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,两个sdAb中的每一者以0.01-0.1nM之间的 K_D 结合到MSLN。
- [0419] 在其它实施例中,两种抗体或其抗原结合片段通过第三接头连接。
- [0420] 在又一个方面中,本文提供与结合到上文所述的MSLN的单结构域抗体中的一者竞争的抗体。此类抗体还可以结合到与上文所提及的单结构域抗体中的一者相同的表位,或重叠表位。与上述抗体竞争或结合同一表位的抗体和片段有望表现出相似的功能特性。。示例的抗原结合蛋白和片段包括具有本文所述VH区和CDR的抗原结合蛋白和片段,包括表5

和表7中的抗原结合蛋白和片段。

[0421] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含具有相对于以下抗体中的任一者的特定百分比一致性的氨基酸序列:抗MSLN-1、抗MSLN-2、抗MSLN-3、抗MSLN-4、抗MSLN-5、抗MSLN-6、抗MSLN-7、抗MSLN-8、抗MSLN-9、抗MSLN-10、抗MSLN-11、抗MSLN-12、抗MSLN-13、抗MSLN-14、抗MSLN-15、抗MSLN-16、抗MSLN-17、抗MSLN-18、抗MSLN-19、抗MSLN-20、抗MSLN-21、抗MSLN-22、抗MSLN-23、抗MSLN-24、抗MSLN-25、抗MSLN-26、抗MSLN-27、抗MSLN-28、抗MSLN-29、抗MSLN-30、抗MSLN-31、抗MSLN-32、抗MSLN-33和抗MSLN-34,如表9中所阐述。

[0422] 两个序列(例如氨基酸序列或核酸序列)之间的“百分比一致性”的确定可以使用数学算法实现。用于比较两种序列的数学算法的一个优选的非限制性实例是Karlin和Altschul,1990,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》87:2264-2268的数学算法,如Karlin和Altschul,1993,《美国国家科学院院刊》90:5873-5877中所修改。此算法被并入Altschul等人,1990,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》215:403的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST核苷酸程序参数集进行,例如得分=100,字长=12,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以用XBLAST程序参数集进行,例如得分=50,字长=3,以获得与本文所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的带缺口比对,可以利用如Altschul等人,1997,《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》25:3389-3402中所描述的Gapped BLAST。或者,可以使用PSI BLAST进行迭代搜索,其检测分子之间的远距离关系(同上)。在利用BLAST、Gapped BLAST以及PSI Blast程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数(参见例如万维网ncbi.nlm.nih.gov上的美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI))。用于比较序列的数学算法的另一个优选非限制性实例是Myers和Miller,1988,CABIOS 4:1117的算法。此算法被并入ALIGN程序(2.0版)中,所述程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序用于比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表、12的空位长度罚分和4的空位罚分。

[0423] 两个序列之间的百分比一致性可以使用与上述技术类似的技术来确定,无论是否允许缺口。在计算一致性百分比时,通常只对精确匹配计数。

[0424] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:123的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:124的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:125的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:126的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:127的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到

体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:144的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。

[0426] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:145的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:146的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:147的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:148的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:149的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:150的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:151的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:152的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:153的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:154的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:155的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:156的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。

[0427] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:123的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-1的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0428] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:124的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少

90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-2的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0429] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:125的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-3的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0430] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:126的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-4的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0431] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:127的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-5的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0432] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:128的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-6的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0433] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:129的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-7的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0434] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:130的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-8的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0435] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:131的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-9的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0436] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构

域,所述VH框架区与SEQ ID NO:132的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-10的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0437] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:133的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-11的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0438] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:134的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-12的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0439] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:135的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-13的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0440] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:136的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-14的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0441] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:137的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-15的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0442] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:138的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-16的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0443] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:139的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-17的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0444] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:140的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-18的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0445] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:141的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-19的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0446] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:142的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-20的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0447] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:143的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-21的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0448] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:144的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-22的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0449] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:145的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-23的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0450] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:146的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-24的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0451] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:147的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-25的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-

3)。

[0452] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:148的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-26的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0453] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:149的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-27的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0454] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:150的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-28的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0455] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:151的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-29的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0456] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:152的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-30的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0457] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:153的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-31的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0458] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:154的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-32的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0459] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:155的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实

施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-33的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0460] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含含有VH框架区的VH结构域,所述VH框架区与SEQ ID NO:156的框架区的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性,其中所述抗体免疫特异性地结合到MSLN。在具体实施例中,此抗体包含与抗体抗MSLN-34的CDR(例如VH CDR 1-3)相同的CDR(例如VH CDR 1-3)。

[0461] 人源化单结构域抗体

[0462] 本文所述的单结构域抗体可以包括人源化单结构域抗体。

[0463] 可以使用本领域中已知的多种技术产生人源化抗体,所述多种技术包括但不限于CDR移植(欧洲专利第EP 239,400号;国际专利公开第WO 91/09967号;以及美国专利第5,225,539号、第5,530,101号和第5,585,089号)、镶饰或重塑(欧洲专利第EP 592,106号和第EP 519,596号;Padlan,1991,《分子免疫学(Molecular Immunology)》28(4/5):489-498;Studnicka等人,1994,《蛋白质工程(Protein Engineering)》7(6):805-814;和Roguska等人,1994,PNAS 91:969-973)、链改组(美国专利第5,565,332号)和在以下文献中公开的技术:例如美国专利第6,407,213号;美国专利第5,766,886号;WO 9317105;Tan等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》169:111925(2002);Caldas等人,《蛋白质工程(Protein Eng.)》13(5):353-60(2000);Morea等人,《方法(Methods)》20(3):26779(2000);Baca等人,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》272(16):10678-84(1997);Roguska等人,《蛋白质工程》9(10):895904(1996);Couto等人,《癌症研究(Cancer Res.)》55(增刊23):5973页-5977页(1995);Couto等人,《癌症研究》55(8):1717-22(1995);Sandhu JS,《基因(Gene)》150(2):409-10(1994);以及Pedersen等人,《分子生物学杂志》235(3):959-73(1994)。还参见美国专利公开号第US2005/0042664 A1号(2005年2月24日),上述各文献均以全文引用的方式并入本文中。

[0464] 在一些实施例中,本文所提供的抗体可以是结合MSLN的人源化抗体,所述MSLN包括人类MSLN。例如,本公开的人源化抗体可以包含如表4和表10中所示的一个或多个CDR。用于人源化非人类抗体的各种方法在本领域中是已知的。例如,人源化抗体可以具有一种或多种从非人类来源引入的氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基常常被称为“输入(import)”残基,这些残基通常是从“输入”可变结构域获取。人源化可以例如遵循以下的方法通过用高变区序列取代人类抗体的相应序列来进行:Jones等人,1986,《自然(Nature)》321:522-25;Riechmann等人,1988,《自然》332:323-27;以及Verhoeyen等人,1988,《科学(Science)》239:1534-36)。

[0465] 在一些情况下,人源化抗体通过CDR移植构建,其中亲本非人类抗体的CDR的氨基酸序列被移植到人类抗体框架上。例如,Padlan等人确定CDR中的仅约三分之一的残基实际上接触抗原,并且这些残基被称为“特异性确定残基”或SDR(Padlan等人,1995,《美国实验生物学学会联合会杂志(FASEB J.)》9:133-39)。在SDR移植技术中,仅将SDR残基移植到人类抗体框架上(参见例如Kashmiri等人,2005,《方法》36:25-34)。

[0466] 选择待用于制造人源化抗体的人类可变结构域的对于降低抗原性很重要。例如,根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知人类可变结构域序列的整个库来筛选非人类抗体的可变结构域的序列。最接近非人类抗体的人类序列可以选择为人源化抗体的人类框架

(Sims等人,1993,《免疫学杂志》151:2296-308;以及Chothia等人,1987,《分子生物学杂志》196:901-17)。另一种方法使用一种特定的框架,该框架来源于轻或重链的具体子群的所有人类抗体的共同序列。相同构架可以用于数种不同人源化抗体(Carter等人,1992,《美国国家科学院院刊》,89:4285-89;以及Presta等人,1993,《免疫学杂志》151:2623-32)。在一些情况下,框架来源于最充足的人类亚类、 V_L6 子群I(V_L6I)和 V_H 子群III(V_HIII)的共同序列。在另一种方法中,人类生殖系基因用作框架区的来源。

[0467] 在另一个基于称为超人源化的CDR比较的范例中,FR同源性是不相关的。该方法包括将非人类序列与人类生殖系基因库进行比较。随后选择编码与鼠类序列相同或紧密相关的典型结构的那些基因。接着,在与非人类抗体共享典型结构的基因内,将CDR内具有最高同源性的基因选择为FR供体。最后,将非人类CDR移植到这些FR上(参见例如Tan等人,2002,《免疫学杂志》169:1119-25)。

[0468] 此外通常需要将抗体人源化,保留所述抗体对抗原的亲和其它有利生物特性。为了实现这个目标,根据一种方法,人源化抗体是通过分析亲本序列和各种概念化的人源化产品,利用亲本和人源化序列的三维模型制备的。三维免疫球蛋白模型通常是可用的并且是本领域的技术人员熟悉的。计算机程序可阐明和显示所选候选免疫球蛋白序列可能的三维构象结构。这些计算机程序包括例如,WAM(Whitelegg和Rees,2000,《蛋白质工程》13:819-24)、Modeller(Sali和Blundell,1993,《分子生物学杂志》234:779-815)和瑞士PDB观察器(Swiss PDB Viewer)(Guex和Peitsch,1997,《电泳(Electrophoresis)》18:2714-23)。通过检查这些显示器可以分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。通过这种方式,可以从接受和输入序列选择FR残基并且将其组合,从而获得所需抗体特性,如增加针对(一种或多种)靶抗原的亲合力。一般来说,高变区残基直接并且主要涉及影响抗原结合。

[0469] 抗体人源化的另一种方法是基于称为人类链带含量(HSC)的抗体人类性的度量。该方法将小鼠序列与人类生殖系基因库进行比较,并且将差异记分为HSC。随后通过使靶序列的HSC最大化而非使用全局身份量度来使靶序列人源化,以产生多个不同的人源化变体(Lazar等人,2007,《分子免疫学(Mol. Immunol.)》44:1986-98)。

[0470] 除上文所述的方法以外,经验方法还可以用于产生和选择人源化抗体。这些方法包括基于人源化变体的大型库的产生和使用富集技术或高通量筛选技术选择最佳克隆的方法。抗体变体可以从噬菌体、核糖体和酵母展示库以及通过细菌菌落筛选而分离(参见例如Hoogenboom,2005,《自然生物技术(Nat. Biotechnol.)》23:1105-16;Dufner等人,2006,《生物技术趋势(Trends Biotechnol.)》24:523-29;Feldhaus等人,2003,《自然生物技术》21:163-70;以及Schlappschy等人,2004,《蛋白质工程设计及选择(Protein Eng. Des. Sel.)》17:847-60)。

[0471] 在FR库法中,将残基变体的集合引入到FR中的特定位置,接着筛选库,以选择最能支持移植CDR的FR。待取代的残基可以包括被识别为潜在地促进CDR结构的“维尼尔(Vernier)”残基中的一些或全部(参见例如Foote和Winter,1992,《分子生物学杂志》224:487-99),或来自由Baca等人识别的更有限的靶残基集合(1997,《生物化学杂志》272:10678-84)。

[0472] 在FR改组中,整个FR与非人类CDR组合,而不是创建所选择的残基变体的组合库

(参见例如Da11'Acqua等人,2005,《方法》36:43-60)。可以使用单步FR改组过程。此类方法已经被证明是有效的,因为所得抗体显现出更好的生物化学和物理化学特性,包括增强的表达、增加的亲和力和热稳定性(参见例如Damschroder等人,2007,《分子免疫学》44:3049-60)。

[0473] “人类性(humaneering)”方法是基于基本最小特异性决定子(MSD)的实验识别,并基于将非人类片段依序替换为人类FR库以及评估结合。此方法通常引起表位保留,并识别来自具有不同人类V-片段CDR的多个亚类的抗体。

[0474] “人体工程学”方法涉及通过对抗体的氨基酸序列作出特定改变来改变非人类抗体或抗体片段,以便在仍保持原始非人类抗体的所需结合特性的人类中,产生具有降低的免疫原性的经修饰抗体。一般来说,该技术涉及将非人类抗体的氨基酸残基分类为“低风险”残基、“中等风险”残基或“高风险”残基。使用全局风险/奖励计算来进行分类,所述全局风险/奖励计算评估了进行特定替代的预期收益(例如在人体中的免疫原性),以及替代将影响产生的抗体折叠的风险。可以通过将来自非人类抗体的可变区的氨基酸序列与特定或共同人类抗体序列的对应区进行比对,来选择在非人类抗体序列的给定位置处(例如,低或中度风险)的待取代的特定人类氨基酸残基。根据比对结果,可将非人类序列的低或中等风险位置处的氨基酸残基取代之为人类抗体序列中的对应残基。用于制造人类工程改造蛋白质的技术更详细地描述于:Studnicka等人,1994,《蛋白质工程》7:805-14;美国专利第5,766,886号;第5,770,196号;第5,821,123号;和第5,869,619号;以及PCT专利公开WO 93/11794。

[0475] 复合人类抗体可以使用例如Composite Human Antibody™技术产生(英国剑桥Antitope有限公司)。为了产生复合人类抗体,以避免T细胞表位的方式由多个人类抗体可变区序列的片段设计可变区序列,从而使所得抗体的免疫原性降到最低。

[0476] 去免疫抗体是其中已去除T细胞表位的抗体。用于制造去免疫抗体的方法已有描述。参见例如Jones等人,《分子生物学方法(Methods Mol Biol.))》2009;525:405-23,xiv,和De Groot等人,《分子免疫学》244:148-153(2006)。去免疫抗体包含缺乏T细胞表位的可变区和人类恒定区。简单来说,克隆抗体的可变区,并且随后通过测试在T细胞增殖分析中来源于抗体的可变区的重叠肽来识别T细胞表位。经由电脑模拟(in silico)方法识别T细胞表位以识别结合到人类MHC II类的肽。在可变区中引入突变以消除与人类MHC II类的结合。随后利用经突变的可变区以产生去免疫抗体。

[0477] 在一个具体实施例中,本文所提供的单结构域抗体为根据下文实例3中所述的方法产生的人源化单结构域抗体。在一些实施例中,本文所提供的单结构域抗体为包含下文实例3中的表11中列出的一个或多个FR序列的人源化单结构域抗体。

[0478] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-1的一个或多个FR序列。

[0479] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:157的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:158的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:159的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:157的FR1和SEQ ID NO:158的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:157的FR1和SEQ ID NO:159的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:157的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:158的FR2和SEQ ID NO:159的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:158的FR2和SEQ ID NO:160

的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:159的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:157的FR1、SEQ ID NO:158的FR2和SEQ ID NO:159的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:157的FR1、SEQ ID NO:158的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:157的FR1、SEQ ID NO:159的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:158的FR2、SEQ ID NO:159的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:157的FR1、SEQ ID NO:158的FR2、SEQ ID NO:159的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0480] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:12的CDR1、SEQ ID NO:13的CDR2、SEQ ID NO:14的CDR3、SEQ ID NO:157的FR1、SEQ ID NO:158的FR2、SEQ ID NO:159的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0481] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-2的一个或多个FR序列。

[0482] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:161的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:162的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:163的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:161的FR1和SEQ ID NO:162的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:161的FR1和SEQ ID NO:163的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:161的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:162的FR2和SEQ ID NO:163的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:162的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:163的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:161的FR1、SEQ ID NO:162的FR2和SEQ ID NO:163的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:161的FR1、SEQ ID NO:162的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:161的FR1、SEQ ID NO:163的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:161的FR1、SEQ ID NO:162的FR2、SEQ ID NO:163的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0483] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:15的CDR1、SEQ ID NO:16的CDR2、SEQ ID NO:17的CDR3、SEQ ID NO:161的FR1、SEQ ID NO:162的FR2、SEQ ID NO:163的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0484] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-3的一个或多个FR序列。

[0485] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:164的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:165的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:166的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:164的FR1和SEQ ID NO:165的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:164的FR1和SEQ ID NO:166的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:164的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:165的FR2和SEQ ID NO:166的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:165的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:166的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:164的FR1、SEQ ID NO:165的FR2和SEQ ID NO:166的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:164的FR1、SEQ ID NO:165的FR2和

SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:164的FR1、SEQ ID NO:166的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:165的FR2、SEQ ID NO:166的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:164的FR1、SEQ ID NO:165的FR2、SEQ ID NO:166的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0486] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:18的CDR1、SEQ ID NO:19的CDR2、SEQ ID NO:20的CDR3、SEQ ID NO:164的FR1、SEQ ID NO:165的FR2、SEQ ID NO:166的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0487] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-4的一个或多个FR序列。

[0488] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:167的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:168的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:169的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:167的FR1和SEQ ID NO:168的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:167的FR1和SEQ ID NO:169的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:167的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:168的FR2和SEQ ID NO:169的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:168的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:169的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:167的FR1、SEQ ID NO:168的FR2和SEQ ID NO:169的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:167的FR1、SEQ ID NO:168的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:167的FR1、SEQ ID NO:169的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:167的FR1、SEQ ID NO:168的FR2、SEQ ID NO:169的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0489] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:21的CDR1、SEQ ID NO:22的CDR2、SEQ ID NO:23的CDR3、SEQ ID NO:167的FR1、SEQ ID NO:168的FR2、SEQ ID NO:169的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0490] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-5的一个或多个FR序列。

[0491] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:170的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:171的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:172的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:170的FR1和SEQ ID NO:171的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:170的FR1和SEQ ID NO:172的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:170的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:171的FR2和SEQ ID NO:172的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:171的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:172的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:170的FR1、SEQ ID NO:171的FR2和SEQ ID NO:172的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:170的FR1、SEQ ID NO:171的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:170的FR1、SEQ ID NO:172的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ

ID NO:170的FR1、SEQ ID NO:171的FR2、SEQ ID NO:172的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0492] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:24的CDR1、SEQ ID NO:25的CDR2、SEQ ID NO:26的CDR3、SEQ ID NO:170的FR1、SEQ ID NO:171的FR2、SEQ ID NO:172的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0493] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-6的一个或多个FR序列。

[0494] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:173的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:174的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:175的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:173的FR1和SEQ ID NO:174的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:173的FR1和SEQ ID NO:175的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:173的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:174的FR2和SEQ ID NO:175的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:174的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:175的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:173的FR1、SEQ ID NO:174的FR2和SEQ ID NO:175的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:173的FR1、SEQ ID NO:174的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:173的FR1、SEQ ID NO:175的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:173的FR1、SEQ ID NO:174的FR2、SEQ ID NO:175的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0495] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:27的CDR1、SEQ ID NO:28的CDR2、SEQ ID NO:29的CDR3、SEQ ID NO:173的FR1、SEQ ID NO:174的FR2、SEQ ID NO:175的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0496] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-7的一个或多个FR序列。

[0497] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:176的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:177的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:178的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:176的FR1和SEQ ID NO:177的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:176的FR1和SEQ ID NO:178的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:176的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:177的FR2和SEQ ID NO:178的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:177的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:178的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:176的FR1、SEQ ID NO:177的FR2和SEQ ID NO:178的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:176的FR1、SEQ ID NO:177的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:176的FR1、SEQ ID NO:178的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:176的FR1、SEQ ID NO:177的FR2、SEQ ID NO:178的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0498] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:30的CDR1、SEQ ID NO:31的CDR2、SEQ ID NO:32的CDR3、SEQ ID NO:176的FR1、SEQ ID NO:177的FR2、SEQ ID NO:178的

FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0499] 在一些实施例中, sdAb具有人源化抗MSLN-8的一个或多个FR序列。

[0500] 在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:179的FR1。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:180的FR2。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:181的FR3。在其它实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:179的FR1和SEQ ID NO:180的FR2。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:179的FR1和SEQ ID NO:181的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:179的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:180的FR2和SEQ ID NO:181的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:180的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:181的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:179的FR1、SEQ ID NO:180的FR2和SEQ ID NO:181的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:179的FR1、SEQ ID NO:180的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:179的FR1、SEQ ID NO:181的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:180的FR2、SEQ ID NO:181的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在具体实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:179的FR1、SEQ ID NO:180的FR2、SEQ ID NO:181的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0501] 在一个具体实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:33的CDR1、SEQ ID NO:34的CDR2、SEQ ID NO:35的CDR3、SEQ ID NO:179的FR1、SEQ ID NO:180的FR2、SEQ ID NO:181的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0502] 在一些实施例中, sdAb具有人源化抗MSLN-9的一个或多个FR序列。

[0503] 在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:182的FR1。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:183的FR2。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:184的FR3。在其它实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:182的FR1和SEQ ID NO:183的FR2。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:182的FR1和SEQ ID NO:184的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:182的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:183的FR2和SEQ ID NO:184的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:183的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:184的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:182的FR1、SEQ ID NO:183的FR2和SEQ ID NO:184的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:182的FR1、SEQ ID NO:183的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:182的FR1、SEQ ID NO:184的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:182的FR1、SEQ ID NO:183的FR2、SEQ ID NO:184的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0504] 在一个具体实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:36的CDR1、SEQ ID NO:37的CDR2、SEQ ID NO:38的CDR3、SEQ ID NO:182的FR1、SEQ ID NO:183的FR2、SEQ ID NO:184的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0505] 在一些实施例中, sdAb具有人源化抗MSLN-10的一个或多个FR序列。

[0506] 在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:185的FR1。在一些实施例中, 人源化

sdAb具有SEQ ID NO:186的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:187的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:185的FR1和SEQ ID NO:186的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:185的FR1和SEQ ID NO:187的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:185的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:186的FR2和SEQ ID NO:187的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:186的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:187的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:185的FR1、SEQ ID NO:186的FR2和SEQ ID NO:187的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:185的FR1、SEQ ID NO:186的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:185的FR1、SEQ ID NO:187的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:186的FR2、SEQ ID NO:187的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:185的FR1、SEQ ID NO:186的FR2、SEQ ID NO:187的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0507] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:39的CDR1、SEQ ID NO:40的CDR2、SEQ ID NO:41的CDR3、SEQ ID NO:185的FR1、SEQ ID NO:186的FR2、SEQ ID NO:187的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0508] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-11的一个或多个FR序列。

[0509] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:188的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:189的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:190的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:188的FR1和SEQ ID NO:189的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:188的FR1和SEQ ID NO:190的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:188的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:189的FR2和SEQ ID NO:190的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:189的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:190的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:188的FR1、SEQ ID NO:189的FR2和SEQ ID NO:190的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:188的FR1、SEQ ID NO:189的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:188的FR1、SEQ ID NO:190的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:189的FR2、SEQ ID NO:190的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:188的FR1、SEQ ID NO:189的FR2、SEQ ID NO:190的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0510] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:42的CDR1、SEQ ID NO:43的CDR2、SEQ ID NO:44的CDR3、SEQ ID NO:188的FR1、SEQ ID NO:189的FR2、SEQ ID NO:190的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0511] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-12的一个或多个FR序列。

[0512] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:191的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:192的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:193的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:191的FR1和SEQ ID NO:192的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID

NO:191的FR1和SEQ ID NO:193的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:191的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:192的FR2和SEQ ID NO:193的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:192的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:193的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:191的FR1、SEQ ID NO:192的FR2和SEQ ID NO:193的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:191的FR1、SEQ ID NO:192的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:191的FR1、SEQ ID NO:193的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:192的FR2、SEQ ID NO:193的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:191的FR1、SEQ ID NO:192的FR2、SEQ ID NO:193的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0513] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:45的CDR1、SEQ ID NO:46的CDR2、SEQ ID NO:47的CDR3、SEQ ID NO:191的FR1、SEQ ID NO:192的FR2、SEQ ID NO:193的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0514] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-13的一个或多个FR序列。

[0515] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:194的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:195的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:196的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:194的FR1和SEQ ID NO:195的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:194的FR1和SEQ ID NO:196的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:194的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:195的FR2和SEQ ID NO:196的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:195的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:196的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:194的FR1、SEQ ID NO:195的FR2和SEQ ID NO:196的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:194的FR1、SEQ ID NO:195的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:194的FR1、SEQ ID NO:196的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:195的FR2、SEQ ID NO:196的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:194的FR1、SEQ ID NO:195的FR2、SEQ ID NO:196的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0516] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:48的CDR1、SEQ ID NO:49的CDR2、SEQ ID NO:50的CDR3、SEQ ID NO:194的FR1、SEQ ID NO:195的FR2、SEQ ID NO:196的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0517] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-14的一个或多个FR序列。

[0518] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:197的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:198的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:199的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:197的FR1和SEQ ID NO:198的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:197的FR1和SEQ ID NO:199的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:197的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:198的FR2和SEQ ID NO:199的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:198的FR2和SEQ ID NO:160

的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:199的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:197的FR1、SEQ ID NO:198的FR2和SEQ ID NO:199的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:197的FR1、SEQ ID NO:198的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:197的FR1、SEQ ID NO:199的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:198的FR2、SEQ ID NO:199的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:197的FR1、SEQ ID NO:198的FR2、SEQ ID NO:199的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0519] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:51的CDR1、SEQ ID NO:52的CDR2、SEQ ID NO:53的CDR3、SEQ ID NO:197的FR1、SEQ ID NO:198的FR2、SEQ ID NO:199的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0520] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-15的一个或多个FR序列。

[0521] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:200的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:201的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:202的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:200的FR1和SEQ ID NO:201的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:200的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:201的FR2和SEQ ID NO:202的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:201的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:202的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:200的FR1、SEQ ID NO:201的FR2和SEQ ID NO:202的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:200的FR1、SEQ ID NO:201的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:200的FR1、SEQ ID NO:202的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:200的FR1、SEQ ID NO:201的FR2、SEQ ID NO:202的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0522] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:54的CDR1、SEQ ID NO:55的CDR2、SEQ ID NO:56的CDR3、SEQ ID NO:200的FR1、SEQ ID NO:201的FR2、SEQ ID NO:202的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0523] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-16的一个或多个FR序列。

[0524] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:203的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:204的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:205的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:203的FR1和SEQ ID NO:204的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:203的FR1和SEQ ID NO:205的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:203的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:204的FR2和SEQ ID NO:205的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:204的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:205的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:203的FR1、SEQ ID NO:204的FR2和SEQ ID NO:205的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:203的FR1、SEQ ID NO:204的FR2和

SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:203的FR1、SEQ ID NO:205的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:204的FR2、SEQ ID NO:205的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:203的FR1、SEQ ID NO:204的FR2、SEQ ID NO:205的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0525] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:57的CDR1、SEQ ID NO:58的CDR2、SEQ ID NO:59的CDR3、SEQ ID NO:203的FR1、SEQ ID NO:204的FR2、SEQ ID NO:205的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0526] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-17的一个或多个FR序列。

[0527] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:206的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:207的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:208的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:206的FR1和SEQ ID NO:207的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:206的FR1和SEQ ID NO:208的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:206的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:207的FR2和SEQ ID NO:208的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:207的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:208的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:206的FR1、SEQ ID NO:207的FR2和SEQ ID NO:208的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:206的FR1、SEQ ID NO:207的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:206的FR1、SEQ ID NO:208的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:207的FR2、SEQ ID NO:208的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:206的FR1、SEQ ID NO:207的FR2、SEQ ID NO:208的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0528] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:60的CDR1、SEQ ID NO:61的CDR2、SEQ ID NO:62的CDR3、SEQ ID NO:206的FR1、SEQ ID NO:207的FR2、SEQ ID NO:208的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0529] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-18的一个或多个FR序列。

[0530] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:209的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:210的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:211的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:209的FR1和SEQ ID NO:210的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:209的FR1和SEQ ID NO:211的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:209的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:210的FR2和SEQ ID NO:211的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:210的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:211的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:209的FR1、SEQ ID NO:210的FR2和SEQ ID NO:211的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:209的FR1、SEQ ID NO:210的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:209的FR1、SEQ ID NO:211的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:210的FR2、SEQ ID NO:211的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ

ID NO:209的FR1、SEQ IDNO:210的FR2、SEQ ID NO:211的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0531] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:63的CDR1、SEQ ID NO:64的CDR2、SEQ ID NO:65的CDR3、SEQ ID NO:209的FR1、SEQ ID NO:210的FR2、SEQ ID NO:211的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0532] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-19的一个或多个FR序列。

[0533] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:212的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:213的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:214的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:212的FR1和SEQ ID NO:213的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:212的FR1和SEQ ID NO:214的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:212的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:213的FR2和SEQ ID NO:214的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:213的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:214的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:212的FR1、SEQ ID NO:213的FR2和SEQ ID NO:214的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:212的FR1、SEQ ID NO:213的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:212的FR1、SEQ ID NO:214的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:213的FR2、SEQ ID NO:214的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:212的FR1、SEQ ID NO:213的FR2、SEQ ID NO:214的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0534] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:75的CDR1、SEQ ID NO:76的CDR2、SEQ ID NO:77的CDR3、SEQ ID NO:212的FR1、SEQ ID NO:213的FR2、SEQ ID NO:214的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0535] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-20的一个或多个FR序列。

[0536] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:215的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:216的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:217的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:215的FR1和SEQ ID NO:216的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:215的FR1和SEQ ID NO:217的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:215的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:216的FR2和SEQ ID NO:217的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:216的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:217的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:215的FR1、SEQ ID NO:216的FR2和SEQ ID NO:217的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:215的FR1、SEQ ID NO:216的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:215的FR1、SEQ ID NO:217的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:216的FR2、SEQ ID NO:217的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:215的FR1、SEQ ID NO:216的FR2、SEQ ID NO:217的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0537] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:78的CDR1、SEQ ID NO:79的CDR2、SEQ ID NO:80的CDR3、SEQ ID NO:215的FR1、SEQ ID NO:216的FR2、SEQ ID NO:217的

FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0538] 在一些实施例中, sdAb具有人源化抗MSLN-21的一个或多个FR序列。

[0539] 在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:218的FR1。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:219的FR2。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:220的FR3。在其它实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:218的FR1和SEQ ID NO:219的FR2。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:218的FR1和SEQ ID NO:220的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:218的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:219的FR2和SEQ ID NO:220的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:219的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:220的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:218的FR1、SEQ ID NO:219的FR2和SEQ ID NO:220的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:218的FR1、SEQ ID NO:219的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:218的FR1、SEQ ID NO:220的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:218的FR1、SEQ ID NO:219的FR2、SEQ ID NO:220的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0540] 在一个具体实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:81的CDR1、SEQ ID NO:82的CDR2、SEQ ID NO:83的CDR3、SEQ ID NO:218的FR1、SEQ ID NO:219的FR2、SEQ ID NO:220的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0541] 在一些实施例中, sdAb具有人源化抗MSLN-22的一个或多个FR序列。

[0542] 在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:221的FR1。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:222的FR2。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:223的FR3。在其它实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:221的FR1和SEQ ID NO:222的FR2。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:221的FR1和SEQ ID NO:223的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:221的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:222的FR2和SEQ ID NO:223的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:222的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:223的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:221的FR1、SEQ ID NO:222的FR2和SEQ ID NO:223的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:221的FR1、SEQ ID NO:222的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:221的FR1、SEQ ID NO:223的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:221的FR1、SEQ ID NO:222的FR2、SEQ ID NO:223的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0543] 在一个具体实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:84的CDR1、SEQ ID NO:85的CDR2、SEQ ID NO:86的CDR3、SEQ ID NO:221的FR1、SEQ ID NO:222的FR2、SEQ ID NO:223的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0544] 在一些实施例中, sdAb具有人源化抗MSLN-23的一个或多个FR序列。

[0545] 在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:224的FR1。在一些实施例中, 人源化

sdAb具有SEQ ID NO:225的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:226的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:224的FR1和SEQ ID NO:225的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:224的FR1和SEQ ID NO:226的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:224的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:225的FR2和SEQ ID NO:226的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:225的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:226的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:224的FR1、SEQ ID NO:225的FR2和SEQ ID NO:226的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:224的FR1、SEQ ID NO:225的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:224的FR1、SEQ ID NO:226的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:225的FR2、SEQ ID NO:226的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:224的FR1、SEQ ID NO:225的FR2、SEQ ID NO:226的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0546] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:87的CDR1、SEQ ID NO:88的CDR2、SEQ ID NO:89的CDR3、SEQ ID NO:224的FR1、SEQ ID NO:225的FR2、SEQ ID NO:226的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0547] 在一些实施例中,sdAb具有人源化抗MSLN-24的一个或多个FR序列。

[0548] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:227的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:228的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:229的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:227的FR1和SEQ ID NO:228的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:227的FR1和SEQ ID NO:229的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:227的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:228的FR2和SEQ ID NO:229的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:228的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:229的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:227的FR1、SEQ ID NO:228的FR2和SEQ ID NO:229的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:227的FR1、SEQ ID NO:228的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:227的FR1、SEQ ID NO:229的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:228的FR2、SEQ ID NO:229的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:227的FR1、SEQ ID NO:228的FR2、SEQ ID NO:229的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0549] 在一个具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:90的CDR1、SEQ ID NO:91的CDR2、SEQ ID NO:92的CDR3、SEQ ID NO:227的FR1、SEQ ID NO:228的FR2、SEQ ID NO:229的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0550] 在一些实施例中,sdAb具有一个或多个人源化抗MSLN-25的FR序列。

[0551] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:230的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:231的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:232的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:230的FR1和SEQ ID NO:231的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID

NO:230的FR1和SEQ ID NO:232的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:230的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:231的FR2和SEQ ID NO:232的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:231的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:232的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:230的FR1、SEQ ID NO:231的FR2和SEQ ID NO:232的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:230的FR1、SEQ ID NO:231的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:230的FR1、SEQ ID NO:232的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:231的FR2、SEQ ID NO:232的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:230的FR1、SEQ ID NO:231的FR2、SEQ ID NO:232的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0552] 在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:93的CDR1、SEQ ID NO:94的CDR2、SEQ ID NO:95的CDR3、SEQ ID NO:230的FR1、SEQ ID NO:231的FR2、SEQ ID NO:232的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0553] 在一些实施例中,sdAb具有一或多个人源化抗MSLN-26的FR序列。

[0554] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:233的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:234的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:235的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:233的FR1和SEQ ID NO:234的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:233的FR1和SEQ ID NO:235的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:233的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:234的FR2和SEQ ID NO:235的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:234的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:235的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:233的FR1、SEQ ID NO:234的FR2和SEQ ID NO:235的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:233的FR1、SEQ ID NO:234的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:233的FR1、SEQ ID NO:235的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:234的FR2、SEQ ID NO:235的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:233的FR1、SEQ ID NO:234的FR2、SEQ ID NO:235的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0555] 在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:96的CDR1、SEQ ID NO:97的CDR2、SEQ ID NO:98的CDR3、SEQ ID NO:233的FR1、SEQ ID NO:234的FR2、SEQ ID NO:235的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0556] 在一些实施例中,sdAb具有一个或多个人源化抗MSLN-27的FR序列。

[0557] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:236的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:237的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:238的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:236的FR1和SEQ ID NO:237的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:236的FR1和SEQ ID NO:238的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:236的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:237的FR2和SEQ ID NO:238的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:237的FR2和SEQ ID NO:160

的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:238的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:236的FR1、SEQ ID NO:237的FR2和SEQ ID NO:238的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:236的FR1、SEQ ID NO:237的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:236的FR1、SEQ ID NO:238的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:237的FR2、SEQ ID NO:238的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:236的FR1、SEQ ID NO:237的FR2、SEQ ID NO:238的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0558] 在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:99的CDR1、SEQ ID NO:100的CDR2、SEQ ID NO:101的CDR3、SEQ ID NO:236的FR1、SEQ ID NO:237的FR2、SEQ ID NO:238的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0559] 在一些实施例中,sdAb具有一个或多个个人源化抗MSLN-28的FR序列。

[0560] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:239的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:240的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:241的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:239的FR1和SEQ ID NO:240的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:239的FR1和SEQ ID NO:241的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:239的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:240的FR2和SEQ ID NO:241的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:240的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:241的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:239的FR1、SEQ ID NO:240的FR2和SEQ ID NO:241的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:239的FR1、SEQ ID NO:240的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:239的FR1、SEQ ID NO:241的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:239的FR1、SEQ ID NO:240的FR2、SEQ ID NO:241的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0561] 在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:102的CDR1、SEQ ID NO:103的CDR2、SEQ ID NO:104的CDR3、SEQ ID NO:239的FR1、SEQ ID NO:240的FR2、SEQ ID NO:241的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0562] 在一些实施例中,sdAb具有一个或多个个人源化抗MSLN-29的FR序列。

