



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I881476 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 04 月 21 日

(21)申請案號：112136381

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 12 月 19 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

(30)優先權：2018/12/21 歐洲專利局

18214994.8

(71)申請人：瑞士商赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
瑞士(72)發明人：富雷摩捨 葛倫雪伯 安 FREIMOSER-GRUNDSCHOBBER, ANNE (CH)；哈福
湯瑪士 HOFER, THOMAS (CH)；荷斯 勞福 HOSSE, RALF (DE)；摩斯納 艾克
哈得 MOESSNER, EKKEHARD (DE)；尼可利尼 維樂瑞雅 G NICOLINI,
VALERIA G. (ES)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)；華德豪爾 櫻加
WALDHAUER, INJA (DE)；瑞屈特 沃爾夫剛 RICHTER, WOLFGANG (DE)；諾
普 亞歷山大 KNAUPP, ALEXANDER (DE)；崔村諾史加 哈林娜
TROCHANOWSKA, HALINA (PL)

(74)代理人：陳長文；王淑靜；朱淑尹

(56)參考文獻：

TW 201641513A

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：38 項 圖式數：32 共 342 頁

(54)名稱

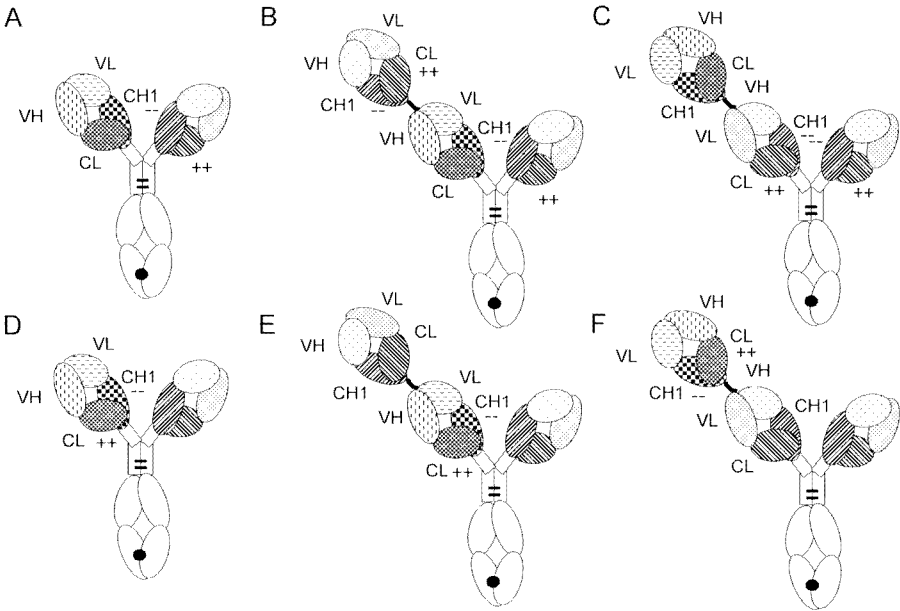
結合 CD3 之抗體

(57)摘要

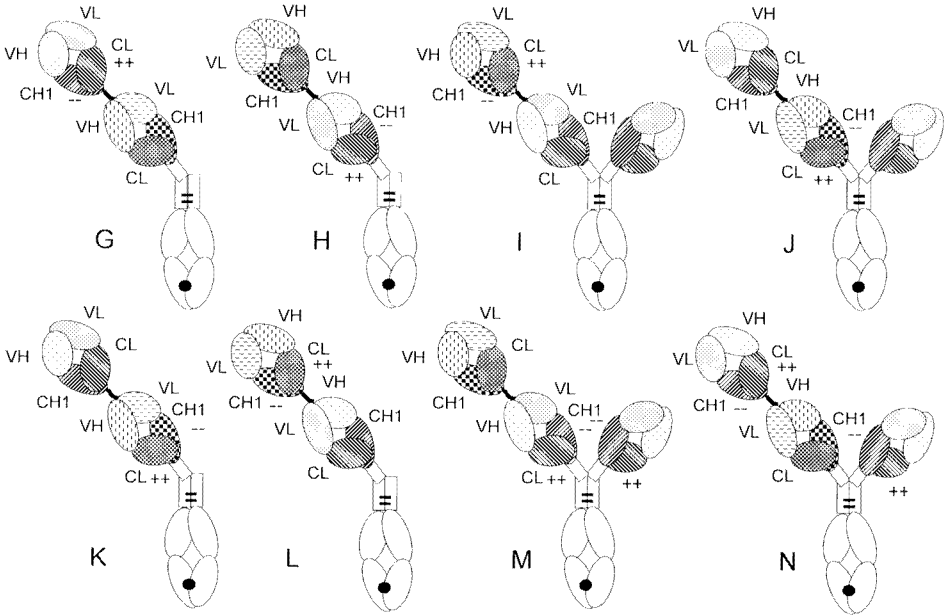
本發明大體上係關於結合 CD3 之抗體，其包括例如用於活化 T 細胞之多特異性抗體。另外，本發明係關於編碼此類抗體之聚核苷酸，以及包含此類聚核苷酸之載體及宿主細胞。本發明進一步係關於用於產生抗體之方法，及使用該等抗體治療疾病之方法。

The present invention generally relates to antibodies that bind to CD3, including multispecific antibodies e.g. for activating T cells. In addition, the present invention relates to polynucleotides encoding such antibodies, and vectors and host cells comprising such polynucleotides. The invention further relates to methods for producing the antibodies, and to methods of using them in the treatment of disease.

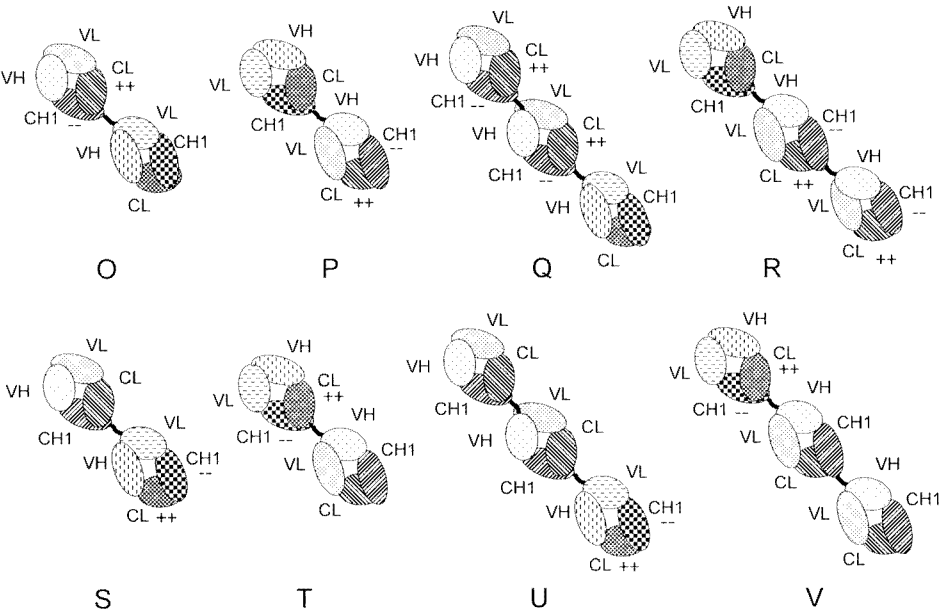
指定代表圖：



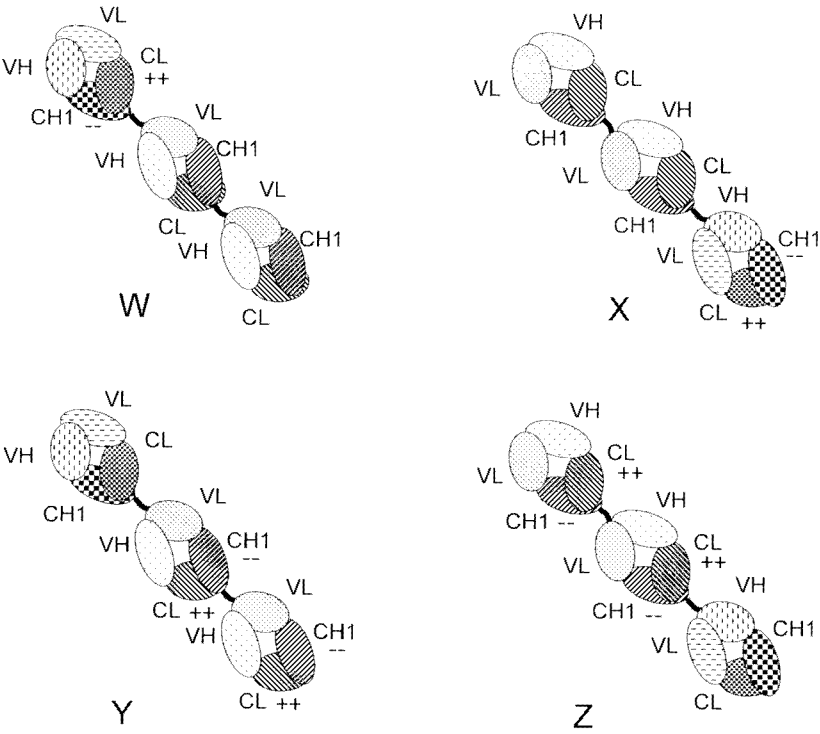
【圖1】



【圖1】(續)



【圖I】(續)



【圖1】(續)



I881476

【發明摘要】

【中文發明名稱】

結合CD3之抗體

【英文發明名稱】

ANTIBODIES BINDING TO CD3

【中文】

本發明大體上係關於結合CD3之抗體，其包括例如用於活化T細胞之多特異性抗體。另外，本發明係關於編碼此類抗體之聚核苷酸，以及包含此類聚核苷酸之載體及宿主細胞。本發明進一步係關於用於產生抗體之方法，及使用該等抗體治療疾病之方法。

【英文】

The present invention generally relates to antibodies that bind to CD3, including multispecific antibodies e.g. for activating T cells. In addition, the present invention relates to polynucleotides encoding such antibodies, and vectors and host cells comprising such polynucleotides. The invention further relates to methods for producing the antibodies, and to methods of using them in the treatment of disease.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

結合CD3之抗體

【英文發明名稱】

ANTIBODIES BINDING TO CD3

【技術領域】

【0001】 本發明大體上係關於結合CD3之抗體，其包括例如用於活化T細胞之多特異性抗體。另外，本發明係關於編碼此類抗體之聚核苷酸，以及包含此類聚核苷酸之載體及宿主細胞。本發明進一步係關於用於產生抗體之方法，及使用該等抗體治療疾病之方法。

【先前技術】

【0002】 CD3（分化簇3）為由四個亞單元—CD3 γ 鏈、CD3 δ 鏈及兩個CD3 ϵ 鏈構成之蛋白複合物。CD3與T細胞受體及 ζ 鏈結合以產生T淋巴細胞中之活化信號。

【0003】 已將CD3作為藥物目標進行了充分研究。已在諸如I型糖尿病之自體免疫疾病中或移植排斥之治療中將靶向CD3之單株抗體用作免疫抑制療法。CD3抗體莫羅單抗-CD3（OKT3）為曾在1985經批准用於人類臨床用途的首個單株抗體。

【0004】 CD3抗體之最近應用係呈雙特異性抗體形式，其一方面結合CD3且另一方面結合腫瘤細胞抗原。此類抗體同時結合其兩個目標將迫使目標細胞與T細胞之間產生暫時性相互作用，引起任何細胞毒性T細胞活化及隨後之目標細胞溶解。

【0005】 出於治療目的，抗體必須滿足之重要需求為在活體外（針對

藥物之儲存)及活體內(在向患者投與之後)皆具有足夠穩定性。

【0006】 如天冬醯胺去醯胺化之修飾為針對重組抗體之典型降解，且可影響活體外穩定性及活體內生物功能兩者。

【0007】 鑒於抗體(特定言之用於活化T細胞之雙特異性抗體)之極大治療劑潛力，需要具有最佳化特性之CD3抗體。

【發明內容】

【0008】 本發明提供抗體，包括多特異性(例如雙特異性)抗體，其視治療目的需要而結合CD3且對藉由例如天冬醯胺去醯胺化之降解具有抗性，且因此尤其穩定。所提供之(多特異性)抗體進一步組合良好功效及可製造性與低毒性及有利藥物動力學特性。

【0009】 如本文所示，相對於在pH 6、-80℃下2週之後的結合活性，由本發明提供之結合CD3之抗體(包括多特異性抗體)在pH 7.4、37℃下2週之後保留超過約90%之CD3結合活性，如藉由表面電漿子共振(SPR)所測定。

【0010】 在一個態樣中，本發明提供一種結合CD3之抗體，其中該抗體包含第一抗原結合域，該第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 2之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 3之HCDR 2及SEQ ID NO: 5之HCDR 3的重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO: 8之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 9之LCDR 2及SEQ ID NO: 10之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)。在一個態樣中，該VH包含與SEQ ID NO: 7之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列，及/或該VL包含與SEQ ID NO: 11之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。

【0011】 在另一態樣中，本發明提供結合CD3之抗體，其中該抗體包含第一抗原結合域，該第一抗原結合域包含SEQ ID NO: 7之VH序列及SEQ ID NO: 11之VL序列。

【0012】 在一個態樣中，該第一抗原結合域為Fab分子。

【0013】 在一個態樣中，該抗體包含由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域。

【0014】 在一個態樣中，該抗體包含結合於第二抗原之第二抗原結合域及視情況存在之第三抗原結合域。

【0015】 在一個態樣中，該第二抗原結合域及/或視情況存在之該第三抗原結合域為Fab分子。

【0016】 在一個態樣中，該第一抗原結合域為Fab分子，其中該Fab輕鏈及該Fab重鏈之該等可變域VL及VH或該韋恆定域CL及CH1，尤其該等可變域VL及VH相互置換。

【0017】 在一個態樣中，該第二抗原結合域及視情況存在之該第三抗原結合域為習知Fab分子。

【0018】 在一個態樣中，該第二抗原結合域及視情況存在之該第三抗原結合域為Fab分子，其中在該恆定域CL中，位置124處之胺基酸係獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat編號)取代，且位置處123之胺基酸係獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat編號)取代，且在該恆定域CH1中，位置147處之胺基酸係獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)取代，且位置213處之胺基酸係獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)取代。

【0019】 在一個態樣中，該第一抗原結合域及該第二抗原結合域視

情況經由肽連接子彼此融合。

【0020】 在一個態樣中，該第一抗原結合域及該第二抗原結合域各自為Fab分子，且(i)該第二抗原結合域在該Fab重鏈之C端與該第一抗原結合域之該Fab重鏈之N端融合，或(ii)該第一抗原結合域在該Fab重鏈之C端與該第二抗原結合域之該Fab重鏈之N端融合。

【0021】 在一個態樣中，該第一抗原結合域、該第二抗原結合域及視情況存在之該第三抗原結合域各自為Fab分子，且該抗體包含由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域；且其中(i)第二抗原結合域在該Fab重鏈之該C端與該第一抗原結合域之該Fab重鏈之該N端融合，且該第一抗原結合域在該Fab重鏈之該C端與該Fc域之該第一亞單元之N端融合，或(ii)該第一抗原結合域在該Fab重鏈之該C端與該第二抗原結合域之該Fab重鏈之該N端融合，且該第二抗原結合域在該Fab重鏈之該C端與該Fc域之該第一亞單元之該N端融合；且該第三抗原結合域在存在時在該Fab重鏈之該C端與該Fc域之該第二亞單元之N端融合。

【0022】 在一個態樣中，該Fc域為IgG Fc域，特定言之IgG₁ Fc域。在一個態樣中，該Fc域為人類Fc域。在一個態樣中，該Fc包含促進該Fc域之該第一亞單元與該第二亞單元之結合的修飾。在一個態樣中，該Fc域包含一或多個降低與Fc受體之結合及/或效應功能之胺基酸取代。

【0023】 在一個態樣中，該第二抗原為目標細胞抗原，特定言之腫瘤細胞抗原。

【0024】 在一個態樣中，該第二抗原為TYRP-1。在一個態樣中，該第二抗原結合域及視情況存在之該第三抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 15之HCDR 1、SEQ ID NO: 16之HCDR 2及SEQ ID NO: 17之

HCDR 3的VH及包含SEQ ID NO: 19之LCDR 1、SEQ ID NO: 20之LCDR 2及SEQ ID NO: 21之LCDR 3的VL。在一個態樣中，該第二抗原結合域及視情況存在之該第三抗原結合域包含：包含與SEQ ID NO: 18之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列地VH及/或包含與SEQ ID NO: 22之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的VL。

【0025】 在一個態樣中，該第二抗原為EGFRvIII。在一個態樣中，該第二抗原結合域及視情況存在之該第三抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 85之HCDR 1、SEQ ID NO: 86之HCDR 2及SEQ ID NO: 87之HCDR 3的VH及包含SEQ ID NO: 89之LCDR 1、SEQ ID NO: 90之LCDR 2及SEQ ID NO: 91之LCDR 3的VL。在一個態樣中，該第二抗原結合域及視情況存在之該第三抗原結合域包含：包含與SEQ ID NO: 88之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的VH及/或包含與SEQ ID NO: 92之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的VL。

【0026】 根據本發明之另一態樣，提供一種編碼本發明之抗體的經分離聚核苷酸及一種包含本發明之經分離聚核苷酸的宿主細胞。

【0027】 在另一態樣中，提供一種產生結合CD3之抗體的方法，其包含以下步驟：(a)在適合於表現該抗體之條件下培養本發明之該宿主細胞，及視情況存在之(b)回收該抗體。本發明亦涵蓋一種藉由本發明之方法產生的結合CD3之抗體。

【0028】 本發明進一步提供一種醫藥組合物，其包含本發明之抗體及醫藥學上可接受之載劑。

【0029】 本發明亦涵蓋使用本發明之抗體及醫藥組合物的方法。在一個態樣中，本發明提供根據本發明之抗體或醫藥組合物，其用作藥物。在一個態樣中，提供根據本發明之抗體或醫藥組合物，其用於治療疾病。在一特定態樣中，該疾病為癌症。

【0030】 亦提供根據本發明之抗體或醫藥組合物在製造藥物中的用途，根據本發明之抗體或醫藥組合物在製造用於治療疾病(特定言之癌症)之藥物中的用途。本發明亦提供一種治療個體之疾病的方法，其包含向該個體投與有效量之根據本發明之抗體或醫藥組合物。

【圖式簡單說明】

【0031】

圖1A至圖1Z. 本發明之(多特異性)抗體之例示性組態。(A、D)示出「1+1 CrossMab」分子。(B、E)示出具有替代性Crossfab與Fab組分次序(「反向」)之「2+1 IgG Crossfab」分子。(C、F)示出「2+1 IgG Crossfab」分子。(G、K)示出具有替代性Crossfab與Fab組分次序(「反向」)之「1+1 IgG Crossfab」分子。(H、L)示出「1+1 IgG Crossfab」分子。(I、M)示出具有兩個CrossFab之「2+1 IgG Crossfab」分子。(J、N)示出具有兩個CrossFab及替代性Crossfab與Fab組分次序(「反向」)的「2+1 IgG Crossfab」分子。(O、S)示出「Fab-Crossfab」分子。(P、T)示出「Crossfab-Fab」分子。(Q、U)示出「(Fab)₂-Crossfab」分子。(R、V)示出「Crossfab-(Fab)₂」分子。(W、Y)示出「Fab-(Crossfab)₂」分子。(X、Z)示出「(Crossfab)₂-Fab」分子。黑點：Fc域中視情況存在之促進雜二聚化的修飾。++，--：視情況引入CH1域及CL域中之帶有相反電荷的胺基酸。Crossfab分子經描繪為包含VH區與VL區之交換，但在

CH1域及CL域中未引入電荷修飾的態樣中，可替代地包含CH1域與CL域之交換。

圖2. 在未加壓條件下，在40°C pH 6下14 d之後或在37°C pH 7.4下14 d之後藉由SPR所量測的原始CD3結合子CD3_{orig}及最佳化CD3結合子CD3_{opt}與重組CD3之相對結合活性(IgG型式)。

圖3. 如藉由流動式細胞測量術所量測的原始CD3結合子CD3_{orig}及最佳化CD3結合子CD3_{opt}與Jurkat NFAT細胞之結合(IgG型式)。用經螢光標記之抗人類Fc特異性二級抗體偵測結合至Jurkat NFAT細胞之抗體。

圖4. 用於實例3中孩子CD3活化分析之示意性圖解說明。

圖5. 用原始CD3結合子CD3_{orig}及最佳化CD3結合子CD3_{opt} (IgG型式)之Jurkat NFAT活化。在CD3_{orig}或CD3_{opt} IgG PGLALA或作為陰性對照之CD3_{opt} IgG wt的存在下將Jurkat NFAT報導子細胞與表現抗PGLALA之CHO (CHO-PGLALA)細胞一起共培育。在24 h之後藉由量測發光對CD3活化進行定量。

圖6. 實例中所製備之T細胞雙特異性抗體(TCB)分子之示意性圖解說明。所有所測試TCB抗體分子以具有電荷修飾之「反向2+1 IgG CrossFab」形式(CD3結合子中之VH/VL交換，目標抗原結合子中之電荷修飾，EE = 147E, 213E；RK = 123R, 124K)產生。

圖7. 在未加壓條件下，在40°C pH 6下14 d之後或在37°C pH 7.4下14 d之後藉由SPR所量測的包含原始CD3結合子CD3_{orig}或最佳化CD3結合子CD3_{opt}之TYRP1 TCB與重組CD3之相對結合活性。

圖8. 在未加壓條件下，在40°C pH 6下14 d之後或在37°C pH 7.4下14 d之後藉由SPR所量測的包含原始CD3結合子CD3_{orig}或最佳化CD3結合

子CD3_{opt}之TYRP1 TCB或對應TYRP1 IgG與重組TYRP1之相對結合活性。

圖9. 如藉由流動式細胞測量術所量測的包含原始CD3結合子CD3_{orig}或最佳化CD3結合子CD3_{opt}之TYRP1 TCB與Jurkat NFAT細胞之結合。用經螢光標記之抗人類Fc特異性二級抗體偵測結合至Jurkat NFAT細胞之TCB。

圖10. 使用包含原始或最佳化CD3結合子之TYRP1 TCB的Jurkat NFAT活化。在TYRP1 TCB CD3_{orig}或TYRP1 TCB CD3_{opt}存在下將Jurkat NFAT報導子細胞與黑素瘤細胞株M150543一起共培育。在24 h之後藉由量測發光對TCB存在下之CD3活化進行定量。

圖11A至圖11R. 使用包含原始或最佳化CD3結合子之TYRP1 TCB的腫瘤細胞殺滅及T細胞活化。藉由24 h (A、G、M)及48 h (B、H、N)之後的LDH釋放測定藉由來自三個不同健康供體(A至F：供體1，G至L：供體2，M至R：供體3)用TYRP1 TCB CD3_{orig}及TYRP1 TCB CD3_{opt}處理後黑素瘤細胞株M150543之殺死。並行地，在48 h之後以用於T細胞活化之標記物形式藉由流動式細胞測量術來量測PBMC內之CD8 (E、F、K、L、Q、R)及CD4 (C、D、I、J、O、P) T細胞上之CD25 (C、E、I、K、O、Q)及CD69 (D、F、J、L、P、R)上調。

圖12A至圖12C. EGFRvIII IgG PGLALA之特異性結合。藉由流動式細胞測量術對CHO-EGFRvIII (A)、EGFRvIII陽性DK-MG (B)及表現EGFRwt之MKN-45 (C)測試EGFRvIII IgG PGLALA抗體在不具有與EGFRwt之交叉反應性的情況下對EGFRvIII之特異性結合。包括西妥昔單抗(cetuximab)作為用於EGFRwt表現之陽性對照。

圖 13. 使用 EGFRvIII IgG PGLALA 之 CAR J 活化。將表現抗 PGLALA CAR 之 Jurkat NFAT 報導子細胞與表現 EGFRvIII 之 DK-MG 細胞及 EGFRvIII IgG PGLALA 抗體或作為陰性對照之 DP47 IgG PGLALA 一起共培育。在 22 h 之後藉由量測發光對 Jurkat NFAT 細胞之活化進行定量。

圖 14A 至圖 14B. EGFRvIII IgG PGLALA 及對應 TCB 與 EGFRvIII 之結合。藉由流動式細胞測量術量測呈 IgG PGLALA 形式且轉化成 TCB 之 EGFRvIII 結合子與 CHO-EGFRvIII (A) 及 MKN-45 (B) 細胞之特異性結合。

圖 15. 使用 EGFRvIII TCB 之 Jurkat NFAT 活化。測定 Jurkat NFAT 活化作為在 EGFRvIII 陽性 DK-MG 細胞存在下 CD3 與 EGFRvIII TCB 之接合的標記物。包括 DP47 TCB 作為陰性對照。

圖 16A 至圖 16D. 使用 EGFRvIII TCB 之腫瘤細胞溶解。在與新近分離之 PBMC 及 EGFRvIII 陽性 DK-MG 細胞 (A、B) 或 EGFRwt 陽性 MKN-45 細胞 (C、D) 一起共培養 24 h (A、C) 或 48 h (B、D) 後測定藉由 EGFRvIII TCB 對特異性腫瘤細胞溶解之誘導。

圖 17A 至圖 17H. 使用 EGFRvIII TCB 之 T 細胞活化。在與新近分離之 PBMC 及 EGFRvIII 陽性 DK-MG 細胞 (A、B、E、F) 或 EGFRwt 陽性 MKN-45 細胞 (C、D、G、H) 一起共培養後使用 CD4 T 細胞 (A 至 D) 或 CD8 T 細胞 (E 至 H) 上之活化標記物 CD25 (A、C、E、G) 或 CD69 (B、D、F、H) 測定藉由 EGFRvIII TCB 對 T 細胞活化之誘導。

圖 18A 至圖 18F. 使用 EGFRvIII TCB 之細胞介素釋放。在與新近分離之 PBMC 及 EGFRvIII 陽性 DK-MG 細胞 (A 至 C) 或 EGFRwt 陽性 MKN-45 細

胞(D至F)一起共培養後測定藉由EGFRvIII TCB對IFN γ (A、D)、TNF α (B、E)及顆粒酶B (C、F)釋放之誘導。

圖19A至圖19B. 親和力成熟EGFRvIII IgG PGLALA之特異性結合。將親和力成熟EGFRvIII抗體與EGFRvIII之特異性結合與U87MG-EGFRvIII細胞(A)及EGFRwt陽性細胞株MKN-45 (B)上之親本EGFRvIII結合子進行比較。

圖20A至圖20C. 藉由EGFRvIII TCB之Jurkat NFAT活化。測定Jurkat NFAT活化作為在EGFRvIII陽性DK-MG細胞(A)、U87MG-EGFRvIII細胞(B)及MKN-45細胞(C)存在下CD3與EGFRvIII TCB之接合的標記物。包括DP47 TCB作為陰性對照。

圖21. 在未加壓條件下，在40°C pH 6下14 d之後或在37°C pH 7.4下14 d之後藉由SPR所量測的包含原始CD3結合子CD3_{orig}或最佳化CD3結合子CD3_{opt}之EGFRvIII TCB與重組CD3之相對結合活性。

圖22. 在未加壓條件下，在40°C pH 6下14 d之後或在37°C pH 7.4下14 d之後藉由SPR所量測的包含原始CD3結合子CD3_{orig}或最佳化CD3結合子CD3_{opt}之EGFRvIII TCB與重組EGFRvIII之相對結合活性。

圖23. 如藉由流動式細胞測量術所量測的包含原始CD3結合子CD3_{orig}或最佳化CD3結合子CD3_{opt}之EGFRvIII TCB與Jurkat NFAT細胞之結合。用經螢光標記之抗人類Fc特異性二級抗體偵測結合至Jurkat NFAT細胞之TCB。

圖24. 如藉由流動式細胞測量術所量測的包含P063.056或P056.021 EGFRvIII結合子之EGFRvIII TCB與U87MG-EGFRvIII細胞之結合。用經螢光標記之抗人類Fc特異性二級抗體偵測結合至U87MG-EGFRvIII細胞

之TCB。

圖25A至圖25D. 使用EGFRvIII TCB之腫瘤細胞溶解及T細胞活化。在與新近分離之PBMC及U87MG-EGFRvIII細胞一起共培養24 h (A、C)或48 h (B、D)後測定藉由EGFRvIII TCB對特異性腫瘤細胞溶解(A、B)及T細胞活化(C、D)之誘導。包括DP47 TCB作為陰性對照。

圖26. 比較EGFRvIII TCB 2+1型式及1+1形式之Jurkat NFAT活化。測定Jurkat NFAT活化作為在EGFRvIII陽性U87MG-EGFRvIII細胞存在下CD3與2+1反向型式及1+1頭尾型式之EGFRvIII TCB之接合的標記物。

圖27A至圖27D. 比較EGFRvIII TCB 2+1型式及1+1形式之腫瘤細胞溶解及T細胞活化。在與新近分離之PBMC及U87MG-EGFRvIII細胞一起共培養24 h (A、C)或48 h (B、D)後測定藉由2+1反向型式及1+1頭尾型式之EGFRvIII TCB對特異性腫瘤細胞溶解(A、B)及T細胞活化(C、D)之誘導。

圖28A至圖28D. 使用EGFRvIII TCB之T細胞活化及增殖。在共培養U87MG-EGFRvIII與分離自健康供體之PBMC後測定藉由EGFRvIII TCB對CD4 T細胞(A、B)及CD8 T細胞(C、D)之T細胞增殖(A、C)及T細胞活化之誘導。

圖29A至圖29F. 使用EGFRvIII TCB之腫瘤細胞溶解、T細胞活化及細胞介素釋放。在共培養U87MG-EGFRvIII細胞與PBMC後測定藉由EGFRvIII TCB對腫瘤細胞溶解(A、B)、T細胞活化(C、D)以及IFN γ 及TNF α 釋放(E、F)之誘導。在處理24 h及48 h之後量測腫瘤細胞溶解，在48 h之後量測T細胞活化及細胞介素釋放。

圖30A至圖30F. 使用TYRP-1 TCB之腫瘤細胞溶解、T細胞活化及細

胞介素釋放。在共培養患者來源之黑素瘤細胞株M150543與PBMC後測定藉由TYRP-1 TCB對腫瘤細胞溶解(A、B)、T細胞活化(C、D)以及IFN γ 及TNF α 釋放(E、F)之誘導。在處理24 h及48 h之後量測腫瘤細胞溶解，在48 h之後量測T細胞活化及細胞介素釋放。

圖31. TYRP-1 TCB之活體內功效。在人類化NSG小鼠中皮下注射IGR-1人類黑素瘤細胞株，以於黑素瘤皮下異種移植模型中研究腫瘤生長抑制。相較於媒劑組，在TYRP-1 TCB組中觀測到顯著腫瘤生長抑制(TGI) (68% TGI，p=0.0058*)。

圖32. EGFRvIII TCB之活體內功效。在人類化NSG小鼠中皮下注射U87-huEGFRvIII人類神經膠母細胞瘤細胞株，以於神經膠母細胞瘤皮下異種移植模型中研究腫瘤生長抑制。在EGFRvIII TCB組中觀測到顯著腫瘤控制，其中所有小鼠獲得完全緩解。

【實施方式】

【0032】

I. 定義

除非下文中另有定義，否則術語在本文中的使用如此項技術一般所用。

【0033】 如本文所用，術語「第一」、「第二」或「第三」與抗原結合域等相關時，係為了便於區分而使用，此時存在的各類型部分超過一種。此等術語之使用並非旨在賦予該部分之特定次序或定向，除非明確如此陳述。

【0034】 術語「抗CD3抗體」及「結合CD3之抗體」係指能夠以足夠親和力結合CD3之抗體，使得該抗體適用作靶向CD3之診斷劑及/或治

療劑。在一個態樣中，抗CD3抗體結合至不相關非CD3蛋白之程度小於抗體結合CD3之約10%，例如藉由表面電漿子共振(SPR)所量測。在某些態樣中，結合CD3之抗體具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 500 \text{ nM}$ 、 $\leq 200 \text{ nM}$ 或 $\leq 100 \text{ nM}$ 之解離常數(K_D)。當如例如藉由SPR量測，抗體具有 $1 \mu\text{M}$ 或更小之 K_D 時，抗體稱為與CD3「特異性結合」。在某些態樣中，抗CD3抗體結合至CD3之抗原決定基，該抗原決定基在來自不同物種之CD3當中為保守性的。

【0035】 術語「抗體」在本文中以最廣泛意義使用且涵蓋各種抗體結構，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現所需抗原結合活性即可。

【0036】 「抗體片段」係指不同於完整抗體，包含完整抗體之一部分，結合完整抗體所結合之抗原的分子。抗體片段之實例包括(但不限於)Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、雙功能抗體、線性抗體、單鏈抗體分子(例如scFv及scFab)、單域抗體及由抗體片段形成之多特異性抗體。關於某些抗體片段之綜述，參見Hollinger及Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136 (2005)。

【0037】 術語「全長抗體」、「完整抗體」及「完全抗體」在本文中可互換使用，其係指具有與原生抗體結構實質上類似之結構的抗體。

【0038】 如本文所用之術語「單株抗體」係指獲自實質上同種之抗體群體的抗體，亦即該群體中所包含之個別抗體相同及/或結合相同抗原決定基，但除可能存在變異抗體，例如含有天然存在之突變或在單株抗體製劑產生期間發生的突變以外，此類變異體一般以少量存在。相比於通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑，單株抗體製劑中之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。因此，修飾語「單株」

指示抗體之特徵係自實質上同種之抗體群體獲得，且不應視為需要藉由任何特定方法產生該抗體。舉例而言，單株抗體可藉由多種技術製得，包括(但不限於)融合瘤方法、重組DNA方法、噬菌體呈現方法及利用含有所有或部分人類免疫球蛋白基因座之轉殖基因動物的方法，此類方法及其他用於製得單株抗體之例示性方法皆描述於本文中。

【0039】「經分離」抗體為已自其天然環境之組分分離的抗體。在一些態樣中，抗體經純化至大於95%或99%之純度，如藉由例如電泳(例如SDS-PAGE、等電聚焦(IEF)、毛細電泳法)或層析(例如離子交換或逆相HPLC、親和力層析法、尺寸排阻層析)方法所測定。關於評定抗體純度之方法的綜述，參見例如Flatman等人，*J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)。在一些態樣中，本發明提供之抗體為經分離抗體。

【0040】術語「嵌合」抗體係指重鏈及/或輕鏈之一部分來源於特定來源或物種，同時重鏈及/或輕鏈之其餘部分來源於不同來源或物種之抗體。

【0041】「人類化」抗體係指包含來自非人類CDR之胺基酸殘基及來自人類FR之胺基酸殘基的嵌合抗體。在某些態樣中，人類化抗體將包含至少一個且通常兩個可變域中之實質上全部，其中全部或實質上全部CDR對應於非人類抗體之彼等CDR，且全部或實質上全部FR對應於人類抗體之彼等FR。此類可變域在本文中稱為「人類化可變區」。人類化抗體視情況可包含源自人類抗體之抗體恆定區的至少一部分。在一些態樣中，人類化抗體中之一些FR殘基經來自非人類抗體(例如，CDR殘基所來源於之抗體)之對應殘基取代，例如用以恢復或改良抗體特異性或親和力。抗體(例如非人類抗體)之「人類化形式」係指已經歷人類化之抗體。

【0042】 「人類抗體」為胺基酸序列對應於由人類或人類細胞產生或來源於利用人類抗體譜系或其他人類抗體編碼序列之非人類來源之抗體的胺基酸序列之抗體。人類抗體之此定義特別排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。在某些態樣中，人類抗體來源於非人類轉殖基因哺乳動物，例如小鼠、大鼠或兔。在某些態樣中，人類抗體來源於融合瘤細胞株。自人類抗體文庫分離之抗體或抗體片段在本文中亦視為人類抗體或人類抗體片段。

【0043】 術語「抗原結合域」係指抗體中包含結合至抗原之一部分或全部且與之互補的區域的部分。抗原結合域可由例如一或多個抗體可變域(亦稱為抗體可變區)提供。在較佳態樣中，抗原結合域包含抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈可變域(VH)。

【0044】 術語「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈中參與抗體與抗原之結合的域。原生抗體之重鏈及輕鏈之可變域(分別為VH及VL)一般具有類似結構，其中各域包含四個保守性構架區(FR)及互補決定區(CDR)。參見例如Kindt等人, *Kuby Immunology*, 第6版, W.H. Freeman & Co., 第91頁 (2007)。單一VH或VL域可足以賦予抗原結合特異性。此外，可使用來自結合抗原之抗體的VH或VL域分別篩選互補VL或VH域之文庫來分離結合特定抗原之抗體。參見例如Portolano等人, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993)；Clarkson等人, *Nature* 352:624-628 (1991)。如本文關於可變區序列所用，「Kabat編號」係指Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. 公共衛生署(Public Health Service), 美國國家衛生研究院(National Institutes of Health), Bethesda, MD (1991)所闡述之編號系統。

【0045】如本文所用，重鏈及輕鏈之所有恆定區及恆定域的胺基酸位置均根據Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, 公共衛生署, 美國國家衛生研究院, Bethesda, MD (1991)中所描述之Kabat編號系統進行編號，在本文中稱為「根據Kabat編號」或「Kabat編號」。具體而言， κ 及 λ 同型之輕鏈恆定域CL使用Kabat編號系統(參見Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, 公共衛生署, 美國國家衛生研究院, Bethesda, MD (1991)之第647-660頁)，且重鏈恆定域(CH1、鉸鏈、CH2及CH3)使用Kabat EU索引編號系統(參見第661-723頁)，在此情況下，在本文中藉由提及「根據Kabat EU索引編號」或「Kabat EU索引編號」來進一步闡明。

【0046】如本文所用之術語「高變區」或「HVR」係指抗體可變域中的序列高變且決定抗原結合特異性之區(例如「互補決定區」(「CDR」))中之每一者。一般而言，抗體包含六個CDR；VH中三個(HCDR1、HCDR2、HCDR3)且VL中三個(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。本文中之例示性CDR包括：

(a)出現在胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)處之高變環(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))；

(b)出現在胺基酸殘基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)及95-102 (H3)處之CDR (Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, 公共衛生署, 美國國家衛生研究院, Bethesda, MD (1991))；及

(c)出現在胺基酸殘基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-

35b (H1)、47-58 (H2)及93-101 (H3)處之抗原接點(MacCallum等人, *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996))。

【0047】 除非另有指示，否則CDR根據Kabat等人(見上文)確定。熟習此項技術者將理解，CDR名稱亦可根據Chothia (見上文)、McCallum (見上文)或任何其他科學上可接受的命名法系統確定。

【0048】 「構架」或「FR」係指除互補決定區(CDR)以外的可變域殘基。可變域之FR一般由四個FR域組成：FR1、FR2、FR3及FR4。因此，HVR及FR序列一般按以下次序出現在VH (或VL)中：FR1-HCDR1(LCDR1)-FR2-HCDR2(LCDR2)-FR3-HCDR3(LCDR3)-FR4。

【0049】 除非另有指示，否則本文中根據Kabat等人(見上文)對可變域中之CDR殘基及其他殘基(例如，FR殘基)進行編號。

【0050】 出於本文之目的，「接受體人類構架」為包含來源於如下所定義之人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之輕鏈可變域(VL)構架或重鏈可變域(VH)構架之胺基酸序列的構架。「來源於」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之接受體人類構架可包含與人類免疫球蛋白構架或人類共同構架相同之胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在一些態樣中，胺基酸變化之數目為10或更小、9或更小、8或更小、7或更小、6或更小、5或更小、4或更小、3或更小或2或更小。在一些態樣中，VL接受體人類構架與VL人類免疫球蛋白構架序列或人類共同構架序列在序列上一致。

【0051】 「人類共同構架」為表示所選人類免疫球蛋白VL或VH構架序列中最常出現之胺基酸殘基的構架。通常，人類免疫球蛋白VL或VH序列係選自可變域序列之子群。一般而言，序列子群為如Kabat等人，

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, NIH出版物91-3242, Bethesda MD (1991), 第1至3卷中之子群。

【0052】 本文中之術語「免疫球蛋白分子」係指具有天然存在之抗體之結構的蛋白質。舉例而言，IgG類之免疫球蛋白為約150,000道爾頓(dalton)之雜四聚體糖蛋白，其由二硫鍵鍵結之兩個輕鏈及兩個重鏈構成。自N端至C端，各重鏈具有可變域(VH)，亦稱為可變重鏈域或重鏈可變區；後接三個恆定域(CH1、CH2及CH3)，亦稱為重鏈恆定區。類似地，自N端至C端，各輕鏈具有可變域(VL)，亦稱為可變輕鏈域或輕鏈可變區，後接恆定輕鏈(CL)域，亦稱為輕鏈恆定區。免疫球蛋白之重鏈可歸為五種類型之一，該五種類型稱為 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)或 μ (IgM)，其中一些可進一步劃分成亞型，例如 γ_1 (IgG₁)、 γ_2 (IgG₂)、 γ_3 (IgG₃)、 γ_4 (IgG₄)、 α_1 (IgA₁)及 α_2 (IgA₂)。免疫球蛋白之輕鏈可基於其恆定域之胺基酸序列歸為兩種類型之一，該兩種類型稱為卡帕(kappa； κ)及拉姆達(lambda； λ)。免疫球蛋白基本上由經由免疫球蛋白鉸鏈區連接之兩個Fab分子及一個Fc域組成。

【0053】 抗體或免疫球蛋白之「類別」係指其重鏈所具有之恆定域或恆定區的類型。抗體存在五種主要類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且其中若干者可進一步劃分成子類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

【0054】 「Fab分子」係指由免疫球蛋白之重鏈(「Fab重鏈」)之VH及CH1域以及輕鏈(「Fab輕鏈」)之VL及CL域組成的蛋白質。

【0055】 「互換型」Fab分子(亦稱為「Crossfab」)意謂Fab重鏈及

輕鏈之可變域或恆定域交換(亦即相互置換)的Fab分子，亦即互換型Fab分子包含由輕鏈可變域VL及重鏈恆定域1 CH1構成之肽鏈(VL-CH1，在N端至C端方向上)及由重鏈可變域VH及輕鏈恆定域CL構成之肽鏈(VH-CL，在N端至C端方向上)。為了清楚起見，在Fab輕鏈與Fab重鏈之可變域交換的互換型Fab分子中，包含重鏈恆定域1 CH1之肽鏈在本文中稱為(互換型)Fab分子之「重鏈」。相反，在Fab輕鏈與Fab重鏈之恆定域交換的互換型Fab分子中，包含重鏈可變域VH的肽鏈在本文中稱為(互換型)Fab分子之「重鏈」。

【0056】 與此相反，「習知」Fab分子意謂呈其天然型式之Fab分子，亦即包含由重鏈可變域及恆定域構成之重鏈(VH-CH1，在N端至C末端方向上)及由輕鏈可變域及恆定域構成之輕鏈(VL-CL，在N端至C端方向上)。

【0057】 本文中之術語「Fc域」或「Fc區」用於定義含有恆定區之至少一部分的免疫球蛋白重鏈的C端區。該術語包括原生序列Fc區及變異Fc區。在一個態樣中，人類IgG重鏈Fc區自Cys226或自Pro230延伸至重鏈之羧基端。然而，宿主細胞所產生之抗體可能在重鏈C端經歷一或多個(特定言之，一或兩個)胺基酸之轉譯後裂解。因此，宿主細胞藉由表現編碼全長重鏈之特定核酸分子產生的抗體可包括全長重鏈，或其可包括全長重鏈之裂解變異體。在重鏈之最末兩個C端胺基酸為甘胺酸(G446)及離胺酸(K447，根據Kabat EU索引編號)的情況下，情況可為如此。因此，Fc區之C端離胺酸(Lys447)或C端甘胺酸(Gly446)及離胺酸(Lys447)可能存在或可能不存在。若另外無指示，則包括Fc區(或如本文所定義之Fc域之亞單元)之重鏈的胺基酸序列在本文中表示為不具有C端甘胺酸-離胺酸二

肽。在一個態樣中，包含於根據本發明之抗體中的包括如本文中所指定之Fc區(亞單元)的重鏈包含額外C端甘胺酸-離胺酸二肽(G446及K447，根據Kabat EU索引編號)。在一個態樣中，包含於根據本發明之抗體中的包括如本文中所指定之Fc區(亞單元)的重鏈包含額外C端甘胺酸殘基(G446，根據Kabat EU索引編號)。除非本文另有說明，否則Fc區或恆定區中之胺基酸殘基之編號係根據EU編號系統，亦稱為EU索引，如Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，公共衛生署，美國國家衛生研究院，Bethesda, MD (1991)(亦參見上文)中所描述。如本文所用之Fc域之「亞單元」係指形成二聚Fc域之兩個多肽中之一者，亦即包含免疫球蛋白重鏈之C端恆定區的多肽，其能夠穩定自結合。舉例而言，IgG Fc域之亞單元包含IgG CH2及IgG CH3恆定域。

【0058】「融合」意謂組分(例如Fab分子及Fc域亞單元)藉由肽鍵、直接或經由一或多個肽連接子連接。

【0059】術語「多特異性」意謂抗體能夠特異性結合於至少兩種不同的抗原決定子。多特異性抗體可為例如雙特異性抗體。通常，雙特異性抗體包含兩個抗原結合位點，其各自對不同抗原決定子具有特異性。在某些態樣中，多特異性(例如雙特異性)抗體能夠同時結合兩個抗原決定子，尤其在兩個不同細胞上表現之兩個抗原決定子。

【0060】如本文所用之術語「價」表示抗原結合分子中存在指定數目個抗原結合位點。因而，術語「單價結合於抗原」表示抗原結合分子中存在一個(且不超過一個)對該抗原具有特異性之抗原結合位點。

【0061】「抗原結合位點」係指提供與抗原之相互作用的抗原結合分子之位點，亦即一或多個胺基酸殘基。舉例而言，抗體之抗原結合位點

包含來自互補決定區(CDR)之胺基酸殘基。原生免疫球蛋白分子通常具有兩個抗原結合位點，Fab分子通常具有單個抗原結合位點。

【0062】如本文所用，術語「抗原決定子」或「抗原」係指多肽大分子上與抗原結合域結合形成抗原結合域-抗原複合物之位點(例如胺基酸之連續延伸部或由非連續胺基酸之不同區構成的構形組態。適用的抗原決定子可發現於例如腫瘤細胞表面上、病毒所感染細胞之表面上、其他病變細胞表面上、免疫細胞表面上、游離於血清中及/或細胞外基質(ECM)中。在較佳態樣中，抗原為人類蛋白。

【0063】除非另有指示，否則「CD3」係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠))的任何原生CD3。該術語涵蓋「全長」的未經處理之CD3以及由細胞中之處理產生的CD3之任何形式。該術語亦涵蓋天然存在之CD3之變異體，例如剪接變異體或對偶基因變異體。在一個態樣中，CD3為人類CD3，特定言之人類CD3之 ϵ 亞單元(CD3 ϵ)。人類CD3 ϵ 之胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 112中(無信號肽)。亦參見UniProt (www.uniprot.org) 寄存編號 P07766 (版本 189) 或 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_000724.1。在另一態樣中，CD3為食蟹獼猴(長尾獼猴) CD3，特定言之食蟹獼猴CD3 ϵ 。食蟹獼猴CD3 ϵ 之胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 113中(無信號肽)。亦參見NCBI GenBank編號BAB71849.1。在某些態樣中，本發明之抗體結合至CD3之抗原決定基，該抗原決定基在來自不同物種之CD3抗原(特定言之人類及食蟹獼猴CD3)當中為保守性的。在較佳態樣中，抗體結合至人類CD3。

【0064】如本文所用之「目標細胞抗原」係指目標細胞(例如腫瘤細

胞，諸如癌細胞或腫瘤基質細胞)表面上所呈遞的抗原決定子(在彼情況下為「腫瘤細胞抗原」)。較佳地，目標細胞抗原不為CD3，及/或表現於不同於CD3之細胞上。在一較佳態樣中，目標細胞抗原為TYRP-1，特定言之人類TYRP-1。在另一較佳態樣中，目標細胞抗原為EGFRvIII，特定言之人類EGFRvIII。

【0065】「TYRP1」或「TYRP-1」代表酪胺酸相關蛋白1，其為參與黑色素合成之酶。TYRP1之成熟形式最初亦稱作gp75，其為75 kDa跨膜糖蛋白。人類TYRP1之序列展示於SEQ ID NO: 114中(無信號肽)。亦參見UniProt登錄號P17643 (版本185)。除非另有指示，否則如本文所用之「TYRP1」係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠))的任何原生TYRP1。該術語涵蓋「全長」未經處理TYRP1以及由細胞中處理產生之任何TYRP1形式。該術語亦涵蓋天然存在之TYRP1之變異體，例如剪接變異體或對偶基因變異體。在一個態樣中，TYRP1為人類TYRP1。

【0066】「EGFRvIII」代表表皮生長因子受體變異體III，其為由外顯子2至7之框內缺失形成的EGFR之突變體，引起接合處具有甘胺酸取代之267個胺基酸之缺失。人類EGFRvIII之序列展示於SEQ ID NO: 115中(無信號肽)。野生型人類EGFR之序列展示於SEQ ID NO: 116中(無信號肽)。亦參見UniProt登錄號P00533 (版本258)。除非另有指示，否則如本文所用之「EGFRvIII」係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠))的任何原生EGFRvIII。該術語涵蓋「全長」未經處理

之 EGFRvIII (但並非野生型 EGFR) 以及由細胞中處理產生之任何 EGFRvIII 形式(例如無信號肽之 EGFRvIII)。在一個態樣中，EGFRvIII 為人類 EGFRvIII。

【0067】「親和力」係指分子(例如，抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如，抗原)之間的非共價相互作用之總量的強度。除非另有指示，否則如本文所用，「結合親和力」係指反映結合對(例如抗體與抗原)成員之間的1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(K_D)表示。可藉由此項技術中已知之公認方法(包括本文所描述之該等方法)來量測親和力。用於量測親和力之較佳方法為表面電漿子共振(SPR)。

【0068】「親和力成熟」抗體係指一或多個互補決定區(CDR)相較於親本抗體具有一或多種變化的抗體，親本抗體不具有該等變化，此類變化引起抗體對抗原之親和力改良。

【0069】「減少之結合」(例如減少的Fc受體結合)係指相應相互作用的親和力降低，如藉由例如SPR所量測。為了清楚起見，該術語亦包括親和力降低至零(或低於分析方法之偵測極限)，亦即相互作用完全消除。反之，「增加之結合」係指相應相互作用的結合親和力增強。

【0070】如本文所用之「T細胞活化」係指T淋巴細胞(特定言之，細胞毒性T淋巴細胞)的一或多種細胞反應，選自：增殖、分化、細胞介素分泌、細胞毒性效應分子釋放、細胞毒性活性及活化標記物之表現。適於量測T細胞活化的分析在此項技術中已知且描述於本文中。

【0071】「促進Fc域之第一亞單元及第二亞單元之結合的修飾」為肽主鏈之操縱或Fc域亞單元之轉譯後修飾，其減少或阻止包含Fc域亞單

元之多肽與完全相同之多肽結合形成均二聚體。如本文所用之促進結合之修飾較佳地包括對期望結合之兩個Fc域亞單元(亦即，Fc域之第一亞單元及第二亞單元)中之每一者的單獨修飾，其中該等修飾彼此互補以便促進兩個Fc域亞單元之結合。舉例而言，促進結合的修飾可改變Fc域亞單元中之一或兩者的結構或電荷以便使其結合在空間上或在靜電上分別為有利的。因此，(雜)二聚化發生於包含第一Fc域亞單元之多肽與包含第二Fc域亞單元之多肽之間，在與亞單元中之每一者融合之其他組分(例如抗原結合域)不相同之意義上，該(雜)二聚化可能不同。在一些態樣中，促進Fc域之第一亞單元與第二亞單元結合的修飾包含Fc域中之胺基酸突變，具體而言胺基酸取代。在一較佳態樣中，促進Fc域之第一亞單元與第二亞單元結合的修飾包含Fc域之兩個亞單元中之每一者中的單獨胺基酸突變，具體而言胺基酸取代。

【0072】術語「效應功能」係指可歸於抗體之Fc區的彼等生物活性，其因抗體同型而異。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)、Fc受體結合、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、抗體依賴性細胞吞噬(ADCP)、細胞介素分泌、免疫複合物介導之抗原呈遞細胞之抗原攝入、細胞表面受體(例如B細胞受體)下調及B細胞活化。

【0073】「活化Fc受體」為一種Fc受體，其與抗體之Fc域接合之後，引發信號傳導事件，該等事件刺激攜帶受體之細胞執行效應功能。人類活化Fc受體包括FcγRIIIa (CD16a)、FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32)及FcαRI (CD89)。

【0074】抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)為促使免疫效應

細胞溶解抗體塗佈之目標細胞的免疫機制。目標細胞為包含Fc區之抗體或其衍生物特異性結合(一般經由Fc區的N端之蛋白質部分結合)的細胞。如本文所用，術語「降低之ADCC」定義為在圍繞目標細胞之介質中、在指定的抗體濃度下、在指定時間內藉由上文所定義之ADCC機制溶解之目標細胞的數目減少，及/或在圍繞目標細胞之介質中、在指定時間內藉由ADCC機制達成指定數目個目標細胞溶解所需的抗體濃度增加。ADCC之降低係相對於由同類型宿主細胞使用相同的標準生產、純化、調配及儲存方法(熟習此項技術者已知)所產生、但尚未經工程改造之相同抗體介導的ADCC而言。舉例而言，在其Fc域中包含降低ADCC之胺基酸取代的抗體所介導之ADCC降低係相對於Fc域中無此胺基酸取代之相同抗體所介導的ADCC而言。適於量測ADCC的分析為此項技術中熟知(參見例如PCT公開案第WO 2006/082515號或PCT公開案第WO 2012/130831號)。

【0075】如本文所用，術語「工程改造(engineer/engineered/engineering)」視為包括任何肽主鏈操縱或天然存在或重組多肽或其片段之轉譯後修飾。工程改造包括胺基酸序列、糖基化模式或個別胺基酸之側鏈基團之修飾，以及此等方法之組合。

【0076】如本文所用之術語「胺基酸突變」意欲涵蓋胺基酸取代、缺失、插入及修飾。取代、缺失、插入及修飾可進行任意組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所需特徵，例如與Fc受體的結合減少，或與另一肽的結合增加。胺基酸序列缺失及插入包括胺基酸之胺基端及/或羧基端缺失及插入。較佳胺基酸突變為胺基酸取代。出於改變例如Fc區之結合特徵之目的，尤佳的為非保守胺基酸取代，亦即用具有不同結構及/或化學特性之一個胺基酸置換另一胺基酸。胺基酸取代包括經非天

然存在之胺基酸置換或經二十種標準胺基酸之天然存在之胺基酸衍生物(例如4-羥基脯胺酸、3-甲基組胺酸、鳥胺酸、高絲胺酸、5-羥基離胺酸)置換。胺基酸突變可使用此項技術中熟知之遺傳學或化學方法產生。遺傳學方法可包括定點突變誘發、PCR、基因合成及類似方法。預期藉由除基因工程改造以外的諸如化學修飾之方法改變胺基酸側鏈基團的方法亦可為適用的。本文中可使用各種名稱表示相同的胺基酸突變。舉例而言，將Fc域之位置329處之脯胺酸取代為甘胺酸可表示為329G、G329、G₃₂₉、P329G或Pro329Gly。

【0077】 相對於參考多肽序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對參考多肽序列與候選序列且必要時引入空位以達成最大序列一致性百分比之後，且在不將任何保守取代視為序列一致性之一部分的情況下，候選序列中與參考多肽序列中之胺基酸殘基一致的胺基酸殘基之百分比。出於確定胺基酸序列一致性百分比之目的的比對可以此項技術中之技能內的各種方式達成，例如使用公開可獲得的電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、Clustal W、Megalign (DNASTAR)軟體或FASTA程式包。熟習此項技術者可測定適用於比對序列之參數，包括在所比較序列之全長內達成最大比對所需的任何演算法。或者，可使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生一致性百分比值。ALIGN-2序列比較電腦程式由Genentech, Inc.設計，且原始程式碼已在美國版權局(U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559與使用者文檔一起提交，其以美國版權註冊號TXU510087註冊且描述於WO 2001/007611中。

【0078】 出於本文之目的，除非另有指示，否則胺基酸序列一致性%值係使用FASTA套裝36.3.8c版或更新版中之ggsearch程式，用

BLOSUM50比較矩陣來產生。FASTA程式包的作者為W. R. Pearson及D. J. Lipman (「Improved Tools for Biological Sequence Analysis」, PNAS 85 (1988) 2444-2448)、W. R. Pearson (「Effective protein sequence comparison」 Meth. Enzymol. 266 (1996) 227-258 及 Pearson 等人 (Genomics 46 (1997) 24-36), 且公開獲自 www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml 或 www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta。或者, 可使用在 fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi 可獲取的公共伺服器來比較序列, 使用 `ggsearch` (全域蛋白質: 蛋白質) 程式及預設選項 (BLOSUM50; 開端: -10; ext: -2; Ktup = 2) 以確保進行全域比對而非局域比對。胺基酸一致性百分比在輸出比對標題中給出。

【0079】 術語「聚核苷酸」或「核酸分子」包括包含核苷酸聚合物之任何化合物及/或物質。各核苷酸由鹼基, 具體而言嘌呤或嘧啶鹼基(亦即胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))、糖(亦即去氧核糖或核糖)及磷酸酯基構成。核酸分子通常用鹼基序列描述, 因此該等鹼基表示核酸分子之一級結構(線性結構)。鹼基序列通常係自5'至3'表示。在本文中, 術語核酸分子涵蓋去氧核糖核酸(DNA), 包括例如互補DNA (cDNA) 及基因組DNA; 核糖核酸(RNA), 詳言之信使RNA (mRNA); DNA或RNA之合成形式; 及包含兩個或更多個此等分子之混合聚合物。核酸分子可呈線性或環狀。另外, 術語核酸分子包括有義股及反義股兩者, 以及單股及雙股形式。此外, 本文描述之核酸分子可含有天然存在或非天然存在之核苷酸。非天然存在之核苷酸之實例包括具有衍生化糖或磷酸酯主鏈鍵聯或經化學修飾之殘基的經修飾核苷酸鹼基。核酸分子亦涵蓋DNA及RNA分子, 其適用作活體外及/或活體內, 例如在宿主或患

者中直接表現本發明之抗體的載體。此類DNA (例如cDNA)或RNA (例如mRNA)載體可未經修飾或經修飾。舉例而言，mRNA可經化學修飾以增強RNA載體之穩定性及/或所編碼分子之表現，使得可將mRNA注射至個體中以在活體內產生抗體(參見例如Stadler等人, (2017) *Nature Medicine* 23:815-817，或EP 2 101 823 B1)。

【0080】 「經分離」核酸分子係指已自其天然環境之組分分離之核酸分子。經分離核酸分子包括通常含有核酸分子之細胞中所含的核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或存在於不同於其天然染色體位置之染色體位置處。

【0081】 「編碼抗體之經分離聚核苷酸(或核酸)」係指一或多個編碼抗體重鏈及輕鏈(或其片段)之聚核苷酸分子，包括單一載體或單獨載體中之該等聚核苷酸分子及存在於宿主細胞中之一或多個位置處之該等聚核苷酸分子。

【0082】 如本文所用之術語「載體」係指能夠傳播至其所連接之另一核酸的核酸分子。該術語包括呈自我複製核酸結構之載體以及併入其已引入至之宿主細胞之基因組中的載體。某些載體能夠導引其可操作地連接之核酸的表現。此等載體在本文中稱為「表現載體」。

【0083】 術語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及「宿主細胞培養物」可互換使用且係指已引入外源核酸之細胞，包括此類細胞之後代。宿主細胞包括「轉型體」及「經轉型細胞」，其包括初級轉型細胞及自其衍生之後代(不考慮繼代次數)。後代之核酸含量與親本細胞可能不完全相同，而是可能含有突變。本文包括針對原始轉型細胞篩選或選擇具有相同功能或生物活性之突變型後代。宿主細胞為可用以產生本發明之抗體的任何類型

之細胞系統。宿主細胞包括培養細胞，例如哺乳動物培養細胞，諸如HEK細胞、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓瘤細胞、P3X63小鼠骨髓瘤細胞、PER細胞、PER.C6細胞或融合瘤細胞、酵母細胞、昆蟲細胞及植物細胞(僅舉數例)，且亦包括轉殖基因動物、轉殖基因植物或培養植物或動物組織內所含的細胞。在一個態樣中，本發明之宿主細胞為真核生物細胞，特定言之哺乳動物細胞。在一個態樣中，宿主細胞不為人體內之細胞。

【0084】 術語「醫藥組合物」或「醫藥調配物」係指呈准許其中所含活性成分之生物活性有效之形式且不含有對該組合物將投與之個體具有不可接受之毒性的額外組分的製劑。

【0085】 「醫藥學上可接受之載劑」係指醫藥組合物或調配物中除活性成分以外之對個體無毒的成分。醫藥學上可接受之載劑包括(但不限於)緩衝劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

【0086】 如本文所用，「治療(treatment)」(及其文法變化形式，諸如「治療(treat)」或「治療(treating)」)係指嘗試改變所治療個體之疾病之自然過程的臨床介入且可出於預防或在臨床病理學過程中進行。所需治療作用包括(但不限於)預防疾病發生或復發、緩解症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理性結果、預防癌轉移、降低疾病進展速率、改善或緩和疾病病況及緩解或改良預後。在一些態樣中，本發明之抗體用於延遲疾病發展或減慢疾病之進展。

【0087】 「個體(individual/subject)」為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)馴養動物(例如牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人類及非人類靈長類動物，諸如猴)、兔及啮齒動物(例如小鼠及大鼠)。在某

些態樣中，該個體為人類。

【0088】藥劑(例如醫藥組合物)之「有效量」係指在劑量上及對於所需時段有效以達成所需治療性或預防性結果的量。

【0089】術語「藥品說明書」用以指待慣常包括於治療性產品之商業包裝中的說明，其含有關於與使用此類治療性產品有關之適應症、用法、劑量、投與、組合療法、禁忌及/或警告的資訊。

【0090】

II. 組合物及方法

本發明提供結合CD3之抗體，包括結合CD3及第二抗原之多特異性抗體。該等抗體顯示優良穩定性與關於治療應用(例如在功效及安全性、藥物動力學以及可製造性方面)之其他有利特性的組合。本發明之抗體適用於例如治療諸如癌症之疾病。

【0091】

A. 抗CD3抗體

在一個態樣中，本發明提供結合CD3之抗體。在一個態樣中，提供結合CD3之經分離抗體。在一個態樣中，本發明提供特異性結合CD3之抗體。在某些態樣中，相對於在pH 6、-80°C下2週之後的CD3結合活性，抗CD3抗體在pH 7.4、37°C下2週之後保持大於約90%之結合活性，如藉由表面電漿子共振(SPR)所測定。

【0092】在一個態樣中，本發明提供一種結合CD3之抗體，其中該抗體包含第一抗原結合域，該第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 2之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 3之HCDR 2及SEQ ID NO: 5之HCDR 3的重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO: 8之輕鏈互補決定區

(LCDR) 1、SEQ ID NO: 9之LCDR 2及SEQ ID NO: 10之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)。

【0093】 在一個態樣中，抗體為人類化抗體。在一個態樣中，抗原結合域為人類化抗原結合域(亦即，人類化抗體之抗原結合域)。在一個態樣中，VH及/或VL為人類化可變區。

