



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108473568 A

(43)申请公布日 2018.08.31

(21)申请号 201680079820.1

D·J·莱特伍德

(22)申请日 2016.12.14

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(30)优先权数据

利商标事务所 11038

1522391.0 2015.12.18 GB

代理人 张小勇

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2018.07.24

C07K 16/24(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C07K 16/18(2006.01)

PCT/EP2016/080979 2016.12.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/102830 EN 2017.06.22

(71)申请人 UCB生物制药私人有限公司

地址 比利时布鲁塞尔

(72)发明人 R·亚当斯 P·巴塔 E·戴夫

S·P·海伍德 D·P·汉弗莱斯

D·马歇尔 S·G·肖

权利要求书6页 说明书55页

序列表65页 附图23页

(54)发明名称

对TNF- α 、IL-17A和IL-17F具有特异性的多
特异性抗体分子

(57)摘要

本发明涉及对TNF α 、IL-17A和IL-17F具有
特异性的多特异性抗体分子、该抗体分子的治疗
用途和用于生产所述抗体分子的方法。

1. 多特异性抗体分子,其包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域和对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域,其中该抗体分子能够中和人TNF- α 、人IL-17A和人IL-17F的生物活性。

2. 权利要求1的多特异性抗体分子,其中该抗体对人TNF- α 具有200pM或更好的结合亲和力。

3. 权利要求1或权利要求2的多特异性抗体分子,其中该抗体对人IL-17A具有100pM或更好的结合亲和力。

4. 权利要求3的多特异性抗体分子,其中该抗体对人IL-17A具有20pM或更好的结合亲和力。

5. 权利要求1-4任一项的多特异性抗体分子,其中该抗体对IL-17F具有100pM或更好的结合亲和力。

6. 权利要求5的多特异性抗体分子,其中该抗体对IL-17F具有20pM或更好的结合亲和力。

7. 权利要求1-6任一项的多特异性抗体分子,其中对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域也结合IL-17A/IL-17F异二聚体。

8. 权利要求1-7任一项的多特异性抗体分子,其中结合结构域各自包含两个抗体可变结构域。

9. 权利要求8的多特异性抗体分子,其中两个抗体可变结构域是VH/VL对。

10. 权利要求1-9任一项的多特异性抗体分子,其中该分子形式选自双抗体、scdiabody、三抗体、串联scFv、FabFv、Fab' Fv、FabdsFv、Fab-scFv、Fab-dsscFv、Fab-(dsscFv)₂双Fab、双Fab'、三体、串联scFv-Fc、scFv-Fc-scFv、scdiabody-Fc、scdiabody-CH3、Ig-scFv、scFv-Ig、V-Ig、Ig-V、Duobody和DVD-Ig。

11. 权利要求1-9任一项的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域和对IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域独立选自Fab、scFv、Fv、dsFv和dsscFv。

12. 权利要求1-9任一项的多特异性抗体分子包含或由如下组成:

c) 式(I)的多肽链:

V_{H1}-CH₁-X-V₁; 和

d) 式(II)的多肽链:

V_{L1}-CL-Y-V₂;

其中:

V_{H1}表示重链可变区;

CH₁表示重链恒定区结构域,例如,其结构域1;

X表示键或接头;

Y表示键或接头;

V₁表示dsFv、sdAb、scFv或dsscFv;

V_{L1}表示轻链可变区;

CL表示来自轻链恒定区的结构域,例如C_K;

V₂表示dsFv、sdAb、scFv或dsscFv。

13. 权利要求12的多特异性抗体分子,其中V₁和V₂的至少一个是scFv或dsscFv。

14. 权利要求13的多特异性抗体分子,其中V₁是scFv或dsscFv,且V₂是scFv或dsscFv。
15. 权利要求14的多特异性抗体分子,其中V₁是dsscFv,且V₂是dsscFv。
16. 权利要求12-15任一项的多特异性抗体分子,其中V₁是scFv或dsscFv,且V₁包含如下的多肽链:
- a. 式(III): VH₂-Z₁-VL₂, VH₂例如通过肽键连接至X;或
- b. 式(IV): VL₂-Z₁-VH₂, VL₂例如通过肽键连接至X;
- 其中VH₂表示重链可变区,Z₁表示肽接头,且VL₂表示轻链可变区。
17. 权利要求12-16任一项的多特异性抗体分子,其中V₂是scFv或dsscFv,且V₂包含如下的多肽链:
- a. 式(V): VH₃-Z₂-VL₃, VH₃例如通过肽键连接至Y;或
- b. 式(VI): VL₃-Z₂-VH₃, VL₃例如通过肽键连接至Y;
- 其中VH₃表示重链可变区,Z₂表示肽接头,且VL₃表示轻链可变区。
18. 权利要求16或17的多特异性抗体,其中Z₁和/或Z₂是12-25个氨基酸长度的肽接头,例如SEQ ID NO:68中指定的序列。
19. 权利要求12-18任一项的多特异性抗体分子,其中X是肽接头,例如,SEQ ID NO:1或2中指定的序列。
20. 权利要求12-19任一项的多特异性抗体分子,其中Y是肽接头,例如,SEQ ID NO:1或2中指定的序列。
21. 权利要求19或权利要求20的多特异性抗体分子,其中X是SEQ ID NO:2中指定的序列,且Y是SEQ ID NO:2中指定的序列。
22. 权利要求19或权利要求20的多特异性抗体分子,其中X是SEQ ID NO:1中指定的序列,且Y是SEQ ID NO:2中指定的序列。
23. 权利要求12-22任一项的多特异性抗体分子,其中V₁和V₂的至少一个是dsscFv或dsFv;且V₁的轻链和重链可变区和/或V₂的轻链和重链可变区通过两个改造的半胱氨酸残基之间的二硫键连接。
24. 权利要求12-23任一项的多特异性抗体分子,其中V₁和V₂的至少一个是dsscFv或dsFv;且V₁和/或V₂的重链和轻链可变结构域通过两个半胱氨酸残基之间的二硫键连接,其中半胱氨酸残基对的位置选自包含或由以下组成的组:V_H37和V_L95,V_H44和V_L100,V_H44和V_L105,V_H45和V_L87,V_H100和V_L50,V_H100b和V_L49,V_H98和V_L46,V_H101和V_L46,V_H105和V_L43以及V_H106和V_L57,其中V_H和V_L值独立地在指定的V₁或V₂内选择。
25. 权利要求24的多特异性抗体分子,其中改造的半胱氨酸残基对的位置是V_H44和V_L100。
26. 权利要求12-25任一项的多特异性抗体分子,其中VH₁和VL₁包含对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域,且V₁和/或V₂包含对人TNF-α具有特异性的结合结构域。
27. 权利要求1-26任一项的多特异性抗体分子,其包含3个结合结构域。
28. 权利要求27的多特异性抗体分子,其中3个结合结构域各自结合不同的抗原。
29. 权利要求28的多特异性抗体分子,其中该抗体分子包含对人血清载体蛋白具有特异性的结合结构域。
30. 权利要求29的多特异性抗体分子,其中人血清载体蛋白选自由甲状腺素结合蛋白、

甲状腺素视黄质运载蛋白、 α 1-酸性糖蛋白、运铁蛋白、血纤蛋白原和白蛋白或其任意片段组成的组。

31. 权利要求12-30任一项的多特异性抗体分子,其中:

a. VH1和VL1包含对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域;且

b. V1包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域,且V2包含对人血清载体蛋白具有特异性的结合结构域,例如,人血清白蛋白;或V2包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域,且V1包含对人血清载体蛋白具有特异性的结合结构域,例如,人血清白蛋白。

32. 权利要求1-31任一项的多特异性抗体分子,其中该抗体分子包含不超过一个对人TNF- α 具有特异性的结合结构域和不超过一个对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域。

33. 权利要求1-32任一项的多特异性抗体分子,其中该抗体分子不包含CH2结构域和/或CH3结构域。

34. 权利要求1-33任一项的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列的CDR、具有SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列的CDR和具有SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列的CDR的至少一个。

35. 权利要求34的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列。

36. 权利要求1-35任一项的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含具有SEQ ID NO:88中对CDRL1指定的序列的CDR、具有SEQ ID NO:89中对CDRL2指定的序列的CDR和具有SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列的CDR的至少一个。

37. 权利要求36的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:88中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列。

38. 权利要求1-37任一项的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含重链可变区,其包含SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:96中指定的序列;与SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:96中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:96中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH2具有权利要求35中指定的序列。

39. 权利要求1-38任一项的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含轻链可变区,其包含SEQ ID NO:91或SEQ ID NO:95中指定的序列;与SEQ ID NO:91或SEQ ID NO:95中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:91或SEQ ID NO:95中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRL1、CDRL2和CDRL3具有权利要求37中指定的序列。

40. 权利要求1-39任一项的多特异性抗体,其中该抗体包含对人TNF- α 具有特异性的dsscFv并且该dsscFv包含SEQ ID NO:101中指定的序列;与SEQ ID NO:101中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:101中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有权利要求35中指定的序列,且CDRL1、CDRL2和CDRL3具有权利要求37中指定的序列。

41. 权利要求1-39任一项的多特异性抗体,其中该抗体包含对人TNF- α 具有特异性的scFv并且该scFv包含SEQ ID NO:99中指定的序列;与SEQ ID NO:99中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:99中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有权利要求35中指定的序列,且CDRL1、CDRL2和CDRL3具有权利要求37中指定的序列。

42. 权利要求1-41任一项的多特异性抗体分子,其中对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域包含3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列。

43. 权利要求1-42任一项的多特异性抗体分子,其中对具有特异性的结合结构域人IL-17A和人IL-17F包含3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列。

44. 权利要求1-43任一项的多特异性抗体分子,其中对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域包含重链可变区,其包含SEQ ID NO:78中指定的序列;与SEQ ID NO:78中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:78中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有权利要求42中指定的序列。

45. 权利要求1-44任一项的多特异性抗体分子,其中对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域包含轻链可变区,其包含SEQ ID NO:77中指定的序列;与SEQ ID NO:77中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:77中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRL1、CDRL2和CDRL3具有权利要求43中指定的序列。

46. 权利要求1-45任一项的多特异性抗体分子,其中该抗体包含重链,其包含SEQ ID NO:82中指定的序列;与SEQ ID NO:82中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:82中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有权利要求42中指定的序列。

47. 权利要求1-46任一项的多特异性抗体分子,其中该抗体包含轻链,其包含SEQ ID NO:81中指定的序列;与SEQ ID NO:81中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:81中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRL1、CDRL2和CDRL3具有权利要求43中指定的序列。

48. 权利要求1-47任一项的多特异性抗体分子,其中该抗体分子包含对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,其包含3个重链CDR,所述CDR具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列。

49. 权利要求1-48任一项的多特异性抗体分子,其中该抗体分子包含对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,其包含3个轻链CDR,所述CDR具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列。

50. 权利要求1-49任一项的多特异性抗体分子,其中对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域包含重链可变区,其包含SEQ ID NO:110或SEQ ID NO:114中指定的序列;与SEQ ID NO:110或SEQ ID NO:114中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:110或SEQ ID NO:114中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有权利要求48中指定的序列。

51. 权利要求1-50任一项的多特异性抗体分子,其中对人血清白蛋白具有特异性的结

合结构域包含轻链可变区,其包含SEQ ID NO:109或SEQ ID NO:113中指定的序列;与SEQ ID NO:109或SEQ ID NO:113中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:109或SEQ ID NO:113中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRL1、CDRL2和CDRL3具有权利要求49中指定的序列。

52. 权利要求1-51任一项的多特异性抗体分子,其中该抗体包含对人血清白蛋白具有特异性的dsscFv并且该dsscFv包含SEQ ID NO:119中指定的序列;与SEQ ID NO:119中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:119指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有权利要求48中指定的序列,且CDRL1、CDRL2和CDRL3具有权利要求49中指定的序列。

53. 权利要求1-51任一项的多特异性抗体分子,其中该抗体包含对人血清白蛋白具有特异性的scFv并且该scFv包含SEQ ID NO:117中指定的序列;与SEQ ID NO:117中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:117指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有权利要求48中指定的序列,且CDRL1、CDRL2和CDRL3具有权利要求49中指定的序列。

54. 三特异性抗体分子,其包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域、对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域和对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,其中该抗体分子包含或由如下组成:

a. 包含或由以下序列组成的第一多肽:SEQ ID NO:125中指定的序列;与SEQ ID NO:125中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;与SEQ ID NO:125中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDR具有权利要求35、37和42中指定的序列;和

b. 包含或由以下序列组成的第二多肽:SEQ ID NO:131中指定的序列;与SEQ ID NO:131中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;与SEQ ID NO:131中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDR具有权利要求43、48和49中指定的序列。

55. 三特异性抗体分子,其包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域、对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域和对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,其中该抗体分子包含或由如下组成:

a. 包含或由以下序列组成的第一多肽:SEQ ID NO:127中指定的序列;与SEQ ID NO:127中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;与SEQ ID NO:127中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDR具有权利要求35、37和42中指定的序列;和

b. 包含或由以下序列组成的第二多肽:SEQ ID NO:131中指定的序列;与SEQ ID NO:131中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;与SEQ ID NO:131中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDR具有权利要求43、48和49中指定的序列。

56. 权利要求54或权利要求55的三特异性抗体分子,其中该抗体分子能够中和人TNF- α 、人IL-17A和人IL-17F的生物活性。

57. 多核苷酸,其编码权利要求1-56任一项的多特异性抗体分子或其多肽链。

58. 载体,其包含权利要求57中定义的多核苷酸。

59. 宿主细胞,其包含一种或多种分别由权利要求57或58所述的多核苷酸或载体。

60. 宿主细胞,其包含两种载体,每种载体包含编码权利要求1-56任一项的多特异性抗体分子的不同多肽链的多核苷酸。

61. 方法,其包括表达来自权利要求59或权利要求60中定义的宿主细胞的多特异性抗体分子。

62. 药物组合物,其包含权利要求1-56任一项的多特异性抗体分子和至少一种赋形剂。

63. 权利要求1-56任一项的多特异性抗体分子或权利要求62的药物组合物,其用于疗法。

64. 治疗有需要的患者的方法,其包括施用治疗有效量的权利要求1-56任一项的多特异性抗体分子或权利要求62的药物组合物。

65. 三特异性抗体分子,其包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域、对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域和对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,并且包含由SEQ ID NO:126中指定的多核苷酸序列编码的第一多肽和由SEQ ID NO:132中指定的多核苷酸序列编码的第二多肽或由它们组成。

对TNF- α 、IL-17A和IL-17F具有特异性的多特异性抗体分子

发明领域

[0001] 本公开涉及对人TNF- α 、人IL-17A和人IL-17F具有特异性的多特异性抗体分子。本发明还涉及该抗体分子的治疗用途及其生产方法。

[0002] 发明背景

[0003] TNF α 作为类风湿性关节炎(RA)患者疾病的关键驱动因素的作用已得到很好的确立。实际上,抗-TNF α 抗体已经改变了患者护理。然而,尽管取得了这样的成功,但由于许多患者没有达到临床缓解,因此仍然存在显著的未满足的医疗需求。因此,治疗RA的下一个临床目标在于解决这种未满足的临床需求并提供显著改善实现临床缓解的患者比例的治疗。最近的研究强调,RA患者中Th17/IL-17生物途径出现增强。已经表明,与健康志愿者相比,RA患者外周血中Th17细胞的百分比增加,并且在用抗-TNF α 治疗后,其进一步得到增加(Alzabin等人,2012;Chen等人,2011;Aerts等人,2010)。这种针对抗TNF α 治疗后的互补生物途径的增强可以部分解释为何许多患者仅对治疗有部分响应或者为何一些患者尽管最初对治疗反应但仍复发。

[0004] 现在有大量文献提供了IL-17在RA发病机制中的作用的证据。IL-17细胞因子家族由基于结构相似性的6个成员组成,其中分子量为23-36kDa和具有二聚体结构。基础成员IL-17A(通常在文献中仍简称为IL-17)与其他成员IL-17B,IL-17C,IL-17D,IL-17E(也称为IL-25)和IL-17F共有16%-50%的氨基酸序列同一性。IL-17A和IL-17F具有最大的同源性(50%)并且与相同的受体复合物结合,因此在这两种细胞因子之间已经注意到共有生物学活性。另外,IL-17A和IL-17F不仅作为同二聚体存在,而且作为IL-17A/F异二聚体存在。IL-17E(IL-25)与IL-17A的相似性最小。与IL-17A和IL-17F的生物活性具有重要意义和相关性的方面在于,发现它们共有相同的IL-17RA/IL-17RC受体复合物,其中IL-17A对IL-17RA具有最大的亲和力,而IL-17F与IL-17RC的结合更为紧密。利用IL-17RA的另一个家族成员是IL-17E,其通过IL-17RA/IL-17RB受体复合物进行信号传导。

[0005] IL-17A和IL-17F由CD4⁺T细胞的Th17亚群产生。此外,其他T细胞亚群产生IL-17A和IL-17F,包括细胞毒性CD8⁺T细胞(Tc17)、gdT细胞和NK⁺T细胞。报道分泌IL-17A的其他细胞群包括中性粒细胞、单核细胞、NK细胞、淋巴组织诱导物-样(LTi-样)细胞、肠帕内特细胞和甚至B细胞和肥大细胞。此外,据报道上皮细胞分泌IL-17F。

[0006] 不同受体的表达反映响应IL-17细胞因子的细胞类型。IL-17RA遍在表达,在造血组织中具有特别高的水平,而IL-17RC在关节、肝、肾、甲状腺和前列腺的非免疫细胞中更高表达。这种差异表达可以解释IL-17A和IL-17F生物活性的差异,因为表达高水平IL-17RC的细胞可能对IL-17F更具有响应性,而IL17-RA表达高于IL-17RC的细胞可能更容易响应于IL-17A。对IL-17A和F有响应的特定细胞类型包括成纤维细胞、上皮细胞、角质形成细胞、滑膜细胞和内皮细胞,其中据报道IL-17A也作用于T和B细胞和巨噬细胞。

[0007] IL-17A和IL-17F是来自成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞的促炎细胞因子、趋化因子和基质金属蛋白酶(包括IL-6、IL-8和MMP-13)的诱导物。经常报道IL-17F活性低于IL-17A,但注意到当IL-17F与TNF α 组合时,生物响应增加(Zrioual等人,2009)。注意到IL-17A

和IL-17F与TNF α 的加和或协同生物活性并且可能是由于mRNA稳定性增加。已经证实RA患者中IL-17A和IL-17F的表达均有增加(Zrioual等人,2009),T细胞和IL-17在RA发病机制中的贡献现已在文献中得到充分公开(Hot&Miossec 2011;Truchetet等人,2013)。使用人滑膜和骨外植体已证明IL-17A可增加软骨和骨质降解(Chabaud等人,2001)。对小鼠胶原诱导关节炎(CIA)模型的进一步研究也表明IL-17A的过度表达诱导滑膜炎症和关节破坏,并且已在IL-17缺陷小鼠中显示CIA被IL-17A的阻断所抑制(Lubberts 2001&2004;Nakae 2003)。

[0008] 因此,TNF α 和IL-17生物途径同时被阻断的治疗具有显著改善响应率并解决RA患者现有的未满足需求以及治疗由TNF- α 和IL-17A和/或IL-17F介导的其它病理性病症的潜能。

[0009] W02014/044758 (Covagen AG)公开了一种能够抑制糖基化IL-17A和结合TNF- α 的融合构建体。W02013/063110 (Abbvie Inc.)公开了能够结合TNF和IL-17的多价DVD-Ig结合蛋白。W02014/137961 (Eli Lilly and Company)公开了抗-TNF和抗-IL-17A双特异性抗体。然而,这些分子由于IL-17F未被中和而仅可以实现有限的效能,并且如上所述,IL-17F赋予IL-17A相似的生物学活性,因此只能通过这些治疗性分子实现IL-17生物途径的部分抑制。抑制IL-17A和IL-17F与抑制TNF- α 组合可以提供比TNF- α 和仅IL-17A阻断剂更好的效能。

[0010] 本发明人已经研发了能够抑制TNF- α 、IL-17A和IL-17F的新型多特异性抗体,这为患者提供了新的治疗选择。

[0011] 本公开的概述

[0012] 本发明提供能够结合TNF- α 、IL-17A和IL-17F的多特异性抗体分子,特别地,其包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域和对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域,其中该抗体分子能够中和人TNF- α 、人IL-17A和人IL-17F的生物活性。在一个实施方案中,所述多特异性抗体分子是三特异性的并且进一步包含对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域。

[0013] 发明详述

[0014] 如本文所用的“抗原结合位点”或“结合位点”是指包含特异性地与靶抗原发生相互作用的一个或多个可变结构域的部分或整体、例如可变结构域对的部分或整体的分子部分。

[0015] 如本文所用的“结合结构域”是指包含特异性地与靶抗原发生相互作用的一个或多个可变结构域、例如可变结构域VH和VL对和任选的一个或多个恒定结构域、例如CH1结构域和/或CL结构域 κ 或 λ 的分子部分。结合结构域抗原可包含单一结构域抗体。在一个实施方案中,结合结构域各自是单价的。优选地,结合结构域各自包含不超过一个VH和一个VL。

[0016] 如本文所用的“特异性地”旨在是指仅识别它所特异性针对的抗原结合位点或结合结构域或它所特异性针对的抗原比它所非特异性针对的抗原具有明显更高的结合亲和力例如5、6、7、8、9、10倍以上的结合亲和力的结合位点或结合结构域。

[0017] 如本文所用的“多特异性抗体”是指如本文所述的具有两个或多个结合结构域、例如两个或三个结合结构域的抗体分子。

[0018] 在一个实施方案中,构建体是双特异性抗体。

[0019] 如本文所用的“双特异性抗体”是指具有两个抗原结合位点的抗体,其中一个结合位点结合人TNF- α ,而另一个结合位点结合人IL-17A和人IL-17F。

[0020] 在一个实施方案中,抗体构建体是三特异性抗体。

[0021] 如本文所用的“三特异性抗体”是指具有三个抗原结合位点的抗体分子。

[0022] 在本发明的一个实施方案中,提供能够结合人TNF- α 、人IL-17A和人IL-17F的多特异性抗体分子,其中该抗体分子能够中和人TNF- α 、人IL-17A和人IL-17F的生物活性。

[0023] 在一个实施方案中,所述多特异性抗体分子包含对人TNF- α 具有特异性的第一结合结构域、对人IL-17A具有特异性的第二结合结构域和对人IL-17F具有特异性的第三结合结构域。

[0024] 在备选的实施方案中,所述多特异性抗体分子包含对人TNF- α 具有特异性的第一结合结构域和对人IL-17A和人IL-17F二者具有特异性的第二结合结构域。

[0025] 在一个实施方案中,抗体分子包含三个结合结构域,且两个结合结构域结合同一抗原,包括结合同一抗原上的同一表位或不同表位,并且第三结合结构域结合不同(独特)抗原。在一个实例中,多特异性抗体分子结合抗原人TNF- α 、人IL-17A和人IL-17F,其中两个结合结构域结合人TNF- α ,并且第三结合结构域结合人IL-17A和人IL-17F。在另一个实例中,多特异性抗体分子结合抗原人TNF- α 、人IL-17A和人IL-17F,其中两个结合结构域各自能够结合人IL-17A和人IL-17F,且第三结合结构域结合人TNF- α 。

[0026] 在根据一个实施方案中本发明的抗体分子包含不超过一个对人TNF- α 具有特异性的结合结构域和不超过一个对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域。因此,在该实施方案中,该抗体分子对于结合人TNF- α 是单价的,并且对于结合人IL-17A和人IL-17F是单价的。

[0027] 在一个实施方案中,本发明的多特异性抗体分子包含三个结合结构域,其独立结合三个不同抗原。在一个实施方案中,多特异性抗体分子结合抗原人TNF- α 、人IL-17A和人IL-17F,其中第一结合结构域结合人TNF- α ,第二结合结构域结合人IL-17A,且第三结合结构域结合人IL-17F。

[0028] 在另一个实施方案中,多特异性抗体分子结合抗原人TNF- α 、人IL-17A、人IL-17F和人血清白蛋白,其中第一结合结构域结合人IL-17A和人IL-17F,第二结合结构域结合人TNF- α ,且第三结合结构域结合能够延长该抗体分子半衰期的抗原。能够结合延长抗体分子半衰期的抗原的第三结合结构域可以结合人血清载体蛋白、循环免疫球蛋白分子或CD35/CR1。

[0029] 如本文所用,“血清载体蛋白”包括甲状腺素结合蛋白、甲状腺素视黄质运载蛋白、 α 1-酸性糖蛋白、运铁蛋白、血纤蛋白原和白蛋白或其任意片段。

[0030] 如本文所用,“循环免疫球蛋白分子”包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM和IgD或其任意片段。

[0031] CD35/CR1是存在于具有36天半衰期的红细胞上的蛋白质(28-47天的正常范围; Lanaro等人,1971,Cancer,28(3):658-661)。

[0032] 在具体的实施方案中,多特异性抗体分子包含三个结合结构域或由其组成,其中第一结合结构域对人TNF- α 具有特异性,第二结合结构域对人IL-17A和人IL-17F具有特异性,且第三结合结构域对人血清白蛋白具有特异性。

[0033] 在根据一个实施方案中本发明的抗体分子包含不超过一个对人TNF- α 具有特异性的结合结构域、不超过一个对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域和不超过一个

对人血清载体蛋白具有特异性的结合结构域。因此,在该实施方案中,该抗体分子对于结合人TNF- α 是单价的、对于结合人IL-17A和人IL-17F是单价的和对于结合人血清载体蛋白例如人血清白蛋白是单价的。

[0034] 包含针对同一靶抗原的多个结合结构域的抗体分子更有可能在体内形成大的抗体和抗原复合物,其中所述靶抗原是同型多聚体,例如,人TNF- α 三聚体或人IL-17二聚体。在本发明的该实施方案中,其中抗体分子包含不超过一个针对每个靶抗原的结合结构域,该抗体可以有利地具有低于包含针对同一靶抗原的结合结构域的那些抗体分子的在体内形成大的抗体和抗原复合物的倾向。

[0035] 本发明提供能够以高亲和力结合IL-17A和IL-17F的改进的多特异性抗体。特别地,本发明的多特异性抗体能够特异性结合IL-17A和IL-17F二者。特异性结合是指抗体对IL-17A和IL-17F多肽(包括IL-17A/IL-17F异二聚体)具有比对另外的多肽具有更大的亲和力,并且在一个实施方案中,抗体不结合IL-17的其它同种型。本发明的多特异性抗体能够特异性结合IL-17A同二聚体和IL-17F同二聚体。优选地,本发明的多特异性抗体还结合IL-17A/IL-17F异二聚体。

[0036] 优选地,本发明的多特异性抗体中和IL-17A和IL-17F的活性。在一个实施方案中,本发明的多特异性抗体还中和IL-17A/IL-17F异二聚体的活性。因此,本发明的多特异性抗体具有有利的特性,即它们能够抑制IL-17A和IL-17F二者的生物活性。

[0037] 如本文所用,术语“中和抗体”描述能够例如通过阻断IL-17A和IL-17F结合一个或多个其受体和通过阻断IL-17A/IL-17F异二聚体结合一个或多个其受体中和IL-17A和IL-17F二者的生物信号传导活性的抗体。可以理解,如本文所用,术语“中和”是指可以是部分或完全的生物信号传导活性的降低。还可以理解,抗体对IL-17A和IL-17F活性的中和程度可以是相同或不同的。在一个实施方案中,IL-17A/IL-17F异二聚体活性的中和程度可以与IL-17A或IL-17F活性的中和程度相同或不同。用于测定中和的适合的测定法是本领域已知的,并且这类测定法的某些在本文的实施例中提供。

[0038] 优选地,IL-17A和IL-17F多肽是人的。在一个实施方案中,抗体还结合食蟹猴IL-17A和IL-17F。

[0039] 多特异性抗体还有利地能够以高亲和力结合TNF- α 。特别地,本发明的多特异性抗体能够特异性结合TNF- α 。

[0040] 优选地,本发明的多特异性抗体例如通过阻断TNF- α 结合一个或多个TNF- α 受体而中和TNF- α 的活性。可以理解,如本文所用,术语“中和”是指可以是部分或完全的生物信号传导活性的降低。优选地,TNF- α 多肽是人的。在一个实施方案中,抗体还结合食蟹猴TNF- α 。用于测定中和的适合的测定法是本领域已知的,并且这类测定法的某些在本文的实施例中提供。

[0041] 因此,本发明还提供这类抗体在治疗和/或预防由TNF- α 和IL-17A和/或IL-17F介导的疾病中的用途,例如自身免疫性或炎性疾病或癌症。

[0042] 通过标准测定法测定结合亲和力(KD),例如,表面等离子体共振,例如BIAcore。

[0043] 在一个实施方案中,所述多特异性抗体分子对人TNF- α 具有200pM或以下的结合亲和力,例如,100pM或更好,50pM或更好,20pM或更好,15pM或更好或者12pM或更好。在一个实施方案中,所述多特异性抗体分子对人TNF- α 具有50pM至1pM、20pM至1pM、15pM至1pM或12pM

至1pM的结合亲和力。在一个实施方案中,所述多特异性抗体分子对TNF- α 具有15pM至5pM或12pM至11pM的结合亲和力。

[0044] 在一个实施方案中,所述多特异性抗体分子对人IL-17A具有200pM或以下的结合亲和力,例如,100pM或更好,50pM或更好,20pM或更好,10pM或更好,8pM或更好,5pM或更好或者2pM或更好。在一个实施方案中,所述多特异性抗体分子对人IL-17A具有50pM至1pM、20pM至1pM、10pM至1pM、8pM至1pM、5pM至1pM或2pM至1pM的结合亲和力。

[0045] 在一个实施方案中,所述多特异性抗体分子对人IL-17F具有200pM或以下的结合亲和力,例如,100pM或更好,50pM或更好,20pM或更好,15pM或更好或者10pM或更好。在一个实施方案中,所述多特异性抗体分子对人IL-17F具有50pM至1pM、20pM至1pM、15pM至1pM或10pM至1pM的结合亲和力。在一个实施方案中,所述多特异性抗体分子对人IL-17F具有10pM至5pM或8pM至7pM的结合亲和力。

[0046] 在一个实施方案中,所述多特异性抗体分子对人血清白蛋白具有3nM或更好,2nM或更好,1.9nM或更好或者1.8nM或更好的结合亲和力。在一个实施方案中,所述多特异性抗体分子对人血清白蛋白具有3nM至1pM、2nM至1nM、2nM至1.5nM或1.8nM至1.7nM的结合亲和力。

[0047] 在本发明的一个方面,结合结构域各自包含两个抗体可变结构域,优选VH/VL对。在一个方面,结合结构域各自包含不超过两个抗体可变结构域。

[0048] 本发明的多特异性抗体分子可以具有任意适合的抗体形式,其能够结合如上所述的两种或多种抗原,例如,三种抗原。

[0049] 在一个方面,所述抗体分子形式选自双抗体、scdiabody、三抗体、串联scFv、FabFv、Fab' Fv、FabdsFv、Fab-scFv、Fab-dsscFv、Fab-(dsscFv) 2、FabFvFv、FabFvFc、双Fab、双Fab'、三体、串联scFv-Fc、scFv-Fc-scFv、scdiabody-Fc、scdiabody-CH3、Ig-scFv、scFv-Ig、V-Ig、Ig-V、Duobody和DVD-Ig。在一个实例中,所述抗体分子具有图8中示例为2xdsscFv并且描述在W02015/197772中的形式。

[0050] 在一个实施方案中,对人TNF- α 具有特异性的结合结构域和对IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域独立选自Fab、scFv、Fv、dsFv和dsscFv。

[0051] 在本发明的一个实施方案中,抗体分子不包含CH2结构域和/或CH3结构域。缺乏CH2结构域和/或CH3结构域的抗体分子(也称作Fc结构域)是有利的,其中无需归因于Fc结构域的功能特性,例如补体结合。

[0052] 在抗体治疗剂中存在Fc结构域,特别是活性Fc结构域,例如IgG1同种型Fc,能够导致体内与促炎蛋白例如FcGR和补体的相互作用。因此,在该实施方案中,其中本发明的抗体分子不包含Fc结构域,与含有Fc结构域的抗体分子相比较,该抗体与促炎蛋白例如FcGR和补体在体内几乎没有相互作用。

[0053] 抗体包含针对同一靶抗原的多个结合结构域,其中所述靶抗原是同型多聚体,并且Fc结构域可以与多个活性Fc结构域合并形成大的抗体:抗原复合物的倾向,以形成大的免疫复合物。大的免疫复合物可能在体内不适当地沉积,导致免疫系统激活。在本发明的实施方案中,其中抗体包含不超过一个针对每个靶抗原的结合结构域并且不包含Fc结构域,该抗体可能具有降低的形成大的免疫复合物的能力并在体内具有较低的不适当沉积和免疫激活的可能性。

[0054] 在本发明的一个方面,将所述多特异性抗体分子提供为二聚体,其包含或由如下组成:

[0055] a) 式(I)的多肽链:

[0056] $V_{H1}-CH_1-X-V_1$; 和

[0057] b) 式(II)的多肽链:

[0058] $V_{L1}-CL-Y-V_2$;

[0059] 其中:

[0060] V_{H1} 表示重链可变结构域;

[0061] CH_1 表示重链恒定区结构域,例如,其结构域1;

[0062] X 表示键或接头;

[0063] Y 表示键或接头;

[0064] V_1 表示dsFv、sdAb、scFv或dsScFv;

[0065] V_{L1} 表示轻链可变结构域;

[0066] CL 表示来自轻链恒定区的结构域,例如 C_{κ} ;

[0067] V_2 表示dsFv、sdAb、scFv或dsScFv。

[0068] 在一个实施方案中, V_{H1} 和 V_{L1} 一起形成对选自人TNF- α 、人IL-17A和人IL-17F的第一抗原具有特异性的结合结构域。在一个实施方案中, V_{H1} 和 V_{L1} 一起形成对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域。

[0069] 在一个实施方案中, V_1 包含对选自人TNF- α 、人IL-17A和人IL-17F的第二抗原具有特异性的结合结构域。在一个实施方案中, V_1 包含对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域。

[0070] 在一个实施方案中, V_2 包含对选自人TNF- α 、人IL-17A和人IL-17F的第二或第三抗原具有特异性的结合结构域。在一个实施方案中, V_2 包含对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域。

[0071] 在一个实施方案中, V_{H1} 和 V_{L1} 包含对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域,且 V_1 和/或 V_2 包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域。在该实施方案中,其中 V_1 和 V_2 包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域, V_1 和 V_2 可抗原结合人TNF- α 的相同或不同表位。

[0072] 在一个实施方案中, V_{H1} 和 V_{L1} 包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域和 V_1 和/或 V_2 包含对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域。在该实施方案中,其中 V_1 和 V_2 包含对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域, V_1 和 V_2 可抗原结合人IL-17A和人IL-17F的相同或不同表位。

[0073] 在一个实施方案中,抗体分子包含如式(I)和式(II)中定义的多肽链或由其组成,并且包含不超过一个对人TNF- α 具有特异性的结合结构域和不超过一个对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域。

[0074] 在本发明的一个方面,所述多特异性抗体分子能够结合另一种抗原并且包含对血清载体蛋白、循环免疫球蛋白分子或CD35/CR1具有特异性的结合结构域、循环免疫球蛋白分子或CD35/CR1,例如,用于提供对抗体分子延长的半衰期。

[0075] 在一个实施方案中, V_{H1}/V_{L1} 对其具有特异性的目标抗原是血清载体蛋白,例如人血清载体,例如人血清白蛋白。

[0076] 在一个实施方案中, V_1 对其具有特异性的目标抗原是血清载体蛋白, 例如人血清载体, 例如人血清白蛋白。

[0077] 在一个实施方案中, V_2 对其具有特异性的目标抗原是血清载体蛋白, 例如人血清载体, 例如人血清白蛋白。

[0078] 在一个实施方案中, V_{H1}/V_{L1} 、 V_1 或 V_2 中仅一个对血清载体蛋白、例如人血清载体、例如人血清白蛋白具有特异性。

[0079] 因此, 在一个实施方案中, 抗体分子包含如上述式 (I) 和式 (II) 中定义的多肽或由其组成, 其中:

[0080] a. V_{H1} 和 V_{L1} 包含对人 IL-17A 和人 IL-17F 具有特异性的结合结构域; 且

[0081] b. V_1 包含对人 TNF- α 具有特异性的结合结构域, 且 V_2 包含对血清载体蛋白、例如人血清白蛋白具有特异性的结合结构域; 或 V_2 包含对人 TNF- α 具有特异性的结合结构域和 V_1 包含对血清载体蛋白、例如人血清白蛋白具有特异性的结合结构域。

[0082] 在一个实施方案中, 抗体分子包含如式 (I) 和式 (II) 中定义的多肽或由其组成, 并且包含不超过一个对人 TNF- α 具有特异性的结合结构域、不超过一个对人 IL-17A 和人 IL-17F 具有特异性的结合结构域和不超过一个对血清载体蛋白例如人血清白蛋白具有特异性的结合结构域。

[0083] V_{H1} - CH_1 部分与 V_{L1} - CL 部分一起形成功能性 Fab 或 Fab' 片段。

[0084] V_{H1} 表示可变结构域, 例如, 重链可变结构域。在一个实施方案中, V_{H1} 表示重链可变结构域。在一个实施方案中, V_{H1} 是嵌合可变结构域, 换言之, 它包含衍生自至少两个物种的成分, 例如, 人框架和非-人 CDR。在一个实施方案中, V_{H1} 是人源化的。在一个实施方案中, V_{H1} 是人的。

[0085] V_{L1} 表示可变结构域, 例如, 轻链可变结构域。在一个实施方案中, V_{L1} 表示轻链可变结构域。在一个实施方案中, V_{L1} 是嵌合可变结构域, 换言之, 它包含衍生自至少两个物种的成分, 例如, 人框架和非-人 CDR。在一个实施方案中, V_{L1} 是人源化的。在一个实施方案中, V_{L1} 是人源化的。在一个实施方案中, V_L 是人的。

[0086] 通常, V_{H1} 和 V_{L1} 其形成抗原结合结构域。在一个实施方案中, V_{H1} 和 V_{L1} 形成同源对。

[0087] 如本文所用的“同源对”是指来自在体内生成的单一抗体的可变结构域对, 即分离自宿主的可变结构域的天然存在的配对。因此, 同源对是 V_H 和 V_L 对。在一个实例中, 同源对共同协作地结合抗原。

[0088] 如本文所用的“可变区”是指包含 CDR 和框架、特别是适合的框架的抗体链中的区域。

[0089] 用于本公开的可变区通常衍生自可以通过本领域公知的任意方法生成的抗体。

[0090] 如本文所用的“衍生自”是指如下事实: 使用的序列或高度类似于使用的序列的序列得自原始遗传材料, 例如抗体的轻链或重链。

[0091] 如本文所用的“高度类似”旨在是指在其全长内 95% 类似或以上例如 96、97、98 或 99% 类似的氨基酸序列。

[0092] 如上述对 V_{H1} 和 V_{L1} 所述的用于本发明的可变区可以来自任意适合的来源并且可以是例如完整的人的或人源化的。

[0093] 在一个实施方案中, CH_1 结构域是来自抗体重链或其衍生物的天然存在的结构域

1。

[0094] 在一个实施方案中,轻链中的 C_L 片段是恒定 κ 序列或恒定 λ 序列或其衍生物。

[0095] 如本文所用的天然存在的结构域衍生物旨在是指其中天然存在的序列中的1、2、3、4或5个氨基酸被替代或缺失,例如以便优化结构域特性,例如通过消除不期望的特性,但其中结构域的特征性特征被保留。

