



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102898527 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 30

(21) 申请号 201210258020. X

(22) 申请日 2012. 07. 24

(30) 优先权数据

10-2011-0073635 2011. 07. 25 KR

(71) 申请人 三星电子株式会社

地址 韩国京畿道

(72) 发明人 李在日

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 金拟燊

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61K 47/48 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 12 页

序列表 38 页 附图 3 页

(54) 发明名称

融合蛋白、药物组合物及预防或治疗癌症的方法

(57) 摘要

本发明提供包含 (a) 包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质和 (b) 包括诱导细胞毒性淋巴细胞的细胞毒性活性的多肽的第二蛋白质的融合蛋白、包含所述融合蛋白的药物组合物、以及通过施用所述药物组合物治疗或预防癌症的方法。

1. 融合蛋白,包含:
 - (a) 包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质,和
 - (b) 包括诱导细胞毒性淋巴细胞的细胞毒性活性的多肽的第二蛋白质。
2. 权利要求 1 的融合蛋白,其中所述融合蛋白进一步包括连接所述第一蛋白质和所述第二蛋白质的接头。
3. 权利要求 1 的融合蛋白,其中所述第一蛋白质是全长抗体或其抗原结合片段。
4. 权利要求 1 的融合蛋白,其中所述第一蛋白质包括氨基酸序列 X_1 -Trp-Gly-His- X_2 - X_3 -Trp (SEQ ID NO:119),
其中 X_1 和 X_2 独立地为选自 Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val、Asn、Cys、Gln、Gly、Ser、Thr、Tyr、Asp、Glu、Arg、His 和 Lys 的氨基酸,和
其中 X_3 是选自 Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val、Asn、Cys、Gln、Gly、Ser、Thr 和 Tyr 的氨基酸。
5. 权利要求 4 的融合蛋白,其中所述氨基酸序列选自 SEQ ID NO:1-8。
6. 权利要求 1 的融合蛋白,其中所述第一蛋白质包括选自 SEQ ID NO:9-42 的氨基酸序列。
7. 权利要求 1 的融合蛋白,其中所述第二蛋白质特异性结合细胞毒性淋巴细胞的表面标记。
8. 权利要求 7 的融合蛋白,其中所述表面标记选自 CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD16、CD28、CD56、CD57 和 TCR。
9. 权利要求 7 的融合蛋白,其中所述第二蛋白质包括 SEQ ID NO:116 或 SEQ ID NO:117 的氨基酸序列。
10. 权利要求 1 所述的融合蛋白,其中所述第二蛋白质是全长抗体或其抗原结合片段。
11. 药物组合物,包括权利要求 1 的融合蛋白和可药用载体。
12. 在受试者中治疗或预防癌症的方法,包括将权利要求 11 的药物组合物向受试者施用,由此在受试者中预防或治疗癌症。
13. 权利要求 12 的方法,其中所述癌症选自:鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、肺的鳞状细胞癌、腹膜癌、皮肤癌、皮肤或眼球中的黑色素瘤、直肠癌、肛门附近的癌症、食道癌、小肠肿瘤、内分泌腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、肝细胞瘤、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、膀胱癌、肝肿瘤、乳腺癌、结肠癌、大肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺肿瘤、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、及头颈癌。

融合蛋白、药物组合物及预防或治疗癌症的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2011 年 7 月 25 日在韩国知识产权局提交的韩国专利申请 No. 10-2011-0073635 的权益,其公开内容通过引用全部引入本文中。

[0003] 电子提交材料的通过引用的引入

[0004] 在本文中通过引用全部引入的是与此同时提交且鉴别如下的计算机可读的核苷酸 / 氨基酸序列表:2011 年 8 月 9 日创建的名为“708782SequenceListing.TXT”的一份 63,762 字节的 ASCII(文本)文件。

背景技术

[0005] 目前,用于治疗的抗体的开发正在积极进行。这为用现有的合成药物难以治疗的疾病提供了解决方案,并且正在取代合成药物。目前,16 种用于治疗的抗体是可商购的,且约 7000 或更多种抗体在被全球约 300 家或更多的公司开发。这些抗体产品正使医药市场持续增长。

[0006] 血管发生对于所有癌组织中的细胞分化是必不可少的,且即使抑制血管发生的靶是已知的,由于其效率低,还没有单独的治疗剂是可用的。此外,尚未开发出可广泛用于各种癌症的治疗剂。

[0007] 二十年前,被称为脂皮质蛋白、依钙蛋白、内附蛋白等的蛋白质被赋予标准名膜联蛋白(Annexin),其已在过去的十年中使用。

[0008] 膜联蛋白结合钙和磷脂,并具有独特的保守域,其中称为内附蛋白折叠的包括“GXGTDE”(SEQ ID NO:118)基序的约 70 个氨基酸序列重复 4 次(有时重复 8 次)。常规已知的膜联蛋白包括保守域。蛋白质取决于序列保守与否而被鉴定为膜联蛋白。已知膜联蛋白存在于从哺乳动物到霉菌的多种活生物体中,且已报道膜联蛋白 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、XIII 等存在于人类中。已知膜联蛋白涉及骨的结构形成和多种生物现象例如膜运输、跨膜通道活性、磷脂酶 A2 的抑制、凝血抑制、有丝分裂信号的转导和细胞-基质相互作用的介导。

[0009] 虽然相关技术公开了通过使用结合膜联蛋白 A1 的抗体递送物质的方法,但是没有关于通过使用抗体治疗癌症的公开内容。虽然另一相关技术公开了通过将针对癌症的多重标记的抑制剂组合治疗癌症的方法,但是没有公开使用膜联蛋白 A1 作为标记。

发明内容

[0010] 本发明提供包含 (a) 包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质和 (b) 包括诱导细胞毒性淋巴细胞的细胞毒性活性的多肽的第二蛋白质的融合蛋白,以及包含所述融合蛋白和可药用载体的药物组合物和使用所述创造性的药物组合物治疗或预防癌症的方法。

[0011] 额外的方面将在随后的说明中部分阐述,和部分将从该说明中明晰,或者可通过所呈现的实施方式的实践而获知。

附图说明

[0012] 图 1 是说明融合蛋白的示意图,所述融合蛋白包含:包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质和包括诱导作用于癌细胞的细胞毒性淋巴细胞的细胞毒性活性的多肽的第二蛋白质。

[0013] 图 2 是 NdeI-XhoI 片段的示意图,所述 NdeI-XhoI 片段插入到用于根据实施方式的由以下构成的融合蛋白表达的载体中:包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质和包括诱导细胞毒性淋巴细胞的细胞毒性活性的多肽的第二蛋白质。(GGGGS) 接头对应于 SEQ ID NO:120。

[0014] 图 3 是说明融合蛋白的纯化结果的照片,所述融合蛋白包含:包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质和包括抗 CD3 的第二蛋白质。根据实施方式,在各道中的 L、FT、W 和数字分别表示加载、流过、洗涤和咪唑摩尔浓度 (mM)。

[0015] 图 4 是 AA1BPxCD3- 活化的 T 细胞对分离的膜联蛋白 A1- 阳性 /- 阴性细胞的效果的图。细胞毒性 T 细胞克隆 (由 PMBC 产生) 与靶细胞 (Ramos、SNU-1、SNU-2) 混合并以 10:1 的效应物对靶 (E:T) 之比在 AA1BPxCD3 的指示浓度下温育 3 小时。显示来自特异性靶溶解的重复三次测定的平均值,以百分比计。

具体实施方式

[0016] 现在将详细介绍实施方式,其实例在附图中说明,其中相同的附图标记始终是指相同的要素。在这方面,本发明的实施方式可具有不同的形式,且不应解释为限于本文所阐述的说明。因此,以下仅通过参考附图描述实施方式以解释本说明的各方面。

[0017] 发明人发现,包含 (a) 包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质和 (b) 包括诱导细胞毒性淋巴细胞的细胞毒性活性的多肽的第二蛋白质的融合蛋白可用于靶向在细胞表面表达膜联蛋白 A1 的癌细胞。

[0018] 因此,本发明提供包含如下、基本上由如下组成或由如下组成的融合蛋白:(a) 包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质和 (b) 包括诱导细胞毒性淋巴细胞的细胞毒性活性的多肽的第二蛋白质。

[0019] 本发明还提供含有融合蛋白及可药用载体的药物组合物,所述融合蛋白包含 (a) 包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质和 (b) 包括诱导细胞毒性淋巴细胞的细胞毒性活性的多肽的第二蛋白质。

[0020] 如本文中使用的术语“融合蛋白”是指包括两种或更多种(例如三种、四种、五种或更多种)蛋白质的蛋白复合物,其通过两种或更多种蛋白质自身的化学结合或者是通过接头的结合形成。

[0021] 已知膜联蛋白(所述融合蛋白特异性结合的靶之一)存在于在从哺乳动物到霉菌的多种活生物体中,并且具有独特的保守域,其中称作内附蛋白折叠的包括“GXGTDE”(SEQ ID NO:118) 基序的约 70 个氨基酸序列重复 4 次(有时重复 8 次)。已知膜联蛋白 A1 涉及多种生物现象例如膜运输、跨膜通道活性、磷脂酶 A2 的抑制、凝血抑制、有丝分裂信号的转导和细胞-基质相互作用的介导。膜联蛋白 A1(膜联蛋白的亚家族)也称作脂皮质蛋白 I。例如,膜联蛋白 A1 可由 ANXA1 基因编码。膜联蛋白 A1 属于膜联蛋白家族的 Ca^{2+} - 依赖性的

磷脂结合蛋白且可位于质膜的胞质面上。膜联蛋白 A1 蛋白质可具有约 40kDa 的分子量,具有磷脂酶 A2 抑制活性。另外,因为膜联蛋白 A1 具有位于正常细胞内部且由于癌症的产生而迁移到细胞的外膜的特性,因此其可用作癌症标记。因此,融合蛋白中的包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质可通过所述多肽特异性结合到癌细胞表面上的膜联蛋白 A1。

[0022] 如本文中使用的术语“特异性结合”与本领域技术人员已知的含义相同,且是指通过在两种或更多种多肽或蛋白质之间的共价键或非共价键的在分子间的特异性相互作用。例如,可包括抗原与抗体特异性相互作用以引起免疫反应的概念。

[0023] 如本文中使用的术语“多肽”是指由彼此通过肽键相互结合的氨基酸残基形成的线性分子。特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽可具有例如 4-200、4-100 或 4-50 个氨基酸残基。具有小于 4 个氨基酸残基的多肽可具有低的对膜联蛋白 A1 的结合亲和性。具有超过 200 个氨基酸残基的多肽可特异性结合到膜联蛋白 A1。多肽可以通过本领域已知的各种方法制备,例如,基因克隆方法和固相合成技术。此外,多肽可以通过可商购的多肽文库(例如多肽文库,噬菌体 M13-多肽文库等)经验地获得。

[0024] 根据实施方式,第一蛋白质可为全长抗体或其抗原结合片段。全长抗体具有拥有两个全长轻链和两个全长重链的结构,并且各轻链通过二硫键(SS键)连接到各重链。抗体的恒定区分为重链恒定区和轻链恒定区,和重链恒定区具有 γ 、 μ 、 α 、 δ 和 ϵ 型以及 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 亚类。轻链恒定区具有 κ 和 λ 型。

[0025] 抗体包括,但不限于,单克隆抗体、双特异性抗体、非人抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链 Fv(scFv)、Fab 片段、F(ab') 片段、二硫键 Fv(sdFV)、抗独特型(抗-Id)抗体、及其表位结合片段。

[0026] 抗体可为人源化抗体或人抗体。非人抗体例如小鼠的人源化抗体可为包括得自如下的最小序列的嵌合免疫球蛋白:小鼠免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段,例如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其他抗原结合亚序列。

[0027] 将非人抗体人源化的方法是本领域公知的。通常,人源化抗体具有从非人类供源引入的一个或多个氨基酸残基。人源化可通过使用对应于人抗体的序列基本上取代啮齿动物的互补决定区(CDR)或 CDR 序列的部分进行。因此,比基本上完整的人抗体的可变区小的区域可被来自非人物种的相应序列取代。例如,人源化抗体可为其中通过来自啮齿动物抗体中相似位点的残基取代一些 CDR 残基和可能的一些框架(FR)残基的那些。

[0028] 人抗体是指其中重链和轻链的可变和恒定区序列得自人类的抗体,并可通过使用各种技术例如基因重组技术和基因工程产生。

[0029] 人抗体的效应部分可与人体免疫系统的其他部分相互作用。此外,人类免疫系统不将人抗体识别为外源物质,因此,针对引入活的人体的抗体的免疫反应可显著地比针对全部外源的非人抗体或部分外源的嵌合抗体的免疫反应不严重。此外,引入到活的人体的人抗体具有与天然存在的人抗体基本上相同的半衰期,因此施用的剂量和频率可降低。如本文中使用的术语“嵌合”是指包括得自两种不同物种的序列的抗体或抗原结合位点。

[0030] 如本文中使用的术语“抗原结合片段”是指免疫球蛋白的整体结构的抗原可结合的片段。例如,抗原结合片段可为 F(ab')₂ 片段、Fab' 片段、Fab 片段、Fv 片段、或 scFv 片段,但不限于此。在抗原结合片段中,Fab 片段含有轻链和重链的可变区、轻链的恒定区、和

重链的第一恒定区 (C_{H1})。Fab 片段具有一个抗原结合位点。Fab' 片段与 Fab 片段的不同在于 Fab' 片段具有在重链 C_{H1} 域的 C 末端有至少一个半胱氨酸残基的铰链区。F(ab')₂ 抗体以在铰链区的半胱氨酸残基形成二硫键产生。Fv 片段是最小的抗体片段,其仅包含重链可变位点和轻链可变位点,且产生 Fv 片段的重组技术是本领域公知的。双链 Fv 片段可具有其中重链和轻链可变区通过非共价键连接的结构,和单链 Fv(scFv) 片段可具有其中重链和轻链可变区经由肽接头共价结合、或在 C-末端直接彼此连接的二聚体结构。可通过使用蛋白酶获得抗原结合片段(例如,整个抗体可通过木瓜蛋白酶消化以获得 Fab 片段或通过胃蛋白酶消化以获得 F(ab')₂ 片段),且可通过基因重组技术制备抗原结合片段。

[0031] 根据具体实施方式,融合蛋白的第一蛋白质可为具有由 X_1 -Trp-Gly-His- X_2 - X_3 -Trp (SEQ ID NO:119) 表示的氨基酸序列的多肽,其中 X_1 和 X_2 独立地为选自 Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val、Asn、Cys、Gln、Gly、Ser、Thr、Tyr、Asp、Glu、Arg、His 和 Lys 的氨基酸,和 X_3 是选自 Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val、Asn、Cys、Gln、Gly、Ser、Thr 和 Tyr 的氨基酸。具有由 X_1 -Trp-Gly-His- X_2 - X_3 -Trp (SEQ ID NO:119) 表示的氨基酸序列的多肽可选自 SEQ ID NO:1-8 的氨基酸序列。

[0032] 根据实施方式,第一蛋白质可选自具有 SEQ ID NO:9-42 的氨基酸序列的多肽。这些可为特异性结合到膜联蛋白 A1 的多肽的氨基酸序列。这些可不为具有由表示 X_1 -Trp-Gly-His- X_2 - X_3 -Trp 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:119) 的多肽。

[0033] 根据实施方式,第二蛋白质可特异性结合细胞毒性淋巴细胞的表面标记。例如,表面标记可选自,但不局限于,CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、D16、CD28、CD56、CD57、和 TCR。

[0034] 根据实施方式,第二蛋白质可为具有 SEQ ID NO:116 或 SEQ ID NO:117 的氨基酸序列的多肽。SEQ ID NO:116 是包含小鼠抗-CD3 的 V_H 和 V_L 的氨基酸序列,和 SEQ ID NO:117 是包含人抗-CD3 的 V_H 和 V_L 的氨基酸序列。

[0035] 根据实施方式,第二蛋白质可为全长抗体或其抗原结合片段。全长抗体或其抗原结合片段是如上所述的。

[0036] 抗体或其抗原结合片段可包括保留特异性识别膜联蛋白 A1 或细胞毒性淋巴细胞的表面标记的能力的变体。例如,可对抗体的氨基酸序列进行修饰以改善抗体的结合亲和力和/或其他生物性质。所述修饰包括例如抗体的氨基酸序列残基的缺失、插入、和/或取代。该氨基酸修饰基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,如疏水性、亲水性、电荷、大小等的性质。例如,精氨酸 (Arg)、赖氨酸 (Lys) 和组氨酸 (His) 都是带正电的残基,丙氨酸 (Ala)、甘氨酸 (Gly) 和丝氨酸 (Ser) 都是类似大小的,以及苯丙氨酸 (Phe)、色氨酸 (Trp) 和酪氨酸 (Tyr) 都具有大体相似的形状。因此,基于这些考虑,Arg、Lys 和 His ;Ala、Gly 和 Ser ;以及 Phe、Trp 和 Tyr 可为生物功能等同物。

[0037] 在蛋白质中通常不改变这样的分子活性的氨基酸取代在本领域是已知的。最通常发生的交换是 :Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu 和 Asp/Gly。考虑到具有生物等同活性的修饰,可理解,特异性结合细胞毒性淋巴细胞或膜联蛋白 A1 的表面标记的抗体或其抗原结合片段,可还包括展现出与序列表中描述的序列相当同一性的序列。相当同一性可为当对任何其他序列进行比对以最大地对序列列表中的氨基酸序列并通过使用本领域典型使用的算法分析经比对的序列时显示至少 60% 同一性、至少 70% 同一

性、至少 80% 同一性、或至少 90% 同一性（例如至少 95% 同一性或至少 99% 的同一性）的序列。用于序列比较的比对方法在本领域是已知的。例如，序列分析程序如 blastp、blastx、tblastn 和 tblastx 可通过 NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 在互联网上使用。

[0038] 根据实施方式，融合蛋白任选地可包括将第一蛋白质和第二蛋白质连接的接头。用于本发明的合适的接头在本领域是已知的且包括肽接头（例如，由多个氨基酸残基组成的）。只要融合蛋白的生物活性不受影响，融合蛋白可不包括接头或包括一个或多个（例如，两个、三个、四个或更多个）任意合适长度的接头。

[0039] 尽管不希望受任何特定理论的束缚，但肽接头可通过将包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质和包括诱导细胞毒性淋巴细胞的活性的多肽的第二蛋白质以足够的距离分开而允许融合蛋白的各蛋白质折叠为合适的二级和三级结构。例如，肽接头可包括 Gly、Asn 和 Ser 残基，和中性氨基酸如 Thr 和 Ala。适于肽接头的氨基酸序列是本领域已知的，并可例如 Gly₄-Ser (SEQ ID NO:120)、(Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO:121) 或 Gly₄-Ser-Gly₅-Ser (SEQ ID NO:122)。

[0040] 肽接头可连接到特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的 N- 和 / 或 C- 末端区。特别地，当肽接头连接到多肽的 N- 末端和 C- 末端时，肽接头可包括各半胱氨酸，且在各半胱氨酸之间可出现二硫键以容许所述多肽存在于两个半胱氨酸之间。

[0041] 本发明还提供治疗或预防受试者的癌症的方法，包括将药物组合物向受试者施用使得受试者中的癌症得到治疗或预防，所述药物组合物包括融合蛋白和可药用载体，所述融合蛋白包含如下、基本上由如下组成或由如下组成：(a) 包括特异性结合药物有效量的膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质和 (b) 包括诱导细胞毒性淋巴细胞的细胞毒性活性的多肽的第二蛋白质。

[0042] 可由包括所述融合蛋白的组合物治疗或预防的癌症可选自：鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、肺的鳞状细胞癌、腹膜癌、皮肤癌、皮肤或眼球中的黑色素瘤、直肠癌、肛门附近的癌症、食道癌、小肠肿瘤、内分泌腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、肝细胞瘤、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、膀胱癌、肝肿瘤、乳腺癌、结肠癌、大肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺肿瘤、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、以及头颈癌，但不限于此。

[0043] 所述组合物通过结合癌细胞表面上的膜联蛋白和结合细胞毒性淋巴细胞表面上的表面标记（例如 CD3）而治疗或预防癌症。尽管不希望受任何特定理论的束缚，但据信，所述组合物通过将细胞毒性淋巴细胞定位在癌细胞附近来治疗或预防癌症，该癌细胞随后被细胞毒性淋巴细胞分泌的细胞毒性颗粒破坏。

[0044] 如图 1 所示，融合蛋白 140 包含包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质和包括诱导作用于癌细胞 120 的细胞毒性淋巴细胞的细胞毒性活性的多肽的第二蛋白质。融合蛋白 140 特异性结合癌细胞 120 表面上的膜联蛋白 130 和细胞毒性淋巴细胞 100 表面上的表面标记 110 两者。通过将细胞毒性淋巴细胞 100 定位于癌细胞 120 周围，可通过细胞毒性淋巴细胞 100 分泌的细胞毒性颗粒特异性杀死癌细胞 120，而不影响正常细胞。因此，创造性的融合蛋白（例如，在药物组合物中）特异性靶向癌细胞以进行破坏，而不影响正常（非癌）细胞。

[0045] 所述组合物中包括的可药用载体是在制剂中通常使用的,并可包括,但不限于,乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁、及矿物油。除了所述组分之外,所述药物组合物可额外地包括润滑剂、润湿剂、甜味剂、增味剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂等。

[0046] 预防或治疗癌症的组合物可口服或肠胃外施用。肠胃外施用可包括静脉注射、皮下注射、肌肉注射、腹膜内注射、内皮施用、局部施用、鼻内施用、肺内施用和直肠施用。由于口服施用导致蛋白质或肽的消化,可将活性剂包覆或配制在药物组合物中以保护所述组合物免于在胃中分解。此外,所述组合物可通过任意具有朝向特定细胞的靶向能力的装置施用。

[0047] 预防或治疗癌症的组合适宜剂量可取决于许多因素,如配制方法、施用方法、病人的年龄、体重、性别、病理状况、饮食、施用时间、施用途径、排泄速度、和反应敏感性。对于成年人,所述组合物的剂量可在约 0.001- 约 100mg/kg 的范围内。如本文使用的术语“治疗有效量”是指用于预防或治疗癌症的足够量。

[0048] 可通过本领域技术人员已知的任意方法,将所述组合物与可药用载体和 / 或赋形剂配制为单位剂型或多种剂型。制剂可为溶液、悬浮液、糖浆、或在油或水性介质中的乳液、提取物、粉剂、粉末、颗粒、片剂、或胶囊,且可额外地包括分散剂或稳定剂。此外,所述组合物可以作为单独的治疗剂施用,或与其他治疗剂组合施用,并可与常规治疗剂顺序或同时施用。

[0049] 所述组合物可包含抗体或其抗原结合片段,因此可配制为免疫脂质体。可使用本领域公知的任意方法制备含有抗体的脂质体。免疫脂质体是包括磷脂酰胆碱、胆固醇和聚乙二醇衍生的磷脂酰基乙醇胺的脂质组合物,并可例如通过反相蒸发法制备。例如,抗体的 F(ab')₂ 片段可通过二硫键交换反应附接于脂质体。

[0050] 可将预防或治疗癌症的药物组合物施用的受试者包括所有的动物。例如,所述受试者可为人或例如狗、猫、啮齿动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠或仓鼠)的动物,以及除人以外的灵长类动物。

[0051] 根据本发明的另一方面,用于制备融合蛋白的方法包括:培养包括编码融合蛋白的多核苷酸序列的细胞,所述融合蛋白包含以下、基本上由以下组成、或由以下组成:包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质和包括诱导细胞毒性淋巴细胞的细胞毒性活性的多肽的第二蛋白质(例如,其中第二蛋白质可连接到第一蛋白质的末端);和获得由在细胞培养中产生的培养物表达的蛋白质。

[0052] 可通过本领域已知的各种方法进行转化细胞的培养。例如,体内或体外分泌的蛋白质可通过如下获得:将转化细胞接种入 YT 液相培养基中以进行培养,在当细胞密度达到一定水平的时间点处向培养基中加入 IPTG 以诱导通过 lacZ 启动子的蛋白质表达,和培养所述蛋白质。

[0053] 可通过本领域已知的各种纯化方法以纯化形式得到体内或体外分泌的蛋白质。例如,可通过纯化方法例如通过硫酸铵的溶解度分级、以及大小分级和过滤与各种色谱分离方法(对于根据大小、疏水性或亲水性的分离制造的),以纯化形式得到蛋白质。例如,当融合蛋白融合到 GST 和 6x His 时,可通过分别使用结合了谷胱甘肽的树脂柱和 Ni²⁺-NTA

His- 结合树脂柱容易地获得所需的蛋白质。

[0054] 实施例

[0055] 下面的实施例进一步说明本发明,但是当然不应该以任何方式解释为限制其范围。

[0056] 实施例 1 :特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的筛选

[0057] (1) 生物淘选

[0058] 编码膜联蛋白 A1 的多核苷酸是由 Genotech, Inc. 化学合成的,并用于表达膜联蛋白 A1 以进行分离和纯化。将膜联蛋白 A1 固定到板上,向其加入噬菌体展示多肽文库 (Dyax Corp.) 以进行结合,并通过各种结合时间和洗涤条件选择以高亲和力结合的多肽表达噬菌体。

[0059] 使用珠淘选方法作为所述淘选。具体地,将表面上固定有抗生蛋白链菌素的磁珠与生物素缀合的膜联蛋白 A1 混合,并在 4° C 搅拌混合物 18 小时以将蛋白质固定在磁珠表面上。在室温下用脱脂乳将其上固定蛋白质的磁珠封闭 2 小时,然后添加在所述珠的表面上展示多肽的噬菌体溶液。将得到的产物搅拌 2 小时进行反应,并用 PBS 溶液 (1.06mM KH_2PO_4 , 155.17mM NaCl, 和 2.97mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 和含 0.1% Tween20 的 PBS 溶液洗涤。仅分离出结合抗原的噬菌体。根据在淘选后获得的噬菌体数进行淘选过程两次或三次。

[0060] (2) 特异性结合于噬菌体 ELISA 和膜联蛋白 D1 的多肽序列的鉴定

[0061] 将在淘选过程中得到的噬菌体克隆各自用大肠杆菌 (*E. coli*) XL1-Blue 感染,并在约 37° C 培养 14 小时以获得噬菌体溶液。将膜联蛋白 A1 添加到 96 孔微量滴定板 (Nunc, Inc.), 并容许在约 4°C 放置 18 小时以将蛋白质固定在板表面上。在室温下用脱脂乳将其上固定蛋白质的板封闭 1 小时,然后加入 100 μL 噬菌体溶液。在室温下使噬菌体与蛋白质反应 2 小时,并用含 0.1% Tween20 的 PBS 溶液洗涤混合物。随后,在室温下向反应混合物中加入与噬菌体特异性反应的 HRP 缀合的抗 -M13 抗体 (GE Healthcare) 以反应 1 小时,然后用含 0.1% Tween20 的 PBS 溶液洗涤两次。最后,向板的各孔加入 100 μL 三甲基联苯胺 (TMB) 底物 (Sigma) 以诱导显色反应。随后加入 50 μL 5N H_2SO_4 溶液以停止反应,然后用板阅读器 (Molecular Devices) 测量 OD_{450} 值。

[0062] 结果,总共鉴定出 42 个与膜联蛋白 A1 具有高反应性的噬菌体克隆。使用引物组 (SEQ ID NO:114 和 SEQ ID NO:115) 进行菌落 PCR 以从噬菌体的单克隆中鉴定编码特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的核苷酸序列。通过使用 GeneAmp PCR System9700 (Applied Biosystem) 进行 PCR, PCR 条件如下:在 94°C 5 分钟;在 94°C 1 分钟、在 60°C 1 分钟和在 72°C 1.5 分钟连续反应重复 30 次;在 72°C 10 分钟;和在 4°C 冷却。随后,进行由溶液获得的多核苷酸片段的洗涤和序列分析 (Solgent), 并鉴定特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽序列 (表 1)。表 1 鉴定了展示在噬菌体上展示的多肽部分 (不包括肽接头), 即特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的氨基酸序列和相应的核酸序列。

[0063] [表 1]

[0064]

序号	氨基酸序列	核酸序列
1	QWGHTLW (SEQ ID NO:1)	cagtggggccataccctgtgg (SEQ ID NO:43)

2	KWGHEVW (SEQ ID NO:2)	aaatggggccatgaagtgtgg (SEQ ID NO:44)
3	WWGHEQW (SEQ ID NO:3)	tggtggggccatgaacagtgg (SEQ ID NO:45)
4	PWGHEIW (SEQ ID NO:4)	ccgtggggccatgaaatttgg (SEQ ID NO:46)
5	LWGHHIW (SEQ ID NO:5)	ctgtggggccatcatatttgg (SEQ ID NO:47)
6	LWGHQIW (SEQ ID NO:6)	ctgtggggccatcagatttgg (SEQ ID NO:48)
7	LWGHGMW (SEQ ID NO:7)	ctgtggggccatggcatgtgg (SEQ ID NO:49)
8	AWGHPFW (SEQ ID NO:8)	gcgtggggccatccgttttgg (SEQ ID NO:50)
9	MNRV (SEQ ID NO:9)	atgaaccgcgtg (SEQ ID NO:51)
10	SLNSIL (SEQ ID NO:10)	agcctgaacagcattctg (SEQ ID NO:52)
11	NLNAWF (SEQ ID NO:11)	aacctgaacgcgtggttt (SEQ ID NO:53)
12	VEWPWW (SEQ ID NO:12)	gtggaatggccgtggtgg (SEQ ID NO:54)
13	WLWPRL (SEQ ID NO:13)	tggtgtggccgcgcctg (SEQ ID NO:55)
14	IDYGLF (SEQ ID NO:14)	attgattatggcctgttt (SEQ ID NO:56)
15	VEGQQWW (SEQ ID NO:15)	gtggaaggccagcagtgggtgg (SEQ ID NO:57)
16	WMGHS AW (SEQ ID NO:16)	tggtatggggccatagcgcgtgg (SEQ ID NO:58)
17	GIHHP IW (SEQ ID NO:17)	ggcattcatcatccgatttgg (SEQ ID NO:59)
18	WGGHP IW (SEQ ID NO:18)	tggggcggccatccgatttgg (SEQ ID NO:60)
19	PWAKIFW (SEQ ID NO:19)	ccgtgggcgaaaatttttgg (SEQ ID NO:61)
20	MGSKMWG (SEQ ID NO:20)	atgggcagcaaaatgtggggc (SEQ ID NO:62)
21	MLWEDQD (SEQ ID NO:21)	atgctgtgggaagatcaggat (SEQ ID NO:63)

[0065]

序号	氨基酸序列	核酸序列
22	ELFDGYD (SEQ ID NO:22)	gaactgtttgatggctatgat (SEQ ID NO:64)
23	WPWEANH (SEQ ID NO:23)	tggccgtgggaagcgaacct (SEQ ID NO:65)

24	EQYGFPP (SEQ ID NO:24)	gaacagtatggctttccgttt (SEQ ID NO:66)
25	SGFGHMIW (SEQ ID NO:25)	agcggtttggccatatgatttg (SEQ ID NO:67)
26	ETRFHAIW (SEQ ID NO:26)	gaaaccgcgtttcatgcgatttg (SEQ ID NO:68)
27	MLHHHQRE (SEQ ID NO:27)	atgctgcatcatcatcagcgcgaa (SEQ ID NO:69)
28	ALHNEPHT (SEQ ID NO:28)	gcgctgcataacgaaccgatacc (SEQ ID NO:70)
29	AFHNDPAE (SEQ ID NO:29)	gcgtttcataacgatccggcgaa (SEQ ID NO:71)
30	LLFSDIGN (SEQ ID NO:30)	ctgctgttttagcatattggcaac (SEQ ID NO:72)
31	LVLK GKWH (SEQ ID NO:31)	ctggtgctgaaaggcaaatggcat (SEQ ID NO:73)
32	SGNGKPFWM (SEQ ID NO:32)	agcggcaacggcaaacggttttgatg (SEQ ID NO:74)
33	IQRGGVDWS (SEQ ID NO:33)	attcagcgcggcggcgtggattggagc (SEQ ID NO:75)
34	RDSQSWSWS (SEQ ID NO:34)	cgcatagccagagctggagctggagc (SEQ ID NO:76)
35	LLESQNPQD (SEQ ID NO:35)	ctgctggaaagccagaaccgcaggat (SEQ ID NO:77)
36	IINGWNPIW (SEQ ID NO:36)	attattaacggctggaaccgatttg (SEQ ID NO:78)
37	DWTTAYGPS (SEQ ID NO:37)	gattggaccacgcgtatggcccgagc (SEQ ID NO:79)
38	IYDGNWSYWH (SEQ ID NO:38)	atztatgatggcaactggagctattggcat (SEQ ID NO:80)
39	STDSNWFNA (SEQ ID NO:39)	agcaccgatagcaactggtttttaacgcg (SEQ ID NO:81)
40	MPENWISWYR (SEQ ID NO:40)	atgccggaaaactggattagctggtatcgc (SEQ ID NO:82)
41	VRTDWYSMLM (SEQ ID NO:41)	gtgcgcaccgattggtatagcatgctgatg (SEQ ID NO:83)
42	MIQTSSANRD (SEQ ID NO:42)	atgattcagaccagcagcgcgaaccgcgat (SEQ ID NO:84)

[0066] 实施例 2 :由抗 -CD3 和膜联蛋白 A1 结合多肽组成的融合蛋白的表达载体的制备

[0067] 在本实施例中,制备用于制造包括 (a) 可特异结合 CD3 的抗 -CD3 多肽 (诱导细胞毒性淋巴细胞的细胞毒性活性的多肽) 和 (b) 实施例 1 中制备的膜联蛋白 A1 结合多肽的融合蛋白的表达载体。包括如图 2 所示结构的 *NheI*-*XhoI* 片段由 Genotech, Inc. 化学合成,且合成的 *NheI*-*XhoI* 片段用 *NheI* 和 *XhoI* 消化并插入到用相同的限制酶消化的 pET21b (Promega) 中以完成表达载体。通过将 2 种类型 (小鼠或人) 的编码抗 -CD3 的多核苷酸和 8 种类型的编码膜联蛋白 A1 结合多肽 (分别是 SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :21, SEQ ID NO :19, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :16) 的多核苷酸组合,将 *NheI*-*XhoI* 片段总共制备出 16 种类型。*NheI*-*XhoI* 片段各自由 SEQ ID NO :85-100 表示。由 *NheI*-*XhoI* 片段表达的融合蛋白分别命名为 M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 和 H8。

[0068] 此外,为了改善所表达的融合蛋白的溶解度,通过使用表达载体制造用于泛素附接于融合蛋白的蛋白质的表达的载体。容许泛素定位于图 2 中所示的 NheI-XhoI 片段中的 peI B 和 FLAG 之间。制造用于泛素附接的融合蛋白的表达的载体的方法如下。

[0069] 首先,使用所述表达载体作为模板进行 PCR,正向引物 (5`-cgccatagaaatacctgctgcccgaccgctg-3` (peI B:NdeI-F;SEQ ID NO:101)) 设计为包括 NdeI 限制位点和包括 peI B 的 5` 区,且反向引物 (5`-cccgatccggccatggccggctggg-3` (peI B-NcoI :BamHI-R;SEQ ID NO:102)) 设计为包括 BamHI 限制位点和包括 peI B 的 3` 区。获得的 PCR 产物用 NdeI 和 BamHI 消化,并纯化以获得 NdeI-BamHI 片段。

[0070] 随后,将在 pET21b 载体的 Bam HI 和 EcoRI 限制位点间包括编码泛素的多核苷酸 (SEQ ID NO:103) 的载体用 NdeI 和 BamHI 消化并纯化,和使 NdeI-BamHI 片段进行连接。将连接产物测序和鉴定。

[0071] 随后,使用 16 种类型表达载体的每一种作为模板以及如下的正向和反向引物通过 PCR 获得包括编码 FLAG-VH-接头-VL-(GGGGS) 接头 (SEQ ID NO:120)-膜联蛋白 A1 结合多肽的多核苷酸的 DNA 片段。正向引物通过如下设计:包括 EcoRI 限制位点和 FLAG 标签,和各自不同地使用对应于小鼠抗 -CD3 抗体的 VH 的部分和对应于人抗 -CD3 抗体的 VH 的部分。反向引物设计为包括 XhoI 限制位点和包括编码膜联蛋白 A1 结合多肽的多核苷酸的一些。所用的引物如下:

[0072] 正向引物:

[0073] 5`-ccggaattcgactacaaagatgatgacgataaggatatcaaac-3` (Flag-小鼠 a-CD3:EcoRI-F) (SEQ ID NO:104)

[0074] 5`-ccggaattcgactacaaagatgatgacgataaggagctg-3` (Flag-人_a-CD3:EcoRI-F) (SEQ ID NO:105)

[0075] 反向引物:

[0076] 5`-ccgctcgaggcaccacaaacggatgg-3` (pep1:XhoI-R) (SEQ ID NO:106)

[0077] 5`-ccgctcgaggcaccacaaatgatggcc-3` (pep2:XhoI-R) (SEQ ID NO:107)

[0078] 5`-ccgctcgaggcaatcctgatcttcccac-3` (pep3:XhoI-R) (SEQ ID NO:108)

[0079] 5`-ccgctcgaggcaccacaaaaattttcgc-3` (pep4:XhoI-R) (SEQ ID NO:109)

[0080] 5`-ccgctcgaggcaccacaaatttcatgacc-3` (pep5:XhoI-R) (SEQ ID NO:110)

[0081] 5`-ccgctcgaggcaccacaggtatgacc-3` (pep6:XhoI-R) (SEQ ID NO:111)

[0082] 5`-ccgctcgaggcaccacactgctgg-3` (pep7:XhoI-R) (SEQ ID NO:112)

[0083] 5`-ccgctcgaggcaccacgcggaatg-3` (pep8:XhoI-R) (SEQ ID NO:113)

[0084] 随后,将获得的 PCR 产物用 EcoRI 和 XhoI 消化并纯化,且连接产物也用 EcoRI 和 XhoI 消化并纯化。将纯化产物相互连接、测序并鉴定。泛素附接于融合蛋白的蛋白分别命名为 Ub-M1, Ub-M2, Ub-M3, Ub-M4, Ub-M5, Ub-M6, Ub-M7, Ub-M8, Ub-H1, Ub-H2, Ub-H3, Ub-H4, Ub-H5, Ub-H6, Ub-H7 和 Ub-H8。

[0085] 实施例 3:融合蛋白的表达和纯化

[0086] 为了使用实施例 2 中制造的载体过表达融合蛋白,在用所述载体(编码泛素附接的融合蛋白的载体)转化的大肠杆菌 (E. coli) BL21 (DE3) 中表达融合蛋白。然后,使用 YT 培养基作为培养基,当在 600nm 的光密度 (O. D.) 值为 0.5 时向其加入 0.1mM 的 IPTG,并

将细胞在 18° C 再温育 16 个小时。将由所述培养物获得的细胞在 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 中声波处理,然后在 13,000rpm 下离心以获得上清液。将上清液施加到用缓冲液平衡的 Ni²⁺-NTA superflow 柱 (Qiagen) 并用对应于 5 倍柱体积的洗涤缓冲液 (50mM Tris-HCl,pH7.4,1M NaCl) 洗涤,并用洗脱缓冲液 (50mM Tris-HCl,pH7.4,250mM 咪唑) 洗脱蛋白质。收集包括融合蛋白的级分,并施加到用缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH7.4,250mM 咪唑) 平衡的 Q 柱 (Amersham Biosciences) 和用对应于 5 倍柱体积的清洗缓冲液 (50mM Tris-HCl,pH7.4) 洗涤,并用洗脱缓冲液 (50mM Tris-HCl,pH7.4,500mM NaCl) 洗脱蛋白质。收集包括融合蛋白的级分并进行透析以除去盐。使用 Amicon (Millipore) 浓缩蛋白质。通过使用 BSA 作为标准物测量纯化的蛋白质的浓度。使用 SDS-PAGE, 鉴定融合蛋白 (Ub-H2) 为约 30kDa 并纯化 (见图 3)。

[0087] 根据实施方式的包括融合蛋白和可药用载体的药物组合物可有效地预防或治疗癌症,所述融合蛋白由包括特异性结合膜联蛋白 A1 的多肽的第一蛋白质和连接到第一蛋白质末端的包括诱导细胞毒性淋巴细胞的细胞毒性活性的多肽的第二蛋白质组成。

[0088] 实施例 4:细胞培养物、细胞系和 T- 细胞分离

[0089] 从 American Type Culture Collection 购买人伯基特 (Burkitt) 淋巴瘤细胞 Ramos (ATCC CRL-1596)。从 American Type Culture Collection 购买胃癌细胞系 SNU1、SNU5 (ATCC CRL-5971, ATCC CRL-5973)。如由供应商推荐的那样培养细胞。通过 Ficoll-Paque 密度梯度离心从由当地血库获得的血液分离外周血单核细胞 (PBMC)。通过在 RBC 溶解缓冲液 (155mM NH₄Cl,10mMKHCO₃,和 0.1mM EDTA) 中在室温下温育 15 分钟除去红细胞 (RBC)。通过离心使细胞沉淀 (在 600g5 分钟)。丢弃上清液,并将细胞再悬浮在 PBS 中。在通过在 110g 的离心步骤 15 分钟除去大部分血小板后,将 PBMC 再悬浮在培养基中且典型地使用在没有刺激的情况下制备之后 4 天。使用 Human CD8Subset Column 试剂盒 (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) 分离 CD8+T 细胞。

[0090] 实施例 5:细胞毒性测定

[0091] 钙黄绿素 AM 释放测定用于确定与 CD3 融合的膜联蛋白 A1 结合肽 (AA1BPxCD3) 的细胞毒性活性。在 3 小时后确定细胞毒性。将 Ramos 或 SNU-5 或 SNU-1 细胞 (1.5x10⁷) 用 10mM 钙黄绿素 AM (Molecular Probes) 在细胞培养基中在 37°C 标记 30 分钟。在细胞培养基中 3 次洗涤后,调节细胞密度至在 RPMI1640/10%FCS 中 3x10⁵ 个细胞 /ml,且每次测定反应使用 100 μl 的 3x10⁴ 个细胞的等分试样。在 96 孔圆底板中,在指示的 AA1BPxCD3 浓度下一式三份地共培养 CD8+T 细胞和靶细胞。对于 10:1 的 E:T 之比,靶细胞数量保持恒定在 3x10⁴ 个细胞 / 孔。AA1BPxCD3 稀释在 RPMI1640/10%FCS 中至所需浓度。在 200 μl 的总反应容积中,将反应温育 3 小时。使用荧光读取器 (2104 EnVision® Multilabel Reader, USA) 测量从溶解细胞释放的荧光钙黄绿素。通过在不存在 AA1BPxCD3 下温育效应物和靶细胞确定对照荧光钙黄绿素。为确定总细胞溶解,通过添加 20 μl 的 1% 皂苷溶解不具有 AA1BPxCD3 的效应物和经标记的靶细胞的混合物 10 分钟。根据下式计算特异性细胞毒性:

[0092] % 特异性溶解 = [(样品的荧光 - 对照的荧光) / (总溶解的荧光 - 对照的荧光)] x100

[0093] 应理解,本文中描述的示例性实施方式应仅在描述意义上考虑而不用于限制的目的。在各实施方式中的特征或方面的描述应典型地被视为可用于其他实施方式中其他类似

的特征或方面。

[0001]

序列表

- <110> 三星电子株式会社(Samsung Electronics Co. Ltd)
 <120> 融合蛋白、药物组合物及预防或治疗癌症的方法
 <130> PN090953
 <150> KR2011-0073635
 <151> 2011-07-25
 <160> 122
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
 <400> 1
 Gln Trp Gly His Thr Leu Trp
 1 5
 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
 <400> 2
 Lys Trp Gly His Glu Val Trp
 1 5
 <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
 <400> 3
 Trp Trp Gly His Glu Gln Trp
 1 5
 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
 <400> 4
 Pro Trp Gly His Glu Ile Trp
 1 5
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

[0002]

- <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
 <400> 5
 Leu Trp Gly His His Ile Trp
 1 5
- <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
 <400> 6
 Leu Trp Gly His Gln Ile Trp
 1 5
- <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
 <400> 7
 Leu Trp Gly His Gly Met Trp
 1 5
- <210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
 <400> 8
 Ala Trp Gly His Pro Phe Trp
 1 5
- <210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
 <400> 9
 Met Asn Arg Val
 1
- <210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
 <400> 10
 Ser Leu Asn Ser Ile Leu
 1 5
- <210> 11

[0003]

<211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

 <400> 11
 Asn Leu Asn Ala Trp Phe
 1 5

 <210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

 <400> 12
 Val Glu Trp Pro Trp Trp
 1 5

 <210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

 <400> 13
 Trp Leu Trp Pro Arg Leu
 1 5

 <210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

 <400> 14
 Ile Asp Tyr Gly Leu Phe
 1 5

 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

 <400> 15
 Val Glu Gly Gln Gln Trp Trp
 1 5

 <210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

 <400> 16

[0004]

Trp Met Gly His Ser Ala Trp
1 5

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

<400> 17
Gly Ile His His Pro Ile Trp
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

<400> 18
Trp Gly Gly His Pro Ile Trp
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

<400> 19
Pro Trp Ala Lys Ile Phe Trp
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

<400> 20
Met Gly Ser Lys Met Trp Gly
1 5

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

<400> 21
Met Leu Trp Glu Asp Gln Asp
1 5

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

[0005]

<220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

 <400> 22
 Glu Leu Phe Asp Gly Tyr Asp
 1 5

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

 <400> 23
 Trp Pro Trp Glu Ala Asn His
 1 5

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

 <400> 24
 Glu Gln Tyr Gly Phe Pro Phe
 1 5

<210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

 <400> 25
 Ser Gly Phe Gly His Met Ile Trp
 1 5

<210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

 <400> 26
 Glu Thr Arg Phe His Ala Ile Trp
 1 5

<210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

 <400> 27
 Met Leu His His His Gln Arg Glu
 1 5

[0006]

- <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 28
 Ala Leu His Asn Glu Pro His Thr
 1 5
- <210> 29
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 29
 Ala Phe His Asn Asp Pro Ala Glu
 1 5
- <210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 30
 Leu Leu Phe Ser Asp Ile Gly Asn
 1 5
- <210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 31
 Leu Val Leu Lys Gly Lys Trp His
 1 5
- <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 32
 Ser Gly Asn Gly Lys Pro Phe Trp Met
 1 5
- <210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

[0007]

- <400> 33
 Ile Gln Arg Gly Gly Val Asp Trp Ser
 1 5
- <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 34
 Arg Asp Ser Gln Ser Trp Ser Trp Ser
 1 5
- <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 35
 Leu Leu Glu Ser Gln Asn Pro Gln Asp
 1 5
- <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 36
 Ile Ile Asn Gly Trp Asn Pro Ile Trp
 1 5
- <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 37
 Asp Trp Thr Thr Ala Tyr Gly Pro Ser
 1 5
- <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 38
 Ile Tyr Asp Gly Asn Trp Ser Tyr Trp His
 1 5 10
- <210> 39
 <211> 10

[0008]

- <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 39
 Ser Thr Asp Ser Asn Trp Phe Phe Asn Ala
 1 5 10
- <210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 40
 Met Pro Glu Asn Trp Ile Ser Trp Tyr Arg
 1 5 10
- <210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 41
 Val Arg Thr Asp Trp Tyr Ser Met Leu Met
 1 5 10
- <210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽
- <400> 42
 Met Ile Gln Thr Ser Ser Ala Asn Arg Asp
 1 5 10
- <210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸
- <400> 43
 cagtggggcc ataccctgtg g 21
- <210> 44
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸
- <400> 44
 aaatggggcc atgaagtgtg g 21

[0009]

<210>	45	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	45	
	tggtggggcc atgaacagtg g	21
<210>	46	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	46	
	ccgtggggcc atgaaatttg g	21
<210>	47	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	47	
	ctgtggggcc atcatatttg g	21
<210>	48	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	48	
	ctgtggggcc atcagatttg g	21
<210>	49	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	49	
	ctgtggggcc atggcatgtg g	21
<210>	50	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	50	
	gcgtggggcc atccgttttg g	21

[0010]

<210>	51	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	51	
	atgaaccgcg tg	12
<210>	52	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	52	
	agecftgaaca gcattctg	18
<210>	53	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	53	
	aacctgaacg cgtggttt	18
<210>	54	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	54	
	gtggaatggc cgtggtgg	18
<210>	55	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	55	
	tggetgtggc cgcacctg	18
<210>	56	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	56	
	attgattatg gcctgttt	18
<210>	57	

[0011]

<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	57	
	gtggaaggcc agcagtggtg g	21
<210>	58	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	58	
	tggtatgggcc atagcgcgtg g	21
<210>	59	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	59	
	ggcatfcatc atccgatttg g	21
<210>	60	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	60	
	tggggcggcc atccgatttg g	21
<210>	61	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	61	
	ccgtggcga aaatttttg g	21
<210>	62	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	62	
	atgggcagca aaatgtggg c	21
<210>	63	
<211>	21	

[0012]

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	63	
	atgctgtggg aagatcagga t	21
<210>	64	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	64	
	gaactgtttg atggctatga t	21
<210>	65	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	65	
	tggccgtggg aagcgaacca t	21
<210>	66	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	66	
	gaacagtatg gctttcgtt t	21
<210>	67	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	67	
	agcggctttg gccatgatg ttgg	24
<210>	68	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	68	
	gaaaccgct ttcatcgat ttgg	24
<210>	69	
<211>	24	
<212>	DNA	

[0013]

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	69	
	atgctgcata atcatcagcg cgaa	24
<210>	70	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	70	
	gcgctgcata acgaaccgca tacc	24
<210>	71	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	71	
	gcgtttcata acgatccgca ggaa	24
<210>	72	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	72	
	ctgctgttta gcgatattgg caac	24
<210>	73	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	73	
	ctggcgctga aaggcaaatg gcat	24
<210>	74	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	74	
	agcggcaacg gcaaacggtt ttggatg	27
<210>	75	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0014]

<220>			
<223>		编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	75		
		attcagcgcg gcggcgtgga ttggagc	27
<210>	76		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>		编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	76		
		cgcgatagcc agagctggag ctggagc	27
<210>	77		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>		编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	77		
		ctgctggaaa gccagaacct gcaggat	27
<210>	78		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>		编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	78		
		attattaacg gctggaacct gatttgg	27
<210>	79		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>		编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	79		
		gattggacca ccgctatgg cccgagc	27
<210>	80		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>		编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸	
<400>	80		
		atttatgatg gcaactggag ctattggcat	30
<210>	81		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		

[0015]

<220>			
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸		
<400>	81		
	agcaccgata gcaactggtt ttttaacgcg		30
<210>	82		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸		
<400>	82		
	atgccgaaa actggattag ctggtatcgc		30
<210>	83		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸		
<400>	83		
	gtgcgcaccg attggtatag catgctgatg		30
<210>	84		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	编码特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽的多核苷酸		
<400>	84		
	atgattcaga ccagcagcgc gaaccgcgat		30
<210>	85		
<211>	894		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	编码包括小鼠抗-CD3 和 AWGHPFW 的融合蛋白的多核苷酸		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(11)..(73)		
<223>	pelB: 周质信号序列		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(74)..(97)		
<223>	FLAG		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(98)..(454)		
<223>	小鼠抗-CD3 VH		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(455)..(508)		

[0016]

<223>	VH 和 VL 之间的接头	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(509)..(826)	
<223>	小鼠抗-CD3 VL	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(827)..(841)	
<223>	(GGGG)接头	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(842)..(868)	
<223>	肽序列 AWGHPFW	
<400>	85	
	atggctagca aataccigtet gccgaccgct getgetggte tgetgetcct cgetgeccag	60
	ccggcgatgg ccgactacaa agatgatgac gataaggata tcaaacgca gcagtcaggg	120
	getgaactgg caagacctgg ggccctcagtg aagatgtcct geaagaette tgctacacc	180
	tttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa cagaggcctg gacagggtet ggaatggatt	240
	ggatacatta atcctagccg tggttatact aattacaate agaagtteaa ggacaaggec	300
	acattgacta cagacaaate ctccagcaea gctacatgc aactgagcag cctgacatct	360
	gaggactctg cagtefatta ctgtcaaga tattatgatg atcattactg cctgactac	420
	tggggccaag gcaccactct cacagtctcc teagtcgaag gtggaagtgg aggttctggt	480
	ggaagtggag gttcaggtgg agtcgacgac attcagetga cccagtctcc ageaatcatg	540
	tctgcatect caggggagaa ggtcaccatg acctgcagag ccagttcaag tghtaagttac	600
	atgaaetggt accagcagaa gtcaggcacc tccccaaaa gatggattta tgacacatcc	660
	aaagtggctt ctggagctcc ttatcgette agtggcagtg ggtctgggac ctcatactct	720
	ctcacaatca gcagcatgga gctcgaagat getgceactt attactgcca acagtggagt	780
	agtaacccege tcacgttcgg tgetgggacc aagctggage tgaaggagg tggtgatcc	840
	tgcgcgtggg gccatcgtt ttggtgcctc gagcaccacc accaaccacca ctga	894
<210>	86	
<211>	894	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码包括小鼠抗-CD3 和 LWGHHIW 的融合蛋白的多核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(11)..(73)	
<223>	pcIB: 周质信号序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(74)..(97)	
<223>	FLAG	

[0017]

<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(98)..(454)		
<223>	小鼠抗-CD3 VH		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(455)..(508)		
<223>	VII 和 VL 之间的接头		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(509)..(826)		
<223>	小鼠抗-CD3 VL		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(827)..(841)		
<223>	(GGGS)接头		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(842)..(868)		
<223>	肽序列 LWGHHLW		
<400>	86		
	atggctagca aataactget gccgaccgt getgtgggtc tgetgtect cgtgccag	60	
	ccgggatgg ccgaclaaa agalgaigac gataaggata tcaaacigea gcagtcaggc	120	
	gctgaactgg caagacctgg ggcctcagt aagatgtect gcaagacttc tggtacacc	180	
	tttactaggt acacgatgea ctgggtaaaa cagagcctg gacagggtet ggaatggatt	240	
	ggatacatta atcctagccg tggttatact aattacaatc agaagttaa ggacaaggcc	300	
	acattgacta cagacaaatc ctccagcaca gcctacatgc aactgagcag cctgacatct	360	
	gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga tattatgatg atcattactg ccttgactac	420	
	tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagtccaag gtggaagtgg aggttctggt	480	
	ggaagtgag gttcagtg agtcagcagc atcagctga cccagctcc agcaatcatg	540	
	ctgcatctc caggggagaa ggtcaccatg acctgcagag ccagttcaag tgtaagttac	600	
	atgaactggt accagcagaa gtcaggcacc tcccccaaaa gatggattta tgacacatcc	660	
	aaagtggctt ctggagtccc ttatcgette agtggcagt ggtctgggac ctcatactct	720	
	ctcacaatca gcagcatgga ggtgaagat gctgccactt attactgcca acagtgaggt	780	
	agtaaccctc tcacgttcgg tgetgggacc aagetggagc tgaaggagg tgggtggatcc	840	
	tgcctgtggg gccatcatat ttggtgctc gaccaccacc accaccacca ctga	894	
<210>	87		
<211>	894		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	编码包括小鼠抗-CD3 和 MLWEDQD 的融合蛋白的多核苷酸		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(11)..(73)		

[0018]

<223>	pe1B: 周质信号序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(74)..(97)	
<223>	FLAG	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(98)..(454)	
<223>	小鼠抗-CD3 VH	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(455)..(508)	
<223>	VH 和 VL 之间的接头	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(509)..(826)	
<223>	小鼠抗-CD3 VL	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(827)..(841)	
<223>	(GGGS)接头	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(842)..(868)	
<223>	肽序列 MLWEDQD	
<400>	87	
	atggctagca aatacctgct gccgaecgct getgetggtc tctctctct cgtgccag	60
	ccggcgatgg ccgactacaa agatgatgac gataaggata teaaactgca gcagtcaggc	120
	gctgaactgg caagacetgg ggctcagtg aagatgtct gcaagacttc tggctacacc	180
	tttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa cagaggcctg gacagggtct ggaatggatt	240
	ggatacatfa atcctagccg tggttatact aattacaatc agaagtcca ggacaaggcc	300
	acattgacta cagacaaatc ctccagcaca gcctacatgc aactgagcag ctgacatct	360
	gaggactctg cagctatfa ctgtgcaaga tattatgatg atcattactg ccttgactac	420
	tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagtcgaag gtggaagtgg aggttctggt	480
	ggaagtggag gttcaggtgg agtcagcagc attcagctga cccagtctcc agcaatcatg	540
	tctgcatctc caggggagaa ggtcaccatg acctgcagag ccagttcaag tgtaagttae	600
	atgaactggt accagcagaa gtcaggcacc tccccaaaa gatggattta tgacacatcc	660
	aaagtggett ctggagtccc ttatcgettc agtggcagtg ggtctgggac ctcatctct	720
	ctcaaatca gcagcatgga ggetgaagat getgccactt attactgeca acagttggagt	780
	agtaacecgc tcacgttcgg tgcftggacc aagctggagc tgaaggagg tggfggatcc	840
	tgcattctgt gggaagatca ggattgcctc gagcaaccacc accaccacca ctga	894
<210>	88	
<211>	894	
<212>	DNA	

[0019]

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码包括小鼠抗-CD3 和 PWAKIFW 的融合蛋白的多核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(11)..(73)	
<223>	peIB: 周质信号序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(74)..(97)	
<223>	FLAG	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(98)..(454)	
<223>	小鼠抗-CD3 VH	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(455)..(508)	
<223>	VH 和 VL 之间的接头	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(509)..(826)	
<223>	小鼠抗-CD3 VL	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(827)..(841)	
<223>	(GGGS)接头	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(842)..(868)	
<223>	肽序列 PWAKIFW	
<400>	88	
	atggctagca aataactget gcgaccget getgetggtc tgetgctect cgetgcecag	60
	cggcgatgg ccgactacaa agatgatgac gataaggata tcaactgca gcagtcaggg	120
	getgaactgg caagacctgg ggcctcagtg aagatgtcct gaagacttc ttgetacacc	180
	tttactaggt acaecatgca ctgggtaaaa cagaggcctg gacagggtct ggaatggatt	240
	ggatacatca atcctagccg tggttatact aattacaate agaagttcaa ggacaaggcc	300
	acattgaeta cagacaaate ctcagcaca gctacatgc aactgagcag cctgacatct	360
	gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga tattatgatg atcattactg ccttgactac	420
	tggggccaag gcaccaactct cacagtctcc tcagtcgaag gtggaagtgg aggttctggt	480
	ggaagtggag gttcaggtgg agtcagcagc attcagctga ccagctctcc agcaatcatg	540
	tctgeatctc caggggagaa ggtcaccatg acetgcagag ccagttcaag tgtaagttac	600
	atgaactggt accagcagaa gtcaggeacc tcccccaaaa gatggattta tgacacatcc	660
	aaagtggctt ctggagtccc ttatcgettc agtggcagtg ggtctgggac ctcatactct	720
	ctcacaatca gcagcatgga ggcggaagat getgccaactt attactgcca acagtgagat	780

[0020]

agtaaccgc teacgltcgg tgcctggacc aagctggagc tgaaggagg tggiggatcc	840
tgccegtggg cgaanaatttt ttggtgecte gageaccacc accaccacca ctga	894
<210>	89
<211>	894
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	编码包括小鼠抗-CD3 和 PWGHEIW 的融合蛋白的多核苷酸
<220>	
<221>	misc_feature
<222>	(11)..(73)
<223>	peIB: 周质信号序列
<220>	
<221>	misc_feature
<222>	(74)..(97)
<223>	FLAG
<220>	
<221>	misc_feature
<222>	(98)..(454)
<223>	小鼠抗-CD3 VH
<220>	
<221>	misc_feature
<222>	(455)..(508)
<223>	VH 和 VL 之间的接头
<220>	
<221>	misc_feature
<222>	(509)..(826)
<223>	小鼠抗-CD3 VL
<220>	
<221>	misc_feature
<222>	(827)..(841)
<223>	(GGGGS)接头
<220>	
<221>	misc_feature
<222>	(842)..(868)
<223>	肽序列 PWGHEIW
<400>	89
atggetagca aataacctget gccgaccget gctgctggc tgcctgctct cgtgcccag	60
ccggcgatgg ccgactacaa agatgatgac gataaggata tcaaactgca gcagtcaggg	120
gctgaactgg caagacctgg gccctcagtg aagatgtct gcaagacttc tggctacacc	180
tttactaggt acaogatgca ctgggtaaaa cagaggcctg gacagggtct ggaatggatt	240
ggatacatta atcctagcgg tggttatact aattacaate agaagttcaa ggacaaggcc	300
acattgacta cagacaaate ctccagcaca gcctacatgc aactgagcag cctgacatct	360
gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga tattatgatg atcattactg ccttgactac	420
tggggccaag gcaccactct cacagctctc tcagtcgaag gtggaagtgg aggttctggt	480

[0021]

ggaagtggag gttcaggtgg agtgcagcagc attcagctga cccagtcctcc agcaatcatg 540
 tctgcatctc cagggagaaa ggtcaceatg acctgcagag ccagttcaag tgtaagttac 600
 atgaactggt accagcagaa gtcaggcacc tccccaaaa gatggattta tgacacatcc 660
 aaagtggett ctggagtcce ttatcgcttc agtggcagtg ggtctgggac ctcatactct 720
 ctcaaatca gcagcatgga ggtgaagat gctgceactt attaetgcca acagtgagtg 780
 agtaacecgc tcaegttegg tgcctgggacc aagctggagc taaaaggagg tggctggatcc 840
 tgcccgtagg gtcataaat ttggtgcctc gagcaccacc accaccacca ctga 894

<210> 90
 <211> 894
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码包括小鼠抗-CD3 和 QWHTLW 的融合蛋白的多核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(73)
 <223> peIB: 周质信号序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (74)..(97)
 <223> FLAG

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (98)..(454)
 <223> 小鼠抗-CD3 VH

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (455)..(508)
 <223> VH 和 VL 之间的接头

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (509)..(826)
 <223> 小鼠抗 CD3 VL

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (827)..(841)
 <223> (GGGS)接头

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (842)..(868)
 <223> 肽序列 QWHTLW

<400> 90
 atggctagca aatacctgct gccgaccgct gctgctggtc tctgtctct cctgcccag 60
 ccggcgatgg ccgactacaa agatgatgac gataaggata tcaaacatgca gcagtcaggg 120
 gctgaactgg caagacctgg ggcctcagtg aagatgtcct gcaagacttc tggctacacc 180
 ttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa cagaggctg gacagggtet ggaatggatt 240

[0022]

```

ggatacatta atcctagccg tggttatact aattacaatc agaagttcaa ggacaaggcc      300
acattgacta cagacaaatc ciccagcaca gcctacaatgc aactgagcag cctgacatct      360
gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga tattatgatg atcattactg ccttgactac      420
tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagtcgaag gtggaagtgg aggtttctggt      480
ggaagtggag gttcaggtgg agtcagcagc attcagetga ccagctctcc agcaatcatg      540
cttgcactct caggggagaa ggtcaccatg acctgcagag ccagttcaag tgtaagttac      600
atgaactggg accagcagaa gtcaggcacc tcccccaaaa gatggattta tgacacatcc      660
aaagtggctt ctggagctcc ttategette agtggcagtg ggtctgggac ctcatactct      720
ctcacaatca gcagcatgga ggcctgaagat gctgccactt attactgcca acagtggagt      780
agtaaccegc tcacgttcgg tgetgggacc aagctggagc tgaaggagg tggtggatcc      840
tgccagtggg gtcataacct gtggtgcttc gagcaaccacc accaccacca ciga      894

```

<210> 91
<211> 894
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码包括小鼠抗-CD3 和 VEGQQWW 的融合蛋白的多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(73)
<223> pelB: 周质信号序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(97)
<223> FLAG

<220>
<221> misc_feature
<222> (98)..(454)
<223> 小鼠抗-CD3 VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (455)..(508)
<223> VH 和 VL 之间的接头

<220>
<221> misc_feature
<222> (509)..(826)
<223> 小鼠抗-CD3 VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (827)..(841)
<223> (GGGS)接头

<220>
<221> misc_feature
<222> (842)..(868)
<223> 肽序列 VEGQQWW

[0023]

<400>	91	
		atggctagca aatāctctget gccgaccgct gctgctggte tgetgetect cgctgcccag 60
		ccggcgatgg ccgactacaa agatgatgac gataaggata tcaaaactgea gcagtcaggg 120
		gctgaactgg caagacctgg gccctcagtg aagaigtctt gcaagactte tggctacacc 180
		tttactaggt acacgatgea ctgggtaaaa cagaggcctg gacagggtct ggaatggatt 240
		ggatacatta atcctagcgg tggttatact aattacaate agaagtcca ggacaagccc 300
		acattgacta cagacaaate ctccagcaca gcctacatgc aactgagcag cctgacatct 360
		gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga tattaigatg atcattactg ccttgaacta 420
		tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagtogaag gtggaagtgg aggttctggg 480
		ggaagtggag gttcaggtgg agtcagcagc attcagctga ccagctctcc agcaatcag 540
		tcigcacttc caggggagaa ggtcaccatg acctgcagag ccagttcaag tgtaagtta 600
		atgaactggt accagcagaa gtcaggcacc tcccccaaaa gatggattta tgacacatcc 660
		aaagtggctt ctggagctcc ttatcctctc agtggcagtg ggtctgggac ctcaactct 720
		ctcacaatca gcagcatgga ggetgaagat gctgccactt attactgcca acagtggagt 780
		agtaaccctc tcacttctgg tctctgggacc aagctggagc tgaaggagg tgggtgatcc 840
		tgcgtggaag gccagcagtg gtggtgcctc gagcaccacc accaccacca ctga 894
<210>	92	
<211>	894	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码包括小鼠抗-CD3 和 WMGSAW 的融合蛋白的多核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(11)..(73)	
<223>	pelB: 周质信号序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(74)..(97)	
<223>	FLAG	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(98)..(454)	
<223>	小鼠抗-CD3 VH	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(455)..(508)	
<223>	VH 和 VL 之间的接头	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(509)..(826)	
<223>	小鼠抗-CD3 VL	
<220>		

[0024]

<221>	misc feature	
<222>	(827)..(841)	
<223>	(GGGS)接头	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(842)..(868)	
<223>	肽序列 WMGHSAW	
<400>	92	
	atggctagca aataactgct gccgaccgct getgetggtc tgetgetect cgetgccag	60
	ccggcgatgg ccgaactaca agatgatgac gataaggata tcaaaactgca gcagtcaggc	120
	gctgaactgg caagacctgg ggcctcagtg aagatgtcct gcaagacttc tggetacacc	180
	tttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa cagagcctg gacagggctc ggaatggatt	240
	ggatacatta atcctagccg tggttatact aattacaatc agaagttaa ggacaaggcc	300
	acattgacta cagacaaatc ctccagcaca gcctacatgc aactgagcag cctgacatct	360
	gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga tattatgatg atcattactg ccttgactac	420
	tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagtcgaag gtgggaagtg aggtctctgt	480
	ggaagtgtag gtteaggtgg agtcgacgac attcagetga cceagtctcc agcaatcatg	540
	tcgtcatctc caggggagaa ggccaccatg acctgcagag ccagttcaag tgtaagttac	600
	atgaactggt accagcagaa gtcaggcacc tccccaaaa gatggattta tgacacatcc	660
	aaagtggctt ctggagctcc ttatcgtctc agtggcagtg ggtctgggac ctcaactct	720
	ctcacaatca gcagcatgga ggtgaagat getgccactt attactgcca acagtgagtg	780
	agtaaccctg tcacgttcgg tgetgggacc aagctggagc tgaaggagg tgggtgatac	840
	tgetggatgg gccattctgc gtggtgctct gagcaaccacc accaccaeca ctga	894
<210>	93	
<211>	909	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码包括人抗-CD3 和 AWGHPFW 的融合蛋白的多核苷酸	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(11)..(73)	
<223>	peIB: 周质信号序列	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(74)..(97)	
<223>	FLAG	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(98)..(475)	
<223>	人抗-CD3 VH	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(476)..(520)	
<223>	VH 和 VL 之间的接头	

[0025]

<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(521)..(841)	
<223>	人抗-CD3 VL	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(842)..(856)	
<223>	(GGGS)接头	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(857)..(883)	
<223>	肽序列 AWGHPFW	
<400>	93	
	atggctagca aatacctgct gccgaccgct gctgctggtc tgetgctcct cgetgcccag	60
	ccggcgatgg ccgactacaa agatgatgac gataaggagc tgcagctggt cgagtggggc	120
	gcaggactgt tgaagccttc ggagaccctg tcctcacct gcctgteta tggtaggtcc	180
	ttcagtgggt actacfggag ctggatccgc cagccccag ggaaggggct ggagtggatt	240
	ggggaaatca atcatagtgg aagcaccac tacanccgt cctcaagag tcagtcacc	300
	atatecagtag acacgtcaa gaaccagttc tcctgaage tgagctctgt gaccgcccgc	360
	gacacggctg tgtattactg tgcgagagge cgaggccgat tttggggtg gttattagg	420
	ggctccaaact ggttcgacc ctggggccag ggaacctgg tcaccgtctc ctcagtggt	480
	ggtggttctg gcggcgsggg ctccggtggt ggtggttctg agetcgtgat gaccagict	540
	ccactctccc tgetgcatc ttaggagac agagtcacca tcattgccg ggcgagtcag	600
	ggcattagca attatttaa ttggtatcag cagaaaccag gaaageccc taagctcctg	660
	atctacgatg catccaattt gaaacaggg gtcccatcaa ggttcagtgg cagtggatct	720
	gggacagatt tcacttcac caicagcagt ctgcaacctg aagattitgc aettactac	780
	tgtcaacaga gttacagtac ccegtacact tttggccagg ggaccaaagt ggatatcaa	840
	ggaggtggtg gatcctfgege gtggggccat cegtittigt gctegagca ccaccacc	900
	caccactga	909
<210>	94	
<211>	909	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码包括人抗-CD3 和 LWGHHIW 的融合蛋白的多核苷酸	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(11)..(73)	
<223>	pe1B: 周质信号序列	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(74)..(97)	
<223>	FLAG	

[0026]

<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(98).. (475)		
<223>	人抗-CD3 VH		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(476).. (520)		
<223>	VH和VL之间的接头		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(521).. (841)		
<223>	人抗-CD3 VL		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(842).. (856)		
<223>	(GGGS)接头		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(857).. (883)		
<223>	肽序列LWGHIIW		
<400>	94		
	atggctagca aatacctget ggcgaccgt gctgctggtc tgetgtctct cgetgccag		60
	ccggcgatgg ccgactacaa agatgatgac gataaggagc tgcagctggt cgagtgggce		120
	gcaggactgt tgaagccttc ggagaccctg tcctcaccct ggcctgteta tggigggtcc		180
	ttcagtggtt actactggag ctggatccgc cagccccag ggaagggcct ggagtggatt		240
	ggggaaatca atcatagtgg aagcaccaac tacaaccctt cctcaagag tcgagtcacc		300
	afatcagtag acacgtccaa gaaccagttc tcctgaage tgagctctgt gaccgccgcg		360
	gacacggctg tgtattactg tgcgagagc cgaggccgat tttggggtg gttattaggg		420
	ggctccaact ggttcgacc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagtggt		480
	ggtggttctg cgggcggcgg ctccggtggt ggtggtctg agctcgtgat gaccagctc		540
	ccatcctccc tgtctgcatc ttaggagac agagtcacca teacttgccg ggcgagtcag		600
	ggcattagca attattttaa ttggtatcag cagaaaccag ggaagaagccc taagctctg		660
	atctacgatg catccaattt ggaacaggg gteccatcaa ggctcagtg cagtggtatc		720
	gggacagatt tcactctcac caicagcagt ctgcaacctg aagatttgc aettactac		780
	tgtaacaga gttacagtac cccgtacact ttggccagg ggaccaaagt ggafatcaaa		840
	ggaggtggtg gatcctgcct gtggggccat catatttgg gctcagca ccaccaccac		900
	caccactga		909
<210>	95		
<211>	909		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	编码包括人抗-CD3和MLWEDQD的融合蛋白的多核苷酸		

[0027]

<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(11)..(73)		
<223>	peIB: 周质信号序列		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(74)..(97)		
<223>	FLAG		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(98)..(475)		
<223>	人抗-CD3 VH		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(476)..(520)		
<223>	VH 和 VI 之间的接头		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(521)..(841)		
<223>	人抗-CD3 VL		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(842)..(856)		
<223>	(GGGS)接头		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(857)..(883)		
<223>	肽序列 MLWEDQD		
<400>	95		
atggctagca aatacctget gccgaecget getgetggtc tgetgetcct cgetgccag			60
ccggcgaagg ccgaactaaa agatgatgac gataaggagc tgcagctggt cgagtggggc			120
gcaggactgt tgaagccttc ggagaccctg tccctcactt gcgctgleta tggigggtcc			180
ttcagtggtt actactggag ctggatccgc cagcccccag ggaagggct ggagtggatt			240
ggggaaatca atcatagtgg aagcaccaac tacaaccctt cctcaagag tgcagtcacc			300
atatacgtag acacgtcaa gaaccagttc tcctgaagc tgagctctgt gaccgccgcg			360
gacacggctg tgtattactg tgcgagaggc cagggccgat tttggggtg gttattaggg			420
ggtccaact ggttcgacc ctggggccag ggaacctgg tcacctctc ctcaggtggt			480
ggtggttctg gcggggcgg ctccgggtgt ggtggttctg agctcgtgat gaccagttc			540
ccatctccc tgtctgcat tgtaggagac agagtcacca tcaattgcc ggcagtcag			600
ggcattagca attattttaa ttggtatcag cagaaaccag gaaagcccc taagctcctg			660
atctacgat catccaattt ggaacagggt gtccatcaa gttcagtggt cagtggatct			720
ggacagatt tcactctcac cactcagagt ctgcaacctg aagattttgc aacttactac			780
tgtcaacaga gttacagtac ccgtacact ttggccagg gaccaaaagt ggatatcaaa			840
ggaggtggfg gatctgcat gctgtgggaa gctcaggatt gctctagaca ccaccaccac			900
eaccactga			909

[0028]

<210>	96	
<211>	909	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码包括人抗-CD3 和 PWAKIFW 的融合蛋白的多核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(11)..(73)	
<223>	pe1B: 周质信号序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(74)..(97)	
<223>	FLAG	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(98)..(475)	
<223>	人抗-CD3 VH	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(476)..(520)	
<223>	VH 和 VL 之间的接头	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(521)..(841)	
<223>	人抗-CD3 VL	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(842)..(856)	
<223>	(GGGS)接头	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(857)..(883)	
<223>	肽序列 PWAKIFW	
<400>	96	
	atggctagca aataactgct gccgaccgct gctgctggtc tgctgctcct ogetgcccag	60
	ccggcgatgg cegactacaa agatgatgac gataaggagc tgcagctggt cgagtggggc	120
	gcaggactgt tgaagccttc ggagacctg tcctcacct gcgctgteta tggtaggtcc	180
	ttcagtggtt actactggag ctggatccgc cagccccag ggaaggggct ggagtggatt	240
	ggggaatca atcatagtgg aagcaaccaac tacaaccgt cctcaagag tegagtcacc	300
	aiatcagtag acaogtccaa gaaccagttc tcctgaagc tgagctelgt gaccgcegcg	360
	gacacggetg tgtattactg tgcgagagge cgaggccgat ttttgggtg gttattaggg	420
	ggctccaact ggttcgacc ctggggccag ggaacctgg tacectctc ctcaggtggt	480
	ggtggttctg cggcgccgg ctcgggtggt ggtggttctg agctcgtgat gaccagctct	540
	ccatcctccc tgtctgcatc tgtaggagac agagtcacca tcacttgccg ggcgagtcag	600

[0029]

ggcattagca attattiaaa ttggatcag cagaaaccag gaaagcccc taagctctg 660
 atctacgatg catecaattt ggaacaggg gteccatcaa ggttcagtg cagtgatct 720
 gggacagatt tcactctcac catcagcagt ctgcaacctg aagattttgc aacttactac 780
 tgteaacaga gttacagtac cccgtacact ttggccagg ggaccaaagt ggatatcaaa 840
 ggagggtgtg gatectgccc gtggcgaaa attttttgg gectegagca ccaccaceac 900
 caccactga 909

<210> 97
 <211> 909
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码包括人抗-CD3 和 PWGHEIW 的融合蛋白的多核苷酸

<220>
 <221> misc feature
 <222> (11)..(73)
 <223> pelB: 周质信号序列

<220>
 <221> misc feature
 <222> (74)..(97)
 <223> FLAG

<220>
 <221> misc feature
 <222> (98)..(475)
 <223> 人抗 CD3 VH

<220>
 <221> misc feature
 <222> (476)..(520)
 <223> VH 和 VL 之间的接头

<220>
 <221> misc feature
 <222> (521)..(841)
 <223> 人抗-CD3 VL

<220>
 <221> misc feature
 <222> (842)..(856)
 <223> (GGGS)接头

<220>
 <221> misc feature
 <222> (857)..(883)
 <223> 肽序列 PWGHEIW

<400> 97
 atggctagca aatacctgct gccgaccgct gcigctggtc tgetgctect cgctgccag 60
 ccggcgatgg ccgactacaa agatgatgac gataaggagc tgcagctggt cgagigggce 120
 gcaggactgt tgaagccttc ggagacctg tcctcacct gcgctgtcia tggtggtgce 180
 ttcagtggtt actactggag ctggatcgc cagccccag gaaagggct ggagtggatt 240
 ggggaaatca atcatagtgg aagcacaac tacaaccct cctcaagag tcgagtcacc 300

[0030]

```

atatacagtag acacgtccaa gaaccagttc tcctgaagc tgaactctgt gaccgcgcg      360
gacacggctg lglallactg tgcgagagc cgaggccgat tttggggtg glalltagg      420
ggctccaact ggttogacce ctggggccag ggaacctgg tcaccgtctc ctcaggtggt      480
ggtggttctg gegggcggg ctcgggtggt ggtggttctg agctegtgat gaeccagtct      540
ccatcctccc tgtctgcac ttaggagac agagtcacca tcaattgccg ggcgagtcag      600
ggcattagca attattaaa ttggtatcag cagaaaccag gaaagcccc taagctctct      660
atctacgatg catccaattt ggaacaggg gtccatcaa gtttcagtgg cagtggatct      720
gggacagatt tcactctcac catcagcagt ctgcaactg aagattttge aacttactac      780
tgtcaacaga gttacagtac cccgtacact tttggccagg ggaccaaagt ggatacaaa      840
ggaggtggtg gatctgccc gtggggtcat gaaatttgt gctcagagca ccaccaccac      900
caccactga      909

```

<210> 98
<211> 909
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码包括人抗-CD3 和 QWGHTLW 的融合蛋白的多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(73)
<223> pe1B: 周质信号序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(97)
<223> FLAG

<220>
<221> misc_feature
<222> (98)..(475)
<223> 人抗-CD3 VH

<220>
<221> misc_feature
<222> (476)..(520)
<223> VH 和 VL 之间的接头

<220>
<221> misc_feature
<222> (521)..(841)
<223> 人抗-CD3 VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (842)..(856)
<223> (GGGS)接头

<220>
<221> misc_feature
<222> (857)..(883)
<223> 肽序列 QWGHTLW

[0031]

<400> 98
 atggetagca aafacctgct gccgaccgct getgetggte tgetgetect cgetgcccag 60
 ccggcgatgg ccgactacaa agatgatgac gataaggagc tgcagctggt cgagtggggc 120
 gcaggactgt tgaagccttc ggagaccctg tccctcaact gcctgtctta tggtaggtec 180
 ttcagtgtgt actactggag ctggatccgc cagccccag ggaaggggct ggagtggatt 240
 ggggaaatec atcatagtgg aagcaccaac tacaaccctt cctcaagag tegagtcaac 300
 atatecagtag acacgtccaa gaaccagttc tccctgaage tgagctctgt gaccgcccgc 360
 gacacggctg tgtattactg tgcgagagge cgaggccgat ttttgggtg gttattaggg 420
 ggtccaact ggttcgacc ctagggccag ggaaccctgg tcaaccgtct ctcaggtggt 480
 ggtggttctg gcggcggcgg ctccggtggt ggtggttctg agctcgtgat gaccagctct 540
 ccatctccc tgtctcctc ttagggagac agagtcacca tcaactgccg ggcgagtcag 600
 ggcattagca attattaaa ttggtatcag cagaaaccag gaaagccccc taagctcctg 660
 atctacgatg catccaattt ggaaacagg gteccatcaa ggttcagtgg cagtggatct 720
 gggacagall tcactctca cctcagcagt ctccaacctg aagattttgc aacttactac 780
 tgtcaacaga gtacagtac ccgtacaact tttggccagg ggaccaaagt ggatataaaa 840
 ggagggtgtg gatcctgcca gtggggctcat acctgtggt gcctegagca ccaccaccac 900
 caccactga 909

<210> 99
 <211> 909
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码包括人抗-CD3 和 VEGQQWW 的融合蛋白的多核苷酸

<220>
 <221> misc feature
 <222> (11).. (73)
 <223> peIB: 周质信号序列

<220>
 <221> misc feature
 <222> (74).. (97)
 <223> FLAG

<220>
 <221> misc feature
 <222> (98).. (475)
 <223> 人抗-CD3 VH

<220>
 <221> misc feature
 <222> (476).. (520)
 <223> VH 和 VL 之间的接头

<220>
 <221> misc feature
 <222> (521).. (841)
 <223> 人抗-CD3 VL

[0032]

<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(842)..(856)	
<223>	(GGGS)接头	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(857)..(883)	
<223>	肽序列 VEGQQWW	
<400>	99	
atggetagca aatacctget gcegaccgct gctgctggtc tgetgetcct cgetgcccag		60
ccggcgatgg ccgactacaa agatgatgac gataaggagc tgcagctggt cgagtggggc		120
gcaggactgt tgaagccttc ggagaccctg tcctcactt gcgctgtcta tggtaggtcc		180
ttcagtggtt actactggag ctggatccgc cageccccag ggaaggggct ggagtggatt		240
ggggaatca atcatagtgg aagcaccac tacaaccctt cctcaagag tgcagtcacc		300
atcatcagtag acacgtccaa gaaccagttc tcctgaagc tgagctctgt gaccgccgag		360
gacacggctg tgtattactg tgcgagagc cgaggccgat ttttgggtg gttattaggg		420
ggctccaact ggttcgacc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctgaggtggt		480
ggtggttctg gcggcggcgg ctccggtggt ggtggttctg agctcgtgat gaccagctt		540
ccatcctccc tgtctgcatc ttaggagac agagtcacca tcaattgccg ggcgagtcag		600
ggcattagca attatttaaa ttggtatcag cagaaaccag gaaagccccc taagctcctg		660
atctacgatg catccaattt gaaacaggg gtcccatcaa ggctcagtg cagtggatct		720
gggacagatt teactctcac caccagcagt ctgcaacctg aagattttgc aacttactac		780
tgtcaacaga gttacagtac cccgtacact tttggccagg ggaccaaagt ggatatacaa		840
ggaggtggtg gatcctgctg ggaagccag cagtgtggt gcctcgagca ccaccaccac		900
caccactga		909
<210>	100	
<211>	909	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码包括人抗-CD3 和 WMGHSAW 的融合蛋白的多核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(11)..(73)	
<223>	pe1B: 周质信号序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(74)..(97)	
<223>	FLAG	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(98)..(475)	
<223>	人抗-CD3 VH	

[0033]

<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(476).. (520)		
<223>	VH 和 VL 之间的接头		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(521).. (841)		
<223>	人抗-CD3 VL		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(842).. (856)		
<223>	(GGGS)接头		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(857).. (883)		
<223>	肽序列 WMGHSAW		
<400>	I00		
	atggctagca aatacctgct gccgaccgct gcctgtggtc tgtgtctcct cgtgccag	60	
	ccggcgatgg ccgactacaa agatgatgac gataaggagc tgcagctggt cgagtggggc	120	
	gcaggactgt tgaagccttc ggagaccctg tccctcaact gcctgtctct tgggtggctc	180	
	tteagtgttt actactggag ctggatccgc cagccccag ggaagggct ggagtggatt	240	
	ggggaaalca atcatagtgg aagcaccacac tacaaccctt cctcaagag tggatcacc	300	
	atatcagtag acacgtccaa gaaccagttc tccctgaagc tgagctctgt gaccgccgcg	360	
	gacacggetg tgtattaactg tgcgagaggc cgagggcctg ttttggggtg gttattaggg	420	
	ggtccaact ggttcgacc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagggtgt	480	
	ggtgttctg ccggcgccg ctcgggtggt ggtgttctg agctctgat gaccagctct	540	
	ccatctccc tgtctgcate ttagggagac agagtcacca tcaattgcc ggcgagtcag	600	
	ggcattagca attattttaa ttggtatcag cagaaaccag gaaagcccc taagctctct	660	
	atctacgaig catccaatti ggaacacagg gtcccatcaa ggttcagtgg eagtggatct	720	
	gggacagatt tcactctcac catcagcagt ctgcaacctg aagattttgc aacttactac	780	
	tgtcaacaga gttacagtac cccgtacact tttggccagg ggaccaaagt ggafatcaaa	840	
	ggaggtgtg gatctgtctg gatgggcat tccgctggtt gctctgagca ccaccaccac	900	
	caccactga	909	
<210>	101		
<211>	31		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	pelB:NdeI-F 引物		
<400>	101		
	cgccatatga aatacctgct gccgaccgct g	31	
<210>	102		
<211>	26		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		

[0034]

<220>		
<223>	pe1B-NcoI:BamHI-R 引物	
<400>	102	
	cccggatccg gccatggcgg cctggg	26
<210>	103	
<211>	228	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码泛素的多核苷酸	
<400>	103	
	atgcagattt ttgtgaaaac cctgaccggc aaaaccatta ccttgggaagf ggaaccgagc	60
	gataaccattg aaaacgtgaa agcgaataa caggataaag aaggeattec gccggatcag	120
	cagcgccitga tttttgggg caaacagctg gaagatggcc gcacctgag cgattataac	180
	atcagaag aaagcaccct gcatctggig ctgcgctgc gcggcggc	228
<210>	104	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Flag-小鼠_a-CD3:EcoRI-F 引物	
<400>	104	
	ccggaattcg actacaaaga tgatgacgat aaggatatca aac	43
<210>	105	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Flag-人_a-CD3:EcoRI-F 引物	
<400>	105	
	ccggaattcg actacaaaga tgatgacgat aaggagctg	39
<210>	106	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	pep1:XhoI-R 引物	
<400>	106	
	ccgctcgagg caccaaaacg gatgg	25
<210>	107	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	pep2:XhoI-R 引物	
<400>	107	
	ccgctcgagg caccaaaatg gatggcc	27

[0035]

<210>	108	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	pep3:XhoI-R 引物	
<400>	108	
	ccgctcgagg caatcctgat cttccac	28
<210>	109	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	pep4:XhoI-R 引物	
<400>	109	
	ccgctcgagg caccaaaaaa ttttcgc	27
<210>	110	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	pep5:XhoI-R 引物	
<400>	110	
	ccgctcgagg caccaaat t catgacc	27
<210>	111	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	pep6:XhoI-R 引物	
<400>	111	
	ccgctcgagg caccacaggg tatgacc	27
<210>	112	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	pep7:XhoI-R 引物	
<400>	112	
	ccgctcgagg caccaccaet gctgg	25
<210>	113	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	pep8:XhoI-R 引物	
<400>	113	
	ccgctcgagg caccacgagg aatg	24

[0036]

<210> 114
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> TN-正向引物

 <400> 114
 ggaggaagcg gccgcgtac tggcagc 27

<210> 115
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> TN-反向引物

 <400> 115
 cctcctctct agagcggacc aggagc 26

<210> 116
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗-CD3 scFv 抗体(小鼠)

 <400> 116
 Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Tyr Gln Ser
 130 135 140
 Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
 145 150 155 160
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
 165 170 175
 Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
 180 185 190
 Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 195 200 205
 Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

[0037]

<223> 内附蛋白-折叠(endonexin-fold)

<400> 118
Gly Xaa Gly Thr Asp Glu
1 5

<210> 119
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特异性结合于膜联蛋白 A1 的多肽

<400> 119
Xaa Trp Gly His Xaa Xaa Trp
1 5

<210> 120
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽接头

<400> 120
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 121
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽接头

<400> 121
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 122
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽接头

<400> 122
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

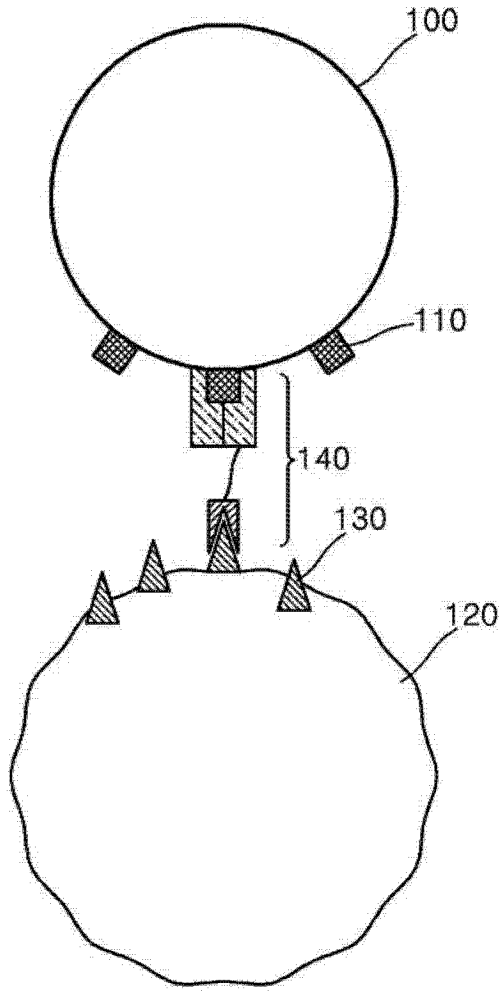


图 1

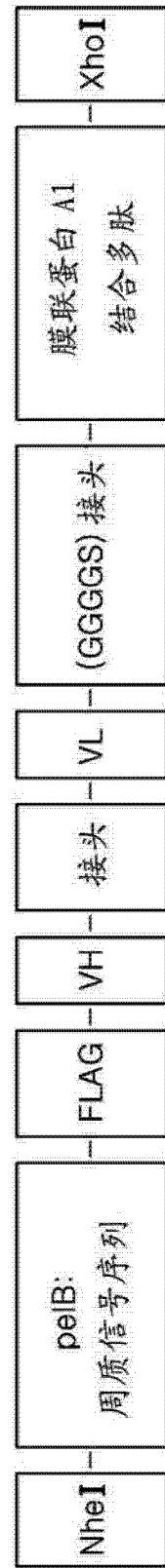


图 2

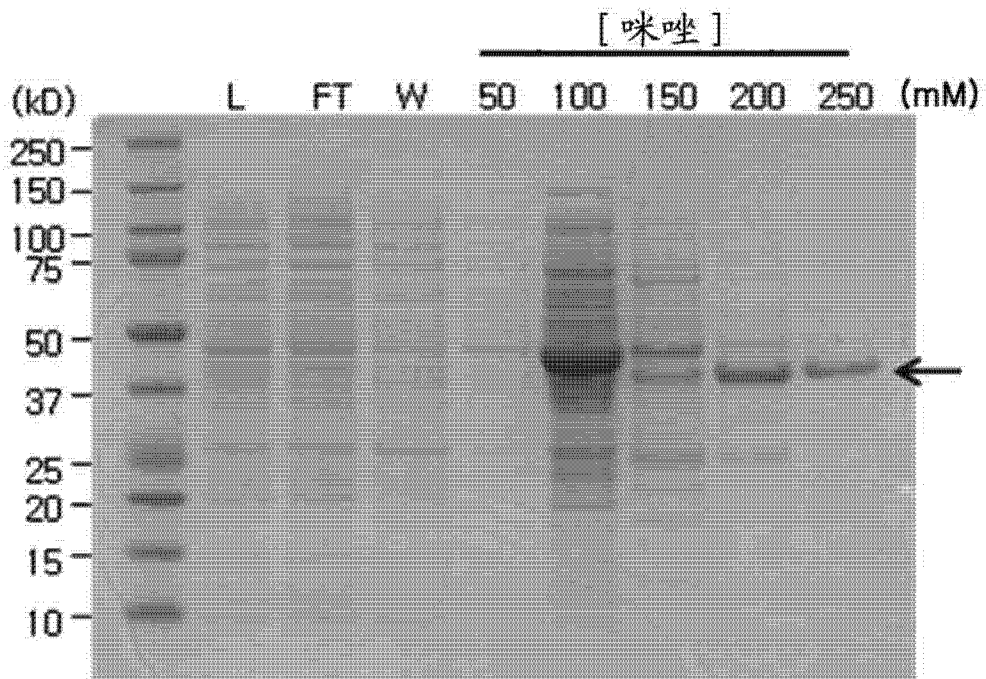


图 3

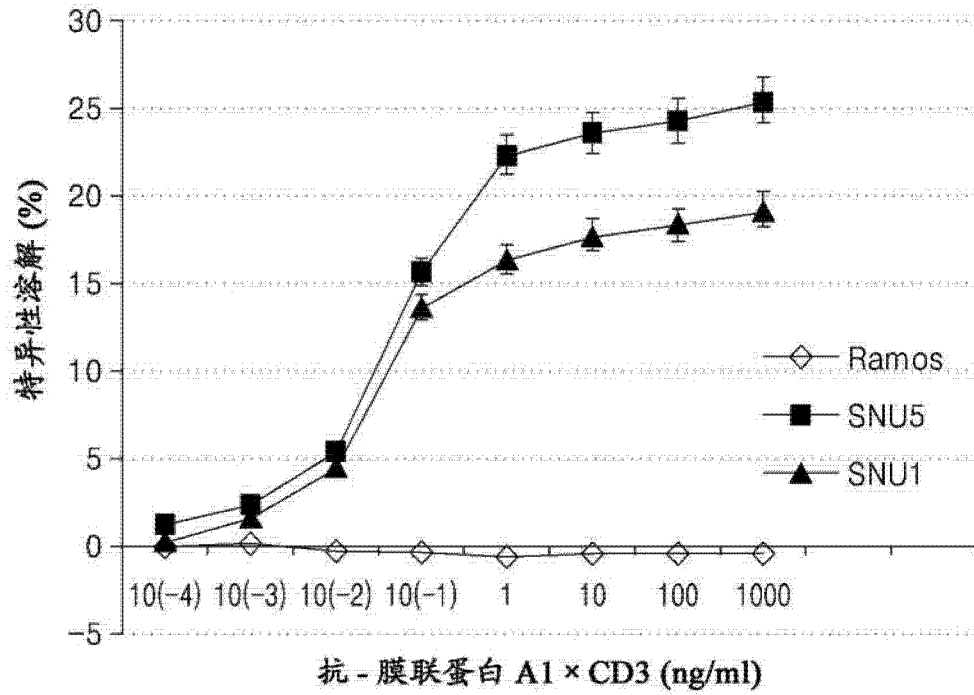


图 4