[0563] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:242的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:243的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:244的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:242的FR1和SEQ ID NO:243的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:242的FR1和SEQ ID NO:244的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:242的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:243的FR2和SEQ ID NO:244的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:243的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:244的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:242的FR1、SEQ ID NO:243的FR2和SEQ ID NO:244的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:242的FR1、SEQ ID NO:243的FR2和

SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:242的FR1、SEQ ID NO:244的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:243的FR2、SEQ ID NO:244的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:242的FR1、SEQ ID NO:243的FR2、SEQ ID NO:244的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0564] 在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:105的CDR1、SEQ ID NO:106的CDR2、SEQ ID NO:107的CDR3、SEQ ID NO:242的FR1、SEQ ID NO:243的FR2、SEQ ID NO:244的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0565] 在一些实施例中,sdAb具有一或多个人源化抗MSLN-30的FR序列。

[0566] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:245的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:246的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:247的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:245的FR1和SEQ ID NO:246的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:245的FR1和SEQ ID NO:247的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:245的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:246的FR2和SEQ ID NO:247的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:246的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:247的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:245的FR1、SEQ ID NO:246的FR2和SEQ ID NO:247的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:245的FR1、SEQ ID NO:246的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:245的FR1、SEQ ID NO:247的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:246的FR2、SEQ ID NO:247的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:245的FR1、SEQ ID NO:246的FR2、SEQ ID NO:247的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0567] 在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:108的CDR1、SEQ ID NO:109的CDR2、SEQ ID NO:110的CDR3、SEQ ID NO:245的FR1、SEQ ID NO:246的FR2、SEQ ID NO:247的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0568] 在一些实施例中,sdAb具有一个或多个人源化抗MSLN-31的FR序列。

[0569] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:248的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:249的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:250的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:248的FR1和SEQ ID NO:249的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:248的FR1和SEQ ID NO:250的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:248的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:249的FR2和SEQ ID NO:250的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:249的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:250的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:248的FR1、SEQ ID NO:249的FR2和SEQ ID NO:250的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:248的FR1、SEQ ID NO:249的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:248的FR1、SEQ ID NO:250的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:249的FR2、SEQ ID NO:250的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID

NO:248的FR1、SEQ ID NO:249的FR2、SEQ ID NO:250的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0570] 在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:111的CDR1、SEQ ID NO:112的CDR2、SEQ ID NO:113的CDR3、SEQ ID NO:248的FR1、SEQ ID NO:249的FR2、SEQ ID NO:250的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0571] 在一些实施例中,sdAb具有一个或多个人源化抗MSLN-32的FR序列。

[0572] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:251的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:252的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:253的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:251的FR1和SEQ ID NO:252的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:251的FR1和SEQ ID NO:253的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:251的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:252的FR2和SEQ ID NO:253的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:252的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:253的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:251的FR1、SEQ ID NO:252的FR2和SEQ ID NO:253的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:251的FR1、SEQ ID NO:252的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:251的FR1、SEQ ID NO:253的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:252的FR2、SEQ ID NO:253的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:251的FR1、SEQ ID NO:252的FR2、SEQ ID NO:253的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0573] 在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:114的CDR1、SEQ ID NO:115的CDR2、SEQ ID NO:116的CDR3、SEQ ID NO:251的FR1、SEQ ID NO:252的FR2、SEQ ID NO:253的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0574] 在一些实施例中,sdAb具有一个或多个人源化抗MSLN-33的FR序列。

[0575] 在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:254的FR1。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:255的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:256的FR3。在其它实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:254的FR1和SEQ ID NO:255的FR2。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:254的FR1和SEQ ID NO:256的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:254的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:255的FR2和SEQ ID NO:256的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:255的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:256的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:254的FR1、SEQ ID NO:255的FR2和SEQ ID NO:256的FR3。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:254的FR1、SEQ ID NO:255的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:254的FR1、SEQ ID NO:256的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:255的FR2、SEQ ID NO:256的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:254的FR1、SEQ ID NO:255的FR2、SEQ ID NO:256的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0576] 在具体实施例中,人源化sdAb具有SEQ ID NO:117的CDR1、SEQ ID NO:118的CDR2、SEQ ID NO:119的CDR3、SEQ ID NO:254的FR1、SEQ ID NO:255的FR2、SEQ ID NO:256的FR3

和SEQ ID NO:160的FR4。

[0577] 在一些实施例中, sdAb具有一个或多个个人源化抗MSLN-34的FR序列。

[0578] 在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:257的FR1。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:258的FR2。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:259的FR3。在其它实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:257的FR1和SEQ ID NO:258的FR2。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:257的FR1和SEQ ID NO:259的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:257的FR1和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:258的FR2和SEQ ID NO:259的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:258的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:259的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:257的FR1、SEQ ID NO:258的FR2和SEQ ID NO:259的FR3。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:257的FR1、SEQ ID NO:258的FR2和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:257的FR1、SEQ ID NO:259的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在一些实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:258的FR2、SEQ ID NO:259的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。在具体实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:257的FR1、SEQ ID NO:258的FR2、SEQ ID NO:259的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0579] 在具体实施例中, 人源化sdAb具有SEQ ID NO:120的CDR1、SEQ ID NO:121的CDR2、SEQ ID NO:122的CDR3、SEQ ID NO:257的FR1、SEQ ID NO:258的FR2、SEQ ID NO:259的FR3和SEQ ID NO:160的FR4。

[0580] 在一些实施例中, 人源化sdAb以0.01-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 人源化sdAb以0.1-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 人源化sdAb以1-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中, 人源化sdAb以1-90nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中, 人源化sdAb以1-80nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中, 人源化sdAb以1-70nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 人源化sdAb以1-60nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 人源化sdAb以1-50nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 人源化sdAb以1-40nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 人源化sdAb以1-30nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 人源化sdAb以1-20nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 人源化sdAb以1-10nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 人源化sdAb以0.1-1nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 人源化sdAb以0.01-1nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 人源化sdAb以0.01-0.1nM之间的 K_D 结合到MSLN。

[0581] 在一些实施例中, 结合到癌症抗原的结合分子包含多个人源化sdAb, 例如结合到通过接头连接的MSLN的两个sdAb。

[0582] 在一些实施例中, 两个人源化sdAb中的每一者以0.01-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 两个人源化sdAb中的每一者以0.1-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 两个人源化sdAb中的每一者以1-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 两个人源化sdAb中的每一者以1-90nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 两个人源化sdAb中的每一者以1-80nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 两个人源化sdAb中的每一者以1-70nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中, 两个人源化sdAb中的每一者以1-60nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中, 两个人源化sdAb中的每一者以1-50nM之间的 K_D

结合到MSLN。在其它实施例中,两个人源化sdAb中的每一者以1-40nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中,两个人源化sdAb中的每一者以1-30nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中,两个人源化sdAb中的每一者以1-20nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中,两个人源化sdAb中的每一者以1-10nM之间的 K_D 结合到MSLN。在其它实施例中,两个人源化sdAb中的每一者以0.1-1nM之间的 K_D 结合到MSLN。在一些实施例中,两个人源化sdAb中的每一者以0.01-0.1nM之间的 K_D 结合到MSLN。

[0583] 单结构域抗体变体

[0584] 在一些实施例中,涵盖结合到本文所描述的MSLN的单结构域抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能需要优化抗体的结合亲和力和/或其它生物特性,包括但不限于特异性、热稳定性、表达水平、效应功能、糖基化、降低的免疫原性或可溶性。因此,除本文所描述的抗MSLN抗体以外,预期可以制备抗MSLN抗体变体。例如,抗MSLN抗体变体可以通过将适当核苷酸变化引入到编码DNA中和/或通过合成所需抗体或多肽来制备。本领域技术人员了解,氨基酸变化可改变抗MSLN抗体的翻译后过程,如改变糖基化位点的数目或位置或改变膜锚定特征。

[0585] 在一些实施例中,本文提供的单结构域抗体经化学修饰,例如通过将任何类型的分子共价附接到抗体。抗体衍生物可以包括已经化学修饰的抗体,例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团衍生化、蛋白水解裂解、键联到细胞配体或其它蛋白质等进行化学修饰的抗体。许多化学修饰可以通过已知技术进行,包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、调配、衣霉素代谢合成等。另外,抗体可以含有一种或多种非经典氨基酸。

[0586] 变异可以是编码单结构域抗体或多肽的一个或多个密码子的取代、缺失或插入,其导致与原始抗体或多肽相比氨基酸序列发生变化。氨基酸取代可以用具有类似结构和/或化学特性的另一氨基酸替换一个氨基酸的结果,如用丝氨酸替换亮氨酸,例如保守性氨基酸替换。本领域技术人员已知的标准技术可用于在编码本文所述分子的核苷酸序列中引入突变,包括例如引起氨基酸取代的定点诱变和PCR介导诱变。插入或缺失可以任选地在约1到5个氨基酸范围内。在某些实施例中,相对于原始分子,取代、缺失或插入包括少于25个氨基酸取代、少于20个氨基酸取代、少于15个氨基酸取代、少于10个氨基酸取代、少于5个氨基酸取代、少于4个氨基酸取代、少于3个氨基酸取代或少于2个氨基酸取代。在具体实施例中,取代为在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处进行的保守性氨基酸取代。所允许的变异可以通过系统地在序列中进行氨基酸的插入、缺失或取代,并且测试所得变体利用亲本抗MSLN抗体所展现的活性来确定。

[0587] 氨基酸序列插入包括从一个残基到含有多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及序列内部插入单个或多个氨基酸残基。末端插入的实例包括具有N端甲硫氨酰基残基的抗体。

[0588] 通过保守性氨基酸取代生成的抗体包括于本公开中。在保守性氨基酸取代中,用侧链具有相似电荷的氨基酸残基替换氨基酸残基。如上文所描述,侧链具有相似电荷的氨基酸残基家族已经在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(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)、具

有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β 支链侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及具有芳香族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。或者,可以沿着全部或部分编码序列随机引入突变,如通过饱和诱变引入,并筛选所得突变体的生物活性以鉴别保留活性的突变体。诱变后,可以表达经编码的蛋白质,并可以确定蛋白质的活性。可进行保守性(例如,在具有类似特性和/或侧链的氨基酸基团内)取代,以便维持或不显著改变特性。

[0589] 氨基酸可以根据其侧链的特性的相似性来分组(参见例如Lehninger,《生物化学(Biochemistry)》73-75(第2版,1975)): (1) 非极性:Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M); (2) 不带电荷的极性:Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q); (3) 酸性:Asp(D)、Glu(E);和(4) 碱性:Lys(K)、Arg(R)、His(H)。或者,可基于共同侧链特性将天然存在的残基分组:(1) 疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2) 中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3) 酸性:Asp、Glu;(4) 碱性:His、Lys、Arg;(5) 影响链定向的残基:Gly、Pro;和(6) 芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0590] 例如,任何不涉及维持抗MSLN抗体恰当构象的半胱氨酸残基也可以用另一氨基酸(如丙氨酸或丝氨酸)取代,以提高分子的氧化稳定性并且预防异常交联。

[0591] 所述变异可以使用本领域中已知的方法进行,如寡核苷酸介导(定点)诱变、丙氨酸筛选和PCR诱变。定点诱变(参见例如Carter,1986,《生物化学杂志(Biochem J.)》237:1-7;和Zoller等人,1982,《核酸研究(Nucl.Acids Res.)》10:6487-500)、盒式诱变(参见例如Wells等人,1985,《基因(Gene)》34:315-23)或其它已知技术可对克隆DNA进行以产生抗MSLN抗体变体DNA。

[0592] 体外亲和力成熟

[0593] 在一些实施例中,与亲本抗体相比具有改进特性(如亲和力、稳定性或表达水平)的抗体变体可以通过体外亲和力成熟来制备。类似于天然原型,体外亲和力成熟是基于突变和筛选的原理。抗体库展示于生物体(例如噬菌体、细菌、酵母或哺乳动物细胞)的表面上或与其编码mRNA或DNA缔合(例如共价地或非共价地)。所展示的抗体的亲和力选择允许携带编码抗体的遗传信息的生物体或复合物的分离。使用噬菌体展示等展示方法进行两轮或三轮突变和筛选,通常产生亲和力在低纳摩尔范围内的抗体片段。亲和力成熟抗体可对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。

[0594] 噬菌体展示是一种广泛应用的抗体展示和筛选方法。抗体展示于Fd或M13噬菌体的表面上,作为与噬菌体外壳蛋白的融合体。筛选涉及暴露于抗原,让噬菌体所展示的抗体与其靶结合,即称为“淘选”的过程。回收结合到抗原的噬菌体,并且将其用于感染细菌以产生噬菌体用于新一轮选择。关于综述,参见例如Hoogenboom,2002,《分子生物学方法(Methods.Mol.Biol.)》178:1-37;以及Bradbury和Marks,2004,《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》290:29-49。

[0595] 在酵母展现系统中(参见例如Boder等人,1997,《自然·生物技术(Nat.Biotech)》15:553-57;以及Chao等人,2006,《自然实验步骤(Nat.Protocols)》1:755-68),抗体可以融合到酵母凝集蛋白Aga2p的粘附子单元,其通过二硫键与Aga1p附接到酵母细胞壁。经由Aga2p展示蛋白质使蛋白质从细胞表面突出,从而使与酵母细胞壁上的其它分子的潜在相互作用降到最低。使用磁性分离和流式细胞测量术来筛选库,以选择具有改进亲和力或稳

定性的抗体。与所关注的可溶性抗原的结合通过用生物素标记的抗原和缀合到荧光团的二级试剂(如抗生蛋白链菌素)标记酵母来确定。抗体的表面表达的变异可以通过侧接scFv的血球凝集素或c-Myc表位标签的免疫荧光标记来测量。已经显示表达与所展示的蛋白质的稳定性相关,并且因此抗体可以经选择以用于改进的稳定性以及亲和力(参见例如Shusta等人,1999,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》292:949-56)。酵母展示的另一个优势在于,所展示的蛋白质利用内质网分子伴侣和质量控制机制在真核酵母细胞的内质网中折叠。一旦成熟完成,抗体亲和力就可以方便地“滴定”同时展示于酵母表面上,从而消除了表达和纯化每个克隆的需要。酵母表面展示的一个理论上的局限性是其功能库大小可能比其它展示方法要小;然而,最近的一种方法使用酵母细胞交配系统来创建估计大小为 10^{14} 的组合多样性(参见例如美国专利公开2003/0186374;和Blaise等人,2004,《基因》342:211-18)。

[0596] 在核糖体展示中,抗体-核糖体-mRNA (ARM) 复合物在无细胞系统中生成以供选择。将编码特定抗体库的DNA库融合到缺乏终止密码子的间隔序列。当翻译时,此间隔序列仍附接到肽基tRNA并且占据核糖体隧道,并且因此允许所关注的蛋白质突出离开核糖体并且折叠。mRNA、核糖体和蛋白质的所得复合物可以结合到表面结合的配体,允许通过与配体的亲和力捕获同时分离抗体和其编码mRNA。核糖体结合的mRNA随后逆转录回到cDNA中,其接着可以进行诱变并且用于下一轮筛选(参见例如Fukuda等人,2006,《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》34:e127)。在mRNA展示中,使用嘌呤霉素作为衔接分子建立抗体与mRNA之间的共价键(Wilson等人,2001,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》98:3750-55)。

[0597] 因为这些方法完全是在体外进行,因此与其他筛选技术相比,它们有两个主要优势。首先,库的多样性不受细菌细胞的转化效率限制,而是仅受试管中存在的核糖体和不同mRNA分子的数目限制。第二,随机突变可以很容易地在各筛选轮次之后引入,例如通过非校正聚合酶引入,因为在任何多样化步骤之后没有库必须被转化。

[0598] 在一些实施例中,可使用哺乳动物展示系统。

[0599] 还可以靶向方式或通过随机引入将多样性引入到抗体库的CDR中。前一种方法包括经由高水平或低水平的诱变来依序靶向抗体的所有CDR,或靶向体细胞高频突变的经分离热点(参见例如Ho等人,2005,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》280:607-17)或疑似在实验基础或结构原因上影响亲和力的残基。还可以通过经由DNA改组或类似技术替换天然多样性的区域来引入多样性(参见例如Lu等人,2003,《生物化学杂志》278:43496-507;美国专利第5,565,332号和第6,989,250号)。替代性技术针对延伸到框架区残基中的超变环(参见例如Bond等人,2005,《分子生物学杂志》348:699-709),采用CDR中的环缺失和插入或使用基于杂合的多样化(参见例如美国专利公开第2004/0005709号)。生成CDR中的多样性的其他方法公开于例如美国专利第7,985,840号。可以用于生成抗体库和/或抗体亲和力成熟的其它方法公开于例如美国专利第8,685,897号和第8,603,930号和美国公开第2014/0170705号、第2014/0094392号、第2012/0028301号、第2011/0183855号和第2009/0075378号,其中的每一者以引用的方式并入本文中。

[0600] 库的筛选可以通过本领域中已知的各种技术实现。例如,抗MSLN抗体可以固定到固体支撑物、柱、针或纤维素/聚(偏二氟乙烯)膜/其它过滤器上,表达于附连到吸附板或用于细胞分选的宿主细胞上,或缀合到生物素以用于用抗生蛋白链菌素涂布的珠粒捕获或用

于淘选展示库的任何其它方法中。

[0601] 关于活体外亲和力成熟方法的综述,参见例如Hoogenboom,2005,《自然·生物技术》23:1105-16;Quiroz和Sinclair,2010,《生物工程杂志 (Revista Ingeneria Biomedica)》4:39-51;以及其中的参考文献。

[0602] 抗MSLN单结构域抗体的修饰

[0603] 抗MSLN抗体的共价修饰包括于本公开的范围內。共价修饰包括使抗MSLN抗体的靶向氨基酸残基与能够与抗MSLN抗体的所选侧链或N端或C端残基反应的有机衍生剂反应。其它修饰包括谷酰胺酰基残基和天冬酰胺酰基残基分别脱酰胺成为相应谷氨酰基残基和天冬氨酰基残基;脯氨酸和赖氨酸的羟基化;丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基的磷酸化;赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链 α -氨基的甲基化(参见例如Creighton,《蛋白质:结构和分子特性 (Proteins:Structure and Molecular Properties)》79-86(1983));N端胺的乙酰化;以及任何C端羧基的酰胺化。

[0604] 本公开范围内所包括的抗MSLN抗体的其它类型的共价修饰包括改变抗体或多肽的天然糖基化模式(参见例如Beck等人,2008,《当代药物生物技术 (Curr.Pharm.Biotechnol.)》9:482-501;以及Walsh,2010,《最新药物 (Drug Discov.Today)》15:773-80),并且以例如美国专利第4,640,835号、第4,496,689号、第4,301,144号、第4,670,417号、第4,791,192号或第4,179,337号中所阐述的方式将抗体连接到多种非蛋白质聚合物中的一种,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯。

[0605] 还可以对本公开的抗MSLN抗体进行修饰以形成包含与另一种异源多肽或氨基酸序列融合的抗MSLN抗体(例如,表位标签)的嵌合分子(参见例如Terpe,2003,《应用微生物学与生物技术附录 (Appl.Microbiol.Biotechnol.)》60:523-33)或IgG分子的Fc区(参见例如Aruffo,《抗体融合蛋白 (Antibody Fusion Proteins)》221-42 (Chamow和Ashkenazi编辑,1999))。

[0606] 本文还提供融合蛋白,其包含本文所提供的结合到MSLN抗原的抗体和异源多肽。在一些实施例中,与抗体融合的异源多肽适用于将抗体靶向到具有细胞表面表达MSLN的细胞。

[0607] 本文还提供结合到MSLN抗原的抗体组。在具体实施例中,抗体组具有不同缔合速率、不同解离速率、MSLN抗原的不同亲和力和/或MSLN抗原的不同特异性。在一些实施例中,所述组包含以下各者或由以下各者组成:约10、约25、约50、约75、约100、约125、约150、约175、约200、约250、约300、约350、约400、约450、约500、约550、约600、约650、约700、约750、约800、约850、约900、约950或约1000抗体或更多。抗体组可以例如用于96孔或384孔培养板中,用于如ELISA的测定。

[0608] 抗MSLN单结构域抗体的制备

[0609] 本文所提供的抗MSLN单结构域抗体可以通过培养用含有编码抗抗MSLN抗体的核酸的载体转化或转染的细胞来产生。编码本发明抗体的多肽组分的多核苷酸序列可使用标准重组技术获得。所需多核苷酸序列可以从抗体产生细胞(如融合瘤细胞)中分离和测序。或者,可以使用核苷酸合成器或PCR技术合成多核苷酸。一旦获得,将编码多肽的序列插入到能够在宿主细胞中复制和表达异源多核苷酸的重组载体中。本领域中可用且已知的许多载体可用于本发明的目的。适当载体的选择将主要取决于待插入到载体中的核酸和待用载

体转化的特定宿主细胞的大小。适合于表达本发明抗体的宿主细胞包括原核生物,如古细菌和真细菌(包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体);真核微生物,如丝状真菌或酵母;无脊椎动物细胞,如昆虫或植物细胞;以及脊椎动物细胞,如哺乳动物宿主细胞系。宿主细胞用上文所描述的表达载体转化并且在常规营养培养基中培养,按需要进行修饰以诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因。使用本领域中已知的标准蛋白质纯化方法纯化由宿主细胞产生的抗体。

[0610] 用于抗体生产的方法,包括载体构筑、表达和纯化,进一步描述于Plückthun等人,《抗体工程(Antibody Engineering)》:“在大肠杆菌中生产抗体:从PCR到发酵(Producing antibodies in Escherichia coli:From PCR to fermentation)”203-52(McCafferty等人编辑,1996);Kwong和Rader,在《最新蛋白质科学实验指南(Current Protocols in Protein Science)》(2009)中的“大肠杆菌表达和Fab抗体片段的纯化(E.coli Expression and Purification of Fab Antibody Fragments)”;Tachibana和Tachibana,在《抗体表达和生产(Antibody Expression and Production)》(Al-Rubeai编辑,2011)中的“在大肠杆菌中生产抗体Fab片段(Production of Antibody Fab Fragments in Escherichia coli)”;以及《单克隆抗体疗法:从实验台到临床(Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic)》(An编辑,2009)。

[0611] 当然,预期本领域中众所周知的替代性方法可用于制备抗MSLN抗体。举例来说,适当氨基酸序列或其部分可通过使用固相技术直接肽合成产生(参见例如Stewart等人,《固相肽合成(Solid-Phase Peptide Synthesis)》(1969);和Merrifield,1963,《美国化学会志(J.Am.Chem.Soc)》85:2149-54)。可以使用手动技术或自动化进行体外蛋白质合成。抗MSLN抗体的各种部分可单独地化学合成,并使用化学或酶促方法组合以产生所需抗MSLN抗体。或者,抗体可以从经工程化以表达抗体的转基因动物的细胞或体液(如乳汁)中纯化,如例如美国专利第5,545,807号和第5,827,690号中所公开。

[0612] 免疫缀合物

[0613] 本发明还提供包含本发明任一种抗MSLN抗体的缀合物,其通过合成接头共价结合到一种或多种非抗体药剂。

[0614] 在一些实施例中,本文提供的抗体与例如诊断或可检测分子缀合或重组融合。缀合或重组融合的抗体可以适用于例如监测或预测MSLNA介导疾病的发病、发展、进展和/或严重程度。

[0615] 这种诊断和检测可以例如通过将抗体与可检测物质偶联来实现,这些可检测物质包括但不限于各种酶,如但不限于辣根过氧化酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,如但不限于抗生蛋白链菌素/生物素或抗生物素蛋白/生物素;荧光材料,如但不限于伞酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,如但不限于鲁米诺;生物发光材料,如但不限于萤光素酶、萤光素或发光蛋白质;化学发光材料,如但不限于基于吖啶的化合物或HALOTAG;放射性材料,如但不限于碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 和 ^{121}I 、)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氦(^3H)、铟(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 和 ^{111}In)、锝(^{99}Tc)、铪(^{201}Tl)、镓(^{68}Ga 和 ^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 或 ^{117}Sn ;使用各种正电

子发射断层扫描的正电子发射金属;以及非放射性顺磁性金属离子。

[0616] 本文还提供与异源蛋白质或多肽(或其片段,例如与具有约10、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90或约100个氨基酸的多肽)重组融合或化学缀合(共价或非共价缀合)以生成融合蛋白的抗体,及其用途。确切地说,本文提供融合蛋白,其包含本文所提供的抗体的抗原结合片段(例如CDR1、CDR2和/或CDR3)和异源蛋白质、多肽或肽。在一个实施例中,抗体融合的异源蛋白质、多肽或肽可用于将抗体靶向到特定细胞类型,如表达MSLN的细胞。例如,结合到由特定细胞类型表达的细胞表面受体的抗体可以融合或缀合到本文所提供的经修饰抗体。

[0617] 此外,本文所提供的抗体可以融合到标记或“标签”序列(如肽)以促进纯化。在具体实施例中,标记或标签氨基酸序列是六聚组氨酸肽,如pQE载体中提供的标签(参见例如凯杰公司(QIAGEN, Inc.)),其中很多都是可商购的。例如,如描述于Gentz等人,1989,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》86:821-24中,六聚组氨酸使融合蛋白的纯化变得方便。适用于纯化的其它肽标签包括但不限于血球凝集素(“HA”)标签,其对应于衍生于流感血球凝集素蛋白质的表位(Wilson等人,1984,《细胞》37:767-78),以及“FLAG”标签。

[0618] 将部分(包括多肽)融合或缀合到抗体的方法为已知的(参见例如Arnon等人,在《单克隆抗体和癌症疗法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)》中的“用于癌症疗法中药物的免疫靶向的单克隆抗体”,243-56(Reisfeld等人编,1985);Hellstrom等人,在《控制药物递送(Controlled Drug Delivery)》中的“药物递送的抗体(Antibodies for Drug Delivery)”623-53(Robinson等人编辑,第2版,1987);Thorpe,在《单克隆抗体:生物和临床应用(Monoclonal Antibodies:Biological and Clinical Applications)》中的“癌症疗法中细胞毒性剂的抗体载体:综述(Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy:AReview)”475-506(Pinchera等人编辑,1985);在《用于癌症检测和疗法的单克隆抗体(Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy)》中的“放射性标记抗体在癌症疗法中的治疗用途的分析、结果和未来前瞻性(Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy)”303-16(Baldwin等人编辑,1985);Thorpe等人,1982,《免疫学评论(Immunol.Rev.)》62:119-58;美国专利第5,336,603号;第5,622,929号;第5,359,046号;第5,349,053号;第5,447,851号;第5,723,125号;第5,783,181第5,908,626号;第5,844,095号;和第5,112,946号;EP 307,434;EP 367,166;EP 394,827;PCT专利公开WO 91/06570、WO 96/04388、WO 96/22024、WO 97/34631和WO 99/04813;Ashkenazi等人,1991,《美国国家科学院院刊》,88:10535-39;Traunecker等人,1988,《自然(Nature)》,331:84-86;Zheng等人,1995,《免疫学杂志(J.Immunol.)》154:5590-600;以及Vil等人,1992,《美国国家科学院院刊》89:11337-41)。

[0619] 融合蛋白可以例如通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(共同称为“DNA改组”)的技术生成。DNA改组可以用于改变如本文所提供的抗MSLN抗体的活性,包括例如具有较高亲和力和较低解离速率的抗体(参见例如美国专利第5,605,793号;第5,811,238号;第5,830,721号;第5,834,252号;和第5,837,458号;Patten等人,1997,《当代生物技术评论(Curr.Opinion Biotechnol)》8:724-33;Harayama,1998,《生物技术趋势(Trends Biotechnol)》16(2):76-82;Hansson等人,1999,《分子生物学杂志》287:265-76;以及Lorenzo和Blasco,1998,《生物技术(Biotechniques)》24(2):308-13)。抗体或经编码

抗体可以通过在重组之前通过易错PCR、随机核苷酸插入或其它方法进行随机诱变来改变。可将编码本文所提供的抗体的多核苷酸与一种或多种异源分子的一种或多种组分、基序、区段、部分、结构域、片段等重组。

[0620] 本文中所提供的抗体(例如sdAb)还可以与第二抗体缀合以形成如例如美国专利第4,676,980号中所描述的抗体异源缀合物。

[0621] 如本文所提供的结合到MSLN的抗体还可以附接到固体支撑物,所述固体支撑物尤其适用于靶抗原的免疫分析或纯化。此类固体支撑物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0622] 接头可以是有助于在细胞中释放缀合剂的“可裂解接头”,但本文还涵盖不可裂解接头。用于本发明缀合物中的接头包括但不限于酸不稳定接头(例如脘接头)、含二硫化物的接头、肽酶敏感型的接头(例如包含氨基酸的肽接头,例如缬氨酸和/或瓜氨酸(如瓜氨酸-缬氨酸或苯丙氨酸-赖氨酸))、光不稳定接头、二甲基接头(参见例如Chari等人,1992,《癌症研究(Cancer Res.)》52:127-31;以及美国专利第5,208,020号)、硫醚接头或经设计以避免多药物转运体介导耐药现象的亲水性接头(参见例如Kovtun等人,2010,《癌症研究(Cancer Res.)》70:2528-37)。

[0623] 抗体和药剂的缀合物可以使用多种双官能蛋白质偶联剂制得,所述双官能蛋白质偶联剂如BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC、磺基-SMPB和SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砜)苯甲酸盐)。本发明进一步涵盖,抗体和药剂的缀合物可以使用本领域中所公开的任何合适的方法制备(参见例如《生物缀合技术(Bioconjugate Techniques)》(Hermanson编辑,第2版,2008))。

[0624] 抗体和药剂的常规缀合策略是基于涉及Lys残基的 ϵ -氨基或Cys残基的硫醇基的随机缀合化学反应,这会产生异质缀合物。最近开发的技术允许对抗体进行位点特异性缀合,从而产生均质负载并且避免具有更改的抗原结合或药代动力学的缀合物亚群。这些包括由重链和轻链上的半胱氨酸取代组成的“硫醇单抗(thiomabs)”工程,这些半胱氨酸提供了反应性硫醇基团,并且不会破坏免疫球蛋白的折叠和组装或改变抗原结合(参见例如Junutula等人,2008,《免疫学方法杂志(J. Immunol. Meth.)》332:41-52;以及Junutula等人,2008,《自然·生物技术》26:925-32)。在另一方法中,通过将终止密码子UGA从末端重新编码为硒代半胱氨酸插入来将硒代半胱氨酸共翻译插入到抗体序列中,从而允许在其它天然氨基酸存在下在硒代半胱氨酸的亲核硒醇基团处进行位点特异性共价缀合(参见例如Hofer等人,2008,《美国国家科学院院刊》105:12451-56;以及Hofer等人,2009,《生物化学》48(50):12047-57)。

[0625] 抗间皮素Fc融合蛋白

[0626] 在一些实施例中,抗MSLN构建体(如分离的抗MSLN构建体)为融合到Fc片段(如IgG1 Fc片段)的包含本文所描述的抗MSLN抗体部分的Fc融合蛋白(在下文中称为“抗MSLN-Fc融合蛋白”)。在一些实施例中,抗MSLN抗体部分经由接头(如肽接头)融合到Fc片段。在一些实施例中,抗MSLN-Fc融合蛋白包含包括Fc片段的抗体。在一些实施例中,抗MSLN-Fc融合蛋白为全长抗体。在“抗MSLN抗体部分章节”中描述的任一种抗MSLN抗体部分都可以应用于所述抗MSLN Fc融合蛋白中。

[0627] Fc片段

[0628] 术语“Fc区”、“Fc结构域”或“Fc区”是指含有恒定区的至少一部分的免疫球蛋白重链的C端非抗原结合区。所述术语包括天然Fc区和变体Fc区。在一些实施例中,人类IgG重链Fc区自Cys226延伸至重链羧基端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可存在或可不存在,不影响Fc区的结构或稳定性。除非本文中另外规定,否则IgG或Fc区中的氨基酸残基的编号根据用于抗体的EU编号系统,也被称为EU索引,如描述于Kabat等人,《免疫学感兴趣的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,第5版,美国国家卫生研究院公共卫生服务部(Public Health Service, National Institutes of Health),马里兰州贝塞斯达(Bethesda, MD), 1991。

[0629] 在一些实施例中,Fc片段包含免疫球蛋白IgG重链恒定区,所述免疫球蛋白IgG重链恒定区包含铰链区(在Cys226处开始)、IgG CH2结构域和CH3结构域。如本文所使用的术语“铰链区”或“铰链序列”是指定位于接头与CH2结构域之间的氨基酸序列。在一些实施例中,融合蛋白包含包括铰链区的Fc片段。在一些实施例中,铰链区包含氨基酸序列CPPCP (SEQ ID NO:345),即发现于天然IgG1铰链区中的序列,以促进二聚化。在一些实施例中,融合蛋白的Fc片段开始于铰链区并且延伸至IgG重链的C端。在一些实施例中,融合蛋白不包含铰链区的Fc片段。

[0630] 在一些实施例中,融合蛋白包含选自以下组成的组的Fc片段:来自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM、以及其组合和杂合的Fc片段。在一些实施例中,Fc片段衍生于人类IgG。在一些实施例中,Fc片段包含人类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、或组合或杂合IgG的Fc区。在一些实施例中,Fc片段为IgG1 Fc片段。在一些实施例中,Fc片段包含IgG1的CH2和CH3结构域。在一些实施例中,Fc片段为IgG4 Fc片段。在一些实施例中,Fc片段包含IgG4的CH2和CH3结构域。已知IgG4 Fc表现比IgG1 Fc更低的效应活性,并且因此对于一些应用而言可能是合乎需要的。在一些实施例中,Fc片段衍生于小鼠免疫球蛋白。

[0631] 在一些实施例中,IgG CH2结构域在Ala231处开始。在一些实施例中,CH3结构域在Gly341处开始。应理解,人类IgG的C端Lys残基可任选地不存在。还应理解,在不影响所需结构和/或Fc稳定性的情况下,Fc区的保守性氨基酸取代涵盖在本发明的范围内。

[0632] 另外,本发明涵盖包含下文所描述的Fc变体中的任一个或其组合的抗MSLN-Fc融合蛋白。在一些实施例中,Fc片段包含已经改变或以其它方式变化的序列,以使得其具有增强的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)效应功能。

[0633] 在一些实施例中,Fc片段的每个链融合到同一实体。在一些实施例中,抗MSLN-Fc融合蛋白包含本文所描述的两个相同抗MSLN抗体部分(特异性识别间皮素),其各自与Fc片段的一个链融合。在一些实施例中,Fc片段的两个链是相同的。在一些实施例中,包含Fc片段的抗MSLN-Fc融合蛋白(包括抗MSLN-Fc融合蛋白,其包含抗体)是同二聚体。

[0634] 在一些实施例中,Fc片段的每个链融合到不同实体。在一些实施例中,融合蛋白包含两种不同抗MSLN抗体部分,其各自融合到Fc片段的一个链。在一些实施例中,两种抗MSLN抗体部分不同但都特异性识别间皮素。在一些实施例中,两种抗MSLN抗体部分不同但都特异性识别间皮素。在一些实施例中,抗MSLN-Fc融合蛋白为单价的,即,仅一个抗MSLN抗体部分融合到Fc片段的一个链,且Fc片段的第二个链不融合到抗MSLN抗体部分。在一些实施例中,包含Fc片段的抗MSLN-Fc融合蛋白(包括抗MSLN-Fc融合蛋白,其包含抗体)为异二聚体。

[0635] 抗MSLN-Fc融合蛋白中的不相同多肽的异二聚化可以通过本领域中已知的方法促进,所述方法包括但不限于通过杵-进入-臼技术(knob-into-hole technology)的异二聚化。杵-进入-臼技术的结构和组装方法可发现于例如US5,821,333、US7,642,228、US2011/0287009和PCT/US2012/059810中,所述专利以全文引用的方式并入本文中。这种技术通过以下方式开发:通过在一个Fc的CH3结构域中用大氨基酸残基替换小氨基酸残基来引入“杵”(或突起),并且通过用较小氨基酸残基替换一个或多个大氨基酸残基来在另一个Fc的CH3结构域中引入“臼”(或空腔)。在一些实施例中,融合蛋白中的Fc片段的一个链包含杵,且Fc片段的第二个链包含臼。

[0636] 用于形成杵的优选残基一般为天然存在的氨基酸残基并且优选地选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)。最优选的是色氨酸和酪氨酸。在一个实施例中,用于形成杵的原始残基具有小侧链体积,如丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。用于形成杵的CH3结构域中的示例性氨基酸取代包括但不限于T366W、T366Y或F405W取代。