[0096] 在一个实施方案中,一个或多个天然或改造的链间(即轻链和重链间)二硫键存在于功能性Fab或Fab'片段中。

[0097] 在一个实施方案中,“天然”二硫键存在于式(I)和(II)的多肽链中的 CH_1 与 C_L 之间。

[0098] 当 C_L 结构域衍生自 κ 或 λ 时,形成键的半胱氨酸的天然位置是人 $c\kappa$ 和 $c\lambda$ 中的214位(Kabat编号,第4版,1987)。

[0099] CH_1 中形成二硫键的半胱氨酸的确切位置取决于实际使用的特定结构。因此,例如,在人 $\gamma-1$ 中,二硫键的天然位置位于第233位(Kabat编号,第4版,1987)。形成用于其它人同种型例如 $\gamma-2$ 、 $\gamma-3$ 、 $\gamma-4$ 、IgM和IgD的键的半胱氨酸的位置是已知的,例如,人IgM、IgE、IgG2、IgG3、IgG4的第127位和人IgD和IgA2B的重链的第128位。

[0100] 任选地,在式I和II的多肽的 V_H 与 V_L 之间可以存在二硫键。

[0101] 在一个实施方案中,根据本公开的多特异性抗体在等同于或相当于 CH_1 与 C_L 之间天然存在的位置上存在二硫键。

[0102] 在一个实施方案中,包含 CH_1 的恒定区和恒定区例如 C_L 具有位于非天然存在的位置上的二硫键。这可以通过在所需位置上将半胱氨酸导入氨基酸链改造成分子。这种非天然二硫键是存在于 CH_1 与 C_L 之间天然二硫键的之外的或者是其可替代选择。天然位置上的半胱氨酸可以被氨基酸例如不可能形成二硫键的丝氨酸替代。

[0103] 可以使用本领域公知的任意方法导入改造的半胱氨酸。这些方法包括、但不限于PCR延伸重叠诱变、位点定向诱变或盒式诱变(通常参见Sambrook等人,Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausbel等人, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993)。位点定向诱变试剂盒是商购可得的,例如**QuikChange®**位点定向诱变试剂盒(Stratagene, La Jolla, CA)。可以基于Wells等人, 1985, Gene, 34:315-323进行盒式诱变。或者,可以经重叠寡核苷酸退火、连接和PCR扩增和克隆通过全基因合成来制备突变体。

[0104] 在一个实施方案中, CH_1 与 C_L 之间的二硫键完全不存在,例如,链间半胱氨酸可以被另一个氨基酸例如丝氨酸替代。因此,在一个实施方案中,在分子的功能性Fab片段中不存在链间二硫键。公开例如W02005/003170描述了如何提供无链间二硫键的Fab片段,该文献通过引用并入本文。

[0105] 在一个实施方案中,如上述所定义的包含如式(I)和式(II)中定义的多肽链或由其组成的抗体分子不包含 CH_2 结构域和/或 CH_3 结构域。

[0106] V_1 表示dsFv、sdAb、scFv或dsscFv,例如,dsFv、scFv或dsscFv。

[0107] V_2 表示dsFv、sdAb、scFv或dsscFv,例如,dsFv、scFv或dsscFv。

[0108] 如本文所用的“单链可变片段”或“scFv”是指包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)或由其组成的单链可变片段,其通过 V_H 与 V_L 可变结构域之间的肽接头稳定。 V_H 和 V_L 可变

结构域可以是任意适合的取向,例如, V_H 的C-末端可以连接至 V_L 的N-末端或 V_L 的C-末端可以连接至 V_H 的N-末端。

[0109] 如本文所用的“二硫键稳定的单链可变片段”或“dsScFv”是指通过 V_H 与 V_L 可变结构域之间的肽接头稳定并且还包括 V_H 与 V_L 之间的结构域间二硫键的单链可变片段。

[0110] 如本文所用的“二硫键稳定的可变片段”或“dsFv”是指不包括 V_H 与 V_L 可变结构域之间的肽接头而是由 V_H 与 V_L 之间的链间结构域二硫键稳定的单链可变片段。

[0111] 如本文所用的“单结构域抗体”或“sdAb”是指由单体可变抗体结构域例如 V_H 或 V_L 或VHH组成的抗体片段。

[0112] 在一个实施方案中, V_1 和 V_2 均为dsFv。当 V_1 和 V_2 均为dsFv时, V_H 或 V_L 可变结构域对于 V_1 和 V_2 是相同的。在一个实施方案中, V_1 和 V_2 具有相同的 V_H 可变结构域。在另一个实施方案中, V_1 和 V_2 具有相同的 V_L 可变结构域。在一个实施方案中, V_H 和 V_L 可变结构域对于 V_1 和 V_2 是相同的。后者允许对于一些靶标可能是期望的交联。

[0113] 在一个实施方案中, V_1 是dsFv,且 V_2 是scFv。在一个实施方案中, V_1 是scFv,且 V_2 是dsFv。在一个实施方案中, V_1 是dsScFv,且 V_2 是dsFv。在一个实施方案中, V_1 是dsFv,且 V_2 是dsScFv。在一个实施方案中, V_1 是dsScFv,且 V_2 是scFv。在一个实施方案中, V_1 是scFv,且 V_2 是dsScFv。在一个实施方案中, V_1 不是scFv。在一个实施方案中, V_2 不是scFv。在一个实施方案中, V_1 和 V_2 均不为scFv。

[0114] 在该实施方案中,其中 V_1 和/或 V_2 是dsFv或dsScFv, V_1 的轻链和重链可变区和/或 V_2 的轻链和重链可变区通过两个改造的半胱氨酸残基之间的二硫键连接。 V_1 和/或 V_2 的可变结构域 V_H 与 V_L 之间的二硫键位于如下所列的残基中的两个之间(除非上下文中表示另外的Kabat编号在如下列表中使用)。无论是否参考Kabat编号,相关文献是Kabat等人,1987,于Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Department of Health and Human Services,NIH,USA。

[0115] 在一个实施方案中,二硫键位于选自包含如下的组的位置:

[0116] • V_H37+V_L95 ,参见例如,Protein Science 6,781-788Zhu等人(1997);

[0117] • V_H44+V_L100 ,参见例如;Biochemistry 33 5451-5459Reiter等人(1994);或Journal of Biological Chemistry Vol.269No.28pp.18327-18331Reiter等人(1994);或Protein Engineering,vol.10no.12pp.1453-1459Rajagopal等人(1997);

[0118] • V_H44+V_L105 ,参见例如,J Biochem.118,825-831Luo等人(1995);

[0119] • V_H45+V_L87 ,参见例如,Protein Science 6,781-788Zhu等人(1997);

[0120] • V_H55+V_L101 ,参见例如,FEBS Letters 377 135-139Young等人(1995);

[0121] • V_H100+V_L50 ,参见例如,Biochemistry 29 1362-1367Glockshuber等人(1990);

[0122] • $V_H100b+V_L49$;

[0123] • V_H98+V_L46 ,参见例如,Protein Science 6,781-788Zhu等人(1997);

[0124] • V_H101+V_L46 ;

[0125] • V_H105+V_L43 ,参见例如;Proc.Natl.Acad.Sci.USA Vol.90pp.7538-7542Brinkmann等人(1993);或Proteins 19,35-47Jung等人(1994),

[0126] • V_H106+V_L57 ,参见例如,FEBS Letters 377 135-139Young等人(1995)

[0127] 其中 V_H 和 V_L 值独立地在指定 V_1 或 V_2 内选择。

[0128] 上面列出的氨基酸对处于有利于被半胱氨酸替代的位置,从而可以形成二硫键。可以通过已知技术将半胱氨酸改造成这些期望的位置。因此,在一个实施方案中,根据本公开的改造的半胱氨酸是指在给定氨基酸位置处天然存在的残基被半胱氨酸替代的情况。

[0129] 可以使用本领域已知的任意方法导入半胱氨酸残基。这些方法包括但不限于PCR延伸重叠诱变、位点定向诱变或盒式诱变(通常参见Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour Laboratory Press,Cold Spring Harbour, NY,1989;Ausbel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing & Wiley-Interscience, NY,1993)。位点定向诱变试剂盒是商购可得的,例如 **QuikChange®** 位点定向诱变试剂盒(Stratagen, La Jolla, CA)。可以基于Wells等人,1985, Gene, 34:315-323进行盒式诱变。或者,可以经重叠寡核苷酸退火、连接和PCR扩增和克隆通过全基因合成来制备突变体。

[0130] 因此,在一个实施方案中,当 V_1 和/或 V_2 是dsFv或dsscFv时, V_1 的可变结构域 V_H 和 V_L 和/或 V_2 的可变结构域 V_H 和 V_L 可以通过两个半胱氨酸残基之间的二硫键连接,其中半胱氨酸残基对的位置选自: V_H37 和 V_L95 , V_H44 和 V_L100 , V_H44 和 V_L105 , V_H45 和 V_L87 , V_H100 和 V_L50 , V_H100b 和 V_L49 , V_H98 和 V_L46 , V_H101 和 V_L46 , V_H105 和 V_L43 以及 V_H106 和 V_L57 。

[0131] 在一个实施方案中,当 V_1 和/或 V_2 是dsFv或dsscFv时, V_1 的可变结构域 V_H 和 V_L 和/或 V_2 的可变结构域 V_H 和 V_L 可以通过位于CDR外的 V_H 中的一个和 V_L 中的一个的两个半胱氨酸残基之间的二硫键连接,其中半胱氨酸残基对的位置选自 V_H37 和 V_L95 、 V_H44 和 V_L100 、 V_H44 和 V_L105 、 V_H45 和 V_L87 、 V_H100 和 V_L50 、 V_H98 和 V_L46 、 V_H105 和 V_L43 以及 V_H106 和 V_L57 。

[0132] 在一个实施方案中,当 V_1 是dsFv或dsscFv时, V_1 的可变结构域 V_H 和 V_L 通过两个改造的半胱氨酸残基之间的二硫键连接,一个位于 V_H44 位,而另一个位于 V_L100 位。

[0133] 在一个实施方案中,当 V_2 是dsFv或dsscFv时, V_2 的可变结构域 V_H 和 V_L 通过两个改造的半胱氨酸残基之间的二硫键连接,一个位于 V_H44 位,而另一个位于 V_L100 位。

[0134] 在一个实施方案中,当 V_1 和 V_2 是dsFv或dsscFv时, V_1 和 V_2 的可变结构域 V_H 和 V_L 通过两个改造的半胱氨酸残基之间的二硫键连接,一个位于 V_H44 位,而另一个位于 V_L100 位。

[0135] 在一个实施方案中,当 V_1 和 V_2 均为dsscFv时, V_1 和 V_2 的可变结构域 V_H 和 V_L 通过两个改造的半胱氨酸残基之间的二硫键连接,一个位于 V_H44 位,而另一个位于 V_L100 位。

[0136] 在一个实施方案中,当 V_1 是dsFv、dsscFv或scFv时, V_1 的 V_H 结构域如通过肽键连接至X。

[0137] 在一个实施方案中,当 V_1 是dsFv、dsscFv或scFv时, V_1 的 V_L 结构域例如通过肽键连接至X。

[0138] 在一个实施方案中,当 V_2 是dsFv、dsscFv或scFv时, V_2 的 V_H 结构域例如通过肽键连接至Y。

[0139] 在一个实施方案中,当 V_2 是dsFv、dsscFv或scFv时, V_2 的 V_L 结构域例如通过肽键连接至Y。

[0140] 本领域技术人员可以理解,当 V_1 和/或 V_2 表示dsFv时,多特异性抗体包含第三多肽,其编码相应的不连接至X或Y的游离 V_H 或 V_L 结构域。当 V_1 和 V_2 均为dsFv时,“游离可变结构域”(即通过二硫键连接至多肽其余部分的结构域)对两条链而言是共同的。因此,通过X或Y融合或连接至多肽的实际可变结构域可以在每条多肽链中是不同的,与其配对的游离可变结

构域通常彼此相同。

[0141] 在一个实施方案中,X是键。

[0142] 在一个实施方案中,Y是键。

[0143] 在一个实施方案中,X和Y均为键。

[0144] 在一个实施方案中,X是接头,优选地,肽接头,例如,用于连接部分CH₁和V₁的适合的肽。

[0145] 在一个实施方案中,Y是接头,优选地,肽接头,例如,用于连接部分C_L和V₂的适合的肽。

[0146] 在一个实施方案中,X和Y均为接头。在一个实施方案中,X和Y均为肽接头。

[0147] 如本文所用,术语“肽接头”是指由氨基酸组成的肽。适合的肽接头的范围是本领域技术人员已知的。

[0148] 在一个实施方案中,X和/或Y肽接头为50个氨基酸长度或以下,例如,20个氨基酸或以下,例如约15个氨基酸或以下,例如9、10、11、12、13或14个氨基酸长度。

[0149] 在一个实施方案中,X和/或Y接头选自序列1-67中所示的序列。

[0150] 在一个实施方案中,X和/或Y接头选自SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中所示的序列。

[0151] 在一个实施方案中,X具有序列SGGGGTGGGGS (SEQ ID NO:1)。

[0152] 在一个实施方案中,Y具有序列SGGGGTGGGGS (SEQ ID NO:1)。

[0153] 在一个实施方案中,X具有序列SGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:2)。

[0154] 在一个实施方案中,Y具有序列SGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:2)。

[0155] 在一个实施方案中,X具有SEQ ID NO:1中指定的序列,且Y具有SEQ ID NO:2中指定的序列。

[0156] 在一个实施方案中,X具有SEQ ID NO:2中指定的序列,且Y具有中SEQ ID NO:1指定的序列。

[0157] 在一个实施方案中,X具有SEQ ID NO:2中指定的序列,且Y具有中SEQ ID NO:2指定的序列。

[0158] 在一个实施方案中,X具有SEQ ID NO:69或70中指定的序列。在一个实施方案中,Y具有SEQ ID NO:69或70中指定的序列。在一个实施方案中,X具有SEQ ID NO:69中指定的序列和Y具有SEQ ID NO:70中指定的序列。

[0159] X和/或Y的适合的接头序列还提供在下表1和2中。

[0160] 表1. 铰链接头序列

[0161]

SEQ ID NO:	序列
3	DKTHTCAA
4	DKTHTCPPCPA
5	DKTHTCPPCPATCPPCPA
6	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
7	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
8	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
9	DKTHTCCVECPCPA

10	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
11	DKTHTCPSCPA

[0162] 表2. 柔性接头序列

[0163]

SEQ ID NO:	序列
12	SGGGGSE
13	DKTHTS
14	(S)GGGGS

[0164]

15	(S)GGGGSGGGGS
16	(S)GGGGSGGGGS
17	(S)GGGGSGGGGS
18	(S)GGGGSGGGGS
19	AAAGSG-GASAS
20	AAAGSG-XGGGS-GASAS
21	AAAGSG-XGGGSXGGGS –GASAS
22	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS –GASAS
23	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
24	AAAGSG-XS-GASAS
25	PGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
26	ATTTGSSPGPT
27	ATTTGS
-	GS
28	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
29	GTVAAPSVFIFPPSD
30	GGGGIAPSMVGGGGS
31	GGGGKVEGAGGGGGS
32	GGGGSMKSHDGGGGS
33	GGGGNLITIVGGGGS
34	GGGGVVPSLPGGGGS
35	GGEKSIPGGGGS
36	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
37	YPRSIYIRRRHPSPSLTT
38	TPSHLSHILPSFGLPTFN
39	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
40	SPA AHFPRSIPRPGPIRT
41	APGPSAPSHRSLPSRAFG

[0165]

42	PRNSIHFLHPLLVAPLGA
43	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
44	SPQYPSPLTLTLPPHPSL
45	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
46	LPWRTSLLPSLPLRRRP
47	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
48	VPPAPVVSLRSAHARPPY
49	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
50	PNVAHVLPLLTVPWDNLR
51	CNPLLPLCARSPAVRTEP

[0166] 在序列14-18中(S)是任选的。

[0167] 刚性接头的实例包括肽序列GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO:52)、PPPP (SEQ ID NO:53) 和PPP。

[0168] 在一个实施方案中,肽接头是白蛋白结合肽。

[0169] 白蛋白结合肽的实例提供在W02007/106120中且包括:

[0170] 表3

[0171]

SEQ ID NO:	序列
54	DLCLRDWGCLW
55	DICLPRWGCLW
56	MEDICLPRWGCLWGD
57	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
58	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
59	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
60	EDICLPRWGCLWEDD
61	RLMEDICLPRWGCLWEDD
62	MEDICLPRWGCLWEDD
63	MEDICLPRWGCLWED

[0172]

64	RLMEDICLARWGCLWEDD
65	EVRSFCTRWPAEKSCKPLRG
66	RAPESFVCYWETICFERSEQ
67	EMCYFPGICWM

[0173] 有利地,白蛋白结合肽作为接头的用途可以增加多特异性抗体分子的半衰期。

[0174] 在一个实施方案中, V_1 和 V_2 的至少一个是scFv或dsscFv。例如, V_1 是scFv或dsscFv,且 V_2 是scFv或dsscFv。

[0175] 在一个实施方案中, V_1 是dsscFv,且 V_2 是dsscFv。

[0176] 在实施方案中,其中 V_1 是scFv或dsscFv, V_1 包含如下的多肽链或由其组成:

[0177] a. 式(III): $VH_2-Z_1-VL_2$ 和 VH_2 例如通过肽键连接至X;或

[0178] b. 式(IV): $VL_2-Z_1-VH_2$ 和 VL_2 例如通过肽键连接至X;

[0179] 其中 VH_2 表示重链可变结构域, Z_1 表示接头,例如,肽接头,且 VL_2 表示轻链可变结构域。

[0180] 在实施方案中,其中 V_2 是scFv或dsscFv, V_2 包含如下的多肽链或由其组成:

[0181] a. 式(V): $VH_3-Z_2-VL_3$ 和 VH_3 例如通过肽键连接至Y;或

[0182] b. 式(VI): $VL_3-Z_2-VH_3$ 和 VL_3 例如通过肽键连接至Y;

[0183] 其中 VH_3 表示重链可变结构域, Z_2 表示接头,例如,肽接头,且 VL_3 表示轻链可变结构域。

[0184] 在一个实施方案中,scFv或dsscFv中的肽接头 Z_1 和/或 Z_2 在约12至25个氨基酸长度的范围,例如15至20个氨基酸。

[0185] 在一个实施方案中,当 V_1 是scFv或dsscFv时,连接 V_1 的可变结构域 V_H 和 V_L 的接头 Z_1 具有序列GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:68)。

[0186] 在一个实施方案中,当 V_2 是scFv或dsscFv时,连接 V_2 的可变结构域 V_H 和 V_L 的接头 Z_2 具有序列GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:68)。

[0187] 在一个实施方案中,当 V_1 是scFv或dsscFv时,连接 V_1 的可变结构域 V_H 和 V_L 的接头 Z_1 具有序列SGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:69)。

[0188] 在一个实施方案中,当 V_2 是scFv或dsscFv时,连接 V_2 的可变结构域 V_H 和 V_L 的接头 Z_2 具有序列SGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:69)。

[0189] 在一个实施方案中,当 V_1 是scFv或dsscFv时,连接 V_1 的可变结构域 V_H 和 V_L 的接头 Z_1 具有序列SGGGSGGGTGGGS (SEQ ID NO:70)。

[0190] 在一个实施方案中,当 V_2 是scFv或dsscFv时,连接 V_2 的可变结构域 V_H 和 V_L 的接头 Z_2 具有序列SGGGSGGGTGGGS (SEQ ID NO:70)。

[0191] 因此,在一个方面,提供了多特异性抗体分子,其包含或由如下组成:

[0192] a) 式(I)的多肽链:

[0193] $V_{H1}-CH_1-X-V_1$; 和

[0194] b) 式(II)的多肽链:

[0195] $V_{L1}-C_L-Y-V_2$;

[0196] 其中:

[0197] V_H 表示重链可变结构域;

[0198] CH_1 表示重链恒定区结构域,例如,其结构域1;

[0199] X 表示具有SEQ ID NO:2中指定的序列的接头;

[0200] Y 表示具有SEQ ID NO:2中指定的序列的接头;

[0201] V_1 表示包含式(III)的多肽链或由其组成的dsscFv: $V_H2-Z1-VL2$,其中 V_H2 表示重链可变结构域, $Z1$ 表示具有SEQ ID NO:68中指定的序列的接头, $VL2$ 表示轻链可变结构域, V_H2 例如通过肽键连接至 X ,且 V_1 的可变结构域 V_H2 和 $VL2$ 通过一个位于 V_H44 位而另一个位于 $VL100$ 位的两个改造的半胱氨酸残基之间的二硫键连接;

[0202] V_{L1} 表示轻链可变结构域;

[0203] C_L 表示来自轻链恒定区的结构域,例如 C_{κ} ;

[0204] V_2 表示包含式(V)的多肽链或由其组成的dsscFv: $V_H3-Z2-VL3$,其中 V_H3 表示重链可变结构域, $Z2$ 表示具有SEQ ID NO:68中指定的序列的接头, $VL3$ 表示轻链可变结构域, V_H3 例如通过肽键连接至 Y ,且 V_2 的可变结构域 V_H3 和 $VL3$ 通过一个位于 V_H44 位而另一个位于 $VL100$ 位的两个改造的半胱氨酸残基之间的二硫键连接;

[0205] 其中 V_H1 和 $VL1$ 包含对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域;且 V_1 包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域,且 V_2 包含对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域;或 V_2 包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域,且 V_1 包含对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域。

[0206] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含如下的至少一个:具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列的CDR、具有SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列的CDR和具有SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列的CDR。在一个实施方案中,对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列。在一个实施方案中,对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含3个重链CDR,且CDRH1的序列与SEQ ID NO:85中指定的序列具有至少60%的同一性或相似性,CDRH2的序列与SEQ ID NO:86中指定的序列具有至少60%的同一性或相似性,且CDRH3的序列SEQ ID NO:87中指定的序列具有至少60%的同一性或相似性。

[0207] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含具有SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:136中对CDRL1指定的序列的CDR、具有SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138或SEQ ID NO:139中对CDRL2指定的序列的CDR和具有SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列的CDR的至少一个。在一个实施方案中,对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:136中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138或SEQ ID NO:139中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列。在一个实施方案中,对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含3个轻链CDR,并且CDRL1的序列与SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:136中指定的序列具有至少60%同一性或相似性,CDRL2的序列与SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138或SEQ ID NO:139中指定的序列具有至少60%同一性或相似性,且

CDRL3的序列与SEQ ID NO:90中指定的序列具有至少60%同一性或相似性。

[0208] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含:3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:88中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列。

[0209] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含:3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:136中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138或SEQ ID NO:139中对CDRL2指定洞悉了和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列。

[0210] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含重链可变结构域,其包含SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:96中指定的序列;与SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:96中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:96中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH2具有SEQ ID NO:85中指定的对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列。

[0211] 在一个实例中,对人TNF- α 具有特异性的结合结构域是人源化的。在本发明的人源化抗体中,受体重链和轻链不一定衍生自同一抗体,且如果期望,可以包含具有衍生自不同链的复合链框架区。

[0212] 在一个实例中,用于本发明TNF- α 结合结构域的一种这样的适合的框架区衍生自人VH3 1-3 3-21JH4受体框架。

[0213] 因此,在一个实例中,对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含重链可变区,其包含一个或多个CDR,所述一个或多个CDR选自SEQ ID NO:85中对CDR-H1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDR-H2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列,其中重链框架区衍生自人受体框架VH3 1-3 3-21JH4。

[0214] 在本发明的人源化抗体中,框架区不一定具有与受体抗体的那些确切相同的序列。例如,可以将不常用的残基改变成对于该受体链类别或类型更频繁出现的残基。或者,可以改变受体框架区中选择的残基,使得它们相当于在供体抗体中同一位置上发现的残基(参见Reichmann等人,1998,Nature,332,323-324)。这类改变应当保持至恢复供体抗体亲和力和力所必需的最低限度。用于选择可能需要改变的受体框架区中的残基的方案在W091/09967中举出。

[0215] 因此,在一个实施方案中,重链和/或轻链框架中的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基可以被可选的氨基酸残基替代。

[0216] 因此,在一个实例中,对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含重链可变区,其中重链可变结构域的第24、48、49、71、73、78和93位(Kabat编号)上的残基的至少一个是供体残基,参见例如,SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:96中指定的序列。

[0217] 在一个实施方案中,重链可变区的残基24被可选氨基酸替代,例如,苏氨酸。

[0218] 在一个实施方案中,重链可变区的残基48被可选氨基酸替代,例如,异亮氨酸。

- [0219] 在一个实施方案中,重链可变区的残基49被可选氨基酸替代,例如,甘氨酸。
- [0220] 在一个实施方案中,重链可变区的残基71被可选氨基酸替代,例如,缬氨酸。
- [0221] 在一个实施方案中,重链可变区的残基73被可选氨基酸替代,例如,赖氨酸。
- [0222] 在一个实施方案中,重链可变区的残基78被可选氨基酸替代,例如,丙氨酸。
- [0223] 在一个实施方案中,重链可变区的残基93被可选氨基酸替代,例如,苏氨酸。
- [0224] 在一个实施方案中,在本公开的人源化抗-TNF α 重链可变结构域中,残基48是异亮氨酸,残基49是甘氨酸,71是缬氨酸,73是赖氨酸,78是丙氨酸,且残基93是苏氨酸。
- [0225] 因此,在一个实例中,提供了人源化TNF- α 结合结构域,其中重链可变结构域的第48、49、71、73、78和93位(Kabat编号)的每一个上的至少一个残基是供体残基,参见例如,SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:96中指定的序列。
- [0226] 在一个实例中,提供了人源化TNF- α 结合结构域,其中重链可变结构域的至少第24、48、49、71、73、78和93位(Kabat编号)的每一个上的残基是供体残基。
- [0227] 在一个实例中,用于本发明人源化TNF- α 结合结构域轻链的适合的框架区衍生自人受体框架VK1 2-1 (U) A20JK2。
- [0228] 因此,在一个实例中,对TNF- α 具有特异性的结合结构域包含轻链可变结构域,其包含SEQ ID NO:88或136中对CDR-L1指定的序列、SEQ ID NO:89、137、138或139中对CDR-L2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列,其中轻链框架区衍生自人受体框架VK1 2-1 (U) A20JK2。
- [0229] 在一个实例中,对TNF- α 具有特异性的结合结构域包含人源化轻链可变结构域,其中轻链可变结构域的第65、71和87位(Kabat编号)上的残基的一个或多个是供体残基,参见例如,SEQ ID NO:91或SEQ ID NO:95中指定的序列。
- [0230] 在一个实例中,提供了人源化TNF- α 结合结构域,其中至少轻链可变结构域的第65、71和87位(Kabat编号)的每一个上的是供体残基,参见例如,中指定的序列SEQ ID NO:91或95。
- [0231] 在一个实施方案中,轻链可变结构域的残基65被可选氨基酸替代,例如,苏氨酸。
- [0232] 在一个实施方案中,轻链可变结构域的残基71被可选氨基酸替代,例如,酪氨酸。
- [0233] 在一个实施方案中,轻链可变结构域的残基87被可选氨基酸替代,例如,苯丙氨酸。
- [0234] 在一个实施方案中,在本公开的人源化抗-TNF- α 轻链可变区中,残基65是苏氨酸,残基71是酪氨酸,且残基87是苯丙氨酸。
- [0235] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含轻链可变结构域,其包含SEQ ID NO:91或SEQ ID NO:95中指定的序列;与SEQ ID NO:91或SEQ ID NO:95中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:91或SEQ ID NO:95中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRL1、CDRL2和CDRL3具有SEQ ID NO:88中对CDRL1中指定的、SEQ ID NO:89中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列。
- [0236] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含含有SEQ ID NO:91中指定的序列的轻链可变结构域和含有SEQ ID NO:92中指定的序列的重链可变结构域。

[0237] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含含有SEQ ID NO:147中指定的序列的轻链可变结构域和含有SEQ ID NO:92中指定的序列的重链可变结构域。

[0238] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人TNF- α 具有特异性的结合结构域包含含有SEQ ID NO:95中指定的序列的轻链可变结构域和含有SEQ ID NO:96中指定的序列的重链可变结构域。

[0239] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中该抗体包含对人TNF- α 具有特异性的dsFc,且dsFc包含SEQ ID NO:101中指定的序列;与SEQ ID NO:101中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:101中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有SEQ ID NO:85对CDRH1中指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列,且CDRL1、CDRL2和CDRL3具有SEQ ID NO:88中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列。

[0240] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中该抗体包含对人TNF- α 具有特异性的scFc,且scFc包含SEQ ID NO:99中指定的序列;与SEQ ID NO:99中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:99中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有SEQ ID NO:85对CDRH1中指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列,且CDRL1、CDRL2和CDRL3具有SEQ ID NO:88中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列。

[0241] 在本发明的该方面,其中所述抗体分子包含如上述所定义的式(I)和式(II)的多肽链或由其组成,该抗体分子可以包含:3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:88或136中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89或137或138或139中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列,所述重链CDR和所述轻链CDR位于该抗体分子的V_{H1}/V_{L1}位上。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和具有SEQ ID NO:88或136中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89或137或138或139中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的V₁位上。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和具有SEQ ID NO:88或136中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89或137或138或139中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的V₂位上。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和具有SEQ ID NO:88或136中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89或137或138或139中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的V₁和V₂位上。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和具有SEQ ID NO:88或136中对CDRL1指

定的序列、SEQ ID NO:89或137或138或139中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的V_{H1}/V_{L1}和V₁位上。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和具有SEQ ID NO:88或136中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89或137或138或139中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的V_{H1}/V_{L1}和V₂位上。

[0242] 在一个实施方案中,包含本公开的式(I)和式(II)的多肽链的抗体分子中的TNF- α 结合位点包含选自SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:96的重链可变结构域和选自SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:95的轻链可变区,特别是重链和轻链分别为SEQ ID NO:92和91或SEQ ID NO:96和95。在一个实施方案中,这些结构域位于本公开构建体的V_{H1}/V_{L1}位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于V₁位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于V₂位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于V₁和V₂位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于本公开构建体中的V_{H1}/V_{L1}和V₁位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于本公开构建体中的V_{H1}/V_{L1}和V₂位。当可变结构域位于本公开构建体中的2个位置上时,可变结构域的相同对可以各种就位,或可以使用可变结构域的2个不同对。

[0243] 在一个实施方案中,包含本公开的式(I)和式(II)的多肽链的抗体分子中的TNF- α 结合位点包含对人TNF- α 具有特异性的dsscFv,且dsscFv包含SEQ ID NO:101中指定的序列。在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:101中指定的序列的dsscFv位于V₁和/或V₂位。在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:101中指定的序列的dsscFv位于V₁位。在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:101中指定的序列的dsscFv位于V₂位。

[0244] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域包含3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列。在一个实施方案中,对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域包含3个重链CDR,且CDRH1的序列与SEQ ID NO:71中指定的序列具有至少60%同一性或相似性,CDRH2的序列与SEQ ID NO:72中指定的序列具有至少60%同一性或相似性,且CDRH3的序列与SEQ ID NO:73中指定的序列具有至少60%同一性或相似性。

[0245] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域包含3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列。在一个实施方案中,对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域还包含3个轻链CDR,且CDRL1的序列与SEQ ID NO:74中指定的序列具有至少60%同一性或相似性,CDRL2的序列与SEQ ID NO:75中指定的序列具有至少60%同一性或相似性,且CDRL3的序列与SEQ ID NO:76中指定的序列具有至少60%同一性或相似性。

[0246] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域包含:3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列。

[0247] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域包含重链可变结构域,其包含SEQ ID NO:78中指定的序列;与SEQ ID NO:78中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:78中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列。

[0248] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域包含轻链可变结构域,其包含SEQ ID NO:77中指定的序列;与SEQ ID NO:77中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:77中指定的序列具有至少80%同一性或相似性序列,其中CDRL1、CDRL2和CDRL3具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列。

[0249] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域包含含有SEQ ID NO:78中指定的序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:77中指定的序列的轻链可变区。

[0250] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域包含含有重链可变结构域和重链恒定结构域的重链,其包含SEQ ID NO:82中指定的序列;与SEQ ID NO:82中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:82中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列。

[0251] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域包含含有轻链可变结构域和轻链恒定结构域的轻链,其包含SEQ ID NO:81中指定的序列;与SEQ ID NO:81中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:81中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRL1、CDRL2和CDRL3具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列。

[0252] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域包含具有SEQ ID NO:82中指定的序列的重链和具有SEQ ID NO:81中指定的序列的轻链。

[0253] 在本发明的该方面,其中所述抗体分子包含如上述所定义的式(I)和式(II)的多肽链或由其组成,该抗体分子可以包含:3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列,所述重链CDR和轻链CDR位于抗体分子中的V_{H1}/V_{L1}位。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和其具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的V₁位。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:71

中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和其具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的V₂位。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和其具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的V₁和V₂位。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和其具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的V_{H1}/V_{L1}和V₁位。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和其具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的V_{H1}/V_{L1}和V₂位。

[0254] 在一个实施方案中,包含本公开式(I)和式(II)的多肽链的抗体分子中的IL-17A和IL-17F结合位点包含SEQ ID NO:78中指定的重链可变结构域和SEQ ID NO:77中指定的轻链可变结构域。在一个实施方案中,这些可变结构域位于本公开构建体中的V_{H1}/V_{L1}位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于V₁位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于V₂位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于V₁和V₂位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于本公开构建体中的V_{H1}/V_{L1}和V₁位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于本公开构建体中的V_{H1}/V_{L1}和V₂位。

[0255] 在一个实施方案中,包含本公开式(I)和式(II)的多肽链的抗体分子中的IL-17A和IL-17F结合位点包含具有V_{H1}位上SEQ ID NO:82中指定的序列的重链和具有V_{L1}位上SEQ ID NO:81中指定的序列的轻链。

[0256] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中该抗体分子包含对包含3个重链CDR的人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,所述重链CDR具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列。在一个实施方案中,对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域包含3个重链CDR,且CDRH1的序列与SEQ ID NO:103中指定的序列具有至少60%同一性或相似性,CDRH2的序列与SEQ ID NO:104中指定的序列具有至少60%同一性或相似性,且CDRH3的序列与SEQ ID NO:105中指定的序列具有至少60%同一性或相似性。

[0257] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中该抗体分子包含对包含3个轻链CDR的人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,所述轻链CDR具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列。在一个实施方案中,对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域还包含3个轻链CDR,且CDRL1的序列与SEQ ID NO:106中指定的序列具有至少60%同一性或相似性,CDRL2的序列与SEQ ID NO:107中指定的序列具有至少60%同一性或相似性,且CDRL3的序列与SEQ ID NO:108中指定的序列具有至少60%同一性或相似性。

[0258] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中该抗体分子包含对人血清白

蛋白具有特异性的结合结构域,其包含:3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列。

[0259] 本发明还提供如上述所定义的多特异性抗体结合分子,其中对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域包含重链可变结构域,其包含SEQ ID NO:110或SEQ ID NO:114中指定的序列;与SEQ ID NO:110或SEQ ID NO:114中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:110或SEQ ID NO:114中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列。

[0260] 本发明提供如上述所定义的多特异性抗体分子,其中对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域包含轻链可变结构域,其包含SEQ ID NO:109或SEQ ID NO:113中指定的序列;与SEQ ID NO:109或SEQ ID NO:113中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:109或SEQ ID NO:113中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRL1、CDRL2和CDRL3具有SEQ ID NO:106中指定的对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列。

[0261] 本发明还提供如上述所定义的多特异性抗体结合分子,其中对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域包含含有SEQ ID NO:110中指定的序列的重链可变结构域和含有SEQ ID NO:109中指定的序列的轻链可变结构域。

[0262] 本发明还提供如上述所定义的多特异性抗体结合分子,其中对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域包含含有SEQ ID NO:114中指定的序列的重链可变结构域和含有SEQ ID NO:113中指定的序列的轻链可变结构域。

[0263] 本发明还提供如上述所定义的多特异性抗体结合分子,其中该抗体包含对人血清白蛋白具有特异性的dsscFv,且dsscFv包含SEQ ID NO:119中指定的序列;与SEQ ID NO:119中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:119的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3的序列,且CDRL1、CDRL2和CDRL3具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列。

[0264] 本发明还提供如上述所定义的多特异性抗体结合分子,其中该抗体包含对人血清白蛋白具有特异性的scFv,且scFv包含SEQ ID NO:117中指定的序列;与SEQ ID NO:117中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或与SEQ ID NO:117的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3的序列,且CDRL1、CDRL2和CDRL3具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列。

[0265] 在本发明的该方面,其中所述抗体分子包含如上述所定义的式(I)和式(II)的多肽链或由其组成,该抗体分子可以包含:3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列;和3

个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列,所述重链CDR和轻链CDR位于抗体分子中的 V_{H1}/V_{L1} 位。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的 V_1 位。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的 V_2 位。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的 V_1 和 V_2 位。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的 V_{H1}/V_{L1} 和 V_1 位。在一个实施方案中,具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列的3个重链CDR和具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列的3个轻链CDR位于本公开构建体中的 V_{H1}/V_{L1} 和 V_2 位。

[0266] 在一个实施方案中,包含本公开的式(I)和式(II)的多肽链的抗体分子中的人血清白蛋白结合位点包含选自SEQ ID NO:110和SEQ ID NO:114的重链可变结构域和选自SEQ ID NO:109和SEQ ID NO:113的轻链可变结构域,特别是重链和轻链分别为SEQ ID NO:110和109或SEQ ID NO:114和113。在一个实施方案中,这些结构域位于本公开构建体中的 V_{H1}/V_{L1} 位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于 V_1 位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于 V_2 位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于 V_1 和 V_2 位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于本公开构建体中的 V_{H1}/V_{L1} 和 V_1 位。在一个实施方案中,这些可变结构域位于本公开构建体中的 V_{H1}/V_{L1} 和 V_2 位。当可变结构域位于本公开构建体中的2个位置上时,可变结构域的相同对可以在每一个位置上或可以使用可变结构域的2个不同对。

[0267] 在一个实施方案中,包含本公开的式(I)和式(II)的多肽链的抗体分子中的人血清白蛋白结合位点包含对人血清白蛋白具有特异性的dsscFv,且dsscFv包含SEQ ID NO:119中指定的序列。在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:119中指定的序列的dsscFv位于 V_1 和/或 V_2 位。在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:119中指定的序列的dsscFv位于 V_1 位。在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:119中指定的序列的dsscFv位于 V_2 位。

[0268] 在本发明的一个方面,将如上述所定义的多特异性抗体分子作为二聚体提供,其包含或由如下组成:

[0269] a) 式(I)的多肽链:

[0270] $V_{H1}-CH_1-X-V_1$; 和

[0271] b) 式 (II) 的多肽链:

[0272] $V_{LI}-C_L-Y-V_2$;

[0273] 其中:

[0274] V_{HI} 表示重链可变结构域,其包含3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列;

[0275] CH_1 表示重链恒定区结构域,例如,其结构域1;

[0276] X表示键或接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;

[0277] Y表示键或接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;

[0278] V_L 表示dsFv、sdAb、scFv或dsScFv,其包含:3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:88中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列;

[0279] V_{LI} 表示轻链可变结构域,其包含3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列;

[0280] C_L 表示来自轻链恒定区的结构域,例如 C_{κ} ;

[0281] V_2 表示dsFv、sdAb、scFv或dsScFv,其包含:3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列。

[0282] 在本发明的一个方面,将如上述所定义的多特异性抗体分子作为二聚体提供,其包含或由如下组成:

[0283] a) 式 (I) 的多肽链:

[0284] $V_{HI}-CH_1-X-V_1$;和

[0285] b) 式 (II) 的多肽链:

[0286] $V_{LI}-C_L-Y-V_2$;

[0287] 其中:

[0288] V_{HI} 表示重链可变结构域,其包含3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列;

