



(10) 授权公告号 CN 113728005 B

(45) 授权公告日 2025.02.21

(21) 申请号 202080012045.4

(22) 申请日 2020.01.30

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113728005 A

(43) 申请公布日 2021.11.30

(30) 优先权数据  
1901305.1 2019.01.30 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.07.30

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2020/052315 2020.01.30

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/157210 EN 2020.08.06

(73) 专利权人 英美偌科有限公司  
地址 英国牛津郡

(72) 发明人 玛蒂娜·卡内斯特拉罗

尼乐·迪克曼 斯蒂芬·哈珀  
彼得·本尼迪克特·柯克  
瑞秋·莫凡尼 罗南·奥德怀尔  
伊恩·巴特勒·罗伯特森

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

专利代理师 郇红

(51) Int.Cl.  
C07K 16/28 (2006.01)  
C07K 14/725 (2006.01)  
C07K 16/30 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2018234319 A1, 2018.12.27  
US 2015166661 A1, 2015.06.18

审查员 关维

权利要求书3页 说明书19页  
序列表19页 附图5页

(54) 发明名称  
CD3特异性结合分子

(57) 摘要  
本发明涉及具有改进的特性的与CD3结合的特异性结合分子,特别是抗体及其片段。

1. 一种特异性结合分子,所述特异性结合分子与CD3结合并包含具有免疫球蛋白VL结构域和免疫球蛋白VH结构域的多肽,其中所述VL结构域包含互补决定区(CDR)VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,以及其中所述VH结构域包含互补决定区(CDR)VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3,其中

VLCDR1为QDIRNY (SEQ ID NO:1)

VLCDR2为YTS

VLCDR3为QQGNTLPWT (SEQ ID NO:2)

VHCDR1为GYSFTGYA (SEQ ID NO:3)

VHCDR2为INPYKGV (SEQ ID NO:4)

VHCDR3为ARSGYYGSDWYFDV (SEQ ID NO:5)。

2. 根据权利要求1所述的特异性结合分子,其中,所述免疫球蛋白VL包含全序列VLFW1-VLCDR1-VLFW2-VLCDR2-VLFW3-VLCDR3-VLFW4,其中VLFW1、VLFW2、VLFW3和VLFW4分别为VL框架(VLFW)序列1至4,所述免疫球蛋白VH包含全序列VHFW1-VHCDR1-VHFW2-VHCDR2-VHFW3-VHCDR3-VHFW4,其中VHFW1、VHFW2、VHFW3和VHFW4分别为VH框架(VHFW)序列1至4。

3. 根据权利要求2所述的特异性结合分子,其中所述VLFW序列和VHFW序列是小鼠、人或人源化的框架序列。

4. 根据权利要求1所述的特异性结合分子,其中,所述免疫球蛋白VL包含全序列VLFW1-VLCDR1-VLFW2-VLCDR2-VLFW3-VLCDR3-VLFW4,其中VLFW1、VLFW2、VLFW3和VLFW4分别为框架(FW)序列1至4,VLFW1、VLFW2、VLFW3和VLFW4,其中:

VLFW1为A I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S (SEQ ID NO:6) 或 DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRAS (SEQ ID NO:7)

VLFW2为LNWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:8)

VLFW3为RLESGVPSRFSGSGSDTYLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:9)

VLFW4为FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:10)。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的特异性结合分子,其中所述免疫球蛋白VH包含全序列VHFW1-VHCDR1-VHFW2-VHCDR2-VHFW3-VHCDR3-VHFW4,其中VHFW1、VHFW2、VHFW3和VHFW4分别为框架(FW)序列1至4,VHFW1、VHFW2、VHFW3和VHFW4,其中:

VHFW1为EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAS (SEQ ID NO:11)

VHFW2为MNWVRQAPGKGLEWVAL (SEQ ID NO:12)

VHFW3为TYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:13) 或 TYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:14)

VHFW4为WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15)。

6. 根据权利要求1-4任一项所述的特异性结合分子,其中,所述免疫球蛋白VL包含以下序列:

AIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSDTYLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFQGQTKVEIK (SEQ ID NO:16); 或

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSDTYLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFQGQTKVEIK (SEQ ID NO:17)。

7. 根据权利要求1-4任一项所述的特异性结合分子,其中,所述免疫球蛋白VH包含以下

序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWRQAPGKGLEWVALINPYKG VSTYNQKFKDRFTIS  
VDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGSDWYFDVWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:18);或

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWRQAPGKGLEWVALINPYKG VSTYNQKFKDRFTFS  
VDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGSDWYFDVWGQG GTLVTVSS (SEQ ID NO:19)。

8. 根据权利要求1-4任一项所述的特异性结合分子,其中所述免疫球蛋白VL包含以下序列:

AIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSG TDY  
TLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID No:16);以及

所述免疫球蛋白VH包含序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFK DRFTFS  
VDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGSDWYFDVWGQGLVTVSS (SEQ ID No:19)。

9. 根据权利要求1-4任一项所述的特异性结合分子,其中,所述分子是scFv片段的形  
式。

10. 根据权利要求1-4任一项所述的特异性结合分子,其中,所述免疫球蛋白VL结构域  
和所述免疫球蛋白VH结构域通过接头连接。

11. 根据权利要求1-4任一项所述的特异性结合分子,其中所述分子是具有以下序列的  
单链特异性结合分子:

AIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYT  
LTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS  
LRLSCAASGYSFTGYAMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAV  
YYCARGSYGSDWYFDVWGQGLVTVSS (SEQ ID No:21)。

12. 一种双功能结合分子,包括:

i) 靶向部分;和

ii) 根据权利要求1至11中任一项所述的与CD3结合的特异性结合分子。

13. 根据权利要求12所述的双功能结合分子,其中,所述靶向部分是T细胞受体 (TCR)、  
抗体或抗体片段。

14. 根据权利要求13所述的双功能结合分子,其中,所述T细胞受体 (TCR) 是异二聚体 $\alpha/\beta$ TCR多肽对。

15. 根据权利要求13所述的双功能结合分子,其中,所述T细胞受体 (TCR) 是单链 $\alpha/\beta$ TCR  
多肽。

16. 根据权利要求13、14或15所述的双功能结合分子,其中,所述TCR包含 $\alpha$ 链恒定区和 $\beta$   
链恒定区之间的非天然二硫键。

17. 根据权利要求12至15中任一项所述的双功能结合分子,其中,根据权利要求1至11  
中任一项所述的与CD3结合的特异性结合分子与所述靶向部分的C末端或N末端融合。

18. 根据权利要求12至15中任一项所述的双功能结合分子,其中,根据权利要求1至11  
中任一项所述的与CD3结合的特异性结合分子通过接头与所述靶向部分的C末端或N末端融  
合。

19. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至11中任一项所述的与CD3

结合的特异性结合分子或根据权利要求12至18中任一项所述的双功能结合分子。

20. 一种核酸,所述核酸编码根据权利要求1至11中任一项所述的与CD3结合的特异性结合分子或根据权利要求12至18中任一项所述的双功能结合分子。

21. 一种表达载体,所述表达载体包含权利要求20所述的核酸。

22. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求20所述的核酸或权利要求21所述的载体,其中,编码根据权利要求1至11中任一项所述的与CD3结合的特异性结合分子或根据权利要求12至18中任一项所述的双功能结合分子的核酸作为单个开放阅读框或分别编码 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链的两个不同的开放阅读框存在。

23. 一种制备根据权利要求1至11中任一项所述的与CD3结合的特异性结合分子或根据权利要求12至18中任一项所述的双功能结合分子的方法,所述方法包括将权利要求22所述的宿主细胞维持在最佳的用于核酸表达的条件下以及分离与所述与CD3结合的特异性结合分子或双功能结合分子。

24. 根据权利要求1至11中任一项所述的与CD3结合的特异性结合分子或根据权利要求12至18中任一项所述的双功能结合分子,所述与CD3结合的特异性结合分子或所述双功能结合分子用作药物。

25. 根据权利要求1至11中任一项所述的与CD3结合的特异性结合分子或根据权利要求12至18中任一项所述的双功能结合分子在制备用于治疗癌症或传染病的药物中的用途,其中所述癌症选自白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、膀胱癌、乳房癌、子宫颈癌、结肠直肠癌、食管癌、子宫内膜癌、胶质母细胞瘤、肝癌、黑色素瘤、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤和甲状腺癌,所述传染病选自HIV、HBV、TB和HCV。

## CD3特异性结合分子

### 技术领域

[0001] 本发明涉及具有改进的特性的与CD3结合的特异性结合分子,特别是抗体及其片段。

### 背景技术

[0002] CD3(分化簇3)是一种T细胞共受体,其有助于活化细胞毒性T细胞(CD8+T细胞)和T辅助细胞(CD4+T细胞)。CD3与T细胞受体(T-cell receptor,TCR)和 $\zeta$ 链(zeta链;CD247)缔合以在T淋巴细胞中产生活化信号。TCR、 $\zeta$ 链和CD3分子共同构成了TCR复合物。

[0003] 与CD3结合的抗体是已知的并且可用作免疫抑制药物。例子包括muromonab-CD3(Janssen-Cilag)、奥昔组单抗(otelixizumab,也称为TRX4)、替利组单抗(teplizumab,也称为PRV-031)和维西珠单抗(visilizumab)。

[0004] 抗CD3抗体也可用作广泛称为T细胞接合双特异性疗法的一类基于蛋白质的疗法中的T细胞募集剂(Baeuerle et al.,Cancer Res.2009Jun 15;69(12):4941-4)。此类疗法将靶细胞识别结构域与抗CD3结构域相结合。不依赖于T细胞受体特异性,靶细胞(例如癌细胞)和CD3+细胞毒性T细胞的同时接合导致CD3信号通路的活化,并最终导致靶细胞死亡。双特异性抗体兰妥莫单抗(blinatumomab)(Amgen)是用于治疗急性成淋巴细胞性白血病(Acute lymphoblastic leukemia,ALL)的市售T细胞接合治疗剂的例子。许多其他T细胞接合双特异性抗体正在临床试验中进行研究,用于治疗各种癌症和传染病(例如,参见Yuraszcek et al.,Clin Pharmacol Ther.2017May;101(5):634-645和Husain et al.,BioDrugs.2018Oct;32(5):441-464中提供的表格)。大多数T细胞接合双特异性抗体识别靶细胞上的细胞表面抗原。此外,还已知T细胞接合双特异性抗体识别源自细胞内抗原并呈递在细胞表面的与MHC形成复合物(pMHC)的短肽(Liddy et al.,Nat Med.2012Jun;18(6):980-7)。

[0005] 抗体UCHT1是本领域已知的临床相关的抗CD3抗体(Shalaby et al.,J Exp Med.1992Jan1;175(1):217-25;US5821337)。已将人源化UCHT1抗体的scFv片段与可溶性T细胞受体融合,以构建与靶细胞上的pMHC结合的T细胞接合双特异性抗体(例如参见W02011001152)。

### 发明内容

[0006] 本发明人惊奇地发现,在UCHT1的氨基酸序列中引入某些突变导致产生具有特别有利于临床使用的意想不到的特性的T细胞接合双特异性分子。

[0007] 在第一方面,提供一种特异性结合分子,该特异性结合分子与CD3结合并包含具有免疫球蛋白VL结构域和免疫球蛋白VH结构域的多肽,其中该VL结构域包含互补决定区(Complementarity Determining Region,CDR)VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,以及其中该VH结构域包含互补决定区(CDR)VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3,各互补决定区具有:

[0008] 如下各氨基酸序列,其中

[0009] VLCDR1为QDIRNY

[0010] VLCDR2为YTS

[0011] VLCDR3为QQGNTLPWT

[0012] VHCDR1为GYSFTGYA

[0013] VHCDR2为INPYKGV

[0014] VHCDR3为ARSGYYGSDWYFDV;

[0015] 或与其至少70%相同的氨基酸序列。

[0016] CDR根据国际免疫遗传学信息系统(International ImMunoGeneTics information system, **IMGT**®)定义(LeFranc et al., Nucleic Acids Res. 2009 Jan; 37 (Database issue): D1006-12)。

[0017] 特别地,本发明的特异性结合分子在VHCDR1的C末端包含丙氨酸,其对应于**IMGT**®编号中的第38位(其在本文中被指定为第165位,并且在图1的重链序列v1中以粗体进行例示和显示)。已经发现,与没有这种突变的分子相比,包括这种突变的分子具有改进的特性,包括改进的特异性窗(specificity window)。

[0018] CDR可以在抗体可变结构域框架序列中提供。框架序列可以是小鼠框架序列或人框架序列或人源化框架序列或任何其他合适的框架。优选的框架是人框架序列或人源化框架序列。人框架或人源化框架基本上具有人免疫球蛋白的氨基酸序列。在某些情况下,小鼠框架、人框架和人源化框架可以任意组合混合。

[0019] 优选地,免疫球蛋白VL包含全序列VLFW1-VLCDR1-VLFW2-VLCDR2-VLFW3-VLCDR3-VLFW4,其中VLFW1、VLFW2、VLFW3和VLFW4分别为VL框架(VL framework, VLFW)序列1至4,免疫球蛋白VH包含全序列VHFW1-VHCDR1-VHFW2-VHCDR2-VHFW3-VHCDR3-VHFW4,其中VHFW1、VHFW2、VHFW3和VHFW4分别为VH框架(VH framework, VHFW)序列1至4,任选地其中VLFW序列和VHFW序列是小鼠、人或人源化的框架序列。

[0020] 优选地,免疫球蛋白VL包含如下全序列:VLFW1-VLCDR1-VLFW2-VLCDR2-VLFW3-VLCDR3-VLFW4,其中VLFW1、VLFW2、VLFW3和VLFW4分别为框架(Framework, FW)序列1至4, VLFW1、VLFW2、VLFW3和VLFW4各自具有:

[0021] 如下的各氨基酸序列,其中:

[0022] VLFW1为AIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRAS或DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRAS

[0023] VLFW2为LNWYQQKPGKAPKLLIY

[0024] VLFW3为RLESGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYYC

[0025] VLFW4为FGQGTKVEIK;

[0026] 或与其至少70%相同的氨基酸序列。

[0027] 优选地,免疫球蛋白VH包含如下全序列:VHFW1-VHCDR1-VHFW2-VHCDR2-VHFW3-VHCDR3-VHFW4,其中VHFW1、VHFW2、VHFW3和VHFW4分别为框架(FW)序列1至4, VHFW1、VHFW2、VHFW3和VHFW4各自具有:

[0028] 如下的各氨基酸序列,其中:

[0029] VHFW1为EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAS

[0030] VHFW2为MNWVRQAPGKGLEWVAL

[0031] VHFW3为TYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC或TYNQKFKDRFTFSVDKSKNTA

YLMNSLRAEDTAVYYC

[0032] VHF4为WGQGTLTVSS;

[0033] 或与其至少70%相同的氨基酸序列。

[0034] 特别地,本发明的特异性结合分子在VHF3的对应于IMGT®编号中的第78位的位置上包含苯丙氨酸(其在本文中被指定为第202位,并且在图1的重链序列v2中以粗体进行例示和显示)。已经发现,与没有这些突变的分子相比,除了第38位的丙氨酸还包括这种突变的分子具有增加的T细胞活化效率。

[0035] 优选地,免疫球蛋白VL包含以下序列或与以下序列至少70%相同的氨基酸序列:

[0036] AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIK;或

[0037] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIK。

[0038] 优选地,免疫球蛋白VH包含以下序列或与以下序列至少70%相同的氨基酸序列:

[0039] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRF TISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSQGYGDSWYFDVWGQTLTVSS;或

[0040] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRF TFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSQGYGDSWYFDVWGQTLTVSS。

[0041] 优选地,特异性结合分子是scFv片段的形式。

[0042] 优选地,免疫球蛋白VL和VH结构域通过接头连接。接头可以为任意氨基酸序列,优选长度为约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。任选地除了其他氨基酸之外,优选的接头包括具有式(GGGGS)<sub>n</sub>的序列。因此,提供具有以下序列或与以下序列至少70%相同的氨基酸序列的单链特异性结合分子:

[0043] AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCARSQGYGDSWYFDVWGQTLTVSS;或

[0044] AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCARSQGYGDSWYFDVWGQTLTVSS。

[0045] 特异性结合分子也可以是包含其他结构域的融合蛋白的一部分。融合蛋白可以通过N末端或C末端与VL或VH免疫球蛋白结构域的融合来构建。其他结构域可以通过接头融合。接头序列通常是柔性的,因为它们主要由氨基酸(比如不具有可能限制柔性的庞大侧链的甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸)组成。可替代地,具有更大刚性的接头可能是可取。可以容易地确定可用的或最佳长度的接头序列。通常接头序列的长度小于约12个氨基酸,例如小于10个,或小于2-10个氨基酸。接头可以为任意氨基酸序列,优选长度为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。合适的接头的实例包括但不限于:GGGSGGGG、GGGGS、GGGSG、GGSGG、GSGGG、GSGGGP、GGEPS、GGEGGGP和GGEGGGSEGGGS(如WO2010/133828中所述的)。优选的接头包括具有式(GGGGS)<sub>n</sub>、

任选地还有其他氨基酸的序列。

[0046] 优选地,当特异性结合分子用作双特异性分子(优选如本文所述的T细胞接合双特异性抗体)的一部分时,该特异性结合分子显示出一种或多种相对于非突变分子改进的治疗特性。优选地,改进的治疗特性选自在给定浓度下的改进的治疗窗和/或增加的最大T细胞活化。改进的治疗窗可以实现更高的用药量,同时最大限度地减少脱靶活化导致的毒性。在给定的双特异性分子浓度下,最大T细胞活化的增加可以在给定的药物剂量下更有效地杀死靶细胞。确定T细胞活化的方法是本领域已知的,包括免疫活化细胞因子的释放和T细胞介导的细胞死亡。可以通过在存在抗原阳性细胞和抗原阴性细胞的情况下测量T细胞活化并计算两个测量值之间的差异来确定T细胞接合双特异性抗体的治疗窗。优选方法的更多细节在实施例2中描述。

[0047] 优选地,本发明的抗CD3抗体与CD3的CD3 $\epsilon$ 亚单位结合。

[0048] 根据本发明的特异性结合分子可以用于治疗或诊断人体或动物体的方法,例如治疗患者(优选人)病症的方法,该方法包括向所述患者给药有效量的本发明的特异性结合分子。本发明还提供了用于医学的本发明的特异性结合分子,以及本发明的特异性结合分子在制备用于诊断或治疗肿瘤的药物中的用途。

[0049] 下面更详细地描述本发明的这些方面和其他方面。

[0050] 如本文所用,“治疗”包括能够使人或非人动物、优选哺乳动物受益的任何方案。治疗可以针对现有病情,或者可以是预防性的(预防性治疗)。

[0051] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有特异性结合抗原的抗原结合位点的分子,无论是天然的还是部分或全部合成产生的。该术语还涵盖具有结合结构域的任何多肽或蛋白质,该结合结构域是抗体结合结构域或与抗体结合结构域同源。这些抗体可来自天然来源,或者它们可以是部分或全部合成产生的。抗体的实例是免疫球蛋白同种型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)及其同种型亚类;包含抗原结合结构域如Fab、scFv、Fv、dAb、Fd的片段;以及双体抗体。抗体可以是多克隆的或单克隆的。单克隆抗体在本文中可以被称为“mab”。

[0052] 可以采用单克隆抗体和其他抗体,并使用重组DNA技术来产生保留原始抗体特异性的其他抗体或嵌合分子。此类技术可能涉及将编码抗体的免疫球蛋白可变区或互补决定区(CDR)的DNA引入到不同免疫球蛋白的恒定区或恒定区加框架区。例如参见EP-A-184187、GB2188638A或EP-A-239400。杂交瘤或产生抗体的其他细胞可能会经历基因突变或其他变化,这可能会或可能不会改变所产生的抗体的结合特异性。

[0053] 由于抗体可通过多种方式进行修饰,因此术语“抗体”应被解释为涵盖具有带有所需特异性的结合结构域的任何特异性结合分子或物质。因此,该术语涵盖抗体片段、衍生物、功能等同物和抗体同源物、人源化抗体,包括包含免疫球蛋白结合结构域的任何多肽,无论是天然的还是完全或部分合成的。因此与另一多肽融合的包含免疫球蛋白结合结构域或等同物的嵌合分子被包括在内。在EP-A-0120694和EP-A-0125023中描述了嵌合抗体的克隆和表达。人源化抗体可以是具有非人(例如鼠类)抗体可变区和人抗体恒定区的修饰的抗体。例如,美国专利号5225539描述了制备人源化抗体的方法。

[0054] 已经表明了完整抗体的片段可以执行结合抗原的功能。结合片段的实例是:(i)由VL、VH、CL和CH1结构域组成的Fab片段;(ii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iii)由单个

抗体的VL和VH结构域组成的Fv片段；(iv)由VH结构域组成的dAb片段(Ward,E.S.et al., Nature 341:544-546(1989))；(v)分离的CDR区；(vi)F(ab')<sub>2</sub>片段:包含两个连接的Fab片段的二价片段；(vii)单链Fv分子(scFv),其中VH结构域和VL结构域通过肽接头连接,该肽接头使两个结构域缔合形成抗原结合位点(Bird et al.,Science 242:423-426(1988); Huston et al.,PNAS USA85:5879-5883(1988))；(viii)双特异性单链Fv二聚体(PCT/US92/09965)；以及(ix)“双体抗体”:通过基因融合构建的多价或多特异性片段(W094/13804;P.Hollinger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993))。

[0055] 双体抗体是多肽的多聚体,每个多肽包括含有免疫球蛋白轻链的结合区的第一结构域和含有免疫球蛋白重链的结合区的第二结构域,所述两个结构域相连(例如通过肽接头),但不能相互缔合形成抗原结合位点:抗原结合位点通过多聚体内一种多肽的第一结构域与多聚体内另一种多肽的第二结构域的缔合形成(W094/13804)。

[0056] 在使用双特异性抗体的情况下,这些可以是可以通过各种方式例如化学制备或杂交瘤杂交来制造的常规双特异性抗体(Hollinger&Winter,Current Opinion Biotechnol.4:446-449(1993)),或者可以是上述任何双特异性抗体片段。可能优选的是,使用scFv二聚体或双体抗体而不是整个抗体。双体抗体和scFv可以在没有Fc区的情况下仅使用可变结构域构建,潜在地降低了抗独特型反应的效果。其他形式的双特异性抗体包括在Traunecker et al.,EMBO Journal10:3655-3659(1991)中描述的单链“Janusins”。

[0057] 与双特异性完整抗体不同的双特异性双体抗体也可能是有用的,因为它们可以容易地在E.coli中构建和表达。使用从文库进行噬菌体展示(W094/13804)可容易地选择适当结合特异性的双体抗体(和许多其他多肽,例如抗体片段)。如果双体抗体的一个臂要保持恒定,例如恒定的针对抗原X的特异性,则可以制备其中另一臂变化的文库,并选择具有适当特异性的抗体。

[0058] “抗原结合结构域”是抗体的包含与抗原的部分或全部特异性结合并互补的区域的部分。当抗原很大时,抗体可能仅与抗原的特定部分结合,该部分被称为表位。抗原结合结构域可以由一个或多个抗体可变结构域提供。抗原结合结构域可以包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。

[0059] “特异性”通常用于指特异性结合对的一个成员不会表现出与其特异性结合配偶体以外的分子的任何显著结合的情况,例如该成员与任何其他分子具有小于约30%,优选20%、10%或1%的交叉反应性。该术语也适用于例如抗原结合结构域对由许多抗原携带的特定表位具有特异性的情况,在这种情况下,携带抗原结合结构域的特异性结合分子将能够与携带该表位的各种抗原结合。

[0060] 根据本发明,“分离的”是指本发明的特异性结合分子或编码此类结合分子的核酸优选所处的状态。分子和核酸通常将不含或基本上不含与它们天然相关联的材料,例如,在它们的天然环境中的其他多肽或核酸,或当制备是通过体外或体内实施的重组DNA技术而进行时在制备它们的环境(例如细胞培养基)中发现的其他多肽或核酸。特异性结合分子和核酸可以与稀释剂或佐剂一起配制,但出于实际目的仍是分离的一例如,分子如果用于涂覆微量滴定板以用于免疫测定通常会与明胶或其他运载体(carrier)混合,或者在用于诊断或治疗时与药学上可接受的运载体或稀释剂混合。特异性结合分子可以是天然糖基化的或通过异源真核细胞系统糖基化的,或者它们可以是(例如如果通过在原核细胞中表达而

产生)未糖基化的。

[0061] “基本上如所列出的”意指本发明的CDR区与图1a和图1cb的制定区域相同或高度同源。“高度同源”是指在CDR中可以进行1至5、1至4、1至3、2或1个替换。

[0062] 本发明在其范围内还包括具有图1和图2所示的氨基酸序列的多肽和与其基本上相同的序列,例如与其具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或99%的同一性的序列。

[0063] 可变结构域可以源自任何种系或重排的人可变结构域,或者可以是基于已知的人可变结构域的共有序列的合成可变结构域。可以使用重组DNA技术,例如Stemmer (Nature 370:389-391 (1994)),描述了与 $\beta$ -内酰胺酶基因相关的技术,而观察到该方法可用于产生抗体公开的改组或组合技术,将本发明的序列引入缺乏CDR3区的可变结构域库中。

[0064] 另一种替代方案是利用对例如SC104 VH或VL基因随机诱变在整个可变结构域内产生突变,从而产生携带本发明的序列的新VH或VL区。Gram等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:3576-3580 (1992))描述了这种技术,他们使用了易错PCR。

[0065] 可以使用的另一种方法是直接诱变VH或VL基因的CDR区。Barbas等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA91:3809-3813 (1994))和Schier等人(J.Mol.Biol.263:551-567 (1996))公开了这种技术。

[0066] 免疫球蛋白可变结构域的主要部分通常将包含至少三个CDR区以及它们的间插框架区。该部分还可以包括第一框架区和第四框架区之一或两者的至少约50%,该50%是第一框架区的C末端50%和第四框架区的N末端50%。可变结构域的主要部分的N末端或C末端的额外的残基可以是那些通常不与天然存在的可变结构域区相关联的残基。例如,通过重组DNA技术进行本发明的特异性结合分子的构建可能导致引入由被引入以便于克隆或其他操作步骤的接头编码的N末端或C末端残基,包括引入接头以连接本发明的可变结构域和其他蛋白序列,该其他蛋白序列包括免疫球蛋白重链、其他可变结构域(例如在双提抗体的生产中)或蛋白质标记,如下文更详细讨论的。

[0067] 优选地,特异性结合分子包含基于基本上如图1所列出的VL和VH区的氨基酸序列的一对结合结构域。基于这些序列中任一个的单个结合结构域形成了本发明的又一个方面。在基于基本上如图1所列出的VH区氨基酸序列的结合结构域的情况下,此类结合结构域可以用作靶向剂,因为已知免疫球蛋白VH结构域能够以特定方式结合靶抗原。