[0637] 用于形成臼的优选残基通常为天然存在的氨基酸残基并且优选地选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)。在一个实施例中,用于形成臼的原始残基具有大侧链体积,如酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。用于生成臼的CH3结构域中的示例性氨基酸取代包括但不限于T366S、L368A、F405A、Y407A、Y407T和Y407V取代。在某些实施例中,杵包含T366W取代,并且臼包含T366S/L368A/Y407V取代。应理解,本领域中已知的有助于异二聚化的对Fc区的其它修饰也由本申请涵盖和包涵。

[0638] 本申请涵盖其它抗MSLN Fc融合蛋白变体(如经分离的抗MSLNA-Fc融合蛋白的变体,例如全长抗MSLN抗体变体),其包含本文所描述的变体中的任一个(例如Fc变体、效应功能变体、糖基化变体、经半胱氨酸工程化的变体)或其组合。关于抗MSLN Fc融合蛋白(例如全长抗MSLN抗体)的所有可适用变异,参见“抗MSLN变体”章节。

[0639] 降低的岩藻糖基化

[0640] 在一些实施例中,抗间皮素构建体包含a)抗间皮素抗体部分,和b)融合到所述抗间皮素抗体部分的Fc片段,其中所述Fc片段具有降低的岩藻糖基化。在一些实施例中,Fc是选自由以下组成的组的片段:来自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM以及其组合和杂合的Fc片段。在一些实施例中,Fc片段衍生于人类IgG。在一些实施例中,Fc片段包含人类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、或组合或杂合IgG的Fc区。在一些实施例中,Fc片段为IgG1 Fc片段。在一些实施例中,Fc片段具有比对应的野生型Fc片段低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的岩藻糖基化。

[0641] 在一些实施例中,所述抗间皮素构建体包含a)抗间皮素抗体,其包含i)抗间皮素抗体部分,ii)融合到所述抗间皮素抗体部分的Fc片段,和b)融合到所述抗间皮素抗体的细胞因子(如包含IL-21和半衰期延长结构域的细胞因子融合蛋白(例如结合到白蛋白的抗体))。在一些实施例中,细胞因子融合到抗间皮素抗体部分的N端。在一些实施例中,细胞因子经由接头(如肽接头)融合到抗间皮素抗体。在一些实施例中,肽接头为稳定接头,不可被蛋白酶(如通过基质金属蛋白酶(MMP))裂解。

[0642] 多特异性抗间皮素构建体

[0643] 在一些实施例中,抗间皮素构建体包含多特异性(例如双特异性)抗间皮素分子,

其包含根据本文所描述的抗间皮素抗体部分中的任一个的抗间皮素抗体部分,和特异性识别第二抗原的第二结合部分(如第二抗体部分)。在一些实施例中,多特异性抗间皮素分子包含抗间皮素抗体部分和特异性识别第二抗原的第二抗体部分。

[0644] 多特异性分子为对于至少两种不同抗原或表位具有结合特异性的分子(例如双特异性抗体对于两种抗原或表位具有结合特异性)。还涵盖具有超过两个价数和/或特异性的多特异性分子。例如,可以制备三特异性抗体(Tutt等人,《免疫学杂志(J. Immunol.)》147:60(1991))。应了解,本领域的技术人员可以选择本文所描述的个别多特异性分子的适当特征,使其相互组合,以形成本申请的多特异性抗间皮素分子。

[0645] 在一些实施例中,多特异性抗间皮素构建体为例如双功能抗体(Db)、单链双功能抗体(scDb)、串联scDb(Tandab)、线性二聚scDb(LD-scDb)、圆形二聚scDb(CD-scDb)、双-双功能抗体、串联scFv、串联二scFv(例如双特异性T细胞接合体)、串联三scFv、三功能抗体(tri(a) body)、双特异性Fab2、双微型抗体、四功能抗体、scFv-Fc-scFv融合体、双亲和性重新靶向(DART)抗体、双可变结构域(DVD)抗体、IgG-scFab、scFab-ds-scFv、Fv2-Fc、IgG-scFv融合体、对接和锁定(DNL)抗体、杆-进入-臼(KiH)抗体(通过KiH技术制备的双特异性IgG)、DuoBody(通过DuoBody技术制备的双特异性IgG)、异多聚体抗体或异源缀合抗体。在一些实施例中,多特异性抗间皮素分子为串联scFv(例如串联二scFv,如双特异性T细胞接合体)。

[0646] 第二抗原

[0647] 在一些实施例中,抗MSLN构建体包含多特异性(例如双特异性)抗MSLN分子,其包含抗MSLN抗体部分和特异性识别第二抗原的第二抗体部分(例如scFv)。在一些实施例中,第二抗原也是间皮素,但包含与抗MSLN抗体部分识别的表位不同的表位。在一些实施例中,第二抗原不是间皮素。在一些实施例中,第二抗原是肿瘤抗原。在一些实施例中,第二抗原是CD3(例如人类CD3)。

[0648] 在一些实施例中,本文中所描述的多特异性(例如双特异性)抗MSLN构建体可以经工程化以通过将效应细胞(如细胞毒性T细胞)引导(或补充)到肿瘤部位而促进杀死(例如,细胞毒性溶解或吞噬)肿瘤细胞。在一些实施例中,肿瘤细胞毒性可以使用LDH细胞毒性分析来测试。在一些实施例中,多特异性(例如双特异性)抗MSLN分子可在免疫抑制环境(如免疫抑制肿瘤环境)中将效应细胞(例如,T细胞、NK细胞、CAR-T细胞、caTCR-T细胞)有效地引导到靶细胞。

[0649] 示例性效应细胞包括但不限于T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、树突状细胞(DC)、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性白细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、抗体依赖性细胞毒性细胞、嵌合抗原受体(CAR)效应细胞(例如CAR-T)、嵌合抗体T细胞受体(TCR)构建体(caTCR)效应细胞(参见下文的caTCR章节)等。在一些实施例中,效应细胞为T细胞(例如细胞毒性T细胞、辅助T细胞或NKT细胞)。在一些实施例中,效应细胞为细胞毒性T细胞。在一些实施例中,效应细胞为同种异体的。在一些实施例中,效应细胞为自体的。

[0650] 诱导型表达

[0651] 在一些实施例中,多特异性(例如双特异性)抗MSLN分子(例如抗MSLN×CD3串联二scFv T细胞接合体)的表达是可诱导的。在一些实施例中,效应细胞(例如,T细胞、CAR-T细胞、caTCR T细胞)包含编码可操作地连接到诱导型启动子的多特异性(例如双特异性)抗

MSLN分子(例如抗MSLN×CD3双特异性T细胞接合体)的核酸序列,所述诱导型启动子包括本文所描述的任何诱导型启动子(例如参见“核酸”章节)。在一些实施例中,在效应细胞(例如,T细胞、CAR-T细胞、caTCR T细胞)中的多特异性(例如双特异性)抗MSLN分子(例如抗MSLN×CD3串联二scFv T细胞接合体)的表达在经由效应细胞(例如,TCR、CAR、caTCR)上的信号传导受体的信号传导后是可诱导的。在一些此类实施例中,CAR-T细胞包含编码可操作地连接到启动子或调节元件的多特异性(例如双特异性)抗MSLN分子(例如抗MSLN×CD3串联二scFv T细胞接合体)的核酸序列,所述启动子或调节元件响应于通过CAR的信号传导。在一些此类实施例中,caTCR-T细胞包含编码可操作地连接到启动子或调节元件的多特异性(例如双特异性)抗MSLN分子(例如抗MSLN×CD3串联二scFv T细胞接合体)的核酸序列,所述启动子或调节元件响应于通过caTCR的信号传导。在一些实施例中,编码多特异性(例如双特异性)抗MSLN分子(例如抗MSLN×CD3串联二scFv T细胞接合体)的核酸序列可操作地连接到活化T细胞(NFAT)衍生的启动子的核因子。在一些实施例中,NFAT衍生的启动子为NFAT衍生的最小启动子(参见例如Durand, D.等人,《分子与细胞生物学(Molec. Cell. Biol.)》8,1715-1724(1988);Clipstone,NA,Crabtree,GR.《自然》1992357(6380):695-7;Chmielewski,M.等人,《癌症研究(Cancer research)》71.17(2011):5697-5706;和Zhang,L.等人,《分子疗法(Molecular therapy)》19.4(2011):751-759)。NFAT转录因子家族是T细胞活化的重要调节因子。在一些实施例中,编码多特异性(例如双特异性)抗MSLN分子(例如抗MSLN×CD3串联二scFv T细胞接合体)的核酸序列可操作地连接到IL-2启动子。

[0652] 嵌合抗原受体(CAR)和CAR效应细胞

[0653] 在一些实施例中,抗MSLN构建体为包含抗MSLN抗体部分的CAR(在本文中也称为“抗MSLN CAR)。本文所描述的抗MSLN抗体部分中的任一个可以在抗MSLN CAR中采用。还提供一种CAR效应细胞(例如T细胞),其包含CAR,所述CAR包含抗MSLN抗体部分(在本文中也称为“抗MSLN CAR效应细胞”,例如“抗MSLN CAR T细胞”)。在一些实施例中,抗MSLN CAR包含特异性识别细胞表面结合MSLN的抗MSLN抗体部分。

[0654] 抗MSLN CAR包含a)包含特异性结合到MSLN的抗MSLN抗体部分的胞外结构域,和b)胞内信号传导结构域。跨膜结构域可以存在于胞外结构域与胞内结构域之间。

[0655] 在抗MSLN CAR的胞外结构域和跨膜结构域之间,或在抗MSLN CAR的胞内结构域和跨膜结构域之间,可存在间隔结构域。间隔结构域可以是用于在多肽链中将跨膜结构域连接到胞外结构域或胞内结构域的任何寡肽或多肽。间隔结构域可包含至多约300个氨基酸,包括例如约10到约100、或约25到约50个氨基酸。

[0656] 跨膜结构域可以衍生于天然或合成来源。当来源是天然的时,结构域可衍生于任何膜结合或跨膜蛋白质。本发明中特别适用的跨膜区可衍生于(即包含至少以下各者的跨膜区)T细胞受体、CD28、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154的 α 、 β 、 δ 或 γ 链。在一些实施例中,跨膜结构域可以是合成的,在此情况下其可以主要包含疏水性残基,如亮氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,可以在合成跨膜结构域的每个末端处发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。在一些实施例中,长度为例如约2至约10(如约2、3、4、5、6、7、8、9或10中的任一个)个氨基酸的短寡肽或多肽接头可以在抗MSLN CAR的跨膜结构域与胞内信号传导结构域之间形成键联。在一些实施例

中,所述接头为甘氨酸-丝氨酸双联体。

[0657] 在一些实施例中,使用与抗MSLN CAR的胞内结构域中的序列中的一个天然相关的跨膜结构域(例如如果抗MSLN CAR胞内结构域包含CD28共刺激序列,那么抗MSLN CAR的跨膜结构域衍生于CD28跨膜结构域)。在一些实施例中,可通过氨基酸取代来选择或修饰跨膜结构域,以避免此类结构域结合到相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域,以最小化其与受体复合物的其它成员的相互作用。

[0658] 抗MSLN CAR的胞内信号传导结构域负责激活其所在的免疫细胞的至少一种正常效应功能。T细胞的效应功能例如可以是细胞溶解活性或包括细胞因子分泌的辅助活性。因此,术语“胞内信号传导结构域”是指转导效应信号功能信号并引导细胞执行特有功能的蛋白质部分。尽管通常可采用整个胞内信号传导结构域,但在许多情况下不必使用整个链。就使用胞内信号传导结构域的截短部分来说,可使用此截短部分代替完整链,只要其转导效应功能信号即可。术语“胞内信号传导序列”因此意指包括胞内信号传导结构域中足以转导效应功能信号的任何截短部分。

[0659] 用于本发明的抗MSLN CAR的胞内信号传导结构域的实例包括共同作用以在抗原受体接合之后引发信号转导的TCR和共受体的细胞质序列,以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何合成序列。

[0660] 众所周知,仅经由TCR生成的信号不足以完全活化T细胞且还需要二次或共刺激信号。因此,T细胞活化可以称为由两种不同类别的胞内信号传导序列介导:通过TCR引发抗原依赖性初级活化的那些胞内信号传导序列(初级信号传导序列)和以抗原非依赖性方式起作用以提供二级或共刺激信号的那些胞内信号传导序列(共刺激信号传导序列)。

[0661] 初级信号传导序列以刺激性方式或以抑制性方式调节TCR复合物的初级活化。以刺激性方式起作用的初级信号传导序列可含有信号传导基序,所述信号传导基序称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM。在一些实施例中,抗MSLN CAR构建体包含一个或多个ITAM。

[0662] 适用于本发明中的含有ITAM的初级信号传导序列的实例包括衍生于TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的初级信号传导序列。

[0663] 在一些实施例中,抗MSLN CAR包含衍生于CD3 ζ 的初级信号传导序列。例如,CAR的胞内信号传导结构域可包含CD3 ζ 胞内信号传导序列自身,或与可用于本发明的抗MSLN CAR的上下文中的任何其它所需胞内信号传导序列组合的CD3 ζ 胞内信号传导序列。例如,抗MSLN CAR的胞内结构域可包含CD3 ζ 胞内信号传导序列和共刺激信号传导序列。共刺激信号传导序列可以是共刺激分子的胞内结构域的一部分,所述共刺激分子包括例如CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关的抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、特异性结合CD83的配体等。

[0664] 在一些实施例中,抗MSLN CAR的胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的胞内信号传导序列和CD28的胞内信号传导序列。在一些实施例中,抗MSLN CAR的胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的胞内信号传导序列和4-1BB的胞内信号传导序列。在一些实施例中,抗MSLN CAR的胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的胞内信号传导序列以及CD28和4-1BB的胞内信号传导序列。

[0665] 在一些实施例中,提供抗MSLN CAR,其包含a)包含特异性结合到MSLN的抗MSLN抗体部分的胞外结构域,其包含抗MSLN重链可变区(VH),所述抗MSLN重链可变区包含:HC-

CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3(其分别包含 V_H 链区内的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述 V_H 链区具有SEQ ID NOS:123-156和SEQ ID NOS:285-301中任一个所阐述的序列);b)跨膜结构域以及c)胞内信号传导结构域。在一些实施例中,胞内信号传导结构域能够活化免疫细胞。在一些实施例中,胞内信号传导结构域包含初级信号传导序列和共刺激信号传导序列。在一些实施例中,初级信号传导序列包含CD3 ζ 胞内信号传导序列。在一些实施例中,共刺激信号传导序列包含CD28胞内信号传导序列。在一些实施例中,胞内结构域包含CD3 ζ 胞内信号传导序列和CD28胞内信号传导序列。在一些实施例中,抗体部分包含SEQ ID NO:123-156和SEQ ID NO:285-301中任一个的氨基酸序列或其具有与SEQ ID NO:123-156和SEQ ID NO:285-301中任一个至少约80%(如约85%、90%、95%、98%或99%)序列一致性的变体。

[0666] 还提供一种产生表达抗MSLN CAR的效应细胞的方法,所述方法包括将包含编码抗MSLN CAR的核酸的载体引入到效应细胞中。在一些实施例中,将载体引入到效应细胞中包含用载体转导效应细胞。在一些实施例中,将载体引入到效应细胞中包含用载体转染效应细胞。载体转导或转染到效应细胞中可以使用本领域中已知的任何方法进行。

[0667] 在一些实施例中,提供一种抗MSLN CAR效应细胞(如淋巴细胞,例如T细胞),其包含编码可操作地连接到诱导型启动子的本文所描述的多特异性(例如双特异性)抗MSLN分子(例如抗MSLN \times CD3双特异性T细胞接合体)的核酸序列。在一些实施例中,抗MSLN CAR效应细胞中的多特异性(例如双特异性)抗MSLN构建体的表达在经由抗MSLN CAR的信号传导后是可诱导的。在一些实施例中,编码多特异性(例如双特异性)抗MSLN构建体的核酸序列可操作地连接到NFAT衍生的启动子。在一些实施例中,NFAT衍生的启动子为NFAT衍生的最小启动子。在一些实施例中,编码多特异性(例如双特异性)抗MSLN分子的核酸序列可操作地连接到IL-2启动子。

[0668] 接头

[0669] 在一些实施例中,融合蛋白或抗间皮素构建体包含两个结构域之间(如抗间皮素抗体部分与第二结构域(如细胞因子、Fc结构域等)之间)的接头。接头可以是如下文描述为“第一接头”或“第二接头”的接头中的任一种。

[0670] 在一些实施例中,包含IL-21的融合蛋白包含IL-21或其变体与白蛋白结合分子之间的第一接头,以及白蛋白结合分子与结合到抗原的结合分子之间的第二接头。在一些实施例中,第一接头和/或第二接头可以独立地为刚性接头或柔性接头。

[0671] 在一些实施例中,接头(例如第一接头、第二接头)是非肽接头。在一些实施例中,接头(例如第一接头、第二接头)是肽接头。

[0672] 非肽接头

[0673] 本文所描述的接头中的任一个或全部均可以通过结合两个分子的任何化学反应来实现,只要这些组分或片段保留其相应活性,例如结合到靶间皮素、结合到FcR或抗体参与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)/补体依赖性细胞毒性(CDC)。这种键联可以包括许多化学机制,例如共价结合、亲和力结合、插层、配位结合和络合。在一些实施例中,结合为共价结合。共价结合可以通过直接缩合现有侧链或通过并入外部桥接分子来实现。许多二价或多价连接剂适用于将蛋白质分子(如Fc片段)偶联到本发明的抗间皮素抗体部分。例如,代表性偶联剂可包括有机化合物,如硫酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、二氮杂苯和六亚甲基二胺。此列表并不旨在穷尽本领域中已知的各种类别的偶联剂,而实际上旨在

示例更常见的偶联剂(参见Killen和Lindstrom,《免疫学杂志(Jour. Immun.)》133:1335-2549(1984);Jansen等人,《免疫学评论(Immunological Reviews)》62:185-216(1982);和Vitetta等人,《科学(Science)》238:1098(1987))。

[0674] 可以在本申请中应用的接头描述于文献(参见例如Ramakrishnan, S. 等人,《癌症研究(Cancer Res.)》44:201-208(1984),描述MBS(M-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)的使用)中。在一些实施例中,本文所用的非肽接头包括:(i) EDC(1-乙基-3-(3-二甲氨基-丙基)碳化二亚胺盐酸盐;(ii) SMPT(4-琥珀酰亚胺酰氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫基)-甲苯(皮尔斯化学公司,Cat. (21558G);(iii) SPDP(琥珀酰亚胺基-6[3-(2-吡啶基二硫基)丙酰胺基]己酸酯(皮尔斯化学公司,Cat#21651G);(iv) 磺基-LC-SPDP(磺基琥珀酰亚胺基6[3-(2-吡啶基二硫基)-丙酰胺基]己酸酯(皮尔斯化学公司,Cat.#2165-G);以及(v) 缀合到EDC的磺基-NHS(N-氢氧磺基-琥珀酰亚胺:皮尔斯化学公司,Cat#24510)。

[0675] 上文所描述的接头含有具有不同属性的组分,因此产生具有不同生理-化学特性的抗间皮素构建体。例如,烷基羧酸盐的磺基NHS酯比芳香族羧酸盐的磺基NHS酯更稳定。含NH酯的接头的可溶性比磺基NHS酯低。此外,接头SMPT含有位阻双硫键,可以形成稳定性更高的融合蛋白。二硫化物键联一般比其它键联不那么稳定,因为二硫化物键联是体外裂解的,从而使得可用融合蛋白更少。磺基NHS,确切地说,可提高碳化二亚胺偶联的稳定性。碳化二亚胺偶联(如EDC)与磺基NHS结合使用时,形成比单独的碳二亚胺偶联反应更耐水解的酯。

[0676] 肽接头

[0677] 本文所描述的接头中的任一个或全部可以是肽接头。肽接头可以具有天然存在的序列或非天然存在的序列。例如,衍生于仅重链抗体的铰链区的序列可以用作接头。参见例如W01996/34103。在一些实施例中,肽接头包含CPPCP的氨基酸序列(SEQ ID NO:345),即发现于天然IgG1铰链区中的序列。

[0678] 肽接头可以具有任何合适的长度。在一些实施例中,肽接头的长度至少约为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多个氨基酸(aa)中的任一个。在一些实施例中,肽接头的长度不超过约100、75、50、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5或更少个氨基酸中的任一个。在一些实施例中,肽接头的长度为以下中的任一个:约1aa到约10aa、约1aa到约20aa、约1aa到约30aa、约5aa到约15aa、约10aa到约25aa、约5aa到约30aa、约10aa到约30aa、约30aa到约50aa、约50aa到约100aa或约1aa到约100aa。

[0679] 此类肽接头的基本技术特征为所述肽接头不包含任何聚合活性。包含不存在促进二级结构的肽接头的特征在本领域中是已知的并且描述于例如Da11'Acqua等人(《生物化学(Biochem)》(1998) 37, 9266-9273)、Cheadle等人(《分子免疫学(Mol Immunol)》(1992) 29, 21-30)以及Raag和Whitlow(FASEB(1995) 9(1), 73-80)中。就“肽接头”而言,特别优选的氨基酸是Gly。此外,还优选不促进任何二级结构的肽接头。分子之间的键联可以通过例如基因工程化提供。制备融合和可操作地连接的抗体构建体并在哺乳动物细胞或细菌中表达的方法在本领域中众所周知(例如W0 99/54440, Ausubel,《当代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》,格林出版协会和威立国际科学(Green

Publishing Associates and Wiley Interscience), 纽约(N.Y.)1989和1994,或Sambrook等人,《分子克隆:实验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约冷泉港(Cold Spring Harbor, N.Y.),2001)。

[0680] 在一些实施例中,肽接头为稳定接头,不可被蛋白酶(如通过基质金属蛋白酶(MMP))裂解。

[0681] 在一些实施例中,肽接头趋向于不采用刚性三维结构,但是对多肽(例如第一和/或第二组分)提供柔性,如在抗间皮素抗体部分与Fc片段之间提供柔性。在一些实施例中,肽接头是柔性接头。示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物($(G)_n$)、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如 $(GS)_n$ (SEQ ID NO:337)、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:338)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:339)和 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:340),其中n是至少为一的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域中已知的其它柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物相对地未结构化,因此可充当组分之间的中性系物(neutral tether)。甘氨酸甚至比丙氨酸能进入更多的phi-psi空间,并且比具有更长侧链的残基更不受限制(参见Scheraga,《计算机化学评论(Rev.Computational Chem.)》11173-142(1992))。本领域一般技术人员将认识到,抗间皮素构建体的设计可以包括全部或部分柔性的接头,使得接头可以包括柔性接头部分,以及赋予较小柔性结构以提供所需融合蛋白结构的一个或多个部分。

[0682] 在一些实施例中,本文所描述的抗MSLN构建体中的任一个中的两个结构域(如抗MSLN抗体部分和半衰期延长结构域或细胞因子)通过具有足够长度的接头连接在一起,以使得抗MSLN构建体以能够结合到靶MSLN和其它所需抗原的方式折叠。在一些实施例中,接头包含SRGGGSGGGSGGGGSLEMA(SEQ ID NO:341)的氨基酸序列。在一些实施例中,接头为或包含 $(GGGS)_n$ 序列(SEQ ID NO:339),其中n等于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更大。在一些实施例中,接头包含TSGGGGS的氨基酸序列(SEQ ID NO:342)。在一些实施例中,接头包含GEGTSTGSGGSGGGAD的氨基酸序列(SEQ ID NO:343)。

[0683] 天然接头在二级结构中采纳各种构象,如螺旋、 β -链、卷/弯(coil/bend)和转弯(turn),以发挥其功能。 α -螺旋结构中的接头可以充当刚性间隔物以有效地分离蛋白质结构域,因此减少其不利的相互作用。具有富含Pro的序列的非螺旋接头可增加接头硬度且在减少结构域间干扰方面起作用。在一些实施例中,抗MSLN构建体中的两个结构域(如抗MSLN抗体部分和半衰期延长结构域或细胞因子)通过氨基酸序列为A(EAAAK)₄A(SEQ ID NO:344)的 α -螺旋接头连接在一起。

[0684] 在某些实施例中,第一接头为基质金属蛋白酶(MMP)敏感型接头。在某些实施例中,第二接头为MMP敏感型接头。在某些实施例中,第一和第二接头都是MMP敏感型接头。

[0685] 在某些实施例中,MMP敏感型接头为可通过MMP(例如MMP-7、MMP-9或MMP-13)裂解的接头。主要富集在肿瘤细胞外基质(ECM)、肿瘤细胞和肿瘤脉管中的MMP与肿瘤的进展和转移紧密相关。在一些实施例中,第一接头对MMP-7敏感。在一些实施例中,第一接头对MMP-9敏感。在一些实施例中,第一接头对MMP-13敏感。在一些实施例中,第二接头对MMP-7敏感。在一些实施例中,第二接头对MMP-9敏感。在一些实施例中,第二接头对MMP-13敏感。

[0686] 在一些实施例中,MMP可裂解接头由具有以下结构的部分组成或包含具有以下结构的部分:

[0687] P5-P4-Pro-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'。

[0688] 在一些实施例中,P5可以是除Pro以外的任何氨基酸且优选地为具有小脂肪族侧链的氨基酸。

[0689] 在一些实施例中,P4可以是除Pro以外的任何氨基酸且优选地为Gly。

[0690] 在一些实施例中,P2可以选自由Gln、Ala、Ser、Arg和Lys组成的组。

[0691] 在一些实施例中,P1可以选自由Ser、Thr和Gly组成的组。

[0692] 在一些实施例中,P1'可以是Leu或Ile,或任何疏水性氨基酸,如Phe、Ala、Val或Met。

[0693] 在一些实施例中,P2'可以是具有疏水性侧链的氨基酸。

[0694] 在一些实施例中,P3'可以是具有小脂肪族侧链的氨基酸且优选地为Gly。

[0695] 在一些实施例中,P4'可以是具有疏水性侧链的氨基酸且优选地为Gln。

[0696] 在一些实施例中,P5是除Pro以外的任何氨基酸且优选地为具有小脂肪族侧链的氨基酸;P4是除Pro以外的任何氨基酸且优选地为Gly;P2选自由Gln、Ala、Ser、Arg和Lys组成的组;P1选自由Ser、Thr和Gly组成的组;P1'是Leu或Ile,或任何疏水性氨基酸,如Phe、Ala、Val或Met;P2'是具有疏水性侧链的氨基酸;P3'是具有小脂肪族侧链的氨基酸且优选地为Gly;以及P4'是具有疏水性侧链的氨基酸且优选地为Gln。

[0697] 在一些实施例中,第一接头和/或第二接头包含选自以下表5的序列。

[0698] 表5

[0699]

Lys-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln(SEQ ID NO:267)
Phe-Gly-Pro-Gln-Gly- <u>Leu</u> -Ala-Gly-Gln(SEQ ID NO:268)
Arg-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Phe-Gly-Gln(SEQ ID NO:269)
Ile-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln(SEQ ID NO:270)
Met-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Leu-Gly-Gln(SEQ ID NO:27)
Lys-Gly-Pro-Gln-Ser-Ile-Ala-Gly-Gln(SEQ ID NO:272)
Phe-Gly-Pro-Gln-Ser- <u>Leu</u> -Ala-Gly-Gln(SEQ ID NO:273)
Arg-Gly-Pro-Gln-Ser-Ile-Phe-Gly-Gln(SEQ ID NO:274)
Ile-Gly-Pro-Gln-Ser-Ile-Trp-Gly-Gln(SEQ ID NO:275)
Met-Gly-Pro-Gln-Ser-Ile-Leu-Gly-Gln(SEQ ID NO:27)
Lys-Gly-Pro-Gln-Thr-Ile-Ala-Gly-Gln(SEQ ID NO:277)
Phe-Gly-Pro-Gln-Thr- <u>Leu</u> -Ala-Gly-Gln(SEQ ID NO:278)
Arg-Gly-Pro-Gln-Thr-Ile-Phe-Gly-Gln(SEQ ID NO:279)
Ile-Gly-Pro-Gln-Thr-Ile-Trp-Gly-Gln(SEQ ID NO:280)
Phe-Arg-Pro-Arg-Ser-Ile-Thr-Gly-Gln(SEQ ID NO:281)
Met-Gly-Pro-Gln-Thr-Ile-Leu-Gly-Gln(SEQ ID NO:282)

[0700] 在一些实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:267的序列。在其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:268的序列。在其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:269的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:270的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:270的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:271的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:272的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:

273的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:274的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:275的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:276的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:277的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:278的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:279的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:280的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:281的序列。在又其它实施例中,第一接头包含SEQ ID NO:282的序列。

[0701] 在一些实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:267的序列。在其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:268的序列。在其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:269的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:270的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:270的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:271的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:272的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:273的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:274的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:275的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:276的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:277的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:278的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:279的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:280的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:281的序列。在又其它实施例中,第二接头包含SEQ ID NO:282的序列。

[0702] 在一些实施例中,第一接头和第二接头各自独立地选自由以下组成的组:SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74,如以下实例中的表8所阐述。

[0703] 在一些实施例中,第一接头具有SEQ ID NO:66。在一些实施例中,第一接头具有SEQ ID NO:67。在一些实施例中,第一接头具有SEQ ID NO:68。在一些实施例中,第一接头具有SEQ ID NO:69。在其它实施例中,第一接头具有SEQ ID NO:70。在其它实施例中,第一接头具有SEQ ID NO:71。在其它实施例中,第一接头具有SEQ ID NO:72。在又其它实施例中,第一接头具有SEQ ID NO:73。在又其它实施例中,第一接头具有SEQ ID NO:74。

[0704] 在一些实施例中,第二接头具有SEQ ID NO:66。在一些实施例中,第二接头具有SEQ ID NO:67。在一些实施例中,第二接头具有SEQ ID NO:68。在一些实施例中,第二接头具有SEQ ID NO:69。在其它实施例中,第二接头具有SEQ ID NO:70。在其它实施例中,第二接头具有SEQ ID NO:71。在其它实施例中,第二接头具有SEQ ID NO:72。在又其它实施例中,第二接头具有SEQ ID NO:73。在又其它实施例中,第二接头具有SEQ ID NO:74。

[0705] 在本文所提供的某些IL-21融合蛋白中,结合到抗原的结合分子包含两种或更多种抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,结合到抗原的结合分子包含两种抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,两种抗体或抗原结合片段与第三接头连接。例如,如以下实例中所描述,IL-21- α HSA-抗MSLN的抗MSLN功能模块(结合到MSLN的结合分子)包含靶向间皮素不同结构域的两单结构域抗体(sdAb),并且所述两种sdAb通过第三接头连接。

[0706] 在一些实施例中,第三接头为MMP敏感型接头。

[0707] 在一些实施例中,第三接头选自由以下组成的组:SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69和SEQ ID NO:70,如以下表8中所阐述。在一些实施例中,第三接头具有SEQ ID NO:66。在一些实施例中,第三接头具有SEQ ID NO:67。在一些实施例中,

第三接头具有SEQ ID NO:68。在其它实施例中,第三接头具有SEQ ID NO:69。在其它实施例中,第三接头具有SEQ ID NO:70。

[0708] 在一些实施例中,第一接头在S123到S132处连接到IL-21或其变体的C端。在其它实施例中,第一接头在IL-21或其变体的氨基酸123到132内的氨基酸处连接到IL-21或其变体。在其它实施例中,第一接头在IL-21或其变体的C端的最后10个氨基酸处连接到IL-21或其变体。

[0709] 在一个实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸123。在一个实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸124。在一个实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸125。在一个实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸126。在一个实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸127。在一个实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸128。在一个实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸129。在一个实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸130。在一个实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸131。在一个实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸132。

[0710] 在其它实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的L123。

[0711] 在一些实施例中,第一接头在Q1到D4处连接到IL-21或其变体的N端。在一些实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸1。在一些实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸2。在一些实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸3。在一些实施例中,第一接头连接到IL-21或其变体的氨基酸4。

[0712] 在一些实施例中,第二接头连接到白蛋白结合分子的C端。在其它实施例中,第二接头连接到白蛋白结合分子的N端。

[0713] 在一些实施例中,第二接头连接到结合到抗原的结合分子的N端。在一些实施例中,第二接头连接到结合到抗原的结合分子的C端。

[0714] 多核苷酸

[0715] 在某些实施例中,本发明涵盖编码本文所描述的融合蛋白的多核苷酸。术语“编码多肽的多核苷酸”涵盖仅包括多肽的编码序列的多核苷酸以及包括额外编码和/或非编码序列的多核苷酸。本发明的多核苷酸可以呈RNA形式或呈DNA形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合成DNA;并且可以是双链或单链的,如果是单链的,可以是编码链或非编码(反义)链。

[0716] 在某些实施例中,多核苷酸包含在同一阅读框中融合到多核苷酸(其有助于例如从宿主细胞表达和分泌多肽)的多肽的编码序列(例如,充当控制多肽转运的分泌序列的前导序列)。多肽可以具有被宿主细胞裂解的前导序列,以形成多肽的“成熟”形式。

[0717] 在某些实施例中,多核苷酸包含在同一读取框中融合到标记或标签序列的多肽的编码序列。例如,在一些实施例中,标记序列为由载体供应的六聚组氨酸标签,所述载体允许在细菌宿主的情况下有效纯化融合到标记的多肽。在一些实施例中,标记与其它亲和力标签结合使用。

[0718] 本发明进一步涉及本文所描述的多核苷酸的变体,其中变体编码例如多肽的片段、类似物和/或衍生物。在某些实施例中,本发明提供多核苷酸,其包含具有以下核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列与编码包含本文所描述的结合分子的多肽的多核苷酸至少约80%一致、至少约85%一致、至少约90%一致、至少约95%一致,并且在一些实施例中,至

少约96%、97%、98%或99%一致。

[0719] 如本文所使用,短语“具有与参考核苷酸序列至少例如95%“一致”的核苷酸序列的多核苷酸”意指多核苷酸的核苷酸序列与参考序列一致,除了所述多核苷酸序列在参考核苷酸序列的每100个核苷酸中可包括至多五个点突变。换句话说,为了获得具有与参考核苷酸序列至少95%一致的核苷酸序列的多核苷酸,参考序列中至多5%的核苷酸可以缺失或用另一个核苷酸取代,或占参考序列中总核苷酸的至多5%的核苷酸数目可以插入到参考序列中。参考序列的这些突变可以在参考核苷酸序列的5'或3'端位置处或在那些末端位置之间的任何位置处发生,散布在参考序列的核苷酸之间或分布在参考序列内的一个或多个连续基团中。

[0720] 多核苷酸变体可包含编码区、非编码区或这两者的更改。在一些实施例中,多核苷酸变体含有产生沉默取代、添加或缺失,但不改变经编码的多肽的特性或活性的更改。在一些实施例中,多核苷酸变体包含不引起多肽的氨基酸序列变化的沉默取代(这是由于遗传密码的简并)。多核苷酸变体的产生可出于多种原因,例如,优化特定宿主的密码子表达(即,将人类mRNA中的密码子变为细菌宿主(如大肠杆菌)所优选的那些)。在一些实施例中,多核苷酸变体在序列的非编码区或编码区中包含至少一个沉默突变。

[0721] 在一些实施例中,产生多核苷酸变体以调节或更改经编码多肽的表达(或表达水平)。在一些实施例中,产生多核苷酸变体以提高经编码多肽的表达。在一些实施例中,产生多核苷酸变体以降低经编码多肽的表达。在一些实施例中,相比于亲本多核苷酸序列,多核苷酸变体提高了经编码多肽的表达。在一些实施例中,相比于亲本多核苷酸序列,多核苷酸变体降低了经编码多肽的表达。

[0722] 在某些实施例中,多核苷酸被分离。在某些实施例中,多核苷酸基本上是纯的。

[0723] 还提供包含本文所描述的多核苷酸的载体和细胞。在一些实施例中,表达载体包含多核苷酸分子。在一些实施例中,宿主细胞包含包括多核苷酸分子的表达载体。在一些实施例中,宿主细胞包含一种或多种包含多核苷酸分子的表达载体。在一些实施例中,宿主细胞包含多核苷酸分子。在一些实施例中,宿主细胞包含一种或多种多核苷酸分子。本文中提供的载体的构建在以下实例中示例。