【0094】 在一個態樣中，VH及/或VL包含接受體人類構架，例如人類免疫球蛋白構架或人類共同構架。

【0095】 在一個態樣中，VH包含SEQ ID NO: 7之重鏈可變區序列之一或多個重鏈構架序列(亦即，FR1、FR2、FR3及/或FR4序列)。在一個態樣中，VH包含與SEQ ID NO: 7之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VH包含與SEQ ID NO: 7之胺基酸序列至少約95%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VH包含與SEQ ID NO: 7之胺基酸序列至少約98%一致的胺基酸序列。在某些態樣中，具有至少95%、96%、97%、98%或99%一致性之VH序列相對於參考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗體保留結合CD3之能力。在某些態樣中，SEQ ID NO: 7之胺基酸序列中總共1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些態樣中，取代、插入或缺失發生在CDR外部之區域中(亦即在FR中)。在一個態樣中，VH包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列。視情況，VH包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列，包括彼序列之轉譯後修飾。

【0096】 在一個態樣中，VL包含SEQ ID NO: 11之輕鏈可變區序列之一或多個輕鏈構架序列(亦即，FR1、FR2、FR3及/或FR4序列)。在一個態樣中，VL包含與SEQ ID NO: 11之胺基酸序列至少約95%、96%、

97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VL包含與SEQ ID NO: 11之胺基酸序列至少約95%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VL包含與SEQ ID NO: 11之胺基酸序列至少約98%一致的胺基酸序列。在某些態樣中，具有至少95%、96%、97%、98%或99%一致性之VL序列相對於參考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗體保留結合CD3之能力。在某些態樣中，SEQ ID NO: 11之胺基酸序列中總共1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些態樣中，取代、插入或缺失發生在CDR外部之區域中(亦即在FR中)。在一個態樣中，VL包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。視情況，VL包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列，包括彼序列之轉譯後修飾。

【0097】 在一個態樣中，VH包含與SEQ ID NO: 7之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列，且VL包含與SEQ ID NO: 11之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VH包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列且VL包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。

【0098】 在另一態樣中，本發明提供一種結合CD3之抗體，其中該抗體包含第一抗原結合域，該第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的VH及包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的VL。

【0099】 在另一態樣中，本發明提供結合CD3之抗體，其中該抗體包含第一抗原結合域，該第一抗原結合域包含SEQ ID NO: 7之VH序列及SEQ ID NO: 11之VL序列。

【0100】 在另一態樣中，本發明提供一種結合CD3之抗體，其中該抗體包含第一抗原結合域，該第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 7

之VH之重鏈CDR序列的VH及包含SEQ ID NO: 11之VL之輕鏈CDR序列的VL。

【0101】 在另一態樣中，第一抗原結合域包含SEQ ID NO: 7之VH的HCDR1、HCDR2及HCDR3胺基酸序列以及SEQ ID NO: 11之VL的LCDR1、LCDR2及LCDR3胺基酸序列。

【0102】 在一個態樣中，VH包含SEQ ID NO: 7之VH之重鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 7之VH之構架序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的構架。在一個態樣中，VH包含SEQ ID NO: 7之VH之重鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 7之VH之構架序列具有至少95%序列一致性的構架。在另一態樣中，VH包含SEQ ID NO: 7之VH之重鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 7之VH之構架序列具有至少98%序列一致性的構架。

【0103】 在一個態樣中，VL包含SEQ ID NO: 11之VL之輕鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 11之VL之構架序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的構架。在一個態樣中，VL包含SEQ ID NO: 11之VL之輕鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 11之VL之構架序列具有至少95%序列一致性的構架。在另一態樣中，VL包含SEQ ID NO: 11之VL之輕鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 11之VL之構架序列具有至少98%序列一致性的構架。

【0104】 在一個態樣中，本發明提供一種結合CD3之抗體，其中該抗體包含第一抗原結合域，該第一抗原結合域包含如上文提供之態樣中之任一者中的VH序列及如上文提供之態樣中之任一者中的VL序列。

【0105】 在一個態樣中，抗體包含人類恆定區。在一個態樣中，抗體為包含人類恆定區之免疫球蛋白分子，特定言之包含人類CH1、CH2、

CH3及/或CL域之IgG類免疫球蛋白分子。人類恆定域之例示性序列載於SEQ ID NO 120及121 (分別為人類 κ 及 λ CL域)及SEQ ID NO: 122 (人類IgG1重鏈恆定域CH1-CH2-CH3)中。在一個態樣中，抗體包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含與SEQ ID NO: 120或SEQ ID NO: 121之胺基酸序列，特定言之SEQ ID NO: 120之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，抗體包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含與SEQ ID NO: 122之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。特定言之，重鏈恆定區可包含如本文所描述之Fc域中之胺基酸突變。

【0106】 在一個態樣中，第一抗原結合域包含人類恆定區。在一個態樣中，第一抗原結合部分為包含人類恆定區，特定言之人類CH1及/或CL域之Fab分子。在一個態樣中，第一抗原結合域包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含與SEQ ID NO: 120或SEQ ID NO: 121之胺基酸序列，特定言之SEQ ID NO: 120之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。特定言之，輕鏈恆定區可包含如本文在「電荷修飾」下所描述的胺基酸突變及/或可包含互換型Fab分子中之一或多個(特定言之，兩個) N端胺基酸的缺失或取代。在一些態樣中，第一抗原結合域包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含與SEQ ID NO: 122之胺基酸序列中所含之CH1域序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。特定言之，重鏈恆定區(具體而言CH1域)可包含如本文在「電荷修飾」下所描述的胺基酸突變。

【0107】 在一個態樣中，抗體為單株抗體。

【0108】 在一個態樣中，抗體為IgG抗體，特定言之IgG₁抗體。在

一個態樣中，抗體為全長抗體。

【0109】 在另一態樣中，抗體為選自以下之群的抗體片段：Fv分子、scFv分子、Fab分子及F(ab')₂分子；特定言之Fab分子。在另一態樣中，抗體片段為雙功能抗體、三功能抗體或四功能抗體。

【0110】 在一個態樣中，該第一抗原結合域為Fab分子。在一較佳態樣中，第一抗原結合域為Fab分子，其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH或恆定域CL及CH1，特定言之可變域VL及VH相互置換(亦即，第一抗原結合域為互換型Fab分子)。

【0111】 在另一態樣中，根據上文態樣中之任一者之抗體可併有如下文章節II. A. 1.-8.中所描述之任一特徵(單個或組合)。

【0112】 在一較佳態樣中，抗體包含Fc域，特定言之IgG Fc域，更特定言之IgG1 Fc域。在一個態樣中，該Fc域為人類Fc域。在一個態樣中，Fc域為人類IgG₁ Fc域。Fc域由第一亞單元及第二亞單元構成，且可併有下文中關於Fc域變異體(章節II. A. 8.)描述之任一特徵(單個或組合)。

【0113】 在另一較佳態樣中，抗體包含結合第二抗原之第二抗原結合域及視情況存在之第三抗原結合域(亦即，抗體為多特異性抗體，如下文(章節II. A. 7.)中進一步描述。

【0114】

1. 抗體片段

在某些態樣中，本文所提供之抗體為抗體片段。

【0115】 在一個態樣中，抗體片段為Fab、Fab'、Fab'-SH或F(ab')₂分子，詳言之如本文所描述之Fab分子。「Fab'分子」與Fab分子之不同之處在於在包括一或多個來自抗體鉸鏈區的半胱胺酸之CH1域的羧基端處添

加有殘基。Fab'-SH為其中恆定域之半胱胺酸殘基攜帶游離硫醇基之Fab'分子。胃蛋白酶處理得到F(ab')₂分子，其具有兩個抗原結合位點(兩個Fab分子)及Fc區之一部分。

【0116】 在另一態樣中，抗體片段為雙功能抗體、三功能抗體或四功能抗體。「雙功能抗體」為兩個抗原結合位點可為二價或雙特異性之抗體片段。參見例如EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson等人，Nat. Med. 9:129-134 (2003)；及Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson等人，Nat. Med. 9:129-134 (2003)中。

【0117】 在另一態樣中，抗體片段為單鏈Fab分子。「單鏈Fab分子」或「scFab」為由抗體重鏈可變域(VH)、抗體恆定域1 (CH1)、抗體輕鏈可變域(VL)、抗體輕鏈恆定域(CL)及連接子組成之多肽，其中該等抗體域及該連接子在N端至C端方向上具有以下次序中之一者：a) VH-CH1-連接子-VL-CL；b) VL-CL-連接子-VH-CH1；c) VH-CL-連接子-VL-CH1；或d) VL-CH1-連接子-VH-CL。特定言之，該連接子為具有至少30個胺基酸，較佳地32至50個胺基酸之多肽。該等單鏈Fab分子經由CL域與CH1域之間的天然二硫鍵穩定化。另外，此等單鏈Fab分子可藉由經由插入半胱胺酸殘基(例如可變重鏈中之位置44及可變輕鏈中之位置100，根據Kabat編號)而產生鏈間二硫鍵來進一步穩定化。

【0118】 在另一態樣中，抗體片段為單鏈可變片段(scFv)。「單鏈可變片段」或「scFv」為藉由連接子連接的抗體之重鏈(VH)與輕鏈(VL)之可變域之融合蛋白。詳言之，連接子為具有10至25個胺基酸之短多肽，且通常富含於甘胺酸中以用於可撓性以及富含於絲胺酸或蘇胺酸中以用於

溶解性，且可連接VH之N端與VL之C端或反之亦然。儘管移除恆定區且引入連接子，但此蛋白質保留原始抗體之特異性。關於scFv片段之綜述，參見例如Plückthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷，Rosenburg及Moore編，(Springer-Verlag, New York)，第269-315頁(1994)；亦參見WO93/16185；及美國專利第5,571,894號及第5,587,458號。

【0119】 在另一態樣中，抗體片段為單域抗體。「單域抗體」為包含抗體之重鏈可變域之全部或一部分或輕鏈可變域之全部或一部分的抗體片段。在某些態樣中，單域抗體為人類單域抗體 (Domantis, Inc., Waltham, MA；參見例如美國專利第6,248,516 B1號)。

【0120】 抗體片段可藉由各種技術製得，包括(但不限於)完整抗體之蛋白水解分解以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌)重組產生，如本文所描述。

【0121】

2. 人類化抗體

在某些態樣中，本文所提供之抗體為人類化抗體。通常，可使非人類抗體人類化以降低對人類之免疫原性，同時保留親本非人類抗體之特異性及親和力。一般而言，人類化抗體包含一或多個可變域，其中CDR (或其部分)來源於非人類抗體，且FR (或其部分)來源於人類抗體序列。人類化抗體視情況亦將包含人類恆定區之至少一部分。在一些態樣中，人類化抗體中之一些FR殘基經來自非人類抗體(例如，CDR殘基所來源於之抗體)之對應殘基取代，例如用以恢復或改良抗體特異性或親和力。

【0122】 人類化抗體及製得方法綜述於例如Almagro及Fransson,

Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)中，且進一步描述於例如Riechmann等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；Queen等人，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989)；美國專利第5,821,337號、第7,527,791號、第6,982,321號及第7,087,409號；Kashmiri等人，*Methods* 36:25-34 (2005)(描述特異性決定區(SDR)移植)；Padlan，*Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (描述「表面重塑」)；Dall'Acqua等人，*Methods* 36:43-60 (2005)(描述「FR改組」)；及Osbourn等人，*Methods* 36:61-68 (2005)及Klimka等人，*Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000)(描述FR改組之「導引選擇」方法)。

【0123】可用於人類化之人類構架區包括(但不限於)：使用「最佳擬合(best-fit)」方法選擇之構架區(參見例如Sims等人，*J. Immunol.* 151:2296 (1993))；來源於具有輕鏈或重鏈可變區之特定子組之人類抗體的共同序列之構架區(參見例如Carter等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)；及Presta等人，*J. Immunol.*, 151:2623 (1993))；人類成熟(體細胞突變)構架區或人類生殖系構架區(參見例如Almagro及Fransson，*Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008))；及來源於篩選FR文庫之構架區(參見例如Baca等人，*J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997)及Rosok等人，*J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996))。

【0124】

3. 糖基化變異體

在某些態樣中，改變本文所提供之抗體以增大或減小抗體糖基化之程度。在抗體上添加糖基化位點或使抗體缺失糖基化位點可藉由改變胺基酸序列以便產生或移除一或多個糖基化位點來便利地實現。

【0125】 在抗體包含Fc區之情況下，可改變連接於其上之寡醣。由哺乳動物細胞產生之原生抗體通常包含分支鏈雙觸角寡醣，其一般藉由N鍵連接至Fc區之CH2域之Asn297。參見例如Wright等人*TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡醣可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及連接至雙觸寡醣結構之「主幹」中之GlcNAc的岩藻糖。在一些態樣中，可對本發明之抗體中之寡醣進行修飾以便產生具有某些改良特性之抗體變異體。

【0126】 在一個態樣中，提供具有非岩藻糖基化寡醣，亦即缺少連接(直接地或間接地)至Fc區之岩藻糖的寡醣結構的抗體變異體。特定言之，此類非岩藻糖基化寡醣(亦稱作「去岩藻糖基化」寡醣)為缺少連接至雙觸角寡醣結構之主幹中之第一GlcNAc的岩藻糖殘基之N鍵聯寡醣。在一個態樣中，提供Fc區中非岩藻糖基化寡醣之比例相較於原生或親本抗體增加的抗體變異體。舉例而言，非岩藻糖基化寡醣之比例可為至少約20%、至少約40%、至少約60%、至少約80%或甚至約100% (亦即不存在岩藻糖基化寡醣)。非岩藻糖基化寡醣之百分比為如藉由例如WO 2006/082515中所描述之MALDI-TOF質譜法所量測，相對於連接至Asn 297之所有寡醣(例如複合、雜交及高甘露糖結構)的總和，缺少岩藻糖殘基之寡醣的(平均)量。Asn297係指位於Fc區中約位置297 (Fc區殘基之EU編號)處的天冬醯胺殘基；然而，歸因於抗體之輕微序列變化，Asn297亦可位於位置297上游或下游約 ± 3 個胺基酸處，亦即位置294與300之間。Fc區中之非岩藻糖基化寡醣之比例增加的此類抗體可具有改良之Fc γ RIIIa受體結合及/或改良之效應功能，詳言之改良之ADCC功能。參見例如US 2003/0157108；US 2004/0093621。

【0127】 能夠產生岩藻糖基化減少之抗體的細胞株之實例包括缺乏蛋白質岩藻糖基化之Lec13 CHO細胞(Ripka等人*Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)；US 2003/0157108；及WO 2004/056312，尤其在實例11處)，及基因剔除細胞株，諸如 α -1,6-岩藻糖基轉移酶基因、*FUT8*、基因剔除CHO細胞(參見例如Yamane-Ohnuki等人*Biotech. Bioeng.* 87:614-622 (2004)；Kanda, Y.等人，*Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)；及WO2003/085107)，或GDP-岩藻糖合成或轉運蛋白之活性降低或消除的細胞(參見例如US2004259150、US2005031613、US2004132140、US2004110282)。

【0128】 在另一態樣中，提供具有等分寡糖之抗體變異體，例如其中連接至抗體之Fc區的雙觸寡糖經GlcNAc平分。此類抗體變異體可具有如上文所描述的降低之岩藻糖基化及/或改良之ADCC功能。此類抗體變異體之實例描述於例如Umana等人, *Nat Biotechnol* 17, 176-180 (1999)；Ferrara等人, *Biotechn Bioeng* 93, 851-861 (2006)；WO 99/54342；WO 2004/065540、WO 2003/011878中。

【0129】 亦提供寡糖中之至少一個半乳糖殘基與Fc區連接的抗體變異體。此類抗體變異體可具有改良之CDC功能。此類抗體變異體描述於例如WO 1997/30087；WO 1998/58964；及WO 1999/22764中。

【0130】

4. 經半胱胺酸工程改造之抗體變異體

在某些態樣中，可能需要產生經半胱胺酸工程改造之抗體，例如THIOMAB™抗體，其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在較佳態樣中，經取代之殘基出現在抗體之可接近位點處。藉由用半胱胺酸取

代彼等殘基，反應性硫醇基藉此定位於抗體之可接近位點處且可用於使抗體與其他部分(諸如藥物部分或連接子-藥物部分)結合以產生如本文中進一步描述之免疫結合物。經半胱胺酸工程改造之抗體可如例如美國專利第 7,521,541 號、第 8,30,930 號、第 7,855,275 號、第 9,000,130 號或 WO 2016040856 中所描述來產生。

【0131】

5. 抗體衍生物

在某些態樣中，可對本文所提供之抗體進一步修飾以含有此項技術中已知且可易於獲得的額外非蛋白質部分。適合於抗體衍生化之部分包括(但不限於)水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇之共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙醇醇、聚乙醇吡咯啉酮、聚-1,3-二氧雜環戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及葡聚糖或聚(n-乙醇吡咯啉酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如丙三醇)、聚乙醇醇及其混合物。聚乙醇丙醛因其在中之穩定性而可能在製造中具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為分支鏈或未分支鏈的。連接至抗體之聚合物的數目可變化，且若連接超過一種聚合物，則聚合物可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生化之聚合物的數目及/或類型可基於包括(但不限於)待改良抗體之特定特性或功能、抗體衍生物是否將用於限定條件下之療法等考慮因素來確定。

【0132】

6. 免疫結合物

本發明亦提供免疫結合物，其包含與一或多種治療劑結合(化學鍵結)

的本文中之抗CD3抗體，該等治療劑諸如細胞毒性劑、化學治療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如細菌、真菌、植物或動物來源之蛋白質毒素、酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素。

【0133】 在一個態樣中，免疫結合物為抗體-藥物結合物(ADC)，其中抗體與上文所提及之一或多種治療劑結合。抗體通常使用連接子連接至一或多種該等治療劑。包括治療劑及藥物及連接子之實例的ADC技術之概述闡述於*Pharmacol Review* 68:3-19 (2016)中。

【0134】 在另一態樣中，免疫結合物包含與酶促活性毒素或其片段結合之本發明之抗體，該酶促活性毒素或其片段包括(但不限於)白喉A鏈(diphtheria A chain)、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈(ricin A chain)、相思子毒素A鏈(abrin A chain)、莫迪素A鏈(modeccin A chain)、 α -帚麴菌素(alpha-sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、康乃馨(*dianthin*)蛋白、洋商陸(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(*momordica charantia*)抑制劑、麻瘋樹毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(crotonin)、肥皂草(*saponaaria officinalis*)抑制劑、白樹素(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、伊諾黴素(enomycin)及黴菌毒素(tricothecenes)。

【0135】 在另一態樣中，免疫結合物包含與放射性原子結合以形成放射性結合物的本發明之抗體。各種放射性同位素可用於產生放射性結合物。實例包括At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及Lu之放射性同位素。當放射性結合物用於偵測時，其可包含用於閃爍攝影研究之放射性原子，例如TC^{99m}或I¹²³；或用於核磁共振(NMR)

成像(亦稱磁共振成像，MRI)之自旋標記，諸如 I^{123} 、 I^{131} 、 In^{111} 、 F^{19} 、 C^{13} 、 N^{15} 、 O^{17} 、釷、錳或鐵。

【0136】 可使用各種雙功能蛋白偶合劑製得抗體與細胞毒性劑之結合物，該等雙功能蛋白偶合劑諸如N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、亞胺酸酯之雙功能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯HCl)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人, *Science* 238:1098 (1987)中所描述來製備。經碳14標記之1-異硫氰基苯甲基-3-甲基二伸乙三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於使放射性核苷酸與抗體結合之例示性螯合劑。參見WO 94/11026。連接子可為「可裂解連接子」，其有助於細胞毒性藥物在細胞中釋放。舉例而言，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含二硫鍵連接子(Chari等人, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992)；美國專利第5,208,020號)。

【0137】 本文之免疫結合物或ADC明確涵蓋(但不限於)用交聯試劑製備之此類結合物，該等交聯試劑包括(但不限於) BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC及磺基-SMPB，及SVSB(丁二醯亞胺基-(4-乙炔基磺)苯甲酸酯)，該等交聯試劑可商購(例如購自Pierce

Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。

【0138】

7. 多特異性抗體

在某些態樣中，本文所提供之抗體為多特異性抗體，特定言之雙特異性抗體。多特異性抗體為對至少兩種不同抗原決定子(例如兩個不同蛋白質，或相同蛋白質上之兩個不同抗原決定基)具有結合特異性的單株抗體。在某些態樣中，多特異性抗體具有三個或更多個結合特異性。在某些態樣中，結合特異性中之一者係針對CD3，且其他特異性係針對任何其他抗原。在某些態樣中，多特異性抗體可結合CD3之兩個(或更多)不同抗原決定基。多特異性(例如雙特異性)抗體亦可用於將細胞毒性劑或細胞定位至表現CD3之細胞。多特異性抗體可以全長抗體或抗體片段形式製備。

【0139】 用於製得多特異性抗體之技術包括(但不限於)對具有不同特異性之兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對進行重組共表現(參見Milstein及Cuello, *Nature* 305: 537 (1983))；以及「臼包杵(knob-in-hole)」工程改造(參見例如美國專利第5,731,168號，及Atwell等人, *J. Mol. Biol.* 270:26 (1997))。多特異性抗體亦可藉由以下方式製得：對靜電轉向效應進行工程改造來製得抗體Fc-異二聚體分子(參見例如WO 2009/089004)；使兩種或更多種抗體或片段交聯(參見例如美國專利第4,676,980號，及Brennan等人, *Science* 229: 81 (1985))；使用白胺酸拉鏈來產生雙特異性抗體(參見例如Kostelny等人, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)，及WO 2011/034605)；使用共同輕鏈技術以避免輕鏈錯配問題(參見例如WO 98/50431)；使用「雙功能抗體」技術來製得雙特異性抗體片段(參見例如Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993))；以及

使用單鏈Fv (sFv)二聚體(參見例如Gruber等人, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994))；以及例如Tutt等人*J. Immunol.* 147: 60 (1991)中所描述製備三特異性抗體。

【0140】本文中亦包括經工程改造的具有三個或更多個抗原結合位點之抗體(包括例如「章魚抗體(Octopus antibodies)」或DVD-Ig)(參見例如WO 2001/77342及WO 2008/024715)。具有三個或更多個抗原結合位點之多特異性抗體的其他實例可見於WO 2010/115589、WO 2010/112193、WO 2010/136172、WO 2010/145792及WO 2013/026831中。多特異性抗體或其抗原結合片段亦包括「雙重作用FAb」或「DAF」，其包含結合CD3以及另一不同抗原或CD3之兩個不同抗原決定基的抗原結合位點(參見例如US 2008/0069820及WO 2015/095539)。

【0141】多特異性抗體亦可呈相同抗原特異性之一或多個結合臂中具有域互換之不對稱形式提供(所謂的「CrossMab」技術)，亦即藉由交換VH/VL域(參見例如WO 2009/080252及WO 2015/150447)、CH1/CL域(參見例如WO 2009/080253)或完整Fab臂(參見例如WO 2009/080251、WO 2016/016299，亦參見Schaefer等人，PNAS, 108 (2011) 1187-1191；及Klein等人，MAbs 8 (2016) 1010-20)提供。不對稱Fab臂亦可藉由將帶電或不帶電胺基酸突變引入域界面中以導引正確Fab配對來進行工程改造。參見例如WO 2016/172485。

【0142】多特異性抗體之各種其他分子型式為此項技術中已知的且包括在本文中(參見例如Spiess等人, *Mol Immunol* 67 (2015) 95-106)。

【0143】本文中亦包括之一種特定類型之多特異性抗體為經設計以同時結合目標細胞(例如腫瘤細胞)上之表面抗原及T細胞受體(TCR)複合

物(諸如CD3)之活化性不變組分來再靶向T細胞以殺死目標細胞的雙特異性抗體。因此，在較佳態樣中，本文所提供之抗體為多特異性抗體，特定言之雙特異性抗體，其中結合特異性中之一者係針對CD3且其他係針對目標細胞抗原。

【0144】可適用於此目的之雙特異性抗體型式的實例包括(但不限於)所謂的「BiTE」(雙特異性T細胞接合子)分子，其中兩個scFv分子藉由可撓性連接子融合(參見例如WO 2004/106381、WO 2005/061547、WO 2007/042261及WO 2008/119567，Nagorsen及Bäuerle, Exp Cell Res 317, 1255-1260 (2011))；雙功能抗體(Holliger等人, Prot Eng 9, 299-305 (1996))及其衍生物，諸如串聯雙功能抗體(「TandAb」；Kipriyanov等人, J Mol Biol 293, 41-56 (1999))；「DART」(雙重親和力再靶向)分子，其係基於雙功能抗體型式但以用於額外穩定化之C端二硫橋鍵為特徵(Johnson等人, J Mol Biol 399, 436-449 (2010))，及所謂的三功能單抗(triomab)，其為完全雜合小鼠/大鼠IgG分子(綜述於Seimetz等人, Cancer Treat Rev 36, 458-467 (2010)中)。本文所包括之特定T細胞雙特異性抗體型式描述於WO 2013/026833、WO 2013/026839、WO 2016/020309；Bacac等人, Oncoimmunology 5(8) (2016) e1203498中。

【0145】本發明之多特異性抗體之較佳態樣描述於下文中。

【0146】在一個態樣中，本發明提供一種結合CD3之抗體，其包含如本文所描述之結合CD3之第一抗原結合域且包含結合第二抗原之第二抗原結合域及視情況存在之第三抗原結合域。

【0147】根據本發明之較佳態樣，包含於抗體中之抗原結合域為Fab分子(亦即，抗原結合域由各自包含可變域及恆定域之重鏈及輕鏈構

成)。在一個態樣中，第一抗原結合域、第二抗原結合域及/或視情況存在之第三抗原結合域為Fab分子。在一個態樣中，該Fab分子為人類分子。在一較佳態樣中，該Fab分子為人類化分子。在又一態樣中，該Fab分子包含人類重鏈及輕鏈恆定域。

【0148】 較佳地，抗原結合域中之至少一者為互換型Fab分子。此類修飾減少來自不同Fab分子之重鏈及輕鏈之錯配，由此改良重組產生中之本發明之(多特異性)抗體之產率及純度。在適用於本發明之(多特異性)抗體的較佳互換型Fab分子中，Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域(分別為VL及VH)交換。然而，即使在此域交換之情況下，(多特異性)抗體製劑可包含歸因於錯配之重鏈與輕鏈之間的所謂本斯-瓊斯型(Bence Jones-type)相互作用的某些副產物(參見Schaefer等人, PNAS, 108 (2011) 11187-11191)。為了進一步減少來自不同Fab分子之重鏈與輕鏈之錯配且因此增加所需(多特異性)抗體之純度及產率，帶相反電荷之帶電胺基酸可引入於結合第一抗原(CD3)之Fab分子或結合第二抗原(例如目標細胞抗原，諸如TYRP-1或EGFRvIII)之Fab分子之CH1及CL域中的特定胺基酸位置處，如本文進一步描述。在包含於(多特異性)抗體中之習知Fab分子(諸如例如圖1A至圖1C、圖1G至圖1J中所示)中或在包含於(多特異性)抗體中之VH/VL互換型Fab分子(諸如例如圖1D至圖1F、圖1K至圖1N中所示)中(但並非了兩者中)進行電荷修飾。在較佳態樣中，在包含於(多特異性)抗體中之習知Fab分子(其在較佳態樣中結合第二抗原，例如目標細胞抗原，諸如TYRP-1或EGFRvIII)中進行電荷修飾。

【0149】 在根據本發明之一較佳態樣中，(多特異性)抗體能夠同時結合第一抗原(亦即，CD3)及第二抗原(例如目標抗原，諸如TYRP-1或

EGFRvIII)。在一個態樣中，(多特異性)抗體能夠藉由同時結合CD3及目標細胞抗原而使T細胞與目標細胞交聯。在一甚至更佳態樣中，此同時結合引起目標細胞，特定言之表現目標細胞抗原(例如TYRP-1或EGFRvIII)之腫瘤細胞溶解。在一個態樣中，此同時結合引起T細胞活化。在其他態樣中，此同時結合引起T淋巴細胞(特定言之，細胞毒性T淋巴細胞)之細胞反應，細胞反應選自以下之群：增殖、分化、細胞介素分泌、細胞毒性效應分子釋放、細胞毒性活性及活化標記物之表現。在一個態樣中，(多特異性)抗體結合CD3而不同時結合目標細胞抗原不會引起T細胞活化。

【0150】 在一個態樣中，(多特異性)抗體能夠將T細胞之細胞毒性活性再導引至目標細胞。在一較佳態樣中，該再導引不依賴於MHC介導之藉由目標細胞的肽抗原呈遞及/或T細胞之特異性。

【0151】 較佳地，根據本發明之態樣中之任一者的T細胞為細胞毒性T細胞。在一些態樣中，T細胞為CD4⁺或CD8⁺ T細胞，特定言之CD8⁺ T細胞。

【0152】

a) 第一抗原結合域

本發明之(多特異性)抗體包含至少一個結合CD3之抗原結合域(第一抗原結合域)。在較佳態樣中，CD3為人類CD3 (SEQ ID NO: 112)或食蟹獼猴CD3 (SEQ ID NO: 113)，最特定言之人類CD3。在一個態樣中，第一抗原結合域對人類及食蟹獼猴CD3具有交叉反應性(亦即，特異性結合人類及食蟹獼猴CD3)。在一些態樣中，CD3為CD3之 ϵ 亞單元(CD3 ϵ)。

【0153】 在一較佳態樣中，(多特異性)抗體包含不超過一個結合CD3之抗原結合域。在一個態樣中，(多特異性)抗體提供與CD3之單價結

合。

【0154】 在一個態樣中，結合CD3之抗原結合域為選自以下之群的抗體片段：Fv分子、scFv分子、Fab分子及F(ab')₂分子。在一較佳態樣中，結合CD3之抗原結合域為Fab分子。

【0155】 在較佳態樣中，結合CD3之抗原結合域為如本文所描述之互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈及輕鏈之可變域VH及VL或恆定域CH1及CL交換/相互置換的Fab分子。在此等態樣中，結合第二抗原(例如目標細胞抗原，諸如TYRP-1或EGFRvIII)之抗原結合域較佳地為習知Fab分子。在其中(多特異性)抗體中包含超過一個結合第二抗原的抗原結合域(特定言之Fab分子)的態樣中，結合CD3之抗原結合域較佳地為互換型Fab分子，且結合第二抗原之抗原結合域為習知Fab分子。

【0156】 在替代性態樣中，結合CD3之抗原結合域為習知Fab分子。在此等態樣中，結合第二抗原(例如目標細胞抗原，諸如TYRP-1或EGFRvIII)之抗原結合域為如本文所描述之互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈及輕鏈之可變域VH及VL或恆定域CH1及CL交換/相互置換的Fab分子。在其中(多特異性)抗體中包含超過一個結合CD3之抗原結合域(特定言之Fab分子)的態樣中，結合第二抗原之抗原結合域較佳地為互換型Fab分子，且結合CD3之抗原結合域為習知Fab分子。

【0157】 在較佳態樣中，第一抗原結合域為其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH或恆定域CL及CH1 (特定言之可變域VL及VH)相互置換的Fab分子(亦即，根據此類態樣，第一抗原結合域為其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變或恆定域交換的互換型Fab分子)。在一個此類態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域為習知Fab分子。

【0158】 在一個態樣中，不超過一個結合CD3之抗原結合域存在於(多特異性)抗體中(亦即，抗體提供與CD3之單價結合)。

【0159】

b) 第二(及第三)抗原結合域

在某些態樣中，本發明之(多特異性)抗體包含至少一個結合第二抗原之抗原結合域，特定言之Fab分子。第二抗原較佳地不為CD3，亦即不同於CD3。在一個態樣中，第二抗原為表現於不同於CD3之細胞上(例如表現於除T細胞以外之細胞上)的抗原。在一個態樣中，第二抗原為目標細胞抗原，特定言之腫瘤細胞抗原。在一特定態樣中，第二抗原為TYRP-1。在另一特定態樣中，第二抗原為EGFRvIII。第二抗原結合域能夠將(多特異性)抗體導引至目標位點，例如導引至表現第二抗原之特定類型之腫瘤細胞。

【0160】 在一個態樣中，結合第二抗原之抗原結合域為選自以下之群的抗體片段：Fv分子、scFv分子、Fab分子及F(ab')₂分子。在一較佳態樣中，結合第二抗原之抗原結合域為Fab分子。

【0161】 在某些態樣中，(多特異性)抗體包含兩個結合第二抗原之抗原結合域，特定言之Fab分子。在較佳之此類態樣中，此等抗原結合域中之每一者結合至相同抗原決定子。在一甚至更佳態樣中，所有此等抗原結合域相同，亦即其具有相同分子型式(例如習知或互換型Fab分子)且包含如本文所描述在CH1及CL域中包括相同胺基酸取代(若存在)之相同胺基酸序列。在一個態樣中，(多特異性)抗體包含不超過兩個結合第二抗原之抗原結合域，特定言之Fab分子。

【0162】 在較佳態樣中，結合第二抗原之抗原結合域為習知Fab分

子。在此等態樣中，結合CD3之抗原結合域為如本文所描述之互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈及輕鏈之可變域VH及VL或恆定域CH1及CL交換/相互置換的Fab分子。

【0163】 在替代性態樣中，結合第二抗原之抗原結合域為如本文所描述之互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈及輕鏈之可變域VH及VL或恆定域CH1及CL交換/相互置換的Fab分子。在此等態樣中，結合CD3之抗原結合域為習知Fab分子。

【0164】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含人類恆定區。在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域為包含人類恆定區(特定言之人類CH1及/或CL域)的Fab分子。人類恆定域之例示性序列載於SEQ ID NO 120及121 (分別為人類 κ 及 λ CL域)及SEQ ID NO: 122 (人類IgG1重鏈恆定域CH1-CH2-CH3)中。在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含與SEQ ID NO: 120或SEQ ID NO: 121之胺基酸序列，特定言之SEQ ID NO: 120之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。特定言之，輕鏈恆定區可包含如本文在「電荷修飾」下所描述的胺基酸突變及/或可包含互換型Fab分子中之一或多個(特定言之，兩個) N端胺基酸的缺失或取代。在一些態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含與SEQ ID NO: 122之胺基酸序列中包含的CH1域序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。特定言之，重鏈恆定區(具體而言CH1域)可包含如本文在「電荷修飾」下所描述的胺基酸突變。

【0165】

TYRP-1

在較佳態樣中，第二抗原為TYRP-1，特定言之人類TYRP-1 (SEQ ID NO: 114)。

【0166】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 15之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 16之HCDR 2及SEQ ID NO: 17之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 19之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 20之LCDR 2及SEQ ID NO: 21之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)。

【0167】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域為(來源於)人類化抗體。在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域為人類化抗原結合域(亦即，人類化抗體之抗原結合域)。在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VH及/或VL為人類化可變區。

【0168】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VH及/或VL包含接受體人類構架，例如人類免疫球蛋白構架或人類共同構架。

【0169】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VH包含SEQ ID NO: 18之一或多個重鏈構架序列(亦即，FR1、FR2、FR3及/或FR4序列)。在一個態樣中，VH包含與SEQ ID NO: 18之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VH包含與SEQ ID NO: 18之胺基酸序列至少約95%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VH包含與SEQ ID NO: 18之胺基酸序列至少約98%一致的胺基酸序列。在某些態樣中，具有至少95%、96%、97%、

98%或99%一致性之VH序列相對於參考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗體保留結合TYRP-1之能力。在某些態樣中，SEQ ID NO: 18之胺基酸序列中總共1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些態樣中，取代、插入或缺失發生在CDR外部之區域中(亦即在FR中)。在一個態樣中，VH包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列。視情況，VH包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列，包括彼序列之轉譯後修飾。

【0170】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VL包含SEQ ID NO: 22之一或多個輕鏈構架序列(亦即，FR1、FR2、FR3及/或FR4序列)。在一個態樣中，VL包含與SEQ ID NO: 22之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VL包含與SEQ ID NO: 22之胺基酸序列至少約95%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VL包含與SEQ ID NO: 22之胺基酸序列至少約98%一致的胺基酸序列。在某些態樣中，具有至少95%、96%、97%、98%或99%一致性之VL序列相對於參考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗體保留結合TYRP-1之能力。在某些態樣中，SEQ ID NO: 22之胺基酸序列中總共1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些態樣中，取代、插入或缺失發生在CDR外部之區域中(亦即在FR中)。在一個態樣中，VL包含SEQ ID NO: 22之胺基酸序列。視情況，VL包含SEQ ID NO: 22之胺基酸序列，包括彼序列之轉譯後修飾。

【0171】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VH包含與SEQ ID NO: 18之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列，且第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VL包

含與SEQ ID NO: 22之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VH包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列且VL包含SEQ ID NO: 22之胺基酸序列。

【0172】 在另一態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 18之序列的VH及包含SEQ ID NO: 22之序列的VL。

【0173】 在另一態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含SEQ ID NO: 18之VH序列及SEQ ID NO: 22之VL序列。

【0174】 在另一態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 18之VH之重鏈CDR序列的VH及包含SEQ ID NO: 22之VL之輕鏈CDR序列的VL。

【0175】 在另一態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含SEQ ID NO: 18之VH之HCDR1、HCDR2及HCDR3胺基酸序列以及SEQ ID NO: 22之VL之LCDR1、LCDR2及LCDR3胺基酸序列。

【0176】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VH包含SEQ ID NO: 18之VH之重鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 18之VH之構架序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的構架。在一個態樣中，VH包含SEQ ID NO: 18之VH之重鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 18之VH之構架序列具有至少95%序列一致性的構架。在另一態樣中，VH包含SEQ ID NO: 18之VH之重鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 18之VH之構架序列具有至少98%序列一致性的構架。

【0177】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VL包含SEQ ID NO: 22之VL之輕鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 22之VL之

構架序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的構架。在一個態樣中，VL包含SEQ ID NO: 22之VL之輕鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 22之VL之構架序列具有至少95%序列一致性的構架。在另一態樣中，VL包含SEQ ID NO: 22之VL之輕鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 22之VL之構架序列具有至少98%序列一致性的構架。

【0178】

EGFRvIII

【0179】 在較佳態樣中，第二抗原為EGFRvIII，特定言之人類EGFRvIII (SEQ ID NO: 115)。

【0180】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 85之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 86之HCDR 2及SEQ ID NO: 87之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 89之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 90之LCDR 2及SEQ ID NO: 91之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)。

【0181】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域為(來源於)人類化抗體。在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域為人類化抗原結合域(亦即，人類化抗體之抗原結合域)。在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VH及/或VL為人類化可變區。

【0182】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VH及/或VL包含接受體人類構架，例如人類免疫球蛋白構架或人類共同構架。

【0183】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之

VH包含SEQ ID NO: 88之一或多個重鏈構架序列(亦即，FR1、FR2、FR3及/或FR4序列)。在一個態樣中，VH包含與SEQ ID NO: 88之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VH包含與SEQ ID NO: 88之胺基酸序列至少約95%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VH包含與SEQ ID NO: 88之胺基酸序列至少約98%一致的胺基酸序列。在某些態樣中，具有至少95%、96%、97%、98%或99%一致性之VH序列相對於參考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗體保留結合EGFR_{vIII}之能力。在某些態樣中，SEQ ID NO: 88之胺基酸序列中總共1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些態樣中，取代、插入或缺失發生在CDR外部之區域中(亦即在FR中)。在一個態樣中，VH包含SEQ ID NO: 88之胺基酸序列。視情況，VH包含SEQ ID NO: 88之胺基酸序列，包括彼序列之轉譯後修飾。

【0184】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VL包含SEQ ID NO: 92之一或多個輕鏈構架序列(亦即，FR1、FR2、FR3及/或FR4序列)。在一個態樣中，VL包含與SEQ ID NO: 92之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VL包含與SEQ ID NO: 92之胺基酸序列至少約95%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VL包含與SEQ ID NO: 92之胺基酸序列至少約98%一致的胺基酸序列。在某些態樣中，具有至少95%、96%、97%、98%或99%一致性之VL序列相對於參考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗體保留結合EGFR_{vIII}之能力。在某些態樣中，SEQ ID NO: 92之胺基酸序列中總共1至10個胺基酸已經取代、插入及/或

缺失。在某些態樣中，取代、插入或缺失發生在CDR外部之區域中(亦即在FR中)。在一個態樣中，VL包含SEQ ID NO: 92之胺基酸序列。視情況，VL包含SEQ ID NO: 92之胺基酸序列，包括彼序列之轉譯後修飾。

【0185】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VH包含與SEQ ID NO: 88之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列，且第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VL包含與SEQ ID NO: 92之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在一個態樣中，VH包含SEQ ID NO: 88之胺基酸序列且VL包含SEQ ID NO: 92之胺基酸序列。

【0186】 在另一態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 88之序列的VH及包含SEQ ID NO: 92之序列的VL。

【0187】 在另一態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含SEQ ID NO: 88之VH序列及SEQ ID NO: 92之VL序列。

【0188】 在另一態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 88之VH之重鏈CDR序列的VH及包含SEQ ID NO: 92之VL之輕鏈CDR序列的VL。

【0189】 在另一態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含SEQ ID NO: 88之VH之HCDR1、HCDR2及HCDR3胺基酸序列以及SEQ ID NO: 92之VL之LCDR1、LCDR2及LCDR3胺基酸序列。

【0190】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VH包含SEQ ID NO: 88之VH之重鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 88之VH之構架序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的構架。在一個態樣中，VH包含SEQ ID NO: 88之VH之重鏈CDR序列及與SEQ

ID NO: 88之VH之構架序列具有至少95%序列一致性的構架。在另一態樣中，VH包含SEQ ID NO: 88之VH之重鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 88之VH之構架序列具有至少98%序列一致性的構架。

【0191】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之VL包含SEQ ID NO: 92之VL之輕鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 92之VL之構架序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的構架。在一個態樣中，VL包含SEQ ID NO: 92之VL之輕鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 92之VL之構架序列具有至少95%序列一致性的構架。在另一態樣中，VL包含SEQ ID NO: 92之VL之輕鏈CDR序列及與SEQ ID NO: 92之VL之構架序列具有至少98%序列一致性的構架。

【0192】 在替代性態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含如在上文關於EGFRvIII之章節中所提供之任一態樣中的VH序列及如在上文關於EGFRvIII之章節中所提供之任一態樣中的VL序列，但基於以下序列(按列排序)而非SEQ ID NO 85 (HCDR1)、86 (HCDR2)、87 (HCDR3)、88 (VH)、89(LCDR1)、90 (LCDR2)、91 (LCDR3)及92 (VL)：

HCDR1	HCDR2	HCDR3	VH	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VL
SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 44
SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 52
SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 60
SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 68
SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 76
SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84
SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 96	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 99	SEQ ID NO: 100
SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 104	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 106	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 108

【0193】 在一個態樣中，第二(及視情況存在之第三)抗原結合域包含如在上文之此章節中所提供之任一態樣中的VH序列及如在上文之此章節中所提供之任一態樣中的VL序列。

【0194】

抗TYRP-1及抗EGFRvIII抗體

本發明亦提供一種結合TYRP-1之抗體，其包含如在上文關於TYRP-1之章節中所提供之任一態樣中的VH序列及如在上文關於TYRP-1之章節中所提供之任一態樣中的VL序列(例如，一種結合TYRP-1之抗體，其包含：包含SEQ ID NO: 15之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 16之HCDR 2及SEQ ID NO: 17之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 19之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 20之LCDR 2及SEQ ID NO: 21之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)；或一種結合TYRP-1之抗體，其包含：包含SEQ ID NO: 18之序列的VH及包含SEQ ID NO: 22之序列的VL)。

【0195】 本發明亦提供一種結合EGFRvIII之抗體，其包含如在上文關於EGFRvIII之章節中所提供之任一態樣中的VH序列及如在上文關於EGFRvIII之章節中所提供之任一態樣中的VL序列(例如，一種結合EGFRvIII之抗體，其包含：包含SEQ ID NO: 85之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 86之HCDR 2及SEQ ID NO: 87之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 89之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 90之LCDR 2及SEQ ID NO: 91之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)；或一種結合TYRP-1之抗體，其包含：包含SEQ ID NO: 88之序列的VH及包含SEQ ID NO: 92之序列的VL)。

【0196】 在另一態樣中，根據以上態樣中之任一者的結合TYRP-1或EGFRvIII之抗體可併有如關於結合CD3之抗體所描述之任一特徵(單個或組合)(除非該特徵顯然特定針對抗CD3抗體，諸如結合序列)。

【0197】

c) 電荷修飾

本發明之(多特異性)抗體可包含其中所含Fab分子中之胺基酸取代，其在減少輕鏈與不匹配重鏈之錯配(本斯-瓊斯型副產物)方面尤其有效，該錯配可發生在其一個(或多個，在分子包含超過兩個抗原結合Fab分子情況下)結合臂中具有VH/VL交換的基於Fab之多特異性抗體之產生中(亦參見PCT公開案第WO 2015/150447號，特定言之參見其中之實例，該文獻以全文引用之方式併入本文中)。所需(多特異性)抗體相較於非所需副產物(詳言之出現在其一個結合臂中具有VH/VL域交換之多特異性抗體中的本斯-瓊斯型副產物)之比可藉由在CH1及CL域中之特定胺基酸位置處引入具有相反電荷之帶電胺基酸(有時在本文中稱為「電荷修飾」)來改良。

【0198】 因此，在其中(多特異性)抗體之第一抗原結合域及第二(及視情況存在之第三)抗原結合域皆為Fab分子的一些態樣中，且在抗原結合域中之一者(特定言之第一抗原結合域)中，Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH相互置換，

i)在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸經帶正電胺基酸取代(根據Kabat編號)，且其中在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸或位置213處之胺基酸經帶負電胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)；或

ii)在第一抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸經帶正電

胺基酸取代(根據Kabat編號)，且其中在第一抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸或位置213處之胺基酸經帶負電胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0199】 (多特異性)抗體不同時包含i)及ii)提及之修飾。具有VH/VL交換之抗原結合域之恆定域CL及CH1不相互置換(亦即，保持不交換)。

【0200】 在一更特定態樣中，

i)在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸或位置213處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)；或

ii)在第一抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且在第一抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸或位置213處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0201】 在一個此類態樣中，在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸或位置213處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0202】 在另一態樣中，在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組

胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0203】 在一較佳態樣中，在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且位置123處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)且位置213處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0204】 在一更佳態樣中，在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且位置123處之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)，且位置213處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0205】 在一甚至更佳態樣中，在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且位置123處之胺基酸經精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)，且在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)，且位置213處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0206】 在較佳態樣中，若根據以上態樣之胺基酸取代發生於第二

(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CL及恆定域CH1中，則第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CL具有 κ 同型。

【0207】 或者，根據上文態樣之胺基酸取代可發生於第一抗原結合域之恆定域CL及恆定域CH1中，而非第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CL及恆定域CH1中。在較佳之此類態樣中，第一抗原結合域之恆定域CL具有 κ 同型。

【0208】 因此，在一個態樣中，在第一抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且在第一抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸或位置213處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0209】 在另一態樣中，在第一抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且在第一抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0210】 在再一態樣中，在第一抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且位置123處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)，且在第一抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)，且位置213處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0211】 在一個態樣中，在第一抗原結合域之恆定域CL中，位置

124處之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且位置123處之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且在第一抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)，且位置213處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0212】 在另一態樣中，在第一抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且位置123處之胺基酸經精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)，且在第一抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)，且位置213處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0213】 在一較佳態樣中，本發明之(多特異性)抗體包含

(a)結合CD3之第一抗原結合域，其中第一抗原結合域為Fab分子，其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH相互置換，且第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 2之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 3之HCDR 2及SEQ ID NO: 5之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 8之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 9之LCDR 2及SEQ ID NO: 10之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)，及

(b)結合第二抗原之第二抗原結合域及視情況存在之第三抗原結合域；

其中在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一較佳態樣中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且位置123處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一較佳態樣中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，

且在第二(及視情況存在之第三)抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)，且位置213處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0214】

d) 多特異性抗體型式

【0215】 根據本發明之(多特異性)抗體可具有各種組態。例示性組態描繪於圖1中。

【0216】 在較佳態樣中，包含於(多特異性)抗體中之抗原結合域為Fab分子。在此等態樣中，第一抗原結合域、第二抗原結合域、第三抗原結合域等在本文中可分別稱作第一Fab分子、第二Fab分子、第三Fab分子等。

【0217】 在一個態樣中，(多特異性)抗體之第一抗原結合域及第二抗原結合域視情況經由肽連接子彼此融合。在較佳態樣中，第一抗原結合域及第二抗原結合域各自為Fab分子。在一個此類態樣中，第一抗原結合域在Fab重鏈之C端處與第二抗原結合域之Fab重鏈之N端融合。在另一此類態樣中，第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與第一抗原結合域之Fab重鏈之N端融合。另外，在其中(i)第一抗原結合域在Fab重鏈之C端與第二抗原結合域之Fab重鏈之N端融合或(ii)第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與第一抗原結合域之Fab重鏈之N端融合的態樣中，第一抗原結合域之Fab輕鏈及第二抗原結合域之Fab輕鏈可視情況經由肽連接子彼此融合。

【0218】 具有能夠特異性結合於第二抗原(例如目標細胞抗原，諸如TYRP-1或EGFRvIII)之單一抗原結合域(諸如Fab分子)的(多特異性)抗體

(例如，如圖1A、圖1D、圖1G、圖1H、圖1K、圖1L中所示)在預期在高結合親和力抗原結合域之後進行第二抗原之內化的情況下尤其適用。在此等情況下，存在超過一個對第二抗原具有特異性之抗原結合域可增強第二抗原之內化，從而降低其可用性。

【0219】 然而，在其他情況下，將有利的是具有如下(多特異性)抗體，其包含兩個或更多個對第二抗原(例如目標細胞抗原)具有特異性之抗原結合域(諸如Fab分子)(參見圖1B、圖1C、圖1E、圖1F、圖1I、圖1J、圖1M或圖1N中所示)，例如以最佳化對目標位點之靶向或允許目標細胞抗原之交聯。因此，在較佳態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含第三抗原結合域。

【0220】 在一個態樣中，第三抗原結合域結合第二抗原，例如目標細胞抗原，諸如TYRP-1或EGFRvIII。在一個態樣中，第三抗原結合域為Fab分子。

【0221】 在一個態樣中，第三抗原域與第二抗原結合域完全相同。

【0222】 在一些態樣中，第三抗原結合域及第二抗原結合域各自為Fab分子，且第三抗原結合域與第二抗原結合域完全相同。因此，在此等態樣中，第二抗原結合域及第三抗原結合域包含相同重鏈及輕鏈胺基酸序列且具有相同域配置(亦即，習知或互換型)。此外，在此等態樣中，第三抗原結合域包含與第二抗原結合域相同之胺基酸取代(若存在)。舉例而言，本文中描述為「電荷修飾」之胺基酸取代將發生於第二抗原結合域及第三抗原結合域中之每一者之恆定域CL及恆定域CH1中。或者，該等胺基酸取代可發生於第一抗原結合域(其在較佳態樣中亦為Fab分子)之恆定域CL及恆定域CH1中，但不發生於第二抗原結合域及第三抗原結合域之

恆定域CL及恆定域CH1中。

【0223】如同第二抗原結合域，第三抗原結合域較佳地為習知Fab分子。然而，亦涵蓋其中第二抗原結合域及第三抗原結合域為互換型Fab分子(且第一抗原結合域為習知Fab分子)之態樣。因此，在較佳態樣中，第二抗原結合域及第三抗原結合域各自為習知Fab分子，且第一抗原結合域為如本文所描述之互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈及輕鏈之可變域VH及VL或恆定域CL及CH1交換/相互置換的Fab分子。在其他態樣中，第二抗原結合域及第三抗原結合域各自為互換型Fab分子，且第一抗原結合域為習知Fab分子。

【0224】若存在第三抗原結合域，則在一較佳態樣中，第一抗原域結合CD3，且第二抗原結合域及第三抗原結合域結合第二抗原，特定言之目標細胞抗原，諸如TYRP-1或EGFRvIII。

【0225】在較佳態樣中，本發明之(多特異性)抗體包含由第一亞單元及第二亞單元構成的Fc域。Fc域之第一亞單元及第二亞單元能夠穩定結合。

【0226】根據本發明之(多特異性)抗體可具有不同組態，亦即第一抗原結合域、第二(及視情況存在之第三)抗原結合域可彼此融合及以不同方式與Fc域融合。組分可彼此直接融合或較佳地，經由一或多個適合之肽連接子融合。在Fab分子與Fc域之亞單元之N端融合的情況下，其通常經由免疫球蛋白鉸鏈區進行。

【0227】在一些態樣中，第一抗原結合域及第二抗原結合域各自為Fab分子，且第一抗原結合域在Fab重鏈之C端與Fc域之第一或第二亞單元之N端融合。在此等態樣中，第二抗原結合域可在Fab重鏈之C端與第一抗

原結合域之Fab重鏈之N端融合或與Fc域之亞單元中之另一者之N端。在較佳之此類態樣中，第二抗原結合域為習知Fab分子，且第一抗原結合域為如本文所描述之互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈及輕鏈之可變域VH及VL或恆定域CL及CH1交換/相互置換的Fab分子。在其他此類態樣中，第二抗原結合域為互換型Fab分子，且第一抗原結合域為習知Fab分子。

【0228】 在一個態樣中，第一抗原結合域及第二抗原結合域各自為Fab分子，第一抗原結合域在Fab重鏈之C端與Fc域之第一或第二亞單元之N端融合，且第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與第一抗原結合域之Fab重鏈之N端融合。在一特定態樣中，(多特異性)抗體基本上由第一Fab分子及第二Fab分子、由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域以及視情況存在之一或多個肽連接子組成，其中第二Fab分子在Fab重鏈之C端與第一Fab分子之Fab重鏈之N端融合，且第一Fab分子在Fab重鏈之C端與Fc域之第一或第二亞單元之N端融合。此類組態示意性地描繪於圖1G及圖1K中(其中此等實例中之第一抗原結合域為VH/VL互換型Fab分子)。視情況，第一Fab分子之Fab輕鏈及第二Fab分子之Fab輕鏈可另外彼此融合。

【0229】 在另一態樣中，第一抗原結合域及第二抗原結合域各自為Fab分子，且第一抗原結合域及第二抗原結合域各自在Fab重鏈之C端與Fc域之亞單元中之一者之N端融合。在一特定態樣中，(多特異性)抗體基本上由第一Fab分子及第二Fab分子、由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域以及視情況存在之一或多個肽連接子組成，其中第一Fab分子及第二Fab分子各自在Fab重鏈之C端與Fc域之亞單元中之一者之N端融合。此類組態示意性地描繪於圖1A及圖1D中(在此等實例中，第一抗原結合域為VH/VL互換型Fab分子，且第二抗原結合域為習知Fab分子)。第一Fab分

子及第二Fab分子可直接或經由肽連接子與Fc域融合。在一較佳態樣中，第一Fab分子及第二Fab分子各自經由免疫球蛋白鉸鏈區與Fc域融合。在一特定態樣中，免疫球蛋白鉸鏈區為人類IgG₁鉸鏈區，Fc域為IgG₁ Fc域之情況下尤其如此。

【0230】 在一些態樣中，第一抗原結合域及第二抗原結合域各自為Fab分子，且第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與Fc域之第一或第二亞單元之N端融合。在此等態樣中，第一抗原結合域可在Fab重鏈之C端與第一抗原結合域之Fab重鏈之N端或(如上文所描述)與Fc域之亞單元中之另一者之N端融合。在較佳之此類態樣中，該第二抗原結合域為習知Fab分子，且第一抗原結合域為如本文所描述之互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈及輕鏈之可變域VH及VL或恆定域CL及CH1交換/相互置換的Fab分子。在其他此類態樣中，該第二抗原結合域為互換型Fab分子，且第一抗原結合域為習知Fab分子。

【0231】 在一個態樣中，第一抗原結合域及第二抗原結合域各自為Fab分子，第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與Fc域之第一或第二亞單元之N端融合，且第一抗原結合域在Fab重鏈之C端與第二抗原結合域之Fab重鏈之N端融合。在一特定態樣中，(多特異性)抗體基本上由第一Fab分子及第二Fab分子、由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域以及視情況存在之一或多個肽連接子組成，其中第一Fab分子在Fab重鏈之C端與第二Fab分子之Fab重鏈之N端融合，且第二Fab分子在Fab重鏈之C端與Fc域之第一或第二亞單元之N端融合。此類組態示意性地描繪於圖1H及圖1L中(在此等實例中，第一抗原結合域為VH/VL互換型Fab分子，且第二抗原結合域為習知Fab分子)。視情況，第一Fab分子之Fab輕鏈及第二Fab分子之Fab

輕鏈可另外彼此融合。

【0232】 在一些態樣中，第三抗原結合域(特定言之第三Fab分子)在Fab重鏈之C端與Fc域之第一或第二亞單元之N端融合。在較佳之此類態樣中，該第二抗原結合域及第三抗原結合域各自為習知Fab分子，且第一抗原結合域為如本文所描述之互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈及輕鏈之可變域VH及VL或恆定域CL及CH1交換/相互置換的Fab分子。在其他此類態樣中，該第二抗原結合域及第三抗原結合域各自為互換型Fab分子，且第一抗原結合域為習知Fab分子。

【0233】 在較佳之此類態樣中，第一抗原結合域及第三抗原結合域各自在Fab重鏈之C端與Fc域之亞單元中之一者之N端融合，且第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與第一Fab分子之Fab重鏈之N端融合。在一特定態樣中，(多特異性)抗體基本上由第一、第二及第三Fab分子、由第一及第二亞單元構成之Fc域以及視情況存在之一或多個肽連接子組成，其中第二Fab分子在Fab重鏈之C端與第一Fab分子之Fab重鏈之N端融合，且第一Fab分子在Fab重鏈之C端與Fc域之第一亞單元之N端融合，且其中第三Fab分子在Fab重鏈之C端與Fc域之第二亞單元之N端融合。此類組態示意性地描繪於圖1B及圖1E中(在此等實例中，第一抗原結合域為VH/VL互換型Fab分子，且第二抗原結合域及第三抗原結合域為習知Fab分子)以及圖1J及圖1N中(在此等實例中，第一抗原結合域為習知Fab分子，且第二抗原結合域及第三抗原結合域為VH/VL互換型Fab分子)。第一Fab分子及第三Fab分子可直接或經由肽連接子與Fc域融合。在一較佳態樣中，第一Fab分子及第三Fab分子各自經由免疫球蛋白鉸鏈區與Fc域融合。在一特定態樣中，免疫球蛋白鉸鏈區為人類IgG₁鉸鏈區，Fc域為IgG₁ Fc域之情

況下尤其如此。視情況，第一Fab分子之Fab輕鏈及第二Fab分子之Fab輕鏈可另外彼此融合。

【0234】 在另一此類態樣中，第二抗原結合域及第三抗原結合域各自在Fab重鏈之C端與Fc域之亞單元中之一者之N端融合，且第一抗原結合域在Fab重鏈之C端與第二抗原結合域之Fab重鏈之N端融合。在一特定態樣中，(多特異性)抗體基本上由第一、第二及第三Fab分子、由第一及第二亞單元構成之Fc域以及視情況存在之一或多個肽連接子組成，其中第一Fab分子在Fab重鏈之C端與第二Fab分子之Fab重鏈之N端融合，且第二Fab分子在Fab重鏈之C端與Fc域之第一亞單元之N端融合，且其中第三Fab分子在Fab重鏈之C端與Fc域之第二亞單元之N端融合。此類組態示意性地描繪於圖1C及圖1F中(在此等實例中，第一抗原結合域為VH/VL互換型Fab分子，且第二抗原結合域及第三抗原結合域為習知Fab分子)以及圖1I及圖1M中(在此等實例中，第一抗原結合域為習知Fab分子，且第二抗原結合域及第三抗原結合域為VH/VL互換型Fab分子)。第二Fab分子及第三Fab分子可直接或經由肽連接子與Fc域融合。在一較佳態樣中，第二Fab分子及第三Fab分子各自經由免疫球蛋白鉸鏈區與Fc域融合。在一特定態樣中，免疫球蛋白鉸鏈區為人類IgG₁鉸鏈區，Fc域為IgG₁ Fc域之情況下尤其如此。視情況，第一Fab分子之Fab輕鏈及第二Fab分子之Fab輕鏈可另外彼此融合。

【0235】 在其中Fab分子在Fab重鏈之C端經由免疫球蛋白鉸鏈區與Fc域之亞單元中之每一者之N端融合的(多特異性)抗體之組態中，兩個Fab分子、鉸鏈區及Fc域基本上形成免疫球蛋白分子。在一較佳態樣中，免疫球蛋白分子為IgG類免疫球蛋白。在一甚至更佳態樣中，免疫球蛋白

為IgG₁子類免疫球蛋白。在另一態樣中，免疫球蛋白為IgG₄子類免疫球蛋白。在一更佳態樣中，免疫球蛋白為人類免疫球蛋白。在其他態樣中，免疫球蛋白為嵌合免疫球蛋白或人類化免疫球蛋白。在一個態樣中，免疫球蛋白包含人類恆定區，特定言之人類Fc區。

【0236】 在本發明之一些(多特異性)抗體中，第一Fab分子之Fab輕鏈及第二Fab分子之Fab輕鏈視情況經由肽連接子彼此融合。視第一Fab分子及第二Fab分子之組態而定，第一Fab分子之Fab輕鏈可在其C端與第二Fab分子之Fab輕鏈之N端融合，或第二Fab分子之Fab輕鏈可在其C端與第一Fab分子之Fab輕鏈之N端融合。第一Fab分子及第二Fab分子之Fab輕鏈的融合進一步減少不匹配Fab重鏈及輕鏈之錯配，且亦減少表現本發明之一些(多特異性)抗體所需的質體數目。

【0237】 抗原結合域可直接或經由包含一或多個胺基酸(通常約2至20個胺基酸)之肽連接子與Fc域融合或彼此融合。肽連接子為此項技術中已知且描述於本文中。適合之非免疫原性肽連接子包括例如(G₄S)_n、(SG₄)_n、(G₄S)_n或G₄(SG₄)_n肽連接子。「n」一般為1至10，通常2至4之整數。在一個態樣中，該肽連接子之長度為至少5個胺基酸，在一個態樣中，長度為5至100個胺基酸，在另一態樣中為10至50個胺基酸。在一個態樣中，該肽連接子為(G_xS)_n或(G_xS)_nG_m，其中G=甘胺酸，S=絲胺酸，且(x=3，n= 3、4、5或6，且m=0、1、2或3)或(x=4，n=2、3、4或5，且m=0、1、2或3)，在一個態樣中，x=4且n=2或3，在另一態樣中，x=4且n=2。在一個態樣中，該肽連接子為(G₄S)₂。尤其適用於第一Fab分子與第二Fab分子之Fab輕鏈彼此融合的肽連接子為(G₄S)₂。適合於連接第一Fab片段及第二Fab片段之Fab重鏈的例示性肽連接子包含序列(D)-(G₄S)₂

(SEQ ID NO 118及119)。另一種適合的此類連接子包含序列(G₄S)₄。另外，連接子可包含免疫球蛋白鉸鏈區(之一部分)。尤其在Fab分子與Fc域亞單元之N端融合的情況下，其可在額外肽連接子存在或不存在的情況下經由免疫球蛋白鉸鏈區或其部分融合。

【0238】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第一Fab分子之Fab輕鏈可變區與第一Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)，該第一Fab分子之Fab重鏈恆定區又與Fc域亞單元共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4))，以及其中第二Fab分子之Fab重鏈與Fc域亞單元共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4))。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第一Fab分子之Fab重鏈可變區與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₁₎-CL₍₁₎)以及第二Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。在某些態樣中，多肽係例如藉由二硫鍵共價連接。

【0239】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第一Fab分子之Fab重鏈可變區與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)，該第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與Fc域亞單元共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₁₎-CL₍₁₎-CH2-CH3(-CH4))，以及其中第二Fab分子之Fab重鏈與Fc域亞單元共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4))。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第一Fab分子之Fab輕鏈可變區與第一Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₁₎-CH1₍₁₎)以及第二Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。在某些態樣

