



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114245806 A

(43) 申请公布日 2022.03.25

(21) 申请号 202080051477.6

(22) 申请日 2020.05.14

(30) 优先权数据

62/847,778 2019.05.14 US

PCT/US2019/032224 2019.05.14 US

PCT/US2019/032307 2019.05.14 US

PCT/US2019/032302 2019.05.14 US

PCT/US2019/032306 2019.05.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.01.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/032985 2020.05.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/232303 EN 2020.11.19

(71) 申请人 哈普恩治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 霍尔格·韦舍

理查德·J·奥斯汀

硕岩·杰克·林 布莱恩·莱蒙

凯文·怀特 索尼·罗恰

凯瑟琳·科万特

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 武晶晶

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书11页 说明书111页 附图36页

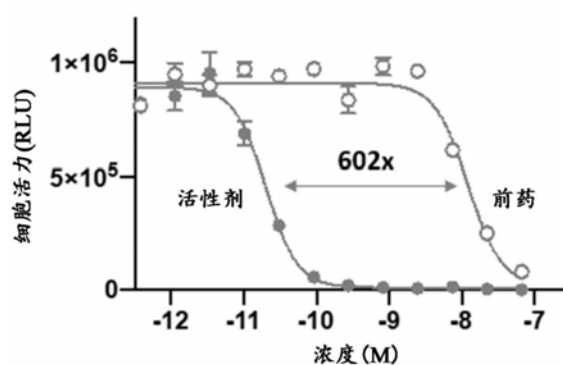
(54) 发明名称

EpCAM结合蛋白及使用方法

(57) 摘要

本文提供了EpCAM结合蛋白,包含这类蛋白或其片段的药物组合物,以及用于制备这类EpCAM结合蛋白的核酸、重组表达载体和宿主细胞。还公开了使用所公开的EpCAM结合蛋白预防和/或治疗疾病、病况和病症的方法。

H90.2



1. 一种包含互补决定区1 (CDR1)、CDR2和CDR3的EpCAM结合域,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列。

2. 根据权利要求1所述的EpCAM结合域,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列。

3. 根据权利要求1或2所述的EpCAM结合域,其包含与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列至少约75%相同的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述EpCAM结合域是多特异性蛋白的一部分。

5. 根据权利要求4所述的EpCAM结合域,其中所述多特异性蛋白进一步包含CD3结合域。

6. 根据权利要求5所述的EpCAM结合域,其中所述多特异性蛋白包含活性药物形式。

7. 根据权利要求4或5所述的EpCAM结合域,其中所述多特异性蛋白进一步包含大体积血清蛋白结合域。

8. 根据权利要求7所述的EpCAM结合域,其中所述大体积血清蛋白包括血清白蛋白。

9. 根据权利要求8所述的EpCAM结合域,其中所述血清白蛋白包括人血清白蛋白。

10. 根据权利要求7-9中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述大体积血清蛋白结合域包含与SEQ ID No.378所示的序列至少75%相同的序列。

11. 根据权利要求4-9中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述CD3结合域包含与SEQ ID No.379所示的序列至少75%相同的序列。

12. 根据权利要求4-9中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述多特异性蛋白包含与SEQ ID No.492所示的序列至少约75%相同的序列。

13. 根据权利要求7-9中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述大体积血清蛋白结合域是包含连接体和掩蔽部分的结合部分,其中所述掩蔽部分能够掩蔽所述EpCAM结合域或CD3结合域与其各自的靶标的结合。

14. 根据权利要求7-9和13中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述多特异性蛋白包含不可切割的前药形式。

15. 根据权利要求13或14所述的EpCAM结合域,其中所述掩蔽部分包含选自SEQ ID No.380-424的序列,或在选自SEQ ID No.380-424的序列中包含一个或多个置换的序列。

16. 根据权利要求13-15中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述连接体包含选自SEQ ID No.425-471、503-507和581的序列,或在选自SEQ ID No.425-471、503-507和581的序列中包含一个或多个置换的序列。

17. 根据权利要求13-16中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述大体积血清蛋白结合域包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少75%相同的序列。

18. 根据权利要求5-9和13-17中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述CD3结合域包含与SEQ ID No.474所示的序列至少75%相同的序列。

19. 根据权利要求7-9和13-18中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述多特异性蛋白包

含与选自SEQ ID No.495、498-502、569-570、572、573、575、576、577和578的序列至少75%相同的序列。

20. 根据权利要求7-9和13-19中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.495和502的序列至少75%相同的序列。

21. 根据权利要求7-9和13-20中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.498-501、569-570、572、573、575、576、577和578的序列至少75%相同的序列。

22. 根据权利要求6所述的EpCAM结合域,其中所述活性药物包含与选自SEQ ID No.153-179、180-206、210-212、494、571和574的序列至少75%相同的序列。

23. 根据权利要求1-3中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述EpCAM结合域是嵌合抗原受体(CAR)或条件可激活的嵌合抗原受体(ProCAR)的一部分,其中所述CAR进一步包含跨膜域、共刺激域和细胞内信号域中的至少一种。

24. 根据权利要求23所述的EpCAM结合域,其中所述EpCAM结合域是所述ProCAR的一部分,并且所述ProCAR进一步包含(a)包含非CDR环和可切割连接体的结合部分;(b)跨膜域;和(c)细胞内信号域;其中所述结合部分能够掩蔽所述EpCAM结合域与其靶标的结合。

25. 根据权利要求24所述的EpCAM结合域,其中所述结合部分进一步包含一个或多个互补决定区(CDR)。

26. 根据权利要求25所述的EpCAM结合域,其中所述CDR环提供对大体积血清蛋白具有特异性的结合位点。

27. 根据权利要求26所述的EpCAM结合域,其中所述大体积血清蛋白包括以下至少一种:血清白蛋白、转铁蛋白、IgG1、IgG2、IgG4、IgG3、IgA单体、因子XIII、纤维蛋白原、五聚体IgM。

28. 根据权利要求27所述的EpCAM结合域,其中所述大体积血清蛋白包括血清白蛋白。

29. 根据权利要求28所述的EpCAM结合域,其中所述血清白蛋白是人血清白蛋白。

30. 根据权利要求23-29中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述ProCAR进一步包含共刺激域,其中所述共刺激域是选自下组的蛋白质的功能信号域:OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)和4-1BB(CD137),及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

31. 根据权利要求30所述的EpCAM结合域,其中所述至少一个但不超过20个修饰包括介导细胞信号传导的氨基酸的修饰,或响应于配体与编码的T细胞受体融合蛋白的结合而磷酸化的氨基酸的修饰。

32. 根据权利要求23-31中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述跨膜域包含选自下组的蛋白质的跨膜域:TCR α 链、TCR β 链、TCR ζ 链、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基、CD45、CD4、CDS、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、其功能片段及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

33. 根据权利要求23-32中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述细胞内信号域来源于CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 α 、CD3 β 或其组合。

34. 根据权利要求23-33中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述EpCAM结合域是所述ProCAR的一部分,并且其中所述ProCAR包含与选自SEQ ID No.485-491的序列至少约75%

相同的序列。

35. 一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据权利要求1-34中任一项所述的EpCAM结合域,或包含其的药物组合物。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述受试者是人。

37. 一种包含单条多肽链的条件活性嵌合抗原受体(ProCAR),其包含

(a) 包含非CDR环和可切割连接体的结合部分;

(b) EpCAM结合域,其中该EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列;

(c) 跨膜域;和

(d) 细胞内信号域;

其中所述结合部分能够掩蔽所述EpCAM结合域与其靶标的结合。

38. 根据权利要求37所述的条件活性嵌合抗原受体,其中所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列至少约75%相同的序列。

39. 一种条件活性EpCAM结合蛋白,其包含结合部分(M),该结合部分包含非CDR环、可切割连接体(L)、第一靶抗原结合域(T1)和第二靶抗原结合域(T2),其中所述第一靶抗原结合域(T1)和第二靶抗原结合域(T2)中的至少一个包含EpCAM结合域,其中该EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列,其中所述非CDR环能够与所述EpCAM结合域或所述第二靶抗原结合域结合,并且其中所述结合部分能够掩蔽所述EpCAM结合域或所述第二靶抗原结合域与其靶标的结合。

40. 根据权利要求39所述的条件活性EpCAM结合蛋白,其中所述结合部分包含掩蔽部分,并且其中所述掩蔽部分包含选自SEQ ID No.380-424的序列,或相对于选自SEQ ID No.380-424的序列包含一个或多个置换的序列。

41. 根据权利要求39或40所述的条件活性EpCAM结合蛋白,其中所述连接体包含选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列,或相对于选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列包含一个或多个氨基酸置换的序列。

42. 根据权利要求39-41中任一项所述的条件活性EpCAM结合蛋白,其中所述结合部分包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少75%相同的序列。

43. 根据权利要求39-42中任一项所述的条件活性EpCAM结合蛋白,其中所述第二靶抗原结合域(T2)包括CD3结合域。

44. 根据权利要求43所述的条件活性EpCAM结合蛋白,其中所述CD3结合域包含与SEQ ID No.474所示的序列至少75%相同的序列。

45. 一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用

根据权利要求37或38所述的条件下活性嵌合抗原受体,或包含其的药物组合物。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述受试者是人。

47. 一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据权利要求39-44中任一项所述的条件下活性EpCAM结合蛋白,或包含其的药物组合物。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述受试者是人。

49. 根据权利要求1-3中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述结合域是人源化抗体或其抗原结合片段。

50. 根据权利要求1-3和49中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述结合域是单结构域抗体、VHH结构域、scFv、VH结构域、VL结构域、Fab、Fab'、非Ig结构域、配体、knottin或小分子实体。

51. 根据权利要求50所述的EpCAM结合域,其中所述结合域包含单结构域抗体。

52. 根据权利要求1-3和49-51中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述结合域以约0.001nM至约500nM的结合亲和力(Kd)结合EpCAM。

53. 根据权利要求1-3和49-52中任一项所述的EpCAM结合域,其中所述结合域与人EpCAM、小鼠EpCAM、食蟹猴EpCAM或其组合结合。

54. 一种包含EpCAM结合域的多特异性蛋白,其中所述EpCAM结合域根据权利要求1-3和49-53中的任一项所述。

55. 根据权利要求54所述的多特异性蛋白,其包含根据权利要求1-3和49-53中任一项所述的EpCAM结合域(抗EpCAM结构域)和CD3结合域(抗CD3结构域)。

56. 根据权利要求55所述的多特异性蛋白,其中所述抗EpCAM结构域和所述抗CD3结构域处于抗EpCAM:抗CD3方向。

57. 根据权利要求55所述的多特异性蛋白,其中所述抗EpCAM结构域和所述抗CD3结构域处于抗CD3:抗EpCAM方向。

58. 根据权利要求54-56中任一项所述的多特异性蛋白,其包含根据权利要求1-3和49-53中任一项所述的EpCAM结合域(抗EpCAM结构域)、CD3结合域(抗CD3结构域)和白蛋白结合域(抗ALB结构域)。

59. 根据权利要求54-58中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述抗CD3结构域包含SEQ ID No.379或SEQ ID No.474所示的氨基酸。

60. 根据权利要求58-59中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述抗ALB结构域包含SEQ ID No.375、SEQ ID No.472、SEQ ID No.473、SEQ ID No.482或SEQ ID No.483所示的氨基酸序列。

61. 根据权利要求58-60中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗CD3:抗ALB:抗EpCAM方向。

62. 根据权利要求58-60中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗EpCAM:抗ALB:抗CD3方向。

63. 根据权利要求58-60中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗ALB:抗EpCAM:抗CD3方向。

64. 根据权利要求58-60中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗CD3:抗EpCAM:抗ALB方向。

65. 根据权利要求58-60中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗ALB:抗CD3:抗EpCAM方向。

66. 根据权利要求58-60中任一项所述的多特异性蛋白,其中所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗EpCAM:抗CD3:抗ALB方向。

67. 一种多价蛋白,其包含SEQ ID No. 495、498-502、569-570、572、573、575、576、577和578中任一所示的序列。

68. 一种活性药物,其包含SEQ ID No. 494、571和574中任一所示的序列。

69. 一种多价蛋白,其包含SEQ ID No. 485-491中任一所述的序列。

70. 一种药物组合物,其包含(i) (a) 根据权利要求1-34和49-53中任一项所述的EpCAM结合域;(i) (b) 根据权利要求37-38中任一项所述的条件下活性嵌合抗原受体;(i) (c) 根据权利要求39-44中任一项所述的条件下活性EpCAM结合蛋白;(i) (d) 根据权利要求54-66中任一项所述的多特异性蛋白;(i) (e) 根据权利要求67或69所述的多价蛋白;或(i) (f) 根据权利要求68所述的活性药物,和(ii) 药学上可接受的载体。

71. 一种产生根据权利要求1-3和49-53中任一项所述的EpCAM结合域的方法,所述方法包括在允许表达EpCAM结合域的条件下培养用包含编码根据权利要求1-3和49-53中任一项所述EpCAM结合域的核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

72. 一种产生根据权利要求54-66中任一项所述的多特异性蛋白的方法,所述方法包括在允许表达多特异性蛋白的条件下培养用包含编码根据权利要求54-66中任一项所述多特异性EpCAM结合蛋白的结构域的一个或多个核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

73. 一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据权利要求1-34和49-53中任一项所述的EpCAM结合域,或根据权利要求70所述的药物组合物。

74. 一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据权利要求54-66中任一项所述的多特异性蛋白、根据权利要求67或69所述的多价蛋白、根据权利要求68所述的活性药物或根据权利要求70所述的药物组合物。

75. 根据权利要求73或74所述的方法,其中所述受试者是人。

76. 根据权利要求75所述的方法,其中所述方法进一步包括与根据权利要求1-34和49-53中任一项所述的EpCAM结合域、根据权利要求54-66中任一项所述的多特异性蛋白、根据权利要求67或69所述的多价蛋白,根据权利要求68所述的活性药物或根据权利要求70所述的药物组合物联合施用药剂。

77. 根据权利要求73-76中任一项所述的方法,其中所述EpCAM结合域选择性地结合表达EpCAM的肿瘤细胞。

78. 根据权利要求73-77中任一项所述的方法,其中所述肿瘤性疾病包括实体瘤疾病。

79. 根据权利要求78所述的方法,其中所述实体瘤疾病是转移性的。

80. 根据权利要求73-79中任一项所述的方法,其中所述肿瘤性疾病包括以下至少一种:结直肠癌、前列腺癌、神经内分泌癌、甲状腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、食管癌、乳腺癌、腺癌。

81. 根据权利要求45-48中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括与根据权利要求37或38所述的条件活性嵌合抗原受体、根据权利要求39-44中任一项所述的条件活性EpCAM结合蛋白或包含其的药物组合物联合施用药剂。

82. 根据权利要求81所述的方法,其中所述EpCAM结合域选择性地结合表达EpCAM的肿瘤细胞。

83. 根据权利要求81或82所述的方法,其中所述肿瘤性疾病包括实体瘤疾病。

84. 根据权利要求83所述的方法,其中所述实体瘤疾病是转移性的。

85. 根据权利要求81-84中任一项所述的方法,其中所述肿瘤性疾病是以下至少一种:结直肠癌、前列腺癌、神经内分泌癌、甲状腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、食管癌、乳腺癌、腺癌。

86. 一种产生根据权利要求37-38中任一项所述的条件活性嵌合抗原受体的方法,所述方法包括在允许表达条件活性嵌合抗原受体的条件下培养用包含编码权利要求37-38中任一项所述条件活性嵌合抗原受体的核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

87. 一种产生根据权利要求39-44中任一项所述的条件活性EpCAM结合蛋白的方法,所述方法包括在允许表达条件活性EpCAM结合蛋白的条件下培养用包含编码根据权利要求39-44中任一项所述条件活性EpCAM结合蛋白的结构域的一个或多个核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

88. 一种产生根据权利要求67或69所述的多价蛋白的方法,所述方法包括在允许表达多价蛋白的条件下培养用包含编码根据权利要求67或69所述多价蛋白的结构域的一个或多个核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

89. 一种产生根据权利要求68所述的活性药物的方法,所述方法包括在允许表达活性药物的条件下培养用包含编码根据权利要求68所述活性药物的结构域的一个或多个核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的药物。

90. 一种细胞,其包含根据权利要求23和30-33中任一项所述的CAR。

91. 一种细胞,其包含根据权利要求23-33和37-38中任一项所述的ProCAR。

92. 根据权利要求90或91所述的细胞,其中所述细胞是T细胞或NK细胞。

93. 一种方法,其包括用包含编码CAR或ProCAR的核苷酸序列的载体或RNA转染根据权利要求90-92中任一项所述的细胞。

94. 根据权利要求37或38所述的条件活性嵌合抗原受体,其中与不包含(a)结合部分但在其他方面与条件活性嵌合抗原受体相同的嵌合抗原受体(CAR)相比,所述条件活性嵌合抗原受体具有更高的治疗指数。

95. 根据权利要求94所述的条件活性嵌合抗原受体,其中与不包含(a)结合部分但在其他方面与条件活性嵌合抗原受体相同的嵌合抗原受体(CAR)相比,所述条件活性嵌合抗原受体的治疗指数为至少约5倍至约100倍。

96. 根据权利要求39-44中任一项所述的条件活性EpCAM结合蛋白,其中所述蛋白质包含与选自SEQ ID No. 498-501、569-570、572、573、575、576、577和578的序列至少约75%相同的序列。

97. 根据权利要求96所述的条件活性EpCAM结合蛋白,其中所述蛋白质包含与SEQ ID

No.576的序列至少约75%相同的序列。

98. 根据权利要求97所述的条件下活性EpCAM结合蛋白,其中所述蛋白质包含SEQ ID No.576所示的序列。

99. 根据权利要求39-44和96-98中任一项所述的条件下活性EpCAM结合蛋白,其中与不包含结合部分(M)或可切割连接体(L)但在其他方面与条件下活性EpCAM结合蛋白相同的EpCAM结合蛋白相比,所述条件下活性EpCAM结合蛋白具有更高的治疗指数。

100. 根据权利要求99所述的条件下活性EpCAM结合蛋白,其中与不包含结合部分(M)或可切割连接体(L)但在其他方面与条件下活性EpCAM结合蛋白相同的EpCAM结合蛋白相比,所述条件下活性EpCAM结合蛋白的治疗指数为至少约5倍至约100倍。

101. 一种药物组合物,其包含:(i) (a) 根据权利要求94或95所述的条件下活性嵌合抗原受体;或(i) (b) 根据权利要求99或100所述的条件下活性EpCAM结合蛋白,和(ii) 药学上可接受的载体。

102. 一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据权利要求94或95所述的条件下活性嵌合抗原受体,或根据权利要求101所述的药物组合物。

103. 一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据权利要求99或100所述的条件下活性EpCAM结合蛋白,或根据权利要求101所述的药物组合物。

104. 根据权利要求102或103所述的方法,其中所述受试者是人。

105. 根据权利要求102-104中任一项所述的方法,其中所述肿瘤性疾病包括以下至少一种:结肠癌、前列腺癌、神经内分泌癌、甲状腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、食管癌、乳腺癌、腺癌。

106. 一种增加EpCAM结合域的治疗指数的方法,所述方法包括将EpCAM结合域与包含可切割连接体和非CDR环的结合部分缀合,

- 其中所述非CDR环包含对所述EpCAM结合域具有特异性的结合位点,
- 其中所述EpCAM结合域被所述结合部分掩蔽而不能结合其靶标,
- 其中所述EpCAM结合域能够在切割所述可切割连接体后结合其靶标。

107. 根据权利要求106所述的方法,其中所述EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列。

108. 根据权利要求106或107所述的方法,其中所述与结合部分缀合的EpCAM结合域是条件下活性多特异性蛋白的一部分,其中所述多特异性蛋白进一步包含CD3结合域。

109. 根据权利要求106-108中任一项所述的方法,其中所述结合部分包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少约75%相同的序列。

110. 根据权利要求108或109所述的方法,其中所述CD3结合域包含与选自SEQ ID No.379和474的序列至少约75%相同的序列。

111. 根据权利要求106-110中任一项所述的方法,其中所述可切割连接体包含选自SEQ

ID No.425-471、503-507和581的序列,或在选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列中包含一个或多个置换的序列。

112.根据权利要求106-111中任一项所述的方法,其中所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列至少75%相同的序列。

113.根据权利要求106-112中任一项所述的方法,其中所述条件活性多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.498-501、569-570、572、573、575、576、577和578的序列至少75%相同的序列。

114.根据权利要求106-113中任一项所述的方法,其中所述条件活性多特异性蛋白包含与SEQ ID NO:576至少75%相同的序列。

115.根据权利要求106-114中任一项所述的方法,其中所述条件活性多特异性蛋白包含SEQ ID NO:576所示的序列。

116.根据权利要求106所述的方法,其中所述与结合部分缀合的EpCAM结合域是条件活性嵌合抗原受体的一部分,其中所述条件活性嵌合抗原受体进一步包含以下至少一种:跨膜域、细胞内信号域和共刺激域。

117.根据权利要求116所述的方法,其中所述EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列。

118.根据权利要求106或117所述的方法,其中所述结合部分包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少约75%相同的序列。

119.根据权利要求116-118中任一项所述的方法,其中所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列至少75%相同的序列。

120.根据权利要求116-119中任一项所述的方法,其中所述条件活性嵌合抗原受体包含与选自SEQ ID No.485-491的序列至少约75%相同的序列。

121.一种提高包含第一靶抗原结合域和第二靶抗原结合域的EpCAM结合蛋白的治疗指数的方法,其中所述第一和第二靶抗原结合域中的至少一个包含EpCAM结合域,所述方法包括将所述第一或第二靶抗原结合域与包含可切割连接体和非CDR环的结合部分缀合,

-其中所述非CDR环包含对所述第一或第二靶抗原结合域具有特异性的结合位点,

-其中所述第一或第二靶抗原结合域中的至少一个被所述结合部分掩蔽而不能结合其靶标,并且

-其中所述被掩蔽的第一或第二靶抗原结合域在切割所述可切割连接体后能够结合其靶标。

122.根据权利要求121所述的方法,其中所述EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列。

123.根据权利要求121或122所述的方法,其中所述非CDR环包含对所述EpCAM结合域具

有特异性的结合位点。

124. 根据权利要求121或122所述的方法,其中所述第一或第二靶抗原结合域中的至少一个包含CD3结合域。

125. 根据权利要求124所述的方法,其中所述非CDR环包含对所述CD3结合域具有特异性的结合位点。

126. 根据权利要求125所述的方法,其中所述CD3结合域包含与SEQ ID No.474至少约75%相同的序列。

127. 根据权利要求121-126中任一项所述的方法,其中所述结合部分包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少约75%相同的序列。

128. 根据权利要求121-127中任一项所述的方法,其中所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列至少75%相同的序列。

129. 根据权利要求121-128中任一项所述的方法,其中所述可切割连接体包含选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列,或在选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列中包含一个或多个置换的序列。

130. 根据权利要求121-129中任一项所述的方法,其中所述条件活性多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.498-501、569-570、572、573、575、576、577和578的序列至少75%相同的序列。

131. 根据权利要求121-130中任一项所述的方法,其中所述条件活性多特异性蛋白包含与SEQ ID NO:576至少75%相同的序列。

132. 根据权利要求121-131中任一项所述的方法,其中所述条件活性多特异性蛋白包含SEQ ID NO:576所示的序列。

133. 一种提高包含EpCAM结合域和CD3结合域的EpCAM结合蛋白的治疗指数的方法,所述方法包括将CD3结合域与包含可切割连接体和非CDR环的结合部分缀合,其中所述非CDR环包含对CD3结合域具有特异性的结合位点。

134. 根据权利要求133所述的方法,其中所述EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列。

135. 根据权利要求133或134所述的方法,其中所述CD3结合域包含与SEQ ID No.474至少约75%相同的序列。

136. 根据权利要求133-135中任一项所述的方法,其中所述结合部分包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少约75%相同的序列。

137. 根据权利要求133-136中任一项所述的方法,其中所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列至少75%相同的序列。

138. 根据权利要求133-137中任一项所述的方法,其中所述可切割连接体包含选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列,或在选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列中包含一个或多个置换的序列。

139. 根据权利要求133-138中任一项所述的方法,其中所述条件活性多特异性蛋白包

含与选自SEQ ID No.498-501、569-570、572、573、575、576、577和578的序列至少75%相同的序列。

140. 根据权利要求133-139中任一项所述的方法,其中所述条件活性多特异性蛋白包含与SEQ ID NO:576至少75%相同的序列。

141. 根据权利要求133-140中任一项所述的方法,其中所述条件活性多特异性蛋白包含SEQ ID NO:576所示的序列。

142. 一种EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白,其包含:EpCAM结合域、CD3结合域、白蛋白结合域,其中所述白蛋白结合域包含非CDR环,该非CDR环包含对所述CD3结合域具有特异性的结合位点和可切割连接体,其中所述EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列。

143. 根据权利要求142所述的EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白,其中所述白蛋白结合域包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少约75%相同的序列。

144. 根据权利要求142或143所述的EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白,其中所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列至少75%相同的序列。

145. 根据权利要求142-144中任一项所述的EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白,其中所述可切割连接体包含选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列,或在选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列中包含一个或多个置换的序列。

146. 根据权利要求142-145中任一项所述的EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白,其中所述条件活性多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.498-501、569-570、572、573、575、576、577和578的序列至少75%相同的序列。

147. 根据权利要求142-146中任一项所述的EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白,其中所述条件活性多特异性蛋白包含与SEQ ID NO:576至少75%相同的序列。

148. 根据权利要求142-147中任一项所述的EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白,其中所述条件活性多特异性蛋白包含SEQ ID NO:576所示的序列。

149. 一种药物组合物,其包含权利要求142-148中任一项的EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白。

150. 根据权利要求149所述的药物组合物,其进一步包含药学上可接受的载体。

151. 一种产生根据权利要求142-148中任一项所述的EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白的方法,所述方法包括在允许表达EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白的条件下培养用包含编码权利要求142-148中任一项之EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白的结构域的一个或多个核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

152. 一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用权利要求142-148中任一项的EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白,或根据权利要求149或150所述的药物组合物。

153. 根据权利要求152所述的方法,其中所述肿瘤性疾病包括实体瘤疾病。

154. 根据权利要求153所述的方法,其中所述实体瘤疾病是转移性的。

155. 根据权利要求152-154中任一项所述的方法,其中所述肿瘤性疾病包括以下至少一种:结直肠癌、前列腺癌、神经内分泌癌、甲状腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、食管癌、乳腺癌、腺癌。

EpCAM结合蛋白及使用方法

交叉引用

[0001] 本申请要求2019年5月14日提交的第62/847,778号美国临时申请、2019年5月14日提交的PCT申请PCT/US2019/032307、2019年5月14日提交的PCT申请PCT/US2019/032224、2019年5月14日提交的PCT申请PCT/US2019/US032302和2019年5月14日提交的PCT申请PCT/US2019/032306的权益,以上各申请均通过引用整体并入本文。

援引并入

[0002] 本说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度犹如具体地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请均通过引用而并入。

背景技术

[0003] 研究表明,上皮细胞粘附/激活分子(EpCAM/CD326)在基本上所有人类腺癌、某些鳞状细胞癌、视网膜母细胞瘤和肝细胞癌上均有表达。参见,例如,Baeuerle PA,Gires O。EpCAM(CD326)在癌症中具有作用。EpCAM是许多实体瘤中癌症增殖细胞以及正常祖细胞和干细胞的特征的一部分。见上。EpCAM与癌症(例如乳腺癌)的增殖、迁移和信号转导有因果关系。参见,例如,Osta WA,Chen Y,Mikhitarian K等人,EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy.Cancer Res 2004;64:5818-24。

[0004] 依决洛单抗(Edrecolomab)是一种抗EpCAM抗体,在III期研究中显示出有限的功效。参见Eyvazi S, Farajnia S, Dastmalchi S, Kanipour F, Zarredar H, Bandehpour M. Antibody Based EpCAM Targeted Therapy of Cancer, Review and Update. Curr Cancer Drug Targets. 2018;18(9):857-868。在各种临床研究中使用的其他抗EpCAM抗体包括阿德木单抗(Adecatumumab)(一种完全人单克隆抗体)、卡妥索单抗(Catumaxomab)(一种嵌合抗体)、莫奥珠单抗(Oportuzumab Monatox)(一种与假单胞菌外毒素A(ETA)缀合的scFv抗体)、泊西他珠单抗(Citatumumab Bogatox)(具有bougandin毒素的Fab片段)、免疫缀合物抗体Tucotuzumab(具有IL2的单克隆抗体)。见上。

[0005] 需要有更多允许医生为个体患者选择具有最佳副作用谱的治疗剂的治疗选择。本公开提供了在治疗方法,特别是治疗与EpCAM异常表达相关的病况的方法中有用的新型多肽和蛋白质治疗剂。

发明内容

[0006] 一个实施方案提供了一种包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3的EpCAM结合域,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114

的序列；并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列。在一些实施方案中，所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列至少约75%相同的氨基酸序列。

[0007] 在一些实施方案中，所述EpCAM结合域是多特异性蛋白的一部分。在一些实施方案中，所述多特异性蛋白进一步包含CD3结合域。在一些实施方案中，所述多特异性蛋白包含活性药物形式。在一些实施方案中，所述多特异性蛋白进一步包含大体积(bulk)血清蛋白结合域。在一些实施方案中，所述大体积血清蛋白包括血清白蛋白。在一些实施方案中，所述血清白蛋白包括人血清白蛋白。在一些实施方案中，所述大体积血清蛋白结合域包含与SEQ ID No.378所示的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中，所述CD3结合域包含与SEQ ID No.379所示的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中，所述多特异性蛋白包含与SEQ ID No.492所示的序列至少约75%相同的序列。在一些实施方案中，所述大体积血清蛋白结合域是包含连接体和掩蔽部分的结合部分，其中所述掩蔽部分能够掩蔽所述EpCAM结合域或CD3结合域与其各自的靶标的结合。在一些实施方案中，所述多特异性蛋白包含不可切割的前药形式。在一些实施方案中，所述掩蔽部分包含选自SEQ ID No.380-424的序列，或在选自SEQ ID No.380-424的序列中包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中，所述连接体包含选自SEQ ID No.425-471、503-507和581的序列，或在选自SEQ ID No.425-471、503-507和581的序列中包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中，所述大体积血清蛋白结合域包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中，所述CD3结合域包含与SEQ ID No.474所示的序列至少75%相同的序列。

[0008] 在一些实施方案中，所述多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.495、498-502、569-570、572、573、575、576、577和578的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中，所述多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.495和502的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中，所述多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.498-501、569-570、572、573、575、576、577和578的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中，所述活性药物包含与选自SEQ ID No.153-179、180-206、210-212、494、571和574的序列至少75%相同的序列。

[0009] 在一些实施方案中，所述EpCAM结合域是嵌合抗原受体(CAR)或条件可激活的嵌合抗原受体(ProCAR)的一部分，其中所述CAR进一步包含跨膜域、共刺激域和细胞内信号域中的至少一种。在一些实施方案中，所述EpCAM结合域是所述ProCAR的一部分，并且所述ProCAR进一步包含(a)包含非CDR环和可切割连接体的结合部分；(b)跨膜域；和(c)细胞内信号域；其中所述结合部分能够掩蔽所述EpCAM结合域与其靶标的结合。在一些实施方案中，所述结合部分进一步包含一个或多个互补决定区(CDR)。在一些实施方案中，所述CDR环提供对大体积血清蛋白具有特异性的结合位点。在一些实施方案中，所述大体积血清蛋白包括以下至少一种：血清白蛋白、转铁蛋白、IgG1、IgG2、IgG4、IgG3、IgA单体、因子XIII、纤维蛋白原、五聚体IgM。在一些实施方案中，所述大体积血清蛋白包括血清白蛋白。在一些实施方案中，所述血清白蛋白是人血清白蛋白。在一些实施方案中，所述ProCAR进一步包含共刺激域，其中所述共刺激域是选自下组的蛋白质的功能信号域：OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)和4-1BB(CD137)，及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述至少一个但不超过20个修饰包括介导细胞

信号传导的氨基酸的修饰,或响应于配体与编码的T细胞受体融合蛋白的结合而磷酸化的氨基酸的修饰。在一些实施方案中,所述跨膜域包含选自下组的蛋白质的跨膜域:TCR α 链、TCR β 链、TCR ζ 链、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基、CD45、CD4、CDS、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、其功能片段及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述细胞内信号域来源于CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 α 、CD3 β 或其组合。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域是所述ProCAR的一部分,并且其中所述ProCAR包含与选自SEQ ID No. 485-491的序列至少约75%相同的序列。

[0010] 一个实施方案提供了一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本公开的EpCAM结合域,或包含其的药物组合物。在一些实施方案中,所述受试者是人。

[0011] 一个实施方案提供了一种包含单条多肽链的条件活性嵌合抗原受体(ProCAR),其包含(a)包含非CDR环和可切割连接体的结合部分;(b) EpCAM结合域,其中该EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No. 39-76的序列,或在选自SEQ ID No. 39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No. 77-114的序列或在选自SEQ ID No. 77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No. 115-152的序列或在选自SEQ ID No. 115-152的序列中包含一个或多个置换的序列;(c)跨膜域;和(d)细胞内信号域;其中所述结合部分能够掩蔽所述EpCAM结合域与其靶标的结合。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No. 1-38、207-209和496-497的序列至少约75%相同的序列。

[0012] 一个实施方案提供了一种条件活性EpCAM结合蛋白,其包含结合部分(M),该结合部分包含非CDR环、可切割连接体(L)、第一靶抗原结合域(T1)和第二靶抗原结合域(T2),其中所述第一靶抗原结合域(T1)和第二靶抗原结合域(T2)中的至少一个包含EpCAM结合域,其中该EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No. 39-76的序列,或在选自SEQ ID No. 39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No. 77-114的序列或在选自SEQ ID No. 77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No. 115-152的序列或在选自SEQ ID No. 115-152的序列中包含一个或多个置换的序列,其中所述非CDR环能够与所述EpCAM结合域或所述第二靶抗原结合域结合,并且其中所述结合部分能够掩蔽所述EpCAM结合域或所述第二靶抗原结合域与其靶标的结合。在一些实施方案中,所述结合部分包含掩蔽部分,并且其中所述掩蔽部分包含选自SEQ ID No. 380-424的序列,或相对于选自SEQ ID No. 380-424的序列包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,所述连接体包含选自SEQ ID No. 425-471、503-506和581的序列,或相对于选自SEQ ID No. 425-471、503-506和581的序列包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,所述结合部分包含与选自SEQ ID No. 472-473和482-483的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述第二靶抗原结合域(T2)包括CD3结合域。在一些实施方案中,所述CD3结合域包含与SEQ ID No. 474所示的序列至少75%相同的序列。

[0013] 一个实施方案提供了一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本公开的条件活性嵌合抗原受体,或包含其的药物组合物。在一些实施方案中,所述受试者是人。一个实施方案提供了一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤

性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本公开的条件活性EpCAM结合蛋白,或包含其的药物组合物。在一些实施方案中,所述受试者是人。

[0014] 在一些实施方案中,所述结合域是人源化抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述结合域是单结构域抗体、VHH结构域、scFv、VH结构域、VL结构域、Fab、Fab'、非Ig结构域、配体、knottin或小分子实体。在一些实施方案中,所述结合域包含单结构域抗体。在一些实施方案中,所述结合域以约0.001nM至约500nM的结合亲和力(Kd)结合EpCAM。在一些实施方案中,所述结合域与人EpCAM、小鼠EpCAM、食蟹猴EpCAM或其组合结合。

一一个实施方案提供了一种包含EpCAM结合域的多特异性蛋白,其中所述EpCAM结合域根据本公开所述。在一些实施方案中,所述多特异性蛋白包含根据本公开的EpCAM结合域(抗EpCAM结构域)和CD3结合域(抗CD3结构域)。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域和所述抗CD3结构域处于抗EpCAM:抗CD3方向。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域和所述抗CD3结构域处于抗CD3:抗EpCAM方向。在一些实施方案中,根据权利要求1-3和49-53中任一项所述的EpCAM结合域(抗EpCAM结构域)、CD3结合域(抗CD3结构域)和白蛋白结合域(抗ALB结构域)。在一些实施方案中,所述抗CD3结构域包含SEQ ID No.379或SEQ ID No.474所示的氨基酸。在一些实施方案中,所述抗ALB结构域包含SEQ ID No.375、SEQ ID No.472、SEQ ID No.473、SEQ ID No.482或SEQ ID No.483所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗CD3:抗ALB:抗EpCAM方向。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗EpCAM:抗ALB:抗CD3方向。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗ALB:抗EpCAM:抗CD3方向。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗CD3:抗EpCAM:抗ALB方向。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗ALB:抗CD3:抗EpCAM方向。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗EpCAM:抗CD3:抗ALB方向。

[0015] 一个实施方案提供了一种多价蛋白,其包含SEQ ID No.495、498-502、569-570、572、573、575、576、577和578中任一个所示的序列。一个实施方案提供了一种活性药物,其包含SEQ ID No.494、571和574中任一个所示的序列。一个实施方案提供了一种多价蛋白,其包含SEQ ID No.485-491中任一个所述的序列。

[0016] 一个实施方案提供了一种药物组合物,其包含(i) (a) 根据本公开的EpCAM结合域;(i) (b) 根据本公开的条件活性嵌合抗原受体;(i) (c) 根据本公开的条件活性EpCAM结合蛋白;(i) (d) 根据本公开的多特异性蛋白;(i) (e) 根据本公开的多价蛋白;或(i) (f) 根据本公开的活性药物,和(ii) 药学上可接受的载体。

[0017] 一个实施方案提供了一种产生根据本公开的EpCAM结合域的方法,所述方法包括在允许表达EpCAM结合域的条件下培养用包含编码根据本公开EpCAM结合域的核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

[0018] 一个实施方案提供了一种产生根据本公开的多特异性蛋白的方法,所述方法包括在允许表达多特异性蛋白的条件下培养用包含编码根据本公开多特异性EpCAM结合蛋白的结构域的一个或多个核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

[0019] 一个实施方案提供了一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本公开的EpCAM结合域,或包含其的药物组合物。一个实施方案提供了一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本公开的多特异性蛋白、根据本公开的多价蛋白、根据本公开的活性药物或根据本公开的药物组合物。在一些实施方案中,所述受试者是人。在一些实施方案中,所述方法进一步包括与根据本公开的EpCAM结合域、根据本公开的多特异性蛋白、根据本公开的多价蛋白、根据本公开的活性药物或根据本公开的药物组合物联合施用药剂。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域选择性地结合表达EpCAM的肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述肿瘤性疾病包括实体瘤疾病。在一些实施方案中,所述实体瘤疾病是转移性的。在一些实施方案中,所述肿瘤性疾病包括以下至少一种:结直肠癌、前列腺癌、神经内分泌癌、甲状腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、食管癌、乳腺癌、腺癌。在一些实施方案中,所述方法进一步包括与根据本公开的条件活性嵌合抗原受体、根据本公开的条件活性EpCAM结合蛋白或包含其的药物组合物联合施用药剂。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域选择性地结合表达EpCAM的肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述肿瘤性疾病包括实体瘤疾病。在一些实施方案中,所述实体瘤疾病是转移性的。在一些实施方案中,所述肿瘤性疾病是以下至少一种:结直肠癌、前列腺癌、神经内分泌癌、甲状腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、食管癌、乳腺癌、腺癌。

[0020] 一个实施方案提供了一种产生根据本公开的条件活性嵌合抗原受体的方法,所述方法包括在允许表达条件活性嵌合抗原受体的条件下培养用包含编码本公开条件活性嵌合抗原受体的核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。一个实施方案提供了一种产生根据本公开的条件活性EpCAM结合蛋白的方法,所述方法包括在允许表达条件活性EpCAM结合蛋白的条件下培养用包含编码本公开条件活性EpCAM结合蛋白的结构域的一个或多个核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。一个实施方案提供了一种产生根据本公开的多价蛋白的方法,所述方法包括在允许表达多价蛋白的条件下培养用包含编码本公开多价蛋白的结构域的一个或多个核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。一个实施方案提供了一种产生根据本公开的活性药物的方法,所述方法包括在允许表达活性药物的条件下培养用包含编码本公开活性药物的结构域的一个或多个核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的药物。

[0021] 一个实施方案提供了一种包含根据本公开的CAR的细胞。

一个实施方案提供了一种包含根据本公开的ProCAR的细胞。在一些实施方案中,所述细胞是T细胞或NK细胞。一个实施方案提供了一种方法,其包括用包含编码CAR或ProCAR的核苷酸序列的载体或RNA转染根据本公开的细胞。

[0022] 一个实施方案提供了一种条件活性嵌合抗原受体,与不包含(a)结合部分但在其他方面与条件活性嵌合抗原受体相同的嵌合抗原受体(CAR)相比,其具有更高的治疗指数。在一些实施方案中,与不包含(a)结合部分但在其他方面与条件活性嵌合抗原受体相同的嵌合抗原受体(CAR)相比,所述条件活性嵌合抗原受体的治疗指数为至少约5倍至约100倍。在一些实施方案中,所述蛋白质包含与选自SEQ ID No. 498-501、569-570、572、573、575、

576、577和578的序列至少约75%相同的序列。在一些实施方案中,所述蛋白质包含与SEQ ID No.576的序列至少约75%相同的序列。在一些实施方案中,所述蛋白质包含如SEQ ID NO:576所示的序列。在一些实施方案中,与不包含结合部分(M)或可切割连接体(L)但在其他方面与条件活性EpCAM结合蛋白相同的EpCAM结合蛋白相比,所述条件活性EpCAM结合蛋白具有更高的治疗指数。在一些实施方案中,与不包含结合部分(M)或可切割连接体(L)但在其他方面与条件活性EpCAM结合蛋白相同的EpCAM结合蛋白相比,所述条件活性EpCAM结合蛋白的治疗指数为至少约5倍至约100倍。

[0023] 一个实施方案提供了一种药物组合物,其包含:(i) (a) 根据本公开的条件活性嵌合抗原受体;或(i) (b) 根据本公开的条件活性EpCAM结合蛋白,和(ii) 药学上可接受的载体。

一个实施方案提供了一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本公开的条件活性嵌合抗原受体,或包含其的药物组合物。

[0024] 一个实施方案提供了一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本公开的条件活性EpCAM结合蛋白,或包含其的药物组合物。在一些实施方案中,所述受试者是人。在一些实施方案中,所述肿瘤性疾病包括以下至少一种:结直肠癌、前列腺癌、神经内分泌癌、甲状腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、食管癌、乳腺癌、腺癌。

[0025] 一个实施方案提供了一种增加EpCAM结合域的治疗指数的方法,所述方法包括将EpCAM结合域与包含可切割连接体和非CDR环的结合部分缀合,

- 其中所述非CDR环包含对所述EpCAM结合域具有特异性的结合位点,
- 其中所述EpCAM结合域被所述结合部分掩蔽而不能结合其靶标,
- 其中所述EpCAM结合域能够在切割所述可切割连接体后结合其靶标。

[0026] 在一些实施方案中,所述EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,所述与结合部分缀合的EpCAM结合域是条件活性多特异性蛋白的一部分,其中所述多特异性蛋白进一步包含CD3结合域。在一些实施方案中,所述结合部分包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少约75%相同的序列。在一些实施方案中,所述CD3结合域包含与选自SEQ ID No.379和474的序列至少约75%相同的序列。在一些实施方案中,所述可切割连接体包含选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列,或在选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列中包含一个或多个置换的序列。

[0027] 在一些实施方案中,所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述条件活性多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.498-501、569-570、572、573、575、576、577和578的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述条件活性多特异性蛋白包含与SEQ ID No.576至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述条件活性多特异性蛋白包含如SEQ ID NO:576所示的序列。在一些实施方案中,所述与结合部分缀合的EpCAM结合域是条件活性嵌合抗原受体的一

部分,其中所述条件活性嵌合抗原受体进一步包含以下至少一种:跨膜域、细胞内信号域和共刺激域。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,所述结合部分包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少约75%相同的序列。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述条件活性嵌合抗原受体包含与选自SEQ ID No.485-491的序列至少约75%相同的序列。

[0028] 一个实施方案提供了一种提高包含第一靶抗原结合域和第二靶抗原结合域的EpCAM结合蛋白的治疗指数的方法,其中所述第一和第二靶抗原结合域中的至少一个包含EpCAM结合域,所述方法包括将所述第一或第二靶抗原结合域与包含可切割连接体和非CDR环的结合部分缀合,

-其中所述非CDR环包含对所述第一或第二靶抗原结合域具有特异性的结合位点,

-其中所述第一或第二靶抗原结合域中的至少一个被所述结合部分掩蔽而不能结合其靶标,并且

-其中所述被掩蔽的第一或第二靶抗原结合域在切割所述可切割连接体后能够结合其靶标。

[0029] 在一些实施方案中,所述EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,所述非CDR环包含对所述EpCAM结合域具有特异性的结合位点。在一些实施方案中,所述第一或第二靶抗原结合域中的至少一个包含CD3结合域。在一些实施方案中,所述非CDR环包含对所述CD3结合域具有特异性的结合位点。在一些实施方案中,所述CD3结合域包含与SEQ ID No.474至少约75%相同的序列。在一些实施方案中,所述结合部分包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少约75%相同的序列。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述可切割连接体包含选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列,或在选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列中包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,所述条件活性多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.498-501、569-570、572、573、575、576、577和578的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述条件活性多特异性蛋白包含与SEQ ID No.576至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述条件活性多特异性蛋白包含如SEQ ID NO:576所示的序列。

[0030] 一个实施方案提供了一种提高包含EpCAM结合域和CD3结合域的EpCAM结合蛋白的治疗指数的方法,所述方法包括将CD3结合域与包含可切割连接体和非CDR环的结合部分缀合,其中所述非CDR环包含对CD3结合域具有特异性的结合位点。在一些实施方案中,所述

EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,所述CD3结合域包含与SEQ ID No.474至少约75%相同的序列。在一些实施方案中,所述结合部分包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少约75%相同的序列。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述可切割连接体包含选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列,或在选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列中包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,所述条件活性多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.498-501、569-570、572、573、575、576、577和578的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述条件活性多特异性蛋白包含与SEQ ID No.576至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述条件活性多特异性蛋白包含如SEQ ID NO:576所示的序列。

[0031] 一个实施方案提供了一种EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白,其包含:EpCAM结合域、CD3结合域、白蛋白结合域,其中所述白蛋白结合域包含非CDR环,该非CDR环包含对所述CD3结合域具有特异性的结合位点和可切割连接体,其中所述EpCAM结合域包含互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3,其中所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或在选自SEQ ID No.39-76的序列中包含一个或多个置换的序列;所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列或在选自SEQ ID No.77-114的序列中包含一个或多个置换的序列;并且所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列或在选自SEQ ID No.115-152的序列中包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,所述白蛋白结合域包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少约75%相同的序列。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述可切割连接体包含选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列,或在选自SEQ ID No.425-471、503-506和581的序列中包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,所述条件活性多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.498-501、569-570、572、573、575、576、577和578的序列至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述条件活性多特异性蛋白包含与SEQ ID No.576至少75%相同的序列。在一些实施方案中,所述条件活性多特异性蛋白包含如SEQ ID NO:576所示的序列。

[0032] 一个实施方案提供了一种药物组合物,其包含本公开的EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白。在一些实施方案中,所述药物组合物进一步包含药学上可接受的载体。一个实施方案提供了一种产生根据本公开的EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白的方法,所述方法包括在允许表达EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白的条件下培养用包含编码本公开EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白的结构域的一个或多个核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

[0033] 一个实施方案提供了一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用本公开的EpCAM靶向条件活性多特异性蛋白,或根据权利要求149或150所述的药物组合物。在一些实施方案中,所述肿瘤性疾病包括实体瘤疾病。在一些实施

方案中,所述实体瘤疾病是转移性的。在一些实施方案中,所述肿瘤性疾病包括以下至少一种:结直肠癌、前列腺癌、神经内分泌癌、甲状腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、食管癌、乳腺癌、腺癌。

[0034] 一个实施方案提供了一种EpCAM结合域,其包含与选自SEQ ID No.1-38的序列至少约75%相同的序列。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域包含CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,所述CDR1包含选自SEQ ID No.39-76的序列,或相对于选自SEQ ID No.39-76的序列的一个或多个氨基酸置换。在一些实施方案中,所述CDR2包含选自SEQ ID No.77-114的序列,或相对于选自SEQ ID No.77-114的序列的一个或多个氨基酸置换。在一些实施方案中,所述CDR3包含选自SEQ ID No.115-152的序列,或相对于选自SEQ ID No.115-152的序列的一个或多个置换。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域包含与选自SEQ ID No.1-38的序列至少约75%相同的序列。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域包含选自SEQ ID No.1-38的序列。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域是人源化抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域是单结构域抗体、VHH结构域、scFv、VH结构域、VL结构域、Fab、Fab'、非Ig结构域、配体、knottin或小分子实体。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域包含单结构域抗体。在一些实施方案中,所述结合域以约0.001nM至约500nM的结合亲和力(Kd)结合EpCAM。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域与人EpCAM、小鼠EpCAM、食蟹猴EpCAM或其组合结合。

[0035] 一个实施方案提供了一种包含EpCAM结合域的多特异性蛋白,其中所述EpCAM结合域根据本公开所述。在一些实施方案中,所述多特异性蛋白包含根据本公开的EpCAM结合域(抗EpCAM结构域)和CD3结合域(抗CD3结构域)。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域和所述抗CD3结构域处于抗EpCAM:抗CD3方向。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域和所述抗CD3结构域处于抗CD3:抗EpCAM方向。在一些实施方案中,所述多特异性蛋白包含根据本公开的EpCAM结合域(抗EpCAM结构域)、CD3结合域(抗CD3结构域)和白蛋白结合域(抗ALB结构域)。在一些实施方案中,所述抗CD3结构域包含SEQ ID No.379或SEQ ID No.474所示的氨基酸。在一些实施方案中,所述抗ALB结构域包含SEQ ID No.375、SEQ ID No.472、SEQ ID No.473、SEQ ID No.482或SEQ ID No.483所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗CD3:抗ALB:抗EpCAM方向。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗EpCAM:抗ALB:抗CD3方向。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗ALB:抗EpCAM:抗CD3方向。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗ALB:抗EpCAM:抗CD3方向。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗CD3:抗EpCAM:抗ALB方向。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗ALB:抗CD3:抗EpCAM方向。在一些实施方案中,所述抗EpCAM结构域、所述抗CD3结构域和所述抗ALB结构域处于抗EpCAM:抗CD3:抗ALB方向。

[0036] 一个实施方案提供了一种多价蛋白,其包含SEQ ID No.485-491中任一个所述的序列。一个实施方案提供了一种药物组合物,其包含(i) (a) 根据本公开的EpCAM结合域,(i) (b) 根据本公开的多特异性蛋白,或(i) (c) 根据本公开的多价蛋白;和(ii) 药学上可接受的载体。

[0037] 一个实施方案提供了一种产生根据本公开的EpCAM结合域的方法,所述方法包括在允许表达EpCAM结合域的条件下培养用包含编码根据本公开EpCAM结合域的核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。一个实施方案提供了一种产生根据任何本公开的多特异性蛋白的方法,所述方法包括在允许表达多特异性蛋白的条件下培养用包含编码根据本公开多特异性EpCAM结合蛋白的结构域的一个或多个核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

[0038] 一个实施方案提供了一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本公开的EpCAM结合域,或根据本公开的药物组合物。

[0039] 一个实施方案提供了一种治疗或改善增生性疾病或肿瘤性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本公开的多特异性蛋白、根据本公开的多价蛋白或根据本公开的药物组合物。在一些实施方案中,所述受试者是人。在一些实施方案中,所述方法进一步包括与根据本公开的EpCAM结合域、根据本公开的多特异性蛋白、根据本公开的多价蛋白或根据本公开的药物组合物联合施用药剂。在一些实施方案中,所述EpCAM结合域选择性地结合表达EpCAM的肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述肿瘤性疾病包括实体瘤疾病。在一些实施方案中,所述实体瘤疾病是转移性的。

附图说明

[0040] 本发明的新颖特征在所附权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述以及附图,将会对本发明的特征和优点获得更好的理解,在这些附图中:

[0041] 图1提供了使用含有本文所述抗EpCAM结构域和抗CD3结构域的本公开的示例性融合蛋白,用NCI-H508细胞进行的代表性T细胞依赖性细胞毒性测定的结果。