[0724] 抗间皮素构建体或融合蛋白的制备方法

[0725] 在又一个方面,本文提供了用于制备本文所提供的各种抗间皮素构建体或融合蛋白的方法。

[0726] 本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白的重组表达可能需要构建含有编码抗MSLN构建体或融合蛋白或其片段的多核苷酸的表达载体。一旦已经获得编码本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白、或其片段的多核苷酸,就可以使用本领域中众所周知的技术通过重组DNA技术产生用于产生结合分子的载体。因此,本文描述了通过表达含有编码核苷酸序列的多核苷酸来制备蛋白质的方法。可以使用本领域技术人员熟知的方法以构建含有编码序列和适当转录及翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。还提供可复制载体,其包含可操作地连接到启动子的编码本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白、或其片段或CDR的核苷酸序列。

[0727] 可以通过常规技术将表达载体转移到宿主细胞,并且随后通过常规技术培养经转染的细胞,以产生本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白。因此,本文还提供含有可操作地

连接到异源启动子的编码本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白或其片段的多核苷酸的宿主细胞。

[0728] 可利用多种宿主-表达载体系统来表达本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白(参见例如美国专利第5,807,715号)。此类宿主-表达系统表示可以产生目的编码序列并随后纯化的载体,还可表示在经适当核苷酸编码序列转化或转染时可原位表达本文所提供的融合蛋白的细胞。宿主-表达系统包括但不限于微生物,如经含有编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌(*E. coli*)和枯草杆菌(*B. subtilis*));经含有编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,酿酒酵母(*Saccharomyce*)毕赤酵母(*Pichia*));经含有编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;经重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒(CaMV)、烟草花叶病毒(TMV))感染的或经含有编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统;或具有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如,COS、CHO、BHK、293、NS0和3T3细胞),所述构建体含有衍生于哺乳动物细胞的基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或衍生于哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)。细菌细胞(如大肠杆菌)或真核细胞(尤其用于表达全重组抗体分子)可以用于表达重组抗MSLN构建体或融合蛋白。例如,哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞(CHO))与载体(如来自人类巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件)结合是抗体或其变体的有效表达系统(Foecking等人,1986,《基因》45:101;和Cockett等人,1990,《生物技术(Bio/Technology)》8:2)。在一些实施例中,本文提供的抗MSLN构建体或融合蛋白产生于CHO细胞中。在具体实施例中,编码本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白的核苷酸序列的表达受组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子的调节。

[0729] 在细菌系统中,根据表达的抗MSLN构建体或融合蛋白的预期用途,可以有利地选择多个表达载体。例如,当将产生大量此类抗MSLN构建体或融合蛋白时,对于抗MSLN构建体或融合蛋白的药物组合物的生成,可能需要引导表达高水平的易于纯化的抗MSLN构建体或融合蛋白产物的载体。此类载体包括但不限于大肠杆菌表达载体pUR278(Ruther等人,1983,EMBO 12:1791),其中编码序列可以单独地接合到与lac Z编码区的框架中的载体中,以产生抗MSLN构建体或融合蛋白;pIN载体(Inouye和Inouye,1985,《核酸研究》13:3101-3109;Van Heeke和Schuster,1989,《生物化学杂志》24:5503-5509);等等。pGEX载体还可以用于将外源多肽表达为抗MSLN构建体或具有谷胱甘肽S转移酶(GST)的融合蛋白。一般来说,此类抗MSLN构建体或融合蛋白是可溶的,可以通过吸附且与基质谷胱甘肽琼脂糖珠粒结合、随后在游离谷胱甘肽存在的情况下洗脱而从经过溶解的细胞中容易地纯化。所述pGEX载体被设计成包括凝血酶或因子Xa蛋白酶裂解位点,使得克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0730] 在昆虫系统中,苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核多角体病毒(AcNPV)用作表达外源基因的载体。病毒在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。编码序列可以单独地克隆到病毒的非必需区(例如多角体蛋白基因)中并且置于AcNPV启动子(例如多角体蛋白启动子)的控制下。

[0731] 在哺乳动物宿主细胞中,可以利用多个基于病毒的表达系统。在腺病毒用作表达载体的情况下,所关注的编码序列可以接合至腺病毒转录/翻译控制复合物,例如晚期启动

子和三联体前导序列。随后可以通过体外或体内重组将这种嵌合基因插入腺病毒基因组中。在病毒基因组的非必需区(例如,区E1或E3)中插入将产生活的且能够在感染的宿主中表达抗MSLN构建体或融合蛋白的重组病毒(例如,参见Logan和Shenk,1984,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》81:355-359)。为了高效地翻译所插入的编码序列,还可能需特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。此外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同相,以确保对整个插入物的翻译。这些外源性翻译控制信号和起始密码子可具有天然和合成的多种来源。通过包括适当的转录增强子元件、转录终止子等,可以增强表达效率(参见例如,Bittner等人,1987,《酶学方法(Methods Enzymol)》153:51-544)。

[0732] 另外,可以选择调节所插入序列的表达或以所期望的特定方式修饰且加工基因产物的宿主细胞株系。蛋白质产物的此类修饰(例如糖基化)和加工(例如裂解)对于蛋白质的功能来说可以是重要的。不同的宿主细胞对蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰有各自的特征和特异性机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统,以确保表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此目的,可以使用具有用于对初级转录物进行适当加工、对基因产物进行糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERY、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不内源地产生任何免疫球蛋白链的鼠类骨髓瘤细胞系)、CRL7030和HsS78Bst细胞。

[0733] 为了长期高产量地生产重组蛋白,可以利用稳定表达。例如,可工程化稳定表达抗MSLN构建体或融合蛋白的细胞系。宿主细胞可以用通过适当的表达控制元件(例如启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等)控制的DNA和可选标记来转化,而不是使用含有病毒复制起点的表达载体。在引入外源DNA后,可以使工程化细胞在增菌培养基中生长1-2天,随后换成选择性培养基。重组质粒中的可选标记使其对选择产生抗性,并使得细胞将质粒稳定地整合到其染色体中并生长形成病灶,而病灶又进而克隆并扩增成细胞系。这种方法可有利地用于工程化表达抗MSLN构建体或融合蛋白的细胞系。此类工程化的细胞系特别适用于筛选和评估与结合分子直接或间接相互作用的组合物。

[0734] 可以使用多种选择系统,包括但不限于可分别用于tk细胞、hgprt细胞或aprt细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase)(Wigler等人,1977,《细胞》11:223)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase)(Szybalska和Szybalski,1992,《美国国家科学院院刊》48:202)和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(adenine phosphoribosyltransferase)(Lowy等人,1980,《细胞》22:8-17)基因。并且,抗代谢产物抗性可作为下列基因的选择基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler等人,1980,《美国国家科学院院刊》77:357;O'Hare等人,1981,《美国国家科学院院刊》78:1527);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan和Berg,1981,《美国国家科学院院刊》78:2072);neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Wu和Wu,1991,《生物疗法(Biotherapy)》3:87-95;Tolstoshev,1993,《药理学和毒理学年度评论(Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.》32:573-596;Mulligan,1993,《科学(Science)》260:926-932;以及Morgan和Anderson,1993,《生物化学年鉴(Ann.Rev.Biochem.》62:191-217;May,1993,TIB TECH 11(5):155-215);以及hygro,赋予对潮霉素的抗性(Santerre等人,1984,《基因》30:147)。可以常规地应用重组DNA技术领域已知的方法来选择所需的重组克隆,

并且此类方法描述于以下文献中:例如,Ausubel FM等人(编辑),《当代分子生物学实验室指南(Current Protocols in Molecular Biology)》,约翰威利父子出版社(John Wiley& Sons),纽约(1993);Kriegler,《基因转移和表达,实验室手册(Gene Transfer and Expression,ALaboratory Manua)》,斯托克顿出版社(Stockton Press),纽约(1990);以及 Dracopoli等人(编辑),《当代人类遗传学实验室指南(Current Protocols in Human Genetics)》的第12章和第13章中,约翰威利父子出版社,纽约(1994);Colbère-Garapin F等人,1981《分子生物学杂志》150:1,所述文献通过全文引用的方式并入本文中。

[0735] 通过载体扩增,可以提高抗MSLN构建体或融合蛋白的表达水平(综述参见 Bebbington和Hentschel,《基于基因扩增的载体在DNA克隆中在哺乳动物细胞中表达克隆基因的用途(The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning)》,第3卷(学术出版社(Academic Press),纽约,1987))。当表达抗MSLN构建体或融合蛋白的载体系统中的标记是可扩增的时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的提高将增加标记基因的拷贝数。由于扩增区与抗MSLN构建体或融合蛋白基因相关,抗MSLN构建体或融合蛋白的产生也将增加(Crouse等人,1983,《分子与细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)》3:257)。

[0736] 宿主细胞可以用本文所提供的多种表达载体共转染。载体可以包含相同的选择标记,其使得各个编码多肽能够相等表达。或者,可以使用单一载体,其编码并且能够表达多种多肽。编码序列可以包含cDNA或基因组DNA。

[0737] 一旦本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白已经通过重组表达产生,其可以通过本领域中已知的用于纯化多肽(例如免疫球蛋白分子)的任何方法纯化,例如通过色谱法(例如离子交换法、亲和法(尤其通过蛋白质A之后的对特异性抗原的亲和法、尺寸柱色谱法和Kappa选择亲和色谱法)、离心法、差溶法或通过用于纯化蛋白质的任何其它标准技术纯化。此外,本文中提供的抗MSLN构建体或融合蛋白分子可以融合到本文中所描述或以其它方式在本领域中已知的异源多肽序列以促进纯化。

[0738] 以下实例举例说明制得本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白的方法。

[0739] 药物组合物

[0740] 在一个方面,本公开进一步提供包含至少一种本公开的抗MSLN构建体或融合蛋白的药物组合物。在一些实施例中,药物组合物包含治疗有效量的本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白和药学上可接受的赋形剂。

[0741] 通过将具有所需纯度程度的抗MSLN构建体或融合蛋白与呈水溶液形式或冻干或其它干燥形式的任选的生理学上可接受的赋形剂混合,来制备包含抗MSLN构建体或融合蛋白的药物组合物,以进行储存。(参见例如Remington,《雷明顿药理学科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》(第18版,1980))。

[0742] 本发明的抗MSLN构建体或融合蛋白可以任何合适形式配制,用于递送到靶细胞/组织,例如作为微胶囊或粗乳液(Remington,同上文;Park等人,2005,《分子》10:146-61;Malik等人,2007,《当今药物递送(Curr.Drug.Deliv.)》4:141-51),作为缓释制剂(Putney和Burke,1998,《自然生物技术》,16:153-57),或呈脂质体(Maclean等人,1997,《国际肿瘤学杂志(Int.J.Oncol.)》11:325-32;Kontermann,2006,《分子治疗学新见(Curr.Opin.Mol.Ther.)》8:39-45)。

[0743] 本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白也可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚(甲基丙烯酸酯)微胶囊,分别在胶态药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中或在粗乳液中。此类技术例如在上文的Remington中公开。

[0744] 各种组合物和递送系统为已知的且可与如本文所描述的抗MSLN构建体或融合蛋白一起使用,包括但不限于脂质体、微米粒子、微胶囊中的囊封,能够表达抗MSLN构建体或融合蛋白的重组细胞,受体介导的内吞(参见例如Wu和Wu,1987,《生物化学杂志》262:4429-32),将核酸构建为逆转录病毒或其它载体等的一部分。在另一实施例中,组合物可作为控制释放或缓释系统提供。在一个实施例中,泵可用于实现控释或缓释(参见例如Langer,同上文;Sefton,1987,《生物医学工程中的重要评论(Crit.Ref.Biomed.Eng.)》14:201-40;Buchwald等人,1980,《手术》88:507-16;以及Saudek等人,1989,《新英格兰医学杂志(N.Engl.J.Med.)》321:569-74)。在另一个实施例中,聚合材料可用于实现预防性或防治性药剂(例如本文所描述的融合蛋白)或本文提供的组合物的控释或缓释(参见例如,《控制释放的医学应用(Medical Applications of Controlled Release)》(Langer和Wise编辑,1974);《控制的药物生物可用性、药品设计和性能(Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance)》(Smolen和Ball编辑,1984);Ranger和Peppas,1983,《高分子科学杂志-高分子化学评论(J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.)》23:61-126;Levy等人,1985,《科学(Science)》228:190-92;During等人,1989,《神经病学年鉴(Ann.Neurol.)》25:351-56;Howard等人,1989,《神经外科杂志(J.Neurosurg.)》71:105-12;美国专利第5,679,377号;第5,916,597号;第5,912,015号;第5,989,463号;和第5,128,326号;PCT专利公开第W0 99/15154号和第W0 99/20253号)。用于缓释制剂的聚合物的实例包括但不限于聚(甲基丙烯酸2-羟基乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酸酐、聚(N-乙基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)和聚原酸酯。在一个实施例中,在缓释制剂中使用的聚合物是惰性的、不含可浸出杂质、在储存时稳定的、无菌和生物可降解的。

[0745] 在又一个实施例中,可将控释或缓释系统放置在特定靶组织(例如鼻通道或肺)附近,因此仅需要全身剂量中的一小部分(参见例如Goodson,《控制释放的医学应用》第2卷,115-38(1984))。控释系统例如由Langer,1990,《科学》249:1527-33论述。本领域技术人员已知的任何技术都可用于生产包含如本文所描述的一种或多种抗MSLN构建体或融合蛋白的缓释制剂(参见例如美国专利第4,526,938号;PCT专利公开第W0 91/05548号和第W0 96/20698号;Ning等人,1996,《放射疗法和肿瘤学(Radiotherapy&Oncology)》39:179-89;Song等人,1995,《PDA药物科学与技术杂志(PDA J.ofPharma.Sci.&Tech.)》50:372-97;Cleek等人,1997,《控制释放生物活动国际研讨会记录(Pro.Int'l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.)》24:853-54;和Lam等人,1997,《控制释放生物活动国际研讨会记录》24:759-60)。

[0746] 使用方法

[0747] 在具体实施例中,本文提供用于预防和/或治疗疾病或病况的包含本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白的组合物。在一个实施例中,本文提供用于预防疾病或病况的组

合物,其中所述组合物包含本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白。在一个实施例中,本文提供用于治疗疾病或病况的组合物,其中所述组合物包含本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白。在一些实施例中,疾病或病况是癌症。在一些实施例中,癌症为实体肿瘤癌症。在某些实施例中,受试者是有需要的受试者。在一些实施例中,受试者患有疾病或病况。在其它实施例中,受试者处于患有疾病或病况的风险下。在一些实施例中,施用使得预防、管理、治疗或改善疾病或病况。

[0748] 在一个实施例中,本文提供用于预防和/或治疗疾病或病况的症状的组合物,其中组合物包含本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白。在一个实施例中,本文提供用于预防疾病或病况的症状的组合物,其中所述组合物包含本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白。在一个实施例中,本文提供用于治疗疾病或病况的症状的组合物,其中所述组合物包含本文所提供的抗MSLN构建体或融合蛋白。在一个实施例中,疾病是癌症。在某些实施例中,受试者是有需要的受试者。在一些实施例中,受试者患有疾病或病况。在其它实施例中,受试者处于患有疾病或病况的风险下。在一些实施例中,施用使得预防或治疗疾病或病况的症状。

[0749] 在另一实施例中,本文提供预防和/或治疗受试者的疾病或病况的方法,其包含施用有效量的本文所提供的抗间皮素构建体或融合蛋白。在一个实施例中,本文提供预防受试者的疾病或病况的方法,其包含施用有效量的本文所提供的抗间皮素构建体或融合蛋白。在一个实施例中,本文提供治疗受试者的疾病或病况的方法,其包含施用有效量的本文所提供的抗间皮素构建体或融合蛋白。在一个实施例中,疾病或病况是癌症。在某些实施例中,受试者是有需要的受试者。在一些实施例中,受试者患有疾病或病况。在其它实施例中,受试者处于患有疾病或病况的风险下。在一些实施例中,施用使得预防或治疗疾病或病况。

[0750] 在另一实施例中,本文提供预防和/或治疗受试者的疾病或病况的症状的方法,其包含施用有效量的本文所提供的抗间皮素构建体或融合蛋白。在一个实施例中,本文提供预防受试者的疾病或病况的症状的方法,其包含施用有效量的本文所提供的抗间皮素构建体或融合蛋白。在一个实施例中,本文提供治疗受试者的疾病或病况的症状的方法,其包含施用有效量的本文所提供的抗间皮素构建体或融合蛋白。在一个实施例中,疾病或病况是癌症。在某些实施例中,受试者是有需要的受试者。在一些实施例中,受试者患有疾病或病况。在其它实施例中,受试者处于患有疾病或病况的风险下。在一些实施例中,施用使得预防或治疗疾病或病况的症状。

[0751] 本文还提供预防和/或治疗疾病或病况的方法,其通过向受试者施用有效量的本文所提供的抗间皮素构建体或融合蛋白、或包含本文所提供的抗间皮素构建体或融合蛋白的药物组合物来进行。在一个方面,融合蛋白是基本上纯化的(即,基本上不含限制其作用或产生非所需副作用的物质)。施用疗法的受试者可以是哺乳动物,如非灵长类动物(例如牛、猪、马、猫、犬、大鼠等)或灵长类动物(例如猴类,如猕猴,或人类)。在一个实施例中,受试者为人类。在另一实施例中,受试者为患有疾病或病况的人类,例如癌症,包括实体肿瘤癌症。

[0752] 本文还提供预防和/或治疗疾病或病况的方法,其通过向受试者施用有效量的包含特异性结合到间皮素的抗MSLN抗体部分的抗间皮素构建体来进行,其中所述抗MSLN抗体部分具有降低的岩藻糖基化。

[0753] 疾病或病况

[0754] 本文所描述的方法可以用于治疗疾病或病况。在一些实施例中,疾病或病况是癌症。在一些实施例中,癌症是间皮素阳性癌。在一些实施例中,癌症是实体肿瘤。在一些实施例中,癌症选自由以下组成的组:胃癌(gastric cancer)、肺癌(如非小细胞肺癌)、卵巢癌(如上皮卵巢癌)、食道癌、胰脏癌、宫颈癌、间皮瘤(如恶性间皮瘤、恶性上皮胸膜间皮瘤、晚期复发性上皮样间皮瘤)、胃癌(stomach cancer)、子宫内膜癌、胰腺导管腺癌(ductal pancreatic adenocarcinomas)和乳腺癌。

[0755] 组合疗法

[0756] 在一些实施例中,本文所描述的方法进一步包含施用第二药剂。在一些实施例中,第二药剂包含细胞因子。在一些实施例中,细胞因子是IL-21或IL-15。在一些实施例中,IL-21或IL-15呈包含半衰期延长结构域的融合蛋白形式。在一些实施例中,半衰期延长结构域是Fc结构域或白蛋白结合结构域。在一些实施例中,同时施用抗间皮素构建体和细胞因子。

[0757] 在一些实施例中,提供一种治疗个体的胃癌的方法,其包含向所述个体施用a)抗间皮素药剂;b)抗Her2药剂;和c)IL-21。在一些实施例中,IL-21呈包含半衰期延长结构域的融合蛋白形式。在一些实施例中,抗Her2药剂是赫赛汀(Herceptin)。在一些实施例中,抗间皮素药剂包含如本文所描述的抗间皮素构建体。在一些实施例中,抗间皮素药剂包含包括抗MSLN重链可变区(V_H)的抗间皮素抗体部分,所述抗MSLN重链可变区包含:HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,其分别包含V_H链区内的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,所述V_H链区具有SEQ ID NO:123-156和SEQ ID NO:285-301中的任一个中所阐述的序列。在一些实施例中,同时施用抗间皮素构建体、抗Her2药剂和IL-21。

[0758] 用药方案

[0759] 可以使用任何合适的剂量和施用途向个体施用抗间皮素构建体和/或第二药剂。在一些实施例中,使抗间皮素构建体和/或第二药剂经肠胃外施用到个体中。施用途根据已知和公认的方法,如以合适方式在一段时间内单次或多次团注(bolus)或输注,例如通过皮下、静脉内、腹膜内、肌肉内、动脉内、病灶内、关节内、瘤内或口服途径注射或输注。

[0760] 在一些实施例中,将抗间皮素构建体和第二药剂同时、并行或依序施用到个体中。

[0761] 确定适当剂量或施用途完全在普通技术人员的技能范围内。动物实验为确定用于人类诊断应用的有效剂量提供可靠指导。有效剂量的种间类推可遵循由Mordenti, J. 和 Chappell, W., 在《毒代动力学和新药开发 (Toxicokinetics and New Drug Development)》中的“毒代动力学中种间缩放的用途 (The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics)”, Yacobi等人编辑,培格曼出版社 (Pergamon Press), 纽约1989,第42-46页制定的原理来进行。

[0762] 在一些实施例中,抗MSLN构建体以约每周一次到约每周两次的频率施用。在一些实施例中,抗MSLN构建体以至少约每周一次的频率施用。在一些实施例中,抗MSLN构建体以不超过约每周两次的频率施用。在一些实施例中,对于每一治疗周期,施用抗MSLN构建体至少约一、二、三、四或五周。

[0763] 在一些实施例中,用于每次向人类施用的抗MSLN构建体的量为相当于对小鼠来说约5mg/kg的剂量的量。在一些实施例中,用于每次向人类施用的抗MSLN构建体的量为相当于对小鼠来说约100μg的剂量的量。参见Nair, A. B. 和 Jacob, S. (2016), “动物和人之间剂量

转换的简单实践指南(A simple practice guide for dose conversion between animals and human)”,《基础与临床药理学杂志(Journal of basic and clinical pharmacy)》,7(2),27。

[0764] 在一些实施例中,第二药剂包含细胞因子(如细胞因子融合蛋白,如IL-21-抗HSA融合蛋白)。在一些实施例中,细胞因子以约每周两次的频率施用。在一些实施例中,对于每一治疗周期,施用细胞因子至少约一、两周或两周半。在一些实施例中,用于每次向人类施用的细胞因子的量为相当于对小鼠来说约5 μ g到约25 μ g的剂量的量。

[0765] 在一些实施例中,第二药剂包含抗Her2药剂(如赫赛汀)。在一些实施例中,抗Her2药剂以约每周两次的频率施用。在一些实施例中,对于每一治疗周期,施用细胞因子至少约一、两周或两周半。在一些实施例中,用于每次向人类施用的细胞因子的量为相当于对小鼠来说约20 μ g的剂量的量。

[0766] 各种递送系统为已知的且可用于施用预防性或防治性药剂(例如本文所提供的融合蛋白),包括但不限于脂质体、微米粒子、微胶囊中的囊封,能够表达融合蛋白的重组细胞,受体介导的内吞(参见例如Wu和Wu,《生物化学杂志》262:4429-4432(1987)),将核酸构建为逆转录病毒或其它载体等的一部分。施用预防性或防治性药剂(例如本文所提供的融合蛋白)或药物组合物的方法包括但不限于肠胃外施用(例如,皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内和皮下)、硬膜外施用和粘膜施用(例如鼻内和口服途径)。在具体实施例中,预防性或防治性药剂(例如本文所提供的融合蛋白)或药物组合物经鼻内、肌肉内、静脉内或皮下施用。预防性或防治性药剂、或组合物可以通过任何适宜途径,例如通过输注或团注、通过由上皮或粘膜皮肤衬里(例如,口腔粘膜、鼻内粘膜、直肠和肠粘膜等)而吸收来施用,且可与其它生物活性剂一起施用。可全身性或局部施用。另外,还可以采用经肺施用,例如通过使用吸入器或喷雾器,和具有雾化剂的制剂。参见例如美国专利第6,019,968号、第5,985,320号、第5,985,309号、第5,934,272号、第5,874,064号、第5,855,913号、第5,290,540号和第4,880,078号;以及PCT专利公开第W092/19244号、第W0 97/32572号、第W0 97/44013号、第W0 98/31346号和第W0 99/66903号,其中各自以全文引用的方式并入本文中。

[0767] 在具体实施例中,可能需要局部地向需要治疗的区域施用防治性或治疗性药剂或本文所提供的药物组合物。这可以通过例如但不限于局部输注,通过局部施用(例如通过鼻内喷雾)、通过注射或借助于植入物来实现,所述植入物是多孔、无孔或胶状的材料,包括膜,如硅橡胶(silastic)膜或纤维。在一些实施例中,当施用本文所提供的融合蛋白时,必须谨慎使用融合蛋白不吸收的材料。

[0768] 在另一个实施例中,本文所提供的预防性或防治性药剂、或组合物可以小囊泡、具体来说以脂质体形式递送(参见Langer,1990,《科学》249:1527-1533;Treat等人,《传染性疾病和癌症的疗法中的脂质体(Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer)》,Lopez-Berestein和Fidler(编辑),利斯(Liss),纽约,第353-365页(1989);Lopez-Berestein,同上,第317-327页;一般来说参见同上)。

[0769] 在另一个实施例中,本文所提供的防治性或治疗性药剂、或组合物可在控释或缓释系统中递送。在一个实施例中,泵可用于实现控释或缓释(参见Langer,同上文;Sefton,1987,《生物医学工程中的重要评论》14:20;Buchwald等人,1980,《手术》88:507;Saudek等人,1989,《新英格兰医学杂志》321:574)。在另一个实施例中,聚合材料可用于实现防治性

或治疗性药剂(例如本文所提供的抗体)或本文所提供的组合物的控释或缓释(参见例如,《控制释放的医学应用》,Langer和Wise(编辑),CRC出版社,佛罗里达波卡拉顿(Boca Raton,Florida)(1974);《控制的药物生物可用性、药品设计和性能》,Smolen和Ball(编辑),威立(Wiley),纽约(1984);Ranger和Peppas,1983,《高分子科学杂志-高分子化学评论》23:61;也参见Levy等人,1985,《科学》228:190;During等人,1989,《神经病学年鉴》25:351;Howard等人,1989,《神经外科杂志》71:105;美国专利第5,679,377号;第5,916,597号;第5,912,015号;第5,989,463号;和第5,128,326号;PCT专利公开第W0 99/15154号和PCT专利公开第W0 99/20253号。用于缓释制剂的聚合物的实例包括但不限于聚(甲基丙烯酸2-羟基乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酸酐、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)和聚原酸酯。在实施例中,在缓释制剂中使用的聚合物是惰性的、不含可浸出杂质、在储存时稳定的、无菌和生物可降解的。在又一个实施例中,可将控释或缓释系统放置在治疗靶点(例如鼻通道或肺)附近,因此仅需要全身剂量中的一小部分(参见例如Goodson,《控制释放的医学应用》,同上文,第2卷,第115-138页(1984))。控释系统由Langer(1990,《科学》249:1527-1533)在文献中论述。本领域技术人员已知的任何技术都可用于生产包含本文所提供的一种或多种融合蛋白的缓释制剂。参见例如,美国专利第4,526,938号;PCT专利公开W0 91/05548;PCT专利公开W0 96/20698;Ning等人,1996,“使用持续释放凝胶对人类结肠癌异种移植物的瘤内放射免疫疗法(Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel)”,《放射疗法和肿瘤学》39:179-189;Song等人,1995,“长循环乳液的抗体介导肺靶向治疗(Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions)”,《PDA药物科学与技术杂志》50:372-397;Cleek等人,1997,“bFGF抗体用于心血管施用的可生物降解聚合载体(Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application)”,《控制释放生物活动国际研讨会记录》24:853-854;和Lam等人,1997,“用于局部递送的重组人源化单克隆抗体的微囊封装(Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery)”,《控制释放生物活动国际研讨会记录》24:759-760,其各自以全文引用的方式并入本文中。

[0770] 在具体实施例中,当本文所提供的组合物是编码防治性或治疗性药剂(例如本文所提供的融合蛋白)的核酸时,可通过将核酸构筑为适当核酸表达载体的一部分且施用其以使得其进入细胞内而将核酸体内施用以促进其所编码的防治性或治疗性药剂的表达,例如通过使用逆转录病毒载体(参见美国专利第4,980,286号),或通过直接注射,或通过使用微粒子轰击(例如基因枪;杜邦基因枪(Biolistic,Dupont))、或用脂质或细胞表面受体或转染剂而涂布、或与已知进入细胞核的同源异型盒状肽联用(参见例如Joliot等人,1991,《美国国家科学院院刊》88:1864-1868)等。或者,核酸可引入细胞内,并且通过同源重组并入宿主细胞DNA内,用于表达。

[0771] 在具体实施例中,本文所提供的组合物包含本文所提供的一种、两种或更多种融合蛋白。在另一实施例中,本文所提供的组合物包含本文所提供的一种、两种或更多种融合蛋白和除本文所提供的融合蛋白以外的防治性或治疗性药剂。在一个实施例中,已知药剂

可用于或已经或当前用于预防、控制、治疗和/或改善疾病或病况。除防治性或治疗性药剂以外,本文所提供的组合物还可包含赋形剂。

[0772] 本文所提供的组合物包括可用于制造药物组合物(例如适合于向受试者或患者施用的组合物)的原料药组合物(bulk drug composition),该药物组合物可以单位剂型制备。在实施例中,本文所提供的组合物是药物组合物。此类组合物包含防治或治疗有效量的一种或多种防治性或治疗性药剂(例如本文所提供的融合蛋白或其它防治性或治疗性药剂),和药学上可接受的赋形剂。药物组合物可经配制以适合于向受试者施用的途径。

[0773] 在具体实施例中,术语“赋形剂”还可以指稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(Freund's adjuvant)(完全或不完全)或媒剂。药物赋形剂可以是无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当药物组合物经静脉内施用,水是示例性赋形剂。还可以采用盐水溶液和右旋葡萄糖水溶液和甘油溶液作为液体赋形剂,特别是用于可注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、无水脱脂奶、甘油、丙二醇、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物还可含有少量的润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可以采用溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、缓释制剂等形式。口服制剂可以包括标准赋形剂,如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物赋形剂的实例描述于《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》(1990) 马克出版公司(Mack Publishing Co.),宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton, PA)。此类组合物将含有防治或治疗有效量的本文所提供的融合蛋白(如呈纯化形式),以及合适量的赋形剂,以便向患者提供用于适当施用的形式。制剂应与施用方式相适应。

[0774] 在实施例中,根据常规程序将组合物配制为适用于向人类静脉给药的药物组合物。通常,用于静脉给药的组合物是呈无菌等渗水性缓冲液的溶液。必要时,组合物还可以包括增溶剂和局部麻醉剂(如利诺卡因(lignocaine))以减轻注射部位的疼痛。然而,这些组合物也可通过静脉给药以外的途径施用。

[0775] 一般来说,本文所提供的组合物的成分单独地供应或在指示活性剂的数量的气密密封式容器(如安瓿或药囊)中以单位剂型(例如呈干燥冻干粉末或无水浓缩物形式)混合在一起提供。在通过输注施用组合物的情况下,可利用装有无菌药物级的水或生理盐水的输注瓶分配。在通过注射施用组合物的情况下,可以提供一安瓿注射用无菌水或生理盐水,使得可在施用之前将成分混合。

[0776] 本文所提供的融合蛋白可包装于指示抗体数量的气密密封式容器(如安瓿或药囊)中。在一个实施例中,将融合蛋白以干燥无菌冻干粉末或无水浓缩物形式供应于气密密封式容器中,并且可以例如用水或生理盐水复原到适当浓度以用于向受试者施用。冻干融合蛋白可以在其原始容器中在2°C与8°C之间储存,并且融合蛋白可以在复原后12小时内(如6小时内、5小时内、3小时内或1小时内)施用。在替代性实施例中,本文所提供的融合蛋白以液体形式供应于指示抗体的数量和浓度的气密密封式容器中。

[0777] 本文所提供的组合物可以被配制为中性或盐形式。药学上可接受的盐包括与阴离子形成的盐,所述阴离子如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的阴离子;和与阳离子形成的盐,所述阳离子如衍生自氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的阳离子。

[0778] 可以通过标准临床技术确定将可有效预防和/或治疗疾病或病况的防治性或治疗性药剂(例如本文所提供的融合蛋白)或本文所提供的组合物的量。另外,可以任选地采用体外测定以帮助鉴别最优剂量范围。制剂中采用的确切剂量还取决于施用途径和疾病或病况的严重性,且应根据医师的判断和每个患者的情况来决定。

[0779] 有效剂量可以从衍生于体外或动物模型测试系统的剂量反应曲线推断出来。

[0780] 在某些实施例中,向患者施用本文所提供的一定剂量的融合蛋白的途径为鼻内、肌肉内、静脉内或其组合,但本文所描述的其它途径也为可接受的。每一剂量可以或可不通过相同施用途径来施用。在一些实施例中,本文提供的融合蛋白可以同时或随后通过多种施用途径与其他剂量的本文提供的相同或不同融合蛋白一起施用。

[0781] 在某些实施例中,向受试者防治性或治疗性地施用本文所提供的融合蛋白。本文所提供的融合蛋白可以防治性或治疗性方式向受试者施用,以便预防、减轻或改善其疾病或症状。

[0782] 出于简洁起见,本文中某些缩写。一个实例为表示氨基酸残基的单字母缩写。氨基酸和其对应的三字母和单字母缩写如下:

[0783]	丙氨酸	Ala	(A)
[0784]	精氨酸	Arg	(R)
[0785]	天冬酰胺	Asn	(N)
[0786]	天冬氨酸	Asp	(D)
[0787]	半胱氨酸	Cys	(C)
[0788]	谷氨酸	Glu	(E)
[0789]	谷氨酰胺	Gln	(Q)
[0790]	甘氨酸	Gly	(G)
[0791]	组氨酸	His	(H)
[0792]	异亮氨酸	Ile	(I)
[0793]	亮氨酸	Leu	(L)
[0794]	赖氨酸	Lys	(K)
[0795]	甲硫氨酸	Met	(M)
[0796]	苯丙氨酸	Phe	(F)
[0797]	脯氨酸	Pro	(P)
[0798]	丝氨酸	Ser	(S)
[0799]	苏氨酸	Thr	(T)
[0800]	色氨酸	Trp	(W)
[0801]	酪氨酸	Tyr	(Y)
[0802]	缬氨酸	Val	(V)

[0803] 本文中一般使用肯定语言公开本发明以描述众多实施例。本发明还确切地包括完全或部分排除特定主题的实施例,如物质或材料、方法步骤和条件、方案、程序、测定或分析。因此,尽管本发明在本文中一般不表达为关于本发明不包括的内容,但本文中仍公开未明确地包括于本发明中的方面。

[0804] 已描述了本发明的多个实施例。然而,应理解,在不脱离本发明的精神和范围的情

况下,可以进行各种修改。因此,以下实例旨在说明但不限制权利要求书中所描述的本发明的范围。

[0805] 制品和试剂盒

[0806] 在本发明的一些实施例中,提供一种含有可用于治疗个体的疾病或病况(如癌症,如间皮素阳性癌)的材料的制品,以用于向所述个体施用抗MSLN构建体。所述制品可以包含容器以及在容器上或与容器相关联的标签或药品说明书。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器等。容器可以由多种材料如玻璃或塑料形成。一般来说,容器容纳可有效治疗本文所描述的疾病或病症的组合物并且可以具有无菌接取口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或是具有通过皮下注射针可刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是本文所描述的抗MSLN构建体。标签或药品说明书指示所述组合物用于治疗特定病况。标签或药品说明书还将包含有关向患者施用抗MSLN构建体的说明。还涵盖包含本文所描述的组合作疗法的制品和试剂盒。

[0807] 药品说明书是指通常包括在治疗产品的商业包装中的含有关于适应症、用法、剂量、施用、有关使用此类治疗产品的禁忌和/或警告的信息的说明书。在一些实施例中,药品说明书指示所述组合物用于治疗疾病或病况(如癌症,如间皮素阳性癌)。

[0808] 此外,所述制品还可以包含第二容器,所述容器包含药学上可接受的缓冲液,如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲生理盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)和右旋葡萄糖溶液。从商业和用户的观点来看,其还可以包括所需的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针及注射器。

[0809] 还提供适用于各种目的的试剂盒,例如用于治疗本文所描述的疾病或病况(如癌症,如间皮素阳性癌),以用于将抗MSLN构建体施用到个体中,任选地与制品组合。本发明的试剂盒包括一种或多种包含抗MSLN构建体组合物(或单位剂型和/或制品)的容器,并且在一些实施例中,还包含根据本文所描述的方法中的任一种使用的另一种药剂(如本文所描述的药剂)和/或说明书。试剂盒还可以包含对选择适合于治疗的个体的描述。虽然本发明试剂盒中供应的说明书通常为在标签或药品说明书(例如试剂盒中包括的纸片)上的书面说明书,但机器可读说明书(例如磁盘或光盘存储盘上载有的说明书)也是可接受的。