中，多肽係例如藉由二硫鍵共價連接。

【0240】 在一些態樣中，(多特異性)抗體包含其中第一Fab分子之Fab輕鏈可變區與第一Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)，該第一Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第二Fab分子之Fab重鏈共用羧基端肽鍵，該第二Fab分子之Fab重鏈又與Fc域亞單元共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4))。在其他態樣中，(多特異性)抗體包含其中第二Fab分子之Fab重鏈與第一Fab分子之Fab輕鏈可變區共用羧基端肽鍵，該第一Fab分子之Fab輕鏈可變區又與第一Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)，該第一Fab分子之Fab重鏈恆定區又與Fc域亞單元共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₂₎-CH1₍₂₎-VL₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4))。在一些此等態樣中，(多特異性)抗體進一步包含：第一Fab分子之互換型Fab輕鏈多肽，其中第一Fab分子之Fab重鏈可變區與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵(VH₍₁₎-CL₍₁₎)；以及第二Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。在其他此等實施例中，適當時，(多特異性)抗體進一步包含其中第一Fab分子之Fab重鏈可變區與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵，該第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第二Fab分子之Fab輕鏈多肽共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₁₎-CL₍₁₎-VL₍₂₎-CL₍₂₎)，或其中第二Fab分子之Fab輕鏈多肽與第一Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基端肽鍵，該第一Fab分子之Fab重鏈可變區又與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CL₍₁₎)。根據此等態樣之(多特異性)抗體可進一步包含(i) Fc域亞單元多肽(CH2-

CH₃(-CH₄))，或(ii)其中第三Fab分子之Fab重鏈與Fc域亞單元共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₃₎-CH₁₍₃₎-CH₂-CH₃(-CH₄))以及第三Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。在某些態樣中，多肽係例如藉由二硫鍵共價連接。

【0241】 在一些態樣中，(多特異性)抗體包含其中第一Fab分子之Fab重鏈可變區與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)，該第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第二Fab分子之Fab重鏈共用羧基端肽鍵，該第二Fab分子之Fab重鏈又與Fc域亞單元共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CH₁₍₂₎-CH₂-CH₃(-CH₄))。在其他態樣中，(多特異性)抗體包含其中第二Fab分子之Fab重鏈與第一Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基端肽鍵，該第一Fab分子之Fab重鏈可變區又與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)，該第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與Fc域亞單元共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₂₎-CH₁₍₂₎-VH₍₁₎-CL₍₁₎-CH₂-CH₃(-CH₄))。在一些此等態樣中，(多特異性)抗體進一步包含：第一Fab分子之互換型Fab輕鏈多肽，其中第一Fab分子之Fab輕鏈可變區與第一Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵(VL₍₁₎-CH₁₍₁₎)；以及第二Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。在其他此等實施例中，適當時，(多特異性)抗體進一步包含其中第一Fab分子之Fab輕鏈可變區與第一Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵，該第一Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第二Fab分子之Fab輕鏈多肽共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₁₎-CH₁₍₁₎-VL₍₂₎-CL₍₂₎)，或其中第二Fab分子之Fab輕鏈多肽與第一Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基端肽鍵，該第一Fab分子之Fab重鏈可變區又與第一Fab

分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CL₍₁₎)。根據此等態樣之(多特異性)抗體可進一步包含(i) Fc域亞單元多肽(CH2-CH3(-CH4))，或(ii)其中第三Fab分子之Fab重鏈與Fc域亞單元共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₃₎-CH1₍₃₎-CH2-CH3(-CH4))以及第三Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。在某些態樣中，多肽係例如藉由二硫鍵共價連接。

【0242】 在某些態樣中，(多特異性)抗體不包含Fc域。在較佳之此類態樣中，該第二抗原結合域及(若存在)第三抗原結合域各自為習知Fab分子，且第一抗原結合域為如本文所描述之互換型Fab分子，亦即其中Fab重鏈及輕鏈之可變域VH及VL或恆定域CL及CH1交換/相互置換的Fab分子。在其他此類態樣中，該第二抗原結合域及(若存在)第三抗原結合域各自為互換型Fab分子，且第一抗原結合域為習知Fab分子。

【0243】 在一個此類態樣中，(多特異性)抗體基本上由第一抗原結合域及第二抗原結合域以及視情況存在之一或多個肽連接子組成，其中第一抗原結合域及第二抗原結合域皆為Fab分子，且第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與第一抗原結合域之Fab重鏈之N端融合。此類組態示意性地描繪於圖1O及圖1S中(在此等實例中，第一抗原結合域為VH/VL互換型Fab分子，且第二抗原結合域為習知Fab分子)。

【0244】 在另一此類態樣中，(多特異性)抗體基本上由第一抗原結合域及第二抗原結合域以及視情況存在之一或多個肽連接子組成，其中第一抗原結合域及第二抗原結合域皆為Fab分子，且第一抗原結合域在Fab重鏈之C端與第二抗原結合域之Fab重鏈之N端融合。此類組態示意性地描繪於圖1P及圖1T中(在此等實例中，第一抗原結合域為VH/VL互換型Fab分子，且第二抗原結合域為習知Fab分子)。

【0245】 在一些態樣中，第二Fab分子在Fab重鏈之C端與第一Fab分子之Fab重鏈之N端融合，且(多特異性)抗體進一步包含第三抗原結合域，特定言之第三Fab分子，其中該第三Fab分子在Fab重鏈之C端與第二Fab分子之Fab重鏈之N端融合。在某些此類態樣中，(多特異性)抗體基本上由第一、第二及第三Fab分子以及視情況存在之一或多個肽連接子組成，其中第二Fab分子在Fab重鏈之C端與第一Fab分子之Fab重鏈之N端融合，且第三Fab分子在Fab重鏈之C端與第二Fab分子之Fab重鏈之N端融合。此類組態示意性地描繪於圖1Q及圖1E中(在此等實例中，第一抗原結合域為VH/VL互換型Fab分子，且第二抗原結合域及第三抗原結合域各自為習知Fab分子)或圖1X及圖1Z中(在此等實例中，第一抗原結合域為習知Fab分子，且第二抗原結合域及第三抗原結合域各自為VH/VL互換型Fab分子)。

【0246】 在一些態樣中，第一Fab分子在Fab重鏈之C端與第二Fab分子之Fab重鏈之N端融合，且(多特異性)抗體進一步包含第三抗原結合域，特定言之第三Fab分子，其中該第三Fab分子在Fab重鏈之N端與第二Fab分子之Fab重鏈之C端融合。在某些此類態樣中，(多特異性)抗體基本上由第一、第二及第三Fab分子以及視情況存在之一或多個肽連接子組成，其中第一Fab分子在Fab重鏈之C端與第二Fab分子之Fab重鏈之N端融合，且第三Fab分子在Fab重鏈之N端與第二Fab分子之Fab重鏈之C端融合。此類組態示意性地描繪於圖1R及圖1V中(在此等實例中，第一抗原結合域為VH/VL互換型Fab分子，且第二抗原結合域及第三抗原結合域各自為習知Fab分子)或圖1W及圖1Y中(在此等實例中，第一抗原結合域為習知Fab分子，且第二抗原結合域及第三抗原結合域各自為VH/VL互換型

Fab分子)。

【0247】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第二Fab分子之Fab重鏈與第一Fab分子之Fab輕鏈可變區共用羧基端肽鍵，該第一Fab分子之Fab輕鏈可變區又與第一Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)的多肽($VH_{(2)}-CH1_{(2)}-VL_{(1)}-CH1_{(1)}$)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第一Fab分子之Fab重鏈可變區與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽($VH_{(1)}-CL_{(1)}$)以及第二Fab分子之Fab輕鏈多肽($VL_{(2)}-CL_{(2)}$)。

【0248】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第一Fab分子之Fab輕鏈可變區與第一Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)，該第一Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第二Fab分子之Fab重鏈共用羧基端肽鍵的多肽($VL_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(2)}-CH1_{(2)}$)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第一Fab分子之Fab重鏈可變區與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽($VH_{(1)}-CL_{(1)}$)以及第二Fab分子之Fab輕鏈多肽($VL_{(2)}-CL_{(2)}$)。

【0249】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第二Fab分子之Fab重鏈與第一Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基端肽鍵，該第一Fab分子之Fab重鏈可變區又與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)的多肽($VH_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CL_{(1)}$)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第一Fab分子之Fab輕鏈可變區與第一Fab分

子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₁₎-CH1₍₁₎)以及第二Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。

【0250】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第一Fab分子之Fab重鏈可變區與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)，該第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第二Fab分子之Fab重鏈共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CH1₍₂₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第一Fab分子之Fab輕鏈可變區與第一Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₁₎-CH1₍₁₎)以及第二Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。

【0251】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第三Fab分子之Fab重鏈與第二Fab分子之Fab重鏈共用羧基端肽鍵，該第二Fab分子之Fab重鏈又與第一Fab分子之Fab輕鏈可變區共用羧基端肽鍵，該第一Fab分子之Fab輕鏈可變區又與第一Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)的多肽(VH₍₃₎-CH1₍₃₎-VH₍₂₎-CH1₍₂₎-VL₍₁₎-CH1₍₁₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第一Fab分子之Fab重鏈可變區與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₁₎-CL₍₁₎)以及第二Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含第三Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

【0252】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第三Fab分子之Fab重鏈與第二Fab分子之Fab重鏈共用羧基端肽鍵，該第二Fab分子之Fab重鏈又與第一Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基端肽鍵，

該第一Fab分子之Fab重鏈可變區又與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)的多肽(VH₍₃₎-CH1₍₃₎-VH₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第一Fab分子之Fab輕鏈可變區與第一Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₁₎-CH1₍₁₎)以及第二Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含第三Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

【0253】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第一Fab分子之Fab輕鏈可變區與第一Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)，該第一Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第二Fab分子之Fab重鏈共用羧基端肽鍵，該第二Fab分子之Fab重鏈又與第三Fab分子之Fab重鏈共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₃₎-CH1₍₃₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第一Fab分子之Fab重鏈可變區與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₁₎-CL₍₁₎)以及第二Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含第三Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

【0254】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第一Fab分子之Fab重鏈可變區與第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第一Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)，該第一Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第二Fab分子之Fab重鏈共用羧基端肽鍵，該第二Fab分子之Fab重鏈又與第三Fab分子之Fab重鏈共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₃₎-CH1₍₃₎)。在一些

態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第一Fab分子之Fab輕鏈可變區與第一Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₁₎-CH1₍₁₎)以及第二Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含第三Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

【0255】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第一Fab分子之Fab重鏈與第二Fab分子之Fab輕鏈可變區共用羧基端肽鍵，該第二Fab分子之Fab輕鏈可變區又與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)，該第二Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第三Fab分子之Fab輕鏈可變區共用羧基端肽鍵，第三Fab分子之Fab輕鏈可變區又與第三Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第三Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)的多肽(VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VL₍₃₎-CH1₍₃₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₂₎-CL₍₂₎)以及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第三Fab分子之Fab重鏈可變區與第三Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₃₎-CL₍₃₎)。

【0256】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第一Fab分子之Fab重鏈與第二Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基端肽鍵，該第二Fab分子之Fab重鏈可變區又與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)，該第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第三Fab分子之

Fab重鏈可變區共用羧基端肽鍵，第三Fab分子之Fab重鏈可變區又與第三Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第三Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)的多肽(VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₃₎-CL₍₃₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第二Fab分子之Fab輕鏈可變區與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₂₎-CH1₍₂₎)以及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第三Fab分子之Fab輕鏈可變區與第三Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₃₎-CH1₍₃₎)。

【0257】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第三Fab分子之Fab輕鏈可變區與第三Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第三Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)，該第三Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第二Fab分子之Fab輕鏈可變區共用羧基端肽鍵，該第二Fab分子之Fab輕鏈可變區又與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈可變區經輕鏈可變區置換)，該第二Fab分子之Fab重鏈恆定區又與第一Fab分子之Fab重鏈共用羧基端肽鍵(VL₍₃₎-CH1₍₃₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第二Fab分子之Fab重鏈可變區與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₂₎-CL₍₂₎)以及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第三Fab分子之Fab重鏈可變區與第三Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VH₍₃₎-CL₍₃₎)。

【0258】 在某些態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體包含其中第三Fab分子之Fab重鏈可變區與第三Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第三Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)，該第三Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第二Fab分子之Fab重鏈可變區共用羧基端肽鍵，該第二Fab分子之Fab重鏈可變區又與第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區共用羧基端肽鍵(亦即，第二Fab分子包含互換型Fab重鏈，其中重鏈恆定區經輕鏈恆定區置換)，該第二Fab分子之Fab輕鏈恆定區又與第一Fab分子之Fab重鏈共用羧基端肽鍵(VH₍₃₎-CL₍₃₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第二Fab分子之Fab輕鏈可變區與第二Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₂₎-CH1₍₂₎)以及第一Fab分子之Fab輕鏈多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些態樣中，(多特異性)抗體進一步包含其中第三Fab分子之Fab輕鏈可變區與第三Fab分子之Fab重鏈恆定區共用羧基端肽鍵的多肽(VL₍₃₎-CH1₍₃₎)。

【0259】 在一個態樣中，本發明提供一種(多特異性)抗體，其包含

a)結合CD3之第一抗原結合域，其中第一抗原結合域為Fab分子，其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH或恆定域CL及CH1相互置換，且第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 2之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 3之HCDR 2及SEQ ID NO: 5之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 8之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 9之LCDR 2及SEQ ID NO: 10之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)；

b)結合第二抗原(特定言之目標細胞抗原，更特定言之TYRP-1或EGFRvIII)之第二抗原結合域，其中第二抗原結合域為(習知)Fab分子；

c)由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域；

其中

(i) a)中之第一抗原結合域在Fab重鏈之C端與b)中之第二抗原結合域之Fab重鏈之N端融合，且b)中之第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合，或

(ii) b)中之第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與a)中之第一抗原結合域之Fab重鏈之N端融合，且a)中之第一抗原結合域在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合。

【0260】 在一較佳態樣中，本發明提供一種(多特異性)抗體，其包含

a)結合CD3之第一抗原結合域，其中第一抗原結合域為Fab分子，其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH或恆定域CL及CH1相互置換，且第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 2之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 3之HCDR 2及SEQ ID NO: 5之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 8之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 9之LCDR 2及SEQ ID NO: 10之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)；

b)結合第二抗原(特定言之目標細胞抗原，更特定言之TYRP-1或EGFRvIII)之第二抗原結合域及第三抗原結合域，其中第二抗原結合域及第三抗原結合域各自為(習知)Fab分子；及

c)由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域；

其中

(i) a)中之第一抗原結合域在Fab重鏈之C端與b)中之第二抗原結合域之Fab重鏈之N端融合，且b)中之第二抗原結合域及b)中之第三抗原結合

域各自在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合，或

(ii) b)中之第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與a)中之第一抗原結合域之Fab重鏈之N端融合，且a)中之第一抗原結合域及b)中之第三抗原結合域各自在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合。

【0261】 在另一態樣中，本發明提供一種(多特異性)抗體，其包含

a)結合CD3之第一抗原結合域，其中第一抗原結合域為Fab分子，其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH或恆定域CL及CH1相互置換，且第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 2之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 3之HCDR 2及SEQ ID NO: 5之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 8之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 9之LCDR 2及SEQ ID NO: 10之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)；

b)結合第二抗原(特定言之目標細胞抗原，更特定言之TYRP-1或EGFRvIII)之第二抗原結合域，其中第二抗原結合域為(習知)Fab分子；

c)由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域；

其中

(i) a)中之第一抗原結合域及b)中之第二抗原結合域各自在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合。

【0262】 在根據本發明之(多特異性)抗體之所有不同組態中，本文所描述之胺基酸取代(「電荷修飾」)若存在則可處於第二抗原結合域/Fab分子及(若存在)第三抗原結合域/Fab分子之CH1及CL域中或第一抗原結合域/Fab分子之CH1及CL域中。較佳地，其處於第二抗原結合域/Fab分子及(若存在)第三抗原結合域/Fab分子之CH1及CL域中。根據本發明之概念，若如本文所描述之胺基酸取代發生在第二(及若存在，第三)抗原結合

域/Fab分子中，則此類胺基酸取代不發生在第一抗原結合域/Fab分子中。相反，若如本文所描述之胺基酸取代發生在第一抗原結合域/Fab分子中，則此類胺基酸取代不發生在第二(及若存在，第三)抗原結合域/Fab分子中。胺基酸取代較佳地發生在包含其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH1相互置換之Fab分子的(多特異性)抗體中。

【0263】在根據本發明之(多特異性)抗體之較佳態樣中，特定言之在如本文所描述之胺基酸取代發生在第二(及若存在，第三)抗原結合域/Fab分子中之情況下，第二(及若存在，第三)Fab分子之恆定域CL具有 κ 同型。在根據本發明之(多特異性)抗體之其他態樣中，特定言之在如本文所描述之胺基酸取代發生在第一抗原結合域/Fab分子中之情況下，第一抗原結合域/Fab分子之恆定域CL具有 κ 同型。在一些態樣中，第二(及若存在，第三)抗原結合域/Fab分子之恆定域CL及第一抗原結合域/Fab分子之恆定域CL具有 κ 同型。

【0264】在一個態樣中，本發明提供一種(多特異性)抗體，其包含

a)結合CD3之第一抗原結合域，其中第一抗原結合域為Fab分子，其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH相互置換，且第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 2之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 3之HCDR 2及SEQ ID NO: 5之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 8之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 9之LCDR 2及SEQ ID NO: 10之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)；

b)結合第二抗原(特定言之目標細胞抗原，更特定言之TYRP-1或EGFRvIII)之第二抗原結合域，其中第二抗原結合域為(習知)Fab分子；

c)由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域；

其中在b)中之第二抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且位置123處之胺基酸經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)(最佳地經精胺酸(R)取代)，且其中在b)中之第二抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)，且位置213處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)；且

其中

(i) a)中之第一抗原結合域在Fab重鏈之C端與b)中之第二抗原結合域之Fab重鏈之N端融合，且b)中之第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合，或

(ii) b)中之第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與a)中之第一抗原結合域之Fab重鏈之N端融合，且a)中之第一抗原結合域在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合。

【0265】 在一較佳態樣中，本發明提供一種(多特異性)抗體，其包含

a)結合CD3之第一抗原結合域，其中第一抗原結合域為Fab分子，其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH相互置換，且第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 2之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 3之HCDR 2及SEQ ID NO: 5之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 8之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 9之LCDR 2及SEQ ID NO: 10之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)；

b)結合第二抗原(特定言之目標細胞抗原，更特定言之TYRP-1或EGFRvIII)之第二抗原結合域及第三抗原結合域，其中第二抗原結合域及

第三抗原結合域各自為(習知)Fab分子；及

c)由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域；

其中在b)中之第二抗原結合域及b)中之第三抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且位置123處之胺基酸經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)(最佳地經精胺酸(R)取代)，且其中在b)中之第二抗原結合域及b)中之第三抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)，且位置213處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)；
且

其中

(i) a)中之第一抗原結合域在Fab重鏈之C端與b)中之第二抗原結合域之Fab重鏈之N端融合，且b)中之第二抗原結合域及b)中之第三抗原結合域各自在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合，或

(ii) b)中之第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與a)中之第一抗原結合域之Fab重鏈之N端融合，且a)中之第一抗原結合域及b)中之第三抗原結合域各自在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合。

【0266】 在另一態樣中，本發明提供一種(多特異性)抗體，其包含

a)結合CD3之第一抗原結合域，其中第一抗原結合域為Fab分子，其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH相互置換，且第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 2之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 3之HCDR 2及SEQ ID NO: 5之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 8之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 9之LCDR 2及SEQ ID NO: 10之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)；

b)結合第二抗原(特定言之目標細胞抗原，更特定言之TYRP-1或EGFRvIII)之第二抗原結合域，其中第二抗原結合域為(習知)Fab分子；

c)由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域；

其中在b)中之第二抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且位置123處之胺基酸經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)(最佳地經精胺酸(R)取代)，且其中在b)中之第二抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)，且位置213處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)；且

其中a)中之第一抗原結合域及b)中之第二抗原結合域各自在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合。

【0267】 根據以上態樣中之任一者，(多特異性)抗體之組分(例如Fab分子、Fc域)可直接或經由本文所描述或此項技術中已知之各種連接子(特定言之包含一或多個胺基酸，通常約2至20個胺基酸之肽連接子)融合。適合之非免疫原性肽連接子包括例如 $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ 、 $(G_4S)_n$ 或 $G_4(SG_4)_n$ 肽連接子，其中n一般為1至10，通常2至4之整數。

【0268】 在一較佳態樣中，本發明提供一種(多特異性)抗體，其包含

a)結合CD3之第一抗原結合域，其中第一抗原結合域為Fab分子，其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH相互置換，且第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 2之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 3之HCDR 2及SEQ ID NO: 5之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 8之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 9之LCDR 2及SEQ ID

NO: 10之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)；

b)結合TYRP-1之第二抗原結合域及第三抗原結合域，其中第二抗原結合域及第三抗原結合域各自為(習知)Fab分子，且第二抗原結合域及第三抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 15之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 16之HCDR 2及SEQ ID NO: 17之HCDR 3的重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO: 19之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 20之LCDR 2及SEQ ID NO: 21之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)；

c)由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域；

其中

在b)中之第二抗原結合域及第三抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且位置123處之胺基酸經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)(最佳地經精胺酸(R)取代)，且其中在b)中之第二抗原結合域及第三抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)，且位置213處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)；

且其中進一步地

b)中之第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與a)中之第一抗原結合域之Fab重鏈之N端融合，且a)中之第一抗原結合域及b)中之第三抗原結合域各自在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合。

【0269】 在一更佳態樣中，本發明提供一種(多特異性)抗體，其包含

a)結合CD3之第一抗原結合域，其中第一抗原結合域為Fab分子，其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH相互置換，且第一抗原結合域包

含：包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的輕鏈可變區；

b)結合TYRP-1之第二抗原結合域及第三抗原結合域，其中第二抗原結合域及第三抗原結合域各自為(習知)Fab分子，且第二抗原結合域及第三抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 22之胺基酸序列的輕鏈可變區；

c)由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域；
其中

在b)中之第二抗原結合域及第三抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且位置123處之胺基酸經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)(最佳地經精胺酸(R)取代)，且其中在b)中之第二抗原結合域及第三抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)，且位置213處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)；

且其中進一步地

b)中之第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與a)中之第一抗原結合域之Fab重鏈之N端融合，且a)中之第一抗原結合域及b)中之第三抗原結合域各自在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合。

【0270】 在一較佳態樣中，本發明提供一種(多特異性)抗體，其包含

a)結合CD3之第一抗原結合域，其中第一抗原結合域為Fab分子，其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH相互置換，且第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 2之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 3之

HCDR 2及SEQ ID NO: 5之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 8之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 9之LCDR 2及SEQ ID NO: 10之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)；

b)結合EGFR_{vIII}之第二抗原結合域及第三抗原結合域，其中第二抗原結合域及第三抗原結合域各自為(習知)Fab分子，且第二抗原結合域及第三抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 85之重鏈互補決定區(HCDR) 1、SEQ ID NO: 86之HCDR 2及SEQ ID NO: 87之HCDR 3的重鏈可變區(VH)以及包含SEQ ID NO: 89之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、SEQ ID NO: 90之LCDR 2及SEQ ID NO: 91之LCDR 3的輕鏈可變區(VL)；

c)由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域；

其中

在b)中之第二抗原結合域及第三抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且位置123處之胺基酸經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)(最佳地經精胺酸(R)取代)，且其中在b)中之第二抗原結合域及第三抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)，且位置213處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)；

且其中進一步地

b)中之第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與a)中之第一抗原結合域之Fab重鏈之N端融合，且a)中之第一抗原結合域及b)中之第三抗原結合域各自在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合。

【0271】 在一更佳態樣中，本發明提供一種(多特異性)抗體，其包含

a)結合CD3之第一抗原結合域，其中第一抗原結合域為Fab分子，其中Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH相互置換，且第一抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的輕鏈可變區；

b)結合EGFR_{vIII}之第二抗原結合域及第三抗原結合域，其中第二抗原結合域及第三抗原結合域各自為(習知)Fab分子，且第二抗原結合域及第三抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 88之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 92之胺基酸序列的輕鏈可變區；

c)由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域；

其中

在b)中之第二抗原結合域及第三抗原結合域之恆定域CL中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)取代(根據Kabat編號)，且位置123處之胺基酸經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代(根據Kabat編號)(最佳地經精胺酸(R)取代)，且其中在b)中之第二抗原結合域及第三抗原結合域之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)，且位置213處之胺基酸經麩胺酸(E)取代(根據Kabat EU索引編號)；

且其中進一步地

b)中之第二抗原結合域在Fab重鏈之C端與a)中之第一抗原結合域之Fab重鏈之N端融合，且a)中之第一抗原結合域及b)中之第三抗原結合域各自在Fab重鏈之C端與c)中之Fc域之亞單元中之一者的N端融合。

【0272】 在根據本發明之此等態樣的一個態樣中，在Fc域之第一亞單元中，位置366處之蘇胺酸殘基經色胺酸殘基置換(T366W)，且在Fc域之第二亞單元中，位置407處之酪胺酸殘基經纈胺酸殘基置換(Y407V)，

且視情況，位置366處之蘇胺酸殘基經絲胺酸殘基置換(T366S)，且位置368處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換(L368A) (根據Kabat EU索引編號)。

在根據本發明之此等態樣的另一態樣中，在Fc域之第一亞單元中，另外，位置354處之絲胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(S354C)，或位置356處之麩胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(E356C) (特定言之，位置354處之絲胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換)，且在Fc域之第二亞單元中，另外，位置349處之酪胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(Y349C) (根據Kabat EU索引編號)。

【0273】 在根據本發明之此等態樣的又一態樣中，在Fc域之第一亞單元及第二亞單元中之每一者中，位置234處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換(L234A)，位置235處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換(L235A)，且位置329處之脯胺酸殘基經甘胺酸殘基置換(P329G) (根據Kabat EU索引編號)。

【0274】 在根據本發明之此等態樣的又一態樣中，Fc域為人類IgG₁ Fc域。

【0275】 在一較佳特定態樣中，(多特異性)抗體包含：包含與SEQ ID NO: 23之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽、包含與SEQ ID NO: 24之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽、包含與SEQ ID NO: 25之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽(特定言之兩個多肽)及包含與SEQ ID NO: 27之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽。在一更佳之特定態樣中，(多特異性)抗體包含：包含

SEQ ID NO: 23之胺基酸序列的多肽、包含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的多肽、包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的多肽(特定言之兩個多肽)及包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的多肽。

【0276】 在一個態樣中，本發明提供一種結合CD3及TYRP-1之(多特異性)抗體，其包含：包含與SEQ ID NO: 23之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽、包含與SEQ ID NO: 24之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽、包含與SEQ ID NO: 25之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽(特定言之兩個多肽)及包含與SEQ ID NO: 27之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽。在一個態樣中，本發明提供一種結合CD3及TYRP-1之(多特異性)抗體，其包含：包含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列的多肽、包含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的多肽、包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的多肽(特定言之兩個多肽)及包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的多肽。

【0277】 在一更佳之特定態樣中，(多特異性)抗體包含：包含與SEQ ID NO: 109之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽、包含與SEQ ID NO: 110之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽、包含與SEQ ID NO: 111之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽(特定言之兩個多肽)及包含與SEQ ID NO: 27之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽。在一更特定態樣中，(多特異性)抗體包含：包含SEQ ID NO: 109之胺基酸序列的多肽、包含SEQ ID NO: 110之胺基酸序列的多肽、包含SEQ ID NO: 111之胺基酸序列的多肽(特定言之兩個多肽)

及包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的多肽。

【0278】 在一個態樣中，本發明提供一種結合CD3及EGFRvIII之(多特異性)抗體，其包含：包含與SEQ ID NO: 109之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽、包含與SEQ ID NO: 110之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽、包含與SEQ ID NO: 111之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽(特定言之兩個多肽)及包含與SEQ ID NO: 27之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的多肽。在一個態樣中，本發明提供一種結合CD3及EGFRvIII之(多特異性)抗體，其包含：包含SEQ ID NO: 109之胺基酸序列的多肽、包含SEQ ID NO: 110之胺基酸序列的多肽、包含SEQ ID NO: 111之胺基酸序列的多肽(特定言之兩個多肽)及包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的多肽。

【0279】

8. *Fc*域變異體

在較佳態樣中，本發明之(多特異性)抗體包含由第一亞單元及第二亞單元構成的Fc域。

【0280】 (多特異性)抗體之Fc域由包含免疫球蛋白分子之重鏈域的一對多肽鏈組成。舉例而言，免疫球蛋白G (IgG)分子之Fc域為二聚體，其中各亞單元包含CH2及CH3 IgG重鏈恆定域。Fc域之兩個亞單元能夠彼此穩定結合。在一個態樣中，本發明之(多特異性)抗體包含不超過一個Fc域。

【0281】 在一個態樣中，(多特異性)抗體之Fc域為IgG Fc域。在一個較佳態樣中，Fc域為IgG₁ Fc域。在另一態樣中，Fc域為IgG₄ Fc域。在一個

更特定態樣中，Fc域為包含位置S228 (Kabat EU索引編號)之胺基酸取代(特定言之，胺基酸取代S228P)的IgG₄ Fc域。此胺基酸取代減少活體內IgG₄ 抗體之Fab臂交換(參見Stubenrauch等人，Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010))。在一更佳態樣中，Fc域為人類Fc域。在一甚至更佳態樣中，Fc域為人類IgG₁ Fc域。人類IgG₁ Fc區之例示性序列載於SEQ ID NO: 117中。

【0282】

a) 促進雜二聚化之Fc域修飾

根據本發明之(多特異性)抗體包含可與Fc域之兩個亞單元中之一者或另一者融合的不同抗原結合域，因此Fc域之兩個亞單元通常包含於兩個不一致多肽鏈中。此等多肽之重組共表現及後續二聚化產生兩種多肽之若干種可能的組合。為了改良(多特異性)抗體在重組產生時之產率及純度，因此將有利於的是在(多特異性)抗體之Fc域中引入促進所需多肽之結合的修飾。

【0283】 因此，在較佳態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體之Fc域包含促進Fc域之第一亞單元及第二亞單元之結合的修飾。人類IgG Fc域中之兩個亞單元之間最廣泛蛋白質-蛋白質相互作用的位點位於Fc域之CH3域中。因此，在一個態樣中，該修飾存在於Fc域之CH3域中。

【0284】 存在若干種用於Fc域之CH3域中之修飾以便進行雜二聚化的方法，其充分描述於例如 WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012058768、WO 2013157954、WO 2013096291中。通常，在所有此類

方法中，Fc域之第一亞單元之CH3域與Fc域之第二亞單元之CH3域皆以互補方式經工程改造，使得各CH3域(或包含其之重鏈)本身不可再發生均二聚，而是被迫與以互補方式經工程改造之另一CH3域雜二聚(使得第一二CH3域及第二CH3域雜二聚，而不在兩個第一CH3域或兩個第二CH3域之間形成均二聚體)。涵蓋此等用於改良重鏈雜二聚化之不同方法作為與(多特異性)抗體中之重-輕鏈修飾(例如一個結合臂中之VH及VL交換/置換及在CH1/CL界面中引入具有相反電荷之帶電胺基酸之取代)組合的不同替代方案，該等修飾減少重/輕鏈錯配及本斯-瓊斯型副產物。

【0285】 在一特定態樣中，促進Fc域之第一亞單元與第二亞單元結合的該修飾為所謂的「臼包杵」修飾，包含發生於Fc域之兩個亞單元中之一者中的「杵」修飾及發生於Fc域之兩個亞單元中之另一者中的「臼」修飾。

【0286】 臼包杵技術描述於例如US 5,731,168；US 7,695,936；Ridgway等人, Prot Eng 9, 617-621 (1996)及Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)中。一般而言，方法涉及在第一多肽之界面處引入隆凸(「杵」)及在第二多肽之界面處引入對應凹穴(「臼」)，使得隆凸可位於凹穴中以便促進雜二聚體形成且阻礙均二聚體形成。藉由用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換第一多肽界面中之小胺基酸側鏈來構築隆凸。大小與隆凸相同或相似的補償性凹穴係藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈而形成於第二多肽之界面中。

【0287】 因此，在一較佳態樣中，在(多特異性)抗體之Fc域之第一亞單元之CH3域中，一胺基酸殘基經具有較大側鏈體積之胺基酸殘基置換，從而在第一亞單元之CH3域內產生隆凸，其可位於第二亞單元之CH3

域內之凹穴中，且在Fc域之第二亞單元之CH3域中，一胺基酸殘基經具有較小側鏈體積之胺基酸殘基置換，從而在第二亞單元之CH3域內產生凹穴，第一亞單元之CH3域內之隆凸可位於該凹穴內。

【0288】 較佳地，具有較大側鏈體積之該胺基酸殘基係選自由精胺酸(R)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)及色胺酸(W)組成之群。

【0289】 較佳地，具有較小側鏈體積的胺基酸殘基係選自由丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)及纈胺酸(V)組成之群。

【0290】 隆凸及凹穴可藉由改變編碼多肽之核酸產生，例如藉由定點突變誘發或藉由肽合成。

【0291】 在一特定態樣中，在Fc域之第一亞單元(「杵」亞單元)(之CH3域)中，位置366處之蘇胺酸殘基經色胺酸殘基置換(T366W)，且在Fc域之第二亞單元(「臼」亞單元)(之CH3域)中，位置407處之酪胺酸殘基經纈胺酸殘基置換(Y407V)。在一個態樣中，在Fc域之第二亞單元中，另外，位置366之蘇胺酸殘基經絲胺酸殘基(T366S)置換且位置368之白胺酸殘基經丙胺酸殘基(L368A)置換(根據Kabat EU索引編號)。

【0292】 在又一態樣中，在Fc域之第一亞單元中，另外，位置354處之絲胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(S354C)或位置356處之麩胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(E356C)(特定言之，位置354處之絲胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換)，且在Fc域之第二亞單元中，另外，位置349處之酪胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(Y349C)(根據Kabat EU索引編號)。引入此等兩個半胱胺酸殘基使得Fc域之兩個亞單元之間形成二硫橋鍵，進一步穩定二聚體(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001))。

【0293】 在一較佳態樣中，Fc域之第一亞單元包含胺基酸取代

S354C及T366W，且Fc域之第二亞單元包含胺基酸取代Y349C、T366S、L368A及Y407V (根據Kabat EU索引編號)。

【0294】 在一較佳態樣中，結合CD3之抗原結合域與Fc域之第一亞單元(包含「杵」修飾)融合(視情況經由結合第二抗原之第二抗原結合域及/或肽連接子)。不希望受理論束縛，結合CD3之抗原結合域與Fc域之含杵亞單元之融合將(進一步)使包含兩個結合CD3之抗原結合域之抗體的產生減至最少(兩種含杵多肽發生空間位阻)。

【0295】 涵蓋用於增強雜二聚化之CH3修飾的其他技術作為本發明之替代方案且此等技術描述於例如WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954、WO 2013/096291中。

【0296】 在一個態樣中，替代地使用EP 1870459中所描述之雜二聚化方法。此方法係基於在Fc域之兩個亞單元之間的CH3/CH3域界面中的特定胺基酸位置引入具有相反電荷的帶電胺基酸。本發明之(多特異性)抗體之特定態樣為(Fc域之)兩個CH3域中之一者中的胺基酸突變R409D、K370E及Fc域之CH3域中之另一者中的胺基酸突變D399K、E357K (根據Kabat EU索引編號)。

【0297】 在另一態樣中，本發明之(多特異性)抗體包含Fc域之第一亞單元之CH3域中的胺基酸突變T366W及Fc域之第二亞單元之CH3域中的胺基酸突變T366S、L368A、Y407V；以及另外Fc域之第一亞單元之CH3域中的胺基酸突變R409D、K370E及Fc域之第二亞單元之CH3域中的胺基酸突變D399K、E357K (根據Kabat EU索引編號)。

【0298】 在另一態樣中，本發明之(多特異性)抗體包含Fc域之第一亞單元之CH3域中的胺基酸突變S354C、T366W及Fc域之第二亞單元之CH3域中的胺基酸突變Y349C、T366S、L368A、Y407V，或該(多特異性)抗體包含Fc域之第一亞單元之CH3域中的胺基酸突變Y349C、T366W及Fc域之第二亞單元之CH3域中的胺基酸突變S354C、T366S、L368A、Y407V，以及另外在Fc域之第一亞單元之CH3域中的胺基酸突變R409D、K370E及Fc域之第二亞單元之CH3域中的胺基酸突變D399K、E357K(全部根據Kabat EU索引編號)。

【0299】 在一個態樣中，替代地使用WO 2013/157953中所描述之雜二聚化方法。在一個態樣中，第一CH3域包含胺基酸突變T366K且第二CH3域包含胺基酸突變L351D (根據Kabat EU索引編號)。在另一態樣中，第一CH3域進一步包含胺基酸突變L351K。在另一態樣中，第二CH3域進一步包含選自Y349E、Y349D及L368E之胺基酸突變(特定言之L368E)(根據Kabat EU索引編號)。

【0300】 在一個態樣中，替代地使用WO 2012/058768中所描述之雜二聚化方法。在一個態樣中，第一CH3域包含胺基酸突變L351Y、Y407A，且第二CH3域包含胺基酸突變T366A、K409F。在另一態樣中，第二CH3域包含位置T411、D399、S400、F405、N390或K392之另一胺基酸突變，例如選自以下之胺基酸突變：a) T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E或T411W；b) D399R、D399W、D399Y或D399K；c) S400E、S400D、S400R或S400K；d) F405I、F405M、F405T、F405S、F405V或F405W；e) N390R、N390K或N390D；f) K392V、K392M、K392R、K392L、K392F或K392E (根據Kabat EU索

引編號)。在另一態樣中，第一CH3域包含胺基酸突變L351Y、Y407A，且第二CH3域包含胺基酸突變T366V、K409F。在另一態樣中，第一CH3域包含胺基酸突變Y407A，且第二CH3域包含胺基酸突變T366A、K409F。在另一態樣中，第二CH3域進一步包含胺基酸突變K392E、T411E、D399R及S400R (根據Kabat EU索引編號)。

【0301】 在一個態樣中，替代地使用WO 2011/143545中所描述之雜二聚化方法，例如，其中在選自由368及409組成之群的位置進行胺基酸修飾(根據Kabat EU索引編號)。

【0302】 在一個態樣中，替代地使用WO 2011/090762中所描述之雜二聚化方法，其亦使用上文所描述之臼包杵技術。在一個態樣中，第一CH3域包含胺基酸突變T366W，且第二CH3域包含胺基酸突變Y407A。在一個態樣中，第一CH3域包含胺基酸突變T366Y，且第二CH3域包含胺基酸突變Y407T (根據Kabat EU索引編號)。

【0303】 在一個態樣中，(多特異性)抗體或其Fc域屬於IgG₂子類，且替代地使用WO 2010/129304中所描述之雜二聚化方法。

【0304】 在一替代性態樣中，促進Fc域之第一亞單元與第二亞單元之結合的修飾包含介導靜電轉向效應之修飾，例如PCT公開案WO 2009/089004中所描述。一般而言，此方法涉及用帶電胺基酸殘基置換兩個Fc域亞單元之界面處之一或多個胺基酸殘基，使得均二聚體形成變成在靜電上不利的，但雜二聚化在靜電上為有利的。在一個此類態樣中，第一CH3域包含帶負電胺基酸(例如麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)，特定言之K392D或N392D)對K392或N392的胺基酸取代，且第二CH3域包含帶正電胺基酸(例如離胺酸(K)或精胺酸(R)，特定言之D399K、E356K、

D356K或E357K，且更特定言之D399K及E356K)對D399、E356、D356或E357的胺基酸取代。在另一態樣中，第一CH3域進一步包含用帶負電胺基酸(例如麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)，特定言之K409D或R409D)對K409或R409的胺基酸取代。在另一態樣中，第一CH3域進一步或替代地包含帶負電胺基酸(例如麩胺酸(E)或天冬胺酸(D))對K439及/或K370的胺基酸取代(全部根據Kabat EU索引編號)。

【0305】在又一態樣中，替代地使用WO 2007/147901中所描述之雜二聚化方法。在一個態樣中，第一CH3域包含胺基酸突變K253E、D282K及K322D，且第二CH3域包含胺基酸突變D239K、E240K及K292D(根據Kabat EU索引編號)。

【0306】在又一態樣中，替代地使用WO 2007/110205中所描述之雜二聚化方法。

【0307】在一個態樣中，Fc域之第一亞單元包含胺基酸取代K392D及K409D，且Fc域之第二亞單元包含胺基酸取代D356K及D399K(根據Kabat EU索引編號)。

【0308】

b) 降低Fc受體結合及/或效應功能之Fc域修飾

Fc域賦予(多特異性)抗體有利的藥物動力學特性，包括促進於目標組織中良好積聚之長血清半衰期及有利的組織-血液分佈比率。然而，其可同時引起(多特異性)抗體對表現Fc受體之細胞而非較佳抗原攜帶細胞的非所需靶向。此外，Fc受體信號傳導路徑之共活化可引起細胞介素釋放，其與(多特異性)抗體之T細胞活化特性及長半衰期組合導致細胞介素受體之過度活化及全身性投與之後的嚴重副作用。除T細胞以外之(Fc受體攜帶)

免疫細胞之活化甚至可歸因於T細胞(例如NK細胞)之潛在破壞而降低(多特異性)抗體之功效。

【0309】 因此，在較佳態樣中，根據本發明之(多特異性)抗體之Fc域相較於原生IgG₁ Fc域展現降低之Fc受體結合親和力及/或降低之效應功能。在一個此類態樣中，Fc域(或包含該Fc域之(多特異性)抗體)相較於原生IgG₁ Fc域(或包含原生IgG₁ Fc域之(多特異性)抗體)展現小於50%、特定言之小於20%、更特定言之小於10%及最特定言之小於5%之Fc受體結合親和力，及/或相較於原生IgG₁ Fc域(或包含原生IgG₁ Fc域之(多特異性)抗體)展現小於50%、特定言之小於20%、更特定言之小於10%及最特定言之小於5%之效應功能。在一個態樣中，Fc域(或包含該Fc域之(多特異性)抗體)實質上不結合Fc受體及/或誘導效應功能。在一較佳態樣中，Fc受體為Fc γ 受體。在一個實施例中，Fc受體為人類Fc受體。在一個態樣中，Fc受體為活化Fc受體。在一特定態樣中，Fc受體為活化人類Fc γ 受體，更具體言之人類Fc γ R111a、Fc γ RI或Fc γ R11a，最具體言之人類Fc γ R111a。在一個態樣中，效應功能為選自CDC、ADCC、ADCP及細胞介素分泌之群的一或多者。在一較佳態樣中，效應功能為ADCC。在一個態樣中，Fc域相較於原生IgG₁ Fc域展現實質上類似的與新生兒Fc受體(FcRn)之結合親和力。當Fc域(或包含該Fc域之(多特異性)抗體)展現原生IgG₁ Fc域(或包含原生IgG₁ Fc域之(多特異性)抗體)與FcRn之結合親和力的大於約70%、特定言之大於約80%、更特定言之大於約90%時，實現實質上類似之FcRn結合。

【0310】 在某些態樣中，Fc域經工程改造以具有相較於未經工程改造之Fc域降低之Fc受體結合親和力及/或降低之效應功能。在較佳態樣

中，(多特異性)抗體之Fc域包含一或多個降低Fc域之Fc受體結合親和力及/或效應功能的胺基酸突變。通常，Fc域之兩個亞單元中之每一者中存在相同的一或多個胺基酸突變。在一個態樣中，胺基酸突變降低Fc域之Fc受體結合親和力。在一個態樣中，胺基酸突變將Fc域之Fc受體結合親和力降低至少2倍、至少5倍或至少10倍。在其中存在超過一個降低Fc域之Fc受體結合親和力的胺基酸突變之態樣中，此等胺基酸突變之組合可將Fc域之Fc受體結合親和力降低至少10倍、至少20倍或甚至至少50倍。在一個態樣中，包含經工程改造Fc域的(多特異性)抗體相較於包含未經工程改造Fc域之(多特異性)抗體展現小於20%、特定言之小於10%、更特定言之小於5%之Fc受體結合親和力。在一較佳態樣中，Fc受體為Fc γ 受體。在一些態樣中，Fc受體為人類Fc受體。在一些態樣中，Fc受體為活化Fc受體。在一特定態樣中，Fc受體為活化人類Fc γ 受體，更具體言之人類Fc γ RIIIa、Fc γ RI或Fc γ RIIa，最具體言之人類Fc γ RIIIa。較佳地，減少與此等受體中之每一者的結合。在一些態樣中，亦降低對補體組分之結合親和力，即對C1q之特異性結合親和力。在一個態樣中，對新生兒Fc受體(FcRn)的結合親和力未降低。當Fc域(或包含該Fc域之(多特異性)抗體)展現Fc域之未經工程改造形式(或包含Fc域之該未經工程改造形式的(多特異性)抗體)之FcRn結合親和力的大於約70%時，實現實質上類似之FcRn結合，亦即保留Fc域對該受體之結合親和力。Fc域或包含該Fc域之本發明之(多特異性)抗體可展現此親和力之大於約80%及甚至大於約90%。在某些態樣中，(多特異性)抗體之Fc域經工程改造以具有相較於未經工程改造之Fc域降低之效應功能。降低之效應功能可包括(但不限於)以下中之一或多者：降低之補體依賴性細胞毒性(CDC)、降低之抗體依賴性細胞介導之

細胞毒性(ADCC)、減少之抗體依賴性細胞吞噬(ADCP)、減少之細胞介素分泌、減少之免疫複合物介導之抗原呈遞細胞抗原攝入、減少之NK細胞結合、減少之巨噬細胞結合、減少之單核球結合、減少之多形核細胞結合、減少之誘導細胞凋亡之直接信號傳導、減少之目標所結合抗體之交聯、減少之樹突狀細胞成熟或減少之T細胞激活。在一個態樣中，降低之效應功能為選自以下之群的一或多者：降低之CDC、降低之ADCC、減少之ADCP及減少之細胞介素分泌。在一較佳態樣中，降低之效應功能為降低之ADCC。在一個態樣中，降低之ADCC為藉由未經工程改造Fc域(或包含未經工程改造Fc域之(多特異性)抗體)誘導的ADCC之小於20%。

【0311】 在一個態樣中，降低Fc域之Fc受體結合親和力及/或效應功能的胺基酸突變為胺基酸取代。在一個態樣中，Fc域在選自E233、L234、L235、N297、P331及P329之群的位置處包含胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)。在一更特定態樣中，Fc域在選自L234、L235及P329之群的位置處包含胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)。在一些態樣中，Fc域包含胺基酸取代L234A及L235A (根據Kabat EU索引編號)。在一個此類態樣中，Fc域為IgG₁ Fc域，特定言之人類IgG₁ Fc域。在一個態樣中，Fc域包含在位置P329處之胺基酸取代。在一更特定態樣中，胺基酸取代為P329A或P329G，特定言之P329G (根據Kabat EU索引編號)。在一個態樣中，Fc域包含在位置P329處之胺基酸取代及在選自E233、L234、L235、N297及P331之位置處之另一胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)。在一更特定態樣中，另一胺基酸取代為E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S。在較佳態樣中，Fc域包含在位置P329、L234及L235處之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)。在更

佳態樣中，Fc域包含胺基酸突變L234A、L235A及P329G（「P329G LALA」、「PGLALA」或「LALAPG」）。特定而言，在較佳態樣中，Fc域之各亞單元包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G（Kabat EU索引編號），亦即在Fc域之第一亞單元及第二亞單元中之每一者中，位置234處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換（L234A），位置235處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換（L235A），且位置329處之脯胺酸殘基經甘胺酸殘基置換（P329G）（根據Kabat EU索引編號）。

【0312】在一個此類態樣中，Fc域為IgG₁ Fc域，特定言之人類IgG₁ Fc域。「P329G LALA」胺基酸取代組合幾乎完全消除人類IgG₁ Fc域之Fcγ受體（以及補體）結合，如PCT公開案第WO 2012/130831號中所描述，該案以全文引用之方式併入本文中。WO 2012/130831亦描述製備此類突變Fc域的方法及測定其特性（諸如Fc受體結合或效應功能）的方法。

【0313】相較於IgG₁抗體，IgG₄抗體展現降低之Fc受體結合親和力及降低之效應功能。因此，在一些態樣中，本發明之（多特異性）抗體之Fc域為IgG₄ Fc域，特定言之人類IgG₄ Fc域。在一個態樣中，IgG₄ Fc域包含位置S228處之胺基酸取代，具體而言胺基酸取代S228P（根據Kabat EU索引編號）。為了進一步降低其Fc受體結合親和力及/或其效應功能，在一個態樣中，IgG₄ Fc域包含位置L235處之胺基酸取代，具體而言胺基酸取代L235E（根據Kabat EU索引編號）。在另一態樣中，IgG₄ Fc域包含位置P329處之胺基酸取代，具體而言胺基酸取代P329G（根據Kabat EU索引編號）。在一較佳態樣中，IgG₄ Fc域包含位置S228、L235及P329處之胺基酸取代，具體而言胺基酸取代S228P、L235E及P329G（根據Kabat EU索引編號）。此類IgG₄ Fc域突變體及其Fcγ受體結合特性描述於PCT公開案

第WO 2012/130831號中，該案以全文引用之方式併入本文中。

【0314】 在一較佳態樣中，相較於原生IgG₁ Fc域展現降低之Fc受體結合親和力及/或降低之效應功能的Fc域為包含胺基酸取代L234A、L235A及視情況存在之P329G的人類IgG₁ Fc域或包含胺基酸取代S228P、L235E及視情況存在之P329G的人類IgG₄ Fc域(根據Kabat EU索引編號)。

【0315】 在某些態樣中，已消除Fc域之N-糖基化。在一個此類態樣中，Fc域包含位置N297處之胺基酸突變，特定言之天冬醯胺經丙胺酸(N297A)或天冬胺酸(N297D)置換的胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)。

【0316】 除上文及PCT公開案第WO 2012/130831號中所描述之Fc域以外，具有降低之Fc受體結合及/或效應功能的Fc域亦包括具有Fc域殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者之取代的Fc域(美國專利第6,737,056號)(根據Kabat EU索引編號)。此類Fc突變體包括具有胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或兩者以上之取代的Fc突變體，包括殘基265及297取代為丙胺酸的所謂「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。

【0317】 突變Fc域可使用此項技術中熟知之遺傳學或化學方法藉由胺基酸缺失、取代、插入或修飾來製備。遺傳學方法可包括DNA編碼序列之定點突變誘發、PCR、基因合成及類似方法。恰當的核苷酸變化可藉由例如定序來檢驗。

【0318】 與Fc受體的結合可例如藉由ELISA或藉由表面電漿子共振(SPR)、使用標準儀器(諸如BIAcore儀器(GE Healthcare))容易地測定，且可藉由重組表現來獲得諸如Fc受體。或者，Fc域或包含Fc域之(多特異

性)抗體的Fc受體結合親和力可使用已知表現特定Fc受體之細胞株(諸如表現FcγIIIa受體之人類NK細胞)評估。

【0319】 Fc域或包含Fc域之(多特異性)抗體之效應功能可藉由此項技術中已知之方法量測。用於評定所關注分子之ADCC活性的活體外分析之實例描述於美國專利第5,500,362號；Hellstrom等人Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)及Hellstrom等人, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)；美國專利第5,821,337號；Bruggemann等人, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)中。或者，可採用非放射性分析(參見例如用於流動式細胞測量術之ACTI™非放射性細胞毒性分析(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI))。適用於此類分析之效應細胞包括外周血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，可例如在動物模型中，諸如Clynes等人, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)中所揭示之動物模型中活體內評定所關注分子之ADCC活性。

【0320】 在一些態樣中，Fc域與補體組分(具體而言C1q)的結合減少。因此，在其中Fc域經工程改造而具有降低之效應功能的一些態樣中，該降低之效應功能包括降低之CDC。可進行C1q結合分析以確定Fc域或包含Fc域之(多特異性)抗體是否能夠結合C1q且因此具有CDC活性。參見例如WO 2006/029879及WO 2005/100402中之C1q及C3c結合ELISA。為了評定補體活化，可進行CDC分析(參見例如Gazzano-Santoro等人, J Immunol Methods 202, 163 (1996)；Cragg等人, Blood 101, 1045-1052 (2003)；Cragg及Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004))。

【0321】 亦可使用此項技術中已知之方法(參見例如Petkova, S.B.等

人, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006) ; WO 2013/120929) 進行 FcRn 結合及活體內清除率/半衰期測定。

【0322】

B. 聚核苷酸

本發明進一步提供一種經分離聚核苷酸，其編碼本發明之抗體。該經分離聚核苷酸可為單個聚核苷酸或複數個聚核苷酸。

【0323】 編碼本發明之(多特異性)抗體的聚核苷酸可表現為編碼整個抗體之單個聚核苷酸或共表現之多個(例如兩個或更多個)聚核苷酸。由共表現之聚核苷酸編碼之多肽可經由例如二硫鍵或其他方式結合，以形成功能性抗體。舉例而言，抗體之輕鏈部分可由與包含抗體之重鏈之抗體部分分離的聚核苷酸編碼。當共表現時，重鏈多肽將與輕鏈多肽結合以形成抗體。在另一實例中，包含兩個Fc域亞單元中之一者及視情況存在之一或多個Fab分子(之部分)的抗體部分可由與包含兩個Fc域亞單元中之另一者及視情況存在之Fab分子(之部分)的抗體部分分離的聚核苷酸編碼。共表現時，Fc域亞單元將結合而形成Fc域。

【0324】 在一些態樣中，經分離聚核苷酸編碼如本文所描述的根據本發明之整個抗體分子。在其他態樣中，經分離聚核苷酸編碼如本文中所描述的根據本發明之抗體中所包含之多肽。

【0325】 在某些態樣中，聚核苷酸或核酸為DNA。在其他態樣中，本發明之聚核苷酸為RNA，例如呈信使RNA (mRNA)形式。本發明之RNA可為單股或雙股RNA。

【0326】

C. 重組方法

本發明之抗體可例如藉由固態肽合成(例如梅里菲爾德固相合成(Merrifield solid phase synthesis))或重組產生獲得。為了重組產生，例如如上文所描述之編碼抗體之一或多個聚核苷酸經分離且插入至一或多個載體中以供進一步選殖及/或在宿主細胞中表現。此聚核苷酸可使用習知程序容易地分離及定序。在一個態樣中，提供一種載體，特定言之表現載體，其包含本發明之聚核苷酸(亦即單個聚核苷酸或複數個聚核苷酸)。可使用已為熟習此項技術者所熟知之方法來構築含有抗體之編碼序列以及適當轉錄/轉譯控制信號的表現載體。此等方法包括活體外重組DNA技術、合成技術及活體內重組/基因重組。參見例如 Maniatis 等人，MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)；及 Ausubel 等人，CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989)中所描述之技術。表現載體可為質體、病毒之部分，或可為核酸片段。表現載體包括表現卡匣，編碼抗體之聚核苷酸(亦即編碼區)以與啟動子及/或其他轉錄或轉譯控制元件可操作結合之方式經選殖至該表現卡匣中。如本文所用，「編碼區」為由轉譯成胺基酸之密碼子組成的核酸之一部分。雖然「終止密碼子」(TAG、TGA或TAA)未轉譯成胺基酸，但其可視為編碼區(若存在)之部分，但任何側接序列(例如啟動子、核糖體結合位點、轉錄終止子、內含子、5'及3'非轉譯區及類似序列)不為編碼區之部分。兩個或更多個編碼區可存在於單一聚核苷酸構築體中，例如單一載體上，或單獨的聚核苷酸構築體中，例如單獨(不同)的載體上。此外，任何載體可含有單一編碼區，或可包含兩個或更多個編碼區，例如本發明之載體可編碼一或多個多肽，

其經由蛋白水解裂解而轉譯後或共轉譯分離成最終蛋白質。另外，本發明之載體、聚核苷酸或核酸可編碼與編碼本發明之抗體的聚核苷酸或其變異體或衍生物融合或未融合的異源編碼區。異源編碼區包括(但不限於)專用元件或基元，諸如分泌性信號肽或異源功能域。可操作結合在基因產物(例如多肽)之編碼區與一或多個調控序列相關以使得在調控序列之影響或控制下表現基因產物時進行。若誘導啟動子功能導致編碼所需基因產物之 mRNA 轉錄且若兩個 DNA 片段之間的鍵聯性質不干擾表現調控序列導引基因產物表現的能力或不干擾 DNA 模板轉錄的能力，則兩個 DNA 片段(諸如多肽編碼區及與其相關之啟動子)為「可操作地結合」。因此，若啟動子能夠實現核酸轉錄，則啟動子區與編碼多肽之核酸將可操作地結合。啟動子可為僅導引預定細胞中之 DNA 實質性轉錄的細胞特異性啟動子。除啟動子以外的其他轉錄控制元件(例如強化子、操縱子、抑制子及轉錄終止信號)可與導引細胞特異性轉錄之聚核苷酸可操作地結合。適合之啟動子及其他轉錄控制區揭示於本文中。各種轉錄控制區已為熟習此項技術者所知。此等區域包括(但不限於)在脊椎動物細胞中起作用的轉錄控制區，諸如(但不限於)啟動子及強化子區段，其來自巨細胞病毒(例如即刻早期啟動子，結合內含子-A)、猿猴病毒 40 (例如早期啟動子)及反轉錄病毒(諸如勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus))。其他轉錄控制區包括來源於脊椎動物基因之彼等區域(諸如肌動蛋白、熱休克蛋白、牛生長激素及兔 β -血球蛋白)，以及能夠在真核細胞中控制基因表現之其他序列。額外適合的轉錄控制區包括組織特異性啟動子及強化子以及誘導性啟動子(例如可由四環素誘導之啟動子)。類似地，各種轉譯控制元件已為一般熟習此項技術者所知。此等元件包括(但不限於)核糖體結合位點、轉譯起始及終止密碼

子，以及來源於病毒系統的元件(特定言之，內部核糖體進入位點或IRES，亦稱為CITE序列)。表現卡匣亦可包括其他特徵，諸如複製起點，及/或染色體整合元件，諸如反轉錄病毒長末端重複序列(LTR)，或腺相關病毒(AAV)反向末端重複序列(ITR)。

【0327】 本發明之聚核苷酸及核酸編碼區可與編碼分泌肽或信號肽的額外編碼區結合，從而導引由本發明之聚核苷酸編碼的多肽之分泌。舉例而言，若抗體之分泌為所需的，則編碼信號序列之DNA可置於本發明之抗體或其片段之核酸上游。根據信號假設，哺乳動物細胞所分泌之蛋白質具有信號肽或分泌性前導序列，一旦生長蛋白鏈跨越粗糙內質網之輸出已起始，該信號肽或分泌性前導序列自成熟蛋白質裂解。一般熟習此項技術者認識到，脊椎動物細胞分泌的多肽一般具有與多肽之N端融合的信號肽，該信號肽自所轉譯之多肽裂解而產生呈分泌或「成熟」形式的多肽。在某些態樣中，使用原生信號肽，例如免疫球蛋白重鏈或輕鏈信號肽，或保留導引與其可操作地結合之多肽之分泌的能力的彼序列之功能衍生物。或者，可使用異源哺乳動物信號肽，或其功能衍生物。舉例而言，野生型前導序列可經人類組織纖維蛋白溶酶原活化因子(TPA)或小鼠 β -葡萄糖醛酸酶之前導序列取代。

【0328】 可用以促進稍後純化(例如，組胺酸標籤)或協助標記抗體的編碼短蛋白序列之DNA可包括於編碼抗體(片段)之聚核苷酸內或處於該聚核苷酸末端處。

【0329】 在另一態樣中，提供一種宿主細胞，其包含本發明之聚核苷酸(亦即，單個聚核苷酸或複數個聚核苷酸)。在某些態樣中，提供一種宿主細胞，其包含本發明之載體。聚核苷酸及載體可併有本文分別關於聚

核苷酸及載體所描述之任一特徵(單個或組合)。在一個此類態樣中，宿主細胞包含一或多個載體(例如經載體轉型或轉染)，該一或多個載體包含一或多個編碼本發明之抗體(之部分)的聚核苷酸。如本文所用，術語「宿主細胞」係指可經工程改造以產生本發明之抗體或其片段的任何種類之細胞系統。適合於複製及支援抗體表現的宿主細胞為此項技術中所熟知。此類細胞在適當時可經特定表現載體轉染或轉導，且可生長含有大量載體之細胞以用於接種大型發酵槽，從而獲得足量的抗體用於臨床應用。適合之宿主細胞包括原核微生物，諸如大腸桿菌，或各種真核細胞，諸如中國倉鼠卵巢細胞(CHO)、昆蟲細胞或其類似物。舉例而言，可在細菌中生產多肽，尤其在不需糖基化時。在表現之後，可自可溶性部分之細菌細胞糊狀物分離出多肽且可將該多肽進一步純化。除原核生物以外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為適用於編碼多肽之載體的選殖或表現宿主，包括糖基化路徑已「人類化」，從而使得所產生之多肽具有部分或完全人類糖基化型態的真菌及酵母菌株。參見Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004)，及Li等人, Nat Biotech 24, 210-215 (2006)。適用於表現(糖基化)多肽的宿主細胞亦來源於多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物細胞及昆蟲細胞。已鑑別出眾多可與昆蟲細胞聯合使用，尤其用於轉染草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞之桿狀病毒株。植物細胞培養物亦可用作宿主。參見例如美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(描述用於在轉殖基因植物中產生抗體之PLANTIBODIES™技術)。脊椎動物細胞亦可用作宿主。舉例而言，適於在懸浮液中生長之哺乳動物細胞株可為適用的。適用哺乳動物宿主細胞株之其他實例為經SV40轉型的猴腎

CV1細胞株(COS-7)；人類胚腎細胞株(293或293T細胞，如例如Graham等人, J Gen Virol 36, 59 (1977)中所描述)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠塞特利氏細胞(mouse sertoli cells)(TM4細胞，如例如Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)中所描述)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤細胞(MMT 060562)；TRI細胞(如例如Mather等人, Annals N. Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)中所描述)；MRC 5細胞及FS4細胞。其他適用之哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括dhfr⁻ CHO細胞(Urlaub等人, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如YO、NS0、P3X63及Sp2/0。關於適用於蛋白質產生之某些哺乳動物宿主細胞株之綜述，參見例如Yazaki及Wu, Methods in Molecular Biology, 第248卷(B.K.C. Lo編, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268頁 (2003)。宿主細胞包括經培養細胞，例如經培養之哺乳動物細胞、酵母細胞、昆蟲細胞、細菌細胞及植物細胞(僅舉數例)，且亦包括轉殖基因動物、轉殖基因植物或經培養之植物或動物組織中所包含的細胞。在一個態樣中，宿主細胞為真核細胞，特定言之哺乳動物細胞，諸如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、人類胚腎(HEK)細胞或淋巴細胞(例如YO、NS0、Sp20細胞)。在一個態樣中，宿主細胞不為人體內之細胞。

【0330】 在此等系統中表現外源基因之標準技術為此項技術中已知的。表現包含抗原結合域之重鏈或輕鏈之多肽(諸如抗體)的細胞可經工程改造以便亦表現抗體鏈中之另一者，使得所表現產物為具有重鏈及輕鏈兩者的抗體。

【0331】 在一個態樣中，提供一種產生根據本發明之抗體的方法，其中該方法包含在適合於表現抗體之條件下培養包含如本文所提供之編碼抗體之聚核苷酸的宿主細胞，及視情況自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收抗體。

【0332】 本發明之(多特異性)抗體之組分可在基因上彼此融合。(多特異性)抗體可經設計使得其組分直接彼此融合或經由連接子序列間接融合。連接子之組成及長度可根據此項技術中熟知之方法確定且可測試其功效。本文提供(多特異性)抗體之不同組分之間的連接子序列之實例。亦可包括額外序列以併有裂解位點，從而視需要分離融合體之個別組分，該等額外序列例如肽鏈內切酶識別序列。