[0068] 本发明的特异性结合分子还可以包含抗体恒定区或其部分。例如,基于图1所示的VL区的特异性结合分子可以在其C末端连接到抗体轻链恒定结构域,包括人 $C\kappa$ 链或 $C\lambda$ 链。类似地,基于图1所示的VH区的特异性结合分子可以在其C末端连接至源自任何抗体同种型(例如IgG、IgA、IgE和IgM)和任何同种型亚类(特别是IgG1和IgG4)的免疫球蛋白重链的全部或部分。

[0069] 本发明的特异性结合分子可以额外地用功能性标记来标记。这种功能性标记包括毒素(例如蓖麻毒素)和酶(例如细菌羧肽酶或硝基还原酶),它们能够将前药转化为活性药物。此外,特异性结合分子可以与化学治疗剂或细胞毒性剂(例如卡奇霉素(calicheamicin))或放射性标记(例如 $^{90}\text{Y}$ 或 $^{131}\text{I}$ )连接或以其他方式缔合。

[0070] 此外,本发明的特异性结合分子可以与额外的治疗剂或靶向部分缔合。可以与特异性结合分子缔合的治疗剂包括免疫调节剂和效应因子、放射性化合物、酶(例如穿孔素)

或化疗剂(例如顺铂)。为了确保在所需位置发挥毒性作用,毒素可以在与特异性结合分子连接的脂质体内,以使得化合物被缓慢释放。这将防止在体内转运过程中的损伤作用,并确保毒素在特异性结合分子与相关抗原呈递细胞结合后具有最大效应。

[0071] 合适的治疗剂的实例包括但不限于:

[0072] • 小分子细胞毒性剂,即具有杀死哺乳动物细胞的能力的分子量小于700道尔顿的化合物。这种化合物还可以含有能够具有细胞毒性作用的有毒金属。此外,应当理解,这些小分子细胞毒性剂还包括前药,即在生理条件下衰变或转化以释放细胞毒性剂的化合物。此类药剂的实例包括顺铂、美登素(maytansine)衍生物、雷卡霉素(rachelmycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、多西他赛(docetaxel)、依托泊苷(etoposide)、吉西他滨(gemcitabine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、伊立替康(irinotecan)、美法仑(melphalan)、米托蒽醌(mitoxantrone)、吡吩姆钠光敏素II(sorfiner sodiumphotofrin II)、替莫唑胺(temozolomide)、拓扑替康(topotecan)、trimetreate arbourate、奥瑞斯他汀E(auristatin E)、长春新碱(vincristine)和多柔比星(doxorubicin);

[0073] • 肽细胞毒素,即具有杀死哺乳动物细胞能力的蛋白质或其片段。例如,蓖麻毒素、白喉毒素、假单胞菌细菌外毒素A、脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶;

[0074] • 放射性核素,即随着 $\alpha$ 或 $\beta$ 粒子或 $\gamma$ 射线中的一种或多种的同时发射而衰变的元素的不稳定同位素。例如,碘131、镱186、铟111、钇90、铋210和213、铯225和砷213;可以使用螯合剂来促进这些放射性核素与高亲和力TCR或其多聚体的缔合;

[0075] • 免疫刺激剂,即刺激免疫应答的免疫效应子分子。例如,细胞因子,比如IL-2和IFN- $\gamma$ ;

[0076] • 超级抗原及其突变体;

[0077] • TCR-HLA融合体,例如与肽-HLA复合物的融合体,其中,所述肽衍生自常见的人病原体,例如埃伯斯坦巴尔病毒(Epstein Barr Virus,EBV);

[0078] • 趋化因子,比如IL-8、血小板因子4、黑色素瘤生长刺激蛋白等;

[0079] • 抗体或其片段,包括抗T细胞或NK细胞决定簇抗体(例如抗CD3、抗CD28或抗CD16);

[0080] • 具有抗体样结合特征的替代蛋白质支架;

[0081] • 补体活化剂;

[0082] • 异种蛋白结构域、同种异体蛋白结构域、病毒/细菌蛋白结构域、病毒/细菌肽。

[0083] 可以与特异性结合分子缔合的靶向部分包括:

[0084] • TCR(包括 $\alpha/\beta$ 和 $\gamma/\delta$ TCR)

[0085] • 识别并结合靶细胞上呈递的抗原的抗体或其片段,包括源自细胞表面上呈递的细胞内抗原并与MHC/HLA形成复合物的肽;

[0086] • 具有抗体样结合特征的替代蛋白质支架。

[0087] 此外,取决于要治疗的病症,本发明的特异性结合分子可以单独给药或与其他治疗一起给药,其可以是同时给药或顺序给药。因此,本发明进一步提供了含有本发明的特异性结合分子和活性剂的产品,其在肿瘤治疗中作为用于同时、单独或顺序使用的组合制剂。活性剂可以包括化学治疗剂或细胞毒性剂,包括5-氟尿嘧啶、顺铂、丝裂霉素C、奥沙利铂(oxaliplatin)和他莫昔芬(tamoxifen),该化学治疗剂或细胞毒性剂可以与本发明的结合

分子协同作用。其他活性剂可以包括合适剂量的镇痛药,例如非甾体抗炎药(例如阿司匹林、扑热息痛、布洛芬或酮洛芬)或阿片剂(例如吗啡)或止吐药。

[0088] 本发明的特异性结合分子通常将以药物组合物的形式给药,该药物组合物除了该特异性结合分子外还可以包含至少一种成分。除了活性成分之外,该药物组合物还可以包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂、运载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员公知的其他材料。此类材料应该是无毒的,并且应该不会干扰活性成分的功效。运载体或其他材料的确切性质将取决于给药途径,给药途径可以是口服或注射,例如静脉注射。

[0089] 预期组合物的治疗性给药的主要途径是注射,但也可以使用导管或其他外科输液管来递送。一些合适的给药途径包括静脉内、皮下和肌肉内给药。粉末制剂可以重构为液体制剂后使用。

[0090] 对于静脉内注射或病痛部位注射,活性物质将为无热原、pH合适、等渗且稳定的肠胃可接受的水溶液形式。本领域技术人员能够很好地使用例如等渗赋形剂例如氯化钠注射液(Sodium Chloride Injection)、林格氏注射液(Ringer's Injection)、乳酸林格氏注射液(Lactated Ringer's Injection)制备合适的溶液。根据需要,可以包含防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0091] 用于口服给药的药物组合物可以是片剂、胶囊、粉末或液体形式。片剂可以包括固体运载体,例如明胶或佐剂。液体药物组合物通常包括液体运载体,例如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油。可以包括生理盐水溶液、右旋葡萄糖或其他糖类溶液,或二醇类例如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。当制剂为液体时,其可以是例如pH 6.8-7.6的含有非磷酸缓冲液的生理盐溶液,或冻干粉末。

[0092] 该组合物也可以通过微球、脂质体、其他微粒递送系统或置于某些组织(包括血液)中的缓释制剂来给药。缓释运载体的合适例子包括共用制品(shared article)形式的半渗透聚合物基质,例如栓剂或微胶囊。可植入或微囊缓释基质包括L-谷氨酸和 $\gamma$ -乙基-L-谷氨酸(Sidman et al, Biopolymers 22(1):547-556, 1985)的聚交酯(US Patent No. 3, 773, 919; EP-A-0058481)共聚物、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或乙烯醋酸乙烯酯(Langer et al, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981和Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982)。含有多肽的脂质体通过以下众所周知的方法来制备:DE 3,218,121A; Epstein et al, PNAS USA, 82:3688-3692, 1985; Hwang et al, PNAS USA, 77:4030-4034, 1980; EP-A-0052522; EP-A-0036676; EP-A-0088046; EP-A-0143949; EP-A-0142541; JP-A-83-11808; 美国专利号4, 485, 045和4, 544, 545。通常,脂质体是小的(约200埃至800埃)单层型,其中脂质含量大于约30mol%胆固醇,所选比例根据多肽泄漏的最佳速率进行调整。

[0093] 组合物可以以局部方式给药至所需部位或者可以以其靶向相关细胞的方式递送。

[0094] 组合物优选为以“治疗上有效的量”给药至个体,该量足以显示对个体的益处。实际给药量、给药速率和时间进程将取决于所治疗的性质和严重程度。治疗处方,例如剂量的决策等,是全科执业医师和其他医生的职责范围,且一般需要考虑到所治疗的病症、个体患者的情况、递送部位、给药方法和医师所知的其他因素。

[0095] 最佳剂量可由医师基于许多参数来确定,这些参数包括例如年龄、性别、体重、所治疗病症的严重程度、给药的活性成分以及给药途径。通常,允许受体饱和的多肽和抗体的血清浓度是可取的。超过大约0.1nM的浓度通常就足够了。例如,100mg/m<sup>2</sup>的抗体剂量提供

大约20nM的血清浓度,持续大约八天。

[0096] 作为粗略的指导,每周可以给予的抗体剂量可以为 $10\text{mg}/\text{m}^2$ - $300\text{mg}/\text{m}^2$ 。应该以更频繁的间隔使用等效剂量的抗体片段,以使血清水平保持超过使唾液酸四糖基碳水化合物神经酰胺(Sialyltetraosyl carbohydrateceramide)饱和的浓度。

[0097] 组合物的剂量将取决于结合分子的性质,例如,其结合活性和体内血浆半衰期、制剂中多肽的浓度、给药途径、给药部位和剂量、参与的患者的临床耐受性、患者遭受的病理状况等,这完全在医师的技术范围内的。例如,优选每名患者每次给药 $300\mu\text{g}$ 抗体的剂量,尽管剂量范围可以为每剂约 $10\mu\text{g}$ 至 $6\text{mg}$ 。在一系列顺序接种期间使用不同的剂量;执业医师可能会进行初始接种,然后使用相对较小剂量的抗体进行加强。

[0098] 本发明的结合分子可以全部或部分通过化学合成来生成。该结合分子可根据完备建立的标准液相肽合成法或优选的固相肽合成法来容易地制备,所述方法的一般性描述随处可得(例如参见J.M.Stewart and J.D.Young,Solid Phase Peptide Synthesis,2nd edition,Pierce Chemical Company,Rockford,Illinois(1984);M.Bodanzsky and A.Bodanzsky,The Practice of Peptide Synthesis,Springer Verlag,New York(1984);和Applied Biosystems 430AUsers Manual,ABI Inc.,Foster City,California);或者,它们可以在溶液中通过液相法制备,或通过固相法、液相法和溶液化学法的任意组合来制备,例如通过首先完成各个肽部分,然后根据需要和是否适当,在去除存在的任何保护基团后,通过各碳酸或磺酸或其反应性衍生物的反应来引入残基X。

[0099] 另一种产生根据本发明的结合分子的便利方法是通过在表达体系中使用该核酸来表达编码该结合分子的核酸。

[0100] 本发明还提供编码本发明的特异性结合分子的分离的核酸。核酸包括DNA和RNA。在优选的方面中,本发明提供了编码如上所述的本发明的特异性结合分子的核酸。本领域技术人员能够确定仍将提供本发明的特异性结合分子的对这种核酸的替换、缺失和/或添加。

[0101] 本发明还提供含有至少一种上述核酸的质粒、载体、转录或表达组件形式的构建体。本发明还提供包括含有一种或多种上述构建体的重组宿主细胞。如上所述,编码本发明的特异性结合分子的核酸构成本发明的一个方面;产生该特异性结合分子的方法也构成本发明的一个方面,该方法包括表达该特异性结合分子的编码核酸。通过在适当条件下培养含有所述核酸的重组宿主细胞,可以便利地实现表达。通过表达而产生后,可以视情况而定用任何合适的技术来分离和/或纯化特异性结合分子然后使用。

[0102] 用于多肽在各种不同宿主细胞中克隆和表达的体系是众所周知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。本领域可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、NS0小鼠黑色素瘤细胞和许多其他细胞。常见的优选细菌宿主为E.coli。在原核细胞(例如E.coli)中的表达抗体和抗体片段为本领域完备建立的。综述参见例如Plückthun,Bio/Technology 9:545-551(1991)。在培养物中的真核细胞中表达也是本领域技术人员可用的产生特异性结合分子的选项,近期综述参见例如Reff,Curr.Opinion Biotech.4:573-576(1993);Trill et al.,Curr.Opinion Biotech.6:553-560(1995)。

[0103] 可以选择或构建含有适当调控序列的合适载体,该调控序列视情况而定包括启动

子序列、终止子序列、多聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因和其他序列。载体视情况而定可以是质粒，病毒例如噬菌体或噬菌粒。进一步的细节参见，例如，Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual: 2nd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)。Ausubel et al. eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd Edition, John Wiley & Sons (1992) 中详细记载了许多核酸操作的已知技术和方案，例如核酸构建体的制备、诱变、测序、DNA引入细胞和基因表达以及蛋白分析。

[0104] 因此，本发明的又一方面提供了一种含有本文所公开的核酸的宿主细胞。在再一个方面中，提供一种方法，该方法包括将这种核酸引入宿主细胞。可以使用任何可用技术进行引入。对于真核细胞，合适的技术可以包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染，和使用反转录病毒或其他病毒（例如痘苗病毒，或对昆虫细胞而言，使用杆状病毒）的转导。对于细菌细胞，合适的技术可以包括氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体进行转染。引入之后可以引发或允许由该核酸表达，例如通过在该基因的表达条件下培养宿主细胞来进行。

[0105] 本发明的核酸可以整合入宿主细胞的基因组（例如染色体）中。可以根据标准技术，通过包含促进与该基因组重组的序列来促进整合。

[0106] 本发明还提供一种方法，该方法包括在表达体系中使用上述构建体以表达如上所述的特异性结合分子或多肽。

[0107] 在另一方面，提供一种双功能结合分子，该双功能结合分子包括：

[0108] i) T细胞受体 (TCR) 或抗体；和

[0109] ii) 根据第一方面的与CD3结合的特异性结合分子。

[0110] 应当理解，上述关于第一方面的任何和所有特征同样适用于该另一方面。

[0111] 靶向部分可以是T细胞受体 (TCR)、抗体或抗体片段。

[0112] 抗CD3和靶向部分的排列可以是任何已知的形式（例如Brinkman et al., *MAbs*. 2017Feb-Mar; 9(2):182-212的图2中所描述的）。