[0810] 例如,在一些实施例中,试剂盒包含包括抗MSLN构建体的组合物。在一些实施例中,试剂盒包含a)包含抗MSLN构建体的组合物,和b)有效量的至少一种如本文所描述的其它药剂。在一些实施例中,试剂盒包含a)包含抗MSLN构建体的组合物,和b)向个体施用抗MSLN构建体组合物用于治疗的说明书。在一些实施例中,试剂盒包含a)包含抗MSLN构建体的组合物,b)有效量的至少一种如本文所描述的其它药剂,和c)向个体施用抗MSLN构建体组合物和其它药剂用于治疗的说明书。抗MSLN构建体和其它药剂可存在于单独容器中或单一容器中。例如,试剂盒可以包含一种不同的组合物或两种或更多种组合物,其中一种组合物包含抗MSLN构建体并且另一种组合物包含另一种药剂。

[0811] 本发明的试剂盒呈合适的包装形式。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶、罐、软包装(例如,密封的密拉(Mylar)或塑料袋)等。试剂盒可以任选地提供其他组分(如缓冲液)和解释性信息。本申请因此还提供制品,其包括小瓶(如密封小瓶)、瓶子、罐、柔性包装等。

[0812] 与抗MSLN构建体组合物的使用相关的说明书一般包括关于所预期治疗的剂量、用药时程和施用途径的信息。容器可为单位剂量、散装(例如多剂量包装)或亚单位剂量。例

如,可以提供如下试剂盒,其含有足够剂量的如本文所公开的抗MSLN构建体,以提供对个体的延长治疗,如一周、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周、4周、6周、8周、3个月、4个月、5个月、7个月、8个月、9个月或更长时间段中的任一个。试剂盒还可以包括多个单位剂量的抗MSLN构建体和药物组合物以及使用说明书,其包装数量应足以在药房(例如医院药房和复合药房)中存储和使用。

[0813] 本领域的技术人员将认识到,在本发明的范围和精神内若干实施例是可能的。现将参考以下非限制性实例更详细地描述本发明。以下实例进一步说明本发明,但是,当然,不应被解释为以任何方式限制其范围。

[0814] 示例性实施例

[0815] 1. 一种融合蛋白,其包含(a)介白素21(IL-21)或其变体;(b)白蛋白结合分子;和(c)结合到抗原的结合分子,其中IL-21或其变体经由第一接头连接到所述白蛋白结合分子,并且其中所述白蛋白结合分子经由第二接头连接到所述结合分子。

[0816] 2. 根据技术方案1所述的融合蛋白,其中IL-21或其变体包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0817] 3. 根据技术方案1所述的融合蛋白,其中IL-21或其变体包含在SEQ ID NO:1内的一个或多个缺失。

[0818] 4. 根据技术方案1所述的融合蛋白,其中IL-21或其变体包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0819] 5. 根据技术方案1所述的融合蛋白,其中IL-21或其变体包含与SEQ ID NO:1具有大于80%一致性的氨基酸序列。

[0820] 6. 根据技术方案1所述的融合蛋白,其中IL-21或其变体包含与SEQ ID NO:1具有大于90%一致性的氨基酸序列。

[0821] 7. 根据技术方案1所述的融合蛋白,其中IL-21或其变体包含与SEQ ID NO:1具有大于95%一致性的氨基酸序列。

[0822] 8. 根据技术方案1到7中任一项所述的融合蛋白,其中所述白蛋白结合分子是白蛋白结合结构域(ABD)。

[0823] 9. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD结合到人类血清白蛋白(HSA)。

[0824] 10. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中所述ABD结合到小鼠血清白蛋白(MSA)。

[0825] 11. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD以1-1000nM之间的 K_D 结合到HSA。

[0826] 12. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD以10-500nM之间的 K_D 结合到HSA。

[0827] 13. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD以20-200nM之间的 K_D 结合到HSA。

[0828] 14. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD以50-100nM之间的 K_D 结合到HSA。

[0829] 15. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0830] 16. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0831] 17. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0832] 18. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0833] 19. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0834] 20. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0835] 21. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

- [0836] 22. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。
- [0837] 23. 根据技术方案8所述的融合蛋白,其中ABD包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。
- [0838] 24. 根据技术方案1到7中任一项所述的融合蛋白,其中所述白蛋白结合分子是抗白蛋白抗体或其抗原结合片段。
- [0839] 25. 根据技术方案24所述的融合蛋白,其中所述抗白蛋白抗体或其抗原结合片段是结合到HSA的sdAb。
- [0840] 26. 根据技术方案25所述的融合蛋白,其中sdAb是V_HH单结构域抗体。
- [0841] 27. 根据技术方案25或技术方案26所述的融合蛋白,其中sdAb以1-1000nM之间的K_D结合到HSA。
- [0842] 28. 根据技术方案25或技术方案26所述的融合蛋白,其中sdAb以10-500nM之间的K_D结合到HSA。
- [0843] 29. 根据技术方案25或技术方案26所述的融合蛋白,其中sdAb以20-200nM之间的K_D结合到HSA。
- [0844] 30. 根据技术方案25或技术方案26所述的融合蛋白,其中sdAb以50-100nM之间的K_D结合到HSA。
- [0845] 31. 根据技术方案1所述的融合蛋白,其中所述结合分子是结合到癌细胞上表达的抗原的抗体或其抗原结合片段,其中所述癌细胞是任选地实体肿瘤癌细胞。
- [0846] 32. 根据技术方案31所述的融合蛋白,其中所述结合分子是sdAb。
- [0847] 33. 根据技术方案32所述的融合蛋白,其中sdAb是V_HH单结构域抗体。
- [0848] 34. 根据技术方案33所述的融合蛋白,其中sdAb结合到间皮素(MSLN)。
- [0849] 35. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含(i)互补决定区1(CDR1),其具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:120;(ii)互补决定区2(CDR2),其具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118和SEQ ID NO:121;和(iii)互补决定区3(CDR3),其具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:89、SEQ

ID NO:92、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:119和SEQ ID NO:122。

[0850] 36. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:12的CDR1、SEQ ID NO:13的CDR2和SEQ ID NO:14的CDR3的VH。

[0851] 37. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:15的CDR1、SEQ ID NO:16的CDR2和SEQ ID NO:17的CDR3的VH。

[0852] 38. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:18的CDR1、SEQ ID NO:19的CDR2和SEQ ID NO:20的CDR3的VH。

[0853] 39. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:21的CDR1、SEQ ID NO:22的CDR2和SEQ ID NO:23的CDR3的VH。

[0854] 40. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:24的CDR1、SEQ ID NO:25的CDR2和SEQ ID NO:26的CDR3的VH。

[0855] 41. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:27的CDR1、SEQ ID NO:28的CDR2和SEQ ID NO:29的CDR3的VH。

[0856] 42. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:30的CDR1、SEQ ID NO:31的CDR2和SEQ ID NO:32的CDR3的VH。

[0857] 43. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:33的CDR1、SEQ ID NO:34的CDR2和SEQ ID NO:35的CDR3的VH。

[0858] 44. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:36的CDR1、SEQ ID NO:37的CDR2和SEQ ID NO:38的CDR3的VH。

[0859] 45. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:39的CDR1、SEQ ID NO:40的CDR2和SEQ ID NO:41的CDR3的VH。

[0860] 46. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:42的CDR1、SEQ ID NO:43的CDR2和SEQ ID NO:44的CDR3的VH。

[0861] 47. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:45的CDR1、SEQ ID NO:46的CDR2和SEQ ID NO:47的CDR3的VH。

[0862] 48. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:48的CDR1、SEQ ID NO:49的CDR2和SEQ ID NO:50的CDR3的VH。

[0863] 49. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:51的CDR1、SEQ ID NO:52的CDR2和SEQ ID NO:53的CDR3的VH。

[0864] 50. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:54的CDR1、SEQ ID NO:55的CDR2和SEQ ID NO:56的CDR3的VH。

[0865] 51. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:57的CDR1、SEQ ID NO:58的CDR2和SEQ ID NO:59的CDR3的VH。

[0866] 52. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:60的CDR1、SEQ ID NO:61的CDR2和SEQ ID NO:62的CDR3的VH。

[0867] 53. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:63的CDR1、SEQ ID NO:64的CDR2和SEQ ID NO:65的CDR3的VH。

[0868] 54. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:75的CDR1、

SEQ ID NO:76的CDR2和SEQ ID NO:77的CDR3的VH。

[0869] 55.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:78的CDR1、SEQ ID NO:79的CDR2和SEQ ID NO:80的CDR3的VH。

[0870] 56.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:81的CDR1、SEQ ID NO:82的CDR2和SEQ ID NO:83的CDR3的VH。

[0871] 57.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:84的CDR1、SEQ ID NO:85的CDR2和SEQ ID NO:86的CDR3的VH。

[0872] 58.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:87的CDR1、SEQ ID NO:88的CDR2和SEQ ID NO:89的CDR3的VH。

[0873] 59.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:90的CDR1、SEQ ID NO:91的CDR2和SEQ ID NO:92的CDR3的VH。

[0874] 60.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:93的CDR1、SEQ ID NO:94的CDR2和SEQ ID NO:95的CDR3的VH。

[0875] 61.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:96的CDR1、SEQ ID NO:97的CDR2和SEQ ID NO:98的CDR3的VH。

[0876] 62.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:99的CDR1、SEQ ID NO:100的CDR2和SEQ ID NO:101的CDR3的VH。

[0877] 63.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:102的CDR1、SEQ ID NO:103的CDR2和SEQ ID NO:104的CDR3的VH。

[0878] 64.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:105的CDR1、SEQ ID NO:106的CDR2和SEQ ID NO:107的CDR3的VH。

[0879] 65.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:108的CDR1、SEQ ID NO:109的CDR2和SEQ ID NO:110的CDR3的VH。

[0880] 66.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:111的CDR1、SEQ ID NO:112的CDR2和SEQ ID NO:113的CDR3的VH。

[0881] 67.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:114的CDR1、SEQ ID NO:115的CDR2和SEQ ID NO:116的CDR3的VH。

[0882] 68.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:117的CDR1、SEQ ID NO:118的CDR2和SEQ ID NO:119的CDR3的VH。

[0883] 69.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含包括SEQ ID NO:120的CDR1、SEQ ID NO:121的CDR2和SEQ ID NO:122的CDR3的VH。

[0884] 70.根据技术方案34到69中任一项所述的融合蛋白,其中sdAb进一步包含以下抗体的一个或多个FR序列:抗MSLN-1、抗MSLN-2、抗MSLN-3、抗MSLN-4、抗MSLN-5、抗MSLN-6、抗MSLN-7、抗MSLN-8、抗MSLN-9、抗MSLN-10、抗MSLN-11、抗MSLN-12、抗MSLN-13、抗MSLN-14、抗MSLN-15、抗MSLN-16、抗MSLN-17、抗MSLN-18、抗MSLN-19、抗MSLN-20、抗MSLN-21、抗MSLN-22、抗MSLN-23、抗MSLN-24、抗MSLN-25、抗MSLN-26、抗MSLN-27、抗MSLN-28、抗MSLN-29、抗MSLN-30、抗MSLN-31、抗MSLN-32、抗MSLN-33或抗MSLN-34,如表9中所阐述。

[0885] 71.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列。

- [0886] 72.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列。
- [0887] 73.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列。
- [0888] 74.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:126的氨基酸序列。
- [0889] 75.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列。
- [0890] 76.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列。
- [0891] 77.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列。
- [0892] 78.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列。
- [0893] 79.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列。
- [0894] 80.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列。
- [0895] 81.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列。
- [0896] 82.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列。
- [0897] 83.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列。
- [0898] 84.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列。
- [0899] 85.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列。
- [0900] 86.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列。
- [0901] 87.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列。
- [0902] 88.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列。
- [0903] 89.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列。
- [0904] 90.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列。
- [0905] 91.根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:143的氨基酸序

列。

[0906] 92. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列。

[0907] 93. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列。

[0908] 94. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列。

[0909] 95. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列。

[0910] 96. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列。

[0911] 97. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列。

[0912] 98. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列。

[0913] 99. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列。

[0914] 100. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列。

[0915] 101. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:153的氨基酸序列。

[0916] 102. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列。

[0917] 103. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:155的氨基酸序列。

[0918] 104. 根据技术方案34所述的融合蛋白,其中sdAb包含SEQ ID NO:156的氨基酸序列。

[0919] 105. 根据技术方案34到69中任一项所述的融合蛋白,其中sdAb进一步包含如表11中所阐述的一个或多个个人源化FR序列。

[0920] 106. 根据技术方案105所述的融合蛋白,其中sdAb以1-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。

[0921] 107. 根据技术方案105所述的融合蛋白,其中sdAb以1-80nM之间的 K_D 结合到MSLN。

[0922] 108. 根据技术方案105所述的融合蛋白,其中sdAb以1-70nM之间的 K_D 结合到MSLN。

[0923] 109. 根据技术方案105所述的融合蛋白,其中sdAb以1-60nM之间的 K_D 结合到MSLN。

[0924] 110. 根据技术方案105所述的融合蛋白,其中sdAb以1-50nM之间的 K_D 结合到MSLN。

[0925] 111. 根据技术方案1所述的融合蛋白,其中所述结合分子包含各自结合到癌细胞上表达的抗原的两种抗体或其抗原结合片段,其中所述癌细胞是任选地实体肿瘤癌细胞,并且其中所述两种抗体或其抗原结合片段通过第三接头连接。

[0926] 112. 根据技术方案111所述的融合蛋白,其中所述两种抗体或其抗原结合片段是

两种sdAb。

[0927] 113. 根据技术方案112所述的融合蛋白,其中所述两种sdAb是VHH单结构域抗体。

[0928] 114. 根据技术方案112所述的融合蛋白,其中所述两种sdAb结合到MSLN的两种不同表位。

[0929] 115. 根据技术方案114所述的融合蛋白,其中一个表位在MSLN的N端上并且另一个表位在MSLN的C端上。

[0930] 116. 根据技术方案112到115中任一项所述的融合蛋白,其中每种sdAb以0.1-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。

[0931] 117. 根据技术方案112到115中任一项所述的融合蛋白,其中每种sdAb以1-100nM之间的 K_D 结合到MSLN。

[0932] 118. 根据技术方案112到115中任一项所述的融合蛋白,其中每种sdAb以1-80nM之间的 K_D 结合到MSLN。

[0933] 119. 根据技术方案112到115中任一项所述的融合蛋白,其中每种sdAb以1-70nM之间的 K_D 结合到MSLN。

[0934] 120. 根据技术方案112到115中任一项所述的融合蛋白,其中每种sdAb以1-60nM之间的 K_D 结合到MSLN。

[0935] 121. 根据技术方案112到115中任一项所述的融合蛋白,其中每种sdAb以1-50nM之间的 K_D 结合到MSLN。

[0936] 122. 根据技术方案1到121中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一接头和所述第二接头各自独立地选自由以下组成的组:SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74。

[0937] 123. 根据技术方案121所述的融合蛋白,其中所述第三接头选自由以下组成的组:SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69和SEQ ID NO:70。

[0938] 124. 根据技术方案1所述的融合蛋白,其中所述第一接头连接到IL-21或其变体的C端。

[0939] 125. 根据技术方案1所述的融合蛋白,其中所述第一接头在IL-21或其变体的氨基酸123到132内的氨基酸处连接到IL-21或其变体。

[0940] 126. 根据技术方案1所述的融合蛋白,其中所述第一接头在IL-21或其变体的C端的最后10个氨基酸中的一个处连接到IL-21或其变体。

[0941] 127. 根据技术方案1或4所述的融合蛋白,其中所述第一接头连接到IL-21或其变体的L123。

[0942] 128. 根据技术方案1所述的融合蛋白,其中所述第一接头在Q1到D4处连接到IL-21或其变体的N端。

[0943] 129. 一种药物组合物,其包含根据技术方案1到128中任一项所述的融合蛋白和药学上可接受的赋形剂。

[0944] 130. 一种治疗癌症的方法,其包含向受试者施用治疗有效量的根据技术方案1到128中任一项所述的融合蛋白。

[0945] 131. 根据技术方案130所述的方法,其中所述癌症是实体肿瘤癌症。

[0946] 132. 根据技术方案131所述的方法,其中所述受试者是人类受试者。

[0947] 133.一种多核苷酸,其包含编码根据技术方案1到128中任一项所述的融合蛋白的核苷酸序列。

[0948] 134.一种载体,其包含根据技术方案133所述的多核苷酸。

[0949] 135.一种细胞,其包含根据技术方案133所述的多核苷酸。

[0950] 136.一种细胞,其包含根据技术方案134所述的载体。

[0951] 137.一种制备融合蛋白的方法,其包含培养根据技术方案135或136所述的细胞以表达所述融合蛋白。

[0952] 138.一种结合到间皮素 (MSLN) 的单结构域抗体,其包含以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中 (i) CDR1 包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:120;(ii) CDR2 包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118和SEQ ID NO:121;以及 (iii) CDR3 包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:119和SEQ ID NO:122。

[0953] 139.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:12,CDR2具有SEQ ID NO:13,且CDR3具有SEQ ID NO:14。

[0954] 140.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:15,CDR2具有SEQ ID NO:16,且CDR3具有SEQ ID NO:17。

[0955] 141.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:18,CDR2具有SEQ ID NO:19,且CDR3具有SEQ ID NO:20。

[0956] 142.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:21,CDR2具有SEQ ID NO:22,且CDR3具有SEQ ID NO:23。

[0957] 143.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:24,CDR2具有SEQ ID NO:25,且CDR3具有SEQ ID NO:26。

[0958] 144.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:27,CDR2具

有SEQ ID NO:28,且CDR3具有SEQ ID NO:29。

[0959] 145.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:30,CDR2具有SEQ ID NO:31,且CDR3具有SEQ ID NO:32。

[0960] 146.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:33,CDR2具有SEQ ID NO:34,且CDR3具有SEQ ID NO:35。

[0961] 147.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:36,CDR2具有SEQ ID NO:37,且CDR3具有SEQ ID NO:38。

[0962] 148.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:39,CDR2具有SEQ ID NO:40,且CDR3具有SEQ ID NO:41。

[0963] 149.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:42,CDR2具有SEQ ID NO:43,且CDR3具有SEQ ID NO:44。

[0964] 150.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:45,CDR2具有SEQ ID NO:46,且CDR3具有SEQ ID NO:47。

[0965] 151.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:48,CDR2具有SEQ ID NO:49,且CDR3具有SEQ ID NO:50。

[0966] 152.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:51,CDR2具有SEQ ID NO:52,且CDR3具有SEQ ID NO:53。

[0967] 153.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:54,CDR2具有SEQ ID NO:55,且CDR3具有SEQ ID NO:56。

[0968] 154.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:57,CDR2具有SEQ ID NO:58,且CDR3具有SEQ ID NO:59。

[0969] 155.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:60,CDR2具有SEQ ID NO:61,且CDR3具有SEQ ID NO:62。

[0970] 156.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:63,CDR2具有SEQ ID NO:64,且CDR3具有SEQ ID NO:65。

[0971] 157.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:75,CDR2具有SEQ ID NO:76,且CDR3具有SEQ ID NO:77。

[0972] 158.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:78,CDR2具有SEQ ID NO:79,且CDR3具有SEQ ID NO:80。

[0973] 159.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:81,CDR2具有SEQ ID NO:82,且CDR3具有SEQ ID NO:83。

[0974] 160.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:84,CDR2具有SEQ ID NO:85,且CDR3具有SEQ ID NO:86。

[0975] 161.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:87,CDR2具有SEQ ID NO:88,且CDR3具有SEQ ID NO:89。

[0976] 162.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:90,CDR2具有SEQ ID NO:91,且CDR3具有SEQ ID NO:92。

[0977] 163.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:93,CDR2具有SEQ ID NO:94,且CDR3具有SEQ ID NO:95。

- [0978] 164. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:96,CDR2具有SEQ ID NO:97,且CDR3具有SEQ ID NO:98。
- [0979] 165. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:99,CDR2具有SEQ ID NO:100,且CDR3具有SEQ ID NO:101。
- [0980] 166. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:102,CDR2具有SEQ ID NO:103,且CDR3具有SEQ ID NO:104。
- [0981] 167. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:105,CDR2具有SEQ ID NO:106,且CDR3具有SEQ ID NO:107。
- [0982] 168. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:108,CDR2具有SEQ ID NO:109,且CDR3具有SEQ ID NO:110。
- [0983] 169. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:111,CDR2具有SEQ ID NO:112,且CDR3具有SEQ ID NO:113。
- [0984] 170. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:114,CDR2具有SEQ ID NO:115,且CDR3具有SEQ ID NO:116。
- [0985] 171. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:117,CDR2具有SEQ ID NO:118,且CDR3具有SEQ ID NO:119。
- [0986] 172. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中CDR1具有SEQ ID NO:120,CDR2具有SEQ ID NO:121,且CDR3具有SEQ ID NO:122。
- [0987] 173. 根据技术方案138到172中任一项所述的单结构域抗体,其中sdAb进一步包含以下抗体的一个或多个FR序列:抗MSLN-1、抗MSLN-2、抗MSLN-3、抗MSLN-4、抗MSLN-5、抗MSLN-6、抗MSLN-7、抗MSLN-8、抗MSLN-9、抗MSLN-10、抗MSLN-11、抗MSLN-12、抗MSLN-13、抗MSLN-14、抗MSLN-15、抗MSLN-16、抗MSLN-17、抗MSLN-18、抗MSLN-19、抗MSLN-20、抗MSLN-21、抗MSLN-22、抗MSLN-23、抗MSLN-24、抗MSLN-25、抗MSLN-26、抗MSLN-27、抗MSLN-28、抗MSLN-29、抗MSLN-30、抗MSLN-31、抗MSLN-32、抗MSLN-33或抗MSLN-34,如表9中所阐述。
- [0988] 174. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列。
- [0989] 175. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列。
- [0990] 176. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列。
- [0991] 177. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:126的氨基酸序列。
- [0992] 178. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列。
- [0993] 179. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列。
- [0994] 180. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列。
- [0995] 181. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列。

酸序列。

[0996] 182. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列。

[0997] 183. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列。

[0998] 184. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列。

[0999] 185. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列。

[1000] 186. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列。

[1001] 187. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列。

[1002] 188. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列。

[1003] 189. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

[1004] 190. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列。

[1005] 191. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列。

[1006] 192. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列。

[1007] 193. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列。

[1008] 194. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列。

[1009] 195. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列。

[1010] 196. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列。

[1011] 197. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列。

[1012] 198. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列。

[1013] 199. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:148的氨基酸序列。

[1014] 200. 根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列。

[1015] 201.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:150的氨基酸序列。

[1016] 202.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:151的氨基酸序列。

[1017] 203.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列。

[1018] 204.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:153的氨基酸序列。

[1019] 205.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列。

[1020] 206.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:155的氨基酸序列。

[1021] 207.根据技术方案138所述的单结构域抗体,其中sdAb包含SEQ ID NO:156的氨基酸序列。

[1022] 208.根据技术方案138到172中任一项所述的单结构域抗体,其中sdAb进一步包含如表11中所阐述的一个或多个个人源化FR序列。

[1023] 实例

[1024] 以下是对研究中所使用的各种方法和材料的描述,并且提出这些方法和材料是以便向本领域的普通技术人员提供如何制得和使用本发明的完整公开和描述,并且并不意图限制本发明人视为其发明的范围,也不意图表示以下实验已进行并且是可以进行的所有实验。应理解,并不一定执行以现在时态书写的示例性描述,而是可执行所述描述以生成与本发明的教导相关联的数据等。已作出努力确保关于所用数字(例如量、百分比等)的准确性,但应该考虑到一些实验误差和偏差。

[1025] 实例1:示例性IL-21融合蛋白

[1026] 此实例说明本文所提供的某些示例性IL-21融合蛋白。应理解,在此实例中描述的示例性IL-21融合蛋白并不意图表示本发明的完整范围。

[1027] 本文中使用的IL-21-(HSA结合分子)-(抗MSLN)以呈现某些示例性IL-融合蛋白,其包含1) IL-21或其变体(例如截短的IL-21);2) 结合到人类血清白蛋白(HSA)的肽(例如ABD或sdAb);3) 靶向肿瘤抗原间皮素(MSLN)的一种或多种抗体或其抗原结合片段;4) 由4-20个氨基酸构成的第一接头(L1),其连接IL-21的C端和 α HSA的N端;以及5) 由4-20个氨基酸构成的第二接头(L2),其连接 α HSA的C端和抗MSLN的N端。

[1028] IL-21可以具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列(参见以下表6)。或者,IL-21可以是具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的截短的人类IL-21(参见以下表6)。

[1029] 表6

SEQ ID NO	序列	名称
[1030] 1	QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPED VETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKL KRKPPSTNAGRRQKHRLTCPCSDSYEKKPPKEFLERF KSLQKMIHQHLSSRTHGSEDS	人类 IL-21, 全 长
2	QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPED VETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKL KRKPPSTNAGRRQKHRLTCPCSDSYEKKPPKEFLERF KSLQKMIHQHL	人类 IL-21, 截 短的

[1031] 以下表7列出HSA结合肽的几个选项(SEQ ID NO:3到SEQ ID NO:11)。

[1032] 表7

SEQ ID NO	序列	名称
[1033] 3	LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEG VKALIDEILAALP	G148-ABD- wt
4	LAEAKVLANRELDKYGVSDFAKRLINKAKTVEG VEALKDEILAALP	LI-ABD-1
5	LAEAKVLANRELDKYGVSDFAKRINKAKTVEG VEALKDEILAALP	LI-ABD-2
6	LAEAKVLANRELDKYGVSDFAKRINKAKTVEG AEALKDEILAALP	LI-ABD-3
7	LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEG VEALKLHILAALP	ABD-035
8	LAEAKVLANRELDKYGVSDYAKNLINNAKTVEG VKALIDEILAALP	ABD _{Y21A}
9	LAEAKVLANRELDKYGVADAYANLINNAKTVEG VKALIDEILAALP	ABD _{S18Y20K2} 2A
10	LKEAKEKAIEELKKAGITSDYYFDLINKAKTVEGV NALKDEILKA	ABDcon
11	TIDEWLLKEAKEKAIEELKKAGITSDYYFDLINKA KTVEGVNALKDEILKA	ABDcon12

[1034] 在这些示例性融合蛋白中,融合蛋白的抗MSLN部分可以选自实例2中所描述的34种抗MSLN sdAb和其人源化版本中的任一种。

[1035] L1和L2接头各自可以独立地选自以下表8中列出的接头,以及表5中列出的可裂解接头。

[1036] 表8

[1037]

SEQ ID NO	序列	名称
66	(GSGS) _n (n = 1-4)	GSGS 接头,
67	(GGSG) _n (n = 1-4)	GGSG 接头
68	(GGGGS) _n (n = 1-3)	GGGGS 接头
69	(PAPA) _n (n = 1-3)	PAPA 接头
70	(PQPQ) _n (n = 1-3)	PQPQ 接头
71	IKRADAAP	VL-CL 天然接头
72	AEAAAKEEAAKA	螺旋成型接头
73	GTNEVCKCPKCP	Dromedary IgG3 铰链
74	EPKIPQPQPKPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP	Dromedary IgG2a 铰链
307	(GSG) _n	GSG 接头, n=1-6

	308	(G3S)n	G3S 接头, n=1-6
	309	(G4S)n	G4S 接头, n=1-6
	310	A(EAAAK)nA	EAAAK 接头, n=1-6
	311	(PAPAP)n	PAPAP 接头, n=1-6
	312	IKRTVAAP	VLVH.接头
	313	RAKPS	SIRP α 接头
	314	(GSGS)n (n = 1-4)	GSGS 接头,
	315	(GGSG)n (n = 1-4)	GGSG 接头
	316	(PAPA)n (n = 1-3)	PAPA 接头
	317	(PQPQ)n (n = 1-3)	PQPQ 接头
	318	IKRADAAP	VL-CL 天然接头
	319	ASTKGP	VH-CH1 接头
	320	GTNEVCKCPKCP	Dromedary IgG3 铰链
	321	EPKIPQPQPKPQPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP	Dromedary IgG2a 铰链
[1038]	322	RRKRAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A (可裂解)
	323	SGRSA	UPA 接头 (可裂解)
	324	PVGLIG	MMP 接头 (可裂解)
	267	Lys-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln	可裂解接头
	268	Phe-Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Ala-Gly-Gln	可裂解接头
	269	Arg-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Phe-Gly-Gln	可裂解接头
	270	Ile-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln	可裂解接头
	271	Met-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Leu-Gly-Gln	可裂解接头
	272	Lys-Gly-Pro-Gln-Ser-Ile-Ala-Gly-Gln	可裂解接头
	273	Phe-Gly-Pro-Gln-Ser-Leu-Ala-Gly-Gln	可裂解接头
	274	Arg-Gly-Pro-Gln-Ser-Ile-Phe-Gly-Gln	可裂解接头
	275	Ile-Gly-Pro-Gln-Ser-Ile-Trp-Gly-Gln	可裂解接头
	276	Met-Gly-Pro-Gln-Ser-Ile-Leu-Gly-Gln	可裂解接头
	277	Lys-Gly-Pro-Gln-Thr-Ile-Ala-Gly-Gln	可裂解接头
	278	Phe-Gly-Pro-Gln-Thr-Leu-Ala-Gly-Gln	可裂解接头
	279	Arg-Gly-Pro-Gln-Thr-Ile-Phe-Gly-Gln	可裂解接头
	280	Ile-Gly-Pro-Gln-Thr-Ile-Trp-Gly-Gln	可裂解接头
	281	Phe-Arg-Pro-Arg-Ser-Ile-Thr-Gly-Gln	可裂解接头
	282	Met-Gly-Pro-Gln-Thr-Ile-Leu-Gly-Gln	可裂解接头

[1039] 在某些示例性IL-21融合蛋白中,抗MSLN功能模块包含靶向间皮素的不同结构域
的两种单结构域抗体(sdAb),并且两种sdAb通过由4-20个氨基酸构成的第三接头(L3)连
接。L3接头可以选自以上表8中的SEQ ID NO:66到70。

[1040] 本实例的示例性IL-21融合蛋白的设计涵盖上文所描述的IL-21融合蛋白的各种组分的所有可能组合。

[1041] 实例2:生成抗MSLN单结构域抗体

[1042] 两种不同抗原肽用于使大羊驼免疫以产生抗MSLN单结构域抗体(VHH抗体)。第一抗原肽(MSLN抗原1)表示锚定细胞膜的MSLN。第二抗原肽(MSLN抗原2)表示锚定细胞膜的MSLN的C端。这两种肽的序列如下:

[1043] MSLN抗原1(MSLN裂解形式)

[1044] EVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDLYPQG
YPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQAPRRPLPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLD
TLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTED
LKALSQQNVSMIDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIP
NGYLVLDLSMQEALS (SEQ ID NO:283);

[1045] MSLN抗原2(MSLN C端)

[1046] VQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLV (SEQ ID NO:284)。

[1047] 在免疫接种之后,分离外周血单核细胞(PBMC)以用于RNA提取。用编码抗体基因的mRNA/cDNA构建VHH抗体噬菌体展示库。经由与抗原的多轮亲和力结合筛选所构建的噬菌体展示库。通过ELISA鉴别阳性克隆。将阳性克隆的抗体基因测序,并克隆到UCOE载体(EMD密理博(Millipore))中以用于CHO细胞表达。

[1048] 以下表9列举根据上文所描述的方法生成的34种示例性新颖抗MSLN单结构域(VHH)抗体(即抗MSLN-1到抗MSLN-34)。这34种示例性新颖VHH抗体的CDR序列在以下表10中列出。在34种抗体中,使用第一MSLN抗原(MSLN抗原1)生成31种抗体(抗MSLN-1到抗MSLN-31),使用第二MSLN抗原(MSLN抗原2)生成3种抗体(抗MSLN-32到抗MSLN-34)。

[1049] 表9

[1050]

sdAb 名称		VHH 序列 (SEQ ID NO)
抗 MSLN-1	R2-B02(D2) 或 R2D2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGGTASSYTMA WFRQAPGKERDFVASILWSGNTTAYANFVKGRFTI SRDNAKNMMYLQMNSLKPEDTAVYYCARARGG WGTTAEVSNYAYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 123)
抗 MSLN-2	R2-B04(B6)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSGSMG WFRQAPGEERKLVSTFNWDGSSYYADSVKGRFTIS KDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAAGYYHT GGPLLRDNEYRYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 124)
抗 MSLN-3	R3-B08(D5) 或 R3D5	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSISSIRHMR WYRQAPGKQRELVATVSNDGSAYYLGSVKGRFTIS RTNAKNTLLYLQMNSLKPEDSALYICNADTWGWP GADYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 125)
抗 MSLN-4	R2-D03(F4)	QVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCSVSGLTFSSRAMG WFRQASGKEREVFAAIIHSGDYTYADSVKGRFTV SRDNAKNTVYLMNSLKLGDYAVYYCAADSVNK RGASSYVVRTTEYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 126)
抗 MSLN-5	R2-E03(H4)	QVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAASGLTFTSHTMG WFRQAPGKEREVATISWSGGNTYYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYPQMNSLKPEDAAYYYCAADRSSF SYGGSSRVKVEGEYNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 127)
抗 MSLN-6	R3-E08(C7)或 R3C7	QVQLVESGGGLVEAGDSLRLSCVVSGLTLESYVM AWFRQAPGKEREAVASINWSSGRLIYADSVKGRFTI SRDYEKNTIYLSMNNLKPEDTAVYYCAAGRYWGQ GTQVTVSS (SEQ ID NO: 128)
抗 MSLN-7	R2-G01(A2)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRALSSYAVG WFRQAPGKEREVFAAITWNGGRTYYADSEKGRSII SMDVAKSTVYLMNSLKLKEDTAVYYCAADPRGDV YHRDKYNIWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 129)
抗 MSLN-8	R2-G05(A10)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFSGYTM AWFRQAPGKEREVAGMTWSGDRTYYSDSVKDRF AISRDNVKNMGYLQMNSLKPEDTAVYYCATKLG YNSHDLRRPDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 130)
抗 MSLN-9	R2-G06(G12) 或 R2G12	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFPVNAYG WYRQAPGKQRDLVAIISAGGTTNYADSVKGRFAIS KDNVNNTVYLMNSLTSSEDTGVYYCYLQRRIGML RDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 131)
抗 MSLN-10	R3-E09(E11)	QRQVAESGGGSVQPGSLRLSCAASGFTFDNKQVA WFREVPKEREQISCISISDGATRYTDSVKGRFAVS RDYATNTVVLQMNNLRPEDTAIYYCATNPTQIMIG TMRCDLESKWYGTWGPQTQVTVSG (SEQ ID NO: 132)

[1051]

抗 MSLN-11	R3-A09(E10)	QVQLVESGGGLVLRAGDSLRLS CAASGR TNSTVAM GWFRQTPGKEREFVAVIVWSNGYSHYADSVKDRF SISR NKARNTVY LQLNSLKPEDTAVYYCALDIRDSE ITVQQKYWGMGTQVTVSS (SEQ ID NO: 133)
抗 MSLN-12	R2-C03(A4)	QVQLIESGGGLVQPGDSLRLS CAASGPT YTTETMG WFRQAPGKEREFVSSIRWRGAHTNYGDFVKGRFTI SKDS AKQTVY LQMNSLKPEDTAVYFCAASRSFDYP RREDEYRYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 134)
抗 MSLN-13	R2-D01(F1)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAATGR TFSPTYMG WFRQAPGKEREFVTRITWKS GSTYYADSVKGRFTI SRDNAKNTVTLQMDSLKPEDTAVYFCASTSFAYGL TNSNKYNYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO: 135)
抗 MSLN-14	R2-D02(G2)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGR SFSTYRM GWFRQAPGKAREFVATITASGSW TYYSDSVKGRST ISR DNAKNTVY LQMNSLKP GDTAVYYCAA EILTA ITSSDYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 136)
抗 MSLN-15	R4-(E04)	QVQLSERGGGLVQAGDSLRLS CAASGR MFSSYAV GWFRQAPGKER EYVAAISYNGGATYYLNSVEGRF TISR DNAKNMVY LQMNSLKP EDTAIYTCAARGGH WYSIHDP SNFRAWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 137)
抗 MSLN-16	R4-(D10)	QVQLIESGGGLVQAGGSLRLS CVASGR RRVTAAMA WFRVPGKEREFVSSITWRGGERNYADAVKDRFTI SKDNAKNTVY LQMNSLKP EDTASY YCAA GPWYT NHDT SQGYNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 138)
抗 MSLN-17	R4-(P2D2)	QVQLAESGGGLVQAGGSLRLS CSASGR TISNYAMG WFRQAPGKEREFVASINWNGGGITYTSSVKGRFTIS RDNAKSTVY LQMNSLKP EDAAVYYCAA QRAGTW TYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 139)
抗 MSLN-18	R4-(P2F4)	QVQLVESGGGLVQPGGSLT LSCAASGISDISSMGW YRQAPGEQRELVAIIGSGGNTKYSDSLKGRFTISIDN AKNTVYLRMNSLKPEDTSVYYCNA AQRIGAGPIVL YWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 140)
抗 MSLN-19	R3-G07(B5)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGHTFSVYAIG WFRQAPGKEREFVSSINWGDGLTYYTDSVKGRFII SKDNAKNTDY LQMNSLKP EDTAVYYCAARQRRE GWDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 141)
抗 MSLN-20	R2-B12-5	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGR TASSYVIA WFRQAPGKAREYVASVSRSGVSTYYADSVKGRFTI SRDKPKNTVFLQMNSLKLEDTAVYYCAADGKNFS NRWWSRDEYKYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO: 142)
抗 MSLN-21	R2-B12-7	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLS CVVSGRTETTYNIG WFRQAPGKERELVTAISR GATITYYADSVKGRFTIS RDNAKNAVY LQMNSLKP EDTAVYYCAA SFTNLAV VARDY YWYGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 143)