【0333】 如本文所描述製備的抗體可藉由此項技術中已知的技術(諸如高效液相層析、離子交換層析、凝膠電泳、親和力層析、尺寸排阻層析及其類似者)純化。用於純化特定蛋白質的實際條件將部分地視諸如淨電荷、疏水性、親水性等因素而定，且對於熟習此項技術者而言將為顯而易見的。對於親和力層析純化，可使用抗原所結合之抗體、配體、受體或抗原。舉例而言，關於本發明之抗體之親和力層析純化，可使用具有蛋白質A或蛋白質G之基質。可使用序列蛋白A或G親和力層析及尺寸排阻層析來分離基本上如實例中所描述之抗體。抗體之純度可藉由各種熟知分析方法中之任一者來測定，該等方法包括凝膠電泳、高壓液相層析及其類似者。

【0334】

D. 分析

可藉由此項技術中已知之各種分析，針對其物理/化學特性及/或生物活性鑑別、篩選或表徵本文所提供之抗體。

【0335】

1. 結合分析

抗體對Fc受體或目標抗原之結合(親和力)可例如藉由表面電漿子共振 (SPR)使用諸如BIAcore儀器(GE Healthcare)之標準儀器測定，且受體或目標蛋白諸如可藉由重組表現獲得。或者，抗體對不同受體或目標抗原之結合可使用表現特定受體或目標抗原之細胞株，例如藉由流動式細胞測量術(FACS)來評估。用於量測CD3結合活性之特定說明性及例示性態樣描述於下文中。

【0336】 在一個態樣中，藉由SPR來如下測定CD3結合活性：

在Biacore T200儀器(GE Healthcare)上進行SPR。使用標準胺偶合化學方法將抗Fab捕捉抗體(GE Healthcare，#28958325)以4000至6000共振單位(RU)之表面密度固定在S系列感測器晶片CM5 (GE Healthcare)上。使用HBS-P+ (10 mM HEPES，150 mM NaCl pH 7.4，0.05%界面活性劑P20)作為運行及稀釋緩衝液。將濃度為2 µg/ml之CD3抗體(於20 mM His中，140 mM NaCl，pH 6.0)以5 µl/min之流速注射約60 s。使用之CD3抗原為CD3δ及CD3ε胞外域與具有臼包杵修飾及C端Avi-標籤之人類Fc域融合的異二聚體(參見SEQ ID NO 28及29)。以10 µg/ml之濃度注射CD3抗原120 s，且在5 µl/min之流速下監測解離約120 s。藉由連續注射10 mM甘胺酸(pH 2.1)兩次，各約60 s而使晶片表面再生。藉由減去空白注射劑及藉由減去自空白對照流細胞獲得之反應來校正整體折射率差異。為了評估，取注射結束之後5秒之結合反應。為了標準化結合信號，將CD3結合除以抗Fab反應(在捕捉固定化抗Fab抗體上之CD3抗體後獲得信號(RU))。相對於抗體在某一處理之後的CD3結合活性，抗體在不同處理

之後的CD3結合活性(亦稱作相對活性濃度(RAC))係藉由對照抗體樣本在某一處理之後的結合活性與抗體之對應樣本在不同處理之後的結合活性來計算。

【0337】

2. 活性分析

本發明之(多特異性)抗體之生物活性可藉由如實例中所描述之各種分析來量測。生物活性可例如包括誘導T細胞增殖、誘導T細胞中之信號傳導、誘導T細胞中之活化標記物的表現、誘導T細胞分泌細胞介素、誘導目標細胞(諸如腫瘤細胞)溶解及誘導腫瘤消退及/或改善存活率。

【0338】

E. 組合物、調配物及投與途徑

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含本文所提供之任何抗體，其用於例如以下治療方法中之任一者中。在一個態樣中，醫藥組合物包含根據本發明之抗體及醫藥學上可接受之載劑。在另一態樣中，醫藥組合物包含根據本發明之抗體及至少一種例如下文所描述之額外治療劑。

【0339】 進一步提供一種產生呈適於活體內投與之形式的本發明之抗體的方法，該方法包含：(a)獲得根據本發明之抗體，及(b)調配抗體與至少一種醫藥學上可接受之載劑，由此調配用於活體內投與之抗體製劑。

【0340】 本發明之醫藥組合物包含有效量之溶解或分散於醫藥學上可接受之載劑的抗體。片語「醫藥學上可接受」係指分子實體及組合物在所用劑量及濃度下對於接受者而言一般為無毒性的，亦即當適當時投與至動物(諸如人類)時，不會產生有害的過敏反應或其他不良反應。含有抗體

及視情況存在之額外活性成分的醫藥組合物之製備為熟習此項技術者根據本發明將已知的，如藉由以引用之方式併入本文中的 **Remington's Pharmaceutical Sciences**, 第18版 Mack印刷公司, 1990所例示。此外，關於動物(例如人類)投與，應理解，製劑應滿足FDA生物學標準局(FDA Office of Biological Standards)或其他國家之對應機關所要求的無菌性、發熱性、總體安全及純度標準。較佳組合物為凍乾調配物或水溶液。如本文所用，「醫藥學上可接受之載劑」包括一般熟習此項技術者將已知的任何及所有溶劑、緩衝劑、分散介質、包衣、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗細菌劑、抗真菌劑)、等張劑、吸收延遲劑、鹽、防腐劑、抗氧化劑、蛋白質、藥物、藥物穩定劑、聚合物、凝膠、黏合劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、調味劑、染料、此類類似物質及其組合(參見例如以引用之方式併入本文中的 **Remington's Pharmaceutical Sciences**, 第18版 Mack印刷公司, 1990, 第1289-1329頁)。除非任何習知載劑與活性成分不相容，否則考慮將其用於醫藥組合物中。

【0341】 本發明之抗體(及任何額外治療劑)可藉由任何合適方式投與，該等方式包括非經腸、肺內及鼻內投與，且視需要針對局部治療，包括病灶內投與。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投與。部分視投與之短期或長期性而定，可藉由任何適合途徑(例如藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射)給藥。

【0342】 非經腸組合物包括彼等為藉由注射(例如皮下、皮內、病灶內、靜脈內、動脈內、肌肉內、鞘內或腹膜內注射)投藥所設計的組合物。為了注射，本發明之抗體可在水溶液中，特定言之在生理學上相容之緩衝液(諸如漢克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's

solution)或生理鹽水緩衝液)中調配。溶液可含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。或者，抗體可呈粉末形式，可在使用之前使用適合媒劑(例如無菌無熱原質水)復原。無菌可注射溶液係由所需量本發明抗體併入視需要具有下文所列舉各種其他成分的適當溶劑中來製備。無菌性很容易例如：藉由經過無菌過濾膜過濾地完成。一般而言，分散液係由各種不同滅菌活性成分併入含有基本分散介質及/或其他成分的無菌媒劑中來製備。在用於製備無菌可注射溶液、懸浮液或乳液之無菌粉末情況下，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥技術，其得到活性成分加上來自預先無菌過濾之液體介質的任何額外所需成分的粉末。必要時，液體介質應經過適當緩衝，且在使用足量鹽水或葡萄糖注射之前，首先使液體稀釋劑呈等張性。該組合物必須在製造及儲存條件下穩定，且避免諸如細菌及真菌之微生物的污染作用。應瞭解，內毒素污染應最低限度地保持在安全水準，例如低於0.5 ng/mg蛋白質。適合的醫藥學上可接受之載劑包括(但不限於)：緩衝液，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苯甲基銨；氯化六羥季銨(hexamethonium chloride)；氯化苯甲銨(benzalkonium chloride)；氯化苯索銨(benzethonium chloride)；苯酚、丁醇或苯甲醇；對羥基苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山

梨糖醇；形成鹽之抗衡離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子性界面活性劑，諸如聚乙二醇(PEG)。水性注射懸浮液可含有增加懸浮液黏度之化合物，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇、葡聚糖或其類似物。視情況，懸浮液亦可含有適合穩定劑或增加化合物溶解性以允許製備高度濃溶液之藥劑。另外，活性化合物之懸浮液可製備為適當之油性注射懸浮液。適合親脂性溶劑或媒劑包括脂肪油，諸如芝麻油；或合成脂肪酸酯，諸如油酸乙酯或三酸甘油酯；或脂質體。

【0343】 活性成分可截留於微膠囊中，例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合所製備之微膠囊，例如分別為羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊；截留於膠態藥物遞送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)中或巨乳液中。此類技術揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版, Mack印刷公司, 1990)中。可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有多肽之固體疏水性聚合物之半滲透基質，該等基質呈成形製品形式，例如膜或微膠囊。在特定態樣中，可注射組合物之延長吸收可藉由在組合物中使用延遲吸收劑(諸如單硬脂酸鋁、明膠或其組合)來實現。

【0344】 除先前描述之組合物以外，抗體亦可調配為儲槽式製劑。此類長效調配物可藉由植入(例如皮下或肌肉內植入)或藉由肌肉內注射來投與。因此，舉例而言，抗體可用適合聚合材料或疏水性材料(例如於可接受之油中的乳液)或離子交換樹脂調配，或調配為微溶性衍生物,例如微溶性鹽。

【0345】 包含本發明之抗體的醫藥組合物可藉助於習知混合、溶解、乳化、囊封、包覆或凍乾製程製造。醫藥組合物可使用一或多種有助

於將蛋白質處理成可在醫藥學上使用之製劑的生理學上可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑或助劑而以習知方式調配。適當之調配物視所選投與途徑而定。

【0346】 抗體可調配成游離酸或鹼、中性或鹽形式之組合物。醫藥學上可接受之鹽為實質上保持游離酸或鹼之生物活性的鹽。此等鹽包括酸加成鹽，例如與蛋白質組合物之游離胺基形成的鹽，或與無機酸(諸如鹽酸或磷酸)或有機酸(諸如乙酸、草酸、酒石酸或杏仁酸)形成的鹽。與游離羧基形成之鹽亦可衍生自無機鹼，諸如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣或氫氧化鐵；或有機鹼，諸如異丙胺、三甲胺、組胺酸或普魯卡因(procaine)。相較於對應的游離鹼形式，醫藥鹽傾向於更可溶於水性及其他質子溶劑中。

【0347】

F. 治療方法及組合物

本文所提供之任何抗體可用於治療方法中。本發明之抗體可用作免疫治療劑，例如治療癌症的免疫治療劑。

【0348】 為了用於治療方法中，本發明之抗體將以符合良好醫學實踐的方式調配、給藥及投與。在此情形下考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病況、病症起因、藥劑遞送位點、投與方法、投與時程及醫學從業者已知之其他因素。

【0349】 在一個態樣中，提供本發明之抗體用作藥物。在其他態樣中，提供用於治療疾病之本發明之抗體。在某些態樣中，提供用於治療方法中的本發明之抗體。在一個態樣中，本發明提供一種用於治療有需要之個體之疾病的本發明之抗體。在某些態樣中，本發明提供一種用於治療患

有疾病之個體的方法中之抗體，該方法包含向個體投與有效量之抗體。在某些態樣中，待治療之疾病為增生性病徵。在一較佳態樣中，疾病為癌症。在某些態樣中，若待治療之疾病為癌症，則該方法進一步包含向個體投與有效量之至少一種額外治療劑，例如抗癌劑。在其他態樣中，本發明提供一種用於誘導目標細胞(特定言之腫瘤細胞)之溶解的本發明之抗體。在某些態樣中，本發明提供一種用於誘導個體中之目標細胞(特定言之腫瘤細胞)溶解之方法的本發明之抗體，該方法包含向個體投與有效量之抗體以誘導目標細胞溶解。根據以上態樣中之任一者的「個體」為哺乳動物，較佳地人類。

【0350】 在另一態樣中，本發明提供本發明之抗體用於製造或製備藥物之用途。在一個態樣中，藥物用於治療有需要之個體之疾病。在另一態樣中，藥物用於治療疾病之方法中，該方法包含向患有疾病之個體投與有效量之藥物。在某些態樣中，待治療之疾病為增生性病徵。在一較佳態樣中，疾病為癌症。在一個態樣中，若待治療之疾病為癌症，則該方法進一步包含向個體投與有效量之至少一種額外治療劑，例如抗癌劑。在另一態樣中，藥物係用於誘導目標細胞(特定言之，腫瘤細胞)溶解。在又一態樣中，藥劑係用於在個體中誘導目標細胞(特定言之，腫瘤細胞)溶解的方法中，該方法包含向個體投與有效量之藥物以誘導目標細胞溶解。根據以上態樣中之任一者的「個體」可為哺乳動物，較佳地人類。

【0351】 在另一態樣中，本發明提供一種用於治療疾病之方法。在一個態樣中，該方法包含向患有此類疾病之個體投與有效量之本發明之抗體。在一個態樣中，向該個體投與組合物，該組合物包含呈醫藥學上可接受之形式的本發明之抗體。在某些態樣中，待治療之疾病為增生性病徵。

在一較佳態樣中，疾病為癌症。在某些態樣中，若待治療之疾病為癌症，則該方法進一步包含向個體投與有效量之至少一種額外治療劑，例如抗癌劑。根據以上態樣中之任一者的「個體」可為哺乳動物，較佳地人類。

【0352】 在另一態樣中，本發明提供一種用於誘導目標細胞(特定言之腫瘤細胞)溶解之方法。在一個態樣中，該方法包含使目標細胞與本發明之抗體在T細胞(特定言之細胞毒性T細胞)存在下接觸。在另一態樣中，提供一種用於在個體中誘導目標細胞(特定言之，腫瘤細胞)溶解的方法。在一個此類態樣中，該方法包含向個體投與有效量之本發明之抗體以誘導目標細胞溶解。在一個態樣中，「個體」為人類。

【0353】 在某些態樣中，待治療之疾病為增生性病變，特定言之癌症。癌症之非限制性實例包括膀胱癌、腦癌、頭頸癌、胰臟癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、子宮癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、食道癌、結腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、胃癌、前列腺癌、血癌、皮膚癌、鱗狀細胞癌、骨癌及腎癌。可使用本發明之抗體治療的其他細胞增生性病變包括(但不限於)位於以下中之贅瘤：腹部、骨骼、乳房、消化系統、肝臟、胰臟、腹膜、內分泌腺(腎上腺、副甲狀腺、垂體、睪丸、卵巢、胸腺、甲狀腺)、眼、頭頸部、神經系統(中樞及周邊)、淋巴系統、骨盆、皮膚、軟組織、脾臟、胸部區域及泌尿生殖系統。亦包括癌前病況或病變及癌症轉移。在某些態樣中，癌症係選自以下組成之群：腎癌、膀胱癌、皮膚癌、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、腦癌、頭頸癌及前列腺癌。在一個態樣中，詳言之在其中抗體為結合作為第二抗原之TYRP-1之多特異性抗體的態樣中，癌症為表現TYRP-1之癌症。在一個態樣中，詳言之在其中抗體為結合作為第二抗原之TYRP-1之多特異性抗體的態樣中，癌症為皮膚癌，詳言之黑素瘤。在

一個態樣中，詳言之在其中抗體為結合作為第二抗原之EGFRvIII之多特異性抗體的態樣中，癌症為表現EGFRvIII之癌症。在一個態樣中，詳言之在其中抗體為結合作為第二抗原之EGFRvIII之多特異性抗體的態樣中，癌症為腦癌，詳言之神經膠母細胞瘤。熟習此項技術者容易認識到，在許多情況下，抗體可能不會提供治癒，而僅僅可能提供部分益處。在一些態樣中，具有一些益處之生理變化亦視為治療上有益的。因此，在一些態樣中，提供生理學變化之抗體之量視為「有效量」。需要治療之個體(subject/individual)或患者通常為哺乳動物，更具體而言為人類。

【0354】 在一些態樣中，向個體投與有效量之本發明之抗體以治療疾病。

【0355】 為了預防或治療疾病，本發明之抗體(當單獨或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)之適當劑量將視以下而定：待治療之疾病類型、投與途徑、患者體重、抗體類型、疾病嚴重程度及病程、抗體係為了預防目的抑或治療目的而投與、先前或同時之治療干預、患者之臨床病史及對抗體之反應以及主治醫師之判斷。負責投與的從業者將在任何情況下確定組合物中活性成分之濃度及適用於個別個體的劑量。本文中涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投與或經各個時間點多次投與、藥團投與及脈衝式輸注。

【0356】 一次性或歷經一系列治療向患者適當地投與抗體。視疾病的類型及嚴重程度而定，約1 µg/kg至15 mg/kg (例如0.1 mg/kg至10 mg/kg)抗體可為向患者投與的初始候選劑量，不論例如藉由一或多次分開投與抑或藉由連續輸注。視上文所提及之因素而定，一個典型的日劑量可在約1 µg/kg至100 mg/kg之範圍內或大於100 mg/kg。對於歷經數日或更

長時間之重複投與，治療一般將視病況而定持續至發生對疾病症狀之所需抑制為止。抗體之一個示例性劑量將在約0.005 mg/kg至約10 mg/kg範圍內。在其他非限制性實例中，每次投與時的劑量亦可包含每公斤體重約1微克、每公斤體重約5微克、每公斤體重約10微克、每公斤體重約50微克、每公斤體重約100微克、每公斤體重約200微克、每公斤體重約350微克、每公斤體重約500微克、每公斤體重約1毫克、每公斤體重約5毫克、每公斤體重約10毫克、每公斤體重約50毫克、每公斤體重約100毫克、每公斤體重約200毫克、每公斤體重約350毫克、每公斤體重約500毫克至每公斤體重約1000毫克或1000毫克以上，及可自其中推導的任何範圍。在本文所列數字之可推導範圍之非限制性實例中，基於上文所描述之數字，可投與的範圍為每公斤體重約5 mg至約每公斤體重約100 mg、每公斤體重約5微克至約每公斤體重約500毫克等。因此，可向患者投與約0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、5.0 mg/kg或10 mg/kg (或其任何組合)之一或多種劑量。此類劑量可間歇地投與，例如每週或每三週(例如以使得患者接受約二至約二十或例如約六劑抗體)。可投與初始較高起始劑量，接著可投與一或多種較低劑量。然而，其他劑量方案可為適用的。此療法之進展易於藉由習知技術及分析來監測。

【0357】 本發明之抗體一般將以有效達成預期目的之量使用。為用於治療或預防疾病病況，本發明之抗體或其醫藥組合物以有效量投與或施加。

【0358】 針對全身性投與，可首先根據活體外分析(諸如細胞培養分析)估計有效劑量。隨後可在動物模型中調配劑量以實現循環濃度範圍，包括如在細胞培養物中測定的IC₅₀。此類資訊可用於更準確地確定適用於

人類之劑量。

【0359】 亦可使用此項技術中熟知的技術根據活體內資料(例如動物模型)估計初始劑量。

【0360】 劑量及時間間隔可個別地調整以提供足以維持治療作用之抗體的血漿含量。常見的患者注射投與劑量在約0.1至50毫克/公斤/天，通常約0.5至1毫克/公斤/天之範圍內。治療有效血漿含量可藉由每天投與多次劑量來實現。血漿含量可例如藉由HPLC來量測。

【0361】 本發明之抗體的有效劑量一般將提供治療益處而不引起實質毒性。抗體之毒性及治療功效可在細胞培養物或實驗動物中藉由標準醫藥程序來確定。可使用細胞培養分析及動物研究來測定LD₅₀ (50%群體致死劑量)及ED₅₀ (50%群體治療有效劑量)。毒性作用與治療作用之間的劑量比為治療指數，其可表述為比率LD₅₀/ED₅₀。展現大治療指數之抗體較佳。在一個態樣中，根據本發明之抗體展現高治療指數。自細胞培養分析及動物研究獲得之資料可用於調配適用於人類的劑量範圍。劑量較佳在循環濃度範圍內，其包括毒性極小或無毒性的ED₅₀。劑量可視各種因素而在此範圍內變化，該等因素例如所用劑型、所用投與途徑、個體之狀況及其類似因素。可由個別醫師根據患者狀況選擇確切調配物、投與途徑及劑量(參見例如Fingl等人, 1975, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第1章, 第1頁, 其以全文引用之方式併入本文中)。

【0362】 用本發明之抗體治療之患者的主治醫師將知曉如何及何時因毒性、器官功能異常及其類似因素而終止、中斷或調整投與。相反，主治醫師亦將知曉在臨床反應不足(排除毒性)時將治療調整至較高水準。管理所關注病症時所投與之劑量的量值將隨待治療之病況的嚴重程、投與途

徑及其類似因素而變化。病況之嚴重程度可例如部分地藉由標準預後評估方法來加以評估。此外，劑量及可能的給藥頻率亦將根據個別患者之年齡、體重及反應而變化。

【0363】 本發明之抗體可與療法中之一或多種其他藥劑組合投與。舉例而言，本發明之抗體可與至少一種額外治療劑共投與。術語「治療劑」涵蓋投與以治療需要此類治療之個體之症狀或疾病的任何藥劑。此類額外治療劑可包含適合於治療特定疾病的任何活性成分，較佳為具有互補活性、彼此間無不利影響的彼等活性成分。在某些態樣中，額外治療劑為免疫調節劑、細胞生長抑制劑、細胞黏附抑制劑、細胞毒性劑、細胞凋亡活化劑或提高細胞對細胞凋亡誘導劑之敏感度的藥劑。在一較佳態樣中，額外治療劑為抗癌劑，例如微管瓦解劑、抗代謝物、拓撲異構酶抑制劑、DNA嵌入劑、烷化劑、激素療法、激酶抑制劑、受體拮抗劑、腫瘤細胞凋亡活化劑或抗血管生成劑。

【0364】 此類其他藥劑宜以有效用於預期目的之量組合存在。此類其他藥劑之有效量視所用抗體之量、病症或治療之類型及上文所論述之其他因素而定。該等抗體一般係以相同劑量且以如本文所描述之投與途徑，或本文所描述之約1至99%之劑量，或以憑經驗/臨床上確定適當之任何劑量及任何途徑使用。

【0365】 上文提及之此類組合療法涵蓋組合投與(其中相同或獨立組合物中包括兩種或更多種治療劑)以及分開投與，在此情況下，本發明之抗體的投與可在額外治療劑及/或佐劑投與之前、同時及/或之後進行。本發明之抗體亦可與放射線療法組合使用。

【0366】

G. 製品

在本發明之另一態樣中，提供一種含有適用於治療、預防及/或診斷上文所描述之病症的物質的製品。製品可包含容器及在容器上或容器隨附之標籤或藥品說明書。適合容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可由多種材料(諸如玻璃或塑膠)形成。容器容納某一組合物本身或某一組合物與可有效治療、預防及/或診斷病況之另一組合物之組合，且可具有無菌接取口(例如容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一種活性劑為本發明之抗體。標籤或藥品說明書指示組合物用於治療所選病況。此外，製品可包含(a)其中含有組合物之第一容器，其中該組合物包含本發明之抗體；及(b)其中含有組合物之第二容器，其中該組合物包含另一種細胞毒性劑或其他治療劑。本發明之此態樣中之製品可進一步包含指示組合物可用於治療特定病況之藥品說明書。或者或另外，該製品可進一步包含第二(或第三)容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝劑，諸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。其可進一步包括就商業及使用者觀點而言所需之其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭及注射器。

【0367】

H. 用於診斷及偵測之方法及組合物

在某些態樣中，本文所提供之任何抗體適用於偵測其目標(例如CD3、TYRP-1、EGFRvIII)在生物樣本中之存在。如本文所使用，術語「偵測」涵蓋定量或定性偵測。在某些態樣中，生物樣本包含細胞或組織，諸如前列腺組織。

【0368】 在一個態樣中，提供一種用於診斷或偵測之方法中的根據本發明之抗體。在另一態樣中，提供一種偵測CD3、TYRP-1或EGFRvIII在生物樣本中之存在的方法。在某些態樣中，該方法包含使生物樣本與本發明之抗體在允許抗體與CD3、TYRP-1或EGFRvIII結合之條件下接觸，及偵測抗體與CD3、TYRP-1或EGFRvIII之間是否形成複合物。此方法可為活體外或活體內方法。在一個態樣中，本發明之抗體用於選擇符合使用結合CD3、TYRP-1及/或EGFRvIII之抗體的療法之條件的個體，例如其中CD3、TYRP-1及/或EGFRvIII為選擇患者之生物標記。

【0369】 可使用本發明之抗體來診斷的例示性病症包括癌症，特定言之皮膚癌或腦癌。

【0370】 在某些態樣中，提供根據本發明之抗體，其中抗體經標記。標記包括(但不限於)直接偵測之標記或部分(諸如螢光、色基、電子緻密、化學發光及放射性標記)，以及例如經由酶促反應或分子相互作用間接偵測之部分，諸如酶或配體。例示性標記包括(但不限於)放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H及¹³¹I；螢光團，諸如稀土螯合物或螢光素及其衍生物；若丹明及其衍生物；丹醯基；繖酮；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(美國專利第4,737,456號)；螢光素；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化酶(HRP)；鹼性磷酸酶；β-半乳糖苷酶；葡萄糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸去氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，其與採用過氧化氫氧化染料前驅體之酶(諸如HRP、乳過氧化酶或微過氧化酶)偶合；生物素/抗生物素蛋白；自旋標記；噬菌體標記；穩定自由基及其類似標記。

【0371】

III.序列

	胺基酸序列	SEQ ID NO
CD3 _{orig} HCDR1	TYAMN	1
CD3 _{opt} HCDR1	SYAMN	2
CD3 _{orig} / CD3 _{opt} HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	3
CD3 _{orig} HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY	4
CD3 _{opt} HCDR3	HTTFPSSYVSYYGY	5
CD3 _{orig} VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQA PGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS	6
CD3 _{opt} VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFSSYAMNWVRQA PGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTFPSSYVSYYGYWGQGTL VTVSS	7
CD3 _{orig} / CD3 _{opt} LCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	8
CD3 _{orig} / CD3 _{opt} LCDR2	GTNKRAP	9
CD3 _{orig} / CD3 _{opt} LCDR3	ALWYSNLWV	10
CD3 _{orig} / CD3 _{opt} VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	11
CD3 _{orig} IgG HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQA PGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNHYTQKS LSLSP	12
CD3 _{opt} IgG HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFSSYAMNWVRQA PGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTFPSSYVSYYGYWGQGTL	13

	VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSP	
CD3 _{orig} / CD3 _{opt} IgG LC	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	14
TYRP1 HCDR1	DYFLH	15
TYRP1 HCDR2	WINPDNGNTVYAQKFQG	16
TYRP1 HCDR3	RDYTYEKAALDY	17
TYRP1 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYFLHWVRQ APGQGLEWMGWINPDNGNTVYAQKFQGRVTMTADTSTST VYMELSSLRSEDATVYYCTRRDYTYEKAALDYWGQGT LVTVSS	18
TYRP1 LCDR1	RASGNIYNYLA	19
TYRP1 LCDR2	DAKTLAD	20
TYRP1 LCDR3	QHFWSLPFT	21
TYRP1 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIYNYLAWYQQKPG KVPKLLIYDAKTLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDV ATYYCQHFWSLPFTFGQGGTKLEIK	22
TYRP1 VH- CH1(EE) - CD3 _{orig} /CD3 _o pt VL-CH1 - Fc (杵 , PGLALA)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYFLHWVRQ APGQGLEWMGWINPDNGNTVYAQKFQGRVTMTADTSTST VYMELSSLRSEDATVYYCTRRDYTYEKAALDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQ EPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEY YCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	23

TYRPI VH-CH1(EE) -Fc (臼 , PGLALA)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYFLHWVRQAPGQGLEWMGWINPDNGNTVYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCTRRDYTYEKAALDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSP	24
TYRPI VL-CL(RK)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASGNIYNYLAWYQQKPGKVPKLLIYDAKTLADGVPSRFGSGSGGTDFLTITSLQPEDVATYYCQHFWSLPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	25
CD3 _{orig} VH-CL	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	26
CD3 _{opt} VH-CL	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFQFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTFPSSYVSYYGYWGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	27
人類CD3 ε 莖-Fc (杵) - Avi	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVSENCVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE	28
人類 CD3 δ 莖- Fc (臼) - Avi	FKIPIEELEDRVFN CNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCRSEQLYFQGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE	29
食蟹獼猴 CD3 ε 莖- Fc (杵) - Avi	QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCQHLGSEAQWQHNGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHHLYLKARVSENCVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN	30

	WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE	
食蟹獼猴 CD3 δ 莖- Fc (臼) - Avi	FKIPVEELEDRLFVKCNTSVTWVEGTVGTLTNTRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKEAVQVHYRMSQNCVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE	31
人類 TYRP1 ECD - Fc (杵) - Avi	QFPRQCATVEALRSGMCCPDLSVSGPGTDRCGSSSGRGRC EAVTADSRPHSPQYPHDGRDDREVWPLRFFNRTCHCNGNFSGHNCGTCRPGWRGAACDQRVLVRRNLLDLSKEEKNHFVRALDMAKRTTHPLFVIATRSEEILGPDGNTQPENISINYFVWTHYYSVKKTFLGVGQESFGEVDFSHEGPAFLTWHRYHL LRLEKDMQEMLQEPSFSLPYWNFATGKNVCDICTDDL MGSRSNFDSTLISPNSVFSQWRVVCDSLEDYDTLGTLCNSTEDGPIRRNPAGNVARPMVQRLPEPQDVAQCLEVGFLDTPPFYSNSTNSFRNTVEGYSDPTGKYDPAVRSLHNL AHLFLNGTGGQT HLSPNDPIFVLLHTFTDAVFDEWLRRYNADISTFPLENAPIG HNRQYNMVPFWPPVTNTEMFVTAPDNLGYTYEIQWPSREFSVPEGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE	32
食蟹獼猴 TYRP1 ECD - Fc (杵) - Avi	QFPRECATVEALRSGMCCPDLSMSGPGTDRCGSSSGRGRC EAVTADSRPHSPRYPHDGRDDREVWPLRFFNRTCHCNGNFSGHNCGTCRPGWRGAACDQRVLVRRNLLDLSKEEKNHFVRALDMAKRTTHPLFVIATRSEEILGPDGNTQPENISINYFVWTHYYSVKKTFLGAGQESFGEVDFSHEGPAFLTWHRYHL LRLEKDMQEMLQEPSFSLPYWNFATGKNVCDICTDDL MGSRSNFDSTLISPNSVFSQWRVVCDSLEDYDTLGTLCNSTESGP IRRNPAGNVARPMVQRLPEPQDVAQCLEVGFLDTPPFYSNSTNSFRNTVEGYSDPTGKYDPAVRSLHNL AHLFLNGTGGQT HLSPNDPIFVLLHTFTDAVFDEWLRRYNADISTFPLENAPIG HNRQYNMVPFWPPVTNTEMFVTAPDNLGYTYEVQWPSREFSVPGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE	33
小鼠 TYRP1	QFPRECANIEALRRGVCCPDLLPSSGPGTDPCGSSSGRGRCV	34

ECD - Fc (杵) - Avi	AVIADSRPHSRHYPHDGGKDDREAWPLRFFNRTCQCNDNFS GHNCGTCRPGWRGAACNQKILTVRRNLLDLSPEEKSHFVR ALDMAKRTTHPQFVIATRRLLEDILGPDGNTQPQFENISVYNYF VWTHYYSVKKTFLGTGQESFGDVDFSHEGPAFLTWHRYHL LQLERDMQEMLQEPSFSLPYWNFATGKNVCDVCTDDLMG SRSNFDSTLISPNSVFSQWRVVCESSLEEYDTLGTLCNSTEGG PIRRNPAGNVGRPAPVQRLPEPQDVTQCLEVRVFDTPPFYSNS TDSFRNTVEGYSAPTGKYDPAVRSLHNLHLFLNGTGGQT HLSPNDPIFVLLHTFTDAVFDEWLRRYNADISTFPLENAPIG HNRQYNMVPFWPPVTNTEMFVTAPDNLGYAYEVQWPGQE FTVSEGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVHLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIF EAQKIEWHE	
Fc (臼)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHRTQKSLSLSP	35
EGFRvIII ECD - Avi - His	LEEKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCE GPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILP VAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRT DLHAFENLEIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCK ATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCN LLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQ CAHYIDGPHCVKTCVAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCH PNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSVDDGGSPPTPGGSGSL NDIFEAQKIEWHEARAHHHHHH	36
EGFRvIII P056.021 HCDR1	SYWIA	37
EGFRvIII P056.021 HCDR2	VIHPYDS DTRYSPSFQG	38
EGFRvIII P056.021 HCDR3	VSRSSYAFDY	39
EGFRvIII P056.021 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFDSYWIAWVRQM PGKGLEWMGVVIHPYDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYAFDYWGQGTLVTVSS	40
EGFRvIII P056.021 LCDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA	41
EGFRvIII P056.021 LCDR2	WASTRES	42

EGFRvIII P056.021 LCDR3	QQVHSGPPVT	43
EGFRvIII P056.021 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTSS LQAEDVAVYYCQQVHSGPPVTFGQGTKVEIK	44
EGFRvIII P056.052 HCDR1	NYWIG	45
EGFRvIII P056.052 HCDR2	TIYPGDSDRRYSPSFQG	46
EGFRvIII P056.052 HCDR3	VSRSSYAFDY	47
EGFRvIII P056.052 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFMNYWIGWVRQ MPGKGLEWMGTIYPGDSDRRYSPSFQGGQVTLADKSISTAY LQWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYAFDYWGQGTLLTVSS	48
EGFRvIII P056.052 LCDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA	49
EGFRvIII P056.052 LCDR2	WASTRES	50
EGFRvIII P056.052 LCDR3	QQVHSGPPVT	51
EGFRvIII P056.052 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTSS LQAEDVAVYYCQQVHSGPPVTFGQGTKVEIK	52
EGFRvIII P047.019 HCDR1	SIWIH	53
EGFRvIII P047.019 HCDR2	TIYPGDSDTRYSPSFQG	54
EGFRvIII P047.019 HCDR3	TGPGLAFDY	55
EGFRvIII P047.019 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFPSIWIHWVRQMP GKGLEWMGTIYPGDSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARTGPGLAFDYWGQGTLLTVSS	56
EGFRvIII P047.019 LCDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA	57
EGFRvIII P047.019 LCDR2	WASTRES	58
EGFRvIII P047.019 LCDR3	QQSYSTPIT	59

EGFRvIII P047.019 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTSS LQAEDVAVYYCQQSYSTPITFGQGTKVEIK	60
EGFRvIII P057.012 HCDR1	NYWIA	61
EGFRvIII P057.012 HCDR2	IIYPDDSDTRYSPSFQG	62
EGFRvIII P057.012 HCDR3	ATNIASGGYFDY	63
EGFRvIII P057.012 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFANYWIAWVRQM PGKGLEWMGIIYPDDSDTRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYICARATNIASGGYFDYWGQGTLVTVSS	64
EGFRvIII P057.012 LCDR1	KSSQSVLWNSNNKNYLA	65
EGFRvIII P057.012 LCDR2	WASKRES	66
EGFRvIII P057.012 LCDR3	QQSYSAPIT	67
EGFRvIII P057.012 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLWNSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASKRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTSS LQAEDVAVYYCQQSYSAPITFGQGTKVEIK	68
EGFRvIII P057.011 HCDR1	RRWIA	69
EGFRvIII P057.011 HCDR2	IIYPGDS TRYSPSFQG	70
EGFRvIII P057.011 HCDR3	ATNIASGGYFDY	71
EGFRvIII P057.011 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFGRRWIAWVRQM PGKGLEWMGIIYPGDS TRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYICARATNIASGGYFDYWGQGTLVTVSS	72
EGFRvIII P057.011 LCDR1	KSSQSVLWNSNNKNYLA	73
EGFRvIII P057.011 LCDR2	WASKRES	74
EGFRvIII P057.011 LCDR3	QQSYSAPIT	75
EGFRvIII P057.011 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLWNSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASKRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTSS LQAEDVAVYYCQQSYSAPITFGQGTKVEIK	76

EGFRvIII P056.027 HCDR1	NNWIA	77
EGFRvIII P056.027 HCDR2	VIYPGDSDKRYSPSFQG	78
EGFRvIII P056.027 HCDR3	VSRSSYAFDY	79
EGFRvIII P056.027 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFGNNWIAWVRQM PGKGLEWMGVIYPGDSDKRYSPSFQGQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYAFDYWGQGTTLTVSS	80
EGFRvIII P056.027 LCDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA	81
EGFRvIII P056.027 LCDR2	WASTRES	82
EGFRvIII P056.027 LCDR3	QQVHSGPPVT	83
EGFRvIII P056.027 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTSS LQAEDVAVYYCQQVHSGPPVTFGQGTKVEIK	84
EGFRvIII P063.056 HCDR1	SYWIA	85
EGFRvIII P063.056 HCDR2	VIHPYDSDTRYSPSFQG	86
EGFRvIII P063.056 HCDR3	VSRSSYAFDY	87
EGFRvIII P063.056 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFDSYWIAWVRQM PGKGLEWMGVIHPYDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYAFDYWGQGTTLTVSS	88
EGFRvIII P063.056 LCDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA	89
EGFRvIII P063.056 LCDR2	WASTRES	90
EGFRvIII P063.056 LCDR3	QQQRDGPPVT	91
EGFRvIII P063.056 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTSS LQAEDVAVYYCQQQRDGPPVTFGQGTKVEIK	92
EGFRvIII P064.078 HCDR1	SYWIA	93

EGFRvIII P064.078 HCDR2	VIHPYDS DTRYSPSFQG	94
EGFRvIII P064.078 HCDR3	VSRLSYALDY	95
EGFRvIII P064.078 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFDSYWIAWVRQM PGKGLEWMGVIIHPYDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARVSRLSYALDYWGQGTLVTVSS	96
EGFRvIII P064.078 LCDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA	97
EGFRvIII P064.078 LCDR2	WASTRES	98
EGFRvIII P064.078 LCDR3	QQVHSGPPVT	99
EGFRvIII P064.078 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS LQAEDVAVYYCQQVHSGPPVTFTGQGTKVEIK	100
EGFRvIII P065.036 HCDR1	SYWIA	101
EGFRvIII P065.036 HCDR2	VIHPYDS DTRYSPSFQG	102
EGFRvIII P065.036 HCDR3	VSRSSYALDY	103
EGFRvIII P065.036 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFDSYWIAWVRQM PGKGLEWMGVIIHPYDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYALDYWGQGTLVTVSS	104
EGFRvIII P065.036 LCDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA	105
EGFRvIII P065.036 LCDR2	WASTRES	106
EGFRvIII P065.036 LCDR3	QQVYSGPPVT	107
EGFRvIII P065.036 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS LQAEDVAVYYCQQVYSGPPVTFTGQGTKVEIK	108
EGFRvIII VH-CH1(EF) - CD3 _{orig} /CD3 _o pt VL-CH1 - Fc (杵 ,	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFDSYWIAWVRQM PGKGLEWMGVIIHPYDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYAFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLT	109

PGLALA)	VSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQEKPQAFRGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCAL WYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	
EGFR _{vIII} VH-CH1(EE) -Fc (白 , PGLALA)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFDSYWIAWVRQM PGKGLEWMGVHPYDSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARVSRSSYAFDYWGQGTLLTVVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	110
EGFR _{vIII} VL-CL(RK)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS LQAEDVAVYYCQQQRDGPVTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	111
CD3 _{orig} VH- CL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQA PGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLR AEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	26
CD3 _{opt} VH- CL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFSSYAMNWVRQA PGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLR AEDTAVYYCVRHTTFPSSYVSYYGYWGQGT LTVVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	27
人類CD3	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHND KNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSK PEDANFYLYLRARVCENCMEMDVM SVATIVIVDICITGGLL LLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVP NPDIYEPIRKQRDLYSGLNQRRRI	112
食 蟹 獼 猴 CD3	QDGNEEMGSITQTPYQVVSISGTTVILTCSQHLGSEAQWQHN GKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHH LYLKARVCENCMEMDVM AVATIVIVDICITLGLLLL VYYWS KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDIYEPIR KGQQDLYSGLNQRRRI	113
人類TYRP1	QFPRQCATVEALRSGMCCPDLSPVSGPGTDRCGSSSGRGRC	114

	EAVTADSRPHSPQYPHDGRDDREVVPLRFFNRTCHCNGNF SGHNCGTCPGWRGAACDQRVLIVRRNLLDLSKEEKNHFV RALDMAKRTTHPLFVIATRSEIILGPDGNTQPENISIYNYF VWTHYYSVKKTFLGVGQESFGEVDFSHEGPAFLTWHRYHL LRLEKDMQEMLQEPSFSLPYWNFATGKNVCDICTDDLMGS RSNFDSTLISPNSVFSQWRVVCDSLEDYDTLGTLCNSTEDG PIRRNPAGNVARPMVQRLPEPQDVAQCLEVGLFDTPPFYSN STNSFRNTVEGYSDPTGKYDPAVRSLHNLAHLFLNGTGGQT HLSPNDPIFVLLHTFTDAVFDEWLRRYNADISTFPLENAPIG HNRQYNMVPFWPPVTNTEMFVTAPDNLGYTYEIQWPSREF SVPEIIAIAVVGALLLVALIFGTASYLIRARRSMDEANQPLLT DQYQCYAEEYEKLQNPQNQSVV	
人 類 EGFR _{vIII}	LEEKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCE GPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDLHILP VAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRT DLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCK ATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCN LLEGEPREFVENSECICHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQ CAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCH PNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVAL GIGLFMRRRHIVRKRTLRLQLERELVEPLTPSGEAPNQALL RILKETEFKKIKVLGSGAFGT VYKGLWIPEGEKV KIPVAIKE LREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQ LITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNY LEDRLVHRDLAARNVLVKT PQHVKITDFGLAKLLGAEEK EYHAEGGKVPIKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWEL MTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKC WMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPS PTDSNFYRALMDEEDMDDVVDAD EYLIPQQGFFSSPSTRT PLLSSLSATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTG ALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNP APSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDS PAHWA QKGS HQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLR VAPQSSEFIGA	115
人類EGFR	LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFN NCEVVLGN LEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNLQII RGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGA VRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNH LGSCQ KCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPS DCCHNQCAAGCTGPRES DCLVCRKFRDEATCKDTCPLML YNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCV RACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDS LSINATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQE LDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTIN WKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCW GPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECICH PECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAG VMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRTL	116

	RRLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSG AFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEA YVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVRE HKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNV LVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGKVPIKWMAL ESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISS ILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELJIEF SKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPDTDSNFYRALMDEEDMD DVVDADAYLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSLSATSNNSTVACID RNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDFTFLPVPEYIN QSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVG NPEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHWAQKGSHQISLDNPDYQQ DFFPKAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA	
hIgG1 Fc區	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	117
連接子	GGGGSGGGGS	118
連接子	DGGGGSGGGGS	119
人類κ CL域	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	120
人類λ CL域	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	121
人類 IgG1 重 鏈 恆 定 區 (CH1-CH2- CH3)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SP	122

【0372】

IV.實例

以下為本發明之方法及組合物之實例。應理解，考慮到上文所提供之一般描述，可實踐各種其他態樣。

【0373】

實例1-產生最佳化CD3結合子

以本文中稱為「CD3_{orig}」且包含SEQ ID NO 6及11相應之VH及VL

序列的前述(參見例如以引用之方式併入本文中的WO 2014/131712) CD3結合子為起始物質，吾人旨在藉由移除重鏈CDR3之Kabat位置97及100處之兩個天冬醯胺去醯胺化序列基元來最佳化此結合子之特性。

【0374】 為此目的，吾人產生具有如下重鏈的適合於噬菌體呈現的抗體文庫：移除Kabat位置97及100處之天冬醯胺且另外使CDR H1、H2及H3隨機化以便經由親和力成熟過程補償由置換Asn97及Asn100引起之親和力損失。

【0375】 此文庫經由融合至少數鞘蛋白p3 (Marks等人(1991) *J Mol Biol* 222, 581-597)而置於絲狀噬菌體上且經選擇以結合重組CD3 ϵ 。

【0376】 在初始篩選中鑑別10個候選純系，其如藉由SPR以Fab片段(產生於大腸桿菌中)形式所量測在重組抗原上展示可接受結合。

【0377】 然而，如在轉化成IgG型式之後藉由流動式細胞測量術所量測，僅此等純系中之一者顯示可接受的與表現CD3之細胞的結合活性。

【0378】 進一步評估本文中稱為「CD3_{opt}」且包含SEQ ID NOs 7及11相應之VH及VL序列的所選純系且如下文中所描述將其轉化成雙特異性型式。

【0379】

實例2-最佳化CD3結合子與CD3之結合 與重組CD3之結合

藉由表面電漿子共振(SPR)針對最佳化CD3結合子「CD3_{opt}」及原始CD3結合子「CD3_{orig}」測定與重組CD3之結合，該等兩種結合子呈在Fc區(SEQ ID NO 12及14 (CD3_{orig})以及SEQ ID NO 13及14 (CD3_{opt}))中具有P329G L234A L235A (「PGLALA」，EU編號)突變的人類IgG1型式。

【0380】 為了評定去醯胺化位點移除效果及其對抗體穩定性之作用，在於37°C或40°C之溫度應力下14天之後測試原始及最佳化CD3結合子與重組CD3之結合。儲存於-80°C下之樣本用作參考。參考樣本及處於40°C下之應力下的樣本係在20 mM His、140 mM NaCl (pH 6.0)中，且處於37°C下之應力下的樣本係在PBS (pH 7.4)中，濃度皆為1.2至1.3 mg/ml。在應力週期(14天)之後，透析PBS中之樣本回至20 mM His、140 mM NaCl (pH 6.0)中以供進一步分析。

【0381】 如下藉由SPR測定樣本之相對活性濃度(RAC)。

【0382】 在Biacore T200儀器(GE Healthcare)上進行SPR。使用標準胺偶合化學方法將抗Fab捕捉抗體(GE Healthcare，#28958325)固定在S系列感測器晶片CM5 (GE Healthcare)上，得到4000至6000共振單位(RU)之表面密度。使用HBS-P+ (10 mM HEPES，150 mM NaCl pH 7.4，0.05%界面活性劑P20)作為運行及稀釋緩衝液。將濃度為2 µg/ml之CD3抗體以5 µl/min之流速注射約60 s。將CD3抗原(參見下文)以10 µg/ml之濃度注射120 s，且在5 µl/min之流速下監測解離120 s。藉由連續注射10 mM甘胺酸(pH 2.1)兩次，各60 s而使晶片表面再生。藉由減去空白注射劑及藉由減去自空白對照流細胞獲得之反應來校正整體折射率差異。為了評估，取注射結束之後5秒之結合反應。為了標準化結合信號，將CD3結合除以抗Fab反應(在捕捉固定化抗Fab抗體上之CD3抗體後獲得信號(RU))。藉由對照各溫度加壓樣本與對應未加壓樣本來計算相對活性濃度。

【0383】 使用之抗原為CD3 δ及CD3 ε胞外域與具有臼包杵修飾及C端Avi-標籤之人類Fc域融合的異二聚體(參見SEQ ID NO 28及29)。

【0384】 此實驗之結果展示於圖2中。如可見，相較於原始CD3結合子CD3_{orig}，最佳化CD3結合子CD3_{opt}在溫度應力(2週，在37°C下，pH 7.4)之後顯示大大改良之CD3結合。此結果表明去醯胺化位點移除成功，且產生了具有與活體內半衰期相關之優良穩定性特性的抗體以及中性pH下之抗體調配物。

【0385】

與Jurkat細胞上之CD3之結合

藉由FACS針對最佳化CD3結合子「CD3_{opt}」及原始CD3結合子「CD3_{orig}」測定在人類報導子T細胞株Jurkat NFAT上與CD3之結合，該等兩種結合子呈在Fc區(SEQ ID NO 12及14 (CD3_{orig})以及SEQ ID NO 13及14 (CD3_{opt}))中具有P329G L234A L235A (「PGLALA」，EU編號)突變的人類IgG1型式。

【0386】 Jurkat-NFAT報導子細胞(GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P；Promega #CS176501)為表現人類CD3的具有NFAT啟動子之人類急性淋巴白血報導子細胞株。將細胞以10至50萬個細胞/毫升培養在RPMI1640、2 g/l葡萄糖、2 g/l NaHCO₃、10% FCS、25 mM HEPES、2 mM-麩醯胺酸、1×NEAA、1×丙酮酸鈉中。每當細胞繼代時，添加最終濃度200 µg/ml之潮黴素B。

【0387】 針對結合分析，收集Jurkat NFAT細胞，用PBS洗滌且再懸浮於FACS緩衝液中。在96孔圓底培養盤中進行抗體染色。因此，每孔接種100,000至200,000個細胞。使培養盤在400×g下離心4 min且移除上清液。在FACS緩衝液中稀釋測試抗體且在4°C下向細胞中添加20 µl抗體溶液，持續30 min。為了移除未結合抗體，用FACS緩衝液洗滌細胞兩次，

之後添加經稀釋之二級抗體(PE結合之AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人類IgG Fcg片段特異性(PE-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment goat anti-human IgG Fcg Fragment Specific)；Jackson ImmunoResearch #109-116-170)。在4℃下培育30 min後，洗掉未結合二級抗體。在量測之前，使細胞再懸浮於200 µl FACS緩衝液中，且藉由流動式細胞測量術使用BD Canto II裝置分析。

【0388】如圖3中所示，最佳化CD3結合子「CD3_{opt}」及原始CD3結合子「CD3_{orig}」同樣良好地結合於Jurkat細胞上之CD3。

【0389】

實例3-最佳化CD3結合子之功能活性

在Jurkat報導子細胞分析中測試最佳化CD3結合子「CD3_{opt}」之功能活性，且將其與原始CD3結合子「CD3_{orig}」之該活性進行比較。為了測試IgG之功能活性，將表現抗PGLALA之CHO細胞與Jurkat NFAT報導子細胞一起在濃度增加之CD3_{opt}人類IgG1 PGLALA或CD3_{orig}人類IgG1 PGLALA存在下共培育。Jurkat NFAT報導子細胞上之CD3在T細胞交聯後之活化誘導螢光素酶之產生，且可將發光作為活化標記物進行量測。包括CD3_{orig}人類IgG1 wt作為無法結合於表現抗PGLALA之CHO細胞且因此無法在Jurkat NFAT細胞上交聯的陰性對照。分析之示意性說明提供於圖4中。

【0390】表現抗PGLALA之CHO細胞為經工程改造以在其表面上表現特異性結合人類IgG₁ Fc (PGLALA)之抗體的CHO-K1細胞(參見以引用之方式併入本文中的WO 2017/072210)。將此等細胞培養於含有5% FCS+1% GluMax之DMEM/F12培養基中。Jurkat NFAT報導子細胞如實

例2中所描述。

【0391】 當 CD3 huIgG1 PGLALA 同時與表現在 CHO 上之抗 PGLALA 及表現在 Jurkat-NFAT 報導子細胞上之 CD3 結合時，NFAT 啟動子經活化且引起活性螢火蟲螢光素酶之表現。發光信號強度(添加螢光素酶受質時所得)與 CD3 活化及信號傳導之強度成比例。使 Jurkat-NFAT 報導子細胞生長於懸浮液中且培養在 RPMI1640、2 g/l 葡萄糖、2 g/l NaHCO₃、10% FCS、25 mM HEPES、2 mM L-麩醯胺酸、1×NEAA、1×丙酮酸鈉(10至50萬個細胞/毫升)、200 μg/ml 潮黴素中。為了分析，收集 CHO 細胞且使用 ViCell 測定活力。將 30 000 個目標細胞/孔於 100 μl 介質中塗鋪於平底白壁 96 孔培養盤(Greiner bio-one #655098)中，且將 50 微升/孔之經稀釋抗體或介質(用於對照)添加至 CHO 細胞。隨後，收集 Jurkat-NFAT 報導子細胞且使用 ViCell 評定活力。將細胞以 120 萬個細胞/毫升再懸浮於不含潮黴素 B 之細胞培養基中，且以 60 000 個細胞/孔(50 微升/孔)添加至 CHO 細胞，以獲得 2:1 之最終效應目標(E:T)比及 200 微升每孔之最終體積。隨後，將 4 μl 之 GloSensor (Promega #E1291) 添加至各孔(最終體積之 2%)。將細胞在增濕培育箱中於 37°C 下培育 24 h。在培育時間結束時，使用 TECAN Spark 10M 偵測發光。

【0392】 如圖 5 中所示，最佳化 CD3 結合子 CD3_{opt} 在交聯後於 Jurkat NFAT 細胞上之活性類似於 CD3_{orig}。

【0393】

實例 4-包含最佳化 CD3 結合子之 T 細胞雙特異性抗體之產生

TYRP1 TCB

使用實例 1 中鑑別之最佳化 CD3 結合子(「CD3_{opt}」，SEQ ID NO 7

(VH)及11 (VL))產生靶向CD3及TYRP1之T細胞雙特異性抗體(「TYRP1 TCB」)。

【0394】藉由人類化TYRP1結合子「TA99」來產生此TCB中包含之TYRP1結合子(重鏈及輕鏈分別參見GenBank條目AXQ57811及AXQ57813)，且該結合子包含SEQ ID NO 18及22中分別所示之重鏈及輕鏈可變區序列。

【0395】TCB分子之示意性說明提供於圖6中，且其完整序列載於SEQ ID NO 23、24、25及27中。

【0396】亦製備具有原始CD3結合序列之類似分子(SEQ ID NO 23、24、25及26)。

【0397】藉由瞬時轉染HEK293 EBNA細胞來產生雙特異性分子。細胞經對應表現載體以1:2:1:1比率轉染(「載體重鏈(VH-CH1-VL-CH1-CH2-CH3)」：「載體輕鏈(VL-CL)」：「載體重鏈(VH-CH1-CH2-CH3)」：「載體輕鏈(VH-CL)」)。將細胞離心，且將培養基用預溫熱CD CHO培養基(Thermo Fisher，#10743029)置換。在CD CHO培養基中混合表現載體，添加PEI (聚乙烯亞胺，Polysciences，#23966-1)，使溶液渦旋且在室溫下培育10分鐘。隨後，將細胞(2百萬個/毫升)與載體/PEI溶液混合，轉移至燒瓶中且在具有5% CO₂氛圍的振盪培育箱中在37°C培育3小時。在培育之後，添加具有補充劑(總體積之80%)之Excell培養基。轉染後一天，添加補充劑(進料，總體積之12%)。7天之後，藉由離心及隨後過濾(0.2 μm過濾器)收集細胞上清液。

【0398】藉由標準方法自經過濾細胞培養物上清液純化蛋白質。簡言之，藉由蛋白質A親和力層析(MabSelect Sure，GE Healthcare：平衡

緩衝液：20 mM檸檬酸鈉、20 mM磷酸鈉，pH 7.5；溶離緩衝液：20 mM檸檬酸鈉、100 mM NaCl、100 mM甘胺酸，pH 3.0)自細胞培養物上清液純化含有Fc之蛋白質。在pH 3.0下實現溶離，隨後立即pH中和樣本。藉由離心(Millipore Amicon® ULTRA-15 (#UFC903096))濃縮蛋白質，且藉由尺寸排阻層析(Superdex 200，GE Healthcare)在20 mM組胺酸、140 mM氯化鈉(pH 6.0)中自單體蛋白質分離聚集之蛋白質。

【0399】 根據Pace等人, (1995), Protein Science 4, 2411-23，使用基於胺基酸序列所計算的質量消光係數，藉由在280 nm下量測吸光值來測定經純化蛋白質的濃度。在存在及不存在還原劑之情況下使用LabChipGXII (Perkin Elmer)藉由CE-SDS分析蛋白質之純度及分子量(表1)。在25℃下使用分析型尺寸排阻管柱(TSKgel G3000 SW XL或UP-SW3000)，在運行緩衝液(分別為25 mM K₂HPO₄、125 mM NaCl、200 mM L-精胺酸單鹽酸鹽，pH 6.7或200 mM KH₂PO₄、250 mM KCl pH 6.2)中平衡，藉由HPLC層析進行聚集體含量之測定(表2)。

表1. TYRP1 TCB之CE-SDS分析(非還原性)。

分子	峰#	大小[kDa]	純度[%]
TYRP1 TCB CD3 _{opt}	1	221	100
TYRP1 TCB CD3 _{orig}	1	206	100

表2. TYRP1 TCB之產生及純化之概述

分子	滴度[mg/l]	回收[%]	產量[mg/l]	分析型SEC (HMW/單體/LMW) [%]
TYRP1 TCB CD3 _{opt}	114	20	22.8	0.5/ 98.6 /0.9
TYRP1 TCB CD3 _{orig}	72	12	8.7	0/ 97.5 /2.5

【0400】

實例5-包含最佳化CD3結合子之T細胞雙特異性抗體與CD3及TYRP1之結

合

與重組CD3之結合

藉由SPR使用具有最佳化(TYRP1 TCB CD3_{opt})或原始(TYRP1 TCB CD3_{orig})CD3結合序列之TCB評定TYRP1 TCB與重組CD3之結合。

【0401】 在Biacore T200上以HBS-EP作為運行緩衝液(0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、0.05 % (v/v)界面活性劑P20 (GE Healthcare))進行SPR實驗。

【0402】 在具有特異性結合人類IgG₁ Fc之固定化抗體(PGLALA)之CM5感測器晶片表面上捕捉TYRP1 TCB(參見以引用之方式併入本文中的WO 2017/072210)。藉由使用標準胺偶合套組(GE Healthcare)在pH 5.0下直接固定大約8700共振單位(RU)來將捕捉抗體偶合至感測器晶片表面。在5 nM下用10 µl/min之流量捕捉TCB分子30 s。

【0403】 使人類及食蟹獼猴抗原(參見下文)以12.35至3000 nM之濃度及30 µl/min之流量經240 s穿過流槽。監測解離階段240 s，且藉由自樣本溶液切換至HBS-EP來進行觸發。在每一循環之後，使用10 mM甘胺酸(pH 2.0)之一個注射劑使晶片表面再生30 s。

【0404】 所用抗原為人類或食蟹獼猴CD3 δ及CD3 ε胞外域與具有白包杵修飾及C端Avi-標籤之人類Fc域融合的異二聚體(參見SEQ ID NO 28及29 (人類CD3)以及SEQ ID NO 30及31 (食蟹獼猴CD3))。

【0405】 藉由減去在參考流槽上獲得之反應來校正整體折射率差異(未捕捉TCB)。親和力常數藉由使用BIAeval軟體(GE Healthcare)相對於1:1朗格繆爾結合進行擬合而由動力學速率常數推導。

【0406】 TYRP1 TCB CD3_{opt}與人類及食蟹獼猴CD3之結合的K_D值

經測定分別為50 nM及20 nM，且與TYRP1 TCB CD3_{orig}之K_D值(分別為50 nM及40 nM)類似。

【0407】 此顯示，在未加壓條件下，包含CD3_{opt}或CD3_{orig}之TCB皆同樣良好地結合於重組CD3。

【0408】 在溫度應力下於37°C或40°C下14天之後亦使用具有最佳化或原始CD3結合序列之TCB評定TYRP1 TCB與重組人類CD3之結合。如上文實例2中所描述使用TCB代替IgG分子來進行實驗。

【0409】 此實驗之結果展示於圖7中。

【0410】 如圖7中可見，相較於包含原始CD3結合子CD3_{orig}之TCB，包含最佳化CD3結合子CD3_{opt}之TCB在應力(2週，在37°C下，pH 7.4)之後顯示大大改良之CD3結合。此結果證實，在TCB層級下維持了最佳化CD3結合子之改良特性(參見實例2)。

【0411】

與重組TYRP1之結合

藉由SPR使用藉由對應抗體之纖維蛋白溶酶分解製備之TYRP1 Fab片段來評定重組TYRP1結合。

【0412】 在Biacore T200上以HBS-EP作為運行緩衝液(0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、0.05 % (v/v)界面活性劑P20 (GE Healthcare))進行SPR實驗。

【0413】 使用標準胺偶合套組(GE Healthcare)在pH 5.0下於CM5感測器晶片上直接偶合特異性結合人類IgG₁ Fc之抗體(PGLALA)(參見以引用之方式併入本文中的WO 2017/072210)。以10 µl/min之流速捕捉抗原(參見下文)，持續30 s。使TYRP1 Fab片段之3倍稀釋系列以30 µl/min在

流槽上經過，持續180 s，以記錄結合階段。監測解離階段180 s或1200 s且藉由自樣本溶液切換至HBS-EP進行觸發。在每一循環之後，使用10 mM甘胺酸(pH 2)之一個注射劑以30 μ l/min使晶片表面再生30 s。

【0414】 所用抗原為人類、食蟹獼猴或小鼠TYRP1細胞外域(ECD)與具有白包杵(及PG LALA)修飾及C端Avi-標籤之人類Fc域之單體融合體(參見SEQ ID NO 32及35 (人類TYRP1)、SEQ ID NO 33及35 (食蟹獼猴TYRP1)或SEQ ID NO 34及35 (小鼠TYRP1))。

【0415】 藉由減去在參考流槽上獲得之反應校正整體折射率差異(未捕捉抗原)。親和力常數(K_D)藉由使用BIAeval軟體(GE Healthcare)相對於1:1朗格繆爾結合進行擬合而由動力學速率常數推導。

【0416】 與人類、食蟹獼猴及小鼠TYRP1結合之 K_D 值分別測定為130 pM、180 pM及530 pM，且與親本TA99抗體之 K_D 值(分別為90 pM、120 pM及310 pM)類似。

【0417】 在溫度應力下於37°C或40°C下14天之後亦使用具有最佳化或原始CD3結合序列之TCB評定TYRP1 TCB與重組TYRP1之結合。

【0418】 使用重組TYRP1 (Sino Biologicals)作為抗原如上文所描述針對CD3結合進行實驗。

【0419】 此實驗之結果展示於圖8中。其證實，TCB (以及IgG型式之對應TYRP1結合子)之人類TYRP1結合不受應力條件影響。

【0420】

與Jurkat細胞上之CD3之結合

如上文於實例2中所描述藉由FACS測定包含最佳化CD3結合子「CD3_{opt}」或原始CD3結合子「CD3_{orig}」之TYRP1 TCB與人類報導子T

細胞株Jurkat NFAT上之CD3之結合。

【0421】 如圖9中所示，包含最佳化CD3結合子「CD3_{opt}」之TCB與包含原始CD3結合子「CD3_{orig}」之TCB至少同樣良好地結合至Jurkat細胞上之CD3。

【0422】

實例6-包含最佳化CD3結合子之T細胞雙特異性抗體之功能活性 CD3活化

在Jurkat NFAT報導子細胞分析(參見實例3)中在TYRP1陽性黑素瘤細胞M150543 (原發性黑素瘤細胞株，自蘇黎世大學之皮膚病學細胞庫獲得)存在下測試含有最佳化CD3結合子CD3_{opt}或原始CD3結合子CD3_{orig}之TYRP1 TCB (實例4)。

【0423】 當TYRP1 TCB同時結合TYRP1陽性目標細胞及CD3抗原(表現於Jurkat-NFAT報導子細胞上)時，NFAT啟動子經活化且引起活性螢火蟲螢光素酶之表現。發光信號強度(添加螢光素酶受質時所得)與CD3活化及信號傳導之強度成比例。如實例3中所描述使用M150543代替表現抗PGLALA之CHO細胞來進行分析。

【0424】 如針對IgG (實例3)所見，含有CD3_{opt}或CD3_{orig}之TCB皆在Jurkat NFAT報導子細胞上具有類似功能活性且以濃度依賴性方式誘導CD3活化(圖10)。