[0113] T细胞受体 (TCR) 可以是异二聚体 $\alpha/\beta$ 或 $\gamma/\delta$ TCR多肽对。T细胞受体 (TCR) 可以是单链TCR多肽。

[0114] 与CD3结合的特异性结合分子可以与T细胞受体 (TCR) 的 $\alpha$ 链或 $\beta$ 链的C末端或N末端融合。优选地，CD3效应子与TCR的 $\beta$ 链的N末端融合。双功能结合分子可以是双体抗体形式，其中TCR-Va与抗CD3-VL连接，TCR-Vb与抗CD3-VH连接，反之亦然。

[0115] 在一些情况下，与CD3结合的特异性结合分子可以与靶向部分的C末端或N末端融合。在其他情况下，与CD3结合的特异性结合分子通过接头与靶向部分的C末端或N末端融合。

[0116] 与CD3结合的特异性结合分子可以通过接头与T细胞受体 (TCR) 或TCR样抗体融合，该接头可以是多肽接头。多肽接头序列通常是柔性的，因为它们由氨基酸（比如不具有可能限制柔性的庞大侧链的甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸）组成。可用的或最佳长度的接头序列是容易确定的。通常，接头序列的长度将小于约12个氨基酸，例如小于10或为5至10个氨基酸。接头的长度可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。任选地除了其他氨基酸之外，优选的接头包括具有式 (GGGS)<sub>n</sub>、任选地还有其他氨基酸的的序列。

[0117] TCR可以包含 $\alpha$ 链恒定区和 $\beta$ 链恒定区之间的非天然二硫键。

[0118] TCR可以与与肽抗原形成复合物的MHC结合。优选地,肽抗原是任何疾病相关抗原。优选地,肽抗原是任何肿瘤相关抗原。优选地,肽抗原是如W02011001152、W02017109496、W02017175006和W02018234319中所述的衍生自GP100、NYESO、MAGEA4或PRAME的肽。

[0119] 合适的TCR可以具有如W02011001152、W02017109496、W02017175006和W02018234319中定义的氨基酸序列。

[0120] TCR可以具有以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少70%相同的氨基酸序列:

[0121] DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIMGDEQKGDIAEGYSVSR  
EKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWWTGGSAPIRFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV  
CLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSEN  
DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD。

[0122] 双功能结合分子可以具有以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少70%相同的氨基酸序列:

[0123] AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSG  
TDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ  
PGGSLRLS CAASGYSFTGYAMNWRQAPGKLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAE  
DTAVYYCARGSYGSDSDWYFDVWGQGLTVTVSSGGGSDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQD  
PGQGLRLIYYSQIMGDEQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWWTGGSAPIRFGPGTRLTVT  
EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYAL  
SSRLRVSATFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD。

[0124] 或者,双功能结合分子可以具有以下氨基酸序列或与以下氨基酸序列至少70%相同的氨基酸序列:

[0125] AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSG  
TDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ  
PGGSLRLS CAASGYSFTGYAMNWRQAPGKLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAE  
DTAVYYCARGSYGSDSDWYFDVWGQGLTVTVSSGGGSDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQD  
PGQGLRLIYYSQIMGDEQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWWTGGSAPIRFGPGTRLTVT  
EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYAL  
SSRLRVSATFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD。

[0126] 本文还公开了特异性结合分子或双功能结合分子的表型沉默变体。如本文所用,术语“表型沉默变体”应理解为是指合并一个或多个其他氨基酸变化(包括替换、插入和缺失)的特异性结合分子或双功能结合分子可变结构域,该特异性结合分子或双功能结合分子可变结构域具有与相应的不含所述变化的分子或多肽相似的表型。

[0127] 表型沉默变体可包含一个或多个保守替换和/或一个或多个无害替换(tolerated substitution)。无害替换意指那些不落入如下所提供的保守的定义但仍然是表型沉默的替换。技术人员知道各种氨基酸具有相似的性质并因此是“保守的”。蛋白质、多肽或肽的一个或多个这样的氨基酸通常可以被一个或多个其他这样的氨基酸替换,而不会消除该蛋白质、多肽或肽的所需活性。

[0128] 因此,氨基酸甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸(具有脂肪族侧链的氨基

酸)通常可以互相替换。在这些可能的替换中,优选使用甘氨酸和丙氨酸来互相替换(因为它们具有相对短的侧链),以及使用缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸来互相替换(因为它们具有较大的疏水脂肪族侧链)。通常可以互相替换的其他氨基酸包括:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸(具有芳香族侧链的氨基酸);赖氨酸、精氨酸和组氨酸(具有碱性侧链的氨基酸);天冬氨酸和谷氨酸(具有酸性侧链的氨基酸);天冬酰胺和谷氨酰胺(具有酰胺侧链的氨基酸);以及半胱氨酸和甲硫氨酸(具有含硫侧链的氨基酸)。应当理解,本发明范围内的氨基酸替换可以使用天然存在的或非天然存在的氨基酸来进行。例如,本文考虑可以用乙基基团取代丙氨酸上的甲基基团,和/或可以对肽骨架进行微小的改变。无论是否使用天然氨基酸或合成氨基酸,优选仅存在L-氨基酸。

[0129] 这种性质的替换通常被称为“保守”或“半保守”氨基酸替换。因此,本发明延伸至如下这样的特异性结合分子或双功能结合分子的用途,该特异性结合分子或双功能结合分子包含上述任意氨基酸序列,但在该序列中具有一个或多个保守替换和/或一个或多个无害替换,使得该特异性结合分子或双功能结合分子的氨基酸序列与上述特异性结合分子或双功能结合分子具有至少80%的同一性,或至少90%的同一性,例如至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性。

[0130] 如本领域已知的“同一性”是通过比较序列所确定的两个或更多个多肽序列或两个或更多个多核苷酸序列之间的关系。在本领域中,同一性也意指多肽或多核苷酸序列(视情况而定)之间的序列相关程度,如通过这种序列的串之间的匹配所确定。虽然存在许多测量两个多肽序列或两个多核苷酸序列之间的同一性的方法,但通常用于确定同一性的方法是在计算机程序中编码化的。用于确定两个序列之间的同一性的优选计算机程序包括但不限于GCG程序包(Devereux, et al., *Nucleic Acids Research*, 12, 387 (1984)、BLASTP、BLASTN和FASTA(Atschul et al., *J. Molec. Biol.* 215, 403 (1990))。

[0131] 可以使用程序(例如CLUSTAL程序)来比较氨基酸序列。该程序比较氨基酸序列,并通过视情况而定在任一序列中插入空格来找到最优比对。可以针对最优比由来计算氨基酸同一性或相似性(同一性加上氨基酸类型的保守性)。像BLASTx这样的程序会比对相似序列的最长延伸(longest stretch),并为该拟合赋值。因此,可以在发现若干相似区,每个区具有不同的分数的情况下获得比较。本发明中考虑了两种类型的同一性分析。

[0132] 通过出于最优比较目的对序列进行比对(例如,可以在第一序列中引入空位以与序列进行最佳比对)并且比较相应位置处的氨基酸残基或核苷酸,来确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性。“最佳比对”是获得最高的百分比同一性的两个序列的比对。百分比同一性由所比较序列中的相同氨基酸残基或核苷酸的数量来确定的(即, %同一性=相同位置数/位置总数×100)。

[0133] 可以使用本领域技术人员已知的数学算法来完成两个序列之间的百分比同一性的确定。用于比较两个序列的数学算法的例子是Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268的算法,该算法在Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877中进行了改进。Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410的BLASTn和BLASTp程序已经合并了这种算法。可以用BLASTn程序来进行两个核苷酸序列之间的同一性百分比的确定。可以用BLASTp程序来进行两个蛋白质

序列之间的同一性百分比的确定。为了获得出于比较目的的空位比对,可以如Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402所述使用Gapped BLAST。可替代地,可以使用PSI-Blast来执行迭代搜索,检测分子之间的远距离关系(Id.)。当使用BLAST、Gapped BLAST和PSI-Blast程序时,可以使用各个程序(例如,BLASTp和BLASTp)的默认参数。参见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。默认的常规参数可以包括,例如,字体大小=3,期望阈值=10。可以选择参数以自动调整为输入短序列。用于序列比较的数学算法的另一例子是Myers and Miller, CABIOS (1989)的算法。作为CGC序列比对软件包的一部分的ALIGN程序(版本2.0)已经合并了这种算法。本领域已知的用于序列分析的其他算法包括如Torellis and Robotti (1994) *Comput. Appl. Biosci.*, 10:3-5中所述的ADVANCE和ADAM;以及Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-8中所述的FASTA。在FASTA中,ktup是设置搜索的灵敏度和速度的控制选项。出于评估本发明中的百分比同一性的目的,使用BLASTp以及默认参数作为比较方法。另外,当所述同一性百分比提供氨基酸的非整数值(即,具有90%序列同一性的25个氨基酸的序列提供的值为“22.5”)时,则将所得值下舍入到下一个整数,即“22”。因此,在提供的例子中,在25个氨基酸中具有22个匹配的序列在90%序列同一性内。

[0134] 对于本领域技术人员来说显而易见的是,在基本不影响特异性结合分子的功能特性的情况下,有可能将在其C末端和/或N末端所提供的序列截短或延伸1、2、3、4、5或更多个残基。在其C末端和/或未N端所提供的序列可以被截短或延伸1、2、3、4或5个残基。所有这些变体都涵盖在本发明中。

[0135] 可以使用任何适当的方法将突变(包括保守和无害的替换、插入和缺失)引入所提供的序列中,所述方法包括但不限于基于聚合酶链式反应(PCR)、基于限制酶的克隆或不依赖于连接的克隆(Ligation independent cloning, LIC)步骤的方法。这些方法在许多标准分子生物学文本中都有详细描述。有关聚合酶链式反应(PCR)和基于限制酶的克隆的更多细节,参见Sambrook&Russell, (2001) *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (3rd Ed.) CSHL Press。有关不依赖于连接的克隆(LIC)步骤的更多信息可以在Rashtchian, (1995) *Curr Opin Biotechnol* 6(1):30-6中找到。本发明提供的序列可以从固态合成或本领域已知的任何其他合适的方法获得。

[0136] 靶向部分可以是抗体或其片段。优选地,抗体,包括其片段、衍生物和变体,与病态细胞或癌性细胞上呈递的抗原结合。

[0137] 本发明的特异性结合分子或双功能结合分子可用于诊断和治疗人或动物对象的癌症或传染病的方法。癌症的例子包括但不限于:液体肿瘤,例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤;和实体瘤,包括膀胱、乳房、子宫颈、结肠直肠、食管、子宫内膜、胃、胶质母细胞瘤、肝、黑色素瘤、肺、卵巢、胰腺、前列腺、肉瘤、甲状腺。传染病的例子包括但不限于HIV、HBV、TB、HCV。

[0138] 当用于诊断时,本发明的特异性结合分子或双功能结合分子可以用可检测标记来标记,例如放射性标记,比如<sup>131</sup>I或<sup>99</sup>Tc,这些可检测标记可以使用抗体成像领域已知的常规化学方法连接到本发明的特异性结合分子上。标记还包括酶标记,例如辣根过氧化物酶。标记还包括化学部分,例如生物素,该化学部分可以通过与特定的同源可检测部分(例如,标记的亲合素)结合来进行检测。

[0139] 本发明的特异性结合分子或双功能结合分子可以适于高产率纯化,特别是可溶性

形式的特异性结合分子。可以基于纯化过程期间保留的物质质量来确定产率(即,在纯化过程结束时获得的正确折叠物质的量相对于重折叠前获得的水溶性物质的量),和/或产率可以基于在纯化过程结束时获得的正确折叠物质的量相对于原始培养物体积。高产率意指大于1%,或更优选大于5%,或更高的产率。高产率意指大于1mg/ml,或更优选大于3mg/ml,或大于5mg/ml,或更高的产率。

[0140] 确定结合亲和力(与平衡常数 $K_D$ 成反比)和结合半衰期(表示为 $T_{1/2}$ )的方法是本领域技术人员已知的。优选地,结合亲和力和结合半衰期分别使用表面等离子体共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)或生物层干涉法(Bio-Layer Interferometry, BLI)来确定,例如分别使用BIAcore仪器或Octet仪器来确定。应当理解,亲和力加倍导致 $K_D$ 减半。根据 $\ln 2$ 除以解离率( $k_{off}$ )计算 $T_{1/2}$ 。因此, $T_{1/2}$ 加倍导致 $k_{off}$ 减半。 $K_D$ 和 $k_{off}$ 值。为了考虑独立测量之间的变化,尤其是超过20小时解离时间时的相互作用的测量之间的变化,可以使用相同的测定方案测量给定分子的结合亲和力和/或结合半衰期数次(例如3次或更多次),并取结果的平均值。为了比较两个样品(即两个不同的分子和/或同一分子的两种制剂)之间的结合数据,优选使用相同的测定条件(例如温度)进行测量,例如W02018234319中所述的那些条件。

[0141] 本文所述的TCR可以是 $\alpha\beta$ 异二聚体。 $\alpha$ - $\beta$ 异二聚体TCR通常包含 $\alpha$ 链TRAC恒定结构域序列和/或 $\beta$ 链TRBC1或TRBC2恒定结构域序列。恒定结构域可以是全长的,这意味着存在胞外结构域、跨膜结构域和胞质结构域,或者它们可以是可溶形式(即不具有跨膜结构域或胞质结构域)。相对于天然TRAC和/或TRBC1/2序列,恒定结构域中的一个或两个可包含突变、替换或缺失。术语TRAC和TRBC1/2也涵盖天然多态性变体,例如TRAC第4位处的N变为K(Bragado et al International immunology.1994Feb;6(2):223-30)。