[0042] 图2提供了使用含有本文所述抗EpCAM结构域和抗CD3结构域的本公开的示例性融合蛋白进行的代表性T细胞依赖性细胞毒性测定的结果。

[0043] 图3提供了使用含有本文所述抗EpCAM结构域和抗CD3结构域的本公开的示例性融合蛋白进行的代表性T细胞依赖性细胞毒性测定的结果。

[0044] 图4提供了使用含有本文所述抗EpCAM结构域和抗CD3结构域的本公开的示例性融合蛋白进行的代表性T细胞依赖性细胞毒性测定的结果。

[0045] 图5提供了使用含有本文所述人源化抗EpCAM结构域和抗CD3结构域的本公开的示例性融合蛋白进行的代表性T细胞依赖性细胞毒性测定的结果。

[0046] 图6示出了示例性ProCAR构建体。一个示例性构建体包含抗人EpCAM sdAb、FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3 ζ 胞内域(SEQ ID NO:485)。一个示例性构建体包含抗人血清白蛋白sdAb、抗人EpCAM sdAb、FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3 ζ 胞内域(SEQ ID NO:486)。一个示例性构建体包含抗人血清白蛋白sdAb、抗人EpCAM sdAb、FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3 ζ 胞内域(SEQ ID NO:487)。一个示例性构建体包含抗人血清白蛋白sdAb、抗人EpCAM sdAb、FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3 ζ 胞内域(SEQ ID NO:488)。一个示例性构建体包含抗人血清白蛋白sdAb、蛋白酶切割位点3、抗人EpCAM sdAb、FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3 ζ 胞内域(SEQ ID NO:489)。一个示例性构建体包含抗人血清白蛋白sdAb、蛋白酶切割位点3、抗人EpCAM sdAb、

FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3 ζ 胞内域 (SEQ ID NO:490)。一个示例性构建体包含抗GFP sdAb、FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3 ζ 胞内域 (SEQ ID NO:491)。

[0047] 图7展示了以10:1、5:1、2.5:1和1.25:1的CAR-T:靶细胞比,所示构建体的HSA对于抗EpCAM sdAb H90的空间阻断。

[0048] 图8A-8C提供了来自图6的CAR-T细胞的EpCAM-Fc/Alexa Fluor 647染色的直方图,其基于显示EpCAM mask 1在阻断ProCAR EpCAM结合活性方面的功效的抗FLAG染色被分组为低(图8A)、中(图8B)或高(图8C) CAR表达。数字是指序列标识符(例如,491=SEQ ID No.491)。

[0049] 图9A-9C提供了来自图6的CAR-T细胞的EpCAM-Fc/Alexa Fluor 647染色的直方图,其基于显示EpCAM mask 2在阻断ProCAR EpCAM结合活性方面的功效的抗FLAG染色被分组为低(图9A)、中(图9B)或高(图9C) CAR表达。数字是指序列标识符(例如,488=SEQ ID No.488)。

[0050] 图10展示了以10:1、5:1、2.5:1和1.25:1的CAR-T:靶细胞比,图6的构建体的抗EpCAM sdAb H90的掩蔽。

[0051] 图11展示了EpCAM ProCAR mask 2细胞杀伤活性的蛋白酶位点依赖性激活。

[0052] 图12A-12C示出了基于抗FLAG染色,在低(图12A)、中(图12B)或高(图12C) CAR表达下EpCAM Mask 1ProCAR抗原结合活性的蛋白酶激活。数字是指序列标识符(例如,489=SEQ ID No.489)。

[0053] 图13A-13C示出了基于抗FLAG,在低(图13A)、中(图13B)或高(图13C) CAR表达下EpCAM Mask 2ProCAR抗原结合活性的蛋白酶激活。数字是指序列标识符(例如,485=SEQ ID No.485)。

[0054] 图14A-14C显示了在施用本公开的示例性EpCAM ProTriTAC分子(图14B中含有连接体L040的EpCAM ProTriTAC;图14C中含有不可切割连接体的EpCAM ProTriTAC)和EpCAM TriTAC分子(图14A)后小鼠的体重变化百分比。

[0055] 图15A-15C显示了各种EpCAM结合域的结合动力学;H13(图15A)、H90(图15B)和H90.2(图15C)。

[0056] 图16A-16C显示了使用含有EpCAM结合域H13(图16A)、H90.2(图16B)和H138.2(图16C)的ProTriTAC、TriTAC蛋白或的活性药物(CT),对HCT116细胞的T细胞依赖性细胞毒性测定(TDCC测定)的结果。

[0057] 图17A-17C显示了使用含有EpCAM结合域H13(图17A)、H90.2(图17B)和H138.2(图17C)的ProTriTAC、TriTAC蛋白或活性药物(CT),对NCI-H929细胞的T细胞依赖性细胞毒性测定(TDCC测定)的结果。

[0058] 图18A-18B显示了使用含有EpCAM结合域H13和H90.2的TriTAC,对HCT116细胞(图18A)和HCT116(EpCAM-敲除;KO)(图18B)的T细胞依赖性细胞毒性测定(TDCC测定)的结果。

[0059] 图19显示了用于测量HCT116细胞野生型(WT)和HCT116(EpCAM-敲除;KO)细胞与EpCAM结合域H13和H90.2的结合的流式细胞术测定的结果。

[0060] 图20显示了使用含有EpCAM结合域H13或H90.2的不可切割的前药或活性药物(CT)形式,对SKBR3细胞的TDCC测定的结果。

[0061] 图21A-21B示出了代表性曲线图,其展示了与含有它们的活性药物相比,由含有EpCAM结合域H13(图21A)或H90.2(图21B)的不可切割的前药形式实现的掩蔽效果。

[0062] 图22A-22H显示了使用含有EpCAM结合域H13或H90.2的不可切割的前药(NCLV)、ProTriTAC(L040)或活性药物(CT)形式,对各种细胞系的TDCC测定的结果。图22A显示了CAPAN2细胞的结果;图22B显示了DMS53细胞的结果,图22C显示了HepG2细胞的结果;图22D显示了KMRC3细胞的结果;图22E显示MDAPCA2b细胞的结果;图22F显示了OVCAR8细胞的结果;图22G显示了PECAPJ41细胞的结果;图22H显示了SKBR3细胞的结果。

[0063] 图23A-23B显示了含有EpCAM结合域H13的ProTriTAC(图23B)和TriTAC(图23A)形式在小鼠肿瘤模型中的功效。

[0064] 图24A-24D显示了在食蟹猴中施用含有EpCAM结合域H13的ProTriTAC和TriTAC形式后的细胞因子谱;图24A示出了IFN- γ 水平;图24B示出了IL-2水平;图24C示出了IL-6水平,图24D示出了IL-10水平。

[0065] 图25A-25B显示了在食蟹猴中施用含有EpCAM结合域H13(图25A)或H90.2(图25B)的ProTriTAC和TriTAC形式后的血浆浓度。

[0066] 图26示出了免疫球蛋白分子的可变域,其包含互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)和连接 β 链的非CDR环(AB、CC'、C"D、EF和DE)。

[0067] 图27示出了本公开的靶抗原结合域(aTarget 1)、可切割连接体和结合部分(aTarget 2)的示例性排列。

[0068] 图28示出了如本文所述的条件活性受体的实例。

[0069] 图29A-29K显示了对照TriTAC、EpCAM ProTriTAC和EpCAM TriTAC蛋白在建立的LoVo(结肠癌)肿瘤模型中的功效;图29A显示了对照TriTAC的结果;图29B显示了0.003mg/kg的EpCAM TriTAC的结果;图29C显示了0.01mg/kg的EpCAM TriTAC的结果;图29D显示了0.03mg/kg的EpCAM TriTAC的结果;图29E显示了0.1mg/kg的EpCAM TriTAC的结果;图29F显示了0.1mg/kg的EpCAM TriTAC的结果;图29G显示了0.03mg/kg的EpCAM ProTriTAC的结果;图29H显示了0.1mg/kg的EpCAM ProTriTAC的结果;图29I显示了0.3mg/kg的EpCAM ProTriTAC的结果;图29J显示了1mg/kg的EpCAM ProTriTAC的结果;图29K显示了3mg/kg的EpCAM ProTriTAC的结果。

[0070] 图30A-30E显示了在施用含有EpCAM结合域的ProTriTAC或TriTAC形式后的存活百分比(图30A-30B)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)(图30C)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)(图30D)和总胆红素(图30E)水平。

[0071] 图31显示了使用对照GFP TriTAC、EpCAM TriTAC或EpCAM ProTriTAC的组织病理学研究的结果和总结。

[0072] 图32提供了靶向EpCAM的三特异性蛋白的示意图。

具体实施方式

[0073] 本文描述了靶向EpCAM的三特异性蛋白,其药物组合物,以及用于制备这类蛋白质的核酸、重组表达载体和宿主细胞。还提供了使用所公开的靶向EpCAM的三特异性蛋白预防和/或治疗疾病、病况和病症的方法。所述靶向EpCAM的三特异性蛋白能够特异性结合EpCAM以及CD3,并且具有半衰期延长结构域,如与人白蛋白(ALB)结合的结构域。图32描绘了三特

异性EpCAM结合蛋白的一个非限制性实例。

某些定义

[0074] 本文使用的术语仅用于描述特定情况的目的,而非旨在限制。除非上下文另有明确规定,否则如本文所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”也意欲包括复数形式。此外,就具体实施方式和/或权利要求书中使用的术语“包括”、“包含”、“具有”或其变化形式而言,这些术语旨在以与术语“包含”类似的方式为包含性的。

[0075] 术语“约”或“大约”意指在本领域普通技术人员测定的特定值的可接受误差范围内,该可接受误差范围将部分取决于该值如何测量或测定,例如,测量系统的局限性。例如,根据给定值的实践,“约”可以表示在1个或大于1个标准差内。在本申请和权利要求书中描述特定值的情况下,除非另有说明,否则术语“约”应被认为意指该特定值的可接受误差范围。

[0076] 术语“个体”、“患者”或“受试者”可互换使用。这些术语都不需要或局限于以卫生保健工作者(例如,医生、注册护士、从业护士、医师助理、护理员或临终关怀工作人员)的监护(例如,持续的或间歇的)为特征的情形。

[0077] “抗体”通常是指Y形四聚体蛋白质,其包含通过共价二硫键和非共价相互作用保持在一起的两条重(H)多肽链和两条轻(L)多肽链。人轻链包含可变域(VL)和恒定域(CL),其中基于氨基酸序列和基因座,该恒定域可被容易地分类为 κ 或 λ 。每条重链包含一个可变域(VH)和恒定区,在IgG、IgA和IgD的情况下,恒定区包含三个结构域,分别被称为CH1、CH2和CH3(IgM和IgE具有第四个结构域——CH4)。在IgG、IgA和IgD类别中,CH1和CH2结构域被柔性铰链区隔开,该柔性铰链区是可变长度(在IgG中通常为约10个至约60个氨基酸)的富含脯氨酸和半胱氨酸的区段。轻链和重链中的可变域都通过约12个或更多个氨基酸的“J”区与恒定域连接,并且重链还具有约10个额外氨基酸的“D”区。每种类别的抗体进一步包含由成对的半胱氨酸残基形成的链间和链内二硫键。免疫球蛋白分子中存在两种类型的天然二硫桥或二硫键:链间和链内二硫键。链间二硫键的位置和数目根据免疫球蛋白的类别和种类而不同。链间二硫键位于免疫球蛋白的表面上,是溶剂可及的,并且通常相对易于还原。在人IgG1同种型中,存在四个链间二硫键,从每个重链到轻链有一个,而两个在重链之间。链间二硫键不是链缔合所必需的。众所周知,重链的富含半胱氨酸的IgG1铰链区通常被保持为由三个部分组成:上铰链、核心铰链和下铰链。本领域技术人员将会理解,IgG1铰链区在重链中含有半胱氨酸,这些半胱氨酸构成链间二硫键(两个重/重,两个重/轻),其提供有助于Fab运动的结构柔性。IgG1的轻链和重链之间的链间二硫键在 κ 或 λ 轻链的C214与重链上铰链区中的C220之间形成。重链之间的链间二硫键位于位置C226和C229处(全部按照EU索引编号,根据Kabat等人,下文)。

[0078] 如本文所用的,术语“抗体”包括多克隆抗体、多个克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、去免疫的、人源化和灵长类动物化抗体、CDR移植的抗体、人抗体、重组产生的抗体、胞内抗体(intrabodies)、多特异性抗体、双特异性抗体、单价抗体(例如,单价IgG)、多价抗体、抗独特型抗体、合成抗体,包括突变蛋白(muteins)及其变体,免疫特异性抗体片段,如:hcIgG、V-NAR、Fv、Fd、Fab、F(ab')₂、F(ab')、Fab2、Fab3片段、单链片段(例如,di-scFv、ScFv、ScFvFc、scFv-zipper、scFab)、二硫键连接的Fv(sdFv)、由VH和CH1结构域组成的Fd片段、线性抗体、单结构域抗体,如纳米抗体或仅包含一个可变域的单可变域抗体,如sdAb

(VH、VL或VHH结构域)、“r IgG” (“半抗体”)、双抗体、单链双抗体、串联双抗体(Tandab's)、串联di-scFv、串联tri-scFv、“微型抗体”,在一些情况下由如下结构例示:(VH-VL-CH3)₂、(scFv-CH3)₂、((scFv)₂-CH3+CH3)、((scFv)₂-CH3)或(scFv-CH3-scFv)₂,多抗体(multibodies)如三抗体或四抗体;及其衍生物,包括Fc融合体和其他修饰,以及任何其他免疫反应性分子,只要其包含具有与EpCAM蛋白优先缔合或结合的结合位点的结构域即可。此外,除非上下文约束另有指示,否则该术语还包括所有类别的抗体(即,IgA、IgD、IgE、IgG和IgM)和所有亚类(即,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。对应于不同抗体类别的重链恒定域一般分别用相应的小写希腊字母 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 来表示。来自任何脊椎动物物种的抗体的轻链,基于其恒定域的氨基酸序列,可以归为两种截然不同的类型(称为 κ (kappa)和 λ (lambda))之一。在一些实施方案中,所述EpCAM结合蛋白包含仅重链抗体,如VH或VHH结构域。在一些情况下,所述EpCAM结合蛋白包含仅重链抗体,其为工程化VH结构域。在一些实例中,通过淘选噬菌体展示文库产生工程化人VH结构域。在一些实施方案中,所述EpCAM结合蛋白包含VHH。如本文所用的术语“VHH”是指不含轻链的单链抗体结合域。在一些情况下,VHH衍生自可在骆驼科或软骨鱼中发现的天然缺乏轻链的类型的抗体,或者衍生自可以相应构建的合成和非免疫的VHH。每条重链包含由V-、D-和J-外显子编码的可变区。在一些情况下,VHH是天然的VHH,如骆驼科来源的VHH,或包含重链可变域的重组蛋白。在一些实施方案中,该VHH来源于选自骆驼、美洲驼、骆马(vicunas)、大羊驼(guanacos)和软骨鱼(例如但不限于鲨鱼)的物种。在另一个实施方案中,该VHH来源于羊驼(例如但不限于霍加耶羊驼(Huacaya Alpaca)或苏里羊驼(Suri alpaca))。

[0079] 如本文所用的,“可变区”或“可变域”是指以下情况:可变域的某些部分在抗体之间在序列上广泛不同,并且在每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性中使用。然而,可变性并非均匀地分布在抗体的整个可变域中。其集中在轻链和重链可变域中被称为互补决定区(CDR)或高变区的三个区段中。可变域更高度保守的部分被称为框架(FR)。天然重链和轻链的可变域各自包含四个FR区,其主要采取 β -折叠构型,通过三个CDR连接,它们形成连接 β 折叠结构的环,并且在一些情况下形成 β 折叠结构的一部分。每条链中的CDR通过FR区紧密靠近保持在一起,并且与来自另一条链的CDR一起有助于形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,National Institute of Health,Bethesda,Md.(1991))。恒定域虽然不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应物功能,诸如抗体参与抗体的抗体依赖性细胞毒性。在一些实施方案中,除非另有说明,否则将氨基酸指定到每个结构域、框架区和CDR是根据以下提供的编号方案之一:Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest(第5版),US Dept.of Health and Human Services,PHS,NIH,NIH Publication no.91-3242;Chothia等人,1987,PMID:3681981;Chothia等人,1989,PMID:2687698;MacCallum等人,1996,PMID:8876650;或Dubel,Ed.(2007)Handbook of Therapeutic Antibodies,第3版,Wily-VCH Verlag GmbH and Co or AbM(Oxford Molecular/MSI Pharmacopia)。在本公开的一些实施方案中,所述EpCAM结合蛋白包含仅重链的抗体,如VH或VHH结构域,并且包含三个CDR。在一些实施方案中,这类仅重链的抗体以单体形式结合EpCAM,其最佳结合亲和力不依赖于与VL(轻链可变)区的二聚化。

[0080] “按照Kabat的可变域残基编号”或“按照Kabat的氨基酸位置编号”及其变化形式

是指在Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)中用于抗体编译的重链可变域或轻链可变域的编号系统。使用该编号系统,实际的线性氨基酸序列可含有较少的或额外的氨基酸,其对应于可变域的FR或CDR的缩短或向其中的插入。例如,重链可变域可包含在H2的残基52之后的单氨基酸插入(根据Kabat为残基52a)和在重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat为残基82a、82b和82c等)。可通过将抗体序列在同源性区域与“标准”Kabat编号的序列进行比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。这并不意味着本公开的CDR必然对应于Kabat编号约定。

[0081] 术语“框架”或“FR”残基(或区)是指除本文定义的CDR或高变区残基之外的可变域残基。“人共有框架”是代表在选择人免疫球蛋白VL或VH框架序列中最常出现的氨基酸残基的框架。

[0082] 如本文所用的术语“表位”是指与抗体分子的可变区中被称为互补位的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单一抗原可具有超过一个表位。因此,不同抗体可与抗原上的不同区域结合,并且可具有不同的生物效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位由来自线性多肽链不同区段的空间并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下,表位可包括抗原上的糖、磷酸基或磺酰基部分。

[0083] 如本文所用的,用于序列的术语“氨基酸序列同一性百分比(%)”被定义为在将序列进行比对并引入空位(如果需要)以达到最大序列同一性百分比之后,候选序列中的氨基酸残基与特定序列中的氨基酸残基相同的百分比,并且不认为任何保守置换是序列同一性的一部分。用于确定氨基酸序列同一性百分比目的的比对可通过本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,如EMBOSS MATCHER、EMBOSS WATER、EMBOSS STRETCHER、EMBOSS NEEDLE、EMBOSS LALIGN、BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0084] 如本文所用的,“消除半衰期”以其普通含义使用,如在Goodman和Gillman的The Pharmaceutical Basis of Therapeutics 21-25(Alfred Goodman Gilman, Louis S. Goodman和Alfred Gilman编著,第六版1980)中所述。简言之,该术语意在包括药物消除的时间过程的定量量度。大多数药物的消除是指数式的(即,遵循一级动力学),因为药物浓度通常并未接近消除过程的饱和和所需的浓度。指数过程的速率可由其速率常数 k 或由其半衰期 $t_{1/2}$ 表示,速率常数 k 表示每单位时间的分数变化,半衰期 $t_{1/2}$ 表示该过程完成50%所需的时间。这两个常数的单位分别是时间 -1 和时间。该反应的一级速率常数和半衰期简单相关($k \times t_{1/2} = 0.693$)并且可以相应地互换。由于一级消除动力学指示每单位时间损失恒定分数的药物,因此药物浓度的对数相对于时间的图形在初始分布阶段之后(即在药物吸收和分布完成之后)一直是线性的。可从这样的图形准确地确定药物消除的半衰期。

[0085] 如本文所用的,术语“结合亲和力”是指本公开内容中描述的蛋白质与其结合靶标的亲和力,并且使用“Kd”值以数字表示。如果表明两种或更多种蛋白质对其结合靶标具有相当的结合亲和力,那么各蛋白质与其结合靶标结合的Kd值在彼此的 ± 2 倍之内。如果表明两种或更多种蛋白质对单一结合靶标具有相当的结合亲和力,那么各蛋白质与所述单一结合靶标结合的Kd值在彼此的 ± 2 倍之内。如果表明蛋白质以相当的结合亲和力结合两种或

更多种靶标,那么所述蛋白质与所述两种或更多种靶标结合的Kd值在彼此的 ± 2 倍之内。通常,较高的Kd值对应于较弱的结合。在一些实施方案中,使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)通过放射性标记的抗原结合测定(RIA)或表面等离子体共振测定来测量“Kd”。在某些实施方案中,还使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)通过表面等离子体共振技术来测定“缔合率”或“缔合的速率”或“缔合速率”或“kon”以及“解离率”或“解离的速率”或“解离速率”或“koff”。在另外的实施方案中,使用OCTET®Systems(Pall Life Sciences)来测定“Kd”、“kon”和“koff”。在使用OCTET®Systems测量结合亲和力的示例性方法中,将配体(例如,生物素化的人或食蟹猴EpCAM)固定在OCTET®链霉亲和素毛细管传感器端头表面上,然后按照制造商的说明书使用约20-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人或食蟹猴EpCAM蛋白激活该链霉亲和素端头。还引入PBS/酪蛋白溶液作为封闭剂。对于缔合动力学测量,以约10ng/mL至约100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约50ng/mL至约5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或约2ng/mL至约20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度引入EpCAM结合蛋白变体。在一些实施方案中,结合EpCAM的单结构域蛋白质以约2ng/mL至约20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度使用。在阴性对照,即不含结合蛋白的测定缓冲液的情况下观察到完全解离。然后使用适当的工具例如ForteBio软件来确定结合反应的动力学参数。

[0086] 在一些实施方案中,如本文所用的,“治疗”或“处理”是指治疗性处理,其中目的是减缓(减轻)不期望的生理病况、病症或疾病,或是获得有益或期望的临床结果。对于本文所述的目的,有益或期望的临床结果包括但不限于症状的减轻;病况、病症或疾病程度的减小;病况、病症或疾病状态的稳定(即不恶化);病况、病症或疾病的延迟发作或进展减缓;病况、病症或疾病状态的改善;以及病况、病症或疾病的可检测到的或不可检测的缓解(部分或全部的)或者增强或改善。治疗包括引发临床上显著的反应,而没有过高水平的副作用。治疗还包括与不接受治疗的情况下预期的生存期相比延长生存期。在其他实施方案中,“治疗”或“处理”是指预防性措施,其中目的是例如在易患疾病的人(例如,携带诸如乳腺癌等疾病的遗传标志物的个体)中,延迟不希望的生理病况、病症或疾病的发作或者降低其严重程度。

[0087] 如本文所用的“TriTAC”、“EpCAM靶向TriTAC”或“靶向EpCAM的三特异性蛋白”是指未被条件激活的三特异性结合蛋白,并且包含对大体积血清蛋白具有特异性的结合部分、第一靶抗原结合域和第二靶抗原结合域,其中第一靶抗原结合域和第二靶抗原结合域中的至少一个包含如本文所述的EpCAM结合蛋白,并且第一靶抗原结合域和第二靶抗原结合域中的至少一个与CD3如人CD3结合的结构域。

[0088] 如本文所用的“ProTriTAC”或“靶向EpCAM的前三特异性蛋白”是指条件激活的三特异性结合蛋白,并且包含(i)可切割连接体(例如,包含如SEQ ID No.425-471和SEQ ID No.503-506所示的序列),(ii)对大体积血清蛋白具有特异性并且还包含阻止第一靶抗原结合域或第二靶抗原结合域与其靶标结合的掩蔽部分(例如,包含如SEQ ID No.380-424所示的序列)的结合部分,其中第一靶抗原结合域和第二靶抗原结合域中的至少一个包含如本文所述的EpCAM结合蛋白。在一些情况下,例如在富含蛋白酶的环境中,例如在肿瘤微环境中,本公开的ProTriTAC蛋白通过可切割连接体的切割从掩蔽状态激活到活性状态,以形成活性药物。在一些情况下,本文提供的活性药物包含本公开的EpCAM结合域和本公开的CD3结合域。活性药物的实例提供于SEQ ID No.153-179、180-206、210-212、494、571和574,

或与选自SEQ ID No.153-179、180-206、210-212、494、571和574的序列至少约75%至100%相同的序列，如与选自SEQ ID No.153-179、180-206、210-212、494、571和574的序列约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%相同的序列。

[0089] 如本文所用的“不可切割的前药”是指如上所述的ProTriTAC，其中可切割连接体被不可切割连接体（例如，如SEQ ID No.507中的连接体）替代。活性药物的实例提供于SEQ ID No.495和502，或与选自SEQ ID No.495和502的序列至少约75%至100%相同的序列，如与选自SEQ ID No.495和502的序列约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%相同的序列。

[0090] 在非 β -夹心支架（例如，DARPin、affimer、affibody）中，“非CDR环”是指这样的区域：其（1）适于序列随机化以允许对第二抗原的工程化特异性，并且（2）通常在支架上使用的主要特异性决定区的远端，以允许支架同时与两种抗原接合而没有空间干扰。为此，可以使用Skrlec2015出版物（Trends in Biotechnol,33:408-418）中建立的框架定义主要特异性决定区。下面列出了框架的摘录。

支架	主要特异性决定区
Affibody	在两个螺旋中 13 个残基
Affimer	12-36 个残基
Anticalin	四个环(可达 24 个氨基酸)
Avimer	11 个残基
Centyrin	13 个残基
DARPin	在每个 n-重复序列中 7 个残基，或者 在每个 n-重复序列中 8 个残基
Fynomer	在 RT 环和 n-Src 环中 6 个残基
Kunitz 结构域	1-2 个环

[0091] 如本文所用的，“嵌合抗原受体”或“CAR”或“CARs”是指为细胞（例如T细胞）提供抗原特异性的工程化受体。CAR包含多个结构域，例如，至少一个靶抗原结合域、跨膜域、一个或多个共刺激域和细胞内信号域。每个结构域可以通过连接体连接。如本文所用的，“ProCAR”是指可条件激活的CAR，其包含本公开的EpCAM结合域。

EpCAM结合蛋白

[0092] 本文描述了结合EpCAM的蛋白质，其药物组合物，以及用于制备这类蛋白质的核酸、重组表达载体和宿主细胞。还提供了使用所公开的EpCAM结合蛋白预防和/或治疗疾病、病况和病症的方法。在一些实施方案中，EpCAM结合蛋白是包含如本文所述的EpCAM结合域的多特异性（例如，三特异性）蛋白质的一部分。

[0093] 上皮细胞粘附分子（EpCAM）是在大多数正常人类上皮细胞中表达并在大多数癌中

过表达的膜糖蛋白。该分子负责细胞间粘附,此外还参与信号传导、细胞迁移、增殖和分化。因此,EpCAM已成为若干实体瘤临床试验中免疫治疗的靶点。已发现它在检测和分离循环肿瘤细胞(CTC)中发挥重要作用。EpCAM已在各种研究中显示有益于各种癌的诊断和治疗。此外,在许多情况下,观察到肿瘤细胞表达EpCAM的程度远高于其亲本上皮或所述癌症的侵袭性较低的形式。例如,显示EpCAM表达在赘生组织和腺癌中显著高于正常前列腺上皮($n=76$; $p<0.0001$),提示EpCAM表达的增加代表前列腺癌发展的早期事件。参见Poczatek, *J Urol.*, 1999, 162, 1462-1644。另外,在大多数宫颈鳞癌和腺癌中,已显示强EpCAM表达与增殖增加和终末分化标志物的消失相关。参见Litvinov, *Am. J. Pathol.* 1996, 148, 865-75。一个示例是乳腺癌,其中肿瘤细胞上EpCAM的过表达是生存的预测指标。参见Gastl, *Lancet.* 2000, 356, 1981-1982。此外,EpCAM已被描述为用于检测头、颈和肺鳞状细胞癌患者中散布性肿瘤细胞的标志物。参见Chaubal, *Anticancer Res* 1999, 19, 2237-2242, Piyathilake, *Hum Pathol.* 2000, 31, 482-487。在表皮、口腔、会厌、咽、喉和食道中发现的正常鳞状上皮没有显著表达EpCAM。参见Quak, *Hybridoma*, 1990, 9, 377-387。

[0094] 预期EpCAM用于以定向和高度有序的方式粘附上皮细胞。参见Litvinov, *J Cell Biol.* 1997, 139, 1337-1348。在上皮细胞发生恶性转化时,快速生长的肿瘤细胞被认为放弃了上皮的高细胞顺序。因此,预计EpCAM的表面分布将受到较少限制,并且该分子更好地暴露在肿瘤细胞上。由于它们的上皮细胞起源,预计来自大多数癌的肿瘤细胞会在其表面表达EpCAM。

[0095] EpCAM是由314个氨基酸组成的40-kDa的膜整合糖蛋白,在某些上皮和许多人类癌中具有特异性表达。参见,例如,Balzar, *J. Mol. Med.* 1999, 77, 699-712。EpCAM被发现,随后通过其被鼠单克隆抗体17-1A/依决洛单抗的识别而被克隆。参见Goettlinger, *Int J Cancer.* 1986; 38, 47-53和Simon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87, 2755-2759。单克隆抗体17-1A是通过用人结肠癌细胞对小鼠进行免疫而产生的。参见Koprowski, *Somatic Cell Genet.* 1979, 5, 957-971。EpCAM的EGF样重复序列显示在嗜同性细胞粘附中介导横向和相互的相互作用。参见,例如,Balzar, *Mol. Cell. Biol.* 2001, 21, 2570-2580, 并且由于该原因,主要位于上皮细胞之间(Litvinov, *J Cell Biol.* 1997, 139, 1337-1348, Balzar, *J Mol Med.* 1999, 77, 699-712, 和Trebak, *J Biol Chem.* 2001, 276, 2299-2309)。

[0096] EpCAM也有以下别名:上皮细胞粘附分子、肿瘤相关钙信号转导物、主要胃肠肿瘤相关蛋白GA733-2、腺癌相关抗原、细胞表面糖蛋白Trop-1、上皮糖蛋白314、TACSTD1、EGP314、MIC18、TROP1、M4S1、KSA、膜成分染色体4表面标志物(35kD糖蛋白)、通过单克隆抗体AUA-1鉴定的抗原、人上皮糖蛋白-2、上皮细胞表面抗原、上皮糖蛋白、KS 1/4抗原、CD326抗原、GA722-2、HEGP314、HNPCC8、Ep-CAM、DIAR5、EGP-2、EGP40、KS1/4、MK-1、M1S2、ESA和EGP。UniProtKB ID No. P16422和B5MCA4中提供了EpCAM的示例性蛋白质序列。在一些实施方案中,本公开的EpCAM结合蛋白与UniProtKB ID No. P16422 (SEQ ID No. 478) 或B5MCA4 (SEQ ID No. 475) 中提供的EpCAM序列结合。

[0097] 在一些实施方案中,EpCAM结合域与成熟EpCAM蛋白的胞外域结合。人胞外域序列在SEQ ID No. 479中提供;食蟹猴胞外域序列在SEQ ID No. 480中提供;小鼠胞外域序列在SEQ ID No. 481中提供。

[0098] 在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含与SEQ ID No. 475相比截短的序列的蛋

白质结合。在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含SEQ ID No.475的序列的蛋白质结合。在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含与SEQ ID No.476相比截短的序列的蛋白质结合。在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含SEQ ID No.476的序列的蛋白质结合。在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含与SEQ ID No.477相比截短的序列的蛋白质结合。在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含与SEQ ID No.477相比截短的序列的蛋白质结合。在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含与SEQ ID No.478相比截短的序列的蛋白质结合。在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含与SEQ ID No.478相比截短的序列的蛋白质结合。在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含与SEQ ID No.479相比截短的序列的蛋白质结合。在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含与SEQ ID No.479相比截短的序列的蛋白质结合。在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含与SEQ ID No.480相比截短的序列的蛋白质结合。在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含与SEQ ID No.480相比截短的序列的蛋白质结合。在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含与SEQ ID No.481相比截短的序列的蛋白质结合。在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白与包含与SEQ ID No.481相比截短的序列的蛋白质结合。

[0099] 在一些实施方案中,本文公开的EpCAM结合域识别全长EpCAM。在某些情况下,本文公开的EpCAM结合域识别EpCAM内的表位,例如在一些情况下,EpCAM结合蛋白与人EpCAM的结构域内发现的一个或多个氨基酸相互作用。抗体所结合的表位可由位于EpCAM的结构域内的3个或更多个(例如,3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个)氨基酸的单连续序列组成。或者,表位可由位于EpCAM的结构域内的多个非连续氨基酸(或氨基酸序列)组成。

[0100] 在一些实施方案中,本公开的EpCAM结合蛋白结合全长EpCAM蛋白或其片段,如全长EpCAM蛋白内的包含表位的片段,如上所述。在一些情况下,含有表位的片段包含EpCAM蛋白的抗原性或免疫原性片段及其衍生物。在一些实施方案中,包含抗原表位的片段,包括抗原性或免疫原性片段,为12个氨基酸或更多,例如20个氨基酸或更多、50或100个氨基酸或更多。在一些实施方案中,EpCAM片段包含完整蛋白质长度的95%或更多,完整蛋白质长度的90%或更多、75%或50%或25%或10%或更多。在一些实施方案中,EpCAM的包含表位的片段,包括抗原性或免疫原性片段,能够在患者中引发相关免疫应答。在一些实施方案中,EpCAM的衍生物包括序列的变体,其中已对SEQ ID No.475-481中提供的EpCAM序列进行了一个或多个(例如,1-20个,如15个氨基酸,或基于蛋白质总长的氨基酸数目的多达20%,如多达10%或5%或1%)缺失、插入或置换。

[0101] 在一些实施方案中,置换包括保守置换。在一些实例中,衍生物和变体与它们所源自的蛋白质具有基本相同的生物学功能。例如,在一些情况下,EpCAM的衍生物和变体与它们所源自的蛋白质具有相当的抗原性或免疫原性,具有它们所源自的蛋白质的配体结合活性或活性受体复合物形成能力,或优选地两者兼具,并且具有与EpCAM相同的组织分布。

[0102] 在一些实施方案中,EpCAM结合蛋白以与参考EpCAM结合蛋白相同或更好的亲和力特异性结合EpCAM,在这样的实施方案中,EpCAM结合蛋白包含亲和力成熟的EpCAM结合分子,并且衍生自EpCAM结合亲本分子,其相对于EpCAM结合亲本分子包含一个或多个氨基酸突变(例如,稳定突变、去稳定突变)。在一些实施方案中,亲和力成熟的EpCAM结合分子相对于选择的去稳定剂具有比参考EpCAM结合亲本分子更好的稳定性。在一些实施方案中,亲和

力成熟的EpCAM结合分子是在以下过程中鉴定的,该过程包括针对EpCAM蛋白,如人EpCAM蛋白,淘选在噬菌体展示文库中表达的,由一个或多个EpCAM结合亲本分子衍生的一个或多个预候选DLL3结合分子。在一些实施方案中,该预候选EpCAM结合分子相对于亲本分子在可变区、CDR或框架残基中包含氨基酸置换。

[0103] 如本文所用的,“噬菌体展示”是指这样的技术,通过该技术将变异多肽作为融合蛋白展示到噬菌体(例如丝状噬菌体)颗粒表面上的外壳蛋白的至少一部分。噬菌体展示的实用性在于以下事实:可以为那些以高亲和力与靶分子结合的序列快速而有效地选择随机化蛋白质变体的大型文库。在噬菌体上展示肽和蛋白质文库已用于针对具有特定结合性质的多肽筛选数百万种多肽。多价噬菌体展示方法已用于通过与丝状噬菌体的基因III或基因VIII融合来展示小的随机肽和小的蛋白质。参见,例如,Wells和Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3:355-362 (1992), 以及其中引用的参考文献。在单价噬菌体展示中,将蛋白质或肽文库与基因III或其部分融合,并在野生型基因III蛋白的存在下以低水平表达,从而使噬菌体颗粒展示出一个拷贝的融合蛋白或不展示融合蛋白。相对于多价噬菌体,亲合力作用降低,因此选择是基于固有的配体亲和力,并且使用了噬菌粒载体,从而简化了DNA操作。参见,例如,Lowman和Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:205-0216 (1991)。

[0104] 在一些实施方案中,淘选包括使用变化的结合时间和浓度来从预候选EpCAM结合分子中鉴定具有增加或降低的结合速率的EpCAM结合分子。在一些实施方案中,淘选包括使用变化的洗涤时间来从预候选EpCAM分子中鉴定具有增加或降低的解离速率的EpCAM结合分子。在一些实施方案中,淘选包括使用变化的结合时间和变化的洗涤时间两者。在一些实施方案中,例如通过改组以从此类突变体创建第二阶段组合文库并进行第二轮淘选,随后进行结合选择,来组合一个或多个稳定突变,以增加亲和力成熟的EpCAM结合分子的稳定性。

[0105] 在一些实施方案中,亲和力成熟的EpCAM结合分子与EpCAM结合亲本分子相比具有对EpCAM蛋白(如人EpCAM蛋白)相等或更好的亲和力,但是具有降低的与诸如配体、蛋白质、抗原等所选物质的交叉反应性,或在一些实施方案中,具有增加的交叉反应性,该所选物质不是EpCAM结合亲本分子对其具有特异性的或被设计为对其具有特异性的EpCAM表位。关于后者,在一些实施方案中,如果亲和力成熟的EpCAM结合分子与人EpCAM和动物模型的相应靶标例如小鼠EpCAM或食蟹猴EpCAM反应,则在动物模型中更成功地测试亲和力成熟的EpCAM结合分子。在一些实施方案中,亲本EpCAM结合分子以约500nM或更低、400nM或更低、300nM或更低、200nM或更低、100nM或更低、50nM或更低、10nM或更低的亲和力与人EpCAM结合,并以约500nM或更低、400nM或更低、300nM或更低、200nM或更低、100nM或更低、50nM或更低、15nM或更低或者10nM或更低的亲和力与食蟹猴EpCAM结合。在一些实施方案中,在一轮淘选后鉴定的亲和力成熟的EpCAM结合分子以约5nM或更低,如1nM或更低的亲和力与人EpCAM结合,并以约7.5nM或更低,如1nM或更低的亲和力与食蟹猴EpCAM结合。在一些实施方案中,在两轮淘选后鉴定的亲和力成熟的EpCAM结合分子以约2.5nM或更低的亲和力与人EpCAM结合,并以约3.5nM或更低的亲和力与食蟹猴EpCAM结合。

[0106] 在一些实施方案中,所述EpCAM结合蛋白包含抗原特异性结合域多肽,其特异性结合靶标,如病变细胞上的靶标或支持疾病状态的其他细胞上的靶标,如支持肿瘤生长的基

质细胞上的靶标或支持疾病介导的免疫抑制的免疫细胞上的靶标。在一些实例中,抗原特异性结合域包括抗体、单链抗体、Fab、Fv、T细胞受体结合域、配体结合域、受体结合域、结构域抗体、单结构域抗体、小型抗体 (minibodies)、纳米抗体、肽抗体 (peptibodies) 或各种其他抗体模拟物 (如affimers、affitins、alphabodies、atrimers、基于CTLA4的分子、adnectins、anticalins、基于Kunitz结构域的蛋白质、avimers、knottins、fynomers、darpins、affibodies、affilins、单抗体 (monobodies) 和基于狢狢重复蛋白的蛋白质)。

[0107] 在一些实施方案中,所述EpCAM结合域是抗EpCAM抗体或其抗原结合片段,或EpCAM结合域或其抗原结合片段的抗体变体。如本文所用的,术语“抗体变体”是指本文所述的抗体或抗原结合片段的变体和衍生物。在某些实施方案中,涉及如本文所述的抗EpCAM抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列变体。例如,在某些实施方案中,涉及如本文所述的抗EpCAM抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列变体以改善其结合亲和力和/或其他生物学性质。用于制备氨基酸变体的示例性方法包括但不限于将适当的修饰引入编码抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列中,或者通过肽合成。这类修饰包括,例如,抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或置换。

[0108] 可进行缺失、插入和置换的任意组合以得到最终构建体,条件是最终构建体具有期望的特性,例如抗原结合。在某些实施方案中,提供了具有一个或多个氨基酸置换的变体。用于置换诱变的感兴趣的位点包括CDR和框架区。以下描述了此类置换的实例。可将氨基酸置换引入感兴趣的抗体或其抗原结合片段中,并针对所需活性,例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性、改变的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或改善的T细胞介导的细胞毒性 (TDCC) 来筛选产物。保守和非保守的氨基酸置换均考虑用于制备抗体变体。

[0109] 在用来产生变异抗EpCAM抗体或其抗原结合片段的置换的另一个实例中,亲本抗体的一个或多个高变区残基被置换。通常,之后基于与亲本抗体或其抗原结合片段相比的所需性质的改善,例如,增加的亲和力、降低的亲和力、降低的免疫原性、增加的结合的pH依赖性来选择变体。

[0110] 在一些实施方案中,所述EpCAM结合域是单结构域抗体 (sdAb),如对EpCAM具有特异性的重链可变域 (VH)、美洲驼 (llama) 来源的sdAb的可变域 (VHH)、肽、配体或小分子实体。在一些实施方案中,本文所述的EpCAM结合域是与EpCAM结合的任何结构域,包括但不限于来自单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体的结构域。在某些实施方案中,该EpCAM结合域是单结构域抗体。在其他实施方案中,该EpCAM结合域是肽。在进一步的实施方案中,该EpCAM结合域是小分子。

[0111] 通常,应当注意,本文中以其最广泛的含义使用的术语单结构域抗体不限于特定的生物学来源或特定的制备方法。单结构域抗体是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、衍生自常规4链抗体的单结构域抗体、工程抗体以及与衍生自抗体的那些不同的单结构域支架。单结构域抗体可以是本领域的任何单结构域抗体,或任何未来的单结构域抗体。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、美洲驼、山羊、兔、牛。例如,在一些实施方案中,通过以下方法获得本公开的单结构域抗体: (1) 通过分离天然存在的重链抗体的VHH结构域; (2) 通过表达编码天然存在的VHH结构域的核苷酸序列; (3) 通过天然存在的VHH结构域的“人源化”或通过表达编码这样的人源化VHH结构域的核酸; (4) 通过来自任何动物物种,特别是来自哺乳

动物物种,如来自人类的天然存在的VH结构域的“骆驼化”,或通过表达编码这样的骆驼化VH结构域的核酸;(5)通过“结构域抗体”或“Dab”的“骆驼化”,或通过表达编码这样的骆驼化VH结构域的核酸;(6)通过使用合成或半合成技术制备蛋白质、多肽或其他氨基酸序列;(7)通过使用本领域已知的核酸合成技术制备编码单结构域抗体的核酸,然后表达由此获得的核酸;以及/或者(8)通过前述一种或多种的任意组合。

[0112] 在一个实施方案中,单结构域抗体对应于针对EpCAM的天然存在的重链抗体的VHH结构域。如本文进一步描述的,这样的VHH序列通常可以通过以下方法来生成或获得:用EpCAM适当地免疫美洲驼物种(即,以产生针对EpCAM的免疫应答和/或重链抗体),获得来自所述美洲驼的合适的生物样品(如血液样品、血清样品或B细胞样品),并使用本领域已知的任何合适技术从所述样品开始生成针对EpCAM的VHH序列。

[0113] 在另一个实施方案中,这类天然存在的针对EpCAM的VHH结构域从骆驼科VHH序列的幼稚文库获得,例如通过使用本领域已知的一种或多种筛选技术使用EpCAM或其至少一个部分、片段、抗原决定簇或表位筛查这样的文库。这类文库和技术例如在WO 99/37681、WO 01/90190、WO 03/025020和WO 03/035694中描述。或者,使用衍生自幼稚VHH文库的改进的合成或半合成文库,如通过诸如随机诱变和/或CDR改组等技术从幼稚VHH文库获得的VHH文库,例如WO 00/43507所述。

[0114] 在进一步的实施方案中,又一种获得针对EpCAM的VHH序列的技术涉及适当地免疫能够表达重链抗体的转基因哺乳动物(即,以产生针对EpCAM的免疫应答和/或重链抗体),从所述转基因哺乳动物获得合适的生物样品(如血液样品、血清样品或B细胞样品),然后使用本领域已知的任何合适技术从所述样品开始生成针对EpCAM的VHH序列。例如,为此目的,可以使用表达重链抗体的大鼠或小鼠以及在WO 02/085945和WO 04/049794中描述的其他方法和技术。

[0115] 在一些实施方案中,本公开的抗EpCAM单结构域抗体包括单结构域抗体,其具有对应于非人抗体和/或天然存在的VHH结构域例如美洲驼抗EpCAM抗体的氨基酸序列的氨基酸序列,但是已经“人源化”,即通过用存在于来自人类的常规4链抗体(例如,如上所述)的VH结构域中相应位置处的一个或多个氨基酸残基替换所述非人抗EpCAM和/或天然存在的VHH序列(特别是框架序列中)的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基。这可以按本领域已知的方式进行,该方式对于本领域技术人员将会是显而易见的,例如基于本文的进一步描述。此外,应当注意,本公开的此类人源化抗EpCAM单结构域抗体以本质上已知的任何合适的方式获得(即,如以上(1)-(8)点所示),因此不严格限于使用包含天然存在的VHH结构域的多肽作为起始材料获得的多肽。在一些另外的实施方案中,如本文所述的单结构域抗EpCAM抗体包括单结构域抗体,其具有对应于天然存在的VH结构域的氨基酸序列的氨基酸序列,但是已经“骆驼化”,即通过用存在于重链抗体的VHH结构域中的相应位置处的一个或多个氨基酸残基替换来自常规4链抗体的天然存在的VH结构域的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基。此类“骆驼化”置换优选地在形成VH-VL界面和/或存在于VH-VL界面处的氨基酸位置处以及/或者在所谓的骆驼科标志残基处插入。参见,例如,WO 94/04678,以及Davies和Riechmann(1994和1996)。优选地,用作生成或设计骆驼化单结构域的起始材料或起始点的VH序列优选地是来自哺乳动物的VH序列,更优选地是人类的VH序列,如VH3序列。然而,应当注意,在某些实施方案中,本公开的此类骆驼化抗EpCAM单结构域抗体以本领域已知的任何

合适的方式获得(即,如以上(1)-(8)点所示),因此不严格限于使用包含非人抗EpCAM抗体和/或天然存在的VH结构域的多肽作为起始材料获得的多肽。例如,如本文进一步描述的,“人源化”和“骆驼化”均通过分别提供编码天然存在的VHH结构域或VH结构域的核苷酸序列,然后分别以新核苷酸序列编码“人源化”或“骆驼化”单结构域抗体的方式改变所述核苷酸序列中的一个或多个密码子来进行。然后可以表达该核酸,以提供本公开的期望的抗EpCAM单结构域抗体。或者,在其他实施方案中,分别基于天然存在的VHH结构域或VH结构域的氨基酸序列,分别设计本公开的期望的人源化或骆驼化抗EpCAM单结构域抗体的氨基酸序列,然后使用已知的肽合成技术从头合成。在一些实施方案中,分别基于天然存在的VHH结构域或VH结构域的氨基酸序列或核苷酸序列,分别设计编码本公开的期望的人源化或骆驼化抗EpCAM单结构域抗体的核苷酸序列,然后使用已知的核酸合成技术从头合成,之后使用已知的表达技术表达由此获得的核酸,以提供本公开的期望的抗EpCAM单结构域抗体。

[0116] 用于从天然存在的VH序列或VHH序列开始获得本公开的抗EpCAM单结构域抗体和/或编码该抗BCMA单结构域抗体的核酸的其他合适方法和技术包括例如以合适的方式组合一个或多个天然存在的VH序列(诸如一个或多个框架(FR)序列和/或互补决定区(CDR)序列)的一个或多个部分、一个或多个天然存在的VHH序列(诸如一个或多个FR序列或CDR序列)的一个或多个部分以及/或者一个或多个合成或半合成序列,以提供本公开的抗EpCAM单结构域抗体或编码该抗BCMA单结构域抗体的核苷酸序列或核酸。

[0117] 在一些实施方案中,所述EpCAM结合域是抗EpCAM特异性抗体,其包含重链可变互补决定区CDR1、重链可变CDR2、重链可变CDR3、轻链可变CDR1、轻链可变CDR2和轻链可变CDR3。在一些实施方案中,该EpCAM结合域包含与EpCAM结合的任何结构域,包括但不限于来自以下的结构域:单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体,或者抗原结合片段如单结构域抗体(sdAb)、Fab、Fab'、F(ab)2和Fv片段,由一个或多个CDR组成的片段,单链抗体(例如,单链Fv片段(scFv)),二硫键稳定的Fv(dsFv)片段,异缀合抗体(例如,双特异性抗体),pFv片段,重链单体或二聚体,轻链单体或二聚体,以及由一条重链和一条轻链组成的二聚体。在一些实施方案中,该EpCAM结合域为单结构域抗体。在一些实施方案中,抗EpCAM单结构域抗体包含重链可变互补决定区(CDR),CDR1、CDR2和CDR3。

[0118] 在一些实施方案中,所述EpCAM结合域是包含氨基酸序列的多肽,该氨基酸序列由三个互补决定区/序列中断的四个框架区/序列(f1-f4)组成,如下式所示:f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4,其中r1、r2和r3分别是互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,并且f1、f2、f3和f4是框架残基。本公开的EpCAM结合蛋白的框架残基包含例如75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93或94个氨基酸残基,并且互补决定区包含例如24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35或36个氨基酸残基。在一些实施方案中,该EpCAM结合域包含选自SEQ ID NO:1-38、207-209和496-497的氨基酸序列。

[0119] 在一些实施方案中,本文所述的结合蛋白包含具有选自SEQ ID No.1-38的序列、其子序列及其变体的多肽。在一些实施方案中,所述EpCAM结合蛋白与选自SEQ ID No.1-38的序列、其子序列及其变体具有至少70%-95%或更高的同源性。在一些实施方案中,所述EpCAM结合蛋白与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列、其子序列及其变体具有至少60%、61%、62%、63%、63%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同源性。在一些实施方案中,所述EpCAM结合蛋

白与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列、其子序列及其变体具有至少70%-95%或更高的同一性。在一些实施方案中,所述EpCAM结合蛋白与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的序列、其子序列及其变体具有至少60%、61%、62%、63%、63%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性。

[0120] 在一些实施方案中,所述CDR1包含如SEQ ID No.39-76中任一所示的氨基酸序列或与选自SEQ ID No.39-76的序列相比包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,所述CDR2包含如SEQ ID No.77-114中任一所示的序列或与选自SEQ ID No.77-114的序列相比包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,所述CDR3包含如SEQ ID No.115-152中任一所示的序列或与选自SEQ ID No.115-152的序列相比包含一个或多个置换的序列。

[0121] 在各个实施方案中,本公开的EpCAM结合域与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的氨基酸序列至少约60%、约61%、至少约62%、约63%、约64%、约65%、约66%、约67%、约68%、约69%、约70%、约71%、约72%、约73%、约74%、约75%、约76%、约77%、约78%、约79%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同。

[0122] 在各个实施方案中,本公开的EpCAM结合域的互补决定区与SEQ ID No.39-76所示的氨基酸序列至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同。

[0123] 在各个实施方案中,本公开的EpCAM结合域的互补决定区与SEQ ID No.77-114所示的氨基酸序列至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同。

在各个实施方案中,本公开的EpCAM结合域的互补决定区与SEQ ID No.115-152所示的氨基酸序列至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同。

[0124] 在一些实施方案中,所述EpCAM结合蛋白对人、食蟹猴和小鼠EpCAM具有交叉反应性。在一些实施方案中,该EpCAM结合域对人EpCAM是特异性的。在某些实施方案中,本文公开的EpCAM结合域以人Kd (hKd) 与人EpCAM结合。在某些实施方案中,本文公开的EpCAM结合域以食蟹猴Kd (cKd) 与食蟹猴EpCAM结合。在某些实施方案中,本文公开的EpCAM结合域以小鼠Kd (mKd) 与食蟹猴EpCAM结合。在某些实施方案中,本文公开的EpCAM结合域分别以食蟹猴Kd (cKd) 和人Kd (hKd) 与食蟹猴EpCAM和人EpCAM结合。在某些实施方案中,本文公开的EpCAM结合域分别以食蟹猴Kd (cKd)、小鼠Kd (mKd) 和人Kd (hKd) 与食蟹猴EpCAM、小鼠EpCAM和人EpCAM结合。在一些实施方案中,该EpCAM结合蛋白质以相当的结合亲和力(即,hKd、mKd和cKd值相差不超过 $\pm 10\%$)与人、小鼠和食蟹猴EpCAM结合。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.001nM至约500nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约

0.001nM至约450nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.001nM至约400nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.001nM至约350nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.001nM至约300nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.001nM至约250nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.001nM至约200nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.001nM至约150nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.1nM至约90nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.2nM至约80nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.3nM至约70nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.4nM至约50nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.5nM至约30nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.6nM至约10nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.7nM至约8nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.8nM至约6nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约0.9nM至约4nM的范围内。在一些实施方案中,所述hKd、mKd和cKd在约1nM至约2nM的范围内。

[0125] 在一些实施方案中,任何前述EpCAM结合域(例如,SEQ ID NO:1-38的抗EpCAM单结构域抗体)是为了易于纯化而标记的亲肽。在一些实施方案中,亲肽标签是六个连续的组氨酸残基,也称为6X-his (SEQ ID No.377)。

[0126] 在某些实施方案中,本公开的EpCAM结合域相对于可溶性EpCAM优先结合膜结合的EpCAM。膜结合的EpCAM是指在表达EpCAM的细胞的细胞膜表面之中或之上存在EpCAM。可溶性EpCAM是指不再存在于正表达或已表达EpCAM的细胞的细胞膜表面之中或之上的EpCAM。在某些情况下,可溶性EpCAM存在于受试者的血液和/或淋巴循环中。在一个实施方案中,所述EpCAM结合域与膜结合的EpCAM的结合至少是与可溶性EpCAM的结合的5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、100倍、500倍或1000倍。在一个实施方案中,本公开的抗原结合蛋白优先结合膜结合的EpCAM,是与可溶性EpCAM的结合的30倍。使用结合测定可以容易地确定抗原结合蛋白与膜结合的EpCAM相对于可溶性EpCAM的优先结合。