【0425】

目標細胞殺死

在下一步驟中，在腫瘤細胞殺死分析中用來自三個不同供體之與人類黑素瘤細胞株M150543共培育的新近分離人類PBMC測試兩種TCB分

子。在24 h及48 h之後藉由LDH釋放測定腫瘤細胞溶解。藉由在48 h之後上調兩個細胞亞群上之CD69及CD25來分析CD4及CD8 T細胞之活化。

【0426】簡言之，用胰蛋白酶/EDTA收集目標細胞，洗滌且使用平底96孔培養盤以30 000個細胞/孔之密度塗鋪。使細胞黏附過夜。藉由對獲自健康人類供體的新鮮血液進行Histopaque密度離心來製備外周血液單核細胞(PBMC)。新鮮血液用無菌PBS稀釋且經Histopaque梯度(Sigma #H8889)分層。離心(450×g，30分鐘，室溫)之後，丟棄含PBMC之相界面上方的血漿且將PBMC轉移至新的法爾康管中，隨後填充50 ml PBS。對混合物進行離心(400×g，10分鐘，室溫)，丟棄上清液且將PBMC集結粒用無菌PBS洗滌兩次(離心步驟350×g，10分鐘)。對所得PBMC群體進行自動計數(ViCell)且於含有10% FCS及1% L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸(Biochrom #K0302)之RPMI1640培養基中，在細胞培育箱中在37℃、5% CO₂下儲存直至進一步使用(不超過24 h)。針對殺死分析，以指定濃度一式三份添加抗體。以10:1之最終效應目標(E:T)比將PBMC添加至目標細胞中。在37℃、5% CO₂下培育24 h之後，藉由對藉由細胞凋亡/壞死細胞釋放至細胞上清液中之LDH進行定量(LDH偵測套組，Roche Applied Science #11 644 793 001)來評定目標細胞殺死。藉由將目標細胞與1% Triton X-100一起培育來實現目標細胞之最大溶解(=100%)。最小溶解(=0%)係指在不存在雙特異性構築體之情況下，目標細胞與效應細胞共培育。

【0427】藉由流動式細胞測量術使用識別T細胞活化標記物CD25 (晚期活化標記物)及CD69 (早期活化標記物)之抗體評定CD8及CD4 T細胞在由TCB介導之目標細胞之T細胞殺死後的活化。培育48 h之後，將

PBMC轉移至圓底96孔培養盤中，以350×g離心5 min且用FACS緩衝液洗滌兩次。根據供應商之指示進行CD4 APC (BioLegend #300514)、CD8 FITC (BioLegend #344704)、CD25 BV421 (BioLegend #302630) 及 CD69 PE (BioLegend #310906)之表面染色。將細胞用150微升/孔之FACS緩衝液洗滌兩次且在4℃使用100微升/孔之固定緩衝液(BD #554655)固定15 min。離心後，使樣本再懸浮於200微升/孔之FACS緩衝液中。在BD FACS Fortessa處分析樣本。

【0428】 在全部三個供體上，包含最佳化或原始CD3結合子之兩種TCB以相當之方式誘導T細胞活化及腫瘤細胞溶解(圖11)。全部三個供體在48 h之後的腫瘤細胞溶解之EC50值概述於表3中。

表3. 48 h處TYRP1 TCB之腫瘤細胞殺死之EC50值的概述。

PBMC供體	TYRP1 TCB (CD3 _{opt}) EC50 (95%信賴區間)	TYRP1 TCB (CD3 _{orig}) EC50 (95%信賴區間)
供體1	0.31 nM (0.17至0.55)	0.44 nM (0.28至0.70)
供體2	0.03 nM (0.02至0.06)	0.05 nM (0.02至0.09)
供體3	0.08 nM (0.07至0.1)	0.14 nM (0.11至0.18)

【0429】

實例7-在小鼠中關於T細胞雙特異性抗體之PK研究

在以1 mg/kg靜脈內推注投與至人類FcRn轉殖基因(株系32，同種接合)及FcRn基因敲除小鼠(Jackson實驗室菌株編號003982及014565)(n=3/菌株/測試化合物)之後，研究具有不同CD3結合子(CD3_{orig}及CD3_{opt})之TYRP1 TCB之藥物動力學(PK)。直至672 h自人類FcRn轉殖基因(tg)小鼠(自給藥後5 min至672 h每隻小鼠取9個樣本)及直至96 h自FcRn基因剔除(ko)小鼠(自給藥後5 min至96 h每隻小鼠取8個樣本)獲取連續血液微量樣本。製備血清且冷凍儲存直至分析。用對人類Ig/Fab CH1/κ域具有特異性

之通用ECLIA方法使用cobas® e411 (Roche)儀器在非GLP條件下分析小鼠血清樣本。使用標準非分室分析進行藥物動力學評估。

【0430】 此研究之結果展示於表4中。此表明，CDR之工程改造並不產生將影響抗體清除率之其他序列不利因素。CD3_{opt}就血清半衰期而言與CD3_{orig}同樣良好，而對增加CDR穩定性具有額外益處。

表4. huFcRn tg小鼠及FcRn ko小鼠中之清除率資料(毫升/天/公斤；平均值及(CV))。

小鼠菌株	TYRP1 TCB (CD3 _{orig})	TYRP1 TCB (CD3 _{opt})
hFcRn tg32	8.82 (10.0)	6.68 (12.5)
FcRn ko	66.4 (16.2)	65.0 (6.5)

【0431】

實例8-包含最佳化CD3結合子之另一T細胞雙特異性抗體之產生

使用實例1中鑑別之最佳化CD3結合子(「CD3_{opt}」，SEQ ID NO 7 (VH)及11 (VL))產生靶向CD3及EGFR_{vIII}之T細胞雙特異性抗體(TCB) (「EGFR_{vIII} TCB」)。

【0432】 此TCB中包含之EGFR_{vIII}結合子(P063.056)來源於噬菌體呈現，之後親和力成熟(參見下文)，且包含SEQ ID NO 88及92中分別所示之重鏈及輕鏈可變區序列。

【0433】 TCB分子之示意性說明提供於圖6中，且其完整序列載於SEQ ID NO 109、110、111及27中。

【0434】 亦製備具有原始CD3結合序列之類似分子(SEQ ID NO 109、110、111及26)。

【0435】 如上文在實例4中所描述藉由瞬時轉染HEK293 EBNA細胞來產生雙特異性分子，進行純化及分析。

【0436】此外，以類似方式(用IgG重鏈及輕鏈之表現載體以1:1之比率轉染HEK EBNA細胞)以人類IgG₁型式產生來源於噬菌體呈現之EGFRvIII抗體，以供如下文所描述使用。

【0437】以相當之品質以如藉由尺寸排阻層析所測定之高於95%之單體含量純化所有IgG及TCB構築體。

【0438】

EGFRvIII抗體之選擇

EGFRvIII抗體來源於噬菌體呈現且親和力成熟。使用穩定表現EGFRvIII及EGFRvIII陽性人類神經膠母細胞瘤細胞株DK-MG之CHO細胞測試展示對EGFRvIII (P056.021 (SEQ ID NO 40及44)、P056.052 (SEQ ID NO 48及52)、P047.019 (SEQ ID NO 56及60)、P057.012 (SEQ ID NO 64及68)、P057.011 (SEQ ID NO 72及76)、P056.027 (SEQ ID NO 80及84))之高親和力結合及特異性的抗體對表現於細胞表面上之EGFRvIII的結合。為了證實特異性及排除對野生型EGFR (EGFRwt)之交叉反應性，測試所選抗體對EGFRwt陽性人類腫瘤細胞株MKN-45之結合(圖12)。包括西妥昔單抗(Cetuximab)作為EGFRwt結合之陽性對照且包括非靶向DP47 IgG作為陰性對照。所有所選抗體特異性結合於EGFRvIII而與EGFRwt無交叉反應性且考慮進一步特徵化。

【0439】在下一步驟中，藉由量測發光在與表現抗PGLALA嵌合抗原受體(CAR)之Jurkat NFAT報導子細胞一起共培育之DK-MG細胞上評定呈IgG1 PGLALA (在Fc區中具有P329G L234A L235A(「PGLALA」，EU編號)突變之人類IgG1型式)的此等EGFRvIII抗體之功能活性(CAR J分析，參見以全文引用之方式併入本文中的PCT申請案第

PCT/EP2018/086038號)。包括DP47 IgG1 PGLALA作為陰性對照。所有所測試EGFRvIII抗體誘導表現CAR之Jurkat NFAT報導子細胞之強活化(圖13)。選擇除顯示最弱結合及活化之P047.019以外的所有所測試EGFRvIII抗體以供轉化為TCB型式(具有CD_{orig}作為CD3結合子)。

【0440】 將轉化成TCB型式之所選EGFRvIII抗體與CHO-EGFRvIII細胞之結合與對應IgG之結合進行比較(圖14)，以證實轉化為TCB型式對EGFRvIII抗體之結合能力無影響。大部分所測試EGFRvIII純系在轉化為TCB型式之後保留其與EGFRvIII結合之能力；僅純系P057.011相較於對應IgG顯示略微降低的與TCB型式之EGFRvIII之結合(表5)。

表5. EGFRvIII IgG及TCB與CHO-EGFRvIII之結合(EC50)。

EGFRvIII純系	EC50 IgG (nM)	EC50 TCB (nM)
P056.021	16.5	13.0
P056.027	13.1	15.9
P056.052	18.2	19.5
P057.012	3.0	5.5
P057.011	5.3	12.8

【0441】 隨後，在Jurkat NFAT報導子細胞分析中於EGFRvIII陽性DK-MG細胞上測試EGFRvIII TCB之功能活性(圖15)。所有所測試EGFRvIII TCB在Jurkat NFAT報導子細胞分析中具有活性，其中P056.021為最強效之一者，接著為具有類似活性之P056.027、P056.052及P057.012，且P057.011具有最低活性。接下來，在腫瘤細胞溶解分析中用與DK-MG或MKN-45細胞一起共培養以排除EGFRvIII TCB與EGFRwt之交叉反應性的PBMC測試EGFRvIII TCB(圖16)。在此分析中，除腫瘤細胞溶解以外，量測T細胞活化(圖17)及細胞介素釋放(圖18)作為額外讀出。如在之前報導子細胞分析中所見，EGFRvIII TCB P056.021在EGFRvIII陽性細胞上具有最高活性，而在EGFRwt陽性細胞上

不具有任何活性。EGFRvIII TCB P057.011在EGFRwt細胞上顯示非特異性活性且因此排除。EGFRvIII TCB P056.027、P056.052及P057.012具有相當之活性。基於此等結果，選擇EGFRvIII結合子P056.021及P057.012用於額外輪次之親和力成熟。

【0442】良好結合子不可來源於P057.012（未展示結果）。如藉由SPR所測定的來源於P056.021之所選EGFRvIII結合子對EGFRvIII之親和力及特異性展示於表6中。

表6. 如藉由SPR所測定的所選EGFRvIII結合子對EGFRvIII之親和力及特異性。

結合子	特異性 (不與EGFRwt結合)	與EGFRvIII之結合 (KD [nM])
P056.021 (親本)	是	35
P063.056	是	10
P064.078	否	15
P065.036	否	10

【0443】亦在U87MG-EGFRvIII及MKN-45細胞上關於與EGFRvIII之特異性結合將親和力成熟EGFRvIII結合子(P063.056 (SEQ ID NO 88及92)、P064.078 (SEQ ID NO 96及100)、P065.036 (SEQ ID NO 104及108))與親本結合子進行比較(圖19)。選擇就針對EGFRvIII之親和力及特異性而言最佳的EGFRvIII結合子P063.056，以供轉化為具有CD3_{orig}或CD3_{opt}作為CD3結合子之TCB型式。

【0444】在Jurkat NFAT報導子細胞分析中於U87MG-EGFRvIII、DK-MG及MKN-45細胞上將EGFRvIII TCB P063.056（具有CD3_{opt}或CD3_{orig}）之功能活性與親本EGFRvIII TCB P056.021進行比較(圖20)。全部三個TCB僅在EGFRvIII陽性細胞存在下誘導特異性Jurkat NFAT活化。EGFRvIII TCB P063.056具有比親本EGFRvIII TCB P056.021略高之活

性。

【0445】

方法

表面電漿子共振

藉由表面電漿子共振，在Biacore T200上，使用HBS-EP作為運行緩衝液(0.01 M HEPES pH 7.4，0.15 M NaCl，0.005% (v/v)界面活性劑P20；GE Healthcare)在25°C下測定EGFRvIII抗體對EGFRvIII之親和力。用固定在CM5晶片上之特異性結合人類IgG₁ Fc之抗體(PGLALA)(參見以引用之方式併入本文中的WO 2017/072210)以25 nM捕捉抗EGFRvIII PGLALA IgG，持續30 s。使EGFRvIII-ECD avi his抗原(參見下文，實例9)以12.4至1000 nM之濃度以30 µl/min之流量經200 s穿過所有流槽。監測解離階段300 s，且藉由自樣本溶液切換至HBS-EP來進行觸發。在每一循環之後，使用10 mM甘胺酸(pH 2.0)之兩個注射劑使晶片表面再生30 s。藉由減去在參考流槽上獲得之反應校正整體折射率差異。親和力常數藉由使用BIAeval軟體(GE Healthcare)相對於1:1朗格繆爾結合進行擬合而由動力學速率常數推導。

【0446】 為了進行特異性測定，用固定在CM5晶片上之抗his (Penta His，Qiagen)以100 nM捕捉EGFRvIII及EGFRwt ECD抗原40 s。以500 nM進行抗EGFRvIII抗體之單次注射，持續60 s，之後用10 mM甘胺酸(pH 2.0)再生60 s。針對EGFRvIII結合觀測到超過50之反應單位。將超過5個反應單位(RU)之反應視為EGFRwt結合陽性的，且將對EGFRwt具有低於5 RU之反應的IgG分類為具特異性的。

【0447】

細胞株

Jurkat-NFAT 報導子細胞 (GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P ; Promega #CS176501) 為表現人類CD3的具有NFAT啟動子之人類急性淋巴白血病報導子細胞株。以 10 至 50 萬個細胞 / 毫升將細胞培養於 RPMI1640、2 g/l 葡萄糖、2 g/l NaHCO₃、10% FCS、25 mM HEPES、1% GlutaMAX、1×NEAA、1×丙酮酸鈉中。每當細胞繼代時，添加最終濃度 200 µg/ml 之潮黴素 B。

【0448】 內部產生具有 PGLALA CAR 之 Jurkat NFAT 細胞。原始細胞株 (Jurkat NFAT ; Signosis) 為具有促進在經由人類CD3活化後之螢光素酶表現的NFAT啟動子之人類急性淋巴白血病報導子細胞株。其經工程改造以表現能夠識別 P293G LALA 突變之嵌合抗原受體。培養時，使細胞生長在於補充有 10% FCS 及 1% 麩醯胺酸之 RPMI1640 中的懸浮液中且維持於 40 至 150 萬個細胞 / 毫升之間。

【0449】 內部產生 CHO-EGFR_{vIII} 細胞。用 EGFR_{vIII} 穩定轉導 CHO-K1 細胞。在含有 5% FCS、1% GlutaMAX 及 6 µg/ml 嘌呤黴素之 DMEM/F12 培養基中培養細胞。

【0450】 DK-MG (DSMZ #ACC 277) 為人類神經膠母細胞瘤細胞株。藉由針對 EGFR_{vIII} 表現進行細胞分選富集 DK-MG 細胞。於 RPMI 1860、10% FCS 及 1% GlutaMAX 中培養細胞。

【0451】 U87MG-EGFR_{vIII} (ATCC HTB-14) 為用 EGFR_{vIII} 穩定轉導之人類神經膠母細胞瘤細胞株。於 DMEM、10% FCS 及 1% GlutaMAX 中培養細胞。

【0452】 MKN-45 (DSMZ ACC 409) 為表現高水準之 EGFR_{wt} 的人

類胃腺癌細胞。提前在含有2% FCS及1% GlutaMAX之RPMI1640中培養細胞。

【0453】

藉由流動式細胞測量術之目標結合

收集用於結合實驗之細胞，用PBS洗滌且再懸浮於FACS緩衝液中。在96孔圓底培養盤中進行抗體染色。收集細胞，計數，且每孔接種100 000至200 000個細胞。使培養盤在400×g下離心4 min且移除上清液。在FACS緩衝液中稀釋測試抗體且在4℃下向細胞中添加20 µl抗體溶液，持續30 min。為了移除未結合抗體，用FACS緩衝液洗滌細胞兩次，之後添加經稀釋之二級抗體PE結合之AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人類IgG Fcγ片段特異性(Jackson ImmunoResearch #109-116-170或#109-116-098)。在4℃下培育30 min後，洗掉未結合二級抗體。在量測之前，使細胞再懸浮於200 µl FACS緩衝液中，且藉由流動式細胞測量術使用BD Canto II或BD Fortessa分析。

【0454】

關於EGFRvIII PGLALA IgG之CAR J NFAT報導子細胞分析

使用CAR J NFAT報導子細胞分析評定EGFRvIII PGLALA IgG誘導T細胞活化之效力。分析之原理在於將經Jurkat-NFAT工程改造之效應細胞與表現腫瘤抗原之癌症細胞一起共培養。僅在IgG同時經由PGLALA突變結合CAR及結合目標抗原EGFRvIII時，NFAT啟動子經活化且引起Jurkat效應細胞中之螢光素酶表現增加。在添加恰當受質後，活性螢火蟲螢光素酶引起發光發射，其可經量測作為CAR介導之活化的信號。簡言之，收集目標細胞且測定其活力。在分析開始前一天，將30 000個目標細胞

胞/孔於100 μ l介質中塗鋪於平底白壁96孔培養盤(Greiner bio-one , #655098)中。次日，移除介質，且將25微升/孔經稀釋之抗體或介質(用於對照)添加至目標細胞。隨後，收集Jurkat-NFAT報導子細胞且使用ViCell評定活力。將細胞以150萬個細胞/毫升再懸浮於細胞培養基中且以75 000個細胞/孔(50微升/孔)添加至腫瘤細胞，獲得2.5:1之最終效應目標(E:T)比及75微升/孔之最終體積。隨後，將4 μ l之GloSensor (Promega #E1291)添加至各孔(最終體積之2%)。將細胞在增濕培育箱中於37°C下培育24 h。在培育時間結束時，使培養盤適應室溫(約15 min)。隨後，添加25微升/孔之One-Glo螢光素酶(Promega , #E6120)，且在暗處培育培養盤15 min，之後使用TECAN Spark偵測發光。

【0455】

關於EGFRvIII TCB之Jurkat NFAT報導子細胞分析

使用EGFRvIII陽性細胞及Jurkat-NFAT報導子細胞評定具有改良CD3或原始CD3結合子之EGFRvIII TCB誘導T細胞交聯且隨後誘導T細胞活化之能力。在EGFRvIII TCB同時結合於EGFRvIII陽性目標細胞及CD3抗原(表現於Jurkat-NFAT報導子細胞上)時，NFAT啟動子經活化且引起活性螢火蟲螢光素酶之表現。發光信號強度(添加螢光素酶受質時所得)與CD3活化及信號傳導之強度成比例。針對分析，收集目標細胞且測定活力。將30 000個目標細胞/孔於100 μ l介質中塗鋪於平底白壁96孔培養盤(Greiner bio-one #655098)中，且將50微升/孔之經稀釋抗體或介質(用於對照)添加至目標細胞。隨後，收集Jurkat-NFAT報導子細胞且使用ViCell評定活力。將細胞以120萬個細胞/毫升再懸浮於不含潮黴素B之細胞培養基中且以60 000個細胞/孔(50微升/孔)添加至腫瘤細胞，獲得2:1之最終效

應目標(E:T)比及200微升/孔之最終體積。隨後，將4 μ l之GloSensor (Promega #E1291)添加至各孔(最終體積之2%)。將細胞在增濕培育箱中於37°C下培育24 h。在培育時間結束時，使用TECAN Spark偵測發光。

【0456】

T細胞介導之腫瘤細胞殺死

用胰蛋白酶/EDTA收集目標細胞，洗滌且使用平底96孔培養盤以30 000個細胞/孔之密度塗鋪。使細胞黏附過夜。藉由對獲自健康人類供體的新鮮血液進行Histopaque密度離心來製備外周血液單核細胞(PBMC)。新鮮血液用無菌PBS稀釋且經Histopaque梯度(Sigma，#H8889)分層。離心(450×g，30分鐘，室溫)之後，丟棄含PBMC之相界面上方的血漿且將PBMC轉移至新的法爾康管中，隨後填充50 ml PBS。對混合物進行離心(400×g，10分鐘，室溫)，丟棄上清液且將PBMC集結粒用無菌PBS洗滌兩次(離心步驟350×g，10分鐘)。對所得PBMC群體進行自動計數(ViCell)且於含有10% FCS及1% GlutaMAX之RPMI1640培養基中，在細胞培育箱中在37°C、5% CO₂下儲存直至進一步使用(不超過24 h)。針對殺死分析，以指定濃度一式三份添加抗體。以10:1之最終效應目標(E:T)比將PBMC添加至目標細胞。在37°C、5% CO₂下培育24 h之後，藉由對藉由細胞凋亡/壞死細胞釋放至細胞上清液中之LDH進行定量(LDH偵測套組，Roche Applied Science，#11 644 793 001)來評定目標細胞殺死。藉由將目標細胞與1% Triton X-100一起培育來實現目標細胞之最大溶解(=100%)。最小溶解(=0%)係指在不存在雙特異性構築體之情況下，目標細胞與效應細胞共培育。

【0457】 藉由流動式細胞測量術使用識別T細胞活化標記物CD25

(晚期活化標記物)及CD69 (早期活化標記物)之抗體評定CD8及CD4 T細胞在由TCB介導之目標細胞之T細胞殺死後的活化。培育48 h之後，將PBMC轉移至圓底96孔培養盤中，以350×g離心5 min且用FACS緩衝液洗滌兩次。根據供應商之指示進行CD4 APC (BioLegend，#300514)、CD8 FITC (BioLegend，#344704)、CD25 BV421 (BioLegend，#302630)及CD69 PE (BioLegend，#310906)之表面染色。將細胞用150微升/孔之FACS緩衝液洗滌兩次且在4℃使用100微升/孔之固定緩衝液(BD，#554655)固定15 min。離心後，使樣本再懸浮於200微升/孔之FACS緩衝液中。在BD FACS Fortessa處分析樣本。

【0458】藉由流動式細胞測量術，使用細胞測量珠粒陣列(cytometric bead array，CBA)根據製造商的說明來量測上清液中之細胞介素分泌，但僅使用25 µl之上清液及珠粒代替50 µl珠粒及樣本。使用以下CBA套組(BD Biosciences)：CBA人類干擾素 γ (IFN γ)靈活組合(Flex Set)、CBA人類顆粒酶 β 靈活組合及CBA人類TNF靈活組合。使用BD FACS Canto II或BD FACS Fortessa來量測樣本，且使用Diva軟體(BD Biosciences)進行分析。

【0459】

實例9-包含最佳化CD3結合子之T細胞雙特異性抗體與CD3及EGFRvIII之結合
與重組CD3之結合

藉由SPR，使用具有最佳化(EGFRvIII TCB CD3_{opt})或原始(EGFRvIII TCB CD3_{orig}) CD3結合序列之TCB如上文在實例5中關於TYRP1 TCB所描述來評定EGFRvIII TCB與重組CD3之結合。藉由在pH

5.0下使用標準胺偶合套組(GE Healthcare)進行大約5200個共振單位(RU)之直接固定來將捕捉抗體偶合到感測器晶片，且在20 nM下以10 μ l/min之流量捕捉TCB分子30 s。

【0460】 TYRP1 TCB CD3_{opt}與人類及食蟹獼猴CD3之結合的K_D值經測定分別為30 nM及20 nM，且與TYRP1 TCB CD3_{orig}之K_D值(分別為40 nM及30 nM)類似。

【0461】 此顯示，在未加壓條件下，包含CD3_{opt}或CD3_{orig}之TCB皆同樣良好地結合於重組CD3。

【0462】 在於37°C或40°C下之溫度應力14天之後，使用具有最佳化或原始CD3結合序列之TCB來評定EGFRvIII TCB與重組人類CD3之結合。如上文實例2中所描述使用TCB代替IgG分子來進行實驗。

【0463】 此實驗之結果展示於圖21中。

【0464】 如圖21中可見，相較於包含原始CD3結合子CD3_{orig}之TCB，包含最佳化CD3結合子CD3_{opt}之TCB在應力(2週，在37°C下，pH 7.4)之後顯示大大改良之CD3結合。此結果再次證實，在TCB層級下維持了最佳化CD3結合子之改良特性(參見實例2)。

【0465】

與重組EGFRvIII之結合

藉由SPR評定EGFRvIII TCB與重組EGFRvIII之結合。

【0466】 在Biacore T200上以HBS-EP作為運行緩衝液(0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、0.05 % (v/v)界面活性劑P20 (GE Healthcare))進行SPR實驗。

【0467】 在pH 5.0下使用標準胺偶合套組(GE Healthcare)將抗Fc抗

體(GE Healthcare)偶合至CM5感測器晶片上。以10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流速捕捉EGFRvIII TCB (5 nM) 30 s。使EGFRvIII抗原之3倍稀釋系列以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 在流槽上經過，持續200 s，以記錄結合階段。監測解離階段300 s，且藉由自樣本溶液切換至HBS-EP來進行觸發。在每一循環之後，使用3 M MgCl_2 之一個注射劑以20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 使晶片表面再生30 s。

【0468】 所用抗原含有在C端上與Avi-標籤及His標籤融合的人類EGFRvIII (EGFRvIII-ECD avi his；SEQ ID NO: 36)之細胞外域。

【0469】 藉由減去在參考流槽上獲得之反應來校正整體折射率差異(未捕捉TCB)。親和力常數(K_D)藉由使用BIAeval軟體(GE Healthcare)相對於1:1朗格繆爾結合進行擬合而由動力學速率常數推導。藉由動力學分析，使用對此2:1相互作用進行1:1結合擬合經由速率常數粗略估計表觀親合力常數 K_D 。

【0470】 包含CD3_{opt}或CD3_{orig}之EGFRvIII TCB與人類EGFRvIII之結合之 K_D 值(親和力)經測定皆為6 nM。

【0471】 在於37°C或40°C下之溫度應力14天之後，亦使用具有最佳化或原始CD3結合序列之TCB來評定EGFRvIII TCB與重組EGFRvIII之結合。如上文在實例5中所描述使用EGFRvIII-ECD avi his作為抗原(參見上文)進行實驗。

【0472】 此實驗之結果展示於圖22中。其證實兩種TCB與人類EGFRvIII之結合皆不受應力條件影響。

【0473】

與Jurkat細胞上之CD3之結合

藉由FACS如上文在實例2中所描述測定包含最佳化CD3結合子

「CD3_{opt}」或原始CD3結合子「CD3_{orig}」之EGFRvIII TCB與人類報導子T細胞株Jurkat NFAT上之CD3的結合。

【0474】如圖23中所示，包含最佳化CD3結合子「CD3_{opt}」及原始CD3結合子「CD3_{orig}」之TCB同樣良好地結合於Jurkat細胞上之CD3。

【0475】

與U87MG-EGFRvIII細胞上之EGFRvIII之結合

藉由FACS測定包含具有CD3_{opt}或CD3_{orig}之EGFRvIII結合子P063.056或具有CD3_{orig}之EGFRvIII純系P056.021的EGFRvIII TCB與人類神經膠母細胞瘤細胞株U87MG-EGFRvIII上之EGFRvIII的結合。亦包括IgG型式的EGFRvIII結合子P063.056。

【0476】如圖24中所示，全部三個TCB以高親和力結合表現於U87MG-EGFRvIII細胞上之EGFRvIII，且結合不因轉化為TCB型式而受損。

【0477】

實例10-包含最佳化CD3結合子之T細胞雙特異性抗體之功能活性 CD3活化

在Jurkat NFAT報導子細胞分析中，在EGFRvIII陽性神經膠母細胞瘤細胞DK-MG、U87MG-huEGFRvIII及EGFRwt陽性MKN45細胞存在下，如上文在實例8中所描述測試含有所選EGFRvIII結合子(P063.056)及最佳化CD3結合子CD3_{opt}或原始CD3結合子CD3_{orig}之EGFRvIII TCB。

【0478】如針對IgG (實例3)所見，含有CD3_{opt}或CD3_{orig}之TCB皆在Jurkat NFAT報導子細胞上具有類似功能活性且以濃度依賴性方式誘導CD3活化(圖20)。

【0479】

目標細胞殺死

在腫瘤細胞殺死實驗中，在神經膠母細胞瘤細胞株 U87MG-EGFR_{vIII}及PBMC存在下，如上文在實例8中所描述將含有所選EGFR_{vIII}結合子(P063.056)及最佳化CD3結合子CD3_{opt}或原始CD3結合子CD3_{orig}之EGFR_{vIII} TCB與含有親本EGFR_{vIII}結合子P056.021及CD3結合子CD3_{orig}之EGFR_{vIII} TCB進行比較。如在Jurkat NFAT報導子細胞上所見，具有CD3_{opt}或CD3_{orig}之TCB之功能活性在誘導腫瘤細胞溶解及活化CD4及CD8 T細胞方面類似，如藉由CD69上調所量測(圖25)。

【0480】 另外，將「2+1型式」(如圖6中所示)之具有EGFR_{vIII}結合子P063.056及最佳化CD3結合子CD3_{opt}的EGFR_{vIII} TCB之功能活性與「1+1頭尾型式」(示意性地描繪於圖1G中)之具有相同EGFR_{vIII}及CD3結合子的EGFR_{vIII} TCB進行比較。在Jurkat NFAT報導子細胞分析及腫瘤細胞殺死分析中，用神經膠母細胞瘤細胞株U87MG-EGFR_{vIII}如實例8中所描述測試此等兩種EGFR_{vIII} TCB。2+1型式之EGFR_{vIII} TCB在Jurkat NFAT報導子細胞分析中所量測之CD3活化(圖26)及使用PBMC之殺死分析中的腫瘤細胞殺死及T細胞活化之誘導(圖27)兩者中皆具有較優功能活性。

【0481】

**實例11-包含最佳化CD3結合子之T細胞雙特異性抗體之功能性特徵化
藉由EGFR_{vIII} TCB進行之T細胞增殖及活化**

在T細胞增殖分析中於U87MG-EGFR_{vIII}細胞上將含有所選EGFR結合子(P063.056)及最佳化CD3結合子CD3_{opt}或原始CD3結合子CD3_{orig}之

EGFR_{vIII} TCB之功能活性與含有親本EGFR_{vIII}結合子P056.021及CD3結合子CD3_{orig}之EGFR_{vIII} TCB進行比較(圖28)。全部三個TCB誘導CD4 T細胞及CD8 T細胞之強增殖及活化。具有CD3_{opt}之P063.056 EGFR_{vIII} TCB具有比另兩個EGFR_{vIII} TCB高之活性。

【0482】

藉由EGFR_{vIII} TCB進行之腫瘤細胞溶解

接下來，在腫瘤細胞溶解分析中用與DK-MG細胞共培養之PBMC測試含有所選EGFR結合子(P063.056)及最佳化CD3結合子CD3_{opt}之EGFR_{vIII} TCB以及含有親本EGFR_{vIII}結合子P056.021及CD3結合子CD3_{orig}之EGFR_{vIII} TCB(圖29)。在此分析中，除腫瘤細胞溶解以外，量測T細胞活化及細胞介素釋放作為額外讀出。如之前所見，具有CD3_{opt}之P063.056 EGFR_{vIII} TCB在腫瘤細胞溶解、T細胞活化以及IFN γ 及TNF α 之釋放方面具有之活性比具有CD3_{orig}之P056.021 EGFR_{vIII} TCB高。

【0483】

藉由TYRP1 TCB進行之T細胞活化及腫瘤細胞溶解

藉由將原發性黑素瘤細胞株M150543與自健康供體分離之PBMC一起共培養來測試TYRP1 TCB誘導細胞介素釋放之功能特性。在處理24 h及48 h之後分析由T細胞經由TYRP1 TCB介導之腫瘤細胞溶解(圖30)。在處理48 h之後分析IFN γ 及TNF α 至上清液中之釋放以及CD4及CD8 T細胞活化。TYRP1 TCB能夠在24 h之後誘導強效腫瘤細胞溶解。此伴隨著藉由上調CD25測定的CD4及CD8 T細胞之強活化以及IFN γ 及TNF α 之大量釋放。

【0484】

方法

PBMC分離

藉由對獲自健康人類供體的新鮮血液進行Histopaque密度離心來製備外周血液單核細胞(PBMC)。新鮮血液用無菌PBS稀釋且經Histopaque梯度(Sigma, #H8889)分層。離心(450×g, 30分鐘, 室溫)之後, 丟棄含PBMC之相界面上方的血漿且將PBMC轉移至新的法爾康管中, 隨後填充50 ml PBS。對混合物進行離心(400×g, 10分鐘, 室溫), 丟棄上清液且將PBMC集結粒用無菌PBS洗滌兩次(離心步驟350×g, 10分鐘)。對所得PBMC群體進行自動計數(ViCell)且於含有10% FCS及1% GlutaMAX之RPMI1640培養基中, 在細胞培育箱中在37°C、5% CO₂下儲存直至進一步使用(不超過24小時)或冷凍並儲存於液氮中直至進一步使用。使用前一天, 使冷凍PBMC解凍且在37°C於培養基中培養過夜。

【0485】

T細胞增殖

簡言之, 收集目標細胞, 計數且用PBS洗滌兩次。將細胞以5百萬個細胞每毫升再懸浮於PBS中。在37°C下將細胞用細胞增生染料eFluor 670(eBioscience, #65-0840-85)以5 μM之最終濃度染色10 min。為了停止染色反應, 將4體積之低溫全細胞培養基添加至細胞懸浮液且在4°C下培育5 min, 且隨後用培養基洗滌三次。對經標記之目標細胞計數, 且於RPMI1640、10% FCS及1% GlutaMax中調整至10萬個細胞/毫升。將10,000個目標細胞/孔接種至96孔培養盤中。隨後, 以指定濃度添加處理物, 且在結束時每孔添加與健康供體分離之100,000 PBMC。將細胞在37°C下培育5天, 隨後收集PBMC, 且用CD3 BUV395 (BioLegend,

#563548)、CD4 PE (BioLegend, #300508)、CD8 APC (BioLegend, #344722)、CD25 PE/Cy7 (BioLegend, #302612)染色。藉由用流動式細胞測量術(FACS Fortessa, BD Bioscience)量測eFluor 670染料於CD4 T細胞及CD8 T細胞中之稀釋來測定增殖,且藉由量測CD25上調來測定CD4及CD8 T細胞之活化。

【0486】

T細胞介導之腫瘤細胞殺死

用胰蛋白酶/EDTA收集目標細胞,洗滌且使用平底96孔培養盤以30 000個細胞/孔之密度塗鋪。使細胞黏附過夜。針對殺死分析,以指定濃度一式三份添加抗體。以10:1之最終效應目標(E:T)比將PBMC添加至目標細胞。在37°C、5% CO₂下培育24 h之後,藉由對藉由細胞凋亡/壞死細胞釋放至細胞上清液中之LDH進行定量(LDH偵測套組, Roche Applied Science, #11 644 793 001)來評定目標細胞殺死。藉由將目標細胞與1% Triton X-100一起培育來實現目標細胞之最大溶解(=100%)。最小溶解(=0%)係指在不存在雙特異性構築體之情況下,目標細胞與效應細胞共培育。

【0487】

T細胞活化

藉由流動式細胞測量術使用識別T細胞活化標記物CD25 (晚期活化標記物)及CD69 (早期活化標記物)之抗體評定CD8及CD4 T細胞在由TCB介導之目標細胞之T細胞殺死後的活化。培育48 h之後,將PBMC轉移至圓底96孔培養盤中,以350×g離心5 min且用FACS緩衝液洗滌兩次。根據供應商之指示進行CD4 APC (BioLegend, #300514)、CD8 FITC

(#344704, BioLegend)、CD25 BV421 (BioLegend, #302630)及CD69 PE (BioLegend, #310906)之表面染色。將細胞用150微升/孔之FACS緩衝液洗滌兩次且在4°C使用100微升/孔之固定緩衝液(BD, #554655)固定15 min。離心後,使樣本再懸浮於200微升/孔之FACS緩衝液中。在BD FACS Fortessa處分析樣本。

【0488】

細胞介素分泌

藉由流動式細胞測量術,使用細胞測量珠粒陣列(cytometric bead array, CBA)根據製造商的說明來量測上清液中之細胞介素分泌,但僅使用25 µl之上清液及珠粒代替50 µl珠粒及樣本。使用以下CBA套組(BD Biosciences):CBA人類干擾素 γ (IFN γ)靈活組合及CBA人類TNF靈活組合。使用BD FACS Canto II或BD FACS Fortessa來量測樣本,且使用Diva軟體(BD Biosciences)進行分析。

【0489】

實例12-小鼠中關於EGFRvIII TCB之PK研究

在以1 mg/kg靜脈內推注投與至人類FcRn轉殖基因(株系32,同種接合)及NOD-SCID小鼠之後,研究包含最佳化CD3結合子CD3_{opt}之EGFRvIII TCB之藥物動力學(PK)。直至672 h自人類FcRn轉殖基因(tg)小鼠及NOD-SCID小鼠(自給藥後5 min至672 h每隻小鼠取9個樣本)獲取連續血液微量樣本。在非GLP條件下使用特異性酶聯結免疫吸附劑分析法(ELISA)分析用EGFRvIII TCB處理之小鼠血清樣本。用經生物素標記之EGFRvIII抗原(huEGFRvIII his生物素)在經鏈黴親和素塗佈之微量滴定盤(SA-MTP)上進行EGFRvIII TCB之捕捉。用針對人類IgG1 Fc之經地殼新

配基(digoxigenin)標記之單株抗體(PGLALA)，接著添加抗地殼新配基 POD二級偵測抗體來偵測結合之EGFRvIII TCB(參見實例3)。藉由添加過氧化酶基質(ABTS)來產生信號。校準範圍為2.35 ng/ml至150 ng/ml，定量下限(LLOQ)為2.5 ng/ml。

【0490】 此研究之結果展示於表7中。兩種所測試小鼠菌株之EGFRvIII TCB之PK概況處於預期範圍內。此表明，CD3結合子之CDR之工程改造並不產生將影響抗體清除率之其他序列不利因素。

表7. huFcRn tg小鼠及NOD-SCID小鼠中之清除率資料(毫升/天/公斤；平均值)。

小鼠菌株	EGFRvIII TCB (CD3 _{opt})
hFcRn tg32	12.4
NOD-SCID	10.1

【0491】

實例13-包含最佳化CD3結合子之T細胞雙特異性抗體之活體內功效

在人類腫瘤細胞株之異種移植小鼠模型(IGR-1黑素瘤異種移植模型)測試TYRP1 TCB (包含實例1中鑑別之最佳化CD3結合子)的抗腫瘤功效。

【0492】 在含有10% FCS (Sigma)之DMEM培養基中培養IGR-1細胞(人類黑素瘤)。在37℃下，在5% CO₂之水飽和氛圍中培養細胞。移植使用第6次繼代。細胞活力為96.7%。使用1 ml結核菌素注射器(BD Biosciences，Germany)於100 µl之RPMI細胞培養基(Gibco)中將2×10⁶個細胞/動物皮下注射至小鼠側腹。

【0493】 根據提交準則(GV-Solas；Felasa；TierschG)以每天12 h光照/12 h黑暗之循環將完全人類化之NSG雌性小鼠(Roche Glycart AG，Switzerland)維持在無特定病原體條件下。實驗研究方案由當地政府審查

且批准(ZH223/2017)。定期進行連續健康監測。

【0494】 研究第0天，將 2×10^6 個IGR-1細胞皮下注射至小鼠中，隨機分組且稱重。在腫瘤細胞注射二十天之後(腫瘤體積 $>200 \text{ mm}^3$)，對小鼠靜脈內注射 $10 \text{ } \mu\text{g}$ (0.5 mg/kg) TYRP1 TCB，每週兩次，持續五週。對所有小鼠靜脈內注射 $200 \text{ } \mu\text{l}$ 適當溶液。對載劑組中之小鼠注射組胺酸緩衝液，且對處理組注射TYRP1 TCB構築體。為獲得每 $200 \text{ } \mu\text{l}$ 適當量之抗體，需要時用組胺酸緩衝液稀釋儲備溶液。用測徑規一週三次量測腫瘤大小，且用GrahPad Prism軟體標繪為以 $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$ 為單位之體積。用JMP12軟體進行統計分析。

【0495】 圖31展示相較於載劑組，TYRP1 TCB在腫瘤生長抑制方面介導顯著功效($68\% \text{ TGI}$ ， $p=0.0058^*$)。

【0496】 同樣在人類腫瘤細胞株之異種移植小鼠模型(U87-EGFRvIII神經膠母細胞瘤異種移植模型)中測試EGFRvIII TCB (包含實例1中鑑別之最佳化CD3結合子)之抗腫瘤功效。

【0497】 U87細胞(人類神經膠母細胞瘤)最初自ATCC (Manassas, USA)獲得且經穩定轉染以表現人類EGFRvIII蛋白(Roche Glycart AG, Switzerland)。在擴增之後，將細胞寄存於Roche Glycart內部細胞庫中。將U87-EGFRvIII細胞株培養於含有 $10\% \text{ FCS}$ (Sigma)及 $0.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 嘌呤黴素(Invitrogen)之DMEM培養基中。在 37°C 下，在 $5\% \text{ CO}_2$ 之水飽和氛圍中培養細胞。移植使用第8次繼代。細胞活力為 94.7% 。使用 1 ml 結核菌素注射器(BD Biosciences, Germany)於 $100 \text{ } \mu\text{l}$ 之RPMI細胞培養基(Gibco)中將 5×10^5 個細胞/動物皮下注射至小鼠側腹。

【0498】 根據提交準則(GV-Solas ; Felasa ; TierschG)以每天 12 h

光照/12 h黑暗之循環將完全人類化之NSG雌性小鼠(Roche Glycart AG, Switzerland)維持在無特定病原體條件下。實驗研究方案由當地政府審查且批准(ZH223/2017)。定期進行連續健康監測。

【0499】 研究第0天，將 5×10^5 個U87-EGFRvIII細胞皮下注射至小鼠，隨機分組且稱重。在腫瘤細胞注射兩週之後(腫瘤體積 $>200 \text{ mm}^3$)，對小鼠靜脈內注射 $10 \text{ }\mu\text{g}$ (0.5 mg/kg) EGFRvIII TCB，每週兩次，持續三周。對所有小鼠靜脈內注射 $200 \text{ }\mu\text{l}$ 適當溶液。對載劑組中之小鼠注射組胺酸緩衝液，且對處理組注射EGFRvIII TCB構築體。為獲得每 $200 \text{ }\mu\text{l}$ 適當量之抗體，需要時用組胺酸緩衝液稀釋儲備溶液。用測徑規一週三次量測腫瘤大小，且用GrahPad Prism軟體標繪為以 $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$ 為單位之體積。

【0500】 圖32展示EGFRvIII TCB介導腫瘤生長控制方面之顯著功效，所有小鼠實現完全緩解。

* * *

【0501】 雖然出於清楚理解之目的，前述發明已藉助於說明及實例較詳細地加以描述，但該等描述及實例不應解釋為限制本發明之範疇。本文所引用的所有專利及科學文獻之揭示內容均以全文引用之方式明確併入。

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司(F. Hoffmann-La Roche AG)

<120> 結合CD3之抗體

<130> TW 108146680

<150> EP18214994.8

<151> 2018-12-21

<160> 122

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3orig HCDR1

<400> 1

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3opt HCDR1

<400> 2

Ser Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3orig / CD3opt HCDR2

<400> 3

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3orig HCDR3

<400> 4

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3opt HCDR3

<400> 5

His Thr Thr Phe Pro Ser Ser Tyr Val Ser Tyr Tyr Gly Tyr
1 5 10

<210> 6

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3orig VH

<400> 6

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 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 7
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3opt VH

<400> 7

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 Ala Ser Gly Phe Gln Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Thr Thr Phe Pro Ser Ser Tyr Val Ser Tyr Tyr
100 105 110

Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3orig / CD3opt LCDR1

<400> 8

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3orig / CD3opt LCDR2

<400> 9

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3orig / CD3opt LCDR3

<400> 10

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 11
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3orig / CD3opt VL

<400> 11

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 12
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3orig IgG HC

<400> 12

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 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr 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	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
225						230				235					240	
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
			245						250					255		
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
		260						265					270			
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
		275						280				285				
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
	290						295				300					
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
305						310				315					320	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
			325						330					335		
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
		340						345					350			

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 13
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3opt IgG HC

<400> 13

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 Ala Ser Gly Phe Gln Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Thr Thr Phe Pro Ser Ser Tyr Val Ser Tyr Tyr
100 105 110

Gly Tyr 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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

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

Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 14
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3orig / CD3opt IgG LC

<400> 14

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Thr Val
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TYRP1 HCDR1

<400> 15

Asp Tyr Phe Leu His
1 5

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TYRP1 HCDR2

<400> 16

Trp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Asn Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TYRP1 HCDR3

<400> 17

Arg Asp Tyr Thr Tyr Glu Lys Ala Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 18
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TYRP1 VH

<400> 18

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Asn Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Arg Asp Tyr Thr Tyr Glu Lys Ala Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TYRP1 LCDR1

<400> 19

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

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TYRP1 LCDR2

<400> 20

Asp Ala Lys Thr Leu Ala Asp
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TYRP1 LCDR3

<400> 21

Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TYRP1 VL

<400> 22

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 Gly Asn Ile Tyr 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 Asp Ala Lys Thr Leu Ala Asp 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 His Phe Trp Ser Leu Pro Phe
85 90 95

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

<210> 23
<211> 674
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TYRP1 VH-CH1(EF) - CD3orig/CD3opt VL-CH1 - Fc (杵・PGLALA)

<400> 23

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr
225 230 235 240

Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr
245 250 255

Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
260 265 270

Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr
275 280 285

Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu
290 295 300

Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu
305 310 315 320

Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly
325 330 335

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
340 345 350

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
355 360 365

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
370 375 380

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
385 390 395 400

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
405 410 415

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
420 425 430

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
435 440 445

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
450 455 460

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
465 470 475 480

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
485 490 495

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
500 505 510

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
515 520 525

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
530 535 540

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
545 550 555 560

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
565 570 575

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
580 585 590

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
595 600 605

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
610 615 620

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
625 630 635 640

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
645 650 655

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
660 665 670

Ser Pro

<210> 24
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TYRP1 VH-CH1(EE) -Fc (白，PGLALA)

<400> 24

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Asn Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Arg Asp Tyr Thr Tyr Glu Lys Ala Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro

<210> 25
<211> 214

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TYRP1 VL-CL(RK)

<400> 25

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 Gly Asn Ile Tyr 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 Asp Ala Lys Thr Leu Ala Asp 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 His Phe Trp Ser Leu Pro Phe
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys 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> 26
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3orig VH-CL

<400> 26

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 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 27
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3opt VH-CL

<400> 27

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 Ala Ser Gly Phe Gln Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Thr Thr Phe Pro Ser Ser Tyr Val Ser Tyr Tyr
100 105 110

Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 28
<211> 360
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類CD3 ϵ 莖- Fc (杆) - Avi

<400> 28

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro
20 25 30

Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
35 40 45

Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys
50 55 60

Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
65 70 75 80

Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg
85 90 95

Val Ser Glu Asn Cys Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser
100 105 110

Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
115 120 125

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
130 135 140

Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
145					150					155					160
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
				165					170					175	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
			180					185						190	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
		195					200					205			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
	210					215					220				
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
225					230					235					240
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
			245						250					255	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
		260						265						270	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
		275					280					285			
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
	290					295					300				
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
305					310					315					320
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
			325						330					335	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Ser	Gly	Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	Glu
		340						345					350		

Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
355 360

<210> 29
<211> 325
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類CD3 δ 莖- Fc (臼) - Avi

<400> 29

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser
20 25 30

Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
35 40 45

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr
50 55 60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Arg Ser Glu Gln Leu Tyr Phe Gln
65 70 75 80

Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
85 90 95

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
100 105 110

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
115 120 125

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
130 135 140

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
145 150 155 160

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
165 170 175

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
180 185 190

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
195 200 205

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
210 215 220

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
225 230 235 240

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
245 250 255

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
260 265 270

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
275 280 285

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
290 295 300

Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
305 310 315 320

Ile Glu Trp His Glu
325

<210> 30
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 食蟹獼猴CD3 ε 莖- Fc (杵) - Avi

<400> 30

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Gln
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Ser Gln His Leu
20 25 30

Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser
35 40 45

Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly
50 55 60

Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His
65 70 75 80

His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Ser Glu Asn Cys Val Asp Glu Gln
85 90 95

Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr
100 105 110

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
130 135 140

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
145 150 155 160

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
165 170 175

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
180 185 190

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
195 200 205

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
210 215 220

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
225 230 235 240

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
245 250 255

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
260 265 270

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
275 280 285

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
290 295 300

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
305 310 315 320

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly
325 330 335

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
340 345 350

<210> 31
<211> 334

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 食蟹獼猴CD3 δ 莖- Fc (白) - Avi

<400> 31

Phe Lys Ile Pro Val Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Lys Cys
1 5 10 15

Asn Thr Ser Val Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Thr
20 25 30

Asn Asn Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
35 40 45

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Ala
50 55 60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Ser Gln Asn Cys Val Asp Glu Gln Leu
65 70 75 80

Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys
85 90 95

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
100 105 110

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
115 120 125

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
130 135 140

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
145 150 155 160

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
165 170 175

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
180 185 190

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
195 200 205

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser
210 215 220

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
225 230 235 240

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
245 250 255

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
260 265 270

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
275 280 285

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
290 295 300

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly
305 310 315 320

Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
325 330

<210> 32
<211> 699
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類TYRP1 ECD - Fc (杵) - Avi

<400> 32

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

Cys Cys Pro Asp Leu Ser Pro Val Ser Gly Pro Gly Thr Asp Arg Cys
20 25 30

Gly Ser Ser Ser Gly Arg Gly Arg Cys Glu Ala Val Thr Ala Asp Ser
35 40 45

Arg Pro His Ser Pro Gln Tyr Pro His Asp Gly Arg Asp Asp Arg Glu
50 55 60

Val Trp Pro Leu Arg Phe Phe Asn Arg Thr Cys His Cys Asn Gly Asn
65 70 75 80

Phe Ser Gly His Asn Cys Gly Thr Cys Arg Pro Gly Trp Arg Gly Ala
85 90 95

Ala Cys Asp Gln Arg Val Leu Ile Val Arg Arg Asn Leu Leu Asp Leu
100 105 110

Ser Lys Glu Glu Lys Asn His Phe Val Arg Ala Leu Asp Met Ala Lys
115 120 125

Arg Thr Thr His Pro Leu Phe Val Ile Ala Thr Arg Arg Ser Glu Glu
130 135 140

Ile Leu Gly Pro Asp Gly Asn Thr Pro Gln Phe Glu Asn Ile Ser Ile
145 150 155 160

Tyr Asn Tyr Phe Val Trp Thr His Tyr Tyr Ser Val Lys Lys Thr Phe
165 170 175

Leu Gly Val Gly Gln Glu Ser Phe Gly Glu Val Asp Phe Ser His Glu
180 185 190

Gly	Pro	Ala	Phe	Leu	Thr	Trp	His	Arg	Tyr	His	Leu	Leu	Arg	Leu	Glu
195				200				205							
Lys	Asp	Met	Gln	Glu	Met	Leu	Gln	Glu	Pro	Ser	Phe	Ser	Leu	Pro	Tyr
210				215				220							
Trp	Asn	Phe	Ala	Thr	Gly	Lys	Asn	Val	Cys	Asp	Ile	Cys	Thr	Asp	Asp
225				230				235				240			
Leu	Met	Gly	Ser	Arg	Ser	Asn	Phe	Asp	Ser	Thr	Leu	Ile	Ser	Pro	Asn
				245				250				255			
Ser	Val	Phe	Ser	Gln	Trp	Arg	Val	Val	Cys	Asp	Ser	Leu	Glu	Asp	Tyr
260				265				270							
Asp	Thr	Leu	Gly	Thr	Leu	Cys	Asn	Ser	Thr	Glu	Asp	Gly	Pro	Ile	Arg
275				280				285							
Arg	Asn	Pro	Ala	Gly	Asn	Val	Ala	Arg	Pro	Met	Val	Gln	Arg	Leu	Pro
290				295				300							
Glu	Pro	Gln	Asp	Val	Ala	Gln	Cys	Leu	Glu	Val	Gly	Leu	Phe	Asp	Thr
305				310				315				320			
Pro	Pro	Phe	Tyr	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Ser	Phe	Arg	Asn	Thr	Val	Glu
				325				330				335			
Gly	Tyr	Ser	Asp	Pro	Thr	Gly	Lys	Tyr	Asp	Pro	Ala	Val	Arg	Ser	Leu
340				345				350							
His	Asn	Leu	Ala	His	Leu	Phe	Leu	Asn	Gly	Thr	Gly	Gly	Gln	Thr	His
355				360				365							
Leu	Ser	Pro	Asn	Asp	Pro	Ile	Phe	Val	Leu	Leu	His	Thr	Phe	Thr	Asp
370				375				380							
Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Trp	Leu	Arg	Arg	Tyr	Asn	Ala	Asp	Ile	Ser	Thr
385				390				395				400			

Phe Pro Leu Glu Asn Ala Pro Ile Gly His Asn Arg Gln Tyr Asn Met
405 410 415

Val Pro Phe Trp Pro Pro Val Thr Asn Thr Glu Met Phe Val Thr Ala
420 425 430

Pro Asp Asn Leu Gly Tyr Thr Tyr Glu Ile Gln Trp Pro Ser Arg Glu
435 440 445

Phe Ser Val Pro Glu Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
450 455 460

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
465 470 475 480

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
485 490 495

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
500 505 510

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
515 520 525

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
530 535 540

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
545 550 555 560

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
565 570 575

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu
580 585 590

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
595 600 605

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
610 615 620

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
625 630 635 640

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
645 650 655

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
660 665 670

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp
675 680 685

Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
690 695

<210> 33
<211> 698
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 食蟹獼猴TYRP1 ECD - Fc (杵) - Avi

<400> 33

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

Cys Cys Pro Asp Leu Ser Pro Met Ser Gly Pro Gly Thr Asp Arg Cys
20 25 30

Gly Ser Ser Ser Gly Arg Gly Arg Cys Glu Ala Val Thr Ala Asp Ser
35 40 45

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

Ser Val Phe Ser Gln Trp Arg Val Val Cys Asp Ser Leu Glu Asp Tyr
260 265 270

Asp Thr Leu Gly Thr Leu Cys Asn Ser Thr Glu Ser Gly Pro Ile Arg
275 280 285

Arg Asn Pro Ala Gly Asn Val Ala Arg Pro Met Val Gln Arg Leu Pro
290 295 300

Glu Pro Gln Asp Val Ala Gln Cys Leu Glu Val Gly Leu Phe Asp Thr
305 310 315 320

Pro Pro Phe Tyr Ser Asn Ser Thr Asn Ser Phe Arg Asn Thr Val Glu
325 330 335

Gly Tyr Ser Asp Pro Thr Gly Lys Tyr Asp Pro Ala Val Arg Ser Leu
340 345 350

His Asn Leu Ala His Leu Phe Leu Asn Gly Thr Gly Gly Gln Thr His
355 360 365

Leu Ser Pro Asn Asp Pro Ile Phe Val Leu Leu His Thr Phe Thr Asp
370 375 380

Ala Val Phe Asp Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Asn Ala Asp Ile Ser Thr
385 390 395 400

Phe Pro Leu Glu Asn Ala Pro Ile Gly His Asn Arg Gln Tyr Asn Met
405 410 415

Val Pro Phe Trp Pro Pro Val Thr Asn Thr Glu Met Phe Val Thr Ala
420 425 430

Pro Asp Asn Leu Gly Tyr Thr Tyr Glu Val Gln Trp Pro Ser Arg Glu
435 440 445

Phe Ser Val Pro Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
450 455 460

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
465 470 475 480

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
485 490 495

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
500 505 510

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
515 520 525

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
530 535 540

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
545 550 555 560

Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
565 570 575

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
580 585 590

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
595 600 605

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
610 615 620

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
625 630 635 640

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
645 650 655

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
660 665 670

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile
675 680 685

Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
690 695

<210> 34
<211> 699
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠TYRP1 ECD - Fc (杆) - Avi

<400> 34

Gln Phe Pro Arg Glu Cys Ala Asn Ile Glu Ala Leu Arg Arg Gly Val
1 5 10 15

Cys Cys Pro Asp Leu Leu Pro Ser Ser Gly Pro Gly Thr Asp Pro Cys
20 25 30

Gly Ser Ser Ser Gly Arg Gly Arg Cys Val Ala Val Ile Ala Asp Ser
35 40 45

Arg Pro His Ser Arg His Tyr Pro His Asp Gly Lys Asp Asp Arg Glu
50 55 60

Ala Trp Pro Leu Arg Phe Phe Asn Arg Thr Cys Gln Cys Asn Asp Asn
65 70 75 80

Phe Ser Gly His Asn Cys Gly Thr Cys Arg Pro Gly Trp Arg Gly Ala
85 90 95

Ala Cys Asn Gln Lys Ile Leu Thr Val Arg Arg Asn Leu Leu Asp Leu
100 105 110

Ser Pro Glu Glu Lys Ser His Phe Val Arg Ala Leu Asp Met Ala Lys
115 120 125

Arg Thr Thr His Pro Gln Phe Val Ile Ala Thr Arg Arg Leu Glu Asp
130 135 140

Ile Leu Gly Pro Asp Gly Asn Thr Pro Gln Phe Glu Asn Ile Ser Val
145 150 155 160

Tyr Asn Tyr Phe Val Trp Thr His Tyr Tyr Ser Val Lys Lys Thr Phe
165 170 175

Leu Gly Thr Gly Gln Glu Ser Phe Gly Asp Val Asp Phe Ser His Glu
180 185 190

Gly Pro Ala Phe Leu Thr Trp His Arg Tyr His Leu Leu Gln Leu Glu
195 200 205

Arg Asp Met Gln Glu Met Leu Gln Glu Pro Ser Phe Ser Leu Pro Tyr
210 215 220

Trp Asn Phe Ala Thr Gly Lys Asn Val Cys Asp Val Cys Thr Asp Asp
225 230 235 240

Leu Met Gly Ser Arg Ser Asn Phe Asp Ser Thr Leu Ile Ser Pro Asn
245 250 255

Ser Val Phe Ser Gln Trp Arg Val Val Cys Glu Ser Leu Glu Glu Tyr
260 265 270

Asp Thr Leu Gly Thr Leu Cys Asn Ser Thr Glu Gly Gly Pro Ile Arg
275 280 285

Arg Asn Pro Ala Gly Asn Val Gly Arg Pro Ala Val Gln Arg Leu Pro
290 295 300

Glu	Pro	Gln	Asp	Val	Thr	Gln	Cys	Leu	Glu	Val	Arg	Val	Phe	Asp	Thr
305					310					315					320
Pro	Pro	Phe	Tyr	Ser	Asn	Ser	Thr	Asp	Ser	Phe	Arg	Asn	Thr	Val	Glu
				325					330					335	
Gly	Tyr	Ser	Ala	Pro	Thr	Gly	Lys	Tyr	Asp	Pro	Ala	Val	Arg	Ser	Leu
			340						345					350	
His	Asn	Leu	Ala	His	Leu	Phe	Leu	Asn	Gly	Thr	Gly	Gly	Gln	Thr	His
		355						360					365		
Leu	Ser	Pro	Asn	Asp	Pro	Ile	Phe	Val	Leu	Leu	His	Thr	Phe	Thr	Asp
		370					375					380			
Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Trp	Leu	Arg	Arg	Tyr	Asn	Ala	Asp	Ile	Ser	Thr
385						390					395				400
Phe	Pro	Leu	Glu	Asn	Ala	Pro	Ile	Gly	His	Asn	Arg	Gln	Tyr	Asn	Met
				405						410					415
Val	Pro	Phe	Trp	Pro	Pro	Val	Thr	Asn	Thr	Glu	Met	Phe	Val	Thr	Ala
			420						425					430	
Pro	Asp	Asn	Leu	Gly	Tyr	Ala	Tyr	Glu	Val	Gln	Trp	Pro	Gly	Gln	Glu
			435							440				445	
Phe	Thr	Val	Ser	Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
		450						455				460			
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
465						470					475				480
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
				485						490					495
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
				500						505				510	

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
515 520 525

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
530 535 540

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
545 550 555 560

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
565 570 575

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu
580 585 590

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
595 600 605

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
610 615 620

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
625 630 635 640

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
645 650 655

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
660 665 670

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp
675 680 685

Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
690 695

<210> 35
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc (臼)

<400> 35

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro
225

<210> 36
<211> 393
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII ECD - Avi - His

<400> 36

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys
1 5 10 15

Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val
20 25 30

Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly
35 40 45

Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn
50 55 60

Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile
65 70 75 80

Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	His	Thr	Pro	Pro	Leu
85					90					95					
Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Gly
100					105					110					
Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr	Asp	Leu	His	Ala
115					120					125					
Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	Gln	His	Gly	Gln
130					135					140					
Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg
145					150					155					160
Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	Lys
165					170					175					
Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu	Phe	Gly	Thr
180					185					190					
Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys
195					200					205					
Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser	Pro	Glu	Gly	Cys
210					215					220					
Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Arg
225					230					235					240
Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Arg
245					250					255					
Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu
260					265					270					
Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Asp	Asn	Cys
275					280					285					

Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys
290 295 300

Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala
305 310 315 320

Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly
325 330 335

Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile
340 345 350

Pro Ser Val Asp Gly Gly Ser Pro Thr Pro Pro Thr Pro Gly Gly Gly
355 360 365

Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
370 375 380

Ala Arg Ala His His His His His His
385 390

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.021 HCDR1

<400> 37

Ser Tyr Trp Ile Ala
1 5

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P056.021 HCDR2

<400> 38

Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P056.021 HCDR3

<400> 39

Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P056.021 VH

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Asp Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.021 LCDR1

<400> 41

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.021 LCDR2

<400> 42

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.021 LCDR3

<400> 43

Gln Gln Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr
1 5 10

<210> 44
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.021 VL

<400> 44

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
100 105 110

Ile Lys

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.052 HCDR1

<400> 45

Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.052 HCDR2

<400> 46

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Arg Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.052 HCDR3

<400> 47

Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 48
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.052 VH

<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Met Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Arg Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P056.052 LCDR1

<400> 49

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P056.052 LCDR2

<400> 50

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P056.052 LCDR3

<400> 51

Gln Gln Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr
1 5 10

<210> 52

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P056.052 VL

<400> 52

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
100 105 110

Ile Lys

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P047.019 HCDR1

<400> 53

Ser Ile Trp Ile His
1 5

<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P047.019 HCDR2

<400> 54

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P047.019 HCDR3

<400> 55

Thr Gly Pro Gly Leu Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 56
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P047.019 VH

<400> 56

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Ser Ile
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Pro Gly Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P047.019 LCDR1

<400> 57

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P047.019 LCDR2

<400> 58

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P047.019 LCDR3

<400> 59

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile Thr
1 5

<210> 60
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P047.019 VL

<400> 60

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Ser Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.012 HCDR1

<400> 61

Asn Tyr Trp Ile Ala
1 5

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.012 HCDR2

<400> 62

Ile Ile Tyr Pro Asp Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.012 HCDR3

<400> 63

Ala Thr Asn Ile Ala Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 64
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.012 VH

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ala Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Asp Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Thr Asn Ile Ala Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.012 LCDR1

<400> 65

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Trp Asn Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.012 LCDR2

<400> 66

Trp Ala Ser Lys Arg Glu Ser
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.012 LCDR3

<400> 67

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Ile Thr
1 5

<210> 68
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.012 VL

<400> 68

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Trp Asn
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Lys Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Ser Tyr Ser Ala Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P057.011 HCDR1

<400> 69

Arg Arg Trp Ile Ala
1 5

<210> 70

<211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.011 HCDR2

<400> 70

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 71
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.011 HCDR3

<400> 71

Ala Thr Asn Ile Ala Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 72
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.011 VH

<400> 72

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Gly Arg Arg
20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Thr Asn Ile Ala Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 73
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.011 LCDR1

<400> 73

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Trp Asn Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.011 LCDR2

<400> 74

Trp Ala Ser Lys Arg Glu Ser
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.011 LCDR3

<400> 75

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Ile Thr
1 5

<210> 76
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P057.011 VL

<400> 76

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Trp Asn
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Lys Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Ser Tyr Ser Ala Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 77
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.027 HCDR1