[0142] 对于可溶性TCR,可通过截短或替换使TRAC的外显子2的Cys4与TRBC1或TRBC2的外显子2的Cys2之间的天然二硫键缺失来修饰 $\alpha$ 和 $\beta$ 链恒定结构域序列。 $\alpha$ 和/或 $\beta$ 链恒定结构域序列可以在各恒定结构域的残基之间具有引入的二硫键,例如W0 03/020763中所描述。可以通过用半胱氨酸残基替换TRAC的Thr48位和TRBC1或TRBC2的Ser57位来修饰 $\alpha$ 和 $\beta$ 恒定结构域,所述半胱氨酸在TCR的 $\alpha$ 和 $\beta$ 恒定结构域之间形成二硫键。TRBC1或TRBC2可另外包括恒定结构域第75位的半胱氨酸至丙氨酸突变和恒定结构域的第89位的天冬酰胺至天冬氨酸突变。在 $\alpha\beta$ 异二聚体中存在的胞外恒定结构域中的一个或两个可以在C端或C末端截短,例如截短至多15个、或至多10个、或至多8个或更少的氨基酸。 $\alpha\beta$ 异二聚体中存在的胞外恒定结构域中的一个或两个可以在C末端或C端截短例如至多15个、或至多10个或至多8个氨基酸。 $\alpha$ 链胞外恒定结构域的C末端可以截短8个氨基酸。可溶性TCR优选与治疗剂和/或可检测标记物缔合。

[0143]  $\alpha\beta$ 异二聚体TCR的恒定结构域可以是全长的,具有跨膜结构域和胞质结构域。此类TCR可以包含对应于自然界中发现的在各自 $\alpha$ 和 $\beta$ 恒定结构域之间的二硫键。另外地或可替代地,在胞外恒定结构域之间可以存在非天然二硫键。所述非天然二硫键在W003020763和W006000830中进一步描述。非天然二硫键可以在TRAC的Thr48位与TRBC1或TRBC2的Ser57位之间。相对于天然TRAC和/或TRBC1/2序列,恒定结构域中的一个或两个可包含一个或多个突变、替换或缺失。具有全长恒定结构域的TCR优选用于过继性治疗。

[0144] 本文所述的TCR可以是单链形式。单链形式包括但不限于 $V\alpha$ -L- $V\beta$ 、 $V\beta$ -L- $V\alpha$ 、 $V\alpha$ -C

$\alpha$ -L-V $\beta$ 、V $\alpha$ -L-V $\beta$ -C $\beta$ 、或V $\alpha$ -C $\alpha$ -L-V $\beta$ -C $\beta$ 型的 $\alpha\beta$ TCR多肽,其中V $\alpha$ 和V $\beta$ 分别为TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 可变区,C $\alpha$ 和C $\beta$ 分别为TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 恒定区,并且L为接头序列(Weidanz et al., (1998) *J Immunol Methods*. Dec 1; 221(1-2):59-76; Epel et al., (2002), *Cancer Immunol Immunother*. Nov; 51(10):565-73; WO 2004/033685; W09918129)。恒定结构域中的一个或两个(当存在时)可以是全长的,或者它们可以如上所述被截短和/或含有突变。优选地,单链TCR是可溶的。单链TCR可以在各恒定结构域的残基之间具有引入的二硫键,如WO 2004/033685中所描述的。W02004/033685; W098/39482; W001/62908; Weidanz et al. (1998) *J Immunol Methods* 221(1-2):59-76; Hoo et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10):4759-4763; Schodin (1996) *Mol Immunol* 33(9):819-829中进一步描述了单链TCR。

[0145] 特异性结合分子或双功能结合分子可以与PK修饰部分缔合(以共价或以其他方式)。PK修饰部分的实例包括但不限于PEG(Dozier et al., (2015) *Int J Mol Sci*. Oct 28; 16(10):25831-64和Jevsevar et al., (2010) *Biotechnol J*. Jan; 5(1):113-28)、PASylation(Schlapschy et al., (2013) *Protein Eng Des Sel*. Aug; 26(8):489-501)、白蛋白、和白蛋白结合结构域、(Dennis et al., (2002) *J Biol Chem*. Sep 20; 277(38):35035-43)、和/或非结构化多肽(Schellenberger et al., (2009) *Nat Biotechnol*. Dec; 27(12):1186-90)。其他PK修饰部分包括抗体Fc片段。

[0146] 如本文所用,术语“抗体”涵盖此类片段和变体。适用于本文所述的组合物和方法的抗体片段和变体/类似物包括微型抗体、Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、dsFv和scFv片段、双体抗体、Nanobodies™(这些构建体由Ablynx(比利时)销售,包含:衍生自骆驼科动物(例如骆驼或美洲驼)抗体和域抗体(Domantis(比利时)的合成的单一免疫球蛋白可变重结构域,包括亲和力成熟的单一免疫球蛋白可变重结构域或免疫球蛋白可变轻结构域)或表现出抗体样结合特性的替代蛋白质支架,例如Affibody(Affibody(瑞典),其包含工程化蛋白A支架)或Anticalins(Pieris(德国)),其包括工程化的anticalins),略举数例。

[0147] 抗体还包括TCR样抗体(Chang et al., *Expert Opin Biol Ther*. 2016 Aug; 16(8):979-87和Dahan et al., *Expert Rev Mol Med*. 2012 Feb 24; 14:e6)。

[0148] 第一方面的靶向部分和特异性结合分子的连接可以通过共价或非共价连接。共价连接可以是直接的,或通过接头序列间接的。接头序列通常是柔性的,因为它们主要由氨基酸(比如不具有可能限制柔性的庞大侧链的甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸)组成。可替代地,具有更大刚性的接头可能是可取的。可以容易地确定可用的或最佳长度的接头序列。通常,接头序列的长度将小于约12个氨基酸,例如小于10或为2至10个氨基酸,优选为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。可用于本发明的TCR的合适接头的实例包括但不限于:GGGSGGGG、GGGGS、GGGSG、GGSGG、GSGGG、GSGGGP、GGEPS、GGEGGGP和GGEGGGSEGGGS(如W02010/133828中所述的)。

[0149] 如本领域所熟知的,可以对特异性结合分子或双功能结合分子进行翻译后修饰。糖基化就是这样一种修饰,其包括寡糖部分与氨基酸链中限定的氨基酸的共价连接。例如,天冬酰胺残基或丝氨酸/苏氨酸残基是熟知的寡糖连接位置。特定蛋白质的糖基化状态取决于许多因素,包括蛋白质序列、蛋白质构象和某些酶的可用性。此外,糖基化状态(即寡糖类型、共价键和连接总数)会影响蛋白质功能。因此,当生产重组蛋白时,控制糖基化通常是可取的。受控糖基化已被用于改进基于抗体的治疗剂(Jefferis et al., (2009) *Nat Rev*

Drug Discov Mar;8(3):226-34.)。对于可溶性TCR,可以通过例如使用特定细胞系(包括但不限于哺乳动物细胞系,比如中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary,CHO)细胞或人胚肾(Human embryonic kidney,HEK)细胞)或通过化学修饰来控制糖基化。这种修饰可能是可取的,因为糖基化可以改善药代动力学、降低免疫原性并且更接近地模拟天然人蛋白质(Sinclair and Elliott, (2005) Pharm Sci. Aug;94(8):1626-35)。

[0150] 为了向患者给药,本发明的特异性结合分子、双功能结合分子、核酸、表达载体或细胞可以作为无菌药物组合物的一部分与一种或多种药学上可接受的运载体或赋形剂一起提供。该药物组合物可以是任何合适的形式(取决于将其给药于患者的所需方法)。其可以以单位剂型提供,通常在密封容器中提供,并且可以作为试剂盒的一部分提供。这种试剂盒会通常(但并非必然)包括使用说明书。它可以包括多个所述单位剂型。

[0151] 药物组合物可以适于通过任何适当途径的给药,例如肠胃外(包括皮下、肌内、囊内或静脉内)、肠内(包括口服或直肠)、吸入或鼻内途径。此类组合物可以通过药学领域已知的任何方法制备,例如通过无菌条件下将活性成分与运载体或赋形剂混合来制备。

[0152] 本发明的物质的剂量可以在宽限度内变化,这取决于待治疗的疾病或病症、待治疗个体的年龄和状况等,本发明的分子的合适剂量范围可以在25ng/kg至50 $\mu$ g/kg或1 $\mu$ g至1g的范围内。医师将最终确定所使用的适当剂量。

[0153] 本发明的特异性结合分子、双功能结合分子、药物组合物、载体、核酸和细胞可以以基本纯的形式提供,例如纯度为至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%。

[0154] 治疗方法可进一步包括分开、联合或依次给药另外的抗肿瘤剂。此类药剂的实例是本领域已知的,并且可以包括免疫活化剂和/或T细胞调节剂。

[0155] 预期关于第一方面所述的核酸、表达载体、宿主细胞和生产方法也与本文所述的其他方面相关。

[0156] 本发明的每个方面的优选特征在细节上作必要修改后用于每个其他方面。本文提到的现有技术文件在法律允许的最大范围内并入本文。

## 附图说明

[0157] 图1-提供了改进的UCHT1变体的VH和VL氨基酸序列。CDR加有下划线。突变以粗体显示;

[0158] 图2-提供了示例TCR-抗CD3融合蛋白的氨基酸序列,其中合并了改进的抗CD3 scFv变体;

[0159] 图3-示出了相对于非突变抗CD3,合并了改进的抗CD3 scFv变体1的TCR-CD3融合体具有更好的治疗窗(A),以及相对于非突变抗CD3,合并了改进的抗CD3 scFv变体2的TCR-CD3融合体具有更高的Emax(B);

[0160] 图4-示出了由合并了UCHT1变体1和变体2的TCR-CD3融合体介导的改进的T细胞杀伤特性。

[0161] 在以下非限制性实施例中进一步描述本发明。

## 具体实施方式

[0162] 实施例

[0163] 以下实施例描述了本发明的双功能结合分子,该双功能结合分子可以称为TCR-抗CD3双特异性蛋白。

[0164] 1) 具有改进的抗CD3的TCR-抗CD3双特异性融合蛋白的制备

[0165] 包含TCR和抗CD3 scFv的融合蛋白是本领域已知的(例如,参见W02011001152、W02017109496、W02017175006和W02018234319)。这些分子包含人源化UCHT1 scFv片段。

[0166] 在该实施例中,产生了W02018234319中描述的TCR-抗CD3融合蛋白的变体,其合并了抗CD3变体1(T165A)或抗CD3变体2(T165A+I202F)。使用标准诱变和克隆方法来引入突变(例如Sambrook, Joseph. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press所描述的)。图1中提供了T165A和T165A+I202F的VL和VH的氨基酸序列。图2中提供了合并了图1中提供的序列的TCR-抗CD3的氨基酸序列。

[0167] 包含T165A、T165A+I202F或非突变(WT) UCHT1 scFv的TCR-抗CD3融合蛋白在E. coli中作为包涵体表达,随后使用W02018234319的实施例2中所述的方法进行折叠和纯化。

[0168] 2) 由具有变体T165A和T165A+I202F的TCR-抗CD3介导治疗窗和最大T细胞活化增加

[0169] A) IFN- $\gamma$  释放

[0170] 评估上述TCR-抗CD3融合蛋白在抗原阳性细胞和抗原阴性细胞存在下介导CD3+T细胞活化的能力。干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 释放被用作T细胞活化的读数。

[0171] 根据制造商的说明,使用人IFN- $\gamma$  ELISPOT试剂盒(BD Biosciences)进行检测。简而言之,Me1624黑色素瘤细胞用作抗原阳性靶细胞。Granta-519 B细胞淋巴瘤细胞用作抗原阴性靶细胞。在测定培养基(含有10%热灭活的FBS和1%青霉素-链霉素-L-谷氨酰胺的RPMI1640)中以 $1 \times 10^6$ /ml的密度制备靶细胞,并以50 $\mu$ l体积每孔50000个细胞铺板。将从新鲜供体血液中分离的外周血单核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)用作CD3+效应细胞,并以50 $\mu$ l体积每孔35000个细胞铺板。将TCR-抗CD3蛋白滴定至10nM至0.0001nM的最终浓度,并以50 $\mu$ l体积加入孔中。

[0172] 根据制造商的说明书准备板并使板显色。用测定培养基将含有靶细胞、效应细胞和融合蛋白的孔补足至终体积为200 $\mu$ l。所有反应以一式三份进行。还制备了对照孔,其中省去了融合蛋白、效应细胞或靶细胞。将板孵育过夜(37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>)。第二天,用洗涤缓冲液(1 $\times$ PBS小袋,含有0.05%吐温-20,在去离子水中配制)将板洗涤三次。然后将检测一抗以50 $\mu$ l的体积加入到每个孔中。将板在室温下孵育2小时,然后再次洗涤三次。通过向各孔中添加50 $\mu$ l稀释的链霉亲和素-HRP,在室温下孵育1小时,并重复洗涤步骤,来进行二抗检测。在使用前不超过15分钟,每1ml AEC底物添加一滴(20 $\mu$ l) AEC发色团并混合,并向每个孔中添加50 $\mu$ l。定期监测点显色,并将板在自来水中洗涤以终止显色反应。接着将板在室温下干燥至少2小时,然后使用CTL分析仪(Cellular Technology Limited)通过免疫印迹软件来对点计数。使用PRISM软件准备和分析数据。