[0127] 在一些实施方案中,考虑到所述EpCAM结合蛋白相当小,并且在一些实施方案中不大于25kDa、不大于20kDa、不大于15kDa或不大于10kDa。在某些情况下,所述EpCAM结合蛋白如果是肽或小分子实体,则为5kDa或更小。

[0128] 在其他实施方案中,本文所述的EpCAM结合蛋白包含针对EpCAM的小分子实体(SME)结合物。SME结合物是大小平均为约500Da至2000Da的小分子,并且通过已知方法如分选酶连接或缀合而附接至EpCAM结合蛋白上。在这些情况下,EpCAM结合蛋白包含含有分选酶识别序列如LPETG (SEQ ID No.376)的结构域。为了将SME结合物附接至包含分选酶识别序列的EpCAM结合蛋白上,将该蛋白质与分选酶和SME结合物一起孵育,从而分选酶将SME结合物附接至该识别序列上。在另外其他的实施方案中,本文所述的EpCAM结合蛋白包含用于结合EpCAM的knottin肽。Knottin是具有半胱氨酸结支架(knot scaffold)的二硫键稳定的肽,并且具有约3.5kDa的平均大小。已预期Knottin与某些肿瘤分子如EpCAM结合。在进一步的实施方案中,本文所述的EPCAM结合蛋白包含天然EpCAM配体。

[0129] 在一些实施方案中,所述EpCAM结合蛋白包含超过一个结构域,并且是具有结构域柔性连接的单多肽设计。这允许容易地产生并制备EpCAM结合蛋白,因为它们可以由易于引

入载体中的单个cDNA分子编码。另外,在本文所述的EpCAM结合蛋白是单体单多肽链的一些实施方案中,不存在链配对问题或不需要二聚化。预期在这样的实施方案中,本文所述的EpCAM结合蛋白具有降低的聚集趋势。

[0130] 在包含超过一个结构域的EpCAM结合蛋白中,这些结构域通过一个或多个内部连接体连接。在某些实施方案中,内部连接体是“短的”,即,由0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11个或12个氨基酸残基组成。因此,在某些实例中,该内部连接体由约12个或更少的氨基酸残基组成。在0个氨基酸残基的情况下,该内部连接体为肽键。在某些实施方案中,内部连接体是“长的”,即,由15、20或25个氨基酸残基组成。在一些实施方案中,内部连接体由约3个至约15个,例如8、9或10个连续氨基酸残基组成。关于内部连接体的氨基酸组成,选择具有以下性质的肽,即,能赋予该EpCAM结合蛋白柔性,不干扰结合域,以及抵抗蛋白酶切割。例如,甘氨酸和丝氨酸残基通常提供蛋白酶抗性。适合于连接EpCAM结合蛋白中结构域的内部连接体的实例包括但不限于(GS)_n(SEQ ID No.365)、(GGS)_n(SEQ ID No.366)、(GGGS)_n(SEQ ID No.367)、(GGSG)_n(SEQ ID No.368)、(GGSGG)_n(SEQ ID No.369)、(GGGGS)_n(SEQ ID No.370)、(GGGGG)_n(SEQ ID No.371)或(GGG)_n(SEQ ID No.372),其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一个实施方案中,该连接体是(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS)(SEQ ID No.373)、(GGGGSGGGGSGGGGS)(SEQ ID No.374)或(GGGGSGGGGS)(SEQ ID No.375)。

[0131] 在EpCAM结合蛋白包含一个以上的结构域的一些情况下,使用酶促位点特异性缀合方法缀合方法缀合EpCAM结合蛋白内的结构域,该方法涉及使用哺乳动物或细菌转谷氨酰胺酶。微生物转谷氨酰胺酶(mTG)是现代研究和生物技术中的多功能工具。大量的相对较纯的酶的可获得性、易用性以及钙和鸟嘌呤-5'-三磷酸(GTP)的调节缺乏使mTG成为食品工业和生物技术中使用的主要交联酶。当前,mTG在许多应用中用来将蛋白质和肽附接至小分子、聚合物、表面、DNA以及其他蛋白质上。参见,例如,Pavel Strp,Veracity of microbial transglutaminase,Bioconjugate Chem.25,5,855-862。

[0132] 在一些实例中提供了包含超过一个结构域的EpCAM结合蛋白,其中结构域之一在恒定区中包含受体谷氨酰胺,然后其可以通过基于赖氨酸的连接体(例如,作为TGase底物的任何伯胺链,例如包含烷基胺、草胺(oxoamine))与另一结构域缀合,其中该缀合仅发生在抗原结合位点外部(例如,可变区的外部,恒定区中)的靶向部分中存在的一个或多个受体谷氨酰胺残基上。因此,缀合不发生在可变区内的谷氨酰胺上,例如至少部分表面暴露的谷氨酰胺上。在一些实例中,EpCAM结合蛋白通过在TGase的存在下使结构域之一与基于赖氨酸的连接体反应而形成。

[0133] 在EpCAM结合蛋白内的一个或多个结构域直接连接的一些实施方案中,制备杂合载体,其中编码直接连接的结构域的DNA本身直接相互连接。在使用连接体的一些实施方案中,制备杂合载体,其中编码一个结构域的DNA与编码连接体部分的一个末端的DNA连接,并且编码另一结构域的DNA与连接体部分的另一末端连接。

[0134] 在一些实施方案中,所述EpCAM结合蛋白是单链可变片段(scFv)、单结构域抗体,如重链可变域(VH)、轻链可变域(VL)和骆驼科来源的单结构域抗体的可变域(VHH)。在其他实施方案中,该EpCAM结合蛋白为非Ig结合域,即,抗体模拟物,如anticalins、affilins、affibody分子、affimers、affitins、alphabodies、avimers、DARpins、fynomers、kunitz结构域肽和单抗体(monobodies)。在进一步的实施方案中,该EpCAM结合蛋白为与EpCAM结合

或缔合的配体或肽。在更进一步的实施方案中,该EpCAM结合蛋白是knottin。在更进一步的实施方案中,EpCAM的结合域为小分子实体。

[0135] 在某些实施方案中,可以将根据本公开的EpCAM结合蛋白并入靶向EpCAM的三特异性蛋白中。在一些实施方案中,根据本公开内容,所述三特异性蛋白包含CD3结合域、半衰期延长结构域和EpCAM结合域。在一些实施方案中,该EpCAM结合三特异性蛋白包含三特异性抗体。

多特异性EpCAM靶向蛋白,如靶向EpCAM的三特异性蛋白(本文也称为EpCAM靶向TriTAC蛋白或分子)

[0136] 在一个方面,本文描述了包含根据本公开的EpCAM结合蛋白的多特异性或多价蛋白。在一些实施方案中,该多特异性蛋白进一步包含与CD3特异性结合的结构域。在一些实施方案中,该多特异性蛋白进一步包含与人CD3特异性结合的结构域。在一些实施方案中,该多特异性蛋白进一步包含与CD3- γ 特异性结合的结构域。在一些实施方案中,该多特异性蛋白进一步包含与CD3- δ 特异性结合的结构域。在一些实施方案中,该多特异性蛋白进一步包含与CD3- ϵ 特异性结合的结构域。

[0137] 在另外的实施方案中,该多特异性蛋白进一步包含与T细胞受体(TCR)特异性结合的结构域。在一些实施方案中,该多特异性蛋白进一步包含与TCR的 α 链特异性结合的结构域。在一些实施方案中,该多特异性蛋白进一步包含与TCR的 β 链特异性结合的结构域。

[0138] 在某些实施方案中,所述多特异性蛋白的CD3结合域不仅表现出对于人CD3的有效CD3结合亲和力,而且还显示出与各自的食蟹猴CD3蛋白的优异的交叉反应性。在一些实例中,所述多特异性蛋白的CD3结合域与来自食蟹猴的CD3交叉反应。在某些实例中,CD3结合的人:食蟹猴KD(hKd:cKd)比为20:1至1:2。

[0139] 在一些实施方案中,所述多特异性蛋白的CD3结合域是与CD3结合的任何结构域,包括但不限于来自以下的结构域:单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体,或者CD3结合抗体的抗原结合片段如单结构域抗体(sdAb)、Fab、F(ab')₂和Fv片段,由一个或多个CDR组成的片段,单链抗体(例如,单链Fv片段(scFv)),二硫键稳定的Fv(dsFv)片段,异缀合抗体(例如,双特异性抗体),pFv片段,重链单体或二聚体,轻链单体或二聚体,以及由一条重链和一条轻链组成的二聚体。在一些情况下,CD3结合域来源于包含本文所述单结构域血清白蛋白结合蛋白的多特异性蛋白最终将在其中使用的相同物种是有益的。例如,对于人用而言,包含本文所述EpCAM结合蛋白的多特异性蛋白的CD3结合域包含来自抗体或抗体片段的抗原结合域的人或人源化残基可能是有益的。本公开的多特异性(例如,三特异性)EpCAM靶向TriTAC蛋白的CD3结合域的示例性氨基酸序列被提供为SEQ ID No.379,或与SEQ ID No.379至少约75%至100%相同,如与SEQ ID No.379至少约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%相同的序列。

[0140] 在一些实施方案中,包含如本文所述的EpCAM结合蛋白的多特异性蛋白的血清白蛋白结合域(本文也称为半衰期延长结构域)可以是与血清白蛋白结合的任何结构域,包括但不限于来自单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体的结构域。在一些实施方案中,该血清白蛋白结合域是单链可变片段(scFv),单结构域抗体如重链可变域(VH)、轻链可变域(VL)和骆驼科动物衍生的sdAb的可变域(VHH),或HSA结合抗体的抗原结合片

段,如Fab、F(ab')₂和Fv片段,由一个或多个CDR组成的片段,单链抗体(例如,单链Fv片段(scFv)),二硫键稳定的(dsFv)Fv片段,异缀合抗体(例如,双特异性抗体),pFv片段,重链单体或二聚体,轻链单体或二聚体,以及由一条重链和一条轻链组成的二聚体,肽,配体,或对血清白蛋白具有特异性的小分子实体。在某些实施方案中,该HSA结合域是单结构域抗体。在其他实施方案中,该血清白蛋白结合域是肽。在进一步的实施方案中,该血清白蛋白结合域是小分子。在一些实施方案中,预期包含单链可变片段CD3结合蛋白的多特异性结合蛋白的血清白蛋白结合域相当小,并且不超过25kD、不超过20kD、不超过15kD或不超过10kD。在某些实例中,该血清白蛋白结合域如果是肽或小分子实体,则为5kD或更小。本公开的多特异性(例如,三特异性)EpCAM靶向TriTAC蛋白的血清白蛋白结合域的示例性氨基酸序列被提供为SEQ ID No.378,或与SEQ ID No.378至少约75%至100%相同,如与SEQ ID No.378至少约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%相同的序列。

[0141] 包含单链可变片段CD3结合蛋白的如本文所述的多特异性结合蛋白的半衰期延长结构域导致该单链可变片段CD3结合蛋白本身的药效学和药代动力学改变。如上所述,半衰期延长结构域延长消除半衰期。半衰期延长结构域还改变药效学性质,包括单链可变片段CD3结合蛋白的组织分布、穿透和扩散的改变。在一些实施方案中,与没有半衰期延长结构域的蛋白质相比,半衰期延长结构域提供改善的组织(包括肿瘤)靶向、组织分布、组织穿透、组织内的扩散和增强的功效。在一个实施方案中,治疗方法有效且高效地利用减少量的包含单链可变片段CD3结合蛋白的多特异性结合蛋白,从而导致副作用减小,例如脱靶如非肿瘤细胞的细胞毒性降低。

[0142] 此外,在一些实施方案中,选择半衰期延长结构域的结合亲和力,以便针对如本文所述的包含EpCAM结合蛋白的特定多特异性结合蛋白中的特定消除半衰期。因此,在一些实施方案中,该半衰期延长结构域具有高结合亲和力。在其他实施方案中,该半衰期延长结构域具有中等结合亲和力。在另外其他的实施方案中,该半衰期延长结构域具有低或微小的结合亲和力。示例性的结合亲和力包括10nM或更低(高)、10nM至100nM(中等)和大于100nM(低)的K_d。如上所述,通过已知方法如表面等离子体共振(SPR)测定与血清白蛋白的结合亲和力。

[0143] 在某些实施方案中,本公开的靶向EpCAM的多特异性蛋白包含(A)与CD3结合的第一结构域;(B)作为半衰期延长结构域的第二结构域;和(C)作为本文所述的EpCAM结合蛋白的第三结构域。在某些实施方案中,第一结构域包含特异性结合CD3的scFv。例如,该CD3是人CD3蛋白。在某些实施方案中,第二结构域包含特异性结合大体积血清蛋白的sdAb。在一些情况下,该大体积血清蛋白是白蛋白,如血清白蛋白,如人血清白蛋白。

[0144] 在一些实施方案中,结构域(A)、(B)和(C)通过连接体L1和L2以如下任一方向连接:H₂N-(A)-L1-(C)-L2-(B)-COOH、H₂N-(B)-L1-(A)-L2-(C)-COOH、H₂N-(C)-L1-(B)-L2-(A)-COOH、H₂N-(C)-L1-(A)-L2-(B)-COOH、H₂N-(A)-L1-(B)-(C)-L2-COOH或H₂N-(B)-(C)-(A)-COOH。

[0145] 在一些实施方案中,本公开的靶向EpCAM的多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.153-206和210-212的序列至少约70%至约100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的靶向EpCAM的多特异性蛋白包含与选自SEQ ID No.153-206和210-212的序列

至少约70%、至少约75%、至少约76%、至少约77%、约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%至约100%相同的氨基酸序列。

条件活性多特异性EpCAM靶向蛋白,如条件活性EpCAM靶向三特异性蛋白(本文也称为EpCAM靶向ProTriTAC或前三特异性蛋白或分子)

[0146] 本公开的一个实施方案提供了包含本文公开的EpCAM结合域的条件活性多特异性蛋白(例如,在一些实施方案中,本公开提供了包含本公开的EpCAM结合域的EpCAM靶向前三特异性/ProTriTAC蛋白)。

[0147] 在一些实施方案中,条件活性多特异性蛋白进一步包含与CD3特异性结合的结构域和与大体血清蛋白如人血清白蛋白特异性结合的结合部分。在一些实施方案中,该结合部分能够掩蔽EpCAM结合域或CD3结合域与其靶标的相互作用。在一些实施方案中,本公开的结合部分包含掩蔽部分和可切割连接体,如蛋白酶可切割连接体。结合部分内的掩蔽部分的示例性序列提供于SEQ ID No.380-424中,或相对于选自SEQ ID No.380-424的序列包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,该结合部分包含修饰的非CDR环序列和可切割连接体。在一些实施方案中,该可切割连接体包含选自SEQ ID No.425-471、503-506、508-550和581的序列,或相对于选自SEQ ID No.425-471、503-506、508-550和581的序列包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,该掩蔽部分包含修饰的非CDR环序列和不可切割连接体。在一些实施方案中,该不可切割的连接体包含如SEQ ID No.507所示的序列,或相对于SEQ ID No.507包含一个或多个置换的序列。在一些实施方案中,结合部分包含与选自SEQ ID No.472-473和482-483的序列至少约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的序列。在一些实施方案中,本公开的EpCAM ProTriTAC的CD3结合域包含与SEQ ID No.474至少约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的序列。

[0148] 在一些实施方案中,本公开的EpCAM靶向ProTriTAC从N末端到C末端包含结合部分、可切割连接体、CD3结合域和在C末端上的抗EpCAM结合域,该结合部分是抗ALB结构域,其包含具有针对CD3结合域(例如,具有SEQ ID No.474或与其至少约75%相同的序列的CD3结合域)的结合位点的非CDR环。在一些实施方案中,ProTriTAC的EpCAM结合域与选自SEQ ID No.1-38、207-209和496-497的氨基酸序列至少约60%、约61%、至少约62%、约63%、约64%、约65%、约66%、约67%、约68%、约69%、约70%、约71%、约72%、约73%、约74%、约75%、约76%、约77%、约78%、约79%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同。

[0149] 在一些实施方案中,本公开的EpCAM靶向ProTriTAC包含与选自SEQ ID No.495、498、499、500、502、569、570、572、573、575、576、577和578的序列至少约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的EpCAM靶向ProTriTAC包含如SEQ ID No.576所示的氨基酸序列,包含其的药物组合物,以及使用其治疗疾病如本文所述的肿

瘤性疾病的方法。

[0150] 在一些实施方案中,作为不可切割的前药形式,本公开的EpCAM靶向ProTriTAC包含与选自SEQ ID No.495和502的序列至少约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列。

[0151] 如本文所述的活性EpCAM靶向药物(CT)的示例性序列是与SEQ ID No.153-179、180-206、210-212、494、571和574至少约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的序列。

[0152] 所述结合部分能够通过空间掩蔽和特异性掩蔽两者协同扩大条件活性EpCAM靶向前三特异性蛋白的治疗窗。在一些实施方案中,该结合部分将空间掩蔽(例如,通过与大体积血清白蛋白结合)和特异性掩蔽(例如,通过非CDR环与抗EpCAM结构域或抗CD3 scFv结构域的CDR结合)组合起来。在一些情况下,修饰该结合部分内的非CDR环不影响白蛋白结合。在一些情况下,蛋白酶可切割连接体能够在单个蛋白水解事件中激活靶向EpCAM的前三特异性蛋白,从而允许在肿瘤微环境中更有效地转化前三特异性分子。此外,在一些情况下,肿瘤相关蛋白水解激活显露出在激活后具有最小肿瘤外活性的活性T细胞接合物。在一些实施方案中,本公开提供了半衰期延长的T细胞接合物形式(ProTriTAC),其包含本文所述的EpCAM结合部分,在一些情况下,其代表用来工程改造条件活性T细胞接合物的新的改进方法。

[0153] 在一些实施方案中,通过使用如上所述的结合部分(其充当安全开关,该安全开关将前(pro)形式的多特异性蛋白保持在惰性状态,直到其到达肿瘤微环境,在其中通过连接体的切割而被条件地激活并能够结合其靶抗原),延长了条件活性前三特异性形式的EpCAM结合域在体循环中的半衰期。在某些情况下,安全开关具有若干优点;一些实例包括(i)扩大条件活性EpCAM靶向蛋白的治疗窗;(ii)通过将条件活性EpCAM靶向蛋白维持在体循环中来减少靶标介导的药物处置;(iii)降低不希望的活化蛋白质在体循环中的浓度,从而使化学、制备和控制相关的杂质的扩散最小化,所述杂质例如是预活化的药物产品,内源性病毒、宿主细胞蛋白质、DNA、浸出物、消泡剂、抗生素、毒素、溶剂、重金属;(iv)降低不希望的活化蛋白质在体循环中的浓度,从而使与产品相关的杂质、聚集体、分解产物、由于以下原因导致的产物变体的扩散最小化:氧化,脱酰胺,变性,MAb中的C末端Lys丢失;(v)防止在循环中的异常激活;(vi)减少与活化种类从病变组织或其他病理生理学状况(例如肿瘤、自身免疫病、炎症、病毒感染、组织重塑事件(如心肌梗死、皮肤伤口愈合)或外部损伤(如X射线、CT扫描、UV暴露))泄漏相关的毒性;以及(vii)减少条件活性EpCAM靶向蛋白的非特异性结合。此外,在安全开关激活后,或者换句话说,在其断裂后,条件活性EpCAM靶向蛋白与安全开关分离,从而提供延长的半衰期,因此从循环中清除。例如,如果药物在肿瘤环境之外无意中被激活,或者在激活后从肿瘤环境中泄漏出来,它可能被迅速清除,而不太可能对正常组织造成损害,因而降低了毒性。

[0154] 在一些实施方案中,与不具有条件活性但有组成型活性的EpCAM结合蛋白相比,本文所述的条件活性多特异性EpCAM结合蛋白具有改善的治疗指数。例如,在一些实施方案中,EpCAM ProTriTAC具有比EpCAM TriTAC增加的治疗指数。在一些实施方案中,治疗指数的增加为至少约2倍至约1000倍,例如约4倍至约800倍、约6倍至约800倍、约6倍至约600倍、

约10倍至约400倍、约20倍至约200倍、约30倍至约150倍、约50倍至约100倍。在一些实施方案中,治疗指数的增加归因于EpCAM结合域与如上所述的结合部分采用非CDR环和可切割连接体的缀合。

[0155] 在一些实施方案中,“治疗指数”(TI)(也称为“治疗窗”)是治疗剂(例如,EpCAM TriTAC、EpCAM ProTriTAC、EpCAM CAR、EpCAM ProCAR)导致治疗效果(例如,用上述治疗剂治疗的患有表达EpCAM的癌症的患者的存活率提高)的最小量与最小耐受剂量的比较。ProTriTAC的治疗指数扩大的示例在表14中示出。在一些情况下,治疗指数的改善表现为在T细胞介导的癌细胞杀伤方面,与EpCAM ProTriTAC相比,EpCAM TriTAC的 EC_{50} 的改善。

[0156] 在一些实施方案中,条件活性EpCAM靶向蛋白形式赋予EpCAM结合域显著更长的血清半衰期,并降低其在循环中不期望的活化的可能性,从而产生“生物上更好的”形式。

[0157] 如本文所述的结合部分包含至少一个非CDR环。在一些实施方案中,非CDR环提供用于结合部分与本公开的EpCAM结合域的结合的结合位点。在一些情况下,该结合部分例如通过空间阻塞、通过特定分子间相互作用或两者的组合来掩蔽EpCAM结合域与其靶抗原的结合。

[0158] 在一些实施方案中,本文所述的结合部分进一步包含互补决定区(CDR),例如,对结合大体积血清蛋白(例如,人血清白蛋白)具有特异性的CDR。在一些情况下,本公开的结合部分是衍生自免疫球蛋白分子(Ig分子)的结构域。Ig可以是任何类别或亚类(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM等)。Ig分子的多肽链折叠成一系列由环连接的平行 β 链。在可变区中,三个环构成确定该分子的抗原结合特异性的“互补决定区”(CDR)。IgG分子包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链或其抗原结合片段。每条重链由重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由CH1、CH2和CH3这三个结构域组成。每条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可进一步细分为超变区,被称为互补决定区(CDR),其序列是高度可变的,并且/或者参与抗原识别和/或通常形成在结构上限定的环,其中散布有更保守的区域,被称为框架区域(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。

[0159] 在一些实施方案中,本公开的结合部分是仅重链的抗体。如图26所示,仅重链抗体的可变域具有以两个折叠排列的几条 β 链。仅重链抗体的可变域包含三个高变环,或互补决定区(CDR)和框架区FR1、FR2、FR3和FR4。可变域的这三个CDR(CDR1、CDR2、CDR3)在 β 桶的一端聚簇。CDR是连接免疫球蛋白折叠的 β 链B-C、C'-C''和F-G的环,而连接免疫球蛋白折叠的 β 链AB、CC'、C''-D和E-F的底部环以及连接免疫球蛋白折叠的D-E链的顶部环是非CDR环。

[0160] 在本公开的一些实施方案中,FR1、FR2、FR3和FR4的至少一些或全部氨基酸序列是本文所述结合部分(如作为仅重链抗体的结合部分)的“非CDR环”的一部分。在本公开的一些实施方案中,恒定域CH1、CH2或CH3的至少一些氨基酸残基是本文所述结合部分的“非CDR环”的一部分。在一些实施方案中,非CDR环包含Ig或Ig样分子的C1-set域的AB、CD、EF和DE环中的一个或多个;Ig或Ig样分子的C2-set域的AB、CC'、EF、FG、BC和EC'环;Ig或Ig样分子的I(中间)-set域的DE、BD、GF、A(A1A2)B和EF环。

[0161] 在可变域内,认为CDR负责抗原识别和结合,而认为FR残基是CDR的支架。然而,在某些情况下,一些FR残基在抗原识别和结合中起重要作用。影响Ag结合的框架区残基分为

两个类别。第一个是与抗原接触的FR残基,因此是结合位点的一部分,并且这些残基中的一些在序列上与CDR接近。其他残基是在序列上远离CDR但在分子的3-D结构(例如重链中的环)中与其接近的残基。

[0162] 在一些实施方案中,对非CDR环进行修饰,以生成对大体积血清蛋白如白蛋白具有特异性的抗原结合位点。在一些实施方案中,对非CDR环进行修饰,以生成对本文所述的EpCAM结合域具有特异性的抗原结合位点。在一些实施方案中,对非CDR环进行修饰,以生成对本文所述的CD3结合域具有特异性的抗原结合位点。

[0163] 预期可以使用各种技术来修饰非CDR环,例如定点诱变、随机诱变、插入至少一个对于非CDR环氨基酸序列而言为外来的氨基酸、氨基酸置换。在一些实例中,将抗原肽插入非CDR环。在一些实例中,用抗原性肽置换非CDR环。在一些情况下,用来生成抗原结合位点的修饰仅在一个非CDR环中。在其他情况下,修饰超过一个非CDR环。例如,该修饰在图26所示的任一个非CDR环中,即AB、CC'、C''D、EF和D-E。在一些情况下,该修饰在DE环中。在其他情况下,该修饰在AB、CC'、C''D、E-F这所有四个环中。

[0164] 在某些实例中,本文所述的结合部分经由其AB、CC'、C''D或EF环与EpCAM结合域结合,并且经由其B-C、C'-C''或F-G环与大体积血清蛋白如白蛋白结合。在某些实例中,该结合部分经由其AB、CC'、C''D和EF环与EpCAM结合域结合,并且经由其BC、C'C''和FG环与大体积血清蛋白如白蛋白结合。在某些实例中,该结合部分经由AB、CC'、C''D和E-F环中的一个或多个与EpCAM结合域结合,并且经由BC、C'C''和FG环中的一个或多个与大体积血清蛋白如白蛋白结合。在某些实例中,该结合部分经由其AB、CC'、C''D或EF环与大体积血清蛋白如白蛋白结合,并且经由其BC、C'C''或FG环与EpCAM结合域结合。在某些实例中,该结合部分经由其AB、CC'、C''D和EF环与大体积血清蛋白如白蛋白结合,并且经由其BC、C'C''和FG环与EpCAM结合域结合。在某些实例中,第一实施方案的结合部分经由AB、CC'、C''D和E-F环中的一个或多个与大体积血清蛋白如白蛋白结合,并且经由BC、C'C''和FG环中的一个或多个与EpCAM结合蛋白结合。在某些实例中,本文所述的结合部分经由其AB、CC'、C''D或EF环与CD3结合域结合,并且经由其B-C、C'-C''或F-G环与大体积血清蛋白如白蛋白结合。在某些实例中,本文所述的结合部分经由其AB、CC'、C''D或EF环与大体积血清蛋白如白蛋白结合,并且经由其B-C、C'-C''或F-G环与CD3结合域结合。在某些实例中,本文所述的结合部分经由其AB、CC'、C''D或EF环与CD3结合域结合,并且经由其B-C、C'-C''或F-G环与EpCAM结合域结合。在某些实例中,本文所述的结合部分经由其AB、CC'、C''D或EF环与EpCAM结合域结合,并且经由其B-C、C'-C''或F-G环与CD3结合域结合。

[0165] 大体积血清蛋白包括,例如,白蛋白、纤维蛋白原或球蛋白。在一些实施方案中,所述结合部分是工程化支架。工程化支架包括,例如,sdAb、scFv、Fab、VHH、III型纤连蛋白结构域、免疫球蛋白样支架(如Halaby等人,1999.Prot Eng 12(7):563-571所提出的)、DARPin、胱氨酸结肽、脂质运载蛋白、三螺旋束支架、蛋白G相关的白蛋白结合模块,或者DNA或RNA适体支架。

[0166] 在一些情况下,所述结合部分包含针对大体积血清蛋白的结合位点。在一些实施方案中,所述结合部分内的CDR提供针对大体积血清蛋白的结合位点。在一些实例中,所述大体积血清蛋白是球蛋白、白蛋白、转铁蛋白、IgG1、IgG2、IgG4、IgG3、IgA单体、因子XIII、纤维蛋白原、IgE或五聚体IgM。在一些实施方案中,所述结合部分包含针对免疫球蛋白轻链

的结合位点。在一些实施方案中,所述CDR提供针对免疫球蛋白轻链的结合位点。在一些实例中,该免疫球蛋白轻链是无Ig κ 的轻链或无Ig λ 的轻链。

[0167] 在另外的实施方案中,所述结合部分是任何种类的多肽。例如,在某些情况下,所述结合部分是天然肽、合成肽或纤连蛋白支架或工程化的大体积血清蛋白。在一些实例中,所述结合部分包含任何类型的结合域,包括但不限于来自单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体的结构域。在一些实施方案中,所述结合部分是单链可变片段(scFv)、可溶性TCR片段、单结构域抗体如重链可变域(VH)、轻链可变域(VL)和骆驼科来源的纳米抗体的可变域(VHH)。在其他实施方案中,所述结合部分是非Ig结合域,即,抗体模拟物,如anticalins、affilins、affibody分子、affimers、affitins、alphabodies、avimers、DARPin、fynomers、kunitz结构域肽和单抗体(monobodies)。

[0168] 本文预期本文所述的结合部分包含至少一个可切割连接体。在一方面,可切割连接体包含具有以序列特异性方式被识别并切割的序列的多肽。在一些情况下,本文所述的结合部分包含以序列特异性方式识别并切割的蛋白酶可切割连接体。在一些实施方案中,该蛋白酶可切割连接体被基质金属蛋白酶(MMP),例如MMP9以序列特异性方式识别。在一些情况下,该蛋白酶可切割连接体被MMP9识别,包含具有氨基酸序列PR(S/T)(L/I)(S/T)的多肽。在一些情况下,被MMP9识别的蛋白酶可切割连接体包含具有氨基酸序列LEATA的多肽。在一些情况下,蛋白酶可切割连接体被MMP11以序列特异性方式识别。

[0169] 蛋白酶是在一些情况下以序列特异性方式切割蛋白质的蛋白质。蛋白酶包括但不限于丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、天冬酰胺肽裂合酶、血清蛋白酶、组织蛋白酶、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、激肽释放酶、hK1、hK10、hK15、纤溶酶、胶原酶、IV型胶原酶、溶基质蛋白酶、因子Xa、胰凝乳蛋白酶样蛋白酶、胰蛋白酶样蛋白酶、弹性蛋白酶样蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶、猕猴桃蛋白酶、菠萝蛋白酶、钙蛋白酶、胱天蛋白酶、胱天蛋白酶-3、Mir1-CP、木瓜蛋白酶、HIV-1蛋白酶、HSV蛋白酶、CMV蛋白酶、凝乳酶、肾素、胃蛋白酶、蛋白裂解酶、豆类蛋白、疟原虫天冬氨酸蛋白酶、nepenthesin、金属外肽酶、金属内肽酶、基质金属蛋白酶(MMP)、MMP1、MMP2、MMP3、MMP8、MMP9、MMP13、MMP11、MMP14、尿激酶纤溶酶原激活物(uPA)、肠激酶、前列腺特异性靶标(PSA, hK3)、白介素-1 β 转化酶、凝血酶、FAP(FAP- α)、二肽基肽酶和二肽基肽酶IV(DPPIV/CD26)。

[0170] 表1:示例性蛋白酶和蛋白酶识别序列

蛋白酶	切割结构域序列	SEQ ID NO:
MMP7	KRALGLPG	508
MMP7	(DE) ₈ RPLALWRS(DR) ₈	509
MMP9	PR(S/T)(L/I)(S/T)	510
MMP9	LEATA	511
MMP11	GGAANLVRGG	512
MMP14	SGRIGFLRTA	513
MMP	PLGLAG	514
MMP	PLGLAX	515
MMP	PLGC(me)AG	516
MMP	ESPAYYTA	517
MMP	RLQLKL	518
MMP	RLQLKAC	519
MMP2, MMP9, MMP14	EP(Cit)G(Hof)YL	520
尿激酶纤溶酶原激活物(uPA)	SGRSA	521
尿激酶纤溶酶原激活物(uPA)	DAFK	523
尿激酶纤溶酶原激活物(uPA)	GGGRR	524

蛋白酶	切割结构域序列	SEQ ID NO:
溶酶体酶	GFLG	525
溶酶体酶	ALAL	526
溶酶体酶	FK	527
组织蛋白酶 B	NLL	528
组织蛋白酶 D	PIC(Et)FF	529
组织蛋白酶 K	GGPRGLPG	530
前列腺特异性抗原	HSSKLQ	531
前列腺特异性抗原	HSSKLQL	532
前列腺特异性抗原	HSSKLQEDA	533
单纯疱疹病毒蛋白酶	LVLASSSFGY	534
HIV 蛋白酶	GVSQNYPIVG	535
CMV 蛋白酶	GVVQASCRLA	536
凝血酶	F(Pip)RS	537
凝血酶	DPRSFL	538
凝血酶	PPRSFL	539
胱天蛋白酶-3	DEVD	540
胱天蛋白酶-3	DEVDP	541
胱天蛋白酶-3	KGSGDVEG	542
白介素 1 β 转化酶	GWEHDG	543
肠激酶	EDDDDKA	544
FAP	KQEQNPGST	545
激肽释放酶	GKAFRR	546
纤溶酶	DAFK	547
纤溶酶	DVLK	548
纤溶酶	DAFK	549
TOP	ALLLALL	550

[0171] 已知蛋白酶是由某些病变细胞和组织,例如肿瘤或癌细胞分泌的,从而产生富含蛋白酶的微环境或蛋白酶丰富的微环境。在一些情况下,受试者的血液富含蛋白酶。在一些情况下,围绕肿瘤的组织细胞将蛋白酶分泌到肿瘤微环境中。分泌蛋白酶的围绕肿瘤的组织细胞包括但不限于肿瘤基质细胞、肌成纤维细胞、血细胞、肥大细胞、B细胞、NK细胞、调节性T细胞、

巨噬细胞、细胞毒性T淋巴细胞、树突细胞、间充质干细胞、多形核细胞和其他细胞。在一些情况下,蛋白酶存在于受试者的血液中,例如靶向在微生物肽中发现的氨基酸序列的蛋白酶。该特征允许诸如抗原结合蛋白等靶向治疗剂具有额外的特异性,因为除了在靶细胞或组织的富含蛋白酶的微环境中以外,T细胞不会被抗原结合蛋白结合。

[0172] 可在本文所述构建体中使用的连接体的其他非限制性实例在以下序列表中提供。
向嵌合抗原受体(CAR)中的整合

[0173] 在某些实例中,本公开的EpCAM结合蛋白可以并入嵌合抗原受体(CAR)或ProCAR中。工程化的免疫效应细胞,例如T细胞或NK细胞,可以用来表达CAR,该CAR包括含有例如本文所述的抗EpCAM单结构域抗体的抗EpCAM结合蛋白。在一个实施方案中,包括本文所述的EpCAM结合蛋白的CAR经由铰链区连接至跨膜域,并进一步连接至共刺激域,例如,从OX40、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)或4-1BB获得的功能性信号域。在一些实施方案中,该CAR进一步包含编码细胞内信号域如4-1BB和/或CD3 ζ 的序列。包含EpCAM结合域的ProCAR的示例性序列提供于SEQ ID No. 485-491中,或与选自SEQ ID No. 485-491的序列至少约75%至100%,例如约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%相同的序列。

[0174] 本文所述的条件活性受体包含至少一个包含非CDR环的结合部分。在一方面,该结合部分掩蔽EpCAM结合域的结合,直到激活。可切割连接体,例如,包含蛋白酶切割位点或pH依赖性切割位点。在某些情况下,可切割连接体仅在肿瘤微环境中被切割。因此,在一些实例中,与可切割连接体连接并进一步与EpCAM结合域结合的结合部分将EpCAM结合域在循环中维持在惰性状态,直到可切割连接体在肿瘤微环境中被切开。在一些实施方案中,该结合部分与EpCAM结合域结合。在一些实施方案中,非CDR环提供用于所述部分与EpCAM结合域结合的结合位点。在一些实施方案中,该结合部分掩蔽EpCAM结合域与其靶抗原的结合,例如,通过空间阻塞,通过特定分子内相互作用,例如在包含结合部分的多肽的不同结构域内的相互作用。在一些实施方案中,该结合部分进一步包含互补决定区(CDR)。

[0175] 在一些情况下,如上文对应于本公开的条件活性多特异性EpCAM靶向蛋白的部分中所述,如本文所述的CAR或proCAR的结合部分是衍生自免疫球蛋白分子(Ig分子)的结构域。

[0176] 图27显示了本公开的示例可切割条件活性受体的一部分的示意图。该条件活性受体包含EpCAM结合域(aTarget1)、可切割连接体和结合部分(aTarget2)。EpCAM结合域对第一靶标(EpCAM)具有特异性,而结合部分对第二靶标具有特异性。结合部分还具有修饰的非CDR环,其可抑制EpCAM结合域与其靶标的结合。一旦在可切割连接体处被切割,结合部分就可以被释放,从而能够结合EpCAM结合域。

[0177] 图28显示了本公开的示例条件活性受体的激活的示意图。无活性受体(无活性ProCAR)包含通过包含蛋白酶切割位点的连接体连接至结合部分(抗靶标2sdAb)的EpCAM结合域(抗肿瘤靶标sdAb或scFv)。结合部分包含插入一个或多个非CDR环中的掩蔽肽/部分,使得结合部分结合并抑制EpCAM抗原结合域。在一些实施方案中,结合部分对给定靶标具有特异性,如本文别处进一步描述的。受体还包含跨膜域和细胞内信号域。该受体在T细胞(CAR-T)中提供。在暴露于肿瘤环境时,蛋白酶切割位点被肿瘤相关蛋白酶切割,从而激活受体,产生不包含结合部分的活性受体。该受体现在包含活性抗原结合域。当受体被细胞内

化时,产生新的受体,其包含结合部分并且是无活性的。

[0178] 在一些实施方案中,结合部分的可切割连接体包含类似于上文关于包含本公开的EpCAM结合域的条件活性多特异性蛋白所描述的蛋白酶可切割位点。例如,在一些实施方案中,可切割连接体包含选自表1的序列或来自序列表中提供的其他连接体序列的序列。

跨膜域

[0179] 本公开的条件活性嵌合抗原受体、T细胞受体融合蛋白和T细胞受体包含用于插入到真核细胞膜中的跨膜域。在一些实施方案中,跨膜域介于EpCAM结合域与胞内域之间。在一些实施方案中,跨膜域介于EpCAM结合域与共刺激域之间。

[0180] 提供将多肽插入到真核(例如,哺乳动物)细胞的细胞膜中的任何跨膜(TM)域都适合使用。作为一个非限制性实例,可以使用TM序列IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC(SEQ ID NO:551)。合适的TM序列的其他非限制性实例包括:a) CD8 β 衍生的:GLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC(SEQ ID NO:552); b) CD4衍生的:ALIVLGGVAGLLIFIGLGIFFCVRC(SEQ ID NO:553); c) CD3 zeta衍生的:LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV(SEQ ID NO:554); d) CD28衍生的:WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV(SEQ ID NO:555); e) CD134(OX40)衍生的:AAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL(SEQ ID NO:556); 和f) CD7衍生的:ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA(SEQ ID NO:557)。

铰链区

[0181] 在一些情况下,本公开的条件活性嵌合抗原受体、T细胞受体融合蛋白和T细胞受体包含铰链区(本文也称为“间隔区”),其中铰链区介于EpCAM结合域与跨膜域之间。在一些情况下,该铰链区是免疫球蛋白重链铰链区。在一些情况下,该铰链区是衍生自受体的铰链区多肽(例如,CD8衍生的铰链区)。

[0182] 铰链区可具有约4个氨基酸至约50个氨基酸(aa)的长度,例如约4aa至约10aa、约10aa至约15aa、约15aa至约20aa、约20aa至约25aa、约25aa至约30aa、约30aa至约40aa或约40aa至约50aa。

[0183] 合适的间隔区可以容易地选择,并且可以是许多合适长度中的任何一个,例如1个氨基酸(例如Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0184] 示例性间隔区包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)_n、(GSGS)_n和(GGGS)_n,其中n是至少为1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性连接体。可以使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物;Gly和Ser都相对非结构化,因此可以作为组件之间的中性系链。可以使用甘氨酸聚合物;甘氨酸比丙氨酸可接近显著更多的phi-psi空间,并且比具有较长侧链的残基更少受到限制(参见Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992))。示例性间隔区包含氨基酸序列,包括但不限于GGSG、GGSGG、GSSGG、GSGGG、GGGSG、GSSSG等。

[0185] 免疫球蛋白铰链区氨基酸序列是本领域已知的;参见,例如, Tan等人(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:162; 和Huck等人(1986) Nucl. Acids Res. 14:1779。作为非限制性实例,免疫球蛋白铰链区可包括以下氨基酸序列之一:DKTHT;CPPC;CPEPKSCDTPPCPR (SEQ ID NO:558); 参见,例如, Glaser等人(2005) J. Biol. Chem. 280:41494); ELKTPLGDTTHT

(SEQ ID NO:559);KSCDKTHTCP (SEQ ID NO:560);KCCVDCP (SEQ ID NO:561);KYGPPCP (SEQ ID NO:562);EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:563);人IgG1铰链);ERKCCVECPCP (SEQ ID NO:564);人IgG2铰链);ELKTPLGDTHTCPCRP (SEQ ID NO:565);人IgG3铰链);SPNMVPHAHHAQ (SEQ ID NO:566);人IgG4铰链);等等。

[0186] 在一些实施方案中,铰链区包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4铰链区的氨基酸序列。与野生型(天然存在的)铰链区相比,该铰链区可包含一个或多个氨基酸置换和/或插入和/或缺失。例如,人IgG1铰链的His229可以被Tyr置换,使得铰链区包含序列EPKSCDKTYTCCPCP (SEQ ID NO:567);参见,例如,Yan等人(2012)J.Biol.Chem.287:5891。

[0187] 在一些实施方案中,铰链区包含衍生自人CD8的氨基酸序列;例如,铰链区包含氨基酸序列:

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:568),或其变体。

条件活性嵌合抗原受体

[0188] 在一个实施方案中,本公开提供了条件活性嵌合抗原受体(CAR)。CAR通常包含多个结构域,包括靶抗原结合域、跨膜域和细胞内信号域。本公开的条件活性CAR包含多个结构域,包括结合部分、结合EpCAM的靶抗原结合域、跨膜域和细胞内信号域。在一些实施方案中,细胞内信号域是包括但不限于ZAP70、CD3 ζ 和4-1BB的蛋白质的信号域。

[0189] 在一些实施方案中,所述条件活性嵌合抗原受体进一步包含共刺激域。在一些实施方案中,该共刺激域是蛋白质的功能信号域,该蛋白质包括但不限于OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137),及其具有至少一个、两个或三个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列。

[0190] 在一些实施方案中,所述跨膜域包含蛋白质的跨膜域,该蛋白质包括但不限于TCR α 链、TCR β 链、TCR ζ 链、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基、CD45、CD4、CDS、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、其功能片段及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

[0191] 在一方面,本公开提供了被工程化为表达CAR的细胞(例如,T细胞)。在一方面,用CAR转化细胞,并且该CAR在细胞表面上表达。在一些实施方案中,用编码CAR的病毒载体转导细胞(例如,T细胞)。在一些实施方案中,该病毒载体是逆转录病毒载体。在一些实施方案中,该病毒载体是慢病毒载体。在一些这样的实施方案中,该细胞可以稳定表达CAR。在另一个实施方案中,用编码CAR的核酸,例如mRNA、cDNA、DNA转染细胞(例如T细胞)。在一些这样的实施方案中,该细胞可以瞬时表达CAR。

条件活性T细胞受体融合蛋白

[0192] 在一个实施方案中,本公开提供了条件活性T细胞受体融合蛋白。如本文所用的,“T细胞受体(TCR)融合蛋白”或“TFP”包括衍生自包含TCR的各种多肽的重组多肽,该TCR通常能够i)与靶细胞上的表面抗原结合,并且ii)与完整TCR复合物的其他多肽组分相互作用,通常当共同位于T细胞中或T细胞表面上时。

[0193] 条件活性TFP包含结合部分、EpCAM结合域和T细胞受体亚基。在一些实施方案中,T细胞受体亚基进一步包含T细胞受体胞外域、跨膜域和T细胞受体胞内域的至少一部分。在一些实施方案中,所述跨膜域包含蛋白质的跨膜域,该蛋白质包括但不限于TCR α 链、TCR β

链、TCR ζ 链、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基、CD45、CD4、CDS、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、其功能片段或其具有至少一个、两个或三个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列。

[0194] 在一些实施方案中，T细胞受体胞内域包含刺激域。刺激域可以来自T细胞受体亚基，包括但不限于 β 亚基、 α 亚基、 δ 亚基、 γ 亚基、 ϵ 亚基或其组合。在一些实施方案中，刺激域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)或其部分，包括但不限于CD3 ζ TCR亚基、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基、TCR ζ 链、Fc ϵ 受体1链、Fc ϵ 受体2链、Fc γ 受体1链、Fc γ 受体2a链、Fc γ 受体2b 1链、Fc γ 受体2b2链、Fc γ 受体3a链、Fc γ 受体3b链、Fc β 受体1链、TYROBP (DAP12)、CDS、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d、其功能片段及其具有至少一个、两个或三个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列。

[0195] 在一些实施方案中，所述条件活性TFP进一步包含共刺激域。在一些实施方案中，该共刺激域是蛋白质的功能信号域，该蛋白质包括但不限于OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137)，及其具有至少一个、两个或三个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列。

[0196] 在一些实施方案中，EpCAM结合域通过连接体序列连接至T细胞受体胞外域。在一些情况下，编码的连接体序列包含(G₄S)_n，其中n=1至4。在一些情况下，编码的连接体序列包含长连接体(LL)序列。在一些情况下，编码的长连接体序列包含(G₄S)_n，其中n=2至4。在一些情况下，编码的连接体序列包含短连接体(SL)序列。在一些情况下，编码的短连接体序列包含(G₄S)_n，其中n=1至3。

[0197] 在一方面，本公开提供了被工程化为表达条件活性T细胞受体融合蛋白(TFP)的细胞(例如，T细胞)。在一方面，用条件活性TFP转化细胞，并且该条件活性TFP在细胞表面上表达。在一些实施方案中，用编码条件活性TFP的病毒载体转导细胞(例如，T细胞)。在一些实施方案中，该病毒载体是逆转录病毒载体。在一些实施方案中，该病毒载体是慢病毒载体。在一些这样的实施方案中，该细胞可以稳定表达条件活性TFP。在另一个实施方案中，用编码条件活性TFP的核酸，例如mRNA、cDNA、DNA转染细胞(例如T细胞)。在一些这样的实施方案中，该细胞可以瞬时表达条件活性TFP。

条件活性T细胞受体

[0198] 在一个实施方案中，本公开提供了条件活性T细胞受体。T细胞受体通常包含多个亚基，包括 α 、 β 、 δ 、 γ 、 ϵ 和 ζ 亚基。本公开的条件活性T细胞受体包含结合部分。在一些实施方案中，该结合部分附接至T细胞受体亚基，包括但不限于 α 亚基、 β 亚基或其组合。

[0199] 在一些实施方案中，所述结合部分能够掩蔽T细胞受体与其靶标的结合。在一些实施方案中，该结合部分与T细胞受体结合。在一些实施方案中，非CDR环提供用于所述部分与T细胞受体结合的结合位点。在一些实施方案中，非CDR环提供对T细胞受体 α 、T细胞受体 β 或其组合具有特异性的结合位点。在一些实施方案中，该结合部分例如通过空间阻塞、通过特定分子间相互作用来掩蔽T细胞受体与其靶标的结合。

[0200] 在一方面，本公开提供了被工程化为表达条件活性T细胞受体(TCR)的细胞(例如，T细胞)。在一方面，用条件活性TCR转化细胞，并且该条件活性TCR在细胞表面上表达。在一些实施方案中，用编码条件活性TCR的病毒载体转导细胞(例如，T细胞)。在一些实施方案

中,该病毒载体是逆转录病毒载体。在一些实施方案中,该病毒载体是慢病毒载体。在一些这样的实施方案中,该细胞可以稳定表达条件活性TCR。在另一个实施方案中,用编码条件活性TCR的核酸,例如mRNA、cDNA、DNA转染细胞(例如T细胞)。在一些这样的实施方案中,该细胞可以瞬时表达条件活性TCR。

细胞

[0201] 在一个实施方案中,本公开提供了一种细胞,其包含本公开的嵌合抗原受体或条件活性嵌合抗原受体、条件活性T细胞受体融合蛋白或条件活性T细胞受体。该细胞可以是哺乳动物细胞。

[0202] 合适的哺乳动物细胞包括原代细胞和无限增殖化细胞系。合适的哺乳动物细胞系包括人细胞系、非人灵长类动物细胞系、啮齿动物(例如小鼠、大鼠)细胞系等。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞(例如,美国典型培养物保藏中心(ATCC)No.CCL-2)、CHO细胞(例如,ATCC No.CRL9618、CCL61、CRL9096)、293细胞(例如,ATCC No.CRL-1573)、Vero细胞、NIH 3T3细胞(例如,ATCC No.CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如,ATCC No.CCL10)、PC12细胞(ATCC No.CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞(ATCC No.CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞(ATCC No.CCLI.3)、人胚肾(HEK)细胞(ATCC No.CRL1573)、HLHepG2细胞、HuT-78、Jurkat、HL-60、NK细胞系(例如,NKL、NK92和YTS)等。

[0203] 在一些情况下,所述细胞不是无限增殖化细胞系,而是从个体获得的细胞(例如,原代细胞)。例如,在一些情况下,该细胞是从个体获得的免疫细胞。作为示例,该细胞是从个体获得的T淋巴细胞。作为另一个示例,该细胞是从个体获得的细胞毒性细胞。作为另一个示例,该细胞是从个体获得的干细胞或祖细胞。

[0204] 在最近的研究中,已使用CAR构建体来引导自然杀伤(NK)细胞活性,如Hermanson&Kaufman(2015,Front Immunol 6:195)和Carlsten&Childs(2015,Front Immunol 6:266)所综述的。与T细胞类似,NK细胞可以用CAR表达构建体转染,并用来诱导免疫应答。由于NK细胞不需要HLA匹配,因此它们可以用作同种异体效应细胞(Harmanson&Kaufman,2015)。此外,用于治疗的外周血NK细胞(PB-NK)可以通过简单的抽血从供体中分离。使用的CAR构建体可包含与用来制备CAR-T细胞的元件类似的元件。

[0205] 因此,在一些实施方案中,本公开提供了包含NK细胞的细胞,该NK细胞包含本公开的嵌合抗原受体、条件活性嵌合抗原受体、条件活性T细胞受体融合蛋白或条件活性T细胞受体。

[0206] 如上文在条件活性EpCAM结合蛋白(例如,EpCAM ProTriTAC)的背景下所讨论的,在一些实施方案中,与包含与条件活性变体相同的EpCAM结合域,但是为组成型活性而不是条件活性的嵌合抗原受体相比,本文所述的条件活性嵌合抗原受体具有改善的治疗指数。例如,在一些实施方案中,EpCAM ProCAR具有比EpCAM CAR增加的治疗指数。在一些实施方案中,治疗指数的增加为至少约2倍至约1000倍,例如约4倍至约800倍、约6倍至约800倍、约6倍至约600倍、约10倍至约400倍、约20倍至约200倍、约30倍至约150倍、约50倍至约100倍。在一些实施方案中,治疗指数的增加归因于EpCAM结合域与如上所述的结合部分采用非CDR环和可切割连接体的缀合。

产生包含条件活性受体的细胞的方法

[0207] 本公开提供了一种产生包含条件活性嵌合抗原受体、T细胞受体融合蛋白或T细胞

受体的细胞的方法。该方法通常涉及用表达载体或RNA(例如体外转录的RNA)对哺乳动物细胞进行遗传修饰,该表达载体或RNA包含编码本公开的条件活性嵌合抗原受体、T细胞受体融合蛋白或T细胞受体的核苷酸序列。该遗传修饰可以在体内、体外或离体进行。该细胞可以是,例如,免疫细胞(例如,T淋巴细胞或NK细胞)、干细胞或祖细胞。

[0208] 在一些情况下,该遗传修饰离体进行。例如,从个体获得T淋巴细胞、干细胞或NK细胞;并且对从个体获得的细胞进行遗传修饰,以表达本公开的条件活性嵌合抗原受体、T细胞受体融合蛋白或T细胞受体。