[0289] CH_1 表示重链恒定区结构域,例如,其结构域1;

[0290] X表示键或接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;

[0291] Y表示键或接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;

[0292] V_L 表示dsFv、sdAb、scFv或dsScFv,其包含:3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列;

[0293] V_{LI} 表示轻链可变结构域,其包含3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列;

[0294] C_L 表示来自轻链恒定区的结构域,例如 C_{κ} ;

[0295] V_2 表示dsFv、sdAb、scFv或dsScFv,其包含:3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:85中对

CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:88中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列。

[0296] 在一个方面,提供了多特异性抗体分子,包含或由如下组成:

[0297] a) 式(I)的多肽链:

[0298] $V_{H1}-CH_1-X-V_1$; 和

[0299] b) 式(II)的多肽链:

[0300] $V_{L1}-CL-Y-V_2$;

[0301] 其中:

[0302] V_{H1} 表示重链可变结构域,其具有SEQ ID NO:78中指定的序列;

[0303] CH_1 表示重链恒定区结构域,例如,其结构域1;

[0304] X 表示接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;

[0305] Y 表示接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;

[0306] V_1 表示dsscFv,其包含具有SEQ ID NO:96中指定的序列的重链可变结构域和具有SEQ ID NO:95中指定的序列的轻链可变结构域;

[0307] V_{L1} 表示轻链可变结构域,其具有SEQ ID NO:77中指定的序列;

[0308] CL 表示来自轻链恒定区的结构域,例如 C_{κ} ;

[0309] V_2 表示dsscFv,其包含具有SEQ ID NO:114中指定的序列的重链可变结构域和具有SEQ ID NO:113中指定的序列的轻链可变结构域。

[0310] 在一个方面,提供了多特异性抗体分子,包含或由如下组成:

[0311] a) 式(I)的多肽链:

[0312] $V_{H1}-CH_1-X-V_1$; 和

[0313] b) 式(II)的多肽链:

[0314] $V_{L1}-CL-Y-V_2$;

[0315] 其中:

[0316] V_{H1} 表示具有SEQ ID NO:78中指定的序列的重链可变结构域;

[0317] CH_1 表示重链恒定区结构域,例如,其结构域1;

[0318] X 表示接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;

[0319] Y 表示接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;

[0320] V_1 表示dsscFv,其包含具有SEQ ID NO:114中指定的序列的重链可变结构域和具有SEQ ID NO:113中指定的序列的轻链可变结构域;

[0321] V_{L1} 表示具有SEQ ID NO:77中指定的序列的轻链可变结构域;

[0322] CL 表示来自轻链恒定区的结构域,例如 C_{κ} ;

[0323] V_2 表示dsscFv,其包含具有SEQ ID NO:96中指定的序列的重链可变结构域和具有SEQ ID NO:95中指定的序列的轻链可变结构域。

[0324] 在一个方面,提供了多特异性抗体分子,包含或由如下组成:

[0325] a) 式(I)的多肽链:

[0326] $V_{H1}-CH_1-X-V_1$; 和

[0327] b) 式(II)的多肽链:

- [0328] $V_{L1}-C_L-Y-V_2$;
- [0329] 其中:
- [0330] V_{H1} 和 CH_1 表示具有SEQ ID NO:82中指定的序列的重链可变结构域和重链恒定结构域;
- [0331] X 表示接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;
- [0332] Y 表示接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;
- [0333] V_1 表示dsscFv,其包含具有SEQ ID NO:96中指定的序列的重链可变结构域和具有SEQ ID NO:95中指定的序列的轻链可变结构域;
- [0334] V_{L1} 和 C_L 表示具有SEQ ID NO:81中指定的序列的轻链可变结构域和轻链恒定结构域;
- [0335] V_2 表示dsscFv,其包含具有SEQ ID NO:114中指定的序列的重链可变结构域和具有SEQ ID NO:113中指定的序列的轻链可变结构域。
- [0336] 在一个方面,提供了多特异性抗体分子,包含或由如下组成:
- [0337] a) 式(I)的多肽链:
- [0338] $V_{H1}-CH_1-X-V_1$; 和
- [0339] b) 式(II)的多肽链:
- [0340] $V_{L1}-C_L-Y-V_2$;
- [0341] 其中:
- [0342] V_{H1} 和 CH_1 表示具有SEQ ID NO:82中指定的序列的重链可变结构域和重链恒定结构域;
- [0343] X 表示接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;
- [0344] Y 表示接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;
- [0345] V_1 表示dsscFv包含,其具有SEQ ID NO:114中指定的序列的重链可变结构域和具有SEQ ID NO:113中指定的序列的轻链可变结构域;
- [0346] V_{L1} 和 C_L 表示具有SEQ ID NO:81中指定的序列的轻链可变结构域和轻链恒定结构域;
- [0347] V_2 表示dsscFv,其包含具有SEQ ID NO:96中指定的序列的重链可变结构域和具有SEQ ID NO:95中指定的序列的轻链可变结构域。
- [0348] 在一个方面,提供了多特异性抗体分子,包含或由如下组成:
- [0349] a) 式(I)的多肽链:
- [0350] $V_{H1}-CH_1-X-V_1$; 和
- [0351] b) 式(II)的多肽链:
- [0352] $V_{L1}-C_L-Y-V_2$;
- [0353] 其中:
- [0354] V_{H1} 和 CH_1 表示具有SEQ ID NO:82中指定的序列的重链可变结构域和重链恒定结构域;
- [0355] X 表示接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;
- [0356] Y 表示接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;
- [0357] V_1 表示dsscFv,其包含SEQ ID NO:101中指定的序列;

- [0358] V_{L1} 和 C_L 表示具有SEQ ID NO:81中指定的序列的轻链可变结构域和轻链恒定结构域;
- [0359] V_2 表示包含SEQ ID NO:119中指定的序列的dsscFv。
- [0360] 在一个方面,提供了多特异性抗体分子,包含或由如下组成:
- [0361] a) 式(I)的多肽链:
- [0362] $V_{H1}-CH_1-X-V_1$;和
- [0363] b) 式(II)的多肽链:
- [0364] $V_{L1}-C_L-Y-V_2$;
- [0365] 其中:
- [0366] V_{H1} 和 CH_1 表示具有SEQ ID NO:82中指定的序列的重链可变结构域和重链恒定结构域;
- [0367] X表示接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;
- [0368] Y表示接头,例如,其具有SEQ ID NO:2中指定的序列;
- [0369] V_1 表示包含SEQ ID NO:119中指定的序列的dsscFv;
- [0370] V_{L1} 和 C_L 表示具有SEQ ID NO:81中指定的序列的轻链可变结构域和轻链恒定结构域;
- [0371] V_2 表示包含SEQ ID NO:101中指定的序列的dsscFv。
- [0372] 本发明提供三特异性抗体分子,其包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域、对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域和对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,其中该抗体分子包含或由如下组成:
- [0373] a) 包含或由如下组成的第一多肽:
- [0374] i. SEQ ID NO:125中指定的序列;
- [0375] ii. 与SEQ ID NO:125中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或
- [0376] iii. 与SEQ ID NO:125中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中该序列包含:3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列;3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:88中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列;和
- [0377] b) 包含或由如下组成的第二多肽:
- [0378] i. SEQ ID NO:131中指定的序列;
- [0379] ii. 与SEQ ID NO:131中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或
- [0380] iii. SEQ ID NO:131中指定的序列具有至少80%与同一性或相似性的序列,其中该序列包含:3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列;3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列。
- [0381] 在一个实施方案中,所述抗体分子包含或由如下组成:具有SEQ ID NO:125中指定

的序列的第一多肽;和具有SEQ ID NO:131中指定的序列的第二多肽。

[0382] 本发明还提供三特异性抗体分子,其包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域、对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的和结合结构域对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,并且该三特异性抗体分子包含或由如下组成:

[0383] a) 第一多肽,包含或由如下组成:

[0384] i. SEQ ID NO:127中指定的序列;

[0385] ii. 与SEQ ID NO:127中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或

[0386] iii. 与SEQ ID NO:127中指定的序列同具有至少80%一性或相似性的序列,其中该序列包含:3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:71中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:72中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:73中对CDRH3指定的序列;3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:85中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:86中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:87中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:88中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:89中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:90中对CDRL3指定的序列;和

[0387] b) 第二多肽,包含或由如下组成:

[0388] i. SEQ ID NO:131中指定的序列;

[0389] ii. 与SEQ ID NO:131中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列;或

[0390] iii. 与SEQ ID NO:131中指定的序列具有至少80%同一性或相似性的序列,其中该序列包含:3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:74中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:75中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:76中对CDRL3指定的序列;3个重链CDR,其具有SEQ ID NO:103中对CDRH1指定的序列、SEQ ID NO:104中对CDRH2指定的序列和SEQ ID NO:105中对CDRH3指定的序列;和3个轻链CDR,其具有SEQ ID NO:106中对CDRL1指定的序列、SEQ ID NO:107中对CDRL2指定的序列和SEQ ID NO:108中对CDRL3指定的序列。

[0391] 在一个实施方案中,所述抗体分子包含具有SEQ ID NO:127中指定的序列的第一多肽和具有SEQ ID NO:131中指定的序列的第二多肽或由它们组成。

[0392] 本发明还提供三特异性抗体分子,其包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域、对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域和对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,并且该抗体分子包含具有SEQ ID NO:121中指定的序列的第一多肽和具有SEQ ID NO:129中指定的序列的第二多肽或由它们组成。

[0393] 本发明还提供三特异性抗体分子,其包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域、对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域和对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,并且该抗体分子包含具有SEQ ID NO:123中指定的序列的第一多肽和具有SEQ ID NO:129中指定的序列的第二多肽或由它们组成。

[0394] 本发明还提供三特异性抗体分子,其包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域、对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域和对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,并且该抗体分子包含具有SEQ ID NO:126中指定的序列的第一多肽和具有SEQ ID NO:132中指定的序列的第二多肽或由它们组成。

[0395] 本发明还提供三特异性抗体分子,其包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域、对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域和对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,并且该抗体分子包含具有SEQ ID NO:144中指定的序列的第一多肽和具有SEQ ID NO:

146中指定的序列的第二多肽或由它们组成。

[0396] 本发明还提供三特异性抗体分子,其包含对人TNF- α 具有特异性的结合结构域、对人IL-17A和人IL-17F具有特异性的结合结构域和对人血清白蛋白具有特异性的结合结构域,并且该抗体分子包含具有SEQ ID NO:143中指定的序列的第一多肽和具有SEQ ID NO:145中指定的序列的第二多肽或由它们组成。

[0397] 在一个实施方案中,根据本发明的三特异性抗体分子包含由选自SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:146或SEQ ID NO:145的多核苷酸序列编码的第一多肽和由选自SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:144或SEQ ID NO:143的多核苷酸序列编码的第二多肽或由它们组成。如上述所定义三特异性抗体分子优选地能够中和人TNF- α 、人IL-17A和人IL-17F的生物活性。

[0398] 本公开还提供与本文公开的序列80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相似的序列。

[0399] 如本文所用的“同一性”表示比对序列中的任意特定位置上的氨基酸残基在所述序列之间是相同的。

[0400] 如本文所用的“相似性”表示在比对序列中的任意特定位置上的氨基酸残基在所述序列之间具有相似的类型。例如,亮氨酸可以取代异亮氨酸或缬氨酸。通常可以彼此取代的另外的氨基酸包括但不限于:

[0401] -苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸(具有芳香侧链的氨基酸);

[0402] -赖氨酸、精氨酸和组氨酸(具有碱性侧链的氨基酸);

[0403] -天冬氨酸和谷氨酸(具有酸性侧链的氨基酸);

[0404] -天冬酰胺和谷氨酰胺(具有酰胺侧链的氨基酸);和

[0405] -半胱氨酸和甲硫氨酸(具有含硫侧链的氨基酸)。

[0406] 可以方便地计算同一性和相似性的程度(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., 和 Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, the BLAST software available from NCBI (Altschul, S.F. 等人, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3: 266-272. Madden, T.L. 等人, 1996, Meth. Enzymol. 266: 131-141; Altschul, S.F. 等人, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7: 649-656)。

[0407] 用于本发明多特异性构建体的抗体可以通过本领域任意适合的已知方法生成。

[0408] 可以得到针对抗原多肽生成的抗体,其中通过使用众所周知和常规的方案对动物、优选非人的动物施用所述多肽对动物免疫接种是必要的,参见例如, Handbook of Experimental Immunology, D.M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986)。可以对许多温血动物进行免疫接种,例如家兔、小鼠、大鼠、绵羊、牛、骆驼或猪。然而,小鼠、家兔、猪和大鼠通常是最适合的。

[0409] 可以通过本领域已知的任意方法制备单克隆抗体,例如杂交瘤技术(Kohler &

Milstein,1975,Nature,256:495-497),三源杂交瘤,人B-细胞杂交瘤技术(Kozbor等人1983,Immunology Today,4:72)和EBV-杂交瘤技术(Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,pp77-96,Alan R Liss,Inc.,1985)。

[0410] 还可以使用单一淋巴细胞抗体方法,通过克隆和表达由为产生特异性抗体选择的单一淋巴细胞生成的免疫球蛋白可变区cDNA生成抗体,例如由Babcook,J.等人1996,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93(15):7843-78481;W092/02551;W02004/051268和W02004/106377所述的方法。

[0411] 还可以使用本领域已知的各种噬菌体展示方法生成用于本公开的抗体,且包括如下文献中公开的那些:Brinkman等人(J.Immunol.Methods,1995,182:41-50),Ames等人(J.Immunol.Methods,1995,184:177-186),Kettleborough等人(Eur.J.Immunol.1994,24:952-958),Persic等人(Gene,1997 187 9-18),Burton等人(Advances in Immunology,1994,57:191-280)和W090/02809;W091/10737;W092/01047;W092/18619;W093/11236;W095/15982;W095/20401;和US 5,698,426;5,223,409;5,403,484;5,580,717;5,427,908;5,750,753;5,821,047;5,571,698;5,427,908;5,516,637;5,780,225;5,658,727;5,733,743;5,969,108,和W020011/30305。

[0412] 在一个实施方案中,根据本公开的多特异性分子是人源化的。

[0413] 如本文所用的人源化(包括CDR-移植抗体)是指具有来自非人物种的一个或多个互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区的分子(参见例如US 5,585,089;W091/09967)。可以理解,唯一有必要的是转移CDR的特异性决定残基而不是完整CDR(参见例如Kashmiri等人,2005,Methods,36,25-34)。人源化抗体可以任选地还包含衍生自衍生CDR的非人物种的一个或多个框架残基。

[0414] 如本文所用,术语“人源化抗体分子”是指这样的抗体分子,其中重链和/或轻链含有来自移植入受体抗体(例如人抗体)的重链和/或轻链可变区框架的供体抗体(例如鼠单克隆抗体)的一个或多个CDR(如果期望,包括一个或多个修饰的CDR)。有关综述,参见Vaughan等人,Nature Biotechnology,16,535-539,1998。在一个实施方案中,并非转移完整的CDR,而仅是将来自本文所述CDR的任意一种的特异性决定残基的一个或多个转移至人抗体框架(参见例如Kashmiri等人,2005,Methods,36,25-34)。在一个实施方案中,仅将来自上文所述CDR的一个或多个的特异性决定残基转移至人抗体框架。在另一个实施方案中,仅将来自上文所述CDR各自的特异性决定残基转移至人抗体框架。

[0415] 当移植CDR或特异性决定残基时,在衍生CDR的供体抗体类别/类型方面,可以使用任意适合的受体可变区框架,包括小鼠、灵长类和人框架区,以及本文提供的CDR的一个或多个。合适地,根据本发明的人源化抗体具有包含人受体框架区以及本文提供的一个或多个CDR的可变结构域。

[0416] 可以用于本公开的人框架的实例是KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY和POM(Kabat等人,同上)。例如,KOL和NEWM可以用于重链,REI可以用于轻链,且EU、LAY和POM可以用于重链和轻链。或者,可以使用人种系序列;可在:<http://www.imgt.org/>或<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/list2.php>获得这些序列。

[0417] 在本公开的人源化抗体分子中,受体重链和轻链不一定衍生自同一抗体,且如果期望,可以包含具有衍生自不同链的框架区的复合链。

[0418] 框架区不一定具有与受体抗体的那些确切相同的序列。例如,可以将不常用的残基改变成对于该受体链类别或类型更频繁出现的残基。或者,可以改变受体框架区中选择的残基,使得它们相当于在供体抗体中相同位置上发现的残基(参见Reichmann等人1998, Nature, 332, 323-324)。这类改变应当保持至恢复供体抗体亲和力所必需的最低程度。用于选择必需改变的受体框架区中的残基的方案在W091/09967中举出。

[0419] 框架的衍生物可以具有被可选的氨基酸例如被供体残基替代的1、2、3或4个氨基酸。

[0420] 供体残基是来自供体抗体的残基,即最初从其衍生CDR的抗体。供体残基可以被衍生自人受体框架的适合的残基(受体残基)替代。

[0421] 在一个实施方案中,本公开的多特异性抗体是全人的,特别地,可变结构域的一个或多个是全人的。

[0422] 全人分子是这样的分子,其中重链和轻链的可变区和恒定区(如果存在)均衍生自人或基本上与人来源的序列相同,不一定来自相同抗体。全人抗体的实例可以包括,例如通过上述噬菌体展示方法产生的抗体和由小鼠产生的抗体,其中鼠免疫球蛋白可变区和任选的恒定区基因已经被其人对应物替代,例如通常在EP0546073、US5,545,806、US5,569,825、US5,625,126、US5,633,425、US5,661,016、US5,770,429、EP 0438474和EP0463151中所述。

[0423] 在一个实施方案中,可以加工本公开的多特异性抗体分子,以便提供针对靶抗原的改善的亲和力。这类变体可以通过许多亲和力成熟方案得到,包括突变CDR(Yang等人 J.Mol.Biol., 254, 392-403, 1995),链改组(Marks等人, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992),应用大肠杆菌(E.coli)的突变株(Low等人, J.Mol.Biol., 250, 359-368, 1996),DNA改组(Patten等人, Curr.Opin.Biotechnol., 8, 724-733, 1997),噬菌体展示(Thompson等人, J.Mol.Biol., 256, 77-88, 1996)和有性PCR(Crameri等人 Nature, 391, 288-291, 1998)。Vaughan等人(同上)讨论了这些亲和力成熟方法。

[0424] 在本文的上下文中使用的改善的亲和力是指超过起始分子的改善。

[0425] 如果期望,则用于本公开的多特异性抗体构建体可以缀合至一个或多个效应分子。可以理解,效应分子可以包含单一效应分子或如此连接以形成可以连接至本发明抗体的单一部分的一个或多个这类分子。如果期望得到连接至效应分子的抗体片段,则可以通过标准化学或重组DNA方法进行制备,其中抗体片段直接或通过偶联剂连接至效应分子。用于将这类效应分子缀合至抗体的技术是本领域众所周知的(参见, Hellstrom等人 Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson等人编辑, 1987, pp.623-53; Thorpe等人 1982, Immunol.Rev., 62:119-58和Dubowchik等人 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123)。特定的化学方法包括,例如W093/06231、W092/22583、W089/00195、W089/01476和W003031581中公开的那些。或者,如果分子是蛋白质或多肽,则可以使用重组DNA方法实现连接,例如,如W086/01533和EP0392745中所述。

[0426] 在本文中所使用的术语“效应分子”包括例如在生物学上有活性的蛋白质,例如酶、其它抗体或抗体片段,合成的或天然存在的聚合物,核酸及其片段,例如DNA、RNA及其片段,放射性核素,特别是放射性碘化物,放射性同位素,经螯合的金属,纳米颗粒和报道基团,例如荧光化合物或可以通过NMR或ESR光谱法来检测的化合物。

[0427] 其它效应分子可以包括经螯合的放射性核素例如¹¹¹In和⁹⁰Y、Lu¹⁷⁷、铋²¹³、铜

252、铟192和钨188/铼188;或药物,例如但不限于,烷基磷酸胆碱、拓扑异构酶I抑制剂、紫杉烷类和苏拉明。

[0428] 其它效应分子包括蛋白质、肽和酶。目的酶包括但不限于蛋白质水解酶、水解酶、裂合酶、异构酶、转移酶。目的蛋白质、多肽和肽包括但不限于免疫球蛋白,毒素例如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌外毒素或白喉毒素,蛋白质例如胰岛素、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子或组织纤溶酶原激活物,血栓形成剂或抗血管发生剂,例如血管抑素或内皮抑制素,或者生物应答调节物例如淋巴因子、白介素-1 (IL-1)、白介素-2 (IL-2)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、神经生长因子 (NGF) 或其它生长因子和免疫球蛋白。

[0429] 其它效应分子可以包括例如在诊断中有用的可检测物质。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性核素、发射正电子的金属(用于正电子发射断层成像术)和非放射性顺磁性金属离子。关于可以与用于用作诊断剂的抗体相缀合的金属离子,通常参见US4,741,900。适合的酶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;适合的辅基包括链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白和生物素;适合的荧光材料包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯和藻红蛋白;适合的发光材料包括鲁米诺;适合的生物发光材料包括萤光素酶、萤光素和水母蛋白;和适合的放射性核素包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 和 ^{99}Tc 。

[0430] 在另一个实施方案中,所述效应分子可以增加所述抗体的体内半衰期和/或降低所述抗体的免疫原性和/或增强抗体穿越上皮屏障向免疫系统的递送。该类型的适合的效应分子的实例包括聚合物、白蛋白、白蛋白结合蛋白或白蛋白结合化合物,例如在W005/117984中所描述的那些。

[0431] 在所述效应分子为聚合物时,它通常可以为合成的或天然存在的聚合物,例如任选地经取代的直链或支链聚亚烷基、聚亚烯基或聚氧亚烷基聚合物,或者支化或非支化的多糖,例如同多糖或异多糖。

[0432] 可以存在于上述举出的合成聚合物上的具体任选的取代基包括一个或多个羟基、甲基或甲氧基。

[0433] 合成聚合物的具体实例包括任选取代的直链或支链聚(乙二醇)、聚(丙二醇)、聚(乙烯醇)或其衍生物,尤其是任选取代的聚(乙二醇),例如甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物。

[0434] 具体的天然存在的聚合物包括乳糖、直链淀粉、葡聚糖、糖原或其衍生物。

[0435] 在本文中所使用的“衍生物”意欲包括反应性衍生物,例如巯基选择性的反应性基团例如马来酰亚胺等。所述反应性基团可以直接地或通过接头段连接至聚合物。可以理解,此类基团的残基在某些情况下将会作为抗体片段和聚合物之间的连接基团而形成产物的一部分。

[0436] 聚合物的大小可以按所希望的进行变化,但通常将会在500Da至50000Da,例如5000至40000Da,例如20000至40000Da的平均分子量范围内。特别地,基于所述产物的所想要的用途,例如定位至某些组织例如肿瘤的能力或延长循环半衰期的能力,来选择聚合物大小(综述可参见Chapman,2002,Advanced Drug Delivery Reviews,54,531-545)。因此,例如,在想要产物离开循环并穿透入组织(例如用于在肿瘤治疗中使用)时,那么使用小分子量聚合物(例如具有大约5000Da的分子量)可以是有利的。对于其中产物保留在循环中的

应用,使用较高分子量聚合物(例如具有在20000Da至40000Da范围内的分子量)可以是有利的。

[0437] 适合的聚合物包括聚亚烷基聚合物,例如聚(乙二醇)或尤其是甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物,并且尤其具有在大约15000Da至大约40000Da范围内的分子量。

[0438] 在一个实施方案中,将用于在本公开中使用的抗体连接至聚乙二醇(PEG)部分。在一个具体实例中,可以通过任何位于抗体片段中的可用的氨基酸侧链或末端氨基酸官能团(例如任何游离的氨基、亚氨基、巯基、羟基或羧基基团)来连接PEG分子。此类氨基酸可以天然地存在于抗体片段中,或者可以通过使用重组DNA方法来改造入片段中(参见例如,US5,219,996;US 5,667,425;W098/25971;W02008/038024)。在一个实施方案中,本发明的抗体分子为经修饰的Fab片段,其中所述修饰为向其重链的C-末端添加一个或多个氨基酸以允许连接效应分子。适合地,额外的氨基酸形成修饰的铰链区,其包含一个或多个可以连接效应分子的半胱氨酸残基。可以使用多个位点来连接两个或更多个PEG分子。

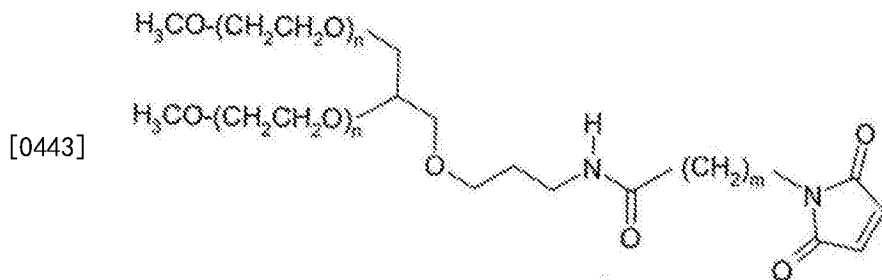
[0439] 适合地,通过位于抗体片段中的至少一个半胱氨酸残基的巯基来共价连接PEG分子。每个连接至经修饰的抗体片段的聚合物分子可以共价连接至位于该片段中的半胱氨酸残基的硫原子。所述共价连接通常将会是二硫键,或特别地硫-碳键。在使用巯基作为经适当地活化的效应分子的连接点时,可以使用例如巯基选择性的衍生物例如马来酰亚胺和半胱氨酸衍生物。在上面所描述的经聚合物修饰的抗体片段的制备中,可以使用经活化的聚合物作为起始材料。经活化的聚合物可以为任何包含巯基反应性基团的聚合物,例如 α -卤代羧酸或 α -卤代羧酸酯,例如碘乙酰胺,亚胺,例如马来酰亚胺,乙烯基砷,或二硫化物。此类起始材料可以商购获得(例如从Nektar(以前的Shearwater Polymers Inc.), Huntsville,AL,USA)或者可以通过使用常规化学程序从商购可得的起始材料来制备。特别的PEG分子包括20K甲氧基-PEG-胺(可获得自Nektar(以前的Shearwater);Rapp Polymere;和SunBio)和M-PEG-SPA(可获得自Nektar(以前的Shearwater))。

[0440] 在一个实施方案中,例如,根据EP 0948544或EP1090037中公开的方法使分子中的F(ab')₂、Fab或Fab'聚乙二醇化,即具有与之连接的PEG(聚(乙二醇)) [还参见"Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris和S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC和"Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam和A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]。在一个实施方案中,PEG连接至铰链区中的半胱氨酸。在一个实例中,PEG修饰的Fab片段具有共价连接至修饰的铰链区中的单一巯基的马来酰亚胺基。赖氨酸残基可以共价连接至马来酰亚胺基,且赖氨酸残基上的胺基各自可以连接具约20,000Da分子量的甲氧基聚(乙二醇)聚合物。连接至Fab片段的PEG的总分子量由此可以约为40,000Da。

[0441] 特定的PEG分子包括N,N'-双(甲氧基聚(乙二醇) MW 20,000)修饰的赖氨酸的2-[3-(N-马来酰亚氨基)丙酰氨基]乙基酰胺,也称作PEG2MAL40K(得自Nektar(以前的Shearwater))。

[0442] PEG连接基的可选来源包括提供GL2-400MA2(其中如下结构中的m为5)和GL2-

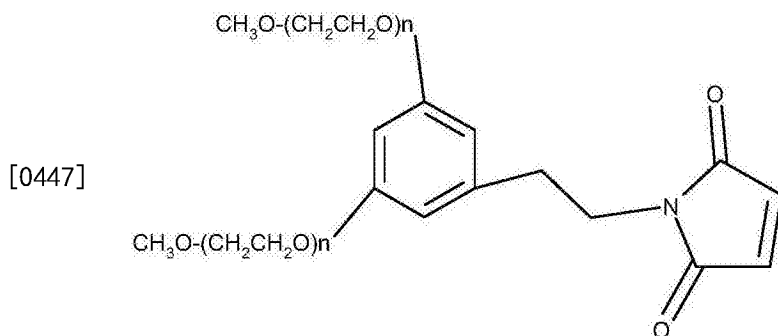
400MA (其中m为2) 且n约为450的NOF:



[0444] m为2或5

[0445] 换言之,PEG各自约为20,000Da。

[0446] 如下类型的另外可选的PEG效应分子:



[0448] 可获得自Dr Reddy、NOF和Jenkem。

[0449] 在一个实施方案中,提供了这样的抗体分子,其被聚乙二醇化(例如,用本文所述的PEG),通过在或约链上226位氨基酸上的半胱氨酸氨基酸残基例如重链226位氨基酸连接(通过顺序编号)。

[0450] 在一个实施方案中,提供了编码本公开分子的多核苷酸序列,例如DNA序列。

[0451] 在一个实施方案中,提供了编码本公开分子的一个或多个例如两个或更多个或三个或更多个多肽成分的多核苷酸序列,例如:

[0452] a) 式(I)的多肽链:

[0453] $V_{HI}-CH_1-X-V_1$; 和

[0454] b) 式(II)的多肽链:

[0455] $V_{LI}-C_L-Y-V_2$;

[0456] 其中:

[0457] V_{HI} 表示重链可变结构域;

[0458] CH_1 表示重链恒定区结构域,例如,其结构域1;

[0459] X表示键或接头;

[0460] Y表示键或接头;

[0461] V_1 表示dsFv、sdAb、scFv或dsFcFv;

[0462] V_{LI} 表示轻链可变结构域;

[0463] C_L 表示来自轻链恒定区的结构域,例如 C_{κ} ;

[0464] V_2 表示dsFv、sdAb、scFv或dsFcFv。

[0465] 在一个实施方案中,所述多核苷酸、例如DNA包含的载体中。

[0466] 本领域技术人员可以理解,当 V_1 和/或 V_2 表示dsFv时,多特异性抗体包含第三多肽,

其编码不连接至X或Y的相应游离V_H或V_L结构域。因此,本发明的多特异性蛋白质可以由一个或多个、两个或更多个或三个或更多个多核苷酸编码,并且它们可以被并入一种或多种载体。

[0467] 可以构建载体的一般方法、转染方法和培养方法是本领域技术人员众所周知的。在该方面,参考“Current Protocols in Molecular Biology”,1999,F.M.Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York和由Cold Spring Harbor Publishing产生的Maniatis Manual。

[0468] 还提供了包含一种或多种克隆或表达载体的宿主细胞,所述载体包含编码本发明多特异性蛋白质的一个或多个DNA序列。任意适合的宿主细胞/载体系统可以用于表达编码本发明抗体分子的DNA序列。可以使用细菌,例如大肠杆菌和其它微生物系统,或还可以使用真核生物(例如,哺乳动物)宿主细胞表达系统。适合的哺乳动物宿主细胞包括CHO、骨髓瘤、NS0骨髓瘤细胞和SP2细胞、COS细胞或杂交瘤细胞。

[0469] 本公开还提供用于生产本公开多特异性蛋白质的方法,包括在适合于导致表达来自编码本发明多特异性蛋白质的DNA的蛋白质的条件下培养含有本发明载体的宿主细胞,并且分离所述多特异性蛋白质。

[0470] 为了生产包含重链和轻链的产物,可以用两种载体转染细胞系,第一载体编码轻链多肽,且第二载体编码重链多肽。或者,可以使用单一载体,该载体包括编码轻链和重链的序列。在一个实例中,可以用两种载体转染细胞系,所述载体各自编码本发明抗体分子的多肽链。如果V₁和/或V₂是dsFv,则用三种载体转染细胞系,所述载体各自编码本发明多特异性蛋白质的多肽链。

[0471] 在一个实施方案中,用两种载体转染细胞系,每一种编码选自如下的不同多肽:

[0472] a) 式(I)的多肽链:

[0473] V_{H1}-CH₁-X-V₁;

[0474] b) 式(II)的多肽链:

[0475] V_{L1}-CL-Y-V₂;

[0476] 其中:

[0477] V_{H1}表示重链可变结构域;

[0478] CH₁表示重链恒定区结构域,例如,其结构域1;

[0479] X表示键或接头;

[0480] Y表示键或接头;

[0481] V₁表示dsFv、sdAb、scFv或dsScFv;

[0482] V_{L1}表示轻链可变结构域;

[0483] CL表示来自轻链恒定区的结构域,例如Cκ;

[0484] V₂表示dsFv、sdAb、scFv或dsScFv。

[0485] 在一个实施方案中,当V₁是dsFv且V₁的V_H结构域连接至X时,可以用编码V₁的V_L结构域的第三载体转染细胞系。

[0486] 在一个实施方案中,当V₁是dsFv且V₁的V_L结构域连接至X时,可以用编码V₁的V_H结构域的第三载体转染细胞系。

[0487] 在一个实施方案中,当V₂是dsFv且V₂的V_H结构域连接至Y时,可以用编码V₂的V_L结构

域的第三载体转染细胞系。

[0488] 在一个实施方案中,当V₂是dsFv且V₂的V_L结构域连接至Y时,可以用编码V₂的V_H结构域的第三载体转染细胞系。

[0489] 在一个实施方案中,当V₁和V₂均为dsFv,且V₂的V_L结构域连接至Y,且V₁的V_L结构域连接至X时,可以用编码V₁和V₂的共同的V_H结构域的第三载体转染细胞系。

[0490] 在一个实施方案中,当V₁和V₂均为dsFv,且V₂的V_H结构域连接至Y,且V₁的V_H结构域连接至X时,可以用编码V₁和V₂的共同的V_L结构域的第三载体转染细胞系。

[0491] 可以理解,可以改变转染入宿主细胞的每种载体的比例,以便优化表达多特异性抗体产物。在一个实施方案中,如果使用两种载体,则载体之比可以为1:1。在一个实施方案中,如果使用三种载体,则载体之比可以为1:1:1。可以理解,本领域技术人员能够通过转染后通过常规测试蛋白质表达水平找到最佳比例。或者或此外,可以通过相同或不同启动子控制来自每种载体的多特异性构建体的每条多肽链的表达水平。

[0492] 可以理解,多肽成分中的两种或更多种或如果存在、三种成分可以由单一载体中的多核苷酸编码。还可以理解,如果多肽成分中的两种或更多种、特别是三种或更多种成分由单一载体中的多核苷酸编码,则可以通过使用针对编码本公开多肽成分的每种多核苷酸的不同启动子改变每种多肽成分的相对表达。

[0493] 在一个实施方案中,载体包含在单一启动子控制下编码两种或如果存在三种本发明多特异性抗体分子的多肽链的单一多核苷酸序列。

[0494] 在一个实施方案中,载体包含编码两种或如果存在三种本公开的多特异性抗体分子的多肽链的单一多核苷酸序列,其中编码每种多肽链的每种多核苷酸序列在不同启动子控制下。

[0495] 本公开的多特异性蛋白质从宿主细胞以良好水平被表达。因此,抗体和/或片段的特性显然被优化并且有助于商业化加工。

[0496] 有利地,本公开的多特异性抗体分子将纯化后观察到的聚集量减少到最低限度,并且在药物浓度上使构建体制剂中单体的量最大化,例如,单体可以作为总蛋白质的50%、60%、70%或75%或以上,例如80或90%或以上,例如91、92、93、94、95、96、97、98或99%或以上存在。在一个实例中,本公开的多特异性抗体分子的纯化样品在4℃下储存28天后保留98%或99%以上的单体。在一个实例中,溶于磷酸缓冲盐水(PBS)中的5mg/ml的本公开的多特异性抗体分子的纯化样品在4℃下储存28天后保留98%以上的单体。

[0497] 本公开的抗体分子和包含它们的组合物用于治疗,例如,用于治疗和/或预防病理病况。

[0498] 本公开还提供药物或诊断组合物,其包含本公开的抗体分子与药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体中的一种或多种的组合。因此,提供了本公开的抗体在治疗特别是用于本文公开的适应症中和在制备特别是用于本文公开的适应症的药物中的用途。

[0499] 该组合物通常作为通常包括药学上可接受的载体的无菌药物组合物的一部分提供。本公开的药物组合物还可以包含药学上可接受的佐剂。

[0500] 本公开还提供用于制备药物或诊断组合物的方法,包括添加和混合本公开的抗体分子与药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体中的一种或多种。

[0501] 抗体分子可以是药物或诊断组合物中唯一的活性成分,或可以伴随其它活性成

分,包括其它抗体成分,例如,抗-IL-1 β 、抗-T细胞、抗-IFN γ 或抗-LPS抗体或非抗体成分,例如黄嘌呤。其它适合的活性成分包括那个诱导耐受性的抗体,例如抗-CD3或抗-CD4抗体。

[0502] 在另一个实施方案中,本公开的抗体、片段或组合物与另一种药物活性剂联用。

[0503] 药物组合物适当地包含治疗有效量的本发明的抗体分子。如本文所用,术语“治疗有效量”是指治疗、改善或预防靶向的疾病或病况或展示出可检测到的治疗或预防作用所需的治疗剂的量。对于任意的抗体,最初可以在细胞培养测定或动物模型、通常为啮齿类、家兔、狗、猪或灵长类中评估治疗有效量。动物模型也可以用于确定适合的浓度范围和施用途径。这类信息然后可以用于确定用于人中施用的有用的剂量和途径。

[0504] 用于人受试者的精确治疗有效量取决于疾病状态的严重程度、受试者的一般健康状况、受试者年龄、体重和性别、膳食、施用时间和频率、药物组合、反应敏感性和对疗法的耐受性/响应。该量可以通过常规实验测定,并且在临床医生的判断范围内。通常,治疗有效量为0.01mg/kg至50mg/kg,例如,0.1mg/kg至20mg/kg。或者,该剂量可以为1至500mg/天,例如10至100、200、300或400mg/天。药物组合物可以便利地以含有预定量本发明活性剂的单位剂型呈现。

[0505] 可以将组合物单独施用于患者或以与另外的药剂、药物或激素组合的方式施用(例如同时、依次或分开)。

[0506] 施用本公开抗体分子时的剂量取决于待治疗病况的性质、存在的炎症程度和抗体分子是以预防方式使用还是以治疗现存病况的形式使用。

[0507] 给药频率取决于抗体分子的半衰期及其作用持续时间。如果抗体分子具有短半衰期(例如2至10小时),则有必要给予每天一次或多次剂量。或者,如果抗体分子具有长半衰期(例如2至15天),则仅有必要给予每天1次、每周1次乃至每1或2个月1次的剂量。

[0508] 药学上可接受的载体自身不应当诱导产生对接受组合物的个体有害的抗体,并且不应当是毒性的。适合的载体可以为大的缓慢代谢的大分子,例如蛋白质、多肽、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和无活性的病毒颗粒。

[0509] 可以使用药学上可接受的盐,例如,无机酸盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和硫酸盐,或有机酸盐,例如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐和苯酸盐。

[0510] 治疗组合物中药学上可接受的载体还可以含有液体,例如水、盐水、甘油和乙醇。另外,辅助物质例如湿润剂或乳化剂或pH缓冲物质可以存在于这类组合物中。这类载体使得能够将药物组合物配制成片剂、丸剂、锭剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆剂和混悬剂,用于患者摄取。

[0511] 用于施用的适合的形式包括适合于胃肠外施用的形式,例如通过注射或输注,例如,通过快速团注或连续输注。如果产物用于注射或输注,则可以采取在油或水性媒介物中的混悬剂、溶液或乳剂的形式,并且可以包含配制剂,例如助悬剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。或者,抗体分子可以为干燥形式,用于在使用前用适合的无菌液体重构。

[0512] 一旦配制,则可以将本发明的组合物直接施用于受试者。待治疗的受试者可以是动物。然而,在一个或多个实施方案中,组合物适合于对人受试者施用。

[0513] 在一个实施方案中,在本公开的制剂中,最终制剂的pH并不类似于抗体或片段的等电点值,因为如果制剂的pH为7,则pI为8-9或以上可能是适合的。尽管不希望受到理论约束,但是认为这最终可以提供具有改善的稳定性的最终制剂,例如抗体或片段保留在溶液