[0173] 通过确定由TCR-抗CD3变体和WT介导的T细胞活化对抗原阳性细胞的相对效力,并

在Prism中曲线拟合后比较Ec50值来计算治疗窗。对于抗原阴性细胞,无法获得可靠的Ec50值,因此通过设置斑点的阈值数量(例如每孔25个斑点)并通过插值确定将首先超过该数量的浓度来确定“最小交叉反应浓度”。

[0174] 结果

[0175] T165A

[0176] 为了获得对治疗窗的可靠确定,对4个Ag+板和4个Ag-板的数据进行平均,每个板都具有并排的非突变和T165A。图3A示出了从一块板上获得的曲线。每个单独板的数据显示在下表中。

|            |                  |                  |                  |                  |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|            | 板 1              | 板 2              | 板 5              | 板 6              |
| 靶细胞        | Mel 624<br>(Ag+) | Mel 624<br>(Ag+) | Mel 624<br>(Ag+) | Mel 624<br>(Ag+) |
| 效应细胞       | 供体 1             | 供体 1             | 供体 2             | 供体 2             |
| T165A EC50 | 116pM            | 137pM            | 160pM            | 446pM            |
| Wt EC50    | 62.2pM           | 60.9pM           | 79.3pM           | 72.1pM           |
| T165A 相对效力 | 0.54             | 0.44             | 0.50             | 0.16             |

|               |                     |                     |                     |                     |
|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|               | 板 3                 | 板 4                 | 板 7                 | 板 8                 |
| 靶细胞           | Granta 519<br>(Ag-) | Granta 519<br>(Ag-) | Granta 519<br>(Ag-) | Granta 519<br>(Ag-) |
| 效应细胞          | 供体 1                | 供体 1                | 供体 2                | 供体 2                |
| T165A 交叉反应浓度  | 1.56nM              | 7.16nM              | 0.698nM             | 0.615nM             |
| Wt 交叉反应浓度     | 0.165nM             | 0.811nM             | 0.206nM             | 0.152nM             |
| T165A 相对交叉反应性 | 0.11                | 0.11                | 0.29                | 0.25                |

[0179] 对抗原阳性细胞的相对效力(即WT的Ec50除以T165A的Ec50)平均为0.41。对抗原阴性细胞的相对交叉反应性(即提供25个斑点的WT浓度/提供25个斑点的T165A浓度)平均为0.19。这些数据表明,T165A的治疗窗是WT的治疗窗的约2倍。

[0180] T165A+I202F

[0181] 图3B示出了相对于WT,T165A+I202F变体导致更高的最大T细胞活化(E<sub>max</sub>)。在这种情况下,其治疗窗类似于WT。这些数据表明T165A+I202F在活化T细胞方面更有效。

[0182] B) T细胞介导的杀伤

[0183] 使用IncuCyte平台(Essen BioScience)研究TCR-抗CD3融合蛋白介导重定向T细胞杀伤抗原阳性和抗原阴性肿瘤细胞的能力。该测定允许通过显微镜检查来实时检测细胞凋亡标志物Caspase-3/7的释放。

[0184] 方法

[0185] 测定使用CellPlayer96孔Caspase-3/7细胞凋亡测定试剂盒(Essen BioScience, 目录号4440)来进行并根据制造商的方案来实施。简而言之,将靶细胞(Mel624(抗原阳性))

或MDA MB 231 (抗原阴性))以每孔10000个细胞铺板并孵育过夜,以使细胞贴附。TCR-抗CD3融合蛋白以0.05nM至0.0125nM(对于抗原阳性细胞)和20nM至0.125nM(对于抗原阴性细胞)的浓度加入。CD3+效应细胞(PBMC)以10:1(每孔100000个细胞)的效靶细胞比使用。制备30 $\mu$ M的NucView测定试剂,并向每个孔中加入25 $\mu$ l,且使最终体积为150 $\mu$ l(得到5 $\mu$ M的最终浓度)。将板放入IncuCyte仪器中,并在3天至5天内定期拍摄图像。确定每个图像中凋亡细胞的数量并以每平方毫米目标计数记录。测定以一式三份进行。使用PRISM软件准备图像。

[0186] 结果

[0187] 得到的WT、T165A和T165A+I202F对抗原阳性和抗原阴性细胞的杀伤曲线如图4所示。请注意,为清楚起见,仅示出了指定浓度的曲线。

[0188] T165A

[0189] 在0.005nM的浓度下,相对于WT,T165A显示出对抗原阳性细胞的T细胞杀伤略降低。在高达20nM时没有观察到对抗原阴性细胞的杀伤,而在1nM的浓度下观察到WT杀伤。这些数据证实了上述发现,即T165A具有改进的治疗窗。

[0190] T165A+I202F

[0191] T165A+I202F显示出在给定浓度(例如0.005nM)下对抗原阳性细胞的T细胞介导的杀伤增加。抗原阴性细胞的杀伤与WT相当。这些数据证实了上述发现并证明了T165A+I202F在活化T细胞方面更有效。

[0192] 实施例中呈现的数据表明,合并了T165A或T165A+I202F UCHT1变体的TCR-抗CD3融合蛋白具有改进的治疗特性。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 英美偌科有限公司
- [0003] <120> CD3特异性结合分子
- [0004] <130> P121631W0
- [0005] <150> GB1901305.1
- [0006] <151> 2019-01-30
- [0007] <160> 36
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 6
- [0011] <212> PRT
- [0012] <213> homosapien
- [0013] <400> 1
- [0014] Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
- [0015] 1 5
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 9
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> homosapien
- [0020] <400> 2
- [0021] Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
- [0022] 1 5
- [0023] <210> 3
- [0024] <211> 8
- [0025] <212> PRT
- [0026] <213> homosapien
- [0027] <400> 3
- [0028] Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Ala
- [0029] 1 5
- [0030] <210> 4
- [0031] <211> 8
- [0032] <212> PRT
- [0033] <213> homosapien
- [0034] <400> 4
- [0035] Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser
- [0036] 1 5
- [0037] <210> 5
- [0038] <211> 15

[0039] <212> PRT  
 [0040] <213> homosapien  
 [0041] <400> 5  
 [0042] Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val  
 [0043] 1 5 10 15  
 [0044] <210> 6  
 [0045] <211> 26  
 [0046] <212> PRT  
 [0047] <213> homosapien  
 [0048] <400> 6  
 [0049] Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0050] 1 5 10 15  
 [0051] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
 [0052] 20 25  
 [0053] <210> 7  
 [0054] <211> 26  
 [0055] <212> PRT  
 [0056] <213> homosapien  
 [0057] <400> 7  
 [0058] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0059] 1 5 10 15  
 [0060] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
 [0061] 20 25  
 [0062] <210> 8  
 [0063] <211> 17  
 [0064] <212> PRT  
 [0065] <213> homosapien  
 [0066] <400> 8  
 [0067] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [0068] 1 5 10 15  
 [0069] Tyr  
 [0070] <210> 9  
 [0071] <211> 36  
 [0072] <212> PRT  
 [0073] <213> homosapien  
 [0074] <400> 9  
 [0075] Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 [0076] 1 5 10 15  
 [0077] Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala

|        |   |    |    |    |
|--------|---|----|----|----|
| [0078] |   | 20 | 25 | 30 |
| [0079] | Thr Tyr Tyr Cys   |    |    |    |
| [0080] |   | 35 |    |    |
| [0081] | <210> 10  |    |    |    |
| [0082] | <211> 10  |    |    |    |
| [0083] | <212> PRT   |    |    |    |
| [0084] | <213> homosapien  |    |    |    |
| [0085] | <400> 10  |    |    |    |
| [0086] | Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys                         |    |    |    |
| [0087] | 1   | 5  | 10 |    |
| [0088] | <210> 11  |    |    |    |
| [0089] | <211> 25  |    |    |    |
| [0090] | <212> PRT   |    |    |    |
| [0091] | <213> homosapien  |    |    |    |
| [0092] | <400> 11  |    |    |    |
| [0093] | Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly |    |    |    |
| [0094] | 1   | 5  | 10 | 15 |
| [0095] | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser                             |    |    |    |
| [0096] |   | 20 | 25 |    |
| [0097] | <210> 12  |    |    |    |
| [0098] | <211> 17  |    |    |    |
| [0099] | <212> PRT   |    |    |    |
| [0100] | <213> homosapien  |    |    |    |
| [0101] | <400> 12  |    |    |    |
| [0102] | Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala |    |    |    |
| [0103] | 1   | 5  | 10 | 15 |
| [0104] | Leu   |    |    |    |
| [0105] | <210> 13  |    |    |    |
| [0106] | <211> 38  |    |    |    |
| [0107] | <212> PRT   |    |    |    |
| [0108] | <213> homosapien  |    |    |    |
| [0109] | <400> 13  |    |    |    |
| [0110] | Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys |    |    |    |
| [0111] | 1   | 5  | 10 | 15 |
| [0112] | Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp |    |    |    |
| [0113] |   | 20 | 25 | 30 |
| [0114] | Thr Ala Val Tyr Tyr Cys   |    |    |    |
| [0115] |   | 35 |    |    |
| [0116] | <210> 14  |    |    |    |

[0117] <211> 38  
 [0118] <212> PRT  
 [0119] <213> homosapien  
 [0120] <400> 14  
 [0121] Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Phe Ser Val Asp Lys  
 [0122] 1 5 10 15  
 [0123] Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 [0124] 20 25 30  
 [0125] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0126] 35  
 [0127] <210> 15  
 [0128] <211> 11  
 [0129] <212> PRT  
 [0130] <213> homosapien  
 [0131] <400> 15  
 [0132] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0133] 1 5 10  
 [0134] <210> 16  
 [0135] <211> 107  
 [0136] <212> PRT  
 [0137] <213> homosapien  
 [0138] <400> 16  
 [0139] Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0140] 1 5 10 15  
 [0141] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr  
 [0142] 20 25 30  
 [0143] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [0144] 35 40 45  
 [0145] Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0146] 50 55 60  
 [0147] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [0148] 65 70 75 80  
 [0149] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp  
 [0150] 85 90 95  
 [0151] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [0152] 100 105  
 [0153] <210> 17  
 [0154] <211> 107  
 [0155] <212> PRT

[0156] <213> homosapien  
 [0157] <400> 17  
 [0158] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0159] 1 5 10 15  
 [0160] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr  
 [0161] 20 25 30  
 [0162] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [0163] 35 40 45  
 [0164] Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0165] 50 55 60  
 [0166] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [0167] 65 70 75 80  
 [0168] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp  
 [0169] 85 90 95  
 [0170] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [0171] 100 105  
 [0172] <210> 18  
 [0173] <211> 122  
 [0174] <212> PRT  
 [0175] <213> homosapien  
 [0176] <400> 18  
 [0177] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [0178] 1 5 10 15  
 [0179] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 [0180] 20 25 30  
 [0181] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0182] 35 40 45  
 [0183] Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0184] 50 55 60  
 [0185] Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 [0186] 65 70 75 80  
 [0187] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0188] 85 90 95  
 [0189] Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
 [0190] 100 105 110  
 [0191] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0192] 115 120  
 [0193] <210> 19  
 [0194] <211> 122

[0195] <212> PRT  
 [0196] <213> homosapien  
 [0197] <400> 19  
 [0198] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [0199] 1 5 10 15  
 [0200] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 [0201] 20 25 30  
 [0202] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0203] 35 40 45  
 [0204] Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0205] 50 55 60  
 [0206] Lys Asp Arg Phe Thr Phe Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 [0207] 65 70 75 80  
 [0208] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0209] 85 90 95  
 [0210] Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
 [0211] 100 105 110  
 [0212] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0213] 115 120  
 [0214] <210> 20  
 [0215] <211> 253  
 [0216] <212> PRT  
 [0217] <213> homosapien  
 [0218] <400> 20  
 [0219] Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0220] 1 5 10 15  
 [0221] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr  
 [0222] 20 25 30  
 [0223] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [0224] 35 40 45  
 [0225] Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0226] 50 55 60  
 [0227] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [0228] 65 70 75 80  
 [0229] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp  
 [0230] 85 90 95  
 [0231] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 [0232] 100 105 110  
 [0233] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

|        |   |     |     |
|--------|---|-----|-----|
| [0234] | 115   | 120 | 125 |
| [0235] | Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln |     |     |
| [0236] | 130   | 135 | 140 |
| [0237] | Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe |     |     |
| [0238] | 145   | 150 | 155 |
| [0239] | Thr Gly Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu |     |     |
| [0240] | 165   | 170 | 175 |
| [0241] | Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn |     |     |
| [0242] | 180   | 185 | 190 |
| [0243] | Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn |     |     |
| [0244] | 195   | 200 | 205 |
| [0245] | Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val |     |     |
| [0246] | 210   | 215 | 220 |
| [0247] | Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe |     |     |
| [0248] | 225   | 230 | 235 |
| [0249] | Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser             |     |     |
| [0250] | 245   | 250 |     |
| [0251] | <210> 21  |     |     |
| [0252] | <211> 253   |     |     |
| [0253] | <212> PRT   |     |     |
| [0254] | <213> homosapien  |     |     |
| [0255] | <400> 21  |     |     |
| [0256] | Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly |     |     |
| [0257] | 1   | 5   | 10  |
| [0258] | Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr |     |     |
| [0259] | 20  | 25  | 30  |
| [0260] | Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile |     |     |
| [0261] | 35  | 40  | 45  |
| [0262] | Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly |     |     |
| [0263] | 50  | 55  | 60  |
| [0264] | Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro |     |     |
| [0265] | 65  | 70  | 75  |
| [0266] | Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp |     |     |
| [0267] | 85  | 90  | 95  |
| [0268] | Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser |     |     |
| [0269] | 100   | 105 | 110 |
| [0270] | Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly |     |     |
| [0271] | 115   | 120 | 125 |
| [0272] | Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln |     |     |

|        |   |     |     |
|--------|---|-----|-----|
| [0273] | 130   | 135 | 140 |
| [0274] | Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe |     |     |
| [0275] | 145   | 150 | 155 |
| [0276] | Thr Gly Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu |     |     |
| [0277] |   | 165 | 170 |
| [0278] | Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn |     |     |
| [0279] |   | 180 | 185 |
| [0280] | Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Phe Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn |     |     |
| [0281] |   | 195 | 200 |
| [0282] | Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val |     |     |
| [0283] |   | 210 | 215 |
| [0284] | Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe |     |     |
| [0285] |   | 225 | 230 |
| [0286] | Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser             |     |     |
| [0287] |   | 245 | 250 |
| [0288] | <210> 22  |     |     |
| [0289] | <211> 8   |     |     |
| [0290] | <212> PRT   |     |     |
| [0291] | <213> artificial sequence                                       |     |     |
| [0292] | <220>   |     |     |
| [0293] | <223> Linker sequence   |     |     |
| [0294] | <400> 22  |     |     |
| [0295] | Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly                                 |     |     |
| [0296] | 1   | 5   |     |
| [0297] | <210> 23  |     |     |
| [0298] | <211> 5   |     |     |
| [0299] | <212> PRT   |     |     |
| [0300] | <213> artificial sequence                                       |     |     |
| [0301] | <220>   |     |     |
| [0302] | <223> Linker sequence   |     |     |
| [0303] | <400> 23  |     |     |
| [0304] | Gly Gly Gly Gly Ser   |     |     |
| [0305] | 1   | 5   |     |
| [0306] | <210> 24  |     |     |
| [0307] | <211> 5   |     |     |
| [0308] | <212> PRT   |     |     |
| [0309] | <213> artificial sequence                                       |     |     |
| [0310] | <220>   |     |     |
| [0311] | <223> Linker sequence   |     |     |