T细胞的来源

[0209] 在一些实施方案中,T细胞的来源源自受试者。在本公开全文中使用的术语“受试者”旨在包括其中可以引发免疫应答的活生物体(例如,哺乳动物)。受试者的实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。T细胞可以从多种来源获得,包括但不限于同种异体T细胞(例如,同种异体供体来源的CAR T细胞)、自然杀伤细胞(例如,供体来源的自然杀伤细胞)、外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在本公开的某些实施方案中,可以使用任何数目的本领域可获得的T细胞系。在本公开的某些实施方案中,可以使用本领域技术人员已知的任何技术如FICOLL™分离,从采集自受试者的血液单位获得T细胞。在一个实施方案中,来自个体的循环血液的细胞通过血液成分分离术(apheresis)获得。血液成分分离产品通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。在一个实施方案中,洗涤通过血液成分分离术收集的细胞以去除血浆部分并将细胞置于合适的缓冲液或培养基中,以用于随后的处理步骤。在本公开的一个实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在替代的实施方案中,洗涤溶液缺少钙,并且可能缺少镁或者可能缺少许多(即便不是全部)二价阳离子。在不存在钙的情况下的初始激活步骤可导致放大的激活。本领域普通技术人员将会容易理解,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法完成,如根据制造商的说明使用半自动“流通式”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)。洗涤后,可将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液,如无Ca、无Mg的PBS、PlasmaLyte A或其他含有或不含缓冲液的盐水溶液中。或者,可以去除血液成分分离样品中的不需要的组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0210] 在一个实施方案中,通过裂解红细胞并消耗单核细胞(例如,通过PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘洗),从外周血淋巴细胞中分离T细胞。可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离特定的T细胞亚群,如CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和CD45RO⁺T细胞。例如,在一个实施方案中,通过与抗CD3/抗CD28(例如,3×28)缀合的珠子(如DYNABEADS® M-450CD3/CD28 T)一起孵育足够用于所需T细胞的阳性选择的时间段来分离T细胞。在一个实施方案中,该时间段是约30分钟。在进一步的实施方案中,该时间段的范围为30分钟至36小时或更长以及其间的所有整数值。在进一步的实施方案中,该时间段是至少1、2、3、4、5或6小时。在又一实施方案中,该时间段是10至24小时。在一个实施方案中,孵育时间段是24小时。可以在T细胞与其他细胞类型相比较少的任何情况下,例如在从肿瘤组织或免疫受损的个体分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的情况下使用更长的孵育时间来分离T细胞。进一步地,使用更长的孵育时间可以提高捕获CD8⁺T细胞的效率。因此,通过简单地缩短或延长允许T细胞与CD3/CD28珠子结合的时间,和/或通过增加或减少珠子与T细胞(如本文进一步描述

的)的比值,可以在培养开始时或在该过程中的其他时间点优先选择或排除某T细胞亚群。另外,通过增加或减少珠子或其他表面上的抗CD3和/或抗CD28抗体的比值,可以在培养开始时或在其他所需时间点优先选择或排除某T细胞亚群。在本公开的上下文中也可以使用多轮选择。在某些实施方案中,可能需要执行选择程序并在激活和扩充过程中使用“未选择的”细胞。也可使“未选择的”细胞经历进一步轮次的选择。

[0211] T细胞群体通过阴性选择的富集可以用针对阴性选择的细胞的特有表面标志物的抗体组合来完成。一种方法是经由负磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,该负磁性免疫粘附或流式细胞术使用针对存在于阴性选择的细胞上的细胞表面标志物的单克隆抗体混合物。例如,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些实施方案中,可能需要富集或阳性选择通常表达CD4⁺、CD25⁺、CD62Lhi、GITR⁺和FoxP3⁺的调节性T细胞。或者,在某些实施方案中,T调节细胞被抗CD25缀合的珠子或其他类似的选择方法消耗。

[0212] 在一个实施方案中,可以选择T细胞群体,其表达IFN- γ 、TNF α 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、粒酶B和穿孔蛋白,或其他合适的分子,例如其他细胞因子。可以确定筛选细胞表达的方法,例如,通过PCT公开WO 2013/126712中描述的方法。

[0213] 为了通过阳性或阴性选择分离所需的细胞群体,可以改变细胞和表面(例如,颗粒,如珠子)的浓度。在某些实施方案中,可能需要显著降低珠子和细胞混合在一起的体积(例如,增加细胞浓度),以确保细胞和珠子的最大接触。例如,在一个实施方案中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施方案中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在进一步的实施方案中,使用大于1亿个细胞/ml。在进一步的实施方案中,使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、35000万、4000万、4500万或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在一个实施方案中,使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方案中,可以使用1.25亿或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可导致细胞产率、细胞活化和细胞扩充增加。进一步地,使用高细胞浓度允许更有效地捕获可能较弱表达感兴趣的靶抗原的细胞(如CD28阴性T细胞)或者来自存在许多肿瘤细胞的样品(例如,白血病血液、肿瘤组织等)的细胞。这样的细胞群体可能具有治疗价值并且将是需要获得的。例如,使用高浓度的细胞允许更有效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8⁺T细胞。

[0214] 在另一实施方案中,可能需要使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面(例如,颗粒,如珠子)的混合物,使颗粒与细胞之间的相互作用最小。这选择表达大量待与颗粒结合的所需抗原的细胞。例如,CD4⁺T细胞表达较高水平的CD28,并且在稀释浓度下比CD8⁺T细胞更有效地捕获。在一个实施方案中,使用的细胞浓度是 5×10^6 /ml。在其他实施方案中,使用的浓度可以是约 1×10^5 /ml至 1×10^6 /ml以及其间的任何整数值。

[0215] 在其他实施方案中,细胞可以在2-10°C或室温下以变化的速度在旋转器上孵育不同的时间长度。

[0216] 用于刺激的T细胞也可在洗涤步骤后冷冻。不希望受理论束缚,冷冻和随后的解冻步骤通过去除细胞群体中的粒细胞和在一定程度上去除单核细胞来提供更均匀的产品。在去除血浆和血小板的洗涤步骤之后,可以将细胞悬浮在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数是本领域已知的并在这种情况下将会是有用的,但一种方法涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或含有10%葡聚糖40和5%右旋糖、20%人血清白蛋白和7.5%

DMSO的培养基,或31.25%Plasmalyte-A、31.25%右旋糖5%、0.45%NaCl、10%葡聚糖40和5%右旋糖、20%人血清白蛋白和7.5%DMSO,或含有例如Hespan和PlasmaLyte A的其他合适的细胞冷冻培养基,然后将细胞以每分钟1℃的速率冷冻至-80℃并储存在液氮储罐的气相中。可以使用其他受控冷冻方法以及在-20℃下或液氮中的不受控的速冻。

[0217] 在某些实施方案中,如本文所述将冷冻保存的细胞解冻并洗涤,并在使用本公开的方法激活之前使其在室温下静置1小时。

[0218] 在本公开的上下文中还考虑到在可能需要如本文所述的经扩充细胞之前的时间段从受试者收集血液样品或血液成分分离产品。因此,可以在任何必要的时间点收集待扩充细胞的来源,并且分离和冷冻所需的细胞如T细胞,以供随后在T细胞疗法中用于将受益于T细胞疗法的任何数目的疾病或病况,例如本文所述的疾病或病况。在一个实施方案中,血液样品或血液成分分离物取自大体健康的受试者。在某些实施方案中,血液样品或血液成分分离物取自大体健康的受试者,该受试者有发展为疾病的风险但尚未发展为该疾病,并且感兴趣的细胞被分离并冷冻以供随后使用。在某些实施方案中,T细胞可以扩充、冷冻并在随后使用。在某些实施方案中,在任何治疗之前,在诊断如本文所述的特定疾病之后的较短时间内从患者收集样品。在进一步的实施方案中,在任何数目的相关治疗方式前,从受试者的血液样品或血液成分分离物中分离细胞,该治疗方式包括但不限于采用诸如以下的药剂的治疗:那他珠单抗,依法珠单抗,抗病毒剂,化疗,放射,免疫抑制剂,如环孢菌素、硫唑嘌呤、氨甲蝶呤、霉酚酸酯和FK506,抗体,或其他免疫清除剂,如CAMPATH、抗CD3抗体、环磷酰胺、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228和辐射。

[0219] 在本公开的进一步的实施方案中,在使患者具有功能性T细胞的治疗后直接从患者获得T细胞。在这方面,已经观察到,在某些癌症治疗,特别是用损害免疫系统的药物治疗之后,在该治疗后不久且在患者通常将从治疗中恢复的时期中,所获得的T细胞的质量可能是最佳的或改善的,因为其有离体扩充的能力。同样地,在使用本文所述的方法进行离体操作后,这些细胞可以处于植入和体内扩充增强的优选状态。因此,在本公开的上下文中考虑在该恢复期中收集血细胞,包括T细胞、树突细胞或造血谱系的其他细胞。进一步地,在某些实施方案中,动员(例如,用GM-CSF动员)和调节方案可用于在受试者体内产生这样的条件,其中特别细胞类型的再增殖、再循环、再生和/或扩充是有利的,尤其是在疗法后限定的时间窗口内。说明性细胞类型包括T细胞、B细胞、树突细胞和免疫系统的其他细胞。

T细胞的激活和扩充

[0220] T细胞可以通常使用如以下文献中所述的方法进行激活和扩充,例如,美国专利6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;以及美国专利申请公开号20060121005。

[0221] 通常,本公开的T细胞可以通过与表面接触来扩充,该表面上附着有刺激CD3/TCR复合物相关信号的试剂以及刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体。特别地,可以如本文所述刺激T细胞群体,如通过与固定在表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段或抗CD2抗体接触,或通过与蛋白激酶C激活剂(例如,苔藓抑制素)以及钙离子载体接触。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用结合辅助分子的配体。例如,可在适于刺激T细胞增殖的条件下,使T细胞群体与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞的增殖,采用抗

CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besancon, France), 其可以与本领域公知的其他方法一样使用 (Berg等人, Transplant Proc. 30 (8) : 3975-3977, 1998; Haanen等人, J. Exp. Med. 190 (9) : 1319-1328, 1999; Garland等人, J. Immunol. Meth. 227 (1-2) : 53-63, 1999)。

[0222] 在某些实施方案中, T细胞的主要刺激信号和共刺激信号可以由不同的方案提供。例如, 提供每个信号的药剂可以在溶液或偶联到表面上。当偶联到表面上时, 药剂可以偶联到相同表面 (即, “顺式” 排列) 或不同表面 (即 “反式” 排列) 上。或者, 可以将一种药剂偶联到表面上而另一药剂在溶液中。在一个实施方案中, 提供共刺激信号的药剂结合到细胞表面上, 而提供主要激活信号的药剂在溶液或偶联到表面上。在某些实施方案中, 两种药剂可以都在溶液中。在一个实施方案中, 药剂可以是可溶形式, 然后交联至表面, 如表达Fc受体的细胞或将会与该药剂结合的抗体或其他结合剂。在这方面, 参见例如美国专利申请公开20040101519和20060034810中的预期用于活化并扩充本公开的T细胞的人工抗原呈递细胞 (aAPC)。

[0223] 在一个实施方案中, 将两种药剂固定在珠子上 (固定在相同的珠子上, 即 “顺式”, 或者固定在不同的珠子上, 即 “反式”)。例如, 提供主要激活信号的药剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段, 而提供共刺激信号的药剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段; 并且两种药剂以相等的分子量共同固定到相同的珠子上。在一个实施方案中, 用于CD4+T细胞扩充和T细胞生长的与珠子结合的每种抗体使用1:1的比值。在本公开的某些实施方案中, 使用这样的与珠子结合的抗CD3抗体: 抗CD28抗体比, 使得与使用1:1的比值观察到的扩充相比, 观察到T细胞扩充增加。在一个特定的实施方案中, 与使用1:1的比值观察到的扩充相比, 观察到约1倍至约3倍的增加。在一个实施方案中, 与珠子结合的CD3抗体: CD28抗体的比值范围为100:1至1:100以及其间的所有整数值。在本公开的一个实施方案中, 与抗CD3抗体相比, 更多的抗CD28抗体与颗粒结合, 即CD3: CD28比小于1。在本公开的某些实施方案中, 与珠子结合的抗CD28抗体与抗CD3抗体的比值大于2:1。在一个特定的实施方案中, 与珠子结合的抗体使用1:100的CD3: CD28比。在另一实施方案中, 与珠子结合的抗体使用1:75的CD3: CD28比。在进一步的实施方案中, 与珠子结合的抗体使用1:50的CD3: CD28比。在一个实施方案中, 与珠子结合的抗体使用1:30的CD3: CD28比。在一个实施方案中, 与珠子结合的抗体使用1:10的CD3: CD28比。在一个实施方案中, 与珠子结合的抗体使用1:3的CD3: CD28比。在又一个实施方案中, 与珠子结合的抗体使用3:1的CD3: CD28比。

[0224] 从1:500至500:1以及其间的任何整数值的颗粒与细胞之比可用于刺激T细胞或其他靶细胞。本领域普通技术人员可以容易理解, 颗粒与细胞之比可以取决于相对于靶细胞的颗粒大小。例如, 大小较小的珠子只能结合少量细胞, 而较大的珠子可以结合许多细胞。在某些实施方案中, 细胞与颗粒之比的范围为1:100至100:1以及其间的任何整数值, 并且在进一步的实施方案中, 该比值包括1:9至9:1以及其间的任何整数值, 也可用于刺激T细胞。如上所述, 抗CD3和抗CD28偶联的颗粒与T细胞的导致T细胞刺激的比值可以变化, 但是某些值包括1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1和15:1, 其中一个优选比值是T细胞/颗粒为至少1:1。在一个实施方案中, 使用1:1或更小的颗粒: 细胞比。在一个特定的实施方案中, 颗粒: 细胞比为1:5。在进一步的实施方案中, 颗粒: 细胞比可以根据刺激的天数而变化。例如, 在

一个实施方案中,颗粒:细胞比在第一天为1:1至10:1,并且之后每天或每隔一天将额外的颗粒添加到细胞,持续至多10天,最终比值为1:1至1:10(基于添加当天的细胞计数)。在一个特定实施方案中,颗粒:细胞比在刺激的第一天为1:1,并且在刺激的第三天和第五天被调整为1:5。在一个实施方案中,每天或每隔一天添加颗粒,直至第一天的最终比值为1:1,并且在刺激的第三天和第五天的最终比值为1:5。在一个实施方案中,颗粒:细胞比在刺激的第一天为2:1,并且在刺激的第三天和第五天被调整为1:10。在一个实施方案中,每天或每隔一天添加颗粒,直至第一天的最终比值为1:1,并且在刺激的第三天和第五天的最终比值为1:10。本领域技术人员将会理解,多种其他比值可适用于本公开。特别地,比值将根据粒度和细胞大小和类型而不同。

[0225] 在本公开的进一步的实施方案中,将细胞如T细胞与药剂包被的珠子组合,然后将珠子和细胞分离,并随后培养细胞。在替代实施方案中,在培养之前,不分离药剂包被的珠子和细胞,而是将其一起培养。在进一步的实施方案中,首先通过施加力(如磁力)浓缩珠子和细胞,导致细胞表面标志物的连接增加,从而诱导细胞刺激。

[0226] 举例来说,可通过使抗CD3和抗CD28所附接至的顺磁珠(3×28 个珠子)接触T细胞来连接细胞表面蛋白。在一个实施方案中,将细胞(例如, 10^4 至 10^9 个T细胞)和珠子(例如,比值为1:1的DYNABEADS®M-450CD3/CD28 T顺磁珠)在缓冲液例如PBS(无二价阳离子,如钙和镁)中混合。同样,本领域普通技术人员可以容易地理解可使用任何细胞浓度。例如,靶细胞在样品中可能非常罕见,并且仅占样品的0.01%,或者整个样品(即100%)可包含感兴趣的靶细胞。因此,任何细胞数都在本公开的范围之内。在某些实施方案中,可能需要显著降低颗粒和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞浓度),以确保细胞和颗粒的最大接触。例如,在一个实施方案中,使用约20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施方案中,使用大于1亿个细胞/ml。在进一步的实施方案中,使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、35000万、4000万、4500万或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在一个实施方案中,使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方案中,可以使用1.25亿或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可导致细胞产率、细胞活化和细胞扩充增加。此外,使用高细胞浓度允许更有效地捕获可能弱表达感兴趣的靶抗原的细胞,如CD28阴性T细胞。这样的细胞群体可能具有治疗价值并且在某些实施方案中需要获得。例如,使用高浓度的细胞允许更有效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8+T细胞。

[0227] 在本公开的一个实施方案中,可以将混合物培养数小时(约3小时)至约14天或其间的任何整数小时的值。在一个实施方案中,可将混合物培养21天。在本公开的一个实施方案中,将珠子和T细胞一起培养约8天。在一个实施方案中,将珠子和T细胞一起培养2-3天。也可能需要几个刺激周期,使得T细胞的培养时间可以是60天或更长。适于T细胞培养的条件包括可含有增殖和生存所必需的因子的适当培养基(例如,基本必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15, (Lonza)),该因子包括血清(例如,胎牛血清或人血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 和TNF- α 或本领域技术人员已知用于细胞生长的其他任何添加剂。用于细胞生长的其他添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉(plasmanate)以及还原剂如N-乙酰基-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20、Optimizer,其添加有氨基酸、丙酮酸钠和维生素,无血清或补充有适量的血清(或血浆)或限定的一组激素,

和/或足够用于T细胞生长和扩充的量的细胞因子。抗生素,例如青霉素和链霉素,仅包含在实验培养物中,而不包含在待注入受试者的细胞培养物中。将靶细胞维持和支持生长所需的条件下,例如适当的温度(例如37°C)和气氛(例如空气加5%CO₂)。

[0228] 已暴露不同刺激时间的T细胞可展现不同的特性。例如,典型的血液或血液成分分离的外周血单核细胞产品具有大于细胞毒性T细胞群体或抑制性T细胞群体(TC,CD8+)的辅助T细胞群体(TH,CD4+)。通过刺激CD3和CD28受体离体扩充T细胞产生T细胞群体,该T细胞群体在约第8-9天之前主要由TH细胞组成,而在约第8-9天之后,该T细胞群体包含越来越多的TC细胞群体。

EpCAM结合蛋白修饰

[0229] 本文所述的EpCAM结合蛋白,包括EpCAM结合域(例如,本公开的EpCAM结合sdAb)和EpCAM靶向多特异性蛋白(例如,本文所述的EpCAM靶向三特异性或前三特异性蛋白),包括衍生物或类似物,其中(i)氨基酸被不是由遗传密码编码的氨基酸残基置换,(ii)成熟多肽与另一化合物如聚乙二醇融合,或(iii)额外的氨基酸与该蛋白质融合,如前导序列或分泌序列或用于纯化该蛋白质的序列。

[0230] 典型的修饰包括但不限于乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价附接、血红素部分的共价附接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价附接、脂质或脂质衍生物的共价附接、磷脂酰肌醇的共价附接、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转移RNA介导的向蛋白质添加氨基酸,如精氨酰化和泛素化。

[0231] 在本文所述的EpCAM结合蛋白中的任何位置进行修饰,所述位置包括肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。可用于EpCAM结合蛋白的某些常见肽修饰包括糖基化、脂质附接、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧化、羟基化、多肽中的氨基或羧基或两者被共价修饰的封闭,以及ADP-核糖基化。

[0232] 在一些实施方案中,如本文所述的结合蛋白的衍生物包含免疫反应性调节剂衍生物和包含一个或多个修饰的抗原结合分子。

[0233] 在一些实施方案中,本公开的EpCAM结合蛋白是单价或多价、二价、三价等。如本文所用的,术语“价”是指与抗体相关的潜在靶标结合位点的数目。每个靶结合位点特异性结合一个靶分子或靶分子上的特定位置或座位。当抗体为单价时,分子的每个结合位点将特异性结合一个抗原位置或表位。当抗体包含一个以上的靶结合位点(多价)时,每个靶标结合位点可以特异性结合相同或不同的分子(例如,可以结合不同的配体或不同的抗原,或相同抗原上的不同表位或位置)。

[0234] 在一些实施方案中,以上提及的EpCAM结合蛋白与来自任何种类的Fc区融合,该种类包括但不限于人免疫球蛋白,如人IgG1、人IgG2、人IgG3、人IgG4,以产生Fc-融合EpCAM结合蛋白。在一些实施方案中,与其他方面相同的EpCAM结合蛋白相比,本公开的Fc融合EpCAM结合蛋白具有延长的半衰期。在一些实施方案中,本公开的Fc-融合EpCAM结合蛋白例如在Fc区中尤其包含一个或多个另外的氨基酸残基置换、突变和/或修饰,其导致具有优选特性的结合蛋白,所述特性包括但不限于:改变的药代动力学、延长的血清半衰期。

[0235] 在一些实施方案中,这类Fc-融合EpCAM结合蛋白在哺乳动物如人中提供长于5天、

长于10天、长于15天、长于20天、长于25天、长于30天、长于35天、长于40天、长于45天、长于2个月、长于3个月、长于4个月或长于5个月的延长的半衰期。在一些情况下,延长的半衰期导致较高的血清滴度,从而降低EpCAM结合蛋白的给药频率,和/或降低待施用的抗体的浓度。在一些实例中,在表达人FcRn的转基因小鼠或转染的人细胞系中,或在施用具有变异Fc区的多肽的灵长类动物中,测定人FcRn高亲和力结合多肽与人FcRn的体内结合和血清半衰期。

[0236] 在一些情况下,EpCAM结合蛋白在生产过程中或之后例如通过糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、采用已知保护基/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、与抗体分子或其他细胞配体的连接等进行差异修饰。通过技术进行多种化学修饰中的任何一种,这些技术包括但不限于通过以下试剂进行特异性化学切割:溴化氰、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶、V8蛋白酶、NaBH₄,乙酰化、甲酰化、氧化、还原、在衣霉素存在下的代谢合成等。

[0237] 本公开还涵盖的EpCAM结合蛋白的各种翻译后修饰包括,例如,N-连接或O-连接的碳水化合物链、N末端或C末端的加工、化学部分与氨基酸骨架的连接、N连接的或O连接的碳水化合物链的化学修饰,以及作为原核宿主细胞表达的结果,N末端甲硫氨酸残基的添加或缺失。此外,在一些情况下,用可检测标记如酶、荧光、放射性标记或亲和标记修饰EpCAM结合蛋白,以允许检测并分离调节剂。

编码EpCAM结合蛋白的多核苷酸

[0238] 在一些实施方案中,还提供了编码本文所述的EpCAM结合蛋白的多核苷酸分子。在一些实施方案中,该多核苷酸分子以DNA构建体的形式提供。在其他实施方案中,该多核苷酸分子以信使RNA转录物的形式提供。

[0239] 所述多核苷酸分子通过已知方法构建,例如通过组合编码单结构域EpCAM结合蛋白的基因或编码包含超过一个结构域的EpCAM结合蛋白的各种结构域的基因。在一些实施方案中,编码结构域的基因由肽连接体隔开,或在其他实施方案中,通过肽键直接连接到单个基因构建体中,该单个基因构建体与合适的启动子以及可选的合适的转录终止子可操作地连接,并且将其在细菌或其他适当的表达系统例如CHO细胞中表达。根据所采用的载体系统和宿主,可使用任何数目的合适的转录和翻译元件,包括组成型和诱导型启动子。选择启动子,以使其驱动多核苷酸在相应宿主细胞中的表达。

[0240] 在一些实施方案中,将编码本文所述的EpCAM结合蛋白的多核苷酸插入载体中,优选表达载体中,这代表进一步的实施方案。该重组载体可根据已知方法来构建。特别感兴趣的载体包括质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、病毒(virii)(例如,逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、慢病毒等)和粘粒。

[0241] 可利用多种表达载体/宿主系统,以包含并表达编码所述EpCAM结合蛋白的多肽的多核苷酸。表达载体的实例是用于在大肠杆菌中表达的pSKK(Le Gall等人,J Immunol Methods.(2004) 285(1):111-27),或用于在哺乳动物细胞中表达的pcDNA5(Invitrogen)。

因此,在一些实施方案中,如本文所述的EpCAM结合蛋白通过以下步骤产生:将编码如上所述蛋白质的载体引入宿主细胞中,并在允许蛋白质结构域表达的条件下培养所述宿主细胞,可将其分离并任选地进一步纯化。

药物组合物

[0242] 在一些实施方案中,还提供了药物组合物,其包含本文所述的抗EpCAM结合蛋白、

包含编码该EpCAM结合蛋白的多肽的多核苷酸的载体或被该载体转化的宿主细胞,以及至少一种药学上可接受的载剂。术语“药学上可接受的载剂”包括但不限于不干扰成分的生物活性的有效性且对所施用的患者无毒的任何载剂。合适的药物载剂的实例是本领域公知的,并且包括磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液如水包油乳液、各种类型的润湿剂、无菌溶液等。这样的载剂可通过常规方法配制,并且可以以合适的剂量施用于受试者。优选地,该组合物是无菌的。这些组合物还可含有辅料如防腐剂、乳化剂和分散剂。可通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂来确保阻止微生物的作用。另一个实施方案提供了一种或多种上述EpCAM结合蛋白,其以冻干形式包装或包装在水性介质中。

[0243] 在药物组合物的一些实施方案中,本文所述的EpCAM结合蛋白被包封在纳米颗粒中。在一些实施方案中,该纳米颗粒是富勒烯、液晶、脂质体、量子点、超顺磁纳米颗粒、树状聚体或纳米棒。在药物组合物的其他实施方案中,将EpCAM结合蛋白附接至脂质体。在一些情况下,EpCAM结合蛋白与脂质体表面缀合。在一些情况下,EpCAM结合蛋白被包封在脂质体的壳内。在一些情况下,该脂质体为阳离子脂质体。

[0244] 本文所述的EpCAM结合蛋白被考虑用作药物。给药通过不同方式实现,例如,通过静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内给药。在一些实施方案中,给药途径取决于疗法的种类和药物组合物中包含的化合物的种类。给药方案将由主治医师根据其他临床因素来确定。对于任何一名患者的剂量依赖于许多因素,包括患者体型、体表面积、年龄、性别、待施用的具体化合物、给药时间和途径、疗法的种类、总体健康和其他同时施用的药物。“有效剂量”是指活性成分的量,该量足以影响疾病的病程和严重程度,从而导致这种病理学的减轻或缓解,并且可使用已知方法来确定。

[0245] 在一些实施方案中,本公开的EpCAM结合蛋白以至多10mg/kg的剂量以每周一次的频率施用。在一些情况下,剂量范围为约1ng/kg至约10mg/kg,例如约1ng/kg至约70ng/kg。在一些实施方案中,该剂量为约1ng/kg至约10ng/kg、约5ng/kg至约15ng/kg、约12ng/kg至约20ng/kg、约18ng/kg至约30ng/kg、约25ng/kg至约50ng/kg、约35ng/kg至约60ng/kg、约45ng/kg至约70ng/kg、约65ng/kg至约85ng/kg、约80ng/kg至约1 μ g/kg、约0.5 μ g/kg至约5 μ g/kg、约2 μ g/kg至约10 μ g/kg、约7 μ g/kg至约15 μ g/kg、约12 μ g/kg至约25 μ g/kg、约20 μ g/kg至约50 μ g/kg、约35 μ g/kg至约70 μ g/kg、约45 μ g/kg至约80 μ g/kg、约65 μ g/kg至约90 μ g/kg、约85 μ g/kg至约0.1mg/kg、约0.095mg/kg至约10mg/kg。在一些情况下,该剂量为约0.1mg/kg至约0.2mg/kg、约0.25mg/kg至约0.5mg/kg、约0.45mg/kg至约1mg/kg、约0.75mg/kg至约3mg/kg、约2.5mg/kg至约4mg/kg、约3.5mg/kg至约5mg/kg、约4.5mg/kg至约6mg/kg、约5.5mg/kg至约7mg/kg、约6.5mg/kg至约8mg/kg、约7.5mg/kg至约9mg/kg或约8.5mg/kg至约10mg/kg。在一些实施方案中,给药频率约为少于每天一次、每隔一天一次、少于每天一次、每周两次、每周一次、7天一次、两周一次、三周一次、每四周一次或每月一次。在一些情况下,给药频率为每周一次。在一些情况下,给药频率为每周一次,剂量最高为10mg/kg。在一些情况下,给药持续时间为约1天至约4周或更长。

治疗方法和肿瘤生长减少性质

[0246] 在某些实施方案中还提供了治疗受试者中与表达EpCAM的恶性细胞相关的病况的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的EpCAM结合域或包含本公开的EpCAM结合域的多特异性蛋白(包括条件活性多特异性蛋白),或包含本文所述EpCAM结合蛋白的CAR或

ProCAR,或包含其的药物组合物。在一些实施方案中,该病况为癌症。

[0247] 在另一方面,本公开提供了一种抑制具有表达EpCAM的恶性细胞的受试者中的肿瘤生长或进展的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的EpCAM结合域或包含本公开的EpCAM结合域的多特异性蛋白,或包含本文所述EpCAM结合蛋白的CAR,或包含其的药物组合物。在另一方面,本公开提供了一种抑制受试者中表达EpCAM的恶性细胞的转移的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的EpCAM结合域或包含本公开的EpCAM结合域的多特异性蛋白,或包含其的药物组合物。在另一方面,本公开提供了一种诱导具有表达EpCAM的恶性细胞的受试者中的肿瘤消退的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的EpCAM结合域或包含本公开的EpCAM结合域的多特异性蛋白,或包含其的药物组合物。在一些实施方案中,本文所述的方法进一步包括施用有效量的第二治疗剂。在一些实施方案中,第二治疗剂是生物治疗剂,例如抗体。在一些实施方案中,第二治疗剂是细胞因子、TNF α (肿瘤坏死因子 α)、PAP (磷脂酸磷酸酶) 抑制剂、溶瘤病毒、激酶抑制剂、IDO (吡咯胺-吡咯2,3-双加氧酶) 抑制剂、谷氨酰胺酶GLS1抑制剂、CAR (嵌合抗原受体)-T细胞或T细胞疗法、TLR (Toll样受体) 激动剂(例如,TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR9) 或肿瘤疫苗。

[0248] 在某些实施方案中,当施用于具有表达EpCAM的肿瘤细胞的受试者时,本公开的EpCAM结合蛋白在体内减少肿瘤细胞的生长。肿瘤细胞生长减少的测量可以通过本领域公知的多种不同方法来确定。非限制性实例包括直接测量肿瘤尺寸,测量切除的肿瘤块并与对照对象进行比较,通过可能使用或可能不使用同位素或发光分子(例如萤光素酶) 增强分析的成像技术(例如CT或MRI) 进行测量,等等。在特定实施方案中,与对照抗原结合剂相比,本公开的EpCAM结合蛋白的施用导致肿瘤细胞的体内生长减少至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%,肿瘤生长减少约100%表明完全反应和肿瘤消失。在进一步的实施方案中,与对照抗原结合剂相比,本公开的EpCAM结合蛋白的施用导致肿瘤细胞的体内生长减少约50-100%、约75-100%或约90-100%。在进一步的实施方案中,与对照抗原结合剂相比,本公开的EpCAM结合蛋白的施用导致肿瘤细胞的体内生长减少约50-60%、约60-70%、约70-80%、约80-90%或约90-100%。

[0249] 在一些实施方案中,施用本公开的EpCAM结合蛋白以治疗赘生性病况。在一些实施方案中,赘生性病况是良性或恶性的;实体瘤或其他血液肿瘤;并且在一些实施方案中,选自包括但不限于以下疾病的组:肾上腺肿瘤、与AIDS相关的癌症、肺泡软质部分肉瘤、星形细胞肿瘤、自主神经节肿瘤、膀胱癌(鳞状细胞癌和移行细胞癌)、囊胚腔病症、骨癌(釉质瘤、动脉瘤性骨囊肿、骨软骨瘤、骨肉瘤)、脑和脊髓癌、转移性脑瘤、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、颈动脉体肿瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、嫌色性肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、增生性小圆形细胞肿瘤、室管膜瘤、上皮病症、尤因肿瘤、骨外粘液样软骨肉瘤、不完全性骨纤维生成、骨纤维结构发育不良、胆囊和胆管癌、胃癌、胃肠道、妊娠滋养细胞性疾病、生殖细胞肿瘤、腺体病症、头颈癌、下丘脑、肠癌、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌(肾母细胞瘤、乳头状肾细胞癌)、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤、肝癌(肝母细胞瘤、肝细胞癌)、淋巴瘤、肺癌(小细胞癌、腺癌、鳞状细胞癌、大细胞癌等)、巨噬细胞病症、髓母细胞瘤、黑素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、神经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺肿瘤、儿科癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、葡萄膜后

黑素瘤 (posterior uveal melanoma)、罕见血液系统病症、肾转移癌、杆状瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、基质病症、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移癌和子宫癌 (宫颈癌、子宫内膜癌和平滑肌瘤)。

[0250] 在某些实施方案中,本公开的EpCAM结合蛋白用作前线治疗,并施用于先前未接受过癌性病况治疗的受试者。在其他实施方案中,本公开的EpCAM结合蛋白用于治疗先前已经(用本公开的EpCAM结合蛋白或其他抗癌剂)治疗过,并且已经复发或确定对先前治疗为难治性的受试者。在一些实施方案中,本公开的EpCAM结合蛋白用于治疗患有复发性肿瘤的受试者。

[0251] 在一些实施方案中,施用如本文所述的EpCAM结合蛋白,包括如本文所述的多特异性蛋白、CAR或ProCAR,以治疗具有广泛EpCAM表达和流行的癌症,包括但不限于结直肠癌、前列腺癌、神经内分泌癌、甲状腺癌、肺癌(非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、胃癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胆道癌和胆囊癌、食管癌、乳腺癌和所有腺癌。

[0252] 在一些方面,施用本公开的EpCAM结合蛋白以治疗包括实体瘤的增生性病症,包括但不限于肾上腺、肝、肾、膀胱、乳腺、胃、卵巢、宫颈、子宫、食道、结直肠、前列腺、胰腺、肺(小细胞和非小细胞)、甲状腺的癌、肉瘤、胶质母细胞瘤和各种头颈肿瘤。

[0253] 在一些实施方案中,将本公开的EpCAM结合蛋白施用于患有黑素瘤的受试者。在一些实施方案中,本公开的EpCAM结合蛋白用于诊断、监测、治疗或预防黑素瘤。如本文所用的,术语“黑素瘤”包括所有类型的黑素瘤,包括但不限于原发性黑素瘤、恶性黑素瘤、皮肤黑素瘤、皮肤外黑素瘤、浅表扩散性黑素瘤、类息肉黑素瘤、黑素癌、黑色素上皮瘤、黑色素肉瘤、原位黑素瘤、结节性恶性黑素瘤、雀斑样痣黑素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、粘膜雀斑样痣黑素瘤、粘膜黑素瘤、肢端黑色素瘤、软组织黑素瘤、眼黑素瘤、侵袭性黑素瘤、家族性非典型性痣和黑素瘤(FAM-M)综合征、结缔组织增生性恶性黑素瘤或葡萄膜黑素瘤。

[0254] 在一些实施方案中,施用本公开的EpCAM结合蛋白或包含其的药物组合物的可能的适应症是肿瘤性疾病,尤其是上皮癌/癌症,如乳腺癌,结肠癌,前列腺癌,头颈癌,皮肤癌,泌尿生殖道癌症,例如卵巢癌、子宫内膜癌、宫颈癌和肾癌,肺癌,胃癌,小肠癌,肝癌,胰腺癌,胆囊癌,胆管癌,食管癌,唾液腺癌,和甲状腺癌。在一些实施方案中,本公开的EpCAM结合蛋白或包含其的药物组合物的施用适用于微小残留疾病,如早期实体瘤、晚期实体瘤或转移性实体瘤,其特征在于单细胞存活引起肿瘤的局部和非局部复发。

[0255] 在选定的方面,将本公开的EpCAM结合蛋白并入嵌合抗原受体(CAR)中,并且以有效治疗癌症的基于CAR的疗法施用EpCAM CAR,该癌症例如是:上皮癌/癌症,如乳腺癌,结肠癌,前列腺癌,头颈癌,皮肤癌,泌尿生殖道癌症,例如卵巢癌、子宫内膜癌、宫颈癌和肾癌,肺癌,胃癌,小肠癌,肝癌,胰腺癌,胆囊癌,胆管癌,食管癌,唾液腺癌,和甲状腺癌,小细胞肺癌,非小细胞肺癌(例如鳞状细胞非小细胞肺癌或鳞状细胞小细胞肺癌),和大细胞神经内分泌癌(LCNEC)。

[0256] 嵌合抗原受体通常是含有或包含与信号域(例如,T细胞信号域或T细胞活化域)连接的抗体的抗原结合域的人工构建的杂合蛋白质或多肽。在一些实施方案中,包含本公开的EpCAM结合蛋白的CAR具有通过利用抗体或其抗原结合片段的抗原结合性质,以非MHC限制的方式将致敏淋巴细胞(例如T细胞)的特异性和反应性重引导至EpCAM阳性靶细胞的能力。这种非MHC限制性抗原识别使表达EpCAM CAR的T细胞能够独立于抗原加工而识别致瘤

性EpCAM,从而绕开了肿瘤逃逸的主要机制。而且,当在T细胞中表达时,CAR不会有利地与内源性T细胞受体(TCR) α 和 β 链发生二聚化。

[0257] 在一些实施方案中,将所公开的EpCAM结合蛋白施用于难治性患者(即,在完成初始治疗过程中或之后不久疾病复发的患者);敏感患者(即复发时间长于初级治疗后2-3个月的患者);或对铂类药物(例如卡铂、顺铂、奥沙利铂)和/或紫杉烷(例如多西他赛、紫杉醇、拉罗他赛或卡巴他赛)表现出抗药性的患者。在另一个实施方案中,所公开的EpCAM CAR治疗有效地治疗卵巢癌,包括卵巢浆液性癌和卵巢乳头状浆液性癌。

[0258] 在另一个实施方案中,本公开的EpCAM结合蛋白、EpCAM CAR或EpCAM致敏的淋巴细胞或其任何组合被用于维持治疗中,以减少或消除疾病初次出现后肿瘤复发的机会。在一些情况下,该疾病已得到治疗,并且最初的肿瘤块已消除、减轻或以其他方式得到改善,因此患者无症状或处于缓解中。在此时,向受试者施用药学有效量的本公开的EpCAM结合蛋白、EpCAM CAR或EpCAM致敏的淋巴细胞或其任何组合一次或多次,无论是否存在很少的或根本没有在使用标准诊断程序的疾病适应症。在一些实施方案中,在一段时间内以有规律的时间表,例如每周、每两周、每月、每六周、每两个月、每三个月、每六个月或每年一次施用本公开的EpCAM结合蛋白、EpCAM CAR或EpCAM致敏的淋巴细胞或其任何组合,以减少疾病复发的可能性。此外,在一些实施方案中,取决于患者的反应以及临床和诊断参数,这类治疗持续数周、数月、数年地时间、甚至无限期地持续。

[0259] 在又一个实施方案中,本公开的EpCAM结合蛋白、EpCAM CAR或DLL3致敏的淋巴细胞或其任何组合遵循缩减程序用于预防性或辅助治疗,以预防或减少肿瘤转移的可能性。如本公开中所使用的,“缩减程序”意指消除、减少、治疗或改善肿瘤或肿瘤增殖的任何程序,技术或方法。示例性的缩减程序包括但不限于手术、放射治疗(即束放射)、化学疗法、免疫疗法或消融。在一些实施方案中,在适当的时间,如临床、诊断或诊疗程序所建议的,施用本公开的EpCAM结合蛋白、EpCAM CAR或EpCAM致敏的淋巴细胞或其任何组合,以减少肿瘤转移。在一些实施方案中,给药方案伴随适当的诊断或监测技术,其允许对其进行修改。

[0260] 本公开的其他实施方案包括将本公开的EpCAM结合蛋白、EpCAM CAR或EpCAM致敏的淋巴细胞或其任何组合施用于无症状但有发展成增生性病征风险的受试者。即,在一些实施方案中,本公开的EpCAM结合蛋白、EpCAM CAR或EpCAM致敏的淋巴细胞或其任何组合以预防性意义使用,并提供给已经过检查或测试并且具有一种或多种值得注意的危险因素(例如,基因组指征、家族史、体内或体外检验结果等),但尚未发展成瘤的患者。在这样的情况下,本领域技术人员将能够通过经验观察或通过公认的临床实践来确定有效的给药方案。

[0261] 在本文所述的方法的一些实施方案中,如本文所述的EpCAM结合蛋白或组合物与用于治疗特定疾病、病症或病况的药剂联合施用。药剂包括但不限于涉及抗体、小分子(例如,化疗药物)、激素(甾体、肽等)的疗法、放射疗法(γ 射线、X射线,和/或放射性同位素、微波、UV辐射等的定向递送)、基因疗法(例如,反义,逆转录病毒疗法等)和其他免疫疗法。在一些实施方案中,本文所述的EpCAM结合蛋白与止泻剂、止吐剂、镇痛药、阿片类药物和/或非甾体抗炎剂联合施用。在一些实施方案中,本文所述的EpCAM结合蛋白质与抗癌剂联合施用。可在本公开的各个实施方案(包括本公开的药物组合物和剂型和试剂盒)中使用的抗癌剂的非限制性实例包括:阿西维辛;阿柔比星;盐酸阿考达唑;阿克罗宁;阿多来新;阿地白

介素;六甲蜜胺;安波霉素;醋酸阿美茵醌;氨鲁米特;安吡啶;阿那曲唑;安曲霉素;天冬酰胺酶;曲林菌素;阿扎胞苷;阿扎替派;阿佐霉素;巴马司他;苯佐替派;比卡鲁胺;盐酸比生群;二甲磺酸双奈法德;比折来新;硫酸博来霉素;布喹那钠;溴匹立明;白消安;放线菌素C;卡鲁唑酮;卡醋酸;卡贝替姆;卡铂;卡莫司汀;盐酸卡柔比星;卡折来新;西地芬戈;苯丁酸氮芥;西罗霉素;顺铂;克拉屈滨;甲磺酸克雷斯托;环磷酰胺;阿糖胞苷;达卡巴嗪;放线菌素D;盐酸柔红霉素;地西他滨;右奥马铂;地扎瓜宁;甲磺酸地扎瓜宁;地吡醌;多西他赛;多柔比星;盐酸多柔比星;屈洛昔芬;柠檬酸屈洛昔芬;丙酸屈他雄酮;达佐霉素;依达曲沙;盐酸依氟鸟氨酸;依沙芦星;恩洛铂;恩普氨酯;依匹哌啶;盐酸表柔比星;厄布洛唑;盐酸依索比星;雌莫司汀;雌莫司汀磷酸钠;依他硝唑;依托泊苷;磷酸依托泊苷;艾托卜宁;盐酸法徕唑;法扎拉滨;芬维A胺;氟尿苷;磷酸氟达拉滨;氟尿嘧啶;氟西他滨;磷唑酮;福司曲星钠;吉西他滨;盐酸吉西他滨;羟基脲;盐酸依达比星;异环磷酰胺;伊莫福新;白介素II(包括重组白介素II或rIL2);干扰素 α -2a;干扰素 α -2b;干扰素 α -n1;干扰素 α -n3;干扰素 β -I a;干扰素 γ -I b;异丙铂;盐酸伊立替康;醋酸兰瑞肽;来曲唑;醋酸亮丙瑞林;盐酸利阿唑;洛美曲索钠;洛莫司汀;盐酸洛索茵醌;马索罗酚;美坦辛;盐酸氮芥;醋酸甲地孕酮;醋酸美伦孕酮;美法仑;美诺立尔;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;甲氨蝶呤钠;氯苯氨啶;美妥替派;米丁度胺;米托克星(mitocarcin);丝裂红素(mitocromin);米托洁林;丝裂马星;丝裂霉素;米托司培;米托坦;盐酸米托蒽醌;霉酚酸;诺考达唑;诺加霉素;奥马铂;奥昔舒仑;紫杉醇;培门冬酶;培利霉素;戊氮芥;硫酸培洛霉素;培磷酰胺;哌泊溴烷;哌泊舒凡;盐酸吡罗茵醌;普卡霉素;普洛美坦;吡吩姆钠;泊非霉素;泼尼莫司汀;盐酸丙卡巴肼;嘌呤霉素;盐酸嘌呤霉素;吡唑呋喃菌素;利波腺苷;罗谷亚胺;沙芬戈;盐酸沙芬戈;司莫司汀;辛曲秦;斯帕膦酸钠;司帕霉素;盐酸螺旋锗;螺莫司汀;螺铂;链黑菌素;链脲霉素;磺氯苯脲;他利霉素;替可加兰钠;替加氟;盐酸替洛茵醌;替莫泊芬;替尼泊苷;替罗昔隆;睾内酯;硫咪嘌呤;硫鸟嘌呤;噻替派;噻唑羧胺核苷;替拉扎明;柠檬酸托瑞米芬;醋酸曲托龙;磷酸曲西立滨;三甲曲沙;葡糖醛酸三甲曲沙;曲普瑞林;盐酸妥布氯唑;乌拉莫司汀;乌瑞替派;伐普肽;维替泊芬;硫酸长春碱;硫酸长春新碱;长春地辛;硫酸长春地辛;硫酸长春匹定;硫酸长春甘酯;硫酸长春罗新;酒石酸长春瑞滨;硫酸长春罗定;硫酸长春利定;伏氯唑;折尼铂;净司他丁;盐酸佐柔比星。抗癌药的其他实例包括但不限于:20-表-1,25二羟基维生素D3;5-乙炔基尿嘧啶;阿比特龙;阿柔比星;酰基富烯;腺环戊醇;阿多来新;阿地白介素;ALL-TK拮抗剂;六甲蜜胺;氨莫司汀;amidox;氨磷汀;氨基酮戊酸;氨柔比星;安吡啶;阿那格雷;阿那曲唑;穿心莲内酯;血管生成抑制剂;拮抗剂D;拮抗剂G;安雷利克斯;抗背侧化形态发生蛋白-1(anti-dorsalizing morphogenetic protein-1);抗雄激素;前列腺癌;抗雌激素;抗瘤酮;反义寡核苷酸;甘氨酸阿非科林;凋亡基因调节剂;凋亡调节剂;无嘌呤酸;ara-CDP-DL-PTBA;精氨酸脱氨酶;芥子碱(asulacrine);阿他美坦;阿莫司汀;阿奇他汀(axinastatin)1;阿奇他汀2;阿奇他汀3;阿扎司琼;阿扎毒素;重氮络氨酸;浆果赤霉素III衍生物;balanol;巴马司他;BCR/ABL拮抗剂;苯并二氢扑酚(benzochlorins);苯甲酰基星状孢菌素(benzoylstauosporine); β -内酰胺衍生物; β -alethine;betaclamycin B;桦木酸;bFGF抑制剂;比卡鲁胺;比生群;双吡丙啶基精胺;双奈法德;双曲群A(bistratene A);比折来新;breflate;溴匹立明;布朵替坦;丁硫氨酸硫酸亚胺;卡泊三醇;钙磷酸蛋白C;喜树碱衍生物;金丝雀痘IL-2;卡培他滨;羧酰胺-氨基-三唑;羧胺三唑;CaRest M3;CARN 700;软骨衍

生抑制剂;卡折来新;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);栗树精胺;天蚕抗菌肽B;西曲瑞克;二氢卟吩;氯喹啉磺酰胺;西卡前列素;顺式卟啉;克拉屈滨;氯米芬类似物;克霉唑;collismycin A;collismycin B;康普瑞汀A4;康普瑞汀类似物;conagenin;crambescidin 816;克雷斯托;念珠藻素8;念珠藻素A衍生物;curacin A;环戊萘醌;环铂(cycloplata);塞匹霉素;阿糖胞苷十八烷基磷酸盐;溶细胞因子;磷酸己烷雌酚(cytostatin);达昔单抗;地西他滨;脱氢膜海鞘素B;地洛瑞林;地塞米松;右异环磷酰胺;右雷佐生;右维拉帕米;地吡醌;膜海鞘素B;didox;二乙基去甲精胺;二氢-5-氮杂胞苷;9-二氢泰素;二氧杂霉菌素(dioxamycin);二苯基螺莫司汀;多西他赛;甘二醇;多拉司琼;去氧氟尿苷;屈洛昔芬;屈大麻酚;多卡米星SA;依布硒;依考莫司汀;依地福新;依决洛单抗(edrecolomab);依氟鸟氨酸;榄香烯;乙嘧替氟;表柔比星;爱普列特;雌莫司汀类似物;雌激素激动剂;雌激素拮抗剂;依他硝唑;磷酸依托泊苷;依西美坦;法倔唑;法扎拉滨;芬维A胺;非格司亭;非那雄胺;夫拉平度;氟卓斯汀;fluasterone;氟达拉滨;盐酸氟道诺霉素(fluorodaunorunicin hydrochloride);福酚美克;福美坦;福司曲星;福莫司汀;德卟啉钆(gadolinium texaphyrin);硝酸镓;加洛他滨;加尼瑞克;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;hepsulfam;调蛋白;六亚甲基双乙酰胺;金丝桃素;伊班膦酸;伊达比星;艾多昔芬;伊决孟酮;伊莫福新;伊洛马司他;咪唑并吡啶酮;咪唑莫特;免疫刺激肽;胰岛素样生长因子-I受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白介素;碘苄胍;碘代多柔比星;4-甘薯苦醇;伊罗普拉;伊索拉定;异邦格唑;异高软海绵素B;伊他司琼;加斯普拉诺利得(jasplakinolide);卡哈拉里德F(kahalalide F);三乙酸片螺素-N;兰瑞肽;雷那霉素;来格司亭;硫酸香菇多糖;雷波斯他汀;来曲唑;白血病抑制因子;白细胞 α 干扰素;亮丙瑞林+雌激素+黄体酮;亮丙瑞林;左旋咪唑;利阿唑;线性多胺类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂化合物;lissoclinamide 7;洛铂;蚯蚓磷脂;洛美曲索;氯尼达明;洛索萘醌;HMG-CoA还原酶抑制剂(诸如但不限于洛伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、他汀类、辛伐他汀和阿托伐他汀);洛索立宾;勒托替康;lutetium texaphyrin;lysofylline;裂解肽;美坦辛;曼诺他汀A;马立马司他;马索罗酚;乳腺丝抑蛋白;基质溶解因子抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔;美巴龙(merbarone);阿伏瑞林;甲硫氨酸酶(methioninase);甲氧氯普胺;MIF抑制剂;米非司酮;米替福星;米立司亭;错配的双链RNA;米托胍脲;二溴卫矛醇;丝裂霉素类似物;米托蒽胺;迈托毒素成纤维细胞生长因子-皂草素;米托萘醌;莫法罗汀;莫拉司亭;人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体;单磷酸脂质A+分支杆菌细胞壁sk;莫哌达醇;多重耐药基因抑制剂;基于多肿瘤抑制物1的疗法;芥子抗癌剂;印度洋海绵B(mycaperoxide B);分枝杆菌细胞壁提取物;myriaporone;N-乙酰地那林;N-取代的苯甲酰胺;那法瑞林;nagrestip;纳洛酮+喷他佐辛;napavin;napterpin;那托司亭;奈达铂;奈莫柔比星;奈立膦酸;中性内肽酶;尼鲁米特;尼萨霉素;一氧化氮调节剂;硝基氧抗氧化剂;nitrullyn;06-苄基鸟嘌呤;奥曲肽;okicenone;寡核苷酸;奥那司酮;昂丹司琼;昂丹司琼;oracin;口服细胞因子诱导剂;奥马铂;奥沙特隆;奥沙利铂;oxaunomycin;紫杉醇;紫杉醇类似物;紫杉醇衍生物;palauamine;palmitoylrhizoxin;帕米膦酸;人参三醇;帕诺米芬;parabactin;泊泽普汀;培门冬酶;培得星(peldesine);戊聚糖多硫酸钠;喷司他丁;喷曲唑;全氟溴烷;培磷酰胺;紫苏醇;吩嗪霉素(phenazinomycin);苯乙酸盐;磷酸酶抑制剂;溶链菌制剂(picibanil);盐酸毛果芸香碱;吡柔比星;吡曲克辛;placetin A;placetin B;纤溶酶原激活物抑制剂;铂络合物;铂化