中。

[0514] 本公开的药物组合物可以通过许多途径施用,包括但不限于口服,静脉内,肌内,动脉内,髓内,鞘内,心室内,透皮,经皮(例如,参见W098/20734),皮下,腹膜内,鼻内,肠内,局部,舌下,阴道内或直肠途径。皮下注射器也可用于施用本发明的药物组合物。典型地,可以将治疗组合物制备成注射剂,可以是液体溶液或混悬剂。也可以制备用于在注射之前溶解或悬浮于液体媒介物中的固体形式。优选地,本发明的抗体分子通过皮下、吸入或局部施用。

[0515] 组合物的直接递送通常通过注射、皮下、腹膜内、静脉内或肌内进行或递送至组织的组织间隙。还可以将组合物施用到目标特定组织中。剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。

[0516] 应当理解,组合物中的活性成分将是抗体分子。照此,它倾向于在胃肠道中降解。因此,如果通过使用胃肠道的途径施用组合物,则组合物将需要含有保护抗体免于降解但在抗体从胃肠道吸收后释放抗体的药剂。

[0517] 药学上可接受的载体的详细讨论可获得自Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991)。

[0518] 在一个实施方案中,将制剂提供为用于局部施用包括吸入的制剂。

[0519] 适合的可吸入制剂包括可吸入粉末,含有推进剂气体的计量气雾剂或不含推进剂气体的可吸入溶液(例如可雾化溶液或悬浮剂)。含有活性物质的本公开的可吸入粉末可以仅由上述活性物质或上述活性物质与生理学上可接受的赋形剂的混合物组成。

[0520] 这些可吸入粉末可包括单糖(例如葡萄糖或阿拉伯糖),二糖(例如乳糖,蔗糖,麦芽糖),寡糖和多糖(例如葡聚糖),多元醇(例如山梨醇,甘露醇,木糖醇),盐(例如氯化钠,碳酸钙)或这些彼此的混合物。适合使用单糖或二糖,使用乳糖或葡萄糖,特别是但不限于其水合物形式。

[0521] 用于沉积在肺中的颗粒需要小于10微米粒径,例如1-9微米,例如,0.1至5 μm ,特别是1至5 μm 。活性剂(例如抗体或抗体片段)的粒径非常重要。

[0522] 可用于制备可吸入气雾剂的推进剂气体在本领域中是已知的。适合的推进剂气体选自烃类,例如正丙烷,正丁烷或异丁烷和卤代烃,例如甲烷,乙烷,丙烷,丁烷,环丙烷或环丁烷的氯化物和/或氟化衍生物。上述推进剂气体可以单独使用或以其混合物使用。

[0523] 特别适合的推进剂气体是卤代烷衍生物,其选自TG 11、TG 12、TG 134a和TG227。在上述举出的卤代烃中,TG134a(1,1,1,2-四氟乙烷)和TG227(1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷)及其混合物是特别适合的。

[0524] 包含推进剂气体的可吸入气雾剂还可以包含另外的成分,例如共溶剂、稳定剂、表面活性剂(表面活性剂)、抗氧化剂、润滑剂,以及用于调整pH的工具。全部这些成分均是本领域已知的。

[0525] 本发明的包含推进剂气体的可吸入气雾剂可以含有至多5%重量的活性物质。本发明的气雾剂含有例如0.002至5%重量,0.01至3%重量,0.015至2%重量,0.1至2%重量,0.5至2%重量或0.5至1%重量的活性物质。

[0526] 或者,还可以通过施用液体溶液或混悬剂制剂进行局部施用,例如,使用装置,例如喷雾器,例如连接至压缩器的喷雾器(例如由Pari Respiratory Equipment, Inc.,

Richmond, Va. 制造的连接至Pari Master (R) 压缩器的Pari LC-Jet Plus (R))。

[0527] 在一个实施方案中,将制剂提供为包含通过雾化递送的单位剂量的分散安瓿。

[0528] 在一个实施方案中,将抗体提供为冻干形式,用于重构,或者,作为混悬剂制剂。

[0529] 可以将本公开的抗体以分散于溶剂中的形式递送,例如溶液或混悬剂形式。可以将其混悬于适合的生理溶液中,例如生理盐水、药理学上可接受的溶剂或缓冲溶液。本领域已知的缓冲溶液可以包含0.05mg至0.15mg依地酸二钠、8.0mg至9.0mg NaCl、0.15mg至0.25mg聚山梨醇酯、0.25mg至0.30mg无水柠檬酸和0.45mg至0.55mg柠檬酸钠/1ml水,以便实现pH约为4.0至5.0。如上所述,例如,可以由冻干抗体制备混悬剂。

[0530] 治疗性混悬剂或溶液制剂还可含有一种或多种赋形剂。赋形剂在本领域中是众所周知的并且包括缓冲剂(例如柠檬酸盐缓冲剂,磷酸盐缓冲剂,乙酸盐缓冲剂和碳酸氢盐缓冲剂),氨基酸,脲,醇,抗坏血酸,磷脂,蛋白质(例如血清白蛋白),EDTA,氯化钠,脂质体,甘露醇,山梨醇和甘油。溶液或混悬剂可以被包封在脂质体或可生物降解的微球中。制剂通常使用无菌制造方法以基本上无菌的形式提供。

[0531] 这可以包括通过过滤用于制剂的缓冲溶剂溶液,抗体在无菌缓冲溶剂溶液中的无菌悬浮,以及通过本领域普通技术人员熟悉的方法将制剂分配到无菌容器中的生产和灭菌。

[0532] 本公开的可雾化制剂可以例如作为包装在箔包封物中的单剂量单位(例如密封的塑料容器或小瓶)提供。每个小瓶含有按体积计例如2ml溶剂/溶液缓冲液的单位剂量。

[0533] 据认为本公开的抗体适合于通过雾化递送。

[0534] 可以预期,本发明的抗体通过使用基因疗法施用。为了实现这一目的,将在适合的DNA成分控制下的编码抗体分子重链和轻链的DNA序列导入患者,使得抗体链由DNA序列表达并且在原位组装。

[0535] 本发明还提供如上述所定义的用于疗法的多特异性抗体分子。

[0536] 本发明还提供如上述所定义的用于控制炎性疾病的多特异性抗体分子。优选地,所述多特异性抗体分子可以用于缩短炎症性过程或预防炎症性过程。

[0537] 本发明还提供用于治疗或预防病理性病症的本发明的多特异性抗体分子,该病理性病症由TNF- α 和IL-17A和/或IL-17F介导或与TNF- α 和IL-17A和/或IL-17F水平增加相关。优选地,上述病理性病症选自感染(病毒、细菌、真菌和寄生虫),与感染相关的内毒素性休克,关节炎,类风湿性关节炎,银屑病关节炎,全身性发作性幼年特发性关节炎(JIA),系统性红斑狼疮(SLE),哮喘,慢性阻塞性气道疾病(COAD),慢性阻塞性肺病(COPD),急性肺损伤,盆腔炎,阿尔茨海默病,克罗恩病,炎症性肠病,肠易激综合征,溃疡性结肠炎,Castleman病,强直性脊柱炎及其它脊柱关节病,皮炎,心肌炎,葡萄膜炎,眼球突出,自身免疫性甲状腺炎,Peyronie病,乳糜泻,胆囊疾病,藏毛病,腹膜炎,银屑病,特应性皮炎,血管炎,手术粘连,中风,自身免疫性糖尿病,I型糖尿病,莱姆关节炎,脑膜脑炎,免疫介导的中枢和周围神经系统炎症性疾病例如多发性硬化和吉兰-巴雷综合征,其它自身免疫性疾病,胰腺炎,创伤(手术),移植物抗宿主病,移植排斥,纤维化疾病,包括肺纤维化,肝纤维化,肾纤维化,硬皮病或系统性硬化症,癌症(实体瘤如黑色素瘤,肝母细胞瘤,肉瘤,鳞状细胞癌,移行细胞癌,卵巢癌和血液系统恶性肿瘤,尤其是急性髓细胞性白血病,慢性髓细胞性白血病,慢性淋巴细胞白血病,胃癌和结肠癌),心脏病包括缺血性疾病,如心肌梗塞以及

动脉粥样硬化,血管内凝血,骨吸收,骨质疏松症,牙周炎和胃酸过少。

[0538] 在一个实施方案中,本发明的抗体用于治疗或预防病理性病症,其选自关节炎,类风湿性关节炎,银屑病,银屑病关节炎,全身性发作性幼年特发性关节炎(JIA),系统性红斑狼疮(SLE),哮喘,慢性阻塞性气道疾病,慢性阻塞性肺病,特应性皮炎,硬皮病,系统性硬化症,肺纤维化,炎症性肠病,强直性脊柱炎和其它脊柱关节病和癌症。

[0539] 在一个实施方案中,本发明的抗体用于治疗或预防病理性病症,其选自关节炎,类风湿性关节炎,银屑病,银屑病关节炎,全身性发作性幼年特发性关节炎(JIA),系统性红斑狼疮(SLE),哮喘,慢性阻塞性气道疾病,慢性阻塞性肺病,特应性皮炎,硬皮病,系统性硬化症,肺纤维化,克罗恩病,溃疡性结肠炎,强直性脊柱炎和其它脊柱关节病和癌症。

[0540] 在一个实施方案中,本发明的抗体用于治疗或预防病理性病症,其选自关节炎,类风湿性关节炎,银屑病,银屑病关节炎,全身性发作性幼年特发性关节炎(JIA),系统性红斑狼疮(SLE),哮喘,慢性阻塞性气道疾病,慢性阻塞性肺病,特应性皮炎,硬皮病,系统性硬化症,肺纤维化,克罗恩病,溃疡性结肠炎,强直性脊柱炎和其它脊柱关节病。

[0541] 在一个实施方案中,本发明的抗体用于治疗或预防病理性病症,其选自关节炎,银屑病关节炎,全身性发作性幼年特发性关节炎(JIA),克罗恩病,炎症性肠病,溃疡性结肠炎,强直性脊柱炎和其它脊柱关节病,银屑病,化脓性汗腺炎,白塞病,类风湿性关节炎,系统性红斑狼疮(SLE),哮喘,心肌炎,葡萄膜炎,特应性皮炎,血管炎,免疫介导的中枢和周围神经系统炎症性疾病例如多发性硬化和吉兰-巴雷综合征,其它自身免疫性疾病,骨质疏松症,骨吸收,痛风,结节病,干燥综合征和坏疽性脓皮病。

[0542] 在一个实施方案中,所述病理性病症是类风湿性关节炎。

[0543] 在一个实施方案中,所述病理性病症是克罗恩病。

[0544] 在一个实施方案中,所述病理性病症是溃疡性结肠炎。

[0545] 在一个实施方案中,所述病理性病症是葡萄膜炎。

[0546] 在一个实例中,本发明的抗体用于治疗炎性或免疫相关疾病。在一个实例中,所述炎性或免疫相关疾病选自类风湿性关节炎、克罗恩病和溃疡性结肠炎。

[0547] 本发明还提供用于治疗或预防疼痛、特别是与炎症相关的疼痛的本发明的抗体。

[0548] 本发明进一步提供了本发明的抗体分子在制备用于治疗或预防由TNF- α 和IL-17A和/或IL-17F介导或与IL-17A和/或IL-17F水平增加相关的病理性病症的药物中的用途。优选地,所述病理性病症是上文所述的医学适应症之一。本发明进一步提供了本发明的抗体分子在制备用于治疗或预防疼痛、特别是与炎症相关的疼痛的药物中的用途。

[0549] 本发明的抗体分子可用于任何疗法中,其中期望降低人体或动物体内TNF- α 和IL-17A和/或IL-17F的作用。TNF- α 和IL-17A和/或IL-17F可以在体内循环,或者可以以位于体内的特定部位、例如炎症部位的不期望的高水平存在。

[0550] 本发明的抗体分子优选地用于控制炎症性疾病、自身免疫疾病或癌症。

[0551] 本发明还提供治疗人或动物受试者的方法,所述人或动物患有由TNF- α 和IL-17A和/或IL-17F介导的病症或处于该病症的风险中,该方法包括向所述受试者施用有效量的本发明的抗体分子。

[0552] 本发明的抗体分子还可以用于诊断,例如在体内诊断和对牵涉TNF- α 和IL-17A和/或IL-17F的疾病状态的成像中。

[0553] 因此,提供了本公开的多特异性抗体,其用于治疗和使用它们治疗的方法中。

[0554] 在一个实施方案中,提供了用于纯化多特异性抗体(特别是本发明的抗体或片段)的方法。

[0555] 在一个实施方案中,提供了用于纯化多特异性抗体(特别是本发明的抗体或片段)的方法,包括下列步骤:以非结合模式进行阴离子交换色谱,使得杂质保留在柱上,且将抗体维持在未结合的级分中。例如,该步骤可以在pH约为6-8下进行。

[0556] 该方法还可以包含最初的捕获步骤,其使用例如在pH约为4-5下进行的阳离子交换色谱。

[0557] 该方法还可以由额外的色谱步骤组成,以确保将产物和方法相关杂质从产物流中适当拆分。

[0558] 纯化方法还可以由一个或多个超滤步骤组成,例如浓缩和渗滤步骤。

[0559] 预期如上述使用的纯化形式是指至少90%纯度,例如91、92、93、94、95、96、97、98、99%w/w或以上纯的。

[0560] 基本上不含内毒素通常是指内毒素含量为1EU/mg抗体产物或以下,例如0.5或0.1EU/mg产物。

[0561] 如果适合,基本上不含宿主细胞蛋白质或DNA一般旨在是指宿主蛋白质和/或DNA含量为400μg/mg抗体产物或以下,例如100μg/mg或以下,特别是20μg/mg。

[0562] 本发明的抗体分子还可以用于诊断,例如,在体内诊断和疾病状态的成像中。

[0563] 在一个实施方案中,提供了选择本发明多特异性蛋白质构建体的方法,包括:

[0564] a) 当V_I或V₂是对于指定的可变区对的dsscFv时,测定单体多特异性蛋白质的收率;

[0565] b) 当在(a)中测试的V_I或V₂无论哪一个对于同样的可变区对的dsFv时,测定单体多特异性蛋白质的收率;和

[0566] c) 比较(a)和(b)中得到的单体收率并且选择具有最高单体收率的多特异性蛋白质。

[0567] 典型地,该方法步骤(a)和(b)中的“可变区对”是V_H和V_L对。通常,V_H和V_L一起形成抗原结合结构域V₁或V₂。因此,该方法允许待测试的V_H和V_L对作为本发明构建体中的dsscFv和dsFv,并且最多的单体构建体在步骤(c)中选择。

[0568] 典型地,在该方法的步骤(a)和(b)中,在纯化后、例如在亲和色谱后测定收率。单体收率抗原使用任意适合的方法、例如大小排阻色谱法测定。

[0569] 在本说明书上下文中的“包含”旨在是指包括。如果在技术上适合,则可以组合本发明的实施方案。实施方案在本文中被描述为包含某些特征/要素。本公开还扩展至由所述特征/要素组成或基本上由其组成的分开的实施方案。

[0570] 技术参考文献例如专利和申请通过引用并入本文。

[0571] 本文特别和明确引述的任意实施方案可以单独地或与一个或多个另外的实施方案组合形成放弃的基础。

[0572] 本公开进一步参考附图通过如下实施例中进行描述,其仅为示例性描述,其中:

[0573] 附图简述

[0574] 图1-7显示根据本发明抗体分子的氨基酸和核酸序列

[0575] 图8显示Fab-2xdsscFv和Fab-dsscFv-dsFv形式

- [0576] 图9显示CA2109小鼠Fab (fwk18FAB) IgG1 (fwk18IgG)的滴定曲线
- [0577] 图10a显示用放线菌素-D/和人TNF- α 和TrYbe 18B或对照化合物Enbrel处理的L929细胞的有代表性的细胞存活曲线。
- [0578] 图10b显示用放线菌素-D/和食蟹猴TNF- α 和TrYbe 18B或对照化合物Enbrel处理的L929细胞的有代表性的细胞存活曲线。
- [0579] 图11显示TrYbe 18B抑制小鼠中人TNF- α 诱导的中性粒细胞增多。
- [0580] 图12显示TrYbe 18B抑制小鼠中合并的人TNF- α 和人IL-17A-诱导的中性粒细胞增多。
- [0581] 图13显示不同批次的TrYbe 18B的SDS PAGE分析。
- [0582] 图14显示TrYbe 18B抑制体外中性粒细胞迁移。
- [0583] 图15显示给予食蟹猴IV推注剂量的TrYbe 18B后TrYbe18B的血清浓度。

实施例

- [0584] 实施例1:中和抗-人TNF- α 可变区的分离:
- [0585] 进行如下免疫接种以生成用于B细胞培养和抗体筛选的材料:
- [0586] 用与小分子苯并咪唑化合物即化合物1预复合的人TNF- α 的3次注射 (shot) 免疫接种5只Sprague Dawley大鼠 (如W02013/186229和PCT/EP2015/074527中所述)。产生血清并在ELISA中测试其与人TNF- α 的结合。可测定滴度超过100,000稀释度,因此被认为可接受用于B细胞培养。
- [0587] 使用类似于Zubler等人 (1985) 和Lightwood等人 (2013) 所述的方法制备B细胞培养物。简言之,将含有B细胞的脾细胞以每孔约5000个细胞的密度在带条形码的96孔组织培养板中在37℃、在5%CO₂气氛中培养7天,其中200 μ l/孔RPMI 1640培养基 (Gibco BRL),所述培养基补充有10%FCS (PAA laboratories ltd),2%HEPES (Sigma Aldrich),1%L-谷氨酰胺 (Gibco BRL),1%青霉素/链霉素溶液 (Gibco BRL),0.1% β -巯基乙醇 (Gibco BRL),2-5%活化的脾细胞培养上清液和 γ 射线照射的鼠胸腺瘤细胞 (5×10^4 /孔)。在该项目期间筛选了超过7000万个B细胞。
- [0588] 使用包被有作为靶抗原来源的生物素化的人TNF的10微米超级抗生物素蛋白 (superavidin) 聚合物珠 (Bangs laboratories),使用基于均匀荧光的结合测定法测定B细胞培养物上清液中人TNF特异性抗体的存在。使用Matrix Platemate液体处理器将10 μ l上清液从带条形码的96孔组织培养板转移到带条形码的384孔黑壁测定板中,所述测定板含有5000个包被的珠。用山羊-抗大鼠或小鼠IgG Fc γ -特异性Cy-5缀合物 (Jackson) 显示结合。在Applied Biosystems 8200细胞检测系统上读板。
- [0589] 或者,使用ELISA测定鉴定阳性孔。用2 μ g/ml TNF包被384孔ELISA板,然后将10 μ l B细胞培养上清液加入到封闭的平板中。孵育1小时后,洗涤平板并用山羊抗-大鼠Fc特异性HRP缀合物 (Jackson) 显示结合。
- [0590] 初步筛选后,使用Aviso Onyx命中-拾取机器人将阳性上清液固结 (consolidated) 到96孔带条形码的主板上,并在-80℃冷冻细胞培养板中的B细胞。然后在Biacore测定中筛选主板以鉴定含有高亲和力抗体的孔。
- [0591] 为了鉴定能够中和TNF α 的生物活性的抗体,我们使用主板中的B细胞培养上清液

进行基于细胞的TNF α 报道分子测定。该测定使用HEK-293-CD40-BLUE细胞(Invivogen),其被改造成响应于通过NF κ B途径(包括人TNF α)操作的许多刺激而分泌碱性磷酸酶。含有抗体的上清液在该测定中以1:2.5的单一稀释度直接使用。选择含有高亲和力阻断抗体(在Biacore中亚100pM并且在报道分子测定中显示>90%抑制)的孔用于进一步进展。

[0592] 为了从目标孔的选区中回收抗体可变区基因,必须进行去卷积(deconvolution)步骤以使得能够鉴定含有异质B细胞群的给定孔中的抗原特异性B细胞。这是使用荧光聚焦方法实现的。简言之,将来自阳性孔的分泌免疫球蛋白的B细胞与包被有生物素化的人TNF的链霉抗生物素蛋白珠(New England Biolabs)和1:1200最终稀释的山羊-抗大鼠Fc γ 片段特异性FITC缀合物(Jackson)混合。在37 $^{\circ}$ C静置孵育1小时后,由于B细胞周围存在荧光晕,可以鉴定抗原特异性B细胞。然后用Eppendorf显微操作器挑选使用Olympus显微镜鉴定的这些个体B细胞并将其沉积到PCR管中。

[0593] 通过使用重链和轻链可变区特异性引物的逆转录(RT)-PCR从单细胞中回收称为2102、2101、2109和2111的四种不同抗体的抗体可变区基因。在Aviso Onyx液体处理机器人上进行两轮PCR,嵌套2 $^{\circ}$ PCR在3'和5'末端掺入限制性位点,允许将大鼠可变区克隆到小鼠 γ 1 IgG或Fab(VH)或小鼠 κ (VL)哺乳动物表达载体。使用Fectin 293(Invitrogen)将重链和轻链构建体共转染到HEK-293细胞中并且在48孔板中以1ml体积表达重组抗体。表达5-7天后,收获上清液并且使抗体进行进一步筛选。

[0594] 在HEK-293-CD40-BLUE报道分析中以多种浓度筛选重组大鼠/小鼠嵌合体IgG和Fab分子,以使得能够计算EC₅₀值并确定最大抑制百分比。测试Fab片段以确保抗体在单价时是活性的。还在Biacore实验中分析IgG以确定对人TNF的结合亲和力。Biacore实验的测定形式是通过固定的抗小鼠IgG-Fc捕获小鼠IgG,然后在捕获的表面上滴定人TNF。使用Biacore T200(GE Healthcare)进行BIA(双分子相互作用分析)。将Fc片段特异性的Affinipure F(ab')₂片段山羊抗-小鼠IgG(Jackson ImmunoResearch)通过胺偶联化学固定在CM5传感器芯片上至~5000响应单位(RU)的水平。使用HBS-EP缓冲液(10mMHEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.05%表面活性剂P20,GE Healthcare)作为运行缓冲液,流速为10 μ L/min。使用10 μ L的0.5 μ g/mL的小鼠IgG注射用于通过固定化的抗小鼠IgG-Fc进行捕获。将人TNF以20nM两次注射到捕获的小鼠IgG上,流速为30 μ L/min。通过以10 μ L/min的流速2 $\times$ 10 μ L注射40mM HCl并穿插5 μ L 5mM注射NaOH再生表面。使用T200评估软件(版本1.0)按照标准程序分析背景扣除的结合曲线。

[0595] 表4:

[0596]

抗体	EC ₅₀ (ng/ml)	%抑制	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (pM)
CA2109IgG	0.31	100	4.70E+06	1.19E-04	25
CA2109Fab	3.8	100	ND	ND	ND

[0597] 使用HEK-293-CD40-BLUE报道分析(Invivogen)测定中和。显示EC₅₀和%中和。进行Biacore分析以确定结合动力学。显示结合速率(k_a)、解离速率(k_d)和亲和力常数(KD)。

[0598] 图9显示CA2109大鼠/小鼠Fab(fwk18FAB) IgG1(fwk18 IgG)的滴定曲线。使用HEK-293-CD40-BLUE报道测定(Invivogen)测定的数据如上所述。

[0599] 如下表4a中所示,就人TNF(hTNF)和食蟹猴TNF(cTNF)筛选如上所述分离的所有四

种抗体 (2101、2109、2111和2102) 为大鼠/人嵌合Fab的食蟹猴和人TNF交叉反应性。

[0600] Biacore实验的测定形式是通过固定的抗人F(ab')₂捕获大鼠/人嵌合Fab,然后在捕获的表面上滴定人或食蟹猴TNF。使用Biacore T200 (GE Healthcare) 进行BIA(双分子相互作用分析)。将山羊抗-人IgG-F(ab')₂ 2片段特异性Affinipure F(ab')₂ 2片段 (Jackson ImmunoResearch) 通过胺偶联化学固定在CM5传感器芯片上至~5000响应单位 (RU) 的水平。使用HBS-EP缓冲液 (10mM HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% 表面活性剂P20, GE Healthcare) 作为运行缓冲液,流速为10μL/min。使用10μL的0.5μg/mL大鼠/人嵌合体注射用于通过固定化的人IgG-F(ab')₂ 2进行捕获。将人或食蟹猴TNF以30μL/min的流速注射到捕获的大鼠/人嵌合Fab上 (分别为5nM或3.125nM)。通过以10μL/min的流速2×10μL注射50mM HCl并穿插5μL 5mM注射NaOH再生表面。使用T200评估软件 (版本1.0) 按照标准程序分析背景扣除的结合曲线。

[0601] 表4a

[0602]

			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (pM)
02101	人 Fab 嵌合体	hTNF	4.63E+06	1.39E-04	2.99E-11	30
02109	人 Fab 嵌合体	hTNF	4.09E+06	1.43E-04	3.49E-11	35
02111	人 Fab 嵌合体	hTNF	2.89E+06	1.39E-04	4.81E-11	48
02102	人 Fab 嵌合体	hTNF	2.59E+06	2.27E-04	8.73E-11	87

[0603]

			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (pM)
02101	人 Fab 嵌合体	cTNF	4.54E+06	9.72E-05	2.14E-11	21
02109	人 Fab 嵌合体	cTNF	3.71E+06	1.02E-04	2.74E-11	27
02111	人 Fab 嵌合体	cTNF	2.26E+06	2.25E-04	9.98E-11	100
02102	人 Fab 嵌合体	cTNF	4.17E+05	8.64E-03	2.07E-08	20720

[0604] 发现抗体2102对食蟹猴TNF具有低得多的亲和力。该抗体在人源化期间也丧失了亲和力,因此没有进一步发展该抗体。

[0605] 基于这项工作,由于其食蟹猴/人交叉反应性、高亲和力 (表4) 和强有力的中和活性 (图9和表4), CA2109被选为先导候选者。基于这些特性选择该抗体用于人源化。

[0606] 选择具有相似亲和力和中和特性的另外两种抗体用于与CA2109平行的人源化,这些抗体是2101和2111。然而,2101在人源化后未能保留对TNF的亲和力,因此没有进一步发展该抗体。抗体2109和抗体2111均成功进行了人源化,然后转化为scFv形式,并在L929TNF抑制测定 (下文实施例6中描述的测定) 中筛选以证实中和活性 (表4b)。

[0607] 表4b

抗体	IC50 (pM)
----	-----------

[0609]	CA2111 Fab	12.49
	CA2111 VH1 HLds scFv	135.09
	CA2111 VH1 LHds scFv	143.24
	CA2109 VH3 scFv	16.55

[0610] 正如从表4b中可以看出的,抗体2111在该测定中没有作为scFv保留活性,因此该抗体不适用于多特异性TrYbe抗体分子。仅抗体2109作为人源化scFv保留了食蟹猴-人交叉反应性、高亲和力和中和能力以及热稳定性。抗体CA2109的人源化在下文中更详细地描述。

[0611] 实施例2:抗-TNF- α 抗体CA2109的人源化

[0612] 通过将互补决定区(CDR)移植到人种系框架上使抗体CA2109人源化。大鼠抗体(供体)序列与人种系(受体)框架与设计的人源化序列的比对如图6和7中所示。

[0613] 所选择的轻链种系受体序列是人VK1 2-1 (U) A20V区+JK2J-区(V BASE,<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)。所选择的重链种系受体序列是人VH3 1-3 3-21V区+JH4J-区(V BASE,<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)。从供体移植到受体序列的CDR如Kabat(Kabat等人1987)所定义,但CDR-H1除外,其中使用组合的Chothia/Kabat定义。

[0614] 设计编码初始V-区序列的基因并通过Entelechon GmbH的自动合成方法构建,并通过寡核苷酸定向诱变进行修饰以产生移植形式gL1、gL18、gH1和gH2。将gL18基因序列亚克隆到UCB Celltech人轻链表达载体pMhCK δ 中,其含有编码人C- κ 恒定区(Km3同种异型)的DNA。将gH2序列亚克隆到UCB Celltech表达载体pMhg1Fab中,其含有编码人重链 γ -1CH1恒定区的DNA。

[0615] 为了保留完全活性和维持高热稳定性,保留了人源化重链的位于第48位(异亮氨酸),第49位(甘氨酸),第71位(缬氨酸),第73位(赖氨酸),第78位(丙氨酸)和第93位(苏氨酸)的供体残基(Kabat编号)。类似地,保留了人源化轻链的第65位(苏氨酸),第71位(酪氨酸)和第87位(苯丙氨酸)的供体残基(Kabat编号)。此外,通过将第31位、第50位和第52位处的天冬酰胺残基分别突变为丝氨酸、天冬氨酸和丝氨酸来除去轻链中的3个脱酰胺位点。最终选择的可变移植序列gL18和gH2显示在图6和7以及SEQ ID NO:91和92中。在以下实施例中,对抗体2109的任何提及是指这些人源化序列而不是原始的大鼠亲本序列。

[0616] 实施例3:Fab496.g3-(HC) dsscFv (HL) 2109和Fab496.g3-(LC) dsscFv (HL) 645质粒的构建和在哺乳动物细胞中的表达

[0617] 先前已在W02008/047134和W02012/095662中描述了针对人IL-17A和人IL-17F的抗体CA028_00496.g3(在本文中也称为抗体496.g3)的产生。该抗体以pM亲和力结合人IL-17A、IL-17F和IL-17A/F异二聚体。抗体496.g3的Fab形式的CDR、重链和轻链可变区的氨基酸和编码DNA序列示于图1中。496.g3(IL-17A/F结合)Fab恒定区包含人C- κ 恒定区(K1m3同种异型)和人 γ -1CH1恒定区和铰链(G1m17同种异型)。

[0618] 先前已在W02013/068571中描述了抗-人白蛋白抗体645的产生。抗体645的CDR、重链和轻链可变区、scFv和dsscFv形式的氨基酸和编码DNA序列示于图3中。

[0619] 抗-TNF抗体2109的产生如上所述并且抗体2109的CDR、重链和轻链可变区、scFv和dsscFv形式的氨基酸和编码DNA序列示于图2中。

[0620] 抗体2109和抗体645的dsscFv各自包含使用Kabat编号系统的残基44(重链)与100(轻链)之间稳定的二硫键。

[0621] 抗体645HL的dsscFv通过11个氨基酸的轻链接头(SGGGSGGGGS)与抗体496.g3的Fab_{Cκ}片段连接,且抗体CA2109HL的dsscFv通过11个氨基酸的重链接头SGGGGTGGGGS[在本文中也称为S,2xG4S](SEQ ID NO:2)或SGGGGTGGGGS[在本文中也称为S,G4T,G4S](SEQ ID NO:1)与抗体496.g3的Fab_{CH1}片段连接。产生的抗体形式在图8中示例为2xdsscFv并且在本文中称为TrYbe。

[0622] 瞬时表达用于表达Fab496.g3-(HC) dsscFv (HL) 2109 (SEQ ID NO:127) (具有连接Fab_{HC}和dsscFv2109的接头SGGGGTGGGGS)和Fab496.g3-(LC) dsscFv (HL) 645 (SEQ ID NO:131) (具有连接Fab_{LC}和dsscFv645的接头SGGGSGGGGS)。编码整个轻链和重链Fab片段的基因从质粒中进行限制性克隆,所述质粒先前在密码子水平上优化以用于在大肠杆菌中表达。从pTrYbe_{HC#1}切下编码645_{dsHLscFv}的AgeI-EcoRI基因片段并克隆到pED489中以在UCB内部表达载体pNAFH (Dhami, 2012) 中产生“轻链单基因载体”496.g3LC-645_{dsHLscFv}。编码2109_{dsHLscFv}的DNA (BspEI-EcoRI片段) 通过DNA2.0合成并克隆到pTrYbe_{HC#1} (Dhami, 2012) 中以在UCB表达载体pNAFL (Dhami, 2012) 中产生“重链单基因载体”496.g3Fab-2109_{dsHLscFv}。在HEK293细胞中瞬时共表达两种单基因载体后,从细胞培养上清液纯化包含具有重链接头SGGGGTGGGGS的Fab496.g3-(HC) dsscFv (HL) 2109和Fab496.g3-(LC) dsscFv (HL) 645的TrYbe蛋白。纯化的TrYbe显示出高水平的单体(89%)和高的热稳定性(T_m 71°C),且由此将其发展用于稳定细胞系的产生。

[0623] 稳定表达用于从生产量水平约为1g/L和约70%单体的哺乳动物CHO细胞系表达Fab496.g3-(HC) dsscFv (HL) 2109 (SEQ ID NO:125) (具有连接Fab_{HC}至dsscFv2109的接头SGGGSGGGGS)和Fab496.g3-(LC) dsscFv (HL) 645 (SEQ ID NO:131) (具有连接Fab_{LC}至dsscFv645的接头SGGGSGGGGS),其在本文中也称为抗体分子Trybe 18B。进行下游纯化过程以产生纯化的TrYbe18B。

[0624] 实施例4 Fab496.g3-(HC) dsHLscFv2109 (LC) dsHLscFv645 (Trybe 18B) 的抗原靶标的Biacore亲和力和同时结合

[0625] 按照下述方法测试包含Fab496.g3-(HC) dsscFv (HL) 2109 (SEQ ID NO:125) (具有连接Fab_{HC}至dsscFv2109的接头SGGGSGGGGS)和Fab496.g3-(LC) dsscFv (HL) 645 (SEQ ID NO:131) (具有连接Fab_{LC}至dsscFv645的接头SGGGSGGGGS)的抗体分子对人TNF-α、人IL-17A、IL-17F和人血清白蛋白的亲和力,该抗体分子在本文中也称为抗体分子Trybe 18B,其根据实施例3中的方法制备:

[0626] 测定形式是通过固定的抗人IgG-F(ab')₂捕获TrYbe 18B,然后在捕获的表面上滴定人TNF,人IL-17A,人IL-17F和人血清白蛋白。使用Biacore T200 (GE Healthcare) 进行BIA(双分子相互作用分析)。将F(ab')₂片段特异性Affinipure F(ab')₂片段山羊抗-人IgG (Jackson ImmunoResearch) 通过胺偶联化学固定在CM5传感器芯片上至~5000响应单位(RU)的捕获水平。使用HBS-EP缓冲液(10mM HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05%表面活性剂P20, GE Healthcare) 作为运行缓冲液,流速为10μL/min。使用10μL的0.5μg/mL的TrYbe 18B注射用于通过固定的抗人IgG-F(ab')₂捕获。以不同浓度(分别为5nM-0.15625nM, 5nM-0.15625nM, 10nM-0.3125nM和100nM-3.125nM) 将人TNF,人IL-17A,人IL-

17F和HAS对捕获的TrYbe 18B进行滴定,流速为30 μ L/min。通过以10 μ L/min的流速2 $\times$ 10 μ L注射50mM HCl并穿插5 μ L 5mM注射NaOH再生表面。使用T200评估软件(版本1.0)按照标准程序分析背景扣除结合曲线。从拟合算法确定动力学参数。结果如表5所示。

[0627] 表5

样品	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	KD(pM)
人 TNF	5.54E+06	6.43E-05	1.16E-11	11.6
人 IL-17A	5.52E+06	1.00E-05*	1.81E-12	1.81
人 IL-17F	5.06E+06	3.80E-05	7.51E-12	7.51
人白蛋白	7.75E+04	1.35E-04	1.74E-09	1740

1.00E-05*

解离因仪器限制而受限

[0629] 进行进一步的测定以测定抗体分子TrYbe 18B对食蟹猴TNF、食蟹猴IL-17A、食蟹猴IL-17F和食蟹猴白蛋白的结合。测定形式是通过固定的抗-人IgG-F(ab')₂捕获TrYbe 18B,然后在捕获的表面上滴定食蟹猴TNF、IL-17A、IL-17F和白蛋白。使用Biacore T200 (GE Healthcare) 进行BIA(双分子相互作用分析)。将F(ab')₂片段特异性的Affinipure F(ab')₂片段山羊抗-人IgG (Jackson ImmunoResearch) 通过胺偶联化学固定在CM5传感器芯片上至~5000响应单位(RU)的捕获水平。使用HBS-EP缓冲液(10mM HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05%表面活性剂P20, GE Healthcare) 作为运行缓冲液,流速为10 μ L/min。使用10 μ L的0.5 μ g/mL的T1Ybe 18B注射用于通过固定的抗人IgG-F(ab')₂捕获。对捕获的TrYbe 18B以不同浓度(分别为5nM-0.15625nM, 10nM-0.3125nM, 40nM-1.25nM和100nM-3.125nM) 滴定食蟹猴TNF、IL-17A、IL-17F和白蛋白,流速为30 μ L/min。通过以10 μ L/min的流速2 $\times$ 10 μ L注射50mM HCl并穿插5 μ L 5mM注射NaOH再生表面。使用T200评估软件(版本1.0)按照标准程序分析背景扣除的结合曲线。从拟合算法确定动力学参数。结果如表6所示。

[0630] 表6

样品	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	KD(nM)
食蟹猴 TNF	8.90E+06	6.38E-05	7.16E-12	7.16
食蟹猴 IL-17A	1.67E+06	1.00E-05*	5.99E-12	5.99
食蟹猴 IL-17F	5.82E+05	1.67E-04	2.88E-10	288
食蟹猴白蛋白	5.83E+04	1.59E-04	2.72E-9	2723

1.00E-05*

解离因仪器限制而受限

[0632] 评估人IL-17A、人TNF和人血清白蛋白与TrYbe 18B的同时结合。将TrYbe 18B构建体通过固定的抗-人IgG-F(ab')₂捕获到传感器芯片,然后将仅hIL-17A,仅hTNF,仅HSA或hIL-17A、hTNF和HSA的混合溶液分别对捕获的TrYbe 18B滴定。

[0633] 使用Biacore T200 (GE Healthcare) 进行BIA(双分子相互作用分析)。如上述对结合人TNF、IL-17A、IL-17F和HSA的TrYbe 18B的Biacore动力学的方法中所述,将TrYbe 18B构建体捕获至传感器芯片表面。对捕获的TrYbe 18B分别滴定100nM HSA, 20nM hIL-17A, 20nM hTNF或具有终浓度为100nM HSA, 20nM hIL-17A, 20nM hTNF的混合溶液。

[0634] 合并的hIL-17A/hTNF/HSA溶液的结合响应等于独立注射的响应之和,如表7所示。这证实了TrYbe 18B能够同时结合人IL-17A、人TNF和HSA。

[0635] 表7

[0636]

样品	分析物	结合(RU)	
TrYbe18B	hTNF		47
	hIL-17A		38
	HSA		58
	hTNF + hIL-17A +HSA		130 (143)

[0637] 进行进一步的测定以测定食蟹猴IL-17A、TNF和白蛋白与TrYbe 18B的同时结合。通过固定的抗-人IgG-F(ab')₂将TrYbe 18B构建体捕获到传感器芯片,然后将仅食蟹猴IL-17A、仅食蟹猴TNF、仅食蟹猴HSA或食蟹猴IL-17A、TNF和白蛋白的混合溶液分别对捕获的TrYbe 18B进行滴定。

[0638] 使用Biacore T200 (GE Healthcare) 进行BIA(双分子相互作用分析)。如上述对结合食蟹猴TNF、IL-17A、IL-17F的TrYbe 18B的Biacore动力学的方法中所述,将TrYbe 18B构建体捕获至传感器芯片表面。对捕获的TrYbe 18B分别滴定100nM CSA、20nM食蟹猴IL-17A、20nM食蟹猴TNF或具有终浓度为100nM HAS、20nM食蟹猴IL-17A、20nM食蟹猴TNF的混合溶液。

[0639] 如表8所示,合并的食蟹猴IL-17A/食蟹猴TNF/CSA溶液的结合响应等于独立注射的响应之和。这证实了TrYbe 18B能够同时结合食蟹猴IL-17A、食蟹猴TNF和CSA。

[0640] 表8

样品	分析物	结合(RU)	
[0641] TrYbe18B	cTNF		42
	cIL-17A		44
	CSA		41
	cTNF + cIL-17A +CSA		118 (127)

[0642] 实施例6 Fab496.g3- (HC) dsHLscFv2109 (LC) dsHLscFv645 (Trybe 18B) 对TNF(人和食蟹猴)的体外基于细胞的活性

[0643] 在体外细胞测定中测试包含Fab496.g3- (HC) dsscFv (HL) 2109 (SEQ ID NO:125) (具有连接Fab HC至dsscFv2109的接头SGGGSGGGGS) 和Fab496.g3- (LC) dsscFv (HL) 645 (SEQ ID NO:131) (具有连接FabLC至dsscFv645的接头SGGGSGGGGS) 的抗体分子对人TNF- α 的活性,所述抗体分子在本文中也称为抗体分子TrYbe 18B,其根据实施例3中的方法产生。L929细胞系是鼠纤维肉瘤细胞系,其对TNF- α 的细胞毒性作用敏感。TNF通过结合人、食蟹猴或鼠TNF- α 的TNF受体刺激以诱导细胞凋亡。用增加对TNF- α 杀伤的易感性的放线菌素D共同处理细胞。用放线菌素D/TNF- α 和TrYbe 18B处理后L929细胞的活力通过荧光素酶反应(CellTiter-Glo,Promega)检测ATP水平(随生存力降低而降低)来确定。

[0644] 在1小时的预孵育后,在384孔平底板中30 μ l终体积中,在TrYbe 18B(浓度范围8.12E-9M至1.23E-13M)或对照化合物Enbrel(浓度范围1.3E-9M至2E-14M)的存在下,用

2.35 μ g/ml放线菌素D和以100pg/ml的人TNF α 处理L929细胞。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下24小时后,通过CellTiter-Glo (Promega Ltd) 测定细胞生存力。图10a显示用放线菌素D/和人TNF- α 和TrYbe 18B或对照化合物Enbrel处理的L929细胞的有代表性的细胞存活曲线。

[0645] 在1小时的预孵育后,在384孔平底板中30 μ l终体积中,在TrYbe 18B (浓度范围8.12E⁻⁹M至1.23E⁻¹³M) 或对照化合物Enbrel (浓度范围1.3E⁻⁹M至2E⁻¹⁴M) 存在下,也用2.35 μ g/ml放线菌素D和20pg/ml的食蟹猴TNF α 处理L929细胞。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下24小时后,通过CellTiter-Glo (Promega Ltd) 测定细胞存活力。图10b显示用放线菌素D/和食蟹猴TNF- α 和TrYbe 18B或对照化合物Enbrel处理的L929细胞的有代表性的细胞存活曲线。

[0646] 当用人或食蟹猴TNF- α 刺激时,TrYbe 18B能够以剂量依赖的方式完全抑制TNF- α 的杀伤作用;平均EC₅₀ 5.87pM (人,N=3) 和平均EC₅₀ 4.97pM (食蟹猴,N=2)。TrYbe 18B不与小鼠TNF交叉反应,且因此不抑制鼠TNF- α 的杀伤作用 (N=3)。

[0647] 实施例7Fab496.g3- (HC) dsHLscFv2109 (LC) dsHLscFv645 (Trybe 18B) 对IL-17A和IL-17F的体外基于细胞的活性

[0648] 在体外细胞测定中测试包含Fab496.g3- (HC) dsscFv (HL) 2109 (SEQ ID NO:125) (具有连接所述Fab HC至dsscFv2109的接头SGGGSGGGGS) 和Fab496.g3- (LC) dsscFv (HL) 645 (SEQ ID NO:131) (具有连接FabLC至dsscFv645的接头SGGGSGGGGS) 的抗体分子对人和食蟹猴IL-17A和F的活性,所述抗体分子在本文中也称作抗体分子Trybe 18B,其根据实施例3中的方法产生。

[0649] IL-17A和IL-17F与IL-1 β 组合诱导鼠成纤维细胞系NIH 3T3释放IL-6。这形成了测定系统的基础,其中测试抗-IL-17A和抗-IL-17F分子的中和能力。

[0650] 将W02012/095662中描述的TrYbe 18B或抗-IL17A/F抗体CA028_00496.g3 (浓度范围5000ng/mL至19.5ng/mL) 与重组人IL-17A (30ng/mL) 和重组人IL-1 β (50pg/mL) 一起在37 $^{\circ}$ C预孵育4hr。然后将TrYbe/抗体蛋白复合物转移到96孔平底板中的NIH-3T3细胞中。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、100%湿度下孵育3天后,收集无细胞上清液,并通过MSD测定IL-6的水平。

[0651] 将TrYbe 18B或抗IL17A/F抗体CA028_00496.g3 (浓度范围5000ng/mL至19.5ng/mL) 与重组人IL-17F (300ng/mL) 和重组人IL-1 β (50pg/mL) 一起在37 $^{\circ}$ C下预孵育4小时。然后将TrYbe/抗体蛋白复合物转移到96孔平底板中的NIH-3T3细胞中。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、100%湿度下孵育3天后,收集无细胞上清液,并通过MSD测定IL-6的水平。

[0652] 将TrYbe 18B或抗-IL-17A/F抗体CA028_00496.g3 (浓度范围5000ng/mL至19.5ng/mL) 与重组食蟹猴IL-17A (30ng/mL) 的和重组人IL-1 β (50pg/mL) 一起在37 $^{\circ}$ C下孵育4小时。然后将TrYbe/抗体蛋白复合物转移到96孔平底板中的NIH-3T3细胞中。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、100%湿度下孵育3天后,收集无细胞上清液,并通过MSD测定IL-6的水平。

[0653] 将TrYbe 18B或抗-IL17A/F抗体CA028_00496.g3 (浓度范围5000ng/mL至19.5ng/mL) 与重组cyno IL-17F (300ng/mL) 和重组人IL-1 β (50pg/mL) 一起在37 $^{\circ}$ C预孵育4小时。然后将三体/抗体蛋白质复合物转移到96孔平底板中的NIH-3T3细胞中。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、100%湿度下孵育3天后,收集无细胞上清液,并通过MSD测定IL-6的水平。

[0654] 将TrYbe 18B或抗-IL17A/F抗体CA028_00496.g3 (浓度范围5000ng/mL至19.5ng/mL) 与重组cyno IL-17F (300ng/mL) 和重组人IL-1 β (50pg/mL) 一起在37 $^{\circ}$ C预孵育4小时。然后将三体/抗体蛋白质复合物转移到96孔平底板中的NIH-3T3细胞中。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、

100%湿度下孵育3天后,收集无细胞上清液,并通过MSD测定IL-6的水平。

[0655] 在NIH 3T3生物测定中,TrYbe 18B以浓度依赖性方式抑制人和食蟹猴(cyno) IL-17A和IL-17F诱导的IL-6释放(数据未显示)。TrYbe 18B具有与对照抗体CA028_00496.g3相当的效能(数据未显示)。

[0656] 实施例8 Fab496.g3- (HC) dsHLscFv2109 (LC) dsHLscFv645 (Trybe 18B) 对TNF- α 的体内活性

[0657] 在体内测定中测试包含Fab496.g3- (HC) dsscFv (HL) 2109 (SEQ ID NO:125) (具有连接Fab HC至dsscFv2109的接头SGGGSGGGGS) 和Fab496.g3- (LC) dsscFv (HL) 645 (SEQ ID NO:131) (具有连接FabLC至dsscFv645的接头SGGGSGGGGS) 的抗体分子以测试TNF- α 的抑制,所述抗体分子在本文中也称为抗体分子Trybe 18B,其根据实施例3中的方法制备。

[0658] 在小鼠中腹膜内施用外源性人TNF α 引起与中性粒细胞增多相关的局部炎症反应。这种反应很大程度上是通过激活小鼠TNF受体I (TNFRI) 和随后NF- κ B介导的转录后中性粒细胞趋化因子的释放引起的。这种人TNF α 诱导的中性粒细胞增多的模型能够用于确定TrYbe18B在独立于人IL-17A/F的生理系统对人TNF α 的体内功效和效能。由于人TNF α 是该模型中唯一的炎症刺激物,因此推定用TrYbe 18B预防性治疗会抑制人TNF α 诱导的腹膜中性粒细胞增多。

[0659] 用PBS或递增浓度的TrYbe 18B (0.1、1或10mg/kg) 静脉内处理Balb/c小鼠。PBS或TrYbe 18B处理后1小时,用PBS或人TNF α (0.3 μ g/kg) 腹膜内攻击小鼠。4小时后,人道处死小鼠并收集腹膜灌洗液用于通过流式细胞术评估中性粒细胞增多。结果是n=8/组的平均值(+/-SEM)。使用单向ANOVA和Dunnett's post检验计算统计学比较(****=p $\leq$ 0.0001)。

[0660] 图11显示TrYbe 18B能够以剂量依赖性方式抑制人TNF α 诱导的中性粒细胞增多,其在1和10mg/kg几乎完全消除了反应(分别为96%和100%抑制)。由于在该系统中没有人IL-17A/F,所以这表明TrYbe 18B的抗人TNF α dsscFv在体内是有效的和强有力的。

[0661] 实施例9 Fab496.g3- (HC) dsHLscFv2109 (LC) dsHLscFv645 (Trybe 18B) 对TNF- α 和IL-17A的体内活性

[0662] 在体内测定中测试包含Fab496.g3- (HC) dsscFv (HL) 2109 (SEQ ID NO:125) (具有连接Fab HC至dsscFv2109的接头SGGGSGGGGS) 和Fab496.g3- (LC) dsscFv (HL) 645 (SEQ ID NO:131) (具有连接FabLC至dsscFv645的接头SGGGSGGGGS) 的抗体分子以测试TNF- α 和IL-17A的抑制,所述抗体分子在本文中也称为抗体分子Trybe 18B,其根据实施例3中的方法制备,。

[0663] 重要的是显示TrYbe 18B抗体能够抑制由同时存在的两种细胞因子引起的生物反应。先前的研究已经表明,人TNF α 和IL-17A的组合在体内产生的协同中性粒细胞反应大于单独刺激的总和。因此,针对人TNF α 与人IL-17A组合测试TrYbe 18B的体内功效和效能。为了进一步区分人TNF α 和人IL-17A在该模型中的协同作用,使用针对人TNF α (101.4) 和人IL-17A/F (抗体CA028_00496.g3) 的单特异性抗体。

[0664] 用PBS、抗体CA028_00496.g3 (30mg/kg), 101.4 (30mg/kg) 或递增浓度的TrYbe 18B (0.1、1或10mg/kg) 静脉内处理Balb/c小鼠。抗体施用后1小时,用PBS、人IL-17A (10 μ g/kg)、人TNF α (0.3 μ g/kg) 或人IL-17A (10 μ g/kg) 与人TNF α (0.3 μ g/kg) 的组合腹膜内攻击小鼠。4小时后,人道处死小鼠并收集腹膜灌洗液用于通过流式细胞术评估中性粒细胞增多。结果是n

=8/组的平均值(+/-SEM)。使用单向ANOVA和Dunnett's post检验计算统计学比较(*=p≤0.05,**=p≤0.01***=p≤0.001=****=p≤0.0001)。

[0665] 图12显示人IL-17A与人TNFα组合的腹膜内施用诱导比单独施用的任一刺激的总和大得多的局部中性粒细胞反应。此外,在该模型中抑制人TNFα(使用过量的抗-TNFα抗体101.4)将合并的IL-17A/TNFα诱导的反应降低至与单独施用IL-17A后观察到的相似的水平。类似地,人IL-17A/F的抑制(使用过量的抗体CA028_00496.g3)仅能抑制合并的IL-17A/TNFα诱导的反应至单独TNFα施用后观察到的相同水平。相反,TrYbe 18B能够以剂量依赖性方式抑制IL-17A/TNFα诱导的中性粒细胞增多,达到低于抗体CA028_00496.g3或101.4所实现的水平(10mg/kg TrYbe 18B时96%抑制vs.30mg/kg 101.4和抗体CA028_00496.g3分别为81%和67%抑制)。总之,该数据表明TrYbe 18B能够在体内模型中同时抑制人TNFα和人IL-17A。

[0666] 实施例10 Fab496.g3-(HC) dsHLscFv2109 (LC) dsHLscFv645 (Trybe 18B) 的生物物理学表征

[0667] 在生物物理学表征实验中测试包含Fab496.g3-(HC) dsScFv (HL) 2109 (SEQ ID NO:125) (具有连接Fab HC至dsScFv2109的有接头SGGGSGGGGS) 和Fab496.g3-(LC) dsScFv (HL) 645 (SEQ ID NO:131) (具有连接FabLC至dsScFv645的接头SGGGSGGGGS) 的抗体分子(其在本文中也称为抗体分子Trybe 18B,其根据实施例3中的方法产生) 和包含Fab496.g3-(HC) dsScFv (HL) 2109 (SEQ ID NO:127) (具有连接Fab HC和dsScFv2109的接头SGGGTGGGGGS) 和Fab496.g3-(LC) dsScFv (HL) 645 (SEQ ID NO:131) (具有连接Fab LC和dsScFv645的接头SGGGSGGGGS) 的抗体分子(其在本文中也称为抗体分子Trybe 18T,其根据实施例3中的方法产生)。

[0668] 分析了三批抗体分子(参见表9)。本研究导致确定了TrYbe 18B分子的整体生化和生物物理学特征。

[0669] 另外,分析从亲本TrYbe 18B分子差异洗脱的稳定批次2的纯化的级分(A3)以确认身份并因此能够解释TrYbe 18B分子的预料不到的杂质和/或生物物理学特征。

[0670] 表9用于生物物理学表征的TrYbe 18B的批次

[0671]

	样品	浓度 (mg/ml)
瞬时批次	TrYbe T(瞬时)	4.6
稳定批次1	TrYbe 18B(小库LP10)	2.64
稳定批次2	TrYbe 18B(小库MP77)	14.18

[0672] 通过大小排阻HPLC (SEC HPLC) (数据未显示) 和SDS PAGE (在非还原和还原条件下) 图13确定批次的纯度。

[0673] 正如通过SEC HPLC判断的,所有样品在相同的保留时间洗脱,具有低于2.2%的高分子量物质(瞬时批次:0.56%;稳定批次1:0.59%;稳定批次2:2.2%)。瞬时样品含有如通过晚于主峰洗脱的宽峰所示的低分子量污染物。

[0674] 图13显示使用SDS PAGE 4-20%Novex Tris/甘氨酸(Invitrogen)对不同批次的TrYbe 18B的SDS PAGE分析。在(A) 非还原(+N-乙基马来酰亚胺(NEM)和(B) 还原条件下的分析。泳道1=看到Blue Invitrogen Markers;泳道2=A3(来自稳定批次2的纯化级分);泳道

3=瞬时批次;泳道4=稳定批次1;泳道5=稳定批次2。所有三个批次通过SDS PAGE显示相似的纯度水平,其中条带在~130kDa(在非还原条件下)(其归因于完全组装的二硫化物配对抗体分子)和在~50kDa的双峰(在还原条件下)(其与相应还原的重链和轻链一致)。在非还原条件下,存在一个~50kDa的带,其相当于用A3(泳道2)观察到的带。通过完整的质谱分析(50.8kDa)和N末端测序(主要是轻链)证实A3是被半胱氨酸封端的轻链。目标样品在50kDa(非还原凝胶)的带被认为是轻链,因为质谱分析没有分辨出任何重链。随后通过从Ponseau S染色的印迹中切下的条带的N末端测序分析证实了这一点;仅分辨出轻链N末端(AIQLTQSPSS.)。

[0675] pI测量:

[0676] 方法1:30 μ l 1mg/ml蛋白质样品,0.35%甲基纤维素,4% pH3-10两性电解质(Pharmalyte),1 μ l每种合成pI标志物(4.65和9.77)和HPLC级水以构成最终体积至100 μ l。然后使用iCE3IEF分析仪(ProteinSimple),在1500V下预聚焦1分钟,然后在3000V下聚焦5分钟分析混合物。然后使用Empower软件(来自Waters)整合校准的电泳图。

[0677] 方法2:30 μ l 2mg/ml蛋白质样品,105 μ l 1%甲基纤维素,12 μ l pH3-8两性电解质(Pharmalyte),1.5 μ l每种合成pI标志物(4.65和9.77)和HPLC级水以构成最终体积至300 μ l。然后使用如方法1的iCE3分析混合物。

[0678] 所有批次的TrYbe T和18B的实验pI都很高(范围9.2-9.4)并且因此在预期的制剂pH(~pH 5)下不太可能具有近似零的总分子电荷(此时存在增加的聚集风险)。

[0679] 发现级分A3的pI主要是8.31(48.6%)。

[0680] 分子稳定性:

[0681] 通过解链温度(T_m)(解折叠的测量值)和搅拌效果(通过物理应力然后聚集而解折叠)测量分子稳定性。

[0682] 通过差示扫描量热法(DSC)对所有批次的TrYbe T和18B进行 T_m 分析可以区分两个主要结构域。较低的解折叠事件归因于2109scFv。缓冲剂种类和pH显然不影响解链温度。

[0683] 尽管不容易区分不同的结构并,thermofluor测定产生 T_m 值(其中观察到的),其类似于衍生自DSC分析得到的值。对于稳定批次1和稳定批次2,只有较高的解折叠结构域是明显的。有可能辨别出瞬时批次的更早的解折叠转变(48-50 $^{\circ}$ C),这可能归因于存在过量的轻链。

[0684] 表10通过差示扫描量热法(DSC)和Thermofluor测定法推导 T_m :所有TrYbe 18B分子显示出比IgG4分子更低的初始解折叠事件(~68 $^{\circ}$ C)

[0685]

		瞬时批次	稳定批次 1	稳定批次 2
Thermo fluor	分析 1(PBS pH 7.40)	3 次转变明显: $48.85 \pm 0.52^{\circ}\text{C}$; $60.95 \pm 0.35^{\circ}\text{C}$; $70.9 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$	$61.63 \pm 0.29^{\circ}\text{C}$; $71.2 \pm 0.23^{\circ}\text{C}$	ND
	分析 2(PBS pH 7.40)	$50.1 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$; $71.3 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$	$71.0 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$	71.9 ± 0.2
	分析 2(PBS pH 7.40 + NEM)	71.0 ± 0.2 ; $61.4 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$	$61.4 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$	$71.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$
DSC	PBS pH 7.4	2 次转变 : $63.8 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$; $72.6 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$	2 次转变: $62.9 \pm 0^{\circ}\text{C}$; $71.8 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$	ND
	Ac pH 5	2 次转变 : $61.8 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$; $72.2 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$	2 次转变: $61.7 \pm 0^{\circ}\text{C}$; $71.9 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$	ND

[0686] ND表示未进行分析(归因于材料的可用性)

[0687] 总之,从上述分析可以明显看出,三个批次的TrYbe T和18B之间没有显著性差异。

[0688] TrYbe 18B具有高pI,但与常规形式(IgG和Fab'分子)相比表现出适度低的 T_m ,其显然由分子的2109scFv成分的CDR控制。所有批次都含有过量的轻链,这可能导致观察到的异质性/不稳定性,然而,这可以通过纯化除去。

[0689] 实施例11Fab496.g3-(HC) dsHLscFv2109 (LC) dsHLscFv645 (Trybe 18B) 对IL-17A和IL-17F的体外基于细胞的活性

[0690] 除IL-17A和IL-17F同种型之外,TNF α 也是Th17细胞产生的关键细胞因子,并且已知间接地通过激活非造血组织例如关节的滑膜细胞诱导中性粒细胞的募集。在本研究中,将TrYbe18B在中性粒细胞迁移的复杂体外模型中的功效与组合的靶向IL-17AF的个体抗体和靶向TNF α 的Enbrel进行比较。

[0691] RA滑膜细胞的活化:第1天:将培养的RA滑膜细胞(第6代)以每孔 10^4 个细胞接种在24孔transwell板的下室中,并在 37°C 下孵育24小时。第2天:在接下来的一天,用IL-17A(抗体497,如W02008/001063中所述)或IL-17F或IL-17AF(抗体CA028_00496.g3)特异性抗体与或不与另外的抗-TNF α 中和Enbrel预先封闭(1小时室温)的Th17细胞(EWBE-037388)衍生的上清液(1:10稀释)活化滑膜细胞。还将Th17与阴性对照A33IgG或TrYbe18B预孵育以中和IL-17A+F和TNF α 。在总体积为0.5ml的对照或刺激培养基中进行培养。测试的所有抗体均过量($10\mu\text{g/ml}$),以完全中和Th17上清液中存在的靶细胞因子。然后在迁移测定之前将刺激的成纤维细胞再孵育24小时。

[0692] 中性粒细胞迁移测定:第3天:为了从人全血中分离人白血细胞(白细胞),将40ml ACK裂解缓冲液与10ml人血在室温下混合10分钟以有效裂解RBC。然后将白细胞以400g旋转10分钟,并进一步在20ml PBS中洗涤两次,然后以 10^6 个细胞/ml重悬于普通RPMI培养基(Gibco)中进行计数。将 5×10^5 个白细胞(0.5ml)接种到transwell的上室并在 37°C 下孵育6小时。将通过 $3.0\mu\text{M}$ 可渗透膜迁移到下室中的白细胞分离并用抗-人CD18特异性抗体(Ebioscience)标记30分钟(冰上 $2\mu\text{l}$ /测试)以鉴定中性粒细胞。然后将抗体染色的样品在磷酸盐缓冲盐水(PBS) pH7.4中洗涤一次,之后在BD LSRII Fortessa X20细胞计数分析仪

上进行FACS采集。将所有样品重悬于200 μ L掺有Sigma参比珠的PBS中。使用具有Dunnett post检验的单向Anova,使用IgG (-抗-TNF α) 作为比较物进行统计学分析。

[0693] 使用TrYbe18B或IL-17同种型特异性和TNF α 阻断抗体,能够确定IL-17和TNF α 在复杂的临床前体外测定中调节人中性粒细胞迁移的个体和集体影响。使用来自Th17细胞的上清液激活的RA滑膜细胞显著增加中性粒细胞的趋化反应(图14)。相对于同种型匹配的阴性对照,特异性IL-17A阻断显著抑制中性粒细胞迁移。仅在RA滑膜细胞活化之前在Th17上清液中中和IL-17F不改变中性粒细胞迁移能力。相反,双重抑制IL-17A和IL-17F比仅抑制IL-17A更大程度地抑制中性粒细胞迁移。使用Enbrel预阻断TNF α 也对中性粒细胞趋化性具有显著影响,其进一步受到另外的IL-17同种型特异性中和抗体的抑制。重要的是,使用TrYbe18B对IL-17A、IL-17F和TNF的三重特异性阻断表现出与使用分开的抗体中和这些细胞因子相似的中性粒细胞迁移抑制。

[0694] 在本研究中,我们证明,无论是利用单独的阻断(抗-IL-17AF+Enbrel)或是通过使用TrYbe18B的三重特异性阻断,通过中和IL-17AF和TNF α 实现了中性粒细胞迁移的最佳抑制。

[0695] 实施例12TrYbe 18B体内药代动力学(PK)分析

[0696] 给4只雄性食蟹猴施用10mg/kg静脉内(IV)推注剂量的TrYbe18B并且在选定间隔收集血清样品28天。使用免疫测定分析样品的TrYbe18B浓度,证实IL17A/F和TNF结合区的存在。进行两个区室PK分析。

[0697] TrYbe18B的血清浓度与大分子量蛋白质一致,具有与FcRn结合并被其再循环的能力(图15)。此属性由其白蛋白结合域赋予TrYbe18B。TrYbe18B IV给药后的初始浓度与具有与血浆体积相似的中央区室体积的分子一致。浓度以双指数方式下降,终末(β)半衰期约为5.6天(表11)。终末半衰期缓慢与TrYbe18B的相对缓慢的清除一致;与FcRn的结合和被其再循环一致。缓慢清除还表明TrYbe在体内的稳定性,因为分子的任何结合成分的显著切割将表现为表观清除率增加。

[0698] 表11. 给食蟹猴IV剂量后TrYbe18B的估计的PK参数。

[0699]

动物	C _{max} (μ g/mL)	中央区室体积 (mL/kg)	稳态体积 (mL/kg)	CL (mL/天/kg)	终末半衰期(天)
平均值	329	31.2	48.1	6.70	5.59
SD	62.8	6.01	12.8	3.01	1.29

[0700] CL=清除率

[0701] C_{max}=最大血清浓度

[0702] SD=标准偏差。

序列表

<110> UCB生物制药私人有限公司

<120> 对TNF- α 、IL-17A和IL-17F具有特异性的多特异性抗体分子

<130> PF0054-W0

<150> GB1522391.0

<151> 2015-12-18

<160> 147

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide Linker

<400> 1

Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide Linker

<400> 2

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge linker

<400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge linker

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge linker

<400> 5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Ala

<210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge linker

<400> 6

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

20 25

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge linker

<400> 7

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu

1 5 10 15

Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr

20 25 30

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge linker

<400> 8

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr His

1 5 10 15

Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr

20 25 30

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge linker

<400> 9

Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

<210> 10

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge linker

<400> 10

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp

1 5 10 15

Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala

20 25

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge linker

<400> 11

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Ser Cys Pro Ala

1 5 10

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 12
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
1 5
<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 13
Asp Lys Thr His Thr Ser
1 5
<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 14
Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 15
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10
<210> 16
<211> 16
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 16

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 17

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Ser
20

<210> 18

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 18

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 19

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ala Ser
1 5 10

<210> 20

<211> 16

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<220>
<221> misc_feature
<222> (7) .. (7)
<223> Xaa can be naturally occuring amino acid
<400> 20
Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
1 5 10 15
<210> 21
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<220>
<221> misc_feature
<222> (7) .. (7)
<223> Xaa can be naturally occuring amino acid
<220>
<221> misc_feature
<222> (12) .. (12)
<223> Xaa can be naturally occuring amino acid
<400> 21
Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
Gly Ala Ser Ala Ser
20
<210> 22
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<220>
<221> misc_feature
<222> (7) .. (7)

<223> Xaa can be naturally occuring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (12) .. (12)

<223> Xaa can be naturally occuring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa can be naturally occuring amino acid

<400> 22

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser

20

25

<210> 23

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa can be naturally occuring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (12) .. (12)

<223> Xaa can be naturally occuring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa can be naturally occuring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (22) .. (22)

<223> Xaa can be naturally occuring amino acid

<400> 23

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
20 25 30

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa can be naturally occuring amino acid

<400> 24

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Ser Gly Ala Ser Ala Ser
1 5 10

<210> 25

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 25

Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr
1 5 10 15

Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr
20 25

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 26

Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr
1 5 10

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 27

Ala Thr Thr Thr Gly Ser

1 5

<210> 28

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 28

Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Ser Pro Pro Ser Lys Glu

1 5 10 15

Ser His Lys Ser Pro

20

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 29

Gly Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Ser Met Val Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Lys Val Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 32

Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Ser His Asp Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 33

Gly Gly Gly Gly Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 34

Gly Gly Gly Gly Val Val Pro Ser Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 35

Gly Gly Glu Lys Ser Ile Pro Gly Gly Gly Gly Ser

1	5	10
---	---	----

<210> 36
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 36
Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Pro Pro Phe Pro Phe Gly Phe Pro Ser Val
1 5 10 15
Arg Pro
<210> 37
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 37
Tyr Pro Arg Ser Ile Tyr Ile Arg Arg Arg His Pro Ser Pro Ser Leu
1 5 10 15
Thr Thr
<210> 38
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 38
Thr Pro Ser His Leu Ser His Ile Leu Pro Ser Phe Gly Leu Pro Thr
1 5 10 15
Phe Asn
<210> 39
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 39
Arg Pro Val Ser Pro Phe Thr Phe Pro Arg Leu Ser Asn Ser Trp Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Pro Ala
<210> 40
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 40
Ser Pro Ala Ala His Phe Pro Arg Ser Ile Pro Arg Pro Gly Pro Ile

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Thr
<210> 41
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 41
Ala Pro Gly Pro Ser Ala Pro Ser His Arg Ser Leu Pro Ser Arg Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Phe Gly
<210> 42
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 42
Pro Arg Asn Ser Ile His Phe Leu His Pro Leu Leu Val Ala Pro Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Ala
<210> 43
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 43

Met Pro Ser Leu Ser Gly Val Leu Gln Val Arg Tyr Leu Ser Pro Pro
1 5 10 15
Asp Leu
<210> 44
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 44
Ser Pro Gln Tyr Pro Ser Pro Leu Thr Leu Thr Leu Pro Pro His Pro
1 5 10 15
Ser Leu
<210> 45
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 45
Asn Pro Ser Leu Asn Pro Pro Ser Tyr Leu His Arg Ala Pro Ser Arg
1 5 10 15
Ile Ser
<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker
<400> 46
Leu Pro Trp Arg Thr Ser Leu Leu Pro Ser Leu Pro Leu Arg Arg Arg
1 5 10 15
Pro
<210> 47
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexible linker

<400> 47

Pro Pro Leu Phe Ala Lys Gly Pro Val Gly Leu Leu Ser Arg Ser Phe
1 5 10 15

Pro Pro

<210> 48

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 48

Val Pro Pro Ala Pro Val Val Ser Leu Arg Ser Ala His Ala Arg Pro
1 5 10 15

Pro Tyr

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 49

Leu Arg Pro Thr Pro Pro Arg Val Arg Ser Tyr Thr Cys Cys Pro Thr
1 5 10 15

Pro

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 50

Pro Asn Val Ala His Val Leu Pro Leu Leu Thr Val Pro Trp Asp Asn
1 5 10 15

Leu Arg

<210> 51

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible linker

<400> 51

Cys Asn Pro Leu Leu Pro Leu Cys Ala Arg Ser Pro Ala Val Arg Thr

1

5

10

15

Phe Pro

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> rigid linker

<400> 52

Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala

1

5

10

<210> 53

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> rigid linker

<400> 53

Pro Pro Pro Pro

1

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 54

Asp Leu Cys Leu Arg Asp Trp Gly Cys Leu Trp

1

5

10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 55

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 56

Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Gly Asp

1 5 10 15

<210> 57

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 57

Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Glu Asp Asp Glu

20

<210> 58

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 58

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Gly Arg Ser Val

20

<210> 59

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 59

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Gly Arg Ser Val Lys

20

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 60

Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp

1 5 10 15

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 61

Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu

1 5 10 15

Asp Asp

<210> 62

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 62

Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp

1 5 10 15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 63

Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp

1 5 10 15

<210> 64

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 64

Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Ala Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu

1 5 10 15

Asp Asp

<210> 65

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 65

Glu Val Arg Ser Phe Cys Thr Arg Trp Pro Ala Glu Lys Ser Cys Lys

1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly

20

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 66

Arg Ala Pro Glu Ser Phe Val Cys Tyr Trp Glu Thr Ile Cys Phe Glu

1 5 10 15

Arg Ser Glu Gln

20

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 67

Glu Met Cys Tyr Phe Pro Gly Ile Cys Trp Met

1 5 10

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> albumin binding peptide

<400> 68

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> flexible linker

<400> 69

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> flexible linker

<400> 70

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 496g3 - CDRH1

<400> 71

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Asn Met Ala

1 5 10

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 496g3 - CDRH2

<400> 72

Thr Ile Thr Tyr Glu Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 73

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 496g3 - CDRH3

<400> 73

Pro Pro Gln Tyr Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Trp Phe Ala His

1 5 10 15

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 496g3 - CDRL1

<400> 74

Arg Ala Asp Glu Ser Val Arg Thr Leu Met His

1 5 10

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 496g3 - CDRL2

<400> 75

Leu Val Ser Asn Ser Glu Ile

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 496g3 - CDRL3

<400> 76

Gln Gln Thr Trp Ser Asp Pro Trp Thr

1 5

<210> 77

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light Chain variable region of antibody 496g3

<400> 77

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asp Glu Ser Val Arg Thr Leu

20 25 30

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Leu Val Ser Asn Ser Glu Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Arg Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Ser Asp Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 78

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain variable region of antibody 496g3

<400> 78

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Tyr Glu Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Pro Gln Tyr Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Trp Phe
 100 105 110
 Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 79

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding Light Chain variable region of antibody 496g3

<400> 79

gcgatccagc tgacgcaatc gccgtcctcg ctgtcagcga gcgtgggcga tagggtcacg 60
 atcacctgtc gggccgatga atcggtcgcg actctgatgc attggtatca gcaaaagccg 120
 ggaaaggccc cgaagctgct catctacctg gtgagcaatt ccgagatcgg agtccccgac 180
 cgcttcagcg gttcgggcag cggaaccgac ttccgcctga ctatttcctc gctgcaaccc 240
 gaggacttcg ctacttacta ctgccagcag acctggtcag atccgtggac tttcgggcag 300
 ggaaccaaag tggaaatcaa gcggact 327

<210> 80

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding Heavy Chain variable region of antibody 496g3

<400> 80

gaagtgcagc tgggtggaatc cggcggagga ctggtgcagc ccggtggatc attgagactt 60
 tcgtgtgcag catcaggctt tactttctcg gactacaata tggcatgggt gcgccaagcg 120
 cctggtaaag gactggaatg ggtcgcgact atcacttatg aggggcggaa tacttactat 180

agggatagcg tcaaaggacg ctttaccatc tcacgggaca acgctaagaa ctccctgtac 240
 ctccaaatga actcactcag ggcagaagat acggccgtgt actactgtgc ctgcctccg 300
 cagtactacg aagggtccat ctaccgcctt tggttcgccc attggggaca gggaacgctg 360
 gtgactgtgt cctcg 375

<210> 81

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light chain (VL-CL) of antibody 496g3

<400> 81

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asp Glu Ser Val Arg Thr Leu
 20 25 30

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Leu Val Ser Asn Ser Glu Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Arg Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Ser Asp Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 82

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain (VH-CH1) of antibody 496g3

<400> 82

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Tyr Glu Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Pro Gln Tyr Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Trp Phe
 100 105 110
 Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys

225

<210> 83

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding light chain of antibody 496g3 (no signal sequence)

<400> 83

```
gcgatccagc tgacgcaatc gccgtcctcg ctgtcagcga gcgtgggcga tagggtcacg 60
atcacctgtc gggccgatga atcgggccgc actctgatgc attggtatca gcaaaagccg 120
ggaaaggccc cgaagctgct catctacctg gtgagcaatt ccgagatcgg agtcccggac 180
cgcttcagcg gttcgggcag cggaaccgac ttccgcctga ctatttctc gctgcaaccc 240
gaggacttcg ctacttacta ctgccagcag acctggtcag atccgtggac tttcgggcag 300
ggaaccaaag tggaaatcaa gcggactgtc gccgcacctt cgggtgttcat ctttccaccg 360
tcagacgaac aacttaaaag cggaactgcg tcggtggtgt gcctccttaa caacttttac 420
cctagagaag ccaaggtcca gtggaaggtg gacaatgccc ttcaaagcgg aaacagccag 480
gagtccgtga ccgagcagga ctcaaaagat tcgacttata gcttgtcgtc cacgctcacc 540
ctgagcaaag cagactacga aaagcacaag gtgtacgctt gcgaagtgc ccaccaaggc 600
ttgtcgagcc ccgtgaccaa atccttcaac cggggagaat gc 642
```

<210> 84

<211> 684

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding heavy chain of antibody 496g3 (no signal sequence)

<400> 84

```
gaagtgcagc tgggtggaatc cggcggagga ctggtgcagc ccggtggatc attgagactt 60
tcgtgtgcag catcaggctt tactttctcg gactacaata tggcatgggt gcgccaagcg 120
cctggtaaag gactggaatg ggtcgcgact atcacttatg aggggcggaa tacttactat 180
agggatagcg tcaaaggacg ctttaccatc tcacgggaca acgctaagaa ctccctgtac 240
ctccaaatga actcactcag ggcagaagat acggccgtgt actactgtgc ctgcctccg 300
cagtactacg aaggggtccat ctaccgcctt tggttcgccc attggggaca gggaacgctg 360
gtgactgtgt cctcggttc gaccaagggg ccctcggtgt tccctctggc gcctagctcc 420
aagagcactt caggcggaac ggetgcctc ggatgcctgg tcaaggacta cttcccagag 480
cccgtgaccg tgtcatggaa cagcggagct ctgactagcg gagtgcacac ctttcggcg 540
gtgctgcaaa gctcaggcct gtactcgtc tctcagtgg tcaactgtcc gtctctctcg 600
ctggggactc aaacgtacat ctgcaacgtc aatcacaac cgtcaaatac caaagtcgac 660
aagaaggtcg agcctaagtc gtgc 684
```

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 2109 CDRH1

<400> 85

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn Tyr Ile His

1 5 10

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 2109 CDRH2

<400> 86

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Thr

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 2109 CDRH3

<400> 87

Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL1

<400> 88

Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly Leu Ala

1 5 10

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL2

<400> 89

Asp Ser Ser Thr Leu His Thr

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL3

<400> 90

Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 91

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light Chain variable region of antibody 2109 gL18

<400> 91

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ser Ser Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Thr Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr

100 105

<210> 92

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain variable region of antibody 2109 gH2

<400> 92

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ala Lys Asn Ser Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 93

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding Light Chain variable region of antibody 2109 gL18

<400> 93

gatatacaga tgaccaatc accaagctct ctgagtgcct ccgttggcga tcgcgttaca 60
 attacctgcc gagctagcga ggatatatac tcaggactgg cctggtacca gcaaaagcct 120
 ggcaaagtgc ctaagctcct gatctacgac tccagtaccc tgcacactgg tgtgccaagc 180
 cgcttttagcg gaactggatc tggaaccgac tatacactga cgatttctc actgcaaccg 240
 gaagacgtgg caacctactt ctgtcagcaa aactacgact tccccttgac gtttgggcaa 300
 gggacaaaagc tggagatcaa acgtacc 327

<210> 94

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding Heavy Chain variable region of antibody 2109 gH2

<400> 94

gaagttcaac tggtcgaaag cggaggtggg ctcgtgaaac ctggcggatc tctgcgattg 60
 tcatgtgctg caagcggcta cacgtttacc gataactata tccactgggt gcgacaagca 120

ccagggaagg gactggaatg gattggatat attaaccgga gctccgccta cgcacactac 180
aacgagaaat tcaagaccgc attcaccatc tccgtggaca aagccaagaa ctccgcttac 240
ctgcaaatga actctctgcg ggccgaagac actgccgtgt attactgcac ccgccgatac 300
tatagcgcta tgccctttgc ctactgggga caaggacac tggtcactgt ctcaagt 357

<210> 95

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light Chain variable region of antibody 2109 gL18

<400> 95

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5						10				15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr	Ser	Gly
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Asp	Ser	Ser	Thr	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Thr	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70						75				80	
Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Asn	Tyr	Asp	Phe	Pro	Leu
				85						90				95	
Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr			
			100							105					

<210> 96

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain variable region of antibody 2109 gH2

<400> 96

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5						10				15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Asn
			20							25				30	
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Cys	Leu	Glu	Trp	Ile
			35				40					45			
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ala	His	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe

50	55	60			
Lys Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ala Lys Asn Ser Ala Tyr					
65	70	75	80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85	90	95		
Thr Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly					
	100	105	110		
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
115					

<210> 97

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding Light Chain variable region of antibody 2109 gL18

<400> 97

gatatccaga tgaccacgac gccgtccagc ctctccgcct ccgtgggaga cagagtgcac 60
 atcacttgca gagcatcaga ggacatctac tctggccttg cttggtatca gcagaagccg 120
 ggaaaggtgc ccaaactgct catctatgac tcctcgaccc tccacacggg agtgccatcg 180
 cgcttcagcg ggaccggatc tgggaccgac tacaccctga ccatttcate gctccagccg 240
 gaggatgttg ccacttactt ctgccaacag aattacgact tcccacttac ttttgatgt 300
 ggcactaagc tcgaaatcaa gcgcacc 327

<210> 98

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding Heavy Chain variable region of antibody 2109 gH2

<400> 98

gaagtgcagt tgggtggagc ggggggaggg ttggtgaagc caggaggatc attgcggttg 60
 tcatgtgcgg cttegggcta cactttcact gacaattaca ttcactgggt gcgacaagca 120
 ccagggaagt gcctcgaatg gattggttac atcaaccgt caagcgata cgcccattac 180
 aacgaaaagt tcaagaccg gttcaccatc tccgtggata aggcgaaaaa cagcgcgtac 240
 cttcagatga actccctgcg ggccgaggat accgccgttt actactgcac tagacgttac 300
 tacagcgcca tgccgttcgc gtactgggga caaggcactc tggtcaccgt gtcgtcg 357

<210> 99

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv (VH-VL) of antibody 2109 gH2gL18

<400> 99

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ala Lys Asn Ser Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
 130 135 140
 Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
 145 150 155 160
 Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln
 165 170 175
 Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Thr
 180 185 190
 Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr
 195 200 205
 Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr
 210 215 220
 Tyr Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 245

<210> 100

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding scFv (VH-VL) of antibody 2109 gH2gL18

<400> 100

```

gaagttcaac tggtcgaaag cggaggtggg ctcgtgaaac ctggcggatc tctgcgattg 60
tcatgtgctg caagcggcta cacgtttacc gataactata tccactgggt gcgacaagca 120
ccagggaagg gactggaatg gattggatat attaaccga gctccgccta cgcacactac 180
aacgagaaat tcaagacccg attcaccatc tccgtggaca aagccaagaa ctccgcttac 240
ctgcaaatga actctctgcg ggccgaagac actgccgtgt attactgcac ccgccgatac 300
tatagcgcta tgccctttgc ctactgggga caagggaac tggtcactgt ctcaagtgga 360
ggtaggcggt ctggcgggtg cggttccggt ggcggtggat cgggaggtgg cggttctgat 420
atacagatga cccaatcacc aagctctctg agtcttccg ttggcgatcg cgttacaatt 480
acctgccgag ctacgagga tatatactca ggactggcct ggtaccagca aaagcctggc 540
aaagtgccta agctcctgat ctacgaactc agtacctgc aactgggtgt gccaaagcgc 600
tttagcggaa ctggatctgg aaccgaactat aactgacga ttctctcact gcaaccggaa 660
gacgtggcaa cctacttctg tcagcaaaac tacgaattcc ccttgacgtt tgggcaaggg 720
acaaagctgg agatcaaacg tacc 744

```

<210> 101

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> dsscFv (VH-VL) of antibody 2109 gH2gL18

<400> 101

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn
20           25           30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35           40           45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe
50           55           60
Lys Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ala Lys Asn Ser Ala Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85           90           95
Thr Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100          105          110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115          120          125

```

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
 130 135 140
 Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
 145 150 155 160
 Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln
 165 170 175
 Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Thr
 180 185 190
 Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr
 195 200 205
 Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr
 210 215 220
 Tyr Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 245

<210> 102

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding dsscFv (VH-VL) of antibody 2109 gH2gL18

<400> 102

gaagtgcagt tgggtggagtc ggggggaggg ttggtgaagc caggaggatc attgcggttg 60
 tcatgtgcgg cttcgggcta cactttcact gacaattaca ttcactgggt gcgacaagca 120
 ccagggaagt gcctcgaatg gattggctac atcaaccgt caagcgcata cgcccattac 180
 aacgaaaagt tcaagaccg gttcaccatc tccgtggata aggcgaaaaa cagcgcgtag 240
 cttcagatga actccctgcg ggccgaggat accgcccgtt actactgcac tagacggtac 300
 tacagcgcca tgccgttcgc gtactgggga caaggcactc tggtcaccgt gtcgtcggga 360
 ggaggaggct cgggtggagg cggatcgggt ggcggaggga gcggcggagg cggttcggat 420
 atccagatga ccagtcgcc gtccagctc tccgctccg tgggagacag agtgacgac 480
 acttgcagag catcagagga catctactct ggcttgcgtt ggtatcagca gaagccggga 540
 aaggtgcca aactgctcat ctatgaactc tcgacctcc acacgggagt gccatcgcg 600
 ttcagcggga ccgatctgg gaccgaactc acctgacca ttcatcgct ccagccggag 660
 gatgttgcca ctacttctg ccaacagaat tacgaattcc cacttacttt tggatgtggc 720
 actaagctcg aaatcaagcg cacc 744

<210> 103

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 645 CDRH1

<400> 103

Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn

1 5 10

<210> 104

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 645 CDRH2

<400> 104

Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly

1 5 10 15

<210> 105

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 645 CDRH3

<400> 105

Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 106

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 645 CDRL1

<400> 106

Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser

1 5 10

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 645 CDRL2

<400> 107

Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 645 CDRL3

<400> 108

Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr

1 5 10

<210> 109

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light Chain variable region of antibody 645

<400> 109

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn

20 25 30

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile

85 90 95

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

100 105 110

<210> 110

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain variable region of antibody 645

<400> 110

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 111

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding Light Chain variable region of antibody 645

<400> 111

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt gtttccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
 attacctgtc agtcctctcc gagcgtttgg tccaacttcc tgagctggta ccagcagaaa 120
 ccgggtaaaag ccccgaact gctgatctac gaggcgtcta aactgacctc tgggtgtaccg 180
 tcccgttttct ctggctctgg ctctggtacg gacttcactc tgaccatctc ctctctgcag 240
 ccggaagact ttgcaacgta ctactgcggt ggtgggttact ctccatctc tgacaccacg 300
 ttcggtggag gcaccaaagt tgaaatcaaa cgtacg 336

<210> 112

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding Heavy Chain variable region of antibody 645

<400> 112

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60
 tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc aactacgcga ttaactgggt acgtcaggca 120

ccgggtaaag gtctggaatg gatcggcac atctgggcct ctggtacgac cttctacgct 180
 acttggggcca aaggtcgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240
 cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg taccgttccg 300
 ggctattcta ctgcaccgta cttcgacctg tggggtcagg gtactctggt taccgtctcg 360
 agt 363

<210> 113

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light Chain variable region of antibody 645

<400> 113

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Gln	Ser	Ser	Pro	Ser	Val	Trp	Ser	Asn
			20				25					30			
Phe	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
		35				40					45				
Ile	Tyr	Glu	Ala	Ser	Lys	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
	50				55				60						
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65				70				75						80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Gly	Gly	Tyr	Ser	Ser	Ile
			85				90					95			
Ser	Asp	Thr	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr
		100				105					110				

<210> 114

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain variable region of antibody 645

<400> 114

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1			5				10					15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Ser	Asn	Tyr
		20				25					30				
Ala	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Cys	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40					45				

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 115

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding Light Chain variable region of antibody 645

<400> 115

gacatccaga tgacgcagtc accatcgctc gtgtcagcat ccgtgggaga cagagtgacc 60
 attacttgct agtcctcgcc ctcaagtctg tcgaattttc tgtcgtggta tcaacaaaag 120
 ccagggaag ccccaaagct gctgatctac gaggccagca aactcacttc gggagtcctt 180
 agcagattct cgggctcggg atcgggcacc gatttcaccc tcaccattag ctcaactcaa 240
 ccagaggatt ttgccaccta ctactgcggc ggtggctaca gctcaatctc agataccact 300
 ttcggatgct gtactaaggt cgagattaag cgcact 336

<210> 116

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding Heavy Chain variable region of antibody 645

<400> 116

gaagtgcagc tcttgaatc ggggtggagga ctggtgcagc cgggaggttc cctgaggctg 60
 agctgtgctg tgtccggcat cgacctttca aactacgcca tcaattgggt gaggcaggcg 120
 ccaggaaaat gtctcgaatg gatcgggtatc atctgggcta gcggaactac cttctatgct 180
 acgtgggcca agggacggtt cactatctcg cgcgataaca gcaagaacac cgtgtacctc 240
 cagatgaaca gcctccgggc tgaggacact gcagtctatt actgcgcgag aacggtgccg 300
 ggctactcca ctgcaccgta cttcgacttg tggggacagg gaactcttgt gaccgtcagc 360
 tcg 363

<210> 117

<211> 253

<211> 759

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding scFv (VH-VL) of antibody 645

<400> 118

```

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc aactacgcga ttaactgggt acgtcaggca 120
ccgggtaaag gtctggaatg gatcggcatc atctgggcct ctggtacgac cttctacgct 180
acttgggcca aaggtcgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240
cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacaact gcggtttact attgcgcgcg taccgttccg 300
ggctattcta ctgcaccgta cttcgacctg tggggtcagg gtactctggt taccgtctcg 360
agtggaggtg gcggttctgg cggtggcggt tccggtggcg gtggatcggg aggtggcggt 420
tctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtgtttccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 480
actattacct gtcagtcttc tccgagcggt tgggtccaact tcctgagctg gtaccagcag 540
aaaccgggta aagccccgaa actgctgate tacgaggcgt ctaaactgac ctctgggtga 600
ccgtcccgtt tctctggctc tggtctctgt acggacttca ctctgacct ctctctctg 660
cagccggaag actttgcaac gtactactgc ggtggtggtt actcttccat ctctgacacc 720
acgttcggtg gaggcaccaa agttgaaatc aaacgtacg 759

```

<210> 119

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> dsscFv (VH-VL) of antibody 645

<400> 119

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20           25           30
Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35           40           45
Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50           55           60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65           70           75           80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85           90           95
Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100          105          110

```

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
 130 135 140
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 145 150 155 160
 Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 165 170 175
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu
 180 185 190
 Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 210 215 220
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr
 225 230 235 240
 Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 245 250

<210> 120

<211> 759

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding dsscFv (VH-VL) of antibody 645

<400> 120

gaagtgcagc tcttggaaac ggggtggagga ctggtgcagc cgggagggtc cctgaggctg 60
 agctgtgctg tgtccggcat cgacatttca aactacgcca tcaattgggt gaggcaggcg 120
 ccaggaaaat gtctcgaatg gatcgggtatc atctgggcta gcggaactac cttctatgcg 180
 acgtgggcca agggacgggt cactatctcg cgcgataaca gcaagaacac cgtgtacctc 240
 cagatgaaca gcctccgggc tgaggacact gcagtctatt actgcgcgag aacggtgccg 300
 ggctactcca ctgcaccgta cttcgacttg tggggacagg gaactcttgt gaccgtcagc 360
 tcgggaggag gaggttcggg cggaggtggg tcgggaggag gtggaagcgg aggaggcgga 420
 tcggacatcc agatgacgca gtcaccatcg tccgtgtcag catccgtggg agacagagtg 480
 accattactt gtcagtcctc gccctcagtc tggtcgaatt ttctgtcgtg gtatcaacaa 540
 aagccaggga aagccccaaa gctgctgac tacgaggcca gcaaactcac ttcgggagtc 600
 cctagcagat tctccggctc gggatcgggc accgatttca ccctcaccat tagctcactc 660
 caaccagagg attttgccac ctactactgc ggcggtggct acagctcaat ctcagatacc 720
 actttcggat gcggtactaa ggtcgagatt aagcgact 759

<210> 121

<211> 487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 496.g3 HC-2109VHVL

<400> 121

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
			20					25					30		
Asn	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Thr	Ile	Thr	Tyr	Glu	Gly	Arg	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65				70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Ser	Pro	Pro	Gln	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Ser	Ile	Tyr	Arg	Leu	Trp	Phe
		100						105					110		
Ala	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
	115					120					125				
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
	130					135					140				
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
145				150					155					160	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
			165					170				175			
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
		180						185				190			
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
	195					200					205				
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu
	210					215				220					
Pro	Lys	Ser	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu
225				230					235					240	
Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser
			245					250				255			
Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr

260	265	270
Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly		
275	280	285
Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys		
290	295	300
Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ala Lys Asn Ser Ala Tyr Leu		
305	310	315
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr		
325	330	335
Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
340	345	350
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
355	360	365
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln		
370	375	380
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr		
385	390	395
Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln		
405	410	415
Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Thr Leu		
420	425	430
His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp		
435	440	445
Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr		
450	455	460
Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr		
465	470	475
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr		
485		

<210> 122

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding 496.g3 HC-2109VHVL

<400> 122

gaagtgcagc tgggtggaatc cggcggagga ctggtgcagc ccggtggatc attgagactt 60
tcgtgtgcag catcaggctt tactttctcg gactacaata tggcatgggt gcgccaagcg 120
cctggtaaag gactggaatg ggtcgcgact atcacttatg aggggcggaa tacttactat 180

agggatagcg tcaaaggacg ctttaccatc tcacgggaca acgctaagaa ctccctgtac 240
 ctccaaatga actcactcag ggcagaagat acggccgtgt actactgtgc ctgcctcccg 300
 cagtactacg aagggtccat ctaccgcctt tggttcgccc attggggaca gggaacgctg 360
 gtgactgtgt cctcggcttc gaccaagggg ccctcgggtg tccctctggc gcctagctcc 420
 aagagcactt caggcggaac ggctgccctc ggatgcctgg tcaaggacta cttcccagag 480
 cccgtgaccg tgtcatggaa cagcggagct ctgactagcg gagtgcacac ctttccggcg 540
 gtgctgcaaa gctcaggcct gtactcgtc tcctcagtgg tcaactgtccc gtctctctcg 600
 ctggggactc aaacgtacat ctgcaacgtc aatcaciaaac cgtcaaatac caaagtcgac 660
 aagaaggctc agcctaagtc gtgcagcggg ggaggtggat ccggcggtgg aggtagcgaa 720
 gttcaactgg tcgaaagcgg aggtgggctc gtgaaacctg gcggatctct gcgattgtca 780
 tgtgtgcaa gcggctacac gtttaccgat aactataatc actgggtgcg acaagcacca 840
 gggaagggac tggaatggat tggatatatt aacccgagct ccgctacgc aactacaac 900
 gagaaattca agacccgatt caccatctcc gtggacaaag ccaagaactc cgcttacctg 960
 caaatgaact ctctgcgggc cgaagacact gccgtgtatt actgcaccgc ccgatactat 1020
 agcgctatgc cctttgccta ctggggacaa gggacactgg tcaactgtctc aagtggaggt 1080
 ggcggttctg gcggtggcgg ttccgggtgg ggtggatcgg gaggtggcgg ttctgatata 1140
 cagatgaccc aatcaccaag ctctctgagt gcttccgttg gcgatcgcgt tacaattacc 1200
 tgccgagcta gcgaggatat atactcagga ctggcctggt accagcaaaa gcctggcaaa 1260
 gtgcctaagc tcctgatcta cgactccagt accctgcaca ctggtgtgcc aagccgcttt 1320
 agcggaaactg gatctggaac cgactataca ctgacgattt cctcactgca accggaagac 1380
 gtggcaacct acttctgtca gcaaaactac gacttccctt tgacgtttgg gcaagggaca 1440
 aagctggaga tcaaactgtac c 1461

<210> 123

<211> 487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 496.g3 HC-2109VHVL

<400> 123

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Ile Thr Tyr Glu Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85				90						95	
Ala	Ser	Pro	Pro	Gln	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Ser	Ile	Tyr	Arg	Leu	Trp	Phe	
					100				105						110	
Ala	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	
					115				120						125	
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	
							130								135	
																140
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	
145							150				155					160
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	
							165				170					175
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
							180				185					190
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	
							195									200
																205
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	
							210									215
																220
Pro	Lys	Ser	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	
225							230				235					240
Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	
							245				250					255
Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	
							260				265					270
Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	
							275				280					285
Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ala	His	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	
							290				295					300
Thr	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ala	Lys	Asn	Ser	Ala	Tyr	Leu	
305							310				315					320
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	
							325				330					335
Arg	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Met	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
							340				345					350
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
							355				360					365
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	
							370				375					380
Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	

385	390	395	400
Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln			
	405	410	415
Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Thr Leu			
	420	425	430
His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp			
	435	440	445
Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr			
	450	455	460
Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr			
465	470	475	480
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr			
	485		

<210> 124

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding 496.g3 HC-2109VHVL

<400> 124

```

gaagtgcagc tgggtggaatc cggcggagga ctggtgcagc ccggtggatc attgagactt 60
tcgtgtgcag catcaggctt tactttctcg gactacaata tggcatgggt gcgccaagcg 120
cctggtaaag gactggaatg ggtcgcgact atcacttatg aggggcggaa tacttactat 180
agggatagcg tcaaaggacg ctttaccatc tcacgggaca acgctaagaa ctccctgtac 240
ctccaaatga actcactcag ggcagaagat acggccgtgt actactgtgc ctgcctcccg 300
cagtactacg aagggtccat ctaccgcctt tggttcgccc attggggaca gggaacgctg 360
gtgactgtgt cctcggcttc gaccaagggg ccctcggtgt tccctctggc gcctagctcc 420
aagagcactt caggcggaac ggctgccctc ggatgcctgg tcaaggacta cttcccagag 480
cccgtgaccg tgtcatggaa cagcggagct ctgactagcg gagtgcacac ctttccggcg 540
gtgctgcaaa gctcaggcct gtactcgtc tctcagtggt tcaactgtccc gtctctctcg 600
ctggggactc aaacgtacat ctgcaacgtc aatcacaaac cgtcaaatac caaagtcgac 660
aagaaggctg agcctaagtc gtgcagtgga ggtgggggca ccggagggtg cggttcagaa 720
gttcaactgg tcgaaagcgg aggtgggctc gtgaaacctg gcggatctct gcgattgtca 780
tgtgtgcaa gcggctacac gtttaccgat aactatatcc actgggtgcg acaagcacca 840
gggaagggac tggaatggat tggatatatt aacccgagct ccgcctacgc aactacaac 900
gagaaattca agacccgatt caccatctcc gtggacaaag ccaagaactc cgcttacctg 960
caaatgaact ctctgcgggc cgaagacact gccgtgtatt actgcacccg ccgatactat 1020
agcgtatgc cctttgccta ctggggacaa gggacactgg tcaactgtctc aagtggaggt 1080
ggcggttctg gcggtggcgg ttccggtggc ggtggatcgg gaggtggcgg ttctgatata 1140

```

cagatgaccc aatcaccaag ctctctgagt gcttccgttg gcgatcgcgt tacaattacc 1200
 tgccgagcta gcgaggatat atactcagga ctggcctggt accagcaaaa gcctggcaaa 1260
 gtgcctaagc tcctgatcta cgactccagt accctgcaca ctggtgtgcc aagccgcttt 1320
 agcggaactg gatctggaac cgactataca ctgacgattt cctcactgca accggaagac 1380
 gtggcaacct acttctgtca gcaaaactac gacttcccct tgacgtttgg gcaagggaca 1440
 aagctggaga tcaaacgtac c 1461

<210> 125

<211> 487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 496.g3 HC-2109dsVHVL

<400> 125

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5						10				15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
			20						25					30	
Asn	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40						45		
Ala	Thr	Ile	Thr	Tyr	Glu	Gly	Arg	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65				70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Ser	Pro	Pro	Gln	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Ser	Ile	Tyr	Arg	Leu	Trp	Phe
		100						105					110		
Ala	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
		115					120						125		
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
	130						135					140			
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
145					150					155				160	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
				165					170					175	
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
		180							185				190		
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
		195						200						205	

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu		
210	215	220
Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu		
225	230	235 240
Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser		
245	250	255
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn Tyr		
260	265	270
Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly		
275	280	285
Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys		
290	295	300
Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ala Lys Asn Ser Ala Tyr Leu		
305	310	315 320
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr		
325	330	335
Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
340	345	350
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
355	360	365
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln		
370	375	380
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr		
385	390	395 400
Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln		
405	410	415
Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Thr Leu		
420	425	430
His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp		
435	440	445
Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr		
450	455	460
Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr		
465	470	475 480
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr		
485		

<210> 126

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding 496.g3 HC-2109dsVHVL

<400> 126

```

gaagtgcagc tgggtggaatc cggcggagga ctggtgcagc ccggtggatc attgagactt 60
tcgtgtgcag catcaggctt tactttctcg gactacaata tggcatgggt gcgccaagcg 120
cctggtaaag gactggaatg ggtcgcgact atcacttatg aggggcggaa tacttactat 180
agggatagcg tcaaaggacg ctttaccatc tcacgggaca acgctaagaa ctccctgtac 240
ctccaaatga actcactcag ggcagaagat acggccgtgt actactgtgc ctgcctccg 300
cagtactacg aagggtccat ctaccgcctt tggttcgccc attggggaca gggaacgctg 360
gtgactgtgt cctcggttc gaccaagggg ccctcggtgt tccctctggc gcctagctcc 420
aagagcactt caggcggaac ggetgcctc ggatgcctgg tcaaggacta cttcccagag 480
cccgtgaccg tgtcatggaa cagcggagct ctgactagcg gagtgcacac ctttcggcg 540
gtgctgcaaa gctcaggcct gtactcgtc tcctcagtgg tcaactgtcc gtctctctcg 600
ctggggactc aaacgtacat ctgcaacgtc aatcaciaaac cgtcaaatac caaagtcgac 660
aagaaggctc agcctaagtc gtgcagcgga ggaggtggat ccggcgggtg aggtagcgaa 720
gtgcagttgg tggagtcggg gggagggttg gtgaagccag gaggatcatt gcggttgta 780
tgtgcggctt cgggctacac tttcactgac aattacattc actgggtgcg acaagcacca 840
gggaagtgcc tcgaatggat tggctacatc aaccgtcaa gcgcatacgc ccattacaac 900
gaaaagttca agaccgggtt caccatctcc gtggataagg cgaaaaacag cgcgtacctt 960
cagatgaact cctgcgggc cgaggatacc gccgtttact actgcactag acggtactac 1020
agcgccatgc cgttcgcgta ctggggacaa ggcactctgg tcaccgtgtc gtcgggagga 1080
ggaggctcgg gtggaggcgg atcgggtggc ggaggagcgc gcggaggcgg ttcggatatc 1140
cagatgaccc agtcgccgtc cagcctctcc gcctccgtgg gagacagagt gacgatcact 1200
tgcagagcat cagaggacat ctactctggc cttgcttgggt atcagcagaa gccgggaaag 1260
gtgcccacaa tgctcatcta tgactcctcg accctccaca cgggagtgcc atcgcgcttc 1320
agcgggaccg gatctgggac cgactacacc ctgaccattt catcgctcca gccggaggat 1380
gttgccactt acttctgcca acagaattac gacttccac ttacttttgg atgtggcact 1440
aagctcgaaa tcaagcgac c 1461

```

<210> 127

<211> 487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 496.g3 HC-2109dsVHVL

<400> 127

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

```

20	25	30
Asn Met Ala Trp Val Arg Gln	Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35	40	45
Ala Thr Ile Thr Tyr Glu Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Ser Pro Pro Gln Tyr Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Trp Phe		
100	105	110
Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr		
115	120	125
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser		
130	135	140
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu		
145	150	155
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His		
165	170	175
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser		
180	185	190
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
195	200	205
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu		
210	215	220
Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Glu		
225	230	235
Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser		
245	250	255
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn Tyr		
260	265	270
Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly		
275	280	285
Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Ala His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys		
290	295	300
Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ala Lys Asn Ser Ala Tyr Leu		
305	310	315
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr		
325	330	335

Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
340	345	350
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser		
355	360	365
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln		
370	375	380
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr		
385	390	395
Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln		
405	410	415
Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Thr Leu		
420	425	430
His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp		
435	440	445
Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr		
450	455	460
Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr		
465	470	475
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr		
485		

<210> 128

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding 496.g3 HC-2109dsVHVL

<400> 128

```

gaagtgcagc tgggtggaatc cggcggagga ctggtgcagc ccggtggatc attgagactt 60
tcgtgtgcag catcaggctt tactttctcg gactacaata tggcatgggt gcgccaagcg 120
cctggtaaag gactggaatg ggtcgcgact atcacttatg aggggcggaa tacttactat 180
agggatagcg tcaaaggacg ctttaccatc tcacgggaca acgctaagaa ctccctgtac 240
ctccaaatga actcactcag ggcagaagat acggccgtgt actactgtgc ctgcctccg 300
cagtactacg aagggtccat ctaccgcett tggttcgccc attggggaca gggaacgctg 360
gtgactgtgt cctcggttc gaccaagggg ccctcggtgt tccctctggc gctagctcc 420
aagagcactt caggcggaac ggctgcctc ggatgcctgg tcaaggacta ctcccagag 480
cccgtgaccg tgtcatggaa cagcggagct ctgactagcg gagtgcacac ctttcggcg 540
gtgctgcaaa gctcaggcct gtactcgtc tcctcagtgg tcaactgtccc gtctcctcg 600
ctggggactc aaacgtacat ctgcaacgtc aatcaciaaac cgtcaaatac caaagtcgac 660
aagaaggctc agcctaagtc gtgcagtgga ggtgggggca ccggaggtgg cggttcagaa 720

```

gtgcagttgg tggagtcggg gggagggttg gtgaagccag gaggatcatt gcggttgtca 780
 tgtgcggctt cgggctacac ttctactgac aattacattc actgggtgcg acaagcacca 840
 gggaagtgcc tcgaatggat tggctacatc aaccctcaa gcgcatacgc ccattacaac 900
 gaaaagtcca agacccggtt caccatctcc gtggataagg cgaaaaacag cgcgtacctt 960
 cagatgaact ccctgcgggc cgaggatacc gccgtttact actgcactag acggtactac 1020
 agcgccatgc cgttcgcgta ctggggacaa ggcactctgg tcaccgtgtc gtcgggagga 1080
 ggaggctcgg gtggaggcgg atcgggtggc ggaggggagcg gcggaggcgg ttcggatata 1140
 cagatgaccc agtcgccgtc cagcctctcc gcctccgtgg gagacagagt gacgatcact 1200
 tgcagagcat cagaggacat ctactctggc cttgcttggg atcagcagaa gccgggaaag 1260
 gtgccccaaac tgctcatcta tgactcctcg accctccaca cgggagtgcc atcgcgcttc 1320
 agcgggaccg gatctgggac cgactacacc ctgaccattt categctcca gccggaggat 1380
 gttgccactt acttctgcca acagaattac gaattccac ttacttttgg atgtggcact 1440
 aagctcgaaa tcaagcgac c 1461

<210> 129

<211> 478

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 496.g3 LC-645VHVL

<400> 129

Ala	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10						15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Asp	Glu	Ser	Val	Arg	Thr	Leu
			20					25						30	
Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35					40						45	
Tyr	Leu	Val	Ser	Asn	Ser	Glu	Ile	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly
			50					55						60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70				75						80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Trp	Ser	Asp	Pro	Trp
				85				90						95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
				100				105						110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
				115				120						125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
				130				135						140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln

145	150	155	160
Glu Ser Val Thr	Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
	180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr	His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
	210	215	220
Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
225	230	235	240
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser	Gly Ile Asp Leu Ser Asn		
	245	250	255
Tyr Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro	Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
	260	265	270
Ile Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr	Phe Tyr Ala Thr Trp Ala		
	275	280	285
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser	Lys Asn Thr Val Tyr		
	290	295	300
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys		
305	310	315	320
Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr	Phe Asp Leu Trp		
	325	330	335
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
	340	345	350
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Asp Ile		
	355	360	365
Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser	Val Gly Asp Arg		
	370	375	380
Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser	Asn Phe Leu		
385	390	395	400
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr			
	405	410	415
Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser			
	420	425	430
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu			
	435	440	445
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp			
450	455	460	

Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

465

470

475

<210> 130

<211> 1434

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding 496.g3 LC-645VHVL

<400> 130

```

gcgatccagc tgacgcaatc gccgtcctcg ctgtcagcga gcgtgggcga tagggtcacg 60
atcacctgtc gggccgatga atcgggtccgc actctgatgc attggtatca gcaaaagccg 120
ggaaaggccc cgaagctgct catctacctg gtgagcaatt ccgagatcgg agtcccggac 180
cgcttcagcg gttcgggcag cggaaccgac ttccgcctga ctatttctc gctgcaaccc 240
gaggacttcg ctacttacta ctgccagcag acctggtcag atccgtggac ttccgggcag 300
ggaaccaaaag tggaatatcaa gcggactgtc gccgcacctt cgggtgttcat ctttccaccg 360
tcagacgaac aacttaaaag cggaactgcg tcggtggtgt gcctccttaa caacttttac 420
cctagagaag ccaaggtcca gtggaaggtg gacaatgccc ttcaaagcgg aaacagccag 480
gagtcctgta ccgagcagga ctcaaaagat tcgacttata gcttgctcgc cacgctcacc 540
ctgagcaaaag cagactacga aaagcacaag gtgtacgctt gcgaagtgc ccaccaaggc 600
ttgtcgagcc ccgtgaccaa atccttcaac cggggagaat gcagcgggtg cgagggtcc 660
ggaggaggag gatcagaggt tcagctgctg gagtctggag gcgggcttgt ccagcctgga 720
gggagcctgc gtctctcttg tgcagtaagc ggcatcgacc tgtccaacta cgcgattaac 780
tggttacgtc aggcaccggg taaaggtctg gaatggatcg gcatcatctg ggcctctggt 840
acgaccttct acgctacttg ggccaaaggt cgtttcacca tctcccgta caactctaaa 900
aacaccgtgt acctgcagat gaactctctg cgtgcggaag aactgcggt ttactattgc 960
gcgcgtaccg ttccgggcta ttctactgca ccgtacttcg acctgtgggg tcagggtact 1020
ctggttaccg tctcgagtgg aggtggcgggt tctggcgggt gcggttccgg tggcgggtga 1080
tcgggaggtg gcggttctga tatccagatg acccagagtc caagcagtgt ttccgccagc 1140
gtaggcgatc gtgtgactat tacctgtcag tcctctccga gcgtttggtc caacttctg 1200
agctgggtacc agcagaaaacc gggtaaagcc ccgaaactgc tgatctacga ggcttctaaa 1260
ctgacctctg gtgtaccgtc ccgtttctct ggctctggct ctggtacgga cttcactctg 1320
accatctcct ctctgcagcc ggaagacttt gcaacgtact actgcggtgg tggttactct 1380
tccatctctg acaccacgtt cgggtggagge accaaagttg aatcaaacg tacg 1434

```

<210> 131

<211> 478

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 496.g3 LC-645dsVHVL

<400> 131

Ala	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10						15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Asp	Glu	Ser	Val	Arg	Thr	Leu
			20					25						30	
Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35					40						45	
Tyr	Leu	Val	Ser	Asn	Ser	Glu	Ile	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly
			50					55						60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65						70				75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Trp	Ser	Asp	Pro	Trp
						85				90					95
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
						100				105					110
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
						115									125
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
						130				135					140
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145						150				155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
						165				170					175
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
						180				185					190
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
						195				200					205
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
						210				215					220
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
225						230				235					240
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Ser	Asn
						245				250					255
Tyr	Ala	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Cys	Leu	Glu	Trp
						260				265					270
Ile	Gly	Ile	Ile	Trp	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Phe	Tyr	Ala	Thr	Trp	Ala
						275				280					285
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr
						290				295					300

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 305 310 315 320
 Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp
 325 330 335
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 340 345 350
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 355 360 365
 Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 370 375 380
 Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu
 385 390 395 400
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 405 410 415
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 420 425 430
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 435 440 445
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp
 450 455 460
 Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 465 470 475

<210> 132

<211> 1434

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding 496.g3 LC-645dsVHVL

<400> 132

gcgatccagc tgacgcaatc gccgtcctcg ctgtcagcga gcgtgggcga tagggtcacg 60
 atcacctgtc gggccgatga atcgggtccgc actctgatgc attggtatca gcaaaagccg 120
 ggaaaggccc cgaagctgct catctacctg gtgagcaatt ccgagatcgg agtcccggac 180
 cgcttcagcg gttcgggcag cggaaccgac ttccgectga ctatttctc gctgcaaccc 240
 gaggacttcg ctacttacta ctgccagcag acctggctag atccgtggac ttccgggcag 300
 ggaaccaaag tggaaatcaa gcggactgtc gccgcacett cgggtgttcat ctttccaccg 360
 tcagacgaac aacttaaaag cggaactgcg tcgggtgtgt gcctccttaa caacttttac 420
 cctagagaag ccaaggtcca gtggaaggtg gacaatgccc ttcaaagcgg aaacagccag 480
 gagtcctga ccgagcagga ctcaaaagat tcgacttata gcttgtcgtc cacgctcacc 540
 ctgagcaaag cagactacga aaagcacaag gtgtacgctt gcgaagtgc ccaccaaggc 600

ttgtcgagcc ccgtgaccaa atccttcaac cggggagaat gcagcgggtg cggaggctcc 660
 ggaggaggag gatcagaagt gcagctcttg gaatcgggtg gaggactggt gcagccggga 720
 ggttccctga ggctgagctg tgctgtgtcc ggcatcgacc tttcaaacta cgccatcaat 780
 tgggtgaggc aggcgccagg aaaatgtctc gaatggatcg gtatcatctg ggctagcgga 840
 actaccttct atgcgacgtg ggccaaggga cggttcacta tctcgcgca taacagcaag 900
 aacaccgtgt acctccagat gaacagcctc cgggctgagg aactgcagt ctattactgc 960
 gcgagaacgg tgccgggcta ctccactgca ccgtacttcg acttgtgggg acagggaact 1020
 cttgtgaccg tcagctcggg aggaggaggt tcgggcggag gtgggtcggg aggaggtgga 1080
 agcggaggag gcggatcgga catccagatg acgcagtcac catcgctcgt gtcagcatcc 1140
 gtgggagaca gagtgaccat tacttgtcag tctcgcct cagtctggtc gaattttctg 1200
 tcgtggtatc aacaaaagcc agggaaagcc ccaaagctgc tgatctacga ggccagcaaa 1260
 ctcacttcgg gagtccctag cagattctcc ggtcgggat cgggcaccga tttaccctc 1320
 accattagct cactccaacc agaggatttt gccactact actgcggcgg tggctacagc 1380
 tcaatctcag ataccacttt cggatgcggt actaaggtcg agattaagcg cact 1434

<210> 133

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Rat variable heavy chain sequence of antibody 2109

<400> 133

Glu	Val	Gln	Leu	His	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5						10				15	
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Asn
			20							25				30	
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40						45		
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ala	His	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
		50					55					60			
Lys	Thr	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys
				85						90				95	
Thr	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Met	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
				100					105					110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
				115											

<210> 134

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human germline acceptor framework VH3 sequence 1-3 3-21 with JH4

<400> 134

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
		100						105					110		

Ser

<210> 135

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain variable region of antibody 2109 gH1

<400> 135

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Asn
			20					25					30		
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40						45			
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ala	His	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55				60					
Lys	Thr	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ala	Lys	Asn	Ser	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		

Thr Arg Arg Tyr Tyr Ser Ala Met Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL1

<400> 136

Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Gly Leu Ala
1 5 10

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL2

<400> 137

Asn Ser Asn Thr Leu His Thr
1 5

<210> 138

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL2

<400> 138

Asn Ser Ser Thr Leu His Thr
1 5

<210> 139

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR sequences of antibody 2109 CDRL2

<400> 139

Asp Ser Asn Thr Leu His Thr

1 5
 <210> 140
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Light Chain variable region of rat antibody 2109
 <400> 140
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Gly
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro His Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Ser Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Thr Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105
 <210> 141
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Human VK1 2-1 (U) A20 JK2 acceptor framework
 <400> 141
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 142

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light Chain variable region of antibody 2109 gL1

<400> 142

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ser Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Thr Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 143

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding 496.g3 HC-2109dsVHVL

<400> 143

gaggtgcagc tcgtcgaaag cggcggagga ctcgtgcagc ctggaggctc attgcggttg 60
tcatgtgccg ccagcggctt caccttttcc gactataaca tggcctgggt gcgccaagct 120
cctggaaagg ggctggaatg ggtcgccacc atcaactacg agggccggaa cacctactac 180
cgcgattccg tgaaggggcg gttcactatt tcgcgggaca acgccaagaa ctcgctgtac 240
cttcaaata ga actccctccg cgcggaagat accgccgtgt attactgcgc ctcaccaccg 300
caatactacg agggaaagcat ctacagactc tggttcgccc attggggcca gggaactttg 360
gtgaccgtca gctcagcctc cactaagggc cccagcgtgt tccctcttgc tccgtcctcc 420

aagtcactt ctggcggcac tgcagccttg ggggtgcctcg tgaaggatta cttccccgaa 480
cccgtgaccg tgtcctggaa ctccggagcc ctgacctcgg gagtgacac cttcccagcg 540
gtgctccagt cctccggcct gtactcactc tcatcggtcg tgacctgcc gtccagctcc 600
ctgggaaccc agacttacat ttgcaacgtg aaccacaagc catccaacac caaggtggac 660
aagaaggtgg agcctaagag ctgttcggga ggaggcggtt ctggtggcgg aggatcggag 720
gtgcagcttg tggagtccgg tggaggcctt gtgaaacctg gcggaagcct gaggtgtca 780
tgtgccgcct ccgatacac cttcactgac aactacatcc actgggtgcg ccaagctccg 840
ggaaagtgcc tggaatggat tggtacatt aaccctcct ccgcctacgc cactacaac 900
gaaaagtcca agaccgggtt caccatctcc gtcgacaagg ccaagaatag cgcctatctg 960
caaatgaaca gcctccgcgc ggaagatacc gcggtgtact actgcactcg gagatactac 1020
agcgccatgc cgttcgcgta ctggggacag ggcaccttg taccgtgtc aagcggagga 1080
ggaggctccg gtggtggagg atcgggggga ggaggaagcg gagggggtgg ttcagatatt 1140
cagatgactc agtccccctt gtccctgagc gcgtcagtgg gcgacagggt caccattacc 1200
tgtcgggctt ccgaggacat ctactcagga ctgcctggt atcaacagaa gccgggaaag 1260
gtcccgaagc tcctgatcta cgactcgtcg acctgcaca ctggcgtgcc atcccattt 1320
tcgggaacgg gctcaggac tgactaact ctgaccattt caagcctgca gcctgaggat 1380
gtggccactt acttctgcca acaaaactac gatttcccc ttaccttcgg ctgcgggact 1440
aagctggaga tcaagcggac t 1461

<210> 144

<211> 1480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding 496.g3 HC-2109dsVHVL

<400> 144

gaagtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
tcttgtgccg cctccggctt cactttctcc gactacaaca tggcctgggt gcgacaggct 120
cctggcaagg gactggaatg ggtggccaca atcacctacg agggccggaa cacctactac 180
cgggactctg tgaagggccg gttaccatc tctcgggaca acgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccaggac accgccgtgt actactgtgc tagccccct 300
cagtactatg agggctccat ctaccggctg tggttcgcgc attggggcca gggcacactc 360
gtgacctgt cctctgcttc caccaagggc cctccgtgt ttctcttggc ccttccagc 420
aagtcacact ctggcggaac agccgtcttg ggtgcctcg tgaaggacta cttccccgag 480
cccgtgacag tgtcttggaa ctctggcgcc ctgacctcgg gcgtgcacac ctttccagct 540
gtgctgcagt cctccggcct gtactccctg tcctccgtcg tgactgtgcc ctccagctct 600
ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aaccacaagc cctccaacac caaggtggac 660
aagaaggtgg aaccaagtc ctgcagcgga ggcggtggtt caggcggcgg aggatctgag 720
gtgcagctgg tggaaagtgg gggaggcctc gtgaaaccag gcggcagtct gagactgagc 780
tgcgccgctt ctggctacac ctttaccgac aactacatcc actgggtgcg ccaggcccca 840

gggaaatgcc tggaaatggat cggctacatc aaccctcca gcgcctacgc cactacaac 900
 gagaagttca agaccgcgtt caccatcagc gtggacaagg ctaagaatag cgcctacctg 960
 cagatgaact ccctgagagc tgaggatacc gctgtgtatt attgcacccg gcggtactac 1020
 tccgccatgc cctttgctta ctggggacag ggaaccctcg tgacagtgtc tagcggcgga 1080
 ggcggaagtg gtggtggtgg atctggggga ggcggttctg gtggtggcgg ctctgatatc 1140
 cagatgaccc agtccccag ctccctgtct gcctctgtgg gcgacagagt gaccatcacc 1200
 tgtcgggcct ccgaggacat ctactctggc ctggcctggt atcagcagaa acccggaag 1260
 gtgccaagc tgctgatcta cgactcctcc accctgcaca ccggcgtgcc ctctagattt 1320
 tccggcaccg gctctggcac cgactatacc ctgaccatct ccagcctgca gcctgaggac 1380
 gtggccacct acttttgcca gcagaactac gacttcctc tgaccttcgg ctgcggcacc 1440
 aagctggaaa tcaagcggac ctgatagctc gaggtatca 1480

<210> 145

<211> 1434

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding 496.g3 LC-645dsVHVL

<400> 145

gcaatccaac tgaccagag cccctcctcc ctctccgct ccgtgggaga cagagtgacc 60
 atcacttgcc gggccgatga gtccgtgaga actctcatgc actggtatca gcaaaagcca 120
 gggaaagctc cgaagctgct gatctacctg gtgtcaaatt ccgagattgg cgtgcctgac 180
 cggttcagcg ggagcggatc aggcaccgac ttcagactca cgatctcatc cctgcaaccg 240
 gaagattttg ccacgtacta ctgccaacag acctggtccg acccctggac attcggtcag 300
 ggcaccaagg tcgaaatcaa gaggactgtg gccgtcctt ccgtgtttat ctccctccg 360
 tccgacgaac agctgaaatc cggaaccgcc agcgtcgtgt gcctgctgaa caatttctac 420
 ccgcgcgaag ccaaggtcca gtggaaggtc gacaacgcc tccagtccgg aaactcccag 480
 gagtccgtga ccgaacagga ttcgaaggac tcgacctact cctgtcctc gactttgacc 540
 ttgtccaagg ccgattacga gaagcataag gtctacgcct gcgaagtgac ccatcagggg 600
 ctgtcatccc ccgtgaccaa gagcttcaac cgcggggagt gctcgggagg aggaggctca 660
 ggaggagggg gttccgaagt gcagctgctg gaatccggag gaggtctggt gcagccaggg 720
 ggttctctgc ggctttcctg cgtgtcagc gggatcgacc tctccaacta cgccatcaat 780
 tgggtgcgac aagctccggg aaagtgcctg gagtggattg gaatcatttg ggccagcggc 840
 actaccttct acgcgacttg ggcgaagggt cgttcacca tctcccggga caattcgaag 900
 aacaccgtgt acttgagat gaacagcctg agagccgagg atacggcctg gtactactgt 960
 gcgaggactg tgcttggtta ctgaccgcc ccctaactcg atctttgggg acagggcaca 1020
 ctggtcaccg tgtcatccgg tggaggagga tcggggggag gaggttccgg aggcggtggt 1080
 agcggaggcg gaggttccga catccaaatg acccagtcct cgtcgagcgt gtccgcctca 1140
 gtcggggaca gagtgaccat cacatgccag tctcgcctt cgggtctggtc caatttctg 1200
 tcttggtatc agcagaaacc cggaaaggcc cccaagctgc tcattctacga agcctccaag 1260

ctgaccagcg ggggtgccttc gaggttctct ggctcgggat caggcaccca ctttaccctc 1320
 acgatttcga gcctgcaacc ggaggatttc gcaacttact actgcggcgg tggttacagc 1380
 tccattagcg acaccacctt cggctgcggg accaaggtcg agatcaagcg cact 1434

<210> 146

<211> 1447

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding 496.g3 LC-645dsVHVL

<400> 146

gccatccagc tgaccagag cccttcagc ctgtctgcct ctgtgggcga cagagtgacc 60
 atcacctgtc gggccgatga gtccgtgcgg accctgatgc actggtatca gcagaagccc 120
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacctg gtgtccaact ccgagatcgg cgtgcccagc 180
 agattctccg gctctggctc tggcaccgac ttccggetga ccattcttag cctgcagccc 240
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag acttgagcgg acccctggac ctttggccag 300
 ggcaccaagg tggaaatcaa gcggaccgtg gccgtccct ccgtgttcat cttcccacct 360
 tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgct tctgtcgtgt gcctgctgaa caattctac 420
 ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaacgccc tgcagtccgg caactcccag 480
 gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact cctgtcctc caccctgacc 540
 ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtac ccaccagggc 600
 ctgtctagcc ccgtgaccaa gtctttcaac cggggcgagt gttctggcgg cggaggatct 660
 gggggaggcg gatctgaagt gcagctgctg gaatctggcg gaggcctggg gcagcctggc 720
 ggatctctga gactgtcctg tgccgtgtcc ggcatcgacc tgtccaacta cgccatcaac 780
 tgggtgcgac agggccctgg caagtgcctg gaatggatcg gcatcatctg ggcctccggc 840
 accaccttct acgccacctg ggctaagggc cggttcacca tctcccggga caactccaag 900
 aacaccgtgt acctgcagat gaactccctg cgggccgagg acaccgccgt gtactactgt 960
 gctagaaccg tgcccggcta ctccaccgcc cttactttg atctgtgggg ccagggaacc 1020
 ctcgtgaccg tgtctagcgg aggcggagggt agtggcggtg gtggaagtgg cggagggggg 1080
 agtgggtggc ggggatctga tattcagatg acccagtcct cctcctcctg gtccgcttcc 1140
 gtgggagatc gcgtgacaat cacatgccag tctccccct ctgtgtggtc caacttcctg 1200
 tcttggtatc agcagaaaacc tgggaaggct cctaaactgc tgatctatga ggcctccaag 1260
 ctgacctccg gcgtgccctc tagattctct ggcagcggca gcggaaccga ctttaccctg 1320
 accatcagct ccctgcagcc tgaagatttt gctacctatt actgcggtgg cggctacagc 1380
 tccatctccg ataccacctt cggtgcgga acaaaagtgg aatcaaacg cacctgatag 1440
 aagcttg 1447

<210> 147

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ligh Chain Variable region of antibody CA2109 gL18

<400> 147

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr	Ser	Gly
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40						45		
Tyr	Asp	Ser	Ser	Thr	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Thr	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Asn	Tyr	Asp	Phe	Pro	Leu
				85						90				95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
				100						105					

(a) 抗体 496g3 的 CDR 序列

CDRH1:	GFTFSDYNMA	(SEQ ID NO:71)
CDRH2:	TITYEGRNTYYRDSVKG	(SEQ ID NO:72)
CDRH3:	PPQYYEGSIYRLWFAH	(SEQ ID NO:73)
CDRL1:	RADESVRTLMH	(SEQ ID NO:74)
CDRL2:	LVSNSEI	(SEQ ID NO:75)
CDRL3:	QQTWSDPWT	(SEQ ID NO:76)

(b) 抗体 496g3 的轻链可变区 (SEQ ID NO:77)

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRADESVRTLMHWYQQKPGKAPKLLIYLVSNSEIGVPDRF
SGSGSGTDFRLTISSLPEDFATYYCQQTWSDPWTFGQGTKVEIK

(c) 抗体 496g3 的重链可变区 (SEQ ID NO:78)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYNMAWVRQAPGKGLEWVATITYEGRNTYYRD
SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQGTTLTVS
S

(d) 编码抗体 496g3 的轻链可变区的 DNA (SEQ ID NO:79)

gcgatccagctgacgcaatgccgctcctcgtgtcagcgagcgtggcgatagggtcacgacacctgtcgggccgatgaatcggtc
cgactctgatgcattggtatcagcaaaagccgggaaagggccgaagctgctcatctacctggtgagcaattccgagatcggagtc
cggaccgcttcagcgggtcgggcagcggaaaccgacttcgcctgactatttcctcgtgcaaccggaggacttcgctactactactgc
cagcagacctggtcagatccgtggactttcgggcagggaaccaaagtggaaatcaagcggact

(e) 编码抗体 496g3 的重链可变区的 DNA (SEQ ID NO:80)

gaagtgcagctggtggaatccggcggaggactggtgcagcccgggtggatcattgagactttcgtgtgcagcatcaggcittactttctc
ggactacaatatggcatgggtgcgcaagcgcctggtaaggactggaatgggtcgcgactatcacttatgagggcggaatactta
ctafagggatagcgtcaaaggacgctttaccatctcacgggacaacgctaagaactccctgtacctccaaatgaactcactcagggca
gaagatacggcgtgtactactgtgccctgcctccgcagtactacgaagggtccatctaccgctttgggtcgccattggggacagg
gaacgctggtgactgtgtcctcg

(f) 抗体 496g3 的轻链(VL-CL) (SEQ ID NO:81)

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRADESVRTLMHWYQQKPGKAPKLLIYLVSNSEIGVPDRF
SGSGSGTDFRLTISSLPEDFATYYCQQTWSDPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

(g) 抗体 496g3 的重链(VH-CH1) (SEQ ID NO:82)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYNMAWVRQAPGKGLEWVATITYEGRNTYYRD
SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQGTTLTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

(h) 编码抗体 496g3 的轻链的 DNA (无信号序列) (SEQ ID NO:83)

```
gcgatccagctgacgcaatcgccgtcctcgctgtcagcgagcgtggcgataggggtcacgat  
cacctgtcgggccgatgaatcgggtccgcactctgatgcattggtatcagcaaaagccgggaa  
aggccccgaagctgctcatctacctgggtgagcaattccgagatcggagtcgccggaccgcttc  
agcgggttcgggcagcggaaccgacttcgcctgactatttcctcgctgcaaccgaggactt  
cgctaacttactactgccagcagacctgggtcagatccgtggactttcgggcagggaaccaaag  
tggaatcaagcggactgtcgccgcaccttcgggtgttcattcttccaccgtcagacgaacaa  
cttaaaagcgggaactgcgtcgggtggtgtgcctccttaacaacttttaccctagagaagccaa  
ggtccagtggaaaggtggacaatgcccttcaaagcggaaacagccaggagtcggtgaccgagc  
aggactcaaaagattcgacttatagcttgtcgtccacgctcacctgagcaaagcagactac  
gaaaagcacaaggtgtacgcttgcggaagtgaaccaccaaggcttgtcgagccccgtgaccaa  
atccttcaaccgggggagaatgc
```

(i) 编码抗体 496g3 的重链的 DNA (无信号序列) (SEQ ID NO:84)

```
gaagtgcagctggtggaatccggcggaggactggtgcagcccggtggatcattgagactttc  
gtgtgcagcatcaggcctttactttctcggactacaatatggcatgggtgcgccaagcgcctg  
gtaaaggactggaatgggtcgcgactatcaattatgaggggcggaatacttactatagggat  
agcgtcaaaggacgctttaccatctcacgggacaacgctaagaactccctgtacctccaaat  
gaactcactcagggcagaagatacggccgtgtactactgtgcctcgcctccgcagtactacg  
aagggtccatctacgccttttggttcgcccattggggacagggaacgctggtgactgtgtcc  
tcggcttcgaccaaggggccctcggtgttccctctggcgccctagctccaagagcaacttcagg  
cggaacgggtgccttcggatgcctggtcaaggactacttcccagagcccgtgaccgtgtcat  
ggaacagcggagctctgactageggagtgcacacctttccggcgggtgctgcaaagctcaggc  
ctgtactcgctctcctcagtggtcactgtcccgtcctcctcgctggggactcaaacgtacat  
ctgcaacgtcaatcacaaaccgtcaaataccaaagtcgacaagaaggctcgagcctaagtcgt  
gc
```

图1

(a) 抗体 2109 的 CDR 序列

CDRH1:	GYTFTDNYIH	(SEQ ID NO:85)
CDRH2:	YINPSSAYAHYNEKEKT	(SEQ ID NO:86)
CDRH3:	RYYSAMPFAY	(SEQ ID NO:87)
CDRL1:	RASEDIYSGLA	(SEQ ID NO:88)
CDRL1:	RASEDIYNGLA	(SEQ ID NO:136)
CDRL2:	DSSTLHT	(SEQ ID NO:89)
CDRL2:	NSNTLHT	(SEQ ID NO:137)
CDRL2:	NSSTLHT	(SEQ ID NO:138)
CDRL2:	DSNTLHT	(SEQ ID NO:139)
CDRL3:	QQNYDFPLT	(SEQ ID NO:90)

(b) 抗体 2109 gL18 的轻链可变区 (SEQ ID NO:91) (未突变*)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSGLAWYQQKPGKVPKLLIYDSSTLHTGV
PSRFSGTGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCQQNYDFPLTFGQGTKLEIKRT

(c) 抗体 2109 gH2 的重链可变区 (SEQ ID NO:92) (未突变*)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDNYIHWVRQAPGKGLEWIGYINPSSAY
AHYNEKFKTRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQG
TLVTVSS

(d) 编码抗体 2109 gL18 的轻链可变区的 DNA (SEQ ID NO:93) (未突变*)

gataacagatgacccaatcaccagctctctgagtgccttcggtggcgatcgcggtacaattacctgccgagctagcgaggatatatac
tcaggactggcctggtaccagcaaaagcctggcaaaagtgcctaaactctctgatctacgactccagtagcctgcacactgggtgtgcca
ggcgctttagcggaactggatctggaaccgactataactgacgatttcctcactgcaaccggaagacgtggcaacctactctgtcag
caaaactacgacttcccttgacgtttgggcaagggacaaagctggagatcaaacgtacc

(e) 编码抗体 2109 gH2 的重链可变区的 DNA (SEQ ID NO:94)

(未突变*)

gaagttcaactggtcgaaagcggaggtgggctcgtgaaacctggcggatctctgcgattgtcatgtgctgcaagcggctacacgttta
ccgataactatataccactgggtgcgacaagcaccagggaagggaactggaatggattggatattataaccgagctccgectacgcac
actacaacgagaaattcaagacccgattcaccatctcctggacaagccaagaactccgcttacctgcaaatgaactctctcgggc
cgaagacactgccgtgtattactgcacccgccgatactatagcgctatgccctttgcctactggggacaagggaactggctactgtct
caagt

(f) 抗体 2109 gL18 的轻链可变区 (SEQ ID NO:95) (突变^f)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSGLAWYQQKPGKVPKLLIYDSSTLHTGV
PSRFSGTGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCQQNYDFPLTFGCGTKLEIKRT

(g) 抗体 2109 gH2 的重链可变区 (SEQ ID NO:96) (突变^f)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDNYIHWVRQAPGKCLEWIGYINPSSAY
AHYNEKFKTRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQG
TLVTVSS

*即无改造用于二硫键的半胱氨酸

^f 即有改造用于二硫键的半胱氨酸

(h) 编码 2109 gL18 的轻链可变区的 DNA (SEQ ID NO:97)

(突变^f)

2109dsVL

gatatccagatgaccagtcgcgcgtccagcctctccgctccgtgggagacagagtgcgatcacttgcagagcatcagaggacatc
tactctggccttgcttggtatcagcagaagccgggaaagggtgccaaactgctcatctatgactcctcgaccctccacacgggagtgcc
atcgcgcttcagcgggaccggatctgggaccgactacacctgaccatttcacgctccagccggaggatgtgccacttactctgcc
aacagaattacgacttcccacttacttttgatgtggcactaagctcgaaatcaagcgcacc

(i) 编码抗体 2109 gH2 的重链可变区的 DNA (SEQ ID NO:98)

(突变^f)

gaagtgcagttgggtggagtcggggggagggtgggtgaagccaggaggatcattgcggtgtcatgtgcggttcgggctacactttca
ctgacaattacattcactgggtgcgacaagcaccagggaagtgcctcgaatggattggctacatcaaccggtcaagcgcatacgcacca
ttacaacgaaaagtcaagaccgggtcaccatctccgtggataaggcgaaaaacagcgcgtaccttcagatgaactccctgcggggc
gaggataccgcggttactactgcactagaagggtactacagcgccatgccgttcgcgtactggggacaaggcactctggtcaccgtgt
cgtcg

(j) 抗体 2109 gH2gL18 的 scFv (VH-VL) (SEQ ID NO:99) (未突变*)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFDNYIHWRQAPGKGLEWIGYINPSSAY
AHYNEKF~~K~~TRFTISVDKAKNSAYLQMN~~S~~LR~~A~~EDTAVYYCTRRYY~~S~~AMPFAYWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYS
GLAWYQQKPGKVPKLLIYDSSTLHTGVPSRFSGTGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCQ
QNYDFPLTFGGTKLEIKRT

(k) 编码抗体 2109 gH2gL18 的 scFv(VH-VL)的 DNA (SEQ ID NO:100)

(未突变*)

gaagtcaactggtcgaaagcggagggtgggctcgtgaaacctggcggatctctgcgattgtcatgtgctgcaagcggctacacgttta
ccgataactatataccactgggtgcgacaagcaccagggaagggaactggaatggattggatataaaccgagctccgcctacgcac
actacaacgagaaattcaagaccgattcaccatctccgtggacaaagccaagaactccgcttactgcaaataaactctctgcgggc
cgaagacaactgccgtgtattactgcacccgccgatactatagcgctatgccctttgctactggggacaagggaactgggtcactgtct
caagtggaggtggcgggtctggcgggtggcgggtccgggtggcgggtgatcgggaggtggcgggtctgatatacagatgacccaatcac
caagctctctgagtcttcggtggcgatecgttacaattacctgccgagctagcgaggatatactcaggactggcctggtaccag
caaaagcctggcaagtgcctaagctcctgatctacgactccagttaccctgcacactgggtgtgccaagccgctttagcggaaactggat
ctggaaccgactatacactgacgatttcctcactgcaaccggaagacgtggcaacctactctgtcagcaaaactacgacttcccctgtg
cgtttgggcaagggaagctgggatcaaacgtacc

(l) 抗体 2109 gH2gL18 的 dsScFv (VH-VL) (SEQ ID NO:101) (突变^f)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFDNYIHWRQAPGK~~C~~LEWIGYINPSSAY
AHYNEKF~~K~~TRFTISVDKAKNSAYLQMN~~S~~LR~~A~~EDTAVYYCTRRYY~~S~~AMPFAYWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYS
GLAWYQQKPGKVPKLLIYDSSTLHTGVPSRFSGTGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCQ
QNYDFPLTFG~~C~~GTKLEIKRT

(m) 编码抗体 2109 gH2gL18 的 dsScFv (VH-VL)的 DNA (SEQ ID NO: 102) (突变^f)

gaagtgcagttgggtggagtcggggggagggtgggtgaagccaggaggatcattgcggtgtcatgtgcggttcgggctacactttca
ctgacaattacattcactgggtgcgacaagcaccagggaagtgcctcgaatggattggctacatcaaccggtcaagcgcatacgcacca
ttacaacgaaaagtcaagaccgggtcaccatctccgtggataaggcgaaaaacagcgcgtaccttcagatgaactccctgcggggc
gaggataccgcggttactactgcactagaagggtactacagcgccatgccgttcgcgtactggggacaaggcactctggtcaccgtgt

cgtcgggaggaggaggctcgggtggaggcggatcgggtggcggaggaggagcggcggaggcgggttcggatatccagatgaccag
tcgccgtccagcctctccgcctccgtgggagacagagtacgatcactgcagagcatcagaggacatctactctggccttgcttgta
tcagcagaagccgggaaagggtgccaaactgctcatctatgactcctcgacctccacacgggagtgccatcgcgcttcagcgggac
cggatctgggaccgactacacctgaccatttcacgctccagccggaggatgtgccacttactctgccaacagaattacgactccc
acttacttttgatgtggcactaagctcgaaatcaagcgcacc

* 即无改造用于二硫键的半胱氨酸

^f 即有改造用于二硫键的半胱氨酸

(n) 大鼠抗体 2109 的轻链可变区 (SEQ ID NO:140)

DIVMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIYNGLAWYQQKPGKSPHLLIYNSNTLHTGV
PSRFSGTGSGTQYSLKINSLQSEDVATYFCQQNYDFPLTFGSGTKLELK

(o) 大鼠抗体 2109 的重链可变区 (SEQ ID NO:133)

EVQLHQSGAALVKPGASVKLSCKTSGYTFTDNYIHVVKQSPGKSLEWIGYINPSSAY
AHYNEKFVKTKATLTVDKSTNTAYMELSRLTSEDSATYFCTRRYYSAMPFAYWGQG
TLVTVSS

(p) 人 VK1 2-1(U) A20 JK2 受体框架 (SEQ ID NO:141)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLTQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGGTKLEIK

(q) 人 VH3 1-3 3-21 JH4 受体框架 (SEQ ID NO:134)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSTSY
IYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYFDYWGGQGLVTVSS

(r) 抗体 2109 gL1 的轻链可变区 (SEQ ID NO:142)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNGLAWYQQKPGKVPKLLIYNSNTLHTG
VPSRFSGTGSGTDYTLTISLQPEDVATYFCQQNYDFPLTFGQGGTKLEIK

(s) 抗体 2109 gH1 的重链可变区 (SEQ ID NO:135)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCATSGYTFTDNYIHVVRQAPGKGLEWIGYINPSSAY
AHYNEKFKTRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQG
TLVTVSS

图2

(a) 抗体 645 的 CDR 序列

CDRH1:	GIDLSNYAIN	(SEQ ID NO:103)
CDRH2:	IIWASGTTFYATWAKG	(SEQ ID NO:104)
CDRH3:	TVPGYSTAPYFDL	(SEQ ID NO:105)
CDRL1:	QSSPSVWSNFLS	(SEQ ID NO:106)
CDRL2:	EASKLTS	(SEQ ID NO:107)
CDRL3:	GGGYSSISDTT	(SEQ ID NO:108)

(b) 抗体 645 的轻链可变区 (SEQ ID NO:109) (未突变*)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGQGTKVEIKRT

(c) 抗体 645 的重链可变区 (SEQ ID NO:110) (未突变*)

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTTFYATW
AKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLR AEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

(d) 编码抗体 645 的轻链可变区的 DNA (SEQ ID NO:111)

(未突变*)

gatatccagatgacccagagccaagcagtggttccgccagcgtaggcgatcgtgtgactattacctgtcagtcctctccgagcggttgg
tccaacttcctgagctggtaccagcagaaacccgggtaaagccccgaaactgctgatctacgaggcgctctaaactgacctctggtgtac
cgccccgtttctctggtctggtctggtacggaacttactctgacctctctctgcagccggaagacttgcacagtactactgcggt
ggtggttactcttccatctctgacaccacgttcggtggaggcaccaaggtgaaatcaaacgtacg

(e) 编码抗体 645 的轻链可变区的 DNA (SEQ ID NO:112)

(未突变*)

gagggtcagctgctggagctctggaggggggttgcagcctggagggagcctgcgtctcttctgtgcagtaagcggcatcgacctgt
ccaactacgcgattaactgggtacgtcaggcaccgggtaaaggtctggaatggatcgcatcatctgggcctctggtacgaccttctac
gtacttgggccaaggtcgtttccacctctcccgtagaactctaaaaacaccgtgtacctgcagatgaactctctgcgtgcggaaga
cactgcgggttactattgcgcgcgtaccgttcgggctattctactgcaccgtacttcgacctgtggggtcagggtactctggttaccgtct
cgagt

(f) 抗体 645 的轻链可变区 (SEQ ID NO:113) (突变^f)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIKRT

(g) 抗体 645 的重链可变区 (SEQ ID NO:114) (突变^f)

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTF
YATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLR AEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQ
GTLTVTVSS

(h) 编码抗体 645 的轻链可变区的 DNA (SEQ ID NO:115)

(突变^f)

gacatccagatgacgcagtcaccatcgctcgtgacgacatccgtgggagacagagtgaccattactgtcagtcctcgccctcagctg
gtcgaattttctgctggtatcaacaaaagccagggaaagcccaagctgctgatctacgaggccagcaaacctcctgggagtc
cctagcagattctcggctcgggatcgggcaccgattcacctcaccattagctcactccaaccagaggatttggcacctactactgc
ggcgggtggctacagctcaatctcagataccactttcgatgcggtactaaggtcgagattaagcgact

(i) 编码抗体 645 的重链可变区的 DNA (SEQ ID NO:116)

(突变^f)

gaagtgcagctcttggaaatcgggtggaggactggtgcagccgggaggttcctgaggtgagctgtgctgtgtccggcatcgacctt
caaaactacgccatcaattgggtgaggcagggccaggaatgtctgaatggatcggtatcatctgggctagcggaaactacctctat
ggcagctgggccaaggagcgggtcactatctcgcgcgataacagcaagaacaccggtgacctccagatgaacagcctcgggctga
ggacactgcagctattactgcgcgagaacgggtgccgggtactccactgcaccgtacttcgacttgtggggacagggaaactctgtg
accgtcagctcg

(j) 抗体 645 的 scFv (VH-VL) (SEQ ID NO:117) (未突变*)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWG
QGTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPS
VWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT
YYCGGGYSSISDITFGQGTKVEIKRT

(k) 编码抗体 645 的 scFv (VH-VL) 的 DNA (SEQ ID NO:118) (未突变*)

gagggtcagctgctggagctctggaggcgggtctgtccagcctggaggagcctgcgtctctctgtgcagtaagcggcatcgacctg
ccaactacgcgattaactgggtacgtcaggcaccgggtaaaggctctggaatggatcgccatcatctgggcctctggtacgacctctac
gctaacttgggccaaggctgttcacatctcccgtagaactctaaaaacaccgtgtacctgcagatgaactctctgctgcggaaga
cactgcggttactattgcgcgcgtaccgttccgggtattctactgcaccgtacttcgacctgtggggtcagggtactctggttaccgtct
cgagtggaggtggcggttctggcggtggcggttcgggtggcggtggatcgggaggtggcggttctgatatccagatgaccagagt
ccaagcagtggttccgccagcgtaggcgategtgtgactattacctgtcagtcctctccgagcgttgggtccaactcctgagctggtacc
agcagaaaccgggtaaagccccgaaactgctgatctacgaggcgtctaaactgacctctggtgtaccgtcccgtttctggtcttggc
tctggtacggacttcactctgaccatctctctctgcagccggaagactttgcaacgtactactgcggtggtgggtactcttccatctctga
caccacgttcggtggaggcaccaagttgaaatcaaacgtacg

(l) 抗体 645 的 dsScFv (VH-VL) (SEQ ID NO:119) (突变^f)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATW
AKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLTVTVSSGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAP
KLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITFGCGTKV
EIKRT

* 即无改造用于二硫键的半胱氨酸

^f 即有改造用于二硫键的半胱氨酸

(m) 编码抗体 645 的 dsscFv (VH-VL) (SEQ ID NO:120) (突变^f)

gaagtgcagctcttggaatcgggtggaggactggtgcagccgggaggttccctgaggctgag
ctgtgctgtgtccggcatcgacctttcaaactacgccatcaattgggtgaggcagggcgccag
gaaaatgtctcgaatggatcgggtatcatctgggctagcggaaactaccttctatgacgactgg
gccaagggacgggttcaactatctcgcgcgataacagcaagaacaccgtgtacctccagatgaa
cagcctccgggctgaggacactgcagtcctattactgcgcgagaacgggtgccgggctactcca
ctgcaccgtacttctgacttgtggggacagggaaactcttgtgaccgtcagctcgggaggagga
ggttcgggaggaggtgggtcgggaggaggtggaagcggaggaggcggatcggacatccagat
gacgcagtcaccatcgtccgtgtcagcatccgtgggagacagagtgaccattacttgtcagt
cctcgcctcagtcctggtcgaattttctgtcgtgggtatcaacaaaagccagggaaagcccca
aagctgctgatctacgaggccagcaaaactcacttcgggagtccttagcagattctccggctc
gggatcgggcaccgatttccacctcaccattagctcactccaaccagaggattttgocacct
actactgcggcgggtgggtacagctcaatctcagataccactttcggatgcggtactaaggctc
gagattaagcgact

* 即无改造用于二硫键的半胱氨酸

^f 即有改造用于二硫键的半胱氨酸

图3

(a) 496.g3 HC-2109VHVL (SEQ ID NO:121) (未突变 scFvs*) 接头= SGGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS¹DYNMAWVRQAPGKGLEWVATITYEGRNTYYRD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQGLTVTS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTFSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGSGGGGSEVQLVESGG
GLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDNYIH²WVRQAPGKGLEWIGYINPSSAYAHYNEKF³KTRFTIS
VDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSGLAWYQQKPGKVPKLLIYDSSTLHT
GVPSRFSGTGSGTDYTLTISSLPEDVATYFCQQNYDFPLTFGQGTKLEIKRT

(b) 编码 496.g3 HC-2109VHVL 的 DNA(SEQ ID NO:122) (未突变 scFvs*) 接头
=SGGGSGGGGS

gaagtgcagctggtggaatccggcgaggactggtgcagcccggatgagacttctgtgcagcatcaggetttactttctc
ggactacaatatggcatgggtgcgccaagcgctgtaaggactggaatgggtcgcgactatcacttatgagggcggaatactta
ctatagggatagcgtcaaaggacgctttaccatctcacgggacaacgtaagaactccctgtacctccaaatgaactcactcagggca
gaagatacggcgtgtactactgtgcctcgcctccgcagtactacgaagggtccatctaccgctttgggtcgcctcattggggacagg
gaacgctggtgactgtgtcctcggcttcgaccaaggggcccctgggtgtccctcctggcgcttagctcaagagcacttcaggcggaac
ggctgcccctggatgctgtgtaaggactacttcccagagcccgtgaccgtgtcatggaacagcggagctctgactagcggagtga
cacctttccggcggtgtgcaaagtcaggcctgtactcgtctcctcagtggtcactgtcccgtcctcctcgtggggactcaaacgta
catctgcaacgtcaatcacaaaccgtcaaatacctaaagtcgacaagaaggtcgagcctaagtcgtgcagcggaggaggtggatccg
gggtgggaggtagcgaagtccaactggctgaaagcggaggtgggtcgtgaaacctggcgatctctgcgattgtcatgtgtgcaa
gggctacacgtttaccgataactatataccactgggtgcgacaagcaccagggaagggaactggaatggattggatatattaacccgag
ctccgctacgcactacaacgagaaattcaagaccgattcaccatctccgtggacaaagccaagaactccgcttacctgcaaatg
aactctctcggggccgaagacactgccgtgtattactgacccgcgatactatagcgtatgccctttgcctactggggacaaggga
cactggtcactgtctcaagtggaggtggcggttctggcggtggcggttcgggtggcggtggaatcgggaggtggcggttctgatataca
gatgaccaatcaccaagctctctgagtgttccgttggcgatcgcgttacaattacctgccgagctagcaggatatactactcaggact
ggcctgtaccagcaaaagcctggcaaaagtcctaagctcctgactctacgactccagctaccctgcacactggtgtgccaagccgctt
agcggaaactggatctggaaccgactatacactgacgatttctcactgcaaccggaagacgtggcaacctactctgtcagcaaaaacta
cgacttccccttgacgtttgggcaagggacaaagctggagatcaaacgtacc

(c) 496.g3 HC-2109VHVL (SEQ ID NO:123) (未突变 scFvs*) 接头
I=SGGGGTGGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS¹DYNMAWVRQAPGKGLEWVATITYEGRNTYYRD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQGLTVTS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTFSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGGTGGGGSEVQLVESGG
GLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDNYIH²WVRQAPGKGLEWIGYINPSSAYAHYNEKF³KTRFTIS
VDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSGLAWYQQKPGKVPKLLIYDSSTLHT
GVPSRFSGTGSGTDYTLTISSLPEDVATYFCQQNYDFPLTFGQGTKLEIKRT

(d) 编码 496.g3 HC-2109VHVL 的 DNA(SEQ ID NO:124) (未突变 scFvs*) 接头
I=SGGGGTGGGGS

gaagtgcagctggtggaatccggcggaggactggtgcagcccggtggatcattgagactttcgtgtgcagcatcaggctttactttctc
ggactacaatatggcatgggtgcgccaagcgctgtaaggactggaatgggtcgcgactatcacttatgagggcggaatactta
ctataggatagcgtcaaaggacgtttaccatctcacgggacaacgctaagaactccctgtacctccaaatgaactcactcagggca
gaagatacggcgtgtactactgtgctcgcctccgcagtactacgaagggtccatctaccgcctttggttcgccattggggacagg
gaacgctggtgactgtgtcctcgggttcgaccaaggggccctcggtgttccctctggcgcttagctccaagagcacttcaggcggaac
gggtgcctcggatgctgtgtaaggactacttccagagcccgtagccgtgtcatggaacagcggagctctgactagcggagtga
cacctttccggcgggtgtgcaaagctcaggcctgtactcgtctcctcagtggtcactgtcccgctcctcctcgtggggactcaaacgta
catctgcaacgtcaatcacaaaccgtcaataccaaagtcgacaagaaggtcgagcctaagtcgtgcagtggaggtggggcaccg
gaggtggcgggtcagaagtcaactggtcgaaagcggaggtgggtcgtgaaacctggcggatctctgcgattgtcatgtgtgcaag
cggctacacgtttaccgataactatcactgggtgcgacaagcaccaggaagggtggaatggattggatatattaaccgagc
tcgcctacgcacactacaacgagaaattcaagaccgcattcaccatctcgtggacaagccaagaactccgcttacctgcaaatga
actctctgggggccgaagacactgccgtgtactactgcacccgccgatactatagcgctatgccctttgctactggggacaagggaac
actggtcactgtctcaagtggaggtggcggttctggcggtggcggttcgggtggcggtggatcgggaggtggcggttctgatatacag
atgaccaatcaccaagctctctgagtgttccgttggcgatcgcggttacaattacctgccgagctagcgaggatatactcaggactg
gcctgttaccagcaaaagcctggcaagtgcctaagctcctgatctacgactccagctaccctgcacactggtgtgccaaagcgcctta
gcggaactggatctggaaccgactatacactgacgatttccctactgcaaccggaagacgtggcaacctacttctgtcagcaaaactac
gacttcccttgacgtttgggcaagggacaaagctggagatcaaacgtacc

(e) 496.g3 HC-2109dsVHVL (SEQ ID NO:125) (突变 scFvs^f) SGGGGS^fGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYNMAWVRQAPGKGLEWVATITYEGRNTYYRD
SVKGRFTISRDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQGLTVTS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGSGGGGSEVQLVESGG
GLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDNYIHWRQAPGKCLEWIGYINPSSAYAHYNEKFKTRFTIS
VDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYSGLAWYQQKPKVPKLLIYDSSTLHT
GVPSRFSGTGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCQQNYDFPLTFGC^fGTKLEIKRT

* 即无改造用于二硫键的半胱氨酸

^f 即有改造用于二硫键的半胱氨酸

(f) 编码 496.g3 HC-2109dsVHVL 的 DNA(SEQ ID NO:126) (突变 scFvs^f)
SGGGGS^fGGGGS

gaagtgcagctggtggaatccggcggaggactggtgcagcccggtggatcattgagactttc
gtgtgcagcatcaggctttactttctcggactacaatatggcatgggtgcgccaagcgctg
gtaaggactggaatgggtcgcgactatcacttatgagggcggaatacttactatagggat
agcgtcaaaggacgctttaccatctcacgggacaacgctaagaactccctgtacctccaaat
gaactcactcagggcagaagatacggcgtgtactactgtgctcgcctccgcagtactacg
aagggtccatctaccgcctttggttcgcccattggggacagggaaacgctggtgactgtgtcc
tcggcttcgaccaaggggccctcggtgttccctctggcgcttagctccaagagcacttcagg
cggaacggctgccctcggatgcctggtcaaggactacttccagagcccgtagccgtgtcat
ggaacagcggagctctgactagcggagtgcacacctttccggcggtgctgcaaagctcaggc
ctgtactcgtctcctcagtggtcactgtcccgtcctcctcgtcgtggggactcaaacgtacat

ctgcaacgtcaatcacaaccgtcaaataccaaagtcgacaagaaggtcgagcctaagtcgt
gcagcggaggaggtggatccggcgggtggaggtagcgaagtgcaagttggtggagtcgggggga
gggttggtgaagccaggaggatcattgcgggtgtcatgtgcggcttcgggctacactttcac
tgacaattacattcactgggtgcgacaagcaccagggaagtgccctcgaatggattggctaca
tcaaccctgtcaagcgcatacgcgccattacaacgaaaagtccaagaccgggttcaccatctcc
gtggataaggcgaaaaacagcgcgtaccttcagatgaactccctgcgggcccaggataccgc
cgtttactactgcactagacggtaactacagcgccatgccgttcgcgtactggggacaaggca
ctctggtcacctgtctcgtcgggaggaggaggtcgggtggaggcggaatcgggtggcggagg
agcggcggaggcgggttcggatatccagatgaaccagtcgccgtccagcctctccgcctccgt
gggagacagagtgcgatcacttgagagcatcagaggacatctactctggccttgcttggt
atcagcagaagccgggaaaggtgccccaaactgctcatctatgactcctcgaccctccacacg
ggagtgccatcgcgttcagcgggaccggatctgggaccgactacaccctgaccatttcac
gctccagccggaggatgttgccacttacttctgccaacagaattacgacttcccacttactt
ttggatgtggcactaagctcgaaatcaagcgcacc

(g) 编码 496.g3 HC-2109dsVHVL 的 DNA (SEQ ID NO:143) (突变 scFvs^f)
SGGGGSGGGGS

gagggtcagctcgtcgaagcggcggaggactcgtgcagcctggaggctcattgcgggtgtcatgtgccgagcggcttcacctttccgacta
taacatggcctgggtgcgcaagctcctggaaaggggtggaatgggtgccaccatcacttacaggggccggaacacctactaccgcatcc
gtgaagggcggttcactatctcggggacaacccaagaactcgtgtaccttcaatgaactccctccgcggaagataccgctgtatta
ctgcgctcaccaccgaatactacgaggaagcatctacagactcgtgtcggcattggggccagggaactttggtgaccgtcagctcagcct
ccactaaggggcccagcgtgttccctcttgcctcctccaagtcacttctggcggcactgcagccttgggtgctcctgtgaaggattacttcc
cgaaccctgaccgtgtcctggaactccggagccctgacctcgggagtgacacacttcccagcgggtgctccagtcctccggcctgtactactctc
atcggctcgtgaccgtgccgtccagctccctgggaaccagacttacatttgaacgtgaaccacaagccatccaacaccaaggtggacaagaag
gtggagcctaagagctgttcgggaggaggcgggtctggtggcggaggatcggagggtgcagcttggaggatccggtggaggccttgtgaacctg
gcggaagcctgaggctgtcatgtgccgctccggatacaccttactgacaactacatccactgggtgcgcaagctccgggaaagtgcctgga
atggattggctacattaacctctcctccctacgcccactacaacgaaaagttcaagaccgggtcaccatctcgtcgacaaggccaagaata
gcgctatctgcaaatgaacagcctccgcggaagataccgcggtgtactactgcactcggagatactacagcgcctatccgttcgctactgtg
ggacagggcaccttggtcacctgtcaagcggaggaggaggtcgggtggtggaggatcggggggaggagggaagcggagggggtggttcag
atattcagatgactcagtccttctgctcctgagcgcgtcagtgggcgacagggtcaccattacctgtcgggcttcgaggacatctactcaggac
tcgctgttatcaacagaagccgggaaaggtccgaagctcctgatctacgactcgtcgacctgcacactggcgtgccatcccgatatttcggga
acgggctcagggactgactacactctgaccatttcaagcctgcagcctgaggatgtggccacttacttctgccaacaaaactacgacttcccctt
accttcggctgcgggactaagctggagatcaagcggact

(h) 编码 496.g3 HC-2109dsVHVL 的 DNA (SEQ ID NO:144) (突变 scFvs^f)
SGGGGSGGGGS

gaagtgcagctggtggaatctggcggcggactggtgcagcctggcgatctctgagactgtcttgtgccgcctccggcttcaccttctccgactac
aacatggcctgggtgcgacaggctcctggcaagggactggaatgggtggccacaatcacctacgaggggccggaacacctactaccgggactct
gtgaagggccggttcaccatctctcgggacaacccaagaactcctgtacctgcagatgaacagcctcggggccaggacaccgccgtgact
actgtgtagccccctcagtactatgagggtccatctaccggctgtggttcgccattggggccagggcacactcgtgaccgtgtcctctgcttc
caccaagggccctcctgtttcctctggcccttcagcaagtcacctctggcggaacagccgtctgggctgctcgtgaaggactacttccc
cgagcccgtagactgtcttgaactctggcgcctgacctccggcgtgcacaccttccagctgtgctgcagtcctccggcctgactccctgtcc
tccgtcgtgactgtccctccagctctctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaagg
tggaaccaagctcgtcagcggaggcgggtggttcaggcggcggaggatctgagggtcagctggtggaaagtgggggaggcctcgtgaacca
ggcggcagctcagactgagctgcgccgttctggctacacctttaccgacaactacatccactgggtgcgcccaggccccagggaatgcctgg

aatggatcggctacatcaaccctccagcgcctacgccactacaacgagaagttcaagaccgcttcaccatcagcgtggacaaggctaaga
 atagcgctacctgcagatgaactccctgagagctgaggataccgctgtgtattatgcacccggcggtactactccgcatgccctttgcttactg
 gggacaggggaaccctcgtgacagtgtctagcggcgaggcggaagtgggtgggtggatctgggggaggcggttctgggtggcggtctgat
 atccagatgacccagtcctccctgtctgctctgtggcgacagagtaccatcacctgtcgggcctccgaggacatctactctggcctg
 gcctggatcagcagaaaccggcaagtgcccaagctgctgatctacgactcctccacccgtcacaccggcggtgcccttagattttccggcac
 cggctctggcaccgactataccctgacctctccagcctgcagcctgaggcgtggccacctacttttgcagcagaactacgacttccctctgac
 cttcggctgcggcaccaagctggaatcaagcggacctgatagctcgaggctatca

(i) 496.g3 HC-2109dsVHVL (SEQ ID NO:127) (突变 scFvs^f) 接头 1=SGGGGTGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYNMAWVRQAPGKGLEWVATITYEGRNTYYRD
 SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQGLTVTS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSSTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGGTGGGGSEVQLVESGG
 GLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDNYIHWRQAPGKCLEWIGYINPSSAYAHYNEKFKTRFTIS
 VDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG
 SGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYSGLAWYQQKPKVKPKLLIYDSSTLHT
 GVPSRFSGTSGTDYTLTISSLPEDVATYFCQQNYDFPLTFGCCTKLEIKRT

(j) 编码 496.g3 HC-2109dsVHVL 的 DNA (SEQ ID NO:128) (突变 scFvs^f) 接头
 1=SGGGGTGGGGS

gaagtgcagctggtggaatccggcgaggactggtgcagcccggtggaatcattgagacttctgtgtgcagcatcaggcttactttctc
 ggactacaatatggcatgggtgcgccaagcgctgtaaggaactggaatgggtcgcgactateacttatgagggggcggaatactta
 ctataggatagcgtcaaaggacgcttaccatctcacgggacaacgctaagaactccctgtacctcaaatgaactactcagggca
 gaagatacggcgtgtactactgtgctcgcctccgcagtaactgaagggtccatctaccgctttggtgcgccattggggacagg
 gaacgctggtgactgtgctcctggcttcgaccaaggggcccctcggtgttccctctggcgctagctccaagagcacttcaggcggaac
 ggtgcctcggatgctggtcaaggacttccagagcccgtagcctgtcatggaacagcggagctctgactagcggagtga
 cacccttcggcggtgctgcaaagctcaggcctgtactcgtctcctcagtggtcactgtcccgtcctcctcgtggggactcaaacgta
 catctgcaacgtcaatcacaaaccgtcaataaccaagtcgacaagaaggtcgagcctaagtcgtcagtgagggtgggggcaccg
 gaggtggcggttcagaagtcagttggtggagtcggggggagggttggtgaagccaggaggatcattgcggttgcattgtcggtctt
 cgggctacacttctactgacaattacattcactgggtgcgacaagcaccagggaagtgcctcgaatggattggctacatcaaccgtca
 agcgcatagcccattacaacgaaaagtcaagacccgggtcaccatctccgtggataaggcgaaaaacagcgcgtaccttcagatg
 aactccctgcgggcccaggatacccggttactactgcactagacgggtactacagcgccatgccgttcgctactggggacaaggc
 actctggtcaccgtgtcgtcgggaggaggaggtcgggtggaggcggatcgggtggcgaggaggcggaggcgggttcggat
 atccagatgaccagtcgccgtccagcctctccgctccgtgggagacagagtacgatcacttcagagcatcagaggacatctac
 tctggccttgccttggtatcagcagaagccgggaaaggtgcccaactgctcatctatgactcctcgaacctccacagggagtgccatc
 gcgttcagcgggaccggtctgggaccgactacacctgaccttctatcgtccagccggaggatgttgccacttacttctgccaac
 agaattacgacttccacttacttttggtgtggcactaagctcgaaatcaagcgacc

* 即无改造用于二硫键的半胱氨酸

^f 即有改造用于二硫键的半胱氨酸

图4

(a) 496.g3 LC-645VHVL (SEQ ID NO:129) (未突变 scFvs*)

AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRADESVRTL¹LMHWYQQKPGKAPKLLIYLVSNSEIGVPDRF
SGSGSGTDFRLTISSLPEDFATYYCQQTWSDPWTFTGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSSGGGSGGGGSEVQLLES²GGGLVQPGGSLRLSCA
VSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDN³SKNTVYLQMNSL
RAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT⁴LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ
SPSSVSASVGDRVITITCQSSPSVWSN⁵FLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGS
GTDFTLT⁶TISSLPEDFATYYCGGGYSSISD⁷TFTGQGTKVEIKRT

(b) 编码 496.g3 LC-645VHVL 的 DNA (SEQ ID NO:130) (未突变 scFvs*)

gcgategcagctgacgcaatcgccgtcctcgtgtcagcgagcgtggcgatagggtcacgataccctgtcgggccgatgaatcggtc
cgcaactctgatgcattggtatcagcaaaagccgggaaaggccccgaagctgctcatctacctggtgagcaattccgagatcgagatgc
cggaccgcttcagcgggtcgggcagcgggaaccgacttcgcctgactatttctcgtgcaacceggaggacttcgctacttactactgc
cagcagacctggcagatccgtggactttcgggcagggaaccaaagtggaaatcaagcggactgtcgccgcaccttcggtgttcatct
ttccaccgtcagacgaacaacttaaaagcggaaactgcgtcgggtgtgctccttaacaactttaccctagagaagccaagggtccag
tggaagggtggacaatgcccttcaaagcggaaacagccaggagtccgtgaccgagcaggactcaaaagattcgacttatagcttgtcg
tccacgtcaccttgagcaaaagcagactacgaaaagcacaaggtgtacgttgcgaagtgaccaccaaggcttgcgagccccgt
gaccaaatecttcaaccggggagaatgcagcgggtggcgaggtccggaggaggagatcagaggttcagctgctggagctctgga
ggcgggcttgtccagcctggaggagcctgcgtctcttgtgcagtaagcggcatcgacctgtccaactacgcgattaactgggtac
gtcaggcacccgggtaaagggtctggaatggatcgcatcatctggcctctgttacgaccttctacgtacttgggccaaaggctgttct
accatctcccgtgacaactctaaaaacaccgtgtacctgcagatgaactctctgcgtgcggaagacactgcggttactattgcgcgt
accgttccgggtctattctactgcaccgtacttcgacctgtgggggtcagggtactctggttaccgtctcagtgagggtggcggttctggc
ggtggcgggttcgggtggcgggtggatcgggaggtggcggttctgatatccagatgaccagagtcgaagcagtggttccgccagcgta
ggcgatcgtgtgactattacctgtcagtcctctcgcgagcgttgggtccaacttctgagctggtaccagcagaaaccgggtaaagcccc
gaaactgctgatctacgagcgtctaaactgacctctgggtgtaccgtcccgttctctggctctggctctggtacggacttactctgacc
atctctctctgcagccggaagacttgcacgtactactgcgggtggtggttactcttccatctctgacaccacgttcggtggaggcacc
aaagttgaaatcaaacgtacg

(c) 496.g3 LC-645dsVHVL (SEQ ID NO:131) (突变 scFvs^f)

AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRADESVRTL¹LMHWYQQKPGKAPKLLIYLVSNSEIGVPDRF
SGSGSGTDFRLTISSLPEDFATYYCQQTWSDPWTFTGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSSGGGSGGGGSEVQLLES²GGGLVQPGGSLRLSCA
VSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDN³SKNTVYLQMNSL
RAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT⁴LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ
SPSSVSASVGDRVITITCQSSPSVWSN⁵FLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGS
GTDFTLT⁶TISSLPEDFATYYCGGGYSSISD⁷TFTGCGTKVEIKRT

(d) 编码 496.g3 LC-645dsVHVL 的 DNA (SEQ ID NO:132) (突变 scFvs^f)

gcgatccagctgacgcaategcgcgtcctcgctgtcagcgagcgtggcgatagggtcacgat
cacctgtcgggcccgatgaatcgggtccgcactctgatgcattgggtatcagcaaaagccgggaa
aggccccgaagctgctcatctacctgggtgagcaattccgagatcggagtcgccggaaccgcttc
agcgggttcgggcagcggaaccgacttccgcctgactatcttccctcgctgcaaccgcgaggactt
cgctacttactactgccagcagacctgggtcagatccgtggactttcgggcagggaaccaaaag
tggaaatcaagcggactgtcgcgcgcacettcgggtgttcattctttccaccgtcagacgaacaa
cttaaaagcggaaactgcgtcgggtgggtgtgcctccttaacaacttttacccctagagaagccaa
gggtccagtggaaggtggacaatgcccttcaaagcggaaacagccaggagtccgtgaccgagc
aggactcaaaagattcgacttatagcttgtcgtccacgctcaccctgagcaaacgagactac
gaaaagcacaaggtgtacgcttgcgaagtgacccaccaaggcttgtcgagccccgtgaccaa
atccttcaaccggggagaaatgcagcgggtggcggaggctccggaggaggaggatcagaagtgc
agctcttggaatcgggtggaggactgggtgcagccgggagggttcctcgaggctgagctgtgct
gtgtccggcatcgacctttcaaaactacgccatcaattgggtgaggcaggcgccaggaaaatg
tctcgaatggatcgggtatcatctgggctagcggaaactaccttctatgcgacgtgggccaagg
gacgggttcactatctcgcgcgataacagcaagaacaccgtgtacctccagatgaacagcctc
cgggctgaggacactgcagctctattactgcgcgagaacgggtgccgggctactccactgcacc
gtacttcgacttgtggggacagggaactcttgtgaccgtcagctcgggaggaggagggttcgg
gcggagggtgggtcgggaggagggtggaagcgggaggaggcggatccggacatccagatgacgcag
tcaccatcgtccgtgtcagcatccgtgggagacagagtgaccattacttgtcagtcctcgc
ctcagtcctggtcgaattttctgtcgtggtatcaacaaaagccagggaagccccaaagctgc
tgatctacgaggccagcaaaactcacttcgggagtccttagcagattctccggctcgggatcg
ggcaccgattttcaccctcaccattagctcactccaaccagaggattttgccacctactactg
cggcgggtggctacagctcaatctcagataaccactttcggatgcgggtactaagggtcgagatta
agcgcaact

(e) 编码 496.g3 LC-645dsVHVL 的 DNA (SEQ ID NO:145) (突变 scFvs^f)

gcaatccaactgaccagagccccctcctcctcctcgctcgtgggagacagagtgaccatcacttgccgggcccgatgagtcctgagaactct
catgcactgggtatcagcaaaagcagggaagctccgaagctgctgatctacctgggtgtcaaatccgagattggcgtgctgaccggttcagcg
ggagcggatcaggcaccgacttcagactcacgatctcatccctgcaaccggaagattttgccacgtactactgccaacagacctgggtccgacccc
tggacattcgggtcagggcaccaaggtcgaatcaagaggactgtggccgctccttccgtgttatcttccctccgtccgacgaacagctgaaatcc
ggaaccgccagcgtcgtgtcctgctgaacaatttctacccgcgcgaagccaagggtccagtggaaagtcgacaacgcctccagtcggaaact
cccaggagtcgggtgaccgaacaggattcgaaggactcgacctactcctgtcctcgactttgaccttgccaaggccgattacgagaagcataag
gtctacgcctgcgaagtgaccatcaggggctgtcatccccgtgaccaagagcttcaaccgcgggagtgctcgggaggaggaggctcagga
ggaggggggtccgaagtgcagctgtggaatccggaggagggtctgggtgcagccagggggttctctcgggcttctcgcgtgtcagcgggatcg
acctctcaactacgccatcaattgggtgcgacaagctccgggaaagtgcctggagtggattggaatcatttggccagcggcactaccttctac
gcgacttgggcgaagggtcgttcacatctccgggacaattcgaagaacaccgtgtacttgagatgaacagcctgagagccgaggatagc
gccgtgtactactgtgcgaggactgtgcctggctactcgaccgccccctacttcgatctttggggacagggcacactggtcaccgtgtcatccgt
ggaggaggatcggggggaggagggttccggaggcgggtgtagcggaggcggaggttccgacatccaatgaccagtccttcgagcgtgtc
cgcctcagtcggggacagagtaccatcacatgccagtcctcgcctcgggtcgttccaacttctgtcctgggtatcagcagaacccggaaagg
ccccaagctgtcatctacgaagcctcaagctgaccagcgggggtgccttcgaggttcttggtcgggatcaggcaccgactttacctcacg
atttcgagcctgcaaccggaggatttcgaacttactactcggcgggtgttacagctccattagcagaccaccttcgggtcggggaccaagg
cgagatcaagcgcaact

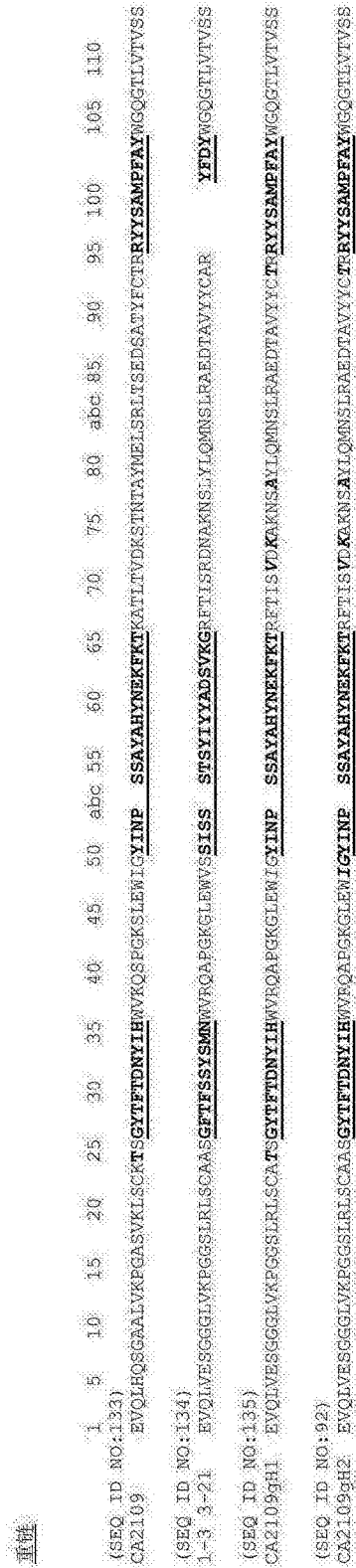
(f) 编码 496.g3 LC-645dsVHVL 的 DNA (SEQ ID NO:146) (突变 scFvs^f)

gccatccagctgacccagagccctccagcctgtctgcctctgtggcgacagagtgaccatcacctgtcgggccgatgagtcctgtcggaccct
gatgcactgggtatcagcagaagcccggcaaggccccaagctgtgatctacctggtgtccaactccgagatcggcgtgcccacagattctcc
ggctctggctctggcaccgacttccggctgacctctctagcctgcagcccaggacttccacactactactgccagcagacttgagcgaccc
ctggacctttggccagggcaccaaggtggaaatcaagcggaccgtggccgctccctccgtgttcattctccaccttccgacgagcagctgaagt
ccggcaccgcttctgtcgtgtgcctgtgaacaacttctaccccgcgaggccaaggtgcagtggaggtggacaacgccctgcagtcggcaa
ctcccaggaatccgtgaccgagcaggactccaaggacagcacctactccctgtcctccacccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcac
aaggtgtacccctgcgaagtgacccaccagggcctgtctagccccgtgaccaagtctttcaaccggggcgagtggttctggcggcggaggatctg
ggggaggcggatctgaagtgcagctgctggaatctggcggaggcctggtgcagcctggcggatctctgagactgtcctgtccgtgtccggcatc
gacctgtccaactacgcatcaactgggtgcgacaggccctggcaagtgcctggaatggatcggcacatctgggcctccggcaccaccttcta
cgccacctgggctaaggccggttcacatctcccggaactccaagaacaccgtgtacctgcagatgaactccctgcgggccgaggacacc
gccgtgtactactgtgtagaaccgtgcccggtactccaccgccccttactttgatctgtgggcccagggaaccctcgtgaccgtgtctagcgga
ggcggaggtagtggcgtggtggaagtggcggaggggtagtggcgggggatctgatattcagatgacccagtcctccctcctccgtgtccg
cttccgtgggagatcgctgacaatcacatgccagtcctccctcctgtgtggtccaacttctgtcttggtatcagcagaaacctgggaaggctc
ctaaactgctgatctatgaggcctccaagctgacctccggcgtgcctctagattctctggcagcggcagcgggaaccgactttaccctgaccatca
gctccctgcagcctgaagattttgctacctattactgcggtggcggctacagctccatctccgataccaccttcggctgcggaacaaaagtggaaa
tcaaaccacctgatagaagcttg

* 即无改造用于二硫键的半胱氨酸

^f 即有改造用于二硫键的半胱氨酸

图5



图例

CA2109 = 大鼠可变重链序列

1-3 3-21 = 具有 JH4 的人种系受体框架 VH3 序列 1-3 3-21

CA2109gH1 & CA2109gH2 = 使用 1-3 3-21 人种系作为受体框架的 CA2109 可变重链的人源化移植植物

粗体/下划线显示 CDR

粗体/斜体并突出显示 CA2109gH2 中的供体残基: I48, G49, V71, K73, A78, T93

图6

轻链

(SEQ ID NO:140)
CA2109 DIVMTQSPASLSASLGSETVTITTCRASEDIYNGLAWYQQKPKSPHLLIYNSNTLHTGVPSRFSCTGSGTQYSLKINSLSQSEDAVATYFQQNYDFF LTFCSGTKLEIK

(SEQ ID NO:141)
2-1(U)-A20 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQGISNYLAWYQQKPKVPKILLIYAASTLQSGVPSRFSRSGSGSTDETLTITSSLPEDVATYICQKYSAP YTFQGQGTKLEIK

(SEQ ID NO:142)
CA2109g11 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASEDIYNGLAWYQQKPKVPKILLIYNSNTLHTGVPSRFSCTGSGTDYTLTITSSLPEDVATYFQQNYDFF LTFCSGTKLEIK

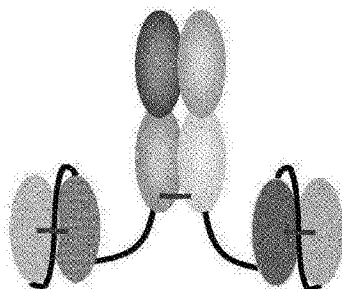
(SEQ ID NO:147)
CA2109g118 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASEDIYSGLAWYQQKPKVPKILLIYDSSTLHTGVPSRFSCTGSGTDYTLTITSSLPEDVATYFQQNYDFF LTFCSGTKLEIK

图例

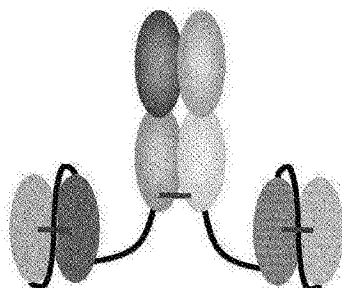
CA2109 = 大鼠可变轻链序列
2-1(U)-A20 = 具有 JK2 的人种系受体框架序列 VK1 2-1(U) A20
CA2109g11 和 CA2109g118 = 使用 VK1 2-1(u)A20 人种系作为受体框架的 CA2109 可变频链的人源化移植
粗体/下划线显示 CDR
粗体/斜体并突出显示供体残基: T65, Y71, F87
粗体/下划线并突出显示 CDRL1 和 CDRL2 中去除潜在的天冬酰胺脱酰胺位点的突变: S31, D50, S52

图7

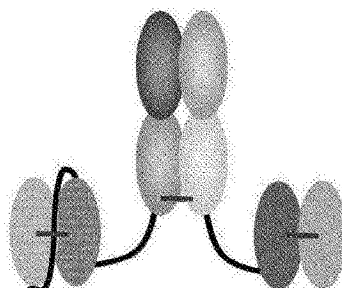
Fab-2x dsscFv 形式和 Fab-dsscFv-dsFv 形式



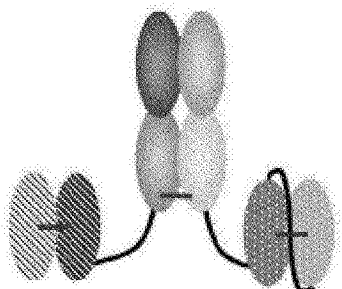
Fab#2-(HC)-dsscFv#3-(LC)-dsscFv#4



Fab#2-(LC)-dsscFv#3-(HC)-dsscFv#4



Fab-(HC)dsscFv-(LC)dsFv



Fab-(HC)dsFv-(LC)dsscFv

图8

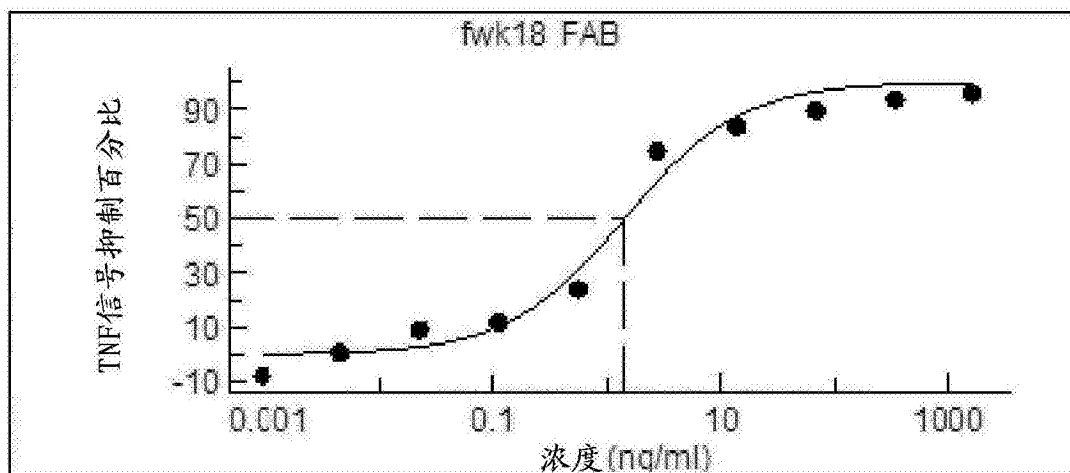


图9a

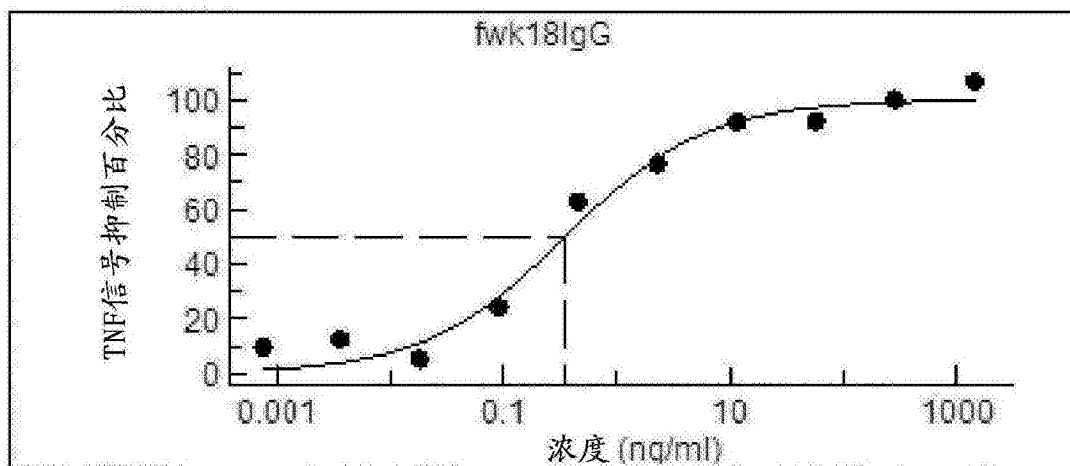


图9b

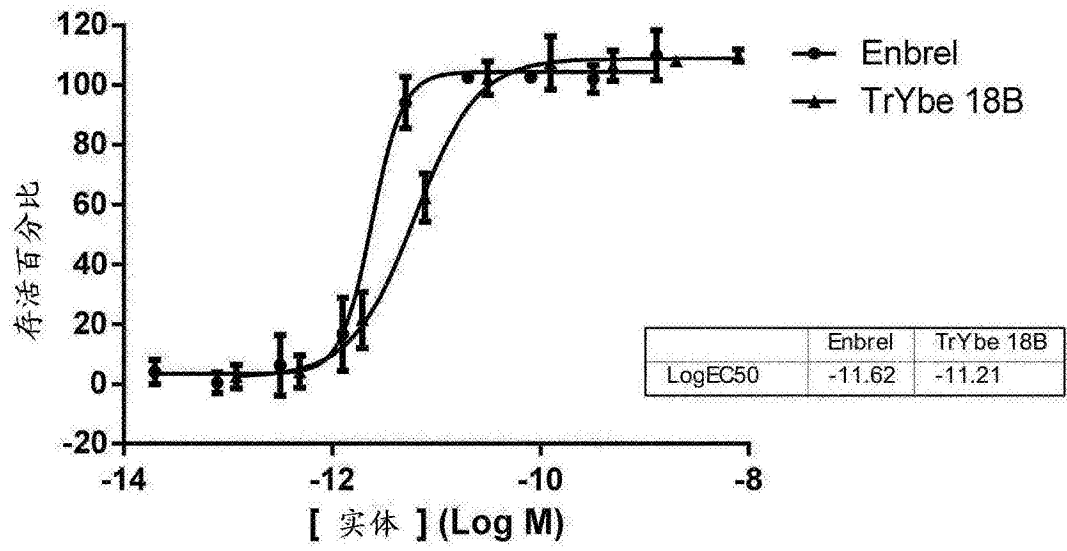


图10a

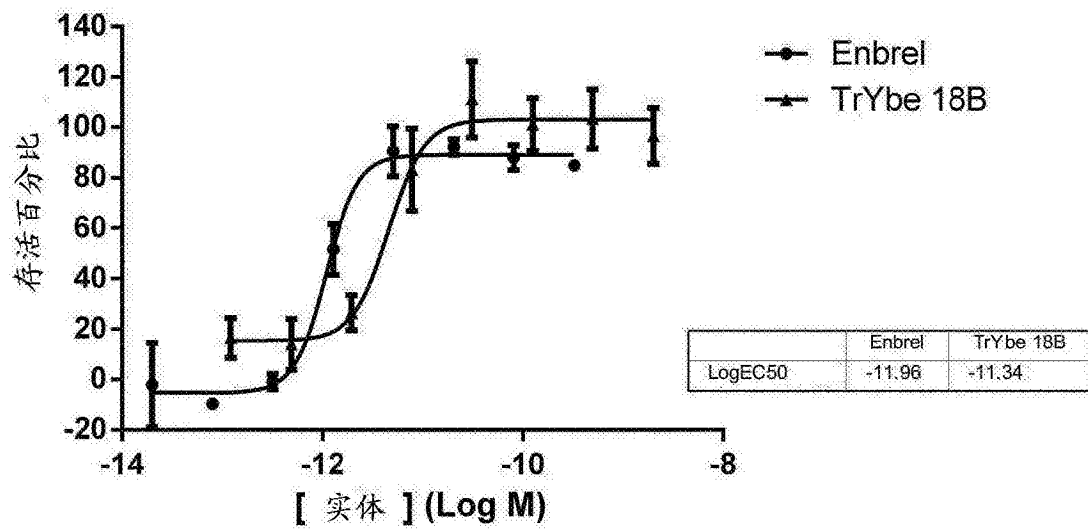


图10b

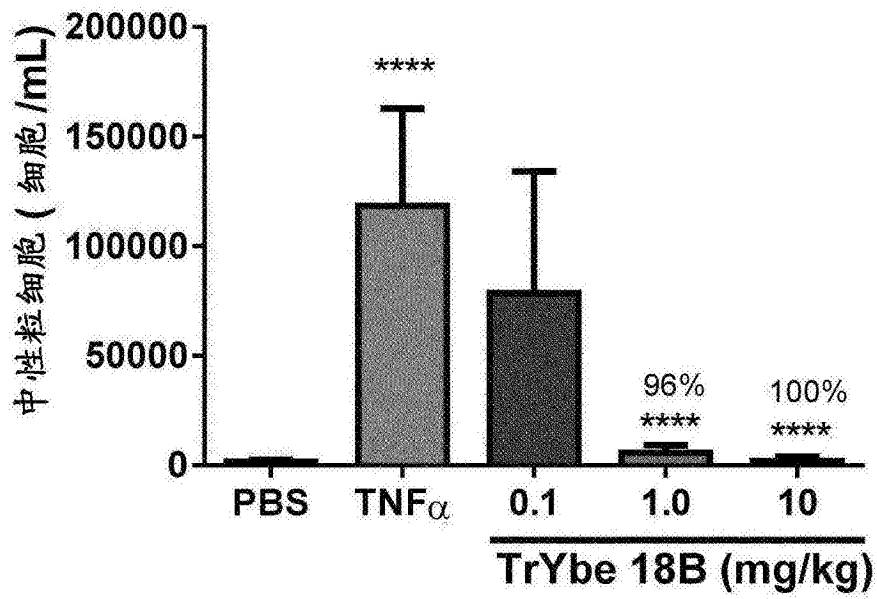


图11

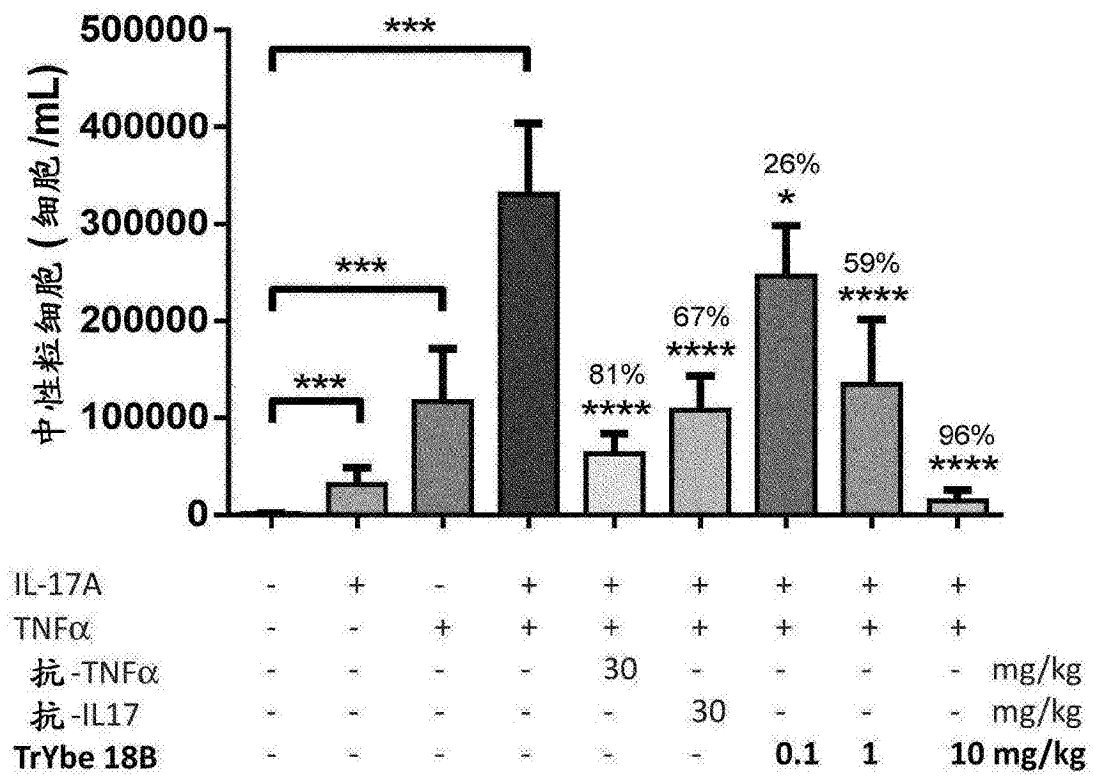


图12

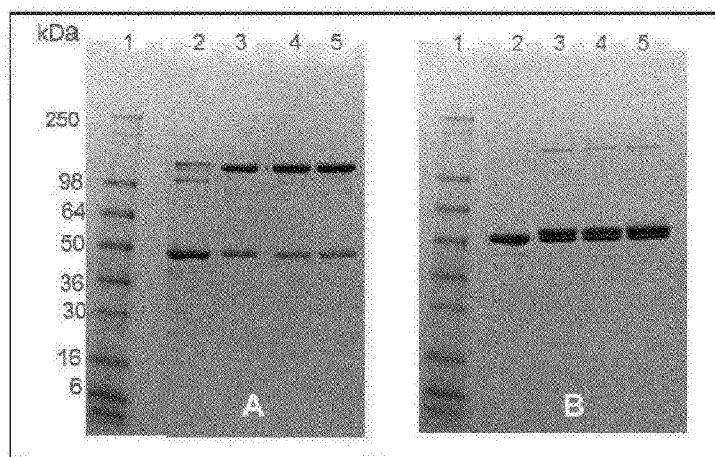


图13

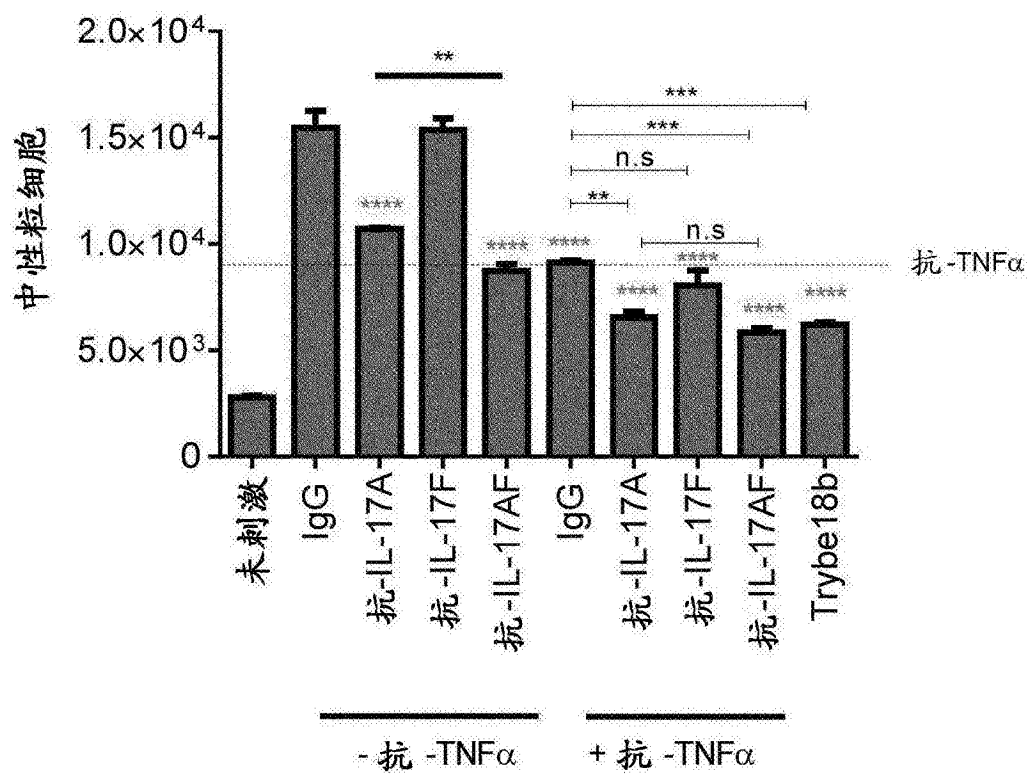


图14

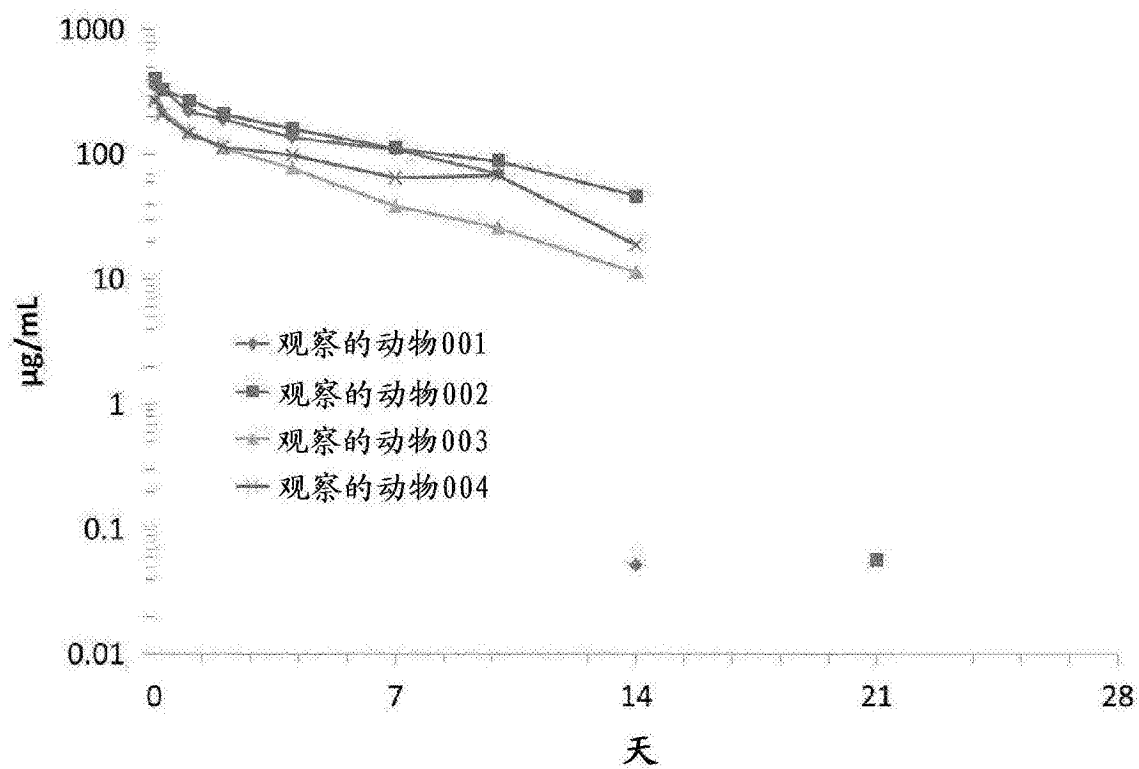


图15