[1052]

抗 MSLN-22	R2-F2-6	QAQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVVSGRTFSHYAM GWFRQPPGKEREVAAITESPDSTIYADSVKGRFTIS RDGAVNTVYLKMNNLKPEDTAVYYCAAARSTLR WFRGQGGQYDYDYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO: 144)
抗 MSLN-23	R2-G3-8	QVHLVESGGGLVQAGGSLMLSCAASGRTWSTYPM GWFRQAPGKEREVAAIRWTTGSTYYQDSVKGRF TISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNAEVRA WYNRRKADYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 145)
抗 MSLN-24	R2-H10-6	QVHLVEAGGGLVQAGGSLRVSCAISGRTDSTGILG WFRRAPGKEREVVALIRWSNNYAWYEDSAKGRFTI SRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAGTGWG FSISDYNWYGQGTQVTVSG (SEQ ID NO: 146)
抗 MSLN-25	R3-H8-8	QVQLVESGGGLVQAGNSLRLSCAATGRSFNTYAM AWFRQAPGKEREVVASITWSGASTPYSDSVKGRFTI SRDNKSTVYLMNSLKREDTAVYYCAASSQYGG AASAPTAYLYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO: 147)
抗 MSLN-26	R4-G5-6	QVQLAESGGGLVQAGGSLRLSCSASGRTISNYAMG WFRQAPGQEREVAAVSWTGHGTFHATAVKGRFTI SRDNAENTVFLQMNSLKLEDTAVYYCAADGKNFS NRWWSRDEYKYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 148)
抗 MSLN-27	R2-H12-6	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLSSINTMA WYRQAPGKQRELVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISR DNAKTTVYLQLNRLKPEDTAAYYCAAGKGSTWY NGAYKYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 149)
抗 MSLN-28	R3-E12-2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTYSRYAM AWFRQAPGKEREVAAISWSGTAYRDSVKGRFTIS GDNKNTVYLMNSLNVEDTAVYYCAYGYSSGA ANYRDLASSTYRYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 150)
抗 MSLN-29	R2-H12-1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGRTFSSVSMG WFRQAPGKERVIVAAADWSGTTYTGLKGRFTIS RDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAASDPRRSA YKYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 151)
抗 MSLN-30	R2-H12-4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFGSYTM GWFRQAPGQEREVVASISRSGSTYYTDSVKGRFTI SRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAASNTGGR ASASYKYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 152)
抗 MSLN-31	R4-A7-2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFIRYAMA WFRQAPGKERVFVAVISQTGGSTDYSDSVKERFTIS RDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAVSTVQSKR MLMYGYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 153)
抗 MSLN-32	p-P3A12	QVRLEQSGGGLVQAGGSLRLACAASGRTARSYNIG WFRQAPGKEREVAAIISPRGTYYSDSVRGRFTIS GNSAENTVFLQMNNLKPEDTAVYHCAATTSSTYYS DKTYAYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 154)

[1053]	抗 MSLN-33	p-P3D4	QVRLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGRILADTPMA WYRQAPGKQRELVAAITSGGTTNYAGSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAANAEGSGS RYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 155)
	抗 MSLN-34	p-P3B4	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGRILADTPMA WYRQAPGKQRELVAAITSGGTTNYAGSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCKVMYHAGS WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 156)

[1054] 表10

	序列	sdAb 名称
	[CDR1]GGTASSYT (SEQ ID NO: 12)	抗 MSLN-1
	[CDR2]ILWSGNTT (SEQ ID NO: 13)	
	[CDR3]ARGGWGTTAEVSNYAY (SEQ ID NO: 14)	
	[CDR1]GRTFSGS (SEQ ID NO: 15)	抗 MSLN-2
	[CDR2]FNWDGSS (SEQ ID NO: 16)	
	[CDR3]AGYYHTGGPLLRDNEYRY (SEQ ID NO: 17)	
	[CDR1]GSISSIRH (SEQ ID NO: 18)	抗 MSLN-3
	[CDR2]VSNDGSA (SEQ ID NO: 19)	
	[CDR3]NADTWGWPGADY (SEQ ID NO: 20)	
	[CDR1]GLTFSSRA (SEQ ID NO: 21)	抗 MSLN-4
	[CDR2]IIHSGDYT (SEQ ID NO: 22)	
	[CDR3]AADSVNKRGAASSYYVRTTEYDY (SEQ ID NO: 23)	
	[CDR1]GLTFTSHT (SEQ ID NO: 24)	抗 MSLN-5
	[CDR2]ISWSSGNT (SEQ ID NO: 25)	
	[CDR3]AADRSSFRSYGGSSRVKVEGEYNY (SEQ ID NO: 26)	
[1055]	[CDR1]GRTLESYV (SEQ ID NO: 27)	抗 MSLN-6
	[CDR2]INWSSGRL (SEQ ID NO: 28)	
	[CDR3]AAGRY (SEQ ID NO: 29)	
	[CDR1]GRALSSYA (SEQ ID NO: 30)	抗 MSLN-7
	[CDR2]ITWNGGRT (SEQ ID NO: 31)	
	[CDR3]AADPRGDVYHRDKYNI (SEQ ID NO: 32)	
	[CDR1]GRAFSGYT (SEQ ID NO: 33)	抗 MSLN-8
	[CDR2]MTWSGDRT (SEQ ID NO: 34)	
	[CDR3]ATKLGTYYNSHDLRRPDY (SEQ ID NO: 35)	
	[CDR1]GITFPVNA (SEQ ID NO: 36)	抗 MSLN-9
	[CDR2]ISAGGTT (SEQ ID NO: 37)	
	[CDR3]YLQRRIGMLRDY (SEQ ID NO: 38)	
	[CDR1]GFTFDNKQ (SEQ ID NO: 39)	抗 MSLN-10
	[CDR2]ISISDGAT (SEQ ID NO: 40)	
	[CDR3]ATNPTQIMIGTMRCDESLEK (SEQ ID NO: 41)	
	[CDR1]GRTNSTVA (SEQ ID NO: 42)	抗 MSLN-11
	[CDR2]IVWSNGYS (SEQ ID NO: 43)	

	[CDR3]ALDIRDSEITVQQKY (SEQ ID NO: 44)	
	[CDR1]GPTYTTET (SEQ ID NO: 45)	
	[CDR2]IRWRGAHT (SEQ ID NO: 46)	抗 MSLN-12
	[CDR3]AASRSFDYPRREDEYRY (SEQ ID NO: 47)	
	[CDR1]GRTFSPYT (SEQ ID NO: 48)	
	[CDR2]ITWKSGST (SEQ ID NO: 49)	抗 MSLN-13
	[CDR3]ASTSFAYGLTNSNKYNY (SEQ ID NO: 50)	
	[CDR1]GRSFSTYR (SEQ ID NO: 51)	
	[CDR2]ITASGSWT (SEQ ID NO: 52)	抗 MSLN-14
	[CDR3]AAAEILTAITSSDYDY (SEQ ID NO: 53)	
	[CDR1]GRMFSSYA (SEQ ID NO: 54)	
	[CDR2]ISYGGAT (SEQ ID NO: 55)	抗 MSLN-15
	[CDR3]AARGGHWYSIHDPNSFRA (SEQ ID NO: 56)	
	[CDR1]GRRVRTAA (SEQ ID NO: 57)	
	[CDR2]ITWRGGER (SEQ ID NO: 58)	抗 MSLN-16
	[CDR3]AAGPWYTNHDTSQGYNY (SEQ ID NO: 59)	
	[CDR1]GRTISNYA (SEQ ID NO: 60)	
	[CDR2]INWNGGGI (SEQ ID NO: 61)	抗 MSLN-17
	[CDR3]AAQRAGTWTY (SEQ ID NO: 62)	
	[CDR1]GISDISS (SEQ ID NO: 63)	
[1056]	[CDR2]IGSGGNT (SEQ ID NO: 64)	抗 MSLN-18
	[CDR3]NAAQRIGAGPIVL (SEQ ID NO: 65)	
	[CDR1]GHTFSVYA (SEQ ID NO: 75)	
	[CDR2]INWGDGLT (SEQ ID NO: 76)	抗 MSLN-19
	[CDR3]AARQRREGWDY (SEQ ID NO: 77)	
	[CDR1]GRTASSYV (SEQ ID NO: 78)	
	[CDR2]VSRSGVST (SEQ ID NO: 79)	抗 MSLN-20
	[CDR3]AADGKNFSNRWWSRDEYKY (SEQ ID NO: 80)	
	[CDR1]GRTETTYN (SEQ ID NO: 81)	
	[CDR2]ISRGATIT (SEQ ID NO: 82)	抗 MSLN-21
	[CDR3]AASFTNLAVVARDYYY (SEQ ID NO: 83)	
	[CDR1]GRTFSHYA (SEQ ID NO: 84)	
	[CDR2]ITESPDST (SEQ ID NO: 85)	抗 MSLN-22
	[CDR3]AAARSTLRWPFRRGQGYDYDY (SEQ ID NO: 86)	
	[CDR1]GRTWSTYP (SEQ ID NO: 87)	
	[CDR2]IRWTTGST (SEQ ID NO: 88)	抗 MSLN-23
	[CDR3]NAEVRAWYNRRKADY (SEQ ID NO: 89)	
	[CDR1]GRTDSTGI (SEQ ID NO: 90)	
	[CDR2]IRWSNNYA (SEQ ID NO: 91)	抗 MSLN-24
	[CDR3]AAGTGWGFSISDYN (SEQ ID NO: 92)	
	[CDR1]GRSFNTYA (SEQ ID NO: 93)	
	[CDR2]ITWSGAST (SEQ ID NO: 94)	抗 MSLN-25

	[CDR3]AASSQYGGAASAPTAYLY (SEQ ID NO: 95)	
	[CDR1]GRTISNYA (SEQ ID NO: 96)	
	[CDR2]VSWTGHGT (SEQ ID NO: 97)	抗 MSLN-26
	[CDR3]AADGKNFSNRWWSRDEYKY (SEQ ID NO: 98)	
	[CDR1]GSLSSINT (SEQ ID NO: 99)	
	[CDR2]ISSSGST (SEQ ID NO: 100)	抗 MSLN-27
	[CDR3]AAGKGSTWYNGAYK (SEQ ID NO: 101)	
	[CDR1]ERTYSRYA (SEQ ID NO: 102)	
	[CDR2]ISWSGT (SEQ ID NO: 103)	抗 MSLN-28
	[CDR3]AYGYYSGAANYRDLASSTYRY (SEQ ID NO: 104)	
	[CDR1]GRTFSSVS (SEQ ID NO: 105)	
	[CDR2]ADWSGTT (SEQ ID NO: 106)	抗 MSLN-29
	[CDR3]AASDPRRSAYKY (SEQ ID NO: 107)	
[1057]	[CDR1]GRTFGSYT (SEQ ID NO: 108)	
	[CDR2]ISRSGGST (SEQ ID NO: 109)	抗 MSLN-30
	[CDR3]AASNTGGRASASYKY (SEQ ID NO: 110)	
	[CDR1]GGTFIRYA (SEQ ID NO: 111)	
	[CDR2]ISQTGGST (SEQ ID NO: 112)	抗 MSLN-31
	[CDR3]AVSTVQSKRMLMYGY (SEQ ID NO: 113)	
	[CDR1]GRTARSYN (SEQ ID NO: 114)	
	[CDR2]IISSPRGT (SEQ ID NO: 115)	抗 MSLN-32
	[CDR3]AATTSSTYYSDKTYAY (SEQ ID NO: 116)	
	[CDR1]GRILADTP (SEQ ID NO: 117)	
	[CDR2]ITSGGTT (SEQ ID NO: 118)	抗 MSLN-33
	[CDR3]AANAEGSGSRY (SEQ ID NO: 119)	
	[CDR1]GRILADTP (SEQ ID NO: 120)	
	[CDR2]ITSGGTT (SEQ ID NO: 121)	抗 MSLN-34
	[CDR3]KVMYHAGS (SEQ ID NO: 122)	

[1058] 上文所描述的sdAb中的任一个均可以用于本文所提供的IL-21融合蛋白中。

[1059] 实例3:人源化抗MSLN单结构域抗体的生成

[1060] 将以上34种sdAb的每个大羊驼序列与IMGT数据库进行比对以鉴别最佳匹配的人类IGHV3生殖系。当多个生殖系具有类似同源性时,FR 2(在IMGT编号系统中)第52位的氨基酸相似性用于确定采用哪个生殖系作为人源化支架。接着采用来自所选择的生殖系的FR1和FR3作为“人源化”FR1和FR3。对于FR2,除了第42位和第52位保留了相应的羊驼序列外,大部分人类序列都存在。

[1061] 以下表11显示34种抗体中的每一者的示例性人类FR区序列。

[1062] 表11

sdAb 名称 (人源化)	匹配的人类生 殖系	人类 FR1	人类 FR2	人类 FR3	人类 FR4
抗 MSLN-1	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 157)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 158)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 159)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-2	IGHV3-7*01	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA AS (SEQ ID NO: 161)	MSWFRQAPG KGLELVAN (SEQ ID NO: 162)	YYVDSVKGRFTIS RDNAKNSLLYLQ MNSLRAEDTAVY YC (SEQ ID NO: 163)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-3	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 164)	MHWFRQAP GKGLELVSA (SEQ ID NO: 165)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 166)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-4	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 167)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 168)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 169)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-5	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 170)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 171)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 172)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-6	IGHV3-23*04	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA AS (SEQ ID NO: 173)	MSWFRQAPG KGLEAVSA (SEQ ID NO: 174)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 175)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-7	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 176)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 177)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 178)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-8	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 179)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 180)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 181)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)

[1063]

抗 MSLN-9	IGHV3-23*04	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA AS (SEQ ID NO: 182)	MSWFRQAPG KGLELVSA (SEQ ID NO: 183)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 184)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-10	IGHV3-23*04	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA AS (SEQ ID NO: 185)	MSWFRQAPG KGLEQVSA (SEQ ID NO: 186)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 187)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-11	IGHV3-23*04	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA AS (SEQ ID NO: 188)	MSWFRQAPG KGLEFVSA (SEQ ID NO: 189)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 190)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-12	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 191)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 192)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 193)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-13	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 194)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 195)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 196)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-14	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 197)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 198)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 199)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-15	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 200)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 201)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSL RAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 202)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-16	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 203)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 204)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 205)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-17	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 206)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 207)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 208)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)

[1064]

[1065]

抗 MSLN-18	IGHV3-66*01	EVQLVESG GGGLVQPG GSLRLSCA AS (SEQ ID NO: 209)	MSWFRQAPG KGLELVSV (SEQ ID NO: 210)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLLYLQ MNSLRAEDTAVY YC (SEQ ID NO: 211)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-19	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 212)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 213)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 214)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-20	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 215)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 216)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY CAR (SEQ ID NO: 217)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-21	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 218)	MHWFRQAP GKGLELVSA (SEQ ID NO: 219)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 220)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-22	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 221)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 222)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY CAR (SEQ ID NO: 223)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-23	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 224)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 225)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 226)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-24	IGHV3-30*02	QVQLVES GGGVVQP GGSLRLSC AAS (SEQ ID NO: 227)	MHWFRQAP GKGLEFVAF (SEQ ID NO: 228)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 229)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-25	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 230)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 231)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 232)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)

抗 MSLN-26	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 233)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 234)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 235)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-27	IGVH3-66*01	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA AS (SEQ ID NO: 236)	MSWFRQAPG KGLELVSV (SEQ ID NO: 237)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLLYLQ MNSLRAEDTAVY YC (SEQ ID NO: 238)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-28	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 239)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 240)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 241)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-29	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 242)	MHWFRQAP GKGLEIVSA (SEQ ID NO: 243)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 244)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-30	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 245)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 246)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSL RAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 247)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-31	IGVH3-74*01	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA AS (SEQ ID NO: 248)	MHWFRQAP GKGLVFVSR (SEQ ID NO: 249)	SYADSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY CA (SEQ ID NO: 250)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-32	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 251)	MHWFRQAP GKGLEFVSA (SEQ ID NO: 252)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY CAR (SEQ ID NO: 253)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-33	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 254)	MHWFRQAP GKGLELVSA (SEQ ID NO: 255)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 256)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)
抗 MSLN-34	IGHV3-64*04	QVQLVES GGGLVQP GGSLRLSC SAS (SEQ ID NO: 257)	MHWFRQAP GKGLELVSA (SEQ ID NO: 258)	YYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYY C (SEQ ID NO: 259)	WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 160)

[1066]

[1067] 这些人源化抗MSLN sdAb中的任一个可以用于本文所提供的抗间皮素构建体中的任一个(如IL-21融合蛋白中的任一个)。表12列举示例性抗MSLN构建体的序列。

[1068] 表12.

示例性抗 MSLN 构建体		序列 (SEQ ID NO)
抗 MSLN-35	R2G12 v1.1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFPVNAY GWYRQAPGKQRDLVAIISAGGTTNYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCYLQRRIG MLRDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 285)
抗 MSLN-36	R2G12 v1.2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFPVNAY GWYRQAPGKGLELVAIISAGGTTNYADSVKGRFA ISKDNVNNTVYLYQMNSLTSEDTEGVYYCYLQRRIG MLRDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 286)
抗 MSLN-37	R2G12 v1.3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFPVNAY GWYRQAPGKGLELVAIISAGGTTNYADSVKGRFA ISKDNVNNTVYLYQMNSLTSEDTEGVYYCYLQRRIG MLRDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 287)
抗 MSLN-38	R3D5 v1.1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISSIRHMR WYRQAPGKQRELVATVSNDSAYYAGSVKGRFTI SRDNKNTLLYLQMNSLRAEDTAVYICNADTWG WPGADYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 288)
抗 MSLN-39	R3D5 v1.2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSISSIRHM RWYRQAPGKGLELVATVSNDSAYYLGSVKGRF TISRTNAKNTLLYLQMNSLKPEDSALYICNADTW GWPGADYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 289)
抗 MSLN-40	R3D5 v1.3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISSIRHMR WYRQAPGKGLELVATVSNDSAYYLGSVKGRFTI SRTNAKNTLLYLQMNSLKPEDSALYICNADTWG WPGADYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 290)
抗 MSLN-41	R3C7 v1.1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSRTLESYVM AWFRQAPGKEREAVASINWSSGRLIYADFVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGRY WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 291)
抗 MSLN-42	R3C7 v1.2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSRTLESYVM AWFRQAPGKGLEAVASINWSSGRLIYADFVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGRY WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 292)
抗 MSLN-43	R3C7 v1.3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLESYVM AWFRQAPGKGLEAVASINWSSGRLIYADFVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGRY WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 293)

[1069]

[1070]

抗 MSLN-44	R3C7 v1.4	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLESYVM AWFRQAPGKGLEAVASINWSSGRLIYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGRY WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 294)
抗 MSLN-45	R3C7 v1.5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLESYVM AWFRQAPGKEREAVASINWSSGRLIYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGRY WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 295)
抗 MSLN-46	R2P2C1 v1.1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSFNNNA MAWFRQTPGKEREVAAITWVGSGTTYADSVKGRF RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQ YPFSIIGYNSKDAWNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 296)
抗 MSLN-47	R2P2C1 v1.2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSFNNNA MAWFRQTPGKGLEFVAAITWVGSGTTYADSVKGRF RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQ YPFSIIGYNSKDAWNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 297)
抗 MSLN-48	R2P2C1 v1.3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSFNNNA MSWFRQAPGKGLEFVSAITWVGSGTTYADSVKGRF RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQ YPFSIIGYNSKDAWNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 298)
抗 MSLN-49	R2P4G9 v1.1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASTSIFSIGTMR WYRQAPGKQREYIAGMTSDGTTYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNTVAHFQ NYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 299)
抗 MSLN-50	R2P4G9 v1.2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASTSIFSIGTMR WYRQAPGKGLEIYIAGMTSDGTTYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNTVAHFQ NYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 300)
抗 MSLN-51	R2P4G9 v1.3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASTSIFSIGTMH WYRQAPGKGLEIYVAGMTSDGTTYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNTVAHF QNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 301)
抗 MSLN-52	R2G12-IgG1 P197	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFPVNAY GWYRQAPGKQRDLVAIISAGGTTNYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCYLQRRIG MLRDYWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 302)

[1071]

抗 MSLN-53	R3C7-IgG1 P303	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLESYVM AWFRQAPGKEREAVASINWSSGRLIYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGRY WGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 303)
抗 MSLN-54	R3D5-IgG1 P200	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISSIRHMR WYRQAPGKQRELVATVSN DGSAYYAGSVKGRFTI SRDN SKNTLLYLQMNSLRAEDTAVYICNADTWG WPGADYWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 304)
抗 MSLN-55	R2P2C1-IgG1 P215	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSFNNNA MAWFRQTPGKEREVAAITWVGS GTYYADSVKGR RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQ YFPIIGYNSKDAWNYWGQGTTRVTVSSDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:305)
抗 MSLN-56	R2P4G9-IgG1 P218	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASTSIFSIGTMR WYRQAPGKQREYIAGMTSDGTTYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNTVAHFQ NYWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF N WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:306)

[1072]

<p>抗 MSLN-57</p>	<p>IL-21-抗白蛋白抗 MSLN P375</p>	<p>QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPA PEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIIN VSIKCLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPCDSYEKK PPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSGSGG SGGSGGSGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG STWSINTLAWYRQAPGKQRDLVARISSGGSTHYA DSVKGRFTVSRDNAENTLVLQMNSLKPEDTAVY YCYAQSTWYPPSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGG GSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR LESYVMAWFRQAPGKEREAVASINWSSGRLIYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAGRYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 325)</p>
<p>抗 MSLN-58</p>	<p>抗 MSLN-抗白蛋白 -IL-15Ra-IL-15 P669</p>	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFPVNAY GWYRQAPGKQRDLVAIISAGGTTNYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCYLQRRIG MLRDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGG QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTWSINTL AWYRQAPGKQRDLVARISSGGSTHYADSVKGRFT VSRDNAENTLVLQMNSLKPEDTAVYYCYAQSTW YPPSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGG GGSITCPPMMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSG FKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIRD PALVHQRPAAPPGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQNWV NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNS LSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTS (SEQ ID NO: 326)</p>
<p>抗 MSLN-59</p>	<p>hIL-21-R3C7-IgG1 (KIH) P286</p>	<p>QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPA PEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIIN VSIKCLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPCDSYEKK PPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSGSGG SGGSGGSGQVQLVESGGGLVEAGDSLRLSCVVS RTLESYVMAWFRQAPGKEREAVASINWSSGRLIY ADFVKGRFTISRDIYEKNTIYLSMNNLKPEDTAVY YCAAGRYWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLV KGFYPDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 327)</p>

[1073]

抗 MSLN-60	R2G12-IgG1 (KIH) P288	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFPVNAY GWYRQAPGKQRDLVAIISAGGTTNYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCYLQRRIG MLRDYWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 328)
抗 MSLN-61	hIL-21-抗 HSA-R3C7-Ig G1 (KIH) P431	QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPA PEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIIN VSIKCLKRKPPSTNAGRQKHLRTPCSCDSYEKK PPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSGSGG SGGSGGSGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG STWSINTLAWYRQAPGKQRDLVARISSGGSTHYA DSVKGRFTVSRDNAENTLVLQMNSLKPEDTAVY YCYAQSTWYPPSWGQGTQVTVSSGGGSGGSGG GSGGGSGGGGSGRSAGGGGSQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGRTLESYVMAWFRQAPGKERE AVASINWSSGRLIYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAAGRYWGQGTQVTVSSD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 329)
抗 MSLN-62	R3C7-IgG1 (KIH) P435	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLESYVM AWFRQAPGKEREAVASINWSSGRLIYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGRY WGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 330)

[1074]	抗 MSLN-63 hIL-21-ABD- R3C7-IgG1 (KIH) P545	<p> QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPA PEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIIN VSIKCLKRKPSTNAGRRQKHRLTCPCDSYEKK PPKEFLERFKSLQKMIHQHLSSRTHGSEDSGSGG SGGSGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDYAKNLI NNAKTVEGVKALIDEILAALPGGGGSPVGLIGGG GGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLES YVMAWFRQAPGKEREAVASINWSSGRLIYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAG RYWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 331) </p>
--------	--	--

[1075] 实例4: IL-21融合蛋白的分子克隆

[1076] 寡核苷酸合成

[1077] 下文描述示例性寡核苷酸合成程序。编码人类IL-21全长 (SEQ ID NO:1)、人类IL-21截短 (SEQ ID NO:2)、G148-ABD-wt (SEQ ID NO:3)、低免疫原性G148-ABD变体 (SEQ ID NO:4-11)、靶向HSA的人源化sdAb和靶向MSLN的人源化sdAb的cDNA序列 (例如表12所列), 是通过使用基因技术基因合成 (GeneArt Gene Synthesis) (赛默飞世尔科技 (ThermoFisher Scientific)) 或gBlocks基因片段 (gBlocks Gene Fragments) (集成DNA技术) 而基因合成来获得的, 其中NcoMIV限制酶位点和Kozak序列添加到5' 并且SalI限制酶位点添加到3'。这些基因的密码子使用经过优化, 可在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中表达。通过NcoMIV/SalI消化-接合方法 (digest-ligation method) 将合成的寡核苷酸插入到UCOE表达载体CET1019-AS-Puro (CS221284, 密理博 (Millipore Sigma)) 中。

[1078] IL-21融合蛋白表达载体的构建

[1079] 本文示例IL-21融合蛋白表达载体的构建。IL-21的C端经由肽接头 (L1) 融合到白蛋白结合结构域或白蛋白结合sdAb (α HSA) 的N端, 并且白蛋白结合结构域或白蛋白结合sdAb的C端经由第二肽接头 (L2) 与间皮素结合sdAb (抗MSLN) 融合。编码这些多肽的DNA序列可以通过Gibson组装 (Gibson Assembly) (合成基因组公司 (Synthetic Genomics)) 或类似的体外重组方法无缝地组装在一起。为了产生具有与其用于Gibson组装反应的相邻片段的重叠序列的DNA片段, 在引物的5' 端处引入编码L1或L2接头肽或CET1019-AS-Puro载体序列的20-40个碱基对 (bp) 重叠序列 (参见图2, 步骤1)。扩增后, PCR产物经纯化且通过使用PureLink凝胶提取试剂盒 (PureLink Gel Extraction Kit) (赛默飞世尔科技) 的凝胶提取来收集。根据制造商的说明 (manufacturer's protocol), 将所需的基因-接头-载体组合的经纯化DNA片段混合并且通过Gibson预混液 (Gibson Assembly Master Mix) (新英格兰生物实验室 (New England BioLabs)) 或NEBuilder HiFi DNA组装预混液 (新英格兰生物实验室) 组装在一起 (参见图2, 步骤2)。

[1080] 类似地, 图3说明当白蛋白结合分子为ABD时本文所提供的示例性IL-21融合蛋白的构建。

[1081] 6His标签可以任选地融合到抗MSLN sdAb的C端。在此类情况下,编码6His的DNA序列用作重叠序列,以设计用于扩增抗MSLN的反向引物和用于扩增CET1019 AS-嘌呤霉素载体主链的正向引物。

[1082] 根据制造商的说明,在组装反应之后,2 μ l组装产物用于转化NEB 5- α 感受态大肠杆菌细胞(新英格兰生物实验室)。使用PureLink快速质粒小规模制备试剂盒(PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit)(赛默飞世尔科技)和DNA测序验证(ELIM生物药物),拾取来自Amp选择培养板的菌落以用于后续小规模制备。

[1083] 实例5:IL-21融合蛋白的表达和纯化

[1084] 编码IL-21融合蛋白的DNA序列瞬时表达于ExpiCHO细胞中。简单来说,在第1天,在25ml瞬时转染培养基中以 $3-4 \times 10^6$ 细胞/ml接种CHO细胞(BalanCD®Transfectory™CHO,欧文科学(Irvine Scientific),#91147),在125ml无挡板烧瓶中加入4mM谷氨酰胺。在第0天,22.5 μ g质粒DNA与112.5 μ g PEI在1.5ml瞬时转染培养基中混合并且在RT下培育7分钟。随后将混合物缓慢添加到细胞中。在第1天,用1) 0.5mM丙戊酸(50 μ l到25ml), 2) 10%TF后补充剂(欧文科学#91148), 3) 1.5ml葡萄糖储备液(200g/L), 4) 具有50g/L TC酵母抽提物(Yeastolyte)的5%IS饲料向细胞馈入一次。在第8天收集CHO细胞以在亲和柱上纯化。

[1085] 实例6:体外NK细胞增殖测定

[1086] 使用阴性选择试剂盒-试剂盒II分离人类NK细胞(所有珠粒都来自德国贝尔吉施格拉德巴(Bergisch Gladbach, Germany)的美天旆生物技术(Miltenyi Biotech))。手动地或用AutoMACS(美天旆)进行纯化。细胞的纯度始终由荧光活化细胞分选(FACS)控制且大于90%。分离的NK细胞用本文所提供的融合蛋白(包括上文在实例1中所描述的融合蛋白)处理。使用FACS分析用CD69信号监测NK细胞的增殖。

[1087] 实例7:体外细胞毒性测定

[1088] 人类肺癌细胞A549与刚分离的人类PBMC混合且与0、5、10和50ng/mL经纯化的IL-21融合蛋白一起培育。在使用MMP可裂解接头的情况下,加入MMP9以激活IL-21,建立平行组实验。将混合的培养物培育至多72小时,且使用MTS方法以确定研究中的经溶解的靶细胞的百分比。

[1089] 实例8:体内功效研究

[1090] 在第0天,将A549癌细胞植入Neu小鼠。在肿瘤生长到大约50-100mm³后,将小鼠随机分组,且每隔一天用本文所提供的IL融合蛋白和对照物(例如PBS中的同型对照抗体)进行处理。当与IL-21组合研究(用IL-21和第二药剂进行组合处理的研究)相比较时,预期本文所提供的IL-21融合蛋白在相同剂量下显示更好的功效,或在低得多的剂量下实现类似功效。

[1091] 用药之前在基线处测量肿瘤大小和体重。治疗后两周内每周测量肿瘤大小和体重3次。收集最终血液样本用于PK/PD分析。

[1092] 实例9:抗MSLN抗体与人类或猴类间皮素(MSLN)的结合

[1093] 使用octet RED96(ForteBio)以表征相互作用。简单来说,将抗MSLN-hgG1Fc融合蛋白负载到蛋白质A生物传感器上并且在100nM、50nM或25nM浓度下浸渍到人或猴类MSLN中。用全局拟合分析初级实验数据以确定K_D。与原始大羊驼抗体相比(图4A),人源化抗MSLN抗体(即,人源化R3C7、人源化R2G12和人源化R3D5)保留对人类和猴类MSLN两者的结合亲和

性(图4B)。

[1094] 实例10:抗MSLN抗体与细胞表面的结合

[1095] 将已知用于表达间皮素的四种癌细胞系,即NCI-H226、OVCAR3、NCI-N87和AsPC-1,在4℃下与抗MSLN抗体R2G12、R3C7或对照抗体MORAb-009一起培育20分钟。洗涤后,在4℃下将细胞与Alexa Fluor 488缀合二次抗体(抗人类IgG,生命技术(Life Technologies))一起培育20分钟。洗涤细胞并且随后通过流式细胞测量术定量细胞的荧光强度。针对如图5中所示的不同浓度的抗体标绘荧光强度值。抗间皮素抗体均以类似效力结合到细胞表面间皮素。

[1096] 实例11:抗间皮素抗体的细胞毒性

[1097] A部分.

[1098] 将NCI-H226癌细胞系维持于含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI-1640中。在第0天,将5,000个NCI-H226细胞/孔涂覆于96孔平底培养板中的培养基中。在第1天,使用RosetteSep NK分离试剂盒(干细胞技术(Stemcell Technologies))从人类白细胞层分离NK细胞,并且将100,000个NK细胞/孔与所指示的处理物(treatment)一起添加到癌细胞中。将培养板在37℃、5%CO₂下培育48小时,并且随后用4%多聚甲醛固定细胞并且用Sytox橙色染料(Sytox Orange)染色细胞核。通过使用Cytation 1(伯腾(Biotek))对每个孔中剩余的癌细胞细胞核的数目进行计数来计算剩余癌细胞的数目。较低细胞计数指示较好的NK介导的细胞杀伤。(MORAb-009-参考抗间皮素抗体;R2G12、R3C7、R3D5、抗间皮素抗体,如实例2中所示。)

[1099] 如图6A中所示,与对照抗体MORAb-009相比,R2G12、R3C7和R3D5产生更好的抗体依赖性细胞毒性。此外,与3ng/ml剂量下的R3D5相比,R3C7和R2G12显示更好的ADCC。

[1100] B部分.

[1101] 将NCI-H226、OVCAR3、NCI-N87和AsPC-1细胞维持于含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI-1640中。在第0天,将10,000个细胞/孔涂覆于96孔平底培养板中的培养基中。在第1天,使用RosetteSep NK分离试剂盒(干细胞技术)从人类白细胞层分离NK细胞,并且将100,000个NK细胞/孔与所指示的处理物一起添加到癌细胞中。将培养板在37℃、5%CO₂下培育48小时,并且随后用4%多聚甲醛固定细胞并且用Sytox橙色染料染色细胞核。通过使用Cytation 1(伯腾)对每个孔中剩余的癌细胞细胞核的数目进行计数来计算剩余癌细胞的数目。较低细胞计数指示较好的NK介导的细胞杀伤。

[1102] 如图6B-6E中所示,R2G12和R3C7对所有四种癌细胞系产生抗体依赖性细胞毒性。。

[1103] 将NCI-N87癌细胞系维持于含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI-1640中。在第0天,将10,000个NCI-N87细胞/孔涂覆于96孔平底培养板中的培养基中。在第1天,使用RosetteSep NK分离试剂盒(干细胞技术)从人类白细胞层分离NK细胞,并且将100,000个NK细胞/孔与所指示的处理物一起添加到癌细胞中。将培养板在37℃、5%CO₂下培育48小时,并且随后用4%多聚甲醛固定细胞并且用Sytox橙色染料染色细胞核。通过使用Cytation 1(伯腾)对每个孔中剩余的癌细胞细胞核的数目进行计数来计算剩余癌细胞的数目。较低细胞计数指示较好的NK介导的细胞杀伤。(MORAb-009-参考抗间皮素抗体;P303(即R3C7),如实例2中所论述的抗间皮素抗体;P303F(即R3C7F)、具有减少岩藻糖的R303)

[1104] 如图7中所示,与参考抗体MORAb-009相比,P303和P303F会产生较好的ADCC活性。

此外,与P303相比,具有减少岩藻糖的P303F会产生较好的ADCC。

[1105] D部分.