合物;铂-三胺络合物;吡吩姆钠;泊非霉素;强的松;丙基双吡啶酮;前列腺素J2;蛋白酶体抑制剂;基于蛋白质A的免疫调节剂;蛋白激酶C抑制剂;蛋白激酶C抑制剂;微藻;蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;红紫素;甲氧基吡唑啉吡啶;吡哆基化血红蛋白聚氧乙烯缀合物;raf拮抗剂;雷替曲塞;雷莫司琼;ras法尼基蛋白转移酶抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂;去甲基化瑞替普汀;铈Re 186依替膦酸盐;根霉素;核糖酶;RII异维A酰胺;罗谷亚胺;罗希吐碱;罗莫肽;罗喹美克;rubiginone B1;ruboxyl;沙芬戈;saintopin;SarCNU;肌植醇A;沙格司亭;Sdi 1模拟物;司莫司汀;衰老衍生的抑制剂1;有义寡核苷酸;信号转导抑制剂;信号转导调节剂;单链抗原结合蛋白;西佐喃;索布佐生;硼卡钠;苯乙酸钠;solverol;生长调节素结合蛋白;索纳明;膦门冬酸;穗霉素D(spicamycin D);螺莫司汀;斯耐潘定;海绵抑素1(spongistatin 1);角鲨胺;干细胞抑制剂;干细胞分裂抑制剂;stipiamide;溶基质蛋白酶抑制剂;sulfinosine;强效血管活性肠肽拮抗剂;suradista;苏拉明;苦马豆素;合成的糖胺聚糖;他莫司汀;它莫西芬甲硫碘化物;牛磺莫司汀;他扎罗汀;替可加兰钠;替加氟;tellurapyrylium;端粒酶抑制剂;替莫泊芬;替莫唑胺;替尼泊昔;四氯十氧化物(tetrachlorodecaoxid);tetrazomine;菌体胚素(thaliblastine);噻可拉林(thiocoraline);血小板生成素;血小板生成素模拟物;胸腺法新;胸腺生成素受体激动剂;胸腺曲南;促甲状腺激素;本紫红素乙酯锡(tin ethyl etiopurpurin);替拉扎明;二氯化二茂钛(titanocene bichloride);topsentin;托瑞米芬;全能干细胞因子;翻译抑制剂;维甲酸;三乙酰尿昔;曲西立宾;三甲曲沙;曲普瑞林;托烷司琼;妥罗特来;酪氨酸激酶抑制剂;酪氨酸磷酸化抑制剂(tyrphostin);UBC抑制剂;乌苯美司;泌尿生殖窦衍生的生长抑制因子;尿激酶受体拮抗剂;伐普肽;variolin B;载体系统;红细胞基因疗法;维拉雷琐;藜芦胺;verdins;维替泊芬;长春瑞滨;vinxaltine; **Vitaxin®**;伏罗唑;扎诺特隆;折尼铂;亚苡维C(zilascorb);和净司他丁斯酯。其他抗癌药是5-氟尿嘧啶和亚叶酸。当在使用沙利度胺和拓扑异构酶抑制剂的方法中使用这两种药剂特别有用。在一些实施方案中,本公开的EpCAM结合蛋白与吉西他滨联合使用。在一些实施方案中,本文所述的EpCAM结合蛋白在手术之前、期间或之后施用。

EpCAM表达的检测方法和EpCAM相关癌症的诊断

[0262] 根据本公开的另一个实施方案,提供了用于在体外或体内检测EpCAM表达的试剂盒。该试剂盒包括前述的EpCAM结合蛋白(例如,含有标记的抗EpCAM单结构域抗体或其抗原结合片段的EpCAM结合蛋白),以及一种或多种用于检测标记物的化合物。在一些实施方案中,该标记物选自荧光标记物、酶标记物、放射性标记物、核磁共振活性标记物、发光标记物和发色团标记物。

[0263] 在一些情况下,在生物样品中检测EpCAM表达。该样品可以是任何样品,包括但不限于来自活检、尸检和病理学标本的组织。生物样品还包括组织切片,例如,用于组织学目的冷冻切片。生物样品还包括体液,如血液、血清、血浆、痰、脊髓液或尿液。生物样品通常来自哺乳动物,如人或非人灵长类动物。

[0264] 在一个实施方案中,提供了一种通过使来自受试者的样品与本文公开的抗EpCAM单结构域抗体接触并检测该单结构域抗体与样品的结合来确定受试者是否患有癌症的方法。与抗体与对照样品的结合相比,抗体与样品的结合的增加确定该受试者患有癌症。

[0265] 在另一个实施方案中,提供了一种通过使来自被诊断出患有癌症的受试者的样品

与本文公开的抗EpCAM单结构域抗体接触并检测该抗体与样品的结合来确认受试者中癌症的诊断的方法。与抗体与对照样品的结合相比,抗体与样品的结合的增加确认了受试者中癌症的诊断。

[0266] 在所公开方法的一些实例中,所述EpCAM单结构域抗体被直接标记。在一些实例中,所述方法进一步包括使与所述抗EpCAM单结构域抗体特异性结合的第二抗体与所述样品接触;以及检测第二抗体的结合。与第二抗体与对照样品的结合相比,第二抗体与样品的结合的增加检测出受试者中的癌症或证实了受试者中癌症的诊断。在一些情况下,所述癌症是神经内分泌癌症、前列腺癌、肺癌、胃癌、鳞状细胞癌、胰腺癌、胆管癌、三阴性乳腺癌或卵巢癌(如上皮卵巢癌),或表达EpCAM的其他任何类型的癌症。在一些实例中,对照样品是来自没有癌症的受试者的样品。在特定的实例中,样品是血液或组织样品。

[0267] 在一些情况下,结合(例如特异性结合)EpCAM的抗体直接用可检测标记物标记。在另一个实施方案中,结合(例如,特异性结合)EpCAM的抗体(第一抗体)未被标记,而第二抗体或可以结合特异性结合EpCAM的抗体的其他分子被标记。选择第二抗体,使其能够特异性结合特定种类和类别的第一抗体。例如,如果第一抗体是美洲驼IgG,则第二抗体可以是抗美洲驼IgG。可以与抗体结合的其他分子包括但不限于蛋白A和蛋白G,两者均可商购获得。抗体或第二抗体的合适的标记物如上所述,并且包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、磁性剂和放射性材料。合适的酶的非限制性实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶。合适的辅基复合物的非限制性实例包括链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素。合适的荧光材料的非限制性实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白。非限制性的示例性发光材料是鲁米诺;非限制性的示例性磁性剂是钆,而非限制性的示例性放射性标记物包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0268] 在备选的实施方案中,可以通过竞争性免疫测定在生物样品中测定EpCAM,该测定采用以可检测物质标记的EpCAM标准品和特异性结合EpCAM的未标记抗体。在该测定中,将生物样品、标记的EpCAM标准品和特异性结合EpCAM的抗体混合在一起,并测定与未标记的抗体结合的标记的EpCAM标准品的量。生物样品中EpCAM的量与同特异性结合EpCAM的抗体结合的标记EpCAM标准品的量成反比。

[0269] 本文公开的免疫测定和方法可以用于多种目的。在一个实施方案中,特异性结合EpCAM的抗体可用来检测细胞培养物中的细胞中EpCAM的产生。在另一个实施方案中,该抗体可以用来检测生物样品如组织样品或血液或血清样品中EpCAM的量。在一些实例中,该EpCAM是细胞表面EpCAM。在其他实例中,该EpCAM是可溶性EpCAM(例如,细胞培养上清液中的EpCAM或体液样品如血液或血清样品中的可溶性EpCAM)。

[0270] 在一个实施方案中,提供了用于检测生物样品如血液样品或组织样品中的EpCAM的试剂盒。例如,为了确认受试者中的癌症诊断,可以进行活检以获得用于组织学检查的组织样品。或者,可以获取血液样品以检测可溶性EpCAM蛋白或片段的存在。根据本公开内容,用于检测多肽的试剂盒通常将包含特异性结合EpCAM的单结构域抗体。在一些实施方案中,该试剂盒中包括抗体片段,如scFv片段、VH结构域或Fab。在进一步的实施方案中,该抗体被标记(例如,用荧光、放射性或酶标记物标记)。

[0271] 在一个实施方案中,试剂盒包括说明材料,其公开了使用结合EpCAM的抗体的手

段。该说明材料可以是书面的、电子形式的(如计算机软盘或光盘),可以是可视的(如视频文件),或者通过电子网络提供,例如经由因特网、万维网、内联网或其他网络提供。试剂盒还可以包括其他组件,以方便试剂盒设计所针对的特定应用。因此,例如,该试剂盒可以另外包含检测标记物的手段(例如用于酶标记物的酶底物,用于检测荧光标记物的滤光器套件,合适的第二标记物,如第二抗体等)。该试剂盒可以另外包括常规用于实施特定方法的缓冲液和其他试剂。这样的试剂盒和合适的内容物是本领域技术人员熟知的。

[0272] 在一实施方案中,诊断试剂盒包括免疫测定。尽管免疫测定的细节可随所采用的特定形式而不同,但是检测生物样品中EpCAM的方法通常包括使生物样品与在免疫反应性条件下与EpCAM多肽特异性反应的抗体接触的步骤。使抗体在免疫反应性条件下特异性结合以形成免疫复合物,并直接或间接检测免疫复合物(结合的抗体)的存在。

[0273] 确定细胞表面标志物存在与否的方法是本领域公知的。例如,抗体可以与包括但不限于酶、磁珠、胶体磁珠、半抗原、荧光染料、金属化合物、放射性化合物或药物的其他化合物缀合。抗体也可用于免疫测定,例如但不限于放射免疫测定(RIA)、ELISA或免疫组织化学测定中。抗体也可用于荧光激活的细胞分选(FACS)。FACS使用多个颜色通道、低角度和钝角光散射检测通道以及阻抗通道,以及其他更复杂的检测级别,来对细胞进行分离或分类。参见美国专利5,061,620。如本文所公开的,结合EpCAM的任何单结构域抗体均可在这些测定中使用。因此,这些抗体可以用于常规的免疫测定中,包括但不限于ELISA、RIA、FACS、组织免疫组织化学、Western印迹法或免疫沉淀。

实施例

实施例1:用于鉴定EpCAM结合域的噬菌体展示文库的筛查

[0274] 用在Expi293细胞中表达的纯化的EpCAM蛋白免疫美洲驼。从循环B细胞构建用于表达重链可变抗体结构域的噬菌体展示文库。参见van der Linden,de Geus,Stok,Bos,van Wassenaar,Verrips,and Frenken.2000.J Immunol Methods 240:185-195。通过在大肠杆菌中表达抗EpCAM蛋白,制备周质提取物,并使用比色ELISA针对人和食蟹猴EpCAM结合活性筛选蛋白质,来针对与EpCAM的结合筛选噬菌体克隆。鉴定了38种独特的仅重链序列(SEQ ID No.1至38),这些序列在ELISA筛选中相对于采用人和/或食蟹猴EpCAM蛋白的对照(如表2所示)产生信号。这些重可变域的CDR1、CDR2和CDR3序列分别是SEQ ID No.39至76、SEQ ID No.77至114和SEQ ID No.115至152。

[0275] 表2:相对于仅重链的对照单结构域抗体,如通过ELISA测定中的信号(比色ELISA测定中的吸光度读数)所证明的,美洲驼抗人EpCAM仅重链单结构域抗体与人和食蟹猴EpCAM的结合

序列名称	ELISA 人 EpCAM	ELISA 食 蟹猴 EpCAM	ELISA 对 照	人 EpCAM / 对照	食蟹猴 EpCAM / 对照
EPL90	1.6	1.7	0.2	10	10
EPL118	3.4	2.9	0.7	5	4
EPL138	3.1	2.7	0.9	3	3
EPL145	0.6	0.4	0.2	3	2
EPL164	0.6	2.8	0.1	7	34
EPL31	0.6	0.5	0.1	7	6
EPL55	0.4	0.6	0.1	5	7
EPL57	1.7	3.4	0.1	14	27
EPL136	0.9	1.3	0.1	9	13
EPL15	0.7	3.2	0.1	8	35
EPL34	0.9	3.1	0.1	10	36

序列名称	ELISA 人 EpCAM	ELISA 食 蟹猴 EpCAM	ELISA 对 照	人 EpCAM / 对照	食蟹猴 EpCAM / 对照
EPL86	0.8	3.0	0.1	8	31
EPL153	3.1	2.2	0.1	31	21
EPL20	2.9	2.2	0.5	6	4
EPL70	3.2	2.2	0.1	24	16
EPL125	3.5	3.5	0.5	8	8
EPL13	2.9	4.0	0.2	17	23
EPL129	2.0	3.1	0.1	20	29
EPL159	0.4	0.2	0.1	3	2
EPL120	3.2	2.3	0.6	5	4
EPL126	3.4	2.8	0.7	5	4
EPL60	1.1	3.5	0.1	10	33
EPL156	3.6	4.0	0.2	16	17
EPL2	2.2	3.6	0.1	15	24
EPL43	1.8	3.8	0.1	13	27
EPL10	2.7	2.0	0.2	12	9
EPL49	1.1	0.6	0.1	8	4
EPL58	1.1	0.5	0.1	8	4
EPL74	1.4	0.7	0.1	10	5
EPL78	3.1	2.0	0.2	17	11
EPL82	0.9	1.1	0.2	4	5
EPL83	2.0	1.1	0.6	3	2
EPL97	2.5	1.7	0.3	8	5
EPL109	0.4	0.1	0.1	5	2
EPL117	0.9	0.6	0.2	4	3
EPL127	0.4	0.9	0.1	5	11
EPL152	3.4	2.8	0.8	4	4

序列名称	ELISA 人 EpCAM	ELISA 食 蟹猴 EpCAM	ELISA 对 照	人 EpCAM / 对照	食蟹猴 EpCAM / 对照
EPL189	1.3	0.9	0.1	12	8

实施例2:结合EpCAM的仅重链单结构域抗体向融合蛋白中的并入以及T细胞依赖性细胞毒性测定

[0276] 将从实施例1选择的抗EpCAM仅重链单结构域抗体克隆到用于表达重组蛋白的DNA构建体中。这些表达构建体均编码信号肽。设计一组抗EpCAM构建体 (SEQ ID No.153至179) 以表达融合蛋白,该融合蛋白在成熟分泌的融合蛋白的N末端上具有人源化抗CD3 scFv结构域,随后是美洲驼抗EpCAM结构域,这两个结构域通过序列GGGSGGGS连接,并且在C末端具有HHHHHH。设计第二组抗EpCAM构建体 (SEQ ID No.180至206) 以表达融合蛋白,该融合蛋白在成熟分泌的融合蛋白N端上具有美洲驼抗EpCAM结构域,随后是人源化的抗CD3-scFv结构域,这两个结构域通过序列GGGSGGGS连接,并在C末端具有HHHHHH。

[0277] 将这些抗EpCAM/抗CD3 (从N末端到C末端) 或抗CD3/抗EpCAM (从N末端到C末端) 融合蛋白构建体转染到Expi293细胞中。通过使用Octet仪器,采用链霉亲和素,并加载生物素化的CD3-Fc融合蛋白,对来自转染的Expi293细胞的条件培养基中抗EpCAM/抗CD3融合蛋白的量进行定量,并使用与抗EPCAM/抗CD3蛋白具有相似分子量的抗CD3融合蛋白作为标准。

[0278] 在T细胞依赖性细胞毒性测定中测试条件培养基。参见Nazarian AA, Archibeque IL, Nguyen YH, Wang P, Sinclair AM, Powers DA. 2015. J Biomol Screen. 20:519-27。在该测定中,将表达EpCAM的萤光素酶标记的NCI-H508细胞与纯化的人T细胞组合,并滴定抗EpCAM/抗CD3融合蛋白或抗CD3/抗EpCAM。假设如果该融合蛋白指导T细胞杀死NCI-H508细胞,则在实验开始后48小时进行的萤光素酶测定中的信号应减少。图1-4以图形格式提供了TDCC数据。

[0279] 来自TDCC测定的EC₅₀值列于表3 (列出SEQ ID No.153-179的EC₅₀数据) 和表4 (列出SEQ ID No.180-206的EC₅₀数据) 中。最有效的分子 (EPL13) 的EC₅₀值约为1.6pM。一些抗EpCAM结合蛋白仅在以抗CD3/抗EpCAM构型存在时才有活性。一种抗EpCAM序列EPL34仅在抗EpCAM/抗CD3构型时才有活性。TDCC测定的阴性对照是抗GFP/抗CD3蛋白,该蛋白质未指导T细胞杀死NCI-H508细胞 (数据未示出)。

[0280] 表3:含有美洲驼抗EPCAM序列的抗CD3/抗EpCAM蛋白对NCI-H508细胞的重定向T细胞杀伤的EC₅₀值 (n/a=活性不足以使用测试的蛋白质浓度计算EC₅₀)

抗 EpCAM 序列	NCI-H508 细 胞杀伤 EC ₅₀ (M)
EPL10	n/a
EPL109	2.2E-09
EPL117	n/a
EPL120	5.8e-010
EPL125	1.3E-09
EPL127	n/a
EPL13	1.6E-12
EPL136	6.1E-12
EPL138	7.9E-12
EPL145	n/a
EPL152	n/a
EPL153	1.4E-10
EPL156	n/a
EPL164	3.6E-10

抗 EpCAM 序列	NCI-H508 细 胞杀伤 EC ₅₀ (M)
EPL189	n/a
EPL2	n/a
EPL20	n/a
EPL34	n/a
EPL49	n/a
EPL58	n/a
EPL74	2.6E-09
EPL78	n/a
EPL82	n/a
EPL83	3.1E-10
EPL86	4.7E-10
EPL90	9.2E-12
EPL97	n/a

[0281] 表4:含有美洲驼抗EPCAM序列的抗EpCAM/抗CD3蛋白对NCI-H508细胞的重定向T细胞杀伤的EC₅₀值 (n/a=活性不足以使用测试的蛋白质浓度计算EC₅₀)

抗 EpCAM 序列	NCI-H508 细 胞杀伤 EC ₅₀ (M)
EPL10	n/a
EPL109	n/a
EPL117	n/a
EPL120	n/a
EPL125	n/a
EPL127	n/a

抗 EpCAM 序列	NCI-H508 细 胞杀伤 EC50 (M)
EPL13	1.6E-11
EPL136	1.3E-10
EPL138	n/a
EPL145	n/a
EPL152	n/a
EPL153	不表达
EPL156	n/a
EPL164	n/a
EPL189	n/a
EPL2	n/a
EPL20	n/a
EPL34	3.7E-10
EPL49	n/a
EPL58	n/a
EPL74	n/a
EPL78	n/a
EPL82	n/a
EPL83	2.1E-11
EPL86	2.7E-10
EPL90	n/a
EPL97	n/a

[0282] 使用具有已知浓度的抗EpCAM/抗CD3或抗CD3/抗EpCAM融合蛋白的条件培养基,测量融合蛋白对人和食蟹猴EpCAM蛋白的结合亲和力。在带有链霉亲和素尖端的Octet仪器中加载生物素化的人或食蟹猴EpCAM蛋白,并通过测量抗EPCAM/抗CD3融合蛋白或抗CD3/抗EpCAM融合蛋白与生物素化EpCAM蛋白的结合的结合速率和解离速率来计算 K_D 值。使用单一50nM浓度的抗EPCAM/抗CD3或抗CD3/抗EpCAM融合蛋白进行 K_D 测量,从而允许对效力进行排

名。表列出了测得的相对亲和力。所有融合蛋白都与食蟹猴EpCAM结合, K_D 值在1.6至56nM的范围内。测量了大多数但不是全部融合蛋白与人EpCAM的结合, 其 K_D 值在0.8至74nM的范围内。

[0283] 表5: 含有美洲驼抗EpCAM序列的抗EPCAM/抗CD3或抗CD3/抗EpCAM融合蛋白对人和食蟹猴EpCAM的结合亲和力

	抗 CD3 / 抗 EpCAM		抗 EpCAM / 抗 CD3	
	hu KD (nM)	cy KD (nM)	hu KD (nM)	cy KD (nM)
人源化 抗 EpCAM 结合物				
EPL13	29	13	14	7.6
EPL136	74	56	32	31
EPL138	2.2	2.2	0.8	1.3
EPL153	n/q	3.5	无表达	
EPL164	3.1	3.6	2.1	2.9
EPL34	n/q	14	n/q	6.4
EPL83	1.1	3	1.6	3
EPL86	n/q	8.3	n/q	7
EPL90	1.9	1.6	0.8	1.2

实施例3: 结合EpCAM的仅重链单结构域抗体的人源化和T细胞依赖性细胞毒性测定

[0284] 通过将它们的CDR序列移植到人种系序列上, 同时保留一些美洲驼框架序列以确保抗体不丧失活性, 对实施例1中鉴别的三个美洲驼抗EpCAM抗体序列进行人源化 (SEQ ID No. 207至209)。

[0285] 将这些序列克隆到表达构建体中, 用于在Expi293细胞中表达抗EpCAM/抗CD3融合蛋白 (SEQ ID No. 210至212), 如实施例2所述。

[0286] 如实施例2所述对存在于条件培养基中的抗EpCAM/抗CD3融合蛋白的量进行定量。如实施例2所述测量这些人源化蛋白质对人、食蟹猴和小鼠EpCAM的亲和力。从这些测量值计算出的相对 K_D 值在表6中列出。所有三个序列均与人和食蟹猴EpCAM结合, 相对 K_D 值在约0.3至约18nM的范围内。其中两个序列也与小鼠EpCAM结合, K_D 值在约1.4至约1.8nM的范围内。

[0287] 表6: 含有美洲驼抗EpCAM序列的抗EpCAM/抗CD3融合蛋白对人、食蟹猴和小鼠

EpCAM的结合亲和力 (n/q=在所使用的实验条件下无法定量)

人源化抗 EpCAM 序列	人 EpCAM (nM)	食蟹猴 EpCAM (nM)	小鼠 EpCAM (nM)
H13	17	18	n/q
H90	0.3	1.3	1.4
H138	0.3	1.8	1.8

[0288] 如实施例2所述评估存在于条件培养基中的抗EpCAM/抗CD3融合蛋白的T细胞杀伤潜力。结果在表7和图5中提供。

[0289] 表7:纯化的含有人源化抗EpCAM序列的抗CD3/抗EpCAM蛋白对NCI-H508细胞的重定向T细胞杀伤的EC₅₀值

人源化抗 EpCAM 结合物序列	EC ₅₀ (pM)
H13	10
H90	10
H138	16

实施例4:异种移植肿瘤模型

[0290] 在异种移植模型中评价本公开的EpCAM靶向融合蛋白(例如,融合蛋白,其为包含抗EpCAM仅重链单结构域抗体、抗CD3 scFv和抗白蛋白结构域的三特异性蛋白)。为了确定示例性EpCAM靶向融合蛋白在体内的功效,使用了多种异种移植肿瘤模型。用于异种移植肿瘤研究的常见肿瘤细胞系的实例包括A549(非小细胞肺癌)细胞、DU-145(前列腺癌)细胞、MCF-7(乳腺癌)细胞、Co1o 205(结肠癌)细胞、3T3/]GF-IR(小鼠成纤维细胞)细胞、NCI H441细胞、HEP G2(肝细胞瘤)细胞、MDA MB 231(乳腺癌)细胞、HT-29(结肠癌)细胞、MDA-MB-435s(乳腺癌)细胞、U266细胞、SH-SY5Y细胞、Sk-Me1-2细胞、NCI-H929、RPM18226和A431细胞。对免疫缺陷的NOD/SCID小鼠进行亚致死照射(2Gy),并将1X 10⁶个肿瘤细胞(例如NCI H441细胞)皮下接种到它们的右背侧。当肿瘤达到100至200mm³时,将动物分成3个处理组。第2组和第3组腹膜内注射1.5×10⁷个活化的人T细胞。三天后,随后用示例性EpCAM靶向三特异性抗原结合蛋白治疗第3组的动物。第1组和第2组仅用媒介物处理。从用示例性EpCAM靶向三特异性蛋白治疗后至少5天开始,测量体重和肿瘤体积30天。

[0291] 与相应媒介物处理的对照组相比,预期用示例性EpCAM靶向三特异性蛋白治疗的动物具有统计学上显著的肿瘤生长延迟。

实施例5:关于向卵巢癌患者施用实施例4的EpCAM靶向三特异性抗原结合蛋白的概念验证临床试验方案

[0292] 这是用于研究本公开的示例性EpCAM靶向三特异性抗原结合蛋白作为上皮卵巢癌治疗的I/II期临床试验。

[0293] 研究结果:

[0294] 主要的: 示例性EpCAM靶向三特异性蛋白的最大耐受剂量。

[0295] 次要的: 确定示例性EpCAM靶向三特异性蛋白的体外反应是否与临床反应相关

[0296] I期

[0297] 最大耐受剂量 (MTD) 在该试验的I期部分确定。

1.1最大耐受剂量 (MTD) 在该试验的I期部分中确定。

1.2满足合格性标准的患者加入针对前述实施例的EpCAM靶向三特异性蛋白的试验。

1.3目标是确定前述实施例的EpCAM靶向三特异性蛋白可以在参与者中安全地施用而没有严重的或难以处理的副作用的最高剂量。给定的剂量取决于之前已经入选该研究的参与者的数目以及剂量耐受程度。并非所有参与者都接受相同的剂量。

[0298] II期

2.1随后的II期部分以MTD进行治疗, 目的是确定采用示例性

EpCAM靶向三特异性蛋白的疗法是否会导致至少20%的反应率。II期的主要结果---确定采用EpCAM靶向三特异性蛋白的疗法是否会致使至少20%的患者实现临床反应(强烈反应 (blast response)、轻微反应、部分反应或完全反应)。

[0299] 合格性:

- 经组织学或细胞学证实的上皮卵巢癌。在一线铂类化疗失败后可能有复发的上皮卵巢癌或疾病进展, 且不超过一种既往铂类方案治疗

- 足够的骨髓功能、肾功能、肝功能和超声心动图检查实验室值

[0300] III期

[0301] 3.1A随后的III期部分使用示例性EpCAM靶向三特异性蛋白来进行, 其中评估次要终点, 如反应率 (RR)、患者记录的结果 (PRO)、无进展生存率 (PFS)、无进展生存期、进展时间 (TIP)、总生存率、健康相关的生活质量评估、总生存率的参与者数量、反应持续时间、反应时间、反应参与者数量以及肿瘤生长时间等。

实施例6: 示例性多价靶标结合蛋白的构建和测试

构建体

[0302] 图6: 使用本文提供的EpCAM结合物序列制备以下ProCAR构建体。示例性构建体, 其包含抗人EpCAM sdAb、FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3ζ胞内域 (SEQ ID NO: 485)。示例性构建体, 其包含抗人血清白蛋白sdAb、抗人EpCAM sdAb、FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3ζ胞内域 (SEQ ID NO: 486)。示例性构建体, 其包含抗人血清白蛋白sdAb、抗人EpCAM sdAb、FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3ζ胞内域 (SEQ ID NO: 487)。示例性构建体, 其包含抗人血清白蛋白sdAb、抗人EpCAM sdAb、FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3ζ胞内域 (SEQ ID NO: 488)。示例性构建体, 其包含抗人血清白蛋白sdAb、蛋白酶切割位点3、抗人EpCAM sdAb、FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3ζ胞内域 (SEQ ID NO: 489)。示例性构建体, 其包含抗人血清白蛋白sdAb、蛋白酶切割位点3、抗人EpCAM sdAb、FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3ζ胞内域 (SEQ ID NO: 490)。示例性构建体, 其包含抗GFP sdAb、FLAG表位、CD8铰链/跨膜域、4-1BB胞内域和CD3ζ胞内域 (SEQ ID NO: 491)。

EpCAM Mask 1阻断ProCAR EpCAM-结合活性

[0303] 将300,000个从健康供体中分离的原代人T细胞用1mL由图6中所示的构建体制成的慢病毒上清液感染,以产生抗EpCAM CAR-T细胞,随后用抗FLAG抗体和EpCAM-Fc以及所示的第二抗体对其进行染色。通过流式细胞术分析数据。图7提供了CAR-T细胞的EpCAM-Fc/Alexa Fluor 647染色的直方图,其基于抗FLAG染色被分组为低(图7A)、中(图7B)或高(图7C) CAR表达。

[0304] 该数据证明了EpCAM mask 1阻断ProCAR EpCAM结合活性的功效。

EpCAM Mask 2阻断ProCAR EpCAM-结合活性

[0305] 将300,000个从健康供体中分离的原代人T细胞用1mL由图21中所示的构建体制成的慢病毒上清液感染,以产生抗EpCAM CAR-T细胞,随后用抗FLAG抗体和EpCAM-Fc以及所示的第二抗体对其进行染色。通过流式细胞术分析数据。

[0306] 图8提供了来自图6的CAR-T细胞的EpCAM-Fc/Alexa Fluor 647染色的直方图,其基于显示EpCAM mask 1在阻断ProCAR EpCAM结合活性方面的功效的抗FLAG染色被分组为低(图8A)、中(图8B)或高(图8C) CAR表达。

抗EpCAM sdAb H90的掩蔽

[0307] 将300,000个从健康供体中分离的原代人T细胞用1mL由图6中所示的构建体制成的慢病毒上清液感染,以产生抗EpCAM CAR-T细胞,其随后与稳定表达萤光素酶的EpCAM表达癌细胞以各种比例(CAR-T:靶细胞)共培养。72小时后读取萤光素酶活性作为癌细胞活力的代表,并将其相对于抗GFP对照CAR-T细胞C1081进行归一化。

[0308] 图9中提供的数据证明了抗EpCAM sdAb H90的掩蔽。SEQ ID No. 485是“裸”CAR,即没有抗ALB结构域。添加抗ALB结构域(SEQ ID No. 486)对细胞杀伤活性的影响很小。由于对EpCAM结合的特异性阻断,向抗ALB结构域的CC'环添加掩蔽对细胞杀伤活性有很大影响。

抗EpCAM sdAb H90被HSA的空间阻断

[0309] 将300,000个从健康供体中分离的原代人T细胞用1mL由图6中所示的构建体制成的慢病毒上清液感染,以产生抗EpCAM CAR-T细胞,其随后与稳定表达萤光素酶的EpCAM表达癌细胞以各种比例(CAR-T:靶细胞)在存在或不存在人血清白蛋白(HSA)的情况下共培养。72小时后读取萤光素酶活性作为癌细胞活力的代表,并将其相对于抗GFP对照CAR-T细胞C1081进行归一化。

[0310] 图10中提供的数据证明了抗EpCAM sdAb H90被HSA的空间阻断。

实施例7:EpCAM ProCAR蛋白酶位点依赖性细胞杀伤

[0311] 通过用表达所指示构建体的慢病毒感染从健康供体中分离的CD4/CD8阳性T细胞来产生表达嵌合抗原受体的T细胞(CART细胞)。图6显示了所用构建体的图示。将细胞与Fc标记的EpCAM胞外域(ECD)一起孵育。洗涤细胞以去除未结合的Fc标记的EpCAM ECD。将细胞与识别Fc的缀合至DyLight 650的第二抗体一起孵育。通过流式细胞术测量第二抗体与细胞的结合。

[0312] 图11展示了EpCAM ProCAR mask 2细胞杀伤活性的蛋白酶位点依赖性激活。

实施例8:EpCAM Mask 1 ProCAR抗原结合活性的蛋白酶激活

[0313] 将300,000个从健康供体中分离的原代人T细胞用1mL由图6中所示的构建体制成的慢病毒上清液感染,以产生抗EpCAM CAR-T细胞,随后将其在PBS中洗涤,然后在室温下用PBS或含有400nM重组uPA蛋白酶的PBS处理1小时,然后用抗FLAG抗体和EpCAM-Fc以及抗小

鼠BV421和抗人Fc Alexa Fluor 647第二抗体染色,并通过流式细胞术进行分析。

[0314] CAR-T细胞的EpCAM-Fc染色的直方图基于抗FLAG染色被分组为低(图12A)、中(图12B)或高(图12C) CAR表达。这些结果证明了EpCAM Mask 1ProCAR抗原结合活性的蛋白酶激活。

实施例9:EpCAM Mask 2 ProCAR抗原结合活性的蛋白酶激活

[0315] 将300,000个从健康供体中分离的原代人T细胞用1mL由图6中所示的构建体制成的慢病毒上清液感染,以产生抗EpCAM CAR-T细胞,随后将其在PBS中洗涤,然后在室温下用PBS或含有400nM重组uPA蛋白酶的PBS处理1小时,然后用抗FLAG抗体和EpCAM-Fc以及抗小鼠BV421和抗人Fc Alexa Fluor 647第二抗体染色,并通过流式细胞术进行分析。

[0316] CAR-T细胞的EpCAM-Fc染色的直方图基于抗FLAG染色被分组为低(图13A)、中(图13B)或高(图13C) CAR表达。这些结果证明了EpCAM Mask 2ProCAR抗原结合活性的蛋白酶激活。

实施例10:由示例性EpCAM靶向ProTriTAC分子赋予的小鼠耐受性改善的证明

[0317] 在该研究中,评估了示例性EpCAM靶向ProTriTAC分子的耐受性。在研究开始时,即在第0天,向七周龄NSG雌性无肿瘤小鼠腹膜内注射 2×10^7 个扩充的人T细胞。在第2天,通过将小鼠分成不同组并向它们施用不同浓度的以下物质开始治疗:包含连接体序列L040的示例性EpCAM靶向ProTriTAC分子(SEQ ID NO:494)、EpCAM靶向TriTAC分子(SEQ ID NO:492)、包含不可切割连接体的EpCAM靶向ProTriTAC分子(EpCAM ProTriTAC (NCLV) (SEQ ID NO:495)以及作为对照的GFP TriTAC分子(SEQ ID NO:493)。这些分子每天施用一次,持续10天,剂量如下:0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg和1mg/kg。从第2天开始,每天记录动物的体重。如图14A-14C所示,即使在1mg/kg的最高剂量下,包含不可切割连接体的EpCAM靶向ProTriTAC分子(ProTriTAC (NCLV))和GFP TriTAC(用作阴性对照)在小鼠中也很好地耐受。含有L040连接体序列的EpCAM靶向ProTriTAC分子在1mg/kg的剂量下耐受良好,而EpCAM靶向TriTAC在0.1mg/kg下耐受性良好。因此观察到,与EpCAM靶向TriTAC相比,含有L040连接体序列的EpCAM靶向ProTriTAC在小鼠中赋予至少约10倍改善的耐受性。

实施例11:EpCAM靶向ProTriTAC蛋白对人、食蟹猴或小鼠EpCAM的亲和力

[0318] 在结合测定中测量了各种示例性EpCAM靶向ProTriTAC蛋白对人、食蟹猴或小鼠EpCAM的亲和力,该测定还研究了测试的ProTriTAC蛋白与人EpCAM之间相互作用的结合动力学。结合动力学显示在图15A、15B和15C中。

[0319] 包含示例性EpCAM结合域H13 (SEQ ID No.207)、H90 (SEQ ID No.209)或H90.2 (SEQ ID No.497)的EpCAM靶向ProTriTAC蛋白的亲和力总结在表8中提供。

[0320] 表8:EpCAM靶向ProTriTAC蛋白的亲和力总结

	H13 (SEQ ID No. 576) (nM)	(H90) (SEQ ID No. 577) (nM)	H90.2 (SEQ ID No. 578) (nM)
huEpCAM:Fc	115	0.23	0.10

(SEQ ID No. 579)			
cyEpCAM:Fc (SEQ ID No. 580)	137	0.42	0.21
muEpCAM (小鼠 EpCAM 抗原的 生物素化形式)	无结合	0.26	0.15

实施例12:TriTAC形式、不可切割的前药形式或活性药物形式的示例性EpCAM靶向蛋白的T细胞接合能力和特异性

[0321] 使用表达EpCAM的结肠癌细胞HCT116,在T细胞依赖性细胞毒性(TDCC)测定(参见Nazarian AA,Archibeque IL,Nguyen YH,Wang P,Sinclair AM,Powers DA.2015.J Biomol Screen.20:519-27)中测试了包含如本文所述的示例性EpCAM结合域H13(SEQ ID NO.207)、H138.2(SEQ ID No.496)或H90.2(SEQ ID No.497)的三种示例性人源化EpCAM靶向ProTriTAC蛋白。H90.2和H138.2 EpCAM结合域序列分别与EpCAM结合域序列H90和H138基本相似,然而,框架4的第一个氨基酸被修饰(参见SEQ ID No.582)。特别是,EpCAM结合域序列H90和H138包含Asn脱酰胺(NG)位点,该位点被改变为WG以去除Asn脱酰胺,并且预期在蛋白质稳定性方面的改善(这继而可能有利于改善药物的可制备性)。

[0322] 结果显示在图16A(H13)、16B(H90.2)和16C(H138.2)中。测试的EpCAM结合蛋白包含EpCAM结合域(H13、H90.2或H138.2)、白蛋白结合域(抗ALB)和CD3结合域(抗CD3),其中抗ALB结构域进一步包含不可切割的连接体(NCLV)(不可切割的前药形式),或可切割连接体加上掩蔽结构域(ACT)。活化的EpCAM结合蛋白(CT)(活性药物形式)包含EpCAM结合域(H13、H90.2或H138.2)和CD3结合域(抗CD3)。

[0323] 在该测定中,萤光素酶标记的HCT116细胞与纯化的人T细胞合并,并暴露于滴定的上述示例性EpCAM结合蛋白(NCLV、CT、ACT)。推测如果EpCAM结合蛋白引导T细胞杀死表达EpCAM的HCT116细胞,则这些细胞的活力(通过在开始实验后48小时进行萤光素酶测定所确定的)应该会降低。还使用了EpCAM阴性NCI-H929骨髓瘤细胞进行了类似的测定,并且如图17A、17B和17C所示,所测试的蛋白质都不能与T细胞接合杀死NCI-H929细胞。

[0324] 图16A、16B和16C示出了来自使用HCT116细胞的测定的代表性TDCC数据。来自TDCC测定的 EC_{50} 值在表9中列出。如图中所见并由 EC_{50} 值所示,包含三种EpCAM结合域(H13、H90.2或H138.2)中任何一种的结合蛋白在表达EpCAM的HCT116结肠癌细胞中充当T细胞接合物。此外,对于具有可切割连接体和掩蔽结构域(ACT)的结合蛋白, EC_{50} 值比具有不可切割的连接体(NCLV)的结合蛋白(不可切割的前药形式)低约7至10倍(H13和H138.2);而对于活性药物(CT), EC_{50} 值比NCLV低至多约350倍(H138.2)。含有H13 EpCAM结合域的活性药物的 EC_{50} 约为37pM;H90.2结合域约为11pM;而H138.2结合域约为107pM。

[0325] 表9:使用EpCAM ProTriTAC蛋白在HCT116细胞上的TDCC测定的 EC_{50} 值

	<u>EC₅₀ (M)</u>	<u>相对于 NCLV 的 变化倍数</u>
EpCAM H13 ProTriTAC (NCLV) (SEQ ID No. 569)	6.87E-09	
EpCAM H13 ProTriTAC (CT) (SEQ ID No. 210)	3.67E-11	187
EpCAM H13 ProTriTAC (ACT) (SEQ ID No. 570)	7.07E-10	10
EpCAM H90.2 ProTriTAC		

	<u>EC₅₀ (M)</u>	<u>相对于 NCLV 的 变化倍数</u>
(NCLV) (SEQ ID No. 502)		
EpCAM H90.2 ProTriTAC (CT) (SEQ ID No. 571)	1.07E-11	
EpCAM H90.2 ProTriTAC (ACT) (SEQ ID No. 572)	2.67E-09	
EpCAM H138.2 ProTriTAC (NCLV) (SEQ ID No. 573)	3.73E-08	
EpCAM H138.2 ProTriTAC (CT) (SEQ ID No. 574)	1.07E-10	349
EpCAM H138.2 ProTriTAC (ACT) (SEQ ID No. 575)	5.01E-09	7

[0326] 为了进一步评估测试EpCAM结合蛋白的EpCAM特异性细胞杀伤潜力,用表达EpCAM的HCT116结肠癌细胞(野生型)或不表达EpCAM的HCT116(EpCAM-KO)细胞进行了如上所述的TDCC测定。在该测定中测试了包含EpCAM结合域H13或H90.2的EpCAM TriTAC蛋白,对照蛋白是GFP TriTAC蛋白和EGFR TriTAC蛋白。该测定的结果在图18A和18B中示出,EC₅₀值在表10中列出。

[0327] 基于EpCAM的表达,EpCAM结合蛋白表现出差异性的细胞杀伤。结合的特异性也通过流式细胞术进行了证实,如图19所示。对于流式细胞术测定,将细胞用300nM CT形式的H13或H90.2(活性药物)进行了染色,并用11D3-AF650抗体进行检测。

[0328] 表10:使用EpCAM TriTAC蛋白在HCT116细胞和HCT116(EpCAM-KO)细胞上的TDCC测定的EC₅₀值

	HCT116	HCT116(EpCAM-KO)
	EC₅₀ (M)	EC₅₀ (M)
EpCAM (H90.2) TriTAC	3.8E-10	3.3E-09
EpCAM (H13) TriTAC	2.3E-10	3.5E-06
EGFR TriTAC	5.6E-12	5.3E-12
GFP TriTAC	4.0E-09	5.8E-07

[0329] 在进一步的TDCC测定中,使用各种其他细胞系,比较了CT形式(活性药物,含有H13或H90.2 EpCAM结合域和抗CD3结构域)或不可切割的前药形式(含有H13或H90.2以及抗CD3和抗HSA与不可切割的连接体,NCLV)的两种EpCAM结合蛋白的细胞杀伤潜力。结果在表11中提供,并且图20的图示是针对使用SKBR3(人乳腺癌细胞)的TDCC测定。

[0330] 观察到在体外TDCC测定中,含有EpCAM结合域H13的活性药物的有效性是含有EpCAM结合域H90.2的活性药物约3倍。当蛋白质在其活性药物和不可切割的前药形式之间进行比较时(CT相比于NCLV),在采用多种EpCAM表达细胞的TDCC测定中表现出类似的400-600倍掩蔽。图21A和图21B显示了证明不可切割的前药形式实现的掩蔽效果的代表性图示。

[0331] 表11:使用活性EpCAM靶向活性药物(CT形式)在各种细胞系中测试的TDCC测定的EC₅₀值

TDCC EC ₅₀ (pM)		活性药物效力(pM)		H90.2/H13 比
		H13	H90.2	
CAPAN2	胰腺	4	11	2.6
SKBR3	乳腺	5	20	4.0
TT	食管	8	13	1.7
HEPG2	肝	13	44	3.3

HCT116	结肠	14	19	1.4
SW780	膀胱	16	56	3.6
DMS53	肺	18	60	3.4
OVCAR8	卵巢	57	160	2.8
HELA	宫颈	62	280	4.4
MDAPCA2b	前列腺	98	380	3.8
PECAPJ41	头颈	120	100	0.8
平均值		34	90	2.9x

[0332] 用细胞系(包括CAPAN2、DMS53、HepG2、KMRC3、MDAPCA2b和SKBR3)进行了另外的TDCC测定,以比较含有H13的EpCAM结合蛋白NCLV(不可切割的前药);ProTriTAC(带有可切割连接体L040)和活性药物CT。 EC_{50} 值在表12中提供,并且代表性图示在图22A、22B、22C、22D、22E、22F、22G和22H中示出。

[0333] 表12:使用活性EpCAM靶向活性药物(CT形式)在各种细胞系中测试的TDCC测定的 EC_{50} 值

细胞系	EpCAM 结合域	形式	EC_{50} (M)
CAPAN2 (胰腺)	H90.2	NCLV	6.31E-09
		L040	1.53E-09
		CT	1.06E-11
	H13	NCLV	2.49E-09
		L040	2.23E-10
		CT	4.06E-12
DMS53 (肺)	H90.2	NCLV	3.26E-08
		L040	1.42E-08
		CT	6.04E-11
	H13	NCLV	1.01E-08
		L040	4.11E-09
		CT	1.76E-11

细胞系	EpCAM 结合域	形式	EC ₅₀ (M)
HepG2 (肝)	H90.2	NCLV	1.18E-08
		L040	1.08E-08
		CT	4.37E-11
	H13	NCLV	8.63E-09
		L040	2.79E-09
		CT	1.32E-11
OVCAR8 (卵巢)	H90.2	NCLV	5.14E-08
		L040	3.53E-08
		CT	1.61E-10
	H13	NCLV	3.49E-08
		L040	1.83E-08
		CT	5.66E-11
PECAPJ41 (头颈)	H90.2	NCLV	6.48E-08
		L040	3.17E-08
		CT	1.01E-10
	H13	NCLV	7.57E-08
		L040	4.53E-08
		CT	1.24E-10
SKBR3 (乳腺)	H90.2	NCLV	9.53E-09
		L040	7.52E-09
		CT	2.02E-11
	H13	NCLV	2.95E-09
		L040	8.76E-10
		CT	4.98E-12
KMRC3	H90.2	NCLV	
		L040	
		CT	
	H13	NCLV	

细胞系	EpCAM 结合域	形式	EC ₅₀ (M)
MDAPCA2b		L040	
		CT	1.60E-11
	H90.2	NCLV	
		L040	6.74E-08
		CT	3.77E-10
	H13	NCLV	5.34E-08
L040		3.07E-08	
CT		9.81E-11	

实施例13:与EpCAM靶向TriTAC相比,EpCAM靶向ProTriTAC的抗肿瘤功效和耐受性

[0334] 在已建立的HT29结直肠肿瘤模型上评估了含有EpCAM结合域H13的EpCAM ProTriTAC的体内功效,并与含有EpCAM结合域H13的EpCAM TriTAC的体内功效进行了比较。

[0335] 在肿瘤植入后的第5天,向小鼠注射0.3mg/kg或0.1mg/kg的测试EpCAM H13 ProTriTAC;0.3mg/kg的测试EpCAM H13 TriTAC;或相当剂量的对照TriTAC,并在大约20天的时间内测量肿瘤体积。如图23A和图23B所示,EpCAM H13 ProTriTAC在小鼠肿瘤模型上比EpCAM H13 TriTAC更有效。

[0336] 在另一项研究中,向食蟹猴注射了相当剂量(30μg/kg)的EpCAM H13 ProTriTAC或EpCAM H13 TriTAC和细胞因子水平(IFN-γ;IL-2;IL-6;和IL-10)。结果显示在图24A、24B、24C和24D中,这表明在30μg/kg的单剂量食蟹猴研究中,与EpCAM H13 TriTAC相比,EpCAM H13 ProTriTAC表现出显著降低的细胞因子产生。

实施例14:示例性EpCAM结合蛋白在食蟹猴中的药代动力学性质

[0337] 将含有EpCAM结合域H13或H90.2的结合蛋白(TriTAC形式;ProTriTAC NCLV形式;以及具有可切割连接体L040的ProTriTAC的形式)施用于食蟹猴,并评估其药代动力学性质。图25A和图25B显示了测试蛋白质在食蟹猴中的血浆浓度随时间的变化。另外,表13总结了药代动力学参数。

[0338] 表13:EpCAM结合三特异性蛋白在食蟹猴中的PK参数

		Cmax (nM)	AUC_{0-inf} (小时* nM)	半衰期 (天)
H13	ProTriTAC (NCLV)	77	4586	9.7
	ProTriTAC (L040)	47	3643	5.8
	TriTAC	38	1588	2.5
H90.2	ProTriTAC (NCLV)	44	5603	10.5
	ProTriTAC (L040)	47	6387	7.7
	TriTAC	25	1126	2.6

实施例15: 评估EpCAM靶向ProTriTAC/TriTAC蛋白的治疗指数(功效和毒性)

[0339] 在该研究中,将不同剂量的含有EpCAM结合域H90的EpCAM靶向TriTAC蛋白或EpCAM靶向ProTriTAC蛋白,或对照TriTAC蛋白,注射到荷有LoVo肿瘤的小鼠模型(结肠癌模型)中。结果显示在图29A-29K中。还测试了ProTriTAC和TriTAC形式的安全性和耐受性,结果显示在图30A-30E中。存活百分比显示在图30A-30B中,而临床化学参数(ALT、AST和总胆红素)显示在图30C、30D和30E中。总体结果表明,在相同的LoVo荷瘤小鼠中,ProTriTAC形式的耐受性比TriTAC形式好约30倍。该观察结果通过组织病理学研究得到了进一步证实,该总结在图31和表14中提供。

[0340] 因此,根据药物在同一动物中的有效性和安全性,本研究证明了ProTriTAC形式的治疗指数扩大了约10倍。

[0341] 表14: TriTAC与ProTriTAC形式的可比的¹治疗指数

	最小有效剂量	最大耐受剂量	治疗指数 (TI)
EpCAM TriTAC	0.03 mg/kg	0.03 mg/kg	1
EpCAM ProTriTAC	0.1 mg/kg	1 mg/kg	10
ProTriTAC 优势	0.3x	30x	10x

[0342] 虽然本文已经显示并描述了本发明的优选实施方案,但是对于本领域技术人员显

而易见的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员现将想到许多变化、改变和替换。应当理解,在实施本发明的过程中可以采用本文所述的本发明实施方案的各种替代方案。旨在以所附权利要求书限定本发明的范围,由此涵盖在这些权利要求及其等同物范围内的方法和结构。

序列

SEQ ID NO:	抗 EpCAM 序列名称	氨基酸序列
1	EPL90	QVQLQESGGGLVQAGGSLRSLCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSG AFTNYADSVKARFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYFCGATFLRSDGHHTI NGQGTQVTVSS
2	EPL118	QVQLQESGGGLVQAGGSLRSLCAASGFIFRAASMGWFRQSPGNERELVATVSSG DFTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYFCGATFVRSDDGHHTI YGQGTQVTVSS
3	EPL138	QVQLQESGGGLVQAGGSLRSLCAASGFIFRAASMDWYRQFPGNERESIATISSGG FTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYFCGATFLRSDGHHTIN GQGTQVTVSS
4	EPL145	QVQLQESGGGLVQAGGSLRSLCAASGFIFRAASMGWFRQSPGNERELVATVSSG GFTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYFCGATFVRSDDGHHTI YGQGTQVTVSS
5	EPL164	QVQLQESGGGLVQAGGSLRSLCAASGFIFRAASMDWYRQSPGTQPELVATISSST GFTNYANSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYFCGATFLRSDGQHSI YGQGTQVTVSS
6	EPL31	QVQLQESGGGLVHTGGSLRSLCAASGDTFLRYAMGWFRQAPGKREFVAAITW NGGNTDYAGSLKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCAADLTFGLAS SHYQYDYWGQGTQVTVSS
7	EPL55	QVQLQESGGGLVQAGGSLRSLCAASGDTFLRYAMGWFRQAPGKREFVAAITW NGGNTDYAGSLKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCAADLTFGLAS SHYQYDYWGQGTQVTVSS
8	EPL57	QVQLQESGGGLVHTGGSLRSLCAFSGDTFLRYAMGWFRQAPGKREFVAAITW NGGNTDYADSLKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTAVYYCAADLTFGLAS SHYQYDYWGQGTQVTVSS
9	EPL136	QVQLQESGGGLVQPGGSLRSLCAASGDTFLRYAMGWFRQAPGKREFVAAITW NGGNTDYAGSLKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCAADLTFGLAS SHYQYDYWGQGTQVTVSS
10	EPL15	QVQLQESGGGSVLAGGSLRSLCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIHY TGDWTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCARGSDKGGQ TQVTVSS
11	EPL34	QVQLQESGGGSVQAGGSLRSLCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIHY TGDWTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCARGSDKGGQ TQVTVSS
12	EPL86	QVQLQESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSDWAMSWVRQAPGKGLEWVSGIHY

		GDHTTHYADFKVGRFTISRDDAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCARGSTKGQGT QVTVSS
13	EPL153	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDWAMSWVRQAPGKGLEWVSSIH GDHTTHYADFKVGRFTISRDDAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCEKGTTRGQGT QVTVSS
14	EPL20	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCAASGNVFRAATMAWYRQAPEKQREMVATIA SGGTTNYADFKVGRFTISRDNKNTVYLMNTLKPEDTAVYYCNAGYLTSLGP KNYWGQGTQVTVSS
15	EPL70	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNVFRAATMAWYRQAPEKXREMVATIAS GGTNYADFKVGRFTISRDNKNTVYLMNTLKPEDTAVYYCNAGYLTSLGP KNYWGQGTQVTVSS
16	EPL125	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNVFRAATMAWYRQVPEKQREMVATIA SGGTTNYADFKVGRFTISRDNKNTVYLMNTLKPEDTAVYYCNALYLTSLGP KSYWGQGTQVTVSS
17	EPL13	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAGFNHMYWYRQAPGRGRELVASISS GGSTNYVDSVKGRFTISRDNARNTVYLMYSLKPEDTAVYYCGTSDNWGQGT QVTVSS
18	EPL129	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFAGFNHMYWYRQAPGRGRELVASISS GGSTNYVDSVKGRFTISRDNARNTVYLMYSLRPEDTAVYYCGTSDNWGQGTQ VTVSS
19	EPL159	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFAGFNHMYWYRQAPGRGRELVASISS GGSTNYVDSVKGRFTISRDNARNTVYLMYSLKPEDTAVYYCGTSDNWGQGT QVTVSS
20	EPL120	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFRAASISWYRQSPGNERELVATINSGG FTNYADSVLGRFTISRDNKNTGYLQMNSLKPEDTAVYFCAATFLRSDGQPIW GQGTQVTVSS
21	EPL126	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFRAASMGWYRQSPGNERELVATINSG GFTNYADSVKGRFTISRDNKNTGYLQMNSLKPEDTAVYFCAATFLRSDGQPI WGQGTQVTVSS
22	EPL60	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASEYILSMYRMAWYRQAPGKVRELVADMS SGGTTNYADFKVGRFTISRDNDRNTVYLMNRLQPEDTAAYYCNVAGRTGPPS YDAFNNWGQGTQVTVSS
23	EPL156	QVQLQESGGGLVQPGASLRVSCAASEYILSMYRMAWYRQAPGKVRELVADMS SGGTTNYADFKVGRFTISRDNDRNTVYLMNRLQPEDTAAYYCNVAGRTGPPS YDAFNNWGQGTQVTVSS
24	EPL2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASESISFIAVGWYRQAPGKERELVAGINRSG FTYYTDSVKGRFSISRDNKNTVLLQMTSLKPEDTAVYYCNAGGLYFSNAYTQ GDYWGQGTQVTVSS