<400> 77

Asn Asn Trp Ile Ala
1 5

<210> 78
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.027 HCDR2

<400> 78

Val Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.027 HCDR3

<400> 79

Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 80

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P056.027 VH

<400> 80

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Asn Asn
20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 81

<211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.027 LCDR1

<400> 81

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 82
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.027 LCDR2

<400> 82

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P056.027 LCDR3

<400> 83

Gln Gln Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr
1 5 10

<210> 84
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P056.027 VL

<400> 84

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
100 105 110

Ile Lys

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P063.056 HCDR1

<400> 85

Ser Tyr Trp Ile Ala
1 5

<210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P063.056 HCDR2

<400> 86

Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 87
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P063.056 HCDR3

<400> 87

Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 88
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P063.056 VH

<400> 88

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Asp Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P063.056 LCDR1

<400> 89

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P063.056 LCDR2

<400> 90

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 91

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P063.056 LCDR3

<400> 91

Gln Gln Gln Arg Asp Gly Pro Pro Val Thr
1 5 10

<210> 92

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P063.056 VL

<400> 92

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Gln Arg Asp Gly Pro Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
100 105 110

Ile Lys

<210> 93
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P064.078 HCDR1

<400> 93

Ser Tyr Trp Ile Ala
1 5

<210> 94
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P064.078 HCDR2

<400> 94

Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 95
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P064.078 HCDR3

<400> 95

Val Ser Arg Leu Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 96

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P064.078 VH

<400> 96

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Asp Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ser Arg Leu Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P064.078 LCDR1

<400> 97

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P064.078 LCDR2

<400> 98

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P064.078 LCDR3

<400> 99

Gln Gln Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr
1 5 10

<210> 100
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P064.078 VL

<400> 100

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Val His Ser Gly Pro Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
100 105 110

Ile Lys

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P065.036 HCDR1

<400> 101

Ser Tyr Trp Ile Ala
1 5

<210> 102
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P065.036 HCDR2

<400> 102

Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 103
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P065.036 HCDR3

<400> 103

Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 104
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P065.036 VH

<400> 104

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Asp Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 105
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII P065.036 LCDR1

<400> 105

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P065.036 LCDR2

<400> 106

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P065.036 LCDR3

<400> 107

Gln Gln Val Tyr Ser Gly Pro Pro Val Thr
1 5 10

<210> 108

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII P065.036 VL

<400> 108

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Val Tyr Ser Gly Pro Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
100 105 110

Ile Lys

<210> 109
<211> 672
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII VH-CH1(EE) - CD3orig/CD3opt VL-CH1 - Fc (杵，PGLALA)

<400> 109

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Asp Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly
210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu
225 230 235 240

Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly
245 250 255

Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
260 265 270

Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys
275 280 285

Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly
290 295 300

Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu
305					310					315					320
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly
				325					330					335	
Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			340					345					350		
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
		355					360					365			
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
370					375						380				
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
385					390					395					400
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				405					410					415	
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			420					425					430		
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
		435					440					445			
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly
450					455						460				
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
465					470					475					480
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				485					490					495	
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			500					505					510		

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
515 520 525

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
530 535 540

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
545 550 555 560

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
565 570 575

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
580 585 590

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
595 600 605

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
610 615 620

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
625 630 635 640

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
645 650 655

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
660 665 670

<210> 110

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRvIII VH-CH1(EE) -Fc (白，PGLALA)

<400> 110

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Asp Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
		195					200					205				
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
		210					215					220				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	
					230					235					240	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
				245					250					255		
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
			260					265						270		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
		275					280					285				
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
		290				295					300					
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
					310					315					320	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
				325					330					335		
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	
			340					345						350		
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	
			355				360					365				
Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	
		370				375					380					
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	
				390					395						400	

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 111
<211> 221
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFRvIII VL-CL(RK)

<400> 111

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Gln Arg Asp Gly Pro Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
100 105 110

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
115 120 125

Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
130 135 140

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
145 150 155 160

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
165 170 175

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
180 185 190

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

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 112
<211> 186
<212> PRT
<213> 智人

<400> 112

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro
20 25 30

Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
35 40 45

Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys

50					55					60					
Glu	Phe	Ser	Glu	Leu	Glu	Gln	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Val	Cys	Tyr	Pro	Arg
65					70					75					80
Gly	Ser	Lys	Pro	Glu	Asp	Ala	Asn	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Arg	Ala	Arg
				85					90					95	
Val	Cys	Glu	Asn	Cys	Met	Glu	Met	Asp	Val	Met	Ser	Val	Ala	Thr	Ile
			100					105					110		
Val	Ile	Val	Asp	Ile	Cys	Ile	Thr	Gly	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Tyr
		115					120					125			
Tyr	Trp	Ser	Lys	Asn	Arg	Lys	Ala	Lys	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Arg	Gly
	130					135					140				
Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Arg	Gln	Arg	Gly	Gln	Asn	Lys	Glu	Arg	Pro	Pro
145					150					155					160
Pro	Val	Pro	Asn	Pro	Asp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Arg	Lys	Gly	Gln	Arg	Asp
			165						170					175	
Leu	Tyr	Ser	Gly	Leu	Asn	Gln	Arg	Arg	Ile						
			180					185							

<210> 113
<211> 177
<212> PRT
<213> 長尾獼猴

<400> 113

Gln	Asp	Gly	Asn	Glu	Glu	Met	Gly	Ser	Ile	Thr	Gln	Thr	Pro	Tyr	Gln
1				5					10					15	
Val	Ser	Ile	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Ile	Leu	Thr	Cys	Ser	Gln	His	Leu
			20					25					30		

Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser
35 40 45

Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly
50 55 60

Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His
65 70 75 80

His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp
85 90 95

Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Leu
100 105 110

Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys
115 120 125

Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly
130 135 140

Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro
145 150 155 160

Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg
165 170 175

Ile

<210> 114
<211> 513
<212> PRT
<213> 智人

<400> 114

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

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

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

Val Pro Phe Trp Pro Pro Val Thr Asn Thr Glu Met Phe Val Thr Ala
420 425 430

Pro Asp Asn Leu Gly Tyr Thr Tyr Glu Ile Gln Trp Pro Ser Arg Glu
435 440 445

Phe Ser Val Pro Glu Ile Ile Ala Ile Ala Val Val Gly Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Val Ala Leu Ile Phe Gly Thr Ala Ser Tyr Leu Ile Arg Ala Arg
465 470 475 480

Arg Ser Met Asp Glu Ala Asn Gln Pro Leu Leu Thr Asp Gln Tyr Gln
485 490 495

Cys Tyr Ala Glu Glu Tyr Glu Lys Leu Gln Asn Pro Asn Gln Ser Val
500 505 510

Val

<210> 115
<211> 919
<212> PRT
<213> 智人

<400> 115

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys
1 5 10 15

Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val
20 25 30

Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly
35 40 45

Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn
50 55 60

Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile
65 70 75 80

Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu
85 90 95

Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly
100 105 110

Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala
115 120 125

Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln
130 135 140

Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg
145 150 155 160

Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys
165 170 175

Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr
180 185 190

Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys
195 200 205

Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys
210 215 220

Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg
225 230 235 240

Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg
245 250 255

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

Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn
465 470 475 480

Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln
485 490 495

Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg
500 505 510

Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val
515 520 525

Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His
530 535 540

Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val
545 550 555 560

Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys
565 570 575

Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu
580 585 590

Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser
595 600 605

Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr
610 615 620

Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu
625 630 635 640

Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met
645 650 655

Val	Lys	Cys	Trp	Met	Ile	Asp	Ala	Asp	Ser	Arg	Pro	Lys	Phe	Arg	Glu
660					665					670					
Leu	Ile	Ile	Glu	Phe	Ser	Lys	Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln	Arg	Tyr	Leu
675					680					685					
Val	Ile	Gln	Gly	Asp	Glu	Arg	Met	His	Leu	Pro	Ser	Pro	Thr	Asp	Ser
690					695					700					
Asn	Phe	Tyr	Arg	Ala	Leu	Met	Asp	Glu	Glu	Asp	Met	Asp	Asp	Val	Val
705					710					715					720
Asp	Ala	Asp	Glu	Tyr	Leu	Ile	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Ser	Ser	Pro
725					730					735					
Ser	Thr	Ser	Arg	Thr	Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Thr	Ser	Asn
740					745					750					
Asn	Ser	Thr	Val	Ala	Cys	Ile	Asp	Arg	Asn	Gly	Leu	Gln	Ser	Cys	Pro
755					760					765					
Ile	Lys	Glu	Asp	Ser	Phe	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Ser	Asp	Pro	Thr	Gly
770					775					780					
Ala	Leu	Thr	Glu	Asp	Ser	Ile	Asp	Asp	Thr	Phe	Leu	Pro	Val	Pro	Glu
785					790					795					800
Tyr	Ile	Asn	Gln	Ser	Val	Pro	Lys	Arg	Pro	Ala	Gly	Ser	Val	Gln	Asn
805					810					815					
Pro	Val	Tyr	His	Asn	Gln	Pro	Leu	Asn	Pro	Ala	Pro	Ser	Arg	Asp	Pro
820					825					830					
His	Tyr	Gln	Asp	Pro	His	Ser	Thr	Ala	Val	Gly	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu
835					840					845					
Asn	Thr	Val	Gln	Pro	Thr	Cys	Val	Asn	Ser	Thr	Phe	Asp	Ser	Pro	Ala
850					855					860					

His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp
865 870 875 880

Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe
885 890 895

Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
900 905 910

Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
915

<210> 116
<211> 1186
<212> PRT
<213> 智人

<400> 116

Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln
1 5 10 15

Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn
20 25 30

Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg
35 40 45

Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr
50 55 60

Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu
65 70 75 80

Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala
85 90 95

Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro

100					105					110						
Met	Arg	Asn	Leu	Gln	Glu	Ile	Leu	His	Gly	Ala	Val	Arg	Phe	Ser	Asn	
115					120					125						
Asn	Pro	Ala	Leu	Cys	Asn	Val	Glu	Ser	Ile	Gln	Trp	Arg	Asp	Ile	Val	
130					135					140						
Ser	Ser	Asp	Phe	Leu	Ser	Asn	Met	Ser	Met	Asp	Phe	Gln	Asn	His	Leu	
145					150					155					160	
Gly	Ser	Cys	Gln	Lys	Cys	Asp	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn	Gly	Ser	Cys	Trp	
165					170					175						
Gly	Ala	Gly	Glu	Glu	Asn	Cys	Gln	Lys	Leu	Thr	Lys	Ile	Ile	Cys	Ala	
180					185					190						
Gln	Gln	Cys	Ser	Gly	Arg	Cys	Arg	Gly	Lys	Ser	Pro	Ser	Asp	Cys	Cys	
195					200					205						
His	Asn	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Arg	Glu	Ser	Asp	Cys	
210					215					220						
Leu	Val	Cys	Arg	Lys	Phe	Arg	Asp	Glu	Ala	Thr	Cys	Lys	Asp	Thr	Cys	
225					230					235					240	
Pro	Pro	Leu	Met	Leu	Tyr	Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Gln	Met	Asp	Val	Asn	
245					250					255						
Pro	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ser	Phe	Gly	Ala	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Cys	Pro	
260					265					270						
Arg	Asn	Tyr	Val	Val	Thr	Asp	His	Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	
275					280					285						
Ala	Asp	Ser	Tyr	Glu	Met	Glu	Glu	Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	
290					295					300						

Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Arg	Lys	Val	Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu
305					310					315					320
Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	Asn	Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys
				325					330					335	
Asn	Cys	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe
			340					345					350		
Arg	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	His	Thr	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu
		355					360					365			
Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln
	370					375					380				
Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr	Asp	Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu
385					390					395					400
Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	Gln	His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val
				405					410					415	
Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile
			420					425					430		
Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala
		435					440					445			
Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu	Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr
	450					455					460				
Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln
465					470					475					480
Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser	Pro	Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro
				485					490					495	
Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val

500 505 510

Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn
515 520 525

Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn
530 535 540

Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His
545 550 555 560

Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met
565 570 575

Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val
580 585 590

Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly
595 600 605

Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr
610 615 620

Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile
625 630 635 640

Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg
645 650 655

Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
660 665 670

Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe
675 680 685

Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
690 695 700

Gly	Leu	Trp	Ile	Pro	Glu	Gly	Glu	Lys	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Ile	
705					710					715					720	
Lys	Glu	Leu	Arg	Glu	Ala	Thr	Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu	
				725					730					735		
Asp	Glu	Ala	Tyr	Val	Met	Ala	Ser	Val	Asp	Asn	Pro	His	Val	Cys	Arg	
			740					745					750			
Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Leu	Ile	Thr	Gln	Leu	
		755					760					765				
Met	Pro	Phe	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp	Tyr	Val	Arg	Glu	His	Lys	Asp	Asn	
	770					775					780					
Ile	Gly	Ser	Gln	Tyr	Leu	Leu	Asn	Trp	Cys	Val	Gln	Ile	Ala	Lys	Gly	
785					790					795					800	
Met	Asn	Tyr	Leu	Glu	Asp	Arg	Arg	Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	
			805						810					815		
Arg	Asn	Val	Leu	Val	Lys	Thr	Pro	Gln	His	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	
		820						825					830			
Gly	Leu	Ala	Lys	Leu	Leu	Gly	Ala	Glu	Glu	Lys	Glu	Tyr	His	Ala	Glu	
		835					840					845				
Gly	Gly	Lys	Val	Pro	Ile	Lys	Trp	Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	His	
	850					855					860					
Arg	Ile	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	
865					870					875					880	
Trp	Glu	Leu	Met	Thr	Phe	Gly	Ser	Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala	
			885						890				895			
Ser	Glu	Ile	Ser	Ser	Ile	Leu	Glu	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	

900										905										910									
Pro	Ile	Cys	Thr	Ile	Asp	Val	Tyr	Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met														
915										920										925									
Ile	Asp	Ala	Asp	Ser	Arg	Pro	Lys	Phe	Arg	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	Phe														
930										935										940									
Ser	Lys	Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln	Arg	Tyr	Leu	Val	Ile	Gln	Gly	Asp														
945										950										955									
Glu	Arg	Met	His	Leu	Pro	Ser	Pro	Thr	Asp	Ser	Asn	Phe	Tyr	Arg	Ala														
965										970										975									
Leu	Met	Asp	Glu	Glu	Asp	Met	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Ala	Asp	Glu	Tyr														
980										985										990									
Leu	Ile	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Thr														
995										1000										1005									
Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Thr	Val															
1010										1015										1020									
Ala	Cys	Ile	Asp	Arg	Asn	Gly	Leu	Gln	Ser	Cys	Pro	Ile	Lys	Glu															
1025										1030										1035									
Asp	Ser	Phe	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Ser	Asp	Pro	Thr	Gly	Ala	Leu															
1040										1045										1050									
Thr	Glu	Asp	Ser	Ile	Asp	Asp	Thr	Phe	Leu	Pro	Val	Pro	Glu	Tyr															
1055										1060										1065									
Ile	Asn	Gln	Ser	Val	Pro	Lys	Arg	Pro	Ala	Gly	Ser	Val	Gln	Asn															
1070										1075										1080									
Pro	Val	Tyr	His	Asn	Gln	Pro	Leu	Asn	Pro	Ala	Pro	Ser	Arg	Asp															
1085										1090										1095									

Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu
1100 1105 1110

Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp
1115 1120 1125

Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu
1130 1135 1140

Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys
1145 1150 1155

Pro Asn Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr
1160 1165 1170

Leu Arg Val Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1175 1180 1185

<210> 117
<211> 225
<212> PRT
<213> 智人

<400> 117

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro
225

- <210> 118
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 連接子

<400> 118

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

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 119

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 120

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 120

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 121
<211> 105
<212> PRT
<213> 智人

<400> 121

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 122
<211> 328
<212> PRT
<213> 智人

<400> 122

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

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

210					215					220					
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230					235					240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245					250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
290						295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro								
				325											

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種結合CD3之抗體，其中該抗體包含第一抗原結合域，其包含SEQ ID NO: 7之VH序列及SEQ ID NO: 11之VL序列。

【請求項2】

如請求項1之抗體，其中該第一抗原結合域為Fab分子。

【請求項3】

如請求項1之抗體，其包含由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域。

【請求項4】

如請求項1之抗體，其包含結合第二抗原之第二抗原結合域。

【請求項5】

如請求項4之抗體，其中該第二抗原結合域為Fab分子。

【請求項6】

如請求項1之抗體，其中該第一抗原結合域為Fab分子，其中該Fab輕鏈及該Fab重鏈之該等可變域VL及VH或該等恆定域CL及CH1係相互置換。

【請求項7】

如請求項1之抗體，其中該第一抗原結合域為Fab分子，其中該Fab輕鏈及該Fab重鏈之該等可變域VL及VH係相互置換。

【請求項8】

如請求項4之抗體，其中該第一抗原結合域為Fab分子，其中該Fab輕鏈及該Fab重鏈之該等可變域VL及VH或該等恆定域CL及CH1係相互置換，且其中該第二抗原結合域為習知Fab分子。

【請求項9】

如請求項8之抗體，其中該第二抗原結合域為習知Fab分子，其中

在該恆定域CL中，位置124處之胺基酸係獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代，其係根據Kabat編號；且位置123處之胺基酸係獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代，其係根據Kabat編號；且

在該恆定域CH1中，位置147處之胺基酸係獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代，其係根據Kabat EU索引編號；且位置213處之胺基酸係獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)取代，其係根據Kabat EU索引編號。

【請求項10】

如請求項4之抗體，其中該第一抗原結合域及該第二抗原結合域彼此融合。

【請求項11】

如請求項10之抗體，其中該第一抗原結合域及該第二抗原結合域經由肽連接子彼此融合。

【請求項12】

如請求項4之抗體，其中該第一抗原結合域及該第二抗原結合域各自為Fab分子，且(i)該第二抗原結合域在該Fab重鏈之C端與該第一抗原結合域之該Fab重鏈之N端融合，或(ii)該第一抗原結合域在該Fab重鏈之C端與該第二抗原結合域之該Fab重鏈之N端融合。

【請求項13】

如請求項4之抗體，其中該第一抗原結合域及該第二抗原結合域各自為Fab分子，且該抗體包含由第一亞單元及第二亞單元構成之Fc域；且其中

(i)該第二抗原結合域在該Fab重鏈之C端與該第一抗原結合域之該Fab重鏈之N端融合，且該第一抗原結合域在該Fab重鏈之C端與該Fc域之該第一亞單元之N端融合，或

(ii)該第一抗原結合域在該Fab重鏈之C端與該第二抗原結合域之該Fab重鏈之N端融合，且該第二抗原結合域在該Fab重鏈之C端與該Fc域之該第一亞單元之N端融合。

【請求項14】

如請求項4之抗體，其包含結合第二抗原之第三抗原結合域。

【請求項15】

如請求項14之抗體，其中該第三抗原結合域為Fab分子。

【請求項16】

如請求項15之抗體，其中該第三抗原結合域為習知Fab分子。

【請求項17】

如請求項16之抗體，其中該第三抗原結合域為習知Fab分子，其中在該恆定域CL中，位置124處之胺基酸係獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat編號)取代，且位置處123之胺基酸係獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat編號)取代，且

在該恆定域CH1中，位置147處之胺基酸係獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)取代，且位置213處之胺基酸係獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)取代。

【請求項18】

如請求項14之抗體，其中該抗體由第一、第二及第三抗原結合域、Fc域及一或多個肽連接子所組成，

其中該第二抗原結合域在該Fab重鏈之C端與該第一抗原結合域之該Fab重鏈之N端融合，且該第一抗原結合域在該Fab重鏈之C端與該Fc域之該第一亞單元之N端融合，且

其中該第三抗原結合域在該Fab重鏈之C端與該Fc域之該第二亞單元之N端融合。

【請求項19】

如請求項3之抗體，其中該Fc域為IgG Fc域。

【請求項20】

如請求項3之抗體，其中該Fc域為IgG₁ Fc域。

【請求項21】

如請求項3之抗體，其中該Fc域為人類Fc域。

【請求項22】

如請求項3之抗體，其中該Fc域為人類IgG₁ Fc域。

【請求項23】

如請求項3之抗體，其中該Fc包含促進該Fc域之該第一亞單元與該第二亞單元結合的修飾。

【請求項24】

如請求項3之抗體，其中：

在該Fc域之該第一亞單元之CH3域中，一胺基酸殘基經具有較大側鏈體積之胺基酸殘基置換，從而在該第一亞單元之CH3域內產生隆凸(protuberance)，其可位於該第二亞單元之CH3域內之凹穴(cavity)中，且

在該Fc域之該第二亞單元之CH3域中，一胺基酸殘基經具有較小側鏈體積之胺基酸殘基置換，從而在該第二亞單元之CH3域內產生凹穴，該

第一亞單元之CH3域內之隆凸可位於該凹穴內。

【請求項25】

如請求項3之抗體，其中：

在該Fc域之該第一亞單元中，位置366處之蘇胺酸殘基經色胺酸殘基置換(T366W)，且

在該Fc域之該第二亞單元中，位置407處之酪胺酸殘基經纈胺酸殘基置換(Y407V)(根據Kabat EU索引編號)。

【請求項26】

如請求項25之抗體，其中

(a) 在該Fc域之該第二亞單元中，額外地，位置366之蘇胺酸殘基經絲胺酸殘基(T366S)置換且位置368之白胺酸殘基經丙胺酸殘基(L368A)置換；及/或

(b) 在該Fc域之該第一亞單元中，額外地，位置354處之絲胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(S354C)或位置356處之麩胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(E356C)，且在該Fc域之該第二亞單元中，額外地，位置349處之酪胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(Y349C)。

【請求項27】

如請求項3之抗體，其中該Fc域包含一或多個降低與Fc受體之結合及/或效應功能的胺基酸取代。

【請求項28】

如請求項3之抗體，其中該Fc域包含在選自E233、L234、L235、N297、P331及P329之群的位置處之胺基酸取代；其係根據Kabat EU索引編號。

【請求項29】

如請求項3之抗體，其中該Fc域之各亞單元包含選自L234A、L235A及P329G之群之胺基酸取代，其係根據Kabat EU索引編號。

【請求項30】

如請求項4或14之抗體，其中該第二抗原為目標細胞抗原。

【請求項31】

如請求項4或14之抗體，其中該第二抗原為腫瘤細胞抗原。

【請求項32】

一種經分離聚核苷酸，其編碼如請求項1至31中任一項之抗體。

【請求項33】

一種宿主細胞，其包含如請求項32之經分離聚核苷酸。

【請求項34】

一種產生會結合CD3之抗體的方法，其包含以下步驟：(a)在適合該抗體表現之條件下培養如請求項33之宿主細胞。

【請求項35】

如請求項34之方法，其進一步包含步驟(b)之回收該抗體。

【請求項36】

一種結合CD3之抗體，其藉由如請求項34或35之方法產生。

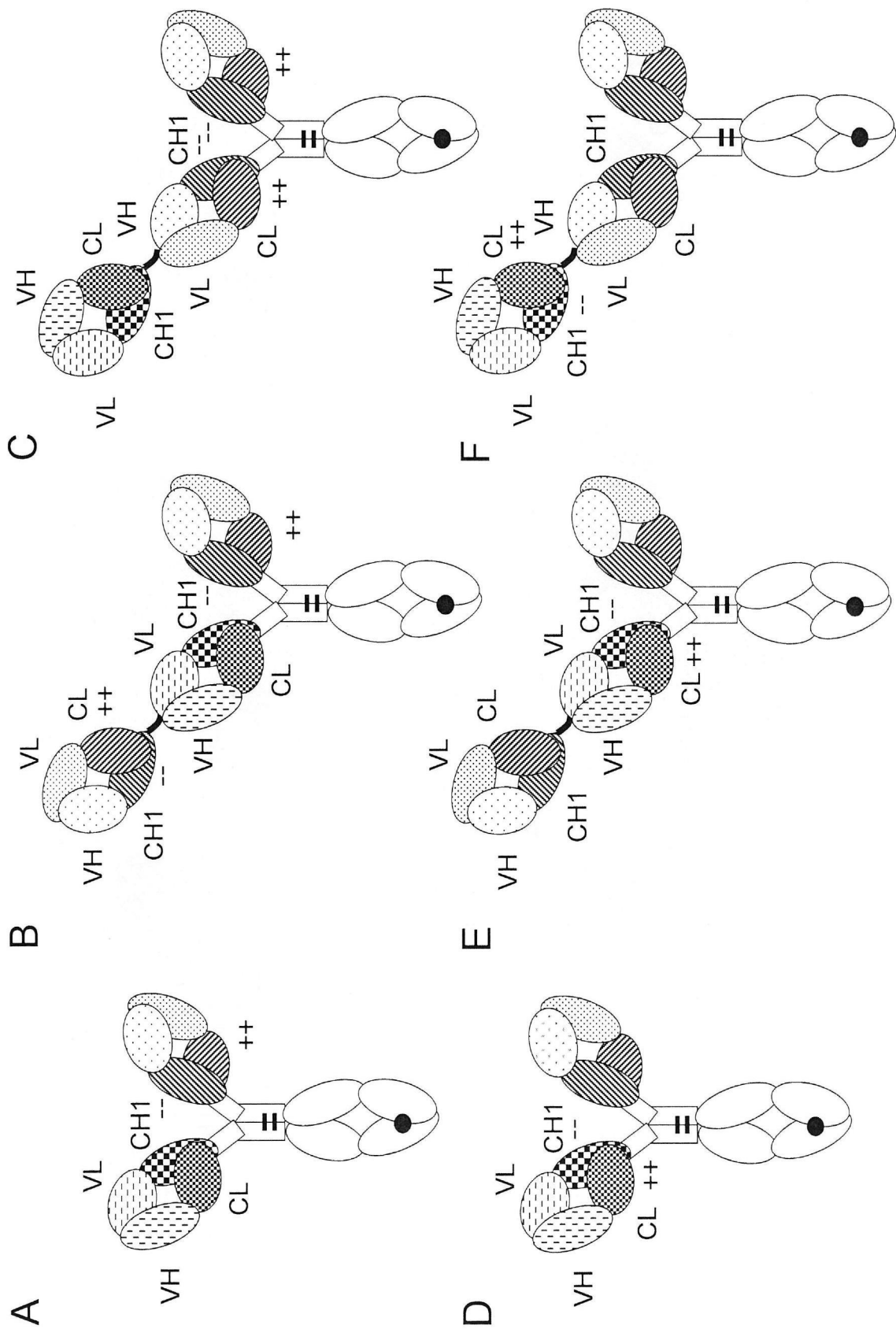
【請求項37】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至31或36中任一項之抗體及醫藥學上可接受之載劑。

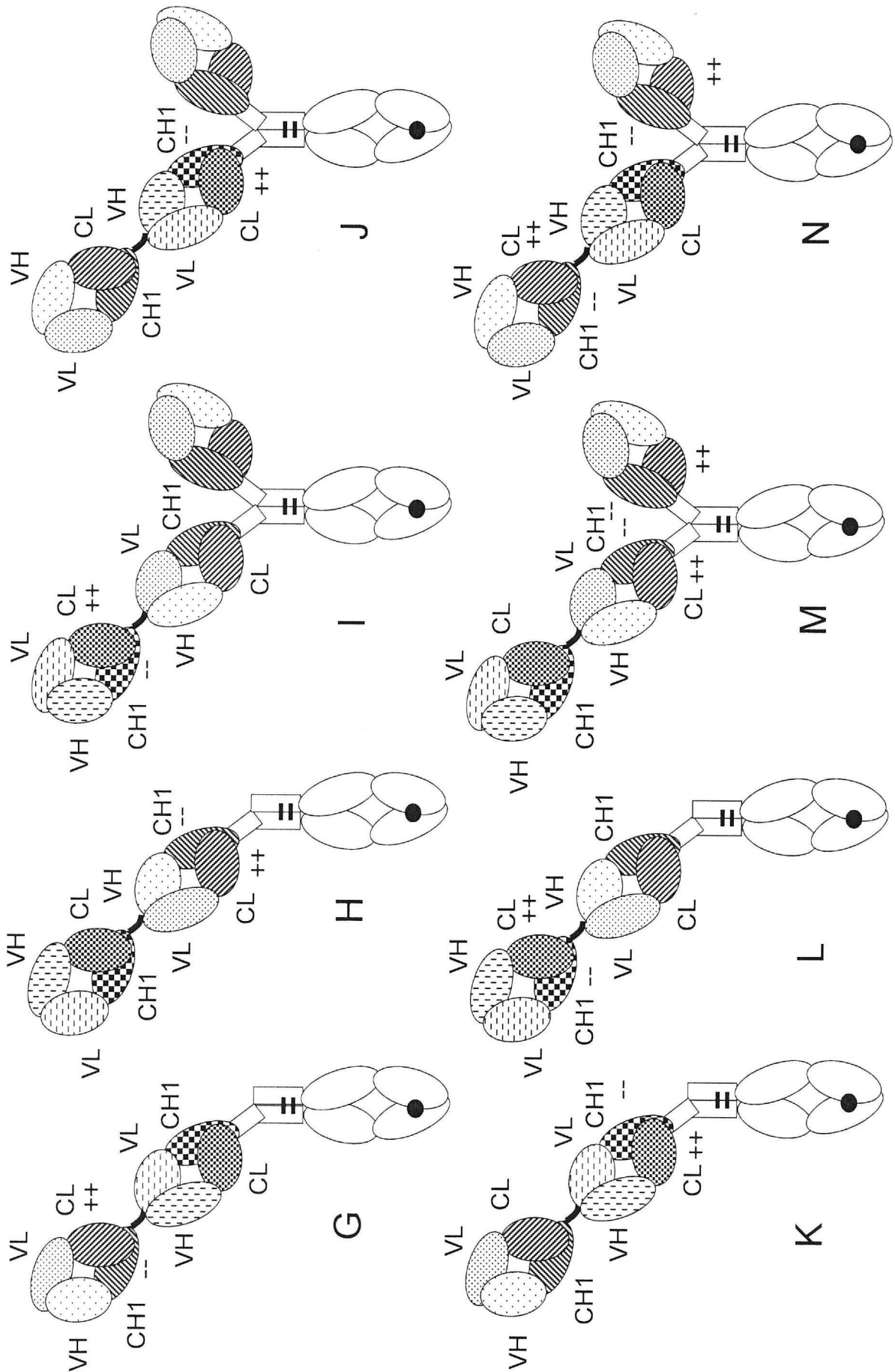
【請求項38】

一種如請求項1至31或36中任一項之抗體或如請求項37之醫藥組合物之用途，其用於製造治療癌症之藥物。

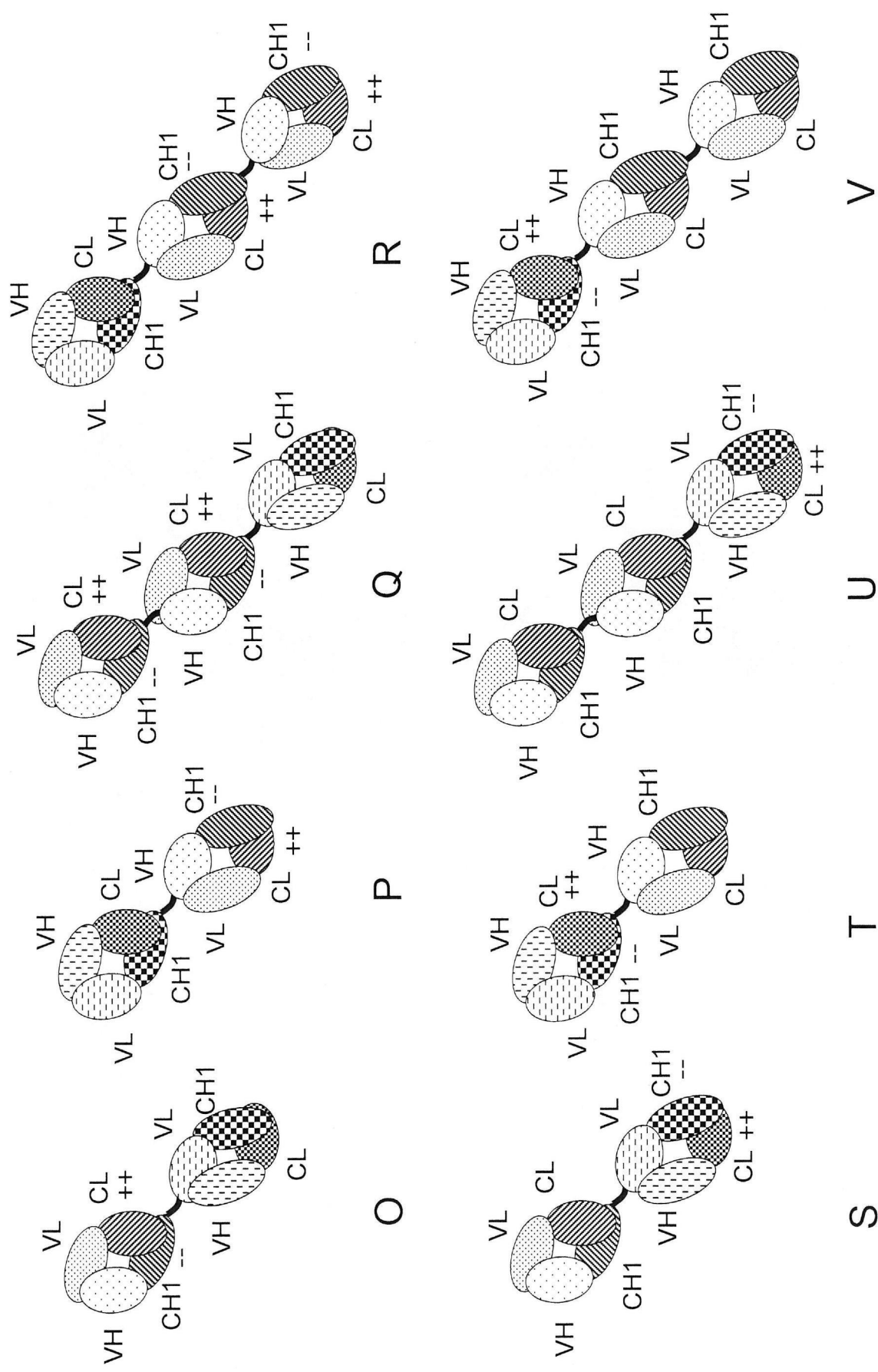
【發明圖式】



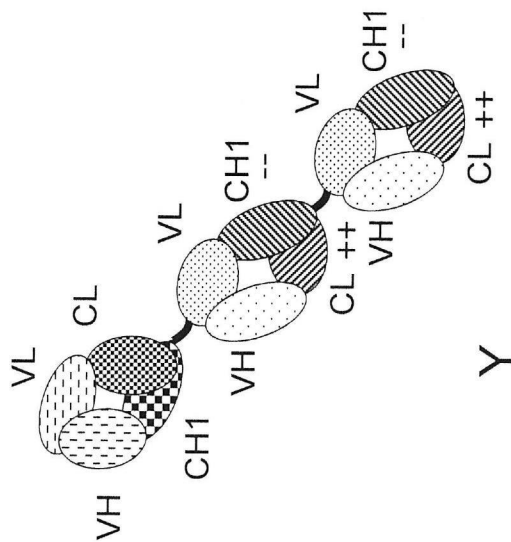
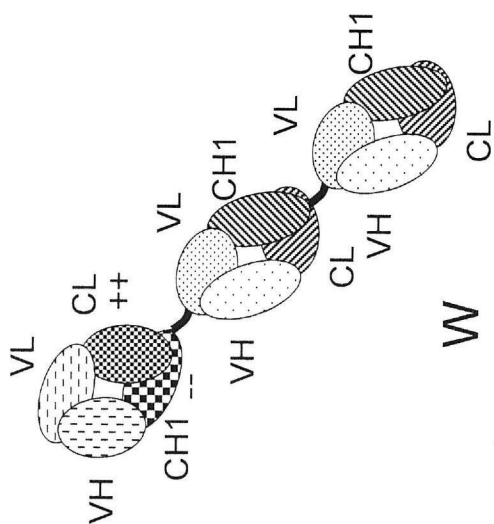
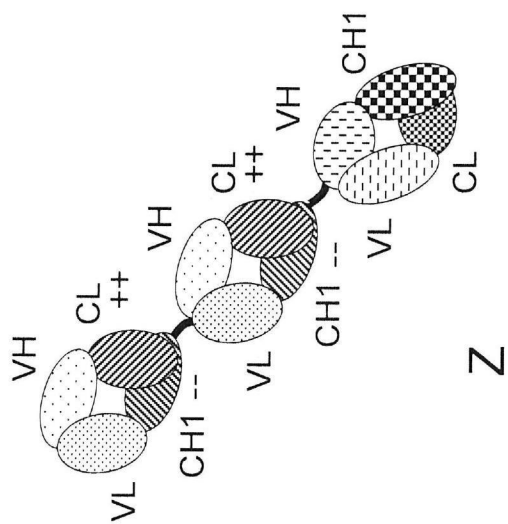
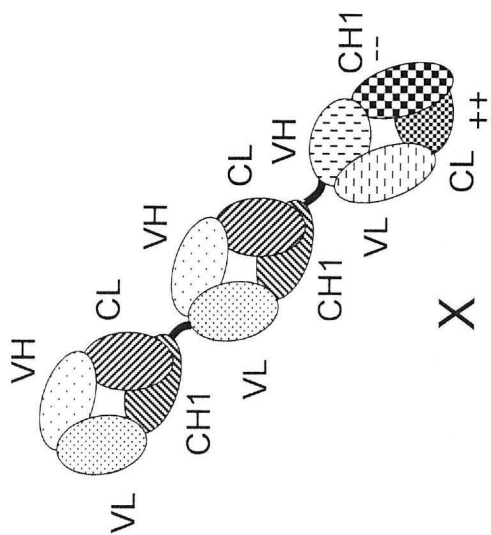
【圖1】



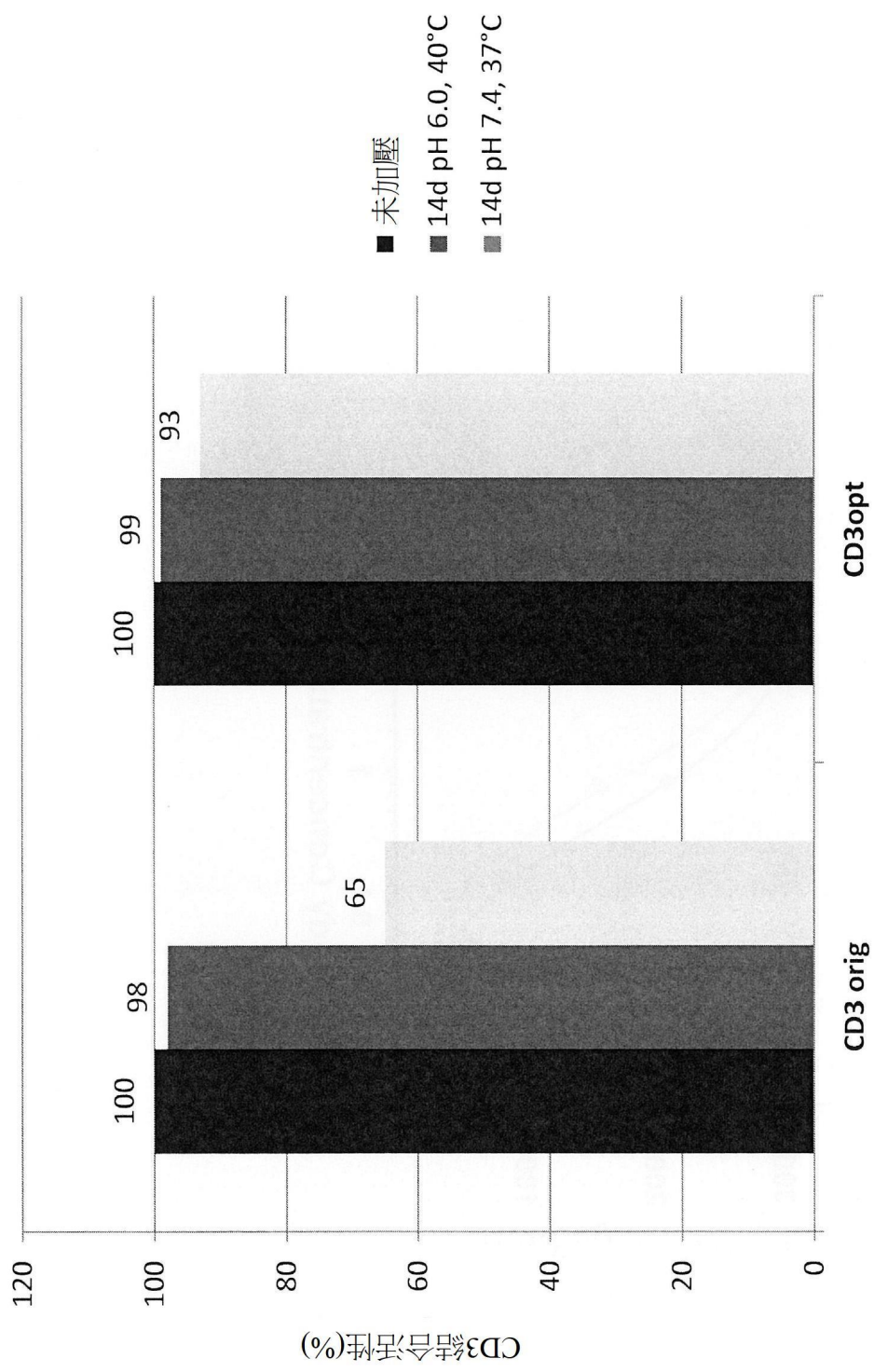
【圖1】(續)



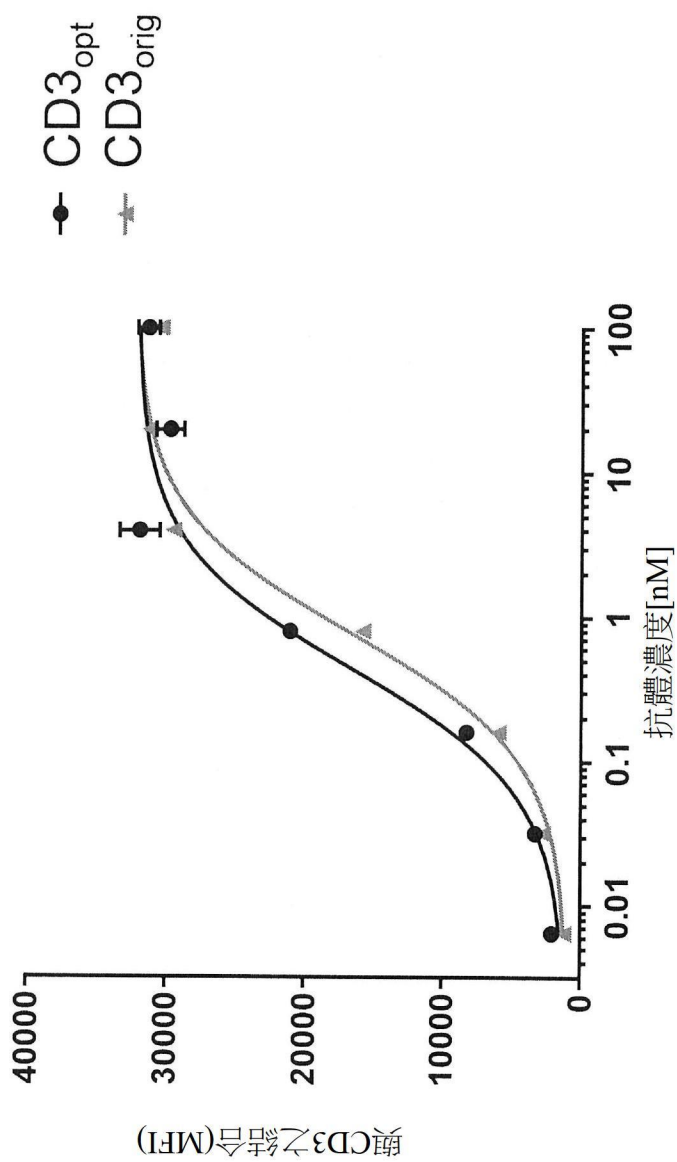
【圖1】(續)