- [0312] <400> 24  
[0313] Gly Gly Gly Ser Gly  
[0314] 1 5  
[0315] <210> 25  
[0316] <211> 5  
[0317] <212> PRT  
[0318] <213> artificial sequence  
[0319] <220>  
[0320] <223> Linker sequence  
[0321] <400> 25  
[0322] Gly Gly Ser Gly Gly  
[0323] 1 5  
[0324] <210> 26  
[0325] <211> 5  
[0326] <212> PRT  
[0327] <213> artificial sequence  
[0328] <220>  
[0329] <223> Linker sequence  
[0330] <400> 26  
[0331] Gly Ser Gly Gly Gly  
[0332] 1 5  
[0333] <210> 27  
[0334] <211> 6  
[0335] <212> PRT  
[0336] <213> artificial sequence  
[0337] <220>  
[0338] <223> Linker sequence  
[0339] <400> 27  
[0340] Gly Ser Gly Gly Gly Pro  
[0341] 1 5  
[0342] <210> 28  
[0343] <211> 5  
[0344] <212> PRT  
[0345] <213> artificial sequence  
[0346] <220>  
[0347] <223> Linker sequence  
[0348] <400> 28  
[0349] Gly Gly Glu Pro Ser  
[0350] 1 5

[0351] <210> 29  
 [0352] <211> 7  
 [0353] <212> PRT  
 [0354] <213> artificial sequence  
 [0355] <220>  
 [0356] <223> Linker sequence  
 [0357] <400> 29  
 [0358] Gly Gly Glu Gly Gly Gly Pro  
 [0359] 1 5  
 [0360] <210> 30  
 [0361] <211> 12  
 [0362] <212> PRT  
 [0363] <213> artificial sequence  
 [0364] <220>  
 [0365] <223> Linker sequence  
 [0366] <400> 30  
 [0367] Gly Gly Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser  
 [0368] 1 5 10  
 [0369] <210> 31  
 [0370] <211> 244  
 [0371] <212> PRT  
 [0372] <213> homosapien  
 [0373] <400> 31  
 [0374] Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg Lys Glu Gly  
 [0375] 1 5 10 15  
 [0376] Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp Ala Met  
 [0377] 20 25 30  
 [0378] Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr  
 [0379] 35 40 45  
 [0380] Ser Gln Ile Met Gly Asp Glu Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu Gly Tyr  
 [0381] 50 55 60  
 [0382] Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Val Thr Ser  
 [0383] 65 70 75 80  
 [0384] Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Trp Trp  
 [0385] 85 90 95  
 [0386] Thr Gly Gly Ser Ala Pro Ile Arg Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr  
 [0387] 100 105 110  
 [0388] Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe  
 [0389] 115 120 125

|        |   |
|--------|---|
| [0390] | Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val |
| [0391] | 130 135 140   |
| [0392] | Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp |
| [0393] | 145 150 155 160   |
| [0394] | Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro |
| [0395] | 165 170 175   |
| [0396] | Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser Ser |
| [0397] | 180 185 190   |
| [0398] | Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His Phe |
| [0399] | 195 200 205   |
| [0400] | Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr |
| [0401] | 210 215 220   |
| [0402] | Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp |
| [0403] | 225 230 235 240   |
| [0404] | Gly Arg Ala Asp   |
| [0405] | <210> 32  |
| [0406] | <211> 502   |
| [0407] | <212> PRT   |
| [0408] | <213> homosapien  |
| [0409] | <400> 32  |
| [0410] | Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly |
| [0411] | 1 5 10 15   |
| [0412] | Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr |
| [0413] | 20 25 30  |
| [0414] | Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile |
| [0415] | 35 40 45  |
| [0416] | Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly |
| [0417] | 50 55 60  |
| [0418] | Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro |
| [0419] | 65 70 75 80   |
| [0420] | Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp |
| [0421] | 85 90 95  |
| [0422] | Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser |
| [0423] | 100 105 110   |
| [0424] | Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly |
| [0425] | 115 120 125   |
| [0426] | Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln |
| [0427] | 130 135 140   |
| [0428] | Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe |

|        |   |     |     |     |
|--------|---|-----|-----|-----|
| [0429] | 145   | 150 | 155 | 160 |
| [0430] | Thr Gly Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu |     |     |     |
| [0431] | 165   | 170 | 175 |     |
| [0432] | Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn |     |     |     |
| [0433] | 180   | 185 | 190 |     |
| [0434] | Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn |     |     |     |
| [0435] | 195   | 200 | 205 |     |
| [0436] | Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val |     |     |     |
| [0437] | 210   | 215 | 220 |     |
| [0438] | Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe |     |     |     |
| [0439] | 225   | 230 | 235 | 240 |
| [0440] | Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly |     |     |     |
| [0441] | 245   | 250 | 255 |     |
| [0442] | Gly Ser Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg Lys |     |     |     |
| [0443] | 260   | 265 | 270 |     |
| [0444] | Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp |     |     |     |
| [0445] | 275   | 280 | 285 |     |
| [0446] | Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile |     |     |     |
| [0447] | 290   | 295 | 300 |     |
| [0448] | Tyr Tyr Ser Gln Ile Met Gly Asp Glu Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu |     |     |     |
| [0449] | 305   | 310 | 315 | 320 |
| [0450] | Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Val |     |     |     |
| [0451] | 325   | 330 | 335 |     |
| [0452] | Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser Ser |     |     |     |
| [0453] | 340   | 345 | 350 |     |
| [0454] | Trp Trp Thr Gly Gly Ser Ala Pro Ile Arg Phe Gly Pro Gly Thr Arg |     |     |     |
| [0455] | 355   | 360 | 365 |     |
| [0456] | Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala |     |     |     |
| [0457] | 370   | 375 | 380 |     |
| [0458] | Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr |     |     |     |
| [0459] | 385   | 390 | 395 | 400 |
| [0460] | Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser |     |     |     |
| [0461] | 405   | 410 | 415 |     |
| [0462] | Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro |     |     |     |
| [0463] | 420   | 425 | 430 |     |
| [0464] | Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu |     |     |     |
| [0465] | 435   | 440 | 445 |     |
| [0466] | Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn |     |     |     |
| [0467] | 450   | 455 | 460 |     |

|        |   |
|--------|---|
| [0468] | His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu |
| [0469] | 465 470 475 480   |
| [0470] | Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu |
| [0471] | 485 490 495   |
| [0472] | Ala Trp Gly Arg Ala Asp   |
| [0473] | 500   |
| [0474] | <210> 33  |
| [0475] | <211> 502   |
| [0476] | <212> PRT   |
| [0477] | <213> homosapien  |
| [0478] | <400> 33  |
| [0479] | Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly |
| [0480] | 1 5 10 15   |
| [0481] | Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr |
| [0482] | 20 25 30  |
| [0483] | Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile |
| [0484] | 35 40 45  |
| [0485] | Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly |
| [0486] | 50 55 60  |
| [0487] | Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro |
| [0488] | 65 70 75 80   |
| [0489] | Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp |
| [0490] | 85 90 95  |
| [0491] | Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser |
| [0492] | 100 105 110   |
| [0493] | Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly |
| [0494] | 115 120 125   |
| [0495] | Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln |
| [0496] | 130 135 140   |
| [0497] | Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe |
| [0498] | 145 150 155 160   |
| [0499] | Thr Gly Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu |
| [0500] | 165 170 175   |
| [0501] | Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn |
| [0502] | 180 185 190   |
| [0503] | Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Phe Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn |
| [0504] | 195 200 205   |
| [0505] | Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val |
| [0506] | 210 215 220   |

|        |   |
|--------|---|
| [0507] | Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe |
| [0508] | 225 230 235 240   |
| [0509] | Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly |
| [0510] | 245 250 255   |
| [0511] | Gly Ser Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg Lys |
| [0512] | 260 265 270   |
| [0513] | Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp |
| [0514] | 275 280 285   |
| [0515] | Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile |
| [0516] | 290 295 300   |
| [0517] | Tyr Tyr Ser Gln Ile Met Gly Asp Glu Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu |
| [0518] | 305 310 315 320   |
| [0519] | Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Val |
| [0520] | 325 330 335   |
| [0521] | Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser Ser |
| [0522] | 340 345 350   |
| [0523] | Trp Trp Thr Gly Gly Ser Ala Pro Ile Arg Phe Gly Pro Gly Thr Arg |
| [0524] | 355 360 365   |
| [0525] | Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala |
| [0526] | 370 375 380   |
| [0527] | Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr |
| [0528] | 385 390 395 400   |
| [0529] | Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser |
| [0530] | 405 410 415   |
| [0531] | Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro |
| [0532] | 420 425 430   |
| [0533] | Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu |
| [0534] | 435 440 445   |
| [0535] | Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn |
| [0536] | 450 455 460   |
| [0537] | His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu |
| [0538] | 465 470 475 480   |
| [0539] | Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu |
| [0540] | 485 490 495   |
| [0541] | Ala Trp Gly Arg Ala Asp   |
| [0542] | 500   |
| [0543] | <210> 34  |
| [0544] | <211> 202   |
| [0545] | <212> PRT   |

[0546] <213> homosapien  
 [0547] <400> 34  
 [0548] Met Gly Asp Ala Lys Thr Thr Gln Pro Asn Ser Met Glu Ser Asn Glu  
 [0549] 1 5 10 15  
 [0550] Glu Glu Pro Val His Leu Pro Cys Asn His Ser Thr Ile Ser Gly Thr  
 [0551] 20 25 30  
 [0552] Asp Tyr Ile His Trp Tyr Arg Gln Leu Pro Ser Gln Gly Pro Glu Tyr  
 [0553] 35 40 45  
 [0554] Val Ile His Gly Leu Thr Ser Asn Val Asn Asn Arg Met Ala Ser Leu  
 [0555] 50 55 60  
 [0556] Ala Ile Ala Glu Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ile Leu His Arg Ala  
 [0557] 65 70 75 80  
 [0558] Thr Leu Arg Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Ile Leu Ile Leu Gly His  
 [0559] 85 90 95  
 [0560] Ser Arg Leu Gly Asn Tyr Ile Ala Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu  
 [0561] 100 105 110  
 [0562] Ser Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu  
 [0563] 115 120 125  
 [0564] Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe  
 [0565] 130 135 140  
 [0566] Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile  
 [0567] 145 150 155 160  
 [0568] Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn  
 [0569] 165 170 175  
 [0570] Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala  
 [0571] 180 185 190  
 [0572] Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr  
 [0573] 195 200  
 [0574] <210> 35  
 [0575] <211> 502  
 [0576] <212> PRT  
 [0577] <213> homosapien  
 [0578] <400> 35  
 [0579] Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0580] 1 5 10 15  
 [0581] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr  
 [0582] 20 25 30  
 [0583] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [0584] 35 40 45

|        |   |
|--------|---|
| [0585] | Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly |
| [0586] | 50 55 60  |
| [0587] | Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro |
| [0588] | 65 70 75 80   |
| [0589] | Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp |
| [0590] | 85 90 95  |
| [0591] | Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser |
| [0592] | 100 105 110   |
| [0593] | Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly |
| [0594] | 115 120 125   |
| [0595] | Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln |
| [0596] | 130 135 140   |
| [0597] | Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe |
| [0598] | 145 150 155 160   |
| [0599] | Thr Gly Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu |
| [0600] | 165 170 175   |
| [0601] | Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn |
| [0602] | 180 185 190   |
| [0603] | Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn |
| [0604] | 195 200 205   |
| [0605] | Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val |
| [0606] | 210 215 220   |
| [0607] | Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe |
| [0608] | 225 230 235 240   |
| [0609] | Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly |
| [0610] | 245 250 255   |
| [0611] | Gly Ser Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg Lys |
| [0612] | 260 265 270   |
| [0613] | Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp |
| [0614] | 275 280 285   |
| [0615] | Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile |
| [0616] | 290 295 300   |
| [0617] | Tyr Tyr Ser Gln Ile Met Gly Asp Glu Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu |
| [0618] | 305 310 315 320   |
| [0619] | Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Val |
| [0620] | 325 330 335   |
| [0621] | Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser Ser |
| [0622] | 340 345 350   |
| [0623] | Trp Trp Thr Gly Gly Ser Ala Pro Ile Arg Phe Gly Pro Gly Thr Arg |