25	EPL43	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAASESISFIAVGWYRQAPGKERELVAGINRSG FTYYTDSVKGRFSISRDNKNTVLLQMTSLKPEDTAVYYCNAGGLYFSNAYTQ GDYWGQGTQVTVSS
26	EPL10	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSVFRANVMGWYRQAPGKQHELVARID PGGTTYADPVKGRFTISRDNKKTVYQLQMNSLKPDDTAVYYCNAIILSGGPK DYWGQGTQVTVSS
27	EPL49	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAPSGRTSSIFGMGWFRQAPGKEREVVASINWS GGSTSYADSVKGRFTISRDNKNEMYLQMNSLKFEDTAVYVCAAAVLTKNPSW NFWGQGTQVTVSS
28	EPL58	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGPIFSDTIRTMGWYRQAAGKQRELVATIA SFPSRTNYVDSVKGRFTISRDIKNTVYQLQMDSLKPEDTAVYYCNVDLASIPTKT YWGQGTQVTVSS
29	EPL74	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFGINAMGWYRQAPGKQRESVAFITIG GNTNYLDSVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNLKPEDTAVYYCNTNPLLITAGGL YWGQGTQVTVSS
30	EPL78	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSANRFNINVMGWYRQAPGQRELVATINIG GSTDYADSVKGRFTISRDNKNTVYQLSDLKPEDTAVYYCNVKLRVSGPTGPN VYWGQGTQVTVSS
31	EPL82	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCTASGTILSTMAWYRQAPGKQRELVATISRGGT TNYSDSVKGRFAISRDKNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCNTPLTDYGMGYNWG QGTQVTVSS
32	EPL83	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSIFSLNTLAWYRQAPGRQRDLIARITGG GTTYADSVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCNLMVRHPSGSTY EYWGQGTQVTVSS
33	EPL97	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGHIIFRGTTMGWFRQAPGKQRESVASISPLG TTSYSGSVEGRFTVSRDNKNTLFLQMNSLKSEDTAVYYCNAIQVTNVGPRVY WGQGTQVTVSS
34	EPL109	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCASSGFTLDDYTIGWFRQAPGKEREGVSCISRRD DSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMISLRPEDTAVYYCAATPRSYTLRCLG KFDFQGGTQVTVSS
35	EPL117	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNIVRMTNMAWYRQAPGKQREFVATISA GGSTTYVDSVKDRFTISRDNKNTVYQLQMNYLKPEDTAVYYCATGSILTNRGAI PGSWGHTQVTVSS
36	EPL127	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAPGFANDHAILWFRQAPGKEREGVSEICRD GTTYTDSVKGRFTISSDNKNTVYQLQMNSVKTDDEAVYYCAVDRRRRYCSGN RAFSSDYWYWGQGTQVTVSS
37	EPL152	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVHSGSIFRASTMAWYRQAPGKQRELVAQIMS GGGTNYAGSVKGRFTISRDNANNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCNAAQITSWGPK

		VYWGQGTQTVSS
38	EPL189	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRINSINTMGWYRQAPGNQRELVAEITRG GTTNYADSVQGRYAISRDNAKNLVYLQMNSLKPEDTDVYYCNAQTFPTFSRPT GLDYWGQGTQTVSS
SEQ ID NO:	抗 EpCAM 序列 CDR1	氨基酸序列
39	EPL90	GFIFRAASMA
40	EPL118	GFIFRAASMG
41	EPL138	GFIFRAASMD
42	EPL145	GFIFRAASMG
43	EPL164	GFIFRAASMD
44	EPL31	GDTFLRYAMG
45	EPL55	GDTFLRYAMG
46	EPL57	GDTFLRYAMG
47	EPL136	GDTFLRYAMG
48	EPL15	GFTFSSYYMS
49	EPL34	GFTFSSYYMS
50	EPL86	GFTFSWAMS
51	EPL153	GFTFSWAMS
52	EPL20	GNVFRAATMA
53	EPL70	GNVFRAATMA
54	EPL125	GNVFRAATMA
55	EPL13	GFAFGNHWMY
56	EPL129	GFAFGNHWMY
57	EPL159	GFAFGNHWMY
58	EPL120	GFIFRAASIS
59	EPL126	GFIFRAASMG
60	EPL60	EYILSMYRMA
61	EPL156	EYILSMYRMA
62	EPL2	ESISSFIAVG
63	EPL43	ESISSFIAVG
64	EPL10	GSVFRANVMG
65	EPL49	GRTSSIFGMG
66	EPL58	GPIFSDTIRTMG
67	EPL74	GSIFGINAMG
68	EPL78	ANRFNINVMG
69	EPL82	GTILSTMA
70	EPL83	GSIFSLNTLA

71	EPL97	GIIFRGTTMG
72	EPL109	GFTLDDYTIG
73	EPL117	GNIVRMTNMA
74	EPL127	GFAFNDHAIL
75	EPL152	GSIFRASTMA
76	EPL189	GRINSINTMG
SEQ ID NO:	抗 EpCAM 序列 CDR2	氨基酸序列
77	EPL90	SISSGAFTNYADSVKA
78	EPL118	TVSSGDFTNYADSVKG
79	EPL138	TISSGGFTNYADSVKG
80	EPL145	TVSSGGFTNYADSVKG
81	EPL164	TISSTGFTNYANSVKG
82	EPL31	AITWNGGNTDYAGSLKG
83	EPL55	AITWNGGNTDYAGSLKG
84	EPL57	AITWNGGNTDYADSLKG
85	EPL136	AITWNGGNTDYAGSLKG
86	EPL15	GIHYTGDWTNYADSVKG
87	EPL34	GIHYTGDWTNYADSVKG
88	EPL86	GIHYGDHTTHYADFVKG
89	EPL153	SIHYGDHTTHYADFVKG
90	EPL20	TIASGGTTNYADFVKG
91	EPL70	TIASGGTTNYADFVKG
92	EPL125	TIASGGTTNYADFVKG
93	EPL13	SISSGGSTNYVDSVKG
94	EPL129	SISSGGSTNYVDSVKG
95	EPL159	SISSGGSTNYVDSVKG
96	EPL120	TINSSGFTNYADSVLG
97	EPL126	TINSSGFTNYADSVKG
98	EPL60	DMSSGGTTNYADFVKG
99	EPL156	DMSSGGTTNYADFVKG
100	EPL2	GINRSGFTYYTDSVKG
101	EPL43	GINRSGFTYYTDSVKG
102	EPL10	RIDPGGTTTYADPVKG
103	EPL49	SINWSGGSTSYADSVKG
104	EPL58	TIASFPSRTNYVDSVKG
105	EPL74	FITIGGNTNYLDSVKG
106	EPL78	TINIGGSTDYADSVKG

107	EPL82	TISRGGTTNYSDSVKG
108	EPL83	RITGGGTTVYADSVKG
109	EPL97	SISPLGTTSYSGSVEG
110	EPL109	CISRRDDSTYYADSVKG
111	EPL117	TISAGGSTTYVDSVKD
112	EPL127	EICRDGTTYTDSVKG
113	EPL152	QIMSGGGTNYAGSVKG
114	EPL189	EITRGGTTNYADSVQG
SEQ ID	抗 EpCAM 序列	氨基酸序列
NO:	CDR3	
115	EPL90	TFLRSDGHHTI
116	EPL118	TFVRSBGHHTI
117	EPL138	TFLRSDGHHTI
118	EPL145	TFVRSBGHHTI
119	EPL164	TFLRSDGQHSI
120	EPL31	DLTFGLASSHYQYDY
121	EPL55	DLTFGLASSHYQYDY
122	EPL57	DLTFGLASSHYQYDY
123	EPL136	DLTFGLASSHYQYDY
124	EPL15	GSD
125	EPL34	GSD
126	EPL86	GST
127	EPL153	GTT
128	EPL20	GYLTSLGPKNY
129	EPL70	GYLTSLGPKNY
130	EPL125	LYLTSLGPKSY
131	EPL13	SDN
132	EPL129	SDN
133	EPL159	SDN
134	EPL120	TFLRSDGQPPI
135	EPL126	TFLRSDGQPPI
136	EPL60	AGRTGPPSYDAFNN
137	EPL156	AGRTGPPSYDAFNN
138	EPL2	GGLYFSNAYTQGDY
139	EPL43	GGLYFSNAYTQGDY
140	EPL10	IILLSGGPKDY
141	EPL49	AVLTNKPSWNF
142	EPL58	DLASIPKTY

143	EPL74	NPPLILTAGGLY
144	EPL78	KLRVSGTGPNVY
145	EPL82	PLTDYGMGYN
146	EPL83	MVRHPSGSTY EY
147	EPL97	IQVTNVGPRVY
148	EPL109	TPRSYTLRCLGKDFD
149	EPL117	GSILTNRGAIPGS
150	EPL127	DRRRYYCSGNRAFSSDYY
151	EPL152	AQITSWGPKVY
152	EPL189	QTFPTFSRPTGLDY
SEQ ID NO:	抗 CD3/抗 EpCAM 序列名称	氨基酸序列
153	EPL10	VVGGGGTQTVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSVFRANVMGWYRQAPGKQHELVARI DPGGTTYADPVKGRFTISRDNAAKKTIVYLQMNLSKPDPTAVYYCNAIILLSGGP KDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
154	EPL109	VVGGGGTQTVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCASSGFTLDDYTIGWFRQAPGKEREGVSCISRR DDSTYYADSVKGRFTISRDNAAKNTVDLQMISLRPEDTAVYYCAATPRSYTLRCL GKDFDQGGTQVTVSSHHHHHH*
155	EPL117	VVGGGGTQTVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNIVRMTNMAWYRQAPGKQREFVATIS AGGSTTYVDSVKDRFTISRDNKNTVYLQMNLYLPEDTAVYYCATGSILTNRGA IPGSWGHGTQVTVSSHHHHHH*
156	EPL120	VVGGGGTQTVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF

		NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFRAASISWYRQSPGNERELVATINS GFTNYADSVLGRFTISRDNKNTGYLQMNSLKPEDTAVYFCAATFLRSDGQPPI WGQGTQVTVSSHHHHHH*
157	EPL125	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNVFRAATMAWYRQVPEKQREMVATI ASGGTTNYADFKGRFTISRDNKNTVYLMNTLKPEDTAVYYCNALYLTSLG PKSYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
158	EPL127	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAPGFANDHAILWFRQAPGKEREGVSEICR DGTYYTDSVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSVKTTDDTAVYYCAVDRRRYYCSG NRAFSSDYWWGQGTQVTVSSHHHHHH*
159	EPL13	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAGNHWMYWYRQAPGRGRELVASIS SGGSTNYVDSVKGRFTISRDNARNTVYLMYSLKPEDTAVYYCGTSDNWGQGT QVTVSSHHHHHH*
160	EPL136	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDTFLRYAMGWFRQAPGKEREFVAAIT WNGGNTDYAGSLKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAADLTFGLA SSHYQYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
161	EPL138	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF

		NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFRAASMDWYRQFPGNERESIATISSG GFTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCGATFLRSDGHHTI NGQGTQVTVSSHHHHHH*
162	EPL145	VVGGGGTQTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGKTLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFRAASMGWFRQSPGNERELVATVSS GGFTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCGATFVRSDDGH TIYGGGTQVTVSSHHHHHH*
163	EPL152	VVGGGGTQTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGKTLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVHSGSIFRASTMAWYRQAPGKQRELVAQIM SSGGTNYAGSVKGRFTISRDNANNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNAQAITSWGP KVYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
164	EPL153	VVGGGGTQTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGKTLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDWAMSWVRQAPGKGLEWVSSIH YGDHTTHYADFKGRFTISRDDAKNTLYLMNSLKPEDTAVYYCEKGTTRGQG TQVTVSSHHHHHH*
165	EPL156	VVGGGGTQTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGKTLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQPGASLRVSCAASEYILSMYRMAWYRQAPGKRELVADM SSGGTNYADFKGRFTISRDNDRNTVYLMNRLQPEDTAAYYCNVAGRTGPP SYDAFNNWGQGTQVTVSSHHHHHH*
166	EPL164	VVGGGGTQTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGKTLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF

		NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFRAASMDWYRQSPGTQPELVATISS GFTNYANSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCGATFLRSDGQHSI YGQGTQVTVSSHHHHH*
167	EPL189	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGKTLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRINSINTMGWYRQAPGNQRELVAEITR GGTTNYADSVQGRYAISRDNKNTVYLMNSLKPEDTDVYYCNAQTFPTFSRP TGLDYWGQGTQVTVSSHHHHH*
168	EPL2	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGKTLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASESISFIAVGWYRQAPGKERELVAGINRS GFTYYTDSVKGRFSISRDNKNTVLLQMTSLKPEDTAVYYCNAAGGLYFSNAYT QGDYWGQGTQVTVSSHHHHH*
169	EPL20	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGKTLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCAASGNVFRAATMAWYRQAPEKQREMVATI ASGGTTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNTLKPEDTAVYYCNAAGYLTSLG PKNYWGQGTQVTVSSHHHHH*
170	EPL34	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGKTLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSGIH YTGDWTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNLLKPEDTAVYYCARGSDKGQ GTQVTVSSHHHHH*
171	EPL49	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGKTLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF

		NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAPSGRTSSIFGMGWFRQAPGKEREVVASINW SGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNEMYLQMNSLKFEDTAVYVCAAVALTNKPS WNFWGQGTQVTVSSHHHHHH*
172	EPL58	VVGGGGTQTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGPIFSDTIRTMGWYRQAAGKQRELVATI ASFPSRTNYVDSVKGRFTISRDIKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCNVDLASIPTK TYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
173	EPL74	VVGGGGTQTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFGINAMGWYRQAPGKQRESVAFITI GGNTNYLDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNGLKPEDTAVYYCNTNPLILTAG GLYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
174	EPL78	VVGGGGTQTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSANRFNINVMGWYRQAPGQKRELVATINI GGSTDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQLSDLKPEDTAVYYCNVKLRVSGPTGP NVYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
175	EPL82	VVGGGGTQTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCTASGTILSTMAWYRQAPGKQRELVATISRGG TTNYSDSVKGRFAISRDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNTPLTDYGMGYNW GQGTQVTVSSHHHHHH*
176	EPL83	VVGGGGTQTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF

		NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSIFSLNTLAWYRQAPGRQRDLIARITGG GTTVYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLYQMNSLKPEDTAVYYCNLMVRHPSGSTY EYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
177	EPL86	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDWAMSWVRQAPGKGLEWVSGIH YGDHTTHYADFVKGRFTISRDDAKNTLYLYQMNSLKPEDTAVYYCARGSTKGQG TQVTVSSHHHHHH*
178	EPL90	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISS GAFTNYADSVKARFTISRDNAKNTVYLYQMNSLKPEDTAVYFCGATFLRSDGHH TINGQGTQVTVSSHHHHHH*
179	EPL97	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIIFRGTMTMGWFRQAPGKQRESVASISPL GTTSYSGSVEGRFTVSRDNAKNTLFLQMNSLKSEDTAVYYCNAIQVTNVGPRVY WGQGTQVTVSSHHHHHH*
SEQ ID NO:	抗 EpCAM /抗 CD3 序列名称	氨基酸序列
180	EPL10	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSVFRANVMGWYRQAPGKQHELV ARIDPGGTTTYADPVKGRFTISRDNAKKTVYLYQMNSLKPDDTAVYYCNAIILLSG GPKDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLHHHHHH*
181	EPL109	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCASSGFTLDDYTIGWFRQAPGKEREGVSC

		ISRRDDSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMISLRPEDTAVYYCAATPRSYTL RCLGKFDQGGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGG GGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPG QAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNR WVFGGGTKLTVLHHHHHH*
182	EPL117	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNIVRMTNMAWYRQAPGKQREFV ATISAGGSTTYVDSVKDRFTISRDNKNTVYLMNLYLKPEDTAVYYCATGSILT NRGAIPGSWGHTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGG GGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPG QAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNR WVFGGGTKLTVLHHHHHH*
183	EPL120	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFRAASISWYRQSPGNERELVATI NSGGFTNYADSVLGRFTISRDNKNTGYLQMNLSLKPEDTAVYFCAATFLRSDGQ PPIWGQTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNK YAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLI GGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGG TKLTVLHHHHHH*
184	EPL125	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNVFRAATMAWYRQVPEKQREMV ATIASGGTTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNTLKPEDTAVYYCNALYLTS LGPKSYWGQTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQA PRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWV FGGGTKLTVLHHHHHH*
185	EPL127	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAPGFANDHAILWFRQAPGKEREVGS EICRDGTTYTDVSVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSVKTDDTAVYYCAVDRRRY YCSGNRAFSSDYWYWGQTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLK LSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVS SGGGSGGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNW VQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCT LWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
186	EPL13	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAGNHWMYWYRQAPGRGRELV

		ASISSGGSTNYVDSVKGRFTISRDNARNTVYLMYSLKPEDTAVYYCGTSDNWG QGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAIN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SQT VVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKL TVLHHHHHH*
187	EPL136	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLASGDTFLRYAMGWFRQAPGKEREFVA AITWNGGNTDYAGSLKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAADLTF GLASSHYQYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS AASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISR DSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSG GGSGGGSGGGGSQT VVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQ KPGQAPRGLIGGT KFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLW YSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
188	EPL138	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCLASGFIFRAASMDWYRQFPGNERESIAT ISSGGFTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCGATFLRSDG HHTINGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCLASGFTFN KYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG GGGGSQT VVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPR GLIGGT KFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWV FGGTKLTVLHHHHHH*
189	EPL145	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCLASGFIFRAASMGWFRQSPGNERELVA TVSSGGFTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCGATFVRSD GHHTIYQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCLASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNLLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQT VVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGT KFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWV FGGGTKLTVLHHHHHH*
190	EPL152	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVHSGSIFRASTMAWYRQAPGKQRELVA QIMSGGGTNYAGSVKGRFTISRDNANNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNAQAITS WGPVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCLASG FTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSQT VVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQ APRGLIGGT KFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNR WVFGGGTKLTVLHHHHHH*
191	EPL153	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFSDWAMSWVRQAPGKGLEWV

		SSIHYGDHTTHYADFVKGRFTISRDDAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCEKGTR GQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAIN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SQTVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKL TVLHHHHHH*
192	EPL156	GGGSQVQLQESGGGLVQPGASLRVSCAASEYILSMYRMAWYRQAPGKVRELV ADMSSGGTTNYADFVKGRFTISRDNDRNTVYLQMNRLQPEDTAAYYCNVAGR TGPPSYDAFNNWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS AASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGG GGSGGGSGGGGSQTVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQ KPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWY SNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
193	EPL164	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFRAASMDWYRQSPGTQPELVA TISSTGFTNYANSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNNSLKPEDTAVYFCGATFLRSDG QHSIYGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRG LIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGG GTKLTVLHHHHHH*
194	EPL189	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRINSINTMGWYRQAPGNQRELVA EITRGGTTNYADSVQGRYAISRDNKNTVYLQMNNSLKPEDTDVYYCNAQTFPTF SRPTGLDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGGGSGGGGSQTVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPG QAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNR WVFGGGTKLTVLHHHHHH*
195	EPL2	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASESISFIAVGWYRQAPGKERELVAGI NRSGFTYYTDSVKGRFSISRDNKNTVLLQMTSLKPEDTAVYYCNAGGLYFSNA YTQGDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSQTVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQA PRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWV FGGGTKLTVLHHHHHH*
196	EPL20	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCAASGNVFRAATMAWYRQAPEKQREMV

		<p>ATIASGGTTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNTLKPEDTAVYYCNAGYLT SLGPKNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQ APRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRW VFGGGTKLTVLHHHHHH*</p>
197	EPL34	<p>GGGSQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCLASGFTSSYYMSWVRQAPGKGLEWVS GIHYTGDWTNYADSVKGRFTISRDNKNEYLEMNNLKPEDTAVYYCARGSDK GQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAIN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SQTVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKL TVLHHHHHH*</p>
198	EPL49	<p>GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAPSGRTSSIFGMGWFRQAPGKEREFVAS INWSGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNEYLEMNNLKFEDTAVYVCAAAVLTN KPSWNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGG GGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQA PRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWV FGGGTKLTVLHHHHHH*</p>
199	EPL58	<p>GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCLASGPIFSDTIRTMGWYRQAAGKQREL VATIASFPSRTNYVDSVKGRFTISRDIKNTVYLMNLSLKPEDTAVYYCNVDLAS IPTKTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWV FGGGTKLTVLHHHHHH*</p>
200	EPL74	<p>GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCLASGIFGINAMGWYRQAPGKQRESVA FITIGGNTNYLDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNGLKPEDTAVYYCNTNPPLILT AGGLYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWV FGGGTKLTVLHHHHHH*</p>
201	EPL78	<p>GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSANRFNINVMGWYRQAPGQRELVA</p>

		TINIGGSTDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQLSDLKPEDTAVYYCNVKLRVSG PTGPNVYWQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQ APRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRW VFGGGTKLTVLHHHHHH*
202	EPL82	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCTASGTILSTMAWYRQAPGKQRELVA RGGTTNYSVSVKGRFAISRDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNTPLTDYGMG YNWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNK YAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLI GGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGG TKLTVLHHHHHH*
203	EPL83	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSIFSLNTLAWYRQAPGRQRDLIAR ITGGGTTVYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNLMVRHPS GSTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQA PRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWV FGGGTKLTVLHHHHHH*
204	EPL86	GGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDWAMSWVRQAPGKGLEWV SGIHYGDHTTHYADFVKGRFTISRDDAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCARGST KGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTK LTVLHHHHHH*
205	EPL90	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVA SISSGAFTNYADSVKARFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCGATFLRSD GHHTINGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWV GGGTKLTVLHHHHHH*
206	EPL97	GGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIIIFRGTMGWFRQAPGKQRESVAS

		ISPLGTTSYSGSVVEGRFTVSRDNAKNTLFLQMNSLKSEDTAVYYCNAIQVTNVGP RVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPLSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRG LIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGG GTKLTVLHHHHHH*
SEQ ID NO:	人源化抗 EpCAM 序列名 称	氨基酸序列
207	H13	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFVAFGNHWMYWYRQAPGRGRELVASISS GGSTNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGTSDNWGQGLT VTVSS
208	H138	EVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMDWYRQFPGNERESIATISSGG FTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIN GQGTLTVTVSS
209	H90	EVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGA FTNYADSVKARFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIN GQGTLTVTVSS
SEQ ID NO:	人源化抗 CD3/ 抗 EpCAM 序列 名称	氨基酸序列
210	H13	VVGGGGTQTVVTQEPLSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGKTLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFVAFGNHWMYWYRQAPGRGRELVASIS SGGSTNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGTSDNWGQGT LTVVSSH HHHHH*
211	H138	VVGGGGTQTVVTQEPLSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGKTLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SEVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMDWYRQFPGNERESIATISSG GFTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTI NGQGTLTVVSSH HHHHH*
212	H90	VVGGGGTQTVVTQEPLSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF

		GGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGG SEVQLLESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSG AFTNYADSVKARFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTI NGQGTLVTVSSHHHHH*
抗 EpCAM 序列名 称	SEQ ID No.	框架 1 序列
213	EPL90	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
214	EPL118	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
215	EPL138	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
216	EPL145	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
217	EPL164	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
218	EPL31	QVQLQESGGGLVHTGGSLRLSCAAS
219	EPL55	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
220	EPL57	QVQLQESGGGLVHTGGSLRLSCAFS
221	EPL136	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
222	EPL15	QVQLQESGGGSVLAGGSLRLSCAAS
223	EPL34	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS
224	EPL86	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
225	EPL153	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
226	EPL20	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCAAS
227	EPL70	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
228	EPL125	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
229	EPL13	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
230	EPL129	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
231	EPL159	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
232	EPL120	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
233	EPL126	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
234	EPL60	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
235	EPL156	QVQLQESGGGLVQPGASLRVSCAAS
236	EPL2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
237	EPL43	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAAS
238	EPL10	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
239	EPL49	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAPS

240	EPL58	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
241	EPL74	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
242	EPL78	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATS
243	EPL82	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSTAS
244	EPL83	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVS
245	EPL97	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
246	EPL109	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCASS
247	EPL117	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
248	EPL127	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAP
249	EPL152	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVHS
250	EPL189	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
抗 EpCAM 序列名 称	SEQ ID No.	框架 2 序列
EPL90	251	WYRQSPGNERELVA
EPL118	252	WFRQSPGNERELVA
EPL138	253	WYRQFPGNERESIA
EPL145	254	WFRQSPGNERELVA
EPL164	255	WYRQSPGTQPELVA
EPL31	256	WFRQAPGKEREFVA
EPL55	257	WFRQAPGKEREFVA
EPL57	258	WFRQAPGKEREFVA
EPL136	259	WFRQAPGKEREFVA
EPL15	260	WVRQAPGKGLEWVS
EPL34	261	WVRQAPGKGLEWVS
EPL86	262	WVRQAPGKGLEWVS
EPL153	263	WVRQAPGKGLEWVS
EPL20	264	WYRQAPEKQREMVA
EPL70	265	WYRQAPEKXREMVA
EPL125	266	WYRQVPEKQREMVA
EPL13	267	WYRQAPGRGRELVA
EPL129	268	WYRQAPGRGRELVA
EPL159	269	WYRQAPGRGRELVA
EPL120	270	WYRQSPGNERELVA
EPL126	271	WYRQSPGNERELVA

EPL60	272	WYRQAPGKVRELVA
EPL156	273	WYRQAPGKVRELVA
EPL2	274	WYRQAPGKERELVA
EPL43	275	WYRQAPGKERELVA
EPL10	276	WYRQAPGKQHELVA
EPL49	277	WFRQAPGKREFVA
EPL58	278	WYRQAAGKQRELVA
EPL74	279	WYRQAPGKQRESVA
EPL78	280	WYRQAPGQQRELVA
EPL82	281	WYRQAPGKQRELVA
EPL83	282	WYRQAPGRQDLIA
EPL97	283	WFRQAPGKQRESVA
EPL109	284	WFRQAPGKEREVGS
EPL117	285	WYRQAPGKQREFVA
EPL127	286	WFRQAPGKEREVGS
EPL152	287	WYRQAPGKQRELVA
EPL189	288	WYRQAPGNQRELVA
抗 EpCAM 序列名 称	SEQ ID No.	框架 3 序列
EPL90	289	RFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYFCGA
EPL118	290	RFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYFCGA
EPL138	291	RFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYFCGA
EPL145	292	RFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYFCGA
EPL164	293	RFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYFCGA
EPL31	294	RFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAA
EPL55	295	RFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAA
EPL57	296	RFTISRDNKNTVYVLQMNSLRPEDTAVYYCAA
EPL136	297	RFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAA
EPL15	298	RFTISRDNKNELYLEMNNLKPEDTAVYYCAR
EPL34	299	RFTISRDNKNELYLEMNNLKPEDTAVYYCAR
EPL86	300	RFTISRDDAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAR
EPL153	301	RFTISRDDAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCEK
EPL20	302	RFTISRDNKNTVYVLQMNTLKPEDTAVYYCNA
EPL70	303	RFTISRDNKNTVYVLQMNTLKPEDTAVYYCNA

EPL125	304	RFTISRDNAKNTVYLLQMN ¹ TLKPEDTAVYYCNA
EPL13	305	RFTISRDNARNTVYLLQMYSLKPEDTAVYYCGT
EPL129	306	RFTISRDNARNTVYLLQMYSLRPEDTAVYYCGT
EPL159	307	RFTISRDNARNTVYLLQMYSLKPEDTAVYYCGT
EPL120	308	RFTISRDNAKNTGYLLQMN ¹ SLKPEDTAVYFCAA
EPL126	309	RFTISRDNAKNTGYLLQMN ¹ SLKPEDTAVYFCAA
EPL60	310	RFTISRDNDRNTVYLLQMNRLQPEDTAAYYCNV
EPL156	311	RFTISRDNDRNTVYLLQMNRLQPEDTAAYYCNV
EPL2	312	RFSISRDNAKNTVLLQMTSLKPEDTAVYYCNA
EPL43	313	RFSISRDNAKNTVLLQMTSLKPEDTAVYYCNA
EPL10	314	RFTISRDNAKKTVYLLQMN ¹ SLKPD ¹ DTAVYYCNA
EPL49	315	RFTISRDNAKNEMYLLQMN ¹ SLKFEDTAVYVCAA
EPL58	316	RFTISRDIAKNTVYLLQMDSLKPEDTAVYYCNV
EPL74	317	RFTISRDNAKNTVYLLQMNGLKPEDTAVYYCNT
EPL78	318	RFTISRDNAKNTVYLLQLSDLKPEDTAVYYCNV
EPL82	319	RFAISRDKNTVYLLQMN ¹ SLKPEDTAVYYCNT
EPL83	320	RFTISRDNAKNTVYLLQMN ¹ SLKPEDTAVYYCNL
EPL97	321	RFTVSRDNAKNTLFLQMN ¹ SLKSEDTAVYYCNA
EPL109	322	RFTISRDNAKNTVDLQMISLRPEDTAVYYCAA
EPL117	323	RFTISRDN ¹ TKNTVYLLQMN ¹ YLKPEDTAVYYCAT
EPL127	324	RFTISSDNAKNTVYLLQMN ¹ SVKTD ¹ DTAVYYCAV
EPL152	325	RFTISRDNANNTVYLLQMN ¹ SLKPEDTAVYYCNA
EPL189	326	RYAISRDNAKNTLVYLLQMN ¹ SLKPEDTDVYYCNA
抗 EpCAM 序列名 称	SEQ ID No.	框架 4 序列
EPL90	327	NGQGTQVTVSS
EPL118	328	YGQGTQVTVSS
EPL138	329	NGQGTQVTVSS
EPL145	330	YGQGTQVTVSS
EPL164	331	YGQGTQVTVSS
EPL31	332	WGQGTQVTVSS
EPL55	333	WGQGTQVTVSS
EPL57	334	WGQGTQVTVSS
EPL136	335	WGQGTQVTVSS

EPL15	336	KGQGTQVTVSS
EPL34	337	KGQGTQVTVSS
EPL86	338	KGQGTQVTVSS
EPL153	339	RGQGTQVTVSS
EPL20	340	WGQGTQVTVSS
EPL70	341	WGQGTQVTVSS
EPL125	342	WGQGTQVTVSS
EPL13	343	WGQGTQVTVSS
EPL129	344	WGQGTQVTVSS
EPL159	345	WGQGTQVTVSS
EPL120	346	WGQGTQVTVSS
EPL126	347	WGQGTQVTVSS
EPL60	348	WGQGTQVTVSS
EPL156	349	WGQGTQVTVSS
EPL2	350	WGQGTQVTVSS
EPL43	351	WGQGTQVTVSS
EPL10	352	WGQGTQVTVSS
EPL49	353	WGQGTQVTVSS
EPL58	354	WGQGTQVTVSS
EPL74	355	WGQGTQVTVSS
EPL78	356	WGQGTQVTVSS
EPL82	357	WGQGTQVTVSS
EPL83	358	WGQGTQVTVSS
EPL97	359	WGQGTQVTVSS
EPL109	360	QGQGTQVTVSS
EPL117	361	WGHGTQVTVSS
EPL127	362	WGQGTQVTVSS
EPL152	363	WGQGTQVTVSS
EPL189	364	WGQGTQVTVSS
SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
365	连接体	(GS) _n
366	连接体	(GGS) _n
367	连接体	(GGGS) _n

368	连接体	(GGSG)n
369	连接体	(GGSGG)n
370	连接体	(GGGGS)n
371	连接体	(GGGGG)n
372	连接体	(GGG)n
373	连接体	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
374	连接体	GGGGSGGGSGGGGS
375	连接体	GGGGSGGGGS
376	分选酶	LPETG
377	组氨酸标签	HHHHHH
378	抗 HSA sdAb 克隆 10G	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GRDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG TLVTVSS
379	抗 CD3, 克隆 2B2	EVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKLEWVARIRS KYNNTATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFG NSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL
380	示例性掩蔽序列	GGGGGLDGNEEPGG
381	示例性掩蔽序列	APGKG
382	示例性掩蔽序列	GGQDGNEEMGGG
383	示例性掩蔽序列	GGQDGNEEGG
384	示例性掩蔽序列	GGGGQDGNEEMGGGGG
385	示例性掩蔽序列	APFGSEM
386	示例性掩蔽序列	AWNGPYE
387	示例性掩蔽序列	AQDNGDTKTG
388	示例性掩蔽序列	AEAKETQG
389	示例性掩蔽序列	ATRREQVEG
390	示例性掩蔽序列	AQAPSQP
391	示例性掩蔽序列	ATRSRTRNDG
392	示例性掩蔽序列	ADVDPDGLG
393	示例性掩蔽序列	AADISDPGG
394	示例性掩蔽序列	ALSVDPSG

395	示例性掩蔽序列	ARLSVDPG
396	示例性掩蔽序列	AVEAADRG
397	示例性掩蔽序列	GGPDGNEEMGGG
398	示例性掩蔽序列	GGFDGNEEMGGG
399	示例性掩蔽序列	GGGDGNEEMGGG
400	示例性掩蔽序列	GGEMDGEGQNGG
401	示例性掩蔽序列	GGGGPDGNEEPGG
402	示例性掩蔽序列	GGGSLDGNEEPGG
403	示例性掩蔽序列	GGGALDGNEEPGG
404	示例性掩蔽序列	GGGGLDGNEEPGG
405	示例性掩蔽序列	GGGALDGNEEPGG
406	示例性掩蔽序列	GGGGPDGNEEPGGG
407	示例性掩蔽序列	GGSGALDGNEEPGG
408	示例性掩蔽序列	GGSGSLDGNEEPGG
409	示例性掩蔽序列	GGSGPDGNEEPGG
410	示例性掩蔽序列	GGVRDGPDGNEEPGG
411	示例性掩蔽序列	GGSGPDGNEEPGGG
412	示例性掩蔽序列	GGGRPDGNEEPGG
413	示例性掩蔽序列	GGSGLDGNEEPGG
414	示例性掩蔽序列	GGGVGPDGNEEPGG
415	示例性掩蔽序列	GGGEGPDGNEEPGG
416	示例性掩蔽序列	GGVALDGNEEPGG
417	示例性掩蔽序列	GGGRALDGNEEPGG
418	示例性掩蔽序列	GGYAGLDGNEEPGG
419	示例性掩蔽序列	GGAGPDGNEEPGG
420	示例性掩蔽序列	GGRGGPDGNEEPGG
421	示例性掩蔽序列	GGGGPDGNEEPGGG
422	示例性掩蔽序列	GGGEALDGNEEPGG
423	示例性掩蔽序列	GGDASLDGNEEPGG
424	示例性掩蔽序列	GGRDAPDGNEEGG
425	示例性可切割连接体序列	KRALGLPG
426	示例性可切割连接体序列	(DE) ₈ RPLALWRS(DR) ₈
427	示例性可切割连接体序列	PR(S/T)(L/I)(S/T)
428	示例性可切割连接体序列	LEATA

	接体序列	
429	示例性可切割连接体序列	GGAANLVRGG
430	示例性可切割连接体序列	SGRIGFLRTA
431	示例性可切割连接体序列	PLGLAG
432	示例性可切割连接体序列	PLGLAX
433	示例性可切割连接体序列	PLGC(me)AG
434	示例性可切割连接体序列	ESPAYYTA
435	示例性可切割连接体序列	RLQLKL
436	示例性可切割连接体序列	RLQLKAC
437	示例性可切割连接体序列	EP(Cit)G(Hof)YL
438	示例性可切割连接体序列	SGRSA
439	示例性可切割连接体序列	DAFK
440	示例性可切割连接体序列	GGGRR
441	示例性可切割连接体序列	GFLG
442	示例性可切割连接体序列	ALAL
443	示例性可切割连接体序列	FK
444	示例性可切割连接体序列	NLL
445	示例性可切割连接体序列	PIC(Et)FF
446	示例性可切割连接体序列	GGPRGLPG
447	示例性可切割连接体序列	HSSKLQ

	接体序列	
448	示例性可切割连接体序列	HSSKLQL
449	示例性可切割连接体序列	HSSKLQEDA
450	示例性可切割连接体序列	LVLASSSFGY
451	示例性可切割连接体序列	GVSQNYPIVG
452	示例性可切割连接体序列	GVVQASCRLA
453	示例性可切割连接体序列	F(Pip)RS
454	示例性可切割连接体序列	DPRSFL
455	示例性可切割连接体序列	PPRSFL
456	示例性可切割连接体序列	DEV D
457	示例性可切割连接体序列	DEVDP
458	示例性可切割连接体序列	KGSGDVEG
459	示例性可切割连接体序列	GWEHDG
460	示例性可切割连接体序列	EDDDDKA
461	示例性可切割连接体序列	KQEQNPGST
462	示例性可切割连接体序列	GKAFRR
463	示例性可切割连接体序列	DAFK
464	示例性可切割连接体序列	DVLK
465	示例性可切割连接体序列	DAFK
466	示例性可切割连接体序列	ALLLALL

	接体序列	
467	示例性可切割连接体序列	KPLGLQARVV
468	示例性可切割连接体序列	PQASTGRSGG
469	示例性可切割连接体序列	PQGSTGRAAG
470	示例性可切割连接体序列	PPASSGRAGG
471	示例性可切割连接体序列	PIPVQGRAH
472	具有掩蔽部分(以粗体和斜体示出)的示例性抗白蛋白(HSA)序列	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSKFGMSWVRQ GGGGGLDGNEEPGG LEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSVSSQGLVTVSS
473	具有掩蔽部分(以粗体和斜体示出)和可切割连接体(以粗体和下划线示出)的示例性抗白蛋白(HSA)序列	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSKFGMSWVRQ GGGGGLDGNEEPGG LEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSVSSQGLVTVSS GGGGKPLGLQARVVGGGGT
474	含有本公开的抗EpCAM结合域的proTriTAC分子的示例性抗CD3 scFv	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCAASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTK FLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLT VLGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLVTVSS
475	人 EpCAM	>tr B5MCA4 B5MCA4_人上皮细胞粘附分子 OS=智人 OX=9606 GN=EPCAM PE=1 SV=1 METKHLGRGGAGRAGPHLWRGPRPNCASAGAGGGEPTHSPNSRAVTHQRAPAA RECVENYKLAVNCFVNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAAKCLVMKAEMNGS KLGRRAKPEGALQNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVRRTD KDTEITCSERVRTYWHIELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITRYQLDPKFITSIL YENNVITIDLQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKMDLTVNGE QLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVISRKKR MAKYEKAEIKEMGEMHRELNA

476	食蟹猴 EpCAM	OS=食蟹猴 OX=9541 GN=EPCAM PE=4 SV=1 CVCENYKLAVNCFNDNGQCQCTSIGAQNTVLC SKLAAKCLVMKAEMNGSKL GRRAKPEGALQNN DGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSTCWCVNTAGVRRTDKD TEITCSERVRTYWIIELKHKAREKPYDVQSLRTALEEAIKTRYQLDPKFITNILE DNVITIDL VQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKMDLRVNGEQL DLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVISRKKRMA KYEKAEIKEMGEIHRELNA
477	小鼠 EpCAM	>sp Q99JW5 EPCAM_小鼠上皮细胞粘附分子 OS=小鼠 OX=10090 GN=Epcam PE=1 SV=1 MAGPQALAFGLLLAVVTATLAAAQRDCVCDNYKLATSCSLNEYGECQCTSYGT QNTVICSKLASKCLAMKAEMTHSKSGRRIKPEGAIQNN DGLYDPDCDEQGLFKA KQCNGTATCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYWIIELKHKERESPYDHQS LQTALQEAFTSRYKLNQKFIKNIMYENNVITIDLMQNSSQKTQDDVDIADVAYY FEKDVKGESLFHSSKMDLRVNGEPLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLTAGII AVIVVVSLAVIAGIVVLVISTRKKS AKYEKAEIKEMGEIHRELNA
478	人 EpCAM	>sp P16422 EPCAM_人上皮细胞粘附分子 OS=智人 OX=9606 GN=EPCAM PE=1 SV=2 MAPPQVLAFLGLLLAAATATFAAAQEEVCENYKLAVNCFVNNRQCQCTSVG AQNTVICSKLAAKCLVMKAEMNGSKL GRRAKPEGALQNN DGLYDPDCDESGLF KAKQCNGTSMCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYWIIELKHKAREKPYDS KSLRTALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVITIDL VQNSSQKTQNDVDIADVAYY FEKDVKGESLFHSSKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVI AVIVVVVIAVAVAGIVVLVISRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA
479	人 EpCAM 胞外 域序列	QEEVCENYKLAVNCFVNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAAKCLVMKAEMNG SKL GRRAKPEGALQNN DGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVRRRT DKDTEITCSERVRTYWIIELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITSI LYENNVITIDL VQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKMDLTVNGE QLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLK
480	食蟹猴 EpCAM 胞外域序列	QKEVCENYKLAVNCFNDNGQCQCTSIGAQNTVLC SKLAAKCLVMKAEMNG SKL GRRAKPEGALQNN DGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSTCWCVNTAGVRRRT DKDTEITCSERVRTYWIIELKHKAREKPYDVQSLRTALEEAIKTRYQLDPKFITNI LYEDNVITIDL VQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKMDLRVNGE QLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLK
481	小鼠 EpCAM 胞 外域序列	QRDCVCDNYKLATSCSLNEYGECQCTSYGTQNTVICSKLASKCLAMKAEMTHS KSGRRIKPEGAIQNN DGLYDPDCDEQGLF KAKQCNGTATCWCVNTAGVRRTDK DTEITCSERVRTYWIIELKHKERESPYDHQSLQTALQEAFTSRYKLNQKFIKNIM YENNVITIDLMQNSSQKTQDDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKMDLRVNGE PLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLT
482	10G sdAb H90	EVQLVESGGGLVQP GNSLRLSAASGFTFSKFGMSWVRQRQSTFMAMDMPILE

	Mask 1	WVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSVSSQGTLVTVSS
483	10G sdAb H90 Mask 2	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQQA YWWGNSRDLEW VSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSL SVSSQGTLVTVSS
484	H90 sdAb	EVQLLES GGGLVQPGGSLT LSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGA FTNYADSVKARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIN GQGTLVTVSS
485	示例性构建体	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLES GGGLVQPGGSLT LSCAASGFIFRAASM AWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGTLVTVSS TSDYKDDDDKTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
486	示例性构建体	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVES GGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSKFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGSGSGGGGGSGGGGGSGEVQLLES G GGLVQPGGSLT LSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADS VKARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGTLVT VSSTSDYKDDDDKTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRG RDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQUALPPR
487	示例性构建体	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVES GGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSKFG MSWVRQRQSTFMAMDMPLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYL LQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGSGSGGGGGSGGGGGSGEV QLLES GGGLVQPGGSLT LSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFT NYADSVKARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQ GTLVTVSS TSDYKDDDDKTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL D KRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
488	示例性构建体	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVES GGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSKFG MSWVRQQA YWWGNSRDLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGSGSGGGGGSGGGGGSGEVQ LLES GGGLVQPGGSLT LSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTN

		YADSVKARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQG TLVTVSSTSDYKDDDDKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFP EEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL D KRRGRDP EMMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH D G LYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
489	示例性构建体	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLS CAASGFTFSKFG MSWVRQRQSTFMAMDMPLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLY LQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSGGGGPQGSTGRAAGGGGGT EVQLLESGGGLVQPGGSLT LSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGA FTNYADSVKARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIN GQGT LVTV SSTS DYKDDDDKTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSRFP EEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDP EMMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
490	示例性构建体	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLS CAASGFTFSKFG MSWVRQQA YWWGNSRDLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSGGGGPQGSTGRAAGGGGGTE VQLLESGGGLVQPGGSLT LSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAF TNYADSVKARFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTING QGTL VTVS STSDYKDDDDKTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSRFP EEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH D GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
491	示例性构建体	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGALVQPGGSLRLS CAASGFVNRYS MRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCNVNVGFEYWGGTQVTVSSTSDYKDDDDKTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLY KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFP EEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVL D KRRGRDP EMMGGKPRRKNPQEGLYNELQK D KMAEAYSEIGMKGERRRGKGH D GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
492	EpCAM TriTAC	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLS CAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGS GRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQ G TLVTVSSGGGGSGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CASSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAAL T LSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTIS

		RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNER ELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCGATF LRSDGHHTINGQGLTVTVSSHHHHHH
493	GFP TriTAC	QVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAGMS SAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCNVNVGF EYW GQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGRD TLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPE DTAVYYCTIGGSLSVSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLK LSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVS SGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNW VQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCT LWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
494	EpCAM ProTriTAC L040 (CT)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTK FLVPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLT VLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAINW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYAD SVKARFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGLTV TVSSHHHHHH
495	EpCAM ProTriTAC 不可 切割	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGG LEWVSSISGSGRD TLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIG GSLSVSSQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGVVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVT LTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKA ALTL SGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLTLSCAAS GFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDN SKNTLYL QMN SLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGLTVTVSSHHHHHH
SEQ ID NO:	抗 EpCAM 序列 名称	氨基酸序列
496	H138.2	EVQLLESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMDWYRQFPGNERESIA TISSGG FTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIW GQGLTVTVSS
497	H90.2	EVQLLESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGA FTNYADSVKARFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIW

SEQ ID NO:	EpCAM ProTriTAC 序列(抗 Alb: 抗 CD3:抗 EpCAM)	氨基酸序列
		GQGLVTVSS
498	示例性 EpCAM ProTriTAC (L040)(H90.2)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGG LEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDITAVYYCTIG GSLVSSQGLVTVSSGGGGPQASTGRSGGGGGGTQTVVTVQEPSLTVSPGGTVT LTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLLGGKA ALTLGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLTSCAAS GFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGLVTVSSHHHHHH
499	示例性 EpCAM ProTriTAC (L041)(H90.2)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGG LEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDITAVYYCTIG GSLVSSQGLVTVSSGGGGPQGSTGRAAGGGGGGTQTVVTVQEPSLTVSPGGTVT LTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLLGGKA ALTLGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLTSCAAS GFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGLVTVSSHHHHHH
500	示例性 EpCAM ProTriTAC (L043)(H90.2)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGG LEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDITAVYYCTIG GSLVSSQGLVTVSSGGGGPQGSTARSAGGGGGGTQTVVTVQEPSLTVSPGGTVT LTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLLGGKA ALTLGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLTSCAAS GFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGLVTVSSHHHHHH*
501	示例性 EpCAM ProTriTAC (L001)(H90.2)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGG LEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDITAVYYCTIG GSLVSSQGLVTVSSGGGGKPLGLQARVVGGGGGTQTVVTVQEPSLTVSPGGTVT

		LTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLTSCAAS GFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGT LVTVSSH HHHHH
502	示例性 EpCAM 不可切割的前药 (NCLV) (H90.2)	EVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGG LEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSVSSQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGVVGGGGTQT VVTVQEPSLTVSPGGTVT LTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLTSCAAS GFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTI WGQGT LVTVSSH HHHHH
SEQ ID NO:	连接体	氨基酸序列
503	示例性连接体序列(L040)	GGGGPQASTGRSGGGGG
504	示例性连接体序列(L041)	GGGGPQGSTGRAAGGGGG
505	示例性连接体序列(L043)	GGGGPQGSTARSAGGGGG
506	示例性连接体序列(L001)	GGGGKPLGLQARVVGGGG
507	示例性连接体序列(NCLV)	GGGGSGGGGSGGVVGGGG
SEQ ID NO:	EpCAM 结合蛋白序列	氨基酸序列
569	H13 不可切割的前药 (NCLV)	EVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGG LEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSVSSQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGVVGGGGTQT VVTVQEPSLTVSPGGTVT LTCASSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN

		SYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAAS GFAFGNHWMYWYRQAPGRGRELVASISSGGSTNYVDSVKGRFTISRDNANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCGTSDNWGQGLVTVSSHHHHHHH*
570	EpCAM-H13 TriTAC (ACT)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG TLVTVSSGGGGSGGGSTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLVTVSS GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFAFGNHWMYWYRQAPGR GRELVASISSGGSTNYVDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGT SDNWGQGLVTVSSHHHHHHH*
571	EpCAM-H90.2 (CT)	VVGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWV GGGKTLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGG SEVQLLESAGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSG AFTNYADSVKARFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTI WGQGLVTVSSHHHHHHH*
572	EpCAM TriTAC-H90.2 (ACT)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG TLVTVSSGGGGSGGGSTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLVTVSS GGGGSGGGSEVQLLESAGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMAWYRQSPGNER ELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATF LRSDGHHTIWGQGLVTVSSHHHHHHH*
573	EpCAM-H138.2 ProTriTAC (NCLV)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGG LEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSVSSQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVT LTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESAGGLVQPGGSLTLSCAAS

		GFIFRAASMDWYRQFPGNERESIATISSGGFTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIWGQGLTVTVSSHHHHHH*
574	EpCAM ProTriTAC-H13 8.2 (CT)	VVGGGGTQTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAP RGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG SEVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMDWYRQFPGNERESIATISSG GFTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTI WGQGLTVTVSSHHHHHH*
575	EpCAM H138.2 TriTAC DG/WG	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG TLTVTVSSGGGGSGGGSQTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS GGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFIFRAASMDWYRQFPGNER ESIATISSGGFTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGATFL RSDGHHTIWGQGLTVTVSSHHHHHH*
576	EpCAM H13 Mask27 L040	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGG LEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSVSSQGLTVTVSSGGGGPQASTGRSGGGGGGSGTQTVVTQEPLTVSPGGTVT LTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAAS GFAGNHWMYWVRQAPGRGRELVASISSGGSTNYVDSVKGRFTISRDN AKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCGTSDNWGQGLTVTVSSHHHHHH*
577	EpCAM H90 Mask27 L040	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGG LEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSVSSQGLTVTVSSGGGGPQASTGRSGGGGGGTQTVVTQEPLTVSPGGTVT LTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLTLSCAAS GFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFITNYADSVKARFTISRDN SKNTLYL

		QMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTINGQGTLVTVSSHHHHHH*
578	EpCAM H90.2 Mask27 L040	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSKFGMSWVRQGGGGGLDGNEEPGG LEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLVSSSQGTLVTVSSGGGGPQASTGRSGGGGGGSQTVVTVQEPSLTVSPGGTVT LTCASSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGLVTVVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGSLTSLCAAS GFIFRAASMAWYRQSPGNERELVASISSGAFTNYADSVKARFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCGATFLRSDGHHTIWGGQTLVTVSSHHHHHH*
SEQ ID NO:		氨基酸序列
579	1.7 Bn huEpCAM aa22-265 FLAG huIgG1 Fc (生物素 -huEpCAM-Fc)	QEEVCVCENYKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAAKCLVMKAEMNG SKLGRRAKPEGALQNNNDGLYDPDCDEGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVRRRT DKDTEITCSERVRTYWIHIELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITRYQLDPKFITSI LYENNVITIDLQVNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSHKMDLTVNGE QLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKDYKDDDDKGGGGSDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
580	1.9-Bn cyEpCAM aa24-265 FLAG huIgG1 Fc (生物素 -cyEpCAM-Fc)	QKEVCVCENYKLAVNCFNDNGQCQCTSIGAQNTVLC SKLAAKCLVMKAEMNG SKLGRRAKPEGALQNNNDGLYDPDCDEGLFKAKQCNGTSTCWCVNTAGVRRRT DKDTEITCSERVRTYWIHIELKHKAREKPYDVQSLRTALEEAIKTRYQLDPKFITNI LYEDNVITIDLQVNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSHKMDLTVNGE QLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKDYKDDDDKGGGGSDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
581	连接体	GGGGT
582	用于 H90.2 和 H138.2 的框架 4	WGQGLVTVSS