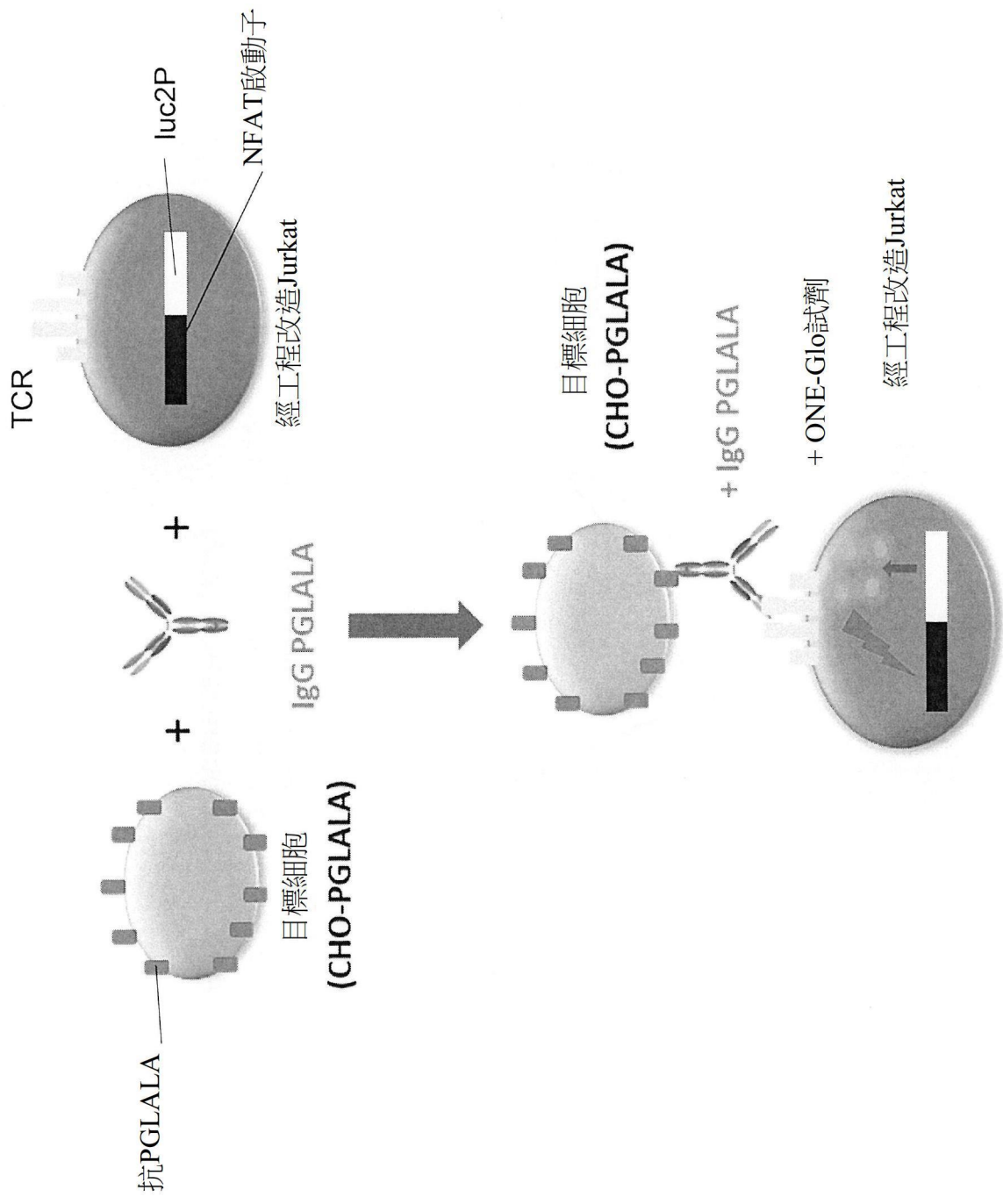
【血相】

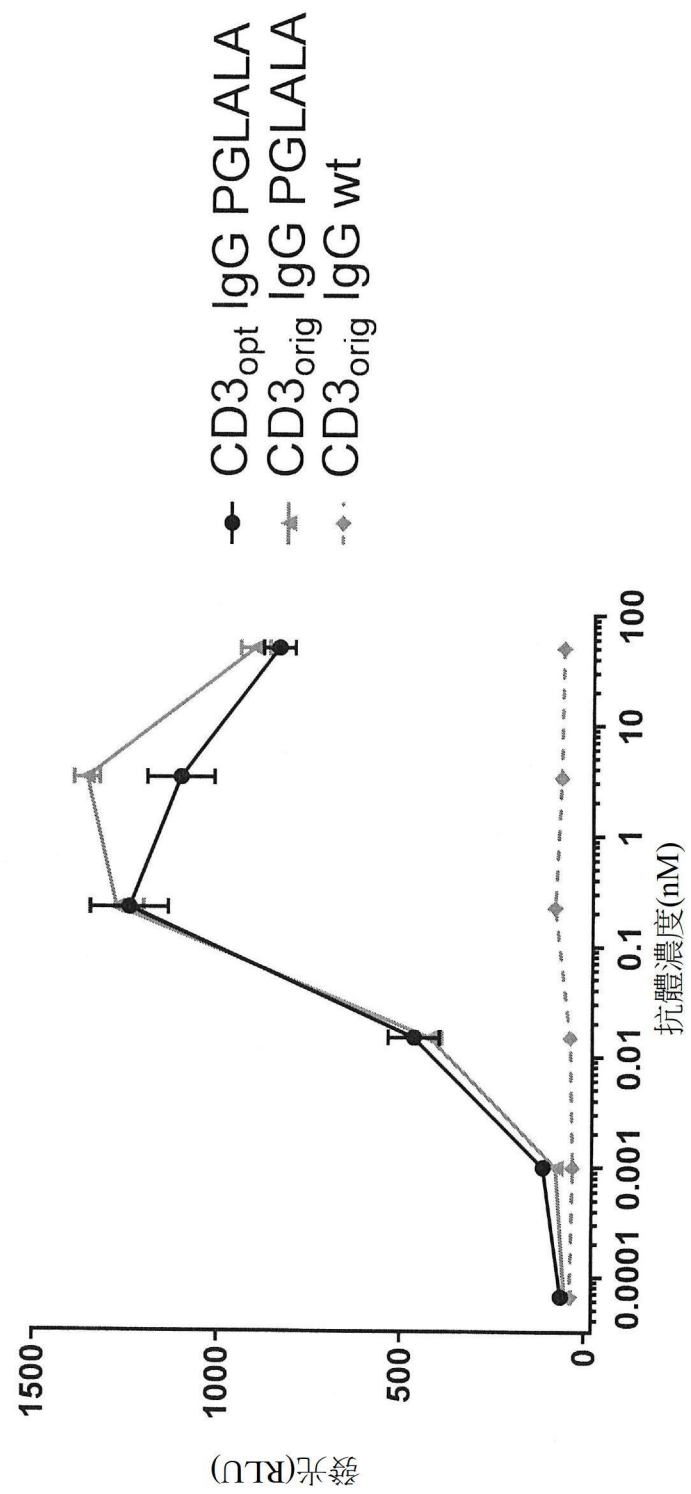


【圖2】

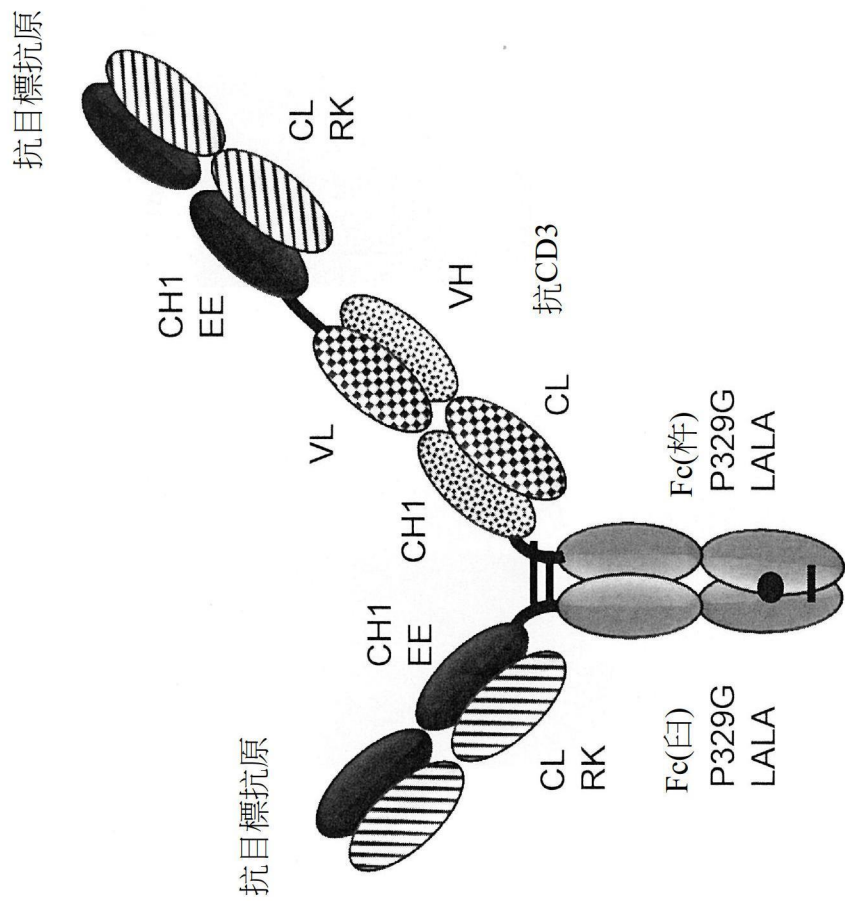


【圖3】

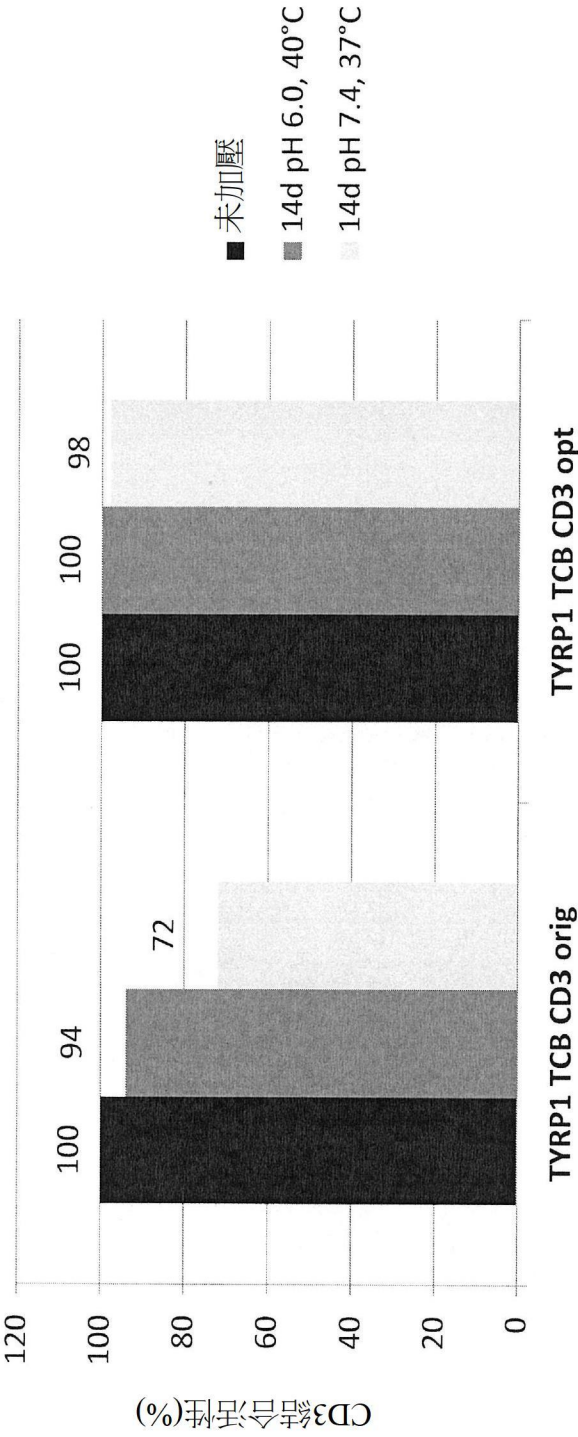




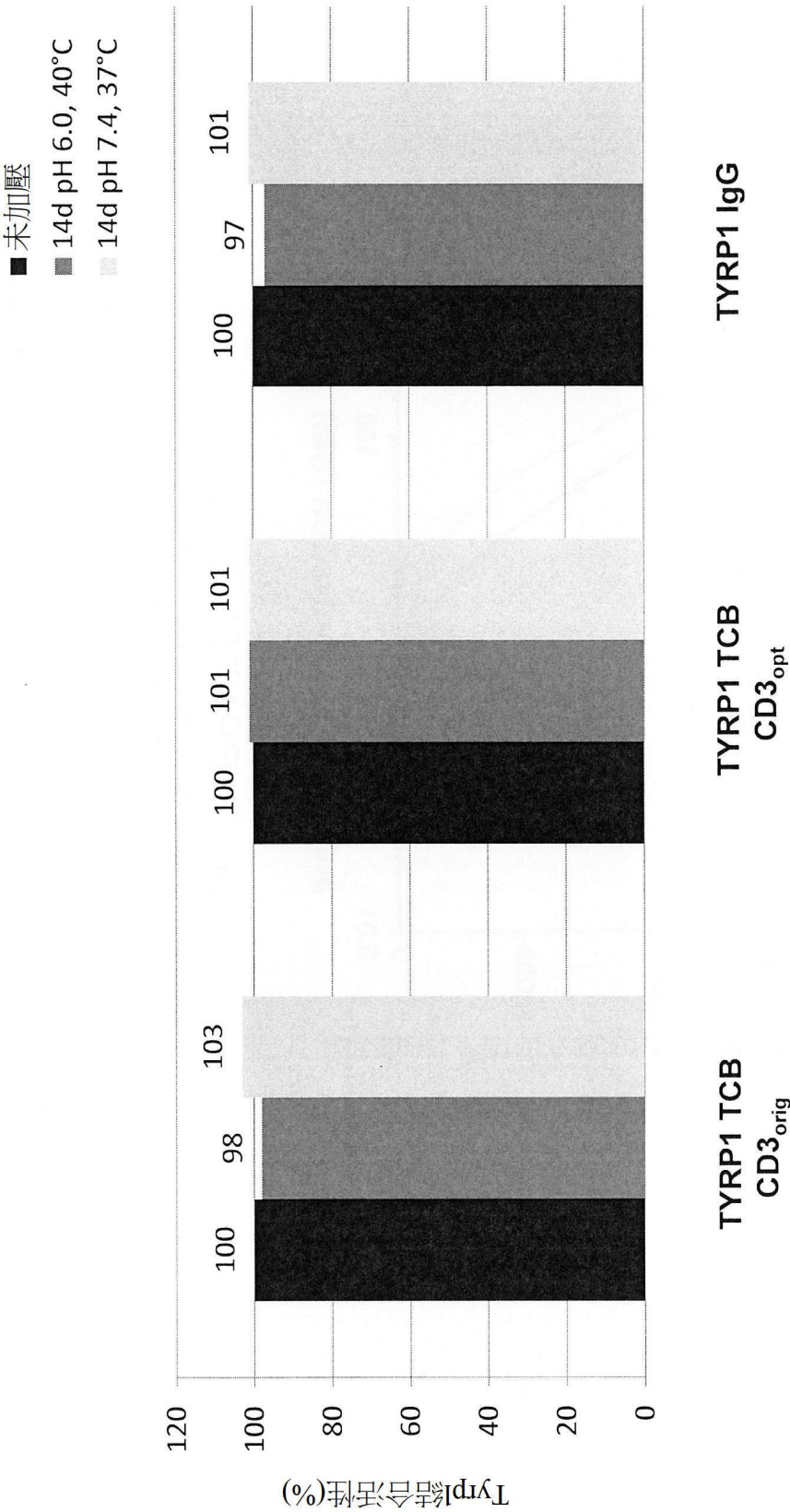
【圖5】



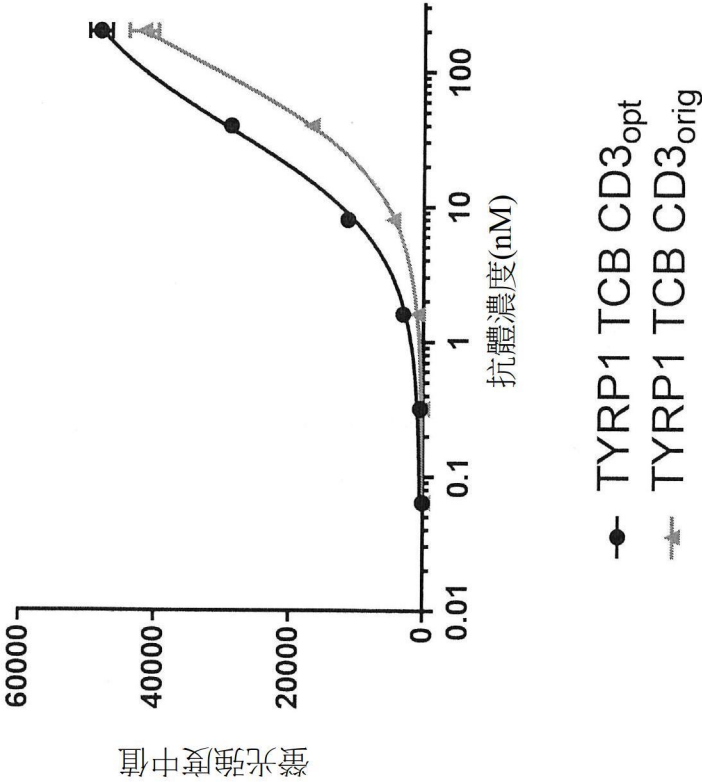
【圖6】



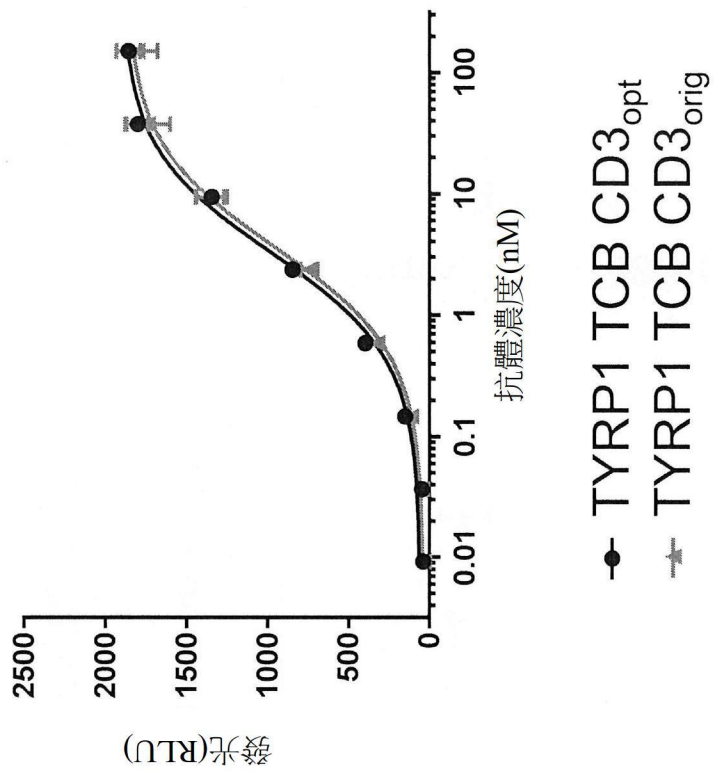
【圖7】



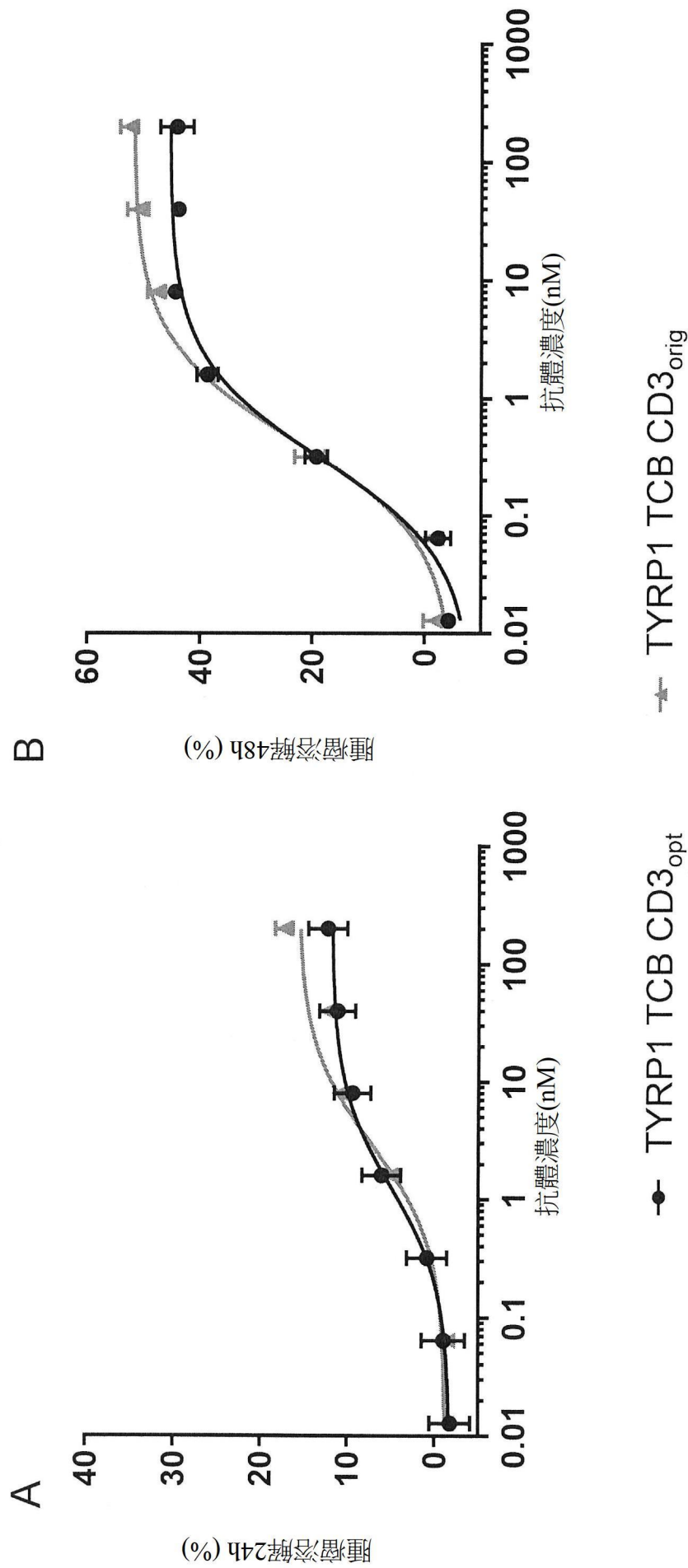
【圖8】



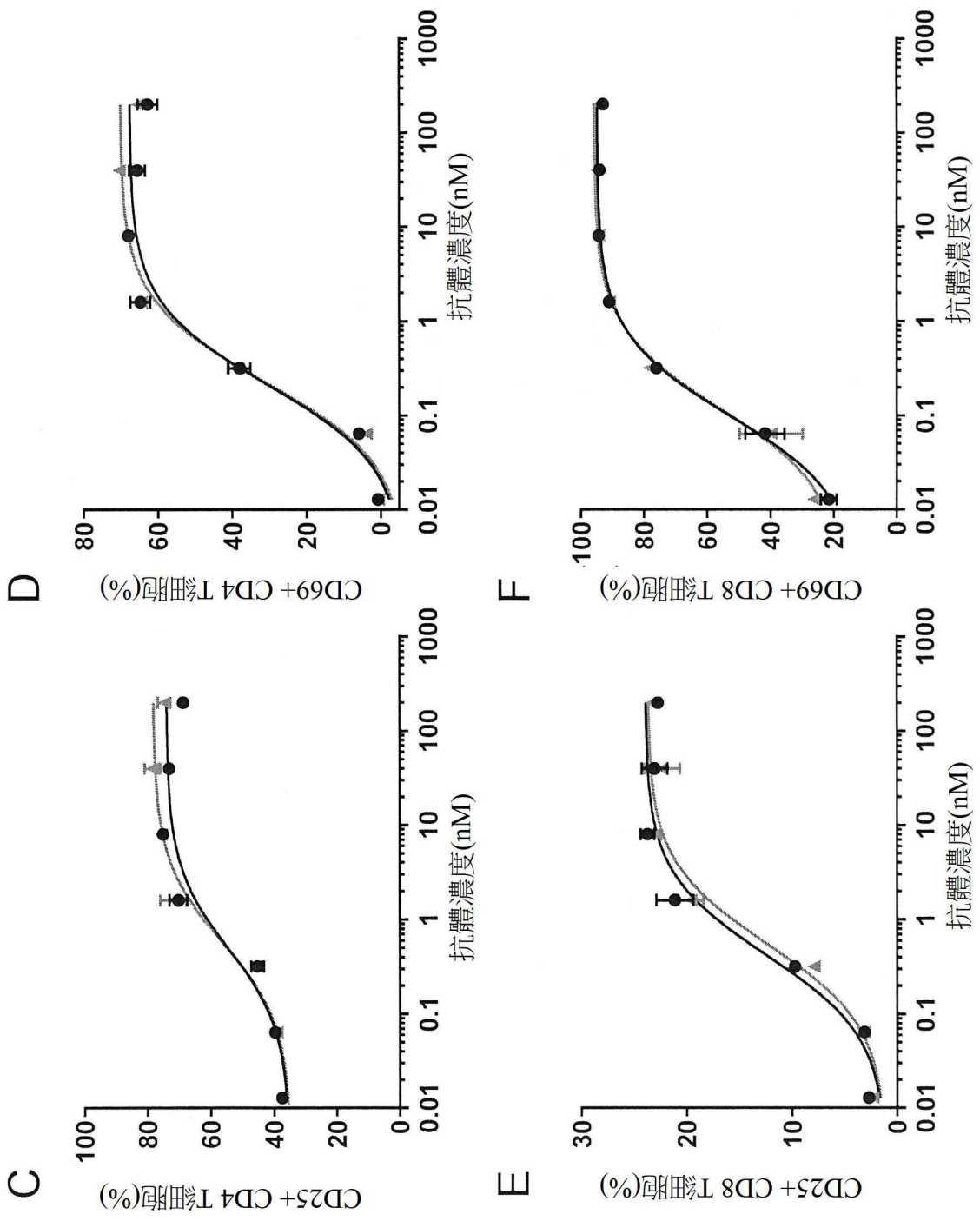
【圖9】



【圖10】

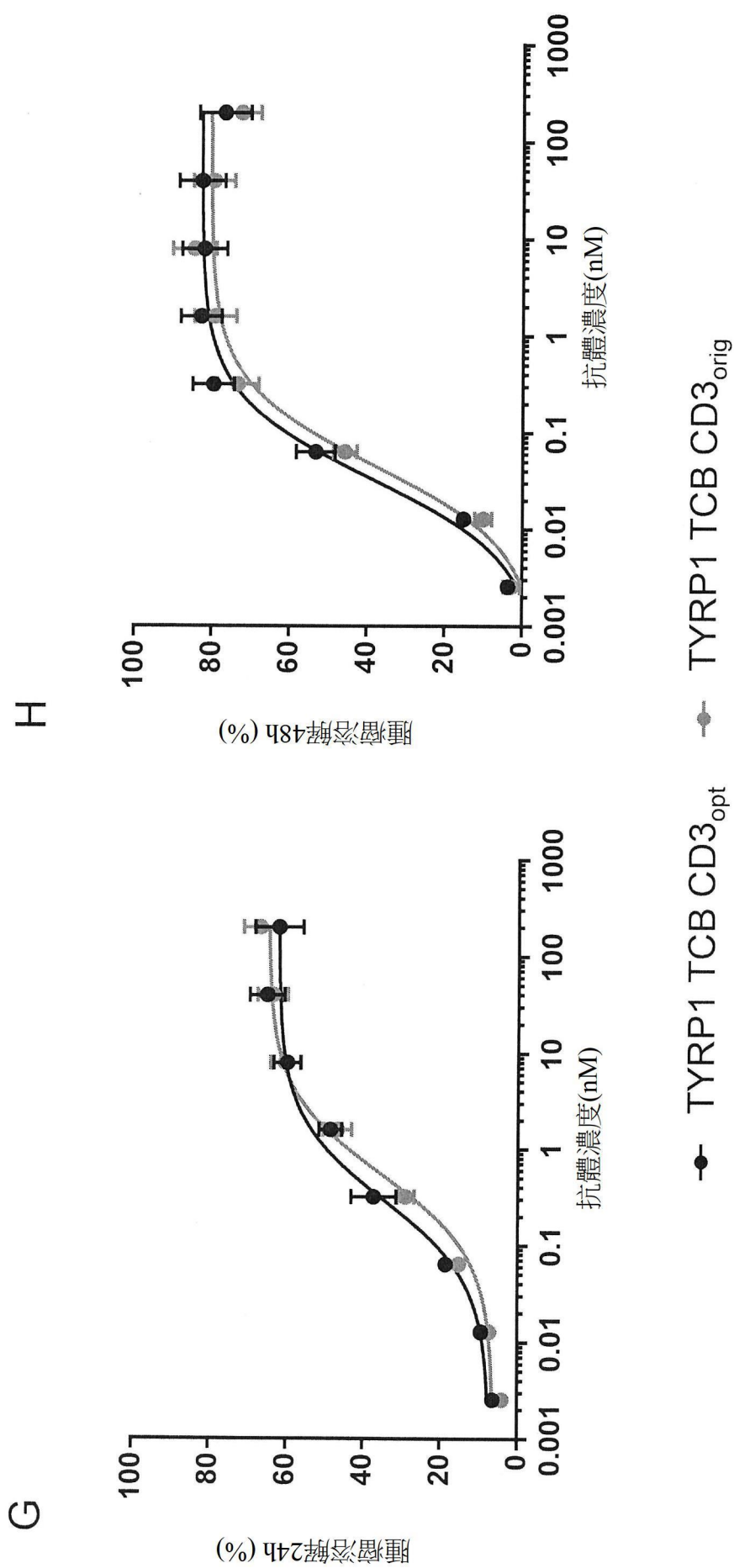


【圖11】

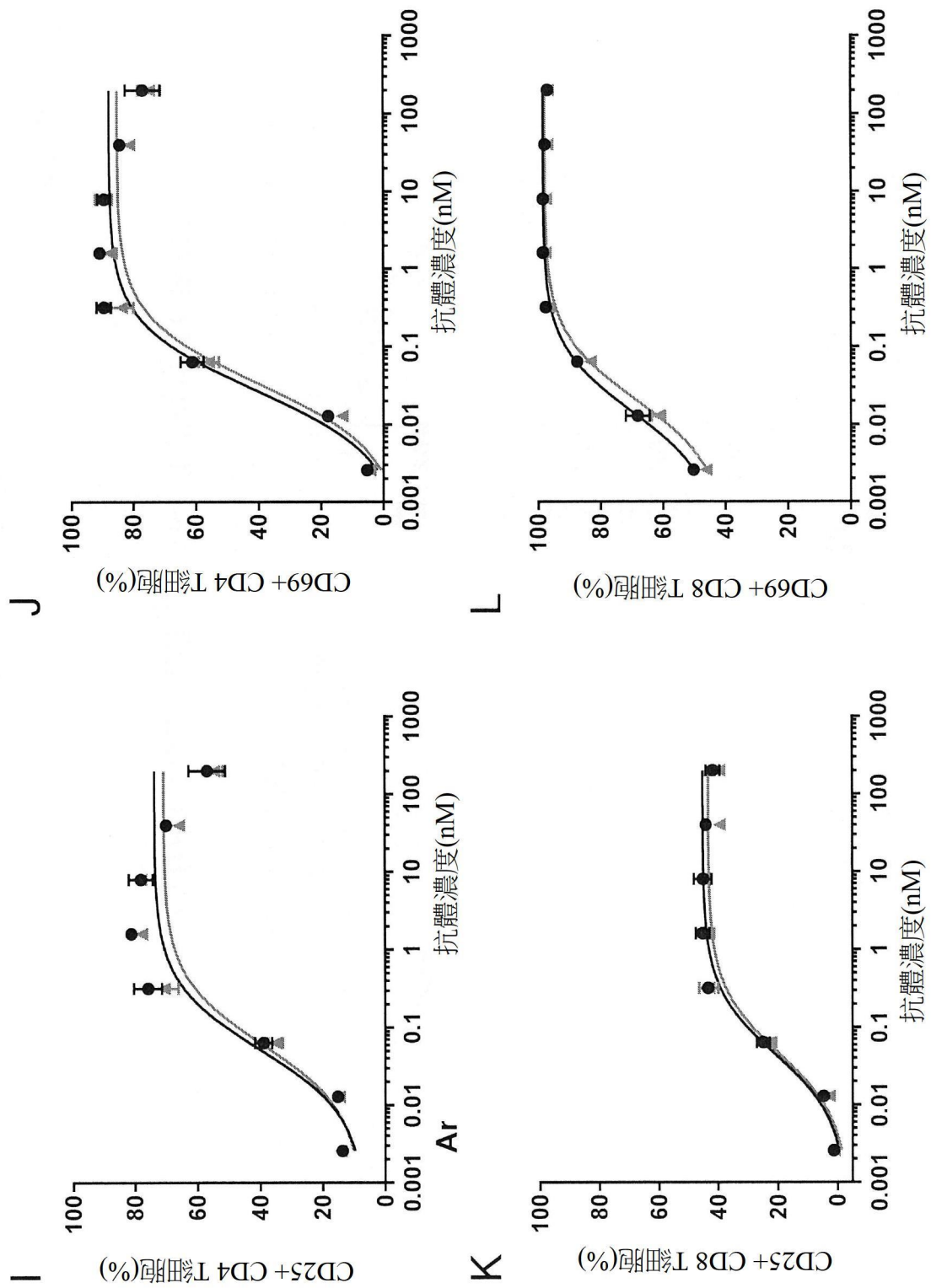


● TYRP1 TCB CD3_{opt} ▲ TYRP1 TCB CD3_{orig}

【圖11】(續)

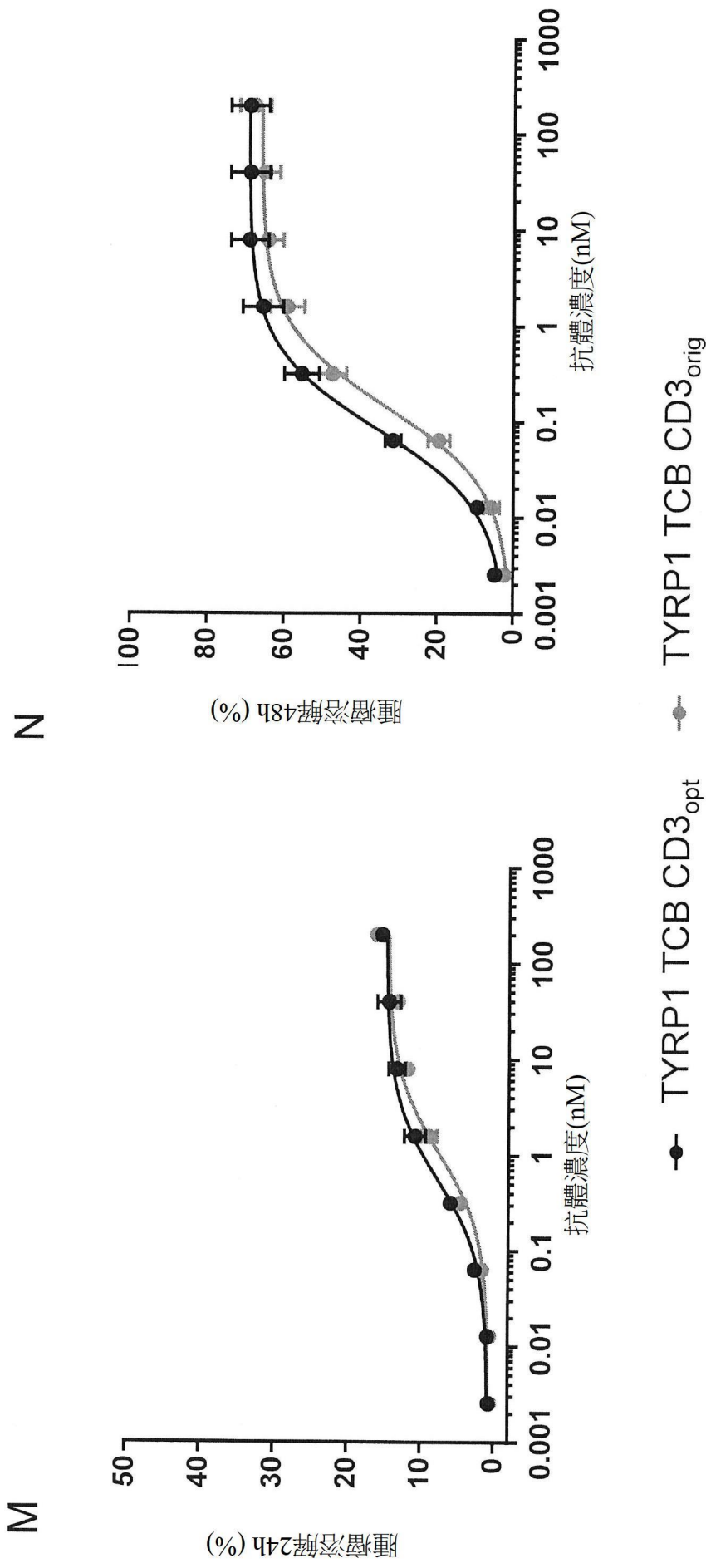


【圖11】(續)

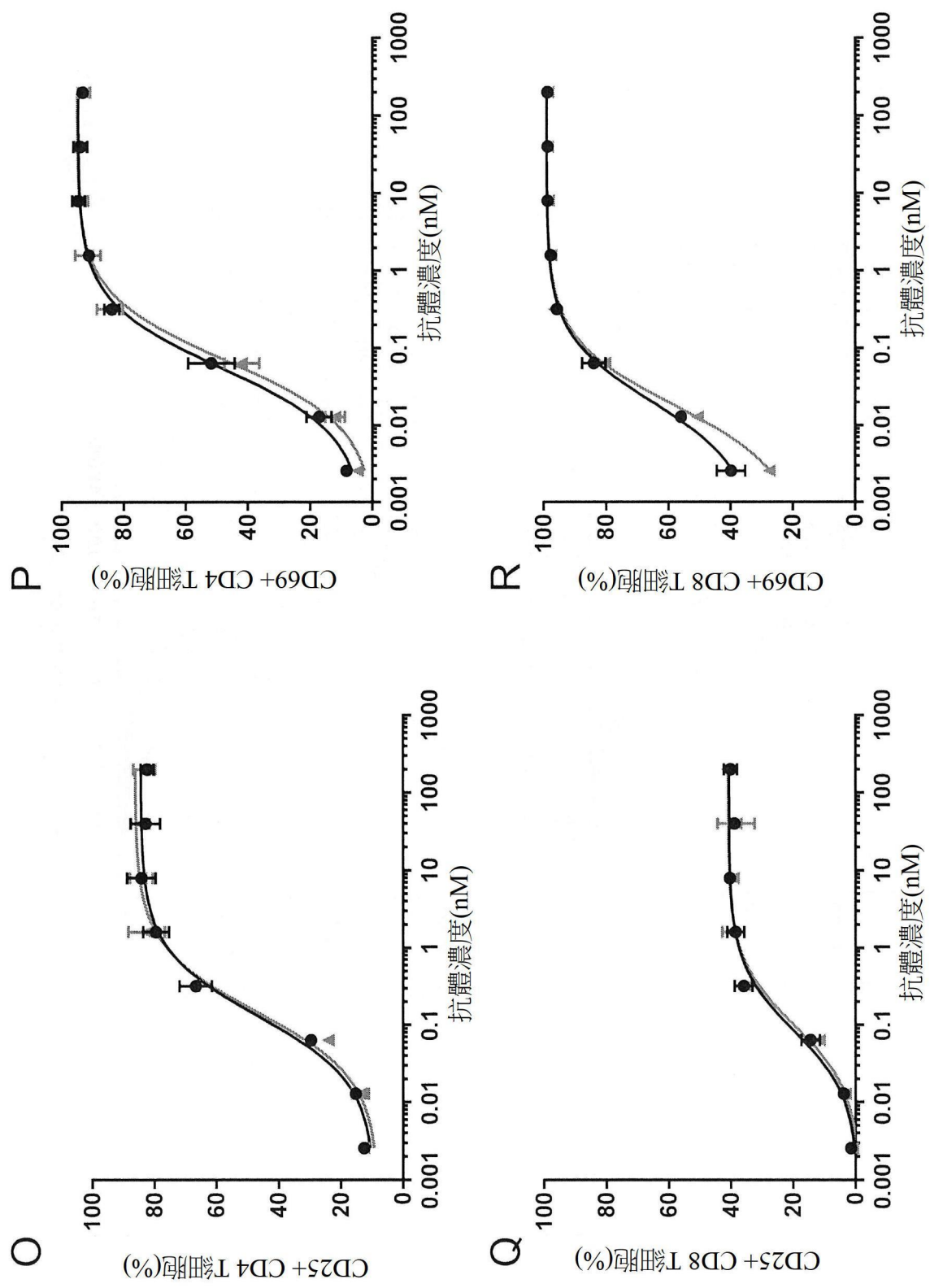


●- TYRP1 TCB CD3_{opt} ▲- TYRP1 TCB CD3_{orig}

【圖11】(續)

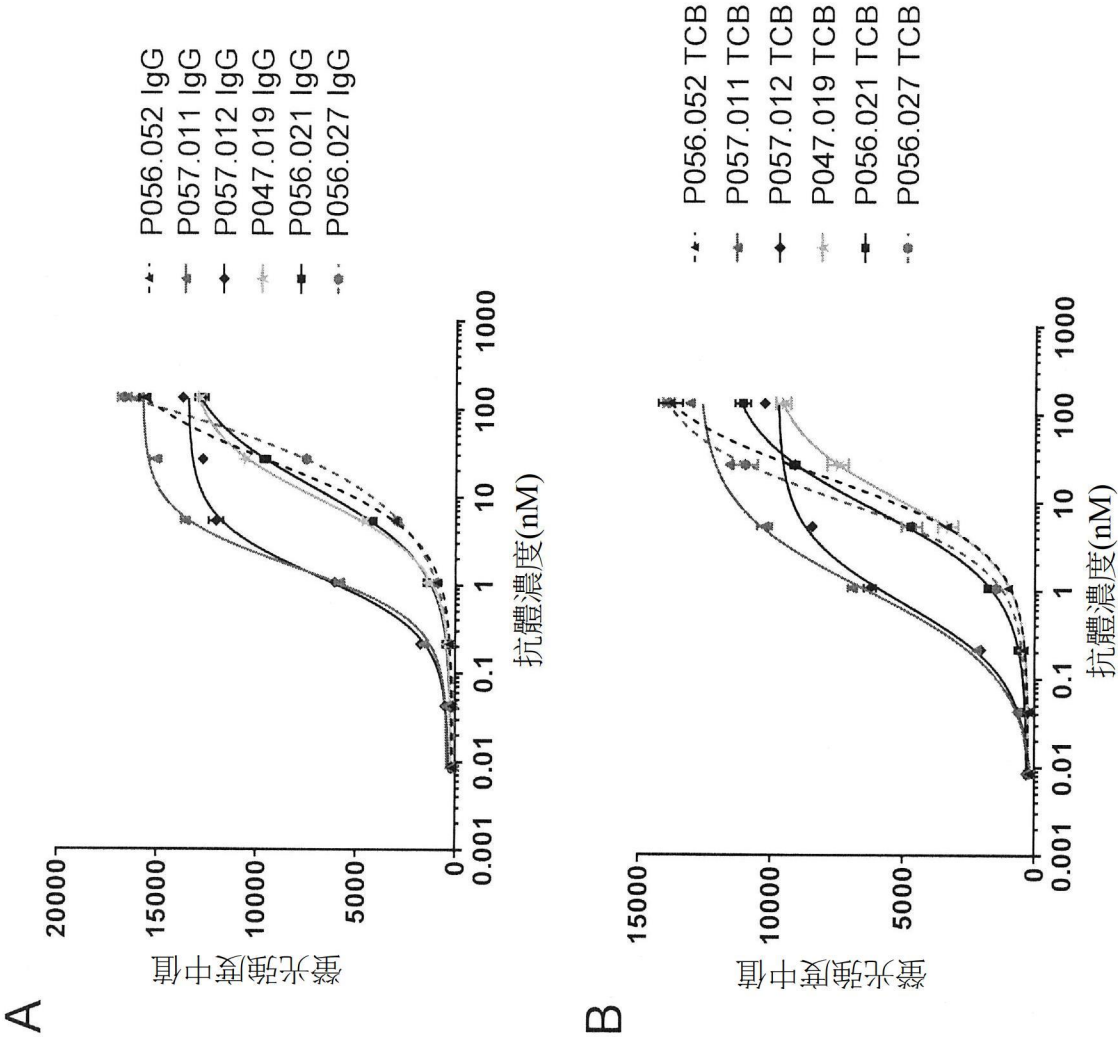


【圖11】(續)



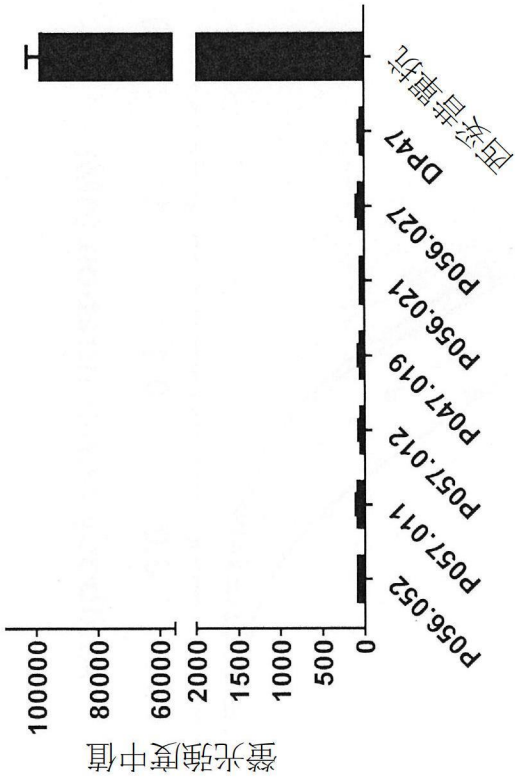
●- TYRP1 TCB CD3_{opt} ▲- TYRP1 TCB CD3_{orig}

【圖11】(續)

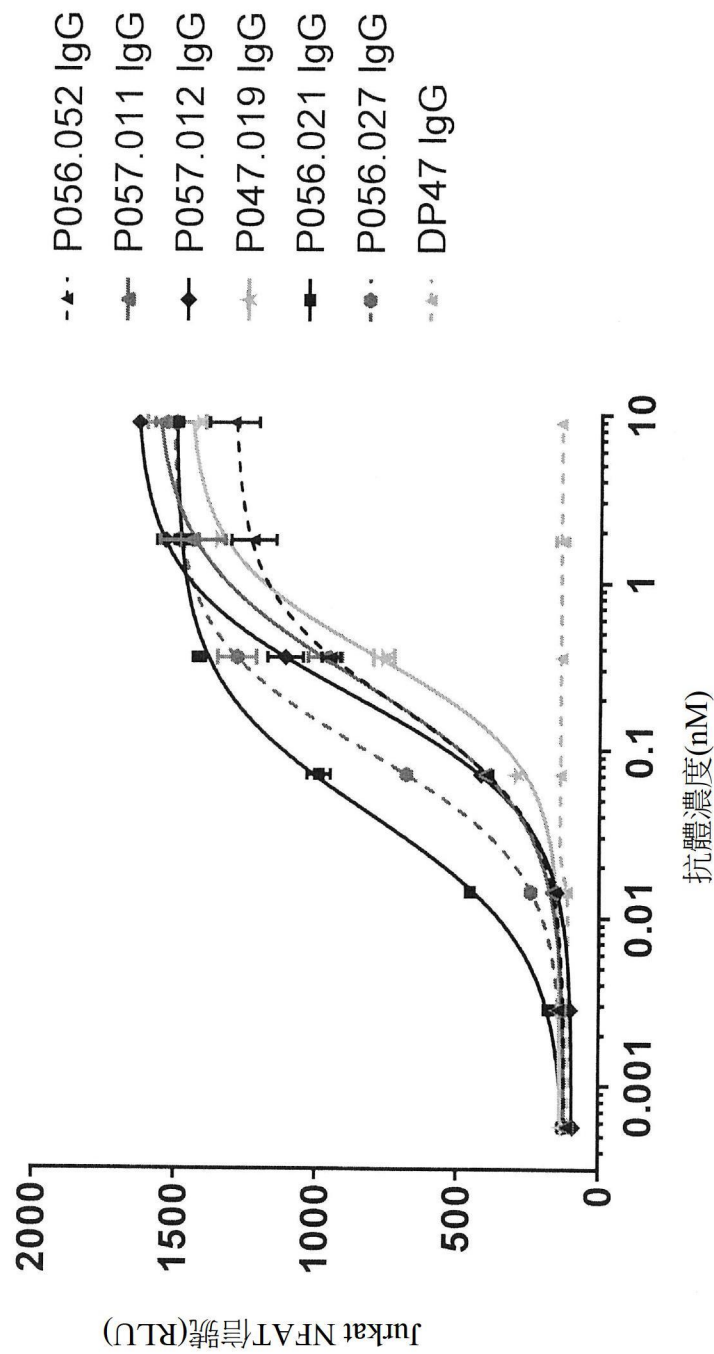


【圖12】

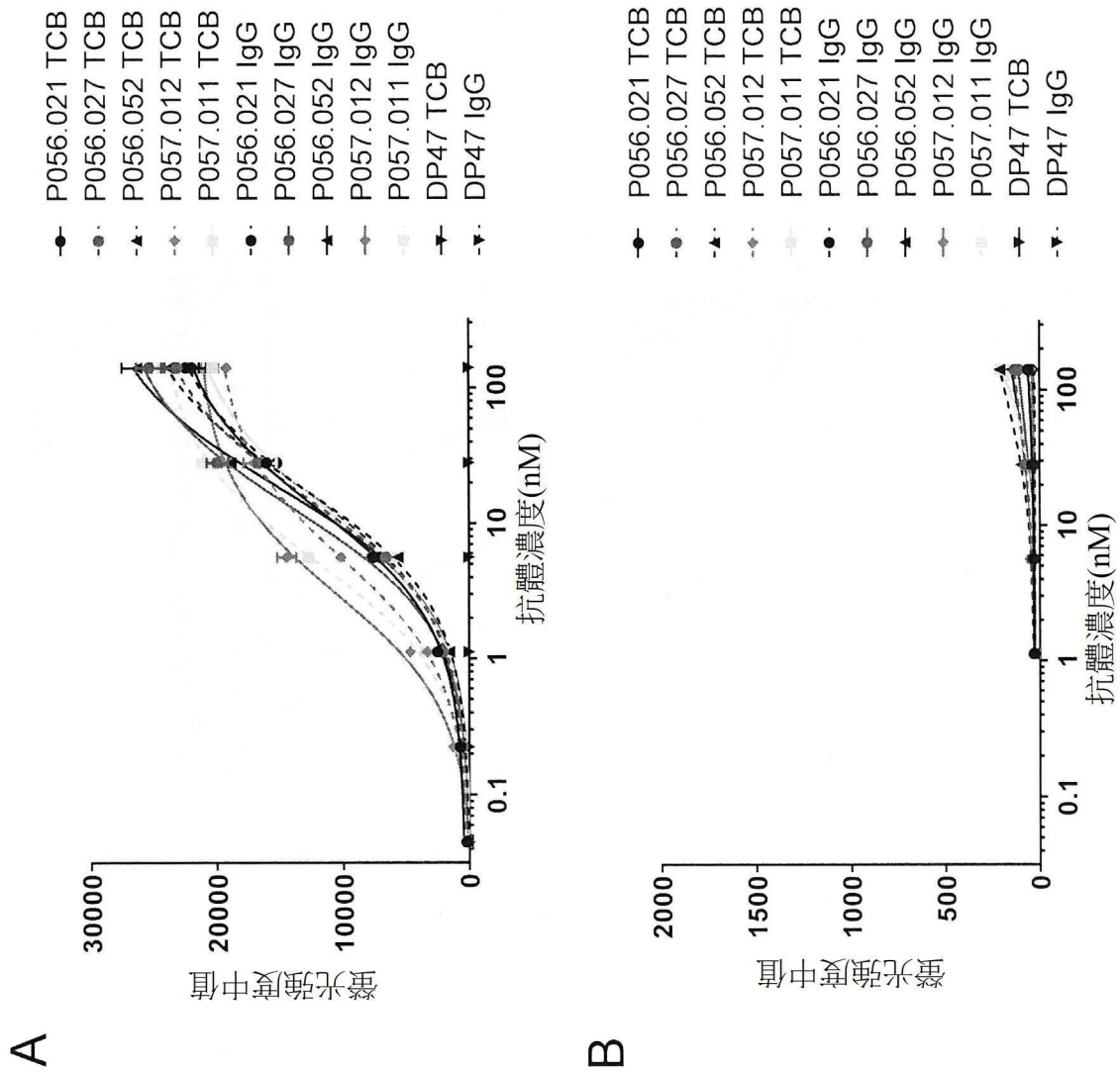
C



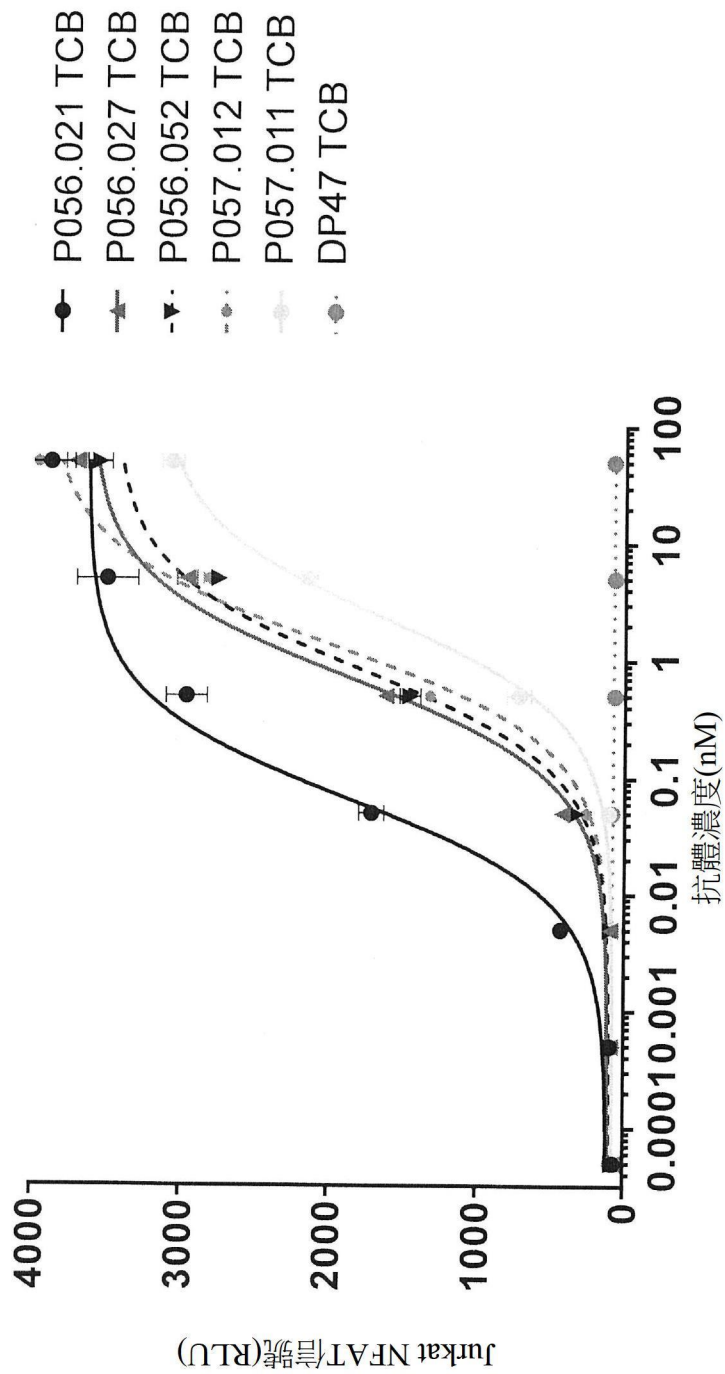
【圖12】(續)



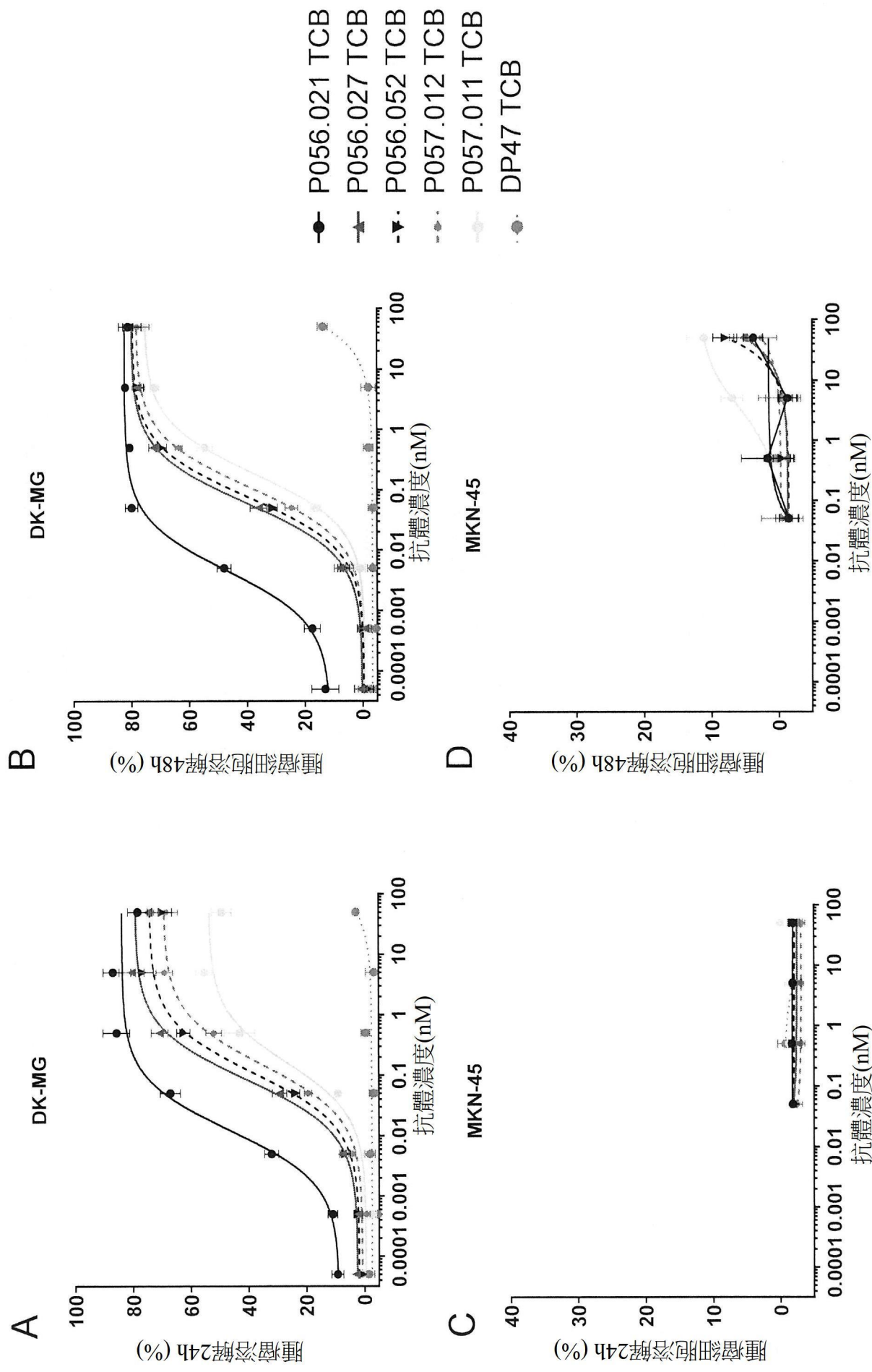
【圖13】



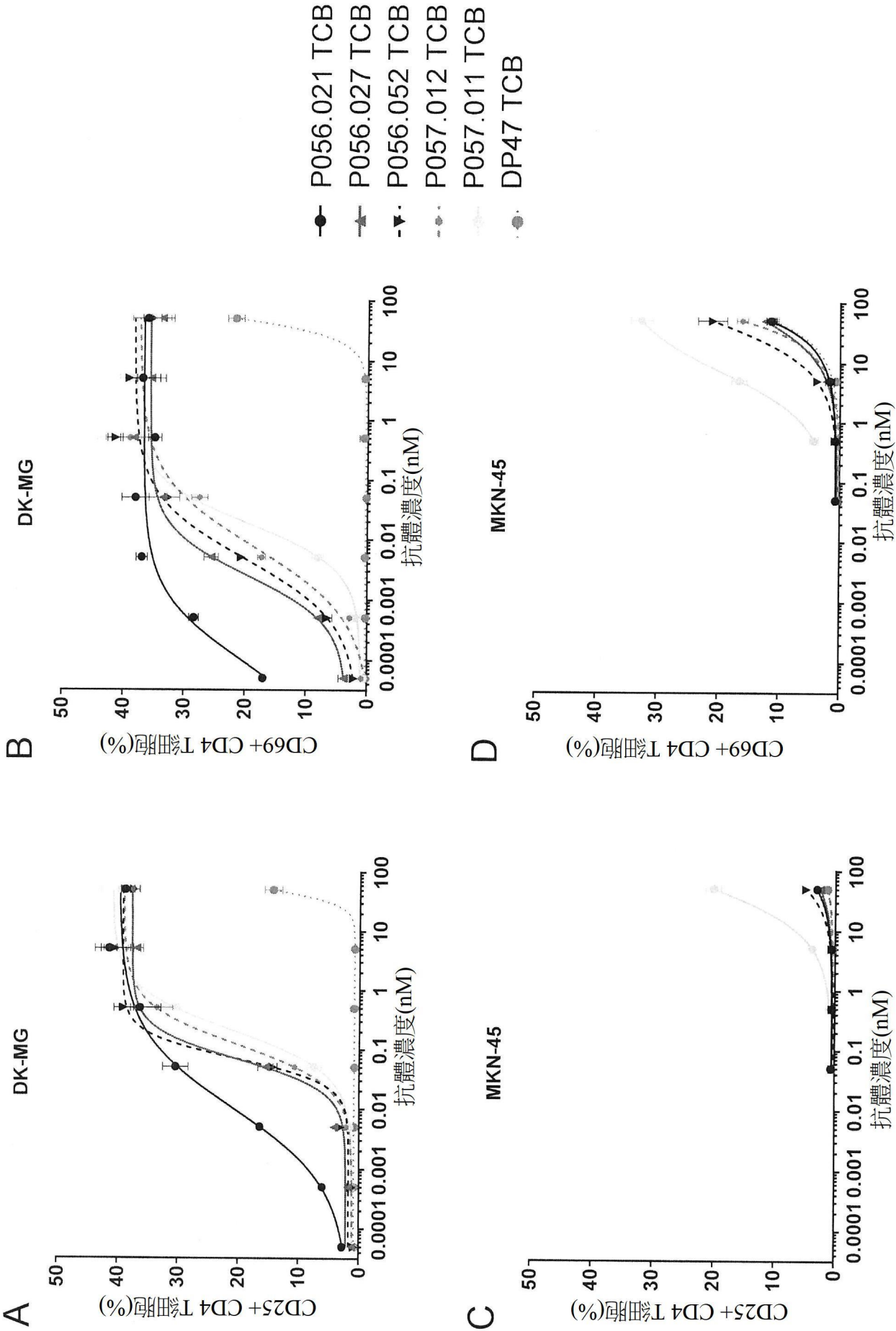
【圖 14】



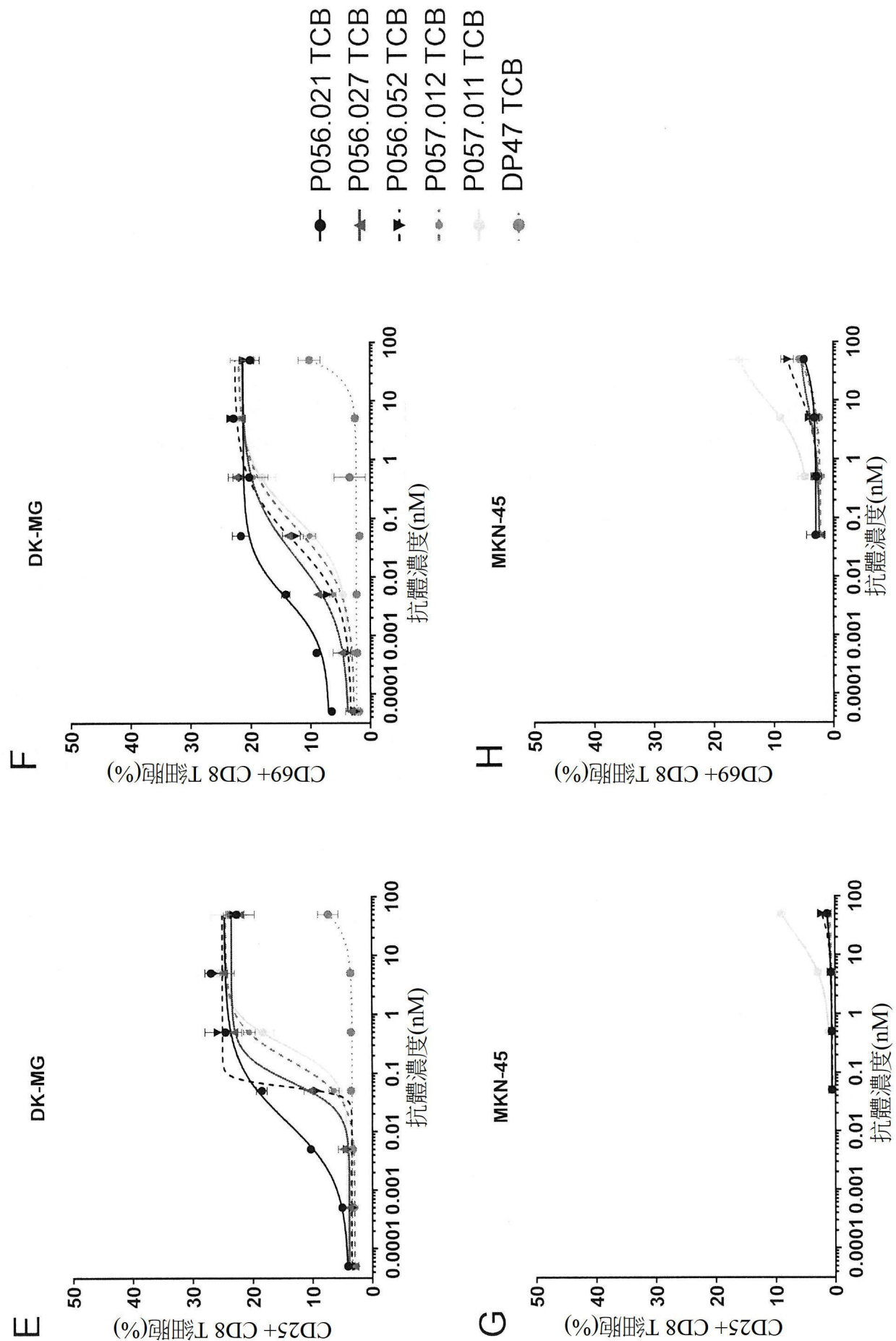
【圖15】



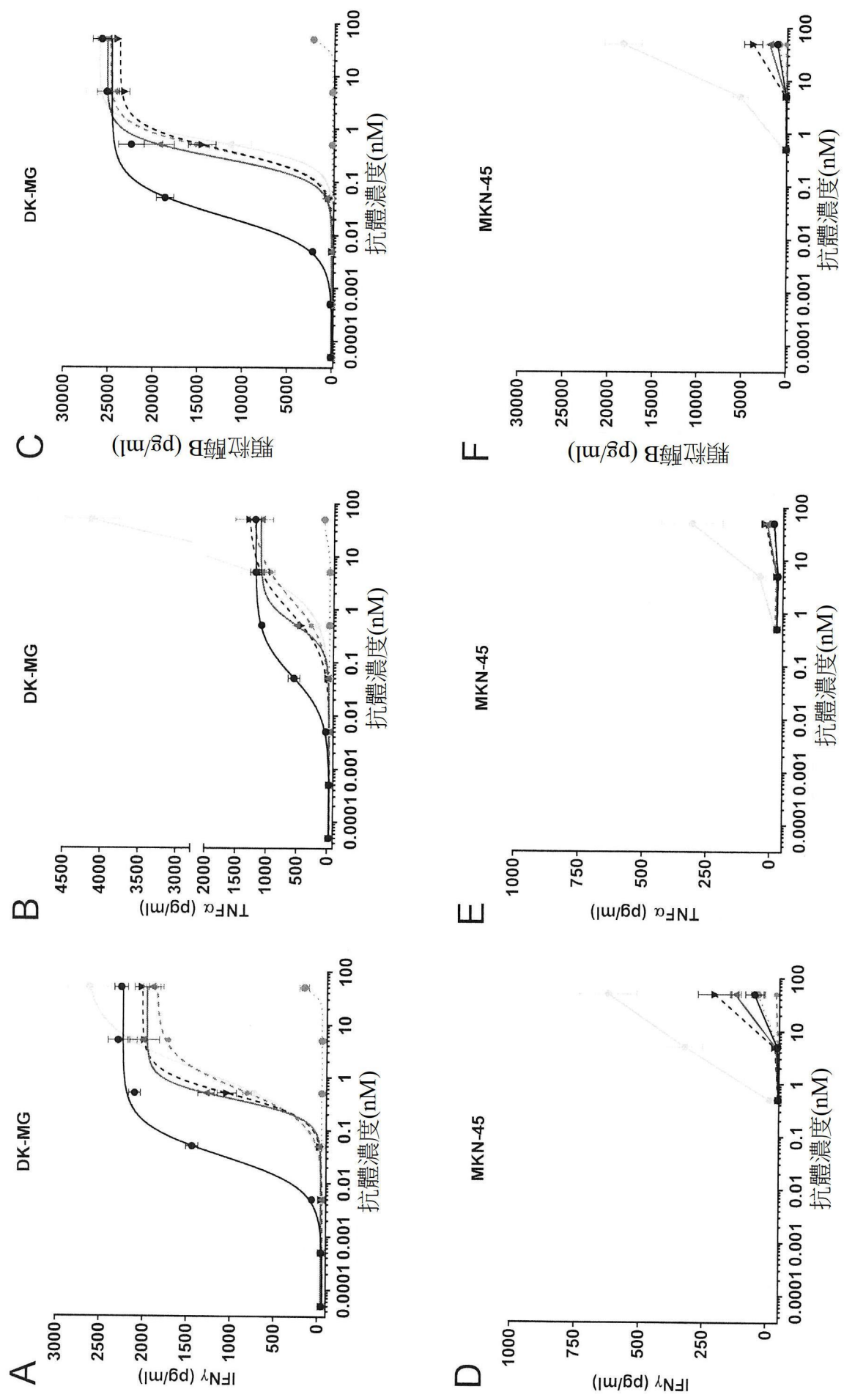
【圖16】



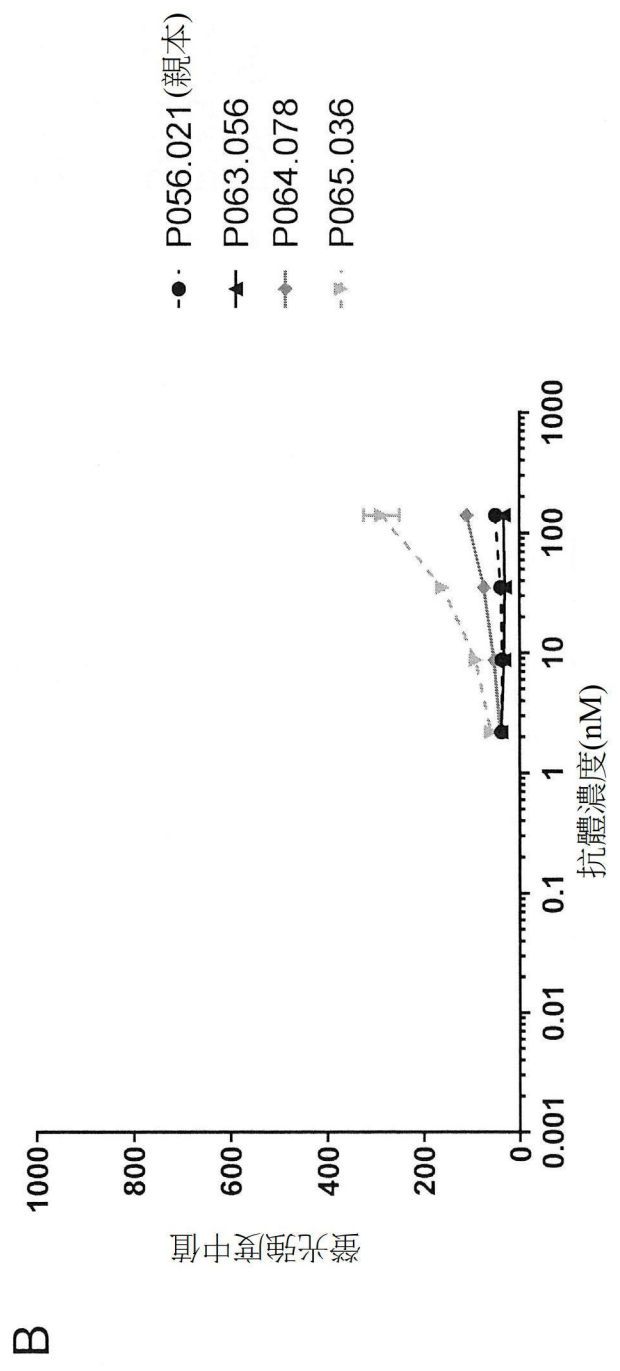
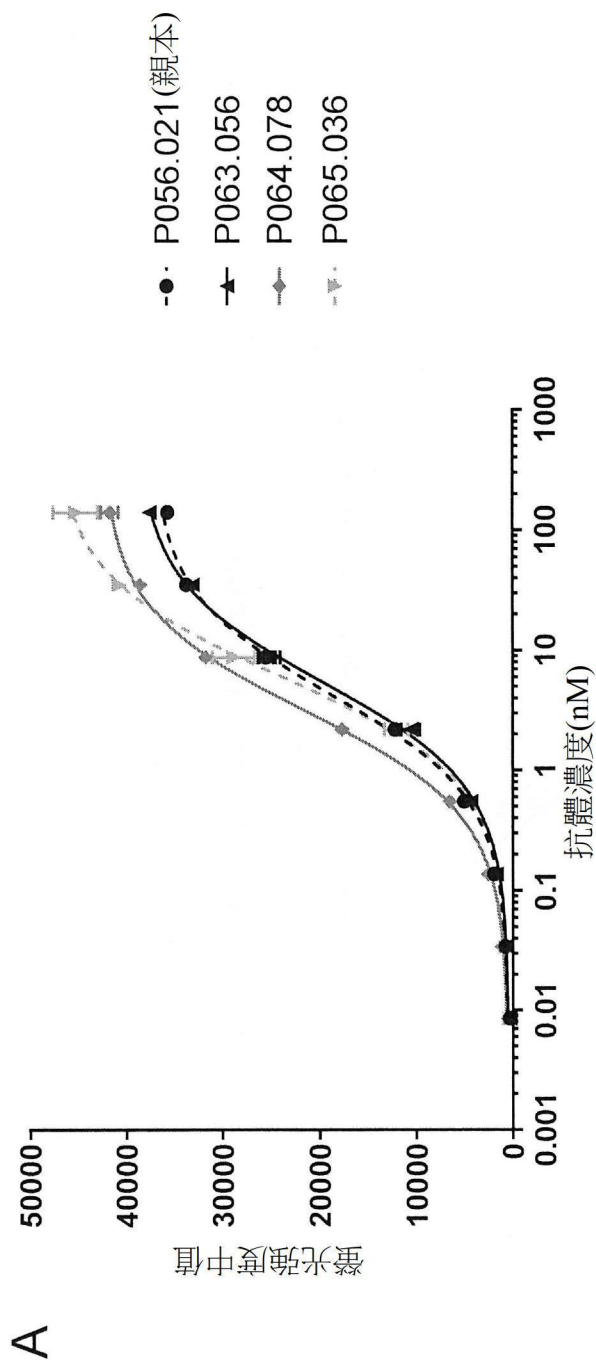
【圖17】



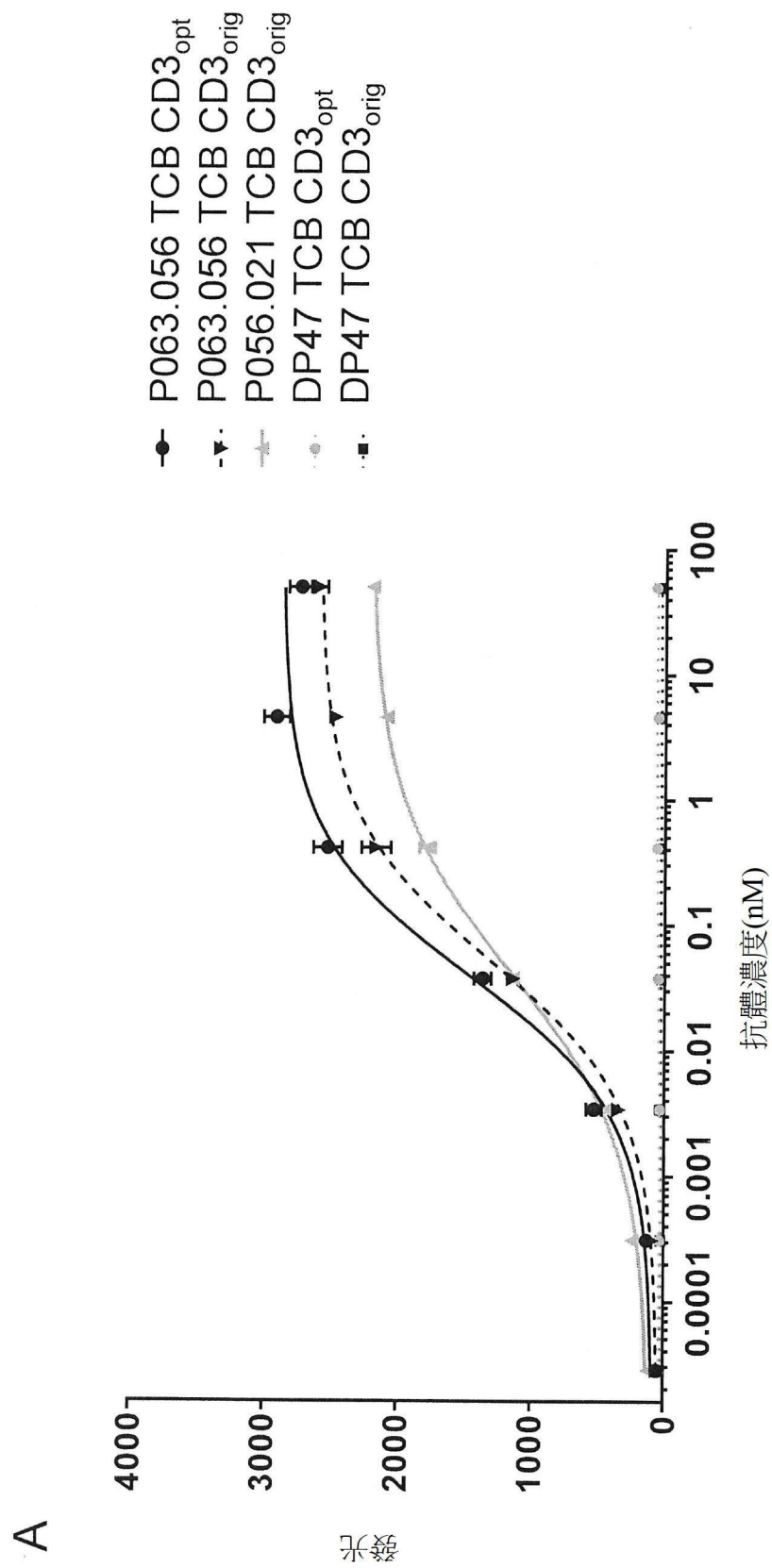
【圖17】(續)