[1106] 将NCI-N87和NCI-H226人类癌细胞系维持于含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI-1640中。将经稳定转染以表达人类间皮素蛋白质的CT26/MSLN小鼠癌细胞系维持于含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI-1640中。在第0天,将10,000个NCI-N87、5,000个NCI-H226和5,000个CT26/MSLN细胞/孔涂覆于96孔平底培养板中的培养基中。在第1天,使用RosetteSep NK分离试剂盒(干细胞技术)从人类白细胞层分离NK细胞,并且将100,000个NK细胞/孔与所指示的处理物一起添加到癌细胞中。将培养板在37°C、5%CO₂下培育48小时,并且随后用4%多聚甲醛固定细胞并且用Sytox橙色染料染色细胞核。通过使用Cytation 1(伯腾)对每个孔中剩余的癌细胞细胞核的数目进行计数来计算剩余癌细胞的数目。较低细胞计数指示较好的NK介导的细胞杀伤。(P303(即R3C7)和P197(即R2G12)-如实例2中所论述的抗间皮素抗体;P303F(即R3C7F)和P197F(即R2G12F)-各自具有减少岩藻糖的R303和P197)。

[1107] 如图8A-8C中所示,通过在抗体产生期间抑制岩藻糖基化而降低的抗体岩藻糖含量增强了抗体R3C7和R2G12的抗间皮素抗体ADCC活性。具体来说,当使用CT26/MSLN细胞系时,P303F(R3C7F)展现最佳的ADCC活性。

[1108] 实例12:用于治疗肿瘤的抗间皮素抗体

[1109] A部分.

[1110] 培养NCI-N87细胞并且将其维持于补充有10%FBS+glutamax+Pen/Strep的RPMI培养基中。细胞经胰蛋白酶处理,用培养基洗涤,且加以计数。随后用PBS洗涤细胞,并且使用18号针将 3×10^6 细胞(在100 μ l PBS中)皮下注射到麻醉的SCID小鼠(泰克里克(Taconic))中。将储备研究药物(MORAb-009、P303F、P303、P197F和P197)在用药当天稀释到PBS中的适当浓度,且用在100 μ l PBS中的5mg/kg的每一研究药物给动物腹膜内(IP)用药,每周两次,总共五次剂量。使用数字卡尺每周两次收集肿瘤测量值(长度(L)和宽度(W)),并且计算肿瘤体积(L \times W \times W)/2。

[1111] 如图9A中所示,所有抗间皮素抗体相对于PBS对照组降低了SCID小鼠模型中的肿瘤生长。与MORAb-009、P197、P197F和P303相比,P303F(R3C7F)处理导致更好的肿瘤生长抑制。

[1112] B部分.

[1113] 培养NCI-N87细胞并且将其维持于补充有10%FBS+glutamax+Pen/Strep的RPMI培养基中。细胞经胰蛋白酶处理,用培养基洗涤,且加以计数。随后用PBS洗涤细胞,并且使用23号针将 3×10^6 细胞(在100 μ l PBS中)皮下注射到麻醉的NSG小鼠(杰克逊(Jackson))中。6天后,将 10×10^6 人类PBMC以每只小鼠100 μ l PBS注射到尾静脉中。将储备研究药物P197在用药当天稀释到PBS中的适当浓度,且用5mg/kg(100 μ l)的研究药物给动物腹膜内(IP)用药,每周两次,总共5次剂量。使用数字卡尺每周两次收集肿瘤测量值(长度(L)和宽度(W)),并且计算肿瘤体积(L \times W \times W)/2。

[1114] 如图9B中所示,抗间皮素抗体P197(R2G12)降低具有人源化免疫系统的NSG小鼠中的肿瘤生长。

[1115] C部分.

[1116] 培养用人类间皮素 (CT26/MSLN) 转染的CT26小鼠细胞并且将其维持于补充有10% FBS+glutamax+Pen/Strep的RPMI培养基中。细胞经胰蛋白酶处理,用培养基洗涤,且加以计数。随后用PBS洗涤细胞,并且使用23号针将 1×10^6 细胞(在100 μ l PBS中)皮下注射到麻醉的BALB/c小鼠中。将储备研究药物在用药当天稀释到PBS中的适当浓度,且用5mg/kg (100 μ l)的研究药物给动物腹膜内用药,每周两次,总共5次剂量。使用数字卡尺每周两次收集肿瘤测量值(长度(L)和宽度(W)),并且计算肿瘤体积 $(L \times W \times W) / 2$ 。

[1117] 如图9C中所示,相对于同基因CT26小鼠模型中的PBS对照物,岩藻糖基化降低的抗间皮素抗体P303F (R3C7F)减少了肿瘤生长。

[1118] 实例13. 抗HSA抗体

[1119] 白蛋白为人类血清中最充足的蛋白质,且其具有三周的半衰期。血清白蛋白的长半衰期主要归因于新生Fc受体 (FcRn) 的保护。血清白蛋白可由体细胞通过称为流体相胞饮作用的过程摄取。胞饮的囊泡之后与核内体隔室融合,其中pH在4.5-6.5范围内。如果囊泡中的蛋白质从其受体释放,那么其将进一步被分选用于溶酶体降解。血清白蛋白与FcRn之间的结合仅在酸性pH(<6.5)下发生,使得FcRn救援来自核内体的白蛋白且将其再循环回到血清(Grevys等人,2018)。因此,作为白蛋白依赖性半衰期延长部分,抗HSA抗体需要在中性和酸性pH下保留其结合亲和性。

[1120] 示例性抗HSA抗体 (P367) 在pH 7.4和pH 5.5下与人类和猴类血清白蛋白两者的相互作用。使用Octet RED96 (ForteBio) 测量结合并且通过使用数据分析HT软件 (Octet Data Analysis HT software) 的全局拟合确定 K_D 。将P367-hgG1 Fc融合蛋白负载到蛋白质A生物传感器上并且在pH 7.4(左图)或pH 5.5(右图)下浸渍到人类或猴类血清白蛋白中。表13显示在pH 5.5和pH 7.4两者下计算的P367的 K_D 。P367显示在pH 5.5下与人类血清白蛋白的结合亲和力有增加。

[1121] 表13

抗体	结合条件	KD (M)	
		人类 SA	猕猴 SA
AWT-P367	pH7.4	29.6×10^{-9}	18.9×10^{-9}
	pH5.5	9.6×10^{-9}	20.5×10^{-9}

[1123] 使用octet RED96 (ForteBio) 以表征抗HSA抗体AWT-P367或其人源化版本AWT-P494与人类、猴类或小鼠白蛋白之间的相互作用。简单来说,将AWT-P367或AWT-P494负载到AHC生物传感器上且在200nM浓度下浸渍到人类、猴类或小鼠血清白蛋白中。用全局拟合分析初级实验数据以确定 K_D 。如图10A-10B中所示,人源化抗HSA抗体AWT-P494的结合亲和力类似于其原始克隆AWT-P367。

[1124] 示例性抗白蛋白抗体的序列在以下表14中列出。

[1125] 表14

SEQ ID NO.	描述	序列 CDR 序列 (IGMT 定义) 突出显示
[1126] 332	P367	<u>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS</u> GSTWSIN <u>TLAWYRQAPGKQRDLVAR</u> ISSGGST HYADSVK GRFTVSRDNAENTLVLQMNSLKPEDTAVYYCY AQSTWYPPSWGQGTQVTVSS
333	P494 (人源化 P367)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS</u> GSTWSIN <u>TLAWYRQAPGKQRDLVAR</u> ISSGGST YYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCY AQSTWYPPSWGQGT LVTVSS
334	P367/P494 CDR1	GSTWSINT
335	P367/P494 CDR2	ISSGGST
[1127] 336	P367/P494 CDR3	YAQSTWYPPS

[1128] 实例14:用于抑制癌细胞的抗间皮素抗体、细胞因子或细胞因子融合蛋白

[1129] 将NCI-N87癌细胞系维持于含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI-1640中。在第0天,将10,000个NCI-N87细胞/孔涂覆于96孔平底培养板中的培养基中。在第1天,使用RosetteSep NK分离试剂盒(干细胞技术)从人类白细胞层分离NK细胞,并且将100,000个NK细胞/孔与所指示的处理物一起添加到癌细胞中。将培养板在37°C、5%CO₂下培育48小时,并且随后用4%多聚甲醛固定细胞并且用Sytox橙色染料染色细胞核。通过使用Cytation 1 (伯腾)对每个孔中剩余的癌细胞细胞核的数目进行计数来计算剩余癌细胞的数目。较低细胞计数指示较好的NK介导的细胞杀伤。(P303-R3C7抗MSLN抗体、具有减少岩藻糖基化的P303F-R3C7抗间皮素抗体、P394-人类IL-21抗HSA、P390-小鼠IL-21抗HSA、P431/435-人类IL-21-抗HSA-IgG1-R3C7、P479-抗HSA-人类-IL-15RA Sushi/IL-15、P480-抗HSA-人类-IL-15RA Sushi/IL-15、rhIL-21-重组人类IL-21、rhIL-15-重组人类IL-15)

[1130] 如图11中所示,与单独的P303相比,当与抗MSLN抗体P303(R3C7)组合时,rhIL-21、mIL-21(P390)和hIL-21(P394)抗HSA融合蛋白将NK细胞ADCC活性增强到类似程度。此外,与单独的P303相比,当与抗MSLN抗体P303(R3C7)组合时,rhIL-15和hIL-15/IL-15RA抗HSA融合蛋白(P479和P480)将NK细胞ADCC活性增强到类似程度。与等效重组细胞因子相比,细胞因子-抗HSA融合蛋白维持充分的ADCC活性。

[1131] 实例15:用于抑制癌细胞的单独或与赫赛汀组合的抗间皮素抗体

[1132] 将NCI-N87癌细胞系维持于含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI-1640中。在第0天,将10,000个NCI-N87细胞/孔涂覆于96孔平底培养板中的培养基中。在第1天,使用RosetteSep NK分离试剂盒(干细胞技术)从人类白细胞层分离NK细胞,并且将100,000个NK细胞/孔与所指示的处理物一起添加到癌细胞中。将培养板在37°C、5%CO₂下培育48小时,并且随后用4%多聚甲醛固定细胞并且用Sytox橙色染料染色细胞核。通过使用Cytation 1 (伯腾)对每个孔中剩余的癌细胞细胞核的数目进行计数来计算剩余癌细胞的数目。较低细胞计数指示较好的NK介导的细胞杀伤。(P303F-具有减少岩藻糖基化的抗间皮素抗体,P380-人类IL-33-抗HSA,P394-人类IL-21-抗HSA)

[1133] 如图12中所示,P303F(R3C7抗间皮素抗体)在NK细胞ADCC方面比赫赛汀更有效力,且P303F与赫赛汀的组合类似于单独的P303F。将P394(人类IL-21-抗HSA)添加到P303F和赫赛汀将显著改善ADCC功能并提高效率。

[1134] 实例16:用于抑制癌细胞的单独或与细胞因子融合蛋白组合的抗间皮素抗体

[1135] 将NCI-N87癌细胞系维持于含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI-1640中。在第0天,将10,000个NCI-N87细胞/孔涂覆于96孔平底培养板中的培养基中。在第1天,使用RosetteSep NK分离试剂盒(干细胞技术)从人类白细胞层分离NK细胞,并且将100,000个NK细胞/孔与所指示的处理物一起添加到癌细胞中。将培养板在37°C、5%CO₂下培育24小时,并且随后用4%多聚甲醛固定细胞并且用Sytox橙色染料染色细胞核。通过使用Cytation 1(伯腾)对每个孔中剩余的癌细胞细胞核的数目进行计数来计算剩余癌细胞的数目。较低细胞计数指示较好的NK介导的细胞杀伤。(P303F-具有减少岩藻糖基化的抗间皮素IgG1抗体R3C7,P480-抗HSA-人类IL-15RA Sushi/IL-15,rhIL-21重组人类IL-21,rhIL-15重组人类IL-15)

[1136] 如图13中所示,当与抗MSLN抗体P303F组合时,rhIL-15和IL-15-抗HSA(P480)增强的NK细胞ADCC活性优于P303F以及P303F与rhIL-21。与表明充分IL-15活性保留于抗体融合蛋白中的rhIL-15相比,P480(IL-15/IL-15R sushi-抗HSA)以类似效力和量值增强了NK介导的ADCC。

[1137] 实例17:用于抑制癌细胞的细胞因子融合蛋白

[1138] 将NCI-N87癌细胞系维持于含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI-1640中。在第0天,将10,000个NCI-N87细胞/孔涂覆于96孔平底培养板中的培养基中。在第1天,使用RosetteSep NK分离试剂盒(干细胞技术)从人类白细胞层分离NK细胞,并且将100,000个NK细胞/孔与所指示的处理物一起添加到癌细胞中。将培养板在37°C、5%CO₂下培育24小时,并且随后用4%多聚甲醛固定细胞并且用Sytox橙色染料染色细胞核。通过使用Cytation 1(伯腾)对每个孔中剩余的癌细胞细胞核的数目进行计数来计算剩余癌细胞的数目。较低细胞计数指示较好的NK介导的细胞杀伤。(P303F-具有减少岩藻糖基化的抗间皮素IgG1抗体R3C7,P431/P435-人类IL-21-抗HSA-IgG1-R3C7,P545/P435-人类IL-21-抗HSA-可裂解接头-IgG1-R3CF7,rhIL-21-重组人类IL-21)

[1139] 如图14中所示,除不具有减少岩藻糖基化的P431/P435(人类IL-21-抗HSA-IgG1-R3C7)以外,IL-21-抗HSA-IgG1-R3CF7融合蛋白具有与P303F加rhIL-21相比类似的NK细胞ADCC活性

[1140] 实例18:用于抑制癌细胞的IL-15-抗HSA融合蛋白

[1141] 将NCI-N87癌细胞系维持于含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI-1640中。在第0天,将10,000个NCI-N87细胞/孔涂覆于96孔平底培养板中的培养基中。在第1天,使用RosetteSep NK分离试剂盒(干细胞技术)从人类白细胞层分离NK细胞,并且将100,000个NK细胞/孔与所指示的处理物一起添加到癌细胞中。将培养板在37°C、5%CO₂下培育48小时,并且随后用4%多聚甲醛固定细胞并且用Sytox橙色染料染色细胞核。通过使用Cytation 1(伯腾)对每个孔中剩余的癌细胞细胞核的数目进行计数来计算剩余癌细胞的数目。较低细胞计数指示较好的NK介导的细胞杀伤。(P303-抗间皮素抗体R3C7,P480-抗HSA-人类-IL-15RA Sushi/IL-15,P597-抗HSA-人类-IL-15RA Sushi-肽接头-IL-15,rhIL-15重组人类IL-15)

[1142] 如图15中所示,与没有在IL-15R sushi与IL-15之间的接头的抗HSA融合蛋白P480相比,具有在IL-15R sushi与IL-15之间的肽接头的抗HSA融合蛋白P597改进了ADCC活性。

P597的ADCC效力类似于rhIL-15,表明充分的IL-15活性保留于融合蛋白中。

[1143] 实例19:用于抑制癌细胞的IL-21融合蛋白

[1144] 将NCI-N87和H226癌细胞系维持于含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI-1640中。在第0天,将10,000个NCI-N87细胞/孔、5000个H226细胞/孔涂覆于96孔平底培养板中的培养基中。在第1天,使用RosetteSep NK分离试剂盒(干细胞技术)从人类白细胞层分离NK细胞,并且将100,000个NK细胞/孔与所指示的处理物一起添加到癌细胞中。将培养板在37°C、5%CO₂下培育48小时,并且随后用4%多聚甲醛固定细胞并且用Sytox橙色染料染色细胞核。通过使用Cytation 1(伯腾)对每个孔中剩余的癌细胞细胞核的数目进行计数来计算剩余癌细胞的数目。较低细胞计数指示较好的NK介导的细胞杀伤。(P129-抗间皮素抗体R2G12,P126-人类IL-21-R2G12-IgG1融合体,P107-人类IL-21-IgG1融合体,P325-人类IL-21-R2D2融合体,P286/288-人类IL-21-R3C7-IgG1-R2G12融合体。)

[1145] 如图16中所示,当与抗MSLN抗体P129(即R2G12)组合时,较低浓度的IL-21-Fc融合蛋白(P107、P126、P288/286)增强了NK细胞ADCC活性。然而,在较高浓度(>100nM)下,当与抗MSLN抗体P129(R2G12)组合时,IL-21-Fc融合蛋白(P107、P126、P288/286)抑制了NK细胞ADCC活性。对于不具有Fc结构域的IL-21或IL-21融合蛋白(P325),未观察到这种抑制。

[1146] 实例20:用于抑制癌细胞的与抗间皮素抗体组合的IL-21-抗HSA融合蛋白

[1147] 将NCI-N87癌细胞维持于含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI-1640中。在第0天,将10,000个NCI-N87细胞/孔涂覆于96孔平底培养板中的培养基中。在第1天,使用RosetteSep NK分离试剂盒(干细胞技术)从人类白细胞层分离NK细胞,并且将100,000个NK细胞/孔与所指示的处理物一起添加到癌细胞中。将培养板在37°C、5%CO₂下培育48小时,并且随后用4%多聚甲醛固定细胞并且用Sytox橙色染料染色细胞核。通过使用Cytation 1(伯腾)对每个孔中剩余的癌细胞细胞核的数目进行计数来计算剩余癌细胞的数目。较低细胞计数指示较好的NK介导的细胞杀伤。(P197-抗间皮素抗体R2G12,P390-小鼠IL-21-抗HSA,P394-人类IL-21-抗HSA)

[1148] 如图17中所示,当与抗MSLN抗体P197(R2G12)组合时,小鼠和人类IL-21-抗HSA融合蛋白(P390和P394)均强力增强了NK细胞ADCC活性。

[1149] 实例21:用于治疗癌症的抗间皮素抗体和/或IL-21-抗HSA融合蛋白

[1150] 培养NCI-N87细胞并且将其维持于补充有10%FBS+glutamax+Pen/Strep的RPMI培养基中。细胞经胰蛋白酶处理,用培养基洗涤,且加以计数。随后用PBS洗涤细胞,并且使用23号针将 3×10^6 细胞(在100 μ l PBS中)皮下注射到麻醉的NSG小鼠(杰克逊)中。6天后,将 10×10^6 人类PBMC以每只小鼠100 μ l PBS注射到尾静脉中。将储备研究药物在用药当天稀释到PBS中的适当浓度,且用100 μ g P303F(抗间皮素抗体)、25 μ g P394(人类IL-21-抗HSA)或100 μ g P303F与25 μ g或5 μ g P394的组合给动物腹膜内用药,每周两次,总共5次剂量。使用数字卡尺每周两次收集肿瘤测量值(长度(L)和宽度(W)),并且计算肿瘤体积(L \times W \times W)/2。

[1151] 如图18中所示,P303F相对于对照物降低了肿瘤生长。接受单独或与P303F组合的P394的所有小鼠相对于PBS对照物或单独P303F具有显著降低的肿瘤生长。

[1152] 实例22:用于治疗癌症的抗间皮素抗体和/或IL-21-抗HSA融合蛋白

[1153] 培养NCI-N87细胞并且将其维持于补充有10%FBS+glutamax+Pen/Strep的RPMI培养基中。细胞经胰蛋白酶处理,用培养基洗涤,且加以计数。随后用PBS洗涤细胞,并且使用

18号针将 3×10^6 细胞(在100 μ l PBS中)皮下注射到麻醉的SCID小鼠(泰克里克)中。将储备研究药物在用药当天稀释到PBS中的适当浓度,且用100 μ l PBS中的100 μ g P303F(抗间皮素抗体)或与25 μ g P390(小鼠IL-21-抗HSA)、5 μ g P390或2.5 μ g重组小鼠IL-21(与5 μ g P390剂量相等的摩尔浓度)组合的P303F给动物腹膜内用药,每周两次,总共5次剂量。使用数字卡尺每周两次收集肿瘤测量值(长度(L)和宽度(W)),并且计算肿瘤体积 $(L \times W \times W) / 2$ 。

[1154] 如图19中所示,与PBS对照、P303F单疗法和与rmIL-21组合的P303F相比,P303F和25 μ g或5 μ g P390的组合使得肿瘤生长显著降低。具有2.5 μ g rmIL-21的P303F显示与P303F类似的肿瘤生长,表明重组IL-21在此剂量下并不有效。与具有2.5 μ g rmIL-21的P303F相比,P303F与5 μ g P390的组合显示显著降低的肿瘤生长,突出显示与重组细胞因子相比半衰期延长的IL-21的改进功效。