|        |   |                         |                 |
|--------|---|-------------------------|-----------------|
| [0624] | 355   | 360                     | 365             |
| [0625] | Leu Thr Val Thr Glu Asp   | Leu Lys Asn Val Phe Pro | Pro Glu Val Ala |
| [0626] | 370   | 375                     | 380             |
| [0627] | Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr |                         |                 |
| [0628] | 385   | 390                     | 395             |
| [0629] | Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser |                         |                 |
| [0630] | 405   | 410                     | 415             |
| [0631] | Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro |                         |                 |
| [0632] | 420   | 425                     | 430             |
| [0633] | Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu |                         |                 |
| [0634] | 435   | 440                     | 445             |
| [0635] | Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn |                         |                 |
| [0636] | 450   | 455                     | 460             |
| [0637] | His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu |                         |                 |
| [0638] | 465   | 470                     | 475             |
| [0639] | Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu |                         |                 |
| [0640] | 485   | 490                     | 495             |
| [0641] | Ala Trp Gly Arg Ala Asp   |                         |                 |
| [0642] | 500   |                         |                 |
| [0643] | <210> 36  |                         |                 |
| [0644] | <211> 502   |                         |                 |
| [0645] | <212> PRT   |                         |                 |
| [0646] | <213> homosapien  |                         |                 |
| [0647] | <400> 36  |                         |                 |
| [0648] | Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly |                         |                 |
| [0649] | 1   | 5                       | 10              |
| [0650] | Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr |                         |                 |
| [0651] | 20  | 25                      | 30              |
| [0652] | Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile |                         |                 |
| [0653] | 35  | 40                      | 45              |
| [0654] | Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly |                         |                 |
| [0655] | 50  | 55                      | 60              |
| [0656] | Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro |                         |                 |
| [0657] | 65  | 70                      | 75              |
| [0658] | Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp |                         |                 |
| [0659] | 85  | 90                      | 95              |
| [0660] | Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser |                         |                 |
| [0661] | 100   | 105                     | 110             |
| [0662] | Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly |                         |                 |

|        |   |     |     |
|--------|---|-----|-----|
| [0663] | 115   | 120 | 125 |
| [0664] | Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln |     |     |
| [0665] | 130   | 135 | 140 |
| [0666] | Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe |     |     |
| [0667] | 145   | 150 | 155 |
| [0668] | Thr Gly Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu |     |     |
| [0669] | 165   | 170 | 175 |
| [0670] | Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn |     |     |
| [0671] | 180   | 185 | 190 |
| [0672] | Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Phe Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn |     |     |
| [0673] | 195   | 200 | 205 |
| [0674] | Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val |     |     |
| [0675] | 210   | 215 | 220 |
| [0676] | Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe |     |     |
| [0677] | 225   | 230 | 235 |
| [0678] | Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly |     |     |
| [0679] | 245   | 250 | 255 |
| [0680] | Gly Ser Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg Lys |     |     |
| [0681] | 260   | 265 | 270 |
| [0682] | Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp |     |     |
| [0683] | 275   | 280 | 285 |
| [0684] | Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile |     |     |
| [0685] | 290   | 295 | 300 |
| [0686] | Tyr Tyr Ser Gln Ile Met Gly Asp Glu Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu |     |     |
| [0687] | 305   | 310 | 315 |
| [0688] | Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Val |     |     |
| [0689] | 325   | 330 | 335 |
| [0690] | Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser Ser |     |     |
| [0691] | 340   | 345 | 350 |
| [0692] | Trp Trp Thr Gly Gly Ser Ala Pro Ile Arg Phe Gly Pro Gly Thr Arg |     |     |
| [0693] | 355   | 360 | 365 |
| [0694] | Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala |     |     |
| [0695] | 370   | 375 | 380 |
| [0696] | Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr |     |     |
| [0697] | 385   | 390 | 395 |
| [0698] | Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser |     |     |
| [0699] | 405   | 410 | 415 |
| [0700] | Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro |     |     |
| [0701] | 420   | 425 | 430 |



改进的 UCHT1 变体的可变结构域氨基酸序列。CDR 加有下划线。突变以粗体显示

轻链 (v1 (165A) 和 v2 (T165A+I202F))

AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR  
LESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEI  
K

重链 v1 (T165A)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGY**AMN**WVRQAPGKGLEWVALINP  
YKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYGDS  
WYFDVWGQGLTVTVSS

重链 v2 (T165A+I202F)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGY**AMN**WVRQAPGKGLEWVALINP  
YKGVSTYNQKFKDRFT**F**SVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS  
GYGDS  
WYFDVWGQGLTVTVSS

图1

合并了改进的 UCHT1 scFv 变体 TCR 抗 CD3 融合蛋白的氨基酸序列

**α 链**

MGDAKTTQPNSMESNEEEPVHLPCNHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIHGL  
TSNVNRMASLAI AEDRKSSTLILHRATLRDAAVYYCILILGHSRLGN IATF  
GKGTKLSVIPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVY  
ITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT|

**β 链 v1 (T165A)**

改进的 UCHT1 scFv 加有下划线，接头以斜体显示

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR  
LESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEI  
KGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYS  
FTGY*AMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFT*ISVDKSKNTAYL  
QMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGLTLTVSSGGGSDGGITQS  
PKYLF<sub>R</sub>KEGQNV<sub>T</sub>LSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYY<sub>S</sub>QIMGDEQKGDI  
AEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWWTGGSAPIRFGPGTRLTV  
TEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEV  
HSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSE  
NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD

**β 链 v2 (T165A+I202F)**

改进的 UCHT1 scFv 加有下划线，接头以斜体显示

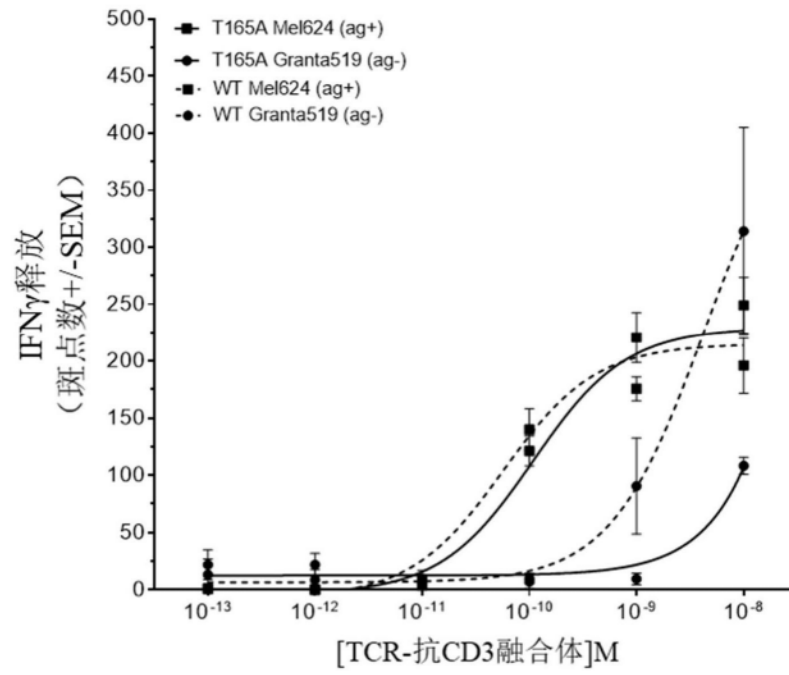
AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR  
LESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEI  
KGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYS  
FTGY*AMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFT***F**SVDKSKNTAYL  
QMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGLTLTVSSGGGSDGGITQS  
PKYLF<sub>R</sub>KEGQNV<sub>T</sub>LSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYY<sub>S</sub>QIMGDEQKGDI

图2

AEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWWTGGSAPIRFGPGTRLTV  
TEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEV  
HSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSE  
NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD

图2(续)

A



B

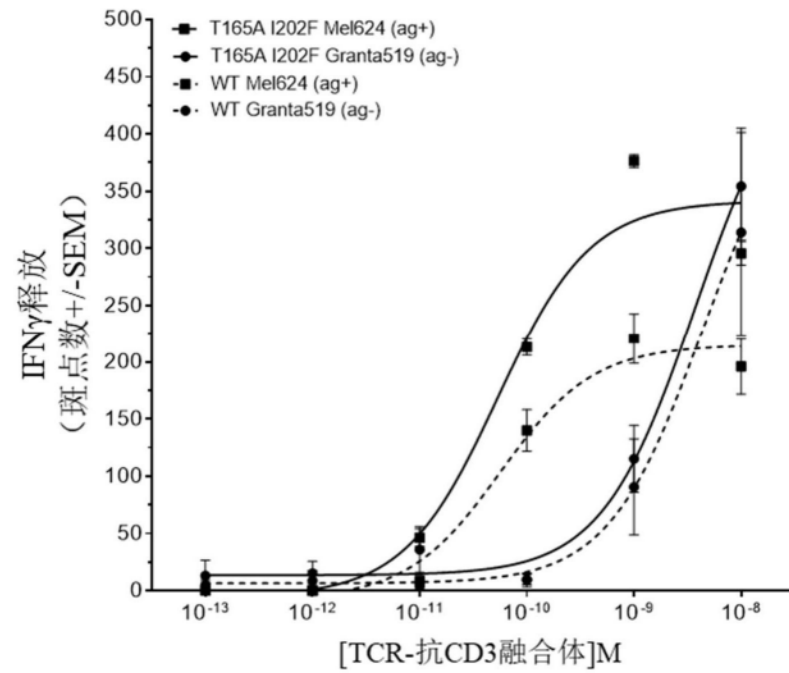


图3

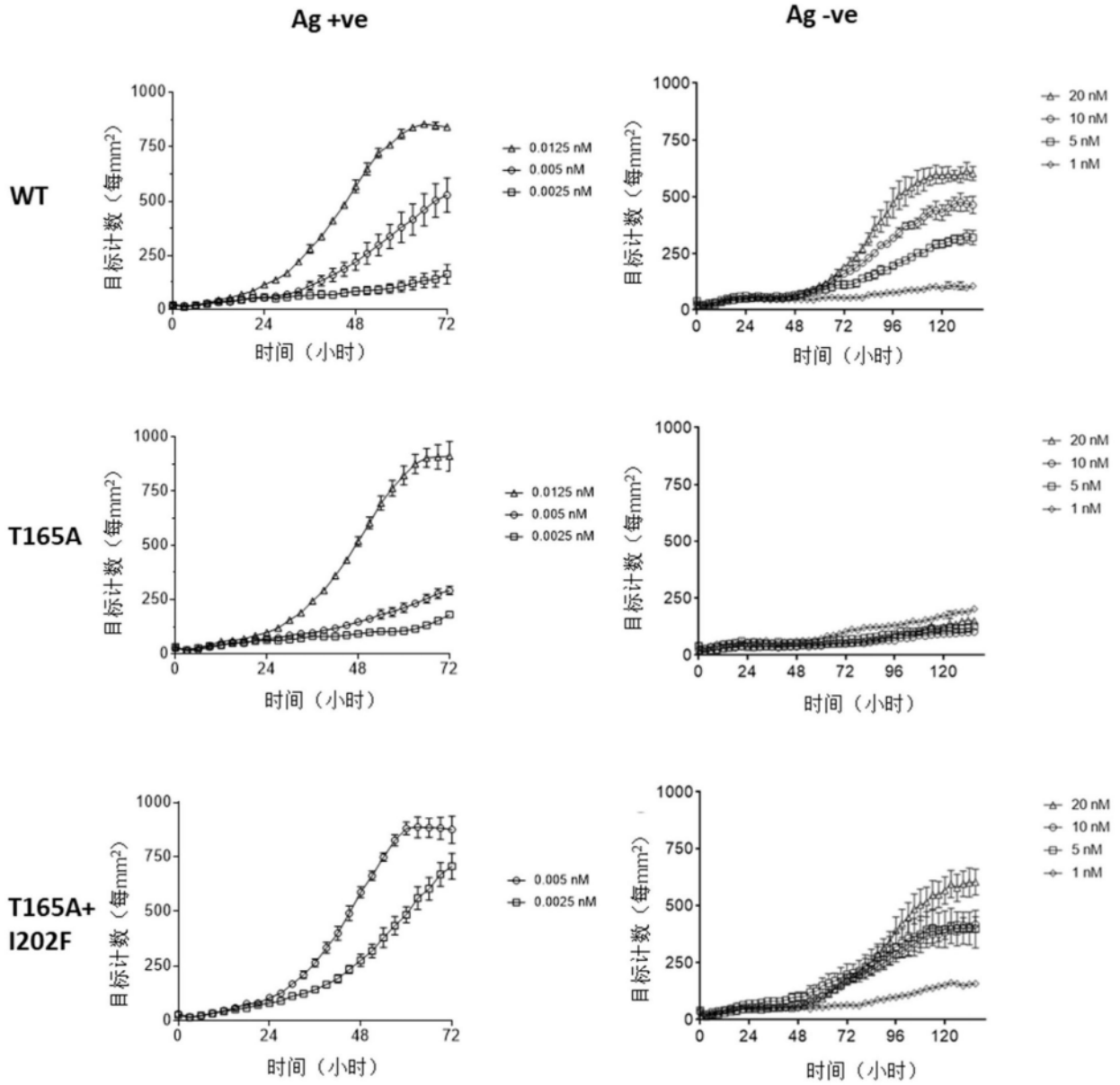


图4