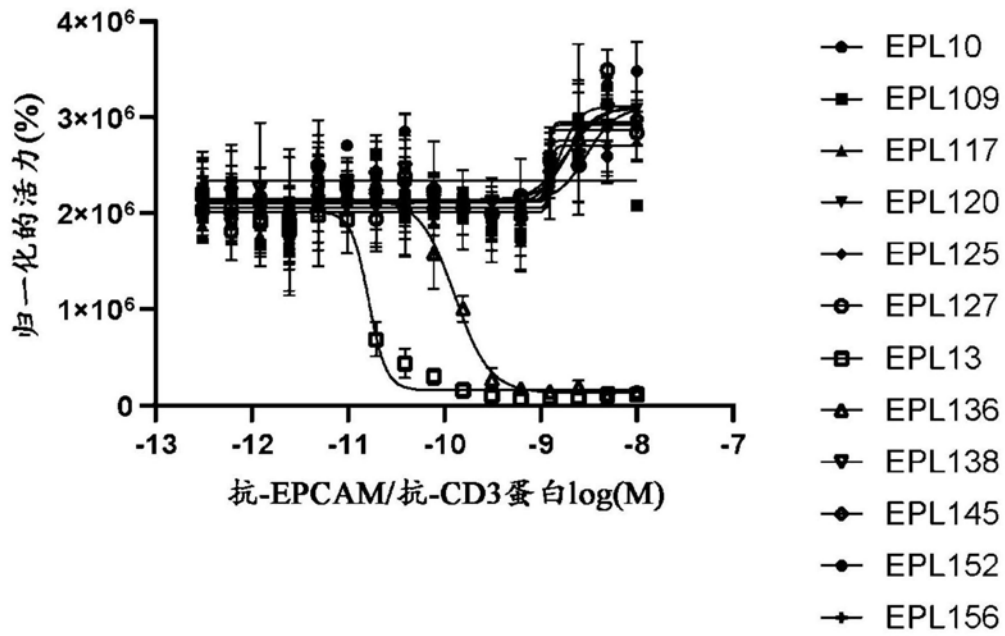


图1

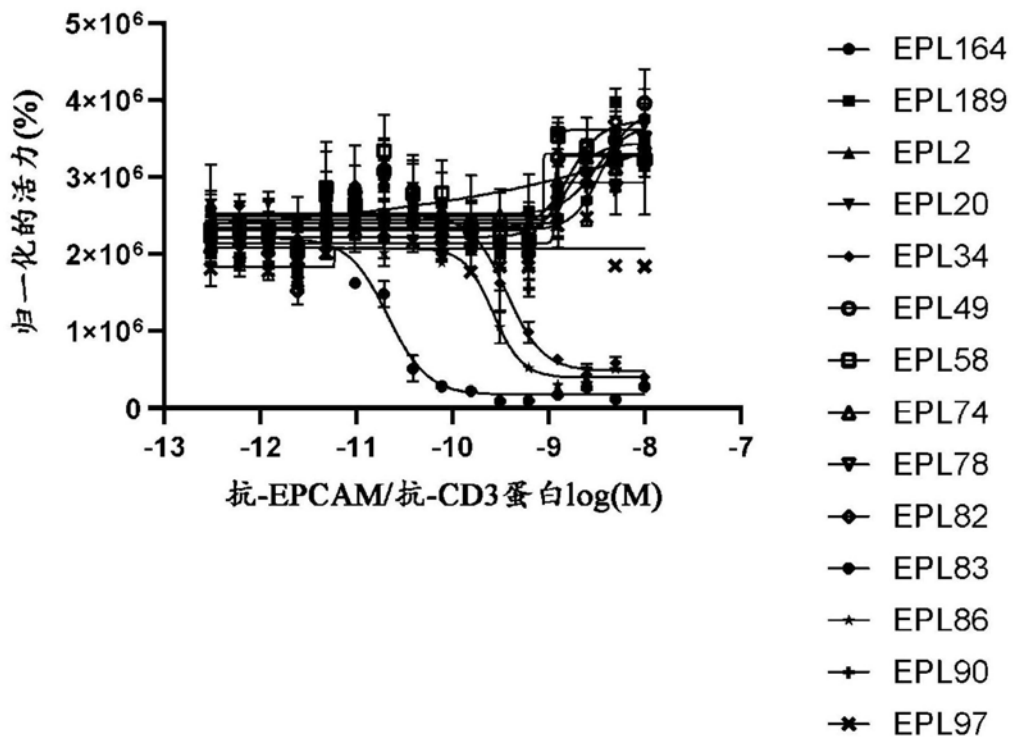


图2

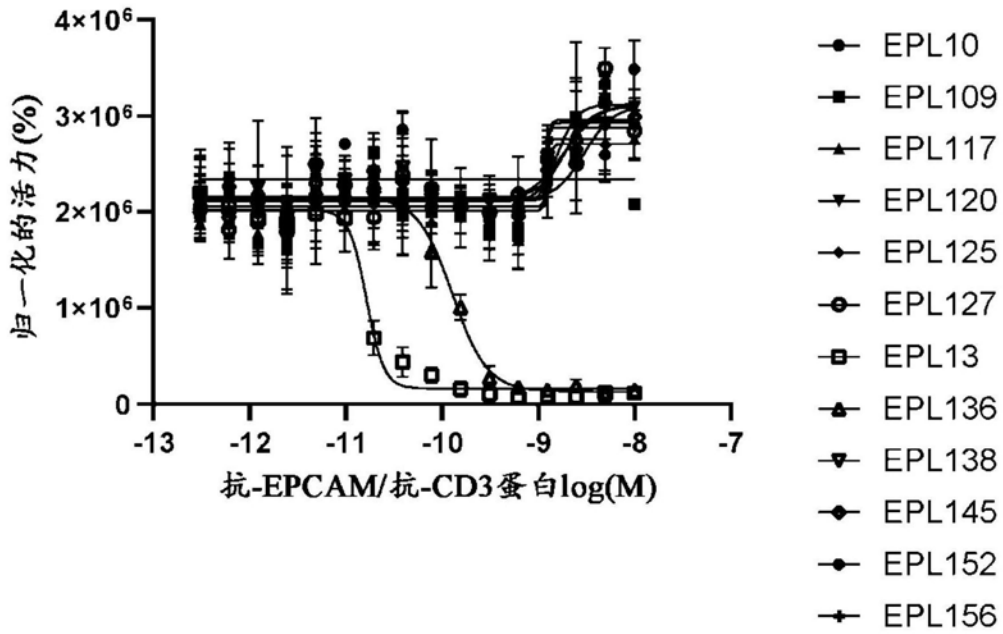


图3

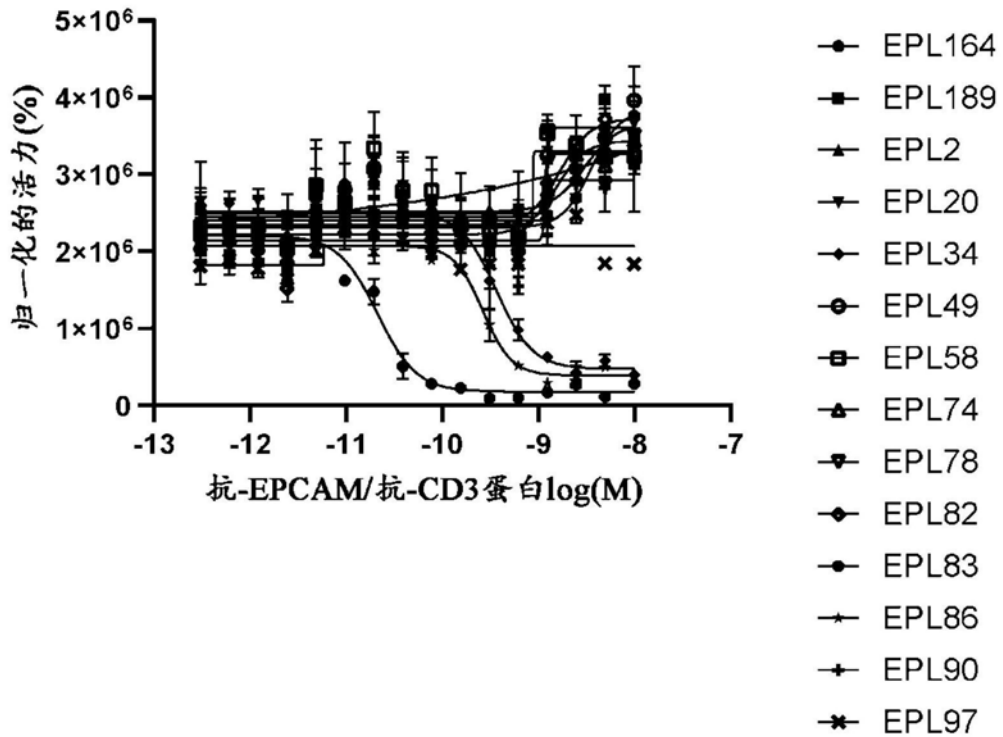


图4

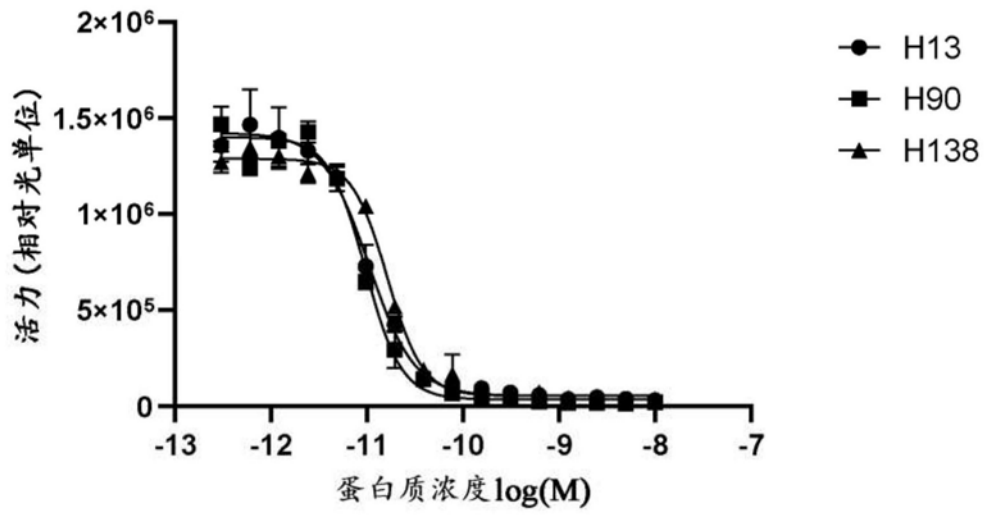


图5

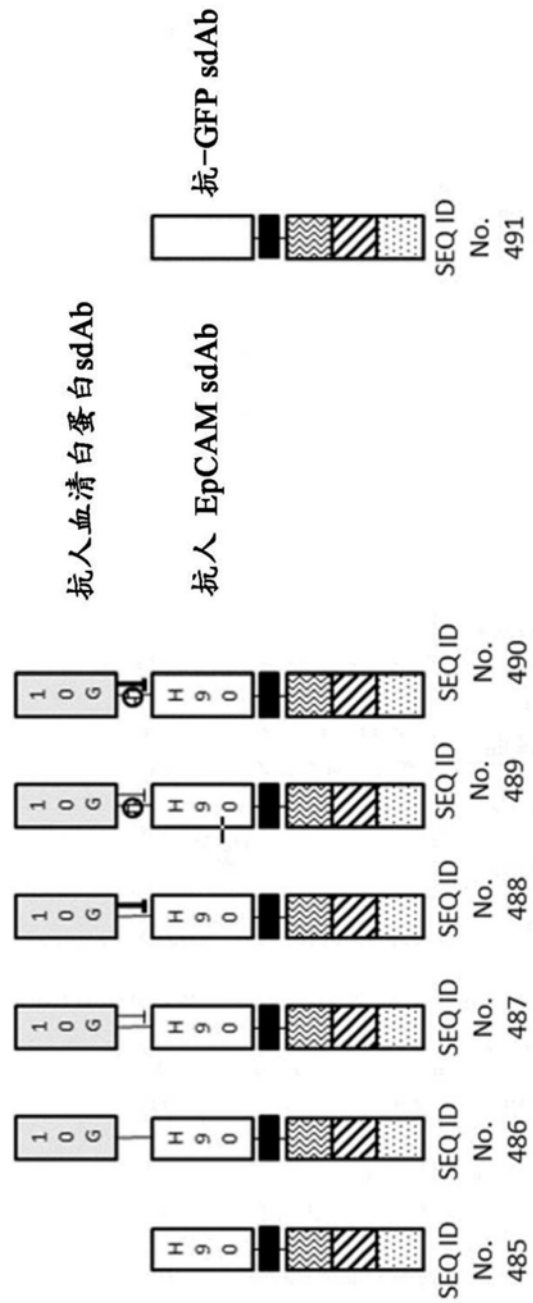


图6

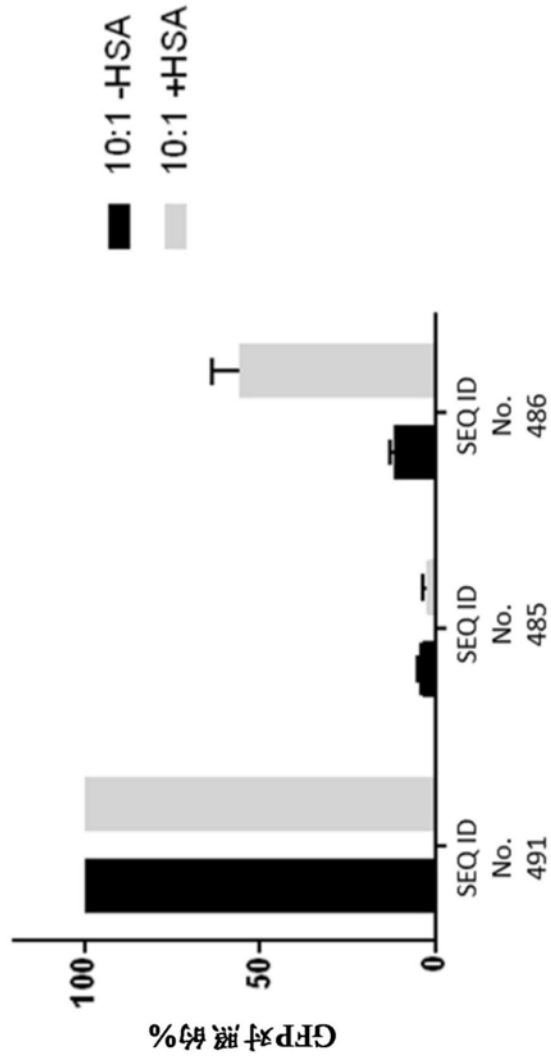


图7

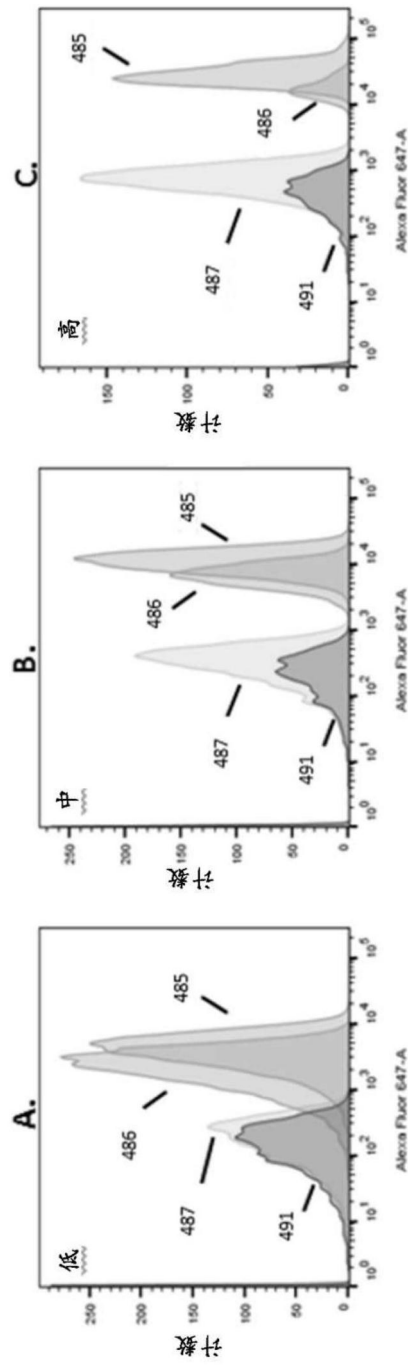


图8

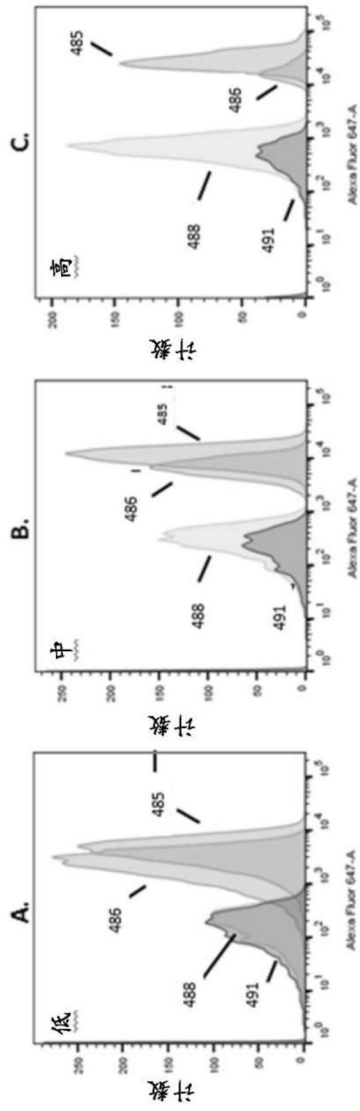


图9

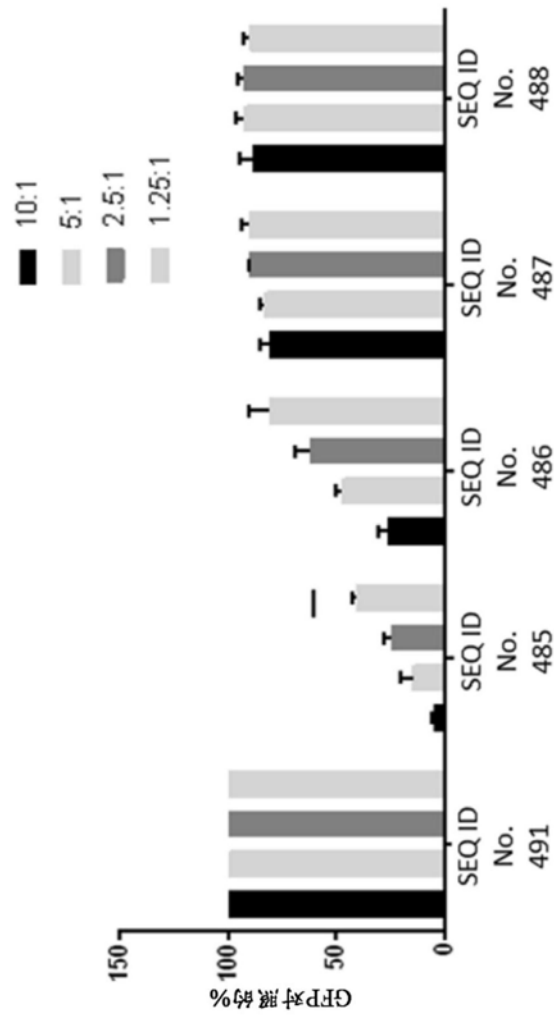


图10

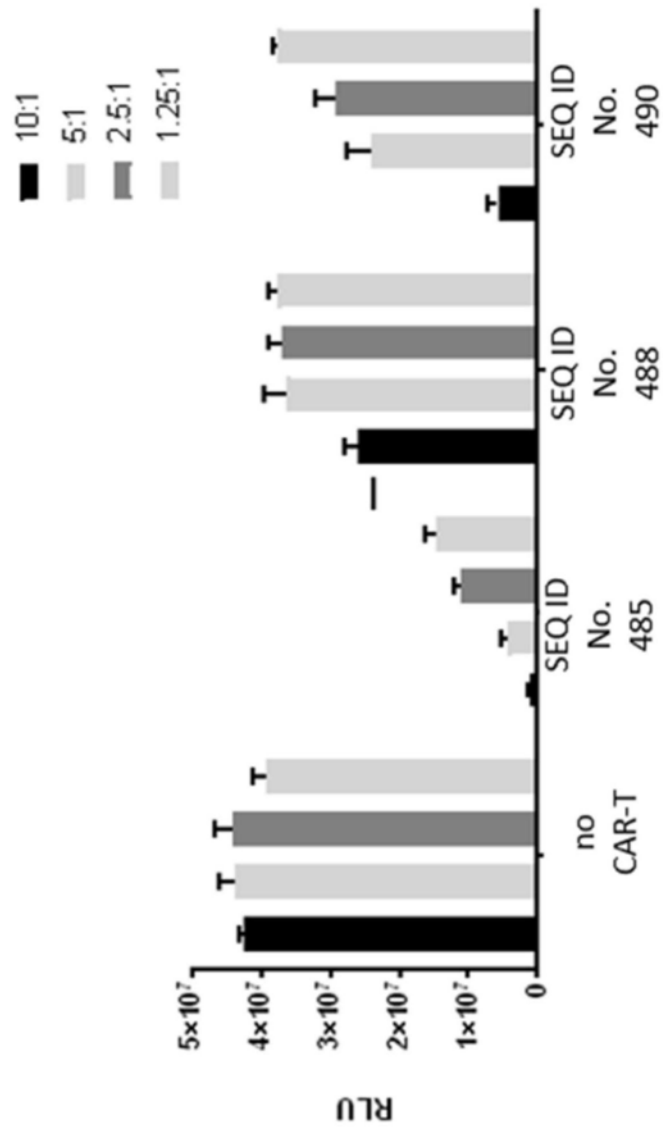


图11

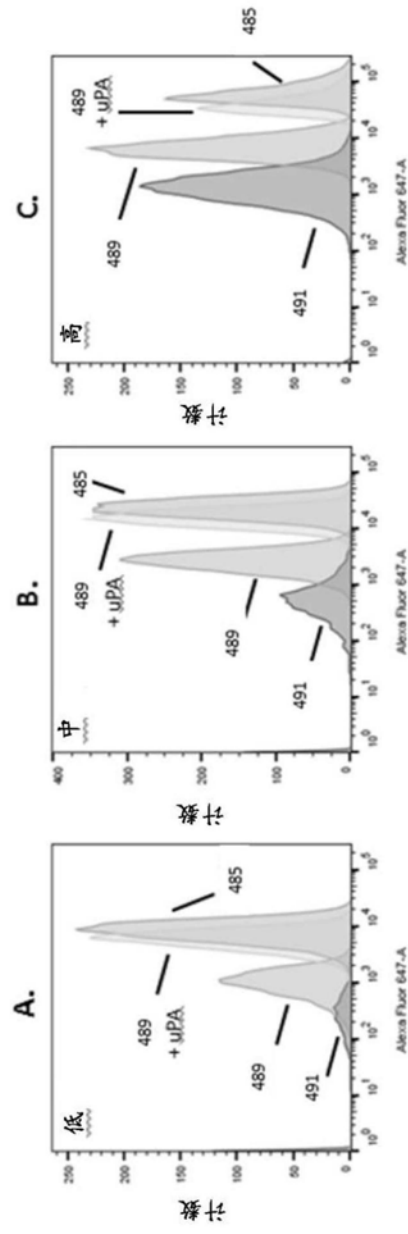


图12

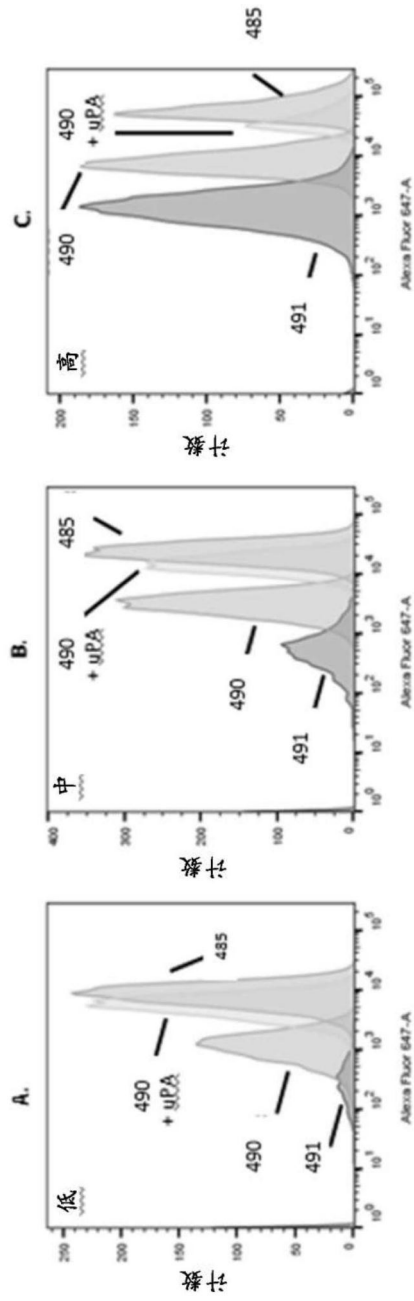


图13

EpCAM TriTAC

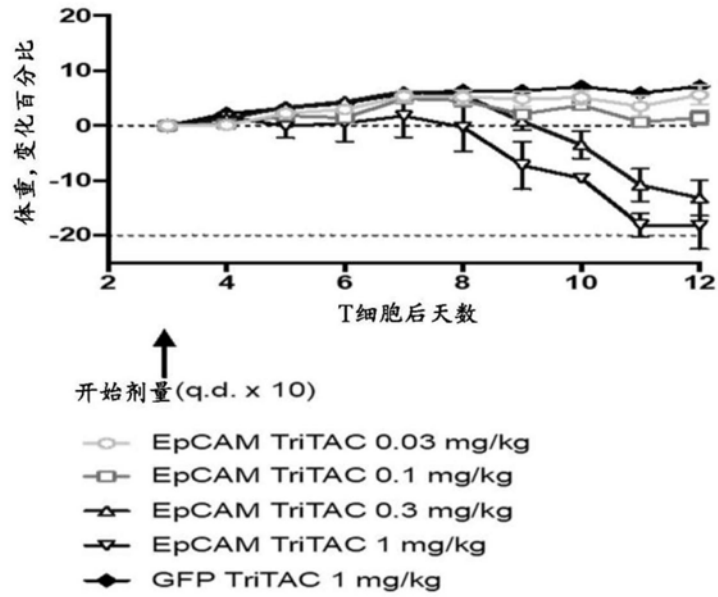


图14A

EpCAM ProTriTAC (NCLV)

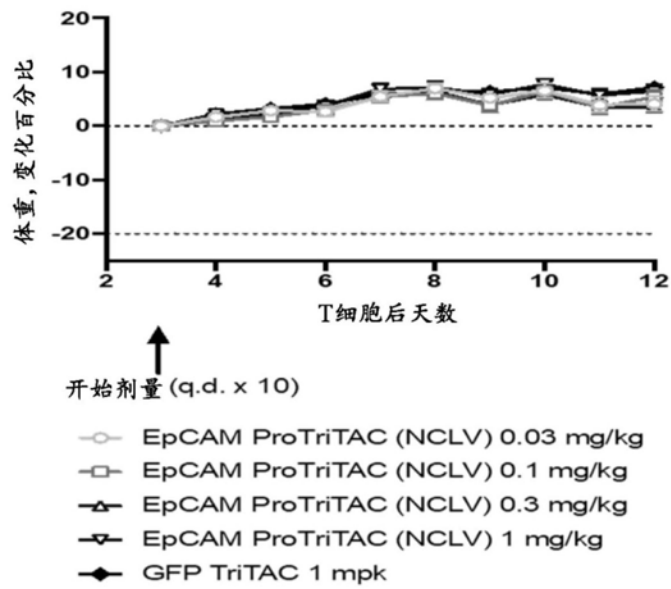


图14B

EpCAM ProTriTAC (L040)

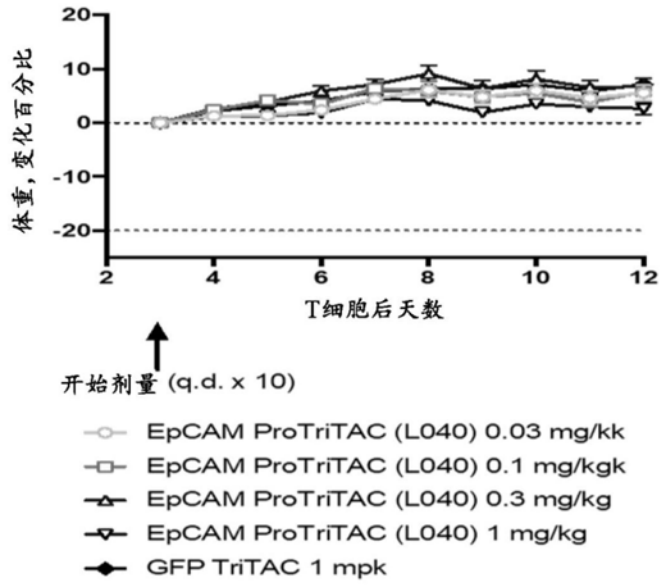


图14C

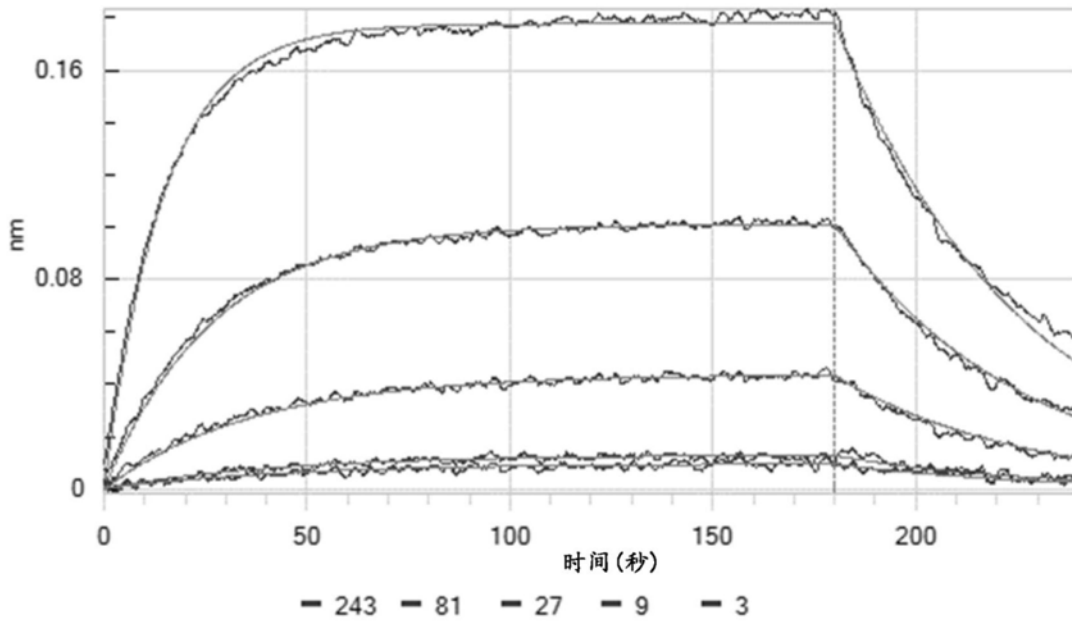


图15A

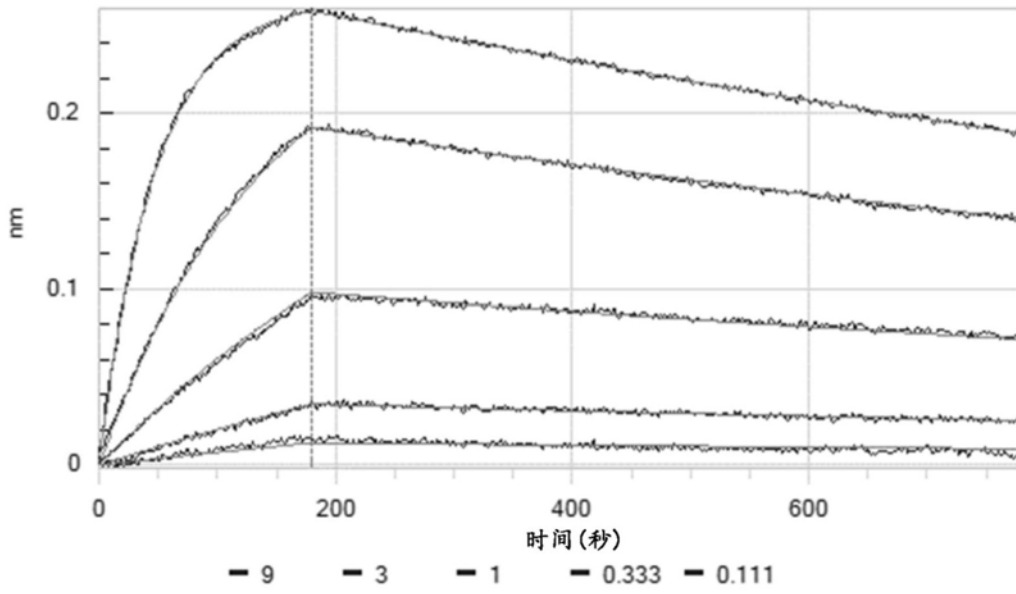


图15B

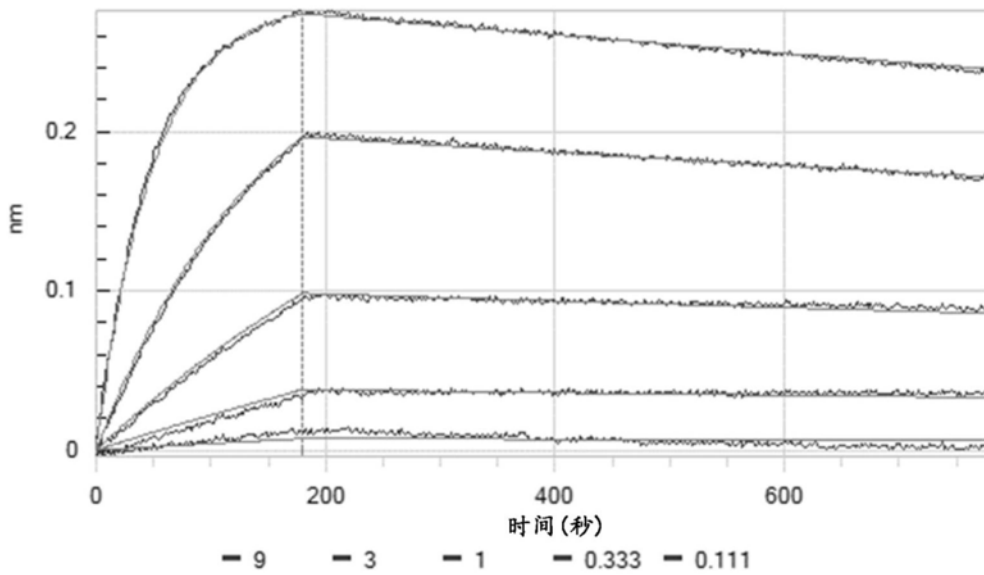


图15C

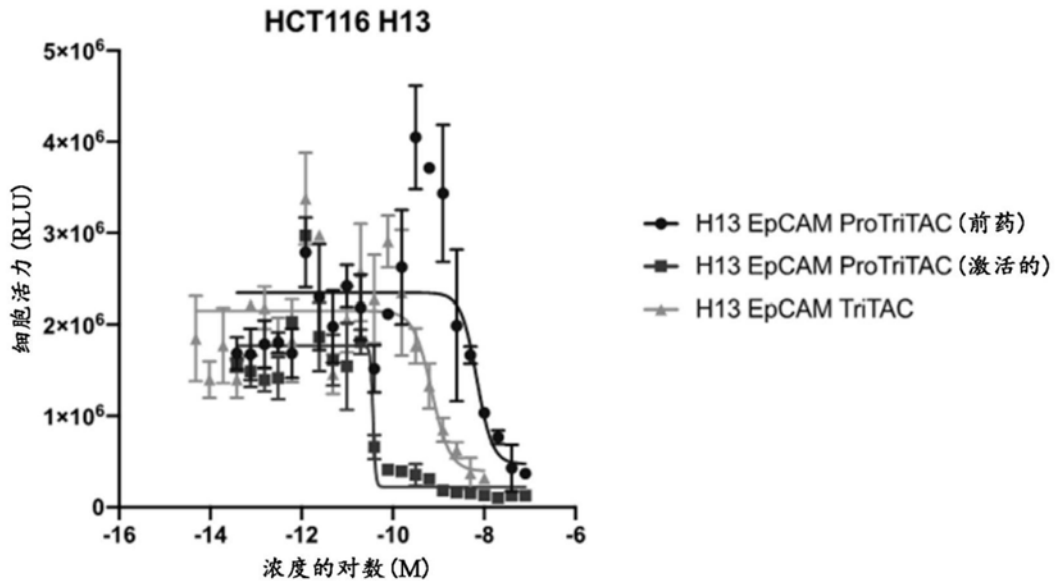


图16A

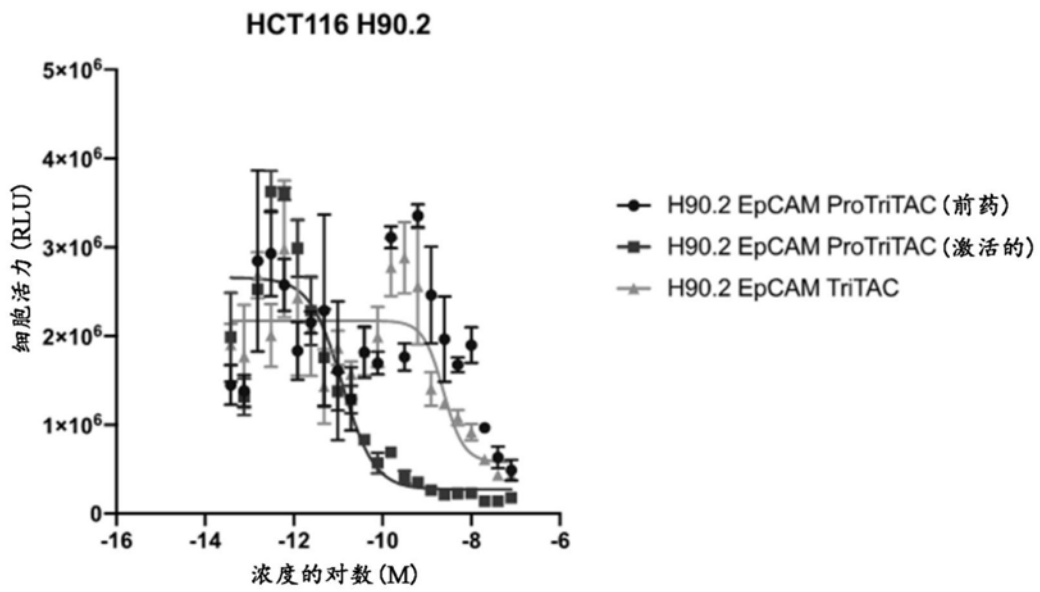


图16B

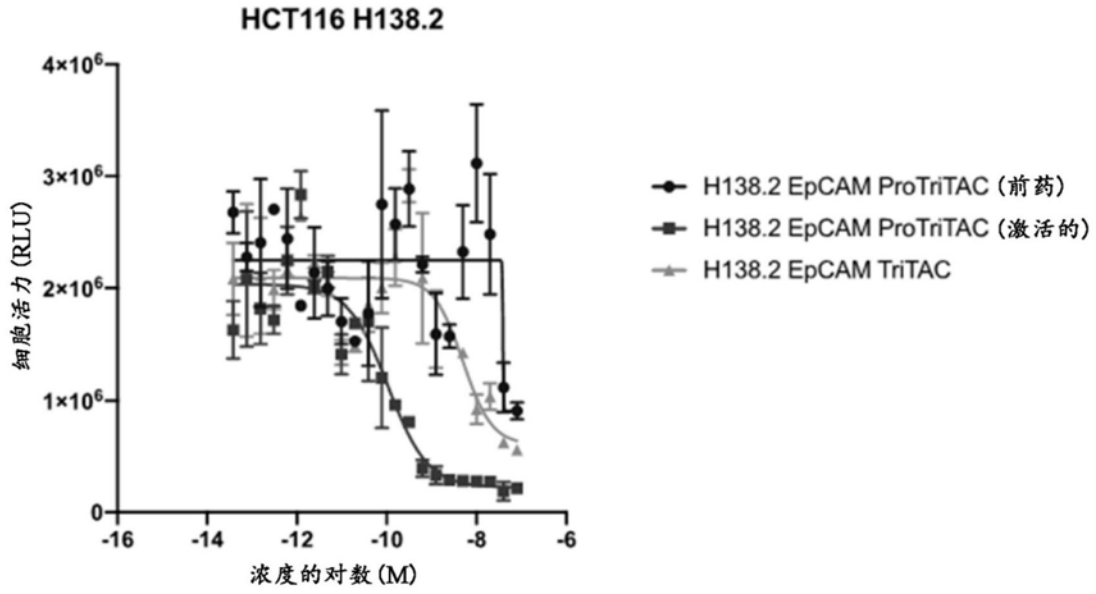


图16C

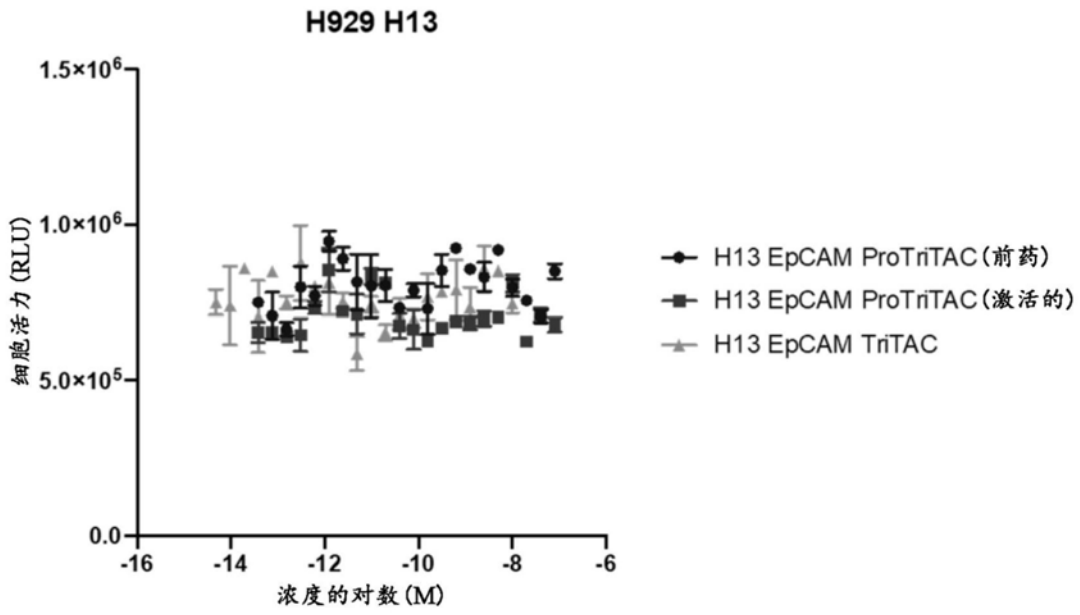


图17A

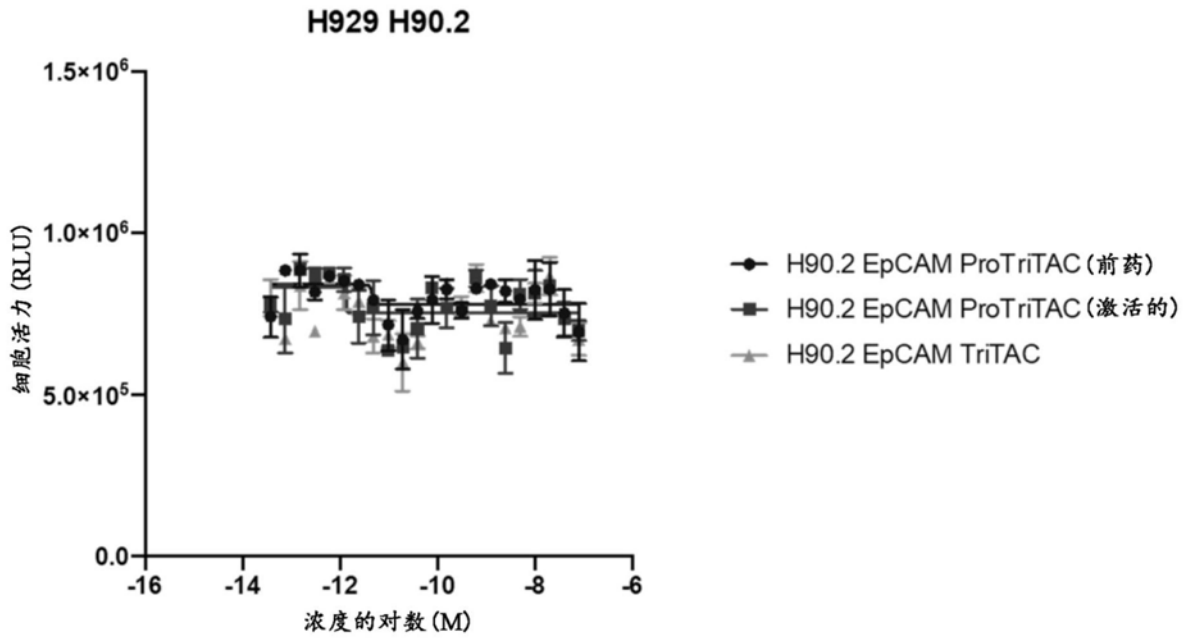


图17B

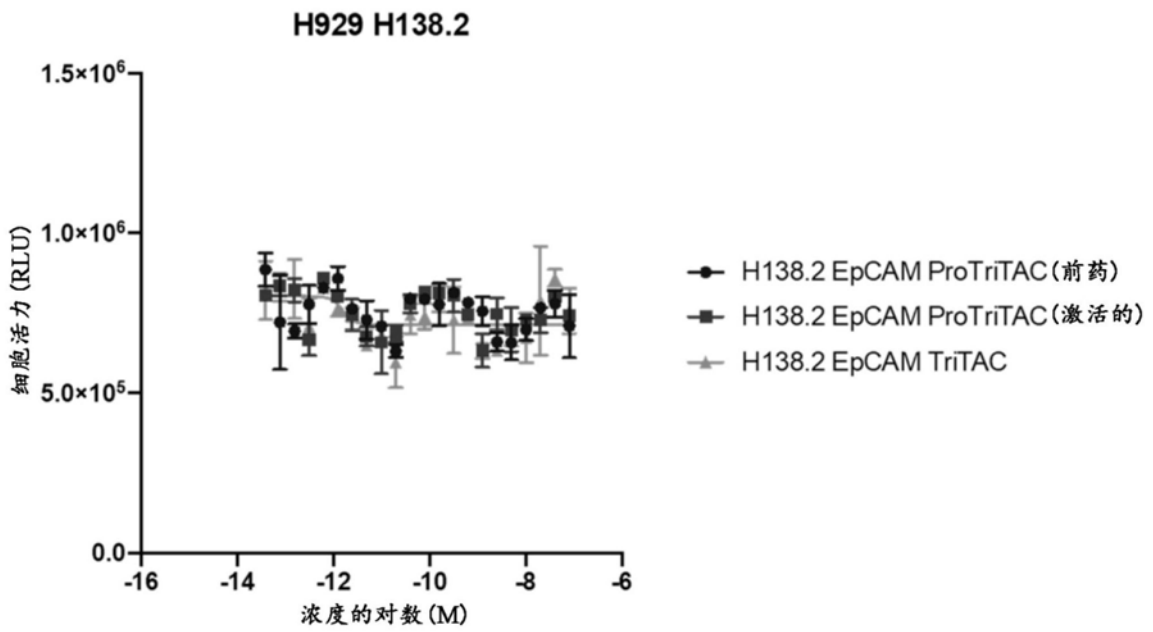


图17C

HCT116 (WT)

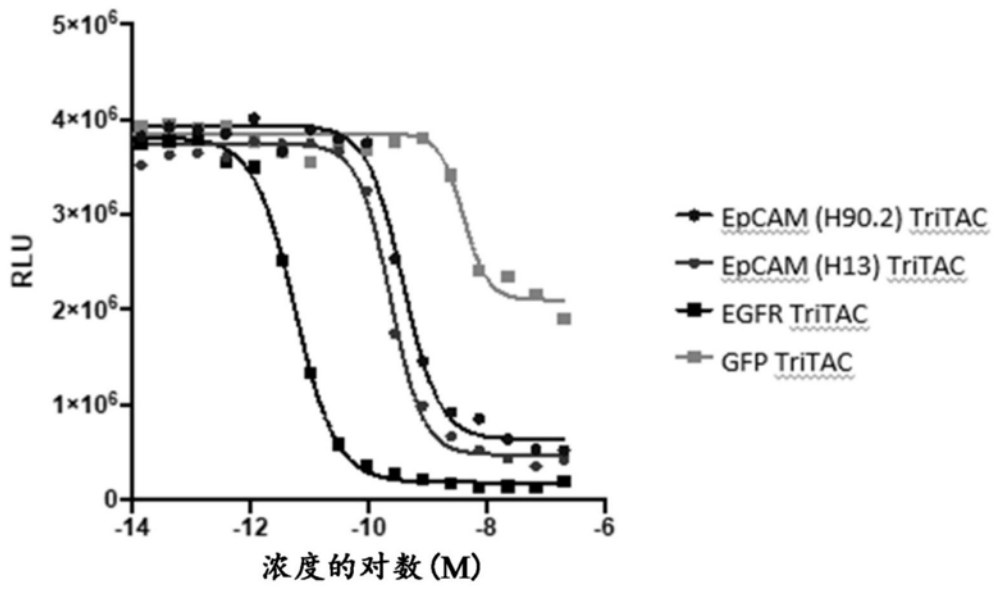


图18A

HCT116 (EpCAM-KO)

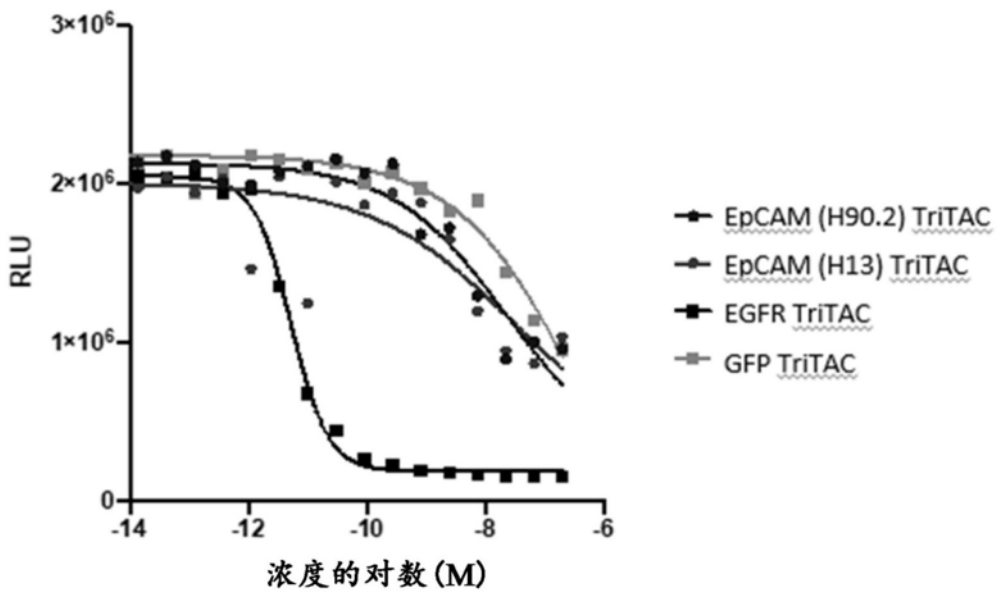


图18B

通过流式细胞术确定的与HCT116细胞的结合

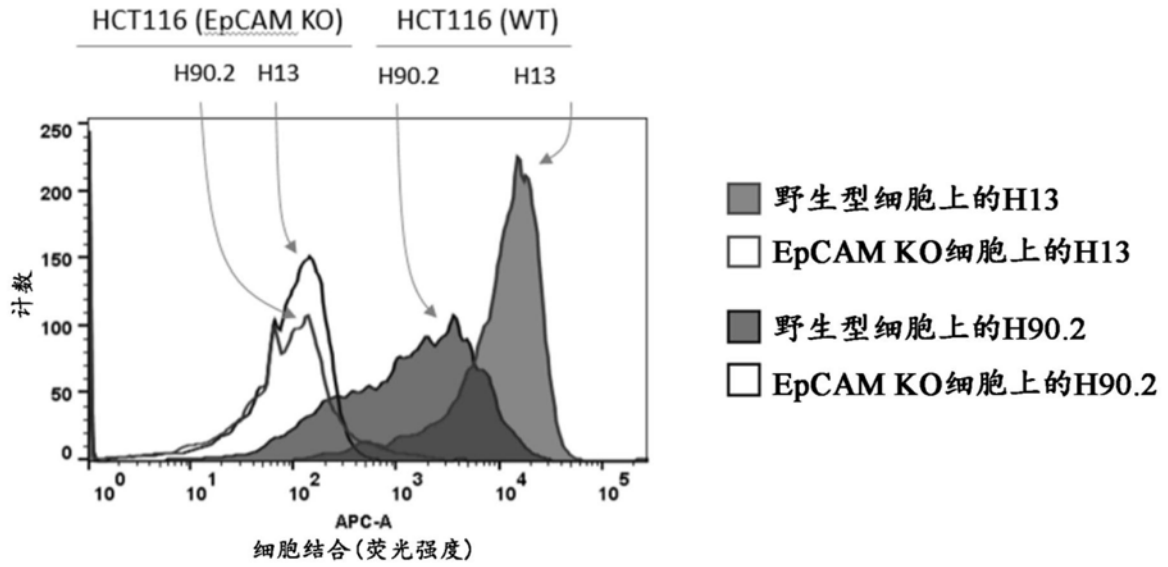


图19

SKBR3细胞上的TDCC

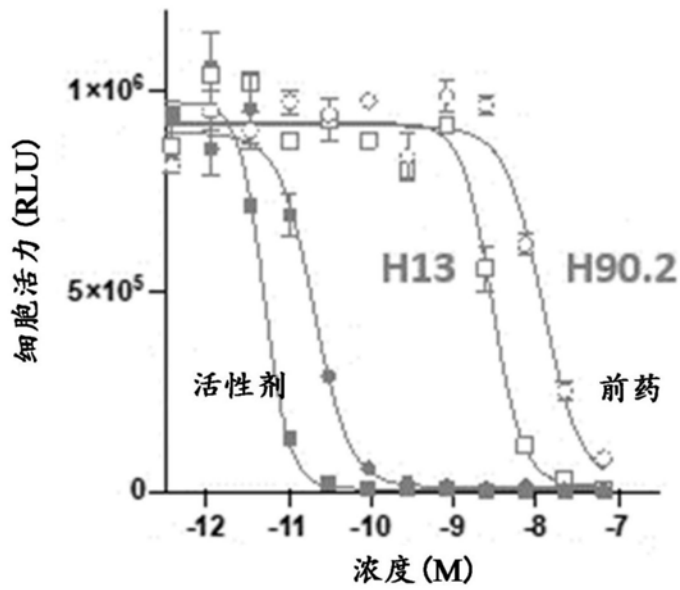


图20

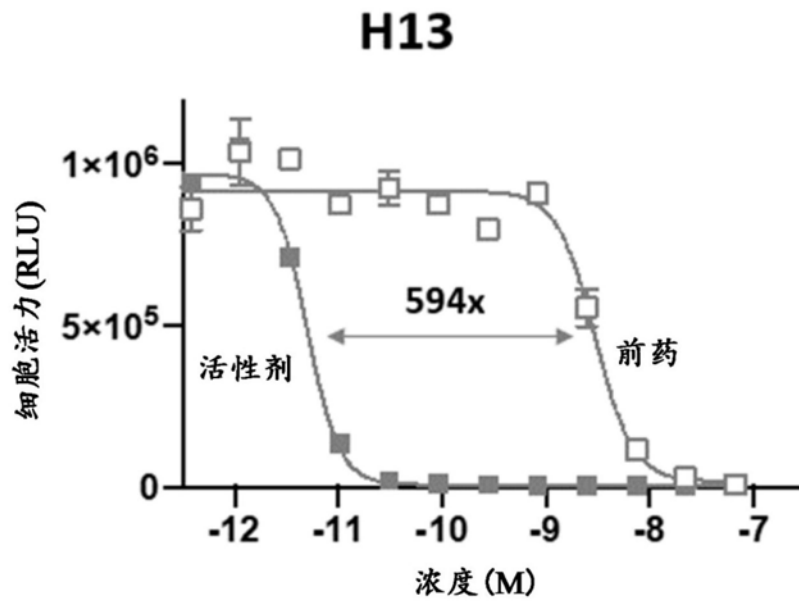


图21A

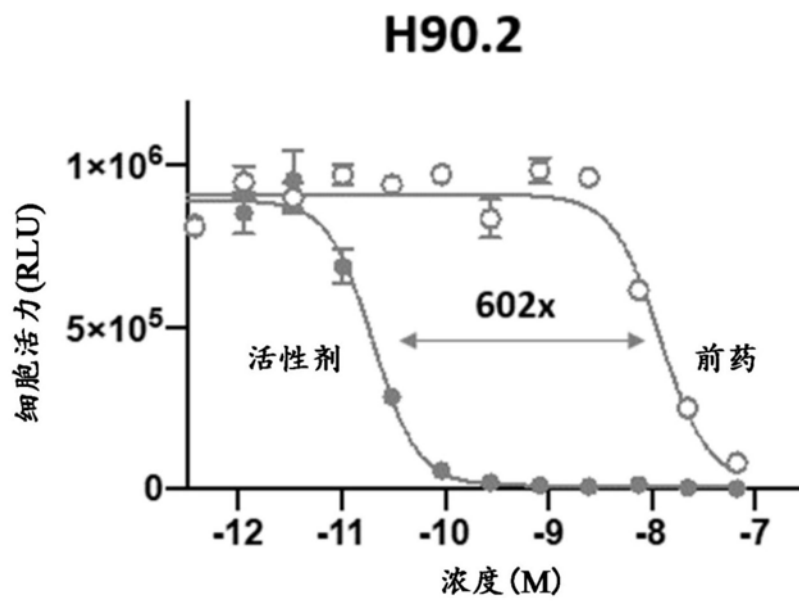


图21B

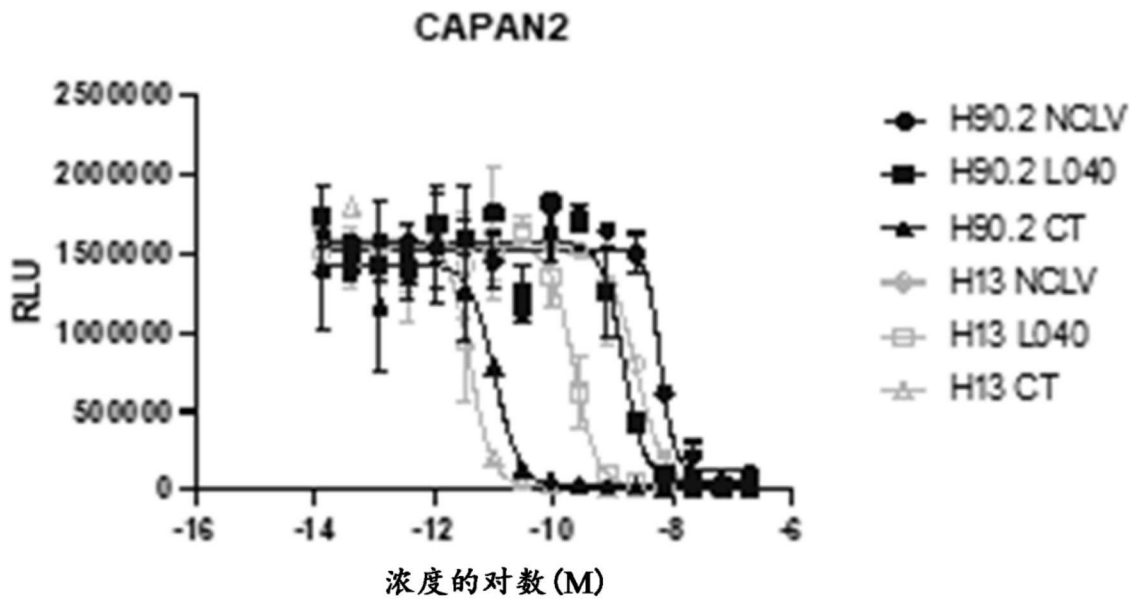


图22A

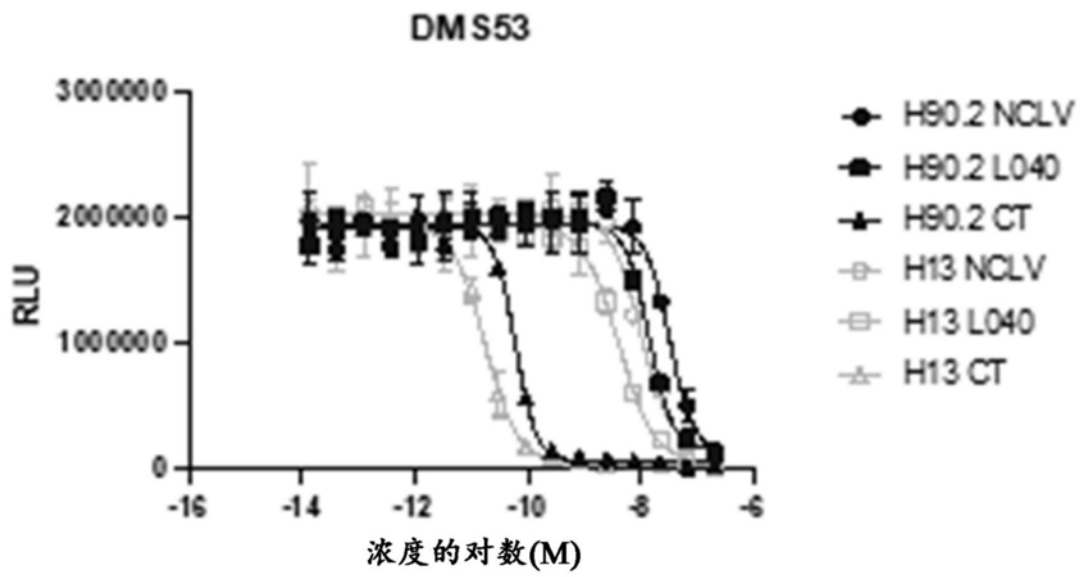


图22B

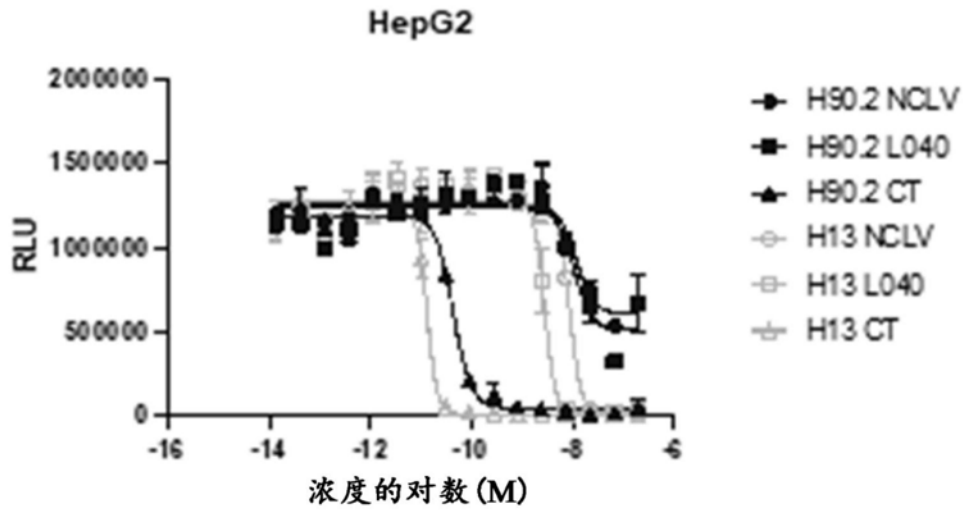


图22C

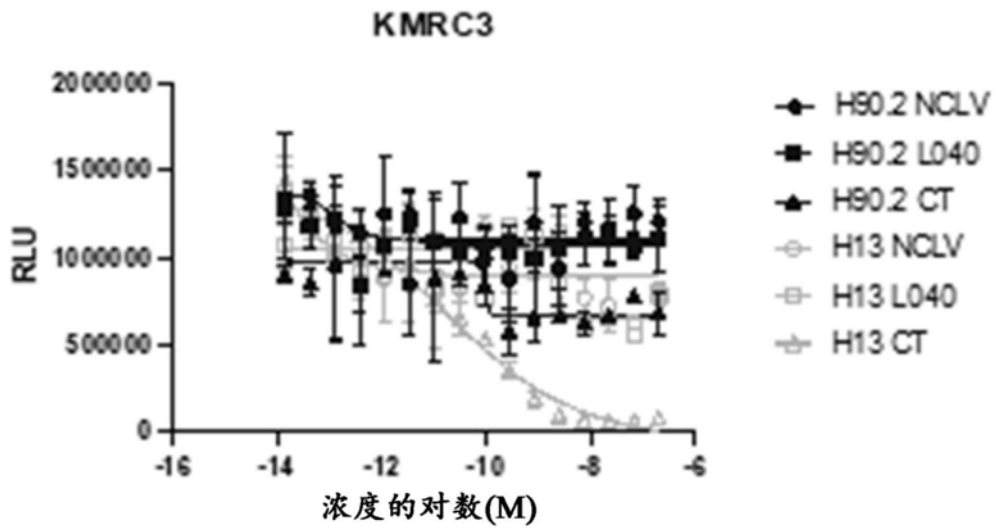


图22D

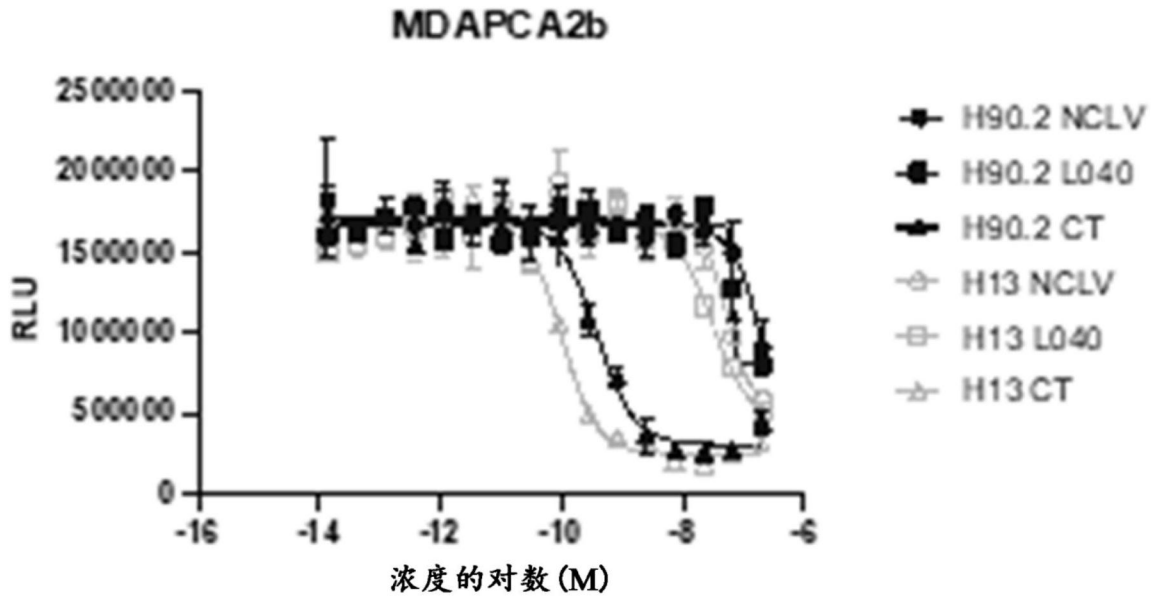


图22E

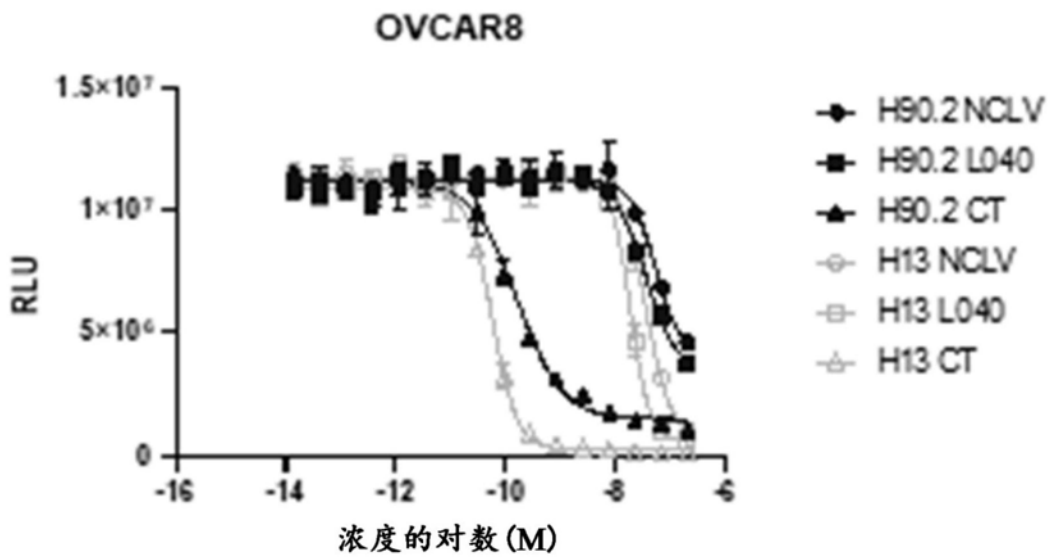


图22F

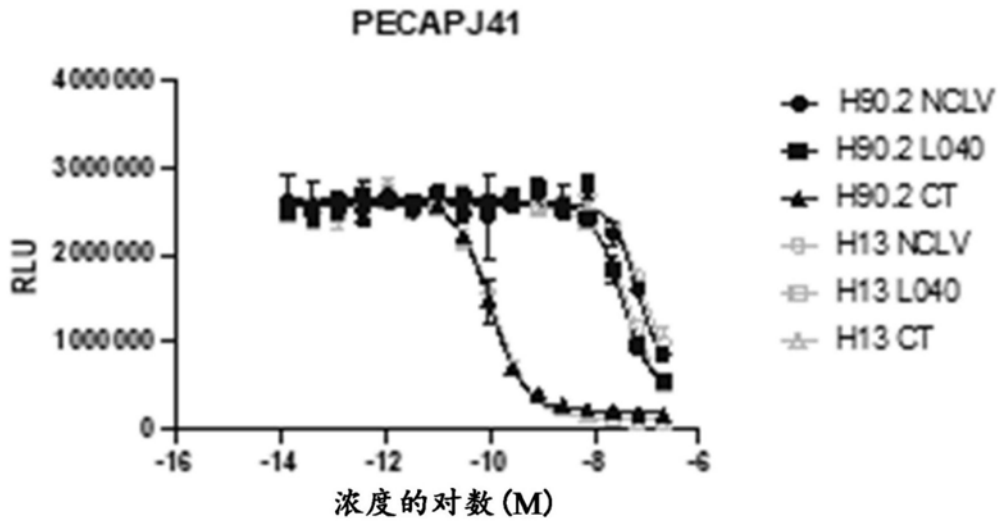


图22G

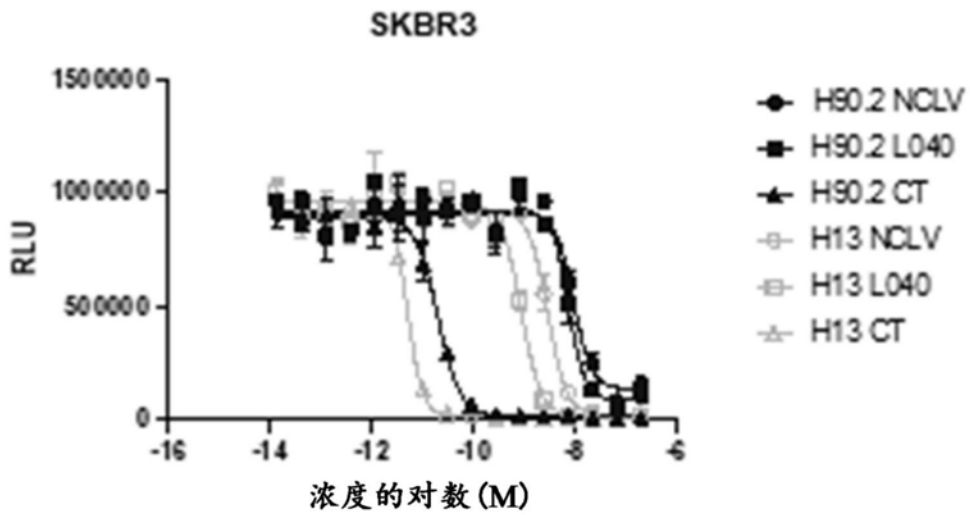


图22H

H13 TriTAC

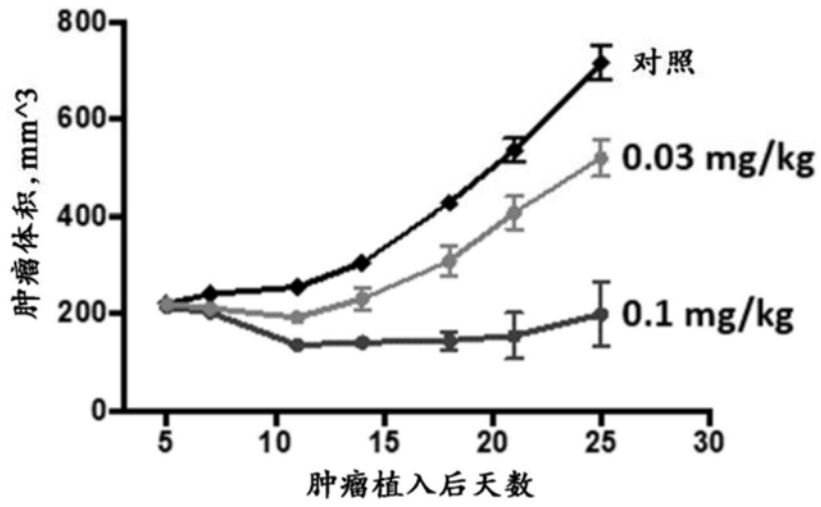


图23A

H13 ProTriTAC

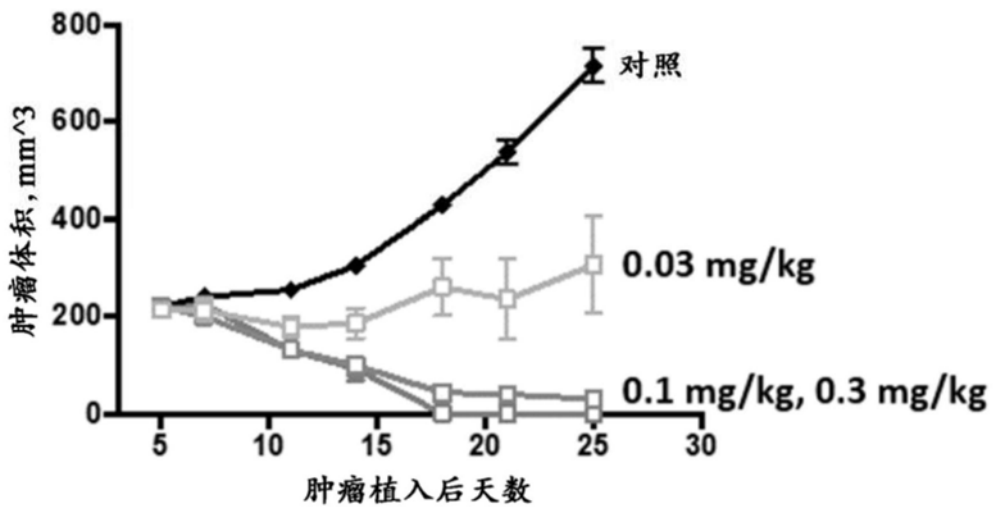


图23B

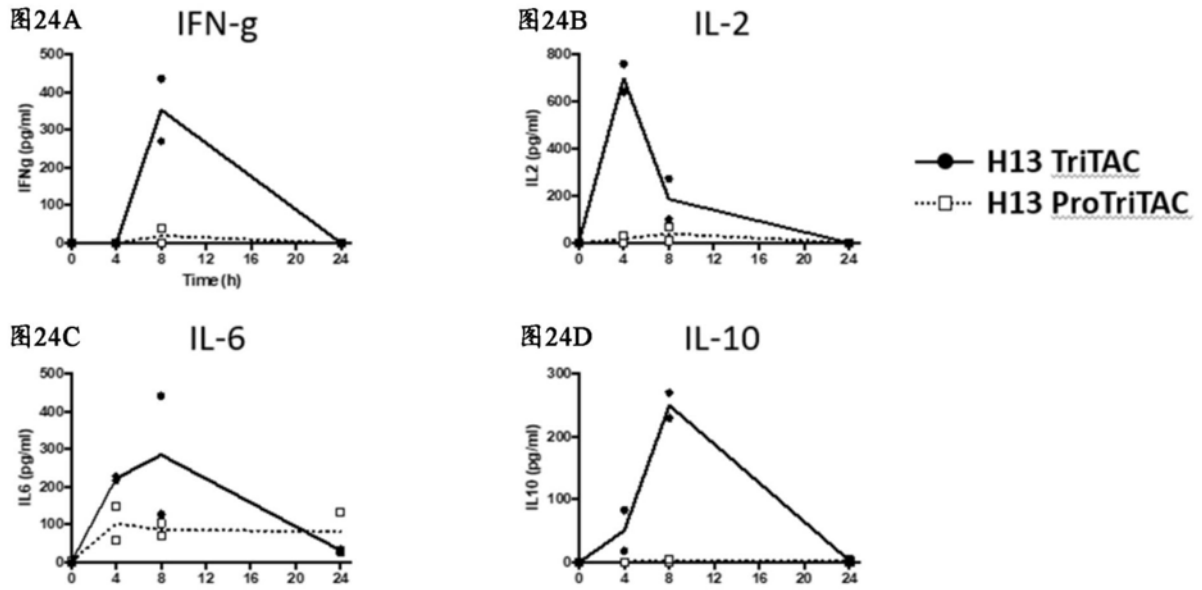


图24A-24D

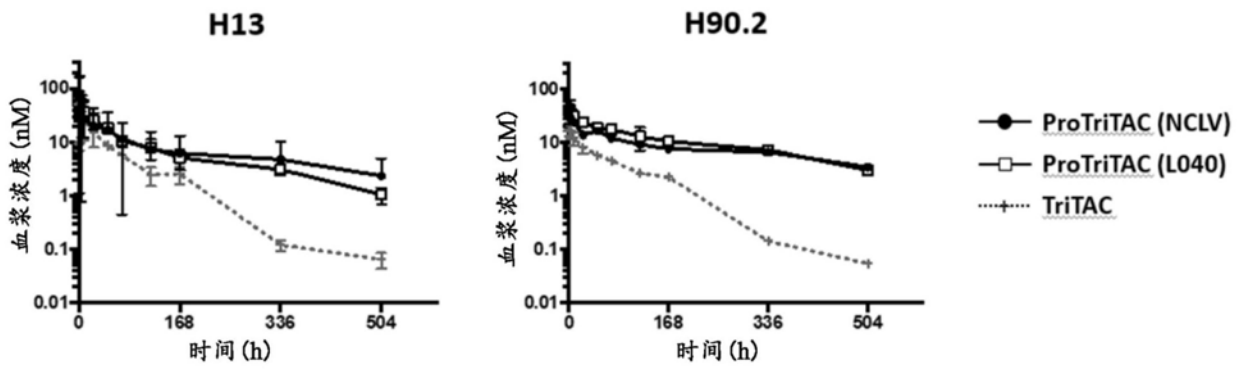


图 25A

图 25B

图25A-25B

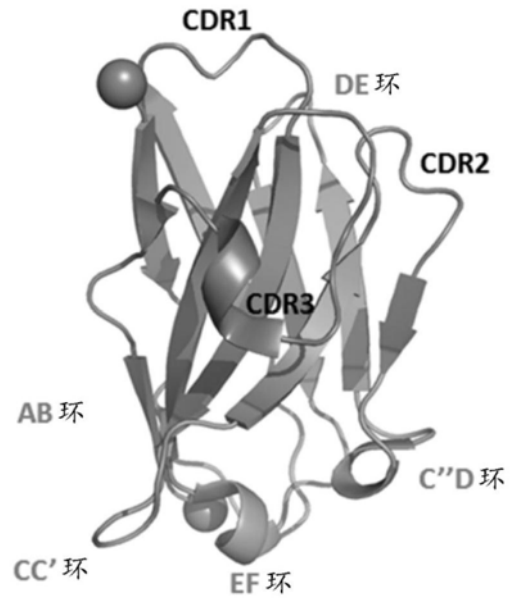


图26

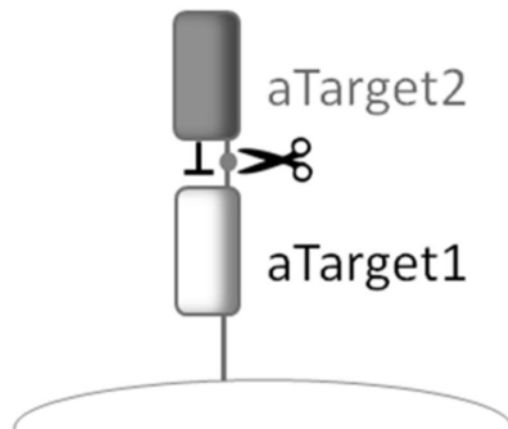


图27

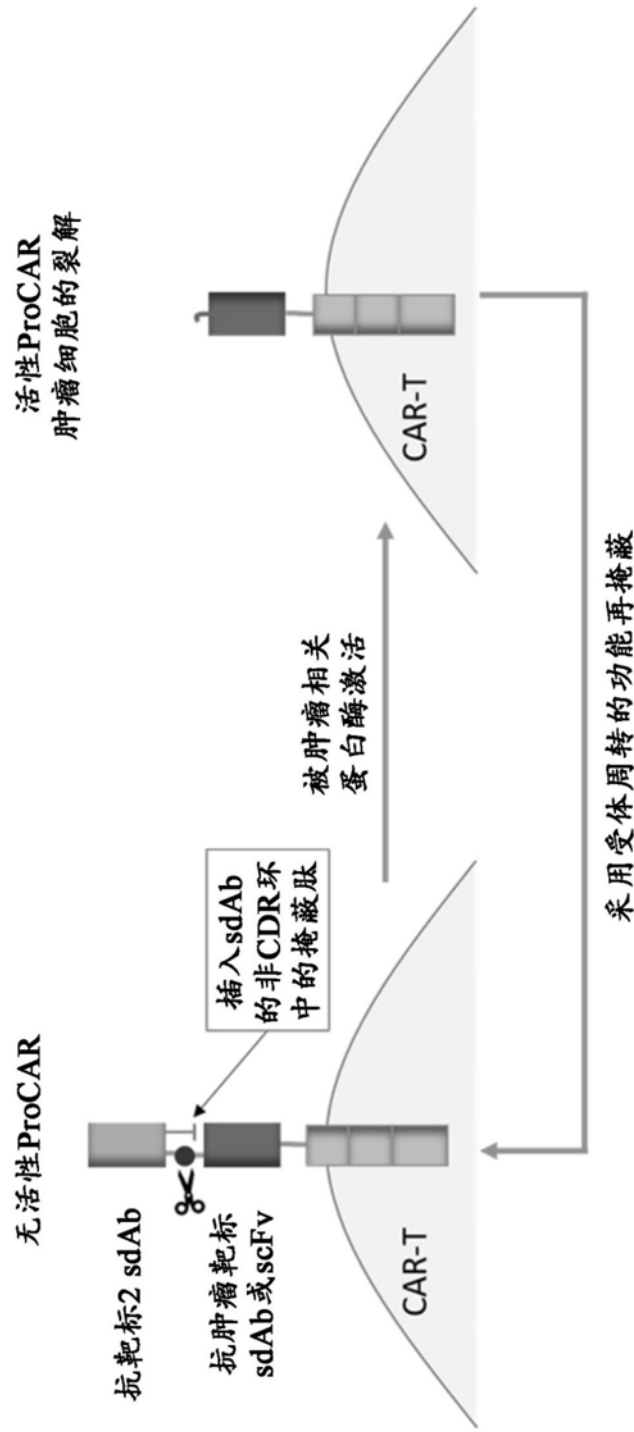


图28

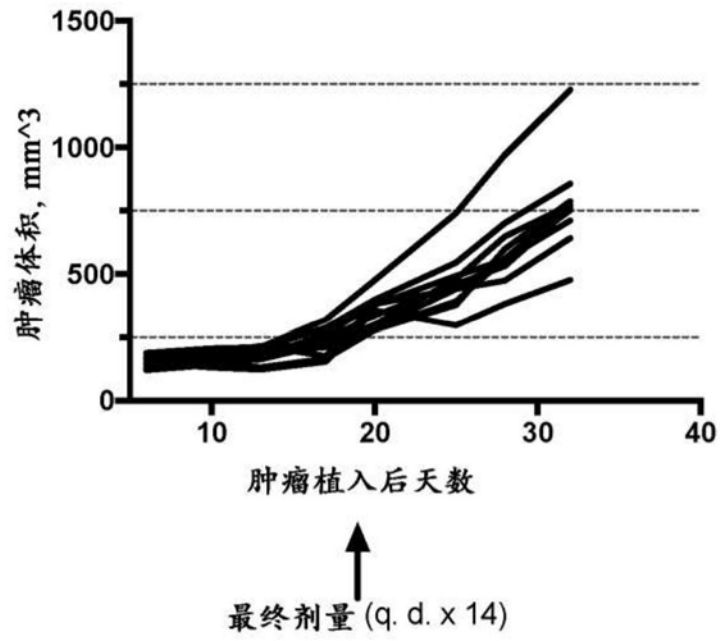


图29A

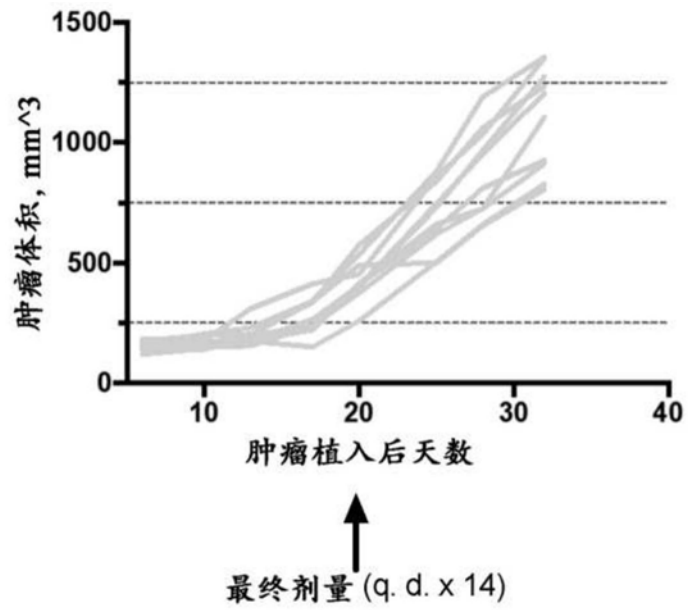


图29B

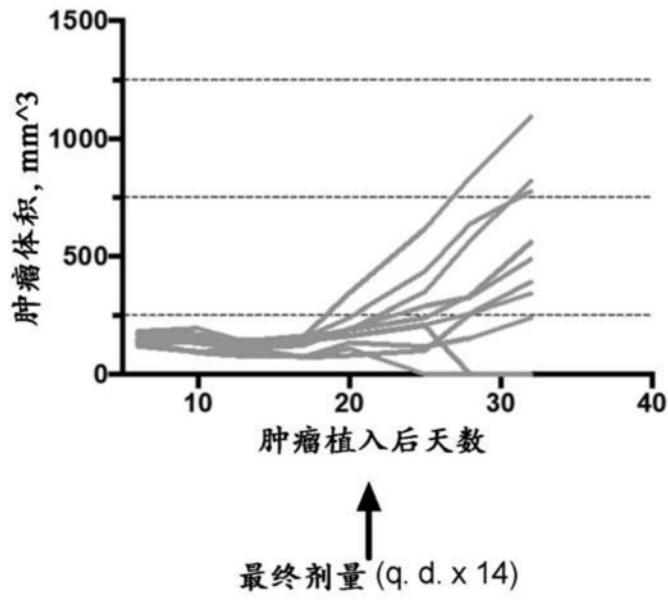


图29C

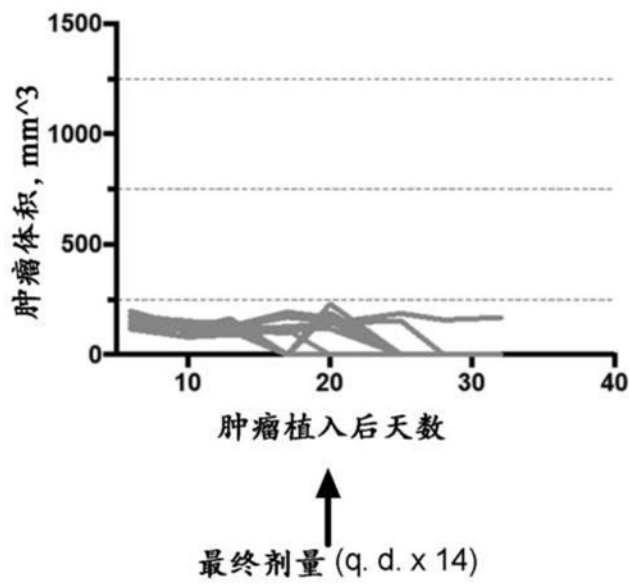


图29D

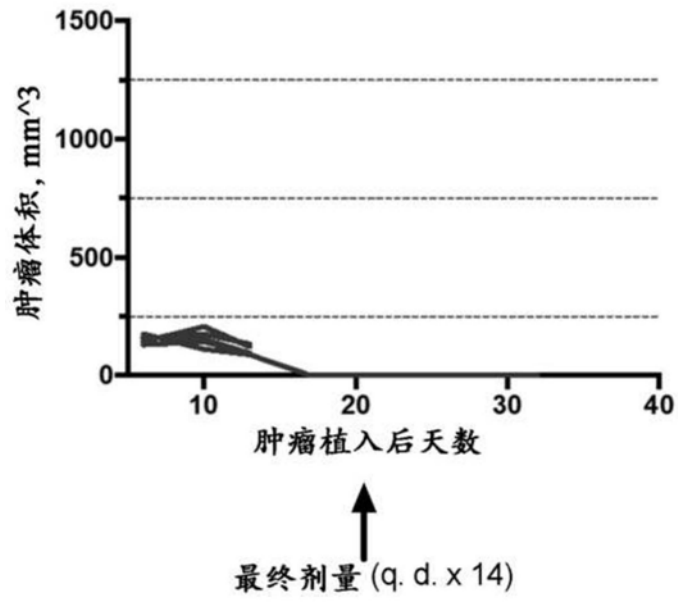


图29E

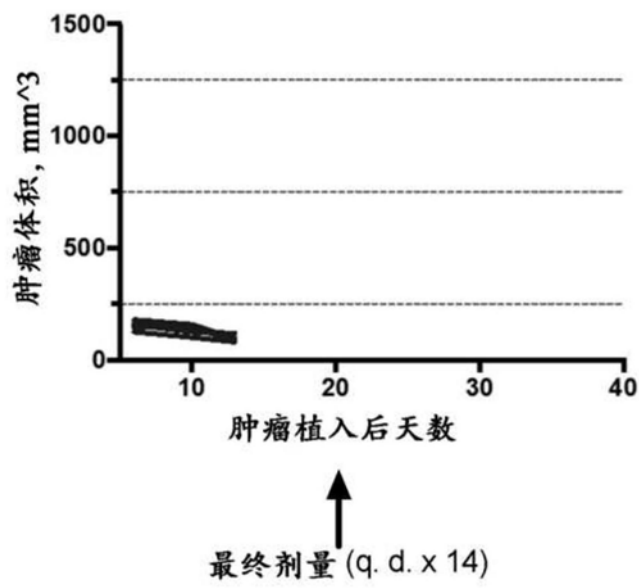


图29F

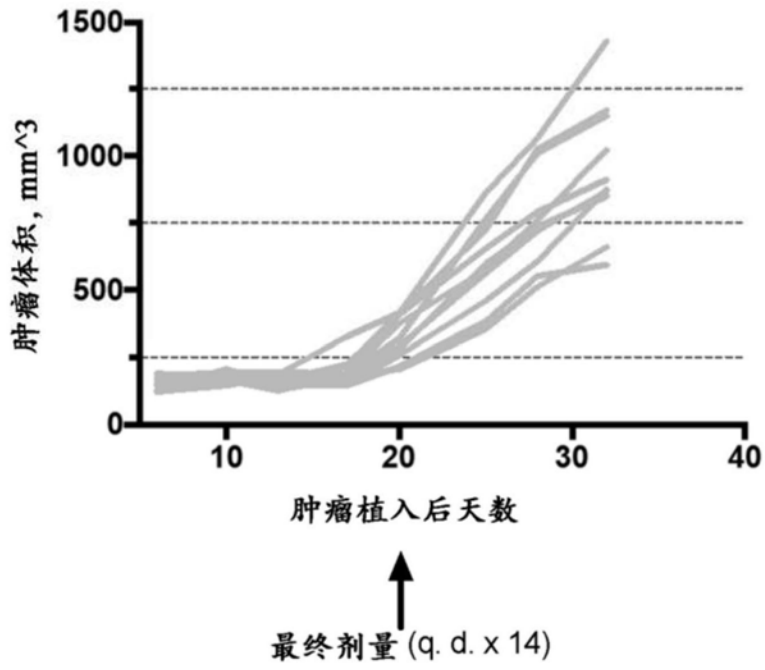


图29G

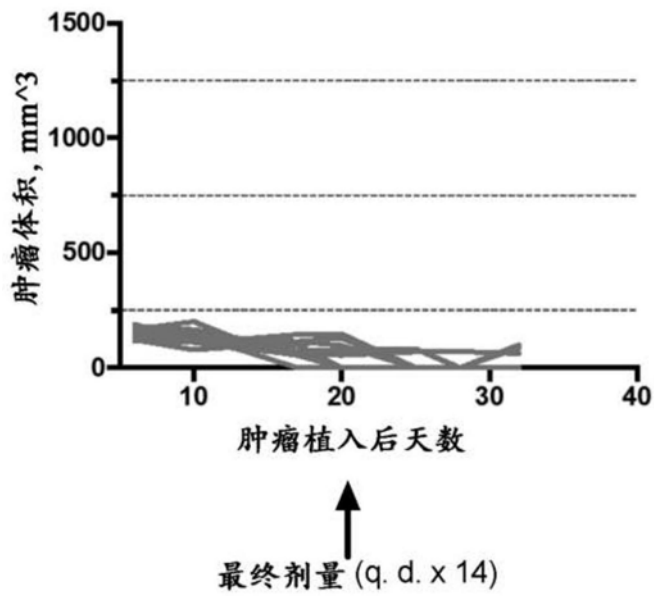


图29H

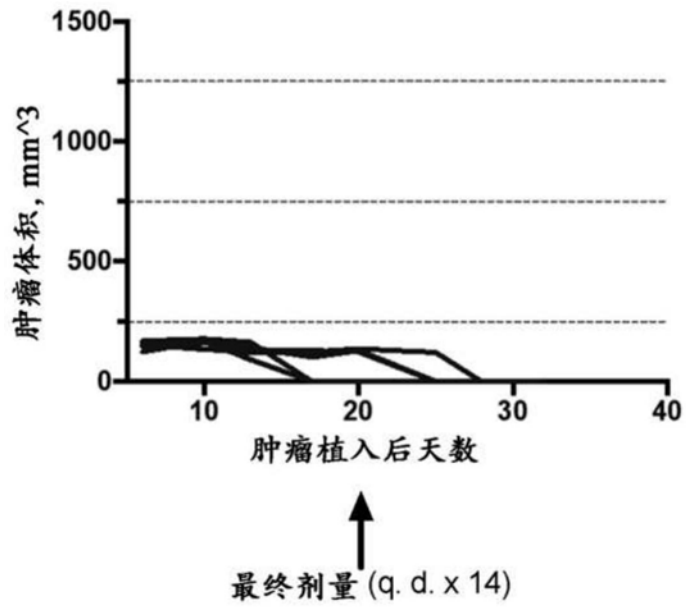


图29I

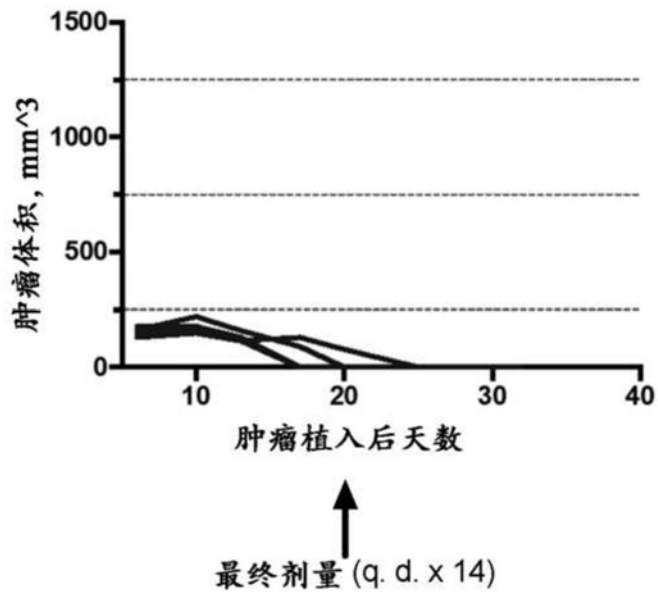


图29J

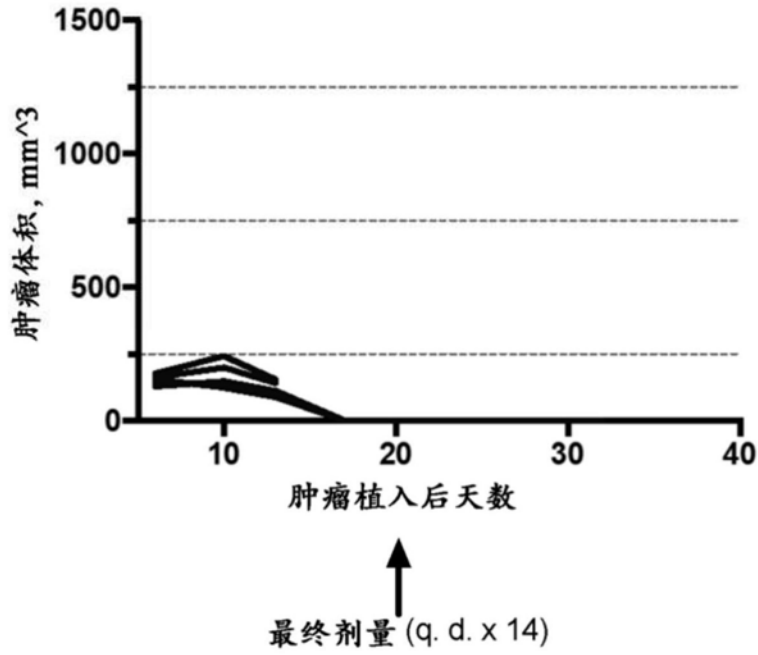


图29K

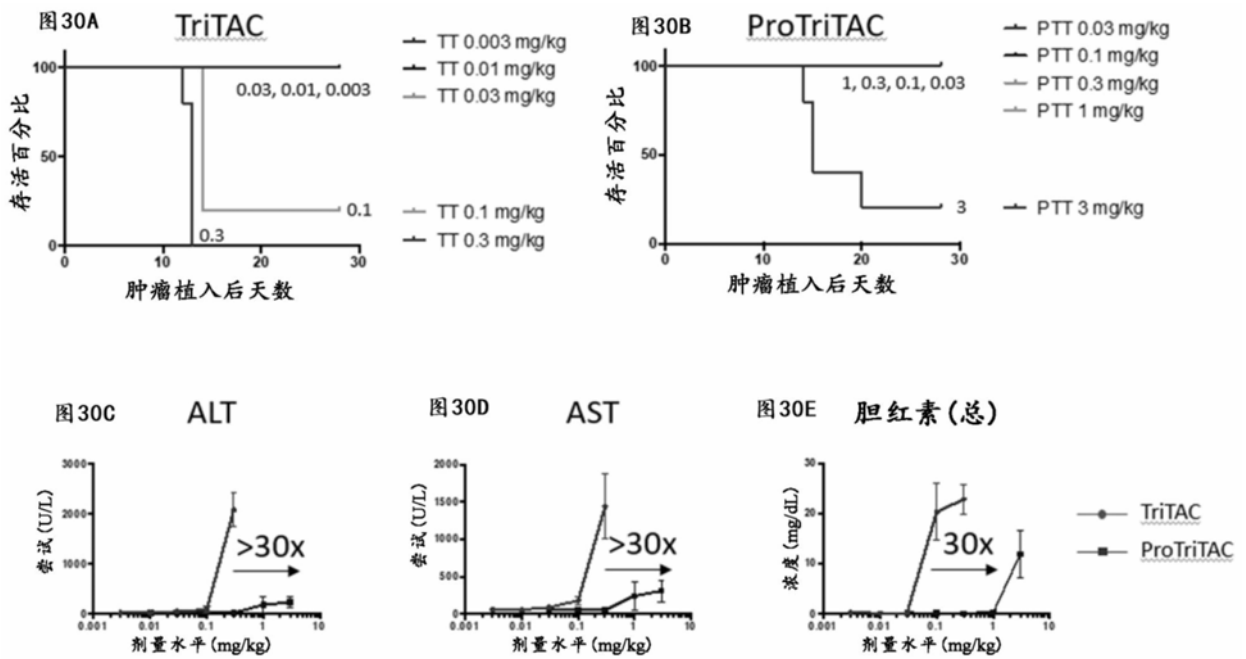


图30

小鼠肝脏组织病理学评分

	GFP TriTAC		TriTAC				ProTriTAC					
	mg/kg	0.3	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3	1	3
	组 物质类型 剂量 (mg/kg) 组中的动物数	F CA 0 10	C Tri 0.003 10	E Tri 0.01 10	A Tri 0.03 10	K Tri 0.1 5	H Tri 0.3 5	D Pro 0.03 10	B Pro 0.1 10	G Pro 0.3 5	I Pro 1.0 5	J Pro 3.0 4
肝脏												
凝固性坏死(肝细胞)	(0)*	(0)	(0)	(0)	(5)	(5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	
最小	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	
轻度	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	2	
中度	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	
明显	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	
门脉纤维化	(1)	(1)	(1)	(1)	(5)	(5)	(2)	(2)	(0)	(0)	(4)	
最小	1	1	1	1	1	-	2	2	-	-	-	
轻度	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	2	
中度	-	-	-	-	1	4	-	-	-	-	2	
胆总管扩张	(0)	(0)	(0)	(0)	(5)	(5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	
最小	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
轻度	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	1	
中度	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	2	
明显	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	
重度	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	1	

* 括号中的数字表示具有所述发现的动物数
Tri=TriTAC,Pro=ProTriTAC,CA=对照抗体(抗 GFP TriTAC)

0.1 mg/kg TriTAC = 3 mg/kg ProTriTAC

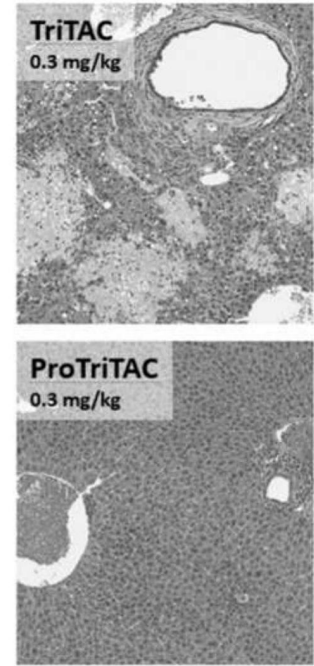


图31

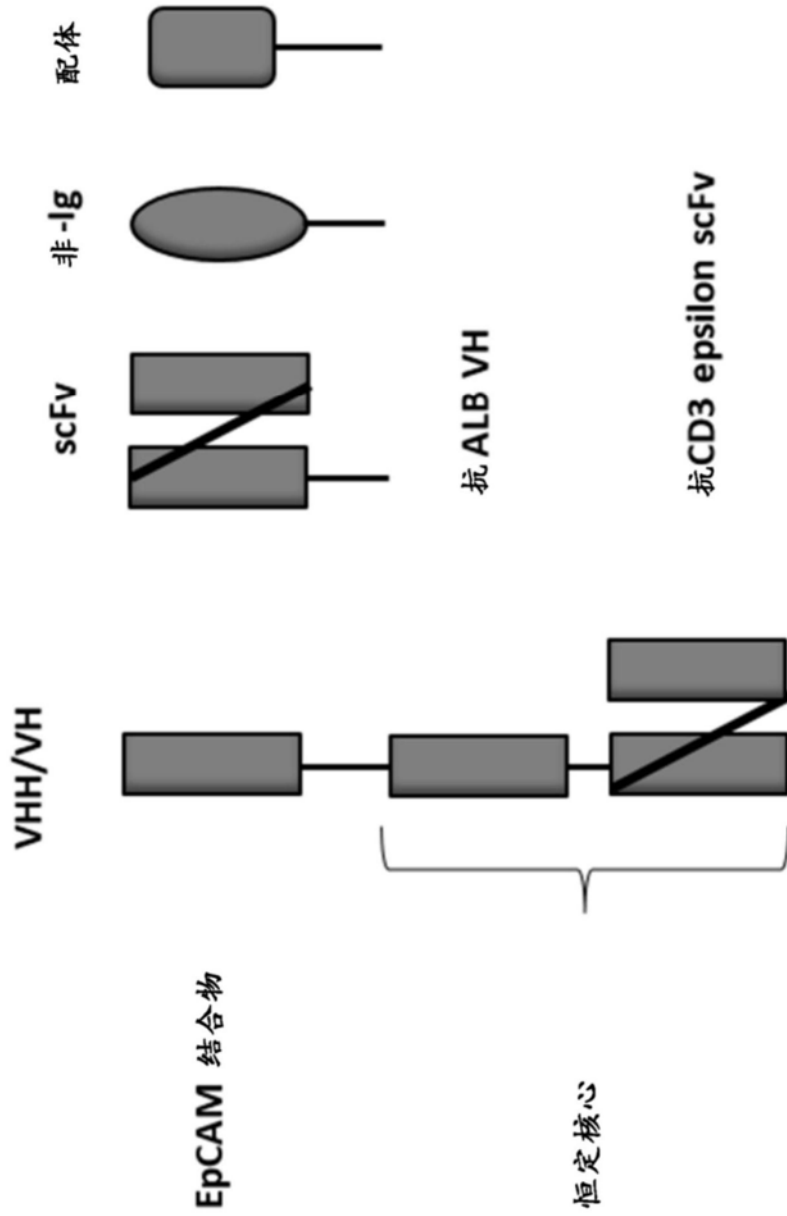


图32