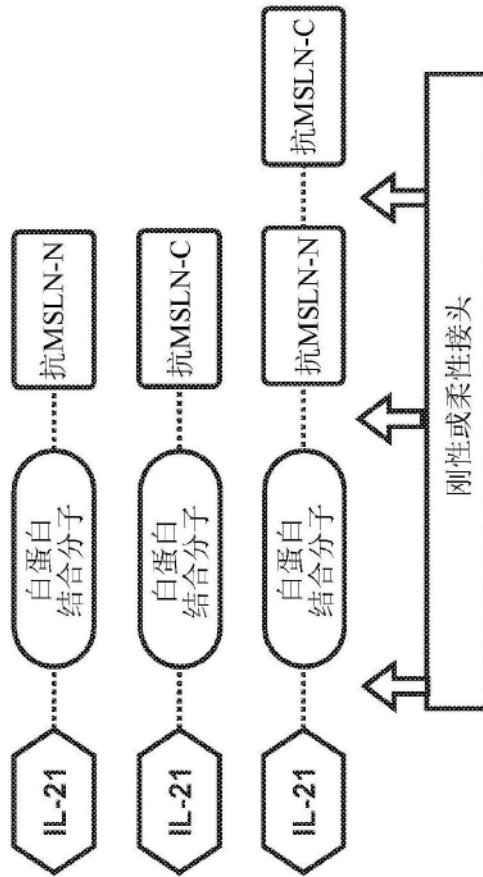


图1

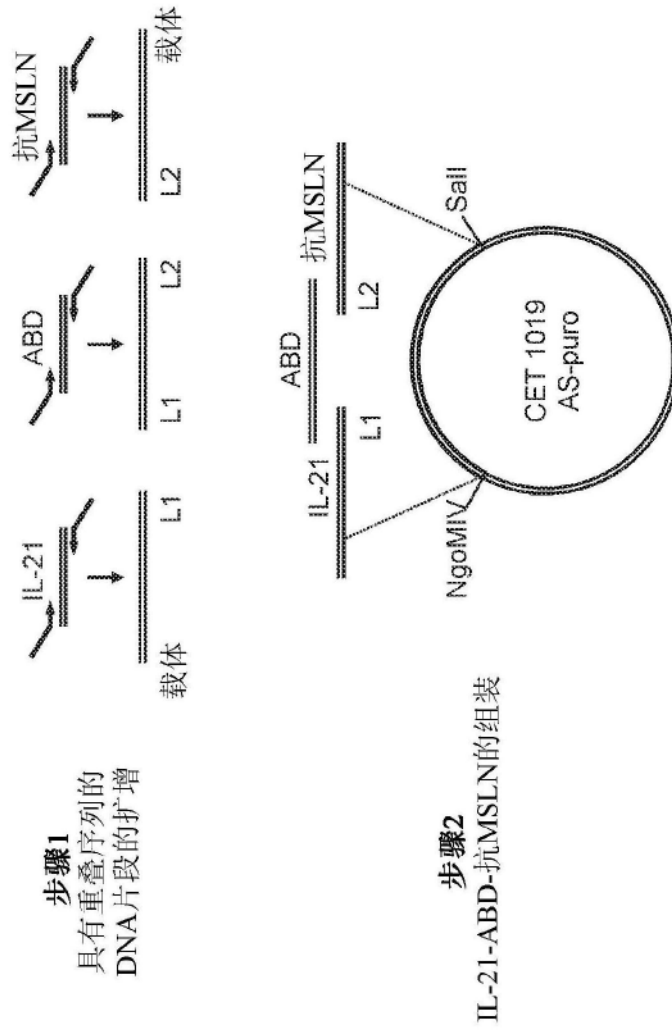


图3

大羊驼VHH抗体

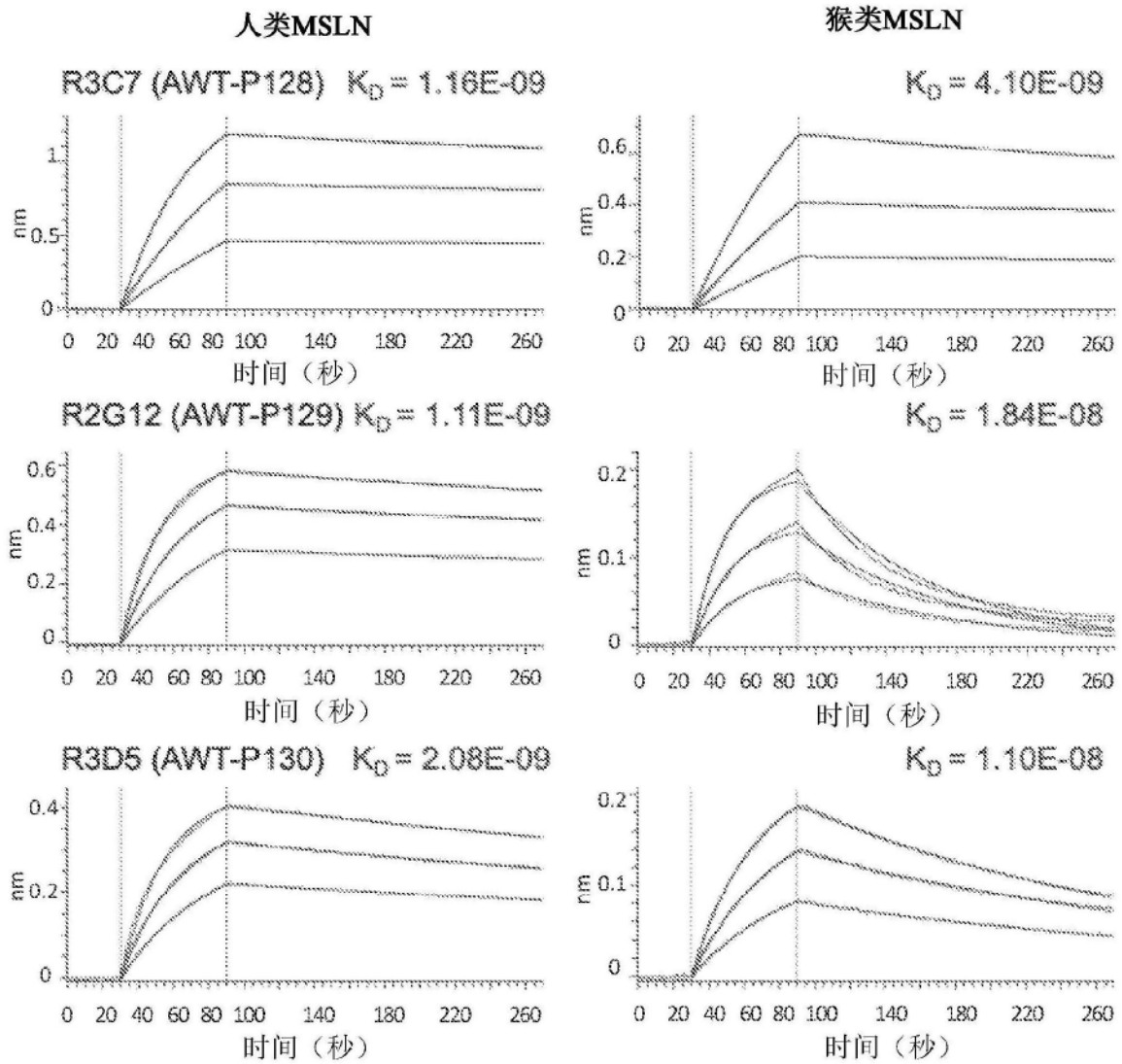


图4A

人类化VHH抗体

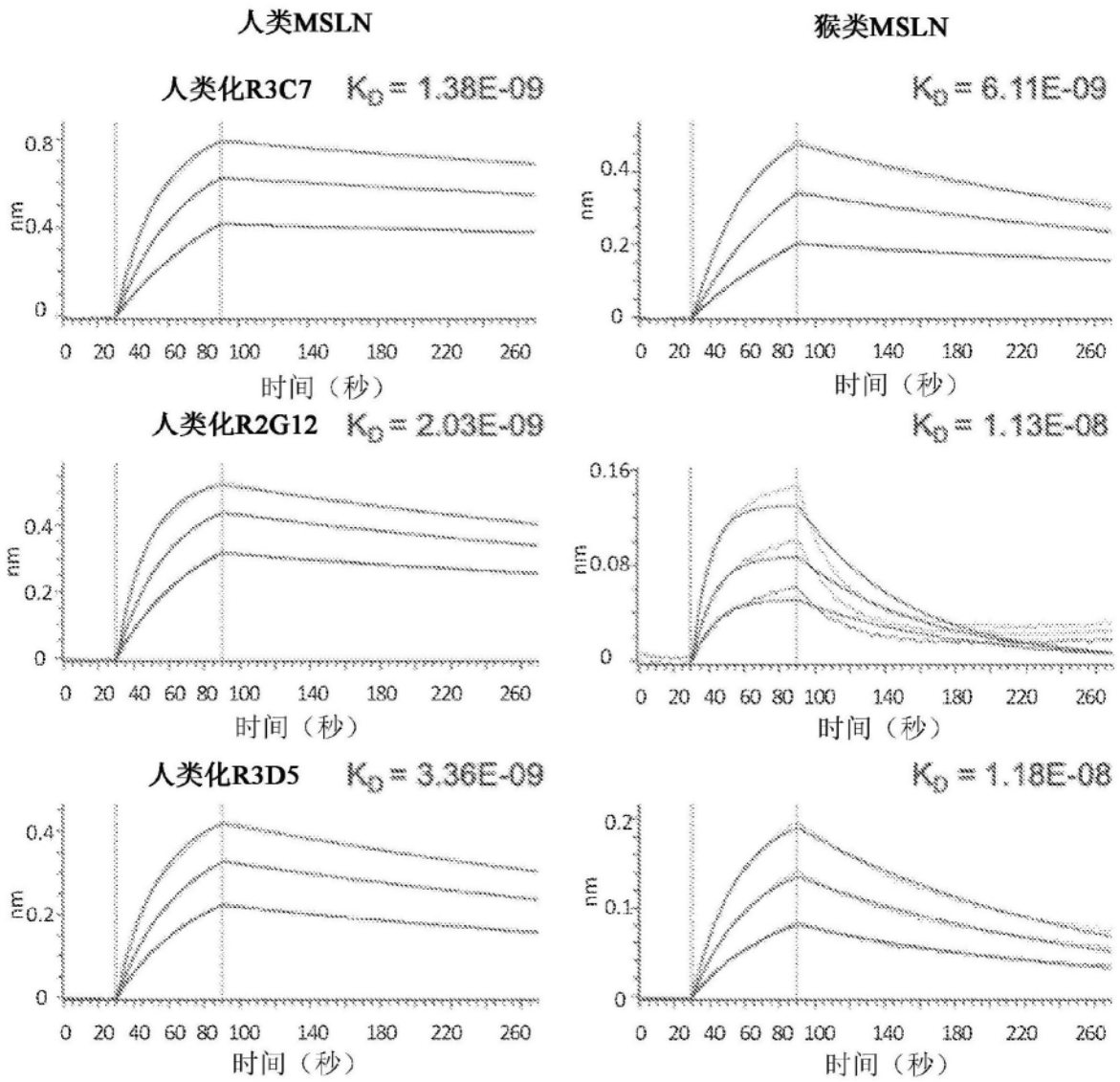


图4B

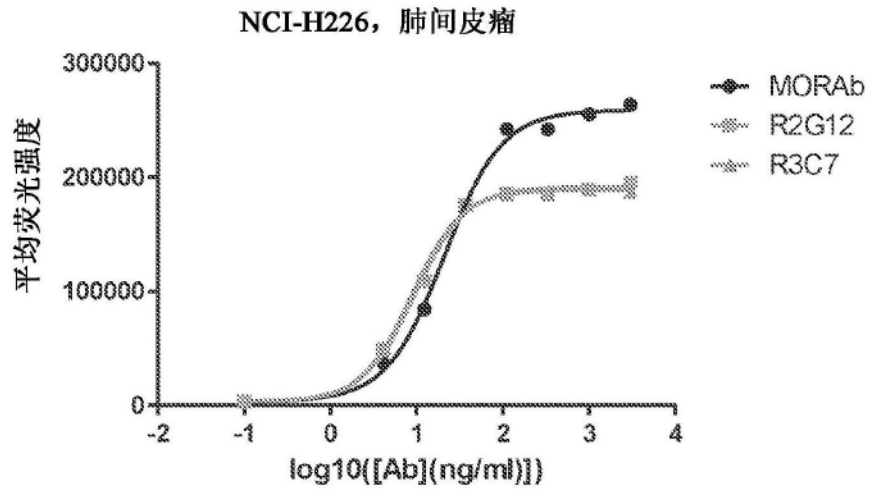


图5A

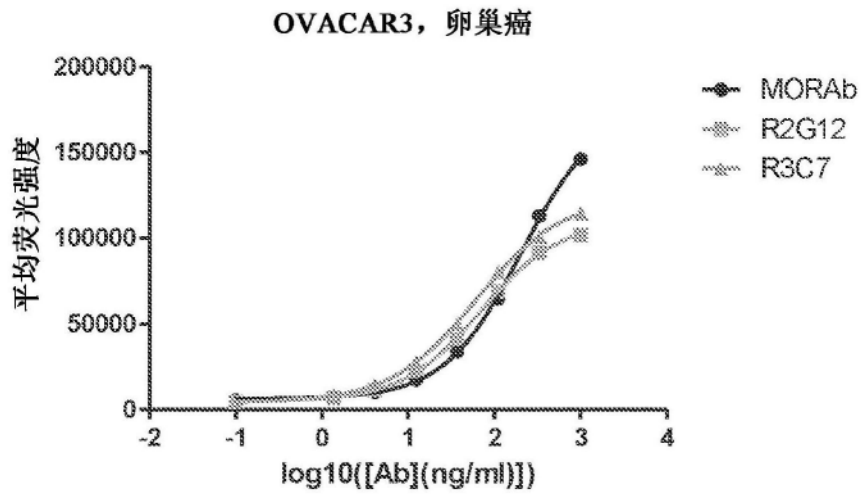


图5B

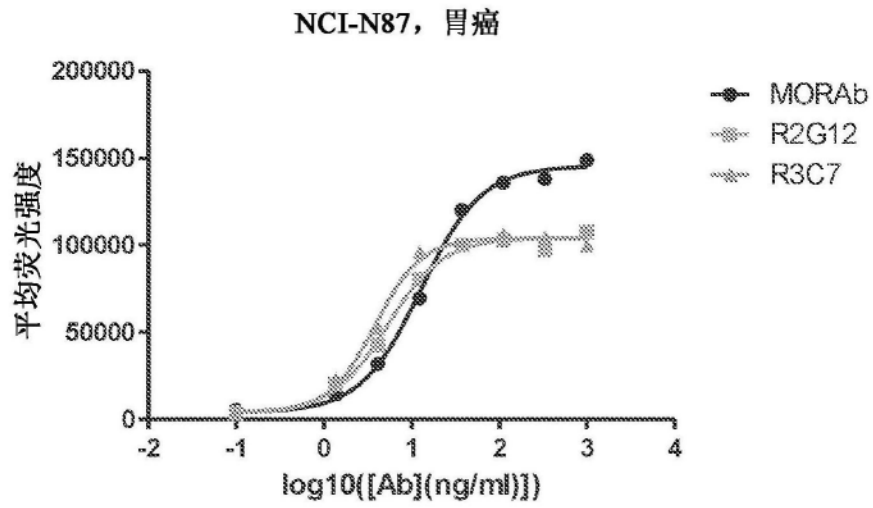


图5C

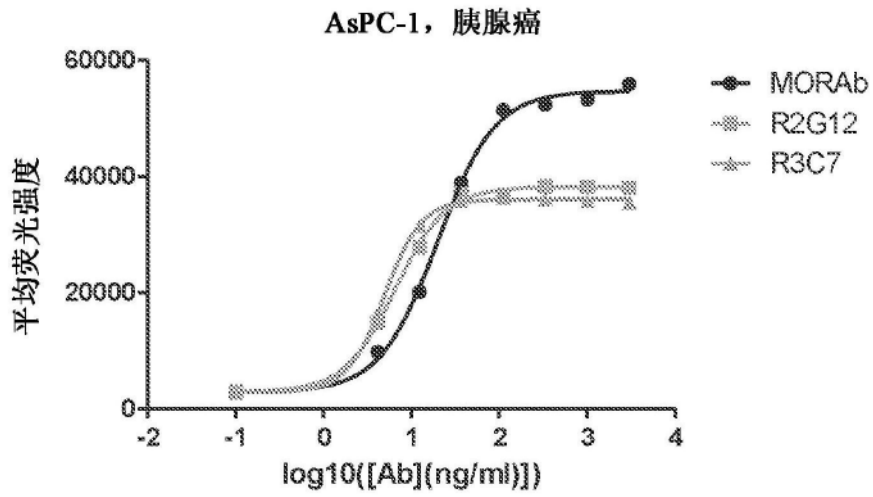


图5D

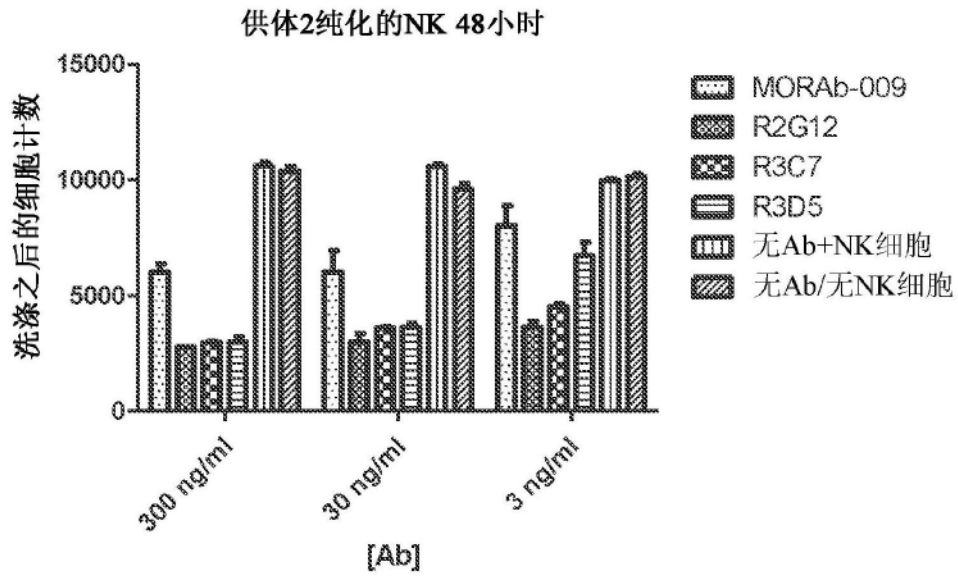


图6A

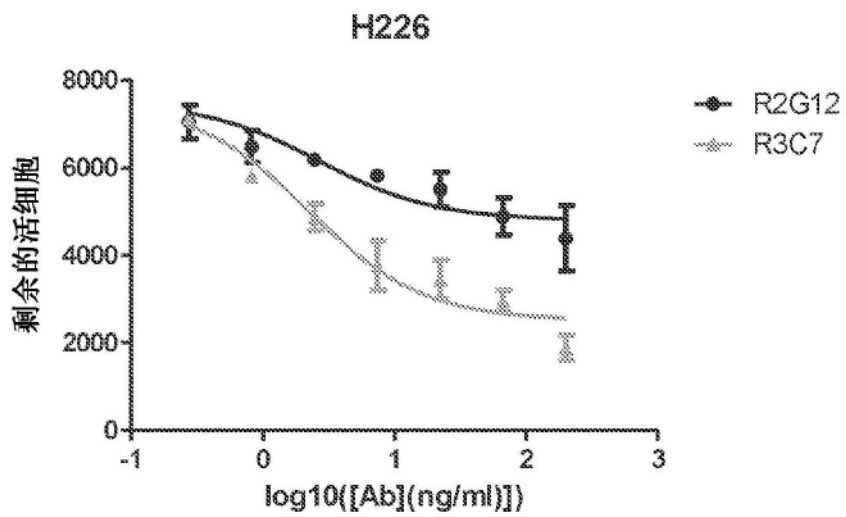


图6B

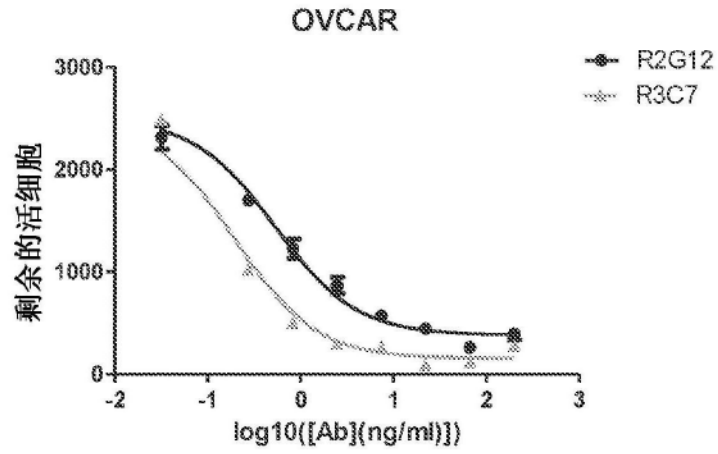


图6C

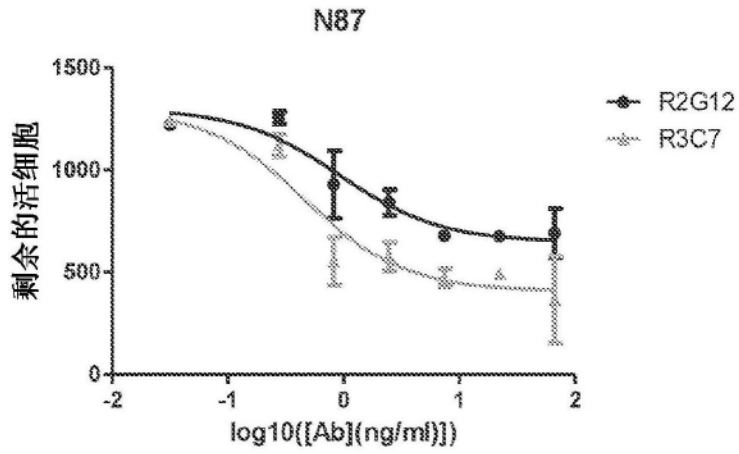


图6D

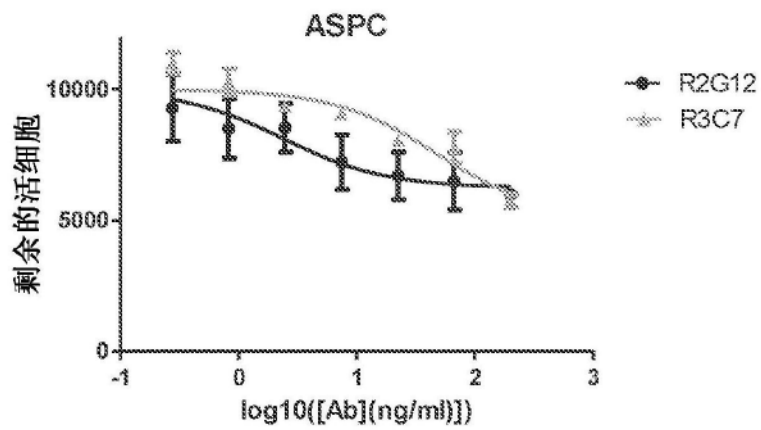


图6E

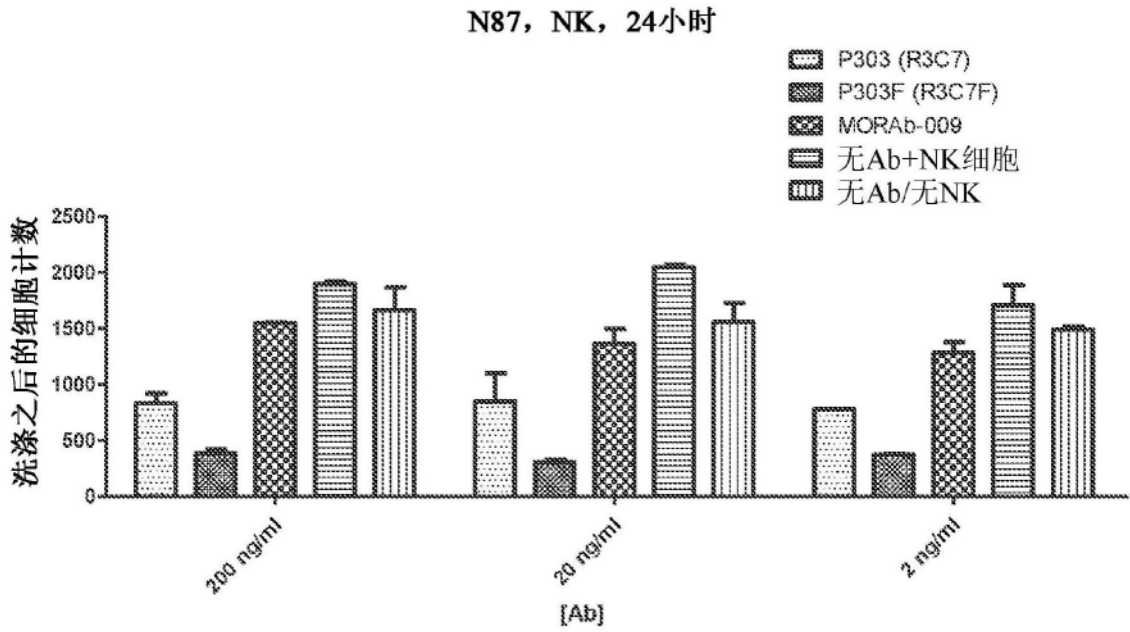


图7

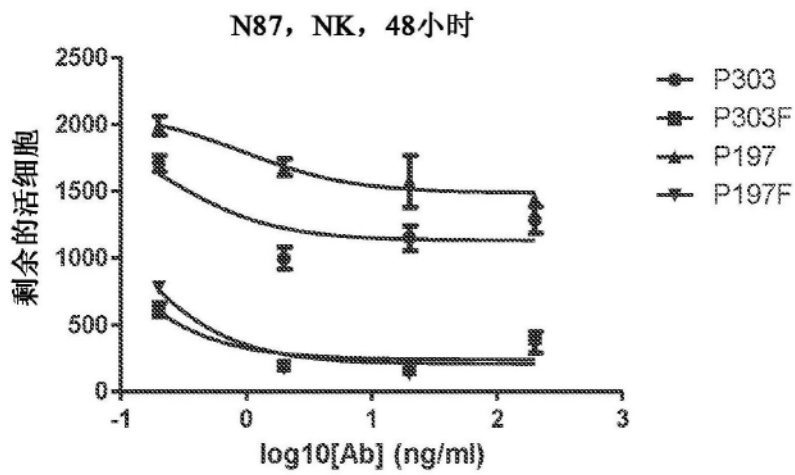


图8A

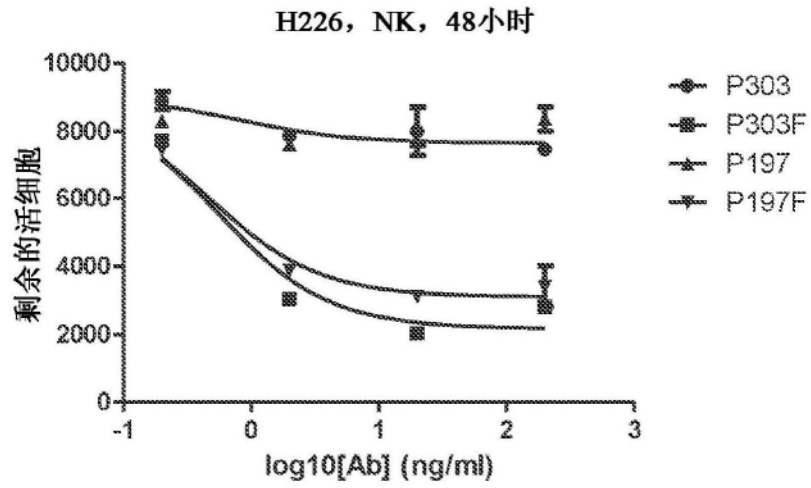


图8B

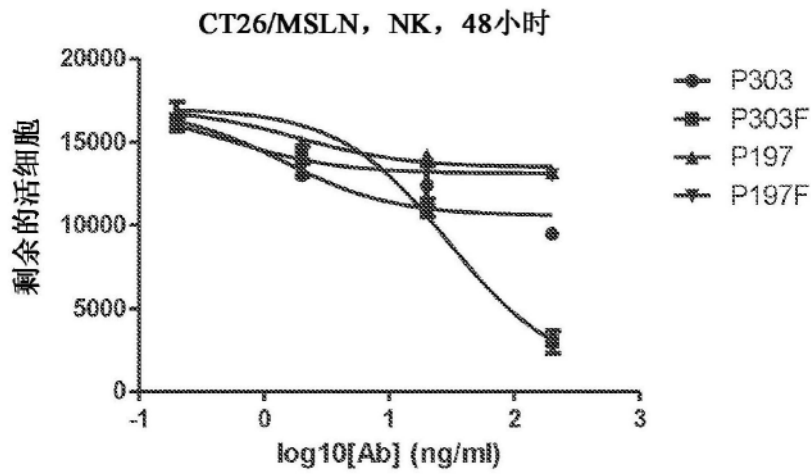


图8C

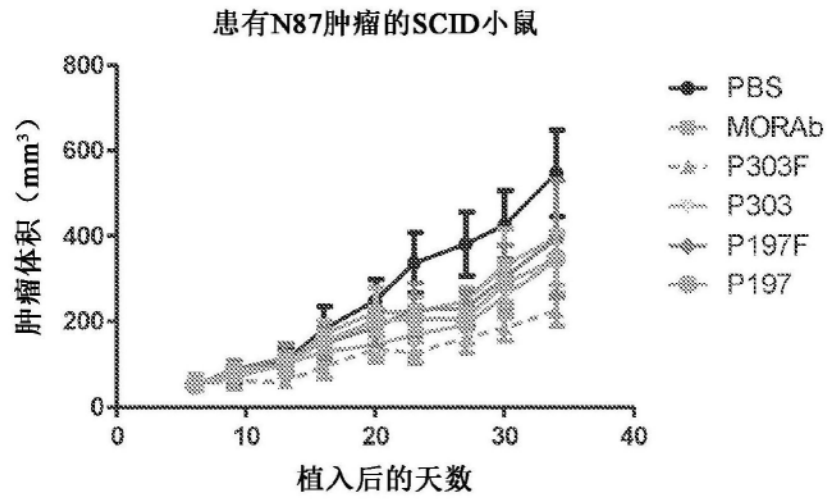


图9A

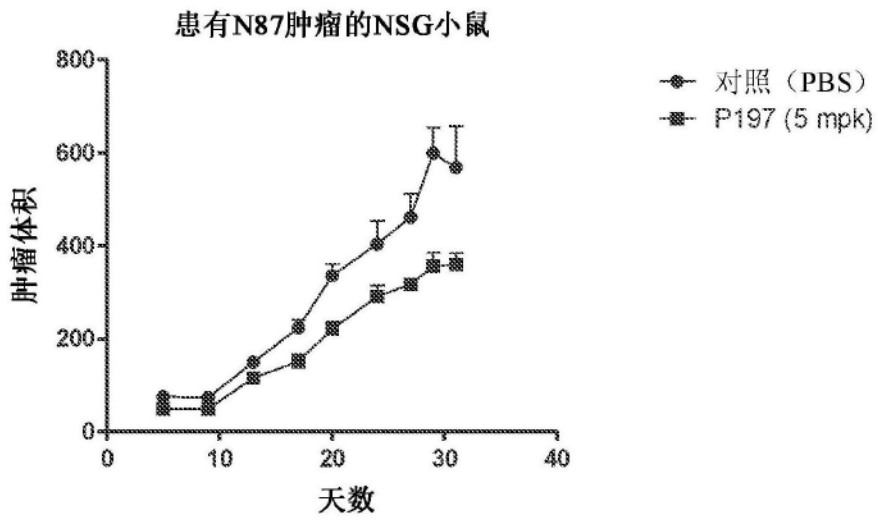


图9B

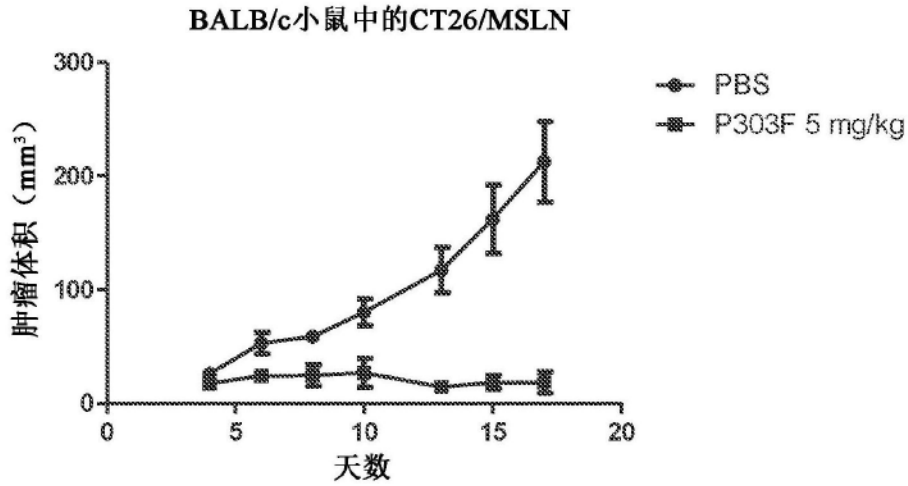


图9C

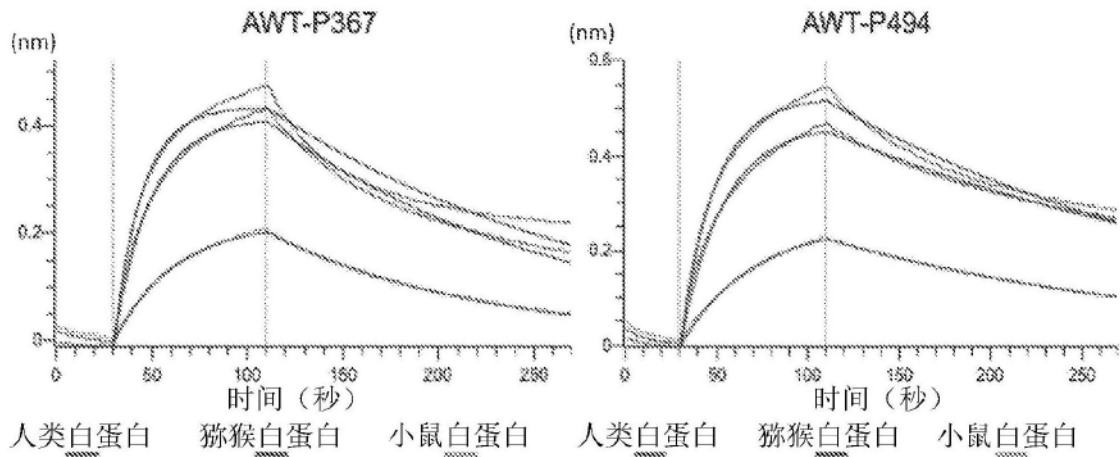


图10A

抗体	抗原	K_D
AWT-P367	人类SA	1.75E-08
	猴类SA	2.79E-08
	小鼠SA	7.69E-08
AWT-P494	人类SA	1.72E-08
	猴类SA	1.74E-08
	小鼠SA	4.72E-08

图10B

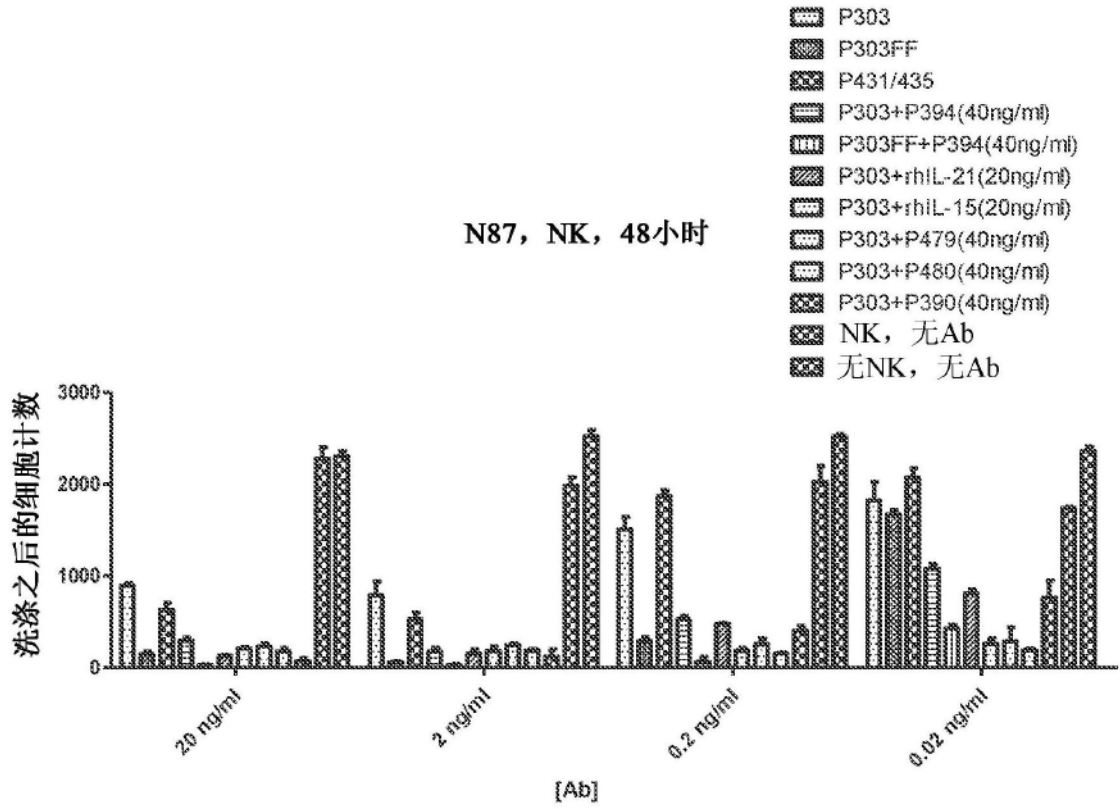


图11

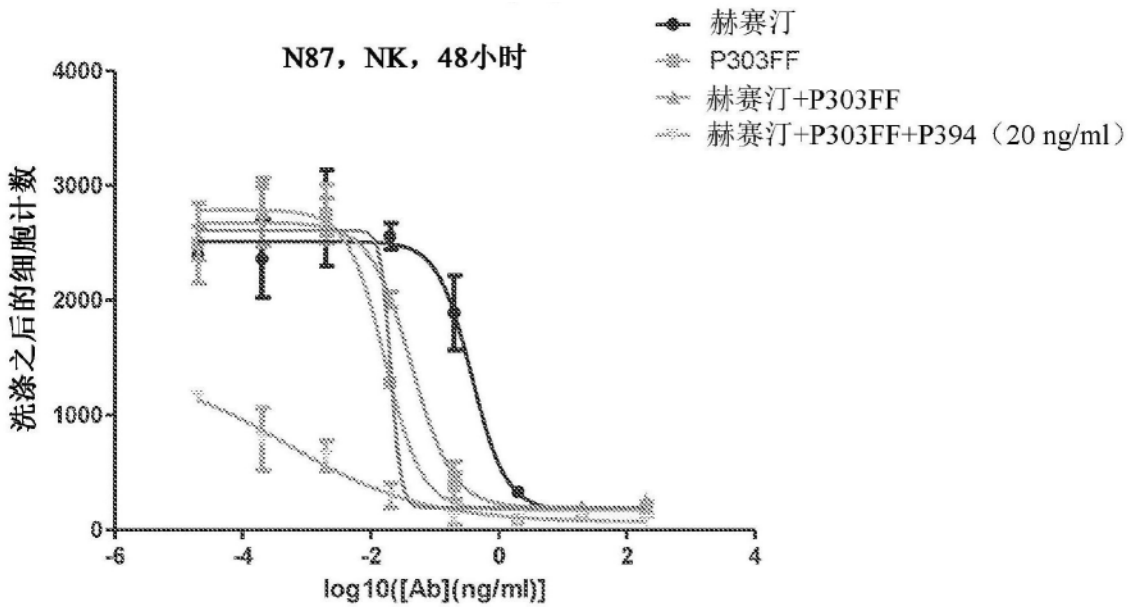


图12

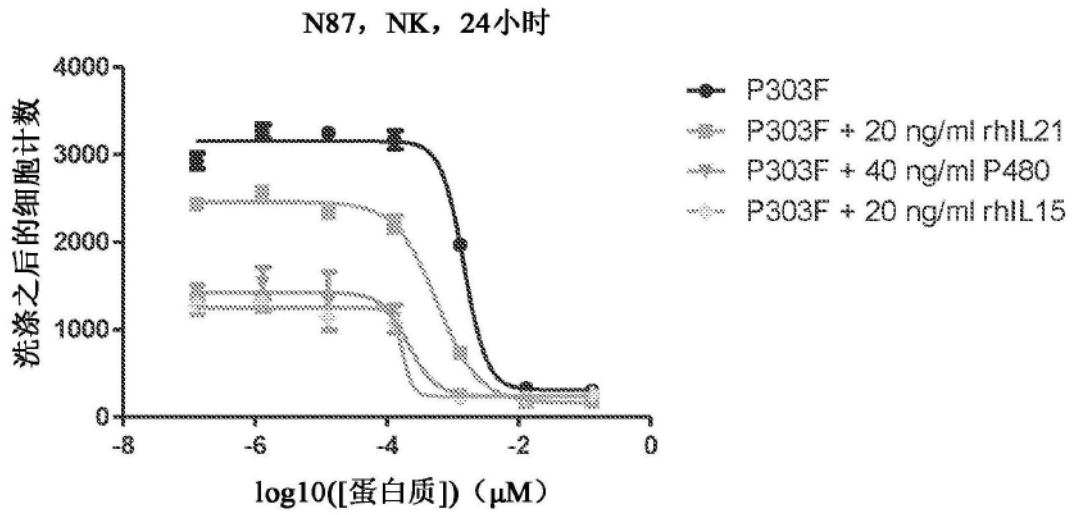


图13

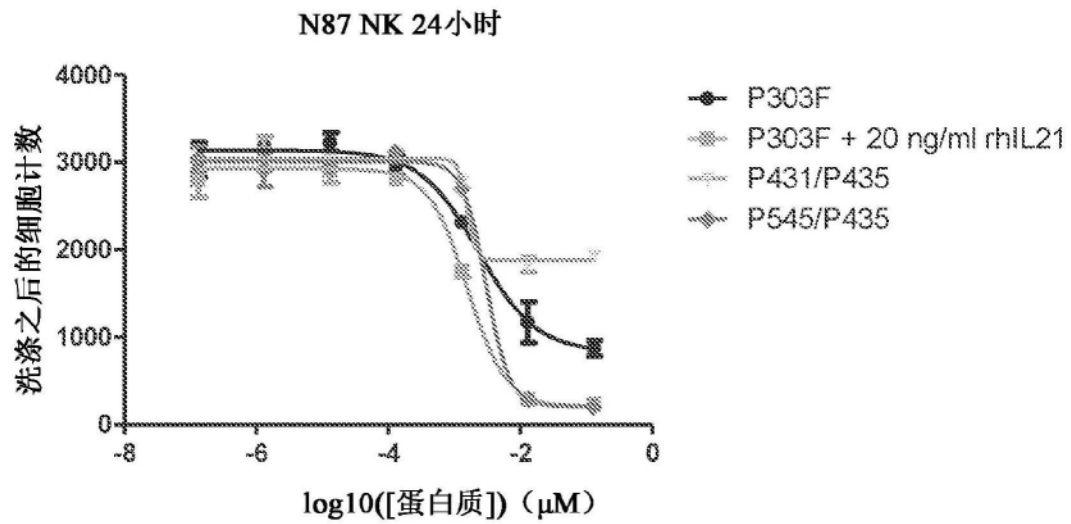


图14

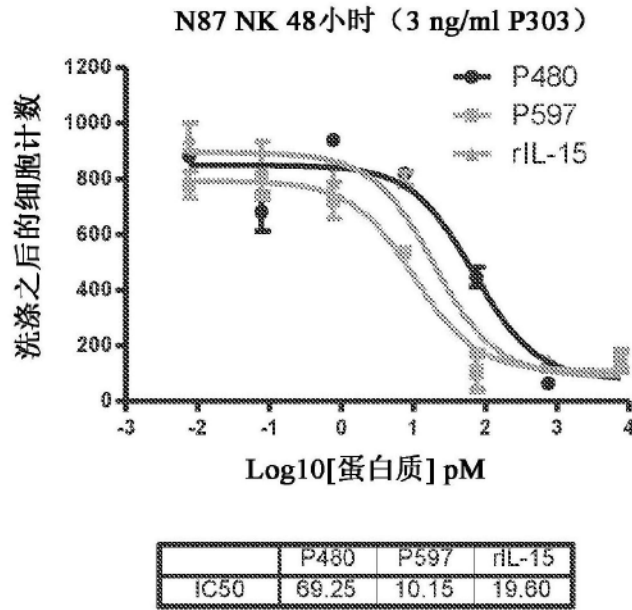


图15

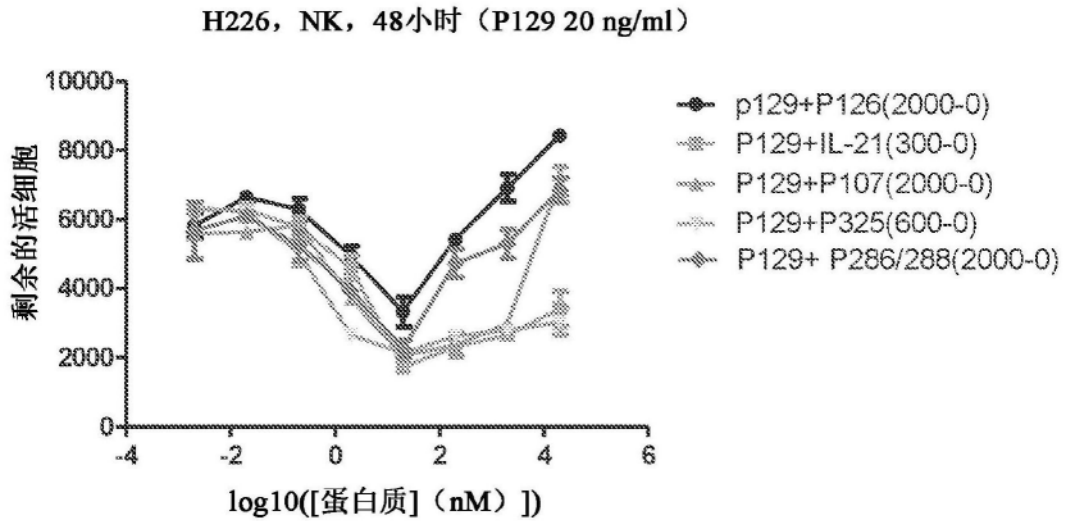


图16

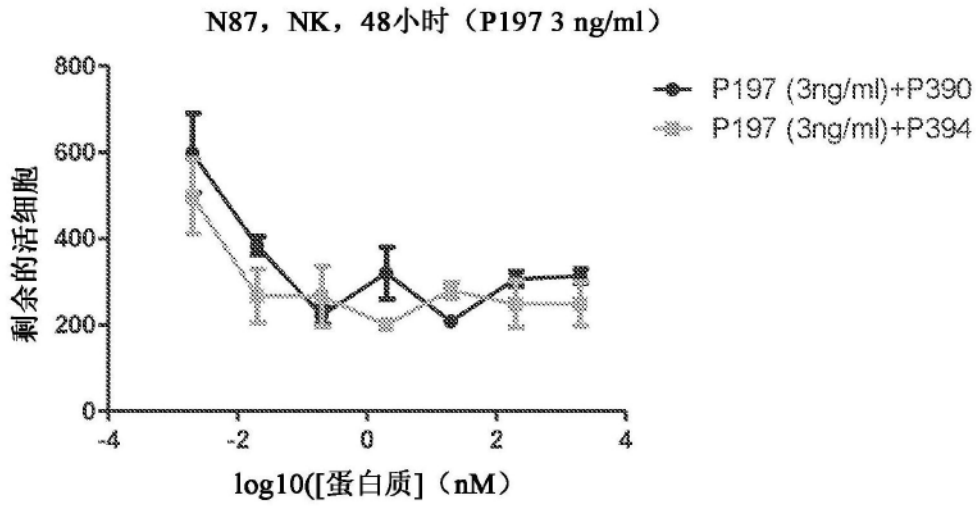


图17

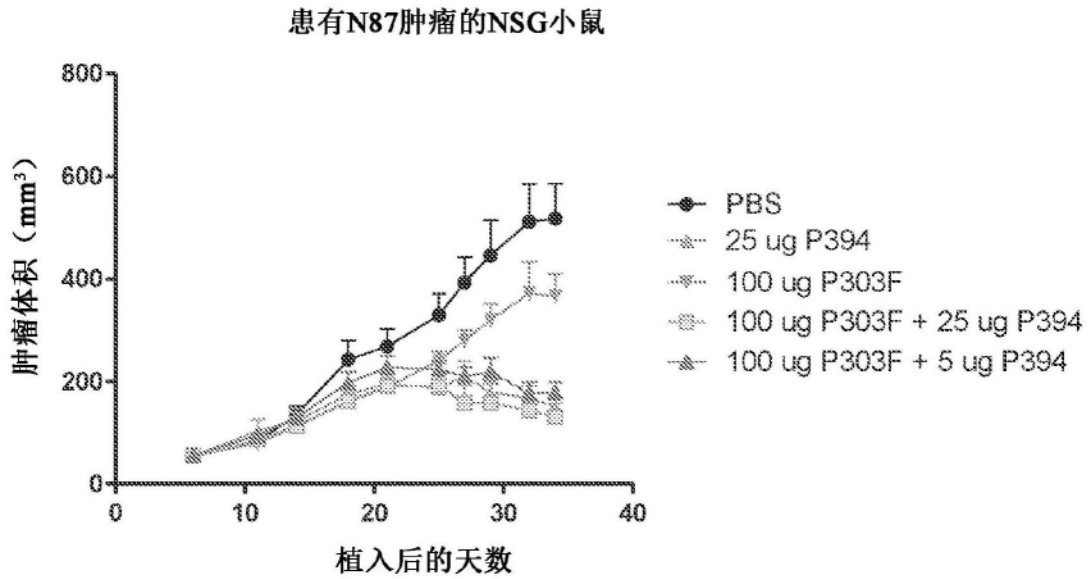


图18

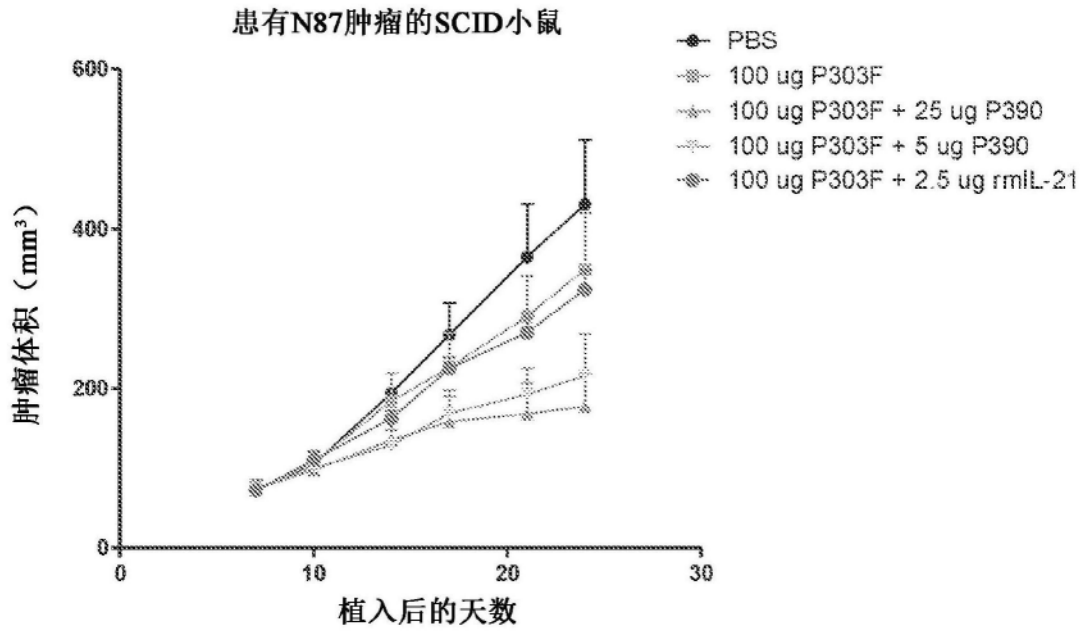


图19