【圖18】

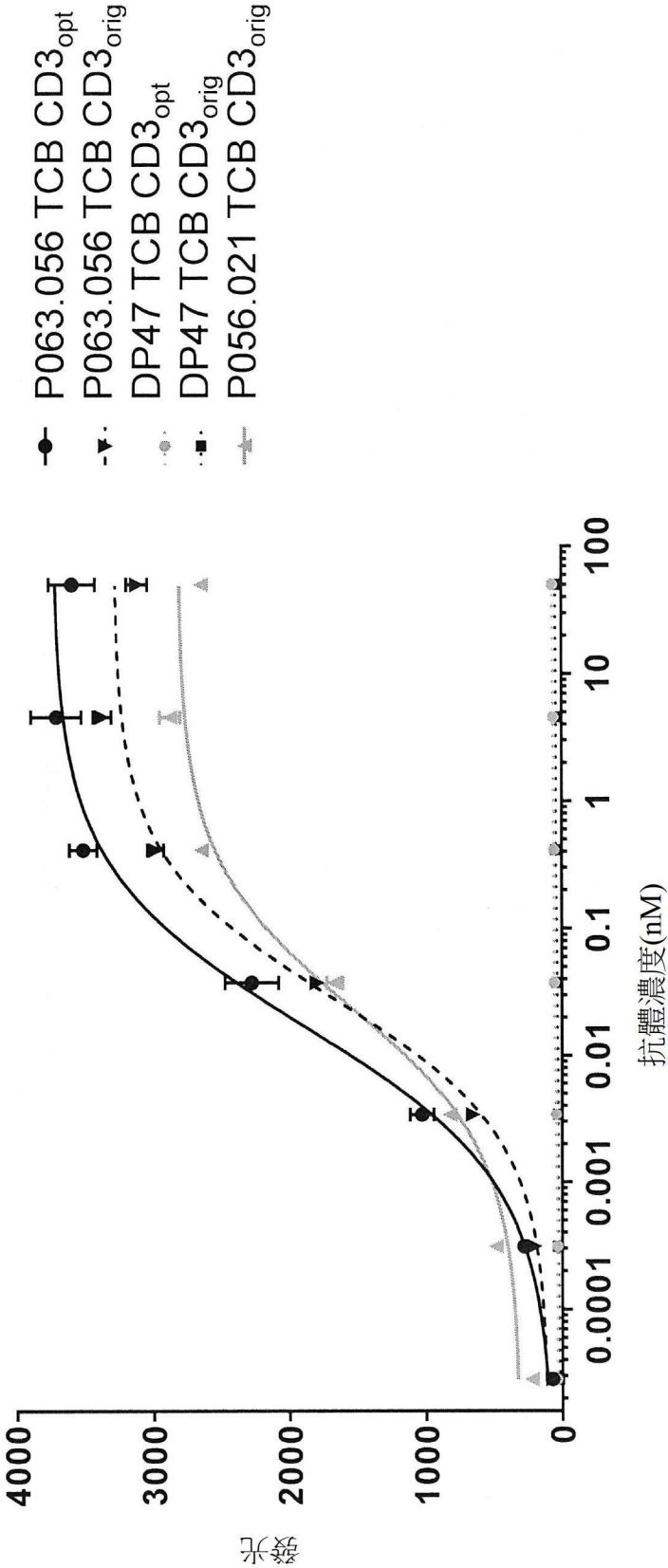


【圖19】

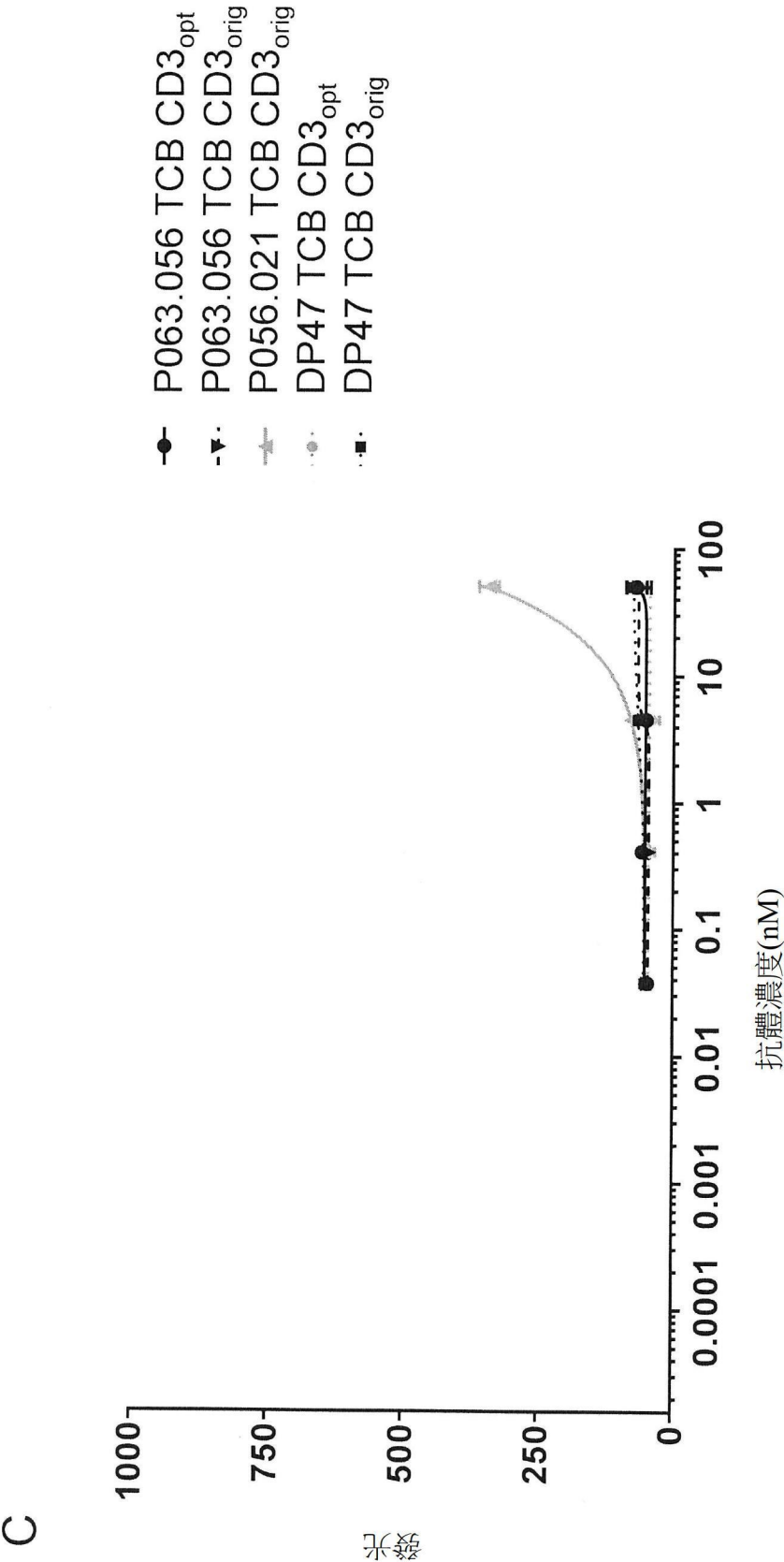


【圖20】

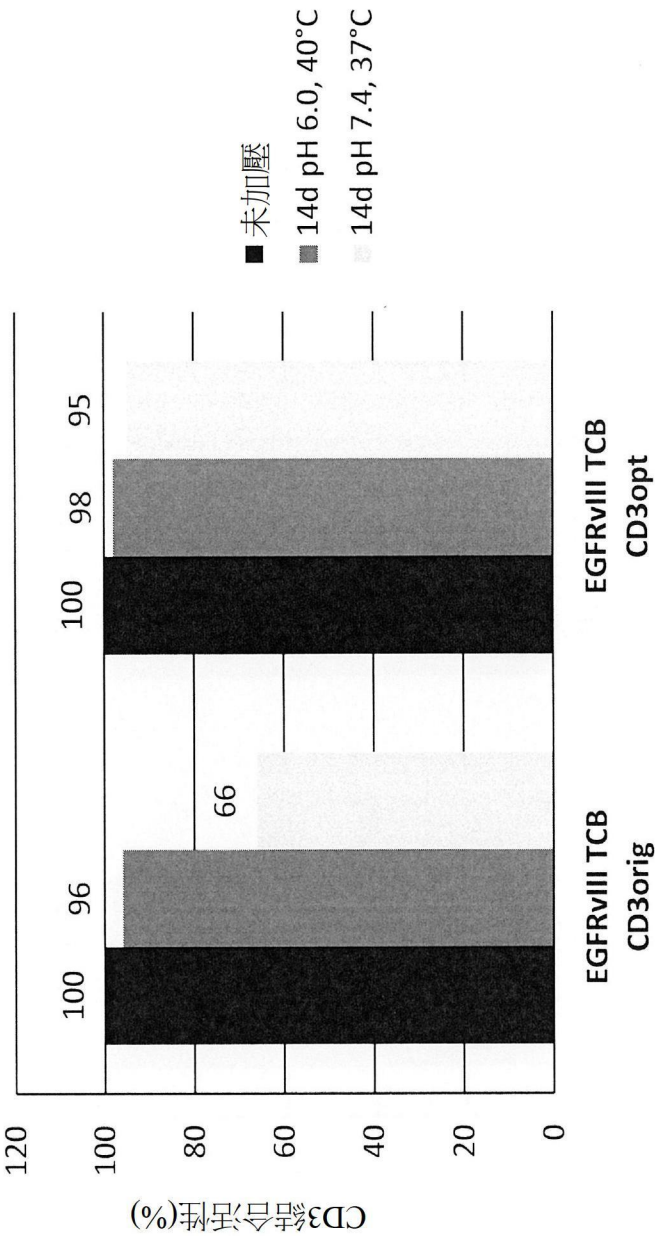
B



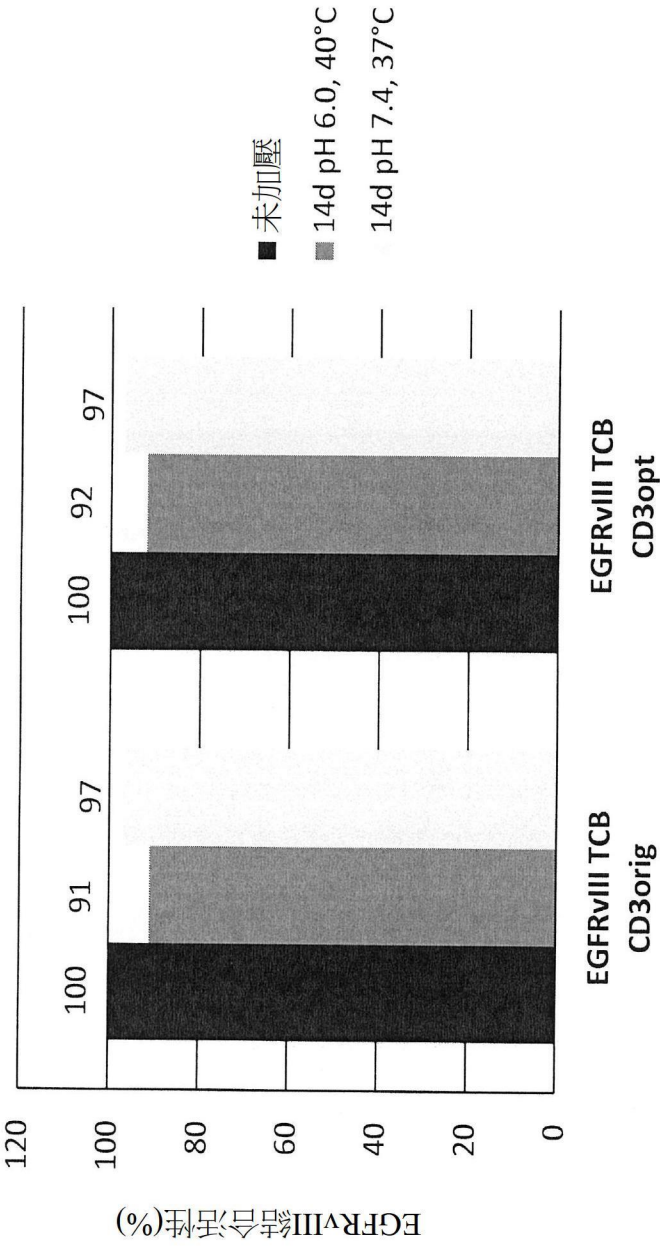
【圖20】(續)



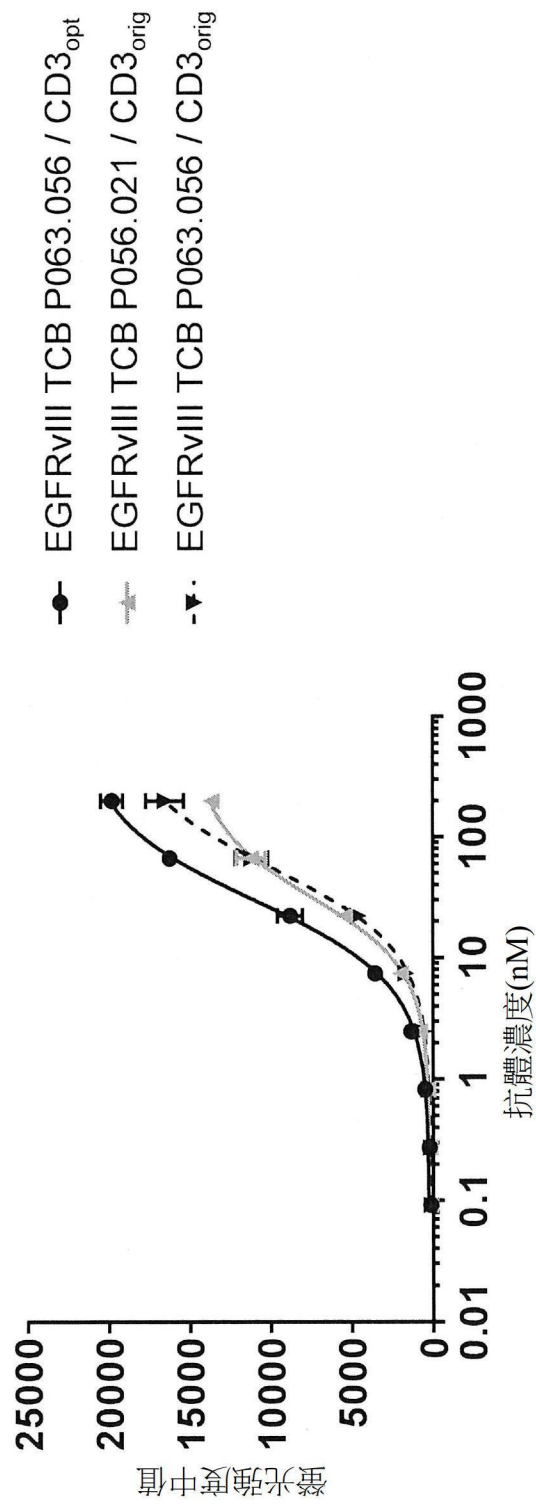
【圖20】(續)



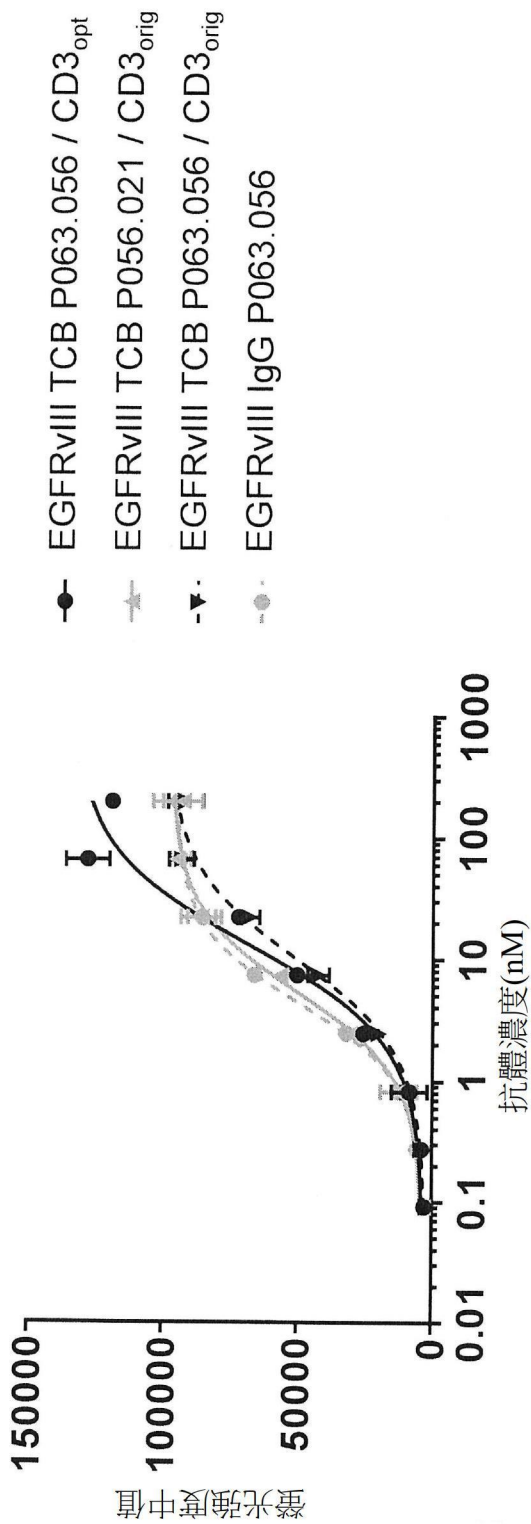
【圖21】



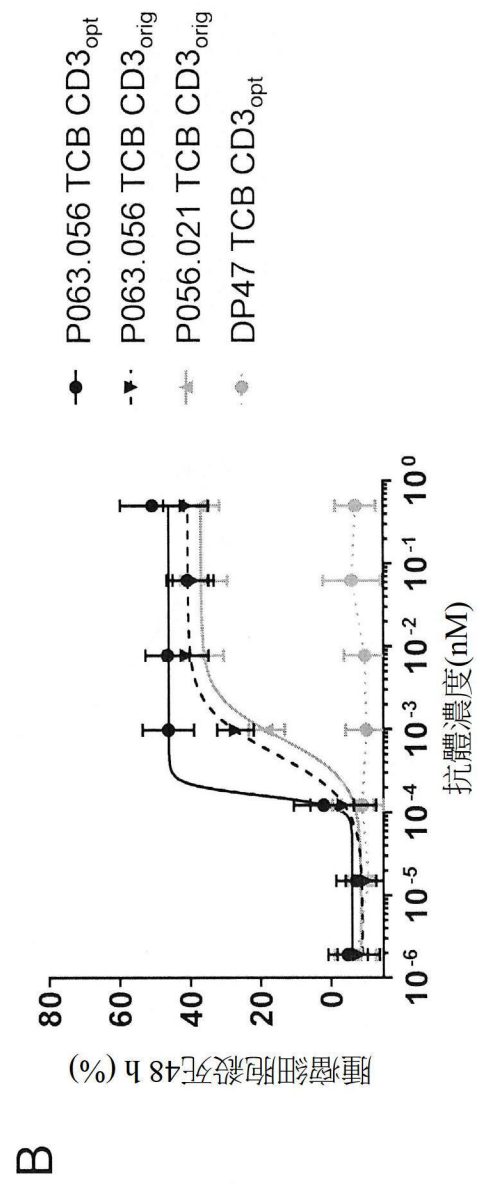
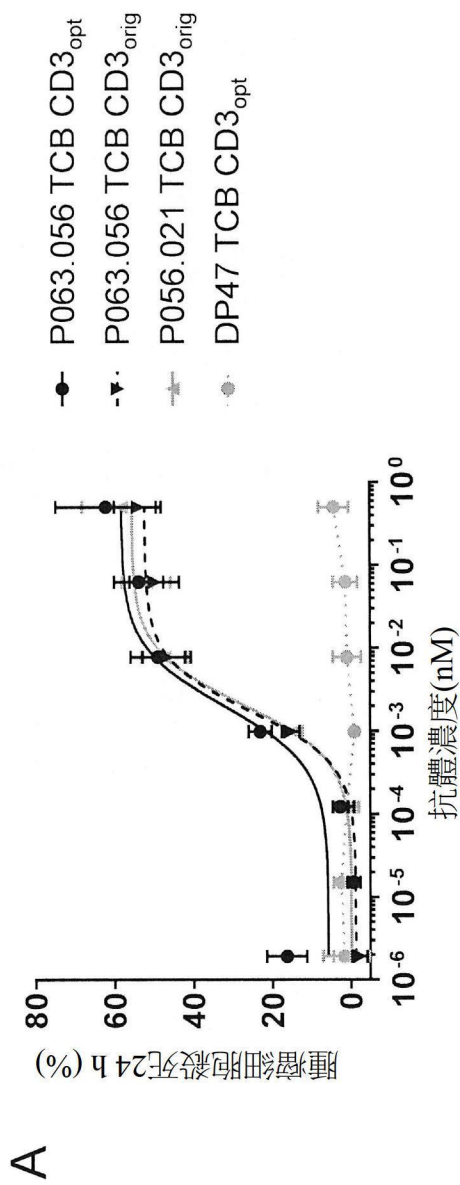
【圖22】



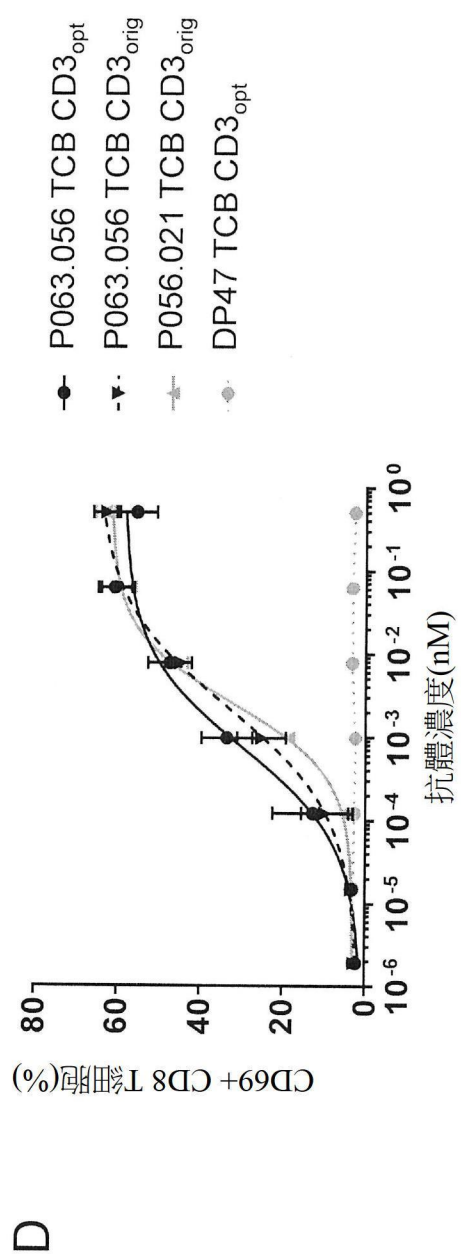
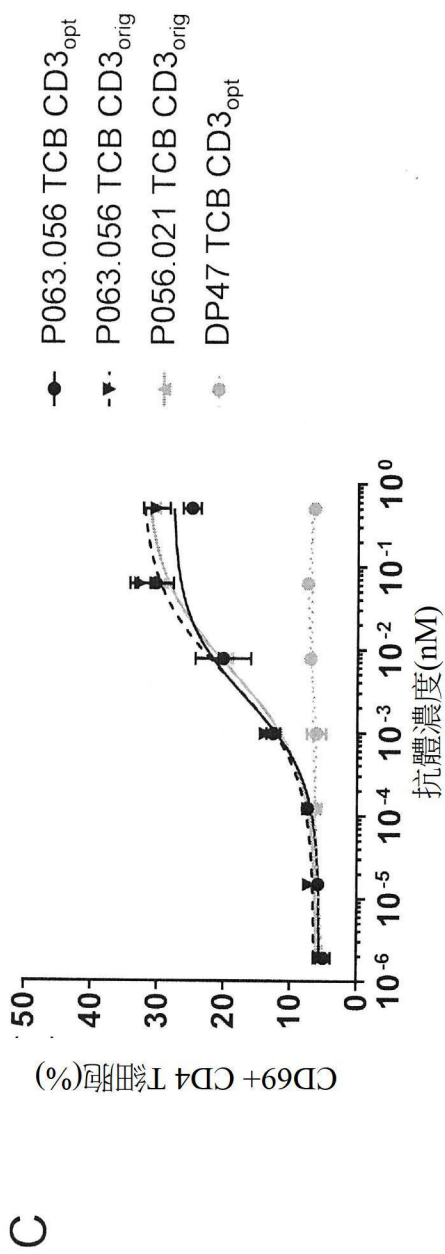
【圖23】



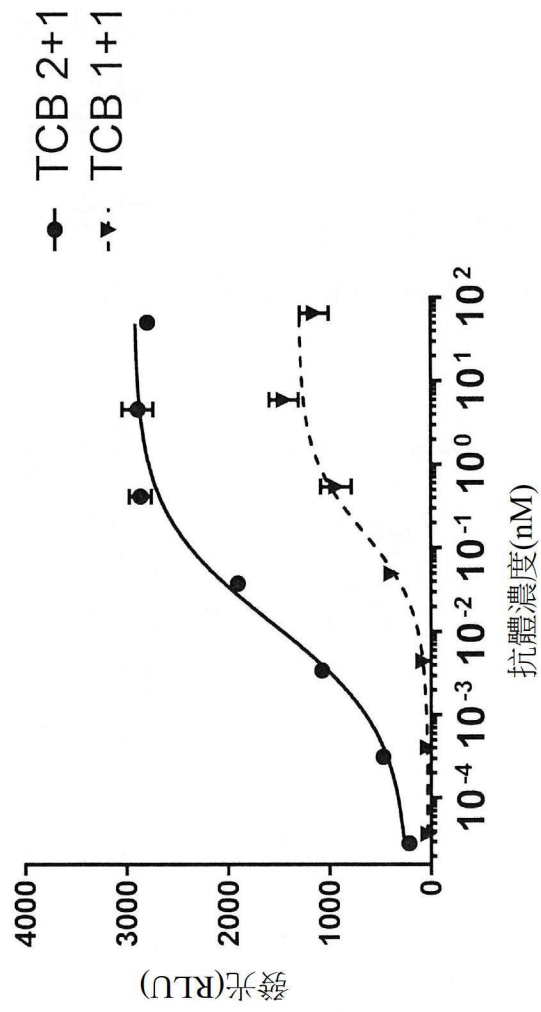
【圖24】



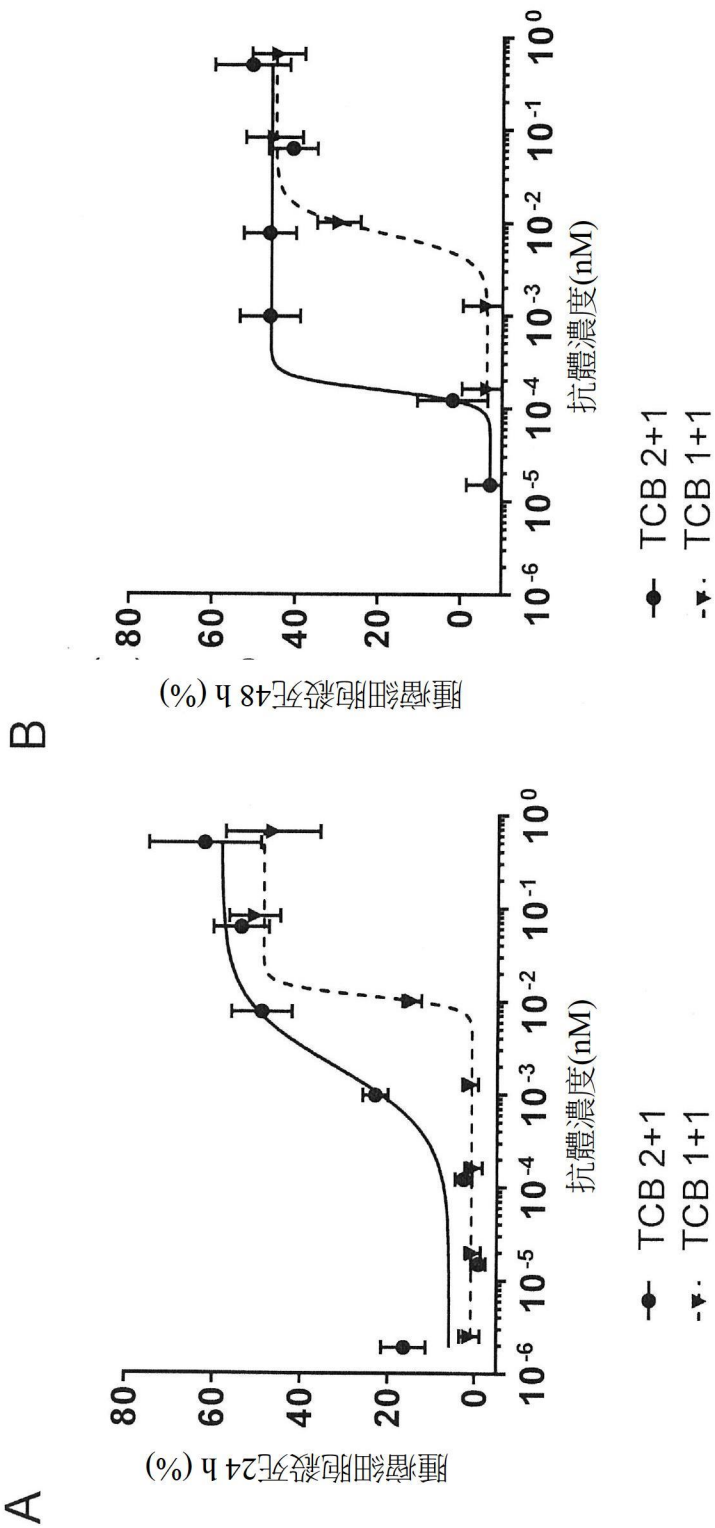
【圖25】



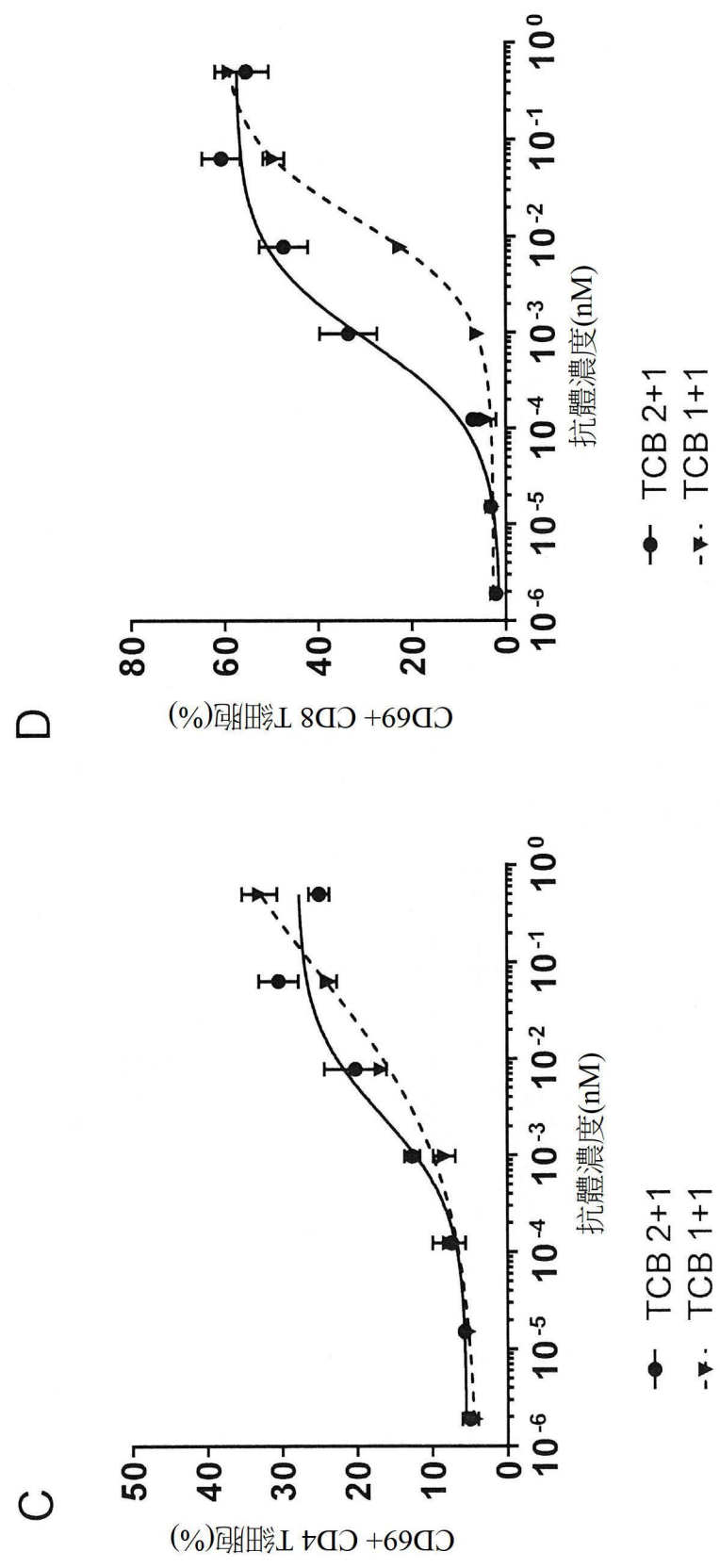
【圖25】(續)



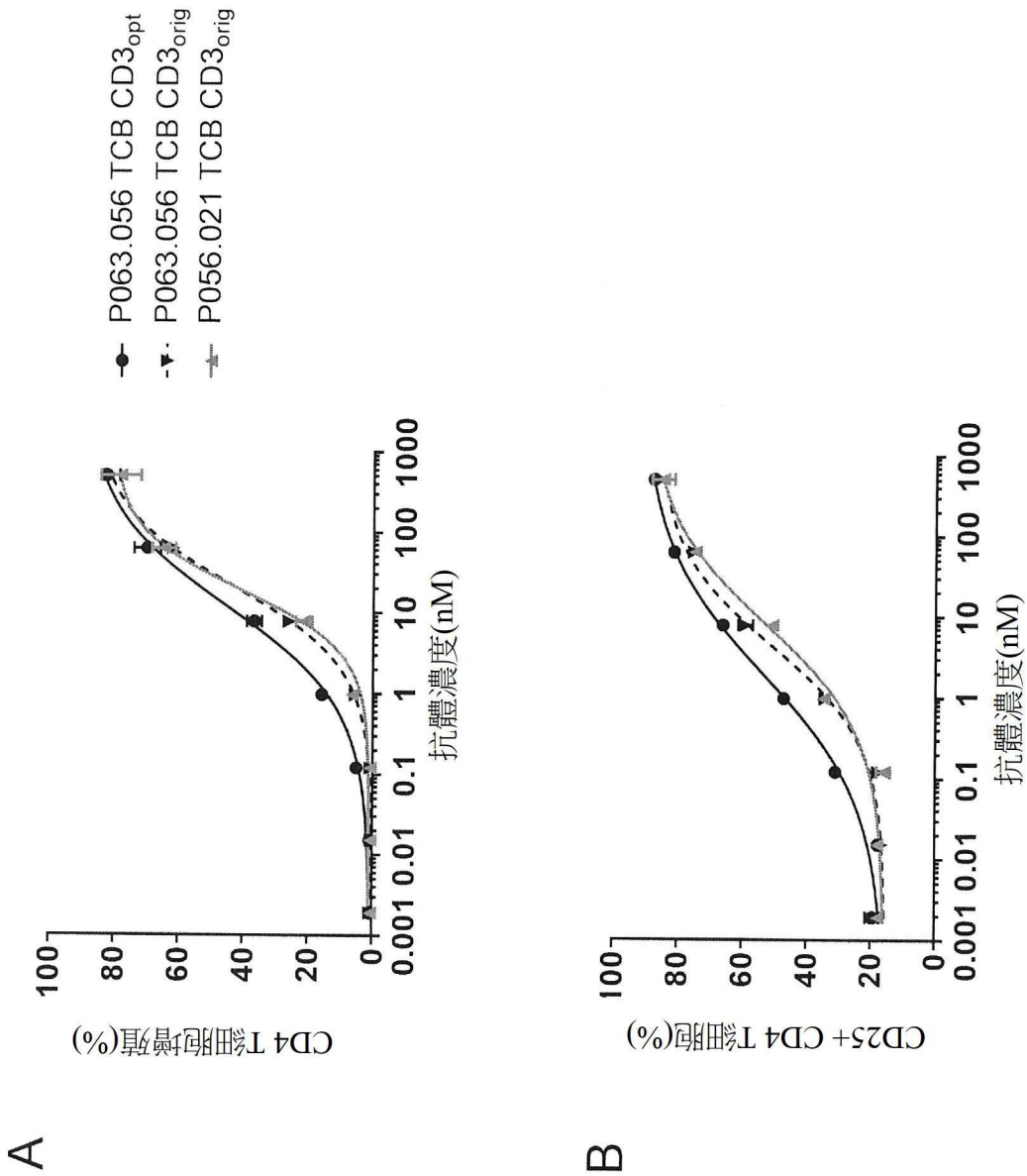
【圖26】



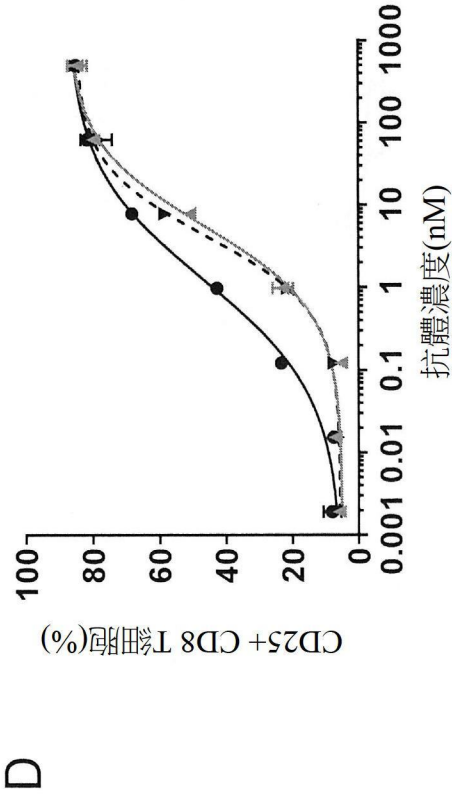
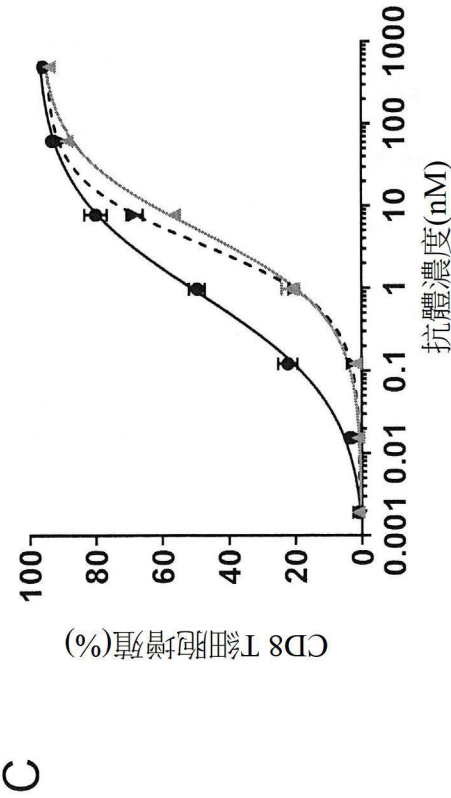
【圖27】



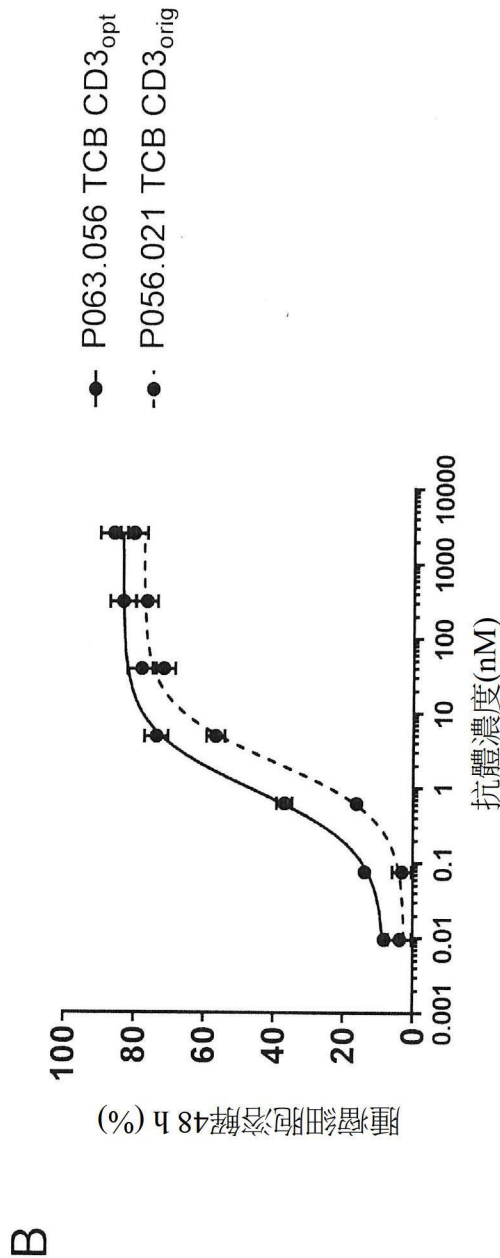
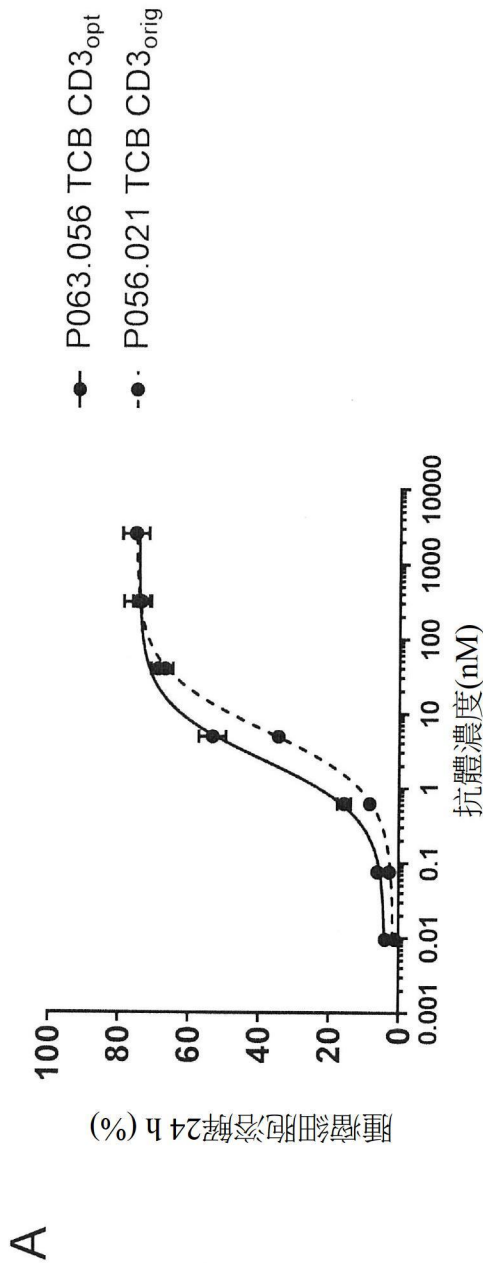
【圖27】(續)



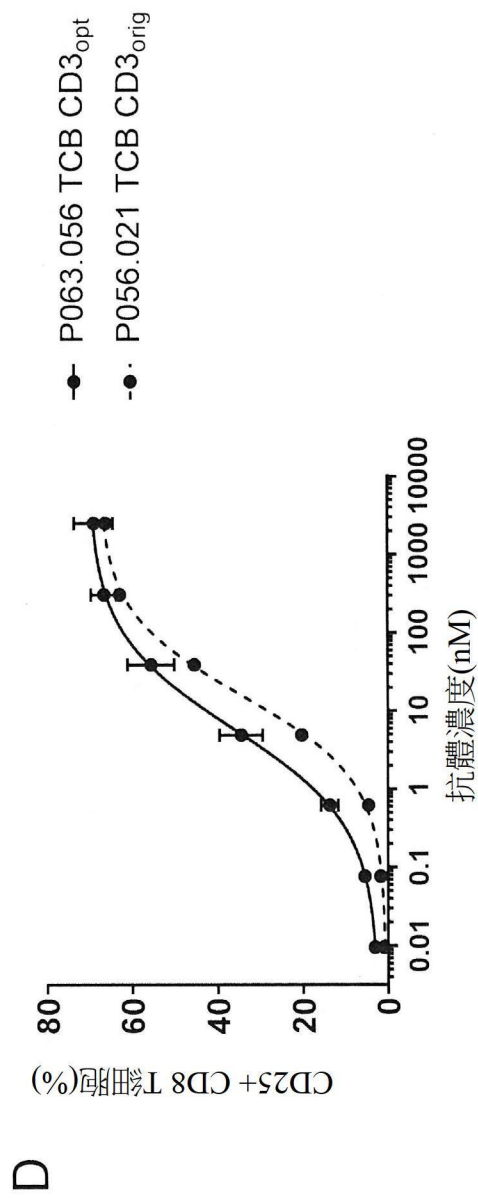
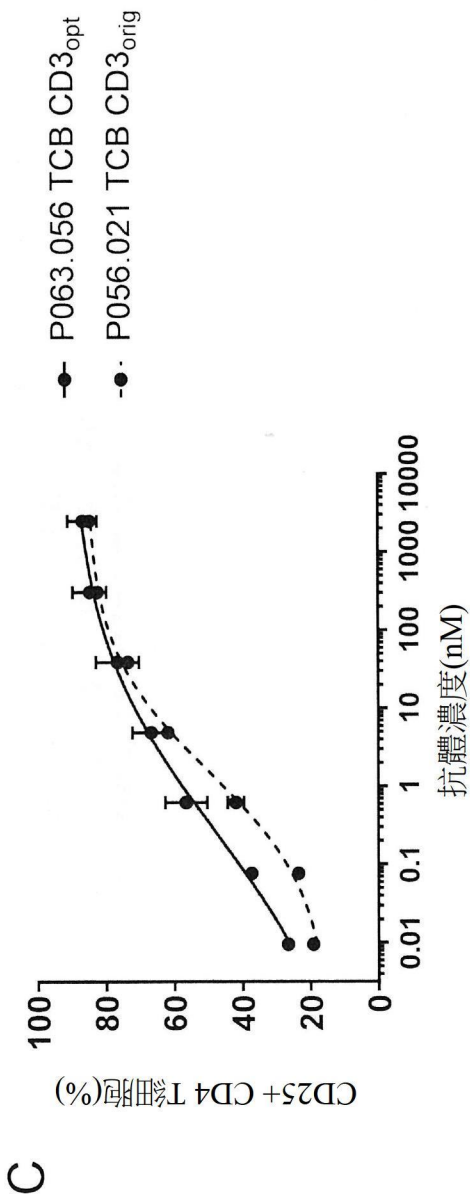
【圖28】



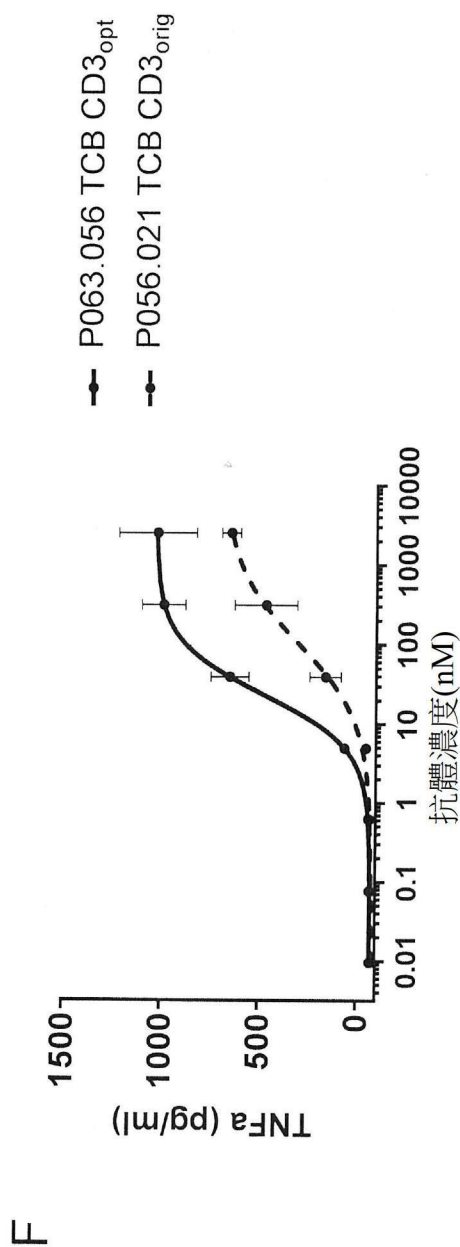
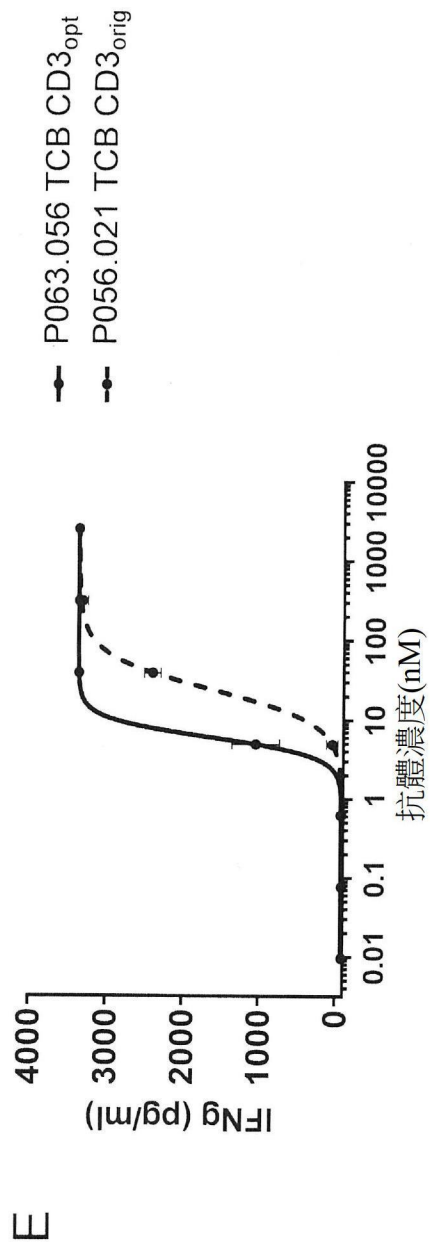
【圖28】(續)



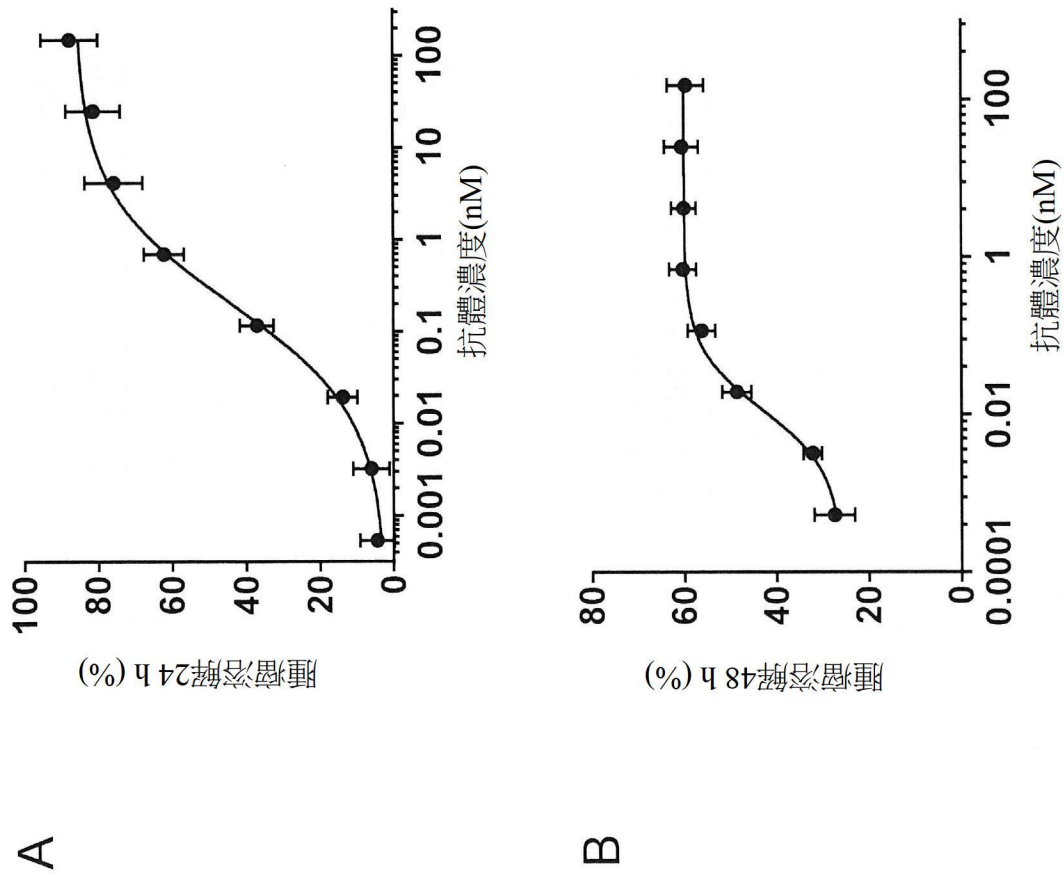
【圖29】



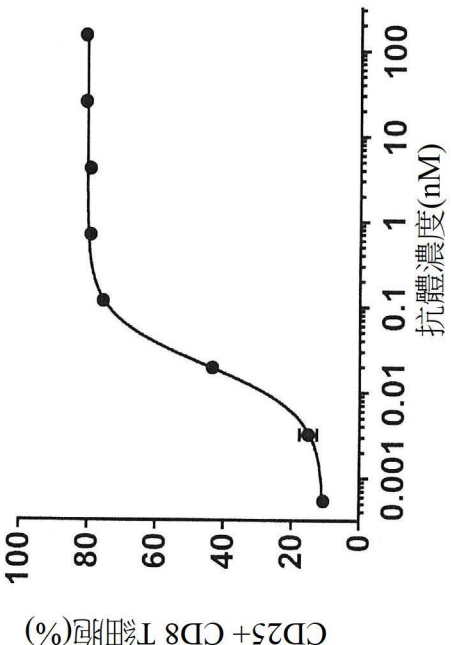
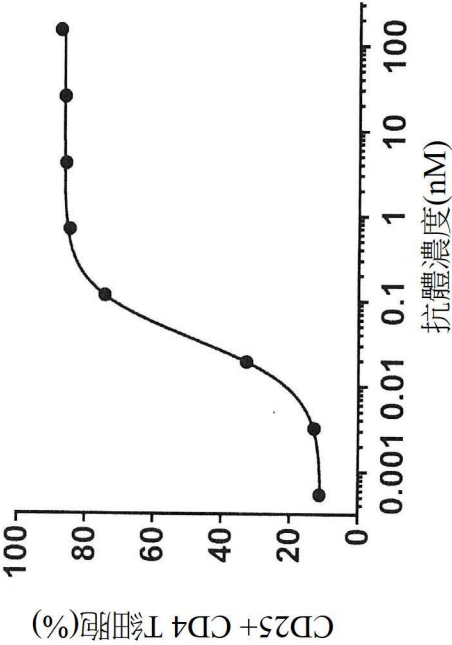
【圖29】(續)



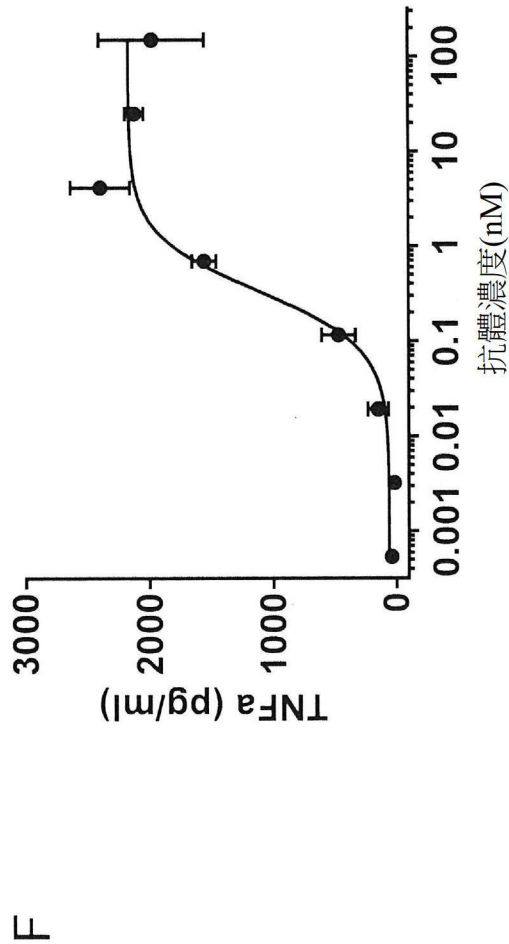
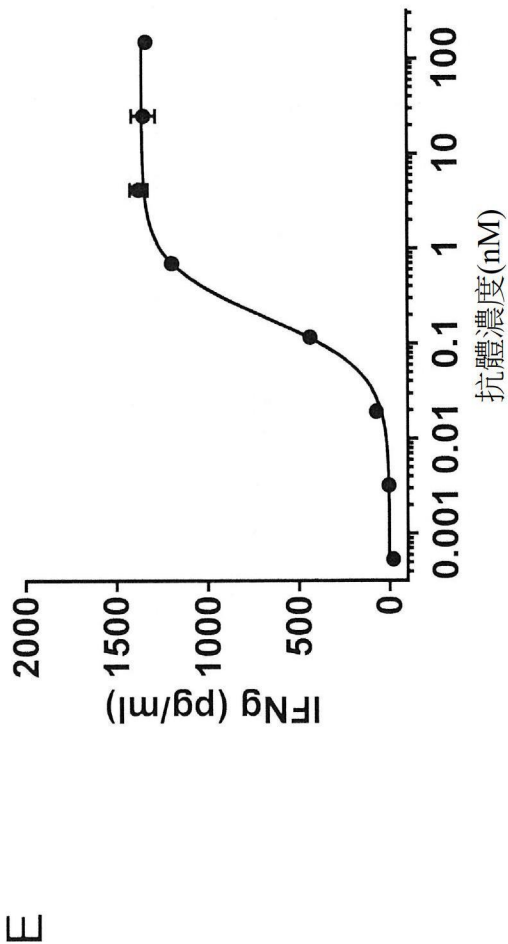
【圖29】(續)



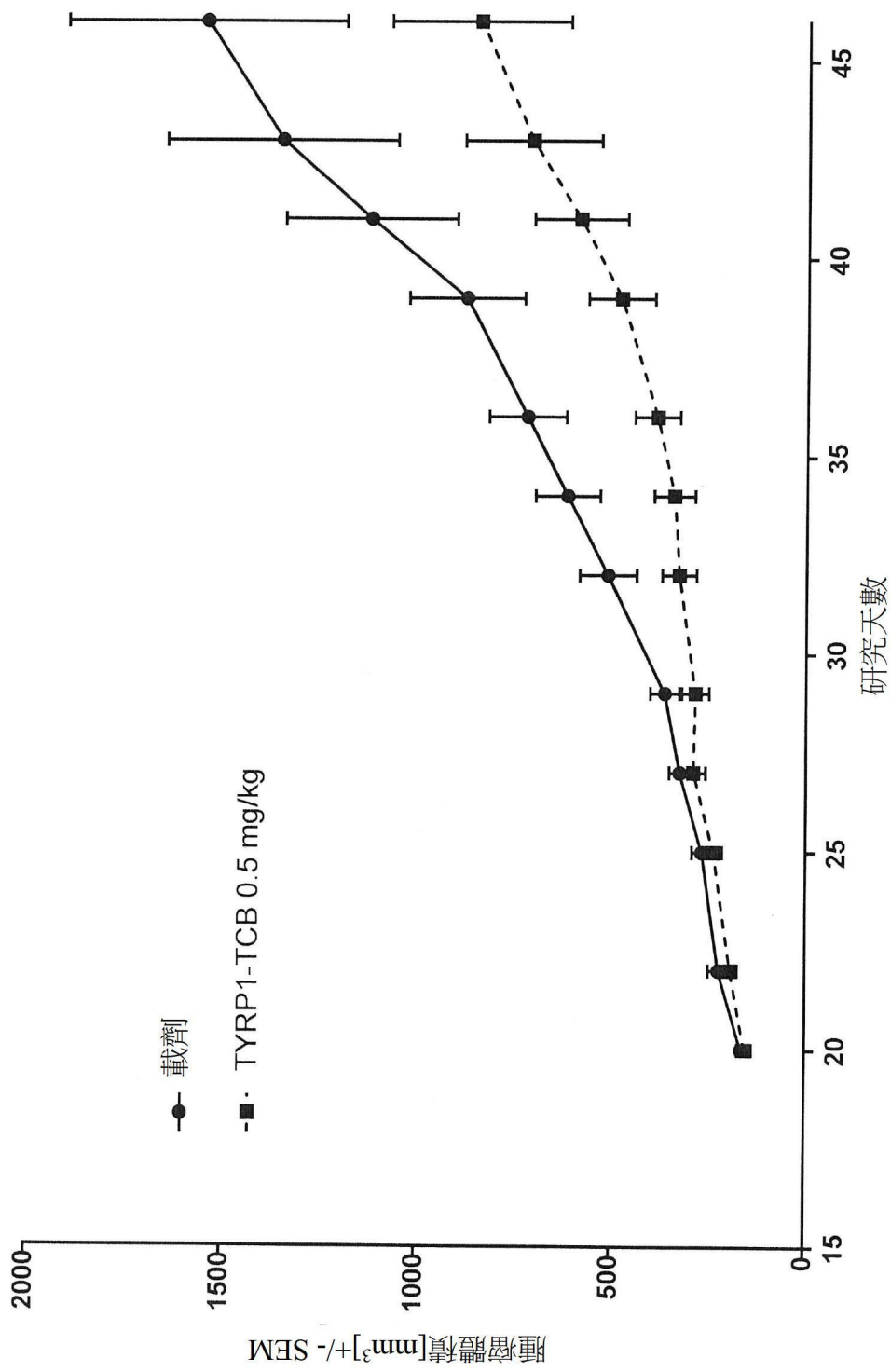
【圖30】



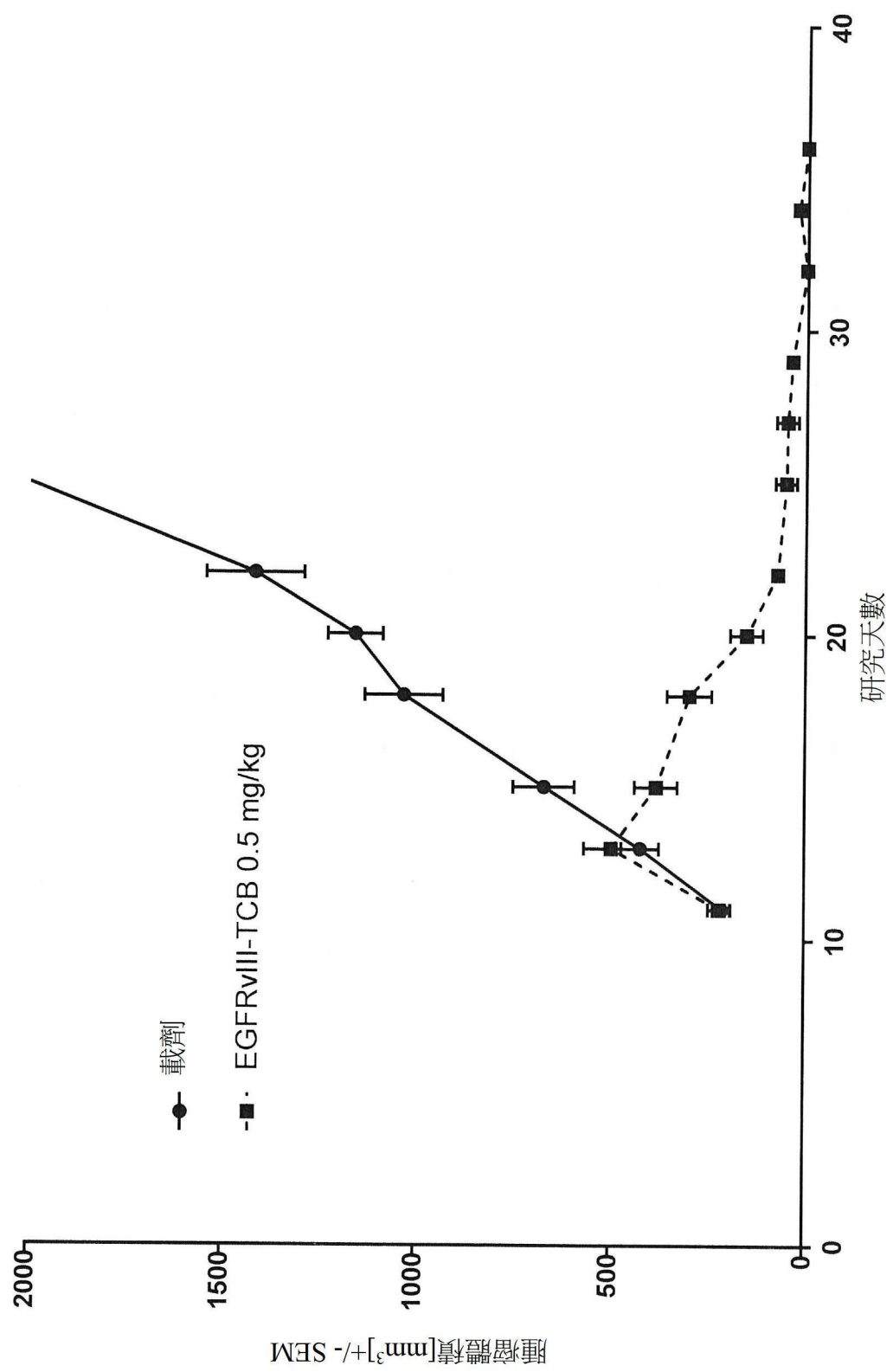
【圖30】(續)



【圖30】(續)



【圖31】



